

ICS
C



中华人民共和国食品安全国家标准

GB ××××—××××
代替GB/T 5413.10—1997

婴幼儿食品和乳品中维生素K₁的测定

Determination of vitamin K₁ in foods for infants and young children,

raw milk and dairy products

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准等同采用国际分析家学会 AOAC 999.15 婴幼儿配方粉和乳中维生素 K 的液相色谱检测方法。

本标准代替GB 5413.10—1997《婴幼儿配方食品和乳粉 维生素K₁的测定》。

本标准与GB/T 5413.10—1997相比，主要变化如下：

——试样处理由试样经酶水解后，用NaOH皂化，用石油醚萃取。改为：试样经酶水解后，用NaOH皂化，用正己烷萃取；

——测定由高效液相色谱紫外检测法改为：用高效液相色谱柱后还原荧光法定量测定维生素K₁；

——仪器与设备由紫外检测器改为荧光检测器。

本标准附录 A、附录 B 和附录 C 均为资料性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 5413—85、GB/T 5413.10—1997。

婴幼儿食品和乳品中维生素K₁的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中维生素K₁的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中维生素K₁的测定。

本标准检出限为 10μg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准；然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

用脂肪酶降解试样中的脂肪和不饱和脂肪酸，经碱皂化后，用正己烷提取维生素K₁。通过液相色谱法分离，柱后还原维生素K₁，荧光检测器检测外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T6682 规定的三级水。

4.1 磷酸盐缓冲溶液：0.8 mol/L。

称取 54g 磷酸氢二钾，精确到 0.1g，溶解于 350ml 水中。用 40%氢氧化钾溶液调 pH 至 7.9-8.0，定容至 500mL。

4.2 氢氧化钠溶液：10mol/L。

4.3 95%乙醇。

4.4 饱和氯化钠溶液。

4.5 正己烷：色谱纯。

4.6 无水硫酸钠。

4.7 甲醇：色谱纯。

4.8 二氯甲烷：色谱纯。

4.9 冰醋酸。

4.10 氯化锌。

4.11 无水乙酸钠。

4.12 流动相：甲醇（4.7）900mL，二氯甲烷（4.8）100mL，冰醋酸（4.9）0.3mL，氯化锌（4.10）1.5g，无水乙酸钠（4.11）0.5g，溶解后用 0.45μm 滤膜过滤。

4.13 淀粉酶：酶活力≥1.5U/mg。

4.14 脂肪酶：酶活力≥700U/mg。

4.15 锌粉：粒度 50-70 μm。

4.16 维生素K₁标准溶液：

4.16.1 维生素K₁标准贮备液，浓度为 2mg/mL

称取 0.05g维生素K₁标准品，精确到 0.1 mg，于 25mL容量瓶中，用正己烷溶解定容。

4.16.2 维生素K₁标准中间液，浓度为 20μg/mL。

取标准贮备液（4.16.1）1mL加正己烷定容100mL。

5 仪器和设备

常用实验室仪器及下列仪器设备：

- 5.1 高效液相色谱仪：带有荧光检测器
- 5.2 分析天平：感量 0.1mg。
- 5.3 分液漏斗：500mL
- 5.4 旋转蒸发器
- 5.5 恒温空气浴振荡器
- 5.6 氮吹仪

