



中华人民共和国国家标准

GB/T 17818—2025

代替 GB/T 17818—2010

饲料中维生素 D₃ 的测定 高效液相色谱法

Determination of vitamin D₃ in feeds—High-performance liquid chromatography

2025-01-24 发布

2025-08-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 17818—2010《饲料中维生素 D₃ 的测定 高效液相色谱法》。与 GB/T 17818—2010 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了适用范围，增加了精料补充料，更改了“第一法 皂化提取法”定量限（见第 1 章，2010 年版的第 1 章）；
- b) 更改了“第二法 直接提取法”定量限（见第 1 章，2010 年版的第 1 章）；
- c) 增加了“第一法 皂化提取法”维生素 D₃ 标准系列溶液（见 4.2.21）；
- d) 更改了“第一法 皂化提取法”中配合饲料、精料补充料、浓缩饲料样品制备方法为试样全部通过 1 mm 孔筛（见 4.4，2010 年版的 3.5）；
- e) 更改了“第一法 皂化提取法”提取剂为“石油醚”（沸程 30 ℃～60 ℃）（见 4.5.1.2.1，2010 年版的 3.6.1.2）；
- f) 增加了离线固相萃取法（见 4.5.1.2.2）和在线固相萃取法（见 4.5.1.2.3）；
- g) 增加了液相色谱参考条件（见 4.5.2.2，4.5.2.3）；
- h) 增加了定性检测方法，定量检测增加多点校正（见 4.5.2.5，4.5.2.6）；
- i) 删除了高效液相色谱净化柱净化（见 2010 年版的 3.6.1.4）；
- j) 删除了高效液相色谱净化条件（见 2010 年版的 3.6.2.1）；
- k) 删除了正相色谱（见 2010 年版的 3.6.2.2.1）；
- l) 增加维生素 D₃ 含量在 100 IU/kg～1 000 IU/kg 范围时精密度要求（见 4.7，2010 年版的 3.6.2.5）；
- m) 更改了“第二法 直接提取法”，水浴温度不应超过 65 ℃（见 5.5.1，2010 年版的 4.6.1）；
- n) 增加了定性检测方法（见 5.5.2.3）。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所，山东省畜产品质量安全中心，帝斯曼维生素(上海)有限公司，四川威尔检测技术股份有限公司，中牧实业股份有限公司，广州爱保农生物科技有限公司。

本文件主要起草人：赵小阳、虞哲高、宋荣、张凤桦、朱高群、刘志英、汪忠艳、郭红双、马晓忠、张玮、谢丽、宋艳、张辉、李丽蓓、陈学海、陈雪、崔婕、冯秀燕、曹林。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 1999 年首次发布为 GB/T 17818—1999，2010 年第一次修订；
- 本次为第二次修订。

饲料中维生素 D₃ 的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了饲料中维生素 D₃ 的高效液相色谱测定方法。

本文件中“第一法 皂化提取法”适用于配合饲料、精料补充料、浓缩饲料、复合预混合饲料中维生素 D₃ 的测定，“第二法 直接提取法”适用于维生素预混合饲料中维生素 D₃ 的测定。

本文件第一法定量限为 100 IU/kg，第二法定量限为 2.00×10^5 IU/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 第一法 皂化提取法

注意：分液漏斗活塞玻璃表面不涂油，处理过程在避光下操作；提取过程在通风柜中操作。

4.1 原理

试样用氢氧化钾乙醇溶液皂化，经液液萃取或固相萃取净化、浓缩后，用二维色谱系统分离，紫外检测器检测，外标法定量。复合预混合饲料也可直接用反相色谱柱分离，紫外检测器检测，外标法定量。

4.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2.2 无水乙醇：色谱纯。

4.2.3 无水乙醇。

4.2.4 石油醚（沸程 30 °C ~ 60 °C）。

4.2.5 甲醇：色谱纯。

4.2.6 乙腈：色谱纯。

4.2.7 甲酸：色谱纯。

4.2.8 异丙醇：色谱纯。

- 4.2.9 L-抗坏血酸。
- 4.2.10 二丁基羟基甲苯(BHT)。
- 4.2.11 无水硫酸钠。
- 4.2.12 氢氧化钾溶液(500 g/L):称取 500 g 氢氧化钾,加水溶解,冷却后用水定容至 1 L,混匀。
- 4.2.13 乙醇溶液 I (70%,体积分数):量取无水乙醇(4.2.3)700 mL,用水稀释,定容至 1 L,混匀。
- 4.2.14 乙醇溶液 II (50%,体积分数):量取无水乙醇(4.2.3)500 mL,用水稀释,定容至 1 L,混匀。
- 4.2.15 甲醇溶液(10%,体积分数):量取甲醇 10 mL,用水稀释,定容至 100 mL,混匀。
- 4.2.16 甲酸溶液(0.1%,体积分数):量取甲酸 1 mL,用水稀释,定容至 1 L,混匀。
- 4.2.17 乙醇溶液 III (40%,体积分数):量取无水乙醇(4.2.3)400 mL,用水稀释,定容至 1 L,混匀。
- 4.2.18 乙腈-异丙醇混合溶液:量取 50 mL 乙腈(4.2.6)与 50 mL 异丙醇(4.2.8)混合均匀。
- 4.2.19 维生素 D₃ 标准储备液(40 000 IU/mL):称取 50 mg 维生素 D₃(胆钙化醇)标准品(C₂₇H₄₄O, CAS号:67-97-0,纯度≥99.0%,或标准物质/标准样品)(精确至 0.000 01 g)于 50 mL 棕色容量瓶中,用无水乙醇(4.2.2)溶解并稀释至刻度,混匀,-20℃~-18℃避光保存,有效期为 6 个月。
- 注:1 国际单位(IU)维生素 D₃ 相当于 0.025 μg 胆钙化醇。
- 4.2.20 维生素 D₃ 标准中间溶液(1 000 IU/mL):准确移取维生素 D₃ 标准储备液(4.2.19)0.25 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中,用无水乙醇(4.2.2)稀释定容,混匀,临用现配。
- 4.2.21 维生素 D₃ 标准系列溶液 I :准确吸取适量的维生素 D₃ 标准中间溶液(4.2.20),于 100 mL 棕色容量瓶中,用无水乙醇(4.2.2)稀释并定容,混匀,配制成质量浓度分别为 0.05 IU/mL、0.1 IU/mL、0.2 IU/mL、0.5 IU/mL、1.0 IU/mL、5.0 IU/mL、10.0 IU/mL、20.0 IU/mL 及 5.0 IU/mL、10.0 IU/mL、20.0 IU/mL、50.0 IU/mL、100.0 IU/mL 标准系列溶液,临用现配。
- 4.2.22 维生素 D₃ 标准系列溶液 II :准确吸取适量的维生素 D₃ 标准中间溶液(4.2.20),于 100 mL 棕色容量瓶中,用乙醇溶液 II (4.2.14)稀释并定容,混匀,配制成质量浓度分别为 0.06 IU/mL、0.12 IU/mL、0.24 IU/mL、0.4 IU/mL、0.80 IU/mL、1.6 IU/mL、4.0 IU/mL、8.0 IU/mL、16 IU/mL 标准系列溶液,临用现配。
- 4.2.23 酚酞指示剂(10 g/L):称取 1 g 酚酞,用 95%乙醇溶解,并稀释至 100 mL,混匀。
- 4.2.24 固相萃取柱:填料为聚苯乙烯-二乙烯基苯聚合物,200 mg/6 mL,或相当者。
- 4.2.25 在线固相萃取柱:填料为聚苯乙烯-二乙烯基苯聚合物,长为 12.5 mm,内径为 4.6 mm,粒径为 15 μm~20 μm,或相当者。
- 4.2.26 微孔滤膜:孔径 0.2 μm,有机系。
- 4.2.27 氮气:纯度 99.9%。

