

外法的含量测定结果受到了辅料和有关物质的干扰,不能准确反应药品的实际质量,修订后的含量测定方法更科学、有效和可控。

4 讨论

4.1 流动相的选择

参照 USP33^[2]中 C₁₃ 尿素原料中含量测定的方法,以乙腈-甲醇-水(89:10:1)为流动相,尿素峰形不对称,拖尾严重;以乙腈-甲醇-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液(89:10:1)为流动相,尿素峰形有所改善,但仍有拖尾现象;以乙腈-甲醇-对而言 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液(10%磷酸调 pH 至 3.6)(89:10:1)为流动相,尿素峰形对称,分离度良好,保留时间适中;以乙腈-甲醇-水(10%磷酸调 pH 至 3.6)(90:7:3)为流动相,尿素峰形对称,分离度良好,保留时间适中。考虑到盐在大量有机溶剂中容易析出,选择乙腈-甲醇-水(10%磷酸调 pH 至 3.6)(90:7:3)为本研究流动相。

4.2 流动相 pH 的选择

流动相 pH 对尿素保留时间、峰形影响较大。随着 pH 减小,主峰保留时间变短,峰形改善,分离度增加。但 pH 太低影响色谱柱寿命,pH 3.6 时,保留时间适当,峰形对称,分离度能够达到要求。

4.3 溶剂的选择

尿素在乙醇和流动相 2 种溶剂中溶解性都比较好,但考虑到尿素检测波长是 200 nm,为末端吸收,乙醇在末端有较大吸收,而流动相 90%为乙腈,短波长溶剂吸收干扰小,因此选择流动相为溶剂。

4.4 柱温的选择

柱温对尿素的峰形、保留时间影响不大,但考虑到环境温度的变化可能的影响,选择柱温为 30 ℃。

4.5 耐用性实验

本实验选择其他品牌的氨基柱[Alltima Amino (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Boston Crest Amino (4.6 mm×200 mm, 5 μm)、Phenomenex Luna (4.6 mm×250 mm, 5 μm)],在不同的操作时间以及不同的操作者采用合适流动相比例进行试验,峰形对称、分离度良好,结果显示该方法的耐用性较好。

4.6 TLC 鉴别

曾参照英国药典 2010 版^[3]尿素乳膏项下鉴别方法进行鉴别,但是,拖尾较严重,并且软膏预处理方法用水溶解,点样时比较难挥干,丙酮毒性又较大。按“2”项下方法操作,尿素在乙醇中易溶,也易于挥干,毒性相对较小。点样量减小为 5 μL 后,拖尾明显改善。英国药典展开为二次展开,经过多次试验,发现尿素软膏二次展开和一次展开没有明显区别,因此选择一次展开。

REFERENCES

- [1] The National Drug Standard Chemical Local Standards Rise National Standard Volume 1(国家药品标准 化学药品地方标准上升国家标准第一册) [S]. 2002: 73-75.
- [2] USP 33 [S]. 2010: 1802.
- [3] BP(2010) Vol II [S]. 2010: 2179-2180.

收稿日期: 2013-03-13

替代对照品法测定新疆孕马尿中 3 种主要结合雌激素含量

赵倩, 姚军, 高晓黎^{*}(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 建立 HPLC 替代对照品法测定新疆孕马尿中 3 种主要结合雌激素的含量。方法 采用 HPLC 在不同条件下测定替代对照品雌酮硫酸钠对于马烯雌酮硫酸钠及 17α-双氢马烯雌酮硫酸钠对照品的校正因子,利用校正因子和替代对照品雌酮硫酸钠测定孕马尿中 3 种主要结合雌激素的含量。结果 以替代对照品法测得的结果与常规含量测定方法结果一致。结论 在高效液相色谱仪上使用替代对照品法测定孕马尿中的 3 种主要结合雌激素的含量,此方法准确可靠,可节约检测成本。

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2011ZX09203-001-10); 新疆维吾尔自治区重大科技专项(201130101)

