Fractionation of Estrogen-Methyl-Esters with Alumina Column Chromatography (Estimation of 16-epi-estriol in Pregnant Urine)

Keizo SHIDA & Mihiko KIMURA

Urological Department, Tokyo Medical & Dental University

Akira KANBEGAWA

Teikoku Hormone Manuf. Co.

A chromatographical method for fractionation of estrogen methyl ethers.

100ml. of late pregnancy urine was boiled for 15 minutes with 15 vol. % of conc HCl. Hydrolyzed urine was extracted twice with 150 ml. of ether and the extract was washed twice with 25 ml. of 5% NaHCO₃ solution to remove acid substances and then washed three times with water (20ml.). The ether solution was dried with anhydrous Na₂SO₄ and was distilled to about 10 ml. in a water bath.

The contents were transferred together with 25 ml. of benzene and 25 ml. of petroleum ether into a separating funnel. The benzene petroleum ether solution was extracted twice with 25 ml. of 1.6% NaOH. Then H₃BO₃ (0.9 gr.) was added to the given NaOH extracts. The flask was placed in a 37°C water bath and 1 ml. of dimethylsulfate was added. The flask was stirred by a magnetic stirrer at 37°C for 30 minutes and was allowed to stand at room temperature overnight.

Ten ml. of 20% NaOH and 2.5 ml. of 30% H₂O₂ were added to the flask and the contents of the flask were transferred to a separating funnel.

The methylated estrogens were chromatographed by alumina column; the size of the column was 0.5×20 cm. The column was prepared by partly filling it with petroleum ether and then adding the 2.0 gr. of Brockmann alumina (activity III). The chromatograms were run at 18°C under the pressure of 10~12 cm./Hg. The eluates was divided into 2ml. for each tube.

Estrone methyl ester, estradiol methyl ester, 16-epi-estriol methyl ester and estriol methyl ester were eluated with 40% petroleum ether in benzene, benzen, 1.6% methanol in benzene and 3.0% methanol in benzene, respectively.

By this method, estrogens in pregnant urine were separated into four fractions and were measured. It was then determined that the 16-epi-estriol contained in late prengnancy urine was 11.5% of the total estrogens.

Production of Experimental Thyroiditis and Goiter by the Administration of Thyrotropin Releasing Factor

Chiaki ABE

Department of Surgery, School of Medicine Gunma University (Director : Prof. K. Schibusawa)

Thyrotropin releasing factor (TRF) was injected into Wistar male rats and DD male mice for various durations in combination with various substances in order to produce experimentally, thyroid diseases clinically resembling simple goiter, hyperthyroidism, subacute thyroiditis and thyroid tumor.

1. When the animals were fed a definite amount of iodine, and at the same time injected daily

Alumina Column Chromatography による Estrogen Methyl Ester の分劃測定法

(特に妊娠尿中よりの 16-Epi-estriol の分離測定について)

東京医科歯科大学泌尿器科

志 田 圭 三
木 村 光 比 子

帝国臓器株式会社研究所

神 戸 川 明

(昭和 35 年 7 月 26 日 受付)

I 緒 言

遊離型 estrogen を分劃測定するには従来行われている alumina column を用いる Stimmel 法¹⁾, 或は celite 535 を用いる Braunsberg 法²⁾ 等が多く用いられているが, これは estrone, estradiol, estriol の 3 者が尿中 estrogen の主要代謝産物とされていた時代の測定法である. 近年 column chromatography のみならず paper chromatography, counter current distribution の発展により尿中 estrogen には種々のものがみだされている. 即ち Marrian 等^{3,4)}は妊婦尿中から 16-epi-estriol, 16-hydroxy-estrone 及び 18-hydroxy-estrone を単離, 同定しており, Diczfaulsky⁵⁾は胎盤中に 16-epi-estriol は estriol よりも少いが存在する事を示している.

1958年度日本内分泌学会東部部会 2 月例会で, 著者等は妊婦尿中に 16-epi-estriol の存在する事を paper chromatography で確認しこの事実を発表した. しかしながら 16-epi-estriol の存在量は現在迄の分劃法では測定し得なかつたので再検討を行なう事にした. Alumina column を用いて 4 分劃に分劃する事を種々試みた結果, 各々の 3-methyl ester が非常によく分離する事を認めたのでここに発表する次第である.

II 実験方法

A. 試 薬

試薬はいづれも特に記載するもの以外は特級を用い, 溶剤は硝子磨合せ蒸溜装置を用いて再溜した.
petroleum-ether: 1 級品を蒸溜し, B.P. 40~60°Cのものをとる.

benzene: 1 級品を蒸溜し, B.P. 80~81°Cのものをとる.

無水 benzene: 蒸溜 benzene に金属 Na を加え, 脱水後再蒸溜.

methanol: B.P. 64.6°C.

ジメチール硫酸:

1.6% NaOH: NaOH 16gr を蒸溜水 1000ml に溶解.

20% NaOH: NaOH 20gr を蒸溜水 1000ml に溶解.

5% NaHCO₃: NaHCO₃ 50gr を蒸溜水 1000ml に溶解.

