中华人民共和国国家标准

GB ××××—××××

食品安全国家标准
食品中维生素 K_2 的测定

（征求意见稿）

××××-××-××发布　　××××-××-××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 K_2 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、发酵豆制品和肉与肉制品中四烯甲萘醌、七烯甲萘醌、九烯甲萘醌三种维生素K_2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（CH_3OH）：色谱纯。

3.1.2 无水乙醇（C_2H_6O）。

3.1.3 正己烷（C_6H_{14}）。

3.1.4 碳酸钾（K_2CO_3）。

3.1.5 二氯甲烷（CH_2Cl_2）：色谱纯。

3.1.6 四氢呋喃（C_4H_8O）：色谱纯。

3.1.7 冰乙酸（$C_2H_4O_2$）。

3.1.8 氯化锌（$ZnCl_2$）。

3.1.9 无水乙酸钠（$C_2H_3O_2Na$）。

3.1.10 磷酸二氢钾（KH_2PO_4）。

3.1.11 淀粉酶：酶活力≥4000 U/g。

3.1.12 脂肪酶：酶活力≥40 U/g。

3.1.13 蛋白酶：酶活力≥6000 U/mg。

3.1.14 氢氧化钾（KOH）。

3.2 试剂配制

3.2.1 40%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40 %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1000 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1000 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90+10）：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（$C_{31}H_{40}O_2$，CAS号：863-61-6）：纯度≥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（$C_{46}H_{64}O_2$，CAS号：2124-57-4）：纯度≥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（$C_{56}H_{80}O_2$，CAS号：523-39-7）：纯度≥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 ℃±2℃避光保存，保存期限为六个月。

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 ℃±2℃避光保存，保存期限为六个月。

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25mg（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 ℃±2℃避光保存，保存期限为六个月。

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 μg/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 ℃±2℃避光保存，保存期限为六个月。

3.4.2.2 MK-9标准中间溶液（50 μg/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 ℃±2℃避光保存，保存期限为六个月。

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标准工作溶液浓度分别为0.025 μg/mL、0.050 μg/mL、0.10 μg/mL、0.30 μg/mL、0.50 μg/mL、1.0 μg/mL， MK-9标准工作溶液浓度分别为0.050 μg/mL、0.10 μg/mL、0.20 μg/mL、0.30 μg/mL、0.50 μg/mL、 1.0μg/mL。现用现配。

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 ℃± 2 ℃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

3.5.1 一次性微孔滤膜：0.22 μm，有机相。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪：配有荧光检测器。

4.2 电子天平：感量为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≥6000 rpm）。

4.6 恒温振荡水浴锅。

4.7 旋转蒸发仪。

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。

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用食品

称取混匀后的粉末试样50g（精确至0. 1g）（m_1）（5.1）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0.001g）（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，加入脂肪酶0.5 g (含淀粉的样品加0.2 g淀粉酶)，加盖，涡旋2 min~3 min，混匀后，置于37 ℃±2 ℃恒温振荡水浴锅中酶解2 h以上（每半小时涡旋1 min），使其充分酶解。

液体样品，称取混匀样品（5.1）1 g~10 g (精确到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，加入脂肪酶0.5 g (含淀粉的样品加0.2 g淀粉酶)，加盖，涡旋2 min~3 min，混匀后，置于37 ℃±2 ℃恒温振荡水浴锅中酶解2 h以上（每半小时涡旋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. 1g）（m_1）（5.1）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3g （精确至0.001g）（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，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 ℃±2℃恒温振荡水浴锅中酶解4 h以上（每半小时涡旋1 min）,使其充分酶解。

5.2.1.3 肉与肉制品

称取均质后的试样试样50g（精确至0.1g）（m_1）（5.1）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，准确称取匀浆试样15g （精确至0.001g）（m_3）(精确到0.001 g)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，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 ℃±2 ℃恒温振荡水浴锅中酶解4 h以上（每半小时涡旋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，3000 rpm涡旋2 min~3 min或≥250 rpm振荡提取10 min，以6000 rpm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 ℃±2 ℃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 ℃±2 ℃，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×150mm）或具有同等性能的色谱柱。

