ステロイドの臨床分析 (第2報¹⁾) 尿中プレグナンジオールの熱酸加水分解と分解について吉沢逸雄, 大内涼子, 中川明子, 川原徳夫,^{2a)} 三浦敏明,木村道也,^{2b)} 安斉和子, (故) 松田正二^{2c)}北海道薬科大学,^{2a)} 北海道大学薬学部,^{2b)} 北海道大学医学部附属病院産婦人科^{2c)}Clinical Analysis on Steroids. II.¹⁾ Hot Acid Hydrolysis and
Decomposition of Urinary PregnanediolITSUO YOSHIZAWA, RYOKO OHUCHI, AKIKO NAKAGAWA, NORIO KAWAHARA,^{2a)}TOSHIKI MIURA, MICHIO KIMURA,^{2b)} KAZUKO ANZAI,and SHOJI MATSUDA (the late)^{2c)}*Hokkaido College of Pharmacy,^{2a)} Hokkaido University, Faculty of
Pharmaceutical Sciences,^{2b)} and Faculty of Medicine,
Department of Obstetrics and Gynecology^{2c)}*

(Received August 1, 1977)

A rearranged steroidal olefin was obtained from the urinary hydrolysate. The structure was determined as 17 α -ethyl-17 β -methyl-18-nor-5 β -androst-13(14)-en-3 α -ol (I), which was completely identical with the one derived from 20 α -tosyloxy-steroid (X). This urinary product was found to be formed from urinary pregnanediol 20-sulfate (XI) by hot acid hydrolysis.

Keywords—pregnanediol; hydrolysis of urinary pregnanediol; decomposition of urinary pregnanediol by hot acid hydrolysis; 17 α -ethyl-17 β -methyl-18-nor-5 β -androst-13(14)-en-3 α -ol; rearrangement reaction forming Δ^{13} -steroid; hot acid hydrolysis of steroid sulfate; urinary steroid conjugate

著者らはプレグナンジオールをはじめとする各種尿中ステロイドの月経周期における量的変動をガスクロマトグラフィー (GLC) で調べてきた。その際、排卵を境に (および妊婦の場合には妊娠の経過とともに) 急激に排泄量の増加する未知 (ステロイド) 化合物が検出され、その物質の性状に興味を持たれた。

健康婦人尿または妊婦尿を数カ月にわたって集め、それぞれ 1 日尿を 17-ケトステロイドの測定に日常繁用されている熱酸加水分解法で処理、得られたステロイド含有部の GLC を行なった。Fig. 1 は卵胞期、排卵直後、および黄体期におけるその 1 例を示したもので、図中矢印を付したピークが前述の未知物質に相当する。その尿中排泄量は卵胞期においては約 0.4 mg/日 であるのに対し、排卵を過ぎると急激に増え続け、黄体期の中間では最大に達し、その排泄量も 2—5 mg/日にまで増加する。

このような排泄パターンはプロゲステロン、エストラジオールあるいはプレグナンジオール等の性ホルモンの月経周期にみられる傾向と極めてよく似ている。一方、妊婦尿の場合には、妊娠 8 週間後で 3—7 mg/日、以下 20 週: 4—7 mg, 30 週: 14—20 mg, 40 週: 18—25 mg, と妊娠の経過とともに尿中排泄量は増え続けるが、この結果も各種の性ホルモン類が示す挙動と類似している。

この興味ある物質について、各種既知ステロイドの GLC における相対保持時間と比較したが、相当するものが見当らず、ここに“未知ステロイド”の期待を抱かせた。従って本化合物の性状を解明することはそれなりの意義をもつと考えられ、尿からのその単離を試みた。

以下、その物質を結晶として単離し、各種分析機器による結果からその構造を、17 α -ethyl-17 β -methyl-18-nor-5 β -androst-13(14)-en-3 α -ol (I) と提出した経過について、ついでこの化合物は Δ^{13} -ステロイドの一般的な合成に

1) Part I: I. Yoshizawa, R. Ohuchi, A. Nakagawa, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **25**, 2137 (1977).

2) Location: a) Katsuraoka-cho, Otaru, Hokkaido, 047, Japan; b, c) Kita-12, Nishi-7, Sapporo, Hokkaido, 060, Japan.

