UDC 547.92 : 545.844.42

西岡五夫：ステロイド及びトリテルペノイドのペーパークロマトグラフィー (第1報)
ステロール、ステロイドサポゲニン及びトリテルペノイドのペーパークロマトグラフィー

Itsuo Nishioka : Paper Chromatography of Steroids and Triterpenoids. I.
Paper Chromatography of Sterols, Steroidal Sapogenins and Triterpenoids.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyushu*)

Separation of steroid and triterpenoid was attempted by submitting about 50 kinds of these substances to reverse-phase chromatography, using liquid paraffin as the stationary phase, and the effect of substituents on Rf values was assumed as follows:

1) Substituents that give positive effect on Rf value are -OH, =O, and -Cl, in that order when substituted in the same position with the same steric configuration while in cholestane type, 3 β -OH is stronger than 3 α -OH. Double bond also gives positive effect on the Rf value.

2) Acetylation or benzylation of -OH, or increase of =CH₂ gives negative effect on the Rf value.

3) Triterpenoids of oleanane type have greater Rf value than those of ursane type.

4) The substituents which give positive effect on Rf value in triterpenoids of oleanane type, when substituted in the same position and taking the same steric configuration, are -CH₂OH, -COOH, and -CH₃ in descending order.

(Received May 13, 1958)

ステロイドは、一般に非解離性で、水に不溶であるので、従来のペーパークロマトグラフィー、即ち濾紙に含まれた水と有機溶媒間の分配による法ではその分離は殆んど不可能であつた。従つて、有機溶媒 2 相間の分配、即ち有機溶媒、例えば methanol^{1,2)}, capryl alcohol³⁾, glycerol³⁾, ethylene glycol³⁾, propylene glycol³⁻⁵⁾ 及び phenyl cellosolve^{3,10)} 等或いは formamide^{3,4)} silicone¹¹⁾ 及び alumina¹²⁻¹⁵⁾ 等を保持した濾紙を用い corticosteroids, 性ホルモン類及び強心配糖体の aglycone の分離に成功している。最近、極性の弱いステロイドの分離に “Quilon”^{16,17)} (stearatochromic chloride), 石油エーテル¹⁸⁾ 或いは流動パラフィン^{19,20)} を保持した濾紙を用いたいわゆる逆相クロマト法が採用され、sterol, vitamin D 或いは estrogens の分離が報告されている。また Rf 値と置換基の化学的性質との関係については、steroid sapogenin の誘導体に関する Brooks 等²¹⁾ の研究が報告されている。今回著者はステロイド及びトリテルペノイドにおける種々の置換基が Rf 値に及ぼす

* Katakasu, Fukuoka.

- 1) Bush, Taylor : Biochem. J. **52**, 643(1952).
- 2) Mitchell : Nature, **170**, 621(1952).
- 3) Boscott : Biochem. J. **48**, XLVII(1951).
- 4) Zaffaroni, Burton, Keutmann : Science **111**, 6(1950).
- 5) Zaffaroni, Burton, Keutmann : J. Biol. Chem. **188**, 763(1951).
- 6) Jellinek : Nature **171**, 750(1953).
- 7) Schwarz : Biochem. J. **53**, 148(1953).
- 8) Savard : J. Biol. Chem. **202**, 457(1953).
- 9) Neher, Wettstein : Helv. Chim. Acta **35**, 276(1952).
- 10) Neher, Wettstein : Ibid. **34**, 2278(1952).
- 11) Markwardt : Arch. Pharm. **288**, 82(1955).
- 12) Bush : Nature **166**, 445(1950).
- 13) Bush : Biochem. J. **50**, 370(1952).
- 14) Koshimura, Okazaki : Pharm. Bull. (Tokyo) **2**, 65(1954).
- 15) Koshimura, Okazaki : Ibid. **3**, 144(1955).
- 16) Davis, McMahon, Kalnitsky : J. Am. Chem. Soc. **74**, 4483(1954).
- 17) Kritchevsky, Kirk : Ibid. **74**, 4484(1954).
- 18) J. Kucera, Prochazka, Veres : Chem. Listy **51**, 97(1957).
- 19) Kodicek, Ashby : Biochem. J. **57**, XII, XIII(1954).
- 20) Eggitt, Ward : J. Sci. Food. Agr. **4**, 176(1953).
- 21) Brooks, Hunt, Long, Mooney : J. Chem. Soc. **1957**, 1175.

