

中图分类号: R927.2; R977 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)03-0091-06  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.03.017



# 高效液相色谱法同时测定小儿四维葡钙片中 6 种成分含量

夏方亮, 顾晶晶, 王建强, 曹洪杰, 雷永艳

(山东省滨州市检验检测中心·山东省滨州市化学药物研发与质量控制重点实验室, 山东 滨州 256600)

**摘要:**目的 建立同时测定小儿四维葡钙片中 6 种成分含量的高效液相色谱法。方法 采用高效液相色谱法测定制剂中葡萄糖、蔗糖、维生素 D<sub>2</sub> 的含量, 采用超高效液相色谱法测定制剂中维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 C 的含量。色谱柱, 葡萄糖和蔗糖为 Ultimate XB-NH<sub>2</sub> 氨基柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 C 为 Acquity UPLC HSS T<sub>3</sub> 柱 (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), 维生素 D<sub>2</sub> 为广州研创 Gensial® C<sub>18</sub> 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相, 葡萄糖和蔗糖为乙腈-水-氨水 (80:20:0.1, V/V/V), 维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 C 为 0.02 mol/L 磷酸二氢铵溶液 (含 0.05% 庚烷磺酸钠, 用磷酸调 pH 至 3.0) - 甲醇 (80:20, V/V), 维生素 D<sub>2</sub> 为乙腈-0.5% 甲酸溶液 (95:5, V/V); 流速, 葡萄糖、蔗糖、维生素 D<sub>2</sub> 为 1.0 mL/min, 维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 C 为 0.2 mL/min; 检测波长, 维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 C 为 267 nm, 维生素 D<sub>2</sub> 为 264 nm; 检测器, 葡萄糖和蔗糖为示差折光检测器, 维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 C 为二极管阵列 (PDA) 检测器, 维生素 D<sub>2</sub> 为紫外-可见分光光度检测器; 柱温, 葡萄糖、蔗糖、维生素 D<sub>2</sub> 为 40 °C, 维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 C 为 35 °C; 进样量, 葡萄糖、蔗糖、维生素 D<sub>2</sub> 为 10 μL, 维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 C 为 1 μL。结果 葡萄糖、蔗糖、维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 C、维生素 D<sub>2</sub> 的质量浓度分别在 1.00~20.00 mg/mL、1.00~20.00 mg/mL、0.80~24.00 μg/mL、0.40~12.00 μg/mL、10.00~300.00 μg/mL、0.10~10.00 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好 ( $R^2 \geq 0.9991$ ); 检测限分别为 1.00 μg、2.00 μg、0.02 ng、0.01 ng、0.025 ng、0.20 ng, 定量限分别为 3.00 μg、6.00 μg、0.80 ng、0.40 ng、0.10 ng、0.50 ng; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.50%; 平均加样回收率分别为 99.18%, 99.47%, 98.83%, 98.54%, 99.49%, 98.80%, RSD 分别为 1.61%, 2.28%, 1.82%, 2.47%, 2.33%, 2.72% ( $n=6$ )。3 批样品中每片分别含以上 6 种成分 148.702~153.218 mg、148.623~151.419 mg、0.198~0.203 mg、0.098~0.103 mg、2.488~2.512 mg、1.632~1.689 μg。结论 该方法操作简便、专属性强、重复性好、结果准确, 可用于同时测定小儿四维葡钙片中主要成分的含量。

**关键词:** 小儿四维葡钙片; 高效液相色谱法; 超高效液相色谱法; 葡萄糖; 蔗糖; 维生素 B<sub>1</sub>; 维生素 B<sub>2</sub>; 维生素 C; 维生素 D<sub>2</sub>; 含量测定

## Content Determination of Six Components in Xiao'er Siwei Pugai Tablets by HPLC

XIA Fangliang, GU Jingjing, WANG Jianqiang, CAO Hongjie, LEI Yongyan

(Binzhou Testing Center · Binzhou Key Laboratory of Chemical Drug R&D and Quality Control, Binzhou, Shandong 256600, China)

