

ステロイドの分析化学的研究 (第 45 報¹⁾) Androst-4-ene-3,6,17-
trione のポーラログラフ的挙動²⁾

神力就子,^{3a)} 南原利夫^{3b)}

北海道工業開発試験所,^{3a)} 東北大学医学部薬学科^{3b)}

Analytical Chemical Studies on Steroids. XLV.¹⁾ Polarographic
Behaviors of Androst-4-ene-3,6,17-trione²⁾

NARIKO SHINRIKI^{3a)} and TOSHIO NAMBARA^{3b)}

Government Industrial Development Laboratory, Hokkaido^{3a)} and
Pharmaceutical Institute, Tohoku University^{3b)}

(Received December 3, 1970)

Polarographic behaviors of androst-4-ene-3,6,17-trione (I) in aqueous dimethylformamide and acetonitrile containing 0.1 M LiCl as a supporting electrolyte were examined. In 50% acetonitrile solution, I showed one reduction wave corresponding to two electrons at -0.75_5 V vs. S.C.E., whereas in 50% dimethylformamide solution, two reduction waves appeared, involving two electrons in all at -0.81_0 and -1.48_5 V vs. S.C.E. In the case of aqueous dimethylformamide, the total limiting current was constant and the height ratio of the 1st wave to the 2nd was dependent on dimethylformamide concentration. The controlled potential electrolysis of I in aqueous dimethylformamide resulted in the formation of 5α -androstane-3,6,17-trione (IX). These results together with the ultra-violet spectral data revealed that in dimethylformamide solution, I exists in the keto-enol equilibrated state, and the 1st and 2nd waves are ascribable to the reduction of keto and 6-enol forms, respectively.

さきに著者らは不飽和ケトステロイドのポーラログラフィーを検討し半波電位 ($E_{1/2}$) と構造との関係ならびに還元機構の解明をこころみた⁴⁾が、その際 androsten-3-one 類のうち androst-4-ene-3,6,17-trione (I) のみが特異なポーラログラフ的挙動を示すことをみとめた。今回この挙動を詳細に検討し、ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液中で I が keto-enol の平衡状態で存在することを明らかにし、また還元成績体を捕捉して還元機構を解明することができたので報告する。

結果ならびに考察

1. DMF-水系におけるポーラログラフィー

50% DMF 中 I が示すポーラログラフ波の性質を androsta-1,4-diene-3,17-dione (II) ならびに androsta-4,6-diene-3,17-dione (III) を対照として Table I にかかげた。これらのポーラログラムはいずれも正常であったが、II, III の第 1 波の $E_{1/2}$ がそれぞれ -1.54_0 , -1.37_0 V であるのに対し、I は -1.48_5 V のほかに -0.81_0 V ときわめて陽電位に還元波を示した。還元波の性質は水銀圧との関係ならびに温度係数より拡散支配であることが判明した。第 1 波、2 波の拡散電流定数 (I_d) はそれぞれ 1.66, 0.30 であり、この和は II および III の第 1 波の I_d の 2 倍に相当した。事実定電位電解において II の第 1 波の還元に関与する電子数 (n) がおよそ 1 であるのに対し、I の第 1 波、2 波の総電子数はおよそ 2 であった。すなわち II, III が 50% DMF 中 1 電子 2 段階波である^{4,5)} のに対し、I は総波高では 2 電子に相当するが、第 1 波、2 波の波高比はおよそ 1:0.2 であった。

1) 第 44 報: T. Nambara, Y. Matsuki, Y. Kawarada, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **19**, 844 (1971).

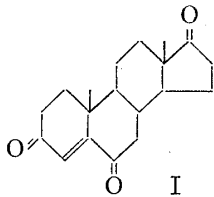
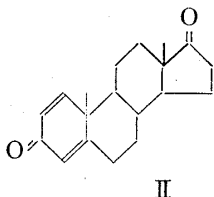
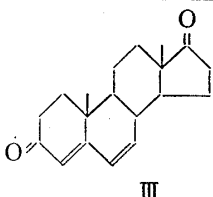
2) 日本薬学会第 90 年会で発表, 札幌, 1970 年 7 月.

3) Location: a) 41-2 Higashi-Tsukisamu, Sapporo; b) Aobayama, Sendai.

