

Paper chromatography 法による牛及び鯨 副腎抽出物の Corticoid の分離定量実験

帝国臓器製薬株式会社 研究部
(部長：薬学博士 新延信吉)
金沢大学結核研究所薬理製剤部
(主任：伊藤 亮 教授)

細 井 稔
神 戸 川 明

(受付：昭和33年1月6日)

緒 言

Reichstein, Kendal, Wintersteiner¹⁾ 等によつて始められた副腎皮質 Steroid に関する系統的化学的研究は遂に牛副腎皮質抽出物から約30種の結晶性 Steroid を分離することに成功し、近代ホルモン学史上に不滅の功績をうち建てるに到つた。処で、これらの研究では個々の Steroid の分離・確認が大量の原料を用いて、極めて複雑な分離操作によつて行われたのであり、而もその分離操作中で一部 Steroid では構造変化の可能性も指摘されているのであつて、このような方法は日常実験室内での Steroid 化合物の分離、検出、定量には到底応用することは出来ない。

副腎皮質 Steroid 化合物中でも、Corticosterone, Desoxycorticosterone, Cortisone 等の生物学的に活性なホルモンを含んだ所謂 Corticoid と呼ばれている約半数近くの Steroid 化合物は、何れもその基本構造中の D 環に α -

ketol ($-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{OH}$) 側鎖を有しているため諸種の特異な化学反応性が知られている。この特性を利用して最近 Zaffaroni, Burton^{2, 3, 4)} 等は Paper Chromatography 法によつて比較的少量の材料で Corticoid 化合物の系統的分離、確認を行うことのできる方法について報告を行つた。Simpson, Reichstein^{5, 6)} 等は Aldosterone の分離研究で Paper Chromatography の適用が甚だ有利なことを実証した。

著者等は牛及鯨の副腎抽出物から Zaffaroni, Burton^{3, 4)} らの方法で Paper Chromatography を行い数種の Corticoid を確認、定量し、その結果を昭和30年日本薬学会総会で発表したのであるが、我が国では未だこの種の研究の報告を見ないし、又鯨副腎よりの Corticoid 分離・定量に関しては著者らの知る限りでは、外国の文献にもその例が見当たらないので、こゝに著者らの行つた実験について報告する。

実験材料並びに方法

1. 供試臓器及び抽出液：

a) 腎皮抽出液として強力インテレン注射液（帝

国臓器製）を用いた。

b) 牛副腎は屠場で屠殺後直ちに摘出した副腎を脂

肪等の不要物を除いて冷凍したものを用いた。副腎1個当たり平均重量26gm.

c) 鯨副腎は南水洋で捕獲した主として白長須鯨の冷凍した副腎(1個約1,300gm)を用いた。

2. 標準品として使用した Corticoid :

Cortisone (Kendall's Compound E ; K. E と称す, 以下同じ)

Hydrocortisone (K. F)

Corticosterone (K. B)

11-Dehydroxycorticosterone (K. A)

11-Desoxy-17 α -hydroxycorticosterone

(Reichstein's Compound S; S. S)

11-Desoxycorticosterone (DOC) (R. Q)

3. 溶媒 (Paper Chromatography 用) :

Toluene

Propylene glycol

Metanol

Chloroform

Tetrahydrofuran

何れも最純品を使用し、之を更に再蒸溜して実験に供した。

4. Paper Chromatography 用濾紙として東洋濾紙

No.51を用いた。

5. 呈色試薬 :

a) アルカリ性硝酸銀溶液

0.1N-AgNO₃ 10ml と強アンモニア水 10 滴及び 10% NaOH 5ml を使用直前に混合する。α-ketol (-CO-CH₂OH) 基があれば褐色に呈色する。(Zaffaroni^{3,7)})

b) Blue tetrazolium 試薬 (B.T.試薬)

Blue tetrazolium の 0.5% methanol 液 1 分と 10% NaOH 1 分を使用直前に混合する。α-Ketol は紫色に呈色する。(Cope⁸⁾)

c) ヨード試薬

石油ベンゼンにヨードを飽和した液。α, β 不飽和 ketone があれば青又は褐色に呈色するが直ちに消失する。澱粉溶液を噴霧すると呈色が長く保つ。(Bush⁹⁾)

d) ヨード白金試薬

1 N-HCl に 5% に塩化白金をとかした液 5 ml に 10% ヨードカリ 45 ml と蒸溜水 100 ml を加う。keto 基があれば青色となる。(Zaffaroni¹⁰⁾)

e) 燐モリブデン酸試

燐モリブデン酸の 10% アルコール溶液に同量の氷酢酸を加う。本試薬をスプレーし、110° C, 1 分

加熱すると spot は青色となる。(Kritchewsky¹¹⁾)

