

粗制核黄素制剂中维生素A、D、E、K在HPLC上的定量分析

王玉梅 唐品志 王善莲*

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

维生素是天然的有机化合物, 种类很多, 其性质差异悬殊, 有胺类(如B₁)、醛类(如B₆)、醇类、酸类(如A)和酚、酯类化合物。但按溶解性可分成脂溶性如A、D、E、K等和水溶性如B₁、B₂、B₆、B₁₂、C、H、PP等两大类。由于它们的种类很多, 其含量有时也很低, 天然产物的成分又很复杂, 因此需要建立具有灵敏、准确、快速的测定方法。以往常用的比色法、分光光度法、荧光法以及微生物法等只能测定某一种维生素的含量, 而不适用于同时测定几种维生素。近十年来高效液相色谱(HPLC)发展很快, 并已广泛地应用于生化领域中维生素的分析^(2,3)。

粗制核黄素是以豆腐渣经接种阿氏假囊酵母菌而产生的一种制剂(亦称为维酶素制剂)。该制剂已作为某些呼吸酶类和解毒酶类的酶促增效剂被推广应用, 在治疗萎缩性胃炎和防止食管(贲门)细胞的增生等方面已取得了初步疗效。为了探讨该制剂对细胞作用和疗效的机理, 需要了解其有效成分的含量。本文报导以HPLC法、应用YWG—C₁₈反相柱、用甲醇-异丙醇-醋酸盐恒定组成的淋洗液、测定粗制核黄素制剂中脂溶性维生素。实验结果表明该制剂含有四种脂溶性维生素A、D、E、K。应用本法于分离和测定这四种脂溶性维生素比已往R.C. Williams等人⁽²⁾所报导的梯度淋洗法简便, 可在十六分钟内完成定量测定, 平均回收率达到95%以上。

实验部分

1. 仪器 日立635A型高效液相色谱仪, 单波长紫外分光光度计检测; 柱子: 内径4毫米长250毫米不锈钢柱, 填料为天津试剂二厂生产的硅胶键合十八烷基硅烷(YWG—C₁₈H₃₇), 粒度10±2微米, 填充压力为350公斤/厘米², 柱效为1万塔板/米(苯); 记录仪—056

2. 试剂 维生素A(英国Koch—Light公司产品)。

维生素D、E、K(德国E. Merck厂产品)。其余试剂均为国产分析纯。

3. 样品处理 取适量试样, 加10—15倍量的2.5%氢氧化钠溶液于70℃水浴中回流15分钟, 皂化后用石油醚-乙醚(1:1)提取, 经真空抽至近干, 迅速以异丙醇溶解后上机进行测定。由于维生素见光容易分解, 因此全部操作应注意防止受强光照射。

结果与讨论

由于反相色谱适应性强, 应用范围广, 因此, 我们在YWG—C₁₈反相色谱柱上用含有少量醋酸盐缓冲溶液的甲醇-异丙醇-冲洗液体系来冲洗, 四种脂溶性维生素A、D、E、K在16分钟内可获得比较满意的分离(见图1和2)。

本文采用波长254毫微米作为检测波长, 脂溶性维生素A、D、K在该波长都有一个强的紫外吸收。而维生素E在此波长的吸收很低。维生素E比其它三种维生素至少低10倍以上。维生素标准液经提取操作后, 其检测量与峰高呈线性关系。工作曲线通过零点(见图3)。

