

化学結合型—逆相—高性能薄層クロマトグラフ法による分配係数の新測定法^{1,2)}窪田種一^{a)}, 加納健司^{a)}, 川田恵理子^{a,b)}, 橋爪博隆^{a,c)}, 宇野文二^{a)}

岐薬紀要 (1987) 36 : 32-41

要約: 化学結合型—逆相—高性能薄層クロマトグラフ法を用いて, フェノール類および安息酸類 (1群), 塩基性の弱い芳香族アミン類 (2群), それ以外の芳香族アミン類 (3群), および酸解離不活性な置換基だけを有する芳香族化合物 (4群) の疎水性パラメーター R_M を測定した。固定相には *n*-オクチルシリル化シリカ (Merck HPTLC RP-8 F254S), 移動相としては通常50% (v/v) エタノール—水混合溶媒を用いた。 R_M 値は移動相の水成分の pH やイオン強度には依存しなかった。上記化合物の R_M は各化合物群ごとで, 1-オクタノール—水系でのフラスコ振盪法で求めた分配係数指数 $\log P$ と高い相関を有することがわかった。その相関における傾きはほぼ同じであったが, 切片は化合物群に依存していた。そこで置換基の種類 (化合物群) に依存した3つの指示変数を導入して, すべての化合物に対して, R_M と $\log P$ の間の良好な直線関係を得た。構造活性相間の研究における R_M 値の有用性についても考察した。

索引用語: 化学結合型—逆相—高性能薄層クロマトグラフ法, 分配係数, 構造活性相関, フェノール類, 安息香酸類, 芳香族アミン類

New Method for Determining True Partition Coefficients by the Technique of Chemically Modified Reversed-Phase High-Performance Thin-Layer Chromatography

TANEKAZU KUBOTA^{a)}, KENJI KANO^{a)}, ERIKO KAWATA^{a,b)},
HAKUTAKA HASHIZUME^{a,c)}, and BUNJI UNO^{a)}

Ann. Proc. Gifu Pharm. Univ. (1987) 39 : 32-41

Abstract: The hydrophobic parameter R_M values for phenol- and benzoic acid derivatives (group 1),

- a) 岐阜薬科大学薬品分析化学教室
岐阜市三田洞東5丁目6-1
- b) 現在: 株式会社日科機研究所, 東京都江戸川区
- c) 現在: 国立名古屋病院薬剤部, 名古屋市中区
- a) Department of Pharmaceutical Analytical Chemistry, Gifu Pharmaceutical University, 6-1 Mitahora-higashi 5 chome, Gifu 502
- b) Present address: Research Laboratory of Nikkaki Co. Ltd., Tokyo
- c) Present address: Department of Phamaceutics, National Nagoya Hospital, Nagoya

Received February 28, 1987
The Annual Proceedings of Gifu
Pharmaceutical University,
ISSN 0434-0094, CODEN: GYDKA 9

aromatic amine derivatives with weak basicity (group 2), the other aromatic amine derivatives (group 3), and aromatic compounds having no dissociation active center (group 4) were determined using a chemically modified reversed-phase high-performance thin-layer chromatography. Octylsilylated silicagel plate (Merck HPTLC RP-8 F_{254S}) and 50% (v/v) aqueous ethanol were usually served as stationary and mobile phases, respectively. The R_M values thus obtained were independent of the pH and the ionic strength of the aqueous component in the mobile phase. Also, the R_M values were correlated significantly to the $\log P$ values for compounds in each group mentioned above (P : partition coefficient determined by shake-flask method on 1-octanol-water system). Although the slopes of the regression equations are almost independent of the chemical structures without regard to the said classification of samples, the intercepts at the ordinate depend on the groups. However, a good correlation between R_M and $\log P$ of all the substances used here was obtained by introducing the three indicator variables representing the characteristics of structures pertaining to each group. The utility of R_M values in the study of structure-activity relationship has discussed.

Keyphrases : chemically modified reversed-phase high-performance thin-layer chromatography, partition coefficient, structure-activity relationship, phenol derivatives, benzoic acid derivatives, aromatic amine derivatives

構造活性相関 (SAR) の研究において薬物の分配係数 (P) は、非常に重要な物理定数のひとつである。³⁻⁵⁾ この P 値は、通常、1-オクタノール-水系でフラスコ振盪法により測定されるが、^{1,6-7)} 近年、これに代わる迅速かつ正確な測定法に興味を持たれている。特に、逆相の高速液体クロマトグラフ法 (RP-HPLC) や逆相薄層クロマトグラフ法 (RP-TLC) が提案されている。^{8,9)} RP-TLC 法は、非常に簡便かつ安価であるが、その再現性は必ずしも良好とは言えず、かつ、固定相への吸着の影響が現れ易いことに注意しなければならない。¹⁰⁾ 最近、化学結合型-逆相-高性能薄層クロマトグラフィー (RP-HPTLC) が開発され、普及しつつある。¹¹⁾ これは、再現性に優れ、溶質の移動は主に分配機構で支配されていると考えられている。そこで本研究においては、RP-HPTLC を用いた P 値の新測定法を検討した。

