



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 D 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》中第三法 维生素D的测定 液相色谱-串联质谱法和第四法 食品中维生素D的测定 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；
- 增加了在线柱切换-反相高效液相色谱法；
- 修改了液相色谱-串联质谱法的线性范围和仪器参考条件；
- 修改了附录中标准校正溶液的配制方法。

食品安全国家标准

食品中维生素 D 的测定

1 范围

本标准规定了食品中维生素D的测定方法。

第一法正相纯化制备-反相液相色谱法适用于添加了麦角钙化醇或胆钙化醇的食品中维生素D₂和维生素D₃的测定。

第二法在线柱切换-反相液相色谱法和第三法液相色谱-串联质谱法适用于食品中维生素D₂和维生素D₃的测定。

第一法 正相纯化制备-反相液相色谱法

2 原理

试样中的维生素D₂或维生素D₃经氢氧化钾乙醇溶液皂化（含淀粉试样先用淀粉酶酶解）、液液萃取净化、浓缩后，用正相高效液相色谱纯化制备，反相高效液相色谱C₁₈柱分离，经紫外或二极管阵列检测器检测，内标法（或外标法）定量。当试样中不含维生素D₂时，可用维生素D₂作内标测定维生素D₃；当试样中不含维生素D₃时，可用维生素D₃作内标测定维生素D₂。否则，用外标法测定。

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（C₂H₆O）：色谱纯。

3.1.2 抗坏血酸（C₆H₈O₆）。

3.1.3 2,6-二叔丁基对甲酚（C₁₅H₂₄O）：简称BHT。

3.1.4 氢氧化钾（KOH）。

3.1.5 正己烷（C₆H₁₄）。

3.1.6 环己烷（C₆H₁₂）。

3.1.7 异丙醇（C₃H₈O）。

3.1.8 石油醚：沸程为30℃~60℃。

3.1.9 无水硫酸钠（Na₂SO₄）。

3.1.10 甲醇（CH₄O）：色谱纯。

3.1.11 α-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≥100 U/mg。

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 1.0 g BHT，溶于 500 mL 无水乙醇中，临用前配制。
- 3.2.3 异丙醇-环己烷-正己烷混合溶液(2+125+125)：将异丙醇、环己烷和正己烷按 2：125：125 的体积比混合均匀，超声脱气，备用。
- 3.2.4 甲醇-水混合溶液(19+1)：将甲醇和水按 19：1 的体积比混合均匀，超声脱气，备用。

3.3 标准品

- 3.3.1 维生素 D₂ 标准品：麦角钙化醇(C₂₈H₄₄O，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品。
- 3.3.2 维生素 D₃ 标准品：胆钙化醇(C₂₇H₄₄O，CAS 号：67-97-0)，纯度>98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 维生素 D₂ 标准储备溶液(1 000 mg/L)：准确称取 50 mg(精确至 0.1 mg) 维生素 D₂ 标准品于小烧杯中，用无水乙醇溶解并转移至 50 mL 容量瓶中，定容至刻度，混匀。按附录 A 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。标准储备液期间核查方法可参考附录 A。

3.4.2 维生素 D₃ 标准储备溶液(1 000 mg/L)：准确称取 50 mg(精确至 0.1 mg) 维生素 D₃ 标准品于小烧杯中，用无水乙醇溶解并转移至 50 mL 容量瓶中，定容至刻度，混匀。按附录 A 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。标准储备液期间核查方法可参考附录 A。

3.4.3 维生素 D₂ 标准使用液(10.0 mg/L)：准确吸取维生素 D₂ 标准储备液(1 000 mg/L) 1.00 mL 于 100 mL 容量瓶中，用无水乙醇溶解并定容至刻度，混匀。于-20℃ 下避光保存，保存期 3 个月，准确浓度按校正后的浓度折算。

3.4.4 维生素 D₃ 标准使用液(10.0 mg/L)：准确吸取维生素 D₃ 标准储备液(1 000 mg/L) 1.00 mL 于 100 mL 容量瓶中，用无水乙醇溶解并定容至刻度，混匀。在-20℃ 下避光保存，保存期 3 个月，准确浓度按校正后的浓度折算。

3.4.5 标准系列溶液的配制

3.4.5.1 当用维生素 D₃ 作内标测定维生素 D₂ 时：分别吸取维生素 D₂ 标准使用液(10.0 mg/L) 0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、4.00 mL、6.00 mL 和 10.00 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中，各加入维生素 D₃ 内标使用液(10.0 mg/L) 2.50 mL，加甲醇定容至刻度，混匀。此标准系列工作液浓度分别为 50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L、400 μg/L、600 μg/L、1 000 μg/L，维生素 D₃ 内标浓度为 250 μg/L。临用前配制。

3.4.5.2 当用维生素 D₂ 作内标测定维生素 D₃ 时：分别吸取维生素 D₃ 标准使用液(10.0 mg/L) 0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、4.00 mL、6.00 mL 和 10.00 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中，各加入维生素 D₂ 内标使用液(10.0 mg/L) 2.50 mL，加甲醇定容至刻度，混匀。此标准系列工作液浓度分别为 50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L、400 μg/L、600 μg/L、1 000 μg/L，维生素 D₂ 内标浓度为 250 μg/L。临用前配制。

3.4.5.3 当用外标法同时测定维生素 D₂ 和 D₃ 时：分别吸取维生素 D₂ 标准使用液(10.0 mg/L)、维生素 D₃ 标准使用液(10.0 mg/L) 各 0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、4.00 mL、6.00 mL 和 10.00 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中，加甲醇定容至刻度，混匀。此标准系列工作液浓度分别为 50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L、400 μg/L、600 μg/L、1 000 μg/L。临用前配制。

3.5 材料

- 3.5.1 微孔滤膜：有机系，孔径 0.45 μm。
- 3.5.2 广泛 pH 试纸：pH 值范围 1~14。

4 仪器和设备

- 4.1 正相纯化制备-高效液相色谱仪，带紫外或二极管阵列检测器，进样器配 500 μL 定量环。
- 4.2 反相高效液相色谱仪，带紫外或二极管阵列检测器，进样器配 100 μL 定量环。
- 4.3 天平，感量为 0.1 mg、0.01 g。
- 4.4 紫外分光光度计，带 1 cm 石英比色皿。
- 4.5 磁力搅拌器，带加热、控温功能。
- 4.6 旋转蒸发仪。
- 4.7 恒温水浴锅。
- 4.8 氮气浓缩仪。
- 4.9 萃取净化振荡器。
- 4.10 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 即食谷物、饼干、其他焙烤食品、膨化食品、婴幼儿谷类辅助食品

