

SPE – HPLC 法检测维生素 D 滴剂(软胶囊)中的有关物质

解植彩¹, 杨丽娜¹, 潘寒¹, 徐庆君¹, 卢大峰¹, 李树英¹, 谢强胜^{2*}

(1. 青岛双鲸药业股份有限公司企业技术中心, 青岛 266109; 2. 山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

摘要 目的:建立固相萃取 – 高效液相色谱法(SPE – HPLC 法)快速检测维生素 D 滴剂(软胶囊)中维生素 D₃有关物质反式维生素 D₃(杂质 A)、7 – 去氢胆固醇(杂质 B)、光甾醇 3(杂质 C)、异速甾醇 3(杂质 D)。**方法:**取内容物约 1.2 g(约相当于维生素 D₃ 1 548 IU),精密称定,置于试管中,加入异辛烷 4 mL,涡旋混匀,采用固相萃取小柱进行净化,以正己烷 – 乙酸乙酯(85:15)为洗脱剂,无水乙醇为解吸剂;采用 Luna Silica(2)100 Å 硅胶柱(150 mm × 4.6 mm, 3 μm),以正己烷 – 正戊醇(996.5:3.5)为流动相,采用加校正因子主成分自身对照法计算维生素 D₃各杂质的含量。**结果:**前维生素 D₃与植物油分离度 > 1.5。维生素 D₃的线性范围为 0.02 ~ 0.80 μg · mL⁻¹, $r = 0.999 5$; 杂质 A 的线性范围为 0.02 ~ 0.80 μg · mL⁻¹, $r = 0.999 9$; 杂质 B 的线性范围为 0.02 ~ 0.80 μg · mL⁻¹, $r = 0.999 9$; 杂质 C 的线性范围为 0.02 ~ 0.80 μg · mL⁻¹, $r = 0.999 9$; 杂质 D 的线性范围为 0.02 ~ 0.80 μg · mL⁻¹, $r = 0.999 9$ 。维生素 D₃杂质 A ~ D 的平均回收率 ($n = 9$) 为 93.2% ~ 102.9%。对 3 批维生素 D 滴剂(软胶囊)样品进行检测,结果已知杂质及其他最大单个杂质含量均 ≤ 0.5%, 杂质总含量 ≤ 1.0%。**结论:**本方法经系统方法学验证,适用于维生素 D 滴剂(软胶囊)中维生素 D₃有关物质的检测,且具有操作简便、快速、准确的优势,为脂溶性维生素 D₃制剂的质量控制提供了技术保证。

关键词:固相萃取; 高效液相色谱法; 维生素 D₃有关物质; 工艺杂质; 降解杂质

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793(2024)07 – 1238 – 08

doi: 10.16155/j.0254 – 1793.2023 – 0441

Detection of related substances in vitamin D drops (soft capsules) by SPE – HPLC

XIE Zhi – cai¹, YANG Li – na¹, PAN Han¹, XU Qing – jun¹,
LU Da – feng¹, LI Shu – ying¹, XIE Qiang – sheng^{2*}

(1. Enterprise's Technical Center of Qingdao Double Whale Pharmaceutical Co., Ltd., Qingdao 266109, China;

2. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

Abstract Objective: To establish a solid – phase extraction – high performance liquid chromatography(SPE – HPLC) method for the rapid detection of related substances of vitamin D₃, *trans* vitamin D₃(impurity A), 7 – dehydrocholesterol (impurity B), lumisterol 3 (impurity C), and isotachysterol 3 (impurity D), in vitamin D drops (soft capsules). **Methods:** The content, which was approximately equivalent to vitamin D₃ 1 548 IU, was taken in about 1.2 g, weighed accurately, put into a test tube, 4 mL of isooctane was added to it, and it was swirled

* 通信作者 Tel:(0531)81216710;E – mail:xie_qsh@163.com

第一作者 Tel:18509513692;E – mail:1530914160@qq.com

and mixed well. Purification was performed using solid phase extraction columns, with *n*-hexane – ethyl acetate (85:15) as the elution agent and anhydrous ethanol as the desorption agent. A Luna Silica(2) 100 Å silica gel column(150 mm × 4.6 mm, 3 μm) was used, with *n*-hexane – *n*-pentanol (996.5:3.5) as the mobile phase. The content of vitamin D₃ impurities was calculated using the adding standard calibration factors principal component self – control method. **Results:** The separation degree between pre – vitamin D₃ and vegetable oil was greater than 1.5. The linear range of vitamin D₃ was 0.02 – 0.80 μg · mL⁻¹, with *r* = 0.999 5. The linear range of impurity A was 0.02 – 0.80 μg · mL⁻¹, with *r* = 0.999 9. The linear range of impurity B was 0.02 – 0.80 μg · mL⁻¹, with *r* = 0.999 9. The linear range of impurity C was 0.02 – 0.80 μg · mL⁻¹, with *r* = 0.999 9. The linear range of impurity D was 0.02 – 0.80 μg · mL⁻¹, with *r* = 0.999 9. The average recovery rate of impurities A – D (*n* = 9) was 93.2% – 102.9%. The detection results of 3 batches of vitamin D drops (soft capsules) showed that the content of known impurities and other maximum single impurities were less than 0.5%, and the total content of impurities was less than 1.0%. **Conclusion:** The results indicate that the established method is suitable for the detection of vitamin D₃ related substances in vitamin D drops (soft capsules). It has the advantages of being easy to operate, providing rapid and accurate results, and providing technical assurance for the quality control of fat – soluble vitamin D₃ preparations.