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of six components in Xiao'er Siwei Pugai Tablets. **Methods** The contents of glucose, sucrose, and vitamin D<sub>2</sub> in the preparation were determined by the HPLC method, while the contents of vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, and vitamin C in the preparation were determined by the ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC) method. Chromatographic columns: the Ultimate XB-NH<sub>2</sub> amino column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used for glucose and sucrose, the Acquity UPLC HSS T<sub>3</sub> column (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) was used for vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub> and vitamin C, and the Guangzhou Yanchuang Gensial® C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used for vitamin D<sub>2</sub>. Mobile phases: acetonitrile-water-ammonia solution (80:20:0.1, V/V/V) was set for glucose and sucrose, 0.02 mol/L ammonium dihydrogen phosphate solution (containing 0.05% sodium heptane sulfonate, adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid)-methanol (80:20, V/V) was set for vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, and vitamin C, and acetonitrile-0.5% formic acid solution (95:5, V/V) was set for vitamin D<sub>2</sub>. Flow rates: 1.0 mL/min was set for glucose, sucrose, and vitamin D<sub>2</sub>, and 0.2 mL/min was set for vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, and vitamin C. Detection wavelengths: 267 nm was set for vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, and vitamin C, and 264 nm was set for vitamin D<sub>2</sub>. Detectors: the UV-visible spectrophotometric refractive index detector was used for determining glucose and sucrose, the photo-diode array (PDA) detector was used for determining vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, and vitamin C, and the UV-visible spectrophotometric detector was used for determining vitamin D<sub>2</sub>. Column temperatures: 40 °C was set for glucose, sucrose, and vitamin D<sub>2</sub>, and 35 °C was set for vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, and vitamin C. Injection volumes: 10 μL was set for glucose, sucrose, and vitamin D<sub>2</sub>, and 1 μL was set for vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, and vitamin C. **Results** The linear ranges for glucose, sucrose, vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, vitamin C, and vitamin D<sub>2</sub> were 1.00-20.00 mg/mL, 1.00-20.00 mg/mL, 0.80-24.00 μg/mL, 0.40-12.00 μg/mL, 10.00-300.00 μg/mL, and 0.10-10.00 μg/mL ( $R^2 \geq 0.9991$ ), respectively. The limits of detection of the above six components were 1.00 μg, 2.00 μg,

0.02 ng, 0.01 ng, 0.025 ng, and 0.20 ng, and the limits of quantification of the above six components were 3.00 μg, 6.00 μg, 0.80 ng, 0.40 ng, 0.10 ng, and 0.50 ng, respectively. The RSDs of the precision, stability, and repeatability tests were all lower than 2.50%. The average recoveries of the above six components were 99.18%, 99.47%, 98.83%, 98.54%, 99.49%, and 98.80%, with RSDs of 1.61%, 2.28%, 1.82%, 2.47%, 2.33%, and 2.72% ( $n = 6$ ), respectively. In the three batches of samples, the six components in each tablet were in the ranges of 148.702 - 153.218 mg, 148.623 - 151.419 mg, 0.198 - 0.203 mg, 0.098 - 0.103 mg, 2.488 - 2.512 mg, and 1.632 - 1.689 μg, respectively. **Conclusion** The method is simple, specific, reproducible, and accurate, which can be used for simultaneous determination of six components in Xiao'er Siwei Pugai Tablets.

**Key words:** Xiao'er Siwei Pugai Tablets; HPLC; UPLC; glucose; sucrose; vitamin B<sub>1</sub>; vitamin B<sub>2</sub>; vitamin C; vitamin D<sub>2</sub>; content determination

小儿四维葡钙片由维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C、维生素D<sub>2</sub>、葡萄糖酸钙、葡萄糖、蔗糖、辅料等制成,主要用于预防和补充儿童体内维生素及钙质的不足。现有质量标准中仅有葡萄糖酸钙的含量测定方法<sup>[1]</sup>,未对其他主要成分进行质量控制。其中,维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素D<sub>2</sub>的含量较少[分别为每片0.2 mg、0.1 mg、1.75 μg(计70 U/片)],且维生素B<sub>2</sub>和维生素D<sub>2</sub>的稳定性较差,为保证儿童用药安全有效和药品质量可控,应建立其主要成分的含量测定方法。故本研究中建立了同时测定小儿四维葡钙片中主要成分葡萄糖、蔗糖、维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C、维生素D<sub>2</sub>含量的高效液相色谱法,旨在提升小儿四维葡钙片的质量。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱(HPLC)仪[岛津企业管理(中国)有限公司,含RID-10A REFRACTIVE INDEX型示差折光检测器及SPD-20A Prominence型紫外-可见分光光度(UV-Vis)检测器]; Acquity H-Class型超高效液相色谱(UPLC)仪[沃特世科技(上海)有限公司,含eλ型二极管阵列(PDA)检测器]; XSE205DU型电子天平(梅特勒托利多科技(中国)有限公司,精度为0.01 mg); KQ-300VDV型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司,功率为300 W,频率为45 kHz); Sorvall ST16型高速离心机(赛默飞世尔科技(中国)有限公司)。

