

# 药物分析

## 第十五章

### 甾体激素类药物的分析



人民卫生出版社

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

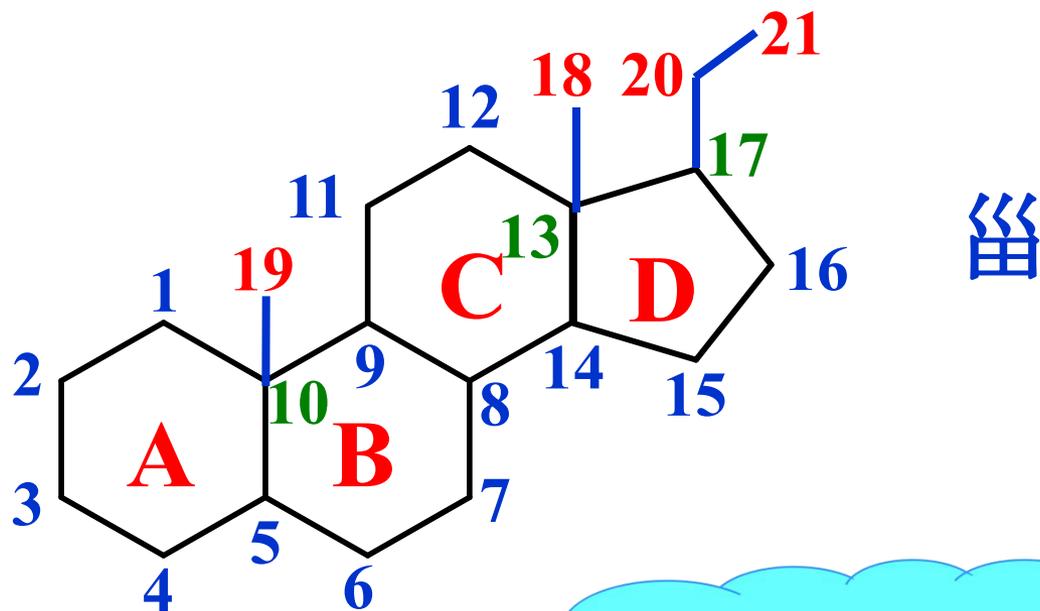
# 第一节 结构与分类



人民卫生出版社

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

结构特点：基本母核

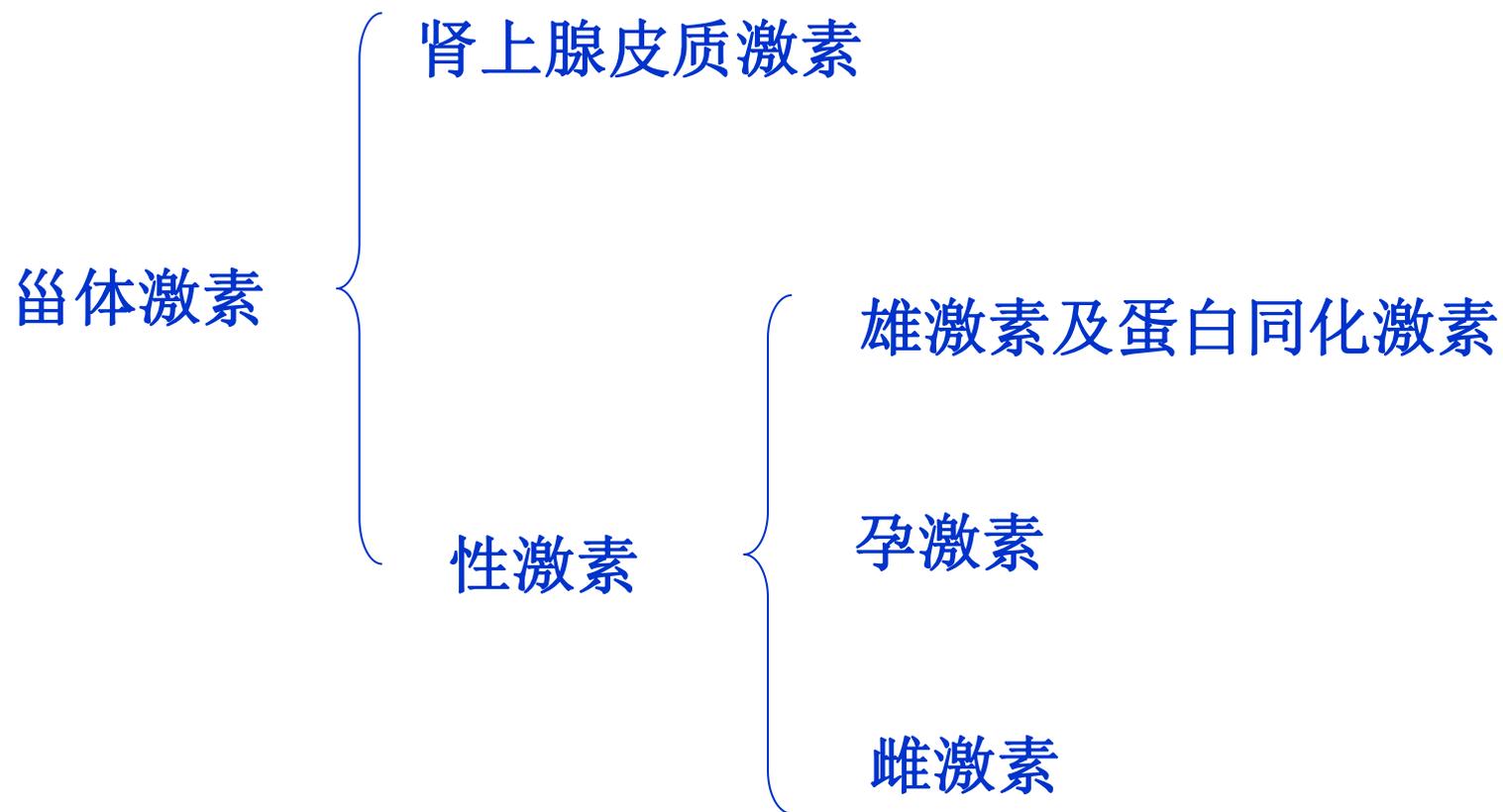


甾

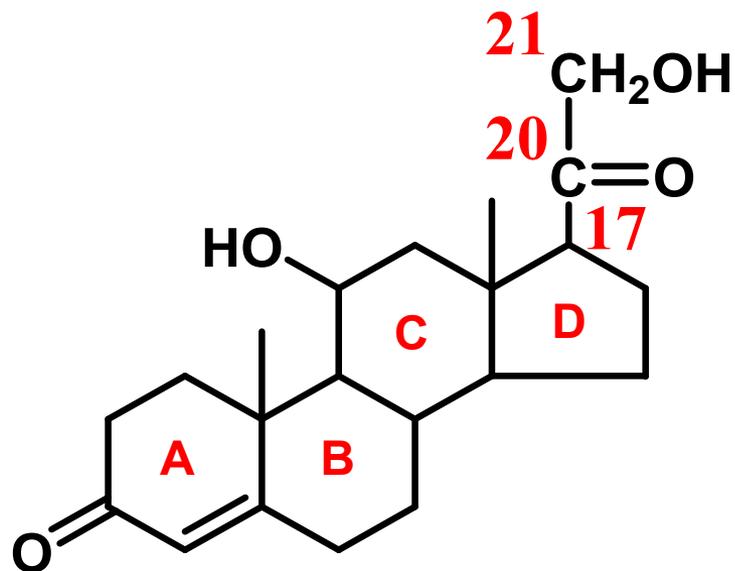
环戊烷并多氢菲



## 分类：按药理作用



# 一、肾上腺皮质激素



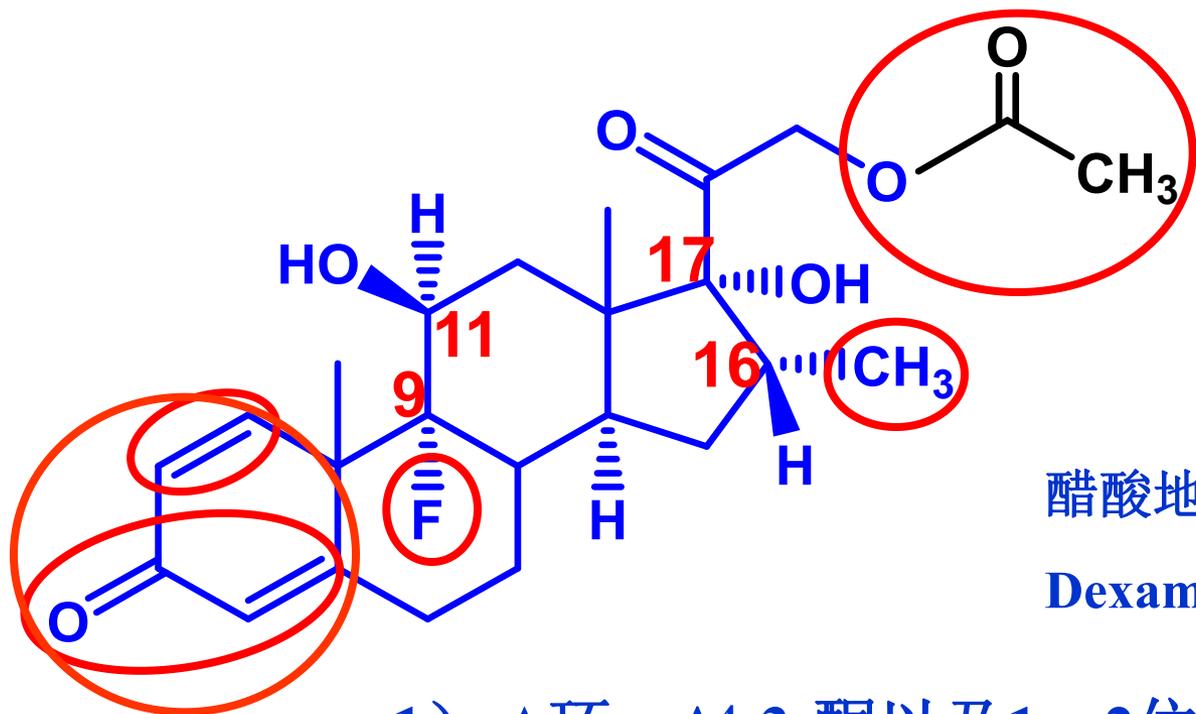
皮质酮的衍生物

结构特点:

- 1) 母核含有 21 个C
- 2) A环:  $\Delta^4$ -3-酮结构
- 3) C<sub>3</sub>和C<sub>20</sub>酮基
- 4) 17位:  $\alpha$ -醇酮基





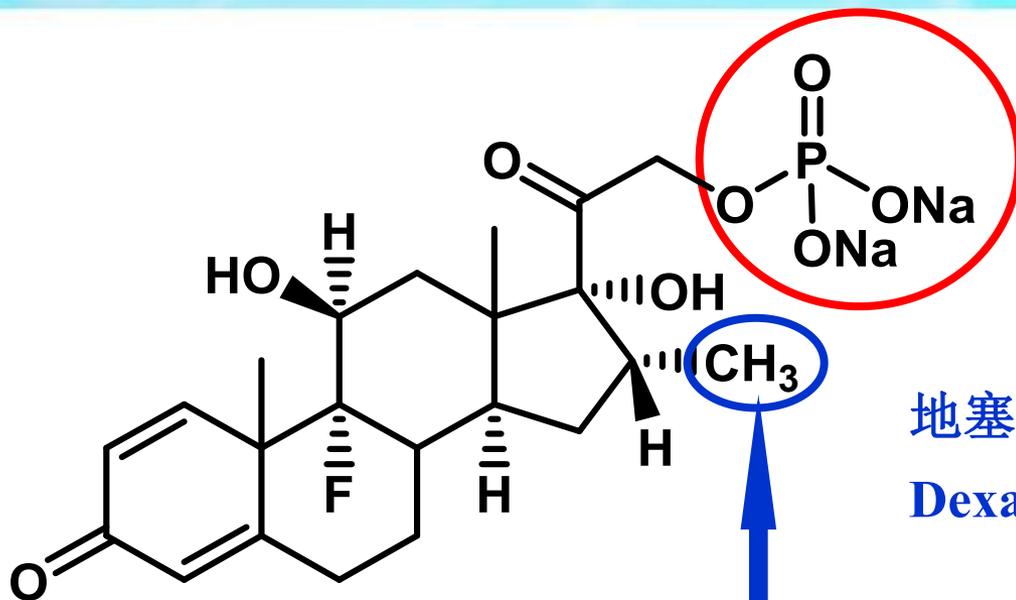


醋酸地塞米松

Dexamethasone acetate

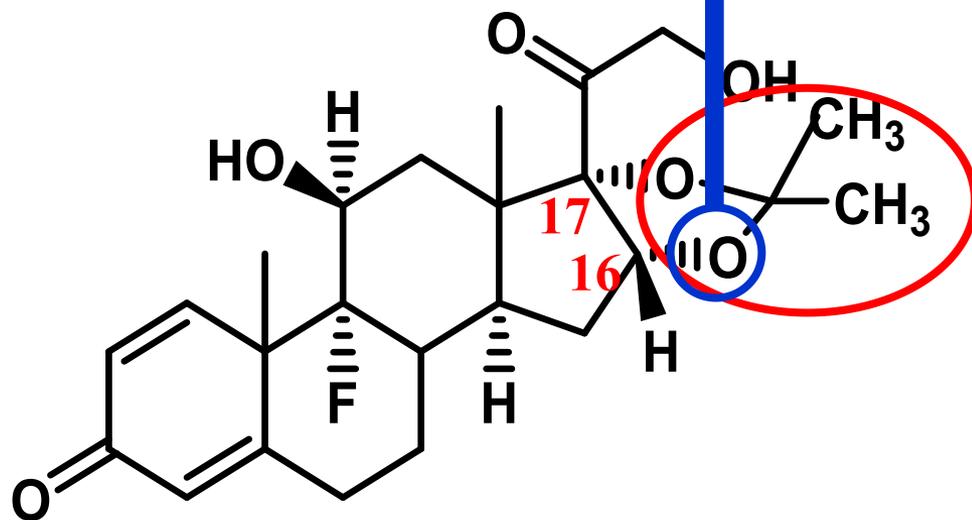
- 1) A环:  $\Delta^4$ -3-酮以及1、2位双键
- 2)  $C_3$ 和 $C_{20}$ 酮基
- 3) 17位:  $\alpha$ -醇酮基
- 4) 其他: 11、17位羟基
- 5)  $9\alpha$ 位氟原子。