Keywords: solid phase extraction; high performance liquid chromatography; vitamin D₃ – related substances; process impurities; degradation impurities

维生素 D₃ 是脂溶性维生素, 作用于钙及磷的激素前体, 能促进钙、磷吸收, 具有广泛的临床应用^[1]。对于维生素 D₃ 原料药和相关制剂, 2020 年版《中华人民共和国药典》^[2]、USP 38^[3]、EP 10.0^[4] 均有收载, 有关物质的检测方法多采用正相高效液相色谱法。维生素 D₃ 有关物质, 主要是其光热转化异构体, 包括前维生素 D₃、反式维生素 D₃ (杂质 A)、7 – 去氢胆固醇 (杂质 B)、光甾醇 3 (杂质 C)、异速甾醇 3 (杂质 D) 和速甾醇 D₃ (杂质 E)^[5-6]。

目前, 我国市售维生素 D 滴剂 (软胶囊) 的规格有 400 IU · 粒⁻¹ (10 μg)、800 IU · 粒⁻¹ (20 μg), 内容物均以植物油为主, 其中维生素 D₃ 的含量约在 10⁻⁵ mg · kg⁻¹ 级别, 若直接采用高效液相色谱法测定维生素 D₃ 中的有关物质, 植物油的干扰会非常严重, 导致无法准确定量。经检索, 可知测定维生素 D₃ 有关物质多采用液液萃取的方法^[6-8]。但对于油性内容物与维生素 D₃ 有关物质, 其在液液萃取溶剂中的相似相容性, 液液萃取很难将前维生素 D₃ 与植物油有效分离, 目前尚无简便且快速测定油性内容物维生素 D₃ 有关物质的相关报道。

固相萃取 (solid phase extract, SPE) 技术利用具有吸附能力的吸附剂对样品进行萃取, 通过不同的

溶剂进行分离、纯化和浓缩来达到去除杂质、富集的效果^[9]。与传统的液液分离相比, 固相萃取具有浓缩度高, 材料简单, 耗材少等优点^[10-11]。此外, 研究表明固相萃取技术与高效液相色谱法结合能够达到更准确的定量^[12]。目前, 固相萃取 – 高效液相色谱法已被有效应用于测定大豆油^[13]、饼干^[14]、婴幼儿奶粉^[15] 中的维生素含量, 但未有相关研究将固相萃取技术直接用于维生素 D 滴剂 (软胶囊) 中维生素 D₃ 有关物质的检测。刘铁成等^[16] 通过液液萃取, 再经固相萃取柱净化、浓缩的方式, 测定了维生素 D₃ 及其有关物质, 方法可行, 但存在前处理所需时间较长, 液液萃取提取率损失等问题。因此, 固相萃取这一稳定且高效, 同时具备抗干扰能力的方法在直接测定维生素 D 滴剂 (软胶囊) 中维生素 D₃ 有关物质方面仍有较大的优化空间及研究意义。

基于目前油性介质中维生素 D₃ 有关物质检测技术现状, 本文以维生素 D₃ 及其有关物质为研究目标, 通过对前处理、方法学等进行系统研究, 建立固相萃取 – 高效液相色谱法 (SPE – HPLC 法) 快速测定维生素 D 滴剂 (软胶囊) 中维生素 D₃ 有关物质, 以为维生素 D 滴剂 (软胶囊) 的质量控制提供技

术保障,为微小规格制剂药物的质控研究提供参考。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20A 液相色谱仪(配备光电二极管阵列紫外可见光检测器,岛津公司)、VORTEX-GENIE 2 涡旋混合仪(Scientific Industries 公司)、XPR205DU 型十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)、UGC-12C 氮吹仪(北京优晟联合科技有限公司)。固相萃取小柱(Agilent Mega BE-SI, 6 mL: 1 g; Agilent NH₂ 6 mL: 200 mg; Welch BRP Silica 6 mL: 200 mg; Welchrom C₁₈ E 6 mL: 200 mg)。

