

甾体激素的比色分析

I. $\Delta^{1,4}$ -3-酮基及 Δ^4 -3-酮基甾体激素与异烟肼的比色测定

李金妹 朱貴珍 彭司勳

(江苏省卫生厅药品检验所,南京)(南京药学院)

提要 本文对 $\Delta^{1,4}$ -3-酮基激素(去氫皮質醇, 去氫可的松)与异烟肼的反应条件进行了試驗,生成脲的最大吸收峯在 400 毫微米波长,符合 Beer 定律。运用于片剂的测定与对照法比較,結果一致,但本法較簡便,省时。对 Δ^4 -3-酮基的六种激素在 Umberger 方法基础上,設計了用比色計测定的方法,运用于各种制剂的测定,与对照法比較,結果一致。

甾体激素在医疗上的应用,日益广泛,常用的性激素有黄体酮、甲基睾丸素、丙酸睾丸素。肾上腺皮质激素有可的松、氫化可的松、去氫可的松(prednisone)、去氫皮質醇(prednisolone)及去氧皮質酮等。这些激素及其在制剂和体液中的测定方法很多,归納有:(1)分光光度法,利用含有 Δ^4 -3-酮基結構于 238—242 毫微米波长,测其吸光,或与有机碱共热后,于 373—375 毫微米波长,测其吸光^[1]。(2)比色法,文献最多,利用肾上腺皮质激素 C_{20} — C_{21} 醇酮基(ketol)的还原作用比色,有 Fehling 法^[2]、磷鉍酸法^[3]和四氮唑(tetrazolinum)法^[4];以及此类激素的酯类轉变为羟肟酸(hydroxamic acid)与高铁离子絡合的比色法^[5];利用羰基反应的有 2, 4-二硝基苯肼法^[6], 苯肼法^[7], 水楊酰肼法^[8];其他比色法还很多,主要有硫酸-冰乙酸法^[9], 联苯胺法^[10], 2, 6-二叔丁基对甲酚法^[11], 間二硝基苯法^[12]等。(3)重量法,有 2, 4-二硝基苯肼法^[13]及縮氨脲法^[14]。(4)施光法^[15]。

重量法較費時間,有些比色法試劑不易得到或專屬性不高,旋光法准确度較差,紫外吸光法虽較准确簡便,但限于仪器,目前难于普遍应用。我們认为寻找适合一般条件,并能用于多数激素的测定方法,甚为必要。

Umberger^[16]以异烟肼作試剂,利用在弱酸性溶液中与 Δ^4 -3-酮基甾体激素生成醇溶性的浅黄色异烟脲,在 380 毫微米波长,用分光光度計测定丙酸睾丸素、黄体酮及其油溶液,并指出可应用于甲基睾丸素、可的松、氫化可的松及去氧皮質酮等激素的测定。对于反应条件作了詳細的討論。上海市药品检验所技术交流資料及上海市卫生局药品标准暫行規定^[17],曾用于测定黄体酮及睾丸素的各种制剂,此法虽很簡便,但需用分光光度計,同时对 $\Delta^{1,4}$ -3-酮基激素未曾試驗。为了使此法应用于其他激素的测定,經实验証明, $\Delta^{1,4}$ -3-酮基激素(去氫可的松,去氫皮質醇)也能与异烟肼反应,我們对反应条件进行了系統的試驗,并設計了用比色計测定的方法,运用于二者片剂的分析,与对照法比較結果一致,但此法較为簡便,省时。

