

6. 西本行雄, 豊島昭二: キレート生成能を有する化合物の薄層クロマトグラフィーに関する研究(第7報<sup>\*1</sup>) イソニコチン酸ヒドラチド  
関連化合物およびそれらのヒドラゾン

Yukio Nishimoto and Shyoji Toyoshima: Studies on Thin-Layer Chromatography of the Compounds Carrying Chelating Ability. VII.<sup>\*1</sup>  
Isonicotinoyl hydrazide related Compounds  
and related Hydrazones.

(Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.)<sup>\*2</sup>

Compounds related to isonicotinic acid hydrazide and their hydrazones show tailing in thin-layer chromatography when using ordinary silica gel. It is considered that this tailing is due to formation of chelate compounds during development by reacting with trace metals in the adsorbent but since the stability of such metal chelates is far smaller than that of organic analytical reagents, this tailing is only weak. In order to prevent this tailing, adsorbent was treated with EDTA and a good result was obtained. Detection of these compounds after development is made by Fe(III)-2,2'-bipyridyl and by the citric acid reagent solution. Isonicotinic acid hydrazide was detected by the former reagent at above 0.5 µg. Examinations were also made on the separatory detection of related compounds.

(Received February 4, 1966)

抗結核剤として広く使用されているイソニコチン酸ヒドラチド (INH と略) およびその関連化合物は金属と反応してキレート化合物を生成することが報告されており,<sup>1-3)</sup> 抗結核剤としての作用の強さとキレート生成能との関連性も研究されている。<sup>4)</sup>

INH およびその代謝産物類のクロマトグラフィーによる分離確認法についてはペーパークロマトグラフ法で多数の報告があるが,<sup>5-8)</sup> Barreto および Sabino はテーリングを防止する目的で濾紙を EDTA・2Na で処理して好結果を得ているが<sup>9)</sup> 処理条件の詳細な検討はなされていない。またこれらの薄層クロマトグラフ (TLC と略) 法による系統的な分離確認法はいままでのところ報告されていない。著者は INH 関連化合物について通常のシリカゲルを用いる TLC を行なったところ若干のテーリングが観察されたが、これら化合物の TLC による迅速にかつ明確な分離確認法が確立されれば生化学方面への応用研究にも寄与するものと考えて著者等が多くのキレート生成能を有する化合物に適用したテーリングを防止する方法<sup>10)</sup> を INH 関連化合物に応用したところ良好な結果が得られたので報告する。

今回著者がとりあげた化合物は Table I に示す 13 種の INH 関連化合物と代謝産物、および Table II に示す 21 種のヒドラゾン類の計 34 種類で、そのほとんどが通常のシリカゲルを用いる TLC では各種溶媒系で展開しても若干のテーリングが観察される。その原因はこれらと吸着剤とを混合するとき観察される pH 低下およ

\*1 第6報: 本誌, 86, 1120 (1966).

\*2 Koishikawa, Bunkyo-ku, Tokyo.

1) Z. Tamura, K. Nagano: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 11, 793 (1963).

2) *Idem.*, *Ibid.*, 11, 999 (1963).

3) A. Albert: Experimentia, 9, 370 (1953).

4) *Idem.*: Nature, 177, 525 (1956).

5) K. Makino, T. Ishikawa, T. Itoh: *Ibid.*, 173, 36 (1954).

6) A. Defranceschi V. Zembom: Biochim. Biophys. Acta, 13, 304 (1954).

7) R.C.R. Barreto: J. Chromatogr., 7, 82 (1962).

8) *Idem.*: *Ibid.*, 9, 180 (1962).

9) *Idem.*: *Ibid.*, 11, 344 (1963).

10) 豊島, 西本: 本誌, 85, 235 (1965).