6. Paper Chromatography 装置:

Zaffaroni, Burton^{3,7)} と同様の装置

7. 測定機: Beckman DU 分光光度計

8. 紫外線吸収による Corticoid 検出法:

a) アルカリ蛍光反応

60% methanol 100 ml に NaOH 10 gm を溶解した液を濾紙に噴霧し 60° ~ 100° C で乾燥する。紫外線照射で α, β 不飽和 ketone は淡黄色の蛍光を発する。この蛍光発現は非常に鋭敏で 27/cm² の steroid の検出も可能である。(Bush⁹⁾)

b) 蛍光板法¹²⁾

展開した炉紙を紫外線透過フィルター上にせ、炉紙に印面紙をのせて露光すると spot 部分のみ紫外線を吸収し白色に現像される。この方法は物質に変化を与えないで spot の位置が判る。

c) α, β 不飽和 ketone は 240 mμ 附近に紫外線吸収スペクトルの最大吸収を示す。

d) 硫酸 Chromogen の紫外線吸収スペクトル検査^{2,14)}

窒素気流中で蒸発乾燥した検体に純硫酸 4 ml を加え室温で 2 時間放置し、発現した硫酸 Chromogen を 210 ~ 500 mμ で紫外線吸収を測り、最大吸収の波長特性を標準品のそれと比較した。

9. Corticoid の比色定量法:

a) 著者らのフェリチアン法

検体を少量のアルコールにとかく水で稀めて 107/ml 程度の 5% アルコール溶液とする。この液 1 ml に 5% Na₂CO₃ 液 1 ml と 0.1% K₃Fe(CN)₆ 液 1 ml を加え 10 分間 100° C に加熱し、冷後 FeNH₄(SO₄)₂ · 12H₂O (鉄明ばん) を 0.2% に溶かした 10% 酢酸溶液 1 ml で発色させ標準品と比較する。この方法は中尾・相沢法^{15,16)} に比して感度良く、又アルコール濃度が 5% で低い為アルコールによる誤差が少い。

b) Porter-Silber 法 (Reddy, Jenkins and Thorn の変法¹³⁾)

65 mg の塩酸 phenyldrazine を 100 ml の 1.63:1 の硫酸にとかした phenylhydrazine-硫酸 4 ml を加え 60° C, 20 分加熱し 410 mμ で比色する。

c) Blue trazolium 法⁸⁾

B.T. 試薬によつて発色せしめた spot を Tetrahydrofuran で処置して Chromogen を溶出し、波長 540 mμ で比色定量する。

実験の部

Paper Chromatography (PCG) 法による Corticoid の分離は Zaffaroni and Burton^{4,4)} 法に準じて行つたのであるが、検体の多寡によつて以下述べる様に 2 通りの実施法を行つた。

I 検体少量の場合の PCG 分離法:

a) 実施法.

先ず第一図の様に、その基底部で共通している 3 本の細長い濾紙片 (30cm×1.8cm) を切り取つて、これを一旦 Methanol で洗つて乾した後、Propylene glycol : Methanol (1:1) 混液に浸す。溶媒から取出した濾紙を別の乾燥濾紙間に挟んで軽く押え過剰の溶媒を吸い取る。この濾紙の上端から 12cm 離れた Start line へ検体 (Chloroform 抽出液を減圧蒸溜し、窒素気流中で乾燥し、残渣を Methanol : Chloroform (1:1) 混液 0.05ml に溶かす) 又は標準 Corticoid (結晶 5mg を Methanol 5ml に溶かした液 0.05ml) をつける。この際、扇風機等を用いて乾燥を促し、滴着 spot の大きさを 5mm 以下とする。次で上端より 8cm で濾紙を折り、ガラス板に固定し Propylene glycol 飽和 Toluene 300ml を展開液とし下降法で展開する。容器の底には展開液の入つた別の容器を置き器内を溶媒蒸気で飽和させる。展開速度は 1 時間 10cm になる様に調製し、温度は $30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ とした。48 時間展開後濾紙を外し、放熱器上で乾燥する。この乾燥濾紙について Corticoid の確認・定量を下記の様にし行つた:

乾燥濾紙を第 1 図の様に縦に 2 等分し、その一半片を B.T. 試薬に浸すと 1-2 分後に Corticoid の存在部位に相当して青紫色の spot が発現する。呈色 spot の位置を検体と標準 Corticoid について比較検討した後、spot を切り取り Tetrahydrofuran 2ml で 3 回溶出し 560m μ で比色定量する。

残りの半截濾紙の呈色部位に相当する部分をやゝ大きめに切り取つて Methanol 2ml で 3 回溶出し、Methanol を一括し、これについて

- 1) 螢光及び紫外線吸収検査,
 - 2) 硫酸 Chromogen の紫外線吸収スペクトル測定,
 - 3) フェリチン法による還元力測定,
 - 4) Porter-Silber 法による比色定量
- 等を行つてその結果を既知濃度の標準 Corticoid のそれと比較して個々の Corticoid の確認・定量を行つた。

b) 結果.

