

改进HPLC法测定注射用多种维生素(12)中维生素B₁₂的含量

徐家根^{1*},刁岩忠²(1.南京大学医学院附属口腔医院药学部,南京 210008;2.南京优科生物医药集团股份有限公司,南京 210009)

中图分类号 R917;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)36-5159-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.36.38

摘要 目的:改进高效液相色谱法测定注射用多种维生素(12)中维生素B₁₂的含量。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil 100-5 C₁₈,流动相为水(用10%稀磷酸调节pH为4.5)-乙腈(梯度洗脱),流速为1.2 ml/min,检测波长为361 nm,柱温为35 ℃,进样量为50 μl。结果:维生素B₁₂检测进样量线性范围为15.03~45.09 ng($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<1%;回收率为99.31%~100.90%(RSD=0.42%, $n=9$)。结论:该方法简便、准确、灵敏度高、重复性好,可用于注射用多种维生素(12)中维生素B₁₂的含量测定。

关键词 注射用多种维生素(12);维生素B₁₂;含量测定;高效液相色谱法;方法改进

Improvement of the Method for Content Determination of Vitamin B₁₂ in Multivitamin for Injection (12) by HPLC

XU Jiagen¹, DIAO Yanzhong² (1.Dept. of Pharmacy, Stomatological Hospital Affiliated to Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China; 2.Nanjing YOKO Pharmaceutical Group Co., Ltd., Nanjing 210009, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve the method for the content determination of vitamin B₁₂ in Multivitamin for injection (12). METHODS: HPLC was performed on the column of Kromasil 100-5 C₁₈ with mobile phase of water (adjusted to pH4.5 with 10% diluted phosphoric acid)-acetonitrile (gradient elution) at a flow rate of 1.2 ml/min, the detection wavelength was 361 nm, column temperature was 35 ℃, and injection volume was 50 μl. RESULTS: The linear range of vitamin B₁₂ was 15.03-45.09 ng ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no lower than 1%; recovery was 99.31%-100.90% (RSD=0.42%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, sensitive, reproducible, and can be used for the content determination of vitamin B₁₂ in Multivitamin for injection (12).

KEYWORDS Multivitamin for injection (12); Vitamin B₁₂; Content determination; HPLC; Method improvement

维生素B₁₂(Vitamin B₁₂)又称氰钴胺素(Cyanocobalamin)^[1],是人体必需的水溶性维生素之一^[2],参与体内多种代谢,还可有效预防恶性贫血、老年痴呆、抑郁症等疾病,对保持人体健康起着重要作用^[3]。维生素B₁₂原料药及单方制剂标准在《中国药典》《美国药典》《欧洲药典》《日本药典》中均有收载,但均采

用紫外-可见分光光度法测定含量,该方法专属性差,干扰因素多。国内外上市的注射用复合维生素制剂有注射用水溶性维生素、注射用12种复合维生素、注射用多种维生素(12)、多种维生素注射液(13)^[4-5]等。这些制剂的标准均为国家药品注册标准^[6-8],尚无药典标准;国家药品注册标准及相关文献^[9]中,均

了该成分与其他4种蒽醌类成分的RCF,分别采用ESM法与QAMS法测定10批保肾乙丸中5种蒽醌类成分的含量。结果表明,ESM法测定结果与QAMS法测定结果无显著差异,说明QAMS法能够准确测定保肾乙丸中5种蒽醌类成分的含量。同时,QAMS法所用对照品种类较少,操作简单、方便,具有实用价值。

综上所述,本方法准确可靠、操作简便快捷,可用于同时测定保肾乙丸中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚5种蒽醌类成分的含量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:59.
- [2] 王智民,钱忠直,张启伟.一测多评法建立的技术指南[J].

