

反相高效液相色谱法测定维生素 K<sub>2</sub>(20)<sup>\*</sup>木晓云<sup>1,2</sup>, 董跃伟<sup>3</sup>, 温晓江<sup>1,2</sup>, 付正启<sup>1,2</sup>, 雷泽<sup>1,2</sup>, 方瑞斌<sup>1</sup>, 朱洪友<sup>1,3</sup>

(1. 云南大学 教育部自然资源药物化学重点实验室, 云南 昆明 650091; 2. 昆明云大医药开发有限公司, 云南 昆明 650022;

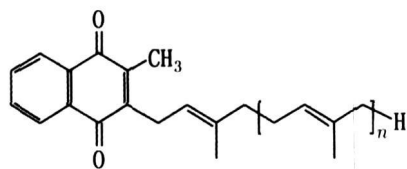
3. 云南省食品药品检验所, 云南 昆明 650022)

**摘要:** 采用外标法测定维生素 K<sub>2</sub>(20) 的含量, 建立了维生素 K<sub>2</sub>(20) 的 RP-HPLC 测定方法. 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm × Φ4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇, 检测波长为 270 nm, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 线性范围为 0.04~0.4 mg·mL<sup>-1</sup> (r = 0.9996). 方法操作简便, 重现性好, 可用于维生素 K<sub>2</sub>(20) 的含量测定.

**关键词:** 维生素 K<sub>2</sub>(20); 测定; 反相高效液相色谱法

**中图分类号:** R 927.2    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0258-7971(2008)04-0405-03

维生素 K<sub>2</sub> 是一系列含有 2-甲基-1,4-萘醌母核及 C<sub>3</sub> 位带有数目不等的异戊二烯结构单元的萜烯侧链化合物的统称, 其中最为重要的是维生素 K<sub>2</sub>(20), K<sub>2</sub>(35) (图 1). 维生素 K<sub>2</sub> 具有良好的促进凝血<sup>[1,2]</sup>、预防和治疗骨质疏松的功效<sup>[3,4]</sup>, 同时还能改善动脉硬化, 对肝癌<sup>[5]</sup> 和白血病<sup>[6,7]</sup> 也有预防和治疗作用, 早在 1995 年日本已经将维生素 K<sub>2</sub> 作为骨质疏松治疗药物<sup>[8]</sup>. 维生素 K<sub>2</sub> 主要通过化学合成生产, 也可通过微生物发酵获得<sup>[9,10]</sup>. 国内对维生素 K<sub>2</sub> 的研究起步较晚, 目前, 尚无批量生产的报道. 我们利用自主开发的技术完成了维生素 K<sub>2</sub>(20) 合成的小试及中试研究, 填补了该项技术的国内空白.



$n=3$ , VK<sub>2</sub>(20);     $n=6$ , VK<sub>2</sub>(35)

图 1 维生素 K<sub>2</sub>(20), K<sub>2</sub>(35) 的结构

Fig. 1 The structures of vitamin K<sub>2</sub>(20), K<sub>2</sub>(35)

鉴于国内尚无维生素 K<sub>2</sub>(20) 的含量测定方法报道, 也无法查阅到国外维生素 K<sub>2</sub>(20) 原料药含量的测定方法, 我们参考药典<sup>[11]</sup> 和国外对水果、蔬菜、食品及血清等中维生素 K<sub>1</sub>、维生素 K<sub>2</sub> 的含量测定方法<sup>[12-17]</sup>, 利用高效液相色谱对原料药维生素 K<sub>2</sub>(20) 的含量测定方法进行了研究, 为该产品质量标准的制定及质量控制提供依据.

## 1 实验部分

**1.1 实验仪器与试剂** 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). 维生素 K<sub>2</sub>(20) 对照品 (SIGMA 公司); 维生素 K<sub>2</sub>(20) 原料药样品 3 批 (昆明云大医药开发有限公司出品, 批号: 070622, 070705, 070802); 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: 060510).

### 1.2 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm × Φ4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇, 检测波长: 270 nm, 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量: 20 μL.

### 1.3 溶液配制

\* 收稿日期: 2008-02-28

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目 (2003C009M).

作者简介: 木晓云 (1972-), 男, 云南人, 硕士, 主要从事药物分析分离方面的研究.