称取均质后的试样 5 g~10 g (m_1 ，精确至 0.01g) 于 150 mL 平底烧瓶中，加入约 20 mL 温水（约 40°C~45°C），混匀。

5.1.1.2 婴幼儿配方食品、特殊医学用途配方食品、调制乳粉

称取均质后的粉末试样约 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。准确称取制备后的溶液 50 g (m_3 ，精确至 0.01g) 至 150 mL 平底烧瓶中。计算粉末样品质量 (m)：

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

5.1.1.3 其他食品

称取均质后的固体试样 5 g~20 g (m ，精确至 0.01 g) 或液体试样 50.00 g (m ，精确至 0.01 g) 于 150 mL 平底烧瓶中，固体试样需加入 20 mL~30 mL 温水（约 40 °C~45 °C），混匀。

5.2 试样皂化

5.2.1 即食谷物、饼干、其他焙烤食品、膨化食品、婴幼儿谷类辅助食品

于 5.1.1.1 所述平底烧瓶中，加入 100 μL 内标使用溶液（10.0 mg/L，如测定维生素 D₂，用维生素 D₃ 作内标；如测定维生素 D₃，用维生素 D₂ 作内标）和 1.0 g α -淀粉酶，放入 60 °C 恒温水浴振荡 30 min，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。

5.2.2 婴幼儿配方食品、特殊医学用途配方食品、调制乳粉和其他食品

于 5.1.1.2 和 5.1.1.3 所述平底烧瓶中，加入 100 μL 内标使用溶液（10.0 mg/L，如测定维生素 D₂，用维生素 D₃ 作内标；如测定维生素 D₃，用维生素 D₂ 作内标），再加入 1.0 g 抗坏血酸和 30 mL~50 mL

BHT-乙醇溶液(0.2 g/100 mL)，加入 20 mL~30 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。

注：如用外标法，则不加内标，其余操作同上。

5.3 试样提取与浓缩

5.3.1 试样提取

将上述皂化液用 30 mL 水转入 250 mL 分液漏斗中，加入 50 mL 石油醚，震荡萃取 5 min，将下层溶液转移至另一 250 mL 的分液漏斗中，加入 50 mL 石油醚重复萃取 1 次，合并石油醚层。用约 150 mL 水洗涤石油醚层，重复洗涤 3 次，直至将石油醚层洗至中性(可用广泛 pH 试纸检测下层溶液)，去除下层水相。

5.3.2 试样浓缩

将洗涤后的石油醚层经无水硫酸钠(约 3 g)滤入 250 mL 旋转蒸发瓶或氮气浓缩管中，用 15 mL 石油醚冲洗分液漏斗及无水硫酸钠 2 次，并入蒸发瓶内，并将其接在旋转蒸发器或氮气浓缩仪上，于 40 °C 水浴中减压蒸馏或气流浓缩，待瓶中石油醚剩下约 2 mL 时，取下蒸发瓶，用石油醚将瓶中浓缩物转移至刻度试管中，氮吹至近干，用正己烷定容至 2 mL，过 0.45 μm 微孔滤膜，供正相纯化高效液相色谱系统净化待测液。

5.4 仪器参考条件

5.4.1 维生素 D 待测液的净化

5.4.1.1 正相纯化制备高效液相色谱参考条件

- 色谱柱：硅胶柱，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm，或相当者。
- 流动相：异丙醇-环己烷-正己烷溶液(2+125+125)。
- 流速：1 mL/min。
- 波长：264 nm。
- 柱温：35 °C。
- 进样量：500 μL。

5.4.1.2 正相纯化制备高效液相色谱系统适用性试验

各取维生素 D₂ 标准使用液和维生素 D₃ 标准使用液 1.00 mL 于 10 mL 具塞试管中，在 40 °C 水浴氮气吹干。残渣用 10 mL 正己烷振荡溶解。取该溶液 100 μL 注入正相纯化制备高效液相色谱仪中测定，确定维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的保留时间。

5.4.1.3 样品待测液正相纯化制备

将 500 μL 待测液注入液相色谱仪中，根据维生素 D₂ 和维生素 D₃ 标准溶液保留时间收集维生素 D₂ 和维生素 D₃ 馏分子试管中。将试管置于 40 °C 水浴氮气吹干，准确加入 1.0 mL 甲醇，残渣振荡溶解，即为试样测定液。

注：全自动(在线)或半自动(离线)的馏分收集器可优化操作参数后使用。

5.4.2 反相液相色谱参考条件

- 色谱柱：PAH C₁₈ 柱，柱长 150 mm，柱内径 4.6 mm，粒径 5 μm，或相当者。
- 流动相：甲醇-水溶液(95+5)。
- 流速：1 mL/min。
- 检测波长：264 nm。
- 柱温：35 °C。
- 进样量：100 μL。

5.5 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入反相液相色谱仪中，以标准系列工作液中维生素D₂或维生素D₃的浓度为横坐标，内标法以维生素D₂或维生素D₃的峰面积与其内标的峰面积比值为纵坐标，外标法以维生素D₂、维生素D₃的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。维生素D₂和维生素D₃标准溶液的色谱图参见附录B图B.1。

5.6 试样溶液的测定

将试样溶液注入反相液相色谱仪中，得到维生素D₂、维生素D₃的峰面积，根据相应的标准曲线得到待测液中维生素D₂、维生素D₃的浓度。

5.7 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 D₂ 或维生素 D₃ 的含量按式 (1) 计算：

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

式中：

X —— 试样中维生素 D₂ 或维生素 D₃ 的含量，单位为微克每百克（ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ）；

ρ —— 由标准曲线得到的试样溶液中维生素 D₂ 或维生素 D₃ 的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

