蜂蜜中维生素 D_2 和 D_3 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_1～D_5 多种形态，以维生素 D_2（麦角钙化醇）和维生素 D_3（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、实验步骤

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_8 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_{18} 柱分离维生素 D_2 和 D_3，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；

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

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_2 标准品：CAS 号为 50-14-6，纯度为 97.6 %；

2.17 维生素 D_3 标准品：CAS 号为 67-97-0，纯度为 98.0 %；

2.18 维生素 D_2 储备液（1000 μg/mL）：称取维生素 D_2 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_2 浓度为 1000 μg/mL 的储备液；

2.19 维生素 D_3 储备液（1000 μg/mL）：称取维生素 D_3 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_3 浓度为 1000 μg/mL 的储备液；

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

2.20 维生素 D_2 标准溶液中间液（10 μg/mL）：吸取维生素 D_2 储备液（2.18）100 μL，用甲醇（2.2）定容至 10 mL，配制成维生素 D_2 浓度为 10 μg/mL 的中间液；

2.21 维生素 D_3 标准溶液中间液（10 μg/mL）：吸取维生素 D_3 储备液（2.19）100 μL，用甲醇（2.2）定容至 10 mL，配制成维生素 D_3 浓度为 10 μg/mL 的中间液；

2.22 维生素 D_2 标准使用溶液（1.0 μg/mL）：吸取维生素 D_2 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_2 浓度为 1.0 μg/mL 的标准使用溶液；

2.23 维生素 D_3 标准使用溶液(1.0 μg/mL）：吸取维生素 D_3 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_3 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_2 标准使用溶液（2.22）和维生素 D_3 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（1D）、K2025 P2 二元高压输液泵（2D）、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（1D）、K2025 UVD 紫外-可见光检测器（2D）、Wookinglab 2D 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；

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

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 μm，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 ℃~45 ℃），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 ℃，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 μg/mL 维

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

生素 D_2 标准使用溶液（2.22）和 维生素 D_3 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 ℃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_8 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_{18} 柱，4.6×150 mm，3.5 μm 或其他效能相当者；

富集柱：C_{18} 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：纯甲醇（2.2）；

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

c）进样量及进样方式：100 μL，满环携带进样；

e）洗针液：90 %甲醇水溶液；

f）柱温：40 ℃；

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阀时间，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	6-1,2-3,4-5
15.50	B 阀:2 位 6 通阀	1-2,3-4,5-6

h）检测器及检测波长：紫外-可见光检测器，检测波长为 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_2 和维生素 D_3 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。

