

# 高效液相色谱法测定多组分配方含维生素 K<sub>2</sub> 制剂中七烯甲萘醌的含量

王 颖\*, 黄丽娟, 黄 瑛

(四川省食品药品检验检测院, 成都 610097)

**摘 要: 目的** 建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定多组分配方含维生素 K<sub>2</sub> 制剂中七烯甲萘醌含量的方法。**方法** 试样在酸化、酶解后, 经异丙醇提取, 采用反相色谱柱分离, 紫外检测, 外标法定量测定七烯甲萘醌含量。**结果** 在优化的实验条件下, 七烯甲萘醌在 0.20~7.90 μg/mL 范围内线性关系良好( $r^2>0.9995$ ), 方法的定量限为 1.6 μg/g, 回收率 94.55%~101.05%, 相对标准偏差为 2.33%( $n=3$ )。**结论** 该方法灵敏快速准确, 适用于多组分配方制剂中七烯甲萘醌的含量检测。

**关键词:** 维生素 K<sub>2</sub>; 七烯甲萘醌; 多组分配方制剂; 高效液相色谱法

## Determination of menaquinone-7 in multi-component formulation containing vitamin K<sub>2</sub> by high performance liquid chromatography

WANG Ying\*, HUANG Li-Juan, HUANG Ying

(Sichuan Food and Drug Inspection and Testing Institute, Chengdu 610097, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of menaquinone-7 in multi-component formulation containing vitamin K<sub>2</sub> by high performance liquid chromatography. **Methods** The samples were acidified, digested by pepsin, and then extracted by isopropyl alcohol. Menaquinone-7 was separated on reversed-phase chromatographic column, detected by ultraviolet detection and the content was quantified by the external standard method. **Results** Under the optimized condition, the linear relationship was good in the range of 0.20–7.90 μg/mL ( $r^2>0.9995$ ). The limit of quantitation(LOQ) of the method was 1.6 μg/g., the recoveries were in the range of 94.55%–101.05% and the relative standard deviation(RSD) was 2.33%( $n=3$ ). **Conclusion** The method is accurate and reliable, and is suitable for the determination of menaquinone-7 in multicomponent formulation.

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

## 1 引 言

维生素 K<sub>2</sub> 是一种脂溶性维生素, 主要由微生物代谢产生, 共有 14 种存在形式, 其中由纳豆芽孢杆菌合成的维生素 K<sub>2</sub> 主要以七烯甲萘醌(menaquinone-7, MK-7)形式存在, 另有少量四烯甲萘醌(menaquinone-4, MK-4)。维生素

K<sub>2</sub> 在其他国家及地区应用已有一定历史, 日本最早批准维生素 K<sub>2</sub> 作为骨质疏松治疗用药, 2006-2007 年, 美国 FDA 及欧盟相继批准维生素 K<sub>2</sub> 作为食品及强化食品添加剂使用, 我国 2016 年批准大豆粉经纳豆枯草芽孢杆菌发酵并精制成的维生素 K<sub>2</sub>(主要成分为 MK-7)可作为食品营养强化剂使用<sup>[1]</sup>。2009 年欧盟食品安全局(European Food Safety

\*通讯作者: 王颖, 副主任药师, 主要研究方向为食品药品检测与分析。E-mail: 550806454@qq.com

\*Corresponding author: WANG Ying, Associate Chief of Pharmacy, Sichuan Food and Drug Inspection and Testing Institute, No.8, Xinwen Road, Gaoxin West District, Chengdu 610097, China. E-mail: 550806454@qq.com

