Table I.

Calculation of Molecular Weight of Callicrein

Sedimentation constant	: 2.85 S
Diffusion constant	: 8.39×10^{-7} cm. ² /se.c
Molecular weight	: 3.30×10^4

標準状態に換算した。

フェニルイソチオチアネートによるアミノ末端アミノ酸の検出法 Product (L) 500 U/mg, 10 mg を蒸留水 1 cc, ピリジン 1 cc にとかし, フェニルイソチオチアネート 0.3 cc を加え, N NaOH をマイクロビュレットから滴下して pH 8.7 とする。これを 40° に保つて時々振盪し, pH が下つたら N NaOH を滴下して pH 8.7 に保つ。2.5 時間振盪後クロロヘキサンで 5 回抽出, 水層に 4N HCl を加えて HCl 濃度を 0.9N とし 75° に保つ。2.5 時間振盪後 Et₂O で 8 回抽出, Et₂O 層を合して HCl 酸性の水で 1 回洗い Et₂O をとばして乾固, これを 0.25N Ba(OH)₂ 1 cc にとかし封管中 140°, 25 時間加熱ついでドライアイスを加えて BaCO₃ を沈殿させ上澄液を 2×40 cm のワットマン No. 1 濾紙上にスポット, BuOH·AcOH·H₂O (4:1:2) および 0.1N NH₄OH 添加 23% フェノールでそれぞれ展開, 乾燥後ニンヒドリンを噴霧して 90~100° に 5 分間加熱, 検出した。

帝国臓器製薬株式会社研究部

UDC 547.92 : 545.844.42

西岡五夫：ステロイドおよびトリテルペノイドのペーパークロマトグラフィー (第2報¹⁾)
ステロールのペーパークロマトグラフィー

Itsuo Nishioka : Paper Chromatography of Steroids and Triterpenoids. II.
Paper Chromatography of Sterols.

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

In order to examine relationship between the structure and R_f value of steroids, various steroids were separated by the reverse-phase chromatography using liquid paraffin as the stationary phase and developing with a polar solvent. It was thereby found from R_f values of stanols (Table I) and stanones (Table II) that the effect of the A/B ring (configuration of H at C-5) of a steroid ring on the polarity of the molecule was greater in the coprostane type (A/B *cis*) than in cholestane type (A/B *trans*). It was also found from R_f values of 3β-stenols [cholestenols (Table III) and ergostenols (Table IV)] that the effect of a double bond in a steroid ring on the polarity of a molecule decreases in the order of the position of the double bond at 14, 8(14), 4 or 7, and 5.

(Received May 11, 1959)

第1報¹⁾で、著者は流動パラフィンを固定相とする逆相ペーパークロマト法によりステロイドを分離し、ステロイドの各種置換基が R_f 値におよぼす影響について報告した。今回、著者はステロイドの A/B 環融合形式 (C₅-H の立体配位) および 3β-stenol 類の各位置の二重結合が R_f 値におよぼす影響について検討する目的で本研究を行ない新知見を得た。

すなわち、濾紙に流動パラフィンを保持させ固定相とし、移動相としては、下記 (1)~(5) の溶媒を用いる逆相法により、ステロール類を分離した。

展開溶媒 (1) MeOH·H₂O (95 : 5), (2) MeOH·H₂O (97 : 3), (3) PrOH·MeOH·H₂O (15 : 82 : 3), (4) PrOH·MeOH·H₂O (20 : 75 : 5), (5) ethylcellosolve·PrOH·MeOH·H₂O (40 : 15 : 35 : 15)

* Katakasu, Fukuoka.

1) 西岡：本誌 78, 1428(1958).

A/B 環融合形式 ($C_{(5)}$ -H の立体配位) の影響 ステロイドの A/B 環融合形式の影響について, Neher 等は C_{19} -ステロイド²⁾ (testane-および androstane-誘導体) および C_{21} -ステロイド³⁾ (pregnane-および allopregnane-誘導体) を toluene/propylene glycol, benzene/formamide, benzene-chloroform/formamide (移動相/固定相) 等の溶媒系で分離し, それらの Rf 値より, その極性を論じ,

の結果を得, A/B 環融合形式の影響については, これらの試料からは結論を得ていない. これは用いられた試料が $C_{(3)}$ 以外にも -OH あるいは =O 等の置換基をもつたステロイドであつたためとも考えられる. したがつて著者は, cholesterol (3β -OH, 5α -H), epicholesterol (3α -OH, 5α -H), coprostanol (3β -OH, 5β -H), epicoprostanol (3α -OH, 5β -H) の 4 種の stanol および 3-cholestanone (5α -H), 3-coprostanone (5β -H) の 2 種の stanone を製し, 前記のペーパークロマトグラフィーにより分離し, A/B 環融合形式の影響について考察を行なつた.