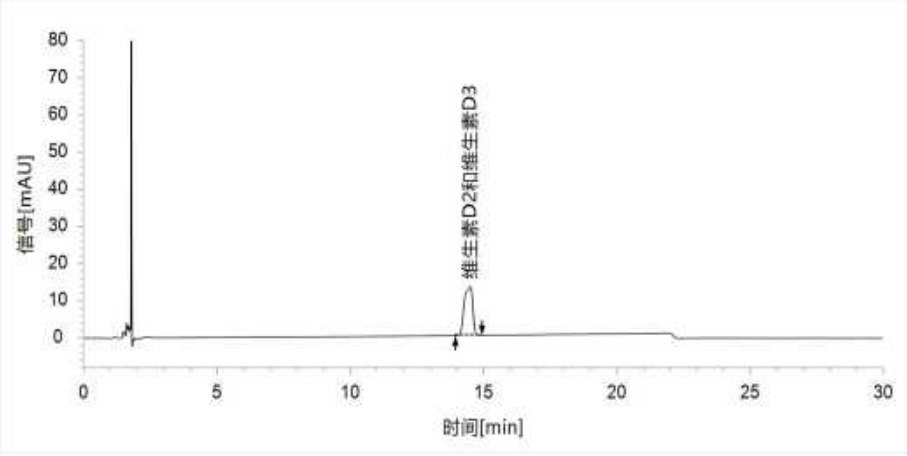


图 1 混合标准溶液（浓度均为 50 ng/mL）一维液相色谱图（不切阀）

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

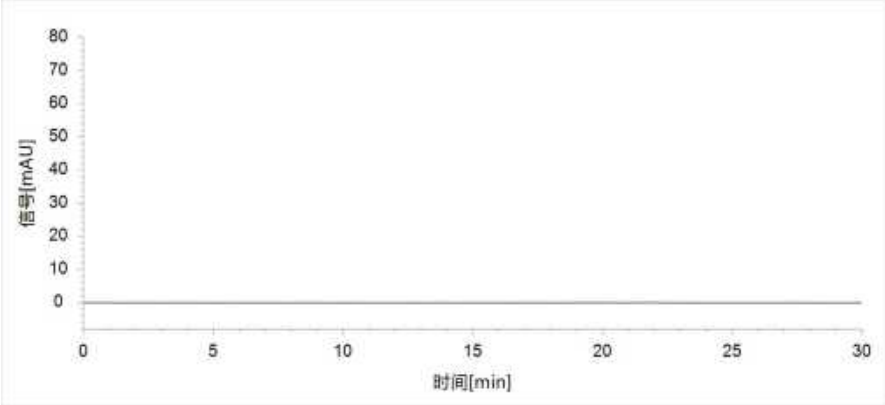


图 2 混合标准溶液（浓度均为 50 ng/mL）二维液相色谱图（不切阀）

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。

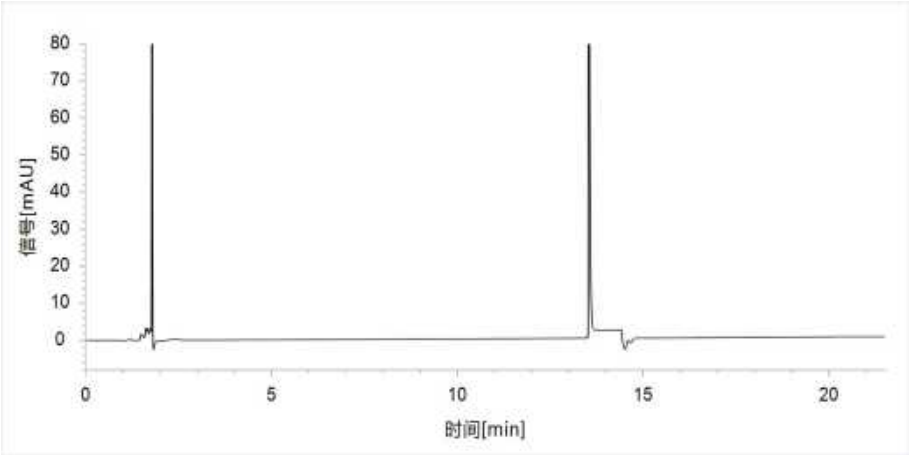


图 3 混合标准溶液（浓度均为 50 ng/mL）一维液相色谱图（切阀）

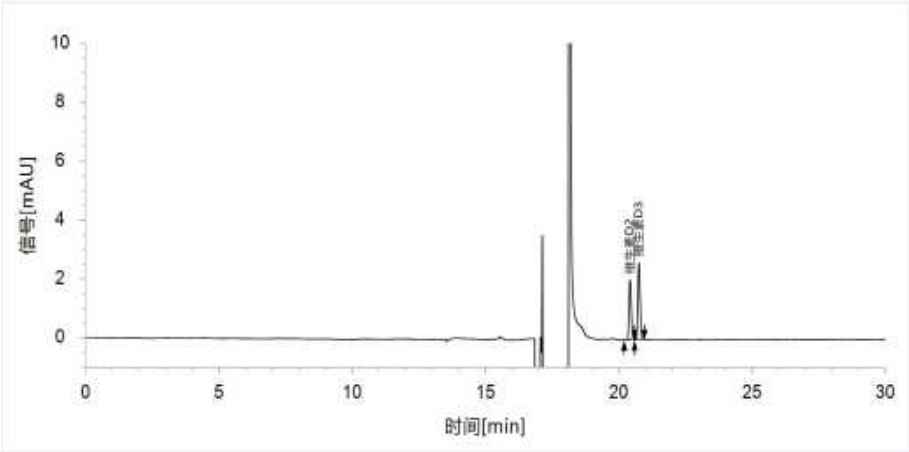


图 4 混合标准溶液（浓度均为 50 ng/mL）切阀的二维液相色谱图

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，

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

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_3 与维生素 D_2 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_2 和维生素 D_3 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_2	20.413	12.285	2.058	274999	-	1.23
维生素 D_3	20.747	16.145	2.636	264206	2.10	1.19

