

高效液相色谱法测定食品中维生素 K2 含量

LC-357

摘要： 本文参照 GB 5009.290-2023《食品安全国家标准 食品中维生素 K2 的测定》，建立了食品中维生素 K2 含量测定的方法。结果表明：MK-4 和 MK-7 在 0.025~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内，MK-9 在 0.050~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内线性关系均良好，所得校准曲线相关系数均在 0.9993 以上，各校准点准确度在 95.72%~103.19% 之间。MK-4、MK-7 和 MK-9 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.26% 和 0.92% 以内，加标回收率在 70.50%~97.93% 之间。

关键词： 高效液相色谱法 食品 维生素 K2

技术特点：

- ❖ 满足《食品安全国家标准 食品中维生素 K2 的测定》标准要求，并具更宽线性范围。
- ❖ 荧光检测器灵敏度高，进样体积 10 μL 即可满足要求。

维生素 K2 又称甲基萘醌 (Menaquinone)，是一种脂溶性维生素，也是人体不可缺少的重要维生素之一。根据化学结构侧链的差异，有四烯甲萘醌 (MK-4, CAS 号: 863-61-6)、七烯甲萘醌 (MK-7, CAS 号: 2124-57-4) 和九烯甲萘醌 (MK-9, CAS 号: 523-39-7) 等多种形式。在人体中，维生素 K2 主要由肠道细菌合成，也存在于一些动物肉制品和发酵产品中，比如动物肝脏、发酵乳制品和奶酪等。维生素

K2 是维生素 K 唯一具有生物活性的形式，多用于加速凝血、维持凝血时间、治疗维生素 K 缺乏引起的出血症等。

本文采用岛津高效液相色谱仪，参照 GB 5009.290-2023《食品安全国家标准 食品中维生素 K2 的测定》，对食品中的维生素 K2 进行测定，本方法灵敏度高、重现性好，可为食品行业相关人员提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪。配置信息如下：

系统控制器：CBM-40lite

输液泵：LC-40D XS

自动进样器：SIL-40C XS

柱温箱：CTO-40S

检测器：RF-20A

工作站：Labsolutions Ver. 5.106

1.2 分析条件

色谱柱：Inertsil ODS-3 (150 mm×4.6 mm I.D., 5 μm , 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

还原柱：锌还原柱 50 mm×4.6 mm

流动相：甲醇溶液 (含 1.5 g/L 氯化锌 +0.5 g/L 无水乙酸钠 +0.03% 冰乙酸 +10% 二氯甲烷)

波长：激发波长 326 nm, 发射波长 410 nm

流速：0.8 mL/min

进样量：10 μL

柱温：35°C

1.3 混合标准工作溶液的制备

参照 GB 5009.290-2023《食品安全国家标准 食品中维生素 K2 的测定》，采用甲醇-二氯甲烷溶液 (90: 10, v:v) 将 MK-4、MK-7 和 MK-9 标准品先后溶解、稀释，然后用流动相将其混合、定容。混合标准工作溶液中各组分的浓度见表 1。

表1 混合标准工作溶液中各组分浓度 (μg/mL)

目标物	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5	Conc.6	Conc.7
MK-4	0.025	0.05	0.10	0.30	0.50	1.0	2.0
MK-7	0.025	0.05	0.10	0.30	0.50	1.0	2.0
MK-9	0.050	0.10	0.20	0.30	0.50	1.0	2.0

