

HPLC法同时测定注射用水溶性维生素冻干粉中6种成分的含量

姚振弘*,葛桐,周红霞,杨丹丹,郑朝武(海南皇隆制药股份有限公司,海口 570100)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)28-2670-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.28.27

摘要 目的:建立同时测定注射用水溶性维生素冻干粉中6种成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Intersil 5 μ ODS2,流动相A、B分别为0.005mol/L戊烷磺酸钠的0.1%磷酸溶液和0.005 mol/L戊烷磺酸钠的0.1%磷酸溶液-乙腈(20:80, V/V),梯度洗脱,流速为0.9 ml/min,检测波长为210 nm,柱温为40 $^{\circ}$ C,进样量为20 μ l。结果:维生素C钠、烟酰胺、盐酸吡哆辛、泛酸钠、硝酸硫胺、核黄素磷酸钠的检测质量浓度分别在0.227 1~0.681 2、0.081 04~0.243 1、0.009 8~0.029 4、0.033 14~0.099 42、0.006 193~0.018 58、0.009 751~0.029 25 mg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 2$ 、 $0.999\ 8$ 、 $0.999\ 8$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 8$ 、 $0.999\ 8$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD $\leq 1.60\%$;平均回收率分别为100.08%、99.70%、100.38%、100.47%、100.51%、100.39%,RSD分别为1.54%、1.28%、1.13%、0.87%、0.70%、0.64%($n=9$)。结论:该方法专属性强、快速、准确、灵敏度高,可用于同时测定注射用水溶性维生素冻干粉中6种成分的含量。

关键词 高效液相色谱法;水溶性维生素;维生素C钠;烟酰胺;盐酸吡哆辛;泛酸钠;硝酸硫胺;核黄素磷酸钠

Content Determination of 6 Components in Water-soluble Vitamin Freeze Dried Powder for Injection by HPLC

YAO Zhen-hong, GE Tong, ZHOU Hong-xia, YANG Dan-dan, ZHENG Chao-wu(Hainan Huanglong Pharmaceutical Co., Ltd., Haikou 570100, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of 6 components in Water-soluble vitamin freeze dried powder for injection. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Intersil 5 μ ODS2 column, with mobile phase A consisted of 0.1% phosphoric acid solution of 0.005mol/L pentane sulfonic acid sodium and mobile phase B consisted of 0.1% phosphoric acid solution of 0.005mol/l pentane sulfonic acid sodium-acetonitrile (20:80, V/V, gradient elution) at the flow rate of 0.9 ml/min. The detection wavelength was set at 210 nm, and column temperature was 40 $^{\circ}$ C. The sample size was 20 μ l. RESULTS: The linear range were 0.227 1-0.681 2 mg/ml for vitamin C sodium ($r=0.999\ 2$), 0.081 04-0.243 1 mg/ml for niacin amide ($r=0.999\ 8$), 0.009 8-0.029 4 mg/ml for pyridoxine hydrochloride ($r=0.999\ 8$), 0.033 14-0.099 42 mg/ml for sodium pantothenate ($r=0.999\ 9$), 0.006 193-0.018 58 mg/ml for thiamine mononitrate ($r=0.999\ 8$) and 0.009 751-0.029 25 mg/ml for riboflavin sodium phosphate ($r=0.999\ 8$), respectively. RSDs of precision, stability and repeatability tests were $\leq 1.60\%$. Average recoveries were 100.08% (RSD=1.54%, $n=9$), 99.70% (RSD=1.28%, $n=9$), 100.38% (RSD=1.13%, $n=9$), 100.47% (RSD=0.87%, $n=9$), 100.51% (RSD=0.70%, $n=9$) and 100.39% (RSD=0.64%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is specific, rapid, accurate and sensitive, and can be used for simultaneous determination of 6 components in Water-soluble vitamin freeze dried powder for injection.