对照品维生素 D₃(含量 100%),中国食品药品检定研究院;维生素 D₃杂质 A(含量 99.30%)、维生素 D₃杂质 B(含量 94.01%)、维生素 D₃杂质 C(含量 95.21%),深圳市江川医药技术有限公司;维生素 D₃杂质 D(含量 96.1%),TLC PharmaChem Inc.。维生素 D 滴剂(软胶囊)样品(400 IU·粒⁻¹,批号 2302005、2302006、2303005)由青岛双鲸药业股份有限公司提供;空白辅料(植物油,批号 220903-2-01)由辽宁新兴药业股份有限公司提供;正己烷(湖北弗顿科学技术有限公司)、正戊醇(天津市科密欧化学试剂有限公司)、乙酸乙酯(西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司)、甲醇(湖北弗顿科学技术有限公司)均为色谱级。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Luna 3 μm Silica 100 Å(150 mm × 4.6 μm, 3 μm)色谱柱,以正己烷-正戊醇(996.5:3.5)为流动相,流速 2.0 mL·min⁻¹,运行时间 50 min,柱温 30 °C,检测波长 265 nm,进样体积 100 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液

2.2.1.1 固相萃取法 取维生素 D 滴剂(软胶囊)内容物约 1.2 g(约相当于维生素 D₃ 1 548 IU),精密称定,置于试管中,加入异辛烷 4 mL,涡旋混匀,加入预先用正己烷活化的硅胶固相萃取小柱(Agilent Mega BE-SI, 6 mL: 1 g),用正己烷-乙酸乙酯(90:10) 2 mL 洗脱,常压洗脱至洗脱液不再流出时,加入无水乙醇 2 mL 解吸附,收集解吸附液,氮气吹干,加入异辛烷 1 mL 复溶,即得。

2.2.1.2 液液萃取法 取维生素 D(软胶囊)内容

物约 6 g(约相当于维生素 D₃ 7 742 IU),精密称定,置离心管中,加甲醇 20 mL,涡旋 3 min,40 kHz 超声 20 min,5 000 r·min⁻¹离心 5 min,倒出上清液,再加入甲醇 10 mL,重复提取 2 次,合并提取液,氮气吹干,加异辛烷 5 mL 复溶,即得。

2.2.2 自身对照溶液

精密移取供试品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用异辛烷稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 混合杂质对照品溶液

取维生素 D₃杂质 A、杂质 B、杂质 C 及杂质 D 的对照品各 10 mg,精密称定,置同一 100 mL 棕色量瓶中,用异辛烷溶解、定容,配制成质量浓度均为 0.1 mg·mL⁻¹混合杂质对照品储备液,-20 °C 避光保存。精密量取混合杂质对照品储备液 1 mL 置 25 mL 量瓶中,用异辛烷稀释定容至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 维生素 D₃对照品储备液

精密称取维生素 D₃的对照品 25 mg,置 100 mL 棕色量瓶中,加异辛烷 80 mL,避免加热,40 kHz 超声处理 1 min 使完全溶解,用异辛烷稀释至刻度,摇匀,即得。储备液充氮密塞,避光,0 °C 以下保存。

2.2.5 系统适用性溶液

量取“2.2.4”项下维生素 D₃对照品储备液 5 mL,置具塞玻璃容器中,通氮后密塞,置 90 °C 水浴中加热 1 h,取出,迅速冷却,加正己烷 5 mL,摇匀,置 1 cm 具塞石英吸收池中,在 2 支 8 W 主波长分别为 254 nm 和 365 nm 的紫外光灯下,将石英吸收池斜放成 45°,并距灯管 5~6 cm,照射 5 min,使溶液中含有前维生素 D₃、杂质 A、维生素 D₃和杂质 E,作为系统适用性溶液^[17],-20 °C 避光保存。

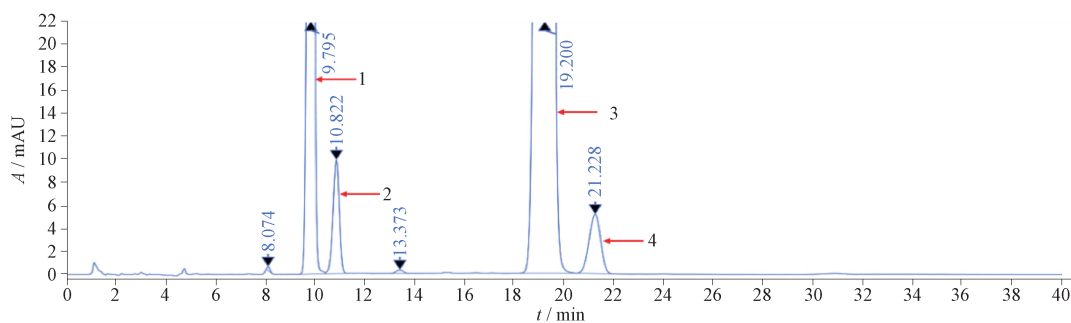
2.3 方法学验证

2.3.1 系统适用性试验

精密吸取“2.2.5”项下系统适用性溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,结果显示,前维生素 D₃峰与杂质 A 峰分离度 2.71,维生素 D₃峰与杂质 E 峰分离度 2.59(图 1)。

