

固相萃取 - HPLC 法测定艾地骨化醇软胶囊中有关物质*

李洁, 王清亭, 张丽敏, 张佳鸿, 刘振飞, 陈阳生**

(正大制药(青岛)有限公司, 青岛 266000)

摘要 目的: 建立一种氨基固相萃取 - HPLC 法测定艾地骨化醇软胶囊中 3 个同分异构体的有关物质。**方法:** 采用氨基固相萃取法, 经乙酸乙酯 - 正己烷洗脱, 无水乙醇提取, 提取液经减压蒸干后用乙腈复溶, 经 ODS 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)分析, 以水 - 乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 进样量为 50 μL, 采用紫外检测器, 在检测波长 265 nm 处检测有关物质。**结果:** 固相萃取前处理可有效去除空白油干扰, 艾地骨化醇与各杂质均可基线分离; 在低温 4 °C 条件下考察溶液稳定性, 24 h 时供试品溶液中各杂质面积百分比为 98.6%~102.3%; 杂质对照品溶液中, 24 h 时 Tachy 杂质、前体、艾地骨化醇和 Trans 杂质的面积百分比分别为 101.2%、96.9%、98.5% 和 96.2%; 艾地骨化醇、trans 杂质、前体和 tachy 杂质的定量限分别为 0.107、0.102、0.128、0.063 μg · mL⁻¹, 检测限分别为 0.054、0.051、0.064、0.031 μg · mL⁻¹; 四者质量浓度分别在 0.1~6.3 μg · mL⁻¹、0.1~1.2 μg · mL⁻¹、0.1~5.6 μg · mL⁻¹ 和 0.1~1.1 μg · mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好线性关系, 相关系数(*n* = 5) 分别为 0.999 9、1.000、1.000 和 0.999 4; tachy 杂质、前体和 trans 杂质回收率(*n* = 6) 分别为 106.6%、88.6% 和 102.8%, RSD(*n* = 6) 分别为 6.7%、3.1% 和 2.1%。3 批样品含前体 5.0%、5.0% 和 5.1%, 杂质 tachy、杂质 Trans 和未知单杂均未检出。**结论:** 该方法操作简单, 经济实用, 安全性高, 专属性强, 重复性好, 准确度高, 为艾地骨化醇软胶囊及类似油性基质的药物质量研究提供可靠依据。

关键词: 固相萃取; 艾地骨化醇软胶囊; 油性基质; 活性维生素 D; 同分异构体; 有关物质

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)06 - 1009 - 08

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024.06.11

Determination of related substances in eldecalcitol soft capsules by solid phase extraction - HPLC*

LI Jie, WANG Qing - ting, ZHANG Li - min,
ZHANG Jia - hong, LIU Zhen - fei, CHEN Yang - sheng**

(CP Pharmaceutical Qingdao Co., Ltd., Qingdao 266000, China)

Abstract Objective: To establish an amino solid - phase extraction - HPLC method for the determination of three related substances in eldecalcitol soft capsules. **Methods:** The eldecalcitol soft capsules were extracted by an amino solid - phase extraction method, followed by eluting with ethyl acetate: *n* - hexane and anhydrous ethanol. The residue was then dissolved with acetonitrile and water after vacuum evaporation. An ODS column

* 泰山产业领军人才工程资助(tsex202211121)

** 通信作者 Tel: 18766396996; E - mail: chenys@cppqd.com

第一作者 Tel: 13780605706; E - mail: lijie@cppqd.com

(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. Water – acetonitrile with gradient elution was employed. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the injection volume was 50 μL, and the detection wavelength was set at 265 nm.

Results: Interference from blank excipients was eliminated with pretreatment. Baseline separation and good selectivity of eldecalcitol and other impurities was achieved. The stability of the test and reference solution was investigated at 4 °C. The area change percentage of the impurities in the test solution were 98.6% – 102.3% at 24 h. The area change percentage of the impurities in the reference solution were 101.2%, 96.9%, 98.5% and 96.2% at 24 h, respectively. The quantitation limits of eldecalcitol, trans impurity, pre – eldecalcitol and tachy impurity were 0.107 μg · mL⁻¹, 0.102 μg · mL⁻¹, 0.128 μg · mL⁻¹ and 0.063 μg · mL⁻¹, respectively. The detection limits were 0.054 μg · mL⁻¹, 0.051 μg · mL⁻¹, 0.064 μg · mL⁻¹, 0.031 μg · mL⁻¹, respectively. The linear ranges of 4 components were 0.1 – 6.3 μg · mL⁻¹, 0.1 – 1.2 μg · mL⁻¹, 0.1 – 5.6 μg · mL⁻¹ and 0.1 – 1.1 μg · mL⁻¹, respectively. The correlation coefficients ($n = 5$) were 0.999 9, 1.000, 1.000 and 0.999 4, respectively. The average recoveries ($n = 6$) of tachy impurity, pre – eldecalcitol and trans impurity were 106.6%, 88.6% and 102.8% with RSDs of 6.7%, 3.1% and 2.1%, respectively. In the three batches of samples, no impurities were detected except pre – eldecalcitol. The contents of pre – eldecalcitol were 5.0%, 5.0% and 5.1%, respectively. **Conclusion:** The method is simple to operate, economical and practical with high safety, strong specificity, good repeatability and high accuracy. The method provides a reliable basis for the study of drug quality such as eldecalcitol soft capsules and drugs with similar oily substrate.

