

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

陈红丽^{1,3}, 夏彤², 王杏林^{3,4}, 尹东东^{3,4*}

1. 河南大学 药学院, 河南 开封 475001

2. 河北爱尔海泰药业有限公司, 河北 石家庄 050035

3. 天津药物研究院, 天津 300193

4. 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 建立测定脂溶性维生素注射液中维生素 A 棕榈酸酯有关物质的反相高效液相色谱法。**方法** Diamond C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为甲醇-异丙醇-水 (60:32:8), 流动相 B 为甲醇-异丙醇 (70:30), 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 324 nm, 柱温 30 ℃。**结果** 维生素 A 棕榈酸酯与维生素 D₃、维生素 E、维生素 K₁ 及其有关物质分离度好, 在质量浓度 0.206~5.14 mg/L 时, 维生素 A 棕榈酸酯的质量浓度与峰面积线性关系良好, 检测限为 0.041 mg/L。**结论** 该方法准确可靠, 专属性好, 可用于脂溶性维生素注射液中维生素 A 棕榈酸酯的质量控制。

关键词: 脂溶性维生素注射液; 维生素 A 棕榈酸酯; 梯度洗脱; 高效液相色谱法; 有关物质

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2011)04-0273-04

Determination of related substances of vitamin A palmitate in fat-soluble vitamin injection by HPLC

CHEN Hong-li^{1,3}, XIA Tong², WANG Xing-lin^{3,4}, YIN Dong-dong^{3,4}

1. Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475001, China

2. Hebei Ideal and Hightech Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

4. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for determining the related substances of vitamin A palmitate in fat-soluble vitamin injection. **Methods** The chromatographic separation was performed on a Diamond C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a column temperature at 30 ℃. The mobile phase consisted of methanol-isopropanol-water (60 : 32 : 8) as mobile phase A and methanol-isopropanol (70 : 30) as mobile phase B. The flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was at 324 nm. **Results** Vitamin A palmitate was separated well with vitamin D₃, vitamin E, vitamin K₁ and its related substances. The calibration range was from 0.206 to 5.14 mg/L. The detection limit was 0.041 mg/L. **Conclusion** The method is accurate and specific, and can be used for the quality control of vitamin A palmitate in fat-soluble vitamin injection.

Key words: fat-soluble vitamin injection; vitamin A palmitate; gradient elution; HPLC; related substances

脂溶性维生素注射液系维生素 A 棕榈酸酯、维生素 E、维生素 D₃ 和维生素 K₁ 组成的水溶液复方注射剂, 可以用水任意稀释。在临床上静脉滴注给药, 主要用于肠外脂溶性维生素的补充。本品中, 维生素 K₁ 对光稳定性极差, 采用棕色安瓿包装。维生素 A 棕榈酸酯对热很不稳定, 自身所含杂质成分也较多。本实验针对脂溶性维生素注射液中的维生素 A 棕榈酸酯进行有关物质研究。按照国家药品审

评中心对于化学药品复方制剂中有关物质研究的指导原则, 需要对大剂量的不稳定的活性成分进行有关物质研究。目前笔者未见有文献报道维生素 A 棕榈酸酯的有关物质检测方法。本品中主要辅料有聚山梨酯 80、聚乙二醇 400 (PEG400)、丙二醇、山梨醇等, 各主药和辅料成分性质及含量差异大, 分离困难, 相互干扰。本实验参考文献^[1-2], 通过试验建立了反相高效液相色谱梯度洗脱法检查脂溶性维

收稿日期: 2011-03-16

作者简介: 陈红丽, 女, 河南省漯河市人, 河南大学硕士研究生, 专业方向为药物制剂。Tel: 15122871513 E-mail: yilihongchen520@126.com

*通讯作者 尹东东 Tel: (022)23006885 E-mail: yindd@tjipr.com

生素注射液中维生素 A 棕榈酸酯的有关物质,方法准确可靠,能够用于脂溶性维生素注射液中维生素 A 棕榈酸酯的质量评价。

1 仪器与试剂

Lab Alliance Series III 液相泵、Lab Alliance Model 201 紫外检测器、HT-230A 型柱温箱、千谱工作站。

脂溶性维生素注射液(规格 4 mL,含维生素 A 棕榈酸酯 1.82 mg,维生素 E 10 mg,维生素 K₁ 2 mg,维生素 D₃ 0.005 mg,批号 090913、090916、090918,自制);甲醇、异丙醇(色谱纯,天津市康科德科技有限公司);水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

