

食品行业维生素检测

解决方案

目录

第1章 前言 1

1.1 HPLC 法测定维生素含量的标准 1

1.2 仪器配置简表 2

第2章 维生素 A 的含量测定 3

2.1 反相高效液相色谱法 3

2.2 正相高效液相色谱法 10

2.3 紫外分光光度计法 11

第3章 维生素 D 的含量测定 13

3.1 反相高效液相色谱法 13

3.2 正相高效液相色谱法 19

第4章 维生素 E 的含量测定 21

4.1 反相高效液相色谱法 21

4.2 正相高效液相色谱法 26

第5章 维生素 B1 的测定 29

5.1 仪器设备与试剂 29

5.2 实验方法 30

5.3 实验结果 31

第6章 维生素 B2 的测定 34

6.1 仪器设备与试剂 34

6.2 实验方法 35

6.3 实验结果 36

第 7 章 维生素 B3(烟酸)的测定 39

7.1 仪器设备与试剂 39

7.2 实验方法 40

7.3 实验结果 41

第 8 章 泛酸的测定 44

8.1 仪器设备与试剂 44

8.2 实验方法 45

8.3 实验结果 46

第 9 章 维生素 B6 测定 49

9.1 仪器设备与试剂 49

9.2 实验方法 50

9.3 实验结果 51

第 10 章 维生素 K1 的测定 54

10.1 仪器设备与试剂 54

10.2 实验方法 55

第 11 章 叶酸的测定 56

11.1 仪器设备与试剂 56

11.2 实验方法 56

第 12 章 维生素 B12 的测定 57

12.1 仪器设备与试剂 57

12.2 实验方法 57

附录 1 维生素标准溶液校正方法 59

第1章 前言

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。

1.1 HPLC 法测定维生素含量的标准

表 1-1 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）、GB/T 7628-2008（谷物）
3	B2	GB 5009.85-2016	GB/T 5009.85-2003（食品）、GB 5413.12-2010（乳制品）、GB/T 9695.28-2008（肉）、GB/T 7629-2008（谷物）
4	B3	GB 5009.89-2016	GB/T5009.89-2003(食品)、GB5413.15-2010（乳品）、GB/T9695.25-2008（肉）
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	GB/T 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 1-2 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	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	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 1-3 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

1.2 仪器配置简表

表 1-4 食品维生素检测方法及配件清单

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：HPLC梯度系统、Supersil C30 3 μ m 4.6 $\times$ 250mm 或者Supersil PFP 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm 或Supersil ODS2 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm；UV2030/2050（校准溶液标定）
A	辅料	2020版药典，0721通则	正相HPLC法：HPLC等度系统、Supersil SiO ₂ 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm； UV法：UV2030/2050
A	添加剂	GB 14750-2010	UV法：UV2030/2050、凝胶净化系统（500 μ L定量环）、C18色谱柱 5 μ m 4.6 $\times$ 150mm
D2/D3	营养成分	GB 5009.82-2016	反相HPLC法：HPLC等度系统（100 μ L定量环）、Supersil ODS2 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm；半制备净化系统：正相HPLC等度（500 μ L定量环）、Supersil SiO ₂ 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm
D2	添加剂	GB 14755-2010	正相HPLC法：HPLC等度系统、硅胶色谱柱 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm
D2/D3	营养成分	2020版药典-维生素AD软胶囊	反相HPLC法：HPLC等度系统、Supersil ODS2 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm
E	营养成分	GB 5009.82-2016	反相HPLC法：HPLC梯度系统、Supersil C30 3 μ m 4.6 $\times$ 250mm 或者Supersil PFP 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm 或Supersil ODS2 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm；UV2030/2050（校准溶液标定） 正相HPLC法：HPLC等度系统、Supersil NH ₂ / NH ₂ -S 1.8 μ m 3.0 $\times$ 150mm 、 UV2030/2050；
B1	营养成分	GB 5009.84-2016	HPLC等度系统-荧光检测器、C18色谱柱 5 μ m 4.6 $\times$ 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 μ m 4.6 $\times$ 150mm
B3	营养成分	GB 5009.89-2016	HPLC等度系统、C18色谱柱 Supersil ODS-B 5 μ m 4.6 $\times$ 150mm
B5 (泛酸)	营养成分	GB 5009.210-2016	HPLC等度系统、C18色谱柱 5 μ m 4.6 $\times$ 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 μ m 4.6 $\times$ 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 μ m 4.6 $\times$ 250mm
B9 (叶酸)	添加剂	GB 15570-2010	HPLC等度系统、Supersil AQ-C18 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm
生物素	营养强化剂	GB 1903.25-2016	HPLC等度系统、C18色谱柱 3 μ m 4.6 $\times$ 150mm
B12	保健品	GB/T 5009.217-2008	HPLC梯度系统、Supersil ODS2 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm

第2章 维生素 A 的含量测定

2.1 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。

2.1.1 仪器设备与试剂

表2-1 高效液相色谱系统配置清单

序号	名称	数量
1	UV3200或荧光检测器	1台
2	P3200高压恒流泵	1台
3	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
4	ZJ-1支架	1个
5	Kromstation色谱数据工作站	1套
6	TP3200溶剂托盘	1个
7	Supersil C30 3 μ m 4.6 $\times$ 250mm或 Supersil PFP 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm或 Supersil ODS2 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm	1支
8	EClassical 3200系统工具包	1套
9	500mL溶剂瓶（无色）	2支
10	AD适配器（荧光检测器需配）	
11	O3200柱温箱（选配）	1台
12	S3200自动进样器(选配)	1台

表2-2 主要试剂

序号	试剂	纯度
1	甲醇	色谱纯
2	水	超纯水
3	无水乙醇	色谱纯，不含醛
4	抗坏血酸	分析纯
5	乙醚	不含过氧化物
6	石油醚	沸程30-60℃
7	淀粉酶	分析纯
8	pH试纸	pH1~14
9	2, 6-二叔丁基对甲酚	分析纯
10	视黄醇	≥95%

注：或同等配置其它型号高效液相色谱仪。

表 2-3 主要前处理设备

序号	名称	规格	备注
1	溶剂过滤器	1000mL	流动相过滤
2	隔膜真空泵	0.08MPa, 160W	GM-0.33A
3	分析天平		感量为0.0001g
4	恒温水浴振荡器		
5	氮吹仪		浓缩样品
6	分液漏斗萃取净化振荡器		提取样品
7	紫外-可见分光光度计	UV2030/UV2050	溶液校正

实验过程中其它玻璃器皿还包括棕色容量瓶(10mL、50mL)、1.5mL 塑料离心管、移液枪(0~1000 μ L, 0~5000 μ L)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性注射器(1mL)、针筒式滤膜(0.45 μ m)、进样针、一次性 PVC 手套、一次性口罩等。

2.1.2 实验方法

● 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 于同一 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。

● 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 0.45μm 有机系滤膜后供高效液相色谱测定。

2.1.3 色谱条件

流动相：甲醇/水

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

或 Supersil PFP 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm

或 Supersil C30 3 μ m 4.6 $\times$ 250mm

流量：1.0mL/min

检测：UV325nm 或激发 328nm，发射 440nm

进样体积：10 μ L

表 2-4 梯度条件

时间/min	水%	甲醇%	流速 mL/min
0	4	96	0.8
13	4	96	0.8
20	0	100	0.8
24	0	100	0.8
24.5	4	96	0.8
30	4	96	0.8

2.1.4 实验结果

● Supersil PFP 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm 色谱柱分析结果

1) 维生素 A 标准品分析谱图

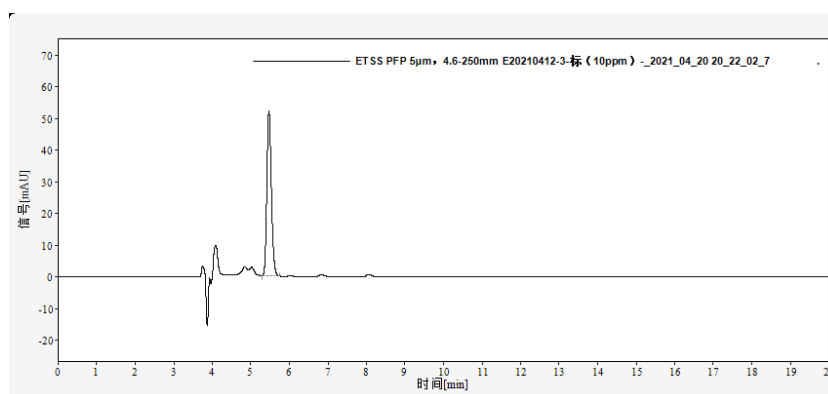


图 2-1 维生素 A 标品浓度为 10 μ g/mL 色谱图（紫外检测器）

表 2-5 10 μ g/mL 的维生素 A 标液色谱参数表

化合物名称	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]	拖尾因子	柱效[N/m]	分离度[-]
维生素 A	5.467	424	1.21	41856	1.6/5.8

2) 线性范围

按照 GB5009.82-2016 中第一法，配制维生素 A 的标准溶液，浓度为 0.2 μ g/mL、0.5 μ g/mL、1.0 μ g/mL、2.0 μ g/mL、10.0 μ g/mL 的六个标点，计算相关线性系数。

表 2-6 线性参数表

序号	浓度(μ g/mL)	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]	拖尾因子
1	0.2	5.469	8	1.23
2	0.5	5.452	20	1.22
3	1	5.464	41	1.20
4	2	5.458	82	1.23
5	5	5.465	211	1.22
6	10	5.467	424	1.22

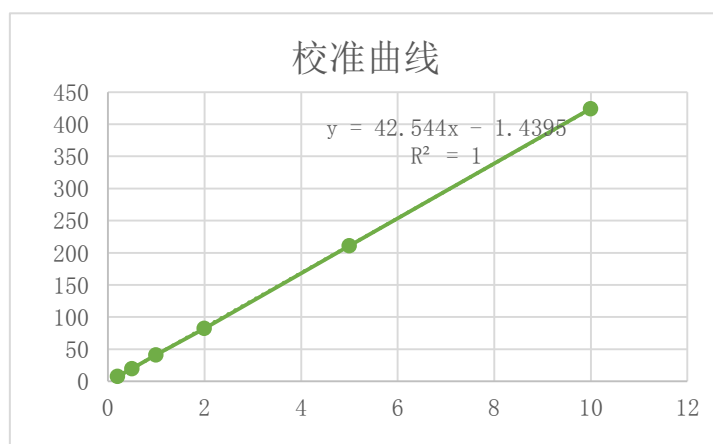


图 2-2 维生素 A 校准曲线图

根据浓度和峰面积数据，得到维生素 A 的线性曲线方程为： $y = 42.544x - 1.4395$ ， $R^2 = 1.000$ 。因此维生素 A 在 $0.2 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ 浓度范围内，线性关系良好。

3) 重复性

用浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 维生素 A 标准溶液，连续进样 6 针，峰面积和保留时间 RSD 结果如下：

表 2-7 重复性参数表 (n=6)

序号	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]
1	5.466	428
2	5.468	422
3	5.458	427
4	5.452	422
5	5.459	425
6	5.467	424
RSD%	0.12	0.63

4) 最小检测浓度

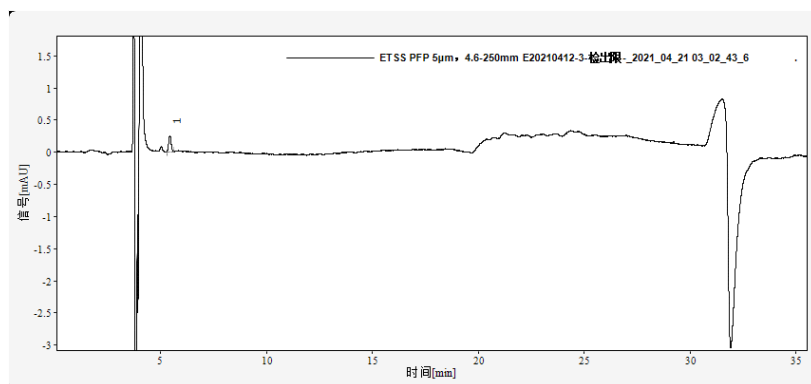


图 2-3 $0.05 \mu\text{g/mL}$ 维生素 A 标准溶液色谱图

该色谱条件下，仪器的基线噪音为 0.0302 mAU ，根据信噪比 $S/N=3$ ，计算得到维生素 A 的仪器最小检测浓度为 $0.017 \mu\text{g/mL}$ ，实际方法检出限为 $3.5 \mu\text{g}/100\text{g}$ ，比国标的方法检出限 $10 \mu\text{g}/100\text{g}$ ，灵敏度高的不少。

5) 实际样品分析

● AD 钙奶样品中维生素 A 的含量分析

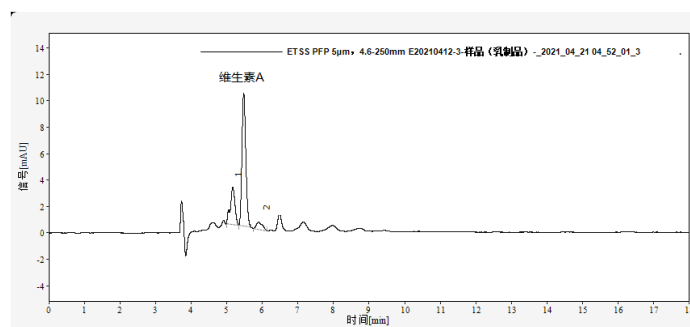


图 2-4 AD 钙奶样品中维生素 A 分析色谱图

根据外标法计算样品中维生素 A 含量如下:

