

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.01.018

高效液相色谱法测定烯丙孕素的有关物质*

包汝泼, 翁士乔[△], 李开刚

(宁波三生生物科技有限公司, 浙江 宁波 315000)

摘要:目的 建立测定烯丙孕素有关物质的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 GRACE Alltima C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(60:40, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 25℃, 检测波长为 316 nm, 进样量为 20 μL。结果 各杂质峰与主峰分离良好。烯丙孕素、杂质 A、杂质 B、杂质 C 质量浓度分别在 0.507 0~8.112 0 μg/mL, 0.501 6~8.025 9 μg/mL, 0.503 4~8.055 1 μg/mL, 0.500 0~8.000 0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.999 9$)。结论 该方法灵敏、准确, 专属性强, 可用于烯丙孕素有关物质的检测。

关键词: 烯丙孕素; 有关物质; 高效液相色谱法; 质量控制

中图分类号: R927.11; R977.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2021)01-0069-04

Determination of Related Substances of Altrenogest by HPLC

BAO Rupo, WENG Shiqiao, Li Kaigang

(Ningbo Sansheng Biological Technology Co., Ltd., Ningbo, Zhejiang, China 315000)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for the determination of related substances of altrenogest. **Methods** The chromatographic column was GRACE Alltima C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water(60:40, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 25℃, the detection wavelength was 316 nm, and the injection volume was 20 μL. **Results** Altrenogest could be well separated from other impurities. Altrenogest, impurity A, impurity B and impurity C showed good linearity in the ranges of 0.507 0~8.112 0 μg/mL, 0.501 6~8.025 9 μg/mL, 0.503 4~8.055 1 μg/mL, 0.500 0~8.000 0 μg/mL($r \geq 0.999 9$). **Conclusion** The method is sensitive, accurate and specific, which can be used for the determination of related substances of altrenogest.

Key words: altrenogest; related substances; HPLC; quality control

烯丙孕素为三烯 21 碳甾体类孕激素, 属 19- 睾酮系列^[1], 是一种口服给药, 且有孕激素活性的化合物, 和所有甾体类化合物一样, 具有脂溶性, 能进入靶细胞, 结合胞内特异性受体^[2], 以类似于天然孕酮的作用来抑制促性腺激素的释放。烯丙孕素是后备母猪同期发情的理想药品^[3], 可用于大规模批次化的人工授精^[4]。另外,

烯丙孕素可显著改善乏情后备母猪繁殖性能, 提高其发情率和产仔数, 且对后代仔猪的生产性能无影响^[5-8]。烯丙孕素的研究与应用已有近 40 年的历史, 目前国内研究该产品的厂家较多, 但未见其有关物质测定方法的公开报道。本研究中建立了一种简单易行、专属性强、灵敏度高的烯丙孕素有关物质检测的高效液相色谱(HPLC)

*基金项目: 国家重点研发计划重点专项 2017 年度项目[2017YFD0501905]。

第一作者: 包汝泼, 男, 硕士研究生, 高级工程师, 研究方向为药物研发, (电子信箱)baorupo@bio-ss.net。

[△]通信作者: 翁士乔, 男, 大学本科, 高级工程师, 研究方向为药物研发, (电子信箱)wengshiqiao@bio-ss.net。

3.3 色谱柱和淋洗液选择^[5]

采用 Dionex IonPacTM CS12A 柱, 色谱柱达到方法系统适用性要求。淋洗液使用 15 mmol/mL 甲磺酸溶液, 考察了柱温、淋洗液流速、淋洗液浓度, 最终选择流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30℃。

3.4 阴性样品干扰

生产厂家提供的不加西瓜霜的阴性样品按供试品溶液制备方法制备溶液, 按拟订色谱条件进样 10 μL, 结果含硫酸钠为 0.13 mg, 可能为样品中其他原料、辅料及溶剂带入, 较样品中含有的硫酸钠的含量(为 12.47 mg)低。因此, 可忽略阴性样品的影响, 认为阴性对照品溶液无干扰。

3.5 方法评价

所建立的离子色谱法, 方法简便, 准确度高, 专属性

强, 线性范围宽, 可用于西瓜霜润喉片中西瓜霜的含量测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:70.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:61.
- [3] 封淑华. 离子色谱法在药品检测中的最新进展[J]. 中国药业, 2010, 19(11):1-3.
- [4] 甘盛, 施晓光, 韩婷, 等. 离子色谱法测定药用芒硝中硫酸钠含量[J]. 中国药业, 2012, 21(14):39-40.
- [5] 滕南雁, 梁飞燕. 离子色谱法测定中药西瓜霜硫酸盐的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(8):1549-1551.

