

HPLC 测定注射用复方三维 B 中盐酸吡多胺、盐酸吡多胺与维生素 B₁₂ 的含量

谢子立(安徽省食品药品检验所, 合肥 230051)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定注射用复方三维 B 中盐酸吡多胺、盐酸吡多胺与维生素 B₁₂ 的含量。方法 色谱柱 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为庚烷磺酸钠溶液-乙腈-甲醇, 采用梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 220 nm, 理论板数按盐酸吡多胺峰计不低于 3 000, 柱温为 30 °C。结果 盐酸吡多胺、盐酸吡多胺与维生素 B₁₂ 分别在 2.04~20.4 μg, 2.05~20.5 μg, 0.020 6~0.206 μg 内与峰面积呈良好的线性关系(*r* 分别为 1.000, 0.999 9, 1.000); 平均回收率分别为 101.0%, 101.6%, 98.3%(*n*=9, RSD 分别为 0.5%, 1.4%, 0.3%)。结论 本法简便、准确、重复性好, 适用于注射用复方三维 B 中盐酸吡多胺、盐酸吡多胺与维生素 B₁₂ 的含量测定。

关键词: 高效液相色谱法; 注射用复方三维 B; 盐酸吡多胺; 盐酸吡多胺; 维生素 B₁₂

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)10-0952-04

Determination of Fursultiamine Hydrochloride, Pyridoxamine Dihydrochloride and Vitamin B₁₂ in Compound Trivitamin B Injection by HPLC

XIE Zili(Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method to determine the content of fursultiamine hydrochloride, pyridoxamine dihydrochloride and vitamin B₁₂ in compound trivitamin B injection. **METHODS** C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase was a mixture of sodium heptanesulfonate solution-acetonitrile-methanol, and elute with linear gradient. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and detection wavelength was 220 nm. The theoretical plate number calculated by the peak of pyridoxamine dihydrochloride was not less than 3 000 and column temperature was 30 °C. **RESULTS** The calibration curve linear of fursultiamine hydrochloride, pyridoxamine dihydrochloride and vitamin B₁₂ were 2.04~20.4 μg, 2.05~20.5 μg and

作者简介: 谢子立, 男, 硕士, 副主任药师

Tel: (0551)3358051

E-mail: xiezili@sohu.com

0.020 6–0.206 μg , respectively, which showed a good linear relationship ($r=1.000, 0.999 9, 1.000$). The average recoveries were 101.0%, 101.6%, 98.3%, respectively ($n=9, \text{RSD}=0.50\%, 1.40\%, 0.30\%$). **CONCLUSION** The method is simple, accurate, repeatable and can be applied to determine the content of fursultiamine hydrochloride, pyridoxamine dihydrochloride and vitamin B₁₂ in compound trivitamin B injection.

KEY WORDS: HPLC; compound trivitamin B injection; fursultiamine hydrochloride; pyridoxamine dihydrochloride; vitamin B₁₂

注射用复方三维 B 为复方制剂, 其组分有盐酸呋喃硫胺、盐酸吡多胺和维生素 B₁₂, 用于治疗周围神经损伤、多发性神经炎、三叉神经痛、恶性贫血、营养性贫血等。注射用复方三维 B 的现行药品标准^[1]采用紫外分光光度法对上述 3 种成分分别进行含量测定, 过程繁琐, 结果误差较大。目前, 对于维生素类含量测定研究较多^[2-3], 对盐酸吡多胺含量测定的报道则较少, 有报道采用加压毛细管电色谱^[4]及液相质谱^[5]等方法提高组分间的分离度和专属性达到有效测定盐酸吡多胺和维生素 B₁₂的含量, 但未见盐酸呋喃硫胺的 HPLC 测定方法。本实验采用 C₁₈ 色谱柱, 用高效液相梯度洗脱的方法即可同时测定 3 个组分的含量, 方法准确、简便、灵敏度高、重复性好, 可用于注射用复方三维 B 中盐酸呋喃硫胺、盐酸吡多胺和维生素 B₁₂的质量控制。

1 仪器和试剂

LC-20AT(配 DAD 检测器)高效液相色谱仪(日本岛津公司); AG-135 分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

