

高效液相色谱-荧光检测法 测定食品中维生素 K₂ 的含量

邓梦雅,彭祖茂,朱 丽,杨 俊*,杨世添,张协光

(深圳市计量质量检测研究院,国家营养食品质量监督检验中心(广东),广东深圳 518131)

摘 要:建立了高效液相色谱-荧光检测法(HPLC-FLD)同时快速分离检测猪肉、猪肝、纯牛奶、酸奶、黄油、鸡蛋、豆豉、纳豆8种食品中2种维生素K₂的方法。样品经酶解、皂化、萃取、氮吹复溶处理后,用Agilent ZORBAX SB-C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)分离,柱后锌粉还原柱(35 mm×4.6 mm)衍生,以甲醇(含有二氯甲烷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,进入荧光检测器进行检测。结果表明,四烯甲萘醌(Menatetrenone4, MK-4)、七烯甲萘醌(Menatetrenone7, MK-7)在15 min内分离出峰。2种维生素K₂在各自的线性范围内关系良好,相关系数 $r=1.0000$ 。当取样量为2 g,定容2 mL时, MK-4的检出限为0.01 μg/100 g,定量限为0.04 μg/100 g; MK-7的检出限为0.06 μg/100 g,定量限为0.2 μg/100 g。当取样量为10 g,定容2 mL时, MK-4的检出限为0.002 μg/100 g,定量限为0.008 μg/100 g; MK-7的检出限为0.012 μg/100 g,定量限为0.04 μg/100 g。精密度(RSD)均不超过3.56%,回收率为80.6%~95.5%。8种食品中,猪肉、纯牛奶、酸奶、黄油、鸡蛋中仅含有MK-4,其中纯牛奶中含量最低,仅为(0.34±0.02) μg/100 g,鸡蛋中含量最高,达(25.38±0.85) μg/100 g。猪肝、豆豉、纳豆中仅含MK-7,其中猪肝含量较低,为(25.45±0.83) μg/100 g,纳豆中含量最为丰富,高达(923.20±11.45) μg/100 g。该法准确、可靠、高效,可用于食品中维生素K₂的高通量检测。

关键词:高效液相色谱-荧光检测法(HPLC-FLD),食品,维生素K₂,四烯甲萘醌(MK-4),七烯甲萘醌(MK-7)

Determination of Vitamin K₂ in Food by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection

DENG Meng-ya, PENG Zu-mao, ZHU Li, YANG Jun*, YANG Shi-tian, ZHANG Xie-guang

(Shenzhen Academy of Metrology & Quality Inspection, National Nutritional
Food Testing Center(Guangdong), Shenzhen 518131, China)

Abstract: A method for simultaneous determination of two kinds of vitamin K₂ in 8 kinds of food, including pork, pork liver, pure milk, yogurt, butter, eggs, lobster sauce and natto, by high performance liquid chromatography-fluorescence detector (HPLC-FLD) was developed. After enzymatic hydrolysis, saponification, extraction, nitrogen blowing and resolving treatment, the sample was separated by an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) and derivatized with a post-column zinc powder reduction column (35 mm×4.6 mm). Methanol (containing 10% dichloromethane, 0.03% glacial acetic acid, 1.5 g/L zinc chloride and 0.5 g/L anhydrous sodium acetate) was used as mobile phase for detection by fluorescence detector. Results showed that the chromatographic peaks of menatetrenone 4 (MK-4) and menatetrenone7 (MK-7) were found within 15 min. A good respective linearity of two kinds of vitamin K₂ was obtained with the correlation coefficient ($r=1.0000$). When the sample size was 2 g and the volume was 2 mL, the detection limit of MK-4 was 0.01 μg/100 g and the quantitative limit was 0.04 μg/100 g. The detection limit of MK-7 was 0.06 μg/100 g and the quantitative limit was 0.2 μg/100 g. When the sample size was 10 g and the volume was 2 mL, the detection limit of MK-4 was 0.002 μg/100 g and the quantitative limit was 0.008 μg/100 g. The detection limit of MK-7 was 0.012 μg/100 g and the quantitative limit was 0.04 μg/100 g. The relative standard deviation (RSD) was no more than 3.56%, and the recoveries ranged from 80.6% to 95.5%. Among the 8 kinds of food, pork, pure milk, yogurt, butter and eggs only contained MK-4, among which the content of pure milk was the lowest (0.34±0.02) μg/100 g and the content of egg was the highest (25.38±0.85) μg/100 g. There was only MK-7 in pork liver, lobster sauce and natto, among which the content of pork liver was low (25.45±0.83) μg/100 g and the content of natto was the most abundant, up to (923.20±11.45) μg/100 g. The method is accurate, reliable, efficient, and can be used for high-throughput

