

中图分类号: R932; R284.1; R286.0
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.23.021

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2023)23-0096-04



高效液相色谱法测定维生素和矿物质复方制剂中维生素 K₂ 含量

杨善岩, 黄凤琴[△], 刘丽云, 冯锋将

(杭州民生健康药业股份有限公司, 浙江 杭州 311100)

摘要:目的 建立测定维生素和矿物质复方制剂中维生素 K₂(七烯甲萘醌)含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Thermo 30105-154630 型 ODS 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 50 ℃, 进样量为 50 μL。结果 七烯甲萘醌的质量浓度在 0~1.0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2 = 0.9999$, $n = 5$); 检测限为 0.12 μg/g, 定量限为 0.36 μg/g; 精密性、稳定性试验结果的 RSD 均小于 3% ($n = 6$); 平均加样回收率为 99.33%, RSD 为 2.98% ($n = 9$)。结论 该方法操作简便、结果准确、稳定性好, 可用于维生素和矿物质复方制剂中维生素 K₂ 的含量测定。

关键词: 维生素和矿物质复方制剂; 维生素 K₂; 高效液相色谱法; 七烯甲萘醌; 含量测定

Content Determination of Vitamin K₂ in Vitamin and Multivitamin Mineral Compound Preparation by HPLC

YANG Shanyan, HUANG Fengqin, LIU Liyun, FENG Fengjiang

(Hangzhou Minsheng Healthcare Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang, China 311100)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of the vitamin K₂ (menatrenone 7, MK-7) in multivitamin mineral compound preparation. **Methods** The chromatographic column was Thermo 30105-154630 ODS column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methyl alcohol, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 50 ℃, and the injection volume was 50 μL. **Results** The linear range of MK-7 was 0-1.0 μg/mL ($R^2 = 0.9999$, $n = 5$). The limit of detection (LOD) was 0.12 μg/g, and the limit of quantitative (LOQ) was 0.36 μg/g. The RSDs of precision and stability test results were all lower than 3% ($n = 6$). The average recovery of MK-7 was 99.33% with an RSD of 2.98% ($n = 9$). **Conclusion** This method is simple, accurate, and stable, which can be used for the content determination of vitamin K₂ in multivitamin mineral compound preparation.

Key words: multivitamin mineral compound preparations; vitamin K₂; HPLC; menatrenone 7; content determination

天然维生素 K 是一类脂溶性维生素, 有维生素 K₁ 和维生素 K₂ 两类^[1]。其中, 维生素 K₂ 又称甲萘醌, 是唯一具有生物活性的维生素 K, 维生素 K₁ 须在肝脏内转化为维生素 K₂ 才能被人体吸收。维生素 K₂ 为系列化合物^[1], 其中以七烯甲萘醌(MK-7)的生物活性和生物利用度最优^[2-4]。维生素 K₂ 是人体必需维生素, 参与骨骼代谢和骨细胞生长^[5], 日本于 1995 年首次将其作为骨质疏松药物应用于临床^[6]。近年的临床研究发现, 维生素 K₂ 具有广泛的生物活性和药用价值, 如促进凝血^[7]、防止并逆转心血管钙化^[8]、降低 2 型糖尿病风险^[9]、预防老年痴呆^[2]、预防肝硬化^[10]、抗肿瘤^[11-12]等。随着维生素 K₂ 药用价值的逐渐凸显, 其已成为药品和保健品添加剂的热点^[13-16]。维生素 K₂ 遇光和碱不稳定, 但耐酸、耐热, 多通过微囊包埋增加稳定性。包埋后有效提高了维生素 K₂ 的稳定性, 但也增加了检测难度。因为囊壳多为高分子材料, 检测前需用溶剂将囊壳溶解, 对维生素 K₂ 进行提取, 整个过程要避免光、碱对维生素 K₂ 的降解, 还

