

高效液相法测定十一酸睾丸素注射液的含量

浙江医科大学 史慧珍 沈向忠 戴幼琴* 黄宝立

睾丸素制剂在治疗睾丸功能不全, 功能性子宫出血, 晚期乳腺癌及贫血等方面具有独特的疗效。本类药物的常用制剂为丙酸睾丸素, 效果确实, 但其持续时间短暂, 肌注一次, 仅能维持药效3~4天。因而使接受长程治疗的患者深感不便。浙江医科大学药学系药化教研室合成十一酸睾丸素, (Testosterone undecanoate) 以下简称TU。通过动物实验, 证明其作用温和, 持续时间约8~10倍于丙酸睾丸素, 无明显不良反应, 可大大减少患者频繁注射的麻烦与痛苦, 因而十一酸睾丸素乃系一极有价值之新型长效睾丸素制剂。

TU结构中具有 Δ^4-3 酮基团在240nm有最大吸收, 故可用紫外分光法测定其原料的含量。而其制剂为油注射液, 溶剂用油在240nm附近有吸收, 故不能直接用紫外分光光度法测定, 通常采用异烟肼法来测定油注射液的含量。但此法由于其它甾体杂质存在, 常使含量偏高。也有人用柱层析或薄层层析分离出待测组分, 得到较纯组分后, 再进行测定^[1]。油的干扰虽可除去, 但操作繁琐, 费时; 鉴于HPLC法具有灵敏度高, 专属性强等特点, 我们用反相HPLC测定十一酸睾丸素油注射液含量进行了研究, 结果比较满意, 现报导如下:

实验部份

一、仪器试剂及样品

(1) 仪器: Varian 5000 LIQUID CHROMATOGRAPH,

(2) 试剂: 异丙醇、甲醇、乙醚、无水乙醇、乙腈和苯甲酸苄酯均为分析纯。注射用茶油符合中国药典规定, 依法用甲醇提取进样, 在样品及内标峰的保留时间内均未出峰。

(3) 对照品样品, 内标:

十一酸睾丸素浙医大药化室提供十一酸睾丸素注射液浙医大药剂室提供。

苯丙酸诺龙(内标)符合中国药典规定。

二、色谱条件

色谱柱: 4.6×250mm 不锈钢柱, 内填C₁₈ODS颗粒平均直径5 μ m由Beckman公司生产。

流动相: 乙腈:异丙醇:水(43:43:14)

流速: 1.5ml/min

室温(25℃)

uv254nm 检测

三、内标选择

将TU配成甲醇液, 以苯丙酸诺龙为内

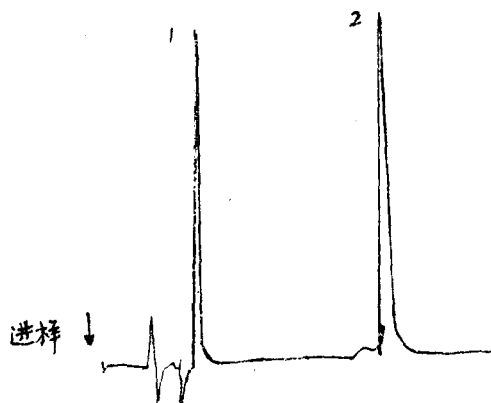


图1

1. 苯丙酸诺龙
2. 十一酸睾丸素
的色谱图

标,照上述分析条件进行测定,其保留时间分别为苯丙酸诺龙2.67分,十一酸睾丸素9.16分见图(1)

对称因子均在0.95~1.05间,对称性很好。

四、线性关系及定量校正因子

用甲醇配制TU溶液,浓度分别为0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 1.6mg/ml, 每管加内标0.3mg/ml, 照上述分析条件进样10 μ l测定,以h_{TU}/h_{IS}为纵坐标, m_{TU}/m_{IS}为横坐标绘图(见图2)其数据经直线回归。

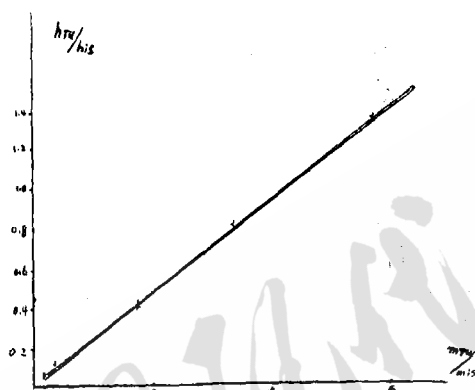


图2

$$b = 0.2369a + 0.0226 \quad r = 0.9999$$

其线性关系及精密度较好。

故本文拟采用定量校正因子法配制对照液和内标液,使1+1(V/V)混合液样品与内标峰高基本相等。

溶液配制方法:分别量取4, 5, 6ml(相当于油注射液提取后配成为标示量的80, 100, 120%, 加内标液5ml(配制见后), 用表1

	4ml	5ml	6ml
标示量	80%	100%	120%
校正因子	3.520	3.536	3.520
平均		3.525	
标准差		0.009	
变异系数(%)		0.26	

