

中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

代替 GB/T5009.197-2003

保健食品中硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、 烟酰胺和咖啡因的测定

Determination of thiamine, riboflavin, pyridoxine, niacin, niacinamide and caffeine
in health foods

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

(本草案完成时间：2024年1月)

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

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 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。

本文件代替GB 5009.197—2003《保健食品中盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因的测定》。

本文件与GB 5009.197—2003相比，除结构调整和编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 修改了标准名称；
- 增加了核黄素的测定；
- 修改了前处理的条件；
- 修改了色谱条件，6种组分同时检测；
- 修改了方法的检出限、定量限。

本文件由全国特殊食品标准化技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：略。

本文件主要起草人：略。

保健食品中硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因的测定

1 范围

本文件规定了保健食品中硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于片剂、粉剂、硬胶囊、软胶囊、液体、凝胶糖果等类型保健食品中的硫胺素、核黄素、烟酸、烟酰胺、吡哆醇和咖啡因的测定。

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

以20%甲醇—0.1%磷酸溶液作为提取剂，试样提取和稀释后，经高效液相色谱分离，紫外检测器检测，以保留时间定性，外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为色谱纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇（ CH_3OH ）。

5.1.2 乙腈（ CH_3CN ）。

5.1.3 癸烷磺酸钠（ $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NaO}_3\text{S}$ ）。

5.1.4 磷酸（ H_3PO_4 ）：优级纯。

5.1.5 五氧化二磷（ P_2O_5 ）或者氯化钙（ CaCl_2 ）：分析纯。

5.1.6 盐酸（ HCl ）：分析纯。

5.2 试剂配制

5.2.1 提取溶剂（20%甲醇—0.1%磷酸溶液）：准确量取 200 mL 甲醇（5.1.1），加入 800 mL 水与 1 mL

磷酸（5.1.4），超声 5 min。

5.2.2 盐酸溶液（0.1mol/L）：吸取 8.5 mL 的盐酸（5.1.6），用水稀释至 1000 mL，混匀。

5.2.3 盐酸溶液（1+1）：量取 100 mL 的盐酸（5.1.6），缓缓倒入 100 mL 水中，混匀。

5.2.4 流动相 A：5 mmol/L 癸烷磺酸钠溶液（含 0.15%磷酸）：称取 1.22 g 癸烷磺酸钠（5.1.3），加入 1.5 mL 磷酸（5.1.4）与 1000 mL 水，超声 5 min，混匀。

5.2.5 流动相 B：5 mmol/L 癸烷磺酸钠—90%乙腈溶液（含 0.15%磷酸）：称取 1.22 g 癸烷磺酸钠（5.1.3），加入 1.5 mL 磷酸（5.1.4）、100 mL 水及 900 mL 乙腈（5.1.2），超声 5 min，混匀。

5.3 标准品

5.3.1 盐酸硫胺素标准品（ $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ ，CAS 号：67-03-8）：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.2 核黄素标准品（ $C_{17}H_{20}N_4O_6$ ，CAS 号：83-88-5）：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.3 烟酸标准品（ $C_6H_5NO_2$ ，CAS 号：59-67-6）：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.4 烟酰胺标准品（ $C_6H_6N_2O$ ，CAS 号：98-92-0）：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.5 盐酸吡哆醇标准品（ $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$ ，CAS 号：58-56-0）：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.6 咖啡因标准品（ $C_8H_{10}N_4O_2$ ，CAS 号：58-08-2）：纯度 $\geq 99\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 硫胺素标准储备液（1.00 mg/mL）：准确称取盐酸硫胺素标准品（5.3.1）12.7 mg（精确至 0.1 mg，相当于硫胺素 10 mg），用 0.1 mol/L 盐酸溶解并定容至 10 mL，混匀后转移入棕色玻璃容器中，在 2℃~8℃冰箱中贮存，保存期 3 个月。

5.4.2 核黄素标准储备液（100 μg/mL）：准确称取核黄素标准品（5.3.2）10 mg（精确至 0.1 mg），加入 2 mL 盐酸溶液（1+1）（5.2.3）超声溶解后，立即用水定容至 100 mL，混匀后转移入棕色玻璃容器中，在 2℃~8℃冰箱中贮存，保存期 3 个月。

5.4.3 烟酸标准储备溶液（1.00 mg/mL）：准确称取烟酸标准品（5.3.3）10 mg（精确至 0.1 mg），用 0.1 mol/L 盐酸溶解并定容至 10 mL，混匀后转移入棕色玻璃容器中，在 2℃~8℃冰箱中贮存，保存期 3 个月。

