

中心切割二维液相法测定药品中维生素 D 含量

LC-200

摘要：本文建立了符合《中国药典》2020年版四部通则《0722 维生素 D 测定法》中第四法维生素 D 含量测定的方法。为了解决前维生素 D 受杂质干扰的问题，采用岛津中心切割二维液相色谱系统进行测试；在指定的二维液相色谱条件下，对照品前维生素 D 和维生素 D 在第一维液相和第二维液相中出峰良好，分离度满足要求。取对照品重复进样测试，保留时间 RSD 为 0.26%~0.71%，峰面积 RSD 为 0.76%~1.46%；虽然维生素 D 制剂供试品溶液前维生素 D 在第一维色谱中受杂质干扰，但在第二维色谱中成功将前维生素 D 与杂质分离；第一维液相色谱中维生素 D 理论塔板数为 2511~2706，前维生素 D 和维生素 D 的分离度均大于 5，第二维液相色谱中前维生素 D 和维生素 D 附近均无明显干扰峰，以上结果均符合药典系统适用性要求。结果表明，该方法有效、可靠，可以应对《中国药典》2020年版四部通则《0722 维生素 D 测定法》中第四法中维生素 D 含量的测定。

关键词：维生素 D 中心切割二维液相色谱 中国药典 2020 年版

维生素 D 是一种脂溶性维生素，其具有促进生长和骨骼钙化，促进牙齿健全、用于治疗佝偻病、骨软化症等功能作用。维生素 D 实际上是一种激素原，本身无活性，需先在肝脏和肾脏中经过代谢后才有活性。2019 年 5 月 24 日，国家药典委员会发出“关于《中国药典》2020 年版四部通则增修订内容（第十二批）的公示”《0722 维生素 D 测定法（第一次征求意见稿）》。该征求意见稿中包含四法，均用高效液相色谱法（通则 0512）测定维生素 D（包括维生素 D₂ 和维生素 D₃）及其制剂、维生素 AD 制剂或鱼肝油中所含维生素 D 及前维生素 D 经折算成维生素 D 的总量。当待测药品中无维生素 A 及其他杂质干扰可用第一法测定，否则应按第二法处理后测定；如果按第二法处

理后，前维生素 D 峰仍受杂质干扰，仅有维生素 D 峰可以分离时，则应按第三法测定；或不经前处理按第四法测定。

其中，《0722 维生素 D 测定法》中维生素 D 测定法新增的第四法为柱切换液相色谱法。柱切换液相色谱法是将同种色谱不同选择性分离柱组合，构成联用系统的技术。柱切换液相色谱系统通常由第一维分离柱和第二维分离柱串联组成，两柱之间通过切换阀作为接口，以改变流动相流路，将部分或全部第一维柱流出的组分，导入第二维柱进行二次分离，从而起到净化目标化合物，提高系统分离能力的作用。

本文采用岛津中心切割二维液相色谱仪，参照中国药典给出的柱切换色谱法建立了相对应的检测方法。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津中心切割二维液相系统。具体配置为：LC-20AD×3（输液泵），DGU-20A_{3R}（在线脱气机），SIL-20AC（自动进样器），CTO-20AC（柱温箱），FCV-12AH 高压流路选择阀，SPD-20A 紫外检测器，SPD-M20A 二极管阵列检测器，CBM-20A 系统控制器。

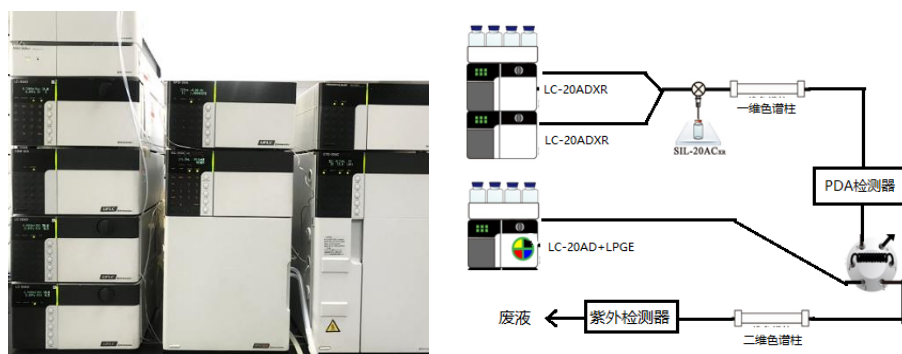


图1 岛津二维液相（中心切割）系统

1.2 分析条件

第一维色谱柱：Acclaim™ HILIC-10 (2.1x150 mm, 3 μm)

第二维色谱柱：ZORBAX RX-SIL (3.0x100 mm, 1.8 μm)

第一维流动相：A相：正己烷；B相：正己烷 - 正戊烷 - 异丙醇 (98:1:1)；按下表程序进行梯度洗脱

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.00	泵	Pump B.Conc	5
15.30	柱温箱	CTO.RVR	0
18.30	柱温箱	CTO.RVR	1
21.50	柱温箱	CTO.RVR	0
27.50	柱温箱	CTO.RVR	1
30.00	泵	Pump B.Conc	5
35.00	泵	Pump B.Conc	100
60.00	泵	Pump B.Conc	100
65.00	泵	Pump B.Conc	5
80.00	泵	Pump B.Conc	5

