

乳制品检测解决方案



ELITEHPLC

ELITE
(+86) 400-66-35483

 www.elitehplc.com

 info@elitehplc.com



目录

第 1 章	仪器系统配置	1
第 2 章	乳制品中三聚氰胺检测	2
2.1	三聚氰胺的基本性质和检测方法.....	3
2.2	按 GB/T 22388—2008 方法检测.....	4
2.3	按 GB/T 22100—2008 方法检测.....	13
第 3 章	乳制品中免疫球蛋白 IgG 检测	19
3.1	样品预处理.....	19
3.2	色谱条件.....	19
3.3	谱图结果.....	19
第 4 章	牛奶中硫氰酸钠的检测	20
4.1	试剂及相关溶液配制.....	20
4.2	样品前处理.....	20
4.3	色谱条件.....	21
4.4	谱图结果.....	21
第 5 章	乳制品中维生素的检测	22
5.1	HPLC 法测定维生素含量的标准.....	22
5.2	仪器配置简表.....	23
5.3	维生素 A 的含量测定.....	24
5.3.1	反相高效液相色谱法.....	24
5.3.2	正相高效液相色谱法.....	26
5.3.3	紫外分光光度计法.....	27
5.4	维生素 D 的含量测定.....	29
5.4.1	反相高效液相色谱法.....	29
5.4.2	正相高效液相色谱法.....	32
5.5	维生素 E 的含量测定.....	33
5.5.1	反相高效液相色谱法.....	33
5.5.2	正相高效液相色谱法.....	35
5.6	维生素 B1 的测定.....	37
5.7	维生素 B2 的测定.....	38
5.8	维生素 B3 (烟酸和烟酰胺) 的测定.....	39
5.9	泛酸的测定.....	41
5.10	维生素 B6 的测定.....	42
5.11	维生素 K1 的测定.....	43
5.12	叶酸的测定.....	45
5.13	维生素 B12 的测定.....	46
附录 1	维生素标准溶液校正方法.....	48

第1章 仪器系统配置

EClassical 3200 高效液相色谱系统，是依利特设计开发的具有自主知识产权的新型高效液相色谱仪，集聚了依利特多年来技术的传承、经典的延续，并且含有多个创新专利技术，在满足不断升级的法规要求的同时，又重新定义国产液相的外观设计，完善分析过程中的自动性、连续性、完整性，展现实际选择时的灵活性、实验室结果的稳定性，满足了实验室低成本、高效率运行的可行性。

表 1-1 EClassical 3200 高效液相色谱系统配置清单

序号	仪器名称	等度系统	梯度系统
1	P3200高压恒流泵	1台	2台
2	UV3200紫外-可见检测器	1台	1台
3	T溶剂瓶托盘	1台	1台
4	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个	1个
5	ZJ-1阀支架	1个	1个
6	TD-1-15梯度混合器	--	1个
7	Kromstation色谱数据处理工作站	1套	1套
8	EClassical 3200系统工具包	1套	1套
9	Supersil 5 μ m 4.6 \times 200色谱柱	1支	1支
10	500mL溶剂瓶（无色）（选配）	2只	2只
11	O3200色谱柱恒温箱（选配）	1台	1台
12	S3200自动进样器（选配）	1台	1台



第2章 乳制品中三聚氰胺检测

大连依利特分析仪器有限公司作为国内知名厂家，秉承着“质量更佳、服务更优、创新更快”的理念，二十年来为食品安全、药品检测及高校应用等众多行业提供着完善的分析方法及先进的仪器配置。从苏丹红、孔雀石绿到“三鹿奶粉三聚氰胺”事件，关系着国计民生的“食品安全”问题一次次为我们敲响警钟，并引起社会广泛关注。针对“三聚氰胺”事件，依利特人在第一时间做出反应，荣获由国家认证认可监督管理委员会颁发的“能力验证合格实验室证书”，并且按照 GB/T 22388-2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》、GB/T 22400-2008《原料乳中三聚氰胺快速检测 液相色谱法》的国家标准，在经过大量实验验证后，提供出符合国标的三聚氰胺检测解决方案，包括分析方法验证及推荐仪器配置在内的全套解决方案。



2.1 三聚氰胺的基本性质和检测方法

三聚氰胺（英文名 Melamine），是一种三嗪类含氮杂环有机化合物，重要的氮杂环有机化工原料，简称三胺，分子式 $C_3N_6H_6$ 、 $C_3N_3(NH_2)_3$ ，分子量 126.12。

三聚氰胺是一种低毒的化工原料。动物实验结果表明，其在动物体内代谢很快且不会存留，主要影响泌尿系统。

由于食品工业蛋白质含量测试方法的缺陷，三聚氰胺也常被不法商人用作食品添加剂，以提升食品检测中的蛋白质含量指标，因此三聚氰胺也被人们称为“蛋白精”。

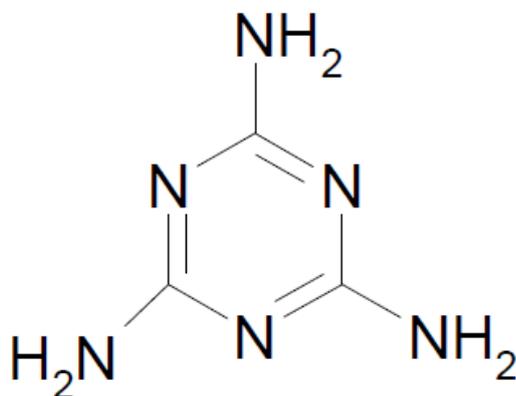


图 2-1 三聚氰胺结构式

目前最为常用的三聚氰胺检测手段有液相色谱法、气相色谱-质谱法、液相色谱-质谱法等。其中，液相色谱法具有灵敏度高、准确、可靠、仪器成本低等优势，因而是检测三聚氰胺的理想方法。

三聚氰胺是强极性化合物，在传统的反相 C18 色谱柱上保留很差，通常采用离子对试剂使其良好的保留。因此，反相离子对模式是最为常用的分析三聚胺分离模式之一。

此外，在酸性条件下，三聚氰胺分子易带上正电荷，离子交换模式对其有良好的选择性，在实际运用中也有不错的效果。

2.2 按 GB/T 22388—2008 方法检测

试样用三氯乙酸溶液-乙腈提取，经混合型阳离子交换固相萃取柱净化后，用高效液相色谱测定，外标法定量。

适用于原料乳、乳制品以及含乳制品中三聚氰胺的定量测定。

2.2.1 试剂配制

● 流动相

- 1) 离子对试剂缓冲液：准确称取 2.10 柠檬酸和 2.16g 辛烷磺酸钠，加入约 980mL 水溶解，调节 pH 至 3.0 后，定容到 1L，并用 0.45 μ m 水系微孔滤膜过滤备用。
- 2) 用量筒分别量取 900mL 离子对试剂缓冲液和 100mL 乙腈，混合均匀，超声脱气 10min。



[注意]

称取辛烷磺酸钠时，需注意其分子量，若含有结晶水，则需换算。如某辛烷磺酸钠 C₈H₁₇O₃S H₂O，分子量 234.29。则配制流动相时，该种离子对试剂的称取量应为 2.34g。



[注意]

离子对缓冲液在不调pH值以前，其pH值应低于3.0，因此应选用碱性溶液调整至3.0。此环节建议采用2mol/L NaOH溶液作为pH调整用试剂。



[注意]

选用标准量筒量取两种液体，保证量具本身的准确性。



[注意]

不要采用容量瓶混合缓冲液与乙腈然后定容。

● 三聚氰胺标准品储备液

准确称取 100.0mg（精确到 0.1mg）三聚氰胺标准品于 100mL 容量瓶中，用 50% 甲醇水溶液溶解并定容至刻度，配制成浓度为 1mg/mL 的标准储备液，于 4℃ 避光保存。

标准系列可采用上述储备液，用流动相逐级稀释。



[注意]

标准储备液可存放 1~2 个月，标准系列有效期一般为 1~2 周，最好现用现配。



[注意]

配制标准系列时，建议采用同一厂家同一批次的容量瓶或将容量瓶标定后使用，以保证标准系列的线性。

- 1%三氯乙酸溶液

准确称取 10g 三聚乙酸于 1L 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀后备用。

- 5%氨化甲醇溶液

准确量取 5 mL 氨水和 95 mL 甲醇，混匀后备用。



[注意] 确保氨水有效期，以免由于存放时间过长造成挥发，使得有效成分缺失。

2.2.2 样品前处理

- 蛋白沉淀

称取2.00g（精确至0.01g）试样于50mL具塞塑料离心管中，加入15mL1%三氯乙酸溶液和5mL乙腈，超声提取10min，再振荡提取10min后，以不低于4000r/min离心10min。上清液经三氯乙酸溶液润湿的滤纸过滤后，用三氯乙酸溶液定容至25mL，移取5mL滤液，加入5mL水混匀后做待净化液。



[注意] 为了获得最佳的离心效果，如果离心机转速允许，可以设定转速为 8000~10000r/min。



[注意] 过滤纸时，一方面需要控制速度，另一方面过滤完后需要少量多次用 1%三氯乙酸溶液洗涤滤纸以保证回收率。



[注意] 若离心效果理想，上清液非常澄清，过滤纸的环节可以省略。一方面可以简化操作，另一方面可以避免由于此环节造成的样品损失。



[注意] 当样品脂肪含量较高时，请参照 GB/T 22388 先进行液-液分配除脂后，再进行净化。

● 样品净化

依次用3mL甲醇和5mL水将固相萃取小柱活化。将上节中的待净化液转移至固相萃取柱中。依次用3mL水和3mL甲醇洗涤，抽至近干后，用6mL氨化甲醇溶液洗脱。洗脱液于50℃下用氮气吹干，残留物（相当于0.4g样品）用1mL流动相定容，涡旋混合1min，过0.45 μm油系微孔滤膜后，供HPLC测定。



[注意] 整个固相萃取过程流速不超过 1mL/min。



[注意] 上柱过程中要避免气泡上柱，一旦气泡进入小柱，将大大影响样品的回收率。

2.2.3 色谱条件

色谱柱：Elite MSP C18 柱 5μm 4.6×250mm
 流动相：离子对试剂缓冲液/乙腈=90/10 (v/v) 混匀
 流速：1.0mL/min
 检测波长：240nm
 进样体积：20μL
 柱温：40℃



[注意] 由于大多数仪器配置均为 7725i 手动进样阀，定量环体积 20μL。为了获得更为准确的测试结果，建议采用满定量环的进样方式，即进样量为 5 倍或 5 倍以上定量环体积。

2.2.4 典型谱图

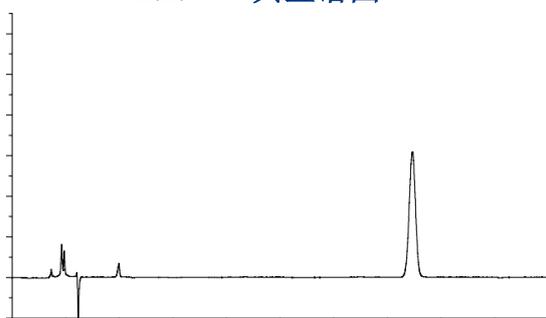


图 2-2 2 μg/mL 三聚氰胺标准品典型谱图

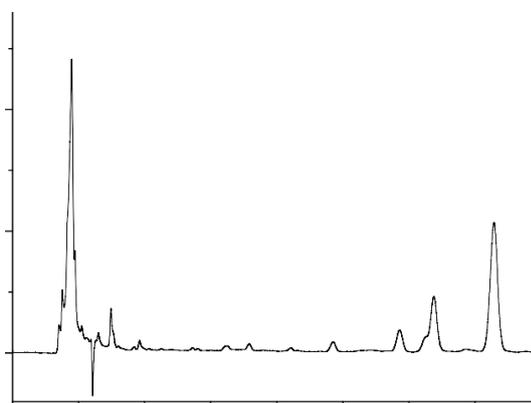


图 2-3 某加标奶粉典型谱图

2.2.5 性能指标

- 连续进样重复性

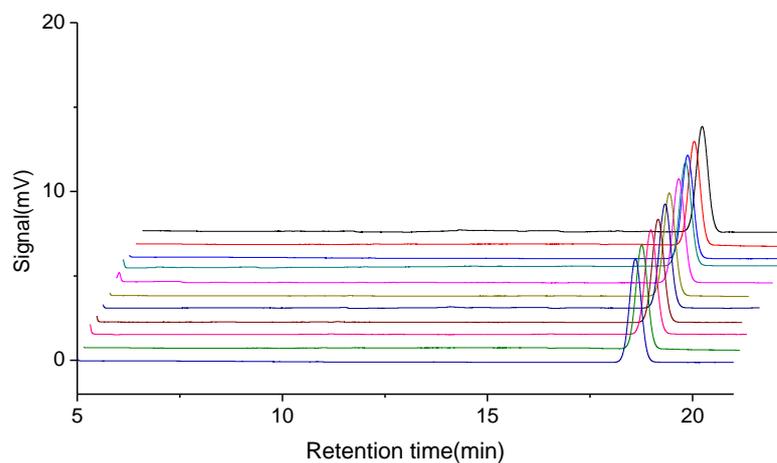


图2-4 2 µg/mL标准品11针连续进样叠加谱图

表2-1 2 µg/mL标准溶液连续进样11次重现性数据

编号	保留时间/min	峰面积/mV sec
1	18.383	124.65
2	18.354	124.49
3	18.353	124.31
4	18.354	124.49
5	18.460	124.81
6	18.451	124.51
7	18.386	124.31
8	18.442	124.39
9	18.428	124.85
10	18.413	124.70
11	18.353	124.31
平均值	18.398	124.53
RSD/%	0.23	0.16

● 线性范围

标准系列浓度分别为：0.8、2、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ ，线性相关系数为0.9996。

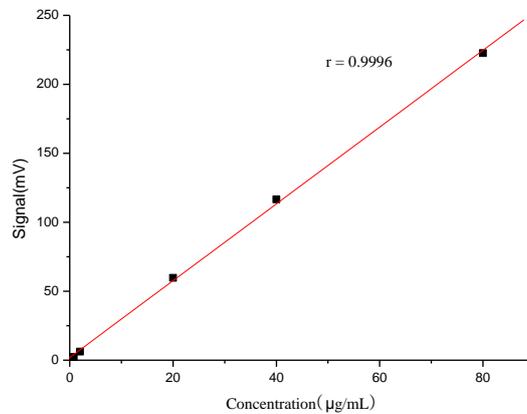


图2-5 三聚氰胺浓度与峰面积关系



[注意]

