

エストロジエン関連化合物のポリアミド薄層クロマトグラフィー および移動率に及ぼす化学構造の影響*

徐 型 堅**

(1974 年 5 月 31 日受理)

エストロジエン関連化合物 20 種について、13 種の 2 成分系展開溶媒によるナイロン 6 薄層クロマトグラフィーを行なった。非プロトン性溶媒とアセトン、または非プロトン性溶媒と少量のメタノールから成る溶媒系では、3-デオキシ体や 3-メトキシ体など低極性化合物の R_f 値は 0.8 以上になるが、その他の化合物の R_f 値は水酸基や二重結合の数の増加につれて低下する。特に n -ヘキサン-アセトン (3:2 v/v)、ベンゼン-アセトン (3:1) などが試料の相互分離に適している。

次に共通の骨格をもつ化合物ごとに R_m 値の差を求め、置換基の種類、位置、配置が移動率に及ぼす影響を検討した。1,3,5(10)-エストラトリエンの 2 または 3 位に導入された水酸基が最も大きな正の ΔR_m 値を示し、吸着性に主として寄与することなどが認められた。

1 緒 言

シリカゲルによるエストロジエンの薄層クロマトグラフィーに関しては多くの報告があるが^{1)~9)}、ポリアミド薄層クロマトグラフィーを応用した例はエストロン、エストラジオールおよびエストリオールの 3 種を分離できることが速報¹⁰⁾されるにとどまっていた。そこで著者は前報¹¹⁾において 23 種類の非水単一溶媒および数種の 2 成分溶媒系で展開したとき、溶媒の溶離能が上記 3 種のエストロジエンの移動率に及ぼす影響について報告した。そして非プロトン性溶媒の hydrogen bonding parameter が増大するにつれて R_f 値が上昇し、また求プロトン性溶媒の solubility parameter の大きいほど R_f 値が上昇することを指摘した。

本報ではエストロジエン関連化合物 20 種についてポリアミド (ナイロン 6) 薄層クロマトグラフィーを試みた。これらの化合物をベンゼン、クロロホルムのような非プロトン性溶媒の混合率が高い 2 成分溶媒系、 n -ヘキサン、ベンゼンなどの非プロトン性溶媒と求プロトン性溶媒であるアセトンから成る 2 成分溶媒系および比較的

多量のアルコール類または水を混合した 2 成分溶媒系によって展開し、得られた各エストロジエン関連化合物の移動率と化学構造との関係について検討した。

2 実 験

2.1 装 置

前報¹¹⁾と同じく、矢沢科学器械工業製の角型薄層クロマトグラフ展開そう 100-70 型を用いた。

2.2 展開溶媒

いずれも和光純薬工業の特級試薬を精製し、Fig. 1, 2, 3 に示した組成のものを用いた。

2.3 ポリアミド薄層

前報¹¹⁾と同様、ポリエチレンテレフタレートフィルムを支持体とする誠心堂化学原料行製、生化学工業販売の“Polyamide Layer” (ナイロン 6) を用いた。

2.4 試 料

Table I に一括して示したエストロジエン関連化合物 20 種を試料とした。これらは、いずれも帝国臓器製薬神戸川明博士から提供された。

2.5 展開条件

試料 2~3 μg を用い、原点の位置を“Polyamide Layer”の下端から 2cm、展開溶媒の液面の深さを 1cm、展開距離を原点から 7cm にそれぞれ一定とし、

* エストロジエンおよびその関連化合物のポリアミドクロマトグラフィー (第 2 報)。前報は徐 型堅：本誌, 20, 1026 (1971)

** 東京薬科大学：東京都新宿区北新宿 3-20-1
現在 台北医学院薬学系：中華民国台湾省台北市具興街 250 号

Table I. Estrogens and related compounds used for polyamide thin-layer chromatography

