

· 药物分析 ·

HPLC 法测定二维亚铁颗粒中维生素 C 和维生素 B₁ 的含量

李焕宇¹, 邓朝晖² (1. 解放军广州疗养院, 广东 广州, 510515; 2. 广州军区联勤部药品仪器检验所, 广东 广州 510500)

[摘要] 目的 建立同时测定二维亚铁颗粒中维生素 C 和维生素 B₁ 含量的 HPLC 方法。方法 采用 Insteril ODS-3 色谱柱, 流动相为 0.03 mol/L 磷酸氢二铵溶液 (加入 0.01% 庚烷磺酸钠, 用磷酸调节 pH 至 3.0) - 甲醇, 梯度洗脱, 检测波长为 244 nm, 流速为 0.6 ~ 1.0 ml/min, 柱温 30 ℃。结果 维生素 C 与维生素 B₁ 分别在 0.501 ~ 6.011 μg ($r = 1.0000$) 与 0.038 ~ 0.456 μg ($r = 0.9999$) 范围内线性关系良好, 平均回收率分别为 99.51% 与 99.20%, RSD 分别为 0.55% 与 0.49% ($n = 9$)。结论 本法简便、结果准确可靠, 可用于二维亚铁颗粒中维生素 C 和维生素 B₁ 的质量控制。

[关键词] 二维亚铁颗粒; 维生素 C; 维生素 B₁; 含量测定; 高效液相色谱法

[中图分类号] R556 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)05-0380-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.05.018

Quantitative determination of vitamin C and vitamin B₁ in ferrous fumarate granules by HPLC

LI Huan-yu¹, DENG Zhao-hui² (1. Guangzhou Sanatorium of PLA, Guangzhou 510515, China; 2. Institute for Drug and Instrument Control of Guangzhou Military Area, Guangzhou 510500, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for the simultaneous determination of vitamin C and vitamin B₁ in ferrous fumarate granules. **Methods** The procedure was performed on the Insteril ODS-3 C₁₈ column at 30 ℃, detected at 244 nm. The mobile phase was composed by a gradient of 0.03 mol/L of ammonium phosphate solution (in which 0.01% of sodium heptanesulfonate was added and the pH was adjusted to 3.0 by phosphoric acid) and methanol, with the flux at 0.6 ~ 1.0 ml/min. **Results** Either vitamin C or vitamin B₁ was in good linear at 0.501 ~ 6.011 μg, $r = 1.0000$ and 0.038 ~ 0.456 μg, $r = 0.9999$, respectively. The mean recoveries were 99.51% and 99.20%, with the RSD 0.55% and 0.49%, $n = 9$. **Conclusion** The method was proved to be simple, accurate and reliable, appropriate for the quality control for vitamin C and vitamin B₁ in ferrous fumarate granules.

[Key words] ferrous fumarate granules; vitamin C; vitamin B₁; content determination; HPLC

二维亚铁颗粒是以富马酸亚铁、维生素 C、维生素 B₁ 为主要原料, 加入柠檬酸、蔗糖等辅料制成的抗贫血类药物。其中维生素 C 参与氨基酸代谢、神经递质的合成、胶原蛋白和组织细胞间质的合成。可降低毛细血管的通透性, 加速血液的凝固, 刺激凝血功能, 促进铁在肠内的吸收。维生素 B₁ 在体内与焦磷酸结合成辅羧酶, 参与糖代谢中丙酮酸和 α-酮戊二酸的氧化脱羧反应, 是糖类代谢所必需。缺乏时, 氧化受阻形成丙酮酸、乳酸堆积, 并影响机体能量供应^[1]。二维亚铁颗粒已有国家标准^[2], 其中的维生素 C 用碘量法测定含量, 而维生素 B₁ 则未要求测定含量。为提高本药的质量标准, 并简化操作, 参考有关文献^[3], 应用反相高效液相色谱法同时快速、准确测定本药中维生素 C 和维生素 B₁ 的含量, 现报道如下。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (美国 Waters2695-2487/996); 电子分析天平 (日本 AND HA-180M)。

