

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.05.011

反相高效液相色谱法测定尼尔雌醇原料及片剂的有关物质和含量*

孙婷¹, 张菁¹, 刘云², 姜建国^{1△}, 王柳¹, 乔晓宁¹

(1. 河北省药品检验研究院, 河北 石家庄 050011; 2. 河北省石家庄市食品药品检验中心, 河北 石家庄 050011)

摘要:目的 建立测定尼尔雌醇原料及片剂的有关物质和含量的反相高效液相色谱(RP-HPLC)法。方法 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.02 mol/L 乙酸铵溶液-乙腈(40:60, V/V)等度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35℃, 检测波长为 280 nm, 进样量为 20 μL。结果 尼尔雌醇峰和相邻杂质峰均能达到完全有效分离; 尼尔雌醇质量浓度在 0.01~2.0 g/L 范围内与峰面积线性关系良好; 平均回收率为 100.00%, RSD 为 1.29% (n=9)。1 批原料和 3 批片剂样品含量测定结果分别为 99.79%, 98.62%, 98.71%, 98.56%, 单个最大杂质分别为 0.14%, 0.41%, 0.39%, 0.40%, 总杂质分别为 0.49%, 0.78%, 0.76%, 0.75%。结论 建立的 RP-HPLC 法能有效测定尼尔雌醇原料及片剂的有关物质和含量, 为该类药物工艺过程控制、监管和质量保障提供了一定的技术支持。

关键词:口服雌激素类药物; 尼尔雌醇; 尼尔雌醇片; 有关物质; 含量测定; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R927.2; R977.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)05-0033-04

Determination of Related Substances and Contents of Active Pharmaceutical Ingredient and Tablets of Nilestriol by RP-HPLC

SUN Ting¹, ZHANG Jing¹, LIU Yun², JIANG Jianguo¹, WANG Liu¹, QIAO Xiaoning¹

(1. Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang, Hebei, China 050011; 2. Shijiazhuang Institute for Food and Drug Control, Shijiazhuang, Hebei, China 050011)

Abstract: **Objective** To establish a RP-HPLC method of determination of related substances and contents of active pharmaceutical ingredient and tablets of nilestriol. **Methods** The chromatographic column was Waters Symmetry C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.02 mol/L ammonium acetate-acetonitrile(40:60, V/V) with equal elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 35℃, the detection wavelength was 280 nm, and the sample size was 20 μL. **Results** Nilestriol peak and adjacent impurity peaks could be completely and effectively separated. The nilestriol showed a good relationship within the range of 0.01~2.0 g/L, the average recovery rate was 100.00%, RSD was 1.29% (n=9). The content results of the 1 batch of active pharmaceutical ingredient and the 3 batches of tablets of nilestriol were 99.79%, 98.62%, 98.71% and 98.56%, respectively, the maximum single impurity was 0.14%, 0.41%, 0.39% and 0.40%, respectively, the total impurities were 0.49%, 0.78%, 0.76% and 0.75%, respectively. **Conclusion** The established RP-HPLC method can effectively determine the related substances and contents of active pharmaceutical ingredient and tablets of nilestriol, and provide some technical support for the process control, supervision and quality assurance of nilestriol.

Key words: oral estrogens; nilestriol; Nilestriol Tablets; related substances; content determination; RP-HPLC

尼尔雌醇又名维尼安, 化学名为 3-(环戊氧基)-19-去甲-17-孕甾-1,3,5(10)-三烯-20-炔-16α, 17α-二醇, 是我国自行研制的新型雌激素, 为雌三醇衍生物, 具有口服长效和强效的优点^[1], 常用于围绝经期妇女雌激素替代治疗^[2]。常用外用制剂主要有尼尔雌醇片、尼尔雌醇阴道用凝胶剂^[3]。目前, 尼尔雌醇原料及片剂的现行质量标准收载于 2015 年版《中国药典(二部)》, 原料质量标准项下虽然设置了有关物质检查项, 但采用的方法为薄层色谱法^[4]; 片剂质量标准项下则未设置安全性指标有关物质检查项, 且鲜见尼尔雌醇有

