

高效液相色谱法同时测定维生素 D₃ 和维生素 K₂ 的含量

刘光兰*, 郑良, 吴银, 陈宏璧

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法同时测定维生素 D₃ 和维生素 K₂ 的含量的分析方法。**方法** 以 95% 甲醇水: 异丙醇=(98:2, V:V) 为流动相, 梯度洗脱, 样品经 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 分离, 并于 264 nm 波长检测。**结果** 维生素 D₃ 在浓度 0.1282~1.2818 μg/mL 之间呈现良好的线性关系, $r^2=0.9999$, 平均回收率为 95.7%~100.7%, 相对标准偏差为 1.7%; 维生素 K₂ 在浓度 0.51397~5.1397 μg/mL 之间呈现良好的线性关系, $r=0.9999$, 平均回收率在 97.3%~100.7% 之间, 相对标准偏差为 1.3%。**结论** 该方法操作简便、准确、重现性好, 能同时测定维生素 D₃ 和维生素 K₂ 含量, 可在实验室推广。

关键词: 高效液相色谱法; 维生素 D₃; 维生素 K₂

Simultaneous determination of the content of vitamin D₃ and vitamin K₂ by high performance liquid chromatography

LIU Guang-Lan*, ZHENG Liang, WU Yin, CHEN Hong-Bi

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of vitamin D₃ and vitamin K₂ by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Using 95% methanol water: isopropanol (98:2, V:V) as mobile phase, gradient elution was performed. The sample was separated by C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) and detected at 264 nm wavelength. **Results** Vitamin D₃ had a good linear relationship in range of 0.1282-1.2818 μg/mL ($r=0.9999$), the average recovery were 95.7%-100.7%, with the RSD of 1.7%. Vitamin K₂ had a good linear relationship in range of 0.51397-5.1397 μg/mL ($r^2=0.9999$), the average recovery were 97.3%-100.7%, with the RSD of 1.3%. **Conclusion** This method is simple, accurate, and has a good reproducibility, which can be used for the simultaneous determination of vitamin D₃ and vitamin K₂ in health foods, and can be popularized in the laboratories.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; vitamin D₃; vitamin K₂

1 引言

维生素 D₃(胆钙化醇)是一种脂溶性维生素, 不溶于水, 只能溶解在脂肪或脂肪溶剂中, 在中性及碱性溶液中能耐高温和氧化, 主要是由人体自身合成的, 人体的皮肤含有一种胆固醇, 经阳光照射后, 就变成了维生素 D₃, 常用的

检测方法为高效液相色谱法^[1-4]。维生素 K₂^[5-12]是一种脂溶性维生素, 具有叶绿醌生物活性的萘醌基团的衍生物, 是人体中不可缺少的重要维生素之一, 常用的检测方法为高效液相色谱法^[13-16]。这 2 种成分各有单一的检测方法, 但方法操作步骤繁琐、耗时、试剂消耗大, 前处理周期长, 易造成各成分氧化, 导致结果重现性差。在以往的研究中,

*通讯作者: 刘光兰, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 1048005722@qq.com

*Corresponding author: LIU Guang-Lan, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 1048005722@qq.com

对其中一个成分研究的相关文献较多,但能同时检测维生素 D₃ 和维生素 K₂ 含量或者分离的研究不多。高效液相色谱法因其简便、成本低被广泛应用。本研究采用高效液相色谱法同时检测钙维生素 D 维生素 K 软胶囊中维生素 D₃ 和维生素 K₂ 含量,并优化其检测条件,达到简便、快速、精确、安全、稳定、重复性好的检测效果,为这 2 种物质的分离与研究提供一些依据,同时在临床研究上也有重要意义。

2 材料与amp;方法

2.1 仪器与试剂

15C 高效液相色谱仪(配紫外检测器,日本岛津公司);EQ-500 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm, 美国 Agilent 公司)。

维生素 D₃(批号: 100656; 含量: 99.9%, 德国 DR 公司);维生素 K₂(批号: R059X0; 含量: 99.8%, 美国 USP 公司);异丙醇、甲醇、正己烷(色谱纯, 德国 CNW 公司);无水乙醇、乙酸乙酯(分析纯, 广州化学试剂公司);钙维生素 D 维生素 K 软胶囊(汤臣倍健股份有限公司)。

