

· 研究报告 ·

口腔溃疡膜有效成分提取方法的考察及含量测定

陈 顺¹, 崔莉莉^{1,2}, 高守红¹, 陆文铨¹, 宋江丽¹, 王志鹏¹ (1. 海军军医大学附属长征医院药学部, 上海 200003; 2. 宜春学院化学与生物工程学院, 江西 宜春 336000)

[摘要] 目的 考察不同溶剂对口腔溃疡膜中有效成分地塞米松磷酸钠和克霉唑的提取率, 优化有效成分含量测定方法。方法 采用不同提取溶剂(甲醇、水、70% 甲醇)对口腔溃疡膜中的有效成分进行提取, 用 HPLC 法进行含量测定, 得到最佳提取方法。结果 纯水对口腔溃疡膜中地塞米松磷酸钠和克霉唑有最好的提取效果。地塞米松磷酸钠在 0.482~16.328 $\mu\text{g/ml}$ 范围内呈良好的线性关系 ($r=0.999\ 9$), 平均回收率为 $(103.97\pm 1.02)\%$; 克霉唑在 5.014 5~200.580 0 $\mu\text{g/ml}$ 范围内呈良好的线性关系 ($r=0.999\ 8$), 平均回收率为 $(104.23\pm 0.63)\%$ 。结论 本研究建立的纯水提取方法操作简单, 提取效率高, 含量测定方法操作简便, 准确性、重复性好。

[关键词] 口腔溃疡膜; 地塞米松磷酸钠; 克霉唑; 含量测定; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2020)05-0466-03

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202003033

Investigation of the extraction method and content determination of the active components from oral ulcer film

CHEN Shun¹, CUI Lili^{1,2}, GAO Shouhong¹, LU Wenquan¹, SONG Jiangli¹, WANG Zhipeng¹ (1. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai 200003, China; 2. School of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Yichun 336000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the extraction methods for active components from oral ulcer film and optimize the determination methods of active components dexamethasone sodium phosphate and metronazole. **Methods** Different extraction solvents(methanol, water and 70% methanol aqueous) were applied to extract the active components dexamethasone sodium phosphate and metronazole from oral ulcer film, which contents were quantified by a HPLC method. **Results** the extraction solvent water had the best efficacy and more simpler compared to the other two solvents. Clotriazole showed a good linear relationship within 5.014 5-200.5800 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.999\ 8$), and the average extraction recovery was $(104.23\pm 0.63)\%$, and for dexamethasone sodium phosphate, a good linear relationship was obtained in the range of 0.482-16.328 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.999\ 9$), and the average extraction recovery was $(103.97\pm 1.02)\%$. **Conclusion** The water extraction method established in this study was simple and efficient, which showed features of simplicity, accuracy and repeatable.

[Key words] oral ulcer film; dexamethasone sodium phosphate; clotrimazole; content determination; HPLC

口腔溃疡膜是海军军医大学附属长征医院的特色院内制剂, 该制剂主要由克霉唑、硫酸新霉素、冰片、盐酸达克罗宁、地塞米松磷酸钠等成分组成, 呈微黄色至淡黄色半透明膜。临床用于治疗多发性口腔溃疡。溃疡是口腔疾病的常见表现, 口腔黏膜溃疡病因可分为 4 类: 感染性、免疫性、外伤性和肿瘤性^[1]。地塞米松磷酸钠属糖皮质激素, 经常用于加速溃疡愈合、减轻口腔溃疡的局部症状^[2];

克霉唑是一种常用于治疗真菌感染的抗真菌药物^[3]。口腔溃疡膜能保护局部溃疡面, 延长局部作用时间、提高药物浓度, 具有定位释放、使用方便等优点^[4]。本制剂室唐蕾等^[5]通过测定口腔溃疡膜中克霉唑和地塞米松磷酸钠的含量建立了一套操作简单、准确性好的 HPLC 含量测定方法, 适用于口腔溃疡膜的质量标准控制。但随着制剂标准的提高, 在《军队医疗机构制剂许可证》验收细则中明确规定: 配制制剂的原料药应符合法定药品标准, 辅料及直接接触制剂的包装材料应符合法定标准。因此, 一些原料药及辅料在更换药用标准后, 按照原先的样品前处理方法测得的含量一直偏低。本文

[作者简介] 陈 顺, 药师, Email: snowboy1208@126.com

[通讯作者] 王志鹏, 博士, 主管药师, 研究方向: 临床系统生物学、结直肠癌生物标志物的发现与应用, Email: wangzhipeng@smmu.edu.cn