5.3.2 锌还原柱：4.6 mm×50 mm，锌还原柱可直接购买商品柱（此锌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，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到液相色谱仪中，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（μg/mL）。

6 分析结果的表述

计算试样的质量（m_s）：

$$m_s = \frac{m_1 \times m_3}{m_2}$$

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_2——均质加水后的溶液质量，单位为克（g）；

m_3——称取的匀浆混合样品质量，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（1）计算：

$$X_i = \frac{c \times V \times f}{m_s} \times 1000 \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（1）$$

式中：

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

1000——换算系数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

7 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20%。

8 其他

当称取试样的质量（m_s）为2.000 g 时，四烯甲萘醌（MK-4）方法检出限为70.0 μg/kg，定量限为200 μg/kg；七烯甲萘醌（MK-7）方法检出限为70.0 μg/kg，定量限为200 μg/kg；九烯甲萘醌（MK-9）方法检出限为300 μg/kg，定量限为1000 μg/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

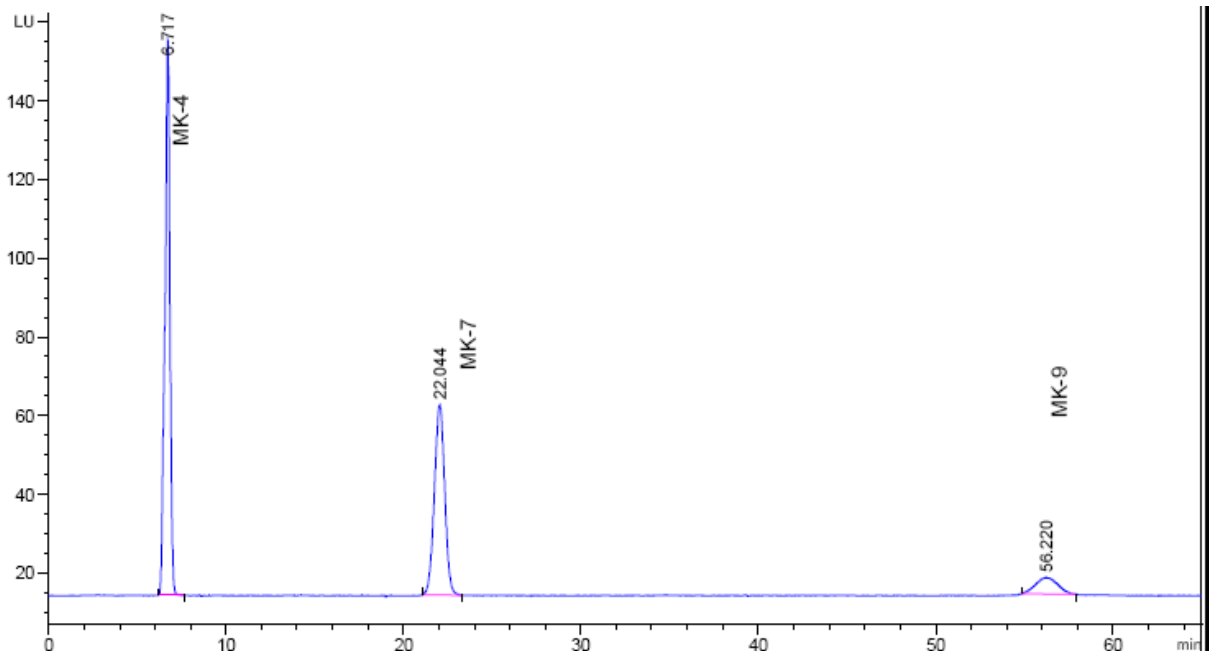

图 A.1 四烯甲萘醌（MK-4）（1.0μg/mL）、七烯甲萘醌（MK-7）（1.0μg/mL）、九烯甲萘醌（MK-9）（1.0μg/mL）标准溶液色谱图