

维生素 D 二维色谱系统分析检测解决方案

前言

维生素 D（简称 VD）是一种脂溶性维生素，最主要的成分是维生素 D₃ 与 D₂。前者由人皮下的 7-脱氢胆固醇经紫外线照射而成；后者由植物或酵母中含有的麦角固醇经紫外线照射而成。维生素 D 的主要功用是促进小肠粘膜细胞对钙和磷的吸收，肠中钙离子吸收需要一种钙结合蛋白，1，25-二羟基维生素 D₃ 可诱导此蛋白合成，促进 Ca²⁺ 吸收，又可促进钙盐的更新及新骨生成，也促进磷吸收与肾小管细胞对钙、磷的重吸收，故可提高血钙、血磷浓度，有利于新骨生成和钙化。

维生素 D 还有促进皮肤细胞生长、分化及调节免疫功能作用。一般成年人经常接触日光不致发生缺乏病，婴幼儿、孕妇、乳母及不常到户外活动的老人要增加维生素 D 供给量到每日 10μg（相当于 400 国际单位）。缺乏维生素 D 儿童可患佝偻病，成人患骨质软化症。

二维液相色谱

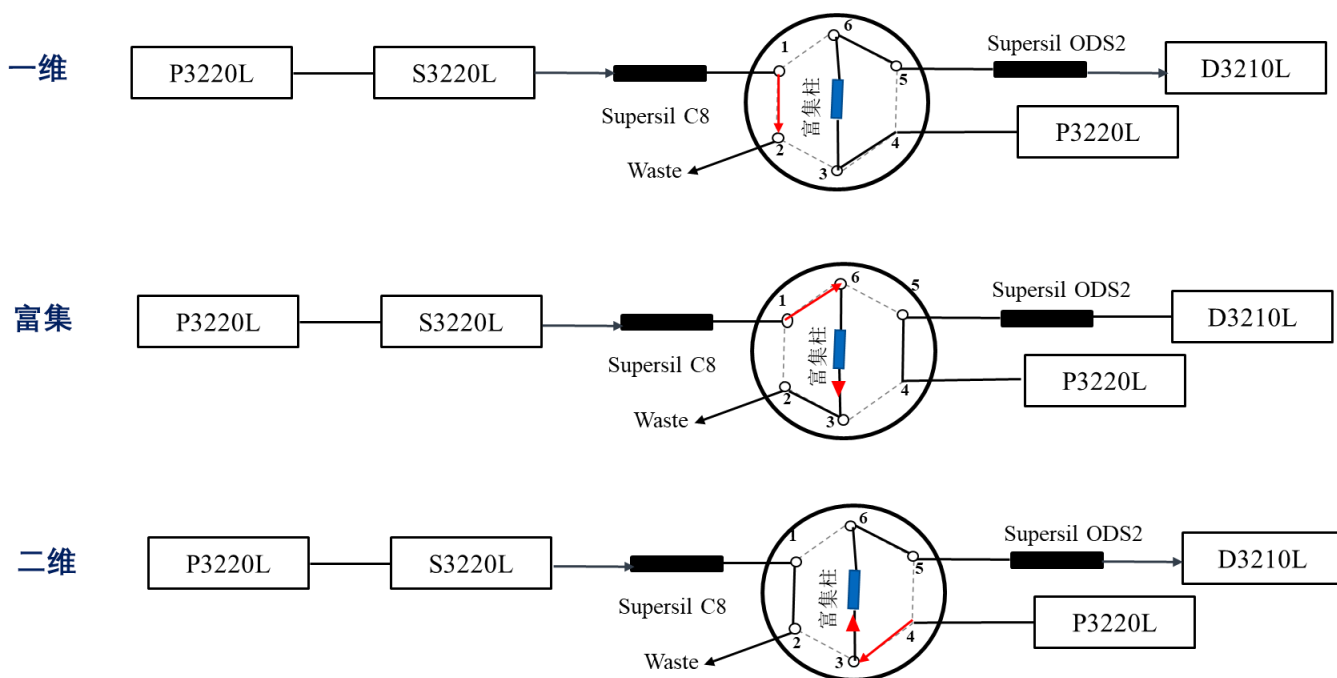
二维液相色谱是将分离机理不同而又相互独立的两支色谱柱组合，加强分离能力的联用技术。二维液相色谱系统通常由第一维分离柱和第二维分离柱串联而成，两柱之间以阀切换作为接口，通过流动相流路的改变，将部分或全部第一维柱流出的组分，导入第二维进行二次分离，从而起到净化目标化合物，提高系统分离能力的作用。在一维分离系统中不能完全分离的组分，可能在二维系统中得到更好的分离，分离能力、分辨率可得到极大

