

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

共軛雌性激素之分析研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-038-034-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：臺北醫學大學藥學系(所)

計畫主持人：陳繼明

計畫參與人員：洪志平

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 2 月 16 日

**共軛雌性激素之分析研究**  
**臺北醫學大學藥學系 陳繼明及洪志平**

**中文摘要**

共軛雌性激素為目前臨床更年期症狀最常用之藥物，含有多種雌激素混合物，來自動物或植物。為確立藥品之品質急需研發一種可靠精確之分析方法，可同時定量共軛雌性激素內十種成分為本研究主要目的。檢品以硫酸酯酶先行水解成為游離態之雌激素，加入內標物質 estriol 後以液相高壓層析法進行分析，經逆相 C18 為層析管柱分離而以 0.22M 硝酸銀水溶液-氯甲烷(60:40)為移動相於紫外光 280nm 檢測之下，可完全分離 estrone(1)、equilin(2)、equilenin(3)、 $\Delta^{8,9}$ -dehydroestrone(4)、17 $\alpha$ -estradiol(5)、17 $\beta$ -estradiol(6)、17 $\alpha$ -dihydroequilin(7)、17 $\beta$ -dihydroequilin(8)、17 $\alpha$ -dihydroequilenin(9) 及 17 $\beta$ -dihydroequilenin(10)等十種雌激素，各成分之解析度均達 1.2 以上，分析方法之確效經驗證後應用於市售藥品，本新開發之分析方法具有良好之分離效果及再現性。

**中文關鍵字：**共軛雌性激素、液相高壓層析法、定量方法確效、分離效果及再現性。

**English Abstract**

Conjugated estrogens is widely used for menopausal women in clinics. It contained a mixture of sulfate conjugated estrogen derived from animals or plants. This research is to explore the use of HPLC to determine ten conjugated estrogens. The test samples were hydrolyzed by sulfatase and mixed with internal standard of estriol. The samples were chromatographed on a reverse-phase ODS column, eluted by a mobile phase of 0.22M AgNO<sub>3</sub> solution - CH<sub>3</sub>CN (60:40) and monitored at UV of 280 nm. This HPLC method could simultaneously make the baseline separation of ten compounds -- estrone(1)、equilin(2)、equilenin(3),  $\Delta^{8,9}$ -dehydroestrone(4); 17 $\alpha$ -estradiol(5)、17 $\beta$ -estradiol(6)、17 $\alpha$ -dihydroequilin(7)、17 $\beta$ -dihydroequilin(8)、17 $\alpha$ -dihydroequilenin(9) and 17 $\beta$ -dihydroequilenin(10). Application of this method to assay of conjugated estrogens in the bulk drug and their preparation was proved to be accurate and reproducible.

**Keywords :** conjugated estrogens; HPLC assay; assay validation; resolution and reproducibility.

**一、前言**

女性更年期因雌激素急劇減少或不再分泌，對健康均有影響，常有月經不順、心悸、失眠、盜汗、潮紅、焦慮等症狀，甚至增加骨質疏鬆、心血管疾病及老人癡呆症機率。如何減輕及治療更年期症狀是現代醫學議題<sup>1,2</sup>。雌激素補充療法可保持荷爾蒙穩定而減輕或避免更年期症狀。目前臨床用來紓解更年期症狀之藥物分為二大類：(1)天然雌激素，包括動物性激素，有 estrone、estrodial、estriol 及共軛雌性激素(conjugated estrogens)等，來源為雌馬或人尿抽取。目前以 Premarin<sup>3,4</sup>為主，用量甚多佔美國銷售量前十名內，台灣對共軛雌性激素製劑使用量亦相當多，通常以口服錠，陰道乳膏，凍晶靜脈注射等使用。(2)合成雌激素：如 ethinylestradiol, mestranol 及 diethylstilbestrol 等。美國藥典第 24 版<sup>5</sup>收載 conjugated estrogens，為混合藥物，至少含 estrone(1)、equilin(2)、equilenin(3)

