

# 维生素 B<sub>1</sub> 有关物质检测方法的研究与应用

张佳茹<sup>1</sup>, 王晗<sup>1\*</sup>, 陈玉双<sup>2</sup>, 房冉<sup>1</sup>, 郑玉林<sup>2</sup>(1.上海工程技术大学, 上海 201620; 2.上海峰林生物科技有限公司, 上海 201203)

**摘要:** 目的 建立一种高效液相色谱法对维生素 B<sub>1</sub> 片剂和原料药有关物质进行检测。方法 采用 Waters 液相色谱柱 Symmetry C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为 4.045 g·L<sup>-1</sup> 庚烷磺酸钠溶液(含 1% 三乙胺, 用磷酸调节 pH 至 3.5), 流动相 B 为甲醇-乙腈(1:1), 采用梯度洗脱, 波长为 254 nm, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。结果 分离度溶液中各杂质之间分离度均>1.5, 片剂辅料不干扰 8 个已知杂质出峰, 各已知杂质检测限为 0.005~0.015 μg·mL<sup>-1</sup>; 在高温、高湿、光照条件下杂质 H 和未知杂质均有不同程度增长。结论 该方法可以同时运用于维生素 B<sub>1</sub> 原料药和片剂的有关物质检测, 维生素 B<sub>1</sub> 片应在阴凉干燥避光的条件下保存。

**关键词:** 维生素 B<sub>1</sub>; 维生素 B<sub>1</sub> 片; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)20-2487-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.20.010

引用本文: 张佳茹, 王晗, 陈玉双, 等. 维生素 B<sub>1</sub> 有关物质检测方法的研究与应用[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(20): 2487-2492.

## Research and Application of Detection Methods for Vitamin B<sub>1</sub> Related Substances

ZHANG Jiaru<sup>1</sup>, WANG Han<sup>1\*</sup>, CHEN Yushuang<sup>2</sup>, FANG Ran<sup>1</sup>, ZHENG Yulin<sup>2</sup>(1.Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620, China; 2.Shanghai Maple Biological Technology Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an HPLC method for the determination of vitamin B<sub>1</sub> tablets and active pharmaceutical ingredient related substances. **METHODS** Waters liquid chromatography column Symmetry C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. Mobile phase A was 4.045 g·L<sup>-1</sup> sodium heptane sulfonate solution (containing 1% triethylamine, pH adjusted to 3.5 with phosphoric acid), mobile phase B was methanol-acetonitrile (1:1). Gradient elution was used with a wavelength of 254 nm and a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. **RESULTS** The resolution of each impurity in the resolution solution was >1.5. Excipients in tablets didn't interfere with the peaks of 8 known impurities. Limit of detection of each impurity was in the range of 0.005~0.015 μg·mL<sup>-1</sup>. It was found that the impurity H and the unknown impurity increased in different degrees under various conditions. **CONCLUSION** The method can be applied to the detection of related substances of vitamin B<sub>1</sub> active pharmaceutical ingredient and tablets. Vitamin B<sub>1</sub> tablets shall be stored under the conditions of cool, dry and dark.

**KEYWORDS:** vitamin B<sub>1</sub>; vitamin B<sub>1</sub> tablets; related substances; HPLC

维生素 B<sub>1</sub> 是临床上一种常见的 B 族维生素, 在中国药典 2015 年版、日本药典(JP17)、美国药典(USP41)、欧洲药典(EP9.0)和英国药典(BP2018)中均有记载<sup>[1-5]</sup>, 对应的维生素 B<sub>1</sub> 片在中国药典和美国药典中也有收录。除美国药典对片剂有关物质检测无规定外, 其他收录和记载均为有关物质检测提供了参考, 并将 HPLC 作为其检测方法。维生素 B<sub>1</sub> 是一种强极性物质, 在反向色谱柱上几乎没有保留, 流动相中添加离子对试剂可以增强其在色谱柱上的保留时间<sup>[6]</sup>。在实际应用过程中, 离子对试剂对一些色谱柱损害极大, 为此有报道运用不含离子对试剂的流动相体系对维生素 B<sub>1</sub> 相关产品进行了含量检测, 该情况下维生素 B<sub>1</sub> 的保留时间在 3~6 min<sup>[6-9]</sup>。保留时间过早会导致各峰

