

基于 LC-40 的中心切割二维液相色谱用于维生素 D 制剂的含量测定

LC-452

摘要：本文参照《中华人民共和国药典（2020 年版）》四部通则“0722 维生素 D 测定法 第四法”，使用基于 LC-40 搭建的中心切割二维液相色谱系统，建立了维生素 D 制剂中维生素 D 的测定方法。系统适应性溶液连续分析结果显示：第一维液相色谱中维生素 D 理论塔板数为 5815~5948，前维生素 D 和维生素 D 的分离度为 7.54~7.81，第二维色谱图中维生素 D 和前维生素 D 与附近峰的分离度均大于 1.5，满足药典系统适用性要求；对照品溶液重复进样测试结果显示：前维生素 D 和维生素 D 保留时间 RSD 为 0.04%~0.14%，峰面积 RSD 为 1.28%~1.85%。结果表明，该方法有效、可靠，可应对相关分析需要。

关键词：维生素 D 中心切割二维液相色谱 LC-40 中国药典 2020 年版

技术特点：

- ❖ 基于 LC-40 系列液相色谱而搭建的二维液相系统，具有更高的理论塔板数和分离度而优于药典系统适用性要求；
- ❖ 系统稳定，方法重复性好，主要化合物保留时间 RSD 不大于 0.15%，峰面积 RSD 在 1.9% 以内。

维生素 D 是脂溶性维生素家族的一员，它对维持人体钙、磷代谢平衡起着重要作用，缺乏维生素 D 会导致钙吸收障碍，从而引发骨质疏松、肌肉无力、骨折等健康问题。维生素 D 除了从食物中摄取外，还可以通过服用维生素 D 制剂等药物加以补充。

《中国药典（2020 年版）》四部通则“0722 维生素 D 测定法”规定了高效液相色谱法（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 的方法。其中，第四法由中心切割二维液相色谱系统完成，该系统由第一维分离柱和第二维分离柱串联组成，两柱之间通过二位六通阀作为连接，通过阀位切换改变流动相流路，将部分一维分离柱流出的组分导入二维分离柱进行二次分离，从而起到净化目标化合物，提高系统分离能力的作用。

本文参照“0722 维生素 D 测定法”，使用基于 LC-40 搭建的中心切割二维液相色谱，建立了维生素制剂中维生素 D 含量的分析方法，供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用基于 LC-40 的中心切割二维液相色谱，具体配置为：

| | | | |
|--------|-------------------------|--------|----------------------|
| 一维泵： | LC-40D（内置 LPGE） | 二维泵： | LC-40D |
| 系统控制器： | SCL-40 | 脱气机： | DGU-405×2 |
| 自动进样器： | SIL-40C XR | 柱温箱： | CTO-40C（内置 2 位 6 通阀） |
| 一维检测器： | SPD-40 | 二维检测器： | SPD-40 |
| 色谱工作站： | LabSolutions Ver. 5.127 | | |

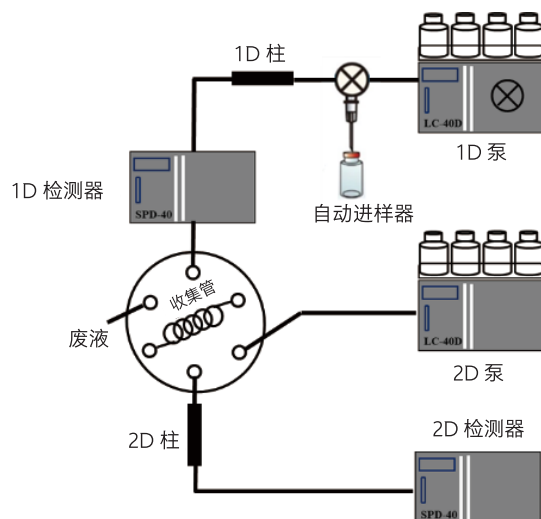


图1 基于 LC-40 的中心切割二维液相色谱流路

1.2 分析条件

- 一维色谱柱：ChromCore VD-ChP4 (150 mm x 2.1 mm I.D., 3 μm)
- 二维色谱柱：SHIMSEN Ankle Amide(100 mm x 2.1 mm I.D., 3 μm)
(岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 380-01200-51)
- 一维流动相：A相：正己烷；B相：正己烷 - 正戊烷 - 异丙醇 (98:1:1, v/v/v)
- 一维洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为5%，洗脱程序见表1
- 二维流动相：正己烷 - 正戊烷 - 异丙醇 (996:2:2, v/v/v)，等度洗脱
- 流速：0.5 mL/min (一维和二维) 柱温：40°C
- 波长：265 nm 进样体积：100 μL
- 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