的提高。二维液相色谱可应用于制药、生物制药、天然产物的研究和食品分析等领域中复杂样品的分离分析，有着广阔的应用前景。

本次依利特公司根据《GB 5009.296-2023 食品安全国家标准 食品中维生素 D 的测定》，用在线柱切换-反相液相色谱法（二维液相色谱法），提出了测定维生素 D 的解决方案，供大家参考使用。



EClassical 3200L 系统外观图



维生素 D 二维系统阀切换示意图

EClassical 3200L 配置

检测器
 类型: D3210L IP: 192 . 168 . 1 . 10 ☒ 启用双波长模式

泵
 类型: P3220L IP: 192 . 168 . 1 . 30

进样器
 类型: S3220L IP: 192 . 168 . 1 . 40

柱温箱
 类型: O3230L IP: 192 . 168 . 1 . 50 阀: 二位多通阀*1

二位多通阀*1
 无
 色谱柱切换阀
 二位多通阀*1
 二位多通阀*2

确定 取消

Kromstation 工作站配置图

仪器方法设置 - DEMO_HPLC\default

LC 梯度 检测器(EClassical 3100) 恒温器 自动进样器

控制参数

工作模式 自动

设定温度(°C) 20

最高报警温度(°C) 85

警告：请确保设定温度低于最高报警温度，否则发送方法后将引起恒温箱报警！

加热模式下，设定温度范围是10~85℃。

制冷模式下，设定温度范围是4~35℃。

自动模式下，设定温度范围是4~85℃。

#	时间[min.]	阀位置
1	初始	A
2	20.2	B
3	21.5	A

方法名称 default

确定

取消

Kromstation 工作站阀切换方法设置图

1、仪器设备与试剂

表 1 EClassical 3200L 二维液相色谱系统配置清单

序号	名称	数量
1	D3210L 紫外-可见检测器	2 台
2	P3220L 二元高压恒流泵	2 台
3	O3230L 色谱柱恒温箱	1 台
4	S3220L 自动进样器	1 台
5	Kromstation 色谱数据工作站	1 套
6	二位六通电动切换阀	1 套
7	Supersil C8 3µm 4.6*150mm 色谱柱	1 支
8	SinoPak C18 3µm 4.6×150mm 色谱柱	1 支
9	Supersil ODS2 5µm 4.6×10mm 色谱柱	1 支

表 2 主要化学试剂、样品清单

序号	试剂	纯度
1	甲醇	色谱纯

2	乙腈	色谱纯
3	去离子水	18.2MΩ
4	维生素 D ₂ 标准品	98%
5	维生素 D ₃ 标准品	98%

表 3 主要样品前处理设备

序号	名称	规格型号	备注
1	溶剂过滤器	1000mL	流动相过滤
2	隔膜真空泵	0.08MPa,160W	流动相过滤，GM-0.33A
3	超声清洗器	3L/6L, 40/60KHz, 120W	流动相脱气，AS3120
4	精密电子天平	感量为万分之一	称量
5	涡旋混合器	QL-861	混合

