

中华人民共和国国家标准

GB 14755—2010

食品安全国家标准

食品添加剂 维生素 D₂（麦角钙化醇）

2010-12-21 发布

2011-02-21 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替 GB 14755—1993《食品添加剂 维生素 D₂》。

本标准与 GB 14755—1993 相比，主要变化如下：

- 增加了红外光谱鉴别；
- 维生素 D₂ 的测定系统适用性试验所用样品由维生素 D₂ 改为维生素 D₃，高效液相色谱含量测定方法由内标法改为外标法；
- 洋地黄皂苷试验检查麦角甾醇修改为薄层色谱法；
- 增加了还原性物质指标和试验方法；
- 增加了重金属指标和试验方法；
- 增加了砷指标和试验方法。

本标准的附录 A 和附录 B 为规范性附录，附录 C 为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB 14755-1993

食品安全国家标准

食品添加剂 维生素 D₂（麦角钙化醇）

1 范围

本标准适用于以麦角甾醇为原料制得的食品添加剂维生素 D₂。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

3 化学名称、分子式、结构式和相对分子质量

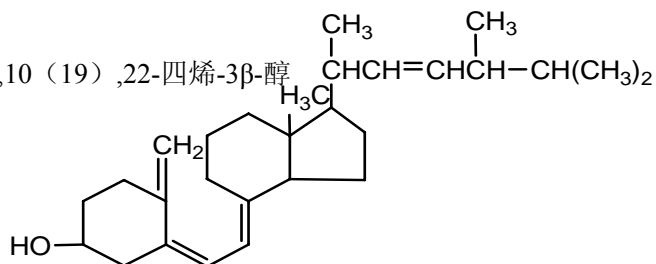
3.1 化学名称

9,10-开环麦角甾-5,7,10(19),22-四烯-3β-醇

3.2 分子式

C₂₈H₄₄O

3.3 结构式



3.4 相对分子质量

396.66（按 2007 年国际相对原子质量）

4 技术要求

4.1 感官要求：应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

| 项 目 | 要 求 | 检验方法 |
|------|------------|---|
| 色泽 | 无色或白色 | 取适量样品置于清洁、干燥的试管中，在自然光线下，观察色泽和组织状态，嗅其气味。 |
| 气味 | 无臭 | |
| 组织状态 | 针状结晶或结晶性粉末 | |

4.2 理化指标：应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

| 项目 | 指标 | 检验方法 |
|--|----------------|----------|
| 维生素 D ₂ (C ₂₈ H ₄₄ O) / % | 98.0~103.0 | 附录A中A.4 |
| 麦角甾醇, w / % ≤ | 0.2 | 附录A中A.5 |
| 比旋光度 $\alpha_m(20^\circ\text{C},\text{D}) / (^\circ\cdot\text{dm}^2\cdot\text{kg}^{-1})$ | +102.0~ +107.0 | 附录A中A.6 |
| 质量吸收系数 α (265nm) / (L/cm·g) | 46~49 | 附录A中A.7 |
| 还原性物质 (四唑蓝显色试验), w / % ≤ | 0.002 | 附录A中A.8 |
| 砷 (As) / (mg/kg) ≤ | 2 | 附录A中A.9 |
| 重金属 (以Pb计) / (mg/kg) ≤ | 20 | 附录A中A.10 |

附录 A

(规范性附录)

检验方法

A.1 安全提示

本标准试验方法中使用的部分试剂具有毒性或腐蚀性，按相关规定操作，使用时需小心谨慎。若溅到皮肤上应立即用水冲洗，严重者应立即治疗。在使用挥发性酸时，要在通风橱中进行。

A.2 一般规定

本标准所用试剂除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和 GB/T 6682—2008 中规定的三级水。

