



中华人民共和国食品安全国家标准

GB ××××—××××
代替GB/T 5413.9—1997

婴幼儿食品和乳品中 维生素 A、D、E 的测定

Determination of vitamin A, D, E in foods for infant and young children,
raw milk and dairy products

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替GB/T 5413.9—1997《婴幼儿配方食品和乳粉 维生素A、D、E的测定》。

本标准与GB/T 5413.9—1997相比，主要变化如下：

——抗氧化剂由原来的焦性没食子酸改为抗坏血酸。

——将处理方法中的加热回流改为恒温皂化操作。

——增加了标准溶液的校正。

——将原有的单点定量改为标准曲线法。

——增加了维生素D回收率的测定。

——将计算公式进行修改。

本标准附录A为规范性附录，附录B为资料性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413—1985、GB/T 5413.9—1997。

婴幼儿食品和乳品中维生素A、D、E的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中维生素A、D、E的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中维生素A、D、E的测定。

本标准检出限：维生素A为10 μ g/Kg、维生素E为100 μ g/Kg、维生素D为2.0 μ g/Kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试样皂化后，经石油醚萃取，维生素A、E用反相色谱法分离，外标法定量；维生素D用正相色谱法净化后，反相色谱法分离，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯或以上规格，水为GB/T 6682规定的三级水。

4.1 α -淀粉酶：酶活力 \geq 1.5U/mg。

4.2 无水硫酸钠。

4.3 异丙醇：色谱纯。

4.4 维生素C的乙醇溶液：15g/L。

4.5 氢氧化钾溶液：称取固体氢氧化钾100g，用50mL水溶解。

4.6 石油醚：沸程30~60 $^{\circ}$ C。

4.7 甲醇：色谱纯。

4.8 正己烷：色谱纯。

4.9 环己烷：色谱纯。

4.10 乙醇：色谱纯。

4.11 维生素A、D、E标准溶液。

4.11.1 维生素A标准储备液（以视黄醇计），浓度为100 μ g/mL。

精确称取10mg的维生素A标准品，用乙醇（4.10）溶解并定容于100mL棕色容量瓶中。

4.11.2 维生素E标准储备液（以 α -生育酚计），浓度为500 μ g/mL。

精确称取50mg的维生素E标准品，用乙醇（4.10）溶解并定容于100mL棕色容量瓶中。

4.11.3 维生素D₂标准储备液，浓度为100 μ g/mL。

精确称取10mg的维生素D₂标准品，用乙醇（4.10）溶解并定容于100mL棕色容量瓶中。

4.11.4 维生素D₃标准储备液，浓度为100 μ g/mL。

精确称取10mg的维生素D₃标准品，用乙醇（4.10）溶解并定容于100mL棕色容量瓶中。

注：维生素A、D、E标准储备液均须冷冻保存，标准工作液现用现配。标准储备溶液用前需校正，见附录A。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪。

5.2 旋转蒸发器。

- 5.3 恒温磁力搅拌器。
- 5.4 氮吹仪。
- 5.5 离心机：6000r/min。
- 5.6 电子天平：±0.1mg。

6 分析步骤

6.1 试样处理：

6.1.1 含淀粉的试样。

称取混合均匀的固体试样约5g或液体试样约50g（均精确到0.1mg）于250mL三角瓶中，加入1g α—淀粉酶（4.1），固体试样需用约50mL 45~50℃的蒸馏水使其溶解，混合均匀后充氮，盖上瓶塞，置于60℃培养箱内培养30min。

6.1.2 不含淀粉的试样。

称取混合均匀的固体试样约10g或液体试样约50g（均精确到0.1mg）于250mL三角瓶中，固体试样需用约50mL 45~50℃蒸馏水使其溶解，混合均匀。

6.2 测定维生素D的试样需要同时做回收率实验。

6.3 待测液的制备：

6.3.1 皂化：于上述处理的试样溶液中加入约100mL维生素C的乙醇溶液（4.4），充分混匀后加25mL氢氧化钾溶液（4.5）混匀，放入磁力搅拌棒，充氮排出空气，盖上胶塞，在50~60℃水浴的恒温磁力搅拌器（5.3）上搅拌皂化45min后取出立刻冷却到室温。

6.3.2 提取：将皂化液全部转入500mL分液漏斗中，加入100mL石油醚（4.6），轻轻摇动，排气减压然后盖好瓶塞，室温下震荡约10min后静置分层，将水相转入另一500mL分液漏斗中，按上述方法进行第二次萃取，合并醚液，用蒸馏水洗至中性，通过无水硫酸钠过滤脱水，滤液收入500mL平底烧瓶中，于旋转蒸发器上在40℃充氮条件下蒸至近干（绝不允许蒸干），用石油醚转移至10mL容量瓶中定容。

