

# 蜂蜜中维生素 D<sub>2</sub> 和 D<sub>3</sub> 的含量测定 二维高效液相色谱法

参考——GB 5009.296-2023（第二法）

## 一、背景

维生素 D 是人体必需的一种脂溶性维生素，包括维生素 D<sub>1</sub>~D<sub>5</sub> 多种形态，以维生素 D<sub>2</sub>（麦角钙化醇）和维生素 D<sub>3</sub>（胆骨化醇）为主。维生素 D 在肝、肾进一步转化为骨化三醇，作为一种激素重新进入血液循环，调节钙、磷的吸收，促进骨骼的生长和重构。维生素 D 缺乏可导致小儿佝偻病、成年人骨软化症和骨质疏松等。

## 二、实验过程

### 1 原理

试样经氢氧化钾乙醇溶液皂化，液液萃取净化、浓缩后，一维液相色谱通过 C<sub>8</sub> 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 C<sub>18</sub> 柱分离维生素 D<sub>2</sub> 和 D<sub>3</sub>，经紫外-可见光检测器检测，保留时间定性，外标法定量。

### 2 试剂与材料

2.1 水：符合 GB/T 6682 的一级水；

2.2 甲醇：色谱纯；

2.3 乙腈：色谱纯；

2.4 无水乙醇：色谱纯；

2.5 抗坏血酸：分析纯；

- 2.6 2, 6-二叔丁基对甲酚 (BHT) : 分析纯;
- 2.7 氢氧化钾: 分析纯;
- 2.8 正己烷: 色谱纯;
- 2.9 乙酸乙酯: 色谱纯;
- 2.10 氢氧化钾溶液 (50 %, 质量分数) : 称取 50 g 氢氧化钾 (2.7) , 溶于 50 g 水 (2.1) 中, 混匀, 冷却后储存于聚乙烯瓶中;
- 2.11 BHT-乙醇溶液 (0.2 g/100 mL) : 称取 1.0 g BHT (2.6) , 溶于 500 mL 无水乙醇 (2.4) 中, 混匀。临用新制;
- 2.12 乙醇-水溶液 (2+3) : 将无水乙醇 (2.4) 和水 (2.1) 按 2:3 的体积比混匀;
- 2.13 乙酸乙酯-正己烷溶液 (3+2) : 将乙酸乙酯 (2.9) 和正己烷 (2.8) 按 3: 2 的体积比混合均匀;
- 2.14 乙腈-甲醇溶液 (3+1) : 将乙腈 (2.3) 和甲醇 (2.2) 按 3: 1 的体积比混合均匀, 超声脱气;
- 2.15 甲醇-水溶液 (1+19) : 将甲醇 (2.2) 和水 (2.1) 按 1:19 的体积比混合均匀, 超声脱气;
- 2.16 维生素 D<sub>2</sub> 标准品: CAS 号为 50-14-6, 纯度为 97.6 %;
- 2.17 维生素 D<sub>3</sub> 标准品: CAS 号为 67-97-0, 纯度为 98.0 %;
- 2.18 维生素 D<sub>2</sub> 储备液 (1000 µg/mL) : 称取维生素 D<sub>2</sub> 标准品 4.3 mg (2.16) , 用 4.19 mL 甲醇 (2.2) 溶解, 配制成维生素 D<sub>2</sub> 浓度为 1000 µg/mL 的储备液;
- 2.19 维生素 D<sub>3</sub> 储备液 (1000 µg/mL) : 称取维生素 D<sub>3</sub> 标准品 5.7 mg (2.17) , 用 5.58 mL 甲醇 (2.2) 溶解, 配制成维生素 D<sub>3</sub> 浓度为 1000 µg/mL 的储备液;

- 2.20 维生素 D<sub>2</sub> 标准溶液中间液 (10 µg/mL) : 吸取维生素 D<sub>2</sub> 储备液 (2.18) 100 µL, 用甲醇 (2.2) 定容至 10 mL, 配制成维生素 D<sub>2</sub> 浓度为 10 µg/mL 的中间液;
- 2.21 维生素 D<sub>3</sub> 标准溶液中间液 (10 µg/mL) : 吸取维生素 D<sub>3</sub> 储备液 (2.19) 100 µL, 用甲醇 (2.2) 定容至 10 mL, 配制成维生素 D<sub>3</sub> 浓度为 10 µg/mL 的中间液;
- 2.22 维生素 D<sub>2</sub> 标准使用溶液 (1.0 µg/mL) : 吸取维生素 D<sub>2</sub> 标准溶液中间液 (2.20) 100 µL, 加入 900 µL 甲醇 (2.2) , 配制成维生素 D<sub>2</sub> 浓度为 1.0 µg/mL 的标准使用溶液;
- 2.23 维生素 D<sub>3</sub> 标准使用溶液(1.0 µg/mL) : 吸取维生素 D<sub>3</sub> 标准溶液中间液 (2.21) 100 µL, 加入 900 µL 甲醇 (2.2) , 配制成维生素 D<sub>3</sub> 浓度为 1.0 µg/mL 的标准使用溶液;
- 2.24 混合标准系列工作液: 分别吸取维生素 D<sub>2</sub> 标准使用溶液 (2.22) 和维生素 D<sub>3</sub> 标准使用溶液 (2.23) 适量, 用甲醇 (2.2) 配制成混合标准系列工作液, 质量浓度依次为 2.5 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL;
- 2.25 市售蜂蜜试样。

