

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.03.04

高效液相色谱法测定烯丙孕素口服液中 烯丙孕素的含量

姜淋洁,崔志刚,杨雪,娄艳华,甄盼盼,程雪娇*

(天津市中升挑战生物科技有限公司,天津 300080)

[收稿日期] 2019-12-16 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 03-0021-05 [中图分类号] S859.793

[摘要] 建立了烯丙孕素口服液中烯丙孕素含量测定的高效液相色谱分析方法及样品前处理方法。采用正相高效液相色谱法,前处理溶剂为异丙醇-正己烷(5:20),色谱柱为 ZORBAX CN C18 柱(250 × 4.0 mm, 5 μm),流动相正己烷-异丙醇(98:2),流速 1.0 mL/min,柱温 35 °C,检测波长 235 nm。该方法中烯丙孕素的定量限浓度为 804.9 ng/mL,线性范围为 0.401 ~ 0.601 mg/mL,平均回收率为 100.3%,该方法前处理简单、准确度高,可适用于该制剂中烯丙孕素的定性定量测定。

[关键词] 烯丙孕素口服液;含量测定;高效液相色谱法

Content Determination of Altrenogest Oral Solution by HPLC

JIANG Lin-jie, CUI Zhi-gang, YANG Xue, LOU Yan-hua, ZHEN Pan-pan, CHENG Xue-jiao*

(Tianjin Speerise Challenge Biotechnology Corporation, Tianjin 30080, China)

Corresponding author: Cheng Xue-jiao, E-mail: 515587301@qq.com

Abstract: This research established not only a HPLC method to determine the content of altrenogest in altrenogest oral solution but also sample treatment method. This research adopted the normal-phase HPLC, using hexane-isopropyl alcohol (5:20) as the extracting solvent. The test condition is like that: separate column is the Agilent ZORBAX CN C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, the mobile phase is hexane-isopropyl alcohol (98:2), the flow rate is 1.0 mL/min, the column temperature is 35 °C and the detection wavelength is 235 nm. In this method, the limit of quantitation is 804.9 ng/mL, the linear range of altrenogest is from 0.401 to 0.601 mg/mL, the average recovery rate is 100.3%. This method is suitable for qualitative and quantitative determination of altrenogest with simple pretreatment procedure of the sample and high accuracy.

Key words: altrenogest oral solution; content determination; HPLC

作者简介: 姜淋洁, 硕士, 工程师, 从事新兽药质量研究。

通讯作者: 程雪娇, E-mail: 515587301@qq.com

烯丙孕素(Altrenogest)是一种人工合成的甾类促孕激素,属于 19-去甲睾酮类化合物^[1-2],它可凭借其脂溶性穿透靶细胞,与特定受体结合^[3-5]。烯丙孕素已被欧盟和美国批准用于母猪和母马的同步发情,由其制成的口服液已成功上市。在我国兽医临床中,烯丙孕素口服液可用于母猪的同期发情、促进乏情母猪的发情^[6-8]。但对于烯丙孕素口服液的质量控制,目前还没有相关的研究报道,本研究建立烯丙孕素口服液中烯丙孕素的含量液相方法检测方法,为烯丙孕素口服液的质量控制研究提供技术支撑。中国兽药典中性激素类药物如丙酸睾酮注射液采用乙醚溶解、甲醇提取后用高效液相色谱法测定丙酸睾酮的含量^[9],操作步骤繁琐且对浪费大量有机溶剂。本研究对前处理方法进行改进,采用高效液相色谱法对烯丙孕素进行定性和定量检测,方法经济快速,可以满足日常检测需求。

1 材料与方法

1.1 仪器 安捷伦 1260 II 高效液相色谱仪包括包括 G7111A 四元泵, G7129A 自动进样器, AT-330 柱温箱, G7115A DAD 检测器, C. 01. 07 SR2 (255) 色谱工作站, 美国安捷伦科技有限公司; ES225SM-DR 电子天平, 普利赛斯仪器有限公司; 超声波清洗器, 昆山仪器有限公司; 真空泵, ASL 仪器有限公司。

