

## 核黄素、光黄素、光色素及其他有关物质的高效液相色谱测定\*

张红霞, 黄荣清\*\*, 肖炳坤, 杨建云

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

**摘要** 目的: 建立一种反相高效液相色谱法测定核黄素的含量及其有关物质。方法: 采用 Agilent Zorbax C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇 (A) - 0.1% 醋酸 (B) 为流动相梯度洗脱 (0~15 min, 30% A; 15~25 min, 30% A → 60% A; 25~35 min, 60% A), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 267 nm, 柱温为室温, 进样量 20 μL, 外标法定量。结果: 在该色谱条件下, 核黄素及其有关物质能够得到很好的分离, 分离度大于 1.5, 理论塔板数按核黄素计大于 5000, 核黄素浓度在 1~30 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内与峰面积呈良好的线性关系 ( $r = 0.9999$ ); 定量限和检测限分别为 1.08 ng (S/N = 10) 和 0.36 ng (S/N = 3)。结论: 该高效液相色谱法准确、灵敏、可靠, 专属性好, 可用于核黄素的含量及其有关物质的测定。

**关键词:** 核黄素; 含量; 光黄素; 光色素; 有关物质; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2010)01-0067-04

## HPLC determination of riboflavin, lumiflavin, lumichrome and other related substances\*

ZHANG Hong-xia, HUANG Rong-qing\*\*, XIAO Bing-kun, YANG Jian-yun

(Institute of Radiation Medicine Academy of Military Medical Science Beijing 100850 China)

**Abstract Objective** To establish an RP-HPLC method for the determination of the content of riboflavin and its related substances. **Methods** The analysis was carried on an Agilent Zorbax C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase was composed of methanol (A) and 0.1% acetic acid (B) with gradient elution (0-15 min, 30% A; 15-25 min, 30% A → 60% A; 25-35 min, 60% A) at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; The detection wavelength was 267 nm, and the column temperature was room temperature. Loaded volume was 20 μL. **Results** Using this method, riboflavin and its related substances were well separated and the degree of separability was more than 1.5, the number of theoretical plates with riboflavin was more than 5000. The linear curve was obtained in the range of 1-30 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ); The minimal quantifiable level and the minimal detectable level were 1.08 ng (S/N = 10) and 0.36 ng (S/N = 3). **Conclusion:** The method proposed for determination of the content and its related substances of riboflavin is specific, sensitive, reliable, accurate and can be used for the determination of the content of riboflavin and its related substances.

**Key words** riboflavin content, lumiflavin, lumichrome, related substances, RP-HPLC

核黄素, 化学名为 7,8-二甲基-10[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-四羟基戊基]-3,10-二氢苯并蝶啶-2,4-二酮, 是一种重要的维生素类药。临床上辅助治疗癌症、冠心病、高血压、关节炎、烧伤等病症, 也可用于治疗化疗、放疗中所引起的各种皮炎、口腔与消化道粘膜炎。中国药典中核黄素的含量测定方法为紫外可见分光光度法, 并用吸收系数计

算<sup>[1]</sup>。用紫外分光光度法测定方便, 但无法考察其有关物质, 且专属性不强, 造成结果有一定差异; 关于 HPLC 法测定核黄素含量研究已有较多报道<sup>[2,3]</sup>, 但文献中建立的 HPLC 法分离度及灵敏度欠佳, 相应色谱图上只能分离出核黄素的主峰, 而有关物质不能得到很好的分离。为此, 本研究建立了一种反相高效液相色谱法测定核黄素的含量及有关物质,

\* 国家科技重大专项“重大新药创制”综合性新药研究开发技术平台 (No. 2009ZX09301-002) 资助; 国家自然科学基金项目 (No. 20672143)

\*\* 通讯作者 Tel: (010) 66930217 E-mail: huangrq@tm.com

提高了检测的灵敏度和分离度,在此条件下,主峰与各有关物质峰都能得到很好分离,且方法准确,重复性好,操作简单。

### 1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(美国 Waters Alliance),包括 Waters 2695 四元泵、2996 二极管阵列检测器、Empower 数据处理系统; SARTORIUS BP211D 型十万分之一天平; KQ3200 超声仪。