表 2-8 AD 钙奶样品中维生素 A 含量结果表

样品名称	取样量 (g)	峰面积[mAU.s]	分离度	VA 含量 (mg/100g)
AD 钙奶	50.0184	77	1.5/1.5	0.037

● 多种维生素矿物质片中维生素 A 的含量分析

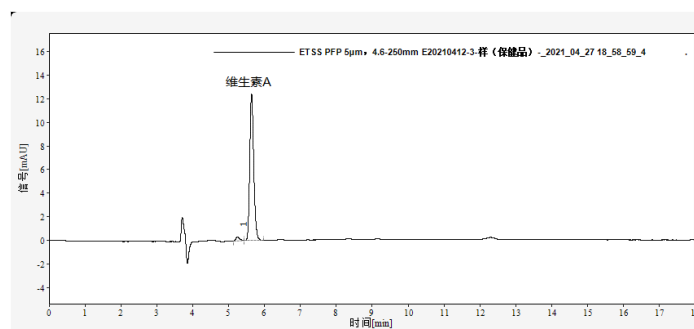


图 2-5 多种维生素矿物质片保健品中维生素 A 分析色谱图

根据外标法计算样品中维生素 A 含量如下:

表 2-9 多种维生素矿物质片样品中维生素 A 含量结果表

样品名称	取样量 (g)	峰面积[mAU.s]	分离度	VA 含量 (mg/100g)
多种维生素矿物质片	2.0018	95	1.96	11.4

● Supersil ODS2 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm 色谱柱分析结果

1) 维生素 A 标准品分析谱图

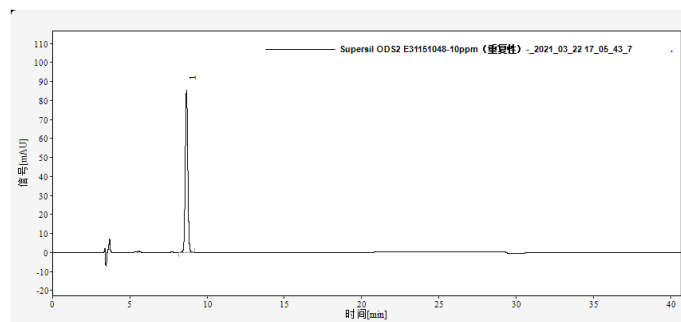


图 2-6 维生素 A 标品浓度为 10 μ g/mL 色谱图（紫外检测器）

表 2-10 10 μ g/mL 的维生素 A 标液色谱参数表

峰号	化合物	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]	拖尾因子
1	维生素 A	8.628	953.656	1.055

2) 线性范围

按照 GB5009.82-2016 中第一法，配制维生素 A 的标准溶液，浓度为 0.2 μ g/mL、0.5 μ g/mL、1.0 μ g/mL、2.0 μ g/mL、10.0 μ g/mL 的六个标点，计算相关线性系数。

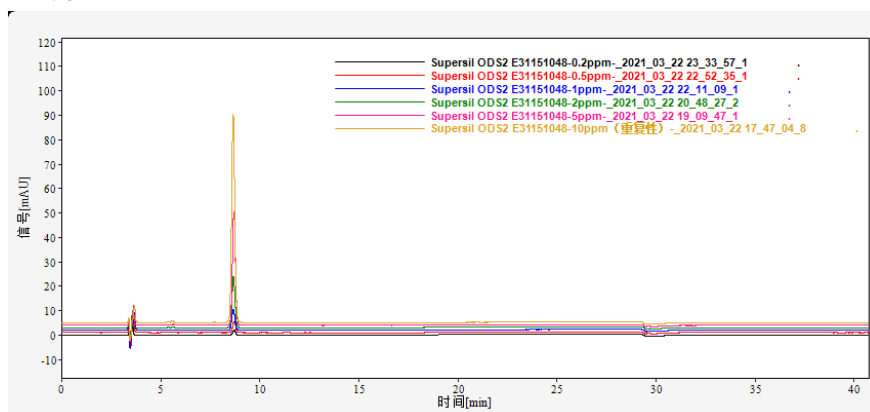


图 2-7 维生素 A 校准曲线叠加色谱图(n=6)

表 2-11 线性参数表

峰号	浓度(μ g/mL)	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]	拖尾因子
1	0.2	8.703	21.52	1.029
2	0.5	8.702	49.714	1.066
3	1	8.661	94.616	1.056
4	2	8.671	222.74	1.045
5	5	8.691	505.56	1.044
6	10	8.652	965.78	1.052

线性曲线方程: $y = 96.793x + 6.5562$ $R^2 = 0.9992$ 。

因此维生素 A 在 0.2~10 μ g/mL 浓度范围内，线性关系良好。

3) 重复性

用浓度为 10 μ g/mL 维生素 A 标液，重复进样 6 针，峰面积和保留时间 RSD 结果如下：

表 2-12 重复性参数表 (n=6)

序号	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]
1	8.621	959.58
2	8.628	953.67
3	8.621	967.09
4	8.657	963.26
5	8.647	966.58
6	8.660	966.12
RSD%	0.54	0.21

2.2 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》2020 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。

2.2.1 仪器设备与试剂

高效液相色谱系统配置清单参见表 2-1；主要前处理设备见表 2-3；主要试剂：正己烷（色谱纯）、异丙醇（色谱纯）、碘试剂。

2.2.2 实验方法

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。

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。

2.2.3 分析条件及结果

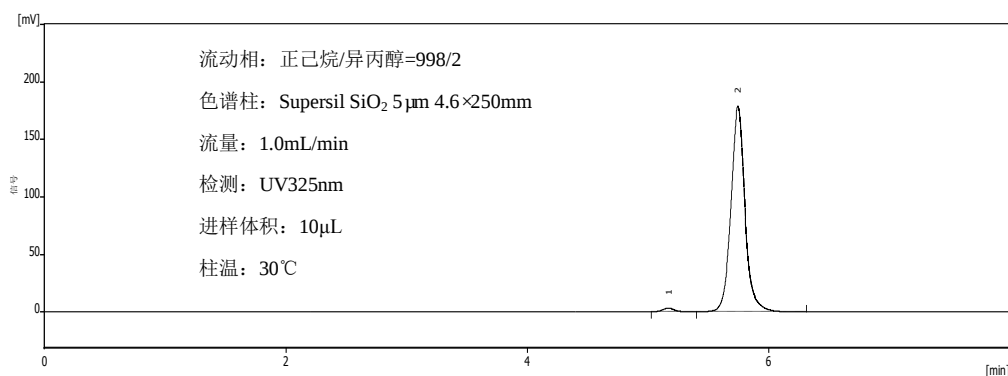


图 2-8 维生素 A 醋酸酯标准样品分析谱图

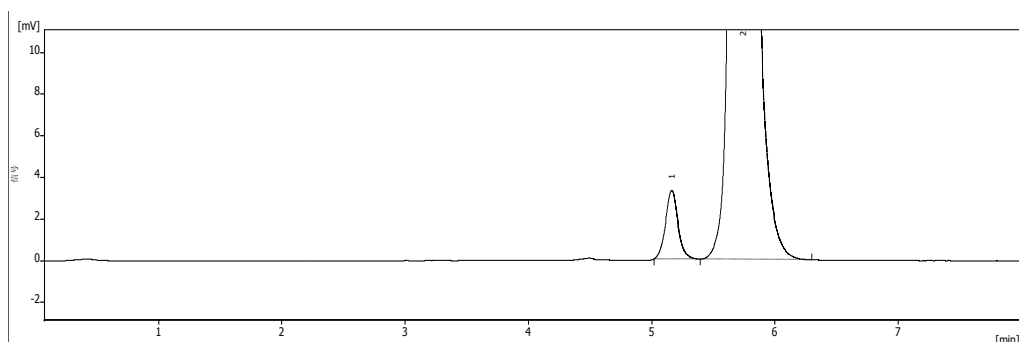


图 2-9 维生素 A 醋酸酯标准样品分析谱图局部放大图

表 2-4 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

2.3 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。

2.3.1 仪器设备与试剂

表 2-13 主要仪器设备

序号	名称	数量
1	UV2030紫外可见分光光度计	1台
2	分析天平（感量为0.0001g）	1台
3	水浴锅	1台
4	氮吹仪	1台

表 2-15 主要试剂

序号	试剂	纯度
1	环己烷	色谱纯
2	水	超纯水
3	无水乙醇	分析纯，不含醛
4	氢氧化钾	分析纯
5	乙醚	不含过氧化物
6	异丙醇	分析纯
7	酚酞指示液	色谱纯
8	甲醇	色谱纯
9	乙腈	色谱纯

表 2-14 净化色谱系统配置清单

序号	品名及规格	数量
1	Elite GPC 凝胶净化系统	1套
	(1) P1100 高压恒流泵	1台
	(2) D1100 紫外-可见检测器（专用池）	1台
	(3) Rheodyne7725i 高压六通进样阀（500 μ L 定量环）	1个
	(4) VB1100 阀支架	1个
	(5) Elitapex 色谱数据工作站	1套
	(6) F3100 馏分收集器	1台
	(7) ZJ-5 色谱柱支架	1个
	(8) 溶剂瓶托盘	1个
	(9) 系统工具包	1套
2	净化柱 C18 5 μ m, 4.6 $\times$ 150mm	1支
3	500mL 溶剂瓶 无色（选配）	1只

注：Rheodyne7725i 高压六通进样阀可选配其他体积的定量环。

2.3.2 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》2020 年版四部通则 0721 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 2-16 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 $E_{1cm}^{1\%}$ 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的 ± 0.02 ，可用公式（A.1）计算含量：

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

室中：x——每克样品中含有维生素 A 的 IU；

$E_{1cm}^{1\%}$ ——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: A_{328} (校正)——在波长 328nm 处校正后的吸光度;

A_{328} ——在波长 328nm 处的吸光度;

A_{316} ——在波长 316nm 处的吸光度;

A_{340} ——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±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, 洗涤应缓缓旋动, 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 9~15IU。

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 = $E_{1\text{cm}}^{1\%}(325\text{nm}, \text{校正}) \times 1830$; 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 300~400IU), 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。

净化色谱条件

流动相: 甲醇-乙腈-水 (50:50:2)

色谱柱: C18 色谱柱 5μm 4.6×150mm

流量: 1.0mL/min

检测: UV254nm

进样体积: 500μL

柱温: 室温

第3章 维生素 D 的含量测定

3.1 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。

3.1.1 仪器设备与试剂

表3-1 高效液相色谱系统配置清单

序号	名称	数量
1	UV3200紫外可见检测器	1台
2	P3200高压恒流泵	1台
3	Rheodyne 7725i高压六通进样阀 (配100μL定量环)	1个
4	ZJ-1支架	1个
5	Kromstation色谱数据工作站	1套
6	TP3200溶剂托盘	1个
7	Supersil ODS2 5μm 4.6×250mm	1支
8	EClassical 3200系统工具包	1套
9	500mL溶剂瓶（无色）	2支
10	O3200柱温箱	1台
11	S3200自动进样器(选配)	1台

注：或同等配置其它型号高效液相色谱仪。

表3-2 主要试剂

序号	试剂	纯度
1	甲醇	色谱纯
2	水	超纯水
3	无水乙醇	色谱不含醛
4	抗坏血酸	分析纯
5	正己烷	色谱纯
6	石油醚	沸程30-60℃
7	淀粉酶	分析纯
8	pH试纸	pH1~14
9	2, 6-二叔丁基对甲酚	分析纯
10	氢氧化钾	分析纯
11	维生素D2标准品	>98%
12	维生素D3标准品	>98%

表 3-3 净化色谱系统配置清单

序号	品名及规格	数量
1	Elite GPC 凝胶净化系统	1 套
	(1)P1100 高压恒流泵	1 台
	(2)D1100 紫外-可见检测器（专用池）	1 台
	(3)Rheodyne7725i 高压六通进样阀 (配 500μL 定量环)	1 个
	(4)VB1100 阀支架	1 个
	(5)Elitapex 色谱数据工作站	1 套
	(6)F3100 馏分收集器	1 台
	(7)ZJ-5 色谱柱支架	1 个
	(8)溶剂瓶托盘	1 个
	(9)系统工具包	1 套
2	净化柱：Supersil SiO2 5 μm 4.6×250mm	1 支
3	500mL 溶剂瓶 无色 （选配）	1 只

表 3-4 其它前处理设备

序号	名称	规格
1	溶剂过滤器	1000mL
2	隔膜真空泵	0.08MPa, 160W
3	分析天平	感量为0.0001g
4	磁力搅拌器	
5	旋转蒸发器	
6	氮吹仪	
7	萃取净化振荡器	
8	紫外-可见分光光度计	UV2030/2050

实验过程中还包括棕色容量瓶(10mL、50mL)、1.5mL 塑料离心管、移液枪(0~1000μL, 0~5000μL)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性注射器(1mL)、针筒式滤膜(0.45μm)、进样针、一次性 PVC 手套、一次性口罩等。

3.1.2 实验方法

● 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℃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℃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。

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。

● 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，0.22 μm 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 馏分于试管中。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。

● 样品净化色谱条件：

色谱柱：Supersil SiO₂ 5μm 4.6mm × 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℃ ± 1℃

