

RP-HPLC法同时测定复方维A酸乳膏中尿囊素、维A酸、异维A酸和维生素E的含量

张志勤^{1*},李 玫²,朱昌辉¹,王 栋¹,韩国柱²,唐泽耀²(1.大连市皮肤病医院,辽宁大连 116021;2.大连医科大学药理教研室,辽宁大连 116044)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)12-1131-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.12.26

摘要 目的:建立同时测定复方维A酸乳膏中尿囊素、维A酸、异维A酸和维生素E含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为ODS Synchronis C₁₈,流动相为甲醇-水-0.5%冰醋酸(梯度洗脱,采用不同的流速和检测波长),进样量为20 μl,柱温为35 ℃。结果:尿囊素、维A酸、异维A酸、维生素E的检测质量浓度分别在125~2 000、12.5~200、6.25~100、250~4 000 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 8, 0.999\ 9, 0.999\ 8, 0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤0.88%;平均加样回收率分别为99.5%、97.6%、99.8%、99.0%,RSD分别为0.24%、0.97%、0.18%、0.72%($n=6$)。结论:该方法操作简便、快速、准确,适用于同时测定复方维A酸乳膏中尿囊素、维A酸、异维A酸和维生素E的含量。

关键词 复方维A酸乳膏;尿囊素;维A酸;异维A酸;维生素E;反相高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Allantoin, Tretinoin, Isomerization A Acid and Vitamin E in Compound Tretinoin Cream by RP-HPLC

ZHANG Zhi-qin¹, LI Mei², ZHU Chang-hui¹, WANG Dong¹, HAN Guo-zhu², TANG Ze-yao²(1.Dalian Dermatology Hospital, Liaoning Dalian 116021, China; 2.Dept. of Pharmacology, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for simultaneous determination of allantoin, tretinoin, isomerization A acid and vitamin E in Compound tretinoin cream. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on ODS Synchronis C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-water-0.5% glacial acetic acid (gradient elution at different flow rates and detection wavelength); sample size was 20 μl and column temperature was 35 ℃. RESULTS: The linear ranges were 125-2 000 μg/ml for allantoin ($r=0.999\ 8$), 12.5-200 μg/ml for tretinoin ($r=0.999\ 9$), 6.25-100 μg/ml for isomerization A acid ($r=0.999\ 8$) and 250-4 000 μg/ml for vitamin E ($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 0.88%. Average recoveries were 99.5% (RSD=0.24%, $n=6$), 97.6% (RSD=0.97%, $n=6$), 99.8% (RSD=0.18%, $n=6$) and 99.0% (RSD=0.72%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, accurate and suitable for the content determination of allantoin, tretinoin, isomerization A acid and vitamin E in Compound tretinoin cream.

KEYWORDS Compound tretinoin cream; Allantoin; Tretinoin; Isomerization A acid; Vitamin E; RP-HPLC

维A酸类药物被广泛应用于临床皮肤科,被称为皮肤治疗学的“第三里程碑”^[1]。维A酸乳膏常外用于皮肤疾病的治疗,如痤疮、角化异常性皮肤病、光老化性皮肤病、银屑病、扁

平疣及皮肤肿瘤等^[2-3]。但是,现有市售的维A酸乳膏均为单方制剂,稳定性较差,维A酸极易见光异构化降解产生异维A酸,疗效并不理想^[4]。维生素E为强抗氧化剂,能阻止乳膏中维

在常温下测定可行。

综上所述,本方法准确、简便、快速,可用于异丙托溴铵原料药中有关物质的测定。

参考文献

- [1] 刘莉敏,谢艳丽,王以炳,等.异丙托溴铵联合舒利迭治疗重度哮喘的疗效[J].临床肺科杂志,2013,18(1):80.
- [2] 杨岚.复方异丙托溴铵联合布地奈德混悬液治疗儿童急性哮喘发作的疗效评价[J].中国医药科学,2013(18):108.