作者简介: 赵倩, 女, 硕士生 Tel: 18699007966 E-mail: xyd_zq@163.com ^{*}通信作者: 高晓黎, 女, 博士, 教授 Tel: (0991)4362442

E-mail: xli_g@sina.com

关键词: 替代对照品法; 高效液相色谱法; 校正因子; 孕马尿; 结合雌激素

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)04-0444-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.04.015

Determination of Three Main Conjugated Estrogens in Pregnant Mare Urine of Xinjiang by Substitute Reference Substance

ZHAO Qian, YAO Jun, GAO Xiaoli* (College of Pharmacy, Xinjiang Medical university, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determination of three main conjugated estrogens in pregnant mare urine of Xinjiang by substitute reference substance by HPLC. **METHODS** Sodium estrone sulfate was selected as the substitute for reference substance of sodium equilin sulfate and sodium 17 α -dihydroequilin sulfate. The relative correction factors(RCF) of sodium equilin sulfate and sodium 17 α -dihydroequilin were measured by HPLC under different conditions. Assay of three main conjugated estrogens in pregnant mare urine of Xinjiang was determined by substitute reference and the relative correction factors. **RESULTS** The quantitative results of the new method were almost consistent with the results of conventional HPLC. **CONCLUSION** The substitute reference substance is adopted in HPLC determination of three main conjugated estrogens in pregnant mare urine of Xinjiang. The new method is economical and practical.

KEY WORDS: substitute reference substance; HPLC; relative correction factors; pregnant mare urine; conjugated estrogens

孕马尿中富含大量的雌激素^[1],其中以硫酸钠盐结合的雌激素为主,它是一系列结合雌激素的混合物,其中雌酮硫酸钠(estrone sulfate, ES)、马烯雌酮硫酸钠(sodium equilin sulfate, EqS)及 17 α -双氢马烯雌酮硫酸钠(sodium 17 α -dihydroequilin sulfate, 17 α -EqS)^[2]占结合雌激素含量的 90%以上。新疆伊犁河谷地区有全国最为集中的孕马资源,当地已有多家企业利用孕马资源开发雌激素新药。采收孕马尿过程中需要测定 ES、EqS 和 17 α -EqS 的含量,目前其测定方法主要为 HPLC^[3],但这 3 种对照品售价高昂,检测成本高。本研究以 ES 作为替代对照品用于新疆孕马尿中 3 种主要结合雌激素的含量测定^[4],该法不仅节约检测成本,且准确实用。

1 仪器与试剂

色谱仪: Waters 2690 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津); 色谱柱: Agilent Zorbax Extend-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m); DiKMA Diamondsil C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m); YMC-Pack ODS(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m)。

ES、EqS 及 17 α -EqS 对照品(新疆新资源生物制药有限公司, HPLC 测定含量均 $\geq$ 99.0%); 乙腈(Fisher Scientific 公司, 色谱纯); 磷酸二氢钾(国药集团化学试剂有限公司, 优级纯); 其他试剂均为分析纯。10 批孕马尿样品由新疆新资源生物制药

公司提供,来自新疆伊犁新源县牧户。

2 方法与结果

2.1 原理

在一定的线性范围内,物质的量与检测器响应值成正比,即 $f = \frac{W}{A}$ 。在许多文献中都使用

$f_{sm} = \frac{f_s}{f_m} = \frac{A_s/C_s}{A_m/C_m}$ 公式推算相对校正因子,其中

A_s 、 C_s 为参照物,即替代对照品的峰面积和浓度, A_m 、 C_m 为目标物,即对照品的峰面积和浓度。

测定样品时,用替代对照品法测定,用

$C = f \times \frac{A}{A_s/C_s}$ 公式计算被测样品的浓度,其中 A

为被测样品峰面积, A_s 、 C_s 为参照物即替代对照品的峰面积和浓度。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取 17 α -EqS、EqS、ES 对照品适量于 50 mL 量瓶中,用 50%甲醇稀释至刻度,摇匀,得一定浓度的储备液。精密吸取各储备液 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL 分别置于 5 mL 量瓶中,用 50%甲醇溶液稀释至刻度配制成混合对照品系列浓度。

