

HPLC 测定注射用脂溶性维生素中 4 种成分的含量

张慧, 裴志东*, 初正云, 翟延君(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法同时测定注射用脂溶性维生素中维生素 A 棕榈酸酯、维生素 D₂、E、K₁ 含量的方法。方法 采用 Intersil (ODS-2) C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-乙腈-乙醇-水(20:55:25:6)为流动相, 流速 1.5 mL·min⁻¹, 检测波长 265 nm。结果 维生素 A 棕榈酸酯、维生素 D₂、E、K₁ 进样量分别在 1.19~2.78 μg、6.14~14.33 ng、10.92~25.48 μg、0.19~0.44 μg 内呈良好的线性关系; 平均回收率分别为 99.70%(RSD=0.48%)、100.13%(RSD=0.88%)、99.74%(RSD=0.69%)、99.97%(RSD=0.59%)。结论 方法操作简便、精确、结果可靠, 可控制注射用脂溶性维生素的质量。关键词: 高效液相色谱法; 维生素 A 棕榈酸酯; 维生素 D₂; 维生素 E; 维生素 K₁

中图分类号: R917.793 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2009)06-0480-03

Determination of Four Compounds in Fat-soluble Vitamin for Injection by HPLC

ZHANG Hui, PEI Zhidong*, CHU Zhengyun, ZHAI Yanjun(Department of drug, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for simultaneous determination of retinol palmitate, vitamin D₂, vitamin E and vitamin K₁ in fat-soluble vitamin for injection. **METHODS** An Intersil (ODS-2) C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) was used as separation column. Methanol- acetonitrile- ethanol-water (17:58:25:5) was used as the mobile phase. Flow rate was 1.5 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 265 nm. **RESULTS** The linear ranges for retinol palmitate, vitamin D₂, vitamin E and vitamin K₁ were 1.19~2.78 μg, 6.14~14.33 ng, 10.92~25.48 μg, 0.19~0.44 μg, and the average recoveries were 99.70% (RSD=0.48%), 100.13% (RSD=0.88%), 99.74% (RSD=0.69%), 99.97% (RSD=0.59%), respectively. **CONCLUSION** The method is simple, accurate, reliable. It can be used for the quality control of fat-soluble vitamin for injection.

KEY WORDS: HPLC; retinol palmitate; vitamin D₂; vitamin E; vitamin K₁

注射用脂溶性维生素是由维生素 A 棕榈酸酯、维生素 D₂、E、K₁ 等多种维生素成分制成的无菌冻干粉针, 临床上用于各种内、外科手术、严重传染性疾病、昏迷等症的肠外维生素补充剂, 是各种外科手术后必用的药物。有关上述 4 种维生素含量分析方法, 文献多采用 HPLC 测定其中 1~3 种维生素^[1-3], 目前尚缺少在同一流动相、同一流速、同一波长条件下同时测定 4 种维生素的有效手段。本试验对此进行了研究, 并建立了采用 RP-HPLC 在同一个色谱条件下同时测定制剂中维生素 A 棕榈酸酯、维生素 D₂、E、K₁ 含量的方法。结果表明方法简便、快速, 重复性好, 精密度高, 可有效控制制剂的质量。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 包括 DAD 型紫

外检测器, Agilent 1100 化学工作站(美国安捷伦); AUW220D 型双量程分析天平(日本岛津)。维生素 D₂ 对照品(批号 10155-0004)、维生素 E 对照品(批号 10062-0007)、维生素 K₁ 对照品(批号 100156-200003)(中国药品生物制品检定所); 维生素 A 棕榈酸酯对照品(北京百灵威科技有限公司); 注射用脂溶性维生素(批号: SY0911, SY0913, SY0915, 山东瑞阳制药有限公司); 甲醇、乙腈、乙醇均为色谱纯, 水为重蒸水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性试验

色谱柱: Intersil(ODS-2) C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-乙醇-水(17:58:25:5); 流速: 1.5 mL·min⁻¹; 检测波长: 265 nm; 进样

基金项目: 辽宁省教育厅攻关计划项目(2005242)

作者简介: 张慧, 女, 博士, 副教授 Tel: (0411)81619075
Tel: (0411)87986098 E-mail: syyyys@163.com

E-mail: syyyys2000@sina.com *通讯作者: 裴志东, 男, 硕士, 副教授

量: 20 μL 。理论板数按维生素 E 计应不低于 5 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 精密称取本品适量(相当于 1 支, 规格: 维生素 A 棕榈酸酯 0.99 mg、维生素 D₂ 5 μg 、维生素 E 9.1 mg、维生素 K₁ 0.15 mg), 置 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2.2 对照品溶液 精密称取维生素 A 棕榈酸酯、维生素 D₂、E、K₁ 对照品适量, 加无水乙醇稀释制成每 1 mL 含维生素 A 棕榈酸酯 0.099 mg·mL⁻¹、维生素 D₂ 0.5 μg ·mL⁻¹、维生素 E 0.91 mg·mL⁻¹、维生素 K₁ 0.015 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 滤过, 即得。