- [3] 刘海平.布地奈德、沙丁胺醇、异丙托溴铵三联吸入治疗小儿毛细支气管炎的疗效观察[J].中国医药指南,2013,11(19):532.
- [4] 滕箭,赵炜,王建华,等.吸入用布地奈德混悬液和吸入用异丙托溴铵溶液雾化吸入治疗慢性阻塞性肺疾病的疗效分析[J].中国现代医药杂志,2013,15(4):18.
- [5] 卢来春,张蓉,刘同华,等.反相高效液相色谱法测定吸入用异丙托溴铵溶液中的有关物质[J].重庆医学,2007,36(11):1 067.
- [6] European pharmacopeia. EP 7.0[S]. 2012:2 277.

*药师,硕士。研究方向:药物制剂与质量控制。电话:0411-83781004。E-mail:zhangzhiqin_520666@163.com

(收稿日期:2013-06-14 修回日期:2013-10-06)

A酸被氧化破坏,提高维A酸的稳定性,减少细胞膜脂质和脂蛋白的过氧化,还具有较强的保湿作用,从而与维A酸起协同作用^[5-6]。尿囊素可促进细胞生长,加快伤口愈合,软化角质蛋白,可用于缓解和治疗皮肤干燥症、鳞屑性皮肤病等,与维A酸和维生素E具有协同作用^[7-8]。近年研制的复方维A酸乳膏(批准文号:辽药准字LBH00782005),主要成分为维A酸、维生素E和尿囊素^[9-10],为O/W型乳膏。为提高复方维A酸乳膏的疗效及稳定性,更好地控制其质量,笔者采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法建立了同时测定其中尿囊素、维A酸、异维A酸和维生素E含量的方法。

1 材料

Ultimate 3000HPLC仪(美国戴安公司);SB-5200D超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司),BS-110S电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

复方维A酸乳膏(大连市皮肤病医院自制,O/W型,含维A酸、尿囊素、维生素E分别为0.1%、1%、2%,批号:121201、121201-1、121201-2、121201-3);尿囊素、维A酸、异维A酸和维生素E对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111501-200202、100307-200902、100224-200903、100062-201110);冰醋酸(分析纯,购于天津市科密欧化学试剂有限公司);甲醇(色谱纯,美国Tedia公司);水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ODS Synchronis C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水-0.5%冰醋酸,梯度洗脱程序及检测波长见表1;进样量:20 μl;柱温:35℃。

表1 流动相梯度洗脱程序及检测波长

Tab 1 Gradient elution process of mobile phase and detection wavelength

时间, min	流速, ml/min	流动相, %			检测波长, nm
		甲醇	水	0.5%冰醋酸	
0	0.5	5	95	0	224
6	2	90	0	10	345
13	1	90	0	10	345
18	2	100	0	0	226
30	2	100	0	0	226

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品贮备液的制备 精密称取尿囊素0.5 g、维生素E 1.0 g,分别置于10 ml量瓶中,再精密称取维A酸0.1 g、异维A酸0.05 g,置于同一10 ml量瓶中,分别加入甲醇加热溶解并稀释至刻度,摇匀,即得尿囊素对照品贮备液、维生素E对照品贮备液、维A酸和异维A酸对照品混合贮备液。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密量取尿囊素对照品贮备液2 ml、维生素E对照品贮备液2 ml、维A酸和异维A酸对照品混合贮备液1 ml,置于50 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取样品5 g,加甲醇80 ml,置于索氏提取器中水浴加热回流4 h,提取液转移至100 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 称取不含维A酸、维生素E、尿

囊素的样品5 g,按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

分别取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液适量,在“2.1”项色谱条件下进样测定,色谱见图1。结果显示,尿囊素、异维A酸、维A酸、维生素E保留时间分别是5.38、15.43、17.25、27.79 min,分离度均>1.5,理论板数均不低于3 000。

