

团 体 标 准

T/GDFPT 0039—XXXX

保健食品中维生素 D₂、D₃、K₁ 和 K₂ 的测定 超高效合相色谱 UPCC 法

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

广东省食品生产技术协会 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。

本文件由××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

保健食品中维生素 D₂、D₃、K₁和 K₂的测定 超高效合相色谱 UPCC 法

1 范围

本文件描述了保健食品中维生素D₂、D₃、K₁和K₂的超高效合相色谱（UPCC法）测定方法。
本文件适用于片剂、固体饮料等保健食品中维生素D₂、D₃、K₁和K₂单个或多个含量的测定。

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

样品经二甲基亚砜和正己烷溶液溶解提取，吹干后流动相溶解定容，用超高效合相色谱，紫外检测器或二极管阵列检测器测定，外标法定量。

5 试剂和材料

除另有说明外，本方法所用试剂均为分析纯，水符合GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 甲醇，色谱纯。
- 5.1.2 乙腈，色谱纯。
- 5.1.3 二甲基亚砜（DMSO），色谱纯。
- 5.1.4 正己烷，色谱纯。

5.2 标准品

- 5.2.1 维生素 K₁标准品，CAS 号：84-80-0。
- 5.2.2 维生素 K₂标准品，CAS 号：2124-57-4。
- 5.2.3 维生素 D₂标准品，CAS 号：50-14-6。
- 5.2.4 维生素 D₃标准品，CAS 号：67-97-0。
- 5.2.5 二甲基亚砜（DMSO）混合溶液：95:5（DMSO:H₂O）体积比混合。
- 5.2.6 复溶溶剂：即流动相 B。

5.3 试剂配制

5.3.1 标准储备液配制：

- 5.3.1.1 维生素 K₁储备液，准确称取 20mg 维生素 K₁标准品到 100mL 棕色容量瓶中，加入甲醇溶解并定容。标准储备液在 4℃冰箱中保存期 30 天。
- 5.3.1.2 维生素 K₂储备液，准确称取 20mg 维生素 K₂标准品到 25mL 棕色容量瓶中，加入甲醇溶解并定容。标准储备液在 4℃冰箱中保存期 10 天。
- 5.3.1.3 维生素 D₂储备液，准确称取 20mg 维生素 D₂标准品到 25mL 棕色容量瓶中，加入甲醇溶解并定容。标准储备液在 4℃冰箱中保存期 30 天。

5.3.1.4 维生素 D₃ 储备液，准确称取 25mg 维生素 D₃ 标准品到 100mL 棕色容量瓶中，加入甲醇溶解并定容。标准储备液在 4℃ 冰箱中保存期 10 天。

5.3.2 混合标准中间液配制：分别准确移取 2mL 维生素 K₁ 标准储备液、3mL 维生素 K₂ 标准储备液、1mL 维生素 D₂ 标准储备液和 2mL 维生素 D₃ 标准储备液于 25mL 棕色容量瓶中，加入甲醇定容，作为中间储备液；标准中间液现用现配。

5.3.3 混合标准工作液配制：分别准确移取 1mL、1mL、1mL、2mL、3mL、4mL、5mL 混合标准中间液于 50mL、25mL、10mL、10mL、10mL、10mL、10mL 棕色容量瓶中，加入流动相 B 定容，作为混合标准工作溶液。标准工作液需现用现配。

6 仪器和设备

6.1 超高效合相色谱，配置紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 研磨机。

6.3 振荡器。

6.4 分析天平（感量为 0.1mg）。

6.5 离心机（转速要求）。

6.6 水浴锅。

6.7 氮吹仪。

6.8 针头式过滤器。

7 分析步骤

7.1 样品制备

取片剂样品 20 片以上，用研磨机磨成粉末状；固体饮料取多个包装混合均匀。准确称取 0.5~5g（准确至 0.001g）样品到 50mL 带盖密封的离心管，加 10mL 二甲基亚砜混合溶液，混匀；放入 58~62℃ 水浴中 10 分钟，同时涡流搅拌，再用振荡器振荡 30 分钟；准确移入 25mL 正己烷，拧紧盖子，用振荡器振荡 30 分钟；放入离心机中，以 4000 转每分钟转速离心 5 分钟；小心准确移取 10mL 上层正己烷清液至 15mL 带盖密封的试管中，放入氮吹仪吹干溶剂；移入 2mL 复溶溶液，超声振荡溶解；用 0.22μm 有机针头过滤器将试管内复溶溶液过滤至液相色谱仪进样瓶中。（注：样品称样量和液稀释倍数可进行适当调整，以保证样品溶液的上机浓度在标准工作溶液浓度范围内。）

7.2 仪器参考条件

7.2.1 色谱柱：两根 ACQYITY UPCC HSS C18 1.8μm, 2.1mm*100mm 串联

7.2.2 流动相：A 为 CO₂，B 为 25% 甲醇 75% 乙腈体积比例混合溶液

7.2.3 检测波长 265 nm

7.2.4 参比波长 500~600 nm

7.2.5 进样量 10μL

7.2.6 柱温 40℃

7.2.7 梯度洗脱程序参见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间（分钟）	A（%）	B（%）	流速（毫升/分钟）
0.0	91.0	10.0	1.00
13.0	91.0	10.0	1.00
14.0	50.0	50.0	1.00
15.0	50.0	50.0	0.50
20.0	50.0	50.0	0.50
21.0	90.0	10.0	0.50
22.0	90.0	10.0	1.00
25.0	90.0	10.0	1.00

7.3 标准曲线的绘制

将混合标准工作液注入液相色谱仪中,得到峰面积,以峰面积为纵坐标,标准工作液浓度为横坐标,绘制维生素D₂、D₃、K₁和K₂的工作标准曲线。

7.4 试样测定

将样品测定溶液注入液相色谱仪中,得到维生素D₂、D₃、K₁和K₂峰面积,根据标准曲线计算待测溶液中各维生素的浓度。标准溶液色谱图见附录A。

8 分析结果的表述

8.1 维生素D₂、D₃、K₁和K₂标准工作液浓度按公式(1)计算。

$$C = \frac{M_{std} \times 1000 \times P}{V_{std}} \times \frac{D_1}{D_2} \times \frac{D_3}{D_4} \quad (1)$$

式中:

C ——标准工作液浓度(μg/mL)

M_{std} ——称取标准品的重量(mg)

P ——标准品的纯度(%)

V_{std} ——标准储备液定容体积(mL)

D₁ ——移取标准储备液体积(mL)

D₂ ——标准中间液定容体积(mL)

D₃ ——移取标准中间液体积(mL)

D₄ ——标准工作液定容体积(mL)

8.2 样品中维生素D₂、D₃、K₁和K₂含量按公式(2)计算。

$$X = \frac{C \times V}{M_{smp}} \times DF \quad (2)$$

式中:

X ——待测物含量(μg/g)

C ——样品溶液中待测物的浓度(μg/mL)

M_{smp} ——称取样品的重量(g)

V ——萃取液体积(mL)

DF ——样品的中间稀释倍数(如无中间稀释过程,则为1)

注:如需要可根据实际使用单位进行换算。

9 精密度

在重复条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过其算术平均值的10%。

10 方法检出限和定量限

当取样量为3.5g时,检出限为0.011 mg/100g;定量限0.033 mg/100g;