V —— 正相纯化制备样品溶液正己烷定容体积，单位为毫升(mL)；

m —— 试样的取样量，单位为克（g）；

100 —— 由每克换算为每百克的换算系数；

1000 —— 由 $\mu\text{g}/\text{L}$ 换算为 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的换算系数。

f —— 稀释因子（ $f_{\text{内标法}}=1$ ， $f_{\text{外标法}}=2$ ）。

计算结果保留三位有效数字。

注：如试样中同时含有维生素 D₂ 和 D₃，维生素 D 的测定结果以维生素 D₂ 和 D₃ 的含量之和计算。

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15 %。

8 其他

当固体试样取样量为10.00g，定容2mL时，维生素D₂、维生素D₃的检出限为0.6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ，定量限为2 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 。

当液体试样取样量为50.00 g，定容2mL时，维生素D₂、维生素D₃的检出限为0.12 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ，定量限为0.4 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 。

第二法 在线柱切换-反相液相色谱法

9 原理

试样中的维生素D₂和维生素D₃经氢氧化钾乙醇溶液皂化（含淀粉试样先用淀粉酶酶解）、液液萃取或固相萃取净化、浓缩后，一维液相通过C₈柱将维生素D₂和维生素D₃与其他杂质分离后，维生素D₂和维生素D₃通过柱切换阀转入二维液相中，通过C₁₈柱分离维生素D₂和维生素D₃，紫外检测器检测，外标法定量。

10 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。

10.1 试剂

- 10.1.1 无水乙醇（C₂H₆O）：色谱纯。
- 10.1.2 抗坏血酸（C₆H₈O₆）。
- 10.1.3 2,6-二叔丁基对甲酚（C₁₅H₂₄O）：简称 BHT。
- 10.1.4 α-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≥100 U/mg。
- 10.1.5 氢氧化钾（KOH）。
- 10.1.6 正己烷（C₆H₁₄）：色谱纯。
- 10.1.7 乙酸乙酯（C₄H₈O₂）：色谱纯。
- 10.1.8 乙腈（C₂H₃N）：色谱纯。
- 10.1.9 甲醇（CH₄O）：色谱纯。
- 10.1.10 酚酞指示剂。

10.2 试剂配制

- 10.2.1 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。
- 10.2.2 BHT-乙醇溶液（0.2 g/100 mL）：称取 1.0 g BHT，溶于 500 mL 乙醇中。临用前配制。
- 10.2.3 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。
- 10.2.4 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。
- 10.2.5 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。
- 10.2.6 酚酞溶液（1 g/100 mL）：称取 1.0 g 酚酞，溶于 100 mL 乙醇中。
- 10.2.7 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。
- 10.2.8 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。

10.3 标准品

- 10.3.1 维生素 D₂ 标准品：麦角钙化醇（C₂₈H₄₄O，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品。
- 10.3.2 维生素 D₃ 标准品：胆钙化醇（C₂₇H₄₄O，CAS 号：67-97-0），纯度>98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

10.4 标准溶液配制

- 10.4.1 维生素 D₂ 标准储备溶液（1 000 mg/L）：准确称取 50 mg（精确至 0.1 mg）维生素 D₂ 标准品于小烧杯中，用无水乙醇溶解并转移至 50 mL 容量瓶中，定容至刻度，混匀。按附录 A 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 °C 下避光保存，保存期 6 个月。标准储备液期间核查方法可参考附录 A。

10.4.2 维生素 D₃ 标准储备溶液 (1 000 mg/L)：准确称取 50 mg (精确至 0.1 mg) 维生素 D₃ 标准品于小烧杯中，用无水乙醇溶解并转移至 50 mL 容量瓶中，定容至刻度，混匀。按附录 A 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 °C 下避光保存，保存期 6 个月。标准储备液期间核查方法可参考附录 A。

10.4.3 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 混合标准溶液中间液 (10.0 mg/L)：分别吸取 1.00 mL 维生素 D₂ 标准储备溶液和 1.00 mL 维生素 D₃ 标准储备溶液于同一 100 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，混匀。在 -20 °C 下避光保存，保存期 3 个月。

10.4.4 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 混合标准溶液使用液 (1.0 mg/L)：吸取 10.00 mL 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 混合标准溶液中间液 (10.0 mg/L) 于 100 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，混匀。在 -20 °C 下避光保存，保存期 1 个月。

10.4.5 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 标准系列工作液：分别吸取维生素 D₂ 和维生素 D₃ 混合标准使用液 (1.0 mg/L) 0.025 mL、0.050 mL、0.10 mL、0.20 mL、0.50 mL 和 1.00 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中，用初始流动相定容至刻度。该标准系列中维生素 D₂ 和维生素 D₃ 浓度为 2.5 μg/L、5.0 μg/L、10.0 μg/L、20 μg/L、50 μg/L、100 μg/L。临用前配制。

10.5 材料

10.5.1 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。

10.5.2 微孔滤膜：有机系，孔径 0.45 μm。

11 仪器和设备

11.1 在线柱切换-液相色谱系统，带紫外或二极管阵列检测器。

11.2 天平，感量为 0.1 mg、0.01 g。

11.3 紫外分光光度计，带 1 cm 石英比色皿。

11.4 离心机，转速 ≥ 8000 r/min。

11.5 多功能涡旋振荡器，带适用于 50 mL 离心管的适配器，转速大于 1500 r/min。

11.6 恒温振荡水浴。

11.7 旋转蒸发仪。

11.8 超声波发生器。

11.9 恒温磁力搅拌器。

12 分析步骤

12.1 样品前处理

注：处理过程应避免紫外光照。

12.1.1 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。

12.1.1.1 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)：

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

12.1.1.2 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。

12.1.1.3 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1~2 g（精确至0.01 g）至50 mL带螺旋盖的离心管，加入约4 mL~3 mL的温水（约40℃~45℃），置于涡旋振荡器中振荡10 min，混匀。对于难于均质的试样，可参考12.1.1.1先制成浆液，再称取制备后的溶液5 g（精确至0.01 g）至50 mL带螺旋盖的离心管中。

12.1.1.4 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。

12.1.1.5 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℃），置于磁力搅拌器中搅拌10 min，混匀。

12.1.1.6 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。

12.1.2 试样皂化

12.1.2.1 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12.1.1.5中描述的150 mL平底烧瓶中，加入1.0 g α -淀粉酶，加上瓶塞，放入60℃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25℃ \pm 5℃室温条件下磁力搅拌16 h \pm 2 h。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。