以口腔溃疡膜中主要有效成分地塞米松磷酸钠和克霉唑的含量为指标,对口腔溃疡膜中有效成分的提取工艺进行研究,并进一步优化地塞米松磷酸钠和克霉唑的含量测定方法。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司):包含 G7104C(四元泵)输液泵, G7129C 自动进样器, G7116A 柱温箱, G7115A DAD 检测器;色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司); Sartorius 天平(型号: BSA124S-CW, 十万分之一天平, 赛多利斯科学仪器有限公司);超声仪(SK7200H 型, 上海科导超声仪器有限公司);Eppendorf 移液器(德国);WL-901 Vortex 旋涡振荡混和器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 试剂与药品

地塞米松磷酸钠对照品(批号: ZN1107XA)、克霉唑对照品(批号: H01S9Z68980), 购自上海源叶生物科技有限公司;甲醇(色谱纯, 德国 Fisher 公司);娃哈哈纯净水(纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司);磷酸二氢钾等其余试剂均为分析纯。口腔溃疡膜(批号: 190919、190923、190926, 每片含地塞米松磷酸钠 0.4 mg, 克霉唑 6.53 mg, 海军军医大学附属长征医院制剂中心自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(70 : 30, 用磷酸溶液调 pH 值 4.4~4.5);紫外检测波长: 230 nm;流速: 1.0 ml/min;柱温: 30 °C;采集时间: 30 min, 进样量: 20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液

精密称取地塞米松磷酸钠 16.328 mg 置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇-水(7 : 3)溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得浓度为 1.632 8 mg/ml 的地塞米松磷酸钠对照品储备液。精密称取克霉唑对照品 20.058 mg 置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇-水(7 : 3)溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得浓度为 2.005 8 mg/ml 的克霉唑对照品储备液。

2.2.2 混合对照品溶液

分别精密量取地塞米松磷酸钠、克霉唑对照品

储备液适量, 加甲醇-水(7 : 3)配制成含地塞米松磷酸钠 16.328 μg/ml 和克霉唑 200.58 μg/ml 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液

取口腔溃疡膜剪成 3~5 mm 大小的碎片, 精密称取样品 0.2 g, 置于 100 ml 容量瓶中, 加入 30 ml 水, 超声 30 min, 取出, 放冷, 加入甲醇并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.4 阴性对照品溶液

参照本课题组前期实验方法, 制备阴性对照品溶液^[5]。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验

分别取混合对照品溶液(地塞米松磷酸钠、克霉唑)和供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图, 结果见图 1。图中显示供试品溶液中地塞米松磷酸钠和克霉唑保留时间与对照品溶液相应色谱峰的保留时间一致。地塞米松磷酸钠和克霉唑与其相近的其他峰分离完全(分离度>1.5), 即本试验条件下地塞米松磷酸钠和克霉唑与其他组分分离完全。

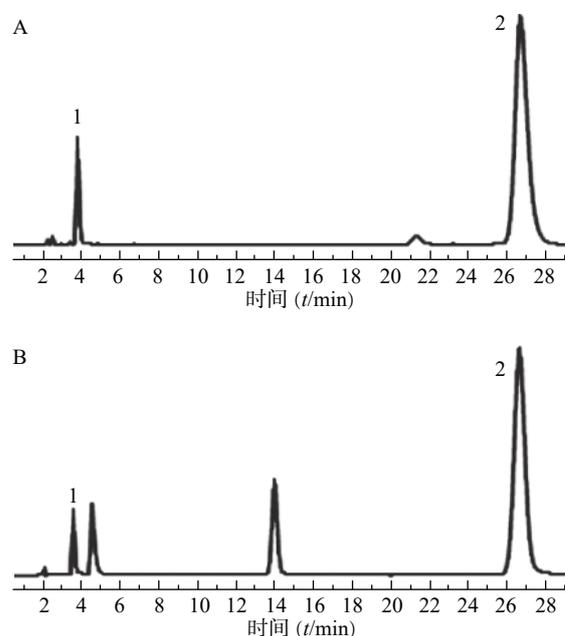


图 1 口腔溃疡膜的 HPLC 图

A. 混合对照品溶液; B. 供试品溶液; 1. 地塞米松磷酸钠; 2. 克霉唑

2.3.2 线性关系的考察

精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量, 稀释成以下浓度的混合对照品溶液: 地塞米松磷酸钠 0.482 0、0.816 4、1.632 8、4.082 0、8.164 0、16.328 0 μg/ml; 克霉唑 5.014 5、10.029 0、20.058