### 3 仪器与设备

- 3.1 二维高效液相色谱仪系统: K2025 P2 二元高压输液泵 (一维)、K2025 P2 二元高压输液泵 (二维)、K2025 AS 自动进样器、K2025 Plus CO 立式柱温箱 (配置 2 位 6 通阀)、K2025 UVD 紫外-可见光检测器 (一维)、K2025 UVD 紫外-可见光检测器 (二维)、Wookinglab 二维色谱工作站;
- 3.2 分析天平: 精确到 0.0001 g;
- 3.3 超声波清洗机;
- 3.4 涡旋混合器;
- 3.5 磁力搅拌器: 带控温功能;

- 3.6 旋转蒸发仪;
- 3.7 氮气浓缩仪;
- 3.8 多功能振荡器: 安装 50 mL 离心管;
- 3.9 离心机: 安装 50 mL 离心管;
- 3.10 具塞锥形瓶 (带橡胶塞): 250 mL;
- 3.11 分液漏斗: 250 mL;
- 3.12 圆底烧瓶: 150 mL;
- 3.13 具塞离心管: 10mL、50mL;
- 3.14 容量瓶: 5mL、100mL, 棕色带刻度;
- 3.15 一次性针头注射器;
- 3.16 微孔滤膜: 0.22  $\mu\text{m}$ , 有机相。

## 4 测定步骤

### 4.1 试样皂化

试样做两次平行实验。称取蜂蜜试样 (2.25) 2.0278 g、2.3280 g, 分别置于 150 mL 具塞锥形瓶中, 加入 1.0 g 抗坏血酸 (2.5) 和 30 mL BHT-乙醇溶液 (2.11), 放入磁力搅拌子, 将平底烧瓶置于磁力搅拌器 (3.5) 中搅拌, 混匀后加入约 20 mL 温水 (40  $^{\circ}\text{C}$ ~45  $^{\circ}\text{C}$ ), 混匀, 再加入 20 mL 氢氧化钾溶液 (2.10), 边加边振摇, 混匀后于磁力搅拌器中皂化, 温度设置为 80  $^{\circ}\text{C}$ , 时间为 30 min, 皂化后立即用冷水冷却至室温; 用乙醇-水溶液 (2.12) 将皂化液转移至 100 mL 容量瓶中, 并用乙醇-水溶液 (2.12) 定容至刻度, 摇匀; 准确移取 20 mL 皂化液于 50 mL 离心管中, 待提取净化。

同时取蜂蜜试样 (2.25) 2.0305 g 于 150 mL 具塞锥形瓶中, 分别加入 1.0  $\mu\text{g/mL}$  维

生素 D<sub>2</sub> 标准使用溶液 (2.22) 和 维生素 D<sub>3</sub> 标准使用溶液 (2.23) 各 500 μL, 进行加标回收实验, 其余操作步骤同试样皂化过程, 制得试样加标皂化液。

#### 4.2 试样萃取

向上述装有皂化液的离心管中加入 5 mL 水 (2.1), 混匀, 再加入 20 mL 乙酸乙酯-正己烷混合溶液 (2.13), 振荡提取 30 min, 于 4000 r/min 条件下离心 3 min, 将上层溶液转移至另一 50 mL 离心管中, 重复提取 1 次, 合并上层有机相, 转移至旋蒸瓶中, 于 40 °C 旋蒸至约 1 mL, 用乙酸乙酯-正己烷混合溶液 (2.13) 转移至 10 mL 离心管中, 置于氮吹仪中吹至近干, 用约 4 mL 乙腈-甲醇溶液 (3:1) (2.14) 分 3 次溶解并转移至 5 mL 容量瓶中, 用水 (2.1) 定容至刻度, 混匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 待高效液相色谱仪测定。

#### 4.3 色谱条件

a) 色谱柱: 一维色谱柱: C<sub>8</sub> 柱, 4.6×150 mm, 5 μm 或其他效能相当者;

二维色谱柱: 多环芳烃 (PAH) C<sub>18</sub> 柱, 4.6×150 mm, 3.5 μm 或其他效能相当者;

富集柱: C<sub>18</sub> 柱, 4.6×100 mm, 5 μm 或其他效能相当者;

b) 流动相: 一维流动相: A 相为乙腈-甲醇=3:1 (2.14); B 相为水 (2.1); 按照下表进行梯度洗脱:

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.0	1.0	80	20
16.0	1.0	100	0
19.0	1.0	100	0
19.5	1.0	80	20
30.0	1.0	80	20

二维流动相: A 相为甲醇 (2.2) ; 按照下表进行洗脱:

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)
0.0	1.0	100
30.0	1.0	100

c) 进样量及进样方式: 100  $\mu$ L, 满环携带进样;

e) 洗针液: 90 %甲醇水溶液;

f) 柱温: 40  $^{\circ}$ C;

g) 切换阀: 根据维生素 D 在一维色谱柱上的保留时间确定阀切换时间, 如下表所示:

时间 (min)	阀	状态
0.00	B 阀:2 位 6 通阀	1-2,3-4,5-6
13.50	B 阀:2 位 6 通阀	1-2,3-4,5-6
15.50	B 阀:2 位 6 通阀	6-1,2-3,4-5

h) 检测器及检测波长: 均为紫外-可见光检测器, 检测波长均为 264 nm。

## 5 实验结果

### 5.1 一维色谱图和二维色谱图

按照上述色谱条件 (4.3) 进行采集, 维生素 D<sub>2</sub> 和维生素 D<sub>3</sub> 混合标准溶液 (浓度均为 50 ng/mL), 当设置不切阀时, 一维色谱图如图 1 所示, 二维色谱图如图 2 所示。

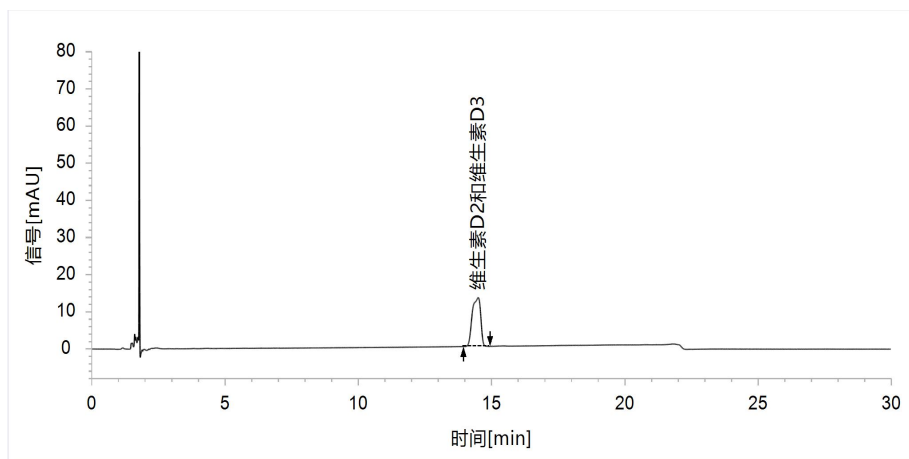


图 1 混合标准溶液（浓度均为 50 ng/mL）一维液相色谱图（不切阀）

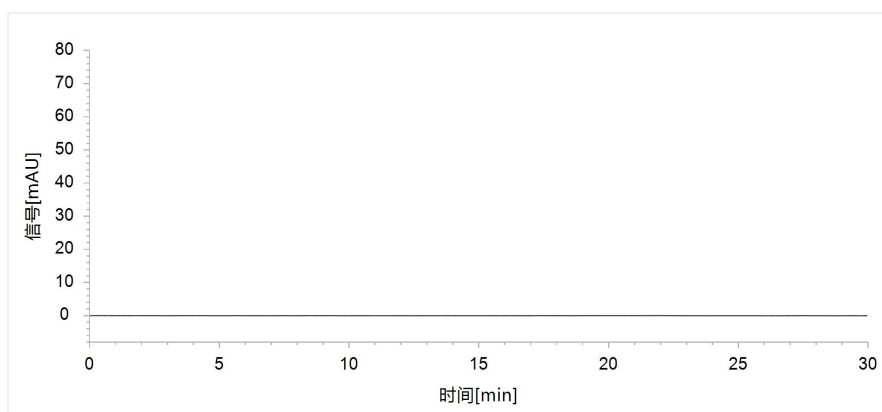


图 2 混合标准溶液（浓度均为 50 ng/mL）二维液相色谱图（不切阀）

当设置切阀时，一维色谱图如图 3 所示，二维色谱图如图 4 所示。

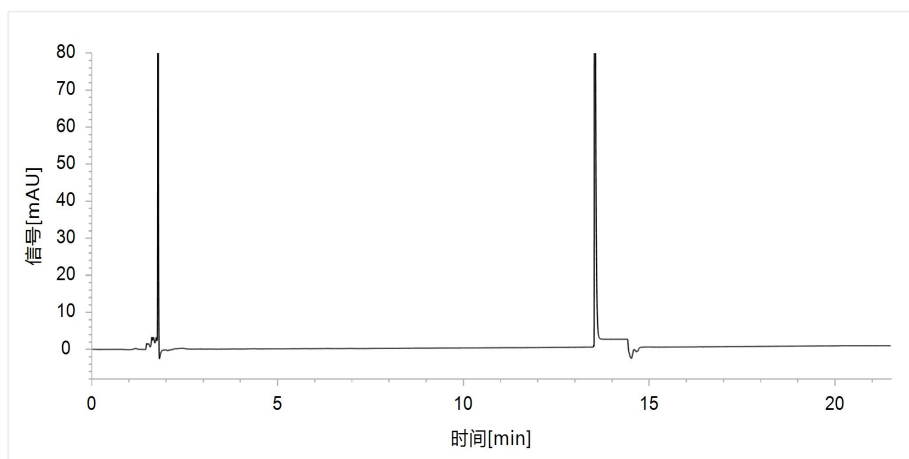


图 3 混合标准溶液（浓度均为 50 ng/mL）一维液相色谱图（切阀）

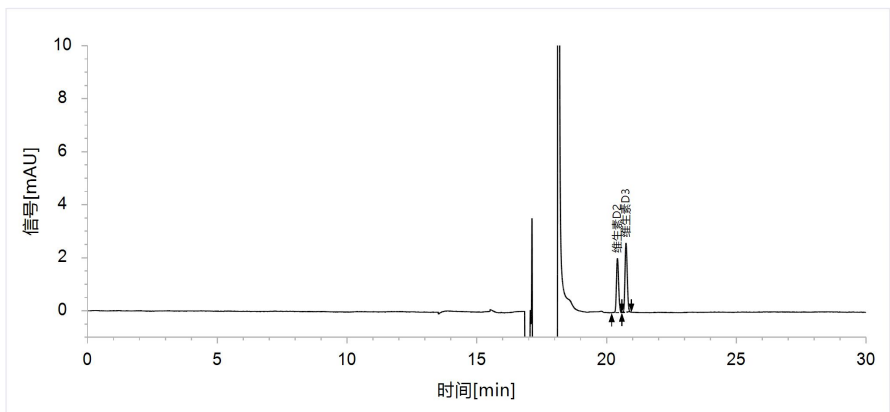


图 4 混合标准溶液（浓度均为 50 ng/mL）切阀的二维液相色谱图

由图 1~图 2 可知，未切阀时，样品只在一维液相上分离，将维生素 D 和其余物质分开，二维液相色谱图上无峰；由图 3~图 4 可知，切阀后，维生素 D 进入二维液相系统进行分离，维生素 D<sub>3</sub>与维生素 D<sub>2</sub>的分离度满足要求。

