

RP-HPLC 法测定维生素 D<sub>3</sub> 制剂中的有关物质王尚<sup>1,2</sup>, 郑枫<sup>1,2\*</sup>, 丁黎<sup>1,2\*\*</sup>(中国药科大学<sup>1</sup>药物分析教研室; <sup>2</sup>药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

**摘要** 建立维生素 D<sub>3</sub> 制剂中有关物质检查的反相 HPLC 方法。以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 乙腈为流动相; 柱温 20 °C; 检测波长为 265 nm; 流速 1.0 mL/min。建立的方法可以使维生素 D<sub>3</sub> 与相邻杂质有效分离。通过光热反应特性和 LC-MS-DAD 对相邻杂质进行了定性。维生素 D<sub>3</sub> 与其主要杂质前维生素 D<sub>3</sub>、反式维生素 D<sub>3</sub> 和速甾醇 D<sub>3</sub> 互为同分异构体, 在 LC-MS 上具有相同的特征离子峰  $m/z$  385.27, 四者的最大紫外吸收波长分别为 265, 265, 275, 279 nm。该法专属性、耐用性较好, 检测限和定量限分别为 0.1 μg/mL 和 0.3 μg/mL。供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定。应用本法对 3 种维生素 D<sub>3</sub> 制剂进行有关物质检查, 并与正相 HPLC 法比较, 两种方法结果一致, 表明本法适用于维生素 D<sub>3</sub> 制剂中有关物质检查。

**关键词** 反相高效液相色谱法; 维生素 D<sub>3</sub>; 有关物质; 含量测定

中图分类号 R917 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2012)01-0055-05

Determination of related substances of vitamin D<sub>3</sub> in its preparations by RP-HPLCWANG Shang<sup>1,2</sup>, ZHENG Feng<sup>1,2\*</sup>, DING Li<sup>1,2\*\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Analysis; <sup>2</sup>Key Laboratory of Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** An isocratic RP-HPLC method for the determination of the related substances of vitamin D<sub>3</sub> in its preparations was established. The chromatographic separation was achieved on amethyst C<sub>18</sub>-H column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), using acetonitrile as the mobile phase. The detection was performed at 265 nm, and the column temperature was 20 °C. A good resolution with baseline separation was obtained. Impurities were identified using photochemical and thermal experiments and LC-MS-DAD. The APCI-MS spectra gave the same [M + H]<sup>+</sup> peak at  $m/z$  385.27 as their base peaks for vitamin D<sub>3</sub>, pre-vitamin D<sub>3</sub>, trans-vitaminD<sub>3</sub>, and tachysterol<sub>3</sub>. The UV λ<sub>max</sub> of vitamin D<sub>3</sub>, pre-vitamin D<sub>3</sub>, trans-vitamin D<sub>3</sub>, and tachysterol<sub>3</sub> were 265 nm, 265 nm, 275 nm and 279 nm, respectively. The method was specific and robust. The limit of detection was 0.1 μg/mL, and the limit of quantification was 0.3 μg/mL. Test solution was stable for 24 h at room temperature. Three kinds of vitamin D<sub>3</sub> preparations were tested using the developed method and the current official method, the results showed no differences. The developed method was suitable for the determination of the related substances of vitamin D<sub>3</sub> in its preparations.

**Key words** RP-HPLC; vitamin D<sub>3</sub>; related substances; content determination

维生素 D<sub>3</sub> (vitamin D<sub>3</sub>), 是一类脂溶性维生素, 能促进钙、磷吸收<sup>[1]</sup>。对于其原料药和相关制剂, 中国药典 2010 版 (ChP 2010)<sup>[2]</sup>906-907, 美国药典 34 版 (USP 34)<sup>[3]</sup>, 欧洲药典 7.0 版 (EP 7.0)<sup>[4]</sup>,

均有收载。其有关物质的测定方法采用的是正相高效液相色谱法。维生素 D<sub>3</sub> 有关物质, 主要是其光热转化异构体, 包括前维生素 D<sub>3</sub> (pre-vitaminD<sub>3</sub>)、反式维生素 D<sub>3</sub> (trans-vitaminD<sub>3</sub>) 和速甾醇