分离较差, 研究空间较小。本研究建立了一种 HPLC 可同时用于检测维生素 B<sub>1</sub> 原料药和片剂有关物质, 且方法耐用性好, 选取的色谱柱可稳定应用于离子对试剂体系中。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 十万分之一电子天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司]; 万分之一电子天平(赛多利斯仪器有限公司)。

维生素 B<sub>1</sub> 对照品(美国 USP, 批号: R03990; 纯度: 99.7%); 杂质对照品: 杂质 A(批号: 2619-088A5)、杂质 B(批号: 1820-050A5)、杂质 C(批号: 1801-030A1)、杂质 D(批号: 2391-048A4)、杂质 E(批号: 2443-009A3)、杂质 F(批号: 1407-085A3)、

作者简介: 张佳茹, 女, 硕士生 Tel: (021)67791214 E-mail: 865909381@qq.com \*通信作者: 王晗, 女, 博士, 副教授 Tel: 13818485261 E-mail: wanghansh@126.com

杂质 G(批号: 2446-016A2)、杂质 H(批号: 2364-049A4)均购自 TLC 公司, 纯度均为 99%; 维生素 B<sub>1</sub> 原料药(武汉维斯尔曼生物工程有限公司, 批号: 02517120007; 纯度: 99%); 玉米淀粉(安徽山河药用辅料股份有限公司); 糊精(安徽山河药用辅料股份有限公司); 羧甲基淀粉钠(湖州展望药业股份有限公司); 酒石酸(湖南尔康制药股份有限公司); 硬脂酸镁(安徽山河药用辅料股份有限公司); 维生素 B<sub>1</sub> 片(规格为 10 mg, 自制, 批号: 20181107); 维生素 B<sub>1</sub> 片[山西亨瑞达制药有限公司(厂家 A), 规格为 10 mg, 批号: 20150601]; 维生素 B<sub>1</sub> 片[江苏大洋制药有限公司(厂家 B), 规格为 10 mg, 批号: 1811024]; 己烷磺酸钠、庚烷磺酸钠、辛烷磺酸钠、磷酸、三乙胺、甲醇、乙腈均为分析纯。

## 2 方法比较

各药典中有关物质检测方法各有特点, 也有相似性, 见表 1。其中, 欧洲药典罗列出维生素 B<sub>1</sub>(盐酸硫胺素)的 8 种已知杂质, 分别为硫胺素硫酸酯(杂质 A)、去甲硫胺素(杂质 B)、氯硫胺(杂质 C)、氧硫胺(杂质 D)、硫代硫胺(杂质 E)、乙基硫胺(杂质 F)、乙酰硫胺(杂质 G)和酮二硫代氨基甲酸酯(杂质 H), 结构式见图 1。这 8 种已知杂质涵盖了各药典所示的全部杂质。

本研究通过实验判断各方法的优劣性。根据表 1 所示检测方法的相似性, 中国药典的检测方法经优化后整合为方法 I; 日本药典和美国药典检测方法中液相体系基本一致, 整合为方法 II; 欧洲

药典和英国药典检测方法完全一致, 整合为方法 III。此外, 本研究建立了方法 IV, 进行实验对比各方法优缺点。要求主成分和各已知杂质出峰之间的分离度 > 1.0, 空白溶剂和空白辅料不干扰主成分和已知杂质出峰。

### 2.1 样品处理

取维生素 B<sub>1</sub> 对照品和杂质 A、B、C、D、E、F、G 和 H 对照品适量, 加流动相使溶解并稀释至目标浓度作为分离度溶液。其中, 方法 I, II, IV 维生素 B<sub>1</sub> 对照品浓度为 1 mg·mL<sup>-1</sup>, 方法 III 浓度为 3.5 mg·mL<sup>-1</sup>, 各杂质对照品浓度为维生素 B<sub>1</sub> 对照品浓度的千分之一。