要保证提取完全。单一原料中维生素 K₂ 的检测方法相对简单, 采用异丙醇等溶剂直接萃取^[17-21], 但不适用于复方制剂, 特别是多种维生素和矿物质复方制剂。因为复方制剂基质复杂、不溶性成分较多, 直接萃取法存在难以定容、提取不完全、杂质干扰严重等问题, 严重影响定量的准确性。随着老龄化的加剧和人们健康意识的提高, 维生素 K₂ 相关的药品和保健品研发成为热点。但缺少适用于多种维生素和矿物质复方制剂中维生素 K₂ 的国标检测方法。故本研究建立了适用于测定多种维生素和矿物质复方制剂中维生素 K₂ 含量的高效液相色谱法, 为此类药品和保健品的开发及质量控制提供保障。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

BT125D 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器 < 北京 > 有限公司, 精度为十万分之一); 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); IKA Multi Drive MI 250 型粉

第一作者: 杨善岩, 男, 硕士研究生, 制药工程师, 研究方向为药品研发, (电子信箱)ysy152031@163.com。

[△]通信作者: 黄凤琴, 女, 硕士研究生, 制药工程师, 研究方向为药品研发, (电子信箱)2337208623@qq.com。

碎机(德国IKA公司);KQ-300DE型超声波振荡器(昆山市超声仪器有限公司,功率为1 000 W,频率为45 kHz);ST16R型离心机(美国Thermo公司)。

1.2 试药

21金维他®多种维生素矿物质片(小试样品,杭州民生健康药业股份有限公司,批号为H20H007);MK-7标准品(美国Usp Reference Standard公司,批号为R080L0,纯度为97.80%);甲醇、异丙醇(色谱纯,德国Merck公司);盐酸(分析纯,国药集团药业股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Thermo 30105-154630型ODS柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇;流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:50℃;进样量:50 μL。

2.2 溶液制备

精密量取浓盐酸(36.0%~38.0%)125 mL,置500 mL容量瓶中,用异丙醇定容,即得异丙醇-3 mol/L盐酸溶液。

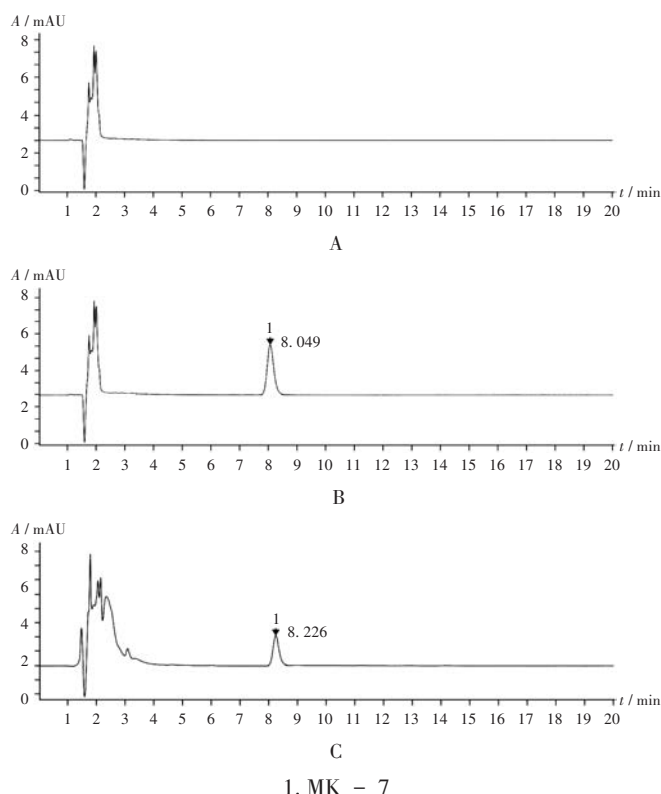
避光操作,取KM-7标准品10 mg,精密称定,置100 mL棕色容量瓶中,加适量异丙醇-3 mol/L盐酸溶液,超声15 min使溶解,定容,即得质量浓度为100 μg/mL的MK-7标准品贮备液;精密移取MK-7标准品贮备液1 mL,置10 mL棕色容量瓶中,加异丙醇-3 mol/L盐酸溶液稀释并定容,即得质量浓度为10 μg/mL的MK-7标准品溶液。

