

22. A. MARIANI e L. TENTORI. — La determinazione colorimetrica dell'esestrol e del dietilstilbestrol.

Riassunto. — La reazione di nitrosazione dei fenoli parasostituiti può essere applicata per la determinazione colorimetrica degli estrogeni sintetici. Per l'esestrol e il dietilstilbestrol che sono i prodotti a maggiore attività biologica, sono state ricavate le curve di assorbimento impiegando lo spettrofotometro del Beckman e, per ambedue le sostanze sono state tracciate le curve per la loro determinazione.

Il procedimento consiste, partendo da soluzioni alcoliche, di evaporare il solvente, riprendere il residuo con soluzione tampone, eseguire la nitrosazione con acido solforico e nitrito sodico e portare a volume con ammoniaca alcolica. Operando in tal modo la colorazione che si ottiene (con massimo di assorbimento ben netto a 440 $m\mu$), è stabile per parecchio tempo ed è in funzione lineare con la concentrazione del prodotto entro i limiti da 0 a 1,5 mg.

Il procedimento analitico è applicabile ai prodotti farmaceutici sia in compresse, operando un'estrazione con alcool etilico, sia in fiale oleose, eseguendo una preventiva saponificazione secondo il procedimento riportato dalla Farmacopea Americana.

Résumé. — La réaction de nitrosation des phénols parasubstitués peut être appliquée pour le dosage colorimétrique des substances oestrogènes synthétiques. Pour l'hexoestrol et le diéthylstilboestrol, qui sont les produits ayant une plus grande activité biologique, on a obtenu les courbes d'absorption en employant le spectrophotomètre de Beckman, et pour l'une et l'autre de ces substances on a tracé les courbes pour leur dosage.

Ce procédé consiste, à partir de solutions alcooliques, à évaporer le solvant, à redissoudre le résidu dans une solution tampon, puis effectuer la nitrosation par l'acide sulfurique et le nitrite de sodium et porter au volume voulu par addition d'ammoniaque alcoolique. Par cette méthode, la coloration obtenue (avec un maximum d'absorption bien net à 440 $m\mu$) est stable pour un temps assez long et est en fonction linéaire avec la concentration du produit entre les limites de 0 à 1,5 mg.

Ce procédé analytique est applicable aux produits pharmaceutiques soit en forme de comprimés, en faisant une extraction par l'alcool éthylique, soit en ampoules huileuses, en faisant une saponification préalable suivant la méthode indiquée dans la Pharmacopée américaine.

Summary. — The reaction of nitrosification of parasubstituted phenols can be applied for the colorimetric determination of synthetic oestrogenic substances. For hexoestrol and diethylstilboestrol, which are the substances having a greater biological activity, the absorption curves have been obtained by using the Beckman spectrophotometre, and for both these substances the curves for their determination have been plotted.

The procedure consists, starting from alcoholic solutions, in evaporating the solvent, redissolving the residue in a buffer solution, then effecting the nitrosification with sulphuric acid and natrium nitrite, and making up the volume with alcoholic ammonia. Following this procedure, the colour obtained (with a well-marked maximum absorption at 440 m μ) is stable for a rather long time and appears as a lineary function of the concentration of the product within the limits of 0 to 1,5 mg.

This analytical procedure is applicable to pharmaceutical preparations either in tablets, by making an extraction with ethyl alcohol, or in ampoules of oily solutions by making a previous saponification according to the method reported in the U. S. Pharmacopoeia.

Zusammenfassung. — Die Nitrosationsreaktion der parasubstituierten Phenole kann bei der kolorimetrischen Bestimmung der synthetischen Oestrogene angewendet werden. Für Hesextrol und Diäthylstilbestrol, Produkte, welche die stärkste biologische Aktivität aufweisen, wurden die absoluten Kurven mit dem Beckmanspektrophotometer ermittelt; für beide Substanzen sind die Bestimmungskurven dargestellt worden.

Das Verfahren besteht darin, dass man von alkoholischen Lösungen ausgehend, das Lösungsmittel verdampft, den Rückstand in Pufferlösung löst, mit Schwefelsäure und Natriumnitrit nitrosiert und mit alkoholischem Ammoniak zum bestimmten Volumen auffüllt. Die bei diesem Verfahren enthaltene Färbung (mit einem deutlichen Absorptionsmaximum bei 440 m μ) bleibt lange Zeit stabil und ist eine lineare Funktion der Konzentration des Produktes zwischen den Grenzgrößen 0 und 1,5 mg.

