

月旭科技 食品中维生素 K₁ 的测定

1、适用范围及原理

水果、蔬菜等低脂性植物样品,用异丙醇和正己烷提取其中的维生素 K₁,经维生素 K₁ 前处理小柱净化,去除叶绿素等干扰物质。用 C18 液相色谱柱将维生素 K₁ 与其他杂质分离,经柱后还原,荧光检测器检测,外标法定量。(本实验选用菠菜和苹果)

参考标准:《GB 5009.158-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 K₁ 的测定》

2、溶液的配制

维生素 K₁ 标准贮备溶液(1mg/mL):精确称取 50mg(精确至 0.1mg)维生素 K₁ 标准品于 50mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度。将溶液转移至棕色玻璃容器中。在-20℃下避光保存,保存期 2 个月。

维生素 K₁ 标准中间液(100μg/mL):准确吸取标准贮备溶液 10.00mL 于 100mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。将溶液转移至棕色玻璃容器中,在-20℃下避光保存,保存期 2 个月

维生素 K₁ 标准使用液(1.00μg/mL):准确吸取标准中间液 1.00mL 于 100mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。

正己烷-乙酸乙酯混合液(90+10):量取 90mL 正己烷,加入 10mL 乙酸乙酯,混匀

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,超声溶解后,用 0.22 μm 有机系滤膜过滤。

3、提取步骤

精确称取 5g 经均质匀浆的样品于 50mL 离心管中,加入 5mL 异丙醇,旋涡 1min,超声 5min,再加入 10mL 正己烷,旋涡震荡提取 3min,6000r/min 离心 5min,移取上清液至 25mL 棕色容量瓶中,向下层溶液中加入 10mL 正己烷,重复提取 1 次,合并上清液于上述容量瓶中,正己烷定容至刻度。用移液管准确移取上清液 5mL 至 15mL 离心管中,氮气轻吹至干,加入 1mL 正己烷溶解,待净化。

声明:除非另有说明,此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可,不可复制。

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号

Tel:400-810-6969

邮编:321000

E-mail:lingyuyu@welchmat.com

4、SPE 净化步骤

SPE 柱：月旭 Welchrom®维生素 K1 前处理小柱，规格：2g/6mL。

活化：5mL 正己烷，弃去

上样：待净化液全部上样，弃去

淋洗：5mL 正己烷淋洗，弃去

洗脱：15mL 正己烷-乙酸乙酯混合液洗脱，收集于 50mL 离心管中，抽干

氮吹至近干，用甲醇定容至 5mL，并过 0.22 μm 滤膜，上 HPLC 检测。

5、注意事项

- 1) 上样速度不能过快，保持在 1s/滴，整个过程填料保持湿润
- 2) 最终洗脱，标准中的 6mL，洗脱不是很完全，此处增加到 15mL
- 3) 加标水平：苹果样品加标为 5g 样中加入 0.25mL 1mg/L 标品，加标水平为 0.05 $\mu\text{g/g}$ ，机读数为 10ng/mL。菠菜样品加标为 5g 样中加入 0.05mL 100mg/L 标品，加标水平为 1 $\mu\text{g/g}$ ，机读数为 200ng/mL（因苹果和菠菜本身基质中就含有维生素 K₁，此处加标是按照基质中含维生素 K₁ 的量进行加标的）
- 4) 前处理过程尽量避光

