

尿中17-Hydroxycorticosteroids および Cortol compounds の新分画測定法に関する研究

岡山大学医学部産婦人科学教室（指導：橋本清教授）

本 森 良 治

〔昭和47年11月25日受稿〕

Synopsis

尿中 Steroid 測定から副腎皮質機能を正確に判定することを目的に同時抽出法より得た試料の一部を TLC を応用した17-OHCS 分画測定に、他の一部は Cortol comp. 以外の HIO₄-17KS を二次 Florisil column chromatography で除去し、これを HIO₄で酸化後 Alumina column chromatography により11-deoxy-cortol, Cortolone, Cortol を分画し測定する方法につき基礎的検討を試み、測定法を確立した。さらに11-deoxy-cortol の同定も合せ行い、本法にもとづく正常男女の排泄値を求め報告する。

1. 緒 言

副腎皮質機能検査特に Glucocorticoids の分泌能検査として一般に用いられている方法は、尿中総17-OHCS 測定法および尿中17 KGS 測定法である。しかし、これら総 Steroid の測定値のみでなく、その病態を詳細に検索するためには尿中17-OHCS の分画測定が必要である。さらに Fukushima¹⁾, Romanoff²⁾ は radioactive cortisol の投与後尿中に排泄される Steroid を検索し、C₂₀-hydroxylase の作用をうけた C₁₇-glycerol side chaine C₂₁-Steroid (以下 Cortol comp. と略す) が25~30% も存在することを報告した。この Cortol comp. は、Porter-Silber chromogen としては発色せず、従って17-OHCS とこれら Cortol compounds の排泄が完全に相関しなければ17-OHCS のみの測定では副腎皮質機能検査法としては完全なものとは言い得ない。一方17 KGS 測定法では Cortol comp. も同時に測定されるが Pregnantriol も測定することとなり吉田³⁾ が指摘した如く成熟婦人では性周期に

伴う変動を示すため判定に困難をきたすことになる。

我々は17-OHCS 分画測定法については従来^{4) 5)} の Paper chromatography より簡易で、しかも分離能のよい Thin layer chromatography (以下 TLC と略す) を応用して、新しい分画測定法につき検討した。Cortol comp. の測定法については Romanoff²⁾, Fukushima¹⁾ らの如く Paper chromatography を使用せず、図1に示すように Periodic acid oxidation により Zimmermann 発色する Steroid (以下 HIO₄-17 KS と略す) の中から Cortol comp. 以外の17, 20-glycol C₁₇-steroid と17KS をまず Florisil column chromatography で除去し、その後 periodic acid oxidation を行い、さらに Alumina column chromatography で Cortol comp. の分画測定を行うことにつき基礎的検討を行い、新しい測定法を確立し得たので報告する。

2. 実験材料および器具

1) 試 薬

1. β -glucuronidase: Fishmanの方法にもとずき step 11 まで仔牛の肝臓より自家精製したものを用いた。(以下 β -Gl. と略す)
2. 0.2 M acetate buffer (PH 4.7)
3. Penicillin G potassium: 市販のもの。
4. Florisil: 和光純業の100~200 mesh のものを使用、その精製法は200g Florisil を醋酸エチル 500ml で時々振盪しながら1昼夜放置、その後60℃の乾燥器で乾燥、さらに500ml の chloroform で1夜洗滌、60℃乾燥器で乾燥、その後600℃にて4時間活性化し、100℃以下にならないうちにデシケーターの中に入れ常温に戻し使用した。
5. 6% water Alumina: Woelm 製 Alumina に水6%に加えたもの。

6. Silica gel G : Merck 製のものをそのまま.
7. 1 % meta Dinitrobenzene alcohol 溶液 : m-Dinitrobenzene は再結晶により精製したものをを用いた.
8. 8 N-KOH 水溶液.
9. Phenylhydrazine 硫酸 : Phenylhydrazine 硫酸塩は特級遊離型を硫酸塩に変換させ, さらに再結晶により精製したものをを用いた. 硫酸1.27mlと水1mlからなる硫酸水100ml中に Phenylhydrazine 硫酸塩を65mg入れて用いた.
10. Ethyl acetate : 試薬特級を再蒸溜した.
(以下 EtOAc. と略す)
11. Ether : 試薬一級を精製した.
12. 芒硝 : 試薬一級を精製した.
13. 水 飽 和 ベンゼン : 試薬一級のベンゼンを精製し, これに少量の水を入れて飽和させたものをを用いた.
14. 以下のものは全て市販試薬特級をそのまま用いた. Sodium chloride, Sodium hydroxide, Chloroform (以下 CHCl_3 と略す), Ethyl alcohol (以下 EtOH と略す), Methyl alcohol (以下 MeOH と略す), Sulfuric acid, Sodium periodate (以下 NaIO_4 と略す), Acetic anhydrous, Pyridin, Blue tetrazolium, Tetramethyl ammonium hydroxide, Phosphomolybdic acid, Antimony pentachloride, Sodium borohydride, Trimethylsilyl-chlorosilane, Hexamethyldisilazane.

2) 実験器具

1. Column : Florisil には内径1cmのもの, Alumina には内径0.75cmのものを使用した.
2. Rotary evaporator : 柴田製.
3. Siphon balanced automatic fraction collector : 東洋沄紙製.
4. 365m μ UV ランプ : マナスル工業製.
5. Photo electric spectrophotometer EPU-2
6. Multipurpose recording spectrophotometer : 日立製 MPS-2 型.
7. Gas Liquid Chromatograph : 島津製 GC-1B, Detector : HFD-1.
8. 吉田式熱風乾燥器 : さくら製.
9. Thin Layer Chromatograph : シュミット製一式, glass plate 20×20, 20×55cmを使用した.
10. Microsyringe : 1 μ l 用.

3) 標準 Steroids

- Pd. : 5 β -pregnan 3 α , 20 α , -diol
(帝臓より提供)
- Pt. : 5 β -pregnan 3 α , 17 α , 20 α -triol
(帝臓より)
- Comp.S. : 17 α , 21-dihydroxy-pregn-4-en-3, 20-dione (帝臓より)
- Comp.E. : 17 α , 21-dihydroxy-pregn-4-en-3, 11, 20-trione (帝臓より)
- Comp.F. : 11 β , 17 α , 21-trihydroxy-pregn-4-en-3, 20-dione (Nutritional biochemicals)
- THS : 3 α , 17 α , 21-trihydroxy-5 β -pregnan-20-one (Southeastern biochemicals)
- THE : 3 α , 17 α , 21-trihydroxy-5 β -pregnan-11, 20-dione (Steraloid)
- THF : 3 α , 11 β , 17 α , 21-tetrahydroxy-5 β -pregnan-20-one (Steraloid)
- allo-THF : 3 α , 11 β , 17 α , 21-tetrahydroxy-5 α -pregnan-20-one (Steraloid)
- β -Cortolone : 3 α , 17 α , 20 β , 21-tetrahydroxy-5 β -pregnan-11-one (Zori)
- α -Cortolone : 3 α , 17 α , 20 α , 21-tetrahydroxy-5 β -pregnan-11-one (Steraloid)
- β -Cortol : 5 β -pregnan-3 α , 11 β , 17 α , 20 β , 21-pentol (Zori)
- Andr. : 3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-one
(帝臓より)
- Etio. : 3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-one
(帝臓より)
- 11-K-Etio. : 3 α -hydroxy-5 β -androstan-11, 17-dione (帝臓より)
- 11-OH-Etio. : 3 α , 11 β -dihydroxy-5 β -androstan-17-one (帝臓より)
- Pregnantriolone : 3 α , 17 α , 20 α -trihydroxy-5 β -pregnan-11-one (帝臓より)
- Pregnantetrol : 5 β -pregnan-3 α , 11 β , 17 α , 20 α -tetrol (帝臓より)

3. 実験方法および結果

[I] 尿中17OHCS および Cortol comp. の水解抽出および分離法について.