2.3.2 专属性

2.3.2.1 加标供试品溶液 取维生素 D 滴剂(软胶囊)内容物约 1.2 g(约相当于维生素 D₃ 1 548 IU),精密称定,置于试管中,加入“2.2.3”项下混合杂质对照品溶液 48 μL 及异辛烷 4 mL,涡旋混匀,加入预先用正己烷活化的硅胶固相萃取小柱,剩余操作



1. 前维生素 D₃ (pre - vitamin D₃) 2. 杂质 A (impurity A) 3. 维生素 D₃ (vitamin D₃) 4. 杂质 E (impurity E)

图 1 系统适用性试验色谱图

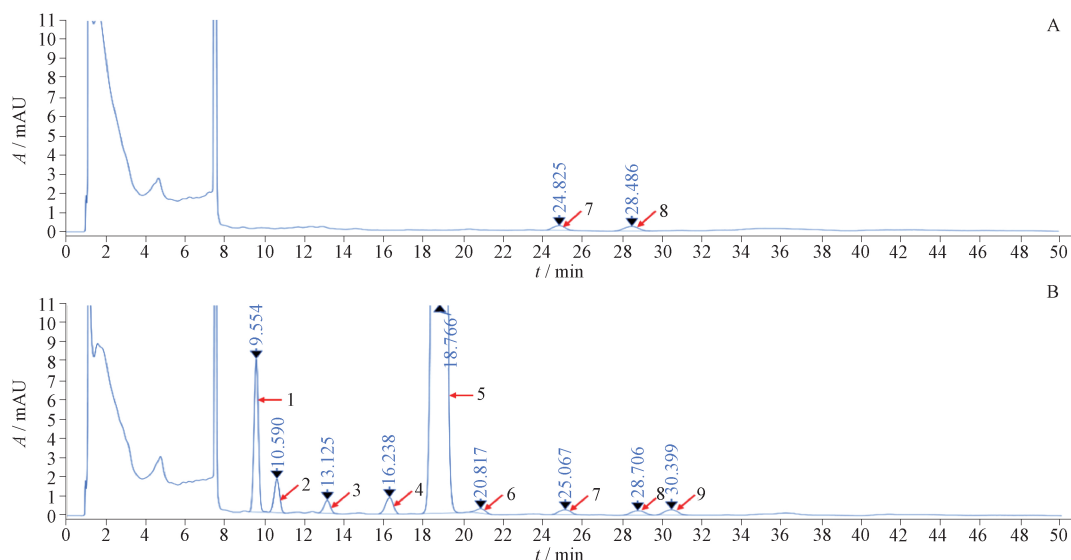
Fig. 1 System suitability test chromatogram

同“2.2.1.1”项下固相萃取法,制备加标供试品溶液。

2.3.2.2 空白辅料溶液 取适量空白辅料,按“2.2.1.1”项下固相萃取法制备空白辅料溶液。

2.3.2.3 专属性试验 分别精密吸取加标供试品

溶液及空白辅料溶液各 100 μL ,按“2.1”色谱条件进行测定,结果见图 2。专属性结果表明,空白辅料溶液在各杂质保留时间范围内均未出峰,且植物油色谱峰未产生干扰,专属性良好。



1. 前维生素 D₃ (pre - vitamin D₃) 2. 杂质 A (impurity A) 3. 杂质 C (impurity C) 4. 杂质 D (impurity D) 5. 维生素 D₃ (vitamin D₃) 6. 杂质 E (impurity E) 7. 植物油 (plant oil) 8. 植物油 (plant oil) 9. 杂质 B (impurity B)

A. 空白辅料溶液 (blank excipient solution) B. 加标供试品溶液 (add standard test solution)

图 2 专属性试验色谱图

Fig. 2 Specificity test chromatograms

2.3.3 线性关系考察及定量限测定

分别精密量取“2.2.4”项下维生素 D₃ 对照品储备液适量,采取逐级稀释的方法,用异辛烷配制含有维生素 D₃ 对照品质量浓度为 0.02、0.04、0.20、0.40、0.80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液;分别精密量取“2.2.3”项下混合杂质对照品溶液适量,采取逐级稀释的方法,用异辛烷配制混合对照品质量浓度为 0.02、0.04、0.20、0.40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。精密吸