KEYWORDS HPLC; Water-soluble vitamin; Vitamin C sodium; Niacin amide; Pyridoxine hydrochloride; Sodium pantothenate; Thiamine mononitrate; Riboflavin sodium phosphate

维生素是维持人体正常生理活动所必需的营养物质,又是一类具有特殊功能的药物,可分为水溶性维生素和脂溶性维生素,其中水溶性维生素在人体内合成极少,无一定储存,却担负着维持组织和细胞正常代谢的功能,在营养素中占有重要地位^[1-3]。

目前,临床使用的多是单方维生素制剂,复方制剂较少。按照人体生理指标,各种维生素必须达到一定的摄入量后才能保证机体维持正常的生理机能。但是,一些维生素的过度摄入也会产生一定的毒性,反而危害机体正常的生理机能。因此,测定维生素的含量极为重要^[4-5]。在本研究中,笔者参考了相关文献^[6-9],采用高效液相色谱(HPLC)法对注射用水溶性维生素冻干粉中6种成分的含量进行测定,以为更好地控制产品质量提供科学依据。

* 工程师,硕士。研究方向:新药开发。电话:0898-68616817。
E-mail:237198403@qq.com

1 材料

1.1 仪器

HPLC仪,包括LC-10ATvp溶剂输送泵、SPD-10Avp紫外-可见检测器、LC-solutionlite色谱工作站(日本岛津公司);DV215CD电子天平(奥豪斯仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

泛酸钠、维生素C钠、硝酸硫胺、烟酰胺、盐酸吡哆辛、核黄素磷酸钠对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100279-0001、100296-200303、100297-199901、10115-0001、0117-9903、100283-200501);注射用水溶性维生素冻干粉针(海南皇隆制药股份有限公司,批号:090801、090802、090803);乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Intersil 5 μ ODS2(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m);柱温

40 ℃,以0.005 mol/L 戊烷磺酸钠的0.1%磷酸溶液为流动相A, 0.005 mol/L 戊烷磺酸钠的0.1%磷酸溶液-乙腈为流动相B (20:80, V/V),采用梯度洗脱(梯度洗脱程序见表1);柱温:40 ℃;流速:0.9 ml/min;检测波长:210 nm;进样量:20 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0.0	99	1
1.0	99	1
6.0	92	8
34.0	70	30
39.0	20	80
39.1	99	1

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取烟酰胺对照品40.11 mg、维生素C钠对照品113.08 mg、泛酸钠对照品16.53 mg,置于同一25 ml容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得烟酰胺、维生素C钠、泛酸钠对照品贮备液;分别精密称定硝酸硫胺对照品6.28 mg、盐酸吡哆辛对照品9.93 mg、核黄素磷酸钠10.02 mg,置于同一50 ml容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得到硝酸硫胺、盐酸吡哆辛、核黄素磷酸钠对照品贮备液。分别精密量取上述对照品贮备液1 ml,置于同一10 ml容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取注射用水溶性维生素粉1瓶,加水溶解后置于250 ml容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.2.3 空白溶液的制备 按制剂处方工艺制备的不含维生素C钠、烟酰胺、盐酸吡哆辛、泛酸钠、硝酸硫胺和核黄素磷酸钠等6种成分的空白贮备溶液,按“2.2.2”项下方法制备溶液,即得空白溶液。

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、空白溶液各20 μl,进样测定,记录色谱图,详见图1。由图1可知,理论塔板数按核黄素磷酸钠峰计算应不低于15 000,各峰之间的分离度均大于1.5。

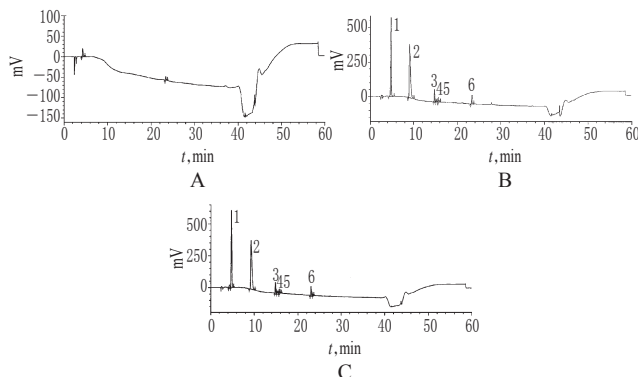


图1 高效液相色谱图

A.空白对照; B.对照品溶液; C.供试品溶液; 1.维生素C钠; 2.烟酰胺; 3.盐酸吡哆辛; 4.泛酸钠; 5.硝酸硫胺; 6.核黄素磷酸钠

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank control; B. substance control; C. test samples; 1 vitamin C sodium; 2. niacin amide; 3. pyridoxine hydrochloride; 4. sodium pantothenate; 5. thiamine mononitrate; 6. riboflavin phosphate sodium