维生素 C (中国药品生物制品检定所, 批号: 100425-200702 含量 100.0%); 维生素 B₁ (中国药品生物制品检定所, 批号: 100390-200703, 含量 99.9%, 105 ℃ 干燥 2 h); 庚烷磺酸钠、甲醇均为色谱级; 磷酸氢二铵、硫代硫酸钠、磷酸为分析纯; Milli-Q 超纯水机 (美国密理博)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为: Insteril ODS-3 (5 μm, 250 mm × 4.6 mm), 检测波长: 244 nm, 流速: 0.6 ~ 1.0 ml/min, 进样量: 10 μl, 柱温 30 ℃, 分离度应符合要求, 理论板数按维生素 C 计算应不低于 4 000, 流动相: 0.03 mol/L 磷酸氢二铵溶液 (加入 0.01% 庚烷磺酸钠, 用磷

[作者简介] 李焕宇 (1966-), 女, 硕士, 副主任药师。Tel: (020) 61657577, E-mail: lihuanyu567@163.com.

酸调节 pH 至 3.0) - 甲醇, 梯度洗脱, 见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

| 时间 (min) | 流速 (ml/min) | 0.03 mol/L 磷酸氢二铵溶液 | 甲醇 |
|-------------|----------------|-----------------------|----|
| 0~8 | 0.6 | 100 | 0 |
| 8~16 | 1 | 40 | 60 |

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取维生素 C 对照品适量, 置 50 ml 量瓶中, 加 0.1% 硫代硫酸钠-流动相(1:1)溶液(以下简称溶剂)振摇溶解, 并定容至刻度, 摇匀, 得维生素 C 对照品储备液; 精密称取维生素 B₁ 对照品适量, 置 50 ml 量瓶中, 加溶剂振摇溶解, 并定容至刻度, 摇匀, 得维生素 B₁ 对照品储备液; 精取上述储备液各 1 ml 置 20 ml 量瓶中, 加溶剂定容至刻度, 摇匀, 制成约含维生素 C 与维生素 B₁ 对照品 200 μg/ml 与 15 μg/ml 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取批号为 20110721 样品 5 包, 研细混匀后, 精密称取细粉适量(约相当于维生素 C 40 mg)置 200 ml 的量瓶中, 加溶剂适量, 振摇使溶解并定容至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 的滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 空白辅料溶液的制备 取处方中不含维生素 C 和维生素 B₁ 的其他成分, 按“2.2.2”项下方法制备, 即得。

2.3 检测波长 取“2.2.1”和“2.2.2”项下的溶液进样, 用 DAD 检测器 190~400 nm 范围进行扫描, 结果维生素 C 和维生素 B₁ 分别在 246 nm 和 244 nm 波长处有最大吸收。考虑到维生素 B₁ 的含量较少, 故将检测波长定为 244 nm, 见图 1。

2.4 干扰试验 分别用“2.2.1”、“2.2.2”、“2.2.3”项下的溶液进样, 记录色谱图的出峰时间并对维生素 C 和维生素 B₁ 进行峰纯度测定, 结果按“2.1”进行测定对维生素 C 和维生素 B₁ 峰无干扰, 见图 2。