取自制维生素 B<sub>1</sub> 片研磨成粉, 取细粉适量, 加流动相振摇超声使维生素 B<sub>1</sub> 溶解, 继续添加流动相稀释制成每 1 mL 中约含维生素 B<sub>1</sub> 1.0 mg 的溶液, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液; 将供试品溶液稀释 1 000 倍作为自身对照溶液。

取 10 倍处方量的辅料至同一 100 mL 量瓶中, 加流动相超声振摇, 定容摇匀, 过滤即得空白辅料溶液。

### 2.2 色谱条件

方法 I: 色谱柱采用 Agilent Zorbax XDB-C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相为 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 庚烷磺酸钠水溶液(含 1% 三乙胺, 用磷酸调节 pH 5.5)-甲醇-乙腈(90 : 5 : 5), 等度洗脱。流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 波长为 254 nm。

表 1 药典方法的比较

Tab 1 Comparison of pharmacopoeia methods

药典版本	中国药典 2015 年版	EP9.0(同 BP2018)	USP41	JP17
方法	不加校正因子 HPLC 自身对照法	不加校正因子 HPLC 自身对照法	HPLC 归一化法	不加校正因子 HPLC 自身对照法
流动相	0.02 mol·L <sup>-1</sup> 庚烷磺酸钠溶液(含 1% 三乙胺, 用磷酸调节 pH 5.5)-甲醇-乙腈(82 : 9 : 9)	A: 3.764 g·L <sup>-1</sup> 己烷磺酸钠用磷酸调节 pH 3.1; B: 甲醇; 梯度洗脱 0~2 min, 90%A; 2~27 min, 90%→70%A; 27~35 min, 70%→50%A; 35~42 min, 50%A	A: 0.005 mol·L <sup>-1</sup> 的辛烷磺酸钠溶解于 1% 冰醋酸中; B: 甲醇-乙腈(3 : 2); 流动相: A : B=60 : 40	A: 1.1 g 的辛烷磺酸钠溶于 1 000 mL 冰醋酸水溶液中; B: 甲醇-乙腈(3 : 2); 流动相: A : B=60 : 40
检测波长/nm	254	248	254	254
供试品浓度/mg·mL <sup>-1</sup>	1	3.5	1	1
对照品溶液浓度/μg·mL <sup>-1</sup>	10 (供试品溶液稀释 100 倍)	3.5 (供试品溶液稀释 1 000 倍)	-	10 (供试品溶液稀释 100 倍)
系统适用性要求	维生素 B <sub>1</sub> 理论板数 ≥ 2 000, 维生素 B <sub>1</sub> 峰与相邻峰的分离度应符合要求	维生素 B <sub>1</sub> 与杂质 B 分离度 ≥ 3.0; 与杂质 C 分离度 ≥ 2.0	-	仪器精密度 RSD ≤ 1.0%
限度	总杂 ≤ 0.5%	杂质 A ≤ 0.15%; 杂质 B ≤ 0.3%; 杂质 C ≤ 0.15%; 未知杂质 ≤ 0.10%; 总杂 ≤ 0.5%; 报告限 0.05%	总杂 ≤ 1.0%	总杂 ≤ 1.0%
已知杂质个数	未作规定	8	未作规定	未作规定

