

# HPLC法检查环戊丙酸雌二醇原料药的有关物质

杜碧莹\*(广州市药品检验所,广州 510160)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)25-2369-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.25.24

**摘要** 目的:建立环戊丙酸雌二醇原料药中有关物质的检查方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil C<sub>18</sub>,流动相为硝酸铵溶液-乙腈(23:77, V/V),流速为1.5 ml/min,检测波长为280 nm,进样量为50 μl。杂质I按不加校正因子的主成分自身对照法计算,杂质II采用杂质对照品外标法进行定量。结果:杂质I与杂质II检测质量浓度线性范围分别为0.3~2.0、0.5~4.0 μg/ml(*r*均为0.999 9),校正因子分别为0.970、0.368;杂质I、杂质II与环戊丙酸雌二醇检测限分别为6.3、1.5、2.3 ng,定量限分别为21.0、5.0、7.7 ng。3批样品中均检出杂质I、杂质II,但未检出雌二醇。结论:建立的方法准确、灵敏度高,可用于检查环戊丙酸雌二醇原料药中的有关物质。

**关键词** 高效液相色谱法;环戊丙酸雌二醇原料药;有关物质

## Determination of Related Substances of Estradiol Cypionate Raw Material by HPLC

DU Bi-ying(Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of related substances in estradiol cypionate raw material. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Kromasil C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of ammonium nitrate-acetonitrile (23:77, V/V) at the flow rate of 1.5 ml/min. The detection wavelength was set at 280 nm, and sample size was 50 μl. The impurity I was determined by main component self contrast method without correction factor, and impurity II was quantified by impurity control internal method. RESULTS: The linear range of impurity I and impurity II were 0.3-2.0 μg/ml (*r*=0.999 9) and 0.5-4.0 μg/ml (*r*=0.999 9). The correction factors of impurity I and impurity II were 0.970 and 0.368. The detection limits of impurity I, impurity II and estradiol cypionate were 6.3 ng, 1.5 ng and 2.3 ng, and the quantification limits were 21.0 ng, 5.0 ng and 7.7 ng, respectively. The impurity I and impurity II were detected in 3 batches of samples, and estradiol was not found. CONCLUSIONS: The method is accurate, sensitive and suitable for the determination of related substances in estradiol cypionate raw material.

**KEYWORDS** HPLC; Estradiol cypionate raw material; Related substances

环戊丙酸雌二醇为长效雌激素,其作用比戊酸雌二醇强而持久,维持时间在3~4周以上,临床上主要用于卵巢功能不全、闭经、更年期综合征、老年性阴道炎及前列腺癌等;其与甲羟孕酮组成复方注射用避孕药(全球通用药名Lunelle),可作为每月1次长效避孕药,已获美国FDA认可<sup>[1-2]</sup>。环戊丙酸雌二醇质量标准仅在《美国药典》(USP)36版<sup>[3]</sup>有记载,2010年版《中国药典》以及现行版《英国药典》《欧洲药典》《日本药局方》均无记载。而目前USP 36版及国内研究并没有对环戊丙酸雌二醇的有关物质进行定性定量研究,因此难以保证药品质量。本文建立了新的有关物质检查方法,并通过测定不同浓度杂质的标准曲线计算杂质校正因子,从而提高了有关物质控制的准确性,以更好地对环戊丙酸雌二醇的质量情况进行评价。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1200 高效液相色谱(HPLC)仪系统、紫外检测器、Chem Station工作站(美国Agilent公司)。

### 1.2 药品与试剂

环戊丙酸雌二醇(USP对照品,批号:CAT NO.1252003,纯度:99.9%,105℃干燥4 h后用);杂质I[雌甾-1,3,5(10)-三

烯-3,17-二醇,(17β)-,17-环戊乙酸酯,企业工作对照品,批号:ZP034-S003,纯度:99.28%];杂质II[雌甾-1,3,5(10),9(11)-四烯-3,17-二醇,(17β)-,17-环戊丙酸酯,企业工作对照品,批号:ZP034-S002,纯度:98.58%];环戊丙酸雌二醇原料药(北京某公司,批号:20110941、20110942、20110943,纯度:100.9%、99.9%、99.8%);乙腈为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C<sub>18</sub>(以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,25 cm×4.6 mm,5 μm);流动相:硝酸铵溶液(取0.8 g硝酸铵,溶解于300 ml水中)-乙腈(23:77, V/V),流速:1.5 ml/min;柱温:35℃;检测波长:280 nm;进样量:50 μl。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液。取环戊丙酸雌二醇原料药适量,精密称定,加溶剂[乙腈-水(70:30)]溶解并定量稀释制成每1 ml中约含1 mg的溶液,即得。