\* 收稿日期 2011-10-14 通讯作者 \* Tel: 025-83271251 E-mail: cpu\_analyst@126.com

\*\* Tel: 025-83271289 E-mail: dinglidl@hotmail.com

$D_3$  (tachysterol<sub>3</sub>)<sup>[5-6]</sup>。它们的转化途径如图1所示。异构体相互间结构差异较小,用反相 HPLC 分离较难<sup>[7]</sup>。目前尚无反相 HPLC 法测定维生素  $D_3$  有关物质的报道。但正相色谱存在保留时间不稳,柱压易波动等缺陷<sup>[8]</sup>,使用频率远不及反相 HPLC。

本文首次建立了能够分离维生素  $D_3$  及其光热转化异构体的反相 HPLC 方法,并在此基础上进行了方法学考察,将其应用于3种维生素  $D_3$  制剂的有关物质检测。本文方法克服了正相 HPLC 的局限,适用性广,适用于维生素  $D_3$  制剂中有关物质检查。

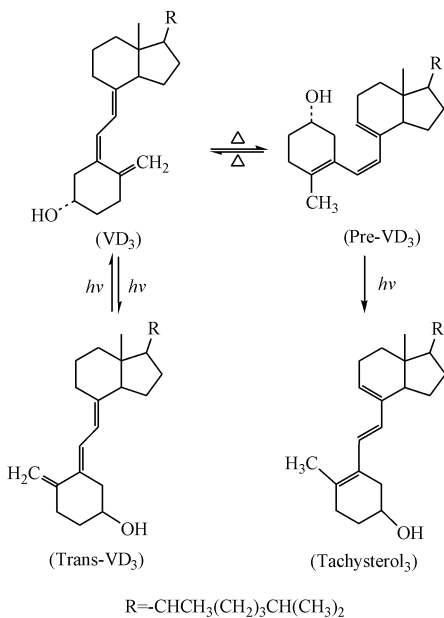


Figure 1 Photochemical and thermal isomers of vitamin  $D_3$  ( $VD_3$ )

## 1 材料

### 1.1 药品和试剂

维生素  $D_3$  对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100061-200607);钙尔奇  $D_3$  片(美国惠氏制药有限公司,批号:1103286),碳酸钙维生素  $D_3$  片及维生素  $D_3$  粉由南京某药企提供。乙腈、甲醇为市售色谱纯;正己烷、无水乙醇为市售分析纯;水为蒸馏水。

### 1.2 仪器

岛津 LC-10AT 液相色谱仪,配置 LC solution 工作站,岛津 20A 紫外检测器(日本岛津公司);TQS Quantum Ultra AM LC-MS/MS 联用仪(美国 Thermo Finnigan 公司)。

## 2 方法

### 2.1 正相色谱分析条件<sup>[2] app. 52-53</sup>

色谱柱:硅胶色谱柱;流动相:正己烷-正戊醇(997:3);柱温:30℃;检测波长:265 nm;流速:2.0 mL/min;进样体积:20  $\mu$ L。

### 2.2 反相色谱分析条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Amethyst C<sub>18</sub>-H 柱(4.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m, 美国 Sepax 公司);流动相:乙腈;柱温:20℃;检测波长:265 nm;流速:1.0 mL/min;进样体积:20  $\mu$ L。

2.2.2 质谱与 DAD 条件 离子源为 APCI 源;喷雾电压:4.5 kV;毛细管温度:300℃;鞘电压(N<sub>2</sub>):241.3 kPa;源内碰撞电压:10 eV;电晕放电电流:10  $\mu$ A;蒸发温度:350℃。扫描方式为全扫描。DAD 扫描范围为 200~400 nm。

### 2.3 系统适用性试验用溶液的制备

精密称取维生素  $D_3$  对照品 10 mg,置 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇 8 mL,避免加热,超声使溶解,甲醇定容至刻度,充氮后密封,0℃以下避光保存,作为对照品贮备溶液。取维生素  $D_3$  对照品贮备溶液 2 mL,置具塞玻璃容器,通氮后密封,置 90℃水浴中避光加热 1 h,取出迅速冷却,加甲醇 2 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 的紫外灯下,将石英吸收池斜放 45°,并距灯管 5~6 cm,照射 5 min,使溶液中含有前维生素  $D_3$ 、反式维生素  $D_3$ 、维生素  $D_3$  和速甾醇  $D_3$ 。此溶液为系统适用性试验用溶液。取此溶液 20  $\mu$ L 注入液相色谱仪,并进行 LC-MS-DAD 分析。

