

# 国产醋酸甲地孕酮的质量研究：6-羟基-6-甲基-17 $\alpha$ -乙酰氧基黄体酮差向异构体的分离与鉴定

方雪光 张启明 凌大奎 宋育文

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

**提要** 用柱层析及薄层层析对国产醋酸甲地孕酮的杂质进行了分析, 共分离出7个杂质点:  $I_1, I_2, I_3, I_4, I_5, I_6, I_7$ , 并对其中  $I_3$  和  $I_4$  进行分离纯制及光谱分析, 确定其结构为6 $\beta$ -羟基-6 $\alpha$ -甲基-17 $\alpha$ -乙酰氧基黄体酮及其差向异构体6 $\alpha$ -羟基-6 $\beta$ -甲基-17 $\alpha$ -乙酰氧基黄体酮。本文报道了薄层层析条件(硅胶 GF<sub>254</sub>, 展开剂: 醋酸乙酯-甲苯=7:3)以及光谱鉴别的依据。

**关键词** 甾体激素; 6 $\beta$ -羟基-6 $\alpha$ -甲基-17 $\alpha$ -乙酰氧基黄体酮; 6 $\alpha$ -羟基-6 $\beta$ -甲基-17 $\alpha$ -乙酰氧基黄体酮; 薄层层析

醋酸甲地孕酮为多种口服避孕药制剂中的主要成分, 国内应用较广。有关醋酸甲地孕酮的药理、毒副作用的研究较多, 但质量的报道则很少。Wender<sup>(1)</sup>曾用高效液相色谱法(HPLC)发现了醋酸甲地孕酮的杂质为D环的重排产物。由于该药在国内产量较大, 广泛应用于各种制剂, 因此我们对国产醋酸甲地孕酮的质量进行了研究及考察, 建立了满意的薄层层析条件, 并对其中的两个主要杂质点( $I_3$  和  $I_4$ )进行了纯制及鉴别。

## 实 验 部 分

**样品** 醋酸甲地孕酮(上海第十二制药厂提供, 批号: 830411 和 830409)。紫外光谱由 Perkin-Elmer Lambda 5 型紫外分光光度计记录; 红外光谱在岛津 IR-400 型红外分光光度计上用 KBr 压片法测定; 质子核磁共振谱由 Varian EM 390 型和 Jeol FX-90 Q 型核磁共振仪测定, 重氢氯仿为溶剂、四甲基硅为内标; 电子轰击质谱由 Jeol JMS-DX 300 质谱仪测定。

### 一. 醋酸甲地孕酮的分离条件

醋酸甲地孕酮样品用氯仿溶解, 在硅胶 GF<sub>254</sub>板上(5 $\times$ 20 $\times$ 0.3 cm)点样 100  $\mu$ g, 在室温下层析缸中先以展开剂醋酸乙酯-甲苯(7:3)预饱和 5 min, 再以 20 $^\circ$ 角上行展开, 晾干, 分别在 365 nm 和 254 nm 紫外灯下观察, 共显出 7 个斑点, 其中杂质点 3 号(简称  $I_3$ )和杂质点 4 号(简称  $I_4$ )的量较大, 约占 0.4%, 见图 1。

### 二. 杂质部分的分离与纯制

用干装法将硅胶装于 2.5 $\times$ 15 cm 柱中约 10 cm 高, 1 g 样品用氯仿溶解后混于 1 g 硅胶中, 待挥干氯仿后上样; 先用 50 ml 氯仿洗脱, 再用氯仿-无水乙醇(10:1)洗脱; 在 365 nm 紫外灯下, 收集亮蓝色荧光以后的杂质部分, 挥干洗脱液, 按上述同样条件再上柱分离, 最后得杂质粗品约 0.1 g。粗品溶于氯仿, 采用制备薄层, 以醋酸乙酯-甲苯(7:3)作展开剂, 刮取  $I_3$  和  $I_4$ , 再经氯仿-醋酸乙酯(10:1)、苯-乙醚-冰醋酸(50:30:0.5)多次精制得  $I_3$  和