2.2.2 对照溶液。精密量取供试品溶液适量,加溶剂稀释制成每1 ml中约含1 μg的溶液,即得。

2.2.3 对照品溶液。取杂质II对照品适量,精密称定,用溶剂溶解并定量稀释制成每1 ml中约含2 μg的溶液,作为对照品溶液。

\* 副主任药师,硕士。研究方向:药物分析、药品检验。电话:020-26282368。E-mail:winddby@tom.com

### 2.3 系统适用性试验

取环戊丙酸雌二醇 USP 对照品、杂质 I 与杂质 II 对照品适量,精密称定,用溶剂溶解并定量稀释制成每 1 ml 中含 1 mg、1.5 μg、2 μg 的混合溶液。取 50 μl,注入液相色谱仪,环戊丙酸雌二醇的保留时间约为 20 min;环戊丙酸雌二醇峰与杂质 II 的分离度应大于 2.0,理论板数按环戊丙酸雌二醇峰计不低于 5 000。系统适用性溶液和供试品溶液(批号:20110941)色谱图见图 1。

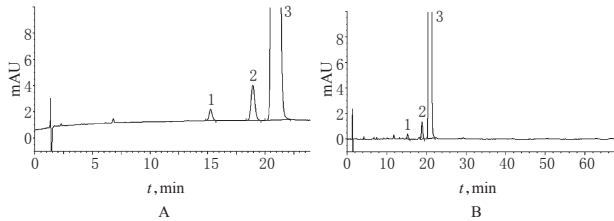


图 1 高效液相色谱图

A. 系统适用性溶液; B. 供试品溶液; 1. 杂质 I; 2. 杂质 II; 3. 环戊丙酸雌二醇

Fig 1 HPLC chromatograms

A. system suitability solution; B. test solution; 1. impurity I; 2. impurity II; 3. estradiol cypionate

### 2.4 不同色谱柱试验

比较了不同牌号的色谱柱对分析的影响,各指标结果见表 1。

表 1 不同色谱柱试验结果

Tab 1 Results of tests under different columns

项目	指标	色谱柱		
		Dikma C <sub>18</sub> 150 mm × 4.6 mm	Waters C <sub>18</sub> 250 mm × 4.6 mm	Kromasil C <sub>18</sub> 250 mm × 4.6 mm
环戊丙酸雌二醇	保留时间, min	19.646	17.574	20.861
	拖尾因子	1.0	1.2	1.2
	理论板数	9 850	18 597	16 823
杂质 II 与杂质 I	分离度	4.7	6.6	6.8
杂质 II 与环戊丙酸雌二醇	分离度	2.4	3.0	3.1
杂质 I 相对主峰保留时间		0.75	0.74	0.73
杂质 II 相对主峰保留时间		0.91	0.91	0.91

试验结果表明该流动相适用范围较广,选择 3 种不同牌号的色谱柱均可适用,杂质 II 与环戊丙酸雌二醇的分离度均大于 2.0。

### 2.5 线性关系试验

分别取环戊丙酸雌二醇、杂质 I 与杂质 II 对照品适量,用溶剂稀释成质量浓度分别为 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 μg/ml, 0.3、0.6、0.9、1.5、2.0 μg/ml, 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 μg/ml 的系列溶液进行测定,以峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x)为横坐标,计算线性回归方程,见表 2。

表 2 线性方程结果

Tab 2 Linear equation

组分	线性方程	r	线性范围, μg/ml
环戊丙酸雌二醇	$y=10.079\ 180\ 6x-0.224\ 971$	0.999 6	0.2~2.0
杂质 I	$y=10.389\ 305\ 2x-0.061\ 223\ 9$	0.999 9	0.3~2.0
杂质 II	$y=27.408\ 085\ 3x+0.320\ 979\ 1$	0.999 9	0.5~4.0

按最小二乘法以进样量对响应值(峰面积等)进行线性回归,求得两条标准曲线,两曲线斜率之比即为校正因子。杂质 I 相对校正因子为 0.970,杂质 II 相对校正因子为 0.368。

### 2.6 耐用性试验

比较了不同流动相组成比例、pH、柱温、流速、检测波长等对测定结果的影响,见表 3。

表 3 耐用性试验结果

Tab 3 Results of durability test

指标	条件	主峰的保留时间, min	相对主峰保留时间		杂质 II 与主峰分离度	拖尾因子	
			杂质 I	杂质 II		杂质 I	杂质 II
pH	4.8	20.931	0.73	0.91	3.1	1.04	0.38
	5.8	20.943	0.73	0.91	3.1	0.98	0.37
柱温, °C	37	20.217	0.73	0.91	3.3	0.95	0.37
	33	21.769	0.73	0.91	3.4	0.99	0.36
波长, nm	281	20.923	0.73	0.91	3.4	1.03	0.44
	279	20.946	0.73	0.91	3.4	0.94	0.32
流动相比例	22:78	19.265	0.74	0.91	3.4	0.91	0.37
	24:76	22.603	0.72	0.91	3.4	1.05	0.37
流速, ml/min	1.6	19.578	0.73	0.91	3.3	0.94	0.37
	1.4	22.386	0.73	0.91	3.4	0.97	0.36