、 $\Delta^{8,9}$ -dehydroestrone(4)； $17\alpha$ -estradiol(5)、 $17\beta$ -estradiol(6)、 $17\alpha$ -dihydroequilin(7)、 $17\beta$ -dihydroequilin(8)、 $17\alpha$ -dihydroequilenin(9)及  $17\beta$ -dihydroequilenin(10)等十種 sulfate conjugates 成分並有訂有含量規格；所含 conjugated estrogens 為 79.5~88.0%，另外 free steroids 總含量不可多於 1.3%。USP 24 版係以氣相層析法定量，檢體製備包括酵素水解、萃取、衍生化反應步驟，而以熔合矽膠毛細管柱併用火焰離子檢測器偵測。文獻記載有比色法<sup>6</sup>，氣相層析法<sup>7~13</sup>，高效液相層析法<sup>14~22</sup>。共軛雌性激素除動物來源外，USP 也認定由植物來源經化學合成而經混合所得。因植物來源及製程之差異，品質雖能符合規格要求，但均質性及安定性仍與動物原料不同，故植物原料之製劑，其含量均一度需加評估。植物所含成分與動物來源並未完源吻合，特別 sodium  $\Delta^{8,9}$ -dehydroestrone(10) sulfate<sup>23,24</sup> 為動物獨特指標成分。動物來源常因品種、年齡、飼料，採收時間不同而含量有所改變，USP 已訂立 conjugated estrogens 和 esterified estrogens 錠劑規格，除含量及鑑別外，sodium equilin sulfate 與 sodium estrone sulfate 兩者比例必須介於 0.35 ~ 0.65 及 0.071 ~ 0.2 之間。因比色法易干擾且操作繁瑣並缺專一性。氣相層析法雖較靈敏且專一性高，但需衍生反應，而 HPLC 尚未有完全分離十種成分報告。目前 USP 氣相層析法，檢體配製步驟需先衍生反應，分析條件仍需調整才有滿意結果，標準品僅用 1、2 及 6 於定量及定性，尚利用 1 標準品推算預估 3、5、8、9 及 10 之含量，並以 4 及 7 波峰相對滯留時間及反應值與 6 比較而預估含量。本研究擬運用液相層析方法開發出一種簡便精準分析方法，可同時定性及定量 conjugated estrogens 之十種成分，並應用相關製劑之分析，了解製劑品質及保障使用之安全及療效。

## 二、材料與方法

### 高效液相層析系統

Agilent 1100 Series (HP, U.S.A.); 雙幫浦: G1312A(HP, U.S.A.); 自動注入器: G1329A (HP, U.S.A.); UV 檢測器: G1365A (HP,U.S.A.); 紀錄器: HP Chemstation (HP, U.S.A.); 層析管柱: Inertsil 5 ODS-2 4.6 × 250 mm (GL Sciences, Japan.); 耐酸鹼層析管柱: SMT 4.6×250 mm B226B OD-5-100 C18。

### 標準品及檢體之來源

Equilin(2),  $17\beta$ -dihydroequilin(7),  $17\alpha$ -dihydroequilenin(8),  $17\beta$ -dihydroequilenin(9),  $\Delta^{8,9}$ -dehydroestrone(10)標準品由 Wyeth-Ayerst (NY, U.S.A.)惠贈。其他標準品購自 Sigma。共軛雌性激素原料及口服錠係由生達、中外、皇佳、東洋製藥公司及肯化公司贈送。原開發廠口服錠及凍晶注射劑係由衛生署藥物食品檢驗局贈送。

### 標準品溶液之配製

分別精稱 1~10 及 estriol 等標準品以甲醇溶解定容成為 1000  $\mu\text{g/mL}$ 。分別量取 3、4、5、7、8、9 各 1.0 mL 及 10、estriol 各 0.5 mL 以甲醇稀釋而至 10.0 mL，而使 3、4、5、7、8、9 各為 100 $\mu\text{g/mL}$  及 10、estriol 各為 50  $\mu\text{g/mL}$  之第二標準品儲備溶液。精取 estriol 標準品儲備溶液 25.0 mL 並以甲醇定容至 100 mL，內標準溶液濃度為 25  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 標準品檢量線之製作

