การหาปริมาณเมธิลเทสโทสเทอโรนในยาผสมไวตามิน-ฮอร์โมนด้วยสเปคโตรฟลูออโรเดนซิโทมิเตอร์

นางสาวเยาวลักษณ์ วรรธนะทิพย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเภสัชเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2526
ISBN 974-562-303-2

007789
i 17074071

SPECTROFLUORODENSITOMETRIC DETERMINATION OF METHYLTESTOSTERONE IN VITAMIN-HORMONE PREPARATIONS

Miss Yaovalak Wattanapicis

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences
Department of Pharmaceutical Chemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1983

Thesis Title	Spectrofluorodensitometric Determination of Methyltestosterone in Vitamin-Hormone Preparations
By	Miss Yaovalak Wattanapicis
Department	Pharmaceutical Chemistry
Thesis Advisor	Dr. Chongdee Wongpinairat
	Associate Prof. Suttatip Chantaraskul

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

S. Bunnag .....Dean of Graduate School

(Associate Prof. Supradit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Committee

Sunibphond Pummangura .....Chairman

(Assistant Prof. Sunibphond Pummangura, Ph.D.)

Chongdee Wongpinairat .....Member

(Dr. Chongdee Wongpinairat)

Suttatip Chantaraskul .....Member

(Associate Prof. Suttatip Chantaraskul)

Suwanna Laungchonlatan .....Member

(Assistant Prof. Suwanna Laungchonlatan)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การหาปริมาณเมธิลเทสโทสเทอโรนในยาผสมไวตามิน-ฮอร์โมนด้วยสเปคโตรฟลูออโรเดนซิโทมิเตอร์

ชื่อนิสิต นางสาวเยาวลักษณ์ วรรธนะพิศิษฐ์

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.จงดี ว่องพินัยรัตน์

ร.ศ.สุทธาทิพย์ จันทรสกุล

ภาควิชาเคมี เภสัชเคมี

ปีการศึกษา 2525

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การหาปริมาณเมธิลเทสโทสเทอโรนในเภสัชภัณฑ์โดยเฉพาะในยาผสมไวตามิน-ฮอร์โมน สามารถทำได้อย่างรวดเร็วโดยใช้สเปคโตรฟลูออโรเดนซิโทมิเตอร์ ขั้นแรกแยกเมธิลเทสโทสเทอโรนจากตัวยาอื่น ๆ ด้วยวิธีธินแลเยอร์โครมาโตกราฟีโดยใช้เพลทสำเร็จชนิดอะลูมิเนียมออกไซด์ 150 เอฟ 254 (ชนิด "ที") ในตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ เบนซินและไดเอธิลอีเทอร์ ซึ่งผสมกันในอัตราส่วน 60:40 เมื่ออบโครมาโตแกรมด้วยความร้อนที่ 150° และมีอะลูมิเนียมออกไซด์เป็นสารเร่งปฏิกริยา กลุ่ม Δ^4-3-คีโต ในโมเลกุลของเมธิลเทสโทสเทอโรนจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารประกอบที่เรืองแสง จากนั้นวัดความเรืองแสงของสารประกอบที่เกิดขึ้นด้วยสเปคโตรฟลูออโรเดนซิโทมิเตอร์ โดยการกระตุ้นสารประกอบนั้นที่ 366 นาโนมิเตอร์ และวัดความเข้มของแสงเรืองที่ 454 นาโนมิเตอร์ การวิเคราะห์หาปริมาณเมธิลเทสโทสเทอโรนในยาเตรียมประเภทไวตามิน-ฮอร์โมนสูตรตำรับต่าง ๆ ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดด้วยวิธีนี้ให้ผลที่มีความแม่นยำเที่ยงตรง ทั้งยังสะดวกและเฉพาะตัว ซึ่งเป็นประโยชน์ในด้านการควบคุมคุณภาพ

Thesis Title Spectrofluorodensitometric Determination of Methyltestosterone in Vitamin-Hormone Preparations

Name Miss Yaovalak Wattanapicis

Thesis Advisor Dr. Chongdee Wongpinairat

Associate Prof. Suttatip Chantaraskul

Department Pharmaceutical Chemistry

Academic Year 1982

ABSTRACT

Methyltestosterone in pharmaceutical preparations, especially vitamin-hormone preparations, could be determined accurately and rapidly by spectrofluorodensitometer. Methyltestosterone was separated from other substances by using precoated TLC plate aluminum oxide 150 F_{254} (type T). A 60:40 mixture of benzene and diethyl ether was selected as mobile phase. The chromatogram was heated at 150°, Δ^4-3-keto group of methyltestosterone molecule was converted to blue fluorescent compound, in which aluminum oxide acted as oxidation catalyst. The blue fluorescence intensity of spots were measured using spectrofluorodensitometer with maximum excitation wavelength at 366 nm and maximum emission wavelength at 454 nm. The method of determination of methyltestosterone in commercially available vitamin-hormone preparations in various formulations and dosage forms gave high accuracy and good reproducibility. The proposed method which was convenient and selective, is a useful method for quality control of methyltestosterone in pharmaceutical preparations.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Acknowledgements