## 5.2 重复性测试

按照上述色谱条件（4.3）进行采集，维生素 D<sub>2</sub>和维生素 D<sub>3</sub>混合标准溶液（浓度均为 50 ng/mL），当设置切阀时，其积分结果表如图 1 所示。

表 1 混合标准溶液（浓度均为 50 ng/mL）色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔板数	分离度	对称/拖尾因子
维生素 D <sub>2</sub>	20.413	12.285	2.058	274999	-	1.23
维生素 D <sub>3</sub>	20.747	16.145	2.636	264206	2.10	1.19

由表 1 中数据可知，维生素 D<sub>2</sub>的理论塔板数为 274999，拖尾因子为 1.23；维生素 D<sub>3</sub>的理论塔板数为 264206，拖尾因子为 1.19，均具有良好的峰形；维生素 D<sub>3</sub>与维生素 D<sub>2</sub>间的分离度为 2.10，可实现良好的基线分离。



将混合标准溶液（浓度均为 50 ng/mL）连续进样 7 针进行重复性测试，叠加的色谱图如图 5 所示，结果见表 2。

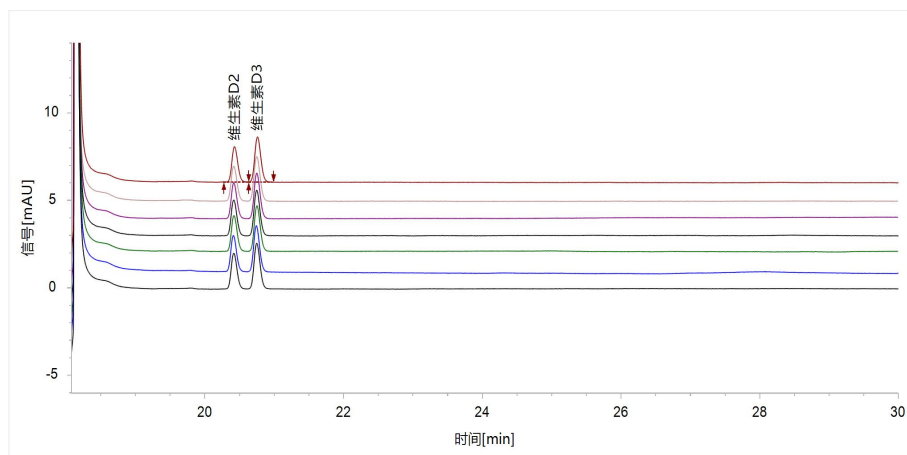


图 5 混合标准溶液（浓度均为 50 ng/mL）连续进样 7 针叠加的色谱图

表 2 混合标准溶液（浓度均为 50 ng/mL）连续进样 7 针重复性数据统计

目标物	项目	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
维生素 D <sub>2</sub>	保留时间 (min)	20.413	20.412	20.422	20.415	20.415	20.417	20.428	20.417	0.03
	峰面积 (mAU.s)	12.285	12.130	12.168	12.232	12.009	12.055	12.090	12.138	0.80
维生素 D <sub>3</sub>	保留时间 (min)	20.747	20.743	20.750	20.747	20.748	20.748	20.758	20.749	0.02
	峰面积 (mAU.s)	16.145	16.203	16.096	16.028	16.048	15.999	16.110	16.090	0.44

