



**ThermoFisher**  
S C I E N T I F I C

GB 5009.82-2016 维生素ADE国标解读及赛默飞解决方案

CCS-SP-167

The world leader in serving science

## 食品安全国家标准

### 食品中维生素 A、D、E 的测定

#### 1 范围

本标准规定了食品中维生素 A、维生素 E 和维生素 D 的测定方法。

本标准第一法适用于食品中维生素 A 和维生素 E 的测定。

本标准第二法适用于食用油、坚果、豆类和辣椒粉等食物中维生素 E 的测定。

本标准第三法适用于食品中维生素 D<sub>2</sub> 和维生素 D<sub>3</sub> 的测定。

本标准第四法适用于配方食品中维生素 D<sub>2</sub> 或维生素 D<sub>3</sub> 的测定。

## 2 原理

试样中的维生素 A 及维生素 E 经皂化(含淀粉先用淀粉酶酶解)、提取、净化、浓缩后, C<sub>30</sub> 或 PFP 反相液相色谱柱分离, 紫外检测器或荧光检测器检测, 外标法定量。

### 5.3 色谱参考条件

色谱参考条件列出如下:

- 色谱柱: C<sub>30</sub> 柱(柱长 250 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 3 μm), 或相当者;
- 柱温: 20 °C;
- 流动相: A: 水; B: 甲醇, 洗脱梯度见表 1;
- 流速: 0.8 mL/min;
- 紫外检测波长: 维生素 A 为 325 nm; 维生素 E 为 294 nm;
- 进样量: 10 μL;
- 标准色谱图和样品色谱图见 C.1。

注 1: 如难以将柱温控制在 20 °C ± 2°C, 可改用 PFP 柱分离异构体, 流动相为水和甲醇梯度洗脱。

注 2: 如样品中只含 α-生育酚, 不需分离 β-生育酚和 γ-生育酚, 可选用 C<sub>18</sub> 柱, 流动相为甲醇。

注 3: 如有荧光检测器, 可选用荧光检测器检测, 对生育酚的检测有更高的灵敏度和选择性, 可按以下检测波长检测: 维生素 A 激发波长 328 nm, 发射波长 440 nm; 维生素 E 激发波长 294 nm, 发射波长 328 nm。

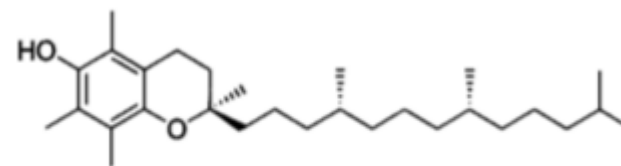
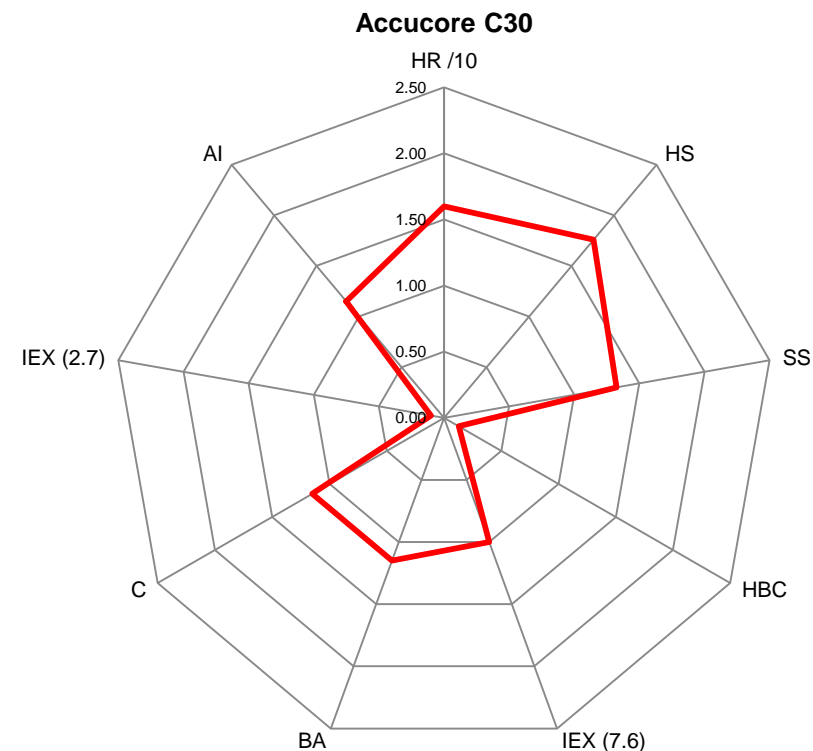


图 1 维生素 E 的结构

**分析难点:** 维生素E 异构体E2和E3实现基线分离

# Acclaim和Accucore C30键合相的特点

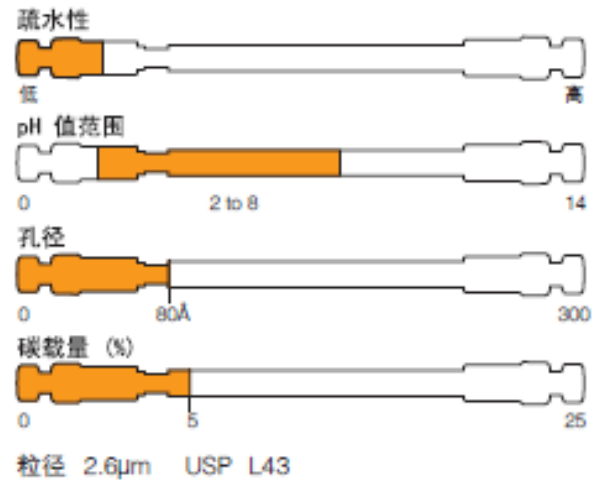
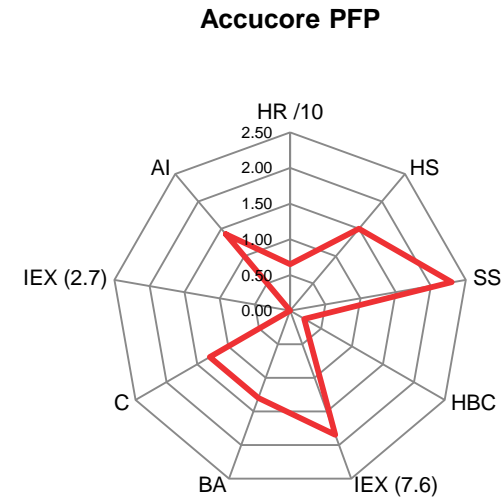
- 1, 对于疏水性、长链和结构相关的异构体, 具有高度的性质选择性, 适用于**结构异构体分析**;
- 2, 与其他反相键合相相比, 具有独特的选择性, 适用于方法开发
- 3, 键合相键和密度低, 疏水保留低于C18;
- 4, **耐受100%纯水相流动相**, 避免发生疏水塌陷问题, 适用于亲水性物质的分析, 如核苷和核苷酸;