2.2.2 供试品溶液 取 5 mL 孕马尿加水稀释至 50 mL,加 10%稀盐酸混合 1 min 后加 10% NaOH 水溶液混合,静置 5 min, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液作为供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱采用 DiKMA Diamonsil C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流速: 1 mL·min⁻¹, 柱温: 40 °C, 流动相: A(0.025 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液):B(乙腈)=25:75, 检测波长: 205 nm, 进样量 20 μL。3 种结合雌激素对照品和孕马尿供试品的色谱图见图 1。

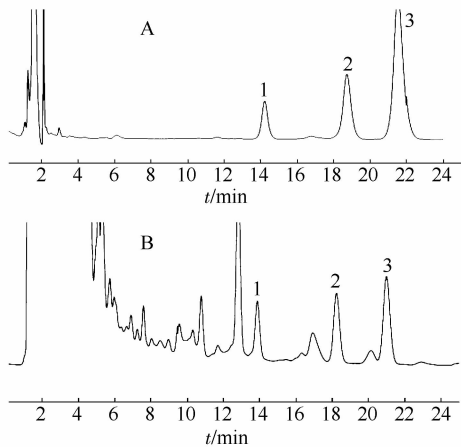


图 1 ES、EqS、17α-EqS 的高效液相色谱图
A-对照品溶液; B-供试品溶液; 1-17α-EqS; 2-EqS; 3-ES
Fig 1 HPLC chromatograms of ES, EqS and 17α-EqS
A-standard solution; B-sample solution; 1-17α-EqS; 2-EqS; 3-ES

其中, 以 ES 为主成分峰, 17α-EqS 与 EqS 的相对保留时间分别为 0.66 与 0.87。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 吸取“2.2.1”项下系列浓度溶液 20 μL, 按“2.3”项下方法测定, 以 17α-EqS、EqS、ES 浓度(C)为纵坐标, 以相应峰面积(A)为横坐标。各组分线性回归方程分别为: $y=26\ 261x+6\ 729(r=0.999\ 5)$, $y=26\ 903x+11\ 409(r=0.999\ 8)$, $y=35198x-55\ 032(r=0.999\ 5)$ 。结果表明上述 3 种成分进样浓度分别在 0.97~4.99 μg·mL⁻¹, 2.00~6.02 μg·mL⁻¹, 4.07~11.84 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.4.2 系统适应性试验 取“2.2.1”项下对照品系列浓度中 17α-EqS、EqS、ES 浓度分别为 3, 4, 8 μg·mL⁻¹ 的混合溶液, 按“2.3”项下色谱条件测定, 重复进样 6 次, 记录峰面积。结果 17α-EqS、EqS、ES 峰面积的 RSD 分别为 0.38%, 0.28%, 0.21%。

2.4.3 稳定性考察 取孕马尿供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件测定, 分别于 0, 3, 6, 9, 12 h 进样, 记录峰面积。结果 17α-EqS、EqS、ES 面积的 RSD 分别为 1.78%, 1.92%, 1.75%。

2.4.4 精密度试验 取孕马尿样供试品 6 份, 按

“2.3”项下色谱条件测定, 记录峰面积, 计算含量, 结果 17α-EqS、EqS、ES 含量平均值($n=6$)分别为 2.09, 3.69, 4.16 μg·mL⁻¹; RSD 分别为 0.70%, 1.18%, 1.12%。

2.4.5 回收率考察 取已测得含量的同一供试品 9 份, 按“2.2.2”项下方法操作, 分别加入低, 中, 高 3 种不同浓度的对照品, 按“2.3”项下色谱条件测定, 3 种成分加样回收率结果见表 1、表 2 和表 3。