12.1.2.2 含蜂蜡等粘稠胶质试样

在12.1.1.6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，再加入约20 mL的温水（约40℃~45℃），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25℃ \pm 5℃室温条件下磁力搅拌16 h \pm 2 h。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。

12.1.2.3 其他食品

按12.1.1.1~2.1.1.4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（50%，w/w），涡旋混匀后于25℃ \pm 5℃室温条件下涡旋振荡16 h \pm 2 h，待提取净化。

12.1.3 试样提取净化

12.1.3.1 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℃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。

12.1.3.2 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 (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。

12.2 仪器参考条件

- a) 一维色谱柱: C_8 柱, 柱长150 mm, 内径 4.6 mm, 粒径5 μm , 或相当者。
- b) 二维色谱柱: PAH C_{18} 柱, 柱长150 mm, 内径 4.6 mm, 粒径3 μm , 或相当者。
- c) 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$
- d) 一维流动相: A相, 水; B相, 乙腈-甲醇 (3+1, 体积比); 梯度洗脱: 0 min~16 min, 80%~100% B; 16 min~19 min, 100% B; 19.0 min~19.5 min, 100%~80% B; 总运行时间30 min。
- e) 二维流动相: A相, 乙腈水溶液 (95+5, 体积比); B相, 甲醇, 95% A等度洗脱, 总运行时间30 min。
- f) 流动相流速: 一维流速, 1.0 mL/min; 二维流速, 0.4 mL/min。
- g) 检测波长: 264 nm
- h) 进样量: 100 μL 。
- i) 根据维生素D在一维色谱柱上的保留时间确定六通阀切换时间: 0.00 min~7.95 min, 阀状态1; 7.95 min~8.55 min, 阀状态2; 8.55 min~30 min, 回到阀状态1, 在线柱切换流路图见附录C。
- (j) 富集柱: C_{18} (或同等性能填料)

12.3 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入高效液相色谱仪中, 以标准系列工作液中维生素 D_2 、维生素 D_3 的浓度为横坐标, 以维生素 D_2 、维生素 D_3 的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。维生素 D_2 和维生素 D_3 标准溶液的色谱图参见附录B图B.2。

12.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中, 得到维生素 D_2 (或 D_3) 的峰面积, 根据标准曲线得到待测液中维生素 D_2 或维生素 D_3 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 D_2 或维生素 D_3 的含量按公式 (2) 计算:

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

式：

$X_{\text{中}}$ ——试样中维生素 D₂ 或维生素 D₃ 的含量，单位为微克每百克（ $\mu\text{g}/100\text{g}$ ）；

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中维生素 D₂（或 D₃）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——由每克换算为每百克的换算系数；

1000——由 $\mu\text{g}/\text{L}$ 换算为 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的换算系数。

计算结果保留三位有效数字。

注：如试样中同时含有维生素 D₂ 和 D₃，维生素 D 的测定结果以维生素 D₂ 和 D₃ 的含量之和计算。

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15%。

15 其他

当固体试样取样量为0.500g，定容5 mL时，维生素D₂、维生素D₃的检出限为0.6 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ，定量限为2 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。

当液体试样取样量为5.00 g时，定容5 mL时，维生素D₂、维生素D₃的检出限为0.06 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ，定量限为0.2 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。

第三法 液相色谱-串联质谱法

16 原理

试样中加入维生素D₂、维生素D₃的同位素内标后，经氢氧化钾乙醇溶液皂化（含淀粉试样先用淀粉酶酶解）、正己烷提取、硅胶固相萃取柱净化、浓缩后，通过C₁₈柱将维生素D₂、维生素D₃与其他杂质分离，串联质谱法检测，内标法定量。

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（C₂H₆O）：色谱纯。

17.1.2 抗坏血酸（C₆H₈O₆）。

17.1.3 2,6-二叔丁基对甲酚（C₁₅H₂₄O）：简称 BHT。

17.1.4 氢氧化钾（KOH）。

17.1.5 正己烷（C₆H₁₄）：色谱纯。

17.1.6 乙酸乙酯（C₄H₈O₂）：色谱纯。

17.1.7 无水硫酸钠（Na₂SO₄）。

17.1.8 甲醇（CH₄O）：色谱纯。

17.1.9 甲酸（CH₂O₂）：色谱纯。

17.1.10 甲酸铵 ($\text{CH}_5\text{O}_2\text{N}$)：色谱纯。

17.1.11 α -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 ≥ 100 U/mg。

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, 临用前配制。

17.2.2 BHT-乙醇溶液 (0.2 g/100 mL)：称取 1.0 g BHT, 溶于 500 mL 无水乙醇中, 临用前配制。

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 (1+19)：将乙酸乙酯与正己烷按 1: 19 的体积比混合均匀。

17.2.5 乙酸乙酯-正己烷混合溶液 (3+17)：将乙酸乙酯与正己烷按 3: 17 的体积比混合均匀。

17.2.6 流动相 A: 0.05%甲酸-5 mmol/L 甲酸铵水溶液：称取 0.315 g 甲酸铵于 1000 mL 烧杯中, 加入 1000 mL 水溶解, 再加入 0.5 mL 甲酸, 混匀。

17.2.7 流动相 B: 0.05%甲酸-5 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液：称取 0.315 g 甲酸铵于 1000 mL 烧杯中, 加入 1000 mL 甲醇溶解, 再加入 0.5 mL 甲酸, 混匀。

17.3 标准品

17.3.1 维生素 D_2 标准品：麦角钙化醇 ($\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$, 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品。

17.3.2 维生素 D_3 标准品：胆钙化醇 ($\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$, CAS 号: 67-97-0), 纯度 $>98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

17.3.3 维生素 D_2 - d_3 内标溶液：100 mg/L。

17.3.4 维生素 D_3 - d_3 内标溶液：100 mg/L。

17.4 标准溶液配制

17.4.1 维生素 D_2 标准储备溶液 (1 000 mg/L)：准确称取 50 mg (精确至 0.1 mg) 维生素 D_2 标准品于小烧杯中, 用无水乙醇溶解并转移至 50 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 混匀。按附录 A 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°C 下避光保存, 保存期 6 个月。标准储备液期间核查方法可参考附录 A。

