高效液相色谱荧光法测定营养素补充制剂中维生素 K_2（MK-7）的含量

孙晓菲，章秀梅，高玉静，邱洁，刘欣，李帅，张琨

（福格森（武汉）生物科技股份有限公司，湖北武汉 430056）

摘要：建立高效液相色谱荧光法（HPLC-FLD）测定营养素补充制剂中维生素 K_2（MK-7）的含量。样品用异丙醇超声提取 30 min，提取液离心过滤后取样液 10 μL 注入液相色谱系统中。样液经安捷伦 C18 色谱柱(4.6 mm×150 mm，5 μm)或其他等效色谱柱分离，柱后采用锌粉还原柱（4.6 mm×50 mm）衍生，使样品中维生素 K_2（MK-7）具有荧光特性。以甲醇（含 5%四氢呋喃，冰乙酸 0.03%，乙酸锌 1.0 g/L）为流动相，流速 1.0 mL/min，检测波长 激发波长 243 nm 发射波长 430 nm。当称取样品 1.0 g，定容体积为 10 mL 时，MK-7 的检出限为 0.03 μg/g，定量限为 0.1 μg/g；MK-7 在浓度 0~2.176 μg/mL 的范围内线性关系良好，线性相关系数为 R^2=0.9999；重复性实验中 RSD%为 0.97%；样品加标回收率为 93.40%。此方法操作简单，高效，准确，重现性好，可用于营养素补充制剂中维生素 K_2（MK-7）的含量测定。

关键词：维生素 K_2；高效液相色谱法；衍生；荧光

文章篇号：1673-9078(2020)06-321-327 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.1209

Determination of Vitamin K_2 (MK-7) in Nutrient Supplements by High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Spectrometry

SUN Xiao-fei, ZHANG Xiu-mei, GAO Yu-jing, QIU Jie, LIU Xin, LI Shuai, ZHANG Kun

(Ferguson (Wuhan) Biotechnologies Co. Ltd., Wuhan 430056, China)

Abstract: To establish a method for the determination of Vitamin K_2 (MK-7) in Nutrient Supplements by high performance liquid chromatography-fluorescence detector (HPLC-FLD), the sample was extracted by isopropanol ultrasonic for 30 min, after centrifugation and filtration, 10 μL of the sample solution was injected into the liquid chromatography system. The sample solution was separated by Agilent C18 column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) or equivalent column. After the column, it was derived by zinc powder reduction column (4.6 mm×50 mm), so that the Vitamin K_2 (MK-7) in the sample had fluorescence characteristics. Methanol (containing 5% tetrahydrofuran, glacial acetic acid 0.03%, zinc acetate 1.0 g/L) was used as mobile phase, the flow rate was 1.0 mL/min, the fluorescence detector was set at λex/λem=243 nm/430 nm. When the sample weight was 1.0 g and the volume was 10 mL, the detection limit of this method was 0.03 μg/g, and the quantitative limit was 0.1 μg/g, MK-7 had a good linearity in the range of 0~2.176 μg/mL, the R^2 was 0.9999. The relative standard deviation of the repeatability experiment was 0.97%, and the recovery of the standard was 93.40%. This method has simple operation, good accuracy, and good reproducibility. It can be used for the determination of MK-7 in Nutrient supplements.

Key words: Vitamin K_2 (MK-7); high performance liquid chromatography (HPLC); derive; fluorescence

引文格式：

孙晓菲,章秀梅,高玉静,等.高效液相色谱荧光法测定营养素补充制剂中维生素 K2（MK-7）的含量[J].现代食品科技,2020, 36(6):321-327

SUN Xiao-fei, ZHANG Xiu-mei, GAO Yu-jing, et al. Determination of vitamin K2 (MK-7) in nutrient supplements by high performance liquid chromatography-fluorescence spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 321-327

