UDC 615.361.63/.65 : 547.92 : 615.412.5

104. 北沢豊吉, 内藤正之, 吉田富佐男, 丸山昌子: スteroidホルモン混合製剤
より各Steroidの分離定量 (第2報^{*1}) メチルテストステロン,
エチステロン, エチニルエストラジオール含有錠剤中の
メチルテストステロンとエチステロンとの分離

Toyokichi Kitazawa, Masayuki Naito, Fusao Yoshida, and Masako Maruyama :

Separation and Determination of the Preparations of Mixed Steroids. II.

Determination of Methyltestosterone and Ethisterone from the
Tablet containing Methyltestosterone, Ethisterone,
and Ethynylestradiol.*¹

(Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.*²)

Separatory determination of methyltestosterone and ethisterone in mixed hormone tablet containing methyltestosterone, ethisterone, and ethynylestradiol was examined. For their separation, column chromatography was employed, the benzene solution of the hormones was passed through a column of alumina and the column was eluted with a mixture (9:91) of acetone-benzene to desorb methyltestosterone. Ethisterone was desorbed by elution with ethanol-benzene (30:70) mixture. The hydroquinone-Kober method (HK method) was used for the determination of methyltestosterone and ethisterone was determined by colorimetry, using sulfuric acid-ethanol mixture (9:10 by volume). The amount of ethynylestradiol was so small that it failed to react with the coloring reagent and did not interfere in this determination.

(Received July 21, 1960)

著者等は前報^{*1}において、エチニルエストラジオール (EED) とメチルテストステロン (MT), あるいは EED とエチステロン (ET) との2種混合錠剤について各成分の分離定量法を報告したが、今回はさらに引き続いて MT, ET, EED の3種を含む混合ホルモン錠剤中の MT と ET との分離定量について検討を試み、好結果を得た。

MT, ET, EED 混合物中 MT, ET の分離 錠剤の種類によりその組成に多少の差異はあるが、MT : ET の比率は大体 3 : 1, EED はさらに少なく ET の 1/500 位が普通である。また MT と ET とは紫外部の最大吸収が共にエタノール溶液中で 241 mμ にあり、その濃度比もさほど離れていないため、他の影響なく紫外部吸収により一方を測定することは不可能である。よつて前報の場合と同じく活性アルミナのカラムクロマトグラフィーにより両者を分離し、比色法によつて定量しようとした。長沢等¹⁾は MT, ET を 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンによつてヒドラゾンとして分離し、また Umberger²⁾ はプロゲステロンとテストステロンとの分離をイソニコチン酸ヒドラジドの誘導体として行なっているが、著者等は誘導体とせずにそのまま分離することを試みた。

MT 0.15 mg/cc, ET 0.05 mg/cc のベンゼン溶液を別々に作り、その 10 cc を活性アルミナ塔 (第1報^{*1} 参照) に吸着させ、これをつぎのような混合溶媒で展開した。すなわち、エタノール・ベンゼン (5 : 95, 3 : 97, 2.5 : 97.5), クロロホルム・ベンゼン (10 : 90, 35 : 65, 70 : 30), イソプロピルアルコール・ベンゼン (0.5 : 99.5, 1 : 99, 2 : 98), ピリジン・ベンゼン (2 : 98, 4 : 96, 5 : 95), アセトン・ベンゼン (7 : 93, 9 : 91, 12 : 88), ヘキサン・ベンゼン (10 : 90) である。なお MT および ET の溶出液は、前報に用いたハイドロキノ・コーベル法 (HK 法) によりハイドロキノ硫酸液で発色させた。その結果エタノール・ベンゼン混液, クロロホルム・ベンゼン混液およびイソプロピルアルコール・ベンゼン混液ではどのような比でも分画溶出できず常に各分画液に MT または ET が溶出していた。またヘキサン・ベンゼン混液では両者いずれも溶出しなかつた。ピリジン・ベンゼン

*¹ 第 80 回日本薬学会年会で発表 (1960), 第 1 報 : 本誌 80, 116(1960).

*² Shimosakunobe, Kawasaki-shi.

1) 長沢, 越村, 土屋, 木村 : 衛生試験 77, 95(1959).

2) E. J. Umberger : Anal. Chem. 27, 768(1955).

ン混液 (5:95) と, アセトン・ベンゼン混液 (9:91, 12:88) の二者が MT と ET の溶出分画を異にするために両者の分離に用いられる可能性がある。すなわち, ピリジン・ベンゼン混液 (5:95) では 80~190 cc の分画に MT が, 220~280 cc の分画に ET が溶出し, アセトン・ベンゼン混液 (9:91) では 30~90 cc の分画に MT が, 140~170 cc の分画に ET が溶出した。しかしながら, ピリジン・ベンゼン混液は溶媒の留去にやや困難をとまうために, 実験にはアセトン・ベンゼン混液 (9:91) を使用することにした。また MT を溶出した後 ET の溶出にはアセトン・ベンゼン混液より, エタノール・ベンゼン混液 (30:70) が溶出液が少量で迅速に進行するために ET の溶出にはこのエタノール・ベンゼン混液を使用することにした。すなわち 1 cc 中に MT 0.15 mg, ET 0.05 mg を含むベンゼン溶液 10 cc を吸着した活性アルミナ塔をアセトン・ベンゼン混液 (9:91) によつて展開し, つぎにエタノール・ベンゼン混液 (30:70) で溶出した場合に MT と ET の分離状態は Table I のごとくである。

