



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.82—2003
代替 GB/T 12388—1990

食品中维生素 A 和维生素 E 的测定

Determination of retinol and tocopherol in foods

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布
中国国家标准化管理委员会

591

前 言

本标准第一法对应于 AOAC. 992. 06(Ⅱ)《婴幼儿配方食品中维生素 A 的测定——高效液相色谱法》(CAC 引用 1994 年版)。

本标准第二法对应于 AOAC. 974. 29(Ⅳ)《特殊食品中维生素 A 的测定——比色法》(CAC 引用 1994 年版)。

本标准与 AOAC. 992. 06(Ⅱ)和 AOAC. 974. 29(Ⅳ)的一致性程度为非等效。

本标准代替 GB/T 12388—1990《食物中维生素 A 和维生素 E 的测定方法》。

本标准与 GB/T 12388—1990 相比主要修改如下：

——修改了标准的中文名称，标准中文名称改为《食品中维生素 A 和维生素 E 的测定》；

——按 GB/T 20001. 4—2001《标准编写规则 第 4 部分：化学分析方法》对原标准的结构进行了修改。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所。

本标准主要起草人：王光亚、李晶、王国栋。

原标准于 1990 年首次发布，本次为第一次修订。

食品中维生素 A 和维生素 E 的测定

1 范围

本标准规定了食品中维生素 A 和维生素 E 的测定方法。

本标准适用于食品中维生素 A 和维生素 E 的测定。

本标准检出限分别为： V_A : 0.8 ng； α -E: 91.8 ng； γ -E: 36.6 ng； δ -E: 20.6 ng。

第一法 高效液相色谱法

2 原理

试样中的维生素 A 及维生素 E 经皂化提取处理后,将其从不可皂化部分提取至有机溶剂中。用高效液相色谱 C_{18} 反相柱将维生素 A 和维生素 E 分离,经紫外检测器检测,并用内标法定量测定。

3 试剂

3.1 无水乙醚:不含有过氧化物。

3.1.1 过氧化物检查方法:用 5 mL 乙醚加 1 mL 10% 碘化钾溶液,振摇 1 min,如有过氧化物则放出游离碘,水层呈黄色或加 4 滴 0.5% 淀粉溶液,水层呈蓝色。该乙醚需处理后使用。

3.1.2 去除过氧化物的方法:重蒸乙醚时,瓶中放入纯铁丝或铁末少许。弃去 10% 初馏液和 10% 残液。

3.2 无水乙醇:不得含有醛类物质。

3.2.1 检查方法:取 2 mL 银氨溶液于试管中,加入少量乙醇,摇匀,再加入氢氧化钠溶液,加热,放置冷却后,若有银镜反应则表示乙醇中有醛。

3.2.2 脱醛方法:取 2 g 硝酸银溶于少量水中。取 4 g 氢氧化钠溶于温乙醇中。将两者倾入 1 L 乙醇中,振摇后,放置暗处两天(不时摇动,促进反应),经过滤,置蒸馏瓶中蒸馏,弃去初蒸出的 50 mL。当乙醇中含醛较多时,硝酸银用量适当增加。

3.3 无水硫酸钠。

3.4 甲醇:重蒸后使用。

3.5 重蒸水:水中加少量高锰酸钾,临用前蒸馏。

3.6 抗坏血酸溶液(100 g/L):临用前配制。

3.7 氢氧化钾溶液(1+1)。

3.8 氢氧化钠溶液(100 g/L)。

3.9 硝酸银溶液(50 g/L)。

3.10 银氨溶液:加氨水至硝酸银溶液(3.9)中,直至生成的沉淀重新溶解为止,再加氢氧化钠溶液(3.8)数滴,如发生沉淀,再加氨水直至溶解。

3.11 维生素 A 标准液:视黄醇(纯度 85%)或视黄醇乙酸酯(纯度 90%)经皂化处理后使用。用脱醚乙醇溶解维生素 A 标准品,使其浓度大约为 1 mL 相当于 1 mg 视黄醇。临用前用紫外分光光度法标定其准确浓度。

3.12 维生素 E 标准液: α -生育酚(纯度 95%), γ -生育酚(95%), δ -生育酚(纯度 95%)。用脱醚乙醇分别溶解以上三种维生素 E 标准品,使其浓度大约为 1 mL 相当于 1 mg。临用前用紫外分光光度计分别标定此三种维生素 E 溶液的准确浓度。

