

# Steroid Alcohol の測定法に就いて

帝国臓器製薬株式会社研究部

(部長：薬学博士 新延信吉)

金沢大学結核研究所薬理製剤部

(主任：伊藤 亮 教授)

細 井 稔

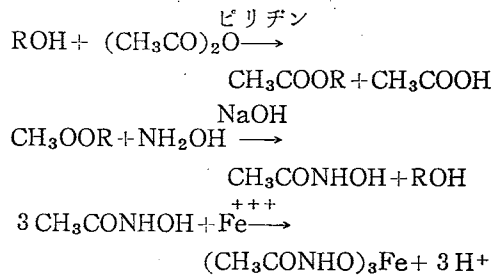
神 戸 川 明

(受付：昭和33年1月6日)

## 緒 言

生体 Steroid の化学的測定法に関しては、C17 位に Keto 基をもつ 17-Ketosteroid や側鎖に  $\alpha$ -ketol 基をもつ Corticoid 等の如く、その分子中に特有な反応基をもつもの場合には、測定も比較的容易であつて、今日迄に種々な検出定量法が研究報告されている。しかし、この様な特異反応基をもたない例えば所謂 Neutral Non-ketonic Steroid Alcohol と称されている Steroid 類の様なものでは、簡易な特異的検出法がない為に、従来は殆んど臨床検査の対象外にあることが多かつた。しかるに最近、これら Non-ketonic Steroid Alcohol 及び alcohol 基含有の一部 Keto-steroid をも含めた Steroid Alcohol (又は Hydroxysteroid) 群の尿中排泄量の消長が Steroid ホルモンの代謝、引いては性腺や副腎皮質等の内分泌器管の機能状態の検知や疾病の診断上、極めて重要な意義をもつものであることが論ぜられる様になつた為、こゝに Steroid Alcohol の検出・定量に関する研究が相次いで報告されるに至つた。即ち、三塩化アンチモン法<sup>1)</sup>無水フタル酸法<sup>2)</sup>、無水コハク酸法<sup>3)4)</sup>、Dinitrophthalate 法<sup>5)</sup>、Dinitrobenzoate 法<sup>6)</sup>等があるが何れも感度が低く臨床検査法としては尚十分ではない。Engel<sup>7)</sup>は1954年 Acetohydroxam 酸法を発表した。本法は3段階より成り、第一に

Steroid Alcohol を酢化し、次に生成した酢化物にアルカリ性で Hydroxylamine を反応させ Acetohydroxam 酸を分離せしめ、最後に第二鉄イオンで赤紫色の Acetohydroxam 酸鉄にして比色定量するものであつて、原理的には Hydroxam 酸による水酸基 -OH の定量法を利用した方法である。



Hydroxam 酸生成法を応用した定量法には Lipmann 等<sup>8)</sup>の Acetylphosphate 定量法を初めとして、その他種々エステル類<sup>9)10)11)12)</sup>やアミド<sup>13)</sup>の測定に関する研究がある。

Hydroxam 酸法が -OH 基の定量に応用し得ることは Hill<sup>9)</sup>によつてリポイドの定量実験で実証されたのであるが、その後 Zaffaroni<sup>14)</sup>が本法を Desoxycorticosterone の定量に利用し、次いで Engel<sup>7)15)</sup>が之を Steroid Alcohol の一般定量法としたのである。著者等は本法を更に詳細に検討し種々反応条件の吟味改良を行つたのでその結果を報告する。

### 実験に必要な試薬類及び器具

1. 試薬：何れも JIS 特級を用う。
  - a. 無水酢酸 } ……再溜精製したもの。
  - b. 無水ピリジン }
  - c. 無水酢酸・ピリジン混液……使用前に酢酸とピリジンの同量を混和する。
  - d. 0.5 N-NH<sub>2</sub>OH・HCl の 90% アルコール溶液 ……NH<sub>2</sub>OH・HCl 0.7gm に水 2 ml を加え加温浴解させアルコールを加え 20ml とする。
  - e. 5 N-HaOH
  - f. 塩化鉄，塩素酸カリ試薬……0.06g の KClO<sub>3</sub>・6H<sub>2</sub>O 0.5gm を溶解させる。
  - g. Dehydroepiandrosterone 標準液…Dehydroepiandrosterone 標準液 (融点 140~141° C,  $[\alpha]_D^{25} = +11.0$ ) 10mg を 10ml のアルコールに溶解する。
2. 器具：Beckman DU 分光光度計

### 実験の部

本法は、Hydroxysteroid の酢化、NH<sub>2</sub>OH による Acetohydroxamic Acid (AH) の生成、及び Fe<sup>+++</sup>による AH-Fe 醋塩の生成の 3 段階よりなるのであるが、著者等は先ず標準 Dehydroepiandrosterone を用いてこれら 3 種の反応について、反応条件を詳細に検討した。

