

## 5 $\alpha$ -二氢可的松乙酸酯的紙层与比色測定\*

方洪鉅 周同惠

(中国医学科学院藥物研究所)

5 $\alpha$ -二氢可的松乙酸酯(別娠烷-17  $\alpha$ , 21-二醇-3, 11, 20-三酮-21-乙酸酯, 以下簡稱三酮物)的分析方法在文献中尚未見报告。因此根据  $\alpha$ -酮醇类化合物能还原四氮茂盐类产生顏色的性質<sup>[1]</sup>, 用紙层分离后洗脫, 再用氯化三苯基四氮茂比色的測定方法。

### 实 驗 部 分

**仪器藥品:** 純品与样品 均系本所合成室供給, 純品系自粗品多次結晶而得。

**Tollen 試剂(紙层显色剂):** 于 10 毫升 0.1N 硝酸銀溶液內, 加入浓氫氧化鉍十滴, 攪勻使产生的沉淀溶解, 再加入 5 毫升 10% 氫氧化鈉溶液, 混勻(如产生棕褐色沉淀, 可再滴加浓氫氧化鉍, 至全部溶解为止)。

**1% 四甲基氫氧化鉍乙醇溶液:** 10 毫升 10% 此試剂的水溶液, 加 95% 乙醇\*\*至 100 毫升。

**氯化三苯基四氮茂溶液 (TPTC):** 500 毫克固体試剂溶于 100 毫升 95% 乙醇\*\*。

其他所用溶剂与試剂均为“純”以上規格。

島津 QC 型分光光度計。

**紙层分离:** 根据这化合物的制备过程, 估計样品中可能含的主要杂质是三醇甾体化合物, 紙层析試驗就按此进行。結果証明这假定是对的。显色剂共試驗对羟基苯甲醛<sup>[2]</sup>、間二硝基苯<sup>[3]</sup>、氯化三苯基四氮茂<sup>[4]</sup>、Tollen 試剂<sup>[4]</sup>等。結果以最后一种較好, 样品与杂质均能显出斑点, 一般有 5 微克即可检出。显色时先将紙浸入試剂湿潤, 立即取出, 俟出現褐色斑点后, 再浸入 5% 硫代硫酸鈉溶液, 用水冲洗, 即得紙层析譜, 斑点顏色稳定。

肯定显色剂后即进行展开剂的寻找, 曾使用一些体系, 如石油醚-氯仿-乙酸、石油醚-氯仿-乙酸-苯等<sup>[5]</sup>, 但均分不开, 后又改用甲酰胺-甲醇(6:4)与丙二醇-甲醇(6:4)处理紙<sup>[6]</sup>, 分別用氯仿、苯、甲苯、苯-环己烷、甲苯-氯仿、苯-氯仿-环己烷等为流动相, 結果发现苯、甲苯-氯仿、苯-环己烷-氯仿等均得到較好分离。二种固定相都可应用, 但甲酰胺混合液似較丙二醇好些。因此在以后的实验中均采用甲酰胺-甲醇为固定相, 苯-环己烷-氯仿为流动相。展开后三酮物移动較远, 杂质則移动較少, 得到分离。

对层析用紙也曾进行試驗, 找出 Whatman 1 号, 4 号与国产白雪牌\*\*\* 1 号滤紙分离情况相同, 均可应用。

\* 一九六二年五月二十三日收到。

\*\* 乙醇质量对显色有影响, 曾在同样条件下用不同批号或不同厂家的乙醇(均为二級), 但結果有的就不一致, 可能含某些杂质影响显色反应, 所以应注意乙醇质量, 以便获得重現結果。

\*\*\* 撫順东捷造紙厂出品。

**洗脫：** 因为最后要用比色法測定，所以要将样品自紙上洗脫。将层析后的紙裁下一条，显色定出位置后，再将未显色的相应部分裁下。曾試用乙醇浸泡，但結果不穩，改为將紙用氯仿在密閉容器內洗脫，則較好。

**比色測定：** 比色方法参照文献中測定可的松与其他  $\alpha$ -酮醇类化合物的方法<sup>[1]</sup>。于样品的乙醇溶液內，加入四甲基氫氧化銨溶液与 TPTC 試剂后即显顏色。測定此溶液的吸收曲綫，找出吸收峯在 480 毫微米，与文献上报导其他結構相似的化合物的最大吸收波长一致<sup>[1]</sup>。以在加入 TPTC 試剂后十五至二十分鐘範圍內測定光密度最为适宜。

