

# DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON $\Delta^4$ -17 $\beta$ -HYDROXYÖSTREN-DERIVATEN UND DEREN ANWENDUNG ZUR STABILITÄTSPRÜFUNG VON TABLETTEN-ZUBEREITUNGEN

HERBERT G. GÄNSHIRT UND J. POLDERMAN  
*Pharmazeutische Forschungslaboratorien, N.V. Organon,  
Oss (Die Niederlande)*

(Eingegangen den 23. April 1964)

In jüngster Zeit haben  $\Delta^4$ -17 $\beta$ -Hydroxyöstren-Derivate in Form von Arzneimitteln grosse Beachtung gefunden. Über die Stabilitätsprüfung verschiedener Östrenol-Tablettenzubereitungen liegt bereits eine qualitative Untersuchung von FOKKENS UND POLDERMAN<sup>1</sup> vor. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie stellten die Autoren fest, dass die Östrenole und ihre Arzneiformen in Abhängigkeit von der 17 $\alpha$ -Substitution unterschiedliche Stabilität aufweisen. Durch Zufügen entsprechender Stabilisatoren konnte, so weit aus den qualitativen Untersuchungen zu schliessen war, die Haltbarkeit wesentlich verbessert werden.

Es erschien uns nun interessant, diese qualitativen Befunde mit einer geeigneten quantitativen Methode eingehend zu prüfen. Da bei der Umsetzung der Östrenole zahlreiche Sekundärprodukte auftreten, war es naheliegend eine Methode zu suchen, womit das noch vorhandene unveränderte Östrenol bestimmt werden konnte. Wir benutzten dazu das von den genannten Autoren verwendete dünnschichtchromatographische Verfahren zum Abtrennen des noch vorhandenen Östrenols von seinen Umsetzungsprodukten und arbeiteten eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Östrenolflecke aus.

Verschiedene Möglichkeiten wurden in Betracht gezogen, zum Beispiel die Auswertung der Fleckenfläche wie es von PURDY UND TRUTER<sup>2-4</sup>, sowie von anderen Autoren<sup>5</sup> angegeben wurde und die kolorimetrische Bestimmung der Östrenole mit einem geeigneten Reagenz nach Lokalisieren auf dem Chromatogramm und Extraktion in Anlehnung an eine Methode wie sie z.B. früher für die Analyse von Gallensäure beschrieben wurde<sup>6,7</sup>.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### *Verwendete Geräte*

- (1) Perkin-Elmer 4000 A, Spectracord, Spektrophotometer.
- (2) Ultraviolett-Strahlungsquelle zum Nachweis der Flecke: Ultra-Violett Equipment, C-3, Black Light Eastern Corp., Bayside, N.Y.
- (3) Schablone zur Herstellung der Sorptionsschichten: Unoplan<sup>®</sup>-Leveller No. 2810, Shandon Scientific Company Ltd., 65 Pound Lane, London N.W. 10.

(4) Streichgerät zur Herstellung der Sorptionsschichten: Selbsthergestelltes Gerät für 250  $\mu$  Schichtdicke.

(5) Glastrennkammern der Fa. Desaga, Hauptstr. 60, Heidelberg.

(6)  $\lambda$ -Pipetten.

### *Reagentien*

Kieselgel, G, Kieselgel H und Kieselgel HF (Merck, Darmstadt).

Heptan, normal (Merck, Darmstadt, No. 4365).

Aceton, p.a. (Merck, Darmstadt).

Methylenchlorid, frisch destilliert. (Mit diesem Methylenchlorid hergestellter Blindwert darf sich nicht anfärben).

Schwefelsäure 95–97 %, p.a. (Merck, Darmstadt).

Verdünnte Schwefelsäure: Schwefelsäure  $7/3$  = Schwefelsäure–Wasser (70:30, V/V).

Verdünnte Schwefelsäure: Schwefelsäure  $8/2$  = Schwefelsäure–Wasser (80:20, V/V).

Schwefelsäure in Äthanol: Schwefelsäure–Äthanol (1:99, V/V).

Essigsäure 96 %, p.a. (Merck, Darmstadt, No. 90061).

Vanillin-Reagenz: 400 mg Vanillin in 10 ml Eisessig auflösen.

