



中华人民共和国国家标准

GB 5009.296—2023

食品安全国家标准 食品中维生素 D 的测定

2023-09-06 发布

2024-03-06 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“食品中维生素 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:

- 标准名称修改为《食品安全国家标准 食品中维生素 D 的测定》;
- 增加了在线柱切换-反相液相色谱法;
- 增加了样品预制备方法;
- 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。

第一法正相色谱净化-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-反相液相色谱法适用于食品中维生素 D₂ 和维生素 D₃ 的测定。

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 正相色谱净化-反相液相色谱法

2 原理

试样经氢氧化钾乙醇溶液皂化,液液萃取净化、浓缩后,用正相高效液相色谱仪通过硅胶柱将维生素 D 与其他杂质分离,将收集的馏分浓缩后,再经反相色谱柱分离维生素 D₂ 与维生素 D₃,紫外检测器检测,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 α-淀粉酶(CAS 号:9000-90-2,中温淀粉酶,来源于芽孢杆菌属):酶活力≥1.5 U/mg。

3.1.5 氢氧化钾(KOH)。

3.1.6 正己烷(C₆H₁₄)。

3.1.7 甲醇(CH₄O):色谱纯。

3.1.8 无水硫酸钠(Na₂SO₄)。

3.1.9 环己烷(C₆H₁₂)。

3.1.10 异丙醇(C₃H₈O)。

3.1.11 石油醚:沸程为 30℃~60℃。

3.2 试剂配制

3.2.1 氢氧化钾溶液(50%,质量分数):称取 50 g 氢氧化钾,溶于 50 g 水中,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。

3.2.4 甲醇-水溶液(19+1):将甲醇和水按 19:1 的体积比混合均匀,超声脱气。

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物质。

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物质。

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,将该储备溶液装至棕色试剂瓶中,密封后在-18℃下避光保存,保存期 6 个月。

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,将该储备溶液装至棕色试剂瓶中,密封后在-18℃下避光保存,保存期 6 个月。

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,用无水乙醇稀释至刻度,混匀。在-18℃下避光保存,保存期 3 个月。

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,用无水乙醇稀释至刻度,混匀。在-18℃下避光保存,保存期 3 个月。

3.4.5 标准系列工作溶液

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,加甲醇稀释至刻度,混匀。此标准系列工作溶液质量浓度分别为 50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L、400 μg/L、600 μg/L、1 000 μg/L,维生素 D₃ 内标质量浓度为 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,加甲醇稀释至刻度,混匀。此标准系列工作溶液质量浓度分别为 50 μg/L、100 μg/L、200 μg/L、400 μg/L、600 μg/L、1 000 μg/L,维生素 D₂ 内标质量浓度为 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,加甲醇稀释至刻度,混匀。此标准系列工作溶液质量浓度分别为 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 广泛 pH 试纸:pH 范围 1~14。

3.5.2 玻璃层析柱:柱径 2 cm~3 cm,柱长 10 cm~15 cm。

3.5.3 微孔滤膜:有机系,孔径 0.45 μm 。

4 仪器和设备

4.1 正相高效液相色谱仪:带紫外检测器,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 恒温振荡器。

4.7 旋转蒸发仪。

4.8 恒温水浴锅。

4.9 氮吹浓缩仪。

4.10 超声波清洗器。

4.11 分液漏斗萃取振荡器。

5 分析步骤

5.1 样品前处理

处理过程应避免紫外光照射。

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、乳及乳制品、冷冻饮品和饮料

固体试样:称取均质后的试样约 25 g(m_1 ,精确至 0.01 g)至 250 mL 干燥玻璃瓶中,加入约 200 mL 温水(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。称取制备后的浆液 20 g~50 g(m_3 ,精确至 0.01 g)至 150 mL 平底烧瓶中。按式(1)计算样品质量(m)。

$$m = \frac{m_1 \times m_3}{m_2} \dots\dots\dots (1)$$

液体试样:称取摇匀后的试样 20 g~50 g(m ,精确至 0.01 g)至 150 mL 平底烧瓶中。

5.1.1.2 谷物及其制品、焙烤食品、婴幼儿谷类辅助食品及其他含淀粉试样

称取均质后的试样 5 g~10 g(m ,精确至 0.01 g)于 150 mL 平底烧瓶中,加入约 20 mL 温水(40 $^{\circ}\text{C}$ ~45 $^{\circ}\text{C}$),混匀。婴幼儿谷类辅助食品可参考 5.1.1.1 先制成浆液,再称取制备后的浆液 20 g~50 g(m_3 ,精确至 0.01 g)至 150 mL 平底烧瓶中。

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 20 g~50 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(40 °C~45 °C),混匀。

5.1.2 试样皂化

5.1.2.1 婴幼儿配方食品、特殊医学用途配方食品、乳及乳制品、冷冻饮品、饮料和其他食品

于 5.1.1.1 和 5.1.1.3 所述平底烧瓶中,加入 100 μ L 内标使用溶液(10.0 mg/L),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),混匀,再加入 20 mL~30 mL 氢氧化钾溶液(50%,质量分数),边加边振摇,混匀后于磁力搅拌器或恒温振荡器中皂化,温度 80 °C \pm 2 °C,时间 30 min(或温度 25 °C \pm 5 °C,时间 16 h \pm 2 h),皂化后立即用冷水冷却至室温。

5.1.2.2 谷物及其制品、焙烤食品、婴幼儿谷类辅助食品及其他含淀粉试样

于 5.1.1.2 所述平底烧瓶中,加入 100 μ L 内标使用溶液(10.0 mg/L)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%,质量分数),边加边振摇,混匀后于磁力搅拌器或恒温振荡器中皂化,温度 80 °C \pm 2 °C,时间 30 min(或温度 25 °C \pm 5 °C,时间 16 h \pm 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,皂化条件选择温度 25 °C \pm 5 °C,皂化时间 16 h \pm 2 h。

5.1.3 试样提取与浓缩

5.1.3.1 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,振荡萃取 5 min,将下层溶液转移至另一 250 mL 分液漏斗中,加入 50 mL 石油醚重复萃取 1 次~2 次,合并石油醚层。用约 150 mL 水洗涤石油醚层,去除下层水相,重复洗涤至少 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)。

5.1.3.2 试样浓缩

将洗涤后的石油醚层缓慢流过预先填充厚度 3 cm~5 cm 无水硫酸钠粉末的玻璃层析柱,滤入 250 mL 旋转蒸发瓶或氮吹浓缩管中,用 15 mL 石油醚冲洗分液漏斗及玻璃层析柱内无水硫酸钠 2 次,合并入蒸发瓶或氮吹浓缩管中,并将其接在旋转蒸发仪或氮吹浓缩仪上,于 40 °C 水浴中旋蒸或氮吹浓缩,待石油醚剩余约 1 mL 时,取下蒸发瓶或浓缩管,用石油醚将浓缩液转移至 2 mL 容量瓶中,氮吹至近干,用正己烷定容至刻度,过 0.45 μ m 微孔滤膜,供正相高效液相色谱净化。