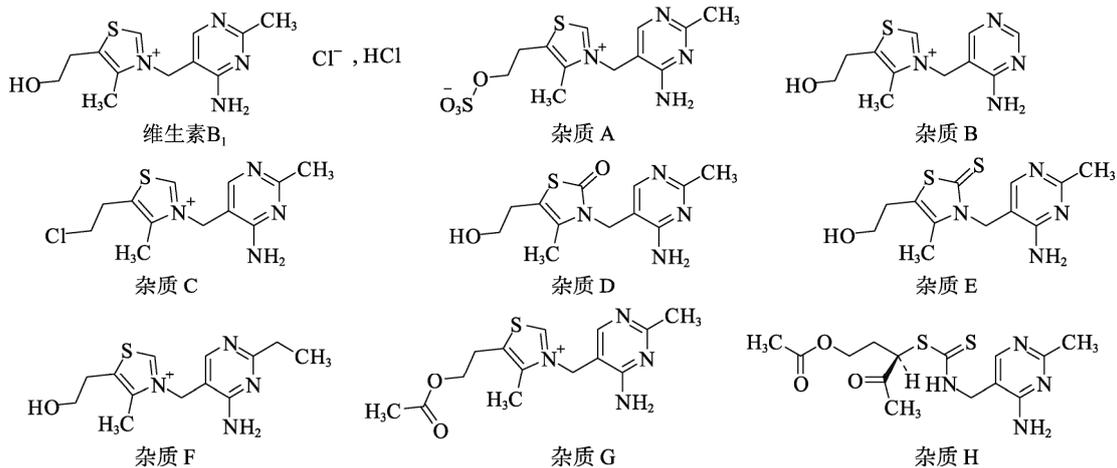


图1 维生素 B<sub>1</sub> 及已知杂质结构图

Fig. 1 Structures of vitamin B<sub>1</sub> and impurities

方法II: 色谱柱采用 Agilent Zorbax XDB-C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相 A 为 1.1 g·L<sup>-1</sup> 辛烷磺酸钠水溶液(含 1%冰醋酸), 流动相 B 为甲醇-乙腈(3 : 2), 采用 A : B=60 : 40 等度洗脱, 运行 60 min。流速为 0.75 mL·min<sup>-1</sup>, 波长为 254 nm。

方法III: 色谱柱采用 Agilent Zorbax XDB-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 A 为 3.764 g·L<sup>-1</sup> 己烷磺酸钠水溶液(用磷酸调节 pH 3.1), 流动相 B 为甲醇, 采用梯度洗脱, 梯度程序见表 2。流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 波长为 248 nm。

表 2 方法III梯度洗脱表

Tab. 2 Gradient elution table of Method III

t/min	A/%	B/%
0	90	10
2	90	10
27	70	30
35	50	50
42	50	50

方法IV: 色谱柱采用 Waters Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 A 为 4.045 g·L<sup>-1</sup> 庚烷磺酸钠溶液(含 1%三乙胺, 用磷酸调节 pH 至 3.5), 流动相 B 为甲醇-乙腈(1 : 1), 采用梯度洗脱, 梯度程序见表 3。流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 波长为 254 nm。

表 3 方法IV梯度洗脱表

Tab. 3 Gradient elution table of Method IV

t/min	A/%	B/%
0	85	15
10	85	15
25	80	20
40	50	50
45	50	50

### 2.3 结果分析

分析色谱图可以发现, 方法I, II, III存在问题, 见图 2 和表 4。对比可见方法IV峰型优良, 各杂质之间分离度均>1.5, 且实验过程中方法耐用性好, 各杂质出峰位置基本不会发生偏移, 辅料未在任何一个已知杂质位置上出峰, 这使得维生素 B<sub>1</sub> 原料药和片剂杂质检测不受干扰。因此, 从杂质出峰、分离度、方法耐用性以及辅料出峰判断, 方法IV为最优方法。根据药典对杂质限度的规定, 拟定方法IV中杂质含量的计算方法和限度标准。选取自身对照法计算单杂和总杂含量, 要求单杂 ≤0.1%, 总杂 ≤0.5%, 报告限为 0.05%。

表 4 方法I、II、III的缺点

Tab. 4 Defects of Method I, Method II and Method III

方法	存在的问题
I	杂质 H 未出峰, 增大 H 浓度发现其在 45 min 附近出峰, 说明该方法下 H 的检测限>1 μg·mL <sup>-1</sup>
II	杂质 C 和 H 重合, H 为宽峰, 杂质 C 为尖峰
III	a. 杂质 E 和未知杂质 10 分离较差; b. 存在杂质 E 和维生素 B <sub>1</sub> 重合的情况; c. 辅料在杂质 A 和 H 位置出峰

