

含炔雌醇复方避孕制剂的分析

吕湘林 汪秀云 曹秀玲

(上海市药品检验所)

提要 含炔雌醇的复方避孕制剂为使用最广泛的计划生育药物,目前尚缺乏良好的分析方法。为克服该类制剂中炔雌醇含量低和其它组分的干扰,研究了反相分离、紫外和荧光串联检测的 HPLC 方法。本法适用于各种含炔雌醇的复方制剂中各组分的直接测定,专属性好,较英美等国药典方法简便。

关键词 复方炔诺酮; 复方甲基炔诺酮; 复方甲地孕酮; 炔雌醇; 避孕药; HPLC 法

炔雌醇、炔诺酮、甲基炔诺酮和醋酸甲地孕酮为目前应用最广泛的口服避孕药。国内多见如:“0号方”(炔诺酮、醋酸甲地孕酮及炔雌醇)、“1号方”(炔诺酮或甲基炔诺酮和炔雌醇)和“2号方”(醋酸甲地孕酮和炔雌醇)⁽¹⁾。中国药典⁽²⁾收载有复方甲基炔诺酮片、复方炔诺酮片及复方醋酸甲地孕酮片等制剂(表1)。各种处方及制剂之共同特点为均含有炔雌醇,且其含量颇低(0.02~0.035mg/片)。此类制剂尚无完善的分析方法。近年来研究报道多着重色谱学方法,并试图用增加取样量以克服低含量的困难⁽³⁾,然而仍无法适用于含量均匀度或溶出度的分析。另有报告用各种荧光衍生化法,以提高其检测灵敏度⁽⁴⁾。英、美药典^(5,6)即采用其衍生物荧光法,不仅操作繁复且需特殊仪器设备。中国药典⁽²⁾对复方甲基炔诺酮片中的炔雌醇用硫酸显色后作比色测定,因产物不稳定,重复性和可靠性均欠佳。

本文以反相 HPLC 法分离含炔雌醇复方制剂中各组分,以荧光和紫外串连检测炔雌醇及其它各组分,作直接定量。本法最低可检出炔雌醇量为 0.016 μg , 专属性好,亦可用于均匀度或溶出度测定,一次进样便可取得各组分的定量结果,误差(CV)小于 3%,比现有各国药典方法简便。

实验和结果

一. 仪器与试剂

Hitachi 635 型高压液相色谱泵, Rheodyne 7125 进样阀, μ -Bondapak ODS, 5 μ , 25 cm \times 4.6 mm 不锈钢色谱柱, Shimadzu SPD-2 A 紫外检测器(UV), C-Ria 色谱数据处理机, Hitachi 650-10 LC 荧光检测器(FL)。

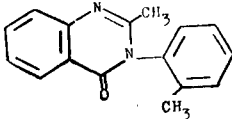
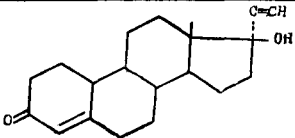
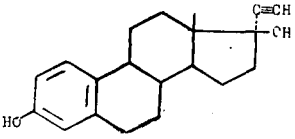
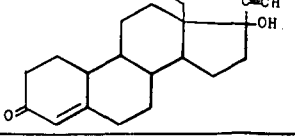
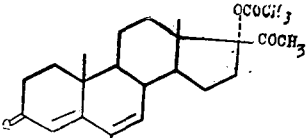
安眠酮(I)上海大众药厂; 炔诺酮(II)、炔雌醇(III)、甲基炔诺酮(IV)、醋酸甲地孕酮(V)均为上海第十二制药厂; 口服避孕“0号”片(由II、III及V组成), “1号”片(由II及III组成), “2号”片(由III和V组成)及复方甲基炔诺酮片(“3号”由III和IV组成)及空白片基均由上海信谊药厂提供, 部分自北京、天津、上海街头药房取样。

二. 实验条件

(一) 色谱条件 以甲醇-水(13:10)为流动相, 流量 1.5ml/min, ODS柱, 温度 35 $^{\circ}\text{C}$, UV 检测波长据不同制剂分别选定, 炔雌醇的 FL 检测均以 E_{λ} 275 nm, $E_{\text{M}\lambda}$ 325 nm, FL 串联于 UV 之后, 各检测器均与数据处理机相接。

(二) 分离度 取“标准品混合液”(见“溶液配制”), 以上述色谱条件, UV λ 230 和 260nm 检测, 进样 10 μ l, 结果见图 1, 2。由图 1 与 2 可见, I~V 均呈完全分离, 其保留值(t_R)和分离度(R_s)均见表 1。