地塞米松磷酸钠

Dexamethasone sodium phosphate



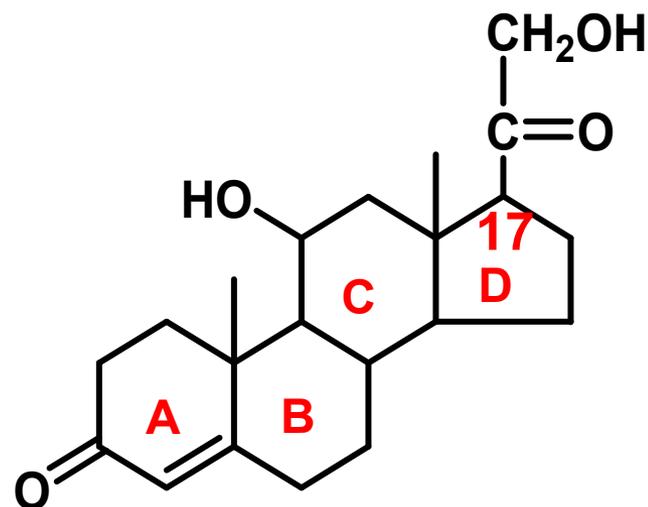
曲安奈德

Triamcinolone acetonide

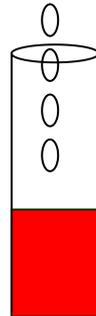


## 可供分析官能团:

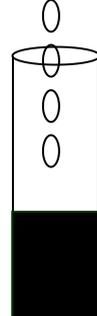
- 1) A环的 $\Delta^4$ -3-酮
- 2) 17位的 $\alpha$ -醇酮基
- 3) 3、20位的酮
- 4) 17、21位的二羟基
- 5) 氟原子、磷酸根、醋酸根



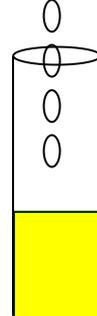
斐林  
试液



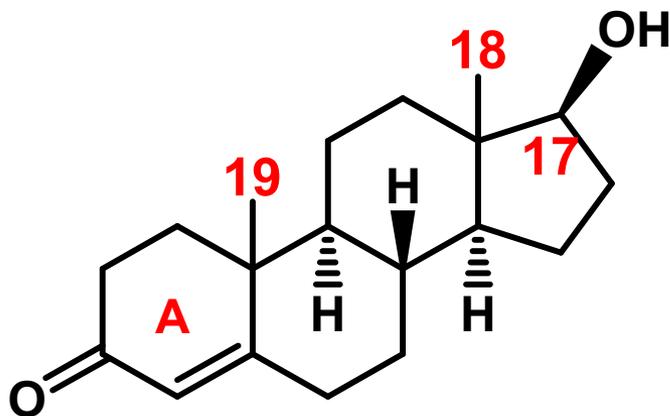
多伦  
试液



羰基  
试剂



## 二、雄性激素及蛋白同化激素



甾酮的衍生物

结构特点:

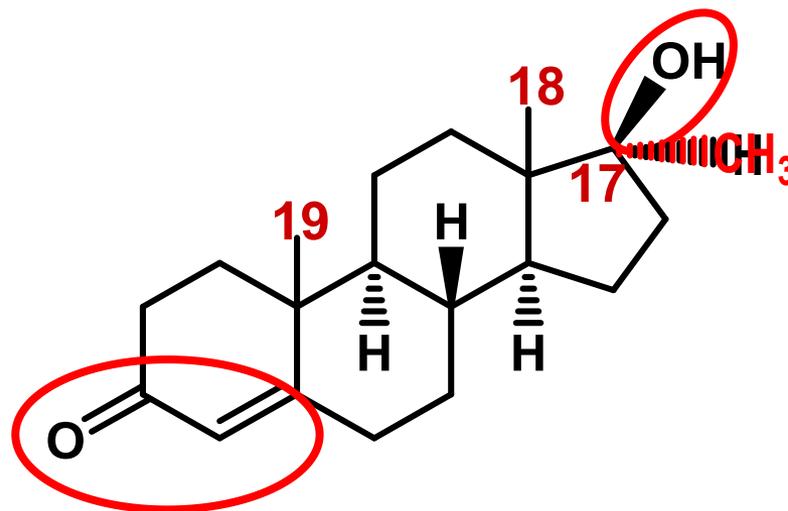
- 1) 母核含有**19**个C
- 2) A环的 $\Delta^4$ -3-酮
- 3) 17位羟基、甲基、酯



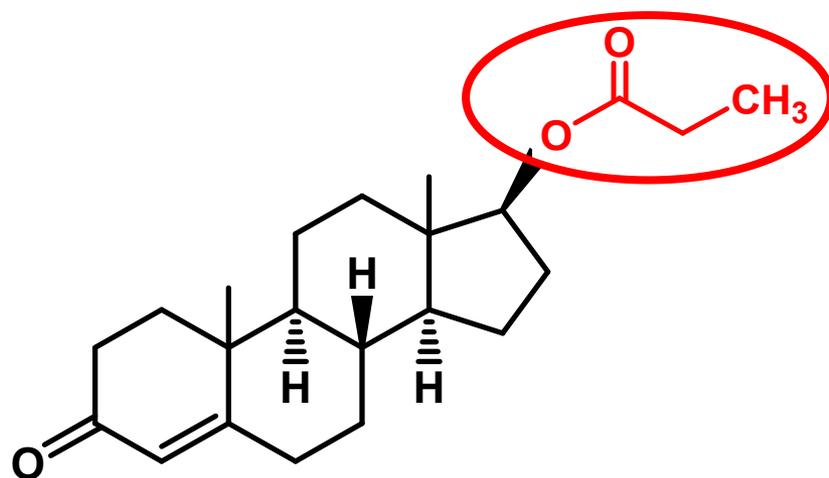
# 代表性药物

## 甲睾酮 Methyltestosterone

- 天然的雄性激素
  - 主要为睾酮
- 1) 母核含有19个C
  - 2) A环的 $\Delta^4$ -3-酮
  - 3) 17位羟基



## 丙酸睾酮 Testosterone propionate

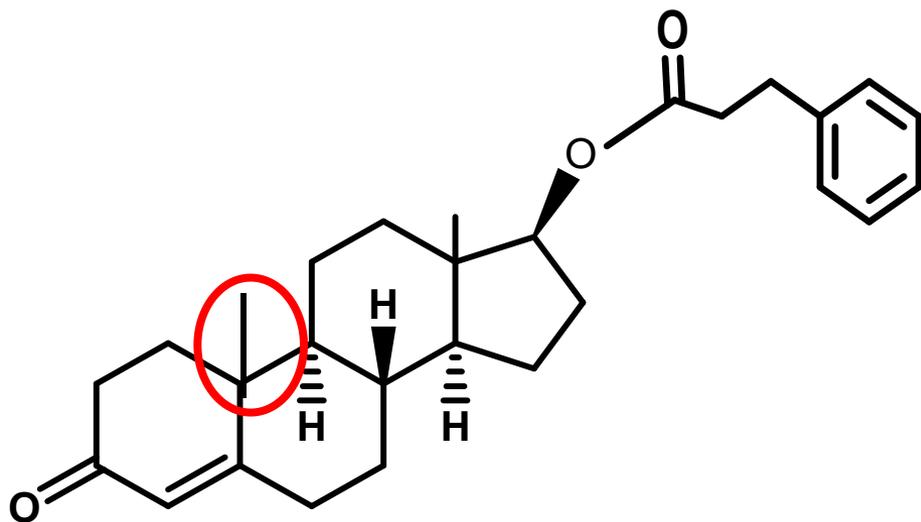


17位酯



## 蛋白同化激素

### 苯丙酸诺龙 Nandrolone phenylpropionate

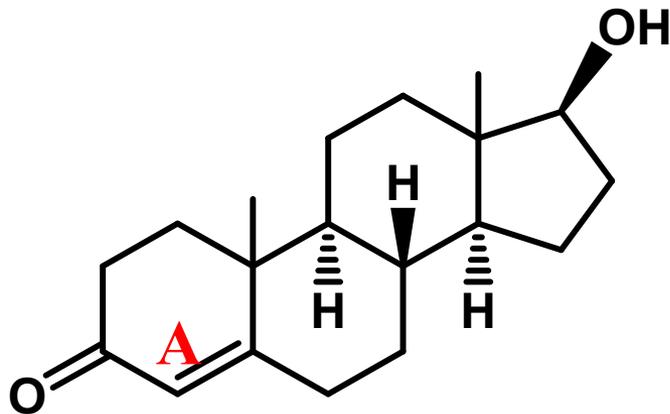


- 1) 母核含有18个C
- 2) 10位无角甲基
- 3) A环的 $\Delta^4$ -3-酮
- 4) 17位酯



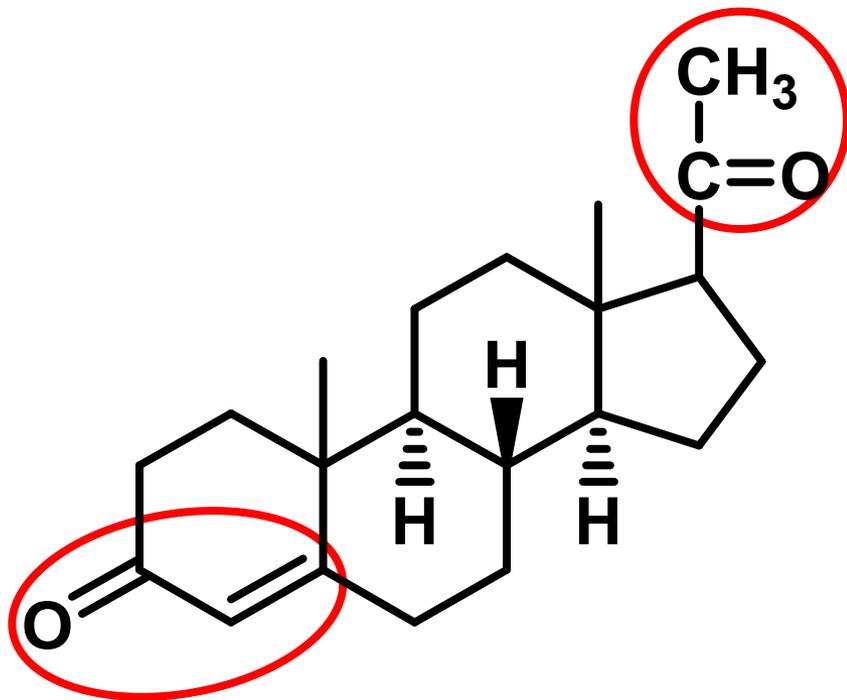
## 可供分析官能团:

- 1) A环 $\Delta^4$ -3-酮
- 2) 3位的酮
- 3) 17位的羟基、酯



# 三、孕激素

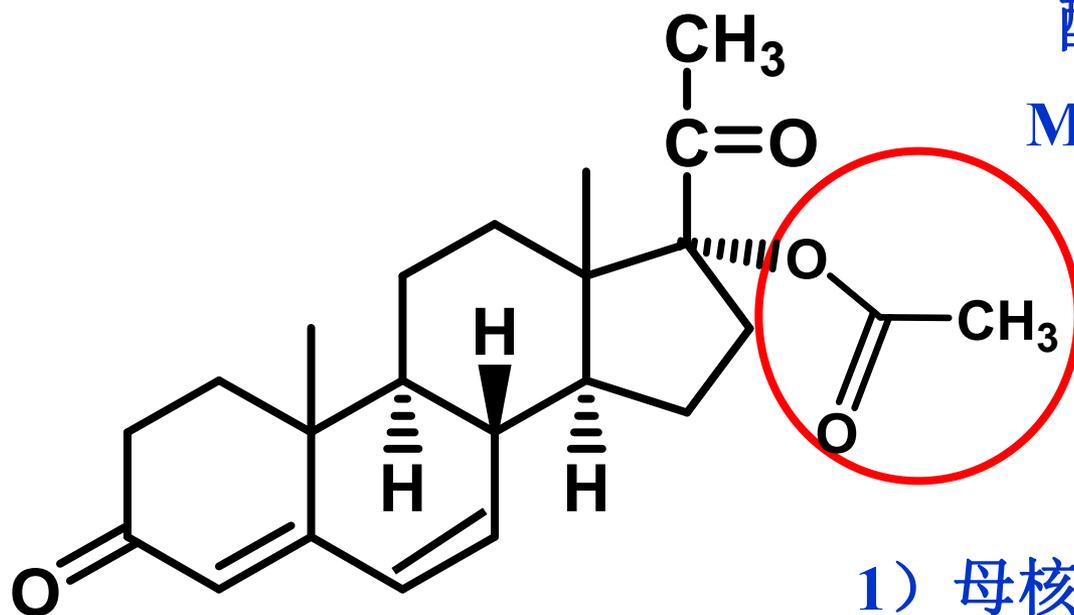
## 黄体酮 Progesterone



- 1) 母核含有 **21**个C
- 2) A环的 $\Delta^4$ -3-酮
- 3) 17位甲酮基



## 黄体酮 Progesterone



## 醋酸甲地孕酮 Megestrol acetate

可供分析官能团:

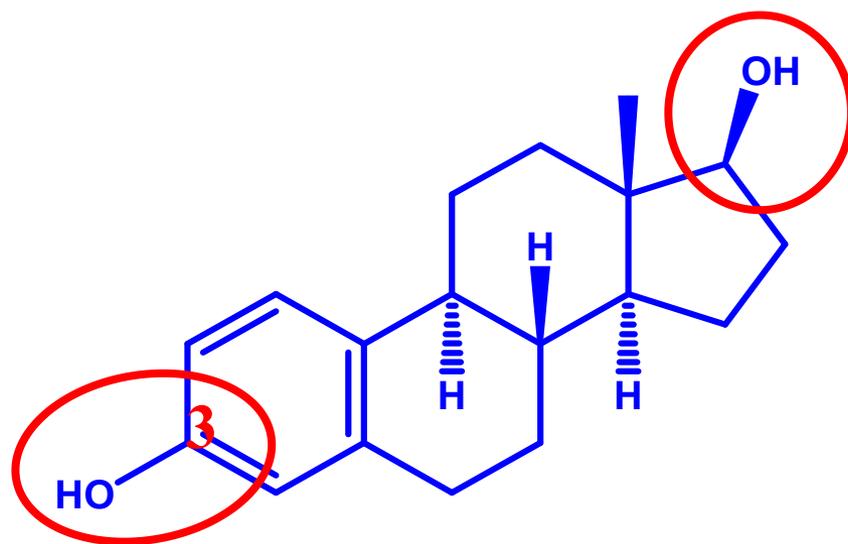
- 1) A环的 $\Delta^4$ -3-酮
- 2) 17位上的甲酮基

- 1) 母核含有 21 个C
- 2) A环的 $\Delta^4$ -3-酮
- 3) 17位| 乙酰氧基



## 四、雌激素

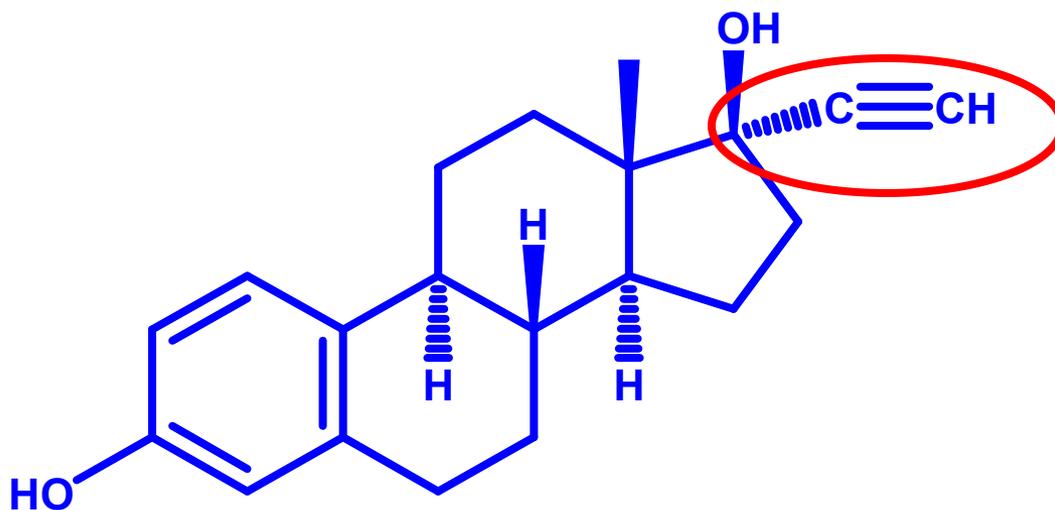
- 1) 含有18个C
- 2) A环：苯环，3位上有酚羟基，10位无甲基
- 3) 17位： $\beta$ 羟基



