

中图分类号: R927.2; R977.2

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2024)05-0080-03

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.05.019



# 高效液相色谱法测定复方鱼肝油氧化锌软膏中维生素A含量\*

苗会娟, 徐艳梅, 王茉莉, 郝丽娟, 高燕霞<sup>△</sup>

(河北省药品医疗器械检验研究院·国家药品监督管理局仿制药质量控制与评价重点实验室, 河北 石家庄 050200)

**摘要:**目的 建立测定复方氧化锌鱼肝油软膏中维生素A含量的高效液相色谱法。方法 采用正己烷提取样品中的维生素A, 色谱柱为 Waters silica 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为正己烷-异丙醇(997:3, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 325 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。结果 维生素A醋酸酯的活性单位浓度在 1.43~28.60 IU/mL 范围内与峰面积线性关系良好( $r=0.999\ 9$ ,  $n=5$ ); 检测限为 30 μg/g, 定量限为 100 μg/g; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 3.0%; 加样回收率为 95.76%, RSD 为 3.58% ( $n=6$ )。3 批样品中维生素A的含量分别为 760.34, 794.62, 747.67 IU/g。结论 该方法操作简便、重复性好、结果准确, 可用于复方氧化锌鱼肝油软膏中维生素A的含量测定。

**关键词:** 复方鱼肝油氧化锌软膏; 维生素A; 高效液相色谱法; 正己烷提取法; 含量测定

## Content Determination of Vitamin A in Compound Cod Liver Oil and Zinc Oxide Ointment by HPLC

MIAO Huijuan, XU Yanmei, WANG Moli, HAO Lijuan, GAO Yanxia

(Hebei Institute for Drug and Medical Device Control · NMPA Key Laboratory for Quality Control and Evaluation of Generic Drug, Shijiazhuang, Hebei, China 050200)

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of vitamin A in Compound Cod Liver Oil and Zinc Oxide Ointment. **Methods** Vitamin A was extracted from the sample by n-hexane, the chromatographic column was Waters silica column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was n-hexane-isopropanol (997:3, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 325 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of active unit concentration of vitamin A acetate was 1.43-28.60 IU/mL ( $r=0.999\ 9$ ,  $n=5$ ). The limit of detection was 30 μg/g, and the limit of quantification was 100 μg/g. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 3.0%. The recovery rate of vitamin A was 95.76% with an RSD of 3.58% ( $n=6$ ). The content of vitamin A in the three batches of samples was 760.34, 794.62, and 747.67 IU/g, respectively. **Conclusion** The method is simple, reproducible and accurate, which can be used for the content determination of vitamin A in Compound Cod Liver Oil and Zinc Oxide Ointment.

**Key words:** Compound Cod Liver Oil and Zinc Oxide Ointment; vitamin A; HPLC; n-hexane extraction method; content determination

复方鱼肝油氧化锌软膏是由鱼肝油、呋喃西林、氧化锌、凡士林、石蜡等制成的复方脂溶性软膏, 主要用于尿布炎、脓疮、湿疹等的治疗, 与其他药物联用的效果更好<sup>[1-3]</sup>。该软膏处方为每克含氧化锌 200 mg、鱼肝油 80 mg(每 1 g 含维生素A 10 000 IU 与维生素D 1 000 IU、呋喃西林 1 mg)。鱼肝油含维生素A、维生素D、角鲨烯等营养物质, 有抗炎、营养皮肤、加快创伤愈合的效果<sup>[4]</sup>。复方鱼肝油氧化锌软膏现行质量标准收载于《国家药品标准·化学药品地标升国标第六册》WS<sub>1-10001</sub>-(HD-0549)-2002。该标准中仅对氧化锌的含量进行了控制, 缺少鱼肝油中有效成分维生素A和维生素D的含量测定。为提高药品质量标准, 保障用药的

安全性与有效性, 本研究中建立了测定复方鱼肝油氧化锌软膏中维生素A含量的高效液相色谱法, 并进行了方法学验证, 为其质量控制提供参考。现报道如下。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

Thermo U3000 型高效液相色谱仪(美国 Thermo 公司); AS 3120 型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司, 功率为 120 W, 频率为 40 kHz); XS105 型电子天平(Mettler Toledo 公司, 精度为十万分之一)。

