# HPLC 法同时测定醋酸亮丙瑞林缓释微球中的乙醇酸和乳酸

宋盛发[1]，夏昀卿[2]，刘万卉[1,2]，许丽晓[1,2*]，马永超[1]

（1. 烟台大学药学院，新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心，分子药理和药物评价教育部重点实验室（烟台大学），山东烟台 264005；2. 绿叶制药集团有限公司先进药物递释系统全国重点实验室，山东烟台 264003）

**摘要**：建立了 HPLC 法同时测定醋酸亮丙瑞林缓释微球中乙醇酸和乳酸的含量。色谱柱采用 Waters XSelect HSS T3 柱（4.6 mm×100 mm，3.5 μm），流动相 A 为磷酸和水的混合溶液，B 为乙腈，梯度洗脱。检测波长为 210 nm，流速为 1.0 mL/min，柱温为 40 ℃，进样量为 5 μL。结果显示，该方法专属性良好，乙醇酸和乳酸在 0.015 ～ 0.06 mg/mL 内线性关系良好。乙醇酸和乳酸的检测限均为 0.008 mg/mL，定量限均为 0.03 mg/mL。乙醇酸和乳酸的平均回收率分别为 99.2%、101.6%，RSD 分别为 1.54%、1.37%。该法可用于醋酸亮丙瑞林缓释微球及其降解过程中乙醇酸和乳酸含量的测定。

**关键词**：醋酸亮丙瑞林缓释微球；HPLC；PLGA；乙醇酸；乳酸

**中图分类号**：R917 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2024)07-1003-05

**引用**：宋盛发 , 夏昀卿 , 刘万卉 , 等 . HPLC 法同时测定醋酸亮丙瑞林缓释微球中的乙醇酸和乳酸 [J]. 中国医药工业杂志 , 2024, 55(7): 1003-1007. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.07.014

# Determination of Glycolic Acid and Lactic Acid in Leuprorelin Acetate Sustained-release Microspheres by HPLC

SONG Shengfa[1], XIA Yunqing[2], LIU Wanhui[1,2], XU Lixiao[1,2*], MA Yongchao[1]

(*1. Key Lab. of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation, Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005; 2. National Key Lab. of Advanced Drug Delivery and Release Systems, Luye Pharma Group Ltd., Yantai 264003*)

**ABSTRACT**: An HPLC method was established to simultaneously determine the contents of glycolic acid and lactic acid in leuprorelin acetate sustained-release microspheres. The Waters XSelect HSS T3 column (4.6 mm×100 mm, 3.5 μm) was used, and the analysis was carried out in the gradient elution mode with the mixed solution of phosphoric acid and water as mobile phase A, and acetonitrile as mobile phase B. The detection wavelength was 210 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 40 ℃, and the injection amount was 5 μL. The results showed that the method had good specificity, and it was linear for glycolic acid and lactic acid in the ranges of 0.015 − 0.06 mg/mL. The detection limits for both glycolic acid and lactic acid were 0.008 mg/mL, and the quantification limits were 0.03 mg/mL. The average recovery rates of glycolic acid and lactic acid were 99.2 % and 101.6 %, respectively, with the RSDs were 1.54 % and 1.37 %, respectively. The results indicated that this method could be used for the determination of glycolic acid and lactic acid content in leuprorelin acetate sustained-release microspheres and their degradation process.

**Key Words**: leuprorelin acetate sustained-release microsphere; HPLC; PLGA; glycolic acid; lactic acid

注射用醋酸亮丙瑞林微球由日本武田药品工业株式会社开发，在治疗子宫肌瘤、子宫内膜异位症等上具有良好的临床应用[1—2]，并于1989年在美国、日本等国被批准上市[3]。PLGA、PLA因具有良好的生物相容性和降解产物无毒性，成为目前应用范围较广泛的生物可降解材料[4—6]。醋酸亮丙瑞林微球中使用的可降解材料为乙醇酸和乳酸的共聚物，PLGA。乳酸和乙醇酸的含量不仅能反映PLGA在贮存期间的质量变化和产品的稳定性，同时也是反应样品纯度的一个重要指标。因此，有必要建立灵敏、可靠的方法测定微球中的乳酸和乙醇酸[7—8]。乳酸和乙醇酸常用的测定方法包括高效液相色谱法[9—10]、气相色谱法[11—12]和离子色谱法等[13]。POURASGHAR等[14]开发了一种以衍生物来监测乳酸和乙醇酸的方法，系将衍生单体放置在254 nm的波长下进行检测，但前处理较为复杂。暂未有直接同时测定乙醇酸和乳酸的方法被报道。

