

## 0722 维生素D测定法

本法系用高效液相色谱法(附录0512)测定维生素D(包括维生素D<sub>2</sub>和维生素D<sub>3</sub>,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 0.025 $\mu$ g。

测定应在半暗室中及避免氧化的情况下进行。

无维生素A醇及其他杂质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

1. 对照品贮备溶液的制备 根据各制剂中所含维生素D的成分,精密称取相应的维生素D<sub>2</sub>或D<sub>3</sub>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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C以下保存,作为贮备溶液(2)。

测定维生素D<sub>2</sub>时,应另取维生素D<sub>3</sub>对照品25mg,同法制成维生素D<sub>3</sub>对照品贮备溶液,供系统适用性试验用。

2. 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254nm。量取维生素D<sub>3</sub>对照品贮备溶液(1) 5ml,置具塞玻璃容器中,通氮后密塞,置90 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ 并距灯管5~6cm,照射5分钟,使溶液中含有前维生素D<sub>3</sub>、反式维生素D<sub>3</sub>、维生素D<sub>3</sub>和速甾醇D<sub>3</sub>;精密量取该溶液注入液相色谱仪,进样5次,记录峰面积,维生素D<sub>3</sub>峰的相对标准偏差应不大于2.0%;前维生素D<sub>3</sub>峰(与维生素D<sub>3</sub>相对保留时间约为0.5)与反式维生素D<sub>3</sub>峰(与维生素D<sub>3</sub>相对保留时间约为0.6)以及维生素D<sub>3</sub>峰与速甾醇D<sub>3</sub>峰(与维生素D<sub>3</sub>相对保留时间约为1.1)的分离度均应大于1.0。

3. 校正因子测定 精密量取对照品贮备溶液(1)或贮备溶液(2) 5ml,置50ml量瓶中,用正己烷稀释至刻度,摇匀,作为校正因子*f*<sub>1</sub>对照品溶液;取10 $\mu$ l注入液相色谱仪,记录色谱图,计算维生素D的校正因子*f*<sub>1</sub>。

$$f_1 = c_1/A_1$$

式中  $c_1$ 为维生素D对照品溶液的浓度,  $\mu$ g/ml;

$A_1$ 为对照品溶液色谱图中维生素D峰的峰面积。

另精密量取对照品贮备溶液(1)或贮备溶液(2) 5ml,置50ml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 $^{\circ}$ C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,作为校正因子*f*<sub>2</sub>混合对照品溶液;取10 $\mu$ l注入液相色谱仪,记录色谱图,计算前维生素D的校正响应因子*f*<sub>2</sub>。

$$f_2 = (c_1 - f_1 A_1) / A_2$$

式中  $c_1$ 为 $f_1$ 测定项下维生素D对照品溶液的浓度,  $\mu\text{g/ml}$ ;

$f_1$ 为维生素D的校正因子;

$A_1$ 为混合对照品溶液色谱图中维生素D峰的峰面积;

$A_2$ 为混合对照品溶液色谱图中前维生素D峰的峰面积。

4. 测定法 取该品种制剂项下制备的供试品溶液进行测定, 按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( $c_i$ )。

$$c_i = f_1 A_{i1} + f_2 A_{i2}$$

式中  $A_{i1}$ 为维生素D峰的峰面积;

$A_{i2}$ 为前维生素D峰的峰面积;

## 第二法

1. 校正因子测定 取第一法的对照品贮备溶液(2), 照第一法校正因子测定项下所述操作, 即得维生素D的校正因子 $f_1$ 和前维生素D的校正因子 $f_2$ , 进样量为100~200 $\mu\text{l}$ 。

2. 供试品溶液A的制备 精密称取供试品适量(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C0.2g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。

3. 净化用色谱柱系统分离收集维生素D 精密量取上述供试品溶液A 500 $\mu\text{l}$ , 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, 检测波长为254nm, 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D50~140单位, 密塞, 超声处理使溶解, 即得供试品溶液B。

4. 测定法 取供试品溶液B, 照第一法进行含量测定, 进样量为100~200 $\mu\text{l}$ 。

## 第三法

1. 供试品溶液的制备 取该品种制剂项下制备的供试品溶液A, 按上述第二法净化用色谱柱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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

2. 对照品溶液的制备 精密量取对照品贮备溶液(1)适量, 加异辛烷定量稀释制成每1ml中约含维生素D50单位, 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, 得对照品溶液。

3. 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~~100~~200  $\mu\text{l}$ ，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

1. 校正因子测定 取第一法的对照品贮备溶液（1）制成的校正因子 $f_1$ 对照品溶液和校正因子 $f_2$ 混合对照品溶液各2ml，分别置100ml量瓶中，用正己烷稀释至刻度，摇匀，制成校正因子 $f_1$ 对照品溶液（1）和校正因子 $f_2$ 混合对照品溶液（1），取100 $\mu\text{l}$ 注入液相色谱仪，记录色谱图，按第一法项下的方法计算，即得校正因子 $f_1$ 和校正因子 $f_2$ 。

2. 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。

3. 色谱条件与系统适用性实验 检测波长265nm，柱温40 $^{\circ}\text{C}$ ，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 $\times$ 150mm，3 $\mu\text{m}$ ，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 $\times$ 100mm，1.8 $\mu\text{m}$ )为填充剂；以正己烷-正戊醇-异丙醇(996:2:2)为流动相。取校正因子 $f_2$ 混合对照品溶液（1）100 $\mu\text{l}$ 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；取校正因子 $f_2$ 混合对照品溶液和供试品溶液各 5ml 混匀，作为系统适用性溶液；取 100 $\mu\text{l}$ 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 峰的分度应不小于 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 峰与相邻峰的分度以及前维生素 D 峰和相邻峰的分度均应符合规定。

4. 测定法 取供试品溶液 100 $\mu\text{l}$ ，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。

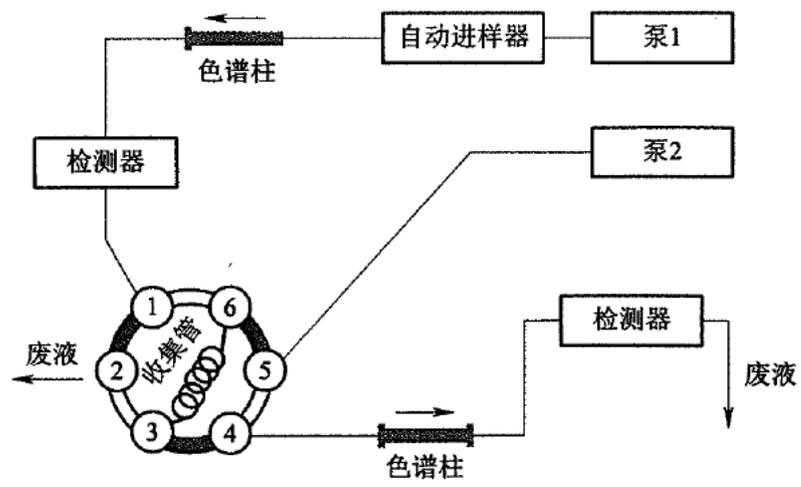


图 六通阀连接图