Sample No.	Systematic names†	Trivial names
1	E-17-one	Deoxyestrone
2	17 β -Methoxy-E	3-Deoxyestradiol-methyl ether
3	3-Hydroxy-2-methoxy-E-17-one	2-Methoxyestrone
4	2,3-Dimethoxy-E-17 β -ol	2,3-Dimethoxyestradiol
5	E-17 β -ol	3-Deoxyestradiol
6	17 α -Ethinyl-3-methoxy-E-17 β -ol	Ethinylestradiol-3-methyl ether
7	3-Hydroxy-E-17-one	Estrone
8	3-Hydroxy-estra-1,3,5(10),7-tetraen-17-one	Equilin
9	3-Hydroxy-estra-1,3,5(10),6,8-pentaen-17-one	Equilenin
10	17 β -Acetoxy-E-2,3-diol	2-Hydroxyestradiol-17-acetate
11	E-3,17 α -diol	17 α -Estradiol
12	17 α -Ethinyl-E-3,17 β -diol	17 α -Ethinylestradiol
13	E-3,17 β -diol	Estradiol
14	E-2,17 β -diol	2,17 β -Dihydroxyestratriene
15	2,3-Dihydroxy-E-17-one	2-Hydroxyestrone
16	meso-3,4-Bis(<i>p</i> -hydroxyphenyl)-hexane	Hexestrol
17	3,4-Bis(<i>p</i> -hydroxyphenyl)-3-hexene	Diethylstilbestrol
18	E-3,16 β ,17 β -triol	16-Epiestriol
19	E-3,16 α ,17 α -triol	17-Epiestriol
20	E-3,16 α ,17 β -triol	Estriol

† Parent compound E=estra-1,3,5(10)-triene

溶媒蒸気をじゅうぶんに飽和させたのち、20°C $\pm$ 1°Cで1次元上昇法により展開した。

2.6 検出方法

前報¹¹⁾と同様、ヨウ素蒸気によりかっ色の呈色像として確認した。

3 結果と考察

3.1 2成分溶媒系におけるエストロゲン関連化合物の挙動

ベンゼン、クロロホルムまたはジクロルメタンのような非プロトン性溶媒と比較的少量のメタノールから成る2成分溶媒系(A~E)で展開した結果をFig. 1に、*n*-ヘキサンまたはベンゼンとアセトンのような求プロトン性溶媒から成る2成分溶媒系(F~I)で展開した結果をFig. 2に示した。いずれの場合にも、遊離の水酸基をもたないデオキシエストロン(試料1)と3-デオキシエストラジオールメチルエーテル(試料2)の R_f 値はほぼ1となりポリアミドに対する吸着性は認められなかったが、それ以外の試料3~20では特に遊離水酸基の置換数が増加するにしたがって R_f 値は低下していくことが示された。すなわち、モノヒドロキシ置換体である試料

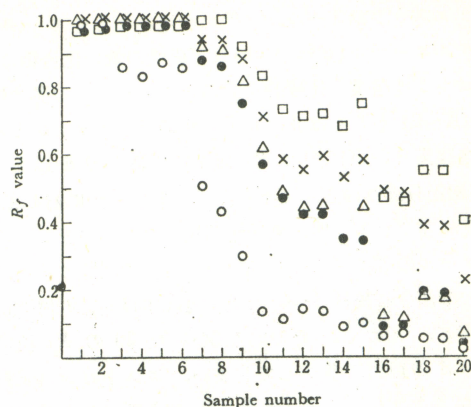


Fig. 1 R_f values of estrogens and related compounds with binary systems containing aprotic solvent as major component

Solvent system: ○ Benzene-methanol (99:1 v/v, A), □ Chloroform-methanol (99:1, B), △ Dichloromethane-methanol (99:1, C), × Benzene-methanol (9:1, D), □ Chloroform-methanol (19:1, E); For sample numbers 1~20, see Table I

