

HPLC 测定注射用 13 种维生素中维生素 B₆、烟酰胺、D-泛醇的含量高桂花¹, 张勇²

(1. 济宁医学院药学院, 日照 276826; 2. 辽宁省药物研究院, 沈阳 110015)

摘要 目的: 建立同时测定注射用 13 种维生素中维生素 B₆、烟酰胺、D-泛醇的 HPLC 法。方法: 采用 Diamonsil (TM) C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 以 20 mmol · L⁻¹ 磷酸二氢钾 (调 pH 5.0) - 甲醇 (88:12) 为流动相, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 214 nm, 柱温为 25 °C。结果: 维生素 B₆ 在 0.06046 ~ 0.2418 mg · mL⁻¹ 范围内、烟酰胺在 0.3999 ~ 1.599 mg · mL⁻¹ 范围内、D-泛醇在 0.1521 ~ 0.6084 mg · mL⁻¹ 范围内具有良好线性关系; 其回收率分别为 100.2%, 99.8%, 100.4%。结论: 本方法快速简便, 准确可靠, 可用于注射用 13 种维生素中维生素 B₆、烟酰胺和 D-泛醇的质量控制方法。

关键词: 维生素 B₆; 制剂; 烟酰胺; D-泛醇; 高效液相色谱法; 注射剂

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)06-1162-03

HPLC determination of vitamin B₆, nicotinamide and D-panthenol in 13 vitamins for injectionGAO Gui-hua¹, ZHANG Yong²

(1. School of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China; 2. Liaoning Institute of Pharmaceutical Research, Shenyang 110015, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the simultaneous determination of vitamin B₆, nicotinamide and D-panthenol in 13 vitamins for injection. **Method:** A Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used as separation column at 25 °C. The mobile phase was 20 mmol · L⁻¹ KH₂PO₄ solution (adjusted to pH 5.0) - methanol (88:12) at flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. Detection wavelength was set at 214 nm. **Results:** The linear ranges of vitamin B₆, nicotinamide and D-panthenol were 0.06046 - 0.2418 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9997, n = 5$), 0.3999 - 1.599 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9996, n = 5$) and 0.1521 - 0.6084 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9998, n = 5$), respectively. The average recoveries ($n = 9$) of Vitamin B₆, Nicotinamide and D-panthenol were 100.3%, 99.9% and 99.3%, respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate, and suitable for determination of the three constituents in 13 vitamins for injection.

Key words: vitamin B₆; preparations; nicotinamide; D-panthenol; HPLC; injection

注射用 13 种维生素是多种维生素混合的无菌冻干品, 含维生素 A、维生素 B₁、维生素 K₁、核黄素、维生素 B₆、D-泛醇、维生素 C、维生素 E、烟酰胺、维生素 B₁₂、生物素、维生素 D₃ 和叶酸。维生素 B₆ 和烟酰胺的含量测定方法很多, 大多采用离子对色谱法^[1-4]。而关于 D-泛醇的含量测定方法, 国内外鲜有文献报道。本文建立了同时测定注射用十三种维生素中的维生素 B₆、烟酰胺、D-泛醇 HPLC 方法, 为完善维生素类药物质量控制方法提供参考。

1 仪器与试剂

Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪配 PDA 检测器(日本岛津)。

甲醇为色谱纯(山东禹王实业有限公司); 磷酸二氢钾为分析纯(天津博迪化工有限公司); 水为二次重蒸水。

维生素 B₆(北京百灵威公司提供); 烟酰胺(中国药品生物制品检定所, 批号: 100115-200302); D-泛醇(北京百灵威公司提供); 注射用 13 种维生素样品(自制)。

2 色谱条件

色谱柱: Diamonsil(TM) C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 20 mmol · L⁻¹ 磷酸二氢钾 (调 pH 5.0) - 甲醇 (88:12); 检测波长: 214 nm; 柱温: 25

℃; 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。维生素 B_6 、烟酰胺、 D -泛醇与相邻峰的分度均大于 1.5, 理论塔板数均不低于 3000。色谱图见图 1。

