

聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯中单双酯的制备及 5 种成分含量测定

郑秋莹^{1,2}, 包建民¹, 周微², 王国成², 李优鑫^{1*} (1.天津大学药物科学与技术学院, 天津化学化工协同创新中心, 天津市现代药物传递及功能高效化重点实验室, 天津 300072; 2.士力控股集团研究院, 天津 300402)

摘要: 目的 分离制备聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯中的单酯与双酯, 并采用 HPLC-UV、HPLC-ELSD 测定聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯中的单酯、双酯、维生素 E 琥珀酸酯、 α -生育酚及聚乙二醇 1000 的含量。方法 制备液相色谱分离采用 DAC-HB50 C₁₈ 动态轴向压缩色谱柱(50 mm×250 mm, 10 μ m), 以水(A)-乙醇(B)为流动相, 梯度洗脱, 流速 75 mL·min⁻¹, 检测波长 285 nm, 收集目标组分旋蒸去除溶剂制得单酯、双酯, 并确证其结构。含量测定色谱条件: Waters XBridge C₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 0.1%甲酸溶液为流动相 A, 乙腈-异丙醇(1:1)为流动相 B, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 285 nm。HPLC 测定制得的单双酯纯度及单酯、双酯、维生素 E 琥珀酸酯、 α -生育酚含量; HPLC-ELSD 测定聚乙二醇 1000 含量, 采用相同色谱柱与流动相, 进行不同的梯度洗脱, ELSD 漂移管温度 90.4 $^{\circ}$ C, 载气流速 2.3 L·min⁻¹。结果 制得单、双酯纯度分别为 99.1%, 99.8%。各成分分离良好, 在相应的范围内线性关系良好, 相关系数 $r \geq 0.9995$; 平均回收率为 98.2%~99.7%。结论 制备液相色谱法可制得满足检测需求的单、双酯对照品; 2 种检测方法经验证, 适用于聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯中单酯、双酯、维生素 E 琥珀酸酯、 α -生育酚及聚乙二醇 1000 的含量测定。

关键词: 聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯; 单酯; 双酯; 制备液相色谱法; 高效液相色谱法; 结构确证

中图分类号: R943; R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)06-0825-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.06.009

引用本文: 郑秋莹, 包建民, 周微, 等. 聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯中单双酯的制备及 5 种成分含量测定[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(6): 825-831.

Preparation of Monoester and Diester from *D*- α -tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate and Determination of Five Components

ZHENG Qiuying^{1,2}, BAO Jianmin¹, ZHOU Wei², WANG Guocheng², LI Youxin^{1*} (1.Tianjin Key Laboratory for Modern Drug Delivery & High-Efficiency, Collaborative Innovation Center of Tianjin Chemical Engineering, School of Pharmacology Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2.Tasly Group Institute Co., Ltd., Tianjin 300402, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare monoester and diester from *D*- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate(TPGS) using a preparative HPLC method, and to establish determination methods of monoester, diester, vitamin E succinate, α -tocopheryl and polyethylene glycol 1000 in TPGS. **METHODS** A preparative HPLC method with a DAC-HB50 C₁₈ dynamic axis compress chromatographic column(50 mm×250 mm, 10 μ m) was developed using the mobile phase of water(A)-ethanol(B) in a gradient mode at a flow rate of 75 mL·min⁻¹. Chromatograms were observed by a UV detector with wavelength set to 285 nm. Collected target product solution was evaporated by rotary evaporation. The target products were identified. An HPLC method with a Waters XBridge C₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μ m) for the determination of prepared components was developed using a gradient elution of 0.1% formic acid solution and acetonitrile-isopropanol(1:1) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. Chromatograms were observed by a UV detector with wavelength set to 285 nm. The HPLC method was used for determination of monoester, diester, vitamin E succinate and α -tocopheryl in TPGS. An HPLC-ESLD method for the determination of polyethylene glycol 1000 in TPGS was developed with the same column and mobile phase but different gradient elution of HPLC method. Chromatograms were observed by an ELSD detector with drift tube temperature of 90.4 $^{\circ}$ C and gas flow rate of 2.3 L·min⁻¹. **RESULTS** The purity of prepared monoester and diester were 99.1% and 99.8%. The methods were validated and they were found that good resolution, linearity($r \geq 0.9995$) within the certain range of five components and average recoveries of 98.2%~99.7% were achieved. **CONCLUSION** The preparative HPLC method is used successfully for the preparation of monoester and diester. Two validated detective HPLC methods can be used for detection of monoester, diester, vitamin E succinate, α -tocopheryl and polyethylene glycol 1000 in TPGS.