Das analytische Verfahren ist bei pharmazeutischen Produkten anwendbar, indem man bei Tabletten eine Extraktion mit Aethylalkohol und bei öligen Phiolen, eine im amerikanischen Arzneibuch angegebene Methode vorausgehen lässt.

La determinazione per via chimica degli estrogeni sintetici è un problema finora non completamente risolto mentre è di attuale importanza pratica dato il crescente uso di tali sostanze in terapia.

Il gran numero di prodotti farmaceutici, che contengono gli estrogeni sintetici, sia sotto forma di compresse, sia in soluzione oleosa, ci

ha spinto a ricercare un metodo, che permettesse la determinazione rapida e sicura di tali sostanze.

Tutti i metodi chimici finora riportati dalla letteratura non presentano purtroppo la necessaria sensibilità, o sono inapplicabili all'analisi corrente. In genere sono quasi tutti metodi colorimetrici data la facilità di creare prodotti colorati dalla caratteristica fenolica dei composti attivi.

Così Tubis e Bloom ⁽¹⁾, per mezzo del reattivo di Folin modificato dal Ciocalteau (acido molibdosfosforico), ottengono una colorazione blu dovuta alla formazione di ossidi tungstici. Huf e Widmann ⁽²⁾ copulano i derivati dello stilbestrolo con l'acido diazobenzensulfonico ottenendo un composto colorato. Sondern e Burson ⁽³⁾ determinano il prodotto per via bromometrica e Cocking ⁽⁴⁾ per mezzo del bromo in soluzione acetica. Malpress ⁽⁵⁾ si serve della colorazione dei nitroderivati in soluzione alcalina. Una rassegna delle reazioni colorate del dietilstilbestrolo è stata compilata da Devis ⁽⁶⁾ comprendente anche quelle ottenute in presenza di acido solforico concentrato per azione dei metalli del IV, V e VI gruppo del sistema periodico.

Pur non essendo gli estrogeni sintetici compresi nei prodotti fenolici che danno la caratteristica reazione di Liebermann, per avere bloccate le posizioni para rispetto agli ossidrili, è interessante rilevare che già da tempo Stoughton ⁽⁷⁾ aveva notato che i fenoli parasostituiti per azione dell'acido nitrico diluito formano con facilità gli ortonitroso derivati, che sono fortemente colorati in soluzione alcalina. Nel 1946 Likken, Treseder e Zahn ⁽⁸⁾ hanno modificato il procedimento di determinazione dei fenoli parasostituiti impiegando per la nitrosazione una soluzione satura di nitrito sodico al posto dell'acido nitrico e hanno potuto così ottenere la formazione, a temperatura ordinaria, del nitrosofenolo, che presenta, in soluzione ammoniacale alcolica, una colorazione gialla di grande stabilità. La colorazione è dovuta alla forma chinonossimica che presentano gli ortonitroso derivati dei fenoli parasostituiti.

Basandoci sulla reazione dei predetti Autori abbiamo voluto applicare analogo procedimento all'esestrolo e al dietilstilbestrolo che, essendo rispettivamente un p.p'-dietil-4-4'-diossidibenzile e un p.p'-dietil-4-4'-dios-

(1) Ind. Eng. Chem. An. Ed., 14, 309 (1942).

(2) Zeitsch. Physiol. Chem., 274, 88 (1942).

(3) Ind. Eng. Chem. An. Ed., 14, 358 (1942).

(4) Analyst, 68, 144 (1943).

(5) Biochem. J., 39, 95 (1945).