表1 一维梯度洗脱时间程序

| Time(min) | Module | Command | Value | 备注 |
|-----------|--------|---------|-------|--|
| 16.30 | 柱温箱 | CTO.RVR | 1 | 阀位切换，使一维洗脱液中前 VD 保留时间前后 1.5min 的部分收集至 PEEK 管 |
| 19.30 | 柱温箱 | CTO.RVR | 0 | |
| 24.40 | 柱温箱 | CTO.RVR | 1 | 阀位切换，使一维洗脱液中 VD 出峰开始前 1.5min 和出峰结束后 1.5min 的部分收集至 PEEK 管 |
| 31.00 | 柱温箱 | CTO.RVR | 0 | |
| 30.00 | 泵 | B.Conc | 5 | |
| 35.00 | 泵 | B.Conc | 100 | |
| 60.00 | 泵 | B.Conc | 100 | |
| 65.00 | 泵 | B.Conc | 5 | |
| 80.00 | 控制器 | STOP | | |

1.3 对照品溶液、供试品溶液和系统适应性溶液

按照《中国药典》2020 版四部“0722 维生素 D 测定法”第四法制备。

■ 结果与讨论

2.1 对照品溶液色谱图和切换时间确认

维生素 D 总量为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 f2 混合对照品溶液进样分析，一维色谱图中前维生素 D 和维生素 D 的保留时间分别为 17.81 min 和 26.95 min（药典要求该保留时间需在 25 min 左右），维生素 D 峰开始时间和结束时间分别为 25.98 min 和 29.47 min。根据药典要求 - “第一维液相色谱中前维生素 D 切换时间设为保留时间的前后各约 1.5 分钟；第一维液相色谱中维生素 D 切换时间设为维生素 D 出峰开始时间前和出峰完毕时间后各约 1.5 分钟”，设置 2 位 6 通阀的切换时间，具体如表 1 所示。

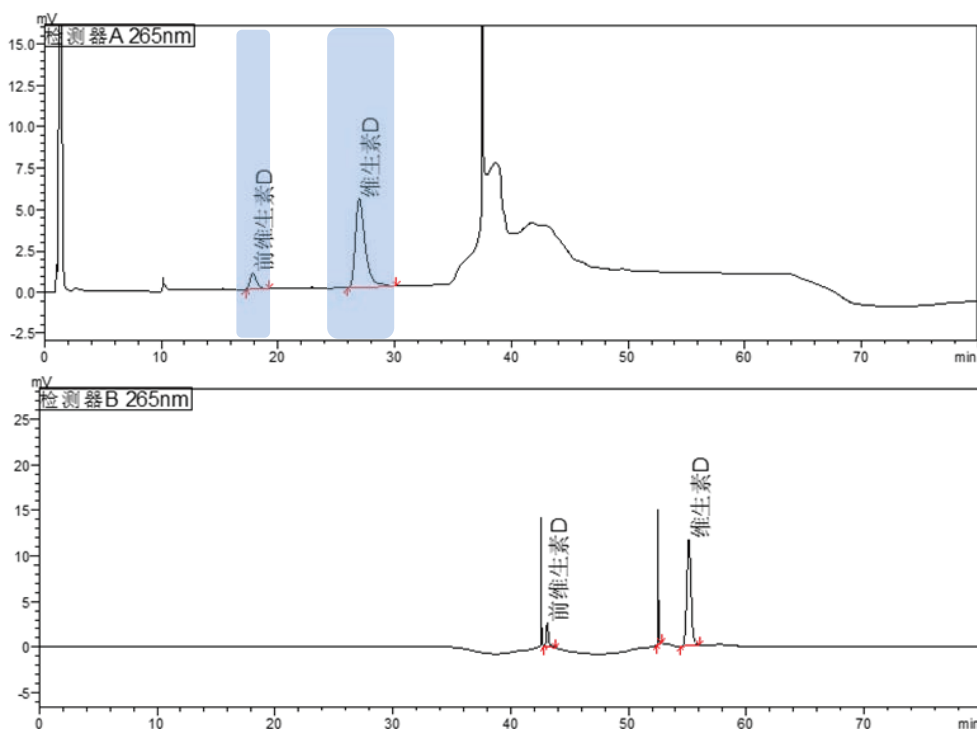


图 2 f2 混合对照品溶液色谱图

2.2 系统适应性考察

按照药典规定，制备系统适应性溶液。进样分析，结果优于药典的要求。

表 2 系统适应性结果

| 系统适应性要求项目 | 标准要求 | 检测结果（5 次重复分析） |
|---|-----------|---------------|
| 理论塔板数：第一维液相色谱，按维生素 D 峰计算 | 应不低于 2300 | 5815~5948 |
| 分离度：第一维液相色谱，前维生素 D 峰与维生素 D 的分离度 | 应不小于 5 | 7.54~7.81 |
| 分离度：第二维液相色谱，维生素 D 峰与相邻峰的分离度以及前维生素 D 峰和相邻峰的分离度 | 应大于 1.5 | 均大于 1.5 |

