



中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××—202×

代替 GB/T 5009.197—2003

保健食品中硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、 烟酰胺和咖啡因的测定

Determination of thiamine, riboflavin, pyridoxine, niacin, niacinamide and
caffeine in health foods

××××-××-××发布

××××-××-××实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

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》的规定起草。

本文件规定了食品质量相关技术要求，食品安全相关要求见有关法律法规、政策和食品安全标准等文件。

本文件代替 GB/T 5009.197—2003《保健食品中盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因的测定》，与 GB/T 5009.197—2003 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了适用范围(见第 1 章,2003 年版的第 1 章)；
- b) 增加了核黄素的测定(见 5.3.2、5.4.2、7.4、7.5、第 8 章和附录 A)；
- c) 更改了试样制备和处理方法(见 7.1、7.2,2003 年版的 5.1)；
- d) 更改了液相色谱参考条件(见 7.3,2003 年版的 5.2)；
- e) 更改了检出限、定量限(见第 10 章,2003 年版的第 1 章)。

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。

本文件由全国特殊食品标准化技术委员会(SAC/TC 466)提出并归口。

本文件起草单位：江中药业股份有限公司、杭州市疾病预防控制中心(杭州市卫生监督所)、江苏艾兰得营养品有限公司、中轻技术创新中心有限公司、浙江新维士生物科技有限公司、健合(中国)有限公司、中国食品发酵工业研究院有限公司、江苏华膳健康科技有限公司、东鹏饮料(集团)股份有限公司、安利(中国)日用品有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、通标标准技术服务有限公司、汤臣倍健股份有限公司、河北晨光检测技术服务有限公司。

本文件主要起草人：陈芳、金铨、徐小明、武竹英、郑敏敏、严俊、钟其顶、安红梅、黎勇、迟华忠、王道兵、胡海娥、彭先武、黄志明、潘敏尧、罗诗慧、张晓芳、徐浩然、刘洋、常俊、徐军、钟顺好、张沛霞、吴祥骞、李学莉、刘春丽、王校冬、杨潞芳、黄正华、贺瑞坤、王文昌、岳红卫。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2003 年首次发布为 GB/T 5009.197—2003；
- 本次为第一次修订。

保健食品中硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、 烟酰胺和咖啡因的测定

1 范围

本文件描述了保健食品中硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于片剂、粉剂、硬胶囊、软胶囊、口服液、饮料、凝胶糖果等剂型形态保健食品中硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因的测定。

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

试样经 20% 甲醇-0.1% 磷酸溶液提取和稀释后，经高效液相色谱柱分离、紫外检测器检测，以保留时间定性，外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用色谱纯试剂。

5.1 试剂

5.1.1 水，按 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1.2 甲醇(CH₃OH)。

5.1.3 乙腈(CH₃CN)。

5.1.4 1-癸烷磺酸钠(C₁₀H₂₁NaO₃S)。

5.1.5 磷酸(H₃PO₄):分析纯。

5.1.6 盐酸(HCl):分析纯。

5.1.7 酸性磷酸酶:酶活力≥0.5 U/mg。

5.2 试剂配制

5.2.1 20% 甲醇-0.1% 磷酸溶液:量取 200 mL 甲醇(5.1.2), 1 mL 磷酸(5.1.5), 用水稀释至 1 000 mL, 超声

5 min,混匀。

5.2.2 盐酸溶液(0.1 mol/L):移取 9 mL 的盐酸(5.1.6),用水稀释至 1 000 mL,混匀。

5.2.3 盐酸溶液(1:1 体积比):量取 100 mL 的盐酸(5.1.6),缓缓倒入 100 mL 水中,混匀。

5.2.4 流动相 A:5 mmol/L 1-癸烷磺酸钠溶液(含 0.15%磷酸)。称取 1.22 g 1-癸烷磺酸钠(5.1.4),用 950 mL 水溶解,加入 1.5 mL 磷酸(5.1.5),用水稀释至 1 000 mL,超声 5 min,混匀。