盐酸呋喃硫胺对照品(批号: 080301, 含量: 98.8%)与盐酸吡多胺对照品(批号: 080201, 含量: 98.6%)均购于上海新亚药业有限公司; 维生素 B₁₂ 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100248-200802, 含量: 95.5%); 注射用复方三维 B(上海新亚药业有限公司, 批号: 090501, 080401, 080402, 规格: 每瓶含盐酸呋喃硫胺为 25 mg, 盐酸吡多胺为 25 mg, 维生素 B₁₂ 为 0.25 mg); 甲醇、乙腈、庚烷磺酸钠均为色谱纯; 水为去离子水; 磷酸和磷酸二氢钾均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为岛津 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以庚烷磺酸钠溶液(取庚烷磺酸钠 2.02 g 与磷酸二氢钾 1.36 g 溶于 1 000 mL 水中, 用磷酸调节 pH 值至 3.0)-乙腈(95:5)为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 甲醇为流动相 C, 梯度洗脱(A 相起始比例为 95%, B 相为 0, C 相为 5%; 30 min 内 A 相匀速

下降至 75%, B 相匀速升至 20%, C 相维持 5%比例不变; 30.1 min 时流动相比比例立即恢复初始条件并维持 5 min), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 220 nm, 理论板数按盐酸吡多胺峰计算不低于 3 000; 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL 。对照品及供试品色谱图见图 1。

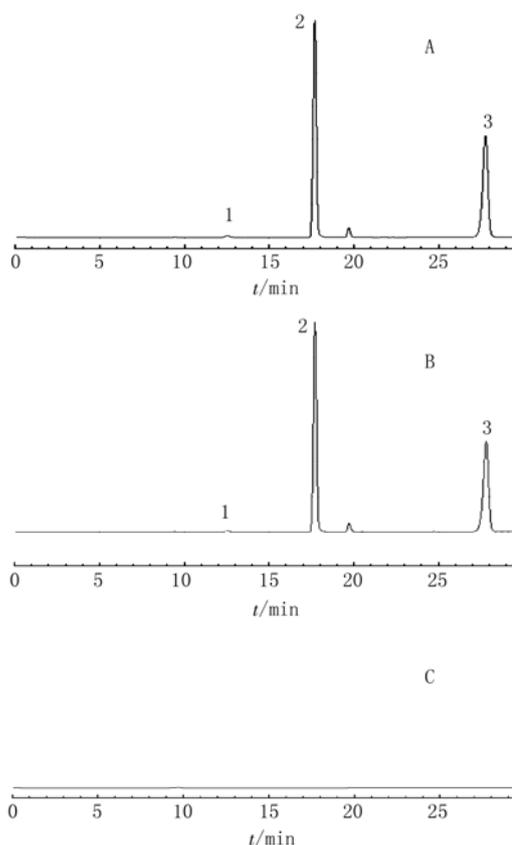


图 1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; C-空白溶液; 1-维生素 B₁₂; 2-盐酸吡多胺; 3-盐酸呋喃硫胺

Fig 1 HPLC chromatogram

A-reference substance; B-sample; C-blank; 1-vitamin B₁₂; 2-pyridoxamine dihydrochloride; 3-fursultiamine hydrochloride

2.2 对照品溶液的制备

精密称取盐酸吡多胺对照品 25.93 mg 和盐酸呋喃硫胺对照品 25.78 mg, 置 25 mL 量瓶中; 另精密称取维生素 B₁₂ 对照品 13.45 mg, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 2 mL 置上述 25 mL 量瓶中, 加水适量使溶解, 并用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取本品 10 瓶的内容物, 混匀, 精密称取适量(约相当于 112 mg), 置 50 mL 量瓶中, 加水使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 空白溶液的制备

取无水碳酸钠 11.5 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加水使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为空白溶液。

2.5 线性关系考察

精密取“2.2”项下对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20 μL 分别进样, 按“2.1”项下色谱条件进行检测, 测定峰面积, 以峰面积(Y)为纵坐标, 进样量(X)为横坐标, 进行线性回归, 得到线性方程:
 $Y=2\ 510\ 981.6X-345.4$, $r=1.000$ (维生素 B_{12});
 $Y=2\ 134\ 931.5X+740\ 049.1$, $r=0.999\ 9$ (盐酸吡多胺);
 $Y=1\ 678\ 402.0X-134\ 234.0$, $r=1.000$ (盐酸呋喃硫胺)。结果表明维生素 B_{12} 、盐酸吡多胺、盐酸呋喃硫胺进样量分别在 0.020 6~0.206 μg , 2.05~20.5 μg 和 2.04~20.4 μg 内线性关系良好。

2.6 仪器精密度试验

精密吸取“2.2”项下对照品溶液 10 μL , 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 依法测定, 结果表明维生素 B_{12} 、盐酸吡多胺、盐酸呋喃硫胺的峰面积的 RSD 分别为 0.5%, 0.1%和 0.2%, 仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

取同一批样品(090501)混匀, 按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液($n=6$), 按样品测定方法测定, 测得平均含量以标示量计分别为 95.1%, RSD=0.6%(维生素 B_{12}); 110.9%, RSD=0.5%(盐酸吡多胺); 98.9%, RSD=0.6%(盐酸呋喃硫胺)。结果表明方法重复性好。

