



第十七章

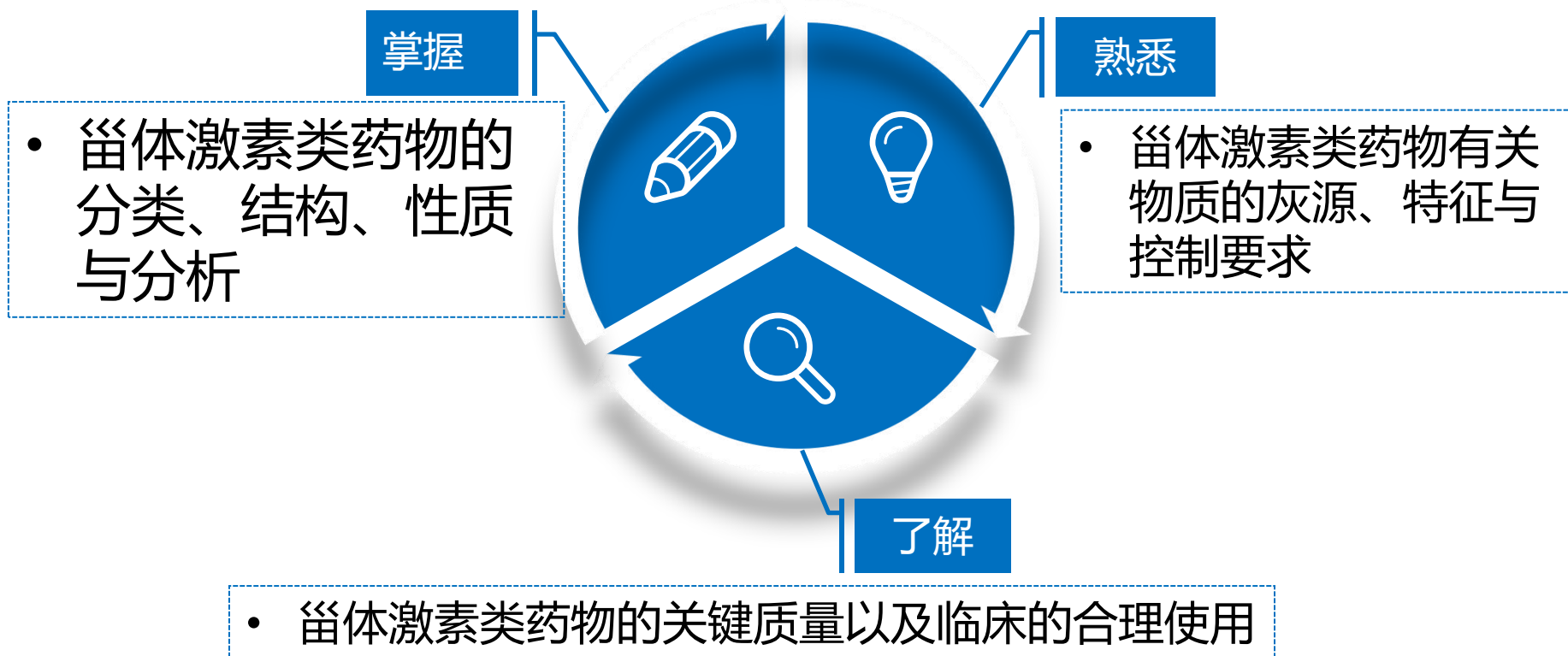
载体激素类药物的分析



目录

- ✦ 第一节 结构与性质
- ✦ 第二节 鉴别试验
- ✦ 第三节 有关物质与检查
- ✦ 第四节 含量测定

重点难点



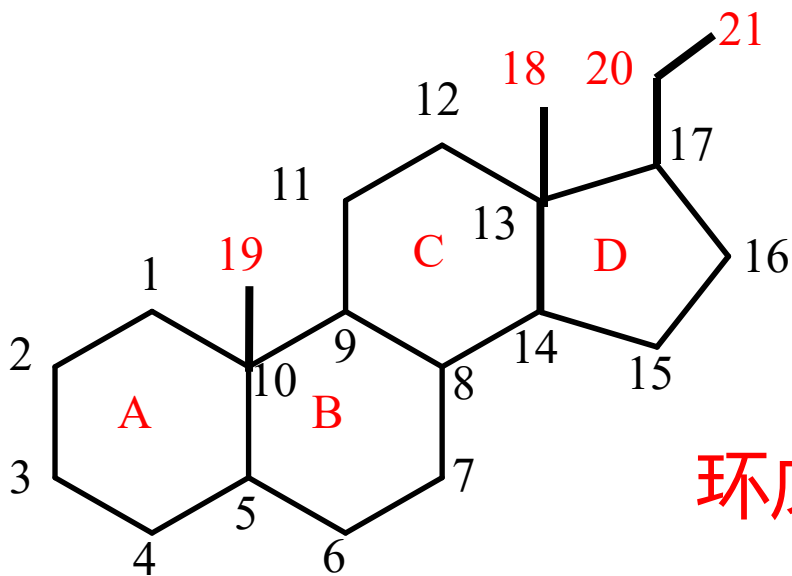


第一节 结构与性质



第一节 结构与性质

结构特点：基本母核



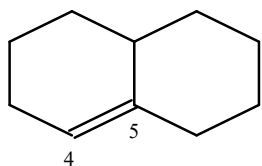
环戊烷骈多氢菲



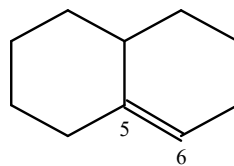
第一节 结构与性质

环上双键的表示方法：

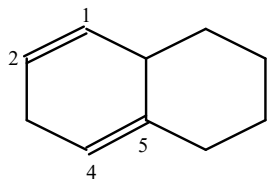
用“ Δ ”表示双键的位置： Δ 双键位置



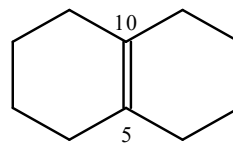
Δ^4



Δ^5



$\Delta^{1,4}$



$\Delta^{5(10)}$



第一节 结构与性质

分类：按药理作用

甾体激素

肾上腺皮质激素

雄激素及蛋白同化激素

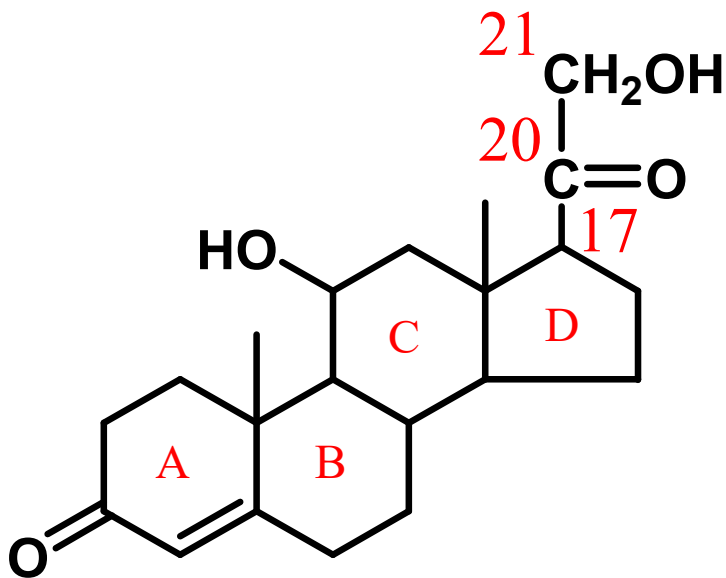
孕激素

雌激素



第一节 结构与性质

一、典型药物与结构特点-肾上腺皮质激素



1) 含有21个C

2) A环： Δ^4 -3-酮结构（ α,β -不饱和酮）

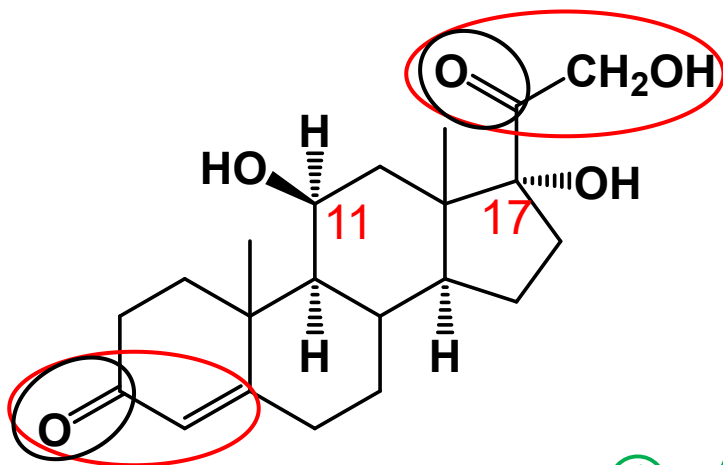
3) 17位： α -醇酮基，有还原性。

4) 其它：18位、19位 β -甲基，11位羟基、羰基等

人工合成品：

- 1、2位间有双键，
- 6α 位， 9α 位引入卤素，
- 16α 位或 16β 位引入甲基， 16α 位引入羟基等。

代表性药物

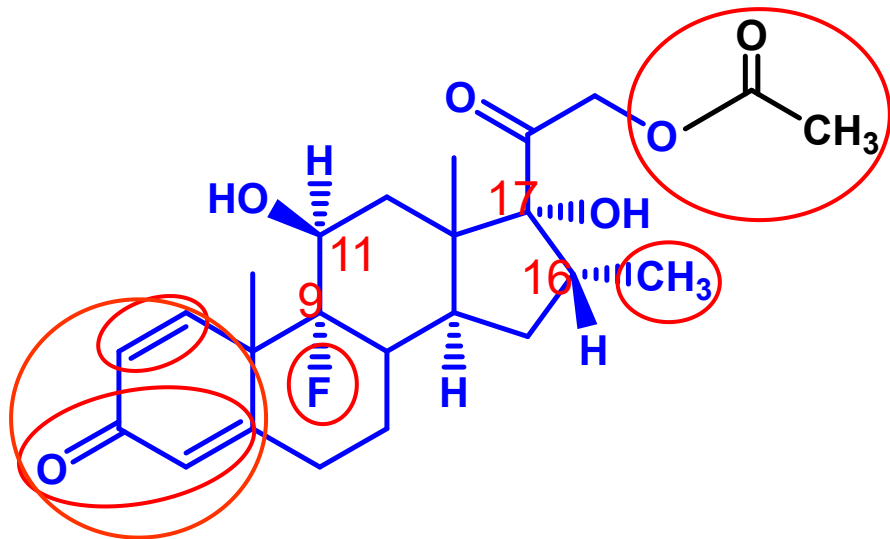


氢化可的松

Hydrocortisone

- ① A环： Δ^4 -3-酮结构
- ② C3和C20酮基
- ③ 17位： α -醇酮基，有还原性
- ④ 其它：17 α 、11 β 位羟基

代表性药物

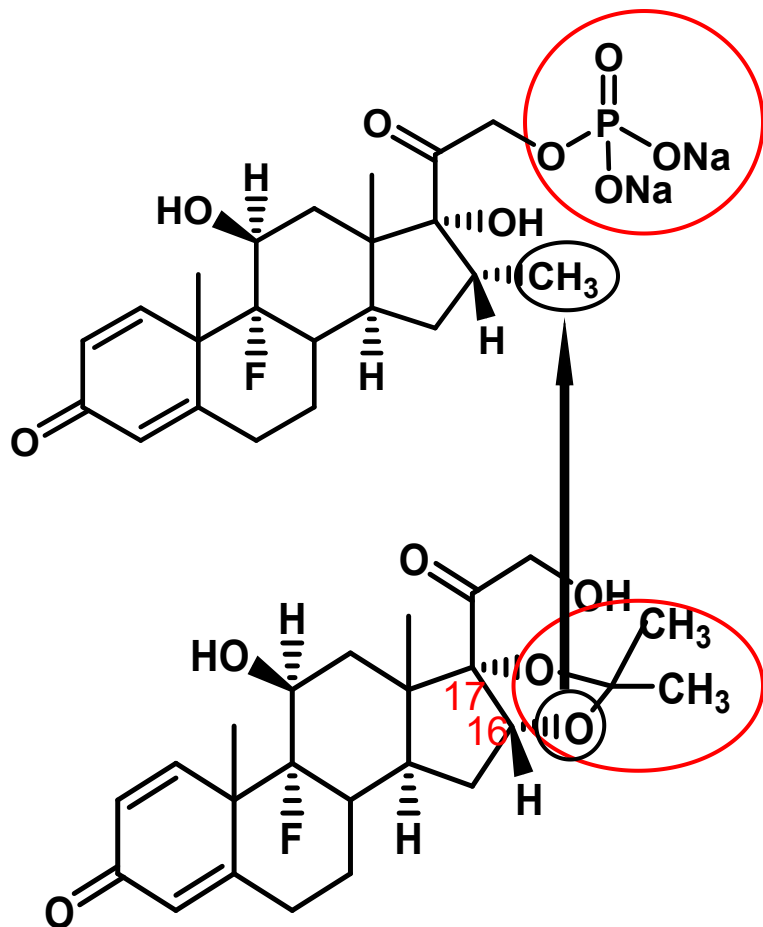