我々は検体が比較的少量の場合として強インテレニン 1 アンプル及牛副腎 100gm より抽出物 (製法後述) について PCG 法による Corticoid の分離実験を行つた。この実験では含量の多い Cortisone と Hydrocortisone のみが検出された。即ち第 1 図は夫々被検抽出物 (中央) と標準 Corticoid (Cortisone と Hydrocortisone の混液) (両側) を滴着させた 3 条の濾紙の PCG 展開図であるが、B.T. 試薬によつて、何れの抽出物でも対照の濾紙の Hydrocortisone 並びに Cortisone の位置に相当した部位に 2 つの spot (Spot III 及び IV) が認められた。又第 2 図は発色させない残りの半截濾紙片の spot 相当分を Methanol で溶出したものについて検査した紫外線吸収スペクトルを示したものであつて、Spot III は 242m μ に Spot IV は 283m μ に最大吸収を示し、夫々 Hydrocortisone 及び Cortisone のそれに全く一致している。第 3 図は Methanol 抽出物を蒸発しその残渣について硫酸 Chromogen 反応を行つて、夫々の紫外線吸収スペクトルを測定したものである。即ち Spot III は Hydrocortisone と同じく 240, 280, 390, 475m μ に特異吸

収があり、一方 Spot IV は Cortisone の吸収スペクトルと一致して 283, 340, 415 $m\mu$ に特異吸収を示した。以上の様に理化学的検出法で Corticoid の種類が確認されたのであるが、次に各 spot 抽出物について更にフェリチアン法、紫外線吸収率測定、B.T.比色定量及び肝グリコーゲン法によって牛副腎 100 g 並びに強インテレン 1 アンプル中の Corticoid 含量を夫々定量算出して第 1 表の成績を得た。

こゝで注目されるのは、紫外線吸収スペクトル法では Background が多いため何れの検体でもやゝ過大の Corticoid 含量を示したが、フェリチアン法及び B.T.法は共に良く一致した値を示した。

尚鯨副腎抽出物は 1 回の PCG では不純物多く、次に述べる様な systematic chromatography を行つて初めて或程度の Corticoid の分離定量が可能である。

II 検体が多量の場合の PCG 分離法:

牛及鯨の副腎 10kg を用いて第 2 表に示した方法で抽出を行つた。最後に副腎抽出液を凍結乾燥し、Chloroform 5ml で 4 回抽出し抽出液を一括する。この液の 1/100 量をとつてフェリチアン法で Corticoid 含量を測定すると牛副腎皮質抽出液では Cortisone に換算して 34.8mg の値が得られたが、鯨では不純物が多くて測定不能であつた。残りの抽出液は窒素気流を通じつつ減圧蒸溜し、残渣を Chloroform:Methanol (1:1) 混液 0.1ml に溶し PCG 分離定量に使用した。

以下、牛副腎抽出液の場合に於ける PCG 分離実験例について述べる。PCG による各分割の分離操作の概略は 4 図に提示した如くである。即ち濾紙を第 5 図の様に切り取つて、型の如く Methanol 洗滌、Propylene glycol:Methanol (1:1) 混液浸漬を行つた後、その start line に上記検体液を定量的につける。濾紙上端より 8cm で折り曲げ展開液槽のガラス板にかけ下降法で展開した。展開液は Propylene glycol 飽

和 Toluene 300ml, 温度 30°C, 展開の進行するにつれて、遂に展開液は濾紙先端より流下するに至る。そこで流下液を別の容器に受け取り展開時間によつて之を A, B, C, D の 4 分割とした (第 3 表)。

展開速度は Corticosteroid 分子の極性 (Polarity) の強弱によつて大きく左右される。従つて Fraction A, B 中には極性の比較的小さい, 11-Desoxycorticosterone, Corticosterone 等の $C_{22}O_3$ 又は $C_{21}O_4$ 型 Corticoid が流出され、他方極性の大きな $C_{21}O_5$ 型化合物 (Hydrocortisone 等) は展開速度も甚だ遅く D Fraction 中に残留している。

次で Fraction A, B, C の各々を減圧蒸溜し残渣を Chloroform-Methanol にとかし、夫々別の濾紙を用いて Propylene glycol 飽和 Toluene で再展開を行つた。今回は濾紙端より展開液が滴下しないように展開時間を前回よりも短くし、Fraction A では 2 時間、Fraction B では 6 時間、Fraction C では 24 時間とした。展開終了後、濾紙の一部分を切り取つて (第 5 図参照) B.T. 試薬で発色させること、Fraction B では 2 spot (B_1, B_2)、Fraction C では 3 spot (C_1, C_2, C_3) が認められたが、Fraction A では何ら spot が認められなかつた。

