中图分类号：R917；R927　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)06－0074－04
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.06.016

高效液相色谱法同时测定口服五维赖氨酸葡萄糖中6种成分含量*

谭菊英，刘庄蔚，何　虹，蒋　洁，杨欣智，吴明珍，朱健萍，邓　鸣△

（广西壮族自治区食品药品检验所，广西 南宁　530021）

摘要：目的　建立同时测定口服五维赖氨酸葡萄糖中6种成分含量的高效液相色谱法。**方法**　色谱柱为Alltima C_{18}柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为5 mmol/L庚烷磺酸钠溶液（用20%磷酸水溶液调pH至2.5）－乙腈（梯度洗脱），流速为1.0 mL/min，检测波长为200 nm（泛酸钙、盐酸赖氨酸），261 nm（烟酰胺、维生素B_2、维生素B_1），290 nm（维生素B_6），柱温为40 ℃，进样量为20 μL。**结果**　泛酸钙、烟酰胺、维生素B_6、盐酸赖氨酸、维生素B_2、维生素B_1质量浓度分别在1.174～23.49 μg/mL、4.220～84.40 μg/mL、0.520 7～10.41 μg/mL、20.88～417.7 μg/mL、0.427 8～8.555 μg/mL、1.676～33.52 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好（r=0.999 9）；精密度、稳定性、重复性试验结果的*RSD*均小于2.0%；平均加样回收率分别为101.02%，99.78%，100.30%，100.32%，95.61%，99.26%，*RSD*分别为0.99%，0.60%，0.57%，1.85%，1.69%，0.71%（n=6）。**结论**　该方法简便，结果准确可靠，可用于同时测定口服五维赖氨酸葡萄糖中6种成分的含量。

关键词：高效液相色谱法；口服五维赖氨酸葡萄糖；泛酸钙；烟酰胺；维生素B_6；盐酸赖氨酸；维生素B_2；维生素B_1；含量测定

Simultaneous Determination of Six Components in Oral Five Vitamins, Lysine and Glucose by HPLC

TAN Juying, LIU Zhuangwei, HE Hong, JIANG Jie, YANG Xinzhi, WU Mingzhen, ZHU Jianping, DENG Ming

(Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning, Guangxi, China　530021)

Abstract: Objective　To establish a high－performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of six components in Oral Five Vitamins, Lysine and Glucose. **Methods**　The chromatographic column was Alltima C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 5 mmol/L sodium 1－heptanesulfonate solution (adjusted to pH 2.5 with 20% phosphoric acid aqueous solution)－acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelengths were 200 nm (calcium pantothenate, lysine hydrochloride), 261 nm (niacinamide, vitamin B_2, vitamin B_1) and 290 nm (vitamin B_6), the column temperature was 40 ℃, and the injection volume was 20 μL. **Results**　The linear ranges of calcium pantothenate, niacinamide, vitamin B_6, lysine hydrochloride, vitamin B_2 and vitamin B_1 were 1.174－23.49 μg/mL, 4.220－84.40 μg/mL, 0.520 7－10.41 μg/mL, 20.88－417.7 μg/mL, 0.427 8－8.555 μg/mL, 1.676－33.52 μg/mL (r=0.999 9) respectively. The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rates of the above six components were 101.02%, 99.78%, 100.30%, 100.32%, 95.61%, 99.26%, with the *RSD*s of 0.99%, 0.60%, 0.57%, 1.85%, 1.69%, 0.71% (n=6) respectively. **Conclusion**　This method is simple, accurate and reliable, which can be used to simultaneously determine the contents of six components in Oral Five Vitamins, Lysine and Glucose.

Key words: HPLC; Oral Five Vitamins, Lysine and Glucose; calcium pantothenate; niacinamide; vitamin B_6; lysine hydrochloride; vitamin B_2; vitamin B_1; content determination

口服五维赖氨酸葡萄糖收载于《化学药品地方标准上升国家标准》第五册[1]，主要成分有葡萄糖、盐酸赖氨酸、维生素B_1、维生素B_2、维生素B_6、烟酰胺、泛酸钙。该品适用于贫血、肝炎等慢性病所致营养不良，葡萄糖补充热量、治疗低血糖症，盐酸赖氨酸维持肌体氮平衡，促进蛋白质的合成和代谢，促进人体生长发育及智力发育，维生素B_1维持心血管系统、神经系统及消化系统的正常功能，维生素B_2维持红细胞完整性，维生素B_6促进蛋白质代谢[1]。此外，泛酸钙参与碳水化合物等的代谢[2－3]，烟酰胺与蛋白质的代谢及儿童智力发育关系密切，并可维持皮肤和消化器官的正常功能[4]。现行质量标准仅测定了方中葡萄糖的含量。为此，本研究中参考文献[5－13]，建立了同时测定制剂中6种成分含量的高效液相色谱（HPLC）法，为其质量控制提供参考。现报道如下。