其次我們改变了 Umberger 法的酸度和試剂浓度,并对上述 Δ^4 -3-酮基六种激素及其

制剂,用光电比色計进行了測定,与对照法比較,不仅結果一致,并較簡便。

实 驗 部 分

(一) 仪器与试剂

Jobin & Yvon 分光光度計。沪江 71 型高級光电比色計。

甲醇：化学純,經重蒸餾,收集 64—66°C 餾液。

异烟肼：熔点 172—173°C。浓盐酸：分析純 (12N)。乙醇：分析純。

异烟肼試剂：称取异烟肼 750 毫克,溶于甲醇中,准确加入浓盐酸 1 毫升,以甲醇稀釋至 1000 毫升,配制成 0.75 克/升的溶液。

去氫皮質醇 (荷兰 Organon 厂出品)、去氫可的松 (法国 Uclaf 厂出品)、乙酸可的松 (荷兰 Organon 厂出品)、氫化可的松 (法国 Uclaf 厂出品)、乙酸去氧皮質酮 (华联葯厂出品)、甲基拳丸素、丙酸拳丸素、黄体酮：經測定均符合英国葯典 (1958 年) 紫外吸光值。

去氫皮質醇标准溶液：精密称取經五氧化二磷真空干燥至恆量的去氫皮質醇 20 毫克,置 100 毫升容量瓶中,加乙醇使溶解,并稀釋至刻度,配制成 200 微克/毫升的标准溶液。

去氫可的松、丙酸拳丸素、甲基拳丸素、黄体酮、乙酸去氧皮質酮、乙酸可的松、氫化可的松标准溶液：方法同去氫皮質醇,均配制成 200 微克/毫升的标准溶液。

(二) 去氫皮質醇及去氫可的松片剂的測定

1. 比色条件的研究：

(1) 吸收光谱：分別測取去氫皮質醇及去氫可的松标准溶液适量,于干燥棕色磨口三角瓶中,置水浴上蒸干。加入异烟肼試剂 20 毫升,附磨口冷凝器,于沸水浴上加热回流

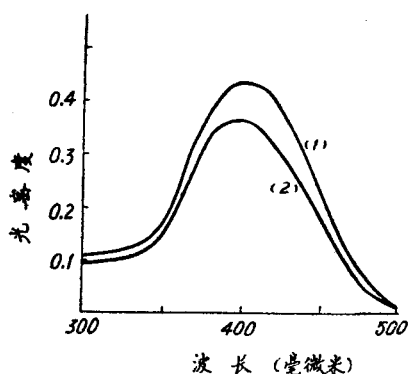


图 1

(1) 去氫皮質醇吸收光谱曲线；

(2) 去氫可的松吸收光谱曲线。

1.5 小时。冷却,以甲醇轉移至 25 毫升容量瓶中,并稀釋至刻度,用分光光度計在 300—500 毫微米波长間,以同样处理的試剂为空白,測定光密度,得曲线如图 1。二者均在 400—402 毫微米显最大吸收,以选择青紫色滤光板为宜。

(2) 反应时间和温度：去氫皮質醇和去氫可的松在室温与异烟肼縮合速率很慢,需在沸水浴上加热回流,促使反应完全。同 (1) 法操作,分別于沸水浴上加热回流不同时间,測定結果見表 1,表明去氫皮質醇在加热回流 1.5 小时,去氫可的松在加热回流 1 小时,光密度讀数恆定,反应完全。

(3) 反应酸度：同 (1) 法操作,但加入含不同量盐酸的异烟肼試剂 (异烟肼量保持 0.5 克/升),測定結果見表 2,表明以盐酸 (12N) 浓度 0.94 毫升/升时,吸光最大,为了操作方便起見,我們采用盐酸浓度为 1 毫升/升。

(4) 試剂浓度：同 (1) 法操作,但加入含不同量异烟肼的試剂 (盐酸浓度保持 1 毫升/升),測定結果見表 3。表明异烟肼浓度以 0.75 克/升时吸光最大。

表 1 回流時間对呈色的影响

回流時間 (分鐘)	光 密 度 讀 數	
	去氫皮質醇	去氫可的松
30	0.244	0.276
60	0.284	0.297
90	0.319	0.297
120	0.319	0.297
150	0.319	—

表 2 盐酸浓度对呈色的影响

盐 酸 量 (毫升/升)	光 密 度 讀 數	
	去氫皮質醇	去氫可的松
0.62	0.319	0.288
0.94	0.351	0.334
1.25	0.328	0.327
1.56	0.314	0.312
1.88	0.297	0.293