本森⁹⁾の尿中17KS, 17OHCS, Pd., Pt. および Cortol comp. の同時抽出および分離法に従った. 即ち新鮮尿を β -Gl., Solvolysis の 2-Step hydrolysis を行い, EtOAc. 5回で振盪抽出を行った.

アルカリ洗滌は cold-2 N NaOH で行い、アルカリ洗滌、水洗ともに Back extraction を行った。脱水後60℃窒素ガス還流下に減圧蒸発乾固して Steroid 残渣を得た。この抽出残渣を Florisil column chromatography にて 11-deoxy-17KS, 11-oxy-17KS および Pd. を含む第1分画と Δ^4 -3-keto-corticosterone, Tetrahydro-corticosterone, Δ^4 -3-keto-17OHCS, Tetrahydro-17OHCS, Cortol comp. および Pt. を含む第2分画に mass separation を行った。

[II] 17OHCS 分画測定法について。

(1) Florisil column chromatography 第2分画の薄層上への spotting までの定量的濃縮法の検討。

1) Bush⁷⁾ の "wick chromatogram by Bush" 法。
Comp.F. 10, 50 μ g, DHA 5, 10, 50 および 200 μ g を用いて検討したところ、その回収率は Comp.F. 10 μ g で 65.9%, 50 μ g で 74.9% であり DHA 5 μ g で 97.9%, 10 μ g で 97.6%, 50 μ g で 98.3% および 200 μ g で 84.0% であった。

2) Bush⁷⁾ の Paper chromatography 法。
THF 5, 10, 50, 100 μ g を用いて行った回収率はそれぞれ 84.1%, 96.5%, 99.5% および 98.7% であった。

3) 定量的濃縮法。

THE 25 μ g, 50 μ g をそれぞれ 100ml 容ナスフラスコにとり窒素ガスで蒸発乾固したものに MeOH 2, 2, 1ml の計 3 回で溶解しては microtube に移し、これを同じく蒸発乾固した。その回収率はそれぞれ 81.8%, 86.8% であった。

(2) Silica Gel G. の活性度についての検討。

薄層の作成は Silica Gel G. 50g と純水 110ml を 300~500ml 容三角フラスコに入れ、混和、直ちに applicator 内に注ぎ、0.5~0.3mm の厚さに作成した。風乾後次のような方法で活性化を試みた。

表 1. Method of activation for Silica gel G. plate

		Rf. values (solvent: Benzene)		
		indophenol	Sudan red G	butter yellow
(1) 6 hr. ward only		0.58	0.68	0.83
(1) + 120 C. 30min. heat (2)		0.095	0.22	0.56
(1) + 150 C. 2hr. heat		0.080	0.19	0.49
(1) + (2) + conc. H ₂ SO ₄ decicator	1 day	0.081	0.18	0.49
	2 day	0.095	0.23	0.52
	3 day	0.100	0.24	0.54
(5) 30min. ward only		no separation		
(5) + 120 C. 30min. heat (6)		0.16	0.26	0.55
(6) + 80% H ₂ SO ₄ decicator	3 hr.	0.19	0.28	0.54
	12 hr.	0.17	0.28	0.57
	18 hr.	0.21	0.30	0.55
	24 hr.	0.13	0.15	0.58
	72 hr.	0.14	0.23	0.59

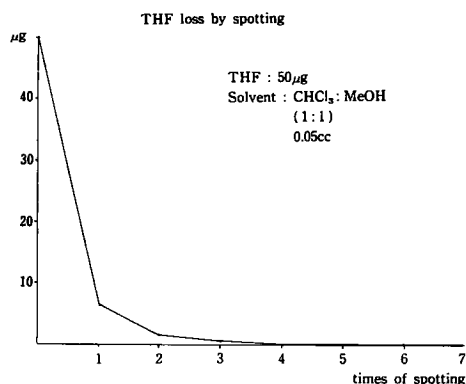
A) 1. 6時間風乾のみ。 2. 6時間風乾後120℃ 30分加熱。 3. 6時間風乾後150℃ 2時間加熱。

4. 3の薄層を濃硫酸を含むデシケーター中に1日、2日および3日保存したもの。

B) 1. 30分風乾のみ。 2. 30分風乾後120℃ 30分加熱。 3. 2の薄層を80%硫酸水を含むデシケーター中に3, 12, 18, 24および72時間保存したもの。

以上の各薄層に Indophenol, Sudan red G. および Butter yellow の色素を spot し、Solvent system として Benzene を使用して色素の Rf を求めた。Brockman 活性度と比較したが、結果は表1に

図 2



示す如くで、30分風乾後120℃ 30分加熱し、保存は80%硫酸水の入ったデシケーター中で3日迄行いうることを認めた。この方法にもとづく活性度は Brockman II-IIIに相当するようである。

(3) 薄層上への Steroid の定量的 Spotting の方法についての検討。

CHCl₃, MeOH, EtOH および MeOH-CHCl₃ 等量液を、それぞれ microsyringe を用いて薄層上に spot したときの溶媒の蒸発の仕方は CHCl₃ または MeOH-CHCl₃ 等量液が最も適しており適当な spot が行い得た。そこで THF 50 μ g を microtube 7 本にとり、これに MeOH-CHCl₃ 等量液を 0.05ml 宛入れ溶解し、これを薄層上に spot した。同様の操作を 1~7 回まで繰返した後、microtube を発色させ tube 内に残る THF を測定したところ図 2 に示す如く 4 回でほぼ残りは 0 となった。

(4) Silica Gel G. に吸着した Steroid の定量的抽出法についての検討。

薄層上の Silica Gel G. を新しい片刃のカミソリでかきとり、0.3g 宛に分けた。これに Comp.F.