试验方法中所用杂质测定用标准溶液、制剂及制品，在没有注明其他要求时，均按 GB/T 602、GB/T 603 之规定制备。

A.3 鉴别试验

A.3.1 醋酐浓硫酸呈色试验

A.3.1.1 试剂和材料

A.3.1.1.1 三氯甲烷。

A.3.1.1.2 乙酸酐。

A.3.1.1.3 硫酸。

A.3.1.2 分析步骤

取约0.5 mg实验室样品，加5 mL三氯甲烷溶解后，加0.3 mL醋酐与0.1 mL硫酸，振摇，初显黄色，渐变红色，迅即变为紫色，最后变为绿色。

A.3.2 红外光谱试验

采用溴化钾压片法，按照 GB/T 6040 进行试验，实验室样品的红外光谱应与对照的图谱一致（对照图谱见附录 B）。

A.4 维生素D₂的测定

A.4.1 方法提要

用高效液相色谱法，在选定的工作条件下，通过色谱柱使样品分离，用紫外吸收检测器检测，用外标法定量，计算样品中维生素 D₂ 的含量。

A.4.2 试剂和材料

A.4.2.1 正戊醇：色谱纯。

A.4.2.2 正己烷：色谱纯。

A.4.2.3 异辛烷：色谱纯。

A.4.2.4 维生素D₂对照品。

A.4.2.5 维生素D₃对照品。

A.4.3 仪器和设备

高效液相色谱仪（HPLC）。

A.4.4 色谱分析条件

推荐的色谱柱及典型色谱操作条件见表 A.1，维生素 D₃ 系统适用性试验高效液相色谱图参见图 C.1，各组分的相对保留时间参见表 C.1。其他能达到同等分离程度的色谱柱和色谱条件均可使用。

表 A.1 色谱柱和典型色谱操作条件

| | |
|---------|--------------------------|
| 色谱柱 | 柱长 250mm，柱内径 4.6mm，硅胶色谱柱 |
| 流动相 | 正己烷-正戊醇（1000+3） |
| 流速 | 2 mL/min |
| 检测器检测波长 | 254 nm |

A.4.5 分析步骤

A.4.5.1 维生素D₃对照品系统适应性试验贮备液的制备

称取约 25 mg 维生素 D₃ 对照品，精确至 0.000 1 g，置 100 mL 棕色容量瓶中，加 80 mL 异辛烷，用超声处理助溶 1min，避免加热，使完全溶解，再加异辛烷至刻度，摇匀充氮密塞，避光，0℃ 以下保存。

A.4.5.2 实验室样品溶液的制备

称取约 25 mg 实验室样品，精确至 0.000 1 g，置 100 mL 棕色容量瓶中，加 80 mL 异辛烷，用超声处理助溶 1min，避免加热，使完全溶解，再加异辛烷至刻度，摇匀。量取 5 mL±0.05 mL 上述溶液，置 10 mL 棕色容量瓶中，加正己烷至刻度，摇匀。

A.4.5.3 维生素D₂对照品溶液的制备

称取约 25 mg 维生素 D₂ 对照品，精确至 0.000 1 g，置 100 mL 棕色容量瓶中，加 80 mL 异辛烷，用超声处理助溶 1min，避免加热，使完全溶解，再加异辛烷至刻度，量取上述溶液 5 mL±0.05 mL，置 10 mL 棕色容量瓶中，加正己烷至刻度，摇匀。

A.4.5.4 系统适用性试验

以硅胶为填充剂的色谱柱，正己烷-正戊醇（1000+3）为流动相，检测波长 254 nm，流速约为 2 mL/min。量取维生素 D₃ 对照品贮备溶液 5 mL，置具塞玻璃容器中，充氮后密塞，置 90℃ 水浴加热 1h，取出迅速冷却，加正己烷 5 mL±0.05 mL，摇匀，置 1 cm 具塞石英吸收池中，在 2 支主波长分别为 254 nm 和 365 nm 的紫外光灯下，将石英吸收池斜放成 45°，并距灯管 5 cm~6 cm，照射 5min，使溶液中含有前维生素 D₃、反式维生素 D₃、维生素 D₃ 和速甾醇 D₃。取此溶液注入液相色谱仪，测定维生素 D₃ 的峰值，先后进样 5 次，相对标准偏差应不大于 2.0%，前维生素 D₃（与维生素 D₃ 的比保留时间为 0.5）与反式维生素 D₃（与维生素 D₃ 的比保留时间约为 0.6）以及维生素 D₃ 与速甾醇 D₃（与维生素 D₃ 的比保留时间约为 1.1）的峰分离度均应大于 1.0。