结果显示,杂质 I 与杂质 II 的相对保留时间比较稳定,杂质 II 与环戊丙酸雌二醇的分离良好。计算得杂质 I 的相对响应因子为 0.9~1.0,杂质 II 的相对响应因子为 0.3~0.4,受参数变化影响较小。拟定标准杂质 I 按不加校正因子的主成分自身对照法计算,以相对主峰的保留时间进行定性;杂质 II 采用杂质对照品外标法进行定量(与加校正因子主成分自身对照法计算的结果一致,见“2.11”项)。

### 2.7 精密度试验

分别取“2.5”项下环戊丙酸雌二醇(1.0 μg/ml)、杂质 II(2.0 μg/ml)对照品溶液连续进样 6 次,环戊丙酸雌二醇、杂质 II 峰面积变化的 RSD 分别为 0.1%、0.4% (n=6)。

取供试品溶液(批号:20110941)连续进样 6 次,峰面积的 RSD 为 0.2% (n=6)。

### 2.8 稳定性试验

取供试品溶液(批号:20110941)放置 0、8、16、24 h 时取样测定,峰面积的 RSD 为 0.5% (n=4)。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 2.9 杂质 II 测定的准确度试验

分别精密称取环戊丙酸雌二醇原料药(批号:20110941)9 份,每份 100 mg,置于 100 ml 量瓶中,精密加入杂质 II 对照品贮备液(20 μg/ml)4、5、6 ml,加溶剂溶解并稀释至刻度,测定高、中、低 3 种质量浓度的回收率,结果平均值分别为 98.86%、99.92%、100.07%,总平均回收率为 99.62%,RSD 为 0.6% (n=9)。

### 2.10 杂质检测限与定量限试验

取“2.5”项下溶液适量,采用逐步稀释法稀释,当信噪比为 3 时,杂质 I、杂质 II 与环戊丙酸雌二醇检测限分别为 6.3、1.5、2.3 ng;当信噪比为 10 时,杂质 I、杂质 II 与环戊丙酸雌二醇定量限分别为 21.0、5.0、7.7 ng。

### 2.11 样品中有关物质测定结果

量取“2.2”项下供试品溶液、对照溶液、对照品溶液各 50 μl,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的 3 倍,供试品溶液如有与杂质 II 保留时间一致的色谱峰,按外标法以峰面积计算,不得过 0.2%;在相对保留时间为 0.7 处如有杂质峰(杂质 I),不得大于对照溶液主峰峰面积的 1.5 倍(0.15%);其他单个杂质不得大于对照溶液主峰峰面积(0.1%),杂质总量不得过 1.0%。供试品溶液中任何小于对照

# HPLC 梯度洗脱法同时测定鼻炎喷剂中 3 种组分的含量

吕冠欣<sup>1\*</sup>, 龚越强<sup>1</sup>, 严静<sup>2</sup>, 欧景仪<sup>2</sup>(1. 佛山市顺德区药品检验所, 广东佛山 528300; 2. 佛山市顺德区桂州医院, 广东佛山 528300)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)25-2371-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.25.25

**摘要** 目的: 建立同时测定鼻炎喷剂中盐酸麻黄碱、环丙沙星、醋酸泼尼松龙 3 种组分含量的方法。方法: 采用高效液相色谱梯度洗脱法。色谱柱为 SHIMADZU Shim-pack VP-ODS, 流动相为甲醇-乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾(含 0.25% 三乙胺, pH 3.0), 流速为 1.0 ml/min, 变换紫外检测波长分别为 207、278、247 nm, 柱温为 40 °C。结果: 盐酸麻黄碱、环丙沙星、醋酸泼尼松龙检测质量浓度线性范围分别为 99.93~799.44、46.38~371.00、5.39~43.12 μg/ml ( $r=0.999\ 6\sim 0.999\ 8$ ), 平均回收率为 100.4% (RSD=1.2%,  $n=3$ )、101.1% (RSD=1.3%,  $n=3$ ) 和 101.0% (RSD=1.5%,  $n=3$ )。结论: 建立的方法简便、灵敏、准确, 可用于制订鼻炎喷剂的质量标准并为产品质量控制提供支持。