### 2.4 光热转化样品溶液的制备

取对照品贮备溶液两份,各 2 mL,分别置具塞玻璃容器中,通氮后密封。其中一份置 90℃水浴中避光加热 1 h,取出迅速冷却,加甲醇 2 mL,摇匀,此溶液为光热转化样品溶液 1;另一份直接加甲醇 2 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 的紫外灯下,将石英吸收池斜放 45°,并距灯管 5~6 cm,照射 10 min,此溶液为光热转化样品溶液 2。取光热转化样品溶液 1 和 2 各 20  $\mu$ L,分别注入液相色谱仪进行分析。

### 2.5 有关物质测定方法

分别取碳酸钙维生素  $D_3$  片和钙尔奇  $D_3$  片

20 片的均匀细粉、维生素 D<sub>3</sub> 细粉适量(约相当于维生素 D<sub>3</sub> 3 μg),精密称定,置于已加入水 4 mL 的 50 mL 具塞离心管中,加入无水乙醇-甲醇(95:5) 2 mL,再精密加入重蒸正己烷 10 mL,2 000 r/min 离心 10 min。上清液完全转移至另一试管中,30 ℃下氮气流吹干,甲醇 100 μL 复溶,作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分保留时间的 2 倍。

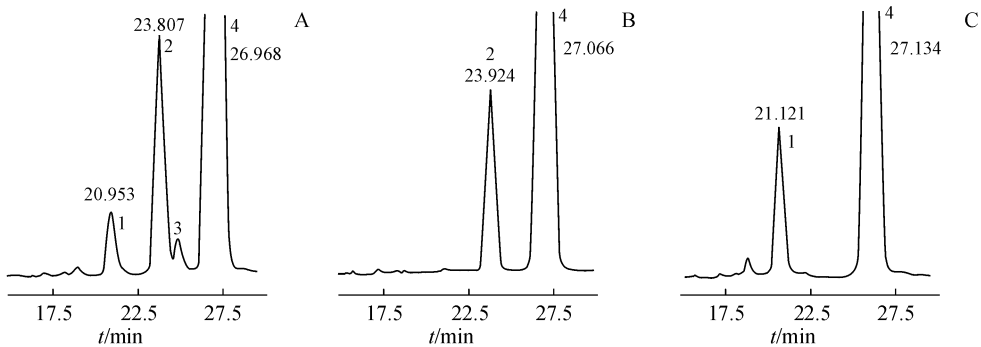
### 3 结果

#### 3.1 光热转化异构体定性

前维生素 D<sub>3</sub>、反式维生素 D<sub>3</sub>、速甾醇 D<sub>3</sub> 与维生素 D<sub>3</sub> 四者为同分异构体,相对分子质量为 384.34,LC-MS 结果显示  $m/z$  385.27,应为其  $[M + H]^+$  峰。DAD 结果显示,维生素 D<sub>3</sub>、速甾醇 D<sub>3</sub> 和前维生素 D<sub>3</sub> 的最大吸收波长  $\lambda_{\max}$  分别为 265,279,265 nm,与文献[7,9]报道完全相符;反式维生素 D<sub>3</sub> 的最大吸收波长  $\lambda_{\max}$  为 275 nm,由于目前尚无

