

## 超临界流体色谱同时测定维生素 B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 和烟酰胺

郭亚东

(昆明医学院药理学系, 云南 昆明 650031)

**摘要** 采用超临界流体色谱同时定量测定维生素制剂中维生素 B<sub>2</sub>(核黄素)、维生素 B<sub>3</sub>(烟酸)和烟酰胺的含量。在 CO<sub>2</sub> 流动相中添加 15%(体积分数)的甲醇(含 0.1% 二乙胺),于填充柱上分离,检测波长为 268 nm。上述 3 种维生素在测定范围内,其浓度与相应的峰面积呈良好的线性关系( $r > 0.999$ ),平均回收率为 97.3%~102.3%,5 min 即可完成分析。其日内和日间峰面积测定的相对标准偏差(RSD)小于 1.5%。该方法简便,样品前处理简单,可用于上述 3 种维生素的快速分析。

**关键词** 超临界流体色谱 核黄素 烟酸 烟酰胺 维生素制剂

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2003)06-0603-03

## Simultaneous Determination of Riboflavin, Nicotinic Acid and Nicotinamide by Supercritical Fluid Chromatography

GUO Yadong

(Faculty of Pharmacy, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

**Abstract**: Simultaneous determination of vitamin B<sub>2</sub>(riboflavin), B<sub>3</sub>(nicotinic acid) and nicotinamide was carried out with packed-column supercritical fluid chromatography(SFC). The mobile phase was a mixture of CO<sub>2</sub> and methanol with added 0.1% of diethylamine in a ratio of 85:15 at a flow rate of 2.5 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 268 nm. The calibration curves were linear in the assay range( $r > 0.999$ ). The recoveries were between 97.3% - 102.3%. The analysis was completed within 5 min. The values of intra-day and inter-day RSD of peak area were all less than 1.5%. This method has simple sample preparation procedures, fast analysis time, and excellent resolution.

**Key words**: supercritical fluid chromatography; riboflavin; nicotinic acid; nicotinamide; vitamin preparation

水溶性维生素对人们的生长发育和健康有着重要作用。人们除了从水果和蔬菜中摄取外,还从添加了维生素的食品和复合维生素制剂中补充人体的需要,因此有必要建立快速、稳定的分析方法用于其含量的测定。对维生素制剂中维生素 B<sub>2</sub>(核黄素)、维生素 B<sub>3</sub>(烟酸)和烟酰胺测定的方法主要是高效液相色谱法<sup>[1~4]</sup>,采用该方法虽可取得较好的结果,但其分析时间长,样品前处理麻烦。毛细管电泳<sup>[5~7]</sup>、胶束电动毛细管电泳<sup>[8,9]</sup>等方法也可用于其含量测定。本文建立了用超临界流体色谱同时测定这 3 种维生素的方法,该方法样品前处理简单、分析时间短、分离好,结果令人满意。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

超临界流体色谱仪: Gilson Model SF<sub>3</sub> 系统(英

国)。核黄素和烟酰胺对照品购自 Lancaster 化学公司(英国),烟酸购自 Acros 公司(英国),甲醇为高效液相色谱纯,二乙胺为分析纯,CO<sub>2</sub> 为超临界流体色谱纯。

#### 1.2 色谱条件

色谱柱: Cyan(5 μm, 4.6 mm i.d. × 250 mm, 英国); 柱温: 50 °C; 紫外检测器配有高压检测池,其检测波长为 268 nm; 进样装置: 带有 10 μL 进样阀的自动进样器; 流动相操作压力: 20 MPa。

### 2 结果与讨论

#### 2.1 流动相组成对分离的影响

只用 CO<sub>2</sub> 或者 CO<sub>2</sub> 加甲醇作流动相时,这 3 种维生素不能完全分开; 当在甲醇中加入少量二乙胺后,其分离情况得到大大改善。表 1 给出了当流动相的流速一定,在 CO<sub>2</sub> 中分别添加 10% 和 15%(均

为体积分数)的甲醇,并在这两种体积分数下的甲醇中各分别添加 0.1% 和 0.5% (均为体积分数)的二乙胺时上述 3 种维生素的保留时间,可见流动相中

表 1 流动相组成对 3 种维生素的保留时间的影响  
Table 1 Influence of the compositions of mobile phases on the retention times of the vitamins

Component of mobile phase		Retention times/min		
$\varphi$ methanol/%	$\varphi$ DEA/%	nicotinamide	nicotinic acid	riboflavin
10	0.1	3.019	3.437	7.173
	0.5	2.608	2.958	8.740
15	0.1	2.548	2.763	3.920
	0.5	1.906	2.088	4.798

DEA: diethylamine.