Tab 1. Comparison of the characteristic of contraceptive drugs

No.	Compound	Structural formula	UV λ_{max} (nm)	t_R (min)	R_s	Preparation	Content per tab. (mg)
I	Methaqualone (Internal standard)		205 225	6.30	6.47		
II	Norethisterone		235 245	10.8	2.00	No. 0 No. 1	0.030 0.600
III	Ethinylestradiol		230 280	12.6	3.63	No. 0 No. 1 No. 2 No. 3	0.035 0.035 0.035 0.030
IV	Norgestrel		240	16.3	6.73	No. 3	0.300
V	Megestrol acetate		288	26.4		No. 0 No. 2	0.500 1.000

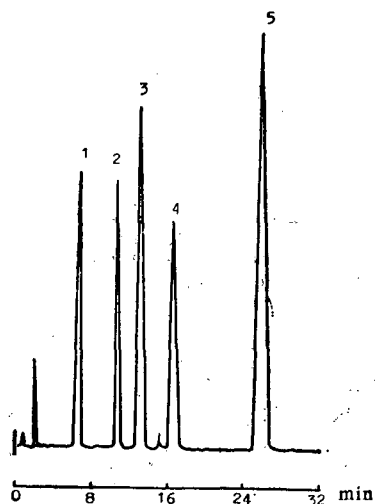


Fig 1. The chromatogram of main steroid contraceptive drugs. 1. Methaqualone (internal standard); 2. Norethisterone; 3. Ethinylestradiol; 4. Norgestrel; 5. Megestrol acetate

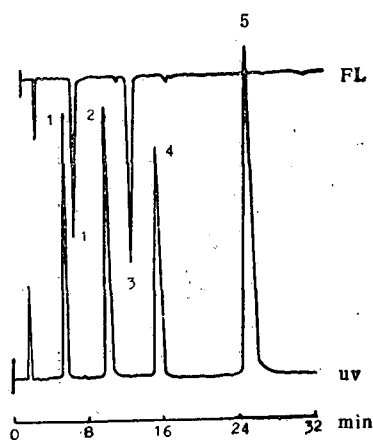


Fig 2. Separation and combined detection of main steroid contraceptive drugs in HPLC. 1. Methaqualone (internal standard); 2. Norethisterone; 3. Ethinylestradiol; 4. Norgestrel; 5. Megestrol acetate

(三) 炔雌醇的荧光检测 为观察 III 的 FL 检测可靠性, 取 III 的醇溶液(0.54 mg/ml), 每次进样 0.03~5.4 μg , 以 UV(λ 230 nm)串联 FL 检测, 结果表明, 进样量与峰的响应值呈良好线性(见图 3)。最低检出量为 0.016 μg 。以 II, IV 及 V 等组分和片基辅料的醇溶液(见“溶液配制”)观察, 表明于 III 相同 t_r 处不存在干扰, 响应强度比较显示, FL 检测的灵敏度比 UV 高出 6 倍。

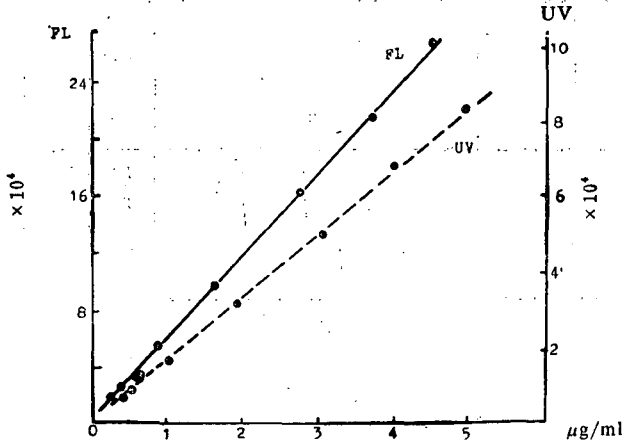


Fig 3. The relationship between concentration of ethinyloestradiol and UV or Fluorescence (FL) response

(四) 紫外检测波长的选择 制剂中各组分的 UV 检测波长据其 λ_{max} 、制剂组成及内标的 λ_{max} 确定。

“0号”片: 由于 II 与 V 的 UV λ_{max} 差距较大, 为选定合适的 λ , 取对照品以乙醇配制成 II (1.2 mg/ml) 及 V (2 mg/ml) 的混合液, 以“色谱条件”分析, 分别观察各 λ_{max} 检测时峰的响应值比。结果显示, 以 λ 260 nm 检测响应值较为接近, 均与取量呈良好线性。“1号”片: 同“0号”片比较, 表明以 I 和 II 的 λ_{max} 间, 即 λ 230 nm 为佳, 其线性关系亦均良好。“2号”片: 同“0号”片, 亦宜选用 λ 260 nm 为检测波长。“3号”片: 据“1号”片: 也以 λ 230 nm 检测, 其响应值与取量间的线性关系均见第四节。