* 副主任药师。研究方向:医院药学。电话:025-83620369。
E-mail:Xjg.234@163.com

- 中国中药杂志,2011,36(6):657.
- [3] 张锴镔,冯伟红,王智民,等.一测多评法与外标法测定新清宁片中大黄蒽醌类成分含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(11):61.
- [4] 王钰莹,冯伟红,杨菲,等.“一测多评”法测定三黄片中的大黄蒽醌类成分[J].中国中药杂志,2012,37(2):212.
- [5] 李爱红,陈伟健,胡文军.一测多评法测定银杏叶胶囊中总黄酮醇苷的含量[J].中国药房,2012,23(36):3446.
- [6] 刘晖晖,张辉,莫结丽,等.一测多评法测定黄连配方颗粒中4个成分的含量[J].中国药业,2012,21(10):39.
- [7] 刘志辉,顾玮,常星洁,等.“一测多评”法测定麦贞花颗粒中不同类型成分的含有量[J].中成药,2012,34(12):2342.
- [8] 韩海红,陈翔.一测多评法测定大败毒胶囊中的蒽醌类成分[J].中国药理学杂志,2013,48(23):2039.

(收稿日期:2016-06-01 修回日期:2016-08-01)
(编辑:刘柳)

采用高效液相色谱法(HPLC),以等度洗脱的方式测定上述制剂中维生素B₁₂的含量,但由于其流动相中含有大量缓冲盐和离子对试剂,对色谱柱和仪器损伤较大,同时大部分脂溶性主成分及辅料会在色谱柱中残留,累积产生污染,导致方法准确度、重复性差。另有文献^[10]介绍了同时测定多种维生素的方法,但在试验中发现其他维生素主成分对维生素B₁₂含量测定有明显干扰。为消除测定干扰,延长色谱柱使用寿命,减少对HPLC仪的损伤,缩短分析时间,降低检验成本,笔者对注射用多种维生素(12)中维生素B₁₂的含量测定方法进行了改进,采用HPLC法以梯度洗脱的方式进行测定。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AB型HPLC仪,包括CBM-20A系统控制器、DGM-20A3真空脱气机、SPD-M20A二极管阵列检测器、LC-20AB输液单元、SIL-20AC自动进样器、CTO-20AC柱温箱、LabSolutions色谱工作站(日本岛津公司);XS205型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 药品与试剂

注射用多种维生素(12)(南京优科制药有限公司,批号:20130201、20130202、20130203,规格:复方);维生素B₁₂对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100248-200802,纯度:95.5%);乙腈(色谱纯,美国Sigma公司);磷酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil 100-5 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:水(用10%稀磷酸调节pH为4.5)(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0 min, 91.5% A; 25.00 min, 91.5% A; 30.00 min, 20.0% A; 40.00 min, 20.0% A; 40.01 min, 91.5% A);流速:1.2 ml/min;检测波长:361 nm;柱温:35 °C;进样量:50 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取维生素B₁₂对照品约12 mg,精密称定,置于100 ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取1 ml,置于200 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,制成每1 ml约含维生素B₁₂ 0.6 μg的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品内容物约650 mg,置于10 ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的配方比例取不含维生素B₁₂的空白制剂(含处方中的其他维生素主成分及所有辅料)约650 mg,置于10 ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,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、阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,维生素B₁₂与其他维生素主成分及辅料之间均能达到基线分离,分离度>2.0;理论板数以维生素B₁₂峰计为12 395,保留时间为22.6 min。结果表明,辅料及其他维生素主成分对维生素B₁₂的测定无干扰。

2.4 破坏性试验

为验证降解产物与维生素B₁₂主峰的分度情况,对本品进行破坏性试验。(1)酸破坏溶液:取样品内容物约650 mg,精密称定,置于10 ml量瓶中,加1 mol/L盐酸溶液1 ml,于室温下放置4 h后用1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至中性,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得;(2)碱破坏溶液:取样品内容物约650 mg,精密称定,置于10 ml量瓶中,加1 mol/L氢氧化钠溶

