

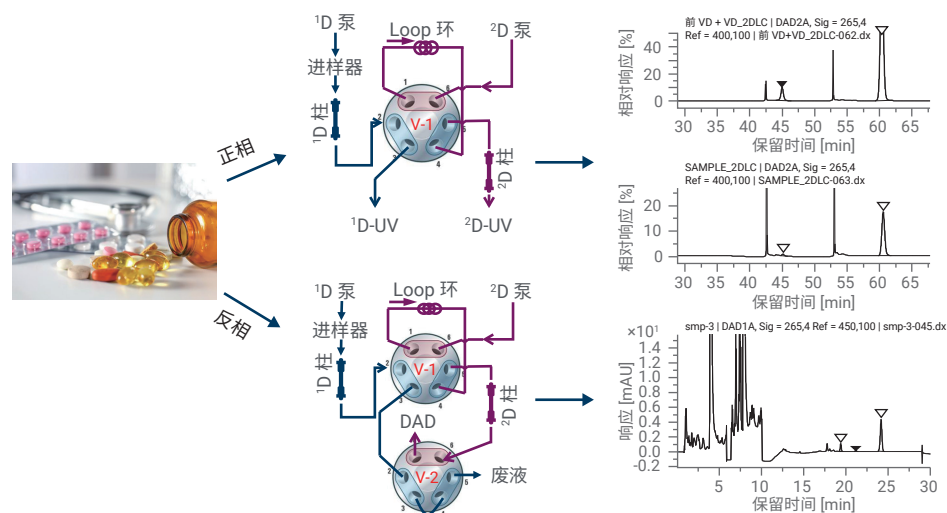
采用二维液相色谱法测定维生素 AD 制剂中维生素 D 的含量

作者

张艳海, 李浪, 杨新磊, 鲁锐
安捷伦科技(中国)有限公司

摘要

本应用简报介绍了二维柱切换液相色谱法在药物维生素 AD 制剂中维生素 D 测定的应用。首先重现了 2020 版中国药典 0722 维生素 D 测定的第四法即正相二维液相色谱法, 结果理论板数、分离度及连续进样重现性完全满足方法测定要求。鉴于正相色谱法在实际应用中的诸多不便之处, 且分析时间较长, 本文也开发基于反相的二维分析方法, 样品采用二氯甲烷-异丙醇混合溶剂溶解后, 直接进样分析, 系统适用性实验结果表明, 各光热异构体等分离度较好, 方法学验证结果表明了所构建的反相方法的可靠性。两种方案可在研发、生产和 QC 中灵活使用。



前言

维生素 D 是人体所必须的脂溶性维生素。维生素 D 的基本作用是能促进钙和磷的吸收，缺乏维生素 D，会影响钙的吸收和骨代谢，最终引起佝偻病、软骨症或骨质疏松症等。作为药物的维生素 D 相关制剂是补充维生素 D 最直接的途径。准确测定维生素 D 及其前体的含量，能够保证维生素 D 达到目标的效价，从而保证药物的有效性和安全性。

维生素 D 测定的难点在于含维生素 A 醇及其他相应脂溶性杂质的供试品，如维生素 AD 软胶囊、滴剂等，其基质中存在大量油性辅料（大豆油）和维生素 A 醇的干扰，同时维生素 D2/D3 含量低（部分品种维生素 D2/D3 含量仅占 1% 左右），加上维生素 D 易受光热影响产生前维生素 D3 (pre-vitamin D3)、反式维生素 D3 (Trans vitamin D3)、速甾醇 (tachysterol) 和光甾醇 (lumisterol) 等。对于本类样品，2015 版药典和 2020 版药典的第二法和第三法，通常需要将样品进行皂化、有机溶剂液液萃取，结合反相色谱系统净化，最后再采用正相色谱系统进行定量检测。方法测定结果的准确性和重现性较难控制，也严重影响方法的分析效率。

