

ベタメタゾンおよびデキサメタゾンの Porter-Silber 反応の呈色について¹⁾

柴田 正, 伊阪 博, 持田研秀

国立衛生試験所大阪支所²⁾Coloration in the Porter-Silber Reaction of Betamethasone and Dexamethasone¹⁾

TADASHI SHIBATA, HIROSHI ISAKA and KENSU Mochida

National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch²⁾

(Received June 10, 1975)

The main Porter-Silber reaction products of Betamethasone (I) was 11 β ,21-dihydroxy-9 α -fluoro-16 β -methyl-1,4-pregnadiene-3,20-dione (V), and 21-phenylhydrazone (III) of I was not found as the reaction product. On the contrary, the main product from Dexamethasone (II) was 21-phenylhydrazone (IV) of II. The reaction mixture of I, V, and II with PS reagent showed absorption maxima at 450, 450, and 423 nm, respectively. It was found that the chromophore showing an absorption maximum at 450 nm was derived from I or V by the reaction with sulfuric acid.

ベタメタゾン (I) およびデキサメタゾン (II) の Porter-Silber 反応 (PS 反応) による呈色はそれぞれ吸収極大波長 (λ_{\max}) を 450 および 423 nm に示す。³⁾ 本報ではこの呈色本体ならびに反応中間体について検討した。

PS 反応ではフェニルヒドラジンを含む硫酸溶液を使用するので, I および II のフェニルヒドラゾンが生成し, これが呈色に関与していることが考えられるので, まず I および II のフェニルヒドラゾンを合成した。

合成した I のフェニルヒドラゾンは mass spectrum において m/e : 464 (M^+) のピーク, 核磁気共鳴 (NMR) スペクトルにおいて, 1, 4 位の二重結合, 11 位 β -OH, 16, 18, 19 位メチルによる共鳴線が観測され, I の 21 位の CH_2O の共鳴線が消失して, 新たに 17 位 α -H (δ : 3.4), 21 位に $>\text{NH}$ (δ : 11.2) の共鳴線が観測されることからその構造は III と推定した (Chart 1)。また II のフェニルヒドラゾンはその赤外 (IR), NMR および mass の各スペクトルが Johnson ら⁴⁾ の結果と一致したので IV と確認した (Chart 1)。

III および IV の硫酸溶液は Fig. 1 に示すように λ_{\max} 423 nm をもつ吸収スペクトルを示し, その $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ はいずれも 630 である。

PS 反応で I から III が生成するならば, λ_{\max} は 423 nm になるはずであるが, 反応液の呈色は先に述べたように 450 nm に λ_{\max} を示した。また, 呈色反応液からの抽出物の薄層クロマトグラフィー (TLC) で III および他のヒドラゾン体は検出されなかった。これらのことから, I は PS 反応において, PS 試液中の硫酸によって変化をうけると考え, I の硫酸反応による生成物 (V) を単離し, この生成物の呈色におよぼす影響について検討した。

V の mass spectrum は m/e : 375 (M^+-1) のピークが, また NMR スペクトルには 1, 4 位に二重結合, 11 位 β -OH, 16, 18, 19 位メチル, 21 位 CH_2O ($J=20$ Hz) のシグナルがある。これをアセチル化して得た物質の NMR スペクトルには 2 個のアセチル基によるシグナル (δ : 2.07, 2.10) が観測され, 21 位の CH_2O によるシグナルが 0.5 ppm 低磁場側にシフトし, この J が 17 Hz に減少することから, V は 11 β ,21-dihydroxy-9 α -fluoro-16 β -methyl-1,4-pregnadiene-3,20-dione (Chart 1) と推定した。V の PS 試液ならび硫酸試液による呈色

1) 日本薬学会第 93 年年会で発表, 東京, 1973 年。

2) Location: 6, Hoenzaka-cho, Higashi-ku, Osaka.