A.4.5.5 测定

取 20 μL 实验室样品溶液注入液相色谱仪，记录色谱图，另取维生素 D₂ 对照品溶液，同法测定。按外标法以峰面积计算出供试品中维生素 D₂ 的含量。

A.4.6 结果计算

根据色谱图计算维生素D₂的质量分数 w_1 ，数值以%表示，按公式(A.1)计算

$$w_1 = \frac{m_1 \times A_2}{A_1 \times m_2} \times 100\% \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

m_1 ——对照品溶液中维生素D₂的进样量的数值，单位为微克（ μg ）；

A_2 ——实验室样品溶液中维生素D₂的峰面积的数值；

A_1 ——对照品溶液中维生素D₂的峰面积的数值；

m_2 ——实验室样品溶液中维生素D₂的进样量的数值，单位为微克（ μg ）。

取两次平行测定结果的算术平均值为测定结果，两次平行测定的允许绝对差不大于 1.5 %。

A.5 麦角甾醇的测定

A.5.1 方法提要

将维生素 D₂ 溶液点样于薄层板上，经展开，显色后，所得的色谱图与对照品溶液按同法所得的色谱图作对比，对维生素 D₂ 进行杂质检查。

A.5.2 试剂和材料

A.5.2.1 角鲨烷氯仿溶液：10 g/L。

A.5.2.2 展开剂：环己烷-乙醚（1+1）。

A.5.2.3 维生素D₂对照品。

A.5.2.4 麦角甾醇对照品。

A.5.3 分析步骤

A.5.3.1 对照品溶液的配制

称取约 50 mg 维生素 D₂ 对照品，精确至 0.000 2 g，用 1 mL 角鲨烷氯仿溶液溶解，得对照品溶液。

A.5.3.2 实验室样品溶液的配制

称取约 50 mg 维生素 D₂ 实验室样品，精确至 0.000 2 g，用 1 mL 角鲨烷氯仿溶液溶解，得实验室样品溶液。

A.5.3.3 麦角甾醇对照溶液的配制

称取约 5 mg 麦角甾醇对照品，精确至 0.1 mg，置于 50 mL 容量瓶中，加角鲨烷氯仿溶液 40 mL 溶解并稀释至刻度，摇匀。

A.5.3.4 显色剂的配制

取 1.0 g 三氯化锑，加 20 mL 乙酰氯溶解。

A.5.3.5 测定

分别取 10 μL 对照品溶液、实验室样品溶液及麦角甾醇对照溶液，分别点于以羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上，用展开剂暗处展开，晾干，用显色剂显色。实验室样品溶液与对照品溶液的主斑点 R_f 值及颜色应一致，实验室样品溶液的杂质斑点不得深于麦角甾醇对照溶液相应的斑点。

A.6 比旋光度的测定

A. 6.1 试剂和材料

无水乙醇。

A. 6.2 仪器和设备

旋光仪。

A. 6.3 分析步骤

取实验室样品适量，精确至0.000 2 g，加无水乙醇制成1 mL中约含40 mg的溶液，其他按GB/T 613-2007规定的方法进行。（注：在溶液配制后30min内测定）。

A. 6.4 结果计算

比旋光度 $\alpha_m(20^\circ\text{C}, D)$ 按公式(A.2)计算：

$$\alpha_m(20^\circ\text{C}, D) = \frac{\alpha}{l \times \rho_\alpha} \dots\dots\dots(\text{A.2})$$

式中：

α —— 测得的旋光角,单位为度(°);

l —— 旋光管的长度,单位为分米(dm);

