

HPLC 检测维生素 B₂ 片中有关物质的方法优化

房冉¹, 王晗^{1*}, 陈玉双², 张佳茹¹, 郑玉林²(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 优化维生素 B₂ 片中有关物质的检测方法。方法 采用 Welch Ultimate AQ-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为 0.1%磷酸水溶液(A)-乙腈(B), 进行梯度洗脱; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 267 nm; 柱温 30 °C。结果 各杂质与主成分峰分离度良好; 杂质 A 在 0.008 7~0.053 5 μg·mL⁻¹($r^2=0.998\ 1$)、杂质 B 在 0.019 8~0.812 3 μg·mL⁻¹($r^2=0.999\ 8$)、杂质 D 在 0.007 3~0.838 7 μg·mL⁻¹($r^2=1.000\ 0$)、维生素 B₂ 在 0.011 3~0.427 6 μg·mL⁻¹($r^2=0.999\ 4$)内呈现良好的线性关系; 杂质 A、杂质 B、杂质 D 平均回收率($n=9$)分别为 100.1%(RSD=1.6%)、100.6%(RSD=2.0%)和 101.1%(RSD=1.1%)。结论 本检测方法专属性强、准确度高, 可用于控制维生素 B₂ 片中的有关物质。

关键词: 维生素 B₂ 片; 高效液相色谱法; 有关物质; 优化参数

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)22-2764-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.22.013

引用本文: 房冉, 王晗, 陈玉双, 等. HPLC 检测维生素 B₂ 片中的有关物质的方法优化[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(22): 2764-2769.

Improvement of Content Determination for Related Substances in Vitamin B₂ Tablets by HPLC

FANG Ran¹, WANG Han^{1*}, CHEN Yushuang², ZHANG Jiaru¹, ZHANG Yulin²(1.Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620, China; 2.Shanghai Maple Biological Technology Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize a method for related substances determination of vitamin B₂ tablets. **METHODS** The Welch Ultimate AQ-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase A was 0.1% phosphoric acid solution and the mobile phase B was acetonitrile for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 267 nm. The column temperature was 30 °C. **RESULTS** The separation of impurity and principal component peak was good. The calibration curves were linear, the impurity A in range 0.008 7–0.053 5 μg·mL⁻¹($r^2=0.998\ 1$), the impurity B in range 0.019 8–0.812 3 μg·mL⁻¹($r^2=0.999\ 8$), the purity D in range 0.007 3–0.838 7 μg·mL⁻¹($r^2=1.000\ 0$) and vitamin B₂ 0.011 3–0.427 6 μg·mL⁻¹($r^2=0.999\ 4$). The average recoveries of impurity A, impurity B and impurity D were 100.1%(RSD=1.6%), 100.6%(RSD=2.0%) and 101.1%(RSD=1.1%). **CONCLUSION** This detection method has strong specificity and high accuracy, and can be used to control related substances in vitamin B₂ tablets.

KEYWORDS: vitamin B₂ tablets; HPLC; related substances; optimize parameters

维生素 B₂ 又名核黄素, 主要用于预防和治疗维生素 B₂ 缺乏症, 如口角炎、唇干裂、舌炎、阴囊炎、结膜炎、脂溢性皮炎等^[1-2]。维生素 B₂ 原料药及片剂现收载于中国药典 2015 年版二部^[3], 其中有关物质检查均采用 HPLC 检测, 对单个杂质和杂质总量有限度要求, 但是没有明确杂质的种类及限度。在国外药典中, 欧洲药典(EP9.0)^[4]收载了维生素 B₂ 原料药的质量控制方法, 其中有关物质亦采用 HPLC 检测, 且明确 4 个已知杂质、杂质总量和未知杂质的限度要求。根据欧洲药典(EP9.0)中对维生素 B₂ 有关物质的相关要求可知, 维生素 B₂ 可能含有已知杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D, 结构式见图 1。杂质可能由原料合成或贮