3) 第八改正日本薬局方, p. 624 (厚生省); 柴田 正, 伊阪 博, 持田研秀, 衛生試験, 91, 97 (1973)。

4) J.D. Johnson, W.R. Starnes, *Ala. J. Med. Soc.*, 5, 513 (1964)。

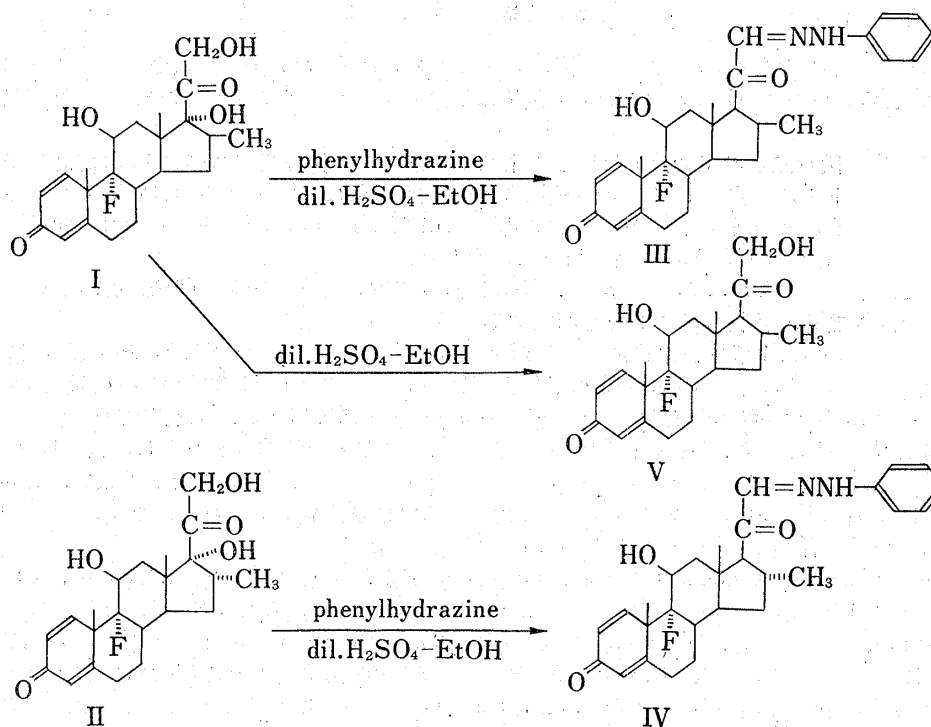


Chart 1

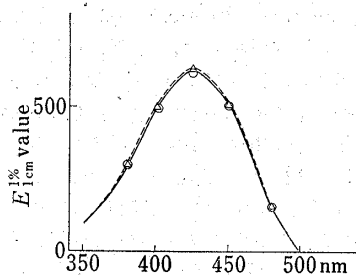


Fig. 1. Absorption Spectra of III and IV in Sulfuric Acid Test Solution

III: —○— IV: —△—

は Fig. 2 に示すように 450 nm に λ_{\max} を示す。

I および II は 16 位メチル基の α および β 異性体である。17 位 OH との立体配位の差によって PS 試液でグリオキサールへの酸転移反応⁵⁾ が I では進行せず、ヒドラゾンが生成しにくい。一方 II はヒドラゾンが生成し、 λ_{\max} 423 nm を示す。また 17-deoxycortisone が PS 反応により呈色しない⁵⁾ ことから、V はヒドラゾンを生成せず、硫酸反応によって λ_{\max} 450 nm を示すと考えられる。ステロイドの強酸における呈色反応⁶⁾ ではカルボカチオンの生成がみとめられているので、PS 反応において I の酸転移反応が進み、V などが生成して λ_{\max} 450 nm に幅広い吸収を示すと考えられる。

