

中华人民共和国国家标准

GB 5413.10—2010

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中维生素 K₁ 的测定

National food safety standard

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

2010-03-26 发布

2010-06-01 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）AOAC 999.15 Vitamin K in Milk and Infant Formulas Liquid Chromatographic Method。

本标准代替GB/T 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：

- 标准名称改为《婴幼儿食品和乳品中维生素K₁的测定》；
- 试样处理改为试样经酶水解后，用NaOH皂化，用正己烷萃取；
- 测定改为用高效液相色谱柱后还原荧光法定量测定维生素 K₁；
- 仪器中将“高压液相色谱仪带紫外检测器”修改为“高效液相色谱仪，带荧光检测器”。

本标准附录 A、附录 B 和附录 C 均为资料性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB 5413-1985、GB/T 5413.10-1997。

食品安全国家标准

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。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

3 原理

用脂肪酶降解试样中的脂肪和不饱和脂肪酸，对于含淀粉试样需先用淀粉酶降解试样中的淀粉，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/T 6682 规定的一级水。

4.1 氢氧化钠溶液（10 mol/L）：临用前配制。

4.2 95%乙醇。

4.3 饱和氯化钠溶液。

4.4 正己烷：色谱纯。

4.5 无水硫酸钠。

4.6 甲醇：色谱纯。

4.7 二氯甲烷：色谱纯。

4.8 冰醋酸。

4.9 氯化锌。

4.10 无水乙酸钠。

4.11 流动相：甲醇（4.6）900 mL，二氯甲烷（4.7）100 mL，冰醋酸（4.8）0.3 mL，氯化锌（4.9）1.5 g，无水乙酸钠（4.10）0.5 g，溶解后用 0.45 μm 滤膜过滤。

4.12 淀粉酶：酶活力 ≥ 1.5 U/mg。

4.13 脂肪酶：酶活力 ≥ 700 U/mg。

4.14 锌粉：粒度 $50\ \mu\text{m}\sim 70\ \mu\text{m}$ 。

4.15 维生素 K_1 标准溶液：标准溶液浓度校正方法参见附录 A。

4.15.1 维生素 K_1 标准储备液 (2 mg/mL)：称取 0.05 g 维生素 K_1 标准品 (精确到 0.1 mg)，于 25 mL 容量瓶中，用正己烷溶解定容。

4.15.2 维生素 K_1 标准中间液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：取标准储备液 (4.15.1) 1 mL 加正己烷定容至 100 mL。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪，带有荧光检测器。

5.2 天平：感量为 0.1 mg。

5.3 分液漏斗：250 mL。

5.4 旋转蒸发器。

5.5 恒温空气浴振荡器。

5.6 离心机：转速 ≥ 3000 转/分钟。

5.7 氮吹仪。

6 分析步骤

6.1 试样处理

6.1.1 含淀粉的试样

称取混合均匀的固体试样约 2.5 g 或液体试样约 10 g (精确到 0.1 mg) 于三角瓶中，加入 0.5 g 淀粉酶 (4.12)，用 30 mL 温水溶解。

6.1.2 不含淀粉的试样

称取混合均匀的固体试样约 2.5 g 或液体试样约 10 g (精确到 0.1 mg) 于三角瓶中，用 30 mL 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 1 g 脂肪酶 (4.13)，于 $37\ \text{C}\pm 5\ \text{C}$ 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 2 mL 氢氧化钠溶液 (4.1)，用 50 mL 乙醇 (4.2) 将溶液转入 250 mL 的分液漏斗中，充分混匀 (必要时加少量饱和氯化钠溶液 (4.3))。加入 50 mL 正己烷 (4.4)。充分振摇 2 min，静置分层。放出下层水相于另一个 250 mL 分液漏斗中，留下有机相。向水相中再次加入 50 mL 正己烷再次萃取。合并有机相。用适量蒸馏水洗有机相两次。将有机相通过无水硫酸钠 (4.5) 脱水过滤到一个 500 mL 的烧瓶中，在旋转蒸发器上于 $40\ \text{C}\pm 2\ \text{C}$ 下蒸发至近干。用正己烷 (4.4) 转移残留物到一个 10 mL 试管中，置氮吹仪上于 $40\ \text{C}\pm 2\ \text{C}$ 下吹干，准确加入 1 mL 正己烷 (4.4)，充分振荡溶解残留物。将试管放入冰箱中在 $0\ \text{C}$ 以下冷冻 1 h 备用。