通讯作者: 朱洪友 (1968-), 男, 重庆人, 教授, 硕士生导师, 主要从事药物合成方面的研究, E-mail: hongyouzhu@sohu.com.

1.3.1 维生素 K<sub>2</sub>(20) 对照品 所有操作必须避光进行. 精密称取维生素 K<sub>2</sub>(20) 对照品适量, 加异丙醇溶解并定量稀释制成含维生素 K<sub>2</sub>(20) 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液.

1.3.2 维生素 K<sub>2</sub>(20) 样品 所有操作必须避光进行. 精密称取样品约 10.0 mg, 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 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.

1.4 最大吸收波长的测定 取维生素 K<sub>2</sub>(20) 对照品适量, 按对照品溶液配制方法制成约含 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液, 在波长 200~400 nm 范围内进行扫描. 维生素 K<sub>2</sub>(20) 在 270 nm 处有最大吸收, 将检测波长定为 270 nm.

1.5 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<sub>2</sub>(20) 计算不低于 20 000, 主成分峰与杂质峰的分度大于 10, 见图 2.

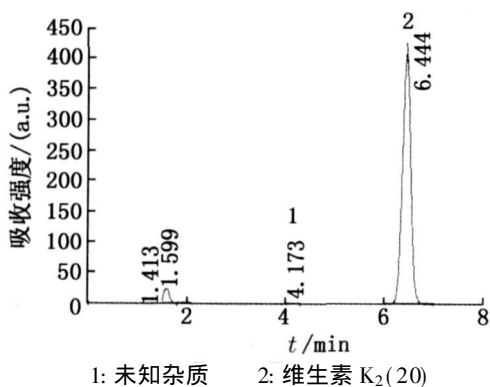


图 2 系统适用性测定色谱图

Fig. 2 Analytical HPLC chromatogram of system suitability

1.6 标准曲线和线性范围 配制 0.01, 0.02, 0.04, 0.12, 0.20, 0.32, 0.40 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 在上述色谱条件下测定. 以进样量  $X$  (mg·mL<sup>-1</sup>) 为横坐标, 峰面积  $Y$  为纵坐标, 进行线性回归, 得维生素 K<sub>2</sub>(20) 的回归方程:

$$Y = 2068.9X - 1.001, r = 0.9996$$

线性范围: 0.04~0.4 mg·mL<sup>-1</sup>.

1.7 精密度试验 取 1.3.1 所述对照品溶液重复进样 5 次, 测得维生素 K<sub>2</sub>(20) 峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0.21%, 表明本法精密度高.

1.8 稳定性考察 取上述对照品溶液, 每隔 30 min 进样, 连续 8 h. 结果 8 h 内维生素 K<sub>2</sub>(20) 的峰

面积积分值基本稳定, 峰面积的 RSD 为 0.18%, 表明本品溶液 8 h 内稳定良好. 整个测定过程中, 对照品溶液必须避光保存.

1.9 重复性实验 取维生素 K<sub>2</sub>(20) 样品(批号 070705), 共 5 份, 按 1.3.2 项所述配制溶液测定. 测得维生素 K<sub>2</sub>(20) 的质量分数 RSD 为 0.25%, 表明本法具有良好的重复性.

1.10 含量测定 所有操作必须避光进行. 分别精密称取 3 批维生素 K<sub>2</sub>(20) 样品适量, 按 1.3.2 所述方法配制溶液, 进样, 记录色谱图, 按外标法计算维生素 K<sub>2</sub>(20) 质量分数. 批号为 070622, 070705, 070802 的 3 批样品, 质量分数分别为 98.1%, 98.7%, 98.8%; RSD 分别为 0.18%, 0.2% 和 0.08%.

根据上述测定结果, 确定本品含维生素 K<sub>2</sub>(20), 以干燥品计, 质量分数不少于 98.0%.

## 2 结果与讨论

维生素 K<sub>2</sub>(20) 对光敏感, 其固态原料见光分解较慢, 但维生素 K<sub>2</sub>(20) 的溶液遇光分解迅速. 因此, 整个称量、配制过程都要在避光环境中进行. 测量过程中, 仪器的进样器部位应用遮光材料完全遮蔽光线. 如此, 可保证样品 8 h 内稳定.