本研究旨在开发一种可以直接检测微球中乙醇酸、乳酸含量的方法，以期为工艺研究提供指导，保证产品的一致性。

## 1　仪器与试药

Agilent 1260型高效液相色谱仪（美国Agilent公司）；XS105型电子天平（瑞士Mettler Toledo公司）；LXJ-IIB型立式离心机（上海安亭科学仪器厂）。

醋酸亮丙瑞林PLGA微球和醋酸亮丙瑞林PLA微球（自制）[15—16]；乙醇酸（合肥天健化工有限公司，含量99%，批号2021092201）；乳酸（美国Sigma-Aldrich公司，含量90%，批号BCBZ4861）；尼龙66有机滤膜（天津市津腾实验设备有限公司）；乙腈为色谱纯，磷酸、三氯甲烷均为分析纯，水为纯化水。

## 2　方法与结果

### 2.1　色谱条件

色谱柱Waters XSelect HSS T3柱（4.6 mm×100 mm，3.5 μm）；流动相A为磷酸和水（体积比1∶499）的混合溶液，B为乙腈，梯度洗脱（0—2 min，A 100%；2—4 min，A 100%—5%；4—6 min，A5%—100%；6—10 min，A 100%）；流速1.0 mL/min；检测波长210 nm；柱温40 ℃；进样量5 μL。

### 2.2　溶液配制

空白溶剂：流动相A。

混合对照品贮备液：取乙醇酸、乳酸各约10 mg，精密称定，置同一100 mL量瓶中，加入空白溶剂溶解并定容，摇匀，即得。

混合对照品溶液：精密移取混合对照品贮备液5 mL，置10 mL量瓶中，加入空白溶剂稀释定容，摇匀，即得。

单一标准对照品溶液：取乙醇酸、乳酸各约10 mg，精密称定，分别置100 mL量瓶中，加入空白溶剂溶解定容，摇匀，即得。

供试品溶液：取醋酸亮丙瑞林PLGA微球约100 mg，精密称定，置10 mL离心管中，加入三氯甲烷8 mL溶解，精密加入空白溶剂2 mL，涡旋1 min后，以离心（3 840×*g*）5 min，取上清液过0.45 μm尼龙66有机滤膜，取续滤液，即得。

### 2.3　专属性试验

取“**2.2**”项下的空白溶剂、单一标准对照品溶液、混合对照品溶液和供试品溶液微球浓度约为0.1 mg/mL，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果如图1所示，乙醇酸（保留时间约为1.4 min）和乳酸（保留时间约为2.0 min）与相邻峰的分离度均大于1.5，分离度良好，空白溶液和供试品溶液中其他成分对乙醇酸、乳酸的测定无干扰，表明该方法专属性良好。