3.13 内标溶液:称取苯并[e]芘(纯度98%),用脱酞乙醇配制成每1 mL相当10 μg 苯并[e]芘的内标溶液。

3.14 pH1~14 试纸。

4 仪器与设备

4.1 实验室常用仪器。

4.2 高效液相色谱仪带紫外分光检测器。

4.3 旋转蒸发器。

4.4 高速离心机。

4.4.1 小离心管:具塑料盖1.5 mL~3.0 mL 塑料离心管(与高速离心机配套)。

4.5 高纯氮气。

4.6 恒温水浴锅。

4.7 紫外分光光度计。

5 分析步骤

5.1 试样处理

5.1.1 皂化:准确称取1 g~10 g 试样(含维生素A约3 μg,维生素E各异构体约为40 μg)于皂化瓶中,加30 mL 无水乙醇,进行搅拌,直到颗粒物分散均匀为止。加5 mL 10%抗坏血酸,苯并[e]芘标准液2.00 mL,混匀。10 mL 氢氧化钾(1+1),混匀。于沸水浴回流30 min 使皂化完全。皂化后立即放入冰水中冷却。

5.1.2 提取:将皂化后的试样移入分液漏斗中,用50 mL 水分2次~3次洗皂化瓶,洗液并入分液漏斗中。用约100 mL 乙醚分两次洗皂化瓶及其残渣,乙醚液并入分液漏斗中。如有残渣,可将此液通过有少许脱脂棉的漏斗滤入分液漏斗。轻轻振荡分液漏斗2 min,静置分层,弃去水层。

5.1.3 洗涤:用约50 mL 水洗分液漏斗中的乙醚层,用pH 试纸检验直至水层不显碱性(最初水洗轻摇,逐次振荡强度可增加)。

5.1.4 浓缩:将乙醚提取液经过无水硫酸钠(约5 g)滤入与旋转蒸发器配套的250 mL~300 mL 球形蒸发瓶内,用约100 mL 乙醚冲洗分液漏斗及无水硫酸钠3次,并入蒸发瓶内,并将其接至旋转蒸发器上,于55°C 水浴中减压蒸馏并回收乙醚,待瓶中剩下约2 mL 乙醚时,取下蒸发瓶,立即用氮气吹掉乙醚。立即加入2.00 mL 乙醇,充分混合,溶解提取物。

5.1.5 将乙醇液移入一小塑料离心管中(4.4.1)离心5 min(5000 r/min)。上清液供色谱分析。如果试样中维生素含量过少,可用氮气将乙醇液吹干后,再用乙醇重新定容。并记下体积比。

5.2 标准曲线的制备

5.2.1 维生素A和维生素E标准浓度的标定

取维生素A和各维生素E标准液若干微升,分别稀释至3.00 mL 乙醇中,并分别按给定波长测定各维生素的吸光值。用比吸光系数计算出该维生素的浓度。测定条件如表1所示。

表 1

标准	加入标准液的量 V/μL	比吸光系数 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$	波长 λ/nm
视黄醇	10.00	1 835	325
α-生育酚	100.0	71	294
γ-生育酚	100.0	92.8	298
δ-生育酚	100.0	91.2	298

浓度计算按式(1):

$$c_1 = \frac{A}{E} \times \frac{1}{100} \times \frac{3.00}{V \times 10^{-3}} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

c_1 ——维生素浓度,单位为克每毫升(g/mL);

A ——维生素的平均紫外吸光值;

V ——加入标准液的量,单位为微升(μL);

E ——某种维生素 1%比吸光系数;

$\frac{3.00}{V \times 10^{-3}}$ ——标准液稀释倍数。

5.2.2 标准曲线的制备

本标准采用内标法定量。把一定量的维生素 A、 α -生育酚、 β -生育酚、 δ -生育酚及内标苯并[e]芘液混合均匀。选择合适灵敏度,使上述物质的各峰高约为满量程 70%,为高浓度点。高浓度的 1/2 为低浓度点(其内标苯并[e]芘的浓度值不变),用此种浓度的混合标准进行色谱分析,结果见色谱图(图 1)。维生素标准曲线绘制是以维生素峰面积与内标物峰面积之比为纵坐标,维生素浓度为横坐标绘制,或计算直线回归方程。如有微处理机装置,则按仪器说明用二点内标法进行定量。