1.2 药品与试剂 烯丙孕素对照品(批号 1708001, 含量 99.95%, 天津市中升挑战生物科技有限公司), 烯丙孕素口服液(批号: 1709001, 天津市中升挑战生物科技有限公司), 正己烷(色谱纯, 西陇化工科技有限公司), 异丙醇(色谱纯, 西陇化工科技有限公司)。

1.3 色谱条件 以氰基键合硅烷为填充剂的 Zorbax CN 色谱柱(250mm×4.6mm, 5μm); 以正己烷-异丙醇(98:2)为流动相; 检测波长为 235 nm; 流速 1.0 mL/min, 进样量 10 μL。

2 结果与分析

2.1 样品溶液制备 精密称取烯丙孕素口服液适量(约相当于烯丙孕素 12.5 mg), 置 25 mL 棕色量瓶中, 加异丙醇 5 mL, 超声 3 min 使溶解, 加正己烷

稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。另取烯丙孕素对照品约 25.0 mg, 精密称定, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加异丙醇 5 mL 溶解后, 用正己烷稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.2 系统适应性试验 按照 2.1 项方法操作, 配制 1 份对照品溶液, 连续进样 5 次。结果显示, 主峰峰面积的相对标准偏差为 0.21%, 主峰保留时间的相对标准偏差为 0.60%, 主峰的理论塔板数都在 15000 以上。结果见表 1, 色谱图见图 1。系统适应性试验表明该色谱条件可以满足分析要求。

表 1 系统适应性试验结果

Tab 1 Results of system suitability test				
样品	主峰面积	主峰面积 RSD/%	主峰保留时间/min	保留时间 RSD/%
1	4413.7	0.21	19.822	0.60
2	4420.5		19.921	
3	4417.7		20.011	
4	4425.3		20.047	
5	4429.4		19.805	
6	4439.5		19.754	

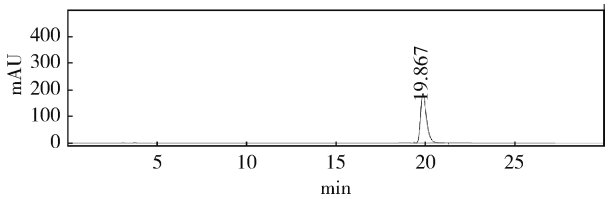


图 1 烯丙孕素对照品色谱图

Fig 1 Chromatogram of Altrenogest reference substance

2.3 专属性试验 按照烯丙孕素口服液处方量配制空白制剂样品, 按 2.1 项中制备方法制成阴性对照溶液; 另取烯丙孕素口服液按 2.1 项中制备方法制成供试品溶液; 另称取适量烯丙孕素对照品, 按 2.1 项中制备方法制成对照品溶液。按 1.3 项的色谱条件分别进阴性对照、供试品溶液和对照品溶液, 色谱图见图 2, 结果表明辅料成分不干扰样品中烯丙孕素的测定。