核黄素对照品(纯度为 99.8%,中国药品生物制品检定所),光黄素及光色素对照品(纯度均为 99.9%,SIGMA-ALDRICH 公司);核黄素原料(批号 2007006 和 2007007,杭州高成生物营养有限公

司;批号 2007008 湖北广济药业有限公司);甲醇(色谱纯,天津市西华特种试剂厂);水(纯化水,自制);冰醋酸(分析纯,北京化工厂)。

### 2 色谱条件和系统适用性试验

色谱柱: Agilent Zarbox C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A) - 0.1% 醋酸(B), 梯度洗脱(0~15 min, 30% A; 15~25 min, 30% A → 60% A; 25~35 min, 60% A); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 267 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。在选定的色谱条件下,理论塔板数按核黄素峰计算不低于 5000,核黄素及其有关物质峰与相邻峰之间分离度均大于 1.5。色谱图见图 1。

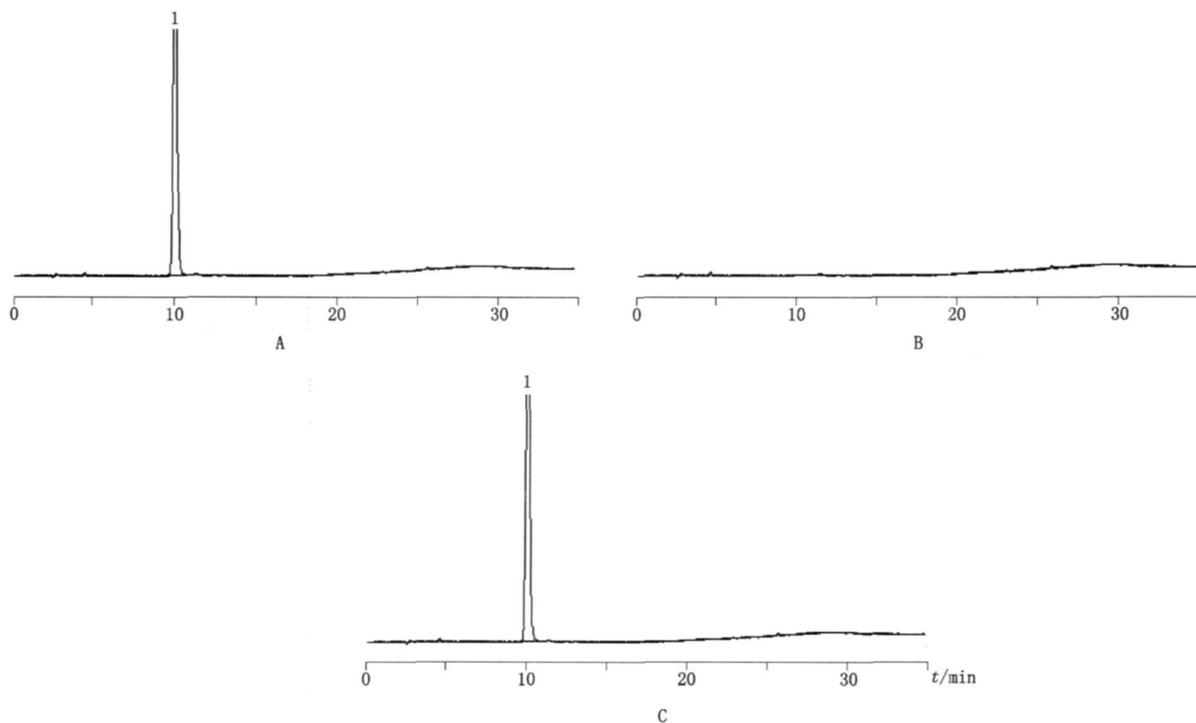


图 1 系统适用性 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC chromatograms for system suitability