### 1.2 试剂

小儿四维葡钙片(山东新华制药股份有限公司,批号分别为2405117, 2405118, 2405119); 葡萄糖对照品(批号为110833-202109,纯度为99.9%), 蔗糖对照品(批号为111507-202406,纯度为100.0%), 维生素B<sub>1</sub>对照品(批号为100390-202107,纯度为97.4%), 维生素B<sub>2</sub>对照品(批号为100369-202206,纯度为99.4%), 维生素C对照品(批号为100425-202105,纯度为100.0%), 维生素D<sub>2</sub>对照品(批号为100155-202309,纯度为99.9%), 均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈均为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为优级纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 HPLC法测定葡萄糖与蔗糖含量

#### 2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Ultimate XB-NH<sub>2</sub>氨基柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相<sup>[2-7]</sup>: 乙腈-水-氨水(80:20:0.1, V/V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测器: 示差折光检测器; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL。在此色谱条件下,理论板数按葡萄糖、蔗糖峰计分别应不低于8 000, 10 000, 葡萄糖与蔗糖的分离度大于8.0。

#### 2.1.2 溶液制备

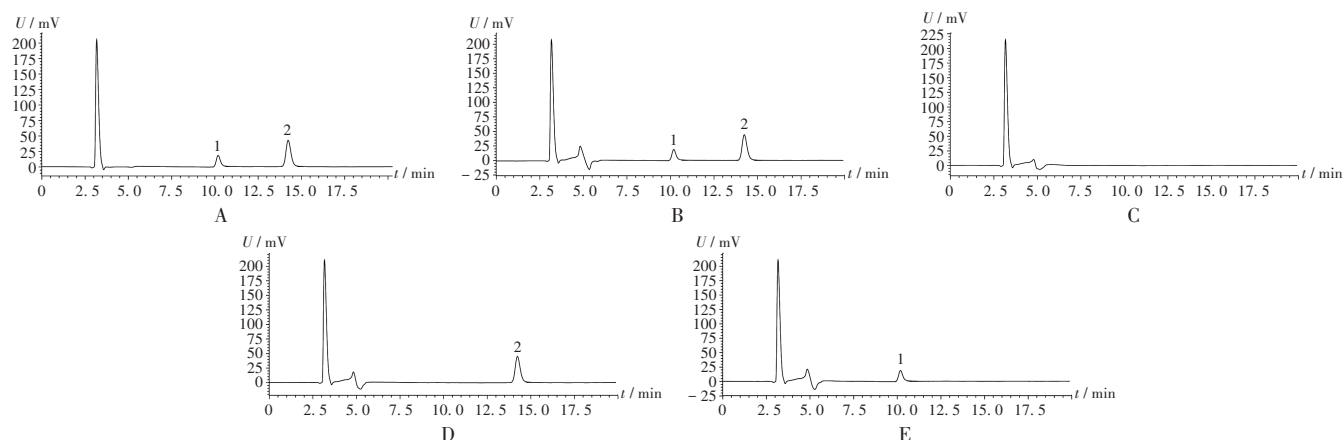
取葡萄糖对照品和蔗糖对照品各适量,精密称定,加50%乙腈制成葡萄糖和蔗糖质量浓度均为10 mg/mL的混合对照品溶液。取样品适量(约相当于葡萄糖500 mg、蔗糖500 mg),研成细粉,精密称定,置50 mL容量瓶中,加50%乙腈适量,超声处理(功率为300 W,频率为45 kHz)15 min,加50%乙腈定容,摇匀,即得供试品溶液。按处方比例分别制备缺葡萄糖、缺蔗糖、缺葡萄糖+蔗糖的阴性样品,按供试品溶液制备方法分别制备阴性对照品溶液。

#### 2.1.3 方法学考察

专属性试验: 取2.1.2项下混合对照品溶液、供试品溶液、3种阴性对照品溶液各10 μL,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与混合对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰出现,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。详见图1。

