



中华人民共和国国家标准

GB/T××××-××××

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

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

国家市场监督管理总局
中国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/T17817—2010相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 皂化提取法范围增加精料补充料（见第 1 章，2010 年版的第 1 章）；
- b) 更改了直接提取法的定量限（见第 1 章，2010 年版的第 1 章）；
- c) 皂化提取法提取剂更改为石油醚（30℃-60℃）（见第 4 章，2010 年版第 3 章）；
- d) 增加了维生素 D₃标准工作液（见 4.2.20）；
- e) 第一法中配合饲料、精料补充料、浓缩饲料样品制备方法更改为试样全部通过 1 mm 孔筛（见 4.4，2010 年版第 3 章）；
- f) 增加固相萃取法、在线固相萃取法（见 4.5.1.2 和 4.5.1.3）；
- g) 删除 3.6.1.4 高效液相色谱净化柱净化（2010 年版第 3 章）；
- h) 删除 3.6.2.1 高效液相色谱净化条件（2010 年版第 3 章）；
- i) 删除 3.6.2.2.1 正相色谱（2010 年版第 3 章）；
- j) 增加了液相色谱参考条件（见 4.5.2.2 和 4.5.2.3）；
- k) 增加了定性（见 4.5.2.5 和 5.5.2.3），定量增加了多点校正（见 4.5.2.6）；
- l) 更改了“第二法 直接提取法”（见第 5 章，2010 年版第 4 章）。

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，帝斯曼维生素（上海）有限公司，山东省饲料质量检验所，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。

本标准主要起草人：

本文件于 1999 年首次发布，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、维生素预混合饲料中维生素 D₃的测定，定量限为 12.5 μg (500 IU) /kg。

本文件中“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，定量限为 25 mg (100 万 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：使用的器皿不含有氧化性物质；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

试样用碱溶液皂化后，高含量的预混合饲料皂化液经液液萃取或固相萃取净化、浓缩后，直接上反相高效液相色谱仪分离、测定，外标法测定；而低含量试样的皂化液则需在液液萃取或离线或在线固相萃取净化后，经一维色谱柱进一步分离净化，然后切换至二维反相色谱柱分离、测定，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℃-60℃）。

4.2.5 甲醇：色谱纯。

4.2.6 乙腈：色谱纯。

4.2.7 甲酸。

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 70 mL, 用水稀释, 定容至 100 mL, 混匀。
- 4.2.14 乙醇溶液 II (50%, 体积分数): 量取无水乙醇 50 mL, 用水稀释, 定容至 100 mL, 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 40 mL, 用水稀释, 定容至 100 mL, 混匀。
- 4.2.18 乙腈-异丙醇混合溶液 [$V(\text{乙腈}) : V(\text{异丙醇}) = 1:1$]: 量取 50 mL 乙腈与 50 mL 异丙醇混合均匀。
- 4.2.19 维生素D₃标准贮备液 (1.0 mg/mL, 40000 IU/mL): 称取50 mg维生素D₃(胆钙化醇)标准品 (C₂₂H₃₂O₂, CAS号: 67-97-0, 纯度≥99.0%, 或有证标准物质) (精确至0.00001g) 于50mL棕色容量瓶中, 用乙醇(4.2.2)溶解并稀释至刻度, 混匀, -18 °C~-20°C避光保存, 有效期为12个月。
- 4.2.20 维生素D₃标准中间溶液 (1000 IU/mL): 准确移取维生素D₃标准贮备液 (4.2.19) 于10 mL棕色容量瓶中, 用无水乙醇 (4.2.2) 稀释定容, 混匀。
- 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 标准贮备液 (4.2.19), 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、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 IU/mL 标准系列溶液。
- 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 50% 乙醇溶液 (4.2.14) 稀释并定容, 混匀, 配制成质量浓度分别为 0.16 IU/mL、0.40 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, -18 °C~-20°C 避光保存, 有效期为 3 个月。
- 4.2.23 酚酞指示剂 (10 g/L): 称取 1 g 酚酞, 用 95%乙醇(4.2.21)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 (PS-DVB), 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 (PLRP-S), 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 分析天平: 精度为 0.01 g、0.001 g、0.0001 g 和 0.00001 g。
- 4.3.3 回流装置: 圆底烧瓶和冷凝管。
- 4.3.4 恒温水浴, 控温精度 ±2°C。
- 4.3.5 旋转蒸发器。
- 4.3.6 离心机: 转速不低于 10 000 r/min。
- 4.3.7 固相萃取装置。
- 4.3.8 氮吹仪: 带加热装置, 温度可控制在 (50±2) °C。
- 4.3.9 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°C~8°C 避光保存, 尽快测定。复合预混合饲料试样、维生素预混合饲料试样装入密闭容器中, 2°C~8°C 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 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），维生素预混合饲料 1 g（精确至 0.0001 g）置入 250 mL 圆底烧瓶中，加 1 g 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 50% 氢氧化钾溶液(4.2.12)，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，分别用 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，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，合并三次石油醚相。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 3g 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干。残渣用无水乙醇（4.2.3）溶解并稀释至 10 mL，于离心管中，调整离心机转速为 5 000 r/min，离心 5 min，或过 0.2 μm 微孔滤膜至进样瓶中，待测。