Table I. $R_s \times 100$ values (s =Cholesterol)

Mobile phase No.	1	3	5
Comps.			
Cholesterol	100	100	100
Epicholesterol	80 ± 2	87 ± 2	75 ± 2
Coprostanol	90 ± 3	91 ± 2	90 ± 2
Epicoprostanol	108 ± 3	103 ± 2	110 ± 2

Table II. $R_s \times 100$ values (s =3-Cholestanone)

Mobile phase No.	2	4
Comps.		
3-Cholestanone	100	100
3-Coprostanone	109 ± 2	105 ± 2

各 stanol の $R_s \times 100$ 値 (Rf value of compound/Rf value of standard compound) は Table I の通りで, 本溶媒系におけるそれらの極性の序列は,

で, ① epicoprostanol と coprostanol および cholesterol と epicholesterol のそれぞれの $R_s \times 100$ 値より, coprostanol 型 [A/B: *cis* (5β -H)], cholestane 型 [A/B: *trans* (5α -H)] いずれの場合にも, 3-OH が分子の極性におよぼす寄与は, equatorial-OH > axial-OH である. ② epicoprostanol と cholesterol (3-OH: equatorial 群) および coprostanol と epicholesterol (3-OH: axial 群) のそれぞれの $R_s \times 100$ 値より, 3-OH が equatorial 群, axial 群いずれの場合にも, coprostanol 型 > cholestane 型である.

また, 各 stanone の $R_s \times 100$ 値は, Table II の通りで, その極性は, 3-coprostanone > 3-cholestanone で stanol の場合と同様, coprostanol 型 > cholestane 型である.

以上の結果より, 本溶媒系において, A/B 環融合の影響は次の如くである.

二重結合の影響 第 1 報¹⁾で, 著者は cholesterol 類の分離について報告したが, 溶媒の撰択および試料の検討が不備であつたため充分な結果は得られなかつた. 今回, 著者は 4-cholestenol, 8(14)-cholestenol, 7-ergo-

2) R. Neher: J. Chromatography **1**, 233(1958).

3) R. Neher, A. Wettstein: Helv. Chim. Acta **39**, 2062(1956).

stenol, 8(14)-ergosterol および 14-ergosterol の 3 β -stenol 類を製し, 前記の方法により分離し 3 β -stenol における各位置の二重結合の影響について考察を行なった。

Table III. $R_s \times 100$ values (s =Cholestanol)

Mobile phase Compds.	No.	1	3	5
Cholestanol		100	100	100
4-Cholestenol		112 $\pm$ 2	110 $\pm$ 2	109 $\pm$ 2
Cholesterol		106 $\pm$ 2	105 $\pm$ 2	106 $\pm$ 2
8(14)-Cholestenol		114 $\pm$ 2	111 $\pm$ 2	115 $\pm$ 2

Table IV. $R_s \times 100$ values (s =Ergosterol)

Mobile phase Compds.	No.	1	3	5
Ergosterol		100	100	100
7-Ergosterol		112 $\pm$ 2	105 $\pm$ 2	107 $\pm$ 2
8(14)-Ergosterol		121 $\pm$ 2	107 $\pm$ 2	110 $\pm$ 2
14-Ergosterol		125 $\pm$ 2	110 $\pm$ 2	120 $\pm$ 2

各 stenol の $R_s \times 100$ 値は, それぞれ Table III および Table IV の通りで, 二重結合がその極性におよぼす寄与は, cholestenol 類では $\Delta^{8(14)} > \Delta^4 > \Delta^5$ であり, ergosterol 類では $\Delta^{14} > \Delta^{8(14)} > \Delta^7$ である. なお, ergosterol の 24b-CH₃ の影響については, 第1報に報告した如く, =CH₂ の増加は分子の極性を減少させるという結論を得ており, また 24b-CH₃ は 3 β -OH および各位置の二重結合に著しい影響を与えるとは考えられないので, 上記の結果より, 本溶媒系において, 3 β -stenol 類の各位置の二重結合が分子の極性におよぼす寄与は, つぎの如くとなる。

$$\Delta^{14} > \Delta^{8(14)} > \Delta^4 \text{ あるいは } \Delta^7 > \Delta^5$$

終りに, 本研究に当り終始御指導を賜わった塚本勉夫教授ならびに御鞭撻を賜わった京都大学高橋西蔵教授に深謝する. また, 試料を分与頂いた梅沢文輔助教授, 赤外吸収スペクトルの測定をされた上田 陽助教授, 矢野弘重氏, 松井久義氏ならびに元素分析を担当された紫藤道生氏に感謝する。

