

多価アルデヒド類による定量法の研究 (第 11 報¹⁾) フェニレンジアミン
異性体混合物中の *o*-フェニレンジアミンのけい光定量

天野為之, 坂野俊行

塩野義製薬株式会社研究所²⁾

Studies on the Determination Methods with Polyaldehydes. XI.¹⁾
Fluorometric Determination of *o*-Phenylenediamine in the
Presence of *m*- and *p*-Phenylenediamine

TAMEYUKI AMANO and TOSHIYUKI SAKANO

Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.²⁾

(Received September 12, 1968)

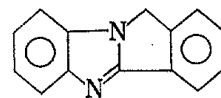
o-Phenylenediamine reacts rapidly and quantitatively with phthalaldehyde in sulfuric acid-ethanol solution to form strongly fluorescent 11H-isoindolo[2,1-*a*]benzimidazole (I). By using the excited wave length of 320 mμ and fluorescence wave length of around 350 mμ of I, a fluorometric determination of *o*-phenylenediamine in a concentration of 1×10^{-12} to 6×10^{-9} moles in 1 ml of a sample solution has been proposed. Reaction of *m*- and *p*-phenylenediamine with phthalaldehyde respectively give 2,2'-(1,3-phenylene)-di-1-isoindolinone (II) and 2,2'-(1,4-phenylene)-di-1-isoindolinone (III). Formation of II and III is much slower than that of I, their fluorescence intensity is weaker, and the wave lengths of their fluorescence differ markedly from that of I. By using such a difference in the optical properties of I, II, and III, the present method of determination made it possible to selectively determine *o*-phenylenediamine in the presence of *m*- and *p*-phenylenediamines.

芳香族 1,2-ジアルデヒド類と芳香族 1,2-ジアミン類とによるベンズイミダゾール誘導体の生成反応は Thiele ら³⁾ によってフタルアルデヒドと *o*-フェニレンジアミンとの反応により 11H-isoindolo[2,1-*a*]benzimidazole (I) が単離されて以来, Amos ら⁴⁾ および Perlmutter ら⁵⁾ によって確かめられた。

一方, *m*-フェニレンジアミンあるいは *p*-フェニレンジアミンの存在下における *o*-フェニレンジアミンの定量は, ゼレン酸による反応⁶⁾ あるいはフェリシアン化カリウムによる酸化反応⁷⁾ に基づく比色法が知られているが, これらの方法においては, 試料溶液 1 ml 当り μg 量の目的成分を必要とする。

著者らは I のけい光とその生成条件を検討した結果, I の生成に起因するけい光反応を利用することによって, フェニレンジアミン異性体混合試料中 ng 量の *o*-フェニレンジアミンのけい光定量が可能であることをみいだしたので報告する。

フタルアルデヒドと *o*-フェニレンジアミンとのエタノール溶液中における反応溶液のけい光特性は Table I に示すように, 硫酸酸性ないし中性溶液中では, 単離した I のけい光特性に一致した。すなわち, 酸性ないし中



I

1) 第 10 報: 天野為之, 坂野俊行, 薬誌, 89, 164 (1969).

2) Location: Sagisu, Fukushima-ku, Osaka.

3) J. Thiele, K.G. Falk, Ann., 347, 112 (1906).

4) D. Amos, G.R. Gillis, Australian J. Chem., 17, 1440 (1964).

5) H.D. Perlmutter, P.S. Knapp, J. Org. Chem., 32, 2350 (1967).

6) L. Barzca, Acta Chim. Acad. Sci. Hung., 41, 91 (1964) [C.A., 62, 4621f (1965)].

7) 森田彌左衛門, 小暮幸全, 日化, 86, 82 (1965).

