

维生素K₁含量测定方法的探讨

柯友彬 (浙江省温州市第三制药厂, 洞头 325700)

维生素K₁为维生素类药, 主要用于维生素K缺乏症及低凝血酶原血症, 其结构的侧链上有一双键, 存在着几何异构现象。天然维生素K₁是2', 3'—反式构型, 而合成品为顺式和反式异构体的混合物。顺式异构体几乎没有生理活性, 为控制顺式

异构体的量及测定顺式和反式异构体的含量, 中国药典, 美国药典均采用高效液相色谱法。二者均采用相同色谱柱, 以苯甲酸胆甾脂为内标, 测定波长为254 nm; 其差异前者用石油醚(60—90°C)—正戊醇(2000:2.5)为流动相, 后者用正己烷—正戊醇

(2000:1.5)为流动相。本文通过对内标物和 VK_1 对照品在两种流动相溶液中紫外吸收图谱分析及正己烷与石油醚的光谱纯度考察,认为两种流动相体系的色谱性能基本一致,但为减少内标物用量,提高异式维生素 K_1 的测定准确性,宜将测定波长设为 246 nm 处,经样品测试结果与药典法比较,两者较一致。

实验部分

1 仪器与试剂

- UV-265紫外分光光度计(日本岛津公司)
- SP-1000型高效液相色谱仪(美国物理光谱公司)
- 苯甲酸胆甾脂(日本东京化成工业株式会社)
- 维生素 K_1 对照品(中国药品生物制品检定所)
- 维生素 K_1 原料药若干批(温州第三制药厂)
- 石油醚、正己烷(杭州炼油厂,杭州医药站)

2 两种流动相中内标物和维生素 K_1 的紫外吸收谱

用维生素 K_1 对照品和内标物分别用石油醚—正戊醇(2000:2.5)流动相配制制成 30 ug/ml 和 15 ug/ml 的测试溶液,以空气为空白,在 200—400 nm 波长范围内,分别记录紫外吸收谱,结果见图 1。维生素 K_1 在两流动相体系中均显示 243, 249, 261, 270 与 327 nm 的波长处有最大吸收。在 246 与 254

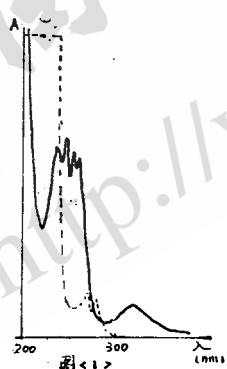
nm 处为维生素 K_1 紫外吸收谷处,其吸收度值分别为 1.15 与 1.01 A。内标物溶液在 254 nm 处吸收度值仅为 0.2 A,而在 246 nm 处内标物的紫外吸收度值为 1.0 A 与维生素 K_1 的紫外吸收度值相差较小。维生素 K_1 和内标物在正己烷—正戊醇(2000:1.5)流动相中的紫外吸收谱呈相似情况,在 246 nm 波长处维生素 K_1 与内标的吸收度相近。

3 正己烷与石油醚的紫外吸收谱

在 200—400 nm 波长范围内,以空气为空白,对分析用石油醚与正己烷两种溶剂紫外吸收谱扫描,可知分析纯石油醚(60—90°C)的紫外吸收谱较复杂,在 250 nm 处显示较大紫外吸收而光谱纯石油醚与正己烷在大于 220 nm 波长区紫外吸收度值均小于 0.12 A。

4 样品测试

按中国药典标准,配制维生素 K_1 供试溶液浓度为 0.2 mg/ml,内标物浓度为 0.15 mg/ml,其液相色谱图显示内标峰面积与异式 VK_1 峰面积相差甚大见图 2(a)。为准确定量,使内标峰面积与异式 VK_1 峰面积相当,美国药典将供试溶液中内标浓度加大至 0.7 mg/ml,使两者峰面积基本一致。鉴于内标物和维生素 K_1 在 246 nm 波长外紫外吸收度相近的特征,我们按中国药典配制供试品溶液,将测定波长改为 246 nm 处,测试结果见表 1。液相色谱图见图 2(b)。



图(1)

紫外吸收光谱图

- 石油醚—正戊醇流动相为溶剂
- 维生素 k_1 (30ug/ml)
- 内标(15ug/ml)

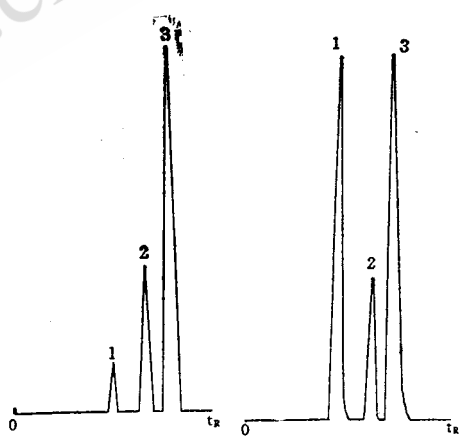


图 2 样品测试色谱图

(a)入测=254nm (b)入测=246nm

1. 内样 2. 顺式维生素 k_1 3. 反式维生素 k_1

收稿日期: 1993-12-18

讨 论

1 从色谱图可知测定维生素 K₁ 的上述两种流动相体系均能保证顺式和反式异构体有足够的分离度 $RS \geq 1.5$, 但石油醚的组分较复杂, 同一馏程(60—90°C)的石油醚紫外吸收截止值相差较大, 故选用光谱纯石油醚为宜。

2 内标物苯甲酸胆甾脂价格昂贵, 溶解度较差, 选择246 nm 处为测定波长, 既节省内标用量, 又有利于维生素 K₁ 的准确定量。

批 号	药典法 (%)	本 法 (%)
930501	95.7	96.3
630502	95.2	96.0
930503	98.7	98.9
930510	99.2	98.4
930518	99.0	99.7
930509	100.4	101.0