

图3 复方雷琐辛擦剂(I)一次按 MLD 剂量涂抹大鼠破损皮肤后的肾组织病理切片

图4 复方雷琐辛擦剂(I)一次按 MLD 剂量涂抹大鼠破损皮肤后的肝组织病理切片

3 讨论

3.1 本试验结果表明,复方雷琐辛擦剂(I)在剂量 $2\ 000\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (该剂量相当于临床剂量的800倍)给大鼠一次涂搽皮肤后完好皮肤可出现红斑、轻微水肿等轻度刺激反应,3~5d内可恢复正常;而这个剂量对破损皮的刺激反应稍强,皮肤划伤处有红斑、水肿等刺激反应出现,皮肤再次长毛时间较空白试验组平均晚1~2d,在5~7d内均可恢复正常。以上剂量虽对破损的皮肤刺激反应稍强,但评分仍在轻度刺激反应范围,均可在5~7d内恢复;此剂量无论给完整或破损皮肤大鼠一次涂搽,均未对其体重、眼、粘膜、呼吸、中枢神经系统、四肢活动等产生明显影响和全身中毒反应,外周血常规和血清生化也未见明显改变;心、脑、肝、肾等重要脏器裸眼和病理切片均未见明显病理改变。

3.2 复方雷琐辛擦剂(I)由雷琐辛,硼酸,液化酚,丙酮等多种成分配制而成的复方外用擦剂,为具有良好的杀灭真菌的效果,常用于真菌引起的手,足癣,体癣,花斑癣等多种皮肤

病。其处方中主药成分为雷琐辛,浓度为5% (g/v),为便于本试验设计试验剂量均以雷琐辛的量作计算和设计。由于动物体表面积不便直接测定,按文献对体表面积与体重进行近似换算体表面积: $A = R \cdot W^{2/3}$,其中,A为动物体表面积(m^2),W为体重(kg),R是动物的体型系数,参考文献^[1](大鼠)本实验取0.09,从而获得相对准确的动物试验剂量。为便于文字表达,本文试验剂量均以公斤体重剂量表示。

3.3 在 LD_{50} 及 MTD 的试验中高剂量组的唯一一只死亡动物,经裸眼仔细观察发现扎线处凹陷近0.5 mm的扎痕,该试验动物死亡可能是由于包扎纱布和油纸过紧所致。

3.4 本次试验考察复方雷琐辛擦剂(I)的急性毒性,以保证药物的临床使用安全性。试验过程中连续7d观察了受试动物的皮肤刺激反应,均无异常变化。随后检查了外周血常规,血清生化并分析了动物病理切片,各项结果都均在正常范围之内。试验表明,复方雷琐辛擦剂(I)大鼠皮肤一次性涂剂量不大于 $\text{MLD}40\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (即 $2\ 000\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 不会产生明显毒副反应。

参 考 文 献

- 徐叔云,下如谦,陈修. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社, 2002. 28-230, 202
- 张均田. 现代药理实验方法学(下册)[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 1814-1820

(2007-07-23 收稿 2007-12-10 修回)

HPLC 法测定复合维生素注射液(13种)中4种脂溶性维生素的含量

曾俊芬 宋金春 (武汉大学人民医院药学部 武汉 430060) 李韵秋 (武汉大学药学院)

摘要 目的:建立 HPLC 法同时测定复合维生素注射液(13种)中4种脂溶性维生素的方法。方法:采用固相萃取法,分离4种脂溶性维生素,色谱柱 Inertsil ODS2 C_{18} 柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm),流动相:乙腈-甲醇-二氯甲烷(80:10:10),检测波长:265 nm,流速:1.0 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。结果:维生素 D_3 、维生素 E、维生素 K_1 及维生素 A 的线性范围分别为:0.82 ~ 1.2 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (0.999 6), 1.65 ~ 2.48 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (0.999 8), 240 ~ 360 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($r = 0.999\ 7$) 及 0.16 ~ 0.24 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($r = 0.999\ 5$), 平均回收率为 100.7% ($RSD\ 1.2\%$), 101.5% ($RSD\ 1.9\%$), 100.7% ($RSD\ 1.1\%$) 及 99.3% ($RSD\ 0.9\%$) ($n = 9$)。结论:方法简单、快速、重复性好,可用于该剂的质量控制。

关键词 HPLC; 脂溶性维生素; 固相萃取

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2008)04-0417-03

Determination the Contents of Four Fat-soluble Vitamins in Multi-vitamins Injection by HPLC

Zeng Junfen, Song Jinchun (Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China); Li Yunqiu (College of Pharmacy, Wuhan University)

