

RP-HPLC 法测定甲睾酮聚乳酸微球中甲睾酮的含量

吕竹芬, 陈燕忠, 黄思玉, 谢清春*

(广东省药物新剂型重点实验室/广东药学院药物研究所, 广州 510006)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法测定甲睾酮聚乳酸微球中甲睾酮的含量。方法: 采用 Diamonsil - C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-水 (72:28) 为流动相, 检测波长为 241 nm, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 进样量为 10 μL, 柱温为 30 °C。结果: 甲睾酮 10 ~ 115 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r = 0.9999$), 平均回收率 ($n = 9$) 为 99.5%。结论: 所建方法简便、快捷, 准确可靠, 可用于甲睾酮聚乳酸微球的质量控制。

关键词: 甲睾酮; 聚乳酸微球; 高效液相色谱法; 含量测定; 激素; 质量控制

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2012)10-1874-03

RP-HPLC determination of methyltestosterone in microspheres of methyltestosterone polylactic acid

LÜ Zhu-fen, CHEN Yan-zhong, HUANG Si-yu, XIE Qing-chun*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery/Institute of Material Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract Objective: To establish a method to determine methyltestosterone in microspheres of methyltestosterone polylactic acid by HPLC. **Methods:** Diamonsil - C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used with the mobile phase consisting of methanol - water (72:28). The ultraviolet detector was set at 241 nm, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ and the injection volume was 10 μL. The column temperature was 30 °C. **Results:** The standard curve of methyltestosterone was linear in the concentration range of 10 - 115 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$). The average recovery was 99.5% ($n = 9$). **Conclusions:** The method is simple, sensitive and applicable for the quality control of methyltestosterone in microspheres of methyltestosterone polylactic acid.

Key words: methyltestosterone; microspheres of polylactic acid; RP-HPLC; assay; hormonal; quality control

甲睾酮(17α-甲基-17β-羟基雄甾-4-烯-3-酮, methyltestosterone, MT) 是一种重要的甾体雄性激素类药物, 在促进男性性器官的形成、发育、成熟及体内平衡等方面发挥着重要作用^[1]。临床上用于男性性腺机能减退症、无睾症及隐睾征的治疗; 还可用于月经过多、子宫肌瘤、子宫内膜异位症等妇科疾病的治疗^[2]。目前, 市面上的甲睾酮剂型主要有片剂, 但常伴有明显的首过效应, 需反复给药, 而制成长效注射用甲睾酮生物可降解缓释微球, 可以达到血药浓度平稳、应用方便、剂量可调、增加病人依从性的目的。现参照中国药典 2010 年版中甲睾酮的含量测定方法^[3], 采用 RP-HPLC 法测定甲睾酮聚乳酸微球中甲睾酮的含量。该法简便、快

速、准确, 适用于甲睾酮聚乳酸微球的质量控制。

1 仪器和试剂

高效液相色谱仪 (Dionex Ultimate 3000 Pump, Ultimate 3000 Photodiode Array Detector, 德国 Dionex corp.)、KQ-400 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)、甲睾酮 (珠海远程医药化工有限公司, 批号: 20091120)、甲睾酮对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 100172-200503)、睾酮对照品 (德国, Augsburg, 批号 80917, 含量 99.5%)、甲睾酮微球 (自制)、外消旋聚乳酸 ($\eta = 0.75$, 济南岱罡生物技术有限公司)、甲醇 (色谱纯, 广州市钛能色谱材料有限公司)、水为纯净水, 其他试剂均为分析纯。

* 通讯作者 Tel: (020) 39352508; E-mail: xieqchun@163.com

2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Diamonsil - C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相: 甲醇 - 水 (72:28); 检测波长 241 nm; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 进样量: 10 μL; 柱温: 30 °C; 取甲睾酮与睾酮适量, 加甲醇溶解并定量稀释制成每 1 mL 中分别含 0.1 mg 的溶液, 取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 理论塔板数按甲睾酮峰计算为 9352, 睾酮峰与甲睾酮峰的分离度 R = 4.75, 符合要求。结果见图 1。

