doi:10.11751/ISSN.1002－1280.2020.09.09

# 烯丙孕素对照品的研制及标定

姜淋洁，甄盼盼，崔志刚，杨　雪，于小婷，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］2020－04－17　［文献标识码］A　［文章编号］1002－1280（2020）09－0055－06　［中图分类号］S859.79

［摘　要］　研制了烯丙孕素对照品并对其进行标定。采用紫外光谱、红外光谱、核磁共振波谱、质谱和 X 射线单晶衍射进行结构确认，高效液相色谱法进行纯度检查，质量平衡法进行定量分析，并用核磁共振波谱法对赋值结果进行验证。结果显示，烯丙孕素对照品原料纯度为 99.96%；质量平衡法赋值结果为 99.92%，定量核磁共振法验证结果为 99.60%。烯丙孕素工作对照品定量赋值结果准确、可靠，能够用于烯丙孕素原料及制剂的鉴别和含量测定。

［关键词］　烯丙孕素对照品；标定；结构确证；质量平衡法；定量核磁共振

# Development and Calibration of Altrenogest

JIANG Lin－jie, ZHEN Pan－pan, CUI Zhi－gang, YANG Xue, YU Xiao－ting, CHENG Xue－jiao*

(*Tianjin Speerise Challenge Biotechnology Corporation*, *Tianjin* 300080, *China*)

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

**Abstract**: To develop and calibrate chemical reference substance of Altrenogest, the structure of the material was characterized by ultraviolet－visible (UV), infrared (IR), nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectrum and X－ray single crystal diffraction. Its chromatographic purity was determined by HPLC. The result of qualitative identification of Altrenogest was 99.96%. The assigned value by mass balance method was 99.92%, in accordance with that obtained by the method of quantitative NMR (99.60%). The structure and purity of the Altrenogest material met the requirements of CRS for assay. The accuracy of the assigned value obtained by mass balance method was accurate and reliable. Thus the altrenogest material can be used for quality control.

**Key words**: Altrenogest; calibrate; structural characterization; mass balance method; quantitative NMR

烯丙孕素（又称四烯雌酮，Altrenogest），分子式为 $C_{21}H_{26}O_2$，CAS 号：850－52－2，是一种合成的 C21 甾类孕激素，属于 19－去甲睾丸素类[1-2]。烯丙孕素是一种人工合成的口服型促孕激素[3]，通过

**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，高级兽医师。E－mail：515587301@ qq. com

抑制促性腺激素分泌而调整母畜发情周期[4]，最早于 1984 年在法国获得上市许可，在欧盟和美国被批准用于犬（母犬黄体不足[5]）、马（母马同期发情[6]、孕酮水平不足的母马妊娠维持[7]、长期使用抑制赛马发情以保持其竞技状态[8-9]））和猪（母猪同期发情[10-11]）。目前，欧美发达国家已将烯丙孕素作为养猪生产中必不可少的同期发情调控剂，且无更好的替代产品[12]。我国已经批准法国诗华动物保健公司和法国维克有限公司的烯丙孕素内服溶液在国内注册使用[13-14]，同时国内多家企业的烯丙孕素及口服液已作为二类新兽药进行注册申报并生产[15-17]。但是目前烯丙孕素对照品国内和国外并无单位提供，多为企业自制，给烯丙孕素原料及其口服液的质量控制带来了困难，因此本文进行了烯丙孕素工作对照品的研制并建立了标定方法。

## 1 材料与方法

1.1 仪器 安捷伦 1260 高效液相色谱仪包括包括 G1311C 四元泵，G1329B 自动进样器，G1316A 柱温箱，G1315D DAD 检测器，C.01.04[35]色谱工作站，美国安捷伦科技有限公司；安捷伦 1260 II 高效液相色谱仪包括包括 G7115A 四元泵，G7129A 自动进样器，G1316A 柱温箱，G7111A 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 烯丙孕素原料、烯丙孕素对照品原料均由天津市中升挑战生物科技有限公司中试制备；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 方法

1.3.1 采用紫外光谱（UV）、红外光谱（IR）、质谱（MS）、核磁共振波谱（NMR）对烯丙孕素对照品进行结构确认 测试方法及条件：UV 测定，供试品用甲醇溶解，浓度为 0.014 mg/mL，扫描范围 190～400 nm；IR 测定，采用 KBr 压片法，供试品与 KBr 的比例约为 1∶200；$^{1}H-NMR$ 测定为 600 MHz，$^{13}C-NMR$测定为 600 MHz，供试品采用 DMSO 溶解；MS 测定，离子化方式为 $ESI^{+}$。