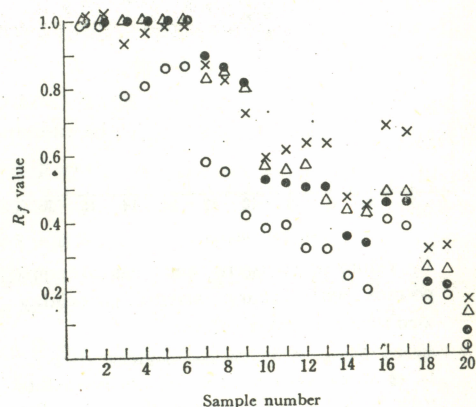


Fig. 2 R_f values of estrogens and related compounds with binary systems containing aprotic and protophilic solvent

Solvent system: ○ *n*-Hexane-acetone (3:2 v/v, F), □ Benzene-acetone (4:1, G), △ Benzene-acetone (3:1, H), × *n*-Hexane-acetone (1:1, I); For sample numbers 1~20, see Table I

3~9の R_f 値が比較的に高いのに対して、トリヒドロキシ置換体である試料18~20は最も低い移動率を与える。試料としたエストロゲン関連化合物の置換基の種類や位置など化学構造の相違が移動率に及ぼす影響については3.2で述べる。

デオキシエストロン(試料1), 3-デオキシエストラジオールメチルエーテル(試料2)をはじめ、2-メトキ

シエストロン, 2,3-ジメトキシエストラジオール, 3-デオキシエストラジオール, エチニルエストラジオール-3-メチルエーテル(試料 3~6)など極性の低い化合物は, 非プロトン性溶媒と比較的少量のメタノールとの混合溶媒系(A~E)もしくは非プロトン性溶媒とアセトンとの混合溶媒系(F~I)では R_f 値がいずれも0.8以上となり, 相互分離はほとんど不可能である。これに対して, たとえば非プロトン性の無極性溶媒シクロヘキサンへのメタノールの混合率が高い溶媒系(J)で展開すると, Fig. 3のように試料1~6の R_f 値は0.7~0.9付近に低下する。しかし, その他の試料7~20の R_f 値は0.7~0.8の範囲に集中してしまい, エストロン(試料7), エストラジオール(試料13)およびエストリオール(試料20)の3者ですらほぼ同一の値を示すに至る。

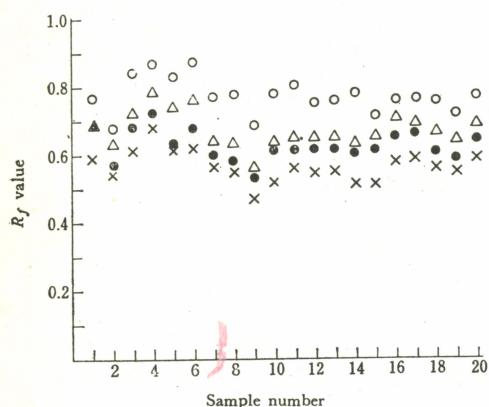


Fig. 3 R_f values of estrogens and related compounds with binary systems containing alcohol or aqueous solvent

Solvent system: ○ Cyclohexane-methanol (1:4 v/v, J), ● Acetone-water (6:4, K), △ *n*-Propyl alcohol-water (6:4, L), × Ethanol-water (6:4, M); For sample numbers 1~20, see Table I

またアセトン, *n*-プロピルアルコール, エタノールのいずれかを他成分とする含水2成分溶媒系(K~M)を用いて展開すると, Fig. 3のように遊離水酸基をもたない極性の低い前記の化合物(試料1~6)の R_f 値はさらに低下して0.5~0.8の範囲となり, 溶媒Lを用いればこれらの相互分離の可能性が認められる。一方, その他の化合物の R_f 値は0.5~0.7前後にまとまって分布し, しかもエストリオール>エストラジオール≥エストロンという R_f 値の序列を示した。Fig. 1, 2のすべての2成分溶媒系ならびに前報¹¹⁾で用いた20種類の非水単一溶媒による展開では, 常に3者の R_f 値の序列が

