

高效液相色谱法测定复方锌铁钙口服溶液中维生素 B₂ 的含量

王 鑫(湖北省十堰市妇幼保健院药剂科 442000)

【摘要】 目的 建立以高效液相色谱(HPLC)法测定复方锌铁钙口服溶液中维生素 B₂ 含量的方法。**方法** 采用高效液相色谱法,色谱柱,Shim-pack VP-ODS 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm)。流动相,醋酸钠溶液(用冰醋酸 3 mL 和 40 g/L 氢氧化钠 18 mL 加水至 600 mL)-甲醇(66:34),流速为 0.8 mL/min;检测波长为 267 nm,柱温为 40 ℃,进样量为 10 μL。**结果** 维生素 B₂ 在 6.4~64 μg 范围内与峰面积积分值线性关系良好($r=0.999\ 9$);维生素 B₂ 的平均回收率分别为 101.02%($RSD=0.20\%$),102.28%($RSD=0.52\%$),98.35%($RSD=1.42\%$)($n=9$)。**结论** 本方法简便、快速、准确,不受其他成分的干扰,可用于测定复方锌铁钙口服溶液中维生素 B₂ 的含量。

【关键词】 复方锌铁钙; 高效液相色谱法; 维生素 B₂

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.23.009

中图分类号:R977.22

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)23-2578-03

Determination of vitamin B₂ in Compound Zn, Fe, Ca Oral Solution by RP-HPLC WANG Xin, Department of Pharmacy, Shiyan Maternal and Child Health Hospital, Shiyan, Hubei 442000, China

【Abstract】 Objective To establish a HPLC method for the determination of vitamin B₂ in Compound Zn, Fe, Ca Oral Solution. **Methods** Chromatography was carried out on the Shim-pack VP-ODS column(4.6 mm×150 mm, 5 μm); the mobile phase consisted of sodium acetate solution-carbinol(66:34); the flow rate:0.8 mL/min and the detection wavelength was 267 nm. The column temperature:40 ℃, the sample size:10 μL. **Results** The good linearity of vitamin B₂ was obtained within the range of 6.4~64 μg/mL; the average recovery rate of vitamin B₂ was 101.02% ($RSD=0.20\%$), 102.28% ($RSD=0.52\%$), 98.35% ($RSD=1.42\%$) ($n=9$), respectively. **Conclusion** The method is simple, rapid, sensitive and accurate, which can be used to detect the content of vitamin B₂ in Compound Zn, Fe, Ca Oral Solution.

【Key words】 compound Zn, Fe, Ca; HPLC; vitamin B₂;

复方锌铁钙口服液为维生素及矿物质类非处方药品,临床应用用于因缺乏锌、铁、钙及维生素 B₂ 引起的疾病^[1-2]。我国约有 60% 的儿童体内含锌量低于正常,口服本品可以补充体内锌的不足^[3-5]。铁是红细胞中血红蛋白的组成元素。缺铁时,红细胞合成血红蛋白量减少,致使红细胞体积变小,携氧能力下降,形成缺铁性贫血。复方锌铁钙口服溶液是在复方锌铁钙颗粒的基础上研制而成,为补钙、铁、锌药,它可以补充人体内维持正常生理功能所需要的锌、铁、钙。纠正缺铁性贫血,改善味觉,促进骨骼生长等^[6]。本品中的维生素 B₂ 对人体有着至关重要的作用,由维生素 B₂ 转化为黄素单核苷酸(flavine mononucleotide, FMN)^[7]和黄素腺嘌呤二核苷酸(flavine adenine denucleotide, FAD)。由于维生素 B₂ 在溶液的稳定性不好,如见光易分解,在碱性溶液中不稳定等,因此本文对其含量测定及有关物质检查进行研究,以提高其质量的可控性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 Agilent 110 液相色谱仪(四元泵 VWD 紫外检测器); Shim-pack VP-ODS (4.6 mm×150 mm, 5 μm); AEL-200 型电子分析天平(日本岛津有限公司)。

1.1.2 试剂 复方锌铁钙口服溶液的样品(自制,批号 090218),规格:10 mL/瓶(葡萄糖酸钙 0.4 g、葡萄糖酸亚铁 0.1 g、葡萄糖酸锌 0.03 g、维生素 B₂ 3 mg);维生素 B₂ 对照品(批

号 100369-200601);由中国药品生物制品检定所提供;甲醇为色谱醇(迪马公司),水为重蒸馏水,其他试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 检测波长的选择 取维生素 B₂ 对照品,经紫外分光光度法 200~600 nm 扫描,结果表明,维生素 B₂ 在 267 nm 处有最大吸收峰,故选择此波长作为检测波长。