4.3 仪器和设备

- 4.3.1 高效液相色谱仪:配有紫外吸收检测器(或二极管矩阵检测器)。
- 4.3.2 二维液相色谱系统:配有 1 个紫外检测器(或二极管矩阵检测器)和 1 个高灵敏度紫外检测器(或二极管矩阵检测器)。
- 4.3.3 在线固相萃取-二维液相色谱系统:在二维液相色谱的系统上增加 1 个泵和 1 个六通阀。
- 4.3.4 分析天平:精度为 0.01 g、0.001 g、0.000 1 g 和 0.000 01 g。
- 4.3.5 回流装置:圆底烧瓶和冷凝管。
- 4.3.6 恒温水浴锅:控温精度±2℃。
- 4.3.7 旋转蒸发仪。
- 4.3.8 离心机:转速不低于 10 000 r/min。
- 4.3.9 固相萃取装置。
- 4.3.10 氮吹仪:带加热装置,控温精度±2℃。

4.3.11 涡旋混合器。

4.4 样品

配合饲料、精料补充料、浓缩饲料试样,按照 GB/T 20195 规定制备试样,至少 200 g,粉碎使其全部通过 1 mm 孔径的试验筛,混合均匀,装入密闭容器中,2℃~8℃避光保存,尽快测定。复合预混合饲料试样经缩分、混合均匀后装入密闭容器中,2℃~8℃避光保存,尽快测定。

4.5 试验步骤

4.5.1 试样溶液的制备

4.5.1.1 皂化

平行做两份试验。称取配合饲料、浓缩饲料、精料补充料 5 g~10 g(精确至 0.01 g);称取复合预混合饲料 4 g(精确至 0.001 g),置入 250 mL 圆底烧瓶中,加 1 g L-抗坏血酸(4.2.9)、0.2 g BHT(4.2.10),加入 50 mL 无水乙醇(4.2.3)和 20 mL 氢氧化钾溶液(500 g/L)(4.2.12)(在线固相萃取加 10 mL),置于沸水浴上回流 30 min,不时振荡,防止试样粘附在瓶壁上,皂化结束,依次用 5 mL 无水乙醇(4.2.3)、5 mL 水自冷凝管顶端冲洗其内部,取出烧瓶,冷却至约 40℃,备用。

4.5.1.2 提取净化

4.5.1.2.1 液液萃取法

将皂化液(4.5.1.1)全部转移至盛有 100 mL 石油醚(4.2.4)的 500 mL 分液漏斗中,用 30 mL~50 mL 水分 2 次~3 次冲洗圆底烧瓶并入分液漏斗,再用 5 mL~10 mL 乙醇冲洗转移,加盖、混匀后放气,激烈振荡 2 min,静置、分层。转移水相于另一个分液漏斗中,分次用 100 mL、60 mL 石油醚(4.2.4)各提取 1 次,弃去水相,合并 3 次石油醚相。用水每次 100 mL 洗涤石油醚提取液至中性[可用酚酞指示剂(4.2.23)检测下层溶液,直至无色],初次水洗时轻轻旋摇,防止乳化。

配合饲料、精料补充料、浓缩饲料、复合预混合饲料的石油醚提取液经约 3 g 无水硫酸钠(4.2.11)脱水,转移到旋转蒸发仪烧瓶中,在水浴温度约 50℃,一定真空条件下蒸发至干或用氮气吹至近干。残渣用无水乙醇(4.2.3)溶解并稀释定容至 10 mL,于离心管中,5 000 r/min 离心 5 min,或过 0.2 μm 微孔滤膜至进样瓶中,待测。

4.5.1.2.2 离线固相萃取法

将皂化液(4.5.1.1)全部转移至 100 mL 棕色容量瓶中,用 5 mL 乙醇溶液 I(4.2.13)洗涤瓶内的残渣并将溶液并入容量瓶内,重复洗涤两次,用乙醇溶液 I(4.2.13)定容,混匀,取一定体积皂化液于离心管中,5 000 r/min 离心 5 min,上清液待用。