维生素预混合饲料的石油醚提取液经约 3g 无水硫酸钠（4.2.11）脱水，转移到 250 mL 容量瓶中，用石油醚（4.2.4）稀释至刻度，混匀，取 2.0 mL，用氮气吹干，用无水乙醇（4.2.3）稀释至 1 mL，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。

移取 3 mL 甲醇、5 mL 水分别淋洗、活化固相萃取小柱（PS-DVB），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。将固相萃取柱抽干，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，用乙腈（4.2.6）定容至 1 mL，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 250 mL 容量瓶中，用适量乙醇溶液 II（4.2.14）洗涤瓶内的残渣并将洗液并入容量瓶内，用乙醇溶液 II（4.2.14）定容，

混匀，取一定体积皂化液于离心管中，10000 r/min 离心 15 min，取适量上清液过 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：室温；
- 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：
 - 一维色谱柱：薄壳型耐碱色谱柱 HPH-C₈，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 EC-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：多环芳烃柱 PAH，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 0.1 %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 $^{\circ}\text{C}$ ；
- d) 进样量：10 μL ；
- e) 检测波长：
 - 检测器一：0 min \sim 3.5 min，326 nm；3.5 min \sim 20.0 min，285 nm；
 - 检测器二：264 nm。
- f) 阀位置：
 - 0 min \sim 6.35 min，位置 1；
 - 6.35 min \sim 6.75 min，位置 2；
 - 6.75 min \sim 25 min，位置 1。

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
20.0	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，在线固相萃取二维柱切换高效液相色谱仪配置连接参考图见附录 C。

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	聚苯乙烯 / 二乙烯基苯 (PLRP-S) 柱, 长 12.5 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 15~20 μm , 或性能相当的聚合物柱	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 EC-C18, 长 5mm, 内径 4.6 mm, 粒径 2.7 μm , 或性能相当者; 多环芳烃柱 PAH: 长 100 mm, 内径 2.1 mm, 粒径 3.5 μm , 或性能相当者
流动相	A 相为 40% 乙醇溶液 (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	0.3
进样体积/ μL	100		
柱温箱温度/ $^{\circ}\text{C}$	35		
检测波长	检测器一: 0 min ~ 10 min, 325 nm; 10 min ~ 22 min, 285 nm 检测器二: 264 nm		
阀 1 切换阀位置	0 min ~ 4 min, 切换阀位置 1~6 4 min ~ 6 min, 切换阀位置 1~2 6 min ~ 22 min, 切换阀位置 1~6		
阀 2 切换阀位置	0 min ~ 12.2 min, 切换阀位置 1~6 12.2 min ~ 12.6 min, 切换阀位置 1~2 12.6 min ~ 22 min, 切换阀位置 1~6		

