

2种液相色谱法测定保健品软胶囊中的维生素K₂

胡赠彬¹, 冯雷¹, 魏用林², 程晓云¹, 田浩³, 赵贵芝¹, 谭建林¹, 王吉祥¹, 牛之瑞^{1*}

(1. 云南省产品质量监督检验研究院, 国家热带农副产品监督检验中心, 昆明 650223; 2. 云南省计量科学研究院, 昆明 650223; 3. 云南省农业科学研究院加工所, 昆明 650223)

摘要: **目的** 建立正相和反相液相色谱法测定保健品中维生素K₂的含量的分析方法。**方法** 正相法采用硅胶正相色谱柱, 流动相为乙酸乙酯:正己烷(0.5:99.5, V:V); 流速为1.8 mL/min; 反相法采用C₁₈反相色谱柱, 流动相为甲醇; 流速为1.0 mL/min。紫外检测波长均为270 nm。**结果** 2种方法维生素K₂浓度在5~100 µg/g的范围内线性关系良好, 回归系数均大于0.999。维生素K₂在5.00、25.00和50.00 µg/g添加水平的回收率为93.20%~99.28%, 相对标准偏差小于1.8%(n=5)。正相法和反相法的检出限均为5 µg/g。**结论** 2种方法均具备操作过程简单、回收率较高的特点, 但反相色谱法具有更好的检测稳定性, 更适合保健品软胶囊中维生素K₂的分析检测。

关键词: 维生素K₂; 保健品; 高效液相色谱法

Determination of vitamin K₂ in soft capsules for health food by 2 kinds of liquid chromatography

HU Zeng-Bin¹, FENG Lei¹, WEI Yong-Lin², CHENG Xiao-Yun¹, TIAN Hao³, ZHAO Gui-Zhi¹, TAN Jian-Lin¹, WANG Ji-Xiang¹, NIU Zhi-Rui^{1*}

(1. Yunnan Institute of Product Quality Supervision & Inspection, National Agricultural and Sideline Products Quality Supervision and Inspection Center, Kunming 650223, China; 2. Yunnan Institute of Measuring and Testing Technology, Kunming 650223, China; 3. Institute of Agro-Products Processing Science and Technology, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China)

ABSTRACT: Objective To establish two methods for the determination of vitamin K₂ in health foods by normal phase and reverse phase chromatography. **Methods** Silica gel column was used for the normal-phase method, the mobile phase was ethyl acetate: N-hexane (0.5:99.5, V:V), and the flow rate was 1.8 mL/min. In the reverse-phase method, the mobile phase was methanol, the flow rate was 1.0 mL/min. The ultraviolet detection wavelength was 270 nm. **Results** There was a good linear relationship between the 2 methods in the range of 5-100 µg/g, and the correlation coefficients were greater than 0.999. The recoveries of vitamin K₂ at 5.00, 25.00 and 50.00 µg/g levels ranged from 93.20% to 99.28%, and the relative standard deviation was less than 1.8% (n=5). The detection limits of both normal and reverse-phase methods were 5 µg/g. **Conclusion** Both methods have the characteristics of simple operation process and high recovery rate, but reversed phase chromatography has better detection stability and is more suitable for the analysis and detection of vitamin K₂ in soft capsules for health care products.

基金项目: 原云南省质量监督局科技计划项目(2017ynzjkj01)

Fund: Supported by the Former Yunnan Quality Supervision Bureau (2017ynzjkj01)

*通讯作者: 牛之瑞, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: bullnzh@163.com

*Corresponding author: NIU Zhi-Rui, Master, Associate Professor, Yunnan Institute of Product Quality Supervision & Inspection, No.23, Jiaochang Road, Wuhua District, Kunming 650223, China. E-mail: bullnzh@163.com