取脂溶性维生素注射液,精密量取 2 mL 于 10 mL 量瓶中,用水稀释制成含维生素 A 棕榈酸酯约 100 μ g/mL 的溶液,即得维生素 A 棕榈酸酯有关物质检查供试溶液。

按照脂溶性维生素注射液的制备工艺分别配制单一的维生素 A 棕榈酸酯溶液、维生素 D₃ 溶液、维生素 E 溶液和维生素 K₁ 溶液。分别精密量取 2 mL 维生素 A 棕榈酸酯溶液、维生素 D₃ 溶液、维生素 E 溶液和维生素 K₁ 溶液,置 4 个 10 mL 量瓶中,用水稀释,定容、摇匀,即得单一脂溶性维生素成分的供试溶液。

2.2 检测波长的选择

维生素 A 棕榈酸酯在流动相中的最大吸收波长为(324 $\pm$ 1) nm,其主要有关物质在此波长也都有最大或者较强吸收;维生素 D₃ 在 265 nm 有最大吸收,维生素 E 在 229、286 nm 有最大吸收,维生素 K₁ 在 248、261、270、328 nm 有最大吸收;辅料聚山梨酯 80、PEG400、丙二醇和山梨醇无明显紫外吸收。选择 324 nm 作为检测波长,能够消除维生素 E 和维生素 D₃ 的干扰,也保证了维生素 A 棕榈酸酯有关物质的最大检出。

2.3 色谱条件及系统适用性试验

Diamond C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),流动相为甲醇-异丙醇-水(60:32:8)(A)和甲醇-异丙醇(70:30)(B),体积流量 1.0 mL/min。梯度洗脱条件:0~3 min, 100% A; 3~13 min, 0~100% B; 13~33 min, 100% B; 33~36 min, 0~100% A, 36 min 以后 100% A。检测波长 324 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样量 20 μ L。在该色谱条件下理论塔

板数按维生素 A 棕榈酸酯计算不低于 10 000,维生素 A 棕榈酸酯与各相邻峰之间的分离度不低于 1.5。

2.4 空白干扰试验

空白干扰试验 取“2.1”项下的 4 个单一脂溶性维生素成分的供试溶液,按“2.3”项下的色谱条件进行检查,记录色谱图,见图 1、2-A;结果表明,在测定浓度条件下辅料、维生素 D₃ 和维生素 E 不出峰,通过扣除维生素 K₁ 峰可以对维生素 A 棕榈酸酯的有关物质进行测定。

2.5 破坏性试验

脂溶性维生素注射液为弱碱性溶液,充氮气灌封于棕色安瓿中并遮光保存。因此,存放温度应是影响其稳定性的主要因素。本实验通过对单组分维生素 A 棕榈酸酯溶液和脂溶性维生素注射液同时进行破坏性研究,归属维生素 A 棕榈酸酯的有关物质,以建立维生素 A 棕榈酸酯的有关物质检查方法。

2.5.1 维生素 A 棕榈酸酯溶液破坏试验 (1) 热破坏 取维生素 A 棕榈酸酯溶液,置沸水浴中破坏 2 h,取出放冷,按“2.1”项下方法配制测定溶液;按“2.3”项下的色谱条件进行维生素 A 棕榈酸酯热破坏有关物质检查,记录色谱图。实验结果显示,维生素 A 棕榈酸酯溶液经热破坏后,有 1 个杂质(杂质 c)明显减少,有 5 个杂质(杂质 a、b、d、e、f)明显增加,其他杂质没有明显变化,见图 2-A、2-C。因此,在控制维生素 A 棕榈酸酯的有关物质时,可重点关注杂质 a、b、d、e、f 的变化。(2) 光破坏 取维生素 A 棕榈酸酯溶液,置 4 500 lx 强光下,照射 12 h,按“2.1”项下方法配制测定溶液;按“2.3”项下的色谱条件进行维生素 A 棕榈酸酯光破坏有关物质检查,记录色谱图。与破坏前比较,光解样品未见杂质明显增加,说明维生素 A 棕榈酸酯在棕色安瓿中对光稳定性良好。