1.2.2 流动相的筛选 参照有关文献,选择醋酸钠溶液(取冰醋酸 3 mL 与 1 mol/L 氢氧化钠溶液 18 mL,加水至 600 mL 制成)-甲醇(65:35),将流动相比比例微调至醋酸钠溶液-甲醇(66:34)时,复方锌铁钙口服溶液和破坏样品中主成份峰与各杂质峰分离良好,主成分峰形好,未见明显拖尾,保留时间也较理想。

1.2.3 色谱条件与系统适用性试验 Phenomnax(luna)C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 mm):醋酸钠溶液-甲醇(66:34)为流动相,流速 0.8 mL/min;柱温为 40 ℃,检测波长 267 nm,进样量 10 μL,在上述色谱条件下维生素 B₂ 完全达到基线分析,与邻峰分离度大于 1.5,按维生素 B₂ 计算理论塔板数均在 6 000 以上。

1.2.4 最小检测限测定 精密称取维生素 B₂ 对照品 12.80 mg,置 100 mL 棕色量瓶中,加混合溶剂(1%醋酸溶液 2.0 mL 与 1.4%醋酸钠溶液 7.2 mL,加水至 100 mL)溶解并稀释至刻度,再不断用混合溶剂稀释后测定其峰面积,取溶液 10 μL 进

样,记录色谱图,并以信噪比为 3:1 时的浓度确定其最低检测量为 5 mg。

1.2.5 酸、碱、氧化等破坏试验 (1)酸破坏试验:取本品适量,置 25 mL 棕色量瓶中,加流动相适量使溶解,加 2 mol/L 盐酸溶液 3 mL,60 °C 烘箱中放置 12 h,调节 pH 至 5~6,加流动相至刻度,摇匀,过滤,取续滤液 10 μL 进样,记录色谱图。同法对空白辅料进行酸破坏试验。(2)碱破坏试验:取本品适量,置 25 mL 棕色量瓶中,加流动相适量使溶解,加入 5 mol/L 氢氧化钠溶液 1.5 mL,60 °C 烘箱中放置 4 h,调节 pH 至 5~6,加流动相至刻度,摇匀,过滤,取滤液 10 μL 进样,记录色谱图。同法进行空白辅料碱破坏试验。(3)强氧化剂破坏试验:称取本品适量,置 25 mL 棕色量瓶中,加流动相适量使溶解,加入过氧化氢 2 mL,室温放置 12 h,加流动相至刻度,摇匀,过滤,取滤液 10 μL 进样,记录色谱图。同法进行空白辅料氧化破坏试验。(4)强光破坏试验:精密称取本品适量(约相当于维生素 B₂ 25.6 μg),置 25 mL 量瓶中,加流动相适量使溶解,在强光(4 500Lx)下破坏 12 h,再加流动相至刻度,摇匀,过滤,取续滤液 10 μL 进样,记录色谱图。同法进行空白辅料强光破坏试验。结果显示:本品经酸、碱、氧化、强光破坏试验的降解产物吸收峰与主峰的分度度良好。

2 结果

2.1 含量测定

2.1.1 对照品储备液的配置 精密称取 105 °C 干燥恒重的维生素 B₂ 对照品约 12.8 mg 于 100 mL 棕色容量瓶中加流动相溶液配成每毫升含 12.8 μg 的溶液,作为维生素 B₂ 对照品储备液并避光保存备用。

2.1.2 对照品的配置 避光操作,精密量 2 mL 维生素 B₂ 对照品储备液,置 25 mL 棕色容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液作为维生素 B₂ 对照品溶液。

2.1.3 供试品的配置 避光操作,精密量取本品 2 mL,置 25 mL 棕色量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液作为供试品溶液并避光保存备用。

2.1.4 空白干扰试验 按处方组成依工艺及制法制成维生素 B₂ 的空白样品,同供试品溶液制备方法制得空白对照溶液,进样,结果空白对照溶液在与对照溶液色谱保留时间相应的位置上无其他峰出现,说明其他成分对维生素 B₂ 无干扰。

2.2 线性关系考察 避光操作,精密量取维生素 B₂ 对照品储备液 0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mL 置于 10 mL 棕色容量瓶中,分别加流动相至刻度,摇匀作为对照品溶液,使浓度被稀释成为 6.4、12.8、25.6、51.2、60.4 μg/mL 标准溶液,从低到高按浓度依次进样,每次 10 μg 测定峰面积,以峰面积 A 对进样 C 回归得到回归方程为: $Y = 65.933X + 55.422$, 相关系数 $r = 0.999$ 3.6.4~64 μg/mL 成良好的线性关系。