存过程中降解产生^[5-6]。在实际研究工作中发现, 采用中国药典 2015 年版二部中的检测方法, 无论原料药还是片剂, 这些杂质与主成分无法有效分离, 且一些杂质峰无保留。即使采用欧洲药典(EP9.0)中维生素 B₂ 原料药的有关物质的检测方法, 片剂中一些杂质仍不能有效分离。因此, 根据本品制剂工艺的实际情况, 急需建立一个更加有效的维生素 B₂ 片有关物质的质量检测方法。

本研究以欧洲药典(EP9.0)色谱方法为基础, 明确了 4 个杂质及其限度要求, 采用不带校正因子的自身对照法计算各杂质含量, 对色谱条件进行了优化。新建的方法比原有方法能检测到更多杂质, 各杂质与主成分峰分离度均符合要求。

作者简介: 房冉, 女, 硕士生 Tel: 17602128747 E-mail: lanlan_fang@hotmail.com
13818485261 E-mail: wanghan@sues.edu.cn

*通信作者: 王晗, 女, 博士, 副教授 Tel:

方法学研究表明本研究所述液相方法能够有效地分离并检测出各杂质,具有方法简单易行,专属性强,准确度高,可用于企业产品的质控标准,显著提升了维生素 B₂ 片的质量控制指标。

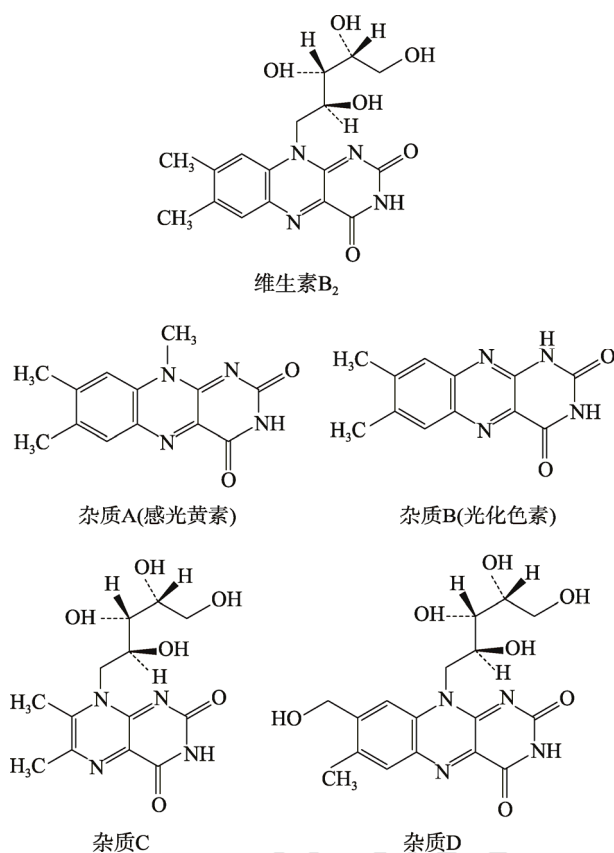


图1 维生素 B₂ 及其杂质 A~D 的结构式
Fig. 1 Structures of vitamin B₂ and its impurity A-D

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪、Agilent 1260 高效液相色谱仪、检测器为二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司);色谱柱为 Welch Ultimate AQ-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Symmetry C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);KQ-500E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BSA225S-CW 型电子分析天平(Sartorius 公司);EX125DZH 型电子分析天平(奥豪斯公司);DZF-6090 真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

维生素 B₂ 对照品(批号:100369-201504,按 C₁₇H₂₀N₄O₆ 计,含量 98.2%,105 °C 干燥 2 h 后使用),由中国食品药品检定研究院提供;维生素 B₂ 杂质 A 对照品(批号:2874-015A22;含量:97.6%)、维生素 B₂ 杂质 B 对照品(批号:2611-072A6;含量:97.2%)、维生素 B₂ 杂质 C 对照品(批号:2953-010A5;含量:91.6%)、维生素 B₂ 杂质 D 对照品(批

