

高效液相色谱法测定脑络通片中维生素 B₆ 的含量 Determination of Vitamin B₆ in Naoluotong Tablets by HPLC

赵翠红, 黎 瑞, 闫莲姣, 苏桂前, 陆巧燕

ZHAO Cui-hong, LI Rui, YAN Lian-jiao, SU Gui-qian, LU Qiao-yan

(南宁市迪智药业有限责任公司, 广西南宁 530003)

(Nanning Dizhi Pharmaceutical Co. Ltd., Nanning, Guangxi, 530003, China)

摘要:采用高效液相色谱法(HPLC)测定脑络通片中维生素 B₆ 的含量。色谱柱为 C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.01% 三乙醇胺溶液(用磷酸调 pH 值至 2.5)为 1:99, 检测波长 291 nm。维生素 B₆ 含量测定的线性范围是 10.6~95.4 μg/ml, $r = 0.9998$ ($n = 6$), 回收率为 99.28%, $RSD = 1.90\%$ 。本方法灵敏、简便、准确, 可以用于脑络通片中维生素 B₆ 的含量测定。

关键词: 高效液相色谱法 维生素 B₆ 脑络通片

中图分类号: O657.72; TQ466.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2006)S0-0413-03

Abstract: Methods of HPLC were applied with a C₁₈ column, and the mobile phase of methanol - 0.01% triethanolamine (adjust pH value 2.5 with phosphoric acid, 1:99), and the detection wavelength was 291nm. Vitamin B₆ was obtained in the range of 10.6 ~ 95.4 μg/ml, $r = 0.9998$ ($n = 6$). The average recovery rate was 99.28%, with $RSD = 1.90\%$. This method is sensitive simple, specific and accurate for the control of Naoluotong tablets.

Key words: HPLC, naoluotong tablets, vitamin B₆

脑络通片为《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂》脑络通胶囊改剂型品种, 系由盐酸托哌酮、川芎、丹参、黄芪、甲基橙皮甙和维生素 B₆ 等六味组成的中西结合的复方制剂, 具有补气活血, 通经活络功能, 有扩张血管, 增加脑血流量作用。用于脑血栓、脑动脉硬化、中风后遗症等各种脑血管疾病气虚血瘀证引起的头痛、眩晕、半身不遂、肢体发麻、神疲乏力等症^[1]。制剂中盐酸托哌酮、丹参等的含量测定研究已有文献报道^[2,3], 本实验采用 HPLC 对方中的西药成分维生素 B₆ 进行含量测定, 为该制剂的质量控制提供了更有效、可行的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

日本岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪, 日本岛津 UV-10A 紫外检测器, 威玛龙色谱工作站; AICHROM 柱(C₁₈, 4.6 mm×250 mm, 5 μm)。

1.2 试剂

盐酸吡哆辛(维生素 B₆)对照品由中国药品生物制品检定所提供, 批号: 100116-199801, 供含量测定用。甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他的试剂均为分析纯。脑络通片供试品由广西欢宝药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: AICHROM C₁₈ 柱(5 μm, 4.6 mm×250 mm), 流动相为甲醇-0.01% 三乙醇胺溶液(磷酸调 pH 值至 2.5)=1:99, 流速 1.0 ml/min, 检测波长 291 nm, 进样量为 10 μl。在此条件下, 维生素 B₆ 能达到基线分离, 分离度 $R > 1.5$, 维生素 B₆ 保留时间约为 5.0 min, 理论塔板数按维生素 B₆ 峰计算均在 4000 以上。

2.2 测定波长选择

取维生素 B₆ 对照品适量, 用甲醇溶解, 在紫外分光光度计上扫描, 结果在 291 nm 处有最大吸收。故选取维生素 B₆ 的最大吸收波长 291 nm 作为测定波长。

2.3 溶液制备

2.3.1 对照品溶液制备

精密称取维生素 B₆ 对照品适量,加甲醇制成每 1ml 含 1.0mg/ml 的溶液。精密吸取 0.5ml,置于 10ml 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,制成每 1ml 含 50 μ g 的溶液,即得对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液制备

取本品 20 片,除去包衣,精密称定,研细,取约 0.5g,精密称定,置于 50ml 容量瓶中,加流动相约 40ml,超声处理 30min,放冷,加流动相至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μ m)过滤,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3.3 阴性对照品溶液制备