进样体积：500μL

● 样品分析色谱条件：

色谱柱：Supersil ODS2 5μm 4.6mm × 250mm

流动相：甲醇：水=95：5

流速：1mL/min

检测波长：264nm

柱温：35℃ ± 1℃

进样体积：100μL

3.1.3 实验结果

1) 标准溶液谱图

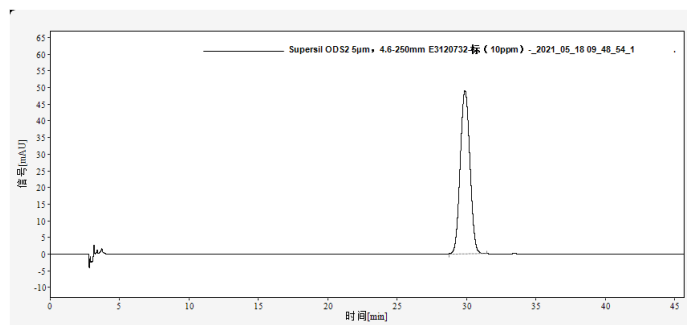


图 3-1 10µg/mL 维生素 D 标准溶液谱图

表 3-5 10µg/mL 维生素 D 标准溶液色谱参数

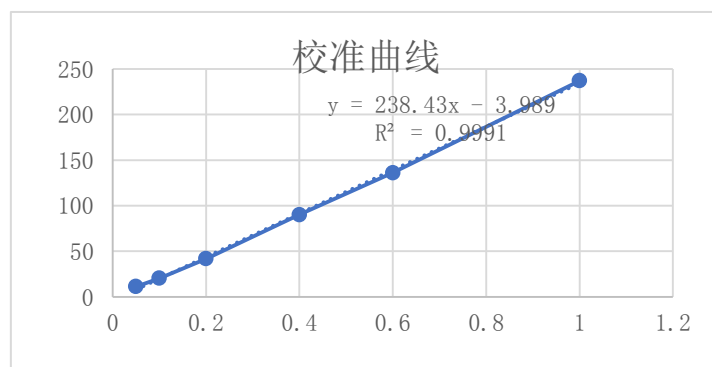
化合物名称	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]	拖尾因子	柱效[N/m]
维生素 D	29.890	2381	1.05	33500

2) 线性范围

按照 GB5009.82-2016 中第四法, 配制维生素 D 的标准溶液, 浓度为 0.05µg/mL、0.1µg/mL、0.2µg/mL、0.4µg/mL、0.6µg/mL、1.0µg/mL、10.0µg/mL 的七个标点, 计算相关线性系数。

表 3-6 维生素 D 校准曲线色谱参数

浓度(µg/mL)	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]
0.05	0.05	29.716
0.1	0.1	29.641
0.2	0.2	29.740
0.4	0.4	29.719
0.6	0.6	29.681
1.0	1	29.512



维生素 D 校准曲线图

根据浓度和峰面积数据, 计算维生素 D 的校准曲线为: $y = 23.43x - 3.989$, $R^2 = 0.9991$ 。

因此维生素 D 在 0.05-1.0µg/mL 的浓度范围内, 线性关系良好。

3) 峰面积重复性

1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的维生素 D 标准溶液，重复进样 6 针，计算峰面积和保留时间 RSD 值。

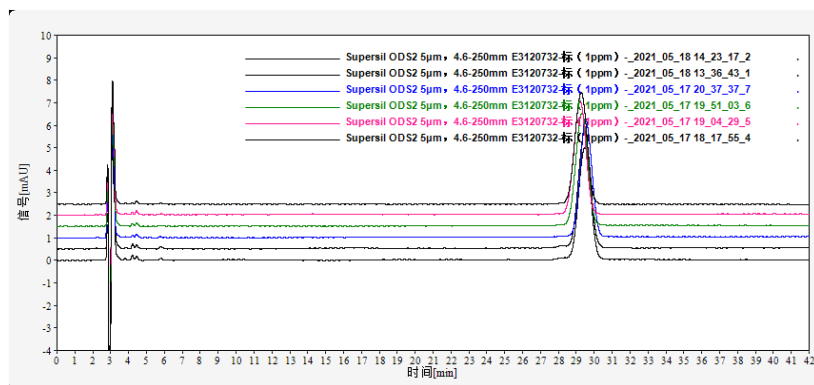


图 3-2 浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 维生素 D 标液叠加谱图 (n=6)

表 3-7 浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 维生素 D 标液色谱参数

峰号	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]
1	29.480	239
2	29.459	242
3	29.512	240
4	29.311	239
5	29.211	239
6	29.277	240
RSD%	0.42	0.40

4) 最小检测浓度

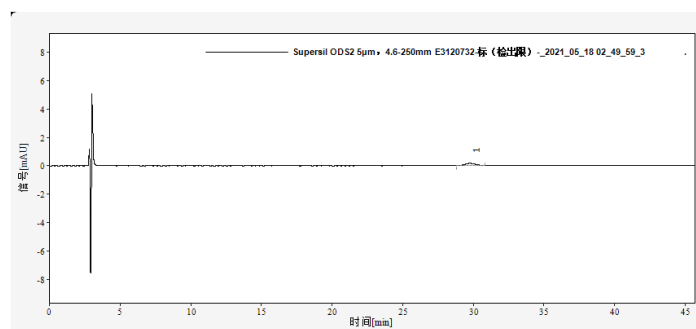


图 3-3 0.035 $\mu\text{g/mL}$ 维生素 D 标准溶液色谱图

该色谱条件下，仪器的基线噪音为 0.0405mAU，根据信噪比 $S/N=3$ ，计算得到维生素 D 的仪器最小检测浓度为 0.024 $\mu\text{g/mL}$ ，实际方法检出限为 0.5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ，国标的方法检出限为 0.7 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。因此利用该系统分析维生素 D 灵敏度可以满足国标要求。

5) 实际样品分析

● AD 钙奶中维生素 D 的含量分析

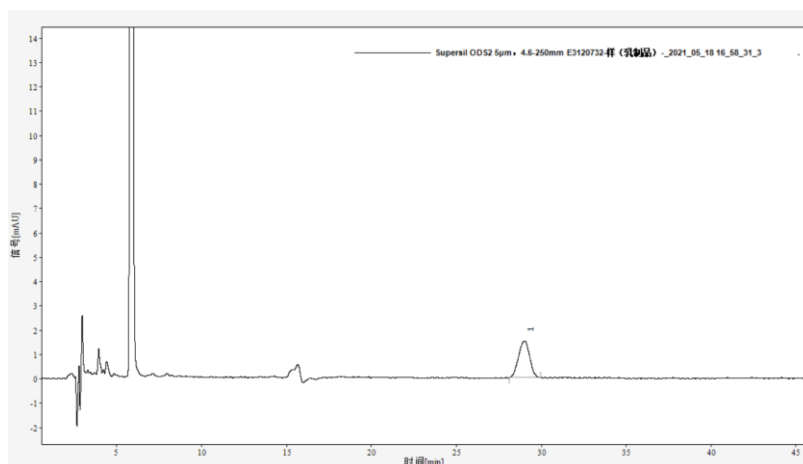


图 3-4 AD 钙奶中维生素 D 分析谱图

表 3-8 AD 钙奶中维生素 D 的含量结果表

物质	保留时间	峰高/mAU	峰面积/mAU.s	拖尾因子	分离度
维生素 D	29.024	1.484	69.886	0.971	31.3

根据外标法计算样品中维生素 D 含量为：0.0012mg/100g。

● 多种维生素矿物质片中维生素 D 含量分析

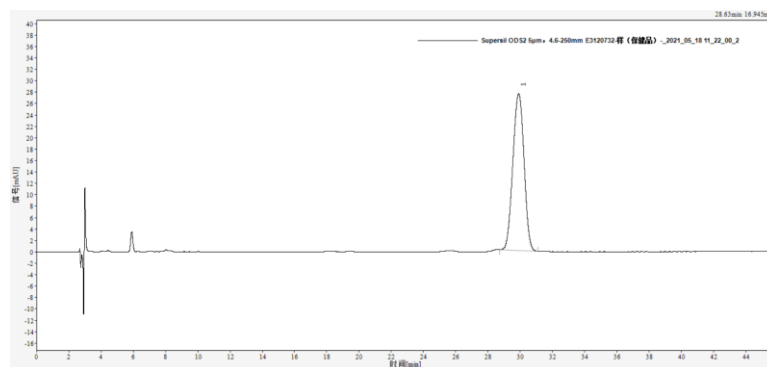


图 3-5 多种维生素矿物质片中维生素 D 分析谱图

表 3-9 多种维生素矿物质片中维生素 D 的含量结果表

物质	保留时间	峰高/mAU	峰面积/mAU.s	拖尾因子	分离度
维生素 D	29.914	27.667	1350.417	0.969	1.3

根据外标法计算多种维生素矿物质片中维生素 D 含量为：0.222mg/100g。

3.2 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食品添加剂维生素 D2 含量测定。

3.2.1 仪器设备与试剂

表3-10 高效液相色谱系统配置清单

序号	名称	数量
1	UV3200紫外可见检测器	1台
2	P3200高压恒流泵	1台
3	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
4	ZJ-1支架	1个
5	色谱数据工作站	1套
6	TP3200溶剂托盘	1个
7	硅胶柱5 μ m 4.6 $\times$ 250mm	1支
8	EClassical3200系统工具包	1套
9	500mL溶剂瓶（无色）	2支
10	O3200柱温箱（选配）	1台
11	S3200自动进样器(选配)	1台

表3-11 主要试剂

序号	试剂	纯度
1	正戊醇	色谱纯
2	正己烷	色谱纯
3	异辛烷	色谱纯
4	维生素D2标准品	>98%
5	维生素D3标准品	>98%

表3-12 主要前处理设备

序号	名称	规格
1	溶剂过滤器	1000mL
2	隔膜真空泵	0.08MPa, 160W
3	分析天平	感量为0.0001g
4	超声波清洗器	

注：或同等配置其它型号高效液相色谱仪。

实验过程中还包括棕色容量瓶(10mL、100mL)、1.5mL 塑料离心管、移液枪(0~1000 μ L, 0~5000 μ L)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性注射器(1mL)、针筒式滤膜(0.45 μ m)、进样针、一次性 PVC 手套、一次性口罩等。

3.2.2 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。

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±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。

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。

色谱条件

色谱柱：硅胶柱 5μm 4.6×250mm

流动相：正己烷：正戊醇=1000：3

流速：2mL/min

检测波长：254nm

进样体积：20μL

柱温：室温

第4章 维生素 E 的含量测定

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 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。

4.1.1 仪器设备与试剂

表4-1 高效液相色谱系统配置清单

序号	名称	数量
1	UV3200或荧光检测器	1台
2	P3200高压恒流泵	1台
3	O3200柱温箱	1台
4	Rheodyne 7725i 高压六通进样阀	1个
5	ZJ-1支架	1个
6	TD-1-15梯度混合器	1个
7	色谱数据工作站	1套
8	TP3200溶剂托盘	1个
9	Supersil C30 3 μ m 4.6 $\times$ 250mm/或 Supersil PFP 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm/或 Supersil ODS2 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm	1支
10	EClassical 3200系统工具包	1套
11	AD适配器（荧光检测器需配）	
12	500mL溶剂瓶（无色）	2支
13	S3200自动进样器(选配)	1台

表 4-4 主要试剂

序号	试剂	纯度
1	甲醇	色谱纯
2	水	超纯水
3	无水乙醇	分析纯，不含醛
4	抗坏血酸	分析纯
5	乙醚	不含过氧化物
6	石油醚	沸程30-60℃
7	淀粉酶	分析纯
8	pH试纸	pH1~14
9	2, 6-二叔丁基对甲酚	分析纯
10	α 、 β 、 γ 、 δ 生育酚	$\geq 95\%$

表4-2 检测器选择指南

检测器	优缺点
UV3200	维生素E检测波长为294nm
荧光检测器	对生育酚（维E）四种异构体检测灵敏度高，选择性佳 维E：激发294nm，发射328nm

表4-3 色谱柱选择指南

色谱柱	优缺点
C30	标准推荐色谱柱，需准确控温，柱尺寸3 μ m 4.6 $\times$ 250mm
PFP	无法准确控温时，选用PFP柱分离维E同分异构体
C18	只含 α -生育酚，不含 β 、 γ 生育酚可选C18柱，甲醇洗脱

表 4-5 主要前处理设备

序号	名称	规格	备注
1	溶剂过滤器	1000mL	流动相过滤
2	隔膜真空泵	0.08MPa，160W	GM-0.33A
3	分析天平		感量0.0001g
4	恒温水浴振荡器		
5	氮吹仪		
6	分液漏斗萃取净 化振荡器		

实验过程中还包括棕色容量瓶(10mL、50mL)、1.5mL 塑料离心管、移液枪(0~1000 μ L，0~5000 μ L)、移液枪枪头(1mL，5mL、10mL)、一次性注射器(1mL)、针筒式滤膜(0.45 μ m)、进样针、一次性 PVC 手套、一次性口罩等。

4.1.2 实验方法

● 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。

● 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。

4.1.3 实验条件

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 $^{\circ}$ C

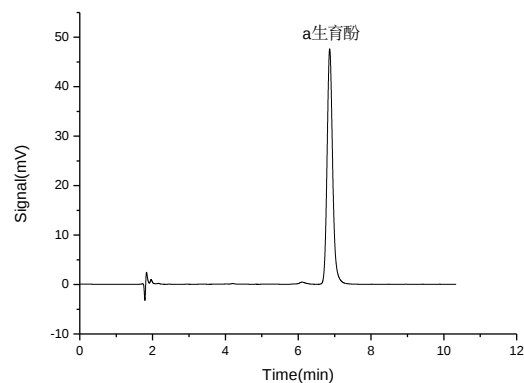


图 4-1 α 生育酚分析谱图

● 样品需分离同分异构体时，参考色谱条件：

流动相 A：水，B：甲醇，梯度洗脱

色谱柱：Supersil PFP 5 μ m 4.6mm $\times$ 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 $^{\circ}$ C