KEY WORDS: *D*- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate; monoester; diester; preparative HPLC; HPLC; structural identification

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划青年项目(15JCQNJC43200)

作者简介: 郑秋莹, 女, 硕士生 Tel: (022)86343844 E-mail: zhengqiuy126@126.com
(022)27892820 E-mail: lyx@tju.edu.cn

*通信作者: 李优鑫, 女, 博士, 副教授 Tel:

聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯 (*D*- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate, TPGS) 是一种水溶性维生素 E, 由维生素 E 琥珀酸酯 (vitamin E succinate, VES) 的游离羧基与聚乙二醇 1000 (polyethylene glycol 1000, PEG 1000) 一端的羟基酯化而成。由于两端同时具有疏水及亲水基团, TPGS 是一种良好的非离子型表面活性剂, 已作为药用辅料收载于美国药典, 近年来在药物制剂中广泛应用, 可用作增溶剂^[1-2]、乳化剂^[3]、吸收促进剂^[4]、增塑剂^[5]、药物载体(如脂质体、混合胶束、纳米粒)^[6-8]等。

TPGS 中除主要成分 TPGS 单酯 (TPGS monoester, TME) 外, 还存在 TPGS 双酯 (TPGS diester, TDE), 以及游离的 α -生育酚 (α -tocopheryl, TCP)、VES、PEG1000 等。TDE 是由于 PEG 1000 两端的羟基均被 VES 酯化, 使两端均存在疏水基团, 导致其表面活性作用较 TME 明显降低, 且理化性质差异较大, 因此 TPGS 中 TDE、VES、TCP、PEG 1000 的含量是控制 TPGS 质量的重要指标。对照品外标法是测定已知组分含量的最佳方法, 但未见有 TME 及 TDE 的对照品出售。目前制备液相色谱法作为一种直观快速的分离制备手段, 已在复杂组分的分离纯化中被大量应用^[9-13]。本实验拟采用制备液相色谱分离制备 TPGS 中的 TME、TDE, 并建立 HPLC 及 HPLC-ELSD 的方法检测 TPGS 中的 TME、VES、TCP、TDE 及 PEG 1000 含量。TME、TDE 结构见图 1。

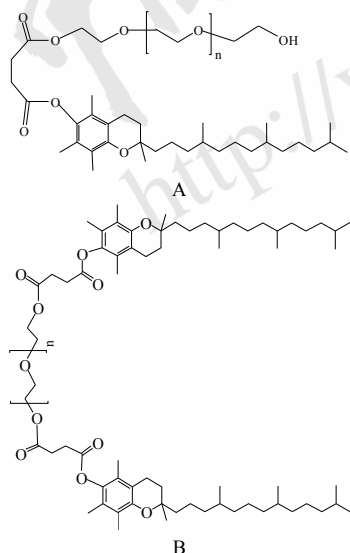


图 1 TME 和 TDE 的结构式

A—TME; B—TDE。

Fig. 1 Structure of TME and TDE

A—TME; B—TDE。

1 仪器与试剂

Agilent SD-1 制备型液相色谱仪、Agilent 1200 液相色谱仪、Agilent 1100 液相色谱仪(配有 Alltech 2000ES ELSD 检测器)均购自美国 Agilent 公司; UPLC-Q-TOF 液质联用仪 (Waters 公司); AVANCE-400 核磁共振仪 (Bruker 公司); Heidolph Laborota 4001 旋转蒸发仪 (德国 Heidolph 公司); XA205 型电子分析天平 (瑞士梅特勒公司)。

TPGS (瑞源生物科技有限公司, 批号 20111103, 20111104, 20111105); VES 对照品 (阿拉丁试剂, 批号: F1510019; 纯度: 99.6%), TCP 对照品 (美国 Supelco 公司, 批号: LB85173V; 纯度: 99.2%); PEG 1000 对照品 (分析纯, 光复精细化工研究所, 批号: 20120413; 纯度: 99.0%); 乙腈、异丙醇、乙醇 (色谱纯, 美国 Merck 公司); 甲酸 (分析纯, 天津市康科德科技有限公司); 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 TME 与 TDE 的制备

2.1.1 制备液相色谱条件 色谱柱: DAC-HB50 C₁₈ 动态轴向压缩色谱柱 (50 mm×250 mm, 10 μ m); 流动相: 纯化水为流动相 A, 乙醇为流动相 B; 梯度洗脱 (0~10 min, 60%→95%B; 10~15 min, 95%B; 15~20 min, 95%→100%B; 20~40 min, 100%B; 40~41 min, 100%→60%B; 41~55 min, 60%B); 流速: 75 mL·min⁻¹; 柱温: 室温; 检测波长: 285 nm; 进样量: 5 mL。