号:2874-025A3;含量:96.4%)均由 TLC Pharmaceutical Standards Ltd.提供;维生素 B₂ 系统适用性对照品(批号:Y0000757)由欧洲药典提供;维生素 B₂ 片(湖北广济药业股份有限公司,批号:190401,190402,190403;规格:5 mg)。乙腈(色谱纯, Spectrum);磷酸(色谱纯,阿拉丁);纯化水(雀巢优活纯化水);其他试剂均为分析级。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Welch Ultimate AQ-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为 0.1%磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱,流速为 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 267 nm,柱温 30 °C,运行时间为 60 min,后运行 10 min,见表 1。

表1 分析方法梯度洗脱程序
Tab. 1 Gradient elution program of analysis method

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	95	5
5	95	5
10	90	10
30	80	20
40	60	40
45	60	40
60	50	50

2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性溶液的制备 取维生素 B₂ 系统适用性对照品 1 瓶(包含杂质 C 和杂质 D)加入 1.0 mL 混合试剂[0.1%磷酸水溶液-乙腈(90:10)],作为杂质 C 和杂质 D 的峰鉴别溶液;另取约含 10 mg 维生素 B₂ 的样品,加入 0.5 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 1 mL,光照 1.5 h 后加入 0.5 mL 醋酸,用水稀释至 100 mL,作为杂质 A 和杂质 B 的峰鉴别溶液。

2.2.2 供试品溶液及对照品溶液的制备 取维生素 B₂ 片,研细,精密称取细粉适量(约相当于维生素 B₂ 10 mg),置 100 mL 量瓶中,加盐酸溶液(1→2) 5 mL,振摇使维生素 B₂ 溶解,用水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。精密移取供试品溶液 1.0 mL,置 25 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,再精密移取上述溶液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,作为对照品溶液。

2.2.3 各杂质和维生素 B₂ 对照品储备液 分别精密称取杂质 A、B、C、D 和维生素 B₂ 对照品 10 mg,

各置 100 mL 量瓶中, 加盐酸溶液(1→2)5 mL, 振摇使溶解, 加水稀释至刻度, 摇匀, 分别得到杂质 A、B、C、D 和维生素 B₂ 对照品储备液。

2.2.4 各杂质和维生素 B₂ 定位溶液 分别精密移取杂质 A、B、C、D 和维生素 B₂ 对照品储备液各 1 mL, 各置 50 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 分别得到杂质 A、B、C、D 和维生素 B₂ 定位溶液。

2.2.5 分离度溶液 分别移取适量的杂质 A 定位溶液和杂质 B、C、D、维生素 B₂ 对照品储备液, 置 100 mL 量瓶中, 加盐酸溶液(1→2)5 mL, 振摇使溶解, 加水稀释至刻度, 配置成约含 0.1 mg·mL⁻¹ 的维生素 B₂, 0.025 μg·mL⁻¹ 的杂质 A, 0.2 μg·mL⁻¹ 的杂质 B、C、D 的分离度溶液。

2.2.6 线性储备液 分别移取适量的杂质 A、B、D 和维生素 B₂ 对照品储备液, 置 100 mL 量瓶中, 加盐酸溶液(1→2)5 mL, 振摇使溶解, 加水稀释至刻度, 配置成约含 5 μg·mL⁻¹ 的维生素 B₂, 1.25 μg·mL⁻¹ 的杂质 A, 10 μg·mL⁻¹ 的杂质 B、D 的线性储备液。

2.2.7 空白溶液及空白辅料溶液 于 100 mL 量瓶中, 加盐酸溶液(1→2)5 mL, 加水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 作为空白溶液。模拟国内某厂家处方, 称取空白辅料适量(约 1 片量), 于 100 mL 量瓶中, 加盐酸溶液(1→2)5 mL, 加水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 作为空白辅料溶液。