#### 1. Acetohydroxam 酸鉄生成に関する基礎実験

##### 1. Hydroxysteroid の Acetyl 化

###### a) Acetyl 化の条件

Hydroxysteroid の Acetyl 化は無水酢酸・ピリジン混液中 100-110° C で行つた。Dehydroepiandrosterone 500 $\gamma$  を、無水酢酸・ピリジン混液量及び加熱時間を種々に變えて Acetyl 化し、Acetyl 化された量を Acetohydroxamic 酸法で測定して第 1 表の結果を得た。この成績から Dehydroepiandrosterone の酢化には無水酢酸・ピリジン混液 0.1ml で 30 分加熱すれば十分であることが分る。尚無水酢酸の代りに塩化アセチルを用いても同様であつた。本反応は湿気を嫌うためグリセリン浴又は油浴で行う。

###### b) 諸種 Steroid Alcohol の水酸基 Acetyl 化実験。

水酸基を有する種々の Steroid を本法で Acetyl 化し、Acetyl 化された -OH 基を定量すると第 2 表の如く水酸基の数と 1 ミリ分子吸光係数 (吸光係数 / 1 ミリ分子量) は比例し、

OH 基 1 ケの Dehydroepiandrosterone, Testosterone, Cholesterol 等では 1 ミリ分子吸光係数は約 1.1 を示し、Androstenediol, Estradiol, Allopregnanediol の如く OH 基 2 ケのものでは略々 2.2 を示す。一方 C11 位や C17 ( $\alpha$ ) 位に OH 基をもつ Steroid では、例えば OH 基 2 ケの Cortisone, 並びに OH 基 3 ケの Hydrocortisone の 1 ミリ分子吸光係数が夫々 1.20 及び 1.19 であつて、OH 基 1 ケの Steroid に相当しているのであるがこのことはこれら Steroid のもつ OH 基の中で Acetyl 化出来る活性水酸基が何れも 1 ケしかないことを示すものである。即ち C11 位や C17 位の  $\alpha$ -OH は不活性で、この方法では Acetyl 化され難い。

##### 2. Hydroxylamine による Acetohydroxamic Acid の生成。

###### a) アルカリ性 Hydroxylamine の安定度の吟味。

Hydroxylamine 塩酸塩 NH<sub>2</sub>OH・HCl はアルカリによつて強い還元性を示すと同時に不安定で室温でも分解する。従つて Acetyl 化された Hydroxysteroid にアルカリ性で NH<sub>2</sub>OH を作用させて、Acetohydroxamic Acid を生成せしめるに當つては、出来るだけ NH<sub>2</sub>OH の分解を少なくすることが必要である。著者らは先ず種々な温度に於ける NH<sub>2</sub>OH の分解速度をその還元力の減退を指標として測定した。即ち 0.5 N-NH<sub>2</sub>OH・HCl の 90% アルコール溶

液 1 ml と 5 N-NaOH 0.2 ml を混和して一定温度 (100°C, 60°C 又は室温) に放置し、一定時間毎に残存 Hydroxylamine を 0.1%  $K_3Fe(CN)_6$  の消費量で測つた。その結果は第 1 図に示した如くであつて、アルカリ性 Hydroxylamine は 60°C 又は 100°C で加熱した場合には 20 分乃至 30 分間で全部分解し、室温に放置した場合でも 30 分後には約 1/3 量となることが分つた。Engel 等<sup>11)</sup> の如く Hydroxylamine 塩酸塩とアルカリを混合して析出する塩を遠沈してその上澄液を使う方法はその操作に約 10—15 分間を要するものであつて従つてその間に既に Hydroxylamine の一部が分解することがこの実験で明かとなつた。そこで著者らは Acetyl 化した検体に 0.5 N-NH<sub>2</sub>OH · HCl の 90% アルコール溶液 1 ml を加えよく検体を溶かしてから 5 N-NaOH 0.2 ml を加え室温に 30 分放置して反応せしめる方法を採用した。この著者らの方法では反応操作による試薬の損失が少ないため、試薬量も Engel 法に比して少量であつて、NH<sub>2</sub>OH · HCl で約 1/2 量 (66mg → 35mg)、アルカリ量で約 1/3 量 (139mg → 40mg) に夫々減量することが出来た。尚著者らの方法では析出する塩はそのまゝで爾後の反応操作に何等支障がなかつた。