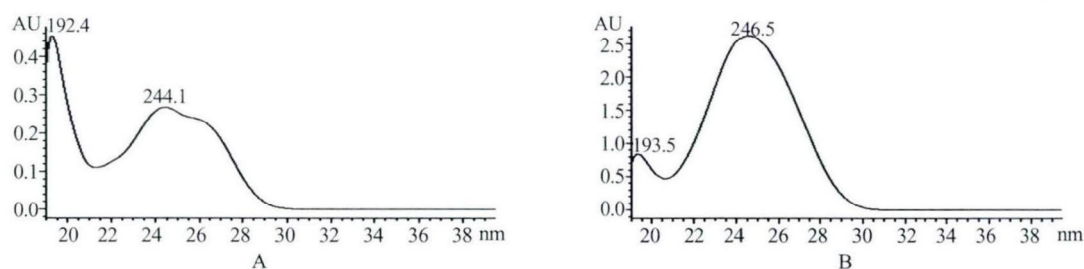


图 1 两个组分的紫外扫描图谱
A-维生素 B₁; B-维生素 C

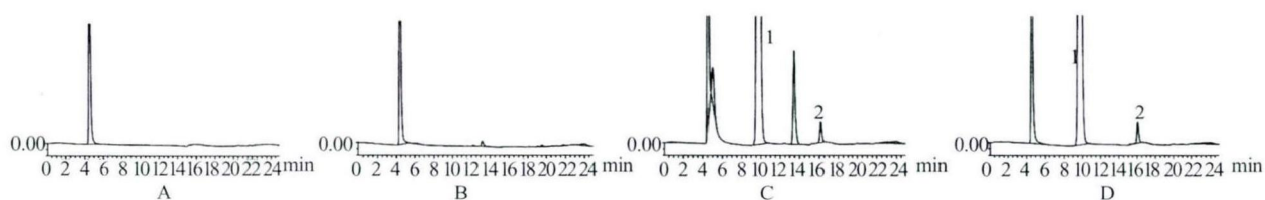


图 2 系统适用性试验色谱图
A-溶剂; B-空白辅料; C-供试品溶液; D-对照品溶液; 1-维生素 C; 2-维生素 B₁

2.5 专属性试验 各精密称取 5 份 20110721 批号的样品细粉, 其中 3 份分别加入 1 mol/L 盐酸 1 ml、0.1 mol/L 氢氧化钠 0.5 ml、5% 过氧化氢 5 滴混匀, 各放置 8 h、10 min、10 min, 分别用等量的酸或碱中和。另 2 份分别置 105 °C 干燥箱中放置 1 h 和 6 000 lx 照度下光照 24 h。将所破坏性试验样品按“2.2.2”项下制备后分别进样, 记录色谱图。结果表明各降解产物与主成分峰均能完全分离, 维生素 C 和维生素 B₁ 的测定不受辅料和降解产物的干扰, 经二级管

阵列检测器(DAD)检测维生素 C 和维生素 B₁ 均为单一纯峰, 详见图 3。

2.6 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.1”维生素 C 与维生素 B₁ 储备液 0.25、0.5、1.0、2.0、3.0 ml, 各置 20 ml 量瓶中, 加溶剂定容至刻度, 摇匀, 维生素 C 与维生素 B₁ 的进样浓度分别为 50.09、100.18、200.36、400.72、601.08 μg/ml 与 3.801、7.602、15.205、30.410、45.612 μg/ml 的系列混合对照品溶液。分别精密吸取上述各溶液 10 μl 进样,

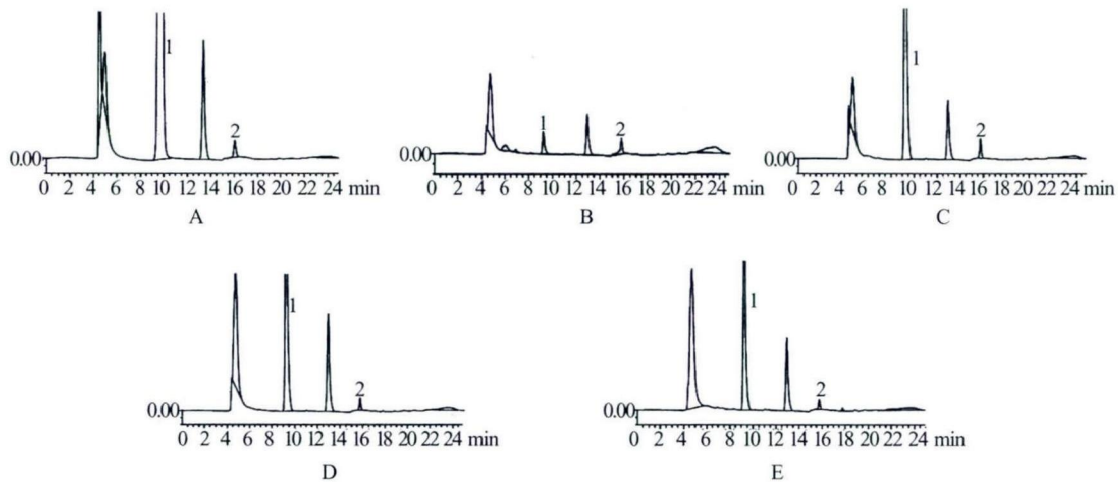


图3 专属性试验色谱图

A-酸破坏样品;B-碱破坏样品;C-氧化破坏样品;D-高温破坏样品;E-光照破坏样品;1-维生素C;2-维生素B₁

记录峰面积,以维生素C与维生素B₁峰面积为纵坐标(Y),进样浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)为横坐标(X)进行线性回归,回归方程为: $Y_{\text{VC}} = 73\ 560X_{\text{VC}} + 752\ 355$ ($r = 1.000\ 0$), $Y_{\text{VB}_1} = 59\ 942X_{\text{VB}_1} - 27\ 859$ ($r = 0.999\ 9$)。