理論の部

分配系が支配的な薄層クロマトグラフィーの試料の見かけの移動比 ($R_{f,a}$) は(1)式で与えられる。¹²⁾

$$R_{f,a} = A_m / (A_m + P_a A_s) \quad (1)$$

ここで P_a は見かけの分配係数で固定相 (s) 中の濃度の移動相 (m) 中の濃度に対する見かけの比である。 A_m , A_s はそれぞれ移動相, 固定相の断面積である。いま、この系の疎水性パラメーター $R_{M,a}$ を(2)式のように定義すると¹³⁾ (3)式が得られる。¹⁴⁾

$$R_{M,a} = \log(1/R_{f,a} - 1) \quad (2)$$

$$R_{M,a} = \log P_a + C \quad (3)$$

ここで $C = \log(A_s/A_m)$ で、一連の実験系で定数とおけるので、 $R_{M,a}$ は $\log P_a$ に比例する量となる。一方、試

料がイオン解離平衡を伴う場合、 P_a は水相の pH の関数となる。例えば、Chart 1 のように中性分子種 AH とその共役イオン種 A^- が移動相（水相）と固定相（有機相）に分配する場合、 P_a は(4)式で表される。^{1,7d)}

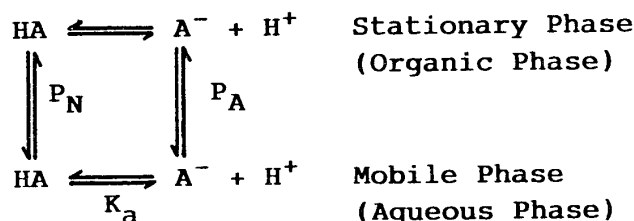


Chart 1

$$P_a = (P_N + P_A 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}) / (1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}) \quad (4)$$

ここで、 $F_a = ([\text{AH}]_s + [\text{A}^-]_s) / ([\text{AH}]_m + [\text{A}^-]_m)$, $P_N = [\text{AH}]_s / [\text{AH}]_m$ (AH の真の分配定数), $P_A = [\text{A}^-]_s / [\text{A}^-]_m$ (A^- の真の分配係数) である。ただし、 $[\text{AH}]$, $[\text{A}^-]$ は固定相または移動相中の各濃度を表す。従って、 $R_{M,a}$ は、

$$R_{M,a} = \log[P_N + P_A 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}] - \log[1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}] + C \quad (5)$$

となる。^{1,7d)} A^- が固定相に移行しない場合は、(4), (5)式で $P_A = 0$ と置けば良い。^{1,7,15)} いずれにしても、こうしたイオン解離平衡を伴う場合は、理論的には $R_{M,a}$ は pH の関数となることが期待される。二塩基酸、二酸塩基、ツッピッターイオンのような複雑なイオン解離平衡を伴う場合にも同様にして P_a および $R_{M,a}$ を pH の関数で書き表すことができるが、^{1,7)} ここでは省略する。

実験の部

試料としては、Table 3 に示したように、1-オクタノール-水系での分配係数 $\log P$ 値が報告されている芳香族化合物を使用した。そしてこれらは市販品をそのまま用いた。Table 3 にはこれらの $\log P$ 値の文献値¹⁶⁾も示した。以後これらの化合物名は Table 3 に示した数字で示す。固定相として、Merck 社製 HPTLC RP-8 F254S プレートを用いた。これは親油性固定相として粒子径が小さく粒径分布の狭い *n*-オクチルシリル化シリカを使用したもので、1-オクタノールに類似している。試料の移動は分配モードが支配的と考えられる。各試料の $1 \sim 2 \text{ mg ml}^{-1}$ アセトン溶液を、このプレートに $1 \mu\text{l}$ スポットした。円筒型展開槽（内径 7cm, 高さ 29cm）の内壁を濾紙で覆い、 $25.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ の恒温槽中に 2 時間保ち、展開溶媒（移動相）の蒸気を飽和させた後、試料をスポットした HPTLC プレートをこの飽和蒸気圧下にさらに 1 時間保持した。その後 HPTLC プレート下端を展開溶媒に浸し、垂直展開法により展開した。移動相としては、通常、体積比でそれぞれ 50% のエタノール-0.1M HCl 混液または 50% エタノール-0.1M 炭酸緩衝液 (0.1M $\text{Na}_2\text{CO}_3 + 0.045\text{M HCl}$, pH=10) の混合溶媒を用いた（以後、M は mol dm^{-3} を意味するものとする）。水系のイオン強度 (I_{aq}) は NaCl で 0.5 に調整した。プレート上の溶質は、紫外ランプで検出した。疎水性パラメーター R_M は(2)式より求めた（以後、 $R_{M,a}$ は R_M と記述する）。

結果と考察

フェノール類または安息香酸類 12, 19, 20, 23, 25 および 26 についてその R_M 値に及ぼす移動相中のエタノール濃度 (C_{EtOH}) の影響について検討した。この実験においては上記化合物の酸解離を抑制するため、移動相の水系成分として 0.1M HCl-0.4M NaCl を用いた。これらの化合物の R_M 値は、Fig. 1 に示したように、 C_{EtOH} の増加と

