

高效液相色谱法测定氯前列醇钠含量

张航俊,林仙军,陈慧华,陆春波*

(浙江省兽药饲料监察所,杭州 310020)

[收稿日期] 2016-05-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 09-0058-03 [中图分类号] S859.2

[摘要] 建立了氯前列醇钠含量测定的高效液相色谱法。采用 Agilent ZORBAX RX-SIL(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 为色谱柱,冰乙酸-无水乙醇-正己烷(1:100:900) 为流动相,流速 1.5 mL/min,检测波长 220 nm,柱温 35 ℃,进样量 10 μL。结果表明,在 0.05~2.50 mg/mL 浓度范围内线性关系良好($r=0.9999$)。本方法结果准确可靠,可用于氯前列醇钠的质量控制。

[关键词] 氯前列醇钠;含量测定;高效液相色谱法

Determination of Cloprostenol Sodium by HPLC

ZHANG Hang-jun, LIN Xian-jun, CHEN Hui-hua, LU Chun-bo*

(Zhejiang Province Institute of Veterinary Drug and Feedstuff, Hangzhou 310020, China)

Abstract: The HPLC method was established for the determination of cloprostenol sodium. A chromatographic column of Agilent ZORBAX RX-SIL(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, with the mobile phase of acetic acid-anhydrous ethanol-*n*-hexane (1:100:900) at the flow rate of 1.5 mL/min, the detective wavelength of 220 nm, the column temperature of 35 ℃ and the injected volume was 10 μL. The linear concentration was within the range of 0.05~2.50 mg/mL ($r=0.9999$). The method is accurate and available for quality control of cloprostenol sodium.

Key words: cloprostenol sodium; determination; HPLC

氯前列醇钠(Cloprostenol Sodium)为人工合成的前列腺素 F_{2a}同系物,具有强大的溶解黄体作用,能迅速引起黄体消退,并抑制其分泌;对子宫平滑肌也具有直接兴奋作用,可引起子宫平滑肌收缩,子宫颈松弛^[1]。2003年10月批准该产品在国内上市,该产品的生产周期较长,约为半年,而市场需求量较少,每年的产量较低,约为1~2 kg,且价格昂贵。氯前列醇钠原料的质量标准在《中国兽药典》^[2]、《美国药典》^[3]和《英国药典》^[4]均有收载,

含量测定均采用正相高效液相色谱法,但进样浓度和进样体积差异较大。《中国兽药典》氯前列醇钠原料的含量测定采用正相色谱法,而注射用氯前列醇钠的含量测定采用反相色谱法。氯前列醇钠的合成工艺产生的杂质,主要为杂质A和杂质B,《英国药典》在有关物质项明确了杂质A和杂质B的结构式,本试验分别采用正相色谱法和反相色谱法对杂质A和杂质B是否对主峰产生干扰进行了研究,确立了HPLC法测定氯前列醇钠原料含量。

作者简介: 张航俊,助理兽医师,从事兽药和畜产品检测和技术研究。

通讯作者: 陆春波。E-mail: lucb02@163.com

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱, 配 Waters 2487 紫外检测器, 美国 Waters 公司; XS-205 电子天平(感量 0.01 mg), 瑞士 METTLER TOLEDO 公司。

氯前列醇钠对照品(含量为 99.3%, 批号 FOH392, USP); 氯前列醇钠样品(批号 130305)由宁波三生药业有限公司提供, 该产品由我国台湾进口; 氯前列醇钠样品(批号 130413); 杂质 A: (±) - (5Z) - 7 - [(1R, 3R, 5S) - 2 - [(1E, 3S) - 4 - (3 - 氯苯氧基) - 3 - 羟基 - 1 - 丁烯基] - 3, 5 - 二羟基环戊烷基] - 5 - 庚烯酸钠(差向异构体, epimer); 杂质 B: (±) - (5E) - 7 - [(1R, 3R, 5S) - 2 - [(1E, 3R) - 4 - (3 - 氯苯氧基) - 3 - 羟基 - 1 - 丁烯基] - 3, 5 - 二羟基环戊烷基] - 5 - 庚烯酸钠(反式异构体, trans - isomer), 均由宁波第二激素厂生产和制备。冰乙酸、无水乙醇、正己烷和乙腈均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 专属性考察