收稿日期:2018-12-17

作者简介:邓梦雅(1991-),女,本科,工程师,研究方向:食品营养检测,E-mail:mydeng@163.com。

*通讯作者:杨俊(1976-),男,硕士,高级工程师,研究方向:卫生检验,E-mail:3244536@qq.com。

基金项目:深圳市计量质量检测研究院科研项目(2018-YA19)。

determination of vitamin K₂ in food.

Key words: high performance liquid chromatography-fluorescence detection (HPLC-FLD); food; vitamin K₂; menatetrenone 4 (MK-4); menatetrenone 7 (MK-7)

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)19-0240-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.19.041

引文格式: 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.

天然维生素 K (Vitamin K, V_K) 是一类基本结构为 2-甲基-1,4-萘醌的脂溶性维生素, 参与人体骨代谢和细胞生长, 是肝内合成凝血酶原的必需物质, 具有止血功能, 当体内缺乏时可造成凝血障碍^[1]。根据其侧链结构的不同, 天然维生素 K 可分为维生素 K₁ (Vitamin K₁, V_{K1})、维生素 K₂ (Vitamin K₂, V_{K2}) 两类。维生素 K₁ 亦称叶绿醌, 在母环 C-3 位置上有一个植烷取代基, 主要存在于绿色植物中。维生素 K₂ 亦称甲萘醌, 是系列化合物, 根据母环 C-3 位置上异戊二烯单元个数的不同, 分为 14 种, 以 MK-n 表示 (图 1), 其中 n 指导异戊二烯单元的个数^[2], 维生素 K₂ 主要由微生物代谢产生, 少量存在于肉类、动物内脏、鸡蛋、乳制品、发酵性食品中, 在纳豆中较丰富^[3]。维生素 K₂ 是唯一具有生物活性的维生素 K, 其中以四烯甲萘醌 (Menatetrenone 4, MK-4)、七烯甲萘醌 (Menatetrenone 7, MK-7) 最具代表性^[4]。然而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。但维生素 K₁ 需在肝脏内转化为维生素 K₂ 才能被人体吸收利用, 其在体内的生物利用率仅为维生素 K₂ 的二分之一^[5]。

随着其药用价值的突显, 维生素 K₂ 已然成为国际上新一代预防和治疗骨质疏松的保健食品^[6]。1995 年, 日本首次将维生素 K₂ 作为治疗骨质疏松药物应用^[2]。2008 年, 美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 将纳豆枯草芽孢杆菌发酵的 MK-7 列入安全类食品添加剂^[7]。2009 年, 欧盟 (European Union, EU) 通过 2009/345/EC 决议, 批准以纳豆枯草芽孢杆菌发酵的维生素 K₂ 作为一种新型食品配料投放市场^[8]。我国台湾地区也将维生素 K₂ 作为第八类“营养添加剂”添加到食品中^[7]。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^[9]。

目前, 国内尚未有食品中维生素 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^[10-13]、毛细管电泳法^[14]、高效液相色谱-质谱法^[15]等。维生素 K₂ 在食品中含量极少, 且易受强酸、氧化剂、碱及光的作用而分解。现有的高效液相色谱-紫外检测法前处理采取的方法有直接萃取法和薄层纯化法; 直接萃取法面对的样品主要是原料药、纳豆提取物等基质较为干净、含量较高的样品, 而食品类别繁多、基质复杂、含量较低, 直接萃取不完全、杂质干扰大; 薄层纯化法前处理复杂, 无法满足高通量检测; 紫外检测器的选择性和灵敏

