

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

T/STIC

团 体 标 准

T/STIC XXXX—2026

乳及乳制品中维生素 K1 和 K2 含量的测定

Determination of Vitamin K1 and K2 Contents in Milk and Dairy products

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

2026 - XX - XX 发布

2026 - XX - XX 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 | 4 |
| 7 环境要求 | 错误！未定义书签。 |
| 8 样品要求 | 错误！未定义书签。 |
| 9 操作步骤 | 5 |
| 10 健康安全操作要求 | 错误！未定义书签。 |
| 11 精密度、检出限及定量限 | 6 |
| 附 录 A | 7 |

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、上海市检验检测认证协会。

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

乳及乳制品中维生素 K₁ 和 K₂ 含量的测定

1 范围

本标准规定了乳及乳制品中维生素K₁和K₂含量的测定方法，
本标准适用于乳及乳制品中维生素K₁及维生素K₂三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 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、淀粉酶酶解，采用正己烷提取试样中的维生素 K₁ 和 K₂ 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、耗材

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。

甲醇：色谱纯。

异丙醇：色谱纯。

无水乙醇。

无水碳酸钾。

磷酸二氢钾。

正己烷：色谱纯。

四氢呋喃：色谱纯。

冰乙酸。

氯化锌。

无水乙酸钠：分析纯。

脂肪酶：酶活力 ≥ 700 U/mg。

淀粉酶：酶活力 ≥ 1.5 U/mg。

维生素 K₁：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。

维生素 K₂（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。

维生素 K₂（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。

维生素 K₂（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。

微孔滤膜（器）：有机相 0.22 μm 。

离心管：50mL。

氮吹管或蒸发瓶。

5.2 试剂配制

维生素 K₁ 标准储备液（400 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确称取维生素 K₁ 标准品适量（精确至 0.1mg）于容量瓶中，用甲醇溶解定容，储备液在 -20°C 以下避光条件下保存，保存期 2 个月。

MK-4 标准储备液（400 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确称取 MK-4 标准品适量（精确至 0.1mg）于容量瓶中，用甲醇溶解定容，储备液在 -20°C 以下避光条件下保存，保存期 6 个月。

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

MK-9 标准储备液（400 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确称取 MK-9 标准品适量（精确至 0.1mg）于容量瓶中，用甲醇异丙醇溶液（1+1）定容，超声 10min，储备液在 -20°C 以下避光条件下保存，保存期 6 个月。

维生素 K₁ 和 K₂ 混合标准中间液（4 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确移取适量体积维生素 K₁ 和 K₂ 标准储备液，用甲醇稀释至一定体积，得到合适的标准混合工作溶液，临用现配。

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。

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

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

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，超声溶解混匀过滤。

6 仪器与设备

分析天平：感量 0.1mg。

液相色谱仪:配荧光检测器。

高速离心机: 转速 ≥ 6000 rpm/min。

恒温振荡水浴锅。

超声波清洗机。

涡旋混合器。

氮吹浓缩仪。

旋转蒸发仪。

7 测定步骤

7.1 试样制备

质地均匀的样品测定前充分混匀。

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。

7.2 酶解

称取混合均匀的样品约5g(精确至0.0001g)于50mL离心管中, 加磷酸盐缓冲液(pH8.0)5mL, 加约0.2-0.5g脂肪酶和0.2g淀粉酶(如样品中不含淀粉可不加淀粉酶), 涡旋混匀后, 置于 $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴振荡器中震荡3h以上, 使其充分酶解。

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, 10mL正己烷重复提取1-2次(当同时测定MK-7和MK-9时需重复提取2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 $40^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 蒸发至近干, 加入5mL甲醇异丙醇溶液(1+1)并加盖或定容至5mL混匀后超声溶解5min, 0.22 μm 有机系滤器过滤上机。

7.5 标准曲线的制备

精确吸取维生素 K_1 和 K_2 标准中间液($4\mu\text{g}/\text{mL}$) $2.5\mu\text{L}$ 、 $5.0\mu\text{L}$ 、 $12.5\mu\text{L}$ 、 $25\mu\text{L}$ 、 $50\mu\text{L}$ 、 $100\mu\text{L}$ 、 $200\mu\text{L}$ 甲醇稀释至1.0mL, 临用前配置。标准系列使用溶液浓度为 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.02\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.05\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.2\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.4\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.8\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

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。

7.6 仪器参考条件

色谱柱: C18柱(柱长250mm, 内径4.6mm, 粒径5 μm)或同等效力色谱柱。

锌粉还原柱：4.6mm×50mm(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)。

荧光检测器：激发波长 243nm，发射波长为 430nm。

流动相：见 5.2 中流动相配制。

流速：1.0mL/min，等度洗脱分离 30-35min。

进样量：10 μL。

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，单位为微克每百克(μg/100g)；

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(μg/mL)；

V—被测组分稀释体积，毫升(mL)；

f—试样稀释倍数；

m—试样质量，单位为克(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，保留到三位有效数字。

9 精密度

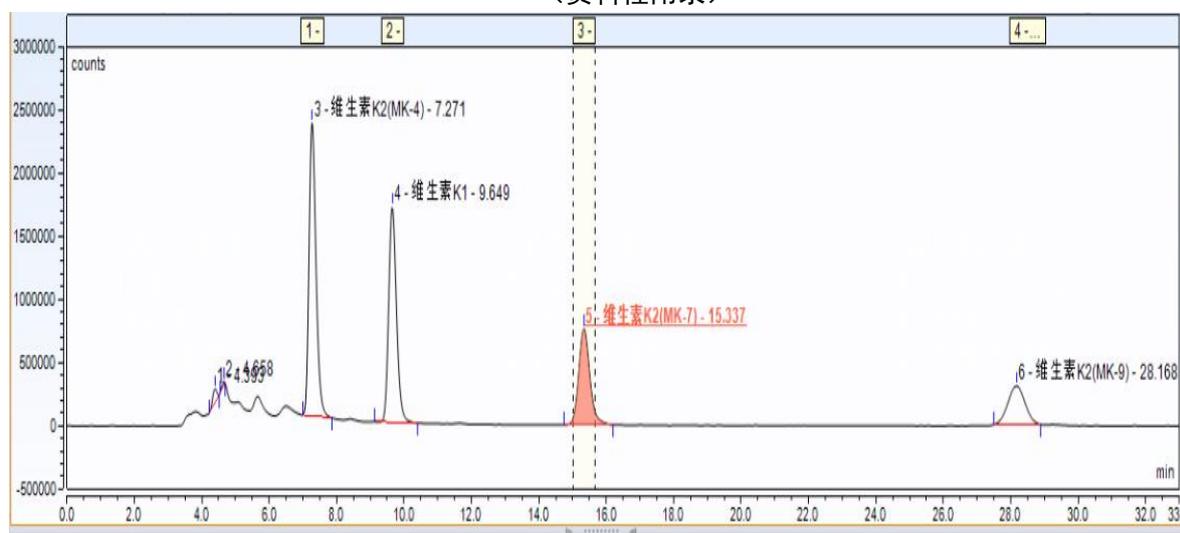
在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

10 检出限及定量限

试样的质量为 5g 时，维生素 K₁ 和维生素 K₂ 各组分的检出限 1 μg/100g，定量限 3 μg/100g。

附录 A

(资料性附录)

图1 样品中维生素 K₂(MK-4)、维生素 K₁、维生素 K₂(MK-7)、维生素 K₂(MK-9)谱图