

HPLC法测定复方锌铁钙口服溶液中维生素B₂有关物质



李琦^{1,2,3}, 李晓燕⁴, 刘雁鸣^{1,2,3}, 舒森⁵, 李钰鑫^{1,3}

1. 湖南省药品检验检测研究院 (长沙 410001)
2. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室 (长沙 410001)
3. 湖南省药品质量评价工程技术研究中心 (长沙 410001)
4. 湖南省药品审核查验中心 (长沙 410001)
5. 岳阳新华达制药有限公司 (湖南岳阳 414022)

【摘要】目的 建立复方锌铁钙口服溶液中维生素 B₂ 有关物质测定方法。**方法** 色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 1% 磷酸溶液 (三乙胺调 pH 至 3.5) - 乙腈, 梯度洗脱, 检测波长为 260 nm, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 40 °C, 进样量为 20 μL。**结果** 该法对维生素 B₂ 及其降解杂质光色素、光黄素均能有效分离; 维生素 B₂、光黄素与光色素的线性范围分别为 0.119~3.594 μg/mL ($r=1.0000$)、0.115~3.479 μg/mL ($r=1.0000$)、0.114~3.435 μg/mL ($r=0.9999$), 光黄素和光色素的校正因子分别为 0.7 与 1.0。**结论** 该法专属性强、操作简便、灵敏度高、重复性好, 能有效测定复方锌铁钙口服溶液中维生素 B₂ 的降解杂质, 为提升药品质量、降低用药风险提供技术支撑。

【关键词】 复方锌铁钙口服溶液; 维生素 B₂; 有关物质; 高效液相色谱法

【中图分类号】 R927.2

【文献标识码】 A

Determination of related substances of vitamin B₂ in compound zinc, iron and calcium oral solution by HPLC

LI Qi^{1,2,3}, LI Xiaoyan⁴, LIU Yanming^{1,2,3}, SHU Sen⁵, LI Yuxin^{1,3}

1. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001, China
 2. Key Laboratory of Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research, National Medical Products Administration, Changsha 410001, China
 3. Hunan Engineering Technology Research Center for Drug Quality Evaluation, Changsha 410001, China
 4. Hunan Drug Inspection Center, Changsha 410001, China
 5. Yueyang Hudex Pharmaceuticals Ltd., Yueyang 414022, Hunan Province, China
- Corresponding author: LI Qi, Email: liqihn2023@163.com

【Abstract】Objective To establish a method for the determination of related substances of vitamin B₂ in compound zinc, iron and calcium oral solution. **Methods** The chromatographic column was Ultimate XB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was 1% phosphoric acid solution (with pH of triethylamine adjusted to 3.5) and acetonitrile with gradient elution. The detection

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202409055

基金项目: 湖南省自然科学基金科药联合基金项目 (2022JJ80009)

通信作者: 李琦, 副主任药师, Email: liqihn2023@163.com

wavelength was 260 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 40 °C, and the injection volume was 20 μ L. **Results** This method could effectively separate vitamin B₂ and its degraded impurities, lumichrome and lumiflavin. The linear range was 0.119-3.594 μ g/mL for vitamin B₂ ($r=1.000\ 0$), 0.115-3.479 μ g/mL for lumichrome ($r=1.000\ 0$), and 0.114-3.435 μ g/mL for lumiflavin ($r=0.999\ 9$). The correction factors of lumiflavin and lumichrome were 0.7 and 1.0 respectively. **Conclusion** This method has strong specificity, simple operation, high sensitivity and good repeatability, can effectively determine the degradation impurities of vitamin B₂ in compound zinc, iron and calcium oral solution, and provide technical support for improving drug quality and reducing medication risks.

