



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 °C~60 °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 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：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 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 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 D₂ 标准储备液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 精确称取 10 mg 的维生素 D₂ 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 D₃ 标准储备液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 精确称取 10 mg 的维生素 D₃ 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℃ \pm 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 1 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℃ \pm 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℃ \pm 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 $40\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $40\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 \times 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： $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、30.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

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 \times 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： $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

进样体积：500 μL 。

6.4.2.1.2 取约0.5 mL维生素D₃标准储备液（4.11.4）于10 mL具塞试管中，在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $40\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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: C₁₈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 mL/min。

检测波长: 264 nm。

柱温: 35 °C ± 1 °C。

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 D₂ (或 D₃) 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 D₂ (或 D₃) 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 D₂ (或 D₃) 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 D₂ (或 D₃) 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:

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

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——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:

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

式中:

X——试样中维生素 D₂ (或 D₃) 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 D₂ (或 D₃) 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 D₂ 和 D₃ 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：

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

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 ($\mu\text{g/mL}$)；

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 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 、维生素 E 为 10.00 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 、维生素 D 为 0.20 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 。

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 (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

浓度计算按式(4)：

$$C = \frac{A}{E} \times \frac{1}{100} \times \frac{3.00}{V \times 10^{-3}} \dots\dots\dots (4)$$

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；

$\frac{3.00}{V \times 10^{-3}}$ ——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、D₃、D₂ 标准品液相色谱图