17.4.2 维生素 D_3 标准储备溶液 (1 000 mg/L)：准确称取 50 mg (精确至 0.1 mg) 维生素 D_3 标准品于小烧杯中, 用无水乙醇溶解并转移至 50 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 混匀。按附录 A 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°C 下避光保存, 保存期 6 个月。标准储备液期间核查方法可参考附录 A。

17.4.3 维生素 D_2 标准中间液 (100 mg/L)：吸取 10.00 mL 维生素 D_2 标准储备溶液于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 混匀。在 -20°C 下避光保存, 保存期 3 个月。准确浓度按校正后的浓度折算。

17.4.4 维生素 D_3 标准中间液 (100 mg/L)：吸取 10.00 mL 维生素 D_3 标准储备溶液于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 混匀。在 -20°C 下避光保存, 保存期 3 个月。准确浓度按校正后的浓度折算。

17.4.5 维生素 D_2 和维生素 D_3 混合标准使用液 (其中维生素 D_2 浓度为 2.00 mg/L、维生素 D_3 浓度为 1.00 mg/L)：分别吸取 2.00 mL 维生素 D_2 标准中间液、1.00 mL 维生素 D_3 标准中间液, 用流动相稀释并定容至 100 mL。在 -20°C 下避光保存, 保存期 1 个月。准确浓度按校正后的浓度折算。

17.4.6 维生素 D_2 - d_3 和维生素 D_3 - d_3 混合内标使用液 (维生素 D_2 - d_3 浓度为 2.00 mg/L, 维生素 D_3 - d_3 浓度为 1.00 mg/L)：分别吸取 200 μL 维生素 D_2 - d_3 内标溶液、100 μL 维生素 D_3 - d_3 内标溶液于同一 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 配制成混合内标使用液。在 -20°C 下避光保存, 保存期 1 个月。

17.4.7 维生素 D 标准系列工作液：分别吸取维生素 D 混合标准使用液 0.10 mL、0.20 mL、0.50 mL、1.00 mL、1.50 mL 和 2.00 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中，各加入维生素 D₂-d₃ 和维生素 D₃-d₃ 混合内标使用液 1.00 mL，用甲醇定容至刻度。此标准系列工作液浓度中维生素 D₂ 浓度分别为 20.0 μg/L、40.0 μg/L、100.0 μg/L、200 μg/L、300 μg/L、400 μg/L，维生素 D₂-d₃ 的浓度为 200 μg/L；维生素 D₃ 浓度分别为 10.0 μg/L、20.0 μg/L、50.0 μg/L、100 μg/L、150 μg/L、200 μg/L，维生素 D₃-d₃ 的浓度为 100 μg/L。临用前配制。

17.5 材料

17.5.1 固相萃取柱：硅胶，6 mL，500 mg。

17.5.2 微孔滤膜：有机系，孔径 0.22 μm。

18 仪器和设备

18.1 液相色谱-串联质谱仪，带电喷雾源。

18.2 天平，感量为 0.1 mg、0.01 g。

18.3 紫外分光光度计，带 1 cm 石英比色皿。

18.4 高速冷冻离心机，转速≥6000 r/min。

18.5 带加热、控温功能的磁力搅拌器或恒温振荡水浴。

18.6 萃取净化振荡器。

18.7 多功能涡旋振荡器。

18.8 旋转蒸发器。

18.9 氮吹仪。

18.10 超声波发生器。

19 分析步骤

19.1 样品前处理

注：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 °C~45 °C），记录加水后的溶液质量 (m_2 ，精确至 0.01 g)。充分溶解混匀，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 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，加入约 5 mL 的温水（约 40 °C~45 °C），置于涡旋振荡器中振荡 10 min，混匀。

19.1.1.3 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

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 0.01 g）至 50 mL 带螺旋盖的离心管，加入约 9.5 mL~8 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 19.1.1.1 先制成浆液，再称取制备后的溶液 10 g（精确至 0.01 g）至 50 mL 带螺旋盖的离心管中。

19.1.1.4 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 2g~5 g（精确至 0.01 g）至 50 mL 带螺旋盖的离心管中，加入约 8 mL-5 mL 的温水（约 40 °C~45 °C），置于涡旋振荡器中振荡 10 min，混匀。

19.1.1.5 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

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。

19.1.1.6 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。

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 19.1.1.5 中描述的 150 mL 平底烧瓶中，加入 400 μ L 维生素 D₂-d₃ 和维生素 D₃-d₃ 混合内标使用液和 1.0 g α -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，磁力搅拌 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 容量瓶中，摇匀，定量分取 25 mL 皂化液于 50 mL 离心管中。

19.1.2.2 含蜂蜡等胶质样品

按 19.1.1.6 中描述的 150 mL 平底烧瓶中，加入 400 μ L 维生素 D₂-d₃ 和维生素 D₃-d₃ 混合内标溶液，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 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，磁力搅拌皂化 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 容量瓶中，摇匀，定量分取 25 mL 皂化液于 50 mL 离心管中。

19.1.2.3 其他食品

于上述 50 mL 离心管中，加入 100 μ L 维生素 D₂-d₃ 和维生素 D₃-d₃ 混合内标使用液，再加入 0.4 g 抗坏血酸，涡旋 1 min，加入 12 mL BHT-乙醇溶液（0.2 g/100 mL），涡旋 30 s，再加入 6 mL 氢氧化钾溶液（50%，w/w），涡旋 30 s 后放入恒温振荡器中，80 °C \pm 2 °C 避光恒温水浴振荡 30 min（如样品组织较为紧密，可每隔 5 min~10 min 取出涡旋 0.5 min），取出放入冷水浴降温（或 25 °C \pm 5 °C，涡旋振荡 16 h \pm 2 h）。

19.1.3 试样提取

向上述离心管中加入 20 mL 正己烷，涡旋提取 3 min，6000 r/min 条件下离心 3 min。转移上层清液到另一个 50 mL 离心管，加入 25 mL 水，轻微晃动数次，在 6000 r/min 条件下离心 3 min，取上层有机相待净化。