共に少なくとも 50% (v/v) まではほぼ直線的に減少し， C_{EtOH} をより増加させると，漸近的にある一定値に近づいた。この場合，展開時間は C_{EtOH} の減少と共に長くなり， C_{EtOH} が 30% (v/v) 以下では，HPTLC 表面の疎水性のため展開できなかった。こうした R_M 値に対する移動相中の有機溶媒濃度の効果は，他の研究者によっても報告されている。^{8,17-20} この現象は，移動相中の有機溶媒濃度の増加により（中性分子の） $\log P$ が減少することを考えあわせ，分配機構に基づいてよく説明できる（(3)式）。¹⁴ 実際の使用上の問題から，すなわち展開時間や化合物間の R_M の差の大きさから考えて， C_{EtOH} は 50% (v/v) とした。

次に，フェノール類，安息香酸類，および芳香族アミン類について，その R_M 値に及ぼす移動相中の水系成分の pH の影響について検討した。この実験では移動相中の水系成分として，0.1M HCl-0.4M NaCl (pH \sim 1)，0.5M NaCl 水溶液（非緩衝液），0.1M 炭酸緩衝液 (pH=10, I_{aq} は NaCl にて 0.5 に調整)，および 0.1M NaOH-0.4M NaCl (pH \sim 13) を用いた。Table 1 に得られた結果の一部を示す。用いた化合物は，酸性側またはアルカリ性側でプロトン付加または解離が期待されるにもかかわらず，理論の部で述べた予期（例えば(5)式参照）に反して，それらの R_M 値は実験誤差範囲内で，移動中の水系成分の pH に依存せず一致した。固定相としてシリコンオイル被覆シリカゲル^{18a,c} または 1-オクタノール被覆セルロース¹⁵ を用いた場合，ペニシリン誘導体の R_M に関しては移動相の pH に依存することが報告されている。しかし，その pH 依存性は理論的に予期される変化量よりかなり小さいものである。この理由として Bird と Marshall¹⁵ は，TLC プレート上における実効 pH が母液移動相の pH と異なることや，固定相でのイオンペア形成を指摘している。また Buchi と Fresen²¹ はナトリウムイオンがシリカゲルのプロトンとイオン交換することを指摘している。我々の用いた HPTLC のシリカ表面も，完全に化学修飾されているとは考えられないので，²² 上記の可能性は残る。更に今の場合 50% (v/v) のエタノールが展開溶媒に含まれていることにより酸・塩基の性質が弱められていることも一つの原因と思われる。²³ 一方，フェノール類および安息香酸類について，その R_M 値に及ぼす移動相中の水系成分の I_{aq} の影響についても検討した。この場合，移動相中の水系成分として，蒸留水または NaCl 非緩衝溶液で $I_{aq}=0\sim 0.8$ としたものをを用いた。その結果の一部を Table 2 に示した。 R_M 値に対する I_{aq} の明確な影響は観測されなかった。以上の結果をもとに，以後は特に断わらない限り，移動相としてエタノールと 0.4mol の NaCl を含む 0.1M HCl 水溶液の 1:1 混液を用いた。この条件下で測定した R_M の標準偏差は通常 0.01 \sim 0.04 であった。

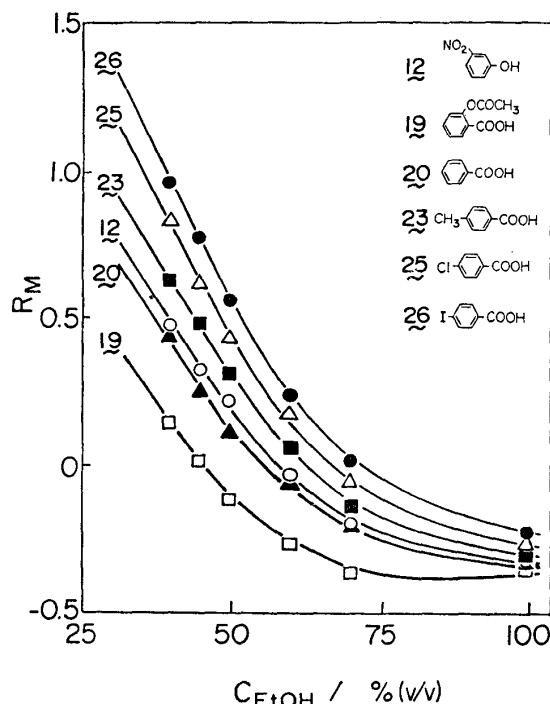


Fig. 1 Effect of ethanol concentration (C_{EtOH}) in the mobile phase on R_M .
0.1M HCl-0.4M NaCl was used as an aqueous component in the mobile phase.

