

RP-HPLC法同时测定避孕贴中炔雌醇与诺孕曲明的含量

张琳杰*, 刘景彬, 张 启, 王 琳, 赵永良, 谢印芝(天津美伦医药集团有限公司, 天津 300400)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)24-3429-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.24.40

摘要 目的: 建立同时测定避孕贴中炔雌醇与诺孕曲明含量的方法。方法: 采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 WondaCract ODS-2, 流动相为甲醇-0.5%磷酸(68:32, V/V), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 220 nm, 柱温为 25 ℃, 进样量为 20 μl。结果: 炔雌醇、诺孕曲明质量浓度分别在 0.872~130.8、0.880~132.0 μg/ml 范围内与各自的峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 6$ 、 $0.999\ 7$); 精密度、重复性、稳定性试验的 RSD 均 $\leq 1.03\%$; 加样回收率分别为 101.50%、101.68%, RSD 分别为 0.99%、0.95% ($n=9$)。结论: 该方法简便、准确, 可用于避孕贴中炔雌醇和诺孕曲明的含量测定。

关键词 反相高效液相色谱法; 避孕贴; 炔雌醇; 诺孕曲明

Simultaneous Determination of the Content of Ethinylestradiol and Norelgestromin in Hormonal Patches by RP-HPLC

ZHANG Lin-jie, LIU Jing-bin, ZHANG Qi, WANG Lin, ZHAO Yong-liang, XIE Yin-zhi(Tianjin Meilen Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300400, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of ethinylestradiol and norelgestromin in hormonal patches. METHODS: RP-HPLC method was performed on column of WondaCract ODS-2 with mobile phase of methanol-0.5% phosphoric acid (68:32, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 220 nm, the detection temperature was 25 ℃, and sample volume was 20 μl. RESULTS: The linear relationship was 0.872-130.8 μg/ml for ethinylestradiol ($r=0.999\ 6$) and 0.880-132.0 μg/ml for norelgestromin ($r=0.999\ 7$); RSDs of precision, reproducibility and stability tests were no more than 1.03%, average recoveries were respectively 101.50% (RSD=0.99%, $n=9$) and 101.68% (RSD=0.95%, $n=9$). CONCLUSIONS: The established method is simple and accurate, and can be used for the content determination of ethinylestradiol and norelgestromin in hormonal patches.

KEYWORDS RP-HPLC; Hormonal patches; Ethinylestradiol; Norelgestromin

避孕贴是一种新型女性避孕工具, 主要借助贴剂上的储药区缓慢释放甾体激素, 经皮肤渗透进入机体而发挥避孕作用^[1-2]。炔雌醇(Ethinylestradiol, EE)是避孕药中最常用的强效雌激素, 与孕激素配伍可产生协同作用^[3-4]; 诺孕曲明(Norelgestromin, NE)是一种孕激素, 为炔诺酮的活性代谢产物, 其与炔雌醇配伍后经透皮吸收, 可达到良好的避孕效果^[5-7]。目前, 同时测定炔雌醇及诺孕曲明含量方法的报道较少。为了更好地控制避孕贴质量, 提高检测效率, 在本研究中笔者采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法同时测定了炔雌醇与诺孕曲明的含量。

1 材料

LC-10A 型 HPLC 仪, 包含 SPD-10A 型紫外检测器、Anastar 5.3 色谱工作站(日本岛津公司); BS110S 型电子天平(德国赛多利斯公司); QYTC-400 型超声波清洗器(沧州全一电子设备有限公司)。

避孕贴(天津美伦医药集团有限公司, 批号: 20140703、20140816、20140908); 炔雌醇对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100052-200609, 纯度: 99.5%); 诺孕曲明对照品(加拿大多伦多研究化学品公司, 批号: D28870, 纯度: 99.9%); 甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为纯水。