効果を検討する目的で、それ等の化合物約 50 種につき、流動パラフィンを用いた逆相クロマト法によりそれ等の分離に成功し、置換基の Rf 値に及ぼす効果について一知見を得たので報告する。

なお、移動相としては、メタノール等のアルコール系溶媒を主とした約 20 種の溶媒につき検討し、(1) MeOH・H₂O (95 : 5), (2) EtOH・H₂O (98 : 2), (3) EtOH, (4) ethyl cellosolve・PrOH・MeOH・H₂O (35 : 10 : 30 : 25), (5) PrOH・MeOH・H₂O (15 : 82 : 3), (6) PrOH・MeOH・H₂O (50 : 45 : 5), (7) PrOH・MeOH・H₂O (70 : 27 : 3) (8) PrOH・MeOH・H₂O (10 : 80 : 10) で好結果を得た。

ステロールのペーパークロマトグラフィー 試料は Table I, II 及び III の如くですべて cholestane 誘導体で、その二重結合、-Cl, -OH, -OAc, -OBz 及び =CH₂ の Rf 値に及ぼす効果を検討する目的で、(1)~(7) の溶媒でそれぞれを分離した。

Table I は、それ等の誘導体の R cholestanol×100 値 (Rf values of compound/Rf value of cholestanol ×100) で、① 3-cholestanone と 4-cholesten-3-one, 及び cholestanol と cholesterol の R cholestanol×100 値より、二重結合が Rf 値に (+) 効果を及ぼすこと、② C₍₃₎-β 置換体である 3β-chloro-5-cholestene, 3-cholestanone 及び cholestanol の R cholestanol×100 値より、それ等の置換基が Rf 値に (+) 効果を及ぼし、その序列は -OH>=O>-Cl の順であること、③ cholesterol とその C₍₃₎-OH の配位を異にする *epi*-cholesterol との比較により、その (+) 効果は 3β-OH>3α-OH であること、④ cholestanol の acetate 及び benzoate は極めて Rf 値が小で、acetyl 化及び benzoyl 化は Rf 値に (-) 効果を及ぼすことを推論し得る。

Table I. R cholestanol×100 Values

Compds.	Solvent No.	1	4	5
3,5-Cholestadiene	4	0	5±1	
3β-Chloro-5-cholestene	3	0	8±1	
3-Cholestanone	41±2	25±2	60±2	
4-Cholesten-3-one	81±2	65±2	70±2	
Cholestanol	100	100	100	
Cholestanyl acetate	8±2	6±1	16±2	
Cholestanyl benzoate	4	0	5±1	
Cholesterol	121±2	130±2	110±2	
Epicholesterol	95±2	75±2	96±2	
3,5-Cholestanediol	160±10	350±30	155±10	

次に炭素数の増加と Rf 値の変化を検べるため、cholestanol の C₍₂₄₎ の -CH₃ 及び -C₂H₅ 置換体である ergostanol, β-sitostanol, γ-sitostanol 及びこれ等の acetate, benzoate について同様の検討をした。R_x×100 値は Table II (1) a, b, (2) a, b, (3) a, b の通りで、炭素数の増加は Rf 値を小にする。即ち =CH₂ は Rf 値に (-) 効果を及ぼすことを推論し得る。なお、この場合 C₍₃₎ 置換基の影響を少なくするため、acetyl 化、或いは benzoyl 化した試料についても検討したが、遊離のステロールの分離に用いた溶媒、例えば 95% MeOH で展開するとよく分離され、R acetate×100 値、或いは R benzoate×100 値のそれぞれの差は大となるが、Rf 値が 0.1 以下であるため、適当な Rf 値を与える溶媒 (2)(3)(6) 及び (7) を用いた。また 5-ergosten-3-ol が得られなかつたため、ergosterol (5,7,22-ergostatrien-3-ol) を試料に供した。

Table II.

