

中图分类号: R927.1; R977.2*2 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)15-0088-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.15.016



离子色谱法测定维生素 B₁ 片中亚硝酸盐含量*

何亚芬, 方文超[△], 郑露盼, 丁金有, 张继红, 朱洪彪

(江西省上饶市检验检测认证院, 江西 上饶 334000)

摘要:目的 建立测定维生素 B₁ 片中亚硝酸盐含量的离子色谱法。方法 色谱柱为 Metrosep A Supp 5-250/4.0 柱(250 mm×4.0 mm, 5 μm), 保护柱为 Metrosep A Supp 5-Guard/4.0 柱(5 mm×4.0 mm, 5 μm), 洗脱液为碳酸盐淋洗液(碳酸氢钠、碳酸钠质量浓度分别为 84, 339 mg/L), 流速为 0.7 mL/min, 进样量为 50 μL, 采用电导检测器, 抑制器电流为 79 mA。结果 亚硝酸盐对照品溶液的质量浓度在 11.88~475.20 μg/L 范围内与峰面积线性关系良好($R^2=0.9994$, $n=7$); 检测限为 2.3 μg/L, 定量限为 5.4 μg/L; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率为 90.28%, RSD 为 2.21% ($n=9$)。60 批样品中, 3 家制药企业的 10 批样品中检出亚硝酸根(NO_2^-), 含量为 6.9~15.9 mg/kg。结论 该方法操作简单、重复性好、结果准确, 可用于测定维生素 B₁ 片中亚硝酸盐的含量。

关键词: 离子色谱法; 维生素 B₁ 片; 亚硝酸盐; *N*-亚硝基二甲胺; 含量测定

Content Determination of Nitrite in Vitamin B₁ Tablets by Ion Chromatography

HE Yafen, FANG Wenchao, ZHENG Lupan, DING Jinyou, ZHANG Jihong, ZHU Hongbiao

(Shangrao Inspection Testing and Certification Institute, Shangrao, Jiangxi, China 334000)

Abstract: Objective To establish an ion chromatography method for the content determination of nitrite in Vitamin B₁ Tablets.

Methods The chromatographic column was Metrosep A Supp 5-250/4.0 column (250 mm×4.0 mm, 5 μm), the protective column was Metrosep A Supp 5-Guard/4.0 column (5.0 mm×4.0 mm, 5 μm), the eluent was carbonate eluent (the mass concentrations of sodium bicarbonate and sodium carbonate were 84 mg/L and 339 mg/L, respectively), the flow rate was 0.7 mL/min, and the injection volume was 50 μL. The conductivity detector was used with the suppressor current of 79 mA.

Results The linear range of nitrite reference solution was 11.88-475.20 μg/L ($R^2=0.9994$, $n=7$). The limit of detection was 2.3 μg/L, and the limit of quantification was 5.4 μg/L. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.0%. The average recovery rate of nitrite was 90.28%, with an RSD of 2.21% ($n=9$). Among the 60 batches of samples, nitrite (NO_2^-) was detected in 10 batches of samples from three pharmaceutical manufacturers, with a content of 6.9-15.9 mg/kg. **Conclusion** The method is simple with good repeatability, and accurate results, which can be used for the content determination of nitrite in Vitamin B₁ Tablets.

Key words: ion chromatography; Vitamin B₁ Tablets; nitrite; *N*-nitrosodimethylamine; content determination

维生素 B₁ 别名硫胺素, 是一种水溶性维生素, 在治疗脚气病、神经炎、消化不良等疾病方面发挥着关键作用^[1-3]。但维生素 B₁ 片的生产和储存过程中可能会产生基因毒性杂质, 这些杂质可能对人体健康构成潜在风险^[4-5]。基因毒性杂质或遗传毒性杂质可直接或间接损伤细胞 DNA, 诱发基因突变, 会导致癌症^[6]。在维生素 B₁ 片的生产过程中, 需特别关注亚硝胺类基因毒性杂质, 这类杂质的形成通常涉及胺类化合物和亚硝化试剂的反应。亚硝化试剂包括亚硝酸根(NO_2^-)及其衍生物, 这些物质在特定条件下能促使胺类化合物转化为具有潜在致癌风险的 *N*-亚硝胺类化合物^[7-8]。为确保维生素 B₁ 片的安全性和有效性, 人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)发布的 M7(R1)指南提出了对