2.1.2 供试品溶液的制备 取 TPGS 适量, 用乙醇溶解并稀释制成约 100 mg·mL⁻¹ 的溶液, 摇匀即得。

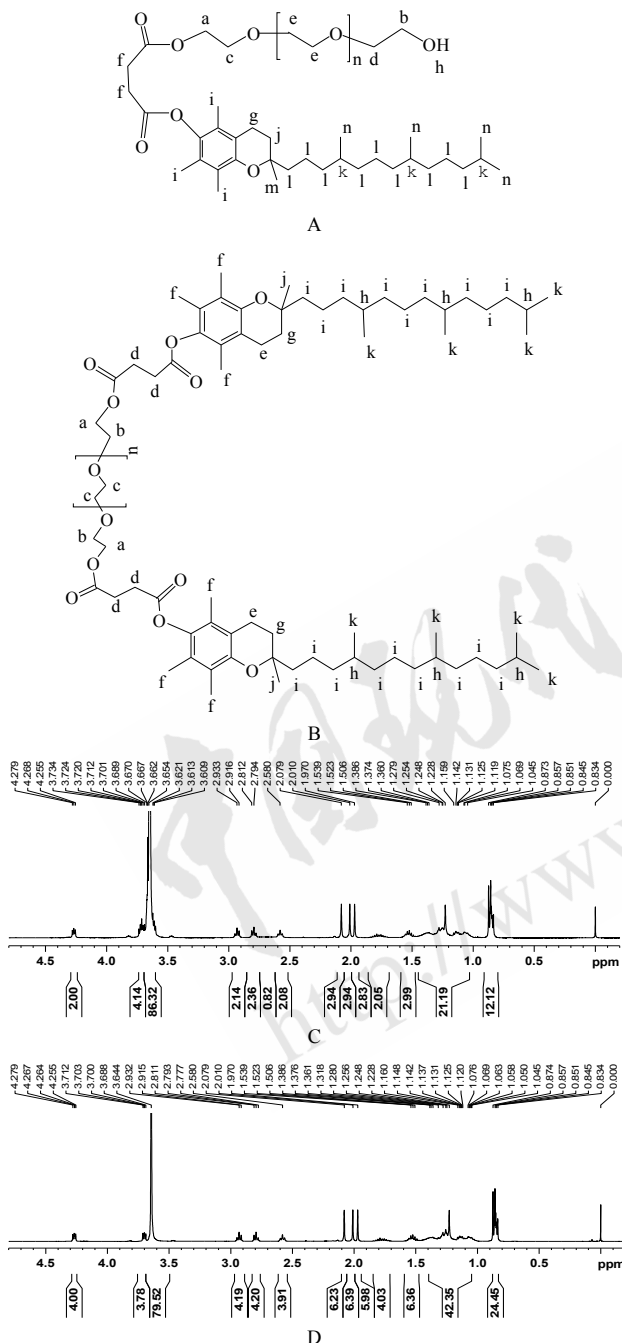
2.1.3 TME 和 TDE 的制备 精密量取制备供试品溶液 5 mL 注入 Agilent SD-1 制备型液相色谱仪, 按“2.1.1”项下条件进行梯度洗脱, 收集相应色谱峰处馏分, 然后在 40~46 °C 下旋转蒸发去除溶剂, 即得。

2.2 制备获得对照品的结构确证

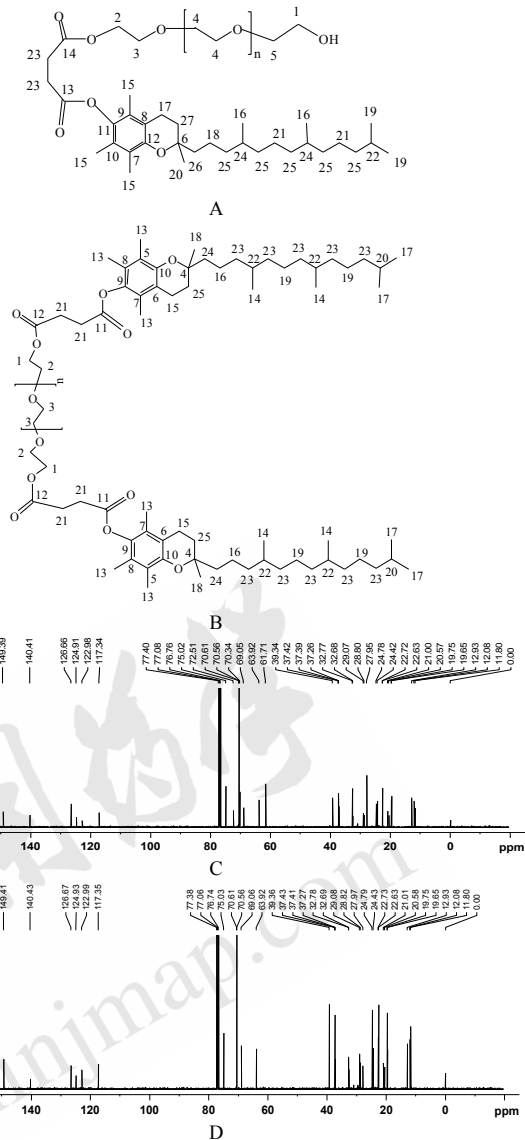
2.2.1 质谱 TME 对照品: ESI-MS m/z 772.474 4 [M+2H]⁺ 信号最强, 相邻信号质荷比差值为 44, 等于相差 1 个单体 PEG 的质量, 计算得 TME 分子量为 1 540.948 8。TME 为 VES (分子量为 530.78) 与 PEG 1000 聚合而成, 与检测结果相符。