6、色谱条件

色谱柱：月旭 Ultimate® XB-C18 4.6×250mm, 5 μm

Ultimate® Zn 4.6×50mm

流动相：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

声明：除非另有说明，此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可，不可复制。

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号

Tel:400-810-6969

邮编：321000

E-mail:lingyuyu@welchmat.com

流速: 1.0mL/min

柱温: 30°C

进样量: 10 μ L

检测波长: 激发波长为 243nm, 发射波长为 430nm

7、色谱图或者加标回收率结果

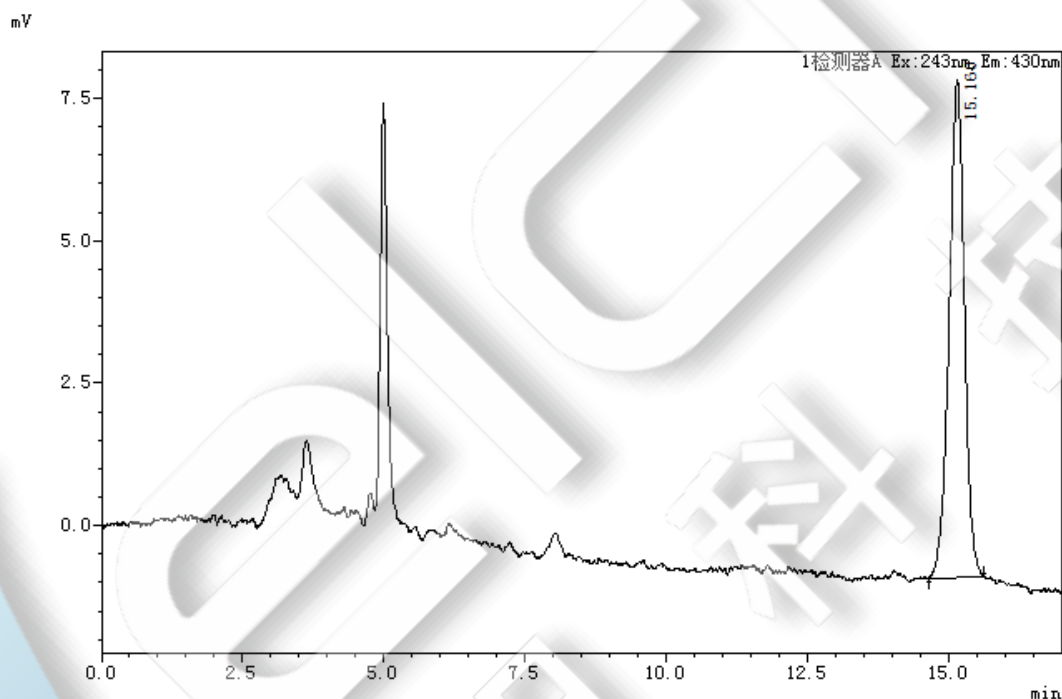


图 1.维生素 K₁ 对照 10ng/mL

| 峰号 | 保留时间 | 面积 | 高度 | 理论塔板数 | 拖尾因子 |
|----|--------|--------|------|-------|-------|
| 1 | 15.160 | 163812 | 8730 | 15116 | 0.952 |

