中华人民共和国国家标准

GB 5413.9—2010

食品安全国家标准
婴幼儿食品和乳品中维生素A、D、E的测定

National food safety standard

Determination of vitamin A, D, E in foods for infants and young children, milk and milk products

2010-03-26 发布　　2010-06-01 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。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413-1985、GB/T 5413.9-1997。

食品安全国家标准

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。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

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规定的一级水。

4.1 α-淀粉酶：酶活力≥1.5 U/mg。

4.2 无水硫酸钠。

4.3 异丙醇：色谱纯。

4.4 乙醇：色谱纯。

4.5 氢氧化钾水溶液：称取固体氢氧化钾 250 g，加入 200 mL 水溶解。

4.6 石油醚：沸程 30 ℃～60 ℃。

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 维生素 C 的乙醇溶液（15 g/L）。

4.11 维生素 A、D、E 标准溶液

4.11.1 维生素 A 标准储备液（视黄醇）（100 μg/mL）：精确称取 10 mg 的维生素 A 标准品，用乙醇（4.4）溶解并定容于 100 mL 棕色容量瓶中。

4.11.2 维生素E标准储备液（α-生育酚）（500 μg/mL）：精确称取50 mg的维生素E标准品，用乙醇（4.4）溶解并定容于100 mL棕色容量瓶中。

4.11.3 维生素D_2标准储备液（100 μg/mL）：精确称取10 mg的维生素D_2标准品，用乙醇（4.4）溶解并定容于100 mL棕色容量瓶中。

4.11.4 维生素D_3标准储备液（100 μg/mL）：精确称取10 mg的维生素D_3标准品，用乙醇（4.4）溶解并定容于100 mL棕色容量瓶中。

注：维生素A、D、E标准储备液均须-10℃以下避光储存。标准工作液临用前配制。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，带紫外检测器。

5.2 旋转蒸发器。

5.3 恒温磁力搅拌器：20 ℃～80 ℃。

5.4 氮吹仪。

5.5 离心机：转速≥5000转/分钟。

5.6 培养箱：60 ℃±2 ℃。

5.7 天平：感量为0.1 mg。

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5 g或液体试样约50 g（精确到0.1 mg）于250 mL三角瓶中，加入l g α-淀粉酶（4.1），固体试样需用约50 mL 45 ℃～50 ℃的水使其溶解，混合均匀后充氮，盖上瓶塞，置于60 ℃±2 ℃培养箱（5.6）内培养30 min。

6.1.2 不含淀粉的试样

称取混合均匀的固体试样约10 g或液体试样约50 g（精确到0.1 mg）于250 mL三角瓶中，固体试样需用约50 mL 45 ℃～50 ℃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100 mL维生素C的乙醇溶液（4.10），充分混匀后加25 mL氢氧化钾水溶液（4.5）混匀，放入磁力搅拌棒，充氮排出空气，盖上胶塞。1000 mL的烧杯中加入约300 mL的水，将烧杯放在恒温磁力搅拌器（5.3）上，当水温控制在53 ℃ ±2 ℃时，将三角瓶放入烧杯中，磁力搅拌皂化约45 min后，取出立刻冷却到室温。

6.3.2 提取：用少量的水将皂化液全部转入500 mL分液漏斗中，加入100 mL石油醚（4.6），轻轻摇动，排气后盖好瓶塞，室温下振荡约10 min后静置分层，将水相转入另一500 mL分液漏斗中，按上述方法进行第二次萃取。合并醚液，用水洗至近中性。醚液通过无水硫酸钠过滤脱水，滤液收入500 mL