TDE 对照品: ESI-MS m/z 1 007.157 7 [M+2H]⁺

2.2.2 核磁共振光谱 将制备得到的 TME、TDE 对照品测定 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT(135°)。谱图见图 2~3, 信号归属见表 1~4。



A-TME; B-TDE; C-¹H-NMR spectrum of TME; D-¹H-NMR spectrum of TDE.



A-TME; B-TDE; C- ^{13}C -NMR spectrum of TME; D- ^{13}C -NMR spectrum of TDE.

Tab. 1 Data of ^1H -NMR and signal attribution(TME)

序号	化学位移 δ/ppm	质子数	氢类型
a	4.255~4.279	2	CH_2
b, c	3.689~3.734	4	CH_2
d, e	3.609~3.670	86	CH_2
f	2.778~2.812, 2.916~2.950	4	CH_2
g	2.564~2.597	2	CH_2
h	2.622~2.753	1	活泼氢 OH
i	1.970, 2.010, 2.079	9	CH_3
j	1.706~1.841	2	CH_2
k	1.473~1.555	3	CH
l	1.026~1.435	18	CH_2
m	1.228	3	CH_3
n	0.834~0.873	12	CH_3

表 2 ¹H-NMR 数据及信号归属(TDE)

Tab. 2 Data of ¹H-NMR and signal attribution(TDE)

序号	化学位移 δ /ppm	质子数	氢类型
a	4.255~4.279	4	CH ₂
b	3.688~3.712	4	CH ₂
c	3.644	80	CH ₂
d	2.776~2.811, 2.915~2.949	8	CH ₂
e	2.563~2.597	4	CH ₂
f	1.970, 2.010, 2.079	18	CH ₃
g	1.705~1.840	4	CH ₂
h	1.490~1.565	6	CH
i	1.027~1.437	36	CH ₂
j	1.228	6	CH ₃
k	0.834~0.874	24	CH ₃

表 3 ¹³C-NMR 数据及信号归属(TME)

Tab. 3 Data of ¹³C-NMR and signal attribution(TME)

序号	化学位移 δ /ppm	碳类型
1	61.71	CH ₂
2, 3	63.92, 69.05	CH ₂
4	70.34, 70.56, 70.61	CH ₂
5	72.51	CH ₂
6	75.02	C
7, 8, 9, 10, 11, 12	117.34, 122.98, 124.91 126.66, 140.41, 149.39	C
13, 14	170.92, 172.18	C
15	11.80, 12.08, 12.93	CH ₃
16	19.65, 19.75	CH ₃
17, 18	20.57, 21.00	CH ₂
19, 20	22.63, 22.72	CH ₃
21	24.42, 24.78	CH ₂
22	27.95	CH
23	28.80, 29.07	CH ₂
24	32.68, 32.77	CH
25	37.26	CH ₂
26	37.39, 37.42	CH ₂
27	39.34	CH ₂

表 4 ¹³C-NMR 数据及信号归属(TDE)

Tab. 4 Data of ¹³C-NMR and signal attribution(TDE)

序号	化学位移 δ /ppm	碳类型
1, 2	63.92, 69.06	CH ₂
3	70.56, 70.61	CH ₂
4	75.03	C
5, 6, 7, 8, 9, 10	117.35, 122.99, 124.93, 126.67, 140.43, 149.41	C
11, 12	170.92, 172.18	C
13	11.80, 12.08, 12.93	CH ₃
14	19.65, 19.75	CH ₃
15, 16	20.58, 21.01	CH ₂
17, 18	22.63, 22.73	CH ₃
19	24.43, 24.79	CH ₂
20	27.97	CH
21	28.82, 29.08	CH ₂
22	32.69, 32.78	CH
23	37.27	CH ₂
24	37.41, 37.43	CH ₂
25	39.36	CH ₂

