

- Chin J Forensic Med(中国法医学杂志), 2009, 24(4): 269-271.
- [3] LIU J, HE B Y, SUN J H. Determination method for 25 organophosphorus pesticides in serum and whole blood by GC/MS with SPE sample cleanup [J]. Mod Prev Med(现代预防医学), 2005, 32(9): 1240-1244.
- [4] WANG X W, ZHANG S R, PEI X P, et al. Determination of organochlorine and pyrethroids pesticide residues in Forsythiae Fructus from Shanxi province by GC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(10): 938-941.
- [5] Commission of European Communities. 2002/657/EC [S]. http://www.wetgiw.gov.pl/old/UE/prowo/02_657/e02657.pdf.
- [6] CAO G H, WANG X P, ZHOU Y, et al. Clinical effects of testing the concentration of organophosphorus pesticides in serum [J]. Med Res Educ(医学研究与教育), 2010, 27(3): 16-17.
- [7] JIN Y J, CHEN Y J, ZHANG J P, et al. Determination of organophosphorus mixed pesticides in blood and experimental study on its hemoperfusion clearance [J]. Chin J Health Lab Technol(中国卫生检验杂志), 2008, 18(7): 1237-1238.
- [8] WANG X P, CAO G H, et al. The role of therapeutic drug monitoring in acute organophosphorus pesticides poisoning [J]. Shangdong Med J(山东医药), 2010, 50(9): 96.
- 收稿日期: 2012-02-20

HPLC 测定炔雌醚含量和有关物质

石云峰¹, 李会林¹, 林丽琴² (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004; 2.杭州市药品检验所, 杭州 310017)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定炔雌醚含量和有关物质的方法。方法 采用 C₁₈ 柱, 以甲醇-水(90:10)为流动相; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 279 nm。结果 炔雌醚的线性范围为 0.078 8~0.788 4 mg·mL⁻¹($r=1.000\ 0$), 平均回收率为 99.9%, RSD 为 0.80%($n=9$), 炔雌醚检测限浓度为 0.06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结论 该方法简便、准确、专属性强, 可作为产品质量检测方法。

关键词: 炔雌醚; 高效液相色谱法; 有关物质

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)01-0095-04

Determination of Quinestrol and Its Related Substances by HPLC

SHI Yunfeng¹, LI Huilin¹, LIN Liqin² (1.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China; 2.Hangzhou Institute for Drug Control, Hangzhou 310017, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for content determination of quinestrol and its related substances. **METHODS** A C₁₈ column was used with the mobile phase of water-methanol(90:10). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 279 nm. **RESULTS** The calibration curve of quinestrol was linear in the range of 0.078 8~0.788 4 mg·mL⁻¹($r=1.000\ 0$), and the average recovery was 99.9%, RSD was 0.80%($n=9$). The detection limit of quinestrol was 0.06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. **CONCLUSION** The method is rapid, accurate and reliable for content determination of quinestrol and related substances.

KEY WORDS: quinestrol; HPLC; related substance

炔雌醚为作用较强的口服长效雌激素^[1], 查阅国内外药品标准, 炔雌醚仅收载于中国药典 2005 年版中, 且标准中无有关物质检查项目, 含量测定采用紫外分光光度法^[2], 为了更好地控制炔雌醚的质量, 在中国药典 2010 年版二部该品种质量标准起草过程中, 本研究建立了高效液相色谱法测定炔雌醚含量和有关物质, 方法简便、快速、准确, 可作为炔雌醚含量及有关物质的有效测定方法。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪、二极管阵列检

测器(日本岛津仪器有限公司); 炔雌醚对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100048-200902, 供含量测定用, 80 °C 干燥 2 h 后使用, 按 C₂₅H₃₂O₂ 计, 供 HPLC 测定, 含量为 98.0%; 供 UV 测定, 含量为 100.0%); 炔雌醇对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100053-200705, 含量为 100.0%); 炔雌醚为国内药厂产品(批号: 090701, 090702, 090703); 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品配制

作者简介: 石云峰, 男, 硕士, 主管药师

Tel: (0571)86459422

E-mail: lin-net@163.com

2.1.1 系统适用性溶液的配制 分别取炔雌醇与炔雌醚对照品适量, 加无水乙醇溶解并稀释制成每 1 mL 中各含 0.1 mg 的混合溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液的配制 取炔雌醚约 40 mg, 精密称定, 加无水乙醇溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 4 mg 的溶液, 作为有关物质测定用供试品溶液, 取有关物质供试品溶液稀释制成 1 mL 中约含 0.1 mg 的溶液作为含量测定用供试品溶液。