雌二醇 Estradiol



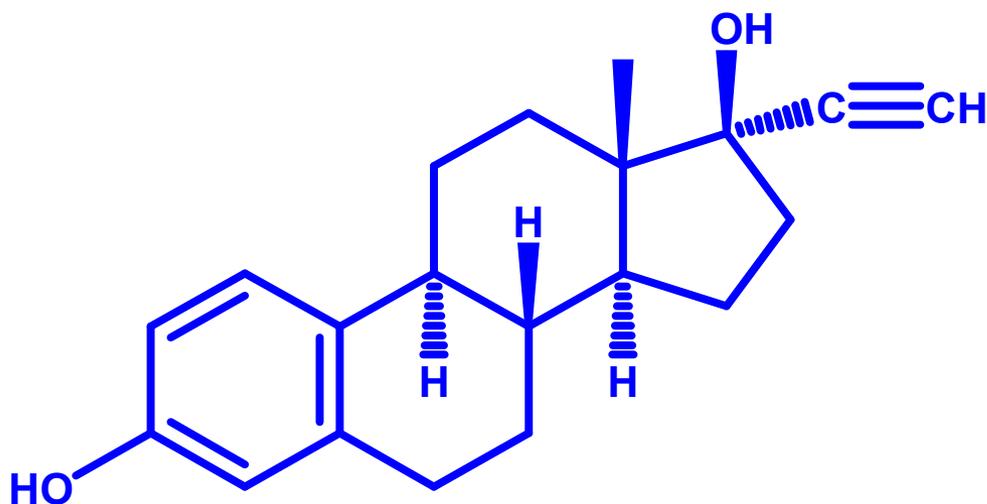
- 1) 含有18个C
- 2) A环：苯环，3位上有酚羟基，10位无甲基
- 3) 17位：乙炔基



炔雌醇 Ethinylestradiol



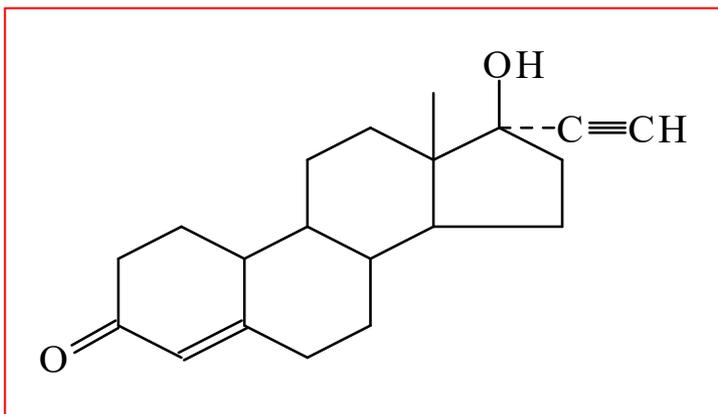
## 可供分析官能团



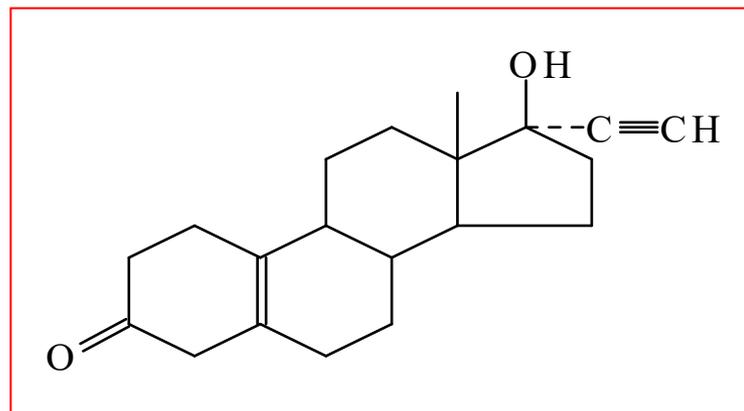
- A环的酚羟基
- 17位的羟基、乙炔基。



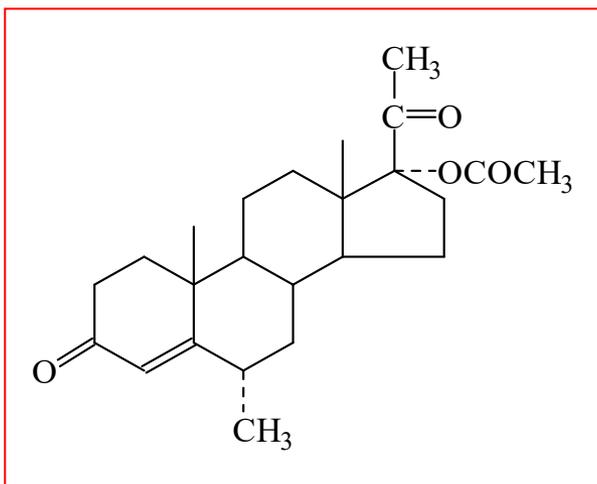
## 口服避孕药：结构相似



炔诺酮



炔诺酮



醋酸甲羟孕酮

- 1) A环有 $\Delta^4$ -3-酮结构;
- 2) 有的第17位有羟基和乙炔基;
- 3) 有的第10位有甲基。



# 基本结构与性质

## 1. 肾上腺皮质激素

---

主要活性基团

化学性质

$\Delta^4-3-$  酮

UV、与羰基试剂反应

$C_{17}-\alpha-$  醇酮基

还原性

---



## 2. 雄性激素及蛋白同化激素

---

主要活性基团

化学性质

---

$\Delta^4-3-$  酮

UV、与羰基试剂反应

$C_{17}-\beta-$  羟基

可成酯

---



### 3.孕激素

---

主要活性基团

化学性质

---

$\Delta^4-3-$ 酮

UV、与羰基试剂反应

$C_{17}$ -甲酮基

与亚硝基铁氰化钠反应

---



## 4. 雌激素

---

主要活性基团

化学性质

---

A环为3-OH 苯环

UV、与重氮苯磺酸盐反应

C<sub>17</sub>-乙炔基

与AgNO<sub>3</sub>反应

C<sub>17</sub>-羟基

可成酯

---



# 第二节

## 理化性质与鉴别试验



# 一、物理常数的测定

## 1.熔点

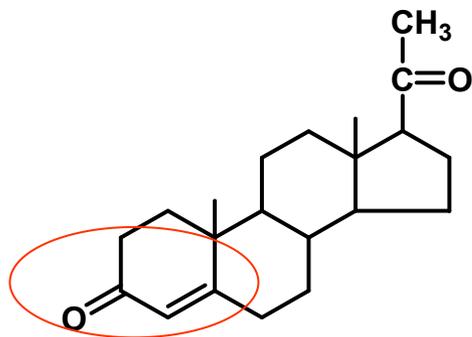
- 鉴定反应药物的纯度
  - 醋酸地塞米松 223~233°C 熔融同时分解

## 2.比旋度

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{100 \alpha}{C L}$$



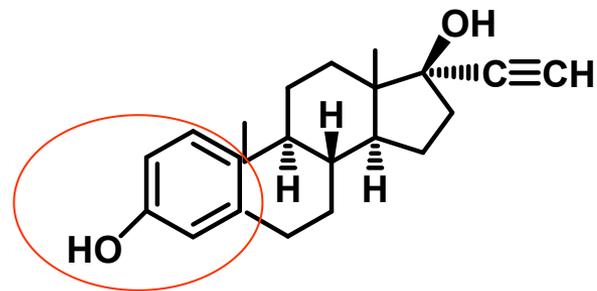
### 3.吸收系数



黄体酮

$\Delta^4-3$ -酮

$\lambda_{\max}=240\text{nm}$



炔雌醇

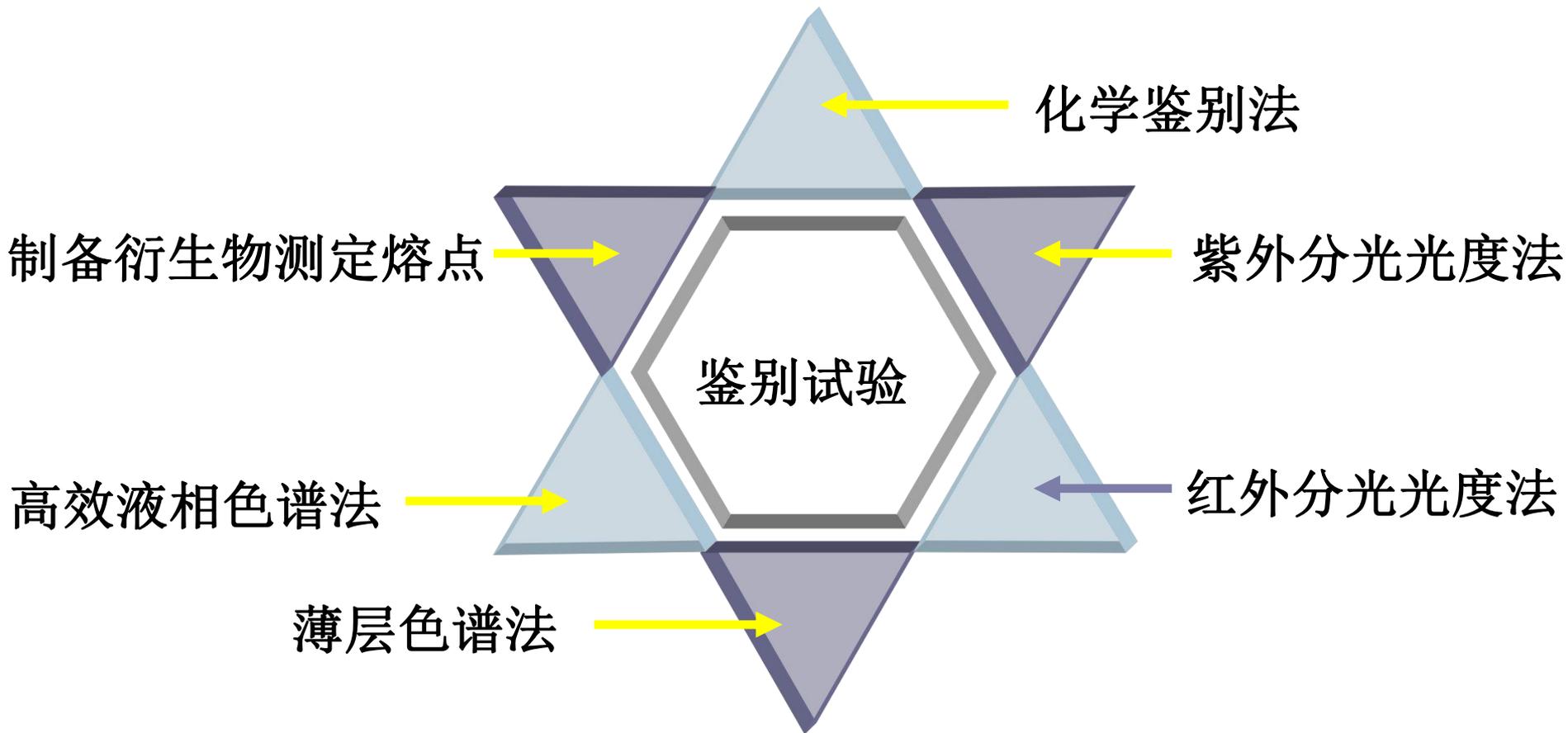
A环苯环、酚羟基

$\lambda_{\max}=280\text{nm}$

$E_{1\%}^{1\text{cm}}$



## 二、鉴别试验



# 化学鉴别法

## (一) 与强酸的呈色反应 (母核的鉴别)



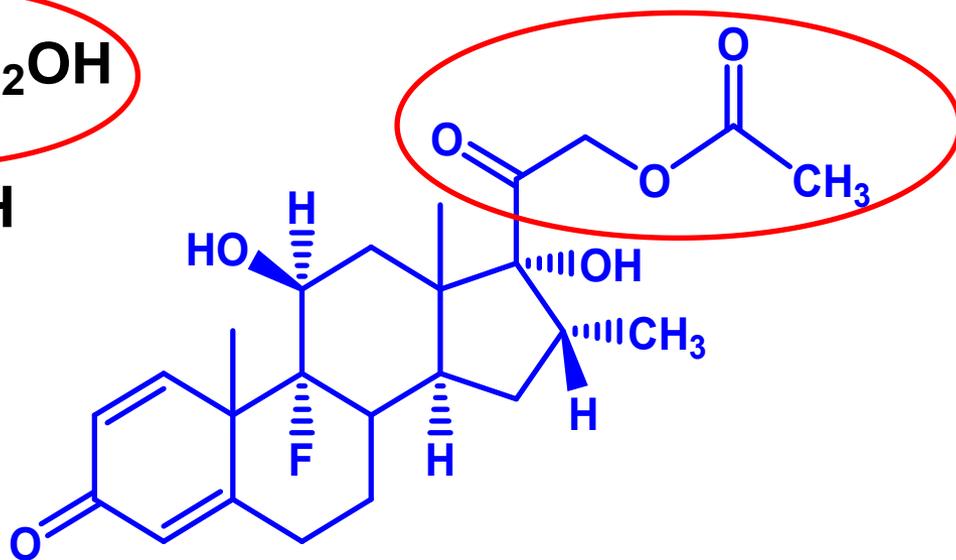
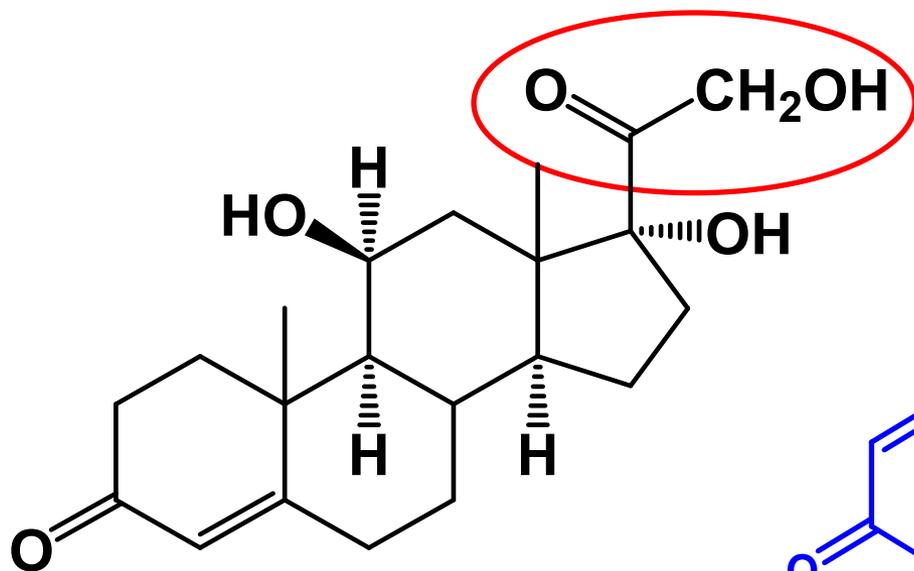
- 方法： 取样品少许  $\xrightarrow{\text{H}_2\text{SO}_4}$  观察颜色、荧光  
 $\xrightarrow{\text{加水稀释后}}$  再观察颜色、荧光