[Man-065416-01-Acclaim-C30-Mar11.pdf](#)

# Accucore 和GOLD PFP 键合相的特点

- 1, 与C18具有不同的选择性
- 2, 对卤化物提供额外的保留, 尤其适合卤化物位置异构体的分析
- 3, 对非卤化合物具有独特的选择性, 尤其是包含羟基, 羧基或其他极性基团的极性化合物



# 第一法，食品中维生素A和维生素E异构体的测定—C30柱

推荐色谱柱：**Acclaim C30 4.6mm × 250mm, 3 μm**

流动相：甲醇-水，

流速：0.8ml/min

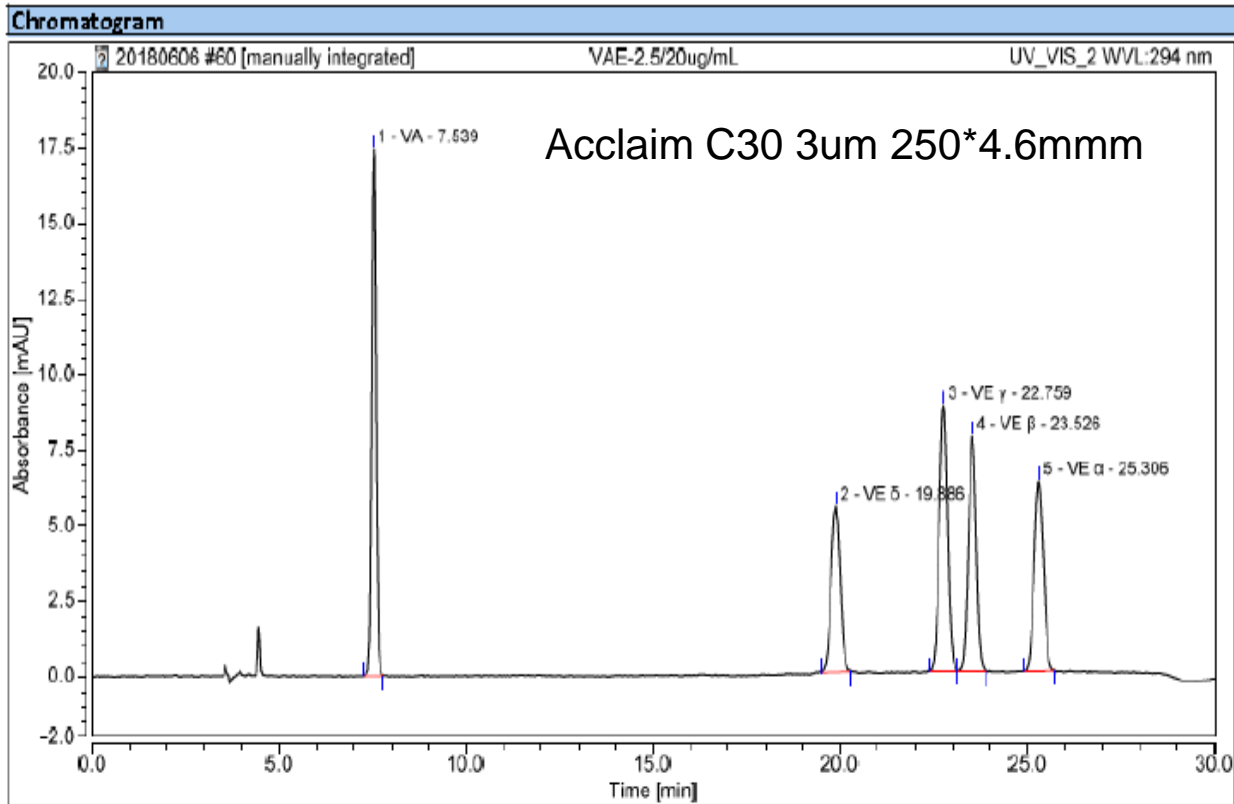
柱温：20℃

检测波长：294nm

建议梯度程序（国标方法）：

时间-min	甲醇	水
0	96	4
13	96	4
20	100	0
24	100	0
24.5	96	4
30	96	4

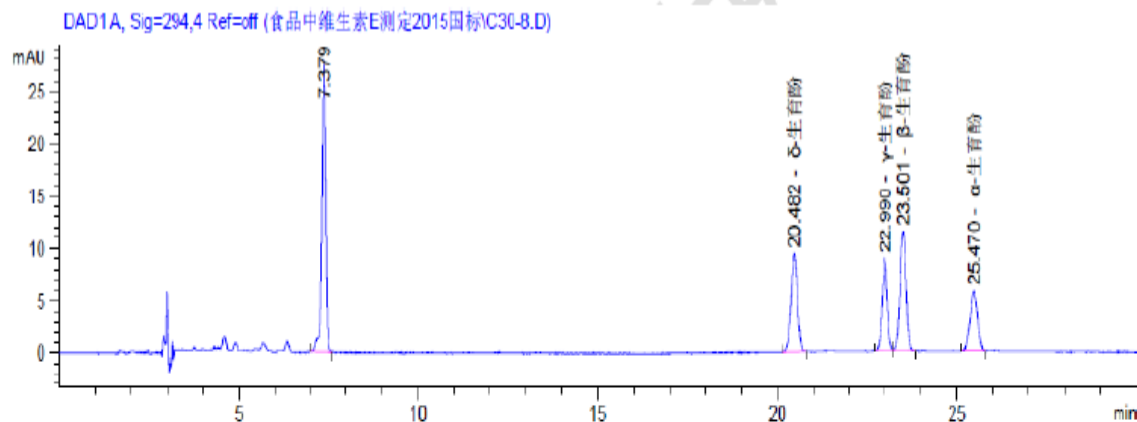
# C30分离谱图



Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time [min]	Area [mAU*min]	Height [mAU]	Asymmetry (EP)	Resolution (EP)	Plates (EP)
1	VA	7.539	2.243	17.447	1.01	37.90	22043
2	VE δ	19.886	1.540	5.486	0.97	6.73	31210
3	VE γ	22.759	2.245	8.824	1.00	1.93	50430
4	VE β	23.526	1.924	7.795	1.01	4.18	57328
5	VE α	25.306	1.790	6.284	1.01	n.a.	46209
Total:			9.742	45.836	5.01	50.74	

