

0722 维生素D 测定法

本法系用高效液相色谱法（通则 0512）测定维生素 D（包括维生素 D₂和维生素 D₃，下同）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，以单位表示，每单位相当于维生素 D 0.025μg。

测定应在半暗室中及避免氧化的情况下进行。

无维生素 A 醇和其他成分干扰的供试品可用第一法测定，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；存在维生素 A 醇和其他成分干扰的供试品也可按第四法测定。

第一法

对照品贮备溶液的制备 根据供试品中所含维生素 D 的成分，取相应的维生素 D₂或 D₃对照品约 25mg，精密称定，置 100ml 棕色量瓶中，加异辛烷 80ml，避免加热，超声处理 1 分钟使完全溶解，用异辛烷稀释至刻度，摇匀，充氮密塞，避光，0℃ 以下保存，作为贮备溶液（1）；精密量取 5ml，置 50ml 棕色量瓶中，用异辛烷稀释至刻度，摇匀，充氮密塞，避光，0℃ 以下保存，作为贮备溶液（2）。

测定维生素 D₂时，应另取维生素 D₃对照品 25mg，同法制成维生素 D₃对照品贮备溶液，供系统适用性试验用。

色谱条件与系统适用性试验 用硅胶为填充剂；以正己烷-正戊醇（997:3）为流动相；检测波长为 265nm。量取维生素 D₃对照品贮备溶液（1）5ml，置具塞玻璃容器中，通氮后密塞，置 90℃ 水浴中加热 1 小时，取出，迅速冷却，加正己烷 5ml，摇匀，置 1cm 具塞石英吸收池中，在 2 支 8W 主波长分别为 254nm 和 365nm 的紫外光灯下，将石英吸收池斜放成 45°并距灯管 5~6cm，照射 5 分钟，使溶液中含有前维生素 D₃、反式维生素 D₃、维生素 D₃和速甾醇 D₃；量取该溶液 10μl 注入液相色谱仪，进样 5 次，记录峰面积，维生素 D₃峰的相对标准偏差应不大于 2.0%；前维生素 D₃峰（与维生素 D₃峰相对保留时间约为 0.5）与反式维生素 D₃峰（与维生素 D₃峰相对保留时间约为 0.6）以及维生素 D₃峰与速甾醇 D₃峰（与维生素 D₃峰相对保留时间约为 1.1）之间的分离度均应大于 1.0。

供试品溶液的制备 取该品种项下制备的供试品溶液。

对照品溶液制备 精密量取对照品贮备溶液（1）或贮备溶液（2）5ml，置 50ml 棕色量瓶中，用正己烷稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。

测定法 精密量取对照品溶液与供试品溶液各 50~200μl，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。按外标法，以峰面积，照下列公式计算维生素 D 及前维生素 D 折算成维生素 D 的总量（c_i）。

$$c_i = (c_1/A_1) \cdot (A_{i1} + F \cdot A_{i2})$$

式中 c₁ 为对照品溶液的浓度，μg/ml；

A₁ 为对照品溶液色谱图中维生素 D 峰的峰面积；

A_{i1} 为供试品溶液色谱图中维生素 D 峰的峰面积；

A_{i2} 为供试品溶液色谱图中前维生素 D 峰的峰面积；

F 为前维生素 D 相对于维生素 D 的校正因子,以 2.25 计;如各论项下检测波长为 254nm, F 值为 2.05。

第二法

供试品溶液A 的制备 取供试品适量(相当于维生素D 总量 600 单位以上,重量不超过 2.0g),精密称定,置皂化瓶中,加乙醇 30ml、维生素C 0.2g 与 50%氢氧化钾溶液 3ml [若供试量为 3g,则加 50%氢氧化钾溶液 4ml],置水浴上加热回流 30 分钟,冷却后,自冷凝管顶端加水 10ml 冲洗冷凝管内壁,将皂化液移至分液漏斗中,皂化瓶用水 60~100ml 分数次洗涤,洗液并入分液漏斗中,用不含过氧化物的乙醚振摇提取 3 次,第一次 60ml,以后每次 40ml,合并乙醚液,用水洗涤数次,每次约 100ml,洗涤时应缓缓旋动,避免乳化,直至水层遇酚酞指示液不再显红色,静置,分取乙醚提取液,加入干燥滤纸条少许振摇除去乙醚提取液中残留的水分,分液漏斗及滤纸条再用少量乙醚洗涤,洗液与提取液合并,置具塞圆底烧瓶中,在水浴上低温蒸发至约 5ml,再用氮气流吹干,迅速精密加入甲醇 3ml,密塞,超声处理助溶后,移入离心管中,离心,取上清液作为供试品溶液 A。

