

HPLC 法测定药渣中维生素 B₁₂ 残留量

张金霞 史慧琴 李 谦 徐 强

宁夏金维制药股份有限公司, 银川 750101

摘要 建立了高效液相色谱法测定药渣中维生素 B₁₂ 残留量的检测方法。采用紫外检测器, 调节波长 361 nm, 柱温 35 ℃, 用 28% 甲醇水为流动相, 以 0.8 mL/min 的流速进行洗脱, 以外标法计算含量。药渣中维生素 B₁₂ 残留量在 2.0 ~ 12.0 μg/mL 范围内与峰面积具有良好的线性关系, 线性方程为 $y=30\ 431x+250.87$, 相关系数 R^2 为 0.999 8, 专属性和回收试验符合要求。该方法简便、灵敏、准确, 适用于药渣中维生素 B₁₂ 残留量的测定。

关键词 HPLC 法; 维生素 B₁₂; 药渣

在维生素 B₁₂ 等药品发酵生产中能产生大量菌渣, 作为抗生素菌渣通常需要做无害化处理, 而维生素 B₁₂ 发酵菌渣属于环境低危害性, 并且由于药渣中含有一定量的残留维生素 B₁₂ 可以用做饲料添加成分或菌体蛋白进行再加工^[1]。因此测定药渣中维生素 B₁₂ 残留量对产品再加工的质量和安全性非常重要。

1 仪器与试剂

1) 岛津 LC2010 高效液相色谱仪, 日本岛津。TU-1900 紫外-可见分光光度计, 购自北京普析通用仪器有限公司。

2) 维生素 B₁₂ 对照品(购自中国药品生物制品检定所), 甲醇(购自天津康巢生物医药有限公司), 冰乙酸、亚硝酸钠(购自天津市凯通化学试剂有限公司)。

2 试验方法

1) 色谱条件。Waters C18 柱, 波长 361 nm^[2], 流速 0.8 mL/min, 柱温 35 ℃。

2) 溶液的配制。

①标准工作液配制。准确称取 0.1 g 维生素 B₁₂ 对照品, 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 加适量 25% 乙醇溶液使其溶解, 并稀释定容至刻度, 摇匀, 作为贮备液。吸取贮备液 1.00 mL 于 100 mL 棕色容量瓶,

用水稀释定容至刻度, 摇匀、备用。

②供试液的制备。称 2 ~ 3 g 菌渣到 25 mL 容量瓶中, 加水至约 10 mL, 超声波震荡, 然后加冰乙酸 1 mL, 亚硝酸钠(12.5%) 1 mL, 加 2 ~ 3 滴消泡剂, 摇匀, 在沸水中加热 30 min, 冷却、定容、滤纸过滤, 滤液过 0.45 μm 滤球, 取滤液。

3) 系统适用性试验。取上述标准工作液 20 μL, 连续进样 5 次。考察理论塔板数 $\geq 2\ 000$ 、拖尾因子小于 1.5, 峰面积相对标准偏差应小于 2.0%。

4) 线性关系考察。分别精密吸取上述贮备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 用水稀释定容至刻度, 摇匀。制成浓度分别为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 μg/mL 的溶液, 分别取上述溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 以对照品溶液浓度为横坐标, 维生素 B₁₂ 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。相关系数 R^2 应大于 0.999。

5) 精密度。取上述浓度为 6.0 μg/mL 的溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算 6 次测试的峰面积的相对标准偏差应不大于 2.0%。

6) 准确度^[3]。分别精密吸取贮备液 0.4 mL 至 9 个 100 mL 容量瓶中(已知浓度为 4.0 μg/mL), 平均分成 3 组, 再向 3 组中分别精密加入 0.8、1.0、1.2 mL 贮备液(已知浓度分别为 8.0、10.0、12.0

收稿日期: 2016-11-30

张金霞, 女, 1985 年生, 助理工程师。

μg/mL), 其相对浓度分别为 80%、100%、120%, 分别测定计算。回收率应在 100% ± 5% 范围内^[4]。

3 结果与分析

1) 系统适用性试验。按上述测定的理论塔板、分离度、拖尾因子均在控制范围内, 供试品连续 5 次测定峰面积的 RSD 值为 0.06%, 重复性良好, 如表 1。