6 分析步骤

6.1 试样处理

6.1.1 含淀粉的试样

称取固体试样约 2.5 g，液体试样 10g（精确到 0.1mg）混合均匀的试样于三角瓶中，加入 0.5g 淀粉酶（4.13），用 30mL 温水溶解。

6.1.2 不含淀粉的试样

称取固体试样约 2.5 g，液体试样 10g（精确到 0.1mg）混合均匀的试样于三角瓶中，用 30mL 温水溶解。

6.2 测定液的制备

向上述处理过的试样溶液中加入 5ml 磷酸盐缓冲液（4.1）、1g 脂肪酶（4.14），于 37℃ 恒温空气浴振荡器中振荡过夜，使其充分酶解。取出酶解好的试样，加入 2mL 氢氧化钠溶液（4.2），转入 500mL 的分液漏斗中，加入 50mL 乙醇（4.3），充分混匀（必要时加少量饱和氯化钠溶液（4.4））。加入 50mL 正己烷（4.5）。充分振摇 2min，静置分层。放出下层水相于另一个 500mL 分液漏斗中，留下有机相。向水相中再次加入 50mL 正己烷再次萃取，合并有机相。用适量蒸馏水洗有机相两次后，将有机相通过无水硫酸钠（4.6）过滤到一个 500mL 的平底烧瓶中，在旋转蒸发器上 40℃ 以下蒸发至近干。用正己烷（4.5）转移残留物到一个 10mL 试管中，放于氮气仪中吹干，准确加入 1mL 正己烷（4.5），充分振荡溶解残留物。将试管放入冰箱中冷冻一小时后备用。

6.3 测定

6.3.1 参考色谱条件：

色谱柱：C₁₈ 色谱柱 150×4.6mm，5μm 或具同等性能的色谱柱。

锌还原柱：4.6×50mm。

检测波长：激发波长=243nm 发射波长=430nm

流动相：（4.12）

流速：1mL/min

进样量：10μl

6.3.2 维生素K₁标准曲线绘制：

分别吸取标准中间液（4.16.2）0.0，0.5，1.0，1.5，2.0，2.5 mL 加正己烷定容至 25mL，此标准系列工作液维生素K₁浓度分别为 0.0，0.40，0.80，1.20，1.60，2.00 μg/mL。

将系列标准维生素K₁工作液分别注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积或峰高，以峰面积或峰高为纵坐标，以标准测定液浓度为横坐标绘制标准曲线。

6.3.3 试样溶液的测定：

将制备好的试样溶液（6.2）在暗处放至室温后吸取上清液注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积或峰高。从标准曲线上查得试样溶液中维生素K₁的浓度或通过回归方程计算出试样溶液中维生素

K₁的浓度 (μg/ mL)。

7 结果计算和表示

试样中维生素K₁的含量X，以质量分数微克每百克 (μg/100g) 表示，按式(1)计算：

$$X = \frac{C_i \times V_i \times n}{m_i} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