他方第 1 回展開を終つた残りの濾紙の一部分について B.T. 発色試験を行うと D_1, D_2 の 2 spot が認められた。そこで D_1, D_2 相当部分を夫々 Methanol で抽出し、上記 Fraction と全く同様に再展開 (60 時間) を行つた結果、 D_1 から 1 spot (D_{1a}) のみ、 D_2 からは 4 spot ($D_{2a}, D_{2b}, D_{2c}, D_{2d}$) が分離された。

この様にして PCG 法によつて牛副腎抽出液から分離した 10 個の spot について、前項少量実験で述べたと全く同様に、その Methanol 抽出液をもつて、標準 Corticoid を対照として紫外線吸収スペクトル検査、呈色試験等を行つて、第 4 表提示の如く、Corticosterone, 11-Dehydrocorticosterone, Allopregnane-3 β , 11 β , 21-tiol-20-one, Allopregnane-3 α ,

17 α -21-triol-20-one,
 Allopregnane-3 β ,21-diol-11, 20-dione,
 Hydrocortisone, Allopregnane-3 β 17 α , 21-
 triol-20-one, Aldosterone, cortisone の9個
 のCorticoidを確認することが出来た。更に第
 5表は各分離Corticoidについて定量試験を行
 つて得られた検出量をZaffaroni⁴⁾並びに
 Pfiffner¹⁸⁾の報告した検出量と比較表示したも
 のである。

一方鯨副腎抽出液についても、上述牛副腎と

同様にPCG分離法を実施して、A, B₁, B₂,
 C, D_{1a}, D_{1b}, D_{1c}, D₂, D₃, D₄の10個の分
 割を得たのであるが、牛副腎抽出液と異つて、
 鯨副腎では不純物の混在が多いため、各分割に
 ついてのCorticoid同定試験は甚だ困難であつ
 た。最後に確認定量し得たのは第6表に示した如
 く、Corticosterone, 11-Dehydrocorticosterone,
 Tetrahydrocorticoid, Hydrocortisone 及び
 Cortisoneの5種であつた。

結

Zaffaroni and BurtonのPaper Chromato-
 graphy 法によつて牛及び鯨の副腎皮質中の
 Corticoidを分離定量して次の結果が得られ
 た。

- 1) 強力インテレニン1アンブル及牛副腎 100
 g m中からCortisone及びHydrocortisone
 の2Corticoidが分離定量された。
- 2) 大量 (10kg) の牛及鯨副腎から得られた

語

抽出液について系統的Corticoid分離法を
 通用して、

- a) 牛副腎からはAldosteroneを含めて9種
 のCorticoidが分離定量されたが
- b) 鯨副腎では、比較的多量の不純物に影響
 されて確認されたCorticoidは5種であつ
 た。

文

- 1) Reichstein, T., et al. Vitamine and Hormone,
 1, 345, 1943. 2) Zaffaroni, A.: J. Amer.
 Chem. Soc., 72, 3828, 1950. 3) Burton, R.
 B., Zaffaroni, A., Keutman, E. H.: J. Biol.
 Chem., 188, 763, 1951. 4) Zaffaroni, A.,
 Burton, R. B.: J. Biol. Chem., 193, 749, 1951.
- 5) Simpson, S. A., Tait, J. F., Wattstein,
 A., Endoc., 50, 150, 1952. 6) Simpson, S.
 A., Tait, J. F., Wattstein, A.: Helv. Chim.
 Acta., 37, 1163, 1954. 7) Zaffaroni, A.,
 Burton, R. B., Keutman, E. H.: Science, 111,
 6, 1950. 8) Cope, C. L., Hurlock, B.:
 The determination of adrenal cortical steroid and
 their metabolites, 25p. London, Dennis Dobson
 LTD, 1953. 9) Bush, I. E.: Biochem. J., 50,
 370, 1952. 10) Zaffaroni, A., Burton,