声明:除非另有说明,此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可,不可复制。

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号

Tel:400-810-6969

邮编: 321000

E-mail:lingyuyu@welchmat.com

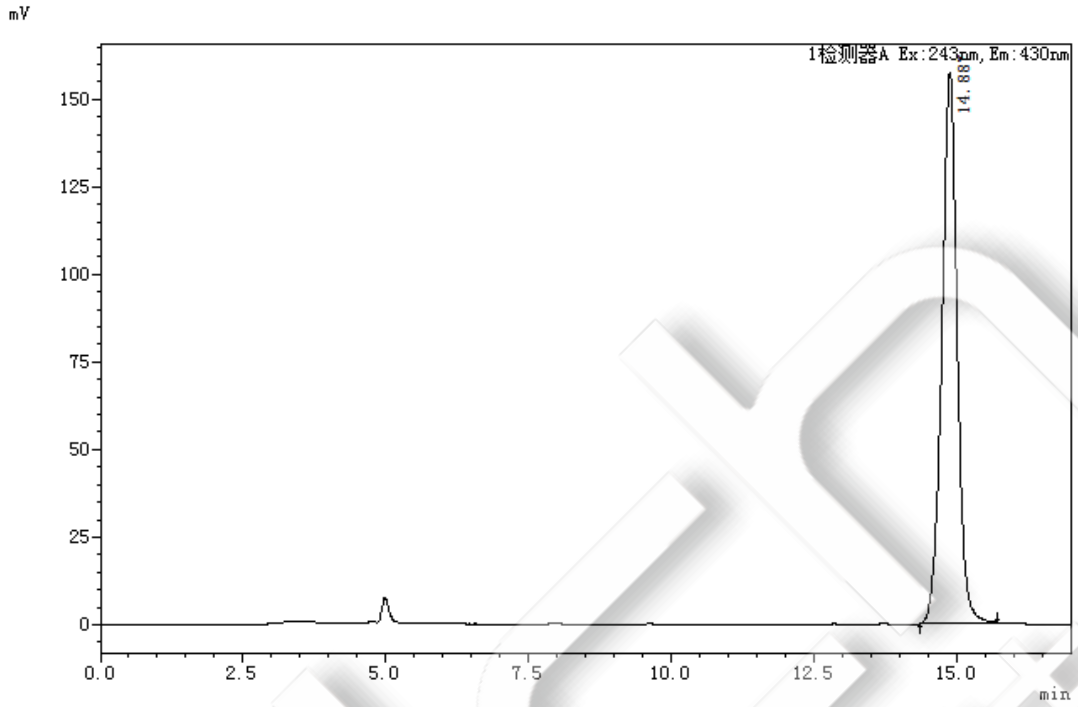


图 2.维生素 K₁ 对照 200ng/mL

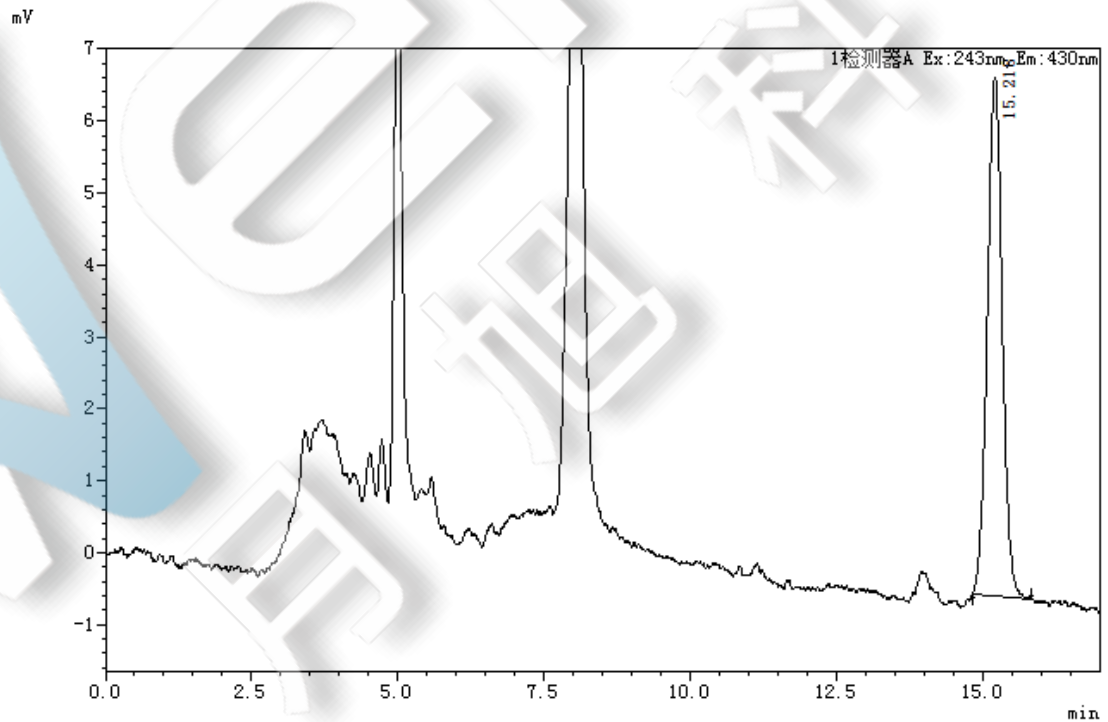


图 3.苹果原样

声明:除非另有说明,此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可,不可复制。

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号

Tel:400-810-6969

邮编:321000

E-mail:lingyuyu@welchmat.com

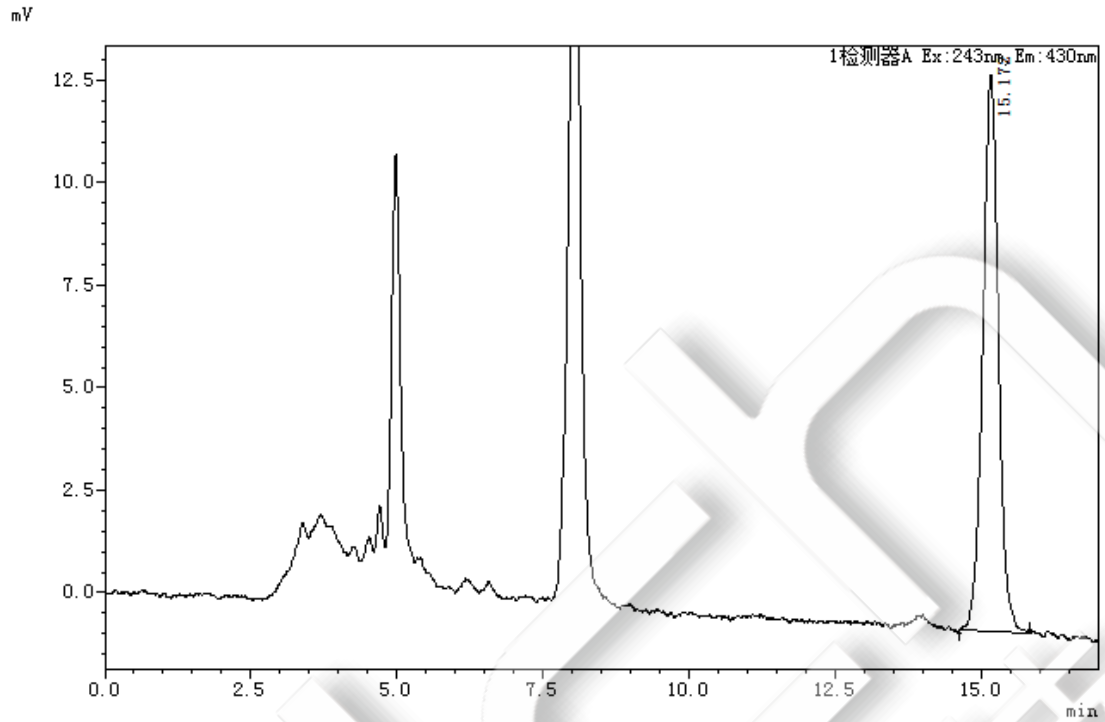


图 4.苹果样+标 0.05 μ g/g

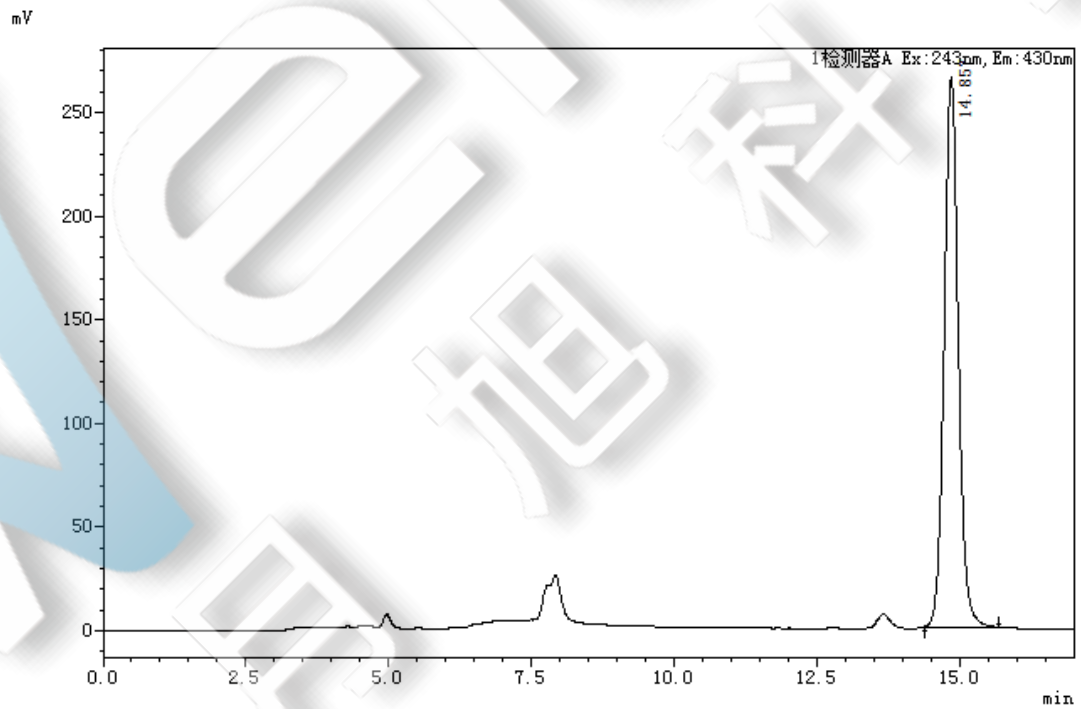


图 5.菠菜原样

声明:除非另有说明,此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可,不可复制。

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号