Authority, EFSA)发表的科学观点<sup>[2]</sup>提到有证据表明“维生素 K<sub>1</sub> 和维生素 K<sub>2</sub> 补充剂在减少骨质流失和维生素 K<sub>2</sub> 补充在减少骨折风险方面有作用”,认为“维生素 K 的饮食摄入与正常骨骼的维持之间存在因果关系”。由于维生素 K<sub>2</sub> 在人体内普遍缺乏,大部分人群都受到亚临床、继发性维生素 K 缺乏症的影响, MK-7 是一种高度生物利用的维生素 K 形式,有助于保持骨骼健康<sup>[3]</sup>,服用补充剂时,首选维生素 K 的形式为 MK-7<sup>[4]</sup>,可以预见随着“健康中国”建设推进,维生素 K<sub>2</sub> 在营养补充剂和增强骨密度类保健食品中的应用将不断增加<sup>[5]</sup>。目前报道的维生素 K<sub>2</sub> 的测定方法主要包括高效液相色谱法<sup>[6-10]</sup>、高效液相-荧光衍生法<sup>[11]</sup>、液相色谱质谱联用法<sup>[12-14]</sup>、毛细管电泳法<sup>[15]</sup>等,其中毛细管电泳操作复杂,液质联用法灵敏度高,但价格昂贵,推广性较差,高效液相色谱法由于灵敏度适中,分离效果好、分析速度快且设备普及率高等优势成为最常用的分析方法,多用于测定原料或单一成分制剂的产品,一般采用溶剂直接提取,但在部分多组分配方产品中存在重现性不佳、测定结果偏低等情况。本研究采用高效液相色谱法对多组分配方含维生素 K<sub>2</sub> 制剂中 MK-7 的含量进行测量,对前处理进行优化,在样品酸化酶解后采用异丙醇进行提取,降低蛋白类成分干扰,改善方法重现性,适用于多组分配方制剂中 MK-7 的测定,也可为其他食品中 MK-7 的检测提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

#### 2.1.1 实验仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); CPA225D 电子天平(德国赛多利斯公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水系统(德国默克密理博公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); ZHWY-110X 往复式水浴恒温振荡器(上海智成分析仪器制造有限公司)。

#### 2.1.2 样品和试剂

含维生素 K<sub>2</sub> 产品(批号: 20180301, 20180302, 20180303, 某企业提供); 七烯甲萘醌(MK-7)(批号: F0M288, 含量 99.1%, 上海安谱实验科技股份有限公司); 甲醇、异丙醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 无水乙醇(分析纯, 成都科隆化学品有限公司); 胃蛋白酶(酶活力 $\geq 1200$  U/g, 国药集团化学试剂有限公司); 盐酸(分析纯, 成都科隆化学品有限公司); 实验用水为超纯水。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 溶液配制

准确称取 10 mg 七烯甲萘醌标准品, 用异丙醇溶解并转移至 50 mL 棕色容量瓶中定容, 得 0.20 mg/mL 的标准贮

备溶液。精密吸取上述标准贮备液 1 mL, 置于 10 mL 棕色容量瓶中, 用异丙醇稀释并定容, 得 20  $\mu\text{g/mL}$  标准品溶液。

#### 2.2.2 样品前处理

取样品研磨均匀, 精密称取 1 g 样品粉末, 置 50 mL 离心管中, 加水 10 mL, 缓缓加入盐酸 1 mL, 摇匀, 放置 10 分钟, 加入胃蛋白酶 0.5 g, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴振荡 10 min, 加异丙醇 25 mL, 超声处理 30 min, 放至室温, 离心, 上清液转移至 50 mL 棕色容量瓶中, 残渣用异丙醇分次洗涤, 洗液并入容量瓶, 用异丙醇定容至刻度, 摇匀, 离心, 上清液作为供试品溶液。

#### 2.2.3 色谱条件

采用 Agilent Zorbax SB-C<sub>8</sub> 色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱, 以甲醇为流动相, 流速 0.8 mL/min, 检测波长 270 nm, 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 5  $\mu\text{L}$ , 理论板数按 MK-7 峰计算大于 6000。

#### 2.2.4 标准曲线的绘制

精密吸取标准品溶液 0.10、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mL, 分别置于 10 mL 棕色容量瓶中, 用异丙醇稀释并定容, 制成标准系列溶液: 0.20、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00  $\mu\text{g/mL}$ 。分别精密吸取上述标准系列溶液各 5  $\mu\text{L}$ , 按“2.2.3”项色谱条件分别进样测定, 记录色谱图, 以浓度( $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

## 3 结果与分析

### 3.1 实验优化

#### 3.1.1 提取溶剂选择

七烯甲萘醌是脂溶性的醌类衍生物, 为脂溶性成分, 溶于正己烷、异丙醇、乙醇等有机溶剂, 考虑到正己烷的毒性相对较大, 本研究对异丙醇、乙醇的提取效率进行了考察, 结果显示采用异丙醇提取结果为 28.3  $\mu\text{g/g}$ , 略高于乙醇提取结果 26.1  $\mu\text{g/g}$ , 因此选择以异丙醇作为提取溶剂。

