

高效液相色谱-荧光检测法测定保健食品中 维生素 K₂ 的含量

黄迪麟*, 李 桑

(广东省食品检验所, 广州 510435)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-荧光检测法快速检测保健食品中维生素 K₂(四烯甲萘醌)的分析方法。**方法** 样品使用 GIST C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)分离, 柱后经锌粉还原柱(4.6 mm×50 mm, 50~70 μm)衍生, 以甲醇(含有四氢呋喃 10%、冰醋酸 0.03%、氯化锌 1.5 g/L、无水乙酸钠 0.5 g/L)为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 进入荧光检测器进行检测。**结果** 四烯甲萘醌保留时间约为 10 min, 在浓度 0.1099~2.197 μg/mL 范围内线性关系良好, 相关系数 $r^2=0.9999$ 。重复性实验 RSD 为 0.794%, 3 个浓度级别的加标回收率在 97.1%~101.9% 之间。当取样量为 1.5 g, 总定容体积为 500 mL 时, 四烯甲萘醌的检出限为 71 μg/100 g, 定量限为 236 μg/100 g。**结论** 该方法准确性高、重现性好、操作简单, 可用于保健食品中维生素 K₂ 的含量测定。**关键词:** 高效液相色谱-荧光检测法; 保健食品; 维生素 K₂; 四烯甲萘醌

Determination of the vitamin K₂ content in functional food by high performance liquid chromatography-fluorescence detector method

HUANG Di-Lin*, LI Sang

(Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the rapid detection of vitamin K₂ (menaquinone 4) in functional food by high performance liquid chromatography-fluorescence detector. **Methods** The samples were separated by a GIST C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) and derivatized with a post-column zinc powder reduction column (4.6 mm × 50 mm, 50-70 μm). Methanol (containing 10% tetrahydrofuran, 0.03% glacial acetic acid, 1.5 g/L zinc chloride and 0.5 g/L anhydrous sodium acetate) was used as mobile phase at the flow rate 1.0 mL/min for detection by fluorescence detector. **Results** The retention time of menaquinone 4 was around 10 min. It had a good linearity in the range of 0.1099 to 2.197 μg/mL with the correlation coefficient ($r^2=0.9999$). The RSD of the repeatability experiment was 0.794%. The recoveries for the 3 levels of concentration were between 97.1% and 101.9%. When the sample size was 1.5 g and the total volume was 500 mL, the detection limit of menaquinone 4 was 71 μg/100 g and the quantitative limit was 236 μg/100 g. **Conclusion** This method is accurate, reproducible and easy to operate. It can be used for the determination of vitamin K₂ in functional food.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-fluorescence detector method; functional food; vitamin K₂; menatetrenone 4

*通讯作者: 黄迪麟, 执业药师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 464520664@qq.com

*Corresponding author: HUANG Di-Lin, Licensed Pharmacist, Guangdong Institute of Food Inspection, No.1103, Zengcha Road, Baiyun District, Guangzhou 510000, China. E-mail: 464520664@qq.com

1 引言

20 世纪 20 年代晚期, 丹麦科学家 Henrik Dam 在研究以低浓度胆固醇饲料养鸡时, 发现一种与凝血有关的活性物质, 经分析这些物质可以影响凝血酶原的合成和凝血, 命名其为维生素 K^[1]。维生素 K 是一族结构类似的化合物, 天然维生素 K 的基本结构为 2-甲基-1,4-萘醌环, 根据其 3 号位置上的侧链结构的不同可分为 2 大类: 维生素 K₁(vitamin K₁, VK₁)与维生素 K₂(vitamin K₂, VK₂)^[2,3]。目前国内主要以维生素 K₁ 作为添加剂添加到食品中, 以补充人体内维生素 K 的不足, 维生素 K₂ 发展仍属起步阶段^[4]。但维生素 K₁ 的生物利用率较低, 必需通过体内转化为维生素 K₂ 才能被人体利用, 其在体内的生物利用率仅为维生素 K₂ 的二分之一^[5,6]。维生素 K₂ 为系列化合物, 其 3 号位置上带有不同数量的异戊二烯结构侧链, 共 14 种^[7]。其中以四烯甲萘醌(menatetrenone 4, MK-4)、七烯甲萘醌(Menatetrenone 7, MK-7)最具药用价值^[8](图 1)。

