

黄体酮阴道缓释凝胶有关物质的色谱-质谱结构鉴定

郝俊菊, 陈立, 宁曼如, 陆宇婷, 宋敏, 杭太俊*

(中国药科大学药物分析系, 南京 210009)

摘要 **目的:** 采用色谱-质谱联用技术鉴定黄体酮阴道缓释凝胶中的有关物质。**方法:** 采用 YMC-Triart C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 以乙腈-水为流动相梯度洗脱, 对黄体酮阴道缓释凝胶有关物质进行分离, 电喷雾正离子化-四极杆-飞行时间串联质谱 (ESI Q TOF MS) 在 5~45 eV 碰撞能下高分辨测定各有关物质母离子及其子离子的准确质量和元素组成, 并解析鉴定有关物质的结构。**结果:** 在所建立的分析条件下, 黄体酮及其有关物质分离良好, 检测并鉴定出黄体酮阴道缓释凝胶及其强制降解试验样品中 18 个主要有关物质, 其中 7 个为 EP 或已知杂质, 而其他均为本研究首次鉴定出的未知有关物质。色谱-质谱联用技术能有效地分离鉴定黄体酮阴道缓释凝胶中的有关物质。**结论:** 黄体酮在酸、碱、高温干法强制降解条件下不稳定, 且易形成氧化降解产物, 研究结果可为黄体酮阴道缓释凝胶质量控制提供参考依据。**关键词:** 黄体酮阴道缓释凝胶; 甾体; 强制降解; 有关物质; 结构鉴定; 色谱-质谱联用

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2024) 01-135-11

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0195

Structural identification of the related substances in progesterone sustained-release vaginal gel by LC-Q TOF MS

HAO Jun-ju, CHEN Li, NING Man-ru, LU Yu-ting, SONG Min, HANG Tai-jun*

(Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract **Objective:** To identify the related substances of progesterone sustained-release vaginal gel by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS). **Methods:** The separation was carried out on YMC-Triart C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3 μm) column by gradient elution using acetonitrile and water as the mobile phases. The accurate mass and elemental composition of the parent ions and their product ions of related substances were determined by electrospray-ionization quadrupole time-of-flight high resolution mass spectrometry (ESI Q TOF MS) at collision energies of 5-45 eV. The structures of the related substances were identified by spectral analysis. **Results:** Under the established analytical condition, progesterone and its related substances were adequately separated, and 18 major related substances were detected and identified by hyphenated techniques in progesterone sustained-release vaginal gel and their stressed samples. Among them, 7 were the impurities listed in the EP or previous reported, and the others were unknown related substances identified for the first time in this paper. The established LC-MS technique was effective for the separation and identification of the related substances of progesterone sustained-

* 通信作者 Tel: (025) 83271090; E-mail: hangtj@cpu.edu.cn

第一作者 Tel: (025) 83271090; E-mail: 3221010257@stu.cpu.edu.cn

release vaginal gel. **Conclusion:** Progesterone is unstable under acid, alkaline, and high-temperature stress conditions, and prone to produce oxidation degradants. The research results can provide a reference for the quality control of progesterone sustained-release vaginal gel.

Keywords: progesterone sustained-release vaginal gel; steroid; stressed degradation; related substances; structural identification; LC-MS

黄体酮(孕甾-4-烯-3,20-二酮)是天然的孕激素,在临床上主要用于治疗先兆性流产、黄体功能不全以及胚胎移植后的辅助生育等^[1-5]。黄体酮属于BCS IV类药物(低溶解度、低渗透性),目前,临床主要有口服、肌肉注射以及阴道3种给药方式。相比口服与肌注,阴道给予黄体酮,由于独特的“子宫首过效应”,可使药物有效富集于子宫部位,使其生物利用度显著提高^[6]。

虽然《中华人民共和国药典》和EP中均收录了黄体酮原料药及其注射剂的质量标准^[7-8],进口药物注册标准(CRID)中收录了其阴道缓释凝胶的质量标准,但是尚未见黄体酮杂质谱的系统研究报告^[9-10]。

本文通过强制降解试验并利用LC-Q TOF MS分析方法,实现黄体酮与有关物质的良好分离,并测定了黄体酮有关物质的准确相对分子质量及分子式,结合MS/MS的子离子特征、合成工艺路线与反应机理分析^[11-12],经综合解析鉴定了各有关物质的结构,可为黄体酮的质量控制提供参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津LCMS-9030液-质联用仪,Lab-Solutions数据处理系统(岛津公司);XS105DU十万分之一电子分析天平(METTLER TOLEDO公司);KH-250DB型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);TGL-16K型冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 试剂

黄体酮阴道缓释凝胶(API含量8%,中国药科大学自研,批号20230928-1);黄体酮对照品(含量99.6%,中国食品药品检定研究院,批号100027-201810);市售杂质对照品:6 α -羟孕酮(批号15565)、6 β -羟孕酮(批号13010)、杂质A(孕甾-4,14-二烯-3,20-二酮,批号12681)、杂质B[(20S)-羟基黄体酮,批号15568]、杂质D[(20S)-3-氧代孕甾-4-

烯-20-乙酸酯,批号15504]、杂质J(孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮,批号15505)、杂质K[孕甾-4,9(11)-二烯-3,20-二酮,批号19181]、杂质G(21-环己基-孕甾-4-烯-3,20-二酮,批号15569)、杂质M[(17 α)-孕甾-4-烯-3,20-二酮,批号15571]、杂质L[(17 β)-3-氧代孕甾-4,20-二烯-21-醛,批号15570]均购自中国深圳QCS公司,6Keto-黄体酮(批号0308-RD-0108)、杂质C[(20R)-羟基黄体酮,批号0809-RC-0057]、杂质E[(20R)-3-氧代孕甾-4-烯-20-乙酸酯,批号0809-RC-0059]、杂质H(孕甾-4,6-二烯-3,20-二酮,批号158-12-20)、杂质I[(20RS)-3-氧代孕甾-4-烯-21-醛,批号0820-RC-0001]均购自中国广州CATO公司,HPLC纯度均>92%。

盐酸、氢氧化钠和过氧化氢(AR级,南京化学试剂有限公司);乙腈、甲醇(HPLC级,Merck公司);碘化钠(HPLC级,萨恩化学技术有限公司);去离子水(市售娃哈哈纯净水)。

2 方法

2.1 溶液的配制

2.1.1 供试品溶液

取本品适量(约相当于黄体酮4 mg),精密称定,置于10 mL具塞试管中,加80%乙腈约3 mL,超声溶解,用80%乙腈稀释至刻度,摇匀,12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液,即得。

2.1.2 对照溶液

精密量取供试品溶液适量,用80%乙腈定量稀释制成每1 mL中约含黄体酮0.4 μ g的溶液,即得。

2.1.3 对照品溶液

取各杂质的对照品适量,分别精密称定,置同一10 mL量瓶中,加80%乙腈溶解并定量稀释成每1 mL中含各杂质均约为100 μ g的储备溶液。取黄体酮对照品适量,精密称定,置50 mL量瓶中,精密添加上述储备溶液1 mL,加80%乙腈溶解并定量稀释成每1 mL中含各杂质均约为2 μ g、黄体酮为400 μ g的

