

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.20.021

庆大霉素普鲁卡因维 B₁₂ 颗粒中维生素 B₁₂ 含量及含量均匀度研究

陈褚建

(浙江省湖州市食品药品检验研究院, 浙江 湖州 313000)

摘要:目的 建立测定庆大霉素普鲁卡因维 B₁₂ 颗粒中维生素 B₁₂ 含量的高效液相色谱法,并研究其含量均匀度。方法 色谱柱为 Alltima C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.02 mol/L 磷酸二氢钠-甲醇 (80:20, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 361 nm, 柱温为 35 ℃, 进样量为 50 μL。结果 维生素 B₁₂ 质量浓度在 0.01~0.30 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好 ($r=0.9999$, $n=5$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0% ($n=6$), 平均加样回收率为 98.53%, RSD 为 0.70% ($n=6$)。3 批样品中维生素 B₁₂ 含量平均值分别为 99.81%, 98.73%, 99.84%, A+2.2S 分别为 4.12, 5.08, 6.41。结论 该方法简便、准确, 专属性强, 重复性好, 可用于庆大霉素普鲁卡因维 B₁₂ 颗粒中维生素 B₁₂ 的含量及含量均匀度研究。

关键词:庆大霉素普鲁卡因维 B₁₂ 颗粒; 高效液相色谱法; 维生素 B₁₂; 含量测定; 含量均匀度

中图分类号: R927.2; R978.1

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)20-0078-04

Determination of Content and Content Uniformity of Vitamin B₁₂ in Gentamycin Sulfate, Procaine Hydrochloride and Vitamin B₁₂ Granules

CHEN Chujian

(Huzhou Institute for Food and Drug Control, Huzhou, Zhejiang, China 313000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of Vitamin B₁₂

第一作者: 陈褚建, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为食品药品检验, (电子信箱) 513032611@qq.com。

表 1 加样回收试验结果 ($n=9$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n=9$)

取样量(g)			样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1.063 4	1.063 4	1.063 4	0.364 7	0.188 2	0.196 7	1.876 8	0.650 8	0.715 2	2.203 6	0.812 7	0.892 5	97.98	95.96	97.29						
1.052 7	1.052 7	1.052 7	0.364 4	0.186 3	0.194 7	1.876 8	0.650 8	0.715 2	2.215 2	0.813 9	0.881 6	98.61	96.44	96.04						
1.036 8	1.036 8	1.036 8	0.355 6	0.183 5	0.191 8	1.876 8	0.650 8	0.715 2	2.202 9	0.809 2	0.883 7	98.43	96.14	96.74						
1.054 4	1.054 4	1.054 4	0.361 7	0.186 6	0.195 1	2.346 0	0.813 5	0.894 0	2.681 5	0.976 5	1.072 9	98.88	97.10	98.19						
1.024 8	1.024 8	1.024 8	0.351 5	0.181 4	0.189 6	2.346 0	0.813 5	0.894 0	2.680 6	0.968 8	1.053 8	99.28	96.79	96.67	98.95	96.86	97.34	0.54	0.72	0.88
1.092 1	1.092 1	1.092 1	0.374 6	0.193 3	0.202 0	2.346 0	0.813 5	0.894 0	2.698 2	0.978 1	1.067 2	99.05	96.47	96.78						
1.078 3	1.078 3	1.078 3	0.369 9	0.190 9	0.199 5	2.815 2	0.976 2	1.072 8	3.172 2	1.138 7	1.255 3	99.54	97.09	98.42						
1.067 5	1.067 5	1.067 5	0.366 2	0.188 9	0.197 5	2.815 2	0.976 2	1.072 8	3.165 4	1.141 6	1.243 2	99.43	97.59	97.47						
1.029 9	1.029 9	1.029 9	0.353 3	0.182 3	0.190 5	2.815 2	0.976 2	1.072 8	3.150 9	1.140 2	1.246 7	99.37	98.13	98.45						

注: A 为丁香酚, B 为土木香内酯, C 为异土木香内酯。表 2 同。

Note: A is eugenol, B is alantolactone, C is isosalantolactone, as well as Tab. 2.

表 2 样品含量测定结果 (mg/g, $n=3$)

Tab. 2 Content determination of eugenol, alantolactone and isosalantolactone in the samples (mg/g, $n=3$)

批号	含量		
	A	B	C
21282	0.34	0.18	0.19
20521	0.42	0.21	0.21
21027	0.37	0.26	0.24

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 16.
- [2] 夏丽珍, 张东升, 王隆彬. 洁白胶囊与曲美布汀片治疗腹泻型肠易激综合征临床观察[J]. 中国民族民间医药, 2013,

22(2): 124-125.