Tel:400-810-6969

邮编:321000

E-mail:lingyuyu@welchmat.com

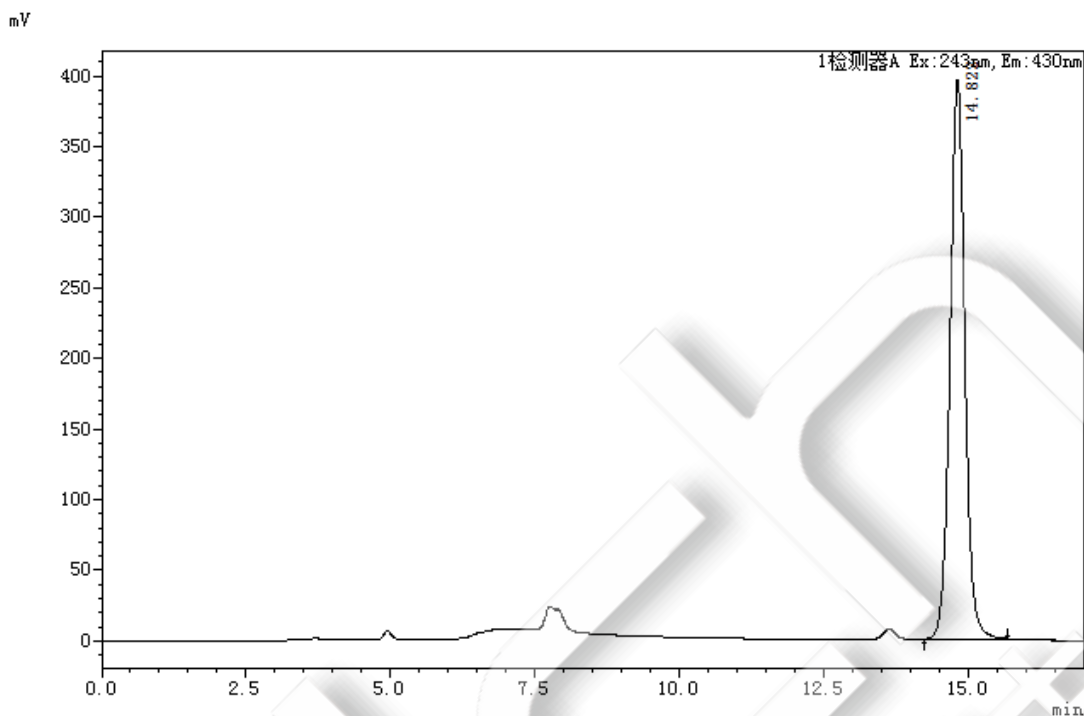


图 6.菠菜样+标 1 μ g/g

表 1：加标回收率

| 名称 | 基质 | 原样峰面积 | 对照品峰面积 | 样加标峰面积 | 加标水平 μ g/g | 回收率% | RSD% N=3 |
|--------|----|---------|-----------------------|---------|-------------------|------|----------|
| 维生素 K1 | 苹果 | 119239 | 163812 (10ng/mL) | 253349 | 0.05 μ g/g | 82 | 3.86 |
| | | | | 251519 | | 81 | |
| | | | | 261381 | | 87 | |
| | 菠菜 | 4540233 | 2657936 (200ng/mL) | 6764112 | 1 μ g/g | 84 | 3.50 |
| | | | | 6887698 | | 88 | |
| | | | | 6919257 | | 90 | |

声明:除非另有说明,此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可,不可复制。

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号

Tel:400-810-6969