4) 神力就子, 南原利夫, 薬誌, **91**, 6 (1971).

5) 第 2 波は支持塩の析出波にいんべいされている。

TABLE I. Polarographic Properties of Androsten-3-ones

Compounds				
	I	II	III	
$-E_{1/2}$, V vs. S.C.E.	0.81 ₀	1.48 ₅	1.54 ₀	1.37 ₀
I_d ($i_d/c \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6}$)	1.66	0.30	1.00	0.95
$\mu\psi/\mu M$	0.18	0.02	0.02	0.05
Temp. depend., ^{a)} % deg. ⁻¹	1.9	2.1	2.0	1.9
$i/\sqrt{h}$, $h=79.8$ cm	0.564	0.125	0.447	0.420
$h=69.8$ cm	0.578	0.115	0.446	0.417
$h=59.8$ cm	0.571	0.101	0.458	0.415
n^b	1.80	0.87	—	—
(cathode potential, V vs. S.C.E.)	(-1.7)	(-1.7)	(-1.7)	(-1.7)

Conditions: 3—4 mm sample, 50% DMF, 0.1 M LiCl, 0.01% gelatine, 25°

a) with respect to the 25° value

b) number of electron transferred, found by controlled potential electrolysis

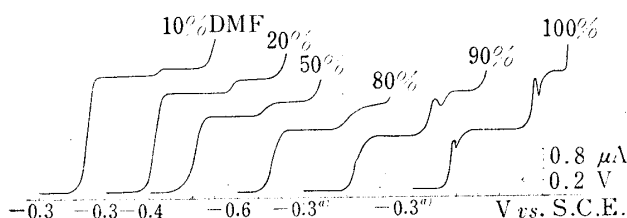


Fig. 1. Polarograms of Androst-4-ene-3,6,17-trione at Various DMF Concentrations

Conditions: 1.66 mm sample, 0.1 M LiCl, 0.01% gelatine, aqueous DMF solution, 25°

a) vs. Hg pool, no gelatine

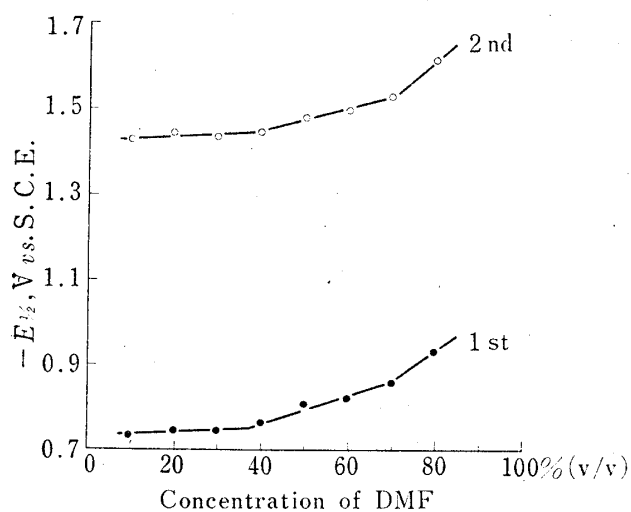
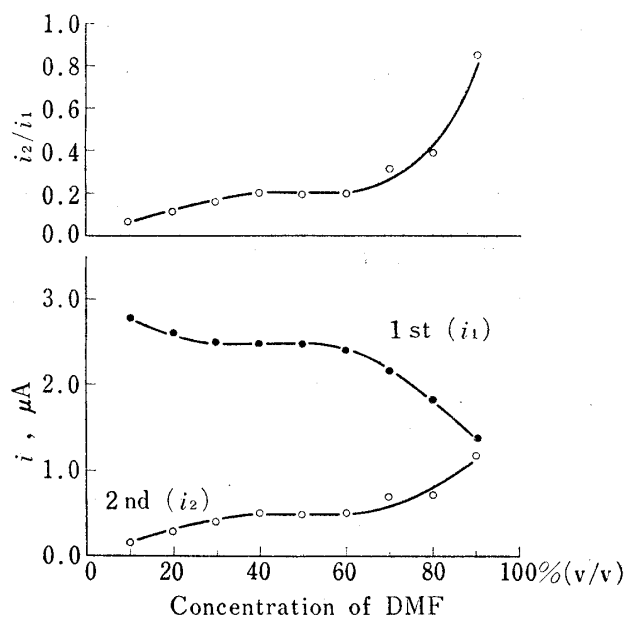


