

注射用水溶性维生素中生物素含量测定方法改进

杜碧莹, 刘丽芳

【摘要】目的 建立高效液相色谱法,改进注射用水溶性维生素中生物素的含量测定方法。**方法** 色谱柱为 COSMOSIL C₁₈ (250 × 4.6mm, 5μm), 以缓冲液(取 0.5g 高氯酸钠, 加入 1ml 磷酸, 用水稀释至 1 000ml)为流动相 A, 乙腈-甲醇(1:2)为流动相 B, 以流速 1.5ml/min 进行梯度洗脱; 柱温为 30℃; 检测波长为 200nm。**结果** 生物素在 1.5~4.5μg/mg 的浓度范围内呈线性关系, $r=0.9995$ ($n=5$)。平均回收率为 101.0%, RSD 为 0.6% ($n=9$)。**结论** 本方法简便、准确, 不受其他成分的干扰, 可用于测定注射用水溶性维生素中生物素的含量。

【关键词】 注射用水溶性维生素; 生物素; 含量测定

【中图分类号】 R 927.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3296(2010)02-0011-03

Improve content determination method of biotin in water-soluble vitamins for injection DU Bi-ying, LIU Li-fang.
Guangzhou Institute of Drug Control, Guangzhou 510160, China

【Abstract】 Objective To establish a HPLC method, to improve the content determination of biotin in water-soluble vitamins for injection. **Methods** COSMOSIL C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5μm) was used as the column. Mobile phase A: buffer solution, Mobile phase B: acetonitrile-methanol (1:2). The flow rate was 1.5ml/min, following the gradient elution. The column temperature was 30℃ and the detection wavelength was 200nm. **Results** Biotin presented a good linear in the range of 1.5~4.5μg/mg, $r=0.9995$ ($n=5$). The average recovery was 101.0%, RSD = 0.6% ($n=9$). **Conclusion** The present method is simple and accurate for content determination of biotin in water-soluble vitamins for injection, and it also has the advantage of preventing the interference from other compounds.

【Key words】 Water-soluble vitamins for injection; Biotin; Content determination

13 种复合维生素注射液(商品名:极坦新)是由注射用 9 种水溶性维生素(瓶 I)和脂溶性维生素注射液(瓶 II)2 部分组成,用于补充机体对维生素的需求,防治维生素缺乏引起的疾病^[1,2]。对瓶 I 中生物素的含量进行测定时,按企业标准的色谱条件,流动相用缓冲液(取 0.5g 高氯酸钠,加入 1ml 磷酸,用水稀释至 1 000ml) - 乙腈(84:16)洗脱,检测波长为 210nm。经二极管阵列检测器检测表明供试品溶液中核黄素磷酸钠干扰生物素的测定,而且调整流动相的比例也难以排除干扰。本文建立的方法简便、准确,用缓冲液为流动相 A,乙腈-甲醇(1:2)为流动相 B,通过梯度洗脱成功分离生物素与其他维生素组分,有效控制产品质量。

1 仪器与试剂

日本 Shimadzu 高效液相色谱仪 LC-10Atvp(二极管阵列检测器)生物素工作对照品(台湾中国化学制药有限公司提供, No.037K13371, 含量:100.1%)与核黄素磷酸钠对照品(台湾中国化学制药有限公司提供, No.034K1223, 含量:69.2%), 样品为台湾中国化学制药有限公司生产(批号为: R35A04、R35A05、R35A06), 乙腈为色谱纯,其余均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: COSMOSIL C₁₈ (250 × 4.6mm, 5μm)。以缓冲液(取 0.5g 高氯酸钠, 加入 1ml 磷酸, 用水稀释至 1 000ml)为流动相 A, 乙腈-甲醇(12)为流动相 B, 以流速 1.5ml/mg 进行梯度洗脱, 洗脱条件为 0~16min, B 为 17%; 16~17min, B 从 17% → 40%; 17~21min, B 为 40%; 21~

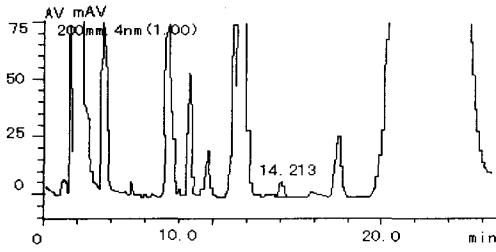
22min, B 从 40% → 17%; 22~27min, B 为 17%。柱温为 30℃, 检测波长为 200nm。理论板数按生物素峰计算 ≥ 5 000。