收稿日期：2019-12-09

基金项目：湖北省博士后创新岗位（鄂博管办[2016]5 号）

作者简介：孙晓菲，（1990-），女，助理工程师，研究方向：营养、保健食品的分析检测

通讯作者：张琨，（1981-），男，高级工程师，研究方向：营养、保健食品的研究开发

维生素K_2亦称甲萘醌，根据2-甲基-1，4-萘醌母核C3位侧链上异戊二烯长短不同而有14种存在形式，以MK-n表示，其中n指异戊二烯单元的个数[1]，维生素K_2主要由微生物代谢产生，来源于动植物发酵食品，纳豆中富含[2]。其中七烯甲萘醌（Menatetrenone-7，MK-7）是维生素K_2家族中代表性成分，已被证明具有最高生物利用度，其功能和安全性现已通过FDA的认证批准。MK-7有抑制多种肿瘤细胞增殖，预防和逆转血管钙化，改善骨质疏松、调节骨代谢等功效[3-6]。目前，已有许多国家及地区将维生素K_2作为食品添加剂或营养补充剂使用。我国也于2016年将维生素K_2（发酵法）列入食品营养强化剂新品种[7]，同时也规定了维生素K_2（MK-7）含量测定方法，但此方法适用于原料药、纳豆提取物等基质较为干净、含量较高的样品，而对于一些营养素补充制剂产品，其维生素K_2含量低，基质复杂，杂质干扰大，难以准确定量。目前国内有关维生素K_2检测方法报道较少，主要有高效液相色谱-紫外法（HPLC-UV）[8-12]、高效液相色谱-质谱法（HPLC-MS）[13]、高效液相色谱-荧光法（HPLC-FLD）[14,15]。在实际测定营养素补充制剂中维生素K_2时，紫外检测器选择性和灵敏度较低，有杂质干扰问题，现有的HPLC-UV色谱法主要针对原料药、营养素成分简单或维生素K_2含量较高的样品，不适合多种营养素补充制剂中维生素K_2含量低的样品。HPLC-MS虽灵敏度高，但仪器昂贵，大部分实验室条件达不到。两种高效液相色谱荧光法（HPLC-FLD）分别采用柱前[14]和柱后[15]衍生法使维生素K_2产生强荧光，提高了检测灵敏度，可以满足微量维生素K_2的含量测定，但样品前处理过程都很复杂。本实验参考高效液相色谱荧光法[15]，采用Zn还原柱柱后衍生法使维生素K_2产生强荧光，再利用荧光检测器测定维生素K_2含量。与文献方法相比，本实验建立的方法前处理操作简单，提高了工作效率，结果重现性好，回收率高，可以为该类产品的质量控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要仪器设备

高效液相色谱仪（带紫外和荧光检测器），Waters2695/2998/2475；色谱柱 Agilent C18（4.6 mm×150 mm，5 μm）；锌粉还原柱（4.6 mm×50 mm），安谱；超声仪（KQ-300DE）；分析天平（XP205）；离心机（TGL-12C）；旋转蒸发器（YRE-2000A）；氮吹仪（MTN-2800D）；多功能振荡器（HY-4）。

1.1.2 样品和试剂

营养素补充制剂样品：福格森牌钙维生素 D 维生素 K 片（孕妇乳母）（规格 2 g/片，每片约含 12 μg 维生素 K_2），以下简称钙 VD VK 片；维生素 K_2（MK-7）对照品（纯度 98.7%，Gnosis S.p.A）；甲醇、二氯甲烷、正己烷、异丙醇、四氢呋喃（色谱纯），Fisher 公司；乙酸锌、氯化锌、冰乙酸、无水乙酸钠、氢氧化钾、无水乙醇（分析纯），国药；脂肪酶(酶活力≥700 U/mg)，源叶生物。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱方法比较研究

采用 2016 年国家卫计委第 8 号公告中规定的 MK-7 含量测定方法测定样品中维生素 K_2 含量[7]，记录色谱图。

参考高效液相色谱荧光法中维生素 K_2 含量测定前处理方法[15]，样品经脂肪酶酶解，正己烷提取，浓缩，甲醇复溶后，进 HPLC-UV 色谱系统，色谱条件同上，记录色谱图。

样品经异丙醇超声提取后，进 HPLC-FLD 色谱系统。色谱条件：色谱柱 Agilent C18 4.6 mm×150 mm，5 μm；锌粉还原柱 4.6 mm×50 mm；激发波长 243 nm 发射波长 430 nm；流动相：甲醇（含 5%四氢呋喃，冰乙酸 0.03%，乙酸锌 1.0 g/L），流速：1.0 mL/min；进样体积：10 μL。