I am most grateful to Dr. Chongdee Wongpinairat and Associate Prof. Suttatip Chantaraskul for their continual advice and encouragements during the course of this work.

I would like to thank Assistant Prof. Sunibhond Pummangura and Assistant Prof. Suwanna Laungchonlatan for serving as thesis committee and for their valuable suggestions and kind cooperations.

I also wish to express my appreciation to Miss Boonlarp Kitisin, Director of Drug Analysis Division, and Dr. Nuanta Muangnoicharoen for their kind assistance.

I am indebted to Mrs. Nathrudee Sittisomwong for her valuable guidance.

Finally, I am deeply obliged to the Graduate School, Chulalongkorn University, for part of the financial support of this project.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
Thai abstract	iv
English abstract	v
Acknowledgements	vi
List of tables	ix
List of figures	xi
Chapter	
I Introduction	1
II Information	
- Pharmacology	4
- Chemistry	6
- Method of analysis	8
III Material and methods	17
- General procedure	20
- Determination of the mobile phase .	21
- Determination of the maximum excitation wavelength and the maximum emission wavelength	23
- Determination of the effect of time on stability of fluorescence intensity	24
- Reproducibility of fluorescence intensity between spots within one plate	25
- Determination of adherence to Beer's law	26

Page

- Interference of other substances in vitamin-hormone preparations 27
- Determination of the percent labelled amount of methyltestosterone in methyltestosterone tablet using spectrofluorodensitometric method and USP method 32
- Determination of the reproducibility of spectrofluorodensitometric determination of methyltestosterone in vitamin-hormone preparations 35
- Determination of the percent recovery of methyltestosterone in vitamin-hormone preparation 36
- Analysis of vitamin-hormone preparations containing methyltestosterone 38

IV Results and discussion 39

V Summary and conclusion 46

References 49

Appendix 54

Biography 79

Appendix

Table No. Page

1. Thin-layer chromatography of methyltestosterone 55
2. Effect of time on fluorescent spot intensity of methyltestosterone 56
3. A comparison of the reproducibility of fluorescence measurements by a single value and a data-pair approach 57
4. Relationship between concentration and peak height of methyltestosterone 58
5. A comparison of R_f values and peak heights between methyltestosterone spots with and without ethinyl estradiol 59
6. A comparison of R_f values and peak heights between methyltestosterone spots with and without fat-soluble vitamins 60
7. A comparison of R_f values and peak heights between methyltestosterone spots with and without water-soluble vitamins 61
8. A comparison of R_f values and peak heights between methyltestosterone spots with and without minerals 62
9. A comparison of R_f values and peak heights between methyltestosterone spots with and without other compounds 63

Page

10. A comparison of R_f values and peak heights between methyltestosterone spots with and without vegetable oil 64

11. Percent labelled amount of methyltestosterone in methyltestosterone tablet using spectrofluorodensitometric method and USP method 65

12. Percent labelled amount of methyltestosterone in vitamin-hormone preparations using spectrofluorodensitometric method 66

13. Percent recovery of methyltestosterone in vitamin-hormone preparation 67

14. Analysis of vitamin-hormone preparations containing methyltestosterone 68

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Appendix

Figure No.		Page
1.	Fluorescence spectra of methyltestosterone ..	69
2.	Chromatogram fluorescence intensity of methyltestosterone spots within one plate	70
3.	A comparison of R_f patterns for methyltestosterone spots	71
4.	Calibration curve of methyltestosterone	72
5.	Chromatogram fluorescence intensity of methyltestosterone and ethinyl estradiol	73
6.	Chromatogram fluorescence intensity of methyltestosterone and fat-soluble vitamins	74
7.	Chromatogram fluorescence intensity of methyltestosterone and water-soluble vitamins	75
8.	Chromatogram fluorescence intensity of methyltestosterone and minerals	76
9.	Chromatogram fluorescence intensity of methyltestosterone and other compounds	77
10.	Chromatogram fluorescence intensity of methyltestosterone and cottonseed oil	78