

# 高效液相色谱法测定复方鱼肝油氧化锌软膏中维生素 A 含量研究

杨德昌\*

(迪庆藏族自治州检验检测院, 香格里拉 674499)

**摘要:**目的 选择高效液相色谱法测定复方鱼肝油氧化锌软膏中维生素 A 的含量。方法 采用高效液相色谱法, 选用岛津 shim-pack 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 正己烷-异丙醇 (997:3) 为流动相, 柱温设置为 30℃, 检测波长设置为 325 nm。样品中维生素 A 的提取溶剂选用正己烷。结果 最终测定结果显示, 维生素 A 测定浓度在 1.45~28.90 IU/mL 范围内时和色谱峰面积有较好的线性关系。加标回收率为 96.12%, 精密性、稳定性及重复性均满足要求, 相对标准偏差 (RSD) 均小于 3.0%。本次研究选择 2 批不同批次样品开展维生素 A 的含量测定, 结果分别为 760.34 IU/g、747.67 IU/g。结论 采用高效液相色谱法测定复方鱼肝油氧化锌软膏中维生素 A 的含量, 方法简单, 操作简便, 结果准确, 且具有良好的重复性、稳定性, 具有应用价值。

**关键词:** 高效液相色谱法; 维生素 A; 方法学验证; 含量测定

## 0 引言

复方鱼肝油氧化锌软膏是一种复方脂溶性软膏, 可用于急慢性皮炎、湿疹、冻疮、轻度烧烫伤等的治疗。该药品每克含有 200 mg 氧化锌、80 mg 鱼肝油、1 mg 吡喃西林。其中鱼肝油作为关键组分, 其主要成分包括维生素 A 和维生素 D, 是加速创伤愈合的重要物质。复方鱼肝油氧化锌软膏的执行标准是化学药品地方标准上升国家标准第六册 WS-10001-(HD-0549)-2002。为切实保证复方鱼肝油氧化锌软膏的使用效果, 同时精确掌握维生素 A 的含量, 需要选择科学合理的方法来精准测定。参考现行标准中各类药品中维生素 A 的检测方法, 紫外分光光度法、高效液相色谱法是业内比较常用的测定方法: 紫外分光光度法存在一定的局限性, 如测定精度欠佳, 误差相对较大等<sup>[1]</sup>; 高效液相色谱法在检验行业应用广泛。相对于紫外分光光度法、超高效液相色谱-质谱联用法、二维色谱法, 高效液相色谱法设备简便、操作流程简单, 而且具有成分能力强、检测结果精准, 误差小、效率高等优点<sup>[2]</sup>。基于此, 本次研究决定采用高效液相色谱法测定鱼肝油氧化锌软膏中维生素 A 的含量, 并对测定方法进行方法学验证。旨在为今后药品成分测定提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: 选用 LC20AD 型岛津液相高效色谱仪, 配备高灵敏度 PDA 检测器, 此检测器能够在特定波长范围内精准检测样品中成分的吸收信号, 为定性和定量分析提供可靠数据支持。电子天平: 选用梅特勒-托利多 XS205DU 型电子天平。超声波清洗器: 选用昆山超声 KQ-500DU 型超声波清洗器, 深圳市朗杰超声电器有限公司生产。离心机: 选用 KH20R-II 型离心机, 最大转速可达 18600 r/min。

维生素 A 醋酸酯对照品: 批号为 100368-202004, 中检院生产, 该对照品每克含 349 mg (101 万 IU) 维生素 A 醋酸酯, 其中含 97.9% 反式维生素 A 醋酸酯。有机溶剂: 正己烷和异丙醇均为色谱纯, 默克公司生产。

