

HPLC法同时测定雌激素类药物尼尔雌醇片和己烯雌酚片中主药含量^Δ

孙婷^{1*}, 张菁¹, 刘云², 姜建国^{1#}, 蒋凝¹(1.河北省药品检验研究院, 石家庄 050011; 2.石家庄市食品药品监督管理局检验中心, 石家庄 050011)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)04-0469-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.08

摘要 目的:建立同时测定尼尔雌醇片和己烯雌酚片中主药含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈, 流动相为 0.02 mol/L 乙酸铵水溶液-乙腈(40:60, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 280 nm, 柱温为 35 ℃, 进样量为 20 μL。结果:尼尔雌醇、己烯雌酚检测质量浓度线性范围均为 0.01~0.5 mg/mL (*r* 均为 0.999 9); 定量限分别为 187、192 ng/mL, 检测限分别为 56、58 ng/mL; 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 1% (*n*=6); 加样回收率分别为 99.13%~100.80% (RSD=0.52%, *n*=9)、99.20%~100.90% (RSD=0.58%, *n*=9)。结论:该方法灵敏度高、重复性好, 可用于同时测定雌激素类药物尼尔雌醇片中尼尔雌醇和己烯雌酚片中己烯雌酚的含量。

关键词 高效液相色谱法; 雌激素类药物; 尼尔雌醇; 己烯雌酚; 含量测定

Simultaneous Determination of Main Components in Estrogenic Hormone Drug Nilestriol Tablets and Diethylstilbestrol Tablets by HPLC

SUN Ting¹, ZHANG Jing¹, LIU Yun², JIANG Jianguo¹, JIANG Ning¹ (1.Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China; 2.Shijiazhuang Institute for Food and Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

- Drug Targets*, 2018, 18(1):52-60.
- [8] CHEN Y, WANG B, ZHAO H. Thymoquinone reduces spinal cord injury by inhibiting inflammatory response, oxidative stress and apoptosis via PPAR-gamma and PI3K/Akt pathways[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(6):4987-4994.
- [9] BARGI R, ASGHARZADEH F, BEHESHTI F, et al. Thymoquinone protects the rat kidneys against renal fibrosis [J]. *Res Pharm Sci*, 2017, 12(6):479-487.
- [10] NOROUZI F, ABARESHI A, ASGHARZADEH F, et al. The effect of Nigella sativa on inflammation-induced myocardial fibrosis in male rats[J]. *Res Pharm Sci*, 2017, 12(1):74-81.
- [11] ASGHARZADEH F, BARGI R, BEHESHTI F, et al. Thymoquinone restores liver fibrosis and improves oxidative stress status in a lipopolysaccharide-induced inflammation model in rats[J]. *Avicenna J Phytomed*, 2017, 7(6):502-510.
- [12] POURGHOLAMHOSSEIN F, SHARIFIFAR F, RA-SOOLI R, et al. Thymoquinone effectively alleviates lung fibrosis induced by paraquat herbicide through down-regulation of pro-fibrotic genes and inhibition of oxidative stress[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016. DOI: 10.1016/j.etap.2016.06.019.
- [13] CHEN X, TANG Y, GAO M, et al. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in myocardial fibrosis in rat offspring[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5):10986-10996.
- [14] KAWARATANI H, MORIYA K, NAMISAKI T, et al. Therapeutic strategies for alcoholic liver disease: focusing on inflammation and fibrosis: review[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(2):263-270.
- [15] ALKHARFY KM, AHMAD A, JAN BL, et al. Thymoquinone reduces mortality and suppresses early acute inflammatory markers of sepsis in a mouse model[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.028.
- [16] WANG LP, FAN SJ, LI SM, et al. Oxidative stress promotes myocardial fibrosis by upregulating K_v3.1 channel expression in AGT-REN double transgenic hypertensive mice[J]. *Pflugers Arch*, 2017, 469(9):1061-1071.
- [17] XIAO T, LUO J, WU Z, et al. Effects of hydrogen sulfide on myocardial fibrosis and PI3K/AKT1-regulated autophagy in diabetic rats[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2):1765-1773.
- [18] 吴限, 黎明江, 李莎. 心肌纤维化病理染色鉴定方法的综合评价[J]. *医学研究杂志*, 2017, 46(9):34-37.