有关物质的测定方法报道。本研究中参考文献[5-16], 建立了反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定尼尔雌醇原料及片剂的有关物质和含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器: 20AT 型高效液相色谱仪(岛津公司); 1260 型高效液相色谱仪(安捷伦公司); XS205 型电子天平(十万分之一, 瑞士 Mettler Toledo 公司), MCM36 型电子天平(百万分之一, 德国 Sartorius 公司)。

试剂: 尼尔雌醇对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 100239-200702, 纯度为 99.4%, 80℃减压干

*基金项目: 国家科技重大专项课题[2017ZX09101001]; 河北省科技计划项目[162777244]。

第一作者: 孙婷, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为药物分析、仿制药质量一致性评价、杂质鉴定, (电话)0311-85212008。

△通信作者: 姜建国, 硕士研究生, 主任药师, 研究方向为药物分析、仿制药质量一致性评价、杂质鉴定, (电话)0311-85212009。

干燥 2 h 后使用); 尼尔雌醇原料药(LJ 公司, 批号为 N20170323, 纯度为 99.5%); 尼尔雌醇片(厂家 A, 批号分别为 170711, 170712, 170713, 规格为每片 1 mg); 乙腈为色谱纯(Fisher 公司); 乙酸铵为分析纯(天津市科密欧试剂有限公司); 水为超纯水。

2 方法

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.02 mol/L 乙酸铵溶液-乙腈(40:60, V/V), 等度洗脱; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 °C; 检测波长: 280 nm; 进样量: 20 μL。在此色谱条件下, 尼尔雌醇保留时间约为 16 min, 理论板数按尼尔雌醇峰计为 9 277, 与相邻峰分离度为 2.38, 符合要求。详见图 1。

2.2 溶液制备

供试品溶液(含量测定): 取尼尔雌醇原料 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 加入流动相适量, 振摇, 溶解后用流动相稀释至刻度, 即得尼尔雌醇原料供试品溶液; 取尼尔雌醇片细粉适量(约相当于尼尔雌醇 10 mg), 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 同法操作, 取续滤液, 作为尼尔雌醇片供试品溶液。

对照品溶液: 精密称取尼尔雌醇对照品适量, 同法操作, 制备同浓度溶液, 作为对照品溶液。

有关物质供试品溶液: 取尼尔雌醇原料 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 容量瓶中, 加入流动相适量, 振摇, 溶解后用流动相稀释至刻度, 即得尼尔雌醇原料供试品溶液; 取尼尔雌醇片细粉适量(约相当于尼尔雌醇 10 mg), 精密称定, 置 10 mL 容量瓶中, 同法操作, 取续滤液, 作为尼尔雌醇片供试品溶液。

对照溶液: 分别精密量取上述供试品溶液适量, 用流动相溶解并稀释至 0.01 g/L, 即得自身对照溶液。

空白辅料溶液: 取按尼尔雌醇片处方比例的辅料适量, 按供试品溶液制备方法制备, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得空白辅料溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验: 取尼尔雌醇原料约 10 mg, 精密称定,

置 10 mL 容量瓶中, 进行不同条件下的降解试验。1) 酸破坏试验, 加 2 mol/L 盐酸溶液 1 mL, 摇匀, 室温放置 10 min 后, 用 2 mol/L 氢氧化钠溶液调至中性。2) 碱破坏试验, 加 2 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL, 摇匀, 室温放置 10 min 后, 用 2 mol/L 盐酸溶液调至中性。3) 氧化破坏试验, 加入 30% 过氧化氢溶液 2 mL, 摇匀, 室温放置 1 h。4) 光照破坏试验, 在紫外灯(4 500 lx)下照射 24 h。5) 高温破坏试验, 在 150 °C 下加热 3 h。分别加流动相稀释至刻度, 按拟订色谱条件测定, 结果见图 2。可见, 经过破坏产生的降解物质与主峰完全分离, 且主成分和主要降解产物在 280 nm 检测波长处均有吸收, 说明拟订色谱条件能准确检测出样品中可能存在的相关杂质。

稳定性考察: 量取 2.2 项下有关物质供试品溶液(质量浓度为 1 g/L), 每隔 2 h 依法进样测定峰面积, 单个最大杂质峰面积的 RSD 为 1.78% (n=5), 总杂质峰面积和的 RSD 为 1.69% (n=5), 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

