

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.03.015

复方维生素E口腔药膜含量测定方法研究*

曲婷¹, 陈岩^{1,2Δ}, 乔宏艳¹, 刘亮¹, 李小红¹

(1. 哈尔滨医科大学附属第一医院药学部, 黑龙江 哈尔滨 150001; 2. 厦门大学附属翔安医院药学部, 福建 厦门 361101)

摘要:目的 改进复方维生素E口腔药膜现有质量标准。方法 将药膜放入少量纯化水中,水浴加热,溶解后,滴加适量无水乙醇,上清液加甲醇稀释。色谱柱为Sinochrom ODS-BP柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-异丙醇(88:12, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为284 nm,柱温为40℃,进样量为10 μL。结果 维生素E质量浓度在50~800 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r=0.9999$);精密度和稳定性均良好,RSD分别为1.13%和0.71%;平均加样回收率为95.55%和100.56%,RSD为2.66%和1.46%($n=3$);6批药膜中维生素E的含量分别为标示量的98.10%~101.70%。结论 热溶法将膜剂中有效物质的提取回收率大于95.00%,显著高于超声波的提取率。该方法操作简便、结果准确、专属性强、重复性好,可用于复方维生素E口腔药膜中维生素E含量的快速测定。

关键词: 维生素E;口腔药膜;前处理;高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R977.2;R927.2 文献标识码:A 文章编号:1006-4931(2020)03-0050-04

Determination Method for Compound Vitamin E Oral Pellicle

QU Ting¹, CHEN Yan^{1,2}, QIAO Hongyan¹, LIU Liang¹, LI Xiaohong¹

(1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, China 150001; 2. Department of Pharmacy, Xiang'an Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian, China 361101)

Abstract: Objective To improve the current method for determining the content of compound vitamin E oral pellicle. **Methods** The pellicle was placed in a small amount of purified water heated in a water bath and dissolved, an appropriate amount of absolute ethanol was dropped into the pellicle solution, and the supernatant was diluted with methanol. The chromatographic column was Sinochrom ODS-BP column (200 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-isopropanol (88:12, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was 284 nm, and the column temperature was 40℃. **Results** The concentration of vitamin E showed a good liner relationship in the range of 50-800 μg/mL ($r=0.9999$). The precision and stability were satisfactory with RSDs of 1.13% and 0.71% respectively. The average recoveries were 95.55% and 100.56%, RSDs were 2.66% and 1.46% ($n=3$). The contents of vitamin E in the 6 batches of compound vitamin E oral pellicle were in the range of 98.10%-101.70% of the labeled amount. **Conclusion** The heat dissolving method can improve the recovery rate of the effective substances in the pellicle to more than 95.00%, which is significantly higher than the ultrasonic extraction rate. This method is simple in operation, accurate in results, strong in specificity, and good in reproducibility, and can be used for rapid determination of vitamin E content in the compound vitamin E oral pellicle.

Key words: vitamin E; oral pellicle; pre-treatment; HPLC; content determination

膜剂为药物与适宜的成膜材料经加工制成的膜状制剂,供口服或黏膜用^[1]。美国药典(USP)中也收载了膜剂(Films),简单描述其为置于口腔内的薄片,可能含有一层或多层,层中可能含有原料药,通常是由聚合物构成的薄膜材料,通过快速释放到口腔给药。复方维生素E口腔药膜为我院自制膜剂,临床主要用于治疗口腔溃疡、皮肤角化症及湿疹等慢性皮肤病^[2-5]。口腔黏附用膜剂薄而软,能将药物直接释放至黏膜表面,快速吸收。与生物黏附凝胶剂相比,膜剂最大的优点是成形性好,给药后可直接黏附于给药部位,不会分散,可保持原状持续释药,故剂量准确。

维生素E分为合成型(dl-α-生育酚醋酸酯)或天然型(d-α-生育酚醋酸酯)^[5],为微黄色至黄色澄清的黏稠液体,不溶于水,溶于无水乙醇、丙酮等有机溶剂,在空气中会缓慢氧化,紫外线照射可使其分解、色渐变深。维生素E是人体非常重要的阻断自由基链式反应的抗