#### b) Acetohydroxamic Acid 生成条件の吟味

Dehydroepiandrosterone acetate 500 $\gamma$  に 0.5 N-NH<sub>2</sub>OH · HCl のアルコール溶液 1 ml と 5 N-NaOH 0.2 ml を加え、種々の温度 (室温, 60°C, 100°C) で反応させ、生成した Acetohydroxam 酸量を逐時的に比色測定して第 2 図に示す成績を得た。即ち室温 (25°C) 放置実験では、時間と共に漸次 AH 生成量は増加し、30 分後に最高となり以後殆んど増減がなかつた。又 60°C 加熱実験では、10 分後に既に AH 生成は最大となり、その値は室温 30 分反応時に於けると略々同一量を示し、以後時間の経過と共に AH 生成量は漸減の傾向を示した。之に反し 100°C 加熱実験では、AH 生

成は前 2 実験の場合に比して可成り劣り、而も約 10 分で最高に達し、その後 AH 生成量は急激に減少を示した。よつて著者等は AH 生成条件として室温 (25°C) 30 分放置して反応を行わしめることとした。

### 3. Acetohydroxam 酸鉄の生成

#### a) pH.

定量実験の最終段階では AH に Fe<sup>+++</sup> (FeCl<sub>3</sub>) を加えて赤色の AH-Fe 錯塩を生成せしめ、その着色度を比色測定するわけであるが、この際生成した AH-Fe 錯塩の安定度が pH によつて著しい影響を受けることが Engel 等によつて指摘されている。著者等は前項の実験で得られた AH に種々の pH で 2.5% FeCl<sub>3</sub> 0.5 ml を加え生じた AH-Fe の着色度を光度計で測定して第 3 図に示す結果を得た。即ち pH 1.2—1.8 の比較的狭い範囲内では AH-Fe の着色度は最高を示したがその前後の pH では着色度の急激な減少が見られた。そこで著者らは、NH<sub>2</sub>OH で AH を生成した後、0.5 N-HCl 1.5 ml を加え pH を 1.2—1.8 内に修正した後 FeCl<sub>3</sub> による発色反応を行うこととした。

#### b) 塩化鉄の濃度と酸化剤の使用について。

pH 1.2—1.8 に調整した AH 液に FeCl<sub>3</sub> を加えて発色せしめる際、FeCl<sub>3</sub> の一部は残存している NH<sub>2</sub>OH によつて Fe<sup>+++</sup> → Fe<sup>++</sup> に還元され、この為 AH-Fe 色素の生成が定量的に行われなことを考慮せねばならない。従つて FeCl<sub>3</sub> を或る程度余分に加えることが必要となつてくるのであるが、しかし乍ら、不必要に過剰の FeCl<sub>3</sub> を加えることは徒らに FeCl<sub>3</sub> の着色による Blank を大にして、比色測定上に支障を来たす虞れがある。これらの点をいろいろと検討して著者らはこの際、FeCl<sub>3</sub> を残存 NH<sub>2</sub>OH の還元作用から防護する目的を以て適当な酸化剤の添加を試みた。酸化剤として KClO<sub>3</sub>, HClO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HIO<sub>4</sub> 及び NaBrO<sub>4</sub> の 5 種について検討を加えた。第 2 表は Acetohydroxam 酸液に各種濃度 (0.2, 0.5

及び2.5%)  $\text{FeCl}_3$  0.5ml を単独に加えて発色せしめた場合と、それに更に各種酸化剤を添加した場合とについて、AH-Fe 錯塩の着色度(光度計の Optical Density) を逐次的に測定した成績を示したものである。即ち、 $\text{FeCl}_3$  単独使用実験では、 $\text{FeCl}_3$  の濃度 2.5% を用いた場合に着色度は最高を示したが、この場合時間の経過と共に色調の褪色が認められた。一方酸化剤添加実験では  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{HIO}_4$  並びに  $\text{NaBrO}_3$  を用いた場合には、夫々不純呈色、ハロゲンの析出、白濁等を生じ何れも比色測定上に支障を来し、この様な酸化剤の使用は不適當であつた。之に反して  $\text{KClO}_3$  は、その緩慢な酸化作用のため生成した AH-Fe 錯塩を分解することなしに、 $\text{NH}_2\text{OH}$  による  $\text{Fe}^{+++} \rightarrow \text{Fe}^{++}$  の還元を防止して色調を安定せしめ、酸化剤として好適であることが分つた。そこで著者らは、本実験には  $\text{KClO}_3$  を 0.3% に加えた 2.5%  $\text{FeCl}_3$  0.5ml を加えて AH-Fe 錯塩色素を生成せしめることとした。

c) Acetohydroxam 酸鉄の吸収スペクトル  
Dehydroepiandrosterone を用いて Acetohydroxam 酸鉄を生成発色せしめ、その吸収スペクトルを分光光度計で検査して第 4 図の如く波長  $510\text{m}\mu$  に比較的鮮鋭な極大を示す吸収曲線が得られた。従つて著者らは波長  $510\text{m}\mu$  を以つて、若し又フィルター式光電比色計を使用する場合にはフィルター  $S_{52}$  を以つて比色測定を行うこととした。尚第 5 図は  $510\text{m}\mu$  を用いて検出した標準 Dehydroepiandrosterone に対する検量線 (Calibration curve) を示したものであるが、Steroid 0.1—1.0mg の範囲では検量線は直線性であつて、Steroid 量と Acetohydroxam 酸鉄の色調度との間には完全な比例的関係が実証された。尚 Engel 等<sup>15)</sup> は Cary 分光光度計を使用して Acetohydroxam 酸鉄のスペクトルの吸収極大が波長  $527\text{m}\mu$  にあると報告している。