KEY WORDS: vitamin K₂; health foods; high performance liquid chromatography

1 引言

维生素 K 是一类 2-甲基-1,4-萘醌衍生物, 维生素 K 包括维生素 K₁ 和维生素 K₂。维生素 K₁ 广泛存在于绿色蔬菜和动物内脏中, 而维生素 K₂ 则是体内一些肠道细菌的代谢的产物。近些年的临床研究发现, 维生素 K₂ 具有重要的生物活性和药用价值^[1]。维生素 K₂ 族化合物具有防止并逆转心血管钙化, 预防肝硬化, 预防老年痴呆, 降低 II 型糖尿病风险, 抗风湿性关节炎, 预防静脉曲张, 促进人体皮肤健康, 治疗原发性痛经^[2], 提高佝偻病患者骨钙素羧化率^[3], 预防癌症^[4]等重要的生理功能。维生素 K₂ 是一种人体必需的营养素, 婴儿建议每日补充量为 10~20 μg, 成人补充量为 70~140 μg^[5]。

在 GB 14880-2012^[6]的《附件 3: L-苏糖酸镁等 3 种食品营养强化剂新品种》中, 已有针对调制乳粉中作为食品营养强化剂的维生素 K₂ 的检测方法。对于保健品胶囊中的维生素 K₂ 的检测, 我国目前还没有相应的专门的检测方法标准, 《中华人民共和国药典》也未对保健品中维生素 K₂ 的检测做出规定。考虑到其化学性质, 可以采用分光光度法、层析法和液相色谱法等方法进行检测^[7], 其中液相色谱法具有检测精度高、重现性好、抗干扰能力强等特点, 应用更为普遍。液相色谱法根据采用的流动相体系不同, 又可以分为正相色谱法和反相色谱法^[8,9]。目前关于这 2 种维生素 K₂ 检测方法的比较文献相对较少。

本研究通过实际检测对 2 种方法的优缺点进行比较, 希望为维生素 K₂ 产品质量标准的制定及质量控制提供依据。通过实际检测建立了正相和反相 2 种维生素 K₂ 的检测方法, 拟为相关领域进一步研究提供借鉴。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

保健品样品为用大豆油作为基质添加维生素 K₂ 的软胶囊产品。

甲醇、异丙醇、正己烷(色谱纯, 德国 Meker 公司); 标准品: 维生素 K₂(纯度为 99.8%, 美国 USP REFERENCE STANDARD 公司); 有机系滤头(0.22 μm, 天津市津腾实验设备有限公司)。

维生素 K₂ 标准储备液和工作液的配制: 分别精确称取适量维生素 K₂ 标准品, 分别用正己烷和异丙醇溶解后存于棕色容量瓶中, 于-20 °C 条件下避光保存。使用时将上述标准储备溶液, 分别用正己烷或异丙醇稀释成不同浓度的标准工作溶液。

2.2 仪器与设备

UFLC-20A 高效液相色谱仪(配有自动进样系统、柱温箱、二极管阵列检测器, 日本 Shimadzu 公司); GL-20G-C 型离心机(上海安亭科学仪器厂); Lab dancer 漩涡振荡器(广州仪科实验室技术有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 色谱条件

正相法色谱柱: Alltima 硅胶柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙酸乙酯: 正己烷(0.5:99.5, V:V); 流速: 1.8 mL/min。紫外检测波长: 270 nm。柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL。

反相法色谱柱: TechMate C₁₈-ST 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇; 流速: 1.0 mL/min。紫外检测波长: 270 nm。柱温: 50 °C; 进样量: 10 μL。

2.3.2 样品前处理

由于受试样品形状为软胶囊包裹的油脂, 所以采用有机溶剂溶解的方式直接进行提取。

正相法: 称取胶囊中的油状试样 1 g(精确到 1 mg)于 10 mL 容量瓶中, 加入少量正己烷溶解, 用正己烷定容至 10 mL, 12000 r/min 离心 15 min 后, 于-18 °C 冰箱中静置 40 min, 取上清液过有机系 0.22 μm 滤头, 供液相色谱测定。

反相法: 称取胶囊中的油状试样 1 g(精确到 1 mg)于 10 mL 容量瓶中, 加入少量异丙醇溶解, 用异丙醇定容至 10 mL, 12000 r/min 离心 15 min 后, 于-18 °C 冰箱中静置 40 min, 取上清液过有机系 0.22 μm 滤头, 供液相色谱测定^[10-16]。

