

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 0.025 μ 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 根据各制剂供试品中所含维生素D的成分,精密称取相应的维生素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。

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;精密量取该溶液10 μ l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。

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棕色量瓶中,用正己烷稀释至刻度,摇匀,作为校正因子f₁对照品溶液,取10 μ l注入液相色谱仪,记录色谱图,计算维生素D的校正因子f₁。

$$f_1 = c_1/A_1$$

式中 c₁ 为维生素D对照品溶液的浓度, μ g/ml;

A₁ 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℃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f₂混合对照品溶液,取10 μ l注入液相色谱仪,记录色谱图,计算前维生素D的校正因子f₂。

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

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。

供试品溶液的制备 取该品种项下制备的供试品溶液。

对照品溶液的制备 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。

4. 测定法 取该品种项下制备的供试品溶液进行测定, 按精密量取对照品溶液与供试品溶液各 $50\mu\text{l} \sim 200\mu\text{l}$, 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_1)。

$$c_1 = (c_1 / A_1) \cdot (A_{11} F + A_{12}) f_1 A_{11} + f_2 A_{12}$$

式中 c_1 为对照品溶液的浓度, $\mu\text{g/ml}$;

A_1 为对照品溶液色谱图中维生素 D 峰的峰面积;

A_{11} 为供试品溶液色谱图中维生素 D 峰的峰面积;

A_{12} 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

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 $100 \sim 200\mu\text{l}$ 。

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 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。

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 D 50~140 单位, 密塞, 超声处理使溶解, 即得供试品溶液 B。

对照品溶液的制备 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。

~~4.测定法~~ 精密量取对照品溶液与~~取~~供试品溶液 B，~~照第一法进行含量测定，进样量~~
~~为各~~100~200 μ l，照第一法进行含量测定。

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℃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~~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，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~~20
0 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

~~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 μ 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.供试品溶液的制备~~ 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。

对照品溶液的制备 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。

定位溶液的制备 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。

系统适用性溶液的制备 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。

~~3.色谱条件与系统适用性实验~~ 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，3 μ 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×100mm，1.8μm）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）~~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；~~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取供试品溶液 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。

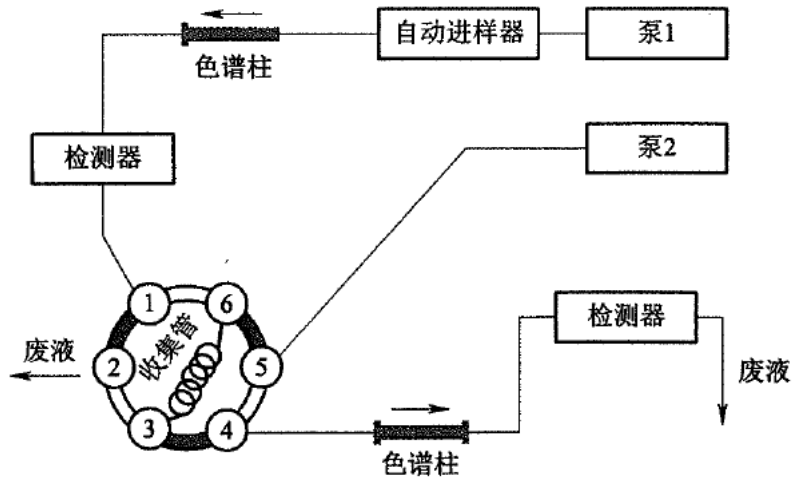


图 六通阀连接图