Table I. Separation of Methyltestosterone (MT) and Ethisterone (ET)
Mixture by Elution with Acetone-Benzene (9:91) and
Ethanol-Benzene (30:70) Mixture

		Fraction	
1st solvent	Me ₂ CO-Benzene (9:91)	30→100 cc.	MT
2nd solvent	EtOH-Benzene (30:70)	0→40 cc.	ET

Table I に示すように, 30~100 cc の分画中に MT が溶出したので, 100 cc 以後エタノール・ベンゼン混液 (30:70) に切換えると 40 cc までに ET が溶出してきたので, 両者を完全に分離することができた。

MT, ET の発色 溶出状態の判定には前述の通り HK 法を用いたが, MT はハイドロキノ・コーベル反応において 470 m μ および 600 m μ に吸収極大を有し, かつ, 470 m μ において少なくとも 15~150 γ の間で直線性が認められた (Fig. 1)。しかし ET は僅かに 470 m μ 付近に吸収の肩を有するような傾向があるのみで, いずれの波長においても吸収極大を示さなかつた (Fig. 2)。したがつて ET の HK 法による呈色を定量に応用するのは適当でないと考えられるので, ET に対しては硫酸および硫酸・エタノール混液による呈色反応を検討した。

ET 100 γ に対し濃硫酸, 70%硫酸, 90%硫酸・エタノール (90 vol:10 vol), および 70%硫酸・エタノール (70 vol:30 vol) を 5 cc ずつ別々に加えて発色させたものは, 415 m μ および 370 m μ に吸収極大を有し (Fig. 3),

Fig. 1.
Absorption Curve of MT by HK Method

Fig. 2.
Absorption Curve of ET by HK Method

Fig. 3.
Absorption Curve of Ethisterone (ET) by
H₂SO₄-EtOH Mixture
(H₂SO₄: EtOH= 90:10)

その 415 m μ における安定性および感度は Table II に示すように 90%硫酸・エタノール (90 vol : 10 vol) が最も良好と考えられたので、以後の実験においては ET の発色には 90%硫酸・エタノールを使用することにした。

Table II. Stability and Sensitivity of the Color of Ethisterone treated with H₂SO₄-EtOH Mixture (Absorbance against time of reaction at 415 m μ , ET 100 γ /5 cc.)

Reagent \ Time (min.)	15	20	30	45	60	90	120
conc. H ₂ SO ₄	180	181	184	184	187	192	192
70% H ₂ SO ₄	140	135	138	129	125	117	113
90% H ₂ SO ₄ ·EtOH (90 : 10)	183	184	185	185	186	184	186
70% H ₂ SO ₄ ·EtOH (70 : 30)	139	143	140	142	138	131	133

実 験 の 部

上述の実験結果よりつぎのような定量法を案出した。

MT の定量 MT と ET との比率が 3 : 1 の試料錠剤 5~10 錠を粉碎し、蒸留水 50 cc を加えてよく捏ね、ベンゼン 80 cc および 30 cc ずつで抽出し、抽出液を合し、ベンゼン層を水洗、脱水、濃縮して、MT として 150 γ (ET として 50 γ) 位を 1 cc 中に含むベンゼン液をつくり、その 10 cc を第 1 報の場合と同様の吸着法により吸着させ、Me₂CO・ベンゼン (9 : 91) で展開溶出し、溶出液 100 cc を蒸発乾固、HK 法により発色させ、同一処理を行なった MT ベンゼン標準液を対照として 470 m μ で比色定量を行なう。

ET の定量 MT 溶出後、EtOH・ベンゼン混液 (30 : 70) で ET を溶出させその 40 cc を蒸発乾固し、90% H₂SO₄·EtOH (90 : 10) で発色させ 415 m μ で同一処理した ET 標準液と比色定量を行なう。

以上案出した分離定量法により、MT, ET および EED の混合錠剤のベンゼン抽出液について MT, ET の分離定量を行なった。その回収実験および実際の製剤についての定量成績は Table III のようである。なお、EED は Me₂CO・ベンゼン混液で MT とほぼ同一分画に溶出してくるはずであるがその量が極めて微量であるため HK 反応に感ぜず、MT, ET の分離定量に支障を与えなかつた。

Table III. Determination of Methyltestosterone and Ethisterone in Mixed Steroid Tablets by Column Chromatography

Recovery Test						
Test No.	1	2	3	4	5	6
Recovery (%) {MT	100.6	100.0	108.1	105.4	96.8	106.8
{ET	100.5	117.2	93.6	80.3	104.5	81.1
mean $\bar{x}$ = {MT	103.0%		δ = {MT	4.46		
{ET	96.2%		{ET	14.25		
Example						
Lot No.	1	2	3	mean		
Tablet, containing {MT	2.92	2.73	3.18	2.94		
MT (3 mg.) and ET (1 mg.) {ET	1.05	1.02	1.00	1.02		

本研究に当たり、御鞭撻を賜わつた上野製造部長ならびに細井工場長に厚く御礼申上げるとともに、種々有益な助言を戴いた研究部 神戸川 明氏、東京医科歯科大学 木村光比子氏に深謝致します。

帝国臓器製薬株式会社研究部