5.2 仪器参考条件

5.2.1 维生素 D 待测液的净化

5.2.1.1 正相色谱参考条件

正相色谱参考条件如下:

- 色谱柱:硅胶柱,柱长 250 mm,柱内径 4.6 mm,粒径 5 μ m,或相当者;
- 流动相:异丙醇-环己烷-正己烷溶液(2+125+125);
- 流速:1.0 mL/min;
- 波长:264 nm;
- 柱温:35 °C;
- 进样量:500 μ L。

5.2.1.2 正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 200 μ L 于 10 mL 具塞试管中, 40 $^{\circ}$ C 水浴中氮气吹至近干。残渣用 10 mL 正己烷振荡溶解。取该溶液 500 μ L 注入正相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。

5.2.1.3 试样待测液正相色谱净化

将 500 μ L 待测液注入正相液相色谱仪中, 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 馏分于试管中。将试管置于 40 $^{\circ}$ C 水浴中氮气吹至近干, 准确加入 1.0 mL 甲醇, 振荡溶解残渣, 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。

5.2.2 反相液相色谱参考条件

反相液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: 多环芳烃(PAH) C₁₈ 柱, 柱长 150 mm, 柱内径 4.6 mm, 粒径 5 μ m, 或相当者;
- b) 流动相: 甲醇-水溶液(19+1);
- c) 流速: 1.0 mL/min;
- d) 波长: 264 nm;
- e) 柱温: 35 $^{\circ}$ C;
- f) 进样量: 100 μ L。

5.3 标准曲线的制作

将标准系列工作溶液分别注入反相液相色谱仪中, 内标法以标准系列工作溶液中维生素 D₂ (或维生素 D₃) 与其对应内标的质量比为横坐标, 以维生素 D₂ (或维生素 D₃) 的峰面积与其对应内标的峰面积比为纵坐标, 绘制标准曲线。外标法以标准系列工作溶液中维生素 D₂ (或维生素 D₃) 的浓度为横坐标, 维生素 D₂ (或维生素 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 中图 B.1。

5.4 试样溶液的测定

5.4.1 定性分析

将试样溶液注入液相色谱仪中进行测定, 同样测试条件下, 试样溶液中维生素 D₂、维生素 D₃ 的保留时间与标准工作溶液中相应的保留时间相比, 偏差应在 $\pm 2.5\%$ 以内。

5.4.2 定量测定

将试样溶液注入反相液相色谱仪中, 得到维生素 D₂ (或维生素 D₃) 的峰面积, 根据相应的标准曲线得到试样溶液中维生素 D₂ (或维生素 D₃) 的浓度。试样溶液中的响应值应在标准曲线线性范围内, 超过线性范围, 可适当减少取样量重新测定。

5.5 空白试验

不称取试样, 按试样的皂化、提取和浓缩分析步骤操作, 应不含有干扰待测组分的物质。内标法需要做不加内标的样品试验, 确认加入内标的可行性。

6 分析结果的表述

试样中维生素 D₂(或维生素 D₃)的含量,内标法按式(2)和式(3)计算,外标法按式(4)计算。

$$X = \frac{N \times 100}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots (2)$$

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($\mu\text{g}/100\text{ g}$);

N ——试样溶液中维生素 D₂(或维生素 D₃)与其对应内标的峰面积比值对应的质量,单位为纳克(ng),按式(3)计算;

100 ——由每克换算为每百克的换算系数;

m ——试样的取样量,单位为克(g);

1 000 ——由 ng 换算为 μg 的换算系数。

$$N = K \times N_{\text{is}} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

K ——从标准曲线查得的质量比;

N_{is} ——试样中加入的内标质量,单位为纳克(ng)。

$$X = \frac{c \times V_1 \times V_3 \times 100}{m \times V_2 \times 1\,000} \times f \dots\dots\dots (4)$$

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($\mu\text{g}/100\text{ g}$);

c ——根据标准曲线得到的进样溶液中维生素 D₂(或维生素 D₃)的质量浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

V_1 ——正相色谱净化时试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);

V_3 ——反相色谱测定时试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);

100 ——由每克换算为每百克的换算系数;

m ——试样的取样量,单位为克(g);

V_2 ——正相色谱净化时试样溶液取用体积,单位为毫升(mL);

1 000 ——由 $\mu\text{g}/\text{L}$ 换算为 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的换算系数;

f ——稀释因子。

计算结果以重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

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

7 精密度

在重复性条件下获得的 2 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 10.00 g,正相进样液定容 2 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 50.00 g, 正相进样液定容 2 mL 时, 维生素 D₂、维生素 D₃ 的检出限为 0.12 μg/100 g, 定量限为 0.4 μg/100 g。

第二法 在线柱切换-反相液相色谱法

9 原理

试样经氢氧化钾乙醇溶液皂化, 液液萃取或固相萃取净化、浓缩后, 一维液相色谱通过 C₈ 柱将维生素 D 与其他杂质分离后, 由柱切换阀转入二维液相色谱中, 通过 C₁₈ 柱分离维生素 D₂ 和维生素 D₃, 紫外检测器检测, 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。

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, 来源于芽孢杆菌属): 酶活力 ≥ 1.5 U/mg。
- 10.1.5 氢氧化钾(KOH)。
- 10.1.6 正己烷(C₆H₁₄)。
- 10.1.7 乙酸乙酯(C₄H₈O₂)。
- 10.1.8 乙腈(C₂H₃N): 色谱纯。
- 10.1.9 甲醇(CH₄O): 色谱纯。

10.2 试剂配制

- 10.2.1 氢氧化钾溶液(50%, 质量分数): 同 3.2.1。
- 10.2.2 BHT-乙醇溶液(0.2 g/100 mL): 同 3.2.2。
- 10.2.3 乙醇-水溶液(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-甲醇溶液(3+1): 将乙腈和甲醇按 3:1 的体积比混合均匀, 超声脱气。
- 10.2.6 甲醇-水溶液(1+19): 将甲醇和水按 19:1 的体积比混合均匀, 超声脱气。
- 10.2.7 乙腈-水溶液(19+1): 将乙腈和水按 19:1 的体积比混合均匀, 超声脱气。

10.3 标准品

- 10.3.1 维生素 D₂ 标准品: 同 3.3.1。
- 10.3.2 维生素 D₃ 标准品: 同 3.3.2。

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): 同 3.4.1。

10.4.2 维生素 D₃ 标准储备溶液(1 000 mg/L):同 3.4.2。

10.4.3 维生素 D₂ 标准溶液中间液(10.0 mg/L):同 3.4.3。

10.4.4 维生素 D₃ 标准溶液中间液(10.0 mg/L):同 3.4.4。

10.4.5 维生素 D₂ 标准使用溶液(1.00 mg/L):吸取 10.00 mL 维生素 D₂ 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-18℃下避光保存,保存期 1 个月。

10.4.6 维生素 D₃ 标准使用溶液(1.00 mg/L):吸取 10.00 mL 维生素 D₃ 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-18℃下避光保存,保存期 1 个月。