### *Durchführung der Untersuchungen*

#### *(a) Auswertung der Fleckenflächen nach Besprühen mit Schwefelsäure*

Um möglichst homogene Sorptionsschichten herstellen zu können, wurde die Unoplan<sup>®</sup>-Schablone, die einen ebenen Übergang der Trägerglasplatten auch bei unterschiedlicher Dicke gewährleistet, verwendet. Als Sorptionsmaterial diente ohne Gipszusatz hergestelltes Kieselgel H bzw. HF, dessen Suspension die Konsistenz beim Stehen nicht verändert. Das Mengenverhältnis Kieselgel–Wasser wurde wie allgemein üblich<sup>8</sup> gewählt. Das Sorptionsmaterial wurde mit einem "Waring-Blender" vollkommen homogen suspendiert und mit einem Streichgerät so gleichmässig wie möglich mit einer Schichtdicke von 250  $\mu$  ausgestrichen. Das von der Lieferfirma der Unoplan Schablone bezogene Streichgerät befriedigte nicht. Es ist der Schablone nicht genau angepasst und ermöglicht keine sichere Führung. Daher wurde ein selbst hergestelltes, die Vorteile der Schablone ausnutzendes Streichgerät verwendet. Das Desaga\* Streichgerät konnte auf Grund seiner Abmessungen nicht in Verbindung mit der Unoplan-Schablone eingesetzt werden. Beim Auftragen der Standardlösungen wurden die Hinweise von PURDY UND TRUTER<sup>3,4</sup> befolgt. Es wurden Standardlösungen verschiedener Konzentration hergestellt und immer dasselbe Volume (10  $\mu$ l), in Form eines Tropfens, mit einer geeichten  $\lambda$ -Pipette, 1.5 cm vom unteren Plattenrand entfernt, aufgebracht.

Nach Einwirken des Fließmittels — Heptan–Aceton (60:30) — über eine Trennstrecke von 10 cm und Abdampfen des Lösungsmittelgemisches an der Luft, wurde mit Schwefelsäure in äthanolischer Lösung möglichst gleichmässig besprüht und 10 Min. auf 100° erhitzt. Unter U.V.-Licht (366 m $\mu$ ) wurden die gelb fluoreszierenden Flecke sorgfältig mit einer Nadel aufgezeichnet und der Fleckenumriss mit Hilfe von

\* Fa. Desaga, Heidelberg, D.B.R., Hauptstr. 60.

Transparentpapier auf gutes Schreibpapier kopiert, ausgeschnitten und die Papierfläche gewogen. Die Daten einer solchen Untersuchung mit Äthylöstrenol sind in Tabelle I wiedergegeben.

TABELLE I  
AUSWERTUNG DER FLECKENFLÄCHE VON ÄTHYLÖSTRENOL\*

Aufgebrachte Menge $w$ ( $\mu\text{g}$ )	5	10	20	40	80
$\log w$	0.7	1.0	1.3	1.6	1.9
Papiergewicht der kopierten Flecke (mg)	4.72	6.08	8.15	9.40	10.97
Fleckenfläche $f$ ( $\text{mm}^2$ )	72	94	126	145	169
$\sqrt{f}$	8.5	9.7	11.2	12.0	13.0
$S_{\text{rel}}$ , % (bei 4 Bestimmungen)	7.5	7.5	4.8	5.2	3.6

\* Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von 4 Bestimmungen. 10 mm Fleckenfläche entsprachen 0.65 mg Papiergewicht.

(b) *Durchführung der kolorimetrischen Bestimmung nach Chromatographie, Lokalisierung mit Joddampf und anschliessender Extraktion der Östrenolflecke*

**Chromatographie.** Die Herstellung der Kieselgel-Sorptionsschicht ist hier nicht kritisch. Sowohl Kieselgel G, wie auch H können verwendet werden. Die in Tabelle III angegebene Menge Standard und die in Tabelle V angeführte Menge Tablettenextrakt wird 1.5 cm vom unteren Plattenrand entfernt mit Hilfe von  $\lambda$ -Pipetten aufgetragen. Fließmittel, Heptan-Aceton (60:30) über eine Trennstrecke von 10 cm einwirken lassen. Nach Abdampfen des Fließmittels an der Luft, Platte in Jodatmosphäre stellen. Die nach 15–30 Sek. erscheinenden Steroidflecke mit einer Nadel anzeichnen. Anschliessend die Platte solange im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahren, bis die braune Anfärbung der Flecke nicht mehr zu sehen ist. Dann die angezeichneten Flecke abkratzen und in 5 ml. Zentrifugengläser mit eingeschliffenen Glasstopfen überführen. In derselben Weise einen leeren Kieselgelfleck als Blindwert I von der Platte abkratzen und verarbeiten.