(收稿日期:2020-01-02;修回日期:2020-06-21)

法,有助于烯丙孕素的质量控制研究^[9-10]。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1260 型高效液相色谱仪[美国安捷伦科技公司,包含二极管阵列检测器(DAD)];XS205 型分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司,精度为十万分之一)。

1.2 试剂

烯丙孕素原料药(批号分别为 151019,151028),烯丙孕素对照品(批号为 151008,纯度为 99.4%),杂质 A(批号为 150701,纯度为 99.4%),杂质 B(批号为 150701,纯度为 99.7%),杂质 C(批号为 150701,纯度为 99.8%),结构见图 1,均由宁波三生生物科技有限公司合成室制备。乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析级,水为超纯水。

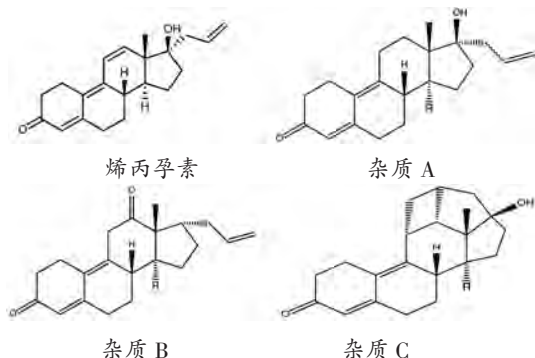


图 1 烯丙孕素及杂质化学结构式

Fig. 1 Chemical structural formula of altrenogest and its impurities

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:GRACE Alltima C₁₈ 柱(250mm×4.6mm,5μm);流动相:乙腈-水(60:40, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:25℃;检测波长:316 nm;进样量:20 μL。

2.2 溶液制备

供试品溶液:取烯丙孕素原料适量,置 50 mL 容量瓶中,加流动相溶解并稀释成质量浓度为 0.5 mg/mL

的溶液,即得。

对照品溶液:精密量取供试品溶液 1 mL,置 100 mL 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

杂质对照品贮备液:分别取杂质 A、杂质 B、杂质 C 对照品约 10 mg,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加流动相溶解并稀释成质量浓度为 0.1 mg/mL 的溶液,即得。

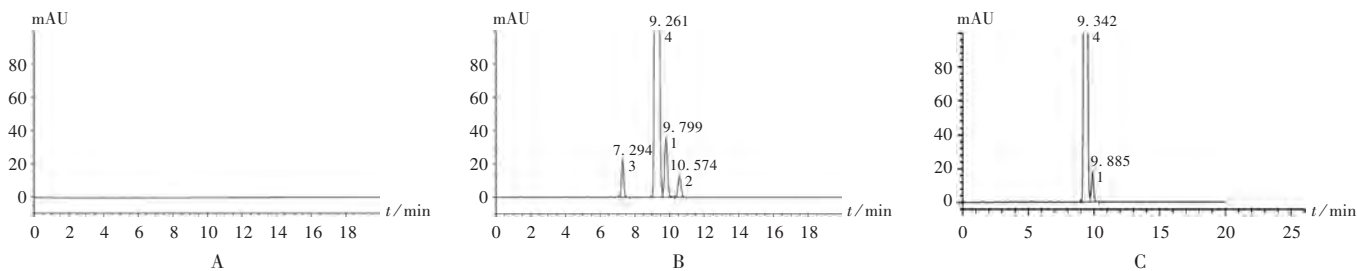
对照品贮备液:取烯丙孕素对照品约 10 mg,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加流动相溶解并稀释成质量浓度为 0.1 mg/mL 的溶液,即得。

系统适用性溶液:取烯丙孕素原料 10 mg,精密称定,置 20 mL 容量瓶中,分别精密加入杂质 A、B、C 对照品贮备液 1 mL 于容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 方法学考察

系统适用性及专属性试验:取 2.2 项下供试品溶液、系统适用性溶液及空白溶剂(流动相),按拟订色谱条件进样。结果空白溶剂不干扰检测,烯丙孕素理论板数大于 5 000,烯丙孕素与各杂质分离度良好。色谱图见图 2。