実 験 の 部

試 料

- (1) cholestanol⁴⁾: 長針状結晶 (EtOH), C₂₇H₄₈O 計算値 C 83.43, H 12.45, 実験値 C 83.38, H 12.48, mp 141~142°, $[\alpha]_D^{25}$: 29.4° (c=1.12, CHCl₃), IR ν_{C-O} 1037 cm⁻¹ (CS₂).
- (2) epicholestanol⁵⁾: 白色粉状結晶 (MeOH), C₂₇H₄₈O 計算値 C 83.43, H 12.45, 実験値 C 83.51, H 12.61, mp 181~182°, $[\alpha]_D^{25}$: 27.3° (c=0.51, CHCl₃), IR ν_{C-O} 1002 cm⁻¹ (CS₂).
- (3) coprostanol⁵⁾: 細針状結晶 (MeOH), mp 100°, $[\alpha]_D^{25}$: 24.5° (c=0.37, CHCl₃), IR ν_{C-O} 1035 cm⁻¹ (CS₂).
- (4) epicoprostanol⁵⁾: 羽状結晶 (MeOH), C₂₇H₄₈O 計算値 C 83.43, H 12.45, 実験値 C 83.01, H 12.47, mp 117~118°, $[\alpha]_D^{25}$: 31.7° (c=0.41, CHCl₃), IR ν_{C-O} 1037 cm⁻¹ (CS₂).
- (5) 3-cholestanone: 針状結晶 (Me₂CO), C₂₇H₄₆O 計算値 C 83.87, H 11.99, 実験値 C 83.98, H 12.04, mp 128~129°, $[\alpha]_D^{25}$: 42.0° (c=0.57, CHCl₃).
- (6) 3-coprostanone⁶⁾: 光輝葉状結晶 (MeOH), mp 59~60°, $[\alpha]_D^{25}$: 36.9° (c=1.40, CHCl₃).
- (7) 4-cholestenol⁷⁾: 針状結晶 (MeOH), C₂₇H₄₆O 計算値 C 83.87, H 11.99, 実験値 C 84.07, H 11.98, mp 130~131°, $[\alpha]_D^{25}$: 44.1° (c=0.66, CHCl₃).
- (8) cholesterol: 長針状結晶 (EtOH), mp 148~149°, $[\alpha]_D^{25}$: -38.4° (c=1.88, CHCl₃).
- (9) 8(14)-cholestenol: 針状結晶 (MeOH), mp 118~120°, $[\alpha]_D^{25}$: 18.9° (c=0.53, CHCl₃).
- (10) 7-ergosterol⁸⁾: 針状結晶 (MeOH), C₂₈H₄₈O 計算値 C 83.93, H 12.08, 実験値 C 83.77, H 12.06,

- 4) R. Willstätter, E. W. Mayer: Ber. **41**, 2199(1908).
- 5) L. Ruzicka, et al.: Hev. Chim. Acta **17**, 1407 (1934).
- 6) H. Grasshof: Z. physiol. Chem. **223**, 249(1934).
- 7) H. McKennis, G. W. Graffney: J. Biol. Chem. **175**, 217(1948).
- 8) Wieland, Benend: Ann. **554**, 1(1948).

mp 145~147°, $[\alpha]_D^{15}$: 0° (c=0.47, CHCl₃).

(11) 8(14)-ergosterol⁹⁾: 針状結晶 (MeOH), C₂₈H₄₈O 計算値 C 83.93, H 12.08, 実験値 C 83.77, H 12.05, mp 130~131°, $[\alpha]_D^{15}$: 11.1° (c=1.58, CHCl₃).

(12) 14-ergosterol¹⁰⁾: 針状結晶 (MeOH), mp 139~140°.

(13) ergosterol: 針状結晶 (MeOH), C₂₈H₄₈O 計算値 C 83.51, H 12.52, 実験値 C 83.37, H 12.26, mp 143~144°.

濾紙処理 濾紙 (東洋濾紙 No. 50) を 50~60° の乾燥器中で 10~15 分間加温乾燥後, シリカゲルデンケータ-中に保存する. この乾燥濾紙を 5%流動パラフィン(比重 0.885)-石油エーテル溶液に約 1 分間浸し, 充分に湿潤させた後, 風乾し, さらに 50~60° の乾燥器中で約 5 分間加温乾燥後, シリカゲルデンケータ-中に保存する.

展開溶媒 前記.

ペーパークロマトグラフィー 試料 10~20 γ を濾紙上にスポットし, 25±1° の定温器中, 上昇法により展開する. (展開距離: 約 20 cm).

顕色法 (1) sterol: 40%珪タングステン酸-EtOH 溶液を噴霧後, 110~120° で約 5 分間加熱し, 冷後発色を検べる. 青灰色~青紫色.

(2) stanone: 0.5% 2,4-dinitrophenylhydrazine-2N H₂SO₄ 溶液を噴霧後, 50~60° に加温し, 発色を検べる. 橙黄色のバックに橙赤色.

標準物質の Rf 値 Table V.

Table V. Rf Values of Standard Compounds

Mobile phase	No.	1	2	3	4	5
Compds.						
Cholesterol	0.48±0.02	—	0.60±0.03	—	0.57±0.03	
3-Cholesterolone	—	0.31±0.02	—	0.37±0.02	—	
Ergosterol	0.43±0.02	—	0.57±0.03	—	0.52±0.02	

九州大学医学部薬学科

9) M. C. Hart, J. H. Speer, F. W. Heyl: J. Am. Chem. Soc. **52**, 2016(1930).

10) I. M. Heilborn, D. G. Wilkinson: J. Chem. Soc. **1932**, 1708.