### 2.4　线性试验

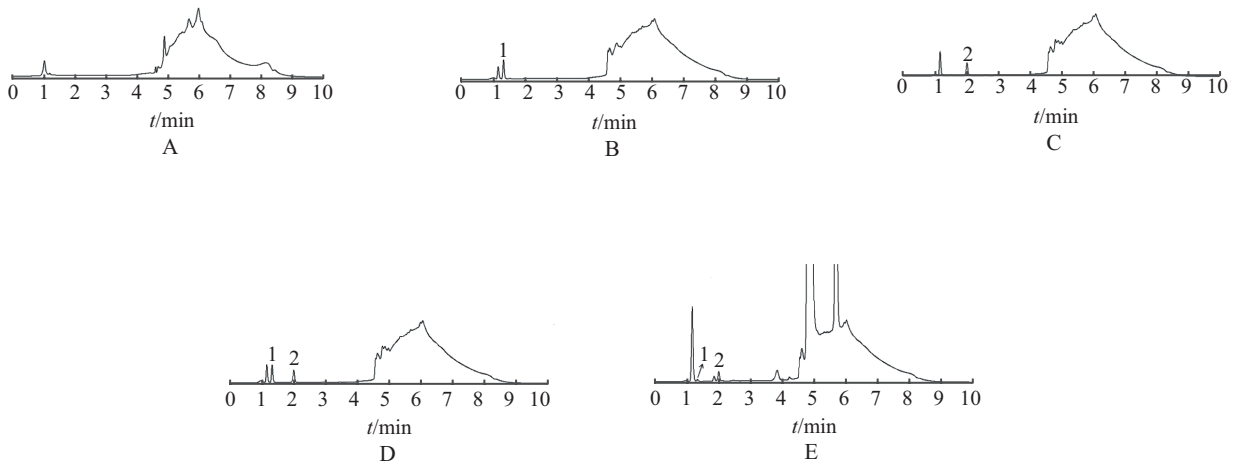
精密量取“**2.2**”项下的混合对照品贮备液1.5、3、4、5、6 mL，置10 mL量瓶中，用空白溶剂稀释并定容，摇匀，制成每1 mL中含有乙醇酸和乳酸0.015、0.03、0.04、0.05、0.06 mg的线性试验溶液，按“**2.1**”项下的色谱条件进样分析。以峰面积（*A*）为纵坐标、相应质量浓度（*c*）为横坐标，进行线性回归。结果显示，乙醇酸的线性方程为*A*=2 955.4*c*－

**收稿日期**：2023-10-19

**作者简介**：宋盛发（1999—），男，硕士研究生，专业方向：药物分析。

**通信作者**：许丽晓（1978—），女，副教授，硕士生导师，从事药物分析与药物代谢相关专业研究与开发。

E-mail：xulixiao78@163.com




A—空白溶液；B—乙醇酸单一对照品溶液（0.1 mg/mL）；C—乳酸单一对照品溶液（0.1 mg/mL）；D—混合对照品溶液（0.05 mg/mL）；E—供试品溶液。

1—乙醇酸；2—乳酸。

**图 1 专属性试验色谱图**

Fig.1 HPLC Chromatograms of the Specific Test

2 482，$r$=0.999 8；乳酸的线性方程为 $A$=2 260.3$c$－123.45，$r$=0.999 8。表明乙醇酸和乳酸均在 0.015～0.06 mg/mL 内线性关系良好。

**2.5** 定量限与检测限

取“**2.2**”项下的单一标准对照品溶液，用空白溶剂逐级稀释，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。以色谱峰信号与噪声信号比值分别大于 3 与 10 时对应的质量浓度作为乙醇酸和乳酸的定量限与检测限。结果显示，乙醇酸、乳酸的定量限均为 0.03 mg/mL，检测限均为 0.008 mg/mL。

**2.6** 精密度试验

取“**2.2**”项下的混合对照品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件连续进样 6 针，记录峰面积和保留时间。结果显示，乙醇酸峰面积的 RSD（$n$=6）为 0.10%，保留时间的 RSD（$n$=6）为 0.37%；乳酸峰面积的 RSD（$n$=6）为 0.89%，保留时间的 RSD（$n$=6）为 0.19%，二者的峰面积和保留时间的 RSD 均小于 2.0%，表明仪器精密度良好。

**2.7** 重复性试验

取 PLGA 微球约 100 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，精密加入“**2.2**”项下的混合对照品溶液 2 mL，用空白溶剂溶解，稀释定容，摇匀，即得加标供试品溶液，平行制备 6 份，按“**2.2**”项下供试品溶液制备方法操作后，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。结果显示，乙醇酸、乳酸的平均含量分别为 0.009、0.014 mg/mL，RSD（$n$=6）分别为 3.2%和 1.6%，表明本方法重复性良好。

**2.8** 回收率试验

取 PLGA 微球约 100 mg，精密称定，平行 9 份，置 10 mL 量瓶中；再分别加入“**2.2**”项下的混合对照品贮备液 4、5、6 mL，用空白溶剂定容，各平行配制 3 份，得高、中、低质量浓度的加样回收率测定溶液，按“**2.2**”项下供试品溶液制备方式配制。另按“**2.2**”项下的供试品溶液制备方式配制供试品溶液，平行 3 份。各样品按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，记录峰面积并计算回收率。结果显示，在 80%～120%浓度下，乙醇酸、乳酸的平均回收率分别为 99.2%和 101.6%，RSD（$n$=9）分别为 1.54%和 1.37%，表明方法的准确度良好。