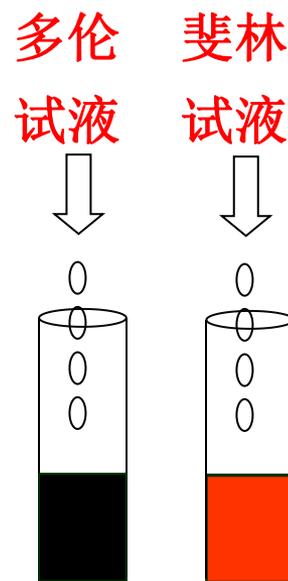
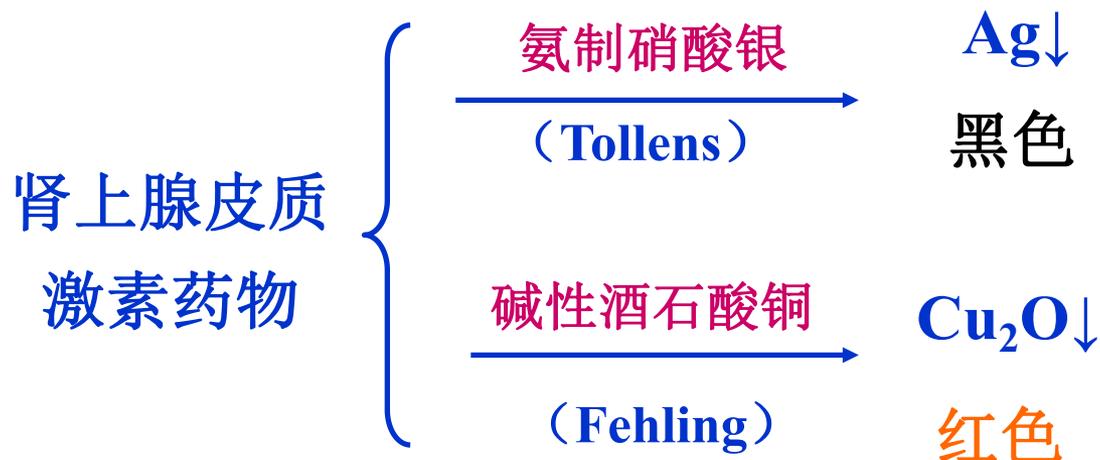


## (二) 官能团反应

### 1. $C_{17}$ - $\alpha$ -醇酮基的呈色反应

(肾上腺皮质激素类药物特征反应)

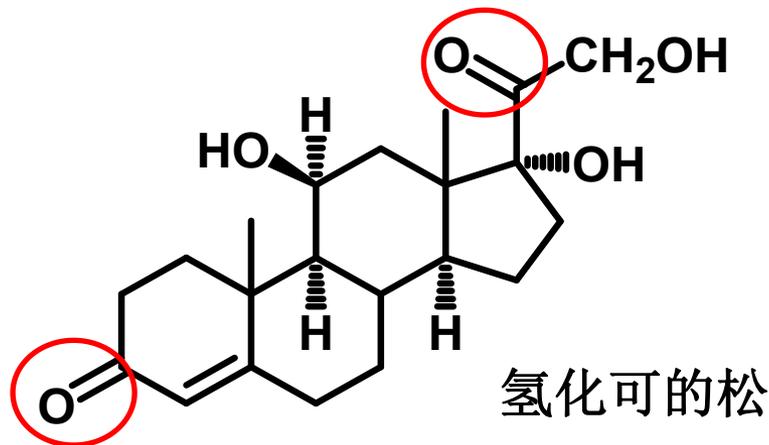
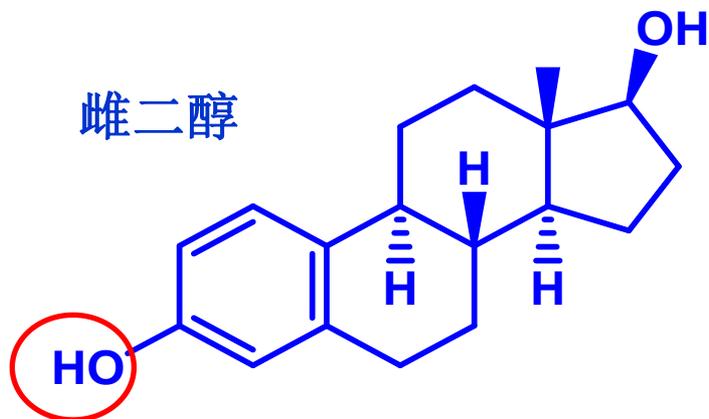




TTC: 氯化三苯四氮唑      BT: 蓝四氮唑

鉴别      薄层色谱显色      含量测定

## 2. C<sub>3</sub>-酮基、C<sub>20</sub>-酮基（雌激素不具有）

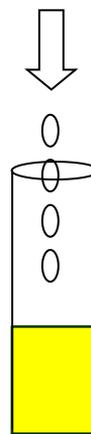


甾酮类激素药物  $\xrightarrow{\text{羰基试剂}}$  呈色

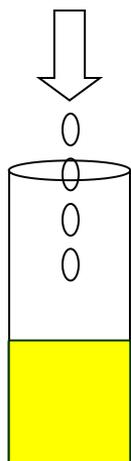
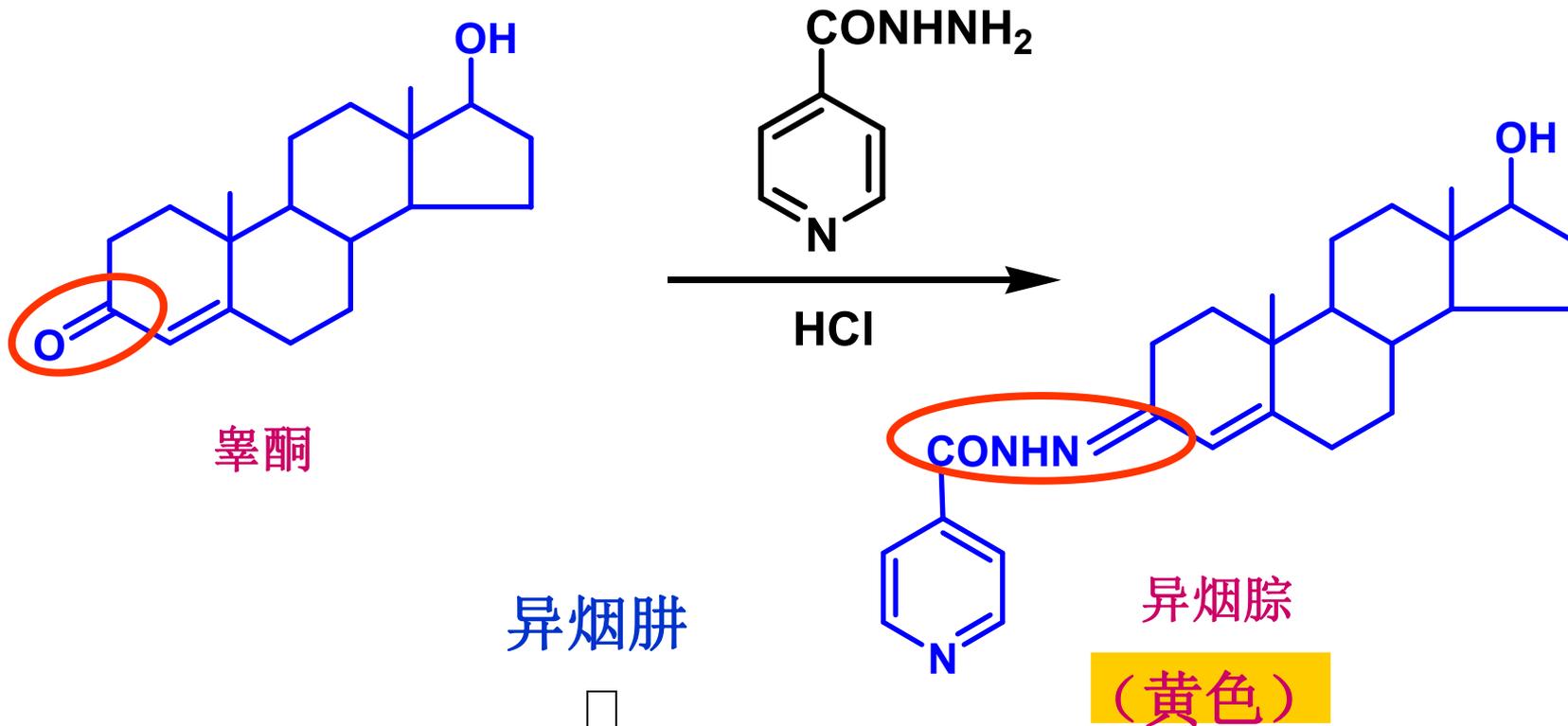
羰基试剂

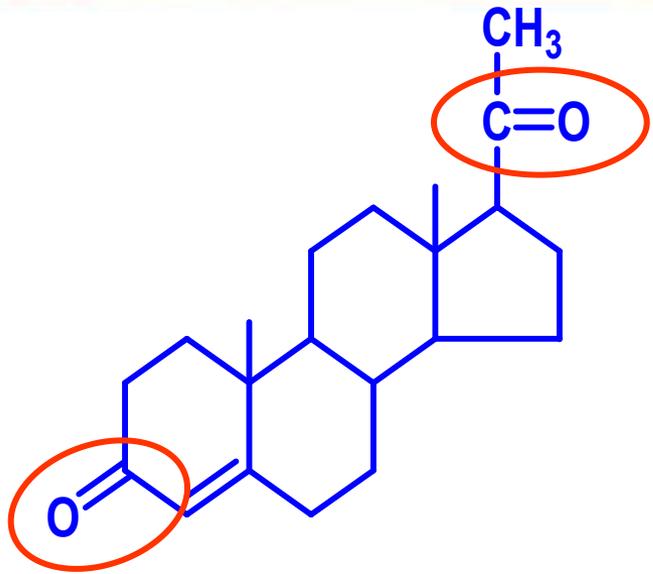
• 常用的羰基试剂:

2,4-二硝基苯肼、异烟肼、硫酸苯肼

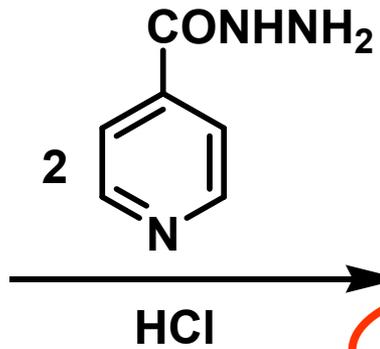


人民卫生出版社  
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

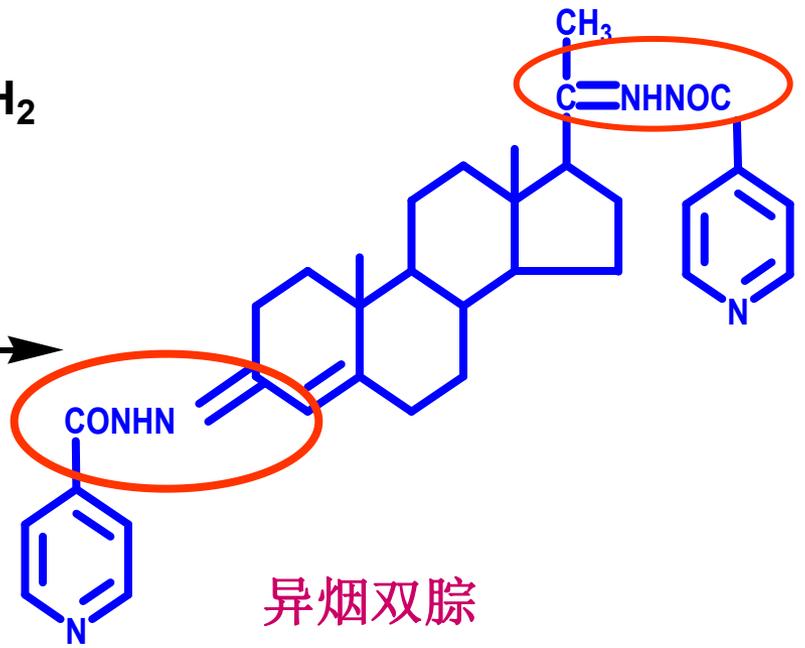
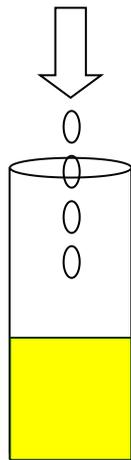




黄体酮



异烟肼

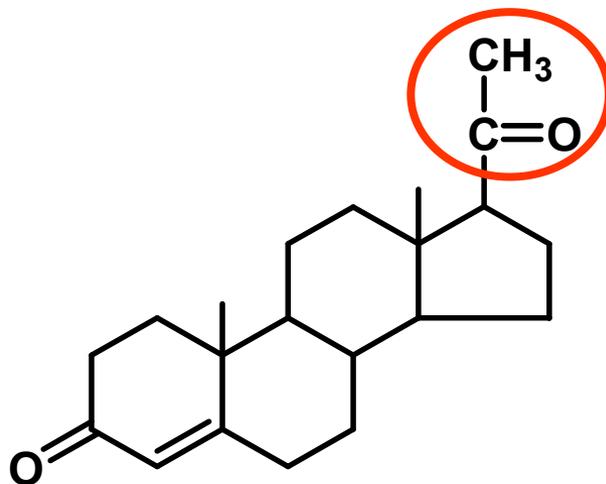


异烟双肼

(黄色)