取上述不同浓度的溶液各 100 μL ,分别注入高效液相色谱仪,进行分析;结果表明,维生素 D₃ 在 0.02 ~ 0.80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,杂质 A、B、C、D 在 0.02 ~ 0.80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好;当信噪比 (S/N) 为 10:1 时的浓度为最低定量限浓度;参考文献中标准曲线法^[18],以维生素 D₃ 与各杂质线性方程的斜率之比,计算各杂质的相对校正因子,即 $f = K_{\text{维生素D}_3} / K_{\text{杂质}}$,详见表 1。

表 1 方法的线性回归方程、相关系数及定量限

Tab. 1 Linear regressions equation, linearity range, *r* and quantitative limit of the method

化合物名称 (compound name)	线性方程 (regression equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range)/(μg · mL ⁻¹)	定量限 (quantitation limit)/(μg · mL ⁻¹)	<i>f</i>
维生素 D ₃ (vitamin D ₃)	$Y = 159.4460X - 0.7531$	0.9995	0.02 ~ 0.80	0.003782	1.00
杂质 A (impurity A)	$Y = 176.7379X + 0.03810$	0.9999	0.02 ~ 0.80	0.003932	0.90
杂质 B (impurity B)	$Y = 69.4141X + 0.2394$	0.9999	0.02 ~ 0.80	0.027640	2.30
杂质 C (impurity C)	$Y = 60.2775X + 0.2060$	0.9999	0.02 ~ 0.80	0.016820	2.65
杂质 D (impurity D)	$Y = 104.6565X + 0.1802$	0.9999	0.02 ~ 0.80	0.009773	1.52

2.3.4 准确度

称取 9 份已测知杂质量 (杂质 A 约为 0.05%, 杂质 B ~ D 均未检出) 的样品 (批号 2303005) 约 1.2 g (约相当于维生素 D₃ 1 548 IU), 精密称定, 置试管中, 分别加入“2.2.3”项下混合杂质对照品溶液 10、48、58 μL 各 3 份, 加入异辛烷 4 mL, 涡旋混匀, 加入预先用正己烷活化

的硅胶固相萃取小柱, 剩余操作同“2.2.1.1”项下固相萃取法, 即得低、中、高 3 个浓度的回收率加标溶液, 按“2.1”色谱条件进行分析, 按加校正因子的 1% 主成分自身对照法计算各杂质回收率, 结果见表 2, 维生素 D₃ 各杂质在不同浓度的回收率为 93.2% ~ 102.9%, RSD < 10%, 结果表明该方法的准确度良好。

表 2 不同浓度下各杂质回收率

Tab. 2 Recovery rates of impurities at different concentrations

化合物名称 (compound name)	样品含有量 (content)/μg	加入量 (added)/μg	测得值 (measurement)/μg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (mean recovery)/%	RSD/ %
杂质 A (impurity A)	0.01644	0.03932	0.04990	85.1	97.3	8.2
	0.01644	0.03932	0.04963	84.4		
	0.01644	0.03932	0.05485	97.7		
	0.01644	0.19661	0.21138	99.2		
	0.01644	0.19661	0.22970	108.5		
	0.01644	0.19661	0.20458	95.7		
	0.01644	0.23594	0.25612	101.6		
	0.01644	0.23594	0.25370	100.6		
	0.01644	0.23594	0.26047	103.4		
杂质 B (impurity B)	0	0.03948	0.04239	107.4	102.9	3.6
	0	0.03948	0.04031	102.1		
	0	0.03948	0.04121	104.4		
	0	0.19742	0.21057	106.7		
	0	0.19742	0.19910	100.9		
	0	0.19742	0.20110	101.9		
	0	0.23691	0.23006	97.1		
	0	0.23691	0.25270	106.7		
	0	0.23691	0.23400	98.8		
杂质 C (impurity C)	0	0.03957	0.03197	80.8	96.7	9.6
	0	0.03957	0.03195	80.7		
	0	0.03957	0.04022	101.6		
	0	0.19785	0.20120	101.7		
	0	0.19785	0.19090	96.5		

表 2(续)

化合物名称 (compound name)	样品含量 (content)/μg	加入量 (added)/μg	测得值 (measurement)/μg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (mean recovery)/%	RSD/ %
杂质 D(impurity D)	0	0.197 85	0.203 20	102.7		
	0	0.237 42	0.241 40	101.7		
	0	0.237 42	0.239 70	101.0		
	0	0.237 42	0.246 10	103.7		
	0	0.039 09	0.038 76	99.2	93.2	3.6
	0	0.039 09	0.035 26	90.2		
	0	0.039 09	0.035 15	89.9		
	0	0.195 46	0.177 66	90.9		
	0	0.195 46	0.179 70	91.9		
	0	0.195 46	0.179 20	91.7		
	0	0.234 55	0.218 82	93.3		
	0	0.234 55	0.230 32	98.2		
	0	0.234 55	0.220 65	94.1		