表 1 17α-EqS 回收率试验结果

已知量/ mg	测得量/ mg	加入量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/%
0.050 2	0.075 6	0.025	101.6		
0.050 2	0.075 1	0.025	99.6		
0.050 2	0.075 3	0.025	100.4		
0.050 2	0.125 6	0.075	100.5		
0.050 2	0.126 1	0.075	101.2	100.7	0.56
0.050 2	0.125 9	0.075	100.9		
0.050 2	0.176 5	0.125	101.0		
0.050 2	0.175 9	0.125	100.6		
0.050 2	0.176 1	0.125	100.7		

表 2 EqS 回收率试验结果

已知量/ mg	测得量/ mg	加入量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/%
0.063 2	0.113 4	0.05	100.4		
0.063 2	0.112 8	0.05	99.2		
0.063 2	0.114 1	0.05	101.8		
0.063 2	0.164 9	0.10	101.7		
0.063 2	0.164 2	0.10	101.0	100.5	0.96
0.063 2	0.164 1	0.10	100.9		
0.063 2	0.213 3	0.15	100.1		
0.063 2	0.212 7	0.15	99.67		
0.063 2	0.212 2	0.15	99.33		

表 3 ES 回收率试验结果

已知量/ mg	测得量/ mg	加入量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/%
0.121 6	0.223 1	0.101 8	99.71		
0.121 6	0.224 2	0.101 8	100.8		
0.121 6	0.223 7	0.101 8	100.3		
0.121 6	0.323 4	0.199 0	101.4		
0.121 6	0.320 1	0.199 0	99.75	100.4	0.55
0.121 6	0.322 5	0.199 0	101.0		
0.121 6	0.419 1	0.296 0	100.5		
0.121 6	0.418 7	0.296 0	100.4		
0.121 6	0.418 1	0.296 0	100.2		

2.5 *f* 值的测定

根据样品的线性范围，精密吸取系列浓度混合对照品溶液 20 μL 进样，每个浓度进样 3 次，取平均值。以 ES 为替代对照品，17α-EqS 和 EqS 为待测物质，按 $f_{sm} = \frac{f_s}{f_m} = \frac{A_s/C_s}{A_m/C_m}$ 公式计算系列浓度下的 *f* 值，再取其平均值，即为 ES 对 17α-EqS 和 EqS 的相对校正因子。

2.6 *f* 值测定方法的耐用性考察

由 $f_{sm} = \frac{f_s}{f_m} = \frac{A_s/C_s}{A_m/C_m}$ 公式看，可能影响色谱分

析的所有因素如色谱柱、色谱仪、温度、流速、流动相比比例、检测波长等都需要进行单因素考察，这些因素反应了仪器波动和系统误差。

2.6.1 仪器波长对*f*值测定的影响 HPLC 紫外检测器的波长可能存在偏差，国家计量局规定其误差范围在±2 nm 之内。在同一台液相色谱仪上分别在 203，204，205，206，207 nm 波长下进样并计算*f*值，结果见表 4。

表 4 仪器波长变化对*f*值测定的影响

Tab 4 The effect of wave length changing on *f* value

波长/nm	<i>f</i> _{17α-EqS/ES}	<i>f</i> _{EqS/ES}
203	0.922 6	0.882 9
204	0.930 7	0.895 7
205	0.940 8	0.908 8
206	0.942 5	0.927 9
207	0.951 3	0.922 5
平均值	0.937 6	0.907 6
RSD/%	1.18	2.05

由表 4 可以看出在同一台高效液相色谱仪上，波长发生变化，替代对照品 ES 对于 17α-EqS 和 EqS 的相对校正因子 *f* 值变化不大，RSD 分别为 1.18%和 2.05%。

2.6.2 流动相比比例对*f*值测定的影响 HPLC 的流动相比比例变化会对样品和对照品的保留产生影响，本实验中有有机相乙腈的比例改变会影响 3 个成分的保留时间。在同一台液相色谱仪上考察不同比例乙腈的流动相对于相对校正因子 *f* 值的影响，乙腈与 0.025 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液的比例分别为 23：77，24：26，25：75，26：74，27：73。进样并计算 *f* 值，结果见表 5。