破坏性试验^[11-12]:1)未破坏,取样品约 10 mg,置 20 mL 容量瓶中,用流动相定容,摇匀,备用;2)酸破坏,取样品约 10 mg,置 20 mL 容量瓶中,加 1 mol/L 盐酸溶液 2 mL,室温下放置 2 h,加碱液调节溶液至中性,用流动相定容,摇匀,备用;3)碱破坏,取样品约 10 mg,置 20 mL 容量瓶中,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL,室温下放置 2 h,加酸液调节溶液至中性,用流动相定容,摇匀,备用;4)氧破坏,取样品约 10 mg,置 20 mL 容量瓶中,加 30% 双氧水 5 mL,室温下放置 2 h,冷却,调节溶液至中性,用流动相定容,摇匀,备用;5)高温破坏,取样品约 10 mg,置 20 mL 容量瓶中,加水适量,溶解,置 100℃ 水浴中放置 12 h,冷却,用流动相定容,摇匀,备用;6)强光破坏,取样品约 10 mg,置 20 mL 容量瓶中,加水适量,



1. 杂质 A 2. 杂质 B 3. 杂质 C 4. 烯丙孕素

A. 空白溶剂 B. 系统适用性溶液 C. 供试品溶液

图 2 系统适用性及专属性试验高效液相色谱图

1. impurity A 2. impurity B 3. impurity C 4. altrenogest

A. Blank solution B. System suitability solution C. Test solution

Fig. 2 HPLC chromatograms of system suitability test and specificity test

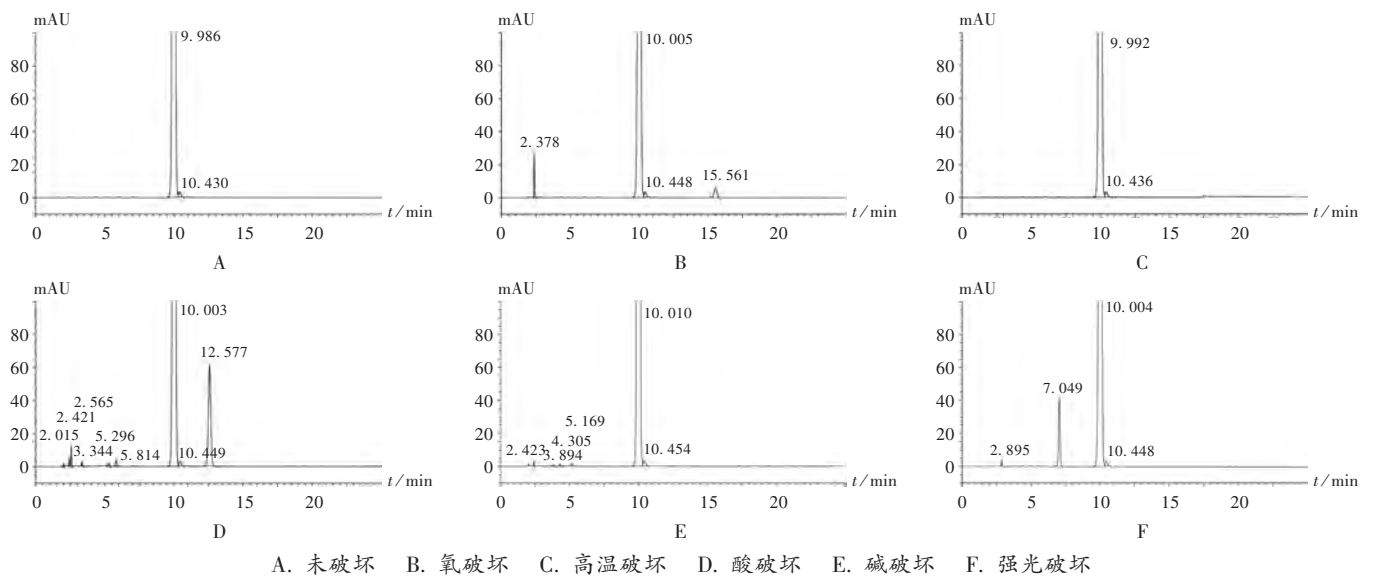


图3 破坏性试验高效液相色谱图

A. No damage B. Oxygen damage C. High temperature damage D. Acid damage E. Alkali damage F. Photodamage

Fig. 3 HPLC chromatograms of destructive tests

溶解,于光照强度4 500 lx条件下放置10 d,用流动相定容,摇匀。按拟订色谱条件进样测定。结果表明,经热、氧、高温破坏后降解不明显,经酸、光破坏后有降解杂质产生,但与主峰分离度良好。详见图3。