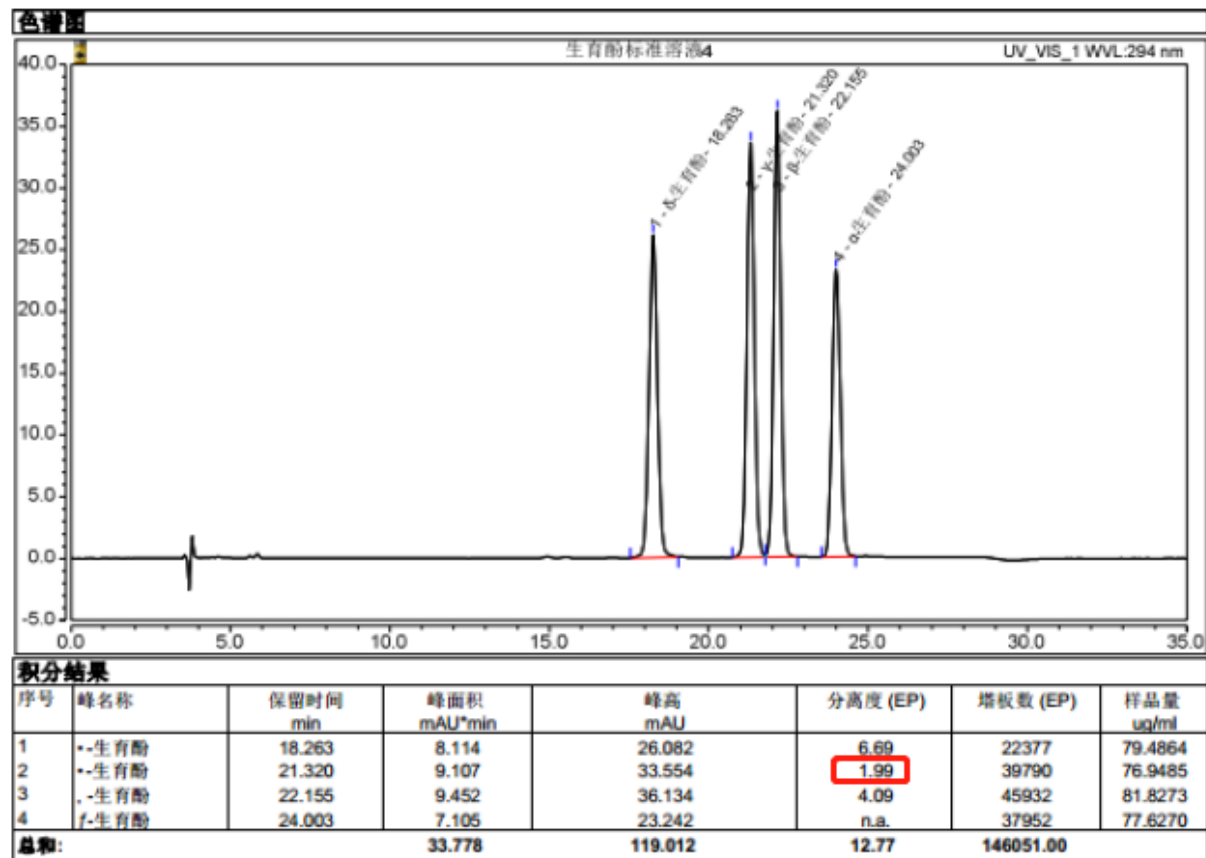
其他品牌 C30 3um 250\*4.6mm



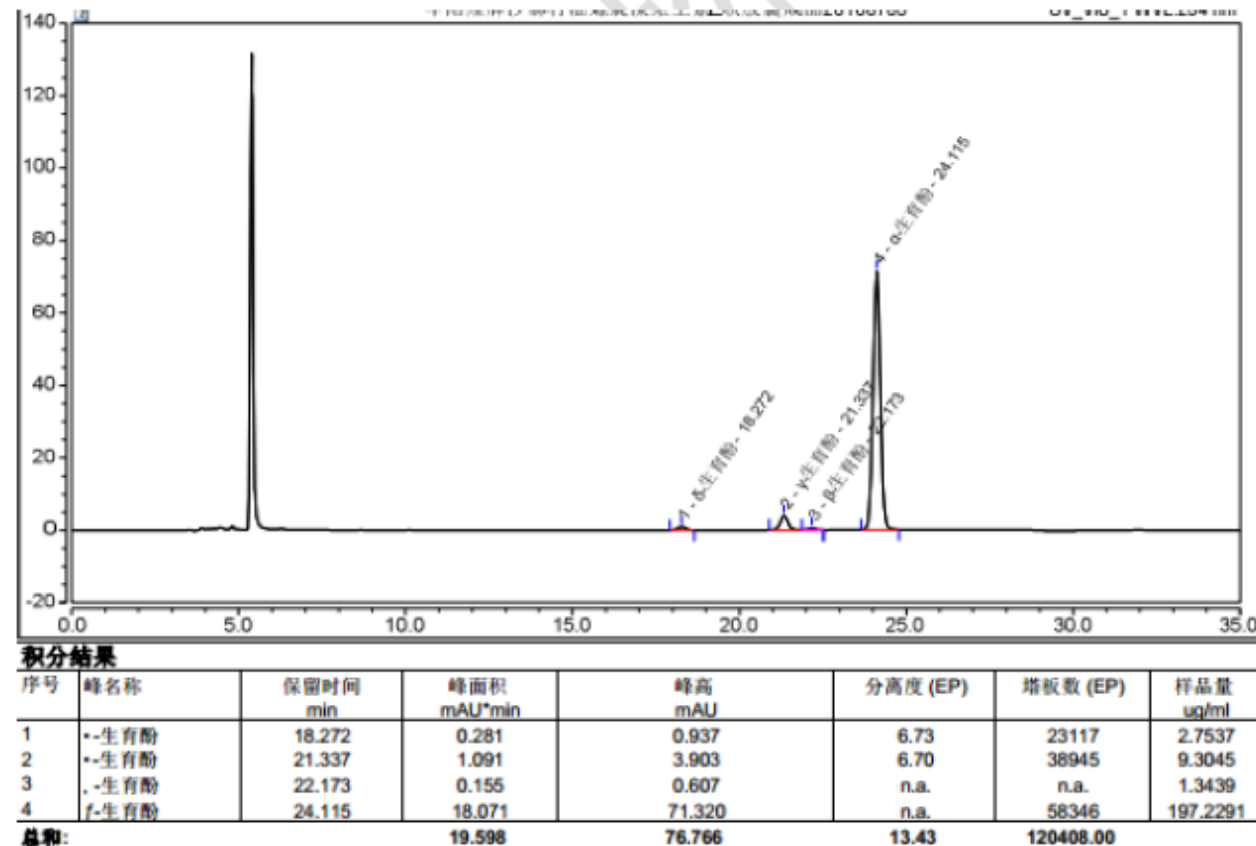
保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
7.379	-	198.14885	27.79145	1.14	0.1050	27358	-	-
20.482	-	109.82579	9.33233	1.02	0.1819	70263	53.67	2.78
22.990	-	94.27428	8.84409	1.06	0.1663	105942	8.47	1.12
23.501	-	125.95548	11.37525	1.03	0.1719	103566	1.78	1.02
25.470	-	83.06184	5.70765	1.07	0.2281	69064	5.78	1.08

β-VE与γ-VE的分离度达到1.93

# 客户分离谱图



标准溶液谱图



实际样品谱图



# 第一法：食品中维生素A和维生素E异构体的测定--PFP柱

推荐色谱柱：ACCUCORE PFP 150x3.0MM， PN: 17426-153030

或： GOLD PFP 250x4.6MM， PN: 25405-254630

流动相： 甲醇-水

流速： 0.6 ml/min ( Accucore PFP) , 1ml/min ( GOLD PFP)