依次移取 3 mL 甲醇、5 mL 水淋洗、活化固相萃取柱(4.2.24),弃去淋洗液。对于配合饲料、精料补充料和浓缩饲料,上清液混匀后准确移取 6 mL 于 15 mL 具塞离心管中,加 2 mL 水,涡旋均匀,全部加载到固相萃取柱(4.2.24)中,控制流速小于 2 mL/min,用甲醇溶液(4.2.15)每次 2 mL,洗涤两次离心管过柱,再用 4 mL 甲醇溶液(4.2.15)淋洗固相萃取柱(4.2.24)。将固相萃取柱(4.2.24)抽干,用乙腈(4.2.6)洗脱 3 次,每次 1 mL,合并洗脱液,于 40℃下用氮气吹干,准确加入 1 mL 乙腈(4.2.6),涡旋复溶,过 0.2 μm 微孔滤膜至进样瓶中,待测。

对于复合预混合饲料皂化上清液,混匀后准确移取 1.5 mL,于 5 mL 具塞离心管中,加 0.5 mL 水,涡旋后,全部加载到固相萃取柱(4.2.24)中,以下淋洗、洗脱步骤同配合饲料、精料补充料和浓缩饲料皂化上清液的淋洗、洗脱步骤,乙腈洗脱液需收集到 5 mL 容量瓶中,并用乙腈(4.2.6)定容,混匀,过

0.2 μm 微孔滤膜至进样瓶中,待测。

4.5.1.2.3 在线固相萃取法

将配合饲料、精料补充料、浓缩饲料、复合预混合饲料皂化液(4.5.1.1)全部转移至 100 mL 棕色容量瓶中,用适量水洗涤瓶内的残渣并将洗液并入容量瓶内,用水定容,混匀,取一定体积皂化液于离心管中,10 000 r/min 离心 15 min,取适量上清液过 0.2 μm 滤膜至进样瓶中;如果试样中维生素 D₃ 含量低于 500 IU/kg,取 2 mL 试样溶液(4.5.1.2.1)用氮气吹干,用乙醇溶液 II(4.2.14)定容至 1 mL,过 0.2 μm 滤膜至进样瓶中,待测。

4.5.2 测定

4.5.2.1 液相色谱参考条件 I

液相色谱参考条件 I 如下:

- a) 色谱柱:C₁₈柱,长 150 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm,或性能相当者;
- b) 流动相:甲醇(4.2.5)+水=95+5;
- c) 流速:1.0 mL/min;
- d) 温度:25 °C;
- e) 进样量:20 μL;
- f) 检测波长:264 nm。

4.5.2.2 液相色谱参考条件 II

液相色谱参考条件 II 如下。

- a) 色谱柱¹⁾:
 - 一维色谱柱:C₈柱,长 50 mm,内径 4.6 mm,粒径 2.7 μm,或性能相当者;
 - 捕获柱:薄壳型色谱柱 C₁₈,长 5 mm,内径 4.6 mm,粒径 2.7 μm,或性能相当者;
 - 二维色谱柱:多环芳烃(PAH)柱,长 100 mm,内径 2.1 mm,粒径 3.5 μm,或性能相当者。
- b) 流动相:
 - 一维:A相为甲酸溶液(4.2.16),B相为乙腈(4.2.6),C相为甲醇(4.2.5),一维梯度洗脱程序见表 1;
 - 二维:A相为乙腈(4.2.6),B相为甲醇(4.2.5),二维梯度洗脱程序见表 2。
- c) 柱温:35 °C。
- d) 进样量:10 μL。
- e) 检测波长:
 - 一维检测器:0 min~3.5 min, 326 nm;3.5 min~25.0 min, 285 nm;在确定维生素 D₃ 一维出峰时间时,波长设置为 264 nm。
 - 二维检测器:264 nm。
- f) 阀位置:
 - 0 min~6 min,位置 1;
 - 6 min~7 min,位置 2;
 - 7 min~25 min,位置 1;
 - 柱切换-液相系统流路示意图见附录 A。

1) 维生素 D₃ 在不同品牌色谱柱的出峰时间会有所不同,对表 1 中流动相的梯度作适当调整,使维生素 D₃ 在约 6.5 min 出峰。调整阀 2 切换时间,一般为维生素 D₃ 保留时间的±0.5 min 范围内。

表 1 一维梯度洗脱程序

时间 min	A 相 %	B 相 %	C 相 %	流速 mL/min
0.0	30	70	0	1.0
1.0	25	75	0	1.0
12.0	0	100	0	1.0
14.0	0	0	100	1.0
19.0	0	0	100	1.0
19.5	30	70	0	1.0
25.0	30	70	0	1.0

表 2 二维梯度洗脱程序

时间 min	A 相 %	B 相 %	流速 mL/min
0.0	0	100	0.3
3.0	0	100	0.3
3.1	100	0	0.3
7.0	100	0	0.3
15.0	50	50	0.3
16.0	0	100	0.3
25.0	0	100	0.3

4.5.2.3 液相色谱参考条件Ⅲ

液相色谱参考条件Ⅲ见表 3；在线固相萃取柱切换-液相系统流路示意图见附录 B。

表 3 液相色谱参考条件Ⅲ

色谱参考条件	配置系统		
	在线固相萃取系统	一维色谱分离系统	二维色谱分离系统
色谱柱 ^a	聚苯乙烯/二乙烯基苯 (PLRP-S)柱,长 12.5 mm,内径 4.6 mm,粒径 15 μm~20 μm,或性能相当者	薄壳型 C ₈ 柱,长 100 mm,内径 4.6 mm,粒径 4 μm,或性能相当者	捕获柱:薄壳型色谱柱 C ₁₈ ,长 5 mm,内径 4.6 mm,粒径 2.7 μm,或性能相当者; 多环芳烃(PAH)柱,长 100 mm,内径 2.1 mm,粒径 3.5 μm,或性能相当者

表 3 液相色谱参考条件Ⅲ (续)