Keywords: solid – phase extraction; eldecalcitol soft capsules; oily substrate; activated vitamin D; structural isomer; related substances

代谢性骨病是继糖尿病和甲状腺疾病之后的第三大类内分泌代谢疾病。维生素 D 活性代谢物是一类具有生物活性的脂溶性类固醇衍生物,在体内发挥广泛的药理活性,包括调节钙磷平衡、骨重建、肠道和肾脏钙的吸收等作用^[1],临床上对骨质疏松症疗效显著。艾地骨化醇 (eldecalcitol) 是一种新型活性维生素 D 衍生物^[2-3],由日本中外制药株式会社与大正制药株式会社联合开发,于 2001 年 1 月在日本上市,用于治疗骨质疏松症,疗效优于阿法骨化醇,显示出广阔的使用前景。

艾地骨化醇分子式为 C₃₀H₅₀O₅,化学名为(1*R*,2*R*,3*R*,5*Z*,7*E*)-2-(3-羟基丙氧基)-9,10-开环胆甾-5,7,10(19)-三烯-1,3,25-三醇,结构式见图 1。与骨化三醇相比,艾地骨化醇在 2β 位引入 3-羟基丙氧基,使其与维生素 D 结合蛋白的亲合力更强,更难被 24-羟化酶降解^[4]。艾地骨化醇具有抑制骨吸收的作用^[5-6],促进骨微塑建的效力也大大高于骨化三醇。此外,在促进肠道钙吸收方面,艾地骨化醇也优于阿法骨化醇^[7-11]。

目前《中华人民共和国药典》、美国药典、欧洲药典、日本药局方等均未收载艾地骨化醇及其

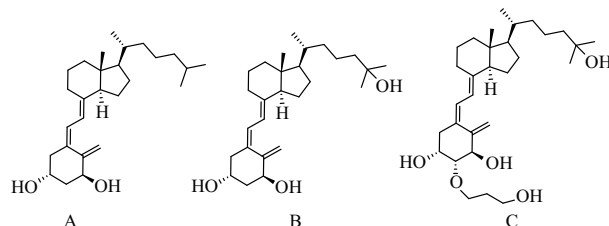


图 1 阿法骨化醇(A)、骨化三醇(B)及艾地骨化醇(C)的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of alfacalcidol(A), calcitriol(B), and eldecalcitol(C)

相关制剂的质量控制方法,相关文献报道也很少。Wang 等^[12-13]报道,骨化三醇性质不稳定,光照和高温都会引起异构化,甚至产生降解的杂质,降低其功效,故将骨化三醇溶解在合适的脂溶性基质(如中链甘油三酯)中制备成软胶囊,保证骨化三醇稳定性,提高生物利用度。

据此,艾地骨化醇溶解于脂溶性基质制备的软胶囊中,主成分浓度极低(约占 0.000 5%),而中链甘油三酯(辅料)占比极高,基质干扰显著,不仅影响了主成分浓度测定,更是大大影响了艾地骨化醇软胶囊的有关物质检查。因此,探索高效去除油性基

质的样品前处理方法对于产品的质控至关重要。

本文采用氨基固相萃取法去除艾地骨化醇软胶囊基质干扰,并对萃取液进行浓缩,提高进样浓度后,采用反相液相色谱法进行艾地骨化醇软胶囊有关物质的测定,并进行方法验证。结果表明,此方法可有效去除基质干扰,灵敏度和准确度符合要求,研究结果为艾地骨化醇软胶囊及类似基质的药物质量研究提供了可靠依据。

艾地骨化醇与前体、tachy 杂质(图 2)互为可逆异构体,2 对异构体均对温度敏感,故在验证时,采用临用前合成并标定的方法确定杂质纯度。且为避免杂质间互转造成干扰,对方法验证中的溶液稳定性、灵敏度、线性与范围和准确度验证进行了分组验证。