表 4-6 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

4.1.4 实验结果

● Supersil PFP 色谱柱

1) 标准品色谱图

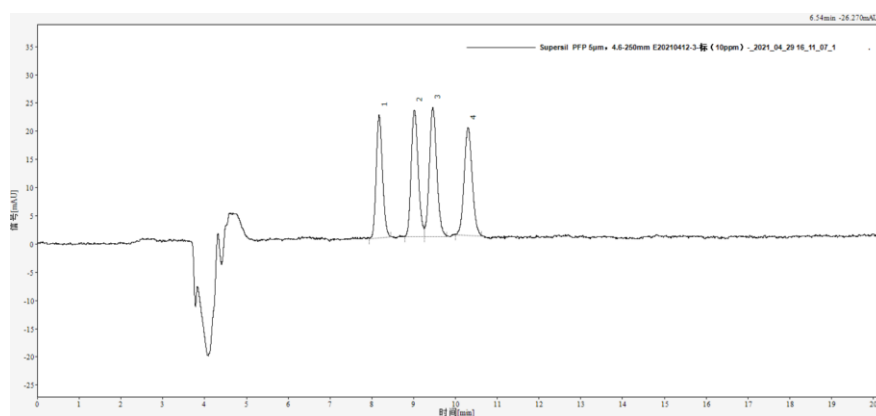


图 4-2 5 μ g/mL 维生素 E 混标色谱图

表 4-7 浓度为 100 μ g/mL 维生素 E 色谱参数表

峰号	化合物名称	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]	拖尾因子	分离度
1	α -生育酚	8.173	227.158	1.148	13.1
2	β -生育酚	9.017	242.545	1.078	2.9
3	γ -生育酚	9.458	261.576	1.235	1.4
4	δ -生育酚	10.301	257.101	1.112	2.5

2) 线性范围

取标准储备液 1mL 稀释至 10mL, 配制成浓度为 100 μ g/mL 的中间液, 再分别取中间液 1.0mL、0.5mL、0.2mL、0.1mL、0.05mL、0.02mL、0.01mL, 配制成浓度为 100 μ g/mL、50 μ g/mL、20 μ g/mL、10 μ g/mL、5 μ g/mL、2 μ g/mL、1 μ g/mL 六个校准点, 做校准曲线, 如下表所示。

表 4-8 维生素 E 校准曲线方程和相关系数

	α -生育酚	β -生育酚	γ -生育酚	δ -生育酚
校准曲线	$y = 19.564x + 24.176$	$y = 20.655x + 20.911$	$y = 22.718x + 17.904$	$y = 23.075x + 22.351$
相关系数	$R^2 = 0.9993$	$R^2 = 0.999$	$R^2 = 0.9991$	$R^2 = 0.9991$

因此, α 、 β 、 γ 、 δ 生育酚在浓度 1-100 μ g/mL 的浓度范围内, 线性关系良好。

3) 峰面积重复性

连续进样浓度 100 μ g/mL 的维生素 E 混合标准品溶液, 得到的叠加谱图如下:

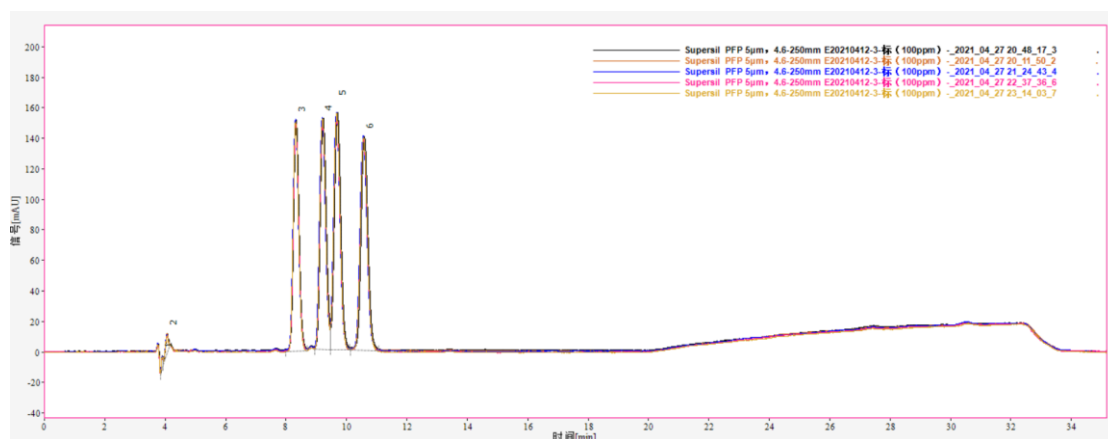


图 4-3 浓度为 100 μ g/mL 维生素 E 叠加谱图 (n=5)

表 4-9 维生素 E 保留时间重复性数据表

	保留时间/min			
维生素 E	α -生育酚	β -生育酚	γ -生育酚	δ -生育酚
1	8.32	9.206	9.672	10.562
2	8.338	9.231	9.706	10.595
2	8.313	9.199	9.671	10.558
4	8.336	9.232	9.701	10.597
5	8.324	9.21	9.677	10.567
RSD%	0.13	0.16	0.17	0.18

表 4-10 维生素 E 峰面积重复性数据表

	峰面积/mAU.s			
维生素 E	α -生育酚	β -生育酚	γ -生育酚	δ -生育酚
1	1895	1841	2011	2198
2	1903	1891	2028	2201
2	1920	1883	2033	2242
4	1908	1878	2050	2248
5	1898	1848	2004	2251
RSD%	0.52	1.19	0.9	1.17

4) 实际样品分析

● 营养快线样品中维生素 E 含量分析

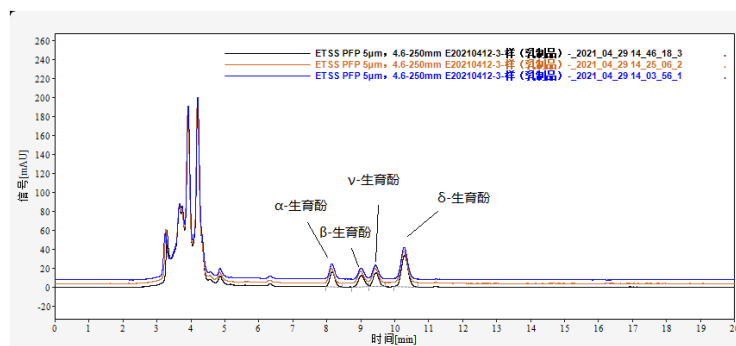


图 4-4 营养快线样品中维生素 E 分析谱图

通过外标法计算，该样品中维生素 E 的含量如下：

表 4-11 营养快线样品中维生素 E 含量结果表

维生素 E	峰面积[mAU.s]	VE 含量 (mg/100g)
α-生育酚	166	0.14
β-生育酚	137	0.11
γ-生育酚	163	0.13
δ-生育酚	457	0.38

● 多种维生素矿物质片保健品中维生素 E 含量分析

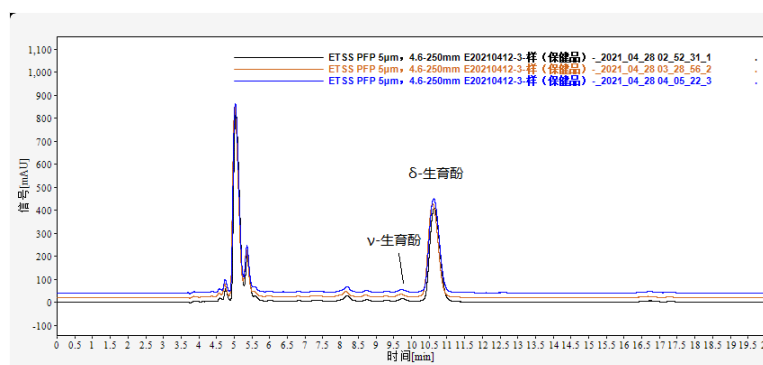


图 4-5 多种维生素矿物质片中维生素 E 分析谱图

通过外标法计算，该样品中维生素 E 的含量如下：

表 4-11 多种维生素矿物质片中维生素 E 含量结果表

维生素 E	α-生育酚	β-生育酚	γ-生育酚	δ-生育酚
样品中含量 (g/100g)	/	/	0.006	0.341

4.2 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。

4.2.1 仪器设备与试剂

表4-12 高效液相色谱系统配置清单

序号	名称	数量
1	UV3200或荧光检测器	1台
2	P3200高压恒流泵	1台
3	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
4	ZJ-1支架	1个
5	色谱数据工作站	1套
6	TP3200溶剂托盘	1个
7	酰胺基柱 1.7 μ m 3.0 $\times$ 150mm	1支
8	EClassical 3200系统工具包	1套
9	500mL溶剂瓶（无色）	2支
	AD适配器（荧光检测器需配）	1台
10	O3200柱温箱（选配）	1台
11	S3200自动进样器(选配)	1台

注：或同等配置其它型号高效液相色谱仪。

表4-13 主要试剂

序号	试剂	纯度
1	无水乙醇	色谱纯
2	正己烷	色谱纯
3	乙醚	不含过氧化物
4	石油醚	沸程30-60℃
5	无水硫酸钠	
6	异丙醇	色谱纯
7	叔丁基对甲基醚	分析纯
8	甲醇	色谱纯
9	四氢呋喃	色谱纯
10	1, 4-二氧六环	色谱纯
11	2, 6-叔丁基对甲酚	分析纯
12	α 、 β 、 γ 、 δ 生育酚	$\geq 95\%$

表4-14 主要前处理设备

序号	名称	规格
1	溶剂过滤器	1000mL
2	隔膜真空泵	0.08MPa, 160W
3	分析天平	感量为0.0001g
4	恒温水浴振荡器	
5	旋转蒸发仪	
6	索氏脂肪抽提仪	
7	超声波清洗器	

实验过程中还包括棕色容量瓶(10mL、100mL)、1.5mL 塑料离心管、移液枪(0~1000 μ L, 0~5000 μ L)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性注射器(1mL)、针筒式滤膜(0.45 μ m)、进样针、一次性 PVC 手套、一次性口罩等。

4.2.2 实验方法

● 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。

● 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。

● 参考色谱条件

色谱柱: SinoChrom Si60 5μm 4.6mm×250mm

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: 10μL

柱温: 30℃

注: 可用Si60硅胶柱(柱长250mm, 内径4.6mm, 粒径5μm)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。

4.2.3 实验结果

1) 标准品分析谱图

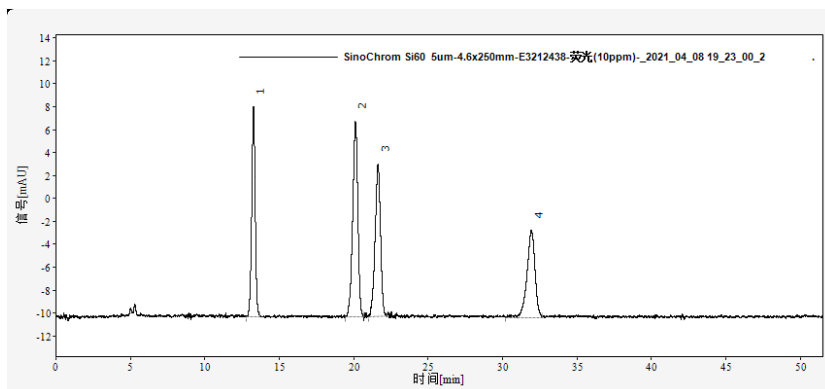


图 4-6 10µg/mL 维生素 E 标准溶液谱图

表 4-15 10µg/mL 维生素 E 标准溶液谱图参数

峰号	化合物名称	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]	拖尾因子	分离度
1	α -生育酚	13.274	298.358	0.949	/
2	β -生育酚	20.116	410.206	0.916	13.0
3	γ -生育酚	21.629	335.273	0.928	2.0
4	δ -生育酚	31.933	287.775	0.922	13.0

第5章 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。

5.1 仪器设备与试剂

表5-1 高效液相色谱系统配置清单

序号	名称	数量
1	荧光检测器	1台
2	P3200高压恒流泵	1台
3	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
4	ZJ-1支架	1个
5	色谱数据工作站	1套
6	TP3200溶剂托盘	1个
7	Supersil ODS2 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm	1支
8	EClassical 3200系统工具包	1套
9	500mL溶剂瓶（无色）	2支
10	AD适配器（荧光检测器需配）	
11	O3200柱温箱（选配）	1台
12	S3200自动进样器(选配)	1台

表5-2 主要试剂

序号	试剂	纯度
1	甲醇	色谱纯
2	水	超纯水
3	正丁醇	
4	铁氰化钾	
5	氢氧化钠	
6	盐酸	
7	乙酸钠	
8	冰乙酸	
9	五氧化二磷	
10	木瓜蛋白酶	不含B1
11	淀粉酶	不含B1
12	维生素B1	$\geq 99\%$

注：或同等配置其它型号高效液相色谱仪。

表5-3 主要前处理设备

序号	名称	规格
1	溶剂过滤器	1000mL
2	隔膜真空泵	0.08MPa, 160W
3	分析天平	感量0.01g
4	离心机	≥ 4000 r/min
5	pH	
6	组织捣碎机	
7	恒温干燥箱	

实验过程中还包括棕色容量瓶(10mL、100mL)、1.5mL 塑料离心管、移液枪(0~1000 μ L, 0~5000 μ L)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性注射器(1mL)、针筒式滤膜(0.45 μ m)、进样针、一次性 PVC 手套、一次性口罩等。

5.2 实验方法

● 标准溶液配制

维生素 B1 标准储备液(500 $\mu\text{g/mL}$)

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℃~4℃ 冰箱中, 保存期为 3 个月。

维生素 B1 标准中间液(10.0 $\mu\text{g/mL}$)

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 μL 、50.0 μL 、100 μL 、200 μL 、400 μL 、800 μL 、1000 μL , 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 $\mu\text{g/mL}$ 、0.0500 $\mu\text{g/mL}$ 、0.100 $\mu\text{g/mL}$ 、0.200 $\mu\text{g/mL}$ 、0.400 $\mu\text{g/mL}$ 、0.800 $\mu\text{g/mL}$ 、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 。临用时配制。

● 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℃ 保持 30min。水解结束待冷却至 40℃ 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℃ 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 μm 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。

