

ポリアミド薄層クロマトグラフィーにおけるエストロジエンの移動率と展開溶媒の溶離能*

徐 型 堅**

(1971年2月17日受理)

エストロン、エストラジオール、エストリオールを試料として、いわゆるナイロン6によるポリアミド薄層クロマトグラフィーを試み、試料の移動率と展開溶媒の種類、組成との関係について検討した。まず23種類の非水単一溶媒について検討した結果、二、三の例外を除き展開溶媒の特性値であるhydrogen bonding parameter (γ 値) と solubility parameter (δ 値) との両者がいまって高くなるにつれて試料の R_f 値が増大した。 γ 値がほぼ5以上の溶媒系ではその δ 値が増大するにしたがって R_f 値が高くなり、 γ 値および δ 値がともに10をこすとポリアミドの吸着能が弱まり、ポリアミドによる試料の相互分離はほとんど認められなくなった。

エストロジエンを相互分離するための展開溶媒としては、ほぼ5以上の γ 値を示す求プロトン性溶媒、あるいは γ 値5以下の非プロトン性の極性溶媒が適当であった。また両者の混合による2成分系、あるいは非プロトン性の極性溶媒に δ 値10以上のプロトン性水型溶媒を少量添加した非水2成分系溶媒が適当であると認められた。

1 緒 言

従来、ポリアミド薄層クロマトグラフィーに適当な展開溶媒系として、エタノール-水 (1:1)、アセトン-水 (1:1)、エタノール-酢酸-ジメチルホルムアミド-水 (4:2:1:6) のような含水溶媒系およびベンゼン-ジメチルホルムアミド (97:3) などが一般的なものとして推奨されているが¹⁾、試料ごとに経験的に選択することが必要である。Wang ら²⁾ はクロロホルム-*n*-ブタノール (95:5) ならびにエタノール-水 (60:40) を用いるポリアミド薄層クロマトグラフィーにより3種のエストロジエンを相互分離できることを速報しているが、展開溶媒に関する系統的な検討は行なわれていない。

本報では、まず23種類の非水単一溶媒で主要なエストロジエンであるエストロン、エストラジオール、エストリオールを展開し、試料の移動率と溶媒の特性値であるhydrogen bonding parameter (γ 値) ならびに solubility parameter (δ 値) との関係を調べた。その結果、展開溶媒の γ 値と δ 値の増大にしたがって試料の R_f 値が上昇する傾向を示すことが認められた。この知見に基づいて数種の2成分系溶媒の混合比を変化させて展開し、単一溶媒の組み合わせとその混合比が、3種のエストロジエンの相互分離に及ぼす影響について検討した。

2 実 験

2.1 装 置

矢沢科学器械工業製の角型薄層クロマトグラフ展開器 100-70 型を用いた。

2.2 展開溶媒

用いた23種類の溶媒は Table I に一括して示した。

* エストロジエンおよびその関連化合物のポリアミドクロマトグラフィー (第1報)

** 東京薬科大学: 東京都新宿区北新宿3丁目
現在 台北医学院薬学系: 中華民國台北市吳興街250号

N,N-ジメチルホルムアミドは第一化学薬品、ジメチルスルホキシドは米山薬品、メチルイソブチルケトン是小泉化学薬品、そのほかはいずれも和光純薬工業の特級試薬を用いた。

2.3 ポリアミド薄層

誠心堂化学原料行製、生化学工業販売のポリエチレンテレフタレートフィルムを支持体とする“Polyamide Layer”(ナイロン6)を用いた。

2.4 試料

エストロン (estrone), エストラジオール (estradiol) およびエストリオール [estriol(16 α , 17 β)] は、いずれも帝國臓器製薬神戸川明博士から提供された。

2.5 展開条件

プレートの一端から 1.5cm を原点として試料のメタノール溶液をつけ、温風で軽く乾燥してから展開そうに入れて溶媒飽和蒸気に 10 分間の前吸着を行なったのち、静かにプレートを溶媒中に約 0.3cm の深さに浸し上昇法で 1 次元展開を行なう。展開距離は原点から 5~7cm。