由表 1 中数据可知，维生素 D_2 的理论塔板数为 274999，拖尾因子为 1.23；维生素 D_3 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_3 与维生素 D_2 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（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。

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

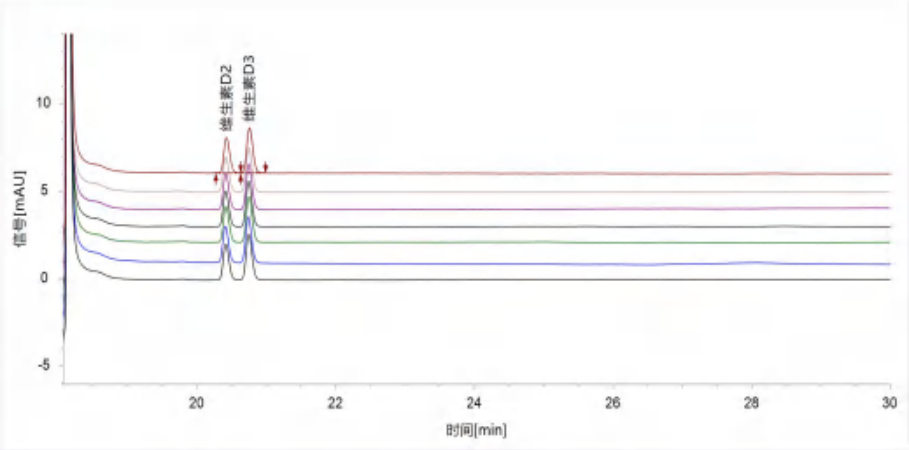


图 5 混合标准溶液（浓度均为 50 ng/mL）连续进样 7 针叠加的色谱图

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_2	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_3	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_2 保留时间的 RSD 为 0.03 %，峰面积的 RSD 为 0.80 %；维生素 D_3 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。

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

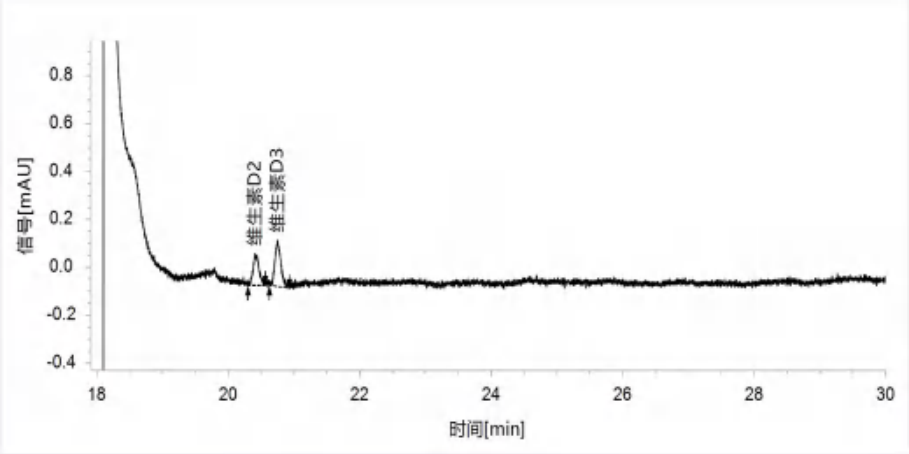


图 6 仪器灵敏度的色谱图

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_2	2.5	0.135	0.040	3.38	2.218	7.396
维生素 D_3		0.196		4.90	1.530	5.102

由表 3 中数据可知，维生素 D_2 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_3 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