ρ_α —— 溶液中有效组分的质量浓度,单位为克每毫升(g/mL)。

A. 7 质量吸收系数的测定

A. 7.1 试剂和材料

无水乙醇。

A. 7.2 仪器和设备

紫外分光光度仪。

A. 7.3 分析步骤

称取实验室样品适量，精确至0.000 2 g，加乙醇制成每1 mL中约含10 μg 样品的溶液，按照GB/T 9721 在265 nm \pm 1 nm的波长处测定吸光度 A ，求其质量吸收系数。

A. 7.4 结果计算

根据吸光度 A 计算维生素D₂的质量吸收系数 α ，数值以 (°)·dm²·kg⁻¹表示，按公式(A.3)计算：

$$\alpha = \frac{A}{b \times \rho_\alpha} \dots\dots\dots(\text{A.3})$$

式中：

A —— 样品溶液的吸光度的数值；

b —— 光路长度（即吸收池厚度）的数值，单位为厘米（cm）；

ρ_α —— 实验室样品溶液的质量浓度的数值，单位为克每升（g/L）。

A. 8 还原性物质的测定

A. 8.1 方法原理

还原性物质在强碱性溶液中能将四唑蓝还原为有色甲月替 (formazan)，与对甲二酚无水乙醇还原物质的标准溶液颜色比较做限量检查。

A. 8. 2 试剂和材料

A. 8. 2. 1 无水乙醇。

A. 8. 2. 2 甲醇。

A. 8. 2. 3 冰乙酸。

A. 8. 2. 4 四唑蓝甲醇溶液：50 mg/mL。

A. 8. 2. 5 羟化四甲铵溶液：羟化四甲铵水溶液(100 g/L) -无水乙醇 (1+9)。

A. 8. 2. 6 对甲二酚无水乙醇溶液：0.2 μg/mL。

A. 8. 3 分析步骤

A. 8. 3. 1 实验室样品溶液的制备

称取约0.1 g实验室样品，精确至0.001 g，溶解于无水乙醇中，稀释至10 mL，加入0.5 mL四唑蓝甲醇溶液和0.5 mL羟化四甲铵溶液，静置5min，加入1.0 mL冰乙酸，摇匀。

A. 8. 3. 2 对照溶液的制备

量取10 mL±0.05 mL 0.2 μg/mL对甲二酚无水乙醇溶液，加入0.5 mL四唑蓝甲醇溶液和0.5 mL羟化四甲铵溶液，静置5min，加入1.0 mL冰乙酸，摇匀。

A. 8. 3. 3 空白溶液的制备

取10 mL无水乙醇，加入0.5 mL四唑蓝甲醇溶液和0.5 mL羟化四甲铵溶液，静置5min，加入1.0 mL冰乙酸，摇匀。

A. 8. 3. 4 测定

在525 nm波长处，用空白溶液调零，分别测定实验室样品溶液与对照溶液的吸光度，实验室样品溶液的吸光度不得大于对照溶液。

A. 9 砷的测定

取5 g±0.01 g实验室样品，用干灰化法处理样品。取相同量的氧化镁、硝酸镁与试样同法处理，做试剂空白试验。量取10 mL±0.05 mL砷标准溶液 (含砷2.0μg)，同法处理，制备砷限量标准。按GB/T5009.76—2003砷斑法的规定进行。