### 3. 甲酮基（孕激素特征反应）



具有甲酮基或活泼亚甲基的甾体激素类药物

亚硝基铁氰化钠

间二硝基酚

芳香醛

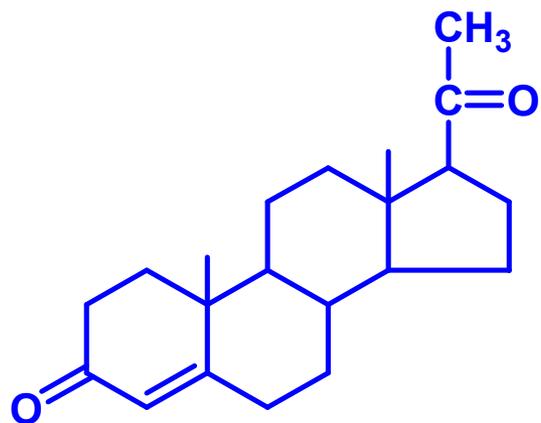
呈色



人民卫生出版社  
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

## 区别黄体酮与其他甾体





黄体酮

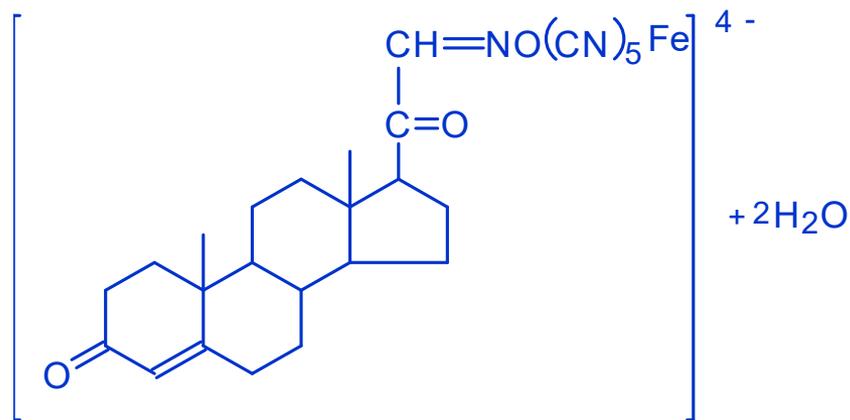
5mg +

0.2ml 甲醇



$\text{OH}^-$

碳酸钠和醋酸铵各约50mg

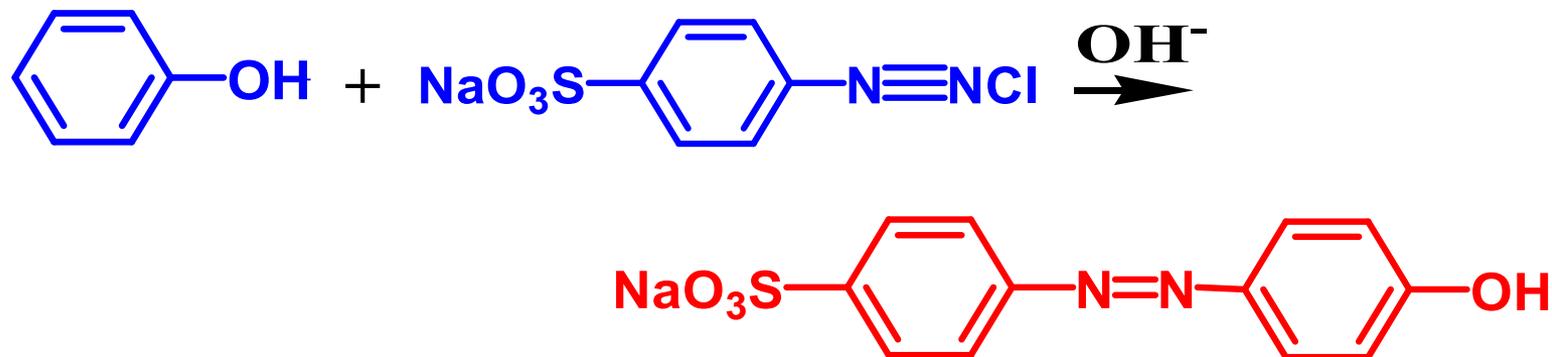


10~30分钟

蓝紫色



#### 4. 酚羟基（雌激素的特征反应）



雌激素类药物  $\xrightarrow{\text{重氮苯磺酸}}$  红色偶氮染料

（JP利用此反应鉴别苯甲酸雌二醇）

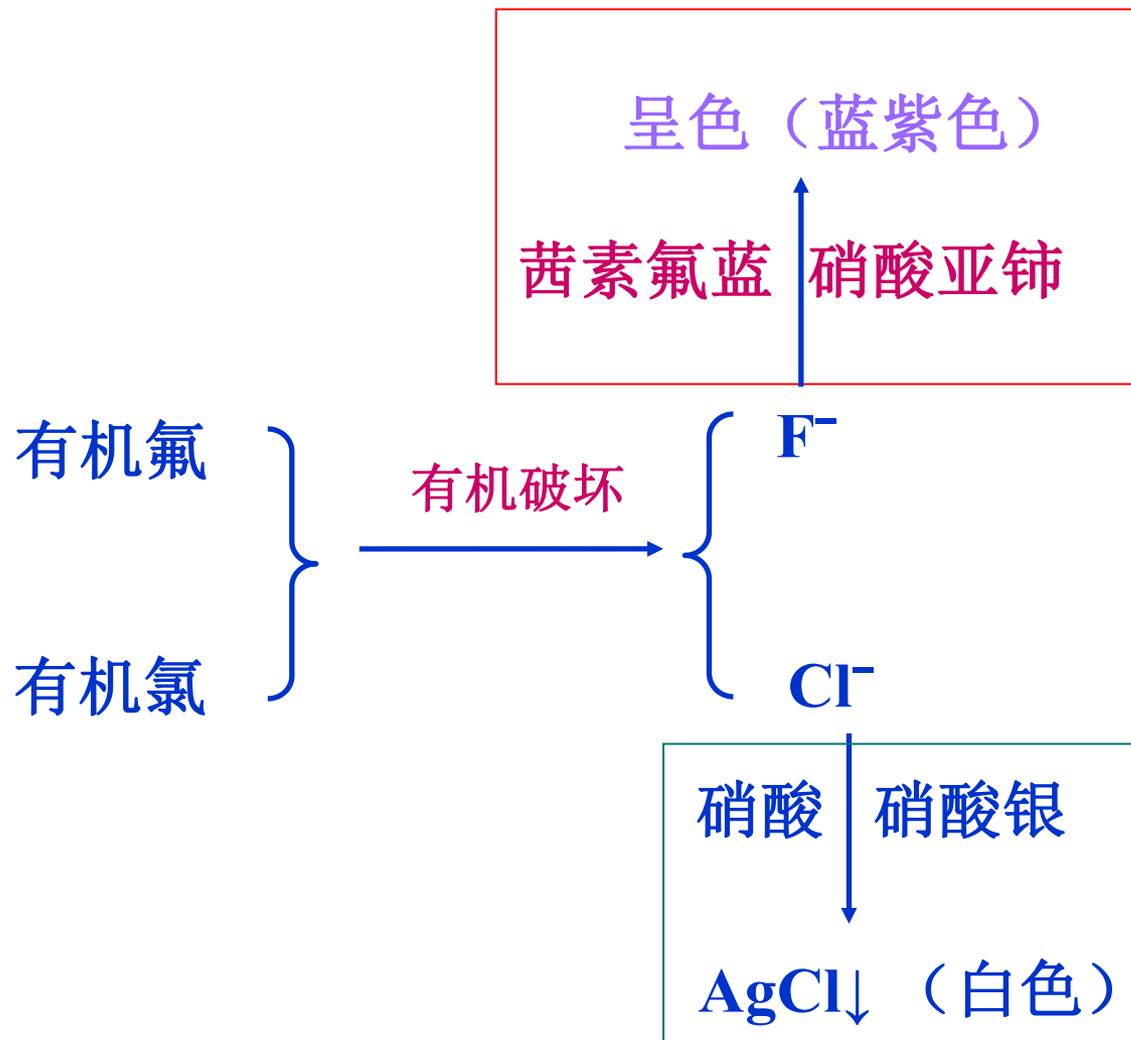


## 5. 炔基

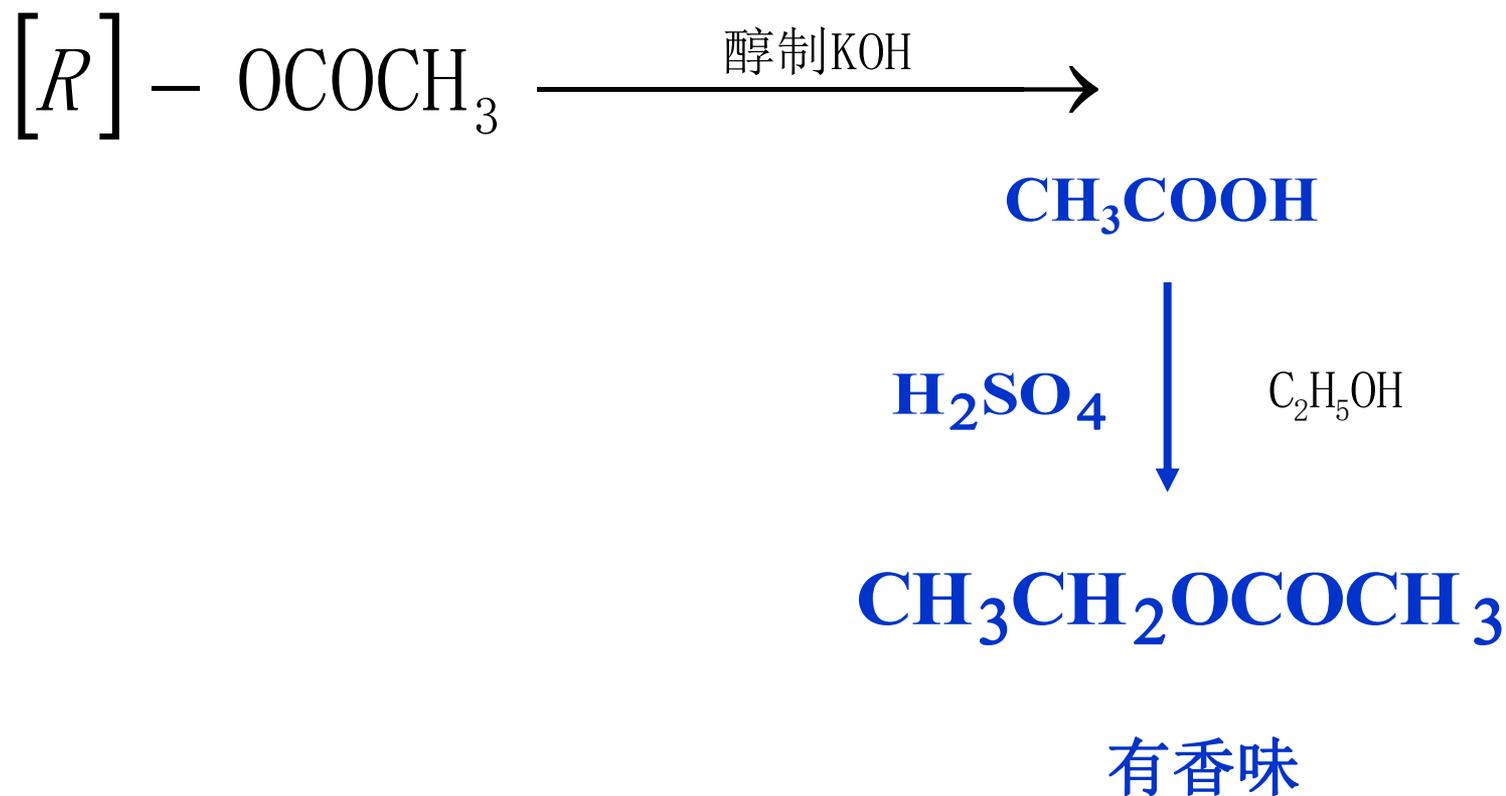
含炔基的甾体激素  $\xrightarrow{\text{硝酸银}}$  炔银沉淀



## 6. 有机卤素



## 7. 酯的水解产物的反应



### 三、UV鉴别法



$\Delta^4$ -3-酮      240nm



苯环      280nm



## 示例

	曲安西龙	丙酸倍氯米松
溶剂	甲醇	乙醇
浓度	20 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ g/ml
结果判断	在238nm处有最大吸收	在239nm处有最大吸收， <i>A</i> 为0.57~0.60，在239nm与263nm处的吸收度比值为2.25~2.45



## 四、IR鉴别法

$\nu_{O-H}$       3750~3300 $\text{cm}^{-1}$

$\nu_{\equiv CH}$       3300~3000 $\text{cm}^{-1}$

$\nu_{-CH}$       3000~2700 $\text{cm}^{-1}$

$\nu_{C=O}$       1900~1650 $\text{cm}^{-1}$

$\nu_{C=C}$       1650~1450 $\text{cm}^{-1}$



## 五、色谱鉴别法

- 主要用于甾体激素类药物制剂的鉴别

### 方法1: TLC (对照品法)

- 要求供试品溶液所显主斑点的颜色和位置与对照品溶液的主斑点相同。



## 方法2：HPLC法

- 主要用于甾体激素类药物制剂的鉴别（如：醋酸曲安奈德软膏、醋酸氟轻松软膏）
- 方法：对照品法
  - 要求在含量测定项下记录的色谱图中，供试品峰的 $t_R$ 与对照品峰的 $t_R$ 一致。



# 第三节

## 有关物质与检查



有关物质的检查  
(杂质未知,甾体  
母核结构相似)

硒的检查

游离磷酸盐的检查

残留溶剂的检查



# 一、有关物质的检查

## 高低浓度对照法

- 薄层色谱 (TLC)
- 高效液相色谱 (HPLC)

