一次萃取后正相 HPLC 法定量测定维生素 AD 微丸的含量

周远华，张立雯，董顺玲
（广州市药品检验所，广东广州 510160）

摘要：建立了正相 HPLC 法测定维生素 AD 微丸（**1**）中全反式维生素 A 棕榈酸酯（**2**）和维生素 D_2（**3**）的含量，前处理只需采用正己烷萃取 1 次。色谱柱采用 Phenomenex Luna NH_2 100A 柱（4.6 mm×250 mm，3 μm），流动相为正己烷，检测波长为 265 nm。结果显示，全反式 **2** 和 **3** 分别在 329.4 ～ 1 647.1 和 19.23 ～ 192.3 IU/ml 内线性关系良好；重复性试验 RSD（n=6）分别为 0.6%和 0.5%，检测限分别为 0.015、0.28 IU/ml；平均回收率（n=9）分别为 100.7%和 99.3%，RSD 分别为 1.9%和 0.9%。建立的萃取方法能够一次性、完全地提取 **1** 中的全反式 **2** 和 **3**；分析方法能够准确测定 **2** 和 **3**，专属性强、灵敏度高，为 **1** 的质量控制提供了参考。

关键词：一次萃取；维生素 AD 微丸；正相高效液相色谱法；含量测定
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2022）06-0890-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.06.018

One-step Extraction Followed by Normal Phase HPLC for Quantitative Analysis of Vitamin AD Micropellets

ZHOU Yuanhua, ZHANG Liwen, DONG Shunling
（*Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160*）

ABSTRACT: A normal phase HPLC method was established for the determination of all-*trans* vitamin A palmitate（**2**）and vitamin D_2（**3**）in vitamin AD micropellets（**1**）, and the pretreatment only required one-step extraction with *n*-hexane. A Phenomenex Luna NH_2 100A column（4.6 mm×250 mm, 3 μm）was used, with the mobile phase of *n*-hexane, and the detection wavelength was 265 nm. The results showed that it was linear for all-*trans* **2** and **3** in the ranges of 329.4 − 1 647.1 and 19.23 − 192.3 IU/ml, respectively. The repeatability RSDs of all-*trans* **2** and **3**（n=6）were 0.6% and 0.5%, and the detection limits were 0.015 and 0.28 IU/ml, respectively. The mean recoveries（n=9）of all-*trans* **2** and **3** were 100.7% and 99.3%, with the RSDs of 1.9% and 0.9%, respectively. The extraction method could completely extract all-*trans* **2** and **3** from **1** in one-step, and the determination method could accurately determine the contents of all-*trans* **2** and **3** with high specificity and sensitivity, which provided a reference for the quality control of **1**.

Key Words: one-step extraction; vitamin AD micropellet; normal phase HPLC; content determination

维生素 AD 微丸（**1**）是由全反式维生素 A 棕榈酸酯（**2**）、维生素 D_2（**3**）和辅料制成的制剂，目前均未被各国药典收载。《中华人民共和国药典》2020 年版（ChP 2020）收载了类似品种维生素 AD 软胶囊和滴剂，其以维生素 A 乙酸酯和维生素 D 为原料，且四部通则收载的维生素 A 测定法的适用范围不包含 **2**；美国药典（USP 43）通则收载的维生素 A 测定法适用于 **2**。**1** 的质量标准中采用 HPLC 法测定含量，需用乙醚多次提取[1]；USP 43 中测定维生素 A 的色谱分析法方法 1 采用正相 HPLC 法，需用正己烷提取 3 次；且已报道的含 **2** 等脂溶性维生素的复方制剂的测定法均需多次萃取[2—5]，存在步骤烦琐、耗费时间长、影响因素多等缺点。

此外，**2** 有全反式和多种顺式异构体，其中全

收稿日期：2021-07-16
作者简介：周远华（1985—），男，副主任药师，从事药物分析和质量标准研究。
E-mail：scjgj_zhouyuh@gz.gov.cn

反式 **2** 最稳定，活性最高，其他顺式异构体的稳定性和活性均较低[6]。已有较多研究采用反相 HPLC 法测定 **2** 的含量[7—10]，但不能有效分离 **2** 的顺式和反式异构体。