通过二维柱切换的液相色谱技术不仅可以提升系统分离能力，改善结构相似化合物的分离分析；同时可以通过第一维的粗分去除样品中大量基质成分干扰，实现样品净化等。因此 2020 版药典 0722 维生素 D 测定新增了第四法，即在线二维液相色谱法，方法第一维和第二维均采用正相色谱体系，主要优点是样品可用正己烷溶解后直接进样分析，且具有载样量大，易去除非极性基质干扰成分，同时 VD 与其他羟基化的代谢物分离良好等优点。但由于正相法平衡慢、保留时间不稳定、总体分析时间长等诸多缺点，本文也开发了反相二维液相方案，两种方案可在药品生产和研发的不同阶段灵活选择。

实验部分

试剂和样品

正己烷（HPLC 级，Supelco）、异丙醇（HPLC，上海安谱实验科技股份有限公司）、正戊醇（高级纯，> 99.5%，Macklin 试剂）、甲醇、乙腈（HPLC 级，Merck）、甲基叔丁基醚（MTBE，HPLC 级，Tedia）。异丙醇（HPLC 级）、二氯甲烷（分析纯）、维生素 D3（纯度 99.9%）购自中国食品药品检定研究院；维生素 AD 滴剂为市售。

仪器和设备

安捷伦中心切割二维液相色谱系统，包括：Agilent 1260 Infinity II 四元泵（部件号 G711B）；Agilent 1260 Infinity II 二元泵（部

件号 G7112B）；Agilent 1260 Infinity II 自动进样器（部件号 G7129A）；Agilent 1260 Infinity II 柱温箱（部件号 G7116A，内置 2 位 6 通阀）；Agilent 1260 Infinity II DAD（部件号 7117C，配备 10 mm 流通池）。

软件采用 Agilent OpenLab CDS 2.5。

对照品溶液配制

按照 2020 版中国药典第四部 0722 维生素 D 测定法配制对照品储备溶液、系统适用性溶液以及 f1、f2 的对照品溶液等。做反相分析方法时，将各对照溶液的溶剂替换为甲醇即可。

样品溶液配制

取维生素 AD 滴剂等供试品适量（相当于维生素 D 总量 500 单位），精密称定，置于 25 mL 棕色容量瓶中，加正己烷溶解并稀释至刻度，采用正相二维液相色谱法上机分析，进样体积 100 μ L；另取供试品适量（约 3 粒，每粒约含 400–500 IU），精密称定，置于 5 mL 的棕色容量瓶中，先加入 1 mL 二氯甲烷使溶解，再加异丙醇稀释至刻度，过滤，采用反相二维液相色谱法进样分析，进样体积 5 μ L。

色谱条件

参考 2020 版中国药典四部 0722 维生素 D 测定第四法，正相法的主要色谱条件如下：

- 色谱柱：第一维，ChromCore VD-ChP41，2.1 $\times$ 150 mm，3 μ m；第二维，Zorbax Silica，3.0 $\times$ 100 mm，1.8 μ m（安捷伦科技公司，货号 828975-301）
- 流动相：第二维，正己烷:正戊醇:异丙醇 = 996:2:2，等度洗脱；第一维，A：正己烷；B：异丙醇；C：正己烷:正戊醇:异丙醇 = 98:1:1，梯度条件如下：

表 1. 第一维梯度程序

时间 (min)	A%	B%	C%	说明
0–30	95	0	5	分析
30–35	0	0	100	清洗
35–40	0	0	100	清洗
40–45	0	20	80	强洗
45–53	0	20	80	强洗
53–55	95	0	5	平衡
55–65	95	0	5	平衡

- 其他条件同药典

表 2. 二维液相色谱法（反相）主要条件

	第一维	第二维
色谱柱	Poroshell HPH C8, 100 × 3.0 mm, 2.7 μm	Zorbax SB-C18, 4.6 × 100 mm, 1.8 μm
流动相	A: 水; B: 乙腈; C: MTBE; D: 甲醇	A: 水; B: 乙腈
梯度	时间 (min) B% C% D%	时间 (min) B%
	0–0.5 80 0 0	0–8.5 40
	0.5–5.0 100 0 0	8.5–10.0 100
	5.0–13.0 100 0 0	10–30.0 100
	13–14.0 80 20 0	
	14–18.0 80 20 0	
	18–19.0 60 0 40	
	19–22.0 60 0 40	
	22–25.0 80 0 0	
流速	0.5 mL/min	1.0 mL/min
进样量	5 μL	
柱温	25 °C	
检测波长	265 nm; 采集频率: 20.0 Hz	
Loop 环	500 μL (SST)	