Table 1 Effect of pH of an aqueous component in the mobile phase^{a)} on R_M

No	Compound	R_M			
		pH \approx 1	Unbuffer	pH=10	pH \approx 13
4	<i>p</i> -Hydroquinone	-0.4699	-0.4857	-0.4180	—
7	<i>o</i> -Hydroquinone	-0.1892	-0.2123	-0.2139	—
15	2-Isopropylphenol	0.6500	0.6636	0.6307	—
21	4-Methoxybenzoic acid	0.1097	0.0987	0.1044	—
24	3-Methylbenzoic acid	0.3211	0.3010	0.3097	—
27	4-Aminobenzamide	-0.6159	—	-0.5502	-0.6544
29	Benzamide	-0.2197	—	-0.2308	-0.2403
34	3-Methoxyaniline	-0.4825	—	-0.4164	-0.4638
35	2-Methoxyaniline	-0.4377	—	-0.4702	-0.4342
36	Benzylamine	-0.0332	—	-0.0523	-0.0580

a) Mobile phase is 50% (v/v) aqueous ethanol with the ionic strength of 0.5 by adding NaCl.

Table 2 Effect of the ionic strength of an aqueous component in the mobile phase^{a)} on R_M

No	Compound	R_M			
		$I_{aq}=0$	$I_{aq}=0.2$	$I_{aq}=0.5$	$I_{aq}=0.8$
9	4-Methoxyphenol	-0.0803	-0.0822	-0.0332	-0.0524
12	3-Nitrophenol	0.1792	0.1913	0.2180	0.1980
20	Benzoic acid	0.1263	0.1440	0.1886	0.1347
21	4-Methoxybenzoic acid	0.1201	0.1254	0.0987	0.1258
23	4-Methylbenzoic acid	0.2954	0.3160	0.3558	0.2923
24	3-Methylbenzoic acid	0.3321	0.3336	0.3010	0.2988
25	4-Chlorobenzoic acid	0.4419	0.4771	0.5042	0.4464

a) Mobile phase consists of 50% (v/v) ethanol and 50% water, the latter water component being adjusted to the ionic strength of 0~0.8 by adding NaCl.

R_M 値と $\log P$ の関係

フェノール類および安息香酸類：種々の置換基を有する18個のフェノール類 (1-17, 22) についてその R_M 値を測定した。これらは、(6)式のように、オクタノール-水系でフラスコ振盪法により測定された $\log P$ 値と高い相関が得られた。

$$R_M = 0.4550 \log P - 0.7103 \quad (r=0.9897, s=0.0643, n=18) \quad (6)$$

ここで r , s , および n は各々相関係数, 標準偏差およびサンプル数である。Butte ら²⁰⁾は先に, 酸解離不活性置換基だけを有するフェノール類 ($\log P=1\sim 5$ のもの) について, RP-18 HPTLC を用いてその疎水性パラメーター (R_M^0 ; 後述) と $\log P$ との間に相関 ($r=0.8345, n=20$) が得られることを報告している。我々の用いた試料には, カルボキシル基やアミノ基を有するフェノール類 (1-3, 5, 6, 8, 17, 22) も含まれていることに注目したい。一方, フェノール性水酸基やアミノ基をも含めた種々の置換基を有する10個の安息香酸類 (17-26) についても(7)式のように, その $\log P$ 値と良い相関が得られた。

$$R_M = 0.4046 \log P - 0.6486 \quad (r = 0.9886, s = 0.0447, n = 10) \quad (7)$$

ここで、(6)式と(7)式の回帰式の傾きと切片はほぼ同じ程度である。結果として、フェノール類および安息香酸類全体について、つぎの回帰式が得られた。

$$R_M = 0.4443 \log P - 0.7106 \quad (r = 0.9867, s = 0.0678, n = 26) \quad (8)$$

(6)~(8)の回帰式でその傾きが(3)式の理論値 1 より小さいのは、 R_M 値の測定においては、移動相に 50% (v/v) エタノールが含まれていることによると考えられる。Biagi ら¹⁸⁾は移動相が100%水系である場合の R_M 値として R_M^0 を導入した。これは、種々の濃度の有機溶媒を含む移動相を用いて R_M を測定し、それを有機溶媒濃度ゼロに外挿した値である。そこで我々は、フェノールおよび安息香酸類 **12**, **19**, **20**, **23**, **25** および **26** について、Fig. 1 の $C_{EtOH} = 40 \sim 50\%$ (v/v) の領域での、 R_M と C_{EtOH} の直線関係を $C_{EtOH} = 0$ に外挿して R_M^0 を求めた。この R_M^0 値は、(9)式に示したように、 $\log P$ と非常に高い相関が認められる。

$$R_M^0 = 0.8550 \log P - 0.0407 \quad (r = 0.9991, s = 0.0245, n = 6) \quad (9)$$

そしてこの傾きは、1 に近い値となっていることに注目したい。この結果は、HPTLC プレート上での試料の移動が、主に分配機構によって支配されていることを支持すると共に、*n*-オクチルシリル化シリカ相はフラスコ振盪法における 1-オクタノールと類似の役割を果たしていることを示している。 R_M^0 だけでなく Fig. 1 に見られる $C_{EtOH} = 40 \sim 70\%$ (v/v) での R_M も各々 $\log P$ と良い相関が得られた。しかしある特定の C_{EtOH} における R_M と $\log P$ の相関を考える場合には、安全のためにその C_{EtOH} は Fig. 1 で R_M と C_{EtOH} が直線関係を保っている領域に設定することが望ましいと思われる。本実験における $C_{EtOH} = 50\%$ (v/v) はこの条件を満たしている。