2.3 检测波长的选择

供试品溶液及各杂质对照品溶液经二极管阵列检测器在 190~400 nm 范围内扫描, 谱图扫描下杂质 A 在 222 nm、266 nm 及 368 nm 出现波峰; 杂质 B 在 218 nm、260 nm、352 nm 及 384 nm 出现波峰; 杂质 C 在 256 nm 出现波峰; 杂质 D 在 222 nm、268 nm 及 364 nm 出现波峰; 维生素 B₂ 在 224 nm、268 nm 及 372 nm 下出现波峰, 鉴于欧洲药典(EP9.0)有关物质波长选择的是 267 nm, 且 4 种波长中 268 nm 下峰面积最大, 故波长选择 267 nm(接近 268 nm)。

2.4 系统适用性试验

按“2.1”项下色谱条件, 精密量取系统适用性溶液、供试品溶液及空白溶液各 50 μL 进样, 记录色谱图。系统适用性溶液色谱图中, 维生素 B₂ 主成分峰与其他杂质峰分离度>1.5; 杂质 A 和杂质 B 分离度为 22, 其他各杂质峰分离度均>1.5; 对照品溶液连续进样 5 次, RSD 为 0.1%; 空白溶液对本

品检测无干扰, 结果见图 2。

2.5 专属性试验

2.5.1 已知杂质及空白干扰 按“2.1”项下色谱条件, 建立系统适用性, 将空白溶液、空白辅料溶液、维生素 B₂ 定位溶液、分离度溶液及供试品溶液, 每个样品溶液各进样 1 针。结果表明: 分离度溶液中已知杂质对维生素 B₂ 主成分峰无干扰; 空白溶液、空白辅料溶液对维生素 B₂ 主峰检测无影响; 供试品溶液中杂质对维生素 B₂ 主峰无干扰, 分离度均>1.5, 结果见图 2。

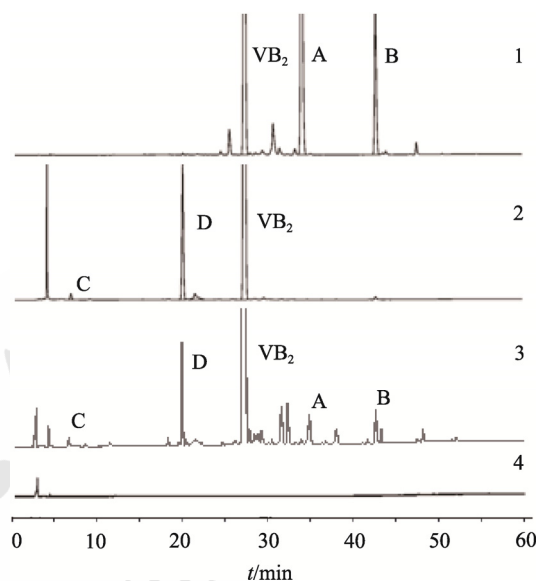


图 2 高效液相色谱图

1-杂质 A、B 系统适用性溶液; 2-杂质 C、D 系统适用性溶液; 3-分离度溶液; 4-空白溶液; VB₂-维生素 B₂; A-杂质 A; B-杂质 B; C-杂质 C; D-杂质 D。

Fig. 2 HPLC chromatograms

1-system suitability solution of impurity A and impurity B; 2-system suitability solution of impurity C and impurity D; 3-resolvable solution; 4-blank solution; VB₂-vitamin B₂; A-impurity A; B-impurity B; C-impurity C; D-impurity D.

2.5.2 破坏性试验 取维生素 B₂ 片, 研细, 精密称取细粉适量(约相当于维生素 B₂ 10 mg), 置 100 mL 量瓶中, 分别进行高温、强酸、光照、强碱、氧化破坏。另取一份未经破坏的样品, 加盐酸溶液(1→2)5 mL, 超声 5 min 振摇使溶解, 加水 10 mL, 振摇, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

破坏性操作如下: ①高温破坏, 样品于 60 °C 烘箱中放置 1 d; ②强酸破坏, 样品加入盐酸溶液(1→2)放置 1 d; ③光照破坏, 样品于光照箱中(4 500 Lx, 25 °C)放置 1 d; ④强碱破坏, 加入 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL, 振摇使溶解, 室温放置 1 d, 加入 1 mol·L⁻¹ HCl 中和; ⑤氧化破坏, 加