Fig. 2. Effect of DMF Concentration on Half-Wave Potential

conditions: 1.6—3.3 mm sample, 0.1 M LiCl, 0.01% gelatine, 25°

そこで DMF 濃度の影響について検討した (Fig. 1). 10—70% DMF では I は正常な波形を示したが, 80% では第 1 波, 2 波ともにそれぞれ 2 段になる傾向を示し, DMF 濃度が増加するとこの傾向はさらによくなった. 第 1 波, 2 波の $E_{1/2}$ は DMF 濃度によってとくに接近することはなかった (Fig. 2) が, 波高ならびに波高比は Fig. 3 に示すように変化した. すなわち 50% DMF 中では第 1 波, 2 波の波高比は 1:0.2 であるが, DMF 濃度の増加にしたがって第 1

Fig. 3. Effect of DMF Concentration on Limiting Current^{a)}

conditions: 1 mm sample, 0.1 M LiCl, 0.01% gelatine, 25°

a) corrected with relative viscosity⁸⁰⁾

TABLE II. Effect of DMF Concentration on Peak Height of AC Polarogram

DMF %	AC polarography $\mu\text{V}/\text{mm}$		DC polarography $\mu\text{A}/\text{mm}$	
	1st	2nd	1st	2nd
100	67.5	34.5	1.23	1.23
90	68.9	14.7	1.16	0.98
80	79.8	6.8	1.30	0.49
50	122	14.7	1.57	0.31
20	219	10.3	2.13	0.23
10	308	10.8	2.54	0.15

波は減少, 第2波は増大し, 100% DMF 中ではほぼ 1:1 となった. また DMF 濃度の減少に伴って逆に第2波が減少, 第1波が増大し, 水溶液中では第1波のみになることが推測された. ここで総波高はほぼ一定であったが, さきに述べたように 50% DMF 中における定電位電解の結果 n は 2 であり, 総波高は DMF 濃度に関係なく 2 電子に相当すると結論された.

DMF のような非水溶媒を用いるポーラログラフにおいては 1 電子還元により生じるラジカルが不均一化反応,⁶⁾ あるいはプロトン付加反応⁷⁾ を伴うことにより第1波, 2波の波高比が含水量によって変わることが報告されている. そこで I の場合第1波の還元でラジカルの生成がみられるか否かをまず検討した. 100% DMF 中では第1波の可逆性がとぼしく, 水添加によって可逆性が増大する (Table II) ことから, ラジカル生成ではないと推測されたが, 事実電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルの測定においてもそれが認められなかった. そこで

DMF 濃度により波高比の変化する挙動について平衡の関与する還元機構を想定し, 以下の検討を行なった.

2. アセトニトリル-水系におけるポーラログラフ

溶媒としてプロトン性のエタノールなどを用いることを試みたが, I は難溶であったため, DMF より非プロトン性の弱いアセトニトリル (AN) 中で検討した. AN-水系では AN 濃度が 60% 以上では二層に分離するため, 10—50% の範囲において測定を行なった. I はいずれの AN 濃度においても正常な第1波とこん跡程度の第2波を -1.4 V 付近に示した. 第

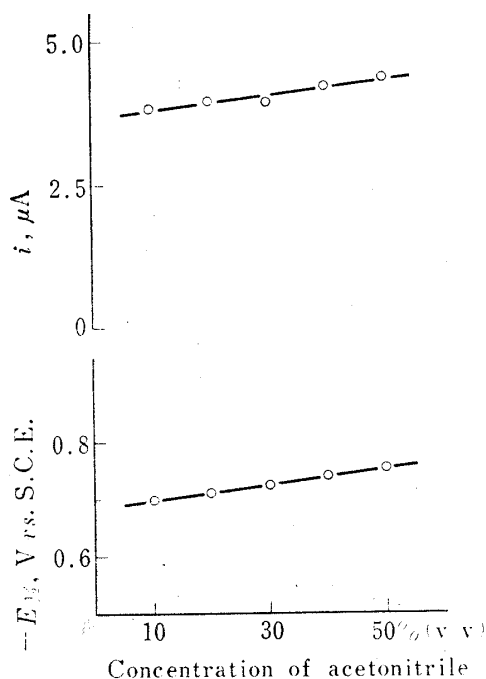


Fig. 4. Effect of Acetonitrile Concentration on Half-Wave Potential and Limiting Current