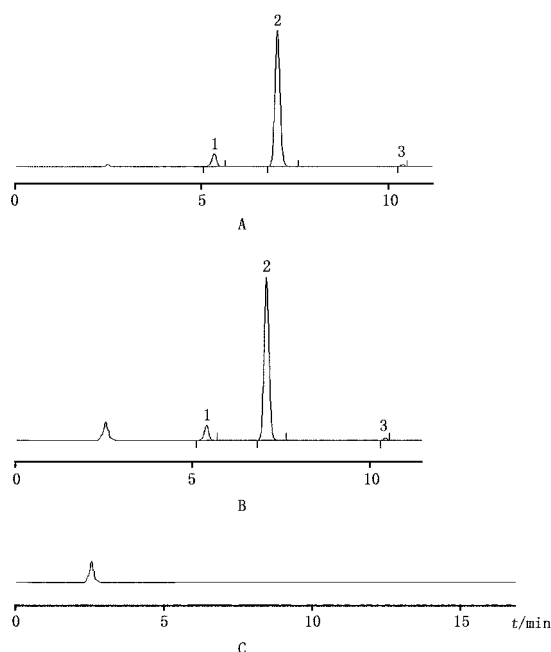


图 1 对照品(A)、样品(B)、阴性样品(C) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances(A), sample(B) and negative sample(C)

1. 维生素 B_6 (vitamin B_6) 2. 烟酰胺 (nicotinamide) 3. D -泛醇 (D -panthenol)

3 溶液制备

3.1 对照品溶液 分别称取维生素 B_6 约 6.0 mg、烟酰胺对照品约 40 mg、 D -泛醇对照品约 15 mg, 精密称定, 加流动相溶解并转移至 50 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。

3.2 供试品溶液 精密称取本品适量(相当于 1 支量), 置 50 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀。

3.3 空白干扰试验 取处方量的辅料和除烟酰胺、 D -泛醇、维生素 B_6 外的其他主药, 照含量测定方法制成供试品溶液, 注入色谱仪。结果辅料及其他药物在 214 nm 处对烟酰胺、维生素 B_6 和 D -泛醇测定无干扰, 色谱图见图 1-C。

4 方法与结果

4.1 线性关系考察 精密称取维生素 B_6 30.23 mg 置 25 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 为储备液。精密称取烟酰胺 199.93 mg 置 25 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 为储备液。精密称取 D -泛醇 76.05 mg 置 25 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 为储备液。分别精密量取 3 种储备液各 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 mL 置同一 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀。进样 10 μL , 记录色谱图。以峰面积对浓度进行线性回归, 结果见表 1。

表 1 线性关系试验结果 ($n=5$)

Tab 1 Regression equation and linear range of the components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range) / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
维生素 B_6 (vitamin B_6)	$Y = 3.676 \times 10^7 X + 5.575 \times 10^5$	0.9997	0.06046 ~ 0.2418
烟酰胺 (nicotinamide)	$Y = 3.354 \times 10^7 X + 7.692 \times 10^6$	0.9996	0.3999 ~ 1.599
D -泛醇 (D -panthenol)	$Y = 1.920 \times 10^6 X + 6.829 \times 10^4$	0.9998	0.1521 ~ 0.6084

4.2 精密度试验 取供试品溶液, 进样 10 μL , 测定峰面积, 连续测定 6 次, 以峰面积计算 RSD。结果维生素 B_6 RSD = 0.21%、烟酰胺 RSD = 0.10%、 D -泛醇 RSD = 0.28%, 表明精密度良好。

4.3 重复性试验 取本品同一批号样品 6 份, 照“3.2”项下方法制成供试品溶液, 测定峰面积, 计算含量, 结果维生素 B_6 标示百分含量为 100.3%, RSD = 0.37%; 烟酰胺标示百分含量为 100.1%, RSD = 0.15%; D -泛醇标示百分含量为 99.97%, RSD = 0.41%。结果表明方法重复性良好。

4.4 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别 0, 2, 4, 6, 8 h 测定峰面积, 结果维生素 B_6 峰面积的 RSD