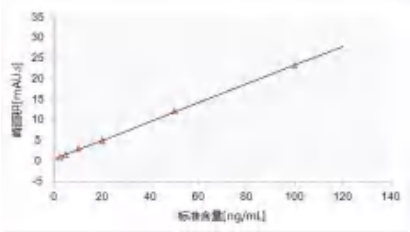
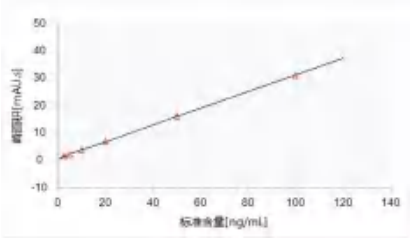
5.4.1 校准曲线的绘制

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。

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

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_2		方程式	y=0.22832*x+0.43281
		相关系数(R)	0.9996
		确定系数(R^2)	0.9993
维生素 D_3		方程式	y=0.30401*x+0.60941
		相关系数(R)	0.9999
		确定系数(R^2)	0.9998

由表 4 中数据可知，维生素 D_2 和维生素 D_3 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^2 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。

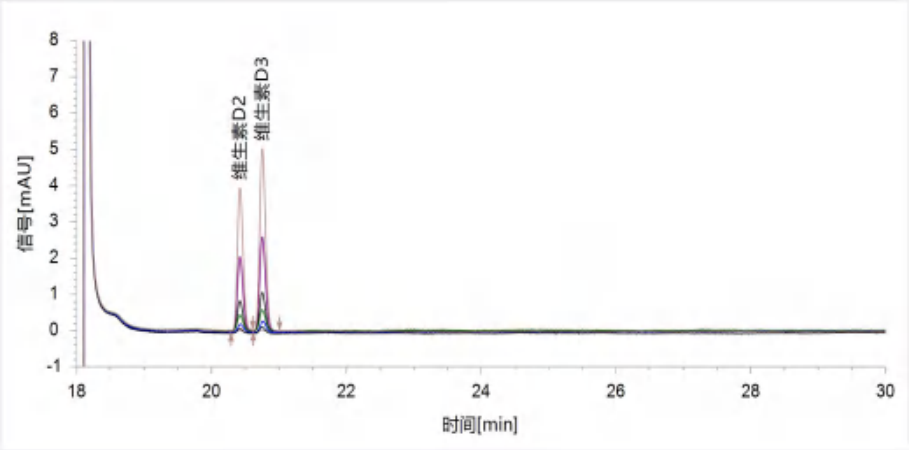


图 7 混合系列标准工作液叠加的色谱图

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

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

（1）计算蜂蜜试样中维生素 D_2 和维生素 D_3 的含量。

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

式中：X----为蜂蜜试样中维生素 D_2/维生素 D_3 的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

C_i----为从校准曲线计算得到的试样测定液中维生素 D_2/维生素 D_3 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_i----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。