色谱参考条件	配置系统		
	在线固相萃取系统	一维色谱分离系统	二维色谱分离系统
流动相	A 相为乙醇溶液Ⅲ (4.2.17); B 相为 50% 乙腈-异丙醇 混合溶液(4.2.18)	A 相为水; B 相为乙腈(4.2.6)	A 相为乙腈(4.2.6); B 相为甲醇(4.2.5)
梯度洗脱程序	见表 4	见表 5	见表 6
流速/(mL/min)	1	1.5	0.4
进样体积/ μ L	100		
柱温箱温度/ $^{\circ}$ C	35		
检测波长	一维检测器:0 min ~ 10 min, 325 nm; 10 min ~ 25 min, 285 nm; 在确定维生素 D ₃ 一维出峰 时间时, 波长设置在 264 nm; 二维检测器: 264 nm		
阀 1	0 min ~ 4 min, 1 和 6 相连; 4 min ~ 6 min, 1 和 2 相连; 6 min ~ 25 min, 1 和 6 相连		
阀 2	0 min ~ 11.5 min, 1 和 6 相连; 11.5 min ~ 12.5 min, 1 和 2 相连; 12.5 min ~ 25 min, 1 和 6 相连		
^a 维生素 D ₃ 在不同品牌色谱柱的出峰时间会有所不同, 对表 5 中流动相的梯度作适当调整, 使维生素 D ₃ 在约 12 min 出峰。阀的位置 2 设定一般定为维生素 D ₃ 保留时间的 ± 0.5 min 的范围。			


表 4 在线固相萃取系统梯度洗脱程序

时间 min	A 相 %	B 相 %
0.0	100	0
4.0	100	0
4.1	0	100
11.0	0	100
11.1	100	0
25.0	100	0

表 5 一维色谱分离系统梯度洗脱程序

时间 min	A 相 %	B 相 %
0.0	20	80
6.0	20	80
16.0	0	100
19.0	0	100
19.1	20	80
25.0	20	80

表 6 二维色谱分离系统梯度洗脱程序

时间 min	A 相 %	 B 相 %
0.0	0	100
5.0	0	100
6.0	90	10
21.0	90	10
21.1	0	100
25.0	0	100

4.5.2.4 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,根据选用的试样溶液制备方法,选取液相色谱参考条件进行测定。

- 选用液液萃取法(4.5.1.2.1)或离线固相萃取法(4.5.1.2.2),如果试样中维生素 D₃ 含量不低于 10 000 IU/kg,可按照液相色谱参考条件 I (4.5.2.1)或液相色谱参考条件 II (4.5.2.2),分别取维生素 D₃ 标准系列溶液(4.2.21)和试样溶液(4.5.1.2.1)、(4.5.1.2.2)上机测定;如果试样中维生素 D₃ 含量在 500 IU/kg~10 000 IU/kg 范围,可按照液相色谱参考条件 II (4.5.2.2)分别取维生素 D₃ 标准系列溶液(4.2.21)和试样溶液(4.5.1.2.1)、(4.5.1.2.2)上机测定;如果试样中维生素 D₃ 含量低于 500 IU/kg,可按照液相色谱参考条件 II (4.5.2.2)分别取维生素 D₃ 标准系列溶液(4.2.21)和试样溶液(4.5.1.2.1)上机测定。样品溶液中维生素 D₃ 浓度超过了线性范围,应将样品稀释后进样。维生素 D₃ 标准溶液的液相色谱图见附录 C 的图 C.1、图 C.2。
- 选用在线固相萃取法(4.5.1.2.3),按照液相色谱参考条件 III (4.5.2.3),分别取维生素 D₃ 标准系列溶液 II (4.2.22)和试样溶液(4.5.1.2.3)上机测定;维生素 D₃ 标准溶液的液相色谱图见图 C.3。

4.5.2.5 定性

在相同试验条件下,试样溶液中待测物的保留时间应与标准系列溶液(浓度相当)中待测物的保留

时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。

4.5.2.6 定量

以维生素 D₃ 的质量浓度为横坐标,以色谱峰面积为纵坐标,绘制过零点的线性标准曲线,其相关系数应不低于 0.999。试样溶液中维生素 D₃ 的质量浓度应在标准曲线的线性范围内,若超出线性范围,应将试样溶液用乙腈(4.2.6)稀释后重新测定。单点校准定量时,试样溶液中维生素 D₃ 的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过 30%。

4.6 试验数据处理

试样中维生素 D₃ 的含量以质量分数 w_1 计,数值以国际单位每千克(IU/kg)表示,多点校正按公式(1)计算,单点校正按公式(2)计算:

$$w_1 = \frac{\rho_1 \times V_1 \times V_3 \times n}{m_1 \times V_2} \times 1.25 \times 1\,000 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- ρ_1 ——从标准曲线查得的试样溶液中维生素 D₃ 质量浓度,单位为国际单位每毫升(IU/mL);
- V_1 ——提取液的总体积,单位为毫升(mL);
- V_3 ——试样溶液最终体积,单位为毫升(mL);
- n ——超出标准曲线范围后的稀释倍数;
- m_1 ——试样质量,单位为克(g);
- V_2 ——从提取液(V_1)中分取的溶液体积,单位为毫升(mL);
- 1.25 ——将预维生素 D₃ 的含量纳入维生素 D₃ 总量计算的校正系数;
- 1 000 ——换算系数。

$$w_1 = \frac{A_1 \times \rho_{s1} \times V_1 \times V_3 \times n}{A_{s1} \times m_1 \times V_2} \times 1.25 \times 1\,000 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- A_1 ——试样溶液中维生素 D₃ 峰面积值;
- ρ_{s1} ——标准溶液维生素 D₃ 质量浓度,单位为国际单位每毫升(IU/mL);
- V_1 ——提取液的总体积,单位为毫升(mL);
- V_3 ——试样溶液最终体积,单位为毫升(mL);
- n ——超出标准曲线范围后的稀释倍数;
- A_{s1} ——标准溶液中维生素 D₃ 峰面积值;
- m_1 ——试样质量,单位为克(g);
- V_2 ——从提取液(V_1)中分取的溶液体积,单位为毫升(mL);
- 1.25 ——将预维生素 D₃ 的含量纳入维生素 D₃ 总量计算的校正系数;
- 1 000 ——换算系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

