

混合成分中 Ethinyl Estradiol과 Norethindrone
Acetate의 分離定量

李 妊 炫, 龍 在 益

淑明女子大學校 藥學大學

**Isolative Determination of Ethinyl Estradiol
and Norethindrone Acetate in the
Mixed Preparations.**

Jung Hyun Lee, Jae Ick Young

(Received September 10, 1971)

Application of the spectrophotometer to the analysis of 17 α -ethinyl estradiol and 17 α -ethinyl-19-nortestosterone acetate mixture in oral contraceptive has been accomplished.

It is used Beckman Du Spectrophotometer as a apparatus. The petroleum ether extract of ethinyl estradiol is determined at 535 m μ and the chloroform extract of norethindrone acetate is determined at 380 m μ respectively. This analytical method is formed Lambert Beer's law. This method can be used to the analysis of ethinyl estradiol and norethindrone acetate mixture in commercial dosage form of routine assay.

緒 論

最近 흔히 사용되는 一般 經口用避妊劑는 estrogens와 progestational agents의 混合製劑로서 ethinyl estradiol 或은 ethinyl estradiol의 methylether와 norethindrone, norethindrone acetate 또는 norethindrel을 含有하고 있다. ethinyl estradiol과 norethindrone acetate의 混合製劑中の 各成分의 分離 定量法에 關하여 既히 Kober 反應이나 또는 이를 modification한 方法¹⁾ 比色定量法^{2,3)} spectrofluorometry에 依한 定量法⁴⁾ 및 chromatography에 依한 方法^{5,6)} 등이 報告된바 있으며 最近에는 gas chromatography⁷⁾와 autoanalyzer에 依한 方法⁴⁾ 등이 報

※College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea

告된바 있으나 同時定量에 있어서는 그 操作이 複雜하며 ethinyl estradiol이나 progestational steroid인 norethindrone acetate도 estrogen의 發色試藥에 依하여 다같이 發色되어 分離가 困難하며 progestational steroid의 α -keto에 依한 一般反應도 困難하다. 著者等은 ethinyl estradiol과 norethindrone acetate의 混合製劑를 簡易하고 迅速한 方法으로서 比色定量法³⁾을 利用하여 分離定量하였기에 이에 報告한다.

實驗 方法

1. 試液

(1) Ethinyl estradiol 試驗用

- i) 10% NaOH液
- ii) Ethanol, methanol 混液 (10 : 1)에 물을 넣어 40%溶液으로 만든다.
- iii) 90% H₂SO₄
- iv) Petroleum ether

(2) Norethindrone acetate 試驗用

- i) Chloroform
- ii) I₂NAH 試液

Isonicotinic acid hydrazide 500 mg을 正確히 달아 100 ml의 mess flask에 넣고 無水 ethanol 750ml를 넣어 녹이고 HCl 1ml (Conc. HCl 62.5 ml에 無水 ethanol을 넣어 1000ml로 만든 것)을 넣은 다음 無水 ethanol을 넣어 標線까지 채운다음 濾過하여 갈색 병에 保管한다.

2. 操作

(1) 標準溶液의 調製

가) 標準 Ethinyl estradiol 溶液

標準 Ethinyl estradiol 50 mg을 正確히 달아 100 ml의 mess flask에 넣고 無水 methanol을 넣어 녹이고 正確하게 100 ml로 한다음 이 液 10 ml를 正確히 取하여 100 ml의 mess flask에 넣고 無水 methanol을 넣어 正確히 100 ml로 하여 標準溶液으로 하였다. 이 溶液은 標準 ethinyl estradiol로서 每 ml 當 50 μ g을 含有한다.

나) 標準 Norethindrone acetate 溶液

標準 norethindrone acetate 10 mg을 正確히 달아 100 ml의 mess flask에 넣고 無水 ethanol을 넣어 녹이고 正確하게 100 ml로 하여 標準溶液으로 하였다. 이 溶液은 標準 norethindrone acetate로서 每 ml當 100 μ g을 含有한다.

(2) 定量法

가) 標準品の 調製

Ethinyl estradiol 5 mg와 norethindrone acetate 300 mg을 各各 正確히 달아 잘 混合하고 작은 mortar로 粉末로 하였다.