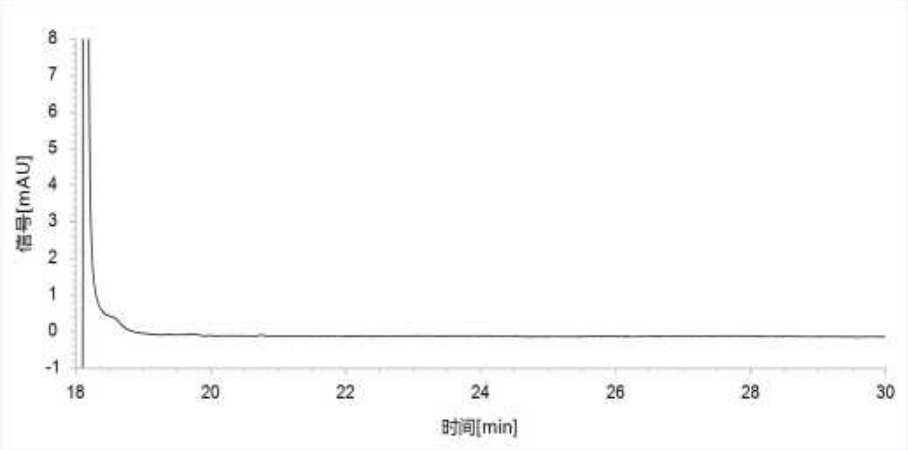


图 8 空白溶液的色谱图

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

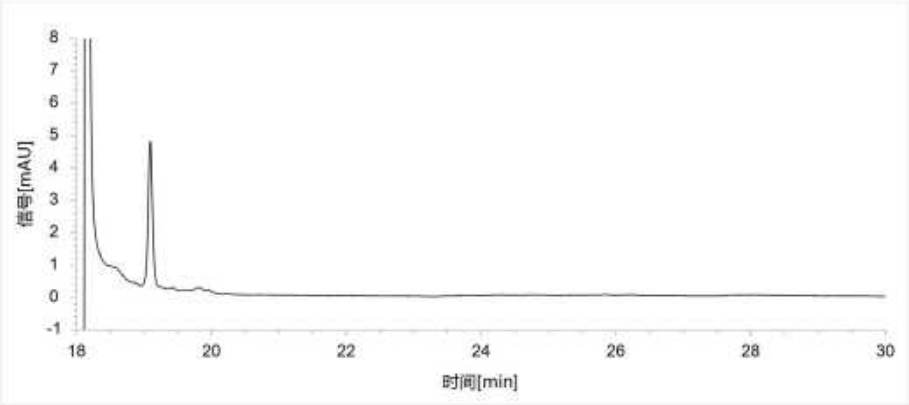


图 9 试样平行样 1 测定液的色谱图

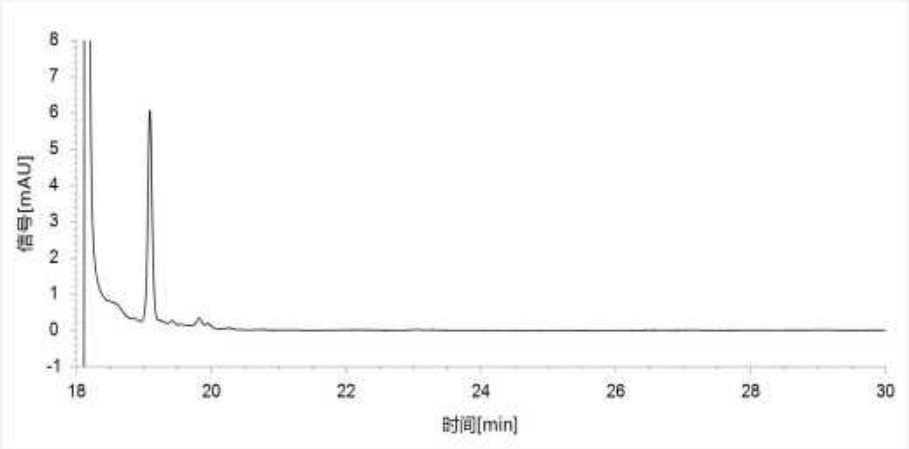


图 10 试样平行样 2 测定液的色谱图

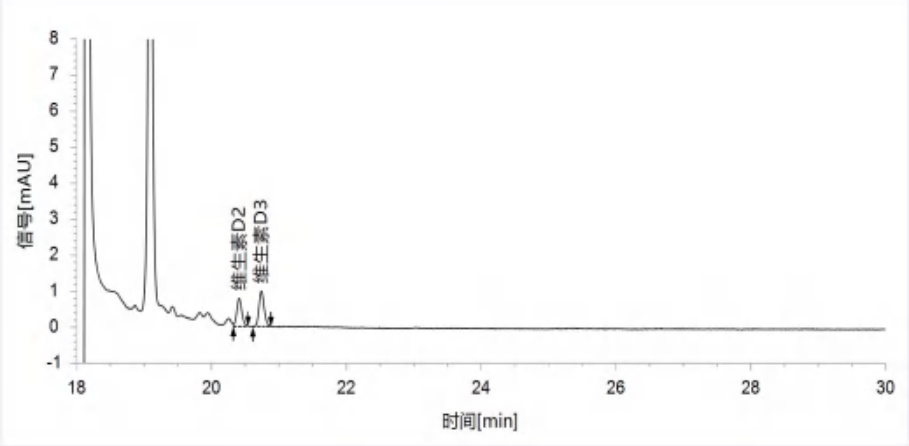


图 11 试样加标测定液的色谱图

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

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（μg）	回收率（%）
试样平行样 1	维生素 D_2	-	-	-	-
	维生素 D_3	-	-		
试样平行样 2	维生素 D_2	-	-	-	-
	维生素 D_3	-	-		
试样加标	维生素 D_2	4.018	16.653	0.5	83.2
	维生素 D_3	5.406	16.424		82.1