conditions: 1 mm sample, 0.1 M LiCl, 0.01% gelatine, 25°

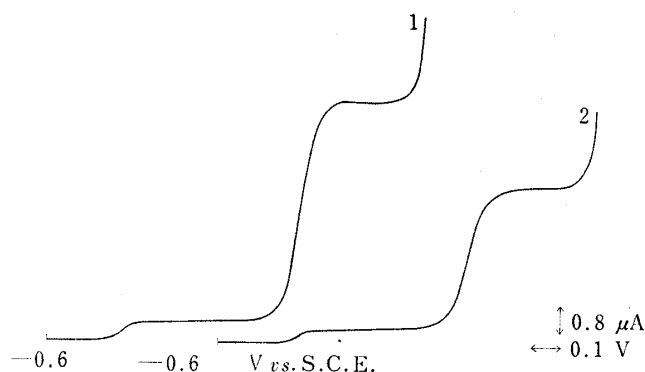


Fig. 5. Polarograms of Androst-4-ene-3,6,17-trione in 0.1 N NaOH

conditions: 1.66 mm sample, 1 50% acetonitrile, 2 50% DMF, 25°

- 6) a) K. Umemoto, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **40**, 1058 (1967); b) 藤永太一郎, 伊豆津公佑, 梅本喜三郎, 新居敏男, 高岡和則, 日化, **89**, 105 (1968).
7) 安河内一夫, 山口博子, 前田正靖, 日化, **89**, 663 (1968).

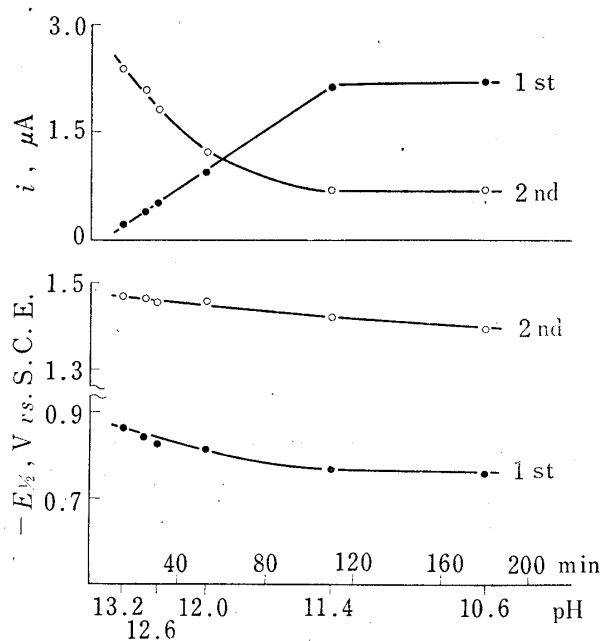


Fig. 6. Half-Wave Potential and Limiting Current at Various pH

conditions: 1 mM sample, 0.1 N NaOH in 50% DMF, 25°

液は黄色を呈し、第1波、2波の $E_{1/2}$ は 0.1M LiCl を支持塩とした場合とほぼ同一であったが、第2波の波高はいずれの場合も増大した (Fig. 5). AN 溶液中では波高の経時変化はみられなかったが、DMF 溶液の場合は DMF がアルカリを消費し pH が次第に低下するため、時間とともに変化した (Fig. 6).