#### 1.2 试剂

维生素A醋酸酯对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 100368-201803, 每 1 g 含维生素A醋酸酯

\*基金项目: 河北省卫生健康委员会 2021 年度河北省医学科学研究课题计划[20211194]。

第一作者: 苗会娟, 女, 硕士研究生, 高级工程师, 研究方向为化学药品检测与质量控制, (电子信箱)miaohj13833470531@163.com。

<sup>△</sup>通信作者: 高燕霞, 女, 博士研究生, 主任药师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)155270849@qq.com。

344 mg < 100 万 IU >, 其中含反式维生素 A 醋酸酯 98.0%); 复方鱼肝油氧化锌软膏(天津市金耀药业有限公司, 批号分别为 19030401, 19030402, 19030403); 正己烷、异丙醇(色谱纯, 德国 Merck 公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters silica 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 正己烷-异丙醇(997:3, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 325 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液制备

对照品溶液: 取维生素 A 醋酸酯对照品 10 mg(相当于维生素 A 10 000 IU), 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 用正己烷溶解并定容, 摇匀, 即得对照品贮备液。精密量取对照品贮备液 2 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 用正己烷定容, 即得每 1 mL 约含 80 IU 维生素 A 的对照品溶液。

供试品溶液: 取样品 0.5 g(约相当于维生素 A 400 IU), 精密称定, 置离心管中, 精密加入 50 mL 正己烷, 精密称定质量, 80 °C 水浴加热 15 min, 冷却至室温, 用正己烷补足减失的质量, 离心(转速为 5 000 r/min) 5 min, 取上清液, 滤过, 即得。

阴性对照品溶液: 按处方工艺制备缺鱼肝油的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

系统适用性溶液: 取维生素 A 醋酸酯对照品 300 mg, 置 200 mL 容量瓶中, 用正己烷定容, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用正己烷定容, 摇匀, 即得。

2.3 方法学考察

专属性试验: 取 2.2 项下 4 种溶液各 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果维生素 A 峰与其顺式异构体峰的分离度均大于 3.0, 且阴性对照无干扰。色谱图

见图 1。

线性关系考察: 取维生素 A 醋酸酯对照品 28.60 mg, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 加正己烷溶解并定容, 摇匀, 即得对照品贮备液(286.0 IU/mL); 再用正己烷逐级稀释为维生素 A 活性单位浓度分别为 28.60, 14.30, 7.15, 5.72, 1.43 IU/mL 的系列溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定。以对照品的活性单位浓度(X, IU/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程  $Y = 0.5107X - 0.0907$  ( $r = 0.9999, n = 5$ )。结果表明, 维生素 A 醋酸酯活性单位浓度在 1.43 ~ 28.60 IU/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

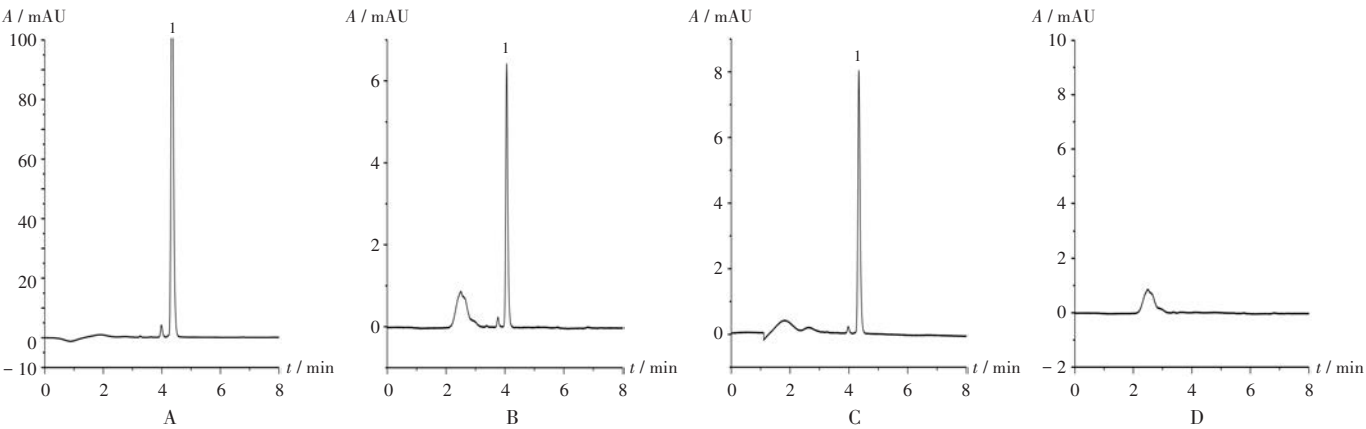
定量限与检测限确定: 取 2.2 项下阴性对照品溶液, 加入适量对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 以信噪比(S/N)分别为 10:1 和 3:1 时的信号响应值为定量限和检测限。结果检测限为 30 μg/g, 定量限为 100 μg/g。