2.2 仪器条件

色谱柱: C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm); 流动相: 以 95% 甲醇水: 异丙醇=(98:2, V:V), 梯度洗脱; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL; 检测器: 紫外检测器 264 nm; 运行时间: 53 min。梯度洗脱表见表 1。

表 1 梯度洗脱表
Table 1 Gradient elution

时间/min	95%甲醇-水溶液/%	异丙醇/%
0.01~20.00	98	2
20.01~38.00	50	50
38.01~42.00	0	100
42.01~45.00	50	50
45.01~53.00	98	2

2.3 测定方法

2.3.1 标准系列溶液的配制

(1) 标准储备液的配制

维生素 D₃: 精密称取维生素 D₃ 标准品 3.5 mg, 置于 250 mL 的棕色容量瓶中, 加入适量无水乙醇, 超声 3 min, 取出放至室温定容至刻度, 摇匀冷却至室温备用。

维生素 K₂: 精密称取维生素 K₂ 标准品 10 mg, 置于 100 mL 的棕色容量瓶中, 加入适量乙酸乙酯, 超声 3 min, 取出放至室温定容至刻度, 摇匀冷却至室温备用。

(2) 标准溶液的配制

维生素 D₃ 与维生素 K₂ 混合标液: 分别精密吸取维生素 D₃、维生素 K₂ 标准储备液 10.00 mL、2.50 mL 置于 25 mL 棕色容量瓶中, 用无水乙醇定容至刻度, 经 0.45 μm 滤膜过滤后, 分别精密吸取标准溶液 1、2、5、8、10 μL 进样。

2.3.2 供试品溶液配制

称取混匀的钙维生素 D 维生素 K 软胶囊内容物适量置 10 mL 容量瓶中, 加入正己烷: 无水乙醇=(20:80, V:V) 适量, 置于 60 °C 超声仪中超声 30 min 后, 取出放至室温, 用正己烷: 无水乙醇=(20:80, V:V) 定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜过滤后待进样。

2.3.3 稳定性实验

取同一批供试品溶液分别于 0、1、4、8、12、24 h 进样, 测定其峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

2.3.4 精密度实验

精密称取钙维生素 D 维生素 K 软胶囊内容物 6 份, 按 2.3.2 试样制备方法处理样品, 检测样品含量, 计算其 RSD。

2.3.5 加标回收率实验

精密称取约 1.1000 g 样品 9 份, 置于 10 mL 棕色容量瓶中, 分成 3 组, 每组 3 份, 于每一组中分别精密加入维生素 D₃ 标准溶液(浓度为 6.4091 μg/mL)0.60、0.80、1.00 mL, 加入维生素 K₂ 标准溶液(浓度为 10.2794 μg/mL)1.1、1.6、1.9 mL, 加入正己烷: 无水乙醇=(20:80, V:V) 适量, 置于 60 °C 超声仪中超声 30 min 后, 取出放至室温, 用正己烷: 无水乙醇=(20:80, V:V) 定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜过滤后, 作为加标样品溶液; 取该样品溶液 20 μL 进样。

3 结果与分析

3.1 色谱行为

采用高效液相色谱法能同时快速检测试样中的维生素 D₃ 和维生素 K₂, 不会因为其他杂质干扰目标物质等因素而影响检测。采用 95% 甲醇水: 异丙醇=(98:2 V:V), 梯度洗脱(见表 1), 53 min 就能把样品中维生素 D₃、维生素 K₂ 流出, 流动相的比例也能让维生素 D₃、维生素 K₂ 不受其他杂质峰的影响, 达到准确的分离和定量, 见图 1、图 2。

3.2 线性实验

维生素 D₃、K₂ 线性方程分别为 $Y=0.0000179204X+0.0035068$ 、 $Y=0.0000179204X+0.0035068$, 相关系数 r^2 均为 0.9999, 用该方法测定钙维生素 D 维生素 K 软胶囊中维生素 D₃ 的含量, 在浓度 0.1282~1.2818 μg/mL 之间呈现良好的线性关系; 测定钙维生素 D 维生素 K 软胶囊中维生素 K₂ 的含量, 在浓度 0.51397~5.13970 μg/mL 之间呈现良好的线性关系。