表 5 流动相比比例变化对 *f* 值测定的影响

Tab 5 Influence of the composition proportion of the mobile phase on *f* value

乙腈：磷酸二氢钾	<i>f</i> _{17α-EqS/ES}	<i>f</i> _{EqS/ES}
23：77	0.939 1	0.905 9
24：76	0.940 7	0.881 2
25：75	0.938 6	0.898 7
26：74	0.939 3	0.881 4
27：73	0.915 8	0.897 8
平均值	0.934 7	0.893 0
RSD/%	1.13	1.25

由表 5 可以看出在同一台高效液相色谱仪上，流动相比比例变化造成 3 种成分保留时间的改变，替代对照品 ES 对于 17α-EqS 和 EqS 的相对校正因子 *f* 值变化不大，RSD 分别为 1.13%和 1.25%。

2.6.3 仪器流速对*f*值测定的影响 HPLC 泵的流速可能存在偏差，用同一台液相色谱仪，分别以 0.8，0.9，1.0，1.1，1.2 mL·min⁻¹ 的流速进样，测定相对校正因子 *f* 值，结果见表 6。

表 6 仪器流速变化对 *f* 值测定的影响

Tab 6 Influence of flow rate on *f* value

流速/mL·min ⁻¹	<i>f</i> _{17α-EqS/ES}	<i>f</i> _{EqS/ES}
0.8	0.914 2	0.871 8
0.9	0.918 2	0.887 0
1.0	0.935 7	0.895 4
1.1	0.929 0	0.875 7
1.2	0.948 0	0.876 8
平均值	0.929 0	0.881 3
RSD/%	1.46	1.10

由表 6 可以看出在同一台高效液相色谱仪上，仪器流速变化±0.1 mL·min⁻¹ 和±0.2 mL·min⁻¹ 时，替代对照品 ES 对于 17α-EqS 和 EqS 的相对校正因子 *f* 值变化不大，RSD 分别为 1.46%和 1.10%。

2.6.4 仪器柱温对*f*值测定的影响 HPLC 的柱温箱温度在一定时间内会产生波动，用同一台液相色谱仪，分别于 35，38，40，42，45 °C 进样并测定相对校正因子 *f* 值，结果见表 7。

表 7 仪器柱温变化对 *f* 值测定的影响

Tab 7 Influence of column temperature on *f* value

温度/°C	<i>f</i> _{17α-EqS/ES}	<i>f</i> _{EqS/ES}
35	0.909 9	0.919 8
38	0.917 6	0.881 9
40	0.935 6	0.912 4
42	0.938 5	0.913 7
45	0.904 7	0.884 5
平均值	0.921 3	0.902 5
RSD/%	1.64	1.97

由表 7 可以看出在同一台高效液相色谱仪上, 仪器柱温变化 $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及 $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 替代对照品 ES 对于 $17\alpha\text{-EqS}$ 和 EqS 的相对校正因子 f 值变化不大, RSD 分别为 1.64% 和 1.97%。

2.6.5 不同品牌同类型色谱柱对 f 值测定的影响 在 HPLC 的实际检测过程中会用到不同品牌的色谱柱, 不同色谱柱间可能存在一定误差。按“2.3”项下色谱条件测定, 在同一台高效液相色谱仪上使用 3 根不同品牌的同类型色谱柱检测并计算相对校正因子 f 值, 结果见表 8。

表 8 不同品牌的同类型色谱柱对 f 测定的影响
Tab 8 The effect of different chromatographic columns on f value

色谱柱	$f_{17\alpha\text{-EqS/ES}}$	$f_{\text{EqS/ES}}$
Agilent Zorbax Extend- C_{18}	0.940 8	0.891 2
DiKMA Diamonsil C_{18}	0.921 9	0.882 1
YMC-Pack ODS	0.954 7	0.911 5
平均值	0.939 1	0.894 9
RSD/%	1.75	1.68