● 参考色谱条件

色谱柱: Superil ODS2 5 μm 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 μL

柱温: 30℃

5.3 实验结果

1) 维生素 B1 标准溶液分析谱图

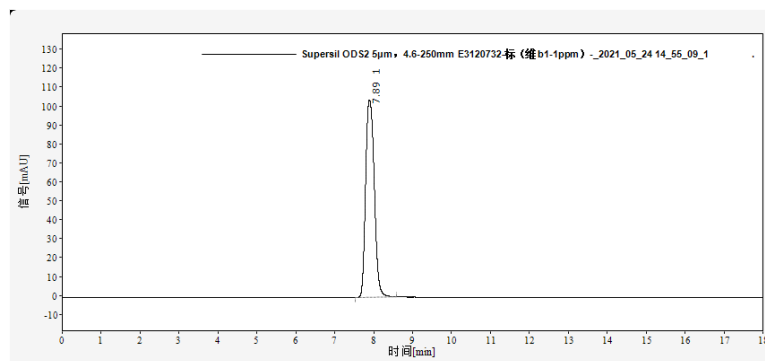


图 5-1 1µg/mL 维生素 B1 标准溶液分析谱图

表 5-4 1µg/mL 维生素 B1 标准溶液谱图参数表

化合物名称	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]	拖尾因子	柱效[N/m]
维生素 B1	7.890	1613	1.21	23000

2) 线性范围

按照 GB5009.84-2016-B1 第一法, 配制维生素 B1 的标准溶液, 浓度为 0.05µg/mL、0.1µg/mL、0.2µg/mL、0.4µg/mL、0.6µg/mL、1.0µg/mL 的六个标点, 计算相关性系数。

表 5-5 维生素 B1 校准曲线检测结果

浓度(µg/mL)	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]
0.05	7.495	77
0.1	7.396	146
0.2	7.607	350
0.4	7.531	664
0.6	7.539	1283
1.0	7.440	1640

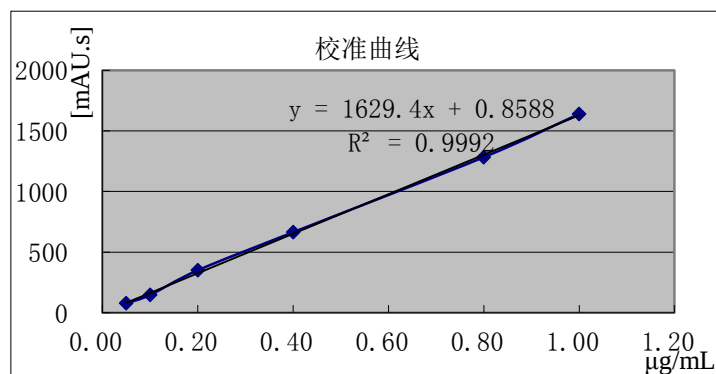


图 5-2 维生素 B1 校准曲线

根据浓度和峰面积数据, 得到校准曲线为: $y = 1629.4x + 0.8588$, $R^2 = 0.9992$ 。

因此在 0.05-1.0µg/mL 的浓度范围内, 维生素 B1 线性关系良好。

3) 峰面积重复性

1.0 μ g/mL 维生素 B1 标准溶液，连续进样 6 针，计算峰面积和保留时间 RSD 值。

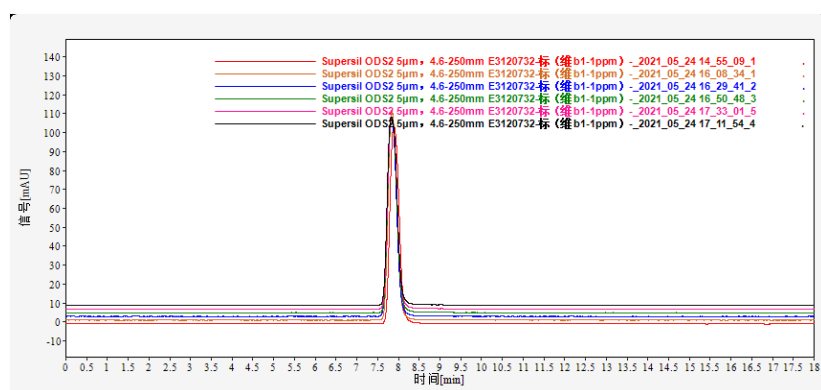


图 5-3 1.0 μ g/mL 维生素 B1 标准溶液叠加色谱图 (n=6)

表 5-6 1.0 μ g/mL 维生素 B1 标准溶液色谱图参数

峰号	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]
1	7.890	1613
2	7.841	1613
3	7.833	1605
4	7.838	1610
5	7.829	1617
6	7.834	1617
RSD%	0.29	0.28

4) 最小检测限

浓度为 0.03 μ g/mL 溶液，得到的色谱图如下：

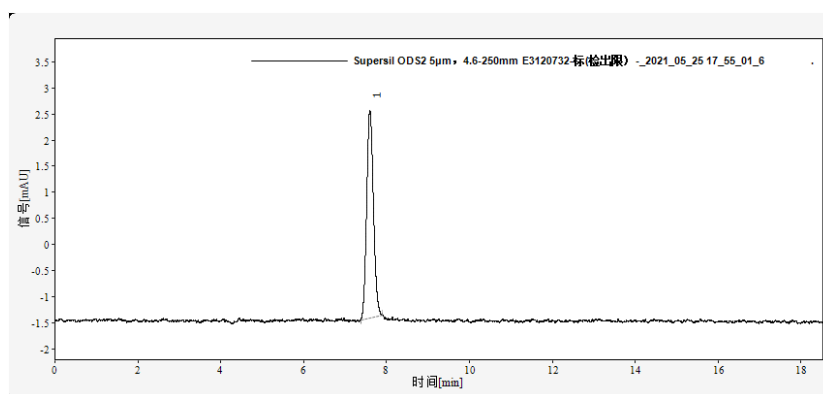


图 5-4 0.03 μ g/mL 维生素 B1 色谱图

软件给出的噪音值为 0.0778mAU (11.98min-13.49min)，根据信噪比 S/N=3，计算维生素 B1 的最小检出限为 0.018 μ g/mL，方法检测限为 0.018 mg/100g，而国标中额方法检出限为 0.03mg/100g，因此用该套设备和分析方法可以得到更高的灵敏度。

5) 实际样品分析

● 羊奶粉中维生素 B1 的含量分析

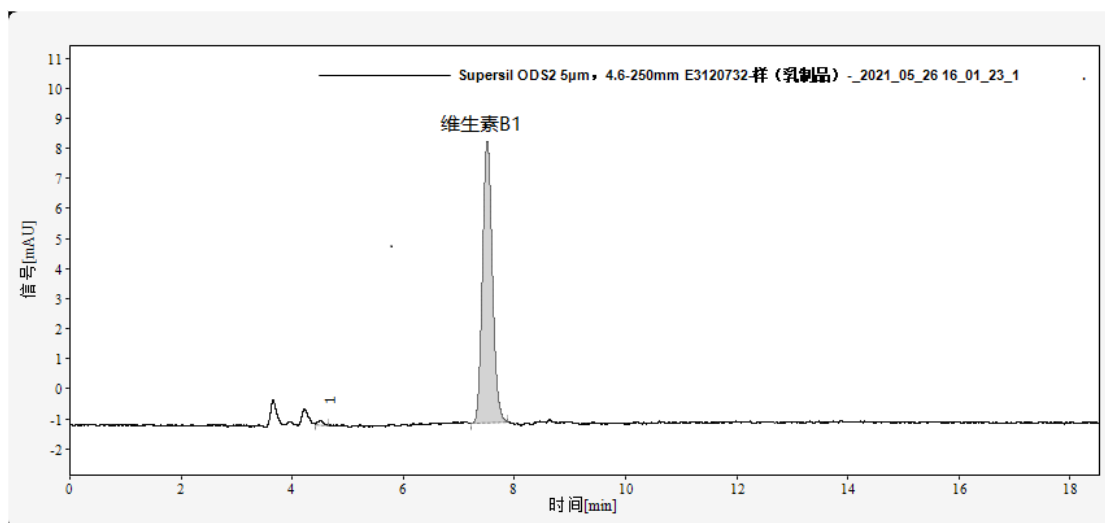


图 5-5 羊奶粉中维生素 B1 分析色谱图

根据外标法计算样品中维生素 B1 含量如下：

表 5-7 羊奶粉中维生素 B1 的含量结果表

样品名称	取样量 (g)	峰面积[mAU.s]	分离度	VB1 含量 (mg/100g)
羊奶粉	3.0156	128	12.22	13

● 多种维生素矿物片中维生素 B1 的含量分析

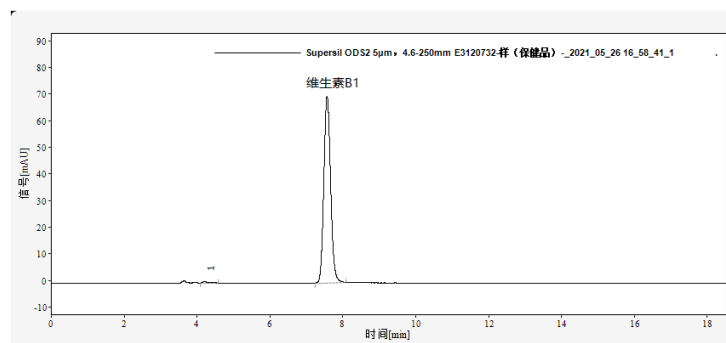


图 5-6 保健品中维生素 B1 分析色谱图

根据外标法计算该多种维生素矿物片样品中维生素 B1 含量如下：

表 5-7 多种维生素矿物片中维生素 B1 的含量结果表

样品名称	取样量 (g)	峰面积[mAU.s]	分离度	VB1 含量 (mg/100g)
多种维生素矿物片	3.0241	905	12.15	185

第6章 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。

6.1 仪器设备与试剂

表6-1 高效液相色谱系统配置清单

序号	名称	数量
1	荧光检测器	1台
2	P3200高压恒流泵	1台
3	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
4	ZJ-1支架	1个
5	色谱数据工作站	1套
6	TP3200溶剂托盘	1个
7	Supersil ODS2 5 μ m 4.6 $\times$ 150mm	1支
8	EClassical 3200系统工具包	1套
9	500mL溶剂瓶（无色）	2支
10	AD适配器（荧光检测器需配）	1台
11	O3200柱温箱（选配）	1台
12	S3200自动进样器(选配)	1台

注：或同等配置其它型号高效液相色谱仪。

表6-2 主要前处理设备

序号	名称	规格
1	溶剂过滤器	1000mL
2	隔膜真空泵	0.08MPa, 160W
3	分析天平	感量0.01g
4	高压灭菌锅	≥ 4000 r/min
5	pH	精度0.01
6	组织捣碎机	
7	恒温干燥箱	
8	涡旋振荡器	
9	干燥器	
10	分光光度计	

表 6-3 主要试剂

序号	试剂	纯度
1	甲醇	色谱纯
2	水	超纯水
3	盐酸	
4	冰乙酸	
5	氢氧化钠	
6	三水乙酸钠	
7	木瓜蛋白酶	≥ 10 U/mg
8	淀粉酶	≥ 100 U/mg
9	维生素B1	$\geq 99\%$

实验过程中还包括棕色容量瓶(10mL、100mL)、1.5mL 塑料离心管、移液枪(0~1000 μ L, 0~5000 μ L)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性注射器(1mL)、针筒式滤膜(0.45 μ m)、进样针、一次性 PVC 手套、一次性口罩等。

6.2 实验方法

● 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℃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。

● 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℃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℃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。

● 参考色谱条件

色谱柱: Supersil ODS2 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: 35℃

检测波长: 激发波长 462nm, 发射波长 522nm

进样体积: 20 μ L

6.3 实验结果

1) 维生素 B2 标准品分析谱图

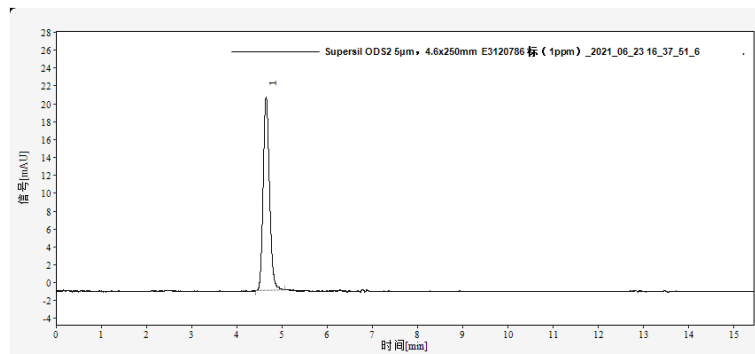


图 6-1 1 μ g/mL 维生素 B2 标准溶液色谱图

表 6-4 1 μ g/mL 维生素 B2 标准溶液色谱图参数表

化合物名称	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]	拖尾因子	柱效[N/m]
维生素 B2	4.608	212	1.17	22000

2) 线性范围

配制维生素 B2 的标准溶液，浓度为 0.05 μ g/mL、0.1 μ g/mL、0.2 μ g/mL、0.4 μ g/mL、0.6 μ g/mL、1.0 μ g/mL 的六个标点，计算相关线性系数。

表 6-5 维生素 B2 校准曲线结果数据

峰号	浓度(μ g/mL)	峰面积[mAU.s]
1	0.05	11
2	0.10	23
3	0.20	43
4	0.40	84
5	0.60	128
6	1.00	212