20 μ g宛吸着させた。抽出溶媒としては、EtOAc. 5 ml, MeOH-CHCl₃等量液15ml, 次いで MeOH 5ml の計 3 種, 25mlを使用した。抽出法は次の 3 種を検討した。

1. 東洋汙紙 No.6. を用いて汙斗上にて汙過した。
2. 蓋付遠沈管にとり、振盪したのち遠沈させ、その上澄をとった。

3. 内径0.75cmの Column にとり、溶出させた。
各々の回収率の結果は ① 102, 101%, ② 103, 102%, ③ 104, 98%で、いずれも良好な回収率、と再現性を認めた。そこで方法の簡便な汙過法を以後使用した。

(5) 薄層上の Steroid spot からの定量的回収法についての検討。

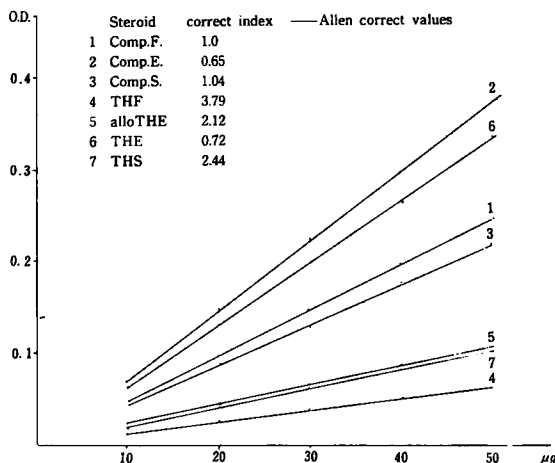
Comp.F. 50 μ g 宛薄層上に spot し、Solvent system として CHCl₃: MeOH: H₂O (90:10:1) を使用して約15度傾斜で15cm約45分間、上行展開したのちに、365m μ UV ランプで spot の認められる area の Silica Gel を次のような方法で採取し、過汙法にて抽出した。

1. 吸引法: a) 薄層上の Silica Gel を吸引管の途中に綿栓したところまで吸引して集める。
b) CHCl₃中に吸引する方法。
2. スパーテル法: 片刃のカミソリでかきとる方法。
それぞれの回収率は、1 a で55.0~58.9%, 1 b で56.4%66.0%, および2. で63~82%でスパーテル法で最もよい回収率が得られた。

(6) 薄層上での Steroid spot の検出法についての検討。

Comp.F. を0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6,

図3 Porter-Silber Chromogenicity of reference Steroids



0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0および10.0 μ g宛薄層上に spot し、次の各々の方法での最少検出量を検討した。

1. alkali Blue tetrazolium 溶液を吹霧する方法。
a. Blue tetrazolium 250mgを再蒸溜した EtOH 100cc中に溶解。
b. 10% tetramethylammonium hydroxide 水溶液 1 容と EtOH 10容を混合、用時調整。
使用时、a. b.等量混合液を調整し、吹霧すると青色の spot が認められる。
2. 濃硫酸を吹霧する。淡褐色の spot が現れる。
3. 燐モリブデン酸溶液の吹霧。淡褐色~黄褐色~暗灰色の spot が認められる。
4. 五塩化アンチモン吹霧。黄褐色~灰褐色の spot が現われる。
5. 365m μ UV ランプ。

それぞれの方法による最少検出量は 1. 0.1 μ g, 2. 0.2~0.5 μ g, 3. 0.4~0.8 μ g, 4. 5 μ g, および5. 0.5~1.0 μ gであり、alkali Blue tetrazolium 溶液の感度が最も良好であった。

(7) 薄層展開槽内への各種溶媒の飽和時間についての検討。

展開槽内の側壁3面に汙紙をおき、Solvent system として 1. CHCl₃: MeOH: H₂O (90:10:1), 2. 10% (CH₃)₂CO: CHCl₃, 3. 10% EtOH-CHCl₃を槽内に入れ、汉紙を湿して密栓した。5分毎に観察して飽和されて槽壁に溶媒滴が附着するまでの時間をみると 1. 5分, 2. 15分, 3. 20分であった。いずれにしても30分間放置したのちに薄層を槽内に入れ展開することにした。

(8) 17 OHCS 用展開溶媒についての検討。

Steroid の純品として DOC, Comp. A., B., Comp. S., E., F., THS, THE, THF および allo THF を用いた。展開は約15°傾斜の上行法で、展開距離10, 15および20cmとし、展開温度19~23℃, 展開に要する時間30~45分の条件を用いた。展開溶媒としては多くの

表2 Rf. Values of the individual α -ketolic Steroids

Steroids	Solvent System		
	CHCl ₃ : MeOH: H ₂ O (90:10:1)	7% EtOH-CHCl ₃	10% EtOH-CHCl ₃
THF	0.119	0.060	0.118
alloTHF	0.134	—	—
THE	0.172	0.099	0.183
Comp.F.	0.211	0.152	0.176
THS	0.258	0.172	0.228
Comp.E.	0.344	0.259	0.424
Comp.B.	0.403	0.311	0.359
Comp.S.	0.450	0.364	0.444
Comp.A.	0.556	0.453	0.532
DOC	0.688	0.642	0.657

Solvent を検討したが比較的良好な結果を得たものは, $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (90 : 10 : 1), 7% $\text{EtOH}-\text{CHCl}_3$ および 10% $\text{EtOH}-\text{CHCl}_3$ であった. 15cm 展開法の各種 Steroid の R_f は, 表2の如くであった. 比較的 R_f 値に近いが, 実際には横に広い隋円形の spot として展開し, 各 spot の overlap は THF, allo THF 以外には認められなかった. 我々の目的からは epimer の分離を必要としないので, 以後 Solvent system として $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (90 : 10 : 1) を使用することにした.

(9) 17 OHCS 各純品の発色度の検討.

最終的な比色判定法としては Porter-Silber²¹⁾ 神戸川変法²¹⁾ にもとずき Phenylhydrazine- H_2SO_4 で発色させ, 370, 410, 450 $m\mu$ での吸光度を測定し, Allen の補正を行った. 各 Steroid を各々, 10, 20, 30, 40, 50 および 100 μg 宛とり発色させ, その chromogenecity を検討した. 平均結果は図3に示す如く, Comp. F. を1とすると Comp. S. 1.04, Comp. E. 0.65, THS 2.44, THE 0.72, THF 3.79 および allo THF 2.12 の発色度であった. さらに各々の連続吸収曲線を見ると, それぞれの max λ OD は Comp. S., E., F., THS 410 $m\mu$, THE 415 $m\mu$, THF 395~400 $m\mu$ および allo THF 400 $m\mu$ であった.

(10) [II] の小括.

尿中17 OHCS の分画測定法として以上の結果から, 尿150mlを β -Gl., Solvolysis の 2-step hydrolysis を行い EtOAc . 5回抽出, cold 2N NaOH でアルカリ洗滌, 次いで水洗するが, これらは逆抽出を行う. 脱水後, 60℃窒素ガス還流下に減圧蒸発乾固し, これを Florisil column chromatography により17 OHCS を含む10% $\text{MeOH}-\text{CHCl}_3$ 分画を求める. この分画残渣を MeOH 6mlに溶解し, そのうちの4mlを定量的に試験管にとり60℃窒素ガス吹込みにより蒸発乾固させる. さらに MeOH 2, 2, 1ml計3回で試料を定量的に microtube に移し乾固させる.