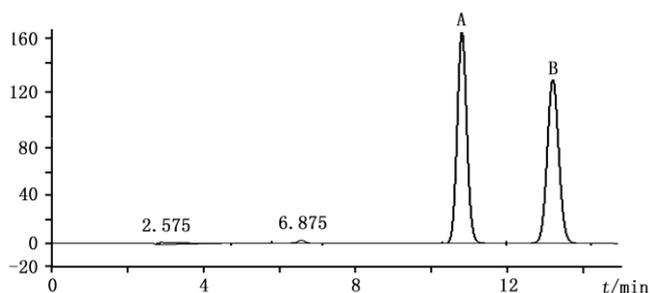


图1 甲睾酮 (A) 与睾酮 (B) 的色谱图

Fig 1 Chromatogram of methyltestosterone (A) and testosterone (B)

3 溶液的制备

3.1 对照品溶液 精密称取经 105 °C 干燥 2 h 的甲睾酮对照品 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成 100 μg · mL⁻¹ 的储备液。分别精密量取储备液 1.0, 15.0, 35.0, 55.0, 75.0, 95.0, 115.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得 10, 15, 35, 55, 75, 95, 115 μg · mL⁻¹ 不同浓度的对照品溶液。

3.2 供试品溶液^[4] 精密称取甲睾酮微球 50 mg (约含甲睾酮 3 mg), 置 5 mL 量瓶中, 用 0.5 mL 二氯甲烷 (CH₂Cl₂) 超声 15 min 后微球溶解, 放置室温后, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 静置。取上清液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

3.3 空白溶液 精密称取空白微球 50 mg, 按照“3.2”项下方法制备空白溶液。

4 方法与结果

4.1 专属性试验 按“2”项下的色谱条件, 取对照品溶液、供试品溶液、空白溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 没有干扰峰出现, 结果见图 2。

4.2 线性关系考察 将“3.1”项下不同浓度对照品溶液依次进行 HPLC 分析, 按“2”项下的色谱条件, 注入液相色谱仪, 记录甲睾酮色谱峰的面积。以峰面积 (Y) 为纵坐标, 甲睾酮进样量 (X) 为横坐标, 制备标准曲线, 得回归方程为:

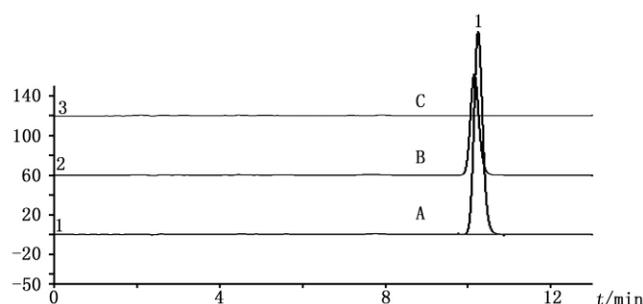


图2 对照品 (A)、供试品 (B) 和空白 (C) 溶液的色谱图

Fig 2 Chromatograms of control solution (A), sample solution (B) and blank solution (C)

1. 甲睾酮 (methyltestosterone)

$$Y = 0.498X - 0.042 \quad r = 0.9999$$

甲睾酮在 10 ~ 115 μg · mL⁻¹ 浓度范围内线性关系良好。

4.3 精密度试验 取“3.2”项下的供试品溶液, 按“2”项色谱条件下连续进样 6 次, 记录各峰面积, 计算 RSD 为 0.32% (n = 6), 表明本方法精密度良好。

4.4 重复性试验 分别精密称取样品 (批号: 20110510) 50 mg, 共 6 份, 按“3.2”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液各 10 μL 进样, 测定含量。结果 6 份样品的甲睾酮含量均值为 6.23%, RSD = 0.58% (n = 6), 说明重复性良好。

4.5 稳定性试验 取“3.2”项下制成的供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 精密吸取 10 μL 进样测定, 结果 RSD = 0.50% (n = 7), 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

4.6 回收率试验 精密称取空白微球 50 mg, 共 9 份, 置 5 mL 量瓶中, 用 0.5 mL 二氯甲烷 (CH₂Cl₂) 超声 15 min 后微球溶解, 放置室温后, 每 3 份分别精密量取浓度为 1.000 mg · mL⁻¹ 的对照品储备液 2.4 mL (80%), 3.0 mL (100%), 3.6 mL (120%), 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 静置, 取上清液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 按“2”项下的色谱条件进样, 记录色谱图, 计算平均回收率 (n = 9) 为 99.5%, 结果见表 1。