エストロン>エストラジオール>エストリオールであったのに対して, 上記の含水2成分溶媒系ではその序列に逆転の傾向が認められる。Wangら¹⁰⁾はすでにエストロゲン3種のポリアミド薄層クロマトグラフィーに関する速報のなかで, クロロホルム-*n*-ブタノール(95:5)で展開すればエストロン>エストラジオール>エストリオールという R_f 値の序列が, エタノール-水(6:4)ではエストリオール>エストロン≥エストラジオールの序列に変わることを指摘した。また Copius-Peereboomら¹²⁾は油溶性色素のポリアミド薄層クロマトグラフィーにおいて, クロロホルム-メタノール-水, アセトン-エタノール-水のような含水溶媒系を用いると分配クロマトグラフィー的な現象が認められることを報告している。なお Haraら²¹⁾によればシリカゲル薄層クロマトグラフィーの場合, 非水の2成分系または単一溶媒のいずれにおいてもエストロン>エストラジオール>エストリオールという R_f 値の序列が得られている。以上のことを考えあわせると, Fig. 3の含水2成分溶媒系で認められた前記のような R_f 値の0.5~0.8への低下と非水溶媒系に比べての序列の変化は, 含水溶媒系の使用によって分配クロマトグラフィーの様相を呈することに基づくものと推定される。

次にヘキストロール(試料16)とジエチルスチルベスチロール(試料17)とは1,3,5(10)-エストラトリエン骨格をもたないスチルベン系合成エストロゲンであり, いずれもフェノール性水酸基2個とフェニレン基2個を有するが, 前者の分子式 $C_{18}H_{22}O_2$, 後者の $C_{18}H_{20}O_2$ がエストラン系天然エストロゲンたとえばエストラジオール $C_{18}H_{24}O_2$ と近似するのも卵胞ホルモン作用の発現にあずかっていることが明らかにされているので, 関連化合物としてクロマトグラフィー的な挙動を比較した。Fig. 1と2を比べたときの顕著な現象は以下の点である。

非プロトン性溶媒の混合率が高い2成分溶媒系A~Eではフェノール性, アルコール性水酸基各1個をもつエストラジオール関連化合物(試料11~14)およびフェノール性水酸基2個をもつカテコール型エストロゲン(試料10, 15)の R_f 値に比べて試料16と17のそれは低い。これに反して非プロトン性溶媒と求プロトン性溶媒から成るF~Iでは, 試料10~15の R_f 値のほうが低く試料16と17ののほうが高くなり, Fig. 1とは R_f 値の傾向が逆になる。非プロトン性溶媒としてクロロホルムを, 求プロトン性溶媒として酢酸エチルを選び, 各単一溶媒および両者の混合比を99:1から1:99まで変えた溶媒系でヘキストロールとエストラジオ

ールを展開しても上記の現象は明りょうに示され、両溶媒の混合比 1:1 を境にして Fig. 4 のように両試料の R_f 値の逆転が認められた。Hara ら²⁾はシリカゲル薄層クロマトグラフィーによるステロイドの系統分析の研究において、展開溶媒の相違によって R_f 値の序列が逆になることがあると指摘している。著者の場合、フェノール性水酸基が 1 個の試料 11~14 およびフェノール性水酸基が 2, 3 位に隣接する試料 10 と 15 がポリアミドと水素結合するよりも、2 個のフェノール性水酸基が互いに独立している試料 16 と 17 の形成する水素結合のほうが、非プロトン性溶媒系またはその混合率が高い系ではより強いことに基づくものと考えられる。

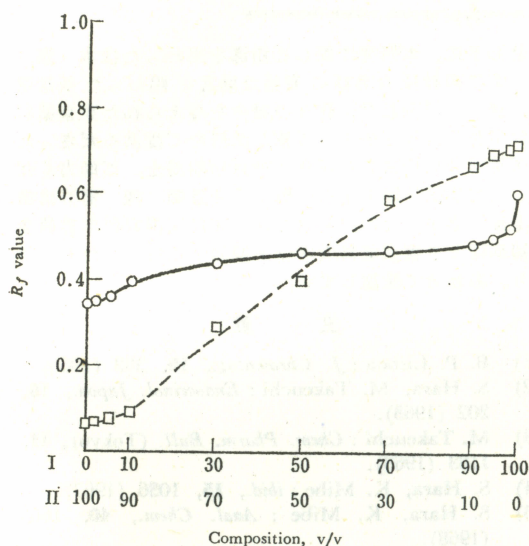


Fig. 4 Change in R_f values of estradiol and hexestrol in chloroform-ethyl acetate systems