3 结果与分析

3.1 样品前处理方法的确定

维生素 K₂ 是脂溶性维生素, 且一般的食品中基本没有维生素 K₂, 添加到保健品中的维生素 K₂ 一般为商品化的人工合成或生物发酵生产的商品化的添加剂, 维生素 K₂ 稳定性相对较差, 对光敏感, 所以检测样品时, 不需要对样品进行皂化处理, 而采用溶剂直接提取的办法, 在操作中尽量避光, 以尽可能降低维生素 K₂ 在提取过程中的损失, 减少因光照导致的降解^[6]。所检测样品为胶囊包裹的油状物, 考虑到正相色谱和反相色谱所用的流动相, 分别采用正己烷和异丙醇进行提取^[8]。

3.2 检测波长的选择

进行色谱检测时, 借鉴了相关的国家标准^[6]和其他研究者^[7-9]的经验, 决定采用紫外检测器。通过参考前人的研究结果, 决定与木晓云等研究者^[7]采用相同的检测波长, 即 270 nm 进行检测。

3.3 流动相的选择

采用正相色谱法检测时,尝试了孙家慧^[9]研究者摸索的液相条件,结合实际检测情况,最终确定,以维生素K₂标准品为参照,以正己烷为提取溶液,以 V(乙酸乙酯):V(正己烷)=0.5:99.5 混合溶液为流动相,流速为 1.8 mL/min。检测结果显示(表 1),维生素 K₂ 的出峰时间在 7.0~7.3 min,而且能够使干扰物质和维生素 K₂ 有效分离。反相色谱法采用流动相为甲醇^[7,8],流速为 1.0 mL/min。维生素 K₂ 的出峰时间在 18.7~18.9 min,能够使干扰物质和维生素 K₂ 有效分离。相比较而言,反相色谱法保留时间更为稳定,且出峰时间较为靠后,可以有效地将样品基质带来的干扰峰分离,得到相对较好的检测效果。

表 1 维生素 K ₂ 色谱峰保留时间及相对标准偏差(n=5) Table 1 Chromatographic peak retention time and relative standard deviation of vitamin K ₂ (n=5)						
保留时间	1	2	3	4	5	相对标准偏差/%
正相法	7.06	7.17	7.15	7.20	7.26	1.01
反相法	18.70	18.77	18.78	18.72	18.79	0.21

注: *保留时间单位为 min。

3.4 线性范围与检出限

取维生素 K₂ 标准储备液,采用逐渐稀释法分别用正己烷(正相法)和异丙醇(反相法)配制标准液。按照上述确定的正相法色谱条件进样,以标准溶液的峰面积(Y)对其质量浓度(X, μg/L)做线性回归方程。结果表明:维生素 K₂ 在

5~100 μg/g 范围内呈良好的线性关系,线性方程为 Y=0.000129251X+0.446734, 回归系数(r)为 0.9993, 维生素 K₂ 标准溶液色谱图和线性回归曲线见图 1。按照上述确定的反相法色谱条件进样,以标准溶液的峰面积(Y)对其质量浓度(X, μg/g)做线性回归程,结果表明:维生素 K₂ 在 5~100 μg/g 范围内呈良好的线性关系,线性方程为 Y=0.000364706X-0.385224, 回归系数(r)为 0.9998, 维生素 K₂ 标准溶液色谱图见图 1 和图 2, 线性回归方程、线性范围和回归系数见表 2。

为了确定方法的检出限,以空白样品(基质样品为大豆油)较低浓度的维生素 K₂ 标准溶液作为样品,分别用两种方法进行测定,经反复尝试,最终确定正相法和反相法的检出限均为 5 μg/g, 结果见表 2。