线性关系考察: 取2.1.2项下混合对照品溶液适量,加50%乙腈稀释成系列梯度质量浓度(葡萄糖与蔗糖质量浓度均分别为1.00, 2.00, 5.00, 10.00, 12.00, 15.00, 20.00 mg/mL)的线性溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,以质量浓度( $X$ , mg/mL)为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归,得回归方程分别为 $Y_{\text{葡}} = 38\,236.0 X_{\text{葡}} - 11\,063.0$  ( $R^2 = 0.999\,1, n = 7$ )和 $Y_{\text{蔗}} = 88\,603.0 X_{\text{蔗}} + 3\,400.2$  ( $R^2 = 0.999\,8, n = 7$ )。结果表明,葡萄糖、蔗糖的质量浓度均在1.00~20.00 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定: 取线性关系考察项下系列



1. 葡萄糖 2. 蔗糖

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C - E. 阴性对照品溶液(分别缺葡萄糖 + 蔗糖、葡萄糖、蔗糖)

图1 高效液相色谱图

1. Glucose 2. Sucrose

A. Mix reference solution B. Test solution C - E. Negative reference solution (lack of glucose + sucrose, glucose, and sucrose, respectively)

Fig. 1 HPLC chromatograms

梯度质量浓度的线性溶液各适量,按2.1.1项下色谱条件进样测定,分别以信噪比( $S/N$ )为3:1和10:1时的进样量作为检测限与定量限。结果葡萄糖的检测限和定量限分别为1.00, 3.00  $\mu\text{g}$ ,蔗糖的检测限和定量限分别为2.00, 6.00  $\mu\text{g}$ 。

精密度试验:取2.1.2项下混合对照品溶液适量,按2.1.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果葡萄糖和蔗糖峰面积的 $RSD$ 分别为0.05%和0.03% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为2405119)适量,精密称定,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,分别于室温放置0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h时按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果葡萄糖和蔗糖峰面积的 $RSD$ 分别为0.67%和0.53% ( $n=7$ ),表明供试品溶液室温放置24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为2405119)适量,精密称定,平行6份,按2.1.2项下方法平行制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果葡萄糖和蔗糖的平均含量分别为每片含153.22, 148.63 mg,  $RSD$ 分别为1.93%和2.31% ( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取除样品处方中葡萄糖和蔗糖外的其他原料和辅料,按处方比例制备阴性样品6份,按处方比例加葡萄糖对照品和蔗糖对照品各适量,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果葡萄糖和蔗糖的平均回收率分别为99.18%和99.47%,  $RSD$ 分别为1.61%和2.28% ( $n=6$ ),表明方法准确度良好。

## 2.1.4 样品含量测定

取3批(批号分别为2405117, 2405118, 2405119)样品各适量,精密称定,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标法计算样品中葡萄糖和蔗糖的含量。结果见表1。

表1 每片小儿四维葡钙片中6种成分含量测定结果

Tab. 1 Results of the content determination of six components in each Xiao'er Siwei Pugai Tablets

批号	葡萄糖 (mg)	蔗糖 (mg)	维生素B <sub>1</sub> (mg)	维生素B <sub>2</sub> (mg)	维生素C (mg)	维生素D <sub>2</sub> [ $\mu\text{g(U)}$ ]
2405117	150.523	149.805	0.195	0.103	2.488	1.632(65.28)
2405118	148.702	151.419	0.203	0.098	2.509	1.653(66.12)
2405119	153.218	148.623	0.198	0.099	2.512	1.689(67.56)

## 2.2 UPLC法测定维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C含量

### 2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Acquity UPLC HSS T<sub>3</sub>柱(150 mm  $\times$  2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ );流动相<sup>[8-12]</sup>:0.02 mol/L磷酸二氢铵溶液(含0.05%庚烷磺酸钠,用磷酸调pH至3.0)-甲醇(80:20, V/V);流速:0.2 mL/min;检测波长:267 nm;检测器:PDA检测器;柱温:35  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量:1  $\mu\text{L}$ 。在此色谱条件下,理论板数按维生素C、维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>峰计分别应不低于6 000, 8 000, 7 000,维生素C与维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>1</sub>与维生素B<sub>2</sub>的分离度分别大于17.0和13.0。