1.3.2 采用 X 射线单晶衍射法对烯丙孕素对照品原料进行结构确认 单晶培养条件：取烯丙孕素对照品原料 0.5 g，置烧瓶内，加乙酸乙酯溶解，过滤，室温放置，缓慢挥发溶剂至晶体长成。

1.3.3 HPLC 纯度检查 参照中华人民共和国农业农村部公告第 101 号[16]附件 3 中烯丙孕素原料质量标准项下有关物质测定的色谱条件，采用 ZORBAX CN $C_{18}$柱（250 mm×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 ℃，检测波长 235 nm。称取烯丙孕素对照品原料适量，加流动相溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 1 mg 的烯丙孕素溶液，作为供试品溶液。分别精密量取供试品溶液 10 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图色谱图至主峰保留时间的 2.5 倍，按峰面积归一化法计算纯度。

1.3.4 干燥失重 按《中国兽药典》2015 年版一部[18]干燥失重测定法（附录 0831）测定，分别精密称取两份烯丙孕素对照品原料 1.00 g，在 105 ℃干燥至恒重。

1.3.5 炽灼残渣 按《中国兽药典》2015 年版一部[18]炽灼残渣测定法（附录 0841）测定，分别精密称取两份烯丙孕素对照品原料 1.00 g 置已炽灼至恒重的坩埚中，缓缓炽灼至完全炭化，放冷；加硫酸 0.5 mL 使湿润，低温加热至硫酸蒸汽除尽后，在 700～800 ℃炽灼使完全灰化，移置干燥器内，放冷，精密称定后，再在 700～800 ℃炽灼至恒重，即得。

1.3.6 烯丙孕素对照品原料熔点测定 按《中国兽药典》2015 年版一部[18]熔点测定法（附录 0841）第一法中传温液加热法测定，记录对照品原料初熔至全熔时的温度，重复测定 3 次，取平均值。

## 2　结果与分析

### 2.1　结构确证

2.1.1　采用 UV、IR、MS、NMR 对烯丙孕素对照品结构确认　结果如下：UV $\lambda_{max}$：239 nm、343 nm；IR v：3370、3070、3017、2968，2869、2931、1639、992、913 $cm^{-1}$；ESI－MS m/z：311.2$[M+H]^{+}$，与烯丙孕素理论分子量吻合；$^{1}$H NMR(DMSO)：δ6.496(d,1H,J＝10.2 Hz,C－11),6.428(d,1H,J＝10.2 Hz,C－12),5.932(m,1H,C－21),5.673(s,1H,C－4),5.046(t,2H,C－22),4.452－1.534(m,17H),0.899(s,3H,C－18)；$^{13}$C NMR(DMSO)：δ197.868(1C,C－3),156.383(1C,C－5),143.063(1C,C－12),142.376(1C,C－7),136.289(1C,C－3),126.776(1C,C－6),123.900(1C,C－11),123.312(1C,C－4),117.591(1C,C－22),80.988,49.412,48.085,42.905,38.274,36.794,33.621,31.203,27.228,24.108,23.223,17.295(12C,C－17,C－13,C－14,C－20,C－8,C－2,C－16,C－10,C－9,C－1,C－15,C－18)。文献[22]报道数据为 1H NMR(500 MHz,$CDCl_3$)：δ6.47(dd,1H,J＝10.5 Hz,Hfrom C－11),6.36(dd,1H,J＝10.5 Hz,Hfrom C－12),5.98－5.96(m,1H,－CH2CH＝CH2),5.78(s,1H,Hfrom C－4),5.23－5.14(m,2H,－CH2CH＝CH2),2.80－1.30(m,17H),1.03(s,3H,CH3)；13C NMR(125MHz,CDCl3)：δ199.4(1C,C－3),156.7(1C,C－5),142.2(1C,C－12),141.8(1C,C－10),134.3(1C,C－9),127.2(1C,C－4),124.1(1C,C－11),123.9(1C,－CH2CH＝CH2),119.4(1C,－CH2CH＝CH2),81.3(1C,C－17),49.2,48.0,42.9,38.5,36.9,35.2,31.7,27.3,24.5,23.3(10C,C－1,C－2,C－6,C－7,C－8,C－13,C－14,C－15,C－16,－CH2CH＝CH2),16.1(1C,－CH3)。烯丙孕素的结构式见图 1，分子式为 $C_{21}H_{26}O_2$，理论分子量为 310.43，上述结果表明烯丙孕素对照品原料化学结构与烯丙孕素相同。

