

HPLC法同时测定三维葡磷钙咀嚼片中维生素B₁、维生素B₂的含量

李丹凤*(广西壮族自治区食品药品检验所, 南宁 530021)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)18-2549-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.18.35

摘要 目的:建立同时测定三维葡磷钙咀嚼片中维生素B₁、维生素B₂含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil C₁₈,流动相为含1%三乙胺的0.02 mol/L庚烷磺酸钠溶液(磷酸调pH至5.5)-甲醇(74:26, V/V),检测波长为260 nm,流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。结果:维生素B₁、维生素B₂质量浓度分别在0.22~1.10、0.22~1.09 μg/ml范围内与各自峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 8$ 、 $0.999\ 7$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<1%;平均加样回收率分别为99.66%、100.31%,RSD分别为0.96%、0.92%($n=9$)。结论:本方法简便、准确度高,可用于三维葡磷钙咀嚼片中维生素B₁、维生素B₂的含量测定。

关键词 三维葡磷钙咀嚼片;高效液相色谱法;维生素B₁;维生素B₂;含量测定

Content Determination of Vitamin B₁ and Vitamin B₂ in Trivitamin and Calcium Gluconate, Calcium Hydrogen Phosphate Chewable Tablets by HPLC

LI Dan-feng(Guangxi Zhuang Autonomous Region Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of vitamin B₁ and vitamin B₂ in Trivitamin and calcium gluconate, calcium hydrogen phosphate chewable tablets. METHODS: HPLC was conducted. The column was Inertsil C₁₈ with the mobile phase of 1% triethylamine contained 0.02 mol/L of sodium heptane solution (pH was adjusted to 5.5 by phosphate) - methanol (74:26, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 260 nm, temperature was 30 ℃ and the volume was 20 μl. RESULTS: There was a good linear relationship between the quality concentration of vitamin B₁ and peak area in the range of 0.22-1.10 μg/ml ($r=0.999\ 8$) and vitamin B₂ was in the range of 0.22-1.09 μg/ml ($r=0.999\ 7$). The RSDs of precision, reproducibility and stability tests were all less than 1%; the average recovery was respectively 99.66% (RSD=0.96%, $n=9$) and 100.31% (RSD=0.92%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, sensitive and reliable and suitable for the content determination of vitamin B₁ and vitamin B₂ in Trivitamin and calcium gluconate, calcium hydrogen phosphate chewable tablets.

KEYWORDS Trivitamin and calcium gluconate, calcium hydrogen phosphate chewable tablets; HPLC; Vitamin B₁; Vitamin B₂; Content determination

冒清热颗粒中9种无机阴离子的测定和质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:1 185.
- [2] 马丽端, 于密密, 傅欣彤, 等. 感冒清热颗粒挥发油特征图谱及薄荷酮和胡薄荷酮的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(8):1 374.
- [3] 桑旭峰. GC法测定感冒清热颗粒中薄荷脑和胡薄荷酮的含量[J]. 中国中医药科技, 2013, 20(4):376.
- [4] 耿榕徽, 王春民, 杨宇杰, 等. 气相色谱法同时测定感冒清热颗粒药材中薄荷醇、胡薄荷酮、紫苏醛含量[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(6):447.
- [5] 杨绍美, 陆建平, 曹家兴, 等. 离子色谱同时测定中草药中磷硫含量[J]. 分析实验室, 2011, 30(7):119.
- [6] 韩勛, 靳朝东. 阴离子、阳离子检测方法研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(2):162.
- [7] 余敏灵, 王小林, 陈文秋, 等. 离子色谱法测定白芷中二氧化硫的含量[J]. 泸州医学院学报, 2014, 37(5):496.
- [8] 魏惠珍, 卢欢, 邓杰华, 等. 离子色谱法测定大承气汤中硫酸根离子含量及不确定度评价[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(5):1 074.
- [9] 蔡卓夫. 离子色谱法定量测定硝酸异山梨酯片中硝酸盐的含量[J]. 中国药房, 2014, 25(1):78.
- [10] 李骥超, 王小燕, 欧阳荔, 等. 离子色谱-电感耦合等离子体质谱联用测定中成药、水体及饮料中痕量BrO₃⁻及Br⁻[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(11):3 136.
- [11] 魏益华, 张金艳, 戴廷灿, 等. 离子色谱法测定地沟油和食用油中氯离子含量[J]. 食品科学, 2011, 32(12):213.
- [12] 翟家骥. 离子色谱技术在污水监测中的应用和发展趋势[J]. 化学分析计量, 2010, 19(1):87.

