

HPLC 法同时测定更年安软胶囊中维生素 B₁、维生素 B₆ 的含量

孙清^{1,2}, 巴晓革³, 史磊⁴

(1. 山东省医药工业研究所 济南 250100; 2. 山东省化学药物重点实验室 济南 250100;
3. 山东药品食品职业学院 威海 264210; 4. 济南宏济堂制药有限责任公司 济南 250100)

摘要 目的: 建立用反相高效液相色谱法同时测定更年安软胶囊中维生素 B₁、维生素 B₆ 含量的方法。方法: 采用 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-0.06% 庚烷磺酸钠溶液(含 1.2% 醋酸与 0.12% 三乙胺) 25:75, 检测波长 275 nm, 流速 0.8 mL · min⁻¹。结果: 维生素 B₁ 和维生素 B₆ 线性范围分别为 16.02 ~ 80.10 μg · mL⁻¹ 和 15.84 ~ 79.20 μg · mL⁻¹, 相关系数 *r* 分别为 0.9996 和 0.9997; 平均回收率分别为 101.2% (RSD = 0.5%) 和 100.1% (RSD = 0.9%)。结论: 该法可同时测定更年安软胶囊中维生素 B₁、维生素 B₆ 的含量, 方法简便、准确, 重复性好。可为制定更年安软胶囊的质量标准和产品质量控制提供依据。

关键词: 高效液相色谱法; 更年安软胶囊; 维生素 B₁; 维生素 B₆; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)04-0725-03

HPLC simultaneous determination of vitamin B₁ and vitamin B₆ in Gengnian'an soft capsules

SUN Qing^{1,2}, BA Xiao-ge³, SHI Lei⁴

(1. Shandong Institute of Pharmaceutical Industry, Jinan 250100, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drug, Jinan 250100, China;
3. Shandong Drug and Food Vocation College, Weihai 264210, China; 4. Jinan Hongjitang Pharmaceutical Limited Company, Jinan 250100, China)

Abstractive Objective: To establish an HPLC method for simultaneous determination vitamin B₁ and vitamin B₆ in gengnian'an soft capsules. **Methods:** C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was adopted with methanol-0.06% sodium heptanesulfonate (containing 1.2% acetic acid and 0.12% triethylamine) (25:75) as the mobile phase at the flow rate of 0.8 mL · min⁻¹ and the detection wavelength was 275 nm. **Results:** The linear ranges of vitamin B₁ vitamin B₆ were 16.02-80.10 μg · mL⁻¹ (*r* = 0.9996) and 15.84-79.20 μg · mL⁻¹ (*r* = 0.9997), average recovery was 100.1% (RSD = 0.9%). **Conclusion:** The method is proved to be simple and accurate, reproducible and it can be used to determination vitamin B₁ and vitamin B₆ simultaneously in Gengnian'an soft capsules. Furthermore, it provides basis for the setting of quality specifications and quality control of Gengnian'an soft capsules. **Key words:** HPLC; Gengnian'an soft capsules; vitamin B₁; vitamin B₆; assay

据全国妇女生理常数协作组调查, 70% 的更年期妇女或多或少会出现更年期综合症。本所自主研发的更年安软胶囊中药、化药同用, 优势互补, 采用现代制药技术制成, 其温肾益阴、调补阴阳的功能对于更年期综合症属阴阳两虚症者有显著疗效。本文建立高效液相色谱法同时测定本品中的维生素 B₆ 和维生素 B₁ [1]。方法学考察试验证明, 维生素 B₆ 和维生素 B₁ 的含量测定方法, 稳定、可靠、简便, 重复性好, 可为制定更年安软胶囊的质量标准和产品质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: 日本岛津 LC-10ATvp 型溶剂输送泵, SPD-10Avp 紫外-可见检测器, 联想 P-III 微机处理系统; 对照品: 维生素 B₁ (供含量测定用, 批号 100390-200501) 及维生素 B₆ (供含量测定用, 批号 0116-200701) 购自中国药品生物制品检定所; 试剂: 三乙胺、冰醋酸为分析纯, 庚烷磺酸钠、甲醇为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱: AGT Venusil ASB-C₁₈ 色

谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 - 0.06% 庚烷磺酸钠溶液(含 1.2% 醋酸与 0.12% 三乙胺)(25:75); 检测波长: 275 nm, 流速: 0.8 mL · min⁻¹; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。在此条件下, 可使维生素 B₆、维生素 B₁ 峰与相邻峰较好的分离。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取本品内容物约 0.1 g, 精密称定, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加水 96 mL, 放置过夜, 超声(功率 120 W, 频率 50 kHz) 5 min, 加水至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液 精密称取对照品维生素 B₁、维生素 B₆ 适量, 置 250 mL 棕色量瓶中, 加水 96 mL, 超声(120 W, 50 kHz) 5 min, 加水至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 含维生素 B₁、维生素 B₆ 各 30 μg 的溶液, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按处方组成, 取除维生素 B₁、维生素 B₆ 的其余药材、化学药品和辅料, 按工艺要求制备不含维生素 B₁、维生素 B₆ 的软胶囊, 按“2.2.1”项下方法操作, 制成阴性样品溶液。

2.3 系统适应性及专属性考察 取阴性样品溶液、对照品溶液、供试品溶液各 10 μL, 在上述色谱条件下, 分别注入液相色谱仪。维生素 B₁、维生素 B₆ 的保留时间分别为 29.9 min 和 10.3 min, 理论塔板数分别为 6000 和 4000, 分离度大于 3.0。维生素 B₁、维生素 B₆ 与其他组分达到了基线分离, 峰形对称。见图 1。

2.4 线性关系考察 精密称取对照品维生素 B₆ 7.92 mg、维生素 B₁ 8.01 mg, 置同一 100 mL 棕色量瓶中, 加水 96 mL, 放置过夜(16 h), 超声(120 W, 50 kHz) 5 min, 加水至刻度, 摇匀, 作为维生素 B₆、维生素 B₁ 对照品溶液(每 1 mL 含维生素 B₆ 0.0801 mg, 维生素 B₁ 0.0792 mg)。精密量取上述对照品溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL, 分置 10 mL 量瓶内, 加水至刻度, 摇匀, 配成 5 份对照品溶液; 精密吸取上述对照品溶液各 10 μL, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以峰面积积分值(A)为纵坐标, 相应的对照品浓度(C)为横坐标, 绘制标准曲线, 维生素 B₁ 和维生素 B₆ 的回归方程分别为:

$$A = 6.814 \times 10^3 C + 6.816 \times 10^3 \quad r = 0.9996$$

$$A = 7.348 \times 10^3 C - 4.632 \times 10^3 \quad r = 0.9997$$

结果表明, 维生素 B₁ 在 16.02 ~ 80.10 μg · mL⁻¹ 及维生素 B₆ 在 15.84 ~ 79.20 μg · mL⁻¹ 的浓度范围内具有良好的线性关系。

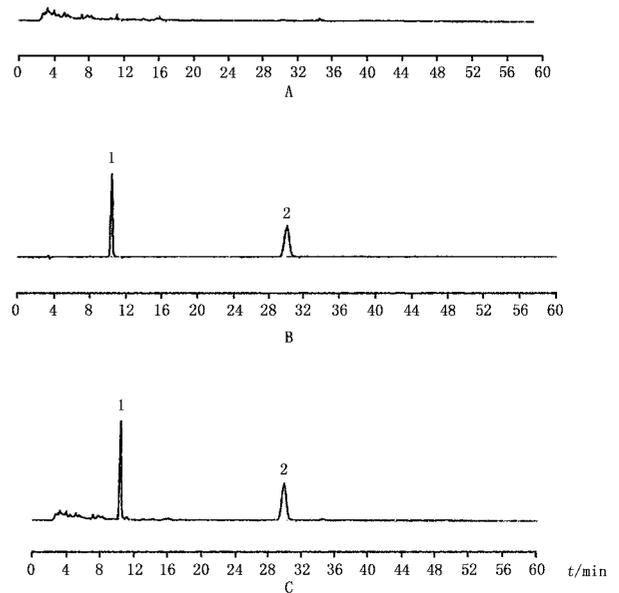


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

A. 阴性样品(negative sample without vitamin B₁ and vitamin B₆) B. 对照品(reference substance) C. 供试品(Gengnian'an soft capsules)
1. 维生素 B₆(vitamin B₆) 2. 维生素 B₁(vitamin B₁)