结果与讨论

药典 0722 维生素 D 测定法第四法重现

本文首先按照药典第一维色谱条件进前维生素 D 和维生素 D 的混合对照品溶液，对目标物进行定位后，再分别将前维生素 D（保留时间前后各 1.5 min）和维生素 D（峰起止各 1.5 min）切割至第二维色谱柱中进行分离。结果对照品溶液的典型色谱图如图 1 所示。

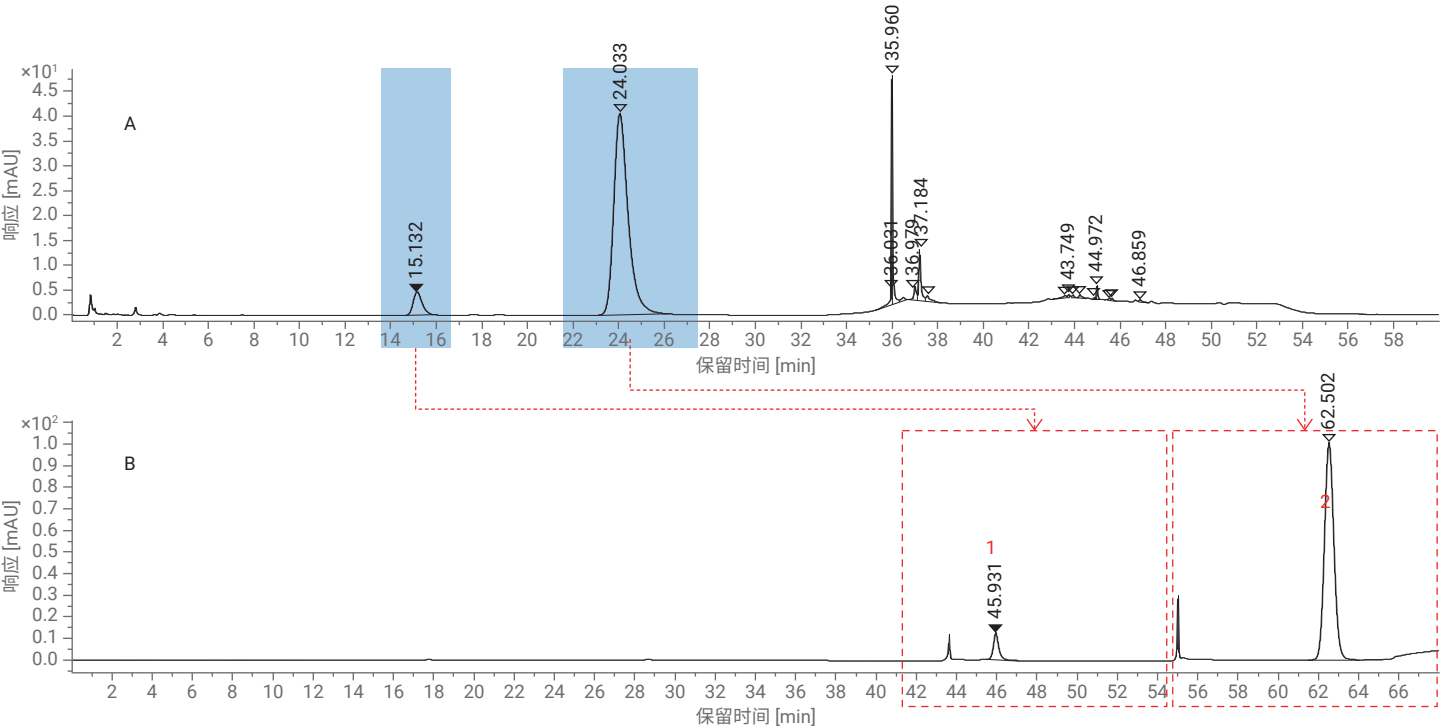


图 1. 采用正相二维液相色谱法时校正因子 f2 的对照品溶液第一维 (A) 和第二维 (B) 分离谱图 (1: 前维生素 D; 2: 维生素 D)