本研究参考 USP 43 和相关文献[11—13]，建立了正相 HPLC 法测定 **1** 中全反式 **2** 和 **3** 的含量，前处理只需采用正己烷萃取 1 次，能够一次性、快速、完全地提取 **1** 中的全反式 **2** 和 **3**，并且可以有效分离 **2** 的顺式和反式异构体，以期为 **1** 的质量控制研究提供参考。

1 仪器与试药

1200 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；XSE205 DU 型电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

2 对照品（含全反式 **2** 98.5%，含顺式 **2** 1.5%，批号 100295-201801）和 **3** 对照品（含量 99.0%，批号 100155-201207）（中国食品药品检定研究院）；**1**（规格 每 1 g 中含 **2** 100 000 IU，含 **3** 10 000 IU，批号 T121607、T121608、T121609）和空白辅料均购于日本 Riken Vitamin 公司；胰蛋白酶（福州飞净生物科技有限公司，活性 1 ∶ 250，批号 181015）；甲醇、异丙醇、正己烷和二甲基亚砜均为色谱纯，乙醚为分析纯，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Phenomenex Luna NH_2 100A 柱（4.6 mm×250 mm，3 μm）；流动相 正己烷；检测波长 265 nm；流速 1.0 ml/min；柱温 30 ℃；进样量 10 μl。

2.2 溶液配制

混合对照品溶液：分别取 **2**、**3** 对照品适量，精密称定，用正己烷溶解并定量稀释，制成每 1 ml 中约含 **2** 800 IU 和 **3** 80 IU 的混合对照品溶液。

供试品溶液：取 **1** 约 0.2 g，精密称定，置 100 ml 棕色量瓶中，加入 0.1%胰蛋白酶溶液（取胰蛋白酶 1 g，加水 1 000 ml 溶解）15 ml 和二甲基亚砜 25 ml，置 37 ℃水浴中保温 30 min 并振摇，取出，放冷。精密加入正己烷 25 ml，振摇（3 000 r/min）萃取 20 min，避光静置 1 h，取上清液，即得供试品溶液。

空白辅料溶液：称取空白辅料约 0.2 g，置 100 ml 棕色量瓶中，同“供试品溶液”配制方法制得空白辅料溶液。

2.3 提取方法的选择

2.3.1 分散溶剂

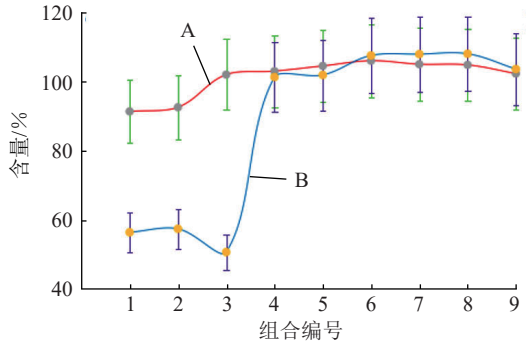
考察分散溶剂胰蛋白酶溶液与二甲基亚砜的加入量对提取结果的影响。取 **1**（批号 T121609），按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，考察加入的 0.1%胰蛋白酶溶液和二甲基亚砜组合（分别为 15 和 0 ml、25 和 0 ml、40 和 0 ml、30 和 10 ml、25 和 15 ml、20 和 20 ml、15 和 25 ml、10 和 30 ml、5 和 35 ml，记作编号 1 ～ 9）对全反式 **2** 和 **3** 含量测定结果的影响。取“**2.2**”项下的混合对照品溶液和上述供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，按外标法以峰面积计算全反式 **2** 和 **3** 的含量。结果见图 1。试验中测得 2 种组分的含量大部分都高于 100%。鉴于 **2** 和 **3** 在生产和贮存过程中会发生降解，生产企业通常会采用增加投料量的策略，并且该品种质量标准中的含量限度上限为 120%，因此本研究采用含量测定结果高者为优的评判标准。由图 1 可见，使用编号 6 ～ 8 的组合时，全反式 **2** 和 **3** 的含量基本处于平台期，因此选择中间点，即分散溶剂加入量为 0.1%胰蛋白酶溶液 15 ml 和二甲基亚砜 25 ml，此时全反式 **2** 和 **3** 的含量分别为 104.8%和 107.7%。