入 10%过氧化氢溶液 2 mL, 室温放置 1 d。按“2.1”项下色谱条件, 建立系统适用性, 每个样品溶液各进样 1 针。

结果表明, 样品在碱性条件下最不稳定, 易被降解, 出现超过限度要求的未知杂质; 在光照条件下容易生成杂质, 需避光保存, 结果见图 3。

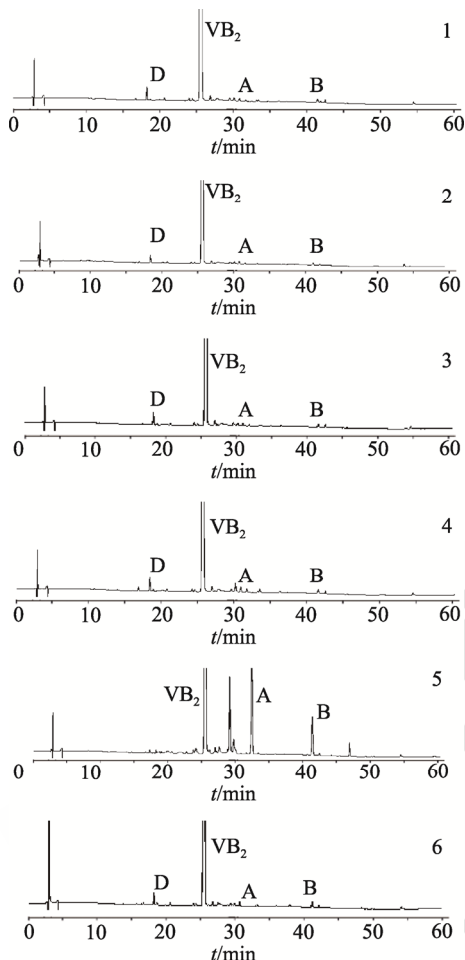


图 3 维生素 B₂ 片破坏性试验色谱图

1-未破坏样品; 2-高温破坏; 3-强酸破坏; 4-光照破坏; 5-强碱破坏; 6-氧化破坏; VB₂-维生素 B₂; A-杂质 A; B-杂质 B; D-杂质 D。

Fig. 3 HPLC chromatograms of Vitamin B₂ tablets

1-unbroken sample; 2-high temperature degradation; 3-acid degradation; 4-light degradation; 5-alkaline degradation; 6-oxidative degradation; VB₂-vitamin B₂; A-impurity A; B-impurity B; D-impurity D.

2.6 定量限和检测限

按“2.1”项下色谱条件, 用稀释剂稀释线性储备液, 逐级降低浓度, 进行测定。以信噪比约 $S/N=3$ 时的浓度作为检测限, $S/N=10$ 时的浓度作为定量限。杂质 A、B、D 和维生素 B₂ 定量限分别为 8.7, 19.9, 7.4, 12.9 ng·mL⁻¹, 各杂质保留时间 RSD 在 0.0%~0.2%; 各杂质峰面积 RSD 在 1.0%~3.2%。检测限分别为 2.9, 6.6, 2.5, 4.3 ng·mL⁻¹。

2.7 线性与范围

移取线性储备液配制成杂质 A、B、D 和维生素 B₂ 的定量限浓度、限度浓度的 25%, 50%, 75%, 100% 和 200% 各浓度水平的线性溶液; 不同浓度级别线性溶液重复进样 3 针。结果表明, 杂质 A、B、D 和维生素 B₂ 各水平浓度的峰面积 RSD 均 ≤ 3.3%, 结果见表 2。