第二维流动相：正己烷 - 正戊醇 - 异丙醇 (996: 2: 2)，等度洗脱

流速：0.5 mL/min

柱温：40℃

进样体积：100 μL

检测波长：265 nm

收集管：聚醚醚酮 (peek) 管，内径 0.0762 cm (0.03 英寸)，20 m，容积约 9 mL

1.3 对照品溶液和样品溶液的制备

按照《中国药典》2020年版四部通则 0722 维生素 D 测定法第四法要求进行制备。

■ 实验结果

2.1 维生素 D 分析色谱图

采用 1.2 项分析条件，取 0.5 μg/mL 对照品溶液进样分析；图 2 和图 3 分别展示了维生素 D 和前维生素 D 的第一维和第二维色谱图。

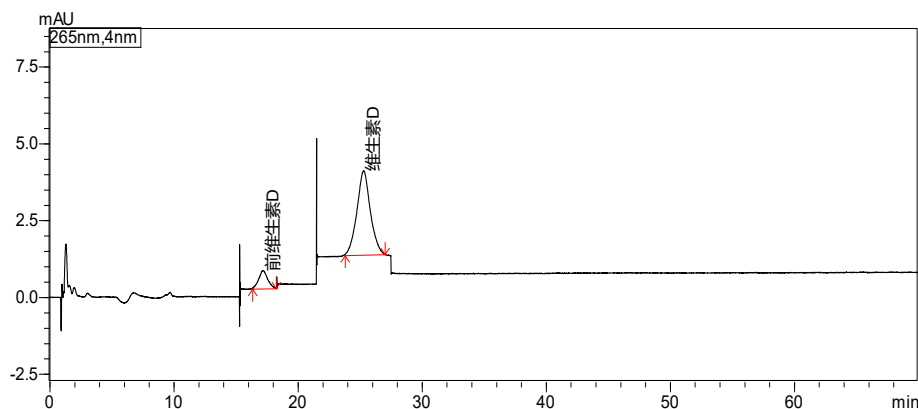


图 2 前维生素 D 和维生素 D 校正因子 f2 对照品溶液第一维色谱图

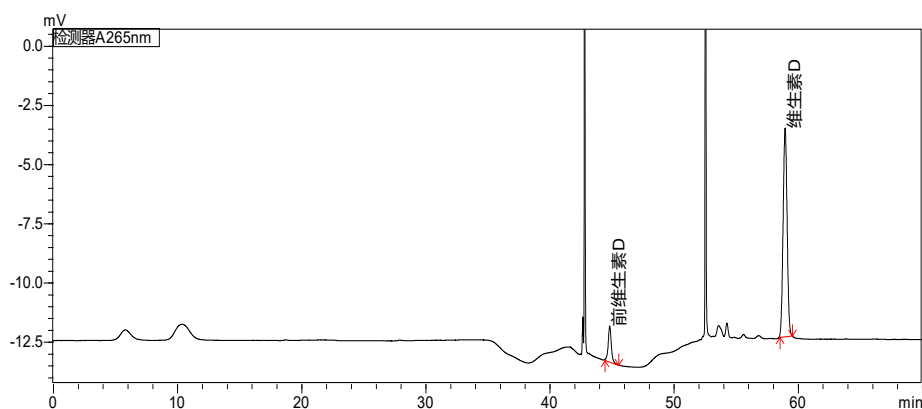


图 3 前维生素 D 和维生素 D 校正因子 f2 对照品溶液第二维色谱图

2.2 重复性结果

按照中国药典的要求，对照品重复进样峰面积 RSD 应低于 2%。取对照品溶液 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 重复进样 5 次，得到的保留时间和峰面积 RSD 如表 2 所示。各化合物保留时间 RSD 为 0.26%~0.71%，峰面积 RSD 为 0.76%~1.46%，均符合药典的要求。

表 2 重复性考察结果 (n=5)

化合物	保留时间 (min)	峰面积	化合物	保留时间 (min)	峰面积
前维生素 D (第一维)	17.129	28,468	维生素 D (第一维)	25.126	204869
	17.169	28,630		25.248	208488
	16.927	27,790		24.881	202582
	17.172	28,092		25.278	200455
	17.225	28,005		25.326	203986
RSD/%	0.67	1.22	RSD/%	0.71	1.46
前维生素 D (第二维)	44.715	25,079	维生素 D (第二维)	58.858	197946
	44.802	25,023		58.822	197713
	44.533	25,477		58.627	202929
	44.791	25,346		58.646	195464
	44.855	25,338		58.984	196356
RSD/%	0.28	0.76	RSD/%	0.26	1.46