### 2.2.2 溶液制备

取维生素B<sub>1</sub>对照品、维生素B<sub>2</sub>对照品和维生素C对照品各适量,精密称定,加50%甲醇制成维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C质量浓度分别为8, 4, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。取样品适量(约相当于维生素B<sub>1</sub> 20 mg, 维生素B<sub>2</sub> 10 mg, 维生素C 250 mg),研成细粉,精密称

定,置100 mL容量瓶中,加50%甲醇适量,超声处理(功率为300 W,频率为45 kHz)10 min,加50%甲醇定容,摇匀,滤过,精密量取滤液1 mL,置25 mL容量瓶中,加50%甲醇定容,摇匀,即得供试品溶液。按处方比例分别制备缺维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C的单一阴性样品和缺以上3种成分的阴性样品,按供试品溶液制备方法分别制备阴性对照品溶液。

### 2.2.3 方法学考察

**专属性试验:**取2.2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液、4种阴性对照品溶液各1 μL,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与混合对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰出现,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。详见图2。

**线性关系考察:**取2.2.2项下混合对照品溶液适量,加50%甲醇稀释成系列梯度质量浓度(维生素B<sub>1</sub>质量浓度分别为0.80,1.60,4.00,8.00,16.00,24.00 μg/mL,维生素B<sub>2</sub>质量浓度分别为0.40,0.80,2.00,4.00,8.00,12.00 μg/mL,维生素C质量浓度分别为10.00,20.00,50.00,100.00,200.00,300.00 μg/mL)的线性溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,以质量浓度( $X$ , μg/mL)为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归,得回归方程  $Y_{B_1} = 10\ 130.0 X_{B_1} - 2\ 588.2$ ,  $Y_{B_2} = 26\ 209.0 X_{B_2} - 4\ 339.7$ ,  $Y_C = 3\ 348.3 X_C - 11\ 802.0$  ( $R^2 = 0.999\ 9, n = 6$ )。结果表明,维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C的质量浓度分别在0.80~24.00 μg/mL、0.40~12.00 μg/mL、10.00~300.00 μg/mL范围内

与峰面积线性关系良好。

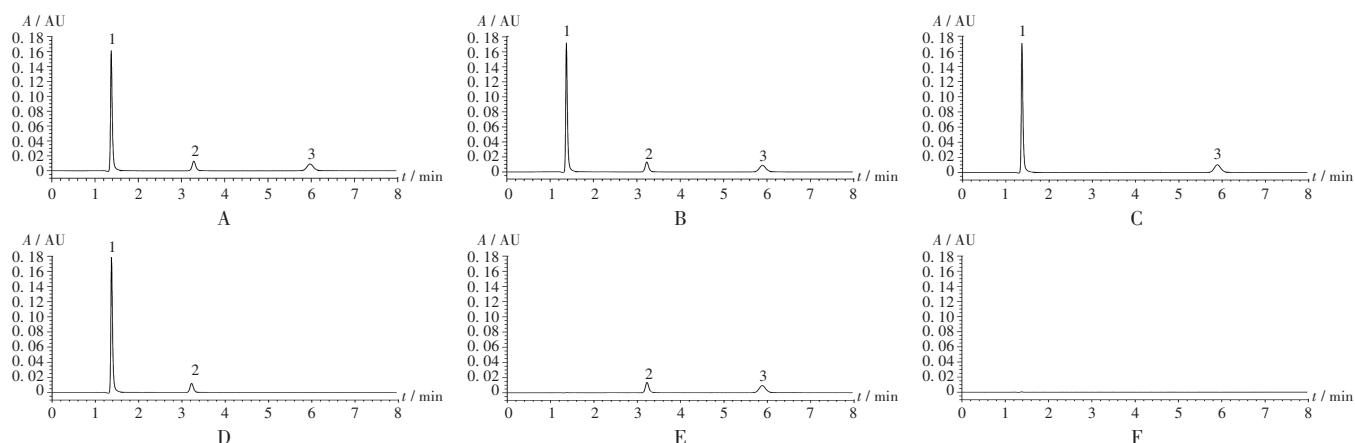
**检测限与定量限确定:**取线性关系考察项下系列梯度质量浓度的线性溶液各适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定,分别以 $S/N$ 为3:1和10:1时的进样量作为检测限与定量限。结果维生素B<sub>1</sub>的检测限和定量限分别为0.02,0.80 ng,维生素B<sub>2</sub>的检测限和定量限分别为0.01,0.40 ng,维生素C的检测限和定量限分别为0.025,0.10 ng。