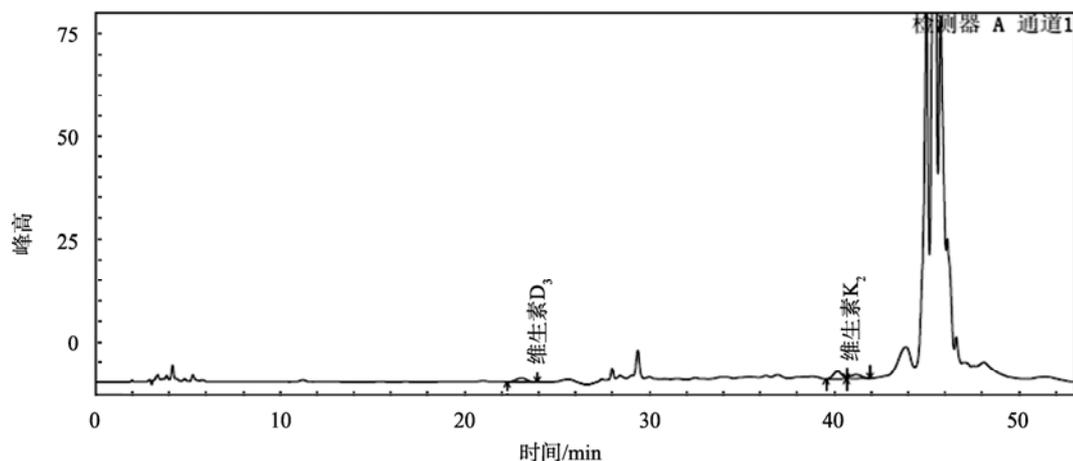


图 1 样品色谱图

Fig.1 Chromatogram of the sample

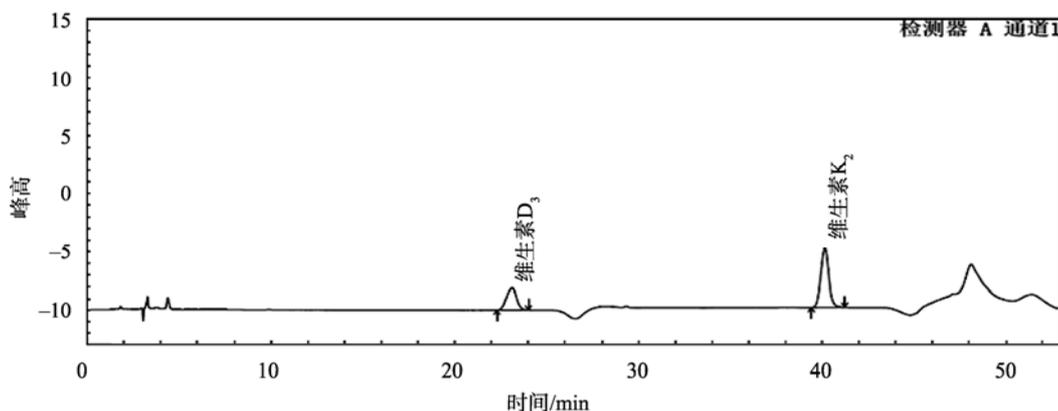


图 2 混合标准品色谱图

Fig.2 Chromatogram of mixed standard

3.3 检出限

分析方法的检出限(limit of detection limit, LOD)和定量限(limit of quantitation limit, LOQ)由信噪比(S/N)计算。LOD 定义为 $S/N=3$ 时对应的待分析物浓度, LOQ 定义为 $S/N=10$ 时对应的分析物浓度。

结果显示, 维生素 D₃ 和维生素 K₂ 的检出限分别为 10.51 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 、24.55 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。维生素 D₃ 和维生素 K₂ 的定量限分别为 35.03 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 、81.82 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。

3.4 稳定性

取同一批供试品溶液分别于 0、1、4、8、12、24 h 进样, 其峰面积的 RSD 分别为 1.5%、4.3%, 说明供试品溶液的维生素 D₃ 和维生素 K₂ 在 24 h 内较稳定。

3.5 精密度

精密度结果见表 2、表 3。结果显示, 维生素 D₃ 和维

生素 K₂ 的相对标准偏差(RSD)分别为 3.6%、3.3%, 具有较好的精密度。

3.6 加标回收率

在不同添加水平下, 钙维生素 D 维生素 K₂ 软胶囊中维生素 D₃ 和维生素 K₂ 方法的回收率范围分别为 95.7%~100.7%、97.3%~100.7%, 相对标准偏差(RSD)分别为 1.7%、1.3%。此液相色谱法对维生素 D₃ 和维生素 K₂ 的含量测定科学有效。