6.3.3 从上述容量瓶中取2mL石油醚溶液放入试管A中，再取7mL石油醚溶液放入另一试管B中，置于40℃的氮吹仪中将试管A和B中的石油醚吹干，向试管A中加5mL甲醇（4.7）溶解用来测定维生素A、E，向试管B中加2mL正己烷（4.8）溶解用来测定维生素D。再将试管A和试管B以5000r/min的速度离心10min，取出静置至室温后待测。

6.4 测定

6.4.1 维生素A、E的测定。

6.4.1.1 参考色谱条件

色谱柱：C18柱，250mm×4.6mm，5μ，或具相近性能的色谱柱。

流动相：甲醇（4.7）。

流速：1.0mL/min。

波长：维生素A：325nm； 维生素E：294nm。

柱温：35℃。

进样体积：20μL。

6.4.1.2 维生素A、E标准曲线的绘制

分别吸取维生素A标准储备液（4.11.1）0.50、1.00、1.50、2.00、2.50（mL）于50mL棕色容量瓶中，用甲醇定容至刻度混匀。此标准系列工作液浓度分别为1.00、2.00、3.00、4.00、5.00（μg/mL）。

分别吸取维生素E标准储备液（4.11.2）1.0、2.0、3.0、4.00、5.0（mL）于50mL棕色容量瓶中，用甲醇定容至刻度混匀。此标准系列工作液浓度分别为10.0、20.0、30.0、40.0、50.0（μg/mL）。

分别将维生素A、E标准工作液注入液相色谱仪中，得到峰高（或峰面积）。以峰高（或峰面积）为纵坐标，以维生素A、E标准工作液浓度为横坐标分别绘制维生素A、E标准曲线。

6.4.1.3 维生素A、E试样的测定

将试液（6.3.3中A管）注入液相色谱仪中，得到峰高（或峰面积），查各自标准曲线得到试样溶液中维生素A、E的浓度。

6.4.2 维生素D的测定。

6.4.2.1 维生素D待测液的净化。

a) 参考色谱条件。

色谱柱：硅胶柱，150 mm×4.6mm，或具相近性能的色谱柱。

流动相：环己烷（4.9）与正己烷（4.8）按体积比1：1混合，并按体积分数0.8%加入异丙醇（4.3）。

流速：1mL/min。

波长：264nm。

柱温：35℃。

进样体积：500 μL。

b) 将50 μL标准维生素D溶液（此标用正己烷溶解）注入液相色谱仪中测定，确定维生素D保留时间，然后将500 μL试样溶液（6.3.3中B管）注入液相色谱仪中，根据维生素D标液保留时间收集待测液于试管C中。将试管C置于40℃条件下的氮吹仪中吹干，取出准确加入1.0mL甲醇（4.7）溶解，即为维生素D待测液。

6.4.2.2 维生素D待测液的测定。

a) 参考色谱条件

色谱柱：C18柱，250mm×4.6mm，5 μ，或具相近性能的色谱柱。

流动相：甲醇（4.7）。

流速：1mL/min。

柱温：35℃。

波长：264nm。

进样体积：100 μL。

b) 标准曲线的绘制

分别吸取维生素D₂（或D₃）标准储备液（4.11.3、4.11.4）0.20、0.40、0.60、0.80、1.00（mL）于100棕色容量瓶中，用甲醇定容至刻度混匀。此标准系列工作液浓度分别为0.200、0.400、0.600、0.800、1.000（μg/mL）。

分别将维生素D₂（或D₃）标准工作液注入液相色谱仪中，得到峰高（或峰面积）。以峰高（或峰面积）为纵坐标，以维生素D₂（或D₃）标准工作液浓度为横坐标分别绘制标准曲线。

c) 维生素D试样的测定

吸取维生素D待测液（6.4.2.1中C管）100 μL注入液相色谱仪中，得到峰高（或峰面积），查标准曲线得到维生素D待测液中维生素D₂（或D₃）的浓度。

维生素D回收率测定结果记为回收率系数k代入测定结果计算公式（7.1.2公式（2）），对维生素D含量测定结果进行校正。

7 结果计算和表示

7.1 维生素A的计算：试样中维生素A的含量X，单位为国际单位每百克（IU/100g），按（1）计算

$$X = \frac{c_s \times 10 / 2 \times 5 \times 3.33 \times 100}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