样品测试过程中，应保证其三聚氰胺含量在该线性范围之内，若超出该范围，需将样品进一步稀释或浓缩。

● 方法检出限和方法定量限

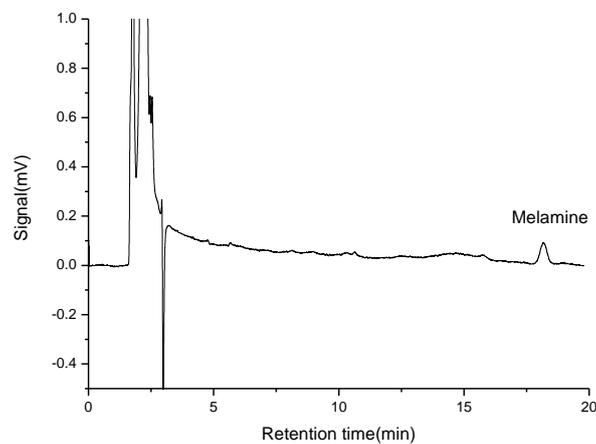


图2-6 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 三聚氰胺标准品谱图

以3倍信噪比峰高对应的浓度换算为方法检出限，以10倍信噪比峰高对应的浓度换算为方法定量限。

表2-2 测试三聚氰胺方法检出限及定量限

计算方法	方法检出限(mg/kg)	方法定量限(mg/kg)
校正曲线方法	0.016	0.055



[注意] 此为方法检出限，并已经将前处理样品稀释倍数考虑在内。



[注意] 检出限、定量限与检测器自身的灵敏度及噪声大小有关，不同检测器测试结果会存在一定差异。

● SPE 小柱加标回收率

表2-3 Thermo Retain-CX 回收率测试结果

SPE型号	Retain-CX 60mg/3mL					
	1	2	3	1	2	3
平行测试						
理论值(μg/mL)	0.8			1.0		
计算值(μg/mL)	0.816	0.815	0.793	1.03	1.04	0.966
回收率(%)	102	102	99.1	103	104	96.6
平均回收率(%)	101			101		

● 方法准确性

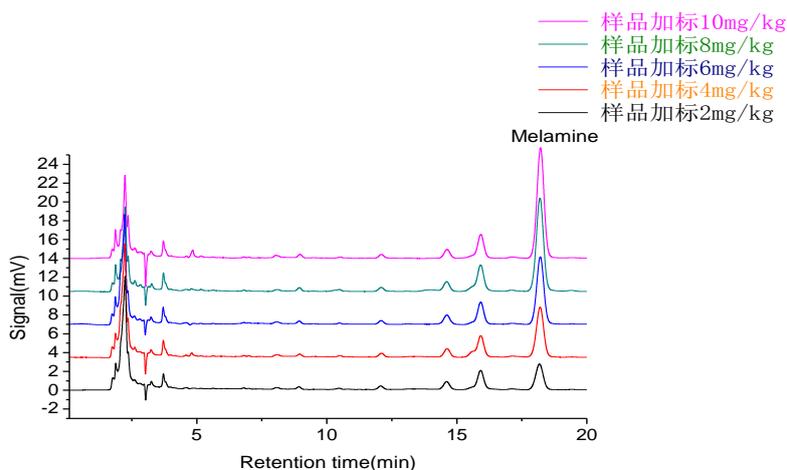


图2-7 不同水平的加标成品奶叠加谱图

表2-4 成品奶加标回收率结果

加标量(mg/kg)	计算结果(mg/kg)	回收率%
2.0	1.80	90.0%
4.0	3.87	96.8%
6.0	5.30	88.3%
8.0	7.58	94.8%
10.0	8.84	88.4%



[注意] 加标回收率测试通常是在阴性样品上加标，这样的加标结果最具代表性，能较好的反应样品在整个前处理过程的收率情况。

● 方法稳定性

将同一未知样品一分为三，连续测试结果如下。

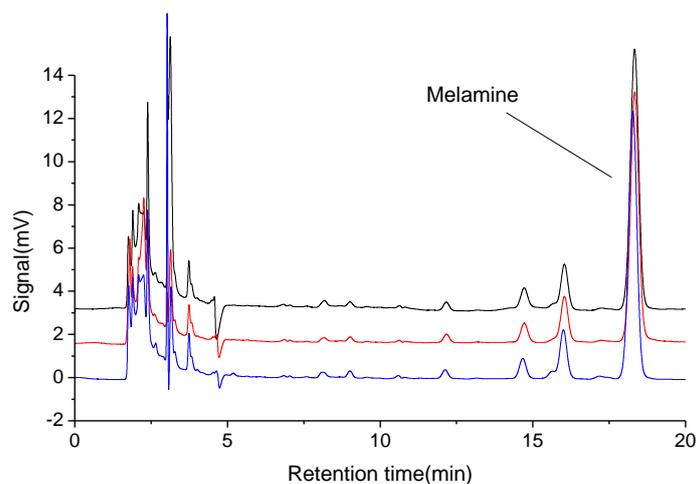


图2-8 某未知样品平行测试叠加谱图

表2-5 方法稳定性测试结果

编号	计算结果(mg/kg)
1	9.54
2	9.57
3	9.79
平均值	9.63
RSD%	1.42

2.2.6 样品谱图

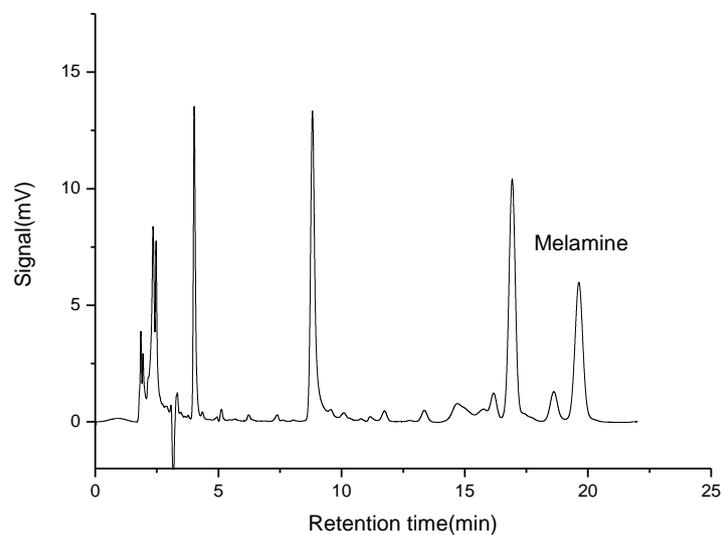


图 2-9 某奶粉样品谱图
阳性样品，含量：5.58mg/kg

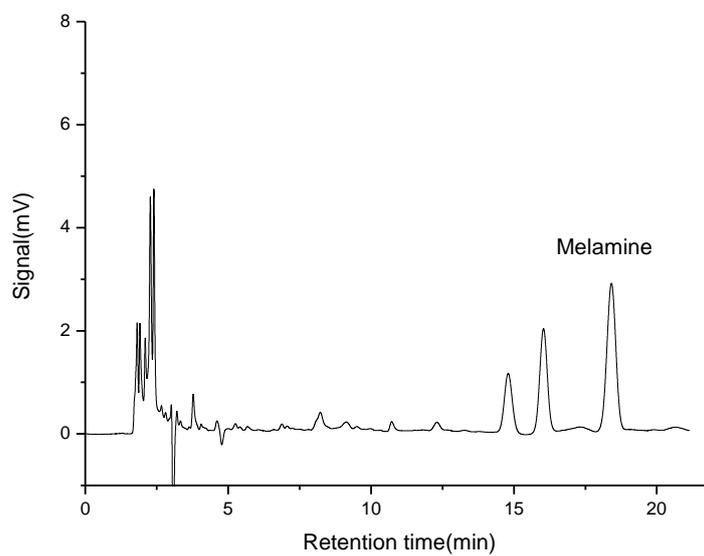


图 2-10 某鲜奶样品谱图
阳性样品，含量：2.73mg/kg

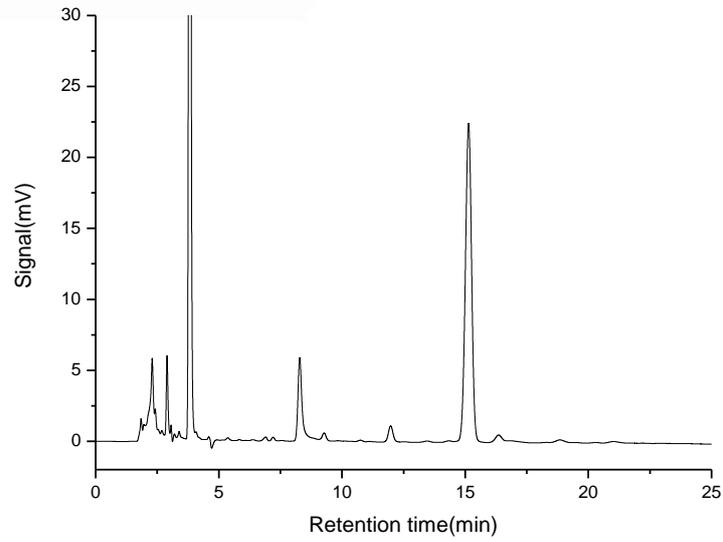


图 2-11 某奶粉样品谱图
阴性样品

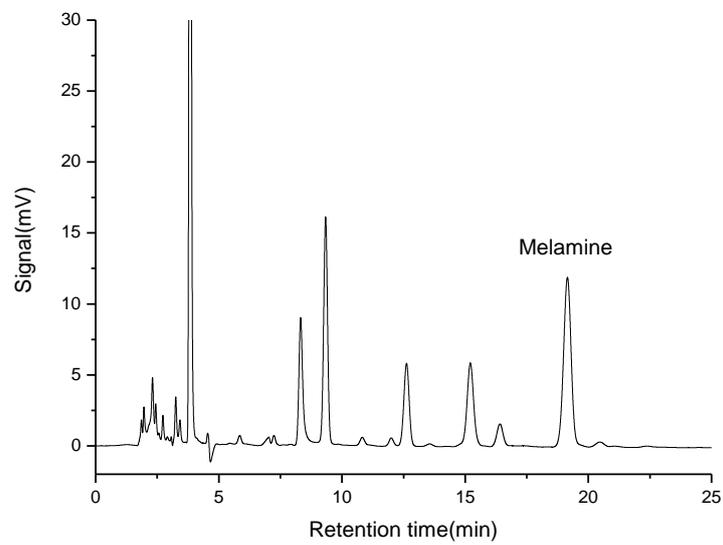


图 2-12 某奶粉样品谱图
阳性样品，含量：13.67mg/kg

2.3 按 GB/T 22100—2008 方法检测

用乙腈作为原料乳中的蛋白质沉淀剂和三聚氰胺提取剂，强阳离子交换色谱柱分离，高效液相色谱-紫外检测器/二极管阵列检测器检测，外标法定量。

该方法适用于原料乳，也适用于不含添加物的液态乳制品。

2.3.1 试剂配制

● 流动相

- 1) 缓冲液：称取 6.80g 磷酸二氢钾（准确至 0.01g），加水 800mL 完全溶解后，用磷酸调节 pH 至 3.0，用水定容至 1L，用 0.45 μm 水系微孔滤膜过滤后备用。
- 2) 用量筒分别量取 700mL 缓冲液和 300mL 乙腈，混合均匀，超声脱气 10min。



[注意] 选用标准量筒量取两种液体，保证量具本身的准确性。



[注意] 不要采用容量瓶混合缓冲液与乙腈然后定容。



[注意] 选用标准量筒量取两种液体，保证量具本身的准确性。

● 三聚氰胺标准品储备液

准确称取 100.0mg（准确至 0.1mg）三聚氰胺标准品物质，用水完全溶解后转移至 100mL 容量瓶中，定容至刻度，混匀，4℃条件下避光保存。

标准系列可采用上述储备液，用流动相逐级稀释。



[注意] 标准储备液可存放 1~2 个月，标准系列有效期一般为 1~2 周，最好现用现配。



[注意] 三聚氰胺可溶于甲醇、甲醛、乙酸、热乙二醇、甘油、吡啶等，微溶于冷水。因此，用水作为溶剂配制标准品时，出现样品不能迅速溶解时，建议采用温水浴加速溶解或超声加速溶解。

2.3.2 样品前处理

称取混合均匀的15.00g原料乳样品（准确至0.01g），置于50mL具塞刻度试管中，加入30 mL乙腈，剧烈振荡6 min，加水定容至满刻度，充分混匀后静置3min，用一次性注射器吸取上清液，用一次性针筒式油系过滤器过滤后，作为高效液相色谱分析用试样。



[注意]

此步操作要求“剧烈振荡 6min”，有条件的情况下可以在摇床上完成，也可以采用涡旋混匀器快速混合，当然也可以手持具塞试管来回振荡。



[注意]

加水定容并混匀后，务必静置充分，待明显分层后取上清液。



[注意]

采用针式油系过滤器过滤样品时，若出现推针较为吃力的情况，请立即更换新的滤头。

2.3.3 色谱条件

色谱柱：BioBasic SCX，强阳离子交换色谱柱，5 μ m 4.6 \times 250mm

流动相：离子对试剂缓冲液/乙腈=90/10（v/v）混匀

流速：1.0mL/min

检测波长：240nm

进样体积：20 μ L

柱温：40 $^{\circ}$ C



[注意]

由于大多数仪器配置均为 7725i 手动进样阀，定量环体积 20 μ L。为了获得更为准确的测试结果，建议采用满定量环的进样方式，即进样量为 5 倍或 5 倍以上定量环体积。

2.3.4 谱图结果

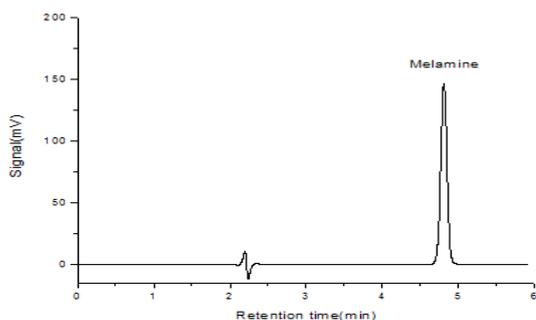


图 2-13 2 μ g/mL 三聚氰胺标准品典型谱图

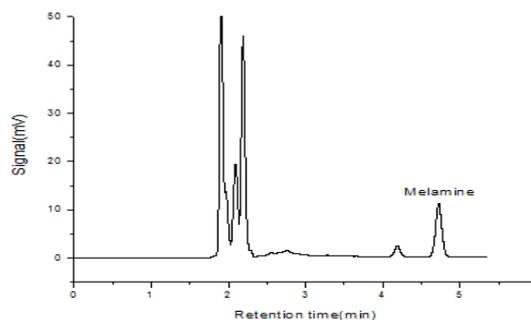


图 2-14 某加标鲜奶样品谱图

2.3.5 性能指标

- 连续进样重复性

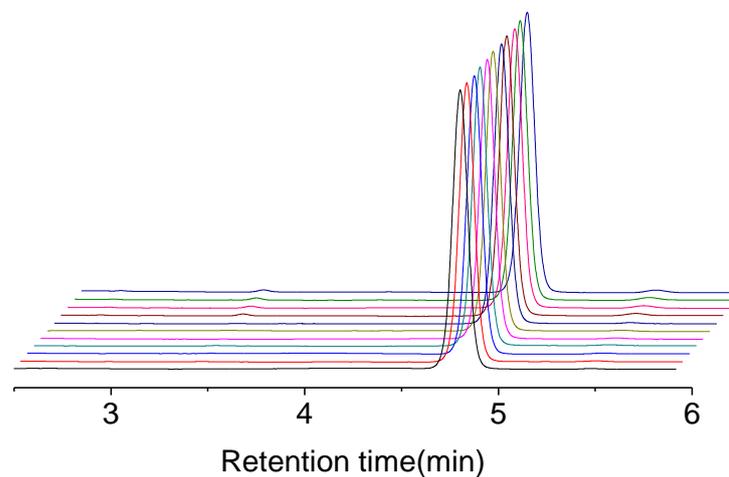


图2-15 2 µg/mL标准品11针连续进样叠加谱图

表2-6 2 µg/mL标准溶液连续进样11次重现性数据

编号	保留时间/min	峰面积/mV sec
1	4.803	87.74
2	4.803.	87.85
3	4.807	87.58
4	4.800	87.46
5	4.804	87.87
6	4.798	87.83
7	4.807	88.12
8	4.800	88.24
9	4.806	87.78
10	4.798	87.82
11	4.799	88.06
平均值	4.802	87.85
RSD/%	0.07	0.26