**拟定方法：** 根据以上結果，拟出样品分析方法如下：

配制样品的氯仿溶液，使約含 3 毫克/毫升。取滤紙裁成 38×13 厘米，距一端 8 厘米处用铅笔等距作三点，即将紙通过甲酰胺-甲醇(6:4)混合液，使刚湿润，取出，将紙夹在二张干滤紙中，以玻棒均匀滚压以吸去多余的固定相，然后用微量吸管吸取样品，在紙上共点二点(每点約 30—100 微克)，另一点留作空白。将紙放入层析筒中，以苯-氯仿-环己烷(1:1:1)为流动相，在室温(15℃左右)下行层析。层析時間不得少于五小时。取出后在空气中放置約一小时，剪下一条，在 100° 烘箱內除去甲酰胺，干后浸入 Tollen 試剂，立即取出，俟产生棕褐色斑点后即浸入 5% 硫代硫酸鈉溶液，取出用水冲洗，烤干。按三酮物显色位置剪下未显色的相应部分，在层析筒中洗脫过夜，以小烧杯收集洗脫液，共約 4 毫升。取出，吹去氯仿，殘渣以 95% 乙醇\* 5 毫升溶解，加入 0.5 毫升四甲基氫氧化銨溶液与 0.5 毫升 TPTC 試剂，混匀。十五至二十分鐘內在 480 毫微米測量光密度值，以未点样品的那一条紙經同样处理为空白。由标准曲綫求出含量。

**純品結果与标准曲綫：** 用純品分別在 Whatman 1 号与白雪牌 1 号紙上按拟定方法进行試驗，以結果繪制标准曲綫，結果如下。

光密度 紙	28.6	57.2	85.8
Whatman 1 号	0.130±0.004	0.253±0.010	0.404±0.018
白雪牌 1 号	0.133±0.006	0.251±0.008	0.400±0.024

[注] 以上結果为三次至五次的平均值。

**样品分析：** 曾分析一样品，用 Whatman 1 号結果为 74.7%，用白雪牌 1 号紙結果为 74.8%，二者相符。

## 討 論

1. 在本法中用白雪牌 1 号与 Whatman 1 号的結果相符。但在洗脫时，白雪牌 1 号所需的氯仿量多些，否則洗脫不完全(文內給出的量則已足够)。此外在显色时，国产紙的背景較深，不如 Whatman 1 号洁白清晰。在試驗过程也发现白雪牌 1 号的性能不穩，移动距离有时随紙的不同而有所变化。但用于本法的定性与定量工作仍属可行。

\* 見上頁脚注 \*\*。

2. 样品用量以 30—100 微克为宜, 过多则分离效果不好, 过少则误差较大。
3. 如果样品的氯仿溶液放置过久, 则纸层析时产生拖尾现象, 影响分离, 因此最好在使用前配制。
4. TPTC 试剂应避光保存<sup>[4]</sup>, 我们将试剂保存于棕色瓶中, 发现甚至放置一个月后仍可照常应用, 光密度并无改变。

### 参 考 文 献

- [1] W. J. Mader and R. R. Buck, *Anal. Chem.* **24**, 666 (1952).
- [2] R. K. Callow *et al.*, *J. Chem. Soc.* 1966 (1955).
- [3] T. H. Kritchevsky and A. Tiselius, *Science* **114**, 299 (1951).
- [4] R. B. Burton, A. Zaffaroni and E. H. Keutmann, *J. Biol. Chem.* **188**, 763 (1951).
- [5] S. G. Brooks *et al.*, *J. Chem. Soc.* 1175 (1957).
- [6] A. Zaffaroni, in "*Recent Progress in Hormone Research*", edited by G. Pincus, Vol. VIII, p. 51, Academic Press, New York, 1953.

## DETERMINATION OF 5 $\alpha$ -DIHYDROCORTISONE ACETATE

FANG HONG-JU AND ZHOU TONG-HUI (D. T.-W. CHOW)

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences)

### ABSTRACT

By means of paper chromatographic separation and colorimetric determination, it is possible to develop a method for the determination of 5 $\alpha$ -dihydrocortisone acetate (allo-pregnane-17 $\alpha$ , 21-diol-3, 11,20-trione-21-acetate). The proposed procedure is given below.

Prepare a chloroform solution of the sample (ca. 3 mg/ml). Impregnate the chromatographic paper (Whatman No. 1 or Chinese Snow White No. 1) with a mixture of formamide and methanol (6:4), and spot in duplicate a suitable amount of the sample solution (30—100  $\mu$ g). Develop the chromatogram with cyclohexane — benzene — chloroform (1:1:1) for about five hours, using descending technique. Remove the paper, cut off one strip and reveal the spots by immersing first in Tollen's reagent, then in 5% sodium thiosulphate solution and wash thoroughly with water. The steroid appears as a dark brown spot. Cut out the corresponding part on the remaining strip, elute with chloroform, collect about 4 ml of the liquid in a small beaker. Evaporate off, dissolve the residue in 5 ml 95% ethanol, add 0.5 ml tetramethylammonium hydroxide solution (10 ml of 10% aqueous solution and enough 95% ethanol to 100 ml) and 0.5 ml triphenyl-tetrazolium chloride solution (500 mg in 100 ml 95% ethanol). Mix well and determine the optical density at 480 m $\mu$  after 15 minutes, using a blank paper strip similarly treated as the reference. Calculate the content from a calibration curve.