度不令人满意, 无法满足食物中维生素 K₂ 的检测需求^[10-13]; 毛细管电泳法步骤繁琐、重现性差; 高效液相色谱-质谱法灵敏度较高, 但仪器复杂、价格昂贵, 不易推广。维生素 K 的不饱和酮结构共轭体系较小, 不能产生荧光, 但能通过衍生法使维生素 K 同系物的母核萘环产生荧光, 以提高其在高效液相色谱荧光检测器上的响应值, 从而达到检测目的^[16]。王琳等^[17]用 SnCl₂ 的乙醇溶液将维生素 K₂ 荧光化, 通过荧光检测器成功测得人体血液中 MK-4 的含量。韩一秀等^[18]用 L-半胱氨酸将维生素 K₃ 还原为有荧光的甲萘酚, 建立了用水溶液测定药物制剂中维生素 K₃ 含量的新的荧光分析方法。

以上方法均是在前处理过程中将维生素 K 荧光化, 本文参考 AOAC Official Method 999.15^[16], 针对食品中 MK-4、MK-7, 采用柱后衍生反应使非荧光化合物维生素 K₂ 产生荧光, 并结合荧光检测器进行检测, 从而建立食物中 MK-4、MK-7 高效、准确、快速、灵敏的同时分离检测技术, 以期食品中维生素 K₂ 的检测、应用和监管提供技术支撑。

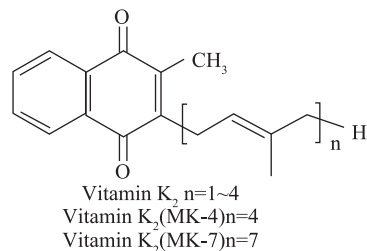


图 1 维生素 K₂ 化学结构式

Fig.1 Chemical structure of vitamin K₂

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

猪肉、猪肝、纯牛奶、酸奶、黄油、鸡蛋、豆豉、纳豆 市售; MK-4 标准品 美国 Supelco 公司; MK-7 标准品 美国 ChromaDex 公司; 脂肪酶 (酶活力 ≥ 700 U/mg) 美国 Sigma 公司; 氢氧化钾、冰乙酸、氯化锌、无水乙酸钠、氯化钠、无水硫酸钠 分析纯, 广州化学试剂厂; 无水乙醇 分析纯, 广州光华科技股份有限公司; 甲醇、正己烷、二氯甲烷 色谱纯, 德国 Merck 公司。

ThermoUltimate 3000 液相色谱仪 (配荧光检测器) 美国 Thermo 公司; BSA224S-CW 型电子分析天平北京赛多利斯公司; MS3 涡旋仪、KS4000ic 空气控温摇床 德国 IKA 公司; Hei-VAP 真空旋转蒸发仪 德国海道夫公司; N-EVAP112 氮吹仪 中国路易公司; Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱 (150 mm $\times$

4.6 mm, 5 μm) 美国 Agilent 公司; 柱后锌粉还原柱 (35 mm $\times$ 4.6 mm, 填料为锌粉, 平均粒径 70 μm) 上海安谱实验科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准品溶液制备 单标储备液: 分别准确称取 MK-4、MK-7 标准品, 用甲醇溶解并定容, 配制质量浓度均为 2000 mg/L 的单标储备液, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存。混合标准中间溶液: 分别吸取 MK-4、MK-7 标准储备液 1.00 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存。

1.2.2 样品制备 称取上述固体样品约 2 g、液体样品约 10 g (精确至 0.0001 g) 于 50 mL 离心管中, 加入约 1 g 脂肪酶、10 mL 去离子水, 振荡溶解, 于 (37 $\pm$ 5) $^{\circ}\text{C}$ 空气控温摇床中酶解 3 h。取出酶解好的试样, 依次加入 5 mL 无水乙醇、2 mL 50% 氢氧化钾溶液, 振荡混匀, 使其皂化完全。加入 30 mL 正己烷, 充分振摇, 于 5000 r/min 下离心 3 min, 取上清液于另一 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 饱和氯化钠溶液, 振荡水洗, 于 5000 r/min 下离心 3 min, 取上清液于 100 mL 旋蒸瓶中。重复操作 1 次, 合并有机相, 将有机相经过无水硫酸钠脱水过滤到旋蒸瓶中, 在旋转蒸发仪上于 (40 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 蒸发至近干, 氮气吹干, 准确加入 2.00 mL 甲醇复溶, 0.22 μm 滤膜过滤, 取滤液备用。

1.2.3 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 柱后锌粉还原柱: 35 mm $\times$ 4.6 mm, 连接于色谱柱之后, 检测器之前; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.5 mL/min; 进样量: 10 μL ; 检测波长: 激发波长 243 nm, 发射波长为 430 nm; 流动相: 甲醇 (含有二氯甲烷 10%、冰醋酸 0.03%、氯化锌 1.5 g/L、无水乙酸钠 0.5 g/L)。