2.7 定量限 取“2.2.2”项下的溶液加溶剂制成含维生素B₁ 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液、另取上述溶液加溶剂制成含维生素C 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液,分别进样10 μl ,以流动相的基线信噪比为10:1计算,维生素C与维生素B₁的定量限分别约为1.3、4.7 ng。

2.8 精密度试验 精密吸取按“2.2.1”制备的对照品溶液10 μl ,连续进样6次,维生素C与维生素B₁峰面积的RSD分别为0.43%、0.60% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

2.9 重复性试验 取批号为20110721的样品按“2.2.2”方法制备6份供试品溶液,分别测定,维生素C与维生素B₁的平均含量为37.98 mg/g、2.86 mg/g,RSD为0.62%、0.91% ($n = 6$),结果表明本法重复性良好。

2.10 稳定性试验 取按“2.2.2”方法制备的供试品溶液室温放置0、2、4、6、8 h后分别进样测定,结果维生素C与维生素B₁峰面积的RSD为0.52%、1.32%,结果表明在室温放置8 h内样品基本稳定。

2.11 加样回收率试验 精密称取“2.9”项下已知含量的二巯亚铁颗粒样品9份,按“2.2.2”方法制备,每份精密称取约0.5 g,并按标示量的80%、100%、120%加入维生素C与维生素B₁对照品储备液各3.5、4.5、5.5 ml,混匀后,按“2.2.2”方法制备后进行测定,以外标法计算加样回收率,结果维生素C与维生素B₁的平均回收率

为99.51% (RSD = 0.55%)、99.20% (RSD = 0.49%),测定值接近真实值,方法准确可靠,结果见表2。

表2 加样回收率实验结果 ($n = 9$)

| 样品 | 加标量 (mg) | 测得加入量 (mg) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|-------------------|----------|------------|---------|-----------|---------|
| 维生素C | 14.025 | 13.891 | 99.04 | 99.51 | 0.55 |
| | 14.025 | 13.924 | 99.28 | | |
| | 14.025 | 13.846 | 98.72 | | |
| | 18.032 | 18.142 | 100.61 | | |
| | 18.032 | 17.963 | 99.62 | | |
| | 18.032 | 17.998 | 99.81 | | |
| | 22.040 | 22.005 | 99.84 | | |
| | 22.040 | 21.891 | 99.32 | | |
| | 22.040 | 21.906 | 99.39 | | |
| 维生素B ₁ | 1.065 | 1.052 | 98.78 | 99.20 | 0.49 |
| | 1.065 | 1.049 | 98.50 | | |
| | 1.065 | 1.059 | 99.44 | | |
| | 1.370 | 1.364 | 99.56 | | |
| | 1.370 | 1.355 | 98.91 | | |
| | 1.370 | 1.372 | 100.15 | | |
| | 1.674 | 1.658 | 99.04 | | |
| | 1.674 | 1.659 | 99.10 | | |
| | 1.674 | 1.663 | 99.34 | | |

2.12 样品测定 取3批样品,按“2.2.2”制备项下方法制备,按“2.1”实验条件进行含量测定,每批平行测定3份,结果见表3。

表3 样品含量测定结果 (mg/g, $n = 3$)

| 批号 | 维生素C | 维生素B ₁ |
|----------|-------|-------------------|
| 20110721 | 38.03 | 2.85 |
| 20111027 | 39.65 | 2.92 |
| 20120401 | 39.87 | 3.04 |

3 讨论

3.1 根据文献报道^[4],维生素C在水溶液中极易被氧化,按文献报道^[3],可采用0.1%硫代硫酸钠-0.03 mol/L磷酸氢二铵(1:1)溶解样品,经实验,维生素C与维生素B₁在pH 3.0酸性条件下较稳定。

3.2 参考文献报道^[3]的流动相,并在0.03 mol/L磷酸氢二铵溶液中加入离子对抑制剂庚烷磺酸钠,以延长维生素B₁的保留时间。在梯度比例不变的情况下,发现采用加入0.01%庚烷磺酸钠的方法既可使维生素C达到较好的分离,亦可使维生素B₁能较快洗脱。