10.4.7 标准系列工作溶液的配制

10.4.7.1 当用维生素 D₃ 作内标测定维生素 D₂ 时:分别吸取维生素 D₂ 标准使用溶液(1.00 mg/L) 0.25 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 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(1.00 mg/L)2.00 mL,用初始流动相稀释至刻度,混匀。此标准系列工作溶液质量浓度分别为 2.5 μg/L、5.0 μg/L、10.0 μg/L、20 μg/L、50 μg/L、100 μg/L,维生素 D₃ 内标质量浓度为 20 μg/L。临用前配制。

10.4.7.2 当用维生素 D₂ 作内标测定维生素 D₃ 时:分别吸取维生素 D₃ 标准使用溶液(1.00 mg/L) 0.25 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 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(1.00 mg/L)2.00 mL,用初始流动相稀释至刻度,混匀。此标准系列工作溶液质量浓度分别为 2.5 μg/L、5.0 μg/L、10.0 μg/L、20 μg/L、50 μg/L、100 μg/L,维生素 D₂ 内标质量浓度为 20 μg/L。临用前配制。

10.4.7.3 当用外标法同时测定维生素 D₂ 和维生素 D₃ 时:分别吸取维生素 D₂ 标准使用溶液(1.00 mg/L)、维生素 D₃ 标准使用溶液(1.00 mg/L)各 0.25 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL 和 10.00 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中,用初始流动相稀释至刻度,混匀。此标准系列工作溶液质量浓度分别为 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,带紫外检测器。

11.2 天平,感量为 0.1 mg、0.001g、0.01 g。

11.3 紫外分光光度计,带 1 cm 石英比色皿。

11.4 磁力搅拌器,带加热、控温功能。

11.5 恒温振荡器。

11.6 多功能振荡器,带适用于 50 mL 离心管的适配器,转速>1 500 r/min。

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

11.8 旋转蒸发仪。

11.9 氮吹浓缩仪。

11.10 超声波清洗器。

12 分析步骤

12.1 样品前处理

处理过程应避免紫外光照射。

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、乳及乳制品、冷冻饮品和饮料

固体试样:按 5.1.1.1 制备试样溶液,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。按式(1)计算粉末样品质量(m)。

液体试样:称取摇匀后的试样 5 g(m ,精确至 0.01 g)至 50 mL 带螺旋盖的离心管中。

12.1.1.2 谷物及其制品、焙烤食品、婴幼儿谷类辅助食品及其他含淀粉试样

称取均质后的试样 5 g~10 g(m ,精确至 0.01 g)至 150 mL 平底烧瓶中,加入约 20 mL 温水(40 °C~45 °C),置于磁力搅拌器中搅拌 10 min,混匀。婴幼儿谷类辅助食品参考 5.1.1.1 先制成浆液,再称取制备后的浆液 20 g~50 g(m_3 ,精确至 0.01 g)至 150 mL 平底烧瓶中。

12.1.1.3 油脂及其制品、肉及肉制品、水产及其制品、蛋及蛋制品

称取均质后的试样 0.5 g~2 g(m ,精确至 0.001 g)至 50 mL 带螺旋盖的离心管,加入 3 mL~4.5 mL 的温水(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 5 g(m_3 ,精确至 0.01 g)至 50 mL 带螺旋盖的离心管中。

12.1.1.4 水果、蔬菜、豆类、食用菌、坚果和籽类

称取均质后的试样 5 g(m ,精确至 0.01 g)至 50 mL 带螺旋盖的离心管中。干制品称取均质后的试样 0.5 g~2 g(m ,精确至 0.001 g)至 50 mL 带螺旋盖的离心管中,加入 3 mL~4.5 mL 的温水(40 °C~45 °C),置于涡旋振荡器中振荡 10 min,混匀。

12.1.1.5 含蜂蜡等黏稠胶质试样和其他食品

称取均质后的试样 2 g~20 g(m ,精确至 0.01 g)至 150 mL 平底烧瓶中。

12.1.2 试样皂化

12.1.2.1 婴幼儿配方食品、特殊医学用途配方食品、乳及乳制品、冷冻饮品和饮料等试样

按 12.1.1.1、12.1.1.3、12.1.1.4 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 100 μ L 内标使用溶液(1.00 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),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%,质量分数),涡旋混匀后于恒温振荡器中皂化,温度 80 °C \pm 2 °C,时间 30 min(或温度 25 °C \pm 5 °C,时间 16 h \pm 2 h),皂化后立即用冷水冷却至室温,加入 5 mL 乙醇-水溶液(2+3),混匀,待提取净化。

12.1.2.2 谷物及其制品、焙烤食品、婴幼儿谷类辅助食品及其他含淀粉试样

在 12.1.1.2 中描述的 150 mL 平底烧瓶中,加入 500 μ L 内标使用溶液 (1.00 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),加入 1.0 g α -淀粉酶,放入 1 颗磁力搅拌子,加上瓶塞,放入 60 $^{\circ}$ C 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%,质量分数),边加边振摇,混匀后于磁力搅拌器或恒温振荡器中皂化,温度 80 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C,时间 30 min (或温度 25 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C,时间 16 h \pm 2 h),皂化后立即用冷水冷却至室温。用乙醇-水溶液 (2+3) 将皂化液转移至 100 mL 的容量瓶中,定容至刻度,摇匀,准确移取 20 mL 皂化液于 50 mL 的离心管中,待提取净化。

12.1.2.3 含蜂蜡等黏稠胶质试样和其他食品

在 12.1.1.5 中描述的 150 mL 平底烧瓶中,加入 500 μ L 内标使用溶液 (1.00 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),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,混匀后加入约 20 mL 的温水 (40 $^{\circ}$ C~45 $^{\circ}$ C),混匀,再加入 10 mL~20 mL 氢氧化钾溶液 (50%,质量分数),边加边振摇,混匀后于磁力搅拌器或恒温振荡器中皂化,温度 80 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C,时间 30 min (或温度 25 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C,时间 16 h \pm 2 h),皂化后立即用冷水冷却至室温。用乙醇-水溶液 (2+3) 将皂化液转移至 100 mL 的容量瓶中,定容至刻度,摇匀,准确移取 20 mL 皂化液于 50 mL 的离心管中,待提取净化。

注:如用外标法,皂化条件选择温度 25 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C,皂化时间 16 h \pm 2 h。

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 水,混匀,加入 20 mL 乙酸乙酯-正己烷混合溶液 (3+2),振荡提取 10 min,8 000 r/min 离心 3 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),再次振荡提取 10 min,高速离心机 8 000 r/min 离心 3 min,合并上层有机相于同一离心管中,加水至 45 mL,振荡 30 s,8 000 r/min 离心 3 min,将上层有机相转移至旋蒸瓶中,于 40 $^{\circ}$ C 旋蒸至约 1 mL,用乙酸乙酯-正己烷混合溶液 (3+2) 转移至 10 mL 试管中,置于氮吹仪中吹至近干,用约 4 mL 乙腈-甲醇溶液 (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 μ m 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)。

