

17-Keto Steroid 之定量

林哲男

一、緒言

1931年, Eutenant自男性尿中分離出Andros- terone後, 內分泌物之分離定量, 因而見到曙光, 之後Jeterman及Dobriner確認出42種之Steroid, Robinson更能個別地分離出7種Steroids, 從此Steroid之研究日新月異, 各地學者對於此種之利用與人體關係, 以及由血, 尿等之定量而研究其對人體生理作用之論文發表甚多。

尿中17-Keto steroid是由男子之副腎, 舉丸, 女子大部份由副腎, 一小部份由卵巢所分泌之代謝物, 其主要成份有Dehydroepiandrosterone, Androsterone, Etio. holonolone, 11-hydrox yandrosterone, 11-hydroxyetio ch'olonolone, 等, 至於其存在於尿中之型態, 有游離型, 磷酸型和結合型, 其中大部份是結合型, 結合型又分有硫酸結合型及glucuronic acid 結合型(血中尚有血清蛋白之結合即蛋白結合型Protein-Bound)。

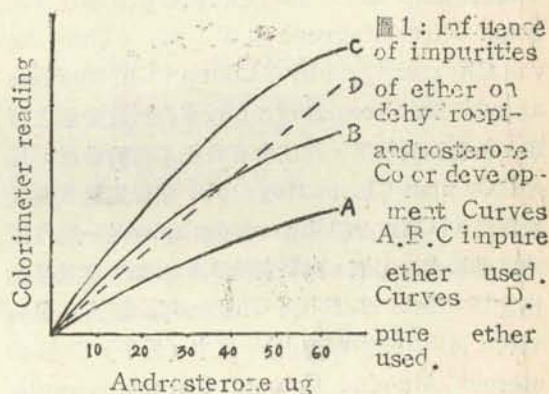
二、測定概要

1. 加水分解: 因為17-keto steroid 在尿中是以多種型態存在, 所以加水分解的過程方法很重要, 為求完全抽出定量, 最好的加水分解條件是①游離型部份以Ether抽出, ②酸室溫水解(Mild hydrolysis) Sulfate結合型部份水解抽出, ③殘部用(B-g'u.uronidase處理'glucuronic'酸結合型部份水解抽出, ④最後酸加熱處理, 未分解部份水解抽出, 此種Step-hydrolysis收量當然最高, 不過所費時間頗多, 操作繁雜, 對於臨床檢查方法的使用不太適當, 所以有人為求簡單迅速起見只採用酸加熱分解(hot-acid hydrolysis), 在1952年Dissemanse提出報告謂游離型之Dehydroepiandrosterone在強酸高溫之苛酷情況下, 約有一半被破壞成11-hydroxy-17-keto steroid, 以後神戶川, 古賀等研究改良為mild hydrolysis, 就是減低酸的濃度及水解的溫度。

各種水解方法使用研習的結果, 假如以緩和酸加熱分解的收量為100, 酸室溫水解+酸加熱水解

為112, B-g'u.uronide水解+酸加熱水解為106, (B-g'u.uronidase+酸室溫水解+酸加熱水解為136, 為求簡便經濟, 溫和酸加熱分解(mild hydrolysis)方法使用最為普遍。

2. 抽出: 17-keto steroid 有溶劑抽出, 最高收量為Ether, Benzene, Chloroform, Dichloroethylen, Carbon tetrachloride, 因Ether蒸溜容易, 通常使用Ether抽出比較多, 不過所用溶劑必須精製, 否則容易發生誤差, 其使用不純Ether之影響如圖1:



3. 防礙色素之去除: 尿水解後, 有機溶劑抽出, Androgen以外之物如色素, 夾雜物通稱為Chromogen, 此種Chromogen之化學組成, 到現在尚無人能斷定其成份構造, Chromogen之多少與年齡及疾患有關, 例如年輕比年老者少, 惡性腫瘤癆或肝機能不全症者排泄尿之Chromogen很多, 由於Chromogen, 對Linmerman反應比色有障害, 所以此種干涉物質必須去除, 去除的方法, 有人發表各種方法如下,

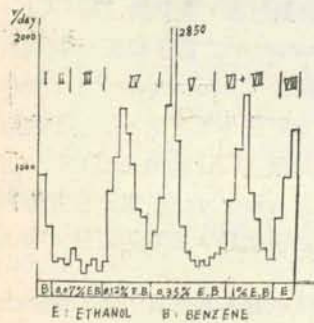
①利用NaOH顆粒吸着不純物質: 是Dreker (1947) 所提倡, 即水解尿用ethylene dichloride (1,2-二氯乙烷) 抽出, 遠心分離後ethylene dichloride加入NaOH粒, 振盪數分鐘後過濾, 此法Chromogen不能完全除去, 且操作不便, 不適合臨床檢查。