由表 2 中数据可知，混合标准溶液（浓度均为 50 ng/mL）连续进样 7 针进行重复性测试，维生素 D<sub>2</sub> 保留时间的 RSD 为 0.03 %，峰面积的 RSD 为 0.80 %；维生素 D<sub>3</sub> 保留时间的 RSD 为 0.02 %，峰面积的 RSD 为 0.44 %，均具有良好的定性定量重复性。

### 5.3 仪器灵敏度测试

将混合标准系列工作液中浓度为 2.5 ng/mL 的溶液作为灵敏度溶液，其色谱图如图 6 所示，计算结果见表 3。

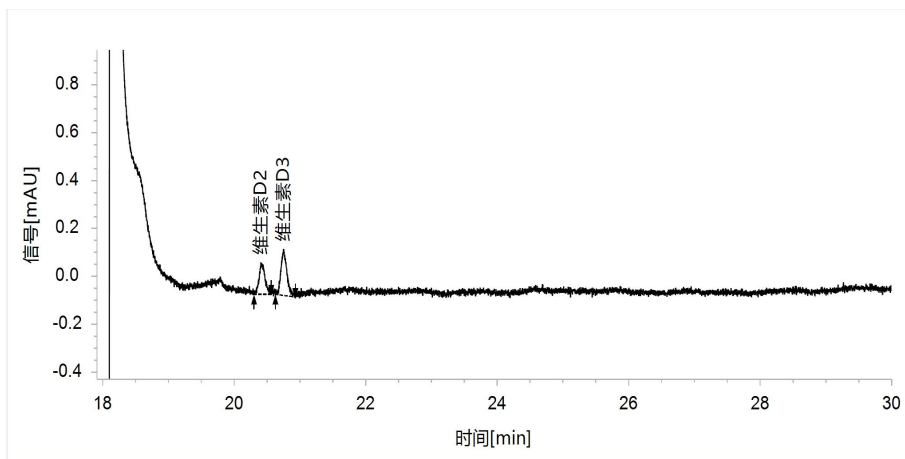


图 6 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

目标物	浓度 (ng/mL)	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
维生素 D <sub>2</sub>	2.5	0.135	0.040	3.38	2.218	7.396
维生素 D <sub>3</sub>		0.196		4.90	1.530	5.102

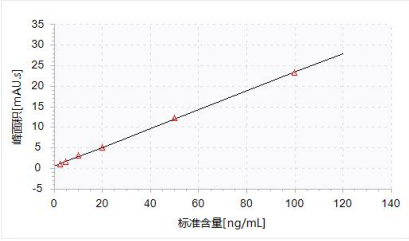
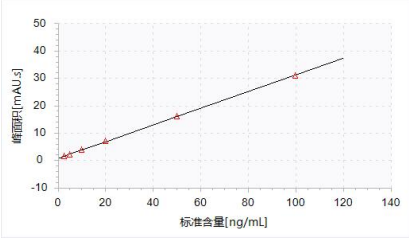
由表 3 中数据可知，维生素 D<sub>2</sub> 的仪器检出限为 2.218 ng/mL，仪器定量限为 7.396 ng/mL；维生素 D<sub>3</sub> 的仪器检出限为 1.530 ng/mL，仪器定量限为 5.102 ng/mL。

## 5.4 含量测定

### 5.4.1 校准曲线的绘制

按照色谱条件（4.3），将混合标准系列工作液（2.24）上机测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，线性方程和确定系数如表 4 所示。

表 4 校准曲线、线性方程和确定系数汇总表

目标物	校准曲线	线性方程及确定系数
维生素 D <sub>2</sub>		<div>方程式 <math>y=0.22832*x+0.43281</math></div> <div>相关系数(R) 0.9996</div> <div>确定系数(R<sup>2</sup>) 0.9993</div>
维生素 D <sub>3</sub>		<div>方程式 <math>y=697.00074*x-7.09767</math></div> <div>相关系数(R) 0.9999</div> <div>确定系数(R<sup>2</sup>) 0.9998</div>

由表 4 中数据可知，维生素 D<sub>2</sub> 和维生素 D<sub>3</sub> 在 2.5 ng/mL~100 ng/mL 浓度范围内均呈现良好的线性关系，确定系数 R<sup>2</sup> 均>0.999。

