

复合维生素B片评价性抽验结果分析及含量测定方法的改进

许怀勇, 祁娟, 赵明

雅安市产品质量检验检测中心, 四川 雅安
Email: xhy37h@163.com

收稿日期: 2021年7月24日; 录用日期: 2021年8月20日; 发布日期: 2021年8月30日

摘要

目的: 对四川省内2019年192批次评价抽验复合维生素B片检验结果进行统计分析, 并对原有含量测定方法进行改进, 增加了维生素B₆的含量检测。方法: 采用高效液相色谱法同时测定供试品中维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆和烟酰胺的含量, 考察方法的可行性及线性范围。结果: 维生素B₁在7.488~73.162 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 峰面积与浓度呈良好线性关系, 线性方程: $Y = 17.54886X - 13.71053$, $r = 0.9997$; 维生素B₂在3.683~36.582 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 峰面积与浓度呈良好线性关系, 线性方程: $Y = 59.51908X - 9.12808$, $r = 0.9999$; 维生素B₆在0.522~5.127 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 峰面积与浓度呈良好线性关系, 线性方程: $Y = 30.96344X - 0.61005$, $r = 0.9998$; 烟酰胺在24.651~249.208 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 峰面积与浓度呈良好线性关系, 线性方程: $Y = 2.83243X + 3.49157$, $r = 0.9999$; 结论: 采用该方法同时测定复合维生素B片中维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆和烟酰胺四种组分含量, 具有样品处理简单、方便、快捷, 定量结果准确、可靠等优点。

关键词

复合维生素B片, 评价性抽验结果分析, 高效液相色谱法, 含量测定

Analysis of the Evaluation Test Results of Tabellae Vitamini B Compositae and Improvement the Quantitative Method

Huayong Xu, Juan Qi, Ming Zhao

Ya'an Product Quality Inspection Center, Ya'an Sichuan
Email: xhy37h@163.com

Received: Jul. 24th, 2021; accepted: Aug. 20th, 2021; published: Aug. 30th, 2021

Abstract

Objective: To statistically analyze the test results of 192 batches of evaluation inspection Tabellae Vitaminin B Compositae samples in Sichuan Province in 2019, and to improve the original content determination method and increase the content determination of vitamin B₆. **Method:** Simultaneous determination of vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₆, and nicotinamide in the test product by high performance liquid chromatography was performed to investigate the feasibility and linear range of the method. **Results:** The concentration of vitamin B₁ in the range of 7.488~73.162 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ showed a good linear relationship between the peak area and the concentration. The linear equation was: $Y = 17.54886X - 13.71053$, $r = 0.9997$; Vitamin B₂ is in the range of 3.683~36.582 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the peak area and concentration have a good linear relationship, linear equation: $Y = 59.51908X - 9.12808$, $r = 0.9999$; Vitamin B₆ in the concentration range of 0.522~5.127 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the peak area and concentration have a good linear relationship, linear equation: $Y = 30.96344X - 0.61005$, $r = 0.9998$; In the concentration range of nicotinamide from 24.651 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to 249.208 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the peak area has a good linear relationship with the concentration, a linear equation: $Y = 2.83243X + 3.49157$, $r = 0.9999$; **Conclusion:** The simultaneous determination of four components of vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₆, and nicotinamide in Tabellae Vitaminin B Compositae by this method has the advantages of simple, convenient, fast, and accurate quantitative results.