芳香族アミン類：結果と考察の部の初めに述べたように、この実験系では、酸解離平衡が期待される化合物でも、その R_M 値は誤差範囲内で移動相の水成分の pH に依存しない。この性質は、フェノール性水酸基やカルボキシル基を合わせ持つ芳香族アミン類 (**1-3**, **5**, **6**, **17**, **18**) のような両性化合物の R_M の測定 (またはそれによる $\log P$ の評価) には非常に都合が良い。実際、先にも述べたようにこれらの化合物の R_M 値は、移動相に 50% (v/v) エタノール-0.1M HCl-0.4M NaCl を用いた場合でも(8)式で良く表現できる。しかし、他のアミン誘導体については、安全の為、そのアミノ基へのプロトン付加を抑制することを目的とし、移動相の水成分として 0.1M 炭酸緩衝液 (pH = 10) を用いた。これらフェノール性水酸基やカルボキシル基を合わせ持たないアミン誘導体の R_M もまた、その $\log P$ と直線関係を示した。しかしこの場合、アミノ基の塩基性に依存して、その相関様式は 2 つのグループに分かれた。これまでに $\log P$ に対する電子状態、特に共鳴効果の寄与が種々論じられてきた。²⁴⁾ 今の場合も置換基の π 電子の効果の差異が R_M に対して違った役割を演じることになったと考えられる。第 1 のグループ (グループ A : **27-32**) は構造化学的にみて、試料分子中に共役している $>C=O$ または NO_2 を有する芳香族アミン類で、その塩基性は比較的弱いもので、次のような回帰式が得られた。

$$R_M = 0.3734 \log P - 0.4971 \quad (r = 0.9694, s = 0.0672, n = 6) \quad (10)$$

第 2 のグループ (グループ B : **33-39**) はその塩基性は通常またはそれよりも強いもので、次のような関係が得られた。

$$R_M = 0.4336 \log P - 0.8793 \quad (r = 0.9752, s = 0.0601, n = 7) \quad (11)$$

このように(10)式と(11)式ではその切片は異なるが、傾きはお互いにはほぼ似た値を示す。更に、(11)式と(8)式の傾きが殆ど一致していることに注目したい。

その他の芳香族化合物：通常の pH 領域で酸解離活性基を持たない芳香族化合物 (**40-48**) についても検討した。その結果この場合も R_M 値は $\log P$ 値に対して直線関係を示した。

$$R_M = 0.3430 \log P - 0.2947 \quad (r = 0.9752, s = 0.0460, n = 9) \quad (12)$$

Table 3 R_M , log P and indicator variables of various kinds of aromatic substances used in the present experiments

No	Compound	$R_M^a)$	log PC)	$I_1^d)I_2^d)I_3^d)$	No	Compound	$R_M^a)$	log PC)	$I_1^d)I_2^d)I_3^d)$		
1	4-Aminophenol	-0.6885	0.04	1	0	4-Aminobenzamide	-0.5502 ^{b)}	0.02	0	1	0
2	3-Aminophenol	-0.6335	0.17	1	0	4-Aminoacetophenone	-0.2699 ^{b)}	0.41	0	1	0
3	4-Acetoaminophenol	-0.4966	0.36	1	0	Benzamide	-0.2308 ^{b)}	0.64	0	1	0
4	p-Hydroquinone	-0.4699	0.50	1	0	Formanilide	-0.0523 ^{b)}	1.18	0	1	0
5	2-Aminophenol	-0.5691	0.62	1	0	4-Nitroaniline	-0.0604 ^{b)}	1.39	0	1	0
6	3-Acetoaminophenol	-0.4102	0.73	1	0	2-Nitroaniline	0.1711 ^{b)}	1.69	0	1	0
7	o-Hydroquinone	-0.1892	1.01	1	0	4-Methoxyaniline	-0.5077 ^{b)}	0.87	0	0	1
8	2-Hydroxybenzamide	-0.1345	1.25	1	0	3-Methoxyaniline	-0.4164 ^{b)}	0.93	0	0	1
9	4-Methoxyphenol	-0.0457	1.34	1	0	2-Methoxyaniline	-0.4702 ^{b)}	0.95	0	0	1
10	Phenol	0.0961	1.51	1	0	Benzylamine	-0.4983 ^{b)}	1.09	0	0	1
11	4-Nitrophenol	0.2081	1.96	1	0	1-Naphthylamine	-0.0482 ^{b)}	1.78	0	0	1
12	3-Nitrophenol	0.2196	2.00	1	0	4-Chloroaniline	-0.0608 ^{b)}	1.83	0	0	1
13	2-Bromophenol	0.3099	2.35	1	0	4-Bromoaniline	0.0566 ^{b)}	2.26	0	0	1
14	3-Chlorophenol	0.4340	2.50	1	0	4-Nitroquinoline N-oxide	0.0842	1.09	0	0	0
15	2-Isopropylphenol	0.6500	2.88	1	0	4-Cyanobenzaldehyde	0.0660	0.91	0	0	0
16	2,4-Dichlorophenol	0.6585	3.07	1	0	4-Nitrobenzaldehyde	0.1678	1.20	0	0	0
17	2-Hydroxy-4-aminobenzoic acid	-0.3677	0.87	1	0	4-Methoxybenzaldehyde	0.2125	1.76	0	0	0
18	2-Aminobenzoic acid	-0.0946	1.21	1	0	p-Naphthoquinone	0.2879	1.78	0	0	0
19	2-Acetoxybenzoic acid	-0.1179	1.23	1	0	4-Methoxymethylbenzoate	0.4528	2.10	0	0	0
20	Benzoic acid	0.1100	1.85	1	0	4-Chlorobenzaldehyde	0.4404	2.19	0	0	0
21	4-Methoxybenzoic acid	0.1097	1.93	1	0	4-Bromobenzaldehyde	0.5424	2.34	0	0	0
22	2-Hydroxybenzoic acid	0.2002	2.24	1	0	4-Nitrotoluene	0.5094	2.37	0	0	0
23	4-Methylbenzoic acid	0.3119	2.27	1	0	3-Hydroxybenzoic acid	-0.2645	1.50	1	0	0
24	3-Methylbenzoic acid	0.3211	2.37	1	0	4-Hydroxybenzoic acid	-0.2908	1.58	1	0	0
25	4-Chlorobenzoic acid	0.4405	2.72	1	0	Isophthalic acid	-0.2620	1.66	1	0	0
26	4-Iodobenzoic acid	0.5639	2.99	1	0	2-Naphthoic acid	0.4882	3.50	1	0	0
						4-Nitropyridine N-oxide	-0.3171	-0.69	0	0	0