さらにこれらの関係を紫外吸収 (UV) スペクトルについても検討した。I は 0.1 N NaOH-50% DMF に溶解した直後では 384 mμ に $\lambda_{\max}$ を示すが、pH の低下とともに減少し、pH 12 付近で新たな吸収帯 ($\lambda_{\max}$ 313 mμ) を生じる。これは 0.1 N HCl-50% DMF ならびに 50% DMF 中で得られるスペクトルと一致した (Fig. 7, 9). 0.1 N NaOH-50% AN においても 380 mμ に $\lambda_{\max}$ がみられるが、0.1 N HCl-50% AN では消滅し、50% AN におけるスペクトルと一致した (Fig. 8, 10). DMF, AN 溶液いずれの場合もアルカリ性で溶液は黄色を呈し、液性に伴うスペクトルの変化には再現性がみられた。これらの事実は I に keto-enol 互変異性を考えるときすべて矛盾なく説明することができる。

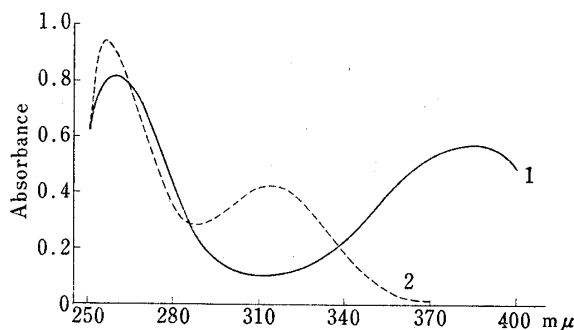


Fig. 7. UV Spectra of Androst-4-ene-3,6,17-trione

- 1: 0.1 N NaOH in 50% DMF (24.1 μg/ml), $\lambda_{\max}$: 260, 384 mμ
- 2: 0.1 N HCl in 50% DMF (24.6 μg/ml), $\lambda_{\max}$: 256, 314 mμ

1 波の $E_{1/2}$ ならびに波高と AN 濃度との関係は Fig. 4 に示すとおりである。電流の性質は波高と水銀圧との関係ならびに温度係数より拡散支配と結論された。 I_d は 50% AN 中 3.28 であったが 50% DMF 中の I_d を水に対する相対粘度^{6b)} で補正された波高を用いて求めてみると、第1波、2波の和は 3.12 となり、50% AN 中の I_d にほぼ一致する。すなわち検討した AN 濃度では第1波がほぼ2電子波高に相当し、I はほとんど第1波に相当する分子種として存在することが判明した。

DMF 溶液と AN 溶液中における挙動の差異はその溶媒効果に起因すると考えられる。すなわち DMF はその dipolar aprotic solvent としての性質から、I を強く enol 化し、第2波に相当する被還元物質は I の enol 体であると推定される。この点を確認するためつぎに液性の変化に伴う挙動について検討を加えた。

3. Keto-Enol 平衡

まず DMF, AN 濃度をそれぞれ 50% とし、0.1 N NaOH 溶液中における I の挙動を検討した。試料溶

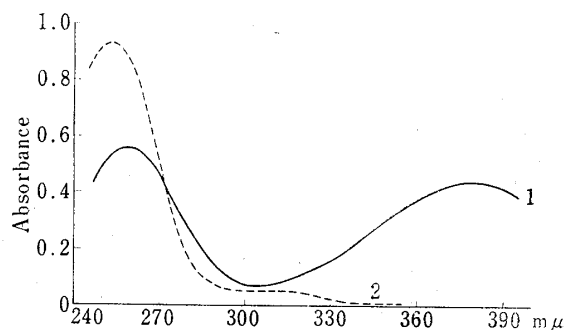


Fig. 8. UV Spectra of Androst-4-ene-3,6,17-trione

- 1: 0.1 N NaOH in 50% acetonitrile (14.9 μg/ml), $\lambda_{\max}$: 260, 380 mμ
- 2: 0.1 N HCl in 50% acetonitrile (24.5 μg/ml), $\lambda_{\max}$: 253 mμ