- [3] 王松, 张晓萍, 侯美英. 洁白胶囊治疗腹泻型肠易激综合征疗效观察[J]. 中国药物经济学, 2014, 9(6): 64-65.
- [4] 郭彦萍. 洁白胶囊联合三联疗法治疗消化性溃疡 62 例疗效观察[J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6(7): 59-60.
- [5] 曾毅, 吴向东. 洁白胶囊治疗胃脘痛 132 例临床分析[J]. 现代临床医学, 2012, 38(4): 269-270.
- [6] 杨琪琪, 董建斌, 王兰霞, 等. 洁白胶囊生产过程中不同灭菌工艺对产品质量的影响[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(10): 67-71.
- [7] 程华, 郑虹. 洁白胶囊微生物学质量分析与评价[J]. 青海医药杂志, 2018, 48(1): 54-57.
- [8] 张明童, 马潇, 张平, 等. 微波消解-ICP-MS 测定洁白胶囊中重金属含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(7): 963-966.

(收稿日期: 2021-01-27; 修回日期: 2021-05-17)

in Gentamycin Sulfate, Procaine Hydrochloride and Vitamin B₁₂ Granules and to study their content uniformity. **Methods** The chromatographic column was Alltima C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.02 mol/L sodium dihydrogen phosphate-methanol (80 : 20, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 361 nm, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 50 μL. **Results** The mass concentration of vitamin B₁₂ showed a good linear relationship with peak area in the range of 0.01–0.30 μg/mL ($r=0.999\ 9$, $n=5$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0% ($n=6$), the average recovery of vitamin B₁₂ was 98.53% with the RSD of 0.70% ($n=6$). The average contents of vitamin B₁₂ in the three batches of samples were 99.81%, 98.73% and 99.84%, respectively, and the contents of $A+2.2\ S$ were 4.12, 5.08 and 6.41, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, specific and reproducible, which can be used to determine the content and content uniformity of vitamin B₁₂ in Gentamycin Sulfate, Procaine Hydrochloride and Vitamin B₁₂ Granules.

Key words: Gentamycin Sulfate, Procaine Hydrochloride and Vitamin B₁₂ Granules; HPLC; Vitamin B₁₂; content determination; content uniformity

庆大霉素普鲁卡因维 B₁₂ 颗粒为复方制剂, 具有消炎、止痛、促进胃黏膜修复等作用, 主要用于治疗慢性、浅表性胃炎, 其组分为硫酸庆大霉素、盐酸普鲁卡因和维生素 B₁₂, 其中维生素 B₁₂ 为形成消化道正常上皮细胞的必需物质。该产品现行质量标准^[1]中缺少针对维生素 B₁₂ 的检测控制。本研究中参考 2020 年版《中国药典(四部)》^[2]含量均匀度检查法项下方法及文献[3–16], 建立高效液相色谱法测定庆大霉素普鲁卡因维 B₁₂ 颗粒中维生素 B₁₂ 的含量及含量均匀度, 以进一步完善该制剂的质量标准。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); XS205 Dual Range 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司, 精度为 0.01 mg); KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

维生素 B₁₂ 对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 100248-201705, 含量为 90.5%); 庆大霉素普鲁卡因维 B₁₂ 颗粒(企业 A, 批号分别为 20190649、20190823、20190838); 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Alltima C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流

动相: 0.02 mol/L 磷酸二氢钠-甲醇(80 : 20, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 361 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 50 μL。

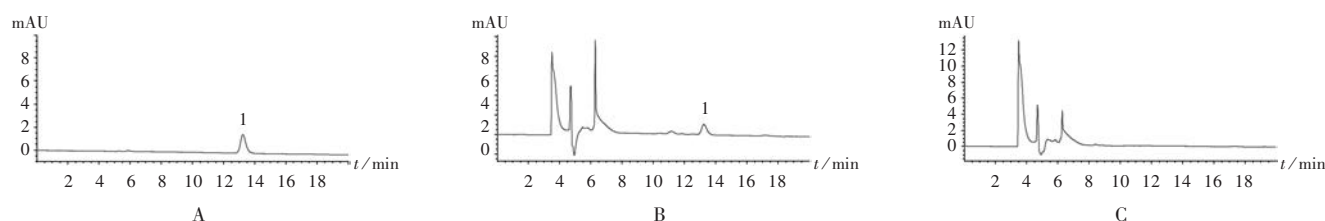
2.2 溶液制备

取维生素 B₁₂ 对照品 27.56 mg, 置 250 mL 容量瓶中, 加流动相溶解并定容, 摇匀, 即得对照品贮备液; 精密量取 1 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加流动相定容, 摇匀, 即得对照品溶液。取样品 5 袋, 研细, 精密称取适量(相当于维生素 B₁₂ 0.02 mg), 置 100 mL 容量瓶中, 加流动相溶解并定容, 摇匀, 即得供试品溶液。按庆大霉素普鲁卡因维 B₁₂ 颗粒处方和工艺, 制备缺维生素 B₁₂ 的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验: 精密吸取 2.2 项下 3 种溶液各适量, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。阴性对照品溶液色谱中, 在与维生素 B₁₂ 对照品溶液色谱相应保留时间处无干扰峰, 表明专属性好。详见图 1。