1.2.2 色谱条件选择

1.2.2.1 流动相选择

采用 HPLC-FLD 色谱法测定时，分别选择流动相 A：甲醇（含冰乙酸 0.03%，氯化锌 1.5 g/L，无水乙酸钠 0.5 g/L）；B：甲醇（含 10%二氯甲烷，冰乙酸 0.03%，氯化锌 1.5 g/L，无水乙酸钠 0.5 g/L）；C：甲醇（含 10%四氢呋喃，冰乙酸 0.03%，氯化锌 1.5 g/L，无水乙酸钠 0.5 g/L）；D：甲醇（含 5%四氢呋喃，冰乙酸 0.03%，乙酸锌 1.0 g/L）为流动相，记录色谱图。

1.2.2.2 流动相中锌离子浓度对衍生反应的影响实验

保持其他条件不变，流动相甲醇（含 5%四氢呋喃，冰乙酸 0.03%，不同浓度的乙酸锌），考察锌离子浓度对样品峰面积的影响。

1.2.2.3 流动相中醋酸浓度对衍生反应的影响实验

保持其他条件不变，流动相甲醇（含 5%四氢呋喃，乙酸锌 1.0 g/L，不同浓度的冰乙酸），考察醋酸浓度对样品峰面积的影响。

1.2.2.4 色谱柱温度控制

不控制色谱柱温，在室温条件下连续进样 6 次，记录色谱图，比较第 1 次和第 6 次进样色谱图保留时

间。设置色谱柱温为 30 ℃，在相同条件下连续进样 6 次，记录色谱图，比较第 1 次和第 6 次进样色谱图保留时间。

1.2.3 前处理方法选择

1.2.3.1 提取方法选择

采用酶解后提取和有机溶剂（分别选甲醇、异丙醇为提取溶剂）直接超声提取维生素 K_2（MK-7）样品，提取液经液相色谱分离，Zn 柱还原，荧光检测器检测。每组分别平行处理 6 个样品，供液相色谱测定。

1.2.3.2 提取时间选择

考察样品超声提取时间与提取效果的关系，分别用异丙醇超声提取样品 15 min、30 min、45 min、60 min，每组平行测定两个样品，供液相色谱测定。

1.2.4 方法学验证实验

1.2.4.1 线性关系、检出限及定量限

分别精密吸取 1.3.2 中标准中间使用液（10 μg/mL）0.0 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.8 mL、1.0 mL、2.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用异丙醇定容，配制成不同浓度的标准系列溶液，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。检出限以 3 倍信噪比（S/N）计，定量限以 10 倍 S/N 计。

1.2.4.2 方法重复性实验

精密称取样品 6 份，按 1.3.3 试样制备方法处理样品，测定样品含量，计算测得含量相对标准偏差，验证方法的重复性。

1.2.4.3 方法准确度实验

精密称取已知含量的样品约 1.0 g 9 份，每组 3 份，分别在每组中加入含维生素 K_2 的标准中间使用液（10.74 μg/mL）0.3 mL、0.5 mL、1.0 mL，按 1.3.3 方法处理样品后，取 10 μL 经 HPLC-FLD 色谱系统分析。计算维生素 K_2 (MK-7)在 3 个不同水平浓度的回收率及相对标准偏差，验证方法的准确度。

1.3 样品测定

1.3.1 标准品储备液的配制

精密称取 10 mg 维生素 K_2 对照品（精确到 0.1 mg），于 10 mL 容量瓶中，用异丙醇超声溶解并定容，配制成 1 mg/mL 的标准储备液，于-20 ℃冰箱避光保存。

1.3.2 标准中间使用液的配制

精密量取上述标准储备液 1.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，用异丙醇定容，配制成 10 μg/mL 的标准中间使用液，于-20 ℃冰箱避光保存。

1.3.3 试样制备

分别精密称取 1.0 g（精确到 0.0001 g）研磨成细粉的样品于 10 mL 的棕色容量瓶中，加入适量异丙醇混匀超声 30 min，用异丙醇定容，摇匀，离心后取上清液过 0.45 μm 滤膜，即为样品待测液。

1.3.4 实际样品测定

分别取 1.2.4.1 中标准系列溶液和 1.3.3 中样品待测液各 10 μL 注入高效液相荧光色谱系统中，记录色谱峰面积，外标法定量，计算样品中维生素 K_2 含量。