### 1.2 分析结果定量

本次复方鱼肝油氧化锌软膏中维生素 A 含量的测定, 为保证测定结果准确, 具有参考价值, 还需应用外标法定量。将维生素 A 标准系列溶液注入高效液相色谱仪, 测定其峰面积, 以峰面积为纵坐标, 标准系列溶液的浓度为横坐标, 绘制标准曲线并计算线性回归方程<sup>[3]</sup>。根据峰面积, 以外标法计算浓度, 计算公式为:

$$X = \rho \times V \times f / m。$$

\* 通信作者: 杨德昌, 主管药师, 研究方向为药品检验检测。E-mail: 3378063433@qq.com

式中,  $X$  为试样包含维生素 A 的含量, IU/g;  $\rho$  为按标准曲线计算的样品溶液中维生素 A 的浓度, IU/mL;  $V$  为定容体积, mL;  $f$  为换算因子, 维生素 A 的  $f=1$ ;  $m$  为样品称样量, g。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 色谱条件

本次研究选择高效液相色谱法测定复方鱼肝油氧化锌软膏中维生素 A 的含量。色谱柱为岛津 shim-pack 柱 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m), 设定色谱条件: 流动相为正己烷-异丙醇(体积比为 997:3); 流速 1.0 mL/min, 检测波长 325 nm, 柱温 30°C, 进样量 10  $\mu$ L。

#### 1.3.2 溶液制备

(1) 系统适用性溶液: 称取 150.02 mg 维生素 A 醋酸酯对照品至烧杯中, 加入碘试液 0.1 mL, 混匀, 放置约 10 min, 定量转移至 100 mL 容量瓶中, 用正己烷稀释至刻度, 量取 1 mL 至 100 mL 容量瓶中, 用正己烷定容至刻度, 摇匀即得系统适用性溶液。

(2) 对照品溶液: 称取 5.03 mg 维生素 A 醋酸酯对照品至 50 mL 容量瓶中, 加入适量正己烷将其溶解, 摇匀后用正己烷定容至刻度, 再量取 4 mL 至 50 mL 容量瓶中, 用正己烷定容至刻度, 摇匀即得(每 1 mL 约含 8 IU 维生素 A)。

(3) 供试品溶液: 称取 1.0 g 复方鱼肝油氧化锌软膏样品至 250 mL 锥形瓶中, 量取 100 mL 正己烷加入其中, 称定后在 80°C 热水中水浴 15 min, 冷却至室温, 用正己烷补足减失重量, 量取 50 mL 溶液至离心管, 高速离心 5 min 后取上清液, 经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液<sup>[4]</sup>。

(4) 阴性对照溶液: 按复方鱼肝油氧化锌软膏处方及工艺, 制备缺鱼肝油的阴性对照样品, 再按照 1.3.2(3) 方法制备阴性对照溶液。

## 2 结果与分析

### 2.1 方法学验证

#### 2.1.1 系统适应性及专属性实验

分别取制备的溶液 10  $\mu$ L, 按表 1 色谱条件注入至高效液相色谱仪中, 并进行测定。测定结果对照品溶液中维生素 A 的保留时间为 4.412 min, 供试品溶液在 4.323 min 位置上出现对应色谱峰, 两峰理论塔板数均不低于 6000, 经对比, 两峰 UV 光谱图一致。系统适用性溶液色谱图中维生素 A 峰和其顺式异构体峰的分度超过 3.0, 阴性对照溶液中未出现维生素 A 峰。专属性实验测定数值见表 1, 参考表 1、表 2 中数据并分析, 该方法系统适用性及专属性良好。

表 1 专属性实验测定数值

溶液	时间 /min	维生素 A 含量 / (mAU)
适用性溶液	0	0
	2	0
	4	15.2
	6	0
	8	0
供试品溶液	0	0
	2	0
	4	7.5
	6	0
	8	0
对照品溶液	0	0
	2	0
	4	8.1
	6	0
	8	0