4.7 精密度

在重复性条件下,2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的百分数,见表 7。

表 7 相对偏差

维生素 D ₃ 含量 IU/kg	相对偏差 %
$1.00 \times 10^2 \sim 1.00 \times 10^3$	30
$>1.00 \times 10^3 \sim 1.00 \times 10^5$	20
$>1.00 \times 10^5 \sim 1.00 \times 10^6$	15
$>1.00 \times 10^6$	10

5 第二法 直接提取法

注意：处理过程在避光下操作，提取过程在通风柜中操作。

5.1 原理

试样中的维生素 D₃ 用水和甲醇溶液提取，高效液相色谱仪测定，外标法定量。

5.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.2.1 水：GB/T 6682 一级。

5.2.2 甲醇。

5.2.3 甲醇：色谱纯。

5.2.4 维生素 D₃ 标准贮备液(40 000 IU/mL)：称取维生素 D₃ 标准品(C₂₇H₄₄O, CAS 号：67-97-0)，纯度≥99.0%，或标准物质/标准样品)100 mg(精确至 0.000 01 g)，于 100 mL 棕色容量瓶中，用甲醇(5.2.3)溶解并稀释至刻度，混匀，-20℃~-18℃避光保存，有效期为 6 个月。

注：1 国际单位(IU)维生素 D₃ 相当于 0.025 μg 胆钙化醇。

5.2.5 维生素 D₃ 标准工作液(200 IU/mL)：准确吸取维生素 D₃ 标准贮备液(5.2.4)0.5 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中，用甲醇(5.2.3)稀释至刻度，混匀，-20℃~-18℃避光保存，临用现配。

5.2.6 微孔滤膜：有机系，孔径 0.2 μm。

5.3 仪器设备

5.3.1 高效液相色谱仪：配有紫外吸收检测器(或二极管矩阵检测器)。

5.3.2 分析天平：精度为 0.000 1 g 和 0.000 01 g。

5.3.3 超声波清洗器：频率不低于 35 000 Hz。

5.4 样品

按照 GB/T 20195 规定制备试样，至少 200 g，试样经缩分、混合均匀后装入密闭容器中，2℃~8℃避光保存，尽快测定。

5.5 试验步骤

5.5.1 试样溶液的制备

平行做两份试验。称取试样 1 g，精确至 0.000 1 g，置于 100 mL 的棕色容量瓶中，加入 10 mL 水将

试样摇匀,在 65 °C 以下超声波水浴中超声提取 5 min,加入约 80 mL 的甲醇(5.2.2),摇匀,瓶塞不要拧紧,置于超声波水浴中继续处理 30 min,处理过程中水浴温度不应超过 65 °C,处理完毕取出容量瓶,冷却至室温,用甲醇(5.2.2)定容,充分摇匀,过微孔滤膜,上机测定。

5.5.2 测定

5.5.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:C₁₈柱,长 150 mm,内径 4.6 mm,粒度 5μm(或性能相当者);
- b) 流动相:甲醇(5.2.3)+水=98+2;
- c) 流速:1.0 mL/min;
- d) 温度:25 °C;
- e) 进样量:20 μL;
- f) 检测波长:264 nm。

5.5.2.2 标准溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取维生素 D₃ 标准工作液(5.2.5)和试样溶液(5.5.1)上机测定。维生素 D₃ 标准溶液的液相色谱图见图 C.4。

5.5.2.3 定性

在相同试验条件下,试样溶液中待测物的保留时间应与标准系列溶液(浓度相当)中待测物的保留时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。

5.5.2.4 定量

在上述液相色谱条件下,将维生素 D₃ 标准工作液(5.2.5)和试样溶液(5.5.1)注入液相色谱仪测定,外标法定量测定。

5.6 试验数据处理

试样中维生素 D₃ 的含量,以质量分数 w_2 计,单位为国际单位每千克(IU/kg)表示,按公式(3)计算。

$$w_2 = \frac{A_2 \times \rho_2 \times V}{A_{s2} \times m_2} \times 1.07 \times 1\,000 \dots\dots\dots(3)$$

式中:

- A_2 —— 试样溶液(5.5.1)峰面积值;
- ρ_2 —— 标准溶液维生素 D₃ 质量浓度,单位为国际单位每毫升(IU/mL);
- V —— 试样溶液(5.5.1)的总稀释体积,单位为毫升(mL);
- A_{s2} —— 维生素 D₃ 标准工作液(5.2.5)峰面积值;
- m_2 —— 试样质量,单位为克(g);
- 1.07 —— 将预维生素 D₃ 的含量纳入维生素 D₃ 总量计算的校正系数;
- 1 000 —— 换算系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

5.7 精密度

在重复性条件下,2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 10%。

附录 A

(资料性)

离线固相萃取柱切换-液相系统流路示意图

离线固相萃取柱切换-液相系统流路示意图见图 A.1~图 A.3。

第一阶段:0 min~6 min,位置 1、2 相连;净化维生素 D₃ 阶段,第一维色谱柱实现维生素 D₃ 与杂质的初步分离见图 A.1。

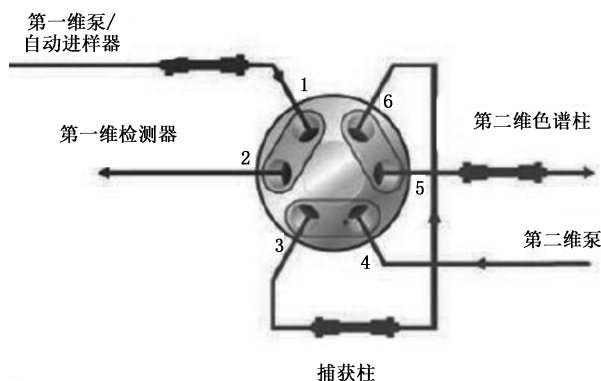


图 A.1 离线固相萃取柱切换-液相系统流路示意图(初始状态)