②Girard試藥之Keto分離法: Girard試藥 (T...Trimethyl ammonium acetohydrazide (

h oxide, P...Pyridyl acetohydrazide chloride) 之hydrazine基 (-NH<sub>2</sub>-NH-) 與Keto基 (O=C<) 之物質反應生成水溶性之hydrazone (>C=N-NH-), 而把non-keto部份去除, Girard hydrazone鹽酸性狀態時水解容易, 酸水解Keto steroid即再生, 本操作所夾雜之Chromogen能完全去除, 是Keto steroid精製之最好方法, 惟所用之Girard試藥價昂是其缺點。

③Formalin添加, 加水分解時Chromogen發生抑制法; 1956年Antunes在尿中加入Formalin以爲防腐劑時, 偶然發現此種尿酸加熱水解後, Chromogen發生減少, Antunes利用於Androgen之抽出實驗時, 亦得到與加Girard試藥處理獲得同樣良好的成果, 但是Formalin之添加, 對夾雜Chromogen發生抑制機序, 到現在尚未確知其原理, 只知其對Androgen回收量有顯著的減少。

④Chromatography method (層析法): Chromatography自1950年盛行以後, 對於Steroid之定量幫助很大, 其利用P.P.C (paper Partition Chromatography) T.L.C. (Thin layer Chromatography) Column Chromatography或gas chromatography來作定性定量之實驗, 所得到的結果, 往往會有料想不到的滿意, 其中以Column Chromatography法做定量實驗最爲普遍, (Column Chromatography是一定內徑之玻璃管末端尖細, 內裝活化Alumina, 然後使抽出之17-Keto steroid+Chromogen讓Alumina吸收, 再用不同溶劑溶出), 尿中 (男子) 17-keto steroid Alumina Column Chromatography之分割如圖2



Alumina: merk  
商標 Brockmann  
標定活性度III 2.1g  
Column: 內徑5mm,  
上部30ml球形膨大。  
1 tube: 5ml

- |                  |                          |
|------------------|--------------------------|
| eluates tube No. | elvated                  |
| 1-3              | I Art: facts             |
| 4-9              | II i-androsterone        |
| 10-19            | III DHD, epiandrosterone |
| 20-31            | IV Androsterone          |
| 32-37            | V Etiocholanolone        |

38-43

VII 11-hydroxyandrosterone

44-48

VII 11-hydroxyetiocholanolone

4. 比色定量: 17-Keto steroid 發色都用 Zimmerman反應, 此反應是Urine extract之17-Keto steroid經過夾雜物離純化後, 加入1% meta-dinitrobenzene 0.4ml及50% KOH水溶液0.2ml在25°C incubate放置30分後加70% Ethanol水溶液4ml稀釋, 3分鐘後Spectrophotometer's (Eckman DU或Zeiss) 460mu 520mu 580mu測定, Allen補正式應用計算, 17-Keto steroid Zimmerman發色吸光曲線如圖3:

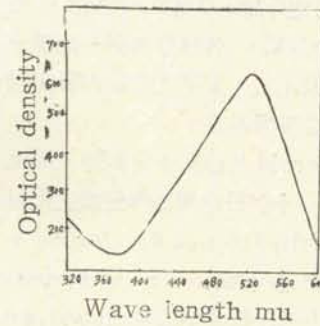
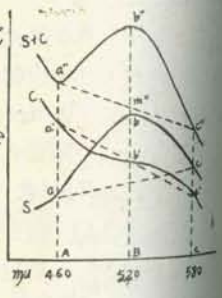


圖3 A: 17-Keto steroid from urine extract of Zimmerman reaction Spectrophotometer absorption Curve

圖3 B: 17-keto steroid Zimmerman reaction 比色定量Allen 補正式,

S: Pure 17-Keto steroid之吸光度曲線。  
C: 夾雜Chromogen之吸光度曲線。  
S+C: Pure 17-Keto steroid+Chromogen之吸光度曲線。



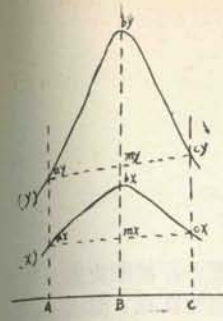
5. Allen補正式應用原理: 如圖3 純 17-Keto steroid最大吸光度是在520mu, 假如有Chromogen存在時 (s+c), 其吸光度曲線在460mu時開始上昇, 而520mu之前後460mu, 580mu的吸光度連接直線, 必被520mu所平分, 即a'm' = m'c', 則

$$m'b = \frac{a'A + c'C}{2} \therefore b'm' = b'B - \frac{a'A + c'C}{2}$$

Allen之補正式爲

$$E_1 = 520mu - \frac{E460mu + E580mu}{2}$$

E<sub>1</sub>: 補正後之吸光值 E: 各波長的原吸光度  
又假如有x與y不同之濃度之Sample設其在520mu之吸光度爲bx反by, 460mu爲ax, ay, 580mu爲Cx, Cy, 580mu與460mu吸光度之連接線與520mu交點爲mx, my則有  
濃度  $\frac{y}{x} = \frac{byB}{bxB} = \frac{byme}{bxme}$