反式维生素 D<sub>3</sub> 吸收特性的报道,因此需要进一步通过保留时间定性。

保留时间定性实验中,系统适用性试验用溶液、光热转化样品溶液 1 和 2 的色谱图分别如图 2 中 A、B 和 C 所示。由图 1 可知,维生素 D<sub>3</sub> 只加热而不进行光照仅生成前维生素 D<sub>3</sub>;不加热只光照仅生成反式维生素 D<sub>3</sub><sup>[7]</sup>。据此,可以确定维生素 D<sub>3</sub> 及其光热转化异构体的出峰顺序。图 2-B 中除维生素 D<sub>3</sub> 峰外,仅有一个有关物质峰,为前维生素 D<sub>3</sub> 峰,其与维生素 D<sub>3</sub> 的相对保留时间为 0.88;图 2-C 中,也仅有一个有关物质峰,为反式维生素 D<sub>3</sub> 峰,其与维生素 D<sub>3</sub> 的相对保留时间为 0.78。由此可知,图 2-A 中剩下的一个有关物质峰为速甾醇 D<sub>3</sub> 峰,其与维生素 D<sub>3</sub> 的相对保留时间为 0.92。各峰之间分离良好。在正相 HPLC 条件下进行同样的光热转化试验,结果一致,确证了反相 HPLC 上各光热转化异构体的定性结果。



1: Trans-vitamin D<sub>3</sub>; 2: Pre-vitamin D<sub>3</sub>; 3: Tachysterol<sub>3</sub>; 4: Vitamin D<sub>3</sub>

**Figure 2** System suitability test and photochemical and thermal experiments of RP-HPLC

A: Photo chemical and thermal solution; B: Thermal solution; C: Photochemical solution

#### 3.2 系统适用性试验

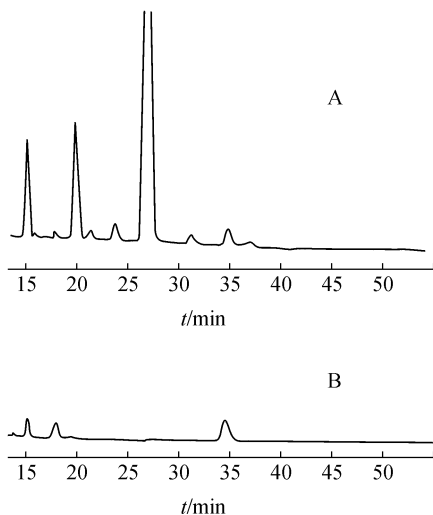
精密量取系统适用性试验用溶液 20 μL 注入液相色谱仪,测定维生素 D<sub>3</sub> 的峰值,连续进样 5 次,相对标准偏差为 0.61%;前维生素 D<sub>3</sub> 与反式维生素 D<sub>3</sub>、前维生素 D<sub>3</sub> 与速甾醇 D<sub>3</sub> 以及维生素 D<sub>3</sub> 和速甾醇 D<sub>3</sub> 的峰分离度均大于 1.0。理论塔板数按维生素 D<sub>3</sub> 计大于 8 000。

取维生素 D<sub>3</sub> 对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,定量稀释制成每毫升中含维生素 D<sub>3</sub> 0.3 μg 的溶液,精密量取该溶液 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,信噪比按维生素 D<sub>3</sub> 计大于等于 10。

#### 3.3 色谱方法的验证

3.3.1 专属性 取碳酸钙维生素 D<sub>3</sub> 片,经酸(4 mol/L 盐酸溶液,超声 30 min)、碱(6 mol/L 氢氧化钠溶液,超声 30 min)、光照(5 000 lx,72 h)、氧化(30% 双氧水溶液,超声 30 min)、高温(105 ℃,24 h)等进行破坏,然后按“2.5”项下操作配制破坏性溶液,进样分析。结果表明,经氧化、高温和酸破坏后,制剂含量降幅程度大,碱和光照破坏含量降幅不大。但所有破坏实验均会使样品有关物质个数增多,杂质总量增加。本研究建立的反相色谱条件能使样品中的主成分、主要有关物质和相邻杂质有效分离,破坏试验样品典型色谱分离图

如图3-A所示。



**Figure 3** HPLC chromatograms of calcium carbonate with vitamin D<sub>3</sub> tablets  
A: Calcium carbonate with vitamin D<sub>3</sub> tablets destroyed by acid; B: Blank solution

按碳酸钙维生素D<sub>3</sub>片的处方,按“2.5”项下操作配制混合辅料溶液,进样分析,结果显示,片剂中辅料组分在265 nm检测波长下不干扰样品的测定,典型的色谱分离图如图3-B所示。

**3.3.2 检测限和定量限** 取维生素D<sub>3</sub>对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,定量稀释制成一系列浓度的溶液,取上述溶液20 μL进样,记录色谱图。结果表明,维生素D<sub>3</sub>的检测浓度为0.1 μg/mL (S/N = 3),定量浓度为0.3 μg/mL (S/N = 10)。

