

高分辨采样二维液相色谱法测定维生素 D 滴剂中维生素 D₃ 含量研究*吴珏¹, 郭伟斌¹, 邱晓峰², 郑淑凤¹

(1. 厦门市食品药品质量检验研究院, 厦门 361012; 2. 国药控股星鲨制药(厦门)有限公司, 厦门 361026)

摘要 目的: 建立高分辨采样二维液相色谱法(HiRes 2D-LC)对维生素 D 滴剂中维生素 D₃ 进行准确定量分析。方法: 第一维液相色谱采用 Thermo HYPERSIL Gold Silica(100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm) 色谱柱, 以正己烷-正戊醇(996:4)为流动相, 流速 0.2 mL · min⁻¹, 检测波长 265 nm, 柱温 40 °C; 第二维液相色谱采用 ShimPack Velox Hilic(50 mm × 2.1 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 以正己烷-正戊醇-异丙醇(98:1:1)为流动相, 流速 0.5 mL · min⁻¹, 检测波长 265 nm, 柱温 40 °C。二维接口采用六位四通阀, 并配置 2 个多中心切割阀, 对前维生素 D₃ 峰和维生素 D₃ 峰进行多次连续切割。结果: 维生素 D₃ 质量浓度在 1.018 4 ~ 5.092 mg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好($r \geq 0.999 8$), 前维生素 D₃ 和维生素 D₃ 精密密度试验 RSD 分别为 0.95% 和 0.40%, 重复性试验 RSD 为 0.41%, 平均加标回收率为 101.4%。供试品溶液在 4 °C 和 10 °C 放置 12 h 稳定, RSD 分别为 0.58%、0.66%。采用本法测得 6 批维生素 D 滴剂样品中维生素 D₃ 的含量分别为 100.4%、101.6%、100.9%、101.6%、102.7%、101.6%, 与采用 2020 年版《中华人民共和国药典》四部通则 0722 第四法所测结果基本一致。结论: 本方法具有优异的灵敏度、重复性和定量准确性, 且省去烦琐的样品前处理步骤, 缩短分析时间, 改善长样品环带来的峰展宽等问题, 显著提高了维生素 D₃ 的含量测定效率, 降低分析成本, 为维生素 D 滴剂等主成分与辅料难分离制剂的准确定量提供新方法。

关键词: 高分辨采样; 二维液相色谱法; 正相色谱法; 维生素 D 滴剂; 前维生素 D₃; 维生素 D₃; 含量测定; 峰纯度确证

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)07-1169-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2023-0741

Determination of vitamin D₃ in vitamin D drops by high resolution sampling two-dimensional chromatography*WU Jue¹, GUO Wei-bin¹, QIU Xiao-feng², ZHENG Shu-feng¹

(1. Xiamen Institute for Food and Drug Quality Control, Xiamen 361012, China;

2. Sinopharm Xingsha Pharmaceuticals(Xiamen) Co., Ltd., Xiamen 361026, China)

Abstract Objective: To establish an innovative analytical method based on high resolution sampling two-dimensional chromatography (HiRes 2D-LC) for determination of the content of vitamin D₃ in vitamin D drops.

Methods: Two-dimensional liquid chromatography was used. Thermo HYPERSIL Gold Silica (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm) column was used in the first dimension with *n*-hexane-*n*-amyl alcohol (996:4) as mobile phase. The flow rate was 0.2 mL · min⁻¹. The samples were injected and tested at the wavelength of 265 nm.

* 厦门市市场监督管理局科技计划项目(XMSJ202305)

第一作者 Tel:(0592)5619836; E-mail:jue459@126.com

The column temperature was 40 °C. In the second dimension liquid chromatography, ShimPack Velox Hilic (50 mm × 2.1 mm, 2.7 μm) was used as the column with *n*-hexane - *n*-pentanol - isopropanol (98:1:1) as the mobile phase. The flow rate was 0.5 mL · min⁻¹. The samples were injected and tested at the wavelength of 265 nm. The column temperature was 40 °C. A six - position 14 - way valve and was equipped with 2 multi - center cutting valves was equipped to make multiple consecutive cuts of the pre - vitamin D₃ peak and vitamin D₃ peak.