● 线性范围

按照GB要求，分别设置了低浓度和高浓度两个系列的标准工作溶液，结果如下：

表2-7 低浓度标准工作溶液浓度-峰面积结果

浓度($\mu\text{g/mL}$)	0.005	0.01	0.02	0.10	0.20
峰面积(mV sec)	0.26	0.46	0.91	4.38	8.79

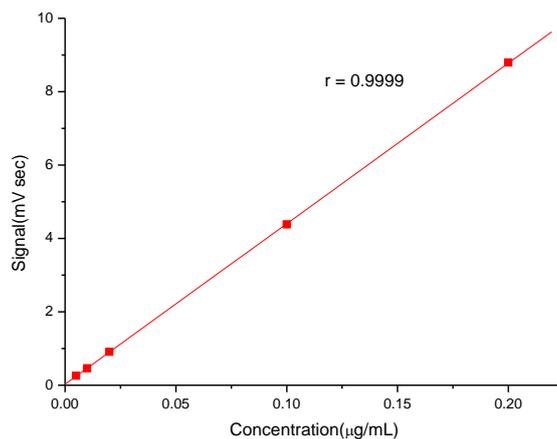


图2-16 低浓度标准溶液与峰面积关系

表2-8 高浓度标准工作溶液浓度-峰面积结果

浓度($\mu\text{g/mL}$)	0.20	0.50	2.00	5.00	20.0
峰面积(mV sec)	8.80	22.30	87.56	218.37	835.26

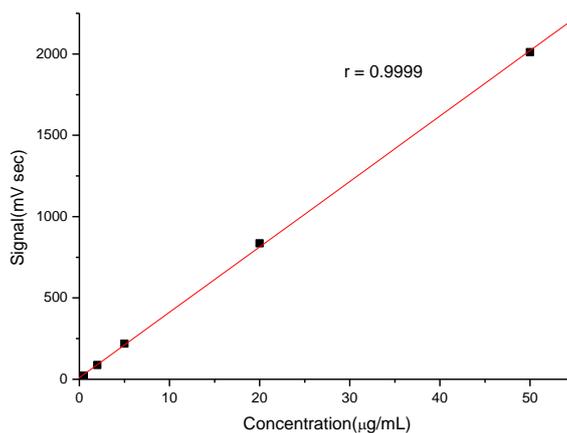


图2-17 高浓度标准溶液与峰面积关系



[注意]

设置两条标准工作曲线，可以获得更准确的定量信息。在进行定量分析时，请根据样品含量选择对应浓度范围内的标准曲线进行定量计算。

● 方法检出限和方法定量限

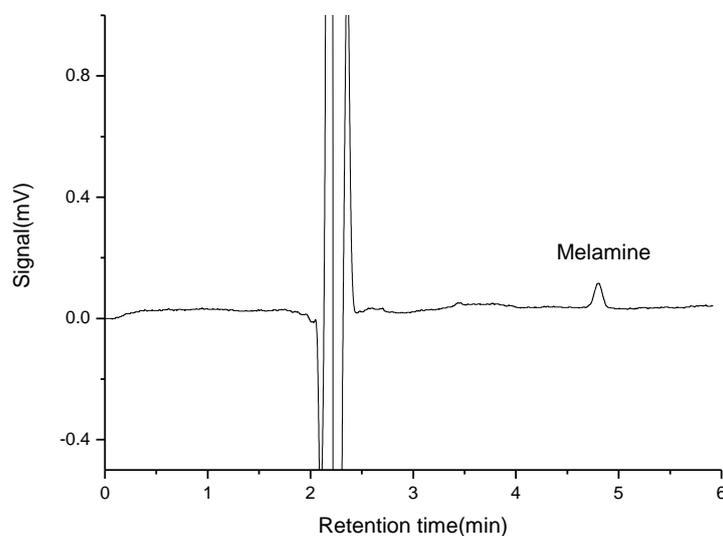


图2-18 0.01 µg/mL三聚氰胺标准品谱图

以3倍信噪比峰高对应的浓度换算为方法检出限，以10倍信噪比峰高对应的浓度换算为方法定量限。

表2-9 测试三聚氰胺方法检出限及定量限

计算方法	方法检出限(mg/kg)	方法定量限(mg/kg)
校正曲线方法	0.008	0.026

● 方法准确性

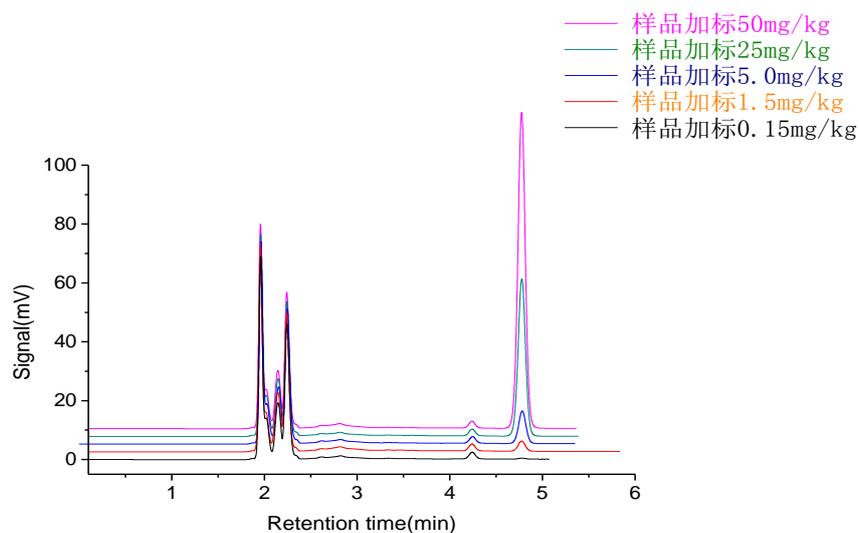


图2-19 不同水平的加标鲜奶叠加谱图

表2-10 鲜奶加标回收率结果

加标量(mg/kg)	计算结果(mg/kg)	回收率%
0.15	0.143	95.2%
1.50	1.44	96.0%
5.0	4.82	96.5%
25.0	23.5	93.8%
50.0	48.6	97.1%



[注意]

加标回收率测试通常是在阴性样品基础上加标，这样的加标结果最具代表性，能较好的反应样品在整个前处理过程的收率情况。

● 方法稳定性

将同一未知样品一分为三，连续测试结果如下。

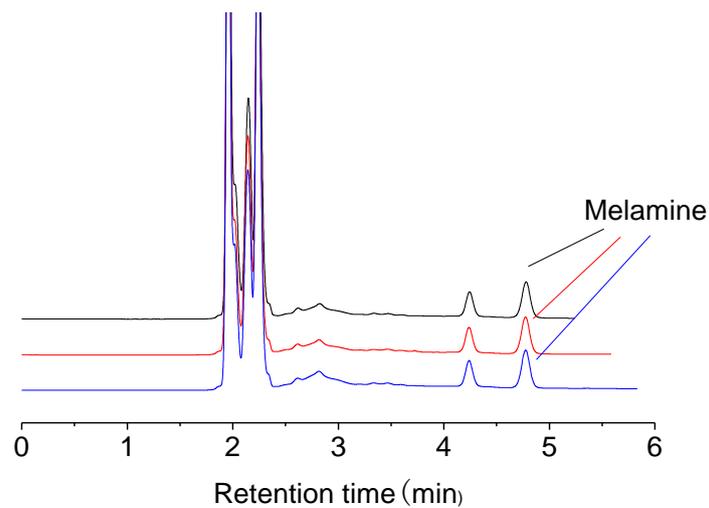


图2-20 某加标鲜奶样品平行测试叠加谱图

表2-11 方法稳定性测试结果

编号	计算结果(mg/kg)
1	9.54
2	9.57
3	9.79
平均值	9.63
RSD%	1.42

第3章 乳制品中免疫球蛋白 IgG 检测

参照国标《GB/T 5009.194-2003 保健食品中免疫球蛋白 IgG 的测定》。

3.1 样品预处理

- 1) 对照品: IgG 标准储备液: 称取 IgG 标准品 0.010g, 用流动相 A 溶解并定容至 10.0mL, 摇匀, 浓度为 1.0mg/mL。
- 2) 供试品: 称取供试品 0.1g (精确至 0.001g) 试样, 用流动相 A 稀释至 25.0mL, 摇匀, 取以上样品 10mL 用流动相 A 稀释至 30mL, 通过 0.45 μ m 微孔滤膜后进样。

3.2 色谱条件

色谱柱: Pharmacia hi-trap Protein G 柱, 1mL

流动相:

流动相 A: 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液, 调 pH=6.5

流动相 B: 0.05mol/L 甘氨酸盐酸缓冲液, 调 pH=2.5

流速: 0.4mL/min

检测波长: 280nm

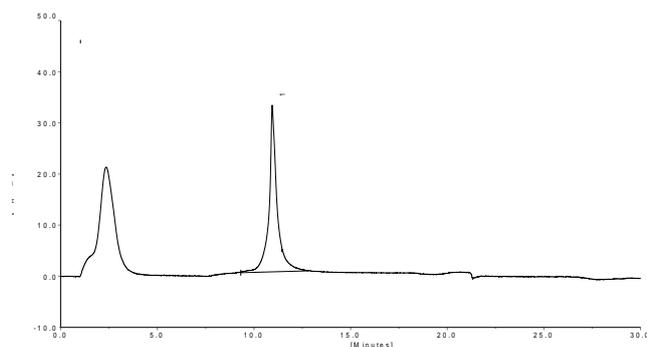
进样体积: 20 μ L

柱温: 室温

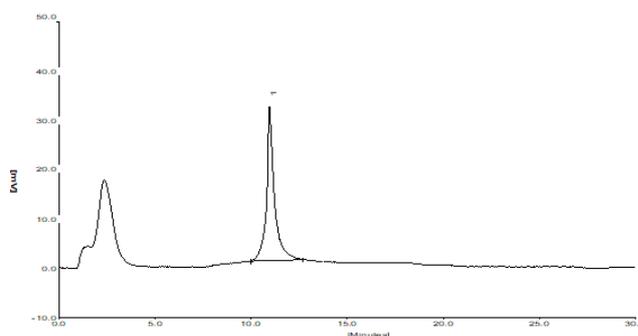
流动相梯度表

时间(min)	A%	B%
0	100	0
4.5	100	0
5.5	0	100
15.0	0	100
15.5	100	0
22.0	100	0

3.3 谱图结果



牛初乳 A 供试品分析色谱图



牛初乳 B 供试品分析色谱图

名称	保留时间 (min)	峰面积(mAU.s)	拖尾因子
牛初乳粉 A	10.942	934.68	1.16
牛初乳粉 B	10.945	909.77	1.31

第4章 牛奶中硫氰酸钠的检测

2008年12月12日，卫生部公布了《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种名单（第一批）》，明确规定乳及乳制品中硫氰酸钠属于违法添加物质。

硫氰酸钠是一种用于医药、印染等多种行业的化工原料，为白色结晶或粉末状，易溶于水。属于有毒有害物质，大量摄入有急性致毒作用。硫氰酸钠作为硫代糖苷和生氰糖苷的代谢物，而天然存在于各种食品中（包括乳），并在人类的肝脏中合成，是氰化物的解毒代谢产物。

国际乳联(IDF)公报234号指出，牛乳中的硫氰酸钠含量是不稳定的，可以达到10~15mg/kg，但通常的浓度范围是2~7mg/kg。国内外科学界做的一些研究，认为硫氰酸钠在原料乳的正常浓度：牛乳为6~12mg/L，平均值8.5mg/L；山羊乳为6.6~8mg/L，平均值7mg/L；个体牛之间，乳中的硫氰酸钠浓度在2.3~35mg/L。有的研究则是，牛奶中平均含硫氰酸根离子范围0.4~22mg/kg之间。

判断乳制品中是否非法添加硫氰酸钠，及其添加量，必须通过其含量测定实现。因此，依利特建立了乳制品中硫氰酸钠的检测方法，为用户提供牛奶中硫氰酸钠检测的高效液相色谱法(HPLC)解决方案。

4.1 试剂及相关溶液配制

亚铁氰化钾水溶液：称取亚铁氰化钾 10.6g，溶于 100mL 水。

乙酸锌水溶液：称取乙酸锌 20.0g，溶于 100mL 水。

磷酸缓冲溶液：准确量取2.0mL磷酸于1000mL容量瓶中，加水定容至刻度，摇匀，倒入1000mL烧杯中，三乙胺调节pH值至7.0±0.02。

硫氰酸钠标准储备液：准确称取硫氰酸钠标准品0.05g于50mL棕色容量瓶中，加水溶解，并定容。

硫氰酸钠标准工作液：取一定体积硫氰酸钠标准储备液，加水稀释至所需浓度。

4.2 样品前处理

准确量取牛奶样品1.5mL，分别加入亚铁氰化钾水溶液和乙酸锌水溶液各3.0mL，涡旋30s，10000转/min离心10min，取上清液，进样分析。

4.3 色谱条件

色谱柱: SinoChrom ODS-BP 5 μ m 4.6 \times 250mm

流动相: 乙腈/磷酸缓冲溶液=5/95

流速: 1.0mL/min

检测波长: 218nm

进样体积: 10 μ L

柱温: 室温

4.4 谱图结果

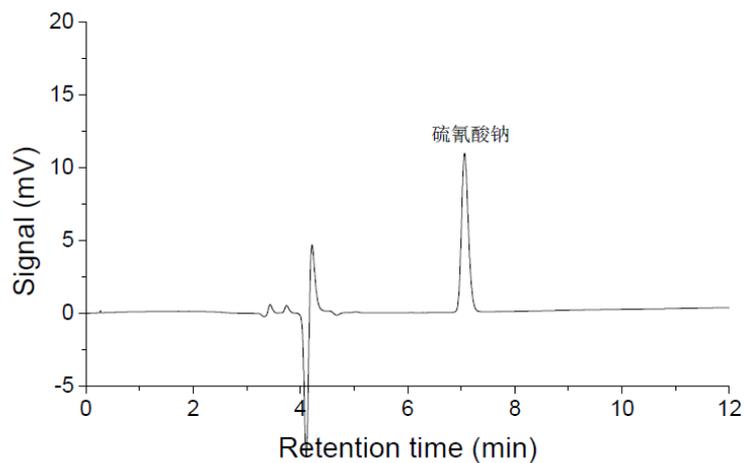


图 4-1 10 μ g/mL 硫氰酸钠标准品色谱图

表4-1 硫氰酸钠标准品分析色谱参数

物质	保留时间(min)	峰面积(mV.sec)	不对称度	塔板数(N/m)	压力(MPa)
硫氰酸钠	7.06	97.15	1.38	58500	12.9

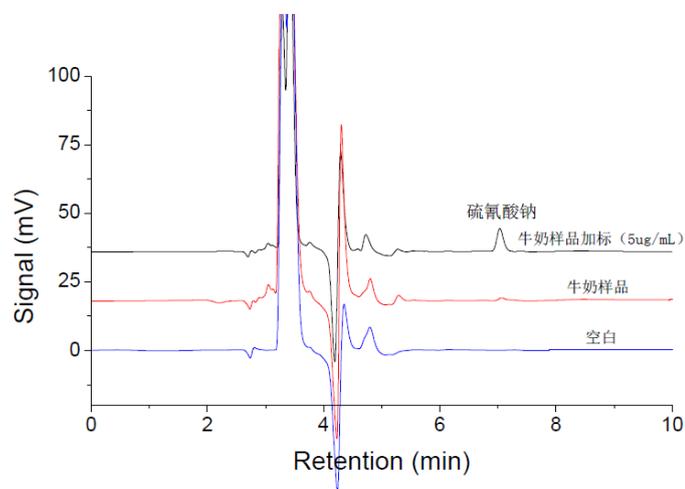


图 4-2 空白, 牛奶样品, 样品加标叠加谱图

第5章 乳制品中维生素的检测

维生素（英语：Vitamin）是一系列有机化合物的统称。它们是生物体所需要的微量营养成分，而一般又无法由生物体自己生产，需要通过饮食等手段获得。维生素不能像糖类、蛋白质及脂肪那样可以产生能量，组成细胞，但是它们对生物体的新陈代谢起调节作用。