2.3.2 胰蛋白酶浓度

取 **1**（批号 T121609），按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，考察胰蛋白酶溶液浓度分别为 0.05%、0.1%、0.2%、0.3%时，全反式 **2** 和 **3** 的含量测定结果。取“**2.2**”项下混合对照品溶液和上述供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，按外标法以峰面积计算全反式 **2** 和 **3** 的含量。结果见图 2，当胰蛋白酶溶液浓度为 0.1%时，全反式 **2** 和 **3** 的含量均稳定且达较高值，分别为 104.6%、107.6%。

2.3.3 萃取时间

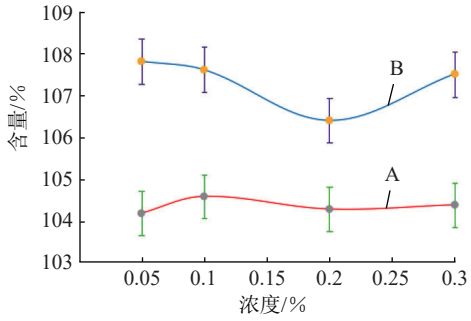
取 **1**（批号 T121609），按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，分别考察萃取时间为 10、15、20、25、30 min 时，全反式 **2** 和 **3** 的含量测定结果。取“**2.2**”项下混合对照品溶液和上述供试品溶液，按



A：全反式 **2**；B：**3**

图 1　分散溶剂组合的考察结果（*n*=2）

Fig.1　Investigation Results of Dispersing Solvent Combination (*n*=2)



A：全反式 **2**；B：**3**

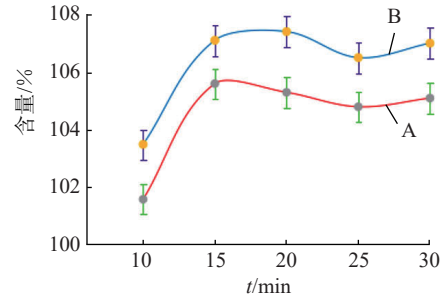
图 2　胰蛋白酶浓度考察结果（*n*=2）

Fig.2　Investigation Results of Trypsin Concentration (*n*=2)

“**2.1**”项下色谱条件进样测定，按外标法以峰面积计算全反式 **2** 和 **3** 的含量。结果见图 3，萃取时间为 20 min 时，全反式 **2** 和 **3** 的含量均达较高值，分别为 105.3%、107.4%。

2.3.4　萃取完全性的考察

取 **1**（批号 T121609），按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，避光静置 30 min 后取全部下层液体，置 100 ml 棕色量瓶中进行二次萃取。精密加入正己烷 25 ml，振摇 20 min，避光静置 1 h，取上清液，按“**2.1**”项下色谱条件测定，平行试验 2 次。结果显示，全反式 **2** 的含量均为 0.87%，**3** 的含量分别为 0.88%和 0.83%。取二次提取后的下层液体，置 100 ml 棕色量瓶中进行三次萃取，精密加入正己烷



A：全反式 **2**；B：**3**

图 3　萃取时间考察结果（*n*=2）

Fig.3　Investigation Results of Extraction Time (*n*=2)

25 ml，振摇 20 min，避光静置 1 h，取上清液按“**2.1**”项下色谱条件测定，平行试验 2 次。结果均未检出全反式 **2** 和 **3**，说明一次萃取基本能完全得到样品中的全反式 **2** 和 **3**。

2.3.5　一次萃取与标准提取方法的比较

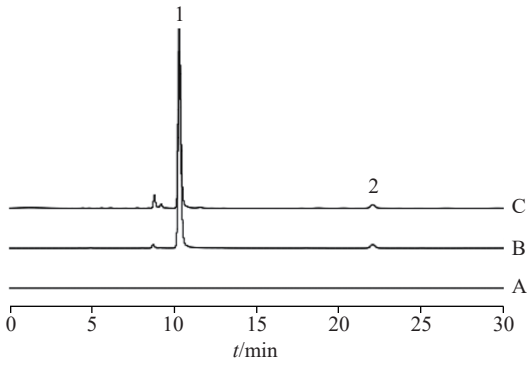
现行 **1** 的质量标准方法中，**1** 在加入 0.1%胰蛋白酶溶液分散后，要转移至分液漏斗，用乙醚提取 4 次，合并乙醚液，经铺有脱脂棉与无水硫酸钠的滤器过滤，滤液减压旋转蒸发至剩 2 ～ 3 ml，用异丙醇转移并定量稀释[1]。

