

维生素类检测技术解决方案解读

林敬本教授

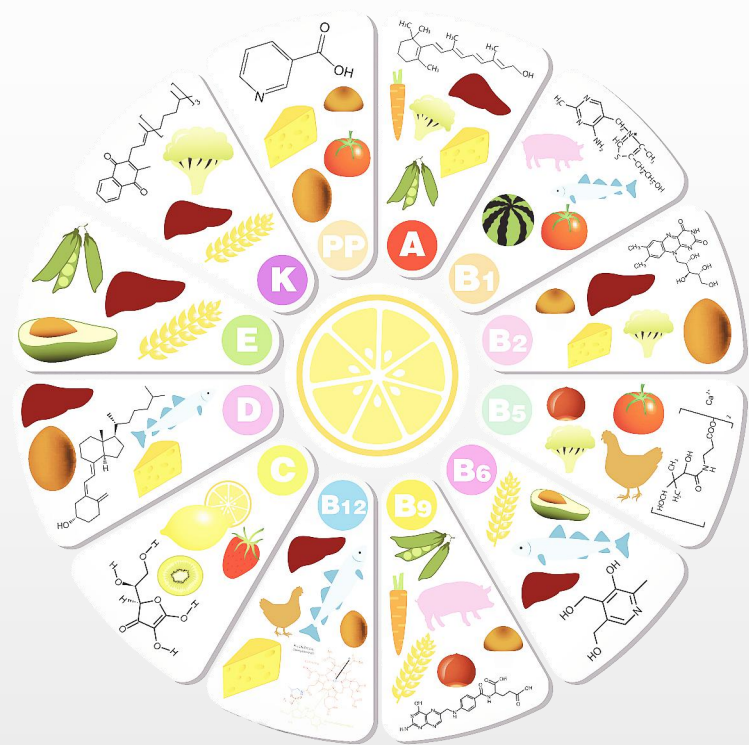
2020.5.14

目录

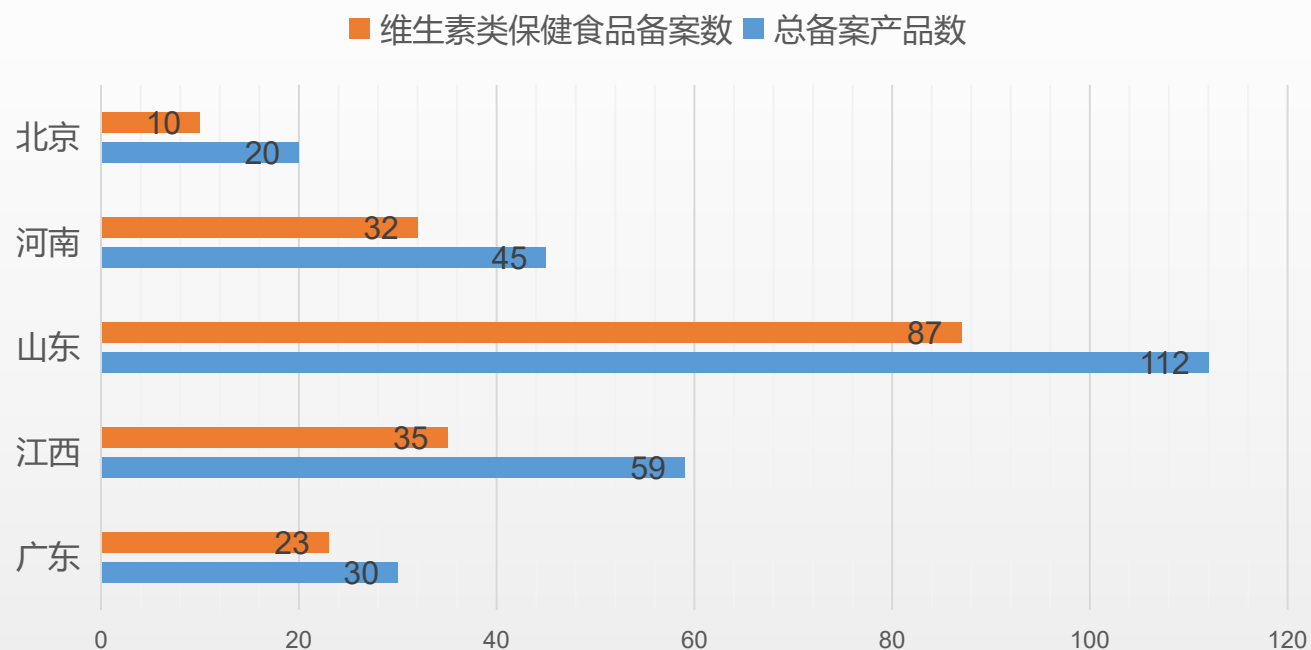
一、维生素简述

二、维生素检测及注意事项

三、讨论和体会



2020年第一季度12个省市市场监督管理局公布保健食品备案总数为**385**个，其中维生素类产品**276**个，占比达到**71.7%**。



维生素类产品维生素含量检测过程中的问题

原辅料对维生素
检测的影响

选择保健食品中维生素检测
方法的关键因素

制定企业标准维生素
检测方法的关键点

维生素定义

维生素是人和动物为维持正常的生理功能而必须从食物中获得的一类微量有机物质，在人体生长、代谢、发育过程中发挥着重要的作用。维生素既不参与构成人体细胞，也不为人体提供能量。



维生素分类



脂溶性维生素

维生素A、维生素E、维生素D



水溶性维生素

维生素C、维生素B1、维生素B2、维生素B6、烟酸和烟酰胺、叶酸、维生素B12

一、脂溶性维生素

1. 维生素A(视黄醇)

- **测定方法：**共7个，AOAC3个，目前常用GB5009.82-2016版 ADE测定。

注意
事项



用加热皂化法测定，维生素A盐类对照品同步皂化使维生素A游离，分子吸光度标定准确浓度，**原游离型标准品**，建议也经皂化提纯标定后使用。



一、脂溶性维生素

1. 维生素A(视黄醇)