精取 1 標準品儲備溶液 2.0 mL、2 及 6 標準品儲備溶液各 1.0 mL 及第二標準品儲備溶液 5.0 mL，以甲醇稀釋至 10.0 mL 而成檢量線儲備溶液。以內標準品溶液稀釋而成製作檢量線之溶液；1 為 0.5、1、5、50、100、及 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度；2 及 6 各為 0.25、0.5、2.5、25、50 及 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度；3、4、5、7、8、9 各為 0.125、0.25、1.25、12.5、25 及 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度；10 各為 0.0625、0.125、0.625、6.25、12.5 及 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度；而內標準濃度為 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。注入高效液相層析後，分別以標準品溶液不同濃度與內部標準品之波峰面積比製作檢量線，分別求出十條檢量線之線性回歸方程式及相關係數，並用三倍於雜訊之波峰面積濃度為最低偵測極限，分析檢體之波峰面積與內部標準品之波峰面積比帶入線性，可得濃度而求出檢體之含量。

#### 共軛雌性激素酵素水解方法

精稱 2 mg 之 conjugated estrogens 檢體粉末加入 15 mL 之 pH 5.2 醋酸緩衝液和 1g 氯化銀，置於 50-mL 有蓋離心瓶振搖 30 分鐘，必要可用 1N 醋酸或醋酸鈉調整 pH 至  $5.0 \pm 0.5$ ，置於超音波震盪 30 秒後，再振搖 30 分鐘。加入 2,500 單位之硫酸酯酵素(sulfatase)，保持 50 °C 水浴震搖 20 分鐘後，加入 15 mL 二氯乙烷蓋緊瓶蓋，振搖 15 分鐘並離心 10 分鐘。有機溶媒層移出並快速流過填塞乾燥玻璃棉及 5 克無水硫酸鈉之小漏斗。精取濾液 3 mL 於試管並以氮氣吹乾後，加入 2 mL 內部標準品溶液完全溶解並以 0.45  $\mu\text{L}$  過濾器過濾，取濾液 20  $\mu\text{L}$  注入 HPLC。

#### 液相層析分析之條件

層析管柱：RP C<sub>18</sub> (Inertsil 5 ODS-2；4.6 × 250 mm)；檢測器：UV 280 nm；移動相：CH<sub>3</sub>CN：0.22 M AgNO<sub>3</sub> in 0.04 % HNO<sub>3</sub> aqueous solution = 40：60 (v/v)；流速：1.0 mL/min。

#### 移動相酸鹼值對各成分分離影響

將製作檢量線之儲備溶液以下列不同 pH 對分離度影響，探討各種成分之滯留時間與移動相酸鹼值變化之關係。移動相各為 (1) CH<sub>3</sub>CN：H<sub>2</sub>O = 40:60 (v/v) (pH 5.7)；(2) CH<sub>3</sub>CN：H<sub>2</sub>O = 40:60 (v/v) with TEA (pH 8.0)；(3) CH<sub>3</sub>CN：H<sub>2</sub>O = 40:60 (v/v) with TEA (pH 10.0)；(4) CH<sub>3</sub>CN：H<sub>2</sub>O = 40:60 (v/v) with TEA (pH 10.5)；(5) CH<sub>3</sub>CN：H<sub>2</sub>O = 40:60 (v/v) with TEA (pH 10.7)。耐酸鹼層析管柱為：Develosil ODS-UG-3 (4.6 × 150 mm)於 UV 280 nm 檢測。

