

高效液相色谱法测定维生素 K₁ 原料药中维生素 K₁ 及顺式异构体的含量

LC-356

摘要： 本文利用岛津高效液相色谱仪，建立了一种维生素 K₁ 原料药中维生素 K₁ 及顺式异构体含量的正相高效液相色谱法。本方法参照《中国药典(2020年版)》中维生素 K₁ 的含量测定方法，使用硅胶柱为分离色谱柱，体积比 2000:1.5 的石油醚（沸程 60°C ~90°C）- 正戊醇为流动相，等度洗脱，用紫外检测器在 254 nm 处进行检测，按内标法以顺、反式异构体峰面积的和计算维生素 K₁ 含量；按峰面积归一化法计算维生素 K₁ 顺式异构体含量。该分析方法操作简单，重复性好，满足相关标准的要求，可用于维生素 K₁ 原料药中维生素 K₁ 及顺式异构体含量的检测。

关键词： 正相 高效液相色谱 维生素 K₁ 异构体

技术特点：

- ❖ 满足《中国药典(2020年版)》中维生素 K₁ 的含量测定方法的相关要求。
- ❖ 操作简单，重复性好。

维生素 K₁ 属维生素类药物，是肝脏合成因子 II、VII、IX、X 所必须的物质，主要用于各种维生素 K 缺乏引起的出血性疾病的治疗。维生素 K₁，又名植物甲萘醌、叶绿基甲萘醌、叶绿醌，化学名称为 2- 甲基 -3-(3,7,11,15- 四甲基 -2- 十六碳烯基) -1,4- 萘二酮，其分子侧链上有一个双键，因而存在顺反异构体。天然维生素 K₁ 是 2,3- 反式构型，化学合成品多为顺式和反

式异构体的混合物，而顺式异构体几乎没有生理活性。因此 20 世纪 80 年代以后，各国药典均对维生素 K₁ 的顺式异构体规定了限量（顺式异构体 ≤ 21%）。

本方法参照《中国药典(2020年版)》中维生素 K₁ 的含量测定方法，建立了相关分析方法。该分析方法操作简单，重复性好，满足相关标准的要求，可用于维生素 K₁ 原料药中维生素 K₁ 及顺式异构体含量的检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

本文使用岛津 LC-16 液相色谱仪，配置信息如下：

系统控制器：	CBM-20Alite	输液泵：	LC-16
自动进样器：	SIL-16	柱温箱：	CTO-16L
脱气机：	DGU-20A	检测器：	SPD-16

1.2 分析条件

色谱柱：	硅胶色谱柱，250 mm × 4.6 mm ID., 5 μm	流速：	1.0 mL/min
流动相：	石油醚（沸程 60°C ~90°C）：正戊醇 = 2000:1.5 (V/V)	进样体积：	10 μL
柱温：	40°C	检测波长：	254 nm
洗脱方式：	等度洗脱		
分析时间：	20 min		

1.3 溶液配制

1.3.1 试剂

正戊醇，色谱纯；石油醚（沸程 60°C ~90°C），色谱纯；维生素 K₁ 对照品，99.7%；内标苯甲酸胆甾酯；维生素 K₁ 原料药，某实验室合成产品。

1.3.2 内标溶液、供试品溶液、对照品溶液的配制

按照中国药典维生素 K₁ 项目下含量测定中内标溶液、供试品溶液、对照品溶液的配制要求进行溶液配制，得到内标溶液： $\rho_{\text{苯甲酸胆甾酯}}=1.5176 \text{ mg/mL}$ ；供试品溶液： $\rho_{\text{供试品}}=200.8 \text{ mg/L}$ ， $\rho_{\text{苯甲酸胆甾酯}}=151.76 \text{ mg/L}$ ；对照品溶液： $\rho_{\text{维生素 K}_1}=207.53 \text{ mg/L}$ ， $\rho_{\text{苯甲酸胆甾酯}}=151.76 \text{ mg/L}$ 。

