

维生素 K 的测定

此处介绍蔬菜中维生素 K1 的测定方法（HPLC 法）和食物及饲料中水溶性维生素 K3（甲萘醌）的测定方法

一、蔬菜中维生素 K1 的测定方法-HPLC 法

1.原理

蔬菜中的维生素 K1 经有机溶剂提取后，经失活的磷酸盐处理过的氧化铝色谱柱进行净化，再用液相色谱法将维生素 K1 分离并进行定性定量测定。

2.适用范围

本标准适用于各类蔬菜、绿色植物及其干制品中维生素 K1 的测定。

3. 仪器：

(1) 实验室常用设备

(2) 打碎机

(3) 202-R 型恒温干燥箱

(4) 色谱柱：为 0.8cm×30cm 的玻璃柱，底端收缩变细，并装有活塞，活塞上约 1 cm 处有一玻璃筛板，筛板孔径为 16~30 μ m，柱上端膨大为容积约 30ml 的储液池。使用前需干燥

(5) 旋转蒸发器

与旋转蒸发器配套的旋转蒸发瓶：具塞，圆底，容积为 150ml。

(6) 恒温水浴锅

(7) 高纯氮气

(8) 高速离心机

与高速离心机配套的小离心管：具塞，容积为 1.5~3.0ml。

(9) 紫外分光光度计

(10) HPLC：高效液相色谱仪，带紫外检测器

4.试剂

除特殊说明实验用水为蒸馏水，试剂为分析纯，有机溶剂使用前需重新蒸馏。

3.1 无水硫酸钠：使用前需在 150℃ 的烘箱内烘烤 4~8 小时，以去除水分。

3.2 0.14mol/L Na₂SO₄ 溶液：称取 20g 无水硫酸钠，用蒸馏水溶解后定容至 1L。

3.3 丙酮：分析纯。

3.4 石油醚：沸程 30~60℃，分析纯。

3.5 0.6mol/L 碘化钾溶液：称取 10g 碘化钾，用蒸馏水溶解定容至 100ml。

3.6 5g/L 淀粉液：称取 0.5g 可溶性淀粉，用水溶解定容至 100ml。

3.7 乙醚：分析纯。不含过氧化物。

(1) 过氧化物的检查方法：用 5ml 乙醚加 1ml 0.6mol/L 碘化钾溶液，振摇 1min，如有过氧化物则放出游离碘，水层呈黄色。或加 4 滴 5g/L 淀粉液，水层呈蓝色。则该乙醚含有过氧化物需处理后使用。

(2) 去除过氧化物的方法：重蒸时瓶中加一段纯铁丝，弃去 10% 初馏液和 10% 残留液。

3.8 洗脱液：石油醚+乙醚（97+3）。

3.9 甲醇：优级纯。

3.10 正己烷：优级纯。

3.11 磷酸氢二钠：分析纯。

3.12 中性氧化铝：100~200 目。

3.13 氧化铝的处理：

上海洪纪仪器设备有限公司

(1) 磷酸盐处理氧化铝: 取 250g 中性氧化铝, 20g 磷酸氢二钠, 1.6L 蒸馏水, 放入容积为 2L 的锥形瓶中沸水浴 30min, 不时摇动或搅拌。冷却, 倒掉上层液体 (包括悬浮的细小颗粒), 然后用布氏漏斗抽滤。将残留物转至平底玻璃皿中, 于 150℃ 干燥箱中烘烤 3~5h 至两次称量相差 3g 以下, 烘烤过程中不时搅拌, 以避免结块, 冷却后放入干燥器中保存。

(2) 失活处理氧化铝: 使用前, 将磷酸盐处理的氧化铝, 加入具塞锥形瓶中。每 100g 氧化铝加 9.0ml 去离子水, 盖紧瓶塞, 蒸汽浴或 80℃ 干燥箱加热 3~5min, 剧烈摇动锥形瓶, 使氧化铝可以自由流动, 无结块。冷却, 静置 30 分钟, 使水分分布均匀。