Fig. 1. Gas Chromatographic Separation of Urinary Hydrolysate in Follicle Phase (a), Ovulatory Phase (b), and Luteal Phase (c)

1.5% OV-17 on Chromosorb-W. Column temperature was programmed from 150-250°, 2°/min.

Chart 1

よってプレグナンジオール誘導体から導いたものと完全に一致し、同定されたがその経過について、さらにこの化合物は尿中プレグナンジオール (20 位スルファート) から熱酸によって生成した副生物であることを確認した経過³⁾ について、最後に尿中プレグナンジオールの測定における加水分解の問題点について、それぞれ項目に分けて記した。

1. 性状と構造について

化合物 I は mp 200—202° を示す結晶で、その赤外線吸収スペクトル (IR) は水酸基と CH 以外の官能基の存在を示さないが、テトラニトロメタンによる呈色は明らかに陽性で、4 置換二重結合の存在が推定される。一方、そのミリマス測定による分子式は C₂₁H₃₄O であること、さらに I の核磁気共鳴吸収スペクトル (NMR, Fig. 2) から、モノヒドロキシ化合物であること、およびそのスペクトルのパターンからステロイド類似化合物であることが窺われる。I は無水酢酸-ピリジンによってモノアセタート (II) を、さらに Jones 試薬による酸化では容易にケトン (III) を与えるが、これら誘導体の質量分析 (MS) およびその他の機器分析、さらに元素分析の結果はいずれも推定式とよく一致する。

I および II の NMR で 3.62 および 4.77 ppm にプロトン 1 個分に相当する吸収 (septet) が見られるが、それらの分裂様式からはシクロヘキサノール環のうち

の様な部分構造の存在が窺われる。この吸収はケトン (III) では消失する。

一方、I と II はそれぞれ 0.90 および 0.92 ppm に、また III は 1.01 ppm にそれぞれメチルプロトンの吸

3) この結果については前報 (速報) で報告した。I. Yoshizawa, T. Miura, M. Kimura, K. Anzai, S. Matsuda, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 21, 1622 (1973).

Fig. 2. NMR Spectrum of I, 100 MHz in CDCl_3

Fig. 3. Optical Rotatory Dispersion Curve of III in Methanol

取を持つが、これらのシグナルはコプロスタン-3 α -オール型ステロイドの 19-メチルプロトンの計算値とよく一致している。さらに III の旋光分散 (ORD) 曲線は Fig. 3 に示されているように負のコットン効果を有し、その分子振幅 $[\phi] = -18.7$ は A/B-シス型ステロイドの 3-ケトンが示す値としては妥当と思われる。⁴⁾

以上の結果から、I が 5 β -プレグナン型ステロイドと類似の構造を持つことが分ったが、残りの部分構造については通常のプレグナン系化合物と若干異なることに気付く。すなわち、化合物 I, II および III はいずれも 0.79 ppm に triplet のメチルシグナルを、また 1.25 ppm に quartet のメチレン吸収を有するが、これは末端エチル基の存在を示すものである。一方、I, II および III の NMR では 0.93, 0.94 および 0.94 ppm にそれぞれプロトン 3 個分に相当するシングルピークが認めら

れるが、このメチルシグナルの帰属は二重結合の位置と関連して複雑である。しかし、これらの化合物の分子式と NMR その他の機器による結果から、通常のプレグナン型ステロイドと類似の構造を持っていることも確かで、少なくとも環の開裂のような構造上の大きな変化は考えられない。他方、I, II および III の MS をみると $[\text{M}^+ - 29 (\text{C}_2\text{H}_5)]$ がいずれも基準ピークとして出現しているが、このイオンが極めて生成しやすいフラグメントであることを思わせる。また、 $(\text{M}^+ - 29)$ に比べるとかなり小さいが、 $[\text{M}^+ - 15(\text{CH}_3)]$ のフラグメントも出現している。これら MS のパターンはメチル、エチル両基が二重結合に近接して、たとえばアリル位に存在していることを推測させる。

以上の結果からこの化合物の構造を推定するのは容易でない。しかし、多数その例が報告されている Δ^{13} -ステロイド、例えば IV のような一連の化合物の諸性状を比較検討すると、両者の間には多くの共通点が見られ、結局その構造を I のような Δ^{13} -ステロイドと決めた。そのように仮定すると I の種々の分析結果の説明が満足されるが、この点に関しては次の項で記述する。

Chart 2

4) C. Djerassi, "Optical Rotatory Dispersion, Application to Organic Chemistry," Chapter 4, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, 1961.