Δ 基金项目: 国家科技重大专项课题(No.2017zx09101001); 河北省科技计划项目(No.162777244)

* 高级工程师, 硕士。研究方向: 药物分析、仿制药疗效与质量一致性评价研究。电话: 0311-85212008。E-mail: 122547652@qq.com

通信作者: 主任药师, 硕士。研究方向: 药物分析、仿制药疗效与质量一致性评价研究。电话: 0311-85212008。E-mail: me-shall1983@126.com

(收稿日期: 2018-10-17 修回日期: 2018-12-07)

(编辑: 张元媛)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of main drug contents in Nilestriol tablet and Diethylstilbestrol tablet. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Waters Symmetry C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.02 mol/L ammonium acetate water solution-acetonitrile (40:60, V/V) at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 280 nm, and column temperature was 35 °C. The sample size was 20 μL. RESULTS: The linear range of nilestriol and diethylstilbestrol were 0.01-0.5 mg/mL ($r=0.9999$); the limits of quantitation were 187 and 192 ng/mL, and the limits of detection were 56 and 58 ng/mL. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1% ($n=6$). The recoveries of them were 99.13%-100.80% (RSD=0.52%, $n=9$) and 99.20%-100.90% (RSD=0.58%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is more sensitive and reproducible, and suitable for simultaneous determination of nilestriol content in estrogenic hormone drug Nilestriol tablets and diethylstilbestrol content in Diethylstilbestrol tablets.

KEYWORDS HPLC; Estrogenic drugs; Nilestriol; Diethylstilbestrol; Content determination

尼尔雌醇(Nilethylenol)又名戊炔雌三醇,化学名为3-(环戊氧基)-19-去甲基-17 α -孕甾-1,3,5(10)-三烯-20-炔-16 α ,17-二醇,属于雌三醇衍生物;己烯雌酚(Diethylstilbestrol)又名丙酸己烯雌酚,化学名为(*E*)-4,4'-(1,2-二乙基-1,2-亚乙烯基)双苯酚,是人工合成的非甾体雌激素类药物;两者均为雌激素类处方药,临床均用于雌激素缺乏引起的绝经期或更年期综合征,其主要不良反应均为突破性出血、子宫出血等。因此,有必要严格、有效、精准地控制尼尔雌醇片和己烯雌酚片的质量。虽然尼尔雌醇片和己烯雌酚片的现行质量标准均已收载于2015年版《中国药典》(二部)^[1],尼尔雌醇片采用紫外-可见分光光度法测定含量,己烯雌酚片采用高效液相色谱法(HPLC)测定含量,且与2005年版《中国药典》(二部)完全相同^[2],但其标准项目的设置及检测方法等多方面仍有待提高。为此,笔者参考相关文献^[3-12],建立了采用HPLC法同时测定雌激素类药物尼尔雌醇片中尼尔雌醇和己烯雌酚片中己烯雌酚的含量,旨在为该类药物的质量控制及同类药物的一测多评提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters 2695 型 HPLC 仪,包括 2489 紫外检测器、e2695 四元梯度输液泵、Waters 色谱工作站(美国 Waters 公司);XS205 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

1.2 药品与试剂

尼尔雌醇对照品(批号:100239-200702,纯度:99.4%;使用前需 80 °C 减压干燥 2 h)、己烯雌酚对照品(批号:100033-200607,纯度:99.9%;使用前不需要干燥处理)均由中国食品药品检定研究院提供;尼尔雌醇片(批号:170103、170104、170105,规格:1 mg/片)、己烯雌酚片(批号:170201、170202、170203,规格:1 mg/片)均由 A 公司提供;乙腈为色谱纯(Fisher,美国 Scientific 公司);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Symmetry C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.02 mol/L 乙酸铵水溶液-乙腈(40:60, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:35 °C;进样量:20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取尼尔雌醇对照品、己烯雌酚对照品各 100 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度均为 10 mg/mL 的尼尔雌醇对照品贮备液和己烯雌酚对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液各 1 mL,分别置于 100 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得尼尔雌醇对照品溶液和己烯雌酚对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取尼尔雌醇片 20 片,研细,精密称取细粉(约相当于尼尔雌醇 10 mg)适量,置于 10 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为尼尔雌醇供试品贮备液;精密量取上述尼尔雌醇供试品贮备液 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得尼尔雌醇供试品溶液。另取己烯雌酚片 20 片,研细,精密称取细粉(约相当于己烯雌酚 10 mg)适量,置于 10 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为己烯雌酚供试品贮备液;精密量取上述己烯雌酚供试品贮备液 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得己烯雌酚供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 按处方工艺分别制备缺尼尔雌醇和己烯雌酚的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法分别制备阴性样品溶液。

2.2.4 系统适用性溶液 精密称取尼尔雌醇对照品、己烯雌酚对照品 5 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加 30% 过氧化氢溶液 5 mL,于 70 °C 加热 10 min,分别制得尼尔雌醇系统适用性溶液和己烯雌酚系统适用性溶液。