一方薄層は20×20cm plate 上に Silica Gel を0.5 mmの厚さに作製し, 風乾30分後120℃30分加熱し, 活性化させ, その後80%硫酸水を入れたデシケーター中で1~3日間保存したものを用意する. 3cm間隔に溝を切り, これと直角の方向に展開距離15cmのところにも溝を切る. 展開槽は三方向に濾紙を立て, $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (90 : 10 : 1) の展開溶媒を底に充分入れ, 濾紙も湿した後密栓し, 30分以上放置しておく.

試料の薄層上への spotting は microtube を $\text{MeOH}-\text{CHCl}_3$ 等量液0.05mlで溶解しては microsyringe で薄層上に spotting し, 同様の操作を計4回繰返して行く. 同時に標準 Steroid mixture も他の溝に spot する. これを約15°傾斜の上行展開法で15cm, 約30~45分間展開する.

展開終了後, 薄層を静かに槽より取り出し水平に保って充分に乾燥させる. 測定用試料が展開している薄層部分をガラス板で被い, 純品部のみに alkali Blue tetrazolium 溶液を吹霧する. さらに暗い場所では365 $m\mu$ UV ランプを照し, 純品と同様の移動がみられるかをチェックする. 次いで片刃のカミソリの刃で各々の純品相当部の Silica Gel をかきとり径6cmの東洋濾紙 No.6 上におく. これに EtOAc . 5ml, CHCl_3 - MeOH 15ml 次いで MeOH 5ml 計3回の抽出溶液を注いで濾過し抽出する. これを蒸発乾固し, Porter-Silber-神戸川変法にて発色させ, Comp. F. を対称に370, 410, 450 $m\mu$ での吸光度を測定し Allen の補正および発色度の補正を行い1日排泄量を計算する. 但し allo THF は THF に含めた分画値として計算した.

以上の方法が基礎的検討から得た成績をもとに確立した尿中17 OHCS 分画測定法である.

[III] 尿中 Cortol comp. の分画測定法に関する研究.

(1) HIO_4 -17KS の中から Cortol comp. のみを分離する方法について検討.

図1の如く HIO_4 -17KS は C_{17} -が ketone, 17, 20-glycol, glycerol 側鎖をもつ Steroid である. このうち17KS は既に Florisil column chromatography の第1分画に全てが溶出されていることは

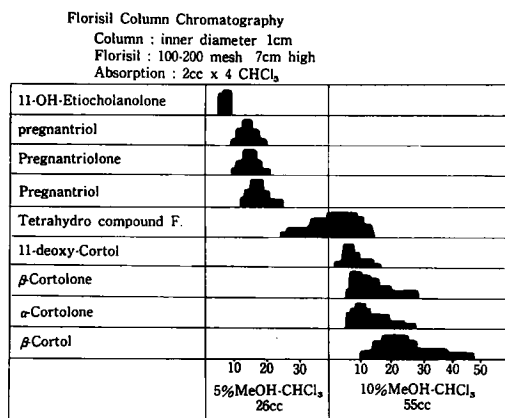
Changes of side chains at C_{17} by periodic acid oxidation

$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{C}-\text{OH} \end{array}$ Dehydroxy-ketone	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{C}-\text{OH} \end{array}$ Glycerol	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{C}-\text{OH} \end{array}$ 17, 20-ketol	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{C}-\text{OH} \end{array}$ 17, 20-glycol	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{C} \end{array}$ Ketone
Comp. F., E., S., THS, THE, THF.	11-deoxy-Cortol Cortolone Cortol	17-OH-progesterone	Pregnenolol	17KS
Porter-Silber Reaction (17OHCS)				
+	-	-	-	-
m-Dinitrobenzene Reaction after NaIO_4 oxidation				
$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C}-\text{OH} \end{array}$ -	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \end{array}$ +	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{C}-\text{OH} \end{array}$ -	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \end{array}$ +	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \end{array}$ +

報告した⁹⁾

17,20-glycol で尿中排泄が報告されているものは Pt., Pregnantetrol, Pregnantriolone などである。そこで 11-OH-Etio., Pt., Pregnantriolone Pregnantetrol, THF, 11-deoxy-Cortol, α -Cortolone, β -Cortolone および β -Cortol を用いてこれらの分離法について検討した。分離法としては Florisil column chromatography を使用した。内径 1cm の Column に Florisil を 7cm の高さになるよう CHCl_3 で湿性につめ、種々溶出溶媒を検討した。

図—14



結果は図 4 に示すように 5% MeOH- CHCl_3 26ml を prewash とし、次いで 10% MeOH- CHCl_3 55ml で他の HIO₄-17KS と Cortol comp. を完全に分離しうることゝ認められた。但し THF は両方に overlap していた。

(2) Periodic acid による酸化条件に関する検討

1) β -Cortol の 11-OH-Etio. への転換に対する反応液の PH および Periodic acid 濃度の検討。

β -Cortol EtOH 溶液 25 μg 宛とり、純水 10ml を加え、PH 2, 7 および 9, NaIO₄ 1, 10 および 25% の組合せで 37°C 1 時間反応させ後述の Ether 抽出、水洗、乾固後 Alumina column chromatography で 11-OH-Etio. 分画を採取し Zimmermann 発色させ分子量補正を行って回収率を求めた。結果は表 3 に示す如くで PH 9 および 7 でも NaIO₄ が 20% 以上の濃度になると回収率が低下するが、神戸川¹⁰⁾の指摘する 11-keto への過剰酸化は認められなかった。また 1% という低濃度でも反応時間が 1 時間あれば比較的反応が進むようである。

2) 酸化時間に対する検討

β -Cortol 40 μg を同様 PH 7, 10% NaIO₄ 4ml / 10 ml sample 濃度に加え、37°C で 10 分, 20, 30, 60 および 120 分と反応させ、それぞれを 1) と同様処理したところ、それぞれの酸化率は 96.2, 97.4, 98.2, 98.5 および 98.9% であった。

さらに二次 Florisil column で THF が overlap してくるので THF を同様酸化処理したのちに ZM 色、PS 発色を試みたが、無処置の THF との間に ZM 発色度に差が認められなく PSC としても発色は認められなく、Etiocholanolic acid 化が起ったものと考えられる。

(3) 11-OH-Etio. の抽出法に関する検討。

11-OH-Etio. 40 μg 宛とり、これに純水 10ml を加え、これに Ether 20ml 宛加えて振盪、Ether 層のみとり、脱水後 ZM 発色を行った。その回収率は 1 回で 94.9~95.0%, 2 回で 98.5~99.2%, 3 回で 97.0~99.1% であり 2 回で充分であることを認めた。