(1) a. R cholestanol×100 Values				(1) b. R cholesterol×100 Values					
Compds.	Solv. No.	1	4	5	Compds.	Solv. No.	1	4	5
Cholestanol		100	100	100	Cholesterol		100	100	100
Ergostanol		90±2	82±2	95±2	Ergosterol		121±2	115±2	105±2
β-Sitostanol		81±2	92±2	90±2	β-Sitosterol		81±2	60±2	95±2
γ-Sitostanol		81±2	62±2	90±2	γ-Sitosterol		81±2	60±2	95±2
					Cholesteryl acetate		10±1	7±1	21±2
					Cholesteryl benzoate		5±1	2±1	7±1

(2) a. R cholestanyl acetate × 100 Values			(2) b. R cholesteryl acetate × 100 Values		
Solv. No.	2	6	Solv. No.	2	6
Compd.			Compd.		
Cholestanyl acetate	100	100	Cholesteryl acetate	100	100
Ergostanyl acetate	91 ± 2	85 ± 2	Ergosteryl acetate	110 ± 2	115 ± 2
β-Sitostanyl acetate	85 ± 2	75 ± 2	β-Sitosteryl acetate	85 ± 2	90 ± 2
γ-Sitostanyl acetate	85 ± 2	75 ± 2	γ-Sitosteryl acetate	85 ± 2	90 ± 2
(3) a. R cholestanyl benzoate × 100 Values			(3) b. R cholesteryl benzoate × 100 Values		
Solv. No.	3	7	Solv. No.	3	7
Compd.			Compd.		
Cholestanyl benzoate	100	100	Cholesteryl benzoate	100	100
Ergostanyl benzoate	91 ± 2	91 ± 2	Ergosteryl benzoate	107 ± 2	115 ± 3
β-Sitostanyl benzoate	88 ± 2	88 ± 2	β-Sitosteryl benzoate	83 ± 3	85 ± 2
γ-Sitostanyl benzoate	88 ± 2	88 ± 2	γ-Sitosteryl benzoate	83 ± 3	85 ± 2

また、二重結合の位置の相異による Rf 値の変化を検べるため、cholesterol (Δ^5), α -cholestenol ($\Delta^{8(14)}$), β -cholestenol (Δ^{14}) 及びそれ等の acetate, benzoate について検討した。その結果は Table III (1)(2)(3) の通りで、本溶媒系で、ペーパークロマトグラフィーによる分離の目的は達せられたが、二重結合の位置と Rf 値との関係については、充分な推論は得られなかつた。また cholestane を製し、ペーパークロマトグラフィーに付したが発色が不能であつたため Rf 値を検査することが出来なかつた。

Table III.

(1) R cholesterol $\times 100$ Values			
Solv. No.	1	4	5
Compd.			
Cholesterol	100	100	100
α -Cholestenol	101 $\pm$ 2	93 $\pm$ 2	100 $\pm$ 2
β -Cholestenol	107 $\pm$ 2	98 $\pm$ 2	100 $\pm$ 2

(2) R cholesteryl acetate $\times 100$ Values			(3) R Cholesteryl benzoate $\times 100$ Values		
Solv. No.	2	6	Solv. No.	3	7
Compd.			Compd.		
Cholesteryl acetate	100	100	Cholesteryl benzoate	100	100
α -Cholestenyl acetate	100 $\pm$ 2	95 $\pm$ 2	α -Cholestenyl benzoate	90 $\pm$ 2	92 $\pm$ 2
β -Cholestenyl acetate	102 $\pm$ 2	93 $\pm$ 2	β -Cholestenyl benzoate	80 $\pm$ 2	80 $\pm$ 2

上記の如く、cholestane 誘導体の逆相クロマトグラフィーに於いて、Rf 値に (+) 効果を及ぼす置換基として -OH, =O, -Cl があげられ、それ等が同一の位置でしかもその立体配位が同一である場合 (+) 効果の序列は -OH > =O > -Cl の順である。また二重結合が同様 (+) 効果を及ぼし、-OH の acetyl 化, benzoyl 化及び =CH₂ の増加が Rf 値に (-) 効果を及ぼすということは、それ等置換基及び二重結合がその分子に与える極性と密接な関係があると考えられる。即ち Rf 値の増加或いは減少は、分子の極性の増大或いは減少に並行していると考えられる。

ステロイドサボゲニンのペーパークロマトグラフィー ステロイドサボゲニンについても、置換基及び二重結合の Rf 値に及ぼす影響を検討する目的で、逆相クロマトを行い、ステロールの場合と同様の結果を得た。即ち流動パラフィンを固定相とし、移動相として溶媒 (1), (4) 及び (5) を用いた。R tigenin × 100 値は Table IV に示す通りで、Rf 値に対する (+) 効果として -OH > -Cl > F, また 3 β -OH > 3 α -OH の序列が与えられ、ステロールの場合と同様の結果を得た。