2.1.3 对照品溶液的制备 取炔雌醚对照品约 40 mg, 精密称定, 加无水乙醇溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 0.1 mg 的溶液, 作为含量测定用对照品溶液; 取有关物质测定用供试品溶液 1.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加无水乙醇定容, 摇匀, 作为自身对照溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈(2)(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(90:10); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 279 nm; 进样量: 20 μL;

柱温: 30 ℃。

2.3 有关物质测定

2.3.1 破坏性试验 分别取本品 5 份(批号: 090702), 每份约为 40 mg, 置 10 mL 量瓶中, 分别加入 3 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 0.5 mL, 放置 8 h, 中和后作为酸破坏供试品溶液; 加入 3 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 0.5 mL, 放置 8 h, 作为碱破坏供试品溶液; 加入 30% 的过氧化氢溶液 0.5 mL, 放置 24 h, 作为氧化破坏供试品溶液; 在 6 000 Lx 的光照下放置 24 h, 作为光照破坏供试品溶液; 在 80 ℃ 水浴中加热 24 h, 作为热破坏供试品溶液。上述酸、碱供试品溶液分别中和后与其余样品均用无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为测定液^[3]。按“2.2”项下色谱条件, 各进样 20 μL, 记录色谱图, 试验表明, 该方法能使炔雌醚的酸、碱、氧化、光照与热破坏的降解物与主峰均能获得良好的分离, 各降解杂质均在 279 nm 的波长处有吸收, 专属性良好。结果见图 1。

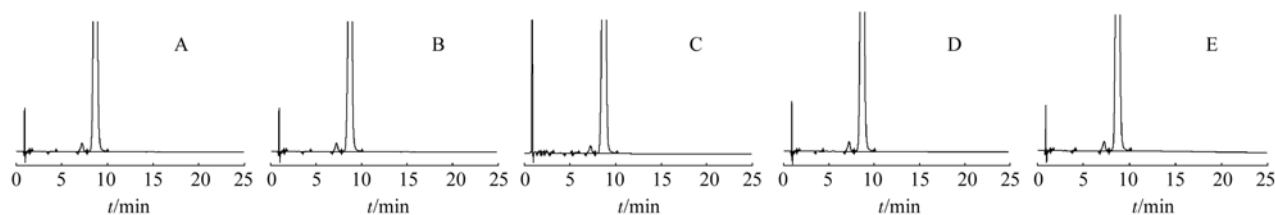


图 1 破坏性试验色谱图

A-酸破坏; B-碱破坏; C-氧化破坏; D-光照破坏; E-加热破坏

Fig 1 HPLC chromatogram of stressing test

A-treated with 3 mol·L⁻¹ HCl; B-treated with 3 mol·L⁻¹ NaOH; C-treated with 30% H₂O₂; D-treated with light; E-treated with heat

2.3.2 检测限试验 将炔雌醚对照品溶液逐步稀释得到 LOD, 信噪比为 3 时, 炔雌醚浓度为 0.06 μg·mL⁻¹。

2.3.3 样品测定 将各批样品按“2.1”项下制备方法, 以“2.2”项下色谱条件测定, 结果见表 1, 典型色谱图见图 2。

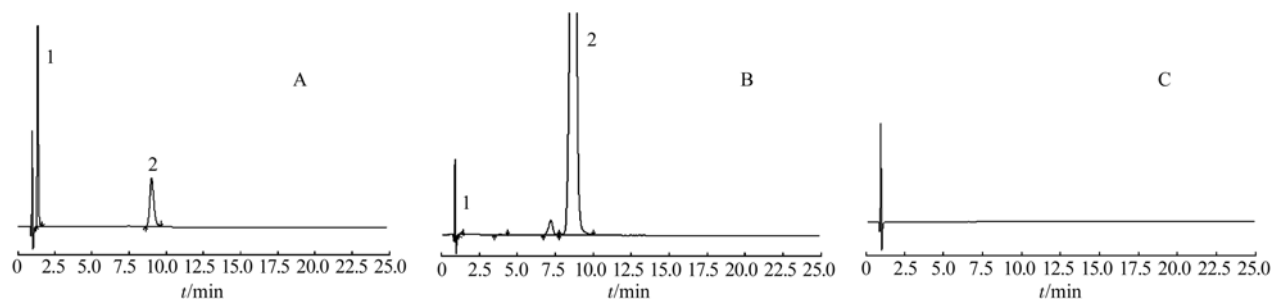


图 2 高效液相色谱图

A-系统适用性溶液; B-样品溶液; C-空白溶液; 1-炔雌醇; 2-炔雌醚

Fig 2 HPLC chromatogram

A-system suitability solution; B-sample; C-blank; 1-ethinylestradiol; 2-quinestrol

表 1 有关物质测定结果(n=3)
Tab 1 Test results for related substances(n=3)