- 强化性食品用有机溶剂直接抽提，用相应对照品定量，报告结果注意VA盐与VA的分子量换算。
- 试剂的预处理和提纯，有机溶剂要脱醛处理.实验操作避光。
- 如原料微囊化，要破坏微囊，再进行测定。



一、脂溶性维生素

2. 维生素E（生育酚）

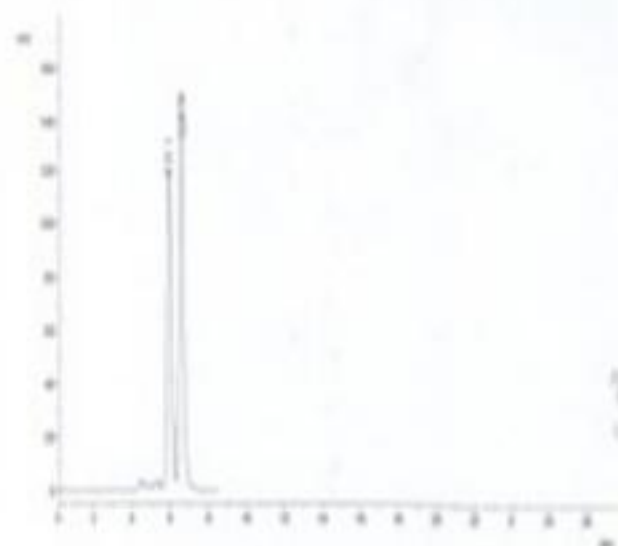
- **测定方法:**共11个，AOAC6个，多用HPLC法：GB5009.82-2016版ADE测定、GB1886.233-2016(GC法)。
- **注意事项:**

同维生素A,VA和VE可同时测定。



数据工作站分析报告

样品名: 104_ 透射电镜谱图(第1点2)

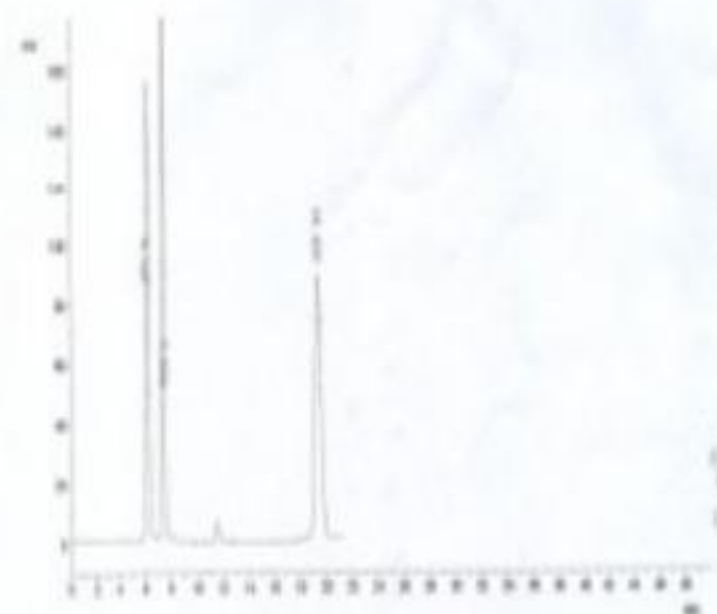


峰号	保留时间	峰高	峰面积	分子量	分子量分布	分子量分布	分子量
1	4.100	100.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2	4.100	100.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

峰号: 104_ 透射电镜谱图(第1点2)

数据工作站分析报告

样品名: (透射电镜谱图) 104_ 透射电镜谱图(第1点2)



峰号	保留时间	峰高	峰面积	分子量	分子量分布	分子量分布	分子量
1	4.100	100.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2	15.400	100.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
3	15.400	100.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

峰号: 104_ 透射电镜谱图(第1点2)

一、脂溶性维生素

3.维生素D（钙化醇）

- **测定方法:**共12个，AOAC8个，现有GB 5009.82-2016版ADE测
- ①.同VA。

②.建议:

用内标法定量、可适当提高皂化温度、标准贮备液冰箱保存10天、标准工作液现用现配、可用反相色谱柱直接分离测定。

③.GB 5009.82-2016版ADE测定VD3标准品CAS号：511-28-4应为67-97-0。



二、水溶性维生素

1. 维生素C（抗坏血酸）

测定方法:共19个，AOAC4个，多用GB5009.86-2016版、药典、“保健食品功效成分检测方法”-HPLC(书P245)。



食物中天然维生素C用GB 5009.86-2003和GB 5413.18-2010测定总抗坏血酸,建议采用荧光法,全部实验操作注意避光,玻璃器皿要洁净。

注意
事项

原料可用药典方法

二、水溶性维生素

1. 维生素C（抗坏血酸）

保健食品营养补充剂建议直接采用HPLC法,需留意原料中维C盐形式,且选择相应对照品定量,再分子量折算维C含量。



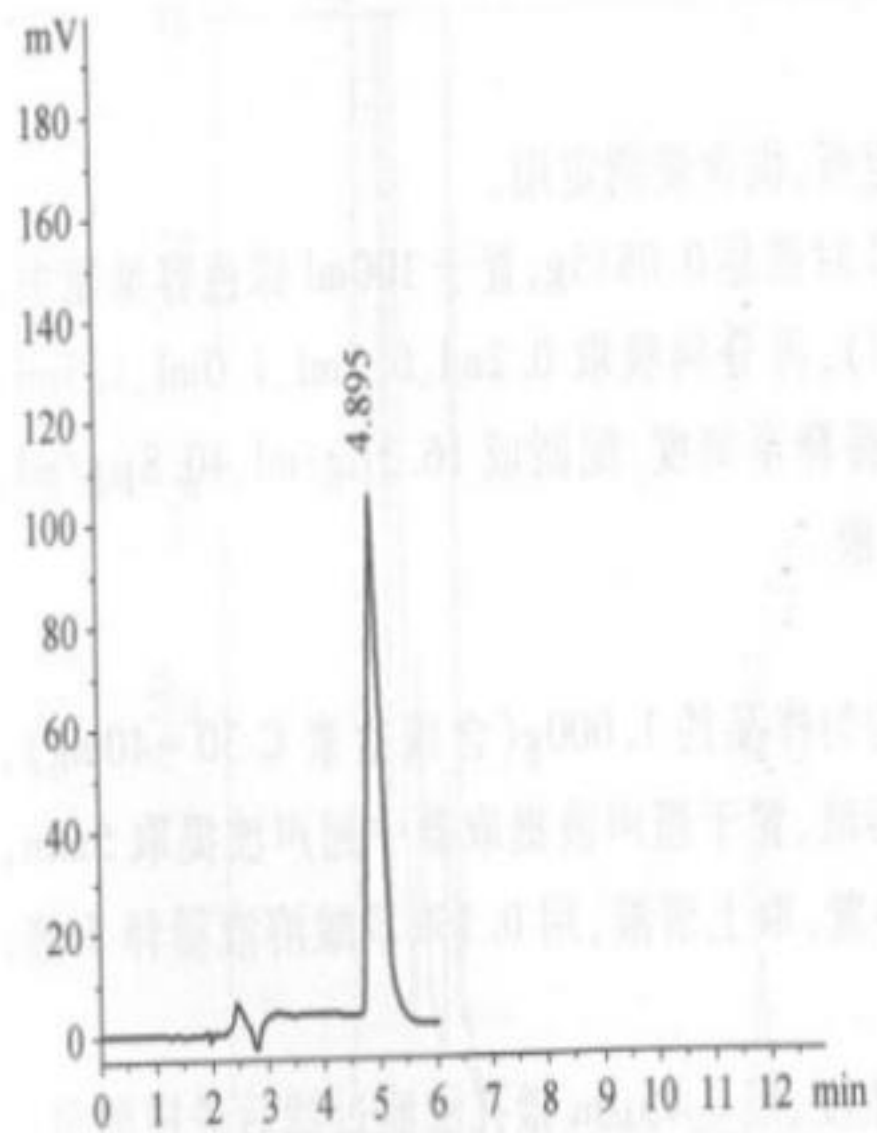


图 3-141 维生素 C 标准色谱图

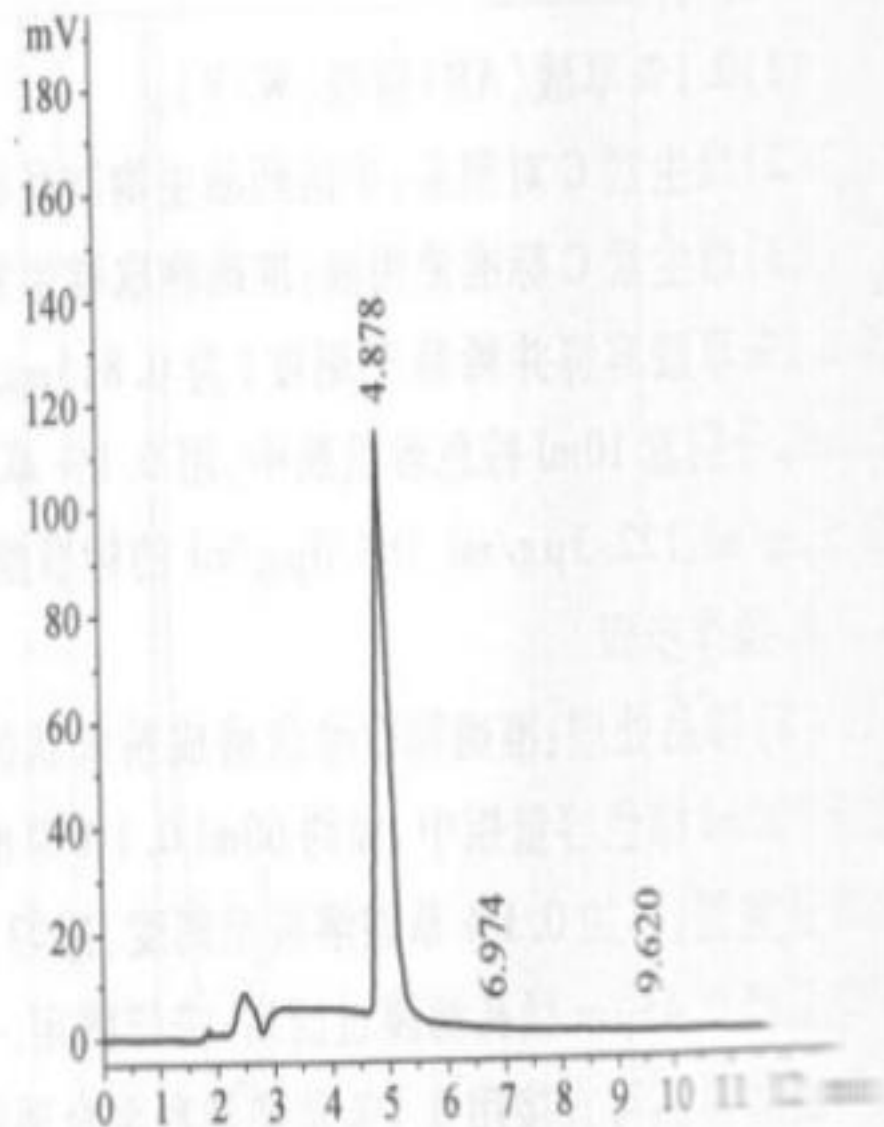


图 3-142 某维生素 C 咀嚼片样品色谱图

二、水溶性维生素

2. 维生素B1（硫胺素）：

测定方法:共13个, AOAC5个, 多用GB/T 5009.197-2003、GB5009.84-2016。



保健食品(包括营养补充剂)的B1不是结合状态,无须水解、酶解和净化,可用GB/T 5009.197-2003直接提取HPLC分离检测, 方法用离子对试剂, 仪器平衡时间长,紫外检测适用于含量较高样品,含量较低样品可用荧光检测, 维生素B1本身不产生荧光,必须衍生。

