

ZJATA

浙江测试团体标准

T/ZJATA 0002—2020

保健食品中维生素K₂的测定
高效液相色谱法

Determination of Vitamin K₂ in health foods—
High performance liquid chromatography method

2020 - 10 - 18 发布

2020 - 11 - 18 实施

浙江省分析测试协会发布

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。

本文件由浙江省分析测试协会提出并归口。

本文件主要起草单位：杭州娃哈哈科技有限公司。

本文件参加起草单位：浙江省疾病预防控制中心、浙江公正检验中心有限公司、杭州市疾病预防控制中心、杭州市食品药品检验研究院、浙江方圆检测集团股份有限公司、浙江华才检测技术有限公司。

本文件主要起草人：赵志红、沈珊珊、汤鋈、陈青俊、金铨、伍勋、牛灿杰、周牡艳、吴琴。

本文件为首次发布。

保健食品中维生素 K₂ 的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了保健食品中维生素 K₂ 的高效液相色谱法检测方法。
本文件适用于脂肪含量 > 1% 的保健食品。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

样品经脂肪酶酶解，酶解液经皂化后用水-正己烷体系萃取，高效液相色谱-二极管阵列检测器检测，外标法定量。

5 试剂或材料

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。

5.1 试剂

- 5.1.1 无水乙醇 (C₂H₅OH)。
- 5.1.2 碳酸钾 (K₂CO₃)。
- 5.1.3 正己烷 (n-C₆H₁₄)。
- 5.1.4 异丙醇 (iso-C₃H₇OH)：色谱纯。
- 5.1.5 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯。
- 5.1.6 磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)。
- 5.1.7 氢氧化钾 (KOH)。
- 5.1.8 脂肪酶：酶活力 ≥ 30 U/mg。

5.2 试剂配制

- 5.2.1 氢氧化钾溶液 (40%)：称取 40g 氢氧化钾于 250 mL 烧杯中，用 40 mL 水溶解，冷却后，加水至 100 mL，储存于聚乙烯瓶中。
- 5.2.2 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5)：溶解 54.0g 磷酸二氢钾于 300 mL 水中，用 40% 氢氧化钾溶液调节 pH 至 7.5，加水至 500 mL。

5.3 标准品

维生素 K₂（七烯甲萘醌，C₄₆H₆₄O₂，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。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 维生素 K₂ 标准储备液（100 mg/L）：准确称取 10 mg（精确至 0.1 mg）维生素 K₂ 标准品，用异丙醇溶解并定容至 100 mL 棕色容量瓶中。在-20 °C下避光保存，保存期3个月。

5.4.2 维生素 K₂ 标准系列工作液：分别准确吸取维生素 K₂ 标准储备液 0.050 mL、0.100 mL、0.200 mL、0.500 mL、1.00 mL、1.50 mL、2.00mL 于 10 mL 棕色容量瓶中，加异丙醇定容至刻度，维生素 K₂ 标准系列工作溶液浓度分别为 0.50mg/L、1.00 mg/L、2.00 mg/L、5.00 mg/L、10.0 mg/L、15.0 mg/L、20.0 mg/L。临用前现配。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪：带二极管阵列检测器。

6.2 涡旋振荡器。

6.3 恒温水浴振荡器。

6.4 pH 计：精度 0.01。

6.5 电子天平：感量 1 mg 和 0.1 mg。

6.6 离心机：转速 ≥6000 r/min。

6.7 氮吹仪。

6.8 超声波振荡器。

6.9 研钵。

6.10 旋转蒸发仪。

7 样品

7.1 根据不同的样品形态进行制样，样品避光保存，制样后尽快测定。

7.2 片剂：取 20 片试样，研磨成粉状。

7.3 胶囊：取 20 粒胶囊，倾出内容物，混匀。

7.4 颗粒剂：取 10 袋试样，倾出内容物，混匀。

8 分析步骤

8.1 试样溶液制备

8.1.1 制备条件

处理过程应避免紫外光直接照射，尽可能避光操作。

8.1.2 酶解

准确称取经均质的试样 0.5 g~2 g（精确到 0.001 g）于 50 mL 离心管中，加入 5 mL 温水溶解（植物油不需加水稀释）。加入磷酸盐缓冲液（pH 7.5）5 mL，混匀，加入 0.3 g 脂肪酶，加盖，充分涡旋 2 min~3 min。混匀后，置于 35 °C±2 °C 恒温水浴振荡器中振荡 2 h 以上，使其充分酶解。

8.1.3 提取

取出酶解好的试样，分别加入 10 mL 乙醇及 1 g 碳酸钾，混匀后加入 10 mL 正己烷和 10 mL 水，涡旋提取 10 min，6000 r/min 离心 5 min，或将酶解液转移至 150 mL 的分液漏斗中萃取提取，静置分层。转移上清液至 100 mL 旋转蒸发瓶中，向离心管中再加入 10 mL 正己烷。重复操作 1 次，合并上清液至蒸发瓶中。