TABLE 1. Chemical Shifts of Methyl and Ethyl Groups in Deuteriochloroform^{a)}

	19-CH ₃	17 β-CH ₃	-CH ₂ CH ₃	-CH ₂ -CH ₃
I	0.90	0.93	1.25 (quartet, <i>J</i> =7.0)	0.79 (triplet, <i>J</i> =7.0)
II	0.92	0.94	1.25 (quartet, <i>J</i> =7.0)	0.79 (triplet, <i>J</i> =7.0)
III	1.01	0.94	1.25 (quartet, <i>J</i> =7.0)	0.79 (triplet, <i>J</i> =7.0)
IV ^{b)}	0.77	0.94	—	0.77 (triplet, <i>J</i> =7.0)

a) δ; ppm. *J*; Hz. b) M. Lebceuf *et al.*; in reference 6b.

Chart 3

Chart 4

2. Δ¹³-ステロイドの生成と構造について

一般に I のような Δ¹³-ステロイド類は、18 メチル基の転移をともなうて生成し、それに関する多数の例が報告されているが、それらは次のように大別される。

1) 17 位に 3 級水酸基 (またはその誘導体) をもつ化合物から酸による脱水と 18-メチル基のシフトをともなうたオレフィン体生成の場合 (Chart 2, V→VI) で、多数の類似反応例が知られている。⁵⁾

2) 20 位の水酸基またはその誘導体の脱離とそれにともなう転移とオレフィン体生成の場合で、Chart 2 に示された VII→VIII のような例が多数報告されている。⁶⁾

今回、尿より単離した I およびその誘導体 II と III の各種機器による分析結果は VIII のような Δ¹³-化合物の報告値と極めてよく一致しており、たとえば NMR における比較の例を Table I に示した。また、MS の開裂様式に関しても、これら Δ¹³-化合物の共通点として脱エチル基イオン (M⁺-29) が脱メチル基イオンに比べて多く出現する。これは VIII のような部分構造からは容易に推定されることであって、生成したビニルカチオンの安定性の差を示していると思われる。逆にこの様なフラグメンテーションパターンは、Δ¹³-ステロイドにおける D-環近辺の構造を解析する場合の補助手段となろう。

今回、尿より得られた化合物については種々の Δ¹³-ステロイドのデータを参考に I のような構造を提出したが、このような変形ステロイドが比較的容易に得られることから、I の合成証明を試みた。方法としては、その生成機構についても詳しく検討されている Hirschmann ら⁷⁾ の方法に従って、20α-トシロキシステロイドを用いて行なった。

5) A. Cohen, J.W. Cook, C.L. Hewett, *J. Chem. Soc.*, **1935**, 445; H.G. Lehman, H. Muller, R. Wiechert, *Chem. Ber.*, **98**, 1470 (1965); H. Laurent, H. Muller, R. Wiechert, *ibid.*, **99**, 3836 (1966); J. Torrealles, A.C. DePoulet, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1968**, 4886; H. Mori, R. Oh-uchi, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **23**, 559 (1975); G. Ortar, A. Romeo, *J. Org. Chem.*, **41**, 4036 (1976).

6) a) F. Kohen, R.A. Mallory, I. Scheer, *J. Org. Chem.*, **36**, 716 (1971); b) M. Lebceuf, A. Cave, R. Goutarel, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1969**, 1624, 1628; c) F.B. Hirschmann, D.M. Kautz, S.S. Deshmane, H. Hirschmann, *Tetrahedron*, **27**, 2041 (1971); d) S. Aoyama, K. Kamata, T. Komeno, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **19**, 1329 (1971).

まず, Marker ら⁸⁾の方法に従って出発物質, 5 β -プレグナン-20 α -オール-3-オン (IX) をつくり, ついでこれを 20-トシル誘導体 (X) に導いた. つぎにそのトシラートをギ酸で処理すると, 主成績体として転位化合物が得られたが, その融点, 各種の機器分析の結果は III と完全に一致した. さらにその NaBH₄ による還元成績体は完全に I と同定された.

以上の結果, 婦人尿の熱酸水解によって得られた化合物の構造は Chart 1 に示されたような Δ^{13} -ステロイド (I) であることが確認された.