■ 样品前处理

样品前处理参照 GB 5009.290-2023《食品安全国家标准 食品中维生素 K2 的测定》。

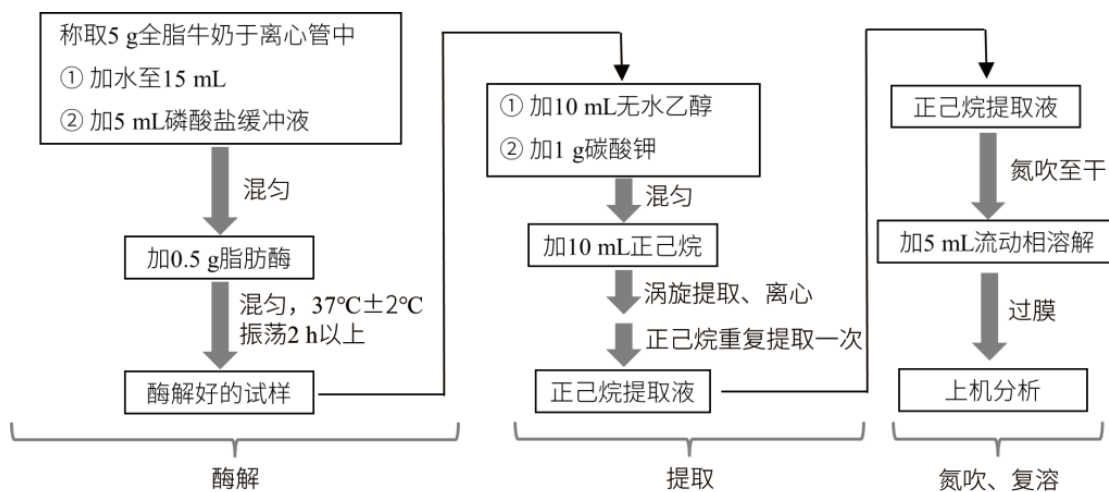


图1 全脂牛奶样品提取流程图

■ 结果与讨论

3.1 色谱图

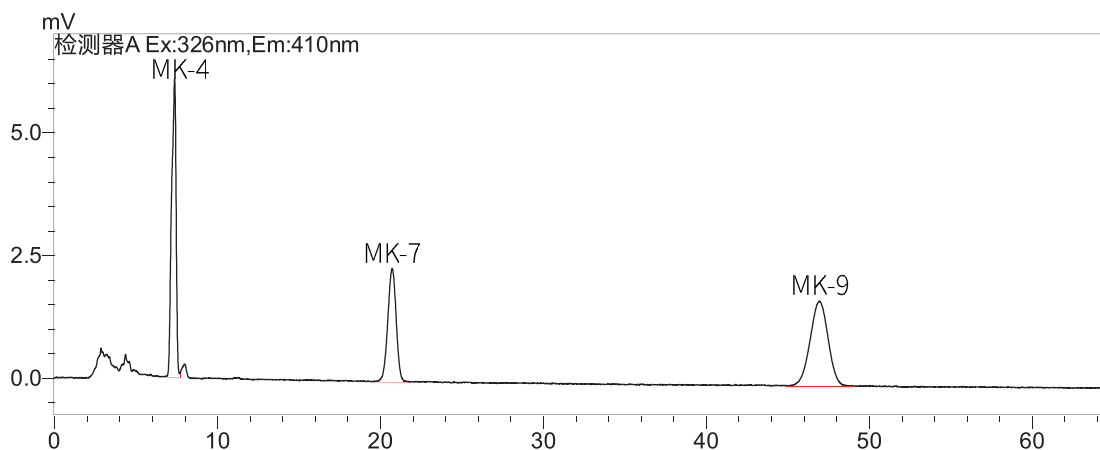


图2 标准溶液色谱图

(MK-4、MK-7: 0.025 μg/mL, MK-9: 0.050 μg/mL)

3.2 校准曲线、检出限及定量限

将“1.3 混合标准工作溶液”按“1.2 分析条件”进行测定。以目标物峰面积为纵坐标，对应的浓度为横坐标，绘制校准曲线，如图 3 所示。所得校准曲线相关系数大于 0.9993，准确度在 95.72%~103.19% 之间，Labsolutions 软件依据信噪比自动计算检出限 (S/N=3) 及定量限 (S/N=10)。线性方程、检出限及定量限结果见表 2。