1.4 数据处理

采用 Excel 2007 和 Waters Empower 软件对数据进行处理分析及作图。

2 结果与分析

2.1 色谱方法优化

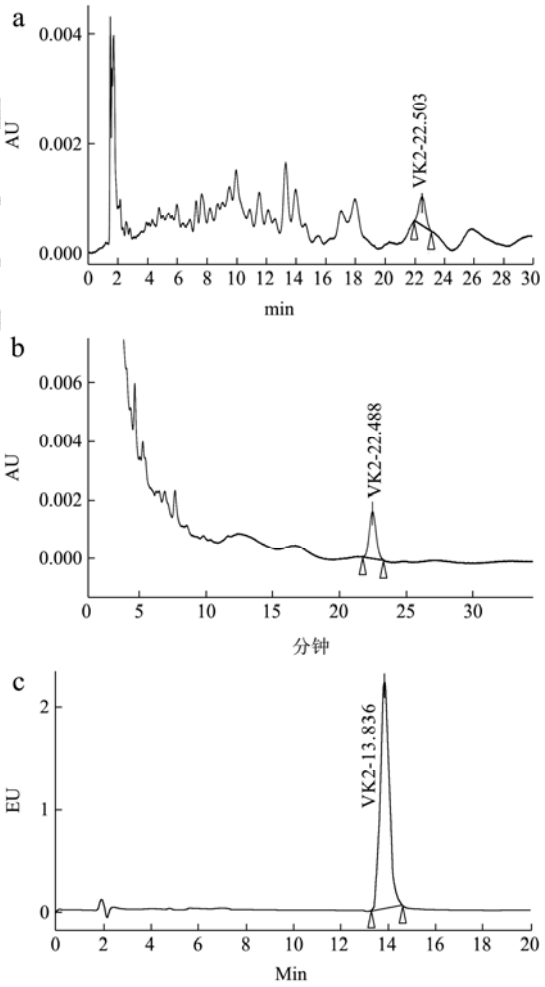


图 1 不同色谱方法图谱比较

Fig.1 Comparison of chromatogram of different chromatographic methods

注：a.样品采用异丙醇提取，以甲醇为流动相，HPLC-UV 测定样品色谱图；b.样品采用酶解提取，以甲醇为流动相，HPLC-UV 测定样品色谱图；c.实验建立方法样品色谱图。

色谱方法比较实验结果见图 1。由图 1 中 a 可见，在测定多种营养素补充制剂中维生素 K_2 时，卫计委附录方法存在杂质及基线干扰问题；对比图 1 中 a 和 b 可知，酶解后提取样品的净化效果很好，但实际样品测定过程繁琐，重复性差，回收率低；对比图 1 中 b 和 c，本实验建立的高效液相色谱荧光法样品响应值高，保留时间短，实际操作简单，更适合维生素 K_2 含量较低的产品。