**精密度试验:**取2.2.2项下混合对照品溶液适量,按2.2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C峰面积的RSD分别为0.02%,0.02%,0.04% ( $n = 6$ ),表明仪器精密度良好。

**稳定性试验:**取样品(批号为2405119)适量,精密称定,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,分别于室温放置0,2,4,6,8,12 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C峰面积的RSD分别为0.51%,1.34%,0.83% ( $n = 6$ ),表明供试品溶液室温放置24 h内稳定性良好。

**重复性试验:**取样品(批号为2405119)适量,精密称定,平行6份,按2.2.2项下方法平行制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C的平均含量分别为每片含0.198 1,0.098 5,2.512 1 mg,RSD分别为0.91%,1.23%,1.51% ( $n = 6$ ),表明方法重复性良好。

**加样回收试验:**取除样品处方中维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C外的其他原料和辅料,按处方比例制备阴性样品6份,按处方比例加维生素B<sub>1</sub>对照品、维生素B<sub>2</sub>对照品、维生素C对照品各适量,按2.2.2项下方法制备供



1. 维生素C 2. 维生素B<sub>1</sub> 3. 维生素B<sub>2</sub>

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C - F. 阴性对照品溶液(分别缺维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C、维生素B<sub>1</sub> + 维生素B<sub>2</sub> + 维生素C)

图2 超高效液相色谱图

1. Vitamin C 2. Vitamin B<sub>1</sub> 3. Vitamin B<sub>2</sub>

A. Mix reference solution B. Test solution C - F. Negative reference solution (lack of Vitamin B<sub>1</sub>, Vitamin B<sub>2</sub>, Vitamin C, and Vitamin B<sub>1</sub> + Vitamin B<sub>2</sub> + Vitamin C, respectively)

Fig. 2 UPLC chromatograms

试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C的平均回收率分别为98.83%,98.54%,99.49%,RSD分别为1.82%,2.47%,2.33%(n=6),表明方法准确度良好。

#### 2.2.4 样品含量测定

取3批(批号分别为2405117,2405118,2405119)样品各适量,精密称定,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标法计算样品中维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C的含量。结果见表1。

### 2.3 HPLC法测定维生素D<sub>2</sub>含量

#### 2.3.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:广州研创Gensial® C<sub>18</sub>柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相<sup>[13-18]</sup>:乙腈-0.5%甲酸溶液(95:5, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:264 nm;检测器:UV-Vis检测器;柱温:40℃;进样量:10 μL。在此色谱条件下,理论板数按维生素D<sub>2</sub>峰计应不低于15 000,维生素D<sub>2</sub>峰与相邻峰的分度应大于2.0。

#### 2.3.2 溶液制备

取维生素D<sub>2</sub>对照品适量,精密称定,加乙醇溶解成质量浓度为0.35 μg/mL(14 U/mL)的对照品溶液。取样品适量(约相当于35 μg维生素D<sub>2</sub>),研成细粉,置50 mL具塞塑料离心管中,加乙醇40 mL,超声处理(功率为300 W,频率为45 kHz)30 min(控制温度不超过40℃),离心(转速为8 000 r/min)10 min,取上清液,置100 mL棕色容量瓶中,残渣加乙醇40 mL,同上超声和离心处理,合并2次离心后的上清液,加乙醇定容,摇匀,作为供试品溶液。按处方比例制备缺维生素D<sub>2</sub>的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

#### 2.3.3 方法学考察

专属性试验:取2.3.2项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各10 μL,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰出现,且

阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。详见图3。

线性关系考察:取2.3.2项下对照品溶液适量,加乙醇稀释成系列梯度质量浓度分别为0.10,0.20,0.50,5.00,10.00 μg/mL的线性溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,以质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 27\,266.0X - 1\,213.2$ ( $R^2 = 0.9997, n = 5$ )。结果表明,维生素D<sub>2</sub>的质量浓度在0.10~10.00 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