## II. 測定法及び補正式

3本の試験管 ( $15 \times 150\text{mm}$ ) に、夫々 (1)

資料 (後述の尿より Pincus 法<sup>16)</sup> によつて抽出した中性エーテルエキス部分 Neutral Ether Extract のアルコール溶液で Dehydroepiandrosterone 200—2,000 $\gamma$  相当量), (2) Dehydroepiandrosterone 標準溶液 0.5ml (500 $\gamma$  含有), 及び (3) アルコール 0.5ml (Reagent Blank) をとり、溶媒を加熱蒸発させ真空デシケーター中で乾燥した後、各々に無水酢酸・ピリジン (1:1) 混液 0.1ml を加えグリセリン浴で  $100-110^\circ\text{C}$  で30分加熱して酢化する。次いで加熱しつゝスプレーで溶媒を蒸発させ、更にメタノールを加えて蒸発を行い無水酢酸の痕跡を除く。この操作を数回繰り返した後、デシケーター中で減圧乾燥する。こゝに得られた Steroid Alcohol の Acetate に 0.5N- $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  の90%アルコール溶液 1ml を加え溶解させ、次いで 5N- $\text{NaOH}$  0.2ml を追加し室温  $25^\circ\text{C}$  で30分放置した後、0.5N- $\text{HCl}$  1.5ml を加えて pH を 1.2—1.8 とする。更に蒸留水を加え液量を 4.5ml とする。これに 0.3%  $\text{KClO}_3$  含有の 2.5%  $\text{FeCl}_3$  0.5ml 次いで、エーテル 4ml を加え、よく振盪すれば、資料並びに標準 Steroid 管では Acetohydroxam 酸鉄の生成によつて水層は赤色を呈し、同時に遊離した Steroid Alcohol 並びに不純呈色はエーテルに移行する。20分後に資料及び標準 Steroid 管の赤色水溶液 (下層) をピペットで吸い取り、アルコール溶液のみの Blank 試験管の水溶液を対照として分光光度計又はフィルター式光電比色計で夫々の吸光係数  $E$  及び  $E_s$  を測定し次式によつて資料中の Steroid Alcohol 量を算出する。

$$\text{Steroid Alcohol } (\gamma) = S \times \frac{E}{E_s}$$

こゝで、 $S$  = 標準 Steroid Alcohol 量 ( $\gamma$ )

$E$  = 検体の吸光係数

$E_s$  = 標準 Steroid Alcohol の吸光係数

然し乍ら、本実験法では Steroid Alcohol 以外の不純物の  $\text{NH}_2\text{OH}$  及び  $\text{FeCl}_3$  による着色が多少なりとも伴うのであつて、従つて光度

計の実測値に対し何らかの方法で補正を加える必要がある。Engel 等<sup>15)</sup>はこの不純呈色による過大測定を修正するため、比色測定用波長として不純呈色による干渉の少ない  $560m\mu$  を使用し、更に Acetylation Blank 並びに Preformed Ester Blank を入れた補正式を採用している。著者らは次の様にして不純呈色に対する補正を行つた。先ず尿抽出物に対し、Acetyl 化操作を行わずに、以下同様に  $NH_2OH$  及び、 $FeCl_3$  反応を行つて得られた不純呈色について吸収スペクトルの検査を行つた。その結果、第4図に示した様に、Acetohydroxam 酸鉄の吸収スペクトル曲線と全く逆の関係を示すスペクトル曲線が得られた。即ち  $AH-Fe$  錯塩が最低の吸収を示す  $420m\mu$  に於て不純呈色が最大吸収を示し、一方  $AH-Fe$  錯塩の吸収最大波長  $510m\mu$  では不純呈色の吸収は極めて僅少であつて、この関係は、Zimmermann 反応<sup>17)</sup>によつて 17-Ketosteroid を測定する場合に於ける Steroid 呈色と不純呈色との関係に極めて類似している、よつて、著者らは Fraser<sup>18)</sup> 19) の補正式を本呈色に利用し次式によつて資料の  $510m\mu$  での実測吸収係数 ( $E$ ) の補正を行つた。

$$\text{補正}E = \frac{K_i E^{510} - E^{420}}{K_i - K_s}$$

ここで、 $E^{510}$ 、 $E^{420}$  は夫々資料の  $510m\mu$ 、 $420m\mu$  に対する吸光係数、

$$K_s = \frac{E_s^{420}}{E_s^{510}}, K_i = \frac{E_i^{420}}{E_i^{510}}$$

但し、 $E_s^{420}$ 、 $E_s^{510}$  は Dehydroepiandrosterone 標準溶液の  $420m\mu$ 、 $510m\mu$  に対する吸光係数を示し、又  $E_i^{420}$ 、 $E_i^{510}$  は尿抽出物の不純呈色の  $420m\mu$ 、 $510m\mu$  に対する吸光係数を示す。