Keywords

Tabellae Vitamin B Compositae, Analysis of the Test Results of Evaluation Inspection, HPLC, Content Determination

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

复合维生素 B 片, 作为维生素类药物, 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[1] (一九八九年), 自 1989 年 12 月 1 日起开始执行以来, 一直未有修订, 沿用至今。主要用于营养不良、厌食、脚气病、癞皮病及因缺乏维生素 B 类所致的各种疾患的辅助治疗。查阅国家药品监督管理局网站, 该品种共有生产企业 118 家, 分布在 30 个省、自治区和直辖市。该品种处方简单, 作用宽泛, 价格便宜, 深受老百姓喜爱, 在市场上销量很大。

2. 评价性抽验样品情况

本次评价抽验样品包装规格均为 100 片/瓶, 药用塑料瓶包装。共抽验了 192 个有效样品批次, 生产厂家分布在 12 个省、自治区和直辖市。被抽样单位中医疗机构 65 家, 零售企业 37 家, 批发企业 80 家, 连锁药店 9 家; 使用环节抽样 66 个, 流通环节抽样 126 个。

3. 评价性抽样检验结果

1. 总检验结果

全部样品按法定现行标准检验, 均符合规定。

2. 分项检验结果与分析

- 1) 性状: 合格率 100%。
- 2) 鉴别: 5 项化学鉴别, 合格率 100%。
- 3) 检查:

重量差异: 平均片重最小值为 0.0662 g, 平均片重最大值为 0.0959 g, 说明不同厂家在处方及生产工艺上存在差异; 同一厂家的产品平均片重都比较接近, 说明各厂的生产工艺都很稳定。

崩解时限: 最短时间为 1 分钟, 最长时间为 14 分钟。可以看出各生产企业之间崩解时限波动较大, 另有同一企业生产的不同批次样品崩解时限也有较大差异。

- 4) 含量测定:

维生素 B₁: 采用重量法[1]测定, 由于中间转移步骤较多, 误差影响因素多, 因而同一厂家的同批次产品测得的结果也有差异。最小值为 91.1%, 最大值为 107.5%, 极差为 16.4%, 全体样本平均值为 98.7%, RSD%为 3.5%。

维生素 B₂: 采用可见 - 紫外分光光度法[1]测定, 最小值为 90.6%, 最大值为 109.7%, 极差为 19.1%, 全体样本平均值为 101.2%, RSD%为 4.8%。

烟酰胺: 采用凯氏定氮法[1]测定, 最小值为 91.8%, 最大值为 104.2%, 极差为 12.4%, 全体样本平均值为 98.9%, RSD%为 2.2%。

4. 探索性研究及其检验结果分析

4.1. 开展探索性研究项目及其目的

复合维生素 B 片为维生素类非处方药, 每片含: 维生素 B₁ 3 mg、维生素 B₂ 1.5 mg、维生素 B₆ 0.2 mg、烟酰胺 10 mg、泛酸钙 1 mg, 辅料为: 淀粉、糊精、硬脂酸镁、羟丙纤维素、蔗糖。现行标准对维生素 B₁、维生素 B₂ 和烟酰胺 3 个组分分别用重量法、紫外 - 可见分光光度法和凯氏定氮法进行含量测定, 方法烦琐, 检验需要的样品量大(全检需要 185 片), 而且对维生素 B₆ 的含量未进行控制, 仅仅依靠化学鉴别对维生素 B₆ 进行定性而不能定量, 不利于对该药品质量的全面监管。

为了减少检验样品取用量, 提高检验效率, 对药品质量进行全面控制, 我们查阅了资料, 重点了解采用液相色谱法测定复合维生素 B 片各组分含量方面的文章。张媛媛、丁大中[2]采用超高效液相色谱法, 建立复合维生素 B 片中维生素 B₁、维生素 B₂、烟酰胺及维生素 B₆ 的超高效液相色谱含量测定方法; 张晓娜、校瑞等[3]用高效液相色谱法, 梯度洗脱, 缩短了检测时间; 徐硕、徐文峰等[4]亦建立了复合维生素 B 片中 5 种维生素含量的高效液相色谱测定方法; 韩秀梅, 祖述春[5]也采用 HPLC 法对复合维生素 B 片中维生素 B₁、B₂、B₆ 的含量测定进行研究; 我们发现多元素片(21) [6]的处方中也含有这几种维生素, 其质量标准 WS1-XG-005-2000-2010 采用高效液相色谱法对维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆ 和烟酰胺的含量进行同时测定。因此, 我们采用相同的色谱条件对复合维生素 B 片中维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆ 和烟酰胺的含量进行可行性研究, 对方法进行改进, 以期达到良好的分离效果, 并将含量测定结果与采用现行标准测得结果进行了比较。