A. 对照品 (reference substance) B. 空白 (blank) C. 样品 (sample)

1 核黄素 (riboflavin)

### 3 含量测定的线性试验

取核黄素对照品 10 mg 精密称定,置 100 mL 量瓶中,加入水约 50 mL 及冰醋酸 1 mL 后超声(功率 120 W,频率 40 kHz)处理 5 min,置 70 °C 水浴至溶解,冷却至室温,加水稀释至刻度,制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液(1),精密量取此溶液 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 mL,置 50 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,制成系列浓度的对照品溶液。分别量取 20 μL,注入液相色谱仪,结果表明:核黄素浓度(X)在 1~30 μg · mL<sup>-1</sup> 范围内与峰面积(Y)呈良好线性关系,其

回归方程(n=6)为:

$$Y = 9.436 \times 10^4 X + 110.6 \quad r = 0.9999$$

### 4 有关物质的线性试验

精密量取“3”项下的溶液(1) 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 6 mL,置 100 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,制成系列浓度的对照品溶液。分别量取 20 μL,注入液相色谱仪,结果表明:核黄素浓度(X)在 0.1~6 μg · mL<sup>-1</sup> 范围内与峰面积(Y)呈良好线性关系,其回归方程(n=6)为:

$$Y = 6.138 \times 10^4 X + 3.215 \times 10^4 \quad r = 0.9999$$

## 5 回收率试验

精密量取“3”项下的溶液(1)适量,加水制成每1 mL含20  $\mu\text{g}$ 的溶液,作为对照品溶液。精密量取20  $\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪;精密量取“3”项下的溶液(1)8、10、12 mL(各3份),分别置50 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。同法测定,按外标法计算,3个浓度的平均回收率( $n=9$ )为99.9%,RSD为0.24%。

## 6 检测限与定量限

取“4”项下的溶液,用水逐级稀释,进样,按10倍信噪比计算定量限,按3倍信噪比计算检测限。经测定,本色谱系统的最低定量限为1.08 ng,最低检测限为0.36 ng。

## 7 精密度试验

取“5”项下的对照品溶液,连续进样6次,记录色谱图,结果核黄素峰面积的RSD为0.18%,表明色谱系统精密度良好。

## 8 重复性试验

精密称取同一批号的核黄素样品6份,照“10”项下的方法操作,6次测得结果的平均值为99.52%,RSD为0.15%。

## 9 稳定性试验

取“11”项下的供试品溶液分别在0、4、8、12、16、20、24 h进行分析,结果核黄素峰面积的RSD为1.2%;取“10”项下的供试品溶液,分别在0、4、8、12、16、20、24 h进行分析,结果核黄素峰面积的RSD为1.4%。上述试验结果表明:2种溶液稳定性良好,能满足测定要求。

## 10 样品含量测定

精密称取对照品及各批样品适量,分别按“3”项下方法制成每1 mL含20  $\mu\text{g}$ 的对照品溶液和供试品溶液,精密量取20  $\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录峰面积,按外标法计算样品含量。3批样品中核黄素含量分别为99.50%、99.48%、99.61%。

## 11 有关物质检测

为控制核黄素质量,保证用药安全,应检查有关物质,供试品溶液的色谱图中如显有关物质峰,其中光黄素与光色素采用外标法控制质量;因其他有关物质对照品难以获得,所以采用自身对照法控制质量。

**11.1 光黄素测定方法** 取光黄素对照品10 mg,精密称定,置100 mL量瓶中,加入水约50 mL及冰醋酸1 mL后超声(功率120 W,频率40 kHz)处理5 min,置70  $^{\circ}\text{C}$ 水浴至溶解,冷却至室温,加水稀释至

刻度,摇匀,精密移取1 mL置100 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得光黄素对照品溶液;精密称取各批样品适量,同法制成每1 mL含0.1 mg的溶液,即得供试品溶液。精密量取光黄素对照品溶液20  $\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高约达满量程的20%;再准确量取光黄素对照品溶液和供试品溶液各20  $\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的2倍,见图2。检测样品3批(批号2007006、2007007、2007008),光黄素含量分别为0.14%、0.16%、0.17%。结果表明:样品中光黄素含量在0.15%左右。