避光操作,取样品粉末(过80目筛)2.0 g,精密称定,置100 mL棕色容量瓶中,精密量取异丙醇-3 mol/L盐酸溶液50 mL,摇匀,超声[功率为(1 000±5)W,频率为45 kHz±5 kHz]振荡20 min(每10 min摇匀1次),超声结束后,常温离心(转速为8 000 r/min)10 min,取上清液,0.45 μm滤膜滤过,取滤液,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察^[22-24]

专属性试验:精密量取空白溶液(异丙醇-3 mol/L盐酸溶液)及2.2项下MK-7标准品溶液、供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液和MK-7标准品溶液色谱中均在7.5~8.5 min处有吸收峰,且空白溶液无干扰。详见图1。

线性关系考察:精密量取2.2项下MK-7标准品溶液(质量浓度为10 μg/mL)0.0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,用异丙醇-3 mol/L盐酸溶液溶解并定容至10 mL,即得质量浓度分别为0.0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 μg/mL的系列标准品溶液(临用现配),按2.1项下色谱条件进样测定,以MK-7标准品溶液质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程



1. MK-7
A. 空白溶液 B. MK-7标准品溶液 C. 供试品溶液

图1 专属性试验高效液相色谱图

1. MK-7

A. Blank solution B. MK-7 standard solution C. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of the specificity test

$Y = 65.47X + 0.04 (R^2 = 0.9999, n = 6)$ 。结果表明, MK-7标准品的质量浓度在0~1.0 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定:取MK-7标准品适量,按2.2项下方法制备质量浓度为0.001~0.020 μg/mL的标准品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定。以信噪比(S/N)为3时的标准品浓度确定检测限,以 S/N 为10时的标准品浓度确定定量限。结果检测限为0.12 μg/g,定量限为0.36 μg/g。

精密密度试验:取样品6份,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,按公式 $C = C_0V/m$ 计算含量(式中, C 为样品中MK-7的含量, C_0 为由标准曲线计算得到的样品中MK-7的含量, V 为样品定容体积, m 为样品质量)。结果含量的 RSD 为2.85% ($n = 6$),均值与理论值的偏差为1.67%,表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:取2.2项下MK-7标准品溶液适量,分别于室温放置0,1,2,4,8,12 h时按2.1项下色谱条件进样测定,计算MK-7标准品的含量。结果的 RSD 为0.99% ($n = 6$),表明MK-7标准品溶液在室温放置12 h内稳定性良好。

加样回收试验:取样品1.0 g,精密称定,共9份,分别置100 mL棕色容量瓶中,分别按低(80.00%)、中(100.00%)、高(120.00%)浓度加入质量浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的MK-7标准品溶液1.0,1.2,1.5 mL,各3份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n=9$)
Tab.1 Result of the recovery test ($n=9$)

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
1.022 3	12.473 0	10.0	22.843 3	103.70		
1.012 3	12.351 0	10.0	22.398 0	100.47		
1.016 9	12.407 1	10.0	22.130 0	97.23		
1.031 1	12.580 3	12.0	24.120 0	96.16		
1.025 7	12.514 5	12.0	24.100 4	96.55	99.33	2.98
1.008 9	12.309 5	12.0	24.606 2	102.47		
1.032 4	12.596 2	15.0	27.341 2	98.30		
1.021 1	12.458 3	15.0	27.815 1	102.38		
1.008 9	12.309 5	15.0	26.810 5	96.67		