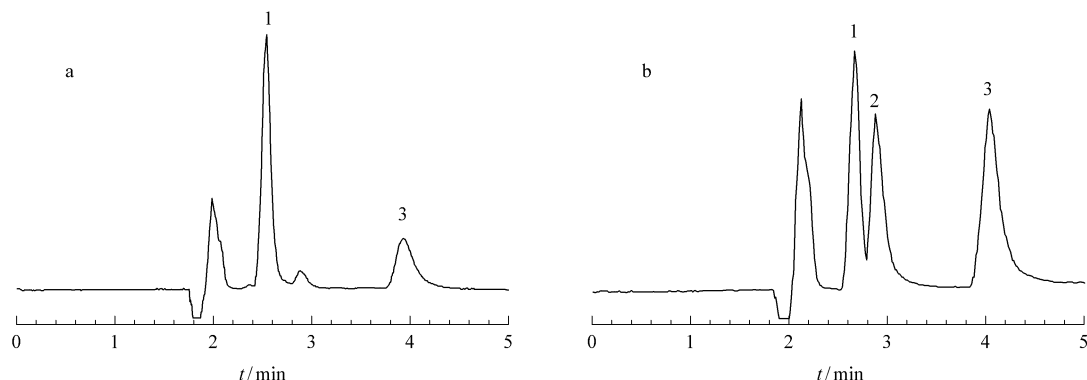


图 1 样品(a)和对照品(b)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of sample (a) and reference standards (b)

1. nicotinamide; 2. nicotinic acid; 3. riboflavin.

## 2.3 线性关系考察

将 3 种维生素对照品各取适量,精密称定后用甲醇稀释成含核黄素 3~30 mg/L、烟酸和烟酰胺各 5~50 mg/L 的混合标准溶液。取 6 个不同浓度的对照品溶液按上述实验条件各进样 3 次,记录其色谱图;以对照品质量浓度  $X$  (mg/L) 为横坐标,对应的峰面积  $Y$  为纵坐标,绘制标准曲线,并求出回归方程,结果见表 2。可见上述 3 种维生素在适用浓度范围内具有良好的线性关系。

表 2 回归方程和相关系数

Table 2 Calibration equations and correlation coefficients

Vitamin	Calibration equation	Correlation coefficient
Nicotinamide	$Y = 472.71X + 99.57$	0.999 3
Nicotinic acid	$Y = 463.29X - 531.69$	0.999 3
Riboflavin	$Y = 1124X - 632.16$	0.999 2

$Y$ : peak area;  $X$ : mass concentration (mg/L).

## 2.4 精密度及稳定性试验

通过测定上述 3 种维生素的日内和日间的峰面积,考察分析方法的精密度和样品的稳定性。在上述实验条件下,连续进样 8 次,核黄素、烟酸和烟酰胺峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 1.11%, 0.85% 和 0.88%。放置 1 d 后测定其峰面积的 RSD 分别为 1.11%、0.60% 和 0.71%。精密度和稳定性

甲醇和二乙胺的含量对保留时间的影响很大。本文将 15% 的甲醇(含有 0.1% 的二乙胺)添加到  $\text{CO}_2$  中作流动相,可使 3 种维生素的同时分析在短时间内完成,分离结果令人满意。

## 2.2 流动相流速对分离的影响

当流动相组成为  $\text{CO}_2$  加 15% 的甲醇(含有 0.1% 的二乙胺)时,将流动相流速从  $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  提高到  $3.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,对这 3 种维生素的色谱峰形和分离情况都没有太大的影响,最后出峰的维生素  $\text{B}_2$  的保留时间仅从 5.11 min 降为 3.37 min。本文采用  $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速进行分析,其色谱分离情况见图 1。

均令人较为满意。

## 2.5 回收率试验

精密称取已知含量的同一样品 3 份,分别加入不同量的 3 种维生素对照品,按“2.6”节样品测定项下的实验步骤进样分析,计算其回收率。结果核黄素、烟酸和烟酰胺的回收率(平均值  $\pm$  SD)分别为:  $(97.3 \pm 1.34)\%$ ,  $(102.3 \pm 1.25)\%$  和  $(98.0 \pm 1.36)\%$  (具体结果见表 3)。