氧化剂,通过影响炎症因子、调节细胞信号转导,在抑制炎症反应、抗自由基、抗衰老、抗癌变过程中发挥重要作用^[6-8],具有稳定和细胞膜的作用,在人体正常新陈代谢中不可或缺,已广泛用于治疗多种皮肤病^[9-10]。维生素E在本制剂中含量最高,故作为其含量控制指标性成分,采用超声波提取、高效液相色谱法测定,但此方法回收率低,不适用于药膜中维生素E的定量。本研究对比了超声波、热回流、索氏提取、醇沉等提取方法对药膜中维生素E的影响,以高效液相色谱(HPLC)法测定其含量,作为前处理评价指标,为膜剂中该药物的质量评价提供准确可行的检测方法,为膜剂中药物含量测定前处理方法的选择提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 600型高效液相色谱系统(美国 Waters 公

*基金项目:黑龙江省卫生计生委科研课题[2017-027]。

第一作者:曲婷,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为药物制剂、临床药学,(电子信箱) nihao163666@163.com。

Δ通信作者:陈岩,女,博士研究生,副主任药师,研究方向为医院药学、药剂学,(电子信箱) wzychenyan@126.com。

司),包括 2996 PDA 检测器、717 自动进样器;SB3200 型超声波仪(必能信超声<上海>有限公司);AE200 型电子天平(梅特勒-托利多仪器<上海>有限公司)。

1.2 试药

维生素 E 对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 100062-201110,供 HPLC 测定,含量为 97.7%);复方维生素 E 口腔药膜(医院自制,批号分别为 200171121,20171128,20171130,20171205,20171207,20171212,规格为每片含维生素 E 6 mg);甲醇与异丙醇均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Sinochrom ODS-BP 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm);检测波长:284 nm;流动相:甲醇-异丙醇(88:12, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:40 °C;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

对照品溶液:称取维生素 E 对照品约 100.0 mg,精密称定,置 100 mL 棕色容量瓶中,先加入适量无水乙醇充分溶解,再用甲醇定容至刻度,摇匀,即得质量浓度为 1.0 mg/mL 的维生素 E 对照品贮备液,置 4 °C 冰箱中保存,备用。

供试品溶液:取本品 20 片,剪碎至大米粒大小,得药膜碎片,备用。1)超声波提取。称取相当于 3 片的上述药膜碎片,精密称定,置 100 mL 棕色容量瓶中,加适量无水乙醇,置超声波(120 W,40 kHz)中,超声处理 60 min,放冷至室温,加甲醇至刻度,混匀,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液 I。2)热回流提取。称取相当于 3 片的上述药膜碎片,精密称定,置圆底烧瓶中,加适量无水乙醇,置加热套中,热回流 60 min,放冷至室温,转移至 100 mL 棕色容量瓶中,加甲醇至刻度,混匀,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液 II。3)热溶醇沉提取。称取相当于 3 片的上述药膜碎片,精密称定,置离心管中,加少量热水溶解后,边滴加适量无水乙醇边搅拌,离心,上清液转移至 100 mL 棕色容量瓶中,加甲醇至刻度,混匀,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即

得供试品溶液 III。

阴性对照品溶液:按处方量称取处方中除维生素 E 的其他药用原料及辅料,按制备工艺制成不含维生素 E 的阴性制剂,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定,色谱图见图 1。结果显示,基线平稳,维生素 E 与杂质峰分度良好,空白辅料及杂质对目标峰无干扰,且柱效高,峰形理想。