TABLE I. Fluorescence Characteristics of *o*-Phenylenediamine reacted^{a)} with Phthalaldehyde and Isolated 11H-Isoindolo[2,1-*a*]benzimidazole (I)

Medium	Reaction mixture ^{a)}					Isolated I ^{b)}				
	$\lambda_{\max}^{c)}$		$E_{x,\max}^{e)}$	$E_{m,\max}^{f)}$	RFI ^{g)}	$\lambda_{\max}^{c)}$		$E_{x,\max}^{e)}$	$E_{m,\max}^{f)}$	RFI ^{g)}
	m μ	Abs. ^{d)}				m μ	Abs. ^{d)}			
0.5N H ₂ SO ₄ in 95% EtOH	292 sh.	0.350	321	347	82	292 sh.	0.346	321	348	83
	305	0.498				306	0.490			
	318	0.373				319	0.366			
95% EtOH	298 sh.	0.344	321	344	81	298 sh.	0.360	321	343	100
	306	0.444				306	0.480			
	319	0.373				319	0.398			
0.1N KOH in 95% EtOH	302	0.173	327	383	4	298 sh.	0.350	321	343	94
	323 sh.	0.112				306	0.470			
						319	0.390			

a) To 2 ml of *o*-phenylenediamine solution (1×10^{-7} mole/ml in EtOH) add. 0.5 ml of 10N H₂SO₄, H₂O or 2N KOH respectively, and 2 ml of phthalaldehyde solution (7.5×10^{-6} mole/ml in EtOH). Heat the mixture for 20 min at 60°, and dilute with EtOH to 10 ml.

b) concn.: 2×10^{-3} mole/ml

c) absorption maximum sh.: shoulder

d) absorptancy

e) fluorescence excitation maximum, uncorrected

f) fluorescence emission maximum, uncorrected

g) relative fluorescence intensities, uncorrected; these are relative values of microammeter readings at the same conditions.

性の反応溶液中では I の生成に起因するけい光反応を示し、かつ、酸性溶液中における I の生成率は吸収極大波長における吸光度、および相対けい光強度の値から、ほぼ定量的であると考えられる。アルカリ性溶液中においては I の生成は認められない。

I のけい光に対する溶媒効果は Table II に示すとおりである。エタノール溶液のけい光強度を 100 とするとき、Table II に示した各溶媒中における相対けい光強度は 76—113 の範囲内にあり、I の発けい光能の溶媒に

TABLE II. Solvent Effects on the Fluorescence of 11H-Isoindolo[2,1-*a*]benzimidazole (I)

Solvent	$\lambda_{\max}^{a)}$		$E_{x,\max}^{b)}$	$E_{m,\max}^{c)}$	RFI ^{d)}
	m μ	log ϵ			
Formamide	320	4.26	321	348	80
Methanol	318	4.30	319	342	105
Ethanol	319	4.30	320	342	100
<i>n</i> -Propanol	320	4.31	320	344	89
<i>n</i> -Butanol	321	4.30	320	343	109
Isoamylalcohol	321	4.30	321	343	111
Pyridine	324	4.29	324	350	85
Acetic acid	318	4.24	320	347	76
Diethylether	321	4.29	321	344	113
Benzene	324	4.28	324	347	85
Dioxane	322	4.30	322	346	83
<i>n</i> -Heptane	324	4.32	324	343	97

a) absorption maximum

b) fluorescence excitation maximum, uncorrected

c) fluorescence emission maximum, uncorrected

d) relative fluorescence intensities, corrected for instrumental sensitivity. All measurements were examined at the same conditions; concn.: 1×10^{-3} mole/ml, wave length width of excitation light: 6 m μ , and wave length width of emission light: 5 m μ .

