

# 反相高效液相色谱法测定维生素 K<sub>2</sub> 中 七烯甲萘醌的含量

王德伟\*, 游景水, 叶礼红

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

**摘要:** **目的** 建立维生素 K<sub>2</sub> 产品中七烯甲萘醌(MK-7)的反相高效液相色谱定量检测的方法。**方法** 采用 Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为 50% 甲醇/水(含 0.1% 乙酸)(95:5=V:V), 50% 异丙烷。流速为等速 1.0 mL/min, 检测波长 270 nm, 柱温 40 °C。**结果** MK-7 在浓度 0.355~2.132 mg/mL 的范围内具有良好的线性关系, 相关系数在 0.9999 以上。重复性实验中相对标准偏差为 0.41%, 加标回收率为 98.15%。**结论** 此方法准确性高、重现性好、操作简单, 可用于维生素 K<sub>2</sub> 中 MK-7 含量测定。

**关键词:** 维生素 K<sub>2</sub>; 反相高效液相色谱法; 七烯甲萘醌

## Determination of menaquinone-7 in vitamin K<sub>2</sub> by reversed-phase high performance liquid chromatography

WANG De-Wei\*, YOU Jing-Shui, YE Li-Hong

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of menaquinone-7 (MK-7) products in the vitamin K<sub>2</sub> by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). **Methods** The samples were performed on C<sub>18</sub> diamonsil (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column with 50% methanol/water (containing 0.1% acetic acid) (95:5=V:V) and 50% propane as mobile phase, the flow rate at 1.0 mL/min, the detection wavelength at 270 nm, and the column temperature at 40 °C. **Results** MK-7 had a good linearity in the range of 0.355~2.132 mg/mL, and the correlation coefficient was over 0.9999. The relative standard deviation of the repeatability experiment was 0.41%, and the recovery of the standard was 98.15%. **Conclusion** The method has a good accuracy, good reproducibility and simple operation, and can be applied for the determination of MK-7 in vitamin K<sub>2</sub>.

**KEY WORDS:** vitamin K<sub>2</sub>; reversed-phase high performance liquid chromatography; menaquinone-7

## 1 引言

七烯甲萘醌(MK-7), 别名维生素 K<sub>2</sub>(35)、甲萘醌-7<sup>[1]</sup>。维生素 K<sub>2</sub> 是一系列含有 2-甲基-1, 4-萘醌母核及 C3 位带有数目不等的异戊二烯结构单元的萘醌侧链化合物的统称, 维生素 K<sub>2</sub>(35) 则为萘醌侧链上有 35 个碳元素的维生素 K<sub>2</sub>; 维生素 K<sub>2</sub>(35) 称为甲萘醌

-7, 这是根据其萘醌侧链上有 7 个异戊二烯侧链命名的。MK-7 是维生素 K<sub>2</sub> 中功能最广泛、活性最强大、作用最持久、最安全、价格也最昂贵的成分。MK-7 具有广泛的抗癌功效, 能抑制多种肿瘤细胞增殖, 预防和逆转血管钙化, 提高骨质密度, 改善骨质增生等<sup>[2-6]</sup>。MK-7 生产主要为微生物发酵、提取、化工合成等方法<sup>[7-10]</sup>。MK-7 国内检测方法报道较少, 主

\*通讯作者: 王德伟, 执业药师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 790007532@qq.com

\*Corresponding author: WANG De-Wei, Licensed Pharmacist, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 790007532@qq.com

要为高效液相色谱法<sup>[11-14]</sup>、毛细管电泳法<sup>[15]</sup>等, 现有高效液相色谱法前处理不完全, 杂质干扰影响大, 影响检测结果。现有毛细管电泳法操作复杂, 重新性差。所以本方法根据 MK-7 溶解特性, 优化后建立该方法, 是一种操作比较简单, 实用性较强、快速、准确的一种检测方法。

## 2 材料与方 法

### 2.1 仪器与试剂

岛津高效液相色谱仪(带紫外检测器); KQ-500E 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司); XW-80A 型旋转混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 分析天平(Mettler Toledo XP-205)