4.2. 方法

参考 WS1-XG-005-2000-2010 标准, 初步建立了如下液相色谱方法: Target WP-C18 色谱柱(十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂); 柱温 30℃; 流动相为庚烷磺酸钠溶液(取庚烷磺酸钠 0.6 g, 加冰醋酸 6 ml 与三乙胺 1 ml, 加水至 1000 ml, 用 2 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 3.80)和甲醇; 流速为 1.0 ml/min; 检测波长为 280 nm。理论板数按烟酰胺峰计算不低于 1000, 各峰之间的分离度应>1.5。

4.3. 仪器与试剂

XS205DU 电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO), pH/电导率/离子对综合测试仪(瑞士 METTLER TOLEDO), Agilent 1260 液相色谱仪;赛默飞 Ultimate 3000 液相色谱仪;对照品:维生素 B₁ 批号 100390-201806 含量 97.9%; 烟酰胺, 批号 100115-201604, 含量 99.9%; 维生素 B₂, 批号 100369-201504, 含量 98.2%; 维生素 B₆, 批号 100116-201705, 含量 100.0%, 以上对照品均由中国食品药品检定研究院提供; 庚烷磺酸钠、甲醇均为色谱纯, 成都市科隆化学品有限公司生产; 冰醋酸、三乙胺、氢氧化钠等试剂均为分析纯。

5. 结果分析

5.1. 流动相选择

初期我们参考 WS1-XG-005-2000-2010 标准, 流动相中庚烷磺酸钠溶液与甲醇的比例设置为 83:17, 结果如图 1 所示, 混合对照品 HPLC 色谱图中的色谱峰从左至右依次为烟酰胺、维生素 B₆、维生素 B₁、维生素 B₂, 维生素 B₁ 和维生素 B₂ 不能很好的分离, 分离度为 1.2, 不符合要求(见图 1)。

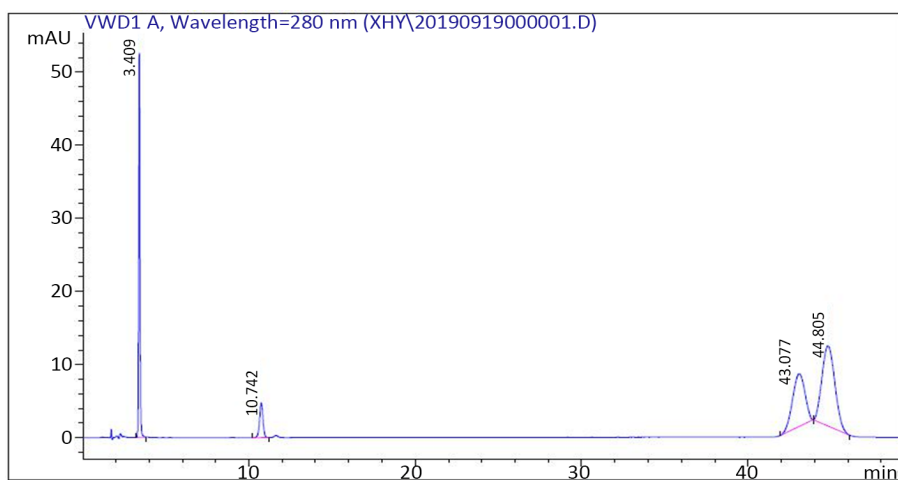


Figure 1. HPLC chromatograms of reference substances (before)

图 1. 流动相变化前对照品 HPLC 色谱图

经过几次摸索试验, 分别采用调整流动相比例、流速等方法, 最终发现将流动相比例调整为庚烷磺酸钠溶液 - 甲醇(88:12)时, 维生素 B₁ 和维生素 B₂ 的分离度变为 2.0, 能很好的分离(见图 2)。