5.4.4 烟酰胺标准储备溶液（1.00 mg/mL）：准确称取烟酰胺标准品（5.3.4）10 mg（精确至 0.1 mg），用 0.1 mol/L 盐酸溶解并定容至 10 mL，混匀后转移入棕色玻璃容器中，在 2℃~8℃冰箱中贮存，保存期 3 个月。

5.4.5 吡哆醇标准储备溶液（1.00 mg/mL）：准确称取盐酸吡哆醇标准（5.3.5）品 12.2mg（精确至 0.1 mg，相当于吡哆醇 10 mg），用 0.1 mol/L 盐酸溶解并定容至 10 mL，混匀后转移入棕色玻璃容器中，在 2℃~8℃冰箱中贮存，保存期 3 个月。

5.4.6 咖啡因标准储备液（1.00 mg/mL）：准确称取咖啡因标准品（5.3.6）10 mg（精确至 0.1 mg），用 0.1 mol/L 盐酸溶解并定容至 10 mL，混匀后转移入棕色玻璃容器中，在 2℃~8℃冰箱中贮存，保存期 3 个月。

5.4.7 混合标准中间液（50 μg/mL）：分别准确吸取硫胺素、烟酸、烟酰胺、吡哆醇、咖啡因标准储备液 2.5 mL，核黄素标准储备液 25 mL 于 50 mL 容量瓶中，以提取溶剂定容至刻度。混匀后转移入棕

色玻璃容器中。临用现配。

注：固体标准品可根据标准品证书进行相关处理。

5.5 标准系列工作溶液配制

分别吸取混合标准中间液（5.4.7）0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL至5 mL容量瓶中，用提取溶剂（5.2.1）定容。该标准系列浓度分别为1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 。临用现配。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器。

6.2 天平：感量 0.001g 和 0.01 mg。

6.3 超声波清洗器。

6.4 涡旋混合器。

6.5 恒温水浴锅。

6.6 高速粉碎机。

6.7 高速离心机：8000 r/min。

7 分析步骤

7.1 试样制备

- a) 片剂：取不少于 20 片或不低于 10 g 样品，经高速粉碎机或研钵磨成粉状，封存备用。
- b) 硬胶囊：取不少于 20 粒或不低于 5 g 样品，除去外壳经高速粉碎机或研钵磨成粉状，封存备用。
- c) 粉剂：取不少于 5 袋或不低于 10 g 样品，封存备用。
- d) 软胶囊：取不少于 20 粒或不低于 5 g 样品，除去外壳取其内容物混匀，封存备用。
- e) 液体：取不少于 20 mL 样品充分混匀，封存备用。
- f) 凝胶糖果：取样品不低于 10 粒（对于不同色泽或风味混装的试样，则按色泽或种类均匀取样），深度冷冻粉碎或剪碎，备用。

7.2 试样处理

7.2.1 固体或半固体试样

准确称取混合均匀的固体或半固体试样0.2~2 g（精确至0.1 mg）于50 mL离心管中，准确加入20 mL提取溶剂（5.2.1），称重，涡旋混匀，超声提取15 min，于98 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热30 min，冷却后称重，用提取溶剂（5.2.1）补足失重，混匀后取适量以8000 r/min离心5 min，上清液经0.45 μm 有机滤膜过滤，待用。

注：对于磷酸酯形式的维生素，样品称样后，加入10 mg酸性磷酸酶及20 mL提取溶剂（pH调至4.5）后，45 $^{\circ}\text{C}$ 酶解16 h 后，离心、过膜后待进样。

7.2.2 液体试样

取混合均匀的液体试样1.0 mL或1.0 g（精确至0.1 mg）于10 mL容量瓶中，加提取溶剂至刻度，摇匀，超声提取15 min。以8000 r/min离心5 min，上清液经0.45 μm 滤膜过滤，待用。

注：对于磷酸酯形式的维生素，样品称样后，加入10 mg酸性磷酸酶及20 mL提取溶剂（pH调至4.5）后，45 $^{\circ}\text{C}$ 酶解

16 h 后，离心、过膜后待进样。

7.3 色谱参考条件

7.3.1 色谱柱：填料为含极性内嵌基团的十八烷基硅烷杂化硅胶色谱柱，（粒径 5.0 μm，4.6 mm×150 mm）或等效色谱柱；

7.3.2 流动相 A：5 mmol/L 癸烷磺酸钠溶液（含 0.15%磷酸）；流动相 B：5 mmol/L 癸烷磺酸钠-90%乙腈溶液（含 0.15%磷酸）；

7.3.3 流速：1.0 mL/min；

7.3.4 柱温：30℃；

7.3.5 进样体积：10 μL；

7.3.6 检测波长：硫胺素、核黄素、烟酸、烟酰胺 260 nm；咖啡因、吡哆醇 280 nm。

7.3.7 流动相洗脱梯度，见表 1。

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间 min	流动相 A %	流动相 B %	流速 mL/min
0.00	85	15	1.0
11.0	85	15	1.0
20.0	50	50	1.0
20.5	20	80	1.0
25.5	20	80	1.0
26.0	85	15	1.0
41.0	85	15	1.0