Results: The calibration curves showed a good linearity at the range of 1.018 4 - 5.092 mg · mL⁻¹ ($r \geq 0.999 8$). The precision test showed the RSDs of the peak area of pre - vitamin D₃ and vitamin D₃ were 0.95% and 0.40%, respectively. The repeatability test showed the RSD of vitamin D₃ content was 0.41%. The average recovery rate ($n=9$) was 101.4%. The test solution was stable at 4 °C and 10 °C for 12 h, and the RSDs were 0.58% and 0.66%, respectively. The contents of vitamin D₃ in the samples of vitamin D drops measured by this method were 100.4%, 101.6%, 100.9%, 101.6%, 102.7% and 101.6%, which was basically consistent with the results measured by the fourth method in General Chapter 0722 of ChP 2020 Vol IV. **Conclusion:** This method has a good specificity and high sensitivity to accurately determine the content of vitamin D₃ in vitamin D drops.

Keywords: high resolution sampling; two - dimensional chromatography; normal phase chromatography; vitamin D drops; pre - vitamin D₃; vitamin D₃; normal - phase chromatography; peak purity confirmation

维生素 D 是类固醇类衍生物,市售制剂主要有维生素 D 软胶囊、维生素 D 滴剂等,其主要成分为维生素 D₃或维生素 D₂,辅料为植物油、明胶、甘油等。在临床上主要用于预防和治疗维生素 D 缺乏性佝偻病、骨质疏松症,长期超剂量摄入可能会引起高钙血症、钙沉积引起的肌肉乏力、关节疼痛、弥漫性骨质脱矿化等中毒现象^[1]。

2020 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)收录了 4 种维生素 D 的含量测定方法^[2],前三法均需对供试品进行皂化回流等前处理,第四法采用柱切换二维液相色谱法,将前维生素 D 峰和维生素 D 峰切入收集管中,再注入第二维液相系统进行分析,存在分析时间长,峰展宽等问题。此外,相关文献显示,对于口服液^[3]、片剂^[4-5]等无油性辅料干扰的制剂,可采用反相液相色谱法进行分析。采用 HPLC - MS 法对维生素 AD 滴剂中维生素 D₃的含量进行测定,仍存在固相萃取等复杂前处理步骤^[6-7]。

近年来,不论是全二维液相色谱法还是中心切割二维液相色谱法,二维液相色谱技术被广泛应用于多组分同步测定、微量杂质分析等领域,但均常见于定性分析^[8]及微量成分定量研究^[9-11],缺乏主成分等常量样品的定量研究。中心切割二维液相色谱法中,多中心切割技术可针对多个目标峰进行切割,且通过高分辨采样可进行多次连续切割以解决峰容

量大的问题^[12],从而对目标物质进行定量分析。

本研究开发了一种高分辨采样二维液相色谱方法,通过多中心切割阀对第一维色谱图中的前维生素 D₃和维生素 D₂ 2 个目标峰进行多次连续切割并利用多组小体积样品环不间断收集,将第一维中 2 个目标峰完整注入第二维液相系统,实现目标组分与油性辅料的分离和准确定量。本方法无需烦琐的样品前处理步骤,缩短分析时间,改善长样品环带来的峰展宽等问题,显著提高了维生素 D₃的含量测定效率,降低分析成本,为维生素 D 滴剂等主成分与辅料难分离制剂的准确定量提供新方法。

1 仪器与试剂

1290 infinity II 二维液相色谱系统(安捷伦科技有限公司),配备六位四通阀、2 个多中心切割阀(配置的样品环体积为 40 μL)、VWD 检测器、DAD 检测器;XSE205 十万分之一电子分析天平(METTLER TOLEDO 公司);HH - 2 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);XM - 500VDE 三频超声波清洗机(小美超声仪器昆山有限公司)。

正己烷、正戊醇、异辛烷(均为色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);异丙醇(色谱纯,默克股份两合公司);2,6 - 二叔丁基对甲酚(化学纯,中国医药集团上海化学试剂公司);大豆油(空白辅料,由生产企业提供);维生素 D₃ 对照品(批号 100061 -