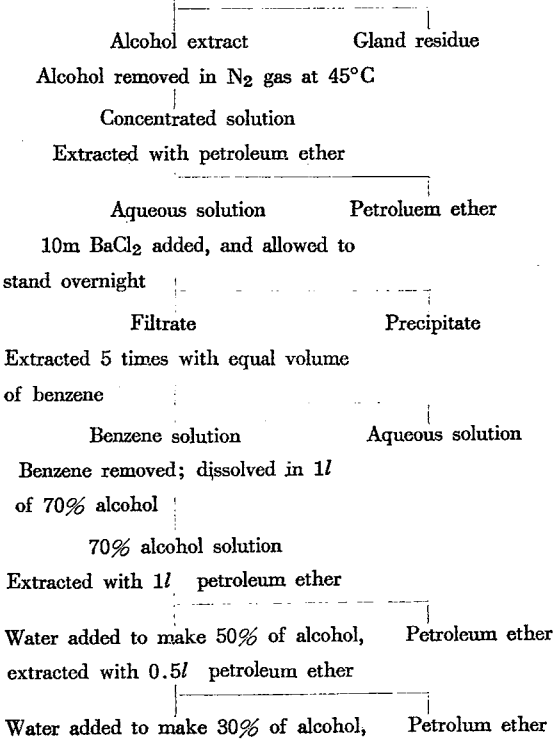
献

- R. B.: J. Biol. Chem., 177, 109, 1949. 11)
 Kritchevsky, D., Kirk, M. R.: Arch. Biochem.
 and Biophys., 35, 346, 1952. 12) Haines, W.:
 Recent Progress Hormone Research, 7, 255, 1952.
- 12) Haines, W.: Recent Progress Hormone
 Research, 7, 255, 1952. 13) Reddy, W. J.,
 Jenkins, D., Thorn, W.: Metabolism, 1, 511,
 1952. 14) Zaffaroni, A.: Recent Progress
 Hormone Research, 8, 51, 1953. 15) 中尾健:
 副腎皮質ホルモン第二版, 218, 医学書院, 1952.
- 16) 相沢義雄: 尿中chemocorticoid定量法,
 慈恵医大雑誌, 67(10), 25, 1953. 17) Pabst,
 M. L., Shepperd, R., Kuizenga, M. H.:
 Endoc., 41, 55, 1947. 18) Pfiffner, J.
 J.: Advance in Enzymol., 2, 325, 1942.

Table 1
Quantities of Cortisone and Cortisol of
Beef Adrenal Extract

Method of determination	Extract from 100gm. adrenal glands		Commercial preparation of adrenal extract 1 ampl.	
	Cortisone <i>r</i>	Cortisol <i>r</i>	Cortisone <i>r</i>	Cortisol <i>r</i>
Ferricyanate	210	260	72	93
Ultraviolet absorption	306	293	183	190
Blue tetrazolium	180	243	65	77
Liver glycogen test	415 ± 70		130 ± 50	

Table 2
Preparation of Adrenal Cortical Extract
Beef or whale adrenals (10kg) ground, and successively
extracted with 30l, 20l, and 10l, of 95% alcohol



extracted with 0.5l petroleum ether
 |
 Alcohol removed Petroleum ether
 |
 Aqueous solution
 |
 Lyophilised; extracted 4 times with 5ml chloroform
 |
 Chloroform extract

Table 3

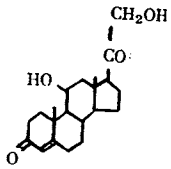
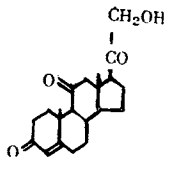
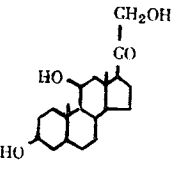
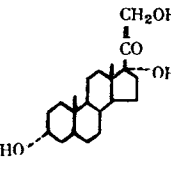
Fractions of Beef Adrenal Extract Paper-
 Chromatographed in Toluene-Propylene
 Glycol

Fraction	Interval of development (hrs)	Corticoid [*] (r)	Remark
A	0 - 4	93	Less polar corticoids
B	4 - 23	8280	
C	23 - 52	18300	
D	Steroids remaining on paper	.	More polar corticoids

* Quantities of corticoids determined by the ferricyanate method.

Table 4

Corticoids Isolated from Beef Adrenal Extract

Fraction	Chemical and physical reagents used for identifying various corticoids							Corticoids isolated
	B.T. reagent	UV absorption (mμ)	Alkaline AgNO ₃	Porter-Silber reaction	H ₂ SO ₄ -chromogen		Fluorescence in UV	
					mμ	Fluorescence		
B ₁	+	240	+	-	285 330 375 455	+	+	 Corticosterone (K.B)
B ₂	+	240	+	-	280 355 415	+	+	 11-Dehydrocorticosterone (K.A)
C ₁	+	•	+	-	•	+	-	 Allopregnane-3β, 11β, 21-triol-20 one (R.R)
C ₂	+	•	+	+	270 313 440	+	-	 Allopregnane-3α, 17α, 21-triol-20 one

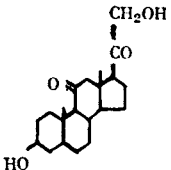
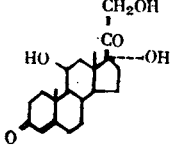
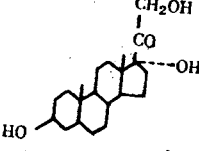
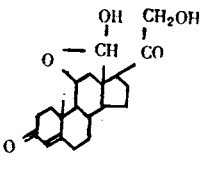
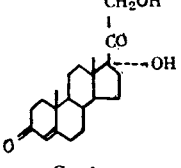
C ₃	+	•	•	-	290 350 415	+	-	 <p>Allopregnane-3β, 21-diol-11,20-dione (R.N)</p>
D _{1a}	+	240	+	+	240 280 395 475	+	+	 <p>Hydrocortisone (K.F)</p>
D _{2a}	+	•	+	+	•	-	-	 <p>Allopregnane-3β, 17α,21-triol-20-one (R.P)</p>
D _{2b}	-	•	-	-	-	-	-	Unknown
D _{2c}	+	240	+	-	285 ~ 290	+	+	 <p>Aldosterone</p>
D _{2d}	+	240	+	+	285 345 415	+	+	 <p>Cortisone (K.E)</p>

