

# 高效液相色谱法测定核黄素制剂含量

铁景沪 (中国人民解放军海军杭州疗养院, 杭州 310003)

刘志强 沈向忠 宗 俭 (浙江医科大学药系, 杭州 310006)

核黄素(维生素B<sub>2</sub>)分子结构中具有异咯嗪环, 故稳定性较差, 特别是遇光极易降解。核黄素制剂的含量测定, 中国药典(90年版)采用紫外分光光度法(测定波长 $444 \pm 1$  nm); 美国药典(XXII)采用荧光法( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 为440/530 nm), 准确度较高但操作繁琐, 条件不易控制。以往的HPLC法大都采用反相离子对色谱技术, 在流动相中加入己烷磺酸钠、水杨酸钠等与核黄素形成离子对, 以克服核黄素较强的极性, 但有平衡时间长、操作复杂、盐类易留在柱上较难冲洗干净等缺点。我们采用甲醇—醋酸为流动相, 使核黄素电离受到抑制而改善峰形, 并且在酸性条件下核黄素较稳定。同时采用灵敏度高、专属性强的荧光检测器检测。实验结果表明本法具有专一、准确、快速、灵敏的特点, 进行多批样品的测定, 结果满意。并进行了核黄素对光稳定性试验。

## 仪器、色谱条件与药品

Beckman液相色谱仪, YWGC18色谱柱(150

$\times 4.6$  mm, id), Varian 荧光检测器( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  = 360/530 nm), 灵敏度5。流动相: 甲醇—0.1% 醋酸(45:55), 使用前经滤过和超声波脱气。流速: 1.2 ml/min。纸速: 60 mm/h, 进样量20  $\mu$ l。

日立U—2000型紫外分光光度计

核黄素对照品: 浙江省药检所提供, 按药典法测定, 含量100.5%。在本法色谱条件下仅出一单峰, 无杂质峰出现。

核黄素片剂和注射剂: 市售品

所用试剂均为分析纯

实验方法与结果

1 线性关系: 取核黄素对照品适量, 精密称定, 照中国药典(90版二部)项下配制浓度为40  $\mu$ g/ml的溶液, 精密吸取0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 ml 分别置5 ml 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀后进样, 以峰高为纵坐标, 浓度为横坐标作图, 得一通过原点的直线。直线回归方程为  $h = -0.0813 + 0.94160C$  ( $r = 0.9999$ )。表明核黄素浓度在4—28  $\mu$ g/ml 范围内与峰高呈良好线性关系。

表1 样品含量测定结果(标示量%)

| 剂型与批号 | HPLC法  | 药典紫外法      |
|-------|--------|------------|
| 片剂    | 911216 | 89.91±0.76 |
|       | 911103 | 88.24±0.26 |
|       | 910710 | 87.40±0.45 |
| 注射剂   | 900801 | 93.94±0.48 |
|       | 900828 | 96.61±0.73 |
|       | 880421 | 84.07±0.58 |

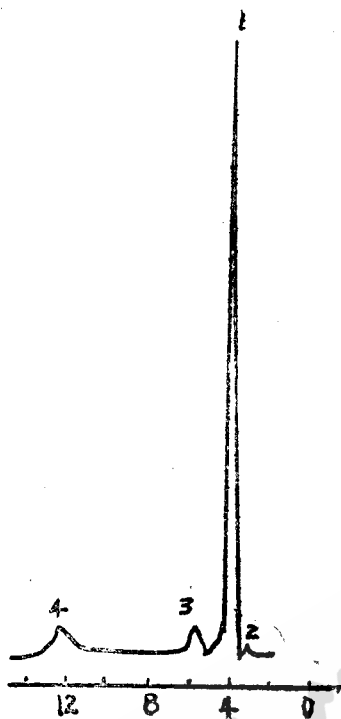


图1 核黄素样品色谱峰

1—核黄素  
2, 3, 4—未知杂质峰

2 重复性试验: 取浓度约为8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的对照液连续进样10次, 测量峰高。变异系数0.62%, 表明重现性良好。