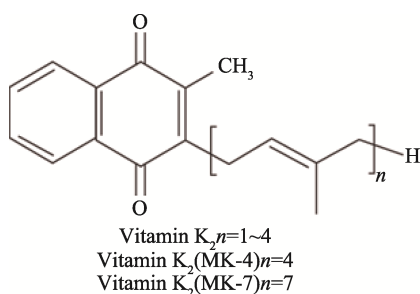


图 1 维生素 K₂ 化学结构式

Fig.1 Chemical structure of vitamin K₂

1960 年的研究发现, 除了维持机体的正常凝血功能外, 维生素 K 尚有促进骨形成、抑制骨吸收的作用, 能防止多种原因引起的骨质疏松症^[9]。维生素 K₂ 为骨质疏松治疗药的机制作用与四烯甲萘醌的侧链相关^[10,11]。因此, 近年国内出现了使用维生素 K₂(MK-4)、维生素 D 和钙作为主要成分的用于增加骨密度的保健食品。然而, 目前国内尚未有保健食品中维生素 K₂ 检测的相关标准, 相关检测方法报道也较少, 主要包括高效液相色谱-紫外检测法^[12-14]、毛细管电泳法^[15]、高效液相色谱-质谱法^[16]。2016 年, 国家卫生和计划生育委员会在《关于海藻酸钙等食品添加剂新品种的公告(2016 年第 8 号)》中将维生素 K₂(发酵法)列入食品营养强化剂新品种^[17]。但该公告中方法只适用于以七烯甲萘醌(menatetrenone 7, MK-7)形式存在的维生素 K₂ 的检测, 而针对保健食品中以四烯甲萘醌(menatetrenone 4, MK-4)存在的维生素 K₂ 检测方法并没有文献报道。而在日常工作中发现, 通过高效液相色谱-紫外检测器对含维生素 K₂ 的保健食品进行检测, 由于目标物含量较低, 其他干扰成分较多, 维生素 K₂ 的紫外响应值

比较低, 使实际的检测工作遇到较大困难。

王琳等^[18]使用氯化亚锡使维生素 K 同系物发生荧光衍生, 通过荧光检测器成功测得人体血液中 MK-4 的含量。本研究参考 GB 5009.158-2016《食品安全国家标准 食品中维生素 K₁ 的测定》^[19], 探究利用高效液相色谱-荧光检测器检测保健食品中四烯甲萘醌含量的方法, 旨在为保健食品中维生素 K₂ 的检测、应用和监管提供技术支撑。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

LC-20A 岛津高效液相色谱仪(配荧光检测器, 日本岛津企业管理有限公司); Mettler Toledo LE04E/02 万分之一天平、Sartorius CPA225D 十万分之一天平; KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Shin-pack GIST C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 日本岛津公司); 锌粉还原柱(4.6 mm×50 mm, 50~70 μm, 上海安谱实验科技股份有限公司)。

四烯甲萘醌标准品(批号: L21N9X75311; 纯度: 98.1%; 上海源叶生物科技有限公司); 甲醇、异丙醇[色谱纯, 霍尼韦尔贸易(上海)有限公司]; 四氢呋喃[色谱纯, 天津市康科德科技有限公司]; 冰乙酸[色谱纯, 上海麦克林生物化学有限公司]; 无水乙酸钠、氯化锌[分析纯, 广州化学试剂公司]; 市售某品牌的维生素 K₂ 补充剂胶囊。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Shin-pack GIST C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);
 流动相: 量取甲醇 900 mL, 四氢呋喃 100 mL, 冰乙酸 0.3 mL, 混匀后, 加入氯化锌 1.5 g, 无水乙酸钠 0.5 g, 超声溶解后, 用 0.22 μm 有机系滤膜过滤;