最后确定流动相比例为: 庚烷磺酸钠溶液 - 甲醇(88:12)。

5.2. 线性关系

精密称取烟酰胺对照品 62.90 mg 置 25 ml 量瓶中, 加 5%冰醋酸溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为烟酰胺对照品贮备液; 精密称取维生素 B₁ 对照品 20.83 mg 置 25 ml 量瓶中, 加 5%冰醋酸溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为维生素 B₁ 对照品贮备液; 精密称取维生素 B₂ 对照品 14.92 mg 置 100 ml 量瓶中, 加 5%冰醋酸溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为维生素 B₂ 对照品贮备液; 精密称取维生素 B₆ 对照品 14.15 mg 置 25 ml 量瓶中, 加 5%冰醋酸溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 ml 置 50 ml 量瓶中, 5%冰醋酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为维生素 B₆ 对照品贮备液; 精密量取烟酰胺对照品贮备液 0.5 ml、1 ml、2 ml、3 ml、4 ml、5 ml, 维生素 B₁ 对照品贮备液 0.5 ml、1 ml、2 ml、3 ml、4 ml、5 ml, 维生素 B₂ 对照品贮备液 3 ml、4 ml、5 ml、6 ml、7 ml、8 ml, 维生素 B₆ 对照品贮备液 0.5 ml、1 ml、2 ml、3 ml、4 ml、5 ml, 至 50 ml 量瓶中, 配制 6 个级别的混合标准曲线工作溶液, 微孔滤膜滤过, 精密量取续滤液

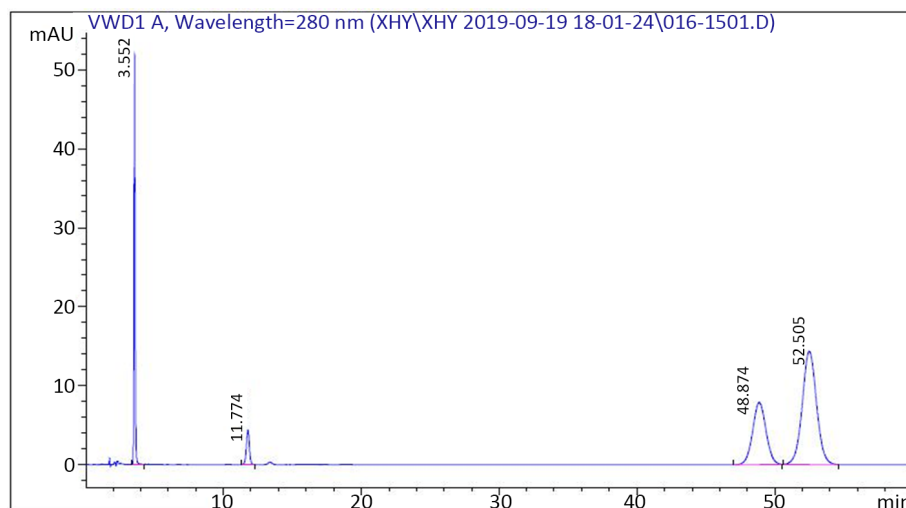


Figure 2. HPLC chromatograms of reference substances (after)
图 2. 流动相变化后对照品 HPLC 色谱图

20 μl , 注入液相色谱仪, 记录色谱图。结果: 各峰之间的分离度均符合要求, 理论板数均不低于 9000。维生素 B_1 在 $7.488\sim 73.162\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 峰面积与浓度呈良好线性关系, 线性方程: $Y = 17.54886X - 13.71053$, $r = 0.9997$; 维生素 B_2 在 $3.683\sim 36.582\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 峰面积与浓度呈良好线性关系, 线性方程: $Y = 59.51908X - 9.12808$, $r = 0.9999$; 维生素 B_6 在 $0.522\sim 5.127\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 峰面积与浓度呈良好线性关系, 线性方程: $Y = 30.96344X - 0.61005$, $r = 0.9998$; 烟酰胺在 $24.651\sim 249.208\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 峰面积与浓度呈良好线性关系, 线性方程: $Y = 2.83243X + 3.49157$, $r = 0.9999$ 。

