

# 维生素 D 二维色谱系统分 析检测解决方案

## 目录

前言 .....	1
二维液相色谱 .....	1
1、仪器设备与试剂 .....	4
2、实验方法 .....	5
2.1 样品溶液配制 .....	5
2.2 色谱条件 .....	5
3、实验结果 .....	6
3.1 实验谱图 .....	6
3.2 重复性 .....	7

## 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 D<sub>3</sub> 与 D<sub>2</sub>。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 D<sub>3</sub> 可诱导此蛋白合成，促进 Ca<sup>2+</sup> 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 10 μg（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。

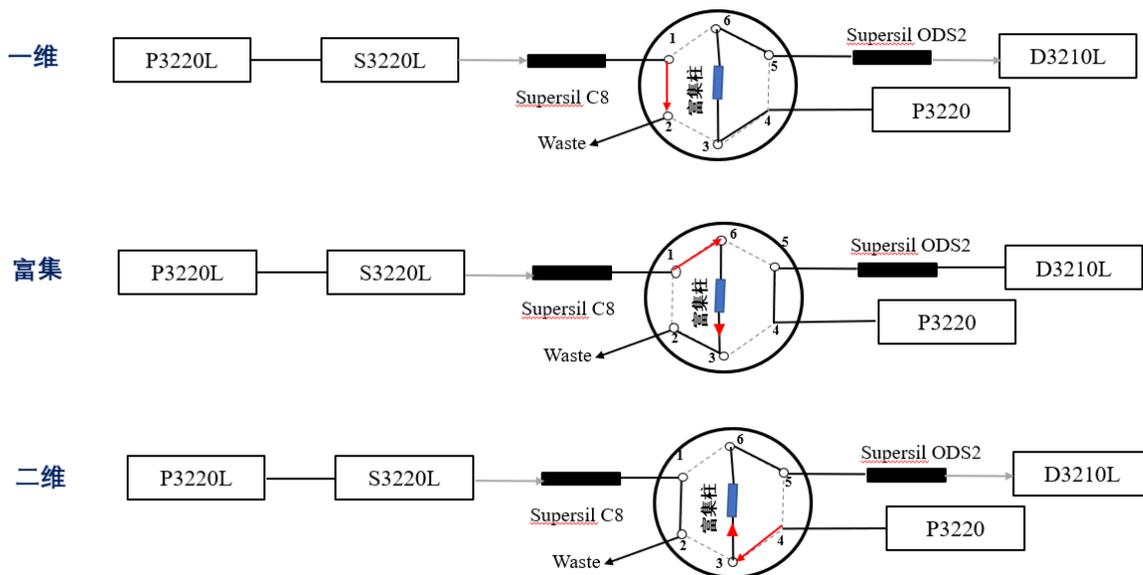
## 二维液相色谱

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。



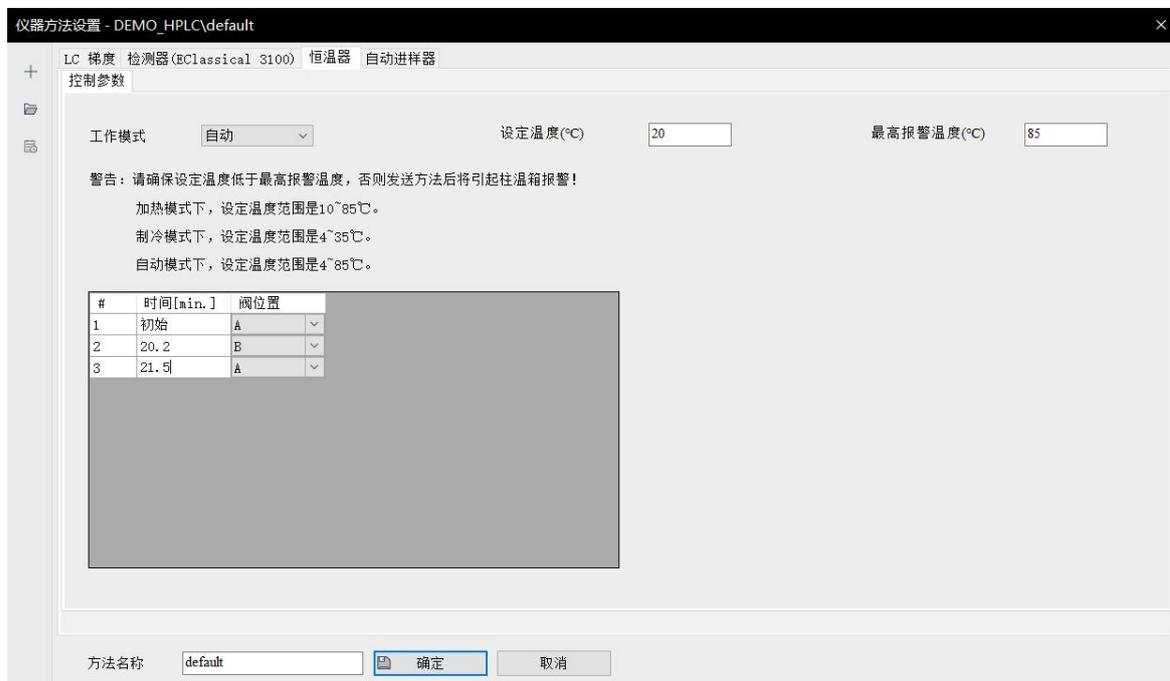
EClassical 3200L 系统外观图



维生素 D 二维系统阀切换示意图



Kromstation 工作站配置图



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	D3210分析池	2 台
3	P3220L 二元高压恒流泵	1 台
4	P3220 二元高压恒流泵	1 台
5	O3230L 色谱柱恒温箱	1 台
6	S3220L 自动进样器	1 台
7	Kromstation 色谱数据工作站（基础版）	1 套
8	柱温箱系统切换套件 OS3230-06S041	1 套
9	Supersil C8 3 $\mu$ m 4.6*150mm 色谱柱	1 支
10	SinoPak C18 3 $\mu$ m 4.6 $\times$ 150mm 色谱柱	1 支