2.2.3 阴性溶液 取制剂处方中除维生素 A 棕榈酸酯、D₂、E、K₁ 外的其他药物及辅料制成空白样品, 照“2.2.1”项下的方法制成阴性溶液, 滤过, 即得。

2.3 耐用性试验

分别采用 Diamonsil、Phenomenex、Agilent C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱、采用甲醇-乙腈-乙醇-水(20:57:25:5)、(14:59:25:5) 流动相比比例及 30, 40, 50 $^{\circ}\text{C}$ 不同柱温进行耐用性试验。结果显示, 不同品牌的色谱柱、流动相的微小变化, 柱温在 30~40 $^{\circ}\text{C}$ 之间可满足系统适应性的要求, 柱温在 50 $^{\circ}\text{C}$ 时样品发生降解现象。

2.4 专属性考察

2.4.1 阴性干扰试验 在上述色谱条件下, 分别精密量取对照品溶液、供试品溶液、阴性溶液各 20 μL , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果 4 种维生素的色谱峰分离度均大于 2.0, 达到基线分离, 阴性空白不干扰主成分测定, 见图 1。

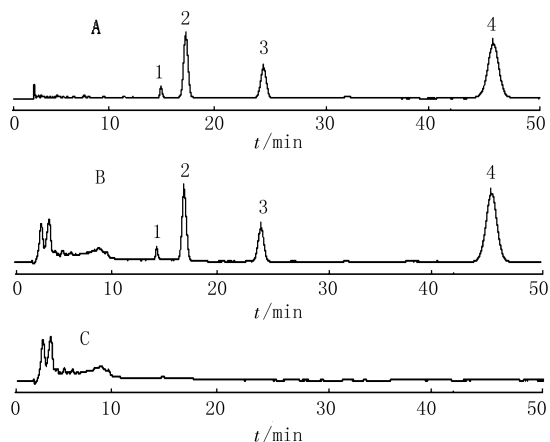


图 1 对照品(A)、供试品(B)、阴性溶液(C)色谱图
1-维生素 D₂; 2-维生素 E; 3-维生素 K₁; 4-维生素 A 棕榈酸酯

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance(A), sample solution(B) and negative solution(C)

1-vitamin D₂; 2-vitamin E; 3-vitamin K₁; 4-retinol palmitate

2.4.2 破坏性试验 取本品 3 支, 分别置 10 mL 量瓶中, 分别加 0.05 mol·L⁻¹ 的盐酸、0.05 mol·L⁻¹ 氢氧化钠和 5% 双氧水各 1 mL, 放置 1 h 进行强酸、强碱和氧化破坏; 另取本品 1 支, 置 10 mL 量瓶中, 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 条件下加热 30 min 进行高温破坏; 再取本品 1 支, 在(4500±500)lx 强光下照射 10 d, 进行光照破坏。分别取上述 5 种破坏后溶液, 加无水乙醇稀释至刻度, 滤过, 分别注入液相色谱仪。结果显示, 4 种维生素与各降解产物均能得以较好的分离。

2.5 最低定量限考察

分别精密配置 4 种维生素的对照品溶液, 逐级稀释, 以信噪比 10:1 的进行量作为最低定量限, 结果 4 种维生素的最低定量限依次是维生素 A 棕榈酸酯为 1.92 ng、维生素 D₂ 0.51 ng、维生素 E 0.84 ng、维生素 K₁ 1.14 ng。

2.6 线性关系考察

分别取维生素 A 棕榈酸酯、维生素 D₂、E、K₁ 对照品适量, 精密称定, 加无水乙醇溶解稀释制成每 1 mL 含维生素 A 棕榈酸酯 0.99 mg、维生素 D₂ 5.12 μg 、维生素 E 9.10 mg、维生素 K₁ 0.15 mg 的混合溶液, 精密量取上述对照品混合溶液 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀。按上述色谱条件, 分别进样 20 μL , 测定峰面积, 以进样量(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得到维生素 A 棕榈酸酯、维生素 D₂、维生素 E、维生素 K₁ 的线性回归方程: $Y=170\,580.7 X-14\,322.7$, $r=0.999\,8$; $Y=2\,326.8 X-3\,055.7$, $r=0.999\,3$; $Y=27\,233.5 X+288.3$, $r=0.999\,7$; $Y=641\,292.9 X-3\,349.2$, $r=0.999\,9$ 。结果表明, 维生素 A 棕榈酸酯进样量在 1.19~2.78 μg 、维生素 D₂ 在 6.14~14.33 ng、维生素 E 在 10.92~25.48 μg 、维生素 K₁ 在 0.19~0.44 μg 内, 与峰面积呈良好的线性关系。