2 方法与结果

* 助理工程师, 硕士。研究方向: 药物分析。E-mail: fishskyzlj@126.com

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: WondaCract ODS-2(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.5%磷酸(68:32, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 25 ℃; 检测波长: 220 nm; 进样量: 20 μl。在此色谱条件下, 炔雌醇与诺孕曲明的出峰时间相对较短(<30 min), 峰形较好(对称因子均在 0.95~1.05 之间), 两组分的理论板数分别以炔雌醇与诺孕曲明峰计均>3 000, 分离度均>1.5。色谱见图 1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取经 105 ℃加热 4 h 后的炔雌醇与诺孕曲明对照品各适量, 置于同一 10 ml 量瓶中, 超声(功率: 200 W, 频率: 45 kHz)处理 30 min 后, 用 70% 甲醇溶解并定容, 即得。

2.2.2 供试品溶液 取避孕贴(批号: 20140703)1 片, 除去保护膜剪碎后置于 100 ml 锥形瓶中, 加入 70% 甲醇 40 ml, 浸泡 1 h 后, 超声(功率: 200 W, 频率: 45 kHz)处理 30 min, 提取 2 次, 提取液转入 100 ml 量瓶并用 70% 甲醇定容, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按避孕贴制备工艺制备不含炔雌醇与诺孕曲明的阴性样品, 按“2.2.2”项下方法制备, 即得。

2.3 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.01、0.05、0.1、0.25、0.5、1.0 ml, 分别置于 10 ml 量瓶中, 加 70% 甲醇稀释并定容, 摇匀, 制成不同质量浓度的系列溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定并记录峰面积。以峰面积(y)为纵坐标、质量浓度

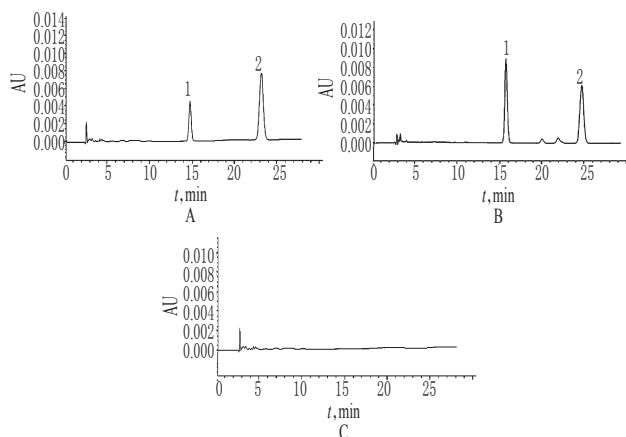


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品溶液;B.供试品溶液;C.阴性对照溶液;1.炔雌醇;2.诺孕曲明

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference solution;B.test solution;C.negative control solution;1. ethingl estradiol;2.nordgestromin

($x, \mu\text{g/ml}$)为横坐标进行线性回归,得炔雌醇的回归方程为 $y=16\ 418x-11\ 009$ ($r=0.999\ 6$),诺孕曲明的回归方程为 $y=17\ 965x+11\ 414$ ($r=0.999\ 7$)。结果表明,炔雌醇、诺孕曲明的质量浓度分别在 $0.872\sim 130.8$ 、 $0.880\sim 132.0\ \mu\text{g/ml}$ 范围内与各自峰面积呈良好的线性关系。

2.4 检测限与定量限

取“2.2.1”项下的混合对照品溶液适量,用流动相逐级稀释,摇匀,滤过,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,以信噪比为3时,测得炔雌醇、诺孕曲明的检测限分别为 0.014 、 $0.012\ \mu\text{g/ml}$;以信噪比为10时,测得炔雌醇、诺孕曲明的定量限分别为 0.042 、 $0.036\ \mu\text{g/ml}$ 。

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件重复进样9次,记录峰面积。结果,炔雌醇、诺孕曲明峰面积的RSD分别为 0.27% 、 0.17% ,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品(批号:20140816)适量,分别于放置 0 、 4 、 8 、 12 、 24 、 48 、 60 、 $72\ \text{h}$ 时按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,炔雌醇、诺孕曲明峰面积的RSD分别为 0.29% 、 0.35% ($n=9$),表明供试品溶液在 $72\ \text{h}$ 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批次(批号:20140816)避孕贴片1片,按“2.2.2”项下方法各平行制备9份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,炔雌醇、诺孕曲明含量的RSD分别为 1.03% 、 0.99% ($n=9$),表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密吸取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20140816) $2\ \text{ml}$,各9份,分别加入相当于对照品溶液质量浓度 80% 、 100% 、 120% 的溶液(每个质量浓度3份)各 $2\ \text{ml}$,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果详见表1。