I: Ethyl acetate; II: Chloroform; —○— Estradiol; --□-- Hexestrol

前報¹¹⁾の実験結果からも hydrogen bonding parameter (γ 値)の低い非プロトン性溶媒またはその混合率の高い 2 成分溶媒系で展開するときには移動率が低く、 γ 値ならびに solubility parameter (δ 値)の高い求プロトン性溶媒またはその混合率の高い溶媒系では移動率が高く、後者においては溶媒分子中の酸素原子が水素結合受容体となって試料分子の水酸基との結合が強められ溶媒和するものと認められた。このような両種の溶媒系による移動率の変化の傾向は、本報では前記のほか展開溶媒系 G, H に対する B, C における 16- および 17-エピエストリオール (試料 18, 19) の R_f 値の逆転

などからも示される。

以上の実験で用いた 2 成分溶媒系のなかでは、3-デオキシ体をはじめとする低極性化合物 (試料 1~6) 以外のエストロゲン関連化合物 14 種には *n*-ヘキサン-アセトン (3:2, F) やベンゼン-アセトン (3:1, H) など非プロトン性溶媒に対する求プロトン性溶媒の混合率が比較的高い系によって各 R_f 値の差異が得られやすく、これらの相互分離に適した展開溶媒系であることを認めた。一方、ベンゼン-メタノール (99:1, A) やジクロルメタン-メタノール (99:1, C) など非プロトン性溶媒の混合率が高い系では、概して試料化合物の水酸基の数など試料の極性に依りて大別的に分属が行なわれる傾向が認められた。

3.2 エストロゲン関連化合物の化学構造と移動率との関係

天然および合成ステロイドの液相クロマトグラフィーにおける移動率と置換基の種類、位置、配置など試料の化学構造との関係を各置換基ごとのパラメーターとして求める方法は、Lisboa¹¹⁾(13)(14)、Fehér¹⁵⁾、原¹⁶⁾、Hara ら⁴⁾⁽⁵⁾⁽¹⁷⁾によって報告されている。これらの研究では数種のエストラン系ステロイド¹⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾のほか主として C_{19} -^{1)(4)(5)(13)~17)}、 C_{21} -ステロイド⁴⁾⁽⁵⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾、合成ステロイド系薬剤⁴⁾⁽⁵⁾、ステロイドサボゲニン¹⁶⁾⁽¹⁷⁾、胆じゅう酸およびそのメチルエステル¹⁶⁾⁽¹⁷⁾についてシリカゲル、アルミナ薄層クロマトグラフィーなどにおける特定の展開溶媒系で得られた R_f 値の平均値から R_m 値 ($=\log [1/R_f - 1]$)¹⁸⁾に換算し、置換基による R_m 値の差 (ΔR_m 値)を置換基のパラメーターとすることが行なわれている。著者は 3.1 で得られた R_f 値に基づいて、ポリアミド薄層クロマトグラフィーにおける移動率に及ぼすエストロゲン関連化合物の置換基の影響を上記の方法により検討した。

展開溶媒には先端分離の影響が少なく R_f 値の再現性が高く、F で展開すると 3-デオキシエストラジオール (試料 5) の R_f 値が 0.86 となる以外は一般に 0.1~0.7 の範囲に R_f 値を与える溶媒系 F, H, A その他を選び、同一試料について得られた少なくとも 5 個以上の R_f 値の平均を R_m 値に換算した。共通の骨格構造をもつ試料化合物を 1 対ずつ選んで一方を基本化合物とし、基本化合物との置換基の相違による R_m 値の差を求めて、その置換基の ΔR_m 値とする。得られた ΔR_m 値は Table II に示したが、この値からポリアミド薄層クロマトグラフィーにおける移動率に及ぼす個々の置換基の寄与を数値的に評価でき、以下のことが認められた。