202311, 中国食品药品检定研究院, 含量 100.0%); 维生素 D 滴剂 (软胶囊型, 批号 129231014、129224259、129224232、129224064、129224052、129231233, 每粒 400 单位)。试验用水均为超纯水, 由 Milli-Q 超纯水系统制备。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液

取维生素 D 滴剂内容物适量 (约含维生素 D₃ 1 000 单位), 精密称定, 置 10 mL 棕色量瓶中, 用正己烷溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.2 对照品储备溶液

取维生素 D₃ 对照品约 25 mg, 精密称定, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加异辛烷 80 mL, 避免加热, 超声处理 1 min 使完全溶解, 用异辛烷稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL, 置 50 mL 棕色量瓶中, 用异辛烷稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 校正因子对照品溶液

校正因子 f_1 对照品溶液: 精密量取对照品储备溶液 5 mL, 置 50 mL 棕色量瓶中, 用正己烷稀释至刻度, 摇匀, 即得。

校正因子 f_2 对照品溶液: 精密量取对照品储备溶液 5 mL, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加 2,6-二叔丁基对甲酚结晶 1 粒, 通氮排除空气后, 密塞, 置 90 °C 水浴中加热 1.5 h, 取出, 迅速冷却, 用正己烷稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.4 空白辅料溶液

精密称取大豆油约 0.6 g, 置 10 mL 棕色量瓶中, 用正己烷溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 色谱条件

第一维液相色谱采用 Thermo HYPERSIL Gold Silica (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm) 色谱柱, 以正己烷-正戊醇 (996:4) 为流动相, 流速 0.2 mL · min⁻¹, 检测波长 265 nm, 柱温 40 °C, 进样体积 10 μL。

第二维液相色谱采用 ShimPack Velox Hilic (50 mm × 2.1 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 以正己烷-正戊醇-异丙醇 (98:1:1) 为流动相, 流速 0.5 mL · min⁻¹, 检测波长 265 nm, 柱温 40 °C。通过阀切换采用高分辨采样, 前维生素 D₃ 目标峰切割开始时间 6.85 min, 采样时间 9.6 s, 连续采集 4 次。维生素 D₃ 目标峰切割开始时间为 12.05 min, 采样时间 9.6 s, 连续采集 10 次, 采样时间见表 1。

表 1 采样时间

Tab. 1 Sampling time

采样时间 (sampling time)/s	模式 (mode)	第一维切割开始时间 (¹ D cut start time)/min	第二维运行开始时间 (² D run start time)/min	样品仓 (deck)	样品环 (loop)
9.60	Time	6.85	10.64	A	2
9.60	Time	7.01	9.64	A	3
9.60	Time	7.17	8.64	A	4
9.60	Time	7.33	7.64	A	5
9.60	Time	12.05	17.00	B	2
9.60	Time	12.21	16.00	B	3
9.60	Time	12.37	15.00	B	4
9.60	Time	12.53	14.00	B	5
9.60	Time	12.69	13.00	B	6
9.60	Time	12.85	23.00	A	1
9.60	Time	13.01	22.00	A	2
9.60	Time	13.17	21.00	A	3
9.60	Time	13.33	20.00	A	4
9.60	Time	13.49	19.00	A	5

2.3 含量计算方法

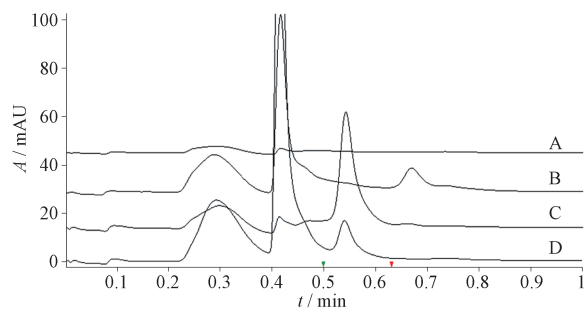
维生素 D₃ 总量 $C_i = f_1 A_{i1} + f_2 A_{i2}$, 式中 A_{i1} 为维生素 D₃ 峰面积, A_{i2} 为前维生素 D₃ 峰面积。

