

附件 5

保健食品中 9 种脂溶性维生素的测定

BJs 201717

1 范围

本方法规定了营养素补充剂类保健食品中维生素 A、维生素 A 醋酸酯、维生素 D₂、维生素 D₃、维生素 E、维生素 E 醋酸酯、维生素 K₁、维生素 K₂、β-胡萝卜素含量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本方法适用于营养素补充剂类保健食品中维生素 A、维生素 A 醋酸酯、维生素 D₂、维生素 D₃、维生素 E、维生素 E 醋酸酯、维生素 K₁、维生素 K₂、β-胡萝卜素含量的测定。

2 原理

试样经混合溶液（异丙醇：二氯甲烷：甲醇=10:10:80，v:v:v）提取后，采用液相色谱-串联质谱仪检测，外标法定量。

3 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 甲醇：质谱级。

3.1.2 乙腈：质谱级。

3.1.3 异丙醇：色谱纯。

3.1.4 丙酮。

3.1.5 二氯甲烷。

3.1.6 提取溶液（异丙醇：二氯甲烷：甲醇=10:10:80，v:v:v）：取异丙醇 50mL、二氯甲烷 50mL，用甲醇稀释至 500 mL，混匀。

3.1.7 0.1%甲酸水溶液：取甲酸 1 mL 用水稀释至 1 000 mL，用滤膜（3.4）过滤后备用。

3.1.8 0.1%甲酸甲醇溶液：取甲酸 1 mL 用甲醇稀释至 1000mL，用滤膜（3.4）过滤后备用。

3.2 标准品

维生素 A、维生素 A 醋酸酯、维生素 D₂、维生素 D₃、维生素 E、维生素 E 醋酸酯、维生素 K₁、维生素 K₂、β-胡萝卜素标准品的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子量见附录 A 表 A.1，纯度≥98%。

3.3 标准溶液配制

3.3.1 标准储备液（100μg/mL）

3.3.1.1 维生素 K₁ 标准储备液：称取 0.01 g（精确至 0.000 1 g）的维生素 K₁ 标准品（3.2），加入 5 mL 丙酮（3.1.4）溶解，用甲醇转移并定容于 100 mL 棕色容量瓶中。

3.3.1.2 β-胡萝卜素标准储备液：称取β-胡萝卜素标准品（3.2）0.01 g（精确至 0.000 1 g），用二氯甲烷（3.1.5）溶解，转移并定容至 100 mL 棕色容量瓶中。

3.3.1.3 维生素 A、维生素 A 醋酸酯、维生素 D₂、维生素 D₃、维生素 E、维生素 E 醋酸酯、维生素 K₂ 标准储备溶液：分别称取 0.01 g（精确至 0.000 1 g）的维生素 A、维生素 A 醋酸酯、维生素 D₂、维生素 D₃、维生素 E、维生素 E 醋酸酯、维生素 K₂ 标准品（3.2），用甲醇溶解，转移并定容至 100 mL 棕色容量瓶中。

3.3.2 空白基质溶液的配制

取空白试样按照试样制备方法（5.2）操作。

3.3.3 基质标准工作液配制

准确吸取标准储备液（3.3.1）适量，用空白基质溶液稀释。此溶液中维生素 A、维生素 A 醋酸酯、维生素 D₂ 含量为 0.01 μg/mL、0.02 μg/mL、0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.5 μg/mL，维生素 D₃ 含量为 0.02 μg/mL、0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL，维生素 E、维生素 E 醋酸酯含量为 0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL，维生素 K₁、维生素 K₂ 含量为 0.005 μg/mL、0.01 μg/mL、0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.25 μg/mL，β-胡萝卜素含量为 0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2.5 μg/mL，临用时配制。

注：操作过程应在避光环境下进行。

3.4 微孔滤膜：0.22 μm，有机相。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱-串联质谱仪：配有大气压化学离子源。

4.2 超声波清洗器。

4.3 分析天平：感量分别为 0.01 g 和 0.000 1 g。

5 分析步骤

5.1 试样制备

将 20 粒片剂或胶囊试样粉碎后混匀，液体试样混合均匀。

5.2 试样提取

准确称取混合均匀的试样 2g（精确至 0.01 g）于 50 mL 棕色容量瓶中，加入 40 mL 提取溶液（3.1.6），超声 20 min，冷却至室温，用提取溶液（3.1.6）定容至刻度，摇匀，上清液经微孔滤膜（3.4）过滤，供液相色谱-串联质谱仪测定。

注：操作过程应在避光环境下进行。

5.3 仪器参考条件

5.3.1 色谱条件

- a) 色谱柱：C₁₈柱，1.7 μm，100 mm×2.1 mm（内径），或性能相当者。
- b) 流动相：A 为 0.1%甲酸水溶液（3.1.7），B 为 0.1%甲酸甲醇溶液（3.1.8），洗脱梯度见表 1。
- c) 流速：0.5 mL/min。
- d) 柱温：35℃。
- e) 进样量：5 μL。

表 1 洗脱梯度

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	15	85
3	0	100
8.5	0	100
8.51	15	85
10	15	85

5.3.2 质谱条件

- a) 电离方式：大气压化学正离子模式。
- b) 检测方式：多反应检测（MRM）。
- c) 雾化气压力：45psi。
- d) 离子喷雾电压：4500V。
- e) 干燥气温度：200 °C（测定维生素 D₂）、350 °C（测定其余 8 种维生素）。
- f) 干燥气流速：6 L/min。
- g) 定性离子对、定量离子、碎裂电压和碰撞能量见表 2。

表 2 脂溶性维生素的定性离子对、定量离子、碎裂电压和碰撞能量

中文名称	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碎裂电压(V)	碰撞能量(eV)
维生素 A	269.2	93.1*； 81.2	135	22； 22
维生素 A 醋酸酯	328.1	93.1*； 81.2	135	22； 22
维生素 D ₂	397.3	69.2*； 107.3	135	18； 35
维生素 D ₃	385.3	367.2*； 259.1	135	5； 5
维生素 E	431.4	165.2*； 137.3	135	5； 40
维生素 E 醋酸酯	473.3	207.3*； 165.3	100	8； 30
维生素 K ₁	451.1	187.2*； 57.3	135	20； 30
维生素 K ₂	445.2	187.3*； 81.2	135	20； 40
β-胡萝卜素	538.4	177.2*； 121.3	100	10； 20

*：定量离子

5.4 定性测定

按照上述条件测定试样和混合标准工作液，如果试样中的质量色谱峰保留时间与混合标准工作液中的某种组分一致（变化范围在±2.5%之内）；试样中定性离子对的相对丰度与浓度相当混合标准工作液的相对丰度一致，相对丰度偏差不得超过表 3 规定的范围，则可判定为试样中存在该组分。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度 (%)	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的最大偏差 (%)	± 20	± 25	± 30	± 50

5.5 定量测定

5.5.1 标准曲线的制作

将基质标准工作液 (3.3.3) 分别按仪器参考条件 (5.3) 进行测定, 得到相应的标准溶液的色谱峰面积。以混合标准工作液的浓度为横坐标, 以色谱峰的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

5.5.2 试样溶液的测定

将试样溶液 (5.2) 按仪器参考条件 (5.3) 进行测定, 得到相应的样品溶液的色谱峰面积。根据标准曲线得到待测液中组分的浓度, 平行测定次数不少于两次; 试样待测液响应值若低于标准曲线线性范围, 应取 5.2 中试样提取续滤液进行分析; 试样待测液响应值若超出标准曲线线性范围, 应用提取溶液 (3.1.6) 稀释后进行分析。

标准品液相色谱图参见附录 B 的图 B.1-B.9。

6 结果计算

结果按式 (1) 计算:

$$X = \frac{c \times V \times 100}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X —试样中某种组分的含量, 单位为微克每百克 ($\mu\text{g}/100\text{g}$);

c —由标准曲线得出的样液中某种组分的浓度, 单位为微克每毫升 ($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V —试样溶液定容体积, 单位为毫升 (mL);

m —试样称取的质量, 单位为克 (g);

计算结果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 精密度

在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

8 其他

当称样量为 2.00 g, 定容体积为 50 mL 时, 维生素 A、维生素 A 醋酸酯、维生素 D₂ 检出限为 8 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 定量限为 25 $\mu\text{g}/100\text{g}$; 维生素 D₃、维生素 E 检出限为 15 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 定量限为 50 $\mu\text{g}/100\text{g}$; 维生素 E 醋酸酯、维生素 K₁、维生素 K₂ 检出限为 4 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 定量限为 12.5 $\mu\text{g}/100\text{g}$; β -胡萝卜素检出限为 40 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 定量限为 125 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。

附录 A

脂溶性维生素标准品信息

表A.1 脂溶性维生素标准品的中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子量

序号	中文名称	英文名称	CAS登录号	分子式	相对分子量
1	维生素 A	Retinol	68-26-8	C ₂₀ H ₃₀ O	286.45
2	维生素 A 醋酸酯	Retinol Acetate	127-47-9	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	328.49
3	维生素 D ₂	Calciferol	50-14-6	C ₂₈ H ₄₄ O	396.65
4	维生素 D ₃	Cholecalciferol	67-97-0	C ₂₇ H ₄₄ O	384.64
5	维生素 E	α-Tocopherol	59-02-9	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430.71
6	维生素 E 醋酸酯	Tocopheryl Acetate	7695-91-2	C ₃₁ H ₅₂ O ₃	472.74
7	维生素 K ₁	Phytomenadione	84-80-0	C ₃₁ H ₄₆ O ₂	450.71
8	维生素 K ₂	Farnoquinone	11032-49-8	C ₁₆ H ₁₆ O ₂ ·(C ₅ H ₈) ₃	444.66
9	β-胡萝卜素	β-Carotene	7235-40-7	C ₄₀ H ₅₆	536.87

附录B

脂溶性维生素标准品色谱图

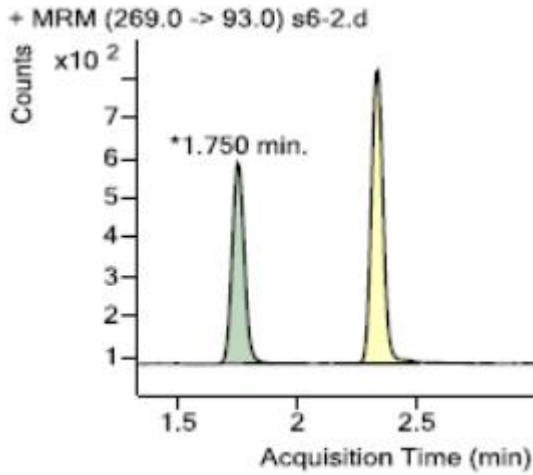


图 B.1 维生素 A 色谱图

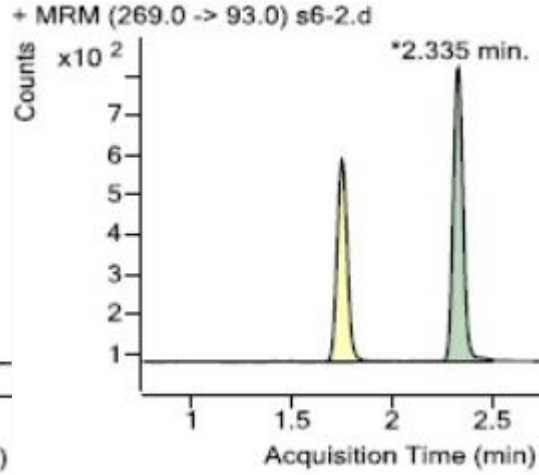


图 B.2 维生素 A 醋酸酯色谱图

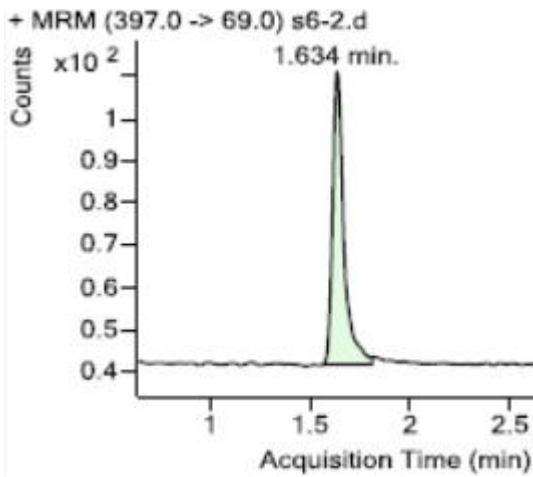


图 B.3 维生素 D₂ 色谱图

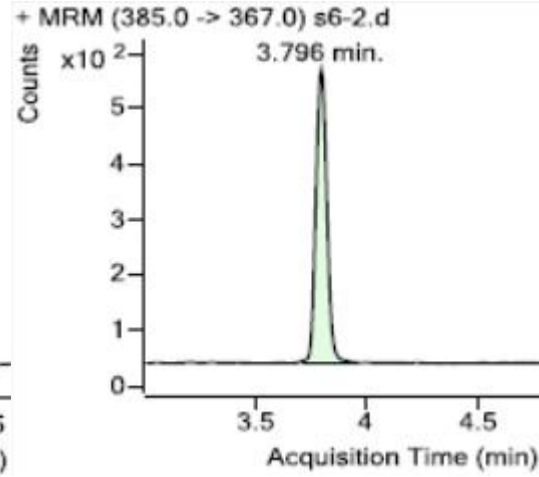


图 B.4 维生素 D₃ 色谱图

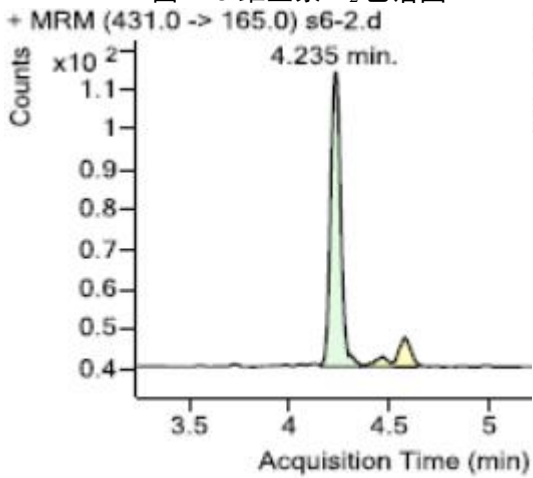


图 B.5 维生素 E 色谱图

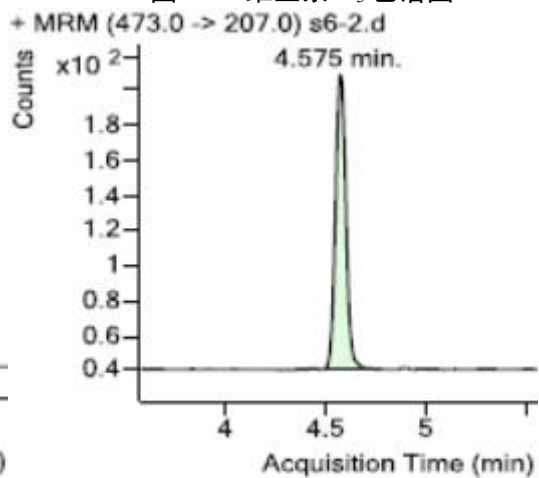


图 B.6 维生素 E 醋酸酯色谱图

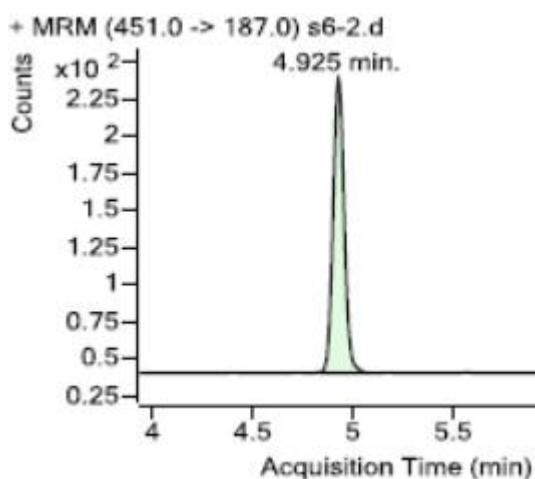


图 B.7 维生素 K₁ 色谱图

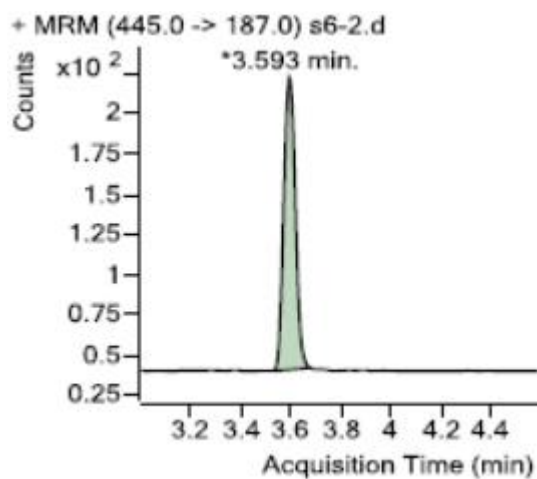


图 B.8 维生素 K₂ 色谱图

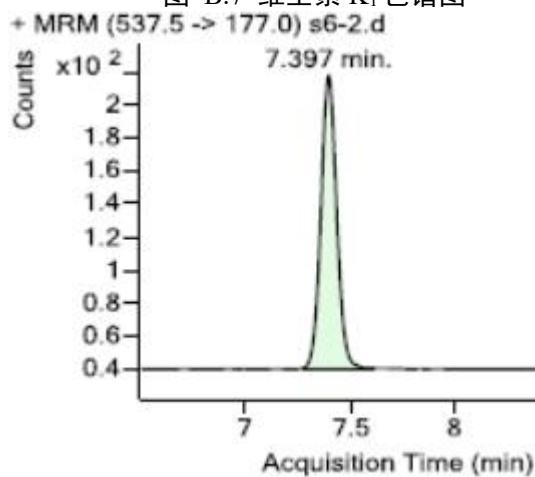


图 B.9 β -胡萝卜素色谱图

本方法负责起草单位：中国食品药品检定研究院。

验证单位：山东省食品药品检验研究院、武汉市食品化妆品检验所、天津市药品检验所、中国医学科学院药物研究所、厦门市药品检验研究院。

主要起草人：宁霄、金绍明、曹进、王聪、孔璇、贾艾玲