

反相离子对高效液相色谱法测定更年舒片中维生素 B<sub>6</sub> 的含量

王英锋, 梁建贞, 张建博

(首都师范大学分析测试中心, 北京 100037)

**摘要** 目的: 采用反相离子对高效液相色谱法测定更年舒片中维生素 B<sub>6</sub> 的含量。方法: 色谱柱: YMC packed ODS-A (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 己烷磺酸钠(用冰醋酸调 pH = 3.1) (4:96); 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 291 nm; 柱温: 25 °C。结果: 维生素 B<sub>6</sub> 与其他成分分离良好。维生素 B<sub>6</sub> 在 0.15~0.76 μg 范围内呈良好的线性关系 ( $r = 0.9998$ ), 平均回收率 ( $n = 9$ ) 101.3%。结论: 方法简便、准确、重现性好。

**关键词** 更年舒片; 维生素 B<sub>6</sub>; 反相离子对高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)06-1019-03

## Ion-pair RP-HPLC determination of vitamin B<sub>6</sub> in Gengnianshu tablets

WANG Ying-feng LIANG Jian-zhen ZHANG Jian-bo

(The Center for Instrumental Analysis of Capital Normal University, Beijing 100037)

**Abstract Objective** To develop an RP-HPLC method for the determination of vitamin B<sub>6</sub> in Gengnianshu tablets. **Methods** A YMC packed ODS-A (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used with mobile phase consisted of methanol-0.1% sodium hexanesulfonate (4:96 adjusted to pH 3.1 with glacial acetic acid). The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detecting wavelength was 291 nm. The column temperature was 25 °C. **Results** Vitamin B<sub>6</sub> was well separated. The calibration curve was linear over the concentration range of 0.15-0.76 μg ( $r = 0.9998$ ). The average recovery of vitamin B<sub>6</sub> ( $n = 9$ ) was 101.3%. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible.

**Key words** Gengnianshu tablets; vitamin B<sub>6</sub>; ion-pair RP-HPLC

更年舒片 (WS3-B-2708-97) 收载于部颁标准中药成方制剂第十四册, 由熟地黄、龟甲(炒)、山药、维生素 B<sub>6</sub> 等 16 味药组成, 具有滋补肝肾, 养阴补血, 化淤调经, 调气温肾, 营养神经, 调节代谢功能的功效。原标准中未测定维生素 B<sub>6</sub>, 为提高和控制本品的质量, 建立了反相离子对高效液相色谱法测定更年舒片中维生素 B<sub>6</sub> 的含量。该法简便、准确、重现性好。

### 1 仪器和试剂

Waters 600-717 高效液相色谱仪, Waters 2996 二极管阵列检测器, Empower 色谱数据工作站, KQ-250E 型医用超声波清洗器 (40 kHz, 250 W)。维生素 B<sub>6</sub> 对照品 (中国药品生物制品检定所, 含量 99.8%); 更年舒片由江西伊尔斯制药有限公司提

供; 所用试剂甲醇为色谱纯, 冰醋酸、庚烷磺酸钠均为分析纯, 水为超纯水; 所有试剂使用前均经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

### 2 色谱及检测条件

色谱柱: YMC-packed ODS-A 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 己烷磺酸钠溶液 (4:96) 为流动相, pH 为 3.1; 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长:  $\lambda = 291$  nm; 柱温: 室温。理论板数按维生素 B<sub>6</sub> 峰计算, 应不低于 3000。

### 3 溶液的制备

**3.1 对照品溶液** 精密称定维生素 B<sub>6</sub> 标准品 0.38 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解, 然后定容至刻度, 即得。

**3.2 供试品溶液** 取本品 10 片, 研成粉末, 精密称

定粉末 0.80 g 于 25 mL 量瓶中, 加流动相, 并定容至刻度, 超声提取 30 min, 静置, 过滤, 取续滤液过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 即得。