维生素是食品中重要的营养成分，缺乏维生素会导致严重的健康问题，适量摄取维生素可以保持身体健康，过量摄取维生素却会导致中毒；因此食品中维生素含量的检测至关重要。国家颁布多项标准法规，对食品、保健品、食品添加剂等中维生素含量检测进行规范，以保障食品安全。依利特仪器参考国家标准及文献，整理了食品中维生素检测解决方案，供相关企业参考使用。

5.1 HPLC 法测定维生素含量的标准

表 5-1 食品中营养成分检测标准

序号	检测维生素	现行标准	原标准
1	A、D、E	GB 5009.82-2016	GB/T 5009.082-2003（食品）、GB 54139-2010（乳制品）、GB/T 9695.26-2008（肉）、GB/T 9695.30-2008（肉）、NY/T1598-2008（植物油）
2	B1	GB 5009.84-2016	GB/T 5009.084-2003（食品）、GB/T 5413.11-2010（乳制品）、
3	B2	GB 5009.85-2016	GB/T 5009.85-2003（食品）、GB 5413.12-2010（乳制品）、
4	B3	GB 5009.89-2016	GB/T5009.89-2003(食品)、GB5413.15-2010（乳品）、
5	B5(泛酸)	GB 5009.210-2016	GB/T 5009.210-2008（食品）、GB 5413.17-2010（乳制品）
6	B6	GB 5009.154-2016	GBT 5009.154-2003（食品）、GB5413.13-2010（乳制品）
7	K1	GB 5009.158-2016	GB/T5009.158-2003（蔬菜）、GB5413.10-2010（乳制品）
8	B12	GB/T 5009.217-2008	

表 5-2 食品中营养强化剂与食品添加剂检测标准

序号	检测物质	标准号	标准名称
1	醋酸维生素A	GB 1903.31-2018	食品安全国家标准 食品营养强化剂 醋酸视黄酯（醋酸维生素A）
2	维生素E琥珀酸钙	GB 1903.6-2015	食品安全国家标准 食品营养强化剂 维生素E琥珀酸钙
3	维生素C磷酸酯镁	GB 1903.24-2016	食品安全国家标准 食品营养强化剂 维生素C磷酸酯镁
4	维生素A	GB 14750-2010	食品安全国家标准 食品添加剂 维生素A
5	棕榈酸维生素A	GB 29943-2013	食品安全国家标准 食品添加剂 棕榈酸视黄酯（棕榈酸维生素A）
6	维生素D2	GB 14755-2010	食品安全国家标准 食品添加剂 维生素D2（麦角钙化醇）
7	生物素（B7/H）	GB 1903.25-2016	食品安全国家标准 食品营养强化剂 D-生物素
8	B9(叶酸)	GB 15570-2010	食品安全国家标准 食品添加剂 叶酸

表 5-3 出口食品维生素相关检验检疫标准

序号	检测物质	标准号	标准名称
1	抗坏血酸（C）	SN/T 0869-2017	出口饮料中抗坏血酸的测定
2	水溶性维生素	SN/T 4258-2015	出口食品中水溶性维生素的测定方法
3	维生素C	SN/T 0744-1999	出口饮料中维生素C和咖啡因检验方法
4	B6	SN/T 0549-1996	出口蜂王浆及干粉中维生素B6检验方法

5.2 仪器配置简表

表 5-4 食品维生素检测方法及配置清单

物质	分类	参考标准	方法及配置
A	营养成分	GB 5009.82-2016	反相HPLC法: UV2030/2050、HPLC等度系统、Supersil ODS2 5 μm 4.6×250mm
A		2015版药典	正相HPLC法: HPLC等度系统、Supersil SiO ₂ 5 μm 4.6×250mm
A	添加剂	GB 14750-2010	UV法: UV2030/2050、凝胶净化系统(500μL定量环)、C18色谱柱 5 μm 4.6×150mm
D2/D3	营养成分	GB 5009.82-2016	反相HPLC法: HPLC等度系统(100μL定量环)、Supersil ODS2 5 μm 4.6×250mm UV2030/2050、凝胶净化系统(500μL定量环)、Supersil SiO ₂ 5 μm 4.6×250mm
D2	添加剂	GB 14755-2010	正相HPLC法: HPLC等度系统、硅胶色谱柱 5 μm 4.6×250mm
E	营养成分	GB 5009.82-2016	反相HPLC法: UV2030/2050、HPLC梯度系统、C30或PFP或C18色谱柱 正相HPLC法: UV2030/2050、HPLC等度系统、酰胺基柱 1.7μm 3.0×150mm
B1	营养成分	GB 5009.84-2016	HPLC等度系统-荧光检测器、C18色谱柱 5 μm 4.6×250mm
B2	营养成分	GB 5009.85-2016	UV2030/2050、HPLC等度系统-荧光检测器、C18色谱柱 5 μm 4.6×150mm
B3	营养成分	GB 5009.89-2016	HPLC等度系统、C18色谱柱 Supersil ODS-B 5 μm 4.6×150mm
B5 (泛酸)	营养成分	GB 5009.210-2016	HPLC等度系统、C18色谱柱 5 μm 4.6×250mm
B6	营养成分	GB 5009.154-2016	UV2030/2050、HPLC等度系统-荧光检测器、C18色谱柱 5 μm 4.6×150mm
K1	营养成分	GB 5009.158-2016	HPLC等度系统-荧光检测器、C18色谱柱 5 μm 4.6×250mm
B9 (叶酸)	添加剂	GB 15570-2010	HPLC等度系统、Supersil AQ-C18 5 μm 4.6×250mm
生物素	营养强化剂	GB 1903.25-2016	HPLC等度系统、C18色谱柱 3 μm 4.6×150mm
B12	保健品	GB/T 5009.217-2008	HPLC梯度系统、Supersil ODS2 5 μm 4.6×250mm

5.3 维生素 A 的含量测定

5.3.1 反相高效液相色谱法

本节反相高效液相色谱法对维生素 A 进行检测是参考 GB5009.82-2016《食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定》。适用于需要参照 GB5009.82-2016 对食品中维生素 A 进行检测的用户参考使用。

5.3.1.1 标准溶液配制

维生素 A 标准储备溶液(0.500mg/mL)

准确称取 25.0mg 维生素 A 标准品，用无水乙醇溶解后，转移入 50mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 0.500mg/mL。将溶液转移至棕色试剂瓶中，密封后，在-20℃下避光保存，有效期 1 个月。临用前将溶液回温至 20℃，并进行浓度校正。

维生素 A 标准溶液中间液

准确吸取维生素 A 标准储备溶液 1.00mL 和维生素 E 标准储备溶液各 5.00mL 于同-50mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，此溶液中维生素 A 浓度为 10.0μg/mL，维生素 E 各生育酚浓度为 100μg/mL。在-20℃下避光保存，有效期半个月。

维生素 A 标准系列工作溶液

分准确吸取维生素 A 标准溶液中间液 0.20mL、0.50mL、1.00mL、2.00mL、4.00mL、6.00mL 于 10mL 棕色容量瓶中，用甲醇定容至刻度，该标准系列中维生素 A 浓度为 0.20μg/mL、0.50μg/mL、1.00μg/mL、2.00μg/mL、4.00μg/mL、6.00μg/mL 临用前配制。

5.3.1.2 样品前处理

● 试样制备

将一定数量的样品按要求经过缩分、粉碎均质后，储存于样品瓶中，避光冷藏，尽快测定。

注意：样品前处理使用的所有器皿不得含有氧化性物质；分液漏斗活塞玻璃表面不得涂油；处理过程应避免紫外光照，尽可能避光操作；提取过程应在通风柜中操作。

● 皂化

不含淀粉样品：称取 2g~5g(精确至 0.01g)经均质处理的固体试样或 50g(精确至 0.01g)液体试样于 150mL 平底烧瓶中，固体试样需加入约 20mL 温水，混匀，再加入 1.0g 抗坏血酸和 0.1gBHT，混匀，加入 30mL 无水乙醇，加入 10mL~20mL 氢氧化钾溶液，边加边振摇，混匀后于 80℃恒温水浴震荡皂化 30min，皂化后立即用冷水冷却至室温。

注：皂化时间一般 30min，如皂化液冷却后液面有浮油，需要加入适量氢氧化钾溶液，并适当延长皂化时间。

含淀粉样品：称取 2g~5g(精确至 0.01g)经均质处理的固体试样或 50g(精确至 0.01g)液体样品于 150mL 平底烧瓶中，固体试样需用约 20mL 温水混匀，加入 0.5g~1g 淀粉酶，放入 60℃水浴避光恒温振荡 30min 后，取出，向酶解液中加入 1.0g 抗坏血酸和 0.1gBHT，混匀，加入 30mL 无水乙醇，10mL~20mL 氢氧化钾溶液，边加边振摇，混匀后于 80℃恒温水浴振荡皂化 30min，皂化后立即用冷水冷却至室温。

● **提取**

将皂化液用 30mL 水转入 250mL 的分液漏斗中，加入 50mL 石油醚-乙醚混合液，振荡萃取 5min，将下层溶液转移至另一个 250mL 的分液漏斗中，加入 50mL 的混合醚液再次萃取，合并醚层。

注：如只测维生素 A 与 α -生育酚，可用石油醚作提取剂。

● **洗涤**

用约 100mL 水洗涤醚层，约需重复 3 次，直至将醚层洗至中性(可用 pH 试纸检测下层溶液 pH 值)，去除下层水相。

● **浓缩**

将洗涤后的醚层经无水硫酸钠(约 3g)滤入 250mL 旋转蒸发瓶或氮气浓缩管中，用约 15mL 石油醚冲洗分液漏斗及无水硫酸钠 2 次，并入蒸发瓶内，并将其接在旋转蒸发仪或气体浓缩仪上，于 40℃ 水浴中减压蒸馏或气流浓缩，待瓶中醚液剩下约 2mL 时，取下蒸发瓶，立即用氮气吹至近干。用甲醇分次将蒸发瓶中残留物溶解并转移至 10mL 容量瓶中，定容至刻度。溶液过 0.45 μ m 有机系滤膜后供高效液相色谱测定。

5.3.1.3 色谱条件

色谱柱：Supersil ODS2 5 μ m 4.6 \times 250mm

流动相：甲醇

流量：1.0mL/min

检测：UV325nm 或激发 328nm，发射 440nm

进样体积：10 μ L

柱温：室温

5.3.1.4 谱图结果

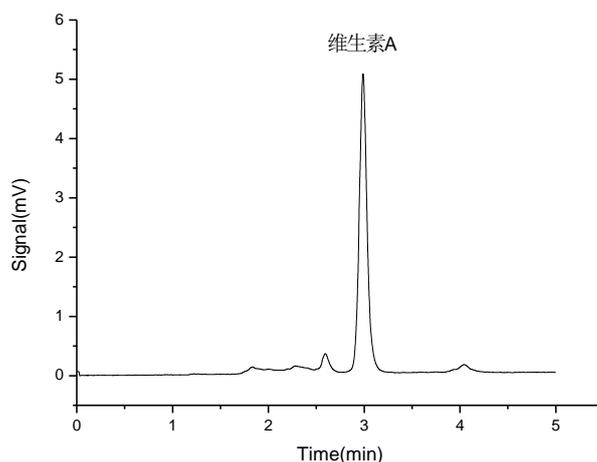


图 5-1 维生素 A 标准样品分析谱图（紫外-可见检测器 UV325nm）

5.3.2 正相高效液相色谱法

本节正相高效液相色谱法对维生素 A 进行检测是参考《中国药典》2015 版四部的基础上进行了优化。适用于维生素 A 醋酸酯原料及其制剂中维生素 A 测定。

5.3.2.1 标准样品配制

维生素 A 醋酸酯对照品：取维生素 A 醋酸酯对照品约 45mg，精密称定，置于 100mL 棕色量瓶中，用正己烷稀释至刻度，摇匀，再精密移取 5mL 置于 50mL 棕色量瓶中，用正己烷稀释至刻度，摇匀，即得。

5.3.2.2 供试品配制

取供试品约 0.5g，精密称定，置 50mL 棕色量瓶中，用正己烷稀释至刻度，摇匀，即得。

5.3.2.3 分析条件及结果

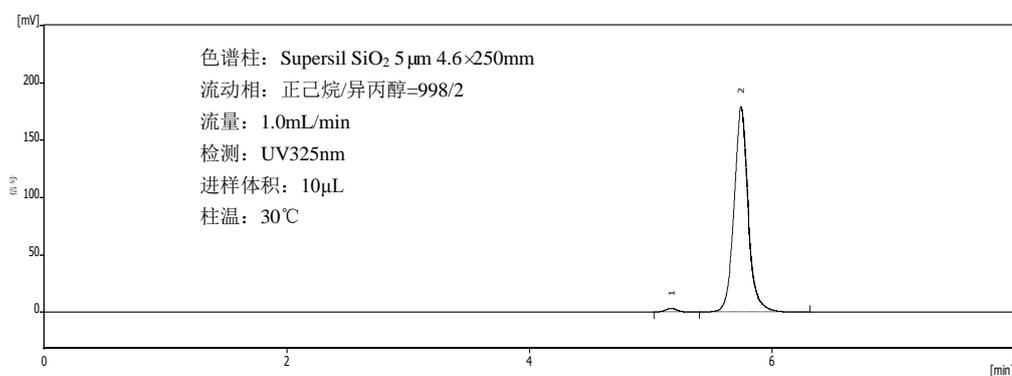


图 5-2 维生素 A 醋酸酯标准样品分析谱图

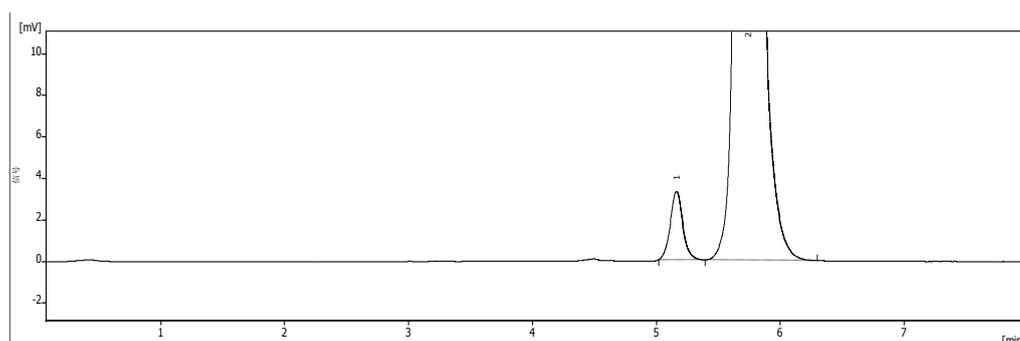


图 5-3 维生素 A 醋酸酯标准样品分析谱图局部放大图

表 5-5 维生素 A 醋酸酯标准品分析结果

峰号	物质名称	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]	面积[%]	拖尾因子	分离度
1	维生素 A 醋酸酯	5.16	23.34	1.58	1.09	-
2	维生素 A 醋酸酯顺式异构体	5.74	1454.47	98.42	1.09	3.03