¹H-NMR 图中, TME 在 δ 2.622~2.753 处具有活泼氢的信号, TDE 中则没有; TDE 中由 VES 引

入的质子数是 TME 中的 2 倍。

¹³C-NMR 图中, TME 中与-OH 相连的 2 个 CH₂ 在 δ 61.71、72.51 处有信号, 在 TDE 中由于结构完全对称, 这 2 个 CH₂ 的信号分别与对称位置的 CH₂ 信号峰重叠。

2.3 TME 和 TDE 对照品纯度测定及 TME、VES、TCP、TDE 含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Waters XBridge C₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 流动相: 0.1%甲酸溶液为流动相 A, 乙腈-异丙醇(1:1)为流动相 B, 梯度洗脱(0~7 min, 65%→100%B; 7~13 min, 100%B; 13~13.5 min, 100%→65%B; 13.5~18 min, 65%B); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 35℃; 检测波长: 285 nm; 进样量: 20 μ L。

2.3.2 溶液制备 ①TME 供试品溶液: 精密称取 TME 适量, 用乙腈溶解并稀释制成 6 mg·mL⁻¹ 的溶液, 摇匀即得。②TDE 供试品溶液: 精密称取 TDE 适量, 用乙腈溶解并稀释制成 3 mg·mL⁻¹ 的溶液, 摇匀即得。③对照品溶液: 精密称取 TME、VES、TCP、TDE 的对照品适量, 加乙腈溶解并稀释制成各含约 3, 0.09, 0.09, 0.6 mg·mL⁻¹ 的混合溶液, 摇匀即得。④供试品溶液: 精密称取 TPGS 供试品 30 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀即得。

2.3.3 TME 和 TDE 对照品纯度测定 TME 及 TDE 供试品溶液分别按“2.3.1”项下色谱条件测定, 采用面积归一化法计算, 得到 TME 的纯度为 99.1%, TDE 的纯度为 99.8%, 色谱图见图 4。

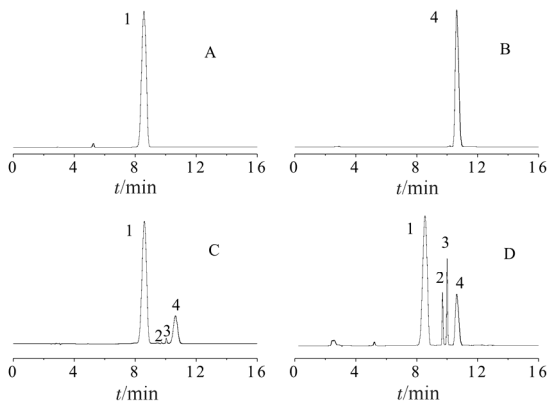


图 4 TME, VES, TCP, TDE 含量测定高效液相色谱图 A-TME 供试溶液; B-TDE 供试溶液; C-供试品溶液; D-对照品溶液; 1-TME; 2-VES; 3-TCP; 4-TDE。

Fig. 4 HPLC chromatograms of determination of TME, VES, TCP, TDE

A-TME solution; B-TDE solution; C-sample solution; D-standard solution; 1-TME; 2-VES; 3-TCP; 4-TDE.

2.3.4 专属性 将对照品溶液与供试品溶液按“2.3.1”项下条件进样测定, 色谱图见图4。结果表明TPGS中各组分分离良好, 专属性能够满足测定要求。

2.3.5 线性关系和范围 分别精密称取TME, VES, TCP, TDE对照品750, 22.5, 22.5, 150 mg, 置50 mL量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为线性储备溶液。精密量取线性储备溶液适量, 加乙腈稀释, 制成TME质量浓度分别为149.4, 373.4, 1 493, 2 240, 2 987, 4 481 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, VES质量浓度分别为4.550, 11.37, 45.50, 68.25, 90.99, 136.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, TCP质量浓度分别为4.466, 11.16, 44.66, 66.99, 89.32, 134.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, TDE质量浓度分别为30.52, 76.30, 305.2, 457.8, 610.4, 915.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列混合溶液。按“2.3.1”项下条件进样测定, 以质量浓度 $X(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 进行线性回归, 得到TME的回归方程为 $Y=1.432\ 7X+25.196$, $r=0.999\ 8$, VES的回归方程为 $Y=4.178\ 6X-0.135\ 6$, $r=1.00\ 0$, TCP的回归方程为 $Y=7.279\ 4X-3.165\ 9$, $r=1.00\ 0$, TDE的回归方程为 $Y=2.032\ 7X-4.99\ 7$, $r=0.999\ 5$, 结果表明各组分在质量浓度范围内线性关系良好。

