

HPLC-ELSD法测定维生素D₃和光转化异构体

黄时海¹, 汪 晟¹, 康 超¹, 夏小斌¹, 何鑫平¹, 李灿明¹, 李湘萍^{2,*}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005;

2. 广西大学动物繁殖研究所, 广西南宁 530005)

摘要:为测定维生素D₃及其它光转化异构体, 研究确定了HPLC-ELSD测定的色谱分离条件: Kromasil C₁₈柱(4.6 × 250mm, 5μm), 流动相为体积比90:10 甲醇-水溶液, 流速1.2mL/min, 蒸发光散射检测器漂移管温度为80℃, 气体流量1.8L/min。在此条件下, 各组分得到有效地分离, 色谱峰面积的自然对数与浓度的自然对数呈良好的线性关系(r > 0.997), 精密度RSD为1.25%~2.01%, 最低检测限为0.05~0.3μg, 回收率测定值为98.3%~101.8%。

关键词:高效液相色谱, 蒸发光散射检测器, 7-脱氢胆固醇, 维生素D₃, 光转化异构体

Determination of vitamin D₃ and the isomers by HPLC-ELSD

HUANG Shi-hai¹, WANG Sheng¹, KANG Chao¹, XIA Xiao-bin¹, HE Xin-ping¹, LI Can-ming¹, LI Xiang-ping^{2,*}

(1. Life Science and Technology College, Guangxi University, Nanning 530005, China;

2. Animal Reproduction Institute, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: An HPLC-ELSD method for the determination of vitamin D₃ and its isomers was studied. Chromatographic analysis was carried out on a Kromasil C₁₈ column (4.6mm × 250mm, 5μm) with methanol-water (90:10, V/V) as the mobile phase. The flow rate was 1.2mL/min. The drift tube temperature was at 80℃ and the gas flow rate was 1.8L/min. The relative standard deviation (RSD) was below 2.01% (n = 6), the detection limits attainable was in the range of 0.05μg for PreVD₃ to 0.3μg for 7-DHC, the recoveries was from 98.3% to 101.8%.

Key words: HPLC; ELSD; 7-DHC; vitamin D₃; isomers

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)05-0351-03

作为必要的乳品添加剂, 维生素D₃是人类和动物生长、发育、繁殖、维持生命和保持健康不可缺少的一种维生素, 其主要作用是调节钙、磷代谢, 促进肠内钙、磷吸收和骨质钙化, 维持血钙和血磷的平衡, 广泛应用于医药、食品和饲料添加剂等行业^[1]。在光化学法生产维生素D₃过程中, 维生素D₃原体(ProD₃)即7-脱氢胆固醇(7-DHC), 经紫外照射后转变为维生素D₃前体(PreD₃), 再热异构化为维生素D₃, 同时还产生光甾醇(L₃)和速甾醇(T₃)等异构体, 如图1所示。维生素D₃产率是由这些异构体相互竞争, 达到平衡后决定的, 并受光照波长、反应物浓度、光照时间、溶剂以及温度等因素的影响^[2]。因此, 在维生素D₃生产过程中, 定量检测7-脱氢胆固醇、维生素D₃和这些异构体是必须的。蒸发光散

射检测器(ELSD)是近年研制发展起来的高灵敏度、多用途的质量型检测器, 其独特的工作原理决定了其响应不依赖样品的光学特性。物理性质类似的物质在ELSD中的响应值近于一致, 响应值与质量成正比^[3]。对于维生素D₃这类甾体化合物定性定量, 由于低波长时紫外-可见光检测器(UV-VIS)基线不稳, 以及各甾体化合物摩尔吸收系数不同, 不易同时准确测定。ELSD克服了上述问题, 基线稳定, 响应相似, 提高了检测的灵敏度和定量准确度^[4]。本文的目的在于建立一种高效液相色谱法联合蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)的快速分析方法, 测定光转化反应液中的维生素D₃和各种中间异构体。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

维生素D₃、7-脱氢胆固醇对照品 购自Sigma公司, 含量 > 99.0%; 维生素D₃前体、光甾醇、速甾醇 按文献[2]自制; 水 为超纯水; 甲醇 为色谱纯。