び INH 類と金属との反応性<sup>1-4)</sup>より、展開中に吸着剤中の微量金属と反応してキレート化合物を生成したために表われた現象と推定することができる。しかしながらそのキレート化合物の安定性があまり大きくないためにテーリングが顕著ではなかったものと考えられる。

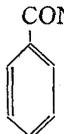
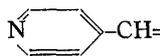
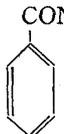
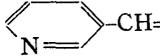
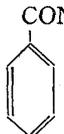
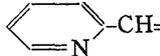
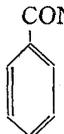
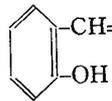
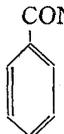
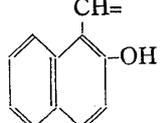
また対照として同様に試験したイソニコチン酸アミド、ニコチン酸アミドはまったくテーリングを示さなかった。

そこでこの現象を防止してまとまりのよいスポットを得る目的で EDTA・2Na 処理せるシリカゲル薄層<sup>10)</sup>を用い分離条件および検出方法などを検討した。展開溶媒には有機溶媒各種の組合わせおよびそれらの含水系、酸性およびアルカリ性溶媒系など種々検討したが含水系がスポットのまとまり、移動性より適当であり (Fig. 1), 酸性およびアルカリ性溶媒系では若干のテーリングが残った。また含水系でも n-ブタノール、2-プロパノールのように粘度の高いアルコール類を使用するとスポットのまとまりが悪くなる傾向を示した。

TABLE I. Isonicotinoyl hydrazide and related Compounds

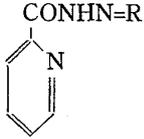
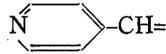
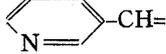
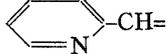
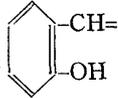
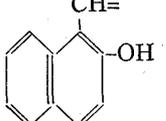
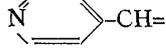
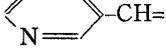
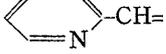
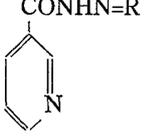
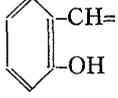
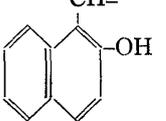
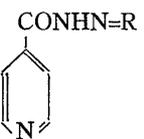
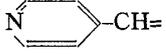
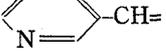
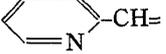
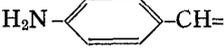
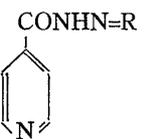
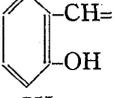
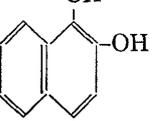
No.	Name	m.p. (°C)
1	Isonicotinic acid hydrazide (INH)	
2	Nicotinic acid hydrazide (NH)	
3	Picolinic acid hydrazide (PH)	
4	Benzoic acid hydrazide (BH)	
5	Acetyl isonicotinyl hydrazone <sup>11)</sup>	163.5~165.5
6	Acetone isonicotinyl hydrazone <sup>12)</sup>	161.0~162.5
7	Acetylacetone isonicotinyl hydrazone <sup>12)</sup>	135 ~137.5
8	(D-glucose) isonicotinyl hydrazone <sup>13)</sup>	162 ~163 (decomp.)
9	(1-carboxy-1-hydroxyethyl) isonicotinyl hydrazone <sup>13)</sup>	209 ~209.5 (decomp.)
10	( $\alpha$ -ketoglutaric) isonicotinyl hydrazone <sup>11)</sup>	177 ~179 (decomp.)
11	Diisonicotinyl hydrazide <sup>13)</sup>	261 ~262.5
12	Isonicotinoyl semicarbazide <sup>14)</sup>	229 ~230 (decomp.)
13	Isonicotinoyl thiosemicarbazide <sup>15)</sup>	276.5~278

TABLE II. Hydrazones

No.	Structure	R	m.p. (°C)	Analysis (%)			
				C	H	O	
14			208.5~210	Calcd.	69.32	4.92	18.66
				Found	69.10	4.93	18.62
15			190.5~192	Calcd.	69.32	4.92	18.66
				Found	69.30	4.06	18.46
16			105.5~108	Calcd.	69.32	4.92	18.66
				Found	69.60	4.99	18.77
17			184.5~185.5	Calcd.	69.99	5.03	11.66
				Found	70.09	4.89	11.64
18			217 ~219.5	Calcd.	74.47	4.86	9.65
				Found	74.27	4.78	9.51

11) V. A. Greulach, J. G. Hacsloop: Anal.Chem., **23**, 1446(1961).12) 大熊: 本誌, **75**, 1724 (1955).13) W. Diller, E. Kruger-Thierner, E. Wempe: Arzneimittel-Forsch., **9**, 432 (1959).14) H. L. Yale, K. Losse, J. Martius, et al.: J. Am. Chem. Soc., **75**, 1933 (1953).