第二阶段:6 min~7 min,位置 1、6 相连;捕获维生素 D₃ 阶段,阀在维生素 D₃ 出峰前切换至 1-6 连通图见图 A.2。

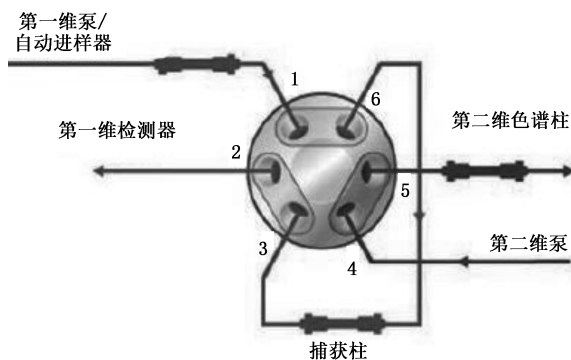


图 A.2 离线固相萃取柱切换-液相系统流路示意图(阀切换捕获维生素 D₃ 状态)

第三阶段:7 min~25 min 位置 1、2 相连;为二次分离阶段,第二维色谱柱实现杂质与维生素 D₃ 分离图见图 A.3。

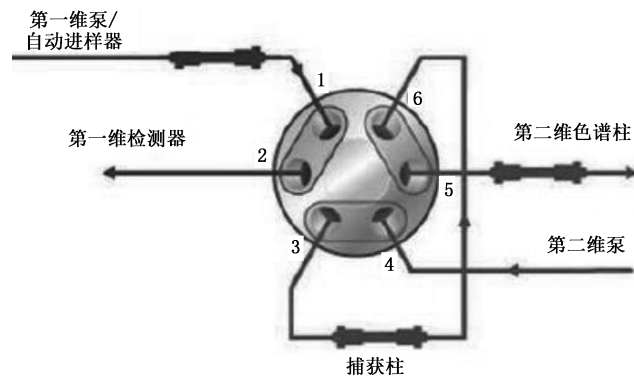


图 A.3 离线固相萃取柱切换-液相系统流路示意图(阀切换维生素 D₃ 分离状态)



附录 B

(资料性)

在线固相萃取柱切换-液相系统流路示意图

在线固相萃取柱切换-液相系统流路示意图见图 B.1~图 B.5。

第一阶段:0 min~4 min,位置 1、6 相连;用洗脱液将注入 SPE 小柱内的强碱性盐溶液和强极性杂质洗脱出柱见图 B.1。

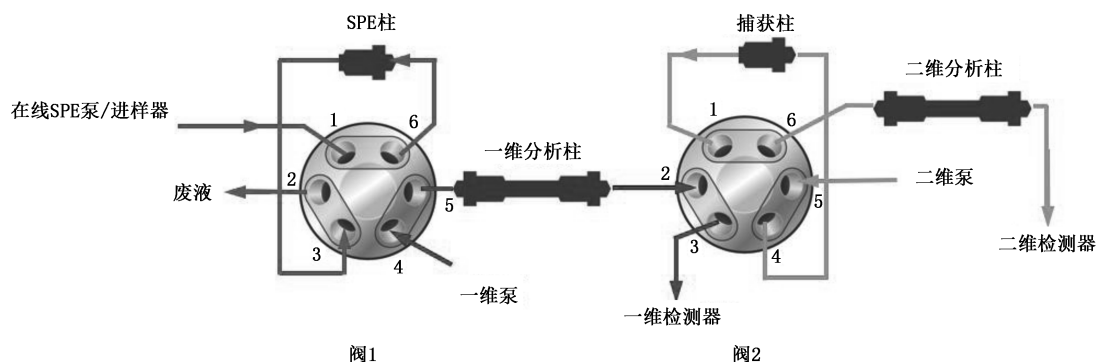


图 B.1 在线固相萃取柱切换-液相系统流路示意图(在线 SPE 上样状态)

第二阶段:4 min~6 min,位置 1、2 相连;一维色谱柱流动相将维生素 D₃ 组分,从 SPE 小柱洗脱至一维色谱柱上净化图见图 B.2。

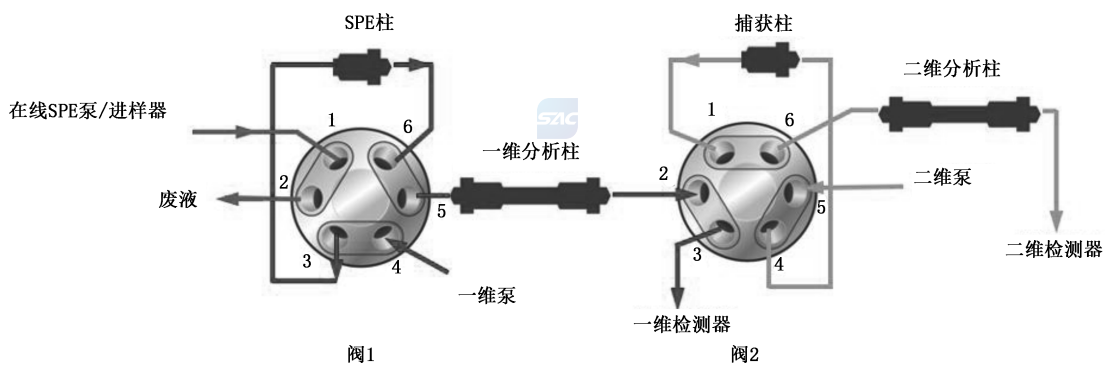


图 B.2 在线固相萃取柱切换-液相系统流路示意图(阀切换 SPE 小柱维生素 D₃ 洗脱状态)