1.2.4 维生素 K₂ 含量的计算 按下列公式计算样品中 MK-4 或 MK-7 含量:

$$X = c \times V \times d \times 100 / m$$

式中, X 为样品中 MK-4 或 MK-7 含量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$), c 为待测液中 MK-4 或 MK-7 的质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), V 为样品定容体积 (mL), d 为稀释倍数, m 为样品称样量 (g)。

1.3 数据处理

通过与仪器配套的 Chromeleon 7 工作站软件完成数据的采集与处理。

2 结果与讨论

2.1 酶解条件的选择

维生素 K₂ 是脂溶性维生素, 在食品中与脂质共存。脂肪酶可有效降解食品中脂肪, 但酶的用量及酶解时间对维生素 K₂ 的提取有一定影响。本文以鸡蛋为样品, 考察了不同用量 (0.5、1.0、1.5 g) 的酶 (见表 1) 和不同酶解时间 (1、2、3、4、5 h) 下样品的测定结果 (见表 1)。结果表明, 在相同酶解时间条件下 (5 h), 样品在酶用量为 1.0 g 时可酶解完全。且实验过程发现, 酶的用量与样品萃取过程中乳化现象有关, 酶用量的增加可有效消除乳化现象的产生, 有利于萃取过程中的液液分层。结合经济考虑, 本文选取 1.0 g 酶用量。在相同酶用量条件下 (酶用量

1.0 g), 酶解 1、2 h 结果偏低, 酶解时间不足导致样品酶解不完全。酶解 3、4、5 h 样品测定结果趋于稳定, 结合考虑时间效率问题, 本文选取酶解时间为 3 h。

表 1 酶解条件的比较

Table 1 Comparison of enzyme solution conditions

酶用量 (g)	含量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)				
	酶解 1 h	酶解 2 h	酶解 3 h	酶解 4 h	酶解 5 h
0.5	/	/	/	/	20.9
1.0	18.9	20.6	25.4	26.8	25.7
1.5	/	/	/	/	26.1

2.2 皂化条件的选择

食品中维生素 K₂ 常与脂质共存, 极少以游离态形式存在, 且食品中其他类脂类化合物的存在也是维生素 K₂ 检测的干扰来源, 因此需要对食品进行皂化, 破坏维生素 K₂ 外的包被物质, 使维生素 K₂ 游离出来。在皂化反应中, 碱的作用是将酶解后的脂肪转化成脂肪酸盐, 将维生素 K₂ 释放出来, 以便于萃取。由于维生素 K₂ 对碱敏感^[2], 本文选用鸡蛋为样品, 选择 50% 氢氧化钾溶液为碱液, 对碱的用量 (1、2、3、4、5 mL) 进行了考察 (见表 2)。结果表明, 当碱用量 1 mL 时, 结果偏低, 这可能与碱用量不够、样品皂化不完全有关。碱用量 2 mL 可以满足实验需求。碱用量 3、4、5 mL 结果逐渐递减, 可能与碱液含量过高, 维生素 K₂ 被碱破坏有关。综合考量, 本文选择使用 2 mL 50% 氢氧化钾溶液。

表 2 皂化条件的比较

Table 2 Comparison of saponification conditions

碱用量 (mL)	1	2	3	4	5
含量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	19.1	25.4	26.2	24.0	23.2

2.3 流动相的选择

考察甲醇 (A, 见图 2)、甲醇 (含二氯甲烷 5%) (B, 见图 2)、甲醇 (含二氯甲烷 10%) (C, 见图 2)、甲醇 (含二氯甲烷 15%) (D, 见图 2) (均含有冰醋酸 0.03%、氯化锌 1.5 g/L、无水乙酸钠 0.5 g/L) 条件下目标峰分离度及出峰时间。结果表明, MK-4、MK-7 在所有流动相条件下均可有效分离, 流动相中添加二氯甲烷可有效改善峰形。随着二氯甲烷比例的增加, 目标峰出峰时间加快。考虑到二氯甲烷对仪器管路具有腐蚀作用, 本文选择使用甲醇 (含有二氯甲烷 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。在该条件下, MK-4 的出峰时间为 3.560 min, MK-7 的出峰时间为 11.332 min, 表明该色谱条件有效可行 (见图 2, C)。