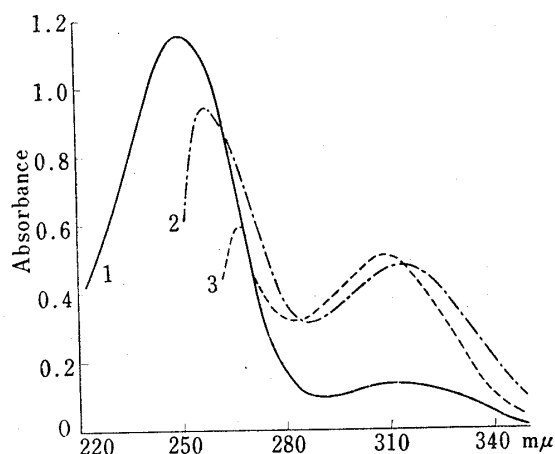


Fig. 9. UV Spectra of Androst-4-ene-3,6,17-trione

1: EtOH (29.0 $\mu\text{g/ml}$), λ_{max} : 250.5, 312.5 $\text{m}\mu$
 2: 50% DMF (30.2 $\mu\text{g/ml}$), λ_{max} : 256.5, 313 $\text{m}\mu$
 3: DMF (30.2 $\mu\text{g/ml}$), λ_{max} : 265.5, 309.5 $\text{m}\mu$

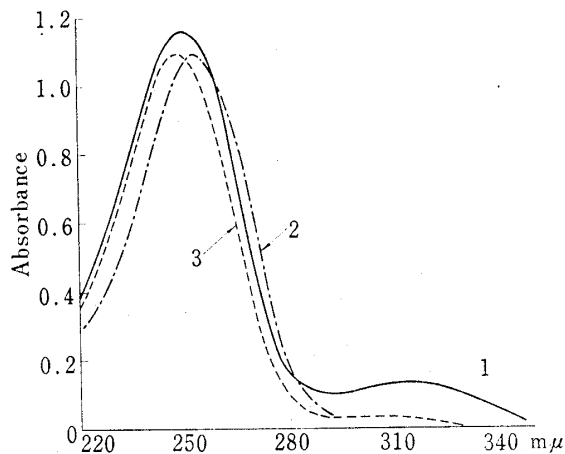


Fig. 10. UV Spectra of Androst-4-ene-3,6,17-trione

1: EtOH (29.0 $\mu\text{g/ml}$), λ_{max} : 250.5, 312.5 $\text{m}\mu$
 2: 50% acetonitrile (29.7 $\mu\text{g/ml}$), λ_{max} : 253.5 $\text{m}\mu$
 3: acetonitrile (29.7 $\mu\text{g/ml}$), λ_{max} : 249.0 $\text{m}\mu$

4. DMF 溶液中における還元機構

I は 50% DMF 中 256.5 ならびに 313 $\text{m}\mu$ に λ_{max} を示す (Fig. 9) ことから前者は keto 型, 後者は enol 型にもとづく吸収と推定される. I の enol 体には 6-enol (IV), 3-enol (V) および 3,6-dienol (VI) の 3 種が考えられる (Chart 1) が, I を酸触媒の存在下アルコールと還流するとき 6-enol alkyl ether が生成する⁸⁾ 化学反応性から推してこれらのうち 6-enol 体と推測される. また, この chromophore に Fieser-Fieser 則⁹⁾ を適用してもとめた λ_{max} の計算値と実測値はよく近似している.