8.1.4 浓缩

将蒸发瓶接入旋转蒸发仪或氮吹仪上，于 40°C 水浴中减压蒸馏或气流浓缩至近干，取下蒸发瓶，用氮气吹干。用异丙醇分次溶解蒸发瓶中残留物并转移定容至 10 mL 容量瓶中，摇匀，0.22 μm 有机系滤膜过滤，滤液待进样。

8.2 液相色谱参考工作条件

液相色谱参考工作条件如下：

a) 色谱柱：C₁₈ 柱，柱长 150 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm，或具同等性能的色谱柱；

b) 流动相：甲醇；

c) 流速：1 mL/min；

d) 柱温：35°C

e) 检测波长：254 nm；

f) 进样量：20 μL；

注：有些品牌 C₁₈ 柱保留时间过长，流动相中可适量加入异丙醇。

8.3 标准曲线制作

采用外标标准曲线法进行定量。将维生素 K₂ 标准系列工作液分别注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积，以峰面积为纵坐标，以标准系列工作液浓度为横坐标绘制标准曲线，计算线性回归方程。

标准溶液色谱图见附录 A。

8.4 试样溶液测定

在相同色谱条件下，将制备的试样溶液进样，进行高效液相色谱分析。以保留时间和光谱图定性，峰面积外标法定量，根据线性回归方程计算出试样溶液中维生素 K₂ 的浓度。

9 试验数据处理

试样中维生素 K₂ 的含量按公式 (1) 计算:

$$X = \frac{\rho \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X —— 试样中维生素 K₂ 的含量, 单位为毫克每千克 (mg/kg);

ρ —— 由标准曲线得到的试样溶液中维生素 K₂ 的浓度, 单位为毫克每升 (mg/L);

V —— 定容体积, 单位为毫升 (mL);

m —— 试样取样量, 单位为克 (g)。

试样中维生素 K₂ 的含量根据产品技术规格表达, 按公式 (2) 计算:

$$Y = \frac{X \times 1000}{1000} \times m_i \dots\dots\dots (2)$$

式中:

Y —— 产品技术规格中维生素 K₂ 的含量, 单位为微克每粒 (或片或袋) (μg /粒 (或片或袋));

X —— 试样中维生素 K₂ 的含量, 单位为毫克每千克 (mg/kg);

m_i —— 每粒 (或每片或每袋) 的质量, 单位为克每粒 (或片或袋) (g/粒 (或片或袋));

1000—— 单位换算系数。

10 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%。
从实验室间试验结果得到的统计数据和其他数据参见附录 B。

11 方法定量限

当取样量为 2 g, 定容体积为 10 mL 时, 本方法检出限为 0.5 mg/kg, 定量限为 1.5 mg/kg。

附录 A
(资料性附录)
液相色谱图

维生素 K₂ 标准溶液高效液相色谱图见图 A.1。

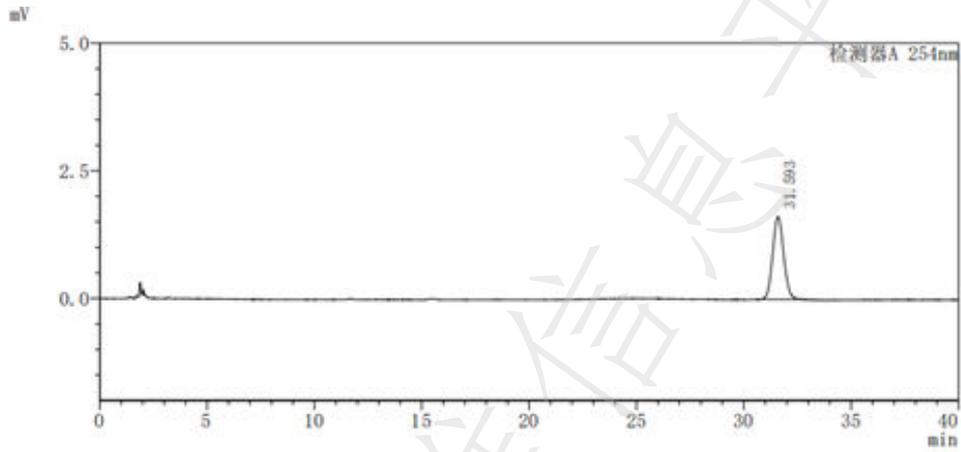


图 A.1 维生素 K₂ 标准溶液高效液相色谱图

附录 B

(资料性附录)

从实验室间试验结果得到的统计数据和其他数据

样品的标识	A	B
参加实验室的数目	4	4
可接受结果的数目	4	4
平均值/ (mg/kg)	1.69	122
重复性标准差 (S_r)	0.035	1.38
重复性变异系数	2.2%	1.2%
重复性限 (r) ($2.8 \times S_r$)	0.062	0.034
再现性标准差 (S_R)	0.093	3.70
再现性变异系数	5.5%	3.0%
再现性限 (R) ($2.8 \times S_R$)	0.154	0.085