注意
事项

HPLC法最低检出量为0.4mg/kg,最佳线性为0.50-50.0ug/ml。

GB 5009.84适用于各类食品。

二、水溶性维生素

3.维生素B2（核黄素）：

测定方法:共9个，AOAC4个，多用GB 5009.85-2016、“保健食品功效成分检测方法”-HPLC(书P239页)。

保健食品(含营养补充剂)的B2不是结合状态,无须水解、酶解、吸附、洗脱,可用HPLC方法直接提取分离检测,方法使用离子对试剂,仪器平衡时间较长,该法**紫外检测适用含量较高样品,含量较低样品也可用荧光检测**,该法同时可测定B6、烟酸和烟酰胺。

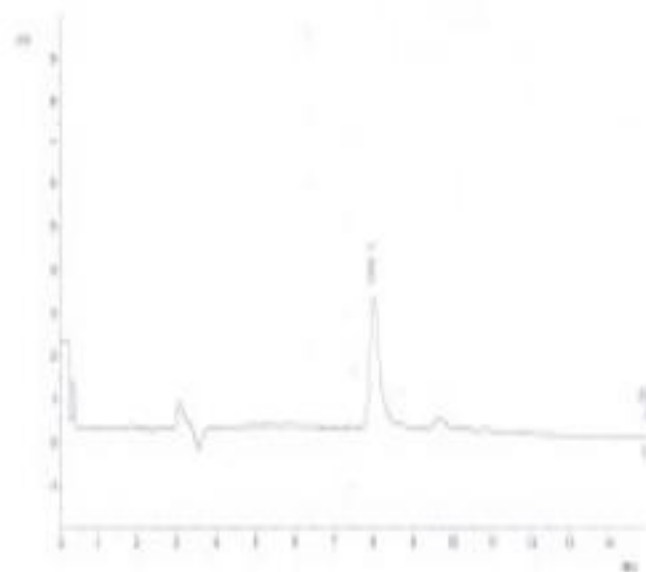
注意
事项

由于核黄素出峰居前,要注意样液中色素(如甜菜红的干扰),本法最低检出限2.2ng,最佳线性范围0.5-50ug/ml。

GB 5009.85(荧光法)适用于各类食品。

数据工作站分析报告

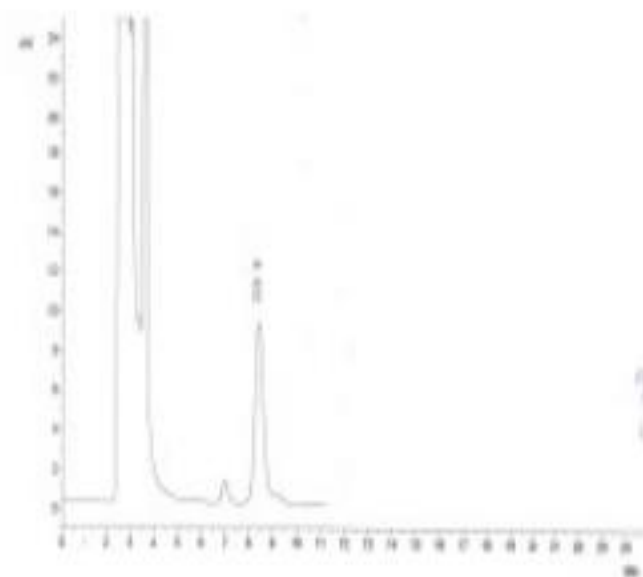
样品名: (康富尔维生素E片 标准色谱图)



峰号	峰名	保留时间	峰高	峰面积	分离度	物质分子	摩尔质量	含量
1		7.905	2794.7	30073.8	17.139	1.921	9101.436	98.5054
2		18.427	1038.4	10290.8	17.149	1.981	9204.910	1.4945
3		19.124	398.9	40617.2	1.302	8.548	86.791	0.0001
合计:			4624.0	116652.2				100.0000

数据工作站分析报告

样品名: (康富尔维生素E复合片标准片 (成人型) 20031101-4-19(2)色谱图)



峰号	峰名	保留时间	峰高	峰面积	分离度	物质分子	摩尔质量	含量
1		8.422	9903.8	101280.5	6.380	1.128	1024.086	100.0000
合计:			9903.8	101280.5				100.0000

二、水溶性维生素

4. 维生素B6（吡哆醇）

测定方法:共6个, AOAC2个, 多用GB/T 5009.197-2003、GB 5009.154-2016。

食物经提取纯化后用HPLC离子对反相色谱荧光检测能分离PN、PL、PM。

注意
事项

对于营养补充剂盐酸吡哆醇可用GB/T5009.197离子对试剂反相色谱紫外检测,并可同时检测VB2、烟酸、烟酰胺,HPLC法最低检出量0.4mg/kg.本法线性范围0.5-50ug/ml。