【Keywords】 Compound zinc, iron and calcium oral solution; Vitamin B₂; Related substances; High performance liquid chromatography

复方锌铁钙口服溶液为复方制剂, 其组分为葡萄糖酸钙 400 mg、葡萄糖酸亚铁 100 mg、葡萄糖酸锌 30 mg、维生素 B₂ 3 mg, 是我国特有品种, 适用于骨质疏松等钙缺乏症、生长发育迟缓等锌缺乏证、妊娠、儿童发育期等引起的缺铁性贫血、口角炎等维生素 B₂ 缺乏引起的疾病。该药受众广泛, 孕妇、儿童与老年人特殊人群为主要用药群体, 由于其生理机能的特殊性, 药品中的毒性杂质即可能引发不良反应, 危害健康, 故更需严格控制其药品质量, 以保障用药安全。目前国内有 2 家复方锌铁钙口服溶液的生产企业 (A 企业和 B 企业)。本课题组在日常检验工作中, 多次发现复方锌铁钙口服溶液中维生素 B₂ 含量偏低, 进一步研究其稳定性, 发现维生素 B₂ 含量在有效期内可降低 7%, 其降解杂质存在安全隐患。经查询相关文献, 维生素 B₂ 具有光降解特性, 降解杂质为光黄素与光色素^[1-5], 但迄今关于光黄素与光色素化合物的研究报道较少。有研究采用 ADMET Predictor 软件预测其毒理性质, 结果光黄素与光色素均具生殖毒性、肝脏毒性及致染色体变异可能性。根据 A 企业和 B 企业注册标准^[6-7]考察本品中维生素 B₂ 有关物质, 结果仅 B 企业标准控制了有关物质, 但采用其有关物质测定法检测时阴性样品产生的色谱峰较多, 干扰维生素 B₂ 降解杂质的检测, 可操作性较差。经查询国内外药典, 维生素 B₂ 原料药《中国药典》^[8]、欧洲药典 (European Pharmacopoeia, EP)^[9] 和英国药典 (British Pharmacopoeia, BP)^[10] 均控制了有关物质, 《中国药典》未控制特定杂质, EP 与 BP 控制的 4 个特定杂质中包括限度为 0.025% 的光黄素和限度为 0.2% 的光色素。采用现行药典维生素 B₂ 原料药的色谱条件考察本品中维生素 B₂ 的有关物质, 光黄素与光色素的检测均存在干扰,

不能有效控制本品中维生素 B₂ 的有关物质含量, 存在安全隐患。

为了进一步保障用药安全、降低用药风险, 迫切需要建立有效测定本品中维生素 B₂ 有关物质的方法。在多组分存在干扰的情况下, 本文通过改进有关物质检测条件, 建立一种操作简便、专属性强、灵敏度高的检测复方锌铁钙口服溶液中维生素 B₂ 降解杂质光黄素与光色素含量的方法。

1 材料

1.1 主要仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪, 包括 LC LabSolutions 工作站和 DAD 检测器 (日本岛津公司); XP205 十万分之一电子分析天平 (瑞士梅特勒托利多公司); Version 10.4.0.5 ADMET Predictor™ 软件 (Simulations Plus, Inc., USA)。

1.2 主要药品与试剂

对照品光黄素 (批号: 1-NVG-118-2, 纯度 95.14%)、光色素 (批号: 3VQ8G-BJ, 纯度 99.9%)、维生素 B₂ (批号: 100369-201504, 纯度 98.2%) 均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇和乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为纯化水。

复方锌铁钙口服溶液, 规格: 10 mL, A 公司 4 批 (批号: 170301、190701、190705、190707), B 公司 6 批 (批号: 151016、160519、160520、180501、180709、190603)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 0.1% 磷酸溶液 (三

乙胺调 pH 至 3.5) (A)–乙腈 (B), 梯度洗脱 (梯度洗脱程序见表 1), 检测波长为 260 nm, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 40 °C, 进样量为 20 μ L。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1. The program of gradient elution

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0~5	90	10
5~20	90~80	10~20
20~25	80	20
25~35	80~50	20~50
35~45	50	50

2.2 溶液的配制

2.2.1 供试品溶液

取本品用 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.2 对照溶液

精密量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 对照品溶液

精密称取维生素 B₂ 对照品 30.50 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加稀盐酸 5 mL 使溶解, 用水稀释至刻度, 得维生素 B₂ 对照品贮备液; 精密称光黄素对照品 7.62 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 得光黄素对照品贮备液, 精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 得光黄素定位溶液; 精密称取光色素对照品 14.33 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加二甲基亚砷溶解并稀释至刻度, 得光色素对照品贮备液, 精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 得光色素定位溶液。