醋酸地塞米松

Dexamethasone acetate

- ① A环： Δ^4 -3-酮以及1、2位双键
- ② C3和C20酮基
- ③ 17位： α -醇酮基
- ④ 其它：11,17位羟基
- ⑤ 9 α 位氟原子。

代表性药物



地塞米松磷酸钠

Dexamethasone sodium phosphate

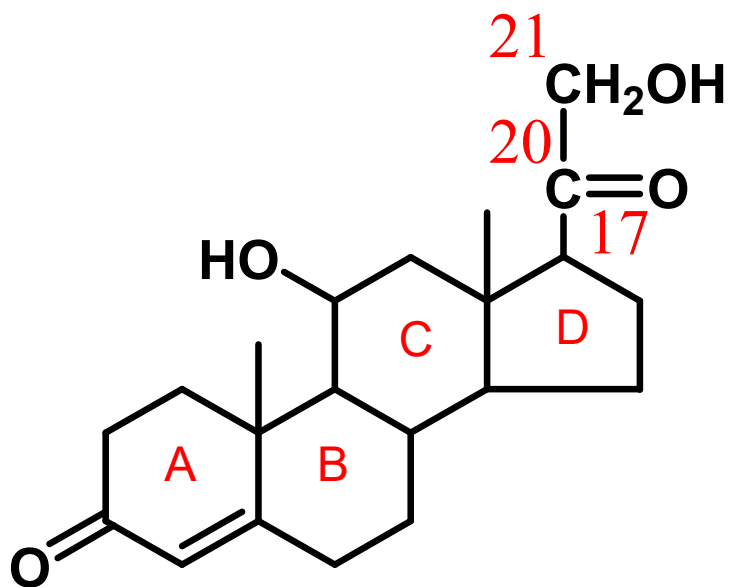
曲安奈德

Triamcinolone acetonide



第一节 结构与性质

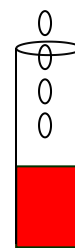
1. 肾上腺皮质激素



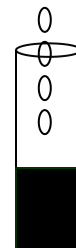
可供分析官能团

- 1) A环的 Δ^4 -3-酮
- 2) 17位的 α -醇酮基

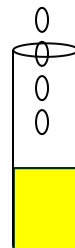
斐林
试液



多伦
试液



羰基
试剂

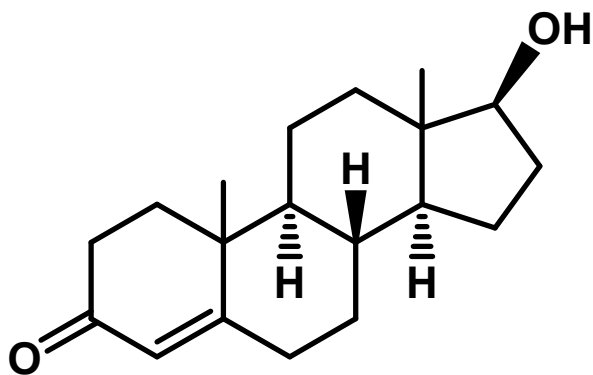




第一节 结构与性质

2. 雄性激素及蛋白同化激素

睾酮的衍生物



结构特点：

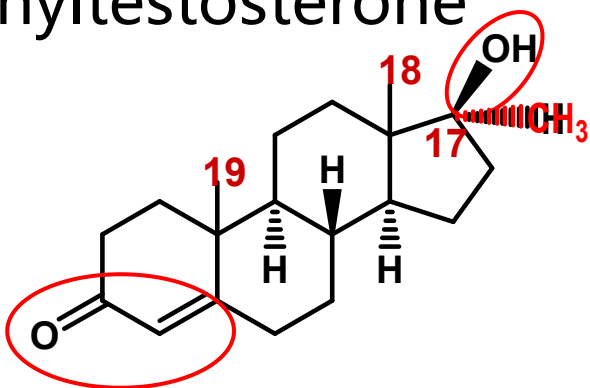
- 1) 母核含有19个C
- 2) A环的 Δ^4 -3-酮
- 3) 17位羟基、甲基、酯

代表性药物

天然的雄性激素主要为睾酮

甲睾酮

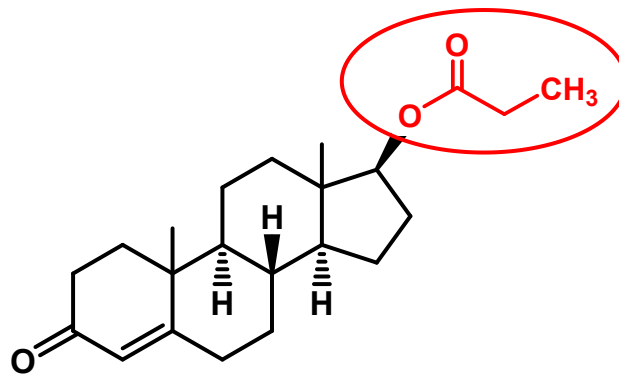
Methyltestosterone



- ① 母核含有19个C
- ② A环的 Δ^4 -3-酮
- ③ 17位羟基

丙酸睾酮

Testosterone propionate

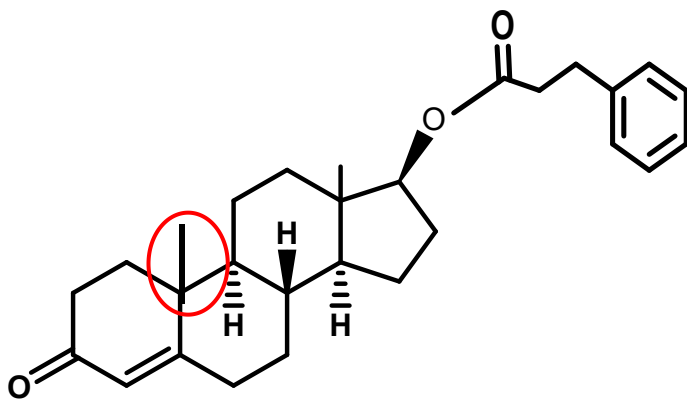


17位酯

蛋白同化激素

苯丙酸诺龙

Nandrolone phenylpropionate



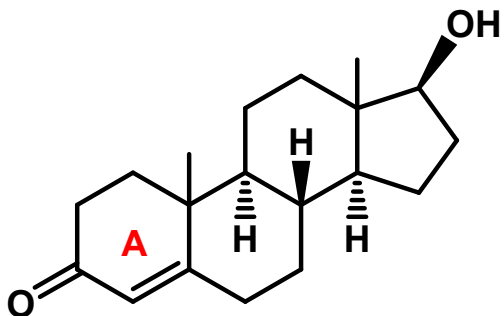
- ① 母核含有18个C
- ② 10位无角甲基
- ③ A环的 Δ^4 -3-酮
- ④ 17位酯



