

## 维生素D的气相色谱分析法

### 一、应用

本方法已被证明可用于鱼肝油,也可用于富含维生素D的(即 $\geq 1$ 微克/克)的其他海产品的油。(注1)

### 二、原理

试样和内标一同进行皂化,将不皂化物用二乙醚提取。甾醇用沉淀法除去,第一次用10%的甲醇水溶液,第二次用含有4%毛地黄皂苷溶液的10%甲醇水溶液以形成毛地黄皂苷化物。维生素D用三氯化铋异构化为异速甾醇,然后在氧化铝上用色谱法将此异构物同维生素A、维生素E以及其他干扰物质分离。用七氟丁酸酐使异速甾醇形成卤代酯。再用石油醚提取此卤代酯,并用电子捕获气液色谱法进行测定。

### 三、仪器

Kuderna-Danish(K, D)蒸发器。

离心机

色谱柱:30厘米 $\times$ 1厘米内径,有多孔淀土的聚四氟乙烯龙头。

带有电子捕获检测器的气-液色谱仪。Pye104型的色谱仪(或其他合适的仪器),配有镍-63电子捕获检测器。

玻璃柱,长215厘米,内径3毫米,用60至80目的带有3%OV-17(苯基[50%]甲基硅酮)的Gas Chrom Q。

柱温,230 $^{\circ}\text{C}$

检测器温度,285 $^{\circ}\text{C}$

氮载气,流量65毫升/分钟。

### 四、试剂

维生素D<sub>2</sub> Koch Lighf 实验室公司,结晶纯 $4 \times 10^7$ 国际单位/克·内标:准确称取250毫克维生素D<sub>2</sub>,溶解于500毫升氯仿中。用石油醚(40—60 $^{\circ}\text{C}$ )稀释此溶液

5毫升至100毫升即为25微克/毫升的工作标准维生素D<sub>2</sub>溶液。

氯仿·分析试剂级

酞醇

无水乙醇

氢氧化钾溶液,60重量/体积水溶液·溶解60克氢氧化钾于蒸馏水中,并稀释至100毫升。

石油醚、沸腾范围40—60 $^{\circ}\text{C}$

二乙醚,分析试剂级

酚酞

无水硫酸钠,粒状,分析试剂级

甲醇,分析试剂级

毛地黄皂苷,纯, Koch Lighf 实验室公司

三氯化铋溶液,20%(重量/体积)在氯仿中,溶解20克分析试剂级的三氯化铋于氯仿中,用氯仿稀释至100毫升,过滤。

酒石酸溶液,40%(重量/体积)水溶液。溶解分析试剂级(+)—酒石酸于水中并稀释至100毫升。

二乙醚—石油醚。混合等体积的二乙醚和石油醚(沸腾范围40—60 $^{\circ}\text{C}$ )。

氨。Woelm中性活性2 $\frac{1}{2}$ 。在1克Woelm中性氧化铝中加入35毫升蒸馏水。激烈摇动直到放热反应停止。冷却,贮存在密闭容器内。

四氢呋喃。Koch Lighf 实验室公司

七氟丁酸酐, Koch Lighf 实验室公司,用巴氏德吸移管小心将溶液转移到小玻璃安瓿瓶中(每安瓿约1—2毫升),密封。

碳酸氢钠溶液,2%(重量/体积)。溶解2克碳酸氢钠分析试剂在水中并稀释至100毫升。

## 五、步骤

### (a) 皂化和提取

1、称取2克至10克鱼肝油(随予期强度而定)到250毫升平底烧瓶中

2、用吸移管小心加入1毫升内标维生素D<sub>2</sub>溶液。

3、加入20毫克酞醇, 60毫升乙醇, 10毫升60%的氢氧化钾溶液和10毫升的石油醚。

4、沸腾回流30分钟(避光)