2.2 测定法 取本品 5 瓶(每瓶含生物素 0.06mg), 用磷酸盐缓冲液(称取磷酸二氢钾 0.272g, 用水溶解并稀释至 1 000ml, 用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.9)溶解, 并定量转移至 100ml 量瓶中, 加上上述磷酸盐缓冲液稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 50μl 注入液相色谱仪, 记录色谱图。见图 1。另取生物素对照品适量, 精密称定, 用磷酸盐缓冲液溶解并定量稀释制成 3μg/ml 的溶液, 摇匀, 同法测定。按外标法以峰面积计算生物素的含量。

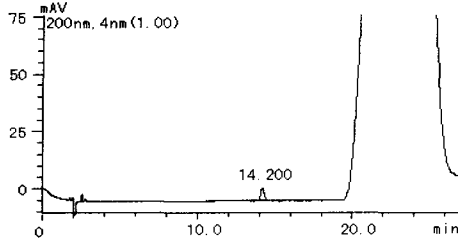
2.3 检测波长的选择 参照 USP(30 版)^[3] 附录水溶性维生素片中生物素含量测定方法的检测波长, 修订为 200nm。

2.4 拟定标准与企业标准的比对 原企业标准以缓冲液(取 0.5g 高氯酸钠, 加入 1ml 磷酸, 用水稀释至 1 000ml)为流动相 A, 乙腈为流动相 B 进行梯度洗脱, B 相初始比例为 16%。经用二极管阵列检测器检测, 按原企业标准方法测得的供试品溶液与生物素对照液的 UV 图不完全一致(见图 4A 与图 2A)。生物素对照液(图 2B)中生物素 t_R 为 7.244min, 核黄素磷酸钠对照液(图 3B)在不同的保留时间均出现色谱峰, 其中在 7.211min 也出峰, 同时检测到供试液(图 4B)在 t_R 7.217 处色谱峰不纯, 3 批样品液中测得生物素的含量分别为 122.3%, 121.5% 与 120.4%, 均 > 120.0%。供试品中核黄素磷酸钠干扰生物素的测定, 实验中曾尝试调整流动相的比例, 但核黄素磷酸钠对生物素准确测定的干扰因素仍然存在。

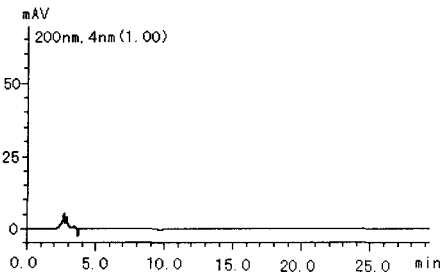
拟定标准修改了流动相, 改为用缓冲液-乙腈-甲醇的流动相进行梯度洗脱, 检测波长参照 USP(30 版)附录水溶性维



A

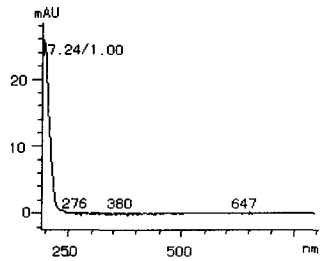


B

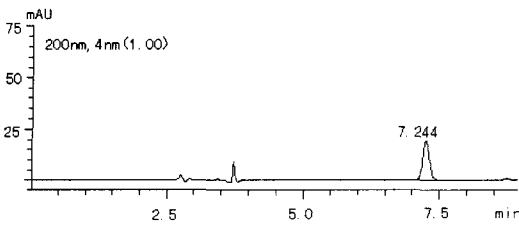


C

图 1 供试品溶液(A)、对照品溶液(B)和空白溶液(C)的 HPLC 图



A

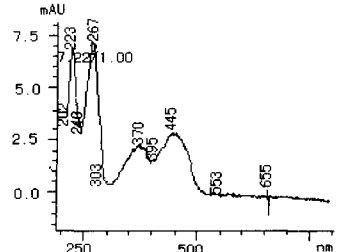


B

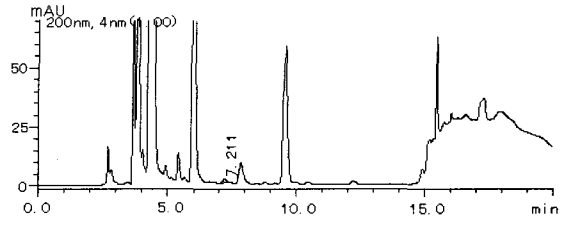
图 2 生物素对照品溶液 UV 图(A)和 HPLC 图(B)

