

国产甲基炔诺酮的杂质分离和鉴定

方雪光 宋育文

(中国药品生物制品检定所, 北京)

提要 本文报道了甲基炔诺酮(norgestrel)中两个杂质的分离和鉴定。用薄层层析和高效液相色谱对甲基炔诺酮进行分析, 发现除主成分甲基炔诺酮外尚含有六个杂质。用柱层析和制备型薄层层析预分, 经径向加压柱对其中两个杂质进行高效液相色谱制备。经紫外、红外和质谱分析并与对照品比较, 确认这两个杂质分别为(±)13 β-乙基-17 β-羟基-甾烷-4-烯-3-酮及(±)13 β-乙基-甾烷-4-烯-3,17-二酮。

关键词 (±)13 β-乙基-17 β-羟基-甾烷-4-烯-3-酮; (±)13 β-乙基-甾烷-4-烯-3,17-二酮; 甲基炔诺酮; 甾体化合物

甲基炔诺酮[norgestrel, (±)13 β-乙基-17 β-羟基-17 α-乙炔基-甾烷-4-烯-3-酮]是高效的孕激素, 通常与少量雌激素——炔雌醇配伍使用, 可抑制排卵, 达到避孕的作用。国产孕激素中大多含多种其它甾体, 对避孕药毒、副作用的评价和进一步提高药品质量有一定的影响; 甲基炔诺酮在国内生产量较大, 使用广泛, 为提高质量和确保用药安全, 我们对甲基炔诺酮中所含的杂质用薄层层析(TLC)和高效液相色谱(HPLC)进行了分析, 并经柱层析、制备型TLC粗分后, 再用HPLC纯制了其中两个杂质, 用UV, IR和MS对其进行了结构鉴定。

实 验 部 分

一. 仪器及试剂

甲基炔诺酮(北京第三制药厂, 批号851127), 硅胶GF₂₅₄和100~200目的硅胶(青岛海洋化工厂)。层析用溶剂均为分析纯。Kofler熔点测定器; Perkin-Elmer Lambda 5可见紫外分光光度计; 岛津IR-400型红外光谱仪(溴化钾压片法); Jeol JMS-D×300质谱仪; Varian EM 390型核磁共振仪(以TMS为内标, 氘代氯仿为溶剂); Waters ALC/GPL 204型高效液相仪, 510泵, U6K进样器, 440型检测器, Radial-PAK β-PORASIL 8 mm×10 cm柱, 岛津C-R1A微处理机。

二. 杂质的分离和纯化

(一) 样品分析

1. TLC 按中国药典1985年版附录规定铺制5×20 cm硅胶GF₂₅₄薄板, 点样品氯仿溶液(10 mg/ml)10 μl, 并于同一薄板上分别点稀溶液(1 mg/ml)2 μl及1 μl, 以CHCl₃-CH₃OH(98:2)为展开剂。显色剂为硫酸-无水乙醇(3:7), 在105℃烘10 min, 冷却, 在365 nm紫外灯下观察, 可显出5个杂质点及1个亮蓝色荧光点(图1), 以限量法定出杂质的总量小于1%。

2. HPLC 通过对正相、反相及数种流动相的实验, 确认以 Badial-PAK β -PORASIL 正相柱, 正己烷—氯仿—异丙醇—甲醇(83:15:1.4:0.6)为流动相, 检测波长 254 nm, 灵敏度 0.05 AUFS, 流速 2 ml/min, 纸速 5 mm/min。流动相用 Millipore 滤膜 (0.5 μ m) 抽滤后使用。用二氯甲烷将样品精确稀释到 5 mg/ml, 进样 5 μ l, 记录谱图(图 2), 可分出 6 个杂质峰, 用归一化法对样品进行定量, 甲基炔诺酮含量为 99.74%, I_1 为 0.011%, I_2 为 0.010%, I_3 为 0.002%, I_4 为 0.02%, I_5 为 0.087%, I_6 为 0.0845%。

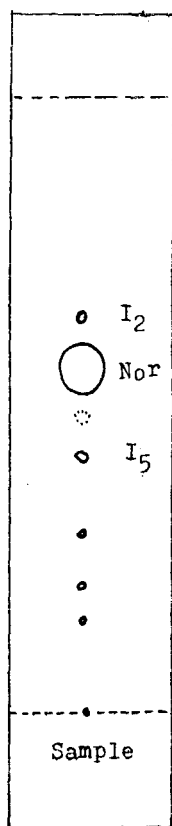


Fig 1. TLC of sample. Dotted line: Visible fluorescence spots under UV lamp (365 nm). Solid line: Spots coloured by H₂SO₄. Nor: Norgestrel. I: Impurities