2.9 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并记录峰面积,计算样品含量,结果见表2。

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	已知含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
炔雌醇	12.55	10.36	23.10	101.88	101.50	0.99
	12.55	10.36	23.11	101.97		
	12.55	10.36	23.26	103.45		
	12.55	13.08	25.87	101.85		
	12.55	13.08	25.84	101.61		
	12.55	13.08	25.79	101.22		
	12.55	15.26	27.84	100.20		
	12.55	15.26	27.83	100.10		
	12.55	15.26	28.00	101.22		
诺孕曲明	73.40	60.50	134.55	101.08	101.68	0.95
	73.40	60.50	134.85	101.58		
	73.40	60.50	135.40	102.47		
	73.40	71.50	145.47	100.80		
	73.40	71.50	146.74	102.57		
	73.40	71.50	145.52	100.86		
	73.40	88.00	161.68	100.32		
	73.40	88.00	163.49	102.38		
	73.40	88.00	164.12	103.09		

表2 样品含量测定结果($n=3, \text{mg/g}$)

Tab 2 Results of content determination of samples ($n=3, \text{mg/g}$)

批次	炔雌醇	诺孕曲明
20140703	0.557 9	3.672
20140816	0.562 4	3.726
20140908	0.559 8	3.689

3 讨论

3.1 流动相的选择

采用2010年版《中国药典》(二部)中检测炔雌醇的流动相[甲醇-水(70:30, V/V)]对避孕贴供试品溶液进行色谱分离,结果发现炔雌醇分离度较好,但诺孕曲明无法与避孕贴中的药用辅料等其他物质完全分离。笔者通过改变流动相比例、pH、流速等方法,最终确定甲醇-0.5%磷酸(68:32, V/V)为本研究的流动相。在此条件下,炔雌醇与诺孕曲明分离度良好、峰形较好、出峰时间相对较短。

3.2 样品前处理方法的选择

根据2010年版《中国药典》(二部)及相关文献可知,萜类药物的处理多采用剪碎后溶剂浸泡的方法^[8-10],但该方法所需时间较长且提取率低。本研究结合超声波辅助方法,将样品剪碎浸泡一定时间后超声处理,这样不仅缩短了样品处理时间,且大大提高了样品中有效成分(炔雌醇与诺孕曲明)的提取率。

综上所述,本方法简便、准确,可用于避孕贴中炔雌醇和诺孕曲明的含量测定。

参考文献

- [1] 武洋洋,高艳丽,刘建平,等.复方孕二烯酮周效避孕贴剂的体外经皮渗透及体内药代动力学[J].中国医科大学学报,2012,43(1):35.
- [2] Fiebig DG, Knox S, Viney R, et al. Preferences for new and existing contraceptive products[J]. Health Econ,2011,20:35.
- [3] 刘笑芬,丁存刚,葛庆华,等.柱前衍生LC-MS/MS同时测定血浆中的孕二烯酮、依托孕烯和炔雌醇[J].药学学报,

大荨麻根的质量标准研究及不同采收期的考察

邱洪^{1*}, 代兵², 潘永雪¹ (1. 解放军第44医院药剂科, 贵阳 550009; 2. 解放军第273医院药械科, 新疆 库尔勒 841000)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)24-3431-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.24.41

摘要 目的: 研究大荨麻根的质量标准, 并对不同采收期的样品含量进行考察。方法: 采用薄层色谱法鉴别大荨麻根中东莨菪内酯, 以环己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(6:10:7:1.2, V/V/V/V)为展开剂; 采用醇溶性热浸法测定含量; 并对大荨麻根不同时期采挖的药材进行了相关对比研究。结果: 东莨菪内酯薄层色谱特征明显; 醇溶性热浸法测定大荨麻根的含量较高(RSD≤1%)。大荨麻根秋末至初春采收的浸出物含量最高, 此阶段为适宜采挖期。结论: 本研究建立的质量标准可准确地对大荨麻根进行定性、定量研究, 不同采收期的考察有利于有效地控制大荨麻根药材的质量。