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
22.0	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
22.0	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。

——复合预混合饲料、维生素预混合饲料选用液液萃取法（4.5.1.1），按照液相色谱参考条件 I（4.5.2.1），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，维生素 D₃ 标准溶液的液相色谱图见附录 A 的图 A.1。

——配合饲料、精料补充料、浓缩饲料、复合预混合饲料选用液液萃取法或固相萃取法（4.5.1.2），或当所测样品的维生素 D₃ 标示量在每千克低于 10000IU 范围时，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（4.5.1.2.2）上机测定，维生素 D₃ 标准溶液的液相色谱图见附录 A 的图 A.2。

——若选用在线固相萃取法（4.5.1.3），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（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附录 A 的图 A.3。

4.5.2.5 定性

以保留时间定性，试样溶液中维生素 D₃ 的保留时间应与质量浓度相当标准系列溶液中维生素 D₃ 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，单位为国际单位每千克（IU/kg），多点校正按公式（1）计算，单点校正按公式（2）计算，若维生素 D₃ 标准品与试样同样皂化处理，按公式（1）、公式（2）计算时，可不乘 1.25。

$$w_1 = \frac{\rho_1 \times V_1 \times V_3 \times n}{m_1 \times V_2} \times 1.25 \times 1000 \quad \dots\dots\dots (1)$$

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—提取时生成预维生素 D₃ 的校正因子；

1 000—换算系数。

$$w_1 = \frac{A_1 \times \rho_{s1} \times V_1 \times V_3 \times n}{A_{s1} \times m_1 \times V_2} \times 1.25 \times 1000 \quad \dots\dots\dots (2)$$

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—提取时生成预维生素 D_3 的校正因子;
 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数平均值的绝对差值不大于该算数平均值的百分数, 见表 7。

表 7 相对偏差

维生素 D_3 含量 (IU/kg)	相对偏差/%
$1.00 \times 10^5 \sim 1.00 \times 10^5$	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: 使用的器皿不含有氧化性物质, 处理过程在避光下操作。

5.1 原理

用水和甲醇溶液提取试样中的维生素 D_3 , 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 微孔滤膜: 有机系, 孔径 0.2 μ m。

5.2.5 维生素 D_3 标准贮备液[1 mg(40000 IU)/mL]: 称取维生素 D_3 标准品 ($C_{27}H_{44}O$, CAS 号: 511-28-4, 纯度 \geq 99.0%, 或有证标准物质) 100 mg(精确至 0.00001 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, $-18\text{ }^\circ\text{C} \sim -20\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存, 有效期为 12 个月。该贮备液浓度为 1.0 mg/mL。

5.2.6 维生素 D_3 标准工作液[10 μ g(400 IU)/mL]: 准确吸取维生素 D_3 标准贮备液 (5.2.5) 1.0 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇 (5.2.3) 稀释至刻度, 混匀, $-18\text{ }^\circ\text{C} \sim -20\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存, 有效期为 3 个月。

5.3 仪器设备

5.3.1 高效液相色谱仪: 配有二极管矩阵检测器或紫外检测器。

5.3.2 分析天平, 精度为 0.0001 g 和 0.00001 g。

5.3.3 超声波清洗器: 频率不低于 35000 Hz。

5.4 样品

同 4.4。

5.5 试验步骤

5.5.1 试样溶液的制备

称取试样 1g, 精确至 0.0001g, 置于 100 mL 的棕色容量瓶中, 加入 10 mL 水将样品浸润均匀, 65℃ 超声波水浴中超声提取 5 min, 加入约 80 mL 的甲醇, 瓶塞不要拧紧, 于 65℃ 超声波水浴中超声提取 30 min, 冷却至室温, 用甲醇稀释至刻度, 充分摇匀, 将溶液过 0.2μm 滤膜, 进样测定, 使待测样品维生素 D₃ 的进样浓度与标准溶液浓度接近。