#### 2.1.2 标准曲线绘制及线性关系考察

精密称取 14.31 mg 维生素 A 醋酸酯对照品至 500 mL 的容量瓶中, 加入适量正己烷将其溶解, 摇匀后用正己烷定容至刻度, 得到维生素 A 含量为 28.90 IU/mL 的贮备液。精密吸取贮备液 50、25、15、5 mL 至 100 mL 容量瓶中, 分别用正己烷定容至刻度, 得到维生素 A 的浓度为 28.90、14.45、7.23、4.34、1.45 IU/mL 的标准系列溶液, 并测定。其中设置标准曲线的横纵坐标依次是维生素 A 浓度 (IU/mL)、色谱峰面积, 最后对其进行线性拟合, 得到线性拟合方程  $y=363483.62x-1846.11$ , 相关系数  $r=0.9997$ 。结果表明, 采用高效液相色谱法测定维生素 A 含量, 维生素 A 浓度在 1.45~28.90 IU/mL 范围内时, 有良好的线性关系。

#### 2.1.3 重复性实验

精密称取同一批复方鱼肝油氧化锌软膏样品 6 份, 按 1.3.2 方法制成平行供试品溶液。精密吸取对照品溶液和平行供试品溶液各 10  $\mu$ L 注入液相色谱仪, 按表 1 色谱条件测定, 记录维生素 A 峰面积。计算得含量分别为 740.29、753.69、754.58、751.05、740.57、745.85 IU/g, 相对标准偏差 (RSD) 值为 0.85% ( $n=6$ ), 重复性良好。

#### 2.1.4 精密度实验

吸取 2.2.2 项下对照品溶液 10  $\mu$ L 注入高效液相色谱仪。连续进样 6 次, 按表 1 色谱条件测定, 记录维生素 A 峰面积, 计算峰面积 RSD 值得 0.11% ( $n=6$ ), 精密度良好。

#### 2.1.5 稳定性实验

称取一批复方鱼肝油氧化锌软膏样品, 按 1.3.2 方法制成供试品溶液, 放置在室温条件下, 并在 0、2、4、8 h 时间段, 根据表 1 色谱条件进样测定。记录维生素 A 峰面积, 并计算峰面积 RSD 值为 1.14% ( $n=4$ ), 供试品溶液

8 h 内稳定性良好。

### 2.1.6 加标回收实验

称取一批已知维生素 A 含量的复方鱼肝油氧化锌软膏样品 6 份，按上述方法制成平行供试品溶液。分别取 25 mL 平行供试品溶液至 50 mL 容量瓶中，分别参加不同量的 3.1.2 项下对照品贮备液（加入量为样品中所含维生素 A 的约 0.8、1.0、1.2 倍），再用正己烷定容至刻度，摇匀即得加标样品溶液。量取剩余未加标供试品溶液 25 mL 至 50 mL 容量瓶中，用正己烷定容至刻度，摇匀即得未加标供试品溶液。分别吸取未加标供试品溶液和加标供试品溶液 10  $\mu$ L 注入高效液相色谱仪，按表 1 色谱条件测定，并按测定结果计算回收率，结果见表 2。

表 2 加标回收实验结果及回收率( $n=6$ )

样品含量 / (IU/mL)	加入量 / (IU/mL)	测得量 / (IU/mL)	回收率 / %	$x/\%$	RSD/%
3.71	3.00	6.35	94.67		
3.83	3.00	6.65	97.36		
3.79	3.76	7.34	97.17	96.12	2.43
3.80	3.76	7.29	96.39		
3.89	4.51	7.75	92.26		
3.76	4.51	8.18	98.91		

### 2.2 复方鱼肝油氧化锌软膏中维生素 A 含量的测定

取 2 批不同批次复方鱼肝油氧化锌软膏样品以同样的方法进行测定，测得 2 批样品中维生素 A 的含量分别为 760.34 IU/g、747.67 IU/g；RSD 分别为 1.07%、0.85%。

## 3 讨论与结论

维生素 A 是一种脂溶性维生素，作为复方鱼肝油氧化锌软膏中的重要成分，它能调节人体生理机能，起到促进生长、维持上皮组织正常功能等多方面的作用<sup>[5]</sup>。不过，即便维生素 A 为人体必需，摄入量必须严格控制，过量摄入可能引发副作用，甚至损害脑组织。因此，精准控制复方鱼肝油氧化锌软膏中的维生素 A 含量至关重要。复方鱼肝油氧化锌软膏的执行标准发布时间较早，仅对氧化锌含量做出控制，缺少其他成分的定量内容。药品质量标准是确保药品安全、有效、稳定的基石，缺少主要成分的定量内容就难以判断药品是否符合预期的质量要求<sup>[6]</sup>。及时更新药品质量标准，使其与时俱进是医药行业发展完善的必然趋势。