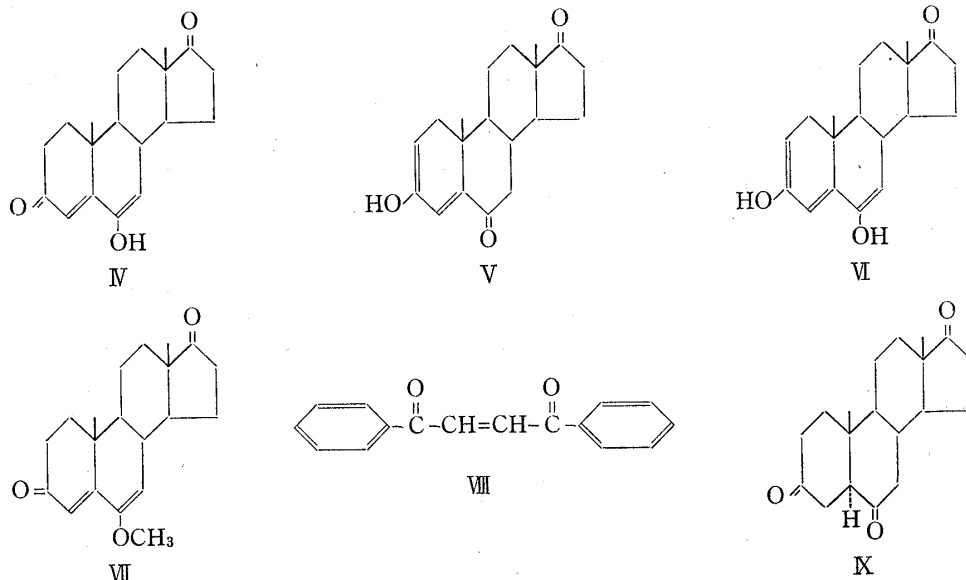


Chart 1

つぎにポーログラフ波と還元をうける分子種との関係を考察してみる. I の AN 溶液は 250 $\text{m}\mu$ 付近にのみ UV 吸収がみられ (Fig. 10), ポーログラムもほとんど第 1 波のみであったことから第 1 波は keto 型の還元にもとづくものであり, また第 2 波は DMF 溶液中における UV スペクトルとポーログラムの関係から推

8) A. Windaus, *Ber.*, **39**, 2249 (1906); *idem, ibid.*, **40**, 257 (1907).

9) R.M. Silverstein, G. C. Bassler "Spectrometric Identification of Organic Compounds," John Wiley & Sons, Inc., New York, 1967, pp. 157—161. γ -OH による効果を 30—50 $\text{m}\mu$ shift と仮定した.

して 6-enol 体 (IV) の還元によると結論した。このことはエノール型をとり得ない dibenzoyl ethylene (VIII) が中性で -0.5 V (vs. N.C.E.) とかなり陽電位でエチレン結合の還元を受け¹⁰⁾ また IV と類似の構造をもつ III, 6-methoxyandrosta-4,6-diene-3,17-dione (VII) の $E_{1/2}$ がそれぞれ -1.37 , -1.39 V にみられる事実からも支持される。

つぎに定電位電解法により 50% DMF における還元成績体の構造について検討した。第 1 波ならびに第 2 波の定常電流部にそれぞれ還元電位を設定して電解を行ない、各電解液から無色針状晶を得たが、別途合成した標品と比較の結果還元成績体はいずれの場合も 5 α -androsta-3,6,17-trione (IX) であることが確認された。したがって第 2 波の定常電流部に電解電位を設定した場合、共存する keto 体ならびに enol 体が同時に還元されて同一還元成績体 IX を与えたものと考えられる。第 1 波の定常電流部で電解した場合、還元成績体として IX のみが捕捉されたことは enol 体が keto 体を経て還元されたものと判断される。このことは電解に長時間を要したことから支持される。

以上検討の結果 I は AN 溶液中 3,6-diketone 体で存在するが、dipolar aprotic solvent である DMF 溶液中では 6-enol 体との平衡状態にあることが証明された。さらに 3,6-diketone 体、6-enol 体分子種の $E_{1/2}$ を明らかにし、keto-enol 平衡をふくむ還元機構により総波高が 2 電子に相当する 2 段波の波高比変化も矛盾なく説明された。またその還元成績体が Δ^4 の飽和された 5 α -androsta-3,6,17-trione であることも確認された。

実 験 の 部

1. Androst-4-ene-3,6,17-trione の合成 Dehydroepiandrosterone 5 g をアセトン 500 ml にとかし、 0° に保ちつつ kiliani クロム酸混液¹¹⁾ 15 ml を加え 1 hr 攪拌する。過剰のクロム酸を 5% NaHSO₃ にて分解し、エーテル抽出液を水洗、脱水後溶媒留去。残留物を少量のベンゼンに溶解し、Al₂O₃ クロマトグラフィーに付す。ベンゼン (150 ml) 溶出画分を MeOH より再結晶し、淡黄色柱状晶を得る。mp 223—224 $^\circ$. Anal. Calcd. C₁₉H₂₄O₃: C, 75.97; H, 8.05. Found: C, 76.08; H, 8.05.