表 2 线性关系考察结果

Tab. 2 Results of linear relationship

名称	浓度范围/μg·mL ⁻¹	回归方程	r ²
杂质 A	0.008 7~0.053 5	y=330.78x+0.329 9	0.998 1
杂质 B	0.019 8~0.812 3	y=227x+0.543 5	0.999 8
杂质 D	0.007 3~0.838 7	y=225.36x+0.269 9	1.000 0
维生素 B ₂	0.011 3~0.427 6	y=237.65x+0.151	0.999 4

2.8 仪器精密度试验

2.8.1 重复性试验 按“2.2.2”项下平行配制供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件, 进行检测。结果表明, 杂质 B、D 和未知单杂、杂质总量的峰面积 RSD 均 ≤ 0.1% ($n=6$)。

2.8.2 中间精密度试验 由不同实验人员于不同时间与仪器上, 按照“2.8.1”项下同法操作, 记录 2 位操作者 12 针样品的峰面积。结果表明, 杂质 B、D 和未知单杂、杂质总量的峰面积 RSD 均 ≤ 0.2% ($n=12$)。

2.9 回收率试验

取维生素 B₂ 片, 研细, 精密称取 9 份细粉适量(每份约相当于维生素 B₂ 10 mg), 其中杂质 B、D 含量分别为 0.03%, 0.09%, 杂质 A 未检出, 置 100 mL 量瓶中, 加入线性储备液, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。制成含杂质 A、B、D 分别为限度浓度的 50%, 100% 和 150% 的供试品溶液, 各浓度平行制备 3 份。按“2.1”项下色谱条件进行检测, 记录峰面积。结果表明, 杂质 A、B、D 的回收率良好。杂质 A 各浓度下的回收率($n=3$)分别为 98.6%, 101.7%, 100.1%; 平均回收率($n=9$)和 RSD 分别为 100.1% 和 1.6%。杂质 B 各浓度下回收率($n=3$)分别为 98.7%, 100.9%, 102.3%; 平均回收率($n=9$)和 RSD 分别为 100.6% 和 2.0%。杂质 D 各浓度下回收率($n=3$)分别为 100.2%, 102.1%, 101.2%; 平均回收率($n=9$)和 RSD 分别为 101.1% 和 1.1%。

2.10 稳定性试验

将对照品溶液、供试品溶液分别于室温和冷藏条件下放置, 经 0, 4, 8, 16 h 不同时间点分别取

样,按“2.1”项下色谱条件,各进样1针。结果表明,对照品溶液中,维生素B₂峰面积与初始0 d相比,回收率在90%~110%,说明对照品溶液样品16 h内稳定性良好;供试品溶液与初始0 d相比,单个杂质峰面积变化≤0.05%,总杂质面积变化≤0.1%,未出现新的>0.05%的杂质,说明样品16 h内稳定性良好。

2.11 耐用性试验

按“2.1”项下色谱条件基础,流速变化±10%、检测波长变化±2 nm、柱温变化±2 °C、不同批次色谱柱的条件下进行耐用性考察。所得结果与初始方法结果相比,各杂质分离度良好,各杂质峰相对保留时间基本稳定,单个杂质的含量、杂质总量的含量和在不同条件下的RSD均≤0.2%。

2.12 样品测定

取3批维生素B₂片,按照“2.1”项下色谱条件,各进样1针。结果表明,3批样品中均未检测出杂质A、杂质C,主成分峰与其他杂质峰分离度均>1.5,各杂质峰分离度均满足要求,结果见表3。

表3 维生素B₂片有关物质检测结果

Tab. 3 Results of related substance determination for Vitamin B₂ tablets %

杂质	维生素B ₂ 片批号		
	190401	190402	190403
杂质A	N/A	N/A	N/A
杂质B	0.10	0.11	0.10
杂质C	N/A	N/A	N/A
杂质D	0.23	0.22	0.22
单个杂质	0.09	0.09	0.09
杂质总量	0.42	0.45	0.43

3 讨论

3.1 方法改进

本研究以欧洲药典(EP9.0)色谱方法为基础,结合中国药典2015年版二部中部分参数,对梯度洗脱程序、稀释剂的种类等进行了优化。以流动

相A为0.1%磷酸水溶液,流动相B为乙腈,流速为1.0 mL·min⁻¹,检测波长为267 nm,柱温30 °C,对空白溶液、杂质混合溶液、供试品溶液进行检测。按表4和表5进行梯度洗脱。