係，故濃度之標準曲線 (standard Curve) 成直線，符合Beer Law (圖1, D)

### 三、測定法之實際

#### 1. 試藥

① 乙醚 (Ethyl ether)

台製聖慈牌化學用 100 cc. 加 0.8M FeSO<sub>4</sub> in 0.4N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3×100 cc. 搖動洗滌，再用蒸溜水 2×50 cc. 洗滌再蒸溜。

② 酒精 (alcohol) 公賣局 95度 1000 cc. 加 4g m-phenyldiamine Hcl 暗室浸一星期，時時攪拌，脫水二次再蒸溜。

③ Conc. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KOH, NaOH, 日製和光。

④ m-Dinitrobenzene 日製和光 20g 加 methyl alcohol 750 cc. 加 100 cc. 5N NaOH 室溫 5 分間，再加 2500 cc. 蒸溜水，則產生白色沉澱，過濾，乾燥然後用 alcohol 再結晶，直至無色為止，結晶保持乾燥於暗室。

⑤ 1% m-dinitrobenzene in alcohol

⑥ standard : Dehydroepiandrosterone

100r/c.c.

#### 2. 操作：

① 採尿保存：正確採集 24 小時之尿，假如 24 小時尿量過少時，宜加蒸溜水稀釋至 2000 cc.，以減少夾雜 Chromogen 之量，然後正確採取 100 cc.，一兩日內加水分解抽出定量。

② 水解抽出：取尿 100 cc.，放在 300 ml 之分解瓶中，加純 Conc HCl 10 cc. 及 Formalin 五倍稀釋液 1 cc. 在 100°C 之水浴中逆流加熱 15 分鐘後冷卻，移至 400 ml 之分離漏斗，分解瓶用約 20 cc. 之 Ether 洗，洗液移至分離漏斗，再加 100 cc. Ether，振盪上層 Ether 分離，再 100 cc. Ether 振盪分離，Ether 共 200 cc. 移至另一分離漏斗中，加入 4% NaOH 15 cc. 振盪後下層捨棄，再一回 4% NaOH 15 cc. 振盪捨棄，Ether 層再用 2×20 cc. 蒸溜水洗滌後，移至蒸溜瓶，在 40°—60°C 下蒸發乾固，Ether 回收，殘渣加入 10 cc. 純 Ethanol，取其中 1 cc. 蒸乾，加入 1% m-dinitrobenzene-ethanol 0.4 cc. 溶解，再加入 50% KOH 水溶液 0.2 cc.，在 5°C in cubate 放置 30 分後加 70% 之 Ethanol 水溶液 4 cc. 稀釋，分鐘後 Spectrophotometer (Zeiss), 460, 520, 580 mu 波長測定，Standard 40r 補正，

24 小時尿 100 cc.

Formalin 五倍稀釋液 1.0 cc. conc. HCl

10 cc. 100 cc

15 分鐘加熱，冷卻後 Ether 100 cc. × 2 回抽出。

Ether

4% NaOH 15 cc. × 2 回洗滌。

水 20 cc. × 2 回洗滌，蒸溜。

殘渣

10 cc. 純 Ethanol 溶解。

Ethanol

取 1.0 cc. 蒸乾 + 1% m-dinitrobenzene 0.4 cc. 溶解，+ 50% KOH 水溶液 0.2 cc. 2.5 cc. in cubate 放置 30 分鐘後加 70% 之 Ethanol 水溶液 4 cc. 稀釋。

比色

460, 520, 580 mu 之吸光度，Allen 計算式補正。

$$\text{補正值} = E_{520} \text{mu} - \frac{E_{460} \text{mu} + E_{580} \text{mu}}{2}$$

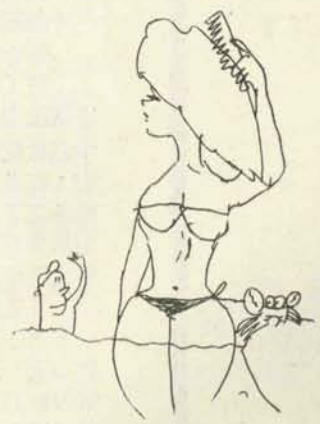
total 17-Keto steroid (mg)

$$= \frac{\text{檢體 17-Keto steroid 之補正值}}{\text{DEAS } 0.04 \text{mg 補正值}} \times$$

$$1 \text{ 日尿量} \times 10 \times 0.04$$

測定尿量

本實驗、蒙徐院長，徐系主任指導，及台灣省衛生試驗所許副所長賜借 Zeiss Spectrophotometer 謹此致謝。



記相畫