溶液,即得。

2.1.4 强制降解试验溶液

取本品适量(约相当于黄体酮 4 mg),精密称定,加甲醇 5 mL 后加 2 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL 并于室温放置 3.5 d;或加甲醇 5 mL 后加 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL 并于室温放置 12 h;或加 80% 乙腈 5 mL 后加 10% 过氧化氢溶液 1 mL 并于室温放置 14 d;或于 105 °C 烘箱中放置 3 d;或于 4 500 lx 光照放置 14 d;或加 80% 乙腈 5 mL 后于 105 °C 放置 14 d;或加 80% 乙腈 5 mL 后于 4 500 lx 光照放置 14 d。分别处理后放冷(酸碱处理溶液先中和),均以 80% 乙腈(酸碱处理溶液用甲醇)溶解并稀释至 10 mL,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,即得各强制降解试验溶液。同法配制空白溶液。

2.2 色谱-质谱条件

2.2.1 色谱方法

采用 YMC-Triart C₁₈(150 mm×4.6 mm, 3 μm) 色谱柱,以 50% 乙腈(A)-80% 乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(A-B):0 min(100:0)→20 min(100:0)→27 min(0:100)→45 min(0:100)→50 min(100:0)→55 min(100:0),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 241、286 nm,进样量 10 μL。

2.2.2 质谱条件

电喷雾正离子化,高分辨 Q TOF MS 检测,碘化钠溶液(400 μg·mL⁻¹)准确质量校正。喷雾电压 4.0 kV,

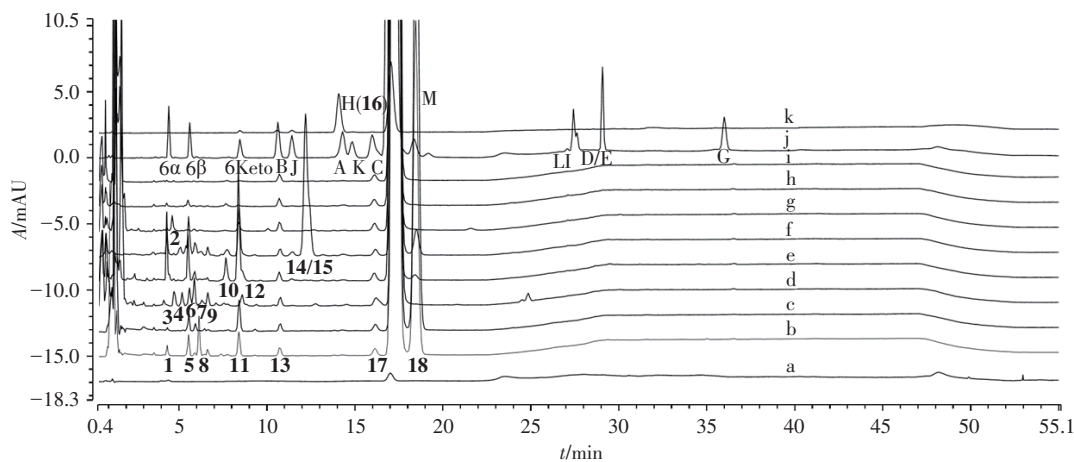
雾化氮气流量 3 L·min⁻¹,加热气流量 10 L·min⁻¹,干燥气流量 10 L·min⁻¹,氩气(CID)能量 5~45 eV,质量数扫描范围 m/z 50~1 000。

3 结果

3.1 有关物质检查

取供试品溶液、对照溶液、混合对照品溶液和强制降解试验溶液,按“2.2.1”项色谱条件进样检测,黄体酮阴道缓释凝胶及其强制降解试验溶液的 HPLC-UV 检测结果见图 1。采用 0.1% 自身稀释对照法计算各有关物质的含量[杂质 16(杂质 H)采用对照品外标法],按保留时间由小到大顺序对主要有关物质进行识别和编号。

强制降解试验的结果表明(表 1),本品在强酸、强碱和高温干法下均不稳定,全部降解条件下共分离并检出 18 个有关物质,研究建立的有关物质检查条件对于不同强制降解样品有关物质的检测均物料平衡。其中酸破坏形成 5 个降解杂质(1、5、8、11、18),碱破坏形成 4 个降解杂质(5、7、11、18),氧化破坏形成 6 个主要降解杂质(3、4、6、7、9、12),高温湿法破坏形成 5 个主要降解杂质(1、5、10、11、12),高温干法破坏形成 7 个主要降解杂质(1、5、7、11、14、15、18),光照湿法破坏形成 1 个主要降解杂质(2)。与未破坏供试品溶液(仅检测到已知杂质 13、16 和 17,含量均为 0.1%)比较,确定有关物质 2~4、6~10、12、14、15 为强制降解新增杂质。



a. 对照溶液(reference solution) b. 酸破坏溶液(acidic solution) c. 碱破坏溶液(alkaline solution) d. 氧化破坏溶液(oxidation solution) e. 高温湿法破坏溶液(wet heat solution) f. 高温干法破坏溶液(dry heat solution) g. 光照湿法破坏溶液(wet photolytic solution) h. 光照干法破坏溶液(dry photolytic solution) i. 供试品溶液(test sample solution) j. 241 nm 混合对照品溶液(mixture solution of references at 241 nm) k. 286 nm 混合对照品溶液(mixture solution of references at 286 nm)

图 1 黄体酮阴道缓释凝胶供试品溶液及强制降解试验溶液的 HPLC 有关物质检查图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of progesterone sustained-release vaginal gel and its stressed test solutions

表 1 黄体酮阴道缓释凝胶供试品溶液及其强制降解试验溶液物料守恒结果

Tab. 1 Mass balance of progesterone sustained-release vaginal gel and its stressed test solutions

破坏条件 (stress condition)	C/(mg · mL ⁻¹)	主峰面积 (area _{API})	总峰面积 (area _{total})	area _{total} /C	物料平衡比例 (mass balance ratio)
未破坏 (none)	5.184	211.245 2	211.489 9	40.80	/
高温干法破坏 (dry heat)	5.022	194.268 8	208.596 7	41.54	1.02
高温湿法破坏 (wet heat)	5.378	220.095 7	229.135 8	42.61	1.04
光照湿法破坏 (wet photolytic)	5.546	239.901 7	241.187 6	43.49	1.07
光照干法破坏 (dry photolytic)	5.444	211.380 4	216.878 6	39.84	0.98
氧化破坏 (oxidation)	5.470	248.408 3	251.299 9	45.94	1.13
碱破坏 (alkaline)	4.977	244.586 2	224.847 5	45.18	1.11
酸破坏 (acidic)	5.557	247.661 2	248.220 8	44.67	1.09

3.2 有关物质的结构鉴定

采用高分辨 Q TOF MS 检测各有关物质的母离子及子离子的准确质量和元素组成, 以及其二级质谱特征碎片, 由 LabSolutions Insight Explore 软件