混合系列标准工作液（2.24）叠加的色谱图如图 7 所示。

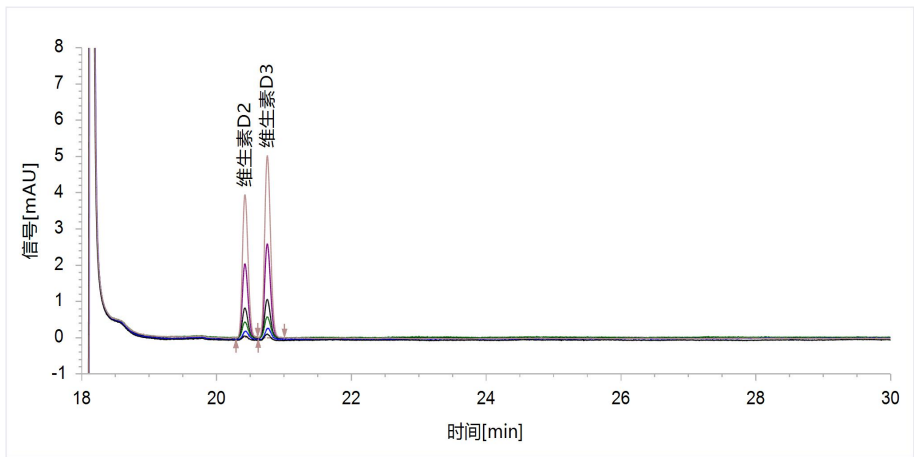


图 7 混合系列标准工作液叠加的色谱图

#### 5.4.2 含量测定

按照色谱条件（4.3），对空白溶液、试样测定液和试样加标测定液进行采集，依据公式（1）计算蜂蜜试样中维生素 D<sub>2</sub> 和维生素 D<sub>3</sub> 的含量。

$$X = \frac{C_i \times V \times 100}{m_i \times 1000} \times f \quad \text{----公式（1）}$$

式中：X----为蜂蜜试样中维生素 D<sub>2</sub>/维生素 D<sub>3</sub> 的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

C<sub>i</sub>----为从校准曲线计算得到的试样测定液中维生素 D<sub>2</sub>/维生素 D<sub>3</sub> 的质量浓度，

单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V----为试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

