

薄层扫描测定复方炔诺酮庚酸酯注射液 中炔诺酮庚酸酯的薄层层析条件探讨

浙江省医学科学院 金宜纫

复方炔诺酮庚酸酯注射液(Composition Norethisterone Enanthate Injection 下称 Co. NET-EN. Inj)除含有 NET-EN 和戊酸雌二醇(Estradiol Valerate 下称 EV)外,尚含溶媒苯甲酸苄酯和苯甲醇。有关薄层分离国内外未见报道。Co. NET-EN. Inj 内控质量标准中鉴别 EV 是采用苯-乙醚-冰 HAC^[1](12.5:7.5:0.125)为溶剂系统,层析后 NET-EN, EV 等各种成份的 R_f 值均偏高,色斑面积扩散使斑点边缘模糊,形状常呈元宝状或扁圆形,分离能力和重现性较差。本文按照 Snyder 方法^[2]从10种溶剂系统中研究最佳组合系统。

方 法

一、移动相选择的方法:欲从众多溶剂系统中选取最佳组合系统,在薄层色谱中依 Snyder 法^[2]以分离度 R_s 来衡量。即 $R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \sqrt{N} \left(\frac{k'}{1+k'} \right)$, α 为分离因子(两溶质容量因子比 k_1/k_2) N 为理论塔板数, k' 为 $k_1 k_2$ 平均值。样品分配比 k' 可用 $k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$ 求出。

t_r 为样品滞留时间。 t_0 为未被吸附成份的滞留时间。提高分离度 R_s 有三条途径,一是增强流动相和固定相的选择性(α 值),二是增加柱效(N),三是改变流动相。对于一个已知的样品和吸附剂,在恒定不变的操作条件下(固定 N 和 α) k' 的变化影响分离的成败。务使每一组成份的 k' 值仍应处于最佳

范围。根据 R. E Kaiser^[3] 方程来计算 k' 与 R_f 值之间的关系: $k' = \frac{1-R_f}{R_f}$

k'	∞	9	4	2	1	0.5	0
R_f	0	0.1	0.2	0.333	0.5	0.666	1.0

k' 值的最佳范围为 $0.5 \leq k' \leq 10$ 。如何控制 k' 值可通过改变溶剂强度(ϵ_0)来实现。Saunders^[4] 经试验定 $k' = 3$ 时的溶剂强度为 ϵ_s 值,亦即 $k' = 3$ 相当于 R_f 值为 $0.3 \sim 0.5$ 。据 D. Jänschen^[5] 报道,在无梯度的薄层中,最大分离度 R_s 出现在 $R_f'(R_f \text{ 平均值}) = 0.3$ 处,在 $R_f' = 0.1 \sim 0.6$ 范围内能达到最大分离度 R_s 不小于 75%(见图 1),从图可得 TLC 的最佳范围是 $0.3 \sim 0.7$ 。

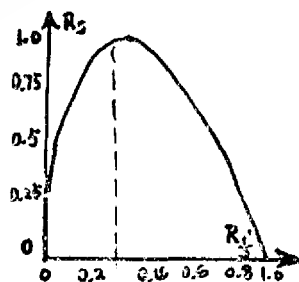


图 1 在一个给定选择性时
 R_s 值对平均值 R_f 的曲线

我们通过二个途径,一是更换溶剂将 A 系统中苯 $\epsilon^\circ = 0.32$,改用环己烷 $\epsilon^\circ = 0.04$ 来代替。二是改变溶剂体积配比例如在青岛硅胶 G 上,正己烷-醋酸乙酯(1:1)展开时 R_f 值偏大时,调正体积比为(7:3)以降低极性达到合适的强度。

二、测定法：取青岛硅胶G板，分别点上Co. NET-EN Inj乙醇溶液(含NET-EN 100 μ g、EV10 μ g)和随行对照品NET-EN、EV、苯甲酸苄酯、苯甲醇，NET。置层析缸(Shandon Southern TLC Chromatank 21 $\times$ 21 $\times$ 6cm)内，行70 $^{\circ}$ C角上行展开至12cm取出，105 $^{\circ}$ C10分钟烘干。硫酸：无水乙醇(1:1)显色，再烘10分钟，置可见光和入366下观察结果。

双波长薄层扫描测定时，在E. Merck硅胶HF254+366上采用正己烷-醋酸乙酯(1:1)溶剂系统层析。NET-EN点样量在15 μ g以下。扫描波长为240nm，参比波长为350nm。

结果与讨论

一、10种溶剂组合系统筛选实验：A、苯-乙醚-冰醋酸(12.5:7.5:0.125)，B、环己烷-乙醚-冰HAC(10:10:0.1)，C、环己烷-醋酸乙酯^[1](7:3)，D、正己烷-醋酸乙酯(7:3)，E、苯-丙酮(9:1)，F、正己烷-醋酸乙酯(1:1)，G、苯-无水乙醇(9:1)，H、二氯甲烷-乙醚-甲醇(15:4:0.1)，I、石油醚-无水乙醇(20:0.5)，J、环己烷-氯仿-丙酮(8:6:6)下称A、B、C、D、E、F、G、H、I、J系统，每种溶剂系统在青岛硅胶G板上重复六次实验，结果见图2、图3。