预测得到母离子和碎片离子的元素组成。并通过与黄体酮及其已知杂质的质谱特征的对比分析, 鉴定各主要有关物质的结构。结果见图 2、3 和表 2。

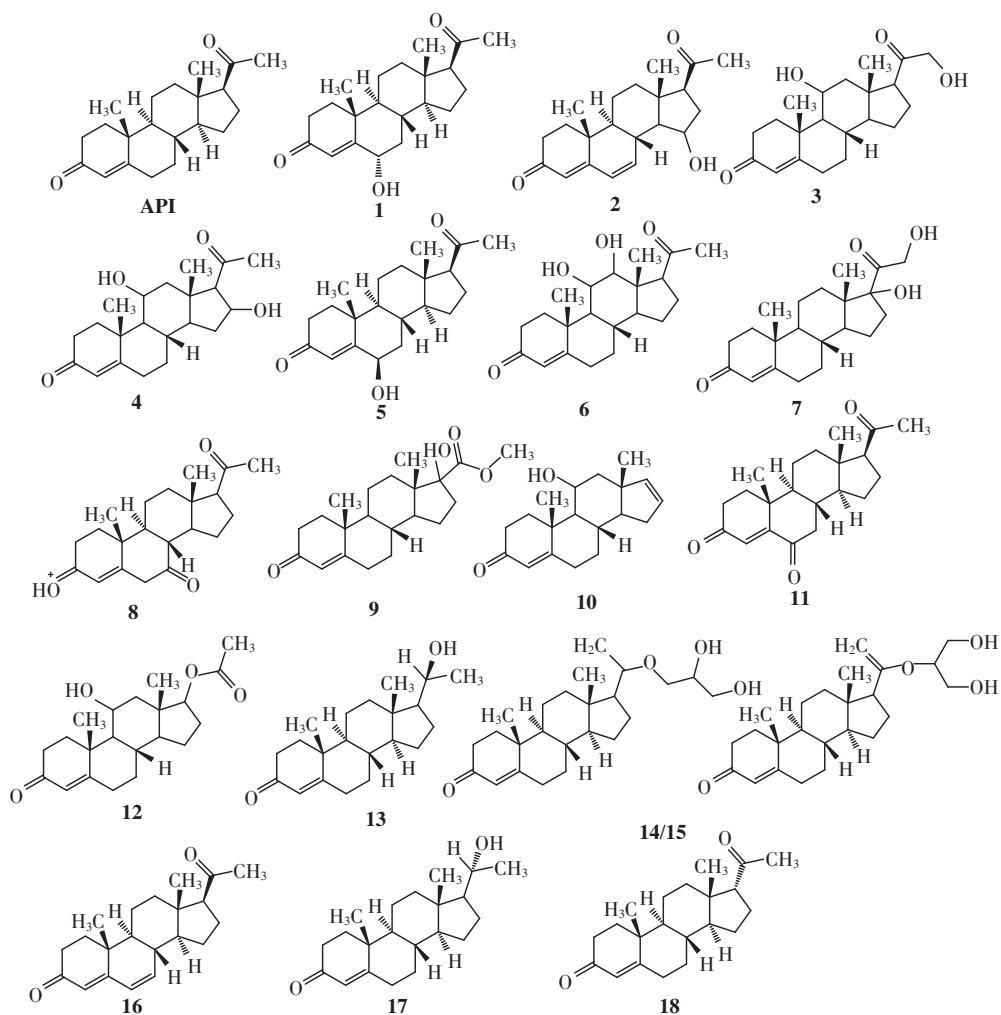


图 2 黄体酮及其有关物质 1-18 的化学结构

Fig. 2 Chemical structures of progesterone and its related substances 1-18

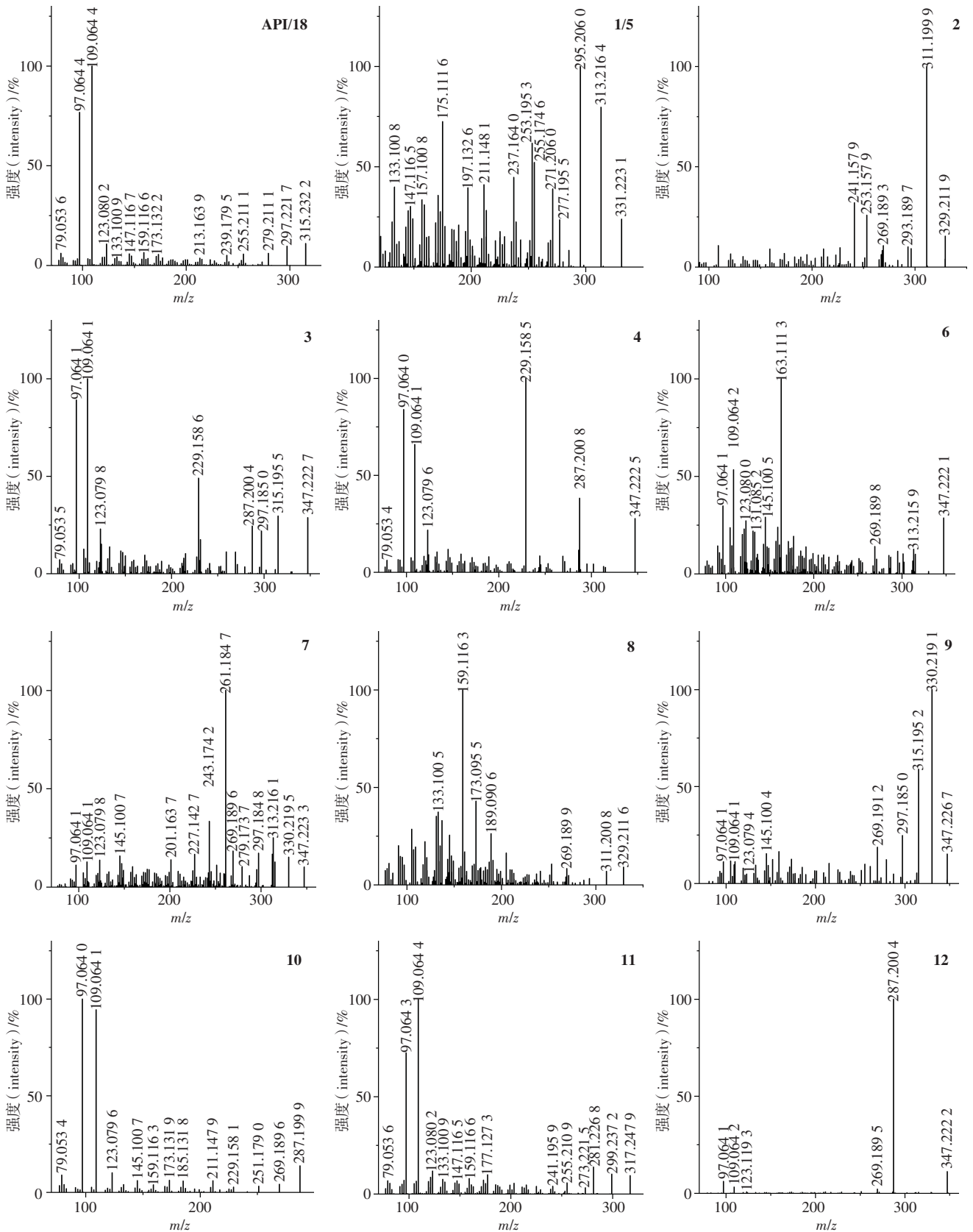


图 3 黄体酮及其有关物质 $[M+H]^+$ 离子的 MS/MS 谱图

Fig. 3 MS/MS spectra of progesterone and its related substance $[M+H]^+$ ions

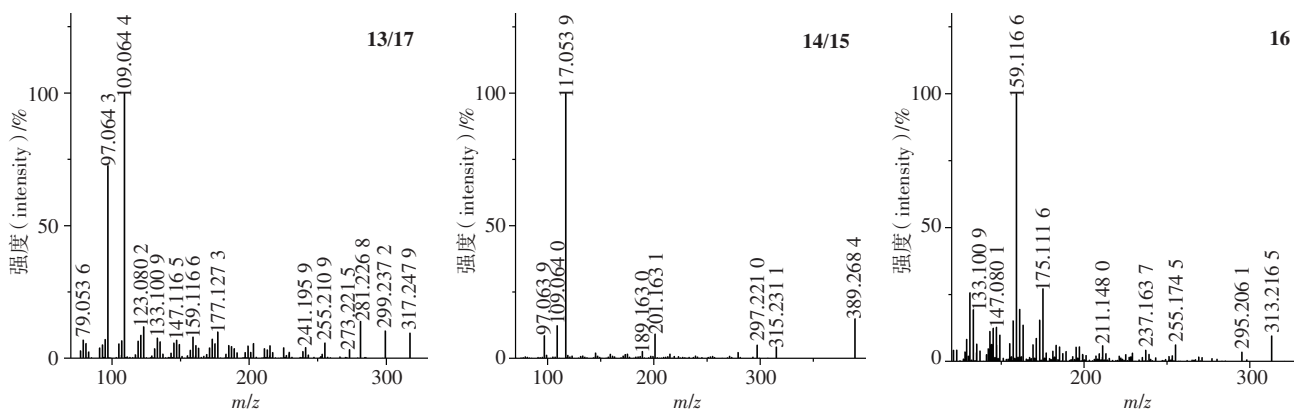


图3(续)

Fig. 3 (continued)

表2 黄体酮阴道缓释凝胶有关物质的 LC-Q TOF MS 鉴定结果

Tab. 2 Related substances identified in progesterone sustained-release vaginal gel by LC-Q TOF MS

编号 (code No.)	母离子 (parent ion) m/z	t_R /min	含量 (content) %	离子式 (ion formula)	Dif	碎片离子 (product ions) m/z	来源 (origin)
API	315.2319	17.26	/	$C_{21}H_{33}O_2^+$	1.21	297.2217, 279.2111, 255.2111, 239.1795, 213.1639, 173.1322, 159.1166, 147.1167, 133.1009, 123.0802, 109.0644, 97.0644, 79.0536	API
1 (CRID-6 α)	331.2270	4.30	0.19	$C_{21}H_{31}O_3^+$	0.85	313.2164, 295.2060, 277.1955, 271.2060, 255.1746, 253.1953, 237.1640, 211.1481, 197.1326, 175.1116, 157.1008, 147.1165, 133.1008	Dr
2	329.2111	4.60	0.07	$C_{21}H_{29}O_2^+$	1.64	311.1999, 293.1897, 269.1893, 253.1579, 241.1579	Dr
3	347.2218	4.71	0.07	$C_{21}H_{31}O_4^+$	0.35	315.1955, 297.1850, 287.2004, 229.1586, 123.0798, 109.0641, 97.0641, 79.0535	Dr
4	347.2217	5.18	0.06	$C_{21}H_{31}O_4^+$	0.46	287.2008, 229.1585, 123.0796, 109.0641, 97.0640, 79.0534	Dr
