

反相高效液相色谱法 测定维生素 K₂ 软胶囊中 K₂ (20) 含量

木晓云^{1,2}, 董跃伟³, 温晓江^{1,2}, 付正启^{1,2}, 雷 泽^{1,2}, 方瑞斌¹, 朱洪友^{* 1,3}

- (1. 云南大学化学科学与工程学院, 云南大学教育部自然资源药物化学重点实验室, 昆明 650091;
2. 昆明云大医药开发有限公司, 昆明 650022; 3. 云南省食品药品检验所, 昆明 650022)

摘 要: 采用外标法测定维生素 K₂ 软胶囊中维生素 K₂ (20) 的含量, 建立了维生素 K₂ (20) 软胶囊含量的 RP-HPLC 测定方法。色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇, 检测波长为 270 nm, 流速为 1.0 mL/min, 线性范围为 0.014 ~ 0.41 μg ($r = 0.9997$)。本法操作简便, 重现性好, 可用于维生素 K₂ (20) 软胶囊质量标准的建立及含量测定。

关键词: 维生素 K₂ (20); 软胶囊; 含量; 反相高效液相色谱法

维生素 K₂ 具有良好的促进凝血^[1,2]、尤其是防治骨质疏松的功效^[3,4]。维生素 K₂ 能促进骨芽细胞的生长, 抑制破骨细胞的产生, 从根本上增加骨密度, 在治疗或抑制骨质疏松方面疗效显著^[5~7], 同时还能改善动脉硬化, 对肝癌^[8]和白血病^[9,10]也有预防和治疗作用。其中, 维生素 K₂ (20) (MK₄) 是维生素 K₂ 系列化合物中具有很高活性及药用价值的几种重要化合物之一 (图 1)。早在 1995 年日本已经将维生素 K₂ 作为骨质疏松治疗药物^[11]。

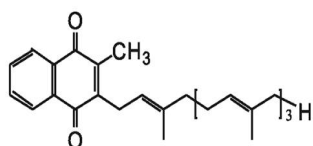


图 1 维生素 K₂ (20) 的结构

我们在国内率先成功实现维生素 K₂ (20) 原料生产的基础上, 开发了以大豆油为基质的维生素 K₂ 软胶囊保健制剂。参考维生素 K₂ (20) 原料药^[12]及国外对水果、蔬菜、食品及血清中维生素 K 的含量测定方法^[13~15], 对维生素 K₂ 软胶囊中 K₂ (20) 的含量测定进行了研究, 为该产品质量标准

的制定及质量控制提供了依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪 (G1314A-VWD 可变波长检测器, G1313A-ALS 自动进样仪, 美国 Agilent 公司)。

维生素 K₂ (20) 标准品 (Sigma 公司); 维生素 K₂ (20) 软胶囊样品 3 批 (昆明云大医药开发有限公司出品, 批号: 070716, 070730, 070813); 甲醇 (Fisher 色谱纯, 批号: 056152); 异丙醇 (上海试四赫维化工有限公司, 分析纯, 批号: 0708101)。

1.2 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇, 检测波长: 270 nm, 流速: 1.0 mL/min, 进样量: 20 μL。

1.3 溶液配制

1.3.1 维生素 K₂ (20) 标准品 所有操作必须避光进行。精密称取维生素 K₂ (20) 标准品适量, 加异丙醇溶解并定量稀释制成含维生素 K₂ (20) 0.014 mg/mL 的溶液。

1.3.2 供试品 所有操作必须避光进行。精密称取软胶囊内容油约 5.0 g, 置于 100 mL 棕色容量瓶

* 基金项目: 科技型中小企业创新基金 (05C26215301427) 项目资助

作者简介: 木晓云 (1972 -), 男, 硕士; E-mail: hongyouzhu @Sohu.com

中,加异丙醇溶解并稀释至刻度,摇匀。微孔滤膜(0.45 μm)过滤,取续滤液,即得。

1.3.3 阴性对照溶液 取不含维生素 K_2 (20) 的大豆油,按供试品溶液的配制方法制得阴性对照溶液,即得。

1.4 系统适用性实验

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,甲醇为流动相,检测波长为 270 nm。理论塔板数按维生素 K_2 (20) 计算不低于 20000,主成分峰与杂质峰的分离度大于 10,见图 2~图 4。图谱表明,阴性对照溶液色谱峰不干扰供试品溶液色谱峰中的维生素 K_2 (20) 峰。