ABSTRACT Objective: To establish a HPLC method for simultaneous determination of four fat-soluble vitamins in multi-vitamins injection. **Method:** A technique of solid-phase extraction was applied for isolation the fat-soluble vitamins, the Inertsil ODS2 C_{18} column(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was acetonitrile-methanol-dichloromethane((80:10:10). The flow rate was 1.0 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ the detection wavelength was 265 nm and the column temperature was 30 $^{\circ}\text{C}$. **Result:** The linear ranges of vitamin D_3 , Vitamin E, Vitamin K_1 , and Vitamin A were at 0.82 - 1.2 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (0.999 6), 1.65 - 2.48 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (0.999 8), 240 ~ 360 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($r = 0.999\ 7$) and 0.16 - 0.24 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($r = 0.999\ 5$) respectively, the average recoveries ($n = 9$) were 100.7% (RSD

1.2%), 101.5% (RSD 1.9%), 100.7% (RSD 1.1%) and 99.3% (RSD 0.9%) respectively. **Conclusion:** The method is simple, rapid and reproducible, it can be used for quality control of this preparation.

KEY WORDS HPLC; Fat-soluble vitamins; Content determination

维生素是维护人体健康、促进生长发育和调节生理机能所必需的一类有机化合物。通常按溶解性把维生素分为脂溶性和水溶性2大类。脂溶性维生素主要包括维生素A、D、E、K,维生素A主要生理功能是维持正常视觉,维持上皮组织的完整等;维生素D主要生理功能为调节钙、磷的吸收和代谢;维生素E是体内最有效的抗氧化剂;维生素K是动物体内形成凝血酶原必需维生素^[1]。

注射用13种复合维生素来自美国mayne公司的M. V. I. ADULT™产品,分为瓶I和瓶II,每瓶5 ml。瓶I由10种维生素组成,其中6种为水溶性维生素,4种为脂溶性维生素,分别是维生素A棕榈酸酯1 mg (1 mg = 3 300IU),维生素D₃ 5 μg,维生素E醋酸酯10 mg,维生素K1150 μg。

脂溶性维生素的测定,现多采用高效液相色谱法,一般采用二极管阵列检测器(DAD),荧光检测器(FLD),电化学检测器(ED),蒸发光散射检测器(ELSD)^[2-4]。本文通过试验,建立了以DAD为检测器的反相高效液相色谱法,可同时测定复合维生素注射剂中4种脂溶性维生素。样品经固相萃取后进样,固定波长检测。该方法简单、快速、灵敏度高、重复性好,能满足多类药物分析要求,结果满意。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪 Agilent1100(二极管阵列检测器)及其化学工作站。

1.2 试剂

乙腈、甲醇、二氯甲烷均为色谱纯,维生素A棕榈酸酯(1.740.000IU/g)对照品购自浙江新和成股份有限公司、维生素K₁(10156-0003)对照品由中国药品生物制品检定所提供,维生素D₃对照品(100.3%)、维生素E醋酸酯对照品(98.8%)购自sigma公司,三批13种复合维生素注射液样品(20041001、20041002、20041003)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Inertsil ODS2 C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-甲醇-二氯甲烷(80:10:10)等度洗脱,检测波长:265 nm,流速:1.0 ml·min⁻¹,柱温:30 ℃。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 避光操作条件下,精密称取维生素D₃对照品约10 mg于100 ml量瓶中加入流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取1 ml置于10 ml量瓶中,备用;精密称取维生素K₁30.0 mg置10 ml量瓶中,用流动相溶解,并稀释至刻度,摇匀,备用;另精密称取维生素A棕榈酸酯38 mg(维生素A棕榈酸酯1740000IU/g,取38 mg约为66 000IU相当于处方中的维生素A 20 mg)、维生素E 200 mg各置于

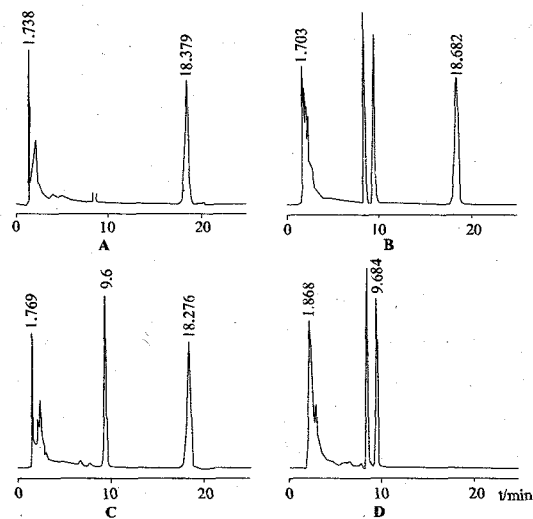
10 ml量瓶中,用流动相溶解,并稀释至刻度,摇匀,将维生素D₃、维生素K₁、维生素A、维生素E贮备液各取1 ml置10 ml量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即制得浓度分别为维生素D₃ 1 μg·ml⁻¹,维生素A 0.2 mg·ml⁻¹,维生素E 2 mg·ml⁻¹维生素K₁ 0.03 mg·ml⁻¹的混合对照品。