#### 移動相銀離子濃度對雌激素分離影響

將製作檢量線之儲備溶液以下列條件分析，探討各成分之滯留時間與銀離子濃度變化之關係，並比較過氯酸銀與硝酸銀對移動相對分離度之差異。(1) CH<sub>3</sub>CN：H<sub>2</sub>O = 40:60 (v/v)；(2) CH<sub>3</sub>CN：0.04% HNO<sub>3</sub> aqueous solution = 40：60 (v/v)；(3) CH<sub>3</sub>CN：0.19 M AgNO<sub>3</sub> in 0.04 % HNO<sub>3</sub> aqueous solution = 40：60 (v/v)；(4) CH<sub>3</sub>CN：0.22 M AgNO<sub>3</sub> in 0.04 % HNO<sub>3</sub> aqueous solution = 40：60 (v/v)；(5) CH<sub>3</sub>CN：0.25 M AgNO<sub>3</sub> in 0.04 % HNO<sub>3</sub> aqueous solution = 40：60 (v/v)；(6) CH<sub>3</sub>CN：0.28 M AgNO<sub>3</sub> in 0.04 % HNO<sub>3</sub> aqueous solution = 40：60(v/v) (7) CH<sub>3</sub>CN：0.22 M AgNO<sub>3</sub> in 0.04 % HNO<sub>3</sub> aqueous solution = 40：

60 (v/v)。層析管柱為 Inertsil 5 ODS-2 (4.6 × 250 mm) 於 UV 280 nm 檢測。

#### 液相層析定量方法之確效

以甲醇配製各成分之三種高、中、低濃度之模擬檢品溶液，以 HPLC 定量三次，求出以偏差係數(C.V.)及相對誤差(R.E.)，評估分析精密度及準確度。製作檢量線及線性方程式求出  $r^2$  相關係數值。

#### 共軛雌性激素檢品之製備

依原料藥之含量標示，精稱 2 mg 之 conjugated estrogens 檢體粉末，以酵素水解法製備檢品。另以未經水解方法，分析原料藥所含游離態雌激素含量。取二十顆口服錠用水洗除顏色及糖衣，並以氮氣吹乾，稱取平均重量而磨成粉末，精稱 2 mg 之 conjugated estrogens 檢體粉末並以酵素水解。取出十支凍晶注射檢體後稱出平均內容量，依藥品標示量，精稱 2 mg 之 conjugated estrogens 檢體粉末，酵素水解法製備檢品。

#### 測定游離雌激素之含量

精稱 2 mg 之 conjugated estrogens 檢體粉末，置於 250-mL 分液漏斗並加入 15 mL H<sub>2</sub>O 及 15 mL dichloroethane 振搖 15 分鐘，取 5 mL 以氮氣吹乾，再以 2 mL 內部標準品溶液而經 0.45 μL 過濾器過濾，取濾液注入 HPLC，分析定量 1、2 及 6 等游離成分總含量。

#### 共軛雌性激素檢品含量之計算

各型劑型檢體之取量乃依標誌量及平均單位重量或內容量，預測檢體各成分含量而製備，使其濃度位於檢量線性範圍之內，再以檢量線之線性回歸方法求出真值與實際取量，換算為單位標誌量之百分比，判定是否符合規格。 $C_{res.}$ ：檢體由檢量線回歸之回應濃度(μg/mL)； $W_{sam.}$ ：檢體取量(mg)

$$\text{Conjugated estrogens 含量} = \frac{C_{res.} \times 2/3 \times 15}{W_{sam.} \times W_{lab.} / 1.381 \times 1000} \times 100 \%$$