5 (CRID-6 β)	331.2272	5.51	0.15	$C_{21}H_{31}O_3^+$	1.39	313.2176, 295.2090, 277.1947, 271.2116, 255.1775, 253.1979, 237.1671, 211.1541, 197.1358, 175.1159, 157.1040, 147.1177, 133.1031	Dr
6	347.2217	5.60	0.07	$C_{21}H_{31}O_4^+$	0.23	313.2159, 269.1898, 163.1113, 145.1005, 131.0852, 123.0800, 109.0642, 97.0641	Dr
7	347.2217	5.87	0.11	$C_{21}H_{31}O_4^+$	0.20	330.2195, 313.2161, 297.1848, 279.1737, 269.1896, 261.1847, 243.1742, 227.1427, 201.1637, 145.1007, 123.0798, 109.0641, 97.0641	Dr
8	329.2110	6.14	0.14	$C_{21}H_{29}O_3^+$	1.49	311.2008, 269.2899, 189.0906, 173.0955, 159.1163, 133.1005	Dr
9	347.2217	6.64	0.05	$C_{21}H_{31}O_4^+$	0.58	330.2191, 215.1952, 297.1850, 269.1912, 145.1004, 123.0794, 109.0641, 97.0641	Dr
10	287.2041	7.67	0.14	$C_{20}H_{31}O^+$	1.81	269.1896, 251.1790, 229.2581, 211.1479, 185.1318, 173.1319, 159.1163, 145.1007, 123.0796, 109.0641, 97.0640, 79.0534	Dr
11 (CRID-6Keto)	329.2111	8.38	0.57	$C_{21}H_{29}O_3^+$	0.18	311.2008, 293.1906, 269.1905, 253.1588, 251.1797, 209.1326, 173.0960, 159.1165, 145.1010, 133.1010	Dr
12	347.2217	8.59	0.08	$C_{21}H_{31}O_4^+$	0.61	287.2004, 269.1895, 123.1193, 109.0642, 97.0641	Dr
13 (EP-B)	317.2477	10.70	0.05	$C_{21}H_{33}O_2^+$	0.60	299.2372, 281.2268, 273.2215, 255.2109, 241.1959, 177.1273, 159.1166, 147.1165, 133.1009, 123.0802, 109.0644, 97.0643, 79.0536	Pr
14	389.2697	12.19	1.19	$C_{24}H_{37}O_4^+$	2.72	315.2311, 297.2210, 201.1631, 189.1630, 117.0539, 109.0640, 97.0639	Dr

表 2(续)