净化用色谱系统分离收集维生素D 精密量取上述供试品溶液 A 500 μ l,注入以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的液相色谱柱,以甲醇-乙腈-水(50:50:2)为流动相进行分离,检测波长 265nm,记录色谱图,维生素D 与前维生素D 应为重叠峰,并能与维生素A 及其他杂质分开。准确收集含有维生素D 及前维生素D 混合物的全部流出液,置具塞圆底烧瓶中,用氮气流迅速吹干,精密加入正己烷溶液适量,使每 1ml 中含维生素 D 50~140 单位,密塞,超声处理使溶解,即得供试品溶液 B。

对照品溶液制备 精密量取第一法的对照品贮备溶液(2) 5ml,置 50ml 棕色量瓶中,用正己烷稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

测定法 精密量取对照品溶液与供试品溶液 B 各 100~200 μ l,照第一法进行含量测定。

第三法

供试品溶液的制备 取该品种项下制备的供试品溶液 A,按上述第二法净化用色谱系统分离收集维生素D 项下的方法处理,至“用氮气流迅速吹干”后,加入异辛烷 2ml 溶解,通氮排除空气后,密塞,置 90℃水浴中,加热 1.5 小时后,立即通氮在 2 分钟内吹干,迅速精密加入正己烷 2ml,溶解后,即得供试品溶液 C。

对照品溶液的制备 精密量取第一法的对照品贮备溶液(1) 适量,加异辛烷定量稀释制成每 1ml 中约含维生素 D 50 单位的溶液,精密量取 2ml,置具塞圆底烧瓶中,照供试品溶液制备项下的方法,自“通氮排除空气后”起,依法操作,即得对照品溶液。

测定法 照第一法项下的色谱条件,精密量取对照品溶液与供试品溶液 C 各 200 μ l,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算维生素D 的含量。

第四法

供试品溶液制备 取供试品适量(相当于维生素D 总量 500 单位),精密称定,置 25ml 棕色量瓶中,加正己烷溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

对照品溶液制备 精密量取第一法的对照品贮备溶液(1) 5ml 置 50ml 棕色量瓶中,用正己烷稀释至刻度,摇匀,精密量取 2ml,置 100ml 棕色量瓶中,用正己烷稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

定位溶液制备 量取第一法的对照品贮备溶液(1) 5ml, 置 50ml 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℃ 水浴中加热 1.5 小时, 取出, 迅速冷却, 用正己烷稀释至刻度, 摇匀, 作为定位贮备溶液; 取定位贮备溶液 2ml, 置 100ml 棕色量瓶中, 用正己烷稀释至刻度, 摇匀, 作为前维生素 D 峰和维生素 D 峰定位溶液。

系统适用性溶液制备 量取上述定位贮备溶液和供试品溶液各 5ml 混匀, 作为系统适用性溶液。

色谱条件与系统适用性试验 检测波长 265nm, 柱温 40℃, 流速为每分钟 0.5ml。收集管为聚醚醚酮 (peek) 管, 内径 0.0762cm (0.03 英寸), 20m, 容积约 9ml。

第一维液相色谱: 以脲基键合硅胶为填充剂 (Urea group, 2.1mm×150mm, 3μm, 或其功能类似填料的色谱柱); 以正己烷为流动相 A, 以正己烷-正戊醇-异丙醇 (98:1:1) 为流动相 B, 按下表程序进行梯度洗脱。

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	95	5
30	95	5
35	0	100
60	0	100
65	95	5
80	95	5

第二维液相色谱: 以硅胶 (3mm×100mm, 1.8μm) 为填充剂; 以正己烷-正戊醇-异丙醇 (996:2:2) 为流动相。量取定位溶液 100μl 注入第一维液相色谱仪, 对前维生素 D 峰和维生素 D 峰进行定位。调节第一维液相色谱流动相 A 和流动相 B 的初始比例使维生素 D 主峰的保留时间约 25 分钟, 第一维液相色谱中前维生素 D 切换时间设为维生素 D 峰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; 量取系统适用性溶液 100μl 注入液相色谱仪, 第一维液相色谱系统中前维生素 D 峰与维生素 D 峰之间的分离度应不小于 5, 理论板数按维生素 D 峰计算应不低于 2300; 第二维液相色谱系统中维生素 D 峰与相邻峰之间的分离度以及前维生素 D 峰和相邻峰的分离度均应符合规定。