Table II ΔR_m values of converted functional groups of estrogens and related compounds

Converted functional group	in No.	No. of root compound	Mean† R_f value	ΔR_m value	Solvent†† system
Δ^7	8	7	0.50	+0.10	A
$\Delta^{6,8}$	9	7	0.58	+0.29	F
2-OH	14	5	0.86	+1.30	F
"	15	7	0.58	+0.82	F
3-OH	13	5	0.86	+1.10	F
3-OH→2-OH	14	13	0.31	+0.22	F
3-OH→3-OCH ₃	6	12	0.13	-1.66	A
2-OH→2-OCH ₃	3	15	0.19	-1.18	F
2-OCH ₃	3	7	0.50	-0.75	A
2-OCH ₃ , 3-OCH ₃	4	5	0.86	+0.15	F
16 α -OH	19	11	0.48	+0.65	C
"	20	13	0.46	+0.55	H
16 β -OH	18	13	0.45	+0.38	C ¹
16 β -OH→16 α -OH	20	18	0.26	+0.38	H
17 β -OH→17 α -OH	19	20	0.23	-0.33	D
17 β -OH, 17 α -OH	11	13	0.45	-0.07	C
17 α -C≡CH	12	13	0.46	-0.18	H

† R_f values of the root compounds; †† For solvent systems, see the end of Fig. 1 and 2

(1) エクイリン (試料8), エクイレニン (試料9) にみられるように, B環に存在する1または2個の二重結合は, A環のみの共役二重結合よりも正の ΔR_m 値を示しポリアミドへの吸着性を強める (基本化合物7に対する試料8, 以下7-8と略記, および7-9). これは試料の3位の水酸基とポリアミドを構成する酸アミド結合の酸素原子との間の水素結合のほかに, 試料の二重結合とポリアミドのアミド水素原子との間に π 型水素結合 (π 電子を受容体とする水素結合) も形成される傾向が増大するためと考えられる.

(2) 2位または3位のフェノール性水酸基は大きな正の ΔR_m 値を示し, ポリアミドへの吸着性を顕著に強める (5-14, 7-15, 5-13). これらの水酸基の形成する水素結合がポリアミドへの吸着に主として寄与するものと推察できる. なお, 2位の水酸基は3位のものに比べてやや強い吸着性を示すようにみえる (13-14).

(3) 2位または3位の水酸基がメトキシ基に変わると大きな負の ΔR_m 値を示し, ポリアミドへの吸着性は顕著に減少する (12-6, 15-3).

3位に水酸基が存在する化合物の2位に導入されたメトキシ基は負の ΔR_m 値を示し, 3位の水酸基のポリアミドへの吸着性を減少する傾向が認められる (7-3).

基本化合物3-デオキシエストラジオールの2位と3位に導入されたメトキシ基はわずかに正の ΔR_m 値を与え, ポリアミドへの吸着性を少し強める (5-4).

(4) エストラジオールのような3, 17-オール体の16位へ α あるいは β 配置に導入された水酸基はいずれも正の ΔR_m 値を示し, ポリアミドへの吸着性をかなり強める (11-19, 13-20, 13-18).

また2例ではあるが, 16位と17位に隣接した2個の水酸基においては16 α , 17 β 配置に比べて16 α , 17 α 配置が負 (20-19) の, 16 β , 17 β 配置に比べて16 α , 17 β 配置が正 (18-20) の ΔR_m 値を示すことから, トランス配置のほうがポリアミドへの吸着性を強めるものと認められる.

(5) 17 β 水酸基の α 位に導入されたエチニル基 (13-12), 17位水酸基が α 配置か β 配置かの差異 (13-11) がポリアミドに対する吸着性に及ぼす影響については, Table II および Fig. 1, 2 での展開結果からは不明りようであった.