3 讨论

3.1 前处理条件优化

维生素K₂人体需要量微小,在产品中的含量多以微克(μg)计,产品中往往含有一些不溶或难溶的原辅料,特别是一些复杂的维生素和矿物质复方制剂(如21金维他®)往往含有十几种甚至二十几种原辅料,样品前处理困难。因此,根据产品特点,通过提取液定量的形式,结合超声提取、离心分离法最大限度地提高维生素K₂的提取率。同时,为避免维生素K₂见光分解而影响检测的准确度,试验过程应全程避光。

3.2 色谱条件选择

影响检测结果准确量的最主要因素为前处理过程中维生素K₂的提取率,但文献[16]中记载的方法主要适用于维生素K₂含量较高的原料级别的测定,而维生素和矿物质复方制剂中维生素K₂含量较微量,故本研究中以50 μL 为进样量。

3.3 检测波长选择

取MK-7标准品适量,采用紫外-可见分光光度计于200~400 nm波长范围内扫描,结果MK-7标准品溶液于254 nm波长处有较大紫外吸收,故选择254 nm为检测波长。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、结果准确、稳定性好,符合相关指南^[22-24]要求,可满足药品、保健品领域研发或生产过程中多种维生素和矿物质复方制剂中维生素K₂的定量检测。

参考文献

- [1] 王 森. 生物化学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2017:223.
- [2] 董润铨. 维生素K₂的生物学效应及临床意义的研究进展[J]. 河南医学研究,2021,30(18):3451-3454.
- [3] SATO T, SCHURGERS LJ, UENISHI K. Comparison of menaquinone-4 and menaquinone-7 bioavailability in healthy women[J]. Nutrition Journal, 2012, 11:93.
- [4] MARLES RJ, ROE AL, OKETCHI - RABAH HA. US Pharmacopeial Convention safety evaluation of menaquinone-7, a form of vitamin K[J]. Nutrition Reviews, 2017, 75(7):553-578.
- [5] FLORE R, PONZIANI FR, DI RIENZO TA, et al. Something more to say about calcium homeostasis: the role of vitamin K₂ in vascular calcification and osteoporosis[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2013, 17(18):2433-2440.
- [6] 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.
- [7] 任芮君. 外源补充维生素K₂对健康人凝血功能的影响[D]. 南充:川北医学院,2021.
- [8] 谭 菲, 罗丽花, 彭 娟, 等. 维生素K₂对慢性肾脏病患者血管钙化的干预研究[J]. 中国医学创新, 2021, 18(32):156-160.
- [9] 郭安然, 刘秀香. 维生素K对2型糖尿病作用机制的研究进展[J]. 中国医药导报, 2022, 19(16):34-37.
- [10] 杨学颖, 刘璐璐, 陈杰鹏, 等. 维生素K₂对肝脏的保护作用[J]. 中国微生物学杂志, 2019, 31(8):985-988.
- [11] 王远涛. 维生素K₂诱导乳腺癌MCF-7细胞凋亡的研究[D]. 武汉:华中科技大学,2017.
- [12] DASARI S, SAMY ALPA, KAJDACSY - BALLA A, et al. Vitamin K₂, a menaquinone present in dairy products targets castration-resistant prostate cancer cell-line by activating apoptosis signaling[J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 115:218-227.
- [13] BRESSON JL, FLYNN A, HEINONEN M, et al. Vitamin K₂ added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses, food supplements and foods intended for the general population and vitamin K₂ as a source of vitamin K added for nutritional purposes to foodstuffs, in the context of Regulation (EC) No 258/97 - Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies [J]. The EFSA Journal, 2008, 11(6):822.
- [14] 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) [2023-01-12]. <http://down.foodmate.net/standard/search.php?corpstandard=2&fields=0&kw=Vitamin+K₂+%28menaquinone%29+from+Bacillus+subtilis+natto+as+a+novel+food+ingredient+under+Regulation>.
- [15] United States Pharmacopeial Convention. Dietary Supplements Compendium 2015 [M]. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2015:553.