维生素 D₃ 百分标示含量 = $C_i \times$ 平均装量 \times 稀释倍数 / (取样量 \times 0.025 \times 标示量), 维生素 D₃ 滴剂以单位表示维生素 D₃ 的总量, 每单位相当于维生素 D₃ 0.025 μg。

2.4 方法学验证

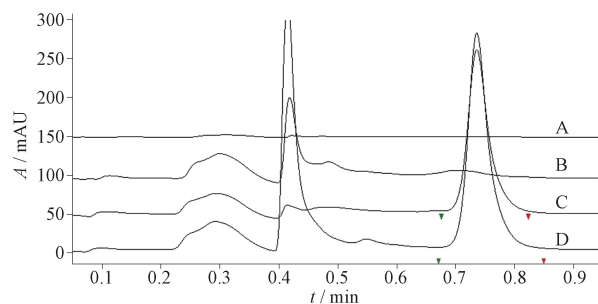
2.4.1 专属性试验

精密量取供试品溶液、校正因子 f_2 对照品溶液、空白辅料溶液、空白溶剂(正己烷)各10 μL ,分别按“2.2”项下条件进样测定。结果见图1、2所示,空白辅料大豆油和溶剂正己烷对前维生素 D_3 峰和维生素 D_3 峰均无干扰。



A. 空白溶剂(blank solvent) B. 空白辅料溶液(blank excipient solution) C. 校正因子 f_2 对照品溶液(correction factor f_2 standard solution) D. 供试品溶液(sample solution)

图1 校正因子 f_2 对照品溶液第二维高效液相色谱图(前维生素 D_3)
Fig. 1 2D chromatogram of correction factor f_2 standard solution (pre-vitamin D_3)



A. 空白溶剂(blank solvent) B. 空白辅料溶液(blank excipient solution) C. 校正因子 f_2 溶液(correction factor f_2 standard solution) D. 供试品溶液(sample solution)

图2 校正因子 f_2 对照品溶液第二维高效液相色谱图(维生素 D_3)
Fig. 2 2D chromatogram of correction factor f_2 standard solution (vitamin D_3)

2.4.2 精密度试验

精密量取校正因子 f_2 对照品溶液10 μL ,按“2.2”项下条件连续进样6次,前维生素 D_3 峰面积和维生素 D_3 峰面积的RSD分别为0.95%和0.40%。

2.4.3 重复性试验

取维生素D滴剂内容物(分别相当于维生素 D_3 800、1 000、1 200单位)各3份,精密称定,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下条件测定,按“2.3”项下公式计算9份样品中维生素 D_3 的平均含量为100.4%,RSD为0.41%。

2.4.4 线性关系考察

精密量取对照品储备溶液2、4、5、6、8、10 mL,分别置50 mL棕色量瓶中,用正己烷稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液按“2.2”项下方法测定。以维生素 D_3 质量浓度(C)为横坐标,维生素 D_3 峰面积(A)为纵坐标,进行线性回归,得维生素 D_3 回归方程

$$A = 281.7753C + 18.1000 \quad r \geq 0.9998$$

表明维生素 D_3 质量浓度在1.018 4 ~ 5.092 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.4.5 校正因子测定

精密量取校正因子 f_1 对照品溶液10 μL ,按“2.2”项下条件进样测定,计算校正因子 f_1 , $f_1 = C_1/A_1$,式中 C_1 为维生素 D_3 对照品溶液浓度, A_1 为色谱图中维生素 D_3 峰面积。

精密量取校正因子 f_2 对照品溶液10 μL ,按“2.2”项下条件进样测定,计算校正因子 f_2 , $f_2 = (C_1 - f_1A_1)/A_2$,式中 C_1 为 f_1 测定时维生素 D_3 对照品溶液的浓度, f_1 为维生素 D_3 校正因子, A_1 为色谱图中维生素 D_3 峰面积, A_2 为色谱图中前维生素 D_3 峰面积。