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:

色谱柱: C₁₈ 型柱, 长 150mm, 内径 4.6mm, 粒度 5μm (或性能类似的分析柱)。

流动相: V(甲醇): V(水) = 98:2。

流速: 1.0 mL/min。

温度: 室温。

进样量: 20 μL。

检测波长: 264nm。

5.5.2.2 标准系列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 标准系列溶液 (5.2.6) 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附录 A 的图 A.4。

5.5.2.3 定性

以保留时间定性, 试样溶液中维生素 D₃ 色谱峰的保留时间应与质量浓度相当的标准系列溶液中维生素 D₃ 色谱峰的保留时间一致, 其相对偏差应在 ±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 标准工作溶液 (5.2.6) 和试样溶液 (5.5.1) 注入液相色谱仪测定, 外标法定量测定。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 %。

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), 按公式 (3) 计算, 若维生素 D₃ 标准品与试样同样处理后, 按公式 (3) 计算时, 可不乘 1.07。

$$w_2 = \frac{A_2 \times \rho_2 \times V}{A_{s2} \times m_2} \times 1.07 \times 1000 \dots \dots \dots (3)$$

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 (5.2.6) 峰面积值;

m_2 —试样质量, 单位为克 (g);

1.07—提取时生成预维生素 D₃ 的校正因子。

1000—换算系数。

5.7 精密度

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

附录 A

(资料性)