取 **1**（批号 T121609），分别按上述质量标准方法和本研究建立的方法进行提取，并采用建立的正相 HPLC 法测定全反式 **2** 和 **3** 的含量。结果显示，采用本研究的提取方法测得全反式 **2** 和 **3** 的含量分别为 104.8%（*n*=2）、107.2%（*n*=2），采用现行标准提取方法测得全反式 **2** 和 **3** 的含量分别为 105.4%（*n*=2）、107.6%（*n*=2），说明本研究的萃取方法与现行标准提取方法效率相当。

2.4　方法学验证

2.4.1　系统适用性试验

精密量取“**2.2**”项下空白辅料溶液、混合对照品溶液和供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果见图 4，空白辅料对全反式 **2** 和 **3** 的含量测定不产生干扰；理论塔板数按全反式 **2** 峰计不低于 3 000；全反式 **2** 峰与顺式异构体峰（与全反式 **2** 峰的相对保留时间为 0.8 ～ 0.9）的分离度符合要求。



A：空白辅料溶液，B：混合对照品溶液，C：供试品溶液
1－全反式 **2**；2－**3**

图 4 典型色谱图

Fig.4 Typical Chromatogram

2.4.2 专属性试验

取 **1**（批号 T121609），按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，分别进行高温破坏（80 ℃水浴 1 h）和光照破坏（紫外光照射 3 min），按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果显示，**1** 中的全反式 **2** 和 **3** 与相邻杂质峰之间均能达到分离要求，表明本法的专属性良好。

2.4.3 精密度试验

取“**2.2**”项下混合对照品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件连续进样 6 次，结果显示全反式 **2** 峰面积的 RSD（n=6）为 0.4%，**3** 峰面积的 RSD（n=6）为 0.5%。

2.4.4 线性试验

精密称取 **2** 对照品 47.31 mg，用正己烷逐级稀释，制成全反式 **2** 浓度分别为 329.4、395.3、658.8、823.6、988.3、1 647.1 IU/ml 的线性试验系列溶液 A；精密称取 **3** 对照品 24.28 mg，用正己烷逐级稀释，制成 **3** 浓度分别为 19.23、38.46、57.70、76.93、96.16、115.4、192.3 IU/ml 的线性试验系列溶液 B。分别按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，以浓度（c）为横坐标、峰面积（A）为纵坐标，绘制标准曲线，得到全反式 **2** 的回归方程为 A=29.99c+814.7，r=0.999 8；**3** 的回归方程为 A=3.538c－0.244 3，r=0.999 9。结果表明，全反式 **2** 在 329.4 ～ 1 647.1 IU/ml、**3** 在 19.23 ～ 192.3 IU/ml 内线性关系良好。

2.4.5 稳定性试验

取 **1**（批号 T121609），按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，于 15 ℃避光放置，分别于 0、2、4、8、12 h 时取样，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果显示，全反式 **2** 峰面积 RSD（n=5）为 1.7%，**3** 峰面积 RSD（n=5）为 1.8%。

2.4.6 重复性试验

取 **1**（批号 T121609），按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，共 6 份，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，结果显示，全反式 **2** 含量的平均值（n=6）为 105.1%，RSD 为 0.6%；**3** 含量的平均值（n=6）为 106.6%，RSD 为 0.5%，说明本法重复性良好。

2.4.7 检测限与定量限

取“**2.2**”项下混合对照品溶液，逐级稀释、进样，按信噪比 3 ∶ 1 计算检测限、按信噪比 10 ∶ 1 计算定量限。结果显示，全反式 **2** 的检测限和定量限分别为 0.015、0.051 IU/ml；**3** 的检测限和定量限分别为 0.28、0.93 IU/ml。

2.4.8 回收率试验

称取空白辅料 0.2 g 置 100 ml 棕色量瓶中，平行称取 9 份，平均分成 3 组，每组分别精密加入浓度为 41 180 IU/ml 的全反式 **2** 母液和浓度为 3 846.5 IU/ml 的 **3** 对照品母液（均用正己烷配制）各 2、2.5、3 ml，按“**2.2**”项下供试品溶液制备方法配制，得 80%、100%和 120%回收率试验溶液。按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，计算回收率。结果显示，全反式 **2** 的平均回收率（n=9）为 100.7%，RSD 为 1.9%；**3** 的平均回收率（n=9）为 99.3%，RSD 为 0.9%。