さらに、2 回抽出した Ether 層を 1N NaOH 5ml でアルカリ洗滌後、純水 5ml 宛 2 回水洗、脱水蒸発後、ZM 発色したときの回収率はアルカリ洗滌 1 回で 97.9%, 2 回で 100.2% でありアルカリ、水洗での loss は認められなかった。

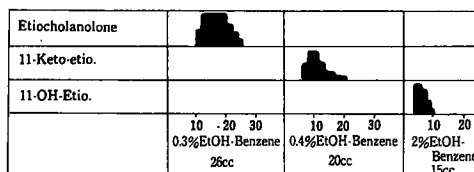
(4) 尿中 Cortol comp. 由来 HIO₄-17KS の分画法についての検討。

理論的にも、また後述する同定試験においても、NaIO₄ 酸化により Cortol は 11-OH-Etio. に、Cortolone は 11-keto-Etio. に変換する。従って、Etio. 11-Keto-Etio., 11-OH-Etio. の分画法を検討した。

表 3. Conditions of Oxidation for β -Cortol by Periodic Acid
pH and Concentration of periodic Acid
Reaction Time : 1 hr.

pH	NaIO ₄ (%)	Alumina Column Chromatography		Recovery (%)
		11-OH-Etio.	11-Keto-Etio.	
7	10	24.35	0	97.4
7	10	24.50	0	98.0
7	1	21.66	0	86.6
7	25	21.34	1.47	85.4
2	10	23.11	0.22	92.4
9	10	21.20	0.61	84.8

図 5 Alumina Column Chromatography
Column : inner diameter : 0.75cm
6% water Wolem Alumina 1gm
Absorption : 4cc Benzene



内径0.75cmのColumnに6% water Alumina 1gを水飽和ベンゼンで湿性につめ、それぞれのSteroid純品を水飽和ベンゼン1ml宛3回でColumnに吸着させた。各種濃度のEtOH—水飽和ベンゼン系で予試験を試みた。

その結果は、図5に見られるように0.3% EtOH-Benzene 26mlでEtio. が、0.4% EtOH-Benzene 20mlで11-Keto-Etio. が、さらに2% EtOH-Benzene 15mlで11-OH-Etio. が分離溶出され、それぞれの回収率は11-Keto-Etio. 94.4%, 11-OH-Etio. 101.6%であった。

(5) 比色測定法に関する検討.

1) Zimmermann—神戸川変法¹¹⁾

2) aqueous Zimmermann by Epstein¹²⁾

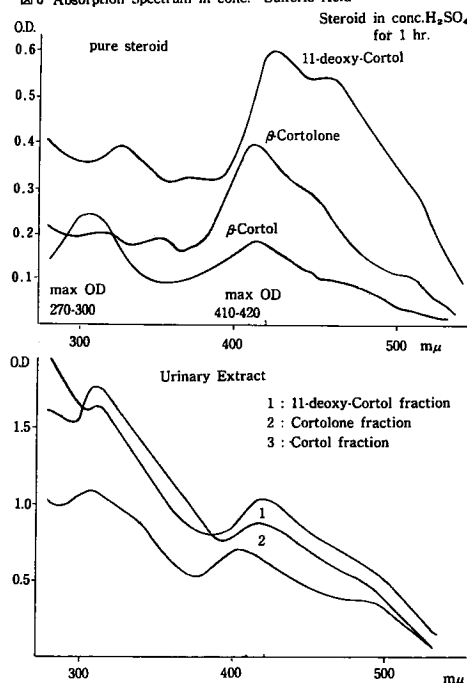
11-OH-Etio. および尿抽出物につき、両発色法につき比較検討を試みた。

aqueous Zimmermannではmax λ ODが510 μ に移動し、peakがbroadとなり、11-OH-Etio., DHA尿抽出物においても連続吸収曲線の変換点があり、390 μ にあり、従って三点測定するには390, 510, 630 μ となり、水Blank, 尿抽出物Blankにおいてもこの間の直線性が認められなくAllenの補正式が適用し難い欠点が認められるが、一方反応が暗所で行う場合と明るい場所で行うことに差がなく、褪色もゆるやかで30分以後に起るといふ長所も見出し得た。

Zimmermann—神戸川変法はこれらの欠点は認められないが、褪色は比較的早く、10分以後おこり始め時間と共に急速に褪色することと、夾雑色素の干

渉を受けやすい欠点が認められた。そこでZMCを30% EtOH 2mlとEther 4mlで振盪抽出する方法も検討したが、この場合はEtherの沸点の関係上逆に時間の経過と共に濃縮され、さらに濃く発色したときの希釈法に問題が見い出された。本法におけるHIO₄-17KSはFlorisol columnを2回、Alumina column 1回通り精製されているのでUrochromogenの夾雑は僅少であることからZimmermann—神

図6 Absorption Spectrum in conc. Sulfuric Acid



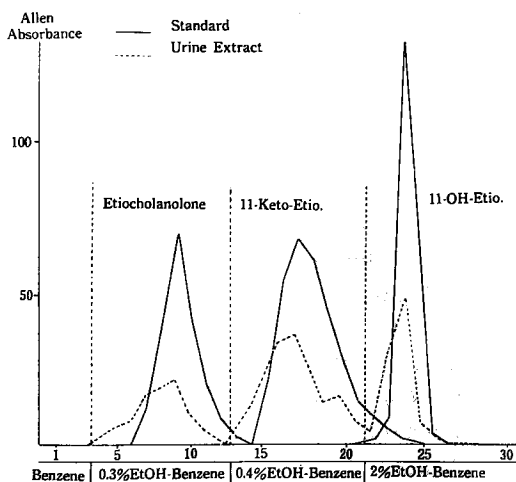
戸川氏法を使用することにした。

Etio., 11-K-Etio., 11-OH-Etio.の発色度はDHAを1とするとEtio. 0.8, 11-K-Etio. 0.7, 11-OH-Etio. 1.1であった。

(6) 同定法

二次Florisol column chromatographyの10% MeOH-CHCl₃ 55cc分画をSilica Gel G 0.5mmの薄層にspotし、solvent system: CHCl₃:MeOH:H₂O (80:20:1)で20cm約30分上行展開した。濃硫酸で発色せしめたところ、各Cortol comp.のR_fはそれぞれβ-Cortol 0.367, α-Cortolone 0.522, β-Cortolone 0.500および11-deoxy-Cortol 0.565と分離し、尿抽出物もこれらに相当するR_fのspotと他にhigh polar 3, less polar 1つを認めた。それらareaのSilica Gel Gをかきとり、前

図7 Alumina Column Chromatogram for Identification



述した方法で抽出して濃硫酸4mlを加え室温1時間放置した後、連続吸収曲線を求めた。結果は図6に示す如く、相当する Steroid 純品と同様 max λ OD は11-deoxy-Cortol 420m μ , β -Cortolone 410m μ および β -Cortol 415m μ に一致した curve が認められ、THF とは全く異なる吸収が認められた。TLC 上の他の spot については、それをかきとり HIO₄-17KS であるかどうかにつき検討を試みたがいずれも negligible ZMC のみしか示さなかった。