2.3 系统适用性试验

分别精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、

阴性样品溶液、系统适用性溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,尼尔雌醇峰保留时间约为15 min,与各杂质峰的分离度均大于2.0,理论板数不低于3 000;己烯雌酚峰保留时间约为5 min,与杂质峰的分离度均大于2.0,理论板数不低于3 000。尼尔雌醇峰和己烯雌酚峰与溶剂及其他杂质峰分离良好,阴性样品对测定无干扰。

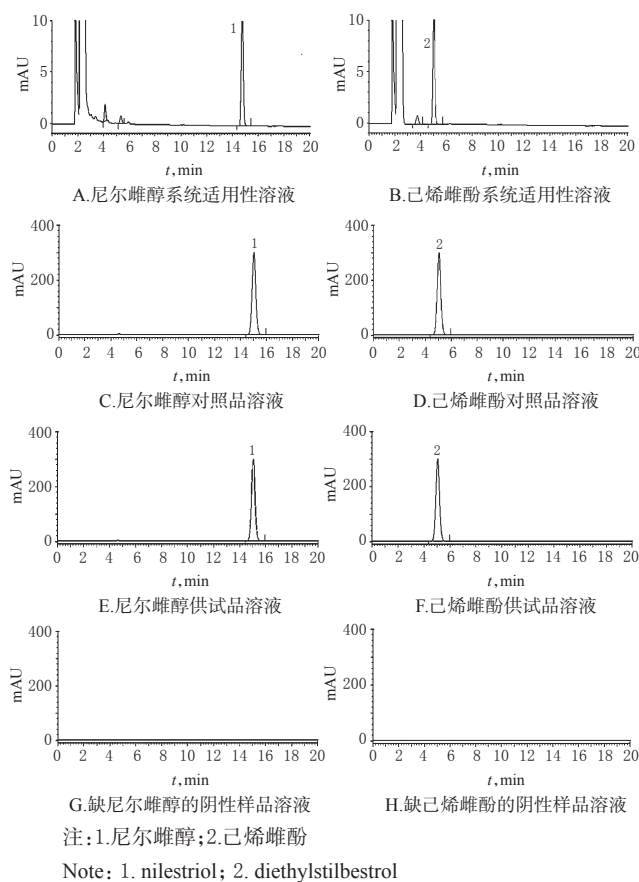


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下尼尔雌醇对照品贮备液、己烯雌酚对照品贮备液0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL,分别置于100 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x , mg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得尼尔雌醇、己烯雌酚回归方程分别为 $y=9.5917 \times 10^8 x + 2.4822 \times 10^6$ ($r=0.9999$)、 $y=3.1204 \times 10^9 x + 7.6897 \times 10^6$ ($r=0.9999$)。结果表明,尼尔雌醇、己烯雌酚检测质量浓度线性范围均为0.01~0.5 mg/mL。

2.5 定量限与检测限考察

分别取“2.2.1”项下尼尔雌醇对照品溶液、己烯雌酚对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别以信噪比10:1、3:1计算定量限、检测限。

结果,尼尔雌醇、己烯雌酚的定量限分别为187、192 ng/mL,检测限分别为56、58 ng/mL。

2.6 精密度试验

分别取“2.2.1”项下尼尔雌醇对照品溶液、己烯雌酚对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,尼尔雌醇、己烯雌酚峰面积的RSD分别为0.19%、0.22% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下尼尔雌醇供试品溶液(批号:170103)、己烯雌酚供试品溶液(批号:170201)适量,分别于室温下放置0、1、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,尼尔雌醇、己烯雌酚峰面积的RSD分别为0.53%、0.59% ($n=7$),表明尼尔雌醇供试品溶液、己烯雌酚供试品溶液于室温下放置12 h内基本稳定。

2.8 重复性试验

精密称取尼尔雌醇片(批号:170103)、己烯雌酚片(批号:170201)适量,各6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算待测成分含量。结果,尼尔雌醇、己烯雌酚的平均含量分别为98.66%、98.57%,RSD分别为0.17%、0.11% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的尼尔雌醇片(批号:170103)、己烯雌酚片(批号:170201)100 mg,各9份,分别置于10 mL量瓶中,各加一定量的尼尔雌醇对照品溶液、己烯雌酚对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算含量和加样回收率,结果见表1。

2.10 样品含量测定

取6批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,平行操作3次,记录峰面积并按外标法计算样品含量,结果见表2。