锌粉还原柱(4.6 mm×50 mm, 50~70 μm);

柱温: 30 °C;

运行时间: 20 min;

流速: 1.0 mL/min;

进样量: 10 μL;

检测器: 激发波长 243 nm, 发射波长 430 nm。

2.2.2 标准系列溶液的配制

(1) 四烯甲萘醌标准储备液的配制

称取四烯甲萘醌标准品 10 mg(精确到 0.01 mg)至 50 mL 棕色容量瓶中, 加异丙醇溶解并定容至刻度, 四烯甲萘醌浓度为 200 μg/mL。

(2) 四烯甲萘醌标准中间液的配制

吸取储备液 1.00 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中, 加异丙醇稀释并定容至刻度, 四烯甲萘醌浓度为 20 μg/mL。

(3) 四烯甲萘醌系列标准溶液的配制

分别吸取储备液 0.05、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、

1.00 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中, 用异丙醇定容至刻度。配成四烯甲萘醌标准系列工作液, 浓度为 0.10、0.20、0.40、0.80、1.20、1.60、2.00 $\mu\text{g/mL}$ 。上机测定, 记录峰面积。

2.2.3 供试品溶液的配制

准确称取预先混匀的样品内容物 1.5 g(精确到 0.1 mg) 于 25 mL 棕色容量瓶中, 加入异丙醇 15 mL, 涡旋振荡 1 min, 40 $^{\circ}\text{C}$ 超声振荡 20 min, 冷却, 用异丙醇定容, 摇匀, 取此溶液 1.00 mL 于 20 mL 棕色容量瓶中, 加异丙醇定容, 0.45 μm 滤膜过滤, 供高效液相色谱仪分析。

2.2.4 稳定性实验

取按 2.2.3 制作的同一份供试品溶液分别于 0、1、4、8、12、24 h 进样, 记录其出峰时间及峰面积, 计算其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

2.2.5 精密度实验

按 2.2.3 供试品制备方法处理样品, 平行制作 6 份供

试品溶液, 用于检测样品含量, 计算其峰面积的 RSD。

2.2.6 加标回收率实验

根据 2.2.5 样品的实际测定结果, 做加标实验考察方法准确度。准确称取预先混匀的维生素 K_2 胶囊内容物 1.5 g(精确到 0.1 mg), 按含量 0.5、1.0、1.5 倍向供试品中加入四烯甲萘醌标准溶液(87.90 $\mu\text{g/mL}$), 按 2.2.3 供试品制备方法处理加标样品, 每个水平平行操作 3 份。

3 结果与分析

3.1 色谱图结果分析

采用高效液相色谱法能快速检测四烯甲萘醌, 出峰时间约 10 min, 理论塔板数 2511, 相同浓度下响应值较紫外检测器于 270 nm 约高 300 倍, 出峰时间快, 样品出峰时不受其他杂质峰的影响, 达到准确的分离和定量, 见图 2~4。