首先,以欧洲药典(EP9.0)色谱分析方法(方案I)进行检测,结果表明,供试品溶液中主峰与杂质峰未完全分离,为满足分离度要求,对洗脱程序进行调整。经过参数调整后,在方案II色谱条件下进行检测,结果表明,杂质混合液中各杂质分离度良好,但杂质C易与溶剂峰重合,故调整洗脱程序。经过参数调整后,在方案III色谱条件下进行检测,结果表明,杂质C易受溶剂峰干扰,考虑更换色谱柱。更换色谱柱后,在方案IV色谱条件下进行检测,结果表明,杂质C不受溶剂峰干扰,但供试品溶液中未知杂质干扰主峰出峰。因欧洲药典(EP9.0)中规定的稀释剂含有碱性组分,同时,维生素B₂在碱性条件下不稳定,故考虑更换稀释剂。中国药典2015年版二部中规定稀释剂为盐酸水溶液,故采用其作为稀释剂,在方案V色谱条件下进行检测,结果表明,空白溶液对各杂质及主峰出峰无影响,供试品溶液中各杂质分离

表4 方案参数

Tab. 4 Parameters of the scheme

方案	色谱柱		稀释剂	
	色谱柱 ¹⁾	色谱柱 ²⁾	稀释剂 ¹⁾	稀释剂 ²⁾
I	√	—	√	—
II	√	—	√	—
III	√	—	√	—
IV	—	√	√	—
V	—	√	—	√

注:色谱柱¹⁾—Symmetry C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);色谱柱²⁾—Welch Ultimate AQ-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);稀释剂¹⁾—0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠与13.6 g·L⁻¹乙酸钠;稀释剂²⁾—盐酸-水(1:1)与水。

Note: Column¹⁾—Symmetry C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm); Column²⁾—Welch Ultimate AQ-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm); dilute solution¹⁾—0.1 mol·L⁻¹ sodium hydroxide and 13.6 g·L⁻¹ sodium acetate; dilute solution²⁾—hydrochloric acid-water (1:1) and water.

表5 梯度洗脱程序

Tab. 5 Gradient elution program

方案I			方案II			方案III			方案IV			方案V		
t/min	A/%	B/%	t/min	A/%	B/%	t/min	A/%	B/%	t/min	A/%	B/%	t/min	A/%	B/%
0	90	10	0	90	10	0	95	5	0	95	5	0	95	5
5	90	10	18	90	10	5	95	5	5	95	5	5	95	5
20	80	20	33	80	20	10	90	10	10	90	10	10	90	10
25	80	20	35	80	20	30	80	20	30	80	20	30	80	20
35	50	50	45	50	50	35	80	20	35	80	20	40	60	40
45	50	50	55	50	50	45	50	50	45	50	50	45	60	40
						55	50	50	55	50	50	60	50	50