2.4 线性关系考察 分别精密称取适量烯丙孕素对照品至 50 mL 容量瓶中, 制成 0.401、0.451、

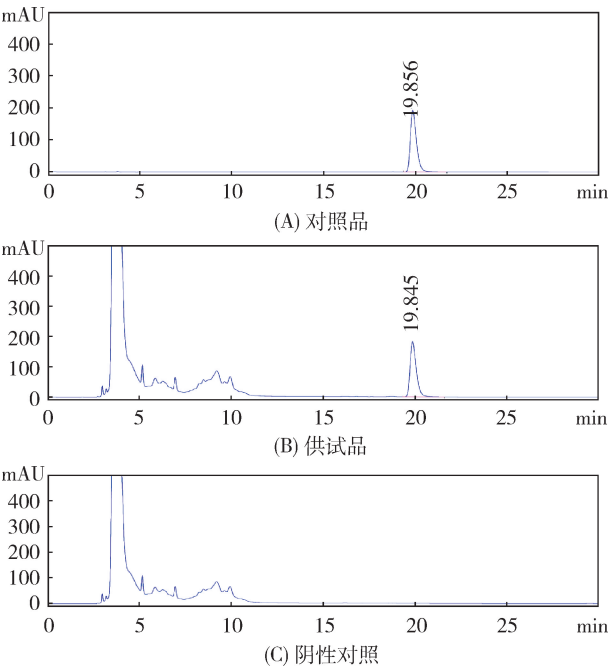


图 2 专属性试验色谱图(A、B、C 分别为对照品、供试品、阴性对照)

Fig 2 HPLC chromatograms of specific test(A:reference substance,B:Test sample,C: negative sample)

0.503、0.551、0.601 mg/mL 的对照品溶液,按照 1.3项色谱条件进样记录峰面积,以峰面积对进样浓度作线性回归,方程为 $y = 8551.6x + 101.78$ ($R = 0.9998, n = 5$),表明烯丙孕素对照品溶液浓度在 0.401 ~ 0.601 mg/mL 范围内时与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 回收率试验 按照烯丙孕素口服液处方分别配制 9 份 50 mL 空白制剂,然后加入主药烯丙孕素处方量的 80% (0.16 g)、100% (0.2 g)、120% (0.25 g) (每个浓度各 3 份)制备 9 份回收率样品溶液,按 2.1 项中制备方法制成供试品溶液;另称取适量烯丙孕素对照品,按 2.1 项中制备方法制成对照品溶液。按照 1.3 项色谱条件进样,记录色谱图。计算样品的回收率,结果见表 2。

2.6 精密度试验 按照 2.1 项方法操作,配制 6 份相同浓度 (0.5 mg/mL) 的烯丙孕素口服液样品溶液和 1 份烯丙孕素对照品溶液。按照 1.3 项色谱条件进样,记录色谱图见图 3。计算样品中烯丙孕素的含量,结果见表 3。

表 2 烯丙孕素口服液中烯丙孕素的回收率 (%)

Tab 2 Results of recovery of Altrenogest in Altrenogest Oral Solution					
	理论值 /mg	实测值 /mg	回收率 /%	平均回收率/%	RSD/%
80% 回收	160.00	159.20	99.5		
	160.00	160.00	100.0		
	160.00	160.16	100.1		
100% 回收	200.00	200.00	100.0		
	200.00	203.20	101.6	100.3	0.67
	200.00	199.80	99.9		
120% 回收	250.00	253.25	101.3		
	250.00	251.00	100.4		
	250.00	251.00	100.4		

表 3 烯丙孕素口服液含量测定精密度试验结果

Tab 3 Results of recovery of Altrenogest in Altrenogest Oral Solution			
编号	含量/%	平均值/%	RSD/%
1	100.52		
2	99.44		
3	99.51	99.74	0.44
4	99.62		
5	99.35		
6	100.00		

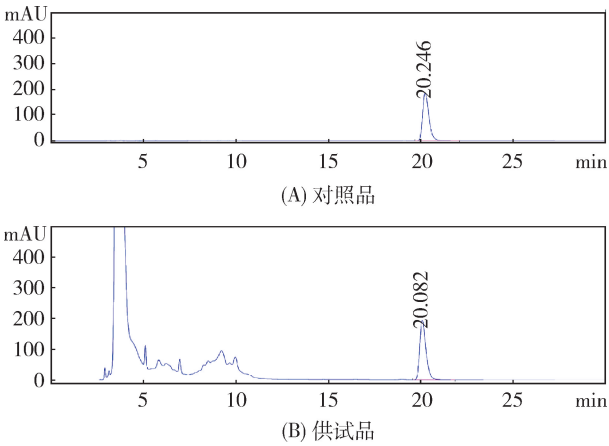


图 3 精密度试验色谱图(A、B 分别为对照品、供试品)

