



中华人民共和国国家标准

GB 5009.290—2023

食品安全国家标准 食品中维生素 K₂ 的测定

2023-09-06 发布

2024-03-06 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

食品安全国家标准

食品中维生素 K₂ 的测定

1 范围

本标准规定了食品中四烯甲萘醌、七烯甲萘醌、九烯甲萘醌含量的液相色谱测定方法。

本标准适用于乳及乳制品、特殊膳食用食品、发酵豆制品和肉及肉制品中四烯甲萘醌、七烯甲萘醌、九烯甲萘醌三种维生素 K₂ 分型的测定。

2 原理

试样经脂肪酶、淀粉酶或蛋白酶酶解,采用正己烷提取四烯甲萘醌、七烯甲萘醌、九烯甲萘醌,提取液浓缩后经反相液相色谱分离,锌还原柱柱后衍生,荧光检测器检测,外标法定量。

3 试剂和材料

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

3.1 试剂

- 3.1.1 甲醇(CH₃OH):色谱纯。
- 3.1.2 无水乙醇(C₂H₆O)。
- 3.1.3 正己烷(C₆H₁₄)。
- 3.1.4 碳酸钾(K₂CO₃)。
- 3.1.5 二氯甲烷(CH₂Cl₂):色谱纯。
- 3.1.6 四氢呋喃(C₄H₈O):色谱纯。
- 3.1.7 冰乙酸(C₂H₄O₂)。
- 3.1.8 氯化锌(ZnCl₂)。
- 3.1.9 无水乙酸钠(C₂H₃O₂Na)。
- 3.1.10 磷酸二氢钾(KH₂PO₄)。
- 3.1.11 淀粉酶:(CAS 号:9000-92-4)酶活力≥4 000 U/g。
- 3.1.12 脂肪酶:(CAS 号:9001-62-1)酶活力≥40 U/g。
- 3.1.13 蛋白酶:(CAS 号:9001-73-4)酶活力≥6 000 U/mg。
- 3.1.14 氢氧化钾(KOH)。

3.2 试剂配制

3.2.1 400 g/L 氢氧化钾溶液:称取 20.0 g 氢氧化钾于 100 mL 烧杯中,用 20 mL 水溶解,冷却后,转移至 50 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,混匀,储存于聚乙烯瓶中。

3.2.2 磷酸盐缓冲溶液(pH 8.0):称取 54.0 g 磷酸二氢钾于 500 mL 烧杯中,用 300 mL 水溶解,用 400 g/L 氢氧化钾溶液(3.2.1)调节 pH 至 8.0±0.2,转移至 500 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,混匀。

3.2.3 流动相:称取 1.5 g 氯化锌、0.5 g 无水乙酸钠于 1 000 mL 烧杯中,加入 500 mL 甲醇、100 mL 二氯甲烷(或四氢呋喃)、0.3 mL 冰醋酸,转移至 1 000 mL 容量瓶中,超声溶解后,加甲醇定容至刻度,混匀,用 0.22 μm 滤膜过滤。

注:增加二氯甲烷,可以缩短保留时间,最高不宜超过 150 mL/L。

3.2.4 二氯甲烷甲醇溶液(体积比 10+90):准确吸取二氯甲烷 20 mL 于 200 mL 容量瓶中,用甲醇稀释并定容至刻度,混匀。

3.3 标准品

3.3.1 四烯甲萘醌(MK-4)标准品($\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_2$,CAS 号:863-61-6):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.2 七烯甲萘醌(MK-7)标准品($\text{C}_{46}\text{H}_{64}\text{O}_2$,CAS 号:2124-57-4):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.3 九烯甲萘醌(MK-9)标准品($\text{C}_{56}\text{H}_{80}\text{O}_2$,CAS 号:523-39-7):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备溶液

3.4.1.1 MK-4 标准储备溶液(1.0 mg/mL):准确称取 MK-4 标准品 25 mg(精确至 0.1 mg),用二氯甲烷甲醇溶液(3.2.4)溶解并定容至 25 mL,混匀。将溶液储存于棕色玻璃容器中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存,保存期限为 6 个月。

3.4.1.2 MK-7 标准储备溶液(1.0 mg/mL):准确称取 MK-7 标准品 25 mg(精确至 0.1 mg),用二氯甲烷甲醇溶液(3.2.4)溶解并定容至 25 mL,混匀。将溶液储存于棕色玻璃容器中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存,保存期限为 6 个月。