2.2 色谱条件优化

2.2.1 不同流动相样品色谱图

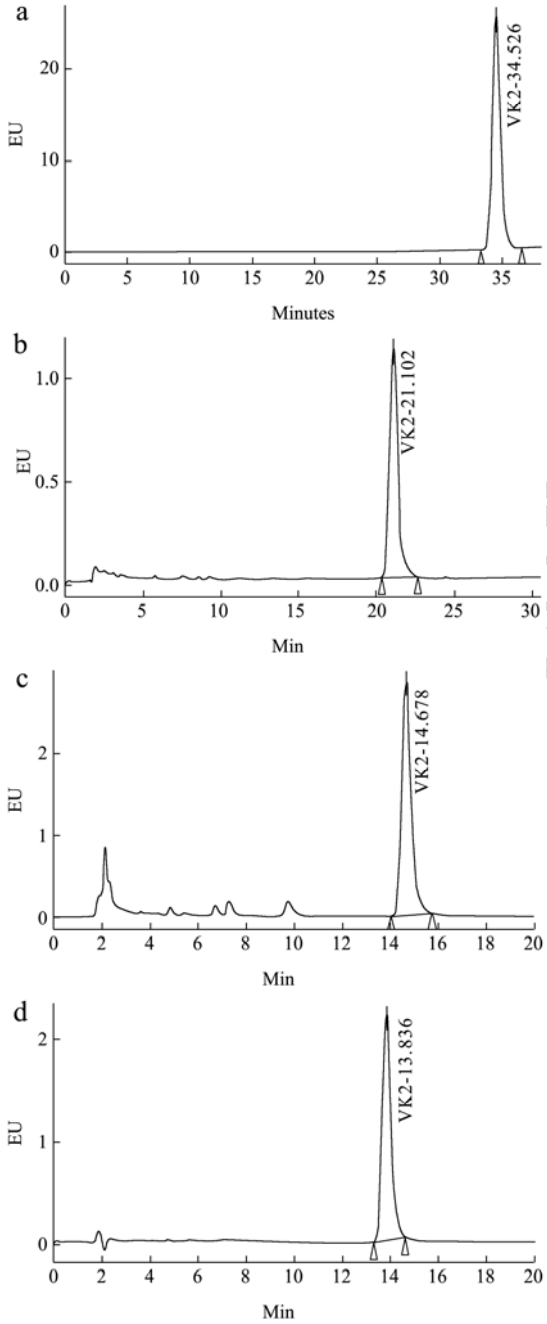


图 2 维生素 K_2(MK-7)样品色谱图

Fig.2 Chromatogram of Vitamin K_2 (MK-7) sample

注：a、b、c、d 分别是流动相 A、B、C、D 所得样品色谱图。

由图 2 中 a、b、c 可知，流动相中使用二氯甲烷和四氢呋喃作流动相辅助剂，均可使样品保留时间提前，对比图 2 中的 b 和 c，流动相 c 所得样品色谱图峰形好，样品保留时间更短，流动相 c 优于 b。在实际实验过程中，配制流动相 c 需超声半小时才能完全溶解氯化锌和无水乙酸钠，且需要四氢呋喃的量更多，长期使用高浓度四氢呋喃对色谱柱和仪器管路有一定损伤。如图 2 中的 d，流动相使用更少的四氢呋喃就可以达到相似的保留时间，减轻了对仪器的损害，同时用乙酸锌代替氯化锌和无水乙酸钠，解决了配制流动相时溶解困难的问题。

2.2.2 流动相中锌离子浓度和醋酸浓度对衍生反应的影响

由图 3 可见锌离子浓度大于或等于 5 mmol/L 时，样品峰面积达到最大并保持不变，醋酸浓度在 5 mmol/L 时样品峰面积达到峰值，即当流动相选择含乙酸锌 1.0 g/L，冰乙酸 0.03%，衍生反应可以反应完全，因此本文选择甲醇（含 5%四氢呋喃，冰乙酸 0.03%，乙酸锌 1.0 g/L）为流动相。

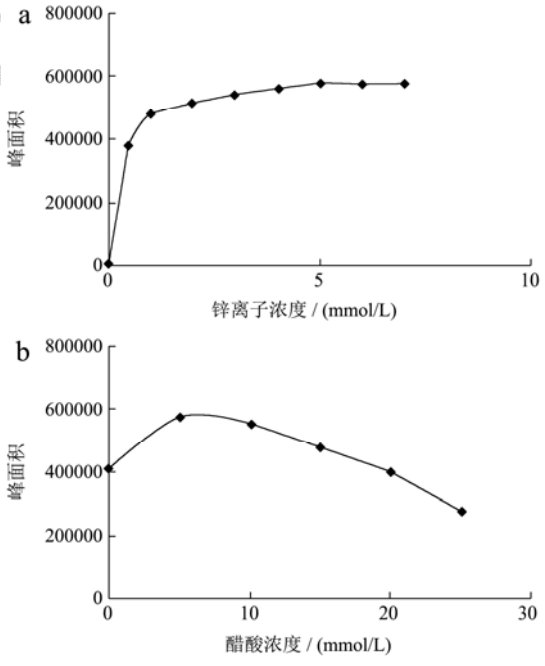


图 3 流动相中锌离子浓度和醋酸浓度对衍生反应的影响

Fig.3 Effect of zinc ion concentration and acetic acid concentration in mobile phase on derivative reaction

注：a：锌离子浓度对衍生反应的影响；b：醋酸浓度对衍生反应的影响。

2.2.3 色谱柱温度控制实验结果

由图 4 中 a 可知，如果不控制色谱柱温度，第 1 次和第 6 次进样维生素 K_2 的保留时间会出现偏移，而

将色谱柱温度控制在 30 ℃，第 1 次和第 6 次进样维生素 K_2 的保留时间基本一致，如图 4 中的 b。考虑色谱柱温度设置太高又会影响色谱柱寿命，所以本实验选择色谱柱温度为 30 ℃。