### 2.4 方法IV的最低检测限和定量限试验

配制各杂质和维生素 B<sub>1</sub> 最低限度浓度溶液, 逐步稀释, 按峰高约为基线噪音的 3 倍为检测限, 峰高约为基线噪音的 10 倍为定量限。维生素 B<sub>1</sub> 和各杂质定量限为 0.010~0.025 μg·mL<sup>-1</sup>(n=6, 维生素 B<sub>1</sub> 和杂质 A~H 的 RSD 依次为 0.13%, 2.82%, 4.50%, 5.69%, 7.99%, 9.01%, 8.12%, 6.32%, 3.23%), 检测限为 0.005~0.015 μg·mL<sup>-1</sup>。

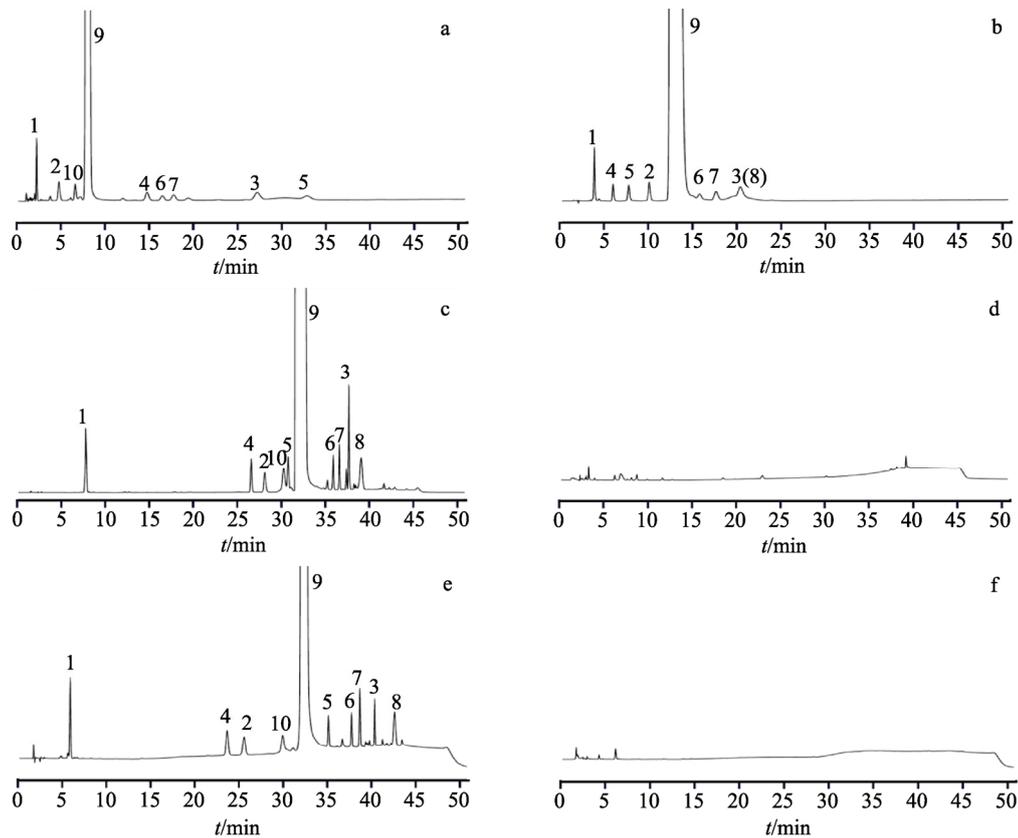


图2 维生素 B<sub>1</sub> 色谱图

a-方法I供试品溶液；b-方法II供试品溶液；c-方法III供试品溶液；d-方法III 空白辅料溶液；e-方法IV供试品溶液；f-方法IV 空白辅料溶液；1-杂质 A；2-杂质 B；3-杂质 C；4-杂质 D；5-杂质 E；6-杂质 F；7-杂质 G；8-杂质 H；9-维生素 B<sub>1</sub>；10-未知杂质 10。

Fig. 2 Chromatograms of vitamin B<sub>1</sub>

a-method I sample; b-method II sample; c-method III sample; d-method III blank control; e-method IV sample; f-method IV blank control; 1-impurity A; 2-impurity B; 3-impurity C; 4-impurity D; 5-impurity E; 6-impurity F; 7-impurity G; 8-impurity H; 9-vitamin B<sub>1</sub>; 10-unknown impurity 10.