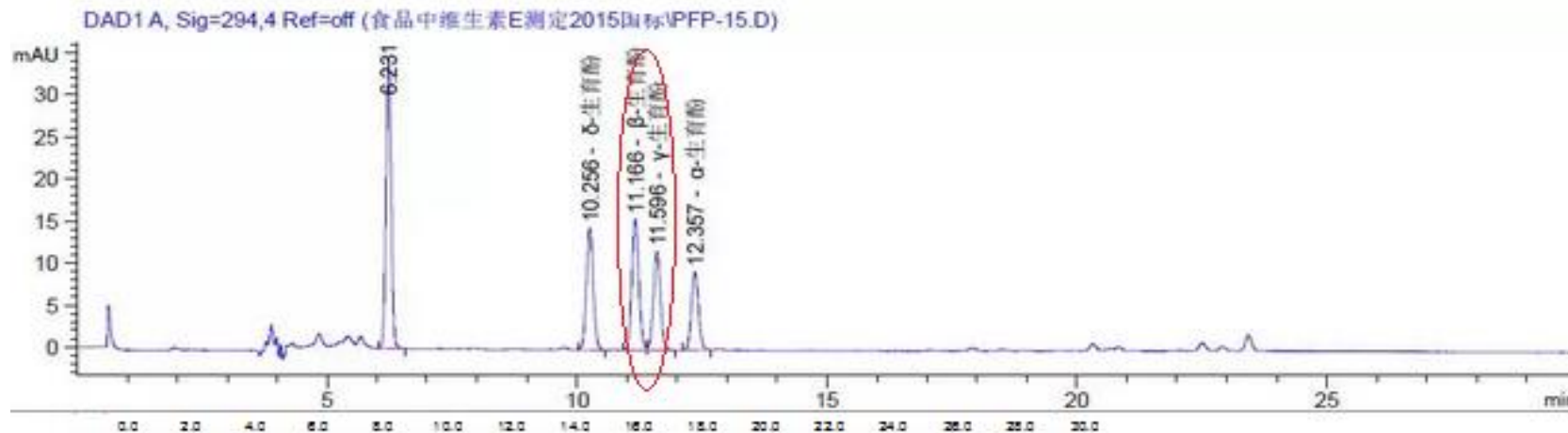
柱温： 20℃

波长： 296nm

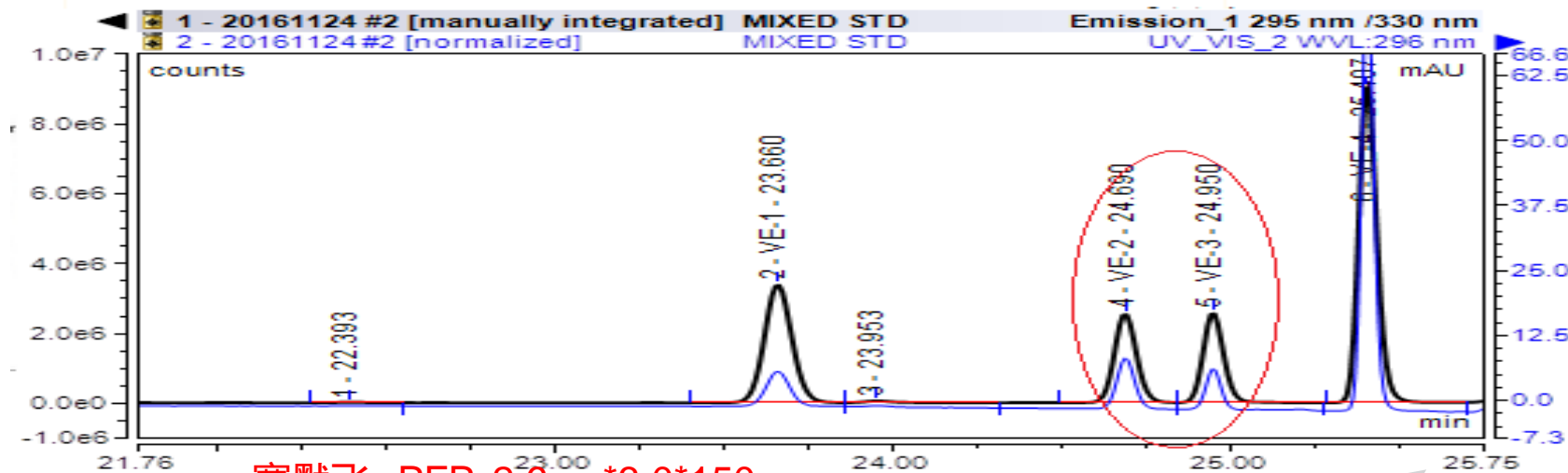
建议梯度程序：

时间-min	甲醇	水
0	75	25
1	75	25
16	90	10
20	100	0
25	100	0

# 第一法，食品中维生素A和维生素E异构体的测定—PFP柱



其他品牌, PFP, 5 $\mu$ m\*4.6\*250mm



赛默飞, PFP, 2.6 $\mu$ m\*3.0\*150mm

分离度大于2, 效果显著

色谱柱: Accucore PFP 2.6 $\mu$ m\*2.1\*100mm (货号: 17426-102130)

流动性: (A) 甲醇: (B) 水=80:20

