

dl-15-甲基PGF_{2α}及其甲酯的HPLC分析研究

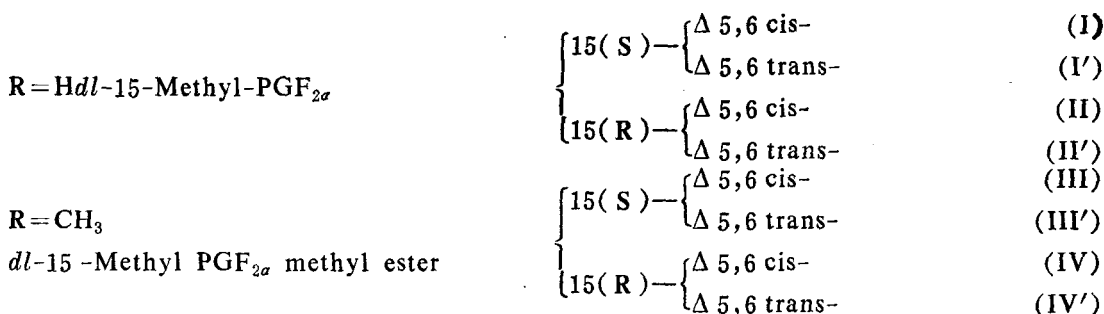
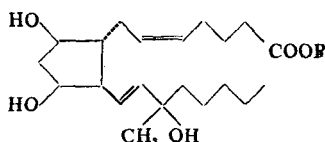
吕湘林 汪秀云 曹秀玲

(上海市药品检验所)

提要 dl-15-甲基PGF_{2α}及其甲酯为前列腺素PGF的衍生物。它们的临床剂量甚小，其合成生产工艺及结构特征表明可能有多种异构体存在，且异构体间的生物活性差异很大。建立具有高专属性、灵敏度以及对各种制剂适用的分析方法是改进生产工艺、深入各项研究和临床安全有效使用所面临的迫切课题。本文报道的反相HPLC直接测定法用ODS柱、UVλ 197 nm检测、甲醇-水-醋酸为流动相，合成杜鹃素为内标，可对dl-15-甲基PGF_{2α}及其甲酯的各种差向和顺反异构体进行分离和分别直接定量。本法分辨率高，最低检测量为0.03 μg，操作简便，定量线性关系良好，分析误差小于3%(CV)，节省试剂，并可发展成制备工艺。本法适用于15-甲基PGF_{2α}及其甲酯的合成原料和各种制剂的分析。

关键词 前列腺素；15-甲基前列腺素F_{2α}；15-甲基前列腺素F_{2α}甲酯；高效液相色谱法

前列腺素(PG)普遍存在于人和其它动物的组织中，具有广泛的生物活性，对生命科学具有重大意义。dl-15-甲基PGF_{2α}及其甲酯均为PGF的衍生物，国内已完成其合成研究，试用于临床作为终止妊娠的药物。在畜牧业上促进产仔，增加奶量均获良好效果^(1~3)。



本品临床剂量甚小，而在合成过程中有多种生物活性显著差异的异构体混同，为此对分析方法的灵敏度、分辨力、适用性及可靠性要求均较高。有关分析方法研究颇多⁽⁴⁾，但多未能满足以上要求。

HPLC法是PG的重要分析手段。国外有关研究多将它们转化为各种衍生物以利于检测，但并非直接测定，缺点较多，难以提示工艺改进所需的多种信息，对制剂样品又多不适用，且操作繁琐，使分析误差增大。

本文研究了样品不经衍生化处理，以反相HPLC方法分离，紫外直接检测，建立了适

用于 *dl*-15-甲基 PGF_{2α}, *dl*-15-甲基 PGF_{2α} 甲酯及其各种临床制剂的快速直接分析测定方法。

本法可完全分离 I, II或III, IV 等各种差向异构体 (简称 S 和 R) 及其 5,6 位的顺反异构体 I', II'或III', IV', 专属性强, 操作简便。本法可发展成生产制备工艺, 溶剂价廉, 有经济价值, 分析误差小于 3%(CV), 灵敏度为 0.03 μg。