$W_{lab.}$ ：單位檢體標誌量；1.381：游離態轉換共軛雌性激素之係數

### 三、結果與討論

共軛雌性激素製劑以酵素水解成為游離態雌激素，再以液相層析定量。因十種共軛雌性激素標準品不易取得，若直接分析結合態雌激素較難普及，且活體檢體之分析多以游離態雌激素。十種雌激素對紫外線 280 nm 波長吸光度具有不同吸收，同一濃度下 3、8 及 9 吸光值約為 0.21，而 1、2、4、5、6 及 7 吸光值約為 0.061；而 10 光值約為 0.64 是其它成分強 3~10 倍。配合檢體含量差異及 USP 所訂定範圍，將十種標準品分別配製成四組濃度之不同檢量線。第一組：1 為 0.5~200 μg/mL 濃度；第二組：2 及 6 為 0.25~100 μg/m 濃度；第三組：3、4、5、7、8 及 9 為 0.125~50 μg/mL 濃度；第四組：10 為 0.0625~25 μg/mL 濃度。製作檢量線並得其線性回歸方程式及相關係數，以三倍雜訊波峰面積之濃度為最低偵測極限(LOD)，各成分濃度與層析反應均呈良好性線關係。因結合態雌激素標準品不易取得，故先水解成游離狀態再行分析，水解以酵素及酸水解<sup>25</sup>等兩種方式進行。因稀鹽酸水解較為簡便迅速，先以甲醇與稀鹽酸(5% v/v)混液置加熱水解。結果顯示酸液水解對大部雌激素成分相當安定，唯獨 10 於五分鐘開始分解，故酸水解並不

適用本研究。酵素水解法為美國藥典目前收載方法，水解完全且不破壞雌激素結構，實驗時間冗長且操作條件較難控制，且價錢較為昂貴。首先硫酸酯酵素(sulfatase)於 37°C、pH 5.0 可水解結合態雌激素，因取量方便、易溶解及價格較便宜之故，採用天然溶液之 Type H-2 硫酸酯酵素用於本研究。

試行普遍之逆性 HPLC 方法進行定量方法探討，依結構考量，因 17-ketoestrogens 類較屬非極性，應比 17-hydroxylestrogens 類滯留時間長；因 B 環含雙鍵而較非極性；17 $\alpha$ -OH 類因立體配位與 17 $\beta$ -OH 有異應具不同滯留時間。首先以 40 % acetonitrile 移動相，以 Inersil ODS-2 為層析管柱，可將八種態雌激素完全分離，唯獨 **2** 與 **10** 重疊無法分離，曾調整不同移動相溶媒比例，但仍無法分離。因 **2** 與 **10** 互為同分異構物，僅 B 環雙鍵位置不同，極性極可能相似而無法分離。雌激素共同特徵為 A 環第三位碳帶有弱酸酚性 OH 基，若於鹼性可使酚性 OH 基解離而成極性酚性 anion 而縮短滯留時間，隨 pH 增高而滯留時間越短；同理 **2** 與 **10** 解離後，產生極性不同而可分離，**2** 之 B 環雙鍵不與 A 苯環共軛，而 **10** 之 B 環雙鍵與 A 環共軛，解離之 **2** 較穩定而具極性，故滯留縮短而可分離，尤以 **3**、**8** 及 **9** 最為明顯。故調整移動相 pH 為 10.5 時完全分離十種成分，所使用鹼液為 triethylamine 或 tetramethylammonium hydroxide，但高鹼對管柱影响及長期再現性可能有礙，每次注射需費時 35~40 分鐘，雖可完全分離但未必適用。故採銀離子或其他金屬能與不飽和結構形成複合物而造成分離效果，曾於薄層層析或柱狀層析法，常用於分離雙鍵之同分異構物。銀離子加入 HPLC 移動相可能具有分離效果，滯留時間隨金屬濃度多少而改變，例如 1,5,9-cyclododecatriene 異構物<sup>20</sup>、oleic 及 elaidic acid methyl esters<sup>20</sup>、Vitamin D<sub>2</sub> 及 Vitamin D<sub>3</sub> 或雌激素之分離<sup>21</sup>。試行銀離子方法分離 **2** 與 **10** 發現以 CH<sub>3</sub>CN : 0.22 M AgNO<sub>3</sub> in 0.04 % HNO<sub>3</sub> = 40 : 60 (v/v) 為移動相，於逆相 C18 管柱可得 10 種成分完全分離效果，且分離解析度均大於 1.2 以上。因銀離子屬 electrophilic，對 $\pi$ 電子之雙鍵具有親和力而易形成複合物，故對具雙鍵之 **2**、**6** 及 **7** 易成複合物而縮短滯留時間，**10** 幾乎無改變；隨銀離子濃度增高而滯留縮短，但移動相因銀離子而增加極性，故可分離 **2** 與 **10** 兩物。**10** 之雙鍵因隱藏於 A 及 B 環構造間，難與銀離子形成複合物而不影響其滯留時間，因此調配適當硝酸銀濃度而可完全分離 **2** 及 **10**；**5** 及 **6**；**7** 及 **8** 之波峰，同時 **6** 及 **7** 滯留時間亦縮短，不會與其他波峰重疊，27 分內即可達成十種成分完全分離結果。同等 mole 量之過氯酸銀試液亦可得到良好分離效果。本 HPLC 分析方法，十種成分檢量線之線性回歸 r<sup>2</sup> 值達 0.9998 以上；為確保本法之再現性，添加標準品以模擬檢品各成分含量比例之 1、2 及 4 倍三種濃度各分析測試三次，以偏差係數(C.V.)評估其精密度，C.V. (%)值小於 2.8；以相對誤差(R.E.)評估其準確度，R.E.(%)值介於 +5.4 至 -8.1 之間。結合態雌激素原料所含之游離態雌激素成分為評估品質項目之一，以主成分 **1**、**2** 及 **6** 之含量總和計算。A 廠原料藥係由化學合成來源，未發現任何游離態雌激素，而 B 廠亦為化學合成來源，但有游離態雌激素成分存在。八種結合態雌激素製劑檢品，應用本研究液相層析分析，結果顯示動物來源製劑及原料具有特殊指標成分之 **10**，可與化學合成來源製品可做區別，如原開發廠製