0~10min (A) 80 $\rightarrow$ 85;

10~15min (A) 85 $\rightarrow$ 90;

15~18min (A) 90 $\rightarrow$ 100;

18~19min (A) 100 $\rightarrow$ 80.

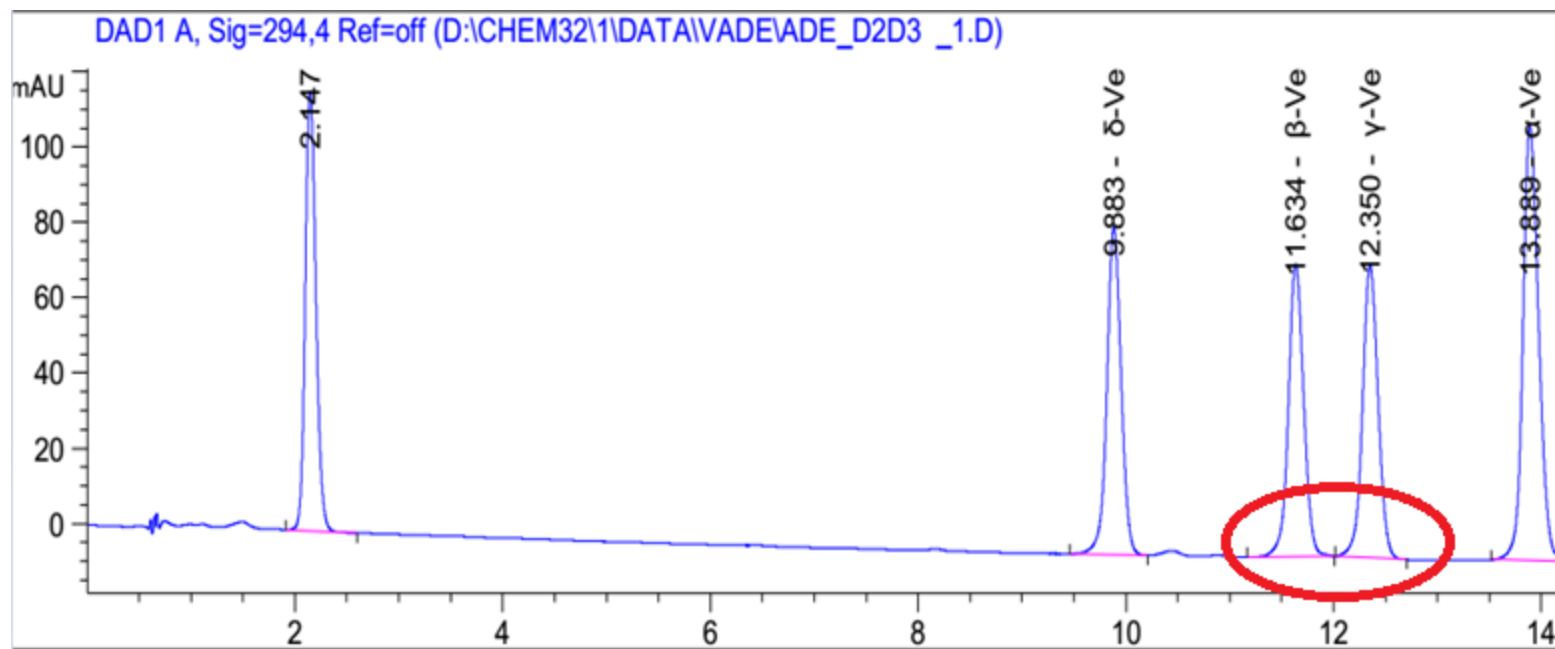
流速: 0.4 mL/min

柱温: 25 °C

进样量: 2  $\mu$ L

样品浓度: VE (生育酚) 浓度:  $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$ 为60 $\mu$ g/mL,  $\alpha$ -ve为150 $\mu$ g/mL

