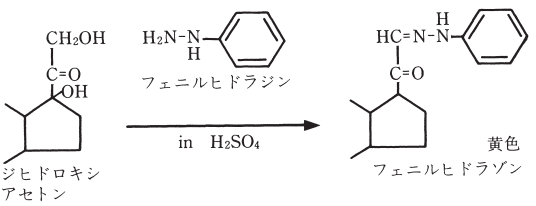
a．尿中ステロイドホルモン

1　17-OHCS（17-ヒドロキシコルチコステロイド）

【原理】 側鎖にジヒドロキシアセトンの構造をもつステロイドは，硫酸溶液中でフェニルヒドラジンと反応して黄色に呈色する（Porter-Silber 反応）のでこれを 410 nm で比色定量する。



【操作】 ①　水解：グルクロン酸抱合をはずすため，24 時間尿の一部 5 ml を 2.5 mol/l 酢酸緩衝液 0.5 ml で pH 5.0 に調整し，硫酸ナトリウム 0.8 g を加え，β-グルクロニダーゼ（500 U/ml）を 0.2 ml 添加し，48°C，30 時間孵置する。

②　抽出：ジクロロメタン 30 ml を加え，30 秒振とうし，上層を吸引除去する。

③　アルカリ，水洗浄：0.1 N 水酸化ナトリウム-15%硫酸ナトリウム 3.0 ml で洗浄し，次に 0.1 N 水酸化ナトリウム 1.0 ml で洗浄し，硫酸ナトリウムで脱水する。

④　Porter-Silber 反応：抽出液 10 ml ずつを 2 本の栓付試験管にとり，本試験用にはエタノール 1 ml と，62%フェニルヒドラジン-硫酸 1.5 ml を加え，ブランク測定用にはエタノールと硫酸を加え，それぞれ 1 分間振とう後，抽出層の半分を除去し，60°C，30 分間加温ののち冷却し，410 nm で比色し，吸光度をそれぞれ E_A, E_{AB} とする。別に試薬盲検（精製水）5 ml と標準液（1 mg/dl F または THF）5 ml について尿と同様に各操作を行い，吸光度を E_B, E_S とする。

⑤　計算

$$17\text{-OHCS（mg/日）} = (E_A - E_{AB} - E_B)/(E_S - E_B) \times 0.01 \times 1\text{日尿量（ml）}$$

干渉物質の補正：Allen の式より 370，410，450 nm の吸光度から：

$$E_{410nm} - \frac{E_{370nm} + E_{450nm}}{2}$$

より 410 nm の吸光度の補正を行う（図 8-5）。

【注】 17-OHCS はアルカリに不安定であるから，ジクロロメタン抽出液をアルカリ液で洗うとき速やかに処理し，呈色液を入れる。

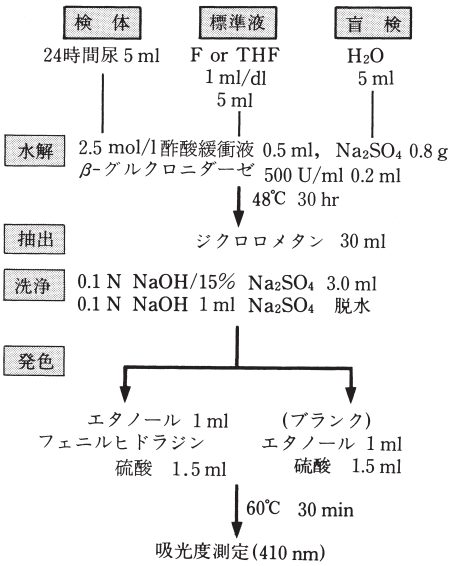


図 8-5　17-OHCS 測定法