式中：

C_i——试样溶液的浓度，单位为微克每毫升 (μg/mL)；

V_i——试样溶液的体积，单位为毫升 (mL)；

m_i——试样的质量，单位为克 (g)；

n——样液稀释倍数。

计算结果以两次独立测定结果的算术平均值表示，保留到小数点后一位。

8 精密度

在重复性条件下获得两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

9 注意事项

由于维生素K₁遇光易分解，整个操作应避光。

附录 A
(资料性附录)
标准溶液浓度校正方法

标准溶液配制后需要对所配制的标准溶液进行校正，具体操作如下：

维生素K₁标准浓度的标定：取维生素K₁标准工作溶液，按给定波长测定各维生素的吸光值，用比吸光系数计算出该维生素K₁的浓度。测定条件如下所示。

标准	比吸光系数 $E_{cm}^{1\%}$	波长 λ (nm)
维生素K ₁	422	248

浓度按下式计算：

$$C_I = \frac{A}{E}$$

式中：

C_I ——维生素K₁浓度，单位为克每毫升 (g/mL)；

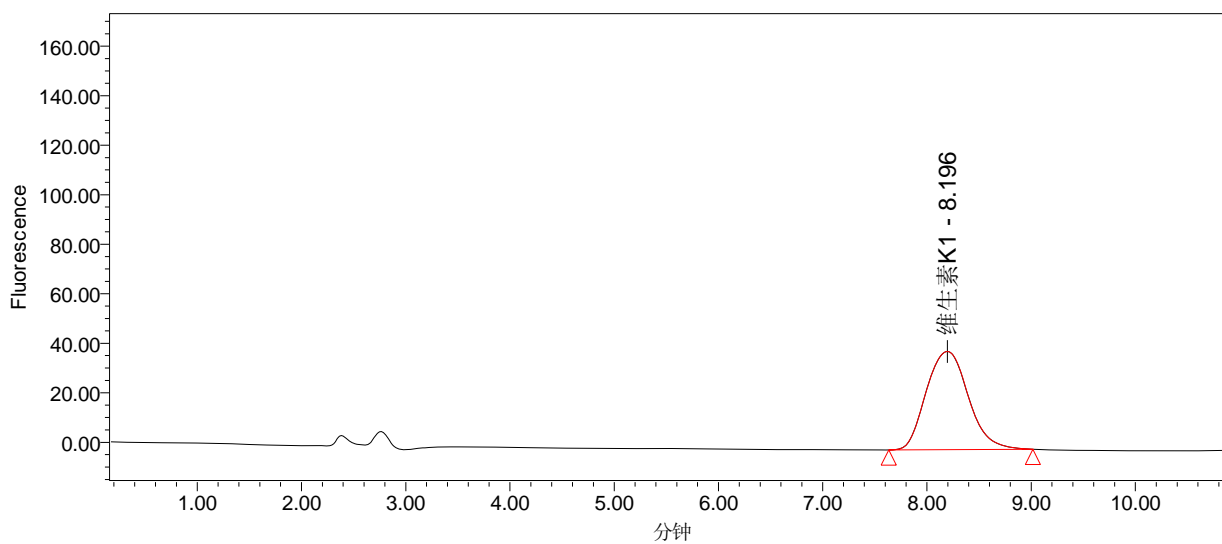
A ——维生素K₁的平均紫外吸光值；

E ——维生素K₁1%比色光系数；

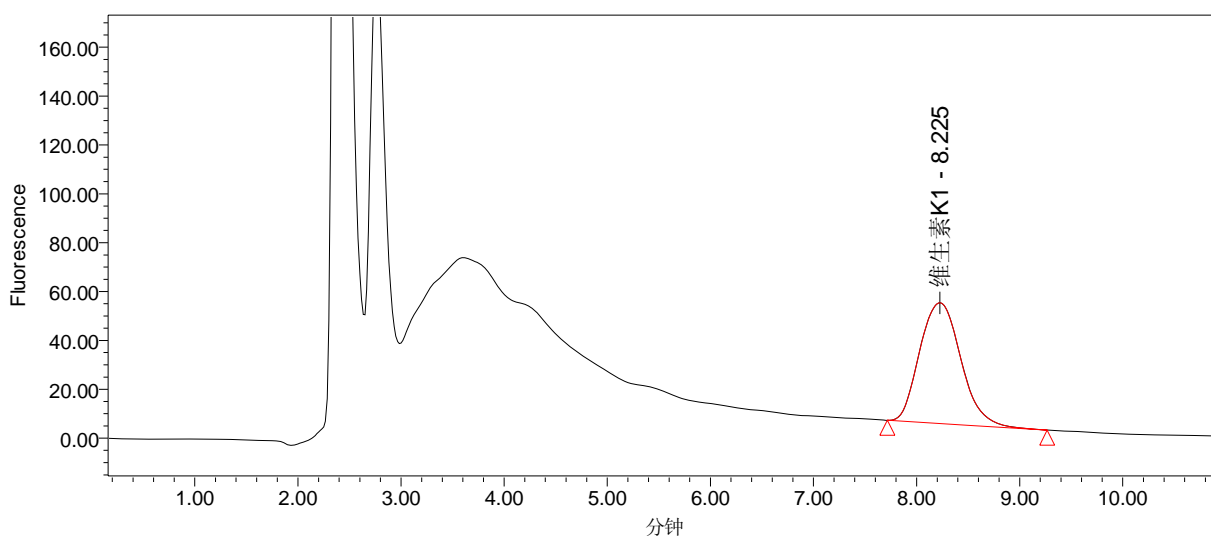
附录 B
(资料性附录)
锌还原柱填装方法

将锌粉(4.15)密集装入还原柱(4.6×50mm, 不锈钢材质)中。装柱时, 应连续少量多次将锌粉装入柱中, 边装边轻轻拍打, 以使装入的锌粉紧密。

附录 C
(资料性附录)
维生素K₁色谱图



C.1 维生素K₁标准色谱图



C.2 试样中维生素K₁色谱图