3.5 精密度与回收率实验

由于市面上常见的维生素 K₂ 软胶囊保健品维生素 K₂ 含量一般在 20~200.00 μg/g 之间,所以确定添加量为 5、25.00 和 50.00 μg/g。在最佳液相色谱条件下,选择空白样品进行加标回收实验,以外标法定量,向空白样品(基质样品为大豆油)中添加低(5.00 μg/g)、中(25.00 μg/g)、高(50.00 μg/g)3 个浓度水平的维生素 K₂ 标准溶液,每个浓度样品平行测定 5 次,计算添加平均回收率和相对标准偏差,结果见表 3, 维生素 K₂ 的平均回收率在 93.20%~99.28%之间,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)在 0.6%~1.8%范围内。该方法的准确度和精密度均满足实际检测需要,能够用于日常分析检测。维生素 K₂ 的回收率及 RSD 值见表 3。

表 2 两种方法的回归方程、回归系数(r)、线性范围和检出限 Table 2 Regression equations, correlation coefficients, liner ranges and limits of detection of two methods				
方法	回归方程	线性范围/(μg/g)	r	方法检出限/(μg/g)
正相法	Y=0.000129251X+0.446734	5~100	0.9993	5
反相法	Y=0.000364706X-0.385224	5~100	0.9998	5

表 3 维生素 K ₂ 的回收率及稳定性(n=5) Table 3 Recovery and stability of vitamin K ₂ (n=5)				
方法	添加量/(μg/g)	检测值/(μg/g)	回收率/%	相对标准偏差/%
正相法	5.00	4.66	93.20	1.8
正相法	25.00	24.82	99.28	1.1
正相法	50.00	49.27	98.54	0.6
反相法	5.00	4.78	95.60	1.7
反相法	25.00	24.09	96.36	1.3
反相法	50.00	49.51	99.02	0.8