编号 (code No.)	母离子 (parent ion) m/z	t_R/min	含量 (content) %	离子式 (ion formula)	Dif	碎片离子 (product ions) m/z	来源 (origin)
15	389.269 7	12.45	0.28	$C_{24}H_{37}O_4^+$	2.62	315.231 4, 297.220 9, 201.163 2, 189.163 2, 117.053 9, 109.064 0, 97.064 0	Dr
16(EP-H)	313.216 2	14.23	0.22	$C_{21}H_{29}O_2^+$	0.83	295.206 1, 255.174 5, 211.148 0, 175.111 6, 159.116 6, 147.080 1, 133.100 9	Pr/Dr
17(EP-C)	317.247 7	16.31	0.06	$C_{21}H_{31}O_2^+$	0.66	299.237 2, 281.226 7, 273.221 4, 255.211 0, 241.195 9, 177.127 2, 159.116 6, 147.116 5, 133.100 8, 123.080 1, 109.064 4, 97.064 3, 79.053 6	Dr
18(EP-M)	315.232 0	18.45	6.15	$C_{21}H_{31}O_2^+$	0.41	297.224 9, 279.214 1, 255.213 3, 239.182 2, 213.166 2, 173.134 3, 159.118 4, 147.118 3, 133.102 5, 123.081 7, 109.065 8	Dr

注 (note): Dif: 测得质谱离子质量误差 (MS difference as parts per millium); Pr: 工艺有关物质 (process related substance); Dr: 降解有关物质 (degradation related substance)

3.3 已知有关物质的确证

通过液相色谱定位及质谱定性,并与市售对照品对比鉴定各已知有关物质的结构。结果表明,有关物

质 1、5、11、13、16、17、18 分别与已知杂质 6 α -羟孕酮、6 β -羟孕酮、6Keto-黄体酮、EP-B、EP-H、EP-C 和 EP-M 的结构相应。

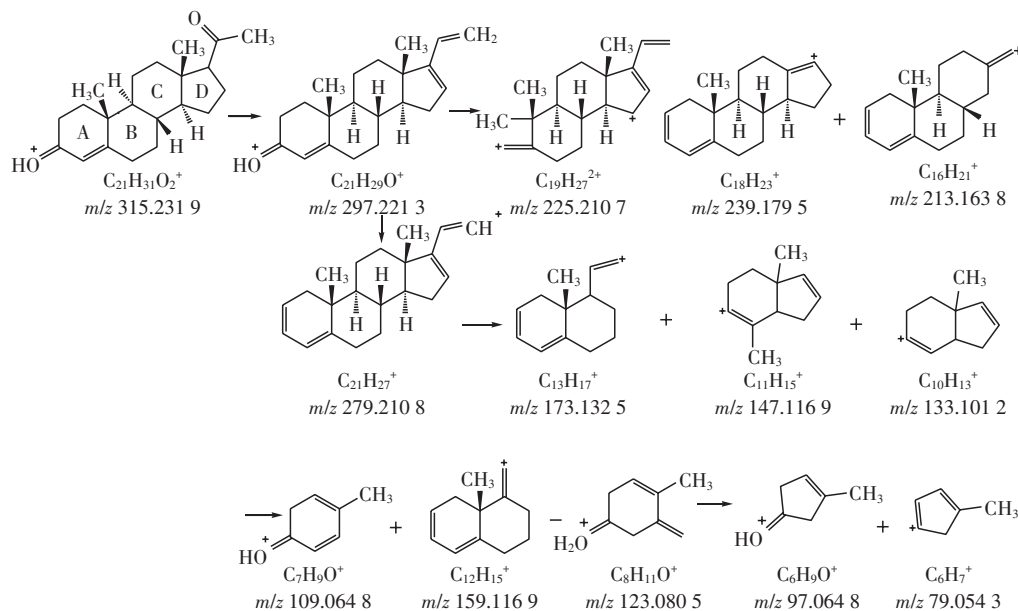


图 4 黄体酮 $[M+H]^+$ 离子的质谱裂解途径

Fig. 4 Progesterone $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

对黄体酮和各已知有关物质的一级质谱母离子准确质荷比、二级质谱特征碎片离子和裂解途径分析,以黄体酮为例(图 4),发现黄体酮及已知有关物质 MS/MS 裂解规律如下:

① 黄体酮、EP-B、EP-C 和 EP-M,化学结构上 A 环和 B 环母核完全一致,产生 m/z 79、97、109、123、133、147、159 碎片离子。

② 黄体酮、EP-M 结构上 3 位和 20 位各有 1 个

羰基;EP-B、EP-C 结构的 3 位上有 1 个羰基,20 位上有 1 个羟基。均生成质量数少 18 和 36 的特征碎片离子,说明分子连续脱了 2 个分子的 H_2O 。

③ 黄体酮和 EP-M、6 α -羟孕酮、6 β -羟孕酮、6Keto-黄体酮 20 位上均有羰基,且 2 个 γ 位上均有 H 原子,分子易发生 McLafferty 重排。

④ 黄体酮及其有关物质母核中均含环状 α 、 β -不饱和酮结构,易在裂解中失去乙烯酮 ($CH_2=C=O$)。

⑤ 黄体酮及其有关物质甾体母核易发生环断裂,环断裂位点取决于环上的取代基。

根据黄体酮及已知有关物质的这些结构特征,并结合已有报道文献分析,可以辅助其未知有关物质结构的分析鉴定^[13-14]。

3.4 未知有关物质的确证

对于各未知有关物质,根据其 HPLC 保留行为、DAD 图谱和黄体酮已知有关物质的差异,结合合成和制剂工艺路线分析,可鉴定结构。

有关物质 **2** 是光照湿法降解产物,有关物质 **8** 是酸碱降解产物。测得有关物质 **2** 和 **8**[M+H]⁺ 的准确质量分别为 329.211 9、329.211 6,均与离子式 [C₂₁H₂₉O₃]⁺ 相应,与黄体酮相比少 2 个 H,多 1 个 O。其中有关物质 **2** 根据 DAD 光谱(图 5)显示其与有关物质 **16** 具有趋同性,说明结构上有双键与 4 位双键形成共轭结构,由 α,β- 不饱和羰基化合物的紫外吸收光谱规律可知,有关物质 **2** 结构上为环外双烯(同环二烯的最佳紫外吸收波长应大于 300 nm);有关物质 **2** 出峰时间约 4.5 min,保留较弱,说明其结构

上有羟基使其极性增大,且碎片离子中 *m/z* 241.157 9 (C₁₇H₂₁O⁺) 说明羟基在 15 位;综上推断有关物质 **2** 为黄体酮被氧化生成的降解产物:6-烯-15-羟基黄体酮。其 MS/MS 主要碎片离子 *m/z* 311.199 9 (C₂₁H₂₇O₂⁺)、*m/z* 269.189 3 (C₁₉H₂₅O⁺) 分别与 [M+H]⁺ 中性丢失 H₂O、H₂O 和 乙烯酮 (CH₂=C=O) 相对应,碎片离子 *m/z* 293.189 7 (C₂₁H₂₅O⁺)、*m/z* 253.157 9 (C₁₈H₂₁O⁺)、*m/z* 241.157 9 (C₁₇H₂₁O⁺) 分别与 *m/z* 311.199 9 中性丢失 H₂O、丙酮、McLafferty 重排后丢失甲基乙烯酮 (CH₃COCH=CH₂)。