2.6 样品的测定

取 3 批样品,分别按“2.2.1.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.2”项下方法制备自身对照溶液。精密量取上述溶液各 100 μL,注入液相色谱仪。供试品溶液色谱图中若有与杂质 A、杂质 B、杂质 C 及杂质 D 保留时间一致的色谱峰,按加校正因子的主成分自身对照法计算,各杂质含量均不得大于 0.5%,其他单个未知杂质含量不得大于 0.5%,总杂质含量不得大于 1.0%。结果见表 3。

表 3 有关物质的测定结果

Tab. 3 Results of related substances

化合物名称 (compound name)	含量(content)/%		
	lot No. 2302005	lot No. 2302006	lot No. 2303005
杂质 A(impurity A)	0.08	0.08	0.05
杂质 B(impurity B)	ND	ND	ND
杂质 C(impurity C)	ND	ND	ND
杂质 D(impurity D)	ND	ND	ND
未知杂质(unknown impurities)	ND	ND	ND
总杂(total impurities)	0.08	0.08	0.05

注(note):ND. 未检出(not detected)

3 讨论

3.1 固相萃取小柱选择

选择 Welch BRP、Welchrom C₁₈E、Agilent NH₂ 及 Agilent Mega BE-SI 共 4 种固相萃取小柱进行同一

浓度的供试品溶液上样分析,以维生素 D₃ 峰面积响应值为考察指标,结果显示,使用 Welchrom C₁₈E 固相萃取小柱时,维生素 D₃ 峰面积为 339.540,峰面积响应差;采用 NH₂ 固相萃取小柱及 Welch BRP 萃取小柱,维生素 D₃ 峰面积响应分别为 154.222 及 302.505,这与王尚等^[6]报道的一致,主要是维生素 D₃ 为甾醇类化合物,极性很弱,其在氰基(-CN)、氨基(-NH₂)等极性固定相上的保留较弱所导致,而在 Mega BE-SI 固相萃取小柱条件下,维生素 D₃ 峰面积 4 099.731 峰面积响应良好。因此,试验选择采用 Mega BE-SI 固相萃取小柱。

3.2 洗脱剂选择

参考文献报道^[19-21],分别对洗脱剂的种类及比例进行筛选,以同浓度对应维生素 D₃ 色谱峰峰面积以及响应峰面积与维生素 D₃ 对照品直接进样峰面积比值计算提取率;结果以甲醇、正己烷、乙酸乙酯、乙酸乙酯-甲醇(90:10)、乙酸乙酯-正己烷(10:90)为洗脱剂时,维生素 D₃ 峰面积响应分别为 2 326.7、278.8、3 374.4、854.5 及 4 294.5,提取率分别为 48.59%、49.68%、70.48%、17.85%、89.69%;各洗脱条件下植物油与前维生素 D 均可有效分离,且以乙酸乙酯-正己烷为洗脱剂时,回收率良好;进一步对乙酸乙酯-正己烷的比例进行筛选,结果显示,以乙酸乙酯-正己烷(15:85)提取率较好,因此,选择乙酸乙酯-正己烷(15:85)作为洗脱剂(图 3)。