圆底烧瓶中，于旋转蒸发器上在 40 ℃±2 ℃充氮条件下蒸至近干（绝不允许蒸干）。残渣用石油醚转移至 10 mL 容量瓶中，定容。

6.3.3 从上述容量瓶中准确移取 2.0 mL 石油醚溶液放入试管 A 中，再准确移取 7.0 mL 石油醚溶液放入另一试管 B 中，将试管置于 40 ℃±2 ℃的氮吹仪（5.4）中，将试管 A 和 B 中的石油醚吹干。向试管 A 中加 5.0 mL 甲醇（4.7），振荡溶解残渣。向试管 B 中加 2.0 mL 正己烷（4.8），振荡溶解残渣。再将试管 A 和试管 B 以不低于 5000 转/分钟的速度离心 10 min，取出静置至室温后待测。A 管用来测定维生素 A、E，B 管用来测定维生素 D。

6.4 测定

6.4.1 维生素 A、E 的测定

6.4.1.1 色谱参考条件

色谱柱：C_{18}柱，250 mm ×4.6 mm，5 μm，或具同等性能的色谱柱。

流动相：甲醇（4.7）。

流速：1.0 mL/min。

检测波长：维生素A：325 nm；维生素E：294 nm。

柱温：35 ℃±1 ℃。

进样量：20 μL。

6.4.1.2 维生素 A、E 标准曲线的绘制

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

分别准确吸取维生素 E 标准储备液（4.11.2）1.00 mL、2.00 mL、3.00 mL、4.00 mL、5.00 mL 于 50 mL 棕色容量瓶中，用乙醇定容至刻度混匀。此标准系列工作液浓度分别为 10.0 μg/mL、20.0 μg/mL、30.0 μg/mL、40.0 μg/mL、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（色谱图参见附录 B），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)，根据各自标准曲线得到待测溶液中维生素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

6.4.2.1.1 色谱参考条件。

色谱柱：硅胶柱，150 mm ×4.6 mm，或具同等性能的色谱柱。

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：1 mL/min。

波长：264 nm。

柱温：35 ℃ ±1 ℃。

进样体积：500 μL。

6.4.2.1.2 取约0.5 mL维生素D标准储备液于10 mL具塞试管中，在40 ℃±2 ℃的氮吹仪（5.4）上吹干。残渣用5 mL正己烷振荡溶解。取该溶液50 μL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待测液（6.3.3中B管）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C中。将试管C置于40 ℃±2 ℃条件下的氮吹仪中吹干，取出准确加入1.0 mL甲醇（4.7），残渣振荡溶解，即为维生素D测定液。

6.4.2.2 维生素 D 测定液的测定

6.4.2.2.1 参考色谱条件

色谱柱：C_{18}柱，250 mm ×4.6 mm，5μm，或具同等性能的色谱柱。

流动相：甲醇（4.7）。

流速：1 mL/min。

检测波长：264 nm。

柱温：35 ℃ ±1 ℃。

进样量：100 μL。

6.4.2.2.2 标准曲线的绘制

分别准确吸取维生素 D_2（或 D_3）标准储备液（4.11.3、4.11.4）0.20 mL、0.40 mL、0.60 mL、0.80 mL、1.00 mL 于 100 棕色容量瓶中，用乙醇定容至刻度混匀。此标准系列工作液浓度分别为 0.200 μg/mL、0.400 μg/mL、0.600 μg/mL、0.800 μg/mL、1.000 μg/mL。

分别将维生素 D_2（或 D_3）标准工作液注入液相色谱仪中，得到峰高（或峰面积)，参见附录 B。以峰高(或峰面积)为纵坐标，以维生素 D_2（或 D_3）标准工作液浓度为横坐标分别绘制标准曲线。

6.4.2.2.3 维生素 D 试样的测定

吸取维生素D测定液（6.4.2.1中C管）100 μL注入液相色谱仪中（色谱图参见附录B），得到峰高（或峰面积），根据标准曲线得到维生素D测定液中维生素D_2（或D_3）的浓度。

维生素 D 回收率测定结果记为回收率校正因子 f，代入测定结果计算公式（2），对维生素 D 含量测定结果进行校正。

7 分析结果的表述

7.1 维生素 A 含量的计算

维生素 A 含量按（1）计算：

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

式中：

X——试样中维生素A的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

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）。

注：1 μg 视黄醇 =3.33 IU 维生素 A。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

7.2 维生素 D 含量的计算

维生素 D 含量按（2）计算：

$$X = \frac{c_s \times 10/7 \times 2 \times 2 \times 100}{m \times f} \quad \cdots\cdots(2)$$