Fig 3 HPLC chromatograms of accurate test (A: reference substance,B: test sample)

2.7 定量限试验 取烯丙孕素对照品约 25 mg 适量置于 50 mL 容量瓶中,按 2.2 项方法操作,得到浓度约为 0.5 mg/mL 的溶液,然后用正己烷逐步稀释至浓度为 804.9 ng/mL,连续测试 6 次,信噪比平均为 10.2,因此,烯丙孕素定量限为 804.9 ng/mL。

3 讨论与结论

关于烯丙孕素在动物组织样品中的残留检测国内外有很多报道,Elin Beckman 等^[10]利用液质联用技术测定烯丙孕素和它的代谢物在马尿液中的残留水平。Martina Rejtharova 等报道了利用液质联用技术测定烯丙孕素等六种孕激素在肾脏脂肪中的残留水平^[11]。Dan Zhang 等利用液质联用技术测定烯丙孕素等在猪肉中的残留水平^[12]。Machnik 等利用液质联用技术测定烯丙孕素在马血浆和马尿液中残留水平^[13]。康海宁等建立了河豚鱼、鳗鱼及烤鳗中烯丙孕素与氯地孕酮残留的同时测定的超高效液相色谱-串联质谱法^[14]。林黎明等建立了进出口动物源性食品中孕激素类药物残留量的高效液相色谱串联质谱检测方法^[15]。邵兵等建立了动物源食品中激素多残留检测方法液相色谱-质谱/质谱法^[16]。贺利民等建立了动物源食品中 11 种激素残留检测液相色谱-串联质谱法^[17]。这些研究者都是将烯丙孕素从组织样品中提取出来,然后运用液质等手段对烯丙孕素进行定量测定,操作过程繁琐且对设备要求比较高。本文建立的烯丙孕素口服液中烯丙孕素的含量测定方法,着重对前处理方法和色谱系统进行改进,以期为企业实际生产中烯丙孕素制剂的质量控制提供依据。

3.1 样品前处理方法的选择 烯丙孕素易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂,难溶于水,其在花生油、大豆油等植物油中有较大溶解度,故烯丙孕素口服液常用植物油作为载体辅料。当制剂样品以植物油作为载体辅料进行含量测定时,须先将主药成分提取出来再进行测试,如用乙醚溶解后再用甲醇多次提取^[9],不仅需要经过繁琐的步骤,还耗费大量的有机溶剂,而且处理过程过多会造成样品损耗,进而导致测量误差。本研究中采用异丙醇-正己烷

(5/20)作为混合溶剂,不但能将主药成分和辅料载体完全溶解,而且操作简单便于控制,避免了复杂的前处理步骤。

3.2 色谱系统的选择 传统的液相色谱系统常用非极性物质(如 C18)作为固定相,以甲醇/水或者乙腈/水这些极性大的溶剂作为流动相进行洗脱。在本研究中由于样品前处理过程中用到异丙醇-正己烷(5/20)作为混合溶剂,混合溶剂的极性比较小,须选用极性大的物质(如氰基键合硅胶)为固定相、极性小的物质(如正己烷-异丙醇混合体系)为流动相的正相色谱系统进行分析。

本方法测定烯丙孕素口服液中烯丙孕素的含量,无需复杂的样品处理和特殊试剂,测定方法专属性强、准确度高、试剂成本低,便于生产中的质量检测。

参考文献:

- [1] Mark G Papich. Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition) [M]. 2016:21-22
- [2] A J Ziecik, J Klos, E Przygodzka, *et al.* Aberrant effects of altrenogest and exposure to exogenous gonadotropins on follicular cysts appearance in gilts[J]. *Theriogenology*, 2017, 89(2):250-254.
- [3] David Hodgson, Stephanie Howe, Leo Jeffcott, *et al.* Early-weaned sows; altrenogest therapy, estrus, ovulation, and reproductive performance[J]. *Animal Reproduction Science*, 2004, 84(9):407-413.
- [4] J JJ van Leeuwen, MRTM Martens, J Jourquin, *et al.* Variation in LH pulsatility during 24 h after a postweaning altrenogest treatment in relation to follicle development in primiparous sows[J]. *Animal Reproduction Science*, 2011, 126(6):101-107.
- [5] David Hodgson, Stephanie Howe, Leo Jeffcott, *et al.* Effect of prolonged use of altrenogest on behaviour in mares[J]. *The Veterinary Journal*, 2005, 169(5):322-325.
- [6] J. J. van Leeuwen, S. I. Williams, N. M. Soede. Post-weaning Altrenogest treatment in primiparous sows; the effect of duration and dosage on follicular development and consequences for early pregnancy[J]. *Animal Reproduction Science*, 2010(9):258-264.
- [7] F. De Rensis, R. N. Kirkwood. Control of estrus and ovulation; Fertility to timed insemination of gilts and sows[J]. *Theriogenology*, 2016, (10):1460-1466.

- [8] Hogson D, Howe S, Jeffcott L, *et al.* Effect of prolonged use of altrenogest on behaviour in mares [J]. The Veterinary Journal, 2005, (2) : 113 – 115.
- [9] 中国兽药典委员会.《中华人民共和国兽药典 (一部) 》2015 年版 [M]. 北京 : 中国农业出版社, 2016 : 44 – 45.
State Pharmacopoeia Commission. The first part of the Pharmacopoeia of the people's Republic of China, 2015 [M]. Beijing : Agriculture Press of China, 2016 : 44 – 45.
- [10] Elin beckman, Ulf bondesson. Detection of altrenogest and its metabolites in post administration horse urine using liquid chromatography tandem mass spectrometry – increased sensitivity by chemical derivatisation of the glucuronic acid conjugate [J]. Journal of Chromatography B, 2006, (8) : 245 – 256.
- [11] Rejtharova M, Rejthar L. Development and validation of an LC – MS/MS method for the determination of six gestagens in kidney fats [J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2013, 995 – 999.
- [12] Dan Zhang, Jin – A Park, Kim SK, *et al.* Determination of residual levels of naloxone, yohimbine, thiophanate, and altrenogest in porcine muscle using QuEChERS with liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry [J]. Research Article, 2016, (12) : 835 – 841.
- [13] Star – Weinstock M, Williamson B L, Dey S, *et al.* LC – ESI – MS/MS analysis of testosterone at sub – picogram levels using a novel derivatization reagent [J]. Anal. Chem., 2012, (84) : 9310 – 9317.
- [14] 康海宁, 谢丽琪, 肖来龙, 等. 超高效液相色谱 – 串联质谱法对河豚鱼、鳗鱼及烤鳗中烯丙孕素与氯地孕酮残留的同时测定 [J]. 分析测试学报, 2009, 28 (10) : 1180 – 1184.
Kang H N, Xie L Q, Xiao L L, *et al.* Determination of Altrenogest and Chlormadinone Residues in Swellfish, Eel, Roasted Eel by Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry [J]. Journal of analysis and test, 2009, 28 (10) : 1180 – 1184.
- [15] SNT 1980 – 2007. 进出口动物源性食品中孕激素类药物残留量的 HPLC – MS/MS 检测方法 [S].
SNT 1980 – 2007. Determination of Progestogens Residues in Food of Animal Origin for Import and Export – HPLC – MS/MS Method [S].
- [16] GB/T 21981 – 2008. 动物源食品中激素多残留检测方法液相色谱 – 质谱/质谱法 [S].
GB/T 21981 – 2008. Determination of hormone multiresidues in foodstuffs of animal origin – LC – MS/MS method [S].
- [17] 农业部 1031 号公告 – 1 – 2008. 动物源食品中 11 种激素残留检测液相色谱 – 串联质谱法 [S].
The number of 1031 notice of Agriculture Ministry. Determination of sex hormones in animal products LC – MS/MS method [S].

(编 辑 : 侯向辉)