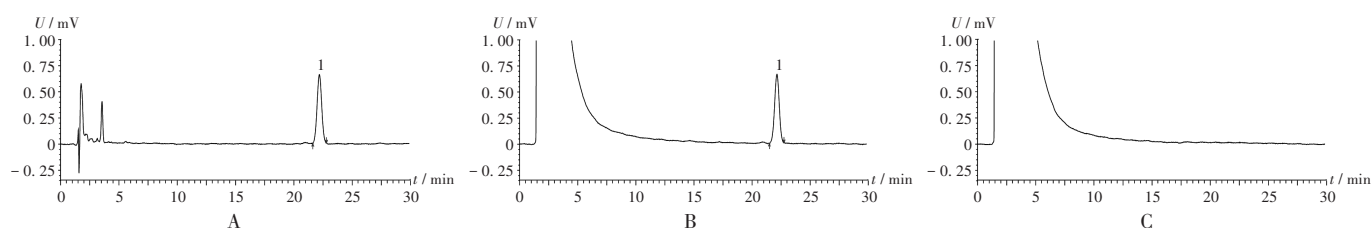
检测限与定量限确定:取线性关系考察项下系列梯度质量浓度的线性溶液各适量,按2.3.1项下色谱条件进样测定,分别以S/N为3:1和10:1时的进样量作为检测限与定量限。结果维生素D<sub>2</sub>的检测限和定量限分别为0.20,0.50 ng。

精密度试验:取2.3.2项下对照品溶液适量,按2.3.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果维生素D<sub>2</sub>峰面积的RSD为0.06%(n=6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为2405119)适量,精密称定,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,分别于室温放置0,2,4,6,8,12 h时按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果维生素D<sub>2</sub>峰面积的RSD为1.27%(n=6),表明供试品溶液室温放置24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为2405119)适量,精密称定,平行6份,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果维生素D<sub>2</sub>的平均含量为每片含1.689 μg(计67.56 U/片),RSD为0.82%(n=6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取除样品处方中维生素D<sub>2</sub>外的其他原料和辅料,按处方比例制备阴性样品6份,按处方比例加维生素D<sub>2</sub>对照品适量,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果维生素D<sub>2</sub>的平均回收率为



1. 维生素D<sub>2</sub>  
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图3 高效液相色谱图

1. Vitamin D<sub>2</sub>

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 3 HPLC chromatograms

98.80%, RSD为2.72% ( $n=6$ ), 表明方法准确度良好。

### 2.3.4 样品含量测定

取3批(批号分别为2405117, 2405118, 2405119)样品各适量, 精密称定, 按2.3.2项下方法制备供试品溶液, 按2.3.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并按外标法计算样品中维生素D<sub>2</sub>的含量。结果见表1。

## 3 讨论

### 3.1 含量测定方法选择

本研究中采用UPLC法测定3种水溶性维生素(维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C)的含量, 比文献[8]报道的HPLC法更节约分析时间和试剂, 且灵敏度更高、检测限更低。维生素D<sub>2</sub>的含量测定多采用正相色谱法, 前处理烦琐, 本研究中采用的方法相对简单, 且效果较好。

### 3.2 色谱条件选择

维生素B<sub>2</sub>不稳定, 制成溶液后在光照条件下降解很快, 故测定时须避光操作, 避光条件下溶液在12 h内的稳定性良好; 且由于制剂中维生素B<sub>2</sub>含量较少, 选择267 nm作为检测波长, 可兼顾维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C的响应值, 从而使灵敏度较高。

维生素D<sub>2</sub>不稳定, 遇光或空气均易变质, 测定时应避光操作, 对照品溶液宜充氮气保存, 供试品溶液制备过程中也须在离心管中充入氮气, 且超声温度不宜超过40 °C; 维生素D<sub>2</sub>在乙醇中易溶解, 故选择乙醇作为提取溶剂, 在本研究中的色谱条件下提取2次即可提取完全, 比文献[17]报道的提取3次更方便、易行。

本研究中, 维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C、维生素D<sub>2</sub>均采用了C<sub>18</sub>色谱柱和弱酸性流动相, 曾尝试采用同一色谱条件测定上述4种成分, 但维生素D<sub>2</sub>提取过程较烦琐, 且对温度、氧气和光照较敏感, 以及维生素B<sub>2</sub>的不稳定性, 且由于样品取样量较大, 经多次提取后干扰峰较大, 维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素C无法与基线良好分离, 为便于日常检验, 故采用本研究中的色谱条件测定上述4种成分。

葡萄糖酸钙为制剂中的主要成分, 原标准中已有滴定法作为其含量测定方法, 操作简单, 准确性较高, 故本研究中未改进葡萄糖酸钙的测定方法, 为提高葡萄糖酸钙测定的专属性, 未来可考虑采用原子吸收分光光度法, 通过测定Ca<sup>2+</sup>对葡萄糖酸钙进行定量分析。