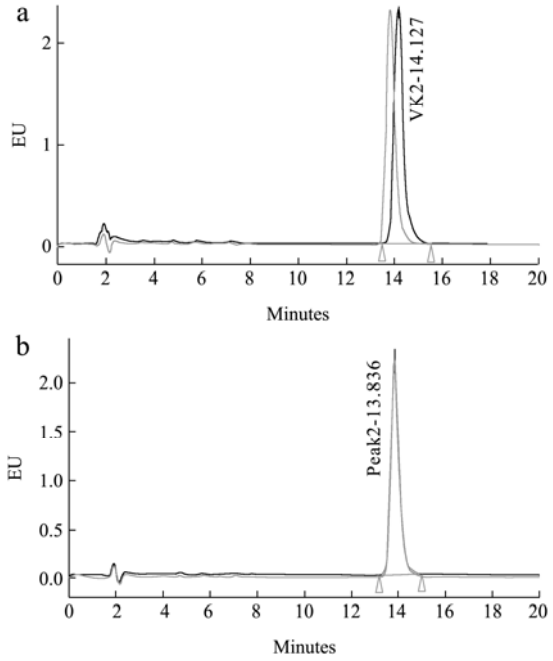


图 4 色谱柱温度控制实验色谱图

Fig.4 Chromatogram of column temperature control experiment

注：a：不控制柱温，第 1 次和第 6 次进样色谱图保留时间比较图；b：色谱柱温度为 30 ℃，第 1 次和第 6 次进样色谱图保留时间比较图。

2.3 前处理方法优化

2.3.1 不同提取方法测定

表 1 前处理方法比对结果

Table 1 Comparison results of pretreatment methods

提取方法	酶解后提取	甲醇提取	异丙醇提取
检测值/(μg/g)	5.42±0.42	0.76±0.03	5.88±0.06
RSD/%	7.81	4.16	0.97

由表 1 可知，酶解后提取和异丙醇超声提取测得结果相差不大，因样品酶解提取后需转移、浓缩、再溶解等一系列步骤，实验操作繁琐，环节多，重现性不好（RSD 为 7.81%），实际回收率也不高。后分别使用甲醇、异丙醇直接超声提取样品，经 HPLC-FLD 色谱系统测定，结果发现异丙醇提取效果最好，与理论值 6 μg/g 相近，且 RSD 为 0.97%，重复性较好。

2.3.2 不同提取时间测定

由表 2 可知，当超声时间不小于 30 min 时，样品测得量已达到最高值，因此实验选择样品提取时间为 30 min。

表 2 超声提取时间实验结果

Table 2 Experimental results of ultrasonic extraction time

超声提取时间/min	15	30	45	60
检测值/(μg/g)	5.21±0.06	5.82±0.06	5.78±0.05	5.85±0.06
RSD/%	1.12	0.97	0.95	1.01

2.4 方法学验证实验

2.4.1 线性关系、检出限及定量限

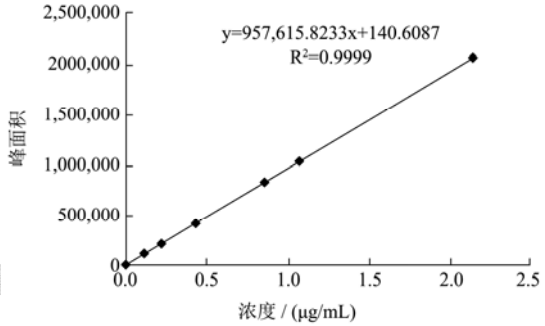


图 5 维生素 K_2（MK-7）标准曲线

Fig.5 Standard curve of vitamin K_2 (MK-7)

由图 5 可知，维生素 K_2（MK-7）在浓度 0~2.176 μg/mL 范围内线性关系良好，线性回归方程为 Y=957615.8233X+140.6087，相关系数 R^2 为 0.9999；当取样量为 1.0 g，定容体积 10 mL 时，维生素 K_2（MK-7）的检出限为 0.03 μg/g，定量限为 0.1 μg/g。

2.4.2 方法重复性实验

表 3 方法重复性实验结果

Table 3 Result of method repeatability test (n=6)