3.4.1.3 MK-9 标准储备溶液(0.5 mg/mL):准确称取 MK-9 标准品 25 mg(精确至 0.1 mg),用二氯甲烷甲醇溶液(3.2.4)溶解并定容至 50 mL,混匀。将溶液储存于棕色玻璃容器中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存,保存期限为 6 个月。

3.4.2 标准中间溶液

3.4.2.1 MK-4 和 MK-7 混合标准中间溶液(10 $\mu\text{g/mL}$):分别准确吸取 MK-4、MK-7 标准储备溶液 0.50 mL 于 50 mL 容量瓶中,用二氯甲烷甲醇溶液(3.2.4)稀释并定容至刻度,混匀。将溶液储存于棕色玻璃容器中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存,保存期限为 6 个月。

3.4.2.2 MK-9 标准中间溶液(50 $\mu\text{g/mL}$):准确吸取 MK-9 标准储备溶液 5.00 mL 于 50 mL 容量瓶中,用二氯甲烷甲醇溶液(3.2.4)稀释并定容至刻度,混匀。将溶液储存于棕色玻璃容器中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存,保存期限为 6 个月。

3.4.3 标准工作溶液

分别准确吸取 MK-4、MK-7 混合标准中间溶液 0.025 mL、0.050 mL、0.10 mL、0.30 mL、0.50 mL、1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,准确吸取 MK-9 标准中间溶液 0.010 mL、0.020 mL、0.040 mL、0.060 mL、0.10 mL、0.20 mL 于上述 10 mL 容量瓶中,用流动相(3.2.3)定容至刻度,混匀。得到 MK-4、MK-7 标准工作溶液质量浓度分别为 0.025 $\mu\text{g/mL}$ 、0.050 $\mu\text{g/mL}$ 、0.10 $\mu\text{g/mL}$ 、0.30 $\mu\text{g/mL}$ 、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$, MK-9 标准工作溶液质量浓度分别为 0.050 $\mu\text{g/mL}$ 、0.10 $\mu\text{g/mL}$ 、0.20 $\mu\text{g/mL}$ 、0.30 $\mu\text{g/mL}$ 、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。临用现配。

注：MK-7、MK-9 低温高浓度时易过饱和，出现浑浊，可提高溶解温度至 $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超声，至完全溶解，恢复室温使用；所称取的标准品质量是折合纯标准品的质量。

3.5 材料

一次性微孔滤膜： $0.22\text{ }\mu\text{m}$ ，有机相。

4 仪器和设备

- 4.1 液相色谱仪：配有荧光检测器。
- 4.2 电子天平：感量分别为 0.1 g 、 1 mg 和 0.01 mg 。
- 4.3 水平振荡器。
- 4.4 涡旋混合器。
- 4.5 高速离心机（转速 $\geq 6\,000\text{ r/min}$ ）。
- 4.6 恒温水浴锅。
- 4.7 旋转蒸发器。
- 4.8 氮气浓缩装置。
- 4.9 pH 计：精确至 0.1 。
- 4.10 组织粉碎机。
- 4.11 均浆器。
- 4.12 超声波清洗器。

5 分析步骤

5.1 试样制备

质地均匀的粉末类样品测定前充分混匀；肉与肉制品取可食部分粉碎均质；其他固体、半固体样品粉碎均质。液态样品测定前混匀。

注：处理过程尽可能避光操作，制备成均匀试样后，避光尽快检测。

5.2 试样处理

警示：处理过程应避免紫外光直接照射，尽可能避光操作。

5.2.1 酶解

5.2.1.1 乳及乳制品和特殊膳食食用食品

称取混匀后的粉末试样 50 g （精确至 0.1 g ）（ m_1 ）至 250 mL 烧杯中，加入 100 mL 水，记录加水后的溶液质量（ m_2 ），充分混匀溶解；准确称取制备后的溶液 6 g （精确至 0.001 g ）（ m_3 ）于 50 mL 离心管中，加入水 11 mL ，再加入磷酸盐缓冲液（3.2.2） 5 mL ，混匀，于 $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴超声 15 min ，冷却至室温后，加入脂肪酶 0.5 g ，再加淀粉酶 0.2 g ，加盖，涡旋 $2\text{ min} \sim 3\text{ min}$ ，混匀后，置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中酶解 2 h 以上（每 30 min 涡旋 1 min ），使其充分酶解。

液体样品，称取混匀样品 $1\text{ g} \sim 10\text{ g}$ （精确至 0.001 g ）（ m_s ）于 50 mL 离心管中，加水至 15 mL ；提取液加入磷酸盐缓冲液（3.2.2） 5 mL ，混匀，于 $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴超声 15 min ，冷却至室温后，加入脂肪酶 0.5 g ，再加淀粉酶 0.2 g ，加盖，涡旋 $2\text{ min} \sim 3\text{ min}$ ，混匀后，置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中酶解 2 h 以上（每 30 min 涡旋 1 min ），使其充分酶解。