**3.3 阴性对照品溶液** 根据处方, 取除维生素 B<sub>6</sub> 外的其他药味, 按制剂工艺进行制备, 作为阴性样品, 取约 0.80 g 的阴性对照品粉末, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加入流动相, 并定容至刻度, 超声提取 30 min, 过滤, 取续滤液过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 即得阴性对照品溶液。

#### 4 系统适用性试验

按上述色谱条件, 分别精密量取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 记录色谱图。对照品、供试品维生素 B<sub>6</sub> 峰的保留时间基本一致, 阴性对照在维生素 B<sub>6</sub> 峰位置处无干扰, 表明其他药味对含量测定无影响, 见图 1。

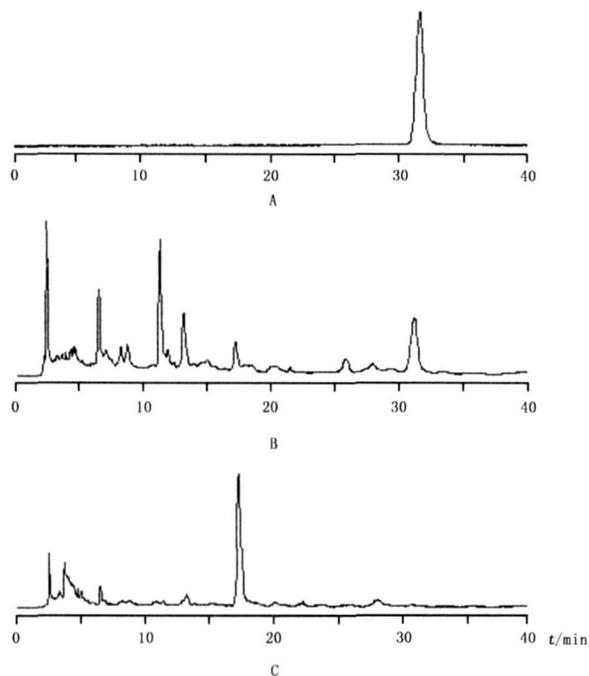


图 1 对照品 (A)、供试品 (B) 及阴性对照品 (C) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), sample (B) and blank (C)

#### 5 线性关系考察

精密称取经五氧化二磷干燥过夜的维生素 B<sub>6</sub> 对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含维生素 B<sub>6</sub> 对照品溶液 38  $\mu\text{g}$  的对照品溶液, 作为储备液。分别精密量取上述对照品溶液 2, 4, 6, 8 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度。依次精密吸取上述对照品溶液及对照品储备液 20  $\mu\text{L}$  进行 HPLC 测定, 记录色谱图。以标准溶液进样量 ( $X$ ) 对色谱峰面积积分值 ( $Y$ ) 作标准曲线, 并进行回归, 计算得回归方程为

$$Y = 2.282 \times 10^6 X - 1.859 \times 10^4 \quad r = 0.9998$$

结果表明维生素 B<sub>6</sub> 进样量在 0.15~0.76  $\mu\text{g}$  范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

#### 6 稳定性试验

取同一批样品, 按供试品溶液制备方法制备后, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进行 HPLC 测定, 峰面积积分值依次为 955649, 960773, 988333, 996529, 993699, 934402, 984197, 平均值为 973486, RSD 为 2.2%。测定结果表明样品在 24 h 内基本稳定。

#### 7 精密度试验

分别精密吸取线性项下的对照品储备液 2, 4, 8 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得低、中、高 3 个浓度的标准品溶液, 分别重复连续进样 20  $\mu\text{L}$ , 测得维生素 B<sub>6</sub> 峰面积的 RSD ( $n = 6$ ) 分别为 0.95%, 0.89%, 0.92%, 表明仪器的精密度良好。

#### 8 重复性试验

精密称取同批样品 5 份 (每份约 0.80 g), 按供试品溶液的制备方法制备后, 按所拟定的含量测定方法操作, 测得维生素 B<sub>6</sub> 平均含量 ( $n = 5$ ) 为 685.52  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 为 1.35%, 结果表明此法重复性良好。