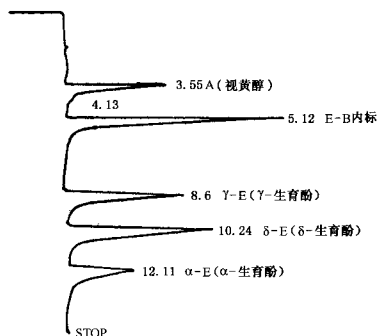


图 1 维生素 A 和维生素 E 色谱图

本标准不能将 β -E 和 γ -E 分开,故 γ -E 峰中包含有 β -E 峰。

5.3 高效液相色谱分析

5.3.1 色谱条件(参考条件)

5.3.1.1 预柱: ultrasphere ODS 10 μm , 4mm \times 4.5 cm。

5.3.1.2 分析柱: ultrasphere ODS 5 μm , 4.6 mm \times 25 cm。

5.3.1.3 流动相: 甲醇+水=98+2。混匀。临用前脱气。

5.3.1.4 紫外检测器波长: 300 nm。量程 0.02。

5.3.1.5 进样量: 20 μL 。

5.3.1.6 流速: 1.7 mL/min。

5.4 试样分析

取试样浓缩液 20 μL ,待绘制出色谱图及色谱参数后,再进行定性和定量。

5.4.1 定性:用标准物色谱峰的保留时间定性。

5.4.2 定量:根据色谱图求出某种维生素峰面积与内标物峰面积的比值,以此值在标准曲线上查到其含量。或用回归方程求出其含量。

6 结果计算

见式(2)。

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

式中:

X——维生素的含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);

c——由标准曲线上查到某种维生素含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V——试样浓缩定容体积,单位为毫升(mL);

m——试样质量,单位为克(g)。

计算结果表示到三位有效数字。

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%。

第二法 比色法

8 原理

维生素A在三氯甲烷中与三氯化铋相互作用,产生蓝色物质,其深浅与溶液中所含维生素A的含量成正比。该蓝色物质虽不稳定,但在一定时间内可用分光光度计于620 nm波长处测定其吸光度。

9 试剂

除非另有说明,在分析中仅使用确定为分析纯的试剂和蒸馏水或相当纯度的水。

9.1 无水硫酸钠。

9.2 乙酸酐。

9.3 乙醚。

9.4 无水乙醇。

9.5 三氯甲烷:应不含分解物,否则会破坏维生素A。

9.5.1 检查方法:三氯甲烷不稳定,放置后易受空气中氧的作用生成氯化氢和光气。检查时可取少量三氯甲烷置试管中加水少许振摇,使氯化氢溶到水层。加入几滴硝酸银液,如有白色沉淀即说明三氯甲烷中有分解产物。

9.5.2 处理方法:试剂应先测验是否含有分解产物,如有,则应于分液漏斗中加水洗数次,加无水硫酸钠或氯化钙使之脱水,然后蒸馏。

9.6 三氯化铋-三氯甲烷溶液(250 g/L):用三氯甲烷配制三氯化铋溶液,储于棕色瓶中(注意勿使吸收水分)。

9.7 氢氧化钾溶液(1+1)。

9.8 维生素A或视黄醇乙酸酯标准液:同3.11,其标定方法同5.2.1。

9.9 酚酞指示剂(10 g/L):用95%乙醇配制。

10 仪器

10.1 实验室常用仪器。

10.2 分光光度计。

10.3 回流冷凝装置。

11 分析步骤

维生素 A 极易被光破坏,实验操作应在微弱光线下进行,或用棕色玻璃仪器。

11.1 试样处理

根据试样性质,可采用皂化法或研磨法。

11.1.1 皂化法

适用于维生素 A 含量不高的试样,可减少脂溶性物质的干扰,但全部试验过程费时,且易导致维生素 A 损失。

11.1.1.1 皂化:根据试样中维生素 A 含量的不同,准确称取 0.5 g~5 g 试样于三角瓶中,加入 10 mL 氢氧化钾(1+1)及 20 mL~40 mL 乙醇,于电热板上回流 30 min 至皂化完全为止。