2.2.4 阴性样品溶液

分别按 A 企业和 B 企业的处方工艺制备缺维生素 B₂ 的阴性样品, 并按“2.2.1”项下方法制得阴性样品溶液。

2.2.5 系统适用性溶液

系统适用性溶液 1: 取维生素 B₂ 对照品 30 mg, 置敞口器皿中, 加 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL 使溶解, 光照 4 h, 加冰醋酸 0.5 mL, 转移至 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

系统适用性溶液 2: 取系统适用性溶液 1 与 A 企业样品溶液等体积混合, 摇匀, 即得。

2.3 方法学验证

2.3.1 系统适用性试验

精密吸取系统适用性溶液 2、阴性样品溶

液、供试品溶液、对照溶液与各对照品定位溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, HPLC 色谱图见图 1。结果显示阴性样品溶液对主峰及所检杂质峰无干扰, 系统适用性溶液 2 中维生素 B₂、光黄素、苯甲酸钠 (A 企业防腐剂) 与光色素依次出峰, 保留时间分别为 15.086、21.363、25.585、28.652 min, 光黄素、光色素与相邻峰的分度分别为 1.9 和 4.0, 均满足《中国药典》的要求。

2.3.2 破坏试验

取同一批复方锌铁钙口服溶液 (A 企业, 批号: 190701) 内容物适量, 滤过, 作为未破坏溶液; 取内容物 5 mL, 加盐酸溶液 (1→2) 1 mL, 60 °C 水浴加热 2 h, 滤过, 作为酸破坏溶液; 取内容物 10 mL, 用 2 mol/L 氢氧化钠溶液调至中性后继续加入 2 mL, 40 °C 水浴加热 2 h, 加冰醋酸 0.5 mL, 滤过, 作为碱破坏溶液; 取内容物 10 mL 加 10% 双氧水 2 mL, 室温放置 2 h, 滤过, 作为氧化破坏溶液; 取内容物 10 mL, 置 60 °C 水浴加热 2 h, 摇匀, 滤过, 作为高温破坏溶液; 取内容物 10 mL, 置敞口器皿中光照 (4 500 Lx \pm 500 Lx) 4 h, 滤过, 作为光照破坏溶液。

将上述 6 份溶液按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图 (图 2), 结果表明在光照破坏情况下光色素明显增加; 各强制破坏条件下主峰与相邻峰、光黄素和光色素与相邻杂质峰均有可效分离。

2.3.3 线性关系考察和校正因子

分别精密量取维生素 B₂ 贮备液、光黄素贮备液和光色素贮备液各 2 mL, 置同一 100 mL 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 作为线性贮备液; 精密量取线性贮备液 1 mL 和 3 mL 分别置于 50 mL 量瓶中, 作为线性 1 号和 2 号溶液; 精密量取线性贮备液 2、4、6 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 作为线性 3~5 号溶液。分别精密量取线性 1~5 号溶液按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 以浓度 (X , μ g/mL) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 并计算线性回归方程与校正因子, 维生素 B₂ 回归方程斜率与杂质回归方程斜率的比值即为校正因子, 结果见表 2。结果表明, 各组分在一定浓度范围内与峰面积之间线性关系良好。

2.3.4 定量限与检测限

取光黄素和光色素对照品溶液进行逐级稀释，按“2.1”项下色谱条件进样测定，以信噪比约为 10 : 1 时的溶液浓度作为定量限，计算得光黄素和光色素的定量限分别为 46、