0、50.14 50、100.290 0、200.580 0 μg/ml,按“2.1”项下色谱条件进行测定,并记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标(Y),对照品质量浓度为横坐标(C),绘制标准曲线,并进行线性回归,结果见表1。

表1 地塞米松磷酸钠和克霉唑的线性关系考察

成分	回归方程	r	线性范围(μg/ml)
地塞米松磷酸钠	$Y=34.961C+27.986$	0.999 9	0.482 0~16.328 0
克霉唑	$Y=32.366C+24.092$	0.999 8	5.014 5~200.580 0

2.3.3 精密度试验

取同一批口腔溃疡膜(批号:190919),按“2.2.3”项方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件进行测定,连续进样6次,记录峰面积。计算地塞米松磷酸钠和克霉唑峰面积RSD分别为0.65%和0.33%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验

取同一批口腔溃疡膜(批号:190919),按“2.2.3”项方法平行制备6份供试品溶液,按“2.1”项色谱条件进行测定,记录峰面积。计算地塞米松磷酸钠和克霉唑峰面积RSD分别为0.56%和0.54%,表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验

取同一批口腔溃疡膜(批号:190919),按“2.2.3”项方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件,分别在0、2、4、6、12、24 h进样测定,记录峰面积。计算地塞米松磷酸钠和克霉唑峰面积RSD值分别为0.94%和1.33%,表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号:190919)0.2 g,共6份,置于100 ml容量瓶中,加入各对照品适量,按“2.2.3”项方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率。结果地塞米松磷酸钠和克霉唑的平均加样回收率分别为(103.97±1.02)%和(104.23±0.63)%,表明本法回收率良好。

2.3.7 样品含量测定

取3批口腔溃疡膜,按“2.2.3”项方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件进行测定,计算样品中地塞米松磷酸钠和克霉唑的含量,结果见表2。

表2 口腔溃疡膜中地塞米松磷酸钠和克霉唑的含量测定结果(n=3, $\bar{x} \pm s$)

批号	含量[标示量(%)]	
	地塞米松磷酸钠	克霉唑
190919	76.600 0±0.005 2	86.800 0±0.011 3
190923	85.900 0±0.011 5	99.100 0±0.025 9
190926	74.900 0±0.043 7	85.700 0 ±0.067 6

3 讨论

3.1 提取方法的优化

本研究根据口腔溃疡膜的特性,对溶剂种类、溶剂提取顺序进行考察,由于口腔溃疡膜中含羧甲基纤维素钠,这是由一种天然纤维素衍生的阴离子水溶性聚合物^[6],易溶于水,因此需要一定比例的水将膜剂破坏,才能释放出膜剂中的有效成分地塞米松磷酸钠和克霉唑。

3.1.1 甲醇超声提取

取口腔溃疡膜剪成3~5 mm大小的碎片,精密称取样品0.2 g,置于100 ml容量瓶中,加入甲醇35 ml,超声30 min,取出,放冷,加入15 ml水,混匀后用甲醇-水(7:3)定容,摇匀,即得。

3.1.2 水超声提取

取口腔溃疡膜剪成3~5 mm大小的碎片,精密称取样品0.2 g,置于100 ml容量瓶中,加入30 ml水,超声30 min,取出,放冷,加入甲醇并稀释至刻度,摇匀,即得。

3.1.3 以70%甲醇超声提取

取口腔溃疡膜剪成3~5 mm大小的碎片,精密称取样品0.2 g,置于100 ml容量瓶中,加入甲醇-水(7:3)30 ml,超声30 min,取出,放冷,加入甲醇-水(7:3)稀释至刻度,摇匀,即得。

用以上不同溶剂提取口腔溃疡膜,每份样品、每种溶剂平行提取3次,按“2.1”项所述色谱条件测定地塞米松磷酸钠和克霉唑含量,结果见表3。实验结果显示:水超声提取和70%甲醇超声提取对口腔溃疡膜中有效成分的提取效果相当,但水超声提取相对简单,故选用水超声提取30 min为最佳提取工艺。

3.2 流动相pH的优化

在液相色谱条件优化实验中,比较了不同pH时的采集时间,结果发现:pH在4.4~4.5时采集时间为30 min,较之于前缩短了5 min,方法更便捷。

(下转第480页)