5.3. 样品测定

样品处理及对照品溶液配制(避光操作): 取本品 20 片, 精密称定, 研细, 精密称取细粉适量(约相当烟酰胺 10 mg), 置 100 ml 量瓶中, 加 5%冰醋酸溶液适量, 超声 10~15 分钟, 放冷至室温, 用 5%冰醋酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 微孔滤膜滤过, 精密量取续滤液 20 μl , 注入液相色谱仪, 记录色谱图。另取烟酰胺对照品约 50 mg、维生素 B_1 对照品约 15 mg 和维生素 B_2 对照品约 10 mg, 精密称定, 置 500 ml 棕色量瓶中, 加 5%冰醋酸溶液适量, 超声 10~15 分钟, 放冷至室温, 精密加入维生素 B_6 对照品溶液(精密称取维生素 B_6 对照品约 10 mg, 置 50 ml 量瓶中, 用 5%冰醋酸溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀) 5 ml, 用 5%冰醋酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 同法测定。按外标法以峰面积计算。

本次试验覆盖全部 12 个厂家样品共计 20 批次, 由 3 名检验人员分别采用不同厂家三个型号仪器测定, 各组分含量限度均设为 90.0%~110.0%。维生素 B_1 、维生素 B_2 、烟酰胺的含量测定结果与按现行标准测定结果非常接近, 各组分含量测定平行偏差均符合要求。

20 批次样品中, 只有 3 个厂家 4 个批次样品维生素 B_6 含量测定结果符合规定且平行试验偏差符合要求。

5.4. 重现性试验

取样品(YP2019A0236), 依法处理 6 份, 测定维生素 B_1 、维生素 B_2 、维生素 B_6 、烟酰胺含量, RSD 分别为 0.4%、0.8%、1.2%和 0.6%, 表明方法的重现性良好。

5.5. 加样回收试验

选取维生素 B_6 含量测定结果符合规定且平行试验偏差符合要求两个批次样品(YP2019A0236,

YP2019A352)进行加样回收试验,烟酰胺平均回收率为 95.4% (RSD%: 0.7%),维生素 B₆ 平均回收率为 95.0% (RSD%: 1.2%),维生素 B₁ 平均回收率为 103.3% (RSD%: 1.4%),维生素 B₂ 平均回收率为 98.8% (RSD%: 0.9%),均符合《中国药典分析检测技术指南》[7]相关要求。

5.6. 重复性试验

取对照品溶液,连续进样 5 次,烟酰胺峰面积测量值的相对标准偏差为 0.7%,维生素 B₆ 峰面积测量值的相对标准偏差为 0.4%,维生素 B₁ 峰面积测量值的相对标准偏差为 0.3%,维生素 B₂ 峰面积测量值的相对标准偏差为 0.2%,均符合要求(应不大于 2.0%)(见图 3)。