2.7 中间精密度试验

取同一批次供试品 6 份, 在同一实验室, 由 3 个不同的实验人员, 采用日本岛津 LC-10A、Agilent 1100、大连依利特 P200II 3 种色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 计算 4 种维生素的含量, 结果维生素 A 棕榈酸酯、维生素 D₂、E、K₁ 含量的 RSD($n=6$) 分别为 1.38%, 1.15%, 1.03%, 1.11%, 方法的中间精密度良好。

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液, 按上述色谱条件, 分别在

0, 2, 4, 6, 8 h 内注入色谱仪, 测定峰面积, 结果维生素 A 棕榈酸酯、维生素 D₂、E、K₁ 在不同测定时间内峰面积 RSD% (n=6) 分别为 0.34、1.01、0.56、0.55, 可见供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.9 重复性试验

取同一批次(批号 SY0911)供试品 6 份, 精密称定, 按“2.2.1”项下方法平行制备供试品溶液, 进样 20 μL 测定峰面积, 按外标法计算 4 种成分的含量, 结果维生素 A 棕榈酸酯、维生素 D₂、E、K₁ 的平均标示含量分别为 98.04%, 100.10%, 98.30%, 99.33%; RSD(n=6)分别为 0.50%, 0.57%, 0.45%, 0.38%, 重复性符合规定。

2.10 回收率试验

按处方量的 80%、100% 和 120% 分别精密称取 4 种维生素主药和相应量的辅料各 3 份, 按“2.2.1”项下方法加无水乙醇稀释制成供试品溶液, 进样 20 μL 测定峰面积, 计算回收率。结果维生素 A 棕榈酸酯、维生素 D₂、E、K₁ 的平均回收率(n=9)分别为 99.70%、100.13%、99.74%、99.97%, RSD(n=9)分别为 0.48%、0.88%、0.69%、0.59%, 证明回收率符合规定。

2.11 样品的测定

取 3 批样品适量(相当于 1 支, 规格: 维生素 A 棕榈酸酯 0.99 mg、维生素 D₂ 5 μg、维生素 E 9.1 mg、维生素 K₁ 0.15 mg), 精密称定, 按“2.2.1”项下方法制备供试品, 分别进样 20 μL 测定峰面积, 并采用外标法计算样品含量, 结果见表 1。

表 1 样品测定结果

Tab 1 Determintion results of sample

批号	含量/ mg·支 ⁻¹			
	维生素 A	维生素 D ₂	维生素 E	维生素 K ₁
SY0911	0.98	0.005 1	9.41	0.17
SY0913	1.01	0.005 4	8.93	0.15
SY0915	0.96	0.004 9	9.02	0.14

3 讨论

分别对 4 种维生素对照品溶液进行了紫外扫描, 各成分最大吸收波长有所差异, 其中维生素 D₂ 最大吸收波长为 265 nm, 因其在制剂中含量甚微, 为此确定 265 nm 为检测波长。

本制剂辅料中使用了助溶剂聚山梨酯 80, 其为多成分的混合物, 实验中发现其保留时间与维生素 D₂ 相近, 且维生素 D₂ 在制剂中含量甚少, 仅微克级, 因此对维生素 D₂ 干扰严重, 增加了实验难度。曾采用甲醇-水、甲醇-乙腈-水、甲醇-乙腈-异丙醇-水^[4]等不同比例、等度或梯度流动相, 均未达到基线分离, 又尝试对样品采用 Sep-pak C₁₈ 柱进行前处理, 干扰现象得到改善, 但分离效果仍欠佳, 经多次实验发现流动相中加入乙醇后, 干扰现象得以解决, 维生素 D₂ 达到基线分离, 因此最终确定采用文中流动相。

本实验建立了应用 RP-HPLC 在同一色谱条件下同时测定极性相近的 4 种维生素含量的新方法, 此方法快速、简便, 可以控制制剂的质量, 同时对分析工作者具有借鉴意义。

REFERENCES

[1] Ch.P(2005)Vol II(中国药典 2005 年版. 二部)[S]. 2005: 672, 674, 676.

[2] LIU H J, YAN C, JIANG Y. Simultaneous determineation of retinol palmitate, colescalciferol and vitamin E in Compound Vitamin injection by RP-HPLC [J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2007, 22(3): 318-319.

[3] LU J, LIU X Y, LIU D F, et al. HPLC determination of vitamin D₂ in calcium-magnesium-D tablets [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2006, 26(12): 1723-1725.

[4] SHAO Y K, XU J, WANG J. Simultaneous determineation of retinol, cholecalciferol and α-tocopherol concentration in human serum by RP-HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2005, 22(6): 503-505.