

团 体 标 准

T/STIC 130032—2026

# 乳及乳制品中维生素 K<sub>1</sub> 和 K<sub>2</sub> 含量的测定 高效液相色谱法

Determination of Vitamin K<sub>1</sub> and K<sub>2</sub> in Milk and Dairy Products  
High Performance Liquid Chromatography

2026 - 03 - 16 发布

2026 - 03 - 16 实施

上海市检验检测认证协会 发布

## 目 次

前 言 .....	II
1 范围 .....	3
2 规范性引用文件 .....	3
3 术语和定义 .....	3
4 方法原理 .....	3
5 试剂和材料 .....	3
6 仪器与设备 .....	5
7 测定分析 .....	5
8 分析结果的表述 .....	6
9 精密度 .....	7
10 检出限及定量限 .....	7
附 录 A .....	8

## 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由上海市检验检测认证协会提出并归口。

本文件由上海市检验检测认证协会发布。

本文件起草单位：内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司、上海市质量监督检验技术研究院、青岛海关技术中心、微谱北方检测认证（山东）有限公司、内蒙古欧世蒙牛乳制品有限责任公司、上海微谱检测认证有限公司、内蒙古特康瑞营养食品有限责任公司、现代牧业（集团）有限公司。

本文件主要起草人：逯刚、潘思奕、赵玉然、董立雅、李秋琴、唐亚娟、黄文强、张琳、吴腾、毕春波、李俊楠、李昊哲、闫良、梁凤玲、马利军、刘一峰、李雪晶、刘天益、高雪梅、王美华。

首次承诺执行单位：内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司、上海市质量监督检验技术研究院、青岛海关技术中心、微谱北方检测认证（山东）有限公司、内蒙古欧世蒙牛乳制品有限责任公司、上海微谱检测认证有限公司、内蒙古特康瑞营养食品有限责任公司、现代牧业（集团）有限公司。

# 乳及乳制品中维生素 K<sub>1</sub> 和 K<sub>2</sub> 含量的测定

## 高效液相色谱法

### 1 范围

本文件规定了乳及乳制品中维生素K<sub>1</sub>和K<sub>2</sub>含量的测定方法。

本文件适用于乳及乳制品中发酵乳、调制乳、乳粉、干酪、炼乳等维生素K<sub>1</sub>及维生素K<sub>2</sub>三种分型即四烯甲萘醌、七烯甲萘醌、九烯甲萘醌含量的测定。

### 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 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备

GB/T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备

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 方法原理

样品经脂肪酶或淀粉酶酶解，采用正己烷提取试样中的维生素 K<sub>1</sub> 和 K<sub>2</sub> 三种分型，提取液浓缩后经反相液相色谱分离，锌还原柱柱后还原，荧光检测器检测，外标法定量。

### 5 试剂和材料

除另有规定外，均使用分析纯试剂。

#### 5.1 试剂

本方法所用水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1.1 甲醇：色谱纯。

5.1.2 异丙醇：色谱纯。

5.1.3 无水乙醇。

5.1.4 无水碳酸钾。

5.1.5 磷酸二氢钾。

5.1.6 正己烷：色谱纯。

5.1.7 四氢呋喃：色谱纯。

5.1.8 冰乙酸。

5.1.9 氯化锌。

5.1.10 无水乙酸钠。

5.1.10 氢氧化钠。

5.1.12 脂肪酶(CAS号：9001-62-1)：酶活力 $\geq 700$  U/mg。

5.1.13 淀粉酶(CAS号：9000-92-4)：酶活力 $\geq 1.5$  U/mg。

## 5.2 试剂配制

5.2.1 甲醇异丙醇溶液(1+1)：量取50mL甲醇与50mL异丙醇混合，摇匀。

5.2.2 氢氧化钠溶液(40%)：称取40.0g氢氧化钠，用水溶解，冷却，稀释至100mL。

5.2.3 磷酸盐缓冲液(pH8.0)：溶解54.0g磷酸二氢钾于300mL水中，用40%氢氧化钠溶液调节pH至8.0，加水至500mL。

5.2.4 流动相：量取甲醇900mL，四氢呋喃100mL，冰乙酸0.3mL，混匀后，加入氯化锌1.5g，无水乙酸钠0.5g，超声溶解，0.2 $\mu$ m滤膜过滤。

## 5.3 标准品

5.3.1 维生素K<sub>1</sub>：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质，CAS号：84-80-0。

5.3.2 维生素K<sub>2</sub>(四烯甲萘醌，MK-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，CAS号：863-61-6。

5.3.3 维生素K<sub>2</sub>(七烯甲萘醌，MK-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，CAS号：2124-57-4。

5.3.4 维生素K<sub>2</sub>(九烯甲萘醌，MK-9)：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质，CAS号：523-39-7。