测定结果如表2、3所示。

表2 f_1 校正因子测定结果

Tab. 2 f_1 correction factor measurement results

对照品量(mass of reference substance)/g	维生素 D_3 峰面积(peak area of vitamin D_3)	f_1	平均值(average value)	RSD/%
0.025 46	724.9	3.5122×10^{-3}	3.5173×10^{-3}	1.2
0.025 91	745.1	3.4774×10^{-3}		
0.025 30	710.2	3.5624×10^{-3}		

2.4.6 稳定性试验

鉴于试验过程中可能存在由测定时间长等原因

引起的样品不能及时分析的情况,本试验考察样品在4和10 $^{\circ}\text{C}$ 下的稳定性。取供试品溶液于4 $^{\circ}\text{C}$ 放置

表3 f_2 校正因子测定结果Tab. 3 f_2 correction factor measurement results

对照品量 (mass of reference substance)/g	前维生素 D ₃ 峰面积 (peak area of pre-vitamin D ₃)	维生素 D ₃ 峰面积 (peak area of vitamin D ₃)	f_2	平均值 (average value)	RSD/ %
0.025 46	95.7	548.0	$6.606 1 \times 10^{-3}$	$6.656 2 \times 10^{-3}$	0.77
0.025 91	97.4	554.8	$6.709 0 \times 10^{-3}$		
0.025 30	93.1	529.0	$6.653 4 \times 10^{-3}$		

0、2、4、8、12 h,另取供试品溶液于 10 °C 放置 0、2、4、8、12 h,分别按“2.2”项下条件测定,结果显示 4 和 10 °C 放置的各供试品溶液峰面积 RSD 分别为 0.58% 和 0.66%,表明供试品溶液在 4 和 10 °C 稳定性良好。

2.4.7 回收率试验

精密称取维生素 D₃对照品约 10、12.5、15 mg 各 3 份,分别置 100 mL 棕色量瓶中,加异辛烷溶解并稀

释至刻度,摇匀,精密量取 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加正己烷稀释至刻度,摇匀,精密量取 2 mL,置 10 mL 量瓶中,再分别加入空白辅料适量(根据制剂处方各加入约 1 粒量),用正己烷溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 μ L,按“2.2”项下条件测定,按“2.3”项下公式计算回收率(表 4),结果表明回收率良好。

表4 维生素 D₃回收率试验结果Tab. 4 Recovery test results of vitamin D₃

加入量 (added amount)/ μ g	测得量 (measured amount)/ μ g	回收率 (recovery)/%	均值 (average value)/%	RSD/ %	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
21.86	21.932	100.3	101.0	0.66	101.4	0.59
20.54	20.717	100.9				
20.22	20.556	101.7				
25.68	26.011	101.3	101.4	0.18		
25.62	25.983	101.4				
24.84	25.250	101.6				
31.36	31.721	101.2	101.9	0.66		
31.06	31.829	102.5				
31.18	31.689	101.6				

2.4.8 耐用性试验

2.4.8.1 流动相流速 调节第一维流速分别为 0.15、0.2、0.3 mL \cdot min⁻¹,当流速为 0.15 mL \cdot min⁻¹时第一维色谱图中维生素 D₃峰峰宽较大,不能将其完全切割转移到第二维以实现准确定量;当流速为 0.2 mL \cdot min⁻¹时,前维生素 D₃峰与维生素 D₃峰均可完全切割进入第二维;当流速为 0.3 mL \cdot min⁻¹时,前维生素 D₃峰与辅料峰大部分重叠难以确定切割开始时间。设置第一维流速为 0.2 mL \cdot min⁻¹,调节第二维流速分别为 0.4、0.5、0.6 mL \cdot min⁻¹,第二维色谱表现无明显差别。

2.4.8.2 流动相比 改变第一维流动相正己烷-正戊醇的比例分别为 997:3、996:4 和 995:5,仅对保留时间存在影响,正己烷-正戊醇为 995:5 时,

前维生素 D₃峰与辅料峰分离度相对较差;设置第一维流动相为正己烷-正戊醇 996:4,只调整第二维流动相正己烷-正戊醇-异丙醇比例分别为 99:0.5:0.5、98:1:1 和 97:1.5:1.5,第二维色谱各峰仅在保留时间上存在细微差别。