C_s ——从标准曲线得到的维生素A待测液的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

m ——试样的质量，单位为克（g）；

3.33 ——微克转换成国际单位的系数。

计算结果要求维生素 A 表示到小数点后一位。

7.2 维生素D的计算：试样中维生素D₂（或D₃）的含量X，单位为国际单位每百克（IU/100g），按（2）计算

$$X = \frac{c_s \times 10 / 7 \times 2 \times 2 \times 40 \times 100}{m \times k} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

C_s ——从标线得到的维生素D₂（或D₃）待测液的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

m ——试样的质量，单位为克（g）；

k ——回收率系数；

40 ——微克转换成国际单位的系数。

注：试样中维生素D的含量以维生素D₂和D₃的含量总和计。

计算结果要求维生素 D 表示到小数点后一位。

7.3 维生素 E 的计算：试样中维生素E的含量X，单位为国际单位每百克（IU/100g），按（3）计算

$$X = \frac{c_s \times 10 / 2 \times 5 \times 1.01 \times 100}{m \times 1000} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

C_s ——从标准曲线得到的维生素E待测液的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

m ——试样的质量，单位为克（g）；

1.01 ——毫克转换成国际单位的系数。

计算结果要求维生素 E 表示到小数点后两位。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值，维生素A、E不得超过算术平均值的5%，维生素D不得超过算术平均值的10%。

附录 A
(规范性附录)
标准溶液浓度校正方法

维生素A、D、E标准储备液配制后需要进行校正，具体操作如下：

分别取维生素A、D、E标准储备液若干微升，分别注入至含有3.00ml乙醇的比色皿中，根据给定波长测定各维生素的吸光值，按下表1给定的条件进行测定，通过下列公式计算出该维生素的浓度。

表1

标准品	加入标准储备液的量 (μL)	比吸光系数 $E_{cm}^{1\%}$	波长 λ (nm)
视黄醇 (A)	V	1835	325
α -生育酚 (E)	V	71	294
麦角钙化甾醇 (D_2)	V	485	264
胆钙化醇 (D_3)	V	462	264