二、水溶性维生素

5.烟酸、烟酰胺

(1)测定方法:共12个, AOAC6个, 多用GB/T5009.197-2003、GB 5009.89-2016。

食物经酸解后可用微生物法、HPLC、或比色法测定。

注意
事项

营养补充剂烟酸、烟酰胺可用GB/T5009.197离子对试剂反相色谱紫外检测,并可同时检测VB2、VB6。

HPLC法最低检出量烟酸2.0mg/kg.烟酸胺1.2mg/kg,最佳线性范围均为1.0-100ug/ml。

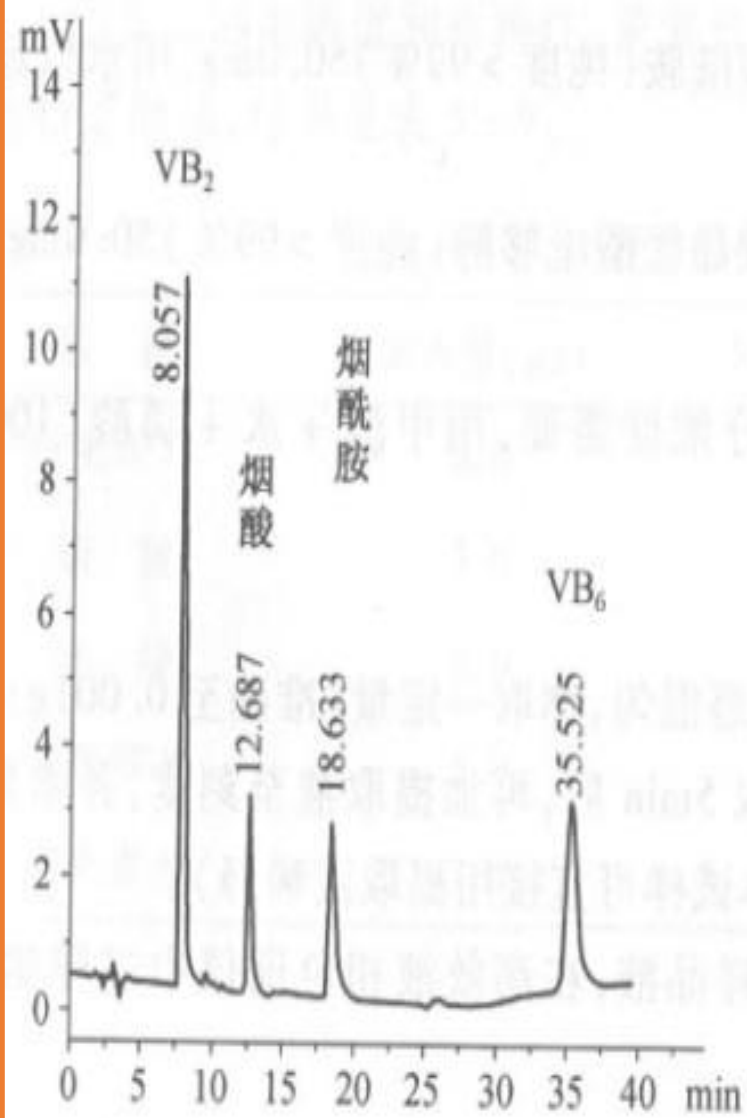


图 3-134 维生素 B₂、烟酸、烟酰胺、
维生素 B₆ 标准色谱图

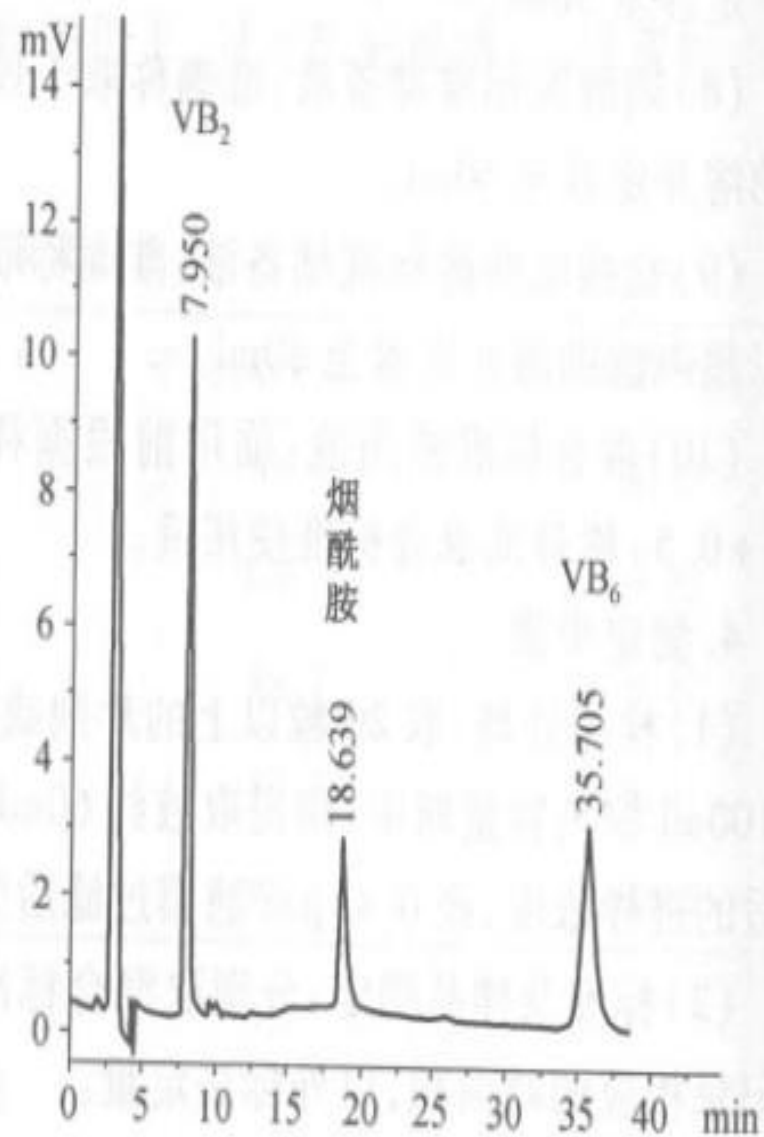


图 3-135 某多维他复合营养素片样品中
维生素 B₂、烟酰胺、维生素 B₆ 色谱图

二、水溶性维生素

6.叶酸

测定方法:共8个, AOAC3个, 多用药典-HPLC、GB 5009.211-2014(食品微生物法)。

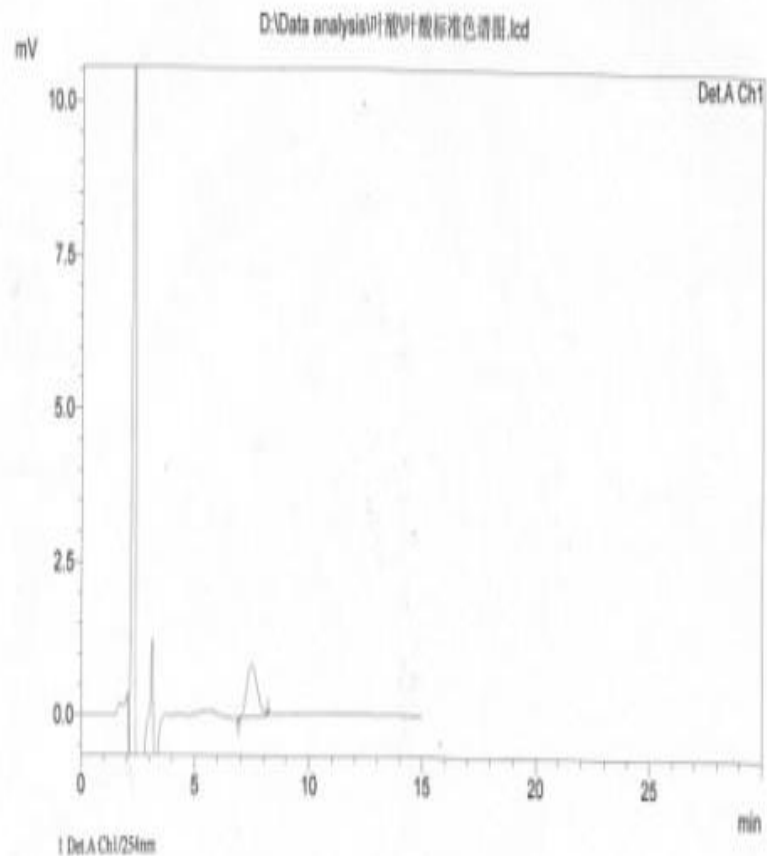
经典方法是微生物法, 营养补充剂可参考药典方法, 采样和操作时适当调节流动相比例使叶酸得到良好的分离, 本法最低检出限5.3ng, 最佳线性范围1.05-158ug/ml。

注意
事项

在保健食品和营养补充剂中, 叶酸的强化量比较小也可采用柱后衍生荧光检测, 如样品蛋白含量高会干扰, 在样品处理时应除去, 消除测定影响。