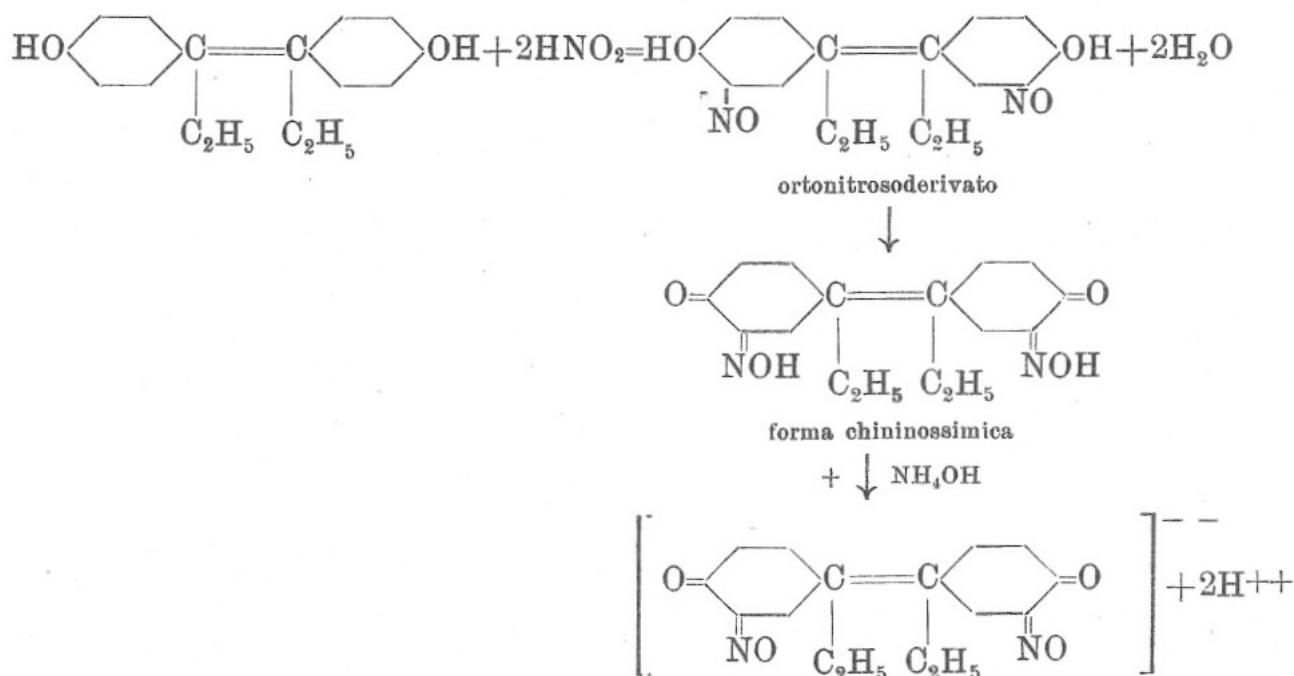
(6) Compt. R. Soc. Biol., 140, 1071, 1083; 1088, 1090 (1946).

(7) Journ. Biol. Chem., 115, 293 (1936).

(8) Ind. Eng. Chem. An. Ed., 18, 103 (1946).

sistilbene, dovevano comportarsi analogamente per quanto riguardava la formazione delle ortochinonossime in seguito alla nitrosazione.

Nel caso ad esempio del dietilstibestrola verosimilmente la reazione procede secondo il seguente schema:



Il metodo da noi seguito è pertanto analogo a quello messo a punto da Likken e coll. per la determinazione dei fenoli.

Come ci si poteva aspettare, abbiamo ottenuto per ambedue le sostanze una colorazione ben stabile e misurabile per quantitativi da 0 ad 1,5 mg ottenendo una perfetta proporzionalità tra i valori dell'assorbimento e quelli delle concentrazioni.

Impiegando il metodo che riportiamo in dettaglio abbiamo potuto controllare il contenuto di esestrola e di dietilstilbestrola in molte preparazioni farmaceutiche sia sotto forma di compresse che in soluzione oleosa.

Al fine di poter rilevare il grado di riproducibilità dei dati analitici, su tre varie concentrazioni di esestrola è stato eseguito il metodo come descritto. La tabella seguente riporta i risultati di quattro identiche prove su ciascuna concentrazione e le deviazioni massime dalla media.

Data la pendenza della curva l'errore massimo che si può commettere nella determinazione colorimetrica è risultato del $\pm 1,3\%$.

Sost. prelevata mg.	Valori dell'E letto				Media	Scarto
0,275	0,170	0,175	0,172	0,180	0,175	0,005
0,800	0,516	0,518	0,524	0,521	0,520	0,004
1,14	0,710	0,721	0,702	0,718	0,712	0,01

PARTE SPERIMENTALE

Apparecchio di misura. — Le misure di assorbimento sono state ricavate con uno spettrofotometro Beckman mod. DU, usando come sorgente luminosa la lampada a filamento di tungsteno e vaschette da 10 mm di spessore. La curva di assorbimento per ricavare il valore di $E_{\max}$, è stata limitata nel campo tra 400 e 500 $m\mu$ mantenendo fisso il bottone della sensibilità e variando la fenditura per ottenere il 100% di trasmissione con l'acqua. La curva per ricavare il valore di C in funzione dell'estinzione a λ di massimo assorbimento (440 $m\mu$) è stata tracciata con una fenditura di 0,04 mm.