5.2.1.2 发酵豆制品

称取均质后的试样 50 g(精确至 0.1 g)(m_1)至 250 mL 烧杯中,加入 100 mL 水,记录加水后的溶液质量(m_2),匀浆器匀浆后,立即准确称取匀浆试样 3 g(精确至 0.001 g)(m_3)于 50 mL 离心管中,加入水 13 mL,加入磷酸盐缓冲液(3.2.2)5 mL,混匀,于 50 °C ± 2 °C 水浴超声 15 min,冷却至室温后,加入脂肪酶 0.2 g,加入蛋白酶 0.1 g,加盖,涡旋 2 min~3 min,混匀后,置于 37 °C ± 2 °C 恒温水浴锅中酶解 4 h 以上(每 30 min 涡旋 1 min),使其充分酶解。

5.2.1.3 肉及肉制品

称取均质后的试样 50 g(精确至 0.1 g)(m_1)至 250 mL 烧杯中,加入 100 mL 水,记录加水后的溶液质量(m_2),匀浆器匀浆后,立即准确称取匀浆试样 15 g(精确至 0.001 g)(m_3)于 50 mL 离心管中,加入水 5 mL,加入磷酸盐缓冲液(3.2.2)5 mL,混匀,于 50 °C ± 2 °C 水浴超声 15 min,冷却至室温后,加入脂肪酶 0.2 g,加入蛋白酶 0.1 g,加盖,涡旋 2 min~3 min,混匀后,置于 37 °C ± 2 °C 恒温水浴锅中酶解 4 h 以上(每 30 min 涡旋 1 min),使其充分酶解。

5.2.2 提取

取出酶解好的试样,分别加入 10 mL 无水乙醇及 1.0 g 碳酸钾,混匀后加入 10 mL 正己烷,3 000 r/min 涡旋 2 min~3 min 或 ≥ 250 r/min 振荡提取 10 min,以 6 000 r/min 离心 5 min,转移上清液至 100 mL 旋蒸瓶中。

注:为保证提取完全,必要时可向下层溶液中再加入 10 mL 正己烷,重复操作 1 次,合并上清液至上述旋蒸瓶中。

5.2.3 浓缩

将上述正己烷提取液于 40 °C ± 2 °C 水浴旋蒸至干(如有残液,可用氮气轻吹至干),用 5.0 mL 流动相(3.2.3)充分溶解浓缩物,将此溶解液用 0.22 μm 滤膜过滤,此滤液为制备的试样溶液。

注:浓缩氮吹后,如果样品浓缩物常温不易溶解,可提高溶解温度至 40 °C ± 2 °C,至完全溶解。纳豆等 MK-7 含量高的样品,可适当加大(5.2.3)定容体积,使制备的试样溶液浓度在标准曲线范围内。

5.3 仪器参考条件

5.3.1 色谱柱: C_{18} (5 μm, 4.6 mm × 150 mm)或具有同等性能的色谱柱。

5.3.2 锌还原柱: 4.6 mm × 50 mm(填料: 锌粉, 锌粉平均粒径 70 μm。锌粉还原柱可直接购买商品柱, 此锌粉还原柱连接于色谱柱后)。

5.3.3 荧光检测器: 激发波长为 326 nm, 发射波长为 410 nm。

5.3.4 流动相: 等度洗脱(按 3.2.3 配制)。

5.3.5 流速: 0.8 mL/min。

5.3.6 进样量: 20 μL。

5.3.7 标准溶液的色谱图见附录 A 中图 A.1。

5.4 标准曲线的制作

分别将 MK-4、MK-7、MK-9 标准系列溶液按照浓度由低到高的顺序注入液相色谱仪中,以测得的峰面积为纵坐标,以 MK-4、MK-7、MK-9 各组分含量(μg/mL)为横坐标,制作标准曲线。