检测限和定量限确定: 对 2.2 项下对照品溶液进行逐级稀释, 按拟订色谱条件进样分析。当信噪比(S/N)为 3:1 时, 测得的检测限为 56 ng/mL; 当信噪比(S/N)为 10:1 时, 测得的定量限为 187 ng/mL。

线性关系考察: 取质量浓度分别为 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50, 1.00, 2.00 g/L 的系列对照品溶液进样测定, 以峰面积(A)为纵坐标、以质量浓度(C)为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $A = 9.5916 \times 10^8 C + 2.4823 \times 10^6$, $r = 0.9999$ (n=8)。结果表明, 尼尔雌醇质量浓度在 0.01 ~ 2.0 g/L 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 精密量取 2.2 项下对照品溶液适量, 按拟订色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果的 RSD 为 0.34% (n=6), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 分别精密量取 2.2 项下供试品溶液(含量测定用, 批号为 170711)适量, 分别于室温下放置 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 h 时, 按拟订色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果的 RSD 为 0.53% (n=7), 表明供试品溶

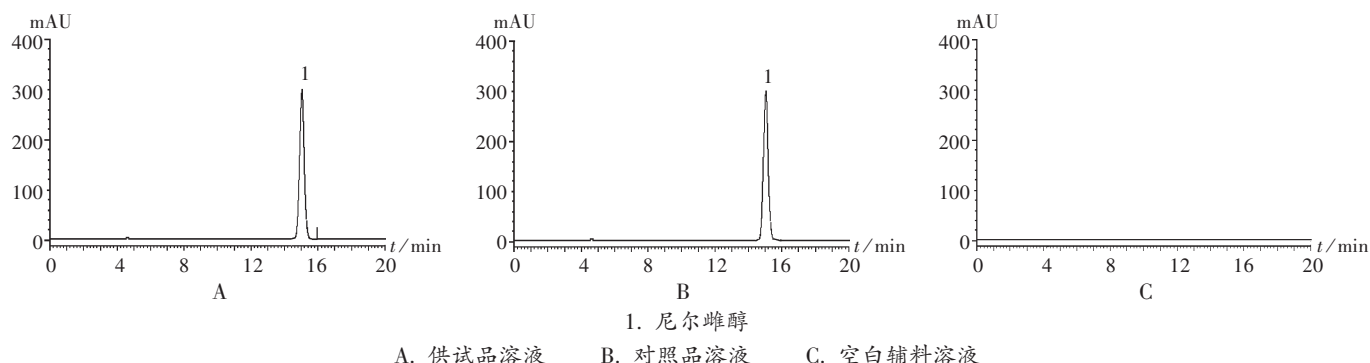


图1 高效液相色谱图

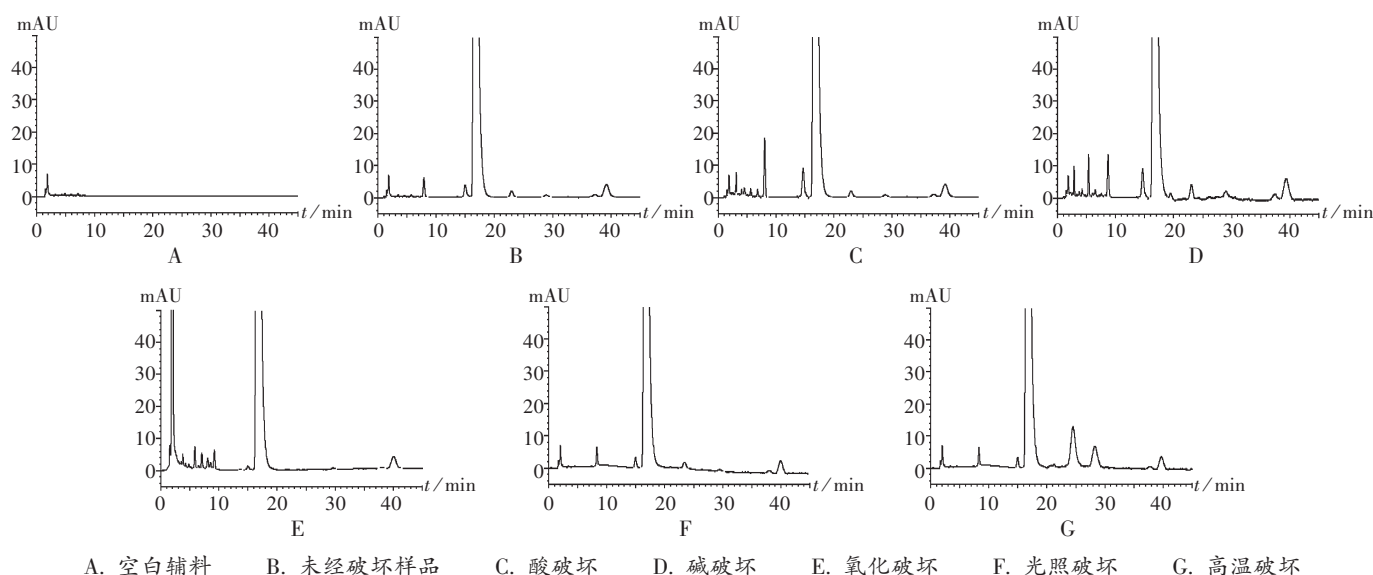


图2 不同降解条件下尼尔雌醇的HPLC色谱图

液在室温下放置12 h内稳定性良好。

加样回收试验:分别取已知含量的样品(批号为170711)100 mg,精密称定,共9份,各置10 mL容量瓶中,分别加入低、中、高质量浓度的尼尔雌醇,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率,结果见表1。

表1 尼尔雌醇加样回收试验结果($n=9$)

取样量 (mg)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
100.0	98.56	0.8	99.35	98.75	100.00	1.29