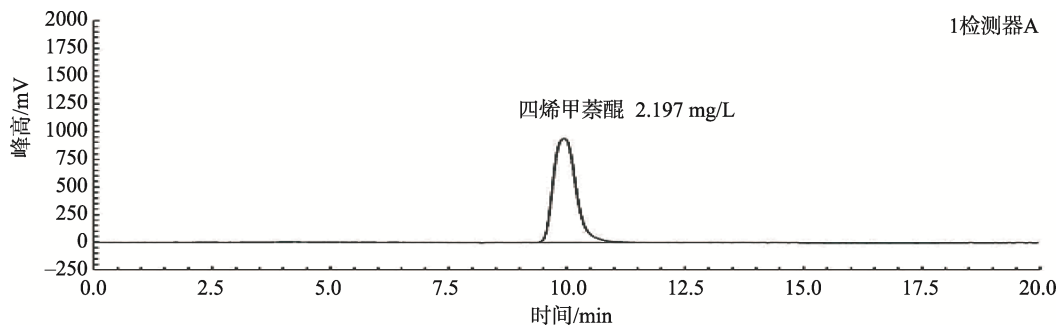


图 2 四烯甲萘醌标准品色谱图

Fig.2 Chromatogram of sucrose and lactose standards

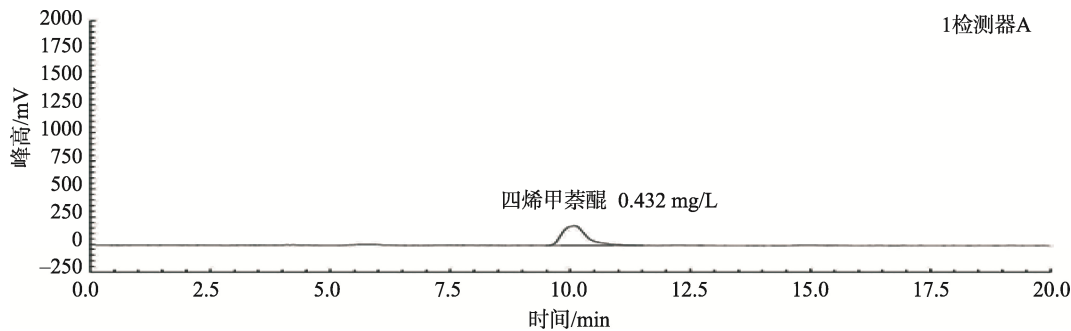


图 3 样品中四烯甲萘醌色谱图

Fig.3 Chromatogram of sucrose and lactose in samples

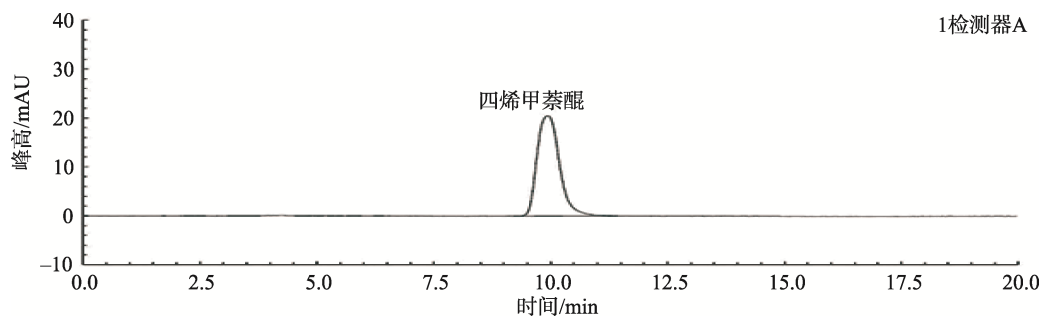


图 4 四烯甲萘醌于 270 nm 紫外检测的色谱图

Fig.4 Chromatogram for UV detection at 270 nm of sucrose and lactose in samples

3.2 线性关系

四烯甲萘醌线性方程为 $Y=1.42998 \times 10^7 X - 2082.55$, 相关系数 r 为 0.9999, 用该方法测定维生素 K₂ 胶囊中四烯甲萘醌的含量, 在浓度 0.1099 ~ 2.197 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间呈现良好的线性关系。

3.3 稳定性

按 2.2.4 制成供试品, 测定其峰面积和保留时间, 计算相对标准偏差, 结果见表 1。四烯甲萘醌峰面积的 RSD 为 1.155%, 保留时间的 RSD 为 1.613%, 说明供试品溶液在 24 h 内较稳定。