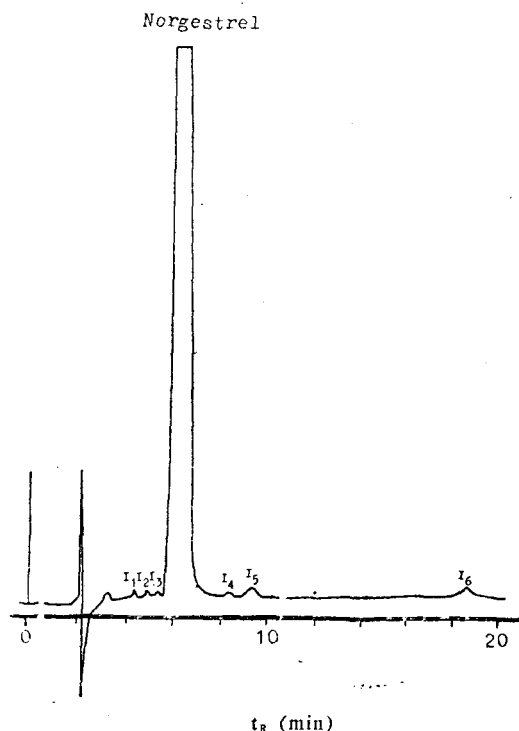


Fig 2. HPLC of norgestrel. Detector: UV 254 nm; Sensitivity: 0.05 AUFS; Flow: 2 ml/min; Injection: 25 μ g

通过对样品的分析可见, 各杂质量较少, 因此选用未精制的甲基炔诺酮粗品作为提取杂质的原料, 在粗品中 I_2 和 I_5 的量较多, 故下面仅对 I_2 和 I_5 这两个杂质进行了分离、纯化和鉴定。

(二) 杂质的分离

1. 柱层分离 用干法装硅胶(100~200目)于 2.5×15 cm 柱中约 10 cm 高。取 0.5 g 甲基炔诺酮粗品, 用氯仿溶解后加到约 0.5 g 硅胶中, 挥干氯仿后上样, 用 CHCl₃—CH₃OH (98:2)洗脱, 在 365 nm 紫外灯指示下, 分别接收洗脱液(1) 0~20 ml, (2) 20 ml至荧光点前, (3) 荧光点范围, (4) 荧光后 30 ml。

2. TLC 制备 将上述洗脱液浓缩后分别用硅胶 GF₂₅₄ 制备薄板, 以 CHCl₃—CH₃OH (98:2)为展开剂, 在 254 nm 紫外灯指示下收集 I_2 和 I_5 部位的硅胶, 用展开剂分别将 I_2 和

I_5 洗脱, 挥干溶剂后用 HPLC 纯化。

3. HPLC 纯化 将 TLC 制备的 I_2 和 I_5 杂质点, 用适量二氯甲烷溶解后, 按 HPLC 分析条件, 适量进样, 分别接取保留时间为 4.5~5.8 min(I_2)和 8.4~10.0 min(I_5)的洗脱液。用此法多次纯化, 可得纯度在 98%以上的 I_2 和 I_5 纯品(图 3)。

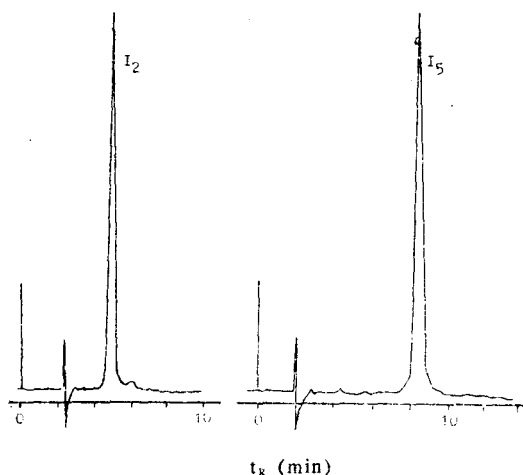


Fig 3. HPLC of I_2 and I_5 after purified by HPLC.-

三. 杂质 I_2 和 I_5 的鉴定

I_2 由 HPLC 收集的洗脱液挥干后得白色块状物(2~3 mg)。mp 155~158°C。紫外光谱 $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 238 nm; 红外光谱 1725 cm^{-1} (-C=O 非共轭酮)、1665 cm^{-1} (-C=O 共轭酮)、1620 cm^{-1} (C=C 共轭烯); 质谱 m/z 286(M^+ 基峰), 268, 258, 242, 230, 200, 110, 28。

I_5 由 HPLC 收集的洗脱液挥干后得白色块状物(2~3 mg)。mp 141~145°C。紫外光谱 $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 239 nm; 红外光谱 3410 cm^{-1} (OH), 1660 cm^{-1} (C=O 共轭酮)、1617 cm^{-1} (C=C 共轭烯)、1065 cm^{-1} (C-O); 质谱 m/z 288(M^+ 基峰); 270, 259, 246, 241, 229, 110。

