doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.09.020

高效液相色谱 - 质谱法同时测定复合维生素 B 片中 5 种成分含量

李 姮,李 玲,吴 琦,陈乃江

(江苏省连云港市食品药品检验检测中心,江苏 连云港 222006)

摘要:目的 建立同时测定复合维生素 B 片中维生素 B_1、维生素 B_2、维生素 B_6、烟酰胺和泛酸钙含量的高效液相色谱 - 质谱法。**方法** 色谱柱为 Phenomenex Gemini C_{18} 柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈 - 0.1% 甲酸溶液(50∶50,*V* / *V*),流速为 0.6 mL / min;电喷雾离子源,正离子模式,锥孔电压为 15 V,毛细管电压为 0.8 kV,单离子记录(SIR)模式下扫描,维生素 B_1、维生素 B_2、维生素 B_6、烟酰胺和泛酸钙的质荷比(*m* / *z*)分别为 265,377,170,123,220。**结果** 维生素 B_1、维生素 B_2、维生素 B_6、烟酰胺和泛酸钙的质量浓度分别在 0.140 2 ~ 20.940 0 μg / mL(*r* = 0.999 8,*n* = 8),0.050 1 ~ 29.900 0 μg / mL(*r* = 0.999 9,*n* = 10),0.007 4 ~ 1.098 0 μg / mL(*r* = 0.999 4,*n* = 8),0.066 0 ~ 9.850 0 μg / mL(*r* = 0.999 4,*n* = 7),0.035 0 ~ 20.920 0 μg / mL(*r* = 0.999 6,*n* = 10)范围内与峰面积线性关系良好;精密度、稳定性、重复性试验的 *RSD* 均小于 4.0%(*n* = 6);平均加样回收率分别为 105.34%,103.35%,103.56%,92.62%,96.49%,*RSD* 分别为 3.36%,2.88%,2.55%,2.47%,1.80%(*n* = 6)。**结论** 该方法操作简便、结果准确,可用于同时测定复合维生素 B 片中 5 种成分的含量。

关键词:复合维生素 B 片;高效液相色谱 - 质谱法;维生素 B_1;维生素 B_2;维生素 B_6;烟酰胺;泛酸钙;含量测定

中图分类号:R927.2;R977.2$^+$2 **文献标志码:A** **文章编号:1006 - 4931(2022)09 - 0087 - 04**

Simultaneous Determination of Five Components in Compound Vitamin B Tablets by HPLC - MS

LI Heng, LI Ling, WU Qi, CHEN Naijiang

(Lianyungang Institute for Food and Drug Control, Lianyungang, Jiangsu, China 222006)

Abstract: Objective To establish a high - performance liquid chromatography - mass spectrometry (HPLC - MS) method for the simultaneous determination of vitamin B_1, vitamin B_2, vitamin B_6, nicotinamide and calcium pantothenate in Compound Vitamin B Tablets. **Methods** The chromatographic column was Phenomenex Gemini C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.1% formic acid solution (50 ∶ 50, *V* / *V*), the flow rate was 0.6 mL / min. The ionization method was adopted with electrospray ion source and positive ion mode, the cone voltage was 15 V, the capillary voltage was 0.8 kV, scanning in the single ion recording (SIR) mode. The mass - to - charge ratios (*m* / *z*) of vitamin B_1, vitamin B_2, vitamin B_6, nicotinamide and calcium pantothenate were 265, 377, 170, 123 and 220, respectively. **Results** The linear ranges of vitamin B_1, vitamin B_2, vitamin B_6, nicotinamide and calcium pantothenate were 0.140 2 - 20.940 0 μg / mL (*r* = 0.999 8, *n* = 8), 0.050 1 - 29.900 0 μg / mL (*r* = 0.999 9, *n* = 10), 0.007 4 - 1.098 0 μg / mL (*r* = 0.999 4, *n* = 8), 0.066 0 - 9.850 0 μg / mL (*r* = 0.999 4, *n* = 7), 0.035 0 - 20.920 0 μg / mL (*r* = 0.999 6, *n* = 10), respectively. The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were less than 4.0% (*n* = 6). The average recoveries were 105.34%, 103.35%, 103.56%, 92.62% and 96.49% with *RSD*s of 3.36%, 2.88%, 2.55%, 2.47% and 1.80% (*n* = 6), respectively. **Conclusion** The method is simple and accurate, which can be used for the simultaneous determination of the five components in Compound Vitamin B Tablets.