5.2.5 流动相 B:5 mmol/L 1-癸烷磺酸钠-90%乙腈溶液(含 0.15%磷酸)。称取 1.22 g 1-癸烷磺酸钠(5.1.4),用 100 mL 水溶解,加入 1.5 mL 磷酸(5.1.5),加入到 900 mL 乙腈(5.1.3)中,超声 5 min,混匀。

5.3 标准物质或标准样品

5.3.1 盐酸硫胺素标准品($C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$,CAS 号:67-03-8):纯度不低于 98%,或经国家认证并授予证书的标准物质或标准样品。

5.3.2 核黄素标准品($C_{17}H_{20}N_4O_6$,CAS 号:83-88-5):纯度不低于 98%,或经国家认证并授予证书的标准物质或标准样品。

5.3.3 烟酸标准品($C_6H_5NO_2$,CAS 号:59-67-6):纯度不低于 98%,或经国家认证并授予证书的标准物质或标准样品。

5.3.4 烟酰胺标准品($C_6H_6N_2O$,CAS 号:98-92-0):纯度不低于 98%,或经国家认证并授予证书的标准物质或标准样品。

5.3.5 盐酸吡哆醇标准品($C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$,CAS 号:58-56-0):纯度不低于 98%,或经国家认证并授予证书的标准物质或标准样品。

5.3.6 咖啡因标准品($C_8H_{10}N_4O_2$,CAS 号:58-08-2):纯度不低于 99%,或经国家认证并授予证书的标准物质或标准样品。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 硫胺素标准储备溶液(1 mg/mL):称取盐酸硫胺素标准品(5.3.1)12.7 mg(精确至 0.1 mg,相当于硫胺素 10 mg),用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.2.2)溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,混匀后转移入棕色玻璃容器中,在 2 °C~8 °C 冰箱中贮存,有效期 3 个月。

5.4.2 核黄素标准储备溶液(0.1 mg/mL):称取核黄素标准品(5.3.2)10 mg(精确至 0.1 mg),加入 2 mL 盐酸溶液(5.2.3),超声溶解后,立即用水定容至 100 mL 容量瓶中,混匀后转移入棕色玻璃容器中,在 2 °C~8 °C 冰箱中贮存,有效期 3 个月。

5.4.3 烟酸标准储备溶液(1 mg/mL):称取烟酸标准品(5.3.3)10 mg(精确至 0.1 mg),用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.2.2)溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,混匀后转移入棕色玻璃容器中,在 2 °C~8 °C 冰箱中贮存,有效期 3 个月。

5.4.4 烟酰胺标准储备溶液(1 mg/mL):称取烟酰胺标准品(5.3.4)10 mg(精确至 0.1 mg),用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.2.2)溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,混匀后转移入棕色玻璃容器中,在 2 °C~8 °C 冰箱中贮存,有效期 3 个月。

5.4.5 吡哆醇标准储备溶液(1 mg/mL):称取盐酸吡哆醇标准品(5.3.5)12.2 mg(精确至 0.1 mg,相当于吡哆醇 10 mg),用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.2.2)溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,混匀后转移入棕色玻璃容器中,在 2 °C~8 °C 冰箱中贮存,有效期 3 个月。

5.4.6 咖啡因标准储备溶液(1 mg/mL):称取咖啡因标准品(5.3.6)10 mg(精确至 0.1 mg),用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.2.2)溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,混匀后转移入棕色玻璃容器中,在 2 °C~8 °C 冰箱中贮存,有效期 3 个月。

5.4.7 混合标准中间溶液(50 μg/mL):分别移取硫胺素标准储备溶液(5.4.1)、烟酸标准储备溶液(5.4.3)、烟酰胺标准储备溶液(5.4.4)、吡哆醇标准储备溶液(5.4.5)、咖啡因标准储备溶液(5.4.6)各

2.5 mL,核黄素标准储备溶液(5.4.2)25 mL于50 mL容量瓶中,以20%甲醇-0.1%磷酸溶液(5.2.1)定容。混匀后转移入棕色玻璃容器中,临用现配。