实 验 部 分

一. 仪器及材料

仪器 Perkin-Elmer series III 高压液相色谱仪; 岛津 SPD-2 A 紫外检测器; C-RIA 色谱数据处理机; Zorbax ODS(5 μm); Perkin Elmer 键合氰基、苯基、氟醚基、氨基及 C₈ 色谱柱 (10 μm; 25 cm × 4.6 mm)。

试剂 甲醇、无水乙醇 (紫外分光纯, 上海试剂一厂); 对照标准品: *dl*-15-甲基 PGF_{2α} 及 *dl*-15-甲基-PGF_{2α} 甲酯 (美国 Upjohn); *dl*-15-甲基 PGF_{2α} 及 *dl*-15-甲基 PGF_{2α} 甲酯各种合成样品 (上海有机化学研究所、上海第五制药厂); *dl*-15-甲基 PGF_{2α} 及其甲酯的栓剂 (上海医药工业研究院); 注射液 (上海第九制药厂); 海绵栓 (上海第一医学院药剂教研室); 合成杜鹃素 (符合上海市药品规范, 1975, 上海第六制药厂)。

二. 样品制备

内标溶液 精密称取合成杜鹃素, 以无水乙醇配制成 5 mg/ml 的溶液。

对照品及样品溶液 分别精密称取对照品或样品, 以无水乙醇溶解后, 加入内标溶液 50 μl, 以无水乙醇稀释至 2 ml, 使成含 (*dl*-15-甲基 PGF_{2α} 或其甲酯 2.5 mg/ml) 对照品或样品溶液。

三. 在各种固定相上的 K' 特征

分别取氨基、氰基、苯基、辛烷 (C₈) 及十八烷基 (ODS) 键合色谱柱, 以甲醇-水 (0.5~3.5:1) 为流动相, 流量 1.5 ml/min, UV λ 195 nm 检测, 取对照标准品 10 μl 进样, 分别记录色谱结果, 比较不同固定相条件下各异构体 (S 和 R) 的色谱行为特征。

四. 流动相的组成及酸度对异构体分离度的影响

取 ODS 柱, 以甲醇-水 (1~2:1) 为流动相, 分别加入醋酸 0.01~0.1% (V/V), 流量 2.0 ml/min, UV λ 195 nm 检测, 分别取 *dl*-15-甲基 PGF_{2α} 及其甲酯的 R, S 差向异构体对照品及样品溶液, 进样 10 μl, 分别记录不同的甲醇-水配比和不同酸量对 R_s 值的影响, 从而选择对 *dl*-15-甲基 PGF_{2α} 及其甲酯的最佳流动相。

五. 检测波长的观察

取对照标准品溶液, 进样 10 μl, 按样品测定项方法分析, 并对各异构体峰作停流 UV 扫描, 以观察它们的 λ_{max} 特征, 并记录谱峰积分值, 比较不同检测波长与峰响应值的关系, 并比较噪声及基线漂移程度。

六. 线性与灵敏度观察

内标: 取杜鹃素 0.05~5 mg/ml 的溶液各 10 μl 分别进样 (0.5~50 μg/次), 以样品测定项方法分析, 观察不同进样量与所得峰响应值间的关系。取不同浓度的对照品溶液各 10 μl 分别进样 (0.5~20 μg/次), 同法操作, 观察对照品峰和内标峰的比值与进样量间的关系。

七. 方法的精密性及专属性考察

分别取不同浓度的对照标准品溶液各 10 μl 分别进样 (2~50 μg/次), 按样品测定项方

法分析,分别重复三次以上,记录并求测日内和日间峰响应值与内标峰响应值之比及CV%,同时分别记录各异构体对(I, II和III, IV)的分离度。

另取对照标准品溶液密闭冷藏,在二个月内分别以上述方法测定,观察样品溶液的稳定性。

八. 样品测定

按样品制备项方法配制待测样品溶液,以甲醇—水—醋酸为1.3:1:0.126 (I与II) 或甲醇—水为1.8:1 (III与IV) 作流动相,色谱系统为ODS柱,紫外检测 λ 195 nm,灵敏度0.01~0.02 AUFS,流量2.0 ml/min。为了核定色谱系统的可行性,取对照标准品溶液(I, II或III, IV) 各10 μ l进样,记录谱峰的积分值,连续进样三次以上, I与II或III与IV间的分离度(R_s)应大于2.5,与内标峰比值的变异小于3%(CV),据此计算各组分的校正因子。取样品液10 μ l分析,根据样品量、校正因子及峰积分值以内标法计算各组分的含量。