维生素 D₃ 标准溶液的液相色谱图

A.1 液相色谱参考条件 I 的维生素 D₃ 标准溶液 (127.33 IU/mL) 的液相色谱图见图 A.1。

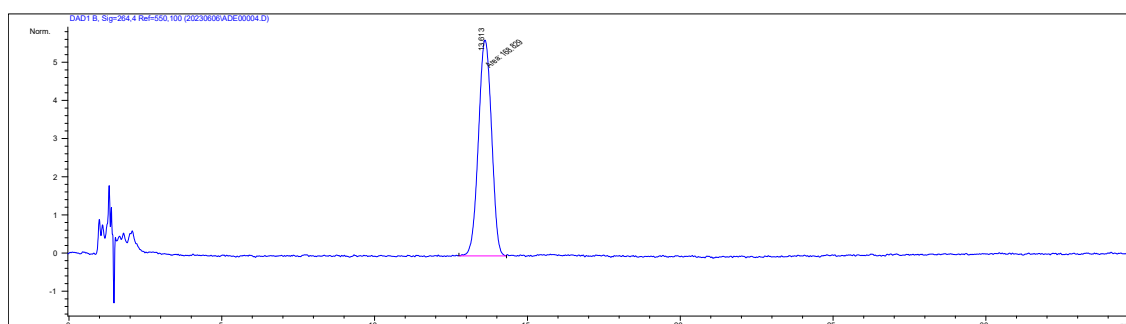


图 A.1 液相色谱参考条件 I 的维生素 D₃ 标准溶液 (127.33 IU/mL) 的液相色谱图

A.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 A.2。

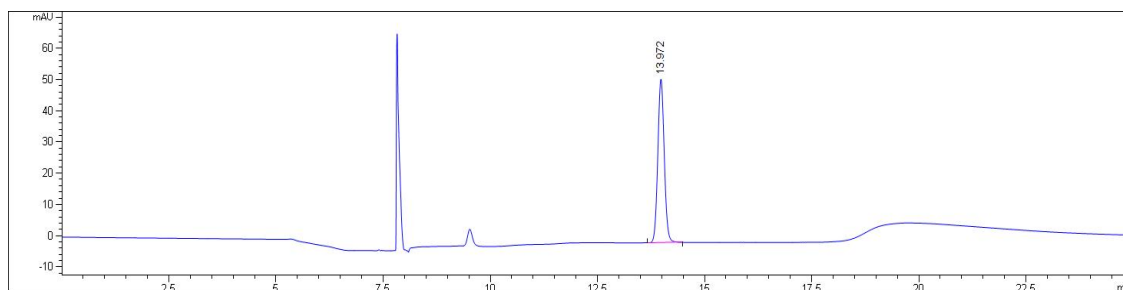


图 A.2 液相色谱参考条件 II 的维生素 D₃ 标准溶液 (50 IU/mL) 的液相色谱图

A.3 液相色谱参考条件 III 的维生素 D₃ 标准溶液 (0.8 IU/mL) 的液相色谱图见图 A.3。