劑含有 **10** 成分，可判定為動物來源，A 及 B 廠製劑及原料均不含 **10** 成分，判定為化學合成來源；各廠之間生產之原料成分種類有所差別，B 廠檢體均不含 **9**，各廠批次間成分含量亦有不同。B 廠成分含量較具均一性及穩定性，但 **1** 及 **6** 二成分仍較 USP 之規格偏低。

#### 四、參考文獻

1. 李源德，健康政策季刊，行政院衛生署，台北，台灣，2000/冬季號，pp 19-21。
2. 楊東川，衛生報導季刊，行政院衛生署衛生報導雜誌社，台北，台灣，2002，第十一卷第一期，pp 10-20。
3. Adams, W. P., Hasegawa, J., Johnson, R. N., Haring, R. C. Conjugated estrogens bioequivalence: comparison of four products in postmenopausal women. *J Pharm. Sci.* 1979, **68**, 986-991.
4. Steven M.Tory, David R.Hicks, Vernon D.Parker, William J.Jusko, Differences in Pharmacokinetics and Comparative Bioavailability Between Premarin and Estratab in health Postmenopausal Women. *Current Therapeutic Research*, 1994, **55**, 359-371.
5. Esaton, P. United States Pharmacopoeia XXIV. United States Pharmacopoeial Convention, Inc. Rockville, Md. USA. 2000, pp 681-682.
6. Germain Carignan. An improved colorimetric method for the analysis of conjugated estrogen. *Can. J. Pharm. Sci.* 1976, **11**, 76-77.
7. Johnson, R., Masserano, R., Haring, R., Kho, B., Schilling, G. Quantitative GLC determination of conjugated estrogens in raw materials and finished dosage forms. *J. Pharm. Sci.* 1975, **64**, 1007-1011.
8. McErlane, K. M., Curran, N. M. GLC assay of conjugated estrogen formulations. *J. Pharm. Sci.* 1977, **66**, 523-526
9. Carignan, G., Lodge, B. A. Comparison of acidic and enzymatic hydrolysis procedures for identification of natural estrogens in pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Sci.* 1980, **69**, 1453-1454.
10. Cairns, T., Siegmund, E. G., Rader, B. Quantitative determination of conjugated and esterified estrogens by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry. *Anal.Chem.* 1981, **53**, 1217-1222.
11. Pillai, G. K., McErlane, K. M. Analysis of conjugated estrogens in a vaginal cream formulation by capillary gas chromatography. *J. Pharm. Sci.* 1982, **71**, 583-585.
12. Shackleton, C. H. Derivatization of estrogen conjugates for analysis by capillary gas chromatography. *Steroids*, 1981, **38**, 485-494.
13. Lyman, G. W., Johnson, R. N. Assay for conjugated estrogens in tablets using fused-silica capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 1982, **234**, 234-239.
14. Desta, B. Complete separation of nine equine oestrogens by high-performance liquid