#### 3.1.2 前处理优化

为改善多组分配方中测定结果偏低、重现性不佳的问题, 对前处理方法进行优化。由于七烯甲萘醌在酸性条件下稳定性良好, 为降低配方中蛋白类成分对检测的影响, 本研究增加样品酸化后, 采用胃蛋白酶酶解的操作改善提取效率、降低色谱干扰。对盐酸和胃蛋白酶的用量进行考察, 经实验, 1 g 样品加入 10 mL 水, 1 mL 盐酸, 此时 pH 在胃蛋白酶的适宜范围内; 当胃蛋白酶加入量 0.3、0.5、0.7 g 时, 测定含量分别为 26.6、26.8 和 26.0  $\mu\text{g/g}$ , 0.5 g 加入量结果最高, 最终确定加入量 0.5 g。采用优化后的前处理方法与直接提取方法进行比较, 结果酶解后提取较直接提取结果高约 10%, 且七烯甲萘醌色谱峰塔板数有明显提高 ( $P=95\%$ ), 说明前处理方式有效降低杂质色谱干扰。另外七

烯甲萘醌的化学性质较稳定,但对光敏感,易被碱和紫外线分解<sup>[10]</sup>,故整个操作过程必须注意避光。

### 3.2 方法线性范围及定量限

七烯甲萘醌的标准溶液色谱图见图 1,标准曲线回归方程为  $Y=55.9040X-1.0234(r^2=1.0000)$ ,七烯甲萘醌在 0.20~7.90  $\mu\text{g/mL}$  范围内与峰面积线性关系良好。精密吸取 0.20  $\mu\text{g/mL}$  标准品溶液用异丙醇逐步稀释后进样测定,记录色谱图,按信噪比(S/N)为 10:1 确定定量限为 1.6  $\mu\text{g/g}$ ,根据国产保健食品数据库信息,含有 MK-7 产品的标示含量范围在 13~360  $\mu\text{g/g}$ ,方法定量限能够满足同类产品定量测定需求。

### 3.3 精密度、稳定性与重复性实验

精密量取 10  $\mu\text{L}$  对照品溶液,连续进样 6 次,计算七烯甲萘醌峰含量的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.67%,说明系统精密度良好。取同一份供试品溶液,分别于 0、2.5、5.0、10.0、20.0 h 进样,对记录的峰面积进行单样本  $t$  检验。峰面积值随时间变化见表 1,峰面积值均落在样本 95%置信区间范围内,表明 0~20 h 供试品溶液峰面积值无显著差异,供试品溶液在 20 h 内稳定。精密称取同一批样品共 6 份,分别按照“2.2.2”“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别进样,计算样品中七烯甲萘醌的平均含量为 27.1  $\mu\text{g/g}$ ,RSD 为 1.31%,说明方法的重复性良好。

