

附录 VII K 维生素 D 测定法

本法系用高效液相色谱法(附录 V D)测定维生素 D(包括维生素 D₂ 和 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 μg。

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, 则可按第三法测定。

第一法

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 D₂ 或 D₃ 对照品 25mg, 置 100ml 棕色量瓶中, 加异辛烷 80ml, 避免加热, 用超声处理助溶 1 分钟使完全溶解, 加异辛烷至刻度, 摇匀, 作为贮备溶液 (1); 精密量取 5.0ml 至 50mL 棕色量瓶中, 加异辛烷稀释至刻度, 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, 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; 取此溶液注入液相色谱仪, 测定维生素 D₃ 的峰值, 先后进样 5 次, 相对标准偏差应不大于 2.0%; 前维生素 D₃(与维生素 D₃ 的比保留时间约为 0.5)与反式维生素 D₃(与维生素 D₃ 的比保留时间约为 0.6)以及维生素 D₃ 与速甾醇 D₃(与维生素 D₃ 的比保留时间约为 1.1)的峰分离度均应大于 1.0。

校正因子测定 精密量取对照品贮备溶液（2）5ml，置 50ml 量瓶中，加正己烷至刻度，摇匀，作为对照品溶液；取一定量注入液相色谱仪，计算维生素 D 的响应因子 f_1 。

$$f_1 = C_1 / A_1$$

式中： C_1 为维生素 D 对照品溶液的浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）

A_1 为对照品溶液所得色谱图中维生素 D 峰的峰面积

另精密量取对照品贮备溶液 5ml 置 50ml 量瓶中，加入 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，取出迅速冷却至室温，加正己烷至刻度，摇匀，作为混合对照品溶液；取一定量注入液相色谱仪，计算前维生素 D 的响应因子 f_2 。

$$f_2 = (C_1 - f_1 A_1) / A_2$$

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 为混合对照品溶液所得色谱图中维生素 D 的峰值；

A_2 为混合对照品溶液所得色谱图中前维生素 D 的峰值。

含量测定 取该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 后的总浓度 (C_i)。

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

式中 A_{i1} 为维生素 D 的峰值；

A_{i2} 为前维生素 D 的峰值；

第二法

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),置皂化瓶中,加乙醇 30ml、抗坏血酸 0.2g 与 50%(g / g)氢氧化钾溶液 3ml[若供试量为 3g,则加 50%(g / g)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。

净化用色谱柱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, 检测波长为 254nm, 从记录仪上观察色谱图, 要求维生素 D 与前维生素 D 为叠峰, 并能与维生素 A 及其他干扰含量测定的杂质分开; 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 为 50~140 单位, 密塞, 超声处理助溶, 即为供试品溶液 B。

取供试品溶液 B, 按第一法进行含量测定, 进样量为 100~200 μ l。

第三法

供试品溶液的制备 取该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, 即为供试品溶液 C。

对照品溶液的制备 精密量取对照品贮备溶液适量, 加异辛烷定量稀释制成每 1ml 中约含维生素 D 50 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。

含量测定 在上述第一法的色谱条件下, 取对照品溶液与供试品溶液 C, 交替精密进样 200 μ l, 量取维生素 D 的峰值, 按外标法计算含量。