100----为由每克换算为每百克的换算系数；

m<sub>i</sub>----为试样的质量，单位为克（g）；

1000----为由 ng 换算为 μg 的换算系数；

f----为稀释因子。

计算结果保留 3 位有效数字。

空白溶液、试样测定液和试样加标测定液的色谱图如图 8~图 11 所示，试样含量结果及回收率汇总表见 5。

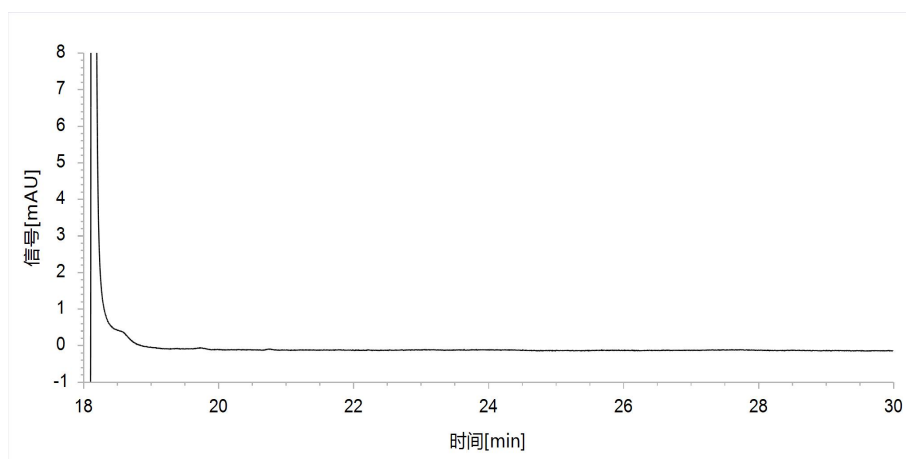


图 8 空白溶液的色谱图

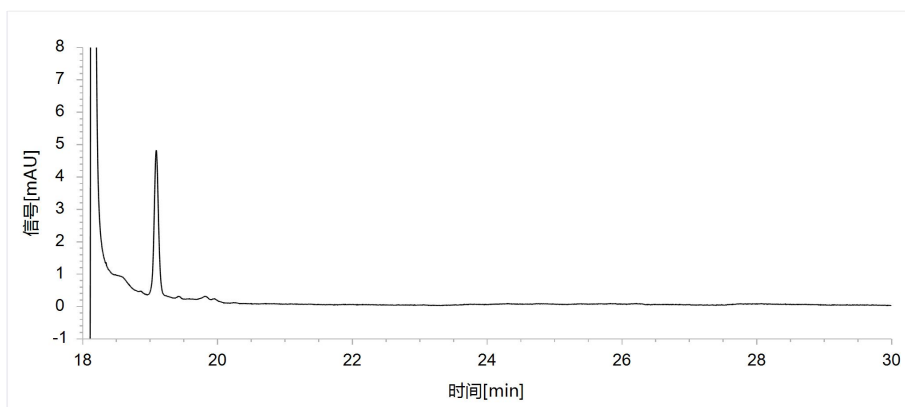


图 9 试样平行样 1 测定液的色谱图

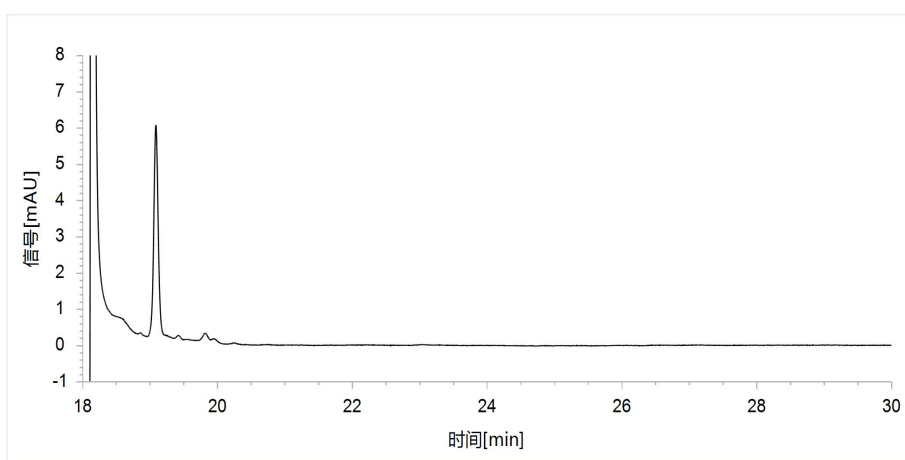


图 10 试样平行样 2 测定液的色谱图

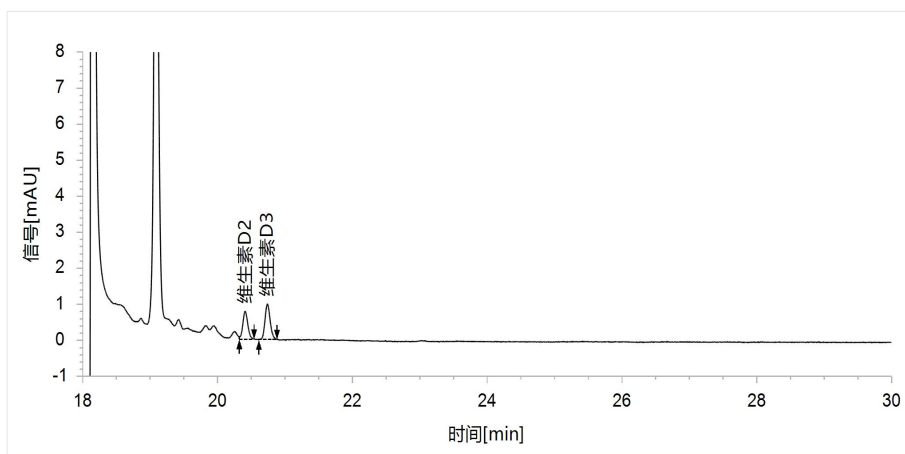


图 11 试样加标测定液的色谱图

表 5 试样含量结果及回收率汇总表

名称	目标物	峰面积 (mAU.s)	实测含量 (ng/mL)	试样加标量 ( $\mu$ g)	回收率 (%)
试样平行样 1	维生素 D <sub>2</sub>	-	-	-	-
	维生素 D <sub>3</sub>	-	-	-	-
试样平行样 2	维生素 D <sub>2</sub>	-	-	-	-
	维生素 D <sub>3</sub>	-	-	-	-
试样加标	维生素 D <sub>2</sub>	4.018	16.653	0.5	83.2
	维生素 D <sub>3</sub>	5.406	16.424	0.5	82.1

依据公式 (1) 进行计算, 蜂蜜试样中维生素 D<sub>2</sub> 和维生素 D<sub>3</sub> 均未检出; 加标回收实验中, 维生素 D<sub>2</sub> 和维生素 D<sub>3</sub> 的加标回收率分别为 83.2 % 和 82.1 %。

## 6 结论

本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪测定蜂蜜试样中维生素 D<sub>2</sub> 和维生素 D<sub>3</sub> 的含量, 实验结果表明: 未切阀时, 样品只在一维液相上分离, 将维生素 D 和其余物质分开, 二维液相色谱图上无峰; 切阀后, 维生素 D 进入二维液相系统进行分离, 维生素 D<sub>3</sub> 与维生素 D<sub>2</sub> 的分离度满足要求; 维生素 D<sub>2</sub> 的理论塔板数为 274999, 拖尾因子为 1.23; 维生素 D<sub>3</sub> 的理论塔板数为 264206, 拖尾因子为 1.19, 均具有良好的峰形; 维生素 D<sub>3</sub> 与维生素 D<sub>2</sub> 之间的分离度为 2.10, 可实现良好的基线分离; 将混合标准溶液连续进样 7 针进行重复性测试, 维生素 D<sub>2</sub> 保留时间的 RSD 为 0.03 %, 峰面积的 RSD 为 0.80 %; 维生素 D<sub>3</sub> 保留时间的 RSD 为 0.02 %, 峰面积的 RSD 为 0.44 %, 均具有良好的定性定量重复性; 灵敏度测试中, 维生素 D<sub>2</sub> 的仪器检出限为 2.218 ng/mL, 仪器定量限为 7.396 ng/mL; 维生素 D<sub>3</sub> 的仪器检出限为 1.530  $\mu$ g/mL, 仪器定量限为 5.102  $\mu$ g/mL; 维生素 D<sub>2</sub> 和维生素 D<sub>3</sub> 在 2.5 ng/mL~100.0 ng/mL 浓度范围内均呈现良好的线性关系, 确定系数 R<sup>2</sup> 均>0.999; 蜂蜜试