2.6 検出方法

ヨウ素蒸気によりかっ色の呈色像として確認した³⁾。

3 結果と考察

3.1 非水単一溶媒系における挙動

Table I に示した 23 種の単一溶媒によってエストロン、エストラジオール、エストリオールの 3 種を上昇法で展開した。得られた R_f 値を増大の傾向にほぼしたがって配列すると Fig. 1 のようになる。ヘキサン、シクロヘキサンのように R_f 値がゼロになる場合、ピリジンのように 3 種の試料がほぼ同一の R_f 値を示す場合、およびメタノールにおける例外を除き、ほかはいずれの展開溶媒においても試料の R_f 値の大小はエストリオール < エストラジオール < エストロンの順になることが認められた。

一般にポリアミドクロマトグラフィーにおけるフェノール性化合物の分離は、ポリアミドを構成する酸アミド結合のカルボニル基の酸素原子と試料化合物の水酸基の水素原子との間に形成される水素結合の強弱の差に基づくこととされている⁴⁾。このことからポリアミドクロマトグラフィーでは、シリカゲルやアルミナなどを用いるほかの吸着型クロマトグラフィーに比べて、展開溶媒の極性が試料の移動率に対してより直接的な影響を及ぼすものと考えられる。吸着型クロマトグラフィーにおける展開

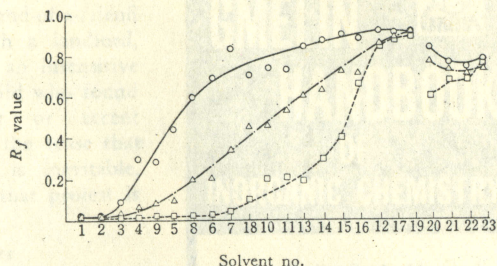


Fig. 1 R_f values of estrogens on polyamide (Nylon 6) layers in one-component solvent systems

—○— Estrone; —△— Estradiol, —□— Estriol; Key numbers denote solvents in Table I

溶媒の溶離能に関しては、古くからいわゆる溶出順位が知られているが、定性的な序列であり、溶媒の極性を特性値として表わしたものではない。近年 Snyder⁵⁾ は liner elution adsorption chromatography についての多数の研究から溶媒の eluent strength ϵ° という特性値を各種の吸着剤ごとに求め、溶質の保持容量との関係式を提出しているが、ポリアミドにおける溶媒の ϵ° 値は求められていない。またその関係式は吸着剤の活性が中等度で溶質が炭化水素類である場合にはよく適合するが、溶質が極性の置換基を有するときは必ずしも実験値と一致しない。

著者は 3 種のエストロジェンについて得られた Fig. 1 の移動率と、それぞれの展開に用いた単一溶媒の特性値である γ 値および δ 値との関係について検討することを試みた。

Hildebrand⁶⁾ の溶液理論から誘導された混合のエネルギーの定量的な関係式における内圧項に相当する δ 値は、London, Keesom, Debye, Lewis 力ならびに水素結合力という溶媒分子に関する四つの分子間力を包括した特性値とされている。一方、各種の単一溶媒に添加された CH_3OD の赤外吸収スペクトルから O-D バンドの移動度を測定し、ベンゼンにおける値を基準のゼロとして算出された γ 値⁷⁾ は溶媒分子の水素結合形成能の大小を示す特性値として提唱されたものである。溶媒パラメーターとしての両者の値は、従来有機溶媒相互の混和性や合成高分子化合物の溶解性を予測、説明するために利用されていたが、液相クロマトグラフィーにおける展開溶媒の溶離能との関係については検討されていない。

Crowley ら⁸⁾ によってまとめられた γ 値と δ 値は Table I に示したとおりであり、本報で用いた展開溶媒の番号は γ 値の増大の順にナンバーをつけたものであ