## 5.4 标准溶液配制

5.4.1 维生素K<sub>1</sub>标准储备液(400 $\mu$ g/mL)：准确称取维生素K<sub>1</sub>标准品适量(精确至0.1mg)于小烧杯中，用甲醇溶解定容至10mL容量瓶中，储备液在-20℃以下避光条件下保存，保存期2个月。

5.4.2 MK-4标准储备液(400 $\mu$ g/mL)：准确称取MK-4标准品适量(精确至0.1mg)于小烧杯中，用甲醇溶解定容至10mL容量瓶中，储备液在-20℃以下避光条件下保存，保存期6个月。

5.4.3 MK-7标准储备液(400 $\mu$ g/mL)：准确称取MK-7标准品适量(精确至0.1mg)于小烧杯中，用甲醇异丙醇溶液(1+1)定容至10mL容量瓶中，超声10min，储备液在-20℃以下避光条件下保存，保存期6个月。

5.4.4 MK-9标准储备液(400 $\mu$ g/mL)：准确称取MK-9标准品适量(精确至0.1mg)于小烧杯中，用甲醇异丙醇溶液(1+1)定容至10mL容量瓶中，超声10min，储备液在-20℃以下避光条件下保存，保存

期6个月。

注：MK-7、MK-9 低温高浓度时易过饱和，出现浑浊，可在使用前超声至完全溶解，恢复室温使用，仍出现浑浊可直接用异丙醇配制。

5.4.5 维生素 K<sub>1</sub> 和 K<sub>2</sub> 混合标准中间液（4 μg/mL）：准确移取 100 μL 维生素 K<sub>1</sub> 和 K<sub>2</sub> 标准储备液，用甲醇稀释至 10mL，临用现配。

5.4.6 维生素 K<sub>1</sub> 和 K<sub>2</sub> 混合标准工作液：准确移取维生素 K<sub>1</sub> 和 K<sub>2</sub> 标准中间液（4 μg/mL）2.5 μL、5.0 μL、10 μL、20 μL、50 μL、100 μL 甲醇稀释至 1.0mL，标准系列使用溶液浓度为 0.01 μg/mL、0.02 μg/mL、0.04 μg/mL、0.08 μg/mL、0.2 μg/mL、0.4 μg/mL，临用现配。

注：在实际操作过程中根据样品实际浓度对标准曲线做适当调整。

## 5.5 材料

5.5.1 微孔滤膜(器)：有机相 0.22 μm。

5.5.2 具塞离心管：50mL。

5.5.3 氮吹管或蒸发瓶。

5.5.4 容量瓶：5mL、10mL。

## 6 仪器与设备

6.1 分析天平：感量 0.1mg。

6.2 液相色谱仪：配荧光检测器。

6.3 高速离心机：转速 ≥6000 rpm/min。

6.4 恒温振荡水浴锅或恒温振荡器。

6.5 超声波清洗机。

6.6 涡旋混合器。

6.7 氮吹浓缩仪。

6.8 旋转蒸发仪。

## 7 分析步骤

### 7.1 试样制备

对质地均匀的粉末样品测定前充分混匀；液体样品测定前充分摇匀；对于固体样品如奶酪可冷冻后打碎或剪碎。

注：处理过程尽可能避光操作，制备成均匀试样后，尽快检测。

### 7.2 酶解

液体样品：称取混合均匀的样品约5g(精确至0.0001g)于50mL具塞离心管中，加磷酸盐缓冲液

(pH8.0)5mL, 加约0.2-0.5g脂肪酶, 样品中含淀粉, 则加0.2g淀粉酶, 涡旋混匀后, 置于 $37 \pm 5^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡器或恒温振荡器中振荡3h以上, 使其充分酶解。

固体样品: 称取混合均匀的样品约2.5g(精确至0.0001g)于50mL具塞离心管中, 加10mL约 $40-50^\circ\text{C}$ 温水溶解, 加磷酸盐缓冲液(pH8.0)5mL, 后续步骤同液体样品。

### 7.3 提取

取出酶解好的试样, 加入10mL无水乙醇, 1g无水碳酸钾, 颠倒混匀, 加入10mL正己烷, 颠倒混匀, 超声5-10min, 6000rpm/min离心5min, 上清液转移到具塞离心管中, 使用10mL正己烷重复提取1次, 测定MK-7和MK-9时, 再重复提取1次, 合并上清液至氮吹管中或旋转蒸发瓶中。

### 7.4 浓缩

将氮吹管或旋蒸瓶接入氮吹仪或旋转蒸发仪上于 $40^\circ\text{C}$ 蒸发至近干, 准确加入5mL甲醇异丙醇溶液(1+1)并加盖或定容至5mL混匀后超声5min, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 有机系过滤器过滤, 作为待测溶液上机。