2.2.2 供试品的制备 在避光操作条件下精密量取本品瓶I 5.0 ml,置于10 ml量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,精密量取稀释液2.0 ml,上C₁₈SPE小柱(预先用20%乙醇10 ml淋洗),减压缓慢滴下,再用20%乙醇约25 ml减压缓慢淋洗。用丙酮3 ml缓慢洗脱,收集洗脱液,用氮气流吹干,残渣用流动相1.0 ml溶解,即得。

2.2.3 阴性样品的制备 在避光操作条件下按13种复合维生素的处方,照“2.2.2”项下方法制备,不含维生素D₃、维生素K₁、维生素A与维生素E的阴性样品。

2.3 专属性试验

分别取维生素D₃、维生素K₁、维生素A与维生素E对照品,不含维生素D₃阴性样品,不含维生素K₁阴性样品,不含维生素A阴性样品、维生素E阴性样品,按含量测定项下配制对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液,依法测定,结果对照品溶液、供试品溶液在相应的保留时间处有吸收峰,各阴性样品溶液分别在各自相应保留时间处无吸收峰(见图1),表明各阴性样品不干扰测定。



A. 不含维生素K₁阴性样品图 B. 不含Vit D₃阴性样品图
C. 不含维生素E阴性样品图 D. 不含维生素A阴性样品图

图1 阴性样品HPLC色谱图

2.4 线性关系试验

用移液管精密量取“2.2.1”中各贮备液0.80, 0.90, 1.00, 1.10, 1.20 ml分别置5个10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀。取上述五种溶液各10 μl,分别按含量测定方法,注入液相色谱仪测定,记录色谱图,以浓度为横坐标,峰

面积为纵坐标,经线性回归,得维生素 D₃ 回归方程: $Y = 2.06 \times 10^4 X + 3.55$; $r = 0.9996$, 维生素 D₃ 浓度在 $0.82 \sim 1.22 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内,线性关系良好。维生素 E 回归方程: $Y = 584X + 52.0$; $r = 0.9998$, 维生素 E 浓度在 $1.65 \sim 2.48 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内,线性关系良好。维生素 K₁ 回归方程: $Y = 1.92 \times 10^4 X + 0.4$; $r = 0.9997$, 维生素 K₁ 浓度在 $240 \sim 360 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内,线性关系良好。维生素 A 回归方程: $Y = 5946X - 74.9$, $r = 0.9995$, 维生素 A 浓度在 $0.16 \sim 0.24 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内,线性关系良好。

2.5 精密度试验

取对照品溶液, $10 \mu\text{l}$ 在高效液相色谱仪上连续进样 6 次,测定峰面积, RSD 分别为: 维生素 D₃ 1.9%, 维生素 E 0.3%, 维生素 K₁ 0.5%, 维生素 A 0.4% ($n = 6$)。

2.6 回收率试验

取批号为 041001 的已知含量 13 种复合维生素注射液 2.5 ml 3 份,各置于 3 个 5 ml 量瓶中,加入含量约为处方量 80%、100%、120% 的各种维生素对照品,约为对照品贮备液各 2.0、2.5、3.0 ml 分别置于 3 个量瓶中,用流动相稀释至刻度。按“2.2.2”项下方法制备供试液取 $10 \mu\text{l}$ 注入液相色谱仪,测定峰面积,以外标法(峰面积)计算回收率及 RSD。维生素 D₃、维生素 E、维生素 K₁ 及维生素 A 回收率分别为 100.7%、101.5%、100.7 及 99.3%, RSD 为 1.2%、1.9%、1.1% 及 0.9% ($n = 9$)。