Key words: Compound Vitamin B Tablets; HPLC - MS; vitamin B_1; vitamin B_2; vitamin B_6; nicotinamide; calcium pantothenate; content determination

复合维生素 B 片主要含有维生素 B_1、维生素 B_2、维生素 B_6、烟酰胺和泛酸钙,用于预防和治疗 B 族维生素缺乏所致营养不良、厌食、脚气病、糙皮病等。截至 2021 年 5 月,我国共有复合维生素 B 片批准文号 103 个。其标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·化学药品及制剂(第一册)》[WS_1 - 73(B) - 89],分别采用重量法、紫外分光光度法和凯氏定氮法测定维生素 B_1、维生素 B_2 和烟酰胺的含量,但存在操作复杂、步骤烦琐、专属性差等问题[1]。曾采用高效液相色谱 - 紫外光谱(HPLC - UV)法、高效液相色谱 - 二极管阵列检测器(HPLC - DAD)法[2-7]、核磁共振法[8]、毛细管电泳法[9]测定复合维生素 B 片中的成分,但部分成分在 C_{18} 柱中保留较差,部分成分紫外吸收较弱,很难使复合维生素 B 片中 5 种成分达到良好分离。QDa 是一种操作简单、维护方便的小型质谱检测器,被广泛应用于化学成分[10-14]和农药残留[15]的快速测定。本研究中应用此检测器,采用高效液相色谱 - 质谱(HPLC - MS)法同时测定复合维生素 B 片中 5 种成分的含量,为提高其质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters Alliance e2695 型高效液相色谱仪、Waters

第一作者:李姮,女,大学本科,副主任药师,研究方向为药品检验,(电话)0518 - 85836780(电子信箱)154605621@qq.com。

Acquity QDa型质谱仪(美国Waters公司);Sartorius BP211D型分析天平(德国Sartorius公司,精度为0.01 mg);KH-700DE型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,功率为700 W,频率为40 kHz);Milli-Q型超纯水机(美国Millipore公司)。

1.2 试药

复合维生素B片(天津力生制药股份有限公司,批号分别为1804010和1905019;南京白敬宇制药有限责任公司,批号为190751;规格均为每片分别含维生素B_1、维生素B_2、维生素B_6、烟酰胺、泛酸钙3.0,1.5,0.2,10.0,1.0 mg);维生素B_1标准品(批号为100390-201806,含量为97.9%),维生素B_2标准品(批号为100396-201905,含量为98.2%),维生素B_6标准品(批号为100116-201906,含量为99.9%),烟酰胺标准品(批号为100115-202005,含量为99.9%),泛酸钙标准品(批号为100370-201903,含量为96.8%),均购于中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱纯,德国Merck公司);甲酸(色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);氨水(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

1)色谱条件

色谱柱:Phenomenex Gemini C_{18}柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%甲酸溶液(50∶50,*V*/*V*);流速:0.6 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2)质谱条件

离子源:电喷雾离子(ESI);离子化模式:正离子模式;单离子记录(SIR)模式下扫描;锥孔电压:15 V;毛细管电压:0.8 kV;探头温度:600 ℃;维生素B_1、维生素B_2、维生素B_6、烟酰胺和泛酸钙的质荷比(*m*/*z*)分别为265,377,170,123,220,均为定量离子。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:取维生素B_1、维生素B_6和泛酸钙对照品各适量,精密称定,加0.1%甲酸溶液制成质量浓度为400 μg/mL的对照品贮备液Ⅰ;取烟酰胺对照品适量,精密称定,加0.1%甲酸溶液制成质量浓度为200 μg/mL的对照品贮备液Ⅱ;取维生素B_2对照品适量,精密称定,加5%氨水溶液制成质量浓度为600 μg/mL的对照品贮备液Ⅲ。分别精密量对照品贮备液Ⅰ、对照品贮备液Ⅱ、对照品贮备液Ⅲ各适量,置100 mL容量瓶中,制成每1 mL含维生素B_1 20.94 μg、维生素B_2 59.80 μg、维生素B_6 8.78 μg、烟酰胺9.85 μg、泛酸钙41.84 μg的混合对照品溶液。

供试品溶液:取样品20片,精密称定,研细,取粉末适量(约相当于维生素B_1 3 mg),精密称定,置100 mL容量瓶中,加0.1%甲酸溶液适量,超声(功率为700 W,频率为40 kHz)10 min,放冷,称定质量,用0.1%甲酸溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液1 mL,置50 mL容量瓶中,用0.1%甲酸溶液定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.3 方法学考察