5.3.3 紫外分光光度计法

本节内容是参考 GB 14750-2010《食品安全国家标准 食品添加剂维生素 A》，适用于以 β-紫罗兰酮为起始原料，经化学合成制得的食品添加剂维生素 A 含量的测定

5.3.3.1 测定方法

● **步骤 1:**

取实验室样品适量，精确至 0.0002g，加环己烷溶解并定量稀释成 9~15IU 的溶液，按照维生素 A 测定法（《中华人民共和国药典》2005 年版二部附录 J VII 维生素 A 测定法项下第一法）测定吸收峰的波长，并在表 2-8 所列波长处测定吸光度。

表 5-6 维生素 A 在不同波长的吸光度比值

波长/nm	吸光度比值
300	0.555
316	0.907
328	1.000
340	0.811
360	0.299

● **步骤 2:**

计算各吸光度与波长 328nm 处的吸光度的比值和波长 328nm 处 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 值。

结果计算：

(1) 如果吸收峰波长在 326nm~329nm 之间，且所测得各波长吸光度比值不超过上表中规定值的 ± 0.02 ，可用公式 (A.1) 计算含量：

$$X = E_{1\text{cm}}^{1\%} (328\text{nm}) \times 1900 \dots \dots \dots (A.1)$$

式中：x——每克样品中含有维生素 A 的 IU；

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ——百分吸收系数。

(2) 如果吸收峰波长在 326nm~329nm 之间，但所测得的各波长吸光度比值超过表 2-8 中规定值的 ± 0.02 ，应按公式 (A.2) 求出校正后的吸光度，然后再计算含量：

$$A_{328} (\text{校正}) = 3.52 (2A_{328} - A_{316} - A_{340}) \dots \dots \dots (A.2)$$

式中：A₃₂₈ (校正)——在波长 328nm 处校正后的吸光度；

A₃₂₈——在波长 328nm 处的吸光度；

A₃₁₆——在波长 316nm 处的吸光度；

A₃₄₀——在波长 340nm 处的吸光度。

(3) 如果校正吸光度与未校正吸光度相差不超过 $\pm 3.0\%$ ，则不用校正吸光度，仍以未经校正的吸光度计算含量。如果校正吸光度与未校正吸光度相差 -15% 至 -3% 之间，则以校正吸光度计算含量。

(4) 如果校正吸光度超过未校正吸光度的 -15% 或 +3% 之间，或者吸收峰波长不在 326nm~329nm 之间，则按步骤 3 进行测定，两次平行测定的允许相对差在 3% 以内。

● **步骤 3:**

精密称取实验室样品适量(约相当于维生素 A 总量 500IU 以上,质量不多于 2g),置皂化瓶中,加 30mL 乙醇与 3mL 氢氧化钾溶液(500g/L),置水浴中煮沸回流 30min,冷却后,自冷凝管顶端加水 10mL 冲洗冷凝管内部管壁,将皂化液移至分液漏斗中(分液漏斗活塞涂以甘油淀粉润滑剂),皂化瓶用水 60mL~100mL 分数次洗涤,洗液并入分液漏斗中,用不含过氧化物的乙醚振摇提取 4 次,每次振摇约 5min,第一次 60mL,以后各次 40mL,合并乙醚液,用水洗涤数次,每次约 100mL,洗涤应缓缓旋转,避免乳化,直至水层遇酚酞指示液不再显红色,乙醚液用铺有脱脂棉与无水硫酸钠的滤器滤过,滤器用乙醚洗涤,洗液与乙醚液合并,放入 250mL 容量瓶中,用乙醚稀释至刻度,摇匀;

● **步骤 4:**

精密量取适量,置蒸发皿内,在水浴上低温蒸发至 5mL 后,置减压干燥器中,抽干,迅速加异丙醇溶解并定量稀释制成每 1mL 中含维生素 A_{9~15}IU。

● **步骤 5:**

在 300nm、310nm、325nm 与 334nm 四个波长处测定吸光度,并测定吸收峰的波长。

(1) 吸收峰的波长在 323nm~327nm 之间,且 300nm 波长处的吸光度与 325nm 波长处的吸光度的比值不超过 0.73,按下式计算校正吸光度:

$$A_{325}(\text{校正}) = 6.815A_{325} - 2.555A_{310} - 4.260A_{334}$$

每 1g 实验室样品中含有的维生素 A 的单位 = $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (325nm, 校正) × 1830; 如果校正吸光度在未校正吸光度的 100% ± 3% 以内,则仍以未经校正的吸光度计算含量。

(2) 如果吸收峰的波长不在 323nm~327nm 之间,或 300nm 波长处的吸光度与 325nm 波长处的吸光度的比值超过 0.73,则应按步骤 6 进行操作。

● **步骤 6:**

自步骤 3 所得乙醚提取液中另精密量取适量(相当于维生素 A_{300~400}IU),减压蒸去乙醚至约剩 5mL,再在氮气流下吹干,立即精密加入 3mL 甲醇,溶解后,精密量取 500μL,注入净化用色谱柱系统,准确收集含有维生素 A 的流出液,在氮气流下吹干,而后按照步骤 4 自“迅速加异丙醇溶解”起,操作并计算含量。

5.3.3.2 净化色谱条件

流动相: 甲醇-乙腈-水 (50:50:2)

色谱柱: C18 色谱柱 5 μm 4.6×150mm

流量: 1.0mL/min

检测: UV254nm

进样体积: 500μL

柱温: 室温

5.4 维生素 D 的含量测定

5.4.1 反相高效液相色谱法

本节内容是参考 GB5009.82-2016《食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定》第 4 法，适用于需要参照 GB5009.82-2016 对食品中维生素 D 进行检测的用户参考使用。

5.4.1.1 标准溶液配制

● 维生素 D2 标准储备溶液

准确称取维生素 D2 标准品 10.0mg，用色谱纯无水乙醇溶解并定容至 100mL，使其浓度约为 100 μ g/mL，转移至棕色试剂瓶中，于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中密封保存，有效期 3 个月。临用前用紫外分光光度法校正其浓度(校正方法参见附录 1)。

● 维生素 D3 标准储备溶液

准确称取维生素 D3 标准品 10.0mg，用色谱纯无水乙醇溶解并定容至 100mL，使其浓度约为 100 μ g/mL，转移至 100mL 的棕色试剂瓶中，于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中密封保存，有效期 3 个月。临用前用紫外分光光度法校正其浓度(校正方法参见附录 1)。

● 维生素 D2 标准中间使用液

准确吸取维生素 D2 标准储备溶液 10.00mL，用流动相稀释并定容至 100mL，浓度约为 10.0 μ g/mL，有效期 1 个月，准确浓度按校正后的浓度折算。

● 维生素 D3 标准中间使用液

准确吸取维生素 D3 标准储备溶液 10.00mL，用流动相稀释并定容至 100mL 的棕色容量瓶中，浓度约为 10.0 μ g/mL，有效期 3 个月，准确浓度按校正后的浓度折算。

● 维生素 D2 标准使用液

准确吸取维生素 D2 标准中间使用液 10.00mL，用流动相稀释并定容至 100mL 的棕色容量瓶中，浓度约为 1.00 μ g/mL，准确浓度按校正后的浓度折算。

● 维生素 D3 标准使用液

准确吸取维生素 D3 标准中间使用液 10.00mL，用流动相稀释并定容至 100mL 的棕色容量瓶中，浓度约为 1.00 μ g/mL，准确浓度按校正后的浓度折算。

5.4.1.2 标准系列溶液的配制

当用维生素 D2 作内标测定维生素 D3 时，分别准确吸取维生素 D3 标准中间使用液 0.50mL、1.00mL、2.00mL、4.00mL、6.00mL、10.00mL 于 100mL 棕色容量瓶中，各加入维生素 D2 内标溶液 5.00mL，用甲醇定容至刻度混匀。此标准系列工作液浓度分别为 0.05 μ g/mL、0.10 μ g/mL、0.20 μ g/mL、0.40 μ g/mL、0.60 μ g/mL、1.00 μ g/mL。

当用维生素 D3 作内标测定维生素 D2 时，分别准确吸取维生素 D2 标准中间使用液 0.50mL、1.00mL、2.00mL、4.00mL、6.00mL、10.00mL 于 100mL 棕色容量瓶中，各加入维生素 D3 内标溶液 5.00mL，用甲醇定容至刻度，混匀。此标准系列工作液浓度分别为 0.05 μ g/mL、0.10 μ g/mL、0.20 μ g/mL、0.40 μ g/mL、0.60 μ g/mL、1.00 μ g/mL。

5.4.1.3 样品前处理

● 试样制备处理

将一定数量的样品按要求经过缩分、粉碎、均质后，储存于样品瓶中，避光冷藏，尽快测定。处理过程应避免紫外光照，尽可能避光操作。如样品中只含有维生素 D3，可用维生素 D2 做内标；如只含有维生素 D2，可用维生素 D3 做内标；否则，用外标法定量，但需要验证回收率能满足检测要求。

● 皂化

不含淀粉样品：称取 5g~10g(准确至 0.01g)经均质处理的固体试样或 50g(准确至 0.01g)液体样品于 150mL 平底烧瓶中，固体试样需加入 20mL~30mL 温水，加入 1.00mL 内标使用溶液(如测定维生素 D2，用维生素 D3 作内标；如测定维生素 D3，用维生素 D2 作内标。)，再加入 1.0g 抗坏血酸和 0.1gBHT，混匀。加入 30mL 无水乙醇，加入 10mL~20mL 氢氧化钾溶液，边加边振摇，混匀后于恒温磁力搅拌器上 80℃ 回流皂化 30min，皂化后立即用冷水冷却至室温。

注：一般皂化时间为 30min，如皂化液冷却后，液面有浮油，需要加入适量氢氧化钾乙醇溶液，并适当延长皂化时间。

含淀粉样品：称取 5g~10g(准确至 0.01g)经均质处理的固体试样或 50g(精确至 0.01g)液体样品于 150mL 平底烧瓶中，固体试样需加入约 20mL 温水，加入 1.00mL 内标使用溶液(如测定维生素 D2，用维生素 D3 作内标；如测定维生素 D3，用维生素 D2 作内标)和 1g 淀粉酶，放入 60℃ 恒温水浴振荡 30min，向酶解液中加入 1.0g 抗坏血酸和 0.1gBHT，混匀。加入 30mL 无水乙醇，10mL~20mL 氢氧化钾溶液，边加边振摇，混匀后于恒温磁力搅拌器上 80℃ 回流皂化 30min，皂化后立即用冷水冷却至室温。

● 提取

将皂化液用 30mL 水转入 250mL 的分液漏斗中，加入 50mL 石油醚，振荡萃取 5min，将下层溶液转移至另一个 250mL 的分液漏斗中，加入 50mL 的石油醚再次萃取，合并醚层。

● 洗涤

用约 150mL 水洗涤醚层，约需重复 3 次，直至将醚层洗至中性(可用 pH 试纸检测下层溶液 pH 值)，去除下层水相。

● 浓缩

将洗涤后的醚层经无水硫酸钠(约 3g)滤入 250mL 旋转蒸发瓶或氮气浓缩管中，用约 15mL 石油醚冲洗分液漏斗及无水硫酸钠 2 次，并入蒸发瓶内，并将其接在旋转蒸发器或气体浓缩仪上，于 40℃ 水浴中减压蒸馏或气流浓缩，待瓶中醚剩下约 2mL 时，取下蒸发瓶，氮吹至干，用正己烷定容至 2mL，0.22μm 有机系滤膜过滤供半制备正相高效液相色谱系统半制备，净化待测液。

● 净化

系统适用性试验：取约 1.00mL 维生素 D2 和 D3 标准中间使用液于 10mL 具塞试管中，在 40℃ ±2℃ 的氮吹仪上吹干。残渣用 10mL 正己烷振荡溶解。取该溶液 100μL 注入液相色谱仪中测定，确定维生素 D 保留时间。然后将 500μL 待测液注入液相色谱仪中，根据维生素 D 标准溶液保留时间收集维生素 D 馏分子试管中。将试管置于 40℃ 水浴氮气吹干，取出准确加入 1.0mL 甲醇，残渣振荡溶解，即为维生素 D 测定液。

5.4.1.4 样品净化色谱条件:

色谱柱: Supersil SiO₂ 5 μ m 4.6mm \times 250mm

流动相: 环己烷: 正己烷=1: 1, 并按体积分数 0.8%加入异丙醇

流速: 1mL/min

波长: 264nm

柱温: 35 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C

进样体积: 500 μ L

5.4.1.5 样品分析色谱条件:

色谱柱: Supersil ODS2 5 μ m 4.6mm \times 250mm

流动相: 甲醇: 水=95: 5

流速: 1mL/min

检测波长: 264nm

柱温: 35 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C

进样体积: 100 μ L

5.4.2 正相高效液相色谱法

本节内容是参考 GB14755-2010《食品安全国家标准 食品添加剂 维生素 D2（麦角钙化醇）》，适用于以麦角甾醇为原料制得的食品添加剂维生素 D2 含量测定。

5.4.2.1 实验方法

- **维生素 D3 对照品系统适应性试验贮备液**

称取约 25mg 维生素 D3 对照品，精确至 0.0001g，置 100mL 棕色容量瓶中，加 80mL 异辛烷，用超声处理助溶 1min，避免加热，使完全溶解，再加异辛烷至刻度，摇匀充氮密塞，避光，0℃ 以下保存。

- **实验室样品溶液的制备**

称取约 25mg 实验室样品，精确至 0.0001g，置 100mL 棕色容量瓶中，加 80mL 异辛烷，用超声处理助溶 1min，避免加热，使完全溶解，再加异辛烷至刻度，摇匀。量取 5mL \pm 0.05mL 上述溶液，置 10mL 棕色容量瓶中，加正己烷至刻度，摇匀。

- **维生素 D2 对照品溶液的制备**

称取约 25mg 维生素 D2 对照品，精确至 0.0001g，置 100mL 棕色容量瓶中，加 80mL 异辛烷，用超声处理助溶 1min，避免加热，使完全溶解，再加异辛烷至刻度，量取上述溶液 5mL \pm 0.05mL，置 10mL 棕色容量瓶中，加正己烷至刻度，摇匀。

5.4.2.2 系统适用性试验

量取维生素 D3 对照品贮备溶液 5mL，置具塞玻璃容器中，充氮后密塞，置 90℃ 水浴加热 1h，取出迅速冷却，加正己烷 5mL \pm 0.05mL，摇匀，置 1cm 具塞石英吸收池中，在 2 支主波长分别为 254nm 和 365nm 的紫外光灯下，将石英吸收池斜放成 45°，并距灯管 5cm~6cm，照射 5min，使溶液中含有前维生素 D3、反式维生素 D3、维生素 D3 和速甾醇 D3。取此溶液注入液相色谱仪，测定维生素 D3 的峰值，先后进样 5 次，相对标准偏差应不大于 2.0%，前维生素 D3（与维生素 D3 的比保留时间为 0.5）与反式维生素 D3（与维生素 D3 的比保留时间约为 0.6）以及维生素 D3 与速甾醇 D3（与维生素 D3 的比保留时间约为 1.1）的峰分离度均应大于 1.0。