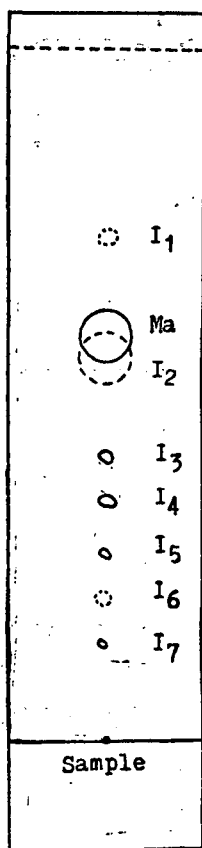


Fig 1. Thin-layer chromatogram of sample. .... Visible fluorescence spots under UV lamp (365 nm); — Dark spots under UV lamp (254 nm). I: Impurities; Ma: Megestrol acetate

I<sub>4</sub> 精品各约 0.2 mg。

I<sub>3</sub>: UV:  $\lambda_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  245 nm;  $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$  237 nm;  $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}+\text{H}_2\text{SO}_4}$  365.4 nm. IR:  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$  3450 (—OH), 3060 (=C—H), 1738 (C=O 酯), 1719 (C=O 酮), 1670 (C=O 共轭酮), 1615 (C=C 共轭烯), 1250 (C—O 酯)。EIMS:  $m/z$  402 (M)<sup>+</sup>, 384 (M—H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>, 359 (M—CH<sub>3</sub>CO)<sup>+</sup>, 342 (384—CH<sub>2</sub>CO)<sup>+</sup>, 324 (384—CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H)<sup>+</sup>, 299(342—CH<sub>3</sub>CO)<sup>+</sup>, 281 (299—H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>, 256(384—C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 241 (384—C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 187(384—C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 43 (CH<sub>3</sub>—C≡O<sup>+</sup>)。 <sup>13</sup>CNMR: 共 24 个信号, 如 204.1 ppm (C<sub>20</sub>), 200.7 ppm (C<sub>3</sub>), 172.7 ppm (C<sub>22</sub>), 169.9 ppm (C<sub>5</sub>), 123.1 ppm (C<sub>4</sub>), 96.8 ppm (C<sub>17</sub>), 71.5 ppm (C<sub>6</sub>), 20.0 ppm (C<sub>18</sub>), 14.5 ppm (C<sub>19</sub>) 等。 <sup>1</sup>HNMR 数据列于表 1。

I<sub>4</sub>: UV:  $\lambda_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  245 nm;  $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$  242 nm;  $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}+\text{H}_2\text{SO}_4}$  365.5 nm. IR:  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$  3400 (—OH), 3050 (=C—H), 1725 (C=O 酯), 1719 (C=O 酮), 1660 (C=O 共轭酮), 1610 (C=C 共轭烯), 1250 (C—O 酯), EIMS: 其特征离子峰与 I<sub>3</sub> 完全相同。 <sup>1</sup>HNMR 数据列于表 1。

## 结果与讨论

一. I<sub>3</sub> 和 I<sub>4</sub> 在质谱中的裂解行为 I<sub>3</sub> 和 I<sub>4</sub> 在质谱中具有相同的裂解行为, 最高质荷比均为 402 (M)<sup>+</sup>, 比醋酸甲地孕酮分子离子峰的质荷比大 18, 其质谱图与 McCamish<sup>(2)</sup> 报道的 6-羟基-6-甲基-17  $\alpha$ -乙酰氧基黄体

Tab 1. Chemical shifts (<sup>1</sup>HNMR, ppm) for I<sub>3</sub>, I<sub>4</sub> and Megestrol acetate

Group	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	Megestrol acetate
18-CH <sub>3</sub>	0.70, s	0.70, s	0.70, s
19-CH <sub>3</sub>	1.27, s	1.27, s	1.10, s
C <sub>6</sub> -CH <sub>3</sub>	1.45, s	1.42, s	1.80, s
21-CH <sub>3</sub>	2.04, s	2.04, s	2.04, s
23-CH <sub>3</sub>	2.10, s	2.10, s	2.10, s
C <sub>4</sub> -H	6.03, s	6.46, s	5.81, s
C <sub>7</sub> -H			5.90, s

s = Singlet.