式中：

X——试样中维生素D_2（或D_3）的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

c_s——从标线得到的维生素 D_2（或 D_3）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）；

f——回收率校正因子。

注： 试样中维生素 D 的含量以维生素 D_2 和 D_3 的含量总和计。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

7.3 维生素 E 含量

维生素 E 含量按（3）计算：

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

式中：

X——试样中维生素E（α-生育酚）的含量，单位为毫克每百克（ mg/100 g）；

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（μg/mL）；

m——试样的质量，单位为克（g）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

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 %。

9 其他

本标准检出限：维生素 A 为 1 μg/100 g、维生素 E 为 10.00 μg/100 g、维生素 D 为 0.20 μg/100 g。

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3.00 mL乙醇的比色皿中，根据给定波长测定各维生素的吸光值，按表A.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A.1　各维生素吸光值的测定条件

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（维生素A）	V	1835	325
α-生育酚（维生素E）	V	71	294
麦角钙化甾醇（维生素D_2）	V	485	264
胆钙化醇（维生素D_3）	V	462	264

浓度计算按式(4)：

$$C=\frac{A}{E}\times\frac{1}{100}\times\frac{3.00}{V\times10^{-3}} \quad \cdots\cdots(4)$$

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；

$\frac{3.00}{V\times10^{-3}}$——标准储备液稀释倍数。

附录 B
（资料性附录）
标准品液相色谱图

B.1 维生素 A、E、D_3、D_2标准品液相色谱图

维生素 A、E、D_3、D_2 标准品液相色谱图见图 B.1～图 B.4。

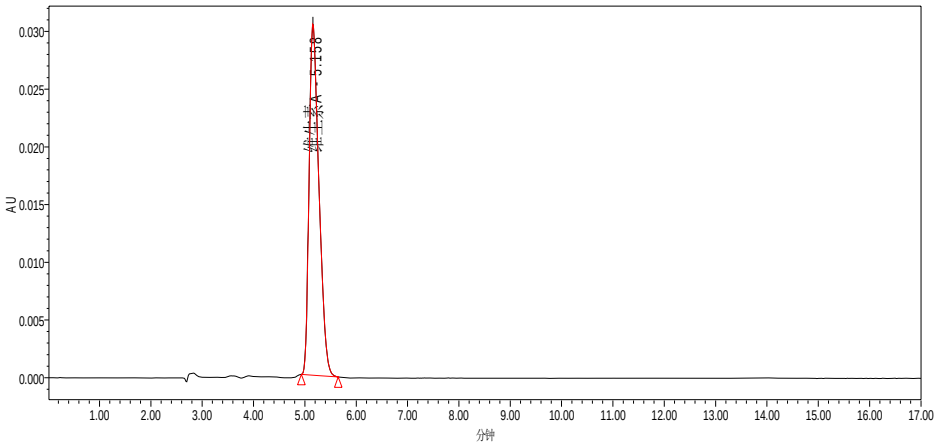


图 B.1　维生素A标准品液相色谱图

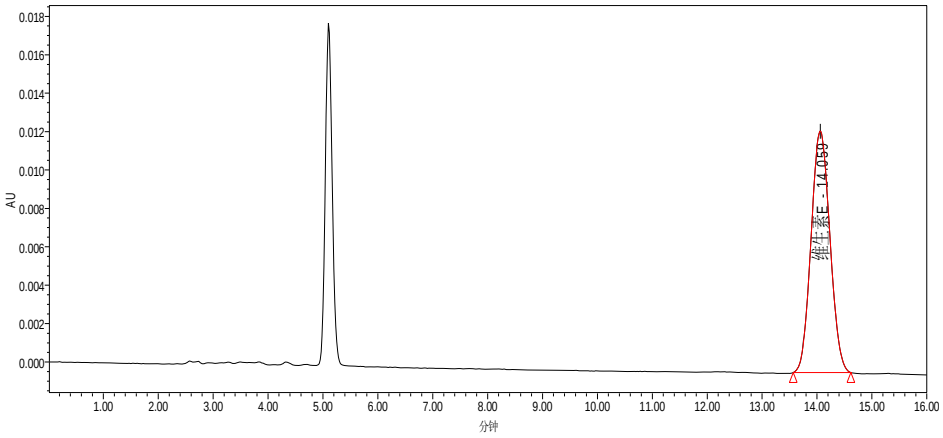


图 B.2　维生素 E 标准品液相色谱图

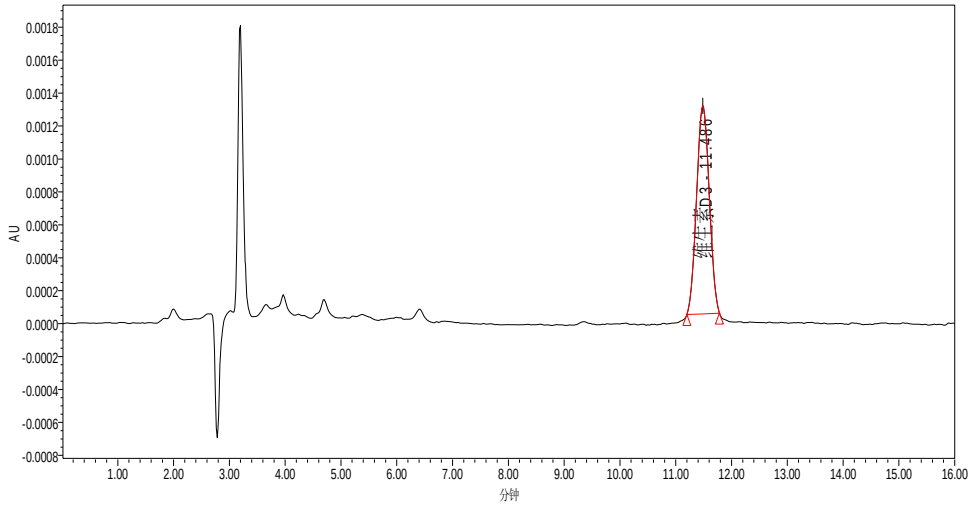


图 B.3　维生素D_3标准品液相色谱图

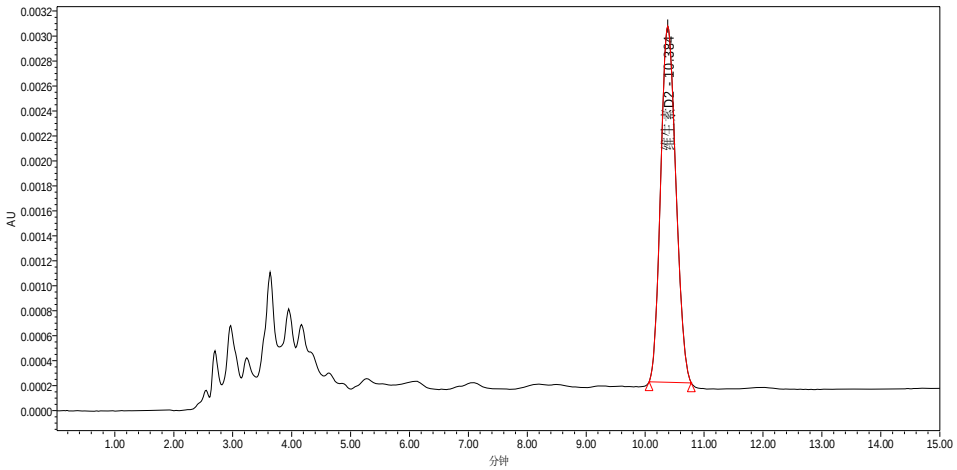


图 B.4　维生素 D_2 标准品液相色谱图