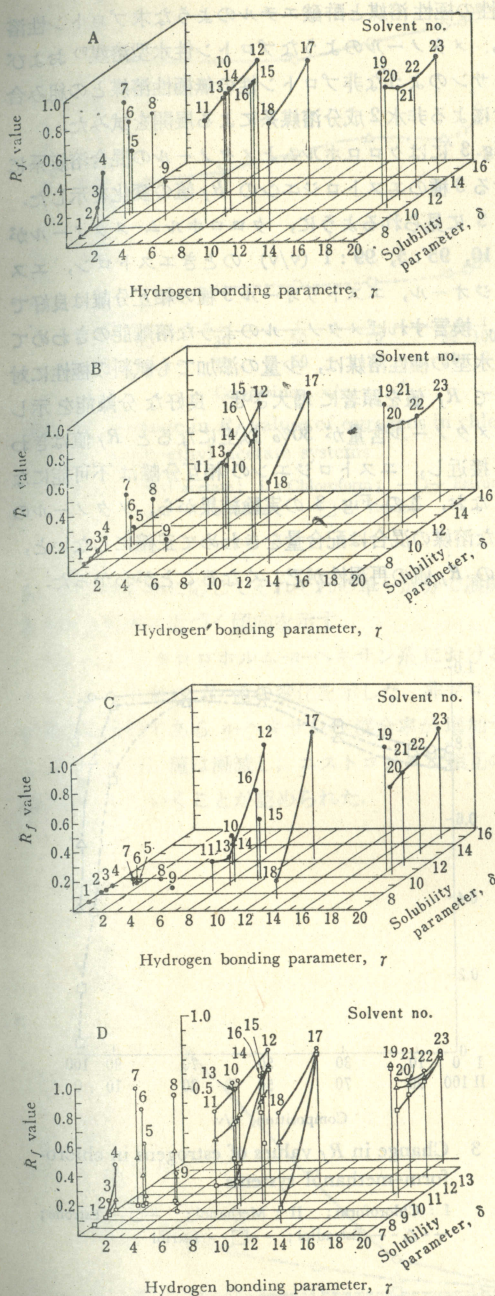


Fig. 2 Three dimensional diagrams on the relationship between R_f values of estrogens and characteristics of solvents

A : Estrone; B : Estradiol; C : Estriol; D : \circ Estrone, \triangle Estradiol, \square Estriol; Key numbers denote solvents in Table I

る。したがって Fig. 1 のようにエストロジエンの R_f 値の増加にほぼしたがって配列したとき、溶媒番号 9、

Table I Solvent systems and their characteristics

No.	Name	Hydrogen bonding parameter ^{a)} (γ)	Solubility parameter ^{b)} (δ)
1	<i>n</i> -Hexane	0	7.3
2	Cyclohexane	0	8.2
3	Carbon tetrachloride	0	8.6
4	Benzene	0	9.2
5	Ethylene dichloride	1.5	9.8
6	Methylene chloride	1.5	9.7
7	Chloroform	1.5	9.3
8	Nitrobenzene	2.8	10.0
9	Toluene	4.5	8.9
10	Acetonitrile	6.3	11.9
11	Methyl isobutyl ketone	7.7	8.4
12	Dimethyl sulfoxide	7.7	12.9
13	Ethyl acetate	8.4	9.1
14	Ethyl formate	8.4	9.4
15	Acetone	9.7	10.0
16	1,4-Dioxane	9.7	9.9
17	<i>N,N</i> -Dimethylformamide	11.7	12.1
18	Diethyl ether	13.0	7.4
19	Pyridine	18.1	10.7
20	Octyl alcohol	18.7	10.3
21	<i>n</i> -Butyl alcohol	18.7	11.4
22	Ethyl alcohol	18.7	12.7
23	Methyl alcohol	18.7	14.5

8, 18, 12 などの箇所では番号順に並ばないことは、試料の移動率と γ 値とが一義的には相関しないことを示す。そこで Fig. 2, A, B, C のようにエストロジエン 3 種の R_f 値を y 軸にとり、展開に用いた単一溶媒の γ 値を x 軸、 δ 値を z 軸にとって 3 次元にプロットすると、溶媒番号 5, 6, 7 における例外を除き、 γ 値と δ 値とが増大するにしたがって試料の R_f 値が上昇する傾向が認められた。なお、Fig. 2, D は Fig. 2, A, B, C を一括し、3 種のエストロジエンについて一つの図にまとめたものである。

試料の R_f 値と溶媒の γ 値ならびに δ 値との関係を示した Fig. 2 からわかるように、 γ 値が 5 以上の溶媒系 (Table I の No. 10~23) では δ 値が大きくなるほど R_f 値は増大した。プロトン性水型溶媒⁹⁾ (No. 20~23) ならびに非プロトン性溶媒⁹⁾ (No. 10~19) がみずからの分子内に電気陰性度の高い酸素原子や窒素原子を含有することは、その溶媒のプロトン受容性が大きいことを意味している。したがって見かけ上 δ 値の大きい展開溶媒ほど R_f 値が増大するものと考えられる。 γ 値および δ 値がともに 10 以上の溶媒系 (No. 19~23 および No. 17) では、3 種のエストロジエンはほぼ同様の高い R_f 値を示し、ポリアミドによる相互分離はほとんど認められなかった。ジメチルスルホキッド (No. 12) も 3 種の