= 0.84%; 烟酰胺峰面积的 RSD = 0.32%; D -泛醇峰面积的 RSD = 0.42%。结果表明样品溶液在 8 h 内稳定。

4.5 回收率试验 称取 D -泛醇 1.5 g 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密称取维生素 B_6 4.8, 6.0, 7.2 mg, 烟酰胺 32, 40, 48 mg, 置 50 mL 量瓶中, 分别加入上述 D -泛醇溶液 0.8, 1.0, 1.2 mL, 并加入处方量的其他原料和辅料, 照供试品溶液制备项下方法制成供试品溶液, 进样 10 μL , 计算回收率。结果见表 2。结果表明 3 种成分回收率符合规定。

表2 回收率试验结果($n=9$)
Tab 2 Result of samples recovery test

成分 (component)	加入量 (added) /mg	测得量 (found) /mg	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
维生素 B ₆ (vitamin B ₆)	4.86	4.85	99.8	0.52
	6.02	6.04	100.3	
	7.21	7.25	100.6	
烟酰胺(nicotinamide)	32.07	32.01	99.8	0.21
	40.15	40.11	99.9	
	48.04	47.89	99.7	
D-泛醇(D-panthenol)	12.26	12.31	100.4	0.60
	15.32	15.47	101.0	
	18.18	18.14	99.8	

4.6 样品测定 取不同批号样品,按“3.2”项下的方法制备供试品溶液,进样 10 μL ,按外标法计算含量,结果见表3。

表3 样品测定结果(%, $n=2$)
Tab 3 Result of samples determination

批号 (Lot No.)	维生素 B ₆ (vitamin B ₆)	烟酰胺 (nicotinamide)	D-泛醇 (D-panthenol)
091101	100.9	100.5	99.2
091104	100.3	100.8	99.6
091108	100.5	100.8	100.0

5 讨论

检测波长的确定: 分别精密称取烟酰胺、D-泛醇和维生素 B₆ 适量,加流动相制成含烟酰胺 12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、D-泛醇 12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、维生素 B₆ 12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 流动相溶液,照分光光度法(中国药典 2005 年

版二部附录 IV A) 在 200 ~ 500 nm 波长范围内扫描。结果,烟酰胺、D-泛醇和维生素 B₆ 在 214 nm 处均有吸收,确定烟酰胺、D-泛醇和维生素 B₆ 检测波长为 214 nm。

参考文献

- MAO Shun-yuan(毛舜元), YANG Guan-zhao(杨观兆), SHI Xin(施辛), *et al.* HPLC assay for multi-vitamins(高效液相色谱法测定多种维生素含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1995, 15(2): 25
- WU Fang(吴芳), XU Hong-yan(徐红艳). Contents determination of the four components in compound vitamin B tablets by HPLC (HPLC 法测定复合维生素 B 片中四种成分的含量). *Chin Med Rep*(中国医药导报), 2007, 4(31): 95
- SHI Bei-jia(石蓓佳), YANG Jing-jing(杨静静), ZHANG Jun(张军). Determination of six water-soluble vitamins in Kebu tablets by HPLC (HPLC 法测定克补片中 6 种水溶性维生素含量). *Pharm Clin Res*(药物与临床研究), 2009, 17(6): 525
- PANG Qing-yun(庞青云), WANG Guo-lan(王国兰), LI Wen-dong(李文乐), *et al.* Establishment of assay method for five water-soluble vitamins in duoweiyuansu tablets(多维元素片中 5 种水溶性维生素测定方法的建立). *Drug Stand China*(中国药品标准), 2007, 8(5): 9
- LI Xiang-sheng(李祥胜), KAN Jia-yi(阚家义). Assay of four vitamins in compound vitamin B injection(复合维生素 B 注射液中 4 种维生素含量测定). *Anhui Med Pharm J*(安徽医药), 2009, 13(7): 755
- CHEN Guang-long(陈光龙), LI Yu-lan(李云兰), LIU Min(刘敏), *et al.* Determination of four vitamins in compound vitamin B tablets by HPLC(高效液相色谱法测定复合维生素 B 片中四种组分的含量). *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2006, 26(10): 1256

(本文于 2010 年 7 月 14 日收到)