

附录 VII J 维生素 A 测定法

本法是用紫外-可见分光光度法（附录 IV A）或高效液相色谱法（附录 VD）测定维生素 A 及其制剂中维生素 A 的含量，以单位表示，每单位相当于全反式维生素 A 醋酸酯 0.344 μ g 或全反式维生素 A 醇 0.300 μ g。

测定应在暗室中进行。

一、紫外-可见分光光度法

由于维生素 A 制剂中含有稀释用油和维生素 A 原料药中混有其他杂质，采用紫外-可见分光光度法测得的吸光度不是维生素 A 独有的吸收。在以下规定的条件下，非维生素 A 物质的无关吸收所引入的误差可以用校正公式校正，以便得到正确结果。

校正公式采用三点法，除其中一点是在吸收峰波长处测得外，其他两点分别在吸收峰两侧的波长处测定，因此仪器波长应准确，故在测定前，应对仪器波长进行校正。

检查法 取供试品适量，精密称定，加环己烷溶解并定量稀释制成每 1ml 中含 9~15 单位的溶液，照紫外-可见分光光度法（附录 IV A），测定其吸收峰的波长，并在下表所列各波长处测定吸光度，计算各吸光度与波长 328nm 处吸光度的比值和波长 328nm 处的 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 值。

波长/nm	吸光度比值	波长/nm	吸光度比值
300	0.555	340	0.811
316	0.907	360	0.299
328	1.000		

如果吸收峰波长在 326~329nm 之间，且所测得各波长吸光度比值不超过表中规定的 ± 0.02 ，可用下式计算含量：

每 1g 供试品中含有的维生素 A 的单位 = $E_{1\text{cm}}^{1\%}(328\text{nm}) \times 1900$

如果吸收峰波长在 326~329nm 之间，但所测得的各波长吸光度比值超过表中规定值的 ± 0.02 ，应按下式求出校正后的吸光度，然后再计算含量：

$A_{328}(\text{校正}) = 3.52(2A_{328} - A_{316} - A_{340})$

如果在 328nm 处的校正吸光度与未校正吸光度相差不超过±3.0%，则不用校正吸光度，仍以未经校正的吸光度计算含量。

如果校正吸光度与未校正吸光度相差在-15%至-3%之间，则以校正吸光度计算含量。

如果校正吸光度超出未校正吸光度的-15%至-3%的范围，或者吸收峰波长不在 326~329nm 之间，则供试品须按下述方法测定。

另精密称取供试品适量（约相当于维生素 A 总量 500 单位以上，重量不多于 2g），置皂化瓶中，加乙醇 30ml 与 50%（g/g）氢氧化钾溶液 3ml，置水浴中煮沸回流 30 分钟，冷却后，自冷凝管顶端加水 10ml 冲洗冷凝管内部管壁，将皂化液移至分液漏斗中（分液漏斗活塞涂以甘油淀粉润滑剂），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 4 次，每次振摇约 5 分钟，第一次 60ml，以后各次 40ml，合并乙醚液，用水洗涤数次，每次约 100ml，洗涤应缓缓旋动，避免乳化，直至水层遇酚酞指示液不再显红色，乙醚液用铺有脱脂棉与无水硫酸钠的滤器过滤，滤器用乙醚洗涤，洗液与乙醚液合并，置 250ml 量瓶中，用乙醚稀释置刻度，摇匀；精密量取适量，置蒸发皿内，微温挥去乙醚，迅速加异丙醇溶解并定量稀释制成每 1ml 中含维生素 A 9~15 单位，照紫外-可见分光光度法（附录 IV A），在 300nm、310nm、325nm 与 334nm 四个波长处测定吸光度，并测定吸收峰的波长。吸收峰的波长应在 323~327nm 之间，且 300nm 波长处的吸光度与 325nm 波长处的吸光度的比值应不超过 0.73，按下式计算校正吸光度：

$$A_{325}(\text{校正}) = 6.815A_{325} - 2.555A_{310} - 4.260A_{334}$$

$$\text{每 1g 供试品中含有的维生素 A 的单位} = E_{1\text{cm}}^{1\%}(325\text{nm}, \text{校正}) \times 1830$$

如果校正吸光度在未校正吸光度的 97%~103%，则仍以未经校正的吸光度计算含量。

如果吸收峰的波长不在 323~327nm 之间，或 300nm 波长处的吸光度与 325nm 波长处的吸光度的比值超过 0.73，则应自上述皂化后的乙醚提取液 250ml 中，另精密量取适量（相当于维生素 A 300~400 单位），微温挥去乙醚至约剩 5ml，再在氮气流下吹干，立即精密加入甲醇 3ml，溶解后，精密量取 500μl，注入维生素 D 测定法（附录 VII K）第二法项下的净化用色谱柱系统，准确收集含有维

生素 A 的流出液，在氮气流下吹干，而后照上述方法自“迅速加异丙醇溶解”起，依法操作并计算含量。

二、高效液相色谱法

本法适用于维生素 A 醋酸酯原料及其制剂中维生素 A 的含量测定。

检查法 色谱条件与系统适用性试验 用硅胶为填充剂；以正己烷-异丙醇（997：3）为流动相；检测波长为 325nm；对照品溶液连续进样 5 次，主峰峰面积的相对标准偏差不得过 3.0%；系统适用性溶液所得色谱图中维生素 A 醋酸酯主峰与其顺式异构体主峰分离度应大于 3。

系统适用性溶液制备：取维生素 A 对照品适量（约相当于维生素 A 醋酸酯 300mg），置烧杯中，加入碘试液 0.2ml，混匀，放置约 10 分钟，定量转移置 200ml 量瓶中，加正己烷稀释至刻度，再精密量取 1ml，置 100ml 量瓶中，加正己烷稀释至刻度。

精密称定供试品适量（约相当于 15mg 维生素 A 醋酸酯），置 100ml 量瓶中，加正己烷稀释至刻度，再精密量取 5ml，置 50ml 量瓶中，加正己烷稀释至刻度。另精密称定维生素 A 对照品适量（约相当于 15mg 维生素 A 醋酸酯），置 100ml 量瓶中，加正己烷稀释至刻度，再精密量取 5ml，置 50ml 量瓶中，加正己烷稀释至刻度。精密量取供试品溶液、对照品溶液及系统适用性溶液各 10 μ l 注入液相色谱仪，记录色谱图，按外标法以峰面积计算，含量应符合规定。

【附注】

（1）甘油淀粉润滑剂 取甘油 22g，加入可溶性淀粉 9g，加热至 140℃，保持 30 分钟并不断搅拌，放冷，即得。

（2）不含过氧化物的乙醚 照麻醉乙醚项下的过氧化物检查，如不符合规定，可用 5%硫代硫酸钠溶液振摇，静置，分取乙醚层，再用水振摇洗涤 1 次，重蒸，弃去首尾 5% 部分，馏出的乙醚再检查过氧化物，应符合规定。

（3）若维生素 A 对照品中含有维生素 A 醋酸酯顺式异构体，则可直接用作系统适用性分离度考察，不必再做破坏性实验。