LC-10ATVP 高效液相色谱仪 日本岛津; 500型蒸发光散射检测器 美国Alltech; 7725i 进样器。

收稿日期: 2009-05-15 * 通讯联系人

作者简介: 黄时海(1967-), 男, 高级工程师, 研究方向: 微生物。

基金项目: 国家自然科学基金(30660126); 广西南宁市科学技术委员会创新基金[南科(1999)62号]; 广西大学科研基金项目(20090046)。

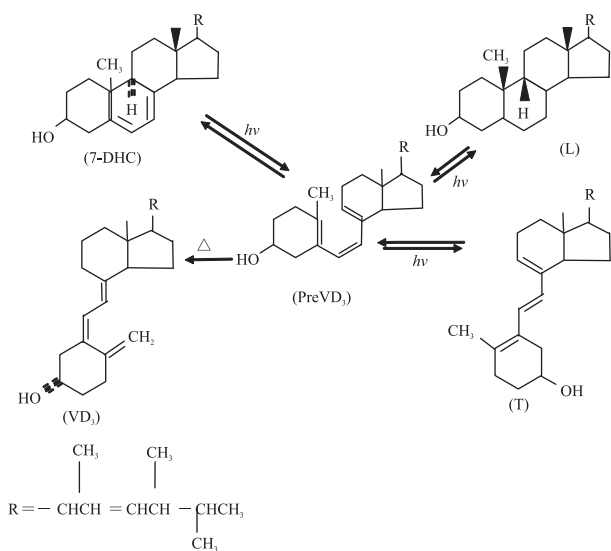
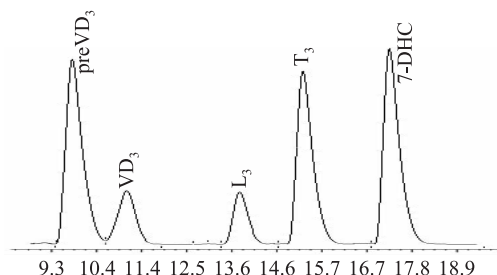
图1 维生素D₃和光转化异构体的相互转化

图2 光照转化液色谱图

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱(4.6 × 250mm, 5μm); 流动相: 甲醇-水(90:10); 流速: 1.2mL/min; 进样量: 20μL。ELSD 参数: 漂移管温度 80℃, 空气流速 1.8L/min。在研究色谱某一条件时, 固定其他基本条件。

1.2.2 对照品溶液的制备 精密称取维生素D₃、7-脱氢胆固醇、维生素D₃前体、光甾醇、速甾醇各25mg分别置于5个25mL的容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 制得浓度为1mg/mL的对照品贮备溶液, 贮存至4℃条件下。从5种标准储备液中分别取100、200、300、400、500μL置于5个5mL的容量瓶中, 用甲醇稀释定容成不同浓度的标准混合溶液。

1.2.3 光转化反应液样品 取经自制光转化反应器照射一定时间的7-脱氢胆固醇酒精溶液(1mg/mL)的转化液500μL, 置于5mL的容量瓶中, 用甲醇稀释定容, 摇匀, 吸取上清液, 经0.45μm滤膜过滤, 作为样品溶液进样测定。

2 结果与分析

2.1 流动相

以体积比为90:10、80:20、70:30的甲醇-水溶液及纯甲醇作为流动相进行实验。结果表明, 体积比为90:10时, 各组分色谱峰完全分离, 色谱峰保留时间短, 峰形良好, 故选用为流动相。

2.2 检测器参数的优化

根据流动相的种类和比例, 改变漂移管温度(65、70、75、80、85℃)和气体流速(1.2、1.4、1.6、1.8、2.0L/min), 观察不同温度和不同气体流速进样时峰面积与信噪比的变化情况, 最终选定的测定参数为: 漂移管温度80℃, 空气流速1.8L/min。

2.3 系统适用性实验

精密吸取反应液样品、混合对照品溶液各20μL, 按1.2.1项色谱条件进样测定。结果表明, 光转化反应液样品在对照品色谱图相应位置上有相同保留时间的色谱峰。

2.4 线性关系考察

取不同浓度的混合对照品溶液20μL, 进样测定。以峰面积的自然对数为纵坐标, 进样浓度的自然对数为横坐标, 线性回归, 回归方程见表1, 结果表明, 各组分在检测浓度范围内, 进样浓度自然对数值与峰面积自然对数值的线性关系良好。比较进样浓度与峰面积的对应关系, 以及5条标准曲线的斜率, 可知各组分在上述浓度范围有相似的响应值。