九. 制剂测定及回收率观察

栓剂的测定 取栓剂一枚,称重,加少量甲醇使溶后转入10 ml容量瓶内,以甲醇稀释至刻度,摇匀后吸取2 ml,加入25 μ l内标溶液。按样品测定项下方法测定,计算栓剂中dl-15-甲基PGF_{2 α} 或其甲酯(即I或III)的含量。取空白栓1枚,以适量甲醇溶解后加入对照标准品溶液2 ml,全部转移至10 ml容量瓶中,以甲醇稀释至刻度;另取2 ml对照品溶液置10 ml容量瓶中,以甲醇稀释至刻度,作为对照,室温放置30 min后测定,观察回收率。

海绵栓测定 分别取海绵栓两块,绞碎,置10 ml容量瓶中以无水乙醇浸渍,每隔2 h搅拌2 min,共搅拌4次,加无水乙醇至刻度,摇匀,吸取上清液2 ml,加入25 μ l内标溶液,混匀,吸取10 μ l,按样品测定项下方法测定,计算每块海绵栓中dl-15-甲基PGF_{2 α} (I)或甲酯(III)的含量。另取对照标准品溶液滴加于空白海绵基质上(2.5 mg/块),同法操作测定,观察回收率。

注射液测定 精确吸取注射液1 ml,置2 ml容量瓶内,加入内标液25 μ l,以无水乙醇稀释至刻度,摇匀,取10 μ l进行测定,计算I或III的含量。

结果和讨论

一. dl-15-甲基PGF_{2 α} 及其甲酯在所观察的固定相上的K'特征表现相同。I在各种固定相上的色谱行为特征(见图1)表明,氨基键合相对dl-15-甲基PGF_{2 α} 类化合物有较大的K',主要原因是氨基与其分子中的羟基脂肪酸有极强的亲和力,且K'随流动相中甲醇比例的增高而下降的趋势也较平缓,但K'增大并不利于二差向异构体分离度的改善。苯基和氟醚基键合相则由于其极性甚小,与上述化合物难以亲合,所以K'过低,以至无法完成主要异构体的分离。氰基从极性看似较前二者稍大,然而K'却最低,C₈的K'值也小,故选用C₁₈为固定相最为适合。

二. 经多种流动相选择后,以甲醇—水1.3:1(对I, II), 1.8:1(对III, IV)为最佳配比,并注意到流动相的酸度十分明显地影响二个差向异构体的分离效果(见图2)。由于dl-15-甲基PGF_{2 α} 羧酸近于呈完全解离态,即与含水流动相亲和力强,掩盖因差向异构所呈现的色谱行为差异。但当加入酸(如醋酸)时,羟基脂肪酸的解离被抑制,由解离态复呈分子态特征,从而有助于二异构体表现其构型差异,对流动相的亲合力差别也就得到了表现。dl-15-甲基PGF_{2 α} 甲酯在流动相中仍呈分子态,故流动相酸度对二差向异构体的分离无明显

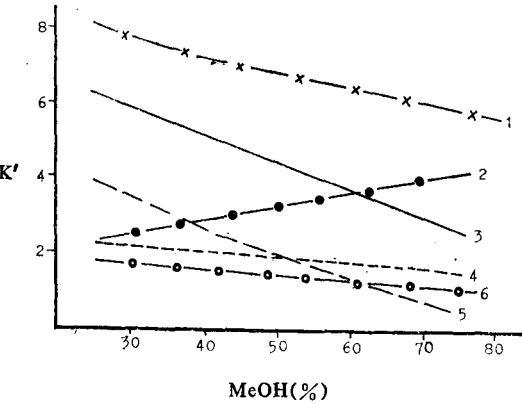


Fig 1. K' characteristics of dl -15-MePGF_{2α} in various chromatographic systems. Stationary phase: 1. Amino bonded; 2. Phenyl bonded; 3. ODS 4. Fluoroether bonded; 5. C₈ bonded; 6. Cyano bonded.