2.4.8.3 不同色谱柱 分别以 Thermo HYPERSIL Gold Silica (100 mm \times 2.1 mm, 1.9 μ m) 色谱柱和 ShimPack Velox Hilic (100 mm \times 2.1 mm, 2.7 μ m) 色谱柱作为第一维色谱柱,结果采用 ShimPack Velox Hilic (100 mm \times 2.1 mm, 2.7 μ m) 色谱柱时第一维色谱图中前维生素 D₃峰与辅料峰不能较好分离,影响切割开始时间的判断。

2.5 样品含量测定

精密量取“2.1.1”项下供试品溶液 10 μ L,照

“2.2”项下条件测定,按“2.3”项下公式计算维生素 D₃含量。结果如表 5 所示,6 批样品的含量测定结果

与《中国药典》通则 0722 四法测得结果基本一致。色谱图见图 3~5。

表 5 含量测定结果表

Tab. 5 Assay results

批号 (batch number)	每粒含维生素 D ₃ /单位 (vitamin D ₃ content per drop)/U	含量(content)/%	
		本法 (studied method)	2020 年版《中国药典》四部通则 0722 四法 (the forth method of General Chapter 0722 of ChP 2020 Vol IV)
129231014	400	100.4	100.7
129224259		101.6	101.2
129224232		100.9	101.2
129224064		101.6	101.8
129224052		102.7	102.4
129231233		101.6	101.7

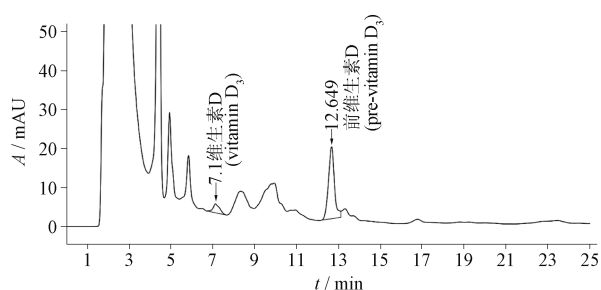


图 3 供试品溶液第一维液相色谱图

Fig. 3 1D chromatogram of sample solution

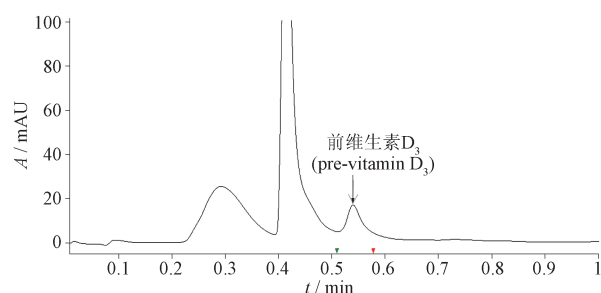


图 4 供试品溶液第二维色谱图(前维生素 D₃)

Fig. 4 2D chromatogram of pre-vitamin D₃ in sample solution

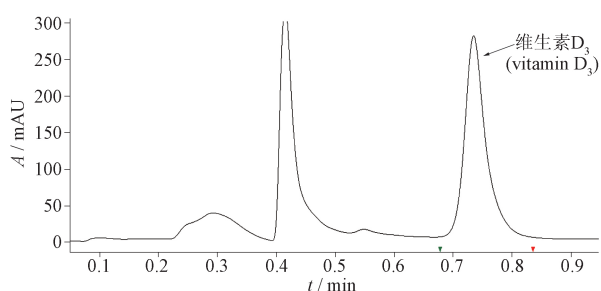


图 5 供试品溶液第二维色谱图(维生素 D₃)

Fig. 5 2D chromatogram of vitamin D₃ in sample solution

3 讨论

本研究采用多中心切割二维液相色谱法对维生素 D 滴剂进行定量研究,相较于药典及文献报道的二维液相色谱方法^[13],将分析时间由 2020 年版《中国药典》四部通则 0722 四法的 70 min 缩短至 25 min,提高了分析效率,降低了检验成本,且解决了长样品环带来的峰展宽等问题。当样品浓度与药典方法一致时,进样量仅为药典方法的 1/10,提高了检测灵敏度,可为微量样品的测定提供参考。