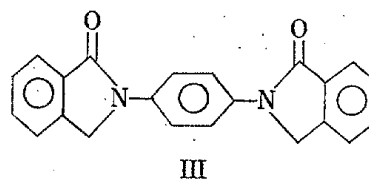
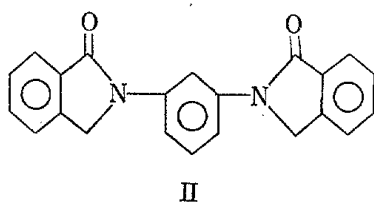


TABLE III. Comparison of Fluorescence and Phosphorescence Characteristics of 11H-Isoindolo-[2,1-*a*]benzimidazole (I),^{a)} 2,2'-(1,3-Phenylene)di-1-isoindolinone (II),^{a)} and 2,2'-(1,4-Phenylene)di-1-isoindolinone (III)^{a)} in EtOH

Compd.	$\lambda_{\max}^{b)}$		Fluorescence						Phosphorescence at -196°			
	$m\mu$	$\log \varepsilon$	at 25°			at -196°						$\tau^g)$ sec
			$E_{x,\max}^{c)}$ $m\mu$	$E_{m,\max}^{d)}$ $m\mu$	RFI ^{e)}	$E_{x,\max}^{c)}$ $m\mu$	$E_{m,\max}^{d)}$ $m\mu$	RFI ^{e)}	$E_{x,\max}^{c)}$ $m\mu$	$E_{m,\max}^{d)}$ $m\mu$	RPI ^{f)}	
I	319	4.30	321	342	100	301 308 315 323	324 341 356 371 sh.	100	316	436 sh. 458 481 sh.	100	2.81
II	281	4.43	300	426	1.6	299	393 sh. 406	39	301	436	111	1.06
III	315	4.31	324	450	2.4	330 338 sh.	376 sh. 396 416 437 sh.	32	331	470	2	0.66

a) concn.: 3×10^{-3} mole/ml

b) absorption maximum

c) Excitation maximum, uncorrected. Italicized values are excitation wavelength maxima at which tabulated emission maxima are obtained.

d) Emission maximum, uncorrected. Italicized values are emission wavelength maxima at which tabulated excitation maxima are obtained.

e) The same as shown in Table I

f) Relative phosphorescence intensities, uncorrected; relative values of microammeter readings at the same conditions. Resolution time: 1.5 msec const