# 分析结果



保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	信号 噪声
2.147	3.13	833.97070	116.64268	0.79	0.1092	2142	-	584.4
9.883	18.02	830.86096	87.13397	0.92	0.1425	26648	36.12	436.6
11.634	21.39	792.82098	77.71642	0.89	0.1533	31893	6.95	389.4
12.350	22.77	808.78973	77.78790	0.91	0.1567	34425	2.71	389.7
13.889	25.73	1211.51416	115.27784	0.77	0.1592	42184	5.73	577.6

## 第四法：食品中维生素D的测定 高效液相色谱法—AQ柱

推荐色谱柱：Accucore AQ 2.6 $\mu$ m\*4.6\*150mm, PN: 17326-154630

流动相：乙腈+甲醇=60+40

流速：·1ml/min

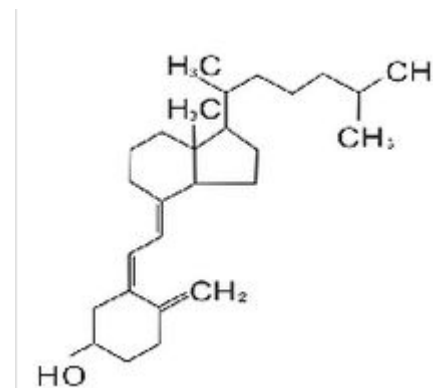
检测波长：264nm

柱温：35 $^{\circ}$ C

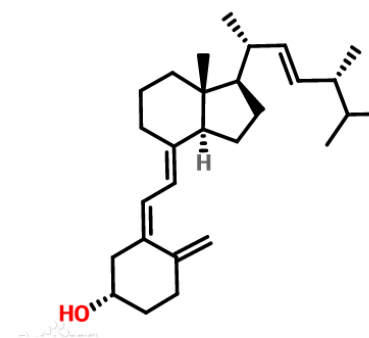
进样量：10 $\mu$ l

样品浓度：D2:200 $\mu$ g/ml

D3:125 $\mu$ g/ml



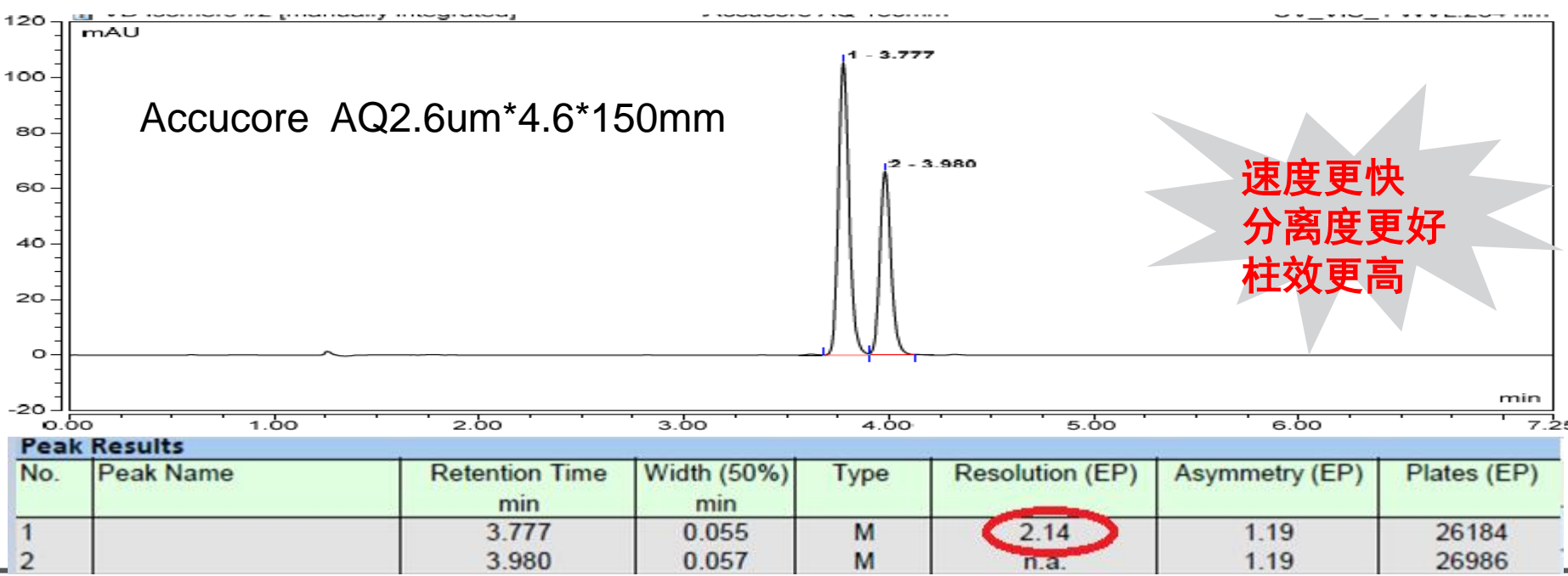
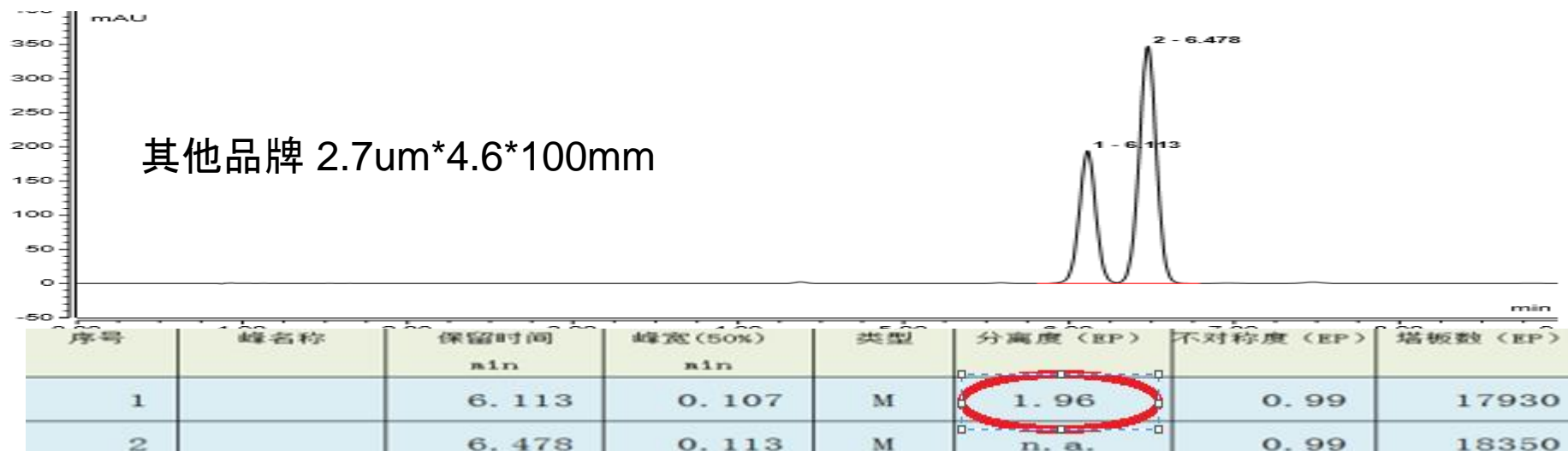
D3结构式