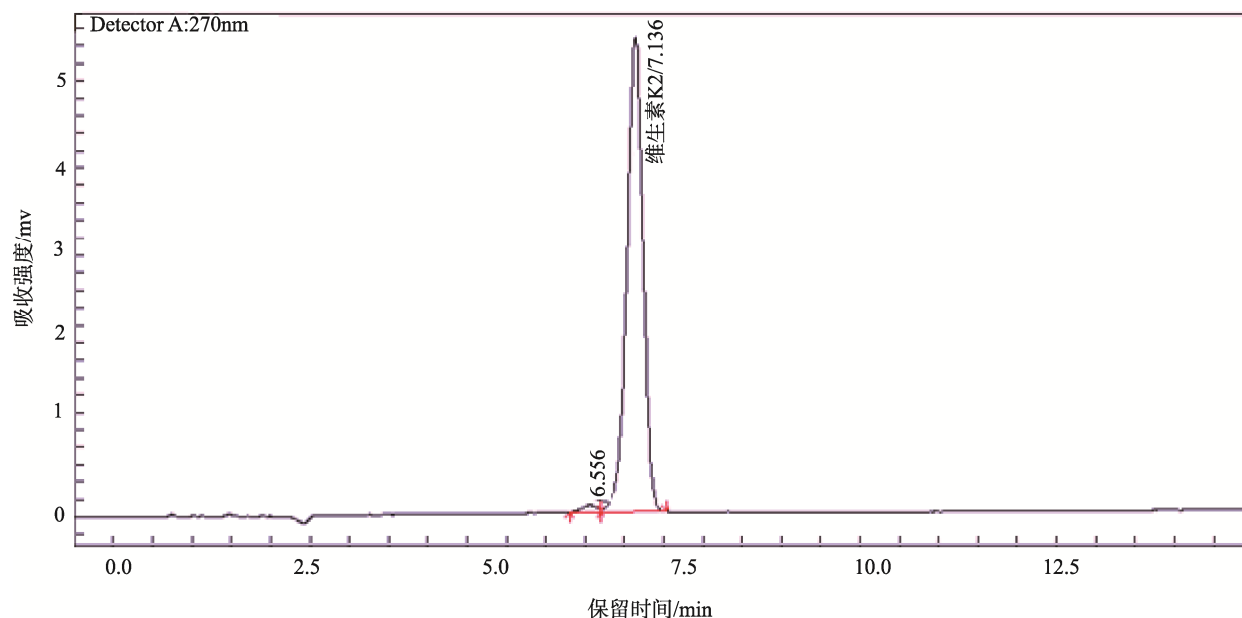


图 1 维生素 K₂ 标准品的正相色谱图
Fig.1 Normal-phase chromatogram of vitamin K₂ standard

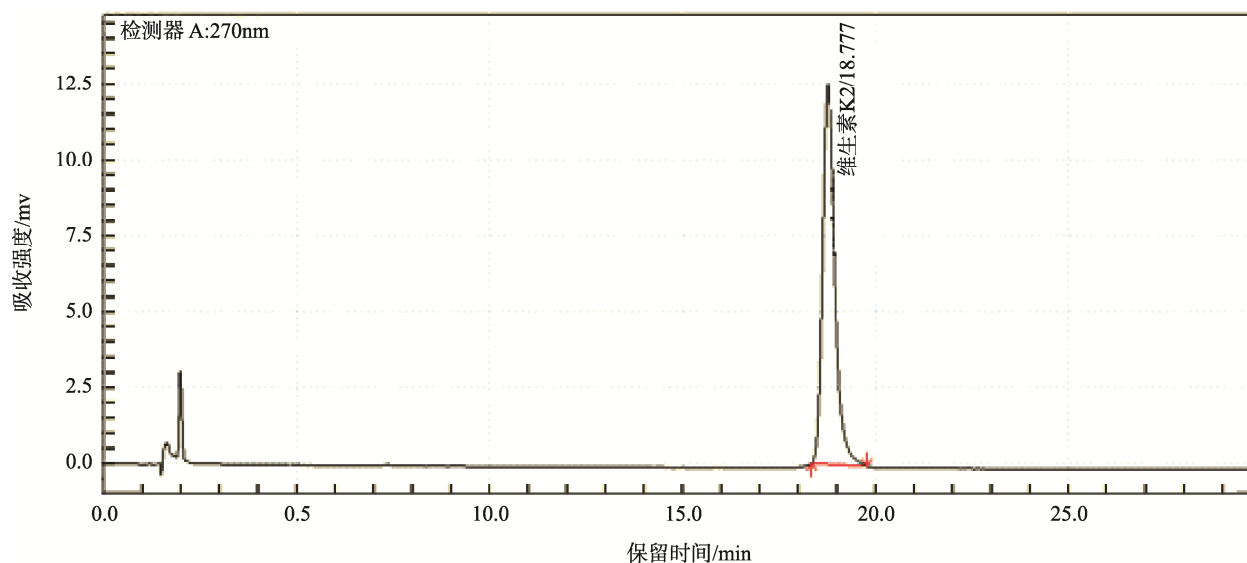


图 2 维生素 K₂ 标准品的反相色谱图
Fig.2 Reversed-phase chromatogram of vitamin K₂ standard

3.6 样品实测实验

采用本研究建立的方法对 4 个维生素 K₂ 保健品软胶囊样品进行实际检测, 检测结果在 56~187 $\mu\text{g/g}$ 之间, 均在样品标签标示范内, 说明建立的 2 种检测方法能够满足实际检测的需求。

4 结 论

综合考虑 2 种检测方法, 均具备操作过程简单、回收率较高的特点, 正相色谱法检测时间短, 具有快速的优势,

但反相色谱法具有更好的检测稳定性, 所以在实际检测工作中更具有使用价值, 非常适合保健品软胶囊中维生素 K₂ 的分析检测, 更具有推广价值。

参考文献

- [1] 王强, 王声雨, 顾群, 等. 维生素 K₂ 与骨质疏松症的研究进展[J]. 中国骨与关节杂志, 2013, 2(11): 655–658.
Wang Q, Wang SY, Gu Q, et al. Research progress of vitamin K₂ and osteoporosis [J]. Chin J Bone Tumor Bone Dis, 2013, 2(11): 655–658.
- [2] 方瑞斌, 雷泽, 刘忠厚. 维生素 K₂ 与骨健康[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(2): 191–198.