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下对照品溶液1.0、1.6、2.0、2.4、4.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。分别精密量取上述溶液各20 μl,依次进样,记录色谱图。以检测质量浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,线性范围和回归方程见表2。

表2 线性范围和回归方程

Tab 2 Linear range and regression equation

成分	线性范围, mg/ml	回归方程	r
维生素C钠	0.227 1~0.681 2	$y=1E+07x+1E+06$	0.999 2
烟酰胺	0.081 04~0.243 1	$y=5E+07x+117 322$	0.999 8
盐酸吡哆辛	0.009 8~0.029 4	$y=3E+07x-187.29$	0.999 8
泛酸钠	0.033 14~0.099 42	$y=2E+06x-1 380.7$	0.999 9
硝酸硫胺	0.006 193~0.018 58	$y=2E+07x-12 258$	0.999 8
核黄素磷酸钠	0.009 751~0.029 25	$y=4E+07x+16 296$	0.999 8

注: E是自然对数的底,约为2.718 281 828 459 045

note: E is the base of natural logarithms, about 2.718 281 828 459 045

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续重复进样测定6次,记录峰面积。结果,维生素C钠、烟酰胺、盐酸吡哆辛、泛酸钠、硝酸硫胺、核黄素磷酸钠的RSD分别为1.35%、0.54%、0.63%、0.53%、1.48%、0.82%,表明仪器精密密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:090801)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8 h时,按“2.1”项下色谱条件进样测定5次。结果,维生素C钠、烟酰胺、盐酸吡哆辛、泛酸钠、硝酸硫胺、核黄素磷酸钠的RSD分别为1.46%、0.55%、0.57%、0.44%、1.59%、0.72%,表明供试品溶液在8 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取样品(批号:090801)6支,共6份。按“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,维生素C钠、烟酰胺、盐酸吡哆辛、泛酸钠、硝酸硫胺、核黄素磷酸钠的RSD分别为1.03%、0.58%、0.37%、0.60%、1.44%、0.41%,表明本方法重复性良好。

2.8 回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号:090801)2 416.52 mg,精密量取维生素C钠对照品180.94、226.12、271.43 mg,分别置于50 ml容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为维生素C钠母液;精密称取烟酰胺对照品64.32、80.18、96.42 mg,分别置于50 ml容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为烟酰胺母液;精密称取取盐酸吡哆辛对照品7.97、9.94、11.86 mg,分别置于50 ml容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为盐酸吡哆辛母液;精密称取取泛酸钠对照品26.62、33.06、39.88 mg,分别置于50 ml容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为泛酸钠母液;精密称取硝酸硫胺对照品5.03、6.33、7.71 mg,分别置于50 ml容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为硝酸硫胺母液;精密称取核黄素磷酸钠对照品7.96、9.83、11.78 mg,分别置于50 ml容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为核黄素磷酸钠母液。分别精密量取上述各母液10 ml,置于同一100 ml容量瓶中,加入不含上述6种成分的空白辅料,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。另取“2.2.1”项下

对照品溶液适量,分别精密量取20 μl,注入色谱仪,计算回收率,结果见表3。

表3 回收率试验结果(n=9)
Tab 3 Results of recovery tests(n=9)