a) Except for the case of footnote b, 0.1 M HCl solution containing 0.4 M NaCl was used as an aqueous component in the mobile phase consisting of 50 % (v/v) ethanol and 50 % aqueous solution.

b) 0.1 M carbonate buffer (pH 10, $I_{aq} = 0.5$ adjusted with NaCl) was used as an aqueous component in the mobile phase.

c) Taken from the reference 16, where the partition coefficient P was determined by shake-flask method in the octanol-water system.

d) Indicator variables. See text for definition.

e) Omitted from the regression analyses. See text for the detail.

全化合物についての回帰式

これまでも述べてきたように，ここで求めた R_M と $\log P$ との関係を表す回帰式 (6)-(8)，(10)-(12) 式は，その傾きがほぼ同じである。しかし，その切片は置換基の種類に依存している。このことは，置換基の立体的，電子的，および分子間相互作用効果が， R_M と $\log P$ に対して，言い換えると HPTLC における試料の移動とフラスコ振盪法における分配に対して，異なる効果を及ぼすことが示唆される。Guerra ら²⁵⁾ は，シリカゲルを固定相とした場合，ニトロイミダゾール類の R_M 値は $\log P$ だけでなく置換基類の分子屈折の和 ΣMR にも依存していることを示した。このことは，溶質と固定相との相互作用に対して立体効果も寄与していることを示唆している。今の場合も，切片が置換基グループの種類に依存することは，固定相との相互作用において立体的な因子，または置換基の分子間水素結合能等と関連しているのかもしれない。いずれにしても， $\log P$ との相関における傾きはほぼ等しいことから， I_1 ， I_2 ， I_3 という指示変数を導入して，すべての化合物に対して，その R_M 値と $\log P$ 値の関係をひとつの回帰式で表現することは可能である。すなわち，フェノール性水酸基またはカルボキシル基を有する化合物 (1 群) に対して $I_1=1$ ，その他は $I_1=0$ ； $I_1=0$ に属するものの内，グループ A のアミノ基を有する化合物 (2 群) に対して $I_2=1$ ，その他は $I_2=0$ ； $I_2=0$ に属するものの内，グループ B のアミノ基を有する化合物 (3 群) に対して $I_3=1$ ，その他 (4 群) は $I_3=0$ とした (Table 3)。このような指示変数を用いて，全化合物について回帰した結果は次のようになった。

$$R_M = 0.4300 \log P - 0.2447 I_1 - 0.1046 I_2 - 0.4315 I_3 - 0.4428 \quad (r=0.9859, s=0.0662, n=48) \quad (13)$$

Fig. 2 には，(14) 式で定義した補正 R_M 値 (R_M^{cor}) と $\log P$ の関係を示した。

$$R_M^{\text{cor}} = R_M + 0.2447 I_1 + 0.1046 I_2 + 0.4315 I_3 \quad (14)$$

このように実測の R_M を指示変数で補正することにより，種々の置換基を有する全化合物について，その $\log P$ 値と非常に高い相関を得ることができた。

これまでの議論においては化合物 49~53 に関するデータは省いてきた。これらの R_M と $\log P$ の関係が他の同類化合物に対して得られた関係と明らかに有意な偏差があったからである。化合物 52 と 53 の場合の偏差の理由は，それらの $\log P$ 値が非常に大きいかまたは小さいことと関係しているように思われる。つまり，このような場合 R_f はそれぞれ非常に小さいかまたは大きい値となることが期待されるが，そのような条件では，(3) 式における C が定数と考えられなくなることが指摘されている。²⁶⁾ 従って， $\log P$ が 3 より大きい場合には試料との親和性がより低い RP-HPTLC プレートを用いて，適当な R_f 値を得ることが望ましいと考えられる。更に，適当な R_f 値を得るには移動用の有機溶媒の種類および濃度を