结果与讨论

I_2 , I_5 和甲基炔诺酮的紫外、红外光谱和质谱数据列于表 1。

Tab 1. UV, IR and EIMS data for I_2 , I_5 and norgestrel

Spectrum	I_2	I_5	Norgestrel	Assignment
UV ($\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$)	238 nm	239 nm	238 nm	Δ^4 -3-one
IR (KBr)		3410 cm^{-1}	3300 cm^{-1}	C≡CH
			3230 cm^{-1}	O-H
	1725 cm^{-1}	1660 cm^{-1}	1630 cm^{-1}	C=O
	1665 cm^{-1} 1620 cm^{-1}	1617 cm^{-1}	1600 cm^{-1}	C=C
EIMS	286	288	312	M^+

紫外吸收表明, I_2 及 I_5 都含有 Δ^4 -3-酮的结构。而红外数据则显示出 I_2 比甲基炔诺酮少一个羟基和一个炔基, 但多一个非共轭的羰基。 I_5 比甲基炔诺酮仅少一个炔基。由此可推断三者的区别可能仅在于 17 位的取代情况不同。在此情况下, 则 I_2 和 I_5 的分子量将比甲基炔

诺酮小 26 和 24。这一情况被质谱数据所证实。为了确证上述的推论,按下述方法制备了 I_2 的对照品(±)13 β -乙基-甾烷-4-烯-3,17-二酮;甲基炔诺酮 500 mg,溶于 50 ml 丙酮中,在室温下滴加 3 ml Jones 铬酸混合液⁽¹⁾,以冰水冷却,搅拌 15 min 后,加 NaHSO_4 溶液 (10 g/30 ml) 15 ml,摇匀,再加 15 ml 饱和盐水,在分液漏斗中用乙醚提取,分去水层,挥干乙醚可得黄色油状物,用硅胶 GF₂₅₄ 薄板,展开剂为 CHCl_3 - CH_3OH (98:2) 纯制后,用丙酮-正己烷重结晶,得白色块状结晶约 100 mg⁽²⁾, mp 155~158°C; NMR σ 5.80 ppm (s, 1H, C_4 -H), 0.80 ppm (t, 3H, $\text{J} = 7$ Hz, C_{18} - CH_3); 紫外、红外、质谱和色谱行为与 I_2 完全相同,并与文献报道的数据一致⁽³⁾。 I_5 的对照品(±)13 β -乙基-17 β -羟基-甾烷-4-烯-3-酮,用 HPLC 流动相溶解后,挥干溶剂得白色块状结晶, mp 142~146°C; NMR δ 5.80 ppm (s, 1H, C_4 -H), δ 3.77 ppm (t, 1H, $\text{J} = 8$ Hz, C_{17} -H), δ 1.00 ppm (t, 3H, $\text{J} = 7$ Hz, C_{18} - CH_3); 紫外、红外、质谱和高效液相色谱行为与 I_5 完全相同。

由上述讨论及与对照品对比可确证 I_2 为(±)13 β -乙基-甾烷-4-烯-3,17-二酮, I_5 为(±)13 β -乙基-17 β -羟基-甾烷-4-烯-3-酮。

致谢 本研究得到国家计划生育委员会及世界卫生组织人类生殖研究特别规划处的资助;中国医学科学院药物研究所郑多楷同志提供(±)13 β -乙基-17 β -羟基-甾烷-4-烯-3-酮对照品;王维、常为民、姚振平同志代测质谱和核磁。

参 考 文 献

1. Bowden K, et al. Acetylenic compounds. I. Preparation of acetylenic ketones by oxidation of acetylenic carbinols and glycols. *J Chem Soc* 1946;39.
2. Rosewberger M, et al. Steroid total synthesis. Part IV. (±) 13 β -Ethyl-17 α -ethynyl-17 β -hydroxy-gon-4-ene-3-one. *Helv Chim Acta* 1971;54:2857.
3. 韩广甸,等. 计划生育药物的合成. I. 甾体口服避孕药高诺酮的全合成. *药理学报* 1980;15:169.

SEPARATION AND IDENTIFICATION OF IMPURITIES IN CHINESE NORGESTREL

FANG Xue-Guang and SONG Yu-Wen

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

ABSTRACT In this paper, the separation and identification of two impurities in Chinese norgestrel were reported. TLC and HPLC analysis indicated that Chinese norgestrel contains six impurities.

On the basis of the UV, IR spectroscopy, EI mass spectrometry and comparison with reference substances, the two impurities were identified as (±) 13 β -ethyl-gon-4-ene-3,17-dione and (±) 13 β -ethyl-17 β -hydroxy-gon-4-ene-3-one.

Key words (±) 13 β -Ethyl-gon-4-ene-3,17-dione; (±) 13 β -Ethyl-17 β -hydroxy-gon-4-ene-3-one; Norgestrel; Steroids