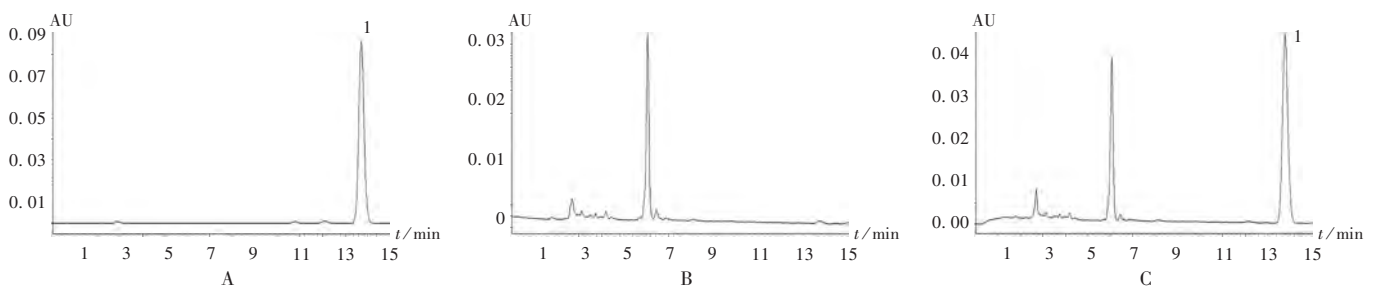
线性关系考察:取 2.2 项下维生素 E 对照品贮备液,精密吸取 2.5,5.0,10.0,20.0,40.0 mL,分别置 50 mL 棕色容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,最终配制成质量浓度分别为 50,100,200,400,800 μg/mL 的溶液。按拟订色谱条件分别进样测定,记录色谱图,以维生素 E 质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 3\,228.7X - 17.083$, $r = 0.9999$ ($n = 5$)。结果表明,维生素 E 质量浓度在 50 ~ 800 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定:精密吸取 2.2 项下维生素 E 对照品贮备液适量,加甲醇逐级稀释后,按拟订色谱条件进样分析。结果维生素 E 的最低检测限(LOD)为 0.25 μg/mL[信噪比(S/N) = 3],最低定量限(LOQ)为 1.0 μg/mL[信噪比(S/N) = 10]。

精密度试验:取 2.2 项下质量浓度为 8 μg/mL 的对照品溶液适量,按拟订色谱条件连续测定 3 d,每天重复测定 6 次。结果维生素 E 色谱峰面积的日内精密度 RSD 为 0.64% ($n = 6$),日间精密度 RSD 为 1.13% ($n = 3$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取 2.2 项下质量浓度为 8 μg/mL 的对照品溶液适量,按拟订色谱条件分别于室温条件下放置 0,1,2,4,8 h 时进样测定。结果维生素 E 峰面积的 RSD 为 0.71% ($n = 5$),表明供试品溶液室温放置 8 h 内稳定性良好。

重复性试验:取同一批(批号为 20171128)复方维生素 E 口腔药膜 6 份,按 2.2 项下“热溶醇沉提取”方



1. 维生素 E

A. 对照品溶液 B. 阴性对照品溶液 C. 供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

法分别制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,计算含量。结果维生素 E 的标示量分别为 99.6%, 102.7%, 104.1%, 99.4%, 102.4%, 100.8%, RSD 为 1.84% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量(6.09 mg/片)的复方维生素 E 口腔药膜(批号为 20171128)6 份,均分为高、低浓度加样组($n=3$),分别精密加入 18 mg 和 6 mg 维生素 E 对照品,按 2.2 项下“热溶醇沉提取”方法制备加样回收试验供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,计算回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果($n=3$)

样品含量 (mg/mL)		加入量 (mg/mL)		测得量 (mg/mL)		回收率 (%)		\bar{X} (%)		RSD (%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.183	0.183	0.06	0.18	0.239	0.361	93.33	98.89				
0.183	0.183	0.06	0.18	0.242	0.366	98.33	101.67	95.55	100.56	2.66	1.46
0.183	0.183	0.06	0.18	0.240	0.365	95.00	101.11				

注:A 为低浓度加样组,B 为高浓度加样组。

提取方法确定:取同一批(批号为 20171128)复方维生素 E 口腔药膜,按 2.2 项下 3 种提取方对药膜进行前处理,每种方法平行制备 3 份供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析。结果见表 2。

表 2 3 种前处理方法提取维生素 E 后 HPLC 检测结果($n=3$)

提取方法	提取时间 (min)	供试液平均浓度 ($\bar{X} \pm s, \mu\text{g/mL}$)	平均含量 ($\bar{X} \pm s, \text{mg/片}$)	平均标示量 ($\bar{X} \pm s, \%$)	RSD (%)
超声波	60	135.3 ± 2.28	4.51 ± 0.08	75.2 ± 1.27	1.68
热回流	60	167.5 ± 1.47	5.58 ± 0.05	93.0 ± 0.81	0.88
热溶醇沉		180.2 ± 2.46	6.01 ± 0.08	100.1 ± 1.36	1.36

2.4 样品含量测定

分别取复方维生素 E 口腔药膜样品 6 批,按 2.2 项下“热溶醇沉提取”方法分别制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析。结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果($\bar{X} \pm s, n=3$)