线性关系考察:吸取2.2项下混合对照品溶液适量,倍比稀释成系列质量浓度的溶液,按2.1项下试验条件进样测定,剔除超限浓度,以溶液质量浓度(*X*,μg/mL)为横坐标、各组分定量离子的峰面积(*Y*)为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

表1 线性关系考察结果

Tab. 1 Results of the linear relation test

成分	回归方程	*r*	线性范围(μg/mL)
维生素B_1	$Y=5\,235.70X+867\,881$	0.999 8($n=8$)	0.140 2~20.940 0
维生素B_2	$Y=963.96X+654\,73$	0.999 9($n=10$)	0.050 1~29.900 0
维生素B_6	$Y=17\,767.00X-280\,25$	0.999 4($n=8$)	0.007 4~1.098 0
烟酰胺	$Y=5\,145.00X+787\,693$	0.999 4($n=7$)	0.066 0~9.850 0
泛酸钙	$Y=1\,459.30X+132\,922$	0.999 6($n=10$)	0.035 0~20.920 0

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液(维生素B_1、维生素B_2、维生素B_6、烟酰胺和泛酸钙的质量浓度分别为0.654 4,1.868 8,0.274 4,0.307 8,1.307 5 μg/mL)适量,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,记录各组分定量离子的峰面积。结果维生素B_1、维生素B_2、维生素B_6、烟酰胺和泛酸钙成分定量离子峰面积的*RSD*分别为1.89%,2.83%,3.46%,3.14%,2.68%($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为1804010)样品适量,精密称定,依法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下试验条件进样测定。结果维生素B_1、维生素B_2、维生素B_6、烟酰胺和泛酸钙含量的*RSD*分别为2.01%,2.53%,3.11%,3.25%,2.74%($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批(批号为1804010)样品适量,精密称定,依法制备供试品溶液,分别于0,2,4,8,12,24 h时按2.1项下试验条件进样测定。结果维生素B_1、维生素B_2、维生素B_6、烟酰胺和泛酸钙定量离子峰面积的*RSD*分别为2.15%,3.09%,2.86%,3.22%,3.31%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为1804010)粉末适量,精密称定,共6份,分别精密加入混合对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,计算回收率。结果见表2。

表 2　加样回收试验结果（$n = 6$）

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

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(%)
维生素B_1	0.080 6	2.868 6	2.094 0	5.196 7	111.18		
	0.080 2	2.854 3	2.094 0	5.068 7	105.75		
	0.080 3	2.857 9	2.094 0	4.964 6	100.61	105.34	3.36
	0.080 5	2.865 0	2.094 0	5.087 4	106.13		
	0.080 6	2.868 6	2.094 0	5.075 6	105.40		
	0.080 5	2.865 0	2.094 0	5.021 8	103.00		
维生素B_2	0.080 6	1.533 0	1.495 0	3.132 8	107.01		
	0.080 2	1.525 4	1.495 0	3.095 7	105.04		
	0.080 3	1.527 3	1.495 0	3.106 3	105.62	103.35	2.88
	0.080 5	1.531 1	1.495 0	3.033 3	100.48		
	0.080 6	1.533 0	1.495 0	3.061 7	102.25		
	0.080 5	1.531 1	1.495 0	3.021 4	99.69		
维生素B_6	0.080 6	0.015 3	0.022 0	0.038 5	105.45		
	0.080 2	0.015 2	0.022 0	0.037 8	102.73		
	0.080 3	0.015 2	0.022 0	0.038 4	105.46	103.56	2.55
	0.080 5	0.015 3	0.022 0	0.037 2	99.54		
	0.080 6	0.015 3	0.022 0	0.038 7	106.36		
	0.080 5	0.015 3	0.022 0	0.037 7	101.82		
烟酰胺	0.080 6	9.731 6	9.850 0	19.055 5	94.66		
	0.080 2	9.683 3	9.850 0	18.885 6	93.42		
	0.080 3	9.695 4	9.850 0	18.564 1	90.04	92.62	2.47
	0.080 5	9.719 6	9.850 0	18.527 4	89.42		
	0.080 6	9.731 6	9.850 0	19.005 1	94.15		
	0.080 5	9.719 6	9.850 0	18.983 2	94.05		
泛酸钙	0.080 6	1.039 7	1.046 0	2.055 6	97.12		
	0.080 2	1.034 6	1.046 0	2.064 1	98.42		
	0.080 3	1.035 9	1.046 0	2.017 5	93.84	96.49	1.80
	0.080 5	1.038 4	1.046 0	2.045 5	96.28		
	0.080 6	1.039 7	1.046 0	2.036 2	95.27		
	0.080 5	1.038 4	1.046 0	2.063 7	98.02		