第一节 结构与性质

2. 雄性激素及蛋白同化激素

可供分析官能团：



1) A环 Δ^4 -3-酮

2) 3位的酮

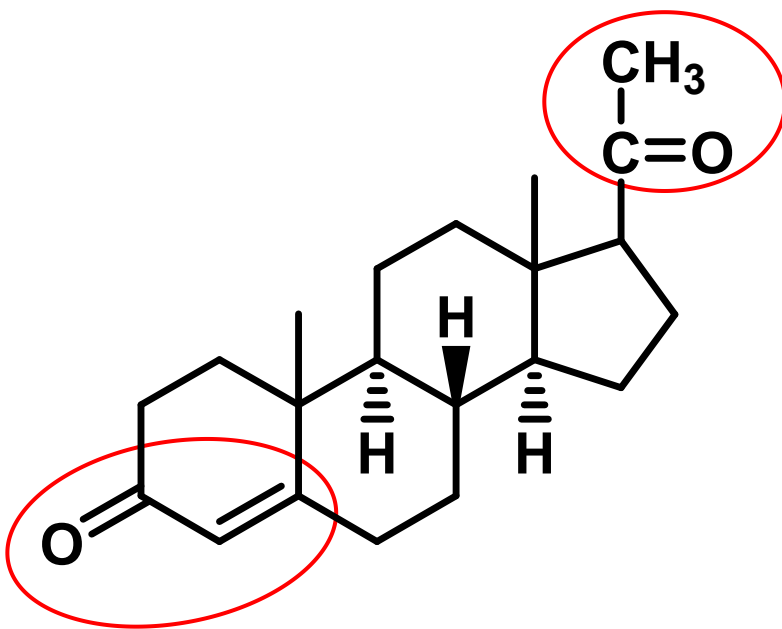
3) 17位的羟基、酯



第一节 结构与性质

3. 孕激素

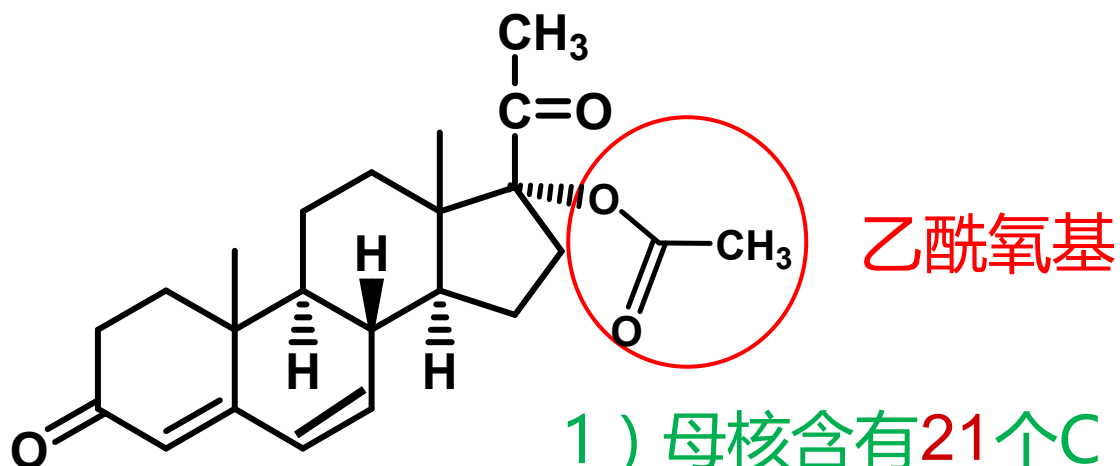
黄体酮 Progesterone



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

代表性药物

醋酸甲地孕酮
megestrol acetate



可供分析官能团：

- 1) A环的 Δ^4 -3-酮
- 2) 17位上的甲酮基

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

第一节 结构与性质

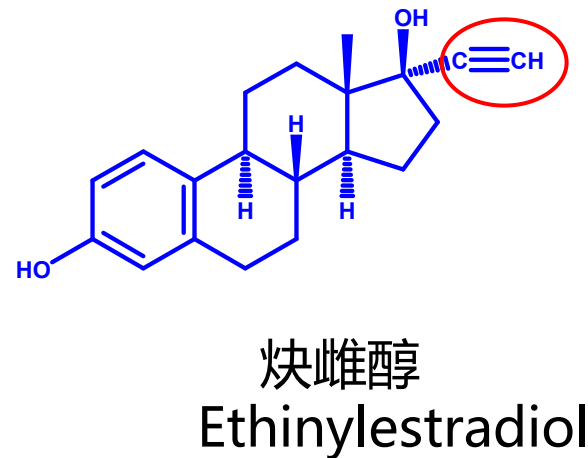
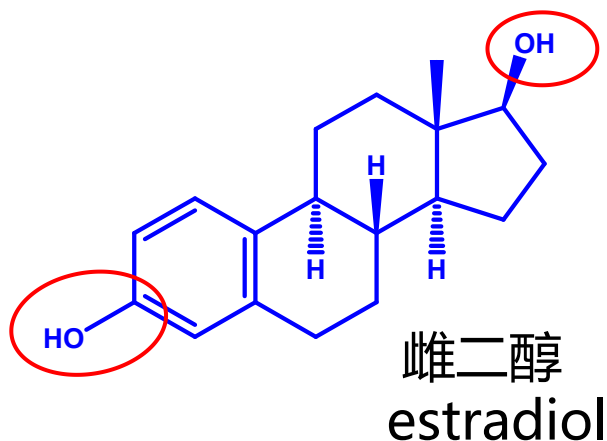
4. 雌激素

- 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： β 羟基 / 乙炔基

可供分析官能团

A环的酚羟基

17位的羟基、乙炔基





第一节 结构与性质

二、主要理化性质

1. 性状与溶解度

2. 熔点

3. 比旋度

4. 吸收系数 $E_{1cm}^{1\%}$



第一节 结构与性质

甾体激素	碳原子数	A环	17位取代基
肾上腺皮质激素	21	Δ^4 -3-酮	α -醇酮基
雄性激素	19	Δ^4 -3-酮	β -OH α -CH ₃
孕激素	21	Δ^4 -3-酮	甲酮基
雌激素	18	苯环, C ₃ -酚OH	β -OH α -C \equiv CH



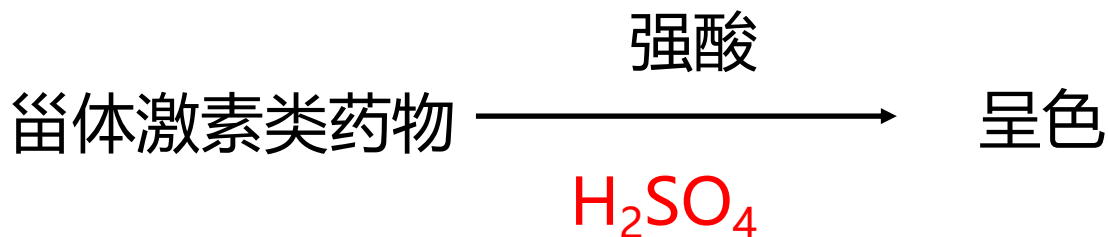
第二节 鉴别试验



第二节 鉴别试验

一、化学反应法

(一) 与强酸的呈色反应 (母核的鉴别)



显色 荧光 加水稀释

氢化可的松 棕黄至红色 绿色 黄至橙黄、微带绿色荧光絮状↓

炔雌醇 橙红 黄绿 玫红絮状↓

甲睾酮 $\xrightarrow[1\text{ml}]{\text{H}_2\text{SO}_4\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH}(2:1)}$ 黄色、黄绿色荧光



第二节 鉴别试验

二、官能团的反应

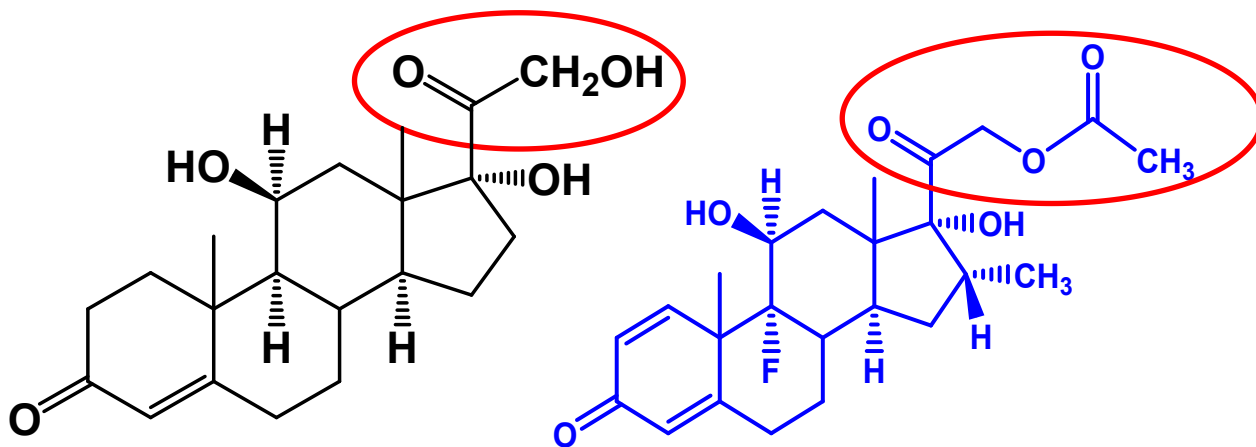
1. C_{17} - α -醇酮基的呈色反应
2. 酮基的呈色反应
3. C_{17} -甲酮基的呈色反应
4. 炔基的沉淀反应
5. 卤素的反应
6. 酯的反应

第二节 鉴别试验

二、官能团的反应

1. C₁₇- α -醇酮基的呈色反应

(肾上腺皮质激素类药物特征反应)