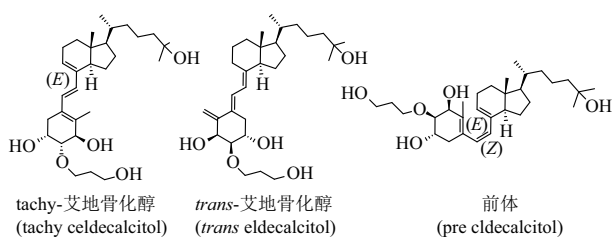


图 2 艾地骨化醇杂质的化学结构式

Fig. 2 Chemical structures of the eldecalcitol impurities

1 仪器与试药

高效液相色谱仪(紫外检测器,岛津公司), YMC-Pack ODS-AM 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); LUX-12 水浴锅(北京陆希科技有限公司), PMK224ZH 型万分之一电子天平(OHAUS 公司), N-1210BV-W 旋转蒸发仪(Heidolph 公司), 100 mg · mL⁻¹氨基固相萃取小柱、100 mg · mL⁻¹C₁₈ 固相萃取小柱、100 mg · mL⁻¹Silica 固相萃取小柱(Welchrom 公司)。乙腈、无水乙醇、乙酸乙酯和正己烷等试剂均为色谱纯,屈臣氏纯化水。

艾地骨化醇对照品(正大制药(青岛)有限公司,批号 QCL-20210802,含量 99.7%),艾地骨化醇软胶囊样品(正大制药(青岛)有限公司,批号 2212281、2212291、2212301,规格 0.75 μg · 粒⁻¹),艾地骨化醇前体(深圳远扬医药科技有限公司,批号 27-JUN-2229,含量 90.58%),trans 杂质(深圳远扬医药科技有限公司,批号 29-JUN-2229,含量 97.80%),tachy 杂质(甘肃皓天医药科技有限责任公司,批号 HT018-45-14-2206001,含量

89.6%),中链甘油三酯(湖北葛店人福药用辅料有限责任公司,批号 F347C230401)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液 取艾地骨化醇软胶囊内容物适量(约相当于艾地骨化醇 12 μg),置 10 mL 量瓶中,用乙酸乙酯-正己烷(1:10)溶解并稀释至刻度,摇匀,将所得溶液缓慢通过氨基固相萃取小柱[Welchrom® NH₂, 100 mg · mL⁻¹或其他相当产品,预先用无水乙醇 5 mL 清洗,再用乙酸乙酯-正己烷(1:10)清洗 2 次,每次 5 mL],待液面近干时,用乙酸乙酯-正己烷(1:10)25~30 mL 洗脱,弃去洗脱液,继续用无水乙醇 2 mL 洗脱,收集洗脱液,30 °C 水浴减压蒸干,残留物加乙腈 0.1 mL 超声(功率 500 W,频率 40 kHz)使溶解,再加水 0.1 mL,超声混合均匀(所有试验均避光操作)。

2.1.2 空白辅料溶液 取中链甘油三酯约 1.6 g,置 10 mL 量瓶中,加乙酸乙酯-正己烷(1:10)溶解并稀释至刻度,摇匀,照“2.1.1”项下自“将所得溶液缓慢通过氨基固相萃取小柱……”处理。

2.1.3 系统适用性溶液 取艾地骨化醇对照品适量,用乙腈溶解并稀释成每 1 mL 中含约 60 μg 的溶液,于 80 °C 水浴中加热 1 h(注意密封,防止溶剂挥发),放冷至室温,即得。

2.1.4 灵敏度测试溶液 精密量取系统适用性溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀,再精密量取 1 mL,置 10 mL 量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.5 混合溶液 取艾地骨化醇对照品和各杂质对照品各适量,精密称定,用 50% 乙腈溶解并稀释制成每 1 mL 含艾地骨化醇约 60 μg、tachy 杂质约 0.6 μg、艾地骨化醇前体杂质约 4.2 μg、trans 杂质约 0.3 μg 的混合溶液。

2.1.6 Tachy 杂质对照品溶液 取 tachy 杂质对照品适量,精密称定,用 50% 乙腈溶解并稀释制成每 1 mL 含 tachy 杂质约 0.6 μg 的溶液。

2.1.7 艾地骨化醇前体杂质对照品溶液 取艾地骨化醇前体杂质对照品适量,精密称定,用 50% 乙腈溶解并稀释制成每 1 mL 含艾地骨化醇前体杂质约 4.2 μg 的溶液。

2.1.8 艾地骨化醇和 trans 杂质对照品溶液 取艾地骨化醇和 trans 杂质对照品适量,精密称定,用

50%乙腈溶解并稀释制成每1 mL含艾地骨化醇和 *trans* 杂质各约0.3 μg的溶液。

2.1.9 *trans* 杂质对照品溶液 取 *trans* 杂质对照品适量,精密称定,用50%乙腈溶解并稀释制成每1 mL含 *trans* 杂质约0.3 μg的溶液。