■ 结果与讨论

2.1 色谱图结果

维生素 K₁ 对照品溶液及供试品溶液色谱图见图 1，化合物信息见表 1。

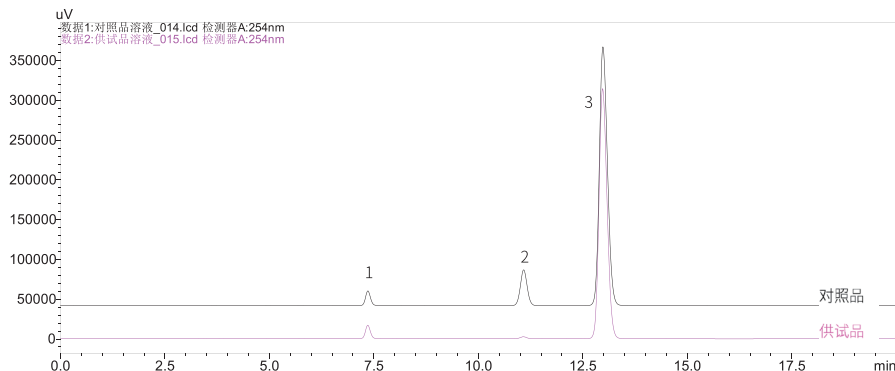


图 1 对照品溶液及供试品溶液色谱图

表 1 化合物信息

No.	化合物	英文名称	CAS 号	保留时间 (min)
1	内标苯甲酸胆甾酯	Cholesteryl benzoate	604-32-0	7.362
2	维生素 K ₁ 顺式异构体	cis-Vitamin K1	16033-41-3	11.090
3	维生素 K ₁ 反式异构体	Vitamin K1	84-80-0	12.987

2.2 重复性实验

将对照品溶液进样 6 次，考察方法的精密度，对照品溶液的重复性结果如表 2 所示。结果表明：对照品溶液的内标苯甲酸胆甾酯、维生素 K₁ 顺式异构体和维生素 K₁ 反式异构体的分离度 R 均大于 1.5，保留时间重复性 RSD 均小于 0.2%，峰面积重复性 RSD 小于 1.5%。

表 2 对照品溶液重复性实验结果 (n=6)

No	内标苯甲酸胆甾酯		维生素 K ₁ 顺式异构体		维生素 K ₁ 反式异构体	
	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积
1	7.390	145975	11.138	502695	13.045	4289086
2	7.379	146548	11.118	504559	13.019	4305423
3	7.373	147153	11.110	506552	13.011	4322623
4	7.370	147779	11.104	508927	13.003	4341533
5	7.365	148343	11.097	510848	12.995	4358022
6	7.362	149003	11.090	513193	12.987	4376883
平均值	7.373	147467	11.109	507796	13.010	4332262
RSD (%)	0.140	0.767	0.153	0.777	0.159	0.760

2.3 供试品中维生素 K₁ 和顺式异构体含量的计算

将供试品溶液进样 6 次，按照方法要求计算供试品中维生素 K₁ 及顺式异构体含量，各组分色谱峰的保留时间和峰面积结果见表 3，维生素 K₁ 及维生素 K₁ 的顺式异构体含量见表 4。

表 3 供试品溶液重复性实验结果 (n=6)

No	内标苯甲酸胆甾酯		维生素 K ₁ 顺式异构体		维生素 K ₁ 反式异构体	
	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积
1	7.360	136771	11.084	28214	12.979	4208001
2	7.356	137051	11.075	28266	12.968	4214464
3	7.351	137684	11.065	28606	12.954	4234241
4	7.354	138516	11.071	28735	12.963	4257517
5	7.357	139021	11.076	29049	12.968	4278806
6	7.361	140028	11.084	29269	12.978	4305937
平均值	7.357	138178	11.076	28690	12.968	4249828
RSD (%)	0.049	0.900	0.066	1.462	0.071	0.898

表 4 供试品维生素 K₁ 及维生素 K₁ 的顺式异构体含量结果

含量	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD (%)
维生素 K ₁ (%)	97.53	97.48	97.49	97.44	97.57	97.49	97.5	0.042
维生素 K ₁ 顺式异构体 (%)	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.68	0.67	0.555

■ 结论

本文利用岛津 LC-16 高效液相色谱仪，建立了一种维生素 K₁ 原料药中维生素 K₁ 及其顺式异构体含量的正相高效液相色谱法。其中对照品溶液和供试品溶液各分析 6 次，对照品溶液和供试品溶液的内标苯甲酸胆甾酯、维生素 K₁ 顺式异构体和反式异构体的分离度 R 均大于 1.5，保留时间重复性 RSD 均小于 0.2%，峰面积重复性 RSD 小于 1.5%。该分析方法操作简单，重复性好，满足药典要求，可用于维生素 K₁ 原料药中维生素 K₁ 含量及顺式异构体的含量的检测。

岛津应用云