1　仪器与试药

1.1　仪器

LC－20AT型HPLC仪，包括二极管阵列检测器、四元泵等（日本Shimadzu公司）；XS205型电子分析天平

*基金项目：广西壮族自治区药品监督管理局药品安全科研项目[桂药监科自〔2022〕037号]。

第一作者：谭菊英，女，硕士，副主任药师，研究方向为药品检验及质量评价，（电子信箱）595075307@qq.com。

△通信作者：邓鸣，女，硕士，副主任药师，研究方向为药品检验及质量评价，（电子信箱）dengming106@sohu.com。

（瑞士 Mettler Toledo 公司，精度为 0.01 mg）；9983 型超声仪（宁波海曙科生超声设备有限公司）。

1.2 试药

5 批口服五维赖氨酸葡萄糖样品及混合空白辅料（葡萄糖、蔗糖、蜂乳的混合物）均源于某企业；泛酸钙对照品（批号为 100369 - 201905，按 $C_{17}H_{20}N_4O_6$ 计含量为 96.8%），烟酰胺对照品（批号为 100115 - 202005，按 $C_6H_6N_2O$ 计含量为 99.9%），维生素 B_6 对照品（批号为 100116 - 201906，按 $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$ 计含量为 99.9%），盐酸赖氨酸对照品（批号为 140673 - 202010，按 $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$ 计含量为 99.9%），维生素 B_2 对照品（批号为 100369 - 201905，按 $C_{17}H_{20}N_4O_6$ 计含量为 98.2%），维生素 B_1 对照品（批号为 100390 - 201806，按 $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ 计含量为 97.9%），均购自中国食品药品检定研究院；乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Alltima C_{18} 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：5 mmol / L 庚烷磺酸钠溶液（用 20% 磷酸水溶液调 pH 至 2.5，A）- 乙腈（B），梯度洗脱（0 ~ 45 min 时 95%A → 77%A，45 ~ 57 min 时 77%A，57 ~ 58 min 时 77%A → 95%A，58 ~ 65 min 时 95%A）；流速：1.0 mL / min；检测波长：200 nm（泛酸钙、盐酸赖氨酸），261 nm（烟酰胺、维生素 B_2、维生素 B_1），290 nm（维生素 B_6）；柱温：40 ℃；进样量：20 μL。

2.2 溶液制备

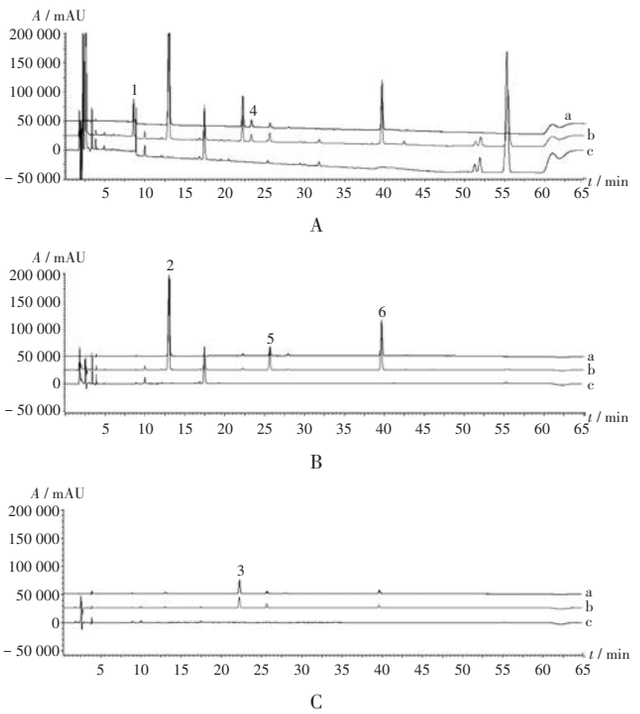
混合对照品溶液：取各对照品适量，以 0.1% 磷酸水溶液溶解，制成泛酸钙、烟酰胺、维生素 B_6、盐酸赖氨酸、维生素 B_2、维生素 B_1 质量浓度分别为 58.72，210.99，26.03，1 044.00，21.39，83.80 μg / mL 的混合对照品贮备液。精密量取 2 mL，置 10 mL 容量瓶中，用 0.1% 磷酸水溶液定容，摇匀，即得。