**2.9** 稳定性试验

取“**2.2**”项下的混合对照品溶液和“**2.7**”项下 100%加标供试品溶液，于室温下放置，分别在 0、3、

6、9、12 h 时取样，再按“**2.1**”项下的色谱条件进样测定，记录峰面积并计算 RSD。结果显示，混合对照品溶液中乙醇酸峰面积的RSD（$n$=5）为0.34%，乳酸峰面积的 RSD（$n$=5）为 0.77%；100%加标供试品溶液中乙醇酸峰面积的 RSD（$n$=5）为 1.42%，乳酸峰面积的 RSD（$n$=5）为 2.63%；表明在室温下 12 h 内溶液稳定性良好。

**2.10** 耐用性试验

在“**2.1**”项下的色谱条件基础上，取“**2.2**”项下的混合对照品溶液，调整柱温（38、40、42 ℃）和流速（0.9、1.0、1.1 mL/min），将同一份溶液分别进样检测。结果显示，在柱温和流速适当变化时，乙醇酸、乳酸与其相邻峰的分离度均大于 1.5，且峰面积回收率均在 96.6%～102.2%，表明该方法耐用性良好。

**2.11** 样品检测

取不同批次的醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球和醋酸亮丙瑞林 PLA 微球各约 100 mg，精密称定，各平行 3 份，分别置 10 mL 玻璃离心管中；将装有微球的玻璃离心管放置在温度为 25 ℃，相对湿度为 92.5%的恒温恒湿箱中加速降解，分别在 0、3、7、14 d 时取样，并按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件测定，记录色谱图，计算微球中乙醇酸、乳酸含量。结果如表 1 所示，随着时间的增加，降解微球中乙醇酸、乳酸含量逐渐增大，说明该方法能够用来检测降解微球中乙醇酸、乳酸含量。

## 3 讨论

**3.1** 色谱柱的选择

乙醇酸、乳酸是 2 种极性较大且易溶于水的化合物。普通的 Ultimate XB-$C_{18}$ 色谱柱对强极性化合物的保留效果较差；Water T3 色谱柱采用低配基密度 $C_{18}$ 烷基链键合技术，对极性分子保留效果较好，可耐受 100%的水相，适用于极性成分的分离检测。因此，本研究选择 Water T3 柱作为试验用色谱柱。

**3.2** 溶液制备条件选择

**3.2.1** 溶解时间

取微球约 100 mg，精密称定，置 10 mL 玻璃离心管中，平行 4 份，各加入三氯甲烷 8 mL，分别静置 2、4、6、8 h；再各加入流动相 A 2 mL，涡旋 5 min 后离心（3 840×$g$）5 min，取上清液，过 0.45 μm 尼龙 66 有机滤膜，取续滤液，即得取不同溶解时间的供试品溶液。分别按“**2.1**”项下色谱条件进样分析。结果显示，溶解时间为 4 h 的供试品溶液图谱中，乳酸峰面积最大，表明溶解效果较好。

**3.2.2** 涡旋时间

取微球约 100 mg，精密称定，置 10 mL 玻璃离心管中，平行 5 份，各加入三氯甲烷 8 mL，静置溶解 4 h，各加入流动相 A 2 mL，分别涡旋 1、2、3、5、9 min，随后离心（3 840×$g$）5 min，取上清液，过 0.45 μm 尼龙 66 有机滤膜，取续滤液，即得不同涡旋时间供试品溶液。分别按“**2.1**”项下色谱条件进样分析。结果显示，涡旋 1 min 的供试品溶液图谱中，乳酸峰面积最大，表明萃取效果更优。