5、冷却

6、用二份80毫升的水将烧瓶内容物转移到500毫升的分液瓶中。

7、加100毫升二乙醚到提取液中。轻摇分液瓶, 间歇打开瓶塞以释放压力。

8、待二相完全分开

9、将下层水相流入另一分液漏斗中

10、再用每份50毫升的二乙醚提取水相三次。在此过程可将溶液比较强烈的摇动。

11、加50—100毫升水到混合的乙醚提取液中并轻轻回荡。

12、弃去下面的水相

13、继续用每份50毫升的水轻轻摇动水洗。直到洗出液无碱性为止(用酚酞测试)。

14、在排去最后一次水洗水后, 让乙醚提取液静置几分钟, 并细心排去分层的水。

15、加少量颗粒无水硫酸钠到提取液中并摇动之。

16、定量转移乙醚提取液到Kuderna-Danish蒸发器, 并蒸发到仅剩几毫升为止

17、用几毫升乙醚轻洗烧瓶, 让其排放几分钟。

18、移去管子, 在氮气流下蒸发提取液至干燥。

19、溶解残留物到9毫升甲醇中(此阶段可能需要加温), 并加入1毫升水, 摇动溶液。

### (b) 甾醇的沉淀:

1、将此溶液放在10毫升10%的甲醇溶液中, 并于0℃下至少搁一小时。

2、用2000转/分钟离心机分离5分钟。

3、将上层清液轻轻倒入一离心管中, 离心管内有10毫升溶解有0.4克毛地黄皂苷的10%甲醇水溶液。细心将上层清液全部转移。

4、在冰箱中静置过夜

5、在2000转/分钟离心分离5分钟

6、将上层清液轻轻倒入50毫升或100毫升的分液漏斗。

7、用10毫升石油醚轻轻摇动以提取溶液, 间歇释出压力。

8、待二相完全分离

9、将下层相转移到第二个分液漏斗

10、转移石油醚层到第三个含有少量水的分液漏斗中。

11、用每份10毫升的石油醚再重复提取二次。

12、用等量的水洗混合的石油醚提取液三次, 每次弃去下层水相。

13、用少量粒状无水硫酸钠干燥提取液。

14、定量转移提取液到10毫升刻度管中, 并在氮气流下蒸发至干。

15、溶解残留物在0.2毫升的氯仿中。

### (C) 异构化

1、加2毫升20%(重量/体积)的三氯化锡氯仿溶液到上述0.2毫升的氯仿溶液中。摇动刻度管, 并在室温下静置15秒钟。

2、加入3毫升40%(重量/体积)酒石酸水溶液以停止反应。激烈摇动悬浊液直至二相分层。

3、加入5毫升石油醚并激烈摇动。

4、令二相完全分开

5、用巴氏德吸移管将石油醚层转移到50毫升分液器中。

6、再用5毫升石油醚提取水相。

7、用同一巴氏德吸移管将石油醚层转移到50毫升分液器中。

8、用等体积的水摇动和水洗混合的提取液。

9、待二相完全分离。

10、流出并弃去下面水相。

11、用同样方法洗提取物二次，每次弃去水相。

12、加少量粒状无水硫酸钠到提取液中并激烈摇动之。

13、转移提取液到带刻度的10毫升管中，并在氮气流下蒸发至刚干燥。

14、将残留物再溶解于约1毫升的50%二乙醚—石油醚中。

(a) 氧化铝柱层析：

1、关闭层析柱的顶部，并用50%二乙醚—石油醚填充柱至一半高度

2、加入12克中性氧化铝，活性2+。

3、排去过量的溶剂，直到氧化铝表面的2毫米处。

4、用二份每份1毫升的50%二乙醚—石油醚将(C)14中的提取物转移到柱上，二次中间加到氧化铝柱的提取物和洗液应在氧化铝表面的二毫米之内。

5、用50%二乙醚—石油醚洗脱柱。

6、弃去柱洗出液的最初90毫升(第一部分，注2)

7、收集柱洗出液的其次140毫升(第二部分，注2)

8、用少量粒状无水硫酸钠干燥从柱上洗出的第二部分。

9、将溶液转移到Kuderna-Danish蒸发器，蒸发器上装有10毫升刻度管，用小量50%二乙醚—石油醚淋洗硫酸钠。

10、将溶液蒸发至小体积，用小量的50%二乙醚—石油醚淋洗Kuderna-Danish蒸发器，并让排泄数分钟。

11、继续在10毫升刻度管内于氮气流下蒸发至干。

12、将残留物溶解在1毫升四氢呋喃中。

(e) 酯化

1、将此1毫升四氢呋喃溶液置冰浴上。

2、用一个250微升注射器加入0.1毫升的七氟丁酸酐。摇荡并放在冰浴上1分钟。

3、加10毫升水以停止反应。

4、加2毫升石油醚到溶液内，摇动和提取酯。

5、待二相完全分层。

6、用一个巴氏德吸移管排出下层水相并弃去。

7、加10毫升水到管中并摇荡之，待二相分层，按前法除去水相。

8、用10毫升2%的碳酸氢钠溶液洗提取物，弃去水相。

9、再用10毫升水洗提取物，弃去水相。

10、让管静止数分钟。用巴氏德吸移管小心移除任何分层出来的水。

11、用石油醚调整提取物至方便的体积(通常为2毫升)。

(f) 气液色谱分析

1、注射合适量的提取物(通常为2微升)到气液色谱柱上。

2、测定保留时间，只注射等分试样的D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>标准，标准是从C3和e5中取得的。(约5—10毫微克就可就得合适大小的峰)