2.2 色谱条件

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),以水为流动相A,乙腈为流动相B,梯度洗脱(见表1),流速为1.0 mL · min⁻¹,检测波长为265 nm,柱温为10 °C,样品盘温度为4 °C,进样体积50 μL。

表1 梯度洗脱程序

Tab.1 Procedure of gradient elution

时间 (time)/min	流动相比比例(ratio of mobile phase)/%	
	A	B
0	55	45
40	45	55
50	0	100
70	0	100
70.1	55	45
80	55	45

2.3 专属性试验

精密量取50%乙腈50 μL,注入液相色谱仪,结果显示,在艾地骨化醇及相关杂质位置无干扰峰,表明乙腈不影响测定结果。

按“2.1.2”项下方法制备空白辅料溶液,按“2.2”项下色谱条件进样,结果色谱图见图3。空白辅料在艾地骨化醇及相关杂质位置无干扰峰产生,表明空白辅料不影响艾地骨化醇软胶囊的有关物质检测。

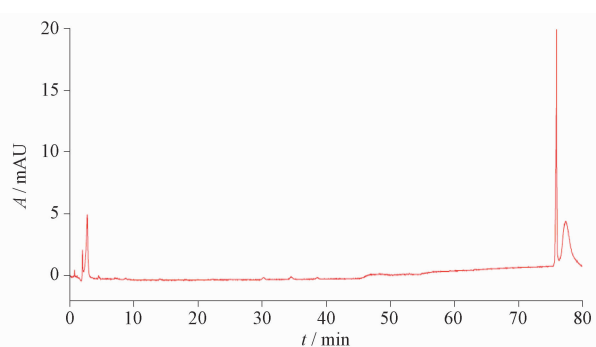


图3 艾地骨化醇软胶囊空白辅料色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of blank excipient of eldecalcitol soft capsules

按“2.1.5”项下方法制备混合溶液,按“2.2”项下色谱条件进样,结果色谱图见图4。主成分与相邻杂质以及各已知杂质间均可基线分离,专属性良好。

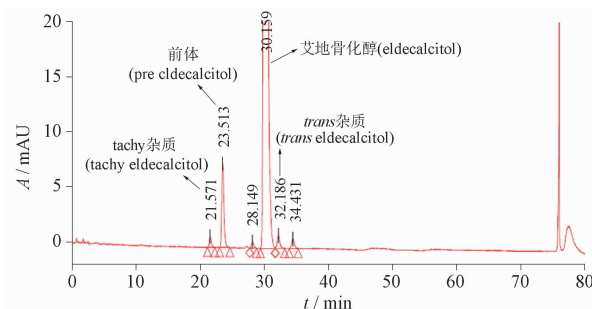


图4 艾地骨化醇对照品与各杂质对照品的混合溶液 HPLC 图

Fig.4 HPLC chromatogram of mixed solution of eldecalcitol and its related substances

2.4 溶液稳定性

取供试品溶液、tachy 杂质对照品溶液、艾地骨化醇前体杂质对照品溶液、艾地骨化醇和 *trans* 杂质对照品溶液,按“2.2”项下色谱条件,分别在室温和低温(4 °C)下于0、2、4、8、12、18、24、36和48 h进样。以0 h峰面积为100%,计算各时间点峰面积与0 h峰面积的百分比,结果表明,在室温条件下,18 h时供试品溶液中各杂质面积百分比为102.8%~103.8%,表明供试品溶液室温下18 h内稳定;杂质对照品溶液中,3 h时 tachy 杂质、前体、艾地骨化醇和 *trans* 杂质的面积百分比分别为105.5%、95.7%、102.0%和102.4%,表明室温条件下 tachy 杂质和前体杂质对照品溶液不稳定;在低温4 °C条件下,24 h时供试品溶液中各杂质面积百分比为98.6%~102.3%;杂质对照品溶液中,24 h时 tachy 杂质、前体、艾地骨化醇和 *trans* 杂质的面积百分比分别为101.2%、96.9%、98.5%和96.2%,表明供试品和各杂质均24 h稳定。

2.5 检测限和定量限

分别精密量取“2.1.6~2.1.8”项下各对照品溶液适量,用50%乙腈逐级定量稀释配制定量限摸索溶液,照“2.2项下”色谱条件进样,当信噪比(S/N)为10:1时对应的样品浓度即为定量限,待定量限确定后,再进一步稀释配制检测限溶液。当信噪比为3:1时对应的样品浓度即为检测限。测定结果见表2。

表2 定量限和检测限结果

Tab. 2 Results of limit of quantitation (LOQ) and limit of detection (LOD)