甲醇(德国 CNW 批号: vc010600); 异丙醇(德国 CNW 批号: 0000364397); 乙酸乙酯(Korea SK 批号: 10071748); MK-7 标准品(由 Synthetica 提供, 批号 A\_SYN\_01\_01\_63)纯度 99.0%; 维生素 K<sub>2</sub> 样品(Kappa Bioscience AS K2P111210-01, K2P111210-02, K2P111210-03)。

### 2.2 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5 μm);  
流动相: 50%甲醇/水(含 0.1%乙酸)(95:5=V/V), 50%异丙烷;  
流速: 1.0 mL/min;  
检测波长: 270 nm;  
柱温: 35 °C;  
进样量: 10 μL。

### 2.3 溶液的制备

#### 2.3.1 对照品贮备液的配制

所有操作必须避光进行。精密称取 MK-7 标准品约 15 mg, 加乙酸乙酯溶解于 20 mL 棕色容量瓶中, 用乙酸乙酯定容。

#### 2.3.2 标准工作曲线绘制

分别精密吸取标准溶液进样, 分别取浓度  $X$  (mg/mL)与峰面积( $Y$ )的常用对数, 绘制标准工作曲线。

#### 2.3.3 试样制备

所有操作必须避光进行。精密称取 2 g 粉末样品于棕色小瓶中, 使用自动移液器向小瓶中加入 10 mL 乙酸乙酯, 充分震荡。使用超声波清洗器保证所有 MK-7 完全溶解。

#### 2.3.4 空白溶液

取乙酸乙酯溶液作为空白对照溶液。

### 2.4 线性实验

将 MK-7 标准溶液, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 进行液相色谱分析, 记录色谱图, 以标准样品浓度为横坐标( $X$ )为横坐标, 标准品的峰面积( $Y$ )为纵坐标绘制标准工作曲线, 求得回归方程。

### 2.5 精密度实验

精密称取样品 6 份, 按 2.3.3 试样制备方法处理样品, 检测样品含量, 计算其相对标准偏差 RSD(%)。

### 2.6 加标回收率实验

加标样品的处理: 精密称取已知含量的样品约 1 g(含 MK-7 0.132g)9 份, 每组 3 份, 每组分别加入含 MK-7 标准品的乙酸乙酯溶液(MK-7 1.28 mg/mL)1.0、1.5、2.0 mL, 按照 2.3.3 样品处理后, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 作为供试品溶液, 进样量为 10 μL。

## 3 结果与讨论

### 3.1 标准曲线验证结果

MK-7 的标准曲线方程见表 1。MK-7 的相关系数在 0.9999 以上, 浓度在 0.355 mg/mL ~ 2.132 mg/mL 的范围内均具有良好的线性关系。

表 1 标准曲线方程的结果  
Table 1 The results of standard curve equation

名称	标准曲线方程	相关系数( $r$ )
MK-7	$Y=1.1e^7X+4411.6$	0.9999

### 3.2 精密度实验

MK-7 的精密度结果见表 2, 6 个样品的相对标准偏差(RSD)均小于 1.0%, 表明该方法有良好的精密度。

### 3.3 回收率实验

MK-7 在 3 个不同添加水平下浓度的回收率结果见表 3, 3 个浓度下样品中的 MK-7 平均回收率为: 98.15%, 相对标准偏差(RSD)小于 2.0%。加标回收率高, 说明本方法对 MK-7 和保健食品中 MK-7 的含量能起到质量控制的目的。能为 MK-7 原料和保健食品中 MK-7 的含量测定提供检测标准依据。

表2 精密度的实验结果( $n=6$ )  
Table 2 The precision of the experiment ( $n=6$ )

名称	含量(mg/g)	平均含量(mg/g)	RSD(%)
MK-7	1.324	1.323	0.41
	1.319		
	1.321		
	1.315		
	1.331		
	1.328		

表3 加标回收率实验结果( $n=9$ )  
Table 3 Standard addition recovery of experimental results ( $n=9$ )

