

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.07.08

HPLC 测定维生素 ADE 注射液中三种维生素的含量

吴春燕^{1,2}, 张金宝³, 刘海艳³, 李文财³, 冯 岩³, 王 莉³, 任建军³, 张玉彦^{3*}

(1. 宁夏兽药饲料监察所, 银川 750011; 2. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100; 3. 宁夏智弘生物科技有限公司, 银川 750021)

[收稿日期] 2017-11-30 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 07-0052-07 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 采用 HPLC 建立了兽药维生素 ADE 注射液中维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E 的含量检测。采用 C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇为流动相 A、乙腈-乙醇-水(60:25:5)为流动相 B 进行梯度洗脱, 流速为 1.5 mL/min, 检测波长为 265 nm, 柱温为 25 ℃, 进样量为 20 μL。结果表明, 在此色谱条件下, 维生素 ADE 注射液中维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E 的分离度良好, 分别在 60.96~1219.20 μg/mL、2.56~51.20 μg/mL 和 300.23~6004.60 μg/mL 范围内线性关系良好($r^2>0.999$)。按外标法以峰面积计算进行检测, 维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E 的平均回收率分别为 99.6%、101.1%和 99.0%, *RSD* 均小于 1.0%; 平均重复性分别为 105.7%、106.8%和 102.3%, *RSD* 均小于 1.0%; 中间精密度的 *RSD* 均小于 0.5%; 稳定性的 *RSD* 均小于 1.0%; 耐用性中选择流动相 A 与 B 变化为 17:83、流速为 1.5 mL/min 时, 在一定范围内三种组分的含量基本稳定; 柱温为 25 ℃时, 可避免维生素降解。说明该方法简单、快速, 适用于维生素 ADE 注射液中三种维生素含量的测定, 具有分离效果好、回收率高和稳定性好的特点。

[关键词] HPLC; 维生素 ADE 注射液; 含量测定

Determination of 3 Kinds of Vitamins in Vitamin ADE Injection by HPLC

WU Chun-yan^{1,2}, ZHANG Jin-bao³, LIU Hai-yan³, LI Wen-cai³, FENG Yan³,WANG Li³, REN Jian-jun³, ZHANG Yu-yan^{3*}

(1. Ningxia Veterinary Drugs and Feed Administration, Yinchuan 750011, China; 2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 3. Ningxia Zoohance Biotech Co., Ltd, Yinchuan 750021, China)

Corresponding author: ZHANG Yu-yan, E-mail: zhangyy@zoohance.com

Abstract: To establish a HPLC method for determination of vitamin A, vitamin D₃ and vitamin E in vitamin ADE injection. Using C18 column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) with a gradient elution of methanol as the mobile phase A and acetonitrile-ethanol-water (60:25:5) as the mobile phase B at a flow rate of 1.5 mL/min and a column temperature of 25 ℃. The determination wave length is 265 nm, while the injection volume is 20 μL. The results indicated that calibration curves for vitamin A, vitamin D₃ and vitamin E were linear over the range of 60.96~1219.20 μg/mL, 2.56~51.20 μg/mL and 300.23~6004.60 μg/mL ($r^2>0.999$), respectively. The mean

作者简介: 吴春燕, 农业工程师, 从事兽药监督、复核检验方面工作。

通讯作者: 张玉彦。E-mail: zhangyy@zoohance.com

recoveries of vitamin A, vitamin D₃ and vitamin E were 99.6%, 101.1% and 99.0% (*RSD*<1.0%); the mean repetitive were 105.7%, 106.8% and 102.3% (*RSD*<1.0%); the *RSD* of intermediate precision were less than 0.5%; the *RSD* of stability were less than 1.0%. During the durability, when the vary of mobile phase (17 : 83) and flow rate (1.5 mL/min) made the contents were basically stable, while column temperature is 25 °C to avoid the degradation of vitamin contents. This method has good selectively, high recovery and good stability, and can be used for the determination of vitamin ADE injection.