D2结构式

**分析难点：** 维生素D异构体D2和D3实现基线分离

# 第四法：食品中维生素D的测定 高效液相色谱法—AQ柱



## 第四法：食品中维生素D的测定 高效液相色谱法—C18法

推荐色谱柱：Acclaim PA2 5um\*4.6\*250mm, PN: 063199

流动相：乙腈+甲醇=60+40

流速：1ml/min

检测波长：264nm

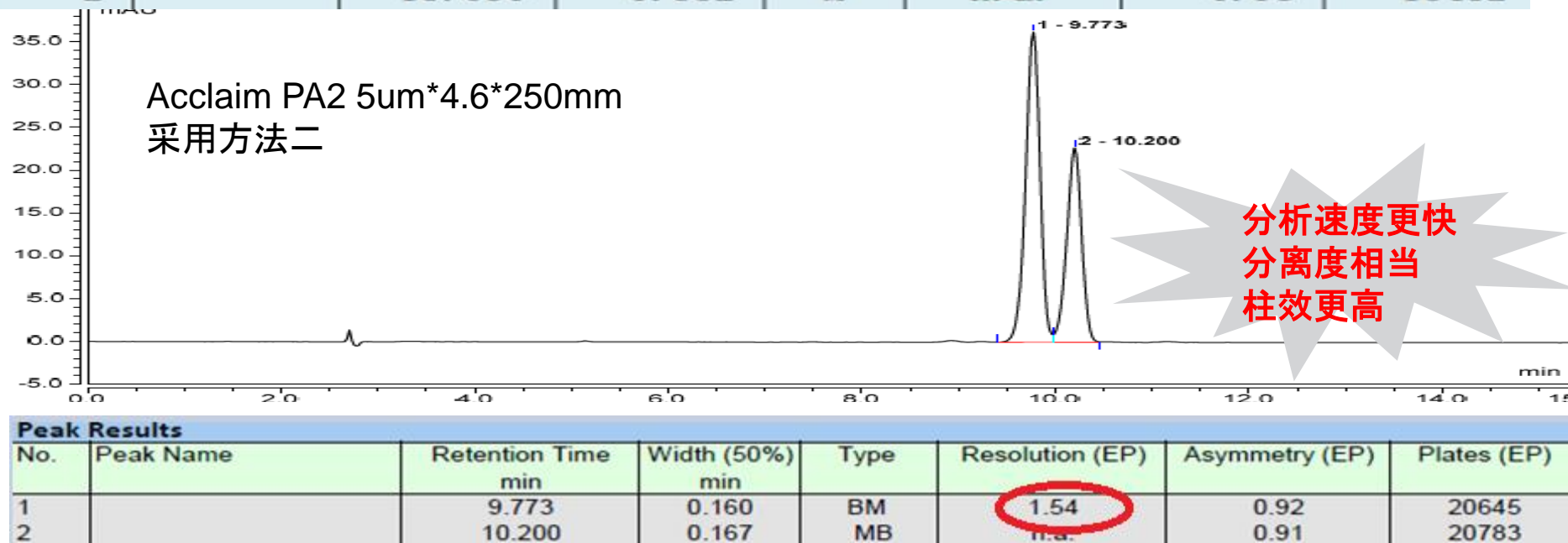
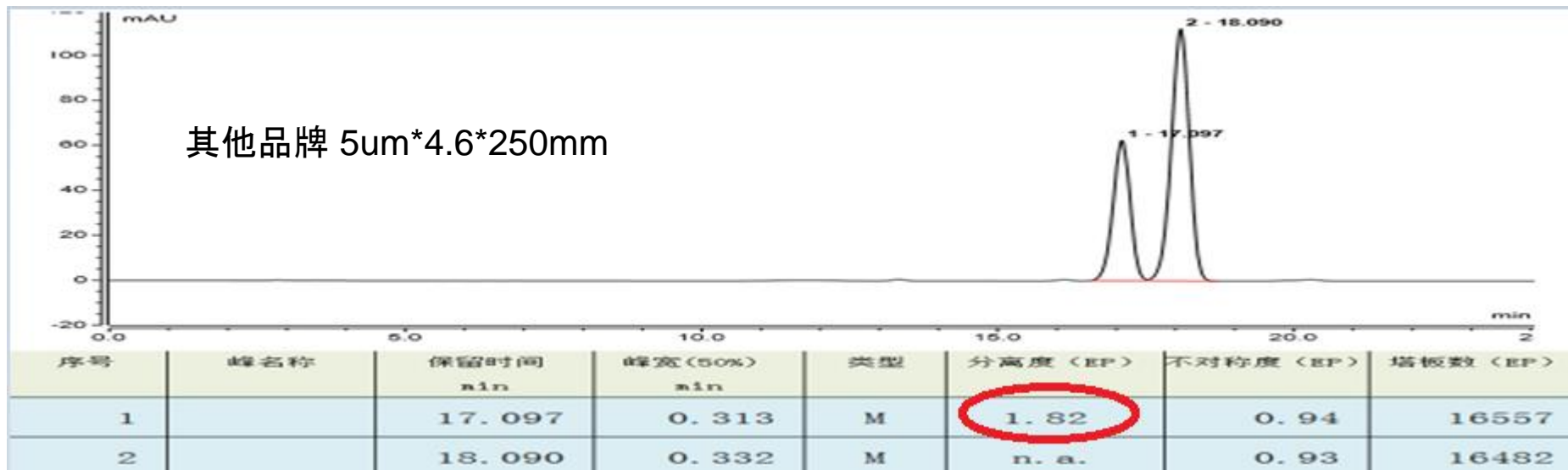
柱温：35°C