(五) 内标的考察 鉴于内标物须适用于本法之 UV 和 FL 联用目的, 经选择, 安眠酮为兼具各项要求之良好对象。取 I 配制成 0.845 mg/ml 的醇溶液, 以不同量进样, 并用上项选定的各种 UV 检测波长分别检测, 同“色谱条件”进行分析, 将峰的响应积分值与相应的进样量作线性回归, 其结果为:

$$\text{UV } \lambda 230 \text{ nm: } Y = -2409.69x + 158836, r = 0.9998$$

$$\text{UV } \lambda 260 \text{ nm: } Y = -160.03x + 26045.6, r = 0.9998$$

$$\text{FL } \lambda E_{275\text{nm}}/E_{325\text{nm}} Y = 430.74x + 6073.69, r = 0.9997$$

考察结果表明, 内标物在选用的各种检测条件下, 取量在 0.1~8.45 μg (UV) 和 0.016~8.45 μg (FL) 范围内均有良好线性关系。

三. 测定方法

(一) 溶液配制 内标溶液: 精密称取 I, 配制成 0.7 mg/ml 的醇溶液。标准品浓溶液: 按各制剂的组成及比例(见表 1), 分别精密称取标准品, 以无水乙醇配制成 II (0.3 mg/ml), V

(0.5 mg/ml)及 III(0.035 mg/ml)(0); II(0.6 mg/ml)III(0.035 mg/ml)(1); V(1 mg/ml), III(0.035 mg/ml)(2); 及 IV(0.3 mg/ml)III(0.03 mg/ml)(3) 的标准品浓溶液备用。标准品溶液: 取“标准品浓溶液”0, 1, 2 及 3 号各 10 ml, 分别加内标溶液 2 ml, 以无水乙醇稀释至 25 ml, 得 0, 1, 2 及 3 号标准品溶液。标准品混合液: 称取 I, II, IV 及 V, 以无水乙醇配制成各含 0.2 mg/ml 及 III 为 0.01 mg/ml 的标准品混合溶液。样品溶液: 取 0, 1, 2 及 3 号片各 20 片, 研细, 分别称取相当于 10 片的细粉, 以少量蒸馏水溶胀后加入适量无水乙醇, 用超声波振荡器振摇 5~10 min, 各加内标溶液 2 ml, 摇匀后滤过, 以无水乙醇洗涤残渣, 洗、滤液合并并稀释至 25 ml。

(二) 测定操作 校正因子测定: 取 0 号(或 1, 2, 3 号)标准品溶液 10 μ l, 以上述“色谱条件”进样; 用“UV 检测波长选择”项确定的波长, 并串联 FL 作检测, 必要时调节流动相, 使各组分峰的分离度均大于 1.5; 重复进样三次以上, 组分峰与内标峰积分值之比的 CV 须小于 3%; 据此分别求出各项校正因子。样品测定: 取 0 号(或 1, 2, 3 号)样品溶液 10 μ l 按“校正因子测定”项方法分析。据所得峰积分值、取量和校正因子, 以内标法求算各组分的含量, 结果见表 4。

四. 方法的精密度与可靠性

(一) 样品量与检测响应值间的线性关系 取 III 的标准品, 配制成 0.54 mg/ml 的醇溶液, 同“校正因子测定”项方法分析, 分别进样 0.03~5.4 μ g, FL 检测, 记录峰响应值并与相应取量作线性回归:

$$Y = -5925x + 50888.4, r = 0.9983$$

结果表明 III 在 0.05~5.4 μ g 间线性良好。另取 0, 1, 2 及 3 号标准品溶液, 同“校正因子测定”项方法, 分别进样 0.1~8 μ g, 观察峰积分值与取量间线性关系, 得线性回归如下:

$$\text{II (检测波长 260 nm)} Y = 0.1607x + 1.4882, r = 0.9983$$

$$\text{(检测波长 230 nm)} Y = 0.01643x + 0.4528, r = 0.9998$$

$$\text{IV (检测波长 230 nm)} Y = 0.01601x + 1.5550, r = 0.9995$$

$$\text{V (检测波长 260 nm)} Y = 0.09681x + 0.8075, r = 0.9991$$

可见在本法条件下, 对各种制剂和各组分的定量呈良好的线性关系。

(二) 分析误差的比较 分别取 0, 1, 2 及 3 号标准品溶液, 按“校正因子测定”项方法, 以不同量进样, 在日内和日间重复分析, 分别观察结果的变异系数(表 2), 表明测定误差均低于 3%(CV)。