(3) 验证处理过的氧化铝: 取标准应用液 1.0ml, 用氮气吹干, 再用石油醚溶解定容至 1.0ml。然后按 5.3 装柱, 将标准溶液加入柱上, 按 5.4 净化步骤进行柱色谱, 用旋转蒸发瓶收集洗脱流出液, 浓缩, 氮气吹干, 用正己烷定容至 1.0ml, HPLC 测定, 记录峰面积或峰高 (A)。另取标准应用液直接测定, 记录峰面积或峰高 (Ar)。将 A 与 Ar 进行比较, 其值在 0.97~1.03 之间 (A/Ar), 则说明柱效较好, 氧化铝处理合格。否则需重新进行失活处理。如果再次验证比值仍不能达到 0.97, 则需重新制备氧化铝。

3.14 维生素 K1 标准: Sigma 公司, 纯度 >98%。

3.15 标准贮备液: 精确称取 50.0mg 维生素 K1 标准, 用正己烷溶解定容至 50.0ml, 即 1.0mg/ml。将储备液分装成安瓿, 冷冻保存。

3.16 标准工作液: 取标准贮备液, 用正己烷准确稀释 50 倍, 即 20.0µg/ml。

标准工作液的标定: 取标准应用液测定紫外吸光值, 波长 248nm, 比色杯厚度 1cm, 以正己烷为空白, 测定 3 次, 取平均值, 按下式计算标准应用液浓度。

$$X_1 = \frac{A}{E} \times M \times 10^3 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中: X1 -- 维生素 K1 标准应用液浓度, µg/ml;

A -- 标准应用液平均紫外吸光值;

E -- 摩尔消光系数, 20,000;

M -- 维生素 K1 分子量 450.7;

103 -- 换算成 µg/ml 的换算系数。

5. 操作步骤

所有操作均需避光进行

5.1 样品处理

(1) 新鲜蔬菜: 拣净去杂物, 将可食部洗净, 擦去表面水分, 切碎, 用打碎机制成匀浆。

(2) 干制植物性样品: 磨碎, 过 60 目筛。

5.2 样品提取

(1) 称取已打成匀浆的新鲜样品 2~10g (维生素 K1 含量不低于 2µg), 加到具塞锥形瓶中, 再加入 5~10 倍体积的丙酮, 盖上塞子, 振摇 3~5min, 静置 1min, 以下按 5.3 步骤操作。

(2) 称取干制植物性样品 0.2~4g (维生素 K1 含量不低于 2µg), 加到研钵中, 再加入 2~4 倍于样品量的无水 Na₂SO₄ 研磨均匀后, 加入 25ml 丙酮, 研磨 3~5min, 静置 1min。

(注: 对于细胞壁比较厚的样品, 如藻类食品, 可先用石英砂研磨, 破坏植物组织细胞。石英砂需进行预处理, 将石英砂用 20 目筛子过筛之后, 先用浓盐酸浸泡, 然后再用稀氢氧化铵浸泡, 最后用蒸馏水洗至中性后在烘箱中烤干。使用时, 每 10g 样品加 3~5g 石英砂于研钵中研磨。)

上海洪纪仪器设备有限公司

5.3 洗涤

将上部澄清液倒入已装有 50~100ml 0.14mol/L Na₂SO₄ 溶液的分液漏斗中,残渣再用丙酮提取 2~3 次,每次用量不少于 25ml,上清液并入分液漏斗。残渣继续用石油醚洗涤 3~4 次,每次用量约 25ml,至洗涤液呈无色,将洗涤液倒入同一分液漏斗中,振摇 1min,静置。弃水相,有机相用蒸馏水洗涤 4~5 遍,至水相澄清。弃水相,将有机相经无水 Na₂SO₄ 脱水后转至旋转蒸发瓶中,于 60°C 水浴中减压蒸馏至约 2ml 时取下,立即用氮气吹干,用石油醚定容至 2.0 ml,待净化。