エストロジェンの相互分離を示していないのは、溶媒の δ 値が 12.9 で非常に大きいためであると思われる。またアセトニトリル (No. 10) の δ 値は 11.9 であってかなり高い値を有するにもかかわらず、試料の R_f 値の差が大きく試料が相互分離されているのは、 γ 値が 6.3 とかなり低い値の溶媒であることに基づくものとして説明できる。

試料の R_f 値と溶媒の γ 値および δ 値との関係を示した Fig. 2 で見られるように、 γ 値がほぼ 5 以下の溶媒系 (Table I の No. 1~9) では、見かけ上 γ 値が大きくなるほど R_f 値が高くなる傾向が認められた。 γ 値はベンゼンの値をゼロとおいて設定されたものであるが、同様に γ 値がゼロのヘキサンやシクロヘキサンで展開するといずれも R_f 値がゼロとなるのに反して、ベンゼン (No. 4) で展開すると試料がある程度移動し、エストラジオール 0.06, エストロン 0.30 程度の R_f 値を示す。このことはポリアミドと試料との間の水素結合が、試料とベンゼンとの相互作用による π 型水素結合によって置換される結果と考えられる。すなわち、1 個の水酸基しか有しないエストロンとポリアミドとの間の弱い水素結合はベンゼンによって置換されて移動するものと考えられる。ニトロベンゼン (No. 8) は電気陰性度の高い酸素原子を含有する溶媒であるが、分子内電子の非局在化が異常に大きく、 δ 値は 10.0 とかなり高い値を有するにもかかわらず、 γ 値は 2.8 と非常に低いため、エストラジオールとポリアミドとの間に形成される水素結合を切断することができず、その結果としてエストラジオールの R_f 値がゼロを示したものと考えられる。トルエン (No. 9) を展開溶媒としたときの試料の R_f 値がベンゼンのそれと類似して低いのは、トルエンの γ 値が 4.5 であるにもかかわらず δ 値が 8.9 と低いことに基づく。 n -ヘキサン (No. 1), シクロヘキサン (No. 2) などの非プロトン性の無極性溶媒で展開しても、3 種のエストロジェンはいずれも移動することなく R_f 値はゼロとなる。このような溶媒では試料とポリアミドとの水素結合を切断できず、試料を移動できないことを示唆していると考えられる。

3.2 非水 2 成分系における挙動

Fig. 1 に示したような 23 種の非水単一溶媒系で展開したときのエストロジェンの移動率の序列は、ポリアミド薄層クロマトグラフィーにおける展開溶媒の溶出順位にはかならない。吸着型の薄層クロマトグラフィーにおいては、一般に 2 成分以上の展開溶媒系が用いられている。3.1 の実験結果から、クロロホルムのような非プロ

トン性の極性溶媒と酢酸エチルのような求プロトン性溶媒⁹⁾、メタノールのようなプロトン性水型溶媒⁹⁾ およびヘキサンのような非プロトン性の無極性溶媒との組み合わせによる非水 2 成分溶媒系による展開を試みた。

Fig. 3 にはクロロホルムとメタノールの混合溶媒系における 3 種のエストロジェンの R_f 値の変化を示した。Fig. 3 に見られるように、クロロホルム-メタノールが 90:10, 95:5, 99:1 (v/v) のときエストロン、エストラジオール、エストリオール 3 種の相互分離は良好である。換言すればメタノールのような溶離能のきわめて強い水型の極性溶媒は、少量の添加でも試料の極性に対応して R_f 値を顕著に増大させ、良好な分離能を示した。メタノール含量が 30% 以上になると R_f 値はきわめて接近し、エストロジェンの相互分離は不可能になる。なお、この Fig. 3 の実験結果から、メタノールのような溶媒の混合は配合量をきわめて正確にしないと、試料の R_f 値の再現性が乏しくなることがわかった。