2.3.6 检测限和定量限 将对照品溶液逐级稀释, 按“2.3.1”项下条件进样测定, 取信噪比10:1为定量限, 信噪比3:1为检测限。结果表明TME, VES, TCP, TDE的定量限分别为7.468, 0.909 9, 0.446 6, 6.104 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 检测限分别为2.240, 0.182 0, 0.134 0, 1.221 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3.7 仪器精密度试验 将对照品溶液按“2.3.1”项下条件连续进样6次, 测得TME, VES, TCP, TDE峰面积的RSD($n=6$)分别为0.05%, 0.26%, 0.14%, 0.05%, 表明仪器精密度良好。

2.3.8 重复性试验 取TPGS(批号: 20111103)样品, 按“2.3.2”项下方法平行配制6份供试品溶液, 按“2.3.1”项下条件进样测定。TME, VES, TCP, TDE的平均含量($n=6$)分别为82.0%, 0.04%, 0.19%, 12.3%, RSD($n=6$)分别为0.46%, 1.32%, 0.60%, 0.46%, 表明方法重复性良好。

2.3.9 回收率试验 精密称取TME, VES, TCP, TDE对照品62.5, 22.5, 22.5, 75.0 mg, 置50 mL量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为回收率储备液。另取TPGS(批号: 20111103)约30 mg, 置10 mL量瓶中, 共称取12份, 分别加

入回收率储备液1, 2, 3, 8 mL, 作为4个浓度水平, 每个浓度水平平行配制3份, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 按“2.3.1”项下条件进样测定, TME以第1, 3, 4浓度水平计算平均回收率, VES, TCP, TDE以第1, 2, 3浓度水平计算平均回收率。TME, VES, TCP, TDE的平均回收率($n=9$)分别为98.8%, 98.4%, 99.7%, 99.3%, RSD分别为1.41%, 0.37%, 1.32%, 1.31%。

2.3.10 稳定性试验 将供试品溶液在常温下放置, 分别于0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h依法取样测定, 测得TME, VES, TCP, TDE峰面积的RSD分别为0.46%, 1.82%, 1.07%, 1.15%, 表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.3.11 样品测定 取3批供试品分别依法测定TME, VES, TCP, TDE的含量, 结果见表5。

2.4 PEG 1000 含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Waters XBridge C₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 0.1%甲酸溶液为流动相A, 乙腈-异丙醇(1:1)为流动相B, 梯度洗脱(0~4 min, 45%B, 4~5 min, 45%→100%B, 5~12 min, 100%B, 12~12.1 min, 100%→45%B, 12.1~17 min, 45%B); 流速: 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 8 μL ; 蒸发光散射检测器条件(高温不分流模式): 漂移管温度 90.4 $^{\circ}\text{C}$, 载气流速 2.3 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.4.2 溶液制备 ①对照品溶液: 精密称取PEG 1000对照品适量, 加乙腈溶解并稀释制成约含0.06, 0.3, 0.6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 摇匀, 作为对照溶液1~3。②供试品溶液: 精密称取TPGS供试品30 mg, 置10 mL量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀即得。

2.4.3 专属性 将对照品溶液, 供试品溶液按“2.4.1”项下条件进样测定, 色谱图见图5。结果表明专属性良好。

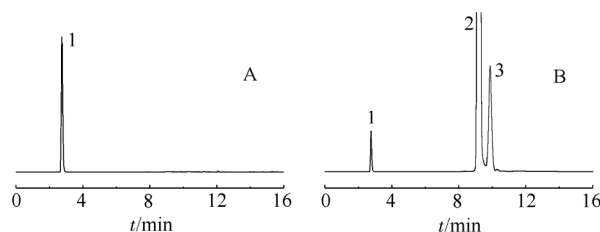


图5 PEG 1000 测定高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; 1-PEG 1000; 2-TME; 3-TDE。

Fig. 5 HPLC chromatograms of determination of PEG 1000
A-standard solution; B-sample solution; 1-PEG 1000; 2-TME; 3-TDE.

2.4.4 线性和范围 精密称取 PEG 1000 对照品 150 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为线性储备溶液。精密量取线性储备溶液适量, 加乙腈稀释, 制成 PEG 1000 质量浓度分别为 9.065, 18.13, 60.44, 120.9, 181.3, 302.2, 483.5, 604.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列溶液。按“2.4.1”项下条件进样测定, 以质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的对数 X 为横坐标, 峰面积的对数 Y 为纵坐标, 进行线性回归, PEG 1000 回归方程为 $Y=1.7388X+2.1513$, $r=0.9995$, 结果表明 PEG 1000 在 9.065~604.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.4.5 检测限和定量限 将对照品溶液 1 逐级稀释, 按“2.4.1”项下条件进样测定, 取信噪比 10:1 为定量限, 信噪比 3:1 为检测限。结果表明 PEG 1000 的定量限为 9.065 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 检测限为 4.533 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.4.6 仪器精密度试验 将对照品溶液 1 按“2.4.1”项下条件连续进样 6 次, 测得 PEG 1000 峰面积的 $\text{RSD}(n=6)$ 为 0.67%, 表明仪器精密度良好。