5.4 装柱

取干燥色谱柱,将验证好的氧化铝浸泡于石油醚中,湿法填充于色谱柱,使氧化铝自由均匀流下,至柱高为 20cm,其上端再加 2 cm 无水 Na₂SO₄。打开活塞,调整流速为每秒 1 滴。一根色谱柱只用于一个样品测定。

5.5 色谱净化:待石油醚流至柱上端 0.5cm 时,加 V1 ml 样品提取液,当样品液流至柱平齐时,加 2 ml 石油醚冲洗柱壁,流下。再加 10ml 石油醚洗脱,2 次,弃除流出液。然后,用 30 ml 洗脱液洗脱,用旋转蒸发瓶收集流出液。流出液于旋转蒸发器浓缩近干,取下用氮气吹干后,用正己烷定容为 V2 ml。将定容液移入小塑料离心管中,5000rpm 离心 5min,上清液供 HPLC 分析。

5.6 标准工作曲线的绘制

分别取维生素 K1 标准应用液 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0ml,加入分液漏斗中,按 5.2 步骤提取,浓缩定容至 2.0ml。取 1.0ml 标准提取液按 5.4 步骤操作,最后定容至 1.0ml,即标准工作曲线中各点维生素 K1 含量分别相当于 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100µg/ml。然后再按 5.6 条件进行 HPLC 测定,记录峰面积或峰高。以标准含量为横坐标,峰面积或峰高为纵坐标绘制标准工作曲线。

5.7 HPLC 色谱分析

色谱条件(推荐条件):

预柱 ultrapack ODS, 10µm, 4.0mm×4.5cm。

分析柱: ultrasphere ODS, C18, 5µm, 4.6mm×250mm。

流动相: 甲醇+正己烷(98+2)。混匀,临用前脱气。

进样量: 20µl。

流速 1.5ml/min。

紫外检测器: 波长 248nm。量程 0.01~0.05。

HPLC 稳定性的测定: 取标准应用液连续进行 6 次 HPLC 测定,计算峰面积或峰高的平均值、标准差和 RSD%,如果 RSD<1%,说明仪器稳定性良好。仪器稳定后方可进行样品测定。

5.8 样品分析

取样品净化液 20µl,按色谱条件进行定性、定量分析。

(1) 定性: 用标准色谱峰的保留时间定性。

(2) 定量: 用样品峰面积或峰高在标准工作曲线上查出其相应的维生素 K1 含量,或用回归方程求出其含量。

上海洪纪仪器设备有限公司

6. 计算

$$X_2 = \frac{c \times 2 \times V_2 \times 100}{V_1 \times m} \quad (2)$$

式中：X₂ -- 样品中维生素 K₁ 的含量,μg/100g;

c -- 由标准工作曲线上查出或回归方程求出的维生素 K₁ 含量,μg;

2 -- 样品提取后的定容体积,ml;

V₁ -- 样品净化处理时的取液量,ml;

V₂ -- 样品净化后的定容体积,ml;

m -- 样品质量,g。

7. 注意事项

(1) 7.1 允许差及最小检出量: 同一实验室同时或连续 2 次测定结果相对偏差绝对值≤10%, 本法最小检出限为 0.5mg。

(2) 本方法避免使用皂化处理, 减少了维生素 K₁ 的破坏; 利用失活的磷酸盐处理过的氧化铝进行色谱分离, 通过改变洗脱液的极性使维生素 K₁ 与杂质分离, 有利于高效液相色谱对维生素 K₁ 的定性及定量分析。