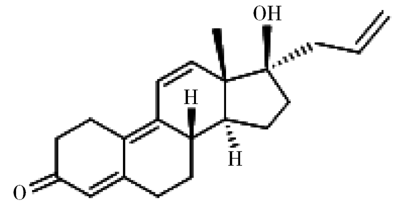


图 1　烯丙孕素结构式

Fig 1　Structural formula of Altrenogest

2.1.2　采用 X 射线单晶衍射法对烯丙孕素对照品原料进行结构确认　结构单元见图 2。

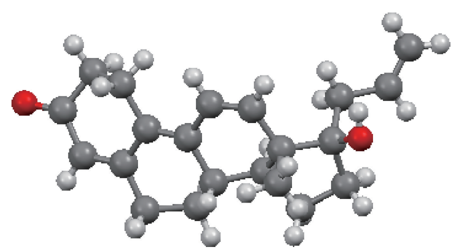
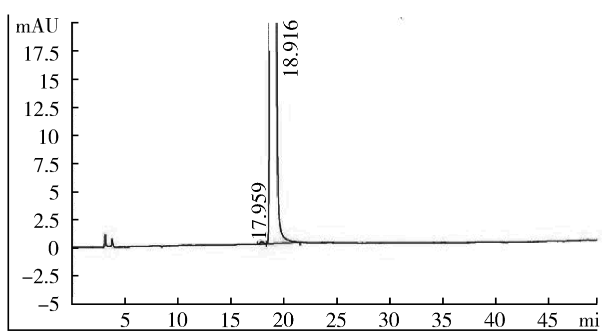


图 2　烯丙孕素对照品原料结构单元

Fig 2　Structure unit of Altrenogest reference material

2.2　HPLC 纯度检查　烯丙孕素对照品原料在两台安捷伦仪器上测得的纯度见表 1，两台仪器取平均值，得到烯丙孕素对照品原料的纯度为 99.96%，见图 3 和表 1。




面积百分比报告

排序 : 信号
乘积因子 : 1.0000
稀释因子 : 1.0000
内标使用乘积因子和稀释因子
信号 1:DAD1 A Sig=235 4 Rof=off

| 峰 # | 保留时间 [min] | 类型 | 峰宽 [min] | 峰面积 [mAU*s] | 峰高 [mAU] | 峰面积 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 17.959 | BB | 0.227 | 4.27146 | 2.31056e−1 | 0.0450 |
| 2 | 18.916 | BB | 0.3001 | 9481.36719 | 489.19382 | 99.9550 |

图 3　烯丙孕素对照品原料纯度测定色谱图

Fig 3　The chromatogram of reference material purity test

表 1 烯丙孕素对照品原料纯度测定结果

Tab 1 The purity test results of Altrenogestreference material

| 对照品原料 | 纯度/% | |
|---|---|---|
| | 安捷伦 1260 | 安捷伦 1260 Ⅱ |
| 1 | 99.96 | 99.97 |
| 2 | 99.95 | 99.95 |
| 3 | 99.96 | 99.96 |
| 4 | 99.95 | 99.97 |
| 5 | 99.96 | 99.96 |
| 6 | 99.96 | 99.95 |
| 平均值 | 99.96 | 99.96 |
| *RSD*/% | 0.01 | 0.01 |

2.3 残留溶剂 本研究中烯丙孕素原料在中试生产中用到的溶剂有乙醚、四氢呋喃、乙酸乙酯、二氯甲烷、丙酮、甲醇和正己烷,且烯丙孕素对照品原料最后采用乙酸乙酯进行精制,通过干燥失重试验可知,对照品原料在 105 ℃下能很快干燥至恒重,说明残留溶剂在该条件下能很快挥发除去,故残留溶剂的结果可不必单独测定。

2.4 干燥失重 测得两份对照品原料的干燥失重为 0.021% 和 0.030%,取平均值为 0.026%。表明烯丙孕素对照品原料在该温度下水分和残留溶剂能很快挥发出来,可用干燥失重结果代替水分和残留溶剂测定。