次いで10% MeOH-CHCl₃ 分画を NaIO₄ oxidation し 6% water alumina column chromatography における ZMC の溶出態度を検討したところ図7に示すごとく、steroid 純品 Etio., 11-K-Etio., 11-OH-Etio. と全く同様の溶出態度を示した。さらに酸化物を10% Acetone-Chloroform system による20cm上行展開の TLC 分析したものを濃硫酸で呈色せしめたときの色調が Steroid 純品と同様で、Etio. 相当部が黄色、11-K-Etio. 相当部が褐青色、11-OH-Etio. が紫青色を示し、しかもそれら spot の Rf も Etio. 0.400, 11-K-Etio. 0.216, 11-OH-Etio. 0.131 と純品 Steroid とよく一致した。さらに20×55cm薄層, 10°下行法, Solvent system : 15% Acetone-Chloroform 系で5時間30分展開したところそれぞれ Etio. 29cm, 11-K-Etio. 21.8cm, 11-OH-Etio. 19.7cmの移動点に純品 Steroid と一致した spot を認めた。また Column : 1.5% SE-30, Column Temp. 230°C, Carrier gas : N₂30ml/min. 3kg, 内部標準 Cholestane の条件での GLC においても Etio., 11-K-Etio., 11-OH-Etio. の RRT に一致した peak 即ち0.220, 0.270, 0.350の RRT を認めた。ACTH-Z 40単位筋注後の尿抽出物では特に0.350, 0.270の RRT の peak が増大し、SU-4885 test 後の尿抽出物では、RRT 0.220の peak が増大した。GLC における Column を1% XE-60, 1% SE-52, 1% QF-1においてC.T.210°Cでの分析でもそれぞれ Etio.2.90, 0.472, 2.20, 11-K-Etio.6.18, 0.602, 3.82, 11-OH-Etio.8.34, 0.796, 4.10という RRT を示し Steroid 純品のそれに一致した peak が認められた。さらに NaIO₄酸化後の Steroid を Chamberlain¹³⁾の方法に基づき TMSi ether 化を行い deliver を作成し1% XE-60の Column で180—240°C, 1°C/分の昇温 GLC を行ったところやはり純品 Steroid と同様の位置に peak を認めた。以上のことより本法において測定している物質は11-deoxy-Cortol, Cort-

olone, Cortol であることを同定した。

(7) 11-deoxy-Cortol について。

THS を神戸川¹⁰⁾の17KGS 測定法における還元操作のみを NaBH₄で行った後抽出し、CHCl₃:MeOH:H₂O (80:20:1) で15cm上行法による TLC で分析したところ、Rf 0.328, 0.427, 0.480および0.592の spot が認められた。これら area の Silica Gel G. をかきとり、Steroid を抽出したのち NaIO₄酸化を行った。これを20×55cm薄層を用いて Solvent system: 15% (CH₃)₂CO-CHCl₃, 5時間30分の10°傾斜の下行展開を行った。純品の RsDHA 1.07と0.92のそれぞれ、Andr., Etio. に相当する area に spot を認め他にも不明の spot が認められた。これら area の Silica Gel G. をかきとり ZM 発色を行ったが、Andr., Etio. に相当する部のものの ZMCであることを認めた、SU-4885を投与後反応が正常な症例の尿を pool し、それを水解抽出後同様の操作により20cm薄層上から得た Etio. に転換する HIO₄-17KS 部の area からの抽出物を求めた。これに硫酸4ml加え1時間放置後、連続吸収曲線を描いたところ THS の NaBH₄還元物中 Etio に転換した HIO₄-17KS と同様の max λ OD 420m μ を示した。

以上のことから Etio. に転換する HIO₄-17KS は 5-pregnan-3 α , 17 α , 20, 21-tetrol であることが考えられ、我々はこの物質を11-deoxy-Cortol と呼ぶことにした。この物質については未だ報告をみないが、これに近いものとして1938に Steiger and Reichstein¹⁴⁾が Substance K として報告した allopregnan-3 β , 17 β , 20 β , 21-tetrol とは5 α , 5 β の違いからなる異なる物質と考えられた。もしこの Substance K が尿中に排泄されているとすれば、本法による Alumina column では Etio. 分画に同じく溶出され混在していることが考えられるが、未だこの物質の尿中への排泄については報告をみない。

(8) 尿中 Cortol comp. の測定法の比較について

本森¹⁵⁾の尿中 Cortol comp. の簡易測定法にもとずき、尿抽出物を Florisil column chromatography で Cortol comp. 以外の HIO₄-17KS を5%-MeOH-CHCl₃で溶出除去したのちに、25% MeOH-CHCl₃で Cortol comp. 分画を溶出させた。これを次の4つの方法で分画測定を試みて比較検討した。

1) Method 1: Solvent system, CHCl₃:MeOH:H₂O (20:80:1) 20cm上行展開法により T-

LCを行い、その後NaIO₄酸化、Ether抽出後ZMCとして測定する方法。

2) Method II: 25% MeOH-CHCl₃分画を先づNaIO₄酸化し、次いでEther抽出を行う。

- a. Alumina column chromatographyを行って分画する。
- b. Solvent system: 10% Acetone-Chloroform, 20cm上行展開法によるTLC分析後ZMCとして測定する。
- c. TMSi-ether作製後Column: 1% XE-60または1% NGSを用いC.T. 210℃にてGLC分析を行った。

同一婦人混合尿を用いてこれら3つの方法で測定した値は11-deoxy-Cortol, CortoloneおよびCortolの各々の値は, Method Lで571, 992, 700μg/L., Method IIaで332, 985, 708μg/L., IIbで274, 883, 1172μg/L.でありIICではそれぞれ52.2, 32.0, 15.8%の分画比であった。

〔IV〕本法における回収率および平行試験について。

β-Cortolを100μgをとり各stepでの回収率を求めた。これらを理論的に計算したときの全操作での回収率は67.9%であった。一方純水にβ-Cortol 100μgを入れ全操作を行ったときの回収率は表4の如く66.24±2.03%であり前者とよく一致した。さらに、

