

前 言

测定维生素 A、D、E 的方法很多，但广为采用的是高压液相色谱法，方法快速、准确，并避免了三种成分的相互干扰。

本标准由中国轻工总会提出。

本标准由全国乳品标准化中心归口。

本标准负责起草单位：国家乳制品质量监督检验中心。

本标准参加起草单位：卫生部食品卫生监督检验所、浙江省轻工业研究所、哈尔滨森永乳品有限公司、雀巢（中国）投资服务有限公司。

本标准主要起草人：杨金宝、王芸。

中华人民共和国国家标准

婴幼儿配方食品和乳粉

维生素 A、D、E 的测定

Milk powder and formula foods for infant and young children
-Determination of vitamin A, D, E content

GB/T 5413.9—1997

1 范围

本标准规定了用液相色谱法测定维生素 A、D、E 的方法。

本标准适用于各种婴幼儿配方食品和乳粉中维生素 A、D、E 的测定。

2 方法提要

样品中脂溶性维生素在皂化过程中与脂肪分离，经（用）石油醚萃取后，用高压液相色谱，紫外检测器定量测定。

3 仪器

所有试剂，如未注明规格，均指分析纯；所有实验用水，如未注明其他要求，均指三级水。

3.1 高峰氏淀粉酶（Taka-Diastase）。

3.2 异丙醇：色谱纯。

3.3 焦性没食子酸的乙醇溶液：15g/L。

3.4 氢氧化钾溶液：质量比为 100：50。

3.5 石油醚：沸程 30~60℃。

3.6 甲醇：色谱纯。

3.7 正己烷：色谱纯。

3.8 环己烷：色谱纯。

3.9 维生素 A、E 标准溶液

3.9.1 维生素 A 标准贮备液，含维生素 A 100μg/mL 的甲醇溶液。

称取 10mg 的维生素 A，用甲醇定容于 100mL 容量瓶中。

3.9.2 维生素 E 标准贮备液，含维生素 E 400 μ g/mL 的甲醇溶液。

称取 40mg 的维生素 E，用甲醇定容于 100mL 容量瓶中。

3.9.3 维生素 A、E 标准工作液，其中维生素 A 的浓度为 2 μ g/mL，维生素 E 的浓度为 20 μ g/mL。

取 1mL 维生素 A 标准贮备液 (3.9.1) 和 2.5mL 维生素 E 标准贮备液 (3.9.2) 于 50mL 容量瓶中，用甲醇溶解。

3.10 维生素 D 标准溶液

3.10.1 维生素 D₂ 标准贮备液，含维生素 D₂ 100 μ g/mL 的甲醇溶液。

称取 10mg 的维生素 D₂，用甲醇定容于 100mL 容量瓶中。

3.10.2 维生素 D₃ 标准贮备液，含维生素 D₃ 100 μ g/mL 的甲醇溶液。

称取 10mg 的维生素 D₃，用甲醇定容于 100mL 容量瓶中。

3.10.3 维生素 D 标准工作液，其中维生素 D₂、维生素 D₃ 的质量浓度均为 1 μ g/mL。

取维生素 D₂ 标准贮备液 1mL，维生素 D₃ 标准贮备液 1mL 于 100mL 容量瓶中，用甲醇定容。

4 仪器

常用实验室仪器及：

4.1 平底烧瓶：250mL。

4.2 分液漏斗：500mL。

4.3 旋转蒸发器。

4.4 高压液相色谱仪：具有可变波长的紫外检测器、数据处理系统或记录仪。

5 操作步骤

5.1 样品处理

5.1.1 含淀粉的样品

准确称取 10g 样品，放入 250mL 平底烧瓶中，加入 1g Taka 淀粉酶 (3.1)，再加入 30mL 45~50 $^{\circ}$ C 的蒸馏水，混合均匀后，用氮气排除瓶中空气，盖上瓶塞，置 45 $^{\circ}$ C 烘箱内 30min。

5.1.2 不含淀粉的样品

准确称取 10g 样品，置于 250mL 平底烧瓶中，加 30mL 蒸馏水。

5.2 测定液的制备

5.2.1 于上述处理的样品溶液中加入 100mL 的没食子酸乙醇溶液 (3.3)，充分混匀后加 50mL 氢氧化钾溶液 (3.4)，在蒸汽浴上连续回流 30min 后，立刻冷却到室温。

5.2.2 将皂化液转入一 500mL 分液漏斗中，用 100mL 水分几次冲洗平底烧瓶，洗涤液并入分液漏斗中。

5.2.3 于上述分液漏斗中，加入 100mL 石油醚 (3.5)，盖好瓶塞，倒置分液漏斗并剧烈振摇 1min。在振摇过程中，注意释放瓶内压力。静置分层，将水相放入另一 500mL 分液漏斗中。重复上述萃取过程二次，合并醚液到第一个分液漏斗中。用蒸馏水洗该醚液至中性，通过无水硫酸钠过滤干燥，在 40 $^{\circ}$ C 和氮气流下，于旋转蒸发器上蒸至近干（绝不允许蒸干）后，用石油醚转移至 10mL 容量瓶中，定容。

5.2.4 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，分别用氮气将试管 A 和 B 中的石油醚吹干，石油醚溶液放

于 A 中加 5mL 甲醇，用来测定维生素 A、E，试管 B 中加 1mL 正己烷，用来测定维生素 D。

5.3 测定

5.3.1 维生素 A 和 E 的测定

5.3.1.1 仪器条件

色谱柱：25mm×4.6mm，ODS 柱或具等同性能的色谱柱。

流动相：甲醇。

流速：1.0mL/min。

灵敏度：0.005AU/MV。

波长：维生素 A，325nm；维生素 E，290nm。

5.3.1.2 注射 50 μL 维生素 A、E 标样（3.9.3）和 50 μL 样品溶液（5.2.4 试管 A 中），得到标样和样品溶液中维生素 A 和 E 的峰高或峰面积。

5.3.2 维生素 D 的测定

5.3.2.1 测定的制备

a) 仪器条件

色谱柱：30cm×4mm，硅胶柱。

流动相：环己烷（3.7）与正己烷（3.8）按体积比 1:1 混合，并按体积分数 0.8% 加入异丙醇（3.2）。

流速：1mL/min。

波长：265nm。

柱温：20℃。

灵敏度：0.005AV/MV。

注射体积：200 μL。

b) 注射 50 μL 维生素 D 标样和 200 μL 样品溶液（试管 B 中），根据维生素 D 标样保留时间收集维生素 D 于试管 C 中，将试管 C 用氮气吹干，准确加入 0.2mL 甲醇（3.6）溶解。

5.3.2.2 测定步骤

a) 仪器条件

色谱柱：25cm×4.6mm，C₁₈ 或具等同性能的色谱柱。

流动相：甲醇。

流速：1mL/min。

柱温：20℃。

波长：265nm。

灵敏度：0.005AV/MV。

注射体积：50 μL。

b) 注射 50 μL 维生素 D 标准溶液（3.10.3），注射 50 μL 样品溶液（试管 C 中），得到标准和样品溶液中维生素 D 峰面积或峰高。

6 分析结果的表述

$$\text{样品中维生素 A (IU/100g)} = \frac{c_s \times 10/2 \times 5 \times 3.33 \times 100}{m} \dots\dots\dots (1)$$

$$\text{样品中维生素 E (IU/100g)} = \frac{c_s \times 10/2 \times 5 \times 100}{m} \dots\dots\dots (2)$$

$$\text{样品中维生素 D (IU/100g)} = \frac{c_s \times 10/75 \times 100 \times 40}{m \times 100} \dots\dots\dots (3)$$

$$c_s = \frac{A_s}{A_{sd}} \times c_{sd} \dots\dots\dots (4)$$

式中： c_s ——进样液是维生素 A、E 或 D 的质量浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

m ——样品的质量， g ；

A_s ——进样液中维生素 A、E 或 D 的峰高（或峰面积）；

A_{sd} ——标样中维生素 A、E 或 D 的峰高（或峰面积）；

c_{sd} ——标样中维生素 A、E 或 D 的质量浓度， $\mu\text{g/mL}$ 。

计算结果精确至小数点后一位。

7 允许差

同一样品的两次测定值之差，维生素 A 不得超过两次测定平均值的 5%；维生素 D 不得超过两次测定平均值的 10%；维生素 E 不得超过两次测定平均值的 5%。