有关物质 **8** 无 *m/z* 97、109、123 碎片离子,推断 A 环和 B 环上存在取代基;与有关物质 **11** 相比,有关物质 **8** 的最佳紫外吸收蓝移(图 5),推断其不是有关物质 **11** 的差向异构体;且有关物质 **8** 出峰时间晚于有关物质 **5**,推断其结构上比黄体酮多 1 个羰基结构;综上推断有关物质 **8** 为黄体酮 7 位被氧化生成的降解产物:7-羰基-黄体酮。有关物质 **8** 的裂解规律与黄体酮一致,主要为环断裂和中性丢失 H₂O (图 6)。

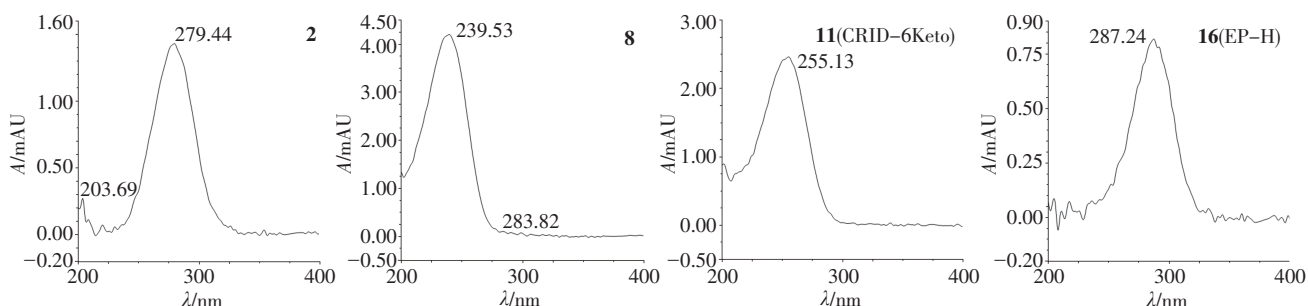


图 5 有关物质 **2**、**8**、**11** 和 **16** 的 DAD 谱图

Fig. 5 DAD spectra of related substances **2**, **8**, **11** and **16**

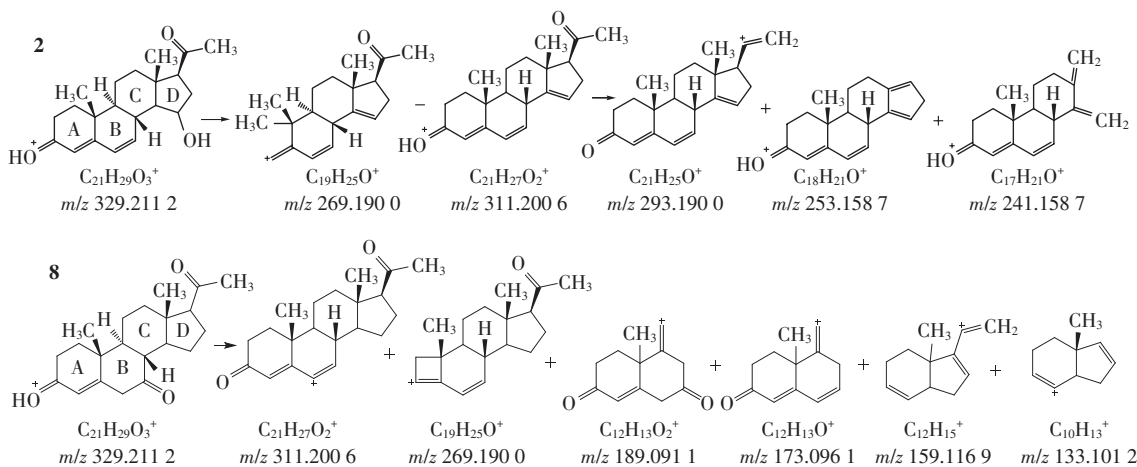


图 6 有关物质 **2** 和 **8**[M+H]⁺ 离子的质谱裂解途径

Fig. 6 Related substances **2** and **8**[M+H]⁺ ion MS/MS fragmentation pathways

有关物质 **3**、**4**、**6**、**7**、**9**、**12** 均是氧化降解产生的杂质。测得其 $[M+H]^+$ 的准确质量分别为 347.222 7、347.222 5、247.222 1、347.223 3、347.226 7、347.222 2，均与离子式 $[C_{21}H_{31}O_4]^+$ 相应，为同分异构体，与黄体酮元素组成相比多了 2 个 O。所以，在黄体酮结构中，存在多个易被氧化降解的位点，潜在多种氧化产物结构，结合文献中提到容易氧化的位点分别为 C-5 位、C-6 位、C-11 位以及 C-20 位^[15] 和二级质谱区别确证氧化位点。其中有关物质 **3**、**4**、**6**、**7**、**9**、**12** 均有 m/z 97.05、 m/z 109.06、 m/z 123.08 碎片离子，说明 A 环和 B 环结构与黄体酮一致，其 6 位和 7 位无取代基，有关物质 **3**、**4**、**6**、**7**、**9**、**12** 结构见图 2，以有关物质 **3** 和 **4** 为代表进行详细解析。

有关物质 **3** 和 **4** 的 MS/MS 都有碎片离子 $C_{19}H_{27}O_2^+$ (m/z 287.20)、 $C_{16}H_{21}O^+$ (m/z 229.16)，说明结构中 11 位为羟基取代。其中有关物质 **3** 有碎片离子 $C_{20}H_{27}O_3^+$ (m/z 315.195 5) 与 $[M+H]^+$ 相比质量数少了 32，根

据中性丢失规律，该过程为中性丢失甲醇 (CH_3OH) 或者同时丢失甲基自由基和羟基自由基。结合出峰时间推断有关物质 **3** 是黄体酮结构中孕甾体结构上 12 位和 21 位被氧化成羟基取代的降解杂质：12, 21-二羟基黄体酮。其碎片离子 $C_{20}H_{27}O_3^+$ (m/z 315.195 5)、 $C_{20}H_{25}O_2^+$ (m/z 297.185 0) 分别与 $[M+H]^+$ 中性丢失 CH_3OH 、进一步中性丢失 H_2O 相对应。

有关物质 **4** 与有关物质 **3** 相比，无碎片离子 $C_{20}H_{27}O_3^+$ (m/z 315.195 5)、 $C_{20}H_{25}O_2^+$ (m/z 297.185 0)，说明 17 位支链不同。有关物质 **4** 特征碎片离子为 $C_{16}H_{21}O^+$ (m/z 229.158 5)，说明 16 位有羟基取代， $C_{16}H_{21}O^+$ (m/z 229.158 5) 与 $[M+H]^+$ 中性丢失 H_2O 、发生 2 次 McLafferty 重排并丢失乙烯酮相应。所以，推断有关物质 **4** 是黄体酮孕甾体结构上 11 位和 16 位被氧化成羟基取代的降解杂质：11, 16-二羟基黄体酮。它们的二级质谱裂解过程见图 7。