2.5.2 脂溶性维生素注射液热破坏试验 取脂溶性维生素注射液,置沸水浴中破坏 1 h,取出放冷,按“2.1”项下方法配制热破坏样品测定溶液;按“2.3”项下的色谱条件进行脂溶性维生素注射液热破坏有关物质检查,记录色谱图,见图 2-B、2-D。脂溶性维生素注射液经热破坏后,杂质 c 也明显减少,杂质 b 无明显变化,杂质 a、d、e、f 均有明显增加,同维生素 A 棕榈酸酯注射液热降解变化的情况一致。实验结果显示,脂溶性维生素注射液中维生素 A 棕榈酸酯与其有关物质分离良好,且能与其他组

分及其降解产物达到基线分离。

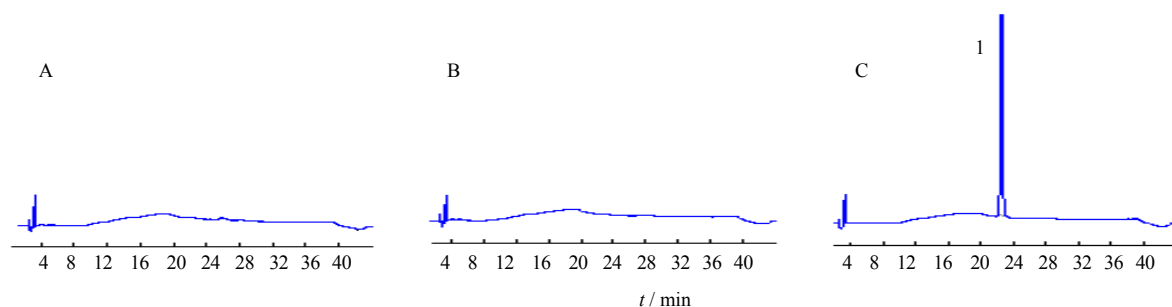
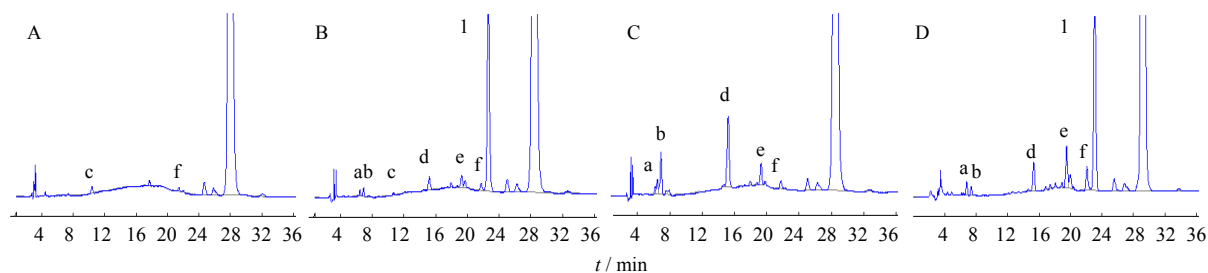


图1 维生素D₃ (A)、维生素E (B)和维生素K₁ (C) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of vitamin D₃ (A), vitamin E (B), and vitamin K₁ (C)



1- 维生素K₁ 2- 维生素A棕榈酸酯 a~f-杂质

1- vitamin K₁ 2- vitamin A palmitate a~f- impurity

图2 维生素A棕榈酸酯溶液(A)、脂溶性维生素注射液(B)、维生素A棕榈酸酯溶液热破坏(C)和脂溶性维生素注射液热破坏(D)有关物质色谱图

Fig. 2 Chromatograms of vitamin A palmitate injection (A), fat-soluble vitamin injection (B), vitamin A palmitate injection destroyed by heat (C), and fat-soluble vitamin injection destroyed by heat (D)

2.6 线性范围

取维生素A棕榈酸酯适量,精密称定,加异丙醇溶解并依次稀释成质量浓度为0.206、1.03、2.06、3.08、5.14 mg/L的系列溶液,分别进样,记录色谱图。用峰面积(Y)对质量浓度(C)进行线性回归,回归方程为: $Y=101\ 842\ C-2\ 063.8$, $r=0.999\ 9$ 。结果显示,维生素A棕榈酸酯在0.206~5.14 mg/L, Y与C线性关系良好。

2.7 检测限

取“2.4”项下最低质量浓度溶液进一步稀释后进样,按 $S/N=3$ 计算,维生素A棕榈酸酯的检测限为0.041 mg/L。

2.8 稳定性试验

取“2.1”项下供试溶液,分别于配制完成后0、2、4、6、8 h测定,按面积归一化法计算杂质质量,杂质个数均为14个,杂质总量均为3.5%。结果表明,样品溶液在8 h内稳定。