表 3 异烟肼浓度对呈色的影响

异烟肼量 (毫克/毫升)	光 密 度 讀 數	
	去氫皮質醇	去氫可的松
0.50	0.347	0.337
0.75	0.377	0.365
1.00	0.367	0.363
1.25	0.357	0.354
1.50	0.347	0.336

(5) 比色分析曲綫：

去氫皮質醇：精密測取去氫皮質醇标准溶液 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 毫升，置干燥棕色磨口三角瓶中，于水浴上蒸干，各准确加入异烟肼試剂 20 毫升，附磨口冷凝器，于沸水浴上加热回流 1.5 小时。冷却，以甲醇轉移至 25 毫升容量瓶中，并稀释至刻度，以同样处理的試剂为空白，用分光光度計 400 毫微米，1 厘米比色池，同时用光电比色計 420 毫微米濾光板，1 厘米比色池，測定光密度，結果見图 2。表明浓度在 0—16 微克/毫升符合 Beer 定律。

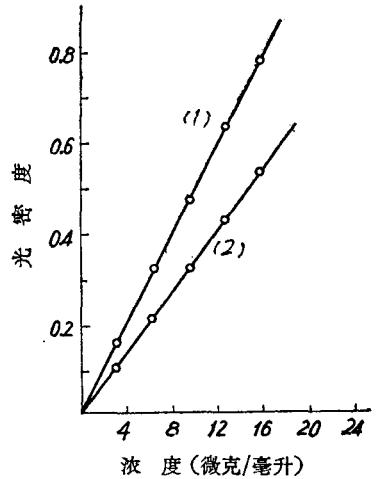


图 2 去氫皮質醇比色分析曲綫

- (1) 分光光度計 400 毫微米波長測定結果。
- (2) 比色計 420 毫微米濾光板測定結果。

計 400 毫微米，1 厘米比色池，同时用光电比色計 420 毫微米濾光板，1 厘米比色池，測定光密度，結果見图 2。表明浓度在 0—16 微克/毫升符合 Beer 定律。

表 4 制剂的測定結果

品 名	規 格	用本法測定結果		用分光光度法測定結果 (英国药典 1958 年版)		用四氮唑法測定結果 (美国药典 16 版)	
		測得每片含量 (毫克)	相当标示量 (%)	測得每片含量 (毫克)	相当标示量 (%)	測得每片含量 (毫克)	相当标示量 (%)
乙酸去氫 皮質醇片	5 毫克/片	3.863	77.26	3.839	76.78	3.874	77.48
		3.863	77.26	3.830	76.60	3.862	77.24
		3.853	77.06				
		平均: 3.860 ± 0.007	77.20 ± 0.14	3.835	76.69	3.868	77.36
乙酸去氫 可的松片	5 毫克/片	4.765	95.30	4.766	95.32	4.779	95.58
		4.765	95.30	4.760	95.20	4.753	95.06
		4.780	95.60				
		平均: 4.770 ± 0.01	95.40 ± 0.2	4.763	95.26	4.766	95.32

去氫可的松：按去氫皮質醇項下方法操作，測定結果濃度在 0—16 微克/毫升符合 Beer 定律。

2. 方法应用与結果:

(1) 乙酸去氫皮質醇片：供試溶液的制备。取本品 20 片，精密秤定，研細，精密称出适量(約与去氫皮質醇 10 毫克相当)于干燥具塞三角瓶中，精密測加乙醇 50 毫升，密塞，振搖 20 分鐘，用干燥滤紙过滤，弃去初滤液即得。

精密測取去氫皮質醇标准溶液与供試溶液各 1 毫升，按去氫皮質醇比色曲綫項下，自“……置干燥磨口三角瓶中……”起，同样操作，用光电比色計測定光密度。

(2) 乙酸去氫可的松片：按乙酸去氫皮質醇項下方法同样操作。

本法与对照法測定結果如表 4，表明結果一致。

(三) 甲基睾丸素片和丙酸睾丸素、黄体酮、乙酸去氫皮質酮、乙酸可的松及氫化可的松注射液の測定

1. 比色条件的研究:

(1) 反应酸度与試剂浓度：用 Umberger 方法，以丙酸睾丸素为例，重新試驗反应酸

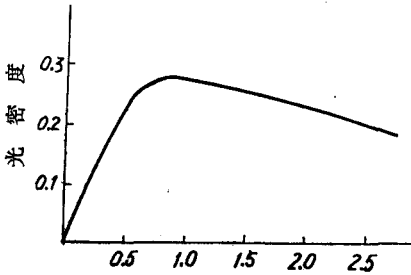


图 3 盐酸浓度对呈色的影响

丙酸睾丸素 10 微克/毫升，380 毫微米測定

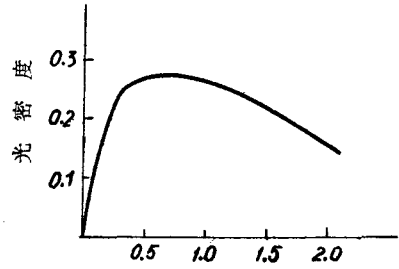


图 4 試剂浓度对呈色的影响

丙酸睾丸素 10 微克/毫升，380 毫微米測定

度及試剂浓度，結果见图 3、图 4，表明盐酸(12N)浓度在 1 毫升/升，异烟肼浓度在 0.75 克/升时，吸光最大。

(2) 比色分析曲綫:

① 用分光光度計測定：精密測取丙酸睾丸素标准溶液 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6 毫升于干燥具塞三角瓶中，置水浴上蒸干，各准确加入异烟肼試剂 10 毫升，密塞，緩緩振搖使溶解。于室温放置 1 小时。用分光光度計 430 毫微米，1 厘米比色池，以試剂为空白，測定光密度，結果见图 5。表明浓度在 0—72 微克/毫升符合 Beer 定律。其他五种 Δ^4-3- 酮基甾体激素經实验結果类似。

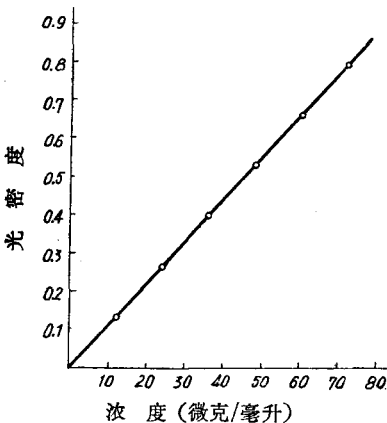


图 5 丙酸睾丸素比色分析曲綫
530 毫微米測定

② 用光电比色計測定：按①項方法同样操作，唯取样有所不同，用光电比色計 420 毫微米滤光板，1 厘米比色池，測定結果，丙酸睾丸素在 0—24 微

表 5 制剂的测定结果

品 名	规 格	用本法测定结果		用对照法测定结果*	
		测得含量 (毫克)	相当标示量 (%)	测得含量 (毫克)	相当标示量 (%)
甲 基 孕 丸 素 片	5 毫克/片	4.930	98.60	4.963	99.26
		4.930	98.60	4.954	99.08
		4.919	98.38	4.969	99.38
		平均: 4.926±0.007	98.53±0.15	4.962	99.24
氢化可的松注射液 (醇溶液)	5 毫克/毫升	4.971	99.42	① 4.963	99.26
		4.989	99.77	4.963	99.26
		4.989	99.77		
		平均: 4.983±0.012	99.65±0.23	4.963	99.26
				② 4.964 4.936	99.28 98.72
可 的 松 注 射 液 (混悬液)	25 毫克/毫升	19.01	76.01	① 18.75	75.00
		18.94	75.78	18.70	74.80
		18.82	75.28	18.80	75.20
		平均: 18.93±0.11	75.70±0.42	18.75	75.00
				② 19.01 19.06 18.89	76.05 76.25 75.67
黄 体 酮 注 射 液 (油溶液)	20 毫克/毫升	18.61	93.03	18.66	93.30
		18.55	92.75	18.66	93.30
		18.68	93.40	18.68	93.40
		平均: 18.61±0.07	93.06±0.36	18.67	93.33
丙 酸 孕 丸 素 注 射 液 (油溶液)	25 毫克/毫升	23.85	95.41	—	—
		23.94	95.74		
		24.05	96.18		
		平均: 23.95±0.1	95.78±0.40		
乙 酸 去 氧 皮 质 酮 注 射 液 (油溶液)	10 毫克/毫升	9.940	99.40	—	—
		9.940	99.40		
		9.936	99.36		
		平均: 9.939±0.003	99.39±0.03		