由表 8 可以看出在同一台高效液相色谱仪上, 使用不同厂家的同一类型色谱柱, 替代对照品 ES 对于 $17\alpha\text{-EqS}$ 和 EqS 的相对校正因子 f 值变化不大, RSD 分别为 1.75% 和 1.68%。

2.6.6 不同高效液相色谱仪对 f 值测定的影响 不同厂家、型号的高效液相色谱仪之间也存在一定差异。按“2.3”项下色谱条件测定, 使用同一根色谱柱: Agilent Zorbax Extend- C_{18} (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm), 分别在 3 台高效液相色谱仪上进样, 并计算相对校正因子 f 值, 结果见表 9。

表 9 不同液相色谱仪对 f 值测定的影响
Tab 9 Influence of liquid instrument on f value

色谱仪	$f_{17\alpha\text{-EqS/ES}}$	$f_{\text{EqS/ES}}$
Waters 2690	0.936 1	0.880 3
Agilent 1100	0.942 4	0.904 2
岛津 LC-20AT	0.910 5	0.872 8
平均值	0.929 7	0.885 7
RSD/%	1.82	1.85

由表 9 可以看出使用同一根色谱柱分别在不同的液相色谱仪上进样, 替代对照品 ES 对于 $17\alpha\text{-EqS}$ 和 EqS 的相对校正因子 f 值变化不大, RSD 分别为 1.82% 和 1.85%。

2.6.7 相对校正因子 f 的平均值 在实际检验工作中, 柱温、流速、波长反应了同一仪器正常波

动产生的偶然误差, 而色谱柱和色谱仪则是主要变化因素, 由“2.6.5”和“2.6.6”项下求得 f 的平均值, 即为替代对照品 ES 对于 $17\alpha\text{-EqS}$ 和 EqS 的相对校正因子, 结果见表 10。

表 10 不同色谱仪与不同品牌的同类型色谱柱的 f 平均值
Tab 10 f average value in different HPLC instruments and columns

影响因素	$f_{17\alpha\text{-EqS/ES}}$	$f_{\text{EqS/ES}}$
色谱仪	0.929 7	0.885 7
色谱柱	0.939 1	0.894 9
平均值	0.934 4	0.890 3

2.7 样品含量测定

2.7.1 外标法 量取 3 种对照品贮备液适量, 稀释成含 $17\alpha\text{-EqS}$ 、 EqS 和 ES 的浓度分别为 2.23, 4.15, 9.38 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混标溶液。精密量取供试品溶液和对照品溶液 20 μL , 按“2.3”项下色谱条件测定, 以外标法计算供试品中 3 种成分的含量, 结果见表 11。

2.7.2 替代对照品法 精密量取 ES 对照品储备液适量, 稀释成 9.38 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为对照品溶液。精密量取供试品溶液和对照品溶液 20 μL , 按“2.3”项下色谱条件测定, 以替代对照品法 ($C = f \times \frac{A}{A_s / C_s}$ 公式) 计算供试品中 3 种成分的含量。其中 $f_{17\alpha\text{-EqS/ES}}$ 和 $f_{\text{EqS/ES}}$ 分别为 0.934 4 和 0.890 3, 结果见表 11。

表 11 2 种方法测定新疆孕马尿中 3 种主要结合雌激素的含量

Tab 11 Comparison of contents of conjugated estrogens by two methods

编号	$17\alpha\text{-EqS}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		$\text{EqS}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		$\text{ES}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
	外标法	替代对照品法	外标法	替代对照品法	外标法
1	1.56	1.45	1.98	1.93	2.91
2	1.37	1.28	1.42	1.39	4.38
3	1.63	1.52	1.95	1.90	2.22
4	1.10	1.02	1.54	1.50	2.01
5	2.83	2.63	2.36	2.31	4.92
6	1.05	0.97	2.59	2.52	4.49
7	2.92	2.72	3.71	3.62	3.91
8	1.31	1.22	2.22	2.16	3.30
9	2.06	1.91	2.14	2.08	4.93
10	2.64	2.46	3.49	3.40	4.39