chromatography. *J. Chromatogr.* 1988, **435**, 385-390.

15. Flann, B., Lodge, B. Analysis of estrogen sulphate mixtures in pharmaceutical formulations by reversed-phase chromatography. *J. Chromatogr.* 1987, 402, 273-282.

16. Jasmina Novakovic High-Performance liquid chromatographic determination of equine estrogens with ultraviolet absorbance and electrochemical detection. *J. Chromatogr. A.* 1994, **678**, 359-363.

17. Zhang, H., Henion, J. Quantitative and qualitative determination of estrogen sulfates in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using 96-well technology. *Anal Chem.* 1999, **71**, 3955-3964.

18. Draisci, R., Palleschi, L., Ferretti, E., Marchiafava, C., Lucentini, L., Cammarata, P. (1998) Quantification of 17 beta-estradiol residues in bovine serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Analyst*, 1998, **123**, 2605-2609.

19. CDER of FDA. Guidance for Industry Conjugated estrogens, USP-LC-MS method for both Qualitative chemical characterization and documentation of qualitative pharmaceutical equivalence . FDA . 2000.

20. Schomburg G. and Zegarski K. Separation of olefinic compounds by reversed-phase liquid chromatography with a mobile phase containing p-complexing metal salts like silver nitrate. *J. Chromatogr.* 1975, **114**, 174-178.

21. Tscherne R. J. and Capitano G. High-pressure liquid chromatographic separation of pharmaceutical compounds using a mobile phase containing silver nitrate. *J. Chromatogr.* 1977, **136**, 337-341.