2.4　样品含量测定

取 3 批（批号分别为 1804010，190751，1905019）样品，各 3 份，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下试验条件进样测定，按外标法计算含量。结果见表 3。

表 3　样品含量测定结果（mg / g，$n = 3$）

Tab. 3　Results of content determination of five components in the samples（mg / g，$n = 3$）

批号	维生素B_1	维生素B_2	维生素B_6	烟酰胺	泛酸钙
1804010	35.59	19.02	2.36	120.74	12.90
190751	36.84	17.93	2.40	122.55	12.79
1905019	35.74	18.87	2.36	119.69	12.80
$\bar{X}$	36.06	18.61	2.37	120.99	12.83

3　讨论

3.1　溶剂选择

在制备对照品溶液的过程中发现，维生素B_1、维生素B_6、烟酰胺和泛酸钙能完全溶解于 0.1% 甲酸溶液，但维生素B_2不能，将维生素B_2的溶剂改为 5% 氨水溶液后能完全溶解。故制备对照品溶液时选择不同溶剂。

3.2　检测器选择

复合维生素 B 片中的 5 种成分极性较大，在C_{18}柱上的保留和分离度均较差，泛酸钙的紫外最大吸收波长小于 200 nm，接近甲醇和乙腈等有机溶剂的截止波长，受流动相干扰较大，故不宜采用 HPLC - UV 法同时测定 5 个成分。本研究中采用 HPLC - MS 法测定，配备 QDa 小型质谱检测器进行试验，其价格低廉，维护保养成本低，操作简便，较 HPLC - UV 法或 HPLC - DAD 法具有灵敏度高、专属性强、检测时间短等优点。

3.3　质谱条件选择

比较了正、负 2 种离子模式，发现正离子模式下待测物较易电离；考察每个化合物的锥孔电压（9，11，13，15，18，21 V），结果锥孔电压为 15 V 时待测物的色谱峰峰形较好，灵敏度较高；当流速为 0.6 mL / min 时，考察不同毛细管电压（0.6，0.7，0.8，0.9，1.0，1.1 kV），结果毛细管电压为 0.8 kV 时色谱峰峰形较好，灵敏度较高。故最终确定 MS 条件为正离子模式，锥孔电压 15 V，毛细管电压 0.8 kV。

3.4　方法评价

本研究中建立的 HPLC - MS 法操作简便、结果准确、重复性好，可用于同时测定复合维生素 B 片中 5 种成分的含量，可为提高其质量标准提供参考。

参考文献

[1] 崔　黎，王　勤，王国英，等. 基于国家药品评价性抽验的复合维生素 B 片标准现状研究和修订[J]. 北方药学，2020，17(8)：179 - 180.

[2] 陈金泉，王　军，何立环. HPLC - DAD 法同时测定复合维生素 B 片中 4 种维生素的含量[J]. 药物分析杂志，2012，32(6)：1090 - 1092.

[3] 陈光龙，李玉兰，刘　敏，等. 高效液相色谱法测定复合维生素 B 片中 4 种组分的含量[J]. 中国医院药学杂志，2006，26(10)：1256 - 1258.

[4] 张媛媛，丁大中. 超高效液相色谱法测定复合维生素 B 片中 4 种成分的含量[J]. 药学研究，2017，36(6)：327 - 329.

[5] 张晓娜，校　瑞，牛家华，等. HPLC 同时测定维生素 B 片中 4 种水溶性维生素的含量[J]. 河南大学学报(自然科学版)，2016，46(5)：583 - 586.

[6] 王彬彬，姜　静，隋　馨. 复合维生素 B 片中维生素B_6的含量测定[J]. 中国药师，2008，11(2)：239 - 240.

[7] 韩秀梅，祖述春. HPLC 法测定复合维生素 B 片中维生素B_1、B_2、B_6的含量[J]. 中国药事，2012，26(8)：891 - 894.

[8] 郭强胜，刘明珂，禹　珊，等. 定量核磁共振法同时测定复合维生素 B 片中B_1、B_2、烟酰胺和泛酸钙[J]. 波谱学杂志，2016，33(3)：442 - 451.