19.1.4 试样净化

将硅胶固相萃取柱依次用 8 mL 乙酸乙酯、8 mL 正己烷活化平衡，将上层提取液转移至硅胶柱净化。用 6 mL 乙酸乙酯-正己烷混合溶液（1+19）淋洗，6 mL 乙酸乙酯-正己烷混合溶液（3+17）洗脱。洗脱液在 40 °C 下氮气吹干，加入 1.0 mL 甲醇，超声 30 s 复溶，涡旋 30 s，过 0.22 μ m 微孔滤膜供仪器测定。

注：为防止将界面的水带入硅胶固相萃取柱，可留少许正己烷有机相。

19.2 仪器参考条件

19.2.1 色谱参考条件

- a) 色谱柱：PAH C₁₈柱（柱长100 mm，柱内径2.1 mm，粒径1.8 μm）或相当者；
 b) 柱温：35°C；
 c) 流动相：A相，0.05%甲酸-5 mmol/L甲酸铵水溶液；B相，0.05%甲酸-5 mmol/L甲酸铵甲醇溶液；流动相洗脱梯度见表1。
 d) 流速：0.4 mL/min；
 e) 进样量：10 μL；

表1 流动相洗脱梯度

时间 min	流动相 A%	流动相 B%
0.0	12	88
1.0	12	88
4.0	10	90
5.0	6	94
6.0	6	94
6.1	0	100
8.0	0	100
8.1	12	88
10.0	12	88

19.2.2 质谱参考条件

- a) 电离方式：ESI⁺；
 b) 毛细管电压：3000 V；
 c) 干燥气温度：375 °C；
 d) 多反应监测（MRM）模式。

监测离子对和碰撞能量见表2，质谱图见附录B图B.3。

表2 维生素 D₂ 和 D₃ 监测离子对和碰撞能量

化合物	保留时间 /(min)	母离子 (m/z)	定性子离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)	量子离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)
维生素 D ₂	6.04	397	379 147	5 25	107	29
维生素 D ₂ -d ₃	6.04	400	382 271	4 6	110	22
维生素 D ₃	6.33	385	367 259	7 8	107	25
维生素 D ₃ -d ₃	6.33	388	370 259	3 6	110	19

注：定性离子和定量离子可根据仪器进行调整。

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串联质谱仪中，以标准系列工作液中维生素D₂、维生素D₃的浓度为横坐标，以维生素D₂、维生素D₃与相应同位素内标的峰面积比值为纵坐标绘制维生素D₂、维生素D₃标准曲线。

19.4 试样溶液的测定

19.4.1 定性测定

在同样测试条件下，试样液中维生素D₂、维生素D₃的保留时间与标准工作液中相应的保留时间相比，偏差在±2.5%以内，且检测到的离子的相对丰度，应当与浓度相当的校正标准溶液相对丰度一致。其允许偏差应符合表3要求。

表3定性确证时相对离子丰度的最大允许误差

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

19.4.2 定量测定

将待测样液依次进样，得到待测样液中维生素D₂、维生素D₃与其相应内标物的峰面积比值，根据标准曲线得到测定液中维生素D₂、维生素D₃的浓度。待测样液中的响应值应在标准曲线线性范围内，超过线性范围则应减少取样量，重新按19.1处理后再进样分析。

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

试样中维生素 D₂或维生素 D₃的含量按公式（3）计算：

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

式中：

X——试样中维生素 D₂或维生素 D₃的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

ρ——由标准曲线得到的试样溶液中维生素 D₂或维生素 D₃的浓度，单位为微克每升（μg/L）；

V——定容体积，单位为毫升（mL）；

m——试样的取样量，单位为克（g）；

100——由每克换算为每百克的换算系数；

1 000——由 μg/L 换算为 μg/mL 的换算系数。

计算结果保留三位有效数字。

注：如试样中同时含有维生素 D₂和 D₃，维生素 D 的测定结果以维生素 D₂和 D₃的含量之和计算。

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15 %。

22 其他

当固体样品取样量为2.00 g，定容1mL时，维生素D₂的检出限为0.3μg/100 g，定量限为1.00 μg/100 g；维生素D₃的检出限为0.15 μg/100 g；定量限为0.50 μg/100g。

当液体样品取样量为10.00 g，定容1mL时，维生素D₂的检出限为0.05 μg/100 g，定量限为0.20 μg/100 g；维生素D₃的检出限为0.03 μg/100 g；定量限为0.10 μg/100g。

附录 A

维生素D标准溶液浓度校正方法

A.1 维生素 D₂、维生素 D₃ 标准溶液浓度校正

A.1.1 取维生素 D₂ 标准储备溶液 (1 000 mg/L) 100 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 石英比色杯, 以无水乙醇为空白参比, 按表 A.1 的波长测定其吸光度, 并按附录 A.2 色谱条件测定色谱纯度 (面积归一化法)。

A.1.2 取维生素 D₃ 标准储备溶液 (1 000 mg/L) 100 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 石英比色杯, 以无水乙醇为空白参比, 按表 A.1 的波长测定其吸光度, 并按附录 A.2 色谱条件测定色谱纯度 (面积归一化法)。

表 A.1 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 测定波长及百分吸光系数

目标物	波长(nm)	<i>E</i>
维生素 D ₂	264	475
维生素 D ₃	264	480

维生素 D₂ (或维生素 D₃) 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 D₂ (或维生素 D₃) 标准液的浓度, 单位为微克每毫升 (μg/mL);
A—维生素 D₂ (或维生素 D₃) 标准液的平均紫外吸光值;
E—维生素 D₂ (或维生素 D₃) 的 1% 吸收系数。
P—色谱纯度。

A.2 维生素 D₂、维生素 D₃ 的色谱纯度测定

A.2.1 试样溶液制备: 同 A.1.1 和 A.1.2

A.2.2 色谱条件

A.2.2.1 色谱柱: PAH C₁₈ 柱, 柱长 150 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 3 μm, 或相当者。