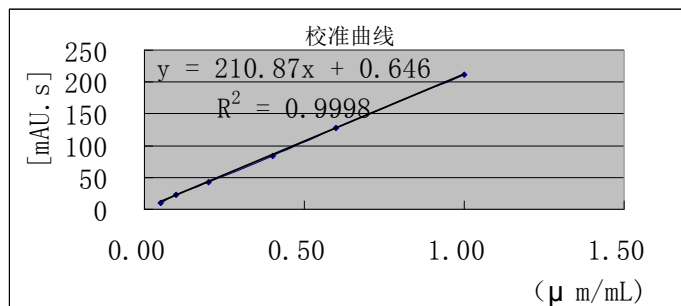


图 6-2 维生素 B2 校准曲线

由上述六个标点作线性校准曲线： $y = 210.87x + 0.646$ $R^2 = 0.9998$ 。

由以上数据知，维生素 B2 在 0.05-1.0 μ g/mL 的浓度范围内，线性关系良好。

3) 峰面积重复性

1.0 μ g/mL 维生素 B2 标准溶液连续进样 6 针，计算峰面积和保留时间 RSD 值。

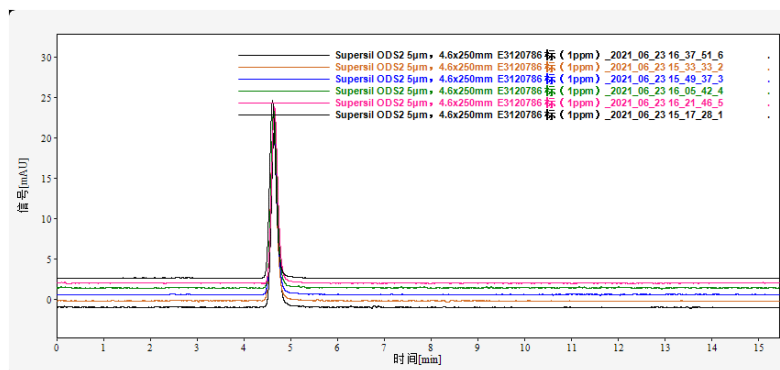


图 6-3 1.0 μ g/mL 维生素 B2 溶液叠加谱图 (n=6)

表 6-6 1.0 μ g/mL 维生素 B2 溶液重复性参数表 (n=6)

峰号	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]
1	4.608	212
2	4.627	211
3	4.631	213
4	4.635	213
5	4.649	213
6	4.646	212
RSD%	0.32	0.39

4) 实际样品分析

● 羊奶粉中维生素 B2 的含量分析

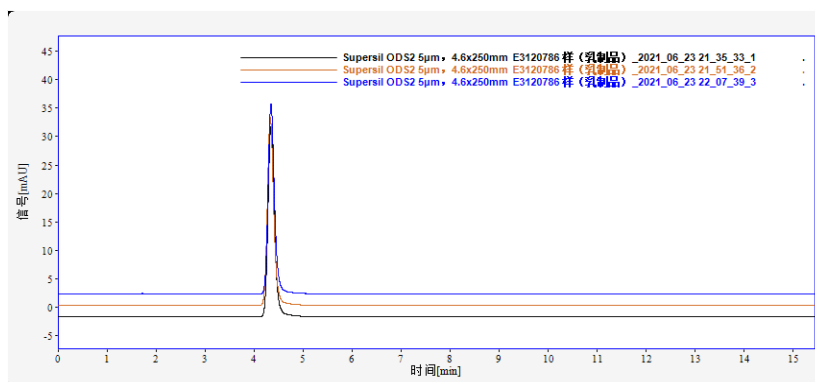


图 6-4 羊奶粉中维生素 B2 分析色谱图

根据外标法计算羊奶粉样品中维生素 B2 含量为：

表 6-7 羊奶粉中维生素 B2 的含量结果表

样品名称	取样量 (g)	峰面积[mAU.s]	VB2 含量 (mg/100g)
羊奶粉	2.0015	308	16.5

● 多种维生素矿物片中维生素 B2 的含量分析

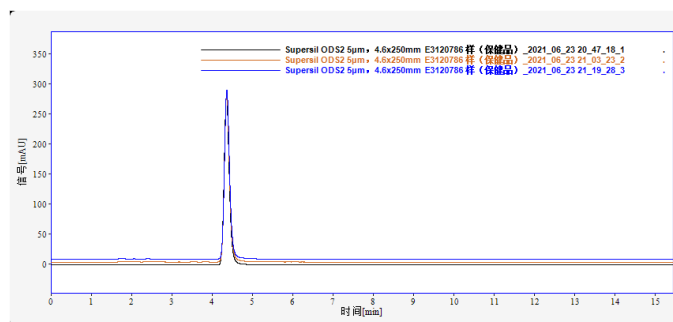


图 6-5 保健品中维生素 B2 分析色谱图(n=3)

根据外标法计算样品中维生素 B2 含量为：

表 6-8 多种维生素矿物片中维生素 B2 的含量结果表

样品名称	取样量 (g)	峰面积[mAU.s]	VB2 含量 (mg/100g)
多种维生素矿物片	2.0016	2567	137.6

第7章 维生素 B3(烟酸)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。

7.1 仪器设备与试剂

表7-1 高效液相色谱系统配置清单

序号	名称	数量
1	UV3200紫外-可见检测器	1台
2	P3200高压恒流泵	1台
3	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
4	ZJ-1支架	1个
5	色谱数据工作站	1套
6	TP3200溶剂托盘	1个
7	Supersil ODS-B 5 μ m 4.6 $\times$ 150mm色谱柱	1支
8	EClassical 3200系统工具包	1套
9	500mL溶剂瓶（无色）	2支
10	O3200柱温箱（选配）	1台
11	S3200自动进样器(选配)	1台

注：或同等配置其它型号高效液相色谱仪。

表 7-2 主要试剂

序号	试剂	纯度
1	甲醇	色谱纯
2	水	超纯水
3	高氯酸	优级纯
4	氢氧化钠	优级纯
5	异丙醇	色谱纯
6	庚烷磺酸钠	色谱纯
7	淀粉酶	$\geq 1.5\text{U/mg}$
8	烟酸和烟酰胺标准品	$\geq 99\%$

表 7-3 主要前处理设备

序号	名称	规格
1	溶剂过滤器	1000mL
2	隔膜真空泵	0.08MPa, 160W
3	分析天平	感量0.01g
4	pH	精度0.01
5	恒温培养箱	
6	超声波振荡器	

实验过程中还包括棕色容量瓶(100mL)、锥形瓶(150mL)、移液枪(0~1000 μ L, 0~5000 μ L)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性注射器(1mL)、针筒式滤膜(0.45 μ m)、进样针、一次性 PVC 手套、一次性口罩等。

7.2 实验方法

● 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。

● 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。

● 参考色谱条件

色谱柱: Supersil ODS2 5μm 4.6mm×250mm

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℃

7.3 实验结果

1) 维生素 B3 的标准品谱图

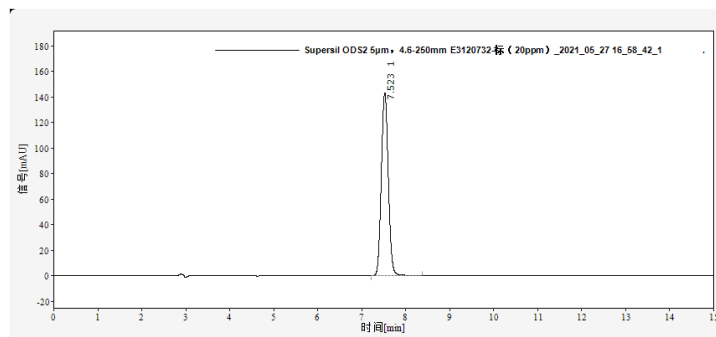


图 7-1 20 μ g/mL 维生素 B3 标品溶液色谱图

表 7-4 20 μ g/mL 维生素 B3 标品溶液色谱参数表

化合物名称	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]	拖尾因子	柱效[N/m]
维生素 B3	7.523	1576	1.07	43400

2) 线性范围

按照 GB5009.89-2016-B3 第二法, 配制维生素 B3 的标准溶液, 浓度为 1.0 μ g/mL、2.0 μ g/mL、5.0 μ g/mL、10.0 μ g/mL、20.0 μ g/mL 的五个标点, 计算相关线性系数。

表 7-5 维生素 B3 校准曲线检测结果

浓度(μ g/mL)	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]
1.0	7.478	79
2.0	7.502	159
5.0	7.450	401
10.0	7.468	790
20.0	7.480	1572

根据以上数据, 做线性曲线, 得到的校准曲线为: $y = 78.485x + 3.711$ $R^2 = 1.0000$

因此维生素 B3 在 1.0-20.0 μ g/mL 浓度范围内, 线性关系良好。

3) 峰面积重复性

20.0 μ g/mL 维生素 B3 标准溶液, 连续进样 6 针, 计算峰面积和保留时间 RSD 值。

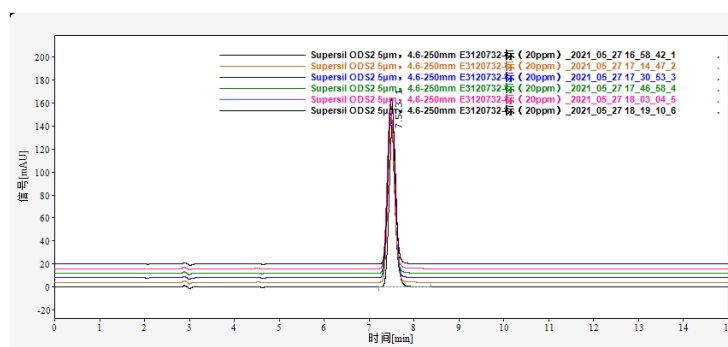
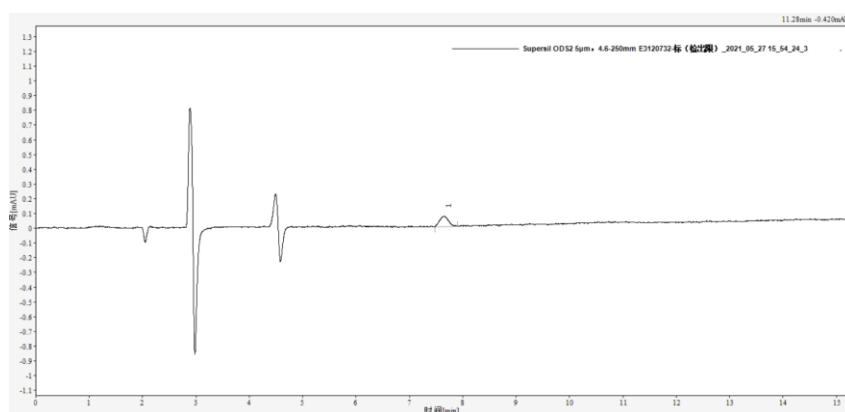


图 7-2 20.0 μ g/mL 维生素 B3 标品溶液叠加色谱图 (n=6)

表 7-6 20.0 μ g/mL 维生素 B3 标品溶液重复性参数表

峰号	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]
1	7.523	1576
2	7.494	1577
3	7.482	1576
4	7.479	1573
5	7.476	1574
6	7.498	1574
RSD%	0.23	0.10

4) 最小检出限

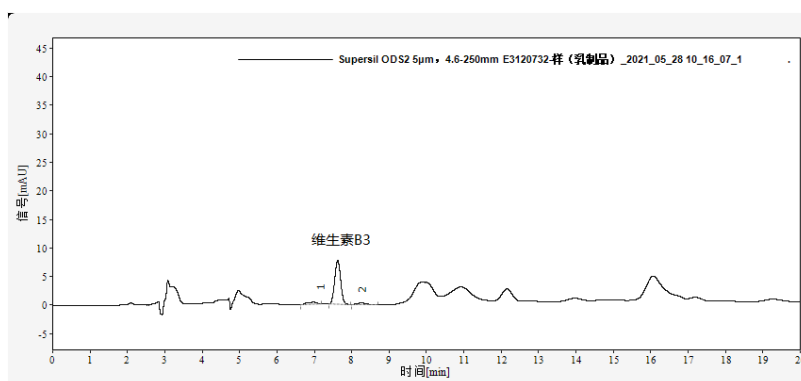


7-3 浓度为 0.01 μ g/mL 维生素 B3 色谱图

基线噪音为 0.0107mAU, 根据 $S/N=3$ 计算出仪器检出限 LOD 为 0.004 μ g/mL, 实际方法检出限为 8.68 μ g/100g, 比标准方法检出限 30 μ g/100g, 灵敏度高出不少。

5) 实际样品分析

● 纯牛奶中维生素 B3 含量分析



7-4 纯牛奶中维生素 B3 分析谱图

根据外标法计算样品中维生素 B3 含量如下：

表 7-7 纯牛奶中维生素 B3 含量结果表

样品名称	取样量 (g)	峰面积[mAU.s]	VB3 含量 (mg/100g)
纯牛奶	20.0324	84	25.57

● 多种维生素矿物质片中维生素 B3 含量分析

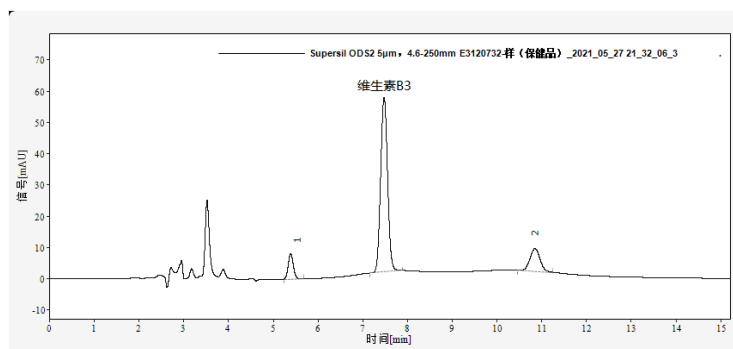


图 7-5 保健品多种维生素矿物质片中维生素 B3 分析色谱图

根据外标法计算样品中维生素 B3 含量如下：

表 7-8 多种维生素矿物质片中维生素 B3 含量结果表

样品名称	取样量 (g)	峰面积[mAU.s]	VB3 含量 (mg/100g)
多种维生素矿物质片	5.0112	602	803.23

● 样品中烟酸烟酰胺的同时检测

色谱条件

色谱柱：Supersil ODS-B 5µm 4.6mm×150mm

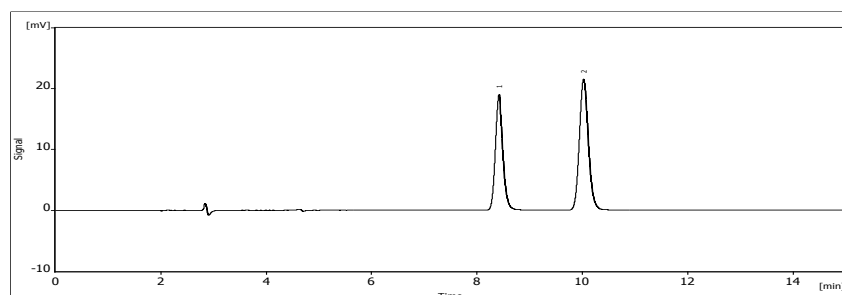
检测波长：261nm

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℃



7-6 烟酸烟酰胺混标分析谱图

表 7-9 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

第8章 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。

8.1 仪器设备与试剂

表8-1 高效液相色谱系统配置清单

序号	名称	数量
1	UV3200紫外-可见检测器	1台
2	P3200高压恒流泵	1台
3	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
4	ZJ-1支架	1个
5	色谱数据工作站	1套
6	TP3200溶剂托盘	1个
7	Supersil AQ-C18 5 μ m 4.6 $\times$ 150mm	1支
8	EClassical 3200系统工具包	1套
9	500mL溶剂瓶（无色）	2支
10	O3200柱温箱（选配）	1台
11	S3200自动进样器(选配)	1台