2.4.7 重复性试验 取 TPGS(批号: 20111103)样品, 平行配制 6 份供试品溶液, 按“2.4.1”项下条件进样测定, PEG 1000 的平均含量($n=6$)为 4.99%, $\text{RSD}(n=6)$ 为 1.17%, 表明方法重复性良好。

2.4.8 回收率试验 精密称取 PEG 1000 对照品 150 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为回收率储备液。另精密称取 TPGS(批号: 20111103)150 mg 置 50 mL 量瓶中, 称取 9 份, 分别加入回收率储备液 1, 5, 10 mL, 作为 3 个浓度水平, 每个浓度水平平行配制 3 份, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 按“2.4.1”项下条件进样测定, 计算平均回收率。PEG 1000 的平均回收率($n=9$)为 98.2%, RSD 为 0.87%。

2.4.9 稳定性试验 将供试品溶液在常温下放置, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 依法取样测定, 测得 PEG 1000 峰面积的 RSD 为 1.09%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.10 样品测定 取 3 批供试品分别依法测定 PEG 1000 的含量, 结果见表 5。

表 5 样品中 5 种成分含量测定结果($n=3$)

Tab. 5 Results of determination of five components($n=3$)

批次	TME/%	VES/%	TCP/%	TDE/%	PEG 1000/%
20111103	82.4	0.04	0.19	12.3	5.0
20111104	80.1	0.04	0.20	14.0	5.7
20111105	81.9	0.03	0.19	12.7	4.6

3 讨论

3.1 TME, TDE 制备方式及洗脱液选择

TPGS 的纯化^[14]与其中单双酯的分离^[15]可见文献报道, 但均使用正相体系硅胶柱层析, 很难得到高纯度的 TME 与 TDE。本实验使用反相制备液相色谱仪, 考察了乙腈-异丙醇-水, 乙腈-乙醇-水和乙醇-水等洗脱体系, 结果显示, 在同等上样量时使用乙醇-水梯度洗脱得到的 TME, TDE 纯度最高, 且该洗脱体系对环境较为友好。

TPGS 中主要成分为 TME, TDE 含量相对较少, 若直接分离制备 TDE 对照品, 制备效率较低。可将 TPGS 与 VES 按约 1:1 的比例反应, 或将 PEG 1000 与 VES 按约 1:2 的比例反应, 得到 TDE 含量较高的供试品, 然后再分离制备 TDE 对照品, 可提高收率, 降低成本, 且环保低碳。

3.2 检测器及参数选择

TME, VES, TCP, TDE 分别在 285, 293 nm 处有最大紫外吸收, 为使 4 种成分在同一条件下有最大吸收, 最终选择 285 nm 作为检测波长。PEG 1000 无紫外吸收且不易挥发, 选择高温不分流模式的 ELSD 检测器, 根据流动相组成确定 ELSD 检测器的初始参数为漂移管温度 91.4 $^{\circ}\text{C}$, 载气流速 2.5 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 逐步降低温度和流速考察样品的检测情况, 在基线噪声符合要求的情况下得到待测组分的最大峰面积, 最终确定漂移管温度 90.4 $^{\circ}\text{C}$, 载气流速 2.3 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

3.3 色谱柱选择

考察了 5 根不同型号的色谱柱(SHISEIDO CAPCELL PAK C_{18} , Agilent ZORBAX Eclipse XDB- C_{18} , Waters XBridge Shield RP18, Waters XBridge C_8 , Agilent ZORBAX Eclipse XDB- C_8), 规格均为 4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm , 结果显示 Waters XBridge C_8 色谱柱在获得良好分离度的同时拥有最佳的检测灵敏度, 色谱图见图 6。

3.4 流动相选择

选择乙腈、甲醇、乙腈-乙醇(1:1)、乙腈-异丙醇(1:1)等有机相分别与 0.1%甲酸进行梯度洗脱, 结果显示乙腈-异丙醇(1:1)与 0.1%甲酸梯度洗脱时, 各组分分离度均 >2.0 , 柱效相对最优, 含量较低组分(VES, TDE, TCP)能够得到最佳的检测灵敏度。

3.5 耐用性考察

比较了不同柱温(30, 35, 40 $^{\circ}\text{C}$), 不同流速

(0.9, 1.0, 1.1 mL·min⁻¹)对样品检测的影响,结果显示各组分的分离度均>2.0,含量结果 RSD 均<5.0%,方法的耐用性良好,适用于TPGS中5种成分的含量测定。