2.5 样品提取方法考察

2.5.1 样品放置时间筛选试验 按“2.2.1”项下制备供试品溶液, 分别放置 45 min 和 16 h(过夜), 前者维生素 B₆ 和维生素 B₁ 的含量只有后者的 80%, 故选择样品溶液放置过夜, 有利于维生素 B 溶出。

2.5.2 样品超声时间筛选试验 取 20081009 批样品按“2.2.1”项下方法制备样品溶液, 比较超声 20 min 和 5 min 时, 样品中维生素 B₆、维生素 B₁ 含量。超声时间为 5 min 时, 样品中维生素 B₆ 和维生素 B₁ 含量达到峰值; 而 20 min 时, 样品杂质峰较高, 故确定样品超声提取时间为 5 min。

2.6 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下供试品溶液(20081009 批), 连续进样 6 次, 维生素 B₆ 和维生素 B₁ 峰面积的 RSD 分别为 1.2% 和 0.9%, 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取 20081009 批样品, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 每隔 60 min 进样 1 次, 共测定 8 h, 维生素 B₆ 和维生素 B₁ 峰面积的 RSD 分别为 1.8% 和 1.9%, RSD 均小于 2%, 表明供试品溶液在 8 h 内, 维生素 B₆、维生素 B₁ 基本稳定。

2.8 重复性试验 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 对同一批样品(20081009 批) 重复操作 6

次测定结果表明, 维生素 B₆ 平均含量为 32.02 mg · g⁻¹, 维生素 B₁ 平均含量为 33.74 mg · g⁻¹, RSD 均小于 2.0%, 表明本方法重复性良好。

2.9 回收率试验 精密称取已知含量的样品 (20081009 批, 维生素 B₆ 平均含量为 32.02 mg · g⁻¹, 维生素 B₁ 平均含量为 33.74 mg · g⁻¹) 5 份, 每份 0.05 g, 再分别精密添加对照品溶液维生素 B₆ (0.3224 mg · mL⁻¹) 和维生素 B₁ (0.3470 mg · mL⁻¹) 各 5 mL, 按上述方法进行试验, 维生素 B₆ 和维生素 B₁ 的平均回收率分别为 100.1% 和 101.2%, RSD 分别为 0.9% 和 0.5%。

2.10 样品含量测定

按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液和对照品溶液, 取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 按上述色谱条件进样测定, 10 批样品中维生素 B₁、维生素 B₆ 含量的测定结果见表 1。

表 1 10 批样品维生素 B₆、维生素 B₁ 含量测定结果 (mg · 粒⁻¹)

Tab1 Determination results of 10 batches of vitamin B₆ and vitamin B₁ (mg · capsules⁻¹)

批号 (Lot No.)	维生素 B ₆ (vitamin B ₆)	维生素 B ₁ (vitamin B ₁)
081009	9.785	10.03
081112	9.557	10.47
081113	9.608	10.40
081114	9.746	9.960
081227	9.716	10.32
081228	9.470	10.18
081229	9.588	9.969
090525	10.32	10.42
090526	9.670	9.453
090527	10.01	9.821

3 讨论

本文对流动相的进行了筛选, 通过对流动相中三乙胺浓度的调整, 改变维生素 B₁ 和维生素 B₂ 分离情况。最后确定流动相为甲醇 - 0.06% 庚烷磺酸钠溶液 (含 1.2% 醋酸与 0.12% 三乙胺) (25:75) 为流动相; 维生素 B₁ 峰、维生素 B₆ 峰与其他峰分离度大于 1.5, 且不拖尾, 结果理想。

参考文献

- 1 MIAO Hui - zhu (苗惠珠), LIU Yu - bo (刘玉波), LIU Yan - e (刘艳娥). Simultaneous determination of vitamin B₁ and vitamin B₆ in compound L - lysine granules by IP - HPLC (离子对液相色谱法测定复方赖氨酸颗粒剂中维生素 B₁ 和维生素 B₆ 的含量). *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 1999, 15(1): 24
- 2 LIU Xiao - lin (刘晓琳), WU Gu (武谷), ZHONG Huai - bin (钟淮滨). Simultaneous determination of vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₆ and niacinamide in compound vitamin B solution by HPLC (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). *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2003 17(4): 241

(本文于 2010 年 4 月 24 日收到)