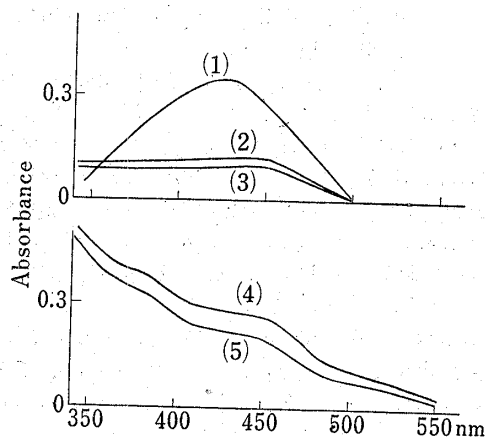


Fig. 2. Absorption Spectra of I, II and V in PS Reagent and Sulfuric Acid

- (1) II+PS reagent (0.0017% solution of II)
- (2) I+PS reagent (0.0017% solution of I)
- (3) V+PS reagent (0.0017% solution of V)
- (4) I+H₂SO₄ test solution (0.017% solution of I)
- (5) V+H₂SO₄ test solution (0.017% solution of V)

5) M.L. Lewbart, V.R. Mattox, *Anal. Chem.*, **33**, 559 (1961); *idem*, *J. Org. Chem.*, **29**, 515 (1964).

6) M. Kimura, K. Akiyama, T. Miura, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **22**, 643 (1974).

実 験 の 部

試薬および試液 JP VIII ベタメタゾン (I), デキサメタゾン (II). H_2SO_4 , 塩酸フェニルヒドラジンは試薬特級品, 硫酸試液は $H_2SO_4-H_2O$ (17:8). PS 試液は塩酸フェニルヒドラジン 0.065 g を硫酸試液 100 ml に溶かして用いた.

装置 融点は柳本微量融点測定装置で測定し, 未補正である. 可視部吸収スペクトルは島津 DF40 型自記分光光度計, IR スペクトルは日立 EPI-2G 型赤外分光光度計, NMR スペクトルは Varian A60-D 型を用い $(CH_3)_4Si$ を内部標準としてそれぞれ測定した. 略号 s: singlet, d: doublet, dd: double doublet, br: broad. mass spectrum は日本電子 KMS-O1SG 型を用いて測定した.

PS 反応 (硫酸反応) I または II の 0.01% EtOH 溶液 2 ml に PS 試液 (硫酸試液) 10 ml を加え, 60° の水浴中で 20 分間加熱し, 吸収スペクトルを測定する.

I および II のフェニルヒドラゾンの合成 I および II それぞれ 2 g を EtOH 200 ml に溶かし, これに塩酸フェニルヒドラジン 1.64 g, H_2SO_4 413 ml, H_2O 253 ml および EtOH 333 ml の混液を加える. 室温で 24 時間放置したのち, H_2O 600 ml を加え, CH_2Cl_2 600 ml で 6 回抽出する. 全抽出液を水洗し, 無水 Na_2SO_4 で乾燥し, 溶媒を減圧留去する. 残渣を EtOH に溶かし, ろ過後 EtOH を留去し, 黄色結晶 500 mg を得. CH_2Cl_2 600 ml を用い, シリカゲルカラムクロマトグラフィー (30 g, 3×20 cm) をおこない, さらに CH_2Cl_2 を用い調製 TLC (HF₂₅₄, 20×20 cm, 厚さ 3 mm) で黄色結晶を分離精製した. 粗結晶を acetone-ether (1:1) から再結晶し, 黄色針状結晶の III 87 mg および IV 198 mg を得.

I の Phenylhydrazone (3,20-dioxo-9-fluoro-11 β -hydroxy-16 β -methyl-1,4-pregnadien-21-al-21-Phenylhydrazone) (III) mp (decomp.) >300°. TLC,⁷⁾ Rf 0.60. Anal. Calcd. $C_{28}H_{33}O_3FN_2$: C, 72.39; H, 7.16; N, 6.03; F, 4.09. Found: C, 71.87; H, 7.38; N, 5.48; F, 4.02. Mass Spectrum *m/e*: 464 (M^+), IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3400 (OH), 3250 (NH), 1663 (C=O), 1620, 1605 (C=C), 1540 (C=N), 893 (C-F), NMR (DMSO- d_6) δ : 1.06 (3H, d, $J=7$ Hz, $C_{16}-CH_3$), 1.33 (3H, s, $C_{18}-CH_3$), 1.48 (3H, s, $C_{19}-CH_3$), 3.4 (1H, d, $J=4$ Hz, $C_{17}-H$), 4.0 (1H, br-s, $C_{11}-H$), 6.02 (1H, s, C_4-H), 6.2 (1H, dd, $J=2, 11$ Hz, C_2-H), 11.2 (1H, s, >NH).