3. I の Precursor について

その特異な構造から考えて, また 20 α -トシロキシステロイドの転位反応の例から考えても, 化合物 I は尿の水解途上に生じた by-product と考えられ, とくに熱酸を用いた苛酷な条件では当然ステロイドの分解も予想される. そこで I がもともと尿中のステロイドであるか否かを検討するために, Chart 4 に示したような各種の水解法を組み合わせて尿を処理し, その生成部について GLC で調べた.

尿を β -グルクロニダーゼで水解し, 得られた有機溶媒抽出部 (A) から, I はまったく検出されない. 一方, 酵素水解後のスルファート含有フラクションについてはその水層部を 2 等分し, それぞれを熱酸分解と緩やかなソルボリシス⁹⁾を行なって比較検討をした. その結果, 確かに I は熱酸水解部 (B) に検出され, その排泄量は月経周期に応じた量的変動を示した. これに反してソルボリシス部 (C) に I は全く検出されず, 対応分としてプレグナンジオールの量が B 部のそれより多いように思われた. この結果は決定的と言えないまでも, I がプレグナンジオール (またはそのスルファート) から生じた by-product の可能性を示すものであろう. そこで, 熱酸によってプレグナンジオールから I が生成するか否かを検討するために次の実験を行なった.

プレグナンジオールは熱酸と言えども, ほとんど水には不溶なので, 塩酸-水性メタノール系での転位化合物生成の有無を検討した. その結果, プレグナンジオールの分解は 24 時間煮沸しても 1% にも満たないので, オレフィン体 (I) がフリープレグナンジオールから二次的に副生したものととは考えられない.

さて, スルファート部を熱酸処理したフラクション (B) からは I が認められたが, この結果はひとつの可能性としてプレグナンジオールの 20-スルファートがその precursor であることを思わせる.

スルファートの加水分解はソルボリシスの様な緩やかな条件では, 一般に S-O の切断が起きてアルコールを生成するが, 熱酸のような苛酷な水解では C-O の切断を起こし, オレフィンあるいは転位オレフィン類の生じる例が報告されている.¹⁰⁾ この異常な加水分解はいずれも硫酸エステル基がアキシアル配座であるような場合^{10a)} か, あるいは隣接の二重結合が anchimeric effect で作用するような立体関係にある場合^{10b)} に起きるようで, いずれもトシル基と同じように硫酸エステル基が脱離してオレフィン体を生成する. さらに類似した例としては, 5 α -プレグナン-3 α , 20 β -ジオールの 20-スルファートの場合で, これは熱酸によって D-ホモ化したステロイドを与える特異な反応として知られている.¹¹⁾ このように考えると転位化合物 I はもともと尿中にあったプレグナンジオール 20-スルファート (あるいは, 3, 20-ジスルファート) を precursor として, 熱酸水解で副生したものではないかと予想されるが, そこで以下の実験を試みた.

プレグナンジオール 20-スルファート (XI) を Rajagopalan および Turner^{12a)}の方法に従って合成した. ついでこのスルファートを塩酸-水性メタノール中で煮沸すると, わずか 30 分で加水分解は終了し, 主成績体として I が得られた (約 40%). 同様な結果は, 尿を処理したと同じ条件下の, 4N 塩酸中で行なった場合にも得られた. これに反して, 3-スルファート^{12b)}の場合には I の生成はほとんど認められなかった.

7) S.S. Deshmene, H. Hirschmann, *J. Org. Chem.*, **38**, 748 (1973).

8) R.E. Marker, O. Kamm, E.L. Wittle, T.S. Oakwood, E.J. Lawson, J.F. Laucius, *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 2291 (1937).

9) S. Lieberman, K. Dobriner, *Recent Progr. Hormone Res.*, **3**, 71 (1948); E.H. Venning, M.M. Hoffman, J.S.L. Browne, *J. Biol. Chem.*, **146**, 369, (1942); S. Lieberman, L.B. Hariton, D.K. Fukushima, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1427 (1948).

10) a) J. Ramseyer, J.S. Williams, H. Hirschmann, *Steroids*, **9**, 347 (1967); b) S. Teich, J. Rogers, S. Lieberman, L.L. Engel, J.W. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2523 (1953).

11) H. Hirschmann, J.S. Williams, *J. Biol. Chem.*, **238**, 2305 (1963).