A.2.2.2 柱温: 35 °C

A.2.2.3 流动相: 甲醇-水 (95+5), 总运行时间 30 min。

A.2.2.4 流动相流速: 0.4 mL/min。

A.2.2.5 检测波长: 264 nm

A.2.2.6 进样量: 20 μL。

A.2.3 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.2.4 标准溶液纯度色谱图

维生素 D₂、维生素 D₃ 标准溶液纯度测定色谱图见图 A.1、图 A.2。

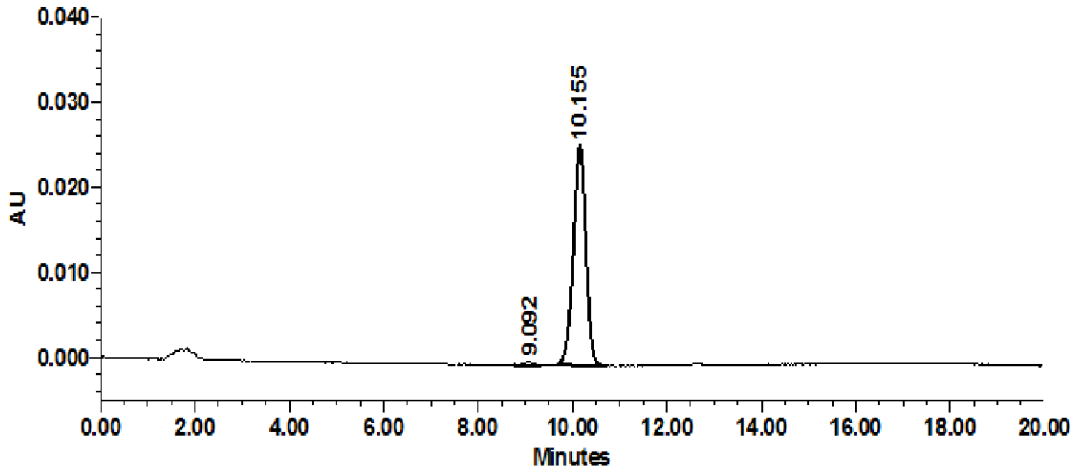


图 A.1 维生素 D₂ 标准溶液 (10 μg/mL) 的纯度测定色谱图

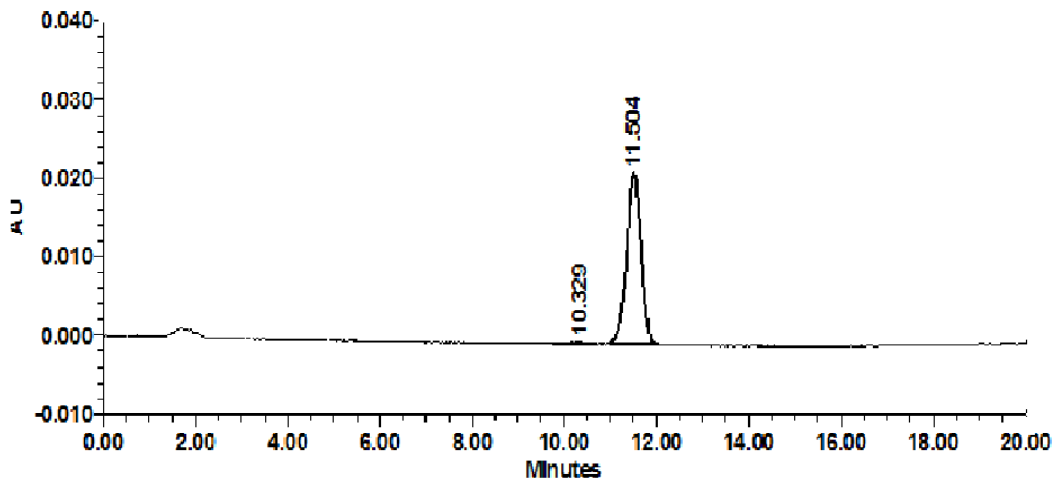


图 A.2 维生素 D₃ 标准溶液 (10 μg/mL) 的纯度测定色谱图

附录 B

维生素 D 标准溶液色谱图

维生素 D 标准溶液（1000 $\mu\text{g/L}$ ）的正向半制备-反相液相色谱图见图 B.1。

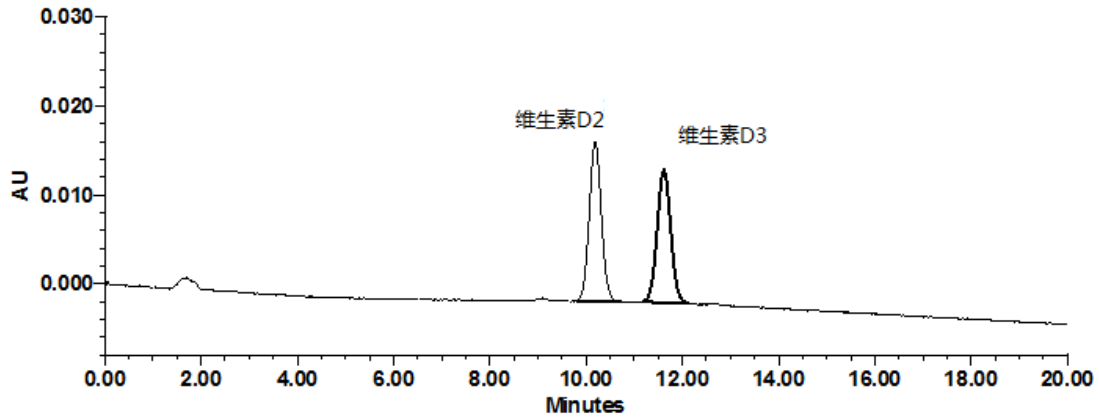


图 B.1 维生素 D 标准溶液（1000 $\mu\text{g/L}$ ）的正相纯化制备-反相液相色谱图

