

复方左炔诺孕酮片和滴丸含量及含量均匀度测定

郭小洁, 代红

(北京市药品检验所, 北京 100035)

摘要 目的: 建立复方左炔诺孕酮片和复方左炔诺孕酮滴丸中炔雌醇和左炔诺孕酮含量测定的高效液相色谱法, 考察复方左炔诺孕酮片及滴丸的含量均匀度。方法: 采用 Waters Symmetry 300TM C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 以乙腈-水 (40:60) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 220 nm。结果: 炔雌醇及左炔诺孕酮的线性范围分别为 1.554~31.08 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$) 和 7.549~151.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$); 复方左炔诺孕酮片中炔雌醇和左炔诺孕酮平均回收率 ($n=3$) 分别为 99.6%~101.8% (RSD 为 0.55%~1.2%) 和 99.5%~100.7% (RSD 为 0.46%~1.6%); 复方左炔诺孕酮滴丸中炔雌醇平均回收率 ($n=3$) 分别为 100.6%~101.1% (RSD 为 0.92%~1.8%) 和 97.9%~98.7% (RSD 为 1.1%~1.9%)。样品检测结果显示, 复方左炔诺孕酮滴丸含量均匀度良好, 但部分复方左炔诺孕酮片的含量均匀度尚不符合 2005 年版中国药典的相关规定。结论: 建立的 HPLC 法具有专属性强、灵敏度高、操作简便等特点, 并可考察炔雌醇和左炔诺孕酮的含量均匀度, 达到严格控制药品质量的目的。

关键词 复方左炔诺孕酮片; 复方左炔诺孕酮滴丸; 含量测定; 含量均匀度; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)09-1533-04

Determination of assay and content uniformity of compound levonorgestrel tablets and its pills

GUO Xiaojie, DAIHong

(Beijing Institute for Drug Control Beijing 100035 China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for determination of assay of ethinylestradiol and levonorgestrel in compound levonorgestrel tablets and its pills, as well as to investigate their content uniformity. **Methods** Using Waters Symmetry 300TM C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (40:60) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and detection wavelength was 220 nm. **Results** The linear ranges of ethinylestradiol and levonorgestrel were 1.554~31.08 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$) and 7.549~151.0 μg·mL⁻¹ respectively ($r=0.9999$). The average recoveries ($n=3$) of ethinylestradiol and levonorgestrel of compound levonorgestrel tablets were 99.6%~101.8% with RSD of 0.55%~1.2% and 99.5%~100.7% with RSD of 0.46%~1.6%; The average recoveries ($n=3$) of ethinylestradiol and levonorgestrel of compound levonorgestrel pills were 100.6%~101.1% with RSD of 0.92%~1.8% and 97.9%~98.7% with RSD of 1.1%~1.9%. The content uniformities of compound levonorgestrel pills were good but some of compound levonorgestrel tablets were not complied with the standard of Chinese Pharmacopoeia 2005 edition. **Conclusion** The HPLC method is good in the aspect of selectivity and sensitivity, the HPLC method can be applicable for the determination of assay and content uniformity of compound levonorgestrel tablets and its pills. In order to safe and effectively use estrogen contraceptive, we have to control the quality of contraceptive in common used in China.

Key words compound levonorgestrel tablets; compound levonorgestrel pills; assay; content uniformity; HPLC

复方左炔诺孕酮片和复方左炔诺孕酮滴丸为 2005 年版中国药典收载的复方口服避孕制剂, 欧洲药典、美国药典、英国药典及日本药局方均未收

载。中国药典 2005 年版收载的复方左炔诺孕酮滴丸含量测定为 HPLC 法^[1]; 而复方左炔诺孕酮片则采用比色法分别测定炔雌醇和左炔诺孕酮的含

量^[2]。比色法操作烦琐,专属性差,测定结果的误差大,不利于该类产品质量的有效控制,为此,有必要对复方左炔诺孕酮片含量测定方法进行修订和完善。本文在左炔诺孕酮滴丸含量测定的HPLC方法^[1]基础上,调整流动相中乙腈-水的比例,以提高检测组分的分离度,有效消除空白辅料的干扰,并对优化后的色谱条件进行方法学验证试验,从而建立了能够同时准确测定复方左炔诺孕酮制剂(片剂及滴丸)中炔雌醇和左炔诺孕酮含量的HPLC方法,并以此方法进行了样品的含量均匀度考察,为复方左炔诺孕酮制剂的质量控制提供可靠的技术手段,确保避孕制剂的用药安全有效。