80 ng/mL；以信噪比约为 3 : 1 时的溶液浓度作为检测限，计算得光黄素与光色素检测限分别为 17、26 ng/mL。

2.3.5 精密度试验

精密量取供试品溶液（A 企业，批号：

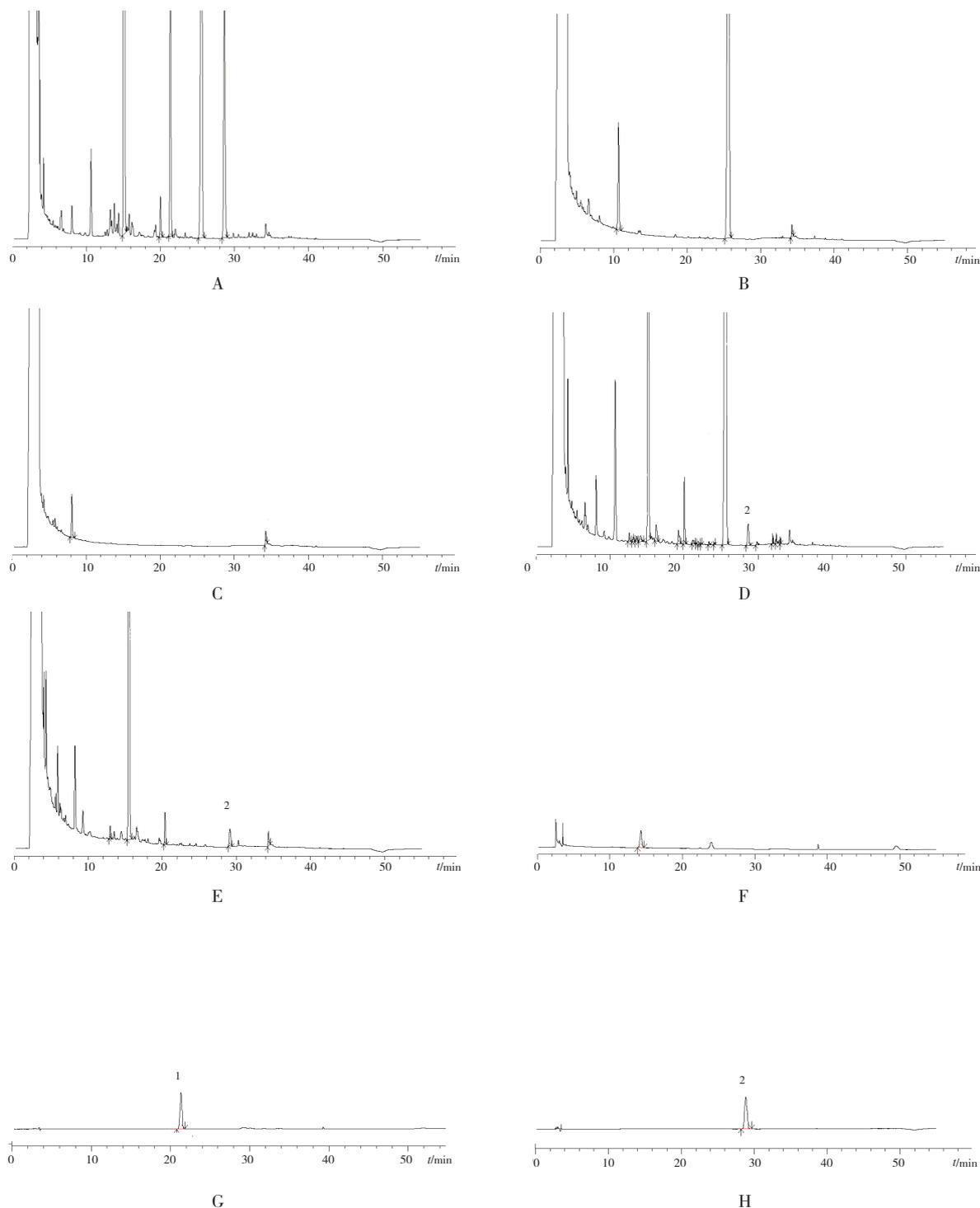


图1 HPLC色谱图

Figure 1. HPLC chromatogram

注：A. 系统适用性溶液2；B. A企业阴性样品溶液；C. B企业阴性样品溶液；D. A企业供试品溶液；E. B企业供试品溶液；F. 对照溶液；G. 光黄素对照品溶液；H. 光色素对照品溶液；1. 光黄素；2. 光色素。