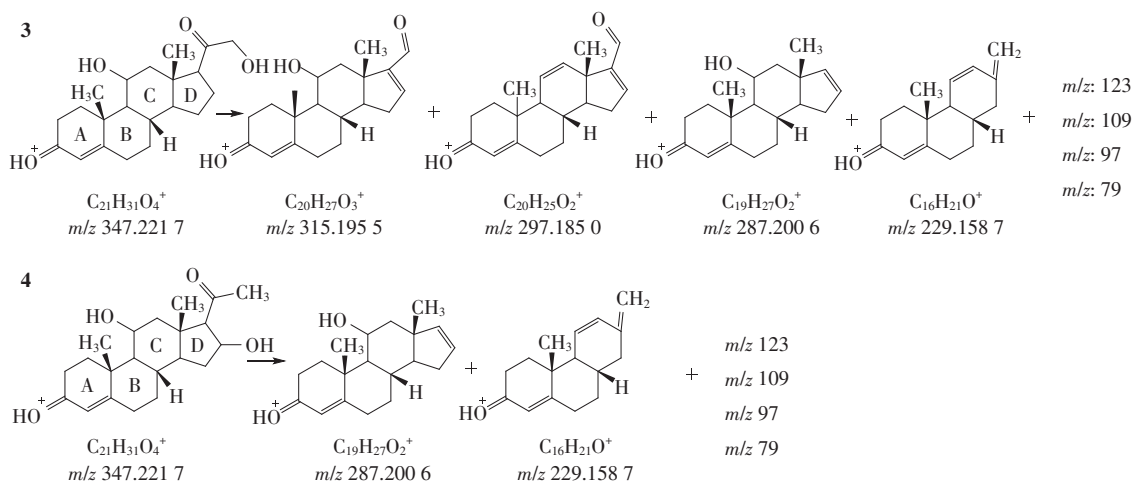


图 7 有关物质 **3** 和 **4** $[M+H]^+$ 离子的质谱裂解途径

Fig. 7 Related substances **3** and **4** $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

有关物质 **10** 是高温干法产生的降解杂质，同时也是高温湿法产生的降解杂质，说明该有关物质易在高温条件下产生。测得有关物质 **10** $[M+H]^+$ 的准确质量为 287.199 9，与离子 $[C_{19}H_{27}O_2]^+$ 相应，与黄体酮相比少了 2 个 C 和 2 个 H；其保留相对较弱 (7.7 min 出峰) 极性略大，推测被羟基化降解。主要碎片离子为 $C_8H_{11}O^+$ (m/z 123.079 6)、 $C_7H_9O^+$ (m/z 109.064 1)、 $C_6H_9O^+$ (m/z 97.0640)、 $C_6H_7^+$ (m/z 79.0534)，表明其 A 环和 B 环结构与黄体酮一致。所以，推断有关物质 **10** 是黄体酮结构 11 位被羟基取代、17 位乙酰基消

除而生的降解杂质：11-羟基-15-烯-17-去乙酰基-黄体酮 (图 8)。

有关物质 **14** 和 **15** 是高温干法降解易产生的降解杂质。测得其 $[M+H]^+$ 的准确质量分别为 389.268 4、389.268 3，均与离子 $[C_{24}H_{37}O_4]^+$ 相对应，与黄体酮相比多了 3 个 C、6 个 H、2 个 O。二者裂解碎片一致，保留时间相近，推测二者为 20 位酮羰基与甘油缩合形成不同醚结构的杂质。MS/MS 碎片离子中均有 $C_7H_9O^+$ (m/z 109.06)、 $C_6H_7^+$ (m/z 79.05)，说明 A 环和 B 环结构与黄体酮一致。主要碎片离子 $C_{21}H_{31}O_2^+$

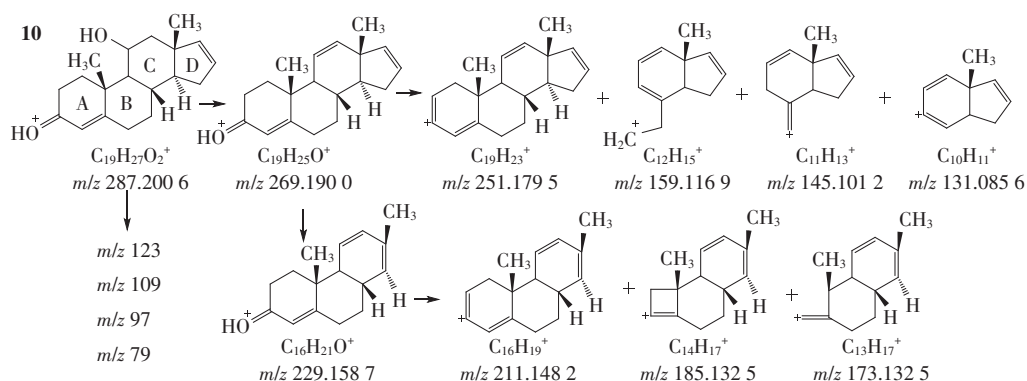


图 8 有关物质 10[M+H]⁺ 离子的质谱裂解途径

Fig. 8 Related substance 10[M+H]⁺ ion MS/MS fragmentation pathways

(*m/z* 315.231 1)、C₅H₉O₃⁺ (*m/z* 117.053 9) 分别与 [M+H]⁺ 醚键断裂、17 位支链断裂相对应。碎片离子 C₁₉H₂₃O⁺ (*m/z* 297.221 0)、C₁₅H₂₁⁺ (*m/z* 201.163 1)、C₁₄H₂₁⁺ (*m/z* 189.163 0) 分别与 *m/z* 315.231 1 中性丢失 H₂O、进一

步发生 2 次 McLafferty 重排并中性丢失乙炔和羰基、或进一步在 B 环 (9 位, 5 位) 相应。所以, 推断有关物质 14 和 15 是黄体酮 20 上羰基与辅料中甘油发生亲核反应的降解杂质^[16] (图 9)。