12) a) M.S. Rajagopalan, A.B. Turner, *J. Chem. Soc. (C)*, **1970**, 2266; b) *Idem, ibid.*, **1969**, 1858.

以上の結果は、転位化合物 I の生成がプレグナンジオール 20-スルファートの熱酸による分解に起因していることを裏づけるものであろう。つまり、20-スルファートはちょうどシリル基が示すと同様な脱離とメチル基転移の反応を起こして Δ^{13} -化合物 (I) を与えた³⁾ ことになる。硫酸エステル基の脱離と 18-メチル基の転移をともなう I を生成するこの一連の反応が、stepwise あるいは concerted のいずれの機構を経ているかは不明である。いずれにしても、20 α -スルファートから Δ^{13} -化合物が得られた今回の結果は、20 β -異性体からは D-ホモステロイドが得られた例¹¹⁾ と対比すると、立体化学的にも極めて興味深いものである。

4. 尿中プレグナンジオール測定上の問題

尿中プレグナンジオールの測定は婦人の黄体機能検査の簡便な方法として広く用いられているが、一方妊娠中の胎盤機能検査のための有力な index ともなっている。そのため、その定量法としては比色法あるいは GLC 法などによる多数の分析法が用いられている。¹³⁾ しかし、分析をするに先立ってはまず、抱合プレグナンジオールの加水分解が必要で、とくに迅速性を要求される臨床検査室等においては熱酸という苛酷な条件を用いるのが普通である。この様な場合には、今回の結果からも分るようにステロイドの分解もはなはだしく、極端な場合にはほとんど分解してしまうこともあり、¹⁴⁾ 分析法としては多々問題がある様に思われる。ポリオキシステロイドの場合には、抱合位置が異なれば熱酸による分解物も当然異なるものと予想されるが、この抱合位置に関してすら検討されていないのが普通である。

今回、プレグナンジオールの 20-スルファートは熱酸によって容易にかつ高収率で Δ^{13} -ステロイドに変換することが判明したが、この結果は尿中プレグナンジオールの一部は 20-(あるいは 3,20-) スルファートとして排泄されていることを示すものである。

尿中プレグナンジオールがグルクロニドとして排泄されていることは古くから知られているが、スルファートに関しては岡村ら¹⁵⁾ により尿中(婦人)にも相当量が排泄されていると報告され、その後最近になって各種の体液、たとえば胆汁、¹⁶⁾ 臍帯血¹⁷⁾ あるいは妊婦血中¹⁸⁾ にも類似 C-21 ステロイドとともにモノあるいはジスルファートとして存在することが報告された。これらモノスルファートの抱合位置はいずれも不明である。

生体内ステロイドスルファートが代謝中間体として積極的にホルモン代謝に関与している例が多数知られているが、そのような見地から今回の結果は、さらに生化学的にも追求すべきいくつかの問題を含んでいるように思われる。

実 験 の 部

測定機器 融点は一視野式微量融点測定装置(三田村)を使用し未補正。IR は JASCO-IR-A-2 型(日本分光)を用いた。NMR は JEOL-TNM-PS-100(日本電子)、内部標準 tetramethylsilane (TMS) で測定し、 δ 値(ppm)で示した。s は singlet, t は triplet, q は quartet, sept は septet, m は multiplet, b.s. は broad singlet。MS は RMU-6E(日立)を用い直接導入法で測定した。ミリマス測定は GCMS-9000, PAC-300DG(島津)を用い直接導入法で、MID-PM によるピークマッチング法で行なった。

ORD は J-20 型(日本分光)を、ガスクロマトグラフは島津 GC-2C 型を使用した。

採尿、尿の保存 健康成人女子(5人)より3カ月にわたって採尿。それぞれ1日の全尿(約1l)はポリエチレン瓶に入れ、トルエン1mlを滴加して -40° に凍結保存。これらの婦人については、それぞれ早朝時に基礎体温を測定し、正常な月経周期のパターンを示すことを確認した。妊婦尿については、妊娠が確認された後、分娩に至る約40週間にわたって週1度採尿、同じく凍結保存した。これらの尿は要時、流水下に融解して使った。