批号	最大杂质/%	杂质总和/%
090701	1.9	2.0
090702	2.0	2.0
090703	2.1	2.2

2.4 含量测定

2.4.1 线性范围 精密称取炔雌醚对照品适量，加无水乙醇制备浓度分别为 0.078 84, 0.197 1, 0.315 4, 0.394 2, 0.473 0, 0.551 9, 0.788 4 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液作为线性系列溶液。取上述溶液进样测定，以峰面积对浓度建立线性回归方程，得回归方程为 Y=6 084 907X+81 431, r=1.000 0。结果表明，在 0.078 8~0.788 4 mg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.4.2 回收率试验 精密称取已知含量的炔雌醚原料(含量 98.8%)约 10 mg，分别加入炔雌醚对照品约 8, 12, 18 mg，置 100 mL 量瓶中，加无水乙醇溶解并稀释至刻度，摇匀，制得低、中、高 3 种浓度的溶液，进样测定，计算平均回收率为 100.7%，RSD 为 0.45%，结果见表 2。

2.4.3 仪器精密度、重复性和稳定性试验 取对照品溶液，连续进样测定 5 次，测得峰面积的 RSD 为 0.12%，结果表明本方法的仪器精密度较好。取

表 3 耐用性试验结果
Tab 3 Results of durability test

批号	Diamonsil C ₁₈ (2) (150 mm×4.6 mm, 5 μm)		Promonsil C ₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm)		Thermo Hypersil GOLD (150 mm×4.6 mm, 5 μm)	
	有关物质/%	含量/%	有关物质/%	含量/%	有关物质/%	含量/%
20100701	2.11	99.4	2.15	99.7	2.18	99.9
20100702	2.16	98.2	2.16	98.1	2.20	98.8
20100703	2.22	98.8	2.21	98.9	2.27	98.8

2.4.5 样品测定 按中国药典 2005 年版收载的炔雌醚含量测定方法操作：取本品约 50 mg，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加无水乙醇使溶解并稀释至刻度，摇匀，用紫外-可见分光光度法，在 280 nm 波长处测定吸光度；另取炔雌醚对照品，同法测定，计算，即得。并与 HPLC 测定结果比较，结果见表 4。

表 4 样品测定结果(n=2)
Tab 4 The content of sample(n=2)

批号	HPLC/%	原方法/%
20100701	99.4	98.4
20100702	98.2	98.2
20100703	98.8	98.2

表 2 炔雌醚加样回收率试验
Tab 2 Results of recovery test

样品量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
10.11	7.82	17.69	100.49	100.7	0.45
9.98	8.34	18.11	100.94		
10.36	8.22	18.39	101.23		
10.16	12.54	22.56	99.86		
10.22	12.36	22.49	100.26		
10.25	13.43	23.68	100.92		
10.47	15.99	26.48	100.91		
10.33	16.59	26.96	100.99		
10.05	16.50	26.47	100.25		

同一批样品，平行 6 份，按“2.1.2”项下方法处理，进样测定，结果样品 RSD 为 0.26%，表明方法重复性良好。取同一份供试品溶液，分别在室温遮光放置 0, 1, 2, 3, 6, 9, 11 h 后进样测定，计算炔雌醚峰面积的 RSD 为 0.34%，表明供试品溶液在 11 h 内稳定。

2.4.4 耐用性试验 取同一份供试品溶液和对照品溶液，分别选用 Diamonsil C₁₈(2)(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Promonsil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Thermo Hypersil GOLD(150 mm×4.6 mm, 5 μm) 进行试验，结果杂质峰与主峰之间均有较好分离，有关物质和含量测定结果基本一致。结果见表 3。

表 3 耐用性试验结果
Tab 3 Results of durability test

批号	Diamonsil C ₁₈ (2) (150 mm×4.6 mm, 5 μm)		Promonsil C ₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm)		Thermo Hypersil GOLD (150 mm×4.6 mm, 5 μm)	
	有关物质/%	含量/%	有关物质/%	含量/%	有关物质/%	含量/%
20100701	2.11	99.4	2.15	99.7	2.18	99.9
20100702	2.16	98.2	2.16	98.1	2.20	98.8
20100703	2.22	98.8	2.21	98.9	2.27	98.8

3 讨论

炔雌醚在国外药典均没有收载。中国药典 2005 年版中仅采用紫外-可见分光光度法对其含量进行测定，无有关物质检查项目，相比较而言，该标准方法明显滞后，方法专属性差。因此，为保证用药安全有效，有必要对其标准进行修订。

