

HPLC法测定苯甲酸雌二醇贴片中药物的含量及其体外透皮释放量

杜洪光¹ 赖宇宏¹ 王 丽² 王树明² 张 爽² 张 强³

(1. 北京化工大学理学院, 北京 100029; 2. 北京康倍得医药技术开发有限公司, 北京 100089;
3. 北京大学药学院, 北京 100083)

摘 要: 文中采用高效液相色谱法测定苯甲酸雌二醇贴片中苯甲酸雌二醇(EB)的含量和体外透皮释放量。色谱柱为 Nova-Pak C₁₈ (4 μm) 3.9 mm × 195 mm, 流动相为甲醇与水, 体积比为 80:20, 使用紫外吸收检测器, 检测波长为 230 nm。EB 体外透皮释放实验采用单室 Franz 扩散池, 测定结果为: EB 质量浓度在 4 ~ 14 μg/mL 范围内呈线性, 平均回收率为 95.2%, RSD 为 2.85%, 最小检出量为 0.015 μg, 日内和日间 RSD 分别为 0.81% (*n* = 5) 和 1.7% (*n* = 5); 体外透皮释放量与时间呈良好线性关系, 相关因数为 0.993。本方法测定 EB 贴片药物含量操作简便, 快速准确, 体外药物透皮释放近似按零级速率释放, 皮肤是药物透皮吸收的主要障碍。

关键词: HPLC法; 苯甲酸雌二醇(EB); 贴片; 体外透皮释放

中图分类号: R944.9; TQ460.72

苯甲酸雌二醇(Estradiol Benzoate, EB)主要用于治疗妇女更年期综合征^[1]。HPLC法测定苯甲酸雌二醇原料^[2]、注射液及凝胶^[3-5]均有报道, 但HPLC法测定苯甲酸雌二醇贴片含量及体外透皮量却未见报道。本文用HPLC法测定苯甲酸雌二醇贴片中药物含量及体外透皮量, 结果表明该方法能使样品得到较好分离, 排除辅料干扰, 方法操作简便, 快速准确, 可用于产品的质量控制和体外透皮量检测。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与动物

1.1.1 仪器 2690 高效液相色谱仪(WATERS), 2487 双波长紫外检测器(WATERS); UV-401PC (SHIMADU); Franz 扩散池。

1.1.2 样品与试剂 对照品苯甲酸雌二醇(EB), 上海华联制药厂; 苯甲酸雌二醇贴片(每片 15 cm², 每片含 EB 7.0 mg), 自制; 苯甲酸雌二醇空白贴片(每片 15 cm², 只含辅料), 自制; 甲醇(HPLC级), FISHER 公司; 纯水, Millipore 超纯水器制备; PEG400(化学纯), 北京益利精细化学品有限公司。

1.1.3 动物 豚鼠, 雌性, 体质量 250 ~ 280 g (北京大学医学部动物中心提供)。

1.2 色谱分析条件

色谱柱为 Nova-Pak C₁₈ (4 μm) 3.9 × 195 mm; 流动相 甲醇与水体积比 80:20; 检测波长 230 nm; 柱温 30; 样品室温度 室温; 进样量 20 μL。

1.3 测定方法

1.3.1 苯甲酸雌二醇紫外吸收光谱的测定 取 EB 对照品适量, 用甲醇配成 10 μg/mL 的溶液, 以甲醇为空白, 在 200 ~ 400 nm 范围内扫描。

1.3.2 线性关系 精确称取苯甲酸雌二醇对照品 10 mg, 置 100 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释到刻度, 摇匀, 制成 100 mg/L 的储备液。精确量取上述储备液 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 用流动相稀释到刻度, 摇匀, 制成对照品溶液。按上述色谱条件进样 20 μL。

1.3.3 最小检测量 取上述对照品溶液进行稀释, 按同一样品条件进行分析。

1.3.4 精密度实验 在上述色谱条件下, 取浓度为 10 μg/mL 的对照品重复进样, 测定峰面积, 日内每隔 1 h 进样测定, 连续测定 3 d。

1.3.5 样品含量测定 取苯甲酸雌二醇贴片 1 片, 揭去防黏层, 置于 50 mL 量瓶中加入甲醇并稀释到刻度。浸泡 12 h 后摇匀, 精密吸取 0.50 mL 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释到刻度线, 摇匀, 精密吸

收稿日期: 2003-11-17

第一作者: 男, 1967 年生, 博士, 教授

E-mail: dhg@mail.buct.edu.cn

取 20 μL 进样测定。

1.3.6 空白实验 取空白贴片,按样品含量测定项进行操作。

1.3.7 加样回收率实验 取不含主药(EB)的空白贴片 3 片,揭去防黏层,置于 50 mL 容量瓶中加入甲醇 30 mL,加入不同量的 EB 对照品,用甲醇稀释到刻度,浸泡 12 h 后按样品含量测定项进行操作。