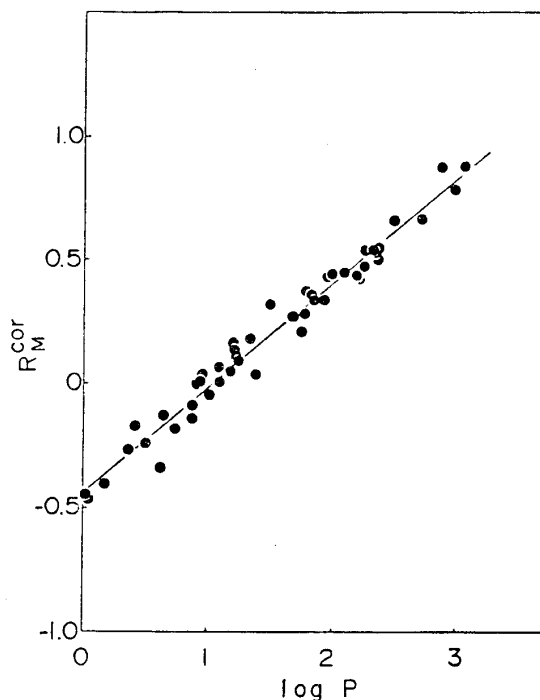


Fig. 2 Linear relation between R_M^{cor} and $\log P$ for all the compounds here employed. $R_M^{\text{cor}} = 0.4300 \log P - 0.4428$ ($r=0.9859$, $s=0.062$, $n=48$). R_M^{cor} is defined by Eq. (14) in text. Each name of samples was deleted to avoid complexity. All the data of R_M , $\log P$, and indicator variables are listed in Table 3 for each sample.

変化させることも考えられる。現実的にはしかし有機溶媒濃度をある濃度以下にすることには限界がある。一方、今の場合 C_{EtOH} をある限度以上に大きくすると化合物間での R_f または RM の差が小さくなり不都合である (Fig. 1)。従って、それぞれのプレートにあった適当な有機溶媒濃度の選定が重要である。化合物 49~51 の場合の偏差の理由は現時点では明確ではない。

結果として、HPTLC RP-8 を用いて、 $\log P$ 値として 0~3 領域の化合物の $\log P$ 値を十分評価できることがわかった。多くの研究者は、Biagi らによって導入された R_M^0 値から $\log P$ を評価することを試みている。^{8,18-20,25)} しかし、HPTLC 法の場合には、移動相中にかなり高濃度の有機溶媒を必要とする上、 RM と移動相中の有機溶媒濃度とが直線関係を保つ領域はそれほど広くない (Fig. 1)。従って、多種多様の構造を持つ種々の化合物について外挿法によって求める R_M^0 の精度は必ずしも高くない。またこの外挿法は煩雑である。これに対し、これまでも述べてきたように、 $C_{EtOH}=50\%$ (v/v) における RM は、 $\log P$ と高い相関を有していることから、SAR に用いる疎水性パラメーターとしては R_M^0 よりも、適当なある一定条件下で求めた RM を用いる方が実際的な応用面から考えても良いと思われる。ただし、先にも述べたように、有機溶媒濃度の設定においては、 RM と有機溶媒濃度とが直線関係を保つ領域内とすることが望ましいと考えられる。一方、我々の方法で求めた RM 値はここで使用した移動相の pH やイオン強度に無関係であった。このことは実際に SAR に応用する面からはむしろ都合が良い。 RM 値の測定に際して、目的化合物の酸解離平衡の影響を考える必要がないからである。このことは特に、酸性、塩基性両置換基を有する両性化合物の場合に有効であると思われる。^{7d)} 本法はフラスコ振盪法や RP-HPLC 法に比べ、簡便かつ迅速であることに加え、より微量の試料で測定でき、また、その試料の純度は必ずしも高くなくても良いという利点がある。