化合物 (compound)	LOQ/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOD/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
艾地骨化醇 (eldecalcitol)	0.107	0.054
<i>trans</i> 杂质 (<i>trans</i> eldecalcitol)	0.102	0.051
前体 (pre eldecalcitol)	0.128	0.064
tachy 杂质 (tachy eldecalcitol)	0.063	0.031

表3 艾地骨化醇和各杂质的线性关系

Tab. 3 Linear relationship of eldecalcitol and its related substances

化合物 (compound)	回归方程 (regression equation)	线性范围 (linear range) ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	<i>r</i>	校正因子 (correction factor)
艾地骨化醇 (eldecalcitol)	$Y = 1.033 \times 10^5 X + 1.372 \times 10^3$	0.1 ~ 6.3	0.999 9	/
前体 (pre eldecalcitol)	$Y = 4.777 \times 10^4 X - 7.88$	0.1 ~ 5.6	1.000	2.16
tachy 杂质 (tachy eldecalcitol)	$Y = 4.437 \times 10^4 X + 675.9$	0.06 ~ 1.1	0.999 4	2.44
<i>trans</i> 杂质 (<i>trans</i> eldecalcitol)	$Y = 1.218 \times 10^5 X - 562.6$	0.1 ~ 1.2	1.000	0.89

2.7 准确度及定量方式

精密量取 tachy 杂质对照品溶液、艾地骨化醇前体杂质对照品溶液、*trans* 杂质对照品溶液各 1.0 mL, 一一对应分别置于 5 mL 量瓶中, 用乙酸乙酯-正己烷(1:10)稀释至刻度摇匀, 作为杂质对照品储备液; 取本品内容物 1.6 g (约相当于艾地骨化醇 12 μg), 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 精密加入杂质对照品储备液 1 mL, 照“2.1.1”项自“将所得溶液缓慢通过氨基固相萃取小柱……”处理。

按照外标法计算各杂质的回收率, 结果表明, tachy 杂质、前体杂质、*trans* 杂质和主成分艾地骨化醇平均回收率 ($n=6$) 分别为 93.1%、89.7%、75.7% 和 79.0%, RSD ($n=6$) 分别为 3.4%、4.5%、10.1% 和 2.9%。

按照加校正因子的面积归一化法计算各杂质回收率, 结果表明, tachy 杂质、前体杂质和 *trans* 杂质平均回收率 ($n=6$) 分别为 106.6%、88.6% 和 102.8%, RSD ($n=6$) 分别为 6.7%、3.1% 和 2.1%。准确度良好, 优于外标法, 故采用加校正因子的面积归一化法作为本品有关物质的定量方式。

2.8 重复性及中间精密度试验

取样品(批号 2212281), 照“2.1.1”项方法配制供试品溶液, 平行配制 6 份。按“2.2”项下色谱条件

2.6 线性范围与校正因子

将艾地骨化醇及其杂质分 3 组进行线性与范围的验证, 艾地骨化醇和 *trans* 杂质为 1 组, 前体为 1 组, tachy 杂质为 1 组。取艾地骨化醇及杂质对照品适量, 加 50% 乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 逐级稀释, 制成不同线性浓度的艾地骨化醇及杂质溶液。按照“2.2”项下色谱条件进样, 记录峰面积。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 回归方程及线性范围见表 3。结果说明线性良好。

进样, 计算各杂质的含量。结果表明, tachy 杂质和 *trans* 杂质均未检出, 前体杂质和总杂(不包括前体)平均含量 ($n=6$) 分别为 6.6% 和 0.06%, RSD ($n=6$) 分别为 0.50% 和 2.1%。

由不同人员在不同日期采用不同仪器进行重现性试验。结果表明, tachy 杂质和 *trans* 杂质均未检出, 前体杂质和总杂(不包括前体)平均含量 ($n=12$) 分别为 6.5% 和 0.08%, RSD ($n=12$) 分别为 1.6% 和 26.0%。主检测结果均无明显差异, 该方法中间精密度良好。

2.9 耐用性试验

更换不同批次色谱柱, 改变柱温、流速和流动相比比例等, 照“2.2”项下色谱条件检测系统适用性溶液和供试品溶液, 结果表明, 各物质分离效果良好, 供试品的检测结果无明显差异, 方法耐用性良好。