==== Shimadzu LCsolution LC Data Image ====

<Chromatogram>



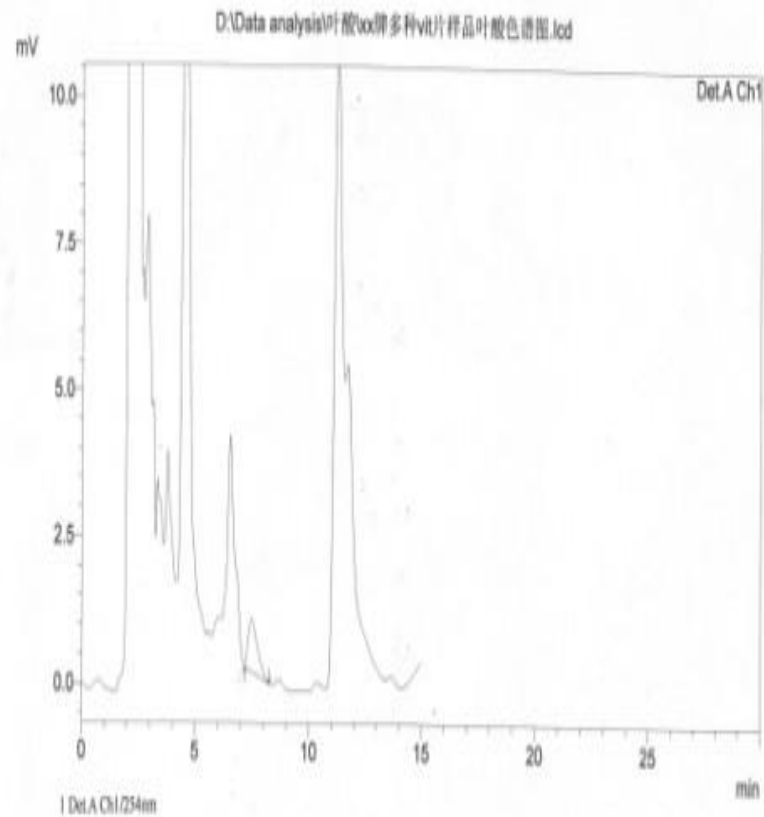
Quantitative Results

Detector A

ID#	Name	Ret.Time	Area	Height	Conc.
1	叶酸标准	7.499	26219	836	0.00

==== Shimadzu LCsolution LC Data Image ====

<Chromatogram>



Quantitative Results

Detector A

ID#	Name	Ret.Time	Area	Height	Conc.
1	叶酸	7.487	25020	888	0.00

二、水溶性维生素

7. 维生素B12 (氰钴胺)

测定方法:共6个, AOAC2个, 多用GB5413.14-2010(微生物法)、 GB/T 5009.217-2008、“保健食品功效成分检测方法”-HPLC(书p241页)。

经典的方法是
样品水解后用
微生物法测定。

注意
事项

保健食品和营养素补充剂中,B12添加量大大小于其它水溶性维生素,用HPLC检测有一定难度,需注意选择高效的色谱柱、有代表性的采样和达到检测限的进样量,“保健食品功效成分检测方法”推荐的方法最低检出限为4ng,线性范围0.103-1.650ug/ml,符合营养补充剂的检出要求。