生素含量测定方法的检测波长,修订为 200nm。对拟定标准作了方法学验证,结果表明拟定标准能准确测定生物素的含量。

2.5 线性实验 精密称取生物素对照品 1.2mg,置 200ml 量瓶中,用磷酸盐缓冲液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为储备液。再精密量取储备液 5.0、10.0、5.0、15.0、15.0ml,分别置 20、25、10、25、20ml 量瓶中,用磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀。

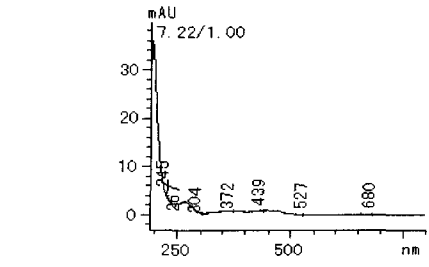


A

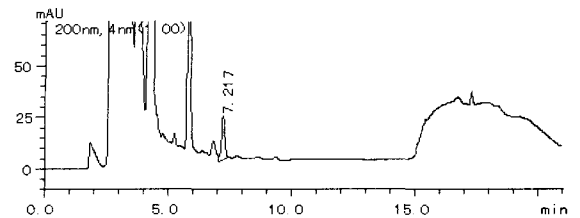


B

图 3 核黄素磷酸钠对照品溶液 UV 图(A)和 HPLC 图(B)



A



B

图 4 供试品溶液 UV 图(A)和 HPLC 图(B)

进样测定,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程为: $Y = 33\ 397.2X - 817.5$, $r = 0.9995$ ($n = 5$)。

2.6 进样的精密性实验 取对照品溶液连续进样 6 次,生物素峰面积变化的 RSD 为 1.3%。

2.7 供试品溶液的稳定性实验 在供试品溶液制备第 0、4、10 小时取样测定,结果测得生物素含量变化的相对标准差(RSD)为 0.9%。

2.8 重复性实验 取同一批样品(R35A05),平行制备 6 份供试液,生物素含量测定结果分别为 115.7%、115.0%、114.3%、116.0%、114.1%、116.1%,RSD 为 0.8%。

2.9 回收实验 取已测定含量的供试品溶液(批号 R35A05,浓度为 $3\ \mu\text{g}/\text{ml}$),置 20ml 量瓶中,加入生物素对照品储备液(浓度为 $5.885\ \mu\text{g}/\text{ml}$)进行加样回收实验,照标准的方法制备回收实验溶液(相当标示浓度的 80%、100% 和 120%)进行测定,平均回收率为 101.0%;RSD 为 0.6% ($n = 9$)。见表 1。

2.10 样品含量测定 按 2.2 项下的测定法,拟定标准与企业标准测得 3 批样品的含量结果见表 2,拟定标准能准确测定生物素的含量。见表 2。

表 1 回收率实验测定结果

取样量 (ml)	样品含量 (μg)	生物素对照品加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	平均 (%)	RSD (%)
10	34.516	17.6576	52.667	100.946		
10	34.516	17.6576	52.957	101.502		
10	34.516	17.6576	53.018	101.618		
10	34.516	29.4294	64.253	100.481	101.0	0.6
10	34.516	29.4294	64.917	101.519		
10	34.516	29.4294	64.217	100.425		
10	34.516	41.2012	76.648	101.229		
10	34.516	41.2012	76.521	101.062		
10	34.516	41.2012	75.682	99.954		

表 2 含量测定结果 (%)

批号	生物素标示量	企业标准	拟定标准
R35A04		122.3	116.5
R35A05	90.0 ~ 120.0	121.5	115.1
R35A06		120.4	115.7

3 讨论

维生素类多数不稳定,含量很少,对色谱柱等色谱条件的

要求非常高。本品瓶 I 中含维生素 B₆、生物素、维生素 B₁₂ 和核黄素磷酸钠等 9 种水溶性维生素,其中核黄素磷酸钠容易分解,取企业提供的核黄素磷酸钠对照品溶液进行实验,也发现在不同的保留时间均出现核黄素磷酸钠色谱峰(见 2.4)。供试液中核黄素磷酸钠干扰生物素的测定,而且调整流动相的比例也难以排除干扰。本文建立的方法是通过反复筛选,成功分离生物素与其他维生素组分,各峰分离效果及峰纯度较理想。

本实验通过加入甲醇,改善了乙腈的洗脱能力,优化了原企业标准。

参考文献

- 1 曾俊芬,宋金春,陆讯. 复合维生素注射液中 6 种维生素的含量测定[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(11):1505-1507.
- 2 曹玮,刘梅妍,冉俐. HPLC 法测定注射用水溶性维生素中维生素 B₁₂ 和生物素的含量[J]. 中国药房,2007,18(7):543-545.
- 3 美国药典委员会. 美国药典(USP)[S]. 30 版. 2007:1011.