线性关系考察: 精密量取对照品溶液 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加流动相定容, 摇匀, 制成系列对照品溶液, 精密量取 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以维生素 B₁₂ 质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=231.887X-0.128$, $r=0.999\ 9$ ($n=5$)。结果表明, 维生素 B₁₂ 质量浓度在 0.01~0.30 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。



1. 维生素 B₁₂

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. Vitamin B₁₂

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

精密密度试验:精密量取 2.2 项下对照品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果维生素 B₁₂ 峰面积的 RSD 为 0.10% ($n=6$),表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:取 2.2 项下供试品溶液适量,分别于室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果维生素 B₁₂ 峰面积的 RSD 为 0.64% ($n=7$),表明供试品溶液在室温放置 12 h 内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为 20190649)适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果维生素 B₁₂ 平均含量为标示量的 99.7%, RSD 为 0.53% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号为 20190649)适量,精密称定,共 6 份,精密加入维生素 B₁₂ 对照品贮备液 0.1 mL,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表 1。

表 2 维生素 B₁₂ 含量均匀度计算结果 ($n=10$)

Tab. 2 Results of the content uniformity of vitamin B₁₂ ($n=10$)

批号	含量(%)										$\bar{X}$	$A+2.2S$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
20190649	99.61	99.83	101.20	102.31	98.22	96.97	100.31	98.55	102.43	98.71	99.81	4.12
20190823	97.83	96.11	100.72	99.54	99.81	97.51	98.04	100.92	96.59	100.22	98.73	5.08
20190838	103.90	98.39	99.28	102.61	97.29	99.83	95.49	100.41	103.71	97.51	99.84	6.41

3 讨论

3.1 检测波长选择

预试验中,取对照品溶液,200~400 nm 波长范围内扫描,结果维生素 B₁₂ 在 361 nm 和 278 nm 波长处均有最大吸收,考虑到检测灵敏度及制剂中其他组分的干扰,最终选择 361 nm 作检测波长。

3.2 流动相选择

预试验中比较了 0.5% 三乙胺溶液-乙腈、水(用 10% 稀磷酸调 pH 为 4.5)-乙腈、0.05 mol/L 磷酸二氢铵溶液(磷酸调 pH 至 3.0)-乙腈、0.02 mol/L 磷酸二氢钠-甲醇等多组流动相系统,结果以 0.02 mol/L 磷酸二氢钠-甲醇(80:20, V/V)为流动相时,维生素 B₁₂ 色谱峰对称性好,并与制剂中其他组分达到基线分离。

3.3 方法评价

2020 年版《中国药典(四部)》中规定,每 1 个单剂标示量小于 25 mg 的片剂、硬胶囊剂、颗粒剂或散剂等,均应检查含量均匀度,庆大霉素普鲁卡因维 B₁₂ 颗粒中维生素 B₁₂ 标示量为 0.02 mg,应建立该成分的含量均匀度检查项目。本研究结果显示,3 批制剂的含量均匀

表 1 维生素 B₁₂ 加样回收试验结果 ($n=6$)

Tab. 1 Results of the recovery test of vitamin B₁₂ ($n=6$)

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
2.5264	9.98	9.98	19.76	98.00	98.53	0.70
2.5142	9.93	9.98	19.81	99.00		
2.5139	9.93	9.98	19.78	98.70		
2.5216	9.96	9.98	19.75	98.10		
2.5273	9.98	9.98	19.92	99.60		
2.5221	9.96	9.98	19.72	97.80		

2.4 样品含量及含量均匀度测定

含量测定:取 3 批样品各适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果 3 批样品中维生素 B₁₂ 的含量分别为标示量的 99.82%, 98.93%, 100.22% ($n=3$)。

含量均匀度测定:取 3 批样品,每批 10 袋,分别置 100 mL 容量瓶中,加流动相溶解并定容,摇匀,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量,并计算 $A+2.2S$ 的值。结果见表 2。

度均符合要求。

所建立的方法简便、准确,专属性强,重复性好,可用于测定庆大霉素普鲁卡因维 B₁₂ 颗粒中维生素 B₁₂ 的含量及含量均匀度。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 国家药品监督管理局国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准(第六册)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:149-150.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:137-138.
- [3] 王璇,马鑫宇,李宛遥,等. 紫外分光光度法测定滴眼液中维生素 B₁₂[J]. 四川化工,2020,23(6):43-44.
- [4] 许倩倩,成雪,贾迪,等. pH 对高效液相色谱法测定保健食品中维生素 B₁₂ 含量结果的影响[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(23):8793-8797.
- [5] 陈沛. 高效液相色谱法测定维生素 B₁₂ 片的含量[J]. 海峡药学,2020,32(11):99-101.
- [6] 刘信奎,王萌萌,王超众,等. HPLC 法测定茶敏维滴眼液 3 种成分的含量[J]. 中国药品标准,2017,18(2):107-110.
- [7] 徐家根,刁岩忠. 改进 HPLC 法测定注射用多种维生素(12)中维生素 B₁₂ 的含量[J]. 中国药房,2016,27(36):5159-5161.