2.7 样品稳定性

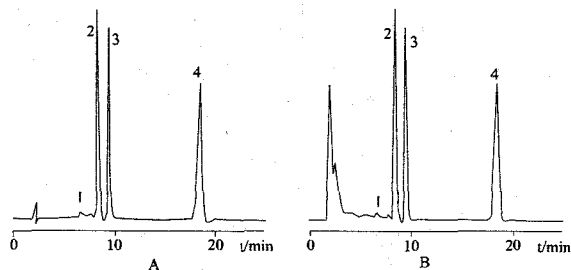
取供试品溶液,在低温,闭光情况下放置 2, 4, 6 h 后分别进行测定,结果 6 h 内各维生素峰面积 RSD < 2%, 表明样品在 6 h 内测定稳定。

2.8 样品含量测定

取供试品溶液各 $10 \mu\text{l}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法(以峰面积)计算含量。测定结果见表 1 及图 2。

表 1 样品含量测定结果 ($n = 3$)

批号	维生素 D ₃ ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	维生素 E ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	维生素 K ₁ ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	维生素 A ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)
041001	1.00	1.97	0.03	0.20
041002	1.01	1.96	0.03	0.20
041003	0.98	1.97	0.03	0.19



A. 对照品 B. 供试品 1. 维生素 D₃
2. 维生素 E 3. 维生素 K₁ 4. 维生素 A

图 2 HPLC 色谱图

3 讨论

3.1 选定流动相为乙腈-甲醇-二氯甲烷后,不断调节其比例直至乙腈-甲醇-二氯甲烷为(80:10:10)时,维生素 K₁ 与维生素 E 完全分离,此时维生素 E 峰塔板数不低于 8000,各维生素峰分离度均符合要求,各峰纯度因子均大于 980。

3.2 13 种复合维生素注射液中维生素 D₃ 与其它脂溶性维生素组分相比含量较低,维生素 D₃ 在 265 nm 波长处有最大吸收,其它组分在此波长下也都有一定的吸收,故选择脂溶性维生素检测波长为 265 nm。在实验中我们一般会设定参比波长 360 nm 来降低基线噪声,由于维生素 A 的最大吸收波长在 325 nm 处,在检测波长 265 nm 参比波长 360 nm 时,维生素 A 吸收峰为倒峰,因此本实验中关闭参比波长。

3.3 固相萃取技术已被广泛的应用于维生素的提取^[5-7], 本试验中采用此技术将脂溶性维生素与水溶性维生素分离,脂溶性维生素吸附在 C₁₈ 固相填料中,水溶性维生素流出。在进行固相萃取时对萃取出的样品进行了考察,取稀释后样品上 SPE 小柱,稀释样品自然滴落。为了确保脂溶性维生素充分吸附在固相萃取填料中,我们分别收集了 3 份样品,第一份样品萃取 1 次,第二份样品萃取 2 次,第三份样品萃取 3 次。将每份样品处理后进样 $10 \mu\text{l}$,记录色谱图结果发现第 2 和第 3 份样品维生素 D₃ 峰面积无显著性差异,第 1 份样品维生素 D₃ 峰面积明显低于后 2 份。而在洗脱时也应严格控制洗脱速度,通过试验发现流速大于 $1.0 \text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,维生素 D₃ 峰面积较小,流速小于 $1.0 \text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,维生素 D₃ 峰与其他杂峰的分度不理想。因此在对样品进行萃取时,应将样品在 SPE 小柱上处理 2 次,在进行洗脱时,应将洗脱速度控制在 $1.0 \text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

参 考 文 献

- 1 蔡东联,耿珊珊,脂溶性维生素的安全性[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28 (1): 68-71
- 2 Lubor U, Dagmar S, Bohuslav M, et al. Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 573-574(28): 267 - 272
- 3 Dagmar P, Hans UM. Determination of α -tocopherolquinone in human serum samples by liquid chromatography with fluorescence detection and on-line post-column derivatization[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1056 (1-2): 257-262
- 4 Claude L, Marargaret A, Genevieve G, et al. Quantitative analysis of vitamin E, cholesterol and phospholipid fatty acids in a single aliquot of human platelets and cultured endothelial cells[J]. *J Chromatogr B*, 1997, 696 (1): 33-42
- 5 Pavlos FC, Victoria FS, Ioannis NP. Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 805 (2): 289-296
- 6 Hiroshi I. Simultaneous sample preparation for high-performance liquid chromatographic determination of Vitamin A and β -carotene in emulsified nutritional supplements after solid-phase extraction[J]. *Chimi Acta*, 2002, 463(1): 21-29
- 7 Hiroshi I. Determination of vitamin D₂ in emulsified nutritional supplements by solid-phase extraction and column-switching high-performance liquid chromatography with UV detection[J]. *J Chromatogr A*, 2000, 88 (1-2): 189-196

(2007-01-30 收稿 2007-10-08 修回)