化合物	含量/(μg/g)	平均值/(μg/g)	RSD/%
维生素 K_2（MK-7）	5.820	5.88	0.97
	5.927		
	5.800		
	5.865		
	5.931		
	5.914		

由表 3 可知，平行测定 6 次样品含量 RSD 小于 1.0%。表明本方法重复性好，适合定量分析。

2.4.3 方法准确度实验

由表 4 可知，维生素 K_2（MK-7）的平均加标回收率为 93.40%，RSD 为 1.11%，说明本方法准确度高，能为保健食品中维生素 K_2（MK-7）含量测定提供检测依据。

表 4 加标回收率实验结果

Table 4 Result of recovery rate of standard addition (n=9)

化合物	加标量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
维生素 K_2 (MK-7)	3.22	8.86	92.32	93.40	1.11
	3.22	8.84	91.85		
	3.22	8.87	93.02		
	5.37	10.88	93.38		
	5.37	10.89	94.54		
	5.37	10.96	93.31		
	10.74	15.90	94.75		
	10.74	16.06	94.58		
	10.74	16.04	92.83		

2.5 样品测定方法对比分析

在现有的液相色谱方法中，用 HPLC-UV 法[7-12]测定本公司产品钙 VD VK 片中微量维生素 K_2 含量时，紫外检测器灵敏度和选择性低，样品色谱图出现基质干扰，此类检测方法无法进行有效的含量测定；文献方法[14]可提供研究思路，但样品前处理过程较复杂，柱前衍生耗时长，前处理对象针对血浆样本；文献方法[15]和本文建立方法均采用柱后衍生，可比性高。表 5 是选用文献方法[15]和本实验建立的方法对三批钙 VD VK 片中维生素 K_2 含量进行实际测定的结果对比，由表可见，采用文献方法[15]测定样品 RSD 大，重复性不好，而本实验方法测定样品 RSD 小，重复性好，准确度更高。

表 5 样品测定方法对比分析结果

Table 5 Comparative analysis results of sample determination methods

样品名	方法	理论值/(μg/g)	检测值/(μg/g)			平均值/(μg/g)	RSD/%
钙 VD VK 片	本方法	6	5.817±0.06	5.933±0.05	5.920±0.06	5.89	1.08
	文献方法[15]		5.476±0.46	5.772±0.37	4.926±0.52	5.39	7.96

3 结论

本研究建立的 HPLC-FLD 法测定营养素补充制剂中维生素 K_2（MK-7），荧光检测器的选择性和灵敏度满足产品要求，优于 HPLC-UV 法，以甲醇（含 5%四氢呋喃，冰乙酸 0.03%，乙酸锌 1.0 g/L）为流动相，样品峰形好、分析时间短。样品经异丙醇超声提取后上机测定，不需经酶解、皂化提取、转移、浓缩、定容等一系列步骤，操作简便。本实验建立的方法简单高效，方法学验证结果良好，可为多种营养素补充制剂产品（粉剂、片剂、胶囊等）中微量维生素 K_2 含量测定提供检测依据。

参考文献

[1] 邹志强,符诗聪,刘忠厚.维生素K_2的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2015,11(3):375-389
ZOU Zhi-qiang, FU Shi-cong, LIU Zhong-hou. Research progress of vitamin K_2 [J]. Chinese Journal of osteoporosis, 2015, 11(3): 375-389

[2] Schurgers L J, Geleijnse J M, Grobbee D E, et al. Nutritional intake of vitamin K_1 (phylloquinone) and K_2 (menaquinone-7) in the Netherlands [J]. Journal of Nutritional& Environmental Medicine, 1999, 9: 115-122

[3] 蒋雨薇.维生素K_2抗肿瘤作用的研究进展[J].实用癌杂志,2015,1:156-158
JIANG Yu-wei. Research progress in the antitumor effect of vitamin K_2 from [J]. Journal of Practical Cancer, 2015, 1: 156-158

[4] 邹志强.维生素K_2的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2005,3:121-124
ZOU Zhi-qiang. Research progress of vitamin K_2 [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2005, 3: 121-124

[5] 朱杰,王中群,王昭军,等.维生素K_2抑制血管钙化作用与机制研究进展[J].中华老年心脑血管病杂志,2016,1:94-96
ZHU Jie, WANG Zhong-qun, WANG Zhao-jun, et al. Research progress on the mechanism of vitamin K_2 inhibiting vascular calcification [J]. Chinese Journal of Geriatric Cardio Cerebrovascular Diseases, 2016, 1: 94-96