2.5 炽灼残渣 测得两份对照品原料的炽灼残渣为 0.017% 和 0.015%,取平均值为 0.016%。表明烯丙孕素对照品原料中的无机不挥发性杂质的含量为 0.016%。

2.6 烯丙孕素对照品原料含量确定 烯丙孕素对照品定值采用国际通用的质量平衡法确定含量,同时定量核磁共振波谱法对质量平衡法赋值准确性进行验证。

2.6.1 质量平衡法 赋值结果含量(%)=纯度×(1-干燥失重-炽灼残渣)×100%,结果为 99.96%×(1-0.026%-0.016%)=99.92%

2.6.2 定量 NMR 法验证结果 依据《中国药典》2015 年版四部[20]通则 0441 核磁共振波谱法,以马来酸作为内标,样品用氘代二甲基亚砜溶解后,以烯丙孕素 H 谱中的 5.94 信号峰与内标物 H 谱中的 6.28 信号峰计算供试品的含量,定量 NMR 法含量测定结果为 99.60%(图 4)。

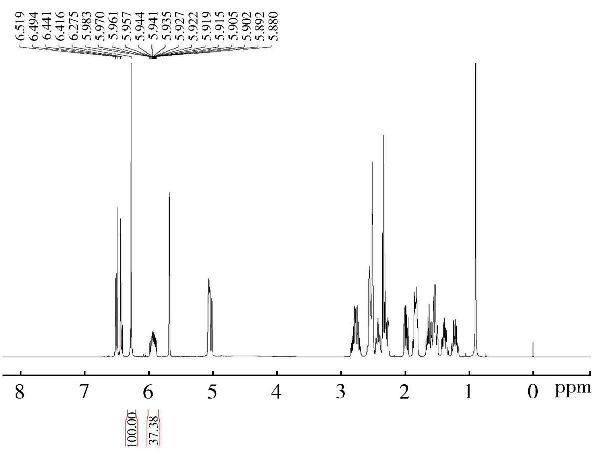



图 4 烯丙孕素定量核磁共振光谱图

Fig 4 The spectrogram of quantitative nuclear magnetic resonance

2.7 烯丙孕素工作对照品稳定性考察 烯丙孕素工作对照品,用安瓿瓶分装,50 mg/瓶,放入药品稳定性试验箱中,在(40±2)℃、相对湿度 75%±5% 条件下放置 6 个月,分别于第 1、2、3、6 月取样,对样品性状、熔点、纯度进行检查。表 2 结果表明,烯丙孕素工作对照在(40±2)℃、相对湿度 75%±5% 条件下放置 6 个月稳定。

表 2 稳定性考察结果

Tab 2 The results of stability investigation

| 考察项目 | 0 月 | 1 月 | 2 月 | 3 月 | 6 月 |
|---|---|---|---|---|---|
| 性状 | 白色结晶性粉末 | 白色结晶性粉末 | 白色结晶性粉末 | 白色结晶性粉末 | 白色结晶性粉末 |
| 熔点 | 117.5~119.1 | 117.9~120.2 | 117.4~119.3 | 117.6~119.2 | 117.9~120.2 |
| 纯度 | 99.96% | 99.95% | 99.96% | 99.95% | 99.96% |

## 3 讨论与结论

3.1 烯丙孕素结构确证　烯丙孕素为 C21 甾类孕激素化合物,化学结构中具有手型碳原子,因此单纯采用核磁共振方法难以确定每个手型中心的绝对构型,本研究通过溶剂结晶方法培养得到烯丙孕素对照品原料单晶,采用 X－射线单晶衍射方法对烯丙孕素的构型进行进一步确定。

3.2 质量平衡法赋值　本研究按质量平衡法对本批烯丙孕素对照品原料进行了含量定值[21]。根据质量平衡法原理,标准品含量(%)=[100% －水分(%)－残留溶剂(%)－无机杂质(%)]×纯度(%),本公式中的水分和残留溶剂的测定结果可用干燥失重结果代替[22]。烯丙孕素对照品原料最后采用乙酸乙酯进行精制,乙酸乙酯沸点为 76 ℃,在 105 ℃能全部挥发出去,说明水分和有机溶剂能完全挥发,可用干燥失重结果代替水分和残留溶剂的测定。