6.3 测定

6.3.1 色谱参考条件

色谱柱：C₁₈ 色谱柱，150 mm×4.6 mm，5 μm，或具同等性能的色谱柱；

锌还原柱：4.6 mm×50 mm（参见附录 B）；

检测波长：激发波长为 243 nm，发射波长为 430 nm；

流动相：甲醇（4.6）900 mL，二氯甲烷（4.7）100 mL，冰醋酸（4.8）0.3 mL，氯化锌（4.9）1.5 g，无水乙酸钠（4.10）0.5 g，溶解后用 0.45 μm 滤膜过滤；

流速：1 mL/min；

进样量：10 μL。

6.3.2 维生素 K₁ 标准曲线绘制

分别准确吸取标准中间液（4.15.2）0.0 mL，0.5 mL，1.0 mL，1.5 mL，2.0 mL，2.5 mL 加正己烷定容至 25 mL，此标准系列工作液维生素 K₁ 浓度分别为 0.00 μg/mL，0.40 μg/mL，0.80 μg/mL，1.20 μg/mL，1.60 μg/mL，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 测定液的测定

将制备好的测定液（6.2）在暗处放至室温，于离心机中在 3000 转/分钟下离心 5 min，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（标准色谱图参见附录 C）。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 分析结果的表述

试样中维生素 K₁ 的含量按式（1）计算：

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

式中：

X——维生素 K₁ 的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

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。

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，结果保留到小数点后一位。

8 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%。

9 其他

9.1 由于维生素 K₁ 遇光易分解，整个操作应避光。

9.2 本标准检出限为 1 μg/100 g。

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。测定条件见表A.1。

表A.1 维生素K₁吸光值的测定条件

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

浓度按式(2)计算：

$$C_I = \frac{A}{E} \times \frac{1}{100} \dots\dots\dots (2)$$

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K₁ 1 %比色光系数。

附录 B
(资料性附录)
锌还原柱填装方法

将锌粉(4.14)密集装入还原柱(4.6 mm×50 mm, 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 液相色谱图

C.1 维生素 K₁ 液相色谱图

维生素 K₁ 液相色谱图见图 C.1。

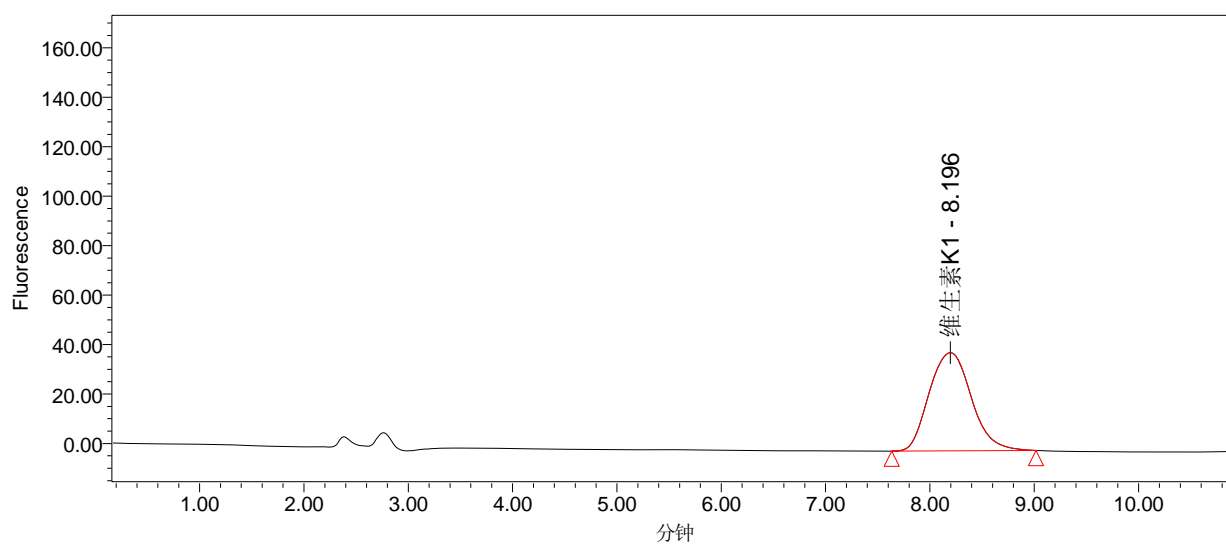


图 C.1 维生素 K₁ 液相色谱图