### 测定方法

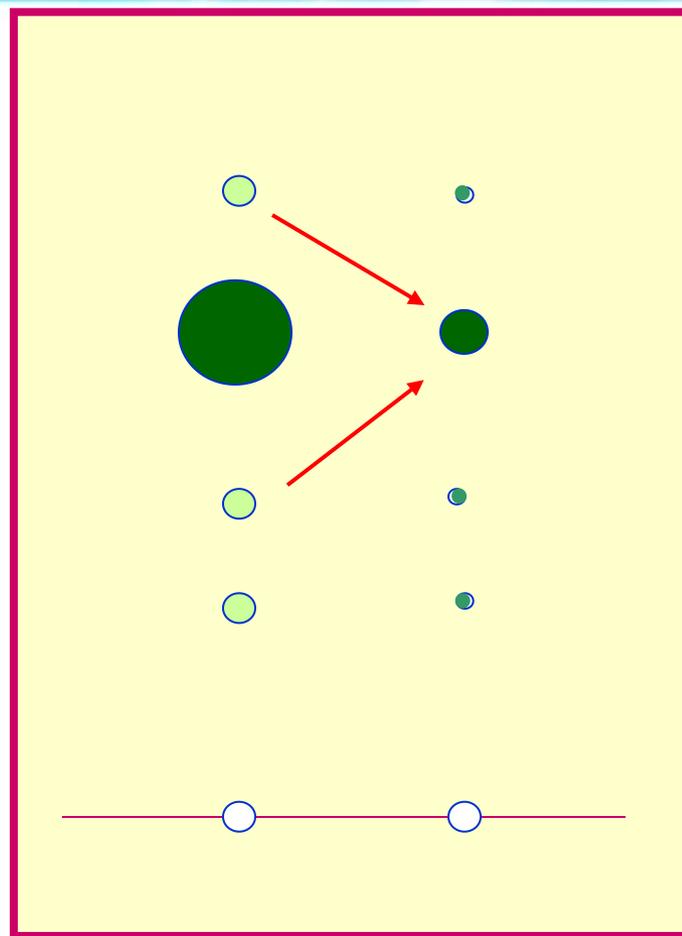
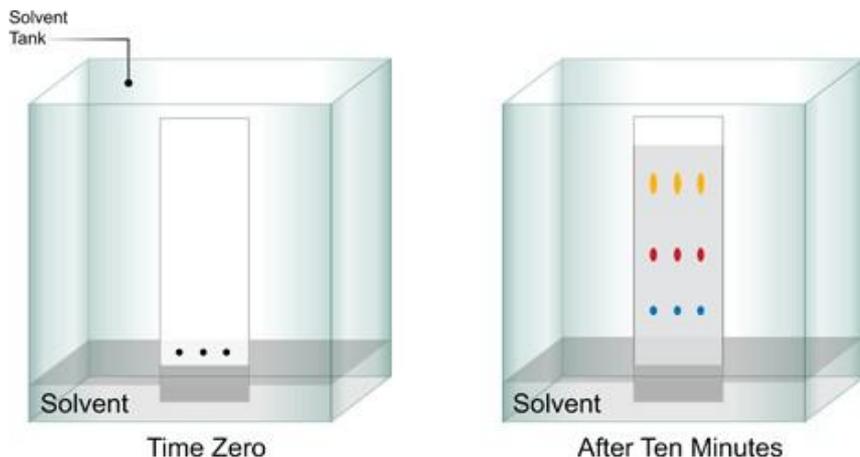
样品液1——0.1%~1.0% 溶液

样品液2——0.01%~0.1% 溶液



## TLC判断-高低浓度对照法:

- ① 规定杂质斑点个数，  
控制杂质种类
- ② 规定杂质斑点颜色，  
样1杂质斑点强度不得  
超过样2主斑点



样  
1

样  
2



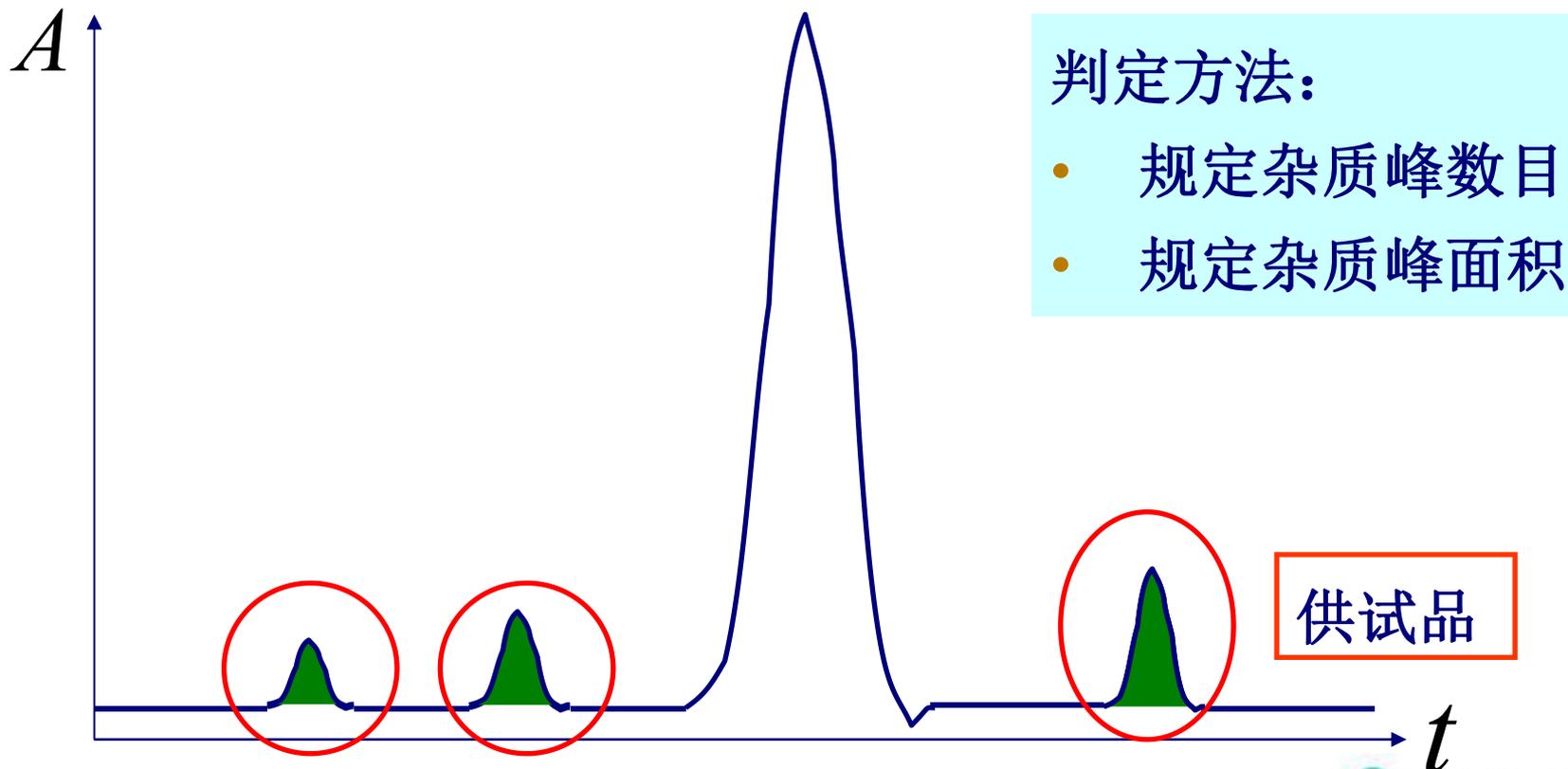
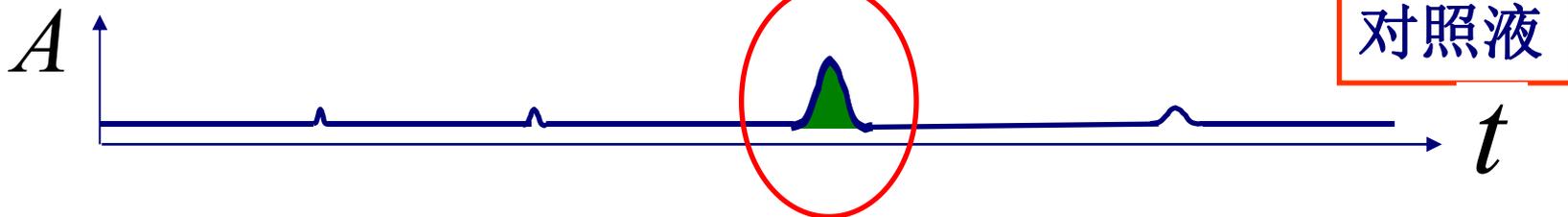
人民卫生出版社  
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

## 例：炔孕酮中有关物质的检查

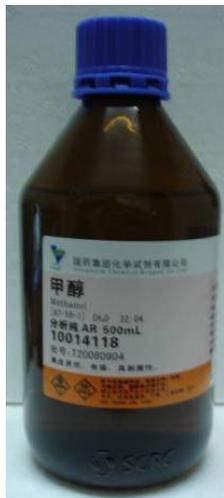
- 供试液：本品+三氯甲烷-甲醇（3：1）  
    浓度：10mg/ml
- 对照液：供试液（10mg/ml）+三氯甲烷-甲醇（3：1）  
    浓度：50 $\mu$ g/ml
- 层析：供试液 点样、展开、斑点检出。  
    对照液
- 判断：供试液如显杂质斑点，其荧光强度与对照溶液主斑点比较，不得更深。



# HPLC法（主成分自身对照法）



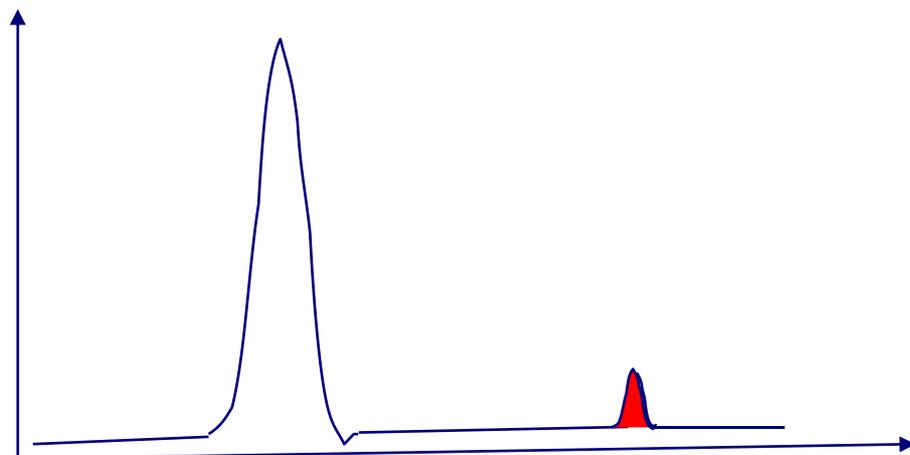
# 示例：黄体酮中有关物质检查



供试液： 1mg/ml



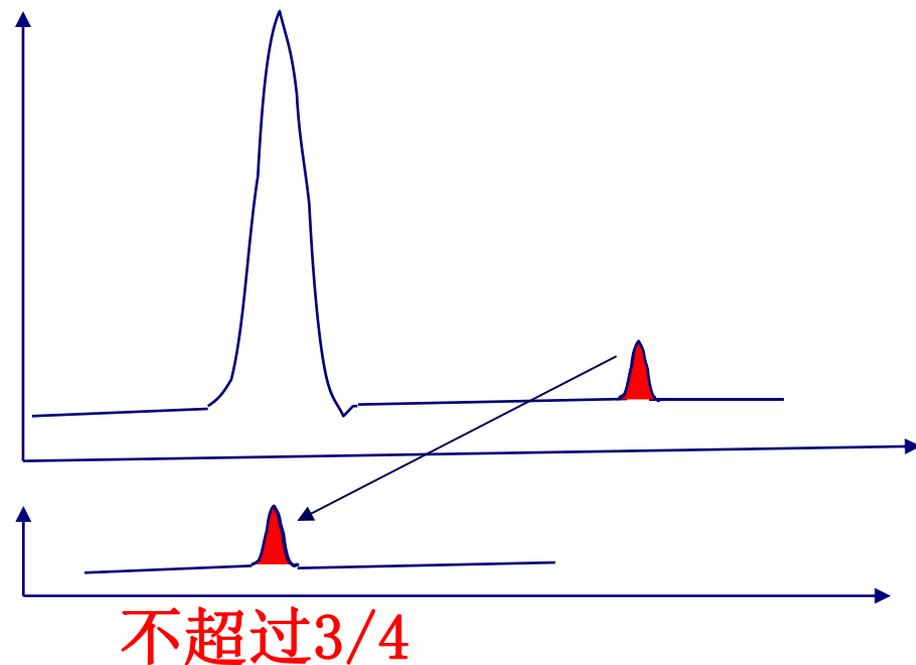
对照液： 0.02mg/ml



## 示例：黄体酮中有关物质检查

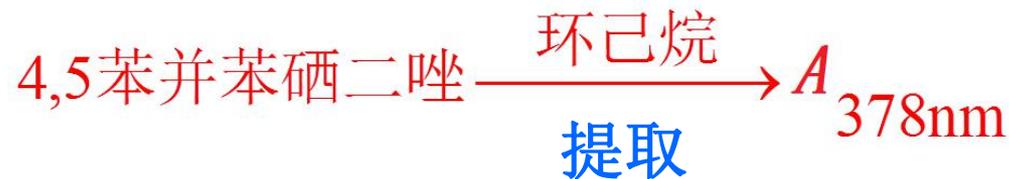
杂质限量？

$$L = \frac{0.02 \times \frac{3}{4}}{1.0} \times 100\% = 1.5\%$$



## 二、硒的检查

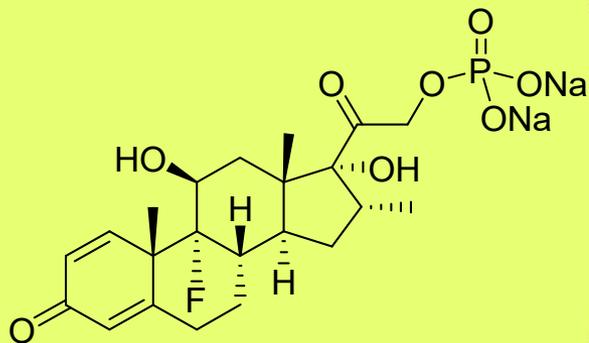
### 氧瓶燃烧法 oxygen flask combustion



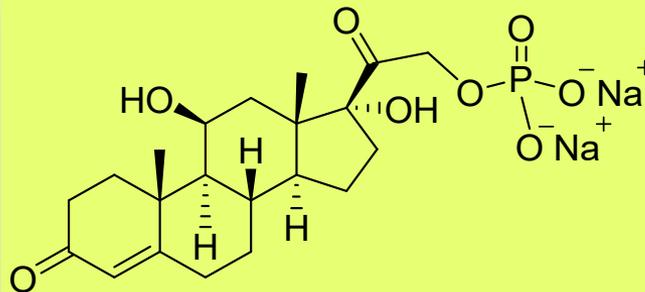
- 硒的限量：0.005%~0.01%



### 三、游离磷酸盐



地塞米松磷酸钠



氢化可的松磷酸钠



倍他米松磷酸钠  
氢化泼尼松磷酸钠



检查方法：对照品法      0.035mg/ml

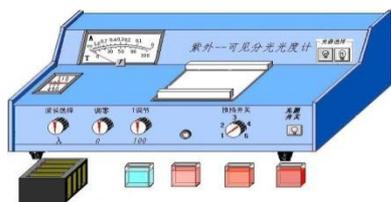
# 示例：地塞米松磷酸钠中游离磷酸盐的检查



**20mg**

**2.5ml 钼酸铵硫酸试液；**

**1ml 1-氨基-2-萘酚-4-磺酸试液**



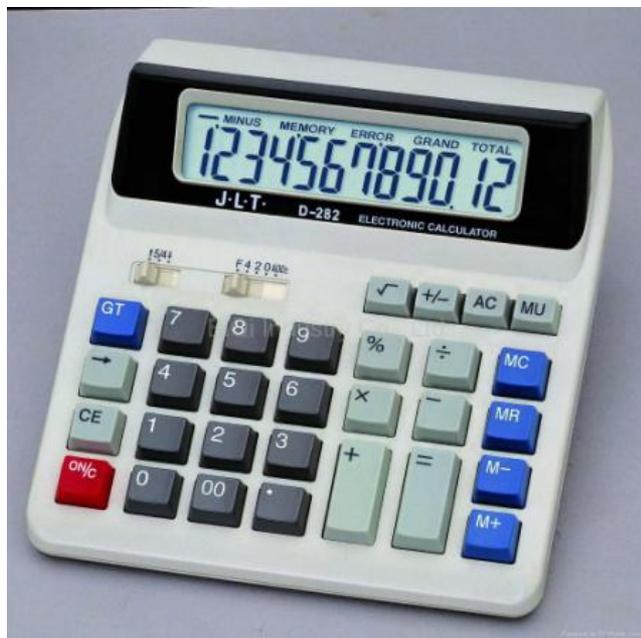
**740nm处测定吸收度**



**标准品4ml**

**0.035mg/ml**





**0.035mg/ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$**

**相当于**

**0.025mg/ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$**



**人民卫生出版社**  
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

# 第四节 含量测定



- 一、高效液相色谱法
- 二、紫外-可见分光光度法



# (一) HPLC法

- USP、BP、JP均采用
- RP-HPLC (大多内标法)