Key words: HPLC; vitamin ADE injection; content determination

维生素 ADE 注射液是以维生素 A、维生素 D 和维生素 E 为主药,辅以其他溶剂,制备成的营养补充类物质,用于预防和治疗动物维生素 A、维生素 D 和维生素 E 缺乏症^[1-3],该制剂目前正在申报 5.1 类新兽药。目前,测定脂溶性维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E 的方法主要包含分光光度法和 HPLC 法^[4-5],其中分光光度法是通过测定吸收度而确定样品含量,因样品中的辅料会对吸收度造成干扰而影响含量检测,须经过皂化和提取等预处理过程后进行检测;HPLC 法具有灵敏度高、操作简单和重现性好等特点,但是样品同样须经过繁琐的预处理过程后,方能进行含量检测。根据维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E 均溶于乙醇的物理特性,结合相似相溶原理,采用无水乙醇直接提取的方法,并建立了以甲醇为流动相 A、乙腈-乙醇-水(60 : 25 : 5)为流动相 B 的反相 HPLC 法,能有效分离维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E,来满足实际生产过程中对检验时间及结果的需求。结果表明该方法操作简单、结果准确,可用于成品及中间体的检测。

1 材 料

1.1 仪器 上海梅特勒托利多仪器有限公司 AB265-S 电子天平;日本岛津 LC-2010C 高效液相色谱仪。

1.2 试药与试剂 维生素 A 棕榈酸酯对照品,购自德国 J&K Scientific Ltd,批号为 LJ10P49,含量 1790,000 U/g;维生素 D₃ 对照品,购自中国食品药品检定研究院,批号为 100061-201208,含量 99.8%;维生素 E 对照品,购自中国食品药品检定研究院,批号为 100062-201110,含量 97.7%;维生素 ADE 注射液,宁夏智弘生物科技有限公司生产,批号为

20121001,规格 10 mL;维生素 A 1,000,000 U+维生素 D₃ 100,000 U+维生素 E 3,000 U;所有试剂均为色谱级。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);甲醇为流动相 A,乙腈-乙醇-水(60:25:5)为流动相 B,按表 1 进行梯度洗脱;检测波长为 265 nm;流速为 1.5 mL/min;柱温为室温;进样量为 20 μL。

表 1 梯度洗脱

Tab 1 Gradient elution

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	17	83
18	50	50
21	100	0
35	100	0
40	17	83

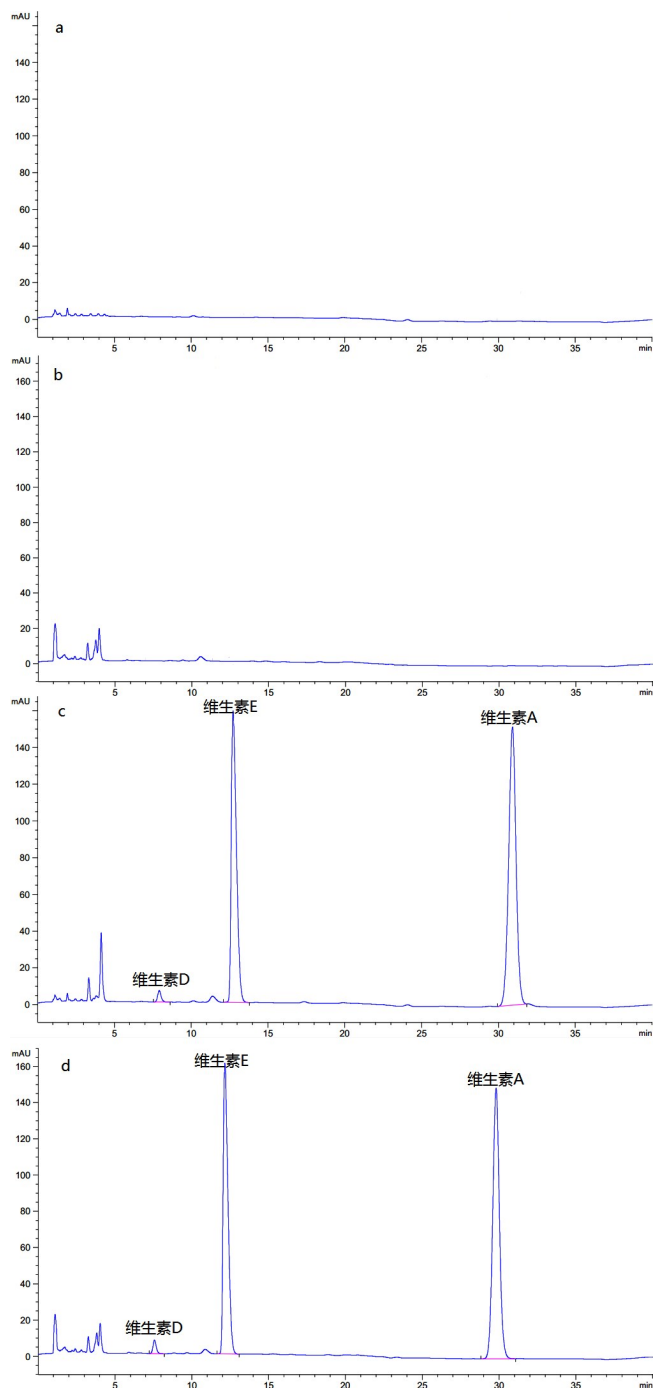
2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 精密称取维生素 A 棕榈酸酯对照品、维生素 D₃ 对照品和维生素 E 对照品各适量,用无水乙醇制成每 1 mL 中约含维生素 A 棕榈酸酯 1000 U、维生素 D₃ 100 U、维生素 E 3 U 的溶液,滤过,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密量取本品 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 精密吸取 20 μL 空白溶剂、阴性溶液(不含主药)、对照品溶液和供试品溶液,按上述色谱条件,注入色谱仪,记录色谱图,结果如图 1 所示,空白溶剂及阴性溶液对三种组分含量测定无干扰。