Tab. 2 Comparison of precision of the assay

Component	Amount of sample determined (μ g)	Within day (CV %)	Day to day (CV %)	Component	Amount of sample determined (μ g)	Within day (CV %)	Day to day (CV %)
Ethinylestradiol	0.0981	1.14	2.87	Norethisterone	1.0585	0.42	2.83
	0.1228	0.28	2.51		1.6935	1.36	1.99
	0.1841	0.80	1.90		2.1169	0.26	0.69
	0.2455	0.38	0.89		3.1754	0.63	0.74
Megestrol acetate	0.4741	0.76	2.69	Noregestrel	0.3498	1.45	2.68
	1.4222	1.36	1.37		1.0494	1.17	2.08
	4.7407	1.60	1.50		3.4981	0.40	1.83

(三) 测定的回收率观察 分别取 0, 1, 2 及 3 号片的空白片基 10 片, 加少量蒸馏水溶胀, 各加相应的“标准品浓溶液”10 ml, 超声振荡 5~10 min 后加入内标溶液 2 ml, 滤过, 无水乙醇洗涤, 洗、滤液稀释至 25 ml, 按“校正因子测定”法, 进样 10 μ l, 同时以各“标准品溶液”作对照测定, 比较各组的测定结果, 求出回收率如表 3。

Tab 3. Recovery of each component in preparations

Tablet	No.	Norethisterone	Ethinylloestradiol	Megestrol acetate
No. 0	1	101.87	98.35	99.16
	2	101.09	98.76	99.93
	3	101.33	101.54	100.43
	\bar{X}	101.43	99.55	99.84
No. 1	1	101.80	98.48	
	2	100.00	101.44	
	3	101.09	100.06	
	\bar{X}	99.84	99.00	
No. 2	1		98.88	99.23
	2		97.99	100.01
	3		98.52	100.09
	\bar{X}		98.66	100.60
No. 3	1	99.76	101.13	
	2	99.92	98.98	
	3	99.43	101.06	
	\bar{X}	99.70	100.39	

另取各种空白片基, 不加“标准品浓溶液”同法分析, 结果表明: 于各相应的组分峰处均无任何峰的响应, 可见各辅料不干扰分析。

五. 串联检测法与紫外检测法的比较 为观察仅以 UV 对各制剂作检测 (包括对炔雌醇) 的可行性, 并与串联 FL 检测法作比较, 取 1 号标准品溶液, 按“校正因子测定”法, 进样 10~20 μ l/次, 以 III 的 UV λ_{max} 230 或 280 nm 作检测, 记录 II 与 III 的峰积分值及其重复进样的误差 (CV), 结果表明 III 的峰响应强度仅为 II 的 1/50, III 的峰高甚至不及记录器满刻度的 5%。III 的进样量低于 2 μ g/次, 则其误差 (CV) 通常大于 3%; 而以 FL 作串联检测时, III 的取量不到 0.1 μ g/次其平均误差仍不超过 2% (见表 2)。

六. 样品测定

分别吸取“样品溶液”10 μ l, 按“样品测定”项方法进样分析, 并计算结果, 均见表 4。

讨 论

一. 本文所研究的各种甾体避孕药的 UV 特征吸收主要由 Δ^4 -3-酮基的共轭体系所致。II 与 IV (λ_{max} 240 nm 附近)、V (λ_{max} 280 nm 附近) 的强吸收 $\log e$ 均大于 III, 并因后者在制剂中的相对含量仅为其它组分的 1/10~1/30, 因而其峰的响应强度仅及其它组分的 1/50。实验结果也表明, 各种制剂中的 III, 若以其 UV λ_{max} 检测, 则于通常的分析取样量范围内, 误差均超过允许的限度。

Tab 4. Results of preparations (from market) determination

Tablet	Batch No.	Norethisterone	Megestrol acetate	Ethinylloestradiol	Noregestrel
No. 0	820706	108.31	102.23	99.11	
	830906	103.59	96.77	93.58	
	840201	98.48	96.05	93.98	
No. 1	820308	90.05		99.01	
	830713	99.62		112.17	
	840109	93.14		88.94	
	821215*	83.85*		88.84*	
	832017*	93.91*		99.07*	
	840209*	95.02*		107.98*	
No. 2	841112		104.11	97.37	
	841201		94.83	97.17	
No. 3	810492			73.72	91.37
	820203			91.42	93.25

