Experimental Studies on the Steroid Aromatization

Appendix: On the aromatization of 17α -methyl-steroids**Minoru AMATSU**

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine

(Director : Prof. Gen-ichi Tokuda)

In the previous paper, aromatization of dehydroepiandrosterone, 4-androstenedione and testosterone was reported. In this paper, two 17α -methyl-steroids were studied about the possibility of their aromatization in vitro.

Methods were similar to those described in the previous paper, but 17α -methyl-19-nortestosterone and 17α -methyl-testosterone were used as substrate. Phenolic extract obtained in 8 experiments with 17α -methyl-19-nortestosterone was pooled and chromatographed on paper in the benzene-ligroin-methanol-water system for 4 hours at 25°C.

Areas corresponded in its mobility with authentic 17α -methyl-estradiol were eluted by methanol and rechromatographed several times in the same system.

The compound thus obtained was compared with authentic 17α -methyl-estradiol in its UV-absorption spectrum, sulfuric acid chromogen spectrum, alcohol-sulfuric acid (1:2) chromogen spectrum, and 2% hydroquinone-65% sulfuric acid chromogen spectrum. All these findings revealed, the compound obtained in the incubation of 17α -methyl-19-nortestosterone with human placental homogenate was 17α -methyl-estradiol.

Experiments with 17α -methyl-testosterone also resulted the formation of 17α -methyl-estradiol in the same criteria.

(pp. 1009-1012)

Steroid Aromatization に関する実験的研究

〔続 報〕

京都府立医科大学産婦人科学教室 (主任 徳田源市教授)

天 津 實

(昭和38年11月28日受付)

緒 言

著者はすでに胎盤の steroid aromatizing enzyme system¹⁾を用いて dehydroepiandrosterone, 4α -androstene-3, 17-dione, testosterone および各種合成 progestin の estrogen への転換の可能性につき検討を加え報告した²⁾. しかし 17α 位に methyl 基を有する testosterone および 19-nortestosterone の誘導体である 17α -methyl-testosterone [以下 MT と略] および 17α -methyl-19-nortestosterone [以下 MNT と略] を substrate として行なった実験では, estronefraction に Hydroquinone-Kober 第1反応で黄色を呈し加熱時間の経過と共に褪色をはじめ, 第2反応後はほとんど chromogen を形成しない物質の存在を認めて報告した. このものが 17α -methyl-estradiol [以下 MED と略] であるかどうかについては MED の pure sample が入手困難であつたので決定出来なかつた. しかし今回幸いに MED の pure sample を入手し得たのでこの点につき検討を試みて, 前述の Hydroquinone-Kober 第1反応で黄色を呈する物質が MED であることを確認し得たので報告する.

実 験 方 法

娩出直後の胎盤から大血管および卵膜を除きこれを 0.05 mol phosphate, pH 7.0, 0.04 mol nicotinamide を含んだ 0.25 mol sucrose 溶液 (incubation medium) で1回洗滌, 水分を可及的に除き, 鉢で細切後 waring blender で homogenize し, その 20g ずつを計量した. 次に上記の incubation medium 7ml を加えふたたび homogenize し, これに substrate として今回は MNT および MT 各々 500 μ g を propylene glycol 0.2ml に溶解して加え, gasphase を空気として2時間 incubation した. Incubation は同時に8個を行ない pool した.

組織からの抽出には acetone を用い以後の抽出精製操作は Table 1 のように Engel 法³⁾を改良して行なった. 次に内径 7 mm のガラス管に Brockmann alumina Oxydatum standard 活性度 II-III 2.0g を充填し, benzene 5ml で資料を吸着させて 5% methanol-benzene 30ml で MED-fraction を溶出した. この後 benzene-ligroin-methanol-water system [70 : 130 : 160 : 40] に

Table 1. Extraction and Purification of Estrogens.