二、在E. Merck硅胶HF254+366上正己烷-醋酸乙酯溶剂系统(1:1)层析后扫描。结果见图4。

结果表明：按照 Snyder 方法选取最佳组合系统，用环己烷代替苯的B系统，调正体积配比的C、D系统经六次重复试验 R_f 值 $\pm$ 0.02均获得与对照品相应颜色斑点的 R_f 值。用展开剂B时，NET-EN, R_f 值=0.44, EV=0.63, 两者的 ΔR_f 值之差为0.19, 其他各种成份的色斑分开的距离均大，色斑清晰园而集中获得令人满意的效果。展开剂

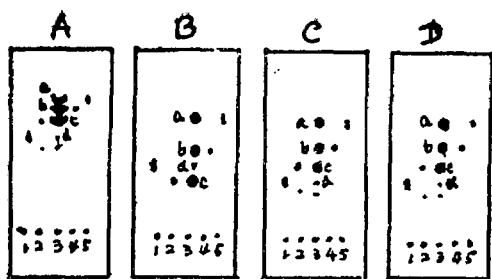


图2 Co. NET-EN. Ing的TLC分离

1) Benzyl alc 2) NET-EN 3) Co. NET-EN Inj 4) EV 5) Benzyl Benzoate, a) Benzyl Benzoate b) EV c) NET-EN d) Benzyl alc

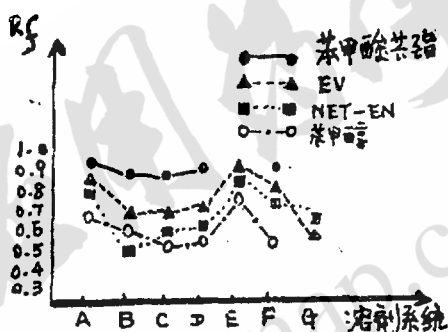


图3 改变溶剂系统Co. NET-EN. Inj R_f 值变化图

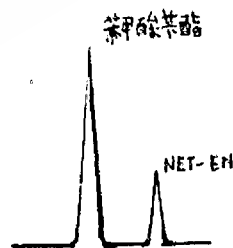


图4 正己烷-醋酸乙酯(1:1)层析 Co. NET-EN. Inj直线扫描图

C和D溶剂系统中，正己烷 ϵ° =0.01，环己烷 ϵ° =0.04有近似的溶剂强度，层析后NET-EN与EVR f 值之差均 $>$ 0.09，显示了预期良好的分离效果。而内控质量标准使用A系统使各成份位置偏高，斑点扩散使斑点与斑点之间的边缘模糊常常呈现元宝状或扁(下转第24页)

(上接第10页)

圆形,分离能力和重现性较差。在F、G系统中丙酮 $\epsilon^\circ = 0.56$,乙醇 $\epsilon^\circ = 0.88$,分离效果F较G好,G系统固然能使NET-EN和EV很好的分离,但其他成份由于扩散不能很好的分离。H-J系统使 R_f 值偏高(在溶剂前沿)或偏低甚至不能很好的分离。

展开剂和吸附剂的选择是薄层层离的关键因素,溶剂强度及配比影响薄层分离的成败。图3、图4表明正己烷-醋酸乙酯的D、E系统,在青岛硅胶G上,E系统使各成份 R_f 值偏高。而在E. Merck硅胶HF254+366上则为理想展开剂,分离效果NET-EN R_f 值=0.45,苯甲酸苯酯 R_f =0.71,两者之差为0.26,NET-EN点样量在15 μ g以下,呈黄色斑点的EV不出峰,不干扰测定。欲获得高度重现性的薄层条件如温度、板厚度、以及溶剂的其他物理参数比重、沸点、粘度、

蒸汽压对最后的结果均带来影响。

参 考 文 献

- [1] 中国药典1985年版,73页。
- [2] L. R Snyder: The Role of the Mobile Phase in Liquid Chromatography, in J. J. Kirkland Edr Moder Practice of Liquid Chromatography 1971, pp125—131.
- [3] R. E. Kaiser: Simplified Theory of TLC in A. Zlatkis & R. E. Kaiser, ed. HPTLC High Performance Thin-Layer Chromatography, Journal of Chromatography Library-Vol 9, 1977, 17—18.
- [4] Saunders D. L: Anal Chem 1974, 46:470.
- [5] D. Janchen: Considerations on The Reproducibility of Thin-Layer Chromatographic Separations, in A. Zlatkis & R. E. Kaiser, ed. HPTLC High Performance Thin-Layer Chromatography, Journal of chromatography Library Vol 9, pp131—133, 1977.
- [6] U. S. P XXI 1985, 400.