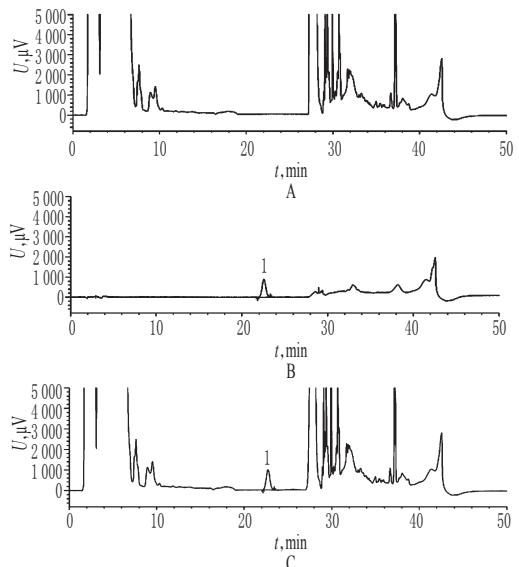


图1 系统适用性试验高效液相色谱图

A.阴性对照;B.对照品;C.供试品;1.维生素B₁₂

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability test

A.negative control;B.reference substance;C.test sample; 1.vitamin B₁₂

液1 ml,于室温下放置2 min后用1 mol/L盐酸溶液调节pH至中性,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得;(3)氧化破坏溶液:取样品内容物约650 mg,精密称定,置于10 ml量瓶中,加30%过氧化氢溶液1 ml,于室温下放置2 h后加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得;(4)高温破坏溶液:取样品内容物约650 mg,精密称定,置于10 ml量瓶中,加水1 ml,于80 °C水浴加热10 min后取出,放冷,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得;(5)光照破坏溶液:取样品内容物约650 mg,精密称定,置于10 ml量瓶中,加水1 ml,于室温下在5 000 lx强光下照射4 h后,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。取各破坏溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图2。由图2可知,本品在酸、碱、氧化、高温及光照破坏条件下均有不同程度的破坏,维生素B₁₂含量均有下降;其中,碱破坏条件降解幅度最大,其次为氧化、光照和酸破坏,各降解产物峰与维生素B₁₂峰分离度均符合要求。

2.5 线性关系考察

取维生素B₁₂对照品约12 mg,精密称定,置于100 ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取5 ml,置于50 ml量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。精密量取对照品贮备液适量,分别加水稀释制成每1 ml中约含维生素B₁₂ 0.30、0.48、0.60、0.72、0.90 μg的系列线性工作溶液。精密量取上述溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以维生素B₁₂进样量(x, ng)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得维生素B₁₂的回归方程为 $y=952.2x+243.2$ ($r=0.9999$)。结果表明,维生素B₁₂检测进样量线性范围为15.03~45.09 ng。

2.6 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限为4.355 ng;当信噪比为3:1时,得检测限为1.452 ng。

2.7 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,维生素B₁₂峰面积

的RSD=0.21% (n=6),表明仪器精密度良好。

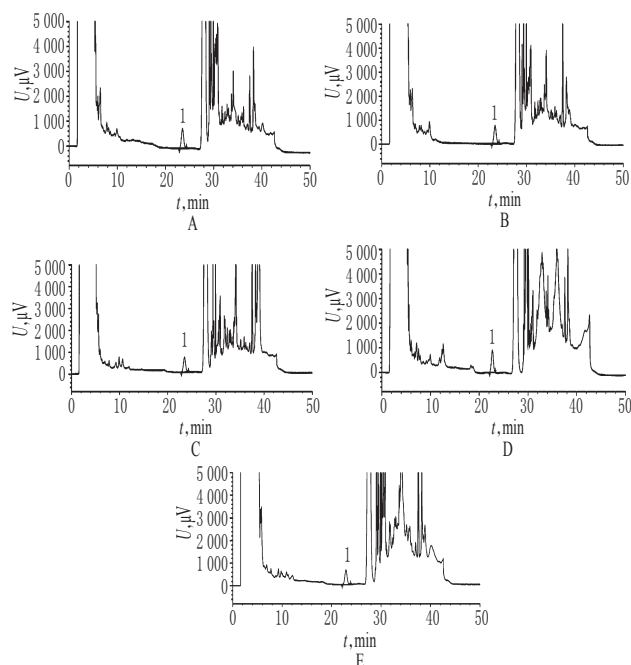


图2 破坏性试验高效液相色谱图

A.酸破坏;B.碱破坏;C.氧化破坏;D.高温破坏;E.光照破坏;1.维生素B₁₂

Fig 2 HPLC chromatogram of destructive tests

A.destroyed by acid; B.destroyed by alkali; C.destroyed by oxidation; D.destroyed by high temperature; E.destroyed by light; 1. vitamin B₁₂