終わりに, 本研究に際して指導を賜った松本 潮, 原 昭二両教授ならびに有益な助言を賜った新延信吉, 森 陽両教授, 研究の機会を与えられた東京薬科大学学長長瀬雄三先生, 貴重な試料をご提供くださった帝國臓器製薬株式会社研究所神戸川明博士, ご助力くださった台北医学院薬学系の唐 孟湘講師, 陳 雪芳講師に深謝します. なお, 本研究は中華民国国家科学委員会の補助により東京薬科大学留学期間中に行なったものであり, あわせて深謝します.

文 献

- 1) B. P. Lisboa: *J. Chromatog.*, **19**, 333 (1965).
- 2) S. Hara, M. Takeuchi: *Endocrinol. Japon.*, **10**, 202 (1963).
- 3) M. Takeuchi: *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **11**, 1183 (1963).
- 4) S. Hara, K. Mibe: *ibid.*, **15**, 1036 (1967).
- 5) S. Hara, K. Mibe: *Anal. Chem.*, **40**, 1605 (1968).
- 6) G. L. Flickinger, J. C. Touchston: *J. Chromatog.*, **36**, 250 (1968).
- 7) J. C. Touchston: *ibid.*, **37**, 359 (1968).
- 8) R. H. Bishara, I. M. Jakovejevic: *ibid.*, **41**, 138 (1969).
- 9) V. V. Patwardhan, E. B. Romanoff: *ibid.*, **39**, 510 (1969).
- 10) Y. C. Tung, K. T. Wang: *Nature*, **208**, 581 (1965).
- 11) 徐 型堅: 本誌, **20**, 1026 (1971).
- 12) J. W. Copius-Peereboom, H. W. Beekes: *J. Chromatog.*, **20**, 43 (1965).
- 13) B. P. Lisboa: *ibid.*, **19**, 81 (1965).
- 14) B. P. Lisboa: *Steroids*, **6**, 605 (1965).
- 15) T. Fehér: *J. Chromatog.*, **19**, 551 (1965).
- 16) 原 昭二: 日化, **86**, 1344 (1965).
- 17) S. Hara, M. Miyaki: *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **15**, 1032 (1967).
- 18) E. C. Bate-Smith, R. G. Westall: *Biochim. Biophys. Acta*, **4**, 427 (1950).

☆

Polyamide thin-layer chromatography of estrogen related compounds and influence of chemical structure on migration rates. (Polyamide chromatography of estrogens and its related compounds. II.) Hsing-Chien Hsu (Tokyo College of Pharmacy, 3-20-1, Kitashinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo)

Thin-layer chromatography on polyamide (Nylon 6) has been examined for twenty estrogens and its related compounds including hexestrol and diethylstilbestrol by using thirteen kinds of binary solvent systems as the developments. R_f values for six kinds of low polar compounds, such as 3-deoxy- or methoxy-estra-1,3,5(10)-triene derivatives, went above 0.8 by use of the binary developing systems composed of either aprotic solvents and a small amount of methanol, or aprotic solvents and acetone. On the other hand, migration rates of the other hydroxy-compounds of estratriene and stilbene derivatives decreased with

the increase of the number of hydroxyl or double bond. The relatively better separation of these compounds could be accomplished with such solvent systems as hexane-acetone (3 : 2 v/v) and benzene-acetone (3 : 1).

To investigate the influence of the chemical structure of estrogens on their migration rates, R_m increments (ΔR_m values) were calculated for several functional groups on the basis of the mean R_f values of a pair of estrogens having the common nucleus. The representative ΔR_m values obtained in the specific developing solvents are: +1.30, +0.82 (2-OH); +1.10 (3-OH); +0.65, +0.55 (16 α -OH); +0.38 (16 β -OH); +0.22 (3-OH $\rightarrow$ 2-OH); +0.38 (16 β -OH $\rightarrow$ 16 α -OH); +0.10 (Δ^7); +0.29 ($\Delta^{6,8}$). From these values, it seems that the phenolic and secondary hydroxyl groups mainly contribute to the adsorption of these estrogens on polyamide.

(Received May 31, 1974)