重复性试验: 取样品(批号为 19030401)适量, 精密称定, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液 6 份, 再按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算含量。结果的 RSD 为 2.04% ( $n = 6$ ), 表明方法重复性良好。

精密度试验: 取重复性试验测定用第 1 份供试品溶液适量, 按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果的 RSD 为 0.22% ( $n = 6$ ), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取 2.2 项下供试品溶液(批号为 19030401)适量, 分别于室温下放置 0, 2, 4, 8 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果的 RSD 为 1.42% ( $n = 4$ ), 表明供试品溶液在室温下放置 8 h 内稳定性良好。

加样回收试验: 取样品(批号为 19030401) 0.5 g, 精密称定, 共 6 份, 分别置 100 mL 容量瓶中, 精密加入对



1. 维生素 A  
A. 系统适用性溶液 B. 供试品溶液 C. 对照品溶液 D. 阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. Vitamin A

C. System suitability solution B. Test solution C. Reference solution D. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

照品贮备液 1.4 mL,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表 1。

表 1 维生素 A 加样回收试验结果 (n = 6)

Tab. 1 Results of the recovery test of vitamin A (n = 6)

| 样品含量(IU/mL) | 加入量(IU/mL) | 测得量(IU/mL) | 回收率(%) | $\bar{X}$ (%) | RSD(%) |
|-------------|------------|------------|--------|---------------|--------|
| 3.84        | 3.93       | 7.64       | 96.69  | 95.76         | 3.58   |
| 3.96        | 3.93       | 7.93       | 101.02 |               |        |
| 3.88        | 3.93       | 7.68       | 96.69  |               |        |
| 3.76        | 3.93       | 7.51       | 95.42  |               |        |
| 3.91        | 3.93       | 7.61       | 94.15  |               |        |
| 3.86        | 3.93       | 7.42       | 90.59  |               |        |

耐用性试验:取样品(批号为 19030401)适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别设置色谱柱[钠谱硅胶柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Waters Silica 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 月旭硅胶柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)]和液相色谱仪[日本 Shimadzu LC-20AT 型、美国 Agilent 1260 型、美国 Thermo Fisher U3000 型],分别按 2.1 项下色谱条件进样测定,结果均能满足系统适用性试验要求。

2.4 样品含量测定

取 3 批(批号分别为 19030401, 19030402, 19030403)样品内容物,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果 3 批样品中维生素 A 的含量分别为 760.34, 794.62, 747.67 IU/g。

3 讨论

维生素 A 的含量测定方法主要有高效液相色谱-紫外检测器法<sup>[5-6]</sup>、紫外-分光光度法<sup>[7]</sup>、液相-荧光分光光度法<sup>[8]</sup>、超高效液相色谱-质谱法<sup>[9-10]</sup>、二维色谱法<sup>[11]</sup>等。但液相色谱-质谱联用仪价格昂贵,紫外-可见分光光度法灵敏度低、专属性差,荧光检测器不常见,二维色谱的应用受限,故本研究中采用正相高效液相色谱法测定样品中维生素 A 的含量。

与 2020 年版《中国药典(四部)》通则 0731 第二法<sup>[12]</sup>相比,本研究中简化了系统适用性溶液的配制过程。考虑到维生素 A 醋酸酯对照品含有顺式维生素 A 醋酸酯,且碘试液具有较强的刺激性气味和腐蚀性,不需再添加碘试液。故直接用作系统适用性溶液,安全性更高。