(a:空白溶剂图谱;b:阴性溶液图谱;c:对照品图谱;d:供试品图谱)

(a:Blank solvent map;b:Negative solution map;c:Reference map;d:Test sample map)

图 1 专属性图谱

Fig 1 Specific map

2.3.2 线性 精密称定维生素 A 棕榈酸酯、维生素 D₃、维生素 E 对照品适量,加无水乙醇制成每 1 mL 中含维生素 A 棕榈酸酯 6096 μg、维生素 D₃ 256 μg、维生素 E 30023 μg 的混合液,精密量取上述对照品混合液 0.1、0.2、0.6、1.0、1.5、2.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,滤过。

按上述色谱条件,精密量取 20 μL,注入色谱仪,记录色谱图。以样品浓度为 x (μg/mL),平均峰面积为 y ,进行线性回归。结果回归方程($n=7$)和相关系数分别为维生素 A $y=7.3235x+24.297, r^2=1$; 维生素 D₃ $y=4.5714x+0.77738, r^2=0.99995$; 维生素 E $y=1.2036x+33.179, r^2=0.9999$ 。实验结果表明,维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E 分别在 60.96 ~ 1219.20 μg/mL、2.56 ~ 51.20 μg/mL 和 300.23 ~ 6004.60 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.3.3 准确度 精密量取对照品溶液 40 mL、50 mL和 60 mL 各 3 份分别置 100 mL 量瓶中,再分别精密量取 0.50 mL 供试品加入至上述各 100 mL 量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,滤过,即得样品溶液。供试品溶液作为本底溶液。按上述色谱条件,精密量取 20 μL,注入色谱仪,记录色谱图,结果如表 2,平均回收率大于 99%,说明检测方法的准确度良好。

表 2 准确度结果
Tab 2 Accuracy result

组分	本底值 (U/mL)	加入量 (U/mL)	测量值 (U/mL)	实测值 (U/mL)	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%	
维生素 A	978.35	523.40	907.65	418.48	99.9	99.6	0.3	
			418.72	906.42	417.24			99.6
			908.10	418.93	100.0			
			1010.72	521.54	99.6			
			1011.95	522.78	99.9			
			1009.37	520.19	99.4			
			1113.55	624.38	99.4			
			628.08	1113.33	624.15			99.4
			1112.31	623.14	99.2			
			87.19	40.80	101.4			
维生素 D ₃	92.77	50.30	87.19	40.80	101.4	101.1	0.2	
			87.19	40.80	101.4			
			87.19	40.80	101.4			
			97.25	50.86	101.1			
			97.25	50.86	101.1			
			107.30	60.92	100.9			
			60.36	107.30	60.92			100.9
			107.30	60.92	100.9			
			2.54	1.20	98.4			
			1.22	2.54	1.20			98.4
维生素 E	2.68	1.52	2.55	1.21	99.2	99.0	0.5	
			2.85	1.51	99.3			
			2.86	1.52	100.0			
			2.84	1.50	98.7			
			3.15	1.81	98.9			
			1.83	3.15	1.81			98.9
			3.15	1.81	98.9			

实测值=测量值-0.5×本底值;回收率=(实测值/加入量)×100%

2.3.4 精密度

生素的含量,结果如表 3,*RSD* 均小于 1.0%,说明重

2.3.4.1 重复性试验 取 6 份供试品,照 2.2.2 项

复性良好。

下方法制备供试品溶液,测定供试品溶液中三种维

表 3 重复性结果

Tab 3 Repetitive results

组分	1	2	3	4	5	6	平均/%	<i>RSD</i> /%
维生素 A	106.0	106.2	105.4	106.3	105.2	104.9	105.7	0.5
维生素 D ₃	106.6	106.9	106.9	107.0	106.7	107.0	106.8	0.2
维生素 E	102.2	101.8	102.7	102.5	102.6	102.0	102.3	0.3