表1 线性方程和相关系数

组分名称	回归方程	相关系数(r)
维生素D ₃ 前体	$\ln Y = 0.5501 \ln X + 7.3265$	0.9996
维生素D ₃	$\ln Y = 0.5389 \ln X + 7.6368$	0.9973
光甾醇	$\ln Y = 0.5478 \ln X + 7.0345$	0.9986
速甾醇	$\ln Y = 0.5316 \ln X + 7.2361$	0.9991
7-脱氢胆固醇	$\ln Y = 0.5407 \ln X + 7.5396$	0.9981

2.5 精密度实验

对同一份浓度为0.04mg/mL的混合对照品溶液, 连续进样20μL测定6次, 各组分峰面积积分RSD见表2, 结果表明, 仪器精密度良好。

表2 精密度实验(n=6)

精密度	维生素D ₃ 前体	维生素D ₃	光甾醇	速甾醇	7-脱氢胆固醇
RSD (%)	2.01	1.25	1.65	1.79	1.87

2.6 检测限

将最小浓度混合对照品逐级稀释后测定, 检测限按3倍空白噪声计算。各组分检出限为: 维生素D₃前体0.05μg, 维生素D₃0.1μg, 光甾醇0.15μg, 速甾醇0.2μg, 7-脱氢胆固醇0.3μg。

2.7 回收率

将照射一定时间的光转化反应液样品溶液, 加入标准混合溶液, 按1.2.3样品处理方法, 20μL进样测定。用加标准样品的测定结果减去未加标准样品的测定结果计算, 各组分回收率为: 维生素D₃前体98.3%, 维生素D₃101.8%, 光甾醇99.6%, 速甾醇100.3%, 7-脱氢胆固醇98.9%。

2.8 样品测定

照射不同时间的光转化反应液, 按2.3处理。精密吸取混合对照品溶液10、20μL, 样品溶液20μL, 依次注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定。以外标两点法对数方程计算定量, 结果见表3。

3 讨论

3.1 ELSD与反相高效液相色谱相结合, 提供了一
(下转第355页)

表1 芦丁、槲皮素的回归方程

组分	线性回归方程	相关系数
芦丁	$Y = 1.72 \times 10^5 X - 8.35 \times 10^{10}$	0.9995
槲皮素	$Y = 5.34 \times 10^5 X - 5.21 \times 10^{11}$	0.9996

2.3 精密度实验

取混合标准溶液,按上述色谱条件,每次进样20 μ L,连续进样六次,以峰面积定量,分别计算芦丁和槲皮素的RSD在1.25%~4.19%,计算结果如表2所示,可见精密度良好。

2.4 加标回收实验和样品测定

准确称取冷冻粉碎后的蜂胶4.00g各三份,用同样的方法进行处理,并加入一定量的已知浓度的混合标准对照品,进行峰面积测定,然后进行计算,测得芦丁和槲皮素的回收率分别为96.48%~100.66%。结果如表2所示。由结果可以看出,高效液相色谱测定芦丁和槲皮素的重现性和再现性都比较好。由表2中测量值,经计算可以求得,芦丁在蜂胶中的含量为10.12 μ g/g,槲皮素在蜂胶中的含量为16.05 μ g/g。

表2 回收率和精密度实验结果

样品	测定值 (μ g/mL)	加标 (μ g/mL)	测定总量 (μ g/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
芦丁	0.80	1.00	1.76	97.79	1.25
	0.82	1.00	1.80	98.96	2.29
	0.79	1.00	1.77	99.22	2.72
	1.29	1.00	2.29	100.35	3.28
槲皮素	1.27	1.00	2.19	96.48	4.19
	1.26	1.00	2.27	100.66	1.64

3 结论

实验结果表明:由于蜂胶成分复杂,组分相互干扰尤严重,样品前处理的好坏是HPLC分析测定成功与否的关键。采用去离子水浸泡除蜡工艺去除粗蜂胶中的蜂蜡,再用甲醇回流去脂溶性杂质的干扰,经HPLC色谱分离后,芦丁、槲皮素色谱峰出峰时间适宜,分离度良好,柱压适中且杂质干扰较小,测得的结果令人满意。由于黄酮类化合物常带有酚羟基,在水中会部分解离羟基与固定相作用较强,从而导

