

## 维生素 D 的测定方法

### 高效液相色谱法

#### 1. 原理

样品中脂溶性维生素在皂化过程中与脂肪分离，以石油醚萃取后，用正相色谱柱提取富集，用反相色谱柱，紫外检测器定量测定。

#### 2. 适用范围

本方法来源于 GB/T 5413.9-1997。适用于婴幼儿配方食品和乳粉维生素 A、维生素 D、维生素 E 的测定；也适用于食品或强经食品及饲料中的维生素 D 含量的测定。

#### 3. 主要仪器

- 1) 高压液相色谱仪，具有可变波长的紫外检测器，数据处理系统或记录仪。
- 2) 旋转蒸发器。
- 3) 平底烧瓶：250mL。
- 4) 分液漏斗：500mL。

#### 4. 试剂

所有试剂，如未注明规格，均指分析纯，所实验用水均指蒸馏水。

- 1) 异丙醇：色谱纯。
- 2) 2% 焦性没食子酸乙醇溶液：取 2g 焦性没食子酸溶于 100mL 无水乙醇中。
- 3) 75% 氢氧化钾溶液：取 75g 氢氧化钾溶于 100mL 水中。
- 4) 石油醚：沸程 30~60℃。
- 5) 甲醇：色谱纯。
- 6) 正己烷：色谱纯。
- 7) 环己烷：色谱醇。
- 8) 维生素 D 标准溶液
  - A. 维生素 D<sub>2</sub> 标准贮备液：含维生素 D<sub>2</sub>100mg/ml 的甲醇溶液。称取 10mg 的维生素 D<sub>2</sub>，用甲醇定容于 100mL 容量瓶中。
  - B. 维生素 D<sub>3</sub> 的标准贮备液：含维生素 D<sub>3</sub>100mg/ml 的甲醇溶液。称取 10mg 的维生素 D<sub>3</sub>，用甲醇定容于 100mL 容量瓶中。

#### 5. 操作步骤

5.1 样品处理：准确称取 10g 样品，于 250mL 平底烧瓶中，加 30mL 蒸馏水。

#### 5.2 测定液的制备：

- 1) 于上述样品溶液中加入 100mL 的 20% 没食子酸乙醇溶液，充分混匀后加 50mL 75% 氢氧化钾溶液，在蒸汽浴上边续回流 30min 后，立刻冷却到室温。
- 2) 将皂化液转入一 500mL 分液漏斗中，用 100mL 水分几次冲平底烧瓶。洗涤液并入分液漏斗中。
- 3) 于上述分液漏斗中，加入 100mL 石油醚，盖好瓶塞，倒置分液漏斗并剧烈振摇 1 min。在振摇过程中，注意释放瓶内压力。静置分层，将水相放入另一 500mL 分液漏斗中，重复上棕萃取过程 2 次，合并醚液到第一个分液漏斗中。用蒸馏水洗该醚液至中性，通过无水硫酸钠过滤干燥，在 40℃ 和氮气流下，于旋转蒸发器上蒸至近于（绝不允许蒸干）后，用石油醚转移至 10mL 容量瓶中，定容。
- 4) 从上述容量瓶中取 7mL 放入一试管中，用氮气将石油醚吹干，于试管中加 1mL 正己烷。

#### 5.3 测定：

##### 1) 测定液的制备：

# 上海洪纪仪器设备有限公司

---

## A) 仪器条件:

色谱柱: 30cm×40cm, 硅胶柱。

流动相: 正己烷与环己烷按体积比 1: 1 混合, 并按体积分数 0.8% 加入异丙醇。

流速: 1mL/min。

波长: 265nm。

柱温: 20℃。

灵敏度: 0.005AU/MV。

注射体积: 200mL。

B) 注射 50mL 维生素 D 标样和 200mL 样品溶液, 根据维生素 D 标样保留时间收集维生素 D 于试管中, 将试管用氮气吹干, 准确加入 0.2mL 甲醇溶解。

## 2) 测定步骤:

### A) 仪器条件:

色谱柱: 4.6mm×25cm, C18 或具同等性能的色谱柱。

流动相: 甲醇。

流速: 1mL/min。

波长: 265nm。

柱温: 20℃。

灵敏度: 0.005AU/MV。

注射体积: 50mL。

B) 注射 50mL 维生素 D 标准溶液, 注射 50mL 样品溶液, 得到标样和样品溶液中维生素 D 峰面积或峰高。

## 6. 计算

$$X = \frac{A_s \times 10^7 \times 40 \times 100}{m \times \rho_{sd}}$$

X =

m

A<sub>s</sub>

$\rho_{sd} = \frac{A_{sd}}{A_s} \times \rho_{sd}$

A<sub>sd</sub>

式中: X—样品维生素 D 的量, mg/100g;

m—称样量, 含量, IU / 100g;

$\rho_{sd}$ —进样液中维生素 D 有浓度, mg/mL;

A<sub>s</sub>—进样液中维生素 D 有峰高 (或峰面积);

A<sub>sd</sub>—标样液中维生素 D 有峰高 (或峰面积);

$\rho_{sd}$ —标样中维生素 D 的浓度;

计算结果精确至小数点后一位。

## 7. 注意事项

1) 允许误差及最小检出量: 同一样品的 2 次测定值之差不得超过 2 次测定平均值的 10%; 最小检出量为 0.1 国标单位。

2) 试剂焦性没食子酸容易变性, 应购习近期生产的试剂。

3) 如果皂化不完全, 可适当增加氢氧化钾的加入量。