## 2.5 方法IV的仪器精密度试验

配制浓度约为  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的供试品溶液，注入液相色谱仪，连续测定 6 次，记录主成分和已知杂质峰面积，计算仪器精密度。结果显示可以检出杂质 A、C 和 H。3 种杂质 RSD 值分别为 4.01%，7.52% 和 4.41%，符合测定要求。

配制浓度约为  $1.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的自身对照溶液，注入液相色谱仪，连续测定 6 次，记录峰面积，计算仪器精密度。结果 RSD 值为 1.15%，符合测定要求。

## 2.6 方法IV的回收率试验

精密移取空白辅料溶液和杂质储备液配制成杂质浓度为 0.5, 1.0 和  $1.5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的回收率溶液，记录各杂质计算浓度与实际浓度的回收率。结果均在 90.0%~110.0%，符合测定要求。

## 2.7 样品检测

采用方法IV检测厂家 A、厂家 B 和自制的维生素 B<sub>1</sub> 片中的有关物质。结果见表 5。结果显示各样品均符合要求。

表 5 样品检测

Tab. 5 Samples testing

杂质	自制/%	厂家 A/%	厂家 B/%
杂质 A	0.003 3	0.003 5	0.021 1
杂质 C	0.029 3	0.029 5	0.025 4
杂质 H	0.010 4	0.009 8	未检出
最大未知单杂	0.047 6	0.047 2	0.057 9
总杂	0.090 6	0.090 0	0.104 4

## 3 影响因素试验

采用方法IV检测维生素 B<sub>1</sub> 片及影响因素试验样品的有关物质，判断杂质增长情况。

### 3.1 影响因素样品处理

取维生素 B<sub>1</sub> 片适量，将其分别放置于高温 ( $60 \text{ }^\circ\text{C}$  和  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ )、高湿 ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、湿度 92.5%) 和光照 (总照度  $\geq 1.2 \times 10^6 \text{ Lx}\cdot\text{h}^{-1}$ 、近紫外能量  $\geq 200 \text{ W}\cdot\text{h}\cdot\text{m}^{-2}$ ) 条件下，经过 5, 10 和 30 d 分别取样，检测有关物质。高湿 ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、湿度 92.5%) 条件下 5 d 时样品吸湿增重达 13%，在高湿 ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、湿度 75%) 条件下同法进行试验，该条件下样品吸湿增重稳定在 4% 左右。另取维生素 B<sub>1</sub> 片作为 0 d 样品。色谱图见图 3。