2.5 样品测定

取 3 批次的 **1**，按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，每个批号平行配制 2 份，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，按外标法以峰面积测定全反式 **2** 和 **3** 的含量。结果见表 1。

3 讨论

3.1 萃取方法的选择

现行 **1** 的质量标准方法中[1]，**1** 样品需加胰蛋

表 1　样品测定结果（*n*=2）

Tab.1　Content Determination Results of Samples（*n*=2）

1批号	含量/%	
	全反式**2**	**3**
T121607	100.4±0.3	102.5±0.4
T121608	101.9±0.5	105.3±1.1
T121609	104.9±0.3	107.2±0.6

白酶溶液分散后，采用乙醚提取 4 次，合并乙醚液，经铺有脱脂棉与无水硫酸钠的滤器过滤，减压旋转蒸发后再用异丙醇转移并定量稀释。整个提取过程步骤多、耗时长，且 **2** 和 **3** 对光、热等不稳定，烦琐的提取过程会影响结果的准确度和精密度；此外，由不同操作人员提取测定得到的结果差异较大。

本研究建立了一次萃取法，**1** 样品经 0.1%胰蛋白酶溶液和二甲基亚砜分散后，定量加入正己烷进行涡旋提取，静置或离心取上清液即可得到供试品溶液。操作简单、耗时短，提取过程影响因素少。经验证，一次萃取基本能完全获得全反式 **2** 和 **3**。

将本研究建立的一次萃取方法应用于维 D_2 磷酸氢钙片、维 D 钙咀嚼片、儿童维 D 钙咀嚼片和五维赖氨酸口服溶液等样品的提取制备，结果表明方法同样可行。说明对同类含脂溶性维生素成分的样品，也可以尝试采用一次液 - 液萃取方法提取制备供试品溶液。

3.2　色谱柱的选择

采用 Phenomenex Luna NH_2 100A 柱（4.6 mm×250 mm，3 μm，批号为 H17-346969 和 H19-094123）和 Chrome Core NH_2 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），分别按“**2.1**”项下色谱条件测定“**2.2**”项下混合对照品溶液。结果显示，3 根色谱柱上全反式 **2** 峰的理论塔板数分别为 9 853、14 167 和 7 526，**3** 峰的理论塔板数分别为 8 839、10 546 和 6 182；全反式 **2** 峰与顺式异构体峰的分离度分别为 3.4、4.1 和 3.6。本研究中根据分离效果选用了 Phenomenex Luna NH_2 100A 柱（4.6 mm×250 mm，3 μm，H19-094123）。

3.3　检测方法的选择

现行的 **1** 质量标准方法采用的 HPLC 法不能有效分离 **2** 的反式异构体与顺式异构体，测定的主峰包含顺式异构体[1]。全反式 **2** 与其顺式异构体的结构相似、最大吸收波长相近，相同质量的吸收强度也相近。分别采用主成分外标法、峰面积归一化法和对照品外标法测定顺式异构体的总量，结果显示 3 种方法得到的结果相近，3 批 **1**（批号 T121607、T121608 和 T121609）中的 **2** 顺式异构体结果分别为 6.3%、6.3%和 6.4%。以中国食品药品检定研究院对照品（含顺式异构体 1.5%）测定 **1**（批号 T121607）中全反式 **2** 的含量，结果显示，采用 HPLC 法得到的全反式 **2** 结果比实际偏高（约偏高 4.8%）；以 USP 标准品（含顺式异构体 2%）测定同一样品，所得全反式 **2** 结果也比实际偏高（约偏高 4.3%）。因此，采用 HPLC 法测定的含量结果不准确。本研究建立的正相 HPLC 法能有效分离测定全反式 **2** 和其顺式异构体，能准确测定 **1** 的含量。

3.4　检测波长的选择

全反式 **2** 在 325 nm 附近有最大吸收，在 265 nm 处有较大吸收；**3** 在 265 nm 处有最大吸收；按 IU 计，样品中 **3** 的量仅为 **2** 的 1/10。因此，选定测定波长为 265 nm。

参考文献：

[1]　原国家食品药品监督管理局．进口药品注册标准：JX20160042［S］．2016.