g) Mean lifetime. sh.: shoulder

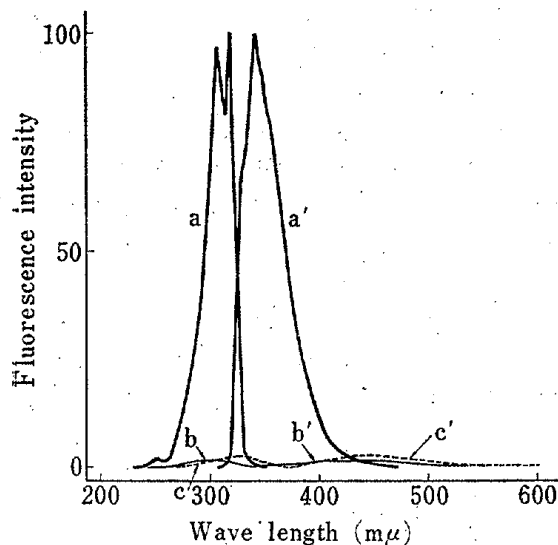


Fig. 1. Fluorescence Excitation and Emission Spectra of I, II, and III at 25°

concn.: 3×10^{-3} mole/ml solvent: EtOH

a —: fluorescence excitation spectrum of I, uncorrected

a' —: fluorescence emission spectrum of I, uncorrected

b —: fluorescence excitation spectrum of II, uncorrected

b' —: fluorescence emission spectrum of II, uncorrected

c - - -: fluorescence excitation spectrum of III, uncorrected

c' - - -: fluorescence emission spectrum of III, uncorrected

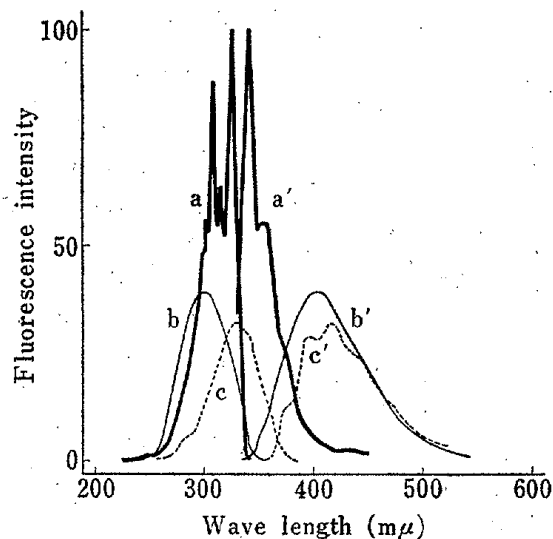


Fig. 2. Fluorescence Excitation and Emission Spectra of I, II, and III at -196°

concn.: 3×10^{-3} mole/ml solvent: EtOH

a —: fluorescence excitation spectrum of I, uncorrected

a' —: fluorescence (total) emission spectrum of I, uncorrected

b —: fluorescence excitation spectrum of II, uncorrected

b' —: fluorescence (total) emission spectrum of II, uncorrected

c - - -: fluorescence excitation spectrum of III, uncorrected

c' - - -: fluorescence (total) emission spectrum of III, uncorrected

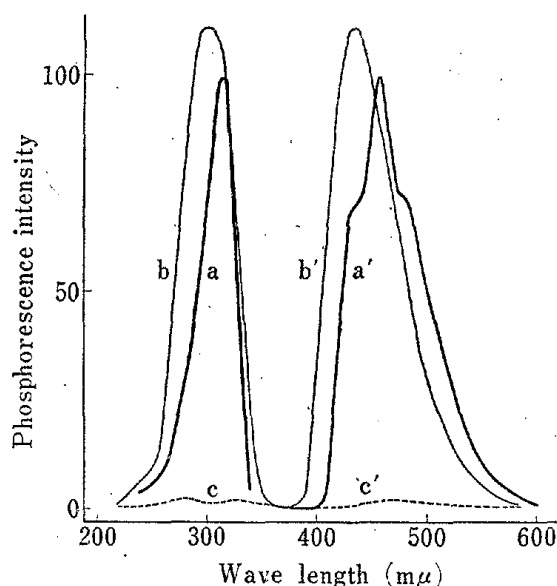


Fig. 3. Phosphorescence Excitation and Emission Spectra of I, II, and III at -196°

concn.: 3×10^{-8} mole/ml solvent: EtOH
 a ———: phosphorescence excitation spectrum of I, uncorrected
 a' ———: phosphorescence emission spectrum of I, uncorrected
 b ———: phosphorescence excitation spectrum of II, uncorrected
 b' ———: phosphorescence emission spectrum of II, uncorrected
 c ———: phosphorescence excitation spectrum of III, uncorrected
 c' ———: phosphorescence emission spectrum of III, uncorrected

定量法

試液——フタルアルデヒド 100 mg をエタノールに溶かして 100 ml とする。

操作法——試料のエタノール溶液 4 ml に 10 N 硫酸 1 ml, 試液 4 ml を加えて混和。室温で 15 分間反応後, 2 時間以内に 320 mμ の励起光を用いてみかけのけい光極大波長におけるけい光強度を測定する。ブランク値を差し引き, 同時に同条件で求めた標準品による検量線から定量値を算出する。

定量条件の検討

i) 試液の濃度——*o*-フェニレンジアミンの濃度を一定とし, その定量条件における試薬の濃度とけい光強度との関係を求めて Fig. 4 を得た。*o*-フェニレンジアミンに対して, モル比で約 50 倍以上のフタルアルデヒドを使用するときは一定のけい光強度を示した。一定のけい光強度を与える試薬濃度すなわち 0.1% フタルアルデヒド試液 (7.5×10^{-6} mole/ml) を定量条件とした。