**表 1　降解微球中乙醇酸和乳酸含量**（$n$=3）

Tab.1　Contents of Glycolic Acid and Lactic Acid in Degradation Microspheres（$n$=3）

| 样品 | 批号 | 0 d | | 3 d | | 7 d | | 14 d | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 乙醇酸含量 / mg | 乳酸含量 / mg | 乙醇酸含量 / mg | 乳酸含量 / mg | 乙醇酸含量 / mg | 乳酸含量 / mg | 乙醇酸含量 / mg | 乳酸含量 / mg |
| 醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球 | 0127-1 | 未检出 | 0.045 | 0.010 | 0.072 | 0.025 | 0.091 | 0.057 | 0.154 |
| | 0127-2 | 0.009 | 0.032 | 0.011 | 0.057 | 0.023 | 0.075 | 0.041 | 0.137 |
| | 0127-3 | 0.007 | 0.034 | 0.011 | 0.060 | 0.030 | 0.079 | 0.047 | 0.132 |
| 醋酸亮丙瑞林 PLA 微球 | 0127-4 | 无 | 0.012 | 无 | 0.031 | 无 | 0.077 | 无 | 0.203 |
| | 0127-5 | 无 | 0.014 | 无 | 0.045 | 无 | 0.170 | 无 | 0.415 |
| | 0127-6 | 无 | 0.012 | 无 | 0.036 | 无 | 0.132 | 无 | 0.360 |

**参考文献：**

[1] WILSON A C, MEETHAL S V, BOWEN R L, *et al*. Leuprolide acetate: a drug of diverse clinical applications [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2007, **16**(11): 1851-1863.

[2] 孔思思, 米秀芳, 舒　琦, 等. 醋酸亮丙瑞林缓释微球主要特性评价及临床应用研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2022,

**57**(15): 1241-1246.

[3] 尹 霞, 王燕清, 徐 朋, 等. 注射用醋酸亮丙瑞林微球中的聚乙烯醇(PVA)残留量测定[J]. 今日药学, 2021, **31**(3): 168-171.

[4] SU Y, ZHANG B, SUN R, *et al*. PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery: recent advances in research and application[J]. *Drug Deliv*, 2021, **28**(1): 1397-1418.

[5] 张佳毅, 刘华钢. PLGA 缓释微球的制备及其缓释性能的研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2019, **12**(1): 174-175.

[6] KAPOOR D N, BHATIA A, KAUR R, *et al*. PLGA: a unique polymer for drug delivery[J]. *Ther Deliv*, 2015, **6**(1): 41-58.

[7] SINGHVI M S, ZINJARDE S S, GOKHALE D V. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications[J]. *J Appl Microbiol*, 2019, **127**(6): 1612-1626.

[8] 韦宝伟, 刘布鸣. 聚乳酸乙醇酸的生物降解和安全性研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, **27**(4): 422-428.

[9] 孔 璇, 吴 燕, 李华龙. HPLC 法测定药用辅料乳酸中乳酸[J]. 现代药物与临床, 2020, **35**(8): 1524-1526.

[10] 周 祎, 徐 宏, 蒋月明. HPLC 法测定乙醇酸甲酯水解产物乙醇酸含量[J]. 化工管理, 2020, (33): 49-50.

[11] DARWIN W, CHARLES W, CORD-RUWISCH R. Concurrent lactic and volatile fatty acid analysis of microbial fermentation samples by gas chromatography with heat pre-treatment[J]. *J Chromatogr Sci*, 2018, **56**(1): 1-5.

[12] 徐萍华, 鲍娇慧, 王敏珠, 等. 气相色谱法测定可吸收缝线降解产物中的乙醇酸[J]. 化学分析计量, 2019, **28**(5): 24-28.

[13] 张成成, 宋永健, 王成艳, 等. 离子色谱法测定聚乳酸制品中的聚乳酸[J]. 中国标准化, 2017, (20): 79-80.

[14] POURASGHAR M, KOENNEKE A, MEIERS P, *et al*. Development of a fast and precise method for simultaneous quantification of the PLGA monomers lactic and glycolic acid by HPLC[J]. *J Pharm Anal*, 2019, **9**(2): 100-107.

[15] 李延森, 王爱萍, 梁荣财, 等. 微球固化过程中溶剂去除速率对醋酸亮丙瑞林微球性质的影响[J]. 中国医药工业杂志, 2023, **54**(6): 927-936.

[16] 马骏威, 任连杰. 浅谈微球制剂的药学研究与评价[J]. 药学与临床研究, 2023, **31**(2): 148-152.

## 广告索引

**封二**：上海现代药物制剂工程研究中心有限公司

**封底**：中国医药工业信息中心

**封三**：鲁南厚普制药有限公司

**927、1015 页**：公益广告