* Paper sheet

二. 化合物 II 及 III 等均具活性荧光, 但强度以后者为大(因具酚环), 据此对制剂作直接荧光分析则互有干扰, 虽可因组分 II 等相对浓度大, 由于其自身熄灭对 III 的干扰有所减少, 但仍不容忽视, 且辅料也有不同程度的影响, 所以曾有文献⁽⁷⁾认为不宜采用。有关研究和分析多趋向与异菸肼、硫酸、铝盐或 densyl 试剂等生成荧光衍生物⁽⁴⁾后再作测定, 如美国药典⁽⁶⁾复方炔诺酮片(同 1 号方)中炔雌醇乃以异菸肼及硫酸在专用的仪器设备中反应生成荧光衍生物后以 λ_{E_s} 534 nm/ E_m 556 nm 测定。

本文所提出的方法系先经色谱分离, 组分间的干扰已不存在, III 的荧光检测(λ_{E_s} 275 nm/ E_m 325 nm)的响应强度较 UV 高出六倍, 最低检测量达 0.016 μg , 对所观察的各种复方制剂均能适用, 一般的荧光检测器即可满足检测要求。

三. 对 II, III, IV 及 V(包括内标)均分别作了定量的可靠性考核, 分析误差的比较和回收率的观察, 均表明在相应的检测条件下定量的线性关系良好, 且范围也较宽。方法的 CV 小于 3%, 回收率平均达 99%。

化合物 I 兼具 UV 吸收和活性荧光特点, 能与各种制剂分析所采用的条件兼容, 定量的线性关系良好, 能很好地满足串联一次检测法的要求, 为较理想的内标物。

本法对 0, 1, 2 和 3 号复方口服制剂分析, 效果良好, 按常规取样即可获得可靠分析结果(表 4)。本法较简便, 用一般高效液相色谱仪即可作分析, 一次进样就能取得各组分的定量结果, 既不必作衍生化处理, 也毋需特殊专用设备, 较各国药典法简便。

四. 曾以 1 号片为对象, 比较了 UV 检测及 FL 与 UV 串联检测的分析误差, 可见 III 的响应强度过低, 误差颇大。例如 III 0.1 μg 时 (II 相应为 17.82 μg) 测定的 CV ($n=5$) 高达 43.17% (对 II 即为 2.31%)。增大样品量虽可降低 CV 值, 然而因 II 的过量破坏了谱峰的分, 或超越了定量线性范围。

五. UV 与 FL 二检测器串联的先后对结果无显著性影响, 串联流路采用内径为 0.2 mm 的不锈钢管(或 TFL 管)曾延长达 80 cm, 对峰的分度或宽度仍无明显影响。

参 考 文 献

1. 上海市卫生局. 上海市药品标准. 1980年版. 上册. 1980:33.
2. 中华人民共和国药典 (1977年版). 1978:389
3. Gluck JAP and Shek E. Determination of ethinyloestradiol and norethisterone in an oral contraceptive capsule by RP-HPLC. *J Chromatogr Sci* 1980; 18:634.
4. Roos RW. HPLC analysis of estrogens in pharmacy by measurement of their densyl derivatives. *J Pharm Sci* 1978; 67:1735.
5. The United States Pharmacopeia. 1985:743.
6. The British Pharmacopeia. 1980:768.
7. 胡育筑等. 荧光分光光度法测定复方炔诺酮片含量. 南京药学院学报 1983;(3):9.

ANALYTICAL STUDIES ON COMPOUND PREPARATIONS CONTAINING ETHINYLOESTRODIOL

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

(Shanghai Institute for Drug Control, Shanghai)

ABSTRACT Compound preparations of ethinyloestradiol are widely use in contraceptive drugs, but the ethinyloestradiol content in the preparations is less than 35 μg per tablet. The content was too low to be determined directly by the normal methods. A HPLC method has been developed for determination of ethinyloestradiol norethisterone and norgestrel acetate in the compound preparations after separation by μ -Bodapak ODS columnn with methaqualone as internal standard and MeOH—H₂O (130:100) as a mobile phase using a UV—Fluorescence (FL) combination detector. For the detection of ethinyloestradiol FL was used and for all other drugs UV was used.

The UV-FL combined detection is favourable to overcome the difficulties of relatively low content in the preparation and low absorptivity of the minor component.

This method is accurate, rapid, sensitive and has a good linearity and suitable to various preparations.

Key words Ethinyloestradiol; Norethisterone; Norgestrel; Megestrol acetate; Contraceptive Drug; HPLC