关键词 大荨麻根; 东莨菪内酯; 薄层色谱法; 浸出物

Study on the Quality Standard of Root of *Urtica dioica* and Different Harvest Periods

QIU Hong¹, DAI Bing², PAN Yong-xue¹ (1. Dept. of Pharmacy, 44 Military Hospital of China, Guiyang 550009, China; 2. Dept. of Drug and Device, 273 Military Hospital of China, Xinjiang Korla 841000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the quality standard of root of *Urtica dioica* and investigate the sample's content in different harvest periods. METHODS: TLC was conducted to identify the scopoletin in the root of *U. dioica* with the developing agent of hexane-dichloromethane - ethyl acetate - formic acid (6:10:7:1.2, V/V/V/V); alcohol-hot dipping was used to determine the content; and the root of *U. dioica* in different harvest periods were comparatively researched. RESULTS: The lactone thin-layer chromatogram feature was obvious, alcohol-hot dipping showed the contents of root of *u. dioica* was relatively high(RSD≤1%), the extract content of root of *U. dioica* was the highest from late fall to early spring, and the stage was suitable excavation period. CONCLUSIONS: The established quality standard can be used for accurately qualitative and quantitative, and studying different harvest periods is conducive to effectively control the quality of root of *U. dioica*.

KEYWORDS Root of *Urtica dioica*; Scopoletin; TLC; Extract

大荨麻根为荨麻科植物大蝎子草 *Girardinia suborbiculata* C.J.Chen sub sp.triloba. 的新鲜或干燥根。目前对大蝎子草的研究主要集中于其植物生态学^[1]、药效学及临床等方面^[2-7],

对其质量的研究内容较少。大蝎子草含有总黄酮、东莨菪内酯、芹菜素等^[8-9]。陶玲等对大蝎子草进行了全草的研究, 在草根中分离鉴定出32个成分; 草茎中分离鉴定出31个成分; 草

2010, 45(1):87.

- [4] Höchel J, Schuett B, Ludwig M, et al. Implications of different application sites on the bioavailability of a transdermal contraceptive patch containing ethinyl estradiol and gestodene: an open-label, randomized, crossover study [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2014, 52(10):856.
- [5] Liu X, Ding C, Ge Q, et al. Determination of norelgestromin in rabbit plasma by LC-MS/MS and its application to the pharmacokinetic study of ORTHO EVRA [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(3):311.
- [6] Crosignani PG, Nappi C, Ronsini S, et al. Satisfaction and compliance in hormonal contraception: the result of a multicentre clinical study on women's experience with the ethinylestradiol/norelgestromin contraceptive patch in Ita-

ly [J]. *BMC Womens Health*, 2009, 9(1):18.

- [7] Schwartz JI, Dunbar S, Yuan J, et al. Influence of taranabant, an orally active, highly selective, potent cannabinoid-1 receptor (CB1R) inverse agonist, on ethinyl estradiol and norelgestromin plasma pharmacokinetics [J]. *J Clin Pharmacol*, 2009, 49(1):72.
- [8] 于燕莉, 潘菡清, 井莉, 等. 高效毛细管电泳法测定痹痛宁贴剂中东莨菪碱及乌头碱的含量 [J]. *解放军药理学学报*, 2005, 21(1):65.
- [9] 丁菊英, 王晓娜, 王晓坤. HPLC测定小儿温里止泻贴剂中桂皮醛的含量 [J]. *食品与药品*, 2014, 16(3):210.
- [10] 李怀国, 何宝凝, 李子鸿, 等. HPLC法测定伤科贴膏中栀子苷的含量及其稳定性研究 [J]. *中国药房*, 2014, 25(27):2544.

(收稿日期:2014-10-24 修回日期:2015-06-06)

(编辑:刘柳)

* 副主任药师。研究方向: 医院药学。电话: 0851- 3830009。

E-mail: Benbento@sina.com