由于脂溶性维生素A、D、E、K在酸性条件下比在碱性条件下稳定, 因此我们试验了pH4.5、5.8和6.5的醋酸盐-醋酸缓冲溶液的

* 北京市第三制药厂在本所进修; 本所丛元滋同志参加部分实验工作谨此致谢。

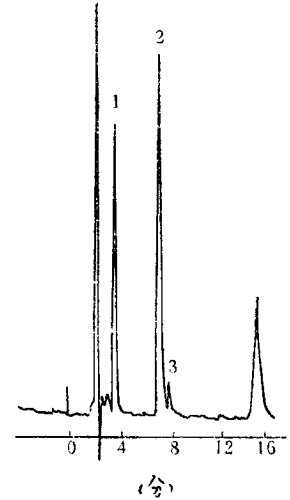
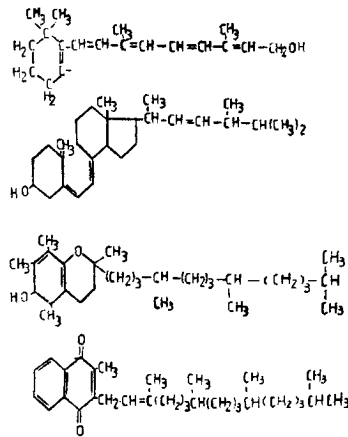
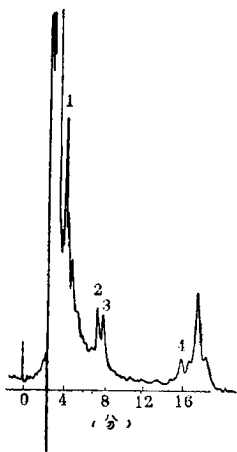


图 1 四种脂溶性维生素的色谱分离

色谱条件：色谱柱：φ4×250毫米。YWG—C₁₈H₃₇ 柱温：20℃
 柱压：70公斤/厘米² 淋洗液：甲醇-异丙醇-1M醋酸铵-
 醋酸pH5.8 (87.5:12:0.5体积比)；流速：1.2毫升/分。
 检测器：UV254毫微米，0.02a-u-f-s. 纸速：2.5毫米/分

图 2 粗制核黄素中维生素 A、D、E、K 的色谱分离图

1. 维生素A 2. 维生素D
 3. 维生素E 4. 维生素K
 色谱条件同图 1

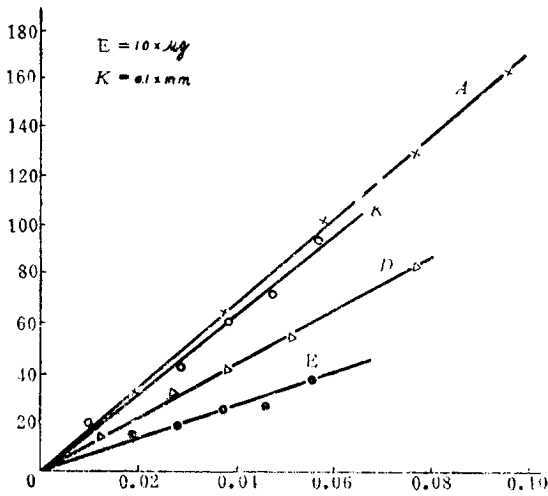


图 3 维生素A、D、E、K的工作曲线

甲醇-异丙醇冲洗液体系，均可达到分离的效果，但以pH5.8的体系分离效果较好，因此本文选用pH5.8的缓冲体系作试样的分离测定。此外由于反相色谱所用的非极性固定相上Si—O—Si—C型化学键合相比较稳定，所以标样与试样各组分的保留时间重复性较好(见表1)

标准品和粗制核黄素中的维生素A、D、E、K的保留时间，五次测定的平均值都很相近，其标准偏差均在±5秒以内。变异系数均在0.75%之内。并按我国药典方法对该试样中四种组分作了定性分析，确证该试样中含有这四种成分。

表 1 保留时间的重复性

组 分	维 生 素 A		维 生 素 D		维 生 素 E		维 生 素 K	
	保留时间(t _R)		标准	样品	标准	样品	标准	样品
	t _R (秒)	t _R (秒)	t _R (秒)	t _R (秒)	t _R (秒)	t _R (秒)	t _R (秒)	t _R (秒)
1	232	235	459	455	512	500	933	935
2	231	234	454	455	510	500	939	938
3	232	236	460	457	508	499	939	940
4	234	238	460	457	508	500	928	957
5	232	236	460	455	503	503	940	957
平 均 值	232	236	459	456	509	501	937	957
标 准 偏 差	±1.12	±1.5	±2.65	±1.12	±1.80	±3.74	±4.97	±1.87
变 异 系 数 (%)	0.48	0.64	0.58	0.25	0.35	0.75	0.53	0.20

回收率实验: 实验条件同前所述, 各加入已知量的维生素 A、D、E、K 进行回收率测定, 其结果列于表 2 中, 由表 2 可见, 四种维生素五次测定的平均回收率分别为

97.04, 100.19, 96.47, 96.67, 其平均标准偏差分别为 $\pm 6.38\%$, ± 2.18 , ± 2.49 , ± 6.84 。变异系数分别为 6.57%, 2.19%, 2.58%, 7.08%。