### 3.3 投料建议

维生素D<sub>2</sub>在制剂中含量较少, 且稳定性较差, 随着保存期的延长, 其在制剂中的含量会不断降低, 故维生素D<sub>2</sub>可进行高限投料, 并注意在生产及贮存过程中避免光照、氧气的影响。

### 3.4 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、专属性强、重复性

好、结果准确, 可用于同时测定小儿四维葡钙片中6种主要成分的含量。

## 参考文献

- [1] WS-10001-(HD-0305)-2002, 国家药品标准: 化学药品地方标准上升国家标准第四册[S].
- [2] 章娟, 石颖, 邱娟, 等. 复方醋酸钠林格注射液中无水葡萄糖含量测定方法的建立及葡萄糖转化现象的探讨[J]. 广东药科大学学报, 2023, 39(4): 14-19.
- [3] 陈晶, 王京辉, 傅欣彤, 等. HPLC-CAD法测定玉竹中果糖、葡萄糖和蔗糖的含量[J]. 中国药品标准, 2022, 23(6): 629-632.
- [4] 陈希, 鄢雷娜, 吴燕红, 等. HPLC-RID法测定门冬氨酸洛美沙星葡萄糖注射液中葡萄糖[J]. 化学工程师, 2020, 34(8): 21-24.
- [5] 张璐, 张土金. HPLC-RID法测定生脉饮(党参方)中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖[J]. 药品评价, 2022, 19(19): 1161-1165.
- [6] 邢晟, 梁翠荣, 巩丽萍, 等. HPLC法测定复方胃蛋白酶颗粒中葡萄糖和蔗糖的含量[J]. 药学研究, 2020, 39(2): 85-87.
- [7] 武红娜, 王晓琦, 潘海霞. HPLC同时测定附子理中丸(大蜜丸)中果糖和葡萄糖的含量[J]. 食品与药品, 2020, 22(4): 272-275.
- [8] 李焕宇, 邓朝晖. HPLC法测定小儿四维葡钙片和颗粒中三种水溶性维生素的含量[J]. 中国药师, 2014, 17(7): 1121-1123.
- [9] 袁利娟, 陈东波. HPLC法测定小儿四维葡钙颗粒中维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>的含量[J]. 宜春学院学报, 2008, 30(4): 89-90.
- [10] 史国生, 徐志洲, 许竹梅, 等. HPLC法测定四维钙片中维生素C、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>的含量[J]. 中国药师, 2014, 17(8): 1329-1331.
- [11] 陈彩云, 魏鲜娥, 蔡伟江, 等. 高效液相色谱法同时测定保健食品中泛酸、烟酰胺、维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素B<sub>6</sub>的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(5): 1866-1871.
- [12] 张洁, 翟志雷, 张伟, 等. HPLC法同时测定维生素C咀嚼片中维生素C和糖的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(10): 1534-1536.
- [13] 芦杰, 刘小叶, 刘丹, 等. HPLC法测定钙镁D片剂中微量维生素D<sub>2</sub>的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(12): 1723-1725.
- [14] 李锋武, 刘鹏鸣, 黄洁, 等. HPLC法测定八维钙片中维生素D<sub>2</sub>和维生素E的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(11): 2180-2181.
- [15] 范世德, 廖晓君, 邱正霞, 等. RP-HPLC法测定钙佳锌口服液维生素D<sub>2</sub>含量[J]. 中国医药导报, 2010, 7(13): 59-62.
- [16] 王理, 张济敏, 林玲. RP-HPLC同时测定维生素AD小丸中维生素A棕榈酸酯和维生素D<sub>2</sub>的含量[J]. 中国药品标准, 2017, 18(4): 308-311.
- [17] 胡代花, 张嘉昕, 韩豪, 等. UPLC法快速测定婴儿维生素D<sub>3</sub>滴剂、维生素D<sub>3</sub>片、维生素AD滴剂及维生素D<sub>2</sub>片中维生素D<sub>3</sub>和维生素D<sub>2</sub>[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(8): 1409-1414.
- [18] 冯国. 反相高效液相色谱法测定维D<sub>2</sub>磷酸氢钙片中维生素D<sub>2</sub>含量[J]. 中国药业, 2013, 22(12): 91-92.

(收稿日期: 2025-01-15; 修回日期: 2025-09-25)