本实验对维生素 K<sub>2</sub>(20) 的含量测定进行了研究, 建立了维生素 K<sub>2</sub>(20) 的含量测定方法, 所建立的维生素 K<sub>2</sub>(20) 含量测定方法简便、可靠, 重现性好, 可用于维生素 K<sub>2</sub>(20) 原料药的含量测定及质量控制.

## 参考文献:

- [1] ALMQUIST H J, STOKSTAD E L R. Hemorrhagic click disease[J]. Journal of Biological Chemistry, 1935, 111: 105-109.
- [2] 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(1): 220-222.
- [3] CEES VERMEER, MARJO H J. Vitamin K metabolic bone disease[J]. J Clin Pathol, 1998, 51: 424-426.
- [4] 陈连元, 郭荣荣, 张利. 维生素 K 与骨健康[J]. 山西医药杂志, 2000, 29(4): 269-271.
- [5] 王艳红, 刘银坤, 叶胜龙, 等. 维生素 K<sub>2</sub> 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): 220-220.
- [6] 王艳丽, 滕容, 杨洪娟, 等. 维生素 K<sub>2</sub> 诱导白血病细胞凋亡的体外研究[J]. 南通大学学报: 医学版, 2005,

- 25(4): 255-257.
- [7] MIYAZAWA K, YAGUCHI M, FUNATO K, et al. Apoptosis / differentiation inducing effects of vitamin K<sub>2</sub> on HL 260 cells: dichotomous nature of vitamin K<sub>2</sub> in leukemia cells[J]. *Leukemia*, 2001, 15: 1111-1117.
- [8] 邹志强. 维生素 K<sub>2</sub> 的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2005, 11(3): 389-392.
- [9] 张华峰, 张华强, 陈天华, 等. 维生素 K 生产工艺进展[J]. *饲料工业*, 2004, 25(1): 19-21.
- [10] 吴天锋, 郑裕国. 微生物法生产维生素 K<sub>2</sub>(MK)[J]. *科技通报*, 2004, 20(5): 428-433.
- [11] 国家药典委员会, 中华人民共和国药典(2000年版, 二部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [12] KIRK E M, FELL A F. Analysis of supplemented vitamin K<sub>1</sub> in serum microsamples by solid-phase extraction and narrow-bore HPLC with multichannel ultraviolet detection[J]. *Clin Chem*, 1989, 35: 1288.
- [13] SAKANO T, NAGAOKA T, MORIMOTO A, et al. Measurement of K vitamins in human and animal feces by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1986, 34: 4322.
- [14] HIROYUKI W, KENJI O, SUSUMU Y, et al. Simultaneous determination of vitamin K analogs in human serum by sensitive and selective high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. *Nutrition*, 2003, 19(7/8): 661-665.
- [15] ELDER S J, HAYTOWITZ D B, HOWE J, et al. Vitamin K contents of meat, dairy, and fast food in the U. S. diet[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 463-467.
- [16] TERHI J K, VIENO I, PIIRONEN S K, et al. Determination of phylloquinone in vegetables, fruits, and berries by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 4644-4649.
- [17] YOSHITOMO S, MAYA K, NAKO T, et al. Method for the determination of vitamin K homologues in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2005, 77: 757-763.

## Determination of menatetrenone by RP-HPLC

MU Xiaoyun<sup>1,2</sup>, DONG Yuewei<sup>3</sup>, WEN Xiaojiang<sup>1,2</sup>, FU Zhengqi<sup>1,2</sup>,  
LEI Ze<sup>1,2</sup>, FANG Ruibin<sup>1</sup>, ZHU Hongyou<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Medicinal Chemistry for Natural Resource of Ministry of Education, Yunnan University, Kunming 650091, China;

2. Yunnan University Medical Development Co., Ltd, Kunming 650022, China;

3. Yunnan Institute of Food and Drug Control, Kunming 650022, China)

**Abstract:** A HPLC external standard method for the determination of menatetrenone was established. The column: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18(150 mm × Φ4.6 mm, 5 μm), mobile phase: methanol, flow rate: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, detection wavelength: 270 nm. Calibrated linear curve of menatetrenone concentration was in the range of 0.04—0.4 mg·mL<sup>-1</sup> ( $r = 0.9996$ ). This reliable and reproducible HPLC analysis offers an option in the quality control of menatetrenone.

**Key words:** menatetrenone; determination; reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)