供试品溶液：取 10 包样品内容物，混匀，研细，取约 2 g，精密称定，置 10 mL 容量瓶中，加入 0.1% 磷酸水溶液 6 mL，超声（功率 250 W，频率 45 kHz）振摇使溶解，放冷至室温，用 0.1% 磷酸水溶液定容，摇匀，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

辅料溶液：取混合空白辅料适量，按供试品溶液制备方法制备，即得。

2.3 方法学考察

专属性试验：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。结果辅料溶液色谱图中，在与混合对照品溶液色谱图相同保留时间处无干扰峰，表明专属性良好。详见图 1。



1. 泛酸钙　2. 烟酰胺　3. 维生素 B_6　4. 盐酸赖氨酸　5. 维生素 B_2　6. 维生素 B_1

a. 混合对照品溶液　b. 供试品溶液　c. 辅料溶液

A. 200 nm　B. 261 nm　C. 290 nm

图 1 高效液相色谱图

1. Calcium pantothenate　2. Niacinamide　3. Vitamin B_6　4. Lysine hydrochloride　5. Vitamin B_2　6. Vitamin B_1

a. Mixed reference solution　b. Test solution　c. Adjuvant solution

A. 200 nm　B. 261 nm　C. 290 nm

Fig. 1 HPLC chromatograms

线性关系考察：分别精密量取 2.2 项下混合对照品贮备液 0.2，0.5，0.7，1.0，1.6，2.0，3.0，4.0 mL，置 10 mL 容量瓶中，加 0.1% 磷酸水溶液定容，摇匀，制成系列混合对照品溶液，各精密量取 20 μL，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以待测成分质量浓度（X，μg / mL）为横坐标、峰面积（Y）为纵坐标进行线性回归。结果见表 1。

精密度试验：取 2.2 项下混合对照品溶液适量，按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录峰面积。结果泛酸钙、烟酰胺、维生素 B_6、盐酸赖氨酸、维生素 B_2、

表 1 线性关系考察结果（$n = 8$）

Tab. 1 Results of the linear relation test（$n = 8$）

待测成分	回归方程	r	线性范围（μg / mL）
泛酸钙	$Y_1 = 23\,568.2X_1 - 353.3$	0.999 9	1.174 ~ 23.49
烟酰胺	$Y_2 = 43\,435.8X_2 + 2,169.6$	0.999 9	4.220 ~ 84.40
维生素 B_6	$Y_3 = 49\,098.6X_3 - 300.4$	0.999 9	0.520 7 ~ 10.41
盐酸赖氨酸	$Y_4 = 695.4X_4 - 155.0$	0.999 9	20.88 ~ 417.7
维生素 B_2	$Y_5 = 82\,538.2X_5 - 640.1$	0.999 9	0.427 8 ~ 8.555
维生素 B_1	$Y_6 = 41\,695.3X_6 - 470.2$	0.999 9	1.676 ~ 33.52

维生素B_1峰面积的*RSD*分别为0.13%，0.05%，0.11%，0.30%，0.08%，0.06%（$n=6$），表明仪器精密度良好。

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0，4，8，12，18，24 h时按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果泛酸钙、烟酰胺、维生素B_6、盐酸赖氨酸、维生素B_2、维生素B_1峰面积的*RSD*分别为0.16%，0.10%，0.58%，1.00%，0.19%，0.23%（$n=6$），表明供试品溶液室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验：取样品内容物适量，精密称定，各6份，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，并计算含量。结果泛酸钙、烟酰胺、维生素B_6、盐酸赖氨酸、维生素B_2、维生素B_1含量的*RSD*分别为1.10%，0.41%，0.57%，1.77%，0.24%，0.70%（$n=6$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：取已知含量的样品适量，共6份，分别加入一定质量浓度的待测对照品溶液，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2。

2.4 样品含量测定

取5批样品各适量，分别按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，平行测定3次，记录峰面积，并计算样品含量。结果见表3。

3 讨论

制剂中6种待测成分均为水溶性，且部分极性较大，在色谱柱中保留较弱，故参考文献[6]以庚烷磺酸钠作为离子对试剂，增强了各物质的保留。预试验中比较了2，5，10 mmol/L庚烷磺酸钠的分离效果，结果5 mmol/L时的保留时间适中；比较了流动相pH为7.2，4.2，3.1，2.5的分离效果，发现pH为7.2时，各待测成分色谱峰为帆状，泛酸钙色谱峰保留时间仅2.8 min；在pH由4.2调至3.1，再调至2.5的过程中，各峰对称性变好，泛酸钙保留时间延长，维生素B_6和维生素B_2出峰顺序发生变化（pH为4.2，2.5时维生素B_6在前，pH为3.1时维生素B_2在前），当pH为2.5时，各峰峰形及分离度均最优，可见pH为2.5时各待测成分以单一成分存在[12]。