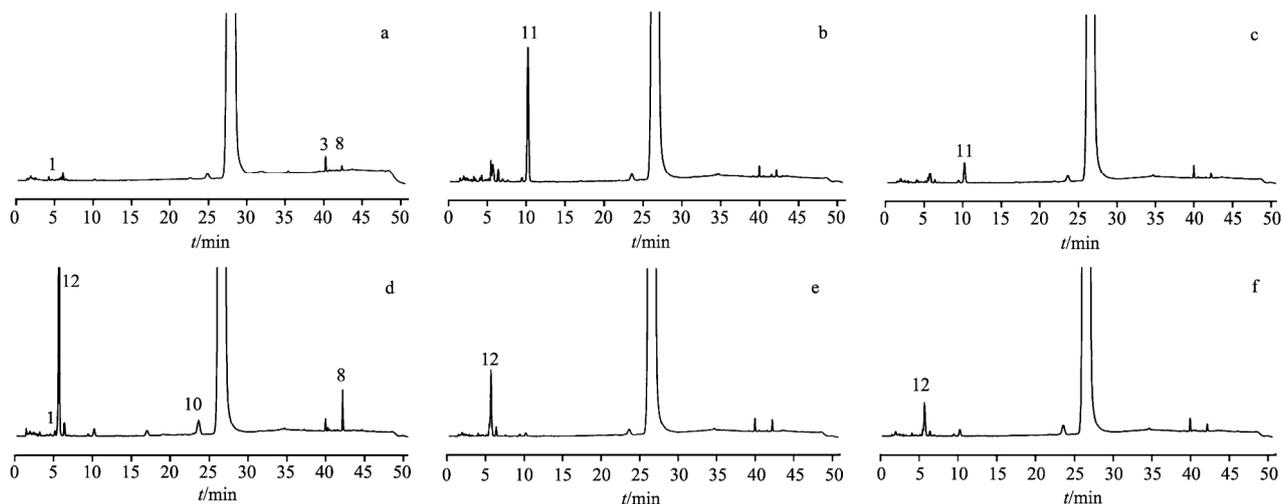


图3 影响因素试验中样品高效液相色谱图

a-0 d; b-高温 60 °C 30 d; c-高温 40 °C 30 d; d-高湿 92.5% 30 d; e-高湿 75% 30 d; f-光照 30 d; 1-杂质 A; 3-杂质 C; 8-杂质 H; 10-未知杂质 10; 11-未知杂质 11; 12-未知杂质 12。

Fig. 3 HPLC chromatograms of samples in the influencing factor

a-high temperature 60 °C 30 d; b-high temperature 40 °C 30 d; c-high humidity 92.5% 30 d; d-high humidity 75% 30 d; e-light 30 d; 1-impurity A; 3-impurity C; 8-impurity H; 10-unknown impurity 10; 11-unknown impurity 11; 12-unknown impurity 12.

### 3.2 结果分析

经检测, 维生素 B<sub>1</sub> 片 0 d 样品中可以检测出杂质 A, C 和 H, 且单杂和总杂均在限度范围内。影响因素样品中的杂质 A 和 C 没有变化, 杂质 H 在高湿条件下有所增长。除此之外, 各条件下的一些

未知杂质均有不同程度的增加, 结果见图 4。尤其是图 4a 中的杂质 11 和图 4c 中的杂质 12, 30 d > 0.5%。这说明在各影响因素条件下维生素 B<sub>1</sub> 不稳定。由此可见, 维生素 B<sub>1</sub> 片的存放应该避免高温、高湿和光照的环境, 尽量在阴凉干燥避光的条件下保存。