2) 某多种维生素片的维生素 B₁₂ 标准及样品色谱图 (图 3-139、3-140)。

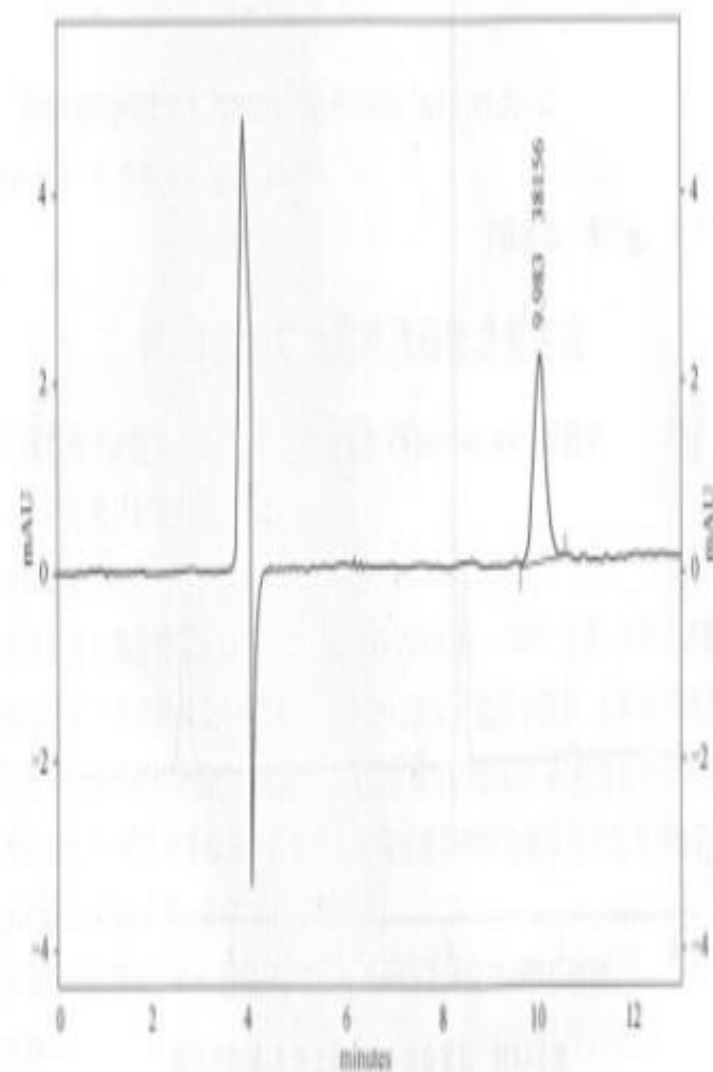


图 3-137 某复合维生素糖漿维生素 B₁₂ 标准色谱图

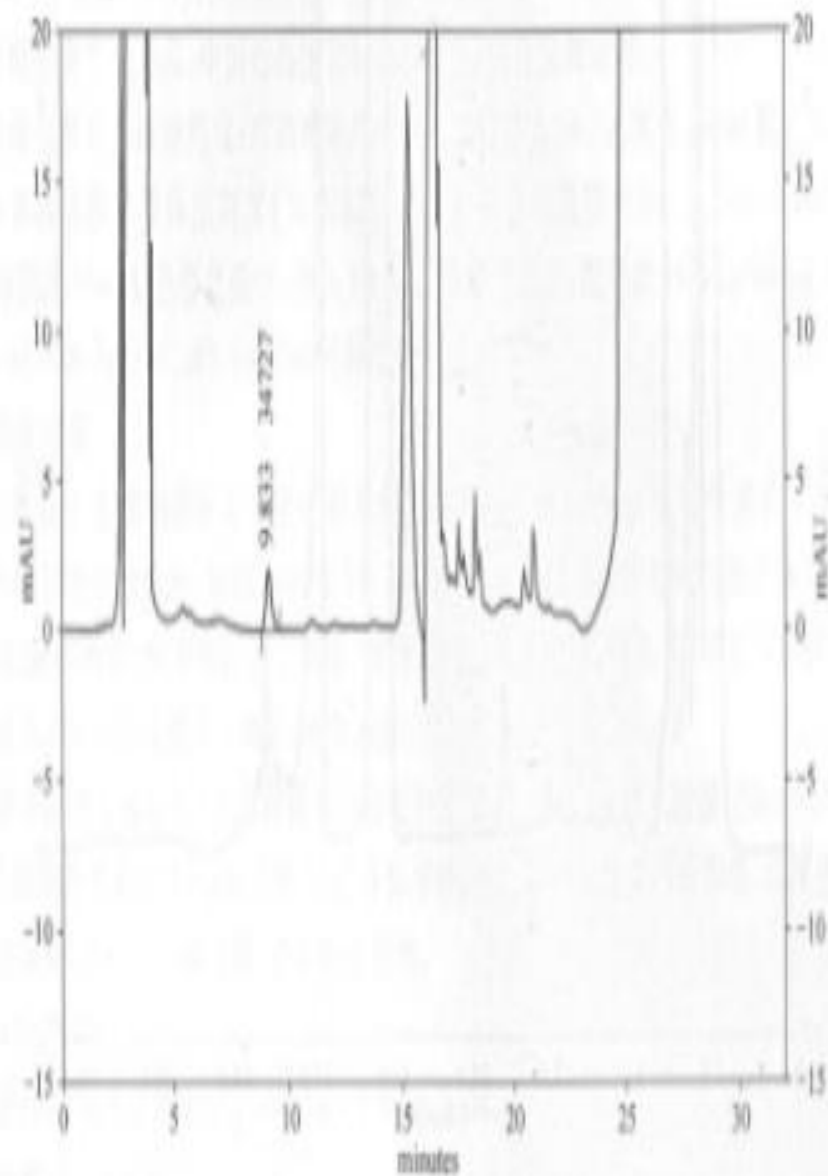


图 3-138 某复合维生素糖漿样品中维生素 B₁₂ 色谱图

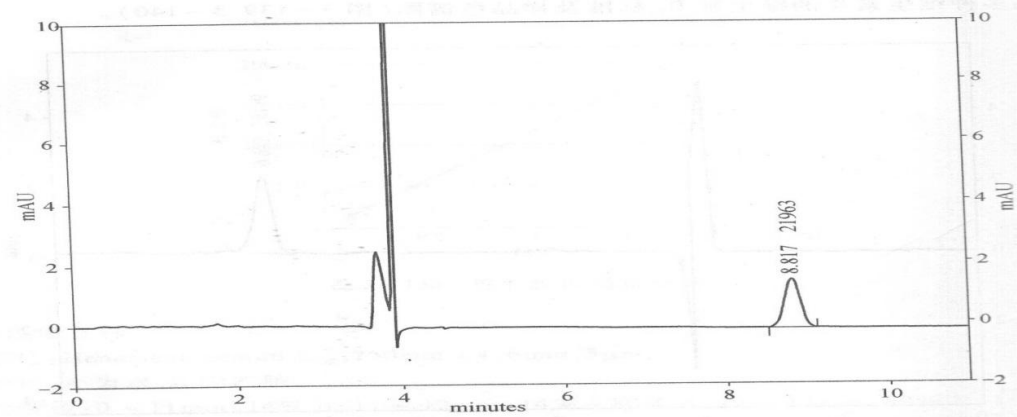


图 3 - 139 某复合维生素片维生素 B₁₂ 标准色谱图

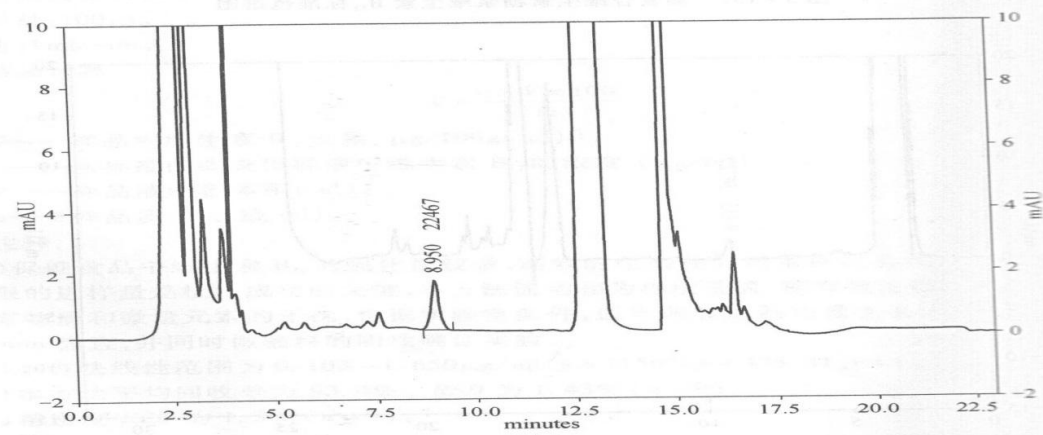


图 3 - 140 某多种维生素片样品中维生素 B₁₂ 色谱图

1. 水溶性维生素在食物中是以蛋白质结合的形式存在的,现行的GB法是建立在对天然食物结构中进行样品处理如:

1

VC的测定要先用活性碳氧化(将还原型的抗坏血酸氧化成脱氢型)再测定;

2

VB1要高压-酸解-酶解-人造浮石净化-氧化-测定;

3

VB2要高压酸解-酶解-氧化去杂质-硅镁吸附剂吸附-洗脱-测定等烦琐步骤才能将维生素游离检测。而对于营养补充剂只要在基质和辅料不干扰的情况下,可用溶剂直接提取后测定。

2. 天然食物中存在的脂溶性维生素多是结合状态,原则上需皂化使之游离,使VA酯类游离成VA测定,皂化水解是整个分析过程中造成误差的最大因素之一,皂化后有机溶剂提取、洗涤、浓缩、过滤、蒸干等操作复杂且繁琐,为减少实验操作误差,内标法定量,但对于营养补充剂在基质和辅料不干扰的情况下,也可用溶剂直接提取后测定。
3. 用溶剂直接提取后测定的维生素要选用相应的强化维生素的盐、酯类作对照品,再以分子量换算成该维生素的含量。
4. 维生素的标准对照品应在有效的保存期内使用,最好现用现配和即时标定。由于维生素的不稳定性,要注意实验室的避光,操作要快,当天要处理和测定完毕,试剂的纯化等。

5. 对内标物的要求:

1

在样品中不存在。

2

不与样品中组份发生任何的化学反应。

3

化学结构与待测组份相似(一般选用同系物、异构体)。

4

浓度(响应值)与被测组份接近。

5

色谱峰形与其它组份的峰分离要好。

6. 目前维生素的原料多为微胶囊状,一定要进行破膜处理使维生素游离后再提取测定,否则会影响检测结果,根据膜的特性和该维生素的检测要求:

1

用水或2%的碳酸胺在一定温度的水浴中超声处理。