(甾体激素类药物常含有结构相似的其他甾体杂质，色谱法可消除它们的干扰)

## 测定对象

- 甾体激素类药物的原料和制剂



## 离子对液 相色谱

示例：地塞米松磷酸钠的含量测定

- 色谱条件：固定相 **ODS**，流动相 三乙胺溶液-甲醇-乙腈（**55：40：5**）
- 检测波长**242nm**
- 系统适用性试验： $n > 7000$ ，地塞米松磷酸钠峰和地塞米松峰分离度应大于**4.4**



流动相

真空脱气机

四元泵

自动进样器

紫外检测器

荧光检测器

蒸发光散射检测器



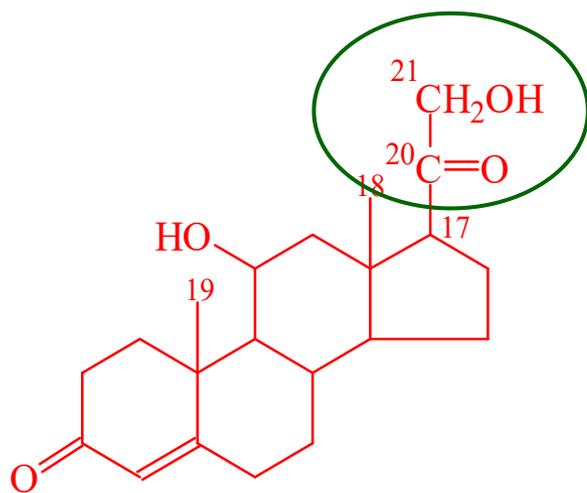
## (二) 紫外-可见分光光度法

### 1. 紫外分光光度法

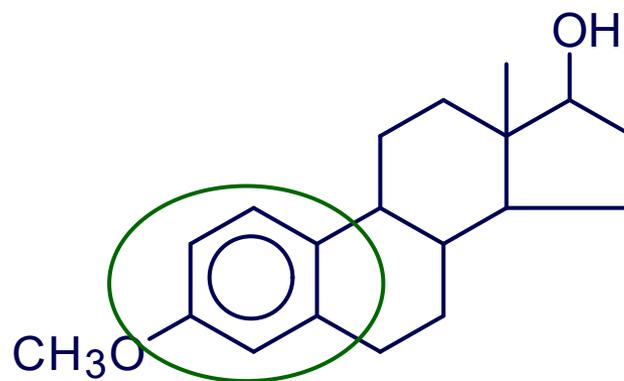
- 曾广泛应用于甾体激素药物的含量测定，但专属性不强，目前已逐步被高效液相色谱法取代，仅有少量药物及制剂采用紫外分光光度法测定含量。如ChP2015醋酸泼尼松龙片的含量测定。



## 2. 比色法



四氮唑比色法



柯柏反应比色法



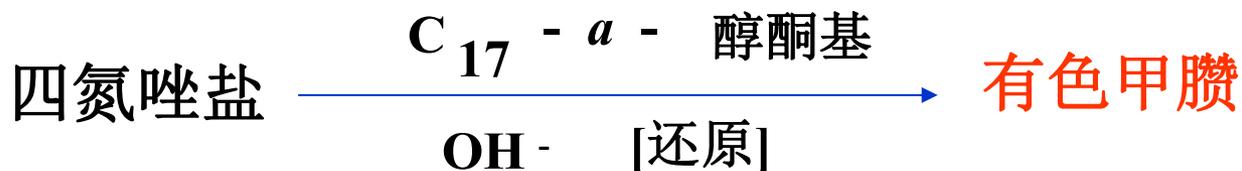
# 四氮唑比色法

## 1.原理

肾上腺皮质激素类

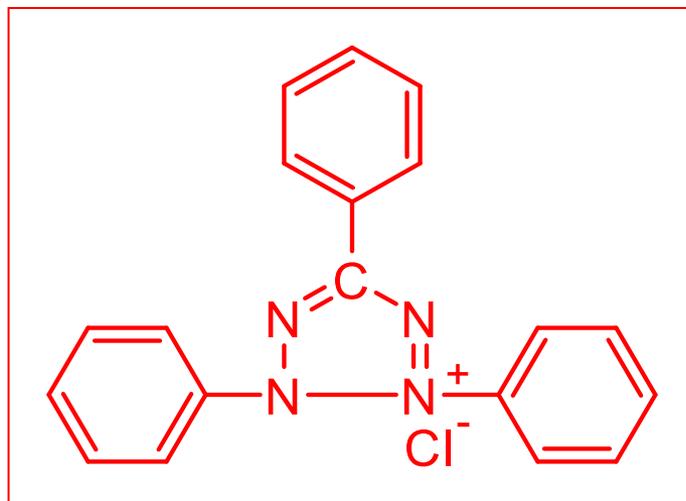
$C_{17-\alpha}$ -醇酮基

强还原性

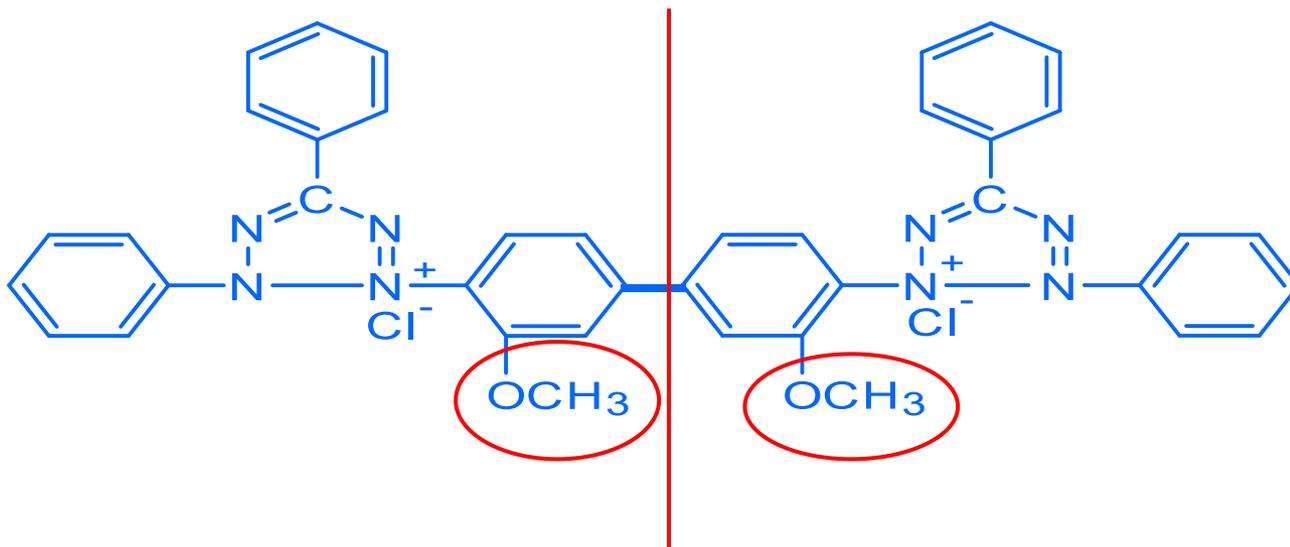


## 2. 四氮唑盐的种类

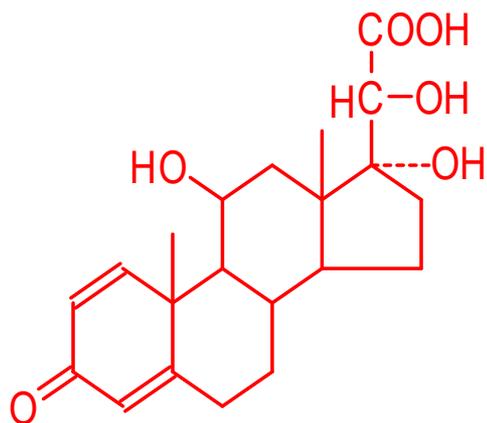
- (1) 红四氮唑：2,3,5—三苯基氯化四氮唑  
(2,3,5—**triphenyl**tetrazolium**chloride**)  
**TTC** 或 **RT** (Red tetrazolium)



(2) 蓝四氮唑：3,3'-二甲氧苯基-双-4,4'-(3,5-二苯基) 氯化四氮唑 {3,3-dianisole-bis[4,4'-(3,5-diphenyl) tetrazolium chloride]} BT ( **B**lue **t**etrazolium )



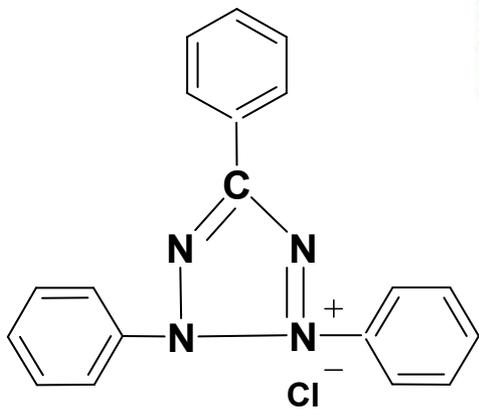
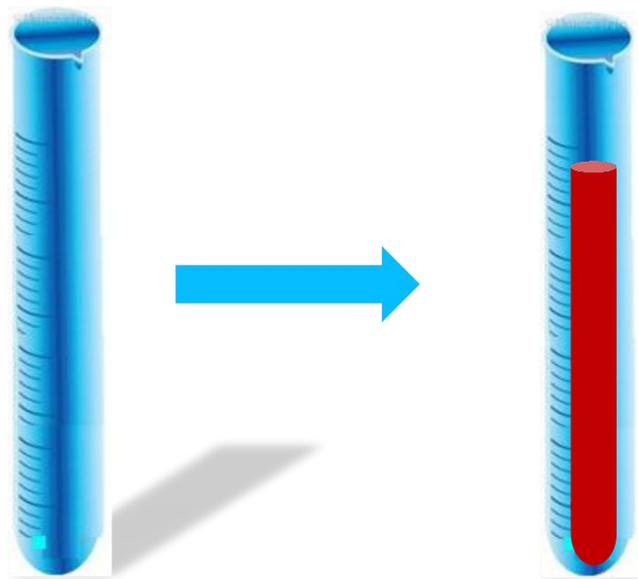
### 3. 反应过程



**20-羟基-21-羧酸衍生物**



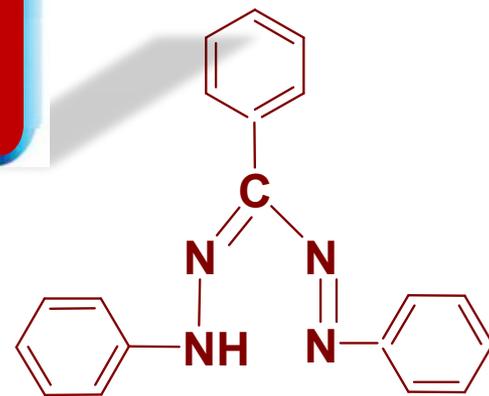
氧化剂I：



红四氮唑 (RT)

+2e

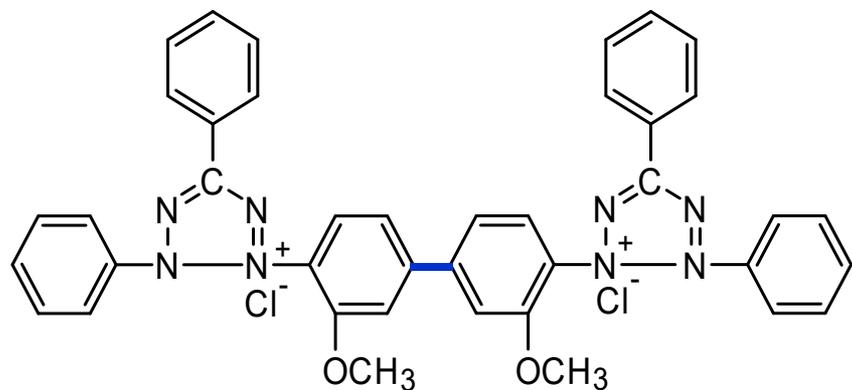
[OH<sup>-</sup>]



三苯甲脞↓深红

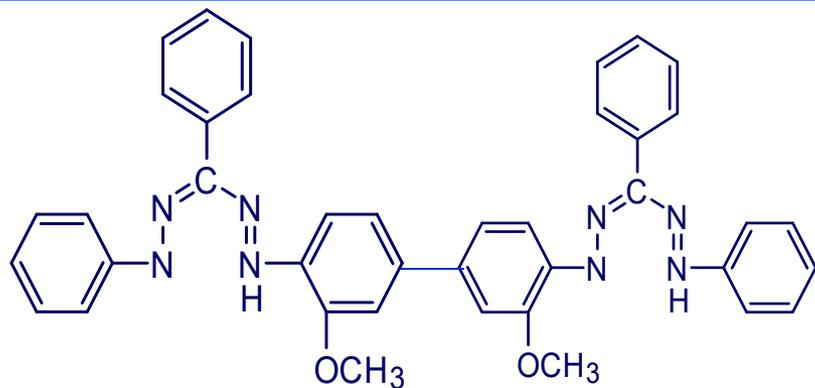
$\lambda_{\max} = 480 \sim 490\text{nm}$