测定法 精密量取对照品溶液与供试品溶液各 100μl, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按第一法的计算方法计算, 即得。

注: 高效液相色谱仪需要双泵、双通道、双紫外检测器。一般情况下选用六通阀即可完成方法的切换过程, 六通阀连接图如下。

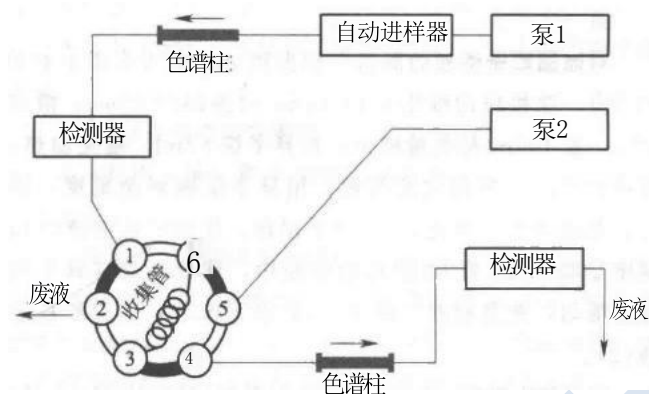


图 六通阀连接图

牵头单位：广州市药品检验所 联系人：张立雯 联系电话：020-81686560

参与单位：江苏省食品药品监督检验研究院、辽宁省药品检验检测院、上海市食品药品检验研究院、厦门市食品药品质量检验研究院、浙江省食品药品检验研究院、中国食品药品检定研究院

维生素D测定法修订说明

一、基本思路

在课题承担单位按规定的测定条件、实验方法和工作要求协作测定，获得了前维生素D相对于维生素D校正因子（F值）相对准确值的基础上，启动通则“0722 维生素D测定法”的修订，将第一法的“测定法”计算公式修订为加校正因子的外标法，将校正因子数值直接列于公式中。修订未改变原方法原理，仅改变了计算方式。并对第二法到第四法与计算公式相关的部分进行相应修订。原通则中每次试验需要同步操作的“校正因子测定”步骤，在通则修订后不需要每次同步操作，而是改为直接采用获得的校正因子F值。这样不仅避免了每次同步测定带来的偶然误差，提高了测定准确度，而且简化了操作步骤，缩短了分析时间，减少了试剂消耗。

二、修订的依据

全体承担单位严格按照作业指导书的要求进行协作测定，获得了前维生素D₂和前维生素D₃在254nm和265nm两个波长下各70个数据的校正因子统计值。

同一波长下的前维生素D₂和前维生素D₃的F值差异不大，为了方便使用，取小数点后两位，前维生素D₂和前维生素D₃使用相同的F值，即254nm下前维生素D校正因子F值按2.05计，265nm下前维生素D校正因子F值按2.25计。将相应波长下的F值带入公式“维生素D总量=（维生素D峰面积+前维生素D峰面积×F）×f₁”计算维生素D总量。

前维生素D校正因子是在严格控制条件下测得的统计值，其准确性能满足维生素D含量测定的需要。此值的获得为简化通则0722维生素D测定法奠定了基础。

三、修订的主要内容

1. 删去原通则第一法中的“校正因子测定”部分，将“测定法”的计算公式由 $c_i = f_i A_{i1} + f_2 A_2$ 变更为： $c_i = (c_1/A_1) \cdot (A_{i1} + F \cdot A_2)$ ，其中F值为前维生素D相对于维生素D的校正因子，以2.25计。2.25的数值是在265nm下获得的，各论也有可能是采用254nm进行检测的，故进行了说明“如各论项下检测波长为254nm，F值为2.05”。

2. 原通则第一、二、三法采用254nm检测，第四法采用265nm检测，本次修订全部统一为维生素D₂、D₃的最大吸收波长265nm。经比较，在254nm与265nm下系统分离行为一致，系统适用性的要求无需变化，详细参数见附图和附表。