**关键词** 高效液相色谱法; 鼻炎喷剂; 盐酸麻黄碱; 环丙沙星; 醋酸泼尼松龙; 含量测定

## Simultaneous Determination of 3 Components in Rhinitis Spray by HPLC with Gradient Elution

LYU Guan-xin<sup>1</sup>, GONG Yue-qiang<sup>1</sup>, YAN Jing<sup>2</sup>, OU Jing-yi<sup>2</sup>(1. Foshan Shunde District Institute for Drug Control, Guangdong Foshan 528300, China; 2. Foshan Shunde District Guizhou Hospital, Guangdong Foshan 528300, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of ephedrine hydrochloride, ciprofloxacin and prednisolone acetate in Rhinitis spray. METHODS: HPLC with gradient elution method was adopted. The determination was performed on SHIMADZU Shim-pack VP-ODS column with mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate (containing 0.25% triethylamine, pH 3.0) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 207 nm, 278 nm and 247 nm and column temperature was 40 °C. RESULTS: The linear ranges were 99.93-799.44 μg/ml for ephedrine hydrochloride, 46.38-371.00 μg/ml for ciprofloxacin and 5.39-43.12 μg/ml for prednisolone acetate ( $r=0.999\ 6\sim 0.999\ 8$ ); their average recoveries were 100.4% (RSD=1.2%,  $n=3$ ), 101.1% (RSD=1.3%,  $n=3$ ) and 101.0% (RSD=1.5%,  $n=3$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive, accurate, and can be used for the formulation of quality standard and quality control of Rhinitis spray.

**KEYWORDS** HPLC; Rhinitis spray; Ephedrine hydrochloride; Ciprofloxacin; Prednisolone acetate; Content determination

溶液主峰面积 0.1 倍的峰可忽略不计。3 批样品有关物质检查结果见表 4。

表 4 3 批样品有关物质检查结果 (%)

Tab 4 Results of related substances in 3 batches of samples (%)

样品批号	杂质 I	杂质 II		单个最大杂质	杂质总量
		外标法	加校正因子法		
20110941	0.10	0.10	0.10	0.03	0.3
20110942	0.08	0.10	0.10	0.05	0.4
20110943	0.07	0.14	0.13	0.03	0.3

### 3 讨论

(1) 本试验中取系统适用性试验溶液进样, 用二极管阵列检测器(DAD)检测, 环戊丙酸雌二醇、杂质 I 及单个杂质的最大吸收波长为 280 nm, 杂质 II 的最大吸收波长为 263 nm。拟定标准采用 280 nm 作为检测波长。由于杂质 I 与杂质 II 的相对保留时间重现性较好, 杂质 I 与杂质 II 的相对响应因子受参数变化影响较小, 故杂质 I 按不加校正因子的主成分自身对照法计算, 以相对主峰的保留时间进行定性。杂质 II 采用加校正因子的主成分自身对照法与外标法计算的结果一致, 由于杂质 II 易于获得, 且经结构确证且纯度大于 98.5%, 故拟

\* 副主任中药师。研究方向: 药物分析与检验。E-mail: 596962547@qq.com

定标准采用杂质对照品外标法进行定量。

(2) 笔者曾采用梯度洗脱的方式进行有关物质检查, 由于不同的仪器间梯度准确度的差异会导致分离重现性差; 而等度洗脱的方式重现性较好, 各有关物质间的分离度均 > 2.0, 有关物质的定量准确度也不受影响, 因此本试验最终采用等度洗脱的方式。

(3) 环戊丙酸雌二醇是以雌酚酮与环戊丙酰氯为起始原料, 通过一系列酯化及水解后的终产物。环戊丙酰氯中含有微量环戊乙酰氯, 与雌酚酮的反应副产物为杂质 I, 杂质 II 为雌酚酮脱氢物(雌酚酮及雌激素衍生物的合成中使用二氯二氰基苯醌脱氢<sup>[4]</sup>)与环戊丙酰氯的反应副产物。试验发现 3 批样品中均检出杂质 I、杂质 II, 但未检出另一已知杂质雌二醇。

### 参考文献

- [1] 雷贞武. 新的激素避孕方法: Lunella 注射避孕针[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2008, 27(1): 58.
- [2] 唐彦, 朱珠. 月用避孕药: 复方甲羟孕酮[J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(11): 285.
- [3] The United States Pharmacopeial Convention. U.S. Pharmacopeia (36)-National Formulary (31) [S]. Baltimore: United Book Press, Inc., 2013: 3 480.
- [4] 景羽. 雌酚酮及雌激素衍生物的合成研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2010: 1-93.

(收稿日期: 2013-09-25 修回日期: 2013-11-05)