Table 5

Quantities of Various Corticoids Isolated from 10 kg
Beef Adrenal Gland, Compared to Amounts Found
By Previous Investigators

Chemical name	Letter designation	Our designation	Quantity $\gamma/10\text{kg}$	Quantity ($\gamma/10\text{ kg}$) isolated by	
				Zaffaroni ⁴⁾	Pfiffner ¹⁸⁾
Corticosterone	K.B	B ₁	920	8000	6600
11-Dehydrocorticosterone	K.A	B ₂	2100	8000	6800
Allopregnane-3 β , 11 β , 21-triol-20-one	R.R	C ₁	69	2200~2800	.
Allopregnane-3 α , 17 α , 21-triol-20-one	.	C ₂	280	.	.
Allopregnane-3 β , 21-diol-11, 20-dione	R.N	C ₃	594	8000~10000	.
Hydrocortisone	K.F	D _{1a}	3700	2400~2800	7400
Allopregnane-3 β , 17 α , 21-triol-20-one	R.P	D _{2a}	175	2200~2800	.
Aldosterone	.	D _{2c}	72	.	.
Cortisone	K.E	D _{2d}	1400	2200~2800	10000

Table 6

Summary of Paper Chromatographic Fractionation and
Analysis of Cortical Extract of Whale Adrenal
Gland (10 kg)

Fraction	Chemical and physical tests				Corticoids isolated	Quantity $\gamma/10\text{kg}$
	B.T.	UV (240m μ)	Alkaline AgNO ₃	Porter Silber		
A	-	-	-	-	not identified	.
B ₁	+	+	+	-	Corticosterone	123
B ₂	+	+	+	-	11-Dehydrocorticosterone	493
C	+	-	-	-	not identified	.
D _{1a}	+	-	-	-	not identified	1300
D _{1b}	+	-	-	-	Tetrahydrocorticoid	80
D _{1c}	+	-	-	-		.
D ₂	+	+	+	+	Hydrocortisone	1100
D ₃	+	+	+	+	Cortisone	526
D ₄	+	-	-	-	not identified	.

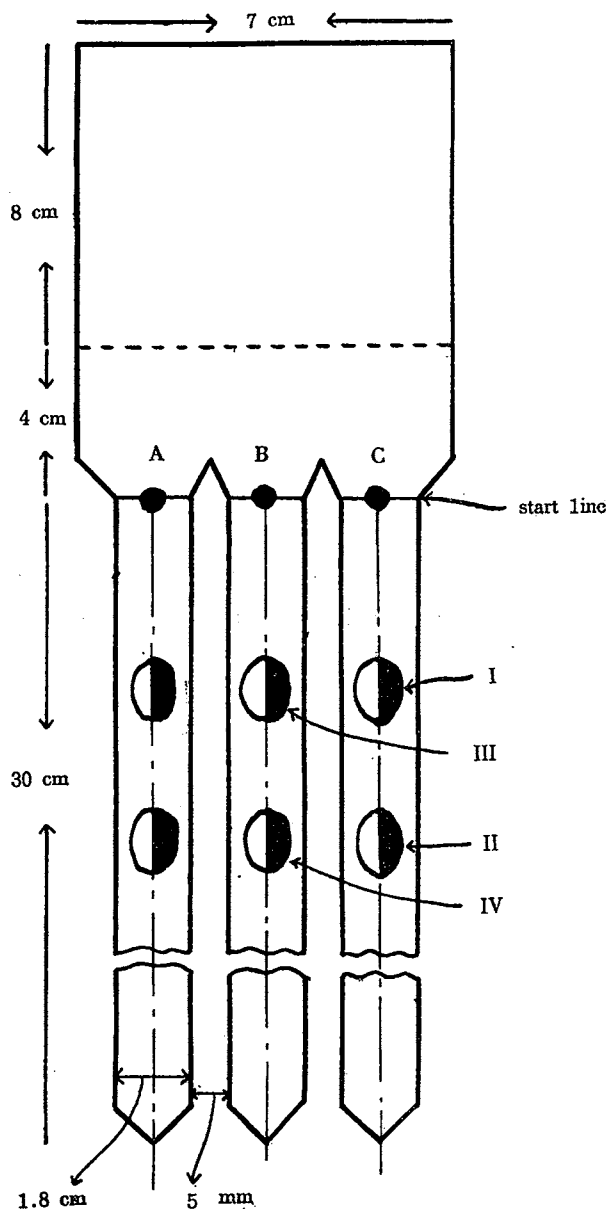


Fig. 1 Diagram of the positions of two steroids chromatographed in toluene-propylene glycol for 48 hours.