2.4 线性关系、检出限及定量限

将混合标准中间溶液逐级稀释成浓度为 0.02~2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列工作液, 在 1.2.3 的色谱条件下检测, 根据各峰面积 (y) 对质量浓度 (x) 进行线性回归, 得到 MK-4、MK-7 的标准曲线方程、线性范围和相关系数。MK-4 标准工作溶液线性回归方程为: $y = 1.37 \times 10^6 x - 4.49 \times 10^3$, 相关系数 $r = 1.0000$ 。MK-7

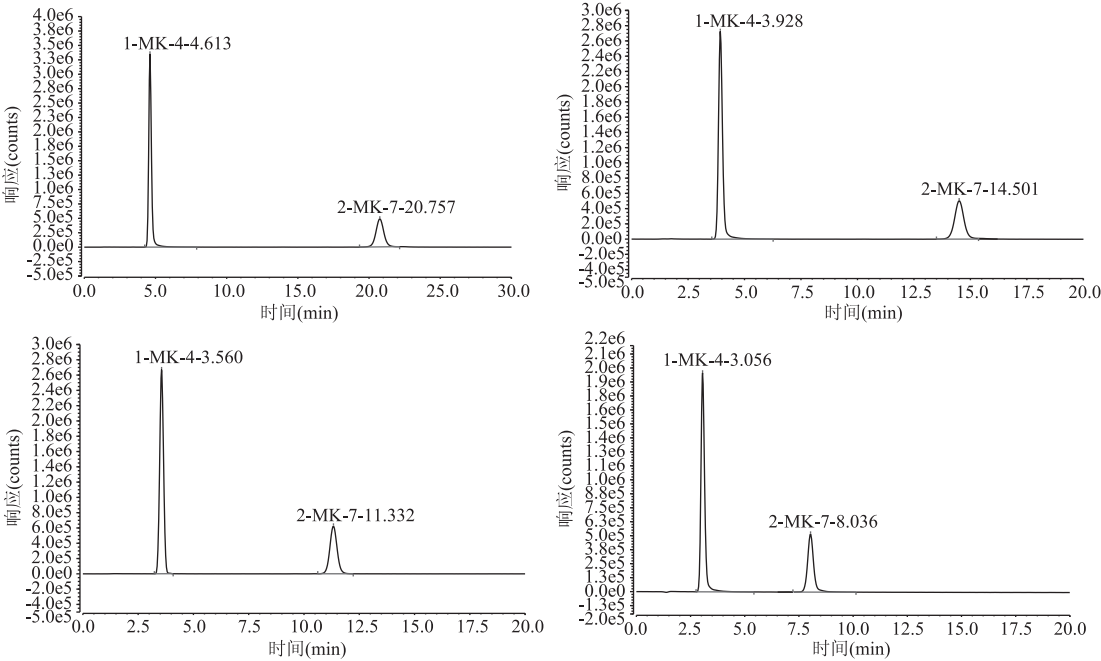


图2 MK-4、MK-7 标准品色谱图

Fig.2 Standard chromatogram of MK-4, MK-7

标准工作溶液线性回归方程为： $y = 6.01 \times 10^5 x - 2.58 \times 10^3$ ，相关系数 $r = 1.0000$ 。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2 g，定容2 mL时，MK-4的检出限为0.01 μg/100 g，定量限为0.04 μg/100 g；MK-7的检出限为0.06 μg/100 g，定量限为0.2 μg/100 g。当取样量为10 g，定容2 mL时，MK-4的检出限为0.002 μg/100 g，定量限为0.008 μg/100 g；MK-7的检出限为0.012 μg/100 g，定量限为0.04 μg/100 g。

2.5 回收率与精密度

根据2.6实际样品的测定结果，选取鸡蛋、豆豉做加标实验考察方法准确度。鸡蛋中含有MK-4，不含MK-7，向鸡蛋中添加0.5、1、2倍含量的MK-4，选取标准曲线低、中、高含量添加MK-7。豆豉中不含MK-4，含有MK-7，向豆豉中添加标准曲线低、中、高

含量的MK-4，按0.5、1、2倍含量添加MK-7。每个水平平行3份（见表3）。MK-4的加标回收率在85.8%~94.1%之间，MK-7的加标回收率在80.6%~95.5%之间，精密度RSD均不超过3.56%，结果表明该方法回收率良好，精密度较高，实验结果准确。