按处方比例及工艺配制缺维生素 B₆ 的脑络通片,按供试品溶液制备方法制备,即得阴性对照品溶液。

2.4 干扰试验

取维生素 B₆ 对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液按实验方法进行测定的结果表明:阴性对照溶液色谱中,在维生素 B₆ 峰相应的保留时间无吸收峰(见图 1,图 2,图 3)。说明处方中其它成分对测定

无影响。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察

精密称取维生素 B₆ 对照品 10.6mg,置于 100ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成 106.0 μ g/ml 对照品溶液,备用。分别精密吸取上述对照品溶液 1.0ml、3.0ml、5.0ml、7.0ml、9.0ml,分别置于 10ml 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,进样测定。以对照品进样浓度为横坐标(X),峰面积积分为纵坐标(Y)绘制标准曲线,回归方程为: $Y = 25137X + 39028, r = 0.9998$ 。维生素 B₆ 在进样浓度 10.6~95.4 μ g/ml 范围内,进样浓度与维生素 B₆ 峰面积呈良好的线形关系。

2.5.2 精密度试验

取同一对照品溶液和同一供试品溶液,按实验的色谱条件,连续测定 6 次,记录维生素 B₆ 峰面积。结果,对照品溶液中维生素 B₆ 的平均峰面积为 1372284, RSD 为 1.37%,供试品溶液中维生素 B₆ 的平均峰面积为 1184934, RSD 为 1.75%。说明本法的精密度较好。

2.5.3 稳定性试验

取同一供试品溶液,每隔一定时间测定 1 次,共测定 6 次。结果是维生素 B₆ 峰面积的平均值为 1238135, RSD 为 1.12% ($n = 6$)。供试品在 10h 内测定稳定。

2.5.4 重现性试验

取同一批样品,按实验方法平行测定 6 份的结果显示,维生素 B₆ 的平均含量为 4.800mg/g, RSD = 1.61% ($n = 6$)。本法的重现性较好。

2.5.5 加样回收试验

取已知含量的样品,除去包衣,研细,取约 0.25g,精密称定,精密加入维生素 B₆ 对照品溶液 1.06mg/ml(精密称取维生素 B₆ 对照品 10.6mg,置于 10ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得)1.2ml,置于 50ml 容量瓶中,加流动相 40ml,超声处理 30min,放冷,加流动相至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μ m)滤过,取续滤液,测定,计算回收率。结果平均回收率为 99.28%, RSD = 1.90% ($n = 6$)。

2.6 样品测定

分别取不同批号样品 20 片,除去包衣,按 2.3.2 项下操作制备供试品溶液。分别精密吸取供试品溶液与对照品溶液各 10 μ l,注入液相色谱仪测定。6 批样品中维生素 B₆ 的含量结果见表 1。表 1 显