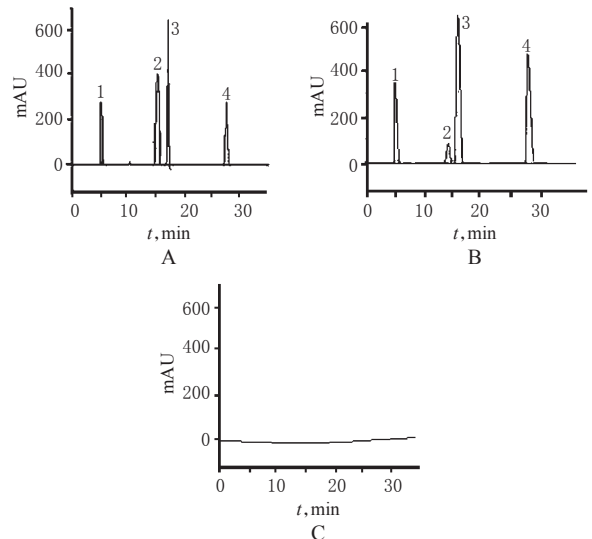


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 尿囊素; 2. 异维A酸; 3. 维A酸; 4. 维生素E

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; C. negative control; 1. allantoin; 2. isomerization A acid; 3. vitamin A acid; 4. vitamin E

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.2”项下对照品液50、25、12.5、6.25、3.125 ml,置于50 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得到系列浓度溶液。按“2.1”项下色谱条件分别吸取20 μl进样,记录色谱。以各成分峰面积(y)为纵坐标,检测质量浓度(x, μg/ml)为横坐标,进行线性回归,回归方程和线性范围详见表2。

表2 回归方程和线性范围

Tab 2 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg/ml
尿囊素	$y=93.798x-0.2697$	0.9998	125~2 000
维A酸	$y=1.2676x+1.1691$	0.9999	12.5~200
异维A酸	$y=1.2170x+0.5871$	0.9998	6.125~100
维生素E	$y=181.22x-1.4543$	0.9999	250~4 000

2.5 精密度试验

精密量取“2.2.2”项下对照品溶液20 μl,分别按“2.1”项下色谱条件于1 d内重复进样测定5次和连续测定5 d。结果,尿囊素、维A酸、异维A酸、维生素E的日内RSD分别为0.42%、0.59%、0.80%、0.43%,日间RSD分别为0.55%、0.81%、0.40%、0.37%,表明本方法日内、日间精密度均良好。

2.6 稳定性试验

取样品(批号:121201)5 g,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,25℃下放置,分别于0、24、48、72、96 h时进样测定。结果,尿囊素、维A酸、异维A酸、维生素E的RSD分别为0.26%、

0.59%、0.63%、0.52%，表明96 h内供试品溶液稳定性良好。

2.7 重复性试验

取样品(批号:121201)5 g,共6份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,尿囊素、维A酸、异维A酸、维生素E的RSD分别为0.32%、0.59%、0.69%、0.88%,表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知各成分含量的样品(批号:121201)6份,每份5 g,分别置于100 ml量瓶中,各精密加入“2.2.2”项下对照品溶液25 ml,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	所含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收 率,%	平均加样回 收率,%	RSD, %
尿囊素	501.00	500.00	998.50	99.5	99.5	0.24
	502.00	500.00	999.50	99.5		
	500.00	500.00	995.60	99.1		
	498.00	500.00	997.20	99.8		
	497.00	500.00	994.80	99.6		
	500.00	500.00	996.30	99.3		
维A酸	50.25	50.00	98.65	96.8	97.6	0.97
	49.93	50.00	98.36	96.9		
	49.95	50.00	99.63	99.4		
	50.12	50.00	98.83	97.4		
	50.08	50.00	98.89	97.6		
	49.87	50.00	98.56	97.4		
异维A酸	0.009 81	25.00	24.96	99.8	99.8	0.18
	0.009 95	25.00	24.95	99.7		
	0.009 78	25.00	24.92	99.6		
	0.009 98	25.00	24.99	99.9		
	0.009 99	25.00	24.96	99.8		
	0.009 93	25.00	24.85	99.4		
维生素E	1 001.00	1 000.00	1 989.00	98.0	99.0	0.72
	1 008.00	1 000.00	1 991.00	98.3		
	998.50	1 000.00	1 995.00	99.7		
	999.20	1 000.00	1 995.00	99.6		
	1 002.00	1 000.00	1 996.00	99.4		
	1 005.00	1 000.00	1 992.00	98.7		