2.6 稳定性

取上述加标样液，于-20℃避光分别保存0、4、8、12和24 h，考察样品中MK-4、MK-7的稳定性（见表4）。结果发现，在24 h内，MK-4、MK-7含量的相对标准偏差（RSD）均不超过8.69%，说明MK-4、MK-7的稳定性好。

2.7 实际样品的测定

本方法选取猪肉、猪肝、纯牛奶、酸奶、黄油、鸡蛋、豆豉、纳豆8种样品进行检测（见表5）。结果表明，猪肉、纯牛奶、酸奶、黄油、鸡蛋中仅含有MK-4，其

表3 鸡蛋和豆豉中维生素K₂的加标回收率和相对标准偏差(n=3)

Table 3 Spiked recoveries and RSDs of VK₂ in eggs and fermented soya beans(n=3)

样品	化合物	样品本底量 (μg/100 g)	加标量 (μg/mL)	回收率(%)			平均回收率 (%)	RSD (%)
鸡蛋	MK-4	25.4	0.50	87.4	89.2	93.6	90.1	3.56
			1.00	84.0	86.3	88.9	87.6	2.84
			2.00	87.9	86.6	82.8	85.8	3.10
	MK-7	未检出	0.02	87.4	85.4	89.6	87.5	2.37
			0.50	90.5	86.6	91.4	89.5	2.87
			1.00	95.0	93.0	94.6	93.8	1.14
豆豉	MK-4	未检出	0.02	88.2	85.0	97.0	90.1	1.85
			0.50	91.9	94.6	95.7	94.1	2.10
			1.00	93.6	92.1	93.7	93.1	0.93
	MK-7	58.9	0.50	82.5	79.1	80.3	80.6	2.12
			1.00	82.6	84.0	83.3	83.3	0.84
			2.00	96.9	94.6	94.9	95.5	1.33

表4 提取液存放时间对维生素 K₂ 含量的影响 (n=3)Table 4 Effect of different storage time on the contents of V_{K2} (n=3)

化合物	序号	维生素 K ₂ 含量 (μg/100 g)					平均值 (μg/100 g)	RSD (%)
		0 h	4 h	8 h	12 h	24 h		
MK-4	1	15.3	14.3	14.1	13.6	13.5	14.2	5.07
	2	16.6	16.1	15.8	15.4	15.0	15.8	3.91
	3	16.7	15.6	15.6	15.3	14.7	15.6	4.65
MK-7	1	16.4	14.7	14.0	13.5	13.3	14.4	8.69
	2	18.0	16.3	15.7	15.6	14.9	16.1	7.28
	3	17.8	16.5	15.5	15.2	14.7	15.9	7.74

表5 8种食品中维生素 K₂ 的含量 (μg/100 g, n=6)Table 5 Contents of V_{K2} in the 8 kinds of food (μg/100 g, n=6)

化合物	猪肉	猪肝	纯牛奶	酸奶	黄油	鸡蛋	豆豉	纳豆
MK-4	1.69 ± 0.03	ND	0.34 ± 0.02	0.72 ± 0.02	10.44 ± 0.28	25.38 ± 0.85	ND	ND
MK-7	ND	25.45 ± 0.83	ND	ND	ND	ND	58.86 ± 0.98	923.20 ± 11.45

注:ND表示未检测到。

中纯牛奶中含量最低,仅为(0.34 ± 0.02) μg/100 g,鸡蛋中含量最高,达(25.38 ± 0.85) μg/100 g。猪肝、豆豉、纳豆中仅含 MK-7,其中猪肝含量较低,为(25.45 ± 0.83) μg/100 g,纳豆中含量最为丰富,高达(923.20 ± 11.45) μg/100 g。本文所测样品中维生素 K₂ 含量与 Schurgers 等^[3]、Peter 等^[19] 的研究结果相符。