DNA 反应性(致突变)杂质的评估和控制要求。根据该指南, *N*-亚硝基二甲胺(NDMA)和 *N*-亚硝基二乙胺(NDEA)等亚硝胺类杂质被归类为“关注队列”物质, 且被世界卫生组织(WHO)列为 2A 类致癌物质^[9]。故建立有效的检测方法来控制维生素 B₁ 片中的 NO_2^- 含量至关重要。通过监测和控制 NO_2^- 含量, 可有效减少 NDMA 等亚硝胺类杂质的生成, 从而降低维生素 B₁ 片的潜在致癌风险^[10-11]。可通过高效液相色谱(HPLC)法^[12]、气相色谱串联质谱(GC-MS/MS)法^[13]、离子色谱(IC)法^[14]等分析技术来测定维生素 B₁ 片中 NO_2^- 的含量。IC 法是一种高效、准确的分析技术, 适用于检测和定量分析样品中的无机离子和有机离子。故本研究中建立了测定维生素 B₁ 片中亚硝酸盐含量的 IC 法, 以确保药品的

*基金项目: 江西省药品监督管理局科研项目[2023JS22]。

第一作者: 何亚芬, 女, 硕士, 工程师, 研究方向为食品药品质量安全检测, (电子信箱)619635776@qq.com。

[△]通信作者: 方文超, 男, 硕士, 助理工程师, 研究方向为食品药品质量安全检测, (电子信箱)813821501@qq.com。

安全性和质量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

930IC 120型IC仪(瑞士Metrohm公司);BP211D型电子天平(德国Sartorius公司,精度为0.001 g)。

1.2 试剂

维生素B₁片(样品信息见表1);亚硝酸钠对照品(信阳市中检计量生物科技有限公司,含量为100%);水为屈臣氏蒸馏水。

表1 样品信息

Tab. 1 Sample information

序号	批号	生产企业	序号	批号	生产企业	序号	批号	生产企业
1	20200418	A	21	210606	B	41	210901	L
2	20210929	A	22	210501	C	42	211102	L
3	20210904	A	23	20210505	D	43	20191115	M
4	20210550	A	24	210802	E	44	20210304	M
5	20210547	A	25	210802	F	45	12103041	N
6	20201214	A	26	20210601	G	46	12103032	N
7	20201209	A	27	220101	H	47	210601	O
8	20210505	A	28	C2201032	I	48	210203	O
9	20210520	A	29	C2110271	I	49	211030/003	P
10	20210309	A	30	C2201271	I	50	211031	P
11	20210930	A	31	200601	J	51	210327/003	Q
12	20211112	A	32	200201	J	52	210926/008	Q
13	20210552	A	33	210202	J	53	210525/003	Q
14	20210552	A	34	210203	J	54	211202	R
15	20210303	A	35	210203	J	55	211203	R
16	20210303	A	36	211101	J	56	211006	R
17	20210303	A	37	211101	J	57	211014	R
18	20210551	A	38	210208	K	58	210912	R
19	20210551	A	39	210605	K	59	211001	R
20	20210551	A	40	210209	K	60	210607	R

2 方法与结果

2.1 色谱条件

检测器:电导检测器;检测方式:抑制电导检测;色谱柱:Metrosep A Supp 5-250/4.0柱(250 mm×4.0 mm, 5 μm);保护柱:Metrosep A Supp 5-Guard/4.0柱(5 mm×4.0 mm, 5 μm);洗脱液:碳酸盐淋洗液(碳酸氢钠、碳酸钠质量浓度分别为84,339 mg/L);流速:0.7 mL/min;进样量:50 μL;抑制器电流:79 mA。

2.2 溶液制备

取亚硝酸钠对照品11.88 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,即得质量浓度为118.8 μg/mL的对照品溶液。取样品0.5 g,精密称定,置250 mL容量瓶中,加水溶解并定容,再取适量溶液离心,精密吸取上清液5 mL,置25 mL容量瓶中,加水稀释并定容,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。取水作为空白溶剂。