4.7 检测限 在选定的色谱条件下, 进样 10 μL, 按信噪比为 3:1 测得最低检测浓度为 0.088 μg · mL⁻¹。

4.8 定量限 在选定的色谱条件下, 进样 10 μL, 按信噪比为 10:1 测得定量限浓度为 0.7 μg · mL⁻¹。

4.9 样品含量测定 分别取 3 份不同批号 (批号: 20110510, 20110512, 20110515) 的甲睾酮聚乳酸微

表1 回收率试验的结果($n=3$)
Tab 1 The results of recovery test

加入量 (added) / μg	测得量 (found) / μg	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
2400	2365	98.5	99.0	0.47
2400	2387	99.5		
2400	2379	99.1		
3000	3006	100.2	99.6	0.62
3000	2986	99.5		
3000	2969	99.0		
3600	3569	99.1	99.8	0.62
3600	3612	100.3		
3600	3605	100.1		

表2 耐用性试验的结果($n=3$)
Tab 2 The results of durability test

色谱柱 (chromatographic column)	批号/含量(Lot No.) / (drug loading) / %		
	20110510	20110512	20110515
Diamonsil - C ₁₈ 柱(S/N: 803964) 250 mm × 4.6 mm 5 μm	6.38	6.27	6.19
Diamonsil - C ₁₈ 柱(S/N: 5031737) 250 mm × 4.6 mm 5 μm	6.28	6.19	6.17
Kromasil - C ₁₈ 柱(S/N: E26264) 250 mm × 4.6 mm 5 μm	6.31	6.29	6.24
RSD / %	0.81	0.85	0.58

5 讨论

甲睾酮在波长 241 nm 处有最大吸收,而辅料 PVA 在此波长处也有紫外吸收。故采用紫外分光光度法测定微球中药物的含量,将会影响测定结果的准确性。因此,本文采用高效液相色谱法测定其含量。

测定微球中药物含量的提取方法通常有如下几种:(1) 研磨提取法:如红霉素明胶微球测定^[5]时,先研磨成细粉,用流动相提取完全过滤后再测定含量。(2) 溶解法:用于聚乳酸微球与乙基纤维素微球,即把微球溶于对载体溶解度更大的溶剂中,溶解载体后再将药物提取出来测定含量。(3) 酶解法:用于白蛋白微球,即用酶将载体的网状结构破坏,使药物完全释放出来,再测定含量。本实验采用溶解法测定甲睾酮含量,经线性试验,精密度试验,回收率试验等证明,本方法符合定量分析的要求,且简便、快捷、准确可靠。

球样品,按照“3.2”项下方法进行样品前处理,按“2”项下的色谱条件进样,记录各峰面积;另吸取 60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 10 μL ,同法测定,用峰面积按外标法计算微球中甲睾酮的含量分别为 6.38%, 6.27%, 6.19%。

4.10 耐用性试验 选择 3 种色谱柱进行检测,对“4.9”项下 3 个批号样品的供试品溶液进行测定,计算样品中甲睾酮的含量。结果见表 2,不同色谱柱对样品的含量测定结果无明显影响。

参考文献

- ZHAO Ying-lan(赵映兰), LIN Cai(林彩), DENG Li(邓莉), *et al.* Preparation and content determination of methyltestosterone gelatin (甲睾酮凝胶剂的制备与含量测定). *J China Pharm* (中国药房), 2010, 21(33): 3133
- TONG Jian-sun(童建孙), WANG Xing-hai(王兴海), CUI Liu-gui(崔毓桂), *et al.* The effect of different doses testosterone undecanoate on spermatogenesis in rats(不同剂量的十一酸睾酮对大鼠生精功能影响). *Acta Androlog Sin* (中华男科学), 2000, 6(2): 89
- ChP(中国药典). 2010. Vol II (二部): 161
- YAN Hui(严慧), XIANG Ping(向平), SHEN Bao-hua(沈保华), *et al.* LC-MS/MS determination of methyltestosterone in hair(液相色谱串联质谱法测定毛发中的甲睾酮浓度). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2008, 28(11): 1789
- WU Shan-guang(伍善广), YANG Fan(杨帆), FAN Yu-fang(潘育方), *et al.* Analysis of gelatin microspheres containing erythromycin by HPLC (HPLC 法测定红霉素明胶微球的含量). *Acad Acad J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 2008, 24(5): 487

(本文于 2011 年 11 月 1 日收到)