2.9 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,按外标法以峰面积计算各成分含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果(mg/g,n=3)

Tab 4 Content determination of samples(mg/g,n=3)

批号	尿囊素	维A酸	异维A酸	维生素E
121201-1	9.85	0.981	0.009 81	19.7
121201-2	9.95	0.993	0.009 89	19.8
121201-3	9.98	0.985	0.009 96	19.7

3 讨论

笔者采用RP-HPLC法,不仅同时测定了复方维A酸乳膏中维A酸、尿囊素和维生素E三组分的含量,还测定了降解产物异维A酸的含量。由于维生素E和维A酸为脂溶性成分,尿囊素为水溶性成分,维A酸与异维A酸又互为异构体,因此笔者采用梯度洗脱方式在0~6 min,采用5%甲醇水溶液洗脱尿囊素;在>6~18 min,采用甲醇-0.5%冰醋酸进行洗脱,减慢流速为1 ml/min,使维A酸与异维A酸达基线分离,>18~30 min,采用100%纯甲醇洗脱维生素E。

为缩短保留时间,笔者曾在流动相中加入异丙醇和四氢呋喃,但发现保留时间无显著改变,且加入四氢呋喃后异维A酸与维A酸分离度反而降低,故均未采用。笔者又尝试提高柱温,通过对25、30、35、40℃不同柱温的研究发现,随着柱温的升高,样品的保留时间逐渐缩短,当柱温达到40℃时维A酸与异维A酸分离度降低,因此选用35℃柱温。

在本试验中,笔者分别对150 mm和250 mm的色谱柱进行了比较。结果表明,150 mm色谱柱保留时间较250 mm略有缩短,但是异维A酸与维A酸的分离度在选用250 mm色谱柱时显著优于150 mm(150 mm异维A酸与维A酸的分离度小于1.5),故选用250 mm的C₁₈色谱柱,进样时间30 min。

综上所述,本法操作简便、快速、准确,适用于同时测定复方维A酸乳膏中尿囊素、维A酸、异维A酸和维生素E的含量。

参考文献

- [1] 杨彤.美容药理学[M].北京:人民卫生出版社,2002:69.
- [2] 杨帆.自制复方呋炉洗剂与维甲酸霜联合治疗寻常痤疮47例[J].皮肤病与性病,2002,24(2):34.
- [3] 解小宛,郭秀珍.同时口服和外用维甲酸类药物治疗顽固性扁平疣44例[J].皮肤病与性病,2001,23(3):22.
- [4] 靳培英.维A酸在皮肤病治疗中应用的进展[J].中华皮肤科杂志,2000,33(6):448.
- [5] 孙小燕.维生素E的药理研究和临床新用[J].中国中医药现代远程教育,2010,8(9):230.
- [6] 陆干明,陆文莉.不同基质不同包装方式维生素E芦荟霜的保湿性对比分析[J].中国现代药物应用,2010,4(21):13.
- [7] 顾文珍,秦万章.尿囊素的作用及其临床应用[J].新药与临床,1990,9(4):232.
- [8] 尚爱民,徐文阁.复方维A酸霜联合维生素C、维生素E治疗黄褐斑[J].中华皮肤科杂志,2003,36(12):727.
- [9] 王红丽,吴铁,吴志华,等.丹参酮和维生素E抗皮肤衰老作用的比较研究[J].中国老年学杂志,2003,12(23):861.
- [10] 黎娟,黄志雄,李清华,等.中药外洗联合地奈德乳膏及维E尿囊素乳膏治疗婴儿湿疹的疗效观察[J].中国临床新医学,2013,6(2):122.

(收稿日期:2013-10-24 修回日期:2013-11-26)