第二节 鉴别试验



TTC : 氯化三苯四氮唑

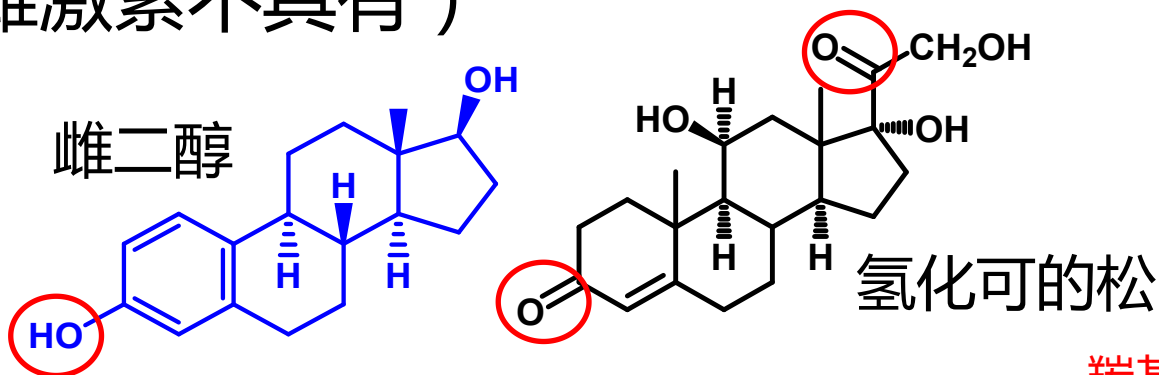
BT : 蓝四氮唑

鉴别 薄层色谱显色 含量测定

第二节 鉴别试验

2. C₃-酮基、C₂₀-酮基

(雌激素不具有)

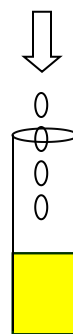


甾酮类激素药物 $\xrightarrow{\text{羰基试剂}}$ 呈色

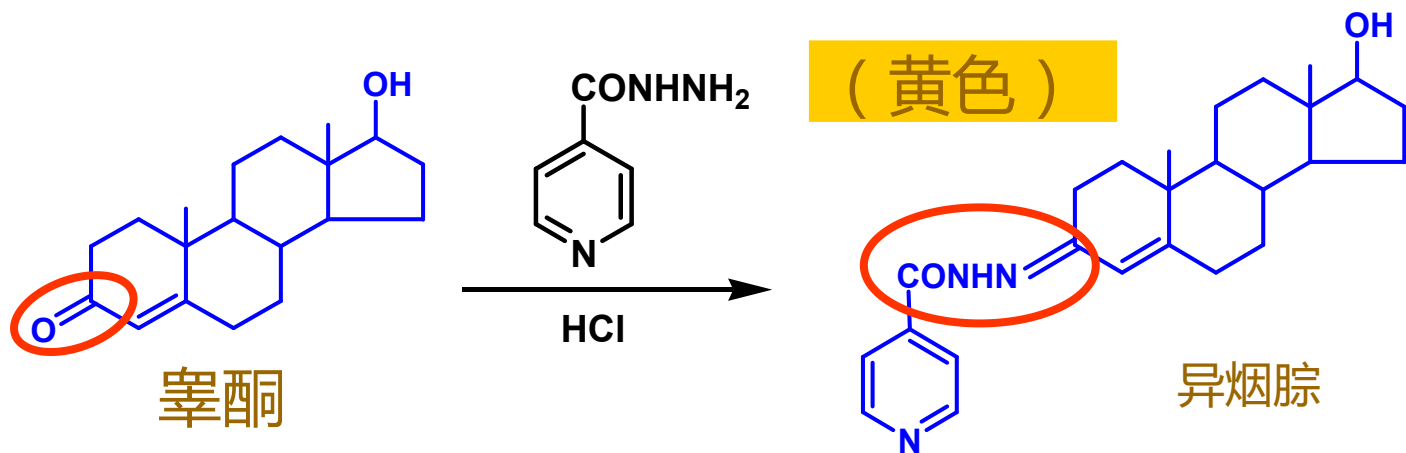
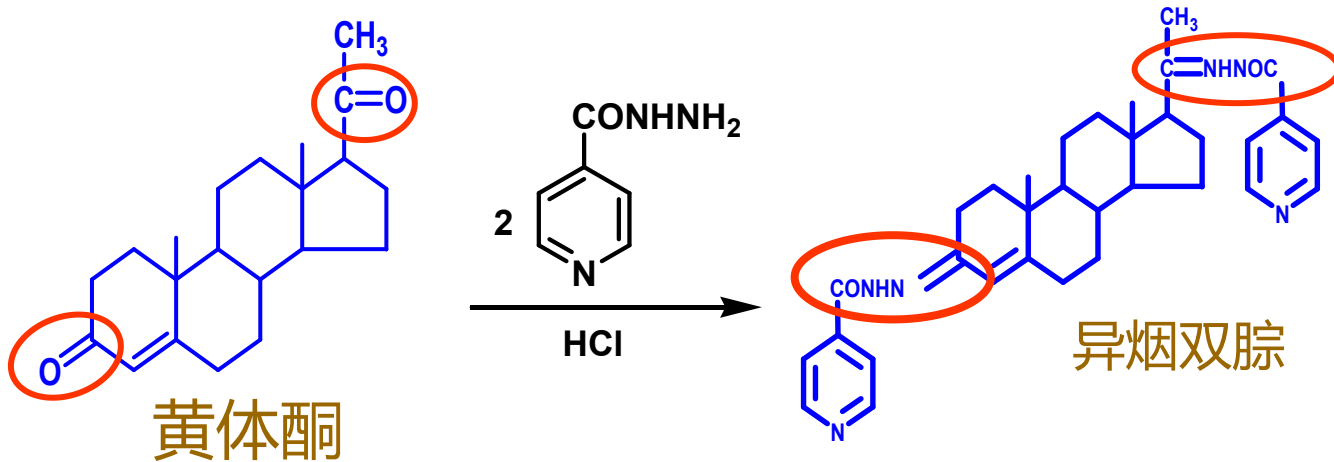
常用的羰基试剂：

2,4-二硝基苯肼、异烟肼、硫酸苯肼

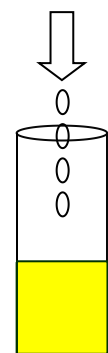
羰基试剂



第二节 鉴别试验

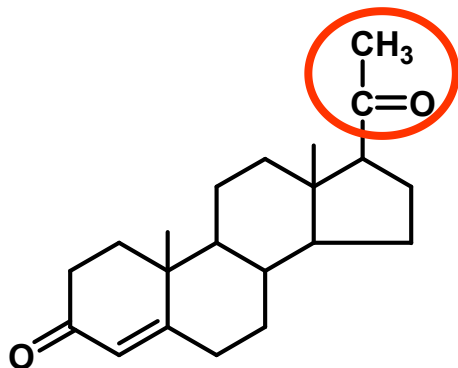


异烟肼



第二节 鉴别试验

3. C-17位甲酮基 (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

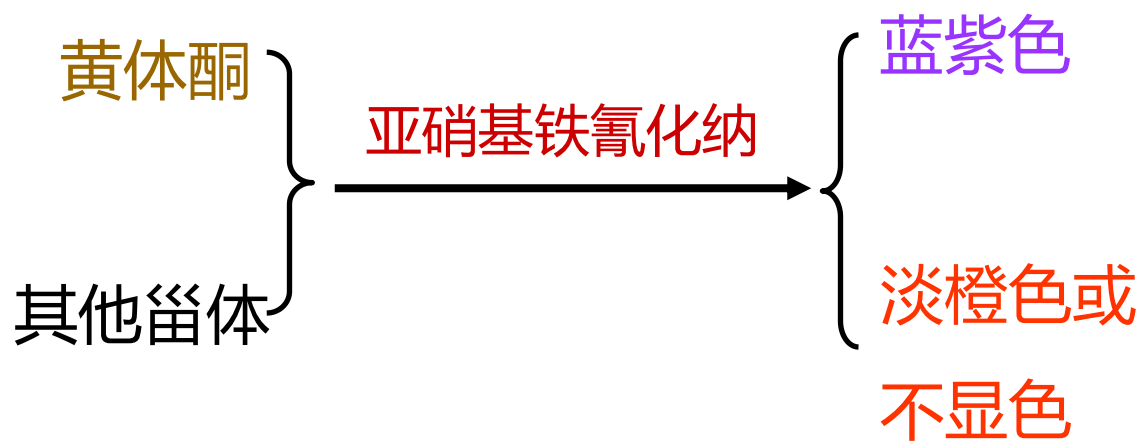
亚硝基铁氰化钠
间二硝基酚
芳香醛

呈色



第二节 鉴别试验

区别黄体酮与其他甾体



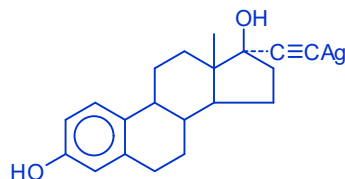
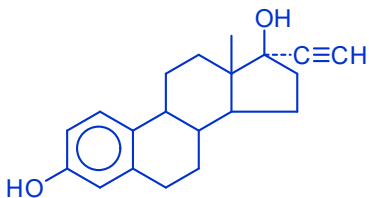
第二节 鉴别试验