实验过程中其它玻璃器皿还包括容量瓶(50mL、100mL)、具塞锥形瓶(50mL、100mL)、移液枪(0~1000μL, 0~5000μL)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、离心管、一次性PVC手套、一次性口罩、进样针、滤膜等若干。

2、实验方法

2.1 样品溶液配制

2.1.1 维生素 D₂ 标准储备溶液（1mg/mL）：准确称取 50mg 维生素 D₂ 标准品于烧杯中，用甲醇溶解并转移至 50mL 容量瓶中，定容至刻度，混匀。

2.1.2 维生素 D₃ 标准储备溶液（1mg/mL）：准确称取 50mg 维生素 D₃ 标准品于烧杯中，用甲醇溶解并转移至 50mL 容量瓶中，定容至刻度，混匀。

2.1.3 维生素 D₂、D₃ 混合标准溶液（50μg/mL）：分别吸取维生素 D₂ 标准储备溶液（1mg/mL）、维生素 D₃ 标准储备溶液（1mg/mL）各 5.00mL 于 100mL 棕色容量瓶中，用甲醇定容至刻度，混匀。

2.2 色谱条件

色谱柱: Supersil C8 3 μ m, 120Å, ID4.6 $\times$ 150mm (一维色谱柱)

SinoPak C18 3 μ m, 120 Å, ID4.6 $\times$ 150mm (二维色谱柱)

Supersil ODS2 5 μ m , 300 Å, ID4.6 $\times$ 10mm (富集柱)

检测波长 (nm): 264

柱温(°C): 室温

一维系统:

流量 (mL/min): 1.0

进样体积(μ L): 100

流动相组成(V/V): A: 水 B: 乙腈/甲醇=3/1

梯度表:

时间	A(%)	B(%)
初始	20	80
16.00	0	100
19.00	0	100
20.00	20	80
55.00	20	80

二维系统:

流量 (mL/min): 1.0

流动相组成(V/V): 乙腈/水=19/1: 甲醇=95: 5

3、实验结果

3.1 实验谱图

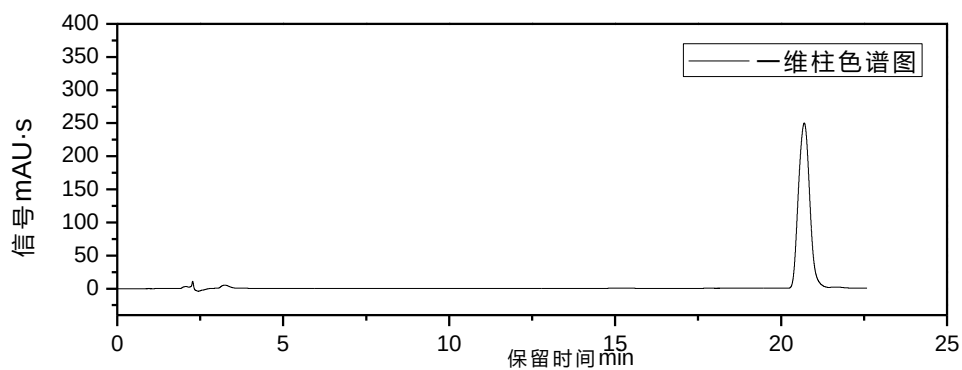


图 1 一维柱维生素 D₂、D₃ 色谱图 (50μg/mL)