15) J. Bernstein: U.S., 2753352 (1956).

19			198 ~200				16)				
20			174 ~175				16)				
21			159 ~160.5					16)			
22			178.5~181	Calcd.	64.72	4.60	17.42	Found	64.92	4.50	17.38
23			195 ~197	Calcd.	70.09	4.50	14.42	Found	69.89	4.37	14.47
24			202.5~205.5								16)
25			213.5~215								16)
26			159.5~162								16)
27			189 ~191	Calcd.	64.72	4.60	17.42	Found	64.98	4.64	17.29
28			252.5~253 (decomp.)	Calcd.	70.09	4.50	14.42	Found	70.04	4.56	14.43
29			237 ~239								16,17)
30			239.5~241								16,17)
31			171.5~173								16,17)
32			251 ~253 (decomp.)								18)
33			246.5~249 (decomp.)								19)
34			263 ~265 (decomp.)	Calcd.	70.09	4.50	17.42	Found	70.04	4.51	17.37

またヒドラゾン類では Rf 値の傾向はベンゾイル系>ピコリノイル系>ニコチノイル系≧イソニコチノイル系の順であり、各系内ではともにアルデヒド部分がナフチル>サリチル≫2-ピリジル≫3-ピリジル>4-ピリジルの順であった (Fig. 2).

さらにこれらの検出方法を INH 関連化合物と代謝産物 (Table I) について検討したが、これらのクロマトグ

16) H. C. Byerman, J. S. Bontekoe, W. J. van. der Burg, W.L.C. Veer: *Rec. trav. Chim.*, **73**, 109 (1954) (C.A., **49**, 3959).

17) H. H. Fox: *J. Org. Chem.*, **17**, 555 (1952).

18) S. Kakimoto, K. Yamamoto: *Chem. Pharm. Bull. (Japan)*, **4**, 5 (1956).

19) D. D. Libman, *et al.*: *J. Chem. Soc.*, **1956**, 2253.

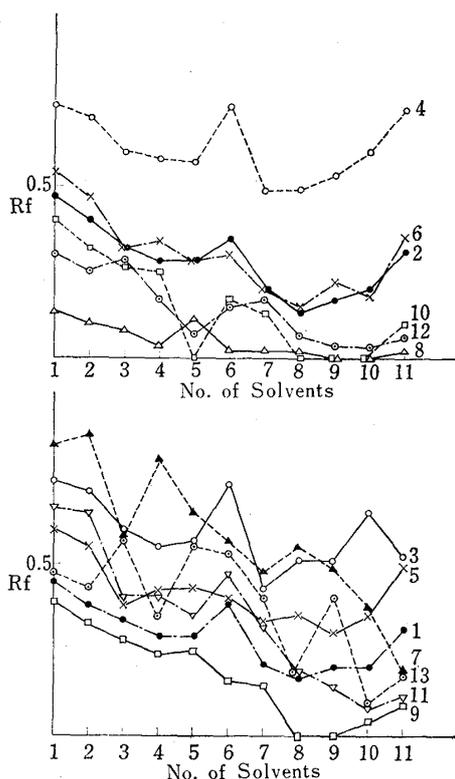


Fig. 1. Rf Values of Isonicotinoyl hydrazide and related Compounds on Layer of Silica gel, treated with 0.1MEDTA.2Na

solvent system :

1.  $\text{CHCl}_3$ -EtOH- $\text{H}_2\text{O}$  (80 : 60 : 10)
2.  $\text{CHCl}_3$ -EtOH- $\text{H}_2\text{O}$  (80 : 65 : 5)
3.  $\text{CHCl}_3$ -2PrOH- $\text{H}_2\text{O}$  (80 : 65 : 5)
4. EtOAc-EtOH- $\text{H}_2\text{O}$  (80 : 65 : 5)
5. EtOAc-EtOH (1 : 1)
6. EtOAc-acetone- $\text{H}_2\text{O}$  (90 : 90 : 10)