**Kolorimetrische Bestimmung.** In alle Zentrifugengläser, die in Tabelle III angeführte Menge Methylchlorid pipettieren, 3 Min. kräftig schütteln und zentrifugieren. Von der klaren überstehenden Lösung 1 ml in Reagenzgläser pipettieren. In ein weiteres Reagenzglas 1 ml Methylchlorid abmessen (Blindwert II). Lösungsmittel auf dem Wasserbad unter Verwendung von Wasserstrahl-Vakuum abdampfen. Da die Östrenole lichtempfindlich sind, schnell weiter arbeiten. Wird die Vanillin-Schwefelsäure-Reaktion benutzt, so gibt man zum Rückstand 0.5 ml Vanillin-Reagenz und vorsichtig, so dass zunächst keine Mischung stattfindet 3.5 ml Schwefelsäure  $7/3$ . Anschliessend wird gut umgeschüttelt. Wird die Schwefelsäurereaktion verwendet, so gibt man zum Rückstand 0.5 ml Eisessig und vorsichtig, so dass zunächst keine Mischung stattfindet 3.5 ml Schwefelsäure  $8/2$ . Anschliessend wird wieder gut umgeschüttelt. Nach Aufbewahren der Reaktionsgemische unter den in Tabelle III angeführten Bedingungen misst man in 1 cm-Küvetten bei den angegebenen Wellenlängen unter Verwendung des Methylchloridblindwertes (Blindwert II). Der Kieselgelblindwert (Blindwert I) darf gegen den Methylchloridblindwert gemessen, keine Extinktion aufweisen.

Um bei Stabilitätsuntersuchungen den Analysenfehler möglichst nieder zu halten (vgl. Tabelle IV) ist es zweckmässig pro Bestimmung jeweils 3 Standard-

und 3 Tablettenextraktflecke auf eine Platte aufzubringen. Die erhaltenen Extinktionswerte für Standard und Tablettenextrakt werden dann gemittelt und daraus der Gehalt pro Tablette berechnet.

## DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Bei dem Versuch die Fleckenflächen chromatographierter Standardmengen der Östrenole quantitativ auszuwerten, fanden wir auch im vorliegenden Fall die von PURDY UND TRUTER<sup>3</sup> angegebene lineare Abhängigkeit zwischen der Quadratwurzel der Fleckenfläche und dem Logarithmus der aufgetragenen Menge. Die Reproduzierbarkeit des Verfahrens war jedoch wie aus dem in Tabelle I wiedergegebenen Beispiel zu ersehen ist, auch bei Verwendung möglichst homogener Sorptionschichten und Aufbringen der Steroidlösungen unter standardisierten Bedingungen nicht befriedigend. Da aus den pharmazeutischen Zubereitungsformen teilweise noch Hilfsstoffe mit extrahiert werden, welche die Fleckenform im Chromatogramm verändern, konnte diese Methode trotz ihres geringen Arbeitsaufwandes nicht für unsere quantitativen Stabilitätsprüfungen verwendet werden. Die Bestimmung der an die Östrenolflecke in Jodatmosphäre addierbaren beziehungsweise adsorbierten Jodmenge durch Kolorimetrie oder Mikrotitration schien eine weitere analytische Möglichkeit zu sein. Eine entsprechende Methode für die Papierchromatographie wurde kürzlich von DITTRICH<sup>9</sup> beschrieben. Über unsere Ergebnisse bei der Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen soll nach Abschluss der Untersuchungen an anderer Stelle berichtet werden.

Günstige Resultate erhielten wir mit der dritten in Erwägung gezogenen Methode. Die Östrenolflecke wurden mit Joddampf lokalisiert, extrahiert und anschliessend mit Schwefelsäure bzw. mit Vanillin-Schwefelsäure kolorimetrisch bestimmt. Der Vorteil dieser Methode ist nicht allein die gute Reproduzierbarkeit, sondern auch die relativ spezifische Anfärbung in Abhängigkeit von der C-17 $\alpha$ -Substitution. Aus Tabelle II