나) Ethinyl estradiol의 定量

Ethinyl estradiol로서 25 μ g에 該當하는 量을 精密하게 달아 물 10 ml와 HCl 1ml가 들어 있는 125 ml의 분액깔대기에 petroleum ether로 씻어넣고 petroleum ether 75ml씩 2回 抽出하고 물 5ml씩 2回 洗滌한 다음 petroleum ether抽出液을 습하여 10%

NaOH 液 10ml로 2回 抽出하여 10% petroleum ether으로 적신 솜을 통하여 깔대기로 濾過하고 물 10ml로 少量씩 세척하여 濾液과 洗液을 합쳐 HCl 7ml가 들어 있는 125 ml의 분액깔대기에 넣고 petroleum ether 75ml씩으로 2回 抽出하였다.

petroleum ether 抽出液을 습하여 水浴上에서 蒸發乾固시킨 후 殘留物에 ethanol methanol 混液(10 : 1) 1ml를 넣어 잘 振盪하여 溶解하고 90% H₂SO₄ 3ml를 넣어 振盪混合하였다. 冷却後 波長 535m μ 에서 ethanol·methanol混液(10 : 1) 1 ml에 90% H₂SO₄ 3ml로 넣은 液을 對照液으로 吸光度 ET를 測定하고 따로 標準液 0.5ml를 正確히 取하여 작은 비이커에 넣고 水浴上에서 蒸發乾固시킨 다음 檢液과 같은 操作을 하여 吸光度 ES를 測定하였다.

다) Ethinyl estradiol과 發色試藥과의 關係

Ethinyl estradiol 50 γ 에 該當하는 量을 取하여 上記 操作과 同一한 方法으로 抽出하고 蒸發乾固시킨 殘留物에 ethanol·methanol混液(10 : 1)과 發色試藥인 90% H₂SO₄ 를 加하는 量을 決定하기 위하여 다음 table 1. 과 같이 操作을 하였든바 ethanol methanol混液(10 : 1) 1ml, 90% H₂SO₄ 3 ml을 加할때의 吸光度가 제일 크며 90% H₂SO₄ 만을 加할때는 殘留物을 完全히 溶解시킬 수가 없으므로 solvent인 ethanol methanol 混液(10 : 1) 1ml를 넣는 것이 適當하다.

Table I. Connection of ethinyl estradiol and chromogenic reagent

Experimental number		1	2	3
Solvent	EtOH-MeOH(10 : 1)	1ml	2ml	3ml
Chromogenic Reagent	90% H ₂ SO ₄	3ml	2ml	1ml
Absorbance	After 7 minute at 535 m μ	1.70	1.30	0.08

라) Norethindrone acetate의 定量

Norethindrone acetate으로서 約 50 μ g에 該當하는 量을 精密하게 달아 물 15ml가

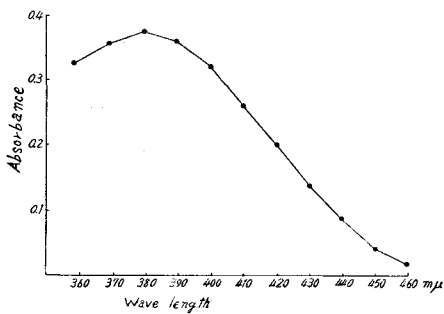


Fig. 1. Absorption spectrum of norethindrone acetate colored solution.

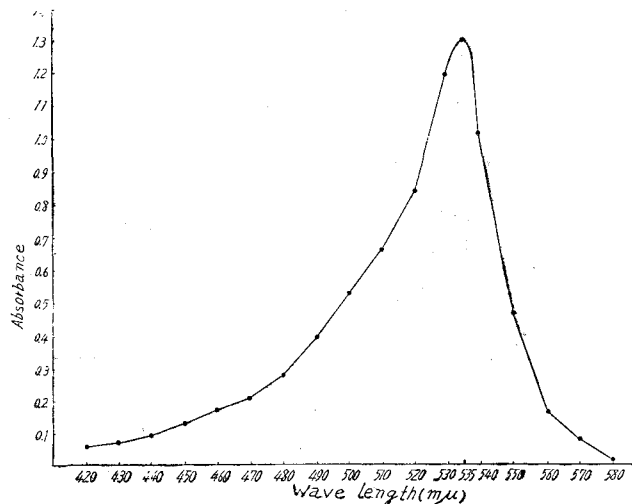


Fig. 2. Absorption spectrum of ethinyl estradiol colored solution.

들어 있는 125 ml의 분액깔대기에 chlorform으로 씻어넣고 chloroform 75 ml씩 2회 抽出하고 必要하면 물 5 ml씩 2회 씻어 씻은 液은 버린다. chlorform으로 적신 솜을 통하여 깔대기로 濾過하고 솜은 chloroform으로 少量씩 씻어 濾液과 洗液을 합하여 水浴上에서 蒸發乾固시킨 다음 冷後 殘留物에 isonicotinic acid hydrazide 試液 4ml를 加하여 잘 흔들어 섞고 室溫에서 1時間 放置한 後 isonicotinic acid hydrazide 試液을 對照液으로 波長 380 m μ 에서 吸光度 ET를 測定하고 따로 標準溶液 0.5ml를 正確히 取하여 작은 비이커에 넣고 水浴上에서 蒸發乾固시킨 다음 檢液과 같은 操作을 하여 吸光度 ES를 測定하였다.