(上接第352页)

表3 光转化液测定结果(mg/mL)

照射时间 (min)	维生素D ₃ 前体	维生 素D ₃	光甾醇	速甾醇	7-脱氢 胆固醇
8	0.343	0.031	0.012	0.111	0.503
6	0.383	0.038	0.026	0.153	0.399
24	0.288	0.064	0.069	0.282	0.296

个较好的定量测定光转化反应液中维生素D₃及其它光转化异构体的方法,快速、简便,精密度、准确度高,可满足定量分析要求。建立标准曲线时,直接将峰面积与样品浓度回归,线性关系不太理想,而将两者分别取自然对数后得到理想的线性关系,这种现象与ELSD检测器的检测机理是一致的^[5],因此,本研究对进样量、峰面积积分值均取自然对数以考察其相关性。

3.2 维生素D₃前体、光甾醇、速甾醇无法从市场购买,自制需要昂贵的正反向制备型色谱柱,步骤多,操作繁琐,样品易降解变质。2.4 实验结果说明,维生素D₃与其它4种异构体在ELSD中有相似的响应

致拖尾,故用甲醇和H₃PO₄缓冲液(V:V=60:40)为流动相并调节缓冲液的pH到4.2,以抑制黄酮类物质解离,克服拖尾现象。反相高效液相色谱法测定蜂胶中芦丁、槲皮素是一种行之有效的方法。此方法精密度、重现性和回收率均令人满意。本研究可为蜂胶生物活性评价及质量控制提供科学依据。

参考文献

- [1] 赵玉娟.高效液相色谱法测定蜂胶中的黄酮成分[J].现代仪器,2000(4):22-24.
- [2] 叶静凌,刘富海,乞永艳,等.超声技术在蜂胶提取上的应用研究[J].蜜蜂杂志,2008(5):7-9.
- [3] 刘元法,王兴国,金青哲.超声波技术提取蜂胶黄酮类功能性物质的研究[J].食品科学,2004,25(6):35-39.
- [4] 李彦杰,杨勇.蜂胶化学成分及其生物活性[J].粮食与油脂,2003(12)43-45.
- [5] 王亚群.蜂胶产品的开发[J].国家食物与营养咨询委员会,2007(3)246-248.
- [6] Karasten M. Propolis current and future medical uses [J]. American bee journal,2001,141(7):507-510.
- [7] 吕国良,紫外分光光度法测定蜂胶软胶囊中总黄酮含量方法的研究[J].现代仪器,2008,3:73-74.
- [8] Howard M, Marken, Cary R. Measurement of food flavonoid by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000, 3:578-596.
- [9] Yu Z, Jingjing J. Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography [J]. Food Chemistry, 2008, 107: 1326-1336.
- [10] 罗丽萍,高荫榆,洪雪娥,等.液质联用测定薯蓣中黄酮类化合物的构成[J].食品科学,2008,29(6):52-55.
- [11] Boryana T, Dorina T, Vassya B. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study [J]. Chemistry Central Journal, 2007, 1:1-13.

植,因此,对不具备分离光甾醇等异构体条件的实验室,可以以某一纯物质(如维生素D₃)作标准品,其它异构体采取参照文献定性,峰面积归一化法计算定量的方式检测样品,当然这种方法误差相对较大。

参考文献

- [1] P B 霍克.实用生物化学[M].北京:人民卫生出版社,1961.
- [2] Lu ZR, Chen TC, Holick MF. Preparation of milligrams of three vitamin D₃ isomers in laboratory scale by two steps high performance liquid chromatography with straight and reverse phase column [J]. Acta Pharm sin, 1992, 27(5):369-374.
- [3] 邓海根,曹雨震.高效液相色谱仪的通用型质量检测器-蒸发光散射检测器[J].药物分析杂志,1994,14:61.
- [4] HPLC-ELSD法提高分析甾体化合物的灵敏度与准确度[C].蒸发光散射检测器的应用报告及论文集,2006.
- [5] Stockwell P B. A light scattering detector for Liquid chromatography [J]. American Laboratory, 1991(8):19.