11	Supersil ODS2 5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 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	18.2M $\Omega$
4	维生素 D <sub>2</sub> 标准品	98%
5	维生素 D <sub>3</sub> 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(0~1000 $\mu$ L, 0~5000 $\mu$ L)、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 D<sub>2</sub> 标准储备溶液 (1mg/mL): 准确称取 50mg 维生素 D<sub>2</sub> 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 D<sub>3</sub> 标准储备溶液 (1mg/mL): 准确称取 50mg 维生素 D<sub>3</sub> 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 D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub> 混合标准溶液 (50 μg/mL): 分别吸取维生素 D<sub>2</sub> 标准储备溶液 (1mg/mL)、维生素 D<sub>3</sub> 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 μm, 120Å, ID4.6×150mm (一维色谱柱)

SinoPak C18 3 μm, 120 Å, ID4.6×150mm (二维色谱柱)

Supersil ODS2 5 μm, 300 Å, ID4.6×10mm (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(μL): 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

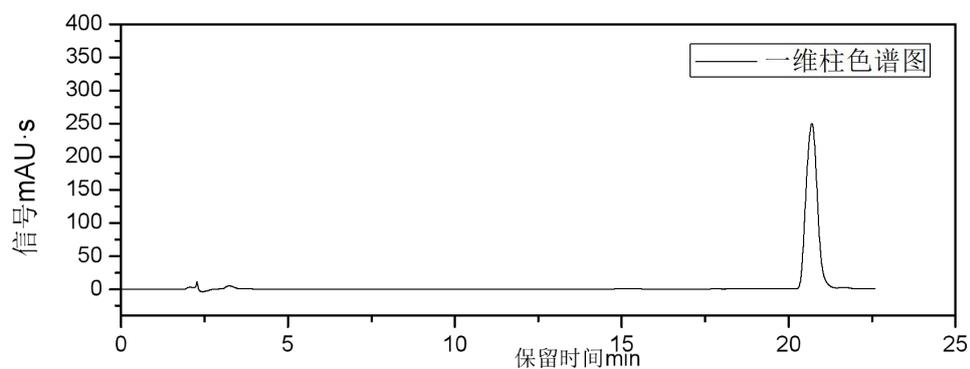


图1 一维柱维生素 D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub> 色谱图 (50 μg/mL)