2.10 样品测定结果

取 3 批艾地骨化醇软胶囊, 采用“2.1.1”项方法制备供试品溶液, 按照“2.2”项条件检测, 结果见表 4。

3 讨论

3.1 前处理方法的选择

目前样品前处理方法主要有皂化回流、液-液萃取、固相萃取、超临界流体萃取等^[14]。李攻科等^[15]在测定去皮(壳)的鱼或海洋生物样品中的

表 4 艾地骨化醇软胶囊有关物质测定

Tab. 4 Determination of related substances in eldecalcitol soft capsules

化合物 (compound)	含量(content)/%		
	批号(lot No.)2212281	批号(lot No.)2212291	批号(lot No.)2212301
tachy 杂质(tachy eldecalcitol)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)
前体(pre eldecalcitol)	5.0	5.0	5.1
trans 杂质(trans eldecalcitol)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)
最大未知单个杂质(maximum impurity)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)
总杂质(total impurity)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)

注(note):总杂质不包含前体(total impurity without pre eldecalcitol)

多氯联苯时采用了微波皂化萃取技术,处理过程中多次使用到浓硫酸等强腐蚀性试剂,实验过程繁琐复杂。因此,随着各种新技术的发展,皂化回流技术逐渐被更加环保高效的方法取代。液-液萃取成为当前最成熟且最常用的前处理方法,马海峰等^[16]在测定食品中黄曲霉毒素 B₁时采用液液萃取的前处理方法,但该方法操作步骤烦琐,样品损失量大,成本高。而超临界流体萃取法属于新兴技术手段,方法不够完善成熟,且设备成本较高。

固相萃取是一种利用固体材料的选择性吸附对样品进行纯化富集的前处理手段,在食品、环境样品和生物制品等方面应用较多,具有有机试剂用量少,操作简单,富集纯化效率高且成本低廉诸多优势^[17]。但固相萃取法在骨化醇类药物中的应用较少,目前报道中对油性基质药物的有关物质考察多为固相萃取-正相液相色谱法。

吴金平等^[17]在建立骨化三醇软胶囊有关物质分析方法时,采用 Online SPE-HPLC 法考察了硅胶、硅藻土和 C₁₈ 固相萃取小柱对骨化三醇软胶囊内容物的提取分离效果,确定使用 Hypersil Gold silica 硅胶柱对样品进行前处理,并建立正相色谱条件考察有关物质,但正相色谱条件采用挥发性较强的正己烷和乙酸乙酯等试剂,且等度洗脱,针对艾地骨化醇的多个异构体杂质分离效果不理想。

Gianluca Bartolucci^[18]等采用氨基固相萃取法对鱼肝油进行前处理,并联合 LC-APCI-MS 法对鱼肝油中的维生素 D₃ 的含量进行考察,采用氨基固相萃取柱前处理效果良好,但仅考察了主成分的含量。可为油基质的艾地骨化醇软胶囊多种异构体杂质检测的前处理方法提供参考。

3.1.1 固相萃取柱 结合上述文献,本文选择采用

C₁₈ 固相萃取小柱、氨基固相萃取小柱和 Silica 固相萃取小柱对艾地骨化醇软胶囊的内容物进行前处理,比较不同填料萃取柱的提取富集效果。结果显示,C₁₈ 固相萃取小柱专属性差,Silica 固相萃取小柱重复性和回收率较差,而氨基固相萃取小柱重复性、回收率和耐用性均较好。

氨基固相萃取小柱的填料,当用正己烷等非极性溶剂进行活化处理时,它可与任何含-OH、-NH 或-SH 基团的分子发生氢键作用,对结构异构体的分离和脂类样品中带极性基团的化合物提取具有良好的效果。恰好可以解决骨化醇类软胶囊在有关物质检查中存在的难点:①规格小,主成分浓度极低(约占 0.000 5%)。②油性基质,中链甘油三酯占比极高,基质干扰问题严重。

因此,选用氨基固相萃取小柱进行艾地骨化醇前处理,采用反相高效液相色谱系统进行有关物质考察。

3.1.2 洗脱体积 本文用乙酸乙酯-正己烷(1:10)作为中链甘油三酯洗脱溶剂,分别对固相萃取小柱上样后的洗脱体积进行 15、20、25 及 30 mL 的考察。结果见表 5 和图 5。当乙酸乙酯-正己烷(1:10)洗脱液用量为 15~30 mL 时,本品有关物质检测结果均无明显差异,为充分洗脱,拟定采用乙酸乙酯-正己烷(1:10)洗脱液 25~30 mL 洗脱。

3.1.3 无水乙醇洗脱体积 本文用乙醇作为艾地骨化醇洗脱溶剂,分别对固相萃取小柱上样经乙酸乙酯-正己烷(1:10)淋洗后的艾地骨化醇洗脱体积进行 1.5、2.0、2.5 mL 考察。结果见表 6 和图 6。当无水乙醇洗脱体积为 1.5~2.5 mL 时,本品有关物质检测结果均无明显差异,拟定采用无水乙醇 2 mL 洗脱。

表 5 不同洗脱液体积艾地骨化醇软胶有关物质检测

Tab. 5 Determination of related substances in eldecalcitol soft capsules at different elution liquid volumes