3.4 精密度

精密度试验结果见表 2。试样含量的 RSD 为 0.794%,

具有较好的精密度。

3.5 检出限

检出限和定量限分别以 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)计, 结果表明, 当取样量为 1.5 g, 总定容体积 500 mL 时, 四烯甲萘醌的检出限为 71 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$, 定量限为 236 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ 。

3.6 加标回收率

按 2.2.6 进行含量加标回收试验。测定样品中四烯甲萘醌含量计算回收率。结果详见表 3, 在 3 个加标水平下本方法的回收率分别为 97.5%、97.1%和 101.9%。说明本方法测定四烯甲萘醌含量准确有效。

表 1 四烯甲萘醌面积和保留时间稳定性结果
Table 1 Repeatability of menatetrenone 4 area and retention time

进样时间/h	峰面积测定值	RSD/%(n=6)	保留时间测定值/min	RSD/%(n=6)
0	6099080		10.043	
1	6041279		10.046	
4	5931097	1.155	10.112	1.613
8	5928500		10.401	
12	5985927		10.352	
24	5943731		10.332	

表 2 精密度实验结果
Table 2 Results of precision experiment for the method

称样量/g	浓度/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	稀释体积/mL	含量/ $\mu\text{g}/\text{g}$	平均值/ $\mu\text{g}/\text{g}$	RSD/%(n=6)
1.5535	0.4317	500	139.0	139.2	0.794
1.5182	0.4258	500	140.2		
1.5265	0.4289	500	140.5		
1.5226	0.4234	500	139.0		
1.5032	0.4186	500	139.2		
1.5069	0.4141	500	137.4		

表 3 加标回收实验结果(n=3)
Table 3 Results of recovery for the method (n=3)

加标量/ $\mu\text{g}/\text{g}$	含量/ $\mu\text{g}/\text{g}$	加标回收率/%	回收率平均值/%	RSD/%(n=3)
105.5	206.5, 204.8, 204.4	99.0, 96.7, 96.8	97.5	1.3
211.0	272.7, 271.5, 270.9	97.2, 97.1, 96.9	97.1	0.2
316.4	347.0, 351.3, 345.7	102.2, 102.8, 100.8	101.9	1.0

4 结论与讨论

本研究建立了高效液相色谱-荧光检测法检测保健食品中维生素 K₂(四烯甲萘醌)的分析方法。目标物质在 9.986 min 出峰,在线性范围内关系良好,相关系数 $r^2=0.9999$ 。检出限和定量限分别以 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)计,当取样量为 1.5 g,定容 500 mL 时, MK-4 的检出限为 71 μg/100 g,定量限为 236 μg/100 g。精密度(RSD)为 0.794%,回收率为 97.1%~101.9%,与现行企业标准中的方法相比,检测响应值更高,出峰时间更短。综上所述,该方法精密度和准确度良好,灵敏度高,分析时间短,可用于保健食品中维生素 K₂ 的研究。