《中国药典》及文献报道的一维液相色谱方法中,样品需经皂化回流、氮吹复溶^[14]、超声离心^[15-16]等前处理,操作烦琐,易造成测定成分的损失。本研究采用正己烷直接溶解样品,降低了样品前处理过程中对设备和人工的要求,操作简便,极大缩短了前处理时间。

从二维液相色谱峰中提取前维生素 D₃和维生素 D₃的光谱图,样品与对照品光谱吸收特征一致,进一步表明 2 个定量峰与辅料之间实现了完全分离,使用本方法所测定的维生素 D₃含量准确、可靠。

文献报道了 4 种维生素 D 含量的计算方法^[17],且其计算结果存在一定差异。本研究参考《中国药典》,通过加热破坏维生素 D₃对照品溶液,使仅产生前维生素 D₃峰,未产生其他杂质峰,计算获得前维生素 D₃的相对校正因子,维生素 D₃总量以维生素 D₃与前维生素 D₃含量之和计,可有效反映维生素 D₃的实际含量。

4 结论

本研究建立高分辨采样二维液相色谱法对维生

素 D 滴剂中维生素 D₃ 含量进行测定, 可以实现目标成分的完全分离和准确定量, 该技术可为难分离样品的定量分析提供参考。

参考文献

- [1] 廖祥鹏, 张增利, 张红红, 等. 维生素 D 与成年人骨骼健康应用指南(2014 年 简化版)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(6): 1011
LIAO XP, ZHANG ZL, ZHANG HH, *et al.* Application guideline for vitamin D and bone health in adult Chinese (2014 Starter Edition)[J]. Chin J Osteoporosis, 2014, 20(6): 1011
- [2] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 105
ChP 2020. Vol IV[S]. 2020: 105
- [3] 范世德, 廖晓君, 邱正霞, 等. RP-HPLC 法测定钙佳锌口服液中维生素 D₂ 含量[J]. 中国医药导报, 2010, 7(13): 59
FAN SD, LIAO XJ, QIU ZX, *et al.* Content determination of vitamin D₂ in Gaijiixin oral liquid by RP-HPLC[J]. China Med Her, 2010, 7(13): 59
- [4] 冯国. 反相高效液相色谱法测定维 D₂ 磷酸氢钙片中维生素 D₂ 含量[J]. 中国药业, 2013, 22(12): 91
FENG G. Determination of vitamin D₂ content in vitamin D₂ and calcium hydrogen phosphate tablets by RP-HPLC[J]. China Pharm, 2013, 22(12): 91
- [5] 许强, 刘金生, 王轶鹏, 等. 反相高效液相色谱法测定维生素 D₂ 和维生素 D₃[J]. 理化检验(化学分册), 2011, 47(10): 1168
XU Q, LIU JS, WANG YP, *et al.* RP-HPLC determination of vitamin D₂ and vitamin D₃[J]. Phys Test Chem Anal (Part B: Chem Anal), 2011, 47(10): 1168
- [6] 李秀明, 徐建. UPLC-MS/MS 测定维生素 AD 滴剂的含量[J]. 甘肃医药, 2021, 40(1): 59
LI XM, XU J. Determination of the content of vitamin AD drops by UPLC-MS/MS[J]. Gansu Med J, 2021, 40(1): 59
- [7] KO DH, JUN SH, NAM Y, *et al.* Multiplex LC-MS/MS for simultaneous determination of 25-hydroxyvitamin D, 24, 25-dihydroxyvitamin D₃, albumin, and vitamin D-binding protein with its isoforms; one-step estimation of bioavailable vitamin D and vitamin D metabolite ratio[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2021, 206:105796
- [8] 赵雅清, 付冬梅, 刘艳芳, 等. 离线二维液相色谱法分离巴天酸模根的化学成分[J]. 色谱, 2018, 36(1): 37
ZHAO YQ, FU DM, LIU YF, *et al.* Separation of chemical compositions in root of *Rumex patientia* L. with off-line two-dimensional liquid chromatography[J]. Chin J Chromatogr, 2018, 36(1): 37
- [9] 张艳海, 张大伟, 孟兆青, 等. 在线二维液相色谱法快速测定桂枝茯苓胶囊中芍药苷、丹皮酚、苦杏仁苷和肉桂酸的含量[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(23): 4088