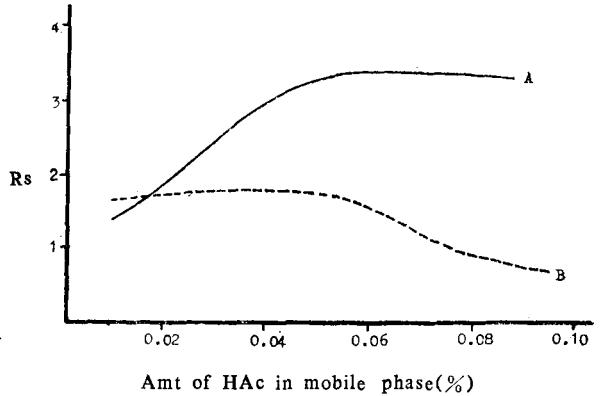


Fig 2. Influence of different amount of HAC on the separation of epimer pair. A. dl -15-MePGF_{2α}; B. dl -15-15MePGF_{2α} methyl ester.

影响, 且由于 pH 降低使之有水解的可能, 导致结果不重复或异常。因此, 对于 dl -15-甲基 PGF_{2α}, 最佳流动相为 1.3:1:0.00126, 其甲酯则以 1.8:1 为佳 (不加酸)。

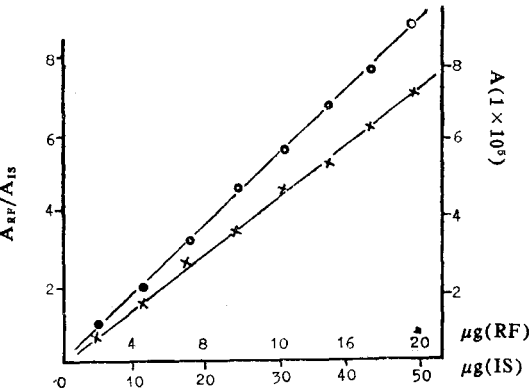


Fig 3. The relationship between injected amount and peak response. --- Farrerol; —15-MePGF_{2α}(S)(I). A₁, Peak area; RF, Pure product; IS, Internal standard.

四. 本文选择合成杜鹃素 (farrerol) 为内标物, 实验表明, 它对各异构体的定量线性关系均良好, 且范围宽 (10~50 μg, 见图 3)。

经分别取对照标准品 2~50 μg 分析, 日内与日间平均 CV 在 3% 左右, 表明该法重现性良好 (见表 1); 取冷藏的对照标准品溶液测定, 发现两个月内结果无变化, 表明样品的稳定性良好。

五. 分析的可靠性与谱峰的分度度相关, 通常当 R_s 值大于 2.5 时, 分离结果已令人满意。在本法条件下, I, II 或 III, IV 差向异构体对的 $R_s \geq 3$, 其 $\Delta 5,6$ 位的顺反异构体对的 $R_s \geq 1.5$ 。它们色谱行为的变异乃由于其构型的差别。在立体结构中 I 与 III 之 11 及 15 位羟基处于同侧, 较易形成分子内氢键, 而 II 与 IV 则不然, 其 11 和 15 位羟基处于异向, 几乎不存在此种可能, 因而使二者对流动相亲和力有差异 (前者小于后者), 表现为 K' 值前者大于后者。酸与甲酯均呈类似特征, 但羧酸基的相对极性活度却因甲酯化后降低, 使 $\Delta 5,6$ 位

三. dl -15-甲基 PGF_{2α} 及其甲酯在紫外区的吸收波长较短, 处于 190~197 nm, 在选定的固定相和流动相条件下进样, λ 195~197 nm 检测, 实验结果表明, 在 λ 195 nm 下检测时, 噪声小于 10^{-5} AU, 基线稳定, 进样量 0.5~20 μg, 响应值线性良好, 回收处理后 r 值大于 0.9990; 最低检测量可达 0.03 μg (0.01 AUFS), 能满足微量分析的各项要求。不同批次的合成产品经以 UV λ 200~280 nm 检测, 均未发现任何其它谱峰, 与此同时, dl -15-甲基 PGF_{2α} 及其甲酯各异构体的谱峰均显著减小, 这也表明 λ 195 nm 检测具有较高灵敏度与可靠性 (见图 3)。