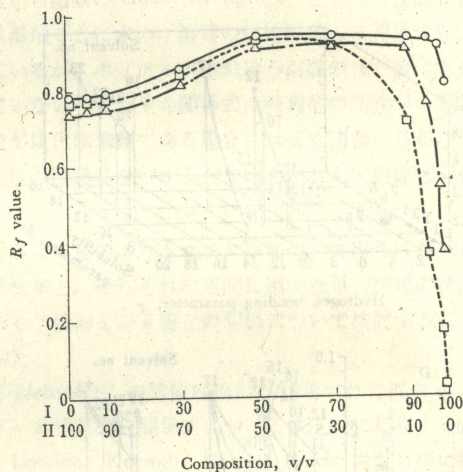


Fig. 3 Change in R_f values of estrogens in chloroform-methanol systems

I : Chloroform; II : Methanol; —○— Estrone; —△— Estradiol; —□— Estriol

Fig. 4 にはクロロホルムと酢酸エチルとの混合率を変えたときのエストロジェンの R_f 値の変化を示した。メタノールのようなプロトン性水型溶媒とは異なり、求プロトン性溶媒である酢酸エチルは γ 値 8.4, δ 値 9.1 で中等度の溶離能を有するため、単一溶媒でも試料の極性に対応してエストロジェンを相互分離できる。したがって単一溶媒でも同様にエストロジェンを相互分離できる非プロトン性の極性溶媒であるクロロホルムと混合して

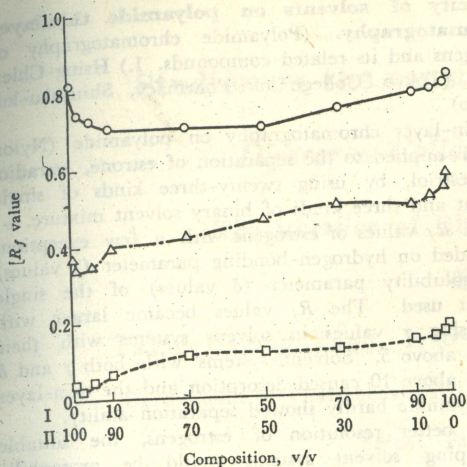


Fig. 4 Change in R_f values of estrogens in chloroform-ethyl acetate systems

I: Ethyl acetate; II: Chloroform; —○— Estrone; —△— Estradiol; —□— Estriol

も、その混合率に応じてそれぞれの単一成分で展開したときの移動率に近づく傾向を示す。

Fig. 5 にはクロロホルム-*n*-ヘキサン系におけるエストロゲン3種の R_f 値の変化を示した。非プロトン性の無極性溶媒である *n*-ヘキサンの混合率が増加するにたがって R_f 値は漸減し、エストロゲン相互の分離能が低下していくことが認められた。

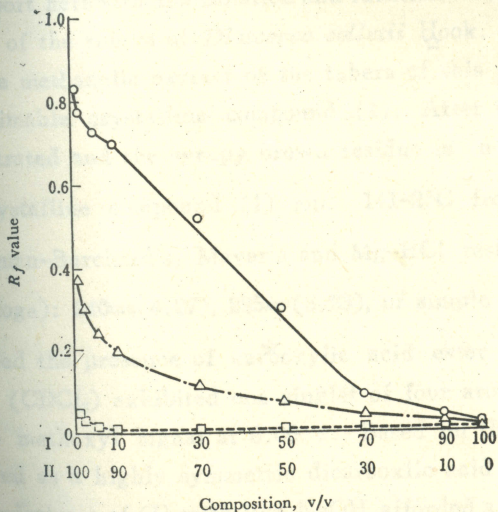


Fig. 5 Change in R_f values of estrogens in chloroform-*n*-hexane systems

I: *n*-Hexane; II: Chloroform; —○— Estrone; —△— Estradiol; —□— Estriol

3.3 含水2成分系における挙動

エタノール-水 (6:4) の2成分系ではエストロン、エストラジオールとエストリオールの R_f 値はそれぞれ 0.69, 0.63, 0.59 であった。またアセトン-水 (6:4) ではそれぞれ 0.64, 0.63, 0.56, *n*-プロピルアルコール-水 (6:4) ではそれぞれ 0.65, 0.62, 0.56 であった。このような含水溶媒系では試料のエストロジエンの R_f 値がいずれも 0.5~0.7 付近に接近して集中し、吸着剤としてのポリアミドの分離効果が認められなかった。一般にポリペプチドの酸アミド結合に対する水和においては、水分子の水酸基と酸アミドのカルボニル基の酸素原子との間に水素結合が形成され、酸アミドのイミノ基と水分子の酸素原子との間で水素結合が形成されるものではないことが指摘されている¹⁰⁾。上述の含水2成分系による実験結果は、溶媒系に含まれる水がポリアミドに強く水和するため分配クロマトグラフィーの様相を呈するものと考えられる。