尚フィルター式光電比色計を使用する場合にはフィルター  $S_{52}$  及び  $S_{43}$  を用いて同様に吸光係数を測定する。

### III. 諸種 Steroid 投与家兔に於ける尿中 Steroid Alcohol の排洩試験

家兔に諸種 Steroid を投与し、尿中 Steroid

Alcohol 排泄量を Acetohydroxam 酸法によつて定量追求した。尚この際、同時に Zimmermann 反応 (Callow の変法<sup>20)</sup>) で 17-Ketosteroid をも定量して Steroid Alcohol 排泄量と比較検討した。

家兔は体重 2 kg の正常雌を用い、各 Steroid 50mg を油溶及びサスペンション 1 ml として筋肉注射した。使用した Steroid は Cortisone, 17-Hydroxy-11-desoxycorticosterone, Desoxycorticosterone, 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone, 及び Progesterone の 5 種。注射前 3 日間と注射後 7 日間の毎日尿について、Pincus 法<sup>16)</sup>によつて中性エーテル・エキス部分を抽出し、Steroid Alcohol と 17-Ketosteroid を測定した。

抽出法：トルオール少量を加え防腐貯蔵せる 24 時間尿より 100ml をとり、conc. HCl 15ml を加え、磨り合せ硝子冷却器をつけたコルペン中で 8 分間煮沸し、冷却後、尿を過酸化水素除去エーテル 100ml で 3 回抽出。エーテルを飽和  $NaHCO_3$  水溶液 50ml で 2 回、蒸溜水 30ml で 1 回、2 N NaOH 50ml で 3 回洗滌する。最後に再び蒸溜水 50ml で 3 回洗滌した後、エーテルを蒸発し、残渣をデシケーター中で減圧乾燥する。かくして得た抽出物をアルコール 5 ml にとかし、その 1 ml を Steroid Alcohol 測定に、0.2ml を 17-Ketosteroid 測定に使用した。

第 6 図は各 Steroid について行つた測定実験の成績を示したものであるが、この成績から明かな如く、何れの場合でも尿中 Steroid Alcohol の排泄量は Steroid 注射翌日又は翌々日より著明に増加し 1 週間後には略々正常に復することが判る。一方尿中 17-Ketosteroid の量は、Cortisone, 17-Hydroxy-11-desoxycorticosterone 及び 17-Hydroxyprogesterone を投与した場合には Steroid Alcohol と同じく増大の傾向を示したが、之に反し Desoxycorticosterone 及び Progesterone を投与した家兔では全く変化が認められなかつた。

この実験結果から、Steroid Hormone 代謝の研究に生殖腺や副腎皮質機能の状態を推知するには、尿中 Steroid Alcohol 排泄量の測定

が重大な意義をもつものであることが明瞭である。他方、従来行われて来た尿中17-Ketosteroid 測定法が、本実験のDesoxycorticosterone や Progesterone 投与家兎例に見られた如く、Steroid Hormone 代謝産物の研究には不適当

であつて、殊に副腎皮質腫瘍や妊娠時に多量に排泄される Pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol, Pregnane-3 $\beta$ , 20 $\alpha$ -diol, Pregnanetriol 等の重要 Alcohol 性 Steroid はこの方法では捕捉されない。

## 結 語

1. Acetohydroxam 酸鉄呈色反応を利用した Engel 等の Steroid Alcohol 定量法を検討して、Hydroxylamine 試薬の使用法を改良すると共に、FeCl<sub>3</sub> の還元防止の為に新たに酸化剤 KClO<sub>3</sub> を添加して呈色反応の安定化を計つた。

2. 本法による加水分解尿の中性抽出物中の Steroid Alcohol 測定に際し、不純呈色に対す

る補正式について検討した。

3. 諸種 C<sub>21</sub>-Steroid を注射した家兎尿について、本法による Steroid Alcohol の測定を行つて、凡ての動物に於て注射後その排泄量の著明な増加を確かめ得た。しかし、その際尿中 17-Ketosteroid の排泄量は必ずしも増加を示さなかつた。