5.5 系列标准工作溶液配制

分别移取混合标准中间溶液(5.4.7)0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL、1 mL、2 mL、5 mL至5 mL容量瓶中,用20%甲醇-0.1%磷酸溶液(5.2.1)定容。该标准系列工作溶液浓度分别为1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL。临用现配。

5.6 材料

滤膜:0.45 μm,有机系。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器或相当者。

6.2 天平:感量0.1 mg和0.01 g。

6.3 超声波清洗器。

6.4 涡旋混合器。

6.5 恒温水浴锅。

6.6 高速粉碎机。

6.7 高速离心机:转速不低于8 000 r/min。

7 分析步骤

7.1 试样制备

不同剂型形态试样制备步骤如下:

- a) 片剂:取不少于20片或不少于10 g样品,经高速粉碎机或研钵磨成粉状,混匀,封存备用;
- b) 粉剂:取不少于5袋或不少于10 g样品,混匀,封存备用;
- c) 硬胶囊:取不少于20粒或不少于5 g样品,除去外壳经高速粉碎机或研钵磨成粉状,混匀,封存备用;
- d) 软胶囊:取不少于20粒或不少于5 g样品,除去外壳取其内容物混匀,封存备用;
- e) 口服液、饮料:取不少于20 mL样品充分混匀,封存备用;
- f) 凝胶糖果:取样品不少于20粒或不少于10 g样品(对于不同色泽或风味混装的试样,则按色泽或风味均匀取样),深度冷冻粉碎或剪碎,混匀,封存备用。

7.2 试样处理

7.2.1 固体或半固体试样

称取0.2 g~2 g(精确至0.01 g)混合均匀的固体或半固体试样于50 mL离心管中,加入20 mL 20%甲醇-0.1%磷酸溶液(5.2.1),称重,涡旋混匀,于(98±2)℃水浴中加热30 min,超声提取15 min,冷却后称重,用20%甲醇-0.1%磷酸溶液(5.2.1)补足失重,混匀后,取适量以8 000 r/min离心5 min,上清液经滤膜(5.6)过滤,待测。

7.2.2 液体试样

移取1.0 mL或称取1 g(精确至0.01 g)混合均匀的液体试样于玻璃容器中,加20%甲醇-0.1%磷

酸溶液(5.2.1)适量,超声 15 min,放冷至室温,转移至 10 mL 容量瓶中,加 20%甲醇-0.1%磷酸溶液(5.2.1)至刻度,摇匀。取适量以 8 000 r/min 离心 5 min,上清液经滤膜(5.6)过滤,待测。

注 1: 对于添加形式为核黄素磷酸钠的试样,称样后,加入 10 mg 酸性磷酸酶(5.1.7)及 20%甲醇-0.1%磷酸溶液(5.2.1)20 mL,pH 调至 4.5,45 °C 酶解 16 h 后,离心、过滤膜(5.6)后待进样。

注 2: 根据试样中组分的含量,适当增加或减少稀释倍数 f ,使组分的质量浓度处于标准曲线测定范围内。

7.3 色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: 填料为含极性内嵌基团的十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(粒径 5 μm , 4.6 mm \times 150 mm),或等效色谱柱;
- b) 流动相: A 相为 5 mmol/L1-癸烷磺酸钠溶液(含 0.15%磷酸)(5.2.4),B 相为 5 mmol/L1-癸烷磺酸钠-90%乙腈溶液(含 0.15%磷酸)(5.2.5),梯度洗脱程序见表 1;
- c) 流速: 1.0 mL/min;
- d) 柱温: 30 °C;
- e) 进样体积: 10 μL ;
- f) 检测波长: 硫胺素、核黄素、烟酸和烟酰胺为 260 nm,咖啡因和吡哆醇为 280 nm。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	A %	B %
0	85	15
11	85	15
20	50	50
20.5	20	80
25.5	20	80
26	85	15
41	85	15

7.4 标准曲线的制作

将系列标准工作溶液(5.5)分别注入高效液相色谱仪中,测定各组分的峰面积,以相应标准工作溶液的质量浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因标准溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)高效液相色谱图见附录 A 中图 A.1。