마) 吸收曲線의 作成

上記 實驗方法에 依하여 ethinyl estradiol과 norethindrone acetate의 各 呈色物의 吸收曲線을 Beckman Du spectrophotometer를 利用하여 얻은 結果는 Fig. 1 및 Fig. 2와 같다.

바) 濃도와 吸光度와의 關係

Ethinyl estradiol과 norethindrone acetate의 各各의 濃도와 吸光度와의 關係를 表示하면 Fig. 3 및 Fig. 4와 같다.

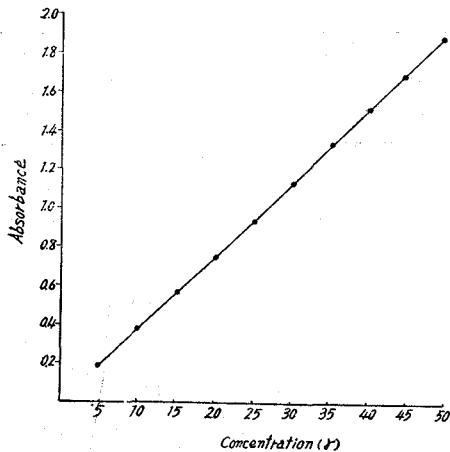


Fig. 3. Calibration curve of ethinyl estradiol.

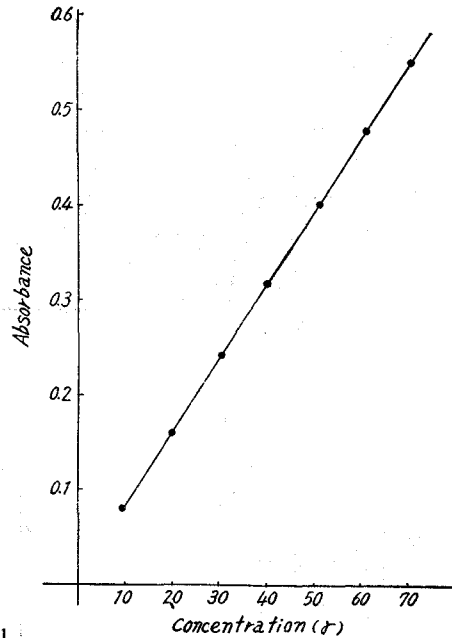


Fig. 4. Calibration curve of norethindrone acetate

사) 安定度試驗

Ethinylestradiol 50 γ 와 norethindrone acetate 100 γ 에 該當하는 量을 取하여 위와 같은 操作을 하여 安定度試驗을 했을 時의 結果는 Fig. 5 및 Fig. 6와 같다.

(3) Recovery Test

Ethinyl estradiol과 norethindrone acetate의 recovery test의 結果는 table II와 같다.

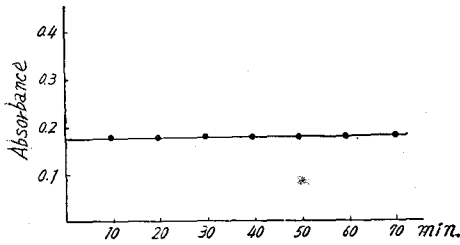


Fig. 5. Stability of ethinyl estradiol colored solution.

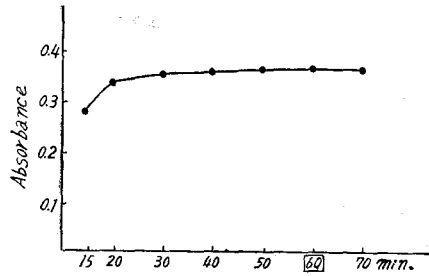


Fig. 6. Stability of norethindrone acetate colored solution.

Table II. Recoveries of ethinyl estradiol and norethindrone acetate

Component	Expenimental No.				Average
		I	II	III	
Found (%)	Ethinyl estradiol	98.5%	98.1%	97.9%	98.2%
	Norethindrone acetate	98.1%	98.5%	97.8%	98.1%

(4) 製劑分析

Ethinyl estradiol 및 norethindrone acetate를 含有한 市販製劑中 錠劑로 된것 10錠을 取하여 그 무게를 달고 每錠當 平均重量을 計算하고 작은 mortar에 넣어 粉末로 하고 調製한 標準品の 定量法과 同一한 操作으로 定量했을때 3回 實驗結果는 다음과 같다.