注：操作者可根据实际情况适当调整流动相比例及平衡时间。

7.4 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入高效液相色谱仪中，测定各组分的峰面积（标准品色谱图见附录图A.1），以相应标准工作液的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

7.5 试样溶液的测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中，得到相应峰面积（样品色谱图见附录图A.2和A.3），根据标准曲线，以外标法计算待测试样溶液中硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺、咖啡因的浓度。

注：可根据试样中组分的含量，适当增加或减少稀释倍数*f*，使组分浓度处于标准曲线测定范围内。

8 分析结果的表述

试样中硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺、咖啡因各组分的含量按式（1）计算：

$$X_i = \frac{C_i \times V \times f}{m \times 1000} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X_i ——试样中单一组分的浓度，单位为毫克每克或每毫升（mg/g或mg/mL）；

C_i ——试样溶液中单一组分的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——试样提取液的稀释体积，单位为毫升（mL）；

f ——提取溶液稀释倍数；

m ——试样取样量，单位为克或毫升（g或mL）；

1000——单位换算系数。

结果保留三位有效数字。

注：试样中测定的硫胺素含量乘以换算系数1.271、1.234，即分别得到盐酸硫胺素、硝酸硫胺素的含量；吡哆醇含量乘以换算系数1.216，得到盐酸吡哆醇的含量。

9 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

10 其他

对于固体或半固体试样，当称样量为 0.2 g 时，检出限为：硫胺素 0.03 mg/g，核黄素 0.03 mg/g，吡哆醇 0.03 mg/g，烟酸 0.03 mg/g，烟酰胺 0.03 mg/g，咖啡因 0.03 mg/g；定量限为：硫胺素 0.1 mg/g，核黄素 0.1 mg/g，吡哆醇 0.1 mg/g，烟酸 0.1 mg/g，烟酰胺 0.1 mg/g，咖啡因 0.1 mg/g。

对于液体试样，当取样量为 1.0 mL/1.0 g 时，方法的检出限为：硫胺素 0.003 mg/mL，核黄素 0.003 mg/mL，吡哆醇 0.003 mg/mL，烟酸 0.003 mg/mL，烟酰胺 0.003 mg/mL，咖啡因 0.003 mg/mL；定量限为：硫胺素 0.01 mg/mL，核黄素 0.01 mg/mL，吡哆醇 0.01 mg/mL，烟酸 0.01 mg/mL，烟酰胺 0.01 mg/mL，咖啡因 0.01 mg/mL。

附录 A
(资料性)

硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因标准品和样品色谱图

硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因标准品色谱图见图A.1。

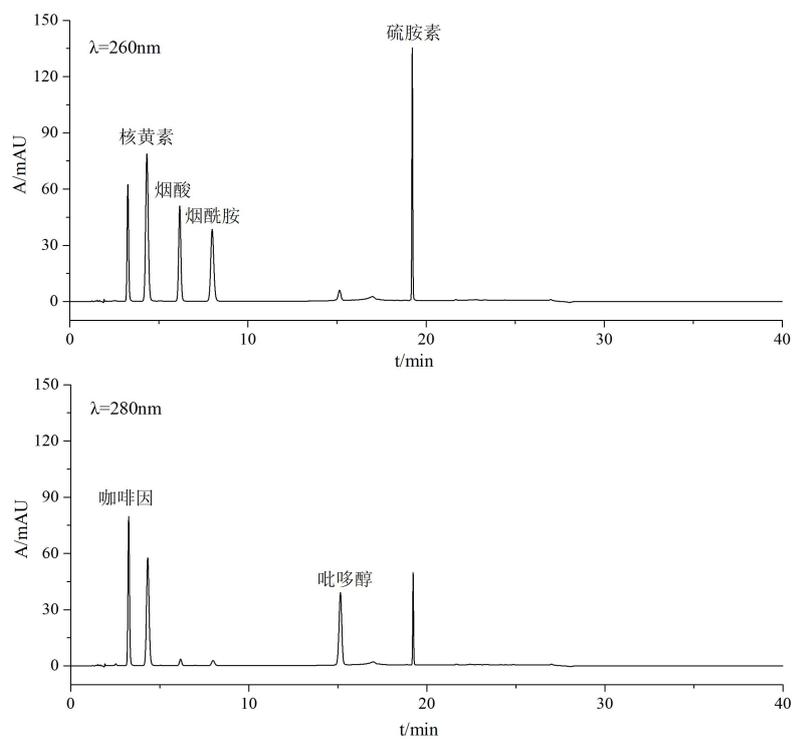


图 A.1 硫胺素、核黄素、吡哆醇、烟酸、烟酰胺和咖啡因标准品色谱图

样品色谱图见图A.2和A.3。

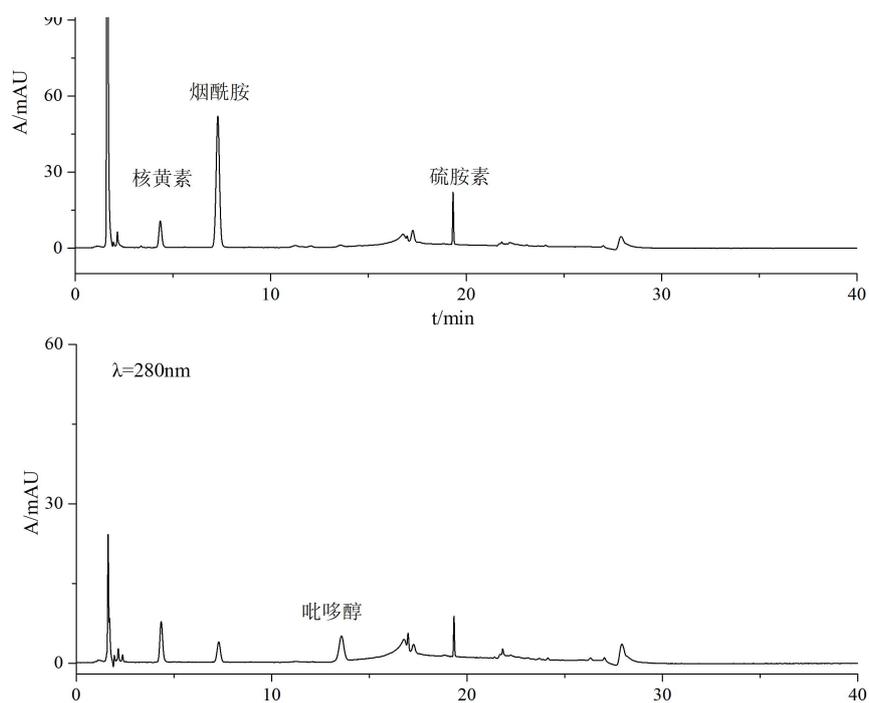


图 A. 2 某固体样品色谱图

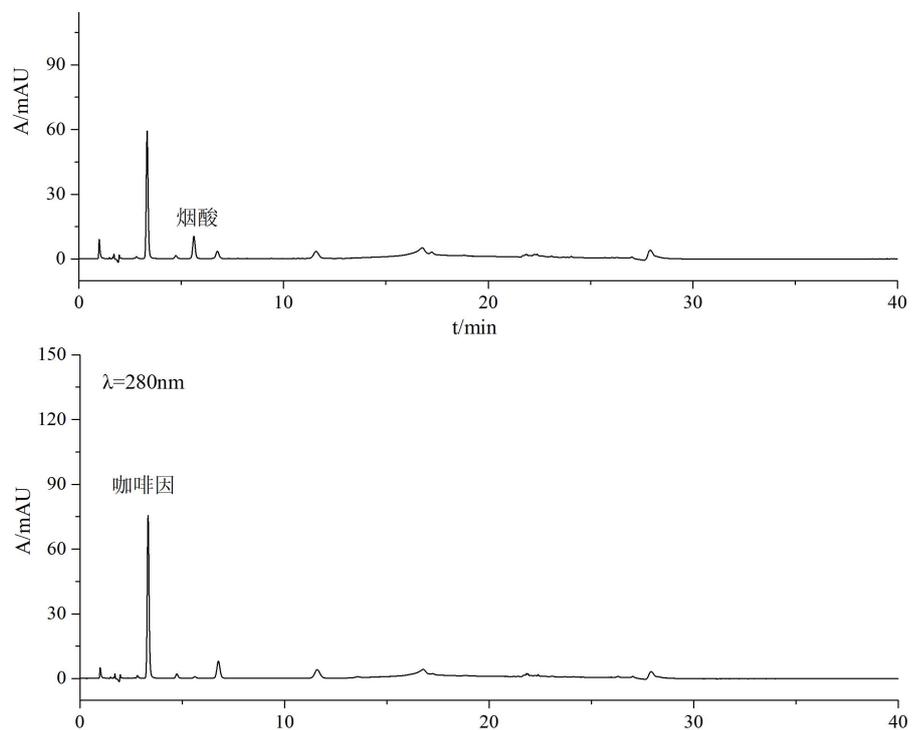


图 A. 3 某液体样品色谱图