トリテルペノイドのペーパークロマトグラフィー ステロイドと同様の目的で、逆相クロマトによるそれ等の分離を試み、約 20 種の溶媒により展開し、(1) 及び (8) の溶媒でその分離の目的が達せられた。

Rf 値は Table V に示す如くで、ursane 型と oleanane 型とは α -amyrin と β -amyrin, 及び ursolic acid

Table IV. R tigenin $\times 100$ Values

Compd.	Solv. No.	1	4	5
Tigogenin		100	100	100
Diosgenin		104 $\pm$ 2	106 $\pm$ 2	104 $\pm$ 2
Epidiosgenin		95 $\pm$ 2	85 $\pm$ 2	95 $\pm$ 2
5-Tigogeninol		127 $\pm$ 3	130 $\pm$ 5	115 $\pm$ 3
3-Chlorodesoxydiosgenin		15 $\pm$ 3	5 $\pm$ 1	23 $\pm$ 2
3,5-Desoxytigogenin		15 $\pm$ 3	5 $\pm$ 1	23 $\pm$ 2
Diosgenin acetate		45 $\pm$ 3	15 $\pm$ 3	59 $\pm$ 3

と oleanolic acid の例より明らかな如く, oleanane 型の方が Rf 値が大である. また oleanane 型に属する β -amyrin, erythrodiol 及び oleanolic acid は, C₍₂₈₎ の置換基がそれぞれ -CH₃, -CH₂OH 及び -COOH の相異のみであり, それ等の Rf 値より (+) 効果の序列として, -CH₂OH > -COOH > -CH₃ を推論し得る. 次に oleanolic acid の C₍₄₎ α -CH₃ が α -CH₂OH である hederagenin が erythrodiol より Rf 値が小さいということ, 即ち相加的でないということは置換基の位置及び立体配位が Rf 値に大いに影響することを暗示している. camellia sapogenol C₃₀H₄₈O₃ 及び tea sapogenol C₃₀H₄₆₋₄₈O₆ の Rf 値も同様の事実を暗示している.

Table V. Rf Values of Triterpenoids

Compd.	Solv. No.	1	8	Compds.	Solv. No.	1	8
α -Amyrin		0.28	0.32	Oleanolic acid		0.73	0.82
β -Amyrin		0.30	0.33	Hederagenin		0.76	0.83
Erythrodiol		0.79	0.86	Camellia sapogenol		0.80	0.84
Ursolic acid		0.63	0.75	Tea sapogenol		0.72	0.70

終りに本研究に当り終始御指導を賜わった塚本越夫教授に深謝する. 又試料を分与頂いた上田 陽助教授, 梅沢文輔助教授及び大学院学生山内辰郎氏に感謝する.

実 験 の 部

濾紙処理 十分に乾燥した濾紙 (東洋濾紙 No. 50) を 5% 流動パラフィン (比重 0.855) - 石油エーテル溶液に約 1 分間浸し, 充分湿潤せしめた後, 風乾し, 更に 50~60° 乾燥器中約 5 分間乾燥後, シリカゲルデシケーター中保存.

展開溶媒 (1)~(8) 前記の通り.

クロマトグラフィー 試料 10~15 γ を点じ 25 $\pm$ 1° の定温器中約 20 cm 展開 (上昇法).

顕色法 (1) 15% SbCl₃ (CHCl₃ 溶液) を噴霧し, 80~90° に加熱.

Δ^5 -ステロイド及び 5-OH ステロイドは赤紫色. $\Delta^8(14)$ - 及び Δ^{14} -ステロールは黄褐色. 共軛二重結合をもつステロイドは冷時既に赤色加熱すると青紫色. トリテルペノイドは黄褐色或いは赤紫色等.

(2) 40% 珪タンゲステン酸 EtOH 溶液を噴霧し, 80~90° に加熱し, 冷後, その発色をみる.

飽和ステロイドは薄橙赤色. 不飽和ステロイドは黄橙色或いは橙赤色. トリテルペノイドは橙赤色或いは青紫色等.

(3) 0.5% 2,4 ジニトロフェニルヒドラジン 2N H₂SO₄ 溶液を噴霧し, 50~60° に加熱.

ケトステロイドは黄色のバックに橙赤色.

九州大学医学部薬学科