尿にβ-Cortol 100μg添加したときの回収試験においても68.9%, 64.1%とほぼ一致し、また平行試験としても満足し得る結果であった。

〔V〕測定法の実際について。

以上の結果にもとずき、測定法を組立て図8に示した。

Steroidの1日排泄量の計算に際しては、酸化に

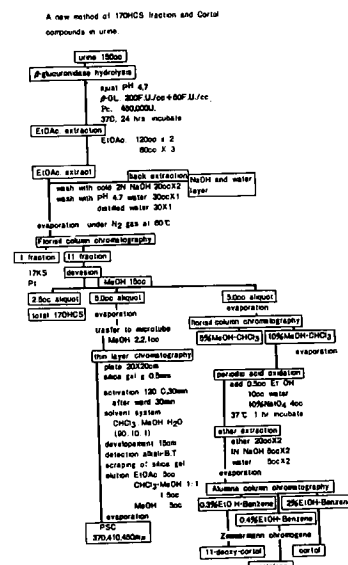


表4. Recovery of β-Cortol by each step and total procedure

	Recovery rate of each step	Calculated recover rate	Experimental recovery rate	
			add μg	Recovery %
β-Cortol	-----	100	100	64.10
β-Glucuronidase hydrolysis	-----	-----	100	61.30
EtOAc extraction 5X	97.4	97.4	100	67.47
Wash with cold 2N NaOH 1X	87.1	83.3	100	62.88
Wash with distilled water 2X	84.1	70.1	100	77.49
Evaporation under N ₂ gas at 60°C	100.0	70.1	100	64.10
Florisil column chromatography	97.7	68.5	50	
Oxidation with NaIO ₄				
Ether extraction 2X	99.2	67.9	50	66.31
Wash with distilled water 2X	99.9	67.9	50	66.30
Alumina column chromatography	100.0	67.9	50	
Recovery rate		67.9		
Recovery from urine added β-Cortol 100μg	No. 1 No. 2	68.88 64.10	Average recovery rate of total procedure 66.24 ± 2.03	

表 5. Mean excretion values of 17OHCS fraction for normal females (proliferative and secretory phase), males in urine.

Subjects	case	THF	THE	THS	comp. F.	comp. E.	comp. S.	sum total	total 17OHCS
normal female	11	486±94	1153±535	256±57	453±97	291±47	192±45	2894±447	3799±540
proliferative	12	457±58	801±189	261±46	596±115	533±265	167±39	3383±444	4979±345
secretory	14	1789±360	2741±568	225±52	1235±285	403±98	130±42	6660±679	6263±721
normal male									

± S. E. μg/day

表 6. Mean excretion values of three cortol compounds for normal females and males in urine

subjects	case	11-deoxy-cortol	cortolone	cortol	sum total
normal females					
proliferative	20	178.8±98.2	1120.6±241.2	734.9±198.1	2034.3±145.8
secretory	20	207.6±58.9	975.2±132.4	462.8±169.6	1645.6±120.3
normal males	20	264.9±49.2	1514.9±227.3	757.5±181.2	2537.3±152.7

± C. L. μg/day

よる分子量補正值と発色度補正值および回収率を乗す必要があり、我々の検討では酸化による分子量補正值と DHA を 1 とする発色度補正值を乗した値は 11-deoxy-Cortol 1.006, Cortolone 0.842, Cortol 1.310 であった。

〔VI〕本法による 17 OHCS 分画および Cortol comp. 分画の正常尿中排泄値について。

正常周期を有する成熟期婦人の卵胞期、黄体期尿および正常男子の排泄値はそれぞれ表 5 および 6 に示した。

4. 考 按

Fukushima¹⁾ は F-4-C¹⁴ を静脈内投与したのちの metabolic transformation を検討した結果 THE, allo THF が neutral Steroid のうち 45~58% を占め、Cortol, Cortolone は 11-keto neutral Steroid の 18~33% を占め 11-oxygenated 17KS への転換は 2~12% に過ぎないと報告し、Cortisol 代謝物としての Cortol comp. の占める比率の大きいことを報告した。一方 Romanoff¹⁶⁾ は 60 例の測定から正常排泄値を THF 1.2±0.07, alloTHF 0.8±0.06, THE 2.0±0.09, β-Cortolone 0.9±0.09mg/day であるとし THF, alloTHF, THE の排泄量と β-Cortolone の排泄量には有意な相関 (γ=0.91) がみられたと報告している。Berliner¹⁷⁾, Zumoff¹⁸⁾ によると Cortol comp. の生成は Δ⁴-3-keto-17O-HCS→Tetrahydro. comp.→Cortol comp. のみでなく Reichstein E., U. または、その epimer からの pass way があると報告している。我々は別

に報告する両者の排泄値比率に異常を認めている症例を経験していることから 17 OHCS の測定とともに Cortol comp. の測定も必要な測定法と考えている。

17 OHCS の分画測定法については Paper chromatography^{19) 4) 20)} が多く用いられ、Fukushima¹⁾ は Celite partition column chromatography を使し、さらに Paper chromatography を使用している。

Paper chromatography に比し、分離能のよい Thin Layer chromatography を E. Stahl²⁰⁾ が開発し、次いで、Adanec²¹⁾ が Solvent system: 5% EtOH-CHCl₃ を用いて、2 時間上行展開したときの R_f が THF 0.43, THE 0.74, Comp. F. 1.00, Comp. E. 1.61, Comp. S. 2.00 で良好な分離を示したことを報告した。

我々は TLC を応用した方法で Solvent system をいろいろ検討した結果 CHCl₃: MeOH: H₂O: (90:10:1) で alloTHF と THF の分離が不十分ではあるが、分画定量し得ることを認めた。しかし TLC までの濃縮、TLC からの定量的抽出法などについては未だいろいろな方法が行なわれているのでこの点についても基礎的な検討を試み、我々の方法を確立し得た。

Cortol comp. 分画測定法については Romanoff¹⁶⁾ は Paper chromatography を 2 回行ったのち Periodic acid oxidation し、17KS として ZMC 測定を行っている。Fukushima¹⁾ は Celite column chromatography について: Paper chromatography を行って測定している。我々は isomer の検討は目

的ではないことから Talbot and Eitingon²²⁾ が示した如く C₁₇-glycerol side chain は過量な NaIO₄ oxidation により 17-keton に酸化されることを応用して, high polar steroid を酸化する以前に分離する困難さを除き, 分離の簡単な 17 ketosteroid に酸化したのちに Alumina column chromatography で分離する方法を考案し, 満足しうる測定法を確立し得た。しかし, Romanoff⁵⁾ によれば HIO₄ oxidation で ZMC となるものとして allopregnan-3 β , 11 β , 17 α , 20 β , 21-pentol, Δ^4 -pregnen-17 α , 20 β , 21-triol-3-one, Δ^4 -pregnen-21, 20 β -diol-3-one があり, さらに Holness²³⁾ は尿中に Δ^4 -pregnen-11 β , 17 β , 20, 21-tetrol-3one, Δ^4 -pregnen-17 β , 20, 21-triol-3, 11-dione の排泄を認めたと報告している。これら Steroid の Florisil column chromatography での溶出順位を検討していないが, 5 β -pregnan-3 α , 11 β , 17 α , 20 α -tetrol の予試験で十分に 11-deoxy-Cortol と分離しているのでまづ Cortol comp. 分画には, これら Steroid は混在していないものと考えられる。

11-deoxy-Cortol については未だ報告をみないが不満足ながら一応の同定をなし得たものと信じている。

正常婦人ならびに男子での本法による正常尿中排泄値は Romanoff, Cost らの報告に比し, THS, Comp. F., Comp. E. がやゝ高値であるが, 一応同