4 小结

本研究建立了高效液相色谱法同时测定钙维生素 D 维生素 K₂ 软胶囊中维生素 D₃ 和维生素 K₂ 的含量, 用 95% 甲醇水:异丙醇=(98:2 V:V), 流速: 1.0 mL/min, 可以获得良好的分离效果。该方法操作简便灵敏度高、精密度好, 在实际工作中大大提高了实验的效率, 达到快速检测的要求。

表 2 维生素 D₃ 精密度实验结果(n=6)
Table 2 The precision of Vitamin D₃ results(n=6)

序号	称样量/g	稀释体积/mL	浓度/(μg/mL)	测定结果/(μg/g)	平均含量/(μg/g)	RSD/%
1	1.1764	10	0.64518	5.484	5.20	3.6
2	1.1955	10	0.62877	5.259		
3	1.1706	10	0.61975	5.294		
4	1.1434	10	0.57079	4.992		
5	1.1325	10	0.56894	5.023		
6	1.1455	10	0.5929	5.175		

表 3 维生素 K₂ 精密度实验结果(n=6)
Table 3 The precision of Vitamin K₂ results(n=6)

序号	称样量/g	稀释体积/mL	浓度/(μg/mL)	测定结果/(μg/g)	平均含量/(μg/g)	RSD/%
1	1.1764	10	2.0006	17.006	17.06	3.3
2	1.1955	10	2.13824	17.885		
3	1.1706	10	2.05549	17.559		
4	1.1434	10	1.88998	16.529		
5	1.1325	10	1.9088	16.854		
6	1.1455	10	1.89086	16.506		

参考文献

- 徐军, 张慧芬, 邵裕坤, 等. 高效液相色谱法测定人血中脂溶性维生素的含量[J]. 中国药理学杂志, 2006, (41): 147-149.
Xu J, Zhang HF, Shao YK, *et al.* Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D₃, 25-OH-D₃, E and β-carotene in human serum by HPLC [J]. Chin Pharm J, 2006, (41): 147-149.
- 谭青松, 付洁, 何瑞国. 高效液相色谱法测定鱼样中的维生素 A、维生素 D₃ 和维生素 E [J]. 动物营养学报, 2007, 19(5): 636-640.
Tan QS, Fu J, He RG. Simultaneous measurement of vitamin A, vitamin D₃ and vitamin E in fish tissue by HPLC [J]. Chin J Anim Nutr, 2007, 19(5): 636-640.
- 蒋晔, 刘红菊, 郝晓花. 4 种脂溶性维生素的非水反相 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(2): 93-94.
Jiang Y, Liu HJ, Hao XH. Determination of four fat-soluble vitamins by nonaqueous RP-HPLC [J]. Chin J Pharm, 2005, 36(2): 93-94.
- 凌龙, 胡海澜, 曹燕明, 等. 维生素 K₂ 联合维生素 D₃ 治疗青壮年早期膝骨关节炎的研究[J/CD]. 中华关节外科杂志(电子版), 2018, 12(2): 197-202.
Ling L, Hu HL, Cao YM, *et al.* Effect of vitamin K₂ combined with vitamin D₃ on young patients of early osteoarthritis of knee [J/CD]. Chin J Joint Surg (Elect Ed), 2018, 12(2): 197-202.
- 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 J Osteoporos 2016, 22(12): 1597-1600.
- 张殿元. 维生素 K 缺乏所致颅内出血 33 例综合报告[J]. 中华儿科杂志, 1982, 20(4): 221.
Zhang DY. A comprehensive report of 33 cases of intracranial hemorrhage caused by vitamin K deficiency [J]. Chin J Pediat, 1982, 20(4): 221.
- 王艳红, 刘银坤, 叶胜龙, 等. 维生素 K₂ 对人肝癌细胞的抗黏附和抗侵袭作用[J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(12): 220.
Wang YH, Liu YK, Ye SL, *et al.* The anti-adhesion and anti-invasion effect of vitamin K₂ on human liver cancer cells [J]. Chin J Oncol, 2004, 26(12): 220.
- 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 J Osteoporos, 2005, 11(3): 389-392.
- 吴元锋, 郑裕国. 微生物法生产维生素 K₂(MK)[J]. 科技通报, 2004, 20(5): 428-433.
Wu YF, Zheng YG. Microbial production of vitamin K₂ (MK) [J]. Bull Sci Technol, 2004, 20(5): 428-433.
- 刘倩, 阳延松, 莫薇薇, 等. 维生素 K₂ 及 Gas6 与维持性血透患者血管钙化相关性研究[J]. 海南医学, 2017, 28(5): 696-697.
Liu Q, Yang YS, Mo WW, *et al.* Correlation between vitamin K₂, Gas6 and vascular calcification in maintenance hemodialysis patients [J]. Hainan Med J 2017, 28(5): 696-697.
- 赵明杰, 黄静静, 王伟伟, 等. 不同血液透析方式对维生素 K₂ 及腹主动脉钙化的影响[J]. 实用医学杂志, 2018, 33(8): 1323-1326.
Zhao MJ, Huang JJ, Wang WW, *et al.* Effects of different hemodialysis methods on vitamin K₂ and abdominal aortic calcification [J]. J Pract Med, 2018, 33(8): 1323-1326.