Table III. Ethinyl estradiol과 norethindrone acetate의 製劑分析

Sxperimental No.	I	II	III	Average
實 驗 結 果	98.3%	98.5%	98.7%	98.5%

本實驗에서 使用한 錠劑 1錠中 含有된 各成分의 含量은 ethinyl estradiol은 3 mg, norethindrone acetate는 0.05 mg의 含有한 것이다. 各成分의 含量計算은 다음 公式에 依하였다.

$$\frac{\text{mcg}}{\text{unit}} = \frac{\text{AT}}{\text{AS}} \times \text{C} \times \frac{\text{mg Av. unit + wt.}}{\text{mg sample unit}}$$

AT : sample의 吸光度

AS : standard의 吸光度

C : sample의 濃度

Av. unit wt. : 1錠中 平均重量 (mg)

Sample unit : 檢體의 量

實驗結果 및 考察

以上 實驗方法에 依하여 얻은 結果는 다음과 같다.

Ethinyl estradiol 및 norethindrone acetate의 定量 ethinyl estradiol의 定量은 上記 實驗方法과 같은 比色法에 依하여 最大吸收波長 535 m μ 에서 定量할 수 있으며 NaOH로 抽出時 上層의 petroleum ether層에는 norethindrone acetate가 存在하며 INAH試液으로 確認된다. CHCl₃로 抽出하는 경우에는 norethindrone acetate와 ethinyl estradiol이 同時에 抽出되므로 適合하지 않는 것을 알 수 있다.

한편 ethanol methanol 混液 (10:1) 1ml, 90% H₂SO₄ 3 ml을 加할때의 吸光度가 제일 크며 90% H₂SO₄만을 加할때는 殘留物을 完全히 溶解시킬 수가 없으므로 solvent인 ethanol methanol 混液 (10:1) 1ml를 넣는 것이 適當하다. Norethindrone acetate의 定量은 最大吸收波長 380m μ 에서 定量할 수 있으며 安定度試驗에 있어서는 ethinylestradiol 50 μ /ml와 norethindrone acetate 100 μ /ml에 該當하는 量을 取하여 위와 같은 操作을 하여 安定度試驗을 했을 때 ethinyl estradiol의 吸光度值는 時間에 影響을 받지 않으나 norethindrone acetate의 吸光度值는 15~50分까지는 上昇하나 60分부터는 一定한 吸光度值를 나타내며 安定하다. 濃도와 吸光度와의 關係에 있어서는 ethinyl estradiol은 5~50 μ /ml에서 norethindrone acetate는 10~70 μ /ml濃度에서 Lambert Beer의 法則이 成立되었다.

Recovery Test와 製劑分析

Table II.에서 보는 바와 같이 ethinylestradiol의 平均實驗值는 98.2%, norethindrone acetate는 98.1%이었다. 또한 製劑分析結果는 Table III.에서 보는 바와 같이 三回 平均値가 98.5%의 結果를 얻었다.

結 論

以上 實驗結果 및 考察에 依하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

Ethinyl estradiol 및 norethindrone acetate를 含有한 混合製劑中 이들 各成分을 分離定量할 때 ethinyl estradiol은 535 m μ 에서, norethindrone acetate는 380 m μ 에서 簡易하고 正確하게 比色定量할 수 있으며 ethinyl estradiol은 5~50 γ /ml, norethindrone acetate는 10~50 γ /ml濃度에서 Lambert Beer의 法則이 成立한다.

文 獻

- 1) Arvin P. Shroff and Richard E. Huettemann: *J. Pharm. Sci.*, **56**, 654 (1967)
- 2) Dimitric, C. Tsilifonis and Lester chafetz: *J. Pharm. Sci.*, **56**, 623 (1967)
- 3) Urbany, T., and Rehm, C.R: *J. Pharm. Sci.* **55**, 501 (1966)
- 4) A. J. Khoury and L. J. Cali: *J. Pharm. Sci.*, **56**, (1967)
- 5) Sjostrom, E., and Nykamen, L: *J. Pharm. Asscc. Sci. Ed.*, **46**, 321 (1957)
- 6) Kadin, H., Uglolini M.S., and Roberts, H. R: *J. Pharm. Sci.*, **53**, 1313 (1964)
- 7) O.D. Boughton, Rhys Bryant W.J. Ludwig, and D.L. Timma: *J. Pharm. Sci.*, **55**, 951 (1966)
- 8) Ernest J. Umberger: *American chemical Society*, **27**, 5, (1935)