2.3 稳定性试验 为了考察维生素 B₂ 溶液的稳定性,取按上述方法制备的供试品溶液,于室温(20~25 °C)下避光放置,避光操作,分别在 0,2,4,8 和 10 h 注入液相色谱仪测定峰面积,结果 RSD1.13%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定(见表 1)。

2.4 精密度试验

2.4.1 中间精密度试验 分别在不同的日期,由不同的分析人员用不同的设备(美国安捷伦 1100 高效液相色谱仪)测定 3 份样品溶液,记录色谱图,结果 RSD1.26%,说明仪器的精密度较好(见表 2)。

表 1 稳定性试验结果

时间(h)	峰面积	RSD%
0	1 746.8	1.13
2	1 726.6	—
4	1 755.3	—
6	1 701.3	—
8	1 744.9	—
10	1 743.8	—

注:—表示无数据。

表 3 中间精密度试验结果

样品	C 对(μg/mL)	A 对	A 供	含量%	RSD%
样 1	25.6	1 796.5	1 770.9	105.15	—
样 2	25.6	1 796.5	1 732.6	102.87	1.26
样 3	25.6	1 796.5	1 771.2	105.16	—

2.4.2 重复性试验 避光操作,精密称取复方锌铁钙口服溶液,按上述供试品(090218)溶液的制备方法平行制备 6 份供试品溶液;按上述对照品溶液的制备方法制备对照品溶液按含量测定方法测定,RSD1.56%,说明方法重现性好(见表 3)。

表 3 重复性实验结果

重复性	C 对(μg/mL)	A 对	A 供	含量%	RSD%
重复性 1	25.6	1 805.2	1 804.2	106.6	1.565
重复性 2	25.6	1 805.2	1 746.2	103.2	—
重复性 3	25.6	1 805.2	1 770.7	104.2	—
重复性 4	25.6	1 805.2	1 737.9	102.7	—
重复性 5	25.6	1 805.2	1 791.8	105.9	—
重复性 6	25.6	1 805.2	1 743.4	103.7	—

注:—表示无数据。

2.5 耐用性试验 通过变换流动相的比例,选择不同厂牌或不同批号的同类型色谱柱,波长,测定峰面积,确保在每次实际测定中该方法都是有效的。

2.5.1 不同检测波长的比较 使用两个不同的检测波长($\lambda_1 = 269$ nm, $\lambda_2 = 265$ nm),按照上述色谱条件,精密吸取供试品溶液及对照品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定供试品溶液中的含量(见表 4)。

表 4 不同检测波长实验结果

波长	C 对(μg/mL)	A 对	A 供	含量%	RSD%
269 nm	25.6	1 755	1 756.4	106.75	1.54
265 nm	25.6	1 662.9	1 616.8	103.71	—

注:—表示无数据。

2.5.2 不同流动相比例的比较 另使用 2 个不同比例的流动相(一个为 68:32,一个为 64:36),按照上述色谱条件,精密吸取供试品溶液及对照品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定供试品溶液中维生素 B₂ 的含量,分别计算含量的平均值,与重复性项下对照品的含量比较,RSD 为 1.66%(见表 5)。

2.5.3 不同色谱柱的比较 另取 2 个不同型号的色谱柱

(Hypersil 250, 2Atlantis250), 精密吸取同一份供试品溶液和对照品溶液各 10 μL, 按照上述色谱条件注入液相色谱仪, 测定供试品溶液中维生素 B₂ 的含量, 分别计算含量的平均值, 与重复性项下供试品的含量比较, RSD 为 1.02% (见表 6)。

表 5 不同比例流动相实验结果

流动相比	C 对(μg/mL)	A 对	A 供	含量%	RSD%
68 : 32	25.6	1683.1	1700	107.74	1.66
64 : 36	25.6	1710.8	1711	106.68	—

注: — 表示无数据。

表 6 不同色谱柱实验结果

色谱柱	C 对(μg/mL)	A 对	A 供	含量%	RSD%
Hypersil 250	25.6	1 805.3	1 739.4	102.77	1.02
2Atlantis250	25.6	1 772.3	1 741.6	104.82	—