### 3.4 加样回收实验

精密称取约 1 g 同一批次已知含量的样品(批号:20180301)粉末共 9 份,置 50 mL 离心管中,分别按照已知

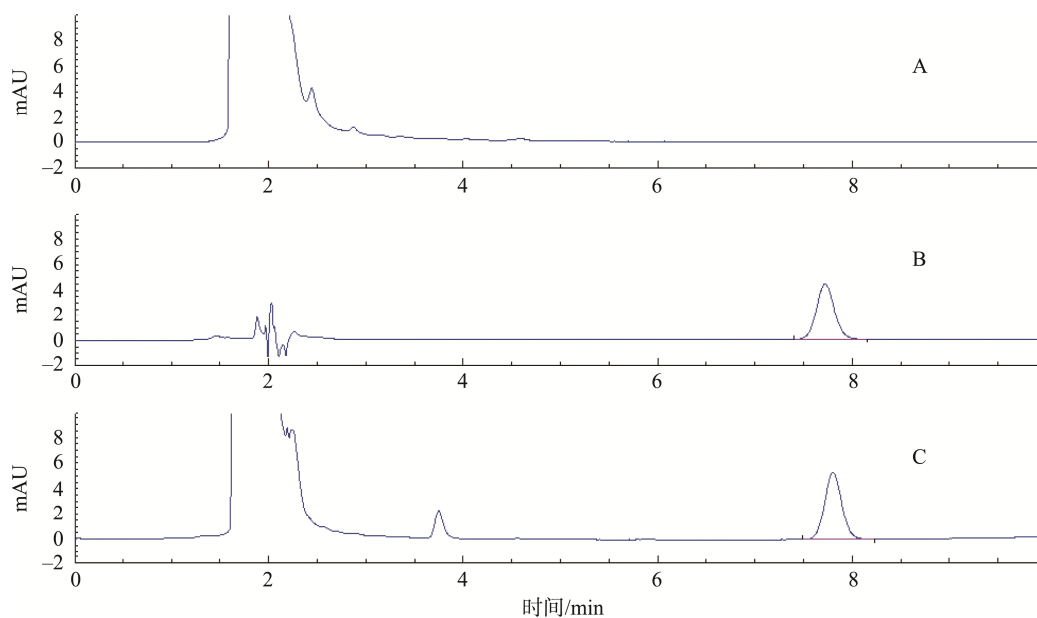
含量的 50%、100%、150%水平加入对照品溶液,再按“2.2.2”、“2.2.3”项下方法制备供试品溶液并测定含量,计算回收率和 RSD,结果见表 2。平均回收率在 95.0%~99.6 之间,RSD 为 2.33%,表明方法的准确度良好。

表 1 供试品溶液稳定性  
Table 1 Stability of the test solution

时间/h	0	2.5	5.0	10.0	20.0
峰面积值	55.83	55.19	55.25	55.60	55.88
平均值	55.48				
置信区间 ( $\alpha=0.05$ )	54.92 ~ 56.03				

表 2 七烯甲萘醌回收率实验结果  
Table 2 Results of the recovery tests of menaquinone-7

加入量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
	99.00		
19.76	98.78	99.6	
	101.05		
	94.55		
29.64	94.56	95.0	2.33
	95.74		
	96.45		
39.52	97.43	97.7	
	99.32		



注: A 空白溶液; B 标准品溶液; C 供试品溶液

图 1 样品色谱图

Fig.1 Chromatogram of sample

### 3.5 实际样品的含量测定

取3批次的样品研磨均匀,精密称取约1.0 g粉末,置50 mL离心管中,按“2.2.2”“2.2.3”项下方法制备供试品溶液并测定含量,计算样品中七烯甲萘醌的含量,结果见表3。

表3 实际样品含量测定结果

批次	七烯甲萘醌的含量/( $\mu\text{g/g}$ )
20180301	27.1
20180302	27.7
20180303	27.4

## 4 讨论与结论

### 4.1 讨论

七烯甲萘醌采用液相色谱常用的十八烷基硅烷键合硅胶柱能得到较好的分离效果<sup>[6,7,9-11]</sup>,本文采用C<sub>8</sub>柱也能满足分离要求,相同色谱条件下分析时间更短,提高检测效率。采用异丙醇作为提取液,在使用微孔滤膜直接过滤时遇到过滤困难的现象,采用离心能够很好解决。实验中观察到在同样色谱条件下,采用酶水解后提取的前处理方式,七烯甲萘醌色谱峰的塔板数有明显提高,提示前处理方式有效降低杂质干扰。七烯甲萘醌对光敏感,故整个操作过程必须全程避光。

### 4.2 结论

本研究采用高效液相色谱法测定多组分配方含维生素 K<sub>2</sub> 制剂中七烯甲萘醌的含量。通过对前处理条件的优化,改善提取效率,降低色谱干扰,有效改善多组分配方中测定结果偏低、重现性不佳的问题,建立了适用于多组分配方制剂中七烯甲萘醌含量测定的方法。结果表明,本方法线性相关系数为1.0000,回收率为95.0%~99.6%,定量限为1.6  $\mu\text{g/g}$ ,方法结果准确可靠,能满足多组分配方保健食品中七烯甲萘醌检测的需求,也可为其他食品中七烯甲萘醌的检测提供参考。