7.5 试样溶液的测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中,得到相应峰面积,根据标准曲线,以外标法计算待测试样溶液中硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺、咖啡因的质量浓度。试样中硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因高效液相色谱图见图 A.2 和图 A.3。

平行做两份试验。

8 结果计算与表述

试样中硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺、咖啡因各组分的含量按公式(1)计算:

$$X_i = \frac{\rho_i \times V \times 100}{m \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X_i —— 试样中单一组分的含量, 固体或半固体试样单位为毫克每百克(mg/100 g), 液体试样单位为毫克每百毫升(mg/100 mL);
- ρ_i —— 由标准曲线得到的试样溶液中单一组分的质量浓度, 单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- V —— 试样的稀释体积, 单位为毫升(mL);
- m —— 试样取样量, 单位为克或毫升(g 或 mL);
- f —— 试样溶液的稀释倍数;
- 100、1 000 —— 单位换算系数。

结果保留三位有效数字。

注: 试样中测定的磺胺素含量乘以换算系数 1.271、1.234, 分别得到盐酸磺胺素、硝酸磺胺素的含量; 吡哆醇含量乘以换算系数 1.216, 得到盐酸吡哆醇的含量。

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应超过算术平均值的 10 %。

10 检出限与定量限

固体或半固体试样: 当称样量为 0.2 g, 提取体积为 20 mL 时, 磺胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因的检出限为 3 mg/100 g, 定量限为 10 mg/100 g。

液体试样: 当取样量为 1 mL 或称样量为 1 g, 定容体积为 10 mL 时, 磺胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因的检出限为 0.3 mg/100 mL 或 0.3 mg/100 g, 定量限为 1 mg/100 mL 或 1 mg/100 g。

附录 A

(资料性)

硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因标准溶液和试样高效液相色谱图

A.1 硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因标准溶液(10 μg/mL)高效液相色谱图见图 A.1。

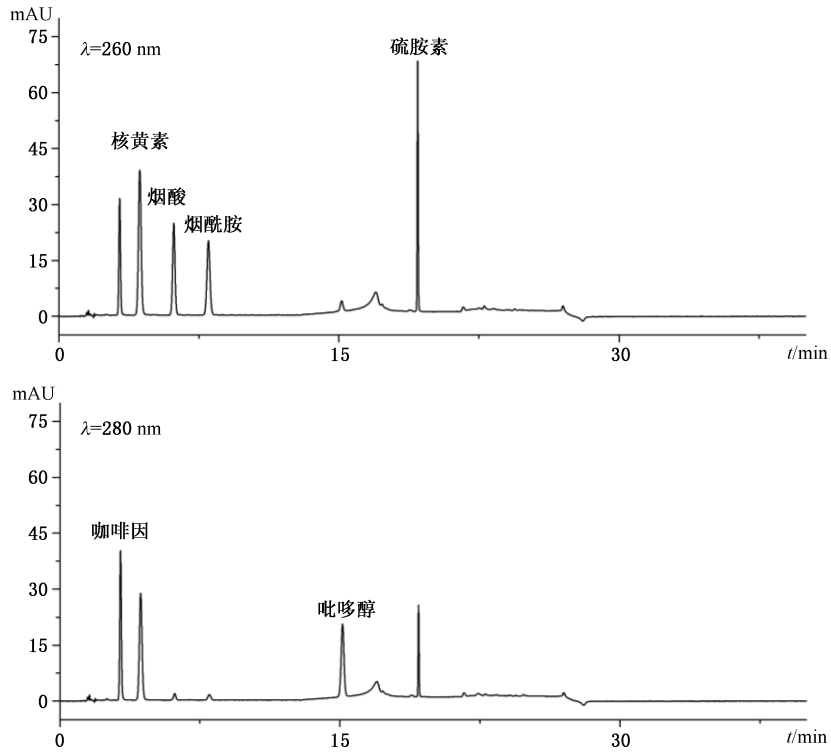


图 A.1 硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因标准溶液(10 μg/mL)高效液相色谱图

A.2 试样中硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因高效液相色谱图见图 A.2 和图 A.3。