A. 10 重金属的测定

A. 10. 1 试剂和材料

A. 10. 1. 1 硝酸。

A. 10. 1. 2 硫酸。

A. 10. 1. 3 盐酸。

A. 10. 1. 4 甘油。

A. 10. 1. 5 乙酸铵。

A. 10. 1. 6 硝酸铅。

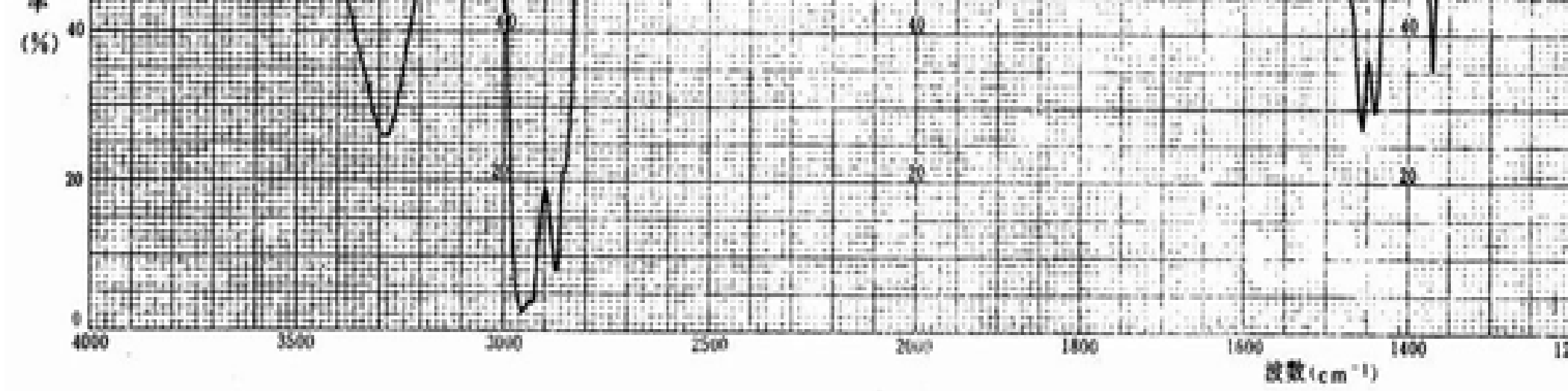
A. 10. 1. 7 硫代乙酰胺。

A. 10. 1. 8 氨试液：400→1000。

- A. 10. 1. 9 氢氧化钠溶液: $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$ 。
- A. 10. 1. 10 盐酸溶液: $c(\text{HCl}) = 2 \text{ mol/L}$ 。
- A. 10. 1. 11 盐酸溶液: $c(\text{HCl}) = 7 \text{ mol/L}$ 。
- A. 10. 1. 12 氨水溶液: $c(\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 5 \text{ mol/L}$ 。
- A. 10. 1. 13 酚酞指示液: 10g/L乙醇溶液。
- A. 10. 1. 14 乙酸盐缓冲液 (pH3.5): 取25 g 乙酸铵, 加水25 mL溶解后, 加7 mol/L盐酸溶液38 mL, 用2 mol/L盐酸溶液或氨水溶液准确调节pH至3.5 (pH计), 用水稀释至100 mL。
- A. 10. 1. 15 硫代乙酰胺试液: 取4 g硫代乙酰胺, 精确至0.01 g, 加水使溶解成100 mL, 置冰箱中保存。临用前取5.0 mL混合液 (由1 mol/L 15 mL氢氧化钠溶液、5.0 mL水及20 mL甘油组成), 加上述1.0 mL硫代乙酰胺溶液, 置水浴上加热20s, 冷却, 立即使用。
- A. 10. 1. 16 铅标准溶液: 称取0.160 g硝酸铅, 精确至0.000 2g, 置于1000 mL容量瓶中, 加5 mL硝酸与50 mL水溶解后, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为贮备液。临用前, 移取 (10 ± 0.02) mL贮备液, 置于100 mL容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得 (每1mL相当于10 μg 的Pb)。配置与贮存用的玻璃仪器均不得含铅。
- A. 10. 2 分析步骤

按《中华人民共和国药典》2005年版二部 附录VIII H 重金属检查法第二法, 具体方法如下:

取 $1 \text{ g} \pm 0.01 \text{ g}$ 实验室样品, 缓缓灼烧至完全炭化, 放冷, 加 0.5 mL~1.0 mL 硫酸, 使恰湿润, 用低温加热制硫酸除尽后, 加 0.5 mL 硝酸, 蒸干, 至氧化氮蒸气除尽后, 放冷, 在 $500 \text{ }^\circ\text{C} \pm 50 \text{ }^\circ\text{C}$ 灼灼至完全灰化, 放冷, 加 2 mL 盐酸, 置水浴上蒸干后加 15 mL 水, 滴加氨试液至对酚酞指示液显中性, 再加 2 mL 乙酸盐缓冲液 (pH3.5), 微热溶解后, 移置纳氏比色管甲管中, 加水稀释成 25 mL; 另取配制实验室样品溶液的试剂, 置瓷皿中蒸干后, 加 2 mL 乙酸盐缓冲液 (pH3.5) 与 15 mL 水, 微热溶解后, 移置纳氏比色管乙管中, 加 $2 \text{ mL} \pm 0.02 \text{ mL}$ 标准铅溶液, 再用水稀释成 25 mL; 再在甲乙两管中分别加 2 mL 硫代乙酰胺试液, 摇匀, 放置 2min, 同置白纸上, 自上向下透视, 甲管中显示的颜色与乙管比较, 不得更深。



注：引自《药品红外光谱集》第一卷（1995）

图B.1 维生素D₂红外光谱图

附录 C

(资料性附录)

系统适用性试验高效液相色谱图和相对保留时间

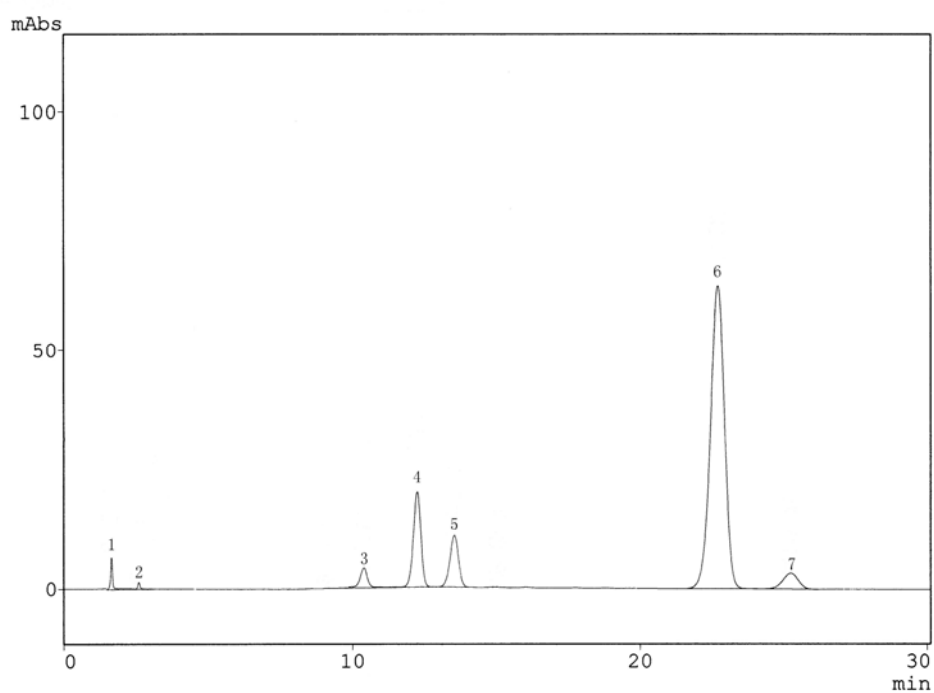


图 C.1 系统适用性试验高效液相色谱图

表 C.1 各峰保留时间和相对保留时间

| 峰序 | 组分名称 | 相对保留时间 |
|------|----------------------|--------|
| 1 | 溶剂峰 | — |
| 2, 3 | 未知峰 | — |
| 4 | 前维生素 D ₃ | 0.54 |
| 5 | 反式维生素 D ₃ | 0.60 |
| 6 | 维生素 D ₃ | 1.00 |
| 7 | 速甾醇 D ₃ | 1.11 |