2.3 重复性

取维生素 D 总量为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 f2 混合对照品溶液连续进样 5 次，前维生素 D 和维生素 D 保留时间 RSD 为 0.04%~0.14%，峰面积 RSD 为 1.28%~1.85%。重复性结果说明，该系统具有良好的稳定性。

表3 重复性结果

| 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) | 17.81 | 36,284.31 | 维生素 D (第一维) | 26.95 | 311,882.79 |
| | 17.83 | 35,370.02 | | 26.95 | 316,116.40 |
| | 17.88 | 35,451.38 | | 27.04 | 315,085.04 |
| | 17.84 | 35,088.58 | | 26.99 | 308,911.28 |
| | 17.85 | 35,088.25 | | 27.00 | 306,705.32 |
| RSD/% | 0.14 | 1.38 | RSD/% | 0.14 | 1.28 |
| 前维生素 D (第二维) | 43.09 | 34,146.77 | 维生素 D (第二维) | 55.10 | 303,274.66 |
| | 43.08 | 33,702.30 | | 55.11 | 304,852.25 |
| | 43.12 | 32,606.78 | | 55.13 | 300,071.50 |
| | 43.14 | 33,370.54 | | 55.15 | 295,195.45 |
| | 43.13 | 33,134.32 | | 55.14 | 291,601.60 |
| RSD/% | 0.06 | 1.74 | RSD/% | 0.04 | 1.85 |

2.4 供试品测试

取市售某维生素 D 制剂，平行制备 2 份样品，进样测试，色谱图如图 3 所示。其中第一维色谱图中前维生素 D 出峰处有基质干扰，切阀至第二维色谱分离后，前维生素 D 和维生素 D 无其它峰干扰。

表4 供试品溶液平行测定结果

| 编号 | 样品 | 产品标识量 (IU) | 实测量 (IU) | 平行样相对相差 (%) |
|----|-------|------------|----------|-------------|
| 1 | 平行样 1 | 500 | 525.23 | 1.51 |
| 2 | 平行样 2 | 500 | 541.48 | |

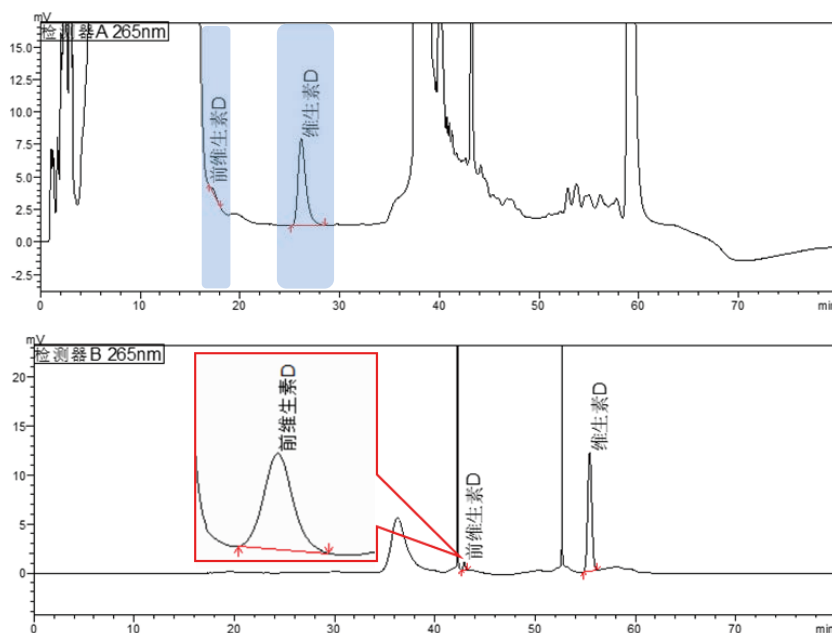


图3 供试品溶液色谱图

■ 结论

本文参照《中华人民共和国药典（2020年版）》四部通则“0722 维生素 D 测定法 第四法”，使用基于 LC-40 搭建的中心切割二维液相色谱系统，建立了维生素 D 制剂中维生素 D 的测定方法。系统适应性结果和重复性测试结果均满足药典要求，可有效应对相关分析需要。

岛津应用云