7.  $\text{CHCl}_3$ -*n*-BuOH (1 : 1)- $\text{H}_2\text{O}$  saturated
8. EtOH-ether (1 : 1)
9. ether-acetone (1 : 2)
10.  $\text{CHCl}_3$ -acetone (1 : 1)- $\text{H}_2\text{O}$  saturated
11. iso-AmOH- $\text{H}_2\text{O}$  saturated

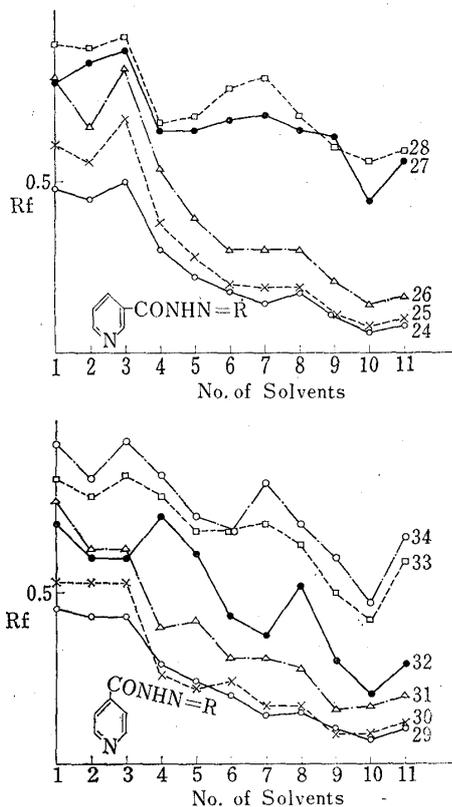


Fig. 2. Rf Values of Hydrazones on Layer of Silica gel, treated with 0.1MEDTA.2Na.

ラム上での検出方法には従来ヒドラチド類の還元作用の利用, ピリジン環の反応の利用などがあり, いずれも広く用いられているが, よく使用されている Greulach-Haesloop 法<sup>20)</sup>は EDTA.2Na 処理せる薄層ではまったく効果はなかった. これはこれらにより還元された 2 価の鉄が EDTA.2Na と反応してフェロシアン化カリウムと反応しなくなることを意味する. そこで同じ型の反応でしかも生成せる 2 価の鉄と強い反応性を有する 2,2'-dipyridyl を使用したところ EDTA.2Na 処理の薄層でも有効であった. 各種呈色法によるこれらの反応性をまとめて Table

TABLE III. Color Reaction

Reag.	Comp.												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
UV			(Bl)								(Y-Bl)		(Bl)
BrCN-UV	Bl	Y-Bl	(Bl)		Bl	Bl	(Bl)				(Y-Bl)		Bl
Citric	Br	Br			Br	Br	Br	Br	Br	Br	Br	Br	Br
Greulach-Haesloop	Bl	Bl	Bl	Bl	(Bl)	Bl	Bl	Bl	Bl	Bl	(Bl)	Bl	Bl
$\text{FeCl}_3$ -dipyridyl	R	R	R	R	(R)	R	R	R	R	R	(R)	R	R
DNFB	V-R	V-R	V-R		V-R	V-R	V-R	V-R	V-R	V-R	V-R	V-R	V-R

Bl : blue Br : brown Y : yellow R : red O : orange V : violet (Bl) : pale blue

20) B. Bhaffacha : Ind. Pharm., 24, 292 (1962) (C.A., 58, 11325).