TABELLE II

EXTINKTIONSMAXIMA DER ÖSTRENOLE BEIM ANFÄRBEEN MIT SCHWEFELSÄURE UND VANILLIN-SCHWEFELSÄURE UNTER GLEICHEN BEDINGUNGEN

Östrenol	Schwefelsäure		Vanillin-Schwefelsäure	
	<i>n m</i>	<i>E</i> *	<i>n m</i>	<i>E</i> **
17-Äthyl	420	0.046	470	0.835
17-Allyl	I 422	0.321	450	0.310
	II		540	0.260
17-Äthinyl	I 375	1.699	520	0.149
	II 515	0.276		
6-Methyl-17-äthinyl	I 375	1.523	520	0.180
	II 508	0.403		
17-Propargyl	380	0.125	540	0.125

\* 100  $\mu$ g, 20 Min., Zimmertemperatur.

\*\* 50  $\mu$ g, 1 St., 40°.

geht hervor, dass 17-Allyl-, 17-Äthinyl- und 6-Methyl-17-äthinyl-östrenol mit Schwefelsäure Anfärbungen ergeben, die im sichtbaren Bereich des Spektrums ein

TABELLE III

DATEN ZU DER QUANTITATIVEN ANALYSENVORSCHRIFT FÜR DIE ÖSTRENOLE

	Östrenol			
	17-Äthyl	17-Allyl	17-Äthinyl	6-Methyl-17-äthinyl 17-Propargyl
Konzentration der verwendeten Standardlösung Methylenchlorid ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	2	5	5	5
Auf die Platte aufgebrachte Mengen, $\mu\text{g}$ ( $\mu\text{l}$ )	60 (30)	200 (40)	200 (40)	100 (20)
Verwendete Volumen Methylenchlorid für die Extraktion der Flecke aus dem Kieselgel (ml)	3	2	2	2
Vom Extrakt jeweils 1 ml für die Farbreaktion eingesetzt, entsprechend folgenden Mengen Östrenol ( $\mu\text{g}$ )	20	100	100	50
Reagenz für die kolorimetrische Bestimmung	Vanillin-Schwefelsäure	Schwefelsäure	Schwefelsäure	Schwefelsäure Vanillin-Schwefelsäure
Reaktionsbedingungen und Messwellenlänge (nm)	1 Std., 40° 470	1 Std., 40° 422	20 Min., Z.T.* 515	20 Min., Z.T. 508
Für die angegebenen Mengen Östrenol im Mittel gefundene Extinktion, 1 cm Schichtdicke	0.324	0.390	0.276	0.202
Entsprechend Tabelle IV bestimmte relative Standardabweichungen $S_{rel}$ (%)	3.2	4.0	3.2	4.3
Linearitätsprüfungen (Mittel von je 3 Bestimmungen)	20 $\mu\text{g}$ , E 0.324 30 $\mu\text{g}$ , E 0.500 40 $\mu\text{g}$ , E 0.677	50 $\mu\text{g}$ , E 0.195 100 $\mu\text{g}$ , E 0.390 200 $\mu\text{g}$ , E 0.781	100 $\mu\text{g}$ , E 0.276 200 $\mu\text{g}$ , E 0.545 300 $\mu\text{g}$ , E 0.810	50 $\mu\text{g}$ , E 0.202 100 $\mu\text{g}$ , E 0.403 125 $\mu\text{g}$ , E 0.509
Im Mittel nach Chromatographie wiedergefundene Menge, im Vergleich mit direkt bestimmten Standardmengen (%)	95	95	94	96

\* Z.T. = Zimmertemperatur.

Maximum besitzen, die 17-Äthyl- und Propargylverbindung nicht. Die Äthylverbindung weist dagegen mit Vanillin-Schwefelsäure ein Spektrum mit einem im sichtbaren Bereich liegenden, gut auswertbaren Maximum auf. Propargylöstrenol zeigt auch mit diesem Reagenz kein ausgeprägtes Spektrum. Um diese Verbindung quantitativ bestimmen zu können, mussten daher die Reaktionsbedingungen auf 1 St., 60° abgeändert werden. Bei keinem der untersuchten Steroide wurde das Spektrum durch die Lokalisierung mit Joddampf verändert. Auch andere Autoren, die Joddampf zum Auffinden von getrennten Substanzen verwendeten, sahen keine Abweichungen bei der nachfolgenden U.V.-spektrophotometrischen Bestimmung<sup>10,11</sup> oder der kolorimetrischen Auswertung im sichtbaren Bereich<sup>12</sup>. Nur bei der Analyse von Triglyceriden wurde bisher über Schwierigkeiten berichtet. Durch Jodierung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren trat ein Verlust derselben bei anschliessender Gaschromatographie auf<sup>13</sup>. Die Lokalisation der Östrenole war auch mit Sorptionsschichten, die 0.02–0.03 % 3,5-Dihydroxypyren-8,10-disulfonsäure Natriumsalz enthielten, unter U.V.-Licht möglich, so wie es von TSCHESCHE und Mitarbeitern beschrieben wurde<sup>14</sup>. Die für die Östrenolanalyse verwendeten Fliess- und Extraktionsmittel lösen die genannte Substanz nicht aus der Schicht.