5.4.2.3 测定

取维生素 D2 对照品溶液和样品，按以下色谱条件分别进样，使用外标法计算样品中维生素 D2 的含量。

5.4.2.4 色谱条件

色谱柱：硅胶柱 5 μ m 4.6 \times 250mm
 流动相：正己烷：正戊醇=1000：3
 流速：2mL/min
 检测波长：254nm
 进样体积：20 μ L
 柱温：室温

5.5 维生素 E 的含量测定

5.5.1 反相高效液相色谱法

本节内容是参考 GB5009.82-2016《食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定》第 1 法，适用于需要参照 GB5009.82-2016 对食品中维生素 E 进行检测的用户参考使用。

5.5.1.1 标准溶液配制

● 维生素 E 标准储备溶液(1.00mg/mL)

分别准确称取 α 生育酚、 β 生育酚、 γ 生育酚和 δ -生育酚各 50.0mg，用无水乙醇溶解后，转移入 50mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 1.00mg/mL。将溶液转移至棕色试剂瓶中，密封后，在 -20℃ 下避光保存，有效期 6 个月。临用前将溶液回温至 20℃，并进行浓度校正（校正方法详见附录 1）。

● 维生素 E 标准溶液中间液

准确吸取维生素 E 标准储备溶液各 5.00mL 于同一个 50mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，此溶液中维生素 E 各生育酚浓度为 100 μ g/mL。在 -20℃ 下避光保存，有效期半个月。

● 维生素 E 标准系列工作溶液

分别准确吸取维生素 E 混合标准溶液中间液 0.20mL、0.50mL、1.00mL、2.00mL、4.00mL、6.00mL 于 10mL 棕色容量瓶中，用甲醇定容至刻度，该标准系列中维生素 E 浓度为 2.00 μ g/mL、5.00 μ g/mL、10.0 μ g/mL、20.0 μ g/mL、40.0 μ g/mL、60.0 μ g/mL。临用前配制。

5.5.1.2 样品前处理

● 试样制备

将一定数量的样品按要求经过缩分、粉碎均质后，储存于样品瓶中，避光冷藏，尽快测定。

注意：样品前处理使用的所有器皿不得含有氧化性物质；分液漏斗活塞玻璃表面不得涂油；处理过程应避免紫外光照，尽可能避光操作；提取过程应在通风柜中操作。

● 皂化

不含淀粉样品：称取 2g~5g(精确至 0.01g)经均质处理的固体试样或 50g(精确至 0.01g)液体试样于 150mL 平底烧瓶中，固体试样需加入约 20mL 温水，混匀，再加入 1.0g 抗坏血酸和 0.1gBHT，混匀，加入 30mL 无水乙醇，加入 10mL~20mL 氢氧化钾溶液，边加边振摇，混匀后于 80℃ 恒温水浴震荡皂化 30min，皂化后立即用冷水冷却至室温。

注：皂化时间一般 30min，如皂化液冷却后液面有浮油，需要加入适量氢氧化钾溶液，并适当延长皂化时间。

含淀粉样品：称取 2g~5g(精确至 0.01g)经均质处理的固体试样或 50g(精确至 0.01g)液体样品于 150mL 平底烧瓶中，固体试样需用约 20mL 温水混匀，加入 0.5g~1g 淀粉酶，放入 60℃ 水浴避光恒温振荡 30min 后，取出，向酶解液中加入 1.0g 抗坏血酸和 0.1gBHT，混匀，加入 30mL 无水乙醇，10mL~20mL 氢氧化钾溶液，边加边振摇，混匀后于 80℃ 恒温水浴振荡皂化 30min，皂化后立即用冷水冷却至室温。

● **提取**

将皂化液用 30mL 水转入 250mL 的分液漏斗中，加入 50mL 石油醚-乙醚混合液，振荡萃取 5min，将下层溶液转移至另一个 250mL 的分液漏斗中，加入 50mL 的混合醚液再次萃取，合并醚层。

注：如只测维生素 A 与 α -生育酚，可用石油醚作提取剂。

● **洗涤**

用约 100mL 水洗涤醚层，约需重复 3 次，直至将醚层洗至中性(可用 pH 试纸检测下层溶液 pH 值)，去除下层水相。

● **浓缩**

将洗涤后的醚层经无水硫酸钠(约 3g)滤入 250mL 旋转蒸发瓶或氮气浓缩管中，用约 15mL 石油醚冲洗分液漏斗及无水硫酸钠 2 次，并入蒸发瓶内，并将其接在旋转蒸发仪或气体浓缩仪上，于 40℃ 水浴中减压蒸馏或气流浓缩，待瓶中醚液剩下约 2mL 时，取下蒸发瓶，立即用氮气吹至近干。用甲醇分次将蒸发瓶中残留物溶解并转移至 10mL 容量瓶中，定容至刻度。溶液过 0.45 μ m 有机系滤膜后供高效液相色谱测定。

5.5.1.3 样品仅含参 α 生育酚，色谱条件

流动相：甲醇
 色谱柱：Supersil ODS2 5 μ m 4.6 \times 250mm
 流量：1.0mL/min
 检测：UV294nm
 进样体积：10 μ L
 柱温：20℃

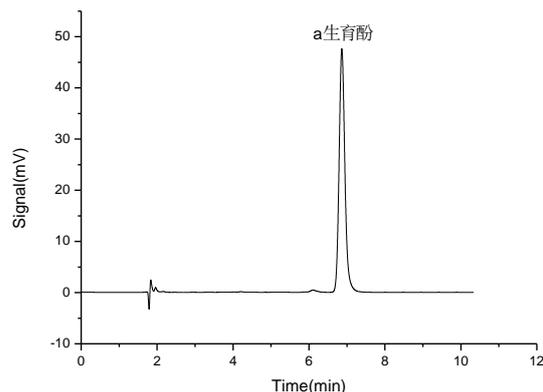


图 5-4 α 生育酚分析谱图

5.5.1.4 样品需要分离 β 生育酚和 γ 生育酚，参考色谱条件

流动相 A：水，B：甲醇，梯度洗脱
 色谱柱：C30 3 μ m 4.6 \times 250mm
 流量：0.8mL/min
 检测：UV294nm 或激发 294nm,发射 328nm
 进样体积：10 μ L
 柱温：20℃

梯度条件		
时间 (min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	4	96
13	4	96
20	0	100
24	0	100
24.5	4	96
30	4	96

5.5.2 正相高效液相色谱法

本节内容是参考 GB5009.82-2016《食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定》第 2 法，适用于食用油、坚果、豆类和辣椒粉等食物中维生素 E 的测定。

5.5.2.1 标准溶液配制

- **维生素 E 标准储备溶液(1.00mg/mL)**

分别称取 4 种生育酚异构体标准品各 50.0mg(准确至 0.1mg)，用无水乙醇溶解于 50mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 1.00mg/mL。将溶液转移至棕色试剂瓶中，密封后，在 -20℃ 下避光保存，有效期 6 个月。临用前将溶液回温至 20℃，并进行浓度校正(校正方法参见附录 1)。

- **维生素 E 标准溶液中间液**

准确吸取维生素 E 标准储备溶液各 1.00mL 于同一 100mL 容量瓶中，用氮气吹除乙醇后，用流动相定容至刻度，此溶液中维生素 E 各生育酚浓度为 10.00μg/mL。密封后，在 -20℃ 下避光保存，有效期半个月。

- **维生素 E 标准系列工作溶液**

分别准确吸取维生素 E 混合标准溶液中间液 0.20mL、0.50mL、1.00mL、2.00mL、4.00mL、6.00mL 于 10mL 棕色容量瓶中，用流动相定容至刻度，该标准系列中 4 种生育酚浓度分别为 0.20μg/mL、0.50μg/mL、1.00μg/mL、2.00μg/mL、4.00μg/mL、6.00μg/mL。

5.5.2.2 样品前处理

- **试样制备**

将一定数量的样品按要求经过缩分、粉碎、均质后，储存于样品瓶中，避光冷藏，尽快测定。

- **试样处理**

警示：使用的所有器皿不得含有氧化性物质；分液漏斗活塞玻璃表面不得涂油；处理过程应避免紫外光照，尽可能避光操作。

植物油脂：称取 0.5g~2g 油样(准确至 0.01g)于 25mL 的棕色容量瓶中，加入 0.1gBHT，加入 10mL 流动相超声或涡旋振荡溶解后，用流动相定容至刻度，摇匀。过孔径为 0.22μm 有机系滤头于棕色进样瓶中，待进样。

奶油、黄油：称取 2g~5g 样品(准确至 0.01g)于 50mL 的离心管中，加入 0.1gBHT，45℃ 水浴融化，加入 5g 无水硫酸钠，涡旋 1min，混匀，加入 25mL 流动相超声或涡旋振荡提取，离心，将上清液转移至浓缩瓶中，再用 20mL 流动相重复提取 1 次，合并上清液至浓缩瓶，在旋转蒸发器或气体浓缩仪上，于 45℃ 水浴中减压蒸馏或气流浓缩，待瓶中醚剩下约 2mL 时，取下蒸发瓶，立即用氮气吹干。用流动相将浓缩瓶中残留物溶解并转移至 10mL 容量瓶中，定容至刻度，摇匀。溶液过 0.22μm 有机系滤膜后供高效液相色谱测定。

坚果、豆类、辣椒粉等干基植物样品：称取 2g~5g 样品(准确至 0.01g)，用索氏提取仪或加速溶剂萃取仪提取其中的植物油脂，将含油脂的提取溶剂转移至 250mL 蒸发瓶内，于 40℃ 水浴中减压蒸馏或气流浓缩至干，取下蒸发瓶，用 10mL 流动相将油脂转移至 25mL 容量瓶中，加入 0.1gBHT，超声或涡旋振荡溶解后，用流动相定容至刻度，摇匀。过孔径为 0.22μm 有机系滤头于棕色进样瓶中，待进样。

5.5.2.3 参考色谱条件

色谱柱：酰氨基柱 1.7 μ m 3.0 \times 150mm

流动相：正己烷：[叔丁基甲基醚-四氢呋喃-甲醇混合液(20+1+0.1)]=90：10

流速：0.8mL/min

检测波长：激发波长 294nm，发射波长 328nm

进样量：10 μ L

柱温：30 $^{\circ}$ C

注：可用 Si60 硅胶柱（柱长 250mm，内径 4.6mm，粒径 5 μ m）分离 4 种生育酚异构体，推荐流动相为正己烷与 1，4 二氧六环按(95+5)的比例混合。

5.6 维生素 B1 的测定

本节内容是参考 GB5009.84-2016《食品安全国家标准 食品中维生素 B1 的测定》第 1 法，适用于食品中维生素 B1 的测定。

5.6.1 标准溶液配制

- **维生素 B1 标准储备液(500 μ g/mL)**

准确称取经五氧化二磷或者氯化钙干燥 24h 的盐酸硫胺素标准品 56.1mg (精确至 0.1mg)，相当于 50mg 硫胺素、用 0.01mol/L 盐酸溶液溶解并定容至 100mL，摇匀。置于 0 $^{\circ}$ C~4 $^{\circ}$ C 冰箱中，保存期为 3 个月。

- **维生素 B1 标准中间液(10.0 μ g/mL)**

准确移取 2.00mL 标准储备液，用水稀释并定容至 100mL，摇匀。临用前配制。

- **维生素 B1 标准系列工作液**

吸取维生素 B1 标准中间液 0 μ L、50.0 μ L、100 μ L、200 μ L、400 μ L、800 μ L、1000 μ L，用水定容至 10mL，标准系列工作液中维生素 B1 的浓度分别为 0 μ g/mL，0.0500 μ g/mL，0.100 μ g/mL，0.200 μ g/mL，0.400 μ g/mL，0.800 μ g/mL，1.00 μ g/mL。临用时配制。

5.6.2 样品前处理

- **试液提取**

称取 3g~5g (精确至 0.01g) 固体试样或者 10g~20g 液体试样于 100mL 锥形瓶中 (带有软质塞子)，加 60mL 0.1mol/L 盐酸溶液，充分摇匀，塞上软质塞子，高压灭菌锅中 121 $^{\circ}$ C 保持 30min。水解结束待冷却至 40 $^{\circ}$ C 以下取出，轻摇数次；用 pH 计指示，用 2.0mol/L 乙酸钠溶液调节 pH 至 4.0 左右，加入 2.0mL (可根据酶活力不同适当调整用量) 混合酶溶液，摇匀后，置于培养箱中 37 $^{\circ}$ C 过夜 (约 16h)；将酶解液全部转移至 100mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀，离心或者过滤，取上清液备用。

- **试液衍生化**

准确移取上述上清液或者滤液 2.0mL 于 10mL 试管中，加入 1.0mL 碱性铁氰化钾溶液，涡旋混匀后，准确加入 2.0mL 正丁醇，再次涡旋混匀 1.5min 后静置约 10min 或者离心，待充分分层后，吸取正丁醇相 (上层) 经 0.45 μ m 有机微孔滤膜过滤，取滤液于 2mL 棕色进样瓶中，供分析用。若试液中维生素 B1 浓度超出线性范围的最高浓度值，应取上清液稀释适宜倍数后，重新衍生后进样。另取 2.0mL 标准系列工作液，与试液同步进行衍生化。

5.6.3 参考色谱条件

色谱柱：C18 色谱柱 5 μ m 4.6mm \times 250mm

流动相：0.05mol/L 乙酸钠溶液：甲醇=65：35

流速：0.8mL/min

检测波长：激发波长 375nm，发射波长 435nm

进样量：20 μ L

5.7 维生素 B2 的测定

本节内容是参考 GB5009.85-2016 《食品安全国家标准 食品中维生素 B2 的测定》第 1 法，适用于食品中维生素 B1 的测定。

5.7.1 标准溶液配制

维生素 B2 标准储备液 (100 μ g/mL): 将维生素 B2 标准品置于真空干燥器或装有五氧化二磷的干燥器中干燥处理 24h 后, 准确称取 10mg (精确至 0.1mg) 维生素 B2 标准品, 加入 2mL 盐酸溶液(1+1)超声溶解后, 立即用水转移并定容至 100mL。混匀后转移入棕色玻璃容器中, 在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中贮存, 保存期 2 个月。标准储备液在使用前需要进行浓度校正, 校正方法参见附录 1。

维生素 B2 标准中间液(2.00 μ g/mL): 准确吸取 2.00mL 维生素 B2 标准储备液, 用水稀释并定容至 100mL。临用前配制。

维生素 B2 标准系列工作液: 分别吸取维生素 B2 标准中间液 0.25mL、0.50mL、1.00mL、2.50mL、5.00mL, 用水定容至 10mL, 该标准系列浓度分别为 0.05 μ g/mL、0.10 μ g/mL、0.20 μ g/mL、0.05 μ g/mL、1.00 μ g/mL。临用前配制。

5.7.2 样品前处理

取样品约 500g, 用组织捣碎机充分打匀均质, 分装入洁净棕色磨口瓶中, 密封, 并做好标记, 避光存放备用。称取 2g~10g (精确至 0.01g) 均质后的试样 (试样中维生素 B2 的含量大于 5 μ g) 于 100mL 具塞锥形瓶中, 加入 60mL 的 0.1mol/L 盐酸溶液, 充分摇匀, 塞好瓶塞。将锥形瓶放入高压灭菌锅内, 在 121 $^{\circ}$ C 下保持 30min, 冷却至室温后取出。用 1mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 6.0~6.5, 加入 2mL 混合酶溶液, 摇匀后, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱或恒温水浴锅中过夜酶解。将酶解液转移至 100mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 用滤纸过滤或离心, 取滤液或上清液, 过 0.45 μ m 水相滤膜作为待测液。