六计算

设：维生素D<sub>2</sub>峰高 = H<sub>2</sub>

维生素D<sub>3</sub>峰高 = H<sub>3</sub>

加上的维生素D<sub>2</sub>的重量 = D<sub>2</sub> (微克)

试样的重量 = W (微克)

维生素D<sub>3</sub>的应答为1.5 × 维生素D<sub>2</sub>的

应答则：试样中维生素D<sub>3</sub>的含量(微克/克)

$$= \frac{H_3 \times D_2}{H_2 \times 1.5 \times W}$$

或维生素D<sub>3</sub>含量(国际单位/克)

$$= \frac{H_3 \times D_2}{H_2 \times 1.5 \times W} \times 40$$

注:

1、本方法对含维生素量低的其他食品不适用。例如人造黄油或奶粉(0.01—0.10微克/公斤),因为含有较高量干扰物质。为除去这些干扰物,需要在(e)11步骤时用制备薄层色谱法提纯,并且气相色谱仪要和质谱仪结合以便在测定阶段有足够的灵敏度和专一性。

2、发现氧化铝的活性有变化,因此每批在制备中或制备后都需要校正,校正方法如下

2.1使100微克维生素D异构化(见3)

2.2转移到氧化铝柱上,用50%二乙醚—石油醚洗脱(见4),收集以下组分:80毫升,5毫升,5毫升,120毫升,10毫升,10毫升,10毫升,10毫升。

2.3用不同组分中异速甾醇在278, 288和301毫微米处的特性吸收以得到异构化维生素D的正确洗脱型式。

另外,也可用少量的维生素D的起始重量(10毫微克),在微生物作用后用气液色谱法测定洗脱型式。(收稿日期79.10)

陈祖荫译自英文《The Analysis of Nutrients in Food》1978

(上接第72页)

不到体积部分,移去分馏柱。这样最小可达到0.2~0.4毫升。

c)蒸发由分离样品时获得脂肪和农药残留物溶剂:在清洁干燥气流下,盛至有萃取液的烧杯于35~40℃水浴上,进行加热蒸发,等溶剂蒸发完毕,就立即除去热和停止通入气流,让残余水份自然地蒸发掉。(收稿日期80.1)

鄢伟章 译自英文《乳制品标准检验方法》资料 陈祖荫校

## 失色水化松软肉(PSE) 和深色坚实干燥肉(DFD) 的快速检定法

对猪肉和牛肉的大量研究表明在死后几分钟内可以将失色水化松软肉(PSE)和深色坚实干燥肉(DFD)同正常的肉区分开,这是因为它们缺乏象糖原和三磷酸腺苷那样能量丰富的物质。PSE和DFD肉只含有少量的三磷酸腺苷,有高浓度的肌苷酸和肌苷,这是由于腺苷嘌呤核苷酸的脱氨作用形成的。相反,正常的肉含有高水平的三磷酸腺苷和低浓度的肌苷酸和肌苷。

三磷酸腺苷和其他的腺嘌呤核苷酸在260毫微米处呈现最大的吸光率,而肌苷酸、肌苷和次黄嘌呤则在248.5毫微米处呈现最大的吸光率。通常把在250和260毫微米处的吸光率之比(R)作为商品腺嘌呤和肌苷核苷酸制剂纯度的指标。对肌苷核苷酸来说,这一比值为0.78—0.80,而肌苷酸和肌苷则其比值分别为1.68和1.70。所以,正常的肉在刚屠宰后的R值应该低,而PSE和DFD肉则有高的R值。对不同的猪肉和牛肉进行了大量研究后证实了这些设想。所以从R值基础可以将PSE肉DFD肉和正常的肉区分开。

PSE的PH值低于6.1,而DFD肉的PH值则高于6.1。用这些标准测定R值和PH值可以区分PSE肉、DFD肉和正常肉。用这样一种快速方法可以在3—4分钟内区分正常肉,PSE肉和DFD肉。(收稿日期80.3)

陈祖荫 译自英文《22nd meat Research Congress Sweden》1976