2.3.4.2 中间精密度 由 A、B、C 三人,分别取 2 份

试品溶液中三种维生素的含量,结果如表 4,*RSD* 均

供试品,照 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,测定供

小于 0.5%,说明精密度良好。

表 4 中间精密度结果

Tab 4 Intermediate precision results

组分	试验员	含量/%	平均值/%	<i>RSD</i> /%
维生素 A	A	104.6	105.0	0.3
		105.3		
	B	105.8	105.5	
		105.2		
	C	105.4	105.8	
		106.1		
维生素 D ₃	A	107.1	107.3	0.4
		107.5		
	B	106.5	106.8	
		107.1		
	C	106.7	106.2	
		105.8		
维生素 E	A	102.6	102.2	0.3
		101.8		
	B	101.9	102.1	
		102.2		
	C	102.2	101.9	
		101.6		

2.3.5 稳定性 取 1 份供试品,照 2.2.2 项下方法

制备供试品溶液,分别在 0、3、6、9、12 h 进样20 μL,

测定供试品溶液中三种维生素的含量,结果如

表 5,*RSD* 均小于 1.0%,说明制备后 12 小时内测定

基本稳定。

2.3.6 耐用性 考察不同的流动相、柱温和流速对

含量测定的影响,按上述色谱条件,精密量取

20 μL,注入色谱仪,记录色谱图,结果如表 6,在流

动相、柱温和流速出现小的变动时,含量测定基本

不受影响。

表 5 稳定性结果(*n*=4)
Tab 5 Stability results(*n*=4)

组分	0	3	6	9	12	平均值	RSD/%
维生素 A	4724249	4735482	4744083	4744505	4746126	4738889	0.2
维生素 D ₃	201524	199595	199120	197757	198183	199236	0.7
维生素 E	3875802	3900052	3906725	3940729	3927257	3910113	0.6

表 6 耐用性-流动相、柱温、流速结果
Tab 6 Durability – mobile phase, column temperature, flow rate results

组分	流动相			柱温			流速		
	A-B(14:86)	A-B(17:83)	A-B(20:80)	25℃	30℃	35℃	1.3 mL/min	1.5 mL/min	1.7 mL/min
维生素 A	106.1	105.5	105.6	105.5	105.6	105.4	105.1	105.9	105.0
维生素 D ₃	107.4	107.2	107.4	106.6	106.7	106.5	106.4	106.7	106.1
维生素 E	102.2	102.0	102.6	102.2	102.2	102.2	102.3	103.2	102.2

3 讨论与结论

3.1 检测方法的选择 截止到目前,维生素的分析方法主要包含微生物法、生物鉴定法、化学法和仪器法四大类^[6],其中微生物法仅用于测定水溶性维生素的含量,生物鉴定法用于分析样品生物利用率,化学法用于特定维生素的检测,仪器法用途较为广泛。随着科技的不断发展,高效液相色谱法已逐步成为常规的含量检测手段,该方法具有快速、灵敏等特点^[7]。HPLC 法能够在40 min内,有效分离维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E,满足了实际生产过程中对检验时间及结果的需求。

3.2 提取方式的选择 目前,脂溶性维生素的提取方式主要以皂化法为主,通过皂化法处理样品,水洗去除类脂物后,用有机溶剂提取脂溶性维生素,浓缩后将样品溶于适当的溶剂中进行测定^[8]。在整个提取过程中,为了避免维生素的氧化降解,通常采用加入抗氧剂、充氮气和避光等方法进行操作。由此可见,采用皂化法进行脂溶性维生素的预处理,是较为繁琐的过程,同时整个过程中容易出现提取不完全的现象,并且过程的复杂性对含量结果的准确度具有很大影响,因此选择更简单、快速的提取方式,是进行脂溶性维生素检测所需要关注的重点方向。根据维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E 均溶于乙醇的物理特性,结合相似相溶原理,采用无水乙醇直接提取的方法进行含量测定,通过方法

学验证结果说明该提取方法是可行的。

3.3 检测波长的选择 根据文献报道,结合实际紫外可见全波段扫描发现,维生素 A、维生素 D₃、维生素 E 的最大吸收波长分别为 325 nm、265 nm 和 290 nm^[9],样品中维生素 D₃ 的占比较小,而且在 265 nm 波长处维生素 A 和维生素 E 具有较好吸收。因此,选择 265 nm 吸收波长作为检测波长^[10-11],既降低了对检测器的要求,扩大了方法的适用性,又满足了三种维生素的检测灵敏度要求,最终达到了简化检测的目的。