表 2 回 收 率 (%)

组 分	维 生 素 A			维 生 素 D			维 生 素 E			维 生 素 K		
	测定值	原加入量	回收率	测定值	原加入量	回收率	测定值	原加入量	回收率	测定值	原加入量	回收率
次 数	(μg)	(μg)	(%)	(μg)	(μg)	(%)	(μg)	(μg)	(%)	(μg)	(μg)	(%)
1	4.83	4.8	100.63	3.26	3.2	101.88	21.88	23.2	94.31	2.30	2.4	95.83
2	5.04	4.8	105.00	3.21	3.2	100.31	23.23	23.2	100.13	2.20	2.4	91.67
3	4.66	4.8	97.08	3.28	3.2	102.50	22.50	23.2	96.98	2.30	2.4	95.83
4	4.53	4.8	94.38	3.10	3.2	96.88	21.80	23.2	93.97	2.60	2.4	108.33
5	4.23	4.8	88.13	3.18	3.2	99.38	22.50	23.2	96.98	2.20	2.4	91.67
平均值			97.04			100.19			96.47			96.67
标准偏差			± 6.38			± 2.19			± 2.49			± 6.84
变异系数			6.57%			2.19%			2.58%			7.03%

样品分析: 按前面所述条件分别对五批粗制核黄素进行 11 次的分析测定, 其结果列于表 3 中。由表 3 可见, 粗制核黄素制剂中脂溶性维生素含量范围 (以微克/克计) A 为 1.46 ± 0.06 — 2.25 ± 0.14 , D 为 0.95 ± 0.09 —

1.41 ± 0.06 , E 为 10.70 ± 0.59 — 16.83 ± 1.02 , K 为 2.50 ± 0.15 — 3.65 ± 0.22 。虽然维生素 A 和 D 在粗制核黄素制剂中的含量较低, 但试样经处理提取后以高效液相色谱测定, 结果令人满意。

表 3 粗制核黄素制剂中维生素的分析

组 分	维 生 素 A			维 生 素 D			维 生 素 E			维 生 素 K			
	测定值*	含 量	标准偏差	变异系数	含 量	标准偏差	变异系数	含 量	标准偏差	变异系数	含 量	标准偏差	变异系数
样品批号	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	(%)	
1		1.82	± 0.09	4.95	1.17	± 0.07	5.98	11.87	± 0.74	6.23	2.52	± 0.17	6.75
2		1.46	± 0.06	4.11	1.01	± 0.12	11.88	10.73	± 0.72	6.71	2.50	± 0.15	6.00
3		1.83	± 0.06	3.28	0.95	± 0.09	9.47	10.70	± 0.59	5.51	2.73	± 0.25	9.16
4		2.25	± 0.14	6.22	1.39	± 0.14	10.07	16.83	± 1.02	6.06	3.65	± 0.22	6.03
5		1.79	± 0.06	3.35	1.41	± 0.06	4.26	14.22	± 0.64	4.50	2.88	± 0.06	2.08

参 考 文 献

- (1) 上海商检局主编, 《食品化学分析》, 上海科技出版社, 42, 1979。
 - (2) R.C. Williams, et al., J. Chromatogr. Sci., 10 494 (1972)。
 - (3) J.W. Dolan et al., Ibid, 16, 616 (1978)。
- (收稿日期: 1983年8月23日)

The Quantitative Determination of the Fat-Soluble Vitamins A, D, E, and K in Crude Riboflavine Preparation by High Performance Liquid Chromatography
Wang Yu-mei, Tang Pin-zh and Wang Shan-lian, Institute of Biophysics, Academia Sinica

This article describes the analysis of the fat-soluble vitamins A, D, E, and K with HPLC method. The analysis conditions including column: YWG-C18 $250 \times 4 \text{mm}$ I.D., mobile phase: methanol-1 M $\text{NH}_4\text{Ac-HAc}$, buffer solution pH 5.8 (87.5:12:0.5v/v), flow rate: 1.2 ml/min, column temperature: 20°C , detector: UV at 254 nm, 0.02 auFS are used for the determination. The quantitative correct curves for the 4 vitamins are drawn according to their peak heights, which are separated in 16 minutes. Recovery for the vitamins are over 95%. The results obtained are satisfactory.