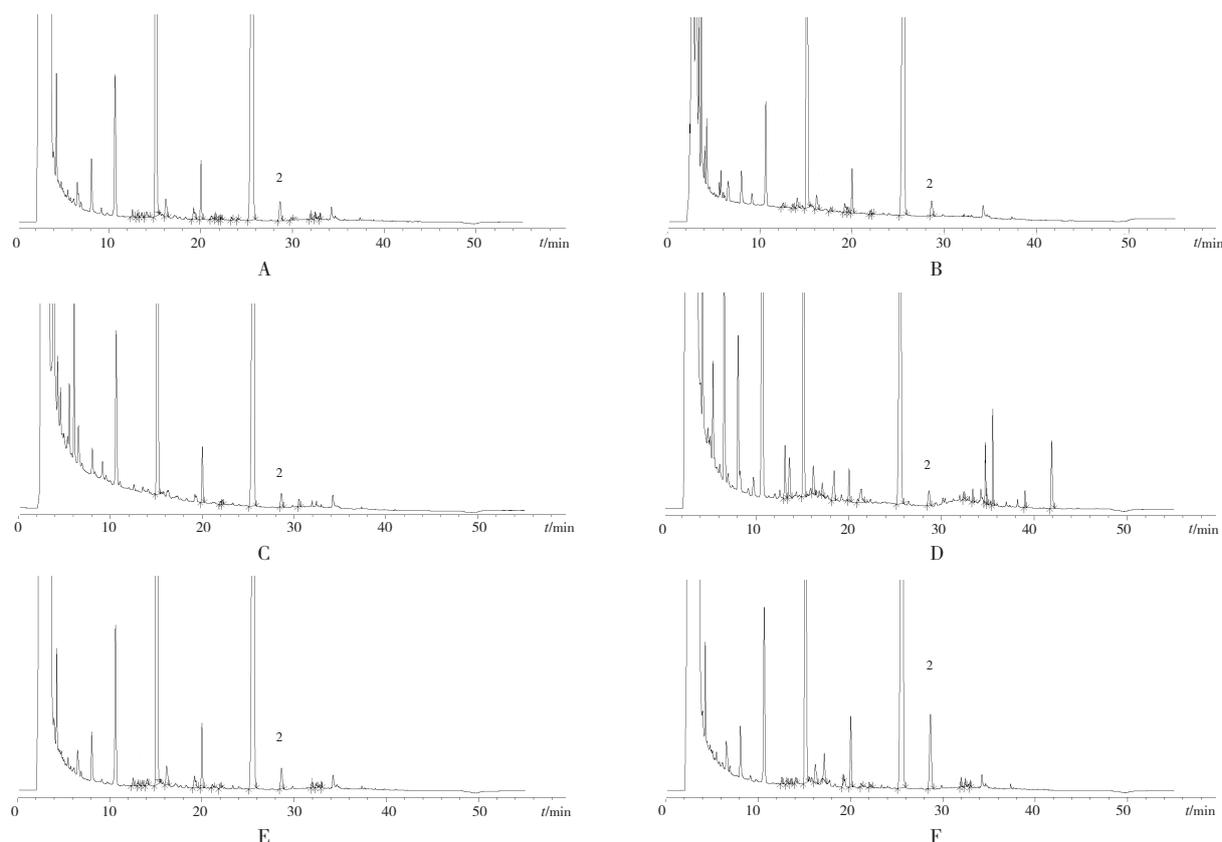


图2 破坏试验HPLC色谱图

Figure 2. HPLC chromatogram of degradation test

注: A. 未破坏; B. 酸破坏; C. 碱破坏; D. 氧化破坏; E. 高温破坏; F. 光照破坏; 1. 光黄素; 2. 光色素。

表2 各组分的线性回归方程、相关系数及线性范围

Table 2. The linear regression equations, correlation coefficients, and linear ranges of each component

组分	线性回归方程	<i>r</i>	线性范围 (μg/mL)	校正因子
维生素B ₂	$Y=92.542X+332$	1.000 0	0.119~3.594	—
光黄素	$Y=139.89X+203.14$	1.000 0	0.115~3.479	0.7
光色素	$Y=90.464X+162.19$	0.999 9	0.114~3.435	1.0

160520) 20 μL, 按“2.1”项下色谱条件连续进样6次, 计算得光色素峰面积的 *RSD* 为 0.32% ($n=6$), 光黄素均未检出, 表明该仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验