维生素 A 不溶于水、甘油，能溶于醇、醚、烃和卤代烃等大多数有机溶剂。本次研究选用正己烷提取复方鱼肝油氧化锌软膏中维生素 A，提取方法采用直接提取法，通过实验摸索提取条件，发现在 80℃ 热水中水浴 15 min 可以最大化提取样品中的维生素 A，随后通过高速离心去除杂质取上清液即可。与皂化法相比，本法方便快捷，能够在保证

结果准确的前提下极大节省实验时间，提升检验效率<sup>[7]</sup>。

维生素 A 在光或空气环境中极易被破坏，耐光性和耐氧化性较差，若保存不当或长时间放置，样品和对照品溶液可能变质，所以需要选择操作便捷、结果准确、灵敏性强的方法进行测定<sup>[8-9]</sup>。本次研究选用高效液相色谱法，参考《中华人民共和国药典(2020 年版)》四部通则 0721 第二法设置色谱条件。结果分析表明，高效液相色谱法测定复方鱼肝油氧化锌软膏中维生素 A 的含量，其系统适用性及专属性好，线性关系优异，精密度、稳定性、重复性均表现出色，满足测定要求，与周璟明<sup>[10]</sup>等研究基本保持一致。

综上所述，最终确定高效液相色谱法测定复方鱼肝油氧化锌软膏中维生素 A 的含量具有可行性，操作简便且结果精准，具有较高的应用价值。

## 参考文献

- [1] 权帆, 詹珍旋, 赵宁, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定干血斑中维生素 A 和维生素 E[J]. 化学分析计量, 2024, 33(12): 17-22.
- [2] 赵丽娟, 高贵桃, 陈鑫, 等. 高效液相色谱-荧光检测器法同时测定乳及乳制品中维生素 A 和维生素 E[J]. 食品与药品, 2024, 26(5): 411-415.
- [3] 戴雁羽, 刘柏林, 赵紫薇, 等. 高效液相色谱法测定鸡肉中维生素 A 含量的不确定度评定[J]. 海峡预防医学杂志, 2023, 29(6): 52-55.
- [4] 杨善岩, 黄凤琴, 刘丽云, 等. 高效液相色谱法测定维生素和矿物质复方制剂中维生素 K<sub>2</sub> 含量[J]. 中国药业, 2023, 32(23): 96-99.
- [5] 王璐, 蒲华寅, 邹力, 等. 高效液相色谱法同时测定植物油中 3 种维生素 A 和 9 种维生素 E[J]. 粮食与油脂, 2023, 36(9): 150-154+158.
- [6] 章欣, 李珊, 周湖武, 等. 超高效液相色谱法测定化妆品中 6 种维生素 A 类物质的含量[J]. 香料香精化妆品, 2023, (5): 143-150.
- [7] 周朗君. 高效液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中维生素 A 含量的不确定度评定[J]. 食品安全导刊, 2023, (23): 84-87.
- [8] 曹林, 冯秀燕, 姚婷, 等. 提取时间和温度对高效液相色谱法测定维生素预混合饲料中维生素 B<sub>2</sub> 含量的影响[J]. 饲料博览, 2023, (3): 31-34+38.
- [9] 赵超群, 张文萍, 陶瑞, 等. 全自动固相萃取-高效液相色谱法测定几种食品基质中维生素 A 和维生素 E[J]. 食品科技, 2023, 48(5): 259-264.
- [10] 周璟明, 许福春, 陈秀明, 等. 高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法测定维生素 D/AD 滴剂(软胶囊)中维生素 D<sub>3</sub> 的含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(5): 780-788.