维生素 A 的提取方法主要有皂化法和直接提取法。鱼肝油是由鲛类动物 Squahdae 等无毒海鱼肝脏中提取的一种脂肪油,在 0℃左右脱去部分固体脂肪后,用精炼食用植物油、浓度较高的鱼肝油或维生素 A 与维生素 D<sub>3</sub> 调节浓度,再加适量稳定剂制成<sup>[13]</sup>,具有较强的脂溶性,用皂化法提取相对烦琐。故采用直接提取法进行提取。曾考察甲醇<sup>[11]</sup>、乙醇<sup>[10]</sup>、异丙醇<sup>[14]</sup>、二甲基亚砜<sup>[15]</sup>、正己烷<sup>[12]</sup>、正庚烷等有机溶剂作为提取剂的提取效果,

结果正己烷的提取液澄清度最佳,维生素 A 的提取率最高。故最终选择正己烷作为提取溶剂。曾采用正交试验法考察水浴温度、提取时间和溶剂体积对维生素 A 的提取率的影响。结果 80℃水浴加热 15 min,溶剂体积为 50 mL 的提取效果最佳。

综上所述,本研究中建立的方法操作简便、重复性好、结果准确,可用于复方鱼肝油氧化锌软膏中维生素 A 的含量测定。

参考文献

[1] 杜 丹. 鱼肝油氧化锌软膏联合夫西地酸乳膏治疗儿童脓疱疮疗效观察[J]. 吉林医学, 2013, 34(32): 6701-6702.

[2] 李政敏, 范振国. 自拟润肤汤泡洗联合复方鱼肝油氧化锌软膏外用治疗掌跖角化性湿疹 82 例[J]. 中医外治杂志, 2010, 19(5): 12-13.

[3] 薛凤娟, 陈 爽, 张淑艳, 等. 复方鱼肝油氧化锌软膏治疗新生儿尿布皮炎的疗效观察[J]. 医学与哲学(B), 2013, 34(8): 34-35.

[4] 付雪媛, 钟 宏, 宋文山, 等. 章鱼内脏鱼油的提取及品质分析[J]. 中国油脂, 2020, 45(5): 17-22.

[5] 杜 杰, 林春兰, 郑绣蓓, 等. 高效液相色谱法同时测定食用油中维生素 A 和维生素 E 的方法[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(10): 258-263.

[6] 张丽媛, 戚绿叶, 周明昊. 柱切换法液相色谱测定保健食品中的 VA、VD、VE[J]. 食品科学, 2022, 43(4): 225-230.

[7] 王明华, 丁卓平, 刘振华. 酸奶中维生素 A 含量的测定[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(2): 185-188.

[8] 赵 莹, 胡佳薇, 赵静璐. 高效液相色谱-多波长荧光检测法同时测定血清中维生素 A 和维生素 E 的含量[J]. 卫生研究, 2020, 49(4): 585-590.

[9] 李雪梅, 吴慧慧, 陈 竞, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时快速检测微量血清中 6 种脂溶性维生素[J]. 现代预防医学, 2022, 49(7): 1297-1302.

[10] 蔡艳娇, 程婷婷, 杭太俊, 等. 维生素 A 棕榈酸酯有关物质的色谱-质谱联用鉴定研究[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(10): 1782-1795.

[11] 苗纪芳, 刘兴国, 张 丽, 等. 在线固相萃取-二维液相色谱法同时测定婴幼儿配方奶粉中的维生素 A、D 和维生素 E 异构体含量[J]. 现代食品, 2022, 28(10): 161-164.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 104.

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 686.

[14] 顾 霄, 李 煜, 赵明娟, 等. C<sub>30</sub>-HPLC-PDA-TOF/MS 对鱼肝油中维生素 A 酯顺反异构体的分离与鉴定[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(12): 2228-2233.

[15] 范 菲, 杨会鸽, 周 娜, 等. HPLC 法同时测定多维元素片中维生素 A 和维生素 E 的含量[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(6): 590-592.

(收稿日期: 2023-02-28; 修回日期: 2023-09-12)