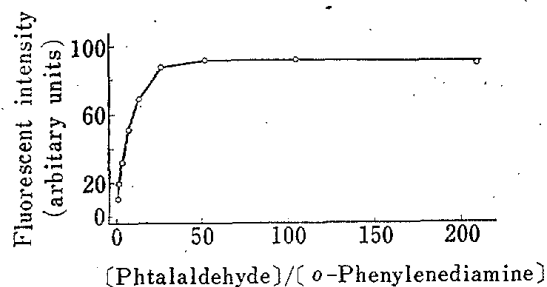


Fig. 4. Relationship between Concentration of Phthalaldehyde and Fluorescence Intensity
 [*o*-Phenylenediamine] = 1×10^{-7} mole/ml

よる変化は比較的小であるとみなし得る。けい光極大波長 ($E_{m, \max}$) あるいは相対けい光強度 (RFI) と, 溶媒の誘電率あるいは粘度 (常温) との間に相関関係は認められない。

フタルアルデヒドと *m*-フェニレンジアミンあるいは *p*-フェニレンジアミンとから, それぞれ合成単離した 2,2'-(1,3-phenylene)di-1-isoindolinone (II) あるいは 2,2'-(1,4-phenylene)di-1-isoindolinone (III) のけい光ならびにりん光特性を I と比較すると Table III および Fig. 1, 2, 3 に示すとおりである。

すなわち, I の室温 (25°) におけるけい光は II および III と著しく異なる。 -196° におけるけい光あるいはりん光の差異よりも室温におけるけい光の方が顕著である。しかも室温においては, II および III を I の励起極大波長である 321 mμ で励起したときの I のけい光極大波長である 342 mμ におけるけい光強度は後述するように I に対して 0.1% 以下を示し無視できる。すなわち, I を II および III からスペクトルの分離することが可能であるので, I の生成反応を利用する分離定量の目的に対しては室温けい光を利用するのがもっとも有効であると考えられる。

以上の知見に基づき, フタルアルデヒドによる *o*-フェニレンジアミンの定量条件を吟味して, つぎのようなけい光定量法を設定した。

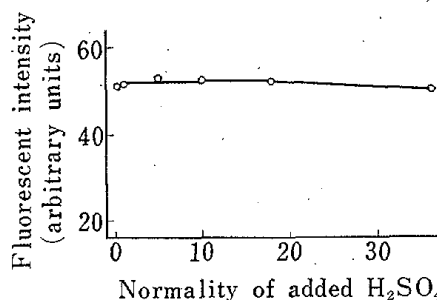


Fig. 5. Relationship between Concentration of Sulfuric Acid and Fluorescence Intensity
 [*o*-Phenylenediamine] = 1×10^{-7} mole/ml

ii) 硫酸の濃度——定量条件において、添加する硫酸の濃度とけい光強度との関係を求めて Fig. 5 を得た. Table I から明らかなように, I のけい光極大波長はそのエタノール溶液に硫酸を加えると数 $m\mu$ 長波長側に移行する. したがって, 反応溶液においても添加する硫酸濃度の増大とともに, けい光極大波長は若干長波長側に移行するのであるが, 1—20 N 硫酸添加の条件におけるけい光強度は一定とみなすことができる. したがって, 10 N 硫酸添加を定量条件とした.

iii) 反応条件——定量条件における, 反応時間と反応溶液中における I の生成率との関係を求めるために, *o*-フェニレンジアミン濃度 1×10^{-7} mole/ml のエタノール溶液について定量操作を行なった溶液のけい光強度 (励起波長 $320 m\mu$, けい光波長 $350 m\mu$) F と, 同一 medium における当量濃度の I によるけい光強度 (励起波長 $320 m\mu$, けい光波長 $350 m\mu$) F_s との比の百分率を反応時間に対してプロットして Fig. 6 を得た. すなわち, 反応温度 25° においては, 反応時間 10—120 分の間で, 一定かつ I の標準溶液と有意差のないけい光強度を示し, 定量的に I を生成することを示した. 反応温度 $30—40^\circ$ においても 25° の場合と同様の結果を得た.

iv) 安定度——定量条件における測定液のけい光強度は, 室温室内光中で少なくとも 2 時間は安定であった.