### 参考文献

- [1] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S]. GB 2760-2014 National food safety standard-Use standard of food additives [S].
- [2] Regulation (EC) No 1924/2006 [S].
- [3] Capozzi A, Scambia G, Migliaccio S, et al. Role of vitamin K<sub>2</sub> in bone metabolism: a point of view and a short reappraisal of the literature [J]. J Gynecol Endocrinol, 2019, 22(3): 115-120.
- [4] Cheng L, Zhang W, Lin S, et al. Effects of dietary vitamin K on growth performances, blood coagulation time and menaquinone-4 (MK-4) concentration in tissues of juvenile large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* [J]. Aquac Res, 2015, 46(5): 1269-1275.
- [5] 王迪. 维生素 K<sub>2</sub> 地位升级[N]. 医药经济报, 2014-2-10.

- Wang D. The upgrading of vitamin K<sub>2</sub> [N]. Med Econ, 2014-2-10.
- [6] 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> 软胶囊中 K<sub>2</sub>(20)含量[J]. 分析实验室, 2009, (5): 33-35.  
Mu XY, Dong YW, Wen XJ, et al. Determination of K<sub>2</sub> (20) in vitamin K<sub>2</sub> soft capsule by RP-HPLC [J]. Chin Anal Lab, 2009, (5): 33-35.
  - [7] 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): 287-289.  
Dong YW. Determination of natto extract vitamin K<sub>2</sub>(35) by RP-HPLC [J]. Chin Drug Stand, 2010, (4): 287-289.
  - [8] 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): 55-56.  
Sun JH. Rapid determination of vitamin K<sub>2</sub> by HPLC [J]. Tianjin Chem Ind, 2011, (6): 55-56.
  - [9] 王德伟, 游景水, 叶礼红. 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[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, (8): 3030-3033.  
Wang D, You JS, Ye LH. Determination of menaquinone-7 in vitamin K<sub>2</sub> by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2011, (6): 55-56.
  - [10] 宋怡, 孔凡建, 李银科, 等. 超高效液相色谱法测定 Menaquinone-7 原料药主成分及有关物质[J]. 理化检验-化学分册, 2017, (53): 1381-1385.  
Song Y, Kong FJ, Li YK, et al. Determination of principal compound and related substances in raw material drug of MK-7 by UPLC [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2017, (53): 1381-1385.
  - [11] 王琳, 刘林生, 缪丽燕. HPLC-荧光衍生法同时测定人血浆中维生素 K<sub>1</sub> 和 K<sub>2</sub> 的浓度[J]. 中国药理学杂志, 2018, (17): 1498-1503.  
Wang L, Liu LS, Miao LY. Determination of vitamin K<sub>1</sub> and K<sub>2</sub> in human plasma by HPLC-FLU and its clinical application [J]. Chin Pharm J, 2018, (17): 1498-1503.
  - [12] 王聪, 梁瑞强, 曹进, 等. 液相色谱-质谱联用法测定保健食品中 9 种脂溶性维生素[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(3): 991-999  
Wang C, Liang RQ, Cao J, et al. Determination of 9 kinds of fat-soluble vitamins in healthy foods by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(3): 991-999.
  - [13] 宁霄, 高文超, 罗娇依, 等. 液相串联质谱法测定保健食品中脂溶性维生素方法建立及应用[J]. 中国药师, 2017, (10): 1768-1772.  
Ning X, Gao WC, Luo JY, et al. Simultaneous detection of fat-soluble vitamins in health foods by UPLC-MS/MS and its application [J]. China Pharm, 2017, (10): 1768-1772.
  - [14] Katerina D, Eva K, Bruno S, et al. LC-MS/MS quantitative analysis of phylloquinone, menaquinone-4 and menaquinone-7 in the human serum of a healthy population [J]. Peer J, 2019, (7): e7695.
  - [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): 87-89.  
Liang HY, Wen J, Jiang XF. Quantitative analysis of vitamin K in serum using capillary electrophoresis [J]. Chin Lab Diagn, 2003, (2): 87-89.

(责任编辑: 李磅礴)

### 作者简介



王颖, 副主任药师, 主要研究方向为食品药品检测与分析。  
E-mail: 550806454@qq.com