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,8 000 r/min 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,过柱速度控制在不超过 60 滴/min。用 10 mL 甲醇-水溶液 (1+19) 洗涤离心管,涡旋 30 s,8 000 r/min 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。上样完毕,负压抽干固相萃取柱,用 8 mL 乙腈-甲醇溶液 (3+1) 分 3 次洗脱,洗脱液加水定容至 10 mL,过 0.45 μ 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。

12.2 仪器参考条件

仪器参考条件如下:

- a) 一维色谱柱: C₈ 柱, 柱长 150 mm, 柱内径 4.6 mm, 粒径 5 μm, 或相当者;
- b) 二维色谱柱: 多环芳烃(PAH)C₁₈ 柱, 柱长 150 mm, 柱内径 4.6 mm, 粒径 3 μm, 或相当者;
- c) 柱温: 35 °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(19+1, 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) 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~10.95 min, 阀状态 1; 10.95 min~11.45 min, 阀状态 2; 11.45 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: C₁₈ 柱, 柱长 5 mm, 柱内径 4.6 mm, 粒径 4 μm, 或相当者。

12.3 标准曲线的制作

将标准系列工作溶液分别注入高效液相色谱仪中, 以标准系列工作溶液中维生素 D₂ (或维生素 D₃) 的浓度为横坐标, 以维生素 D₂ (或维生素 D₃) 的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。维生素 D₂ 和维生素 D₃ 标准溶液的一维色谱图参见图 B.2, 二维色谱图参见图 B.3。

12.4 试样溶液的测定

12.4.1 定性分析

将试样溶液注入液相色谱仪中, 同样测试条件下, 试样溶液中维生素 D₂、维生素 D₃ 的保留时间与标准工作溶液中相应的保留时间相比, 偏差应在 ±2.5% 以内。

12.4.2 定量测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中, 得到维生素 D₂ (或维生素 D₃) 的峰面积, 根据标准曲线得到待测液中维生素 D₂ (或维生素 D₃) 的浓度。待测试样溶液中的响应值应在标准曲线线性范围内, 超过线性范围, 可以适当减少取样量重新测定。

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。内标法需要做不加内标的样品试验, 确认加入内标的可行性。

13 分析结果的表述

试样中维生素 D₂ (或维生素 D₃) 的含量, 内标法按式(2)和式(3)计算, 外标法按式(5)计算。

$$X = \frac{c \times V \times 100}{m \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots (5)$$

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);

c —— 根据标准曲线得到的进样溶液中维生素 D₂ (或维生素 D₃) 的质量浓度, 单位为微克每升

($\mu\text{g/L}$);

V ——进样溶液定容体积,单位为毫升(mL);

100 ——由每克换算为每百克的换算系数;

m ——试样的取样量,单位为克(g);

1 000 ——由 $\mu\text{g/L}$ 换算为 $\mu\text{g/mL}$ 的换算系数;

f ——稀释因子。

计算结果以重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

如试样中同时含有维生素 D_2 和维生素 D_3 ,维生素 D 的测定结果以维生素 D_2 和维生素 D_3 的含量之和计算。

14 精密度

在重复性条件下获得的 2 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 0.50 g,定容 5.00 mL 时,维生素 D_2 、维生素 D_3 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 5.00 mL 时,维生素 D_2 、维生素 D_3 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

试样加入维生素 D_2 和维生素 D_3 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,固相萃取柱净化、浓缩后,通过 C_{18} 柱将维生素 D_2 、维生素 D_3 与其他杂质分离,串联质谱检测,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(C_2H_6O):色谱纯。

17.1.2 抗坏血酸($C_6H_8O_6$)。

17.1.3 2,6-二叔丁基对甲酚($C_{15}H_{24}O$):简称 BHT。

17.1.4 氢氧化钾(KOH)。

17.1.5 正己烷(C_6H_{14})。

17.1.6 α -淀粉酶(CAS 号:9000-90-2,中温淀粉酶,来源于芽孢杆菌属):酶活力 $>1.5 \text{ U/mg}$ 。

17.1.7 甲醇(CH_4O):色谱纯。

17.1.8 无水硫酸钠(Na_2SO_4)。

17.1.9 乙酸乙酯($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)。

17.1.10 甲酸(CH_2O_2):色谱纯。

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

17.2 试剂配制

17.2.1 氢氧化钾溶液(50%,质量分数):同 3.2.1。

17.2.2 BHT-乙醇溶液(0.2 g/100 mL):同 3.2.2。

17.2.3 乙醇-水溶液(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 1 000 mL 烧杯中,加入 1 000 mL 水溶解,再加入 0.5 mL 甲酸,混匀,过滤膜,超声脱气。

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 1 000 mL 烧杯中,加入 1 000 mL 甲醇溶解,再加入 0.5 mL 甲酸,混匀,过滤膜,超声脱气。

17.3 标准品

17.3.1 维生素 D_2 标准品:同 3.3.1。

17.3.2 维生素 D_3 标准品:同 3.3.2。

17.3.3 维生素 $\text{D}_2\text{-d}_3$ 内标溶液:100 mg/L。

17.3.4 维生素 $\text{D}_3\text{-d}_3$ 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):同 3.4.1。

17.4.2 维生素 D_3 标准储备溶液(1 000 mg/L):同 3.4.2。

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 -18°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 -18°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 质量浓度为 2.00 mg/L、维生素 D_3 质量浓度为 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 -18°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 $\text{D}_2\text{-d}_3$ 和维生素 $\text{D}_3\text{-d}_3$ 混合内标使用液(维生素 $\text{D}_2\text{-d}_3$ 质量浓度为 2.00 mg/L,维生素 $\text{D}_3\text{-d}_3$ 质量浓度为 1.00 mg/L):分别吸取 200 μL 维生素 $\text{D}_2\text{-d}_3$ 内标溶液、100 μL 维生素 $\text{D}_3\text{-d}_3$ 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 标准系列工作溶液: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 $\text{D}_2\text{-d}_3$ 和维生素 $\text{D}_3\text{-d}_3$ 混合内标使用液 1.00 mL,用甲醇定容至刻度。此标准系列工作溶液浓度中维生素 D_2 质量浓度分别为 20.0 $\mu\text{g/L}$ 、40.0 $\mu\text{g/L}$ 、100.0 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 、300 $\mu\text{g/L}$ 、400 $\mu\text{g/L}$,维生素 $\text{D}_2\text{-d}_3$ 的质量浓度为 200 $\mu\text{g/L}$;维生素 D_3 质量浓度分别为 10.0 $\mu\text{g/L}$ 、20.0 $\mu\text{g/L}$ 、50.0 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、150 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$,维生素 $\text{D}_3\text{-d}_3$ 的质量浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 。临用前配制。