4. 炔基

含炔基的
甾体激素

硝酸银

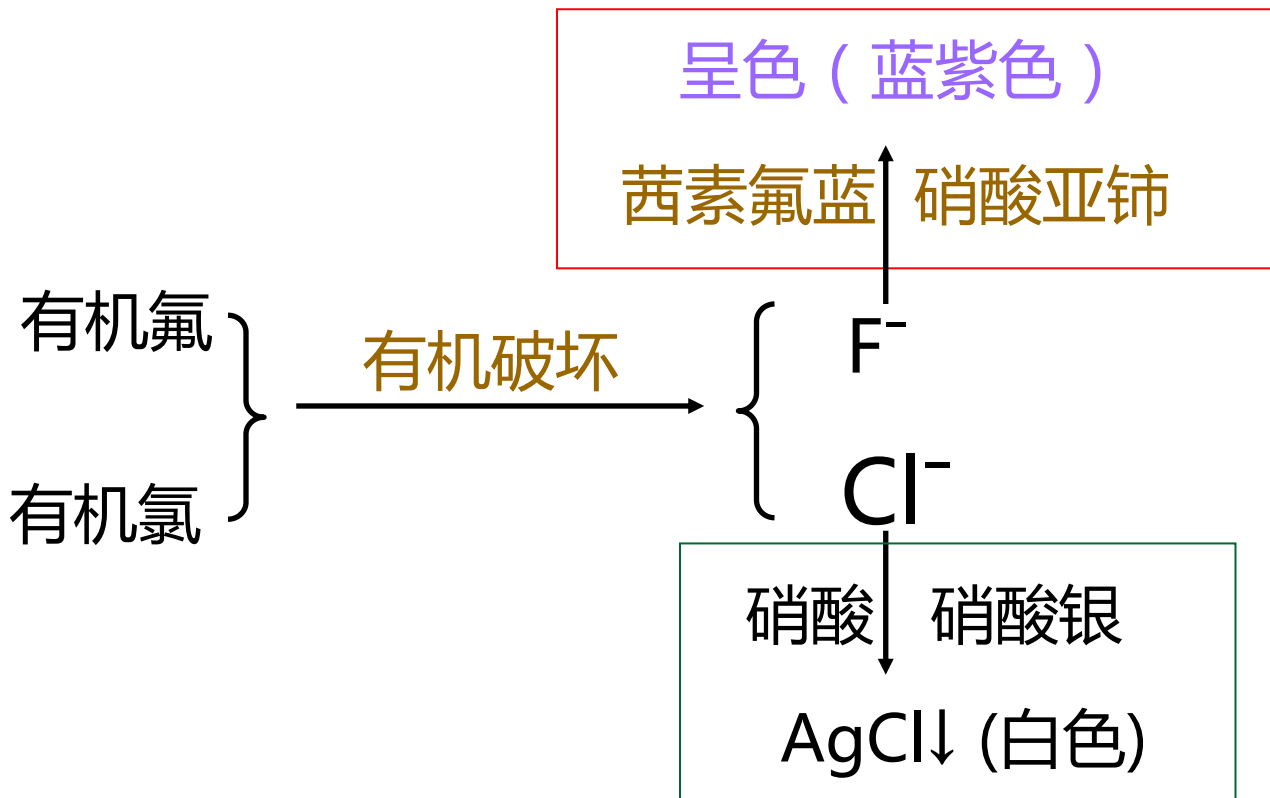
炔银沉淀





第二节 鉴别试验

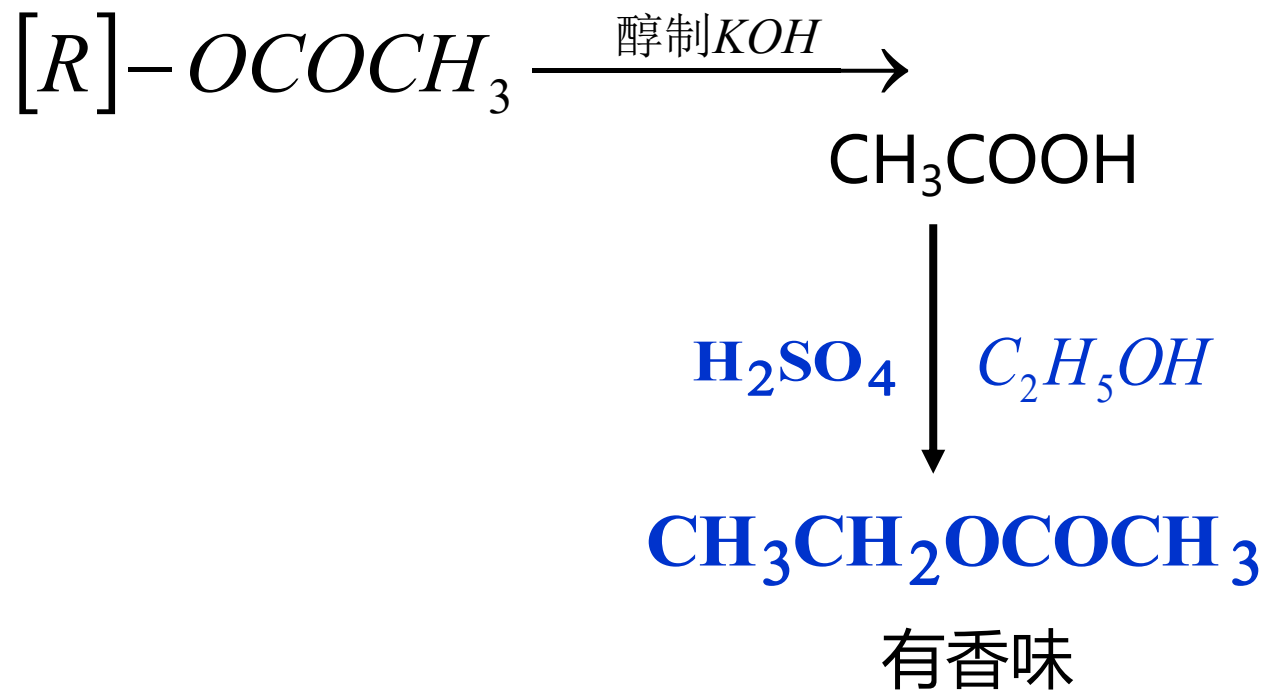
5. 有机卤素





第二节 鉴别试验

7. 酯的水解产物反应





第二节 鉴别试验

二、吸收光谱法

1. 紫外光谱法
2. 红外光谱法
3. 色谱法
 - 薄层色谱法
 - 高效液相色谱法



第二节 鉴别试验

1. UV光谱法



Δ^4 -3-酮 240nm



苯环 280nm

示例	曲安息龙	丙酸倍氯米松
溶剂	甲醇	乙醇
浓度	20 μ g/ml	20 μ g/ml
结果判断	238nm处有最大吸收	239nm处有最大吸收，A为 0.57 ~ 0.60，在239nm与263nm处的吸收度比值为2.25 ~ 2.45