甲醇稀释到25ml, 摇匀, 进样10 μ l, 记录图谱, 以峰高法, 计算校正因子, 见表1

结果表明, 用定量校正因子法测定药物标示量的80~120%之间样品变异系数不大于2%, 故可采用本法定量。

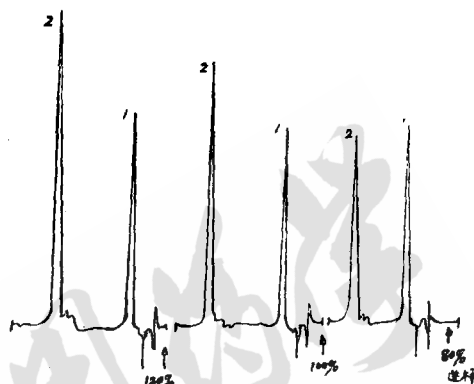


图3 相当于样品标示量80, 100, 120%的色谱图

1. 苯丙酸诺龙 2. 十一酸睾丸素

五、回收试验

(1) 内标溶液配制: 精密称取苯丙酸诺龙60mg置100ml量瓶中, 用甲醇溶解, 并稀释至刻度, 摇匀。

(2) 对照溶液配制: 精密称取TU约60mg, 置25ml容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取5ml置25ml量瓶中, 加内标液5ml, 甲醇稀释至刻度, 摇匀。取10 μ l进样, 计算校正因子。

(3) 样品溶液配制与测定, 按处方量精密称取十一酸睾丸素约100mg, 置50ml量瓶中, 加1ml混合油(内含助溶剂苯甲酸苄酯15%)用乙醚溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取5ml置10ml具塞离心管中, 在温水浴中挥散去乙醚, 然后用甲醇提取四次(第1~3次各5ml, 第4次3ml)每提取一次振摇10分钟, 置离心机中离心15分钟, 合并提取液, 置25ml量瓶中, 加入5ml内标液, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 取10 μ l进样, 测定, 用峰高法计算即得。

表2 十一酸睾丸素回收率测定结果

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
加入量 (mg)	46.6	49.5	51.1	51.0	55.5	50.5	50.5	50.5	50.5
测得量 (mg)	45.96	48.66	50.12	49.53	54.48	50.02	49.73	50.22	49.94
回收率 (%)	98.62	98.31	98.08	97.12	98.16	99.04	98.48	99.44	98.90
平均值 (%)	98.46								
标准差	0.6679								
变异系数 (%)	0.6783								

六、样品测定

用内容量移液管精密量取 Tu 油注射液 1ml, 置 50ml 量瓶中, 按回收率试验项下操作, 进行测定, 并按下式计算样品含量, 结果见表 3

表3 TU注射液的含量测定结果

批 号	相当标示量	平均值	标准差	变异系数 (%)
85033—01	97.10	96.96	0.4918	0.5072
	97.48			
	96.30			
	96.97			
85033—02	95.24	95.44	0.3066	0.3212
	95.79			
	95.28			
85033—04	96.54	97.23	0.6067	0.6240
	97.47			
	97.68			
86049—01*	85.73	85.94	0.1872	0.2178
	86.08			
	86.02			

* 内含助溶剂苯甲酸苄酯 15%

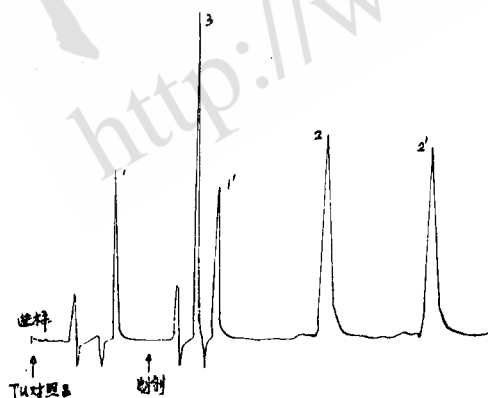


图4 制剂含量测定时的色谱图

11'—苯丙酸诺龙 22'—十一酸睾丸素
3—助溶剂苯甲酸苄酯

$$\text{相当于标示量} \% = \frac{h_i \times m_s \times f_i}{h_s \times \text{取样量}}$$

$$\times \frac{\text{规格装量}}{\text{标示量}} \times 100\%$$

h_i —样品峰高

m_s —内标重量

h_s —内标峰高

f_i —定量校正因子

讨 论

一、因溶剂油注入高效液相后, 不易被流动相洗脱而滞留, 积聚在柱上, 致使柱效下降, 因此注射液需经前处理, 将大部份油除去, 才能进行分析。本文采用甲醇提取油中十一酸睾丸素, 进行了提取次数实验, 按回收率试验的方法配样品并进样, 计算回收率, 结果表明, 提取四次回收率已达 98.96% 提取五次回收率为 98.62%。可见提取四次已基本提取完全, 故实验操作以提取四次为宜。层析柱使用一段时间后, 应用 10% 甲醇或乙晴洗涤层析柱, 以克服因微量油滞留而造成柱效下降的缺点。

二、为了精确量取油溶液, 本实验采用内容量移液管^[8]。

三、本文结果表明, 本法操作简便, 快速, 灵敏、专属性好。回收率实验和含量测定精确度均较好, 油及助溶剂均无干扰。并且其保留时间可作为定性鉴别的依据。同时本法又为该药的体内生物有效性和药代动力学研究中的血药浓度测定, 剂型改进, 制剂稳定性研究提供了可行的检测手段。

(下转第 26 页)

(上接第9页)

参 考 文 献

- [1] Umberger, E. J: Anal. Chem. 27, 768, 1955
- [2] 南药药物分析组: 药物分析 747, 1981
- [3] 李金妹等: 药学学报 10(9) 572, 1963

[4] Smith E. J: Pharm, Sci 56, 630 1967

[5] 王维等: 药物分析杂志 22, 1982, 2(1)

[6] 胡家焱等: 药物分析杂志 169, 1982, 2(3)

[7] 中国药典1985版二部 50, 217, 474

[8] 武汉市药品检验所: 药检工作通讯9(6)329, 1979

* 82届毕业生