## 文 献

- 1) Pincus, G. : *Endocrinol.*, **35**, 227, 1944.
- 2) Dobriner, K., Lieberman, S., and Rhoads, C. P. : *J. Biol. Chem.*, **172**, 241, 1948.
- 3) Lieberman, S., Fieser, L. F., Dobriner, K., and Rhoads, C. P. : *Endocrinol.*, **35**, 223, 1944.
- 4) Tompsett, S. L., and Oastter, E. G. : *Glasgow. med. J.*, **29**, 133, 1948.
- 5) Engel, L. L., Patterson, H. R., Wilson, H., and Shinkel, M. : *J. Biol. Chem.*, **183**, 47, 1950.
- 6) Killie, A. E., Smith, E. R., and Wade, A. P. : *Biochem. J.*, **53**, 578, 582, 1953.
- 7) Engel, L. L., and Baggett, B. : *Recent Progress in Hormone Research IX*, 251, 1954.
- 8) Lipmann, F., and Tuttle, L. C. : *J. Biol. Chem.*, **159**, 21, 1945.
- 9) Hill, U. T. : *Ind. and Eng. Chem. Anal. Ed.*, **18**, 317, 1946.
- 10) Hill, U. T. : *Anal. Chem.*, **19**, 932, 1947.
- 11) Bauer, F. C., JR. and Hirsch, E. F. : *Arch. Biochem.*, **20**, 242, 1949.
- 12) Hestrin, S. : *J. Biol. Chem.*, **180**, 249, 1949.
- 13) Bergmann, F. : *Anal. Chem.*, **24**, 1367, 1952.
- 14) Zaffaroni, A. : *Recent Progress in Hormone Research*, **8**, 51, 1953.
- 15) Baggett, B., Engel, L. L. and Fielding, L. L. : *J. Biol. Chem.*, **213**, 87, 1955.
- 16) Pincus, G. : *J. clin. End.*, **5**, 291, 1945.
- 17) Zimmermann, W. : *Z. f. physiol. Chem.*, **233**, 257, 1936-7; **245**, 47, 1945.
- 18) Fraser, R. W. : *J. clin. End.*, **1**, 234, 1941.
- 19) Talbot, H. B., Berman, R. A. and MacLachlan, E. A. : *J. Biol. Chem.*, **143**, 211, 1942.
- 20) Callow, N. H. : *Biochem. J.*, **32**, 1312, 1938.

Table 1

Acetylation of Dehydroepiandrosterone under  
Various Conditions

Amount of acetic anhydride-pyridine reagent (ml)	Time of heating (min.)	Colorimeter reading of acetohydroxamic acid-Fe complex
0.1	10	0.38
	30	0.43
	60	0.43
	120	0.43
0.5	10	0.40
	30	0.43

Heating was carried out in a oil or glycerol bath at 100-110° C.

Table 2

Acetylation of Various Steroids with Acetic  
Anhydride-Pyridine Reagent

Steroid	Number and position of OH	Number of acylable OH	Optical density (O. D.)	Mol. wt.	O. D. / $\mu$ Mole
Dehydroepiandrosterone	1 C <sub>3</sub>	1	0.382	288	1.10
Testosterone	1 C <sub>17</sub> ( $\beta$ )	1	0.390	288	1.15
Cholesterol	1 C <sub>3</sub>	1	0.274	386	1.06
Desoxycorticosterone	1 C <sub>21</sub>	1	0.345	330	1.14
Cortisone	2 C <sub>21</sub> , C <sub>17</sub> ( $\alpha$ )	1	0.334	360	1.20
Hydrocortisone	3, C <sub>11</sub> C <sub>21</sub> , C <sub>17</sub> ( $\alpha$ )	1	0.327	362	1.19
Estrone	1 C <sub>3</sub>	1	0.307	270	1.10
Androstenediol	2 C <sub>3</sub> , C <sub>17</sub> ( $\beta$ )	2	0.770	290	2.30
Estradiol	2 C <sub>3</sub> , C <sub>17</sub> ( $\beta$ )	2	0.798	272	2.17
Allopregnenediol	2 C <sub>3</sub> , C <sub>20</sub>	2	0.675	320	2.15

10 mg steroid was used.

Table 3  
Formation of Acetohydroxamic Acid Chromogen by Different  
Concentrations of  $\text{FeCl}_3$  and the Effect of Various  
Oxidizing Agents thereon

No. of tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	$\text{FeCl}_3$ (%)			2.5			2.5			2.5			2.5
Oxidizing agents %	No addition			$\text{KClO}_3$			$\text{H}_2\text{O}_2$			$\text{HClO}_4$	$\text{HIO}_4$	$\text{NaBrO}_4$	
	1.2			0.6	0.3	0.15	1.0	1.0	0.25	1.0	1.0	1.3	
Immediately	240	293	394	435	430	393	380	383	449	417	380	402	452
120 minutes after	197	180	320	450	430	390	370	385	440	411	372	397	460
120 minutes after	160	140	308	480	450	390	375	386	433	407	361	392	467

0.5ml. of  $\text{FeCl}_3$ , with or without the addition of the oxidizing agent, was added to acetohydroxamic acid solution.