进样量：10ul

样品浓度：D2:200ug/ml

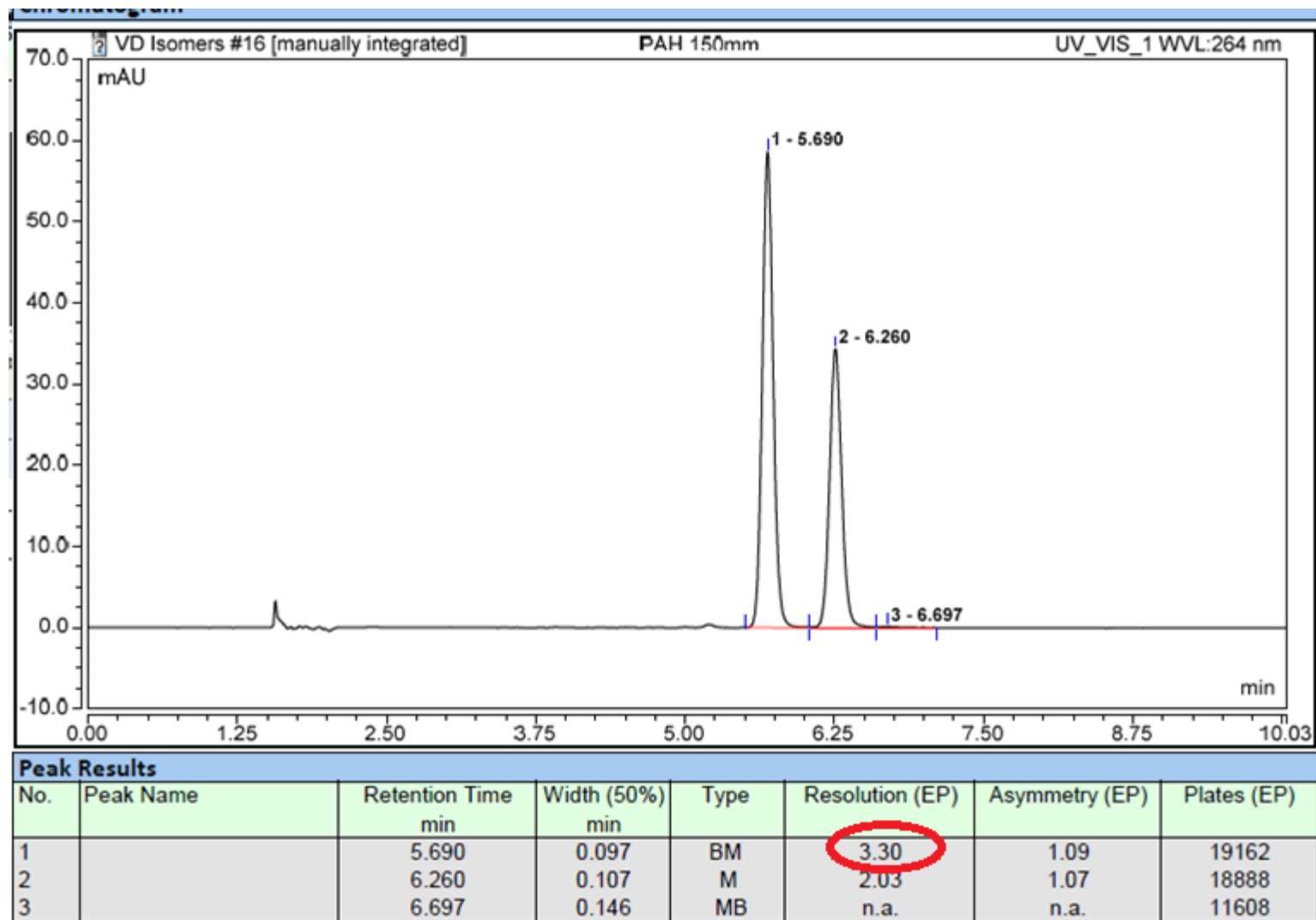
D3:125ug/ml

# 第四法：食品中维生素D的测定 高效液相色谱法—常规法





# 第四法：食品中维生素D的测定 高效液相色谱法—PAH 键合相



- 1, 关于维生素E的异构体分析, Acclaim C30 3um\*4.6\*250mm (分离度1.93); GOLD PFP 5\*4.6\*250mm (分离度1.90) 和Accucore PFP 2.6\*3.0\*150mm (分离度2.74)。PFP的分离度要优于C30
- 2, 关于维生素D的分离, 常规方法尝试过GOLD C18, Acclaim PA2和PAH。PAH分离度最好; 快速方法尝试过Accucore C18, Accucore AQ和Accucore Polar Premium。AQ分离度最好