

氏 名	橋 本 圭 二 はし もと けい じ
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 112 号
学位授与の日付	昭 和 48 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	17-ケトステロイドのガスクロマトグラフィーならびに GC-MS による分析学的研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 宇 野 豊 三 教 授 岡 田 壽 太 郎 教 授 田 中 久

論 文 内 容 の 要 旨

尿中に排泄される 17-ケトステロイド (17 KS) の測定は副腎皮質、性腺機能の指標として、またその代謝の研究および他のホルモンとの相互関係の解明などに意義がある。従来尿中 17 KS は、抱合型を加水分解したのち Zimmermann の比色法により測定されているが、測定値の信頼度および前処理操作の煩雑さなどからも必ずしも十分な測定法とは言えない。

一方近年ガスクロマトグラフィー (GLC) の開発に伴って物質の分離分析は飛躍的に発展し、尿中 17 KS の分析にも広く適用されるようになったが、前処理としてのカラムクロマトグラフィー、または薄層クロマトグラフィーによる分画操作の煩雑さ、回収率、トリメチルシリル (TMS i) 化の方法、分離および同定方法などに不十分な点が多い。

そこで著者は、尿中 17 KS の GLC による定量法の確立を目的として、GLC ならびに GCMS を適用して本研究をおこなった。

まず一般に測定の対象とされている尿中 17 KS (androsterone, etiocholanolone, dehydroepiandrosterone, 11-ketoandrosterone, 11-ketoetiocholanolone, 11-hydroxyandrosterone, 11-hydroxyetiocholanolone) の 7 種を、従来おこなわれてきた 11-デオキシ 17 KS と 11-オキシ 17 KS の 2 分画とすることなく、同時に分離定量するための固定相液体の検討をおこなうに際し、低濃度充填剤の調製法として溶媒蒸発法を改良し、この方法により調製した有極性、無極性の 6 種の充填剤について、17 KS に対する分離能および構造と分離の関係を明らかにするとともに、17 KS の 7 種は 3-TMSi 誘導体としたのち 2 % XE-60 (chromosorb W 60~80 mesh) のカラム (長さ 2 m, 内径 4 mm) を用いて、200°C または 190°C ~ 210°C の昇温分析 (1°C/min) すると定量分析に適用できる良存な分離を示すことが判った。

次に hexamethyldisilazane, N. O-bis (trimethylsilyl) acetamide, N. O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) および N-trimethylsilyl-imidazole などの TMSi 化剤を用い、17 KS の 3 位水酸基、11 β 水酸基の TMSi 化、またその TMSi 誘導体の GLC による分離を検討し、尿中 17KS の

定量分析のための TMSi 化剤としては BSTFA が最も適していることを明らかにした。

従来尿中 17KS の同定法は保持時間のみに基づいた情報によりおこなっているが、より確実に同定するため GC-MS によるマススペクトルを適用した。特にその判別が困難とされていた 5 α -androstane 型 (A/B 環トランス) と 5 β -androstane 型 (A/B 環シス) の異性体のマススペクトルの判別法を検討し、その TMSi 誘導体のマススペクトルは分子イオンの強度に対して $(\text{CH}_3)_3\text{SiOH}$ と $\cdot\text{CH}_3$ の脱離したイオンの強度比が 5 α 型 < 0.5 5 β 型 > 3.0 と大差があることを明らかにして、尿中 17KS の GC-MS による同定法として適用した。また GC-MS についても 2・3 の知見を得た。

上記基礎研究の結果に基づいて、GLC により尿中 17KS の 7 種を 2 分画とすることなく、同時に分離定量する方法を確立し、従来の実用上の臨床検査法である Zimmermann 比色法による総 17KS 値およびカラムクロマトグラフィーによる分画の個々の 17KS 測定値を比較検討した。この結果 GLC による尿中 17KS の定量法は操作が簡単、迅速であり、再現性、精度が著しくすぐれ、またそのすぐれた分離は他の物質に影響されることが少なく臨床検査および代謝研究に満足すべきものであった。

さらに GLC による 17KS グルクロナイドの分析法を検討し、加水分解することなくグルクロナイドを分析する方法を確立した。グルクロナイドの揮発性誘導体として TMSi エステル - TMSi エーテル誘導体を適用し、その TMSi 化については GC-MS により明らかにしたのち、尿中 17KS グルクロナイドの分析をおこない GLC および GC-MS により分離成分を同定した。

論文審査の結果の要旨

尿中 17 ケステロイド (17KS) は 7 種存在が知られ、いずれもグルクロン酸または硫酸抱合体を形成している。従来から 17KS の定量は抱合体を加水分解したのち Zimmermann 反応によって行われているが、この方法によるときは 17KS の総量は求められるが、7 種の 17KS を分離定量することはできない。尿中の 17KS の各分画の定量はガスクロマトグラフィーにより行われているが同時に 7 種を分離する方法は未だ報告はなく煩雑な操作を必要としている。

著者はカラム充填剤の調整法について検討を行ない 2% XE-60 カラムを用い、17KS の定量に適した TMSi 化方法即ち N, O-bis (trimethylsilyl)-trifluoroacetamide を用いて 3-TMSi エーテル誘導体として 7 種の 17KS の分離に成功した。更に本法を用い尿中 17KS の各分画の量と人体の老化との関係に検討を加え興味ある結果を得ている。

また 17KS の 5 α -androstane 型と 5 β -androstane 型の区別は従来から困難であったが TMSi エーテル誘導体となし GC-MS による同定法を考案した。

17KS のグルクロナイドの分析は従来 β -グルクロニダーゼにより加水分解したのち分析が行われていたが、著者は直接 TMSi 化して GLC により分離定量することに成功した。著者の研究は 17KS の 7 種ならびにグルクロナイドについての同時定量法を確立したもので臨床分析に貢献するところ大である。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。