成分	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
维生素C钠	180.94	184.16	101.78	100.08	1.54
	180.94	182.01	100.59		
	180.94	183.93	101.65		
	226.12	227.93	100.80		
	226.12	223.47	98.83		
	226.12	230.12	101.77		
	271.43	266.87	98.32		
	271.43	267.74	98.64		
	271.43	266.82	98.30		
	烟酰胺	64.32	64.12		
64.32		63.23	98.30		
64.32		65.01	101.07		
80.18		81.02	101.05		
80.18		80.00	99.78		
80.18		81.47	101.62		
96.42		95.44	98.98		
96.42		94.85	98.37		
96.42		94.95	98.47		
盐酸吡哆辛		7.97	8.09	101.61	100.38
	7.97	8.08	101.38		
	7.97	8.05	101.04		
	9.94	9.92	99.84		
	9.94	10.13	101.89		
	9.94	9.97	100.28		
	11.86	11.75	99.06		
	11.86	11.77	99.27		
	11.86	11.74	99.02		
	泛酸钠	26.62	26.79	100.62	
26.62		26.64	100.07		
26.62		26.83	100.81		
33.06		33.62	101.68		
33.06		33.10	100.13		
33.06		33.65	101.79		
39.88		39.89	100.03		
39.88		39.92	100.11		
39.88		39.48	98.99		
硝酸		5.03	5.08	101.04	100.51
	5.03	5.02	99.81		
	5.03	5.05	100.48		
	6.33	6.36	100.42		
	6.33	6.38	100.82		
	6.33	6.29	99.32		
	7.71	7.77	100.72		
	7.71	7.84	101.74		
	7.71	7.73	100.26		
	核黄素磷酸钠	7.96	7.96	100.05	
7.96		8.01	100.63		
7.96		7.94	99.71		
9.83		9.85	100.19		
9.83		9.98	101.50		
9.83		9.81	99.79		
11.78		11.93	101.27		
11.78		11.76	99.85		
11.78		11.84	100.49		

2.9 样品含量测定

分别取3批样品,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进行平行试验。按“2.1”项下色谱条件分别进样20 μl,以外标法计算维生素C钠、烟酰胺、盐酸吡哆辛、泛酸钠、硝酸硫胺、核黄素磷酸钠的含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果(n=5)

批号	含维生素C钠的量,%	含烟酰胺的量,%	含盐酸吡哆辛的量,%	含泛酸钠的量,%	含硝酸硫胺的量,%	含核黄素磷酸钠的量,%
090801	114.51	41.14	5.10	17.11	3.06	5.17
090802	112.39	40.93	5.02	16.94	3.10	5.09
090803	113.72	40.88	5.07	17.10	3.06	5.14

3 讨论

在本研究中笔者首先采用了氨基键合多孔硅胶为填料的色谱柱,氨基柱既能用于正相条件也能用于反相条件,通过调整流动相的比例可使峰形、柱效、分离度均能达到测定的要求。

笔者采用不同比例的0.005mol/L戊烷磺酸钠的0.1%磷酸溶液-乙腈作为流动相B,结果发现当0.005mol/L戊烷磺酸钠的0.1%磷酸溶液-乙腈的比例为20:80时,分离度和重复性均较好,可保持色谱条件的稳定。

本研究经过多次试验验证,各组分在210 nm条件下均有较大的吸收波长,且各组分分离度良好。故选择210 nm作为本方法的检测波长。

综上所述,本方法专属性强、快速、准确、灵敏度高,可用于同时测定注射用水溶性维生素冻干粉中6种成分的含量。

参考文献

- [1] A.H 思斯明格.食物与营养百科全书[M].北京:农业出版社,1989:76.
- [2] 赵玲,赵春才,陆超,等.HPLC法测定盐酸西那卡塞片含量[J].中国药房,2007,18(13):1216.
- [3] 叶榕平,张娜,蒋小平.复合水溶性维生素及其制剂的研究与应用[J].海峡药学,1999,2(11):105.
- [4] 杨玲娟,谢天柱,赵素瑞,等.离子对反相高效液相色谱法同时测定功能性饮料中的B族维生素[J]. *Analysis and Examination*, 2009,8(209):140.
- [5] 刘敏,郑伟涛. HPLC法测定功能性饮料中多种B族维生素的含量[J]. *饮料工业*, 2006(1):39.
- [6] 贾林艳,宋伟新,庄志萍,等.高效液相色谱法测定茶叶中水溶性维生素的含量[J]. *中国林副特产*, 2003(2):21.
- [7] Blake CJ. Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary Supplements: A Review[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007,389(1):63.
- [8] 刘晓琳,武谷,钟淮滨,等.HPLC法测定复合维生素B溶液中维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆和烟酰胺的含量[J]. *中国药事*, 2003,17(4):241.
- [9] 海彩虹,董锦燕,盛爱军.高效液相色谱法测定六维胶丸中维生素B₁、维生素B₂、烟酰胺含量[J]. *上海医药*, 2006,27(10):474.

(收稿日期:2014-05-13 修回日期:2014-06-13)