17.5 材料

17.5.1 固相萃取柱:硅胶基质,6 mL,500 mg,或相当者。

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,带电喷雾离子源。

18.2 天平,感量为 0.1 mg、0.001 g、0.01 g。

18.3 紫外分光光度计,带 1 cm 石英比色皿。

18.4 磁力搅拌器,带加热、控温功能。

18.5 恒温振荡器。

18.6 多功能振荡器,使用适用于 50 mL 离心管的适配器,转速 $\geq 1\,500$ r/min。

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

18.8 旋转蒸发仪。

18.9 氮吹浓缩仪。

18.10 超声波清洗器。

19 分析步骤

19.1 样品前处理

处理过程应避免紫外光照射。

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、乳及乳制品、冷冻饮品和饮料

固体试样:按 5.1.1.1 制备试样溶液,称取制备后的溶液 10 g(m_3 ,精确至 0.01 g)至 50 mL 带螺旋盖的离心管中。并按式(1)计算粉末样品质量(m)。

液体试样:称取摇匀后的试样 10 g(m ,精确至 0.01 g)至 50 mL 带螺旋盖的离心管中。

19.1.1.2 谷物及其制品、焙烤食品、婴幼儿谷类辅助食品及其他含淀粉试样

称取均质后的试样 5 g~10 g(m ,精确至 0.01 g)至 150 mL 平底烧瓶中,加入约 20 mL 温水(40 $^{\circ}\text{C}$ ~45 $^{\circ}\text{C}$),置于磁力搅拌器中搅拌 10 min,混匀。婴幼儿谷类辅助食品等难均质的试样,可参考 5.1.1.1 先制成浆液,再称取制备后的浆液 20 g~50 g(m_3 ,精确至 0.01 g)至 150 mL 平底烧瓶中。

19.1.1.3 油脂及其制品、肉及肉制品、水产及其制品、蛋及蛋制品

称取均质后的试样 0.5 g~2 g(m ,精确至 0.001 g)至 50 mL 带螺旋盖的离心管,加入 8 mL~9.5 mL 的温水(40 $^{\circ}\text{C}$ ~45 $^{\circ}\text{C}$),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 10 g(m_3 ,精确至 0.01 g)至 50 mL 带螺旋盖的离心管中。

19.1.1.4 水果、蔬菜、豆类、食用菌、坚果和籽类

称取均质后的试样 10 g(m ,精确至 0.01 g)至 50 mL 带螺旋盖的离心管中。干制品称取均质后的

试样 0.5 g~2 g(精确至 0.001 g)至 50 mL 带螺旋盖的离心管,加入 8 mL~9.5 mL 的温水(40 °C~45 °C),置于涡旋振荡器中振荡 10 min,混匀。

19.1.1.5 含蜂蜡等黏稠胶质试样和其他食品

称取均质后的试样 2 g~20 g(*m*,精确至 0.01 g)至 150 mL 平底烧瓶。

19.1.2 试样皂化

19.1.2.1 婴幼儿配方食品、特殊医学用途配方食品、乳及乳制品、冷冻饮品和饮料等试样

按 19.1.1.1、19.1.1.3、19.1.1.4 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 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 10 mL BHT-乙醇溶液(0.2 g/100 mL),涡旋 30 s,再加入 5 mL 氢氧化钾溶液(50%,质量分数),涡旋混匀后于恒温振荡器中皂化,温度 80 °C \pm 2 °C,时间 30 min(或温度 25 °C \pm 5 °C,时间 16 h \pm 2 h),皂化后立即用冷水冷却至室温。

19.1.2.2 谷物及其制品、焙烤食品、婴幼儿谷类辅助食品及其他含淀粉试样

在 19.1.1.2 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 混合内标使用液以及 1.0 g α -淀粉酶,放入 1 颗磁力搅拌子,加上瓶塞,放入 60 °C 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%,质量分数),边加边振摇,混匀后于磁力搅拌器或恒温振荡器中皂化,温度 80 °C \pm 2 °C,时间 30 min(或温度 25 °C \pm 5 °C,时间 16 h \pm 2 h),皂化后立即用冷水冷却至室温。用乙醇-水溶液(2+3)将皂化液转移至 100 mL 的容量瓶中,定容至刻度,摇匀,准确移取 25 mL 皂化液于 50 mL 的离心管中。

19.1.2.3 含蜂蜡等胶质样品和其他食品

在 19.1.1.5 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(40 °C~45 °C),混匀。再加入 10 mL~20 mL 氢氧化钾溶液(50%,质量分数),边加边振摇,混匀后于磁力搅拌器或恒温振荡器中皂化,温度 80 °C \pm 2 °C,时间 30 min(或温度 25 °C \pm 5 °C,时间 16 h \pm 2 h),皂化后立即用冷水冷却至室温。用乙醇-水溶液(2+3)将皂化液转移至 100 mL 容量瓶中,摇匀,准确移取 25 mL 皂化液于 50 mL 离心管中。

19.1.3 试样提取

向上述离心管中加入 20 mL 正己烷,振荡提取 3 min,8 000 r/min 离心 3 min。转移上层清液到另一个 50 mL 离心管,加入 25 mL 水,振荡 30 s,在 8000 r/min 条件下离心 3 min,待净化。

19.1.4 试样净化

将固相萃取柱依次用 8 mL 乙酸乙酯、8 mL 正己烷活化平衡,将上层提取液转移至固相萃取柱净化。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。洗脱液置于 40 °C 下氮吹浓缩装置吹至近干,加入 1.0 mL 甲醇,超声 30 s,涡旋 30 s,过 0.22 μ m 微孔滤膜供仪器测定。

注:为防止将水带入固相萃取柱,上层提取液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

色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：多环芳烃(PAH) C_{18} 柱，柱长 100 mm，内径 2.1 mm，粒径 1.8 μm ，或相当者；
- b) 柱温：35℃；
- 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	10	90
1.0	10	90
4.0	6	94
6.0	6	94
6.1	0	100
10.0	0	100
10.1	10	90
12.0	10	90

19.2.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 电离方式：ESI⁺；
- b) 毛细管电压：3 kV；
- c) 干燥气温度：375℃；
- d) 多反应监测(MRM)模式。

监测离子对和碰撞能量见表 2，质谱图见图 B.4。

表 2 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 监测离子对和碰撞能量

化合物	保留时间 min	母离子 m/z	定性离子		定量离子	
			m/z	碰撞能量 eV	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

表 2 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 监测离子对和碰撞能量 (续)

化合物	保留时间 min	母离子 m/z	定性离子		定量离子	
			m/z	碰撞能量 eV	m/z	碰撞能量 eV
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

将标准系列工作溶液分别注入液相色谱-串联质谱仪中,以标准系列工作溶液中维生素 D₂ 或维生素 D₃ 的浓度与相应同位素内标的浓度比值为横坐标,以维生素 D₂ 或维生素 D₃ 与相应同位素内标的峰面积比值为纵坐标,分别绘制维生素 D₂、维生素 D₃ 标准曲线。维生素 D₂ 和维生素 D₃ 标准溶液的色谱图参见图 B.3。