都有迹可循。④重复改进措施实验,确保改进措施的有效性,降低意外风险。⑤文件化改进措施以及“人、机、料、法、环”的应用促使小试研究人员用生产的眼光看待小试研究,将小试研究结果与实际生产相结合。通过本案例保证了该模型的小试研究是在 QbD 理念的基础上,系统、有逻辑地、在符合 GMP 要求的情况下进行。但基于 DMAIC 模型的特性,它只适用于原始工艺较成熟,小试目的为优化并控制工艺稳定的情况。不过 DMAIC 模型作为一种先进的管理集成方式,在仿制药小试研究中仍可大有作为。

【参考文献】

[1] 黄晓龙. 从药品注册法规的修订谈工艺研究与验证的重要性[J]. 中国执业药师, 2008, 5(7): 35-37.
 [2] 吴全利, 齐嘉楠. 六西格玛的DMAIC模型[J]. 中国统计, 2005(6): 45.
 [3] 吴伟. 浅谈六西格玛管理中DMAIC模式的建立[J]. 数字通信世界, 2018(10): 26, 33.
 [4] YU L X. Pharmaceutical quality by design: product and process

development, understanding, and control[J]. Pharm Res, 2008, 25(4): 781-791.

[5] 崔雅华, 王茜, 徐冰, 等. 质量源于设计: 基于知识组织的中药生产潜在关键工艺参数的辨识[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(15): 1-8.
 [6] 刘旭亮, 张立颖, 臧恒昌. 仿制原料药研究开发流程及技术要求[J]. 齐鲁药事, 2009, 28(12): 746-748.
 [7] 金树辉, 王钰. 原料药仿制开发过程存在的问题及对策[J]. 河北企业, 2014(7): 101-102.
 [8] 孙成磊. 小试、放大试验与中试的联系与区分[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2018(2): 147.
 [9] 梁毅. GMP教程[M]. 第三版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 16.
 [10] 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心. 药品数据管理规范(征求意见稿)[S/OL]. (2018-01-08)[2019-12-28]. <http://www.cfda.gov.cn/443/resource/news/9831.html>
 [11] 贾娜, 王璐, 王晓, 等. 化学药品注册批准前检查常见问题及思考[J]. 中国药事, 2019, 33(3): 246-249.
 [12] 钟露苗, 王铸辉, 曾令贵, 等. 药品注册现场检查工作的现状与思考[J]. 中国药事, 2012, 26(3): 211-213.

[收稿日期] 2019-12-30 [修回日期] 2020-04-27

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 468 页)

表 3 不同溶剂对口腔溃疡膜有效成分提取率的影响 [n=3, 实测值/标示量 (%)]

提取方法	地塞米松磷酸钠	克霉唑
甲醇超声提取	67.46	74.49
	71.58	79.06
	73.09	72.64
水超声提取	108.29	101.28
	104.08	101.03
	105.88	103.38
70%甲醇超声提取	104.27	95.00
	109.52	100.52
	106.89	103.54

本研究基于 HPLC 同时测定口腔溃疡膜中地塞米松磷酸钠、克霉唑含量的方法,经提取工艺的优化和全面的方法学考察,成功用于测定样品中地塞米松磷酸钠和克霉唑的含量,该法简便可靠,可为口腔溃疡膜的质量控制提供依据,也为其质量标

准研究奠定了基础。

【参考文献】

[1] FITZPATRICK S G, COHEN D M, CLARK A N. Ulcerated lesions of the oral mucosa: clinical and histologic review[J]. Head Neck Pathol, 2019, 13(1): 91-102.
 [2] GIANNETTI L, MURRI DELLO DIAGO A, LO MUZIO L. Recurrent aphthous stomatitis[J]. Minerva Stomatol, 2018, 67(3): 125-128.
 [3] GAGINI T, BORBA-SANTOS L P, MESSIAS RODRIGUES A, et al. Clotrimazole is highly effective *in vitro* against feline *Sporothrix brasiliensis* isolates[J]. J Med Microbiol, 2017, 66(11): 1573-1580.
 [4] 王治国, 程军. 口腔溃疡局部用药应注意的问题[J]. 人民军医, 2017, 60(12): 1227-1228, 1232.
 [5] 唐蕾, 江春霞, 朴淑娟, 等. 用HPLC法同时测定口腔溃疡膜中克霉唑和地塞米松磷酸钠的含量[J]. 药学服务与研究, 2016, 16(6): 457-459.
 [6] OHNISHI A, HASHIMOTO K, OZONO E, et al. Anaphylaxis to carboxymethylcellulose: add food additives to the list of elicitors[J]. Pediatrics, 2019, 143(3): e20181180.

[收稿日期] 2020-03-06 [修回日期] 2020-04-10

[本文编辑] 李睿旻