2.1.1 正相色谱条件 流动相为冰乙酸 - 无水乙醇 - 正己烷(1:100:900); 色谱柱: Agilent ZORBAX RX - SIL(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 检测波长 220 nm; 流速 1.5 mL/min; 进样量 10 μL; 柱温 35 °C。理论板数按氯前列醇峰计算大于 7000, 主峰的保留时间约为 11 min。结果见图 1。结果表明在上述色谱条件下, 氯前列醇与杂质 A 和杂质 B 的分离度分别为 1.5 和 3.3, 均达到基线分离(图 1)。

2.1.2 反相色谱条件 流动相为 0.24% 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调节 pH 值至 2.5) - 乙腈(65:35); 色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB - C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 检测波长 220 nm; 流速 1.5 mL/min; 进样量 10 μL; 柱温 35 °C。理论板数按氯前列醇峰计算大于 7000, 主峰的保留时间约为 8 min。结果见图 1。结果表明在上述色谱条件下, 氯前列醇与杂质 A 不能分离, 氯前列醇与杂质 B 分离度为 1.5(图 2)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取氯前列醇钠对照品

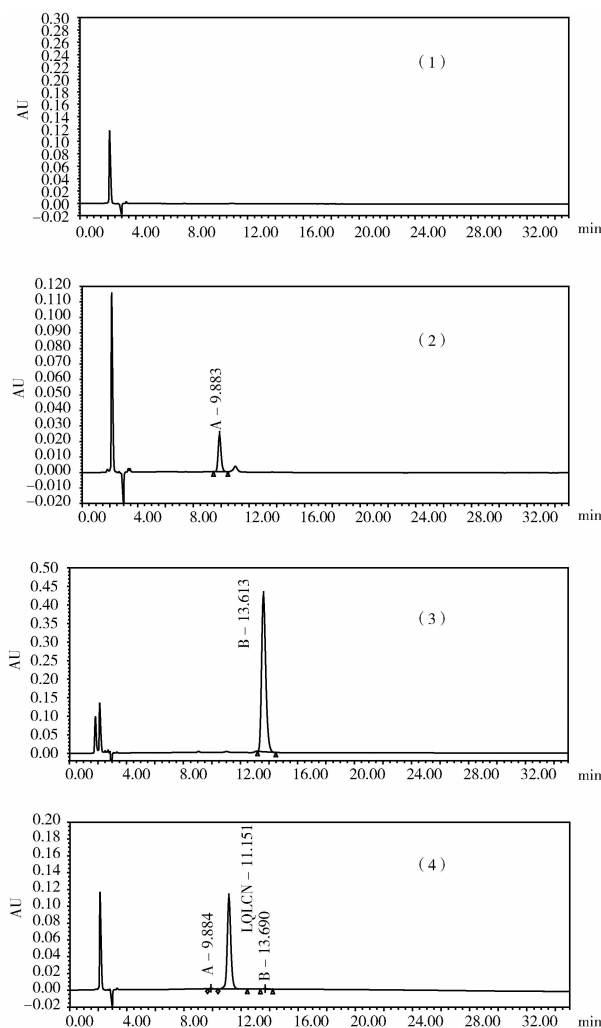


图 1 溶剂(1)、杂质 A(2)、杂质 B(3)、0.5 mg/mL 供试品溶液(4)正相色谱图

25 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 用无水乙醇溶解并稀释至刻度。

2.2.2 供试品溶液的制备 取氯前列醇钠供试品 25 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 用无水乙醇溶解并稀释至刻度。

2.3 线性关系考察 取氯前列醇钠对照品适量, 精密称定, 用无水乙醇稀释成 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.5 mg/mL 的对照品溶液, 按 2.1.1 项的色谱条件, 精密量取 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 回归方程为 $Y = 7.1 \times 10^6 X + 62409$, $r = 0.9999$, 表明在该浓度范围内线性良好。