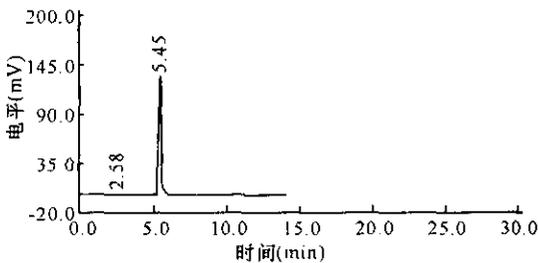


图 1 维生素 B₆ 对照品 HPLC 色谱图

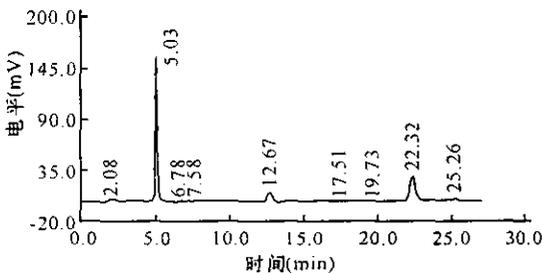


图 2 供试品溶液 HPLC 色谱图

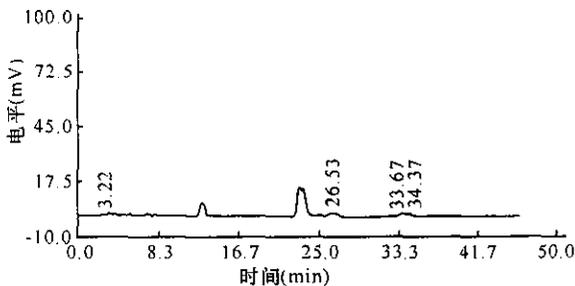


图 3 阴性对照品溶液 HPLC 色谱图

示, 6 批样品中维生素 B₆ 的平均含量为 4.81 ~ 4.92mg/g, 相对平均偏差为 0.10% ~ 0.93%。

表 1 样品中维生素 B₆ 含量测定结果

样品批号	维生素 B ₆ 含量(mg/g)			相对平均 偏差(%)
	1	2	平均值	
20041120	4.85	4.90	4.88	0.51
20041121	4.89	4.80	4.84	0.93
20041122	4.90	4.91	4.90	0.10
20060402	4.82	4.88	4.85	0.62
20060403	4.79	4.83	4.81	0.42
20060404	4.87	4.95	4.92	0.71

3 结束语

本品为中西复方制剂, 成分比较多, 而且比较复杂, 为了排除杂质干扰, 必须选择一个符合的维生素 B₆ 含量测定的色谱条件。我们在试验过程中曾采用了多种流动相系统, 如乙腈-磷酸盐溶液、乙腈-水、甲醇-磷酸盐溶液、乙腈-醋酸溶液等, 分离效果均不理想, 采用本文所述流动相, 即甲醇-0.01% 三乙醇溶液(磷酸调 pH 值至 2.5)=1:99, 分离效果最佳。

参考文献[4]的方法, 我们曾分别采用甲醇、

50% 甲醇、水溶液、流动相四种溶剂对制剂进行超声提取。结果采用水溶液、流动相提取, 含量测定结果高于甲醇、50% 甲醇超声提取, 因为本品中含有中药成分, 采用水作为溶剂制备的样品溶液容易霉变、保存时间较短, 故采用流动相作为提取溶剂。

我们取样品 0.5g, 依法操作, 对不同超声时间的提取效果进行考察, 结果超声提取 30 min, 即可。

总之, 本方法简便、准确, 专属性强, 灵敏度高, 可以作为控制产品质量的指标之一。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂[S]. 第 19 册, 1998, 166.
- [2] 马郑红, 朱芸, 等. HPLC 测定脑络通胶囊中盐酸托哌酮的含量[J]. 华西药理学杂志, 2005, 21(1): 89-91.
- [3] 王锦, 张丽梅, 等. 高效液相色谱法测定脑络通胶囊中丹参酮 II A 的含量[J]. 解放军药学报, 2002, 18(3): 184-186.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

(上接第 412 页)

线, 得回归方程 $Y = 1554X + 1357$, $r = 0.999$, 浓度在 1~200ng/ml 范围线性良好。

2.4 精密度试验

连续进标准溶液, 测定 6 次, 由峰面积计算精密度得 $RSD = 1.2\%$

2.5 回收率试验

将标准溶液定量加入已测知含量的正常人血清, 制备 5 份, 按本法操作测定含量, 计算回收率的结果见表 1。

表 1 VitB₂ 回收率试验结果(n=5)

序号	VitB ₂ 含量(ng/ml)				回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
	样本含量	加入标准含量	测得总含量	回收含量			
1	15.4	20.0	34.4	19.0	95.0	98.0	3.8
2	15.4	20.0	34.1	18.7	93.5		
3	15.4	20.0	35.1	19.7	98.5		
4	15.4	20.0	35.6	20.2	101		
5	15.4	20.0	35.8	20.4	102		

从表 1 可知, 回收率为 93.5% ~ 102%, 平均 98.0%, 方法的准确性较高。

3 结论

本方法的平均回收率为 98.0%, RSD 为 3.8%, 最低检出浓度为 0.8ng/ml, 可以快速、简便、准确地检测人体血清中 VitB₂ 含量。可以为人体血液研究等提供可靠、准确的数据。

参考文献:

- [1] 刘景民. 维生素 B₂ 在人体中的作用[J]. 实用中西医结合杂志, 1996, 9(12): 720.
- [2] 张静, 刘书田. 电修饰电极对人体全血、血清及负荷 VitB₂ 尿样中 VitB₂ 的测定[J]. 药物分析杂志, 1991, 11(3): 131-135.