**3.3.3 溶液稳定性试验** 取碳酸钙维生素D<sub>3</sub>片,按“2.5”项下方法制备一批供试品溶液,将多份上清液混合,每隔2 h分别测定一次主峰峰面积,结果表明,样品溶液在24 h内稳定。

**3.3.4 耐用性试验** 取系统适用性试验用溶液,分别在下列条件下进样,观察峰面积和分离度变化。改变的条件有:柱温变化范围在±2.5%内;流速变化范围在±10%之内;不同厂家不同型号色谱柱:Agilent TC-C<sub>18</sub>柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),岛津VP-ODS柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);不同来源的乙腈。维生素D<sub>3</sub>与各有关物质相对响应及分离度不受影响。可知建立的方法耐用性较好。

#### 3.4 色谱方法的应用

用建立的RP-HPLC法对碳酸钙维生素D<sub>3</sub>片、钙尔奇D<sub>3</sub>片以及维生素D<sub>3</sub>粉按“2.5”项下操作

进行有关物质检查,并与中国药典2010版正相高效液相色谱法(NP-HPLC)进行对比。两种方法结果一致:除前维生素D<sub>3</sub>外,未检出其他杂质。符合中国药典2010版维生素D<sub>3</sub>原料药有关物质检查要求<sup>[2] 906-907</sup>。

## 4 讨论

### 4.1 色谱条件的选择和优化

维生素D<sub>3</sub>为甾醇类化合物,极性很弱,其在氰基(-CN)、氨基(-NH<sub>2</sub>)等极性固定相上的保留较弱,但可通过改变流动相洗脱能力进行调节。以纯有机相(甲醇或乙腈)为流动相,在上述两种色谱柱上,系统适用性试验用溶液的色谱图中均显示一个色谱峰,保留时间 $t_R$ 小于5 min;调节流动相中水的比例,当水比例增加至40%,氰基柱和氨基柱上的色谱图中仍显示一个色谱峰,保留时间大于23 min。

苯基柱和C<sub>18</sub>柱等极性较弱或非极性固定相对维生素D<sub>3</sub>保留适宜。在苯基柱上,流动相为甲醇-水(85:15)时,能分离出包括主峰在内的3个色谱峰,分离度分别为1.0和1.5,保留时间为40 min左右,继续增加流动相中水比例至20%,出峰时间延长至51 min,分离度分别为0.6和2.0。以纯甲醇为流动相,C<sub>18</sub>柱保留时间为10 min,可以明显分离出含主峰在内的2个色谱峰。在甲醇中加入20%乙腈后,C<sub>18</sub>柱上保留时间延长至15 min,色谱峰出峰顺序改变。通过一系列优化,最终以十八烷基硅烷键合硅胶为固定相,乙腈为流动相的色谱条件,能分离出包括主峰在内的4个色谱峰,且保留时间适宜,为30 min左右。

实验中发现,增加流动相中水的比例,维生素D<sub>3</sub>及其异构体保留明显增强,但分离度没有任何改善,无法通过改变流动相中水的比例来改善分离。另一方面,乙腈对维生素D<sub>3</sub>及其异构体的洗脱能力小于甲醇。此现象与绝大多数实验经验相反,推测与乙腈能分离异构体有关,需要进一步研究。

维生素D<sub>3</sub>在C<sub>18</sub>柱上保留对温度较为敏感。柱温由20℃升高至30℃,保留时间缩短了20%左右,分离度也受到影响,最小分离度由1.2下降到1.08。为了尽量缩短分析时间,又保证分离,最终选择20℃作为柱温。

## 4.2 应 用

本试验中所测定的碳酸钙维生素 D<sub>3</sub> 片和钙尔奇 D<sub>3</sub> 片中,维生素 D<sub>3</sub> 含量非常低,需要通过提取浓缩方式进行测定。复溶溶剂为 100  $\mu\text{L}$ ,无法通过主成分自身稀释对照法进行杂质定量。因此,本研究中规定:以定量限 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (供试品浓度的 1% 左右)为限度,除前维生素 D<sub>3</sub> 外,不得检出其他超过定量限的单个杂质。为了排除灵敏度低的仪器其定量限无法达到本研究中的浓度,在系统适用性试验中进一步规定了定量限信噪比应大于等于 10。