取同一样品 (A 企业, 批号: 160520), 按“2.2”项下方法平行配制 6 份供试品溶液, 并按“2.1”项下色谱条件进样测定, 按加校正因子自身对照法计算光黄素与光色素的含量, 结果光黄素均未检出, 光色素平均含量为 2.8%, *RSD* 为 0.68% ($n=6$), 表明该方法重复性良好。

2.3.7 稳定性试验

取室温避光保存的供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算得维生素 B₂ 和光色素峰面积的 *RSD* 分别为 0.64%、0.35% ($n=7$), 表明供试品溶液在室温

避光条件下 24 h 内稳定性良好。

2.3.8 耐用性试验

考察不同色谱仪、色谱柱、柱温、流速等色谱条件的影响, 分别取样品溶液与对照溶液按“2.1”项下色谱条件下进样测定, 结果见表 3。结果表明光黄素与光色素与相邻杂质峰的分度均符合要求, 表明方法耐用性良好。

2.4 样品测定

分别取 A 企业和 B 企业共 10 批复方锌铁钙口服溶液, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液和对照溶液, 并按“2.1”项下色谱条件进样测定, 按加校正因子自身对照法计算光黄素和光色素的含量, 结果见表 4。根据样品测定结果, 参考《中国药典 (2020 年版)》四部^[8] 维生素 B₂ 片有关物质单杂限度, 建议控制光色素限度为 1.5%。

表3 耐用性试验结果表
Table 3. Results of durability test

仪器	色谱柱	色谱条件	光黄素			光色素		
			保留时间 (min)	分离度	含量 (%)	保留时间 (min)	分离度	含量 (%)
LC-20AT	Ultimate AQ-C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	柱温40 °C, 流速1.0 mL/min	21.532	2.233	未检出	28.076	3.134	0.81
	Ultimate XB-C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	柱温40 °C, 流速1.0 mL/min	21.363	2.14	未检出	28.641	3.977	0.81
	Ultimate XB-C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	柱温35 °C, 流速1.0 mL/min	21.472	2.957	未检出	28.984	2.319	0.85
	Ultimate XB-C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	柱温40 °C, 流速0.9 mL/min	23.305	2.776	未检出	31.413	3.857	0.87
		柱温40 °C, 流速1.1 mL/min	21.108	3.326	未检出	28.674	2.291	0.79
Agilent 1260	Kromasil-C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	柱温40 °C, 流速1.0 mL/min	20.927	1.78	未检出	28.002	2.140	1.00
	Ultimate AQ-C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	柱温40 °C, 流速1.0 mL/min	22.717	2.23	未检出	29.819	5.07	0.93
	Wondasil C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	柱温40 °C, 流速1.0 mL/min	22.698	2.02	未检出	30.106	2.5	1.02
	CAPCELL C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	柱温40 °C, 流速1.0 mL/min	21.744	1.87	未检出	29.147	2.68	1.02

表4 样品测定结果表 (%)

Table 4. Determination results of the samples (%)

生产企业	批号	光黄素	光色素
A	170301	未检出	1.84
	190701	未检出	0.56
	190705	未检出	0.47
	190707	未检出	0.48
B	151016	未检出	2.43
	160519	未检出	2.49
	160520	未检出	2.82
	180501	未检出	1.70
	180709	未检出	1.30
	190603	未检出	0.80

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

在现行药典与文献^[11]基础上, 通过优化 HPLC 流动相 pH 与检测波长, 解决了复方锌铁钙口服溶液中维生素 B₂ 降解杂质光黄素与光色素的分离、检测问题。流动相筛选: 以 0.05%、0.1%、0.2% 磷酸溶液为水相, 分别用三乙胺调节 pH 至 4.5、4.0、3.5、3.0 进行梯度洗脱。结果表明, 0.1% 磷酸溶液 (pH 3.5) - 乙腈进行梯度洗脱, 系统适用性溶液 2 中光黄素与光色素峰形对称, 与相邻

峰分离度均大于 1.5。检测波长选择: 光黄素与光色素在 265 nm/222 nm、260 nm/219 nm 处分别有最大吸收。结合杂质的光谱行为与样品测定结果, 选取光色素最大吸收波长 260 nm 为检测波长, 以保障杂质检测灵敏度。