化合物 (compound)	含量(content)/%			
	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL
tachy 杂质(tachy eldecalcitol)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)
前体(pre eldecalcitol)	5.9	6.0	6.2	6.1
trans 杂质(trans eldecalcitol)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)
最大未知单个杂质(maximum single impurity)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)
总杂质(total impurity)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)

注(note):总杂质不包含前体(total impurity without pre eldecalcitol)

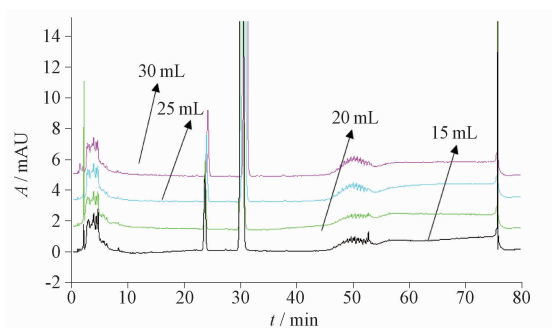


图 5 不同洗脱液体积艾地骨化醇软胶囊有关物质检测色谱图

Fig. 5 HPLC chromatogram of related substances in eldecalcitol soft capsules at different elution liquid volumes

3.1.4 检测波长 采用二极管阵列检测器,对艾地骨化醇溶液及各个杂质溶液的紫外吸收图谱进行考察,结果表明艾地骨化醇及各杂质在 265 nm 处均具有较强的紫外吸收,且峰形良好,故最终采用 265 nm 波长作为艾地骨化醇有关物质考察的检测波长。

3.1.5 计算方式 按外标法计算时,tachy 杂质、前体、trans 杂质和艾地骨化醇回收率结果提示,前处理过程中主成分和杂质存在损失。主要原因是复溶体积小,导致转移过程中的体积损失比例增大,影响了回收率。按加校正因子的面积归一化法计算时,可以避免转移体积损失对结果的影响。

表 6 不同无水乙醇洗脱体积艾地骨化醇软胶囊有关物质检测结果对比

Tab. 6 Comparison of related substances in eldecalcitol soft capsules with different elution volumes of absolute ethanol

化合物 (compound)	含量(content)/%		
	1.5 mL	2.0 mL	2.5 mL
tachy 杂质(tachy eldecalcitol)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)
前体(pre eldecalcitol)	5.9	6.0	5.9
trans 杂质(trans eldecalcitol)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)
最大未知单个杂质(maximum single impurity)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)
总杂质(total impurity)	未检出(not detected)	未检出(not detected)	未检出(not detected)

注(note):总杂质不包含前体(total impurity without pre eldecalcitol)

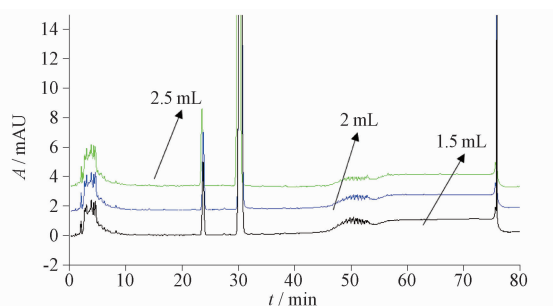


图 6 不同无水乙醇洗脱体积艾地骨化醇软胶囊有关物质检测对比图

Fig. 6 HPLC chromatogram of related substances in eldecalcitol soft capsules with different elution volumes of absolute ethanol

因此,本文选用了加校正因子的面积归一化法进行定量。

4 结论

本文建立了艾地骨化醇软胶囊有关物质的氨基固相萃取-反相液相色谱检查方法,固相萃取法去除油基质的干扰,并对艾地骨化醇进行富集,提高了检测的灵敏度,采用反相色谱法对有关物质进行考察,避免了使用正相色谱的弊端如正相流动相挥发性较强,基线不易平衡,系统硬件要求高等。对该方法进行系统验证,保证方法的专属性、灵敏度及准确