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:20130201)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,维生素B₁₂峰面积的RSD=0.31% (n=6),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.9 重复性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20130201)适量,共6份,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,维生素B₁₂峰面积的RSD=0.29% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.10 回收率试验

取“2.2.3”项下阴性对照溶液适量,加入一定质量的维生素B₁₂对照品,按“2.2.2”项下方法制成80%、100%、120%的低、中、高质量浓度的溶液。取上述溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算维生素B₁₂的回收率,结果见表1。

表1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test(n=9)

加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
4.923	4.941	100.37	100.10	0.42
4.923	4.889	99.31		
4.923	4.935	100.20		
6.154	6.156	100.00		
6.154	6.148	99.90		
6.154	6.169	100.20		
7.385	7.401	100.20		
7.385	7.449	100.90		
7.385	7.378	99.91		

2.11 样品含量测定

取3批样品内容物各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算维生素B₁₂的含量。结果,3批样品(批号:20130201、20130202、20130203)中维生素B₁₂的含量分别为100.4%、100.7%、100.1% (n=3)。

3 讨论

3.1 流动相的选择

有文献^[6]采用0.001 5 mol/L己烷磺酸钠-甲醇(83:17, V/V)为流动相,而该系统中的离子对试剂对HPLC仪有损伤,且重复性差。也有文献^[9]采用0.02 mol/L磷酸氢二钠溶液(用磷酸调节pH为3.5)-甲醇(74:26, V/V)为流动相,或采用0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节pH为6.4)-乙腈(90:10, V/V)为流动相^[10],而这些系统中的缓冲盐可缩短色谱柱的使用寿命,同时易造成HPLC仪的堵塞。为延长色谱柱的使用寿命,减少对HPLC仪的损伤,降低检验成本,本试验采用水(用10%稀磷酸调节pH为4.5)-乙腈(梯度洗脱)为流动相,可缩短分析时间,且各色谱峰的分离度均较好。

3.2 检测波长的选择

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,进行全波长紫外扫描。结果,维生素B₁₂在278、361、550 nm波长处有最大吸收,但在361 nm波长处的吸收值最大。结合各国药典中维生素B₁₂含量测定项下检测波长,最终确定本试验的检测波长为361 nm。

综上所述,本方法简便、准确、灵敏度高、重复性好,可用于注射用多种维生素(12)中维生素B₁₂的含量测定。

参考文献

- [1] 刘惠,张颖,薛稚明,等.食物中维生素B₁₂的测定方法研究进展[J].中国卫生检验杂志,2013,23(11):2 556.
- [2] 秦尚.浅谈维生素与人体健康[J].中国医药指南,2015,13(28):294.
- [3] 冯晓葶.维生素B₁₂缺乏与相关疾病的关系[J].中国实用神经疾病杂志,2014,17(1):96.
- [4] 白靖,何朝星,向柏,等.维生素制剂学研究[J].中国医院药学杂志,2010,30(16):1 396.
- [5] 中华医学会肠外肠内营养学分会,北京医学会肠外肠内营养学分会.维生素制剂临床应用专家共识[J].中华外科杂志,2015,53(7):481.
- [6] 国家食品药品监督管理局.国家药品标准 YBH06412009 [S].2009.
- [7] 国家食品药品监督管理局.国家药品标准 YBH36742005 [S].2009.
- [8] 国家食品药品监督管理局.国家药品标准 WS-784(X-629)-2001(2)[S].2009.
- [9] 宋新康,姚海燕,陈彤.HPLC法测定维生素B₁₂片含量及含量均匀度[J].中国药师,2014,17(9):1 598.
- [10] 宋金春,陆迅,曾俊芬,等.HPLC测定注射用13种复合维生素中维生素H、叶酸及维生素B₁₂含量[J].中国药理学杂志,2007,42(17):1 345.

(收稿日期:2016-05-25 修回日期:2016-09-27)

(编辑:刘 柳)