3.2 潜在风险需重视

尽管现行标准^[8, 12]与文献^[13]尚未对葡萄糖酸亚铁中的紫外吸收杂质提出明确控制要求, 但本研究发现此类杂质的存在可能隐含潜在风险。通过考察原辅料, 发现对阴性样品中 3~4 min 处色谱峰主要来源于葡萄糖酸亚铁原料药, 推测其与合成工艺中副产物或未完全除尽的中间体相关, 不同厂家/批次原料药中该杂质响应值差异显著, 提示现有生产工艺稳定性不足。建议企业将紫外吸收杂质纳入葡萄糖酸亚铁原料药质量研究项目, 并通过优化结晶纯化步骤或订入中间体质控指标, 降低终制剂质量风险。

3.3 小结

本文建立测定复方锌铁钙口服溶液有关物质的 HPLC 方法, 解决了复方制剂中维生素 B₂ 降解产物的检测难题, 具有高专属性、灵敏度和实用性, 为药品全生命周期质量控制提供了关键技术支撑。

参考文献

- 1 Yamabe S, Tsuchida N, Yamazaki S. A DFT study on the degradation mechanism of vitamin B₂[J]. *Food Chem*, 2022, 4: 100080. DOI: [10.1016/j.fochms.2022.100080](https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100080).
- 2 Ahmad I, Fasihullah Q, Vaid FHM. Effect of light intensity and wavelengths on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2005, 82(1): 21–27. DOI: [10.1016/j.jphotobiol.2005.08.004](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.08.004).
- 3 张红霞, 黄荣清, 肖炳坤, 等. 核黄素、光黄素、光色素及其他有关物质的高效液相色谱测定 [J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(1): 67–70. [Zhang HX, Huang RQ, Xiao BK, et al. HPLC determination of riboflavin, lumiflavin, lumichrome and other related substances[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2010, 30(1): 67–70.] DOI: [10.16155/j.0254-1793.2010.01.038](https://doi.org/10.16155/j.0254-1793.2010.01.038).
- 4 薛晶, 李娅萍, 南楠, 等. 维生素 B₂ 片的一致性评价方法研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2018, 35(8): 1253–1257. [Xue J, Li YP, Nan N, et al. Discussion on consistency evaluation method of vitamin B₂ tablets[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2018, 35(8): 1253–1257.] DOI: [10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.08.031](https://doi.org/10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.08.031).
- 5 Iqbal A, Zubair A, Sheraz MA, et al. Stability-indicating spectrofluorimetric method for the assay of riboflavin and photoproducts: Kinetic applications[J]. *Luminescence*, 2018, 33(6): 1070–1080. DOI: [10.1002/bio.3510](https://doi.org/10.1002/bio.3510).
- 6 国家食品药品监督管理总局. 国家药品标准 . YBH01612009[S]. 2009.
- 7 国家食品药品监督管理总局. 国家药品标准 . YBH08212009[S]. 2009.
- 8 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020: 1475–1476, 1517–1518.
- 9 EP11.0[S]. 2022: 3881–3883.
- 10 BP2024[S]. 2024: 824–826.
- 11 房冉, 王晗, 陈玉双, 等. HPLC 检测维生素 B₂ 片中有关物质的方法优化 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 37(2): 2764–2769. [Fang R, Wang H, Chen YS, et al. Improvement of content determination for related substances in vitamin B₂ tablets by HPLC[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2022, 37(22): 2764–2769.] DOI: [10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.22.013](https://doi.org/10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.22.013).
- 12 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 中华人民共和国国家标准 BG1903.10–2015[S]. 2015.
- 13 揭琴丰, 邱伟华, 王杉. 葡萄糖酸亚铁的国内外法规标准概述 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(23): 335–339. [Jie QF, Qiu WH, Wang S. Overview of domestic and overseas regulations and standards of ferrous gluconate[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(23): 335–339.] DOI: [10.13386/j.issn1002-0306.2017.23.061](https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.23.061).

收稿日期: 2024 年 09 月 13 日 修回日期: 2024 年 11 月 20 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