#### 9 回收率试验

取已知维生素 B<sub>6</sub> 含量的同批号样品 0.40 g 共 9 份, 精密称定, 每 3 份为一组, 分别准确加入维生素 B<sub>6</sub> 对照品 135.06, 270.13, 405.19  $\mu\text{g}$  按“3.2”项下方法制备供试品溶液, 进样 20  $\mu\text{L}$  测定, 按所拟定的含量测定方法操作。每组维生素 B<sub>6</sub> 的平均回收率 ( $n = 3$ ) 分别为 102.2%, 100.5%, 101.9%; RSD 分别为 0.40%, 0.70%, 0.98%。总的平均回收率 ( $n = 9$ ) 为 101.4%。

#### 10 样品含量测定

按“3.2”项下方法操作, 处理 6 批样品, 制备所需的供试品溶液。在上述色谱条件下进行维生素 B<sub>6</sub> 含量测定, 结果见表 1。

表 1 样品测定结果 ( $n = 3$ )

Tab 1 Results of sample determination

批号 (Lot No.)	含量 (content) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD /%
20051201	651.90	1.22
20051203	686.72	1.58
20051205	667.37	0.86
20051208	632.42	0.34
20051209	708.63	1.89
20051210	630.69	0.49

## 11 讨论

**11.1 检测波长的选择** 在参考文献 [1, 2] 的基础上, 称取维生素 B<sub>6</sub> 对照品适量, 用水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中含 40 μg 的溶液, 在 400~200 nm 波长范围扫描, 维生素 B<sub>6</sub> 在 291 nm 波长处有最大吸收, 故选择 291 nm 作为检测波长。

**11.2 超声处理时间的选择** 实验中将供试品溶液分别用流动相超声处理 10, 20, 30, 40 min, 结果表明, 超声 30, 40 min 提取效果相差不大, 综合考虑选择提取时间 30 min。

**11.3 流动相的选择** 本实验由于样品成分复杂, 干扰组分较多, 因此流动相的选择很关键。经实验研究, 选择离子对流动相较好, 离子对流动相由己烷

磺酸钠甲醇组成, 并且发现不同离子浓度, 不同 pH 对峰形影响较大, 有机相与水相比比例会影响维生素 B<sub>6</sub> 与其他峰的分离。经实验, 选择文中的色谱条件, 维生素 B<sub>6</sub> 有很好的分离度, 峰形很好。

## 参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol III (二部): 667
- 2 OUYANG Xiao-mei(欧阳晓玫), REN Shu-ling(任淑玲). Determination of content in compound procaine hydrochloride and vitamin B<sub>6</sub> tablets by HPLC (HPLC 法测定复方益康片中的盐酸普鲁卡因和维生素 B<sub>6</sub> 的含量). *China Pharm J* (中国药师), 2002, 5(11): 662

(本文于 2008 年 6 月 24 日修改回)

## 赛默飞世尔科技食品安全八市巡讲圆满结束

横跨两月历时两周, 途经武汉、成都等八个城市的赛默飞世尔科技食品安全巡回讲座于日前圆满结束, 超过 1000 位分析检测界相关人士参加了此次活动。作为赛默飞世尔科技“食品安全月”的重要组成部分, 此次活动主要关注食品中农药兽药残留检测及色谱质谱与元素分析仪器在该领域的应用。



赛默飞世尔科技举办食品安全巡回讲座已有数年之久, 此轮八城市食品安全巡回讲座活动无论从参与人数还是从反馈效果上都远远好于以往任何一次。众多分析测试界同仁对赛默飞世尔科技食品安全解决方案有了全面的了解, 并对优质色谱质谱和痕量元素分析产品表现出浓厚的兴趣。

欲了解更多信息, 请浏览: [www.themofisher.com](http://www.themofisher.com) (英文), [www.themo.com.cn](http://www.themo.com.cn) (中文)