其中维生素 D 和前维生素 D 在第一维的分离度为 9.8，维生素 D 的理论板数为 7600，完全满足系统适用性测试要求；目标物在第二维分离的中峰对称性良好。

反相二维液相色谱法

系统适用性测试

取系统适用性样品溶液，按照上述反相二维法的色谱条件，进样分析，得到典型的色谱图如图 2 所示。

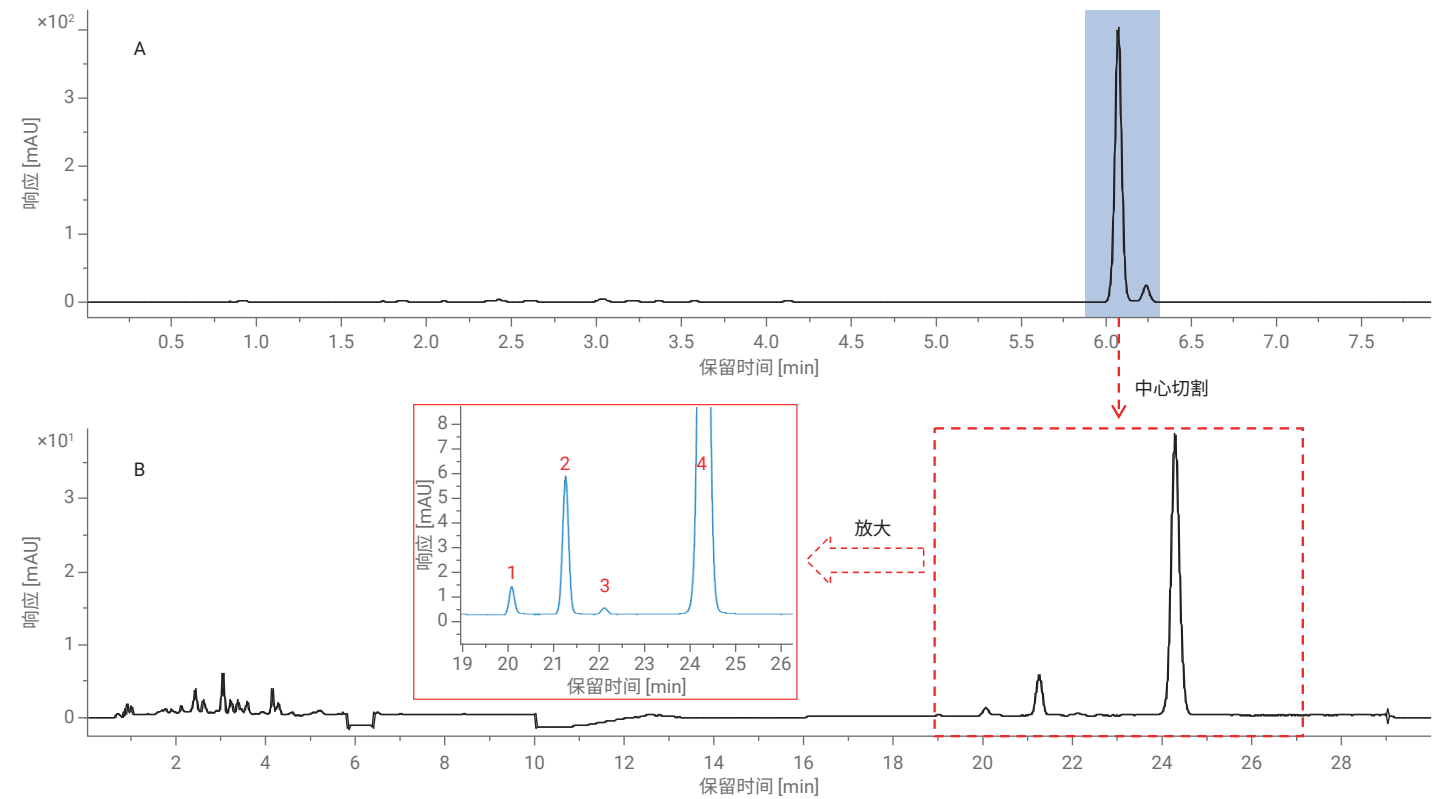


图 2. 采用反相二维液相色谱法时系统适用性溶液的第一维 (A) 和第二维 (B) 分离谱图 (1：反式维生素 D；2：前维生素 D；3：速甾醇；4：维生素 D)