Reattivi:

- a) Soluzione tampone: ad 80 cm^3 di acido acetico glaciale si aggiungono 15 cm^3 di KOH al 10% e si porta a 100 cm^3 con acqua distillata.
- b) Soluzione satura di nitrito di sodio.
- c) Acido solforico concentrato di $d=1,84$.
- d) Ammoniaca alcolica: a 450 cm^3 di alcool etilico si aggiungono 300 cm^3 di ammoniaca concentrata e si porta ad 1 litro con acqua distillata.

Procedimento:

Si prepara una soluzione alcolica dell'ormone sintetico; aliquote contenenti da 0,1 a 1,5 mg di sostanza vengono evaporate in un piccolo beker su b. m. bollente. Al residuo ottenuto si aggiungono 5 cm^3 di soluzione tampone e, a soluzione avvenuta, si aggiungono 5 gocce di acido solforico concentrato e due gocce di soluzione satura di nitrito sodico. Dopo 30' circa si travasa in palloncino da 50 cm^3 e si porta a segno con la soluzione di ammoniaca alcolica, lavando con le prime porzioni il beker dove era contenuta la sostanza. Si raffredda il palloncino sotto acqua corrente, si porta di nuovo a volume e si esegue la lettura dell'assorbimento a 440 $m\mu$.

OSSERVAZIONI

Poichè i prodotti estrogeni sintetici maggiormente usati in Italia sono il dietilstilbestrolo ed il suo diidroderivato, l'esestrolo, ci siamo limitati ad applicare la reazione colorimetrica a queste due sostanze che, come è noto, sono quelle di maggiore attività biologica.

Le curve che riportiamo sono state ricavate impiegando prodotti puri. La fig. 1 rappresenta le curve di assorbimento ottenute nel campo da 400 a 500 $m\mu$ per una concentrazione di 0,0092% e mostra in ambedue i casi l'esistenza di un massimo ben netto a 440 $m\mu$. La fig. 2 mostra la proporzionalità lineare fra l'assorbimento al massimo e la concentrazione.

I valori di $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ sono risultati rispettivamente 320 per l'ese-strolo e 290 per il dietilstilbestrolo, valori che permettono una determinazione quantitativa nel campo fra 0,1 e 1,5 mg seguendo la tecnica sopra descritta.

La colorazione finale da noi ottenuta, contrariamente a quanto viene riferito da Lykken per il caso dei fenoli parassostituiti, ha raggiunto il massimo di intensità in pochi minuti e praticamente le letture si sono mantenute sempre costanti dal momento in cui il liquido veniva raffreddato fino a parecchie ore dopo, anche alla luce del giorno. In ogni modo abbiamo sempre eseguito

le misure colorimetriche 15' dopo l'aggiunta dell'ammoniaca alcolica.

La concentrazione alcolica che si ottiene lavorando con i reattivi sopra indicati, e già sperimentati da Lykken e coll. è la migliore per mantenere in soluzione il prodotto colorato il quale precipiterebbe variando la concentrazione stessa.

Abbiamo anche applicato il metodo alla determinazione quantitativa degli estrogeni sintetici nei prodotti farmaceutici in confezione di compresse e di soluzione oleosa iniettabile. Nel caso delle compresse l'estrazione viene eseguita secondo i dettagli consigliati da Tubis e Bloom. Un quantitativo in compresse pari a circa 10 mg di estrogeno è frantumato e posto con dell'alcool etilico in un pallone tarato a 50 cm³. Il palloncino, collegato con un tubo che funzioni da refrigerante a ricadere, è posto su b. m. bollente per 15', quindi raffreddato e portato a volume con alcool. Cm³ 5 di filtrato limpido vengono prelevati, evaporati e sottoposti a procedimento analitico.