将以上数据进行配对 t 检验, 结果显示 P 值均 >0.05 , 结果无显著性差异。

3 讨论

孕马尿是雌激素类药物的原料, 为当地牧户所有, 企业收购孕马尿时按质论价, 需要测量孕马尿中 ES、EqS 和 17α -EqS 的含量。此 3 种结合雌激素的对照品价格高昂, 采集期时每天需测定大量的孕马尿样品, 对照品消耗多, 增加了企业的检测成本。本研究建立的替代对照品法只需使用 ES 一种对照品, 即可测定孕马尿中 3 种主要结合雌激素的含量。本方法测定样品时引入了 f 值, 同时也引入了误差, 但与外标法的结果相比, 经统计学 t 检验, 二者不存在显著性差异, 用替代对照品法测定新疆孕马尿中 3 种主要结合雌激素的含量是可行、实用的。

REFERENCES

- [1] BENJAMIN S, MARRIAN G F. The isolation of estrone sulfate from the urine of pregnant mare [J]. J Biol Chem, 1938, 126: 663-666.
- [2] MULATALI, GAO X L, XIAO J M. Studies on estrogen concentration changes in pregnant mare's urine [J]. J Xinjiang Med Univ(新疆医科大学学报), 2009, 32(4): 403-405.
- [3] YAO J, GAO X L, GAO X. Study on the qualitative and quantitative methods of main conjugated estrogens in pregnant horse urine of Xinjiang [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2011, 31(8): 1471-1474.
- [4] JIANG Y, SUN L, JIN H Y, et al. Discussion on application and technical requirements of substitute reference substance method for simultaneous determination of multi-components in traditional Chinese medicine [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2013, 33(1): 169-177.

收稿日期: 2013-07-01

正相 HPLC-直链淀粉手性固定相拆分硼替佐米及其光学异构体

邹华生, 郑璐*, 姚书杨, 吴斌, 张益波(扬子江药业集团上海海尼药业有限公司, 上海 201318)

摘要: 目的 建立硼替佐米光学异构体高效液相手性分离方法。方法 在 Chiralpak AD-H[直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性固定相]手性柱上拆分硼替佐米异构体, 考察流动相中不同浓度的异丙醇与乙醇、柱温和流速对手性拆分的影响。结果 最佳拆分流动相组成为正己烷和改性调节剂, 最佳色谱条件为正己烷-异丙醇-乙醇(86:6:8), 流速为 $0.6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。结论 本方法可方便地拆分硼替佐米异构体, 为硼替佐米原料药质量标准和质量控制提供了科学依据。

关键词: 高效液相色谱法; 手性固定相; 硼替佐米; 异构体; Chiralpak AD-H

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2014)04-0449-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.04.016

Separation of Bortezomib and Its Optical Isomers on Amylose Chiral Stationary Phase by NP-HPLC

ZOU Huasheng, ZHENG Lu*, YAO Shuyang, WU Bin, ZHANG Yibo(Yangtze River Pharmaceutical Group Shanghai Heini Pharmaceutical Co., Ltd. Shanghai 201318, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a normal phase HPLC method for the separation of bortezomib and its optical isomers. **METHODS** The chiral separation of bortezomib and its optical isomers on amylose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase was carried out. The effectes of different proportions of *n*-hexane/isopropanol/ethanol in mobile phase were investigated, and the flow rate of mobile phase and column temperature were also optimized. **RESULTS** The mobile phase of the established method was *n*-hexane-isopropanol-ethanol(86:6:8), with the flow rate of $0.6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The column temperature was set at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. **CONCLUSION** The method is simple, rapid and can be used for analysis of bortezomib and its optical isomers.

KEY WORDS: HPLC; chiral stationary; bortezomib; isomer; Chiralpak AD-H

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2011ZX09202-101-29)

作者简介: 邹华生, 男, 硕士, 副主任中药师 Tel: (021)68128999
高级工程师 Tel: (021)68128999 E-mail: zhenglulu@bjhaiyan.com

E-mail: 512441581@qq.com

*通信作者: 郑璐, 女, 博士, 高