(收稿日期:2009-08-05)

· 经验交流 ·

抗病能力低下与肺脾肾三脏的关系

国亚丽

【关键词】 抗病能力;脏器;中医

【中图分类号】 R 223.1 【文献标识码】 B 【文章编号】 1674-3296(2010)02-0013-01

抗病能力低下,中医为正气不足。正气是对邪气而言,其含义有二,一指人体对疾病防御、抵抗和自然再生能力,以及机体对内外环境的适应能力;二指脏腑、组织、功能活动。与正气相对的为邪气,邪气即致病因素的总称,正和邪是对立的一对矛盾,正气经过斗争,其结局决定了疾病的发生、发展和转归。起主导作用的是正气,正如《内经·上古天真论篇》中写道:“真气从之,精神内守,病安从来”只要体内正气旺盛,纵有许多致病因素邪气,正气也能抵御祛除,机体就能免预生病,所以《内经》中指出:“正气存内,邪不可干”。如果机体正气虚衰,邪气便可乘虚而入引起疾病,即所谓“邪气所凑,其气必虚”。

《灵枢·刺节真邪篇》指出,正气又称真气,真气者所以受于天,与谷气并而充身也,说明真气包括先天之气和后天气精微之气,先天之气即元气藏于肾,禀受于父母,赖水谷精微之气不断的充养;水谷之气则指营卫之气而言,其滋生于脾胃由肺气的宣发而输布于周身。由些可知正气的强盛与否与肺、脾、肾三脏关系非常密切。三脏之中又以肾为根本,因为肾所藏之元气,能激发和推动全身各脏腑组织器官的功能活动,维持人体的生长发育。五脏六腑之气的产生也须元气资助,故称元气为人体生命功能原动力。元气包括元阴、元阳,即肾阴肾、阳,为一身阴阳之根本,正如《景岳全书》所言,“五脏之阴非此不能滋”,“五脏之阳非此不能发,元气充沛,五脏六腑功能就正常,机体抗病能力强,身体健康少病,正气虚弱,抗病能力低下,就会发生各种疾病,所以肾中的元气虚损,必然导致整个机体的正气衰减,而抗病能力下降。

1 与脾的关系

脾统血,《灵枢·营卫生会篇》指出“卫出于下焦,人受气于谷,谷入于胃,以传于肺,五脏六腑皆以受气,其清者为营,浊者为卫,营在脉中,卫在脉外”,说明了对机体起温煦作用和防御功能的卫气根源于肾,生化于脾,由肺宣发输布,营卫之气密切合作,对机体荣养温煦和防御的作用。正如《素问·生气通天论》所言:“阴者藏精而起亟也,阳者卫外而故也”。

2 与肺的关系

肺主气,肺主一气之气,外合皮毛,皮毛是人体的屏障,具有防御外邪入侵的作用,防御功能的强弱在一定程度上取决于肺输布卫气的功能,肺气宣发输布正常,卫气才能发挥其“温分肉,肥腠理,司开合”的功能,如肺气虚,宣发卫气失职,防御功能低下,外邪乘虚而入,即所谓“正气存内,邪不可干,邪气所凑,其气必虚”。如肺虚较甚,影响于脾,出现子病及母之症,治疗应以“培土生金”之法。

3 与肾的关系

肾为先天之本,内藏元阴元阳,为水火之脏肾主藏精,为人体生长发育生殖之源,为生命活动之根,肾中元气,又须赖水谷精卫微之气不断地滋养和填充,才能发挥其激发和推动作用,脾阳又须肾阳的温煦,才能发挥其正常的运化和生化气血的功能,两者相互滋生,相互促进,在病变过程中又互相影响,特别是在正气虚衰的疾病中表现的更为突出。脾气的损伤直接影响营卫之气的生成,元气的虚衰,正气的强弱。所以脾、肾两脏功能正常与否直接关系到正气的强弱。临床上所见一些抗病能力低下的患者都不同程度的存在着脾肾功能不足之症,所以对一些慢性虚弱性疾病,中医特别注重“补脾肾以故其本”。

(收稿日期:2009-12-20)

作者单位: 024005 内蒙古自治区赤峰市松山医院