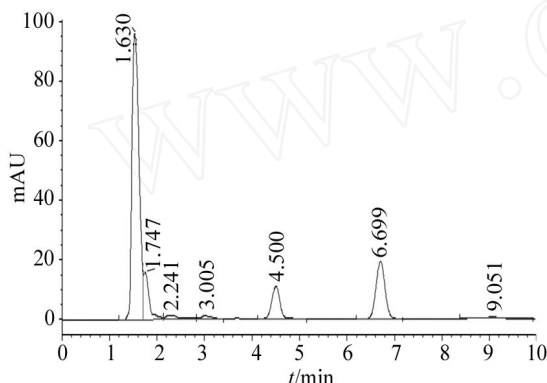


图 2 供试品图谱

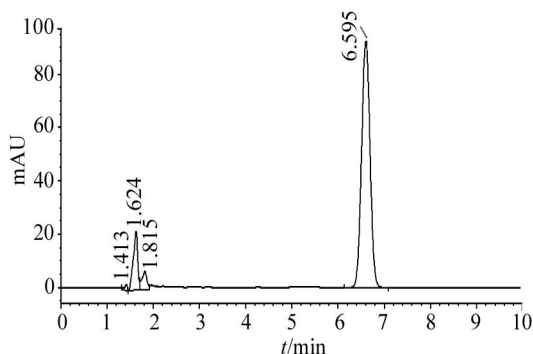


图 3 维生素 K_2 (20) 标准品图谱

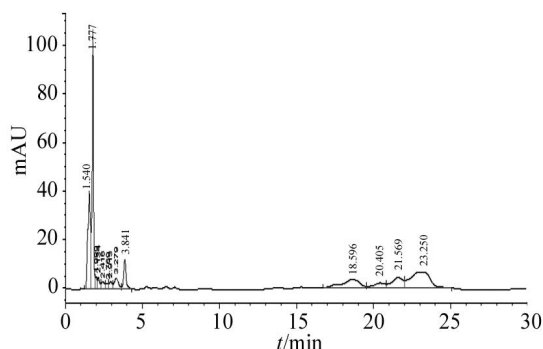


表 1

序号	取样量/mg	样品含量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	4992.1331	0.6739	2.4713	97.86		
2	5035.2175	0.6797	2.4735	97.72		
3	5079.4052	0.6857	2.4740	97.51	97.50	0.51
4	5014.3971	0.6769	2.4721	97.77		
5	4844.6012	0.6540	2.4216	96.65		

注：标准品加入量为 1.8515 mg

2 结果与讨论

用液相色谱法测定胶囊剂的含量时，一般需先用其它分离方法(如柱层析)将检测目标分离富集。本试验曾用柱层析分离富集，但维生素 K₂ (20) 见光易分解的特性，使得分离过程易造成损失，检测误差大；萃取法也因维生素 K₂ (20) 与基质大豆油极性相近，无法实现分离。通过试验，基质大豆油的存在对维生素 K₂ (20) 的含量测定没有影响，因此本试验采用直接溶解进样的方法检测。本检测方法省去了常规的样品前处理过程，方法简单可靠、重现性好，可用于维生素 K₂ 软胶囊中 K₂ (20) 的含量检测及质量控制。

参考文献

[1] H J Almquist, E L R Stokstad. *Journal of Boilological Chemistry*, 1935, 111: 105
[2] 张殿元. *中华儿科杂志*, 1982, 20(1): 220
[3] Cees vermeer, H J Marjo. *J Clin Pathol*, 1998, 51:424
[4] 陈连元, 郭荣荣, 张利. *山西医药杂志*, 2000,

29(4): 269

[5] P Weber. *Nutrition*, 2001, 17(10): 880
[6] Y Takeuchi, M Suzawa, S Fukumoto *et al.* *Bone*, 2000, 27(6): 769
[7] T Kameda, K Miyazawa, Y Mori. *Biochemical and biophysical research communications*, 1996, 220: 515
[8] 王艳红, 刘银坤, 叶胜龙等. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(12): 220
[9] 王艳丽, 滕容, 杨洪娟等. *南通大学学报(医学版)*, 2005, 25(4): 255
[10] A K Miyazaw, M Yaguchi, K Funato *et al.* *Leukemia*, 2001, 15: 1111
[11] 邹志强. *中国骨质疏松杂志*, 2005, 11(3): 389
[12] 木晓云, 董跃伟, 温晓江等. *云南大学学报(自然版)*, 2008, 30(4): 405
[13] E M Kirk, A F Fell. *Clin Chem*, 1989, 35: 1288
[14] T Sakano, T Nagaoka, A Morimoto *et al.* *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, 1986, 34: 4322
[15] S J Elder, D B Haytowitz, J Howe *et al.* *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 463