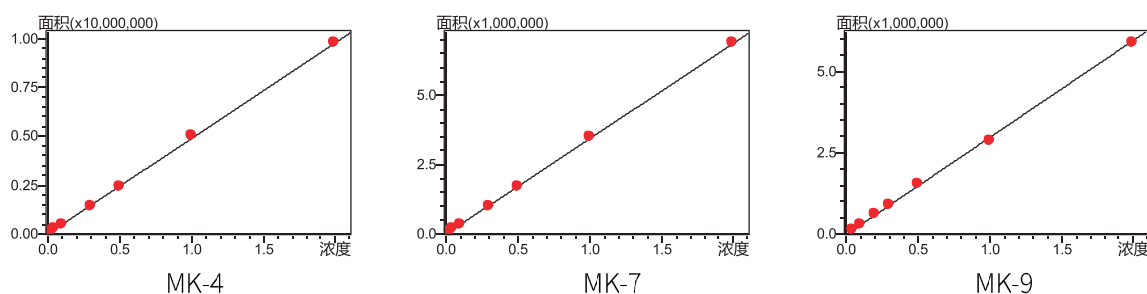


图 3 校准曲线

表 2 线性方程、检出限及定量限

目标物	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	相关系数 R	准确度 %	检出限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
MK-4	$Y = 4887543.66X - 4727.59$	0.025~2.0	0.9996	96.95~103.17	0.0003	0.001
MK-7	$Y = 3439915.17X - 2963.75$	0.025~2.0	0.9996	96.86~103.19	0.0006	0.002
MK-9	$Y = 2986670.32X - 18625.58$	0.050~2.0	0.9993	95.72~102.91	0.006	0.020

3.3 精密度结果

采用定量下限的标准工作溶液连续测定 6 次，考察仪器的精密度。结果如表 3 所示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.26% 和 0.92% 以内，显示仪器精密度良好。

表 3 精密度结果 (n=6)

目标物	理论浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
MK-4	0.025	0.05	0.63
MK-7	0.025	0.06	0.45
MK-9	0.050	0.26	0.92

3.4 加标回收率

准确称取某品牌全脂牛奶样品 5 g，向样品中加入低、中和高三个浓度的 MK-4、MK-7 和 MK-9 的混合标准中间溶液，按照“2. 样品前处理”方法处理后上机分析，加标回收率结果见表 4。结果显示：不同加标浓度下，MK-4、MK-7 和 MK-9 的加标回收率在 70.50%~97.93% 之间。

表 4 加标回收率结果 (n=3)

目标物	样品浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	实测浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率 (%)	RSD (%)
MK-4	<LLOQ ¹	50.00	48.96	97.93	0.14
		300.0	266.0	88.67	1.48
		500.0	404.7	80.94	0.33

MK-7	N.D. ²	50.00	40.96	81.91	0.47
		300.0	256.8	85.60	1.68
		500.0	394.1	78.82	0.35
MK-9	N.D.	100.0	70.50	70.50	0.41
		300.0	219.0	72.98	2.88
		500.0	380.3	76.06	2.00

注：1、<LLOQ 表示检出，但低于定量下限；2、N.D. 表示未检出。

3.5 样品测定结果

取市售某品牌全脂牛奶样品 5 g，每批次 6 样品，按照“2. 样品前处理”方法处理及“1.2 分析条件”进行测定，样品中 MK-4 检出，但低于定量下限，MK-7 和 MK-9 均未检出。

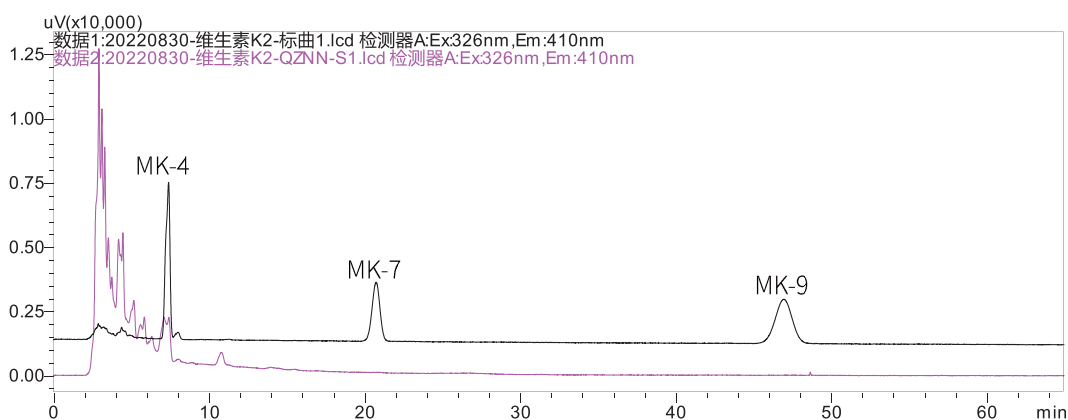


图 4 样品色谱图

■ 结论

本应用采用岛津高效液相色谱仪，参照 GB 5009.290-2023《食品安全国家标准 食品中维生素 K2 的测定》，建立了食品中维生素 K2 含量测定的方法，本方法灵敏度较高、重现性较好，可为食品行业相关人员提供参考。

岛津应用云