- Fang RB, Lei Z, Liu ZH. Vitamin K₂ and bone health [J]. Chin J Osteoporos, 2013, 19(2): 191–198.
- [3] 康丽娟, 李宝强, 徐传伟. 维生素 K 对营养性维生素 D 缺乏性佝偻病患儿童钙素吸收率的影响[J]. 儿科药学杂志, 2018, 24(10): 19–21.
- Kang LJ, Li BQ, Xu CW. Effect of vitamin K on osteocalcin carboxylation rate in children with nutritional vitamin D deficiency rickets [J]. J Pediatr Pharm, 2018, 24(10): 19–21.
- [4] 周小芸. 维生素 K₂ 抗肝癌作用的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2007, 12(2): 152–155.
- Zhou XY. Research progress of anti-hepatoma effect of vitamin K₂ [J]. Chin Clin Oncol, 2007, 12(2): 152–155.
- [5] 张萌萌. 维生素 K₂ 调节骨代谢的生物学研究回顾[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(12): 1597–1600.
- Zhang MM. A biological study review of the role of vitamin K₂ in regulating on bone metabolism [J]. Chin J Osteoporos, 2016, 22(12): 1597–1600.
- [6] GB 14880-2012 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准[S].
- GB 14880-2012 National food safety standard-Standards for the use of food nutrition enhancers [S].
- [7] 木晓云, 董跃伟, 温晓江, 等. 反相高效液相色谱法测定维生素 K₂(20)[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2008, 30(4): 405–407.
- Mu XY, Dong YW, Wen XJ, et al. Determination of menatetrenone by RP-HPLC [J]. J Yunnan Univ (Nat Sci Ed), 2008, 30(4): 405–407.
- [8] 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 K₁ 和 K₂[J]. 营养学报, 1998, 20(1): 72–75.
- Li XR, Fang X, Chen QJ, et al. The simultaneous determination of vitamin K₁ and vitamin K₂ in food by RPLC [J]. Chin Clin Oncol, 2007, 12(2): 152–155.
- [9] 孙家慧. 高效液相色谱法快速测定维生素 K₂[J]. 天津化工, 2011, 25(6): 55–56.
- Sun JH. Rapid determination of vitamin K₂ by high performance liquid chromatography [J]. Tianjin Chem Ind, 2011, 25(6): 55–56.
- [10] GB 5009.158-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 K₁ 的测定[S].
- GB 5009.158-2016 National food safety standard-Determination of vitamin K₁ in food [S].
- [11] 杨灵莉. 维生素 K₂ 的合成方法研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2012.
- Yang LL. Study on the synthesis methods of vitamin K₂ [D]. Chongqing: Chongqing University, 2012.
- [12] 许薇. 维生素 K₂ 的合成研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- Xu W. Study on the synthesis of vitamin K₂ [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006.
- [13] 庄焕雄, 陈东峰, 徐孟凡, 等. 维生素 K₂ 对绝经后骨质疏松症的防治作用及血清组织蛋白酶 K 影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(5): 627–630.
- Zhuang HX, Chen DF, Xu MF, et al. The effect of vitamin K₂ on the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis and serum cathepsin K [J]. Chin J Osteoporos, 2017, 23(5): 627–630.
- [14] 尉鸿飞. 黄杆菌胞内维生素 K₂ 的分离纯化[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2018.
- Yu HF. Isolation, purification and physicochemical characterization of vitamin K₂ from flavobacterium [D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2018.
- [15] 罗苗苗, 胡学超, 邱宏伟, 等. 微生物发酵法制备维生素 K₂ 研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(10): 221–225.
- Luo MM, Hu XC, Qiu HW, et al. Research progress on vitamin K₂ by microorganism fermentation [J]. Food Ferment Ind, 2015, 41(10): 221–225.
- [16] 覃佳强. 维生素 K 治疗儿童继发性骨质疏松的机理及疗效观察[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2004.
- Qin JQ. Observation on the effect and mechanism of secondary osteoporosis in children treated with vitamin K [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2004.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



胡赠彬, 高级工程师, 主要研究方向为实验室管理。

E-mail: 13064281796@139.com



牛之瑞, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: bullnzh@163.com