2. 試薬 DMF は吸収スペクトル用を無水 Na₂SO₄ で脱水後 N₂ 気流中減圧蒸留したものを、また AN, LiCl は特級試薬をそのまま使用。

3. 装置および測定法 (1) ポーラログラフィー——柳本ペン記録式ポーラログラフ 102 型を使用。水銀滴下電極は A, B の 2 種類を使用した。A は 50% DMF 測定液中、 -1.3 V (vs. S.C.E.) において水銀柱の高さ $h=69.8$ cm のとき $m=0.693$ mg/sec, $t=3.24$ sec, B は $h=63.4$ cm のとき $m=1.115$ mg/sec, $t=2.94$ sec の毛細管特性を示した。B は Fig. 4, 5, 6 の実験において使用した。対極は飽和甘こう電極とし、100% DMF では水銀池を使用した。測定液は通常 4 ml とし、H 型セルを用いたが、測定液調製後ただちに 15 min, N₂ ガスを通じた後、 $25 \pm 0.1^\circ$ で測定した。測定液は試料濃度 1.5—3.5 mM, 溶媒として DMF および AN, 支持塩として 0.1 M LiCl を用い、極大抑制剤は 0.01% セラチンとした。pH 測定は堀場 HRL pH メーター M-3 型によったが、本報に記載した値はすべて見かけの pH である。

(2) UV スペクトル——日立自記分光光度計 EPS-2 型を使用。

(3) ESR スペクトル——日本電子 JES-ME-3X を使用。無水 DMF 中支持塩に 0.1 M Et₄Ni を用い試料濃度を 10^{-2} — 10^{-3} M, 設定電位を -1.5 V (vs. S.C.E.) とし、内部電解法で ESR を測定したが、ラジカルを検出することはできなかった。この場合、あらかじめ非水用塩橋を用いて I の第 1 波、2 波の $E_{1/2}$ がそれぞれ -1.16 , -2.08 V (vs. S.C.E.) であること、また支持塩に LiCl を用いた場合と $E_{1/2}$ に差がないことを確かめた。

(4) 定電位電解——使用した装置ならびにセルは前報⁴⁾ と同様である。I の定電位電解にさきだち 50% DMF, 0.1 M LiCl の基礎液に通電したところ、陽極室は酸性に、陰極室はアルカリ性になった。 -1.1 V (vs. S.C.E.) に設定した場合、7—8 hr の通電で陰極室の pH はおよそ 10, -1.7 V (vs. S.C.E.) に設定した場合、2 hr の通電で陰極室の pH はおよそ 11.5 であった。この pH 域における I の $E_{1/2}$ は第 1 波で -0.7 — -0.8 V, 第 2 波で -1.4 — -1.5 V であり、一方第 1 波、2 波の波高比は 1:0.2—1:0.4 であった。したがって電解の進行に伴って液性が中性からアルカリ性になるが、第 1 波について -1.1 V に、第 2 波について -1.7 V に電位設定することに何ら支障はない。 -1.7 V に電位を設定し、あらかじめ除酸素した基礎液で定常電流が得られたところで、I 約 9 mg を含む除酸素電解液 4 ml を加え電解を行なった。電解液がアルカリ性のため I を添加するとただちに黄色を呈するが、まもなく消失し、ほぼ 1 hr で電解は終了した。同様に -1.1 V に電位を設定し、I 約 12 mg を電解したが 7—8 hr の通電後黄色が消失したところで電解を停止した。

4. 定電位電解生成物の同定 -1.7 V における電解液を濃縮後、エーテルで抽出し無色結晶性物質を得た。これを Silica gel G を用いる preparative TLC (ベンゼン—エーテル (1:1)) に付し、ほぼ単一のスポット部を剥

10) R. Pasternak, *Helv. Chim. Acta*, **31**, 753 (1948).

11) 仁科甫啓, 木村道也, 薬誌, **84**, 390 (1964).

取, 溶出物をアセトン-ヘキサン (1:4) より再結晶し mp 190—191° の無色針状晶を得た. 予想される還元成績体の標品を別途合成し, 混融試験, IR スペクトル, TLC, ガスクロマトグラフィーによる比較の結果 5 α -androstane-3,6,17-trione (IX) であることを確認した. また, -1.1 V における電解液についても同様処理し, 還元成績体が IX であることを証明した.

謝辞 本研究において貴重な標品を分与された三共株式会社中央研究所 田部克巳博士, 実験の一部に協力された東北大学薬学科 細田 宏氏に深謝します. また ESR 測定の便宜をはかっていただいた日本電子株式会社磁気研究室の諸氏に御礼申し上げます.