浓度计算按下式：

$$C = \frac{A}{E} \times \frac{1}{100} \times \frac{3.00}{V \times 10^{-3}}$$

式中：

C ——维生素A、D、E浓度，单位为克每毫升 (g/ml)；

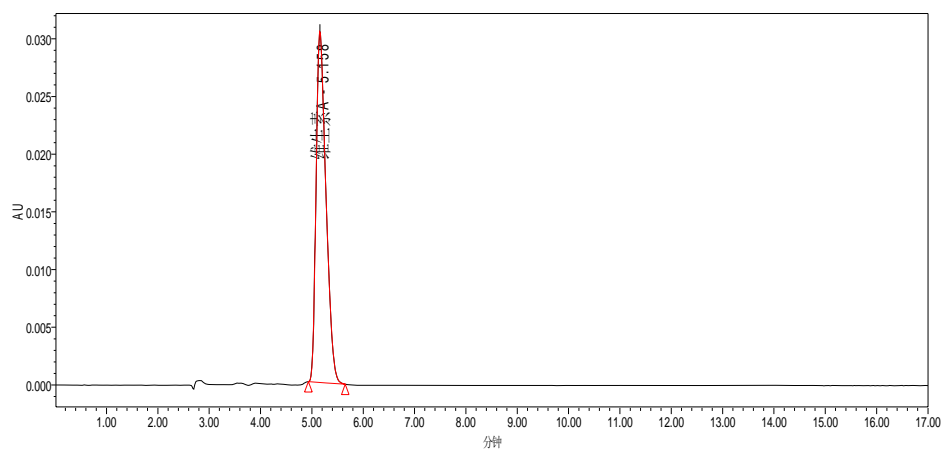
A ——维生素A、D、E的平均紫外吸光值；

V ——加入标准储备液的量，单位为微升 (μl)；

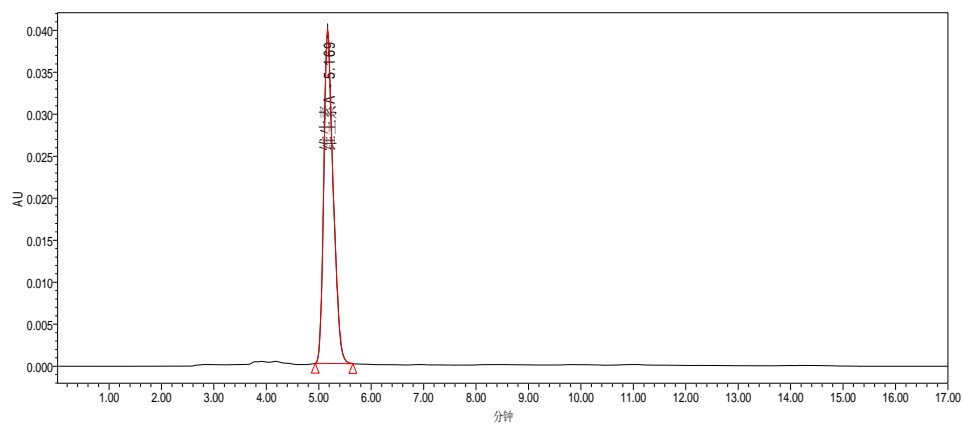
E ——A、D、E维生素1%比色光系数；

$\frac{3.00}{V \times 10^{-3}}$ ——标准储备液稀释倍数。