名称	理论加标量(mg)	实测含量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
MK-7	1.28	2.58	98.44	98.15	1.7
	1.28	2.53	94.53		
	1.28	2.59	99.22		
	1.92	3.20	97.92		
	1.92	3.18	96.88		
	1.92	3.23	99.48		
	2.56	3.86	99.22		
	2.56	3.83	98.05		
	2.56	3.87	99.61		

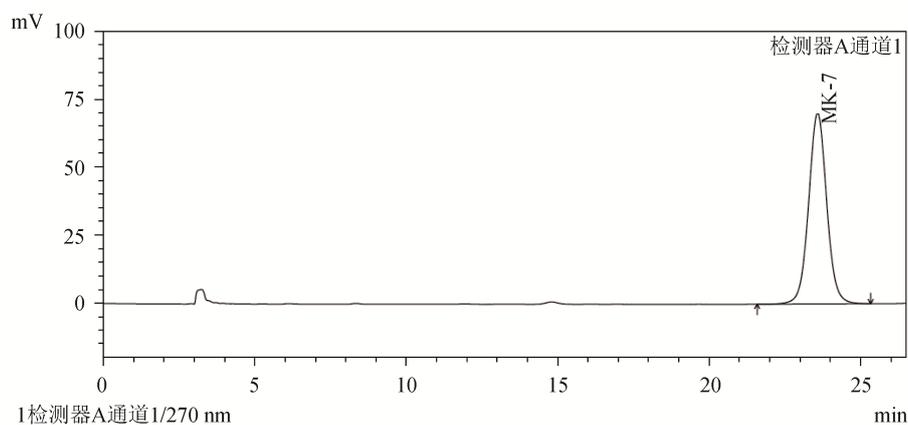


图1 样品的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of sample

### 3.4 样品测定

在2.3.3条件下,与MK-7标准品色谱峰相对应的位置上,可以分离样品中的MK-7。如图1所示,分离效果良好,同时也不会受杂质峰的影响。

## 4 结论

用反向高效液相色谱法测定维生素K<sub>2</sub>原料中MK-7时,在以50%甲醇/水(含0.1%乙酸)(95:5=V:V),

50%异丙烷作为流动相, 270 nm 条件下, 色谱峰型很好, 根据 MK-7 溶解特性, 在用乙酸乙酯溶解样品时, 相对其他有机试剂溶解完全, 损失少, 即溶即得。反复验证, 重复性, 稳定性高, 结果准确度、精密度高, 因此, 在测定维生素 K<sub>2</sub> 原料中 MK-7 时, 操作简单, 所用试剂较少, 本实验方法为 MK-7 的质量控制提供了依据。