第二节 鉴别试验

2. IR光谱法

ν_{O-H} 3750~3300cm⁻¹

$\nu_{\equiv CH}$ 3300~3000cm⁻¹

ν_{-CH} 3000~2700cm⁻¹

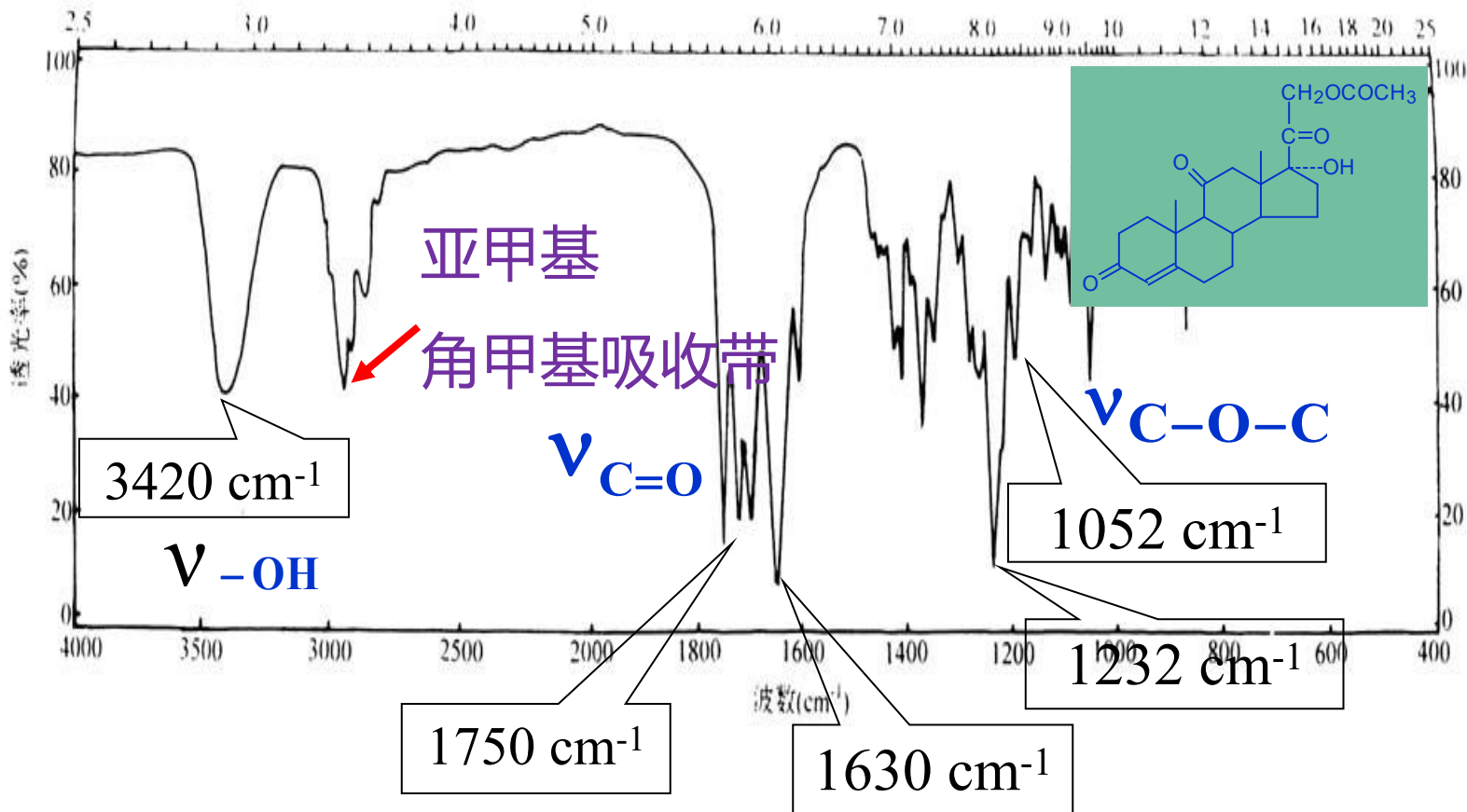
$\nu_{C=O}$ 1900~1650cm⁻¹

$\nu_{C=C}$ 1650~1450cm⁻¹

第二节 鉴别试验

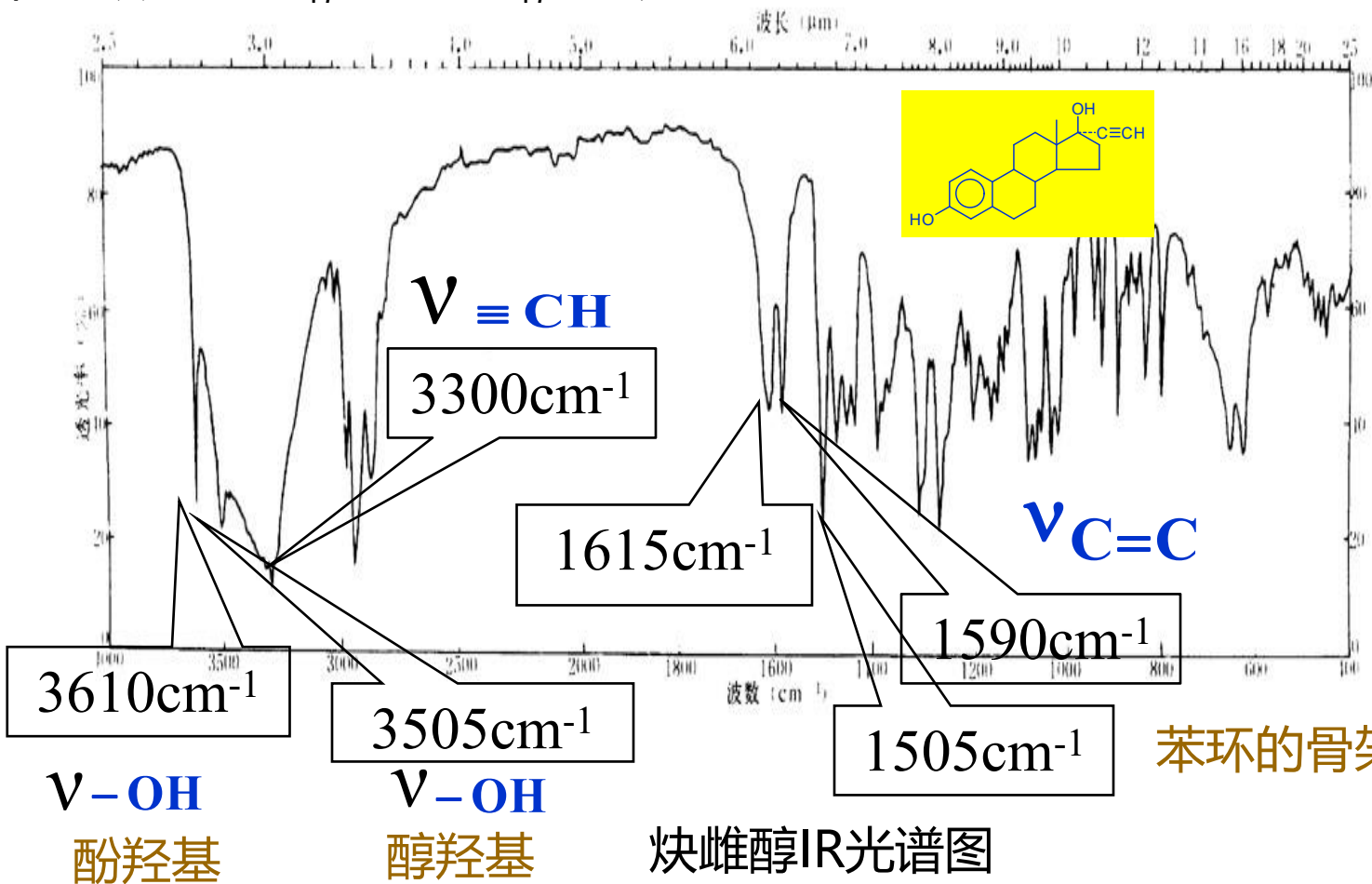
醋酸可的松IR

结构特征： Δ^4 -3-酮、 C_{17} -OH、 C_{20} -酮基、 C_{11} -酮基、醋酸酯



第二节 鉴别试验

结构特征：酚羟基、C₁₇-OH、C₁₇-乙炔基





第二节 鉴别试验

3. 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

(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



第三节 有关物质与检查

一、甲睾酮有关物质的检查

二、炔孕酮有关物质的检查

三、地塞米松磷酸钠中游离磷酸盐的检查

四、醋酸地塞米松中硒的检查

有关物质的检查
(杂质未知,甾体母核结构相似) 硒的检查



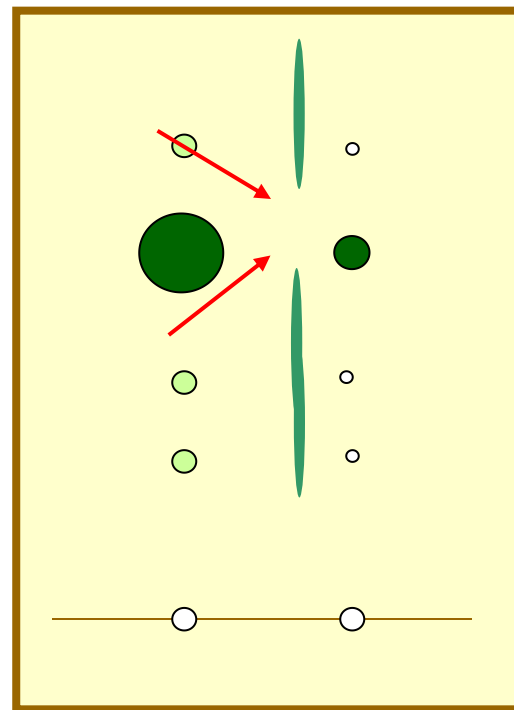
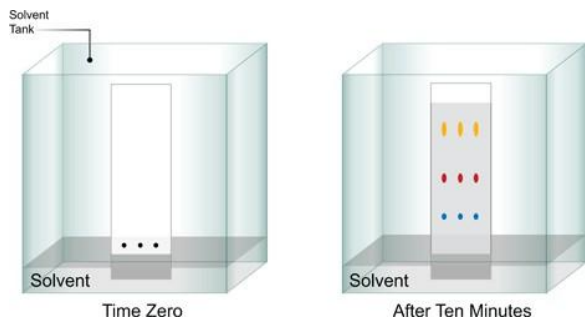
游离磷酸盐的检查

残留溶剂的检查

第三节 有关物质与检查

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

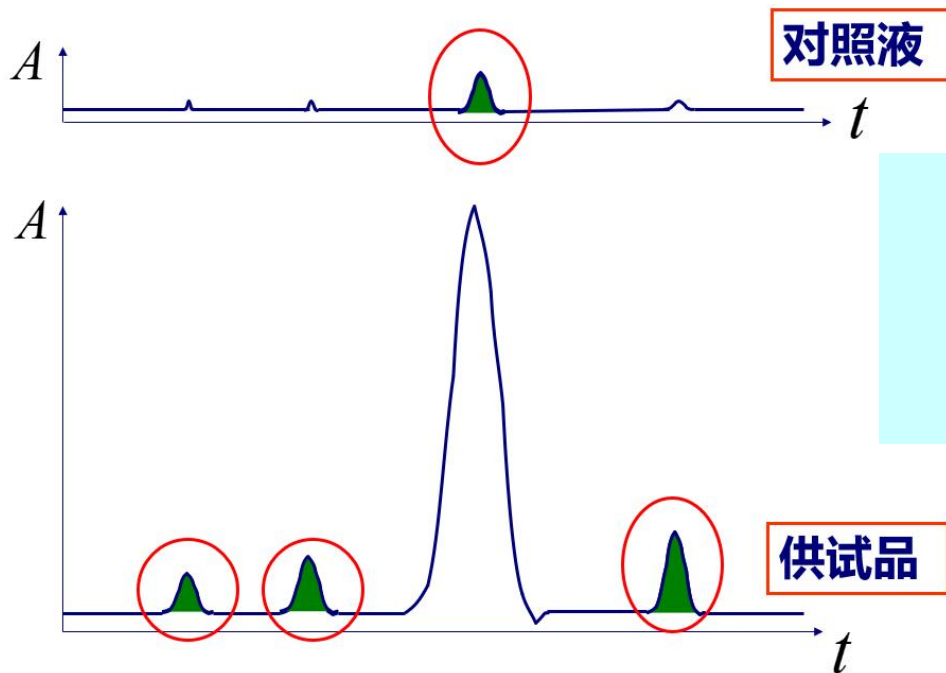


样 1 样 2

样品液1 : 0.1%-1.0% 溶液 样品液2 : 0.01%-0.1% 溶液

第三节 有关物质与检查

HPLC法（主成分自身对照法）



判定方法：

- ❖ 规定杂质峰数目
- ❖ 规定杂质峰面积



第三节 有关物质与检查

示例：黄体酮中有关物质检查

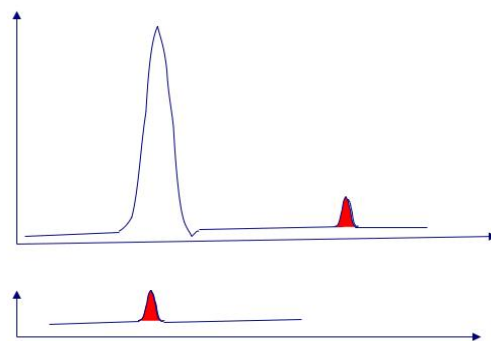
$$L = \frac{0.02 \times \frac{3}{4}}{1.0} \times 100\% = 1.5\%$$