ZHANG YH, ZHANG DW, MENG ZQ, *et al.* Rapid determination of four components in Guizhi Fuling capsule with online two-dimensional liquid chromatography[J]. China J Chin Mater Med, 2013, 38(23): 4088
- [10] 沈灿杰, 马阳, 陈夏霖, 等. 多中心切割二维液相色谱法同时测定九味熄风颗粒中 10 种成分[J]. 中草药, 2022, 53(14): 4333
SHEN CJ, MA Y, CHEN XL, *et al.* Simultaneous quantitation of 10 components in Jiawei Xifeng granules by multiple heart-cutting two dimensional liquid chromatography[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(14): 4333
- [11] 孔滢, 刘红, 彭洪薇, 等. 二维液相色谱法同时测定人血浆中伊马替尼及去甲伊马替尼药物浓度及临床应用[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(17): 2229
KONG Y, LIU H, PENG HW, *et al.* Simultaneous determination of imatinib and *N*-desmethyl imatinib in human plasma by two-dimensional liquid chromatography and its clinical application[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2022, 39(17): 2229
- [12] 王智聪, 傅荣杰, 吉建国, 等. 高分辨采样二维液相色谱法同时测定金银花中绿原酸和木犀草苷含量[J]. 色谱, 2019, 37(2): 201
WANG ZC, FU RJ, JI JG, *et al.* Simultaneous determination of chlorogenic acid and cynaroside contents in *Lonicerae Japonicae* Flos by high resolution sampling two-dimensional liquid chromatography[J]. Chin J Chromatogr, 2019, 37(2): 201
- [13] 林思荣, 王勇, 林晨, 等. 柱切换高效液相色谱法测定维生素 D 滴剂、维生素 AD 滴剂中维生素 D 的含量[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(3): 491
LIN SR, WANG Y, LIN C, *et al.* Determination of vitamin D content in vitamin D drops and vitamin AD drops by column-switching high-performance liquid chromatography [J]. Chin J Pharm Anal, 2021, 41(3): 491
- [14] 徐雄飞, 谭灵芝. 正相 HPLC 法测定碳酸钙 D₃ 片中 VD₃ 的含量[J]. 广东化工, 2015, 42(22):178
XU XF, TAN LZ. Determination of vitamin D₃ content in calcium carbonate D₃ tablets by positive phase HPLC [J]. Guangdong Chem Ind, 2015, 42(22): 178
- [15] 王英新, 王凤英, 吴学萍, 等. HPLC 法测定碳酸钙 D₃ 咀嚼片(II) 维生素 D₃ 含量[J]. 齐鲁工业大学学报, 2017, 31(1): 16
WANG YX, WANG FY, WU XP, *et al.* Determination of vitamin D₃ in calcium carbonate and vitamin D₃ chew table by HPLC[J]. J Qilu Univ Technol, 2017, 31(1): 16
- [16] 徐硕, 徐文峰, 金鹏飞, 等. HPLC 快速测定维生素 D₃ 软胶囊中的维生素 D₃[J]. 华西药学杂志, 2018, 33(1):84
XU S, XU WF, JIN PF, *et al.* Rapid determination of vitamin D₃ in vitamin D₃ soft capsule by HPLC [J]. West China J Pharm Sci, 2018, 33(1): 84
- [17] 王理, 施洁明, 张立雯, 等. HPLC 法测定维生素 D 含量结果计算方法的研究[J]. 中国药品标准, 2020, 21(2): 107
WANG C, SHI JM, ZHANG LW, *et al.* Investigation on the calculation methods of vitamin D assay by HPLC [J]. Drug Stand China, 2020, 21(2): 107

(本文于 2023 年 11 月 20 日收到)