酮 (C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>) 一致。这说明 I<sub>3</sub> 和 I<sub>4</sub> 为此化合物, 二者的不同恐在于立体异构。这可被红外、紫外和核磁数据进一步证实:

IR I<sub>3</sub> 和 I<sub>4</sub> 具有与醋酸甲地孕酮类似的红外特征吸收, 所不同的是醋酸甲地孕酮在 3070  $\text{cm}^{-1}$  和 3025  $\text{cm}^{-1}$  处显示两个烯氢峰, I<sub>3</sub> 和 I<sub>4</sub> 只分别在 3060  $\text{cm}^{-1}$  或 3050  $\text{cm}^{-1}$  处呈现

一个烯氢峰, 又醋酸甲地孕酮在  $1630\text{ cm}^{-1}$  和  $1590\text{ cm}^{-1}$  显示两个碳碳双键吸收峰, 而  $I_3$  和  $I_4$  只在  $1610\text{ cm}^{-1}$  处呈现一个碳碳双键吸收峰。这表明在  $I_3$  和  $I_4$  分子中只存在一个碳碳双键, 见图2。

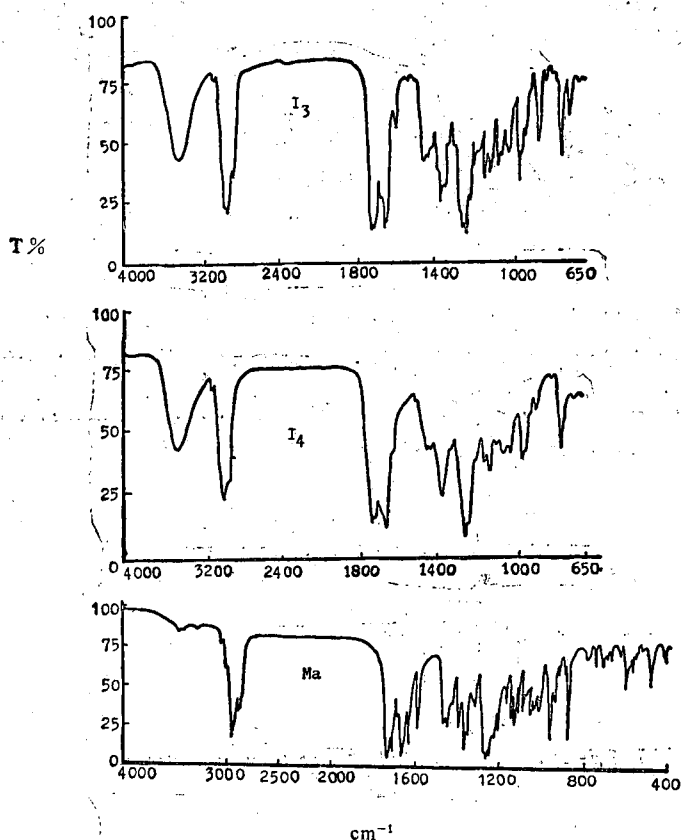


Fig 2. IR spectra of  $I_3$ ,  $I_4$  and Ma

**UV**  $I_3$  和  $I_4$  在氯仿中的最大吸收均在  $245\text{ nm}$ , 与醋酸甲地孕酮紫外吸收 ( $284\text{ nm}$ ) 比较, 蓝移了  $39\text{ nm}$ , 说明前二者的发色团较后者少一个共轭延伸双键。另据 Helmreich<sup>(3)</sup> 报道, 只有 6-羟基的黄体酮在硫酸中的紫外吸收在  $360\sim 370\text{ nm}$  间。这是因 6-羟基脱水后形成  $\Delta^{4,6}-3$  酮结构的特征吸收,  $I_3$  和  $I_4$  在硫酸乙醇溶液中实测为  $365.5\text{ nm}$ , 证明羟基在  $C_6$  位。