Einzelheiten über die Ausführung der Schwefelsäuremethoden sind in Tabelle III zusammengefasst. Die Reproduzierbarkeit innerhalb der Platten wurde als relative

TABELLE IV

REPRODUZIERBARKEIT DER ANALYSE VON ÄTHYLÖSTRENOL INNERHALB DER PLATTEN

Platte	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5$	$x_6$	$x_7$	$x_8$	$x_9$	$x_{10}$
$E \times 1000$	314	337	319	328	324	347	310	328	323	337
	319	338	293	319	335	337	328	308	310	326
	337	335	323	337	324	319	321	308	307	326
$\bar{x}$	323	337	312	328	328	334	320	315	313	330
$\Sigma(x_i - \bar{x})^2$	293	5	530	162	81	404	165	268	145	81
$S = \sqrt{\frac{\Sigma(x_{i1} - \bar{x})^2 + \Sigma(x_{i2} - \bar{x})^2 + \dots + \Sigma(x_{iM} - \bar{x})^2}{N - M}} = \sqrt{107} = \pm 10.4$										

$$S_{\text{rel}} = \frac{S \times 100}{W} = \frac{10.4 \times 100}{324} = \pm 3.2 \%$$

$\bar{x}$  = Mittelwert der Platte;  $x_i$  = Einzelner Messwert;  $N$  = Zahl der Messungen = 30;  $M$  = Zahl der Platten = 10;  $W$  = Mittelwert aller Extinktionen;  $S$  = Standardabweichung, absolut;  $S_{\text{rel}}$  = Standardabweichung, relativ.

Standardabweichung berechnet, so wie es am Beispiel von Äthylöstrenol in Tabelle IV genau wiedergegeben ist. Es wurden Fehler von  $\pm 3.2$  bis  $\pm 4.3$  % gefunden. Die Grössenordnung dieser Fehler ist dieselbe wie sie früher auf dem Steroidsektor von anderen Autoren bei der kolorimetrischen Bestimmung von Gallensäuren nach dünn-schichtchromatographischer Trennung<sup>6,7</sup> und bei der U.V.-spektroskopischen Analyse von 6-Chlor-17 $\alpha$ -hydroxypregna-4,6-dien-3,20-dionacetat<sup>15</sup> gefunden wurde. Der

TABELLE V  
HALTBARKEITSPRÜFUNGEN VON ÖSTRENOL-TABLETTEN

Präparat*	Stabilisator	Besondere Vermerke	Östrenol wiedergefunden (mg)**							
			Zeit	3 W Kühlschrank	6 W 37°	12 W 37°	3 W 45°	6 W 45°	12 W 45°	
Orgabolin®-Tabletten	—	—	—	2.05	—	0.06	—	0.19	0.05	—
(2.1 mg Äthylöstrenol pro 200 mg Tablette)	—	mit 0.4 mg Paraffin pro Tablette	—	1.94	—	0.41	—	1.94	0.40	—
α-Tocopherol	—	—	—	2.00	—	1.85	—	1.92	1.89	—
Gestanon®-Tabletten	Komplexon	Magnesiumstearat <sup>a</sup>	4.79	—	4.90	4.86	—	4.44	4.36	4.50
(5 mg Allylöstrenol pro 250 mg Tablette)	Komplexon	Magnesiumstearat <sup>b</sup>	4.74	—	4.89	4.67	—	5.10	4.56	4.53
	Komplexon	Magnesiumstearat <sup>c</sup>	4.90	—	4.52	4.93	—	4.22	4.15	4.47
	Komplexon	Magnesiumstearat <sup>d</sup>	4.78	—	4.68	4.97	—	4.69	4.71	4.56
	Komplexon	Magnesiumstearat <sup>e</sup>	4.68	—	4.58	4.69	—	4.41	4.48	4.49
Lyndiol®-Tabletten	α-Tocopherol	Muster a	—	—	—	—	—	4.70	4.91	—
(5 mg Äthylöstrenol pro 100 mg Tablette)	α-Tocopherol	Muster b	—	—	—	—	—	4.65	5.11	—