様の傾向を示し, Cortol comp. では 11-deoxy-Cortol, Cortolone, Cortol の多くの症例での排泄値の報告をみない。Sum total 値での 17 OHCS: Cortol Comp. 比は卵胞期婦人で 1:0.70, 黄体期婦人で 1:0.48, 正常男子で 1:0.38 であり, Fukushima¹⁾ の平均 1:0.70 と比し, 黄体期婦人さらに正常男子において Cortol comp. 比が減少している。

5. 結 語

副腎皮質機能を尿中に排泄される Steroid の測定で行う場合, Cortisol metabolite でありながら従来の Porter-Silber Chromogen としての 17-OHCS 測定法では測定し得ない C₁₇-glycerol side chain C₂₁-Steroid の測定法につき検討し, 同時に同一抽出物から TLC を応用した新しい 17 OHCS 分画測定法を確立することが出来た。

測定法の検討中未だ報告を見出し得ない 11-deoxy-Cortol の尿中排泄を認め, 同時に測定し得る方法を確立した。

本法を応用した日本人正常婦人卵胞期, 黄体期ならびに正常男子の 17 OHCS 分画値および Cortol comp. 分画値を測定し報告した。

(稿を終るに当たり御指導御校閲を賜った恩師橋本清教授に深く感謝致します。また終始御指導を戴いた(故)吉田俊彦講師に深謝致します。)

6. 文

- 1) Fukushima, D. K., H. L. Bradlow, L. Hellman, B. Zunoff and T. F. Gallagher, J. Biol. Chem.: **235**; 2246, (1960)
- 2) Romanoff E. M., H. B. Ulaschenko and F. C. Dohan, J. Clin. Endocrinol. and Metab.: **18**; 1399, (1958)
- 3) 吉田俊彦, 武田佳彦, 新宅俊昭, 団上昭夫: 日産婦誌: **14**; 351 (1962)
- 4) L. P. Romanoff, R. M. Rodriguez, J. M. Seelye and G. Pincus, J. Clin. Endocrinol. and Metab.: **17**; 777, (1957)
- 5) E. B. Romanoff and C. A. Hunt; Acta Endocrinol.: **57**, 499, (1955)
- 6) 本森良治: 岡山医学会雑誌: **84**巻 11 ~ 12号 (1972)
- 7) I. E. Bush, Paper Chromatography: **50**;

献

- 370, (1952)
- 8) Silber R. H. and Porter C. C.: J. Biol. Chem.: **210**; 923, (1954)
- 9) 神戸川明: ホと臨: **11**; 77, (1963)
- 10) 神戸川明: ホと臨: **11**; 21, (1963)
- 11) 神戸川明: 昭和医学誌: **20**; 1, (1960)
- 12) E. Epstein and B. Zak: J. Endocrinol. and Metab.: **23**; 357, (1963)
- 13) Chamberlain J., B. A. Knight, a, G. H. Thomas: J. Endocrinol.: **26**, 367, (1963)
- 14) Steiger M., and Reichstein T., : Helv. Chim. Acta: **21**, 546, (1938)
- 15) 本森良治: 日内分泌: **42**: 653, (1966)
- 16) L. P. Romanoff, C. Parent, R. M. Bodriquer and G. Pincus: J. Clin. Endocrinol. and Metab.: **19**; 819, (1959)

- | | |
|--|---|
| 17) Berliner D. L. and T. F. Dougherty : Pharmacol. Rev.; 13 ; 329, (1961)
18) Zumoff B., H. L. Bradlow, T. F. Gallagher and L. Hellman : J. Clin. Endocrinol. and Metab.; 28 ; 1330-(1968),
19) I. E. Bush and M. Walloughby; Biochem.; 67 ; 689, (1957) | 20) E. Stahl : Chemiker-Ztg.; 82 ; 323, (1958)
21) Adanec, J. Matis and M. Galvanek : Lancet; 13 ; 81, (1962)
22) N. B. Talbot and I. V. Eitingon : J. Biol. Chem.; 154 ; 605, (1944)
23) Holness N. J., J. B. Lunnnon and C. H. Gray : J. Endocrinol.; 14 ; 138, (1956) |
|--|---|

Study on a new method for the determination of
17 OHCS fractions (Comp. F., E., S., and THS, THE, THF,)
and Cortol compounds (Cortol, Cortolone, 11-deoxy-Cortol)
in urine, and their urinary excretion values in normal subjects.

Yoshiharu Motomori

Department of Obstetrics and Gynecology, Okayama University, medical
 School, Okayama, Japan. (Professor and Chairman, Kiyoshi Hashimoto, M. D.)

Cortol compounds have been not determined as 17 OHCS or Porter-Silber chromogen, although they form one of the main groups of urinary metabolites of glucocorticoids.

In this study, a new method for fractional determination of these three cortol compounds, and 17 OHCS in urine was established. The new method consisted of the following procedure.

(1) Hydrolysis with β -glucuronidase. (2) Extraction with ethyl acetate. (3) Separation of 1 fraction (17 KS and pregnandiol) and 11 fraction (17 OHCS, pregnantriol and cortol compounds) by first florisil column chromatography. (4a) Separation of 17 OHCS fraction by thin layer chromatography (solvent system : chloroform : methanol : water). (5a) Colorimetry as Porter-Silber chromogen. (5b) Separation of cortol compounds from other HIO₄-17 KS steroids by second florisil column chromatography. (6b) Oxidation with periodic acid. (7a) Fractionation of three converted steroids by 6 % water alumina column chromatography. (7b) Colorimetry as Zimmermann chromogen.

This procedures was cosisted from its fundamental experiments.

Total recovery rate of β -cortol 100 μ g was average $66.2 \pm 2.0\%$.

Identification of cortol compounds measured by this method was carried out on the Rf. values by TLC, RRT values by GLC, RRT values of TMSi-ether deliverts by GLC.

5 β -pregnan-3 α , 17 α , 20, 21-tetrol named "11-deoxy-Cortol" was messured for excretion values in urine. Normal mean excretion values were as follow.

Normal females (proliferative phase) THF 486 ± 94 , THE 1153 ± 535 , THS 256 ± 57 , (secretory phase) THF 457 ± 58 , THE 801 ± 189 , THS 261 ± 46 , normal males : THF 1789 ± 360 , THE 2741 ± 568 , THS 225 ± 52 , ug/day.

Normal females (proliferative phase) : Cortol 734.9 ± 198.1 , Cortolone 1120.6 ± 241.2 , 11-deoxy-Cortol 178.8 ± 98.2 , (secretory phase) : Cortol 462.8 ± 169.6 , Cortolone 975.2 ± 132.4 , 11-deoxy-Cortol 207.6 ± 58.9 , normal males : Cortol 757.5 ± 181.2 , Cortolone 1514.9 ± 227.3 , 11-deoxy-Cortol 264.9 ± 49.2 ug/day.