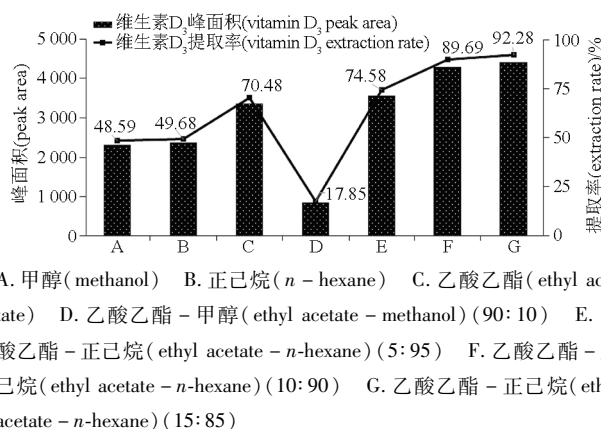


图3 不同洗脱剂试验结果

Fig. 3 Experimental results of different eluents

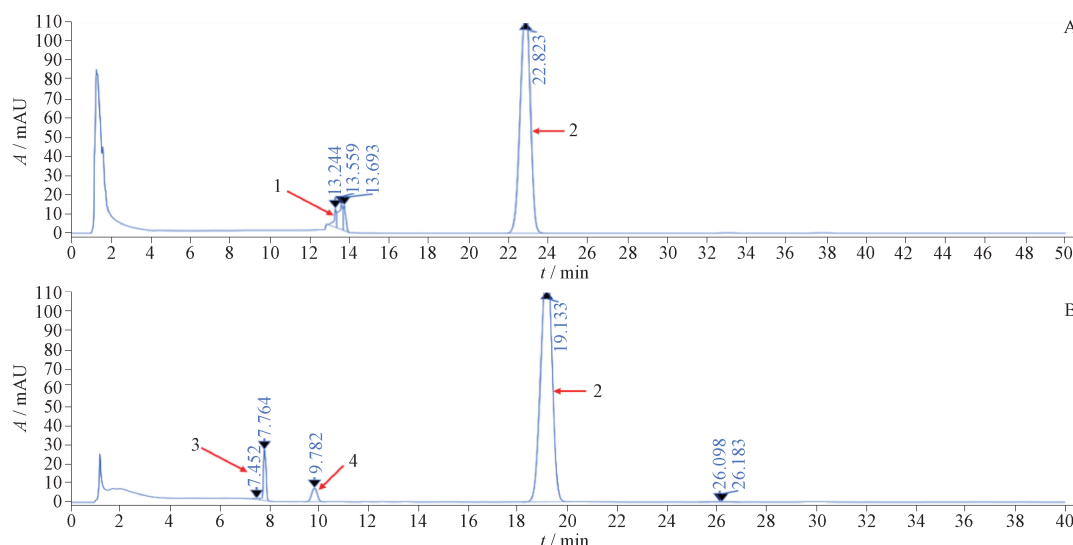
3.3 解吸剂选择

分别以无水乙醇、甲醇及不同比例的正己

烷-乙酸乙酯为解吸剂,以异辛烷为复溶剂,考察相同浓度下加标供试品溶液中维生素 D₃ 提取率及各杂质与植物油分离情况。结果表明,以正己烷-乙酸乙酯(50:50、80:20 及 70:30)解吸时,植物油干扰杂质 B 且提取率低;以正己烷-乙酸乙酯(60:40)、甲醇及无水乙醇解吸时,植物油对各色谱峰均未产生干扰,维生素 D₃ 提取率分别为 91.96%、93.54% 及 99.61%,综合比较,选择无水乙醇为解吸剂。

3.4 固相萃取与液液萃取的比较

为得到最优的提取方法,配制同浓度的供试品溶液进行分析,具体配制方法见“2.2.1.1”项及“2.2.1.2”项。结果显示(图4),相同浓度下,采用液液萃取,前维生素 D₃ 与植物油无法有效分离,而采用固相萃取,前处理后可达到有效分离,且峰形良好。



1. 植物油 + 前维生素 D₃ (plant oil and pre-vitamin D₃) 2. 维生素 D₃ (vitamin D₃) 3. 植物油 (plant oil) 4. 前维生素 D₃ (pre-vitamin D₃)

图4 液液萃取(A)与固相萃取(B)对比色谱图

Fig. 4 Chromatograms of liquid-liquid extraction(A) compared with solid-phase extraction(B)

3.5 结论

本文建立了 SPE-HPLC 法检测维生素 D 滴剂(软胶囊)中有关物质,通过改变选择萃取柱类型、淋洗和洗脱条件等影响维生素 D₃ 响应值及提取率的因素,筛选出固相萃取小柱提取分离的最佳条件,并采用高效液相色谱法检测。这一方法专属性强,灵敏度高,可有效避免反复溶剂提取、冷冻、超声等样品前处理步骤,减少了实验人员带来的误差,节约样品处理、分析时间,能够满足国内外法规中对维生素 D

滴剂(软胶囊)有关物质检测的限度要求。

参考文献

[1] 周璟明, 许福春, 陈秀明, 等. 高效液相色谱-串联三重四级杆质谱法测定维生素 D/AD 滴剂(软胶囊)中维生素 D₃ 的含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(5): 780
 ZHOU JM, XU FC, CHEN XM, et al. Determination of vitamin D₃ in vitamin D/AD drops (soft capsules) by high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(5): 780