III に示す。

またヒドラゾン類 (Table II) はアルデヒド部分がナフチル、サリチルおよび *o*-アミノベンゾイルのものは紫外線ランプ (3650Å) および鉄 (III)-2,2'-dipyridyl 反応に陽性であったが、他は陰性でありクエン酸試液<sup>21)</sup> のみがこれらすべての検出に有効であった。したがってこれらの検出はクエン酸試液を用いた。

また各呈色法における検出限度を INH を用いて測定したところ Table IV に示すように BrCN-紫外線ランプ (3650Å) 法および鉄 (III)-2,2'-dipyridyl 法がともに 0.5 μg. 以上でもっとも高い感度を示したが、迅速性・簡便性より後者がすぐれた方法であった。

TABLE IV. Limit of Detection of Isonicotinoyl hydrazid on Layer of EDTA. 2Na-treated Silicagel

Reagent and Method of Detection	μg.	Reagent and Method of Detection	μg.
UV	—	Greulach-Haesloop	—
BrCN-UV	0.5	FeCl <sub>3</sub> -2,2'-Dipyridyl	0.5
Citric acid	3~5	DNFB	

一方、INH 関連化合物と代謝産物 (Table I) は Fig. 1 からわかるように完全な相互分離は困難であったが、Fig. 3 に示すように1次元方向にクロロホルム-エタノール-水 (80 : 65 : 5) 系を、2次元方向に酢酸エチル-アセトン-水 (90 : 10 : 10) 系を用いて行なう2次元展開法が検討せる溶媒系ではもっとも分離性が良好であった。しかしこの方法でも9と10との相互分離は完全でなかった。

以上のようにここにとりあげた34種の化合物が通常のTLCで示す若干のテーリングは吸着剤のEDTA・2Na処理により防止されそれぞれ明瞭なスポットとして展開することができた。また展開後Table Iに示した化合物は鉄(III)-2,2'-dipyridyl法で0.5 μg以上の感度で検出することができたが、Table IIに示した化合物はクエン酸試液を用いる検出法が適当であった。なおINHとその代謝物類 (Table I) の相互分離もほぼ行なうことができた。

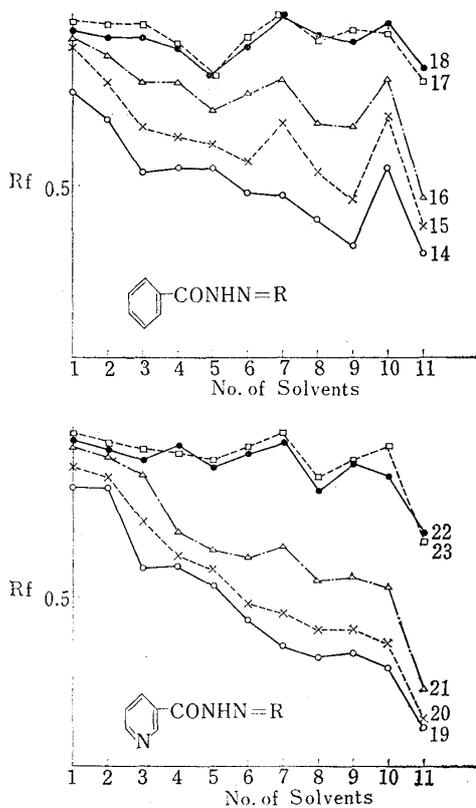


Fig. 2'

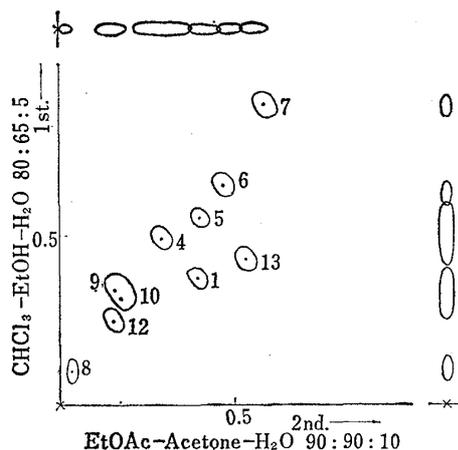


Fig. 3. Chromatographic Separation of Isonicotinoyl hydrazid and related Compounds by two dimensional developing Method on Layer of EDTA. 2Na treated Silicagel

Colore reagent : FeCl<sub>3</sub>-2,2'-dipyridyl

21) Merck Index. VII,577 (Hart, *et al.* : Antibiotics & Chemotherapy, 4, 803 (1954)).