不加试样, 按同一操作方法做空白试验。

5.7.3 参考色谱条件

色谱柱: C18 色谱柱 5 μ m 4.6mm \times 150mm

流动相: 乙酸钠溶液(0.05mol/L): 甲醇=65: 35

流速: 1mL/min

柱温: 30 $^{\circ}$ C

检测波长: 激发波长 462nm, 发射波长 522nm

进样体积: 20 μ L

5.8 维生素 B3（烟酸和烟酰胺）的测定

本节内容是参考 GB5009.89-2016《食品安全国家标准 食品中烟酸和烟酰胺的测定》第 2 法，适用于强化食品中烟酸和烟酰胺的测定。

5.8.1 标准溶液配制

烟酸和烟酰胺标准储备液（1.000mg/mL）：准确称取烟酸及烟酰胺标准品各 0.05g（精确到 0.1mg），分别置于 100mL 容量瓶中，用 0.1mol/L 盐酸溶解，定容至刻度，混匀（4℃冰箱中可保存 1 个月）。

注：标准储备液配制完以后，需要进行浓度校正，校正方法见附录。

烟酸和烟酰胺标准混合中间液（100.0μg/mL）：准确吸取烟酸和烟酰胺标准储备液各 10.0mL 于 100mL 容量瓶中，加水定容至刻度，混匀。临用前配制。

烟酸和烟酰胺标准混合工作液：分别准确吸取标准混合中间液 1.0mL、2.0mL、5.0mL、10.0mL、20.0mL 于 100mL 容量瓶中，加水定容至刻度，混匀，得到浓度分别为 1.0μg/mL、2.0μg/mL、5.0μg/mL、10.0μg/mL、20.0μg/mL 的标准混合工作液。临用前配制。

5.8.2 样品前处理

淀粉类和含淀粉的食品（即食谷物、面包、饼干、面条、小麦粉和杂粮粉等制品）称取混合均匀固体试样约 5.0g（精确到 0.01g），加入约 25mL 45℃~50℃ 的水，称取混合均匀液体试样约 20.0g（精确到 0.01g）于 150mL 锥形瓶中，加入约 0.5g 淀粉酶，摇匀后向锥形瓶中充氮，盖上塞，置于 50℃~60℃ 的培养箱内培养约 30min，取出冷却至室温。

注：如果条件允许，建议酶解时采用 55℃ ±5℃ 水浴振摇。

不含淀粉的食品（调制乳、调制乳粉、饮料类、固体饮料类、豆粉和豆浆粉等制品）称取混合均匀固体试样约 5.0g（精确到 0.01g），加入约 25mL 45℃~50℃ 的水，称取混合均匀液体试样约 20.0g（精确到 0.01g）于 150mL 锥形瓶中，置于超声波振荡器中振荡约 10min 以上充分溶解，静置 5min~10min，并冷却至室温。

● 提取

待试样溶液降至室温后，用 5.0mol/L 盐酸溶液和 0.1mol/L 盐酸溶液调节试样溶液的 pH 至 1.7 ±0.1，放置约 2min 后，再用 5.0mol/L 氢氧化钠溶液和 0.1mol/L 氢氧化钠溶液调节试样溶液的 pH 至 4.5 ±0.1，置于 50℃ 水浴超声波振荡器中振荡 10min 以上充分提取，冷却至室温后转至 100mL 容量瓶中，用水反复冲洗锥形瓶，洗液合并于 100mL 容量瓶中，用水定容至刻度后混匀，经滤纸过滤。滤液再经 0.45μm 微孔滤膜加压过滤，用样品瓶收集，即为试样测定液。

注：必要时，试样测定液用水进行适当的稀释，使试样测定液中烟酸和烟酰胺浓度在 1μg/mL~20μg/mL 范围内。

5.8.3 参考色谱条件

色谱柱：Supersil ODS-B 5μm 4.6mm×150mm

检测波长：261nm

流动相：甲醇 70mL，异丙醇 20mL，庚烷磺酸钠 1g，用 910mL 水溶解并混匀，用高氯酸调 pH 至 2.1 ±0.1，
经 0.45μm 膜过滤

流速：1.0mL/min

进样量：10μL

柱温：25℃

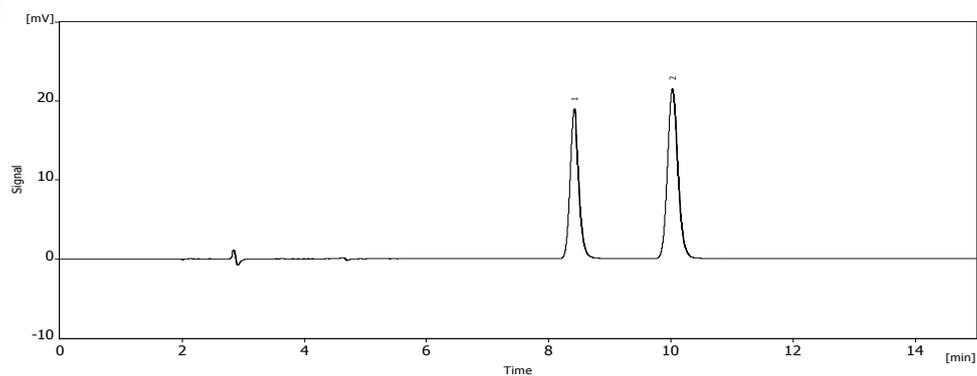


表 5-7 烟酸和烟酰胺的测定结果

峰号	样品	保留时间 (min)	拖尾因子	分离度	柱效 (N/m)
1	烟酸	8.42	1.16		107800
2	烟酰胺	10.03	1.13	5.68	116800

5.9 泛酸的测定

本节内容是参考 GB5009.210-2016 《食品安全国家标准 食品中泛酸的测定》第 2 法，适用于食品中泛酸的测定。

5.9.1 标准溶液配制

泛酸标准储备溶液(1.000mg/mL): 准确称取泛酸钙 1.087g, 加水溶解并转入 1000mL 容量瓶中, 定容至刻度, 混匀(4℃冰箱中可保存 5d)。

泛酸标准中间溶液(100.0μg/mL): 准确吸取标准储备溶液 10.0mL 于 100mL 容量瓶中, 加水定容至刻度。临用前配制。

泛酸标准工作溶液: 分别准确吸取泛酸标准中间液 1.0mL, 2.0mL, 4.0mL, 8.0mL, 16.0mL, 32.0mL 于 100mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 得到浓度分别为 1.0μg/mL, 2.0μg/mL, 4.0μg/mL, 8.0μg/mL, 16.0μg/mL, 32.0μg/mL 的泛酸标准工作溶液, 临用前配制。

5.9.2 样品前处理

试样制备固态试样粉碎并混合均匀; 碳酸饮料需超声波去除二氧化碳, 其他液态试样摇匀。

营养素补充剂类保健食品

准确称取或量取适量试样(m), 精确至 0.001g, 一般固体试样 0.2g~2g, 液态试样 10g~20g, 置于 50mL 锥形瓶中, 加入约 30mL 40℃~50℃温水超声提取 20min, 用水定容至刻度。转入离心管 3000r/min 离心 5min~10min, 取上清液过 0.45μm 滤膜, 滤液待上机测定。

● 配方食品

准确称取适量试样(m), 精确至 0.001g, 一般固体试样约 5g, 液态试样约 20g。置于 100mL 锥形瓶中, 加入 40℃~50℃温水至 30mL。如果试样中含有淀粉, 加入淀粉酶 0.2g, 振摇混匀, 盖上瓶塞, 在 55℃±5℃ 水浴条件下, 振摇酶解 120min~240min。如果试样不含淀粉, 直接超声提取 20min。取出试样液, 冷却至室温, 用 0.1mol/L 盐酸调节 pH 至 5.0±0.1, 加入 5mL 0.5mol/L 硫酸锌溶液, 充分混合。转入 50mL 容量瓶中, 用水定容至刻度并充分混匀后, 转入离心管 3000r/min 离心 5min~10min, 取上清液过 0.45μm 滤膜, 滤液待上机测定。

必要时, 试样测定液用水进行适当的稀释(F), 使试样测定液中泛酸浓度在 1μg/mL~32μg/mL 范围内。

5.9.3 参考色谱条件

色谱柱: C18 色谱柱 5μm 4.6mm×250mm

检测波长: 210nm

流动相: 0.02mol/L 磷酸二氢钾溶液: 乙腈=95: 5

流速: 1.0mL/min

进样量: 10μL

柱温: 28℃

5.10 维生素 B6 的测定

本节参考 GB5009.154-2016《食品安全国家标准 食品中维生素 B6 的测定》第 1 法,适用于食品中维生素 B6 测定。

5.10.1 标准溶液配制

吡哆醇标准储备液(1mg/mL): 准确称取 60.8mg 盐酸吡哆醇标准品,用 0.1mol/L 盐酸溶液溶解后定容到 50mL,在 -20℃下避光保存,有效期 1 个月。

吡哆醛标准储备液(1mg/mL): 准确称取 60.9mg 盐酸吡哆醛标准品,用 0.1mol/L 盐酸溶液溶解后定容到 50mL,在 -20℃下避光保存,有效期 1 个月。

吡哆胺标准储备液(1mg/mL): 准确称取 71.7mg 双盐酸吡哆胺标准品,用 0.1mol/L 盐酸溶液溶解后定容到 50mL,在 -20℃下避光保存,有效期 1 个月。

维生素 B6 混合标准中间液(20μg/mL): 分别准确吸取吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺的标准储备液各 1.00mL,用 0.1mol/L 盐酸溶液稀释并定容至 50mL。临用前配制。

维生素 B6 混合标准系列工作液: 分别准确吸取维生素 B6 混合标准中间液 0.5mL、1.0mL、2.0mL、3.0mL、5.0mL,至 100mL 容量瓶中,用水定容。该标准系列浓度分别为 0.10μg/mL、0.20μg/mL、0.40μg/mL、0.60μg/mL、1.00μg/mL。临用前配制。

注: 标准储备液在使用前需要进行浓度校正,校正方法参照附录 1。

5.10.2 样品前处理

● 含淀粉的试样

固体试样: 称取混合均匀的固体试样约 5g (精确至 0.01g),于 150mL 锥形瓶中,加入约 25mL 45℃~50℃的水,混匀。加入约 0.5g 淀粉酶,混匀后向锥形瓶中充氮,盖上瓶塞,置 50℃~60℃培养箱内约 30min。取出冷却至室温。

液体试样: 称取混合均匀的液体试样约 20g (精确至 0.01g)于 150mL 锥形瓶中,混匀。加入约 0.5g 淀粉酶,混匀后向锥形瓶中充氮,盖上瓶塞,置 50℃~60℃培养箱内约 30min。取出冷却至室温。

● 不含淀粉的试样

固体试样: 称取混合均匀的固体试样约 5g (精确至 0.01g),于 150mL 锥形瓶中,加入约 25mL 45℃~50℃的水,混匀。静置 5min~10min,冷却至室温。

液体试样: 称取混合均匀的液体试样约 20g (精确至 0.01g)于 150mL 锥形瓶中。静置 5min~10min。

● 待测液的制备

用盐酸溶液,调节上述试样溶液的 pH 至 1.7 ± 0.1 ,放置约 1min。再用氢氧化钠溶液调节试样溶液的 pH 至 4.5 ± 0.1 。把上述锥形瓶放入超声波振荡器中,超声振荡约 10min。将试样溶液转移至 50mL 容量瓶中,用水冲洗锥形瓶。洗液合并于 50mL 容量瓶中,用水定容至 50mL。另取 50mL 锥形瓶,上面放入漏斗和滤纸,把定容后的试样溶液倒入其中,自然过滤。滤液再经 0.45μm 微孔滤膜过滤,用试管收集,转移 1mL 滤液至进样瓶作为试样待测液。

注: 操作过程应避免强光照射。

5.10.3 参考色谱条件

色谱柱: C18 柱 5μm 4.6mm×150mm

流动相: 甲醇 50mL、辛烷磺酸钠 2.0g、三乙胺 2.5mL,用水溶解并定容到 1000mL 后,用冰乙酸调 pH 至 3.0 ± 0.1 ,过 0.45μm 微孔滤膜过滤

流速: 1mL/min

柱温: 30℃

检测波长: 激发波长 293nm,发射波长 395nm

进样体积: 10μL

5.11 维生素 K1 的测定

本节内容是参考 GB5009.158-2016《食品安全国家标准 食品中维生素 K1 的测定》第 1 法，适用于食品中维生素 K1 的测定。

5.11.1 标准溶液配制

维生素 K1 标准贮备溶液(1mg/mL): 准确称取 50mg (精确至 0.1mg) 维生素 K1 标准品于 50mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度。将溶液转移至棕色玻璃容器中，在-20℃下避光保存，保存期 2 个月。标准储备液在使用前需要进行浓度校正，校正方法参照附录 1。

维生素 K1 标准中间液(100µg/mL): 准确吸取标准贮备溶液 10.00mL 于 100mL 容量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀。将溶液转移至棕色玻璃容器中，在-20℃下避光保存，保存期 2 个月。

维生素 K1 标准使用液(1.00µg/mL): 吸取标准中间液 1.00mL 于 100mL 容量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀。

标准系列工作溶液: 分别准确吸取维生素 K1 标准使用液 0.10mL、0.20mL、0.50mL、1.00mL、2.00mL、4.00mL 于 10mL 容量瓶中，加甲醇定容至刻度，维生素 K1 标准系列工作溶液浓度分别为 10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、400ng/mL。

5.11.2 样品前处理

● 婴幼儿食品和乳品、植物油

酶解: 准确称取经均质的试样 1g~5g (精确到 0.01g，维生素 K1 含量不低于 0.05µg) 于 50mL 离心管中，加入 5mL 温水溶解 (液体样品直接吸取 5mL，植物油不需加水稀释)，加入磷酸盐缓冲液(pH8.0)5mL，混匀，加入 0.2g 脂肪酶和 0.2g 淀粉酶 (不含淀粉的样品可以不加淀粉酶)，加盖，涡旋 2min~3min，混匀后，置于 37℃±2℃ 恒温水浴振荡器中振荡 2h 以上，使其充分酶解。

提取: 取出酶解好的试样，分别加入 10mL 乙醇及 1g 碳酸钾，混匀后加入 10mL 正己烷和 10mL 水，涡旋或振荡提取 10min，6000r/min 离心 5min，或将酶解液转移至 150mL 的分液漏斗中萃取提取，静置分层 (如发生乳化现象，可适当增加正己烷或水的加入量，以排除乳化现象)，转移上清液至 100mL 旋蒸瓶中，向下层液再加入 10mL 正己烷，重复操作 1 次，合并上清液至上述旋蒸瓶中。

浓缩: 将上述正己烷提取液旋蒸至干 (如有残液，可用氮气轻吹至干)，用甲醇转移并定容至 5mL 容量瓶中，摇匀，0.22µm 滤膜过滤，滤液待进样。不加试样，按同一操作方法做空白试验。