按照反相二维柱切换法，系统适用性溶液的各主要光热异构体的分离度和拖尾因子等结果见表 3。

表 3. 反相二维液相色谱法下各化合物的分离性能

名称	RT (min)	不对称性 10%	USP 分离度	拖尾因子
反式-VD3	20.062	1.08	—	1.17
前-VD3	21.247	1.00	5.04	1.00
速甾醇	22.11	0.96	3.28	0.96
VD3	24.282	1.08	6.98	1.07

结果表明各光热异构体分离良好。

线性关系考察

取浓度为 50 µg/mL 的维生素 D3 对照品溶液，加甲醇逐级稀释，制成系列对照品溶液，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，考察线性相关关系，结果维生素 D3 在 1.25–50 µg/mL 范围内，线性相关系数 > 0.999，在 1.25 µg/mL 时 S/N = 26.4。

精密度试验

取 f2 的混合对照品溶液 5 份，按照反相二维分析方法（表 2）进样分析，结果前维生素 D3 和维生素 D3 峰面积的 RSD 分别为 3.7% 和 1.1%，表明方法的精密度良好。

加标回收率测试

取维生素 AD 滴剂的空白辅料基质 3 份，分别按照高、中、低三个浓度水平加入 f2 对照品溶液，按照样品溶液配制方法配制待测溶液，测定前维生素 D3 和维生素 D3 含量，并计算加标回收率。结果前维生素 D3 的回收率在 79.7%–100.1% 范围内，维生素 D3 在 97.5%–103.6% 之间，平均回收率分别为 91.4% 和 100.5%。完全满足目标物的定量要求。