度均满足要求,因此将方案V作为有关物质检测方法。最终,通过方法学研究验证了方案V的可行性。色谱图见图4。

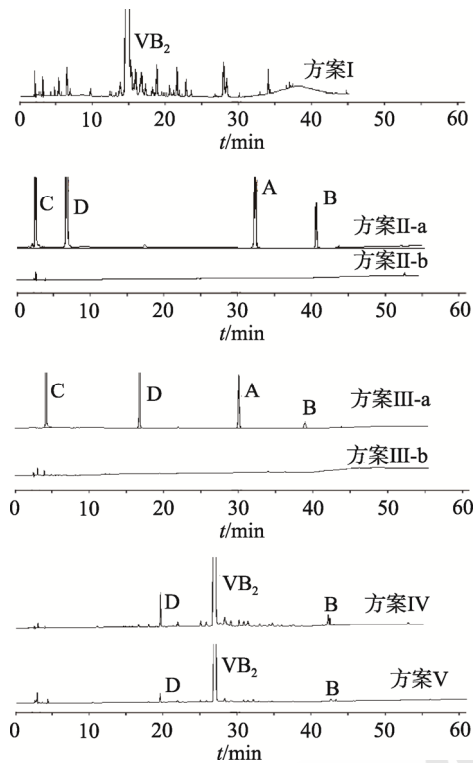


图4 高效液相色谱图

方案I-供试品溶液;方案II-a-杂质混合溶液;方案II-b-空白溶液;方案III-a-杂质混合溶液;方案III-b-空白溶液;方案IV-供试品溶液;方案V-供试品溶液;A-杂质A;B-杂质B;C-杂质C;D-杂质D。

Fig. 4 HPLC chromatograms

Scheme I-sample solution; scheme II-a-mixed impurity solution; scheme II-b-blank solution; scheme III-a-mixed impurity solution; scheme III-b-blank solution; scheme IV-sample solution; scheme V-sample solution; A-impurity A; B-impurity B; C-impurity C; D-impurity D.

3.2 企业质量标准

根据本品有关物质强制破坏性试验及样品检测等试验结果,补充完善对维生素 B₂ 片各杂质类型和其限度要求,根据欧洲药典(EP9.0)中对本品有关物质的质量标准,结合生产厂家内控要求,将维生素 B₂ 片有关物质标准进行修订,结果见表6。

3.3 杂质分析及贮存建议

根据强制破坏性试验及样品检测结果表明,杂质A、杂质B为降解杂质,杂质C为原料药引入杂

表6 质量标准对比

Tab. 6 Comparison of quality standards

名称	中国药典 2015 年版二部	欧洲药典 (EP9.0)	改进 质量标准
杂质 A	N/A	≤0.025%	≤0.025%
杂质 B	N/A	≤0.2%	≤0.4%
杂质 C	N/A	≤0.2%	N/A
杂质 D	N/A	≤0.2%	≤0.4%
单个杂质	≤1.5%	≤0.1%	≤0.2%
杂质总量	≤3.0%	≤0.5%	≤1.0%

质,杂质D为原料药引入或降解杂质,且在碱性条件下样品被降解超过限度要求的未知杂质。针对上述问题,为保证产品的质量安全,提出以下建议:
①本品在生产制备过程中应避免碱性条件的干扰;
②光照条件下较容易生成杂质,本品需避光保存。

综上,本研究所述测定方法参考中国药典 2015 年版二部和欧洲药典(EP9.0)中对于维生素 B₂ 片及原料药有关物质的检测要求,对色谱条件进行了优化,选择杂质分离度更好的方法作为维生素 B₂ 片有关物质的检测方法,并对该方法进行了方法学验证,验证结果满足要求。本研究所述方法可有效测定维生素 B₂ 片中的有关物质,可作为现行质量标准的补充。

REFERENCES

- [1] PAN Y N, LIANG Z C, ZHOU Q G, et al. Determination of vitamin B₂ content and uniformity by fluorescence method [J]. Guangzhou Chem Ind(广州化工), 2019, 17(47): 125-127, 156.
- [2] LI H, ZHAO C X, WANG H M, et al. Determination of vitamin B₂ in mushrooms by nitrogen and sulfur Co-doped fluorescent carbon dots [J]. J Anal Sci(分析科学学报), 2019, 35(4): 449-454.
- [3] 中国药典. 二部[S]. 2015: 1232-1234.
- [4] EP 9.0 [S]. 2017: 3484-3485.
- [5] XUE J, LI Y P, NA N, et al. Discussion on consistency evaluation method of vitamin B₂ tablets [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(8):1253-1257.
- [6] IQBAL A, ZUBAIR A, ALI S M, et al. Stability-indicating spectrofluorimetric method for the assay of riboflavin and photoproducts: Kinetic applications [J]. Luminescence, 2018, 33(6): 1070-1080.

收稿日期: 2019-08-19

(本文责编: 沈倩)