2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2项下空白溶剂、对照品溶液、供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰出现,且溶剂不干扰NO₂⁻的含量测定,各色谱峰间无干扰,表明方法专属性良好。详见图1。

线性关系考察:精密量取2.2项下对照品溶液10 μL,置100 mL容量瓶中,10 μL置50 mL容量瓶中,10 μL置25 mL容量瓶中,20 μL置25 mL容量瓶中,50 μL置50 mL容量瓶中,50 μL置25 mL容量瓶中,100 μL置25 mL容量瓶中,用水制成相应质量浓度的系列标准溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以各组分峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X, μg/L)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 7.44107 \times 10^{-6}X$, $R^2 = 0.9994$ ($n = 7$)。结果表明,亚硝酸盐对照品溶液的质量浓度在11.88~475.20 μg/L(即NO₂⁻质量浓度为7.92~316.80 μg/L)

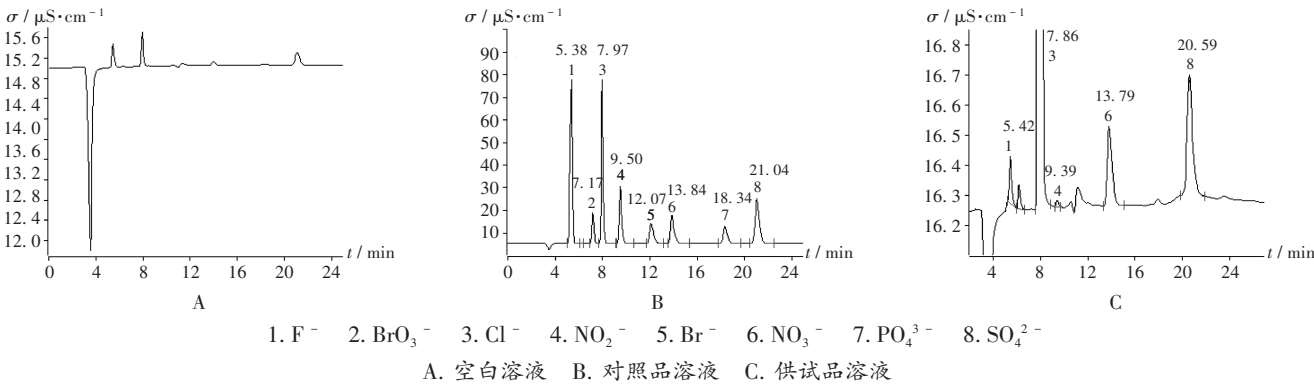


图1 离子色谱图

1. F⁻ 2. BrO₃⁻ 3. Cl⁻ 4. NO₂⁻ 5. Br⁻ 6. NO₃⁻ 7. PO₄³⁻ 8. SO₄²⁻
A. Blank solution B. Reference solution C. Test solution

Fig. 1 IC chromatograms

范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定:取2.2项下对照品溶液适量,采用逐步稀释法制成系列质量浓度的溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)为3时的质量浓度为检测限,以 S/N 为10时的质量浓度为定量限。结果检测限为 $2.3\text{ }\mu\text{g/L}$,定量限为 $5.4\text{ }\mu\text{g/L}$ 。

精密度试验:精密量取2.2项下对照品溶液(NO_2^- 质量浓度为 $79.2\text{ }\mu\text{g/L}$)适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果的 RSD 为 1.83% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为211014) 0.5 g ,精密称定,按2.2项下方法平行制备供试品溶液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 NO_2^- 的平均含量为 14.97 mg/kg , RSD 为 0.55% ,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品(批号为211014) 0.5 g ,精密称定,共9份,置 250 mL 容量瓶中,精密加入高、中、低浓度的对照品溶液各 1 mL ,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,并计算回收率。结果见表2。

表2 加样回收试验结果($n=9$)

Tab. 2 Results of the recovery test ($n=9$)