2.3 供试品溶液结果考察

取某品牌维生素 D 制剂，平行两份，采用 1.3 方法制备成供试品溶液，上机分析，每份供试品重复进样两次，所得供试品溶液色谱图如图 4、图 5 所示。其中第一维色谱图中前维生素 D 峰被油脂包裹，切入至第二维色谱后，前维生素 D 和维生素 D 和杂质峰均得到有效分离。表 3 列出了供试品溶液的测试结果，峰面积重复性良好。

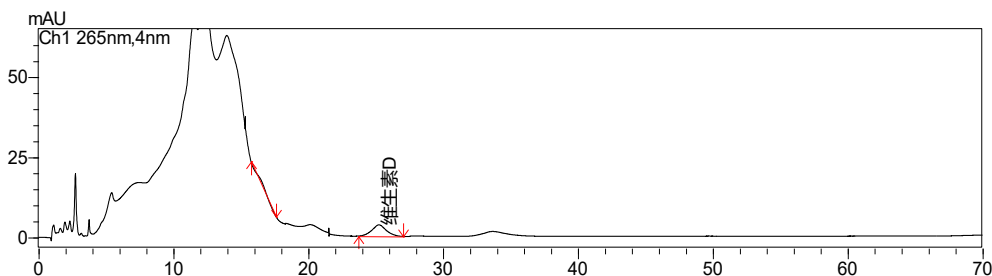


图 4 前维生素 D 和维生素 D 供试品溶液第一维色谱图

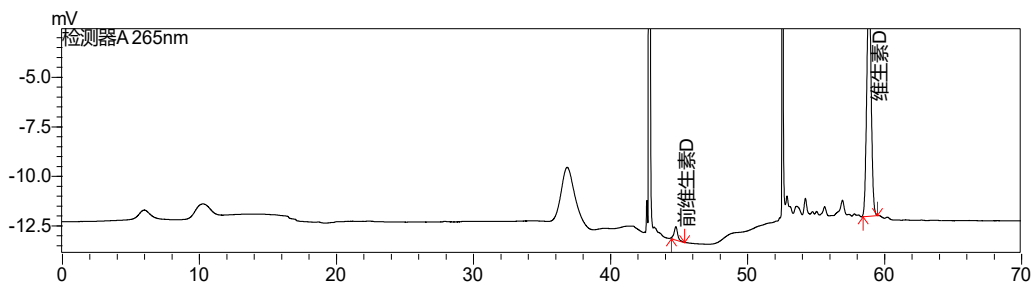


图 5 前维生素 D 和维生素 D 供试品溶液第二维色谱图

表 3 供试品溶液平行测定结果

重复次数	第一维色谱		第二维色谱		
	前维生素 D	维生素 D	前维生素 D	维生素 D	
供试品溶液 峰面积	1-1	-	268464	11595	264553
	1-2	-	274789	10785	268909
	2-1	-	255715	10477	259241
	2-2	-	262550	11446	260512

2.4 系统适用性结果考察

药典对前维生素 D、维生素 D 的分离度、理论塔板数等系统适用性参数作了要求。采用本方法对药典方法中的要求一一进行考察，结果见表 4。结果表明本方法实验结果符合药典标准要求。

表 4 系统适用性考察结果

标准要求项目	标准要求	本方法结果
系统适用性 - 理论塔板数	第一维液相, 理论板数按维生素 D 峰计算应不低于 2300	连续进样 5 针理论塔板数为 2511~2706, 满足要求。
系统适用性 - 分离度	第一维液相色谱系统中前维生素 D 峰与维生素 D 的分离度应不小于 5	连续进样 5 针, 采用 EP 方法计算, 分离度为 5.122~5.239, 满足要求。
系统适用性 - 分离度	第二维液相色谱系统中维生素 D 峰与相邻峰的分度以及前维生素 D 峰和相邻峰的分度均应符合规定 (一般大于 1.5)	对照品溶液和供试品溶液中第二维色谱图维生素 D 和前维生素 D 附近无明显干扰峰。
系统适用性 - 重复性	0512 要求一般应小于 2.0%	第一维、第二维前维生素 D、维生素 D5 针重复进样 RSD 为 0.76%~1.46%, 符合要求

■ 结论

采用岛津中心切割二维液相色谱系统, 参考《中国药典》2020 年版四部通则《0722 维生素 D 测定法》中第四法维生素 D 含量测定的方法, 对维生素 D 含量进行检测, 结果表明对照品溶液前维生素 D 和维生素 D 在第一维色谱和第二维色谱中均分离良好; 配制 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液重复进样 5 次, 前维生素 D 和维生素 D 在第一维和第二维系统中保留时间与峰面积 RSD 均低于 2%; 维生素 D 制剂供试品溶液第一维色谱前维生素 D 与杂质难以分离, 但切入第二维色谱后分离良好; 其余系统适用性测试结果也均符合中国药典要求。结果表明, 所建立的方法适用于应对《中国药典》2020 年版四部通则《0722 维生素 D 测定法》中第四法中维生素 D 含量的测定。

岛津应用云