供试液：1mg/mL



对照液：0.02mg/mL



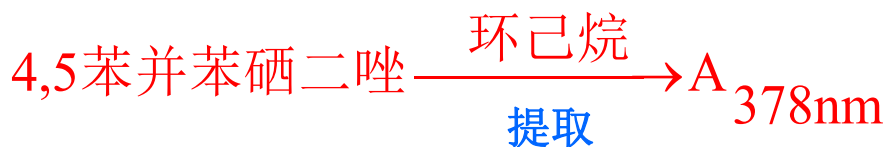
峰面积不超过对照组3/4



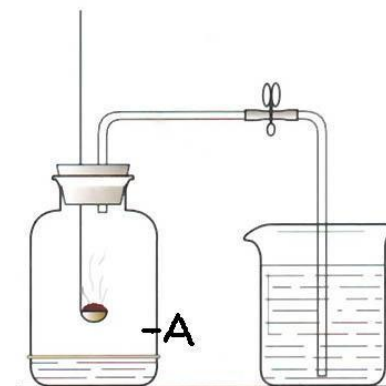
第三节 有关物质与检查

二、硒的检查

氧瓶燃烧法 oxygen flask combustion

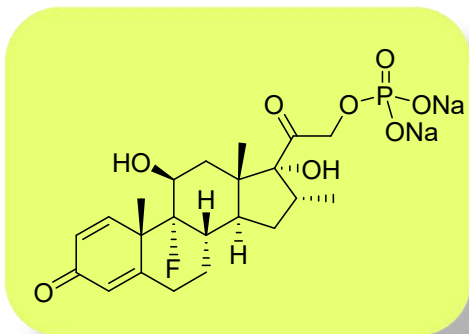


硒的限量：0.005% - 0.01%

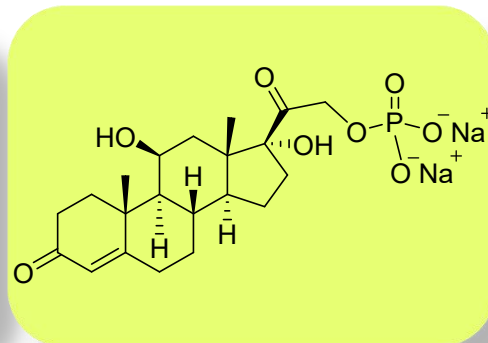


第三节 有关物质与检查

三、游离磷酸盐的检查



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



第三节 有关物质与检查

示例：地塞米松磷酸钠中游离磷酸盐的检查

0.035 mg/ml KH_2PO_4 相当于0.025 mg/ml H_3PO_4

2.5mL 钼酸铵硫酸试液；

1mL 1-氨基-2-萘酚-4-磺酸试液



标准品4mL
0.035mg/mL



$$L = \frac{4.0 \times 0.025}{20} \times 100\% = 0.5\%$$



第四节 含量测定



第四节 含量测定

- 一、高效液相色谱法（基本方法）
- 二、比色法（特征方法）

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。



第四节 含量测定

一、HPLC法

USP、BP、JP、ChP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



第四节 含量测定

示例：醋酸曲安奈德乳膏的含量测定

色谱条件：

固定相：ODS，

流动相：甲醇-乙腈（60:40）

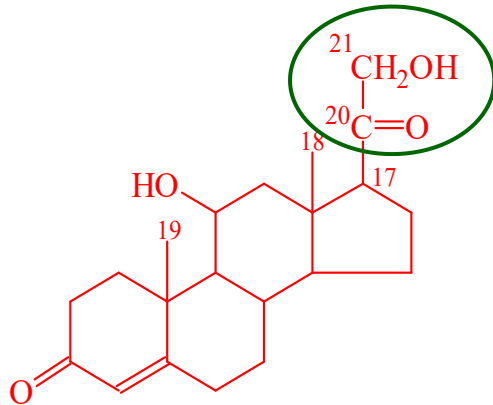
检测波长：240nm

系统适用性试验：

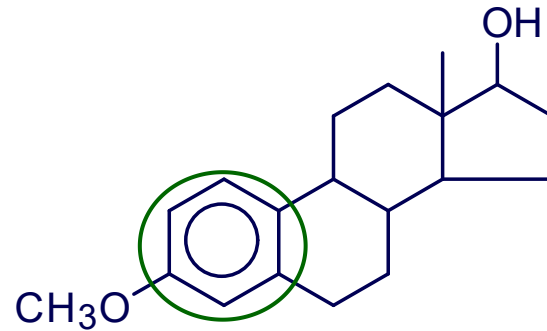
$n > 2500$ ，醋酸曲安奈德与内标物的分离度应符合要求

第四节 含量测定

二、比色法



四氮唑比色法



柯柏反应比色法



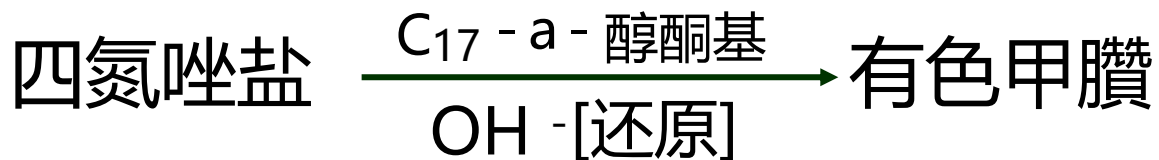
第四节 含量测定

(一) 四氮唑比色法

1. 原理

肾上腺皮质激素类 $C_{17}-\alpha$ - 醇酮基

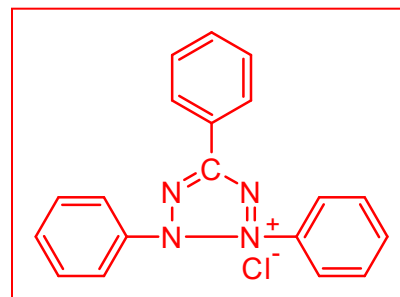
强还原性



第四节 含量测定

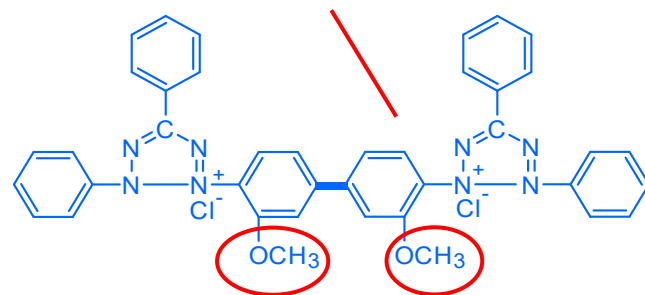
2. 四氮唑盐的种类：

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



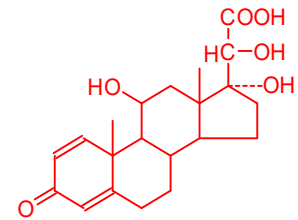
- (2) 蓝四氮唑：

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 (Blue tetrazolium)



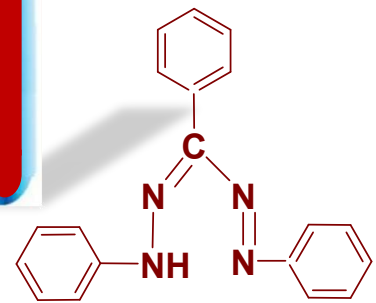
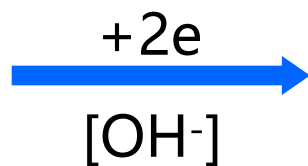
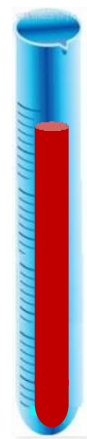
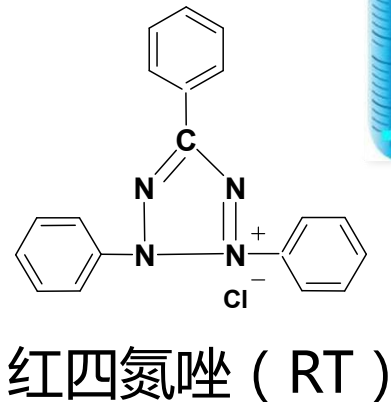
第四节 含量测定

3. 反应过程：



20-羟基-21-羧酸衍生物

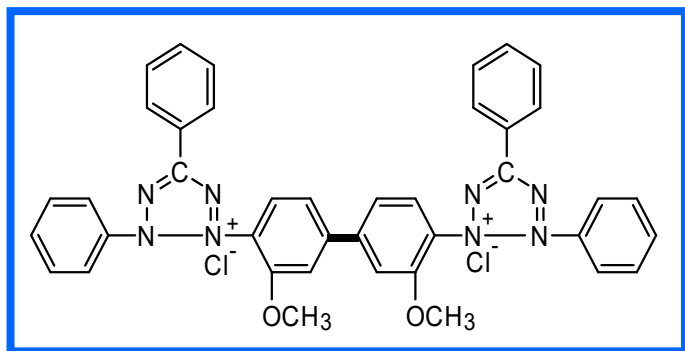
氧化剂：



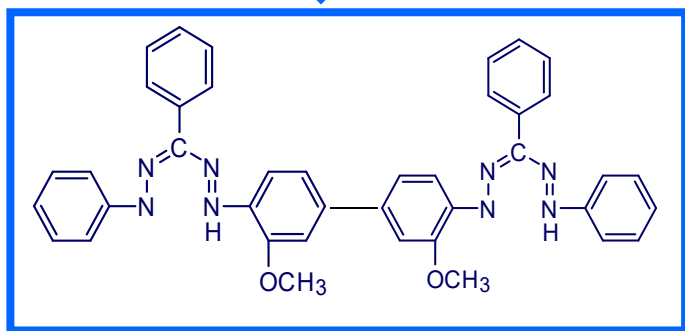
三苯甲噻↓深红

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

第四节 含量测定

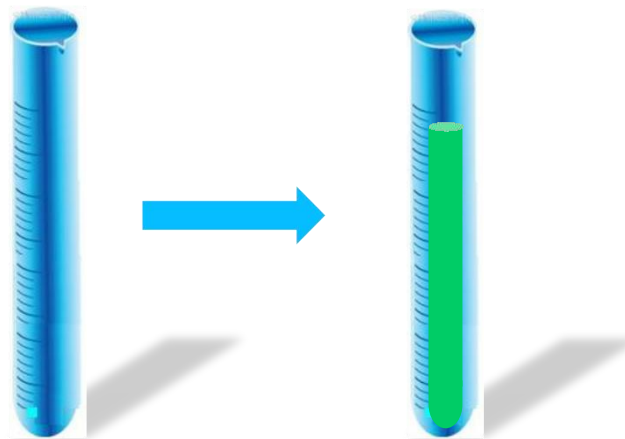


[OH⁻] + 4e



氧化剂II

蓝四氮唑 (BT)