试验中发现，采用不同的色谱柱对炔雌醚及主要杂质分离度有一定影响，为保证所建立检测方法的通用性，故采用炔雌醚中间体炔雌醇和炔雌醚之间的分离度作为系统适用性试验参数，保证该杂质与炔雌醚主峰能有效分离。试验选用了 3 根不同品牌色谱柱[Diamonsil C₁₈(2)(150 mm×

4.6 mm, 5 μ m)、Promonsil C₁₈(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、Thermo Hypersil GOLD(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)]进行试验, 试验结果表明, 当炔雌醇与炔雌醚分离度约为 10 时, 未知杂质与炔雌醚的分离度约为 1.5, 当炔雌醇与炔雌醚分离度约为 12 时, 未知杂质与炔雌醚的分离度约为 2.0, 为保证该杂质与炔雌醚的分离, 将炔雌醇与炔雌醚之间分离度 ≥ 12 作为系统适用性条件。

采用所建立的 HPLC 对该企业样品进行测定, 炔雌醚有关物质色谱图中检出了中间体炔雌醇和雌酚酮, 2 者与炔雌醚的相对响应因子均在 0.9~1.1 内, 同时发现炔雌醚中存在一个较大未知杂质,

该杂质采用自身对照法测得含量约为 2%, 其最大紫外吸收波长为 263 nm, 考虑到炔雌醚主要作用于生殖系统, 因此, 对其杂质结构的确证和生殖毒性研究非常必要, 此研究正在进一步研究中。

REFERENCES

- [1] CHEN X Y, JIN Y Y, TANG G. New Pharmacology(新编药理学) [M]. Vol 16. Beijing: People Hygiene Press, 2007: 640.
- [2] Ch.P(2005)Vol II (中国药典 2005 年版. 二部) [S]. 2005: 360.
- [3] HU C C, ZHENG G G, ZHENG J Q. RP-HPLC determination of the related substances of simvastatin capsules [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(9): 856-859.

收稿日期: 2012-02-23

低分子肝素联合阿司匹林治疗动脉源性短暂性脑缺血发作近期疗效观察

郭舜源, 张庆臣, 陈波, 林高平, 施天明, 顾苏兵(浙江省人民医院神经内科, 杭州 310014)

摘要: 目的 探讨低分子肝素(low-molecular-weight heparin, LMWH)联合阿司匹林(aspirin, ASA)治疗动脉源性短暂性脑缺血发作(transient ischemic attack, TIA)患者的疗效。方法 应用 ABCD3 评分测定 186 例动脉源性 TIA 患者的分值, 根据分值分为低、中、高危 3 组, 每组再随机分为治疗组和对照组。对照组每天给予 ASA 100 mg 口服和奥扎格雷 160 mg 静滴, 治疗组在此基础上加 LMWH 脐周皮下注射。观察 1 月内 TIA 控制率和脑梗死的发生率。结果 低危组的治疗组和对照组 TIA 控制率和脑梗死发生率比较无明显差异。中、高危组的治疗组 TIA 控制率明显高于对照组; 中、高危组的治疗组脑梗死发生率明显小于对照组; 治疗组与对照组比较差异有统计学意义。结论 LMWH 联合 ASA 治疗 ABCD3 中高评分值 TIA 和脑梗死发生的近期疗效优于单用 ASA。

关键词: 低分子肝素; 阿司匹林; 短暂性脑缺血发作

中图分类号: R972.7

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)01-0098-04

Clinical Effects of Combination Therapy of Low-molecular-weight Heparin and Aspirin on Patients with Transient Ischemic Attack of Arterial Originated

GUO Shunyuan, ZHANG Qingchen, CHEN Bo, LIN Gaoping, SHI Tianming, GU Subing(Department of Neurology, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To assess effects of combination therapy of low-molecular-weight heparin(LMWH) and aspirin(ASA) in transient ischemic attack(TIA) of arterial originated. **METHODS** With ABCD3 score, 186 cases of TIA of arterial origin were classified into three risk groups(low, moderate and high). Furthermore, three risk groups were randomized into treatment group and control group separately. The control group were treated with ASA 100 mg once daily and ozagrel 160 mg iv gtt. The treatment group was added with LMWH 0.4 mL twice daily subcutaneous injection, within 10 days. Therapeutic effect was observed with control rate of TIA and incidence of acute ischemic stroke(AIS) within 1 month. **RESULTS** There were no significant differences in control rate of TIA and incidence of AIS in low risk group. The control rate of TIA in moderate and high risk groups were higher in the treatment group than in control group significantly. Incidence of AIS in moderate and high risk groups was lower in the treatment group than in control group significantly at 1 month. No major hemorrhagic complications were observed. **CONCLUSION** The combination of ASA and LMWH in TIA patients with

作者简介: 郭舜源, 男, 硕士, 副主任医师 Tel: 13867431370 E-mail: gsy9316@126.com