依据公式（1）进行计算，蜂蜜试样中维生素 D_2 和维生素 D_3 均未检出；加标回收实验中，维生素 D_2 和维生素 D_3 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_2 和维生素 D_3 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_3 与维生素 D_2 的分离度满足要求；维生素 D_2 的理论塔板数为 274999，拖尾因子为 1.23；维生素 D_3 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_3 与维生素 D_2 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_2 保留时间的 RSD 为 0.03 %，峰面积的 RSD 为 0.80 %；维生素 D_3 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_2 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_3 的仪器检出限为 1.530 μg/mL，仪器定量限为 5.102 μg/mL；维生素 D_2 和维生素 D_3 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^2 均＞0.999；蜂蜜试样中维生素 D_2 和维生素 D_3 均未检出；加标回收实验中，维生素 D_2 和维生素 D_3 的加标回收率分别为

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

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_2 和维生素 D_3 含量测定的需求。

7 注意事项

7.1 维生素 D_2 标准品和维生素 D_3 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。

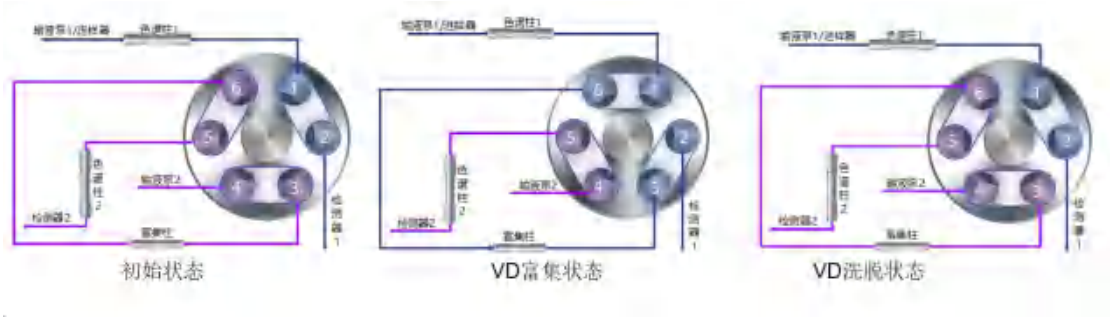
7.4 《GB 5009.296-2023 食品安全国家标准 食品中维生素 D 的测定（第二法）》中 10.2.6 “甲醇-水溶液（1+19）：将甲醇和水按照 19:1 的体积比混合均匀，超声脱气”中存在错误，应为“将甲醇和水按照 1:19 的体积比混合均匀，超声脱气”。

7.5 二维液相系统上维生素 D_2 和维生素 D_3 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_2 和维生素 D_3 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_2 和维生素 D_3 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：

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。



*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

附 1：仪器配置清单

序号	单元
K2025 二维高效液相色谱仪	
A)	*Pump Unit 泵单元（2 套）*
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)	*Sample Injector 进样器*
1	自动进样器
2	样品瓶（2 mL，含瓶盖）
3	脱气组件
4	100 μL 定量环
5	250 μL 注射泵
C)	*Column Oven 柱温箱*
1	色谱柱恒温箱（室温以下 10 ℃至 90 ℃）
2	2 位 6 通阀
3	色谱柱： 一维色谱柱：Kromasil C_8 柱，4.6×150 mm，5 μm； 二维色谱柱：JinGuBang 多环芳烃（PAH）C_{18} 柱，4.6×150 mm，3.5 μm； 富集柱：C_{18} 柱，4.6×100 mm，5 μm
D)	*Detector 检测器（2 套）*
1	紫外-可见光检测器
E)	*Workstation 工作站*
1	Wookinglab 2D 色谱工作站（03.53.15）

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

附 2：悟空 K2025 二维高效液相色谱仪（可靠、精准、友好、合规）



*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。

*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。