经二极管阵列检测器采集混合对照品溶液色谱图后，提取待测成分的紫外图谱，结果盐酸赖氨酸、泛酸钙无最大吸收（仅为末端吸收），烟酰胺、维生素B_6、维生素B_2、维生素B_1的最大吸收波长分别为261，290，267，246 nm；维生素B_1、维生素B_2在261 nm波长处的响应值均约为最大吸收波长处响应值的95%。由于各成分的浓度及响应相差较大，选择多波长检测以快速简捷地同时测定6种成分含量。

本品除盐酸赖氨酸外的其他5种成分含量均在处

表2 加样回收试验结果（$n=6$）

Tab. 2 Results of the recovery test ($n=6$)

待测成分	取样量（g）	样品含量（mg）	加入量（mg）	测得量（mg）	回收率（%）	$\bar{X}$（%）	*RSD*（%）
泛酸钙	0.960 9	0.053 91	0.058 72	0.113 9	102.21	101.02	0.99
	1.000 1	0.056 11	0.058 72	0.114 6	99.56		
	0.994 1	0.055 77	0.058 72	0.114 7	100.29		
	0.993 6	0.055 74	0.058 72	0.115 1	101.06		
	0.942 6	0.052 88	0.058 72	0.112 8	101.98		
	1.005 7	0.056 42	0.058 72	0.115 7	101.00		
烟酰胺	0.960 9	0.185 8	0.211 0	0.397 5	100.33	99.78	0.60
	1.000 1	0.193 4	0.211 0	0.402 6	99.15		
	0.994 1	0.192 3	0.211 0	0.401 9	99.34		
	0.993 6	0.192 2	0.211 0	0.402 6	99.71		
	0.942 6	0.182 3	0.211 0	0.394 8	100.71		
	1.005 7	0.194 5	0.211 0	0.404 3	99.43		
维生素B_6	0.960 9	0.018 1	0.026 03	0.044 13	100.07	100.30	0.57
	1.000 1	0.018 8	0.026 03	0.044 79	99.77		
	0.994 1	0.018 7	0.026 03	0.044 68	99.77		
	0.993 6	0.018 7	0.026 03	0.044 84	100.42		
	0.942 6	0.017 7	0.026 03	0.044 10	101.27		
	1.005 7	0.018 9	0.026 03	0.045 09	100.50		
盐酸赖氨酸	0.960 9	0.771 6	1.044	1.846 5	102.97	100.32	1.85
	1.000 1	0.803 1	1.044	1.870 7	102.30		
	0.994 1	0.798 3	1.044	1.835 0	99.33		
	0.993 6	0.797 9	1.044	1.833 6	99.23		
	0.942 6	0.756 9	1.044	1.798 3	99.71		
	1.005 7	0.807 6	1.044	1.834 1	98.37		
维生素B_2	0.960 9	0.017 33	0.021 39	0.037 92	96.26	95.61	1.69
	1.000 1	0.018 04	0.021 39	0.038 48	95.56		
	0.994 1	0.017 93	0.021 39	0.038 84	97.71		
	0.993 6	0.017 92	0.021 39	0.037 90	93.41		
	0.942 6	0.017 00	0.021 39	0.037 14	94.11		
	1.005 7	0.018 14	0.021 39	0.038 81	96.63		
维生素B_1	0.960 9	0.074 34	0.083 80	0.157 2	98.83	99.26	0.71
	1.000 1	0.077 37	0.083 80	0.159 8	98.38		
	0.994 1	0.076 90	0.083 80	0.160 1	99.25		
	0.993 6	0.076 86	0.083 80	0.160 5	99.76		
	0.942 6	0.072 92	0.083 80	0.157 0	100.35		
	1.005 7	0.077 80	0.083 80	0.160 8	99.01		

表3 样品含量测定结果（%，$n=3$）

Tab. 3 Results of the content determination of six components in samples (%, $n=3$)

序号	泛酸钙	烟酰胺	维生素B_6	盐酸赖氨酸	维生素B_2	维生素B_1
1	93.49	96.68	94.12	80.34	90.16	96.72
2	98.02	96.07	101.02	83.38	96.09	97.95
3	98.84	95.63	96.22	79.59	102.52	96.85
4	98.08	96.37	95.58	78.44	101.67	96.06
5	96.94	95.46	96.21	80.73	98.07	95.08