1 仪器与试剂

岛津 LC-2010A 液相色谱仪,配以 SPD-10AVP 紫外检测器;岛津 LC-20AT 液相色谱仪,配以二极管阵列检测器。

对照品炔雌醇和左炔诺孕酮均购于中国药品生物制品检定所;复方左炔诺孕酮片(A厂生产,批号20040106,20040107,20040108,B厂生产,批号20040101,20040102,20040202,C厂生产,批号20031010,20050409,20050411)和复方左炔诺孕酮滴丸(A厂生产,批号20040311,20040315,20040316)规格均为:每片(粒)含左炔诺孕酮0.15 mg,含炔雌醇0.03 mg,乙腈为HPLC级,超纯水用Milli-Q Plus超纯水系统(美国Millipore公司)制备。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱:Waters Symmetry 300TM C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(40:60);流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:220 nm;柱温:30 °C;进样量:20 μL。

2.2 试验方法 取本品20片(粒),精密称定,研细,精密称取适量(约相当于左炔诺孕酮0.3 mg),置10 mL量瓶中,加流动相约5 mL,超声10 min,放至室温,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液;另取对照品炔雌醇和左炔诺孕酮适量,精密称定,加流动相溶解并稀释制成每1 mL中含炔雌醇6 μg和左炔诺孕酮30 μg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各20 μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算,即得。对照品及片剂和滴丸的HPLC图见图1。

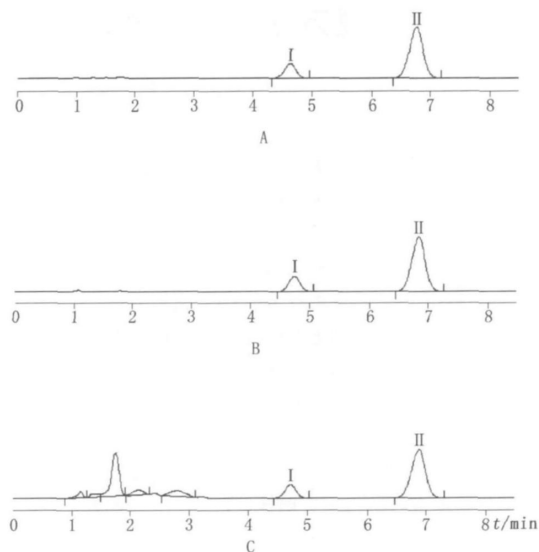


图1 对照品(A)、复方左炔诺孕酮片(B)及复方左炔诺孕酮滴丸(C) HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances(A), compound levonorgestrel tablets(B), and compound levonorgestrel pills(C)
I. 炔雌醇(ethinylestradiol) II. 左炔诺孕酮(levonorgestrel)

3 方法学考察

3.1 线性试验 精密称取对照品炔雌醇15.54 mg和左炔诺孕酮75.49 mg,置100 mL量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取1 mL,分别置100 mL、50 mL、20 mL、10 mL和5 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,制成系列浓度的溶液,按照上述色谱条件依法测定,以浓度与其峰面积进行线性回归,结果炔雌醇和左炔诺孕酮回归方程分别为:

$$Y = 289.4X - 101.6 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 24.22X + 7.507 \quad r = 0.9999$$

线性范围分别为1.554~31.08和7.549~151.0 μg·mL⁻¹。

3.2 精密度试验 精密量取含量测定项下的对照品溶液20 μL,按照上述色谱条件,连续进样5次,计算炔雌醇和左炔诺孕酮峰面积的RSD分别为0.16%和0.10%。试验结果表明本方法的精密度良好。

3.3 重复性试验 取20050411批复方左炔诺孕酮片和20040311批复方左炔诺孕酮滴丸各6份,分别按“2.2”项下方法进行重复性试验。结果复方左炔诺孕酮片中炔雌醇和左炔诺孕酮含量(标示量%, n=6)分别为100.2%和102.0%,RSD分别为0.64%和0.35%;复方左炔诺孕酮滴丸