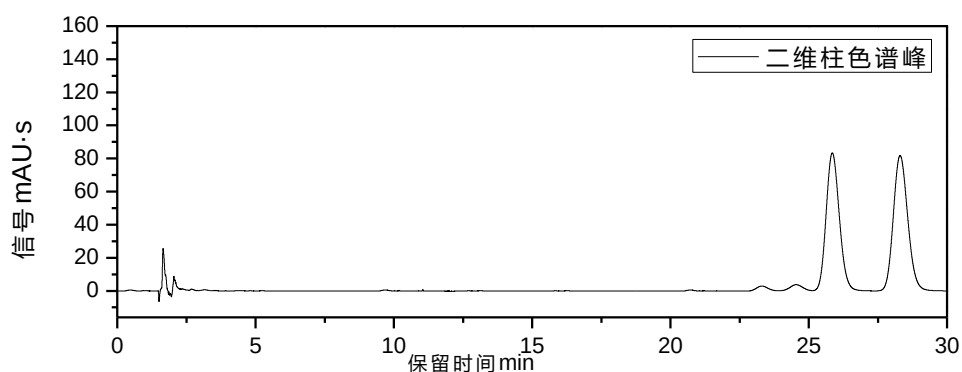


图 2 二维柱维生素 D₂、D₃ 色谱图 (50μg/mL)

表 4 一二维柱分离维生素 D₂、D₃ 结果表

序号	名称	保留时间(min)	分离度
一维柱	维生素 D (D ₂ +D ₃)	20.698	/
二维柱	维生素 D ₂	25.850	/
	维生素 D ₃	28.300	2.684

3.2 重复性

以 Kromstation 色谱数据工作站搭配 EClassical 3200L 在线柱切换（二维液相）系统，连续进样 7 针，重复性谱图及数据如下：

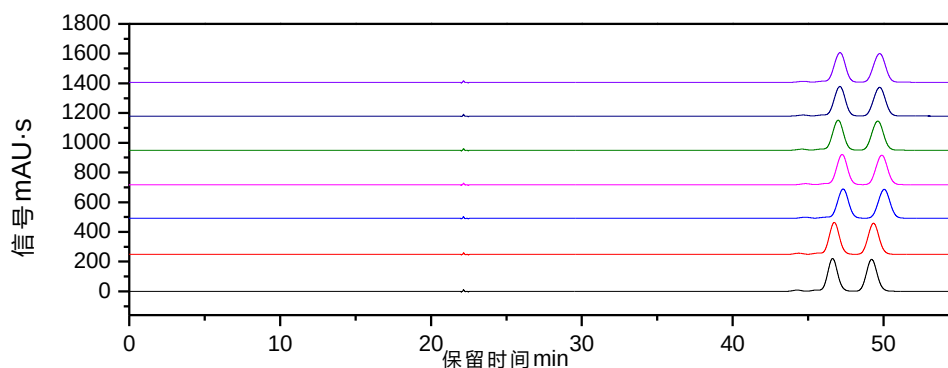


图 3 二维液相系统分离维生素 D₂、D₃ 重复性色谱图

表 5 二维系统分离维生素 D₂、D₃ 重复性结果表

序号	VD ₂ 保留时间 (min)	VD ₃ 保留时间 (min)	VD ₂ 峰面积 (mAU·s)	VD ₃ 峰面积 (mAU·s)	分离度 Rs
1	47.117	49.748	10621.480	10735.997	1.809
2	47.112	49.748	10470.863	10609.640	1.836
3	47.000	49.621	10519.704	10634.681	1.860
4	47.261	49.889	10480.513	10628.605	1.891
5	47.327	50.052	10376.377	10503.172	1.934
6	46.740	49.340	10195.095	10642.630	1.991
7	46.486	49.087	10232.635	10703.788	2.121
RSD	0.6%	0.7%	1.5%	0.7%	/

根据以上实验数据，Kromstation 色谱数据工作站可以实现对 EClassical 3200L 二维系统的全反控。根据 GB 5009.296-2023 《食品安全国家标准 食品中维生素 D 的测定》第二法：在线柱切换-反相液相色谱法（二维液相色谱法）分离维生素 D₂、D₃。Kromstation 色谱数据工作站可以自动实现二维系统的阀切换完成维生素 D₂、D₃ 的分离，且实验结果具有良好的重复性和分离度。满足对维生素 D 同分异构体的分离检测需求。