尿の熱酸加水分解 プールした1日全尿から8mlをとり、これに濃塩酸2mlを加えて振とう。10分間沸騰水浴上で加熱し、冷後これにコレスタン(内部標準)の一定量を加え、ついで過酸化物を含まないエーテルで抽出(10ml $\times$ 5)。得られたエーテル抽出液を10%Na₂CO₃で洗浄(5ml $\times$ 5)してエストロゲン類を除き、ついでよく水洗。最後に無水Na₂SO₄で2時間乾燥、乾燥剤をろ別後エーテルを留去。このようにして得られた残渣をアセトン溶液としてGLCを行なった。

13) 例えば、H. Breuer, D. Hamel, H.L. Kruskemper, "Methods of Hormone Analysis," John Wiley and Sons, New York, 1976.

14) M.G. Metcalf, *Steroids*, **21**, 193 (1973); *Idem*, *Clin. Chem.*, **15**, 24 (1969).

15) Y. Okayama, H. Tateyama, *Folia Endocr. Japonica*, **41**, 137 (1965).

16) T. Laatikainen, R. Vihko, *Steroids*, **14**, 119 (1969).

17) T. Laatikainen, J. Peltonen, P. Nylander, *Steroids*, **21**, 347 (1973).

18) I. Huhtaniemi, R. Vihko, *Steroids*, **16**, 197 (1970).

尿の 2 段加水分解 (Chart 4) 尿 100 ml を酢酸緩衝液で pH 4.9 とし、ついでその活性度が 300 unit/ml となるよう β -グルクロニダーゼ (ウシ肝, 東京臓器, 東京) を加えた。ついで 37° で 5 日間インキュベートした後, 反応液に一定量のコレスタンを加え, エーテルで 3 日連続抽出。エーテル層は 10% Na_2CO_3 、ついで水で洗浄後無水 Na_2SO_4 で 2 時間乾燥。乾燥剤をろ別後エーテルを留去し, 得られたシラップ (グルクロニド部) を GLC の試料とした。一方, 残った水層部については, 2 分してそれぞれ次のような加水分解を行なった。

1) 一方については 10% 硫酸溶液とし, コレスタンの一定量を加えた後エーテルで 5 日間連続抽出した。得られたエーテル層を同様に処理し, ソルボリス部として GLC を行なった。

2) 残りの半分については, 3N HCl となるように濃塩酸を加え, 沸騰水浴上 10 分間加温し, 冷後コレスタンの一定量を加えエーテル抽出 (10 ml $\times$ 5)。同様に処理して得られたシラップを GLC の試料とした。

ガスクロマトグラフィー カラムは 1.5% OV-17 (担体: Chromosorb-W, 60—80 メッシュ) を内封したガラスカラム (内径: 4 mm, 長さ: 2 m) を使用した。カラム温度は 200—250° の範囲で昇温式 (2°/分)。キャリアーガスは N_2 を用い, その流速は毎分 60 ml で行なった。保持時間: 化合物 (I); 10.41 分, プレグナンジオール; 19.24 分, コレスタン; 22.02 分。

化合物 I の単離 健康婦人 (1 人) の黄体期における全尿 (2 週期分, 30 l) を凍結濃縮して約 6 l とし, さらに 1 l に分割して以下の実験を行なった。それぞれの濃縮尿に濃塩酸を加えておよそ 3N HCl とし, これを水浴上 30 分煮沸し, 冷後エーテルで抽出 (200 ml $\times$ 5)。合した抽出液をはじめに 10% Na_2CO_3 で, ついで水でよく洗浄, 最後に無水 Na_2SO_4 で乾燥。エーテルを留去し, シラップ (全量: 8 g) についてアルミナ (メルク, grade II) 250 g を用いたカラムクロマトグラフィーを行なった。 n -ヘキサンとベンゼンの混合液 (1:3) で流出してくるフラクションを濃縮乾固し, シラップ (0.8 g) が得られた。さらにこれをシリカゲル (和光) 40 g を用いたカラムクロマトグラフィーを行ない, n -ヘキサン流出部より相当する粗結晶を得たが, 若干不純物を含んでおり, 再結晶による純化も困難であったので, このフラクションについてはさらに preparative 薄層クロマトグラフィー (シクロヘキサン-アセトン, 3:1, 2 回展開) で精製した。アセトンより再結晶を行ない, mp 200—202° の結晶, 68 mg が得られた。テトラニトロメタンによる呈色反応は陽性。Anal. Calcd. $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}$ (302.48): C, 83.38; H, 11.33. Found: C, 83.41; H, 11.40. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3650—3450 (OH), 2900—2800 (CH). NMR (CDCl_3) δ : 3.62 (1H, sept, $J_1=J_1'=10$ Hz, $J_2=J_2'=5.0$ Hz, 3 β -H), 1.25 (2H, q, $J=7.0$ Hz, 20 CH_2), 0.93 (3H, s, 17 β - CH_3), 0.90 (3H, s, 19- CH_3), 0.79 (3H, t, $J=7.0$ Hz, 21- CH_3). MS m/e : 302 (M^+), 287 [M^+-15 (CH_3)], 284 [M^+-18