11.1.1.2 提取:将皂化瓶内混合物移至分液漏斗中,以 30 mL 水洗皂化瓶,洗液并入分液漏斗。如有渣子,可用脱脂棉漏斗滤入分液漏斗内。用 50 mL 乙醚分二次洗皂化瓶,洗液并入分液漏斗中。振荡并注意放气,静置分层后,下层放入第二个分液漏斗内。皂化瓶再用约 30 mL 乙醚分二次冲洗,洗液倾入第二个分液漏斗中。振荡后,静置分层,下层放入三角瓶中,醚层与第一个分液漏斗合并。重复至水液中无维生素 A 为止。

11.1.1.3 洗涤:用约 30 mL 水加入第一个分液漏斗中,轻轻振荡,静置片刻后,放去水层。加 15 mL~20 mL 0.5 mol/L 氢氧化钾溶液于分液漏斗中,轻轻振荡后,弃去下层碱液,除去醚溶性酸皂。继续用水洗涤,每次用水约 30 mL,直至洗涤液与酚酞指示剂呈无色为止(大约 3 次)。醚层液静置 10 min~20 min,小心放出析出的水。

11.1.1.4 浓缩:将醚层液经过无水硫酸钠滤入三角瓶中,再用约 25 mL 乙醚冲洗分液漏斗和硫酸钠两次,洗液并入三角瓶内。置水浴上蒸馏,回收乙醚。待瓶中剩约 5 mL 乙醚时取下,用减压抽气法至干,立即加入一定量的三氯甲烷使溶液中维生素 A 含量在适宜浓度范围内。

11.1.2 研磨法

适用于每克试样维生素 A 含量大于 5 μg ~10 μg 试样的测定,如肝的分析。步骤简单,省时,结果准确。

11.1.2.1 研磨:精确称 2 g~5 g 试样,放入盛有 3 倍~5 倍试样质量的无水硫酸钠研钵中,研磨至试样中水完全被吸收,并均质化。

11.1.2.2 提取:小心地将全部均质化试样移入带盖的三角瓶内,准确加入 50 mL~100 mL 乙醚。紧压盖子,用力振荡 2 min,使试样中维生素 A 溶于乙醚中。使其自行澄清(大约需 1 h~2 h),或离心澄清(因乙醚易挥发,气温高时应在冷水浴中操作。装乙醚的试剂瓶也应事先放入冷水浴中)。

11.1.2.3 浓缩:取澄清的乙醚提取液 2 mL~5 mL,放入比色管中,在 70℃~80℃水浴上抽气蒸干。立即加入 1 mL 三氯甲烷溶解残渣。

12 测定

12.1 标准曲线的制备

准确取一定量的维生素 A 标准液于 4~5 个容量瓶中,以三氯甲烷配制标准系列。再取相同数量比色管顺次取 1 mL 三氯甲烷和标准系列使用液 1 mL,各管加入乙酸酐 1 滴,制成标准比色列。于 620 nm 波长处,以三氯甲烷调节吸光度至零点,将其标准比色列按顺序移入光路前,迅速加入 9 mL 三氯化锑-三氯甲烷溶液。于 6 s 内测定吸光度,以吸光度为纵坐标,维生素 A 含量为横坐标绘制标准曲线图。

12.2 试样测定

于一比色管中加入 10 mL 三氯甲烷,加入 1 滴乙酸酐为空白液。另一比色管中加入 1 mL 三氯甲烷,其余比色管中分别加入 1 mL 试样溶液及 1 滴乙酸酐。其余步骤同标准曲线的制备。

13 结果计算

见式(3)。

$$X = \frac{c}{m} \times V \times \frac{100}{1\,000} \dots\dots\dots(3)$$

式中：

X ——试样中维生素 A 的含量(如按国际单位,每 1 国际单位=0.3 μg 维生素 A),单位为毫克每百克(mg/100 g);

c ——由标准曲线上查得试样中维生素 A 的含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

m ——试样质量,单位为克(g);

V ——提取后加三氯甲烷定量之体积,单位为毫升(mL);

100——以每百克试样计。

计算结果保留三位有效数字。

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%。