1.3.8 体外透皮释药 将豚鼠处死,剃毛,剥离腹部皮肤,用植皮刀将脂肪层刮净,用生理盐水反复冲洗后固定于单室 Franz 池上,真皮层面向接收介质。选用 EB 贴片 5 片(批号 201)及同配方的空白贴片 1 片,紧贴于离体皮肤角质层上加入接收介质为 30 % 体积分数 PEG400 水溶液 100 mL。Franz 池温度设定为(32 ± 0.5),磁力搅拌速度设定为 120 r/min。分别于 0,6,12,24,48,72,96,120,144 和 168 h 取样,每次用洁净针管从取样口取 2 mL 接收液,同时补加 2 mL 新鲜配制的接收液。取出的接收液用 0.22 μm 的过滤膜过滤后,用高效液相色谱仪测定含量,进样量 20 μL。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 苯甲酸雌二醇紫外吸收光谱 苯甲酸雌二醇的紫外吸收光谱见图 1,测得 $\lambda_{\max} = 230 \text{ nm}$ 。

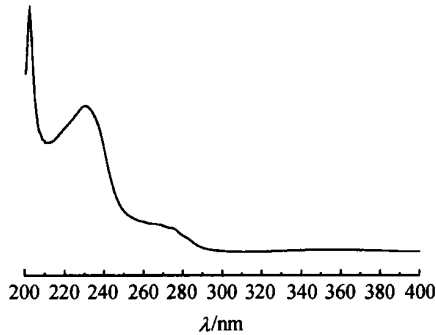


图 1 苯甲酸雌二醇的紫外吸收光谱
Fig. 1 UV spectrum of estradiol benzoate

2.1.2 线性关系 苯甲酸雌二醇 HPLC 分析的色谱图见图 2,样品保留时间为 7.7 min。以 EB 的质量浓度(mg/L)为横坐标(X),其相对应的峰面积(Y)为纵坐标作图,求出 EB 的线性回归方程为: $Y = 3.1 \times 10^{-3} X - 5.2 \times 10^{-2}$, $r = 0.9998$ 。结果表明,EB 的质量浓度在 4 ~ 14 μg/L 范围呈良好的线性关系。

2.1.3 最小检测量 EB 的最小检测量为 0.015 μg

(信噪比为 3:1)。

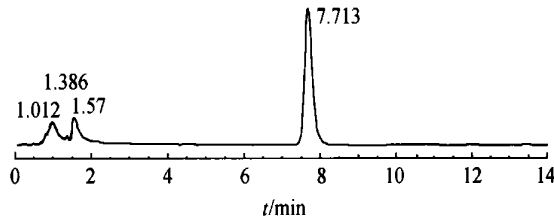


图 2 苯甲酸雌二醇的 HPLC 谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of estradiol benzoate

2.1.4 精密度实验 测定 EB 峰面积的 RSD(S)为 0.8 % ($n = 5$),日内 S 为 0.81 % ($n = 5$),日间 S 为 1.7 % ($n = 5$)。

2.1.5 样品含量测定 以外标法计算苯甲酸雌二醇贴片中药物质量分数,结果见表 1。

表 1 三批苯甲酸雌二醇贴片药物含量测定结果

Table 1 Content of estradiol benzoate in three batches of patch

批次	质量分数/ %	S / %
201	98	0.9
202	97	0.85
203	95	1.5

2.1.6 空白实验 测定结果表明空白贴片样品在对照品的出峰时间不出峰,说明辅料对测定无干扰。

2.1.7 加样回收率实验 苯甲酸雌二醇的回收率测定结果见表 2。

表 2 苯甲酸雌二醇的回收率

Table 2 Recovery of estradiol benzoate

(加入) / (μg/mL)	(回收) / (μg/mL)	回收率 / %	平均回收率 / %	S / %
4	3.72	93	95.2	2.85
8	7.67	95.9		
12	11.6	96.7		

2.1.8 体外透皮释药 计算苯甲酸雌二醇贴片在不同时间的累积释放量($M, \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (见表 3)和第 168 h 后皮肤中残余药量。以累积释放量 $M (\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 对时间 $t (\text{h})$ 作线性回归,线性方程为 $M = -2.62571 + 0.10586t$,相关系数 $r = 0.993$ 。在 12 h 至 168 h 之间,EB 累积透皮释药量与时间呈良好的线性相关。平均残余药量为 25.6 μg/cm²。