(3) 维生素 K₁ 具有很强的亲脂性, 溶于丙酮、石油醚、正己烷、异辛烷等溶剂中, 而不易溶于甲醇、乙醇等溶剂中。当样品中含有较多的水分时, 如直接用石油醚或正己烷提取会使样品变粘, 因此, 样品需先用丙酮提取, 或先用无水 Na₂SO₄ 研磨, 然后再用丙酮提取, 可起到吸收水分的作用, 进一步地破坏样品的细胞组织, 使提取效果更佳。

(4) 以往的报告多选用活性硅胶或中性氧化铝做色谱柱分离维生素 K₁, 再用极性小的有机溶剂作洗脱液。实际工作中发现, 用硅胶色谱柱, 洗脱流速慢, 洗脱液用量大, 分离时间较长; 用未经处理的氧化铝色谱柱分离会出现维生素 K₁ 与干扰物分离不清的现象。当氧化铝用磷酸盐处理后, 氧化铝的极性增强, 使吸附较小的维生素 K₁ 易于被洗脱液洗脱出来, 而且在处理后的氧化铝中加入少量水分可以提高柱效, 减少维生素 K₁ 出峰拖尾的现象, 缩短保留了时间, 避免了因使用氧化铝造成的维生素 K₁ 可能分解的现象。

(5) 如果氧化铝色谱柱柱效良好, 首先被石油醚洗脱出来的应是胡萝卜素, 且柱上没有胡萝卜素黄色带扩散的现象; 叶绿素及其他色素停留在色谱柱的上方没有或仅有少量位移但不影响分离效果。

(6) 洗脱液中乙醚含量的多少影响着洗脱液的极性, 如果乙醚含量少, 可使维生素 K₁ 的保留时间延长, 反之, 会使干扰物质被提前洗脱, 影响净化效果。所以应严格控制洗脱液中乙醚的比例。

(7) 根据标准维生素 K₁ 紫外扫描图谱, 可见维生素 K₁ 于 240, 248nm, 260, 269nm 波长处有 4 个特征峰, 其中 260nm 的峰最低。将标准品用 HPLC 测定, 以 260nm 波长下的峰面积为 1, 则 240nm, 248nm 和 269nm 波长下的峰面积分别为 1.15, 1.23, 1.09。

(8) 一般反相色谱, 多用有极性的甲醇作为流动相。在甲醇中加入适量的非极性有机溶剂 (如

上海洪纪仪器设备有限公司

正己烷、异辛烷等),可以增加维生素 K1 的溶解能力,有利于缩短保留时间,减少出峰拖尾现象。本方法选择甲醇+正己烷(98+2)作为流动相,维生素 K1 的保留时间为 15.6±0.1min。

(9) 本方法最小检测限为 0.5µg/ml,在 1.0~100.0µg/ml 范围内与峰面积有良好的线性关系。批间测定结果的相对标准偏差在 1.3~7.1% (n=6);回收率为 90.9~106.3%。。不同实验室间测定结果表明此方法精密性、重现性较好,净化效果好,试剂价格适中。

二、食物及饲料中水溶性维生素 K3 (甲萘醌)的测定方法

1. 原理

在氨存在的条件下维生素 K3 (甲萘醌, VK3) 与氰乙酸乙酯形成蓝紫色物质,在 575nm 下的吸光度值与维生素 K3 的浓度成正比,用分光光度计测定有色物质的吸光度值,定量分析样品中维生素 K3 的含量。本法检出限为 0.05mg。

2. 适用范围

本方法适用于强化食物及饲料中水溶性维生素 K3 的测定。

3. 仪器

分光光度计

4. 试剂

本实验所用试剂均为分析级,实验用水为蒸馏水。

(1) 0.1mol/L 碘溶液:称取 25g KI 溶解于 20ml 水中,加入 9.8g 碘,混匀溶解,加水至 750ml。贮存于棕色瓶中,避光保存 24h。

(2) 0.1mol/L 硫代硫酸钠:将水煮沸后冷却。称取 25g Na₂S₂O₃·5H₂O 溶解于 500ml 含 0.1g Na₂CO₃ 的冷却水中,并用冷却的水稀释至 1000ml。