v) 検量線——定量条件において, *o*-フェニレンジアミン濃度 $1 \times 10^{-12}—6 \times 10^{-9}$ mole/ml の範囲で濃度とけい光強度間に直線関係が成立した. Table IV に日立 MPF-2 型分光けい光光度計によって求めた各濃度範囲における検量線の回帰式とその変動係数とを示す.

vi) *m*-フェニレンジアミンと *p*-フェニレンジアミンの挙動——定量条件において, *m*-フェニレンジアミンと *p*-フェニレンジアミンはそれぞれ II と III を生成する. *m*-フェニレンジアミンあるいは *p*-フェニレンジアミンの各 1×10^{-8} mole/ml

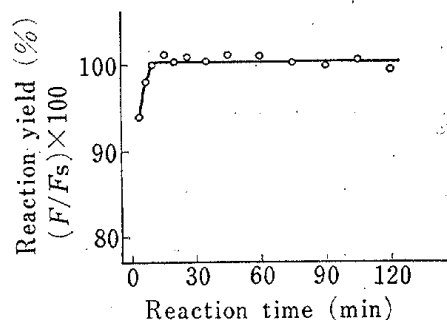


Fig. 6. Relationship between Reaction Time and Reaction Yield

reaction temperature: 25° .

F: fluorescence intensity (at $350 m\mu$, with excitation at $320 m\mu$) of reaction mixture (*o*-phenylenediamine) = 1×10^{-7} mole/ml)

F_s : fluorescence intensity (at $350 m\mu$, with excitation at $320 m\mu$) of standard 11H-isindolo[2,1-a]benzimidazole solution (equimolar concn. to *o*-phenylenediamine)

TABLE IV. Calibration Curves of *o*-Phenylenediamine

Concn. suitable for fluorometry (mole/ml)	Regression equation ^{a)}	Coefficient of variation (%)
$1 \times 10^{-9}—6 \times 10^{-9}$	$y = 10.61x_1 + 1.3$	1.04
$1 \times 10^{-10}—1 \times 10^{-9}$	$y = 9.47x_2 + 0.7$	2.05
$1 \times 10^{-11}—1 \times 10^{-10}$	$y = 7.21x_3 + 1.3$	2.97
$1 \times 10^{-12}—1 \times 10^{-11}$	$y = 4.72x_4 - 1.2$	6.64

a) instrument: Hitachi MPF-2.

y: fluorescence intensity

x: Concn. of *o*-phenylenediamine; $x_1 = (\text{mole/ml}) \times 10^9$, $x_2 = (\text{mole/ml}) \times 10^{10}$, $x_3 = (\text{mole/ml}) \times 10^{11}$, $x_4 = (\text{mole/ml}) \times 10^{12}$

TABLE V. Fluorescence Characteristics of Reaction Products of *m*-Phenylenediamine or *p*-Phenylenediamine Solutions in Acid Medium

Compd.	$E_{x, \max}^{c)}$ $m\mu$	$E_{m, \max}^{d)}$ $m\mu$	RFI ^{e)}
<i>m</i> -Phenylenediamine ^{a)}	308	422	0.7 ^{f)}
II ^{b)}	309	423	100
<i>p</i> -Phenylenediamine ^{a)}	330	448	0.9 ^{g)}
III ^{b)}	328	448	100

a) Experimental conditions are identical to this quantitative method. concn.: 1×10^{-8} mole/ml

b) concn.: 4.44×10^{-9} mole/ml in 1.1N H_2SO_4 -89% EtOH

c) fluorescence excitation maximum, uncorrected

d) fluorescence emission maximum, uncorrected

e) relative fluorescence intensities, uncorrected

f) Fluorescence intensity of II was taken as 100.

g) Fluorescence intensity of III was taken as 100.