### 参 考 文 献

- [1] Lan JF, Liu LX. Determination of VD<sub>3</sub> in calcium with vitamin D capsule[J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2006, 26(4): 498 - 499.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia*: part 2 (中华人民共和国药典: 二部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2010.
- [3] United States Pharmacopoeia Convention. *The United States Phar-*

- macopoeia* 34-The National Formulary 29 [S]. Baltimore: Port City Press, 2011: 2 324 - 2 325.
- [4] European Pharmacopoeia Commission. *European Pharmacopoeia* 7.0 [S]. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), 2010: 1 675 - 1 680.
- [5] Petritz E, Tritthart T, Wintersteiger R. Determination of phylloquinone and cholecalciferol encapsulated in franalates formed by melt extrusion[J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2006, 69(1/2): 101 - 112.
- [6] Benmoussa A, Delaurent C, Lacout JL, et al. Determination of cholecalciferol and related substances by calcium phosphate hydroxyapatite and calcium phosphate fluoroapatite high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 1996, 731(1/2): 153 - 160.
- [7] Lu ZR, Chen TC, Holick MF. Preparation of milligram quantity of vitamin D<sub>3</sub> isomers by a two-step high performance liquid chromatographic method[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1992, 27(5): 369 - 372.
- [8] Ding L. *Drug Chromatographic Analysis* (药物色谱分析) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 181 - 184.
- [9] Abillion E, Mermet-Bouvier R. Effect of wavelength on production of previtamin D<sub>2</sub> [J]. *J Pharm Sci*, 1973, 62(10): 1 688 - 1 691.

## · 本 刊 讯 ·

### 《中国药科大学学报》编辑部召开 2011 年度编委会

2011 年 12 月 30 日,《中国药科大学学报》编委会在中国药科大学学术交流中心隆重召开。《中国药科大学学报》主编彭司勋院士、《中国药科大学学报》副主编王广基教授和在宁近 40 位编委和编辑部全体工作人员参加了会议。

会议由《中国药科大学学报》副主编王明时教授主持并致欢迎辞。首先,主编彭司勋院士发表讲话,在讲话中他肯定了编辑部在过去一年所取得的成绩,同时希望编委能认真履行编委的责任和义务,积极为刊物撰写优质稿件,使编委会的工作真正取得实效。中国药科大学副校长、《中国药科大学学报》副主编王广基教授发表了重要讲话。王广基校长充分肯定了《中国药科大学学报》编辑部 2011 年的工作及取得的成绩,感谢编委会和编辑部成员为《中国药科大学学报》作出的奉献和努力,希望今后继续加强组稿工作,保持《中国药科大学学报》在中国药学期刊的领先地位,最后向编委们表达了新年祝福。《中国药科大学学报》编辑部主任邹栩编审作 2011 年工作总结:《中国药科大学学报》在 2011 年取得了喜人成绩:编辑集体被教育部评为“中国高校科技期刊优秀团队”;编辑部网站荣获“中国高校科技期刊优秀网站”;在“中国学术期刊评价研究报告”中位居高校学报学术期刊(医学类,126 种)排行榜第 2 位,全国药学期刊第 5 位,评为“RCCSE 中国权威学术期刊”;编辑部成员获得中国高校科技期刊优秀青年编辑,江苏省科技期刊优秀编辑奖等单项奖以及 2 位青年编辑获得江苏省新闻出版岗位技能大赛银奖。邹栩主任对一年来编委们为学报工作付出的辛勤劳动表示感谢,并呼吁全体编委在 2012 年继续支持《中国药科大学学报》的工作,认真履行编委职责,认真审稿、组稿,保证我校这一学术窗口健康可持续发展。期刊编辑部主任郑晓南编审也到会并发表重要讲话。最后,与会编委就如何进一步提升刊物的竞争力,如何进一步打造精品期刊,栏目创建以及争取优质稿源等提出了许多建设性的意见和建议。编委会取得圆满成功。

(本刊编辑部)