[12] 王萍, 陈丽艳, 孙银玲, 等. 基于维生素 K₂ 的纳豆发酵条件优化[J]. 食品工业, 2018, 39(7): 54-57.
Wang P, Chen LY, Sun YL, *et al.* Optimization of natto fermentation conditions based on vitamin K₂ [J]. Food Ind, 2018, 39(7): 54-57.

[13] 曾红燕, 邹晓莉, 黎源倩, 等. HPLC 同时测定保健食品中维生素 A、D₃、E 和 β-胡萝卜素[J]. 分析试验室, 2008, 2(27): 15-18.
Zeng HY, Zhou XL, Li YQ, *et al.* Simultaneous determination of retinol, vitamin D₃, tocopherol and β-carotene in health food by HPLC [J]. Chin J Anal Lab, 2008, 2(27): 15-18.

[14] 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]. 分析试验室, 2009, 5(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.

[15] 胡代花, 张嘉昕, 韩豪, 等. UPLC 法快速测定婴儿维生素 D₃ 滴剂、维生素 D₃ 片、维生素 AD 滴剂及维生素 D₂ 片中维生素 D₃ 和维生素 D₂[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(8): 1409-1414.
Hu DH, Zhang JX, Han H, *et al.* Rapid determination of vitamin D₃, D₂ in

baby vitamin D₃ drops, vitamin D₃ tablets, vitamin AD drops and vitamin D₂ tablets by UPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(8): 1409-1414.

[16] 徐建中, 王颖好, 严为留, 等. 维生素 K₂ 合成途径中主要酶对 MK-7 产量的影响[J]. 生物技术通报, 2016, 32(11): 248-254.
Xu JZ, Wang YY, Yan WL, *et al.* Effects of major enzymes in the biosynthetic pathway of vitamin K₂ on MK-7 production [J]. Biotechnol Bull, 2016, 32(11): 248-254.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



刘光兰, 主要研究方向为保健食品的质量检测。
E-mail: 1048005722@qq.com



“动物性食品质量与安全”专题征稿函

动物性食品是人们食品的重要组成部分, 这类食品含有丰富蛋白质、脂肪、碳水化合物、矿物质等。然而这类食品容易腐败变质, 且养殖环境的污染、饲料的污染也会对动物源食品安全造成危害, 从而影响消费者健康。

鉴于此, 本刊特别策划了“动物性食品质量与安全”专题, 由中国农业科学院饲料研究所李俊研究员担任专题主编, 主要围绕动物性食品及饲料中农兽药残留、违禁添加物、霉菌毒素、环境污染物的检测、加工贮藏与品质控制、营养成分分析等方面或您认为有意义的相关领域展开论述和研究, 综述及研究论文均可。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 学报主编吴永宁研究员和专题主编李俊研究员特邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。本专题计划在 2019 年 5 月出版, 请在 2019 年 4 月 1 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 再次感谢您的关怀与支持!

谢谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题: 动物性食品质量与安全”)

E-mail: jfoodsqa@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部