**11.2 光色素测定方法** 同光黄素测定方法。检测样品3批(批号2007006、2007007、2007008),光色素含量分别为0.20%、0.21%、0.21%。结果表明:样品中光色素含量在0.21%左右。

**11.3 其他有关物质测定方法** 精密称取核黄素样品10 mg,置25 mL量瓶中,加入水约15 mL及冰醋酸1 mL后超声(功率120 W,频率40 kHz)处理5 min,置70  $^{\circ}\text{C}$ 水浴至溶解,冷却至室温,加水稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液;精密量取供试品溶液1 mL,置100 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得自身对照溶液。量取自身对照溶液20  $\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高约达满量程的20%,精密量取自身对照溶液与供试品溶液各20  $\mu\text{L}$ 分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的2倍。计算3批样品(批号2007006、2007007、2007008)中的其他有关物质含量分别为0.18%、0.19%、0.18%。见图2。

## 12 讨论

**12.1 主峰纯度的考察** 用PDA检测器测定核黄素峰纯度,主峰的纯度角度小于纯度阈值,核黄素峰纯度大于99.8%,表明主峰为单一峰,经二极管阵列检测器在200~400 nm波长范围内扫描,未漏检杂质峰。

**12.2 检测波长的选择** 核黄素对照品溶解稀释后,于200~400 nm波长范围扫描,核黄素在267 nm波长处有最大吸收,同时,其有关物质也在267 nm波长处有较强吸收,因此检测波长定为267 nm。

## 12.3 流动相的选择

**12.3.1 流动相组成及比例的选择** 曾先后选择了甲醇-水(30:70、28:72、25:75)、甲醇-水-冰醋酸(35:75:0.1、30:70:0.1、25:75:0.1)、乙腈-水-冰醋酸(30:70:0.1、20:80:0.1、15:85:0.1)作为