3 结论

本文建立了高效液相色谱-荧光检测法同时分离检测食品中 2 种维生素 K₂ (MK-4、MK-7) 的分析方法。MK-4、MK-7 在 15 min 内分离出峰。2 种维生素 K₂ 在各自的线性范围内关系良好,相关系数 $r=1.0000$ 。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 2 g,定容 2 mL 时,MK-4 的检出限为 0.01 μg/100 g,定量限为 0.04 μg/100 g; MK-7 的检出限为 0.06 μg/100 g,定量限为 0.2 μg/100 g。当取样量为 10 g,定容 2 mL 时,MK-4 的检出限为 0.002 μg/100 g,定量限为 0.008 μg/100 g; MK-7 的检出限为 0.012 μg/100 g,定量限为 0.04 μg/100 g,精密度(RSD)均不超过 3.56%,回收率为 80.6%~95.5%。方法对猪肉、猪肝、纯牛奶、酸奶、黄油、鸡蛋、豆豉、纳豆 8 种样品进行检测,检测结果表明,猪肉、纯牛奶、酸奶、黄油、鸡蛋中仅含有 MK-4,其中纯牛奶中含量最低,仅为(0.34 ± 0.02) μg/100 g,鸡蛋中含量最高,达(25.38 ± 0.85) μg/100 g。猪肝、豆豉、纳豆中仅含 MK-7,其中猪肝含量较低,为(25.45 ± 0.83) μg/100 g,纳豆中含量最为丰富,高达(923.20 ± 11.45) μg/100 g。综上所述,该方法线性范围广,精密度和准确度良好,分析时间快,可进一步用于食品中维生素 K₂ 的研究。

参考文献

[1] Lowenthal J, Birnbaum H. Vitamin K and coumarinanticoagulants: Dependence of anticoagulant effect on inhibition of vitamin K transport[J]. Science, 1969, 164 (3876):

181-183.

[2] 邹志强,符诗聪,刘忠厚.维生素 K₂ 的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2015,11(3):389-375.

[3] Schurgers L J, Geleijnse J M, Grobbee D E, et al. Nutritional intake of vitamin K₁ (phylloquinone) and K₂ (menaquinone) in the Netherlands[J]. Journal of Nutritional & Environmental Medicine, 1999, 9: 115-122.

[4] 杨灵莉.维生素 K₂ 的合成方法研究[D].重庆:重庆大学,2012.

[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.

[6] 严为留.发酵法生产维生素 K₂ 的研究[D].无锡:江南大学,2014.

[7] 国家食品安全风险评估中心.维生素 K₂ (发酵法)[EB/OL], 2015-01-30/2018-12-01. <http://www.cfsa.net.cn/Article/News.aspx?id=9AE4CE9C2C9A89D396538B04EF6594B817F441522B878995>.

[8] EU. Commission decision of 22 April 2009 authorising the placing on the market of vitamin K₂ (menaquinone) from *Bacillus subtilis natto* as a novel food ingredient under regulation (EC) No 258/97 of the European parliament and of the council[EB/OL]. 2009-04-22/2018-12-01. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32009D0345>.

[9] 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)[EB/OL]. 2016-06-30/2018-12-01. <http://www.nhfp.gov.cn/sps/s7890/201606/125c3d8fa2034de3b7d52a82608709d2.shtml>.

[10] 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(4):87-89.

[11] 董跃伟.反相高效液相色谱法测定纳豆提取物中维生素 K₂ (35) 含量[J].中国药品标准,2010(4):49-51.

[12] 孙家慧.高效液相色谱法快速测定维生素 K₂ [J].天津化工,2011(6):59-60.

(下转第 250 页)

“最后一线”药物,万古霉素和去甲万古霉素在畜禽养殖使用上控制得较好。

3 结论

本文建立了 SPE 结合超高效液相色谱-质谱/质谱仪测定鸡蛋中的万古霉素和去甲万古霉素残留量的方法。本方法以 0.1% 甲酸水为提取溶剂,选择 Strata-X-C 固相萃取柱净化,基本无基质效应。同时,万古霉素和去甲万古霉素在 5.0~100.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内具有良好的线性关系,检出限均为 2.0 $\mu\text{g/kg}$,定量限均为 5.0 $\mu\text{g/kg}$,万古霉素和去甲万古霉素的平均回收率分别为 85.6%~91.5% 和 88.9%~96.3%,相对标准偏差(RSD)分别为 5.6%~9.2% 和 3.7%~9.2%,符合技术要求。本方法具有选择性好、操作简单、灵敏度高、回收率稳定等优点,适用于鸡蛋中万古霉素和去甲万古霉素的测定。

