ICS 67.100
CCS X 16

JAASS

团　　体　　标　　准

T/JAASS X-2021

乳及乳制品中维生素 A、D、E 的测定 在线固相萃取-中心切割二维液相色谱法

Determination of vitamin A, D, E in milk and dairy products by On-line solid phase extraction - heart cutting of two-dimensional liquid phase chromatography

2021－XX－XX 发布　　2021－XX－XX 实施

江苏省农学会　发 布

目　　次

前　　言.....II
1 范围.....1
2 规范性引用文件.....1
3 术语和定义.....1
4 原理.....1
5 试剂和材料.....1
5.1 试剂.....1
5.2 试剂配制.....2
5.3 标准品.....2
5.4 标准溶液配制.....2
6 设备和仪器.....3
7 分析步骤.....3
7.1 试样制备.....3
7.2 试样处理.....3
7.3 系统验证.....4
7.4 色谱条件.....6
8 分析结果表述.....8
8.1 维生素 A、E 的含量计算.....8
8.2 维生素 D 的含量计算.....8
9 精密度.....8
10 检出限和定量限.....8
附录 A（资料性附录）维生素 A、D、E 标准溶液浓度校正方法.....10
附录 B（资料性附录）仪器连接示意图和维生素 A、D、E 典型色谱图.....11

前　　言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规则编写。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由南京市产品质量监督检验院提出。

本文件由江苏省农学会归口。

本文件起草单位：南京市产品质量监督检验院、上海市产品质量监督检验院、上海通标标准技术有限公司、澳优乳业（中国）有限公司、内蒙古伊利实业集团股份有限公司、内蒙古欧世蒙牛乳制品有限责任公司。

本文件主要起草人：徐美玲、张露、王晓丽、陆秀凤、叶沐阳、陈良茜、江雪婷、郭园园、王飞轩、周荣杰、林毅侃、赵立苹、胡雪、吴腾。

乳及乳制品中维生素 A、D、E 的测定 在线固相萃取-中心切割二维液相色谱法

1 范围

本文件规定了乳及乳制品中维生素A、D、E的测定原理及方法。

本文件适用于乳及乳制品中维生素A、D、E的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

样品经皂化（含蛋白或淀粉样品需酶解）后，直接进二维液相色谱系统，经在线固相萃取装置去除高浓度的碱和水溶性成分，经一维液相色谱分离并分析维生素A、E同时对维生素D进行净化和转移，再经过阀切换，将维生素D进入二维液相色谱进行分离和分析。

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 无水乙醇（C_2H_5OH）：色谱纯

5.1.2 乙腈（CH_3CN）：色谱纯

5.1.3 甲醇（CH_3OH）：色谱纯

5.1.4 甲酸（HCOOH）：色谱纯

5.1.5 抗坏血酸（$C_6H_8O_6$）：分析纯

5.1.6 2，6-二叔丁基对甲基苯酚（BHT）：分析纯

5.1.7　磷酸：分析纯

5.1.8　氢氧化钾（KOH）：分析纯

5.1.9　甲基叔丁基醚（MTBE）：色谱纯

5.1.10　淀粉酶：活力单位≥100 U/mg

5.2　试剂配制

5.2.1　50%无水乙醇溶液：量取 50 mL 无水乙醇，加水定容至 100 mL。

5.2.2　氢氧化钾溶液（50 g/100 g）：称取 50 g 氢氧化钾，加入 50 mL 水溶解，冷却后，储存于聚乙烯瓶中。

5.3　标准品

5.3.1　维生素 A 标准品

视黄醇（$C_{20}H_{30}O$，CAS 号：68-26-8）：纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.2　维生素 E 标准品

5.3.2.1　α-生育酚（$C_{29}H_{50}O_2$，CAS 号：10191-41-0）：纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.2.2　β-生育酚（$C_{28}H_{48}O_2$，CAS 号：148-03-8）：纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.2.3　γ-生育酚（$C_{28}H_{48}O_2$，CAS 号：54-28-4）：纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.2.4　δ-生育酚（$C_{27}H_{46}O_2$，CAS 号：119-13-1）：纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.3　维生素 D 标准品

5.3.3.1　维生素 D_2 标准品：钙化醇（$C_{28}H_{44}O$，CAS 号：50-14-6），纯度>98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.3.2　维生素 D_3 标准品：胆钙化醇（$C_{27}H_{44}O$，CAS 号：511-28-4），纯度>98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.4　标准溶液配制

5.4.1　维生素 A 标准储备溶液（0.500 mg/mL）

准确称取 25.0 mg 维生素 A 标准品，用无水乙醇溶解后，转移入 50 mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 0.500 mg/mL。将溶液转移至棕色试剂瓶中，密封后，在-20°C 下避光保存，有效期 1 个月。临用前将溶液回温至 20°C，并进行浓度校正（校正方法见附录 A）。

5.4.2　维生素 E 标准储备溶液（1.00 mg/mL）

分别准确称取α-生育酚、β-生育酚、γ-生育酚、δ-生育酚标准品 50.0 mg，用无水乙醇溶解后，转移至 50 ml 容量瓶定容，此溶液浓度为 1.00 mg/mL。将溶液转移至棕色试剂瓶种，密封后，在-20°C 下避光保存，有效期 6 个月。临用前将溶液回温至 20°C，并进行浓度校正（校正方法见附录 A）。

5.4.3 **维生素 D 标准储备溶液**(100 μg/mL)

准确称取维生素 D_2 标准品 10.0 mg，用无水乙醇溶解后，转移至 100 mL 棕色容量瓶定容，得到维生素 D_2 标准储备液（浓度 100 μg/mL）。准确称取维生素 D_3 标准品 10.0 mg，用无水乙醇溶解后，转移至 100 mL 棕色容量瓶定容，得到维生素 D_3 标准储备液（浓度 100 μg/mL）。在-20°C 下避光保存，有效期 6 个月。临用前将溶液回温至 20°C，并进行浓度校正（校正方法见附录 A）。

5.4.4 **维生素 A、D、E 混合标准溶液**

分别移取适量维生素 A、D、E 标准储备液于 100mL 容量瓶中用乙醇定容至刻度，得到维生素 A、D、E 混合标准溶液（维生素 A：1 μg/mL，维生素 E：10 μg/mL，维生素 D：0.05 μg/mL）。

5.4.5 **维生素 A、D、E 混合工作液**

分别移取适量维生素 A、D、E 混合标准溶液，用 50%乙醇水逐级稀释成以下浓度：维生素 A（0.01 μg/mL，0.025 μg/mL，0.050 μg/mL，0.100 μg/mL，0.250 μg/mL，0.500 μg/mL）、维生素 D（0.5 ng/mL，1.25 ng/mL，2.5 ng/mL，5 ng/mL，12.5 ng/mL，25 ng/mL）、维生素 E（0.1 μg/mL，0.250 μg/mL，0.5 μg/mL，1 μg/mL，2.5 μg/mL，5 μg/mL）。

6 设备和仪器

6.1 在线固相萃取-中心切割二维液相色谱系统：含三个泵、一个自动进样器、一个柱温箱和两个检测器

6.2 分析天平：感量 0.01 g 和 0.00001 g

6.3 涡旋混合器

6.4 250 mL 锥形瓶

6.5 容量瓶：100 mL

6.6 尼龙滤膜：0.22 μm

7 分析步骤

7.1 试样制备

将一定数量的样品按要求经过缩分、粉碎、均质后，储存于样品瓶中，避光冷藏，尽快测定。

7.2 试样处理

7.2.1 **不含淀粉试样**

称取 2 g~5 g（精确至 0.01 g）经均质处理的固试样或 50 g（精确至 0.01 g）液体试样于 250 mL 锥

形瓶中，固体试样需加入约 20 mL 温水混匀，再加入 1.0 g 抗坏血酸和 1.0 g BHT，混匀，加入 30 mL 无水乙醇，加入 10~20 mL 氢氧化钾溶液，变加变摇匀，混匀后于 80°C 恒温水浴震荡皂化 30 min，皂化后立即用流水冷却至室温，皂化液转移至 100 mL 棕色容量瓶中，加 50%乙醇水定容至刻度，混匀，过 0.22 μm 尼龙滤膜上机测试。

7.2.2 **含淀粉试样**

称取2 g~5 g（精确至0.01 g）经均质处理的固试样或50 g（精确至0.01 g）液体试样于250 mL锥形瓶中，固体试样需加入约20 mL温水混匀，加入0.5 g~1.0 g淀粉酶，放入60°C水浴避光恒温震荡30 min后，取出，向酶解液中加入1.0 g 抗坏血酸和1.0 g BHT，混匀，加入30 mL无水乙醇，加入10~20 mL氢氧化钾溶液，变加变摇匀，混匀后于80°C恒温水浴震荡皂化30 min，皂化后立即用流水冷却至室温，皂化液转移至100 mL棕色容量瓶中，加50%乙醇水定容至刻度，混匀，过0.22 μm尼龙滤膜上机测试。

7.3 **系统验证**

7.3.1 **流路连接（见附录 B 图 1）**

7.3.2 **色谱条件**

7.3.2.1 在线固相萃取柱（SPE）：PLRP-S，4.6×12.5 mm，15-20 μm 或等效柱

7.3.2.2 一维分析柱：Poroshell 120 PFP，4.6×100 mm，4 μm 或等效柱

7.3.2.3 捕获柱：Poroshell 120 EC-C18，4.6×5 mm，4 μm 或等效柱

7.3.2.4 二维分析柱：Zorbax Eclipse Plus PAH，2.1×100 mm，3.5 μm 或等效柱

7.3.2.5 柱温：35°C

7.3.2.6 SPE 泵流动相流速及梯度见表 1

7.3.2.7 一维流动相流速及梯度见表 2

7.3.2.8 二维流动相流速及梯度见表 3

7.3.2.9 阀位置：阀 1：0 min（位置 1-6）；4.5 min（位置 1-2）；5.9 min（位置 1-6）；阀 2：0-25 min（位置 1-6）。

7.3.2.10 进样量：100 μL

7.3.2.11 检测波长：一维：0-12 min：325 nm；12-15 min：264 nm（根据维生素 D 保留时间调整）；15-25 min：294 nm。二维：264 nm。

表 1 SPE 泵流动相流速及梯度

时间 min	流速 mL/min	A：水 %	B：乙腈 %	C：甲醇 %	D：甲基叔丁基醚 %
0.0	1.0	20	0	80	0
4.0	1.0	20	0	80	0
4.1	1.0	10	90	0	0
8.0	1.0	10	90	0	0
8.5	1.0	0	100	0	0
15	1.0	0	100	0	0
16.0	1.0	0	90	0	10
20	1.0	0	90	0	10
21.0	1.0	20	0	80	0
25	1.0	20	0	80	0

表 2 一维液相色谱流动相流速及梯度

时间 min	流速 mL/min	A：水 %	B：甲醇 %
0.0	0.5	70	30
6.5	0.5	70	30
7.0	1.0	25	75
17.0	1.0	10	90
19.0	1.0	0	100
22.0	1.0	0	100

表 3 二维液相色谱流动相流速及梯度

时间 min	流速 mL/min	A：乙腈 %	B：甲醇 %
0.0	0.4	0	100
5.0	0.4	0	30
6.0	0.4	90	10
25.0	0.4	90	10

7.3.3 **确定维生素 D 的切割窗口**

按 6.3.2 色谱条件按顺序分别进一针空白溶液，2 针维生素 A、D、E 混合标样，保证维生素 A、D、E 保留时间重复性后，得到维生素 D 的保留时间（约 13.7 min）。典型色谱图见附录 B 图 2 所示。

7.3.4 **建立完整的维生素 A、D、E 分析方法**

根据图 2 结果确定维生素 D 捕获窗口并编辑阀 2 的切换时间。切换开始时间为维生素峰起始时间减去 0.1 min，切换结束时间为维生素 D 峰回到基线时间加 0.1 min。其余条件与表 1 条件一样，得到完整的维生素 A、D、E 分析方法。

7.4 **色谱条件**

7.4.1 在线固相萃取柱（SPE）：PLRP-S，4.6×12.5 mm，15-20 μm 或等效柱

7.4.2 一维分析柱：Poroshell 120 PFP，4.6×100 mm，4 μm 或等效柱

7.4.3 捕获柱：Poroshell 120 EC-C18，4.6×5 mm，4 μm 或等效柱

7.4.4 二维分析柱：Zorbax Eclipse Plus PAH，2.1×100 mm，3.5 μm 或等效柱

7.4.5 柱温：35°C

7.4.6 SPE 泵流动相流速及梯度见表 4

7.4.7 一维流动相流速及梯度见表 5

7.4.8 二维流动相流速及梯度见表 6

7.4.9 阀位置

阀 1：0min（位置 1-6）；4.5min（位置 1-2）；5.9min（位置 1-6）。

阀 2：0min（位置 1-6）；13.7 min（位置 1-2）；14.5 min （位置 1-6）。

阀 2 具体时间阀切以系统实验 VD 出峰时间为准。

7.4.10 进样量：100 μL

7.4.11 检测波长：一维：0-12 min：325 nm；12-15 min：264 nm（根据维生素 D 保留时间调整）；15-25 min：294 nm。二维：264 nm。

表 4 SPE 泵流动相流速及梯度

时间 min	流速 mL/min	A：水 %	B：乙腈 %	C：甲醇 %	D：甲基叔丁基醚 %
0.0	1.0	20	0	80	0
4.0	1.0	20	0	80	0
4.1	1.0	10	90	0	0
8.0	1.0	10	90	0	0
8.5	1.0	0	100	0	0
15	1.0	0	100	0	0
16.0	1.0	0	90	0	10
20	1.0	0	90	0	10
21.0	1.0	20	0	80	0
25	1.0	20	0	80	0

表 5 一维液相色谱流动相流速及梯度

时间 min	流速 mL/min	A：0.1%磷酸水溶液 %	B：甲醇 %
0.0	0.5	70	30
6.5	0.5	70	30
7.0	1.0	25	75
17.0	1.0	10	90
19.0	1.0	0	100
22.0	1.0	0	100

表 6 二维液相色谱流动相流速及梯度

时间 min	流速 mL/min	A：乙腈 %	B：甲醇 %
0.0	0.4	0	100
5.0	0.4	0	100
6.0	0.4	90	10
22.0	0.4	90	10
23.0	0.4	0	100
25.0	0.4	0	100

8 分析结果表述

8.1 维生素 A、E 的含量计算

试样中维生素 A、E 的含量按式（1）计算。

$$X = \frac{c \times V \times f \times 100}{m} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（1）$$

式中：

X ——试样中维生素 A 或维生素 E 的含量，维生素 A、E 单位为微克每百克（μg/100 g），维生素 E 单位为毫克每百克(mg/100 g)；

c ——根据标准曲线计算得到的试样中维生素 A 或维生素 E 的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——定容体积，单位为毫升（mL）；

f ——换算因子（维生素 A：f=1；维生素 E：f=0.001）；

100——试样中量以每 100 克计算的换算系数；

m ——试样的称样量，单位为克（g）。

计算结果保留三位有效数字。

注：如维生素 E 的测定结果要用α-生育酚当量（α-TE）表示，可按下式计算：维生素 E（mgα-TE/100 g）=α-生育酚（mg/100 g）+β-生育酚（mg/100 g）×0.5+γ-生育酚（mg/100 g）×0.1+δ-生育酚（mg/100g）×0.01。

8.2 维生素 D 的含量计算

试样中维生素 D 的含量按式(2)计算

$$X = \frac{c \times V \times 100}{m} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（2）$$

式中：

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

c ——根据标准曲线计算得到的试样中维生素 D 的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——定容体积，单位为毫升（mL）；

100——试样中量以每 100 克计算的换算系数；

m ——试样的称样量，单位为克（g）。

计算结果保留三位有效数字。

9 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不得超过算术平均值的10%。

10 检出限和定量限

当取样量为 2 g，定容 100 mL 时，维生素 A 的紫外检出限为 0.5 μg/100 g，定量限为 1.5 μg/100 g；

生育酚的紫外检出限为 2.5 μg/100 g，定量限为 7.5 μg/100 g；维生素 D 的紫外检出限为 0.05 μg/100 g，定量限为 0.15 μg/100 g。

附　录　A
（资料性附录）
维生素 A、D、E 标准溶液浓度校正方法

维生素 A、维生素 D、维生素 E 标准溶液配制后，再使用前需要对其浓度进行校正，具体操作如下：

a）取视黄醇标准储备溶液 50 μL 于 10 mL 的棕色容量瓶中，用无水乙醇定容至刻度，混匀，用 1 cm 石英比色皿，以无水乙醇为空白参比，按表 A.1 的测定波长测定其吸光度；

b）分别取维生素 D_2、维生素 D_3 标准储备液 100 μL 于各 10 mL 的棕色容量瓶中，用无水乙醇定容至刻度，混匀，分别用 1 cm 石英比色皿，以无水乙醇为空白参比，按表 A.1 的测定波长测定其吸光度；

c）分别取取α-生育酚、β-生育酚、γ-生育酚和δ-生育酚标准储备溶液 500 μL 于各 10 mL 容量瓶中，用无水乙醇定容至刻度，混匀，分别用 1cm 石英比色皿，以无水乙醇为空白参比，按表 A.1 的测定波长测定其吸光度；

试液中维生素 A 或维生素 E 或维生素 D 的浓度按式（A.1）计算：

$$X = \frac{A \times 10^4}{E} \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（A.1）$$

式中：

X——维生素标准稀释液浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

A ——维生素稀释液的平均紫外吸光值；

10^4——换算系数；

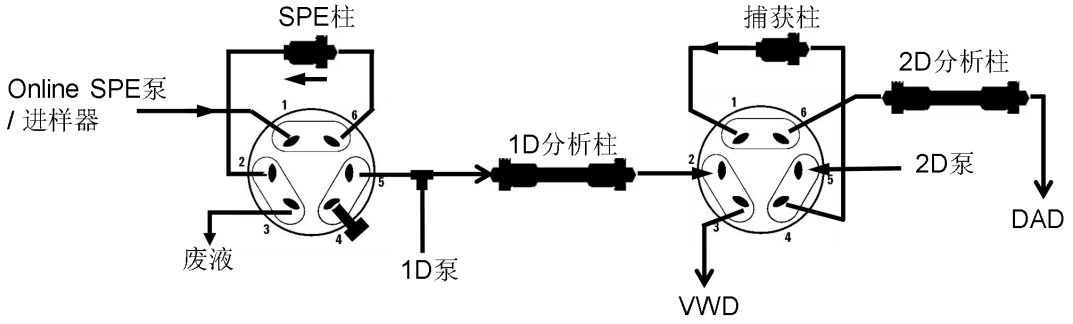
E——维生素 1%比色光系数（各维生素相应比色吸光系数见表 A.1）。

表 A.1 测定波长及百分吸光系数

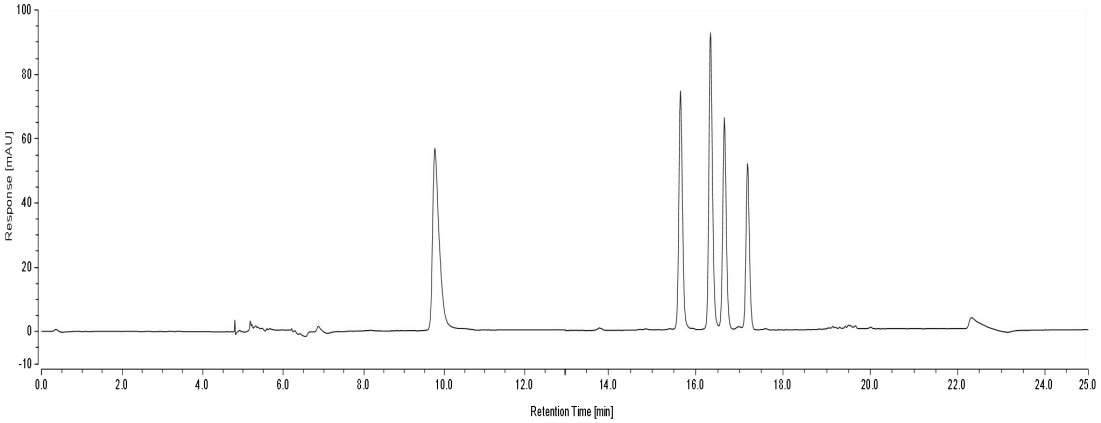
目标物	波长/nm	E（1%比色吸光系数）
α-生育酚	292	76
β-生育酚	296	89
γ-生育酚	298	91
δ-生育酚	298	87
视黄醇	325	1835
维生素 D_2	264	485
维生素 D_3	264	462

附　录　B
（资料性附录）
仪器连接示意图和维生素 A、D、E 典型色谱图

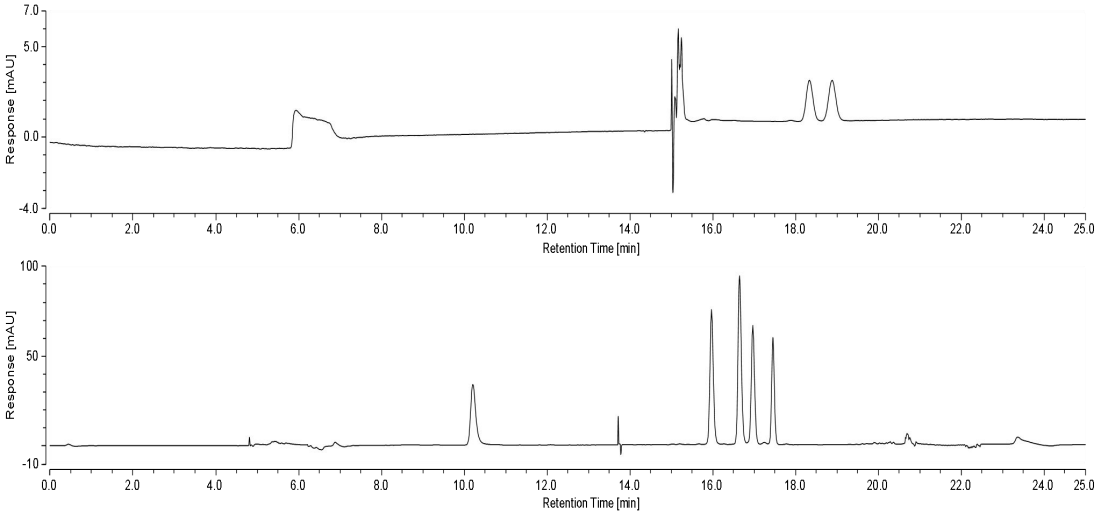
B.1 流路连接示意图



B.2 维生素 A、D、E 混标典型色谱图



B.3 维生素 A、E 和维生素 D 在完整方法下的典型色谱图



T/JAASS X-2021

江苏省农学会团体标准

《乳及乳制品中维生素A、D、E的测定 在线固相萃取-中心切割二维液相 色谱法》

2021年××月第一版　　2021年××月第一次印刷