维生素 D 标准溶液（50 $\mu\text{g/L}$ ）的在线柱切换-液相色谱图见图 B.2.1 和 B.2.2。

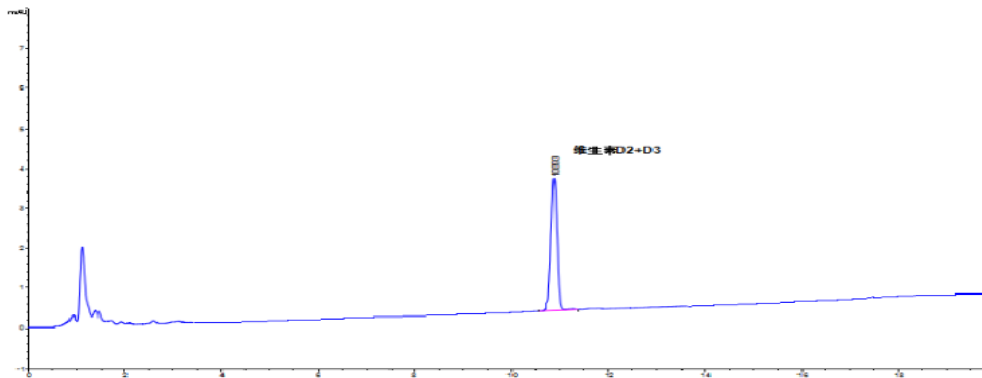


图 B.2.1 维生素 D₂ 和 D₃ 标准溶液（50 $\mu\text{g/L}$ ）一维液相色谱图

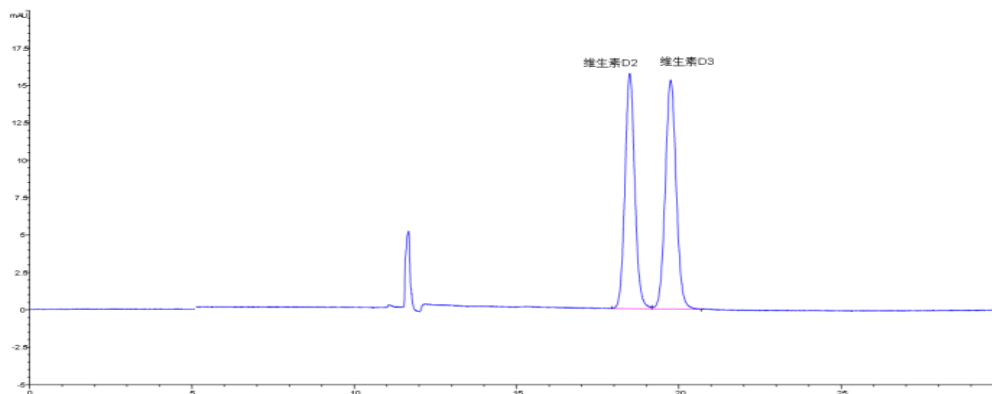


图 B.2.2 维生素 D₂ 和 D₃ 标准溶液（50 $\mu\text{g/L}$ ）二维液相色谱图

维生素 D 和维生素 D-d3 混合标准溶液（100 $\mu\text{g/L}$ ）的液相色谱-串联质谱 MRM 图见图 B.3。

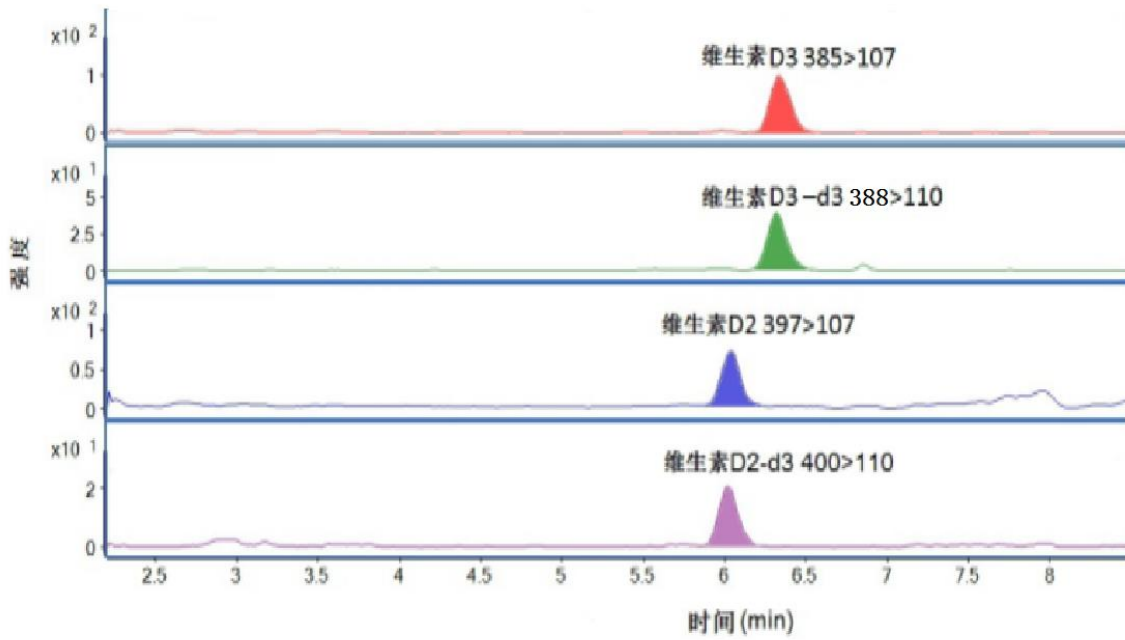


图 B.3 维生素 D 和维生素 D-d3 混合标准溶液（100 $\mu\text{g/L}$ ）的液相色谱-串联质谱 MRM 图

附录 C

在线柱切换-液相色谱系统流路示意图

在线柱切换-液相色谱系统流路示意图见图 C.1。

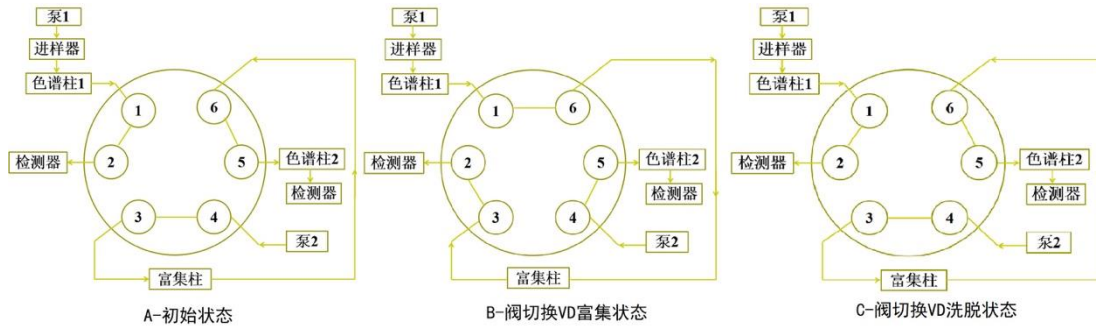


图 C.1 在线柱切换-液相色谱系统流路示意图