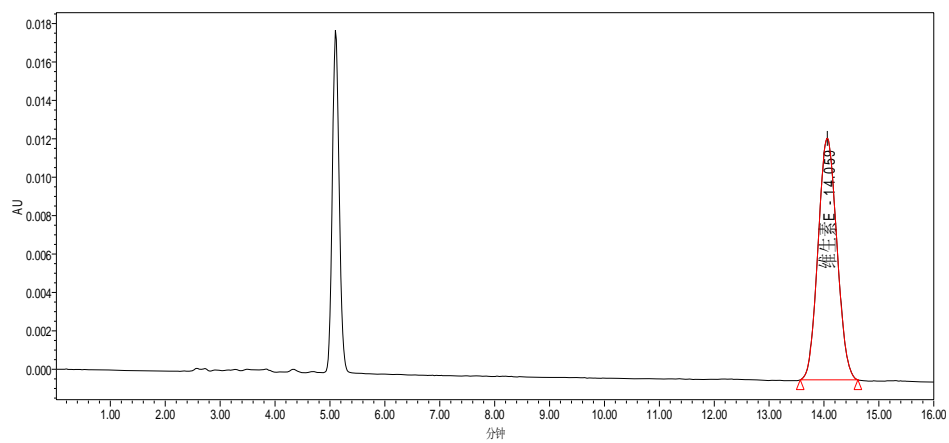
附录 B
(资料性附录)
标准品及试样色谱图



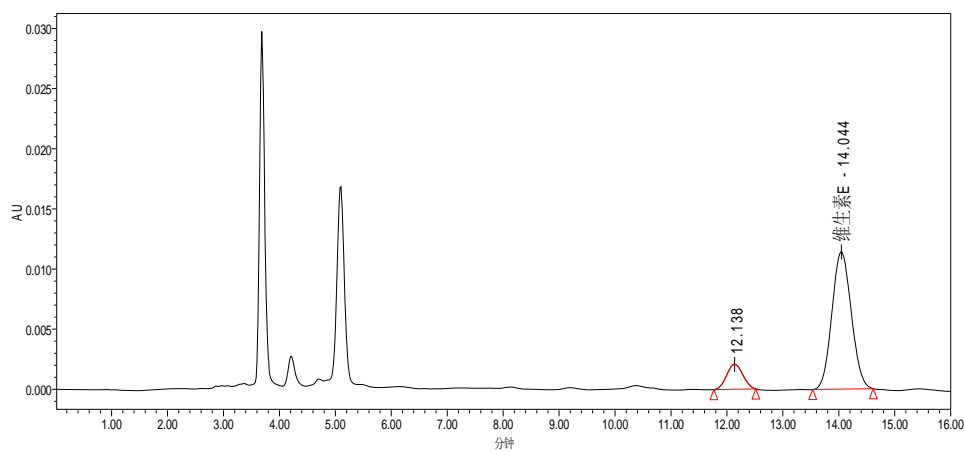
图B.1 维生素A标准品色谱图



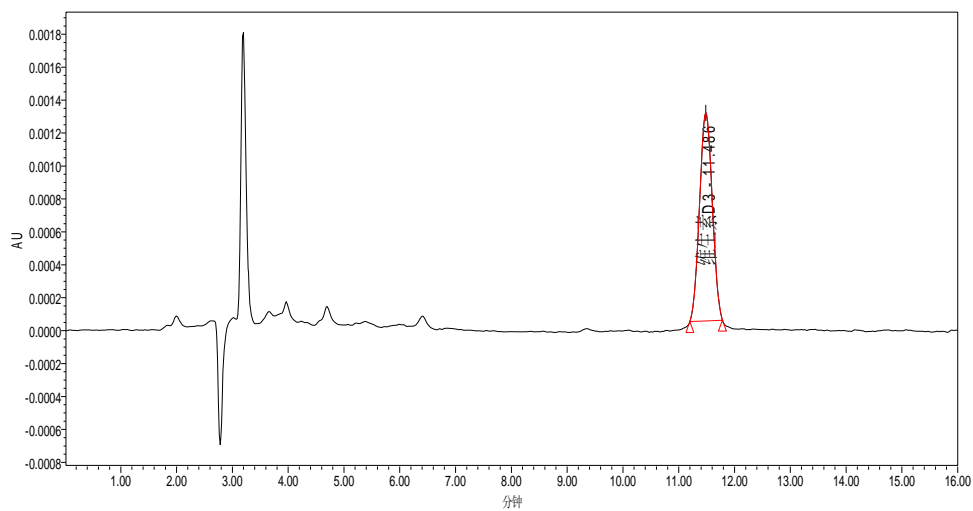
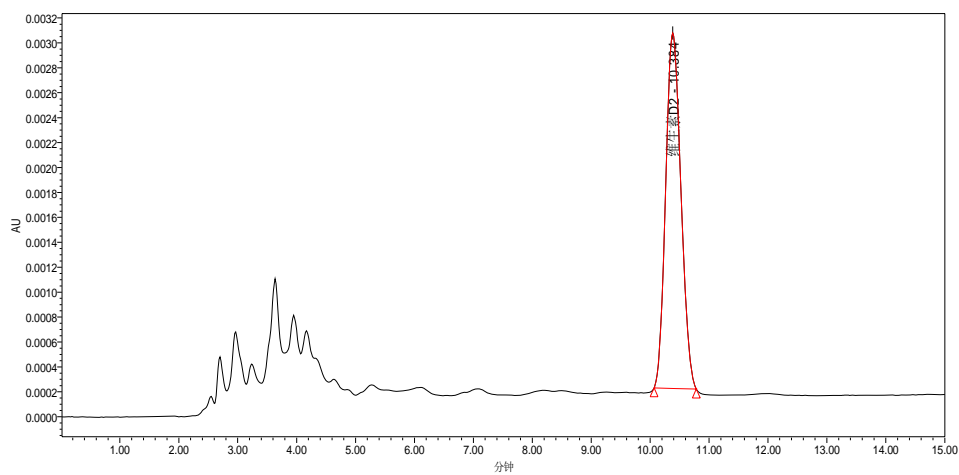
图B.2 试样的维生素A色谱图



图B.3 维生素E标准品色谱图



图B.4 试样的维生素E色谱图

图B.5 维生素D₃标准品色谱图图B.6 维生素D₂标准品色谱图

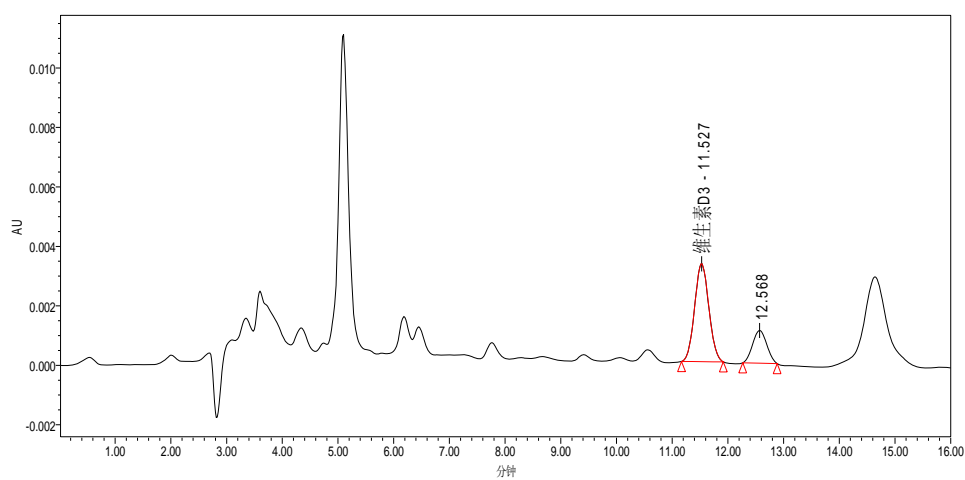


图 B.7 试样的维生素 D 试样色谱图