5.5 试样溶液的测定

将制备的试样溶液注入液相色谱仪中,得到峰面积,根据标准曲线得到制备的试样溶液中 MK-4、

MK-7、MK-9 各组分的含量($\mu\text{g/mL}$)。

6 分析结果的表述

固体、半固体试样的质量(m_s)按公式(1)计算。

$$m_s = \frac{m_1 \times m_3}{m_2} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

m_s ——试样的质量,单位为克(g);

m_1 ——均质样品的质量,单位为克(g);

m_3 ——称取的匀浆混合样品的质量,单位为克(g);

m_2 ——均质加水后的溶液的质量,单位为克(g)。

试样中维生素 K_2 各组分的含量 X (MK-4、MK-7、MK-9)按公式(2)计算。

$$X_i = \frac{c \times V \times f}{m_s} \times 1\,000 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X_i ——试样中维生素 K_2 各组分的含量(分别是 $X_{\text{MK-4}}$ 、 $X_{\text{MK-7}}$ 、 $X_{\text{MK-9}}$),单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$);

c ——试样溶液中维生素 K_2 各组分的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——试样溶液的体积,单位为毫升(mL);

f ——试样的稀释倍数;

m_s ——试样的质量,单位为克(g);

1 000 ——换算系数。

计算结果以重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

7 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

8 其他

当试样的质量(m_s)为 2 g 时,四烯甲萘醌(MK-4)方法检出限为 $70.0 \mu\text{g/kg}$,定量限为 $200 \mu\text{g/kg}$;七烯甲萘醌(MK-7)方法检出限为 $70.0 \mu\text{g/kg}$,定量限为 $200 \mu\text{g/kg}$;九烯甲萘醌(MK-9)方法检出限为 $160 \mu\text{g/kg}$,定量限为 $510 \mu\text{g/kg}$ 。

附 录 A

四烯甲萘醌(MK-4)、七烯甲萘醌(MK-7)、九烯甲萘醌(MK-9)标准溶液色谱图

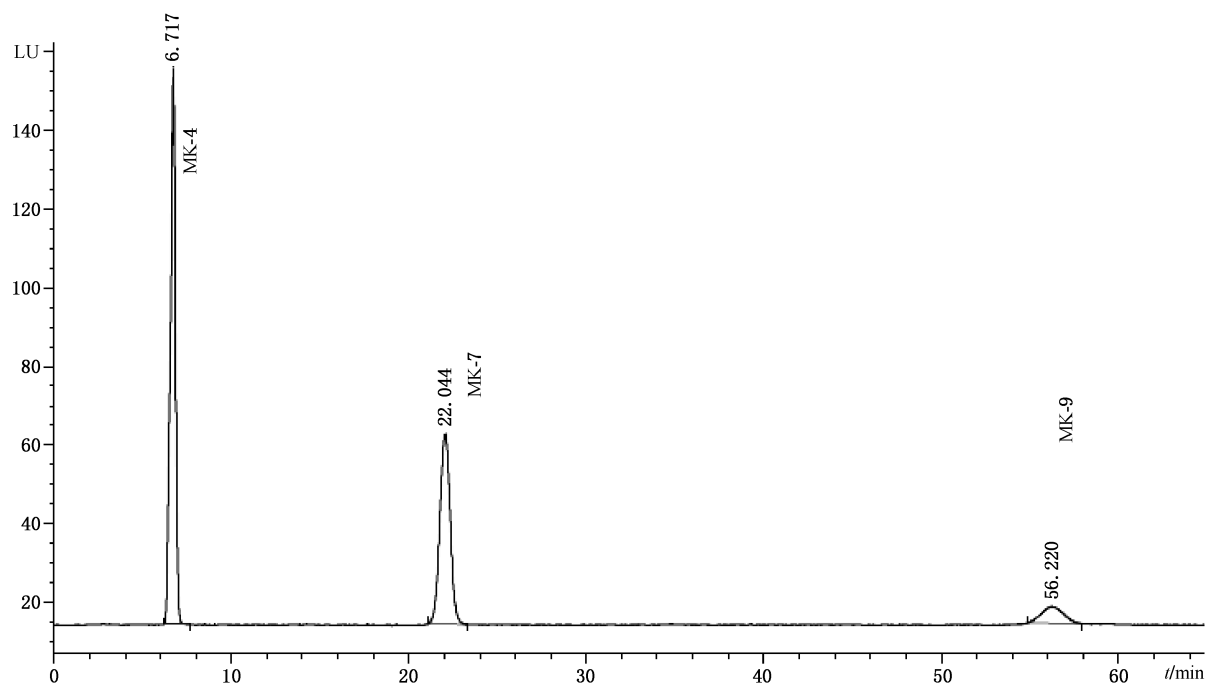


图 A.1 四烯甲萘醌(MK-4)(1.0 $\mu\text{g/mL}$)、七烯甲萘醌(MK-7)(1.0 $\mu\text{g/mL}$)、九烯甲萘醌(MK-9)(1.0 $\mu\text{g/mL}$)标准溶液色谱图