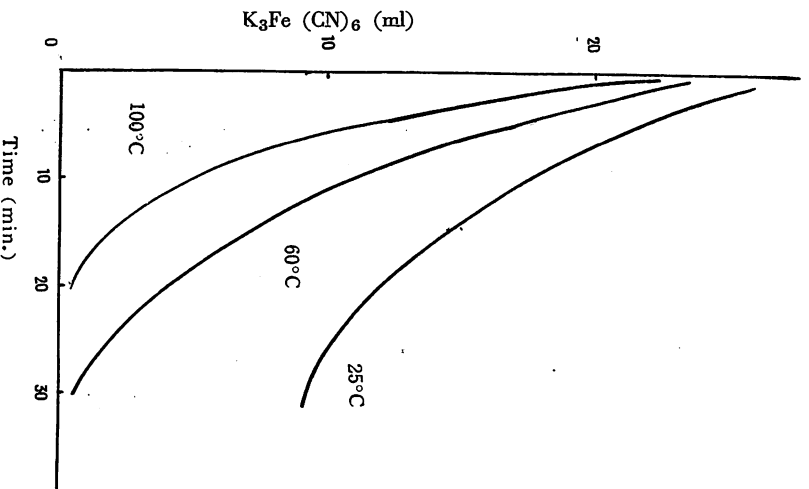


Fig. 1 Lablity of hydroxylamine in  
alkali

A mixture of 1 ml. of 0.5 N  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ , dissolved in 90% alcohol and 0.2 ml of 5 N  $\text{NaOH}$  was allowed to stand at room temperature (25°C), 60 and 100°C. At various times, the residual  $\text{NH}_2\text{OH}$  was determined by titration with 0.1%  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ .



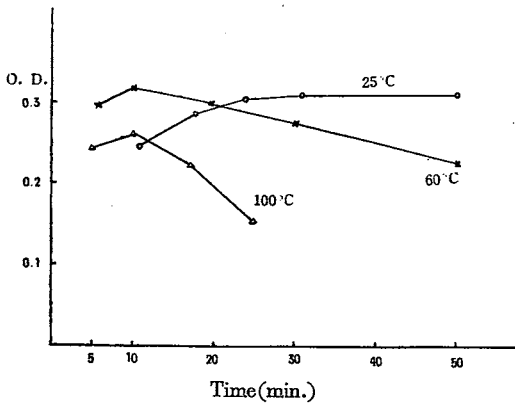


Fig. 2 Conversion of acetoxy groups to acetohydroxamic acid under various conditions.

A mixture of dehydroepiandrosterone acetate 500 $\gamma$ , 1 ml of 0.5 N  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  in 90% alcohol and 0.2 ml of 5 N NaOH was allowed to stand at room temperature (25°C), 60 and 100°C. Acetohydroxamic acid was determined colorimetrically as ferric-complex.

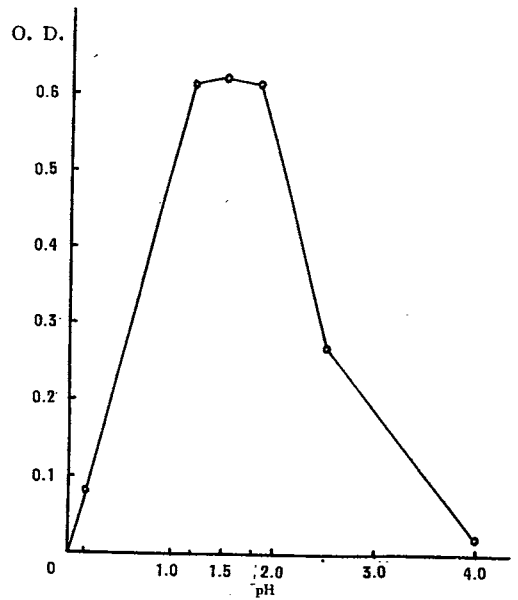


Fig. 3 Showing the dependence of formation of ferric-acetohydroxamic acid complex upon pH.

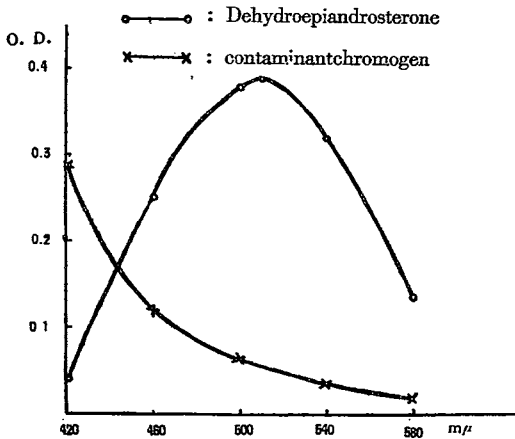


Fig. 4 Absorption spectra for the colored ferric-acetohydroxamic acid complex and the contaminant chromogen.