参考文献

- Dam H, Cliv. The antihemorrhagic vitamin of the chick [J]. *Nutr Rev*, 1973, 31(4): 121-121.
- 张红梅, 赖建强, 蒯士安. 维生素 K 的膳食摄入及其与成人健康关系的研究进展[J]. *卫生研究*, 2012, 41(1): 126-131.
Zhang HM, Lai JQ, Yin SA. Research progress on dietary intake of vitamin K and its relationship with adult health [J]. *J Hyg Res*, 2012, 41(1): 126-131.
- 周小芸, 王艳红. 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, Wang YH. Research progress of vitamin K₂ in antihepatic carcinoma [J]. *Chin Clin Oncol*, 2007, 12(2): 152-155.
- 邓梦雅, 彭祖茂, 朱丽, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定食品中维生素 K₂ 的含量[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(19): 240-244, 250.
Deng MY, Peng ZM, Zhu L, *et al.* Determination of vitamin K₂ in food by high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2019, 40(19): 240-244, 250.
- 夏玉, 殷光玲. 维生素 K₂ 防治骨质疏松症的研究进展[J]. *生物技术世界*, 2016, (3): 184-185.
Xia Y, Yin GL. Research progress of vitamin K₂ in prophylaxis and therapy of osteoporosis [J]. *Biotech World*, 2016, (3): 184-185.
- 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 Osteoporos J*, 2016, 22(12): 1597-1600.
- 邹志强. 维生素 K₂ 的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2005, 11(3): 389-392.
Zou ZQ. Research advance on vitamin K₂ [J]. *Chin Osteoporos J*, 2005, 11(3): 389-392.
- 雷泽, 付正启, 木晓云, 等. 维生素 K₂—新型骨质疏松防治药物[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2010, (1): 60-63.
Lei Z, Fu ZQ, Mu XY, *et al.* Vitamin K₂: a new type of anti osteoporosis drug [J]. *Chin Osteoporos J*, 2010, (1): 60-63.
- 刘春梅, 徐苓. 维生素 K 与骨质疏松症的研究进展[J]. *中华医学杂志*, 2008, 88(17): 1217-1220.
Liu CM, Xu L. Research progress of vitamin K and osteoporosis [J]. *Chin Med J*, 2008, 88(17): 1217-1220.
- Hara K, Akiyama Y, Nakamura T, *et al.* The inhibitory effect of vitamin K₂ (menatetrenone) on bone resorption may be related to its side chain [J]. *Bone*, 1995, 16(2): 179-184.
- Hiruma Y, Nakahama K I, Fujita H, *et al.* Vitamin K₂ and geranylgeraniol, its side chain component, inhibited osteoclast formation in a different manner [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314(1): 24-30.
- 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 软胶囊中 K₂(20)含量[J]. *分析实验室*, 2009, (28): 33-35.
Mu XY, Dong YW, Wen XJ, *et al.* Determination of the content of K₂(20) in vitamin K₂ soft capsule by RP-HPLC [J]. *Chin J Anal Lab*, 2009, 5(28): 33-35.
- 王德伟, 游景水, 叶礼红. 反相高效液相色谱法测定维生素 K₂ 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 DW, You JS, Ye LH. Determination of menaquinone-7 in vitamin K₂ by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, (8): 3030-3033.
- 刘光兰, 郑良, 吴银, 等. 高效液相色谱法同时测定维生素 D₃ 和维生素 K₂ 的含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(5): 1225-1229.
Liu GL, Deng L, Wu Y, *et al.* Simultaneous determination of the content of vitamin D₃ and vitamin K₂ by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(5): 1225-1229.
- 梁红艳, 温洁, 姜晓峰. 利用毛细管电泳测定血清中维生素 K 含量[J]. *中国实验诊断学*, 2003, 7(2): 8-10.
Liang HY, Wen J, Jiang XF. Determination of vitamin K in serum by capillary electrophoresis [J]. *Chin Lab Diagn*, 2003, 7(2): 8-10.
- Karl JP, Fu X, Dolnikowski GG, *et al.* Quantification of phyloquinone and menaquinones in feces, serum, and food by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 963: 128-133.
- 国家卫生和计划生育委员会. 关于海藻酸钙等食品添加剂新品种的公告(2016 年第 8 号)[Z].
National Health and Family Planning Commission. Announcement on new varieties of food additives such as calcium alginate (No.8, 2016) [Z].
- 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 K₁ 和 K₂ 的浓度[J]. *中国药理学杂志*, 2018, 53(17): 71-76.
Wang L, Liu LS, Miao LY. Determination of Vitamin K₁ and K₂ in human plasma by HPLC-FLU and its clinical application [J]. *Chin Pharm J*, 2018, 53(17): 71-76.
- 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].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



黄迪麟, 执业药师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。

E-mail: 464520664@qq.com