### 7.5 标准曲线的绘制

将标准系列工作溶液分别注入液相色谱仪中, 以标准系列工作溶液中维生素 $\text{K}_1$ 及MK-4、MK-7、MK-9的浓度为横坐标, 对应各浓度点的峰面积为纵坐标, 绘制标准工作曲线, 拟合回归方程, 计算回归系数。

### 7.6 仪器参考条件

7.6.1 色谱柱: C18柱(柱长250mm, 内径4.6mm, 粒径 $5\mu\text{m}$ )或同等效力色谱柱。

7.6.2 锌粉还原柱:  $4.6\text{mm} \times 50\text{mm}$ (填料: 锌粉, 锌粉平均粒径 $70 \mu\text{m}$ 。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)。

7.6.3 荧光检测器: 激发波长243nm, 发射波长为430nm。

7.6.4 流动相: 按5.2.4配制。

7.6.5 流速:  $1.0\text{mL}/\text{min}$ , 等度洗脱分离30-35min。

7.6.6 进样量:  $20 \mu\text{L}$ 。

注: 以上仪器条件是参考条件, 在实际操作过程中可以根据样品特性和仪器状态做适当调整, 目标峰分离谱图见附件。

## 8 分析结果的表述

试样中维生素K各组分含量按下式计算:

$$X = \frac{c \times V \times f}{m} \times 100$$

式中:

X—样品中维生素K各组分含量, 微克每百克( $\mu\text{g}/100\text{g}$ );

$c$ —从标准曲线中查出的试样溶液中各被测组分的浓度，微克每毫升( $\mu\text{g/mL}$ )；

$V$ —试样溶液稀释体积，毫升( $\text{mL}$ )；

$f$ —试样稀释倍数；

$m$ —试样质量，单位为克( $\text{g}$ )；

100—换算系数。

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

## 9 精密度

在重复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 检出限及定量限

液体试样的称样量为 5g 时，维生素  $K_1$  和维生素  $K_2$  各组分的检出限  $1\mu\text{g}/100\text{g}$ ，定量限  $3\mu\text{g}/100\text{g}$ 。

固体、半固体试样的称样量为 2.5g 时，维生素  $K_1$  和维生素  $K_2$  各组分的检出限  $2\mu\text{g}/100\text{g}$ ，定量限  $6\mu\text{g}/100\text{g}$ 。

附录 A  
(资料性附录)

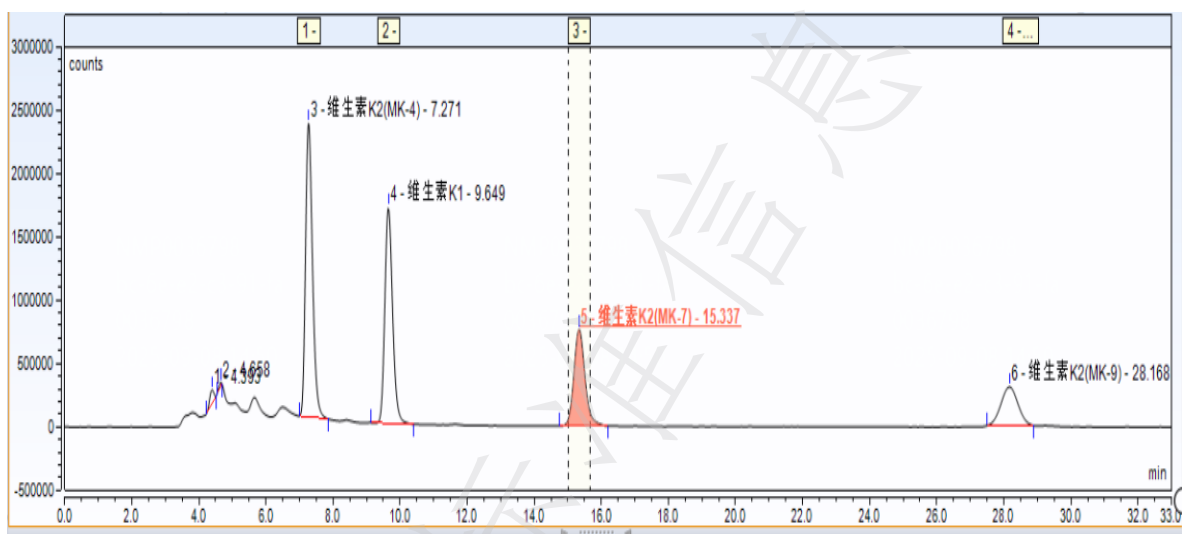


图1 样品中维生素K<sub>2</sub>(MK-4)、维生素K<sub>1</sub>、维生素K<sub>2</sub>(MK-7)、维生素K<sub>2</sub>(MK-9)谱图