参考文献

- [1] Kaufmann A, Widmer M. Quantitative analysis of polypeptide antibiotic residues in a variety of food matrices by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. *Analytica chimica acta*, 2013, 797: 81-88.
- [2] 韩峰, 杨光昕, 张璇, 等. 万古霉素和去甲万古霉素检测方法研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(9): 3414-3419.
- [3] Hagihara M, Sutherland C, Nicolau D P. Development of HPLC methods for the determination of vancomycin in human plasma, mouse serum and bronchoalveolar lavage fluid [J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2013, 51(3): 201-207.
- [4] 陆晓凤, 吴建祥, 徐少毅, 等. 万古霉素治疗医院获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌肺炎的临床评价 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2015, 15(3): 214-216.
- [5] 王丽娜, 姜德平, 何为, 等. 万古霉素在动物性食品中残留的风险评价 [J]. *现代畜牧兽医*, 2013(9): 50-52.
- [6] 中华人民共和国农业部公告第 560 号 [EB/OL]. (2005-10-28) [2005-11-01]. http://www.moa.gov.cn/zwlml/tzgg/gg/200511/t20051117_496523.htm.
- [7] 食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂

(上接第 244 页)

- [13] 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_1 和 K_2 [J]. *营养学报*, 1998(1): 75-78.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] AOAC Official Method 999.15. Vitamin K in milk and infant formulas liquid chromatographic method [S]. America: AOAC International, 1999: https://www.aoac.org/AOAC_Prod_Iimis/

名单(第 1-5 批汇总) [EB/OL]. (2011-04-19). [2011-04-22]. <http://www.nhfp.gov.cn/sps/s7892/201406/38e5c8a5361548688d93ed05ac9731a.shtml>.

- [8] 吴维辉, 李亚菲, 张展, 等. 鸡肉中抗生素残留现状分析及建议 [J]. *广东饲料*, 2016, 25(10): 17-18.
- [9] 王长青. 东台市蛋鸡兽药使用现状和残留分析及控制对策研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [10] 李享, 王玮, 檀笑昕, 等. 毛细管电泳化学发光法测定人血清中的万古霉素和去甲万古霉素 [J]. *分析试验室*, 2017(2): 138-142.
- [11] 戴婷婷, 蒋跃平, 宋柏力, 等. 高效液相色谱法检测脑脊液中万古霉素药物浓度方法学建立 [J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37(17): 1706-1708.
- [12] 慕艳, 李锦清, 黄翠莉, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中万古霉素和去甲万古霉素的残留量 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(12): 4759-4765.
- [13] 卢剑, 范素芳, 李强, 等. 高效液相色谱-串联质谱测定猪肉中万古霉素, 去甲万古霉素和替考拉宁 [J]. *食品科学*, 2016, 37(10): 193-197.
- [14] 洗燕萍, 陈立伟, 罗海英, 等. UPLC-MS/MS 法测定猪肉中万古霉素与去甲万古霉素 [J]. *分析测试学报*, 2013, 32(2): 162-167.
- [15] 薛婷婷, 黄冬梅, 姜晓峰, 等. 双固相萃取/高效液相色谱-串联质谱法测定鱼类中糖肽类抗生素残留量 [J]. *分析试验室*, 2018, 37(1): 36-39.
- [16] 薛婷婷, 黄冬梅, 严敏鸣, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定虾中万古霉素及去甲万古霉素残留量 [J]. *分析测试学报*, 2017, 36(6): 773-777.
- [17] 彭丽, 班付国, 张发旺, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中的万古霉素 [J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(11): 74-78.
- [18] 慕艳, 李锦清, 赵明桥, 等. 固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定乳与乳制品中万古霉素、去甲万古霉素残留 [J]. *分析测试学报*, 2013, 32(6): 768-771.
- [19] 李君君, 李力军, 徐惠诚, 等. 动物源性食品中农药多残留检测前处理技术研究进展 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2012, 24(4): 403-407.

AOAC_Member/Default.aspx? WebsiteKey = 2e25ab5a-1f6d-4d78-a498-19b9763d11b4&hkey = 8fc2171a-6051-4e64-a928-5c47dfa25797.

- [17] 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_1 和 K_2 的浓度 [J]. *中国药理学杂志*, 2018, 53(17): 1498-1503.
- [18] 韩一秀, 李松青. 荧光法测定维生素 K_3 [J]. *分析科学学报*, 2008, 24(6): 738-740.
- [19] Peter Weber M D. Vitamin K and bone health [J]. *Nutrition*, 2001, 17: 880-887.