Placenta 20g wet weight homogenate
Extracted with Acetone 60ml 3 times
Aqueous phase extracted with Ether 50ml 3times
Evaporated to 5ml
Petroleum-ether 50ml added
Extracted with IN-NaOH 10ml 3 times
Acidified to pH 7.0 with conc. HCl
Extracted with Ether 50ml 3 times
Washed with 5%-NaHCO₃ and dist. Water
Evaporated to dryness
Dissolved in Toluene 50ml
Extracted with IN-NaOH 10ml 3 times
Acidified to pH 7.0 with conc. HCl
Extracted with Ether 50ml 3 times
Washed with dist. Water
Evaporated to dryness
Alumina Column Chromatography
Paper Chromatography

Fig.1. Hydroquinone- H_2SO_4 chromogen spectra of MED, and Hydroquinone-Kober chromogen spectra of MED obtained from incubation of MNT and MT

よる paper chromatography を施行して standard の MED 相当部分を methanol で溶出後、さらに2回の rechromatography を行ない各種の定性反応に供した。

実験成績ならびに考察

1 Hydroquinone-Kober 反応

すでに報告したとおり MNT および MT を substrate として incubation を行なつて得られた抽出物に Hydroquinone-Kober 反応を行なうと Hydroquinone 硫酸を加えたのみで黄色を呈する。その chromogen spectrum は Fig.1 に示すように $455\text{m}\mu$ に peak を有する。この呈色は加熱により一時増強するがのち漸次褪色をはじめ、第2反応終了後にはほとんど chromogen を形成しなくなる。

standard MED について同時に Hydroquinone-Kober 反応を行なつても第1反応加熱前の chromogen spectrum は同様の peak を示し、第2反応終了後にはほとんど chromogen を形成しなかつた。

2 Paper chromatography

MNT および MT の incubation で得られた抽出物を前述の system により展開し、paper 上での発色は Burton⁵⁾ の報告した 1%

Fig.2. Paper chromatogram of MED obtained from incubation of MNT

FeCl_3 と 1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ の等量混合液を用いて行なった. Fig.2 に示したように substrate として MNT, MT のいずれを用いても standard MED の Rf と合致する spot を得た. なお MED の Rf は 0.34 である.

3 Ultraviolet absorption spectrum

さらに同一 system による 2 回の rechromatography のちに ethanol 中での ultraviolet absorption spectrum を測定した. Fig.3 に示したように MNT および MT いずれを substrate とした場合にもその抽出物は aromatic 3-hydroxy steroid に特有である $280\text{m}\mu$ 付近に peak が認められ, standard MED のそれと一致した.

Fig.3. UV-absorption spectra of MED obtained from incubation of MNT and MT

Fig.4. Sulfuric acid chromogen spectra of MED obtained from incubation of MNT and MT

4 Sulfuric acid chromogen spectrum

硫酸 4 ml を加え室温に 2 時間放置してその chromogen spectrum を測定した. Fig.4 に示すように MNT, MT のいずれを substrate とした場合も, 368m μ および 457m μ に peak を有する chromogen を形成し, standard MED のそれと一致した.

5 Alcohol-sulfuric acid chromogen spectrum

Ethanol および硫酸を 1 : 2 の割合で混合した氷冷液を加え室温で 20 分放置後にその chromogen spectrum を測定した.

MNT および MT いずれを substrate とした場合にもこの反応で強い緑色の螢光を有する黄色を呈し, その吸収 spectrum は Fig.5 に示すように 370m μ および 468m μ に peak があり, standard MED のそれと一致した.

Fig.5. Alcohol-sulfuric acid chromogen spectra of MED obtained from incubation of MNT and MT

以上の成績から MNT および MT を placental aromatizing enzyme system で incubate すれば MED が得られることが明らかとなった. すなわち 17 α 位に methyl 基をもつまままで aromatize されて MED となり, 17 α 位の methyl 基の存在が steroid の aromatization を障害するものではないということが出来る. したがって 17-substituted-19-nor steroid の aromatization の first step として前回は $\Delta^{1,4}$ -double bond の形成を考慮したが, 本実験はこれら steroid の aromatization に際し前述のような特殊な pathway を考える必要はないのではないかと考えられる.

稿を終るにあたり御指導と御校閲を賜った恩師徳田教授に深甚なる謝意を捧げ, 御助言を賜った当教室岡田博士に謝意を表する. また steroid 標準品の提供をいただいた帝国臓器株式会社に感謝する.

なほ本論文の要旨は第11回日本内分泌学会西日本地方会総会において発表した.

参 考 文 献

- 1) RYAN, K.J. : J. Biol. Chem., 23 : 268, (1959).
- 2) 天津実 : 日内泌誌, 38 : 1164, (1963).
- 3) ENGEL, L.L. : Recent Progress in Hormone Res., 5 : 335, (1950).
- 4) ENGEL, L.L. et al : J. Biol. Chem., 185 : 255, (1950).
- 5) BURTON, G.M. : Nature, 170 : 249, (1952).