批号	样品含量(mg/mL)	平均含量(mg/mL)	标示量(%)	RSD(%)
20171121	0.181 ± 0.002	6.04 ± 0.07	100.70 ± 1.19	1.18
20171128	0.183 ± 0.002	6.09 ± 0.08	101.50 ± 1.38	1.37
20171130	0.183 ± 0.003	6.07 ± 0.12	101.70 ± 1.92	1.90
20171205	0.177 ± 0.002	5.89 ± 0.07	98.10 ± 1.24	1.26
20171207	0.178 ± 0.002	5.95 ± 0.05	99.20 ± 0.87	0.88
20171212	0.181 ± 0.002	6.02 ± 0.05	100.30 ± 0.86	0.85

3 讨论

检测方法选择:除《中国药典》规定的气相色谱法外,维生素 E 的含量测定方法还有气质联用法、HPLC 法、液质联用法、紫外分光光度法等^[11-17],但膜剂中维生素 E 的含量测定方法尚未见报道。气相色谱法所用的内标物正三十二烷在市场难以购买,导致日常

分析较困难,且样品前处理较烦琐。本研究中采用高效液相色谱仪、外标法测定,操作简便,结果准确,优于气相色谱仪采用的内标法进行定量。

检测波长选择:取维生素 E 对照品溶液,无水乙醇溶解,甲醇稀释,在 190 ~ 450 nm 波长范围内扫描,记录光谱图,维生素 E 在 204 nm 及 284 nm 波长处均有吸收峰。考虑到前者为边缘吸收,受溶剂等因素的影响较大,故选择 284 nm 作为检测波长。

流动相选择:曾选用以甲醇-水(95:5, V/V)、甲醇-乙腈(95:5, V/V)为流动相,结果均因其色谱峰分离效果不好而未被采用。最终采用甲醇-异丙醇(88:12, V/V)作为流动相,可使主峰的保留时间缩短。采用 HPLC 法以反相色谱柱进行分析^[12,18],多以水和甲醇为流动相,易造成脂溶性大分子化合物在柱内沉淀,污染色谱柱,也可能使色谱峰峰形不理想。本研究中采用的 HPLC 法是以甲醇和异丙醇为流动相,使脂溶性维生素 E 不残留在柱内,可减少维生素 E 的保留时间,并提高了柱的稳定性,保持柱分离效能,延长其使用寿命。

提取方法选择:2015 年版《中国药典》中收录了 4 种膜剂,含量测定的前处理方法均经过剪碎、超声波提取或有机溶剂热水浴 2 个步骤。其中剪碎过程费时费力,超声波提取耗时长、噪音大,热水浴耗时长,且会导致有机溶剂挥发,存在环境危害和人体损害。本研究中根据脂溶性主药维生素 E 与水溶性辅料聚乙烯醇的理化性质差异,设计了将药膜放入少量纯化水中,水浴加热呈溶解状态,将维生素 E 从药膜中完全释放出来,然后边滴加适量无水乙醇边搅拌,聚乙烯醇遇有机溶剂变性产生絮状沉淀,待沉淀不再增加,停止搅拌,离心,取上清液。整个过程耗时短,操作简便。本研究中考察了超声波法、热回流法、热溶醇沉法提取药膜中的维生素 E。分别将药膜剪碎成花生米大小、黄豆大小、大米粒大小,甲醇为提取溶剂,采用超声波法和热回流法,分别于提取 10, 20, 30, 60, 90 min 时取样, HPLC 法测定维生素 E 含量。试验结果表明,2 种方法提取率与药膜的粉碎度和提取时间、提取温度成正比,但提取 60 min 后,提取率不再增加。其中,超声波法提取不完全,测定结果为标示量的 75.2%;热回流法提取率高于超声波法,为标示量的 93.0%,也未达到完全提取;热溶醇沉法提取, HPLC 法测定维生素 E 含量,结果为标示量的 100.1%。表明热溶醇沉法提取完全,操作简便、快捷,低浓度加样组和高浓度加样组平均回收率均较高,方法准确可靠。

参考文献:

- [1] 刘丕正. 雷尼替丁配合维生素 E 治疗口腔溃疡 200 例临床疗效观察[J]. 中外医疗, 2011, 30(16):118.
- [2] 丁锐, 沈彤, 朱启星. 维生素 E 对三氯乙烯诱导人皮肤