性均符合要求,为艾地骨化醇软胶囊及类似基质的药物质量研究提供可靠依据。

参考文献

- [1] VELDURTHY V, WEI R, OZ L, *et al.* Vitamin D, calcium homeostasis and aging[J]. *Bone Res*, 2016, 4(1): 1
- [2] LI T, SUN FF, LIU YP, *et al.* Pharmacokinetic and bioequivalence study of eldecalcitol soft capsules in healthy Chinese subjects [J]. *Clin Pharm Drug Dev*, 2022, 11(12): 1474
- [3] 王华. 活性维生素 D₃ 类药物马沙骨化醇和艾尔骨化醇及其衍生物的合成研究[J]. *辽宁化工*, 2021, 50(12): 1850
WANG H. Synthesis research of active vitamin D₃ drugs maxacalcitol, El calciferol and their derivatives[J]. *Liaoning Chem Ind*, 2021, 50(12): 1850
- [4] YASUDA K, IWANAGA Y, OGAWA K, *et al.* Human hepatic metabolism of the anti-osteoporosis drug eldecalcitol involves sterol C₄-methyl oxidase[J]. *Pharmacol Res Persp*, 2015, 3(2): 1
- [5] CUTOLO M, SMITH V, PAOLINO S, *et al.* Involvement of the secosteroid vitamin D in autoimmune rheumatic diseases and COVID-19[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2023; 19(5): 265
- [6] HAGINO H. Eldecalcitol: newly developed active vitamin D (3) analog for the treatment of osteoporosis[J]. *Expert Opin Pharmacoth*, 2013, 14(6): 817
- [7] XU Z, FAN C, ZHAO X, *et al.* Treatment of osteoporosis with eldecalcitol, a new vitamin D analog: a comprehensive review and meta-analysis of randomized clinical trials[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10: 509
- [8] MINAMINO H, KATSUSHIMA M, TORII M, *et al.* Serum vitamin D status inversely associates with a prevalence of severe sarcopenia among female patients with rheumatoid arthritis[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 20485
- [9] 曾婧娉, 阎卉, 王成港, 等. 骨质疏松症治疗药物——艾尔骨化醇[J]. *药物评价研究*, 2011, 34(3): 224
ZENG JP, YAN H, WANG CG, *et al.* Eldecalcitol used for treating osteoporosis[J]. *Drug Eval Res*, 2011, 34(3): 224
- [10] SHINTANI T, ROSLI SNZ, TAKATSU F, *et al.* Eldecalcitol (ED-71), an analog of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ as a potential anti-cancer agent for oral squamous cell carcinomas[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016, 164: 79
- [11] 王海鹏, 陈明, 黄韬, 等. 艾地骨化醇通过抑制 CYR61 的表达抑制骨肉瘤细胞的增殖和转移[J]. *山西医科大学学报*, 2023, 54(1): 38
WANG HP, CHEN M, HUANG T, *et al.* Eldecalcitol inhibits proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by inhibiting CYR61 expression[J]. *J Shanxi Med Univ*, 2023, 54(1): 38
- [12] WANG X, SONG H, HOU S, *et al.* Naturally occurring kaolinite as a sorbent for solid-phase extraction of calcitriol in soft capsules [J]. *Appl Clay Sci*, 2021, 210: 106162
- [13] 王清亭, 王明刚, 刘晓霞, 等. 骨化三醇前体对照品的制备及其在软胶囊中检查方法的研究[J]. *药物分析杂志*, 2021, 41(2): 370
WANG QT, WANG MG, LIU XX, *et al.* Study on the preparation of pre-calcitriol reference substance and its examination method in calcitriol soft capsules[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(2): 370
- [14] 张庆, 焦萌, 杨丽娜, 等. 基于不同基质中维生素 D 含量测定样品制备及分析方法研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2023, 32(8): 826
ZHANG Q, JIAO M, YANG LN, *et al.* Recent advances in sample preparation and analysis methods for vitamin D in different matrices[J]. *Chin New Drugs J*, 2023, 32(8): 826
- [15] 李攻科, 何小青, 杨云, 等. 微波皂化萃取气相色谱法测定生物样品中的多氯联苯[J]. *分析化学*, 2000, 28(9): 1186
LI GK, HE XQ, YANG Y, *et al.* Determination of polychlorinated biphenyls in biological samples by microwave saponification extraction and gas chromatography[J]. *Chin J Anal Chem*, 2000, 28(9): 1186
- [16] 马海峰, 陶唐平, 方林明, 等. 液液萃取-HPLC 法测定食品中黄曲霉毒素 B₁[J]. *食品工业*, 2020, 41(5): 296
MA HF, TAO TP, FANG LM, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in food by HPLC with liquid-liquid extraction[J]. *Food Ind*, 2020, 41(5): 296
- [17] 吴金平, 杨艳丽, 朱盼盼, 等. Online SPE-HPLC 法测定骨化三醇软胶囊中的有关物质[J]. *中国卫生检验杂志*, 2023, 33(5): 532
WU JP, YANG YL, ZHU PP, *et al.* Determination of related substances in calcitriol soft capsules with online SPE-HPLC method [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2023, 33(5): 532
- [18] BARTOLUCCI G, GIOCALIERE E, BOSCARO F, *et al.* Vitamin D₃ quantification in a cod liver oil-based supplement [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(1): 64

(本文于 2023 年 12 月 28 日收到)