(收稿日期:2015-01-20 修回日期:2015-02-11)

(编辑:余庆华)

* 主管药师。研究方向:化学药品、抗生素药品、化妆品的检验与研究。电话:0771-5828448。E-mail:lidanfeng@126.com

三维葡磷钙咀嚼片为复方制剂,主要由葡萄糖酸钙、磷酸氢钙、维生素B₁、维生素B₂、维生素D₂组成,除可用于补充妊娠期及哺乳期妇女、儿童、青少年以及老年人的钙质外,还可用于B族维生素缺乏及钙缺乏所致的各种疾病的辅助治疗。三维葡磷钙咀嚼片处方中维生素B₁、维生素B₂的含量均为0.5 mg/片。在现行国家标准中,采用高效液相色谱(HPLC)法测定维生素B₂的含量,并控制其含量范围为0.45~0.55 mg/片,但未对维生素B₁进行含量的测定与控制^[1]。有文献报道,HPLC法是目前使用最普遍的测定维生素类的方法,应用广泛,可测定多组分维生素^[2-6]。为更好地控制三维葡磷钙咀嚼片的质量,笔者建立了采用HPLC法同时测定三维葡磷钙咀嚼片中维生素B₁、维生素B₂含量的方法。

1 材料

Waters 2695-2998 HPLC 仪,包括二极管阵列检测器、Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司);XD205DU 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

维生素B₁对照品(批号:100390-201304,纯度:97.0%)、维生素B₂对照品(批号:100369-201103,纯度:99.1%)均由中国食品药品检定研究院提供;三维葡磷钙咀嚼片(广西世彪药业有限公司,批号:140601、140602、140603);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Inertsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:含1%三乙胺的0.02 mol/L 庚烷磺酸钠溶液(磷酸调pH至5.5)-甲醇(74:26, V/V);检测波长:260 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:30 °C;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取维生素B₁、维生素B₂对照品适量,置于同一棕色量瓶中,加1%醋酸溶液适量,置于60 °C水浴中超声(功率:500 W,频率:45 kHz)处理20 min,放至室温,加1%醋酸溶液稀释至刻度,摇匀,制成每1 ml 含维生素B₁ 0.2 mg、维生素B₂ 0.2 mg的对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液5 ml,置于100 ml量瓶中,加1%醋酸溶液稀释至刻度,摇匀,制成每1 ml 含维生素B₁ 10 μg、维生素B₂ 10 μg的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取三维葡磷钙咀嚼片细粉适量(约相当于维生素B₂ 1 mg),置于100 ml棕色量瓶中,加1%醋酸溶液适量,置于60 °C水浴中超声(功率:500 W,频率:45 kHz)处理20 min,放至室温,加1%醋酸溶液稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.3 空白对照溶液 按制剂处方工艺制备不含维生素B₁、维生素B₂的空白样品,并按“2.2.2”项下方法制备,即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、空白对照溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,详见图1。由图1可知,理论板数以维生素B₁峰计应不低于3 000,维生素B₁与维生素B₂的分离度大于1.5。

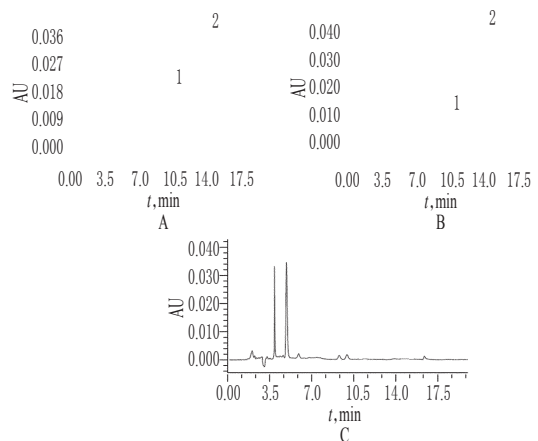


图1 高效液相色谱图

A.对照品溶液;B.供试品溶液;C.空白对照溶液;1.维生素B₁;2.维生素B₂。

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference solution;B.test sample solution;C.blank control solution;1.vitamin B₁;2.vitamin B₂。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下对照品贮备液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,加1%醋酸溶液稀释至刻度,摇匀,制成系列浓度的混合对照品溶液,各精密量取适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得维生素B₁、维生素B₂回归方程分别为 $y=636\ 456x-11\ 560$ ($r=0.999\ 8$)、 $y=171\ 928x-32\ 309$ ($r=0.999\ 7$)。结果表明,维生素B₁、维生素B₂质量浓度分别在0.22~1.10、0.22~1.09 μg/ml范围内与各自峰面积呈良好的线性关系。

2.5 定量限

以信噪比为10测得维生素B₁、维生素B₂定量限分别为14.69、14.56 ng/ml。

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液20 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次测定。结果,维生素B₁、维生素B₂峰面积的RSD分别为0.70%、0.59%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取样品(批号:140601)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、1、2、4、8、12、24 h时,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,维生素B₁、维生素B₂峰面积的RSD分别为0.85%、0.94%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:140601)6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,维生素B₁、维生素B₂峰面积的RSD分别为0.29%、0.99%,表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取样品(批号:140601)适量,共9份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别加入“2.2.1”项下对照品贮备液2.0、2.5、

3.0 ml,加1%醋酸溶液溶解并稀释至刻度,按“2.1”项下色谱条件进样20 μl,记录峰面积,计算加样回收率,结果详见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)
Tab 1 Results of recovery test(n=9)