Tab 1. Precision of assay

Amount of sample determined (μg)	Within day		Day to day	
	A_s/A_I	CV%	A_s/A_I	dV%
2.16	0.7364	2.20	0.7181	2.23
4.32	1.3244	1.33	1.3270	3.51
10.80	3.1460	0.69	3.0880	1.73
4.42	0.6744	2.66	0.6713	0.93
8.83	1.3660	0.55	1.3626	0.65
22.09	3.0648	1.75	3.2141	3.87
44.17	6.6704	2.46	6.4921	2.60

A_s : Peak area of sample; A_I : Peak area of internal standard.

的顺反异构对上侧链的相对极性活度影响也出现了逆转的变化 (见图 4, 5), 然而, 甲酯的反式异构 K' 却大于顺式。

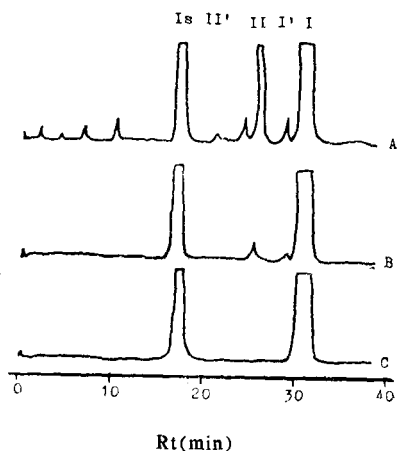


Fig 4. The HPLC separation of epimers in dl -15-MePGF $_{2\alpha}$. A, Crude product; B, Reference standard (Upjohn); C, Product (850123-1); Is, Internal standard.

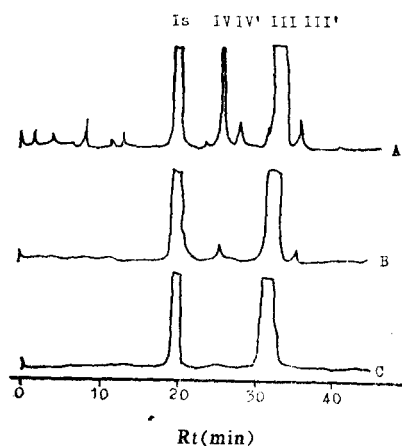


Fig 5. The HPLC separation of epimers in dl -15-MePGF $_{2\alpha}$ methyl ester. A, Crude product; B, Reference standard (Upjohn); C, Product (850012); Is, Internal standard.

以本法分析美国 Upjohn 公司的“对照品”表明: 其中 II 和 II' 的含量达 2.8%, dl -15 (s)-甲基-PGF $_{2\alpha}$ 甲酯的“标准品”中非活性异构体 III' 和 IV' 含量为 1.9%, 可见本法有较高的分辨率及专属性。本法对 dl -15-甲基 PGF $_{2\alpha}$ 及其甲酯 (包括各种制剂) 的分析灵敏度与可靠性据实验结果可作如下概述: 其 R 和 S 异构体的分离度 (R_s) 均大于 3; 对各顺式和反式异构体的分离度均大于 1.5; 测定灵敏度均可达 0.03 μg ; 进样量与峰响应值间的线性关系 (r) 均大于 0.999; 除海绵剂的回收率为 97% 外, 余均大于 98%; 日内测定的变异系数 (CV%) 均小于 3, 测定周期均小于 30 min。

六. 本法可直接用于 dl -15(s)-甲基 PGF $_{2\alpha}$ 及其甲酯的合成原料、注射液、海绵剂及栓剂的定量分析, 其中除海绵剂外均不必做样品处理。此外, 本法还可用于各种制剂的释放度、溶出度和均匀度的测定。各批临床使用制剂的测定结果如表 2。

七. 本文报告的方法经对数十批次各种合成样品进行分析, 提示了出现的杂质和其相对含量变化以及各异构体对的相对和绝对组成量, 为生产工艺和改进研究提供了重要信息。随着工艺的不断完善, 产品的生理活性异构体 (I 和 III) 含量不断提高, 目前所得白色晶体产