2) 线性关系考察。根据表 2 绘制标准曲线(如图 1), 线性回归方程为 $y=30\ 431x+250.87$, 相关系数 $R^2=0.999\ 8$, 即在 2.0 ~ 12.0 μg/mL 范围具有良好的线性关系。

3) 精密性。取浓度为 6.0 μg/mL 的溶液 20 μL

表 1 系统适用性试验数据统计

进样次数	理论塔板数	拖尾因子	对照品峰面积	面积平均值	RSD
1	6 896	1.05	284 293		
2	6 965	1.07	284 494		
3	6 048	1.06	284 267	284 397	0.06%
4	6 792	1.07	284 646		
5	6 866	1.05	284 286		

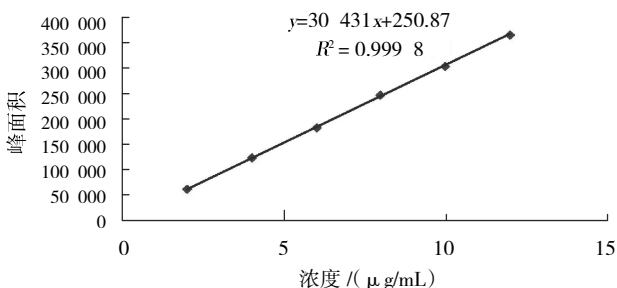


图 1 维生素 B₁₂ 线性关系曲线

注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算 6 次测试的峰面积的相对标准偏差为 0.13%, 重复性良好。

4) 准确度。分别精密吸取贮备液 0.4 mL 至 9 个 100 mL 容量瓶中(已知浓度为 4.0 μg/mL), 平均分成 3 组, 再向 3 组中分别精密加入 0.8、1.0、1.2 mL 贮备液(已知浓度分别为 8.0、10.0、12.0 μg/mL), 其相对浓度分别为 80%、100%、120%, 分别测定计算。回收率为 99.91%, 满足行业标准中回收率要求。

4 讨论与小结

药品生产行业中对生产中药渣无明确的处理方式进行合理处理, 作为生产企业, 能尽力做到将产品副产物无害化、效益最大化是初衷。按照菌体蛋白中维生素 B₁₂ 残留量进行控制和讨论。维生素 B₁₂ 含量作为有效成分是关键质量指标。本文采用高效液相色谱法测定药渣中维生素 B₁₂ 的残留量, 精密性及回收率均达到要求, 试验中采用 28% 甲醇溶液有效地降低了流动相多组分处理难度大的风险, 同时得到了良好的柱效和分离效果。采用维生素 B₁₂ 在 361 nm 有最大吸收波长, 利用紫外检测器进行检测, 具有良好专属性。

目前, 采用 HPLC 法测定维生素 B₁₂ 含量的文献报道很多。本文采用高效液相色谱法测定发酵药渣中维生素 B₁₂ 残留量分离效果良好; 线性考察回归方程为 $y=1\ 141.6x-1.78$, 相关系数 $R^2=0.999\ 8$, 即在 2.0 ~ 12.0 μg/mL 范围内的线性关系良好;

表 2 重复性测试结果

进样次数	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD/%
苯峰面积	181 462	181 920	181 328	181 546	181 425	181 821	181 583.7	0.13

表 3 准确度测定结果

已知浓度/(μg/mL)	添加水平/%	添加浓度/(μg/mL)	测得浓度/(μg/mL)	回收率/%	平均回收率/%	RSD(n=9)/%
4.0	80	8.0	12.01	100.08		
4.0	80	8.0	12.00	100.00		
4.0	80	8.0	11.98	99.83		
4.0	100	10.0	13.97	99.79		
4.0	100	10.0	13.98	99.86	99.91	0.11
4.0	100	10.0	13.97	99.79		
4.0	120	12.0	15.99	99.94		
4.0	120	12.0	16.01	100.06		
4.0	120	12.0	15.98	99.88		