中炔雌醇和左炔诺孕酮含量 (标示量%, $n = 6$) 分别为 91.7% 和 101.4%; RSD 分别为 0.82% 和 0.88%。

3.4 加样回收试验 精密称取炔雌醇对照品 10 mg、12 mg 和 15 mg 分别置 20 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 分别加入精密称取的左炔诺孕酮对照品 12 mg、15 mg 和 18 mg 加乙腈 35 mL 使溶解, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液 (低、中、高浓度溶液各平行制备 3 份); 另取已测知炔雌醇和左炔诺孕酮含量的 20050411 批复方左炔诺孕酮片的细粉约 100 mg ($n = 9$) 和 20040311 批复方左炔诺孕酮滴丸的细粉约 33 mg ($n = 9$), 分别置 10 mL 量瓶中, 精密加入各浓度水平的储备液 1 mL, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件进行加样回收试验。结果复方左炔诺孕酮片中炔雌醇低、中、高 3 种浓度的平均回收率 ($n = 3$) 分别为 99.6% (RSD = 0.53%), 100.3% (RSD = 1.1%) 和 101.8% (RSD = 1.2%), 左炔诺孕酮低、中、高 3 种浓度的平均回收率 ($n = 3$) 分别为 99.5% (RSD = 0.46%), 100.3% (RSD = 1.6%) 和 100.7% (RSD = 0.60%); 复方左炔诺孕酮滴丸中炔雌醇低、中、高 3 种浓度的平均回收率 ($n = 3$) 分别为 101.1% (RSD = 1.8%), 100.6% (RSD = 1.1%) 和 101.1% (RSD = 0.92%), 左炔诺孕酮低、中、高 3 种浓度的平均回收率 ($n = 3$) 分别为 98.2% (RSD = 1.9%), 97.9% (RSD = 1.6%) 和 98.7% (RSD = 1.1%)。

3.5 溶液的稳定性考察 取含量测定项下的对照品溶液, 按上述色谱条件, 在 0、4、8、12、25 h 依法测定炔雌醇和左炔诺孕酮的峰面积, 结果 RSD ($n = 5$) 分别为 0.35% 和 0.31%, 表明溶液中炔雌醇和左炔诺孕酮在 25 h 内稳定。

4 样品含量测定

依照上述方法测定 A、B 和 C 厂的各 3 批复方左炔诺孕酮片和 A 厂的 3 批复方左炔诺孕酮滴丸中炔雌醇和左炔诺孕酮的含量, 并与比色法^[2]测定结果进行比较, 结果见表 1。由表 1 结果可见, 与 HPLC 法测定结果相比, 采用中国药典 2005 年版收载的比色法测定复方左炔诺孕酮片中炔雌醇和左炔诺孕酮含量, 结果总体偏高, 差异显著。这可能与比色法的专属性差有关, 系样品中的辅料干扰所致。

表 1 样品含量测定结果 (相当于标示量, %)

Tab 1 The results of assay of samples (equivalent to the declared content %)

剂型 (dosage)	生产厂家 (manu factre)	批号 (Lot No)	炔雌醇 (ethiny lestradiol)		左炔诺孕酮 (levonorgestrel)	
			HPLC	比色法 (colorimetry)	HPLC	比色法 (colorimetry)
			片剂 (tablets)	A	20040106	100.9
		20040107	104.3	96.5	104.1	102.1
		20040108	100.0	97.4	96.6	97.2
	B	20040101	106.6	115.1	103.2	124.6
		20040102	91.1	131.1	91.5	123.8
		20040202	93.4	112.2	96.2	110.1
	C	20031010	98.2	105.4	104.9	125.7
		20050409	100.9	114.8	105.7	127.8
		20050411	100.2	99.0	101.8	122.6
滴丸 (pills)	A	20040311	90.2	—	101.4	—
		20040315	92.2	—	103.9	—
		20040316	91.7	—	100.4	—

5 样品含量均匀度考察

复方左炔诺孕酮片和复方左炔诺孕酮滴丸规定的处方为每片 (粒) 含炔雌醇 0.03 mg 左炔诺孕酮 0.15 mg 为小规格制剂。根据国家药品标准要求, 需要进行含量均匀度考察。应用本文建立的 HPLC 含量测定方法, 进行复方左炔诺孕酮制剂含量均匀度检查。取本品 1 片 (粒), 置 5 mL 量瓶中, 加水 1 mL, 振摇使崩散, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液, 照含量测定项下的方法测定, 结果见表 2。由表 2 结果可见, 3 批复

表 2 含量均匀度测定结果 ($n = 10$)

Tab 2 The results of content uniformity

剂型 (dosage)	生产厂家 (manu factre)	批号 (Lot No)	炔雌醇 (ethiny lestradiol)		左炔诺孕酮 (levonorgestrel)	
			均值 (average)	A+	均值 (average)	A+
						1.8S
片剂 (tablets)	A	20040106	105.3	9.0	99.1	13.3
		20040107	106.6	9.5	99.2	15.3
		20040108	105.8	7.9	94.3	13.9
	B	20040101	85.5	64.4	95.3	30.6
		20040102	80.0	76.6	93.9	31.3
		20040202	95.9	37.1	93.6	25.0
	C	20031010	99.4	5.0	101.5	6.4
		20050409	101.0	4.1	100.3	4.1
		20050411	101.5	4.5	99.6	3.2
滴丸 (pills)	A	20040311	90.7	13.9	97.4	7.0
		20040315	90.4	12.9	97.0	6.5
		20040316	91.3	14.2	96.8	7.4