- [2] 中华人民共和国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020: 1485
ChP 2020. Vol II [S]. 2020: 1485
- [3] USP 34 - NF 29[S]. 2021: 2324
- [4] EP 10.0[S]. 2013:2195
- [5] 胡屹森. 维生素 D₃ 相关杂质制备及其相对校正因子测定 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019
HU YM. Preparation and Relative Correction Factors Study of Vitamin D₃ Impurities [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019
- [6] 王尚, 郑枫, 丁黎. RP - HPLC 法测定维生素 D₃ 制剂中的有关物质[J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(1): 55
WANG S, ZHENG F, DING L. Determination of related substances of vitamin D₃ in its preparations by RP - HPLC [J]. J China Pharm Univ, 2012, 43(1): 55
- [7] 张俊林, 邱科先. HPLC 法测定维生素 D₃ 粉中有关物质[J]. 广东化工, 2021, 48(14): 229
ZHANG JL, QIU KX. Determination of related substances in vitamin D₃ powder by HPLC [J]. Guangdong Chem Ind, 2021, 48(14): 229
- [8] 李梦瀚, 丁雪梅, 梁建英. 反相高效液相色谱(RP - HPLC)系统分析维生素 D₃ 软胶囊(油性基质)[J]. 复旦学报: 医学版, 2019, 46(1): 23
LI MH, DING XM, LIANG JY. Reverse phase high - performance liquid chromatography (RP - HPLC) system for analysis of vitamin D₃ soft capsules with soybean oil matrix [J]. Fudan Univ J Med Sci, 2019, 46(1): 23
- [9] 洪雷洁, 石璐, 张亚雷, 等. 固相萃取 - 高效液相色谱法同时测定水体中的 10 种磺胺类抗生素[J]. 环境科学, 2012, 33(2): 652
HONG LJ, SHI L, ZHANG YL, *et al.* Simultaneous determination of 10 sulfonamide antibiotics in water by solid - phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. Environ Sci, 2012, 33(2): 652
- [10] 戚欣, 汪雪芳, 喻理, 等. 基于固相萃取的粮油产品前处理技术研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2022, 44(4): 718
QI X, WANG XF, YU L, *et al.* Solid phase extraction based on sample preparation for grain, oilseed and their products [J]. Chin J Oil Crops Sci, 2022, 44(4): 718
- [11] 康凯, 卢俊彪, 范国梁. 固相微萃取的发展近况[J]. 化学研究与应用, 2002, 14(4): 371
KANG K, LU JB, FAN GL. Advances of solid phase microextraction [J]. Chem Res Appl, 2002, 14(4): 371
- [12] 闫建康. HLB 固相萃取 - 高效液相色谱法测定婴幼儿奶粉中对羟基苯甲酸酯类的研究[J]. 绿色科技, 2013, 15(12): 257
YAN JK. Determination of *p* - hydroxybenzoates in infant milk powder by using HLB solid - phase extraction - high performance liquid chromatography [J]. J Green Sci Technol, 2013, 15(12): 257
- [13] 徐超, 周波, 王晓红. 固相萃取 - 高效液相色谱法测定大豆油中维生素 K₁ 含量[J]. 农业科技与装备, 2016(1): 53
XU C, ZHOU B, WANG XH. Determination of vitamin K₁ content in soybean oil by solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. Agric Sci Technol Equip, 2016(1): 53
- [14] 孙璐璐, 朱帅, 陈彦会, 等. 固相萃取 - 高效液相色谱法测定饼干中的维生素 B₁₂ [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(15): 5081
SUN LL, ZHU S, CHEN YH, *et al.* Determination of vitamin B₁₂ in biscuit by solid phase extraction - high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(15): 5081
- [15] 黄旭, 刘家阳. 固相萃取 - 高效液相色谱法测定婴幼儿配方粉中维生素 A 和维生素 E 的含量[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(1): 38
HUANG X, LIU JY. Determination of vitamin A and vitamin E in infant formula powder by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. Chin J Food Hyg, 2018, 30(1): 38
- [16] 刘铁成, 姜海涛, 杨蕾, 等. 一种维生素 D₃ 滴剂中维生素 D₃ 有关物质的检测方法: 中国, N115308338A [P]. 2022 - 11 - 08
LIU TC, JIANG HT, YANG L, *et al.* A Detection Method for Vitamin D₃ Related Substances in Vitamin D₃ Drops; China, N115308338A [P]. 2022 - 11 - 08
- [17] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 105
ChP 2020. Vol IV [S]. 2020: 105
- [18] 肖亭, 王晨, 姚尚辰, 等. HPLC 校正因子法在药物分析中的应用[J]. 药学报, 2020, 55(12): 2854
XIAO T, WANG C, YAO SC, *et al.* Application of an HPLC correction factor method in pharmaceutical analysis [J]. Acta Pharm Sin, 2020, 55(12): 2854
- [19] 刘莹, 刘丽兰, 王艳超, 等. 固相萃取 - 在线二维快速同时测定食品中维生素 A、D 和 4 种维生素 E 异构体的含量[J]. 中国标准化, 2019(18): 175
LIU Y, LIU LL, WANG YC, *et al.* Solid phase extraction - online two - dimensional rapid simultaneous determination of vitamin A, D, and four vitamin E isomers in food [J]. China Standard, 2019(18): 175
- [20] 李少华, 申书昌, 戴建华. 正相固相萃取柱的制备及汉麻中 CBD, CBN 和 THC 的测定[J]. 齐齐哈尔大学学报(自然科学版), 2020, 36(6): 13
LI SH, SHEN SC, DAI JH. Preparation of normal phase solid phase extraction and determination of CBD, CBN and THC in hemp [J]. J Qiqihar Univ (Nat Sci Ed), 2020, 36(6): 13
- [21] SONG H, WANG X, HOU S, *et al.* Economical irregular silica as an effective dispersive solid - phase extraction sorbent for the quantification of calcitriol in soft capsules [J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 5(203): 114227

(本文于 2024 年 6 月 14 日修改回)