2.2 讨论

本实验用甲醇作溶剂,可以使贴片中苯甲酸雌二醇充分溶解,而基质溶胀不溶解,样品溶液可直接

表 3 苯甲酸雌二醇贴片体外透皮释药量

Table 3 Cumulative amount of estradiol benzoate across guinea pig's skin in vitro from the patches

t/h	$M/\mu\text{g cm}^{-2}$	t/h	$M/\mu\text{g cm}^{-2}$
0	0	72	4.38 ± 0.47
6	0	96	6.82 ± 0.50
12	0.15 ± 0.001	120	9.98 ± 0.92
24	0.79 ± 0.004	144	13.46 ± 1.29
48	2.20 ± 0.43	168	15.13 ± 1.35

进样分析,既能减少基质的干扰又免除提取等环节。

苯甲酸雌二醇贴片基质成分复杂,含有高分子、促渗剂等物质,曾用紫外分光光度计测定,但是辅料干扰大,回收率低,结果不可靠。采用 HPLC 法测定含药量能很好地分离测定苯甲酸雌二醇贴片中的苯甲酸雌二醇,操作简便,回收率高,专属性强,快速准确,可作为质量控制的手段。

经皮吸收制剂的透皮量测定目前尚无统一的方法和标准。本实验采用单室 Franz 池,温度为 (32 ± 0.5) ,接近人体表皮温度,选择符合漏槽条件的 30% PEG400 水溶液为接收介质,测定连续 168 h 内的 EB 透皮释放量,实验结果表明在 24 h 至 168 h 之间累积释放量与时间呈线性相关,线性方程为 $M = -2.62571 + 0.10586t$,相关因数为 0.993。可认为 EB 贴片的体外透皮释药近似零级速率释放。

Determination of content of estradiol benzoate in estradiol benzoate patches by HPLC and its skin permeation behavior in vitro

Du Hong-guang¹ Lai Yu-hong¹ Wang Li² Wang Shu-ming² Zhang Shuang² Zhang Qiang³

(1. College of Science, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. Beijing Compete Pharmaceutical Technology Co. Ltd, Beijing 100089;

3. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: HPLC was used to determine the content of estradiol benzoate (EB) in an estradiol benzoate transdermal delivery system and that released by its skin permeation in vitro, with Nova-Pak C₁₈ (4 μm) 3.9 mm \times 195 mm, methanol and water (80:20) as mobile phase, and UV detector at 230 nm. The EB transcutaneous permeation in vitro was studied with Franz diffusion one cell apparatus. The result showed that the linear range of EB permeation was 4 ~ 14 $\mu\text{g/mL}$; average recovery of EB was 95.2% (RSD = 2.85%); the detection limit was 0.015 μg ; the precision of RSD was 0.81% in one day ($n=5$) and 1.7% ($n=5$) between days; the drug permeation rate with the time was in good linear, $r=0.993$. A simple, rapid and accurate way was provided to determine the content of estradiol benzoate in the patches. The transcutaneous permeation of EB in vitro followed zero order rules. Skin was the main resistance against the release of the drug.

Key words: HPLC; estradiol benzoate (EB); patches; transcutaneous permeation in vitro

(责任编辑 曾宪玉)

药物经离体皮肤向释放介质扩散主要经过三个阶段,即从基质向皮肤表面的扩散、由皮肤表面向皮肤内层的扩散和由皮肤向释放介质的扩散。本实验发现皮中残余药量很多,达到 $25.6 \mu\text{g/cm}^2$,大于药物 7 d 的总释放量,表明药物从基质进入皮肤后扩散受到阻碍,在皮肤内蓄积,可见皮肤是药物透皮吸收的主要障碍。原因可能是 EB 具有很高的脂溶性,能很快进入皮肤的角质层,但是 EB 在水中极低的溶解性导致其从角质层向活性表皮扩散的速度缓慢,引起 EB 在皮肤内蓄积。

参 考 文 献

- [1] 陈新谦,金有豫.新编药理学[M].第 14 版.北京:人民卫生出版社,1997,435
- [2] 中国药典委员会.中华人民共和国药典(二部)[M].北京:化学工业出版社,2000,369-370
- [3] 刘玉波,吴玖涵,李喜系.高效液相色谱法测定苯甲酸雌二醇凝胶剂的含量[J].解放军药学学报,1999,15(2):21-23
- [4] Gatti R, Gioia M G, Di Pietra A M. HPLC-fluorescence determination of unconjugated estrogens in pharmaceuticals[J]. J Pharm Biomed Anal, 1998, 18(1-2):187-192
- [5] Rapp M, Meyer H H. Determination of hormone contaminants in milk replacers by high-performance liquid chromatography and immunoassay[J]. J Chromatogr, 1989, 489(1):181-189