(H_2O)], 273 [M^+-29 (C_2H_5)], 255 , 238 (メタステーブルイオン; 255 2 /273). ミリマス測定:

302.26040 (M^+), 計算値: $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}$ の分子式で 302.26114 (C=12.00000, H=1.00783 および O=15.99492 とし て計算)

I のアセチル化 20 mg の I をピリジン 4 ml にとかし, これに無水酢酸 2 ml を加えて 1 夜室温で放置。減圧下に溶媒を留去し, 得られたシラップに氷片を入れてかき混ぜ, スーパーテルでよくこすると結晶性粉末が沈でん, ろ取してよく水洗, 乾燥重量にして 21 mg の結晶性粉末が得られた。メタノールより再結, mp 169—171°. Anal. Calcd. $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_2$ (344.52): C, 80.18; H, 10.50. Found: C, 80.20; H, 10.39. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1728 (OAc). NMR (CDCl_3) δ : 4.77 (1H, sept, $J_1=J_1'=10$ Hz, $J_2=J_2'=5.0$ Hz, 3 β -H), 2.04 (3H, s, OCOCH_3), 1.25 (2H, q, $J=7.0$ Hz, 20- CH_2), 0.94 (3H, s, 17 β - CH_3), 0.92 (3H, s, 19- CH_3), 0.79 (3H, t, $J=7.0$ Hz, 21- CH_3).

I の酸化 30 mg の I を精製アセトン 5 ml にとかし, 0° に冷却したのち Jones 試薬を加え 10 分間攪拌。終了後メタノール 1 ml を加えて過剰の試薬をこわし, ついでエーテル 50 ml を加えた。エーテル溶液をよく水洗, ついで無水 Na_2SO_4 で乾燥。乾燥剤をろ別し, エーテルを留去すると生成物 26 mg が得られた。アセトンから再結晶し, mp 196—196.5° の無色針状晶が得られた。Anal. Calcd. $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}$ (300.47): C, 83.94; H, 10.73. Found: C, 83.88; H, 10.69. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1713 (3 ケトン). NMR (CDCl_3) δ : 1.25 (2H, q, $J=7.0$ Hz, 20- CH_2), 1.01 (3H, s, 19- CH_3), 0.94 (3H, s, 17 β - CH_3), 0.79 (3H, t, $J=7.0$ Hz, 21- CH_3). MS m/e : 300 (M^+), 285 [M^+-15 (CH_3)], 271 [M^+-29 (C_2H_5)]. ORD ($c=1.000$, MeOH): [ϕ]₆₀₀₋₉₀, [ϕ]₅₈₉₋₉₈, [ϕ]₅₀₀₋₁₃₅, [ϕ]₄₀₀₋₂₇₀, [ϕ]₃₅₀₋₄₉₅, [ϕ]₃₀₆₋₁₄₂₅ (trough), [ϕ]₃₀₀₋₁₂₄₅, [ϕ]₂₇₄ 0, [ϕ]₂₅₄+450 (peak), [ϕ]₂₅₀+435.