濃度のエタノール溶液について本定量法を適用して得た溶液のけい光特性を、それぞれ同一 medium における当モル濃度の II あるいは III のけい光と比較して Table V を得た。

すなわち、反応溶液のけい光と比較に用いた II あるいは III のけい光の相対強度から、本定量条件における *m*-フェニレンジアミンあるいは *p*-フェニレンジアミンによる II あるいは III の生成率はいずれも 1% 以下であった。また、それぞれの反応溶液の励起波長 320 mμ, けい光波長 350 mμ における、同濃度の *o*-フェニレンジアミン反応溶液に対する相対けい光強度は両者ともに 0.1% 以下であった。したがって、定量条件においては、*m*-フェニレンジアミンあるいは *p*-フェニレンジアミンに由来する発けい光に基づく障害は無視することができる。

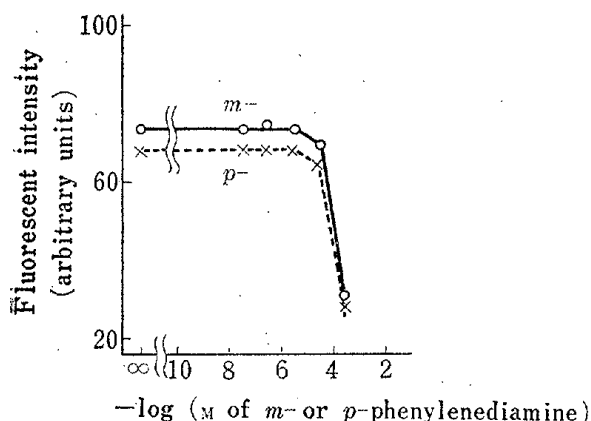


Fig. 7. Quenching Curves with *m*-Phenylenediamine (*m*-) or *p*-Phenylenediamine (*p*-) in Assay of *o*-Phenylenediamine

[*o*-phenylenediamine] = $5 \times 10^{-5} M$

び *p*-フェニレンジアミンをそれぞれモル比で 10—100 倍量ずつ添加した合成試料 No. 1—10 (Table VI) について、本定量法を適用して *o*-フェニレンジアミンの定量値 y を求め、既知量 x と実測値 y について回帰分析計算を行なった結果、本けい光定量法はこれらの異性体と共存するときの *o*-フェニレンジアミンに対して変動係数約 5% で正しい定量値を与えることを認めた (Table VI)。ただし、試料溶液 1 ml 中の *m*- および *p*-フェニレンジアミンの量が 10^{-8} モルをこえる場合は適用できない。

しかしながら、I によるけい光は近紫外領域にあり、II および III の吸収帯のすそとかなるため、I—III が共存する場合の、I の励起光に対する II と III による内部ろ光効果および、I のけい光の II と III による再吸収は無視できない。そこで、*o*-フェニレンジアミンのエタノール溶液に *m*-フェニレンジアミンあるいは *p*-フェニレンジアミンを添加して定量操作を行なったときの消光曲線を求めて Fig. 7 を得た。

すなわち、*m*-フェニレンジアミンと *p*-フェニレンジアミンは、いずれも試料溶液中 5×10^{-8} mole/ml 以下の存在では *o*-フェニレンジアミンの定量値に障害を与えないことを示唆した。 10^{-8} mole/ml 以上の存在では明らかに消光を示した。

回帰分析

o-フェニレンジアミンに *m*-フェニレンジアミンおよ

TABLE VI. Regression Analysis for Assay of *o*-Phenylenediamine (*o*-PD) in the presence of *m*-Phenylenediamine (*m*-PD) and *p*-Phenylenediamine (*p*-PD)