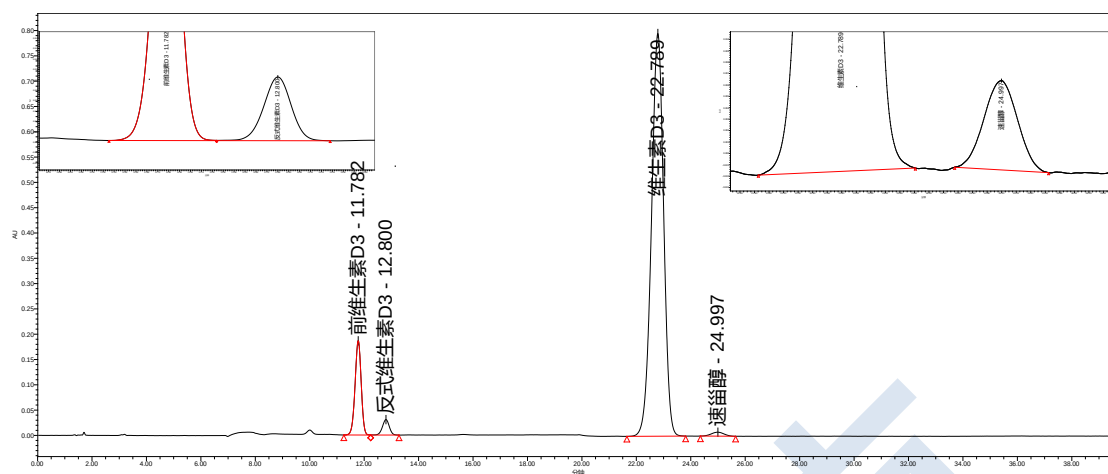
3. 第一法相应增加供试品溶液的制备、对照品溶液的制备。第一法明确了系统适用性溶液、对照品溶液、供试品溶液的进样量。

4. 第二法删除了“校正因子测定”测定部分，相应增加“对照品溶液制备”、修订“测定法”文字、修改波长为265nm。

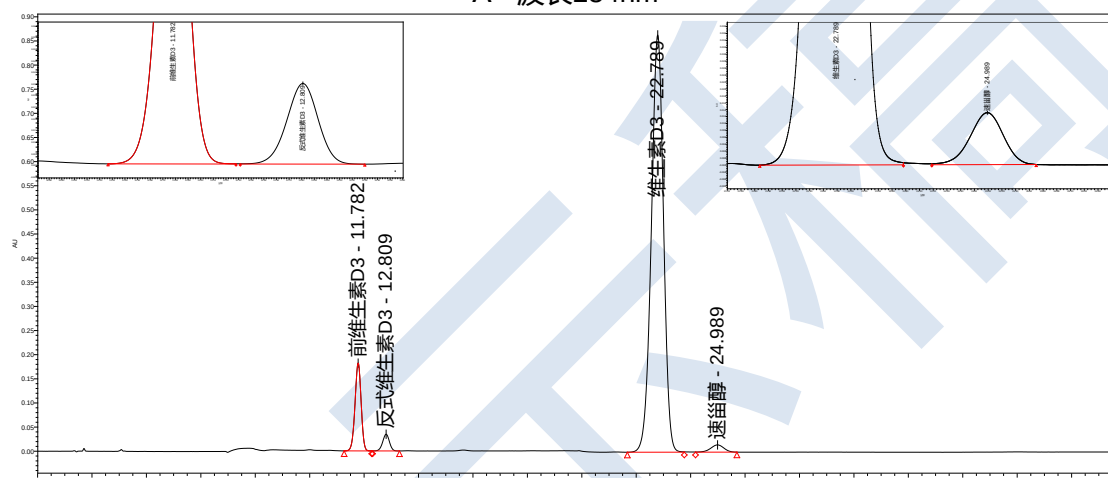
5. 第三法未做修订。

6. 第四法删除了“校正因子测定”测定部分，相应增加“对照品溶液制备”、“定位溶液制备”、“系统适用性溶液制备”，修订“测定法”文字。

附图：



A 波长254nm



B 波长265nm

254nm和265nm下的典型系统适用性色谱图（ECOSIL硅胶柱，4.6*250mm，5 μ m）

附表：

系统适用性溶液254nm和265nm下三根色谱柱的分离度参数比较

色谱柱	前维生素D ₃ 与反式维生素D ₃ 分离度		维生素D ₃ 与速甾醇维生素D ₃ 分离度	
	254nm	265nm	254nm	265nm
硅胶柱（ECOSIL，4.6*250mm，5 μ m）	2.3	2.3	2.6	2.5
硅胶柱（太玮，4.6*250mm，5 μ m）	2.0	2.2	2.4	2.3
硅胶柱（依利特，4.6*250mm，5 μ m）	1.7	1.8	2.2	2.2
标准规定	>1.0	>1.0	>1.0	>1.0