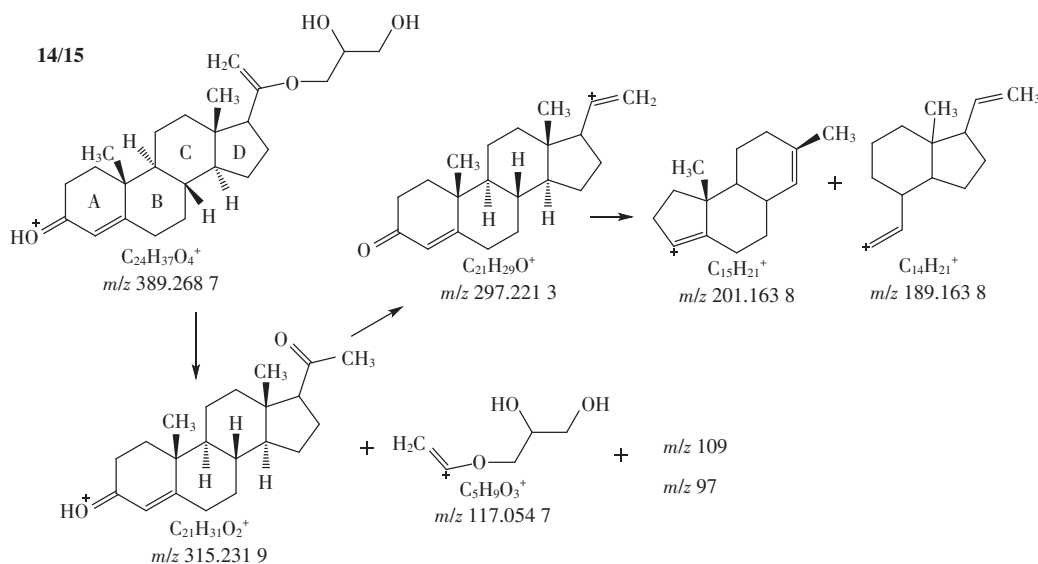


图 9 有关物质 14 和 15[M+H]⁺ 离子的质谱裂解途径

Fig. 9 Related substances 14 and 15[M+H]⁺ ion MS/MS fragmentation pathways

4 讨论

在本研究建立的 LC-Q TOF MS 的分析方法下, 黄体酮与各有关物质获得有效分离, 共检测出 18 个杂质, 其中有关物质 13、16、17、18 分别与 EP 中 B、H、C、M 一致; 有关物质 1、5、11 分别与 CRID 中 6 α -羟孕酮、6 β -羟孕酮、6Keto-黄体酮一致; 其余 11 个有关物质 (2、3、4、6、7、8、9、10、12、14、15) 均为本文首次研究鉴定。

试验结果表明, 黄体酮结构上存在多个氧化位

点, 易在各个条件下发生氧化反应。其中, 高温、酸降解条件下易在 6 位上氧化形成有关物质 1、5、11, 碱降解条件下易在 6 位氧化形成 5、11; 氧化降解条件下, 易发生氧化生成有关物质 3、4、6、7、9, 且辅料中山梨酸易断裂形成乙酸参与黄体酮降解, 发生酯化反应生成有关物质 12; 在光照湿法降解条件下, 易发生氧化反应生成有关物质 2; 在酸降解条件下, 易发生氧化反应生成有关物质 8; 在高温干法降解条件下, 易发生氧化反应生成有关物质 10; 在工艺过程中易

发生氧化反应产生有关物质 **13**、**16**、**17**，其中有关物质 **16** 在碱、高温干法、光照干法降解条件有较为明显增加。在高温干法降解条件下，黄体酮与辅料中的甘油发生亲核反应、脱水反应生成有关物质 **14** 和 **15**。在酸、碱、高温干法降解条件下，黄体酮结构易在 **17** 位发生异构化生成有关物质 **18**。

综上所述，黄体酮在酸、碱、高温干法条件下不稳定，且易发生氧化反应，因此需要注意避酸、避碱、常温密封储存。同时，应注意控制关键制备工艺，并建立相关指标为质量把关^[17]。

参考文献

- [1] RENZE GCD, TOSTO V, TSIBIZOVA V, *et al.* Prevention of preterm birth with progesterone [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(19): 4511
- [2] BULLETTI C, BULLETTI FM, SCIORIO R, *et al.* Progesterone: the key factor of the beginning of life [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 14138
- [3] JULIA SB. Progesterone orchestrates foetal-maternal interactions in pregnancy [J]. *J Reprod Immunol*, 2023, 159: 14
- [4] BERGHELLA V, GULERSEN M, ROMAN A, *et al.* Vaginal progesterone for the prevention of recurrent spontaneous preterm birth [J]. *Am J Obstet Gynecol MFM*, 2023, 5(10): 101116
- [5] BOYNUKALIN FK, ABALI R, GULTOMRUK M, *et al.* Subcutaneous progesterone administration provides a similar ongoing pregnancy rate compared with intramuscular progesterone administration in hormone replacement therapy frozen embryo transfer cycles [J]. *F S Rep*, 2022, 4(2): 165
- [6] 王玥,程艺,刘原兵,等. 黄体酮新剂型及其制备方法研究进展 [J]. *药学学报*, 2022, 57(2): 353
WANG Y, CHENG Y, LIU YB, *et al.* Research progress on new dosage forms of progesterone and its preparation methods [J]. *Acta Pharm Sin*, 2022, 57(2): 353
- [7] 中华人民共和国药典 2020 年版·二部 [S]. 2020: 1438
ChP 2020. Vol II [S]. 2020: 1438
- [8] EP 11.2. Vol II [S]. 2023: 3804
- [9] 邱顺晨,姚小东,刘振齐,等. 黄体酮阴道环中有关物质检测的方法学研究 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2018, 26(1): 21
QIU SC, YAO XD, LIU ZQ, *et al.* The methodology study of the related substances detection in compound progesterone vaginal ring [J]. *Chin J Fam Plann*, 2018, 26(1): 21
- [10] 高娟,唐素芳. 高效液相色谱法测定黄体酮的有关物质 [J]. *中国药品标准*, 2010, 11(1): 29
GAO J, TANG SF. Determination of related substances of progesterone by HPLC [J]. *Drug Stand China*, 2010, 11(1): 29
- [11] 贺一君,潘高峰,系祖斌. 黄体酮合成新工艺研究 [J]. *广东化工*, 2016, 43(4): 43
HE YJ, PAN GF, XI ZB. New synthetic process of progesterone [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2016, 43(4): 43
- [12] DE BRABANDER DH, VERHEYDEN K, MORTIER V, *et al.* Phytosterols and anabolic agents versus designer drugs [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 586(1-2): 49
- [13] 贾帅龙. 基于 LC-MS/MS 技术的姜黄素类化合物系统表征及内源性含羰基甾体激素定性分析 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2021: 94
JIA SL. Systematic Characterization of Curcuminoids and Qualitative Analysis of Endogenous Carbonyl-Containing Steroid Hormones Based on LC-MS/MS [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2021: 94
- [14] JENKINS D, HARMON CL, JIA X, *et al.* Forced degradation studies of medroxyprogesterone acetate injectable suspensions (150 mg/ml) with implementation of HPLC, mass spectrometry, and QSAR techniques [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 187: 113352
- [15] 董伟. 19-羟基孕酮的合成及应用研究 [D]. 青岛: 青岛科技大学, 2020: 3
DANG W. Synthesis and Application of 19-Hydroxyprogesterone [D]. Qingdao: Qingdao University of Science and Technology, 2020: 3
- [16] 黄慧青. 黄体酮阴道缓释凝胶的药学研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2016: 29
HUANG HQ. Pharmaceutical Research of Sustained-Release Progesterone Vaginal Gel [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2016: 29
- [17] 王李杰,林冬香,朱米群,等. 阿昔洛韦片有关物质的 LC-Q-TOF/MS 鉴定 [J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(8): 1381
WANG LJ, LIN DX, ZHU MQ, *et al.* Identification of the related substances in acyclovir tablets by LC-Q-TOF/MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(8):1381

(本文于 2024 年 3 月 25 日收到)