* 甲基孕丸素片为分光光度法(英国药典 1958 年);

黄体酮注射液为 2,4-二硝基苯肼重量法(英国药典 1958 年);

可的松注射液: ①为分光光度法(英国药典 1958 年), ②为四氮唑法(美国药典 16 版);

氢化可的松注射液: ① 为分光光度法(英国药典 1958 年), ②为四氮唑法(美国药典 16 版)。

克/毫升符合 Beer 定律。其他五种 Δ^4 -3-酮基甾体激素經实验結果类似。

2. 方法应用与結果: 甲基睾丸素片, 氫化可的松注射液(醇溶液), 乙酸可的松注射液(混悬液)及黄体酮等注射液(油溶液), 用乙醇溶解配制成相当于 200 微克/毫升的供試溶液后, 按丙酸睾丸素比色分析曲綫項下自“……于干燥具塞三角瓶中……”起, 同样操作, 用光电比色計 420 毫微米滤光板, 測定光密度。

本法測定結果与对照法測定結果見表 5, 表明結果一致。

討 論 与 結 論

1. Δ^4 -3-酮基与 $\Delta^{1,4}$ -3-酮基激素与异烟肼的縮合为可逆反应, 水分可促使水解, 故仪器与試剂应尽量避免水分。

2. 去氫皮質醇和去氫可的松遇光易分解, 需在无直射光处或用棕色瓶回流为宜。

3. Δ^4 -3-酮基甾体激素的异烟肼最大吸收峯在 380 毫微米, 我們选用 420 毫微米滤光板时, 因受滤光板滤过光純度的影响, 測定浓度范围較低, 如能选用与最大吸收峯波长更接近的滤光板, 根据用分光光度計 430 毫微米測定結果, 可以增大測定浓度范围。

4. 拟定了用异烟肼为試剂比色測定 $\Delta^{1,4}$ -3-酮基及 Δ^4 -3-酮基八种激素的方法。結果与对照法一致, 但本法較簡便。

致謝 承上海市藥品檢驗所和华联制葯厂贈与各激素原料, 特此致謝。

参 考 文 献

- [1] Gross, J. M., et al.: Absorption Characteristics of Cortisone Acetate and Other Ketosteroids in Alkali, *Anal. Chem.*, 1952, **24**, 1049.
- [2] Talbot, N. B., et al.: The Colorimetric Assay of Urinary Corticosteroid-like Substances, *J. Bio. Chem.*, 1945, **160**, 535.
- [3] Heard, R. D. H. and Sobel, H.: A Colorimetric Method for the Estimation of Reducing Steroids, *J. Bio. Chem.*, 1946, **165**, 687.
- [4] Mader, W. J. and Buck, R. R.: Colorimetric Determination of Cortisone and Related Ketol Steroids, *Anal. Chem.*, 1952, **24**, 666.
- [5] Forist, A. A. and Theal, S.: Spectrophotometric Determination of Steroid Esters, *J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.)*, 1958, **47**, 520.
- [6] Gornall, A. G. and Macdonald, M. P.: Quantitative Determination of the Steroid Hormones with 2,4-Dinitrophenylhydrazine, *J. Bio. Chem.*, 1953, **201**, 279.
- [7] Porter, C. C. and Silber, R. H.: A Quantitative Color Reaction for Cortisone and Related 17,21-Dihydroxy-20-Ketosteroids, *J. Bio. Chem.*, 1950, **185**, 201.
- [8] Camber: *Oxosteroids, The Use of Phenolic Hydrazides for Detection, Characterization and Estimation* (London: H. K. Lewis & Co. Ltd., 1960).
- [9] Szalkowski, C. R., et al.: Determination of Hydrocortisone, *Anal. Chem.*, 1955, **27**, 944.
- [10] Clarke, I.: A Colorimetric Reaction for the Estimation of Cortisone, Hydrocortisone, Aldosterone and Related Steroids, *Nature*, 1955, **175**, 123.
- [11] Schulz, E. P. and Neuss, J. D.: Colorimetric Assay for Cortisone, Hydrocortisone, and Related Steroids, *Anal. Chem.*, 1957, **29**, 1662.
Ansari, S. and Khan, R. A.: A Note on the Colorimetric Assay of Cortisone and Hydrocortisone, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1960, **12**, 122.
- [12] Callow, N. H., et al.: Colorimetric of Determination of Substances Containing the Grouping- $\text{CH}_2\text{-CO-}$ in Urine Extracts as An Indication of Androgen Content, *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1312;
Broadbent, I. E. and Klyne, W.: The Specificity of the Dinitrobenzene Reaction for Ketosteroids,