第三阶段:6 min~11.5 min,位置 1、6 相连;SPE 泵冲洗净化 SPE 小柱,第一维色谱柱实现维生素 D₃ 与杂质的初步分离图见图 B.3。

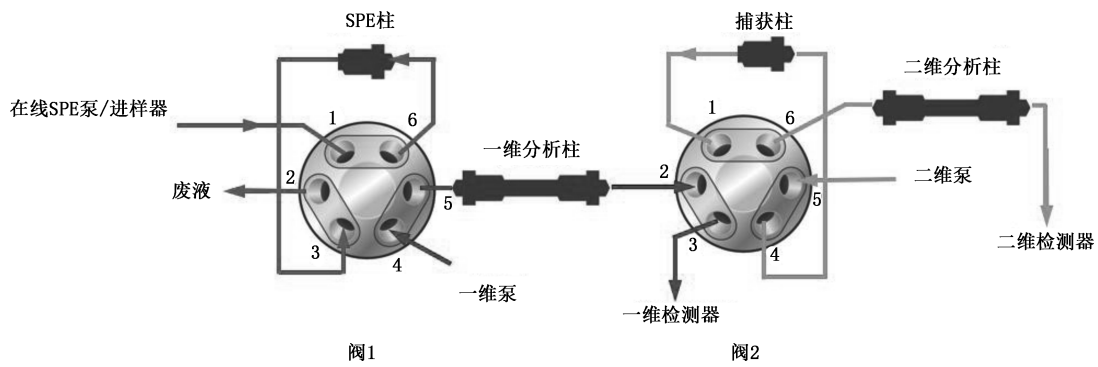


图 B.3 在线固相萃取柱切换-液相系统流路示意图 (阀切换第一维色谱柱维生素 D₃ 初步分离状态)

第四阶段:11.5 min~12.5 min,在维生素 D₃ 即将从一维色谱柱流出前,位置切换为 1、2 相连;使流出一维色谱柱的维生素 D₃ 被捕获柱捕获见图 B.4。

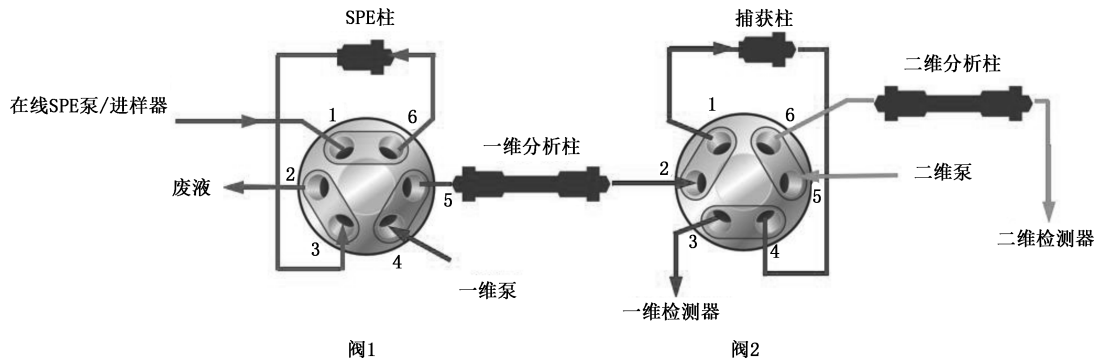


图 B.4 在线固相萃取柱切换-液相系统流路示意图 (阀切换捕获维生素 D₃ 状态)

第五阶段:12.5 min~25 min,在维生素 D₃ 全部被捕获柱捕获后,位置切换为 1、6 相连;二维色谱流动相将维生素 D₃ 从捕获柱洗脱至二维色谱柱上分离见图 B.5。

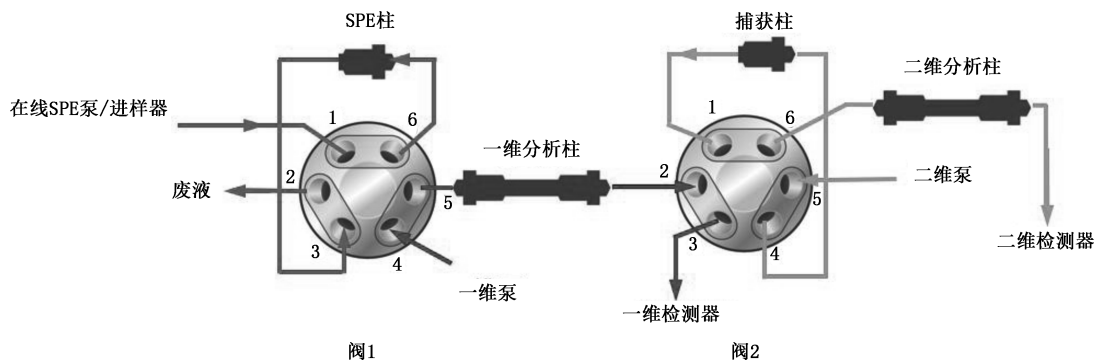


图 B.5 在线固相萃取柱切换-液相系统流路示意图 (阀切换维生素 D₃ 分离状态)

附录 C

(资料性)