3 回收率试验: 按处方制备片剂和注射剂的模拟样品, 参照“样品测定”项下测定, 片剂回收率 $100.02 \pm 0.53\%$  ( $n=6$ ); 注射剂回收率 $99.12 \pm 0.73\%$  ( $n=6$ )。

#### 4 样品测定

4.1 片剂测定: 避光操作。取本品20片, 精密称定, 研细, 精密称取适量(约相当于核黄素1mg), 置100 ml 量瓶中, 加冰醋酸0.25 ml 和水10 ml, 置水浴上加热1 h, 振摇使溶。放冷, 加水稀释, 加4%氢氧化钠溶液1.5 ml, 加水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液进样。

4.2 注射剂测定: 避光操作。精密量取本品适量, 加水适当稀释后, 进样。

以本法和药典紫外法测定数批核黄素制剂, 结果见表1。

5 光照对核黄素稳定性的影响试验: 取一定浓度的核黄素溶液, 置室外阳光下直射不同时间, 以考察其对光稳定性。以本法和紫外法分别测定光照后溶液的浓度, 结果见图2。

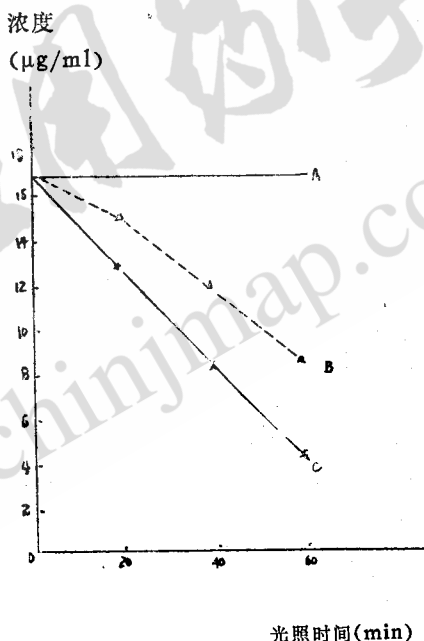


图2 光照对核黄素溶液稳定性的影响

A: 未光照的溶液  
B: 光照后以紫外法测定  
C: 光照后以HPLC法测定

## 讨 论

1 采用甲醇—0.1%醋酸为流动相, 可以改善峰形并获得合适的保留时间。流动相的比例对分离效果影响很大, 当流动相含50%甲醇时, 核黄素与杂质不能完全分离, 而当甲醇量减至45%时, 可达到完全分离, 色谱图见图1。

2 制剂的含量测定结果比较表明,紫外法的测定结果比本法平均高6—10%,有文献报道<sup>[1]</sup>:紫外法在 $444 \pm 1 \text{ nm}$ 处测定核黄素,方法简便,对遇光变为深黄及棕黄色的产品吸收度减小,含量降低,并认为紫外法可有效地控制产品质量。我们在光照对核黄素稳定性影响试验中,用两法同时进行测定并比较,以考察光化降解产物对测定法的影响。结果表明,紫外法所反映的与文献基本相符,随光照降解产物的增加而吸收度减小,浓度降低。但本法测定所反映的浓度下降速度比紫外法快(见图2)。光照开始降解产物较少时,两法测定结果尚接近,但当光照时间延长降解产物增多时,两法测定结果间差异越来越大。说明紫外法虽能反映光照后核黄素含量降低,但仍不能真正测得核黄素的准确含量。我们认为其中的原因是核黄素光照变质后的降解产物虽吸收光谱发生了变化,但在 $444 \pm 1 \text{ nm}$ 处

仍有吸收,致使含量偏高。而在本法条件下,显强黄绿色荧光的核黄素的降解产物如感光黄素无荧光、光化黄素则显蓝色荧光,它们对检测器无响应,同时在所选定的色谱条件下,杂质峰与主峰完全分开,所以不受光化降解产物的影响,专属性强。

3 核黄素对光照稳定性试验表明其对光不稳定,浓度下降与光照时间呈良好线性关系,说明核黄素的光化降解反应属于零级的力学反应,这为核黄素在生产、贮存、使用等过程中采取预防变质失效措施提供了理论依据。

## 参 考 文 献

- 1 中国药典(85年版二部)注释选编,北京:化学工业出版社,1988,180—185.

收稿日期:1994-07-08