\* Extraktionsmethode: Orgabolin®-Tabletten, 200 mg Tablettenpulver + 2 ml Methylenchlorid, 5 Min. schütteln, zentrifugieren; 60 µl auftragen.  
Gestanon®-Tabletten, 250 mg Tablettenpulver + 1 ml Methylenchlorid, 5 Min. schütteln, zentrifugieren; 40 µl auftragen.  
Lyndiol®-Tabletten, 80 mg Tablettenpulver + 1 ml Methylenchlorid, 5 Min. schütteln, zentrifugieren; 50 µl auftragen.

\*\* W = Wochen; — = nicht durchgeführt.

von MATTHEWS und Mitarbeitern<sup>10</sup> bei der U.V.-spektrophotometrischen Bestimmung von Testosteron und 4-Chlor-17 $\alpha$ -hydroxy-progesteron nach Dünnschichtchromatographie gefundene Fehler ist dagegen sehr klein. Jedoch wurden von diesen Autoren zu wenig Analysen durchgeführt, um die Resultate mit den oben genannten Ergebnissen vergleichen zu können. Wie aus Tabelle III hervorgeht, wurde bei den vorliegenden Untersuchungen auch innerhalb eines relativ grossen Konzentrationsbereiches Linearität zwischen eingesetzter Östrenolmenge und Messwert gefunden. Beim Vergleich der Messwerte von nicht chromatographierten und chromatographierten Östrenol-Standardmengen wurden mit Ausnahme von Propargylöstrenol nach einmaligem Extrahieren im Mittel 95 % der eingesetzten Substanzmenge wiedergefunden (Tabelle III). Wie die Linearitätsuntersuchungen zeigten, ist die zurückgewonnene Menge im untersuchten Bereich bei Verwendung gleicher Volumina Extraktionsmittel nicht von der eingesetzten Substanzmenge abhängig. Auf wiederholtes Extrahieren wurde daher verzichtet, um das Verfahren möglichst einfach zu gestalten.

Mit dieser Methode wurden die in Tabelle V angeführten Tablettenzubereitungsformen untersucht. Aus den beschleunigten Haltbarkeitsprüfungen der Äthylöstrenol-tabletten (Orgabolin<sup>®</sup>-Tabletten) geht hervor, dass die früher von FOKKENS UND POLDERMAN<sup>1</sup> angegebene Stabilisierung des oxydationsempfindlichen Äthylöstrenols in Tablettenform mit  $\alpha$ -Tocopherol, wie die jetzt durchgeführten quantitativen Untersuchungen zeigen, ausserordentlich wirksam ist. Der in den ersten Wochen der Stabilitätsprüfung auftretende Schutzeffekt, den geringe, den Tabletten zugesetzte, Paraffinmengen ausüben, ist bisher noch nicht geklärt. Bei den Allylöstrenol enthaltenden Tabletten (Gestanon<sup>®</sup>-Tabletten) wurde auf Grund qualitativer chromatographischer Befunde eine Abhängigkeit der Stabilität von der verwendeten Magnesiumstearatqualität erwartet. Diese Vermutung konnte jedoch durch die quantitativen Analysen, wie aus Tabelle V hervorgeht, nicht bestätigt werden. Vielmehr waren alle geprüften Muster weitgehend stabil. Lediglich bei längerer Einwirkung höherer Temperatur (3, 6 und 12 Wochen, 45°) wurde ein Absinken des Mittelwertes aller Muster beobachtet. Auch das in Lyndiol<sup>®</sup>-Tabletten als Wirkstoffkomponente enthaltene Äthinylostrenol war wie Tabelle V zeigt in zwei mit Tocopherol stabilisierten Mustern gut haltbar.

Nach Prüfung einer grossen Zahl von Tablettenmustern können wir sagen, dass die beschriebene quantitative Methode die qualitativen, chromatographischen Befunde wertvoll ergänzt. Bei der chromatographischen Prüfung werden manchmal geringe Mengen von Umsetzungsprodukten erkannt, die bei der quantitativen Bestimmung des noch vorhandenen Östrenols nicht erfasst werden können. Geht der Abbau jedoch über 5 bis 10 % hinaus, so kann nur durch quantitative Bestimmung des noch vorhandenen, unveränderten Östrenols die weitere Zersetzung verfolgt werden.