**$^{13}\text{C}$ NMR**  $I_3$  的  $^{13}\text{C}$ NMR 数据显示出  $C_6$  的共振信号处于  $71.46\text{ ppm}$ , 这清楚地表明  $C_6$  已不属于  $\text{SP}^2$  杂化类型, 而属于  $\text{SP}^3$  杂化类型了。它之所以仍处于较低场, 是由于受到与之相连的羟基的去屏蔽的缘故, 这也可说明羟基在  $C_6$  位上。

**$^1\text{H}$ NMR**  $I_3$  和  $I_4$  的氢谱与醋酸甲地孕酮的比较, 只分别在  $6.03\text{ ppm}$  和  $6.46\text{ ppm}$  处显示一个烯氢质子信号,  $C_6$  位的甲基信号也向高场移动了  $0.4\text{ ppm}$ 。除此之外其它信号都与醋酸甲地孕酮相同或接近, 说明  $I_3$  和  $I_4$  均为 6-羟基-6-甲基- $17\alpha$ -乙酰氧基黄体酮; 二者的不同之处可能仅在于  $C_6$  的羟基的空间位置不同, 即二者为差向异构体。

## 二. 六位差向异构的确定

在无水乙醇中,  $6\beta$ -羟基- $6\alpha$ -甲基- $17\alpha$ -乙酰氧基黄体酮的紫外吸收在  $237\sim 238\text{ nm}$ , 它的六位差向异构体的吸收在  $242\sim 243\text{ nm}$ <sup>(3)</sup>。  $I_3$  的实测数据为  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$   $237\text{ nm}$ ,  $I_4$  的实测数据为  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$   $242\text{ nm}$ 。证实  $I_3$  为  $6\beta$ -羟基- $6\alpha$ -甲基- $17\alpha$ -乙酰氧基黄体酮, 而  $I_4$  为  $6\alpha$ -羟

基-6 $\beta$ -甲基-17 $\alpha$ -乙酰氧基黄体酮。

另据 Iriarte<sup>(4)</sup>报道, 在  $\Delta^4$ -3 酮中若 C<sub>6</sub>-OH 处于  $\beta$  位时,  $\Delta^4$ -烯质子核磁信号在 5.7~6.0 ppm 之间, 若为  $\alpha$  位时在 6.40 ppm 左右。由表 1 数据可知 I<sub>3</sub> 的 C<sub>6</sub>-OH 处于  $\beta$  位, I<sub>4</sub> 的 C<sub>6</sub>-OH 处于  $\alpha$  位, 这与紫外光谱得出的结论相同。参照 William<sup>(5)</sup>用 X-射线衍射法确定的 17-羟基-6-甲基黄体酮的空间结构, I<sub>3</sub> 和 I<sub>4</sub> 的空间结构如图 3 所示。

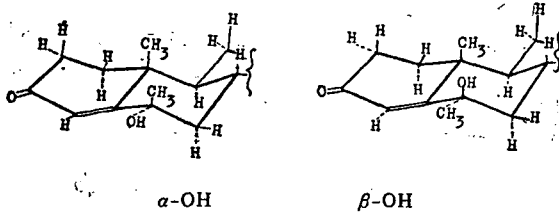
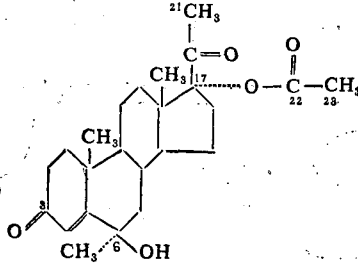
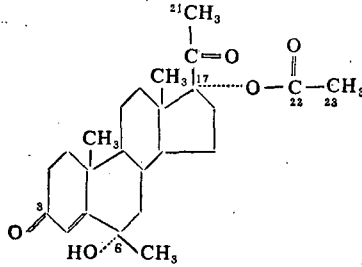