濃硫酸: 市販濃硫酸.

30%v/vH₂SO₄: 濃硫酸 30ml に水 70ml を加える.

H₂O₂: 市販30%過酸化水素水.

H₃BO₃: 局法.

Hydroquinone Kober 試薬: hydroquinone 2gr を65% (v/v) H₂SO₄ 100ml にすみやかに加熱して溶解し, 褐色瓶に貯える.

Fig. 1. Estrogen Methyl Ester ($10\mu\text{g}$) の
Hydroquinone Kober 試薬による吸収曲線

標準溶液: estrone, estradiol, 16-epi-estriol,
estriol 並びに各々の 3-methyl ester 10mg/dl
アルコール溶液

B. 測定器械

Automatic fraction collector, Beckman 型 Du
型 spectrophotometer

III 実験成績

A. Estrogen の Methyl-ester の Hydroquinone
Kober 試薬による反応

Estrone, estradiol 並びに estriol を上記方法で
methyl 化し, hydroquinone-Kober 試薬で発色せ
しめ, その吸収曲線を検討してみるに遊離型のもの
と同様であつた. 16-epi-estriol についても同様に,
estrogen とほぼ同程度の感度を示す (Fig. 1).

B. Elution system の検討

Column chromatography に於ける展開, 溶出状
液を estrone-3-methyl ester と estradiol-3-methyl
ester を用い検討した. 60% petroleum·ether·benzene を使用した際には Fig. 2 の如く, estrone-3-methyl-
ester の溶出がかなりおそくから始まり, 次に benzene で溶出する estradiol-3-methyl ester と重なる危
険性がある. これに反して 40% petroleum·ether·benzene を用いた場合には estrone-3-methyl ester の溶
出ははやくおこり, estradiol-3-methyl ester の溶出とかさなる事がなく, 各々を明確に分離し得たので,
今後の実験に於てはこの溶出 system を用いる事にした (Fig. 2).

Fig. 2. Estrone Methyl Ester 及び Estradiol Methyl Ester の Fractionation Pattern.

尚, 16-epi-estriol-3-methyl-ester は 1.6% methanol·benzene で, estriol-3-methyl ester は 3.0% me-
thanol·benzene で各々溶出される (Fig. 3).

C. 従来の分割法と methyl 化分割法との比較

1 例の妊娠 10 カ月の婦人尿 30ml を従来の方法で抽出, Stimmel 法 (methanol·benzene system で溶出) で
クロマト分割測定し, 同一尿を methyl 化した後上記の system で溶出, 分割測定したものとを比較検討し
た.

Fig.3. Estrogen Methyl Ester の Column Chromatography による Fractionation.

全体の約11.5%を占めている (Fig. 4, 5).

従来の方法では estrone 3.7 μ g, estradiol 6.5 μ g, estriol 93.0 μ g, 計103.2mgの値が得られ, methyl 化法では estrone-3-methyl ester 5.5 μ g, estradiol-methyl ester 7.1 μ g, 16-epi-estradiol-3-methyl ester 6.5 μ g, estriol-3-methyl ester 95.0 μ g, 計111.5 μ g の値が得られた. methyl ester で 111.5 μ g であるから遊離型としては 105.9 μ g となり, 総量にしては従来の方法による測定値と殆んど同一の値が得られている. ただ 16-epi-estradiol が12.4 μ g 分離され,

Fig.4. 妊娠10ヵ月尿30ml中の Estrogen の Fractionation.

Fig.5. 妊娠10ヵ月尿30ml中の Estrogen Methyl Ester の Fractionation.

IV 総括並びに考按

A. 測定法小括

以上の実験成績より尿中 estrogen の分割測定法は次の如く施行するのが適当と考えられる.

(1) 検体調製法

24時間尿を適量 (estrogen 50~150 μ g 含有) を三角コルペンにとり濃硫酸を15Vol%の割合に加えて蒸気浴上で15分間加水分解, 冷却後原尿量の1.5倍の ether を加えて2回抽出, ether 層は5% NaHCO₃(ether 量の約10%)を加えて2度洗滌し, 次いで中性となるまで水洗後, 芒硝で脱水, 約10mlまで濃縮する.

kg 6. 尿中 Estrogen の抽出と Methylation

濃縮せるエーテルを benzene-petroleum. ether 等量混液 80ml を用いてフラスコから分液漏斗に移す, 次いで 1.6% NaOH 25ml で 2 回抽出する.

アルカリ属に H_3BO_3 0.9gr と $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ 1ml を加え 37°C で 30 分攪拌 (magnetic stirrer 使用) して, 一晚放置, 放置後アルカリ液に 20% NaOH 10ml と 3% H_2O_2 2.5ml を加え, 暫時の後 benzene 50ml で 2 回抽出, benzene 層を中性となる迄水洗, 芒硝で脱水後蒸溜する. 蒸溜残渣をデシケーターで乾燥後 petroleum. ether 5ml にとかして検体とする (Fig. 6).