2

用0.02%的氨水溶液加酶在一定温度的水浴中超声处理。

3

用95%的甲基亚砷水溶液在一定温度的水浴中超声,并于搅拌器中混合振荡处理。註:曾试验叶黄素不破膜处理的结果相当于破膜处理的85%。

7. 企业应了解原料供应商提供的维生素预混料的质量要求，同时应了解品牌、商标、化合物来源、理化性质、包装、运输、保存，保质期等。
8. 新产品经稳定性测试后应外送第三方检测机构进行验证，检测结果力求与目标值的误差在5%-10%之间，否则应核实原料、预混料和成品的检测方法是否符合。
9. 由于保健食品的配方复杂,为使被测组份达到良好的分离,可根据实验室的条件,适当改动样品处理步骤和流动相比比例,但企业标准中要注明,以免另第三方检测会有偏差。为避免第三方检测偏差，企业标准制定维生素检测方法一定要对方法进行细化，同时对检测方法进行适用性验证。
10. 小结

维生素A

视黄醇 286.45

醋酸视黄酯 328.49

棕榈视黄酯 524.86

维生素D

D2(麦角钙化醇) 396.66

D3(胆钙化醇) 384.65

维生素E

d- α -生育酚 430.71dl- α -生育酚 430.71d- α -生育酚醋酸酯 472.74dl- α -生育酚醋酸酯 472.74d- α -生育酚琥珀酸酯 530.79d- α -生育酚琥珀酸钙 1099.64dl- α -生育酚琥珀酸钙 1099.64

维生素C

- L-抗坏血酸 176.13
- L-抗坏血酸钠 198.11
- L-抗坏血酸钙 426.34
- 抗坏血酸磷酸酯镁 437.5
- 抗坏血酸棕榈酸酯 414.54

维生素B1

- 硫胺素300.81
- 盐酸硫胺337.27
- 硝酸硫胺327.36

维生素B2

- 核黄素376.36
- 核黄素-5-磷酸钠 475.33

维生素B6

- 吡哆醇 169.18
- 吡哆醛 167.16
- 吡哆胺 241.11
- 盐酸吡哆醇205.64

烟 酸

- 烟酸 123.11
- 烟酰胺 122.12



金至检测

KingTest

金域医学检验集团控股成员

谢谢!

李经理: 15820207469

邮箱: gz-liji@kingmed.com.cn

广州金至检测技术有限公司

地址: 中国广州市海珠区新港东路2429号海珠科技大楼三楼

金域医学检验集团官网Web.: www.kingmed.com.cn



金域医学公众号



金至检测服务号