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.5023	6.0276	7.92	12.8689	86.38		
0.5009	6.0108	7.92	12.9967	88.21		
0.5014	6.0168	7.92	13.1632	90.23		
0.5031	6.0372	15.84	20.6034	91.96		
0.5022	6.0264	15.84	20.6409	92.26	90.28	2.21
0.5016	6.0192	15.84	20.5030	91.44		
0.5027	6.0324	31.68	35.0720	91.67		
0.5020	6.0240	31.68	34.9466	91.30		
0.5018	6.0216	31.68	34.2432	89.08		

稳定性试验:取样品(批号为211014) 0.5 g ,精密称定,平行制备加样回收试验项下中浓度对照品溶液6份,室温下放置0,2,4,6,12,24,32 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为 1.31% ($n=7$),表明供试品溶液室温放置32 h内稳定性良好。

2.4 样品含量测定

限度确定:根据《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》GB 2760—2024,亚硝酸盐在各类食品中允许的最大残留量为 70 mg/kg (以亚硝酸钠计)。参照ICH M7指导原则,则口服药物中亚硝酸盐的限度为 $70\times(1-23\div69)=47\text{ mg/kg}$ 。

样品含量测定结果:取60批样品,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,按外标法计算含量。结果3家生产企业的10批样品中检出 NO_2^- ,含量为 $6.9\sim15.9\text{ mg/kg}$ 。详见表3。

表3 样品含量测定结果(mg/kg)

Tab. 3 Results of the content determination of NO_2^- content in samples (mg/kg)

生产企业	批号	NO_2^- 含量	生产企业	批号	NO_2^- 含量
H	220101	15.9	R	211006	9.3
M	20191115	6.9	R	211014	14.9
M	20210304	8.7	R	210912	10.9
R	211202	8.7	R	211001	11.9
R	211203	10.1	R	210607	8.4

3 讨论

NO_2^- 作为一种常见污染物,可能会在药品生产过程中的多个环节引入,从而增加药品中亚硝胺类基因毒性杂质的风险。本研究结果显示,部分样品中的 NO_2^- 含量低于国家规定的限度,但仍需注意生产过程中可能引入 NO_2^- 的因素。如在同一生产线上生产不同品种的药品时,若清洁和消毒措施不到位,则可能会导致交叉污染;在药品生产过程中使用的纯化水若含 NO_2^- ,则可能会成为污染源;原料药工艺路线、原料药和辅料的选择也会导致 NO_2^- 的产生。本研究中的方法操作简便、重复性好、结果准确,可用于测定维生素 B_1 片中亚硝酸盐的含量,确保药品的安全性和质量。

参考文献

- [1] 王朋晖,钟树圣,苏荣彬.沙利度胺联合维生素 B_1 和维生素AD治疗复发性口腔溃疡的临床疗效及安全性[J].临床合理用药杂志,2022,15(30):152-154.
- [2] 耿战辉,邹挺,刘晋,等.三种促透剂对维生素 B_1 体外透皮吸收的影响[J].营养学报,2022,44(4):321-325.
- [3] 张修红,陈金雄,傅开龙,等.足三里及合谷穴位注射维生素 B_1 治疗功能性消化不良的临床观察[J].针刺研究,2021,46(12):1043-1047.
- [4] 张佳茹,王晗,陈玉双,等.维生素 B_1 有关物质检测方法的研究与应用[J].中国现代应用药学,2020,37(20):2487-2492.
- [5] 廉果,张洪,熊远果.维生素 B_1 缓释片的制备工艺研究[J].中国药师,2017,20(3):453-457.
- [6] 赵舒婧,瞿敏敏,王朝霞,等.药物基因毒性杂质及其检测方法研究现状[J].中国药理学与毒理学杂志,2023,37(3):229-240.
- [7] 吕光,林肖惠.药物中NDMA的健康危害及检测技术的研究进展[J].职业与健康,2021,37(12):1720-1723.
- [8] 孔璇.药物中 N -亚硝胺类基因毒性杂质检测方法的研究进展[J].天津药学,2022,34(1):62-67.
- [9] 曹梦茹,叶志伟,汪隽,等.药品中 N -亚硝胺类有害杂质[J].化学进展,2023,35(12):1881-1894.
- [10] 刘晶晶,梁智渊,梁爱仙,等.GC-MS/MS测定替米沙坦片中10种亚硝胺类基因毒性杂质[J].中国现代应用药学,2023,40(9):1224-1229.