Tab 2. Quantitative analysis of preparations

Suppository		Injection		Sponge	
Batch No.	Content (mg/g)	Batch No.	Content (mg/g)	Batch No.	Content (mg/g)
840803	8.2037	850302	0.7225	829	5.0275
841107	8.9567	850111	0.7981	115	5.4231
850102	7.8243	850112	0.8274	113	5.2085
850110	9.1041	840819	0.8131	416	4.9410
Mean recovery	101.90%		100.00%		99.93%

品中其含量已达 95% 以上, 某些批号则已超过美国 Upjohn 公司所提供的“标准品”水平 (见表 3)。

Tab 3. Quantitative analysis of synthetic products

Batch No.	R-epimer (%)	S-epimer (%)	Other fraction (the full number of peak)	Character
840906	12.10	61.66	7	yellow, oil
841013	4.95	63.44	7	yellow, oil
831204	0.41	64.65	7	yellow, oil
840504-2	5.96	66.73	5	yellow, oil
840201-3	8.96	72.40	4	yellow, oil
840912	5.73	73.34	4	yellow, oil
840201	7.50	75.32	3	yellowish, oil
850123-1	/	98.20	/	white, powder
850123-2	/	95.14	/	white, powder
850123-3	/	97.58	/	white, powder
840913-1	/	97.66	/	white, powder
841111	/	98.22	/	white, powder
851102-3	/	97.31	/	white, powder
851102-4	/	96.63	/	white, powder
851002-3	/	96.66	/	white, powder
851001-3	/	95.25	/	white, powder
Upjohn Co*	2	97.04	2	colourless, oil

* S-pure product

本法为 *dl*-15-甲基 PGF_{2α} 及其甲酯的各种制剂的质量标准制订提供了基础, 为该类计划生育药物使用的安全有效提供了可靠的鉴别测定手段。

参 考 文 献

1. 刘志煜, 等. 从降冰片二烯合成 15-甲基前列腺素 F_{2α}. 科学通报 1981; 859.
2. 吴元鉴. 前列腺素结构改造研究的进展. 药学报 1984; 19:478.
3. 刘志煜. 我国前列腺素的合成及其抗生育研究. 生殖与避孕 1981; (2):3.
4. 吕湘林, 等. 前列腺素分析测定的现状. 药学报 1985; 20:650.

SEPARATION AND DETERMINATION OF *dl*-15-METHYL PGF_{2α} AND ITS METHYL ESTER BY HPLC

LU Xiang-Lin, WANG Xiu-Yun and CAO Xiu-Ling

(Shanghai Institute for Drug Control, Shanghai)

ABSTRACT The *dl*-15-methyl PGF_{2α} and its methyl ester are the derivatives of PGF. They are used clinically in very low dose and show great difference in biological activities with different configurations.

There are two epimer pairs of the 15-methyl (R & S), and C-5,6 (cis & trans).

After careful study of the chromatographic behaviours and configuration relationships between these epimers in various chemically bonded phases, which are amino-, cyano-, phenyl-, fluoroether-, C8-, and ODS, and compare the different components of the mobile phase, a reverse phase method using ODS column and methanol-water-acetic acid (130:100:0.125) as mobile phase is proposed.

This study also revealed that the UV max of PGF at shorter wavelength (max 195~197nm) can still be detected with enough sensitivity. The minimum detectable quantity is 0.03 μg with credibility.

A procedure of directly introducing the sample solution with internal standard (farrerol) into the chromatographic system and detecting by UV 195~197 nm was suggested. A good resolution between epimer R and S ($R_s > 3$), cis-and trans-isomer ($R_s > 1.5$) can be obtained.

The method exhibits very high accuracy ($CV < 3\%$) and can be used in a variety of their preparations, e.g. injections, suppositories and sponges (recovery > 99%).

Several epimer impurities had been separated by the established method in a number of "pure reference standard" of the Upjohn Company.

The analytical results showed that the white crystalline products from the Shanghai Institute of Organic Chemistry was very pure in which epimer was not detected.

Key words Prostaglandin; PGF_{2α}; *dl*-15-Methyl PGF_{2α}; 15-Methyl PGF_{2α} methyl ester; HPLC