(3) 淀粉指示剂:称取 2g 可溶性淀粉,加于 10ml 水中,摇匀。然后缓慢加至 200ml 沸水中,煮 2 min。

(4) 氨水+异丙醇(1+1)溶液:取异丙醇与等体积的浓氨水混合。

(5) 氰乙酸乙酯(30g/L):取 3g 氰乙酸乙酯溶解于 100 ml 异丙醇中。

(6) VK3 标准溶液(0.1 mg/ml):准确称取 50mgVK3 标准品,转至 500ml 棕色容量瓶中,用异丙醇溶解并定容至刻度。

5. 测定步骤

所有操作均需避光进行

5.1 提取:准确称取约 15g 已混匀的样品,准确加入 100ml 水,搅拌 10min,保证 VK3 充分溶解与混匀。过滤,如滤液浑浊,则反复过滤至澄清。

5.2 氧化:吸取 40ml 滤液至 100 ml 容量瓶中,加 1~2 滴淀粉指示剂,用 0.1mol/L 碘溶液滴定,至出现持续的蓝色。向溶液中滴入 1 滴 0.1mol/L Na₂S₂O₃ 消除蓝色。用水定容至刻度。

(注:碘溶液的作用是作为氧化剂氧化样品中的还原性物质,多余的碘溶液可使淀粉变成蓝色,Na₂S₂O₃ 则是去除多余的氧化剂,消除蓝色,以避免有色物质影响测定。)

5.3 标准管和样品管的制备:分别取 2 套 20ml 比色管,分别按表 1 顺序加入 VK3 标准溶液、样品提取液及试剂,制备标准管和样品管。

表 1 标准管和样品管的制备

试剂	标准管					样品管	
	0	1	2	3	4	空白管	测定管

上海洪纪仪器设备有限公司

VK ₃ 标准溶液, ml	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	-	-
样品提取液, ml	-	-	-	-	-	10.0	10.0
异丙醇, ml	3.0	1.50	1.0	0.5	0.0	3.0	2.0
乙基氰乙酸, ml	-	1.0	1.0	1.0	1.0	-	1.0
氨水-异丙醇, ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

用水定容至 20ml, 摇匀, 放置 20min。

用水定容至 20ml, 摇匀, 放置 20min。

(注: 样品管和标准管中水定容的体积与显色强度、显色的稳定时间密切相关, 如果定容体积过少, 则色度较弱, 且稳定时间短。如按本方法的操作进行, 显色反应至少可以稳定 2 小时。

5.4 比色测定: 用分光光度计于 575nm 波长下, 以标准 0 管做空白管, 调节仪器零点, 测定各管吸光度值。

6. 计算

以标准 VK₃ 含量作横坐标, 吸光度值作纵坐标, 绘制标准曲线, 并计算回归方程。用样品测定管与空白管吸光度值的差值在标准曲线上查出样品管的 VK₃ 含量, 然后计算出样品中 VK₃ 的含量。

$$X = \frac{C_{a-b} \times 25}{m} \times 100$$

式中:

X — 样品中 VK₃ 的含量, mg/100g;

C_{a-b} — 样品测定管与空白管吸光度值的差值在标准曲线上对应的 VK₃ 含量, mg;

M — 样品质量, g

25 —— 样品稀释倍数;

7. 注意事项

(1) 同一实验室平行测定或重复测定结果的相对偏差绝对值 < 10%。

(2) 天然食物中不含有维生素 K₃, 只有部分强化食物可能用 VK₃ 作为强化剂。有文献报道人工合成维生素 K₃ 可能有一定的毒副作用, 尽管目前还没有有力的证据支持这一论点, 但是现在市场上应用维生素 K₃ 作为强化剂的产品较少见。饲料常用维生素 K₃ 作为维生素 K 的来源, 所以维生素 K₃ 的测定对饲料检测和质量控制更有意义。