Nel caso delle fiale l'estrazione è eseguita secondo il metodo indicato dalla Farmacopea americana U.S.P. XIII. Un quantitativo di soluzione oleosa pari a 10 mg di estrogeno sintetico viene sciolto in 25 cm³ di etere privo di perossidi, estratto in separatore per tre volte con 15 cm³ di idrato sodico N/10. La fase acquosa, separata, acidificata con acido sol-

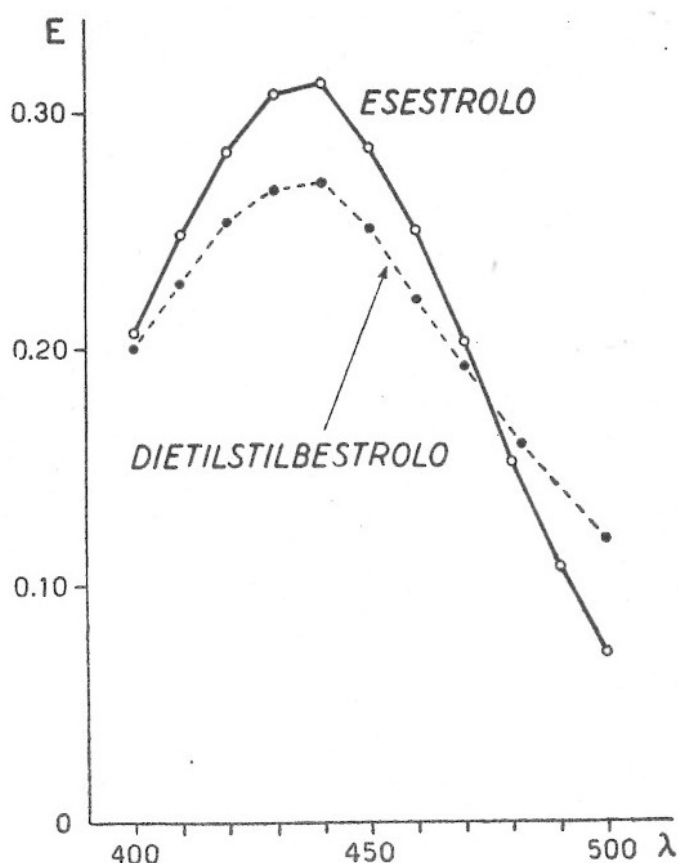


FIG. 1.

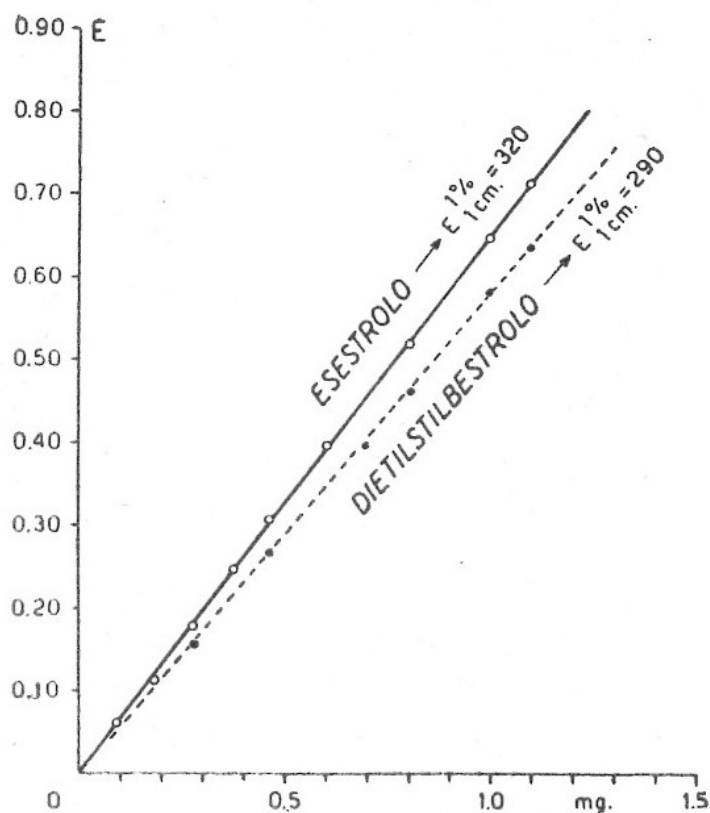


FIG. 2.

forico diluito, è sottoposta di nuovo ad estrazione per tre volte con 10 cm³ di etere; le frazioni eterree, riunite, dopo essiccazione su solfato sodico anidro, vengono evaporate a leggero calore. Il residuo, sciolto in alcool è portato a 50 cm³ dei quali vengono presi per analisi porzioni corrispondenti a circa 1 mg di estrogeno.

I risultati ottenuti in vari prodotti contenenti l'esestrollo ed il dietilstilbestrolo hanno fornito dati concordanti, per cui il metodo è consigliabile per il controllo di tali sostanze nelle preparazioni farmaceutiche.

Roma, Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Biologia, 12 ottobre 1948.