[6] 张萌萌.维生素K_2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 Meng-meng. Review of biological research on vitamin K_2 regulating bone metabolism [J]. Chinese Journal

of Osteoporosis, 2016, 22(12): 159 -1600

[7] 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

[8] 董跃伟.反相高效液相色谱法测定纳豆提取物中维生素 K_2 (35)含量[J].中国药品标准,2010,4:49-51
DONG Yue-wei. Determination of vitamin K_2 (35) in natto extract by RP-HPLC [J]. Chinese Drug Standard, 2010, 4: 49-51

[9] 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_2软胶囊中K_2(20)含量[J].分析实验室,2009,5:33-35
MU Xiao-yun, DONG Yue-wei, WEN Xiao-jiang, et al. Determination of K_2 (20) in vitamin K_2 soft capsules by RP-HPLC [J]. Analytical Laboratory, 2009, 5: 33-35

[10] 孙家慧.高效液相色谱法快速测定维生素K_2[J].天津化工,2011,6:59-60
SUN Jia-hui. Rapid determination of vitamin K_2 by HPLC [J].Tianjin Chemical Industry, 2011, 6: 59-60

[11] 胡赠彬,冯雷,魏用林,等.2种液相色谱法测定保健品软胶囊中的维生素K_2[J].食品安全质量检测学报,2019,10(11):3543-3545
HU Zeng-bin, FENG Lei, WEI Yong-lin, et al. Determination of vitamin K_2 in soft capsules of health products by two kinds of liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2019, 10(11): 3543-3545

[12] 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K_2的含量[J].食品安全质量检测学报,2019,10(5):1225-1229
LIU Guang-lan, ZHENG Niang, WU Yin, et al. Simultaneous determination of vitamin D_3 and vitamin K_2 by HPLC [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2019, 10(5): 1225-1229

[13] 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 Cong, LIANG Rui-qiang, CAO Jin, et al. Determination of nine fat soluble vitamins in health food by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2016, 7(3): 991-999

[14] 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].中国药学杂志,2018,53(17):1498-1503
WANG Lin, LIU Lin-sheng, MIAO Li-yan. Simultaneous determination of vitamin K_1 and K_2 in human plasma by hplc-fda [J]. Chinese Journal of Pharmacy, 2018, 53(17): 1498-1503

[15] 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K_2的含量[J].食品工业科技,2019,40(19):240-244,250
DENG Meng-ya, PENG Zu-mao, ZHU Li, et al. Determination of vitamin K_2 in food by high performance liquid chromatography fluorescence detection [J]. Food Industry Technology, 2019, 40(19): 240-244, 250

（上接第 88 页）

[21] Chang P R, Jian R J, Yu J G, et al. Fabrication and characterization of chitosan nanoparticles/plasticized-starch composites [J]. Food Chemistry, 2010, 120: 736-740

[22] Wang L Y, Dong Y, Men H T, et al. Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 32: 35-41

[23] 郑科旺,付梅芳,黄超凡,等.壳聚糖/淀粉/ZnO 复合膜的制备与性能[J].包装工程,2017,38(13):90-95
ZHENG Ke-wang, FU Mei-fang, HUANG Chao-fan, et al. Preparation and property of chiosan/starch/ZnO composite films [J]. Packaging Engineering, 2017, 38(13): 90-95

[24] 刘颖.羧甲基淀粉-壳聚糖复合膜的制备及性能研究[D].阜新:辽宁工程技术大学,2017:18-19
LIU Ying. Preparation and performance research of carboxymethyl starch-chitosan composite membrane [D]. Fuxin: Liao Ning Technology University, 2017: 18-19

[25] 张书艳,李琳,李冰,等.不同酰基改性淀粉结构及热稳定性研究[J].现代食品科技,2017,33(5):129-134
ZHANG Shu-yan, LI Lin, LI Bing, et al. Multi-scale structural features and thermal property discrepancies of acylated starch with different acyl groups [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(5): 129-134

[26] Joans J P, Nora J. F. Chitosan-starch beads prepared by ionotropic gelation as potential matrices for controlled release of fertilizers [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 148: 134-142

[27] Perez J J, Francois N J, Maroniche G A, et al. A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 202: 409-417