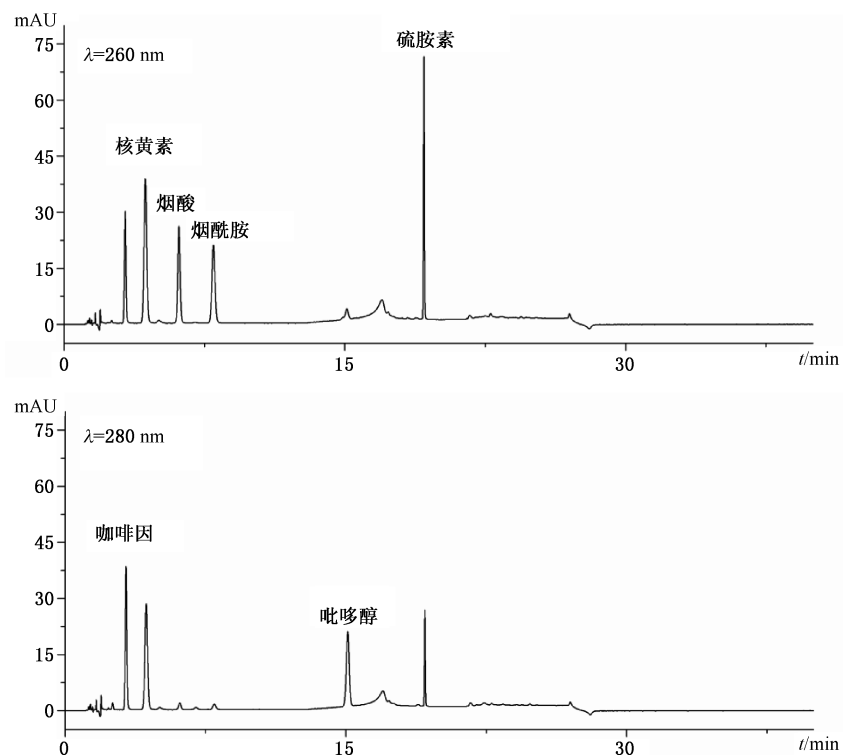


图 A.2 试样(片剂)中硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因高效液相色谱图

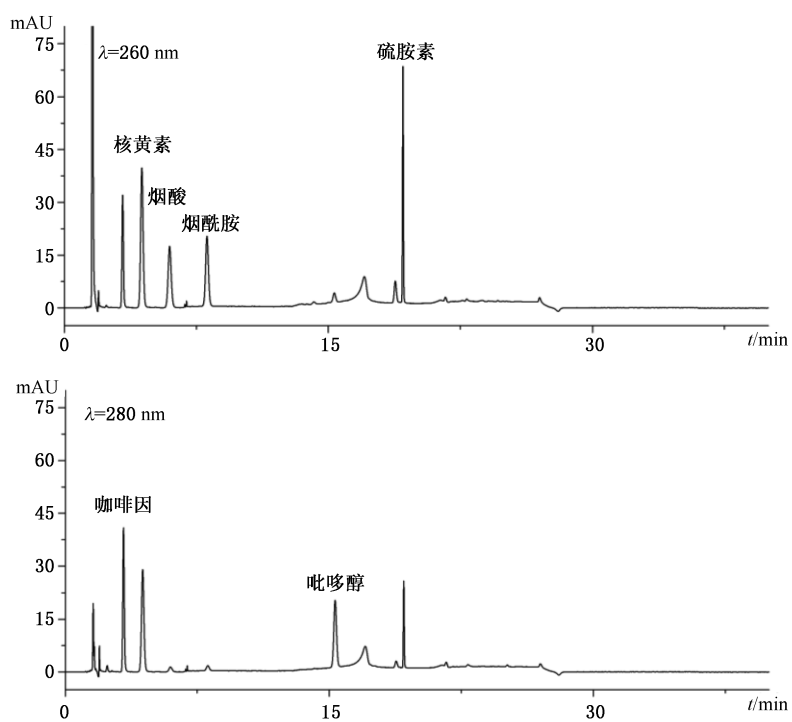


图 A.3 试样(凝胶糖果)中硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因高效液相色谱图