[2]　ADEL B S, MAHMOUD S R, AHMAD M F, *et al*. Development of two reference materials for all *trans*-retinol, retinyl palmitate, α- and γ-tocopherol in milk powder and infant formula［J］. *J Food Drug Anal*, 2015, **23**(1): 82-92.

[3]　李　莉, 何盛江, 汪六英, 等．RP-HPLC法同时测定多种维生素注射液(13)中3种脂溶性维生素的含量[J]．中国药房, 2010, **21**(45): 4298-4299.

[4]　陈　光．HPLC法测定脂溶性维生素注射液中维生素D_2及维生素E的含量[J]．中国医药科学, 2017, **7**(15): 46-50.

[5]　孙学文, 刘莹莹, 谢　军, 等．超高效液相色谱-串联质谱法同时测定特殊医学用途配方食品中 5 种脂溶性维生素[J]．中国食品药品监管, 2020, (6): 64-70.

[6]　李小军, 刘祥洪, 罗春雨, 等．溶剂残留对全反式维生素A棕榈酸酯异构化的影响[J]．广州化工, 2012, **40**(6): 65-67.

[7] SATOSHI Y, SHIGERU O. A simple and robust quantitative analysis of retinol and retinyl palmitate using a liquid chromatographic isocratic method [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, **26**(2): 504-511.

[8] 张美金, 林海丹, 林 峰, 等. 高效液相色谱法同时测定保健食品中 6 种脂溶性维生素[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, **30**(1): 26-30.

[9] VANESSA K, WILLIAN F C, JESUÍ V V, *et al*. Development of a green chromatographic method for determination of fat-soluble vitamins in food and pharmaceutical supplement [J]. *Talanta*, 2008, **75**(1): 141-146.

[10] KIM Y K, QUADRO L. Reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of retinol and retinyl esters in mouse serum and tissues [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, **652**: 263-275.

[11] ADRIENNE M, SCOTT C, LYNSEY S, *et al*. Simultaneous determination of 13-*cis* and all-*trans* vitamin A palmitate (retinyl palmitate), vitamin A acetate (retinyl acetate), and total vitamin E (α-tocopherol and DL-α-tocopherol acetate) in infant formula and adult nutritionals by normal phase HPLC: first action 2012. 10 [J]. *J AOAC Int*, 2013, **96**(5): 1073-1081.

[12] 顾 霄, 李 煜, 赵明娟, 等. C_{30}-HPLC-PDA-TOF/MS对鱼肝油中维生素 A 酯顺反异构体的分离与鉴定[J]. 药物分析杂志, 2019, **39**(12): 2228-2233.

[13] 陈红丽, 夏 彤, 王杏林, 等. HPLC法测定脂溶性维生素注射液中维生素 A 棕榈酸酯的有关物质[J]. 药物评价研究, 2011, **34**(4): 273-276.

(上接第875页)

[14] ZHOU Y C, XU B H, YU A B, *et al*. An experimental and numerical study of the angle of repose of coarse spheres [J]. *Powder Technol*, 2002, **125**(1): 45-54.

[15] PANTALEEV S, YORDANOVA S, JANDA A, *et al*. An experimentally validated DEM study of powder mixing in a paddle blade mixer [J]. *Powder Technol*, 2017, **311**: 287-302.

[16] KETTERHAGEN W R. Modeling the motion and orientation of various pharmaceutical tablet shapes in a film coating pan using DEM [J]. *Int J Pharm*, 2011, **409**(1/2): 137-149.

[17] ESCOTET-ESPINOZA M S, FOSTER C J, IERAPETRITOU M. Discrete element modeling (DEM) for mixing of cohesive solids in rotating cylinders [J]. *Powder Technol*, 2018, **355**: 124-136.

[18] ALIZADEH E, BERTRAND F, CHAOUKI J. Comparison of DEM results and Lagrangian experimental data for the flow and mixing of granules in a rotating drum [J]. *AIChE J*, 2014, **60**(1): 60-75.

[19] 祝宇松, 陈国胜, 吴 旻, 等. 达托霉素发酵培养基的响应面法优化[J]. 中国医药工业杂志, 2010, **41**(3): 183-186.

[20] 陈庆发, 王少平, 秦世康. 柔性隔离层下多漏斗散体矿岩力链演化特征的离散元模拟[J]. 工程科学学报, 2020, **42**(9): 1119-1129.