19.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱-串联质谱仪中进行测定。

19.4.1 定性分析

在同样测试条件下,试样溶液中维生素 D₂、维生素 D₃ 的保留时间与标准工作溶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%~50%	>10%~20%	≤10%
允许的最大偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

19.4.2 定量测定

将试样溶液依次进样,得到试样溶液中维生素 D₂ 或维生素 D₃ 与其相应内标物的峰面积比值,根据标准曲线得到试样溶液中维生素 D₂ 或维生素 D₃ 的量。试样溶液中的响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围,可以适当减少取样量重新测定。

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。

19.6 分析结果的表述

试样中维生素 D₂ (或维生素 D₃) 的含量,按式(6)和式(7)计算。

$$X = \frac{N \times 100}{m \times 1\,000}$$

.....(6)

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 ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) ;

N ——试样溶液中维生素 D₂ (或维生素 D₃) 与其同位素内标的峰面积比值对应的质量, 单位为纳克 (ng), 按式 (7) 计算;

100 ——由每克换算为每百克的换算系数;

m ——试样的取样量, 单位为克 (g);

1 000 ——由 ng 换算为 μg 的换算系数。

$$N = K \times N_{\text{is}} \quad \dots\dots\dots (7)$$

式中：

K ——从标准曲线查得的质量比;

N_{is} ——试样中加入的内标的质量, 单位为纳克 (ng)。

计算结果以重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的算术平均值表示, 结果保留 3 位有效数字。

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

19.7 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

19.8 其他

当固体试样取样量为 2.00 g、定容 1.00 mL 时, 维生素 D₂ 的检出限为 0.3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 定量限为 1.00 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 维生素 D₃ 的检出限为 0.15 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 定量限为 0.50 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 。

当液体试样取样量为 10.00 g、定容 1.00 mL 时, 维生素 D₂ 的检出限为 0.06 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 定量限为 0.20 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; 维生素 D₃ 的检出限为 0.03 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 定量限为 0.10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 。

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 石英比色皿,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 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 石英比色皿,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 A.2 色谱条件测定色谱纯度(面积归一化法)。

维生素 D₂(或维生素 D₃)的浓度按式(A.1)计算。

$$X = \frac{A \times 10^4}{E_{1\text{ cm}}^{1\%}} \times P \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:
X —— 维生素 D₂(或维生素 D₃)标准液的质量浓度,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_{1 cm}^{1%} —— 维生素 D₂(或维生素 D₃)的百分吸光系数;
P —— 色谱纯度。

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	E _{1 cm} ^{1%}
维生素 D ₂	264	475
维生素 D ₃	264	480

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,柱内径 4.6 mm,粒径 3 μm,或相当者。
- A.2.2.2 柱温: 35 ℃。
- 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 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,乙醇试剂空白测定色谱图见图 A.3。