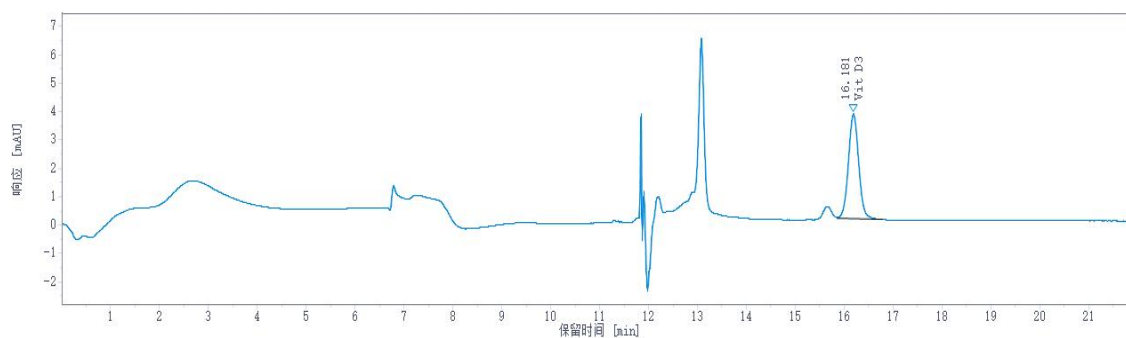


图 A.3 液相色谱参考条件 III 的维生素 D₃ 标准溶液 (0.8 IU/mL) 的液相色谱图

A.4 液相色谱参考条件（5.5.2.1）的维生素 D₃ 标准溶液（127.33 IU/mL）的液相色谱图见图 A.4。

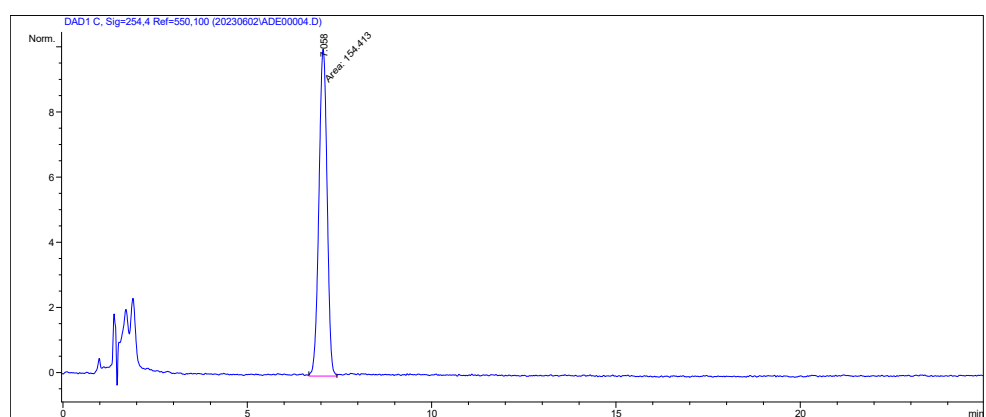


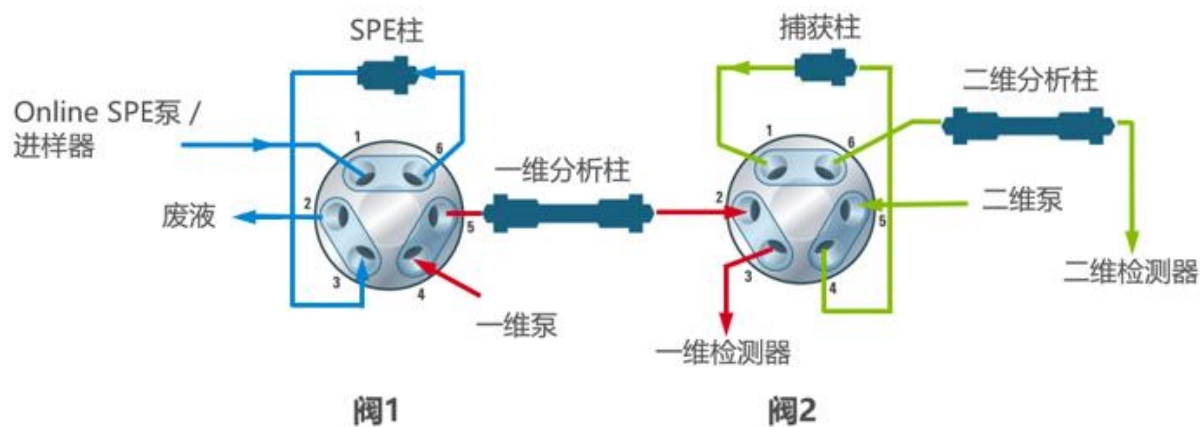
图 A.4 液相色谱参考条件（5.5.2.1）的维生素 D₃ 标准溶液（127.33 IU/mL）的液相色谱图

附录 B

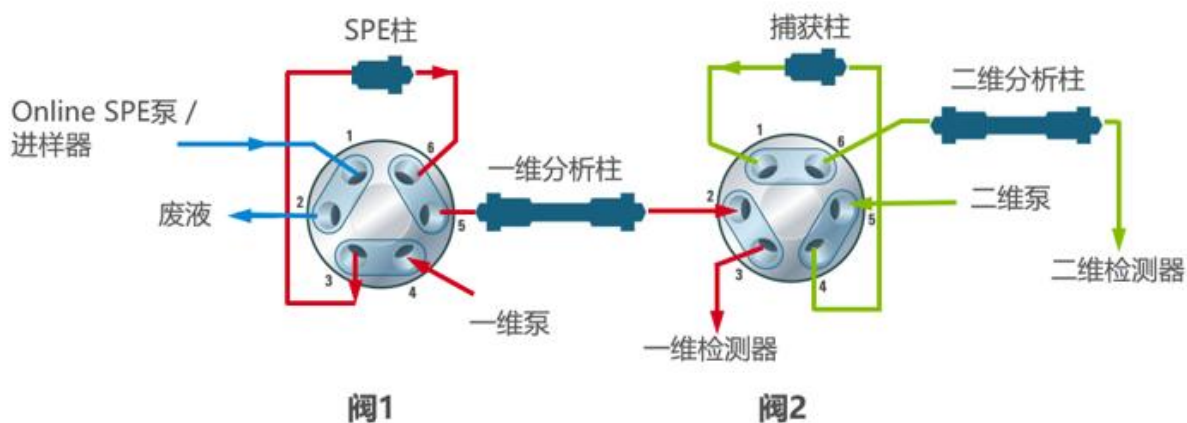
(资料性)