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样, 维生素 B_{12} 、盐酸吡多胺和盐酸呋喃硫胺的峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 0.1%, 0.3%。结果表明供试品溶液在室温下 12 h 内基本稳定。

2.9 回收率试验

精密称取盐酸吡多胺对照品 103.45 mg 和盐酸呋喃硫胺对照品 100.68 mg, 置 50 mL 量瓶中加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 4, 5, 6 mL 分别置 10 mL 量瓶中; 另精密称取维生素 B_{12} 对照品 13.45 mg, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加水溶解并

稀释至刻度, 摇匀, 分别精密吸取 0.8, 1.0 和 1.2 mL, 分别置于上述相应的 10 mL 量瓶中; 另精密称取无水碳酸钠 57.49 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加水使溶解并稀释至刻度, 精密吸取 1.0 mL, 分别加入上述量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。精密取 10 μL 进样, 按“2.1”项下色谱条件进行检测, 测得维生素 B_{12} 、盐酸吡多胺和盐酸呋喃硫胺平均回收率($n=9$)分别为 98.3%(RSD=0.3%), 101.6%(RSD=1.4%), 101.0%(RSD=0.5%)。表明本实验所确定的 HPLC 能有效测定注射用复方三维 B 中盐酸呋喃硫胺、盐酸吡多胺与维生素 B_{12} 的含量, 准确有效, 见表 1。

表 1 回收率试验($n=9$)

Tab 1 Results of recovery ($n=9$)

被测组分	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
维生素 B_{12}	0.102 8	0.101 4	98.61	98.3	0.3
	0.102 8	0.101 3	98.52		
	0.102 8	0.101 1	98.30		
	0.128 4	0.125 5	97.70		
	0.128 4	0.126 3	98.36		
	0.128 4	0.126 6	98.61		
	0.154 1	0.151 6	98.39		
	0.154 1	0.151 3	98.20		
	0.154 1	0.151 3	98.15		
	0.154 1	0.151 3	98.15		
盐酸吡多胺	8.160 1	8.397 6	102.91	101.6	1.4
	8.160 1	8.405 6	103.01		
	8.160 1	8.402 9	102.97		
	10.200 2	10.397 1	101.93		
	10.200 2	10.389 2	101.85		
	10.200 2	10.415 6	102.11		
	12.240 2	12.226 7	99.89		
	12.240 2	12.225 5	99.88		
	12.240 2	12.222 5	99.86		
	12.240 2	12.222 5	99.86		
盐酸呋喃硫胺	7.957 7	7.986 1	100.36	101.0	0.5
	7.957 7	7.987 5	100.37		
	7.957 7	7.989 7	100.40		
	9.947 2	10.088 1	101.42		
	9.947 2	10.090 5	101.44		
	9.947 2	10.085 1	101.39		
	11.936 6	12.062 9	101.06		
	11.936 6	12.062 7	101.06		
	11.936 6	12.061 3	101.04		
	11.936 6	12.061 3	101.04		

2.10 含量测定

取装量差异项下的内容物, 混匀, 精密称取适量(约相当于 112 mg), 置 50 mL 量瓶中, 加水使溶解并稀释至刻度, 作为供试品溶液。精密量取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。另取维生素 B_{12} 、盐酸吡多胺和盐酸呋喃硫胺对照品, 精密称定, 加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含维生素 B_{12} 0.01 mg、盐酸吡多胺 1 mg 和盐酸呋喃硫胺 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液, 同法测定, 按外标法以峰面积计算, 即得, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果($n=3$)Tab 2 Content of samples($n=3$)

样品批号	被测组分	HPLC 法		UV 法(标准方法)	
		含量(以标示量计, %)	RSD/%	含量(以标示量计, %)	RSD/%
090501	维生素 B ₁₂	95.1	0.6	104.1	0.1
	盐酸吡多胺	110.9	0.6	109.0	0.3
	盐酸呋喃硫胺	98.9	0.7	94.6	0.1
080401	维生素 B ₁₂	92.8	0.4	109.0	0.3
	盐酸吡多胺	106.5	0.8	107.3	0.5
	盐酸呋喃硫胺	98.2	1.0	92.5	0.1
080402	维生素 B ₁₂	92.8	1.2	108.8	0.3
	盐酸吡多胺	104.3	0.4	106.8	0.1
	盐酸呋喃硫胺	99.9	1.1	91.3	0.5