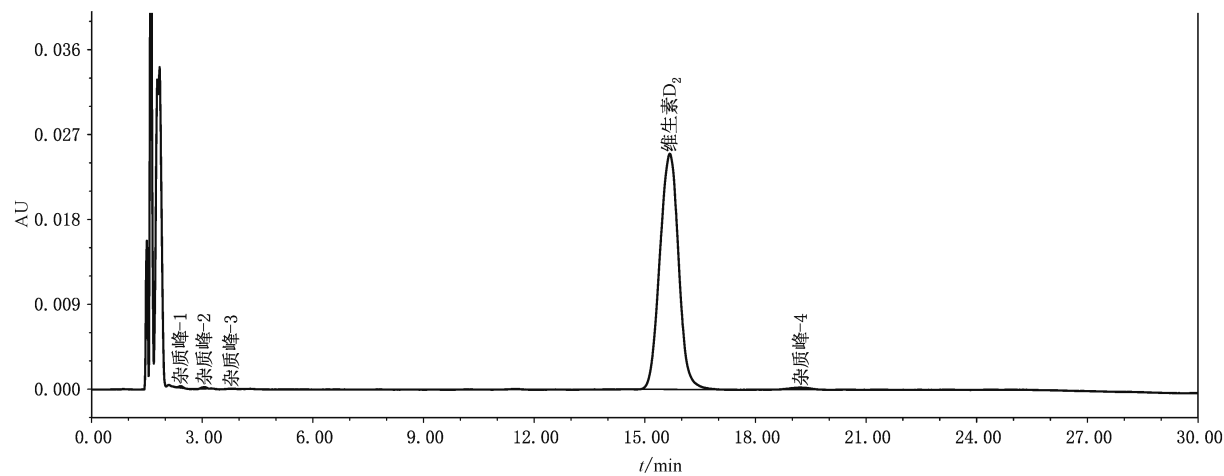


图 A.1 维生素 D₂ 标准溶液(10 μg/mL)的纯度测定色谱图

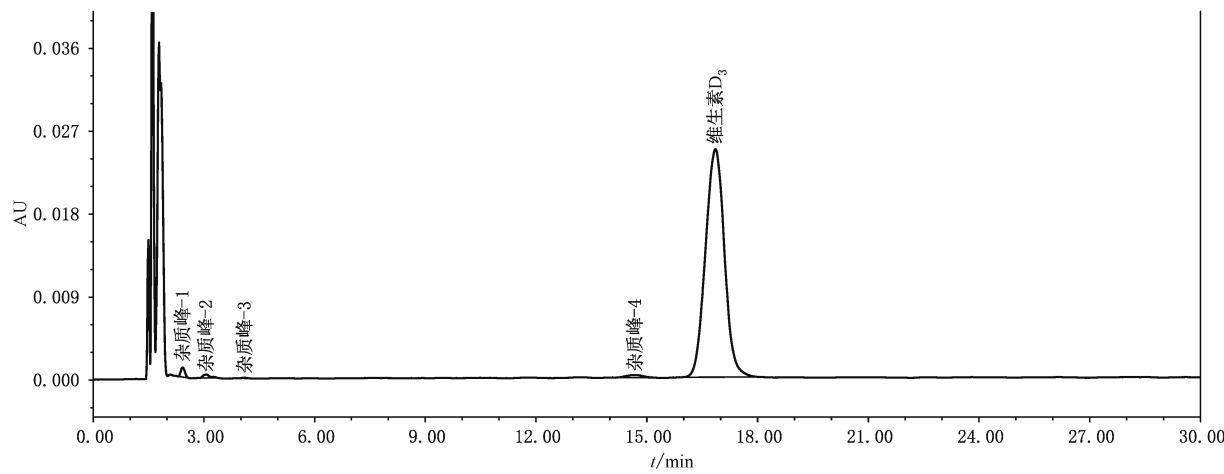


图 A.2 维生素 D₃ 标准溶液(10 μg/mL)的纯度测定色谱图

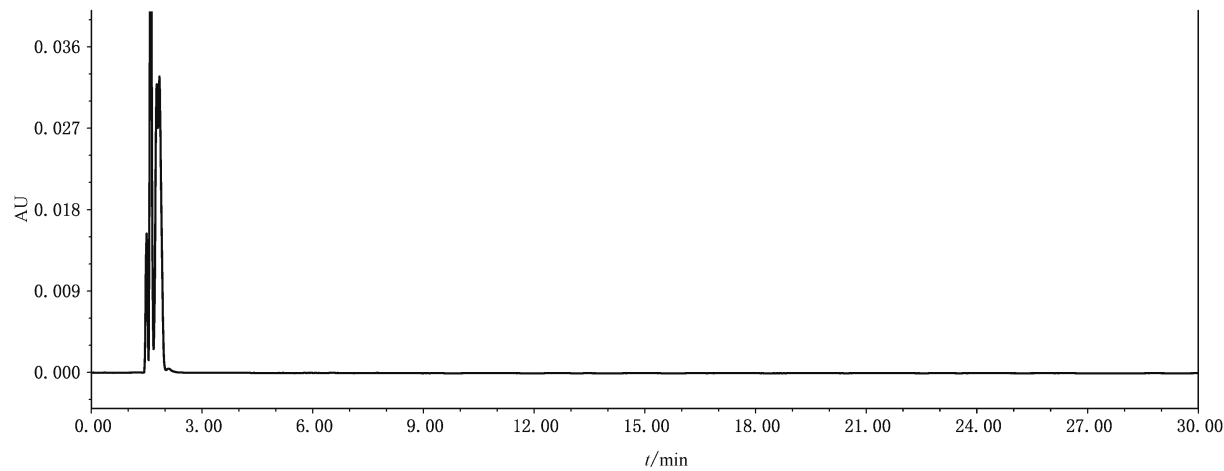


图 A.3 乙醇试剂空白测定色谱图

附 录 B
维生素 D 标准溶液色谱图

维生素 D 标准溶液(维生素 D₂ 和维生素 D₃ 质量浓度为 1 000 μg/L)的正相色谱净化-反相液相色谱图见图 B.1。

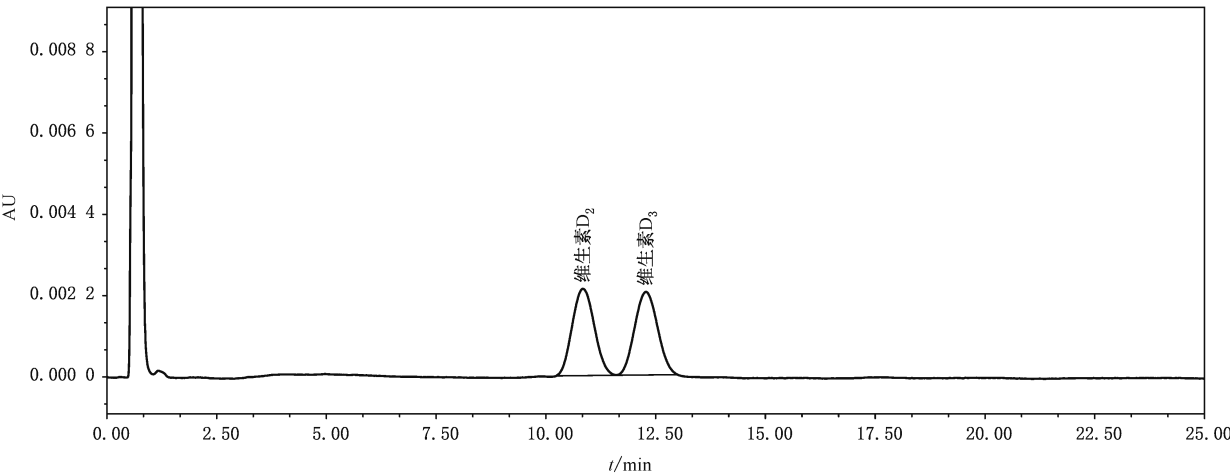


图 B.1 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 标准溶液(1 000 μg/L)的正相色谱净化-反相液相色谱图