2.9 样品测定

取供试品溶液和对照溶液分别进样测定,按自

身对照法计算有关物质量。3批供试样品(批号090913、090916、090918)中最大杂质质量分别为0.69%、0.62%、0.64%,杂质总量分别为3.53%、3.37%、3.41%。3批供试样品中最大杂质均小于1%,杂质总量均小于5%。

3 讨论

3.1 色谱洗脱系统的选择

对于脂溶性维生素,一般选择正相高效液相色谱法进行洗脱;本实验所研究的脂溶性维生素注射液,为iv给药的水溶液,采用正相色谱法时,需要进行脂溶性维生素成分和水溶性辅料间的分离,操作繁琐;采用反相高效液相色谱法,注射液用水适当稀释后可直接进样检测,避免了繁琐的前处理操作,方法简单易行。

3.2 流动相的选择

试验了乙腈-水、甲醇-水、异丙醇-水等流动相,发现乙腈、甲醇、异丙醇对脂溶性维生素的洗脱能力依次增强;使用异丙醇-水作为流动相,流动相黏度较大,色谱柱柱压较高,对色谱柱造成一定伤害。

在保证色谱分离和缩短整个检测时间的前提下,选择甲醇-异丙醇做为基本流动相。由于维生素 A 棕榈酸酯的有关物质较多,在等度洗脱条件下,无法在较短的时间内完成维生素 A 棕榈酸酯同其他成分及各杂质间的分离,所以采用梯度洗脱法,以甲醇-异丙醇-水(60:32:8)为流动相 A,以甲醇-异丙醇(70:30)为流动相 B,先用流动相 A 洗脱,再逐步过渡到流动相 B 洗脱,这样既保证了维生素 A 棕榈酸酯同其他组分及各有关物质的分离,也使维生素 A 棕榈酸酯的保留时间提前,理论塔板数提高。在整个洗脱过程中,维生素 D₃、维生素 E、维生素 K₁ 和维生素 A 棕榈酸酯先后被洗脱出来。

3.3 检测波长的选择

维生素 A 棕榈酸酯在流动相中的最大吸收波长为(324±1) nm,其主要有关物质在此波长也都有最大或者较强吸收;选择 324 nm 作为检测波长,在测定浓度下维生素 E 和维生素 D₃ 没有被检出,维生素 K₁ 的保留时间为 22.5 min,与维生素 A 棕榈酸酯及其有关物质分离较好,通过扣除溶剂、辅料和维生素 K₁ 峰,能够准确检测维生素 A 棕榈酸酯的有关物质,达到质量控制的目的。

3.4 破坏性试验

有关物质研究一般进行酸、碱、氧、热、光的破坏试验。维生素类药物一般稳定性较差,与高浓度的酸、碱和氧接触后,组分降解严重,甚至几乎完全降解,有关物质检查已经失去意义。因此本研究中仅进行热、光的破坏试验。

3.5 脂溶性维生素注射液的有关物质

在脂溶性维生素注射液中,维生素 D₃ 的质量浓度很小,仅有 1.25 mg/L,维生素 E 相对于维生素 K₁ 和维生素 A 棕榈酸酯来说,稳定性稍好。因此,对维生素 D₃ 和维生素 E 仅通过量来控制注射液质量。本实验对维生素 A 棕榈酸酯的有关物质进行了研究,在下一步的工作中,继续对维生素 K₁ 进行有关物质研究。

综上所述,该方法可用于脂溶性维生素注射液中维生素 A 棕榈酸酯的有关物质检查,方法专属、可靠,适用于该制剂的质量控制。

参考文献

- [1] 蒋 晔,刘红菊,郝晓花. 4 种脂溶性维生素的非水反相 HPLC 测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(2): 93-94.
- [2] 张 震,张玉虎. 化学药品复方制剂中有关物质的定性归属方法 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(21): 1898-1900.

版权合作声明

中国药学会于 2009 年与中国学术期刊(光盘版)电子杂志社签订数字出版独家合作协议,在协议期间,中国药学会主办的 19 种科技期刊(包括天津**中草药**杂志社出版的 3 本期刊《**中草药**》、《现代药物与临床》、《药物评价研究》杂志)的网络版由中国学术期刊(光盘版)电子杂志社(其出版和信息服务网站为“中国知网”)独家出版发行,读者可登陆“中国知网”(www.cnki.net)查阅浏览全文。

天津**中草药**杂志社

网址: www.中草药杂志社.com

www.tiprpress.com