3 讨论

3.1 检测波长的选择

盐酸呋喃硫胺、盐酸吡多胺与维生素 B₁₂ 是注射用复方三维 B 的主要组成部分。通过液相 DAD 检测器对上述 3 种成分的紫外光谱进行了分析, 结果显示维生素 B₁₂、盐酸吡多胺和盐酸呋喃硫胺分别在 210, 201, 196 nm 波长处有最大吸收, 由于盐酸吡多胺和盐酸呋喃硫胺在 210 nm 波长处紫外吸收曲线较为陡峭, 而在 220 nm 波长处 3 个组分的紫外吸收曲线均较为平缓且均有较大吸收值, 同时维生素 B₁₂ 在 220 nm 波长处吸收值与 210 nm 波长处的最大吸收值相差很少, 有利于定量结果的准确性, 因此选择 220 nm 作为测定波长, 同时又可避免紫外的末端吸收效应, 结果理想。

3.2 流动相的选择

目前, 用 HPLC 测定维生素 B₁₂ 含量的方法很多, 其流动相大多由甲醇、乙腈、缓冲盐溶液等组成^[6]; 通过实验发现维生素 B₁₂ 按甲醇-水(80:20)的条件下其出峰时间过早, 在添加离子对试剂确保维生素 B₁₂ 出峰时间适中的条件下, 盐酸呋喃硫胺出峰时间又过晚, 峰形存在严重拖尾现象, 同时盐酸吡多胺与杂质峰存在分离不完全的可能。通过比较确定不同比例的乙腈对各组分出峰时间影响最大, 因此最终采用梯度洗脱, 不断增加乙腈比例可较好的解决上述问题。

为了确保最佳实验条件, 考察了不同 pH 值对上述组分离谱行为的影响。实验表明, 不同 pH 值对各组分的色谱行为存在一定影响, 随着 pH 值降低, 各组分峰形及分离度有一定改善, 以 pH 3.0 最佳。结果显示在上述色谱条件下, 盐酸呋喃硫

胺出峰时间约为 30 min, 维生素 B₁₂ 出峰时间约为 10 min, 同时盐酸吡多胺与其他杂质分离度能达到 1.5 以上, 各组分峰保留时间合适, 分离效果佳。

3.3 供试品溶液浓度的选择

由于注射用复方三维 B 处方中维生素 B₁₂ 的量最低, 与盐酸呋喃硫胺和盐酸吡多胺的投料量均相差 100 倍, 为了含量测定的简便, 试验拟定为在同一色谱条件同时测定上述 3 种组分, 根据维生素 B₁₂ 测得的峰面积设计样品的稀释步骤。试验证明供试品溶液中含维生素 B₁₂ 为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 即可有效保证维生素 B₁₂ 定量的准确性, 在此条件下, 供试品溶液中盐酸呋喃硫胺和盐酸吡多胺的量相对较高, 但仍在本次试验的线性范围内, 且色谱峰峰形极好, 测得结果准确、可靠, 因此本次供试品溶液浓度选择符合要求。

3.4 HPLC 与国家标准的 UV 测得结果的比较

通过此次液相测得的含量结果与标准规定 UV 测定的含量结果进行比较, 发现两种方法测得的结果差值较大, 其原因是原标准用 UV 测定时, 组分相互间存在干扰, 原标准虽采用计算公式对存在的干扰进行排除, 但从液相结果观察该公式存在一定误差, 无法彻底消除组分间的干扰现象, 导致测得值与 HPLC 含量差异较大, 因此有必要采用液相色谱法对其含量进行检测, 以提高方法的专属性。

REFERENCES

- [1] WS-10001-(HD-0335)-2002. Local Standard Increase National Standard in Chemicals (Book 4)(国家药品监督管理局国家药品标准. 化学药品地方标准上升国家标准. 第四册) [S]. 2002: 126-127.
- [2] ZHANG L L, ZHOU H S. Determination of VB1, VB2, VB6 in golden partner vitamins tablet by double channel RP-HPLC [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2005, 9(10): 742-743.
- [3] LIU Y, LIU Y, WANG H, et al. Determination of the four content in four vitamin for injection(4) by HPLC [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2009, 13(8): 895-897.
- [4] JIA L, LIU Y, DU Y, et al. Pressurized capillary electrochromatographic analysis of water-soluble vitamins by combining with on-line concentration technique [J]. J Chromatogr A, 2007, 1154(1/2): 416-422.
- [5] ALESSANDRA G, FULVIA C, GIUSEPPE D, et al. Simultaneous determination of water-soluble vitamins in selected food matrices by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass SP, 2008, 22(13): 2029-2043.
- [6] JIANG Y, LIU H J, HAO X H. RP-HPLC determination of nine water-soluble vitamins [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析), 2005, 25(3): 339-341.

收稿日期: 2011-02-14