线性关系考察:分别取烯丙孕素、杂质A、杂质B、杂质C、烯丙孕素对照品适量,精密称定,加流动相制成质量浓度为10 μg/mL的混合贮备液,精密量取混合贮备液0.5,1.0,2.0,4.0,6.0,8.0 mL,置10 mL容量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,按拟订色谱条件分别进样20 μL测定,记录峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X, μg/mL)为横坐标进行线性回归,得回归方程,并计算各杂质的校正因子。结果见表1。

表1 烯丙孕素及杂质的线性关系考察结果和检测限

Tab. 1 Linear relationship and detection limit of altrenogest and its impurities

化合物	线性回归方程	r	范围(μg/mL)	校正因子	检测限(μg/mL)
烯丙孕素	$Y = 28.628X + 4.9338$	0.9999	0.5070~8.1120	1.00	0.0254
杂质A	$Y = 29.481X + 1.9704$	1.0000	0.5016~8.0259	0.97	0.0253
杂质B	$Y = 31.124X + 1.7573$	0.9999	0.5034~8.0551	0.92	0.0252
杂质C	$Y = 39.786X + 1.6955$	0.9999	0.5000~8.0000	0.72	0.0125

检测限确定:取2.2项下各溶液,将其稀释至一定浓度,以3倍信噪比($S/N = 3$)测定。烯丙孕素及各杂质的检测限见表1。

精密度试验:取同一批(批号为151008)对照品6份,精密称定,用流动相溶解并稀释成质量浓度为0.5 mg/mL的溶液。采用不同人员(实验员1,2)及设备(Agilent 1260-1型,Agilent 1260-2型)按拟订色谱条件进样测定,以各杂质的测定结果进行计算。结果实验员1采

用Agilent 1260-1型HPLC仪所得结果的RSD为0,实验员2采用Agilent 1260-2型HPLC仪所得结果的RSD为0.80%,表明方法精密度良好。

稳定性试验:取烯丙孕素原料药(批号为151028)适量,依法制备供试品溶液,置室温。精密量取20 μL,分别在0,8,24,30 h时按拟订色谱条件进样测定。结果的RSD为0.20% ($n = 3$),表明烯丙孕素供试品溶液在30 h内稳定性良好。

加样回收试验:分别精密量取杂质A、杂质B、杂质C对照品贮备液各4,5,6 mL,置100 mL容量瓶中,加入供试品溶液中,制成含标准物质浓度80%,100%和120%的溶液各3份(共9份),分别进样20 μL,按拟订色谱条件进样测定,带入线性方程计算回收率,计算时扣除供试品已有的杂质含量(3.37 μg/mL)。结果见表2。

2.4 样品有关物质测定

精密量取2.2项下供试品溶液及对照品溶液各20 μL,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图至保留时间的2倍。结果见表3。

3 讨论

3.1 检测波长选择

分别称取烯丙孕素及杂质A,B,C适量,加流动相溶解并稀释成质量浓度为0.5 mg/mL的溶液,通过DAD检测器进行全波长扫描,发现在316 nm波长处烯丙孕素与各杂质的响应最接近,且杂质A和杂质B的相对响应因子在0.9~1.1间,可不使用校正因子,易于简化方法。并对“专属性试验”项下样品进行检测,于316 nm波长下相较其他波长可检测出更多未知杂质,故选用316 nm作为有关物质检测波长。

表2 加样回收试验结果($n=9$)
Tab. 2 Results of recovery tests($n=9$)

加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			\bar{X} (%)			RSD(%)		
杂质A	杂质B	杂质C	杂质A	杂质B	杂质C	杂质A	杂质B	杂质C	杂质A	杂质B	杂质C	杂质A	杂质B	杂质C
0.4010	0.4045	0.4005	0.4133	0.4298	0.3845	103.07	106.25	96.00						
0.4010	0.4045	0.4005	0.4055	0.4246	0.3742	101.12	104.97	93.43						
0.4010	0.4045	0.4005	0.4061	0.4116	0.3820	101.27	101.76	95.38						
0.5080	0.5100	0.5030	0.5022	0.5300	0.5014	98.86	103.92	99.68						
0.5080	0.5100	0.5030	0.5028	0.5482	0.5392	98.98	107.49	107.20	101.15	104.19	99.88	1.80	1.73	4.29
0.5080	0.5100	0.5030	0.5055	0.5240	0.5072	99.51	102.75	100.83						
0.6020	0.6085	0.6070	0.6277	0.6336	0.6181	104.27	104.13	101.83						
0.6020	0.6085	0.6070	0.6129	0.6307	0.6214	101.81	103.65	102.37						
0.6020	0.6085	0.6070	0.6109	0.6255	0.6202	101.48	102.79	102.17						