## 氧化剂II



[OH<sup>-</sup>]

+4e



蓝四氮唑 (BT)



双甲胍 (暗蓝)

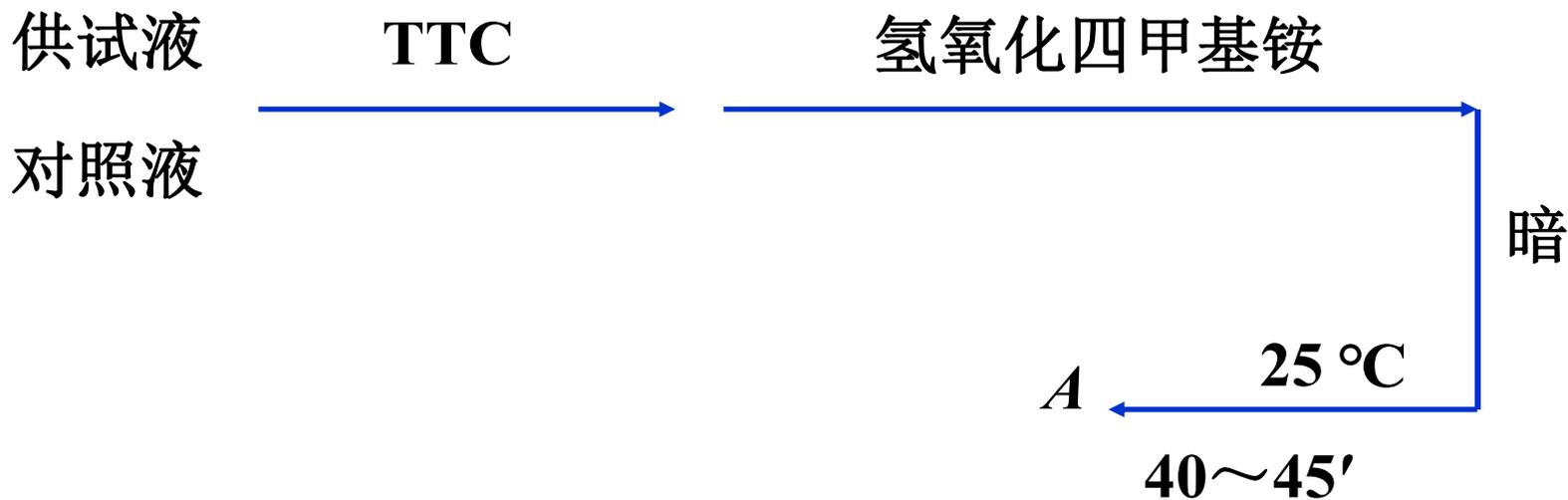
$\lambda_{\max} = 525 \text{ nm}$



人民卫生出版社  
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

## 4. 测定方法

### 对照品法



## 5.讨论

### (1) 基团对反应速度的影响

1)  $C_{21}-OH > C_{21}-酯$

即：游离体 > 酯类

如：可的松 > 醋酸可的松

2) 简单酯 > 复杂酯

• 醋酸酯 > 磷酸酯 > 琥珀酸酯 > 三甲基醋酸酯



## (2) 碱的种类及加入顺序

氢氧化四甲基铵  
四氮唑盐 碱试液

## (3) 溶剂、水分的影响

- 1) 常用无水乙醇  
含水量  $< 5\%$
- 2) 要用无醛醇



## (4) 其他因素

- 光线与O<sub>2</sub>的影响
- 温度与时间的影响

**ChP    25°C    40~45分钟**

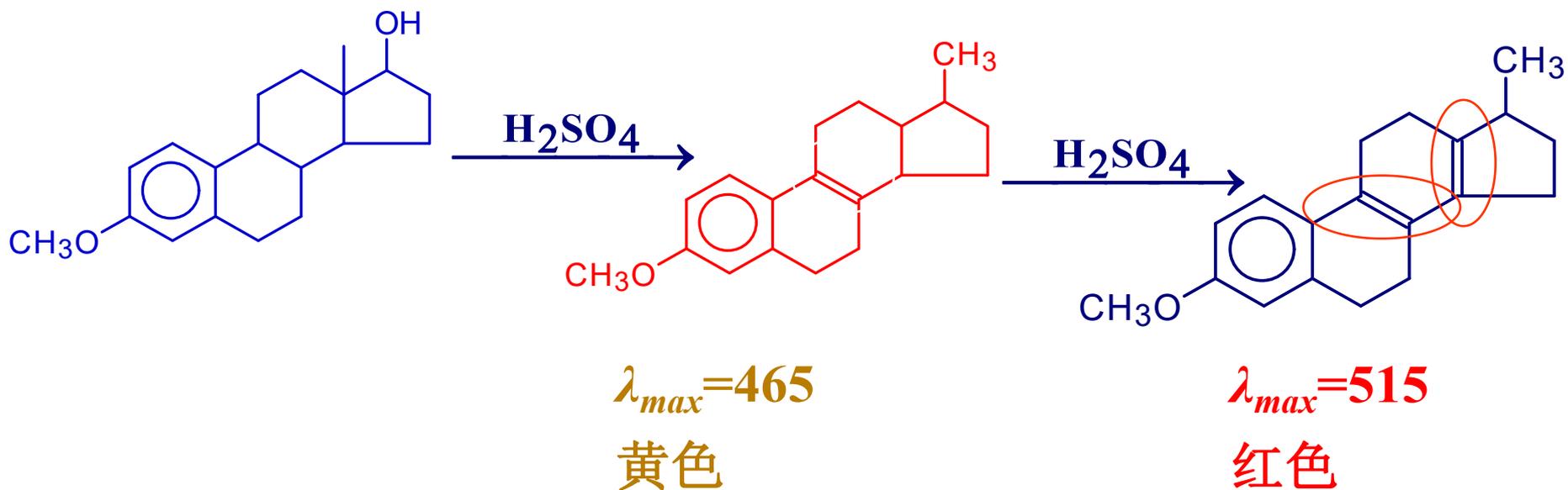
**BP      30°C    1小时**

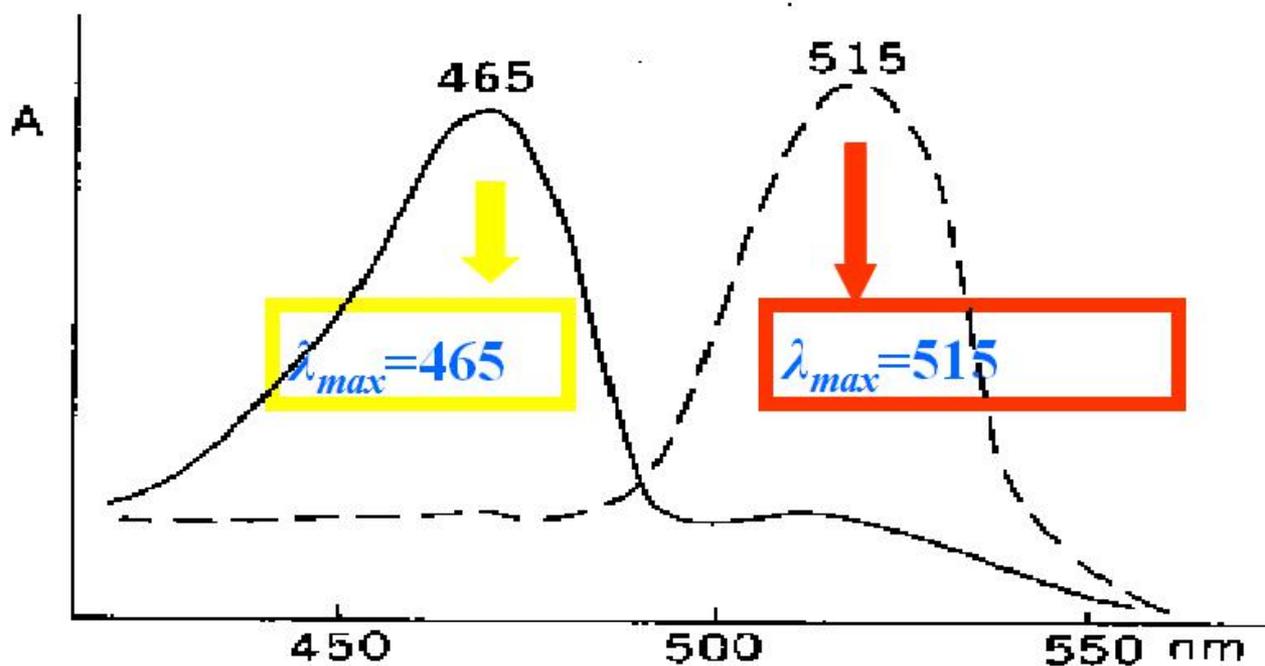


# Kober反应比色法

## 1. 原理

- 雌激素+硫酸-乙醇  $\lambda_{max}=515\text{nm}$

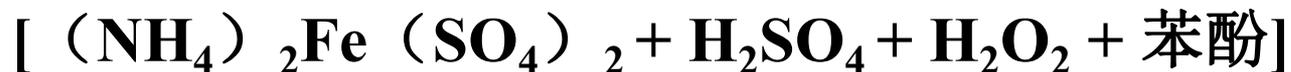




雌二醇 Kober 反应的吸收光谱  
实线为第一步反应  
虚线为第二步反应



## 铁—酚试剂



### 铁盐的作用

- 加快黄色产物的形成、转化
- 加强红色产物的稳定性

### 酚的作用

- 加快红色产物的形成
- 消除反应产生的荧光



# 含量测定小结

高效液相色谱法	紫外分光光度法	比色法
<b>ODS</b> 甲醇-水or乙腈-水 三乙胺-甲醇-乙腈	逐渐被HPLC取代	四氮唑 柯柏反应



# 第五节

## 体内甾体激素类药物分析



1

药物代  
谢研究

2

生物利用  
度研究

3

违禁药  
物监测

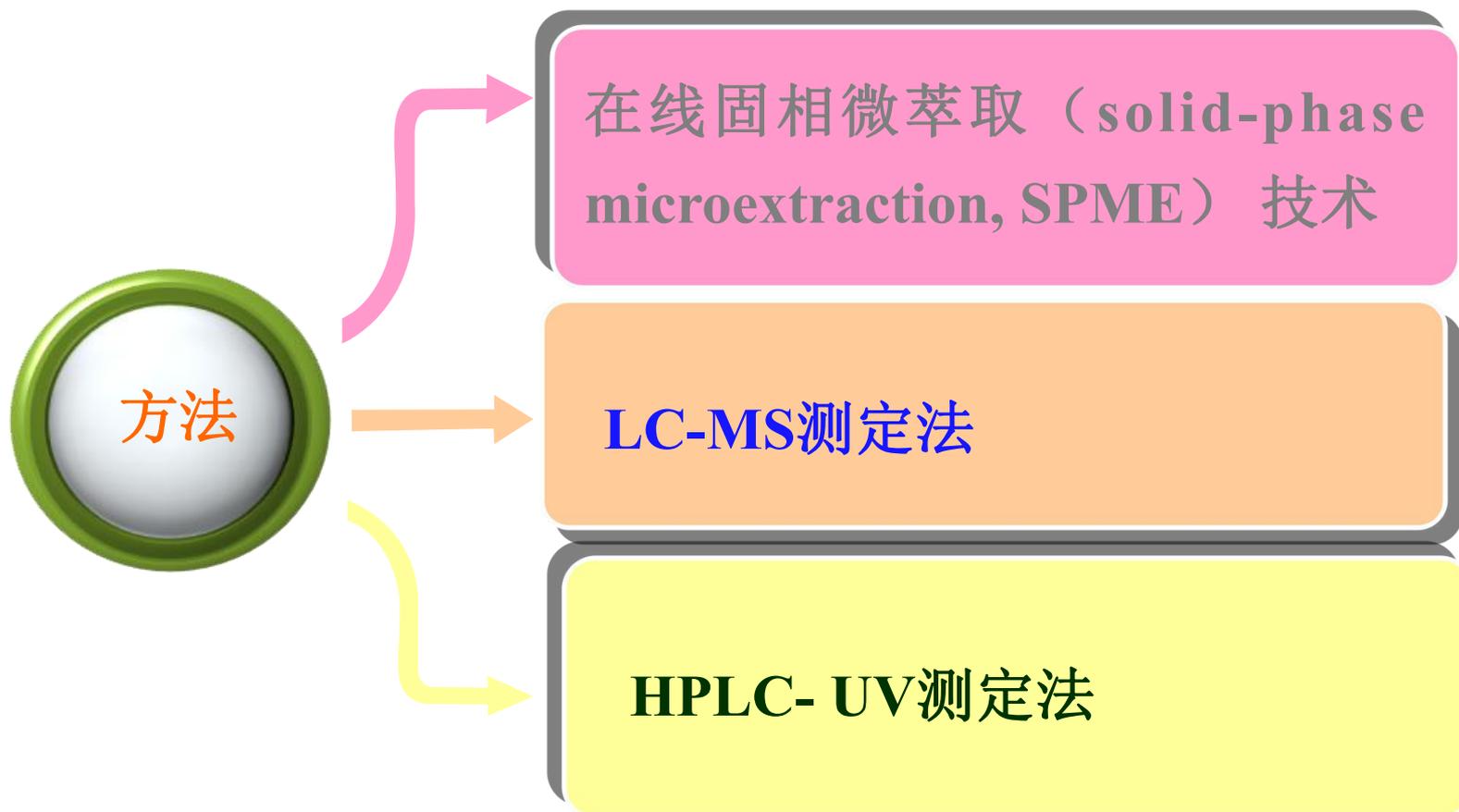


## 此类分析的特点

- 方法的专属性强
- 给药剂量很小
- 药物浓度低
- 分析方法的灵敏度较高



## 竞技运动员体内违禁甾体激素药物的分析



## 示例：尿中违禁同化激素的SPME/LC-MS检查

```
graph LR; A[对受试对象给药，一定时间后采集尿样] --> B[加内标物，调节pH，加酶进行水解一段时间，离心，取上清液。]; B --> C[用上述制的的样品，进行SPME处理，分离纯化后经LC-MS分析];
```

对受试对象  
给药，一定  
时间后采集  
尿样

加内标物，调  
节pH，加酶进  
行水解一段时  
间，离心，取  
上清液。

用上述制的的  
样品，进行  
SPME处理，  
分离纯化后经  
LC-MS分析





**Thank you very much!**



**人民卫生出版社**

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE