



# 中华人民共和国国家标准

GB XXXX—XXXX

## 食品安全国家标准 食品中维生素 A 和 E 的测定

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会  
国家市场监督管理总局 发布

## 前 言

本标准代替 GB 5009.82-2016《食品安全国家标准 食品中维生素A、D、E的测定》中第一法 食品中维生素A和E的测定 反相高效液相色谱法和第二法 食品中维生素E的测定 正相高效液相色谱法。

本标准与 GB 5009.82-2016 相比，主要变化如下：

- 增加了样品预制备方法；
- 增加了标准储备溶液的保存条件；
- 增加了d- $\alpha$ -生育三烯酚、13-顺式视黄醇以及视黄醇棕榈酸酯、视黄醇乙酸酯、 $\alpha$ -生育酚乙酸酯的测定；
- 增加了第三法 食品中d- $\alpha$ -生育酚与dl- $\alpha$ -生育酚的测定 反相高效液相色谱法；
- 删除了附录A；
- 修改了原标准中反相高效液相色谱法的液液萃取溶剂，新增固相萃取法；
- 修改了原标准中正相高效液相色谱法，增加婴幼儿配方食品、特殊医学用途配方食品中维生素A和E的测定方法；
- 修改原附录B为附录A，增加了标准储备溶液的核查要求。

# 食品安全国家标准

## 食品中维生素 A 和 E 的测定

### 1 范围

本标准规定了食品中维生素A和E的测定方法。

第一法 反相高效液相色谱法适用于食品中维生素 A 和 E 的测定。

第二法 正相高效液相色谱法适用于以视黄醇棕榈酸酯、视黄醇乙酸酯、 $\alpha$ -生育酚、dl- $\alpha$ -生育酚乙酸酯、d- $\alpha$ -生育酚乙酸酯以及混合生育酚浓缩物为添加原料的婴幼儿配方食品、特殊医学用途配方食品、食用植物油中维生素 A 和 E 的测定。本方法不适用于以维生素 E 琥珀酸钙、d- $\alpha$ -琥珀酸生育酚、dl- $\alpha$ -琥珀酸生育酚为添加原料的食品中维生素 E 的测定。

第三法 适用于以 d- $\alpha$ -生育酚及其酯类或 dl- $\alpha$ -生育酚及其酯类为添加原料的食品中 d- $\alpha$ -生育酚和 dl- $\alpha$ -生育酚的测定。

### 第一法 食品中维生素 A 和 E 的测定 反相高效液相色谱法

### 2 原理

试样中的维生素 A 和 E 用氢氧化钾-乙醇溶液皂化，经液液萃取或固相萃取净化、浓缩后，通过 C<sub>30</sub> 柱反相分离，将维生素 A 顺反式（全反式视黄醇、13-顺式视黄醇）、维生素 E 的生育酚异构体（ $\alpha$ -生育酚、 $\beta$ -生育酚、 $\gamma$ -生育酚、 $\delta$ -生育酚、 $\alpha$ -生育三烯酚）与其他杂质分离，维生素 A 经紫外检测器检测，维生素 E 经荧光检测器或紫外检测器检测，外标法定量。

### 3 试剂和材料

除非另有说明，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 无水乙醇（C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O）：色谱纯。

3.1.2 抗坏血酸（C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>）。

3.1.3 2,6-二叔丁基对甲酚（C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O）：简称 BHT。

3.1.4  $\alpha$ -淀粉酶（CAS 号：9000-90-2，中温淀粉酶，来源于枯草芽孢杆菌）：酶活力 $\geq$ 100 U/mg。

3.1.5 氢氧化钾（KOH）。

3.1.6 正己烷（C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>）。

3.1.7 乙酸乙酯（C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>）。

3.1.8 乙腈（C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N）：色谱纯。

3.1.9 甲醇（CH<sub>4</sub>O）：色谱纯。

3.1.10 酚酞指示剂。

#### 3.2 试剂配制

- 3.2.1 氢氧化钾溶液（50%，w/w）：称取 50 g 氢氧化钾，加入 50 g 水溶解，冷却后，储存于聚乙烯瓶中。
- 3.2.2 BHT-乙醇溶液（0.2 g/100 mL）：称取 0.2 g BHT，溶于 100 mL 无水乙醇中，混匀，现用现配。
- 3.2.3 乙醇-水混合溶液（2+3）：将无水乙醇和水按 2：3 的体积比混合均匀。
- 3.2.4 乙酸乙酯-正己烷混合溶液（3+2）：将乙酸乙酯和正己烷按 3：2 的体积比混合均匀。
- 3.2.5 乙腈-甲醇混合溶液（3+1）：将乙腈和甲醇按 3：1 的体积比混合均匀。
- 3.2.6 酚酞指示液（1.0 g/100mL）：称取 1.0 g 酚酞，溶于 100 mL 无水乙醇中，混匀。
- 3.2.7 甲醇-水混合溶液（1+19）：将甲醇和水按 1：19 的体积比混合均匀。
- 3.2.8 乙腈-水混合溶液（19+1）：将乙腈和水按 19：1 的体积比混合均匀。

### 3.3 标准品

- 3.3.1 全反式视黄醇（ $C_{20}H_{30}O$ ，CAS 号：68-26-8）：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 3.3.2 13-顺式视黄醇（ $C_{20}H_{30}O$ ，CAS 号：2052-63-3）：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 3.3.3 dl- $\alpha$ -生育酚或 d- $\alpha$ -生育酚（ $C_{29}H_{50}O_2$ ，CAS 号：10191-41-0 或 59-02-9），纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 3.3.4 d- $\beta$ -生育酚（ $C_{28}H_{48}O_2$ ，CAS 号：16698-35-4），纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 3.3.5 d- $\gamma$ -生育酚（ $C_{28}H_{48}O_2$ ，CAS 号：54-28-4），纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 3.3.6 d- $\delta$ -生育酚（ $C_{27}H_{46}O_2$ ，CAS 号：119-13-1），纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 3.3.7 d- $\alpha$ -生育三烯酚（ $C_{29}H_{44}O_2$ ，CAS 号：58864-81-6），纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

### 3.4 标准溶液配制

- 3.4.1 全反式视黄醇标准储备溶液（1.00 mg/mL）：称取 25 mg（精确至 0.1 mg）全反式视黄醇标准物质于小烧杯中，用无水乙醇溶解并转移至 25 mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 1.00 mg/mL。按附录 A.1 进行储备液浓度校正，将该储备溶液分装至棕色小试剂瓶或安瓿瓶中，密封后，在 -80 °C 下避光保存，保存期可达 6 个月（如在 -20 °C 下避光保存，在校正后的储备溶液中须加入 25 mg BHT，加盖超声 10 s，使溶液中 BHT 含量约为 1 mg/mL，混匀后分装密封保存，保存期 6 个月）。
- 3.4.2 13-顺式视黄醇标准储备溶液（0.100 mg/mL）：称取 1.0 mg（精确至 0.01 mg）13-顺式视黄醇标准物质于小烧杯中，无水乙醇溶解并转移至 10 mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 0.10 mg/mL。按附录 A.1 进行储备液浓度校正，将该储备溶液分装至棕色小试剂瓶或安瓿瓶中，密封后，在 -80 °C 下避光保存，保存期可达 6 个月（如在 -20 °C 下避光保存，在校正后的储备溶液中须加入 10 mg BHT，加盖超声 10 s，使溶液中 BHT 含量约为 1 mg/mL，保存期 6 个月）。
- 3.4.3  $\alpha$ -生育酚标准储备溶液（1.00 mg/mL）：称取 50 mg（精确至 0.1 mg） $\alpha$ -生育酚标准物质于小烧杯中，用无水乙醇溶解并转移至 50 mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 1.00 mg/mL，按附录 A.2 进行储备液浓度校正。将该储备溶液分装至棕色小试剂瓶或安瓿瓶中，密封后，-20 °C 下避光保存，保存期 6 个月。
- 3.4.4 d- $\beta$ -生育酚标准储备溶液（1.00 mg/mL）：称取 50 mg（精确至 0.1 mg）d- $\beta$ -生育酚标准物质于小烧杯中，用无水乙醇溶解并转移至 50 mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 1.00 mg/mL，

按附录 A.2 进行储备液浓度校正。将该储备溶液分装至棕色小试剂瓶或安瓿瓶中，密封后，-20 °C 下避光保存，保存期 6 个月。

3.4.5 d- $\gamma$ -生育酚标准储备溶液 (1.00 mg/mL)：称取 50 mg (精确至 0.1 mg) d- $\gamma$ -生育酚标准物质于小烧杯中，用无水乙醇溶解并转移至 50 mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 1.00 mg/mL，按附录 A.2 进行储备液浓度校正。将该储备溶液分装至棕色小试剂瓶或安瓿瓶中，密封后，-20 °C 下避光保存，保存期 6 个月。

3.4.6 d- $\delta$ -生育酚标准储备溶液 (1.00 mg/mL)：称取 50 mg (精确至 0.1 mg) d- $\delta$ -生育酚标准物质于小烧杯中，用无水乙醇溶解并转移至 50 mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 1.00 mg/mL，按附录 A.2 进行储备液浓度校正。将该储备溶液分装至棕色小试剂瓶或安瓿瓶中，密封后，-20 °C 下避光保存，保存期 6 个月。

3.4.7 d- $\alpha$ -生育三烯酚标准储备溶液 (1.00 mg/mL)：称取 50 mg (精确至 0.1 mg) d- $\alpha$ -生育三烯酚标准物质于小烧杯中，用无水乙醇溶解并转移至 50 mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 1.00 mg/mL，按附录 A.2 进行储备液浓度校正。将该储备溶液分装至棕色小试剂瓶或安瓿瓶中，密封后，-20 °C 避光保存，保存期 6 个月。

3.4.8 混合标准溶液中间液：准确吸取全反式视黄醇标准储备溶液 1.00 mL、13-顺式视黄醇标准储备溶液 4.00 mL， $\alpha$ -生育酚、d- $\beta$ -生育酚、d- $\gamma$ -生育酚、d- $\delta$ -生育酚、d- $\alpha$ -生育三烯酚标准储备溶液各 5.00 mL 于同一 100 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，混匀。此溶液中全反式视黄醇 10.0  $\mu\text{g/mL}$ 、13-顺式视黄醇浓度为 4.0  $\mu\text{g/mL}$ ， $\alpha$ -生育酚、d- $\beta$ -生育酚、d- $\gamma$ -生育酚、d- $\delta$ -生育酚、d- $\alpha$ -生育三烯酚浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$ 。在-20 °C 下避光保存。100 mL 混标溶液中加入 100 mg BHT，超声 10 s 使其溶解，将该溶液分装至分装于棕色小试剂瓶或安瓿瓶中，密封后，-20 °C 下避光保存，保存期 3 个月。

3.4.9 维生素 A 和 E 标准系列工作溶液：分别准确吸取混合标准溶液中间液 0.050 mL、0.10 mL、0.20 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇定容至刻度。该标准系列中全反式视黄醇浓度为 50  $\mu\text{g/L}$ 、100  $\mu\text{g/L}$ 、200  $\mu\text{g/L}$ 、500  $\mu\text{g/L}$ 、1000  $\mu\text{g/L}$ 、2000  $\mu\text{g/L}$ ，13-顺式视黄醇浓度为 20  $\mu\text{g/L}$ 、40  $\mu\text{g/L}$ 、80  $\mu\text{g/L}$ 、200  $\mu\text{g/L}$ 、400  $\mu\text{g/L}$ 、800  $\mu\text{g/L}$ ， $\alpha$ -生育酚、d- $\beta$ -生育酚、d- $\gamma$ -生育酚、d- $\delta$ -生育酚、d- $\alpha$ -生育三烯酚浓度为 0.25  $\mu\text{g/mL}$ 、0.50  $\mu\text{g/mL}$ 、1.00  $\mu\text{g/mL}$ 、2.50  $\mu\text{g/mL}$ 、5.00  $\mu\text{g/mL}$ 、10.00  $\mu\text{g/mL}$ ，密封后在-20 °C 避光保存，现用现配。

注 1：测定维生素 A 时，如只需要测定全反式视黄醇或 13-顺式视黄醇，可只选择相应的标准物质。

注 2：测定维生素 E 时，如只需要测定  $\alpha$ -生育酚或某种其他型式维生素 E，可只选择相应的标准物质。

注 3：可根据样品中各目标化合物的浓度调整标准中间溶液和标准工作液的浓度。

### 3.5 材料

3.5.1 固相萃取柱：以聚苯乙烯共聚物 (PS-DVB) 为基材的填料，6 mL，200 mg，或相当者。

3.5.2 微孔滤膜：有机系，孔径 0.45  $\mu\text{m}$ 。

## 4 仪器和设备

4.1 液相色谱仪：带紫外 (或二极管阵列) 检测器和/或荧光检测器。

4.2 天平：感量分别为 0.01 mg、0.1 mg 和 0.01g。

4.3 紫外可见分光光度计：带 1cm 石英比色皿。

4.4 恒温振荡水浴装置。

4.5 涡旋混合器，使用适用于 50 mL 离心管的适配器，转速大于 1500 r/min。

4.6 带加热的磁力搅拌器 (80 °C  $\pm$  2 °C)。

4.7 离心机，使用适用于 50 mL 离心管的适配器，转速大于 8000 r/min。

4.8 氮气浓缩装置。

4.9 超声波发生器。

## 5 分析步骤

### 5.1 样品前处理

注：处理过程应避免紫外光照。

#### 5.1.1 试样制备

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

##### 5.1.1.1 婴幼儿配方食品、特殊医学用途配方食品、调制乳粉、豆浆粉、固体饮料

称取粉末试样 25 g ( $m_1$ ，精确至 0.01 g) 至 250 mL 干燥玻璃瓶中，加入约 200 g 温水（约 40 °C~45 °C），记录加水后的溶液质量 ( $m_2$ ，精确至 0.01 g)。充分混匀溶解，室温避光放置 15 min，每隔 5 min 振摇 30 s。称取制备后的溶液 5 g ( $m_3$ ，精确至 0.01 g) 至 50 mL 带螺旋盖的离心管中。计算粉末样品质量 ( $m$ )：

$$m = \frac{m_1 \times m_3}{m_2}$$

##### 5.1.1.2 即食液态奶、饮料、豆浆、果冻、冰淇淋、雪糕

称取 5 g（精确至 0.01 g）均质后的试样至 50 mL 带螺旋盖的离心管中，置于涡旋振荡器中振荡 10 min，混匀。

##### 5.1.1.3 黄油、人造黄油及其类似制品、肉类、鱼类、蛋类及其制品、干制菌菇、干豆类样品

取代表性试样，按四分法缩分，将缩分所得试样中可食部分用均质器均质。称取均质后的试样 0.5 g~2 g（精确至 0.01g）至 50 mL 带螺旋盖的离心管，加入约 4.5 mL~3 mL 的温水（约 40 °C~45 °C），置于涡旋振荡器中振荡 10 min，混匀。对于难均质的试样，可参考 5.1.1.1 先制成浆液，再称取制备后的溶液 5g（精确至 0.01 g）至 50 mL 带螺旋盖的离心管中。

##### 5.1.1.4 新鲜菌菇等植物性试样

取代表性试样若干，按四分法纵切缩分，将缩分所得试样中可食部分用刀切碎，放入均质器，均质成均匀浆料。称取该浆料 5 g（精确至 0.01 g）至 50 mL 带螺旋盖的离心管中。

##### 5.1.1.5 即食谷物、饼干、其他培烤食品、膨化食品、婴幼儿谷类辅助食品等高淀粉试样

称取 5 g~10 g（精确至 0.01 g）均质后的试样于 150 mL 平底烧瓶中，加入约 20 mL 温水（约 40~45 °C），置于磁力搅拌器中搅拌 10 min，混匀。

##### 5.1.1.6 含蜂蜡等粘稠胶质试样

取可食部分混匀，称取 2 g~5 g（精确至 0.01 g）均质后的试样至 150 mL 平底烧瓶中。

#### 5.1.2 试样皂化

##### 5.1.2.1 即食谷物、饼干、其他培烤食品、膨化食品、婴幼儿谷类辅助食品等高淀粉试样

在 5.1.1.5 中描述的 150 mL 平底烧瓶中，加入 1.0 g  $\alpha$ -淀粉酶，加上瓶塞，放入 60 °C 恒温磁力搅拌器中酶解 30 min，立即冷却至室温，向酶解液中加入 1.0 g 抗坏血酸和 30 mL BHT-乙醇溶液(0.2 g/100 mL)，混匀。再加入 10 mL~20 mL 氢氧化钾溶液（50%，w/w），边加边振摇，混匀后于恒温磁力搅拌器上 80 °C  $\pm$  2 °C，回流皂化 30 min（或 25 °C  $\pm$  5 °C，皂化 16 h  $\pm$  2 h），皂化后立即用冷水冷却至室温。用乙醇-水混合溶液（2+3）将皂化液转移至 100 mL 的容量瓶中，定容至刻度，摇匀，定量分取 20 mL 皂化液于 50 mL 的离心管中，待提取净化。

##### 5.1.2.2 含蜂蜡等粘稠胶质试样

在 5.1.1.6 中描述的 150 mL 平底烧瓶中，加入 1.0 g 抗坏血酸和 30 mL BHT-乙醇溶液（0.2 g/100

mL)，放入1颗磁力搅拌子，将平底烧瓶置于磁力搅拌器中搅拌10 min，混匀，加入约20 mL的温水（约40 °C~45 °C），混匀，再加入10 mL~20 mL氢氧化钾溶液（50%，w/w），边加边振摇，混匀后于恒温磁力搅拌器上80 °C ± 2 °C，回流皂化30 min（或25 °C ± 5 °C，皂化16 h ± 2 h），皂化后立即用冷水冷却至室温。用乙醇-水混合溶液（2+3）将皂化液转移至100 mL的容量瓶中，定容至刻度，摇匀，定量分取20 mL皂化液于50 mL的离心管中，待提取净化。

### 5.1.2.3 其它食品

按5.1.1.1~5.1.1.4中描述的样品前处理方法，称取适量试样于50 mL离心管中，加入0.4 g抗坏血酸，6 mL BHT-乙醇溶液（0.2 g/100 mL），涡旋混匀30 s，再加入3 mL氢氧化钾溶液，涡旋混匀后于80 °C ± 2 °C条件下涡旋振荡30 min（或25 °C ± 5 °C，涡旋振荡16 h ± 2 h），立即冷却，待提取净化。

## 5.1.3 试样提取净化

### 5.1.3.1 液液萃取法

于上述装有皂化液的离心管中加入5 mL乙醇-水混合溶液（2+3），涡旋振荡5 min，再加入5 mL水，涡旋混匀。加入20 mL乙酸乙酯-正己烷混合溶液（3+2），置于涡旋混合器涡旋提取10 min，高速离心机8000 r/min离心5 min，将上层溶液转移至另一50 mL的离心管中。于原离心管中再加入10 mL乙酸乙酯-正己烷混合溶液（3+2），再次涡旋提取10 min，高速离心机8000 r/min离心5 min，合并上层有机相于同一离心管中，加水至45 mL，用滴管加入1滴酚酞溶液（1 g/100 mL），轻微晃动数次，在8000 转/min条件下离心3 min，将上层有机相转移至旋蒸瓶中，于40 °C水浴减压浓缩至1 mL左右，用乙酸乙酯-正己烷混合溶液（3+2）转移至10 mL的试管中，置于氮气浓缩装置吹至近干，用约4 mL乙腈-甲醇混合溶液（3+1）分3次溶解并转移至5 mL容量瓶中，加水定容至刻度，混匀，过0.45 μm微孔滤膜，供液相色谱测定。

注：可根据实验室条件选择浓缩方式，氮吹仪或冷冻浓缩仪，均可用于浓缩。最终定容体积可根据样品情况增减。

### 5.1.3.2 固相萃取法

固相萃取法适用于婴幼儿配方食品、特殊医学用途配方食品、调制乳粉、豆浆（粉）、固体饮料和即食液态奶。

于上述皂化液中加入0 mL~15 mL去离子水（使用不同品牌的固相萃取柱，去离子水的加量不同，需经验证后确定），涡旋混匀，在8000 r/min下离心5 min。全部上清液转移至固相萃取柱中（临用前依次用6 mL甲醇、6 mL水活化平衡）上样，过柱速度控制在每分钟不超过60滴/分钟。用10 mL甲醇-水混合溶液（1+19）洗涤离心管，涡旋30s，在8000 r/min下离心5 min，将上清液一并转移到固相萃取柱上样，重复操作2次。负压抽干固相萃取柱，用8 mL乙腈-甲醇混合溶液（3+1）分3次洗脱，洗脱液加水定容至10 mL，过0.45 μm微孔滤膜，取滤液进样。

注：如仪器灵敏度或进样体积受限，可将洗脱液氮吹至一定体积，再加水定容至适当体积，保持最终进样液中的溶剂体系为初始流动相体系。全自动在线固相萃取法可优化操作参数后使用。

## 5.2 仪器参考条件

- a) 色谱柱：C<sub>30</sub>柱，柱长150 mm，内径4.6 mm，粒径3 μm，或相当者。
- b) 柱温：25 °C
- c) 流动相：A相，水；B相，甲醇，梯度洗脱见表1。
- d) 流速：0.8 mL/min。
- e) 检测波长：维生素A，紫外325 nm检测；维生素E，荧光激发波长为294 nm，发射波长为328 nm；维生素E，紫外检测波长为294 nm。
- f) 进样量：20 μL。

表1 流动相洗脱梯度

时间 min	流动相 A%	流动相 B%
0.0	17	83
15.0	17	83
15.5	7	93
22.0	7	93
32.0	5	95
37.0	5	95
37.5	17	83
45.0	17	83

注 1：测定维生素 A 时，如不需要分离 13-顺式视黄醇与全反式视黄醇，可选用 C<sub>18</sub> 柱，流动相为 100% 甲醇。

注 2：测定维生素 E 时，如只需要测定  $\alpha$ -生育酚，可选用 C<sub>18</sub> 柱，流动相为 100% 甲醇，紫外 294 nm 检测。

### 5.3 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入液相色谱仪中，测定相应的峰面积，以标准系列工作液中各组分的浓度为横坐标，以峰面积的响应值为纵坐标，绘制标准曲线。维生素 A 和 E 标准溶液的色谱图参见附录 B 中图 B.1.1、图 B.1.2 和图 B.1.3。

### 5.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱仪中，得到维生素 A 和 E 各组分的峰面积，根据标准曲线得到待测液中维生素 A 和 E 各组分的浓度。

### 5.5 空白试验

不称取试样，按样品分析步骤操作，应不含有干扰待测组分的物质。

## 6 分析结果的表述

试样中维生素 A 各组分的含量按式 (1) 计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times 100}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X——试样中维生素 A 各组分的含量，单位为微克每百克 ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )；
- $\rho$ ——由标准曲线得到的试样溶液中维生素 A 各组分的浓度，单位为微克每升 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )；
- V——定容体积，单位为毫升 (mL)；
- m——试样的取样量，单位为克 (g)；
- 100——试样中量以每 100 克计算的换算系数；
- 1 000——试样中浓度以  $\mu\text{g}/\text{L}$  换算为  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的换算系数。

试样中维生素 E 各组分的含量按式 (2) 计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times 100}{m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：



- $X$ ——试样中维生素 E 各组分的含量, 单位为毫克每百克 (mg/100g) ;
- $\rho$ ——由标准曲线得到的试样溶液中维生素 E 各组分的浓度, 单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ ) ;
- $V$ ——定容体积, 单位为毫升 (mL) ;
- $m_s$ ——试样的取样量, 单位为克 (g) ;
- 100——试样中量以每 100 克计算的换算系数;
- 1 000——试样中量以  $\mu\text{g}$  换算为 mg 的换算系数。
- 计算结果保留三位有效数字。

注: 按基础标准或产品标准要求报告维生素 A 或 E。1  $\mu\text{g RE}$ =1  $\mu\text{g}$  全反式视黄醇 (维生素 A) ; 本方法不区分 dl- $\alpha$ -生育酚与 d- $\alpha$ -生育酚。

## 7 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%。

## 8 其他

当固体试样取样量为 0.50 g, 定容至 5 mL 时, 13-顺式视黄醇、全反式视黄醇的检出限为 10  $\mu\text{g}/100$  g, 定量限为 30  $\mu\text{g}/100$  g;  $\alpha$ -生育酚、 $\beta$ -生育酚、 $\gamma$ -生育酚、 $\delta$ -生育酚、 $\alpha$ -生育三烯酚的荧光检出限为分别为 0.05 mg/100 g, 定量限分别为 0.15 mg/100 g;  $\alpha$ -生育酚、 $\beta$ -生育酚、 $\gamma$ -生育酚、 $\delta$ -生育酚、 $\alpha$ -生育三烯酚的紫外检出限为 0.15 mg/100 g, 定量限为 0.50 mg/100 g。

当液体试样取样量为 5.00 g 时, 定容至 5 mL 时, 13-顺式视黄醇、全反式视黄醇的检出限为 2  $\mu\text{g}/100$  g, 定量限为 6  $\mu\text{g}/100$  g;  $\alpha$ -生育酚、 $\beta$ -生育酚、 $\gamma$ -生育酚、 $\delta$ -生育酚、 $\alpha$ -生育三烯酚的荧光检出限为分别为 0.005 mg/100 g, 定量限分别为 0.017 mg/100 g;  $\alpha$ -生育酚、 $\beta$ -生育酚、 $\gamma$ -生育酚、 $\delta$ -生育酚、 $\alpha$ -生育三烯酚的紫外检出限为 0.03 mg/100 g, 定量限为 0.1 mg/100 g。

## 第二法 食品中维生素 A 和 E 的测定 正相高效液相色谱法

## 9 原理

试样经蛋白酶酶解, 酶解液中维生素 A 和 E 先用酸化甲醇提取, 再用异辛烷萃取至上层溶液中, 取上层溶液经酰氨基柱或氨基柱将维生素 A (视黄醇棕榈酸酯、视黄醇乙酸酯) 和维生素 E 的酯类及生育酚异构体 ( $\alpha$ -生育酚乙酸酯、 $\alpha$ -生育酚、 $\beta$ -生育酚、 $\gamma$ -生育酚、 $\delta$ -生育酚、 $\alpha$ -生育三烯酚) 分离, 维生素 A 用紫外检测器检测, 维生素 E 用荧光检测器检测, 外标法定量。

## 10 试剂和材料

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

### 10.1 试剂

- 10.1.1 无水乙醇 ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) : 色谱纯。
- 10.1.2 正己烷 ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) : 色谱纯。
- 10.1.3 异辛烷 ( $\text{C}_8\text{H}_{18}$ ) : 色谱纯。
- 10.1.4 叔丁基甲基醚 ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ ) : 色谱纯。
- 10.1.5 甲醇 ( $\text{CH}_4\text{O}$ ) : 色谱纯。
- 10.1.6 四氢呋喃 ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ ) : 色谱纯。
- 10.1.7 对苯二酚 ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ ) 。

- 10.1.8 木瓜蛋白酶：源自番木瓜，酶活力 $>3$  U/mg。
- 10.1.9 无水乙酸钠 ( $C_2H_3O_2Na$ )。
- 10.1.10 盐酸 (HCl)：质量分数为 36%。
- 10.1.11 氢醌 ( $C_{12}H_{12}O_4$ )。
- 10.1.12 2,6-二叔丁基对甲酚 ( $C_{15}H_{24}O$ )：简称 BHT。
- 10.1.13 冰乙酸 ( $C_2H_4O_2$ )。

## 10.2 试剂配制

- 10.2.1 盐酸溶液 (6 mol/L)：量取 100 mL 盐酸，加入至 100 mL 水中，混匀。
- 10.2.2 木瓜蛋白酶溶液 (20 g/L)：将 100 mg 氢醌和 4 g 无水乙酸钠溶于约 80 mL 水中，用盐酸溶液 (6 mol/L) 调节 pH 至 5.0。加入 2 g 木瓜蛋白酶并加水至 100 mL。临用前配制。
- 10.2.3 酸化甲醇溶液：量取 20 mL 冰乙酸，加入至 980 mL 甲醇中，混合。临用前配制。
- 10.2.4 BHT-异辛烷溶液 (0.1 g/100 mL)：称取 0.10 g BHT，溶于 100 mL 异辛烷中，混匀，临用前配制。
- 10.2.5 流动相 A：正己烷，超声脱气 15 min。
- 10.2.6 流动相 B：量取 800 mL 叔丁基甲基醚，加入 40 mL 四氢呋喃，再加入 4 mL 甲醇，混匀，超声脱气 15 min。

## 10.3 标准品

- 10.3.1 视黄醇棕榈酸酯 ( $C_{36}H_{60}O_2$ , CAS 号：79-81-2)：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质；
- 10.3.2 视黄醇乙酸酯 ( $C_{22}H_{32}O_2$ , CAS 号：127-47-9)：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质；
- 10.3.3  $\alpha$ -生育酚乙酸酯 ( $C_{31}H_{52}O_3$ , dl- $\alpha$ -生育酚乙酸酯, CAS 号：7695-91-2 或 d- $\alpha$ -生育酚乙酸酯, CAS 号：58-95-7)：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质；
- 10.3.4 dl- $\alpha$ -生育酚 ( $C_{29}H_{50}O_2$ , CAS 号：10191-41-0) 或 d- $\alpha$ -生育酚 ( $C_{29}H_{50}O_2$ , CAS 号：59-02-9)：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 10.3.5 d- $\beta$ -生育酚 ( $C_{28}H_{48}O_2$ , CAS 号：16698-35-4)：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质；
- 10.3.6 d- $\gamma$ -生育酚 ( $C_{28}H_{48}O_2$ , CAS 号：54-28-4)：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质；
- 10.3.7 d- $\delta$ -生育酚 ( $C_{27}H_{46}O_2$ , CAS 号：119-13-1)：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 10.3.8 d- $\alpha$ -生育三烯酚 ( $C_{29}H_{44}O_2$ , CAS 号：58864-81-6)：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

## 10.4 标准溶液配制

- 10.4.1 视黄醇棕榈酸酯标准储备溶液 (1.00 mg/mL)：准确称取 10 mg (精确至 0.1 mg) 视黄醇棕榈酸酯标准物质，用无水乙醇溶解于 10 mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 1.0 mg/mL。按附录 A.1 进行储备液浓度校正，将该储备溶液分装至棕色小试剂瓶或安瓿瓶中，密封后，在  $-80$  °C 下避光保存，保存期可达 6 个月 (如在  $-20$  °C 下避光保存，在校正后的储备溶液中须加入 10mg BHT，混匀后分装密封保存，保存期 6 个月)。
- 10.4.2 视黄醇乙酸酯标准储备溶液 (1.00 mg/mL)：准确称取 10 mg (精确至 0.1 mg) 视黄醇乙酸酯标准物质，用无水乙醇溶解于 10 mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 1.0 mg/mL。按附录 A.1 进行储备液浓度校正，将该储备溶液分装至棕色小试剂瓶或安瓿瓶中，密封后，在  $-80$  °C 下避光

保存，保存期可达6个月（如在-20℃下避光保存，在校正后的储备溶液中须加入10mg BHT，混匀后分装密封保存，保存期6个月）。

10.4.3  $\alpha$ -生育酚乙酸酯标准储备溶液（10.00 mg/mL）：准确称取100 mg（精确至0.1 mg） $\alpha$ -生育酚乙酸酯标准物质，用无水乙醇溶解于10 mL容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为10.0 mg/mL。按附录A.1进行储备液浓度校正，将该储备溶液分装至棕色小试剂瓶或安瓿瓶中，密封后，在-20℃下避光保存，保存期可达6个月）。

10.4.4  $\alpha$ -生育酚、d- $\beta$ -生育酚、d- $\gamma$ -生育酚、d- $\delta$ -生育酚、d- $\alpha$ -生育三烯酚标准储备溶液（5.00 mg/mL）：分别称取5种生育酚标准品各50 mg（精确至0.1 mg）于10 mL容量瓶中，分别用无水乙醇溶解，定容至刻度，得5种生育酚标准储备溶液浓度各为5.00 mg/mL。按附录A.2进行储备液浓度校正，将该储备溶液分装至棕色小试剂瓶中，密封后，在-20℃下避光保存，保存期6个月。

10.4.5 维生素A和E混合标准溶液中间液：准确吸取视黄醇棕榈酸酯标准储备溶液1.00 mL、视黄醇乙酸酯标准储备溶液1.00 mL， $\alpha$ -生育酚乙酸酯标准储备溶液2.00 mL， $\alpha$ -生育酚、d- $\beta$ -生育酚、d- $\gamma$ -生育酚、d- $\delta$ -生育酚、d- $\alpha$ -生育三烯酚标准储备溶液各1.00 mL于同一100 mL容量瓶中。用氮气吹干乙醇后，用BHT-异辛烷溶液（0.1 g/100 mL）定容至刻度，此溶液中视黄醇棕榈酸酯、视黄醇乙酸酯浓度为10  $\mu$ g/mL， $\alpha$ -生育酚乙酸酯浓度为200  $\mu$ g/mL， $\alpha$ -生育酚、d- $\beta$ -生育酚、d- $\gamma$ -生育酚、d- $\delta$ -生育酚、d- $\alpha$ -生育三烯酚浓度为50  $\mu$ g/mL。在新配制的混标溶液中加入100 mg BHT，加盖振摇30 s使其溶解，将该混合标准溶液中间液分装至棕色小试剂瓶，密封后，在-20℃下避光保存，保存期3个月。

10.4.6 维生素A和E标准系列工作溶液：分别准确吸取维生素A和E混合标准溶液中间液50  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、500  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L、2 000  $\mu$ L于10 mL棕色容量瓶中，用BHT-异辛烷溶液（0.1 g/100 mL）定容至刻度，该标准系列中视黄醇棕榈酸酯、视黄醇乙酸酯浓度依次为50  $\mu$ g/L、100  $\mu$ g/L、200  $\mu$ g/L、500  $\mu$ g/L、1 000  $\mu$ g/L、2 000  $\mu$ g/L； $\alpha$ -生育酚乙酸酯浓度为1.0  $\mu$ g/mL、2.0  $\mu$ g/mL、4.0  $\mu$ g/mL、10.0  $\mu$ g/mL、20.0  $\mu$ g/mL、40.0  $\mu$ g/mL， $\alpha$ -生育酚、d- $\beta$ -生育酚、d- $\gamma$ -生育酚、d- $\delta$ -生育酚、d- $\alpha$ -生育三烯酚浓度为0.25  $\mu$ g/mL、0.50  $\mu$ g/mL、1.00  $\mu$ g/mL、2.50  $\mu$ g/mL、5.00  $\mu$ g/mL、10.00  $\mu$ g/mL，在-20℃下避光保存，保存期7天。

注：可根据样品中各目标化合物的浓度调整标准中间溶液和标准工作液的浓度。

## 10.5 材料

10.5.1 微孔滤膜，有机系，孔径0.45  $\mu$ m。

## 11 仪器和设备

11.1 高效液相色谱仪：带荧光检测器和紫外检测器。

11.2 天平：感量分别为0.1 mg和0.01 g。

11.3 紫外分光光度计。

11.4 恒温水浴振荡器。

11.5 涡旋混合器，使用适用于50 mL离心管的适配器，转速大于1 500 r/min。

11.6 离心机，使用适用于50 mL离心管的适配器，转速大于8 000 r/min。

11.7 旋转蒸发仪。

11.8 氮气浓缩装置。

## 12 分析步骤

### 12.1 样品前处理

处理过程应避免紫外光照。

## 12.1.1 试样制备

## 12.1.1.1 婴幼儿配方食品和特殊医学用途配方食品

称取粉末试样 25 g ( $m_1$ , 精确至 0.01 g) 至 250 mL 干燥玻璃瓶中, 加入约 200 g 温水 (约 40 °C~45 °C), 记录加水后的溶液质量 ( $m_2$ , 精确至 0.01 g)。充分混匀溶解, 室温避光放置 15 min, 每隔 5 min 振摇 30 s。称取制备后的溶液 5g ( $m_3$ , 精确至 0.01 g) 至 50 mL 带螺旋盖的离心管中。计算粉末样品质量 ( $m$ ):

$$m = \frac{m_1 \times m_3}{m_2}$$

## 12.1.1.2 即食液态奶

称取 5 g (精确至 0.01 g) 均质后的试样至 50 mL 带螺旋盖的离心管中。

## 12.1.1.3 植物油

准确称取 1 g (精确至 0.01 g) 油样 25 mL 的棕色容量瓶中, 加入约 8 mL BHT-异辛烷溶液 (0.1 g/100 mL), 超声或涡旋振荡溶解后, 用异辛烷定容至刻度, 摇匀。过微孔滤膜于棕色进样瓶中, 盖紧瓶盖, 供高效液相色谱仪测定用。

## 12.1.2 酶解

向上述称重溶液 (12.1.1.1 或 12.1.1.2) 中加入 5 mL 木瓜蛋白酶溶液, 盖上盖子, 涡旋振荡 5 min, 将离心管置于 37 °C ± 2 °C 水浴 20 min~25 min, 取出样品并冷却。

## 12.1.3 提取

向 12.1.2 酶解后的每个样品管中加入 20 mL 酸化甲醇, 涡旋提取 10 min, 加入 10.0 mL 异辛烷, 拧紧盖子, 避免泄漏。再涡旋提取 10 min, 在 8 000 r/min 下离心 5 min, 取上清液过有机系滤膜于棕色进样瓶中, 盖紧瓶盖, 供高效液相色谱仪测定用。

## 12.2 色谱参考条件

- a) 色谱柱: 酰氨基柱 (柱长 150 mm, 内径 3.0 mm, 粒径 1.7 μm) 或相当者;
- b) 柱温: 30 °C;
- c) 流动相: A 相, 正己烷; B 相, 叔丁基甲基醚-四氢呋喃-甲醇混合液=20+1+0.1;

梯度洗脱见表 2。

- d) 流速: 0.8 mL/min;

- e) 检测波长:

视黄醇棕榈酸酯、视黄醇乙酸酯: 紫外或二极管阵列检测器, 325 nm;

α-生育酚乙酸酯: 荧光检测器, 激发波长为 280 nm, 发射波长为 310 nm;

α-生育酚、d-β-生育酚、d-γ-生育酚、d-δ-生育酚、α-三烯生育酚: 荧光检测器, 激发波长 294 nm, 发射波长 328 nm;

- f) 进样量: 10 μL。

表2 流动相洗脱梯度

时间 min	流动相 A%	流动相 B%
0.0	100	0
5.0	95	5
6.0	90	10
22.0	90	10
26.0	80	20

29.0	80	20
29.1	100	0
40.0	100	0

注：如不需要测定 d-β-生育酚、d-γ-生育酚、d-δ-生育酚和 α-三烯生育酚化合物，也可用常规氨基柱（柱长 150 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm）作为分析柱，流动相流速：1.5 mL/min。流动相 A：正己烷；流动相 B：正己烷-叔丁基甲基醚-甲醇混合液=750+250+3；参考梯度：0 min-3 min，2.5% B；3 min-18 min，2.5% B-95% B；18 min-21 min，95% B；21 min-21.5 min，95% B-100% B；21.5 min-24.5 min，100% B；24.5 min-25 min，100% B-2.5% B；25 min-30 min，2.5% B，总运行时间 30 min。进样量：50 μL。

### 12.3 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入液相色谱仪中，测定相应的峰面积，以标准系列工作液中各组分的浓度为横坐标，以峰面积的响应值为纵坐标，绘制标准曲线。维生素 A 和 E 标准溶液的色谱图参见附录 B 中图 B.2.1、图 B.2.2 和图 B.2.3。

### 12.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱仪中，得到维生素 A 和 E 各组分的峰面积，根据标准曲线得到待测液中维生素 A 和 E 各组分的浓度。

### 12.5 空白试验

不称取试样，按样品分析步骤操作，应不含有干扰待测组分的物质。

## 13 分析结果的表述

试样中维生素 A（视黄醇棕榈酸酯、视黄醇乙酸酯）的含量按式（3）计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times 100}{m \times 1000} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

- X— 试样中各组分的含量，单位为微克每百克（μg/100g）；
- ρ— 根据标准曲线计算得到的试样中维生素的浓度，单位为微克每升（μg/L）；
- V— 定容体积，单位为毫升（mL）；
- m— 试样的称样量，单位为克（g）；
- 100— 试样中量以每100克计算的换算系数；
- 1000— 试样中浓度以μg/L换算为μg/mL的换算系数；

试样中维生素 E（α-生育酚乙酸酯、α-生育酚、β-生育酚、γ-生育酚、δ-生育酚、α-生育三烯酚）各组分的含量按式（4）计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times 100}{m \times 1000} \dots\dots\dots (4)$$

式中：

- X— 试样中维生素 E 各组分的含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；
- ρ— 由标准曲线得到的试样溶液中维生素 E 各组分的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

$V$ ——定容体积，单位为毫升（mL）；  
 $m$ ——试样的取样量，单位为克（g）；  
 100——试样中量以每 100 克计算的换算系数；  
 1000——试样中量以  $\mu\text{g}$  换算为  $\text{mg}$  的换算系数。  
 计算结果保留三位有效数字。

注：按基础标准或产品标准要求报告维生素 A 或维生素 E。

视黄醇含量（ $\mu\text{g}/100\text{g}$ ）=  $0.55 \times$ 视黄醇棕榈酸酯含量（ $\mu\text{g}/100\text{g}$ ）+  $0.87 \times$ 视黄醇乙酸酯含量（ $\mu\text{g}/100\text{g}$ ）。

$\alpha$ -生育酚含量（ $\mu\text{g}/100\text{g}$ ）=  $0.91 \times \alpha$ -生育酚乙酸酯含量（ $\mu\text{g}/100\text{g}$ ）。

$1\mu\text{g RE} = 1\mu\text{g}$  全反式视黄醇（维生素 A）；试样中  $\alpha$ -生育酚包括添加的  $\text{dl-}\alpha$ -生育酚乙酸酯或  $\text{d-}\alpha$ -生育酚乙酸酯以及由生育酚混合物或植物油等引入的  $\text{d-}\alpha$ -生育酚。本方法不区分  $\text{dl-}\alpha$ -生育酚乙酸酯与  $\text{d-}\alpha$ -生育酚乙酸酯，可根据配料表中化合物来源计算  $\alpha$ -生育酚当量。维生素 E 的测定结果如要用  $\alpha$ -生育酚当量（ $\alpha$ -TE）表示，可按以下系数计算： $1\text{ mg d-}\alpha$ -生育酚=  $1\text{ mg } \alpha$ -TE， $1\text{ mg dl-}\alpha$ -生育酚=  $0.74\text{ mg } \alpha$ -TE， $1\text{ mg d-}\beta$ -生育酚=  $0.5\text{ mg } \alpha$ -TE， $1\text{ mg d-}\gamma$ -生育酚=  $0.5\text{ mg } \alpha$ -TE， $1\text{ mg d-}\delta$ -生育酚=  $0.5\text{ mg } \alpha$ -TE， $1\text{ mg d-}\alpha$ -生育三烯酚=  $0.3\text{ mg } \alpha$ -TE。

#### 14 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%。

#### 15 其他

当固体试样取样量为 0.50 g，定容至 10 mL 时，视黄醇棕榈酸酯、视黄醇乙酸酯的检出限为 25  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ，定量限为 75  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ； $\alpha$ -生育酚、 $\beta$ -生育酚、 $\gamma$ -生育酚、 $\delta$ -生育酚、 $\alpha$ -生育三烯酚的检出限为 0.06mg/100 g，定量限为 0.20mg/100 g； $\alpha$ -生育酚乙酸酯荧光检出限为 0.60 mg/100 g，定量限为 1.80 mg/100 g。

当液体试样取样量为 5.00 g，定容至 10 mL 时，视黄醇棕榈酸酯、视黄醇乙酸酯的检出限为 2.5  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ，定量限为 7.5  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ； $\alpha$ -生育酚、 $\beta$ -生育酚、 $\gamma$ -生育酚、 $\delta$ -生育酚、 $\alpha$ -生育三烯酚的检出限为 0.005mg/100 g，定量限为 0.02 mg/100 g； $\alpha$ -生育酚乙酸酯检出限为 0.06 mg/100 g，定量限为 0.18 mg/100 g。

### 第三法 食品中 $\text{d-}\alpha$ -生育酚与 $\text{dl-}\alpha$ -生育酚的测定 反相高效液相色谱法

#### 16 原理

试样中的  $\text{d-}\alpha$ -生育酚与  $\text{dl-}\alpha$ -生育酚用氢氧化钾乙醇溶液皂化，经液液萃取或固相萃取净化、浓缩后，通过手性色谱柱分离，将  $\text{d-}\alpha$ -生育酚与  $\text{dl-}\alpha$ -生育酚与其他杂质分离，经紫外检测器或荧光检测器检测，外标法定量。

#### 17 试剂和材料

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

##### 17.1 试剂

17.1.1 无水乙醇（ $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ）：色谱纯。

17.1.2 抗坏血酸（ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ）。

17.1.3 2,6-二叔丁基对甲酚（ $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ ）：简称 BHT。

17.1.4  $\alpha$ -淀粉酶（CAS 号：9000-90-2，中温淀粉酶，来源于枯草芽孢杆菌）：酶活力 $\geq 100\text{ U}/\text{mg}$ 。

- 17.1.5 氢氧化钾 (KOH)。
- 17.1.6 正己烷 (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>)：色谱纯。
- 17.1.7 乙酸乙酯 (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>)：色谱纯。
- 17.1.8 乙腈 (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N)：色谱纯。
- 17.1.9 甲醇 (CH<sub>4</sub>O)：色谱纯。
- 17.1.10 酚酞指示剂

## 17.2 试剂配制

- 17.2.1 氢氧化钾溶液 (50%, w/w)：称取 50 g 氢氧化钾，加入 50 g 水溶解，冷却后，储存于聚乙烯瓶中。
- 17.2.2 BHT-乙醇溶液 (0.2 g/100 mL)：称取 0.20 g BHT，溶于 100 mL 无水乙醇，混匀，现用现配。
- 17.2.3 乙醇-水混合溶液 (2+3)：将乙醇和水按 2：3 的体积比混合均匀。
- 17.2.4 乙酸乙酯-正己烷混合溶液 (3+2)：将乙酸乙酯和正己烷按 3：2 的体积比混合均匀。
- 17.2.5 乙腈-甲醇混合溶液 (3+1)：将乙腈和甲醇按 3：1 的体积比混合均匀。
- 17.2.6 酚酞指示液：称取 1.0 g 酚酞，溶于 100 mL 无水乙醇中，混匀。
- 17.2.7 甲醇-水混合溶液 (1+19)：将甲醇和水按 1：19 的体积比混合均匀。
- 17.2.8 乙醇-水混合溶液 (2+3)：将无水乙醇和水按 2：3 的体积比混合均匀。

## 17.3 标准品

- 17.3.1 d- $\alpha$ -生育酚 (C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>, CAS 号：59-02-9)：纯度 $\geq$ 95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 17.3.2 dl- $\alpha$ -生育酚 (C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>, CAS 号：10191-41-0)：纯度 $\geq$ 95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

## 17.4 标准溶液配制

- 17.4.1 d- $\alpha$ -生育酚标准储备溶液 (1.00 mg/mL)：称取 50 mg (精确至 0.1 mg) d- $\alpha$ -生育酚标准物质，用无水乙醇溶解于 50 mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 1.00 mg/mL，按附录 A.2 进行储备液浓度校正。将该储备液分装至棕色小试剂瓶或安瓿瓶中，密封后，-20 ℃ 下避光保存，保存期 6 个月。
- 17.4.2 dl- $\alpha$ -生育酚标准储备溶液 (1.00 mg/mL)：称取 50 mg (精确至 0.1 mg) dl- $\alpha$ -生育酚标准物质，用无水乙醇溶解于 50 mL 容量瓶中，定容至刻度，此溶液浓度约为 1.00 mg/mL，按附录 A.2 进行储备液浓度校正。将该储备液分装至棕色小试剂瓶或安瓿瓶中，密封后，-20 ℃ 下避光保存，保存期 6 个月。
- 17.4.3 d- $\alpha$ -生育酚标准中间溶液 (50.0  $\mu$ g/mL)：准确吸取 5.00 mL 浓度为 1.00 mg/mL 的 d- $\alpha$ -生育酚标准储备溶液于 100 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，摇匀，此溶液浓度为 50.0  $\mu$ g/mL。将该溶液分装至棕色小试剂瓶中，密封后，-20 ℃ 下避光保存，保存期 3 个月。
- 17.4.4 dl- $\alpha$ -生育酚标准中间溶液 (100.0  $\mu$ g/mL)：准确吸取 10.00 mL 浓度为 1.00 mg/mL 的 dl- $\alpha$ -生育酚标准储备溶液于 100 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，摇匀，此溶液浓度为 100.0  $\mu$ g/mL。将该溶液分装至棕色小试剂瓶中，密封后，-20 ℃ 下避光保存，保存期 3 个月。
- 17.4.5 d- $\alpha$ -生育酚标准系列工作溶液：准确吸取 d- $\alpha$ -生育酚标准中间溶液 0.050 mL、0.10 mL、0.20 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇定容至刻度。该标准系列中 d- $\alpha$ -生育酚浓度为 0.250  $\mu$ g/mL、0.500  $\mu$ g/mL、1.00  $\mu$ g/mL、2.50  $\mu$ g/mL、5.00  $\mu$ g/mL、10.0  $\mu$ g/mL，在-20 ℃ 避光条件下可保存 7 天。

17.4.6 dl- $\alpha$ -生育酚标准系列工作溶液：准确吸取 dl- $\alpha$ -生育酚标准中间溶液 0.050 mL、0.10 mL、0.20 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇定容至刻度。该标准系列中 dl- $\alpha$ -生育酚浓度为 0.500  $\mu\text{g/mL}$ 、1.00  $\mu\text{g/mL}$ 、2.00  $\mu\text{g/mL}$ 、5.00  $\mu\text{g/mL}$ 、10.0  $\mu\text{g/mL}$ 、20.0  $\mu\text{g/mL}$ ，在 -20  $^{\circ}\text{C}$  避光条件下可保存 7 天。

## 17.5 材料

17.5.1 固相萃取柱：以聚苯乙烯共聚物（PS-DVB）为基材的填料，6 mL，200 mg，或相当者。

17.5.2 微孔滤膜：有机系，孔径 0.45  $\mu\text{m}$ 。

## 18 仪器和设备

18.1 液相色谱仪：带紫外（或二极管阵列）检测器或荧光检测器。

18.2 天平：感量分别为 0.1 mg 和 0.01 g。

18.3 紫外可见分光光度计：带 1cm 石英比色皿。

18.4 恒温振荡水浴装置。

18.5 涡旋混合器，使用适用于 50 mL 离心管的适配器，转速大于 1 500 r/min。

18.6 带加热的磁力搅拌器（80 $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  2  $^{\circ}\text{C}$ ）。

18.7 离心机，使用适用于 50 mL 离心管的适配器，转速大于 8 000 r/min。

18.8 氮气浓缩装置。

18.9 超声波发生器。

## 19 分析步骤

### 19.1 样品前处理

处理过程应避免紫外光照。

#### 19.1.1 试样制备

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

##### 19.1.1.1 婴幼儿配方食品、特殊医学用途配方食品、调制乳粉、豆浆粉、固体饮料

称取粉末试样 25 g ( $m_1$ ，精确至 0.01 g) 至 250 mL 干燥玻璃瓶中，加入约 200 g 温水（约 40  $^{\circ}\text{C}$ ~45  $^{\circ}\text{C}$ ），记录加水后的溶液质量 ( $m_2$ ，精确至 0.01 g)。充分混匀溶解，室温避光放置 15 min，每隔 5 min 振摇 30 s。称取制备后的溶液 5 g ( $m_3$ ，精确至 0.01 g) 至 50 mL 带螺旋盖的离心管中。计算粉末样品质量 ( $m$ )：

$$m = \frac{m_1 \times m_3}{m_2}$$

##### 19.1.1.2 即食液态奶、饮料、豆浆、果冻、冰淇淋、雪糕

称取 5 g（精确至 0.01 g）均质后的试样至 50 mL 带螺旋盖的离心管中，置于涡旋振荡器中振荡 10 min，混匀。

##### 19.1.1.3 人造黄油及其类似制品

取代表性试样，按四分法缩分，将缩分所得试样中可食部分用均质器均质。称取均质后的试样 1 g~2 g（精确至 0.01 g）至 50 mL 带螺旋盖的离心管，加入约 4.5 mL~3 mL 的温水（约 40  $^{\circ}\text{C}$ ~45  $^{\circ}\text{C}$ ），置于涡旋振荡器中振荡 10 min，混匀。

##### 19.1.1.4 即食谷物、饼干、其他培烤食品、膨化食品、婴幼儿谷类辅助食品等高淀粉试样



称取5 g~10 g (精确至0.01 g) 均质后的试样于150 mL平底烧瓶中, 加入约20 mL温水 (约40 °C~45 °C), 置于磁力搅拌器中搅拌10 min, 混匀。

#### 19.1.1.5 含蜂蜡等粘稠胶质试样

取可食部分混匀, 称取2 g~5 g (精确至0.01 g) 均质后的试样至150 mL平底烧瓶中, 加入约20 mL的温水 (约40 °C~45 °C) 和1颗磁力搅拌子, 置于磁力搅拌器中搅拌10 min, 混匀。

### 19.1.2 试样皂化

#### 19.1.2.1 即食谷物、饼干、其他培烤食品、膨化食品、婴幼儿谷类辅助食品等高淀粉试样

在19.1.1.4中描述的150 mL平底烧瓶中, 加入1.0 g  $\alpha$ -淀粉酶, 加上瓶塞, 放入60 °C恒温磁力搅拌器中酶解30 min, 立即冷却至室温, 向酶解液中加入1.0 g 抗坏血酸和30 mL BHT-乙醇溶液(0.2 g/100 mL), 混匀。再加入10 mL~20 mL 氢氧化钾溶液(50%, w/w), 边加边振摇, 混匀后于恒温磁力搅拌器上80 °C  $\pm$  2 °C, 回流皂化30 min (或25 °C  $\pm$  5 °C, 皂化16 h  $\pm$  2 h), 皂化后立即用冷水冷却至室温。用乙醇-水混合溶液(2+3)将皂化液转移至100 mL的容量瓶中, 定容至刻度, 摇匀, 定量分取20 mL皂化液于50 mL的离心管中, 待提取净化。

#### 19.1.2.2 含蜂蜡等粘稠胶质试样

在19.1.1.5中描述的150 mL平底烧瓶中, 加入1.0 g 抗坏血酸和30 mL BHT-乙醇溶液(0.2 g/100 mL), 放入1颗磁力搅拌子, 将平底烧瓶置于磁力搅拌器中搅拌10 min, 混匀, 再加入约20 mL的温水 (约40 °C~45 °C), 混匀。再加入10 mL~20 mL 氢氧化钾溶液(50%, w/w), 边加边振摇, 混匀后于恒温磁力搅拌器上80 °C  $\pm$  2 °C, 回流皂化30 min (或25 °C  $\pm$  5 °C, 皂化16 h  $\pm$  2 h), 皂化后立即用冷水冷却至室温。用乙醇-水混合溶液(2+3)将皂化液转移至100 mL的容量瓶中, 定容至刻度, 摇匀, 定量分取20 mL皂化液于50 mL的离心管中, 待提取净化。

#### 19.1.2.3 其它食品

按19.1.1.1~19.1.1.3中描述的样品前处理方法, 称取适量试样于50 mL离心管中, 加入0.4 g 抗坏血酸, 6 mL BHT-乙醇溶液(0.2 g/100 mL), 涡旋混匀30 s, 再加入3 mL 氢氧化钾溶液, 涡旋混匀后于80 °C  $\pm$  2 °C条件下涡旋振荡30 min (或25 °C  $\pm$  5 °C, 涡旋振荡16 h  $\pm$  2 h), 立即冷却, 待提取净化。

### 19.1.3 试样提取净化

#### 19.1.3.1 液液萃取法

于上述装有皂化液的离心管中加入5 mL 乙醇-水混合溶液(2+3), 涡旋振荡5 min, 再加入5 mL水, 涡旋混匀。加入20 mL 乙酸乙酯-正己烷混合溶液(3+2), 置于涡旋混合器涡旋提取10 min, 高速离心机8000 r/min离心5 min, 将上层溶液转移至另一50 mL的离心管中。于原离心管中再加入10 mL 乙酸乙酯-正己烷混合溶液(3+2), 再次涡旋提取10 min, 高速离心机8000 r/min离心5 min, 合并上层有机相于同一离心管中, 加水至45 mL, 用滴管加入1滴酚酞溶液(1 g/100 mL), 轻微晃动数次, 在8000 转/min条件下离心3 min, 将上层有机相转移至旋蒸瓶中, 于40 °C水浴减压浓缩至1 mL左右, 用乙酸乙酯-正己烷混合溶液(3+2)转移至10 mL的试管中, 置于氮气浓缩装置吹至近干, 用约4 mL 乙腈-甲醇溶液分3次溶解并转移至5 mL容量瓶中, 加水定容至刻度, 混匀, 过0.45  $\mu$ m微孔滤膜, 取滤液进样。

注: 可根据实验室条件选择浓缩方式, 氮吹仪或冷冻浓缩仪, 均可用于浓缩。最终定容体积可根据样品情况增减。

#### 19.1.3.2 固相萃取法

固相萃取法适用于婴幼儿配方食品、特殊医学用途配方食品、调制乳粉、豆浆(粉)、固体饮料和即食液态奶。

于上述皂化液中加入0 mL~15 mL去离子水(使用不同品牌的固相萃取柱, 去离子水的加量不同, 需经验证后确定), 涡旋混匀, 在8000 r/min下离心5 min。全部上清液转移至固相萃取柱中(临用前

依次用 6 mL 甲醇、6 mL 水活化平衡) 上样, 过柱速度控制在每分钟不超过 60 滴/分钟以下。用 10 mL 甲醇水混合溶液洗涤离心管, 涡旋 30s, 在 8000 r/min 下离心 5 min, 将上清液一并转移到固相萃取柱上样, 重复操作 2 次。负压抽干固相萃取柱, 用 8 mL 乙腈-甲醇混合溶液 (3+1) 分 3 次洗脱, 洗脱液加水定容至 10 mL, 过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 取滤液进样。

注: 如仪器灵敏度或进样体积受限, 可将洗脱液氮吹至一定体积, 再加水定容至适当体积, 保持最终进样液中的溶剂体系为初始流动相体系。全自动在线固相萃取法可优化操作参数后使用。

## 19.2 仪器参考条件

a) 色谱柱: 多糖衍生物涂敷型反相手性柱 (OD), 柱长 150 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 5  $\mu\text{m}$ , 或相当者。

b) 柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$

c) 流动相: A 相, 水; B 相, 乙腈-甲醇溶液, 梯度洗脱见表 3。

d) 流速: 1.2 mL/min。

e) 检测波长: 紫外 294 nm 检测; 荧光激发波长为 294 nm, 发射波长为 328 nm;

f) 进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。

表3 流动相洗脱梯度

时间 min	流动相 A%	流动相 B%
0.0	25	75
23.0	25	75
32.5	20	80
35.0	0	100
39.0	0	100
39.5	25	75
50.0	25	75

## 19.3 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入液相色谱仪中, 测定相应的峰面积, 以标准系列工作液中各组分的浓度为横坐标, 以峰面积的响应值为纵坐标, 绘制标准曲线。d- $\alpha$ -生育酚和 dl- $\alpha$ -生育酚标准溶液的色谱图参见附录B中图B.3.1和图B.3.2。

## 19.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱仪中, 得到 $\alpha$ -生育酚各组分峰的峰面积, 以 $\alpha$ -生育酚组分峰2的峰面积乘2计为dl- $\alpha$ -生育酚的峰面积, 以 $\alpha$ -生育酚组分峰1与 $\alpha$ -生育酚组分峰2的峰面积之差, 计为d- $\alpha$ -生育酚的峰面积, 根据标准曲线得到待测液中d- $\alpha$ -生育酚和dl- $\alpha$ -生育酚的浓度。

## 19.5 空白试验

不称取试样, 按样品分析步骤操作, 应不含有干扰待测组分的物质。

## 20 分析结果的表述

试样中 d- $\alpha$ -生育酚或 dl- $\alpha$ -生育酚的含量按式 (5) 计算:

$$X = \frac{\rho \times V \times 100}{m \times 1000} \dots\dots\dots (5)$$

式中：

$X$ ——试样中 d- $\alpha$ -生育酚或 dl- $\alpha$ -生育酚的含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；

$\rho$ ——由标准曲线得到的试样溶液中 d- $\alpha$ -生育酚或 dl- $\alpha$ -生育酚的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V$ ——定容体积，单位为毫升（mL）；

$m$ ——试样的取样量，单位为克（g）；

100——试样中量以每 100 克计算的换算系数；

1 000——试样中量以  $\mu\text{g}$  换算为 mg 的换算系数。

计算结果保留三位有效数字。

注：1 mg d- $\alpha$ -生育酚 = 1 mg  $\alpha$ -TE；1 mg dl- $\alpha$ -生育酚 = 0.74 mg  $\alpha$ -TE。

## 21 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%。

## 22 其他

当固体样品取样量为 0.50 g，定容至 5 mL 时，dl- $\alpha$ -生育酚生育酚的荧光检出限为 0.08 mg/100 g，定量限为 0.24 mg/100 g；紫外检出限为 0.25 mg/100 g，定量限为 0.75 mg/100 g。d- $\alpha$ -生育酚生育酚的荧光检出限为 0.04 mg/100 g，定量限为 0.12 mg/100 g，紫外检出限为 0.12 mg/100 g，定量限为 0.40 mg/100 g。

当液体样品取样量为 5.00 g，定容至 5 mL 时，dl- $\alpha$ -生育酚生育酚的荧光检出限为 0.008 mg/100 g，定量限为 0.024 mg/100 g；紫外检出限为 0.025 mg/100 g，定量限为 0.075 mg/100 g。d- $\alpha$ -生育酚生育酚的荧光检出限为 0.004 mg/100 g，定量限为 0.012 mg/100 g，紫外检出限为 0.012 mg/100 g，定量限为 0.040 mg/100 g。

## 附录 A

## 维生素 A、E 标准溶液浓度校正和核查方法

## A.1 维生素 A 标准溶液浓度校正和核查方法。

## A.1.1 维生素 A 标准溶液的浓度校正

A.1.1.1 准确吸取全反式视黄醇标准储备溶液（1.00 mg/mL）50  $\mu\text{L}$  于 25 mL 的棕色容量瓶中，用无水乙醇定容至刻度，混匀，用 1 cm 石英比色杯，以无水乙醇为空白参比，按表 A.1.1 的波长测定其吸光度，并按附录 A.3.2 色谱条件测定色谱纯度（面积归一化法）。

A.1.1.2 准确吸取 13-顺式视黄醇标准储备溶液（0.100 mg/mL）200  $\mu\text{L}$  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 石英比色杯，以无水乙醇为空白参比，按表 A.1.1 的波长测定其吸光度，并按附录 A.3.2 色谱条件测定色谱纯度（面积归一化法）。

A.1.1.3 准确吸取取视黄醇棕榈酸酯标准储备溶液（1.00 mg/mL）50  $\mu\text{L}$  于 25 mL 的棕色容量瓶中，用无水乙醇定容至刻度，混匀，用 1 cm 石英比色杯，以无水乙醇为空白参比，按表 A.1.1 的波长测定其吸光度，并按附录 A.3.1 色谱条件测定色谱纯度（面积归一化法）。

A.1.1.4 准确吸取视黄醇乙酸酯标准储备溶液（1.00 mg/mL）50  $\mu\text{L}$  于 25 mL 的棕色容量瓶中，用无水乙醇定容至刻度，混匀，用 1 cm 石英比色杯，以无水乙醇为空白参比，按表 A.1.1 的波长测定其吸光度，并按附录 A.3.2 色谱条件测定色谱纯度（面积归一化法）。

表 A.1.1 维生素 A 标准溶液测定波长及百分吸光系数

目标物	波长 nm	<i>E</i>
全反式视黄醇	325	1830
13-顺式视黄醇	328	1686
视黄醇棕榈酸酯	325	975
视黄醇乙酸酯	325	1560

维生素 A 的浓度按式 A.1 计算：

$$X = \frac{A \times 10^4}{E} \times P \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中： *X*—维生素 A 的标准液浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；  
*A*—维生素 A 的标准液的平均紫外吸光值；  
*E*—维生素 A 的 1% 比色光系数；  
*P*—色谱纯度。

## A.1.2 全反式视黄醇标准储备溶液的核查

准确吸取全反式视黄醇标准储备溶液（1.00 mg/mL）50  $\mu\text{L}$  于 25 mL 的棕色容量瓶中，用无水乙醇定容至刻度，混匀，用 1 cm 石英比色杯，以无水乙醇为空白参比，按表 A.1.2 的波长测定其吸光度，并计算各波长下的吸光度比值，若各比值全部满足表 A.1.2 的要求，可继续使用，否则应重新配制。

表 A.1.2 全反式视黄醇标准储备液核查波长比值要求

吸光度比值	$A_{300\text{nm}}/A_{325\text{nm}}$	$A_{350\text{nm}}/A_{325\text{nm}}$	$A_{370\text{nm}}/A_{325\text{nm}}$
比值规定	$\leq 0.602$	$\leq 0.452$	$\leq 0.093$

## A.2 维生素 E 标准溶液浓度校正和核查方法。

A.2.1 分别准确移取  $\alpha$ -生育酚乙酸酯 (5.00 mg/mL) 100  $\mu\text{L}$ ,  $\alpha$ -生育酚 (1.00 mg/mL)、d- $\beta$ -生育酚 (1.00 mg/mL)、d- $\gamma$ -生育酚 (1.00 mg/mL)、d- $\delta$ -生育酚 (1.00 mg/mL)、d- $\alpha$ -生育三烯酚 (1.00 mg/mL) 标准储备溶液 500  $\mu\text{L}$  于各 10 mL 棕色容量瓶中, 用无水乙醇定容至刻度, 混匀, 分别用 1 cm 石英比色杯, 以无水乙醇为空白参比, 按表 A.2 的测定波长测定其吸光度, 并按附录 A.3.2 色谱条件测定色谱纯度 (面积归一化法)。

维生素 E 的浓度按式 A.2:

$$X = \frac{A \times 10^4}{E} \times P \dots\dots\dots (A.2)$$

式中:  $X$ —维生素 E 的标准液浓度, 单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ );  
 $A$ —维生素 E 的标准液的平均紫外吸光值;  
 $E$ —维生素 E 的 1% 比色光系数;  
 $P$ —色谱纯度。

表 A.2 维生素 E 标准溶液测定波长及百分吸光系数

目标物	波长 nm	$E$
$\alpha$ -生育酚乙酸酯	284	43.6
$\alpha$ -生育酚	292	76
d- $\beta$ -生育酚	296	89
d- $\gamma$ -生育酚	298	91
d- $\delta$ -生育酚	298	87
d- $\alpha$ -生育三烯酚	292	86

### A.2.2 $\alpha$ -生育酚标准储备溶液的核查

分别测定  $\alpha$ -生育酚在 292 nm、255 nm 波长下的吸光度, 两个波长下的吸光度比值  $A_{255}/A_{292}$  小于等于 0.18 时, 可继续使用, 否则应重新配制。

## A.3 维生素 A 或 E 的色谱纯度测定

### A.3.1 试样溶液制备

同 A.1 和 A.2

### A.3.2 色谱条件

#### A.3.2.1 全反式视黄醇、13-顺式视黄醇纯度测定色谱条件

A.3.2.1.1 色谱柱： $C_{30}$  柱，柱长 150 mm，内径 4.6 mm，粒径 3  $\mu\text{m}$ ，或相当者。

A.3.2.1.2 柱温：25  $^{\circ}\text{C}$

A.3.2.1.3 流动相：A 相，水；B 相，甲醇，83%A；等度洗脱，总运行时间 30 min。

A.3.2.1.4 流动相流速：0.8 mL/min。

A.3.2.1.5 检测波长：325 nm

A.3.2.1.6 进样量：20  $\mu\text{L}$ 。

#### A.3.2.2 全反式视黄醇棕榈酸酯、全反式视黄醇乙酸酯、 $\alpha$ -生育酚乙酸酯、 $\alpha$ -生育酚、d- $\beta$ -生育酚、d- $\gamma$ -生育酚、d- $\delta$ -生育酚、d- $\alpha$ -生育三烯酚纯度测定色谱条件

A.3.2.2.1 色谱柱： $C_{30}$  柱，柱长 150 mm，内径 4.6 mm，粒径 3  $\mu\text{m}$ ，或相当者。。

A.3.2.2.2 柱温：25  $^{\circ}\text{C}$

A.3.2.2.3 流动相：甲醇，总运行时间 30 min。

A.3.2.2.4 流动相流速：0.8 mL/min。

A.3.2.2.5 检测波长：见表 A.1.1 和表 A.2。

A.3.2.2.6 进样量：20  $\mu\text{L}$ 。

### A.3.3 计算方法

以无水乙醇为空白参比，用面积归一化法计算主峰面积占扣除空白试剂峰后的所有峰面积之和的百分比。

### A.3.4 标准溶液纯度色谱图

全反式视黄醇、13-顺式视黄醇、全反式视黄醇棕榈酸酯、全反式视黄醇乙酸酯、 $\alpha$ -生育酚乙酸酯、 $\alpha$ -生育酚、d- $\beta$ -生育酚、d- $\gamma$ -生育酚、d- $\delta$ -生育酚、d- $\alpha$ -生育三烯酚标准溶液纯度测定色谱图见图 A.1～图 A.10。

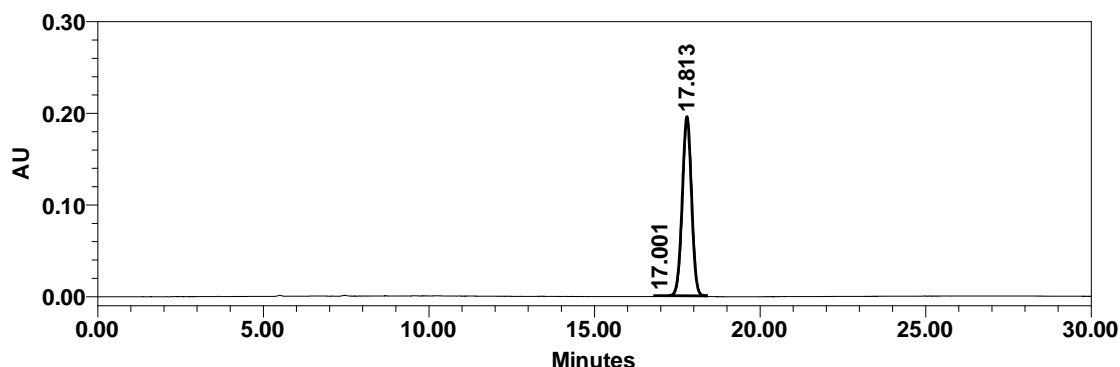


图 A.1 全反式视黄醇标准溶液 (2  $\mu\text{g/L}$ ) 的纯度测定色谱图

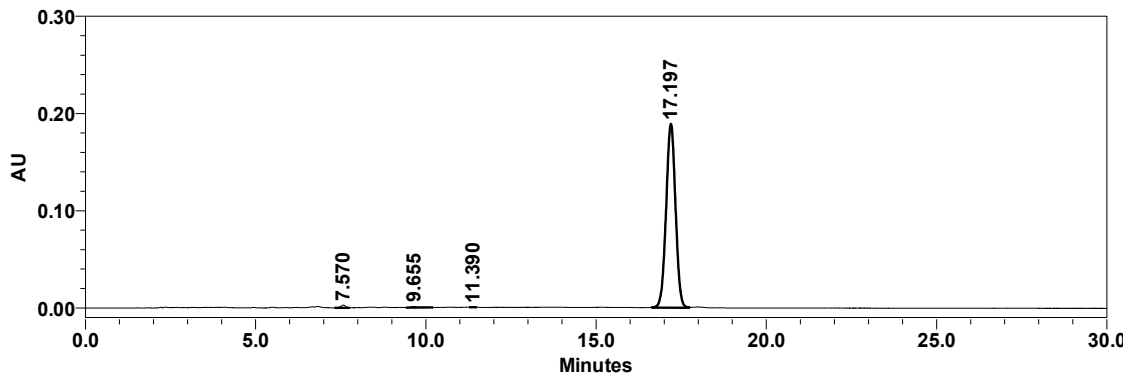


图 A.2 13-顺式视黄醇标准溶液 (50 µg/L) 的纯度测定色谱图

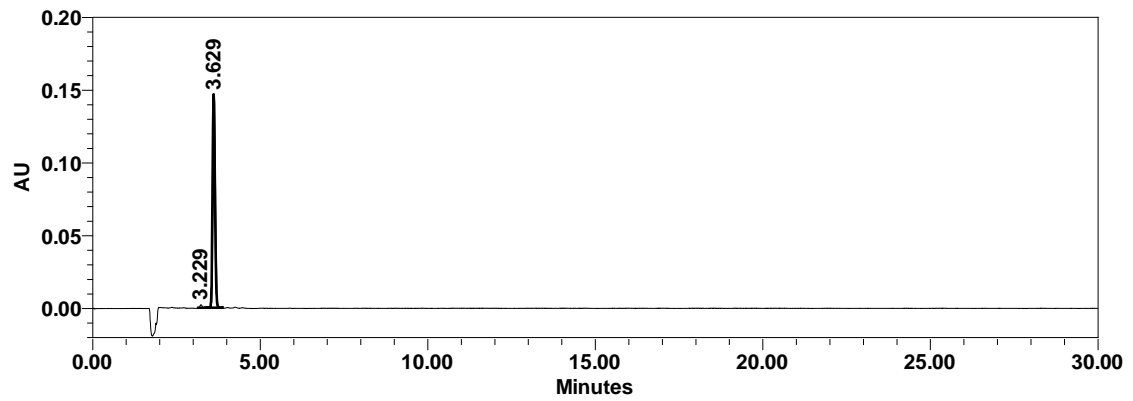


图 A.3 全反式视黄醇乙酸酯标准溶液 (2 µg/L) 的纯度测定色谱图

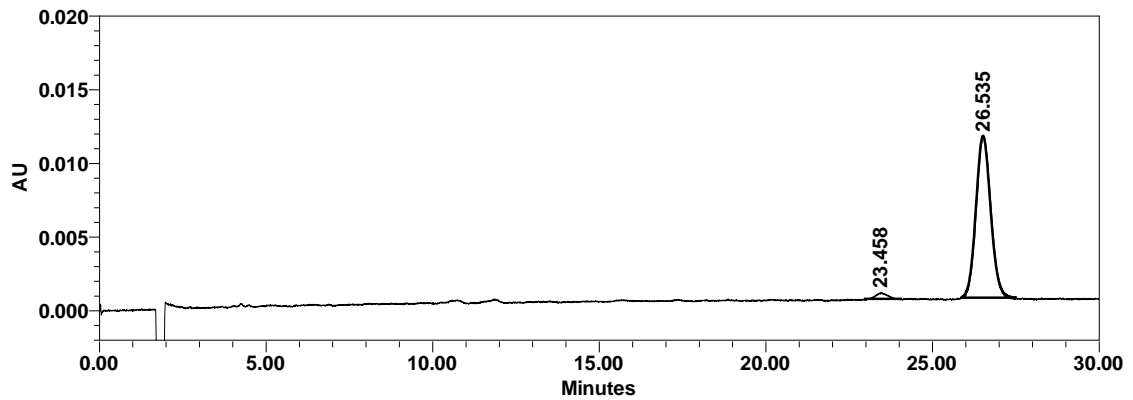
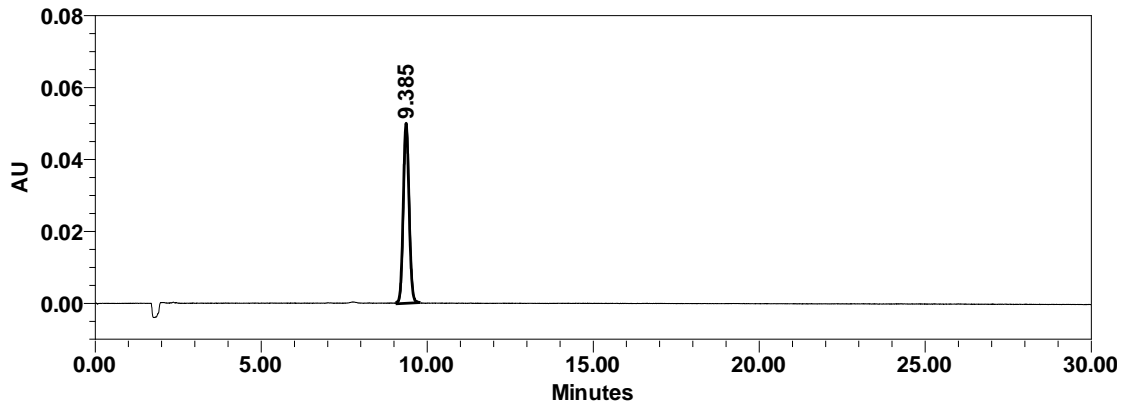
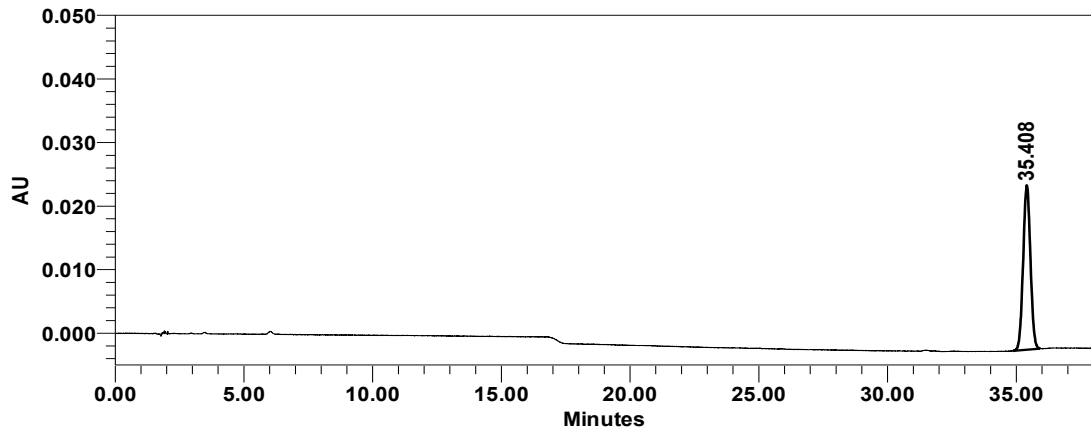
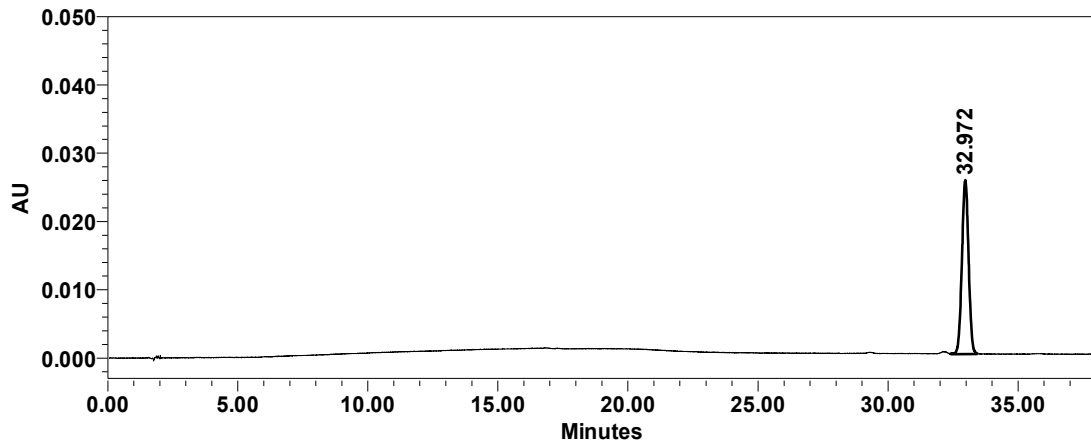
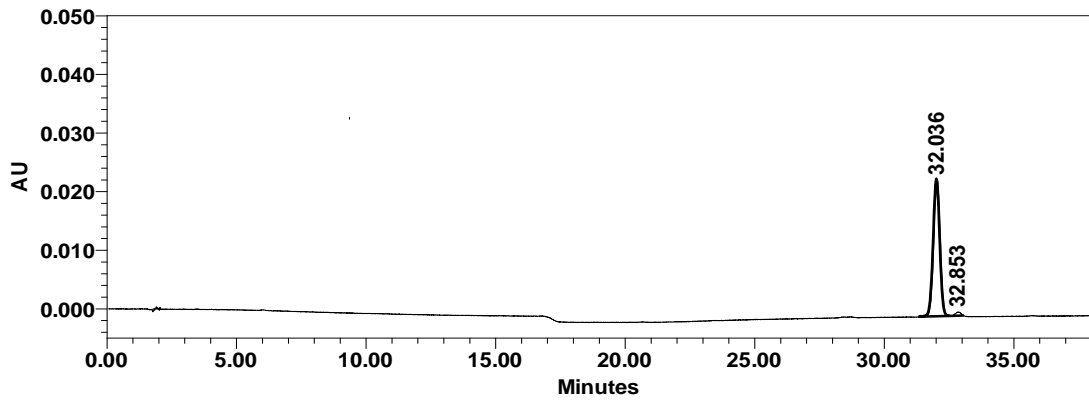
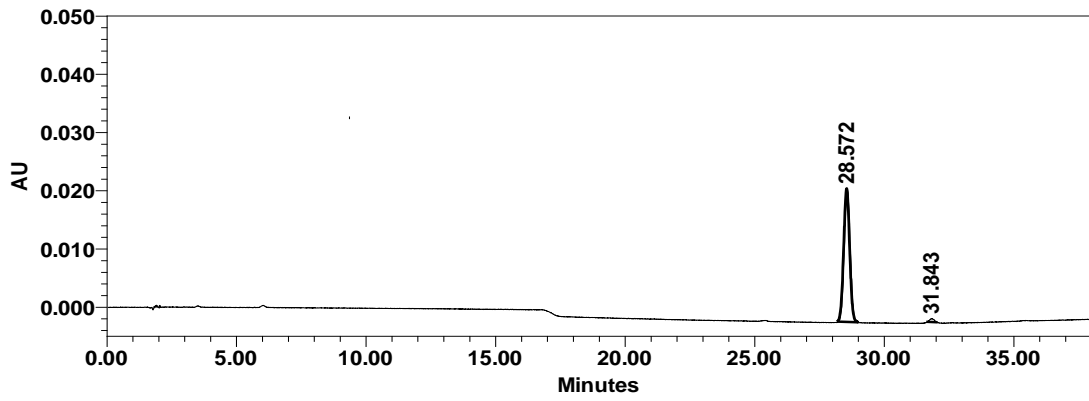
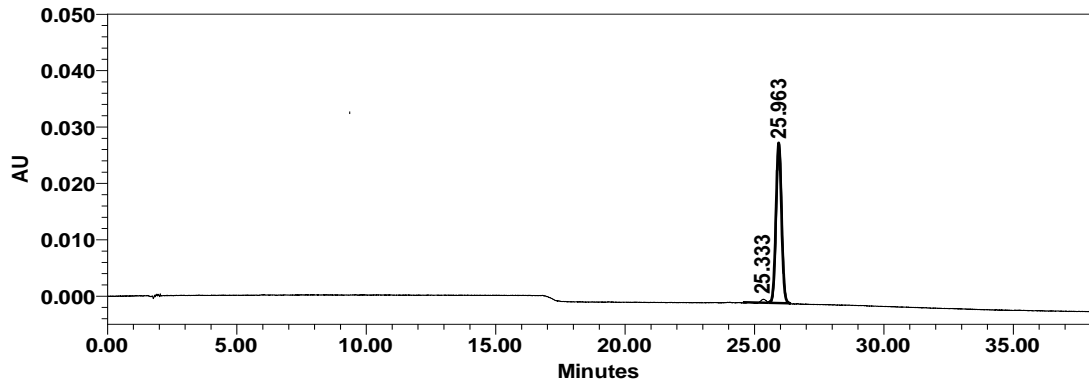


图 A.4 全反式视黄醇棕榈酸酯标准溶液 (2 µg/L) 的纯度测定色谱图

图 A.5  $\alpha$ -生育酚乙酸酯标准溶液 (50  $\mu\text{g/L}$ ) 的纯度测定色谱图图 A.6  $\alpha$ -生育酚标准溶液 (50  $\mu\text{g/L}$ ) 的纯度测定色谱图图 A.7 d- $\beta$ -生育酚标准溶液 (50  $\mu\text{g/L}$ ) 的纯度测定色谱图

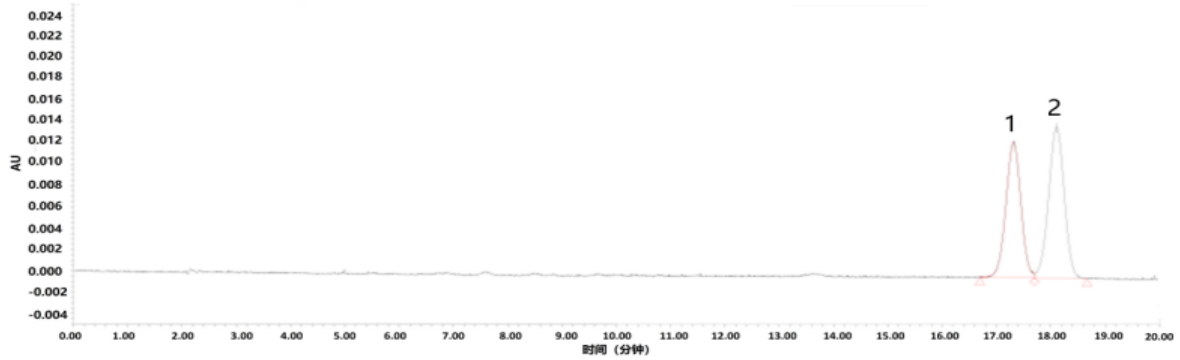


图 A.8 d- $\gamma$ -生育酚标准溶液 (50  $\mu\text{g/L}$ ) 的纯度测定色谱图图 A.9 d- $\delta$ -生育酚标准溶液 (50  $\mu\text{g/L}$ ) 的纯度测定色谱图图 A.10 d- $\alpha$ -生育三烯酚标准溶液 (50  $\mu\text{g/L}$ ) 的纯度测定色谱图

## 附录 B

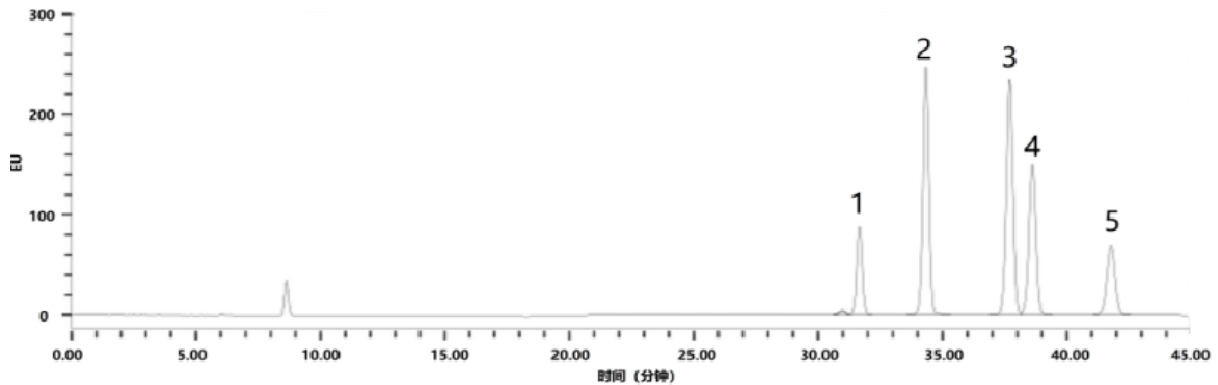
## 维生素 A 和 E 液相色谱图

维生素 A 和 E 反相高效液相色谱图见图 B.1.1、图 B.1.2 和图 B.1.3



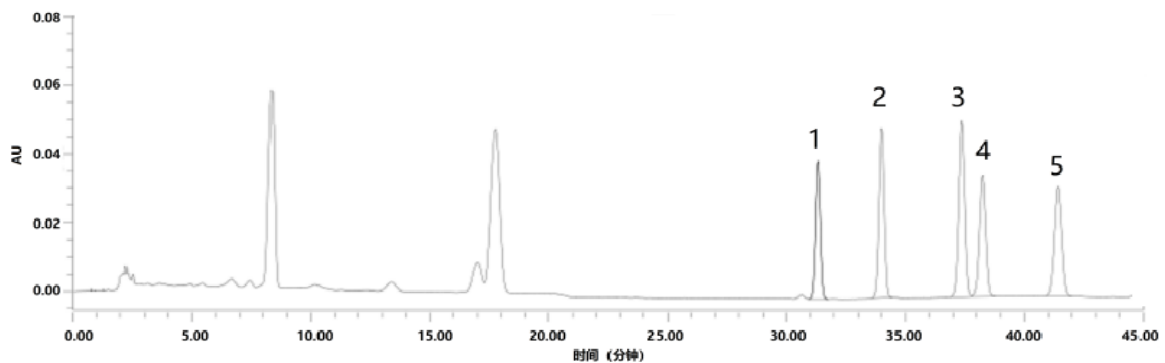
说明：1，13-顺式视黄醇；2，全反式视黄醇

图 B.1.1 维生素 A 标准溶液 (1 µg/mL) 的反相高效液相色谱图 (紫外检测, 波长 325 nm)