- Biochem. J.*, 1954, **56**, XXX.
- [13] Klein, D., et al.: Identification of Crystalline Progesterone by Means of 2,4-Dinitrophenylhydrazine, *Anal. Chem.*, 1948, **20**, 174; Cohen, H. and Bates, R. W.: A Simple Quantitative Method for the Determination of Progesterone in Oil Solution, *J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed.)*, 1951, **40**, 35.
- [14] Madigan, J. J., et al.: Determination of Testosterone Propionate in Vegetable-Oil Solution, *Anal. Chem.*, 1951, **23**, 1691.
- [15] 苏联药典(第9版), 美国药典(第15版).
- [16] Umberger, E. J.: Isonicotinic Acid Hydrazide as a Reagent for Determination of Δ^4 -3-Ketosteroids, Determination of Progesterone Propionate in Oil Solutions, *Anal. Chem.*, 1955, **27**, 768.
- [17] 上海市卫生局药品标准暂行规定; 上海市药品检验所技术交流资料, 1960, 3.

COLORIMETRIC DETERMINATION OF $\Delta^{1,4}$ -3-KETOSTEROID AND Δ^4 -3-KETOSTEROID HORMONES AND THEIR PREPARATIONS BY MEANS OF ISONICOTINIC ACID HYDRAZIDE

LEE KING-MAI, JU KUA-CHING

(Kiangsu Provincial Drug Control Bureau, Nanking)

PENG SZU-HSUN

(Nanking College of Pharmacy)

ABSTRACT

Isonicotinic acid hydrazide as a reagent for the spectrophotometric determination of Δ^4 -3-ketosteroid hormones based on the formation of their hydrazones in acid-alcohol solution has been reported by Umberger. The method was applied to the analysis of vegetable oil solution of testosterone propionate and progesterone. It was pointed out to be suitable for the estimation of other Δ^4 -3-ketosteroids, such as methyl-testosterone, cortisone, hydrocortisone, and desoxycorticosterone.

However, no mention of further application to the $\Delta^{1,4}$ -3-ketosteroid hormones was made. We found that prednisone and prednisolone can also react with isonicotinic acid hydrazide to give yellow solutions having an absorption maximum at 400—402 m μ . The conditions for the colorimetric determination of these two hormones were studied and the method was applied to the analysis of their tablets.

Furthermore, by varying the concentration of hydrochloric acid and isonicotinic acid hydrazide of Umberger's procedure, the above mentioned Δ^4 -3-ketosteroid hormones and their preparations can be determined colorimetrically.

The results obtained by the proposed method both for six Δ^4 -3-ketosteroid and two $\Delta^{1,4}$ -3-ketosteroid hormones were found in close agreement with those of the official methods in U.S.P. XVI and B.P. 1958.

As a result of this study, a simple and accurate method has been proposed for the colorimetric determination of eight steroid hormones and most of their preparations by using the same reagent.