20 α -トシロキシ-5 β -プレグナン-3-オン 640 mg の 20 α -ヒドロキシ-5 β -プレグナン-3-オン (IX) を 12 ml のピリジンにとかし, ついで p -トルエンスルホン酸クロリド (820 mg) を加えて室温 1 夜放置。反応液を氷水に入れ, 生じた沈でんをろ取してよく水洗。減圧下に乾燥して 903 mg の無色粗結晶を得た。 n -ヘキサンとベンゼンの混液より再結晶。mp 145—146° (分解)。Anal. Calcd. $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{S}$ (472.60): C, 71.16; H, 8.53. Found: C, 70.86; H, 8.79. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 2950—2850 (CH), 1717 (3 ケトン), 1355, 1170 ($-\text{SO}_2-\text{O}-$). NMR (CDCl_3) δ : 7.59 [2H, d (2 つのピークはそれぞれ多数の微細分裂をしている), $J=8.0$ Hz, 芳香環エステル両オルト位水素], 7.26 [2H, d (2 つのピークはそれぞれ多数の微細分裂をしている), $J=8.0$ Hz, 芳香環メチル基両隣りの水素], 4.69 (1H, b.s., 20 β -H), 2.43 (3H, s, 芳香環メチル), 1.33 (3H, d, $J=7.0$ Hz, 21- CH_3), 0.99 (3H, s, 19- CH_3),

0.65 (3H, s, 18-CH₃).

トシラート (X) のソルポリシス 560 mg のトシラート (X) を 8 ml のベンゼンにとかし、ついでこれにギ酸 210 ml を加えて室温で 24 時間放置。反応液を水浴上 (45°) 減圧下に留去、得られたシラップを CHCl₃ にとかし、その溶液を 10% Na₂CO₃、ついで水で洗浄。無水 Na₂SO₄ で乾燥。乾燥剤をろ別、CHCl₃ を留去してシラップ 375 mg が得られた。これを SiO₂ (25 g) のカラムにのせ、*n*-ヘキサン、ベンゼン混合溶媒系で展開。両液 50:50 の混合液で流出した部分より主成分体としてオイル 275 mg が得られた。アセトンより再結晶。mp 195.5—196.5°。本品は NMR, MS, および IR によって完全に III と一致した。

NaBH₄ 還元 上記の化合物 180 mg を MeOH (10 ml) にとかし、これに NaBH₄ 100 mg を加えて室温で 1 夜攪拌。反応夜に水を加え、ついでエーテルで抽出。エーテル層をよく水洗、無水 Na₂SO₄ で乾燥。ろ別後、エーテルを留去し、シラップ 170 mg が得られた。アセトンより再結晶をくり返し、無色針状晶 108 mg が得られた。mp 201—202°。本品は各種の機器分析により I と同定された。

分解反応の検討 (1) プレグナンジオール: 10 mg のプレグナンジオールを 100 ml の 3N HCl/80% MeOH 中で煮沸。1, 2, 4, 8, 16 および 24 時間後に反応液の一定量 (20 ml) をとって、これにコレスタン (内部標準) を含む CHCl₃ 溶液 (60 ml) を加え、ついでよく水洗。無水 Na₂SO₄ で乾燥、乾燥剤をろ別後溶媒を留去。得られた残渣についてその GLC を行なった。GLC の結果は、4 時間煮沸までは I の生成は認められず、8 時間煮沸で痕跡程度、24 時間の場合には I を含めた分解物の総量が 1% であった。

(2) プレグナンジオールスルファート: プレグナンジオール-3-, および -20-モノスルファート (XI および XII) についても (1) と同様な条件で加水分解を行ない、生成部について GLC を調べた。両スルファートはいずれも 30 分で完全に加水分解され、とくに 20-スルファートからはほぼ 38%, I の生成したことが判明。3-モノスルファートからは I を含めた分解物の総計は 1% であった。

プレグナンジオール-20-スルファート (XI) の熱酸水解 550 mg の XI を 150 ml の水にとかして水浴上で加温し、ついでこれに熱した 6N HCl (150 ml) を加えて 30 分煮沸。

冷後、反応液をエーテルで抽出、エーテル層をよく水洗、無水 Na₂SO₄ で乾燥。乾燥剤をろ別後、溶媒を留去、シラップ 404 mg が得られた。これを prep. 薄層クロマトグラフィー (アセトン-シクロヘキサン, 1:5, 3 回展開) によって生成物を分離した。相当する部分よりシラップ 158 mg が得られ、アセトンより再結晶をくり返し、mp 200—201.5° の針状晶 88 mg が得られた。本品は、尿より得られた化合物、および X のソルポリシスと還元によって生成した化合物と混融試験によっても融点の降下を示さず、また各種の機器分析の結果からも I と同定された。なお、I 以外に数種の生成物の結晶が得られたが、それらについては今回は検討しなかった。