3 讨论

雌激素类药物是以18个碳原子雌烯为基本结构的类固醇激素^[3],分子结构较为复杂。目前常用的测定雌激素类药物含量的方法有紫外-可见光光度法、薄层色谱法、气相色谱法、HPLC法、放射免疫分析法及酶联免疫吸附法等^[3]。随着分析技术的提高和分析仪器的发展,HPLC法被广泛使用。该方法不仅具有样品用量少、灵敏度高、快速等优点,还具有分离性能好等特点,因此可用于雌激素类药物含量的测定^[13]。

笔者前期采用了2015年版《中国药典》(二部)^[1]的

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	取样量, mg	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
尼尔雌醇	100.010	98.600	0.800	99.398	99.75	99.82	0.52
	100.020	98.440	0.800	99.237	99.62		
	100.050	98.570	0.800	99.363	99.13		
	100.070	98.310	1.000	99.312	100.20		
	100.080	98.790	1.000	99.798	100.80		
	100.030	98.680	1.000	99.679	99.90		
	100.020	98.290	1.200	99.488	99.83		
	100.000	98.170	1.200	99.370	100.00		
	100.040	98.400	1.200	99.590	99.17		
	100.040	98.400	1.200	99.590	99.17		
己烯雌酚	100.030	98.220	0.800	99.019	99.88	100.22	0.58
	100.010	98.410	0.800	99.217	100.88		
	100.020	98.520	0.800	99.323	100.38		
	100.050	98.670	1.000	99.662	99.20		
	100.070	98.830	1.000	99.828	99.80		
	100.050	98.620	1.000	99.629	100.90		
	100.040	98.770	1.200	99.968	99.83		
	100.080	98.540	1.200	99.746	100.50		
	100.090	98.290	1.200	99.497	100.58		

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination samples (n=3)

待测成分	批号	含量,%	平均含量,%	RSD,%
尼尔雌醇	170103	98.91	98.73	0.16
	170104	98.63		
	170105	98.66		
己烯雌酚	170201	98.82	98.62	0.18
	170202	98.51		
	170203	98.52		

方法测定了尼尔雌醇片中尼尔雌醇和己烯雌酚片中己烯雌酚的含量;与HPLC法比较后发现,HPLC法的测定结果比紫外-可见分光光度法略低1%,提示紫外-可见分光光度法易受辅料及杂质干扰,造成检测结果不够准确,而HPLC法能够满足检验需求,灵敏度高、准确度高。

综上所述,本研究所建方法灵敏度高、重复性好,可用于同时测定雌激素类药物尼尔雌醇片中尼尔雌醇和己烯雌酚片中己烯雌酚的含量,该方法能够提高检验效

率、节约资源,又能够为同类药物一测多评提供有效的技术支持。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:48、306.

[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2005年版.北京:中国医药科技出版社,2005:33、165.

[3] 孙旌文,马洪涛.高效液相色谱法测定保泰松片的含量[J].西北药学杂志,2010,25(5):332-333.

[4] 张磊,白青山,王亮.复方颠茄口服液中硫酸阿托品含量测定及质量标准研究[J].药物分析杂志,2013,33(8):1407-1410.

[5] 王淑芳,刘晓阳.尼尔雌醇片溶出度测定方法的研究[J].药物分析杂志,2005,25(2):239-240.

[6] 王昕,唐素芳.己烯雌酚有关物质检查中色谱条件与系统适用性试验的改进[J].天津药学,2010,22(3):8-10.

[7] 车洪勇,杨元玉,冯爱萍.HPLC法测定关节镇痛片中保泰松和马来酸氯苯那敏的含量[J].中国药事,2003,17(3):167-168.

[8] 郭旭光,郑子栋.多索茶碱注射液的含量测定方法改进[J].中国药事,2014,28(7):774-777.

[9] 黎昌权,熊雪庆.HPLC法测定尼美舒利颗粒的含量[J].中国药师,2014,17(9):1590-1594.

[10] 罗春颖,黄晓婧,史立川,等.HPLC法同时测定腰痛胶囊中4种成分的含量[J].中国药房,2017,28(36):5123-5126.

[11] 左春芳,梁雪琪,喻俊峰,等.NIRS结合PLS算法快速测定西洋参饮片中人参皂苷Rg₁、Re、Rb₁的总含量[J].中国药房,2017,28(36):5140-5143.

[12] 方东伟,彭佳庆.HPLC法同时测定附子理中丸(浓缩丸)中甘草苷和甘草酸的含量[J].中国药房,2017,28(36):5147-5149.

[13] 李燕,韩海.雌激素类药物的高效液相色谱分析方法概况[J].华西药学杂志,2002,17(5):395-396.

(收稿日期:2018-04-13 修回日期:2018-12-03)

(编辑:陈宏)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