3.4 流动相的选择 采用 HPLC 法检测脂溶性维生素常用的流动相有甲醇、乙醇、乙腈、乙酸乙酯、异丙醇和水等组成^[12-14]。本研究先后采用甲醇-水、乙腈-乙醇-水和梯度洗脱等方式,发现以甲醇为流动相 A,乙腈-乙醇-水(60:25:5)为流动相 B,进行梯度洗脱时,维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E 能有效分离、峰型对称、无干扰,并且通过方法学验证结果说明该流动相是合适的。

3.5 结论 HPLC 法测定维生素 ADE 注射液维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E 含量方法可行,供试品溶液三个主峰的保留时间与对照品相应三个主峰的保留时间一致,样品分离效果较好,有很好的专属性、准确度、重复性、中间精密度和稳定性和耐用性。

参考文献:

- [1] Snider D B, Gaska J, Gockowski D E, *et al.* Response of new-born calves to injectable vitamin A, D and E. Adsa-asas-csas Joint Meeting. 2014.
- [2] Waldner C. Weak calf syndrome. Alberta Beef Producers. 2007, 07-034.
- [3] Snider D B, Zinn R A and Stuart R L. Differences in formulation and bioavailability of commercial injectable fat-soluble vitamin products. Adsa-asas-csas Joint Meeting. 2014.
- [4] 中国兽药典委员会. 2017 年版兽药质量标准化学药品卷[S]. Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Quality Standards of Veterinary Drugs, 2017 edition, Chemical Medicine Volume[S].
- [5] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版第一部[S]. Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2015 edition, Part1[S].
- [6] 张志清, 白琦, 刘传波, 等. HPLC 法测定饲料原料中脂溶性维生素含量[J]. 粮油加工, 2010(7): 86-89.
Zhang Z Q, Bai Q, Liu C B, *et al.* Determination of fat soluble vitamins in feed ingredients by HPLC[J]. Cereals and Oils Processing, 2010(7): 86-89.
- [7] 朱姜, 张鹏, 杨嘉, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定奶粉中维生素 A、维生素 D、维生素 E[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(11): 1733-1739.
Zhu J, Zhang P, Yang J, *et al.* Determination of vitamin A, D, E in milk powder by HPLC-MS/MS[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2015, 25(11): 1733-1739.
- [8] 谭青松, 付洁, 何瑞国. 高效液相色谱法测定鱼样中维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E[J]. 动物营养学报, 2007, 19(5): 636-640.
Tan Q S, Fu J, He R G. Simultaneous measurement of vitamin A, vitamin D₃ and vitamin E[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2007, 19(5): 636-640.
- [9] 郭茂章, 郭新东, 罗海英, 等. 测定饲料添加剂中维生素 A、D₃、E 含量的新方法[J]. 广东饲料, 2006, 15(3): 42-43.
Guo M Z, Guo X D, Luo H Y, *et al.* A new method of determination of vitamin A, D₃, E in feed additive[J]. Guangdong Feed, 2006, 15(3): 42-43.
- [10] 张晓宇, 侯磊, 陈雪艳. RP-HPLC 检测注射用脂溶性维生素(II)中间品含量[J]. 中国医药导报, 2010, (10): 82-83.
Zhang X Y, Hou L, Chen X Y. Content determination of the mid-protection of fat soluble vitamins (II) for injection by RP-HPLC[J]. China Medical Herald, 2010, (10): 82-83.
- [11] 张慧, 裴志东, 初正云, 等. HPLC 测定注射用脂溶性维生素中 4 中成分的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(6): 480-482.
Zhang H, Pei Z D, Chu Z Y, *et al.* Determination for four compounds in fat-soluble vitamin for injection by HPLC[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2009, 26(6): 480-482.
- [12] 徐萍蔚, 徐海燕, 潘澄, 等. 注射用复合维生素冻干粉针中 10 种维生素的含量测定[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, (6): 442-447, 452.
Xu P W, Xu H Y, Pan C, *et al.* Determination of 10 kinds of vitamins in multivitamin for injection[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2011, (6): 442-447, 452.
- [13] 梅渲. 超高效液相色谱法检测奶粉中的水溶性维生素和脂溶性维生素[D]. 江西农业大学, 2013.
Mei X. Determination of water-soluble vitamin and fat-soluble vitamin in milk powder by HPLC[D]. Jiangxi Agricultural University, 2013.
- [14] 范菲, 杨会鸽, 周娜, 等. HPLC 法同时测定多维元素片中维生素 A 和维生素 E 的含量[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(6): 590-592.
Fan F, Yang H G, Zhou N, *et al.* Simultaneous determination of vitamin A and vitamin E in vitamins with minerals tablets by HPLC[J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2016, 31(6): 590-592.

(编辑:陈希)