实际样品测定

取维生素 AD 滴剂样品，按样品溶液的配制方法配制待测溶液，分别按照表 1 的正相二维液相方法和表 2 的反相二维液相色谱方法进行

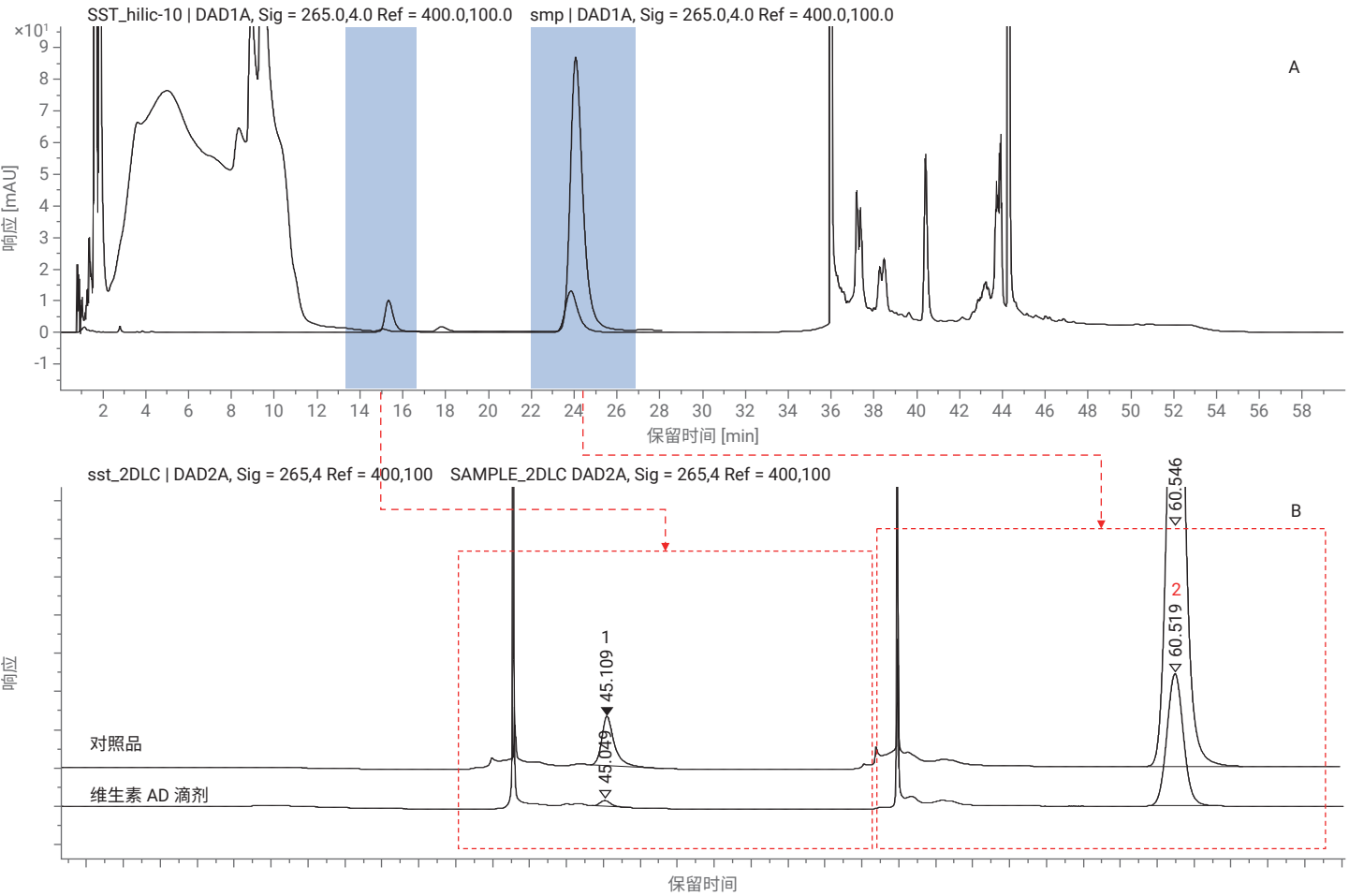


图 3. 采用正相二维柱切换法的对照品和维生素 AD 滴剂样品在第一维 (A) 和第二维 (B) 的叠加谱图 (1: 前维生素 D; 2: 维生素 D)

采用正相二维柱切换法时，由图 3A 的第一维分离谱图可以看出，虽然维生素 D 分离良好，但前维生素 D 由于含量较低，易受到前面大量基质成分的干扰，通过柱切换方式将该目标组分切至第二维进行分离，能够改善前维生素 D 分离，降低基质干扰。

在进行反相二维液相色谱分析时，考虑到样品基质含有大量油性辅料，实验首先用少量二氯甲烷溶解样品，再用异丙醇进行稀释，达到与反相流动相体系兼容的目的。同时在第一维色谱条件中加入了 MTBE 的“强洗”过程，防止强保留的脂溶性基质对第一维色谱柱造成的污染。由图 4 的第二维分离结果可以看出，样品基质不干扰目标物的分离和定量，前维生素 D 和维生素 D 分离良好。