(2) 分割法

長さ 20cm, 内径 5 mm のクロマト管の底部に脱脂綿を少量かるくつめ, Merck 社製 Brockmann 活性アルミナ, (活性度Ⅲ) 2.0g を petroleum. ether に懸濁させて流してみ, クロマト管の上部には摺合せ 50ml の分液漏斗をとりつけ, これを加圧装置に接続する.

加圧は N_2 ガスで水銀柱 10~12cm の圧で行なう. petroleum. ether が alumina column の 0.5

cm の所に来た時に検体を入れ, それが再び alumina 柱の上端 0.5cm に来た時に 40% petroleum. ether-benzene を加え, 加圧して溶剤が滴下し始めたなれば fraction collector の最初に試験管にとる.

1 本の試験管に 2 ml づつ採取, 同一溶媒で 9 本づつとつたなれば次の溶媒を加えて展開をつづける.

- i 40% petroleum. ether-benzene 2 ml × 9 本,
- ii benzene 2 ml × 9 本,
- iii 1.6% methanol -benzene 2 ml × 9 本,
- iv 3.0% methanol -benzene 2 ml × 9 本,

総計 36 本で溶出を完了する. 各試験管の溶媒を蒸発乾涸し, blank 2 本, estrone-3-methyl ester 並びに 16-epi-estriol-3-methyl ester 各 10 μg , estradiol-3-methyl-ester 並びに estriol-3-methyl-ester 各 20 μg を standard として hydroquinone Kober 法で発色させる.

Beckmann DU 型光色光度計で 480, 515, 550m μ の波長で吸光度を測定し, Allen の補正式を使用して補正し, 各 standard より換算する.

B. 文献的考察

近年 16-epiestriol が妊婦尿中に含有されている事が明かにされて以来, 各種の分割法が検討されている. Dao は paper chromatography で estriol, 16-epi-estriol を, Bush は B_2 system で分離し, 生物学的測定法で含有量を測定している. Diczfalusy は countercurrent distribution にて分離し, Marrian 一派は妊婦尿から, まづ estrone, estradiol, estriol を分離し, 次いで Celite 535 を用いて, 16-epi-estriol, 16-hydroxy-estrone を単離測定している. また, 最近では 16-hydroxy-estrone を paper-chromatography を用いて, 同定している. 本邦に於ても, 関, 松本等はイオン交換樹脂を用いて妊婦尿を分割測定し, 好結果を得ている.

Brown, Velle 等の方法は estriol を benzene-petroleum. ether 等量混液から水で抽出して分離後, methyl 化し, estrone, estradiol 部分は methyl 化後 alumina column を用いて, 60% petroleum. ether-benzene 及び benzene で各々分離しており, Marrian 等の方法は, Column に Celite を用いて遊離型のまま 70% methanol. ethylendichloride の system で estriol と 16-epi-estriol を分離定量するもので, 著者等の如く,

5者を同時に methyl 化して分割する方法は見当らない。

尚、著者等の分割法は妊婦尿の場合であつて、正常婦人の尿中に epi-estriol が存在するか否かは測定を行なっていない。Brown 等は正常婦人尿を methyl 化して3分割に分け hydroquinone 法で測定している事実からして、正常婦人尿に於てもかかる方法で estrogen を分割測定しうる可能性があるように考えられる。

男子尿はともかくとして、妊婦尿の estrogen 分割測定法としては簡易で、分離が確実であり、臨床検査に応用しうるものと考えられる。

V 結 語

妊婦尿中には estrone, estradiol, estriol の他、16-epi-estriol がかなり含有されている事が報告されている。著者等は estrogen 部分を methyl 化した後、alumina column chromatography により petroleum-ether-benzene system 並びに methanol-benzene system を用い4分割に分離測定する方法を考案した。

即ち、estrone-3-methyl-ester は40% petroleum-ether-benzene で、estradiol-3-methyl-ester は benzene で、16-epiestriol-3-methyl-ester は1.6% methanol-benzene で、estriol-3-methyl-ester は3% methanol-benzene で溶出される。

この方法で得た妊娠10ヵ月尿中の 16-epi-estriol は総 estrogen 量の11.5%をしめていた。

文 献

- 1) Braunsberg, H. & Swyer, G.I. : J. Endocrinol., **7**, LX, 1951.
- 2) Brown, J.B. : Biochem. J., **60**, 185, 1955.
- 3) Diczfausy, E. & Halla, M. : Acta Endocrinol., **27**, 303, 1958.
- 4) Dao, J. : Endocrinol., **61**, 242, 1957.
- 5) Marrian, G.F. & Bauld, W.S. : Biochem. J., **59**, 136, 1955.
- 6) Marrian, G.F. : Biochem. J., **66**, 60, 1957.
- 7) Marrian, G.F., Loke, K.H. & Watson, E. : Biochem. J., **71**, 43, 1959.
- 8) 志田, 木村, 畝, 細井, 神戸川 : ホと臨, **6**, 373, 1958.
- 9) 関, 松本 : 日本内分泌会誌, **33**, 819, 1957.
- 10) Stimmel, B.F. : J. Biol. Chem., **153**, 327, 1944.
- 11) Velle, W. : Acta Endocrinol., **15**, 307, 1957.