方左炔诺孕酮滴丸的含量均匀度检查均符合规定。但是, 3个厂家 9批复方左炔诺孕酮片的含量均匀度检查结果, 除 C厂的 3批样品均符合规定外, A厂 20040107批样品需复测 20片, 而 B厂的 3批样品含量均匀度均不符合规定 ($A+1.8S$ 最大值达 76.6)。

6 讨论

6.1 采用中国药典 2005年版收载的比色法和本文的 HPLC法测定复方左炔诺孕酮片中炔雌醇和左炔诺孕酮含量, 其结果差异显著。究其原因, 系比色法的专属性差, 样品中的辅料干扰所致。

6.2 避孕制剂作为一种特殊药品, 其质量直接影响到人们的用药安全与有效。作为小剂量的复方避孕制剂, 控制其含量均匀度尤为重要。本文检查的复方左炔诺孕酮滴丸含量均匀度均符合规定, 但是, 复方左炔诺孕酮片的含量均匀度的测定结果不容乐观。由此可见, 为有效保证复方避孕制剂的质量, 保证计划生育用药安全, 需要增加口服避孕制剂的含量均匀度检查。

6.3 用上述给定的流动相, 分别在 220 nm 和 280 nm 波长处检测左炔诺孕酮对照品溶液。结果发现: 在 280 nm 波长处呈现 2 个色谱峰 (见图 2), 其峰面积比 1:1.4 但在 220 nm 波长处检测时, 其峰面积比为 1:350。采用二极管阵列检测器检测, 结果见图 3, 显示了上述相同的试验结果。这是否为左炔诺孕酮的杂质或降解产物有待进一步研究。

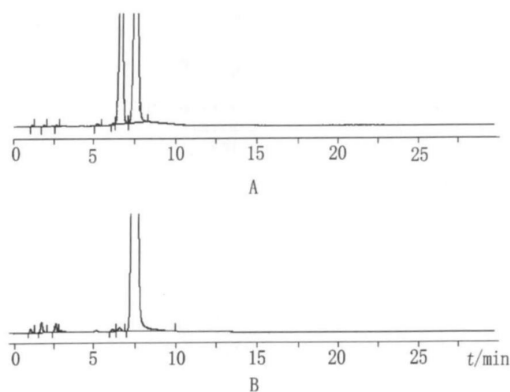


图 2 左炔诺孕酮对照品溶液检测波长为 280 nm (A) 及 220 nm (B) 的色谱图

Fig 2 Chromatograms of reference solution of levonorgestrel at detection wavelength of 280 nm (A) and 220 nm (B)

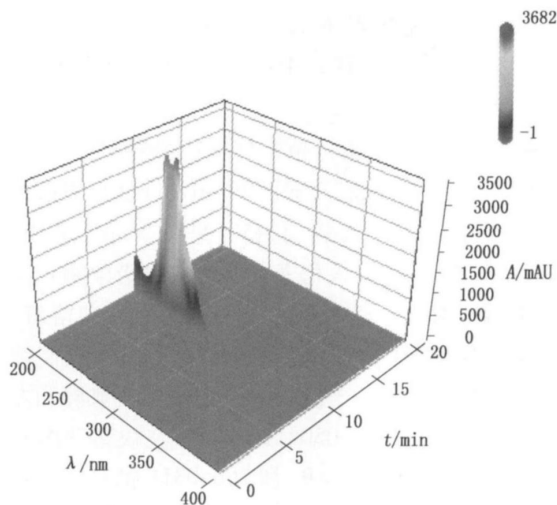


图 3 用二极管阵列检测器测定左炔诺孕酮对照品溶液的三维谱图
Fig 3 Three-dimensional spectrum of reference solution of levonorgestrel scanned by DAD detector

7 结论

本文建立的复方左炔诺孕酮片及其滴丸的 HPLC 含量测定方法具有专属性强、灵敏度高、操作简便, 结果准确可靠的特点, 满足了市售产品的含量均匀度检查要求。其结果已上报国家药典委员会, 旨在提升我国避孕制剂质量标准的检测水平, 为严格控制计划生育药品的质量提供可靠的技术手段。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005 Vol II (二部): 424
- 2 ChP(中国药典). 2005 Vol II (二部): 423

(本文于 2009年 8月 11日修改回)