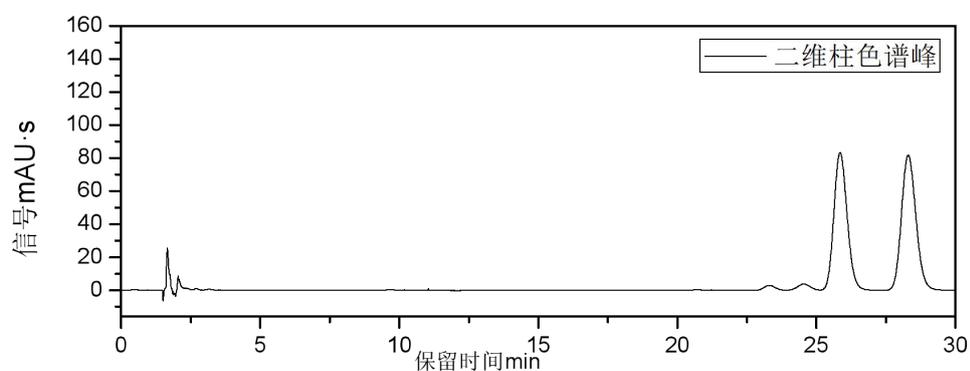


图2 二维柱维生素 D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub> 色谱图 (50 μg/mL)

表4 一二维柱分离维生素 D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub> 结果表

序号	名称	保留时间(min)	分离度
一维柱	维生素 D (D <sub>2</sub> +D <sub>3</sub> )	20.698	/
二维柱	维生素 D <sub>2</sub>	25.850	/
	维生素 D <sub>3</sub>	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：

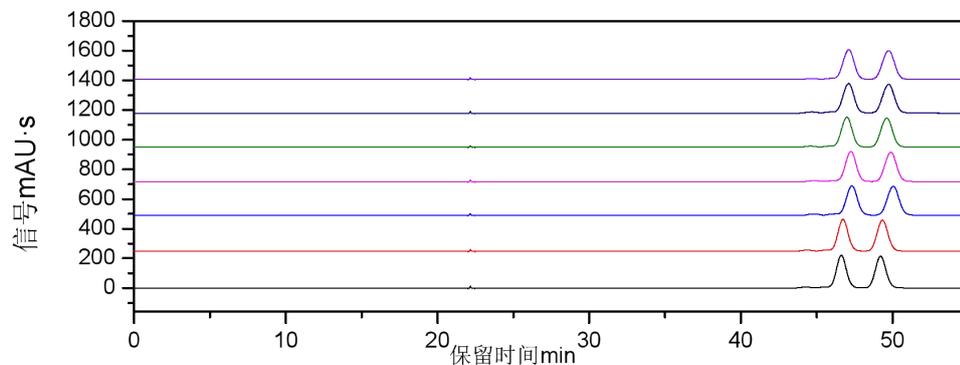


图 3 二维液相系统分离维生素 D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub> 重复性色谱图

表 5 二维系统分离维生素 D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub> 重复性结果表

序号	VD <sub>2</sub> 保留时间 (min)	VD <sub>3</sub> 保留时间 (min)	VD <sub>2</sub> 峰面积 (mAU·s)	VD <sub>3</sub> 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
<b>RSD</b>	<b>0.6%</b>	<b>0.7%</b>	<b>1.5%</b>	<b>0.7%</b>	<b>/</b>

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 D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>。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 D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub> 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。

走进依利特

[www.eliteHPLC.com](http://www.eliteHPLC.com)

来到依利特

大连公司

中国·辽宁·大连市高新技术产业园区七贤岭学子街2号

苏州公司

中国·江苏·苏州工业园区金鸡湖大道99号苏州纳米城西北区14栋501

了解依利特

销售服务免费热线：400-66-35483 转 3

(非工作时间请拨打13604289881)

尊享依利特

售后服务免费专线：400-66-35483 转 1(仪器)/转 2(耗材)

(非工作时间请拨打13604289881)

分享依利特



抖音官方账号



微信售后小程序



依利特视频号



依利特服务号



依利特订阅号