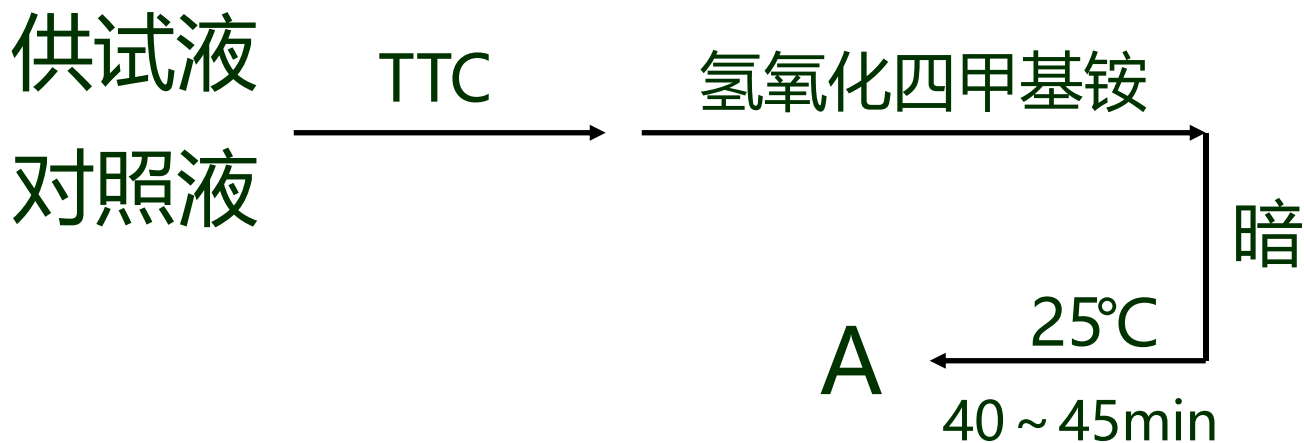
双甲啶 (暗蓝)
 $\lambda_{max} = 525nm$



第四节 含量测定

4. 测定方法

对照品法





第四节 含量测定

5. 讨论

1) 基团对反应速度的影响

a) $C_{21} - OH > C_{21} - 酯$

即：游离体 > 酯类

如：可的松 > 醋酸可的松

b) 简单酯 > 复杂酯

醋酸酯 > 磷酸酯 > 琥珀酸酯 > 三甲基醋酸

2) 碱的种类及加入顺序

氢氧化四甲基铵
加入四氮唑盐后加碱试液



第四节 含量测定

3) 溶剂、水分的影响

- a) 常用无水乙醇, 含水量 < 5%
- b) 要用无醛醇

4) 其他因素

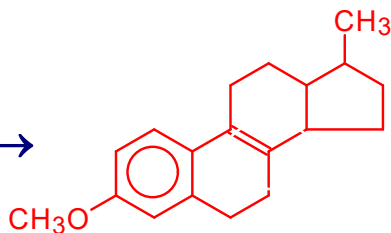
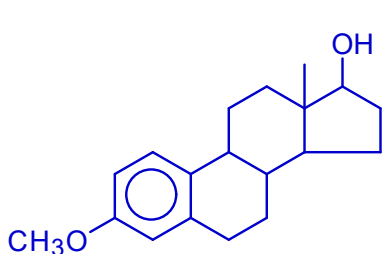
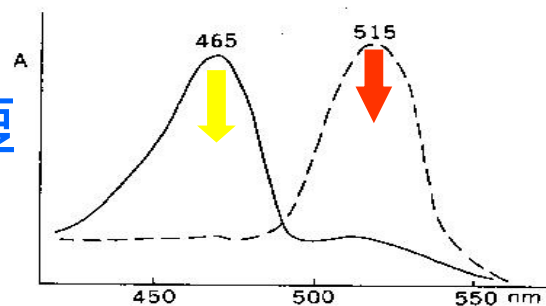
光线与O ₂ 的影响	ChP	25°C	40~45min
温度与时间的影响	BP	30°C	1h

第四节 含量测定

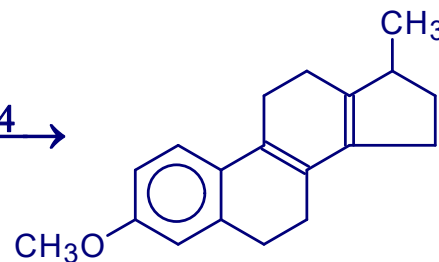
(二) Kober反应比色法

1. 原理

雌激素 + 硫酸-乙醇



$\lambda_{max} = 465$, 黄色

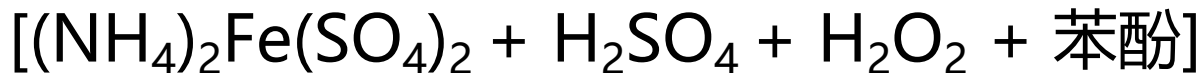


$\lambda_{max} = 515$, 红色



第四节 含量测定

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

(三) 体内样本中甾体激素类药物的分析

1

药物代谢
研究

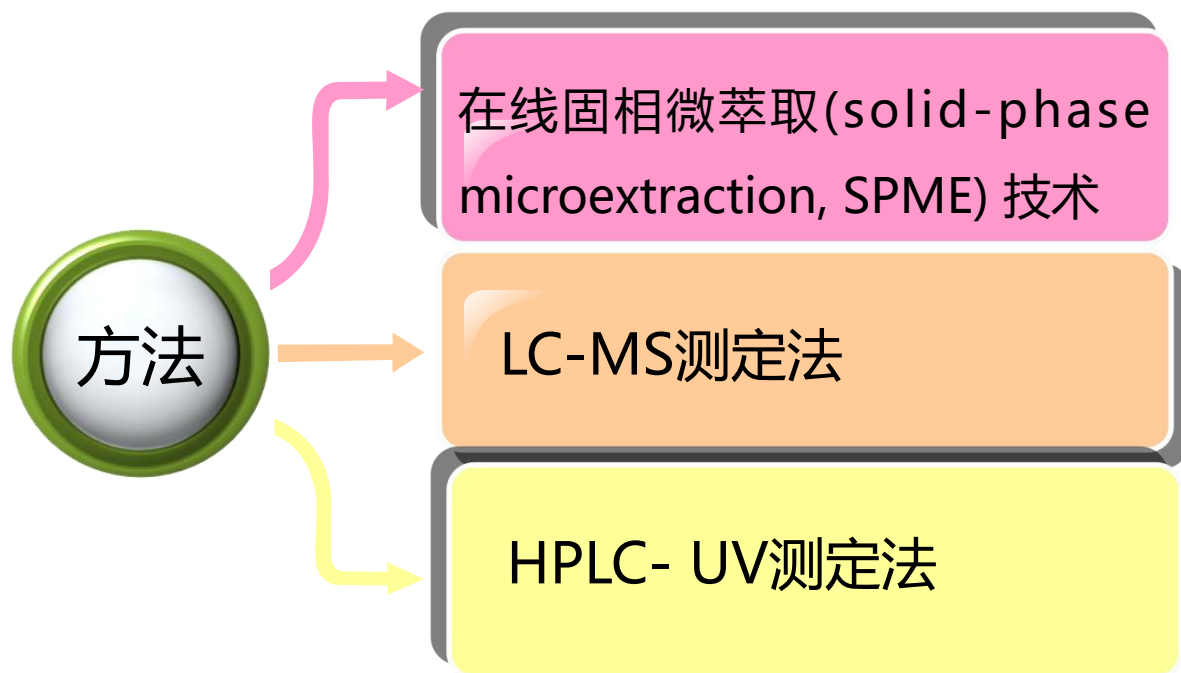
2

生物利用
度研究

3

违禁药物
监测

竞技运动员体内违禁甾体激素药物的分析

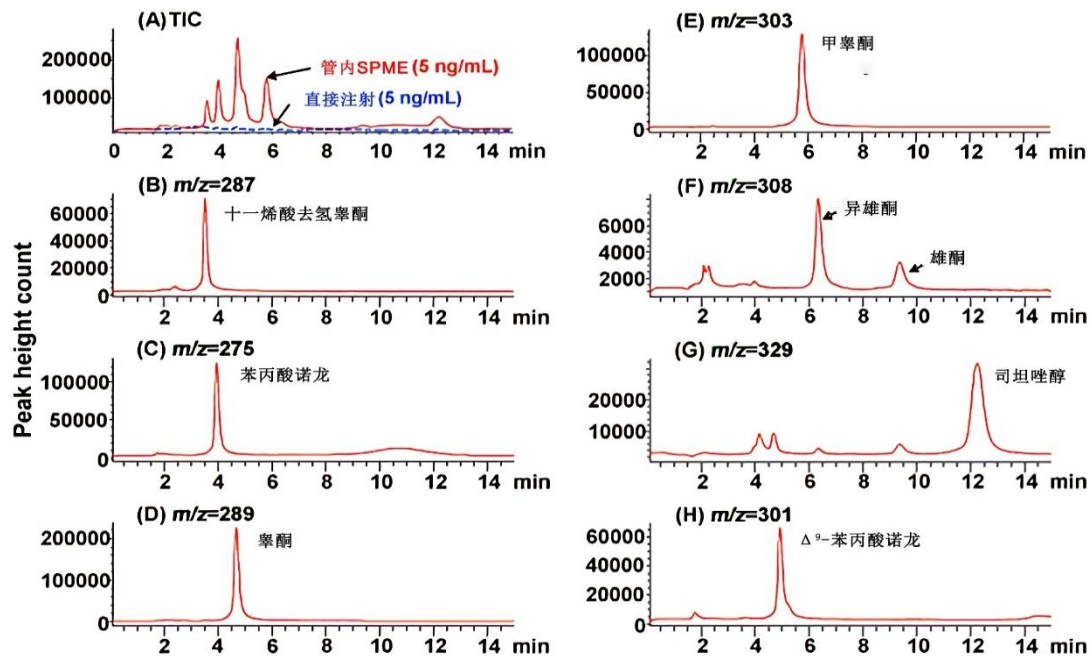


此类分析方法的特点

- 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

示例：尿中违禁同化激素的SPME/LC-MS检查

1. 对受试对象给药，一定时间后采集尿样。
2. 加内标物，调节pH，加酶水解一段时间，离心，取上清液。
3. 上述样品进行SPME处理，分离纯化后经LC-MS分析。



尿样中睾酮等七种违禁甾体激素药物的LC-MS测定



本章小结

小结

● 1. 结构、性质与鉴别

四种甾体激素类药物的结构特点及对应理化特性，与鉴别方法之间的关系。

● 2. 有关物质与检查

自身稀释对照法检查有关物质的方法，磷酸盐及硒等特殊杂质的检查方法。

● 3. 含量测定方法

HPLC、UV、比色法（四氮唑、柯柏反应）