II の Phenylhydrazone (3,20-dioxo-9 α -fluoro-11 β -hydroxy-16 α -methyl-1,4-pregnadien-21-al-21-Phenylhydrazone) (IV) mp (decomp.) >300°, TLC,⁷⁾ Rf 0.60. 元素分析値, mass spectrum, IR および NMR スペクトルは Johnson ら⁴⁾ の結果とよく一致した.

硫酸反応生成物: 11 β ,21-Dihydroxy-9 α -fluoro-16 β -methyl-1,4-pregnadiene-3,20-dione (V) I 2 g を EtOH 400 ml に溶かし, 硫酸試液 2 liter を加え, 室温で 24 時間放置し, 氷水 2 liter 中に注ぎ, CH_2Cl_2 500 ml で 4 回抽出する. 溶媒を留去し, 黄色の粉末 720 mg を得. Acetone を用いシリカゲルカラムクロマトグラフィー (30 g, 3×20 cm) をおこない, さらに CH_2Cl_2 を用いて調製 TLC (HF₂₅₄, 20×20 cm, 厚さ 0.5 mm) で得た粗結晶を acetone-ether (1:1) から再結晶し, 無色針状結晶 52 mg を得. mp 202–204°. TLC,⁷⁾ Rf 0.68. Anal. Calcd. $C_{22}H_{29}O_4F$: C, 70.19; H, 7.76; F, 5.05. Found: C, 69.82; H, 7.82; F, 5.36. Mass Spectrum *m/e*: 375 (M^+-1). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3350 (OH), 1705 (C=O), 1655 (C=O), 1605 (C=C), 890 (C-F). NMR (DMSO- d_6) δ : 0.89 (3H, d, $J=7$ Hz, $C_{16}-CH_3$), 0.93 (3H, s, $C_{18}-CH_3$), 1.45 (3H, s, $C_{19}-CH_3$), 3.95 (1H, d, $J=20$ Hz, $C_{21}-H$), 4.15 (1H, d, $J=20$ Hz, $C_{21}-H$), 4.4 (1H, br-s, $C_{11}-H$), 6.05 (1H, s, C_4-H), 6.2 (1H, dd, $J=2$ Hz, 11 Hz, C_2-H), 7.35 (1H, d, $J=11$ Hz, C_1-H).

V の Diacetate V 30 mg を無水酢酸・ピリジンで常法によりアセチル化し, ether-MeOH (1:1) から再結晶し, 無色針状結晶 28 mg を得. TLC,⁷⁾ Rf 0.89. NMR ($CDCl_3$) δ : 0.99 (3H, d, $J=6$ Hz, $C_{16}-CH_3$), 2.07, 2.10 (3H, s, 2×COCH₃), 4.5 (1H, d, $J=17$ Hz, $C_{21}-H$), 4.8 (1H, d, $J=17$ Hz, $C_{21}-H$), 5.7 (1H, s, $C_{11}-H$), 6.2 (1H, s, C_4-H), 6.35 (1H, dd, $J=2$ Hz, 11 Hz, C_2-H), 7.1 (1H, d, $J=11$ Hz, C_1-H).

謝辞 本研究に当り, 原料を提供され, 元素分析を測定していただいた塩野義製薬株式会社, 御助言いただいた神戸女子薬科大学教授 小林正博士, NMR, mass spectrum を測定していただいた神戸女子薬科大学分析室の方々に感謝いたします.

7) Kiesel gel HF₂₅₄, 展開溶媒 CH_2Cl_2 -ether-MeOH- H_2O (77:15:8:1.2 v/v).