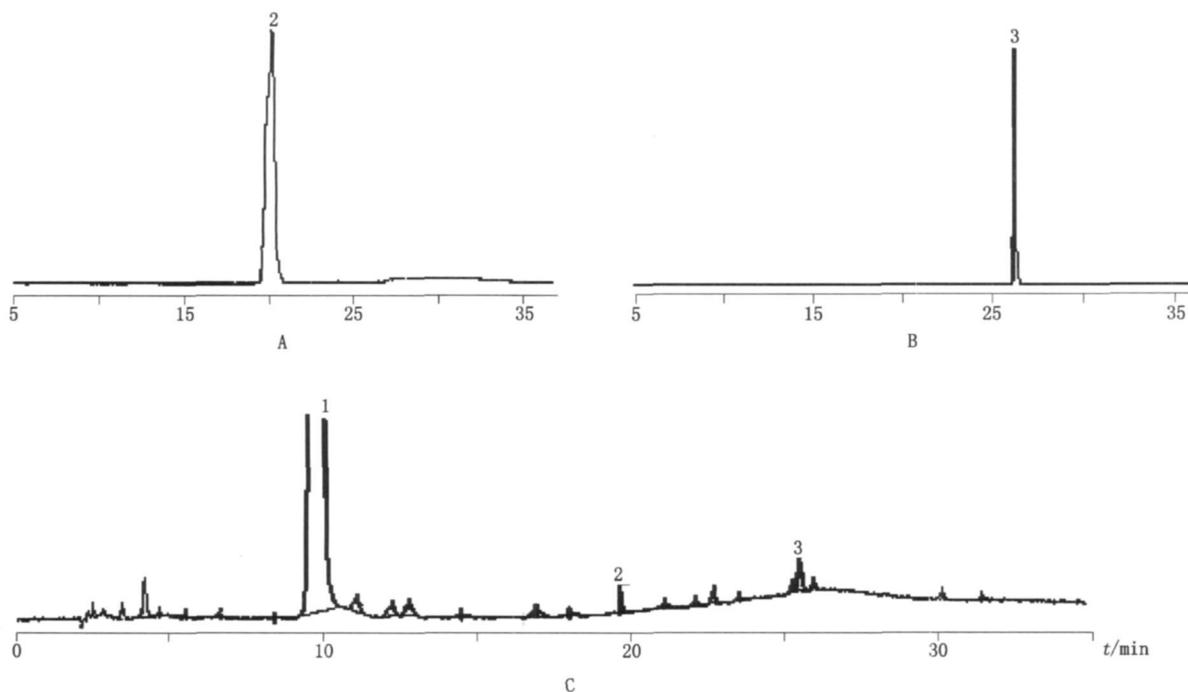


图 2 有关物质检测 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatograms for related substance test

A. 光黄素对照品 (lumiflavin reference substance) B. 光色素对照品 (lumichrome reference substance) C. 样品 (sample)

1. 核黄素 (riboflavin) 2. 光黄素 (lumiflavin) 3. 光色素 (lumichrome)

流动相对样品进行分析。结果表明, 甲醇-水-冰醋酸系统中, 配比为甲醇-水-冰醋酸 (30: 70: 0.1) 时核黄素色谱峰保留时间适中, 有关物质与核黄素分离效果好, 通过比较, 发现醋酸的加入可以明显改善核黄素与有关物质的分离度。乙腈-水系统中, 核黄素与有关物质不能很好地分离, 所以决定采用甲醇-水-冰醋酸 (30: 70: 0.1) 即甲醇-0.1% 醋酸 (30: 70) 进行分析。

**12.3.2 梯度洗脱方法的建立** 使用甲醇-0.1% 醋酸 (30: 70), 记录 60 min 的色谱图, 结果显示 54.6 min 仍有色谱峰出现, 表明此流动相对某些有关物质的洗脱能力弱, 所以考虑在方法后段加入梯度洗脱。考察发现, 15 min 之前出现的色谱峰保留时间适中, 且分离良好, 而其后出现的有关物质色谱峰保留时间显著增加, 故在 15 min 后加入梯度, 经实验后建立以甲醇 (A) - 0.1% 醋酸 (B) 为流动相的如下梯度洗脱方法: 0~ 15 min, 30% A; 15~ 25 min, 30% A → 60% A; 25~ 35 min, 60% A。此分析条件既能保证主峰和有关物质峰的分离度, 又使分离时间不会过长。

**12.3.3 有关物质光黄素与光色素的确定** 光黄

素与光色素是核黄素的光解产物, 在实际检测过程中, 由于此 2 种有关物质分别与其对照品有相同的紫外吸收, 且在相同浓度、相同色谱条件下, 此 2 种有关物质分别与其对照品有完全相同的色谱行为、出峰时间 (光黄素约 20.1 min, 光色素约 26.9 min)。为了进一步确保结论的真实可靠, 最后把光黄素、光色素对照品与样品混合后再进行分析, 结果显示在 20.1 min 与 26.9 min 左右的峰明显增大且无其他杂峰出现, 因此, 可以断定此 2 种有关物质分别为光黄素与光色素。

#### 参考文献

1. ChP(中国药典). 2005. Vol III (二部): 665
2. DENG Jie-xiong(邓洁雄). Determination of riboflavin in riboflavin sodium phosphate by HPLC (HPLC 测定核黄素磷酸钠中核黄素的含量). *J Guangdong Pharm Coll* (广东药学院学报), 2006, 22(1): 53
3. CHEN Gui-hong(陈桂红), HUANG Qing-song(黄清松). Determination of Vit B<sub>1</sub> and Vit B<sub>2</sub> in Duoweitong oral liquid by HPLC (HPLC 法测定多维铁口服液中维生素 B<sub>1</sub>, 维生素 B<sub>2</sub> 的含量). *China Pharm* (中国药房), 2008, 19(10): 776

(本文于 2009 年 2 月 18 日收到)