## 参考文献

- [1] 李拖平, 郭梅, 王娜, 等. 枯草杆菌发酵生产 VK<sub>2</sub> 的技术工艺条件初探[J]. 食品科学, 2008, (11): 354-357.  
Li TP, Guo M, Wang N, *et al.* *Bacillus subtilis* fermentation production technology conditions Preliminary VK<sub>2</sub> [J]. Food Sci, 2008, (11): 354-357.
- [2] 蒋雨薇, 饶智国. 维生素 K<sub>2</sub> 抗肿瘤作用的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2015, (1): 161-163.  
Jiang YW, Rao ZG. Advances in anti-tumor effects of Vitamin K<sub>2</sub> [J]. Pract J Cancer, 2015, (1): 161-163.
- [3] 应卫星, 陈华, 李荣洲. 维生素 K<sub>2</sub> 联合苯那普利对裸鼠胃癌的治疗作用及其机制的研究[J]. 中国药学杂志, 2012, (3): 33-36.  
Ying WX, Chen H, Li RZ. Vitamin K<sub>2</sub> joint benazepril on the therapeutic effect and mechanism of gastric cancer in nude mice [J]. Chin Pharm J, 2012, (3): 33-36.
- [4] 周小芸, 王艳红, 薛琼. 维生素 K<sub>2</sub> 干预肝癌的实验研究[J]. 中国临床医学, 2008, (6).  
Zhou XY, Wang YH, Xue Q. Experimental study on vitamin K<sub>2</sub> intervention in liver cancer [J]. Chin J Clin Med, 2008, (6).
- [5] 雷泽, 付正启, 木晓云, 等. 维生素 K<sub>2</sub>—新型骨质疏松防治药物[J]. 中国骨质疏松杂志, 2010, (1): 63-66.  
Lei Z, Fu ZQ, MU XY, *et al.* Vitamin K<sub>2</sub>-new type of osteoporosis drug [J]. Chin Osteoporosis J, 2010, (1): 63-66.
- [6] 邹志强. 维生素 K<sub>2</sub> 的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2005, (3): 121-124.  
Zou ZQ. Progress of vitamin K<sub>2</sub> [J]. Chin Osteoporosis J, 2005, (3): 121-124.
- [7] 严为留, 张伟国, 钱和, 等. 纳豆芽孢杆菌发酵生产 MK-7 的产物提取与检测[J]. 食品与生物技术学报, 2013, (8): 113-117.  
Yan WL, Zhang WG, Qian H, *et al.* Product extraction and detection of MK-7 production by *Bacillus natto* [J]. Food Biotechnol J, 2013, (8): 113-117.
- [8] 吴元锋, 郑裕国. 微生物法生产维生素 K<sub>2</sub>(MK)[J]. 科技通报, 2004, (5): 55-60.  
Wu YF, Zheng YG. Microbial production of vitamin K<sub>2</sub>(MK) [J]. Bull Sci Technol, 2004, (5): 55-60.
- [9] 刘兴泉, 唐毅, 林晓静, 等. K 系维生素中间体  $\beta$ -甲基萘醌合成的研究进展[J]. 化工科技, 2003, (2): 51-56  
Liu XQ, Tang Y, Lin XJ, *et al.* Department of vitamin K intermediate beta-methyl naphthoquinone synthesis is reviewed [J]. Chem Technol, 2003, (2).
- [10] 陶轶, 焦淑清, 杨明波, 等. 维生素 K<sub>2</sub> 类化合物合成研究进展[J]. 化学通报, 2013, (3): 49-54.  
Tao Y, Jiao SQ, Yang MB, *et al.* Progress in synthesis of vitamin K<sub>2</sub> compounds [J]. Chem Bull, 2013, (3): 49-54.
- [11] 董跃伟. 反相高效液相色谱法测定纳豆提取物中维生素 K<sub>2</sub>(35) 含量[J]. 中国药品标准, 2010, (4): 49-51.  
Dong YW. Determination of natto extract Vitamin K<sub>2</sub> (35) by RP-HPLC [J]. Chin Drug Tstandards, 2010, (4): 49-51.
- [12] 李向荣, 方晓, 陈青俊, 等. 反相液相色谱法同时测定食物中维生素 K<sub>1</sub> 和 K<sub>2</sub>[J]. 营养学报, 1998, (1): 75-78.  
Li XR, Fang X, Chen QJ, *et al.* RP-HPLC method for simultaneous determination of vitamin K<sub>1</sub> and K<sub>2</sub> in food [J]. Nutrition J, 1998, (1): 75-78.
- [13] 木晓云, 董跃伟, 温晓江, 等. 反相高效液相色谱法测定维生素 K<sub>2</sub>(20)[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2008, (4): 87-89.  
Mu XY, Dong YW, Wen XJ, *et al.* RP-HPLC determination of vitamin K<sub>2</sub> (20) [J]. J Yunnan Unvi (Nat Sci Ed), 2008, (4): 87-89.
- [14] 孙家慧. 高效液相色谱法快速测定维生素 K<sub>2</sub>[J]. 天津化工, 2011, (6): 59-60.  
Sun JH. Rapid determination of vitamin K<sub>2</sub> by HPLC [J]. Tianjin Chem Ind, 2011, (6): 59-60.
- [15] 梁红艳, 温洁, 姜晓峰. 利用毛细管电泳测定血清中维生素 K 的含量[J]. 中国实验诊断学, 2003, (2): 8-10.  
Liang HY, Wen J, Jiang QF. Determination of vitamin K in serum by capillary electrophoresis [J]. Chin Lab Diagn, 2003, (2): 8-10.

(责任编辑: 白洪健)

## 作者简介



王德伟, 执业药师, 主要研究方向为保健食品的质量控制。  
E-mail: 790007532@qq.com