样中维生素 D<sub>2</sub>和维生素 D<sub>3</sub>均未检出;加标回收实验中,维生素 D<sub>2</sub>和维生素 D<sub>3</sub>的加标回收率分别为 83.2 %和 82.1 %。因此,使用悟空 K2025 二维高效液相色谱仪可以满足《GB 5009.296-2023 食品安全国家标准 食品中维生素 D 的测定(第二法)》中对蜂蜜中维生素 D<sub>2</sub>和维生素 D<sub>3</sub>含量测定的需求。

## 7 注意事项

7.1 维生素 D<sub>2</sub>标准品和维生素 D<sub>3</sub>标准品应冷冻保存;使用时取出,待其恢复室温后使用。

7.2 维生素 D 见光易分解,实验过程中应避免紫外光照射。

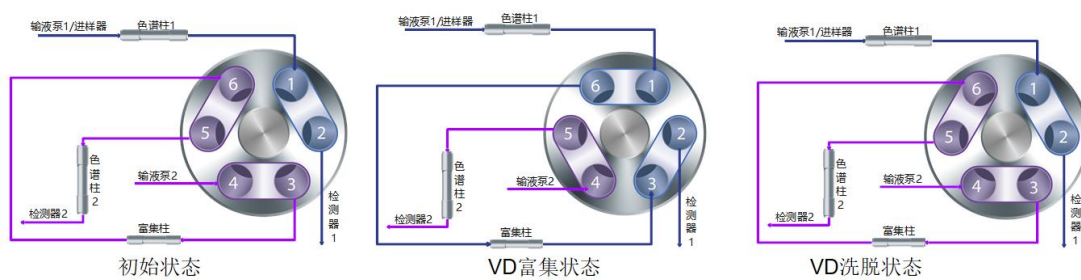
7.3 本实验试样的提取净化过程使用的是液液萃取法,若回收率较低,可以增加振荡提取时间,让其提取充分。

7.4 《GB 5009.296-2023 食品安全国家标准 食品中维生素 D 的测定(第二法)》中 10.2.6

“甲醇-水溶液(1+19):将甲醇和水按照 19:1 的体积比混合均匀,超声脱气”中存在错误,应为“将甲醇和水按照 1:19 的体积比混合均匀,超声脱气”。

7.5 二维液相系统上维生素 D<sub>2</sub>和维生素 D<sub>3</sub>分离时,使用标准中指定的色谱柱,若按照《GB 5009.296-2023 食品安全国家标准 食品中维生素 D 的测定(第二法)》中流动相及梯度表进行实验,维生素 D<sub>2</sub>和维生素 D<sub>3</sub>的灵敏度较低,为了提高检出能力,将流动相更换成 100% 甲醇,使维生素 D<sub>2</sub>和维生素 D<sub>3</sub>的出峰提前。

7.6 《GB 5009.296-2023 食品安全国家标准 食品中维生素 D 的测定(第二法)》附录 C 中,在线柱切换-液相色谱系统流路示意图中 b) 阀切换 VD 富集状态示意图存在错误,正确示意图如下图所示:





# 附 1: 仪器配置清单

序号	单元
K2025 二维高效液相色谱仪	
A)	<u>Pump Unit 泵单元 (2 套)</u>
1	62 MPa 二元高压输液泵 (内置溶剂托盘)
2	流动相瓶 (肖特瓶, 1 L)
3	脱气机
4	四通道溶剂选择阀
5	自动在线清洗系统
B)	<u>Sample Injector 进样器</u>
1	自动进样器
2	样品瓶 (2 mL, 含瓶盖)
3	脱气组件
4	100 $\mu$ L 定量环
5	250 $\mu$ L 注射泵
C)	<u>Column Oven 柱温箱</u>
1	色谱柱恒温箱 (室温以下 10 $^{\circ}$ C 至 85 $^{\circ}$ C)
2	2 位 6 通阀
	色谱柱:
	一维色谱柱: Kromasil C <sub>8</sub> 柱, 4.6 $\times$ 150 mm, 5 $\mu$ m;
3	二维色谱柱: ChromCore 多环芳烃 (PAH) C <sub>18</sub> 柱, 4.6 $\times$ 150 mm, 3.5 $\mu$ m;
	富集柱: C <sub>18</sub> 柱, 4.6 $\times$ 100 mm, 5 $\mu$ m
D)	<u>Detector 检测器 (2 套)</u>
1	紫外-可见光检测器
E)	<u>Workstation 工作站</u>
1	Wookinglab 二维色谱工作站 (03.53.15)

## 附 2: 悟空 K2025 二维高效液相色谱仪 (可靠、精准、友好、合规)



报告人: 李文聪

联系方式: 18871767327