在线固相萃取阀的流程图

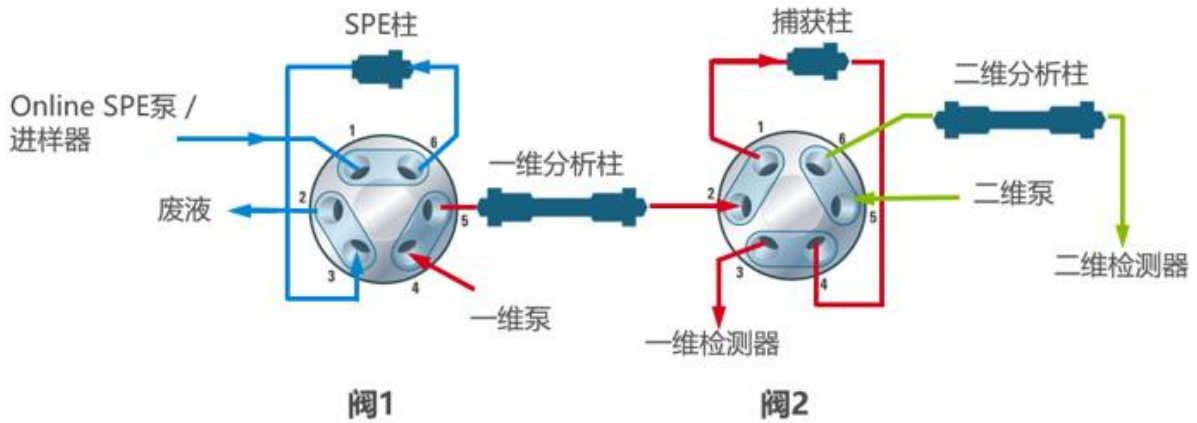
在线固相萃取阀的流程图见图 B. 1。



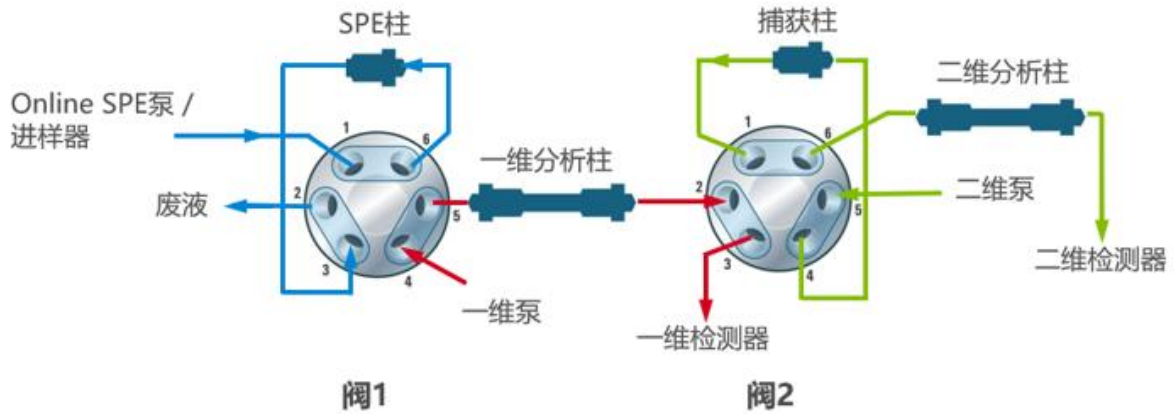
第一阶段：阀 1 将位置 1—6 相连，用洗脱液将注入 SPE 小柱内的强碱性盐溶液洗脱出柱。



第二阶段：阀 1 将位置 1—2 相连，一维色谱流动相将包含 VD_3 组份从 SPE 小柱洗脱至一维色谱柱上再次净化。



第三阶段：在 VD_3 即将从一维色谱柱流出前，阀 2 将位置切换为 1—2 相连，使流出一维色谱柱的 VD_3 被捕获柱捕获。



第四阶段：在 VD_3 全部被捕获柱捕获后，阀 2 将位置切换为 1—6 相连，二维色谱流动相将 VD_3 从捕获柱洗脱至二维色谱柱上分离。

图 B.1 在线固相萃取阀的流程图