注: — 表示无数据。

2.6 回收率试验 避光操作, 精密量 2 mL 维生素 B₂ 对照品储备液, 置 25 mL 棕色容量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液作为维生素 B₂ 对照品溶液。避光操作, 精密量取本品 2 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液作为供试品溶液并避光保存备用。在线性范围内配置高中低(80%, 100%, 120%)三个浓度的 9 份样品, 按含量测定方法测定, 计算回收率, 说明该法回 3 个不同浓度的回收率分别为: 101.23% (RSD=0.2%), 102.28% (RSD=0.52%), 98.25% (RSD=1.42%)。说明回收率好, 方法可行(见表 7)。

表 7 加样回收实验结果

加样回收率%	对照品加入(μg)	测得含量	回收率%	三次平均回收率%	RSD%
80	238.0	240.982 6	101.25		
80	238.0	240.071 5	100.87	101.023	0.2
80	238.0	240.250 1	100.95		
100	297.5	305.422 1	102.66		
100	297.5	304.939 7	102.50	102.280	0.52
100	297.5	302.474 2	101.67		
120	357.0	351.603 4	98.49		
120	357.0	355.819 6	99.67	98.350	1.42
120	357.0	345.886 6	96.89		

2.7 含量测定 分别精密量取供试品溶液及对照品溶液各 10 μL, 注入色谱仪, 记录色谱图。3 批样品的含量测定结果, 批号分别为 090605、080612、080620; 维生素 B₂ 含量分别为 101.0%、99.3%、97.6%。供试品中维生素 B₂ 的平均含量为

99.3%, RSD=1.7% 在规定范围。

3 讨 论

3.1 维生素 B₂ 在水中不溶而溶于稀碱溶液, 但在稀碱溶液中不稳定, 参考中国药典 2005 版(二部)维生素 B₂ 溶出度测定法, 选择醋酸钠溶液作为维生素 B₂ 的溶剂。

3.2 由于维生素 B₂ 性质不稳定, 故选择其溶剂与醇系统作为流动相, 通过调整其溶剂与甲醇的比例, 使样品峰保留时间合理, 其他组分不干扰, 确定醋酸钠溶液(用冰醋酸 3 mL 和 1 mol/L 氢氧化钠 18 mL 加水至 600 mL)-甲醇(66 : 34)为流动相参考《中国药典》2005 年版(二部)维生素 B₂ 片溶出度测定法, 选择醋酸钠溶液作为维生素 B₂ 的溶剂。通过调整其溶剂与甲醇比例, 使样品峰保留时间合理, 其他组分不干扰。确定流动相为甲醇-醋酸钠溶液(34 : 66)。

3.3 经紫外分光光度法扫描, 维生素 B₂ 在 267 nm 处有最大吸收峰, 故选此波长为检测波长。

3.4 原颗粒剂虽然具有质量稳定、不易霉变、服用携带方便、口感良好等优点, 但其生产步骤多, 成本高等缺点。口服溶液剂系指药物以分子、离子状态分散在溶剂中形成的均相口服液体剂, 制备工艺简单, 吸收速度快, 疗效也高, 所以, 溶液剂的作用和疗效也大, 因此, 将此颗粒剂改为口服溶液是科学、合理的。

3.5 维生素是维持人体正常生命活动所必需的小分子有机化合物, 但性质不稳定, 对光、氧、热、pH 非常敏感, 药品在加工、储存、运输、销售过程中都可能造成损失, 从而影响药效, 通过建立 HPLC 法测定维生素 B₂ 的含量, 对于保障该制剂质量稳定, 指导人们制定合理的制备工艺和储存条件具有一定的意义。

参考文献

- [1] 王革, 翁其铨. 思密达和维生素 B₂ 治疗口腔溃疡的疗效观察[J]. 中华临床医药, 2004, 5(13): 12.
- [2] 朱巧丽, 廖莲德. 葡萄糖酸锌治疗儿童营养不良临床观察[J]. 现代医药卫生, 2002, 10(2): 103-104.
- [3] 蔡胜利, 陈敏榕. 醒脾养儿冲剂加葡萄糖酸锌治疗小儿厌食症疗效观察[J]. 中国儿童保健杂志, 2002, 10(2): 103-104.
- [4] 赖柏玉, 范纪钦. 中药和葡萄糖酸锌治疗小儿缺锌性厌食 100 例[J]. 广东微量元素科学, 2003, 10(4): 45-46.
- [5] 闫荣. 硫酸镁、葡萄糖酸锌在帕金森综合征临床治疗中的应用[J]. 中国临床康复, 2003, 5(7): 1587.
- [6] 谢凤林, 唐淑艳, 王建平, 等. 葡萄糖酸钙口服液与维生素 D 联合治疗佝偻病初期临床体会[J]. 内蒙古医学杂志, 1996, 16(6): 376-377.

(收稿日期: 2010-07-13)