A, C : standard corticoid. B : sample.

Spot I : hydrocortisone. Spot II : Cortisone.

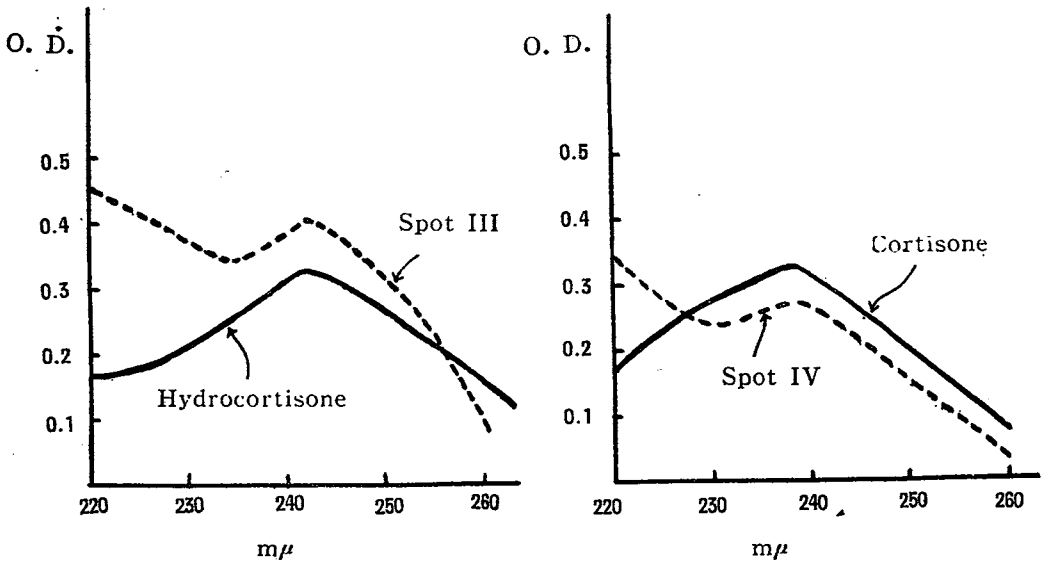


Fig. 2 Ultraviolet absorption spectra of corticoids isolated by paper chromatography. standard corticoid=20 γ /3 ml.

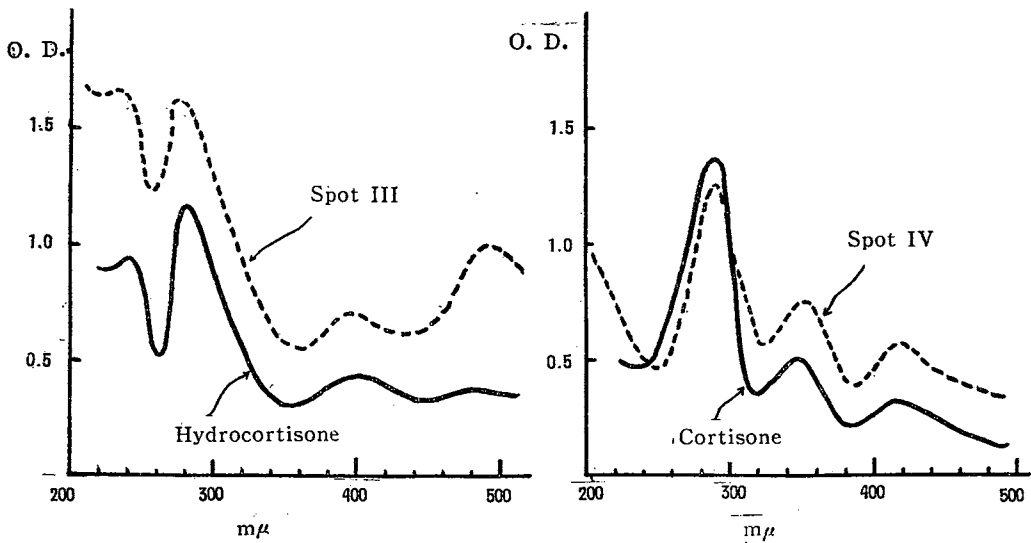


Fig. 3 Ultraviolet absorption spectra of sulfuric acid chromogens of corticoids isolated by paper chromatography.