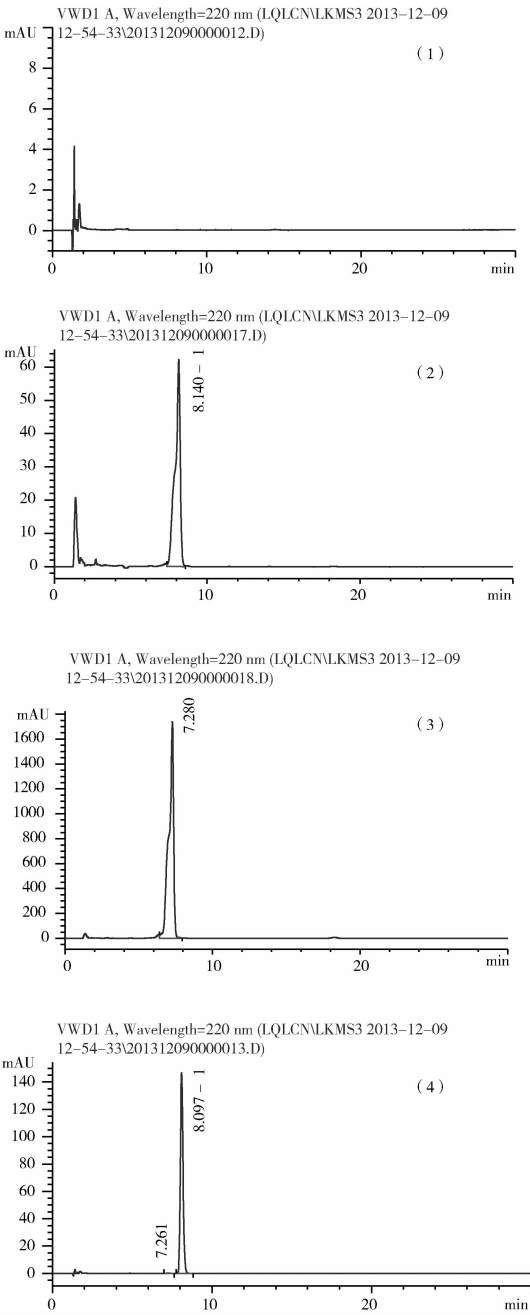


图2 溶剂(1)、杂质 A(2)、杂质 B(3)、0.1 mg/mL 供试品溶液(4)反相色谱图

2.4 精密度试验 精密量取氯前列醇钠对照品溶液,按 2.1.1 项的色谱条件,精密量取 10 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图,连续进样 6 次测定峰面积。结果表明相对偏差(*RSD*)为 0.29%,表明系统精密度符合要求。

2.5 稳定性试验 精密量取供试品溶液(批号 130305),分别在样品处理后的 0、1、2、4、8、12 h,按 2.1.1 项的色谱条件,精密量取 10 μ L,注入液相色谱

谱仪,测定峰面积,考察样品稳定性。测定结果 *RSD* 为 0.34%,表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.6 样品的测定 精密量取供试品溶液,按 2.1.1 项的色谱条件,精密量取 10 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算氯前列醇钠含量,结果见表 1。

表 1 氯前列醇钠原料含量测定结果		
批号	按无水物计算平均含量/%	<i>RSD</i> /%
130305	99.0	0.34
130413	98.3	0.50

3 讨论与小结

杂质 A 和杂质 B 的母体结构与氯前列醇钠相同,理化性质极为相似,采用 2.1.2 项的反相色谱条件,结果显示杂质 A 与主峰不能分离,杂质 B 与主峰完全分离。而采用本文 2.1.1 项的色谱条件,杂质 A、杂质 B 与主峰均达到基线分离,故本试验后续的研究均采用 2.1.1 项的色谱条件。

试验表明,随着进样体积的增加,理论板数下降,浓度为 0.5 mg/mL 的氯前列醇钠对照品溶液进样体积为 5、10、20 μ L 时,理论板数分别为 8499、7180 和 2405。不同浓度的氯前列醇钠对照品溶液,进样体积均为 10 μ L 时,结果显示浓度为 0.1 mg/mL 的氯前列醇钠对照品溶液峰面积过小,且基线波动较大。综合考虑,选择进样浓度为 0.5 mg/mL,进样量为 10 μ L。

由于氯前列醇钠的生产工艺不同,各企业在合成氯前列醇钠的过程中所产生的杂质 A 和杂质 B 的量不同,对氯前列醇钠的含量会产生影响。经试验,批号为 130305、130413 的供试品中杂质 A 和杂质 B 的总量分别为 0.3%、1.1%,对应的氯前列醇钠的含量分别为 99.0% 和 98.3%。

氯前列醇钠的检测标准方法研究尚未见相关报道。本文建立了氯前列醇钠原料的含量测定方法,该方法准确、重现性好,以期为《中国兽药典》二〇一五版氯前列醇钠原料质量标准的修订提供参考依据。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典兽药使用指南化学药品卷二 0—0 年版[S].

[2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二 0—0 年版一部[S].

[3] U. S. Pharmacopoeia. 35—NF27[S].

[4] British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia 2013[S].

(编辑:侯向辉)