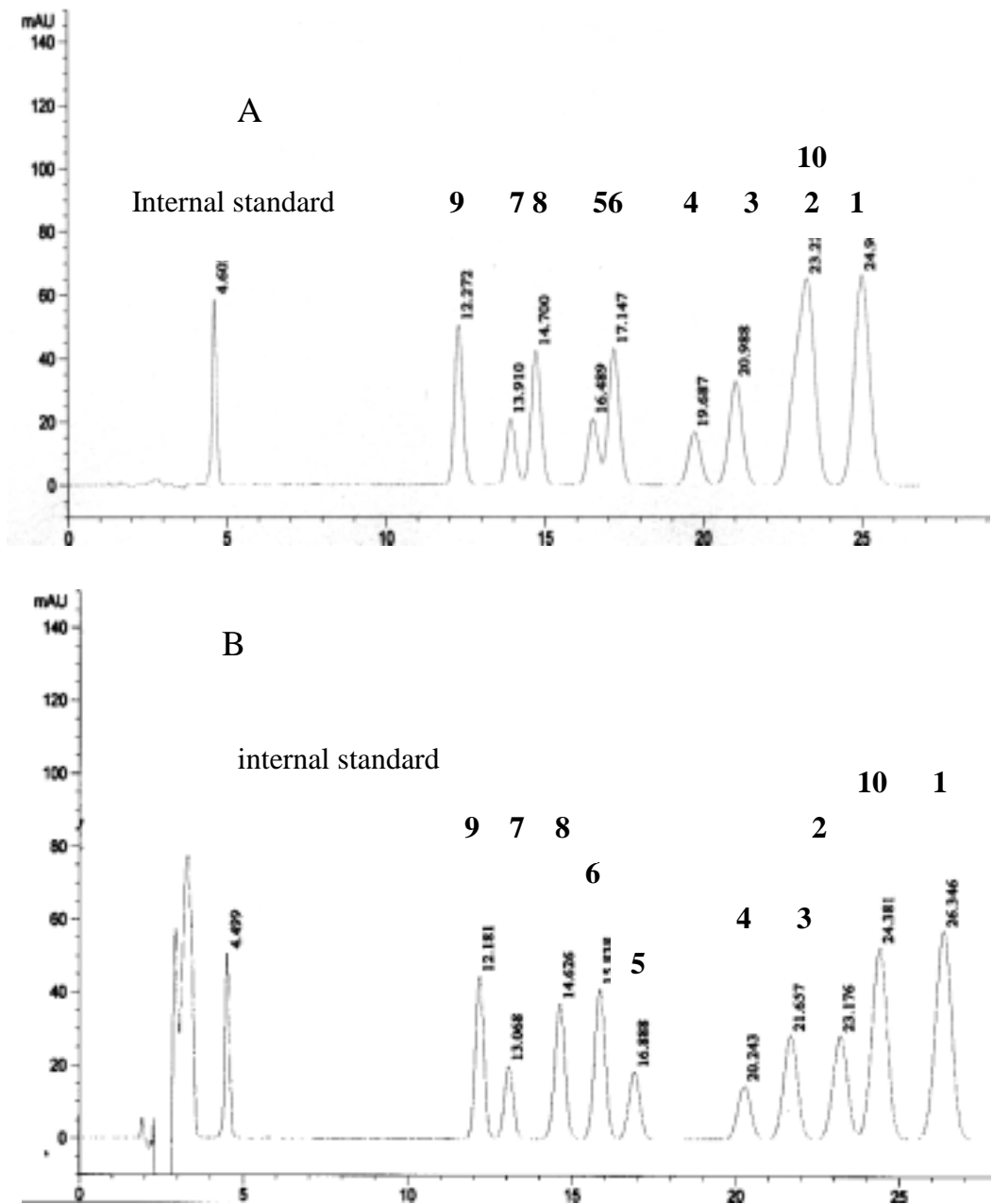
22. Vonach B. and Schomburg G. High-Performance liquid chromatography with silver complexation in the mobile phase. *J. Chromatogr.* 1978, **149**, 417-430.

23. Bhavnani, B. R., Cecutti, A., Gerulath, A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a novel estrogen delta8-estrone in postmenopausal women and men. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1998, **67**, 119-131

24. Esaton, P. United States Pharmacopoeia XXIII. United States Pharmacopoeial Convention, Inc. Rockville, Md. USA. 1995, pp 627-628.

25. Bain, J. D., Kasman, L. H., Bercovitz, A. B., Lasley, B. L. A comparison of three methods of hydrolysis for estrogen conjugates. *Steroids*, 1985, **43**, 603-619.





附圖、十種游離態雌激素在銀離子移動相之分離層析圖譜

(A) Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 40 : 60$  (v/v) ; Column: INERTSIL ODS-2, 250x4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$  ; Detector :280nm ; Flow rate:1.0 mL/min. ; (B) Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{CN} : 0.22 \text{ M AgNO}_3$  in 0.04 %  $\text{HNO}_3$  aqueous solution = 40 : 60 (v/v) ; Column: INERTSIL ODS-2, 250x4.6 mm,5 $\mu\text{m}$  ; Detector :280nm ; Flow rate:1.0 mL/min ; estrone (1); equilin(2);equilenin(3);17  $\alpha$  -estradiol;(4)17  $\beta$  -estradiol;(5)17  $\alpha$  -dihydroequilin;(6)17  $\beta$  -dihydroequilin;(7)17  $\alpha$  -dihydroequilenin;(8)17  $\beta$  -dihydroequilenin;(9)  $\Delta^{8,9}$ -dehydroestrone (10)