引用文献および脚注

- 1) 第7回メディシナルケミストリーシンポジウム (岐阜, 1985年12月): 講演要旨集, p. 43.
- 2) "構造活性相関に関する研究" 第7報. 第6報; T. Kubota, J. Hanamura, K. Kano and B. Uno, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **9**, S-135 (1986).
- 3) J. A. Keverling Buisman ed., "Biological Activity and Chemical Structure," Elsevier, Amsterdam-New York, 1977.
- 4) R. F. Gould ed., "Biological Correlations-The Hansch Approach," *Adv. Chem. Ser.*, **114**, Am. Chem. Soc., Washington, 1972.
- 5) 窪田種一, "薬物の構造活性相関," 化学の領域増刊 **122**, 構造活性相関懇話会編, § 2-1, 南江堂, 東京, 1979.
- 6) W. P. Purcell, G. E. Bass and J. M. Clayton, "Strategy of Drug Design-A Molecular Guide to Biological Activity," Appendix I, John Wiley & Sons, New York, 1973.
- 7) a) K. Ezumi and T. Kubota, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 85 (1980); b) T. Kubota and K. Ezumi, *ibid.*, **28**, 3673 (1980); c) J. Hanamura, K. Kobayashi, K. Kano and T. Kubota, *ibid.*, **31**, 1357 (1983); d) T. Kubota, J. Hanamura, K. Kano and B. Uno, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **9**, S-135 (1986).
- 8) G. L. Biagi, A. M. Barbaro and M. C. Guerra, "Biological Correlations-The Hansch Approach," *Adv. Chem. Ser.*, **114**, R. F. Gould ed., pp. 61-79, Am. Chem. Soc., Washington, 1972.
- 9) 寺田 弘, "薬物の構造活性相関," 化学の領域増刊 **122**, 構造活性相関懇話会編, § 2-2, 南江堂, 東京, 1979.
- 10) J. Gasparic, *J. Chromatogr.*, **196**, 391 (1980).

- 11) a) 滝谷昭司，佐野 明，鈴木政雄，*ぶんせき*，**1984**，267； b) 中村 洋，*フェルマシア*，**19**，1037 (1983)；
c) 原 昭二，*ぶんせき*，1985，543.
- 12) A. J. P. Martin, *Biochem. Soc. Symp. (Cambridge)*, **3**, 4 (1950).
- 13) E. C. Bate-Smith and R. G. Westall, *Biochim. Biophys. Acta*, **4**, 427 (1950).
- 14) R_f と R_M の関係は次のようになる。展開後のプレート上で，原点から移動した試料スポットまでの距離を h_s ，
原点から移動溶媒の先端までの距離を h_m ，試料の移動スポットから移動溶媒の先端までの距離を h_r とすると，
 $R_f = h_s/h_m$ で $0 \leq R_f \leq 1$ となり， $R_M = \log(h_r/h_s)$ となる。 R_M は $-\infty$ と $+\infty$ の間で変化し，系の自由
エネルギー変化に関係する量である。
- 15) A. E. Bird and A. C. Marshall, *J. Chromatogr.*, **63**, 313 (1971).
- 16) C. Hansch and A. Leo, "Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology," John Wiley & Sons, New York, 1979.
- 17) C. B. C. Boyce and B. V. Milborrow, *Nature*, **208**, 537 (1965).
- 18) a) G. L. Biagi, A. M. Barbaro, M. F. Gamba and M. C. Guerra, *J. Chromatogr.*, **41**, 371 (1969)；
b) *idem.*, *ibid.*, **44**, 371 (1969)； c) G. L. Biagi, A. M. Barbaro and M. C. Guerra, *ibid.*, **51**, 548 (1970)；
d) G. L. Biagi, M. C. Guerra and A. M. Barbaro, *J. Med. Chem.*, **13**, 944 (1970)； e) G. L. Biagi, O.
Gandolfi, M. C. Guerra, A. M. Barbaro and G. Cantelli Forti, *ibid.*, **18**, 868 (1975).
- 19) A. Hulshoff and J. H. Perrin, *J. Chromatogr.*, **129**, 263 (1976).
- 20) W. Butte, C. Fooker, R. Klussmann and D. Schuller, *J. Chromatogr.*, **214**, 59 (1981).
- 21) J. Buchi and J. A. Fresen, *Pharm. Acta Helv.*, **41** (1966) 551.
- 22) Merck 製プレートを販売している関東化学（平井徳弘氏）よりの私信によると HPTLC RP-18 プレート（シリカ表面が直鎖状の C_{18} アルキルで修飾されている）の場合 60~70% の修飾率という。
- 23) 今の場合，移動相中のエタノール含量が高いため ($C_{EtOH} = 50\%$ (v/v))，プロトン脱離または付加しにくくなる
ことが予期される。実際，*p*-メチル安息香酸 ($pK_a = 4.32$)，*p*-メチルフェノール ($pK_a = 10.17$)，および *p*-
メチルアニリン ($pK_a = 5.26$) について $C_{EtOH} = 50\%$ (v/v) の緩衝液を用いて，分光学的に測定した見かけの
 pK_a は各々 5.75, 11.65 および 5.06 であった（エタノール含有緩衝液の pH はその混合溶媒を pH メータ
ーで測定した見かけの値である）。 pK_a の変化の方向は，先の予測と一致するが，その変化量は R_M の pH 非依
存性を完全に説明できるほどには大きくない。
- 24) a) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, *Chem. Rev.*, **71**, 525 (1971)； b) A. Leo and C. Hansch, *J. Org.
Chem.*, **36**, 1539 (1971)； c) R. F. Rekker, "The Hydrophobic Fragmental Constant," Elsevier, Am-
sterdam-New York, 1977； d) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 5175 (1964).
- 25) M. C. Guerra, A. M. Barbaro, G. Cantelli Forti, G. L. Biagi and P. A. Borea, *J. Chromatogr.*, **259**,
329 (1983).
- 26) 原 昭二，"有機液相クロマトグラフ分析"，共立出版，東京，1965.