注：或同等配置其它型号高效液相色谱仪。

表 8-2 主要试剂

序号	试剂	纯度
1	乙腈	色谱纯
2	水	超纯水
3	盐酸	
4	磷酸	
5	磷酸二氢钾	色谱纯
6	七水合硫酸锌	
7	淀粉酶	$\geq$
8	维生素B5（泛酸）	$\geq 99\%$

表 8-3 主要前处理设备

序号	名称	规格
1	溶剂过滤器	1000mL
2	隔膜真空泵	0.08MPa, 160W
3	分析天平	感量0.01g
4	pH	精度0.01
5	恒温培养箱	
6	超声波振荡器	

实验过程中还包括棕色容量瓶(10mL、100mL)、1.5mL 塑料离心管、移液枪(0~1000 μ L, 0~5000 μ L)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性注射器(1mL)、针筒式滤膜(0.45 μ m)、进样针、一次性 PVC 手套、一次性口罩等。

8.2 实验方法

● 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。

● 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, 一般固态试样约 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。

● 参考色谱条件

色谱柱: Supersil AQ-C18 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: 35℃

8.3 实验结果

1) 泛酸（维生素 B5）标准品分析谱图

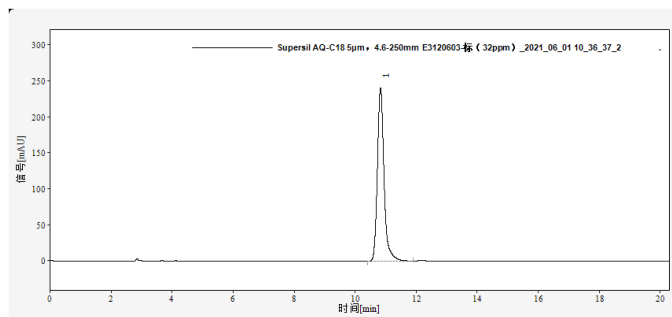


图 8-1 32.0μg/mL 维生素 B5 标准溶液色谱图

表 8-4 32.0μg/mL 维生素 B5 标准溶液色谱参数表

化合物名称	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]	拖尾因子	柱效[N/m]
维生素 B5	10.831	3644	1.27	53800

2) 线性范围

按照 GB5009.210-2016 第二法，配制维生素 B5 的标准溶液，浓度为 1.0μg/mL、2.0μg/mL、4.0μg/mL、8.0μg/mL、16.0μg/mL、32.0μg/mL 根据浓度和峰面积值，做校准曲线。

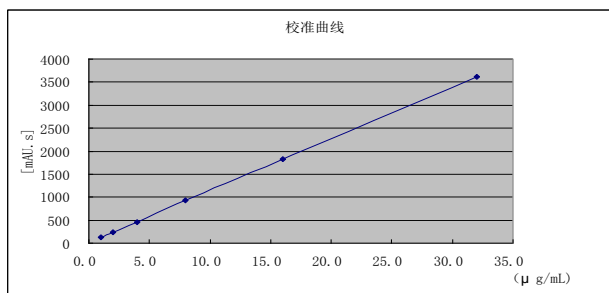


图 8-2 维生素 B5 校准曲线

表 8-5 维生素 B5 浓度峰面积参数

序号	浓度(μg/mL)	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]
1	1.0	10.815	119
2	2.0	10.842	232
3	4.0	10.811	464
4	8.0	10.771	938
5	16.0	10.787	1830
6	32.0	10.786	3618

根据以上数据，得到线性校准曲线为 $y = 112.85x + 15.341$ ， $R^2 = 0.9999$ ，维生素 B5（泛酸）在 1.0-32.0 浓度范围内，线性关系良好。

3) 峰面积重复性

浓度为 32.0 $\mu\text{g/mL}$ 维生素 B5 标准品溶液，连续进样 6 针，计算峰面积和保留时间 RSD 值。

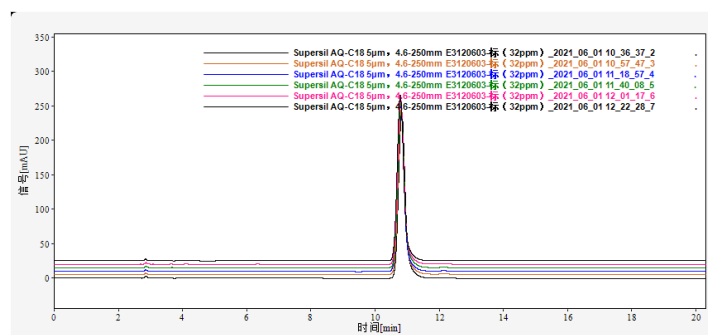


图 8-3 32.0 $\mu\text{g/mL}$ 维生素 B5 标准溶液叠加色谱图 (n=6)

表 8-6 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 维生素 B5 标准溶液重复性参数

峰号	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]
1	10.786	3618
2	10.797	3613
3	10.803	3610
4	10.803	3610
5	10.812	3601
6	10.831	3644
RSD%	0.14	0.41

4) 最小检出限

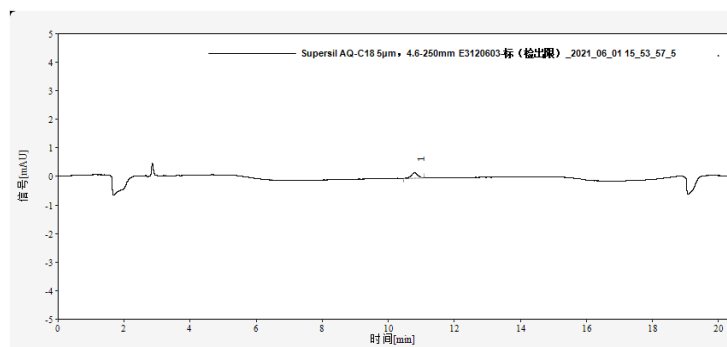


图 8-4 浓度为 0.025 $\mu\text{g/mL}$ 维生素 B5 色谱图

基线噪音为 0.0135mAU，根据 $S/N=3$ 计算出仪器检出限 LOD 为 0.004 $\mu\text{g/mL}$ ，实际方法检出限为 5.9 $\mu\text{g/100g}$ ，比标准方法检出限 25 $\mu\text{g/100g}$ ，灵敏度高出不少。

5) 实际样品分析

● 老酸奶样品中维生素 B5 含量分析

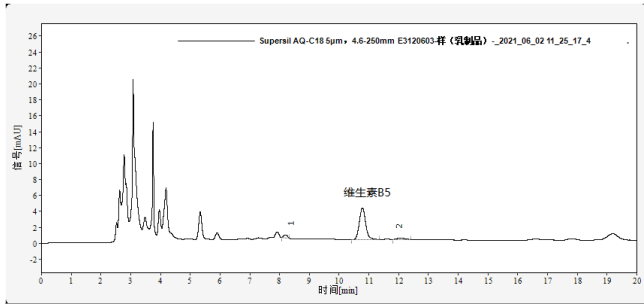


图 8-5 老酸奶样品中维生素 B5 分析谱图

根据外标法计算老酸奶样品中维生素 B5 含量如下：

表 8-7 老酸奶样品中维生素 B5 含量结果表

样品名称	取样量 (g)	峰面积[mAU.s]	分离度	VB5 含量 (mg/100g)
老酸奶	20.0157	68	8.29/3.21	25.9

● 多种维生素矿物片样品中维生素 B5 含量分析

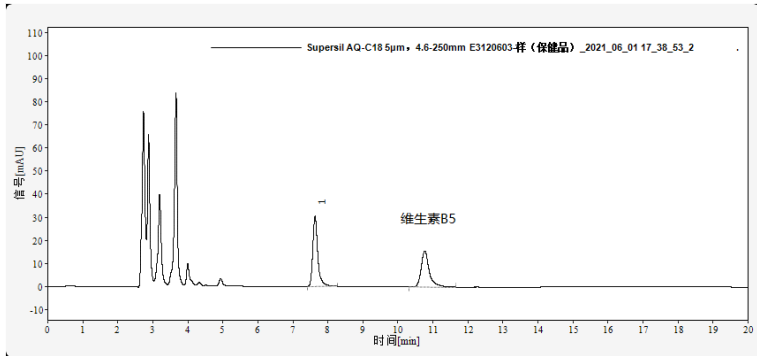


图 8-6 保健品多种维生素矿物片中维生素 B5 分析谱图

根据外标法计算多种维生素矿物片样品中维生素 B5 含量如下：

表 8-8 多种维生素矿物片样品中维生素 B5 含量结果表

样品名称	取样量 (g)	峰面积[mAU.s]	分离度	VB5 含量 (mg/100g)
多种维生素矿物片	2.0028	249	10.16	268.1

第9章 维生素 B6 测定

本节内容是参考 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 的测定。

9.1 仪器设备与试剂

表9-1 高效液相色谱系统配置清单

序号	名称	数量
1	荧光检测器	1台
2	P3200高压恒流泵	1台
3	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
4	ZJ-1支架	1个
5	色谱数据工作站	1套
6	TP3200溶剂托盘	1个
7	Supersil AQ-C18 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm	1支
8	EClassical 3200系统工具包	1套
9	500mL溶剂瓶（无色）	2支
10	AD适配器（荧光检测器需配）	1台
11	O3200柱温箱（选配）	1台
12	S3200自动进样器(选配)	1台

注：或同等配置其它型号高效液相色谱仪。

表9-2 主要试剂

序号	试剂	纯度
1	甲醇	色谱纯
2	水	超纯水
3	盐酸	
4	冰乙酸	
5	氢氧化钠	
6	辛烷磺酸钠	
7	三乙胺	色谱纯
8	淀粉酶	$\geq 1.5\text{U/mg}$
9	盐酸吡哆醇	$\geq 98\%$
10	盐酸吡哆醛	$\geq 99\%$
11	双盐酸吡哆醛胺	$\geq 99\%$

表 9-3 主要前处理设备

序号	名称	规格
1	溶剂过滤器	1000mL
2	隔膜真空泵	0.08MPa, 160W
3	分析天平	感量0.01g
4	pH	精度0.01
5	恒温培养箱	
6	涡旋混合器	
7	超声振荡器	
8	分光光度计	

实验过程中还包括棕色容量瓶(10mL、100mL)、1.5mL 塑料离心管、移液枪(0~1000 μ L, 0~5000 μ L)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性注射器(1mL)、针筒式滤膜(0.45 μ m)、进样针、一次性 PVC 手套、一次性口罩等。

9.2 实验方法

● 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。

● 样品前处理

含淀粉的试样

a) 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。

b) 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

a) 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。

b) 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。

● 参考色谱条件

色谱柱: Supersil AQ-C18 5μm 4.6mm×250mm

流动相: 甲醇 50mL、辛酸磺酸钠 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

9.3 实验结果

1) 吡哆醇标准溶液分析谱图

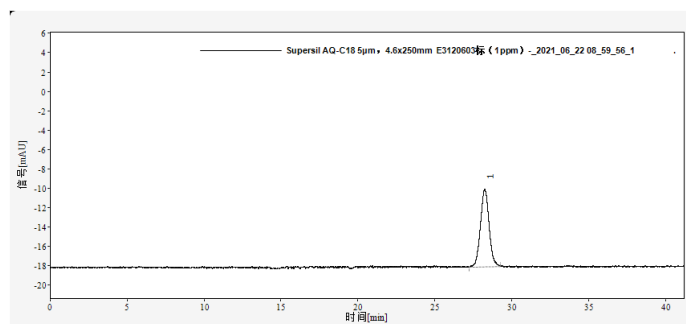


图 9-1 1µg/mL 维生素 B6（吡哆醇）分析谱图

表 9-4 1µg/mL 维生素 B6（吡哆醇）谱图参数

化合物名称	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]	拖尾因子	柱效[N/m]
维生素 B6	28.248	314	1.05	49800

2) 线性范围

按照 GB5009.154-2016 第一法，配制吡哆醇的标准溶液，浓度为 0.1µg/mL、0.2µg/mL、0.4µg/mL、0.6µg/mL、1.0µg/mL，根据浓度和峰面积做校准曲线。