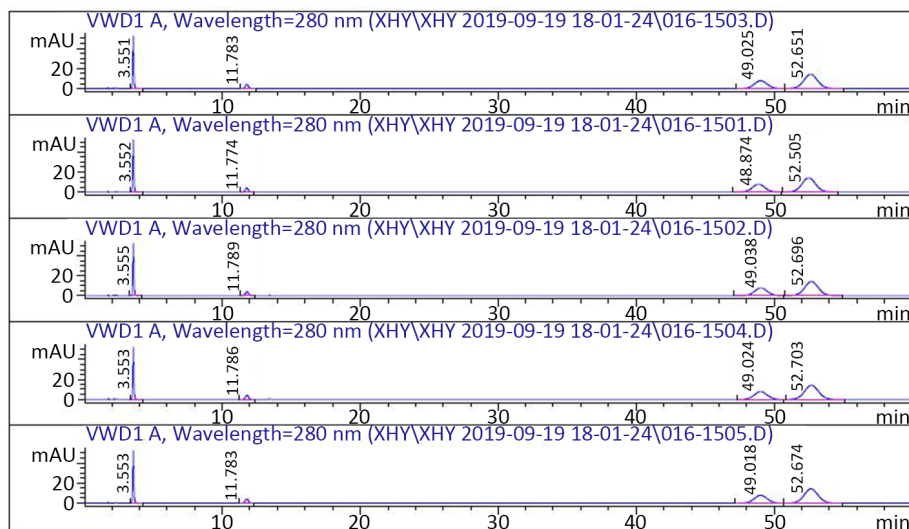


Figure 3. HPLC chromatograms of Mixed reference substances (Repetitive tests)

图 3. 混合对照品 HPLC 色谱图(重复性试验)

5.7. 稳定性试验

供试品溶液室温(25℃)放置 48 小时后测定,烟酰胺含量结果相对平均偏差为 0.3%,维生素 B₆ 含量结果相对平均偏差为 0.0%,维生素 B₁ 含量结果相对平均偏差为 0.0%,维生素 B₂ 含量结果相对平均偏差为 0.7%,表明供试品溶液在 48 小时内稳定,能够满足检测的要求。

6. 讨论

本品处方由 5 种药物组成,现行标准仅对其中维生素 B₁、维生素 B₂、烟酰胺三个组分的含量进行了控制,对维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆ 和烟酰胺四个组分进行了化学鉴别,而对另一组分泛酸钙则没有相关的鉴别项。因检测标准项目缺失,可能造成厂家少投料或不投料,从而影响药品质量,损害广大患者的合法权益。同时由于没有进行含量均匀度检查,可能造成不良反应或药物达不到有效浓度影响治疗效果。

在生产工艺上,原辅料混合制粒过程中,由于维生素 B₆ 分散不均匀,多批次样品维生素 B₆ 含量测定平行试验结果不符合要求。《中国药典》2015 年版四部片剂制剂通则规定:原料药物与辅料应混合均匀。含药量小或含毒、剧毒的片剂,应根据原料药物的性质采用适宜方法使其分散均匀。处方中维生素 B₆ 含量是最低的,药物与辅料的量比相差太大,用普通混合法不易混匀。现行质量标准又没有规定对维生素 B₆ 的含量进行检测,厂家缺乏改进生产工艺的动力。建议厂家在混合的时候,最好采用递加稀释法

和溶剂分散法，并在混合过程中增加过筛次数。

本次评价抽验有效样品 192 批，按现行标准检验，均符合规定。说明各生产厂家均能按照现行标准进行生产，但对标准未明确规定的制剂通则项下样品均一性问题，多数厂家没有很好的把控，也没有进行相关生产工艺的研究与改进，建议尽快对现行标准进行修订，改进含量测定方法，增加维生素 B₆ 含量检测，同时增加含量均匀度项目检查，促进厂家改进生产工艺，确保药品质量提高，保障广大人民群众用药安全有效。

参考文献

- [1] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准化学药品及制剂第一册[Z]. 1989: 94-95.
- [2] 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.
- [3] 张晓娜, 校瑞, 牛家华, 张晓婷, 卢明华. 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.
- [4] 徐硕, 徐文峰, 金鹏飞, 等. HPLC 法同时测定复合维生素 B 片中 5 种维生素的含量[J]. 研究报告, 2018, 21(1): 177-180.
- [5] 韩秀梅, 祖述春. HPLC 法测定复合维生素 B 片中维生素 B₁、B₂、B₆ 的含量[J]. 中国药事, 2012, 26(8): 891-894.
- [6] 国家药典委员会. 国家药品标准 WS1-XG-005-2000-2010 多维元素片(21) [S]. 2010.
- [7] 国家药典委员会. 中国药典分析检测技术指南[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017: 189.