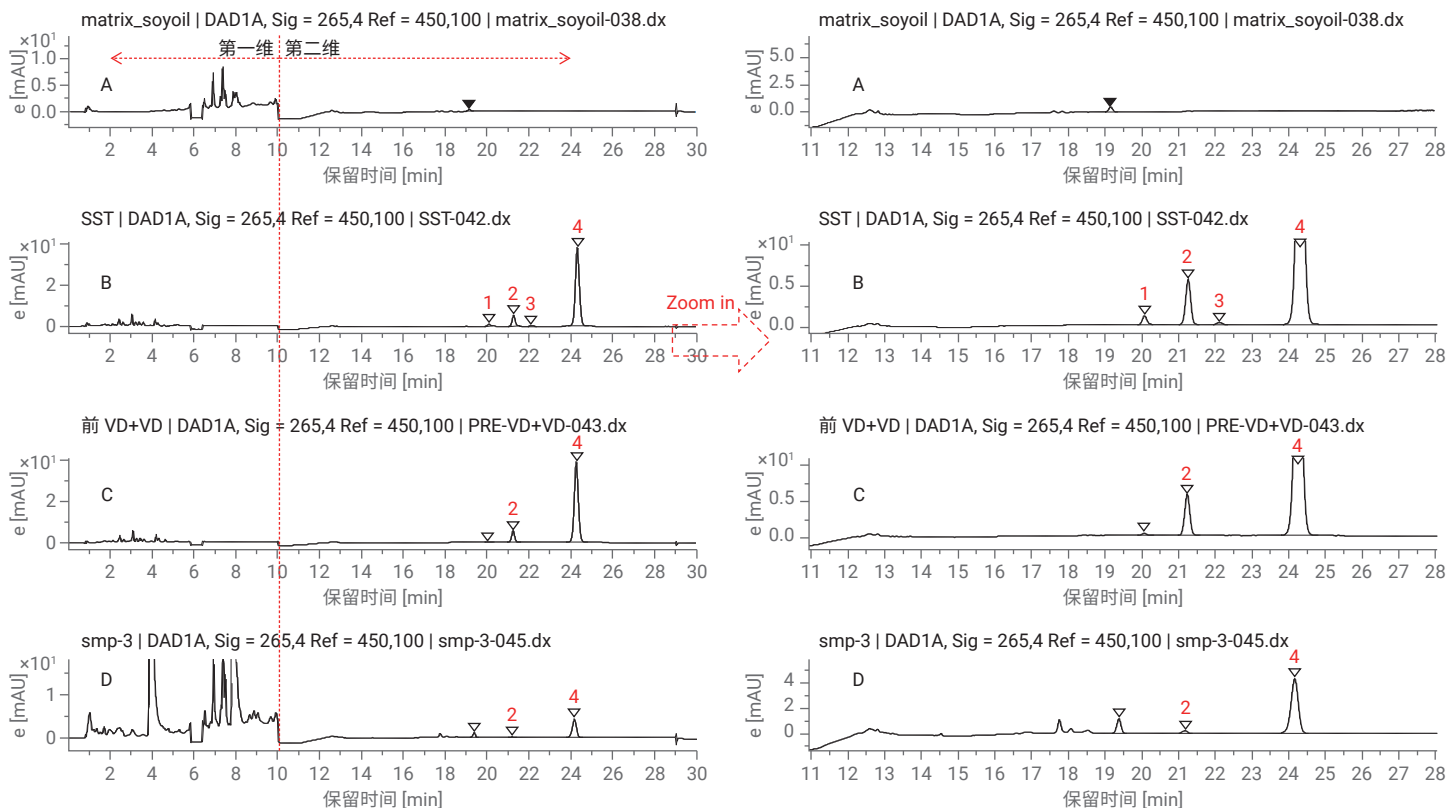


图 4. 采用反相二维液相色谱法分析空白样品基质 (A)、系统适用性测试溶液 (B)、前维生素 D 和维生素 D 混合对照品 (C) 以及实际样品 (D) 的叠加谱图 (1: 反式维生素 D; 2: 前维生素 D; 3: 速甾醇; 4: 维生素 D)

结论

本应用围绕药物维生素 AD 滴剂中维生素 D 的测定，重现了 2020 版药典四部 0722 中维生素 D 测定第四法，即在线正相二维的柱切换法，结果完全满足系统适用性要求，且在第一维的中嵌入了快速强洗过程，既压缩了整体分析时间，也保证了方法运行的稳定性。同时本文也建立了基于反相的二维液相色谱法，样品溶解后直接进样分析，维生素 D 的各光热异构体的分离优于正相色谱，且整体分析时间为 30 min，加标回收率等方法学验证结果也证实本法的可靠性。两种方法可在药物的研发、生产和质量控制中灵活采用。

参考文献

1. 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版[S]. 四部 .北京: 中国医药科技出版社, 2020:106
2. 张艳海, 张大伟, 曹莹, 等. 在线二维反相色谱法快速测定维生素 AD 制剂中维生素 A、D 的含量. 分析测试学报, 2016, 35(1): 28-34
3. 袁松, 张龙浩, 黄海伟. 二维色谱法测定维生素 AD 软胶囊和滴剂中维生素 D 的含量. 中国新药杂志, 2020, 29 (22): 2626-2631

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

Q 安捷伦视界

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021
2021 年 10 月 8 日，中国出版
5994-4220ZHCN