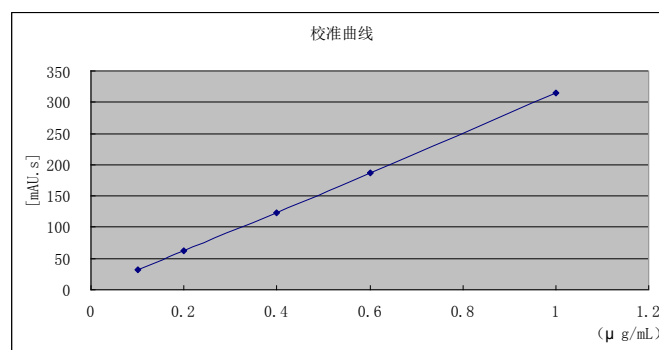


图 9-2 吡哆醇校准曲线

表 9-5 吡哆醇校准曲线峰面积参数表

序号	浓度(µg/mL)	峰面积[mAU.s]
1	0.10	32
2	0.20	62
3	0.40	123
4	0.60	187
5	1.00	315

根据以上数据，得到吡哆醇的线性校准曲线为： $y = 314.89x - 1.2396$ $R^2 = 0.9998$ ，可见吡哆醇在 0.1-1.0µg/mL 浓度范围内，线性关系良好。

3) 峰面积重复性

1.0 μ g/mL 吡哆醇标准溶液，连续进样 6 针，计算峰面积和保留时间 RSD 值。

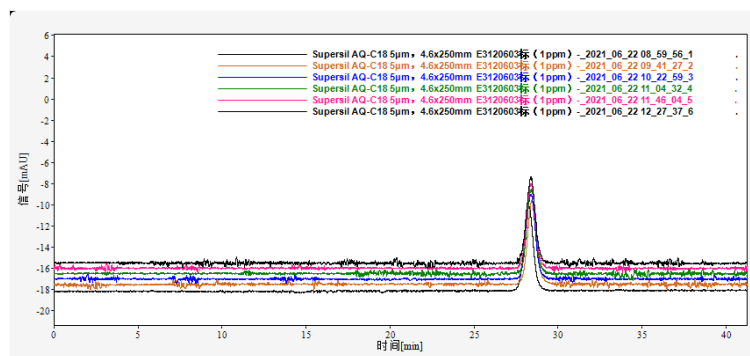


图 9-3 1.0 μ g/mL 吡哆醇溶液叠加谱图 (n=6)

表 9-6 1.0 μ g/mL 吡哆醇溶液峰面积重复性参数表

序号	保留时间[min]	峰面积[mAU.s]
1	28.248	314
2	28.469	314
3	28.374	312
4	28.410	316
5	28.389	315
6	28.382	317
RSD%	0.26	0.54

4) 最小检测浓度

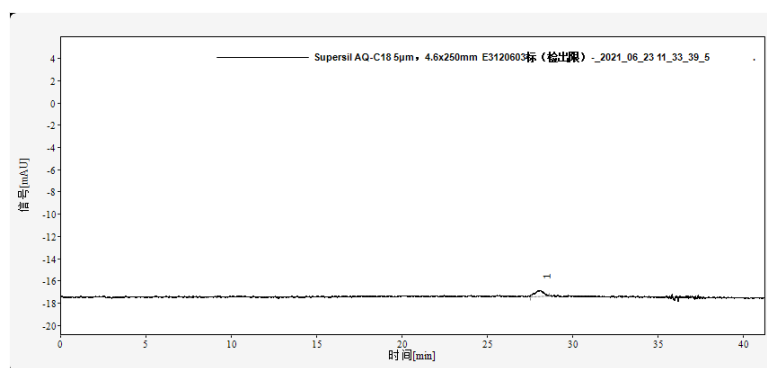


图 9-4 0.02 μ g/mL 吡哆醇溶液色谱图

基线噪音为 0.146mAU mAU，根据 S/N=3 计算出仪器检出限 LOD 为 0.017 μ g/mL，实际方法检出限为 17 μ g/100g，标准方法检出限 20 μ g/100g，因此该实验满足国标对灵敏度的要求。

5) 实际样品分析

● 羊奶粉样品中吡哆醇的含量分析

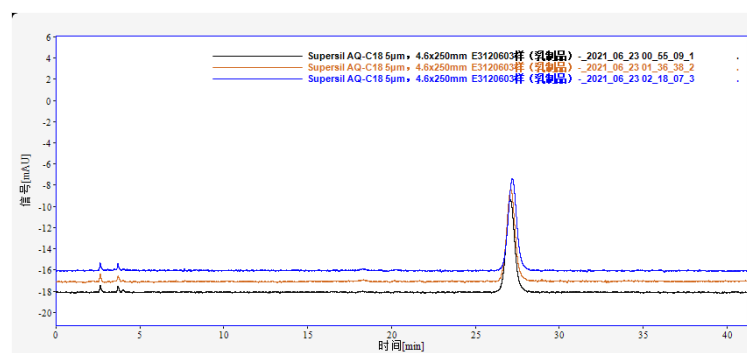


图 9-5 羊奶粉样品中吡哆醇的含量分析谱图

根据外标法计算样品中维生素 B6 含量如下：

表 9-7 羊奶粉样品中吡哆醇的含量结果表

样品名称	取样量 (g)	峰面积[mAU.s]	VB6 含量 (mg/100g)
羊奶粉	5	294	46.9

● 多种维生素矿物片保健品中吡哆醇的含量分析

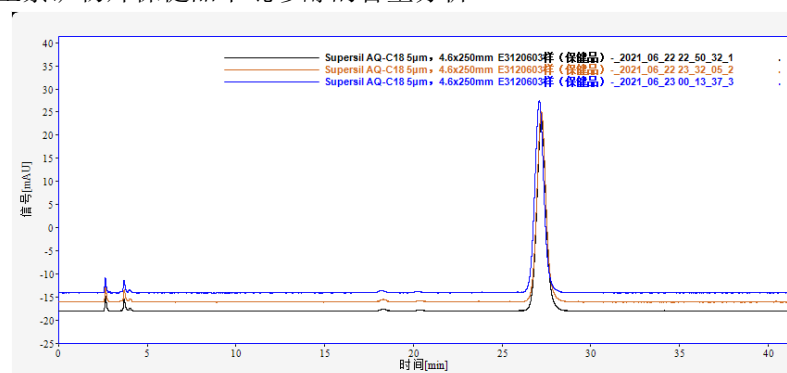


图 9-6 多种维生素矿物片保健品中吡哆醇分析谱图

根据外标法计算多种维生素矿物片保健品中吡哆醇分含量如下：

表 9-8 多种维生素矿物片样品中吡哆醇的含量结果表

样品名称	取样量 (g)	峰面积[mAU.s]	VB6 含量 (mg/100g)
多种维生素矿物片	5	1488	234.4

第10章 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。

10.1 仪器设备与试剂

表10-1 高效液相色谱系统配置清单

序号	名称	数量
1	荧光检测器	1台
2	P3200高压恒流泵	1台
3	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
4	ZJ-1支架	1个
5	色谱数据工作站	1套
6	TP3200溶剂托盘	1个
7	C18色谱柱 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm	1支
8	EClassical 3200系统工具包	1套
9	500mL溶剂瓶（无色）	2支
10	AD适配器（荧光检测器需配）	
11	O3200柱温箱（选配）	1台
12	S3200自动进样器(选配)	1台

表10-2 主要试剂

序号	试剂	纯度
1	甲醇	色谱纯
2	水	超纯水
3	无水乙醇	
4	碳酸钾	
5	无水硫酸钠	
6	异丙醇	
7	正己烷	
8	四氢呋喃	色谱纯
9	乙酸乙酯	
10	冰乙酸	色谱纯
11	氯化锌	色谱纯
12	无水乙酸钠	
13	氢氧化钾	
14	锌粉	50 μ m-70 μ m
15	脂肪酶	≥ 700 U/mg
16	淀粉酶	≥ 1.5 U/mg
17	维生素K1	$\geq 99\%$

注：或同等配置其它型号高效液相色谱仪。

表10-3 主要前处理设备

序号	名称	规格
1	溶剂过滤器	1000mL
2	隔膜真空泵	0.08MPa, 160W
3	分析天平	感量0.01g
4	离心机	≥ 4000 r/min
5	pH	
6	组织捣碎机	
7	匀浆机	
8	高速粉碎机	
9	涡旋振荡器	
10	旋转蒸发仪	
11	氮吹仪	
12	超声波振荡器	
13	恒温水浴振荡器	

实验过程中还包括棕色容量瓶(10mL、100mL)、1.5mL 塑料离心管、移液枪(0~1000 μ L, 0~5000 μ L)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性注射器(1mL)、针筒式滤膜(0.45 μ m)、进样针、一次性 PVC 手套、一次性口罩等。

10.2 实验方法

● 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。

● 样品前处理

1) 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。

2) 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。

● 色谱参考条件

色谱柱: C18 柱 5µm 4.6mm×250mm

锌还原柱: 4.6mm×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 0.22µm 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: 10µL

第11章 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。

11.1 仪器设备与试剂

表11-1 高效液相色谱系统配置清单

序号	名称	数量
1	UV3200紫外-可见检测器	1台
2	P3200高压恒流泵	1台
3	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
4	ZJ-1支架	1个
5	色谱数据工作站	1套
6	TP3200溶剂托盘	1个
7	Supersil AQ-C18 5 μ m 4.6 $\times$ 250mm	1支
8	EClassical 3200系统工具包	1套
9	500mL溶剂瓶（无色）	2支
10	O3200柱温箱（选配）	1台
11	S3200自动进样器(选配)	1台

表11-2 主要试剂

序号	试剂	纯度
1	甲醇	色谱纯
2	水	超纯水
3	氢氧化钾	
4	磷酸二氢钾	
5	无水硫酸钠	
6	氨水溶液	
7	叶酸对照品	

表11-3 主要前处理设备

序号	名称	规格
1	溶剂过滤器	1000mL
2	隔膜真空泵	0.08MPa, 160W
3	分析天平	感量0.01g
4	涡旋混合器	
5	超声波清洗器	

注：或同等配置其它型号高效液相色谱仪。

实验过程中还包括容量瓶(50mL)、一次性注射器(1mL)、针筒式滤膜(0.45 μ m)、进样针、一次性 PVC 手套、一次性口罩等。

11.2 实验方法

对照品溶液的制备：称取约 10mg 叶酸对照品，精确至 0.02 mg，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。

● 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

第12章 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。

12.1 仪器设备与试剂

表12-1 高效液相色谱系统配置清单

序号	名称	数量
1	UV3200紫外可见检测器	1台
2	P3200高压恒流泵	2台
3	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
4	ZJ-1支架	1个
5	TD-1-15梯度混合器	1个
6	色谱数据工作站	1套
7	TP3200溶剂托盘	1个
8	Supersil ODS2 5 μ m 4.6mm $\times$ 250mm	1支
9	EClassical 3200系统工具包	1套
10	500mL溶剂瓶（无色）	2支
11	O3200柱温箱（选配）	1台
12	S3200自动进样器(选配)	1台

注：或同等配置其它型号高效液相色谱仪。

表12-2 主要试剂

序号	试剂	纯度
1	甲醇	色谱纯
2	水	超纯水
3	无水乙醇	
4	乙腈	色谱纯
5	四丁基氯化铵	
6	三氯甲烷	
7	三氟乙酸	
8	柠檬酸	
9	磷酸二氢钾	
10	氢氧化钠	
11	维生素B12	$\geq 99\%$

表12-3 主要前处理设备

序号	名称	规格
1	溶剂过滤器	1000mL
2	隔膜真空泵	0.08MPa,
3	分析天平	感量0.01g
4	离心机	≥ 4000 r/min
12	超声波清洗器	
13	固相萃取柱	

实验过程中还包括容量瓶(10mL、100mL)、50mL 离心管、移液枪(0~1000 μ L, 0~5000 μ L)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性注射器(1mL)、针筒式滤膜(0.45 μ m)、进样针、一次性 PVC 手套、一次性口罩等。

12.2 实验方法

● 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。

● 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 5mL5%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。

● 色谱参考条件

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

表 12-4 梯度洗脱表

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：1.2mL/min

检测波长：361nm

柱温：40 $^{\circ}$ C

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

典型谱图

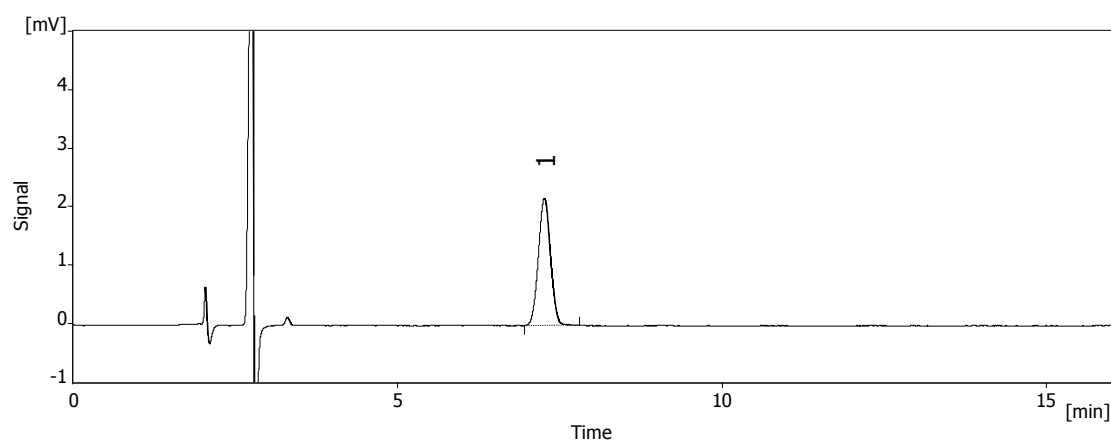


图 12-1 维生素 B12 典型分离谱图

1 维生素 B12

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： $X = (A \times 10^4) / E$(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)。

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： $\rho = (A_{444} \times 10^4 \times 10) / 328$(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：

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：

$$c_1 = A/E \times (1/100) \dots\dots\dots (\text{A. 1})$$

式中： c_1 ——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： $\rho_i = [(A_i \times M_i) / \epsilon_i] \times V \times F_i \dots\dots\dots (\text{A. 4})$

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。

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。

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($\mu\text{g/mL}$)

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

走进依利特
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

本应用中信息仅供参考，提供数据除注明外为本公司特定条件下的实验数据。