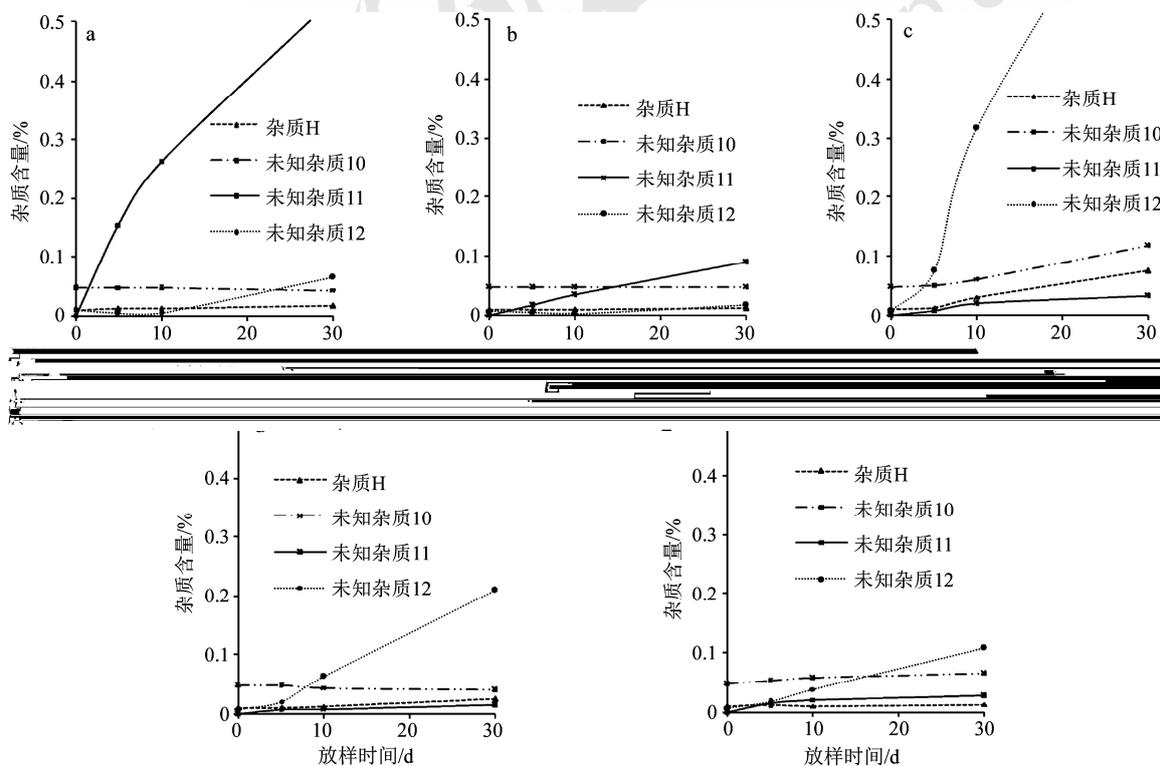


图4 样品杂质增长图

a-高温 60 °C; b-高温 40 °C; c-高湿 92.5%; d-高湿 75%; e-光照。

Fig. 4 Increasing trend graphs of impurities in the samples

a-high temperature 60 °C; b-high temperature 40 °C; c-high humidity 92.5%; d-high humidity 75%; e-light.

#### 4 讨论

本研究为维生素 B<sub>1</sub> 原料药和维生素 B<sub>1</sub> 片提供了一种较为严谨, 耐用性好的有关物质分析方法, 方法同目前现有药典规定的方法相比有一定优势, 可以为当前相关的研发和生产分析提供一些参考价值。

从影响因素数据可以看出, 除了杂质 H 增长外, 还有一些未知杂质大幅度增长。确定这些未知杂质的结构, 研究其不良反应, 探究其在人体最大剂量, 在制剂研究中很有意义。液质联用是目前很常见的一种分析手段, 在液相色谱分离状态下通过质谱得到结构信息。目前已有报道运用液质联用检测生物样本中多种 B 族维生素含量, 报道中 B<sub>1</sub> 的定量限为 0.500 ng·mL<sup>-1</sup>, 最低检测限为 0.170 ng·mL<sup>-1</sup>, 且线性良好, 回收率将近 100%<sup>[10]</sup>。但是方法 IV 的色谱条件中存在不易挥发的盐, 无法直接应用于液质联用, 因此这些结构的确认仍需要其他手段进行研究。

#### REFERENCES

- [1] 中国药典. 二部[S]. 2015: 1231-1232.
- [2] JP 17.Vol XVII [S]. 1674-1675.
- [3] USP 41 [S]. 4047-4050.
- [4] EP 9.0 [S]. 3756-3758.
- [5] BP 2018 [S]. Thiamine Hydrochloride.
- [6] LÜ X, HU M T, YU X. Determination of two components and their related substances in Pediatric Benorilate and Vitamin B<sub>1</sub> Granules by HPLC [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2015, 46(8): 886-888.
- [7] CHEN X J. Determination of Vitamin B<sub>1</sub> tablets by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Inner Mongolia Med J(内蒙古医学杂志), 2018, 50(11): 1281-1283.
- [8] HU D. Determination of vitamin B<sub>1</sub> in Vitamin B<sub>1</sub> tablets by HPLC with fluorometry [J]. J North Pharm, 2016, 13(5): 1-2.
- [9] YU H B. Determination of vitamin B<sub>1</sub> and vitamin B<sub>2</sub> in Duoweigai granules by RP-HPLC [J]. Pharm Today(今日药学), 2017, 27(11): 732-734.
- [10] WIRKUS D, JAKUBUS A, OWCZUK R, et al. Development and application of novelty pretreatment method for the concurrent quantitation of eleven water-soluble B vitamins in ultrafiltrates after renal replacement therapy [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017(1043): 228-234.

收稿日期: 2019-08-20

(本文责编: 曹粤锋)