100.0	98.43	0.8	99.22	98.75		
100.0	98.55	0.8	99.36	101.25		
100.0	98.21	1.0	99.22	101.00		
100.0	98.49	1.0	99.50	101.00		
100.0	98.53	1.0	99.52	99.00		
100.0	98.28	1.2	99.49	100.83		
100.0	98.91	1.2	100.09	98.33		
100.0	98.88	1.2	100.10	101.67		

2.4 尼尔雌醇有关物质及含量测定

取本品20片,精密称定,研细,取细粉适量,精密称定,分别按2.2项下方法制备含量测定用供试品溶液、对照品溶液、有关物质测定用供试品溶液及对照溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果见表2。

表2 各批样品含量及有关物质测定结果(%)

批号	总杂质	有关物质	
		含量	单个最大杂质
N20170323	0.49	99.79	0.14
170711	0.78	98.62	0.41
170712	0.76	98.71	0.39
170713	0.75	98.56	0.40

3 讨论

流动相选择:国外药典中均未收载尼尔雌醇原料及片剂的质量标准,而文献[3]中的色谱条件无法使有关杂质达到准确检出,且流动相中未含有易挥发的缓冲盐,不利于杂质的结构分析。故本研究建立的方法在色谱条件中加入易挥发的醋酸铵,在拟订色谱条件下,不仅杂质和样品能检出并有效分离,而且能对该样品进行定量分析。

检测波长选择:对供试品溶液在200~400 nm波长范围内进行紫外最大吸收扫描,发现尼尔雌醇的最大吸收波长为280 nm,且在该检测波长下,尼尔雌醇的降解杂质及尼尔雌醇响应值基本一致,均能有效检出。

色谱柱耐用性:不同厂家的色谱柱的检测结果显示在相对保留时间上略有不同,但主峰与已知杂质及未知杂质分离度均能满足完全分离要求,且按尼尔雌醇峰计,理论板数均大于6000,峰纯度良好。

有关物质检测:尼尔雌醇片剂现行标准中,未设置有关物质检查项,尼尔雌醇原料质量标准中,虽设置了有关物质检查项,但采用方法为灵敏度较低的薄层色谱法,无法准确对尼尔雌醇有关物质进行准确定性定量研究。文献[5]中,仅考察了尼尔雌醇的含量检测方法。对其有关物质的研究方面呈空白状态。因此,本研究中建立了尼尔雌醇片有关物质检查项,并统一了尼尔雌醇原料及片剂的有关物质检测方法,即节省了检验资源,又为该品种的安全性把控提供了依据。

有关物质降解情况:由图2可见,尼尔雌醇在酸碱、高温破坏条件下,杂质变化较大;在光照破坏条件下,杂质变化较小,且该杂质有待于定性研究。

综上所述,所建立的等度洗脱RP-HPLC法能同