Sample No.	Components in 4 ml of mixed sample solution (mole $\times 10^{10}$)			Found (mole $\times 10^{10}$) <i>o</i> -PD (y)
	<i>o</i> -PD (x)	<i>m</i> -PD	<i>p</i> -PD	
1	1.00	100	100	1.20
2	2.00	100	100	1.91
3	3.00	100	100	3.01
4	4.00	100	100	4.12
5	5.00	100	100	4.79
6	6.00	100	100	5.85
7	7.00	100	100	6.60
8	8.00	100	100	7.49
9	9.00	100	100	8.57
10	10.00	100	100	9.64

a) regression equation: $y = 0.9894x - 0.027$, $s = 0.28$, C.V. = 5.25%

実 験 の 部

装置および測定 けい光測定は日立製分光けい光光度計 MPF-2 型を使用した。励起光源は日立キセノンランプ UXL-150D, 受光部は浜松テレビ製光電子増倍管 R 106, セルは石英製 10 mm×10 mm の角型セルを用いた。-196°におけるけい光およびりん光の測定は前報¹⁾に記載した方法と同様に行なった。スペクトルの波長はいずれも未補正の値である。

試薬および溶媒 Phthalaldehyde: 試薬特級, H₂SO₄: 試薬特級, EtOH: 特級 99.5% EtOH 1 liter に対して Na 約 10 g を加えて蒸留。

11H-Isoindolo[2,1-a]benzimidazole (I)^{3,4)} Phthalaldehyde 402 mg と *o*-phenylenediamine dihydrochloride 543 mg を熱湯 50 ml に溶かし, 蒸気浴上に 20 min 加熱後 10% Na₂CO₃ を加えて pH 8—9 とする。氷冷, 析出する沈殿を水洗後, 50% MeOH, benzene および EtOH から順次再結晶, mp 213° (文献値 210°³⁾, 215°⁴⁾), 針状晶 106 mg を得。Anal. Calcd. C₁₄H₁₀N₂: C, 81.53; H, 4.89; N, 13.58. Found: C, 81.38; H, 4.99; N, 13.44. TLC⁸⁾ (純品であることを確認するために行なったものであるが, 参考のために R_f 値の一例を示す。以下すべて同じ): R_f 0.90, NMR (τ)⁹⁾: 5.21 (2H, singlet, -CH₂-); 2.0—2.9 (8H, multiplet, benzene ring proton)。

2,2'-(1,3-Phenylene)di-1-isoindolinone (II) Phthalaldehyde 536 mg と *m*-phenylenediamine 216 mg を ether 40 ml に溶かし, 室温で 4 hr 反応。析出する沈殿を濾去し, 濾液を室温に 7 日間放置。析出する沈殿を ether で洗浄後 CHCl₃ 溶液として Al₂O₃ (Merck, standard 5 g) でクロマトグラフィーを行なう。CHCl₃ で展開して, はじめの流出液 20 ml から mp 247—249°, 粉末状晶 19 mg を得。Anal. Calcd. C₂₂H₁₆O₂N₂: C, 77.63; H, 4.74; O, 9.40; N, 8.23. Found: C, 77.53; H, 4.66; O, 9.07; N, 8.19. TLC: R_f 0.66. IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: $\nu_{\text{C=O}}$ 1689。

2,2'-(1,4-Phenylene)di-1-isoindolinone (III) Phthalaldehyde 536 mg と *p*-phenylenediamine 216 mg を ether 80 ml に溶かし, 室温で 4 hr 反応。析出する沈殿を ether および CHCl₃ 各 20 ml で洗浄後 N,N-dimethylacetamide から再結晶, mp >300°, 針状晶 60 mg を得。Anal. Calcd. C₂₂H₁₆O₂N₂: C, 77.63; H, 4.74; O, 9.40; N, 8.23. Found: C, 77.16; H, 4.85; O, 9.69; N, 8.06. TLC: R_f 0.45. IR $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ cm⁻¹: $\nu_{\text{C=O}}$ 1678。

謝辞 終わりに, 御鞭撻を賜った当研究所所長 武田健一博士ならびに水上 聡博士に厚く御礼申し上げます。また IR, NMR スペクトルの測定ならびに元素分析を担当された当研究所の諸氏に感謝します。

8) Al₂O₃ (Merck, Aluminium oxide G)—CHCl₃, 253.7 mμ の紫外線下で検出。以下 TLC はすべてこの方法による。

9) Varian A-60 型 Spectrometer (60 Mc) を使用, 溶媒は CDCl₃ を使用した。