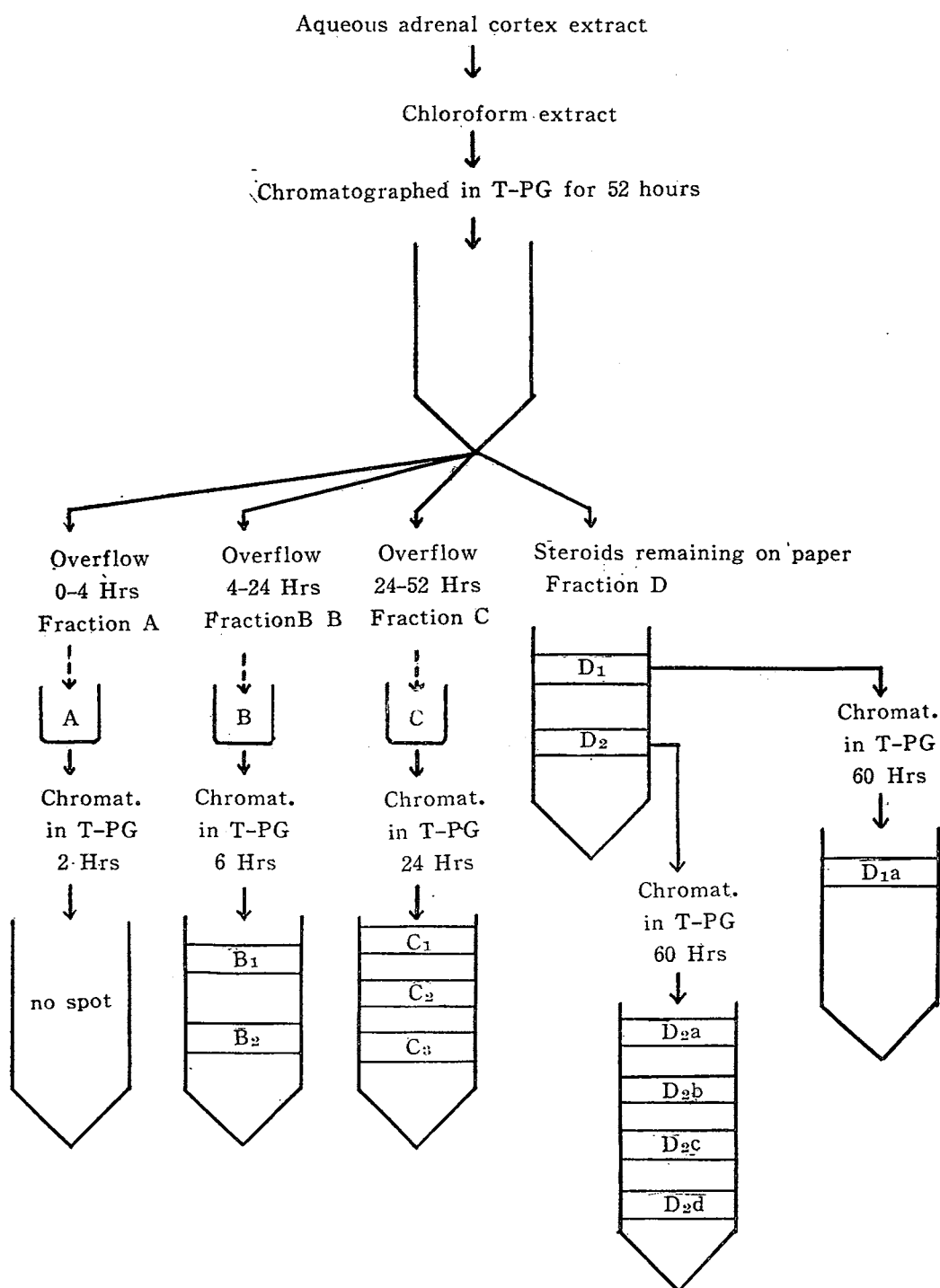


Fig. 4 Scheme of systematic paper chromatographic fractionation of beef adrenal extract T-PG = Tolene-Propylene glycol

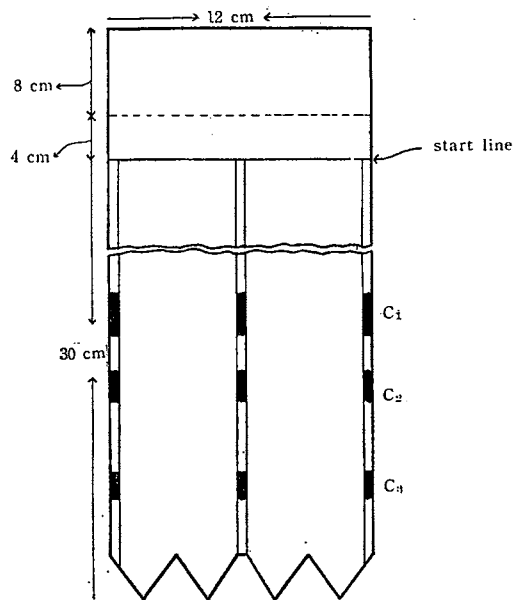


Fig. 5 Filter paper used in chromatography for large amounts of adrenal extract