维生素 D 标准溶液(50 μg/L)的在线柱切换-反相液相色谱图见图 B.2 和图 B.3。

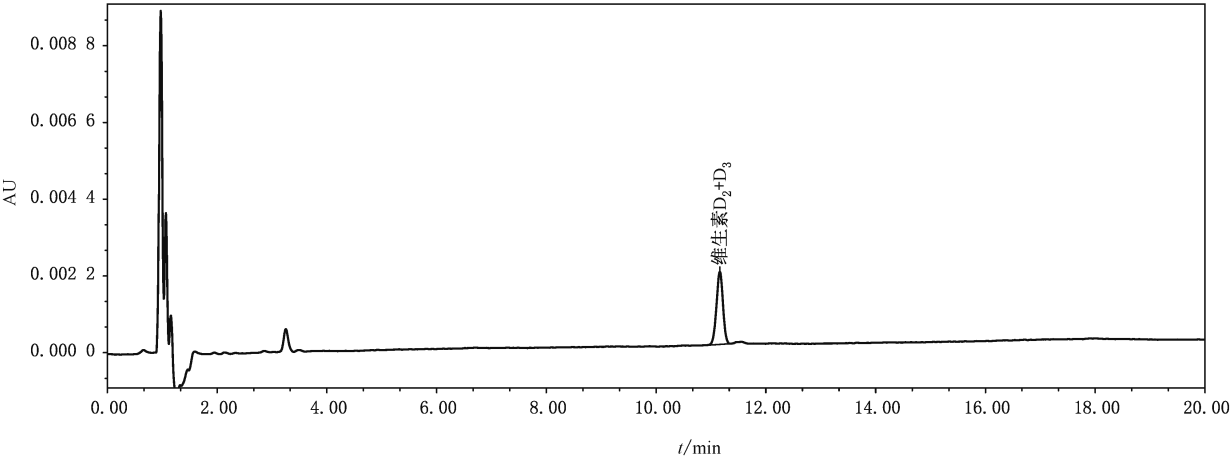


图 B.2 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 标准溶液(50 μg/L)一维液相色谱图

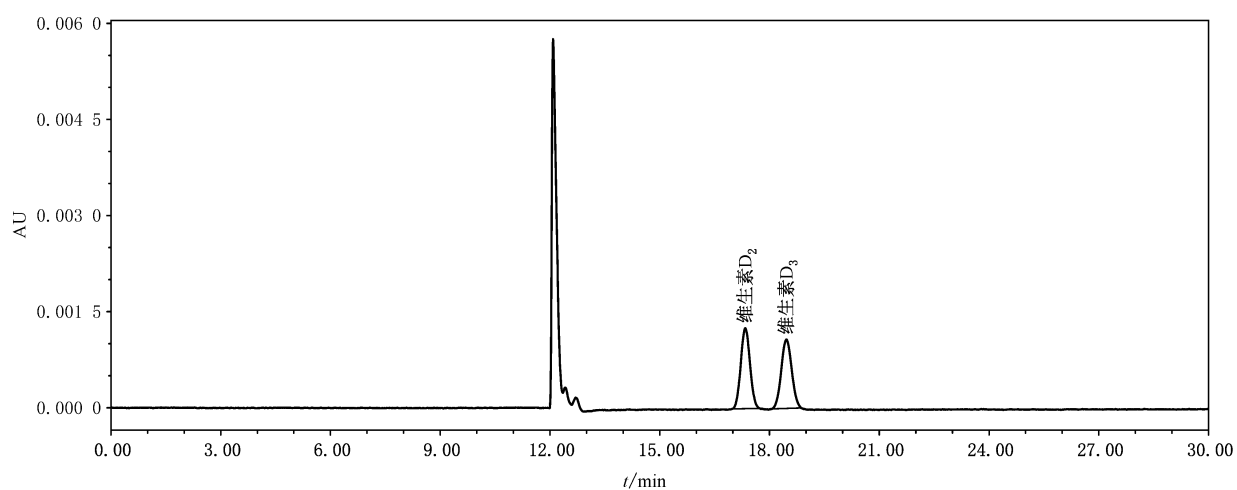


图 B.3 维生素 D₂ 和维生素 D₃ 标准溶液(50 µg/L)二维液相色谱图

维生素 D 和维生素 D-d₃ 混合标准溶液(100 µg/L)的液相色谱-串联质谱 MRM 图见图 B.4。

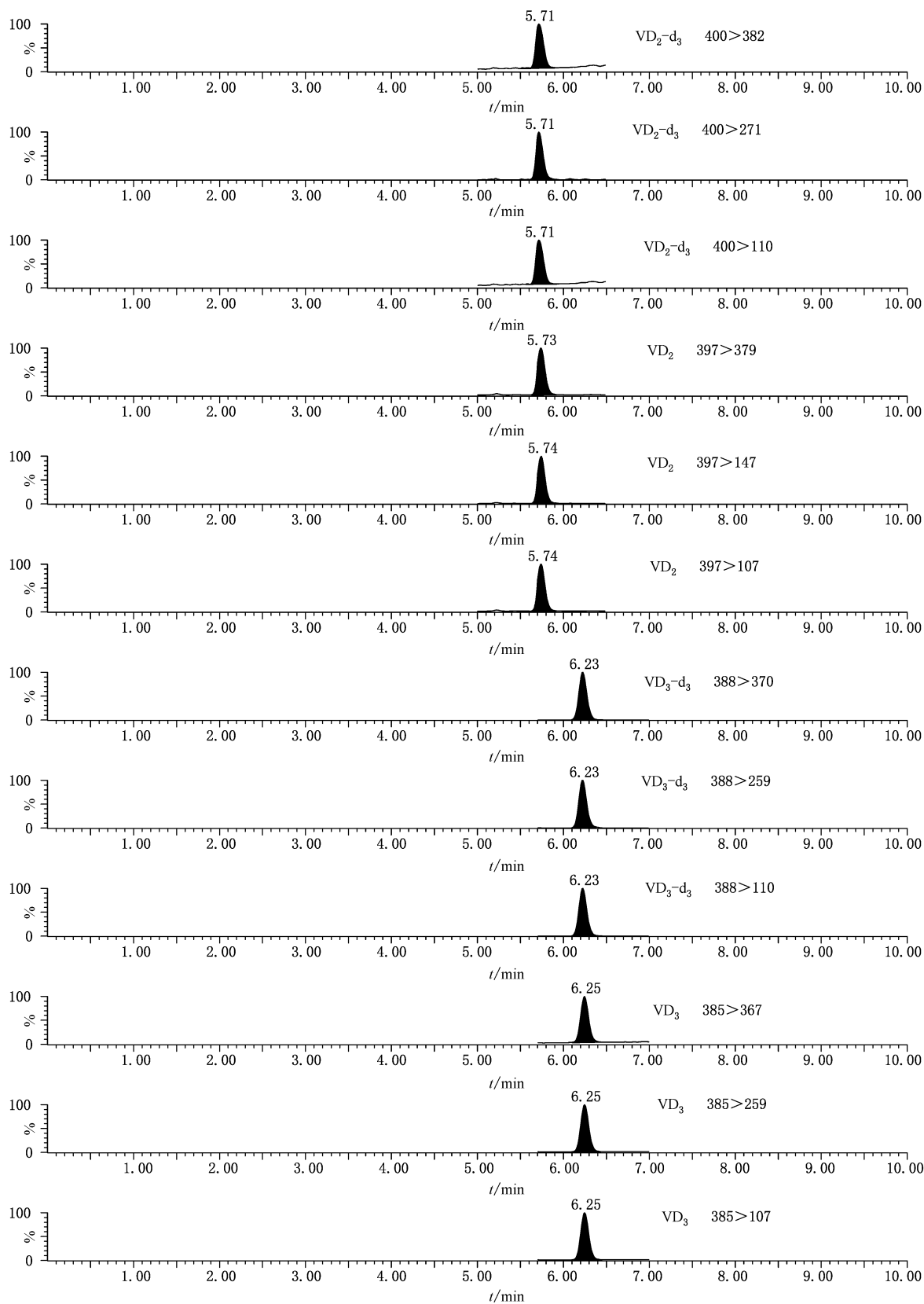


图 B.4 维生素 D 和维生素 D₃ 混合标准溶液(100 μg/L)的液相色谱-串联质谱 MRM 图

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。

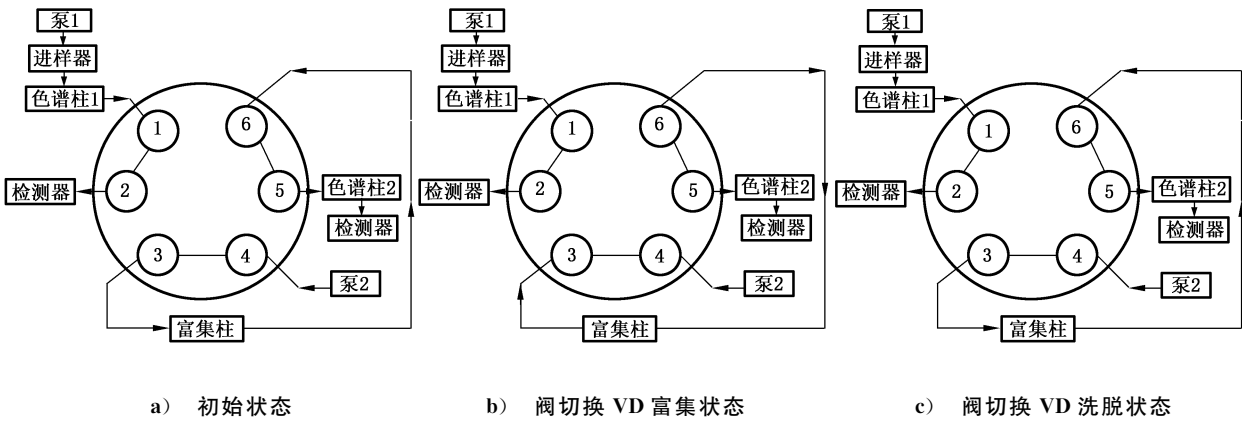


图 C.1 在线柱切换-液相色谱系统流路示意图