#### DANK

Für die sorgfältige Durchführung der zahlreichen Analysen danken wir Frl. B. VAN BOEKEL und Frl. J. MASTWIJK.

## ZUSAMMENFASSUNG

Für die Stabilitätsprüfung von  $\Delta^4$ -17 $\beta$ -Hydroxyöstren-Derivaten in Tabletten wurde eine quantitative Methode ausgearbeitet. Die Östrenole werden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie von Umsetzungsprodukten und Begleitstoffen abgetrennt. Nach Lokalisation mit Joddampf werden die Steroidflecke aus der Sorptionsschicht extrahiert, das Lösungsmittel abgedampft und anschliessend mit Schwefelsäure oder Vanillin-Schwefelsäure spektrophotometrisch bestimmt. Mit dieser Methode wurden Tabletten geprüft, welche 17 $\alpha$ -Äthyl-, 17 $\alpha$ -Allyl- oder 17 $\alpha$ -Äthinyloestrenol enthielten. Am Beispiel der Äthylöstrenol-Tabletten ist zu sehen, dass in Abhängigkeit von Tablettenhilfsstoffen und zugesetzten Stabilisatoren grosse Haltbarkeitsunterschiede auftreten. Jedoch zeigten die verschiedenen Östrenole in den geprüften im Handel befindlichen Präparaten durch die darin befindlichen Stabilisatoren gute Haltbarkeit.

## SUMMARY

A method for the quantitative determination of  $\Delta^4$ -17 $\beta$ -hydroxyestrene derivatives has been worked out. The estrenols are first separated by thin-layer chromatography and after localisation with iodine vapour, the steroid spots are extracted. The residue from the evaporated extract is then determined by a colorimetric method, using sulphuric acid or vanillin-sulphuric acid as reagent. With this method the stability of tablets containing 17 $\alpha$ -ethyl-, 17 $\alpha$ -allyl- or 17 $\alpha$ -ethinyloestrenol has been tested. As has been shown with ethylestrenol tablets, there are large differences in stability depending on the excipients and the chosen stabiliser. However, the stability of the estrenol tablets tested, which were stabilised with different suitable additives, was found to be quite good.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> J. FOKKENS UND J. POLDERMAN, *Pharm. Weekbl.*, 96 (1961) 657.
- <sup>2</sup> S. J. PURDY UND E. V. TRUTER, *Chem. Ind. (London)*, (1962) 506.
- <sup>3</sup> S. J. PURDY UND E. V. TRUTER, *Analyst*, 87 (1962) 802.
- <sup>4</sup> E. V. TRUTER, *Thin Film Chromatography*, Cleaver-Hume Press Ltd., London, 1963, S. 112.
- <sup>5</sup> J. AURENGE, M. DEGEORGES UND J. NORMAND, *Bull. Soc. Chim. France*, (1963) 1732.
- <sup>6</sup> H. G. GÄNSHIRT, F. W. KOSS UND K. MORIANZ, *Arzneimittel-Forsch.*, 10 (1960) 943.
- <sup>7</sup> E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer Verlag, Berlin, 1962, S. 47.
- <sup>8</sup> K. RANDEKATH, *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim, Bergstr., 1962, S. 29.
- <sup>9</sup> S. DITTRICH, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 47.
- <sup>10</sup> J. S. MATTHEWS, A. L. PEREDA V. UND A. AGUILERA, P., *J. Chromatog.*, 9 (1962) 331.
- <sup>11</sup> H. G. GÄNSHIRT, *Arch. Pharm.*, 296 (1963) 129.
- <sup>12</sup> E. VIOQUE UND R. T. HOLMAN, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 39 (1962) 63.
- <sup>13</sup> M. Z. NICHAMAN, C. C. SWEELEY, N. M. OLDHAM UND R. E. OLSON, *J. Lipid Res.*, 4 (1963) 484.
- <sup>14</sup> R. TSCHESCHE, G. BIERNOTH UND G. WULFF, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 342.
- <sup>15</sup> H. L. BIRD, H. F. BRICKLEY, J. P. COMER, P. E. HARTSAW UND M. L. JOHNSON, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 346.