维生素 D₃ 标准溶液的液相色谱图

C.1 液相色谱参考条件 I 的维生素 D₃ 标准溶液(100 IU/mL)的液相色谱图见图 C.1。

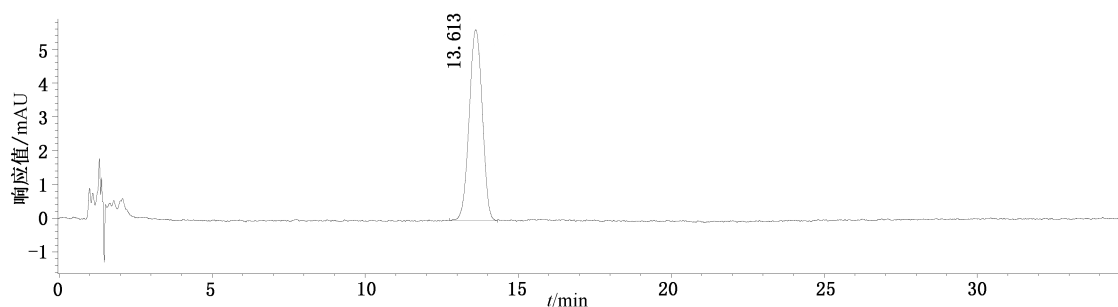


图 C.1 液相色谱参考条件 I 的维生素 D₃ 标准溶液(100 IU/mL)的液相色谱图

C.2 液相色谱参考条件 II 的维生素 D₃ 标准溶液(50 IU/mL)的液相色谱图见图 C.2。

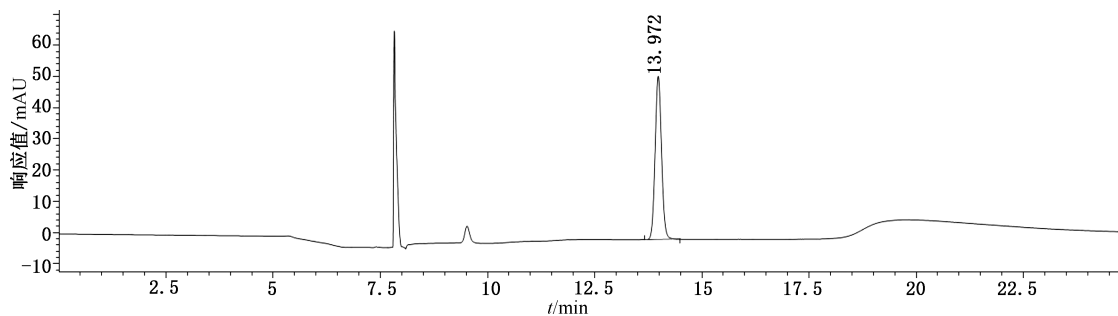


图 C.2 液相色谱参考条件 II 的维生素 D₃ 标准溶液(50 IU/mL)的液相色谱图

C.3 液相色谱参考条件 III 的维生素 D₃ 标准溶液(8 IU/mL)的液相色谱图见图 C.3。

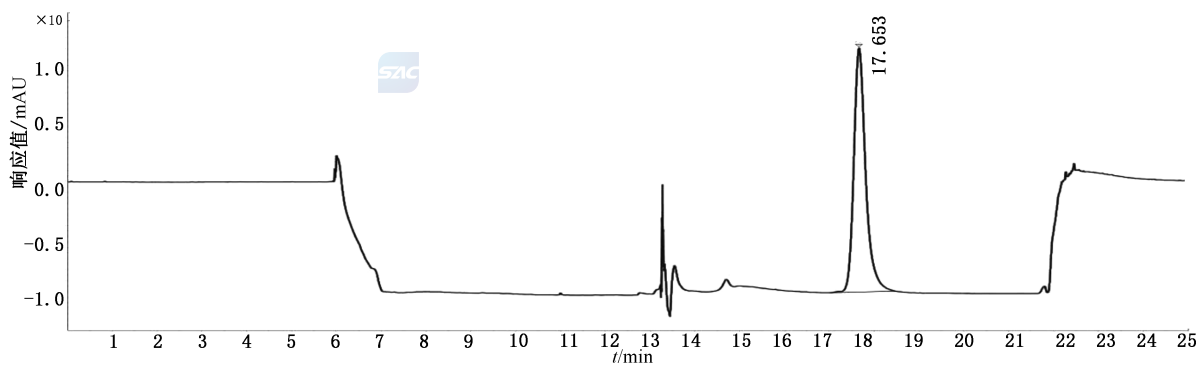


图 C.3 液相色谱参考条件 III 的维生素 D₃ 标准溶液(8 IU/mL)的液相色谱图

C.4 液相色谱参考条件(5.5.2.1)的维生素 D₃ 标准溶液(200 IU/mL)的液相色谱图见图 C.4。

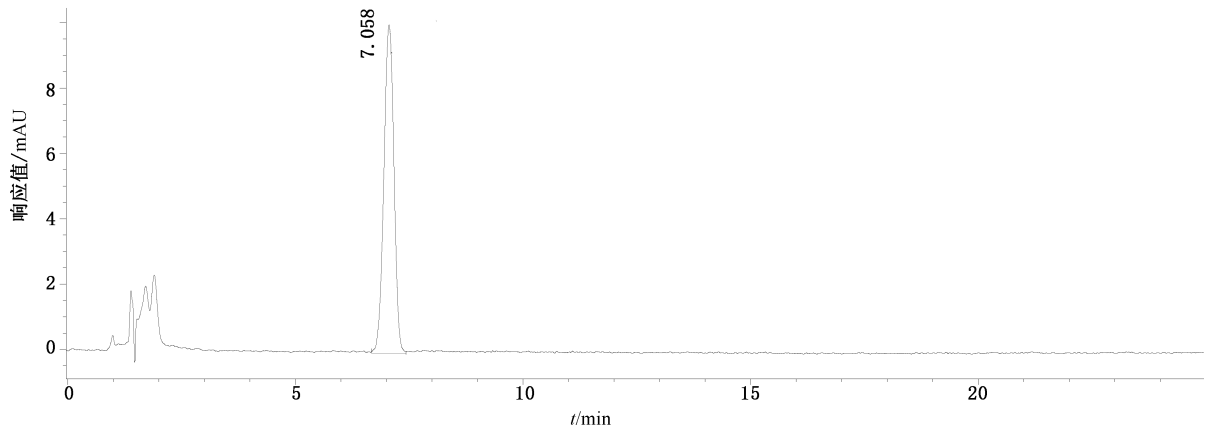


图 C.4 液相色谱参考条件(5.5.2.1)的维生素 D₃ 标准溶液(200 IU/mL)的液相色谱图