3.3 含量定值　为了准确标定烯丙孕素对照品原料的含量,采用了两种不同原理的方法进行测定。按中华人民共和国农业农村部公告第 101 号[16]附件质量标准中烯丙孕素原料的有关物质测定方法测定对照品原料的纯度,结果表明质量平衡法结果与定量核磁波谱法结果相对偏差为 0.25%,两种方法标定结果一致。

本批烯丙孕素对照品原料的结构鉴定结果与其结构式相符合,用质量平衡法测得的烯丙孕素对照品原料含量为 99.92%,用定量核磁共振波谱法法测得的结果为 99.60%,两种方法测定结果差异较小,说明本批烯丙孕素对照品原料赋值准确,可作为烯丙孕素原料及其制剂研制过程中对照品使用。

## 参考文献:


[1] Mark G Papich. Altrenogest[J]. Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition), 2016:21－22

[2] AJ Ziecik, J Klos, E Przygrodzka, *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] Van Leeuwen J, Martens M R, Jourquin J, *et al*. Variation in LH pulsatility during 24 h after a postweaningaltrenogest treatment in relation to follicle development in primiparous sows[J]. Animal Reproduction Science, 2011 (4): 101－107.

[4] Sitrukware R. Pharmacokinetics profile of progestins[J]. Maturitas, 2004 (47): 277－283.

[5] Plumb D C. Plumb's 兽药手册[M]. 沈建忠, 冯忠武, 主译. 北京: 中国农业大学出版社, 2009: 29－31.

[6] Webel S K, Squires E L. Control of the oestrus cycles in mares with altrenogest[J]. Reproduction, 1982(32): 193－198.

[7] Catherine A Deluca, Patrick M McCue, Melissa L Patten, *et al*. Effect of a nonsurgical embryo transfer procedure and/or altrenogest therapy on endogenous progesterone concentration in mares[J]. Journal of Equine Veterinary Science, 2011, 31(2): 57－62.

[8] Machnik M, Hegger I, Kiktamann M, *et al*. Pharmacokinetics of altrenogest in horses[J]. Journal of Veterinary Phamacology and Therapeutics, 2007, 30(1): 86－90.

[9] Hodgson D, Showe S, Jeffcott L. Effect of prolonged use of altrenogest on behavior in mares[J]. Journal of Veterinary, 2005 (3): 113－115.

[10] Estienne M J, Harper A F, Horsley B R, *et al*. Effect of P. G. 600 on the onset of estrus and ovulation rate in gilts treated with Regu－mate[J]. Journal of Animal Science, 2001, 79 (11): 2757－2761.

[11] Van leeuwen J J, Martens M R, Jourquin J, *et al*. Follicle size and reproductive hormone profiles during a post－weaning altrenogest treatment in primiparous sows [J]. Reproductive Fertil Development, 2015, 27 (2): 304－312.

[12] 王 忠, 王立琦, 林 植, 等. 同期发情剂四烯雌酮的应用进展[J]. 动物医学进展, 2018, 39(6): 95－99.
Wang Z, Wang L Q, lin Z, *et al*. Progress on estrus synchronization agent altrenogest[J]. Progess of Veterinary Medicine, 2018, 39(6): 95－99.

[13] 中华人民共和国农业农村部公告第 35 号[Z].
Ministry of Agriculture and Rural Affairs announcement NO.35[Z].

[14] 中华人民共和国农业农村部公告第 223 号[Z].
Ministry of Agriculture and Rural Affairs announcement NO.223[Z].

[15] 中华人民共和国农业部公告第 2653 号[Z].
Ministry of Agriculture announcement NO. 2653[Z].
[16] 中华人民共和国农业农村部公告第 101 号[Z].
Ministry of Agriculture and Rural Affairs announcement NO. 101[Z].
[17] 中华人民共和国农业农村部公告第 186 号[Z].
Ministry of Agriculture and Rural Affairs announcement NO. 186[Z].
[18] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版一部[S].
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China2015[S].
[19] 李勇杰, 颜清云, 王 淳, 等. 一种四烯雌酮的合成方法[P]. 中国专利: 201610597511.5.
[20] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版四部[S].
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China2015[S].
[21] WHO. Gerneral guidelines for the establishment, maintenance, and distribution of Chemical reference substances[S].
[22] 张秀英, 陆连寿, 温 芳, 等. 国家那西肽标准品的研制与建立[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(12): 50 – 53.
Zhang X Y, Lu L S, Wen F, *et al*. Reparation and establishment of first national nosiheptide standards[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014, 48(12): 50 – 53.

(编 辑:李文平)