3.3 对样品进样浓度选择实验中,维生素C的浓度为0.2 mg/ml,进样量为10 μl较适合,且维生素B₁的峰响应值较好。笔者试用了5种不同品牌的

色谱柱,Insteril ODS-3 色谱柱的分离效果较好,且可耐受含维生素C的浓度至0.5 mg/ml。

【参考文献】

- [1] 陈新谦,金有豫,汤光.新编药理学[M].第17版.北京:人民卫生出版社,2011:778.
- [2] 国家药典委员会.《国家药品标准》化学药品地方标准上升国家标准第三册[S].2002:3.
- [3] 何笑荣,姜文清,霍秀颖,等.RP-HPLC法同时测定利明滴眼液中维生素C和维生素B₁的含量[J].中国药房,2012,23(17):1613.
- [4] 张爽,张华,赵思奇.维生素C稳定性紫外分光光度测定法的建立[J].黑龙江医药,2008,21(1):26.

[收稿日期]2012-07-27

[修回日期]2013-01-21

(上接第367页)

2.2.7 含量测定 取3批盐酸罗哌卡因温敏凝胶注射剂样品(规格20 mg/g,批号分别为120601、120602、120603),按“2.2.1”项下(2)的处理方法制备成样品溶液,按“2.2.2”项下色谱条件测定峰面积。根据内标标准曲线方程计算得3批样品中盐酸罗哌卡因的平均含量分别为标示量的(98.92 ± 0.35)%、(99.18 ± 0.38)%、(98.72 ± 0.62)%,*n* = 3,均在标示量的95%~105%之间,符合含量测定要求。

3 讨论

温敏凝胶在室温下是流动性液体,易于保存,使用方便;在达到人体正常温度时发生相变形成半固体凝胶,从而实现缓慢释药的目的。因此,相变温度是温敏凝胶最重要的指标之一,若相变温度过低,则保存不易,且注射时不方便;若相变温度过高,则在人体中无法形成半固体凝胶,就没有足够的缓释作用,还会造成局部药物浓度过大。盐酸罗哌卡因能溶于水,但其在温敏凝胶中的含量受凝胶的辅料用量影响较大,本法制备的温敏凝胶中盐酸罗哌卡因含量已接近其最大溶解量,而盐酸罗哌卡因的加入对该温敏凝胶的相变温度影响不大。盐酸罗哌卡因温敏凝胶注射剂能够在体温37℃情况下形成半固体凝胶,从而维持较长时间的有效药物浓度,但其在体内的具体缓释时间有待进一步验证,可望给心脏外科手术的术后止痛等提供一种新的缓释注射剂。

HPLC流动相对于内标物质和待测物质的出峰时间、峰形和分离度等有很大的影响。本实验参考

陆松伟等^[5]研究采用乙腈-0.02 mol/L磷酸二氢钠-三乙胺(48:52:0.15)为流动相,用磷酸调节pH至3.15,内含0.015 mol/L十二烷基硫酸钠(SDS)作为离子对试剂,不仅延长了药物在非极性固定相中的保留时间,而且减少了色谱峰的拖尾现象,改善了色谱分离的效果。盐酸罗哌卡因在pH 6.0以上难溶,在碱性溶液中会产生沉淀,因此利用磷酸调节合适的pH非常重要。笔者所建立的HPLC法,专属性高,线性关系良好,回收率、精密度、重复性均符合要求,可用于盐酸罗哌卡因温敏凝胶注射剂的质量控制。

【参考文献】

- [1] Akoglu E, Akkurt BC, Inanoglu K, et al. Ropivacaine compared to bupivacaine for post-tonsillectomy pain relief in children: A randomized controlled study[J]. In J Pediatr Otorhinolaryngol, 2006,70(7):1169.
- [2] 项佳音,杨洪军,熊欣,等.常见温度敏感型原位凝胶载体的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(2):252.
- [3] Seo HJ, Kim JC. Effects of additives on phase transitions of Poloxamer 407/Poloxamer 188 mixture and release property of monolein cubic phase containing the poloxamers[J]. J Ind Eng Chem, 2012,18(1):88.
- [4] 陈钢,侯世祥,秦凌浩.动态流变实验评价温敏凝胶的方法研究[J].中国药学杂志,2008,43(6):444.
- [5] 陆松伟,朱全刚,陈方剑,等.用RP-HPLC法测定三利乳膏中盐酸利多卡因的含量[J].药学服务与研究,2011,11(4):291.

[收稿日期]2012-10-17

[修回日期]2013-03-13