● 水果、蔬菜样品

提取: 准确称取 1g~5g (精确到 0.01g，维生素 K1 含量不低于 0.05µg) 经均质匀浆的样品于 50mL 离心管中，加入 5mL 异丙醇，涡旋 1min，超声 5min，再加入 10mL 正己烷，涡旋振荡提取 3min，6000r/min 离心 5min，移取上清液于 25mL 棕色容量瓶中，向下层溶液中加入 10mL 正己烷，重复提取 1 次，合并上清液于上述容量瓶中，正己烷定容至刻度，用移液管准确分取上清液 1mL~5mL (视样品中维生素 K1 含量而定) 至 10mL 试管中，氮气轻吹至干，加入 1mL 正己烷溶解，待净化。

净化、浓缩: 将上述 1mL 提取液用少量正己烷转移至预先用 5mL 正己烷活化的中性氧化铝柱中，待提取液流至近干时，5mL 正己烷淋洗，6mL 正己烷-乙酸乙酯混合液洗脱至 10mL 试管中，氮气吹干后，用甲醇定容至 5mL，过 0.22µm 滤膜，滤液供分析测定。不加试样，按同一操作方法做空白试验。

5.11.3 色谱参考条件

色谱柱: C18 柱 5 μ m 4.6mm \times 250mm

锌还原柱: 4.6mm \times 50mm

流动相: 量取甲醇 900mL, 四氢呋喃 100mL, 冰乙酸 0.3mL, 混匀后, 加入氯化锌 1.5g, 无水乙酸钠 0.5g, 超声溶解后, 用 0.22 μ m 有机系滤膜过滤

流速: 1mL/min

检测波长: 激发波长为 243nm, 发射波长为 430nm

进样量: 10 μ L

5.12 叶酸的测定

本节内容是参考 GB15570-2010《食品安全国家标准 食品添加剂 叶酸》，适用于化学合成法制得的食品添加剂叶酸的测定。

5.12.1 溶液配制

对照品溶液的制备：称取约 10mg 叶酸对照品，精确至 0.02mg，置 50mL 容量瓶中，加 30mL 氨水溶液溶解后，用水稀释至刻度，摇匀。

实验室样品溶液的制备：称取约 10mg 实验室样品，精确至 0.02mg，置 50mL 容量瓶中，加 30mL 氨水溶液溶解后，用水稀释至刻度，摇匀。

5.12.2 色谱参考条件

色谱柱：Supersil AQ-C18 5 μ m 4.6mm \times 250mm

流动相：6.8g 磷酸二氢钾与 70mL 氢氧化钾溶液，加水稀释至 850mL，并调节 pH 至 6.3 \pm 0.1，加 80mL 甲醇，用水稀释成 1000mL 的溶液

流速：1mL/min

检测波长：254nm

柱温：30 $^{\circ}$ C

5.13 维生素 B12 的测定

本节内容是参考 GB5009.217-2008《保健食品中维生素 B12 的测定》，适用于片剂、胶囊、粉剂、功能性饮料类型保健食品中维生素 B12 的测定。

5.13.1 标准溶液配制

维生素 B12 标准储备液：称取维生素 B12 标准品 10mg（精确至 0.1mg），用 5%乙醇溶解，并定容至 10mL 棕色容量瓶中，混匀，得到维生素 B12 的标准储备液。冷藏保存。

维生素 B12 标准中间液：吸取 1mL 储备液至 25mL 棕色容量瓶中，用水稀释得到维生素 B12 的标准中间液。冷藏保存。

维生素 B12 标准系列：分别吸取 0.05mL、0.10mL、0.50mL、1.00mL、2.00mL、5.00mL 的标准中间液于 10mL 棕色容量瓶中，用水稀释得到维生素 B12 标准溶液系列。

5%乙腈：量取 50mL 乙腈，用水稀释定容至 1000mL。

25%乙腈：量取 250mL 乙腈，用水稀释定容至 1000mL。

5.13.2 样品前处理

将 20 粒片剂、胶囊试样粉碎或混匀；粉剂试样取 5 包~10 包充分混匀。

● 提取

称取试样 4g~10g（相当于含维生素 B12 4 μ g 左右，精确至 0.001g）于 50mL 离心管中，加 10mL~15mL 水，混匀，将其置于超声波清洗器中，超声提取约 10min 后以 4000r/min 离心 5min。

用吸管吸取上清液置于另一个 50mL 离心管中。对残渣按上述步骤每次加入约 10mL 水，重复提取两次，合并提取液于 50mL 离心管中。

● 净化

向提取液中加入 5%四丁基氯化铵溶液 1mL、三氯甲烷约 20mL，使用涡旋混匀器充分混匀，于离心机中以 1000r/min 离心 3min。将水层转入蒸发皿中，置水浴锅上加热蒸发至干。残渣用乙醇溶解，转移至离心管中，超声溶解，离心，吸取上清液于蒸发皿中。再重复提取两次，合并提取液于蒸发皿中。蒸干乙醇，试样用 5 mL 5% 乙腈溶液定量转移到试管中，待上固相萃取柱。

● 固相萃取

固相萃取柱先用 3mL 甲醇进行活化，再用 3mL 水对固相萃取柱进行平衡，速度为 1 滴/s。将上述处理过的适量试样加到固相萃取柱上。上样后，用 5mL 5% 乙腈溶液作为洗脱溶剂将干扰物质从固相萃取柱上淋洗下来，最后用 25% 乙腈溶液将维生素 B12 洗脱下来，收集洗脱液 0.5mL。

5.13.3 色谱参考条件

色谱柱：Supersil ODS2 5 μ m 4.6mm \times 250mm

流动相：流动相 A：称取 0.87g 磷酸氢二钾、0.41g 磷酸二氢钾于 1000mL 容量瓶中，用水溶解后加 115mL 乙腈，用水定容至刻度。

流动相 B：水/乙腈/磷酸=499/499/2；梯度洗脱

流速：1.2 mL/min

检测波长：361nm

柱温：40 $^{\circ}$ C

梯度洗脱表

t/min	A	B
0	100	0
13	100	0
28	0	100
38	100	0
50	100	0

5.13.4 典型谱图

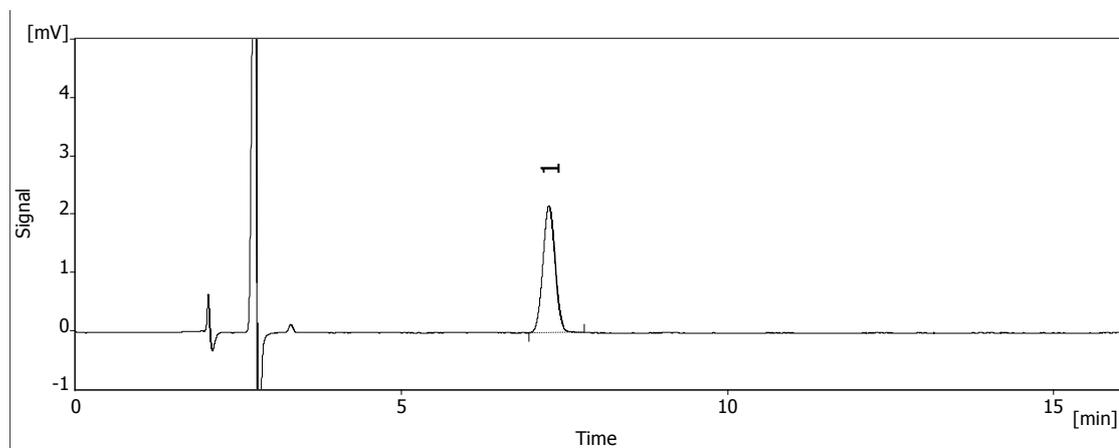


图 5-5 维生素 B12 典型分离谱图

附录 1 维生素标准溶液校正方法

● 维生素 A、D、E 标准溶液校正

维生素 A: 取视黄醇标准储备溶液 50 μ L 于 10mL 的棕色容量瓶中, 用无水乙醇定容至刻度, 混匀, 用 1cm 石英比色杯, 以无水乙醇为空白参比, 按下表的测定波长测定其吸光度;

维生素 D: 分别取维生素 D2、维生素 D3 标准储备溶液 100 μ L 于各 10mL 的棕色容量瓶中, 用无水乙醇定容至刻度, 混匀, 分别用 1cm 石英比色杯, 以无水乙醇为空白参比, 按下表的测定波长测定其吸光度;

维生素 E: 分别取 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚和 δ -生育酚标准储备溶液 500 μ L 于各 10mL 棕色容量瓶中, 用无水乙醇定容至刻度, 混匀, 分别用 1cm 石英比色杯, 以无水乙醇为空白参比, 按下表的测定波长测定其吸光度。

试液中维生素的浓度计算公式: $X = (A \times 10^4) / E \dots \dots \dots (A.1)$

式中:

X —— 维生素标准稀释液浓度, 单位为微克每毫升(μ g/mL);

A —— 维生素稀释液的平均紫外吸光值;

10^4 —— 换算系数;

E —— 维生素 1% 比色光系数(各维生素相应的比色吸光系数见下表)。

表 5-8 维生素 A/D/E 测定波长及百分吸光系数

目标物	波长/nm	E(1%比色光系数)
α -生育酚	292	76
β -生育酚	296	89
γ -生育酚	298	91
δ -生育酚	298	87
视黄醇	325	1835
维生素D2	264	485
维生素D3	264	462

● 维生素 B2 标准溶液校正

准确吸取 1.00mL 维生素 B2 标准储备液, 加 1.30mL 0.1mol/L 的乙酸钠溶液, 用水定容到 10mL, 作为标准测试液。

对照溶液的配制准确吸取 1.00mL 0.012mol/L 的盐酸溶液, 加 1.30mL 0.1mol/L 的乙酸钠溶液, 用水定容到 10mL, 作为对照溶液。

吸收值的测定用 1cm 比色杯于 444nm 波长下, 以对照溶液为空白对照, 测定标准校正溶液的吸收值。

标准溶液的浓度计算: $\rho = (A_{444} \times 10^4 \times 10) / 328 \dots \dots \dots (A. 2)$

式中: ρ —— 标准储备液的质量浓度, 单位为微克每毫升(μ g/mL);

A_{444} —— 标准测试液在 444nm 波长下的吸光度值;

10^4 —— 将 1% 的标准溶液浓度单位换算为测定溶液浓度单位(μ g/mL)的换算系数;

10 —— 标准储备液的稀释因子;

328 —— 维生素 B2 在 444nm 波长下的百分吸光系数, 即在 444nm 波长下, 液层厚度为 1cm 时, 浓度为 1% 的维生素 B2 溶液(盐酸-乙酸钠溶液, pH=3.8)的吸光度。

● **维生素 B3 (烟酸、烟酰胺) 标准溶液校正**

烟酸或烟酰胺标准浓度的标定：准确吸取烟酸或烟酰胺标准储备液 1.0mL 于 100mL 容量瓶中，用 0.1mol/L 盐酸定容至刻度混匀，按给定波长测定溶液的吸光值，用比吸光系数计算出该溶液中烟酸或烟酰胺的浓度。测定条件见下：

表 5-9 烟酸和烟酰胺吸光值的测定条件

标准	比吸光系数 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$	波长 λ/nm
烟酸	420	260
烟酰胺	410	260

浓度按照 A3 计算：

$$c = A/E \times (1/100) \dots\dots\dots(A. 1)$$

式中：c1——溶液中烟酸或烟酰胺的浓度,单位为克每毫升 (g/mL);

A——溶液中烟酸或烟酰胺的平均紫外吸光值;

E——烟酸或烟酰胺 1%比吸光系数。

● **维生素 B6 各组分标准溶液的浓度校正方法**

标准校正溶液的配制分别准确吸取 1.00mL 吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺标准储备液，用 0.1mol/L 盐酸溶液定容到 100mL，作为标准校正液。

对照溶液的配制以 0.1mol/L 盐酸溶液作为对照溶液。

吸收值的测定用 1cm 比色杯于相应最大吸收波长下，以对照溶液为空白对照，测定各标准校正溶液的吸收值。

标准溶液的浓度计算

各标准储备液的质量浓度按式(A.4)计算： $\rho_i = [(A_i \times M_i) / \epsilon_i] \times V \times F_i \dots\dots\dots(A. 4)$

式中：

ρ_i ——维生素 B6 各组分(吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺)标准储备液的质量浓度，单位为 $\mu\text{g/mL}$;

A_i ——维生素 B6 各组分(吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺)标准测试液在各自最大吸收波长 λ_{max} 下的吸收值;

M_i ——维生素 B6 各组分(吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺)标准品的分子量;

ϵ_i ——维生素 B6 各组分(吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺)在 0.1mol/L 盐酸溶液中的吸收系数;

V——稀释因子;

F_i ——无维生素 B6 各组分(吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺)的对照溶液的换算因子。

表 5-10 维生素 B6 各组分标准溶液浓度校正的相关参数

化合物	溶剂	λ_{max}	M_i g/mol	ϵ_i $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	F_i
盐酸吡哆醇 (pyridoxine-hydrochloride)	0.1 mol/L HCl(pH≈1)	291	205.6	8.6	0.823
盐酸吡哆醛 (pyridoxal-hydrochloride)	0.1 mol/L HCl(pH≈1)	288	203.6	9.0	0.821
双盐酸吡哆胺 (pyridoxamine-dihydrochloride)	0.1 mol/L HCl(pH≈1)	292	241.1	8.2	0.698

● **维生素 K1 标准浓度校正方法**

维生素 K1 标准溶液配制后需对其浓度进行校正,具体操作如下:取维生素 K1 标准储备溶液 1.00mL,吹干甲醇后,用正己烷定容至 100mL 容量瓶中,按给定波长测定吸光值,以正己烷为空白,用 1cm 的石英比色杯在 248nm 波长下测定吸收值,标准储备液的质量浓度按式(A.5)计算,测定条件见下表。

表 5-11 维生素 K1 吸光值的测定条件

标准	比吸光系数	波长 λ /nm
维生素 K ₁	419	248

$$\rho = A_{248} \times 10^4 \times 100 / 419 \dots\dots\dots(A.5)$$

式中: ρ ——维生素 K1 标准储备液浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)

A_{248} ——标准校正测试液在 248nm 波长下的吸收值

100——稀释因子

419——在 248nm 波长下的百分吸光系数,即在 248nm 波长下,液层厚度为 1cm 时,浓度为 1%的维生素 K1 正己烷溶液的吸光度

公司网址: www.eliteHPLC.com

客服电话: 400-66-35483

产品/业务咨询: 13604289881



大连公司

公司地址: 高新园区七贤岭学子街 2-2 号

公司电话: 0411-84753333(总机)-转销售

苏州公司

公司地址: 苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 14 栋 501

公司电话: 0512-67997572(总机)-转销售

北京办事处

地址: 北京市朝阳区汤立路 201 号东亚奥北中心南区 4 号楼 2 单元 2307 室

电话: 13998611425

济南办事处

地址: 山东省济南市历下区奥体西路 1222 号力高国际 10 楼 1-1816 室

电话: 18842689516

上海办事处

地址: 徐汇区梅陇路 130 号华东理工大学实验四楼 204 室

电话: 18842688135

武汉办事处

地址: 武汉市洪山区鸿桂苑东区 1 栋 1 单元 2501

电话: 18842683216

南京办事处

地址: 江苏省南京市建邺区云锦路 45 号万达广场 14 幢 608 室

电话: 18842688127

厦门办事处

地址: 厦门市集美区鱼福三里 383 号 127 单元

电话: 18842685196

西安办事处

地址: 陕西省西安市西稍门十字西南角柠檬宫舍 11505 室

电话: 18842681836

广州办事处

地址: 广州市白云区东兴二街 3 号擎山苑 C2 栋 1404 房

电话: 18842683616

成都办事处

地址: 成都武侯区九兴大道 6 号高发大厦 A 座 610

电话: 18842681865