邮编:321000

E-mail:lingyuyu@welchmat.com

8、相关产品信息

| 货号 | 名称 | 规格 |
|--------------------|-----------------------|---|
| 00573-20036 | Welchrom®维生素 K1 前处理小柱 | 2g/6ml, 30pk |
| 00000-30016 | 50mL 螺口尖底离心管 | 50 支/包 |
| | 15mL 螺口尖底离心管 | 50 支/包 |
| 00824-31001 | Welch 固相萃取装置 | 12 位方缸 |
| 00821-32291 | 盖子+垫子 | 预切口红色色特氟龙/白色硅胶隔垫, 9mm 蓝色短螺纹开口盖 中心孔 6mm 100pk |
| 00821-40927 | 样品瓶 | 2ml 透明短螺纹广口样品瓶 (带手写处), 11.6*32mm, 一级水解玻璃 100pk |
| 00201-31041 | Ultimate® XB-C18 | 4.6×250mm, 5μm |
| 00225-51037 | Ultimate® Zn | 4.6×50mm |
| 00826-V030P01 G | 维生素 K1 标准品 | CAS No. :84-80-0, 1000mg |

声明:除非另有说明,此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可,不可复制。

Add:浙江省金华市婺城区双林南街 168 号

邮编: 321000

Tel:400-810-6969

E-mail:lingyuyu@welchmat.com