実 験 の 部<sup>\*3</sup>

(1) 試料・試液および装置 試料：1~4 は市販特級品を用い，5~13 はそれぞれ文献記載の方法<sup>11~15</sup>) にしたがって合成した (Table I). またヒドラゾン類は 19~21, 24~26, 29~33 は文献記載<sup>16~19</sup>) の方法にしたがい合成し，他はそれぞれ相当するヒドラチドとアルデヒドの等モル量を EtOH 中で 30 min. 加温し，後水を加えて冷却後析出結晶を EtOH-H<sub>2</sub>O より再結晶した (Table II).

これらを EtOH または水に溶かして 0.1% の濃度とし，その 0.01 ml. (10 μg.) を使用した。

試薬および装置：シアン化臭素試液；氷冷 10% KCN 水溶液に攪拌下臭素の色が完全に消えるまで臭素水を滴加する。氷冷下保存する。クエン酸試液<sup>21</sup>)；特級クエン酸 2 g. を加熱下無水酢酸に溶かして 100 ml. とする。Greulach-Haesloop 試液<sup>20</sup>)；特級 FeCl<sub>3</sub>-6H<sub>2</sub>O の 1.0% 水溶液と特級 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> の 1.0% 水溶液の等容量を混合する。用時調製。FeCl<sub>3</sub>-2,2'-dipyridyl 試液；特級 FeCl<sub>3</sub>-6H<sub>2</sub>O の 0.2% EtOH 溶液と特級 2,2'-dipyridyl の 0.5% EtOH 溶液の等容量を混合する。用時調製。褐色びんに貯える。

DNFB 試液；特級 2,4-dinitrofluorobenzene の 0.1% MeOH 溶液。

その他有機溶媒類はすべて市販特級品をそのまま使用し，水，シリカゲル (E. Merck 社品)，薄層，展開槽などはすべて前報<sup>\*1</sup>と同様の方法で調製，使用した。

(2) INH とその関連化合物およびそれらのヒドラゾンの TLC すべて前報<sup>\*1</sup>と同様に操作して展開し，完全に乾燥後それぞれ検出してスポットの状態を観察し，R<sub>f</sub> 値を記録した。

(3) 検出方法の検討 (2) に準じて展開後つぎの方法で検出し，それぞれの呈色を観察した。

UV 法；3650 Å の紫外線ランプを使用。

BrCN 法；マイヤーに入れた BrCN 試液を密閉容器に入れ，これに展開後の薄層を室温で 1 hr. 放置して呈色を観察し，さらに 3650 Å の紫外線ランプで蛍光を観察した。クエン酸法；クエン酸試液をスプレー後 80~90°C で 10 min. 加熱した。Greulach-Haesloop 法；Greulach-Haesloop 試液をスプレーした。FeCl<sub>3</sub>-2,2'-dipyridyl 法；FeCl<sub>3</sub>-2,2'-dipyridyl 試液をスプレーした。DNFB 法；DNFB 試液をスプレー後 80~90° で 10 min. 加熱した。

(4) INH の各検出法による検出限度 INH の 0.5~10 μg. (0.01 ml. 中に含むように調製) を (2) に準じて展開後，各方法でスポットの有無を検討した。

(5) INH とその関連化合物の 2 次元法による分離 1, 5~10 および 12, 13 の 10 種の試料各 10 μg. を含む試料液 (0.01 ml.) を薄層の互いに直交する 2 辺から 2 cm. の点にスポットし，1 次元方向に CHCl<sub>3</sub>-EtOH-H<sub>2</sub>O (80 : 65 : 5) で 10 cm. 展開し，完全に乾燥後 2 次元方向に EtOAc-Acetone-H<sub>2</sub>O (90 : 90 : 10) で 10 cm. 展開し乾燥後 FeCl<sub>3</sub>-2,2'-dipyridyl 試液をスプレーしてスポットの位置を測定した。

本研究に当たり終始御指導をいただき，かつ原稿の御校閲をいただいた京都大学薬学部教授 田中久博士に，種々御示唆をいただいた同大学助教授 横山陽博士に厚く感謝いたします。また発表の機会を与えられた内藤豊次社長，研究部門長 田辺普博士，古内正敏試製所長，赤外吸収スペクトルおよび元素分析を測定された当研究所坂口健哉，平塚仙次，江間起一の諸氏に感謝します。

エーザイ株式会社研究所

\*3 融点はすべて未補正。