说明：1， $\alpha$ -三烯生育酚；2，d- $\delta$ -生育酚；3，d- $\gamma$ -生育酚；4，d- $\beta$ -生育酚；5， $\alpha$ -生育酚。

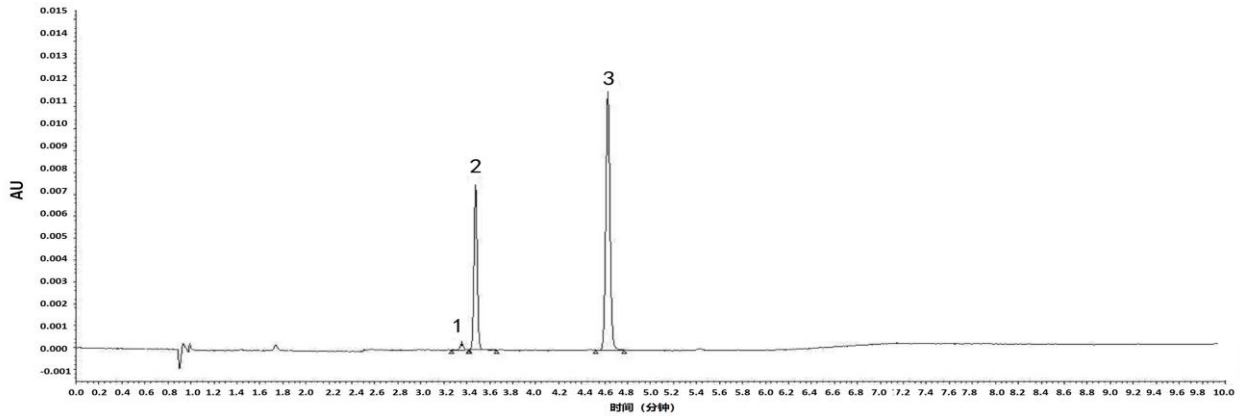
图 B.1.2 维生素 E 标准溶液 (5 µg/mL) 的反相高效液相色谱图  
(荧光检测: 激发波长 294 nm, 发射波长 328 nm)



说明：1， $\alpha$ -三烯生育酚；2，d- $\delta$ -生育酚；3，d- $\gamma$ -生育酚；4，d- $\beta$ -生育酚；5， $\alpha$ -生育酚。

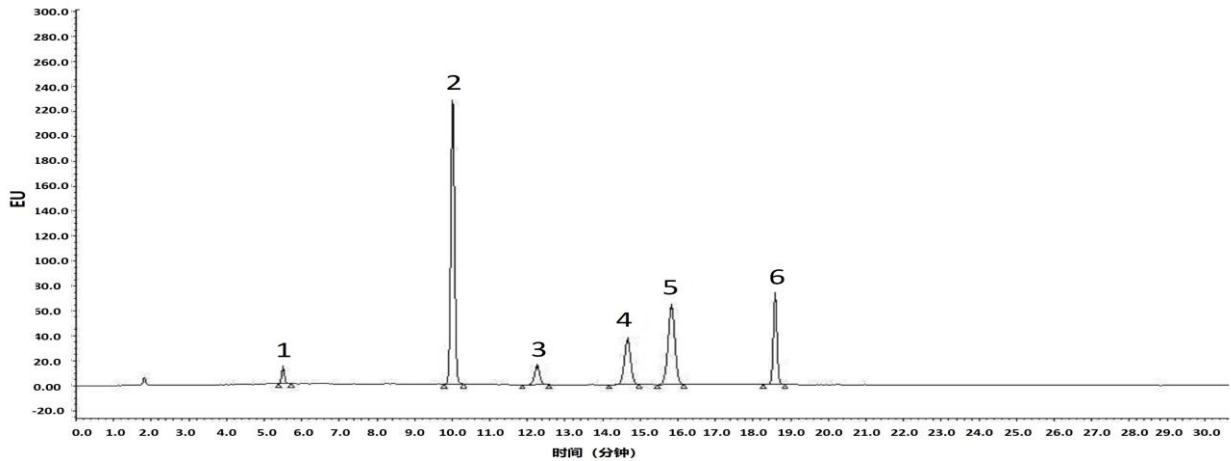
图 B.1.3 50 µg/mL 维生素 E 标准溶液的反相高效液相色谱图 (紫外检测, 波长 294 nm)

维生素 A 和 E 正相高效液相色谱图见图 B.2.1、B.2.2 和 B.2.3



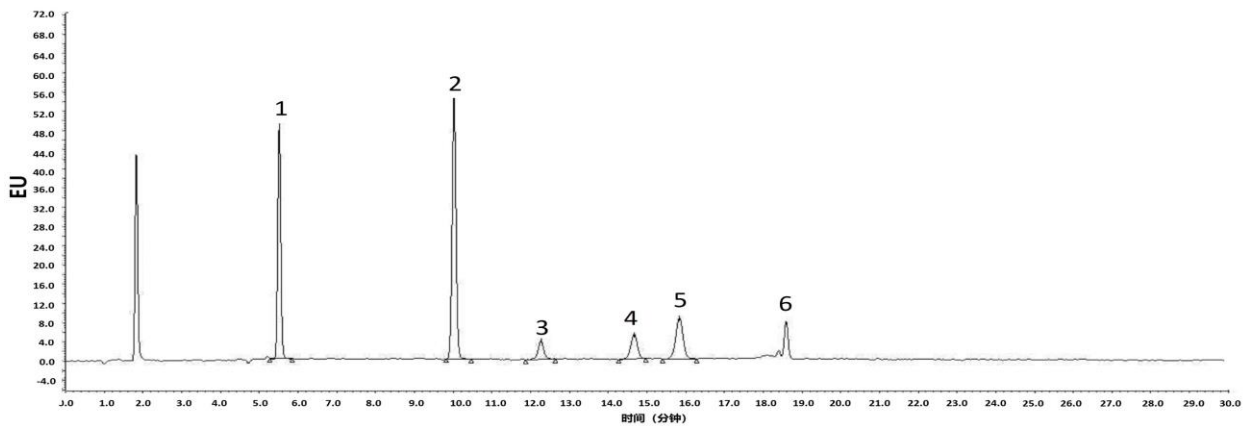
说明：1，13-顺式视黄醇棕榈酸酯；2，全反式视黄醇棕榈酸酯；3，全反式视黄醇乙酸酯

图 B.2.1 维生素 A 标准溶液 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的正相高效液相色谱图 (紫外检测, 波长 325 nm)



说明：1， $\alpha$ -生育酚乙酸酯；2， $\alpha$ -生育酚；3， $\alpha$ -三烯生育酚；4，d- $\beta$ -生育酚；5，d- $\gamma$ -生育酚；6，d- $\delta$ -生育酚。

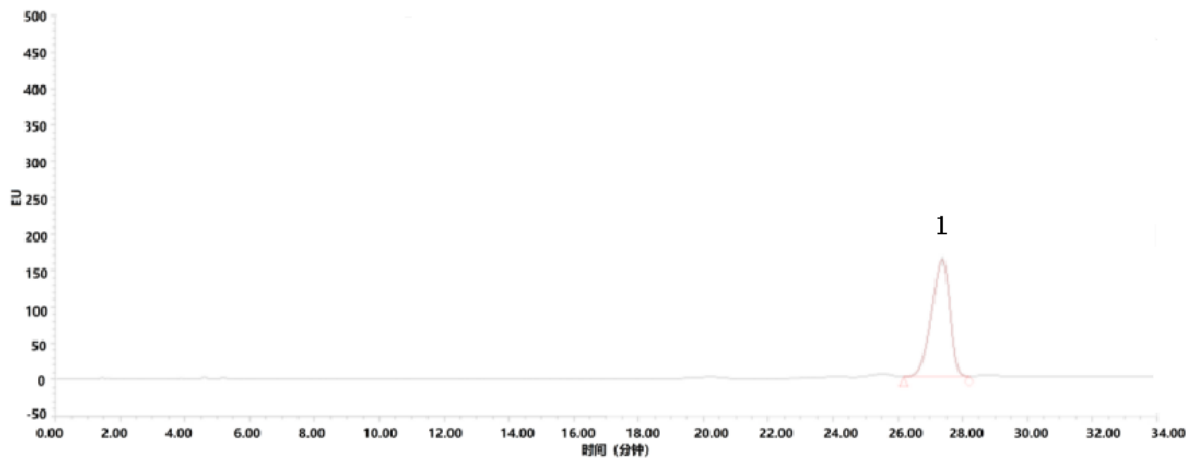
图 B.2.2 维生素 E 标准溶液 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的正相高效液相色谱图  
(荧光检测: 激发波长 294 nm, 发射波长 328 nm)



说明：1， $\alpha$ -生育酚乙酸酯；2， $\alpha$ -生育酚；3， $\alpha$ -三烯生育酚；4，d- $\beta$ -生育酚；5，d- $\gamma$ -生育酚；6，d- $\delta$ -生育酚。

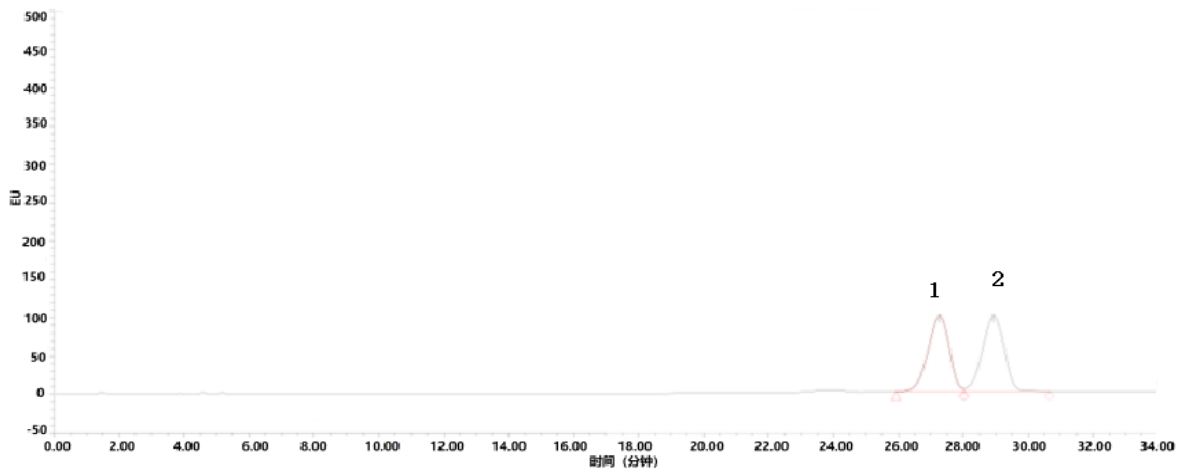
图 B.2.3 维生素 E 标准溶液 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的正相高效液相色谱图  
(荧光检测: 激发波长 280 nm, 发射波长为 310 nm)

d- $\alpha$ -生育酚与dl- $\alpha$ -生育酚的手性柱反相高效液相色谱法色谱图见图B.3.1和B.3.2



说明：1，d- $\alpha$ -生育酚

图 B.3.1 d- $\alpha$ -生育酚标准溶液（5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的反相高效液相色谱图  
（荧光检测：激发波长 294 nm，发射波长 328 nm）



说明：1，dl- $\alpha$ -生育酚组分峰 1；2，dl- $\alpha$ -生育酚组分峰 2

图 B.3.2 dl- $\alpha$ -生育酚标准溶液（10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的反相高效液相色谱图  
（荧光检测：激发波长 294 nm，发射波长 328 nm）