表 3 回收率试验结果

Table 3 Recoveries of the method

Vitamin	Added/mg	Found/mg	Recovery/%
Riboflavin	0.050	0.048	96.0
	0.075	0.074	99.0
	0.100	0.970	97.0
Nicotinic acid	0.125	0.127	101.6
	0.200	0.205	102.5
	0.250	0.260	104.0
Nicotinamide	0.125	0.124	99.1
	0.200	0.196	98.0
	0.250	0.241	96.4

## 2.6 样品测定

取昆明振华制药厂生产的复合维生素 E (批号 990701) 5 片,碾碎后用 5 mL 甲醇溶解并超声提取

20 min, 用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 适当稀释后在上述色谱条件下进样分析, 结果见表 4。

表 4 药片中维生素含量的测定结果 ( $n=4$ )

Table 4 Determination of the vitamins in commercial tablets ( $n=4$ )

Vitamin	Label claimed/mg	Measured/mg	RSD/%
Nicotinamide	10.00	9.88	0.80
Nicotinic acid	0	0	0
Riboflavin	1.50	1.46	4.36

## 2.7 讨论

(1) 由于烟酸和烟酰胺的化学结构及性质相近, 因此当以 CO<sub>2</sub> 加甲醇作流动相时, 这两种维生素难以完全分开, 且维生素 B<sub>2</sub> 的保留时间太长, 若在流动相中加入 0.1% 的二乙胺, 这 3 种维生素可以完全分开, 且保留时间缩短, 能够满足快速分析的要求。通过调节甲醇和二乙胺的体积分数, 可使色谱峰形得到改善。

(2) 分别以水、甲醇和乙醇作溶剂提取样品, 结果以甲醇溶剂提取效果最好。样品用甲醇溶解并超声提取后, 直接进样分析, 不需要复杂的前处理。

(3) 通过测定回收率、精密度并考察线性关系, 表明该方法可以用于同时测定这 3 种维生素, 结果

令人满意。

## 参考文献:

- [1] Hurtado S A, Nogues M T V, Pulido M I, Font A M. J Chromatogr A, 1997, 778: 247
- [2] Wills R B H, Shaw C G, Day W R. J Chromatogr Sci, 1977, 15: 62
- [3] Lu Guorong, Wang Guizhen. Journal of Chinese Pharmaceutical University, 1995, 26(3): 177  
陆帼蓉, 王桂珍. 中国药科大学学报, 1995, 26(3): 177
- [4] Shao Hongmei, Sun Shuqin, Xu Hongjuan. Chinese Journal of Chromatography, 1996, 14(3): 235  
邵红梅, 孙书芹, 徐红娟. 色谱, 1996, 14(3): 235
- [5] Jegle U. J Chromatogr A, 1993, 652: 495
- [6] Boonkerd S, Detaevemier M R, Michotte Y. J Chromatogr A, 1997, 670: 209
- [7] Fotsing L, Fillet M, Chiap P, Hubert P, Cromen J. J Chromatogr A, 1999, 853: 391
- [8] Fujrwaru S, Iwasa S, Honda S. J Chromatogr A, 1988, 447: 133
- [9] Li Xiaoge, He Jinlan. Chinese Journal of Chromatography, 1997, 15(2): 156  
李小戈, 何金兰. 色谱, 1997, 15(2): 156

## 《色谱》重要通知

本刊现提供《色谱》网上查阅服务, 欢迎读者广为利用。

读者现可在本刊“期刊目录”网页 <http://www.sepu.dicp.ac.cn/sepu/qkml.htm> 查阅本刊 2000 年至今发表的全部文章目录、摘要以及 1994~2002 年发表的绝大部分文章的全文 (PDF 格式, 暂时免费浏览)。阅读全文请安装 Acrobat Reader 4.0 (中文版) 或以上版本软件。该数据库将不断加以完善, 欢迎读者提出宝贵意见。

本刊“征稿简则”请见: <http://www.bjb.dicp.ac.cn/sepu/zgjz.htm>

本刊“修改稿注意事项”请见: <http://www.bjb.dicp.ac.cn/sepu/xgsx.htm>

《色谱》编辑部  
2003 年 11 月