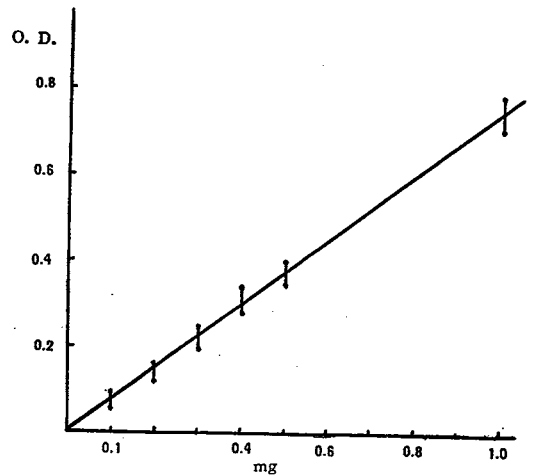


Fig. 5 Calibration curve for dehydroepiandrosterone

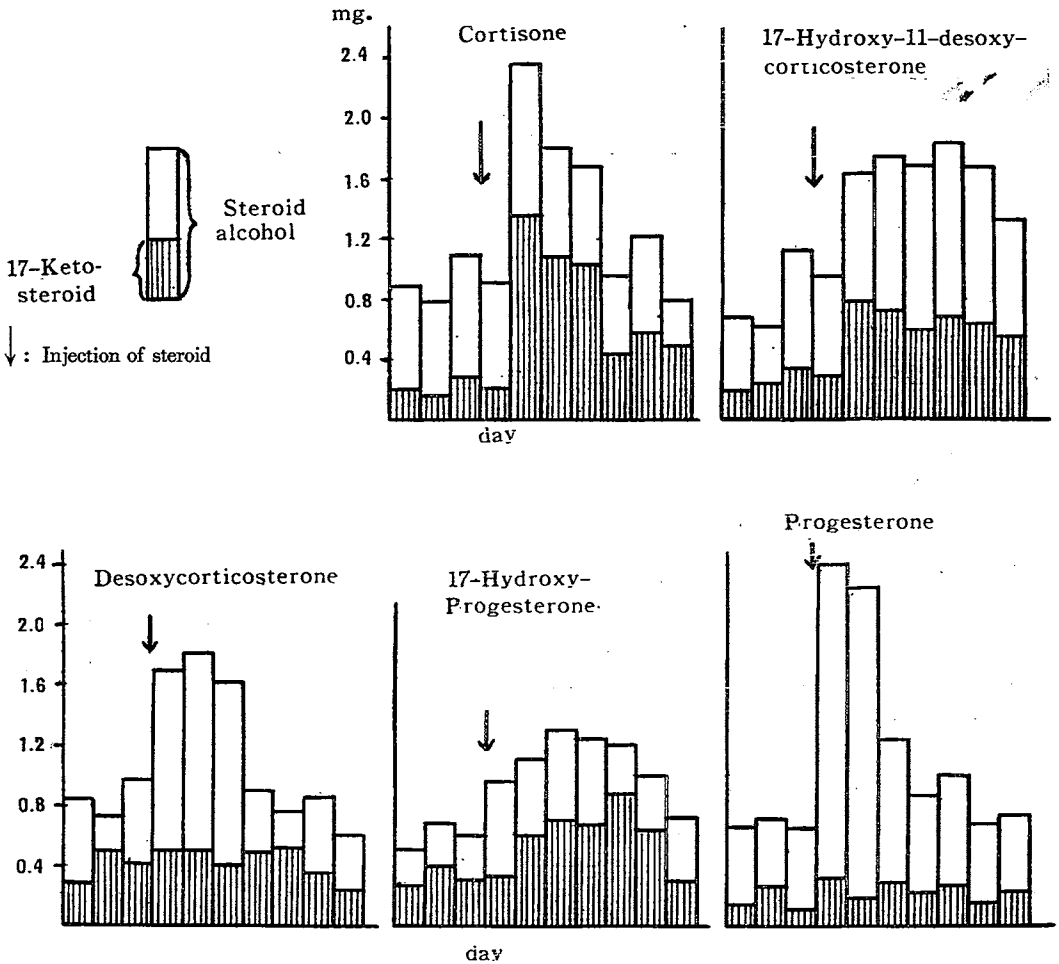


Fig. 6 The effect of intramuscular administration of various

steroids on the urinary excretion of steroid alcohol and ketosteroids in female rabbits. The value of steroid alcohol and 17-ketosteroid was calculated as milligram equivalents of dehydroepiandrosterone per 24 hours.