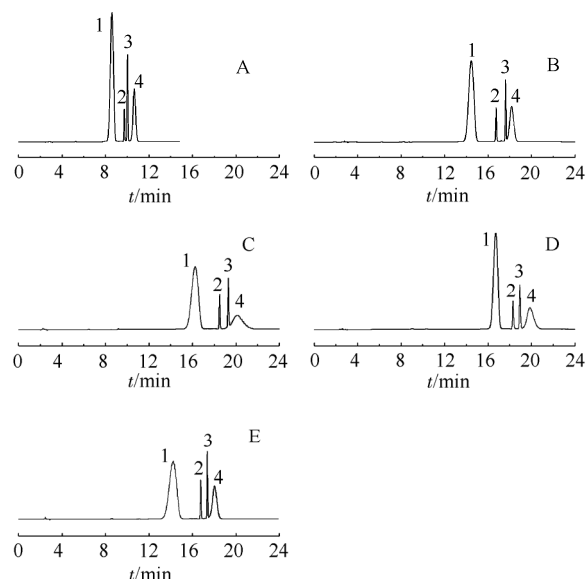


图6 色谱柱考察高效液相色谱图

A-Waters XBridge C₈ 色谱柱; B-Waters XBridge Shield RP18 色谱柱; C-Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱; D-SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱; E-Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₈ 色谱柱; 1-TME; 2-VES; 3-TCP; 4-TDE。

Fig. 6 HPLC chromatograms of choosing columns

A-Waters XBridge C₈ column; B-Waters XBridge Shield RP18 column; C-Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column; D-SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ column; E-Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₈ column; 1-TME; 2-VES; 3-TCP; 4-TDE.

REFERENCES

- [1] CHRISTIANSEN A, BACKENFELD T, WEITSCHIES W. Effects of non-ionic surfactants on *in vitro* triglyceride digestion and their susceptibility to digestion by pancreatic enzymes [J]. Eur J Pharm Sci, 2010, 41(2): 376-382.
- [2] YANG X G, LI L B. Mixed micelles made of pluronic/PEG-PE/TPGS for solubilization of camptothecin [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2009, 44(10): 762-765.
- [3] SONG N, LIU WM, TU Q, et al. Preparation and *in vitro* properties of redox-responsive polymeric nanoparticles for

paclitaxel delivery [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2011, 87(2): 454-463.

- [4] ZHU Y N, WANG M, WANG L L, et al. Preparation of colchicine ethosomes containing TPGS and *in vitro* transdermal permeation [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46(24): 3655-3660.
- [5] GUO Y, LUO J, TAN S, et al. The applications of Vitamin E TPGS in drug delivery [J]. Eur J Pharm Sci, 2013, 49(2): 175-186.
- [6] ZHANG Z, TAN S, FENG S S. Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery [J]. Biomaterials, 2012, 33(19): 4889-4906.
- [7] HU C, LIANG K, AN R, et al. Tissue distribution of TPGS modified artesunate liposome and its metabolites in rats [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43(2): 325-331.
- [8] CAO N, FENG S S. Doxorubicin conjugated to D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS): conjugation chemistry, characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluation.[J]. Biomaterials, 2008, 29(28): 3856-3865.
- [9] YANG F, ZHANG Y, ZHANG J L, et al. Preparation and identification of the doxycycline hyclate impurity eluted right after the main component described in ChP 2015 [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2017, 37(4): 695-701.
- [10] ZHAO D M, WANG W, LIU K, et al. Preparation of torachryson-8-O-β-D-glucopyranoside reference substance from Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix by semi-preparative HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(6): 727-730.
- [11] MOHAN A, HARIHARAN M, VIKRAMAN E, et al. Identification and characterization of a principal oxidation impurity in clopidogrel drug substance and drug product [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 47(1): 183-189.
- [12] ASAKAWA D, IIMURA Y, KIYOTA T, et al. Molecular size fractionation of soil humic acids using preparative high performance size-exclusion chromatography [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(37): 6448-6453.
- [13] MA T, ZHANG Q L, DING C X. Application of pH-zone-refining counter-current chromatography to separation of alkaloids [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(12): 1539-1544.
- [14] CHANG Y Z, YANG Y W, REN Q L, et al. Separation and purification of TPGS by silica gel column chromatography [J]. Food Ferment(食品与发酵工业), 2010(12): 195-199.
- [15] 杜广盛, 李德馨, 魏振平. 田口实验设计法优化 TPGS 单酯与双酯的柱层析分离工艺[J]. 化学试剂, 2014, 36(1): 79-82.

收稿日期: 2017-09-16

(本文责编: 曹粤锋)