表3 烯丙孕素有关物质检测结果(%)

Tab. 3 Detection results of related substances of altrenogest(%)

批号	杂质A	杂质B	杂质C	总杂质
151008	0.7	未检出	未检出	0.7
151019	0.7	未检出	未检出	0.7
151028	0.7	未检出	未检出	0.7

3.2 色谱柱选择

本试验中筛选了不同规格和品牌的 C₁₈ 色谱柱: GRACE Alltima silica C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Diamonsil C₁₈(2) 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Waters XTerra RP₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Agelavensil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Kromasil 100-5-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), GRACE Alltima C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Welch Materials XB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), OMNI BOND ORCA C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。由于杂质 A 和烯丙孕素在色谱柱上的色谱行为极接近,而杂质 B、杂质 C 和烯丙孕素的色谱行为差异较大,故重点考察杂质 A 和烯丙孕素的分离度。经筛选,上述色谱柱杂质 A 分离度分别为无分离效果,1.36,无分离效果,1.01,1.20,1.73,无分离效果,1.63。故最终确定色谱柱为 GRACE Alltima C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。

3.3 流动相选择

本试验中通过流动相组成对比(甲醇和乙腈),发现使用甲醇时,烯丙孕素与各杂质无法有效被洗脱分离,采用乙腈能使各杂质完全分离。通过调整乙腈比例

(50%, 55%, 60%, 65%, 70%)进行条件优化,结果60%乙腈的分离效果最好,故选择水-乙腈(40:60,

V/V)为流动相。

3.4 耐用性考察

通过对流速、柱温、流动相比比例进行微调,考察本方法的耐用性,结果上述条件的调整不影响烯丙孕素的有关物质检测结果,表明该法灵敏度高、分离度好、专属性强、结果准确,适用于烯丙孕素有关物质的检测。

参考文献

- [1] PAPICH MG. Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition) [M]. Netherlands: Elsevier, 2016: 21-22.
- [2] ROUSSEL - UCLAF. Werkwijze voor het bereiden van een gonatrieenderivaat: NL 6401555 [P]. 1964-08-21.
- [3] 李艳艳, 李宇琛, 姚诗赞, 等. 烯丙孕素内服溶液调控母猪同期发情的临床药效试验[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(6): 124-127.
- [4] NADAL - ROIG E, PLA LM. Multiperiod planning tool for multi-site pig production systems[J]. Journal of Animal Science, 2014, 92(9): 4154-4160.
- [5] 陈志林, 师晓杰, 张凯, 等. 烯丙孕素对乏情后备母猪繁殖性能的影响[J]. 养猪, 2018(4): 28-29.
- [6] 李 晓, 董瑞兰, 宋春阳, 等. 烯丙孕素对批次化生产中后备母猪繁殖性能及后代生长性能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2020, 56(11): 171-174.
- [7] 杨海峰, 李艳艳, 陈晓兰, 等. 烯丙孕素内服溶液的临床药效和靶动物安全性研究[J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(1): 78-86.
- [8] 冯言言, 郑 莉, 林 红, 等. 烯丙孕素溶液对母猪繁殖性能的临床疗效研究进展[J]. 今日养猪业, 2020(3): 82-84.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 480-485.
- [10] 国家药品监督管理局. 化学药物杂质研究的技术指导原则[EB/OL]. (2007-08-23)[2020-01-20]. <http://www.cde.org.cn/dzyk.do?method=largePage&id=507a301f9dd281bd>.
- [11] MAHESWARAN R. FDA Perspectives: Scientific Considerations of Forced Degradation Studies in ANDA Submissions[J]. Pharmaceutical Technology, 2012, 36(5): 73-80.
- [12] 黄晓龙. 浅谈强制降解试验[EB/OL]. (2006-03-11)[2020-06-25]. <http://www.cde.org.cn/dzkw.do?method=largePage&id=1470>.

(收稿日期: 2020-03-18; 修回日期: 2020-06-25)