4 結 語

エストロジエンのポリアミドクロマトグラフィーでは、二、三の例外を除き展開溶媒の γ 値と δ 値との増大にしたがって試料の R_f 値は上昇する。一般に γ 値約5以上の溶媒系では δ 値の増大にしたがって試料の R_f 値は上昇する。展開溶媒の γ 値と δ 値とがほぼ 10 以上になると、ポリアミドによるエストロジエンの相互分離は著しく困難になる。

以上の結果からエストロジエンの相互分離を高めるためには、展開溶媒は γ 値がほぼ 5 を境にして、これ以下の γ 値を有するクロロホルムのような非プロトン性の極性溶媒、あるいは 5 以上の γ 値を有する酢酸エチルのような求プロトン性溶媒が適当であり、また両者を混合した2成分系、あるいは両者のいずれかに δ 値 10 以上のメタノールのようなプロトン性水型溶媒を少量加えた非水2成分系溶媒が適当であることが判明した。

本研究に際し懇切なご指導を賜った松本 潮、原昭二両教授ならびに有益な助言とご高配を賜った新延信吉教授、森 陽助教授、研究の機会と便宜を与えられた東京薬科大学学長長瀬雄三先生、またご好意にあずかった東京薬科大学生化学教室のかたがたに深謝いたします。なお、本研究は中華民国国家科学委員会の補助により東京薬科大学留学期間中に行なったものであり、あわせて深謝いたします。

文 献

- 1) E. Stahl, H. K. Mangold (E. Heftmann, Ed.): "Chromatography", 2nd Ed., p. 173 (1967), (Reinhold, New York).

- 2) Y. C. Tung, K. T. Wang : *Nature*, **208**, 581 (1965).
- 3) Wm. Brown, A. B. Turner : *J. Chromatog.*, **26**, 518 (1967).
- 4) V. Carelli, A. M. Liquori, A. Mele : *Nature*, **176**, 70 (1955).
J. W. Copius-Peereboom : *ibid.*, **204**, 748 (1964).
L. S. Bark, R. J. T. Graham : *J. Chromatog.*, **27**, 131 (1967).
- 5) L. R. Snyder : *J. Chromatog.*, **6**, 22 (1961); *ibid.*, **8**, 178 (1962); *ibid.*, **16**, 55 (1964).
- 6) J. Hildebrand, R. Scott : "The Solubility of Nonelectrolytes", 3rd Ed., (1949), (Reinhold, New York).
- 7) W. Gordy : *J. Chem. Phys.*, **7**, 93 (1939); *ibid.*, **8**, 170 (1940); *ibid.*, **9**, 204 (1941).
- 8) J. D. Crowley, G. S. Teague, Jr., J. W. Lowe, Jr. : *J. Paint Technology*, **38**, 269 (1966).
- 9) 藤永太郎, 伊豆津公佑, 梅本喜三郎, 新居敏男, 高岡和則 : 日化, **89**, 105 (1968).
- 10) M. Tsuboi : *Bull. Chem. Soc. Japan*, **25**, 160 (1952).

capacity of solvents on polyamide thin-layer chromatography. (Polyamide chromatography of estrogens and its related compounds. I.) Hsing-Chien Hsiu (Tokyo College of Pharmacy, Shinjuku-ku, Tokyo)

Thin-layer chromatography on polyamide (Nylon 6) was applied to the separation of estrone, estradiol and estriol, by using twenty-three kinds of single solvent and three kinds of binary solvent mixture.

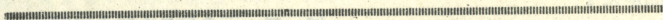
The R_f values of estrogens with a few exceptions depended on hydrogen-bonding parameter (γ values) and solubility parameter (δ values) of the single solvent used. The R_f values became larger with increasing γ values in solvent systems with their values above 5. Solvent systems with both γ and δ values above 10 caused desorption and the thin-layer of polyamide hardly showed separation ability.

For better resolution of estrogens, the suitable developing solvent systems would be protophilic solvents with γ values above 5 or aprotic polar solvents with γ values below 5. A mixture of these or the aprotic polar solvents with an addition of a small amount of protic solvent with δ value above 10 would be also useful.

(Received Feb. 17, 1971)

☆

Migration rates of estrogens and elution



☆

☆

☆

☆