维生素 A、E、D₃、D₂ 标准品液相色谱图见图 B.1~图 B.4。

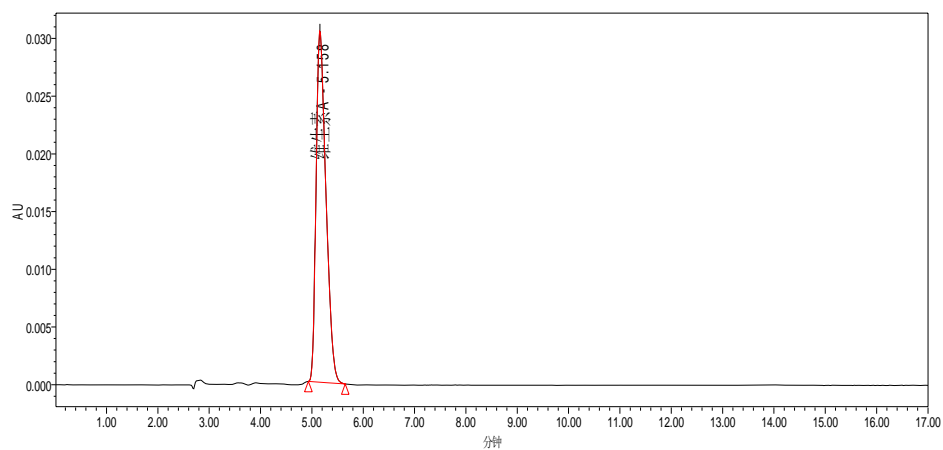


图 B.1 维生素A标准品液相色谱图

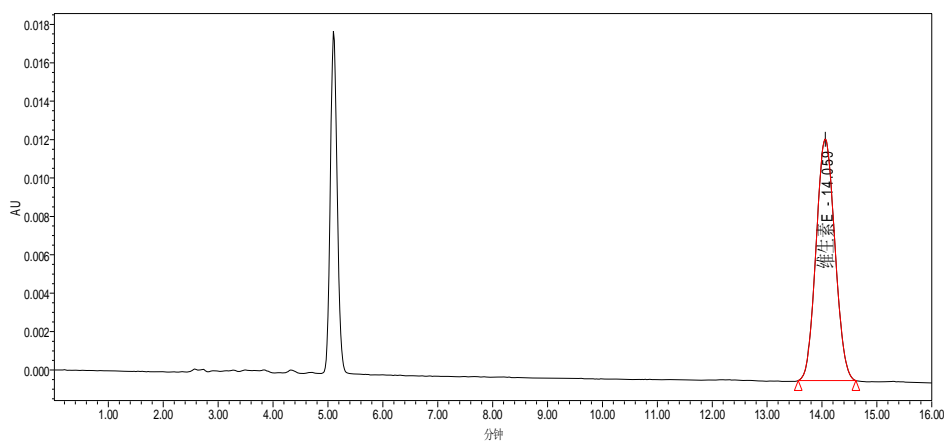


图 B.2 维生素 E 标准品液相色谱图

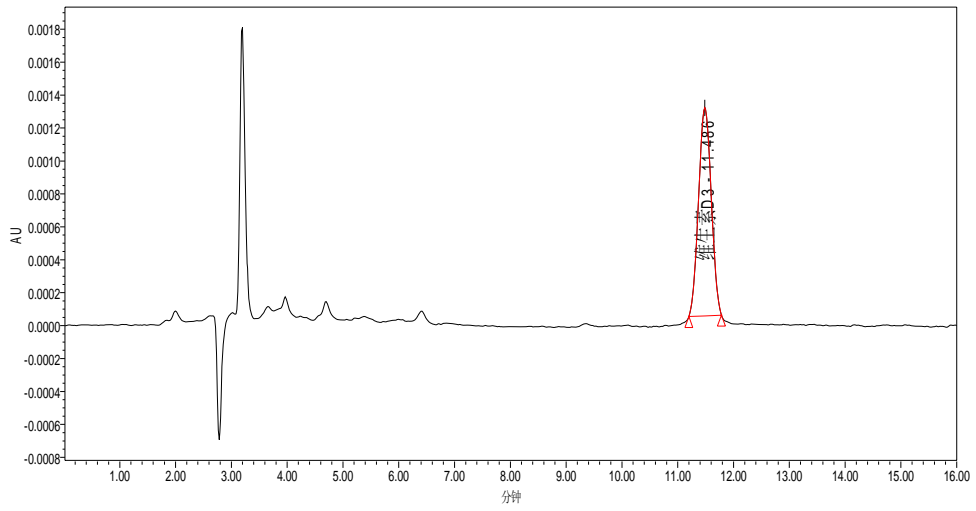


图 B.3 维生素D₃标准品液相色谱图

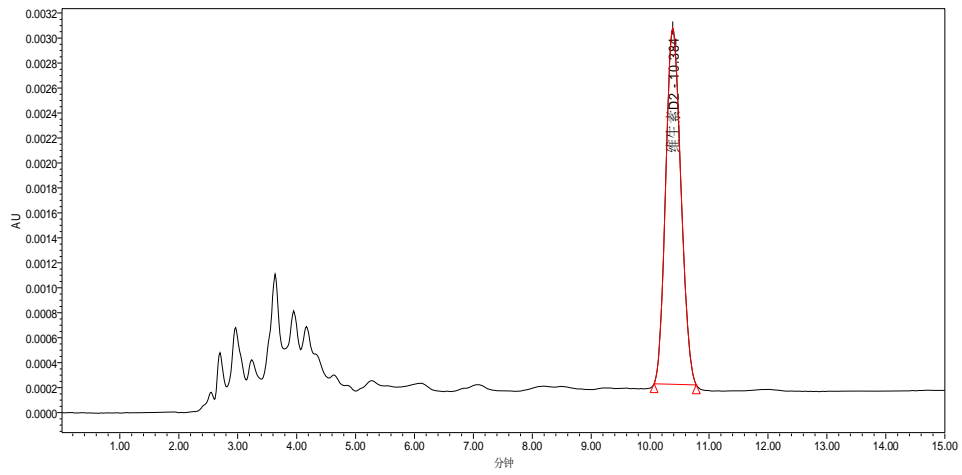


图 B.4 维生素 D₂标准品液相色谱图