待测成分	已知含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	加样平均回收率,%	RSD,%
维生素B ₁	0.341 9	0.440 8	0.775 7	98.41	99.66	0.96
	0.352 7	0.440 8	0.793 2	99.93		
	0.330 7	0.440 8	0.771 2	99.93		
	0.334 7	0.551 0	0.887 2	100.27		
	0.347 4	0.551 0	0.893 7	99.15		
	0.312 2	0.551 0	0.856 6	98.80		
	0.339 8	0.661 1	1.006 3	100.82		
	0.352 5	0.661 1	1.020 2	101.00		
	0.324 8	0.661 1	0.976 8	98.62		
	0.517 8	0.436 8	0.958 2	100.82		
0.534 2	0.436 8	0.968 9	99.52			
0.500 9	0.436 8	0.938 1	100.09			
0.506 9	0.546 0	1.059 6	101.23			
0.526 3	0.546 0	1.070 4	99.65			
0.524 5	0.546 0	1.063 5	98.72			
0.514 6	0.655 2	1.173 5	100.56			
0.534 0	0.655 2	1.200 6	101.74			
0.512 3	0.655 2	1.170 2	100.41			

2.10 样品含量测定

取3批样品,按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进行测定,按外标法以峰面积计算含量,结果详见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3,mg/片)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3,mg/tablet)

批号	维生素B ₁	维生素B ₂
140601	0.31	0.47
140602	0.34	0.51
140603	0.32	0.50

3 讨论

3.1 检测波长的确定

取“2.2.1”项下对照品溶液在220~400 nm波长范围内进行全波长扫描。结果发现,维生素B₁最大吸收波长为245 nm,维生素B₂最大吸收波长为267 nm。刘元欢等^[5]和袁利娟等^[6]研究采用的检测波长均为260 nm。本研究经多次试验验证,发现两组分在260 nm波长条件下均有较大的吸收,且各组分分离度良好,故选择260 nm作为本研究的检测波长。

3.2 流动相的确定

维生素B₁易溶于水,维生素B₂微溶于水且在中性或酸性溶液中加热较稳定。本试验参照有关标准^[1],加1%醋酸溶液,并在60℃水浴中超声处理20 min使维生素B₂溶解。因维生素B₂对光比较敏感,见光易分解,故分析过程应避免光操作^[6]。

笔者参考文献,用甲醇-己烷磺酸钠溶液(称取己烷磺酸钠

0.47 g,置于500 ml量瓶中,加水100 ml溶解,加冰醋酸5 ml,三乙胺0.6 ml,加水稀释至刻度,摇匀)(30:70, V/V)作为流动相^[1],结果发现维生素B₁先出峰,维生素B₂后出峰,但维生素B₁与相邻杂质峰分离度不好,调整流动相比比例也未能达到理想效果。又参考文献,用0.005 mol/L庚烷磺酸钠溶液(含0.5%冰醋酸和0.05%三乙胺)-甲醇(72:28, V/V)作为流动相^[1],结果发现维生素B₂出峰时间约为7 min,维生素B₁出峰时间约为20 min,且峰形较差,理论板数较低,维生素B₁与相邻杂质峰的分度度均未能达到要求。随后参考文献,选择含1%三乙胺的0.02 mol/L庚烷磺酸钠溶液(磷酸调pH至5.5)-甲醇(74:26, V/V)为流动相^[8],结果发现样品中的杂质对维生素B₁、维生素B₂的测定均没有干扰,且理论板数较高。因此,选定含1%三乙胺的0.02 mol/L庚烷磺酸钠溶液(磷酸调pH至5.5)-甲醇(74:26, V/V)为最终的流动相。

3.3 维生素B₁含量的控制

本试验结果显示,3批样品中维生素B₁的含量均较低,提示企业的处方或投料工艺中存在一定的缺陷,因此对于其含量的控制十分重要。

综上所述,本方法简便、准确度高,可用于三维葡磷钙咀嚼片中维生素B₁、维生素B₂的含量测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准:第五册[S].2002:41.
- [2] 陈桂红,黄青松.HPLC法测定多维铁口服溶液中维生素B₁、维生素B₂的含量[J].中国药房,2008,19(10):776.
- [3] 白靖,向柏,申磊,等.HPLC法同时测定复合维生素口服液中4种水溶性维生素的含量[J].中国药房,2011,22(29):2748.
- [4] 王琛,陈彬彬,邹梅娟,等.HPLC法同时测定多维元素胶囊中烟酰胺、维生素B₆、维生素B₁和维生素B₂的含量[J].海峡药学,2010,22(3):52.
- [5] 刘元欢,彭建梅,罗燕,等.高效液相色谱法测定五维葡钙口服溶液中维生素B₁、维生素B₂的含量[J].现代医院,2008,8(6):85.
- [6] 袁利娟,陈东波.HPLC法测定小儿四维葡钙颗粒中维生素B₁、维生素B₂的含量[J].宜春学院学报,2008,30(4):89.
- [7] 吴芳,徐红艳.HPLC法测定复合维生素B片中4种成分的含量[J].药物研究,2007,4(31):95.
- [8] 刘旺培,严晓明,陈华龙.高效液相色谱法测定维生素B₁片中维生素B₁的含量[J].首都医药,2013(22):71.

(收稿日期:2014-10-13 修回日期:2015-03-20)

(编辑:陈宏)