Fig 3. Structure of 6 $\beta$ ( $\alpha$ )-hydroxy-6 $\alpha$ ( $\beta$ )-methyl-17 $\alpha$ -acetoxy-progesterone

由图可见处于  $\alpha$  位或  $\beta$  位的 C<sub>6</sub>-OH 与  $\Delta^4$ -烯质子之间的空间距离是不同的, 6-OH 与烯质子之间的距离较接近, 因此使该烯质子信号与其差向异构体的相应烯质子信号相比向低场位移了 0.43 ppm。以上事实证明 I<sub>3</sub> 和 I<sub>4</sub> 分别为:



I<sub>3</sub>: 6 $\beta$ -Hydroxy-6 $\alpha$ -methyl-17 $\alpha$ -acetoxy-progesterone



I<sub>4</sub>: 6 $\alpha$ -Hydroxy-6 $\beta$ -methyl-17 $\alpha$ -acetoxy-progesterone

致谢 蒙涂国土教授指导、仪器室王维、孙桂英等同志代测 MS 和 <sup>1</sup>H NMR; 上海第十二制药厂提供样品。

### 参 考 文 献

1. Wendler NL, et al. eds. *Molecular Rearrangements II*. New York, N Y: Interscience Publishers, 1966: 114~1121.
2. Mecamish M, et al. The *in vitro* metabolism of methoxyprogesterone acetate. *Anal Chem Symp Ser* 1979; 4:243.
3. Helmreich ML, et al. Identification of a 6, 21-dihydroxylated metabolite of methoxyprogesterone acetate in human urine. *J Clin Endocrinol Metab* 1962; 22:1019.
4. Iriarte J, et al. Steroids CXCI. Some reactions of a 6-methyl- $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxy steroid system. *J Org Chem* 1962; 27:1139.
5. William L, et al. Steroid structure and function V. A ring conformation in 17-hydroxy-6 $\alpha$ -methylprogesterone. *Steroids* 1979; 34:501.

# STUDIES ON THE PURITY OF CHINESE MEGESTROL ACETATE: SEPARATION AND IDENTIFICATION OF EPI-MERIC ISOMERS OF 6-HYDROXY-6-METHYL-17 $\alpha$ -ACETOXY-PROGESTERONE

FANG Xue-Guang, ZHANG Qi-Ming, LING Da-Kui and SONG Yu-Wen

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

**ABSTRACT** Two impurities are separated from Chinese megestrol acetate by column chromatography and thin-layer chromatography. On the basis of UV, IR,  $^1\text{H}$ NMR,  $^{13}\text{C}$ NMR spectroscopy and EI mass spectrometry, these two impurities were identified as 6 $\alpha$ -hydroxy-6 $\beta$ -methyl-17 $\alpha$ -acetoxy-progesterone and its epimeric isomer 6 $\beta$ -hydroxy-6 $\alpha$ -methyl-17 $\alpha$ -acetoxy-progesterone. we report here the optimal TLC conditions (silica GF<sub>254</sub>, ethyl acetate—toluene=7:3) and the spectral data.

**Key words** Steroids; 6 $\alpha$ -Hydroxy-6 $\beta$ -methyl-17 $\alpha$ -acetoxy-progesterone; 6 $\beta$ -Hydroxy-6 $\alpha$ -methyl-17 $\alpha$ -acetoxy-progesterone; Thin-layer chromatography