

高效液相色谱法测定黄疸患婴血清中维生素 B₂ * Determination of Vitamin B₂ in the Serum of Icterus Diseased Infant by the High Performance Liquid Chromatography

周琳¹, 莫建光¹, 黄岛平¹, 陈秋虹¹, 陈玉君²

ZHOU Lin¹, MO Jian-guang¹, HUANG Dao-ping¹, CHEN Qiu-hong¹, CHEN Yu-jun²

(1. 广西分析测试中心, 广西南宁 530022; 2. 南宁铁路医院, 广西南宁 530001)

(1. Guangxi Research Center for Analysis and Test, Nanning, Guangxi, 530022, China;
2. Guangxi Nanning Railway Hospital, Nanning, Guangxi, 530001, China)

摘要: 采用 Oasis C₁₈ 小柱吸附富集血清中的维生素 B₂, 除去蛋白质等杂质的前处理手段, 以 Phenomenex Luna C₁₈ 柱为分析柱, 甲醇: 0.02mol/L 乙酸铵为 3: 7 为流动相, 荧光检测器(激发波长 425nm, 发射波长 525nm) 测定维生素 B₂ 含量。方法的平均回收率为 98.0%, RSD 为 1.2%, 最低检出浓度为 0.8ng/ml。本方法操作简便, 能快速、准确地检测人体血清中维生素 B₂ 含量。

关键词: 高效液相色谱法 维生素 B₂ 血清

中图分类号: O657.72; TQ466.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2006)S0-0411-02

Abstract: The article created a method for determination of VitB₂ in serum of icterus diseased infant by HPLC. Before the determination, absorb pregnant VitB₂ in serum through the Oasis C₁₈ column, removing the impurity of hemocyanin and so on. Taking the phenomenex Luna C₁₈ as the analytical column, the methanol: 0.02mol/L aminum acetate = 3: 7 as the mobile phase, the fluoresce detector (Excitation wavelength was 425 nm; Emission wavelength was 525nm). The method average recovery is 98.0%, RSD = 1.2%, and the lowest certified concentration is 0.8ng/ml. The method is simple, rapid and accurate in determining VitB₂ in serum of human body.

Key words: HPLC, VitB₂, serum

维生素 B₂ (VitB₂) 是呼吸链的成分之一, 人们发现人体内 VitB₂ 浓度下降, 可使化学致癌物质的作用增强^[1]。光疗是治疗新生儿黄疸的常用方法, 但同时不可避免地造成人体内 VitB₂ 下降。测定 VitB₂ 常用荧光比色法和高效液相色谱法, 而血中 VitB₂ 的测定国内曾见有电修饰电极法^[2]报道。本文采用 Oasis C₁₈ 小柱将血清中的 VitB₂ 富集, 洗去蛋白质杂质后, 用 40% 甲醇将 VitB₂ 洗脱, 用高效液相色谱法 (HPLC) 法检测该方法快速、灵敏, 回收率高, 重现性好, 结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国 Waters 公司出品的 HPLC 仪配 RF-535 荧光检测器, U6K 进样器, 600 泵, Phenomenex Luna C₁₈ (250mm × 4.6mm 5μm) 分析柱, 金科色谱工作站, Oasis C₁₈ 小柱。

甲醇(色谱纯), 乙酸铵(分析纯), VitB₂ 标准品 (Sigma 公司出品), 盐酸(分析纯), 去离子水。

VitB₂ 标准品 (Sigma 公司出品), 血清样本 (由南宁铁路医院提供)。

1.2 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Luna C₁₈ (250mm ×

4.6mm 5 μ m),流动相:甲醇:0.02mol/L 乙酸铵为3:7;流速:1.0ml/min;检测波长:激发波长425nm,发射波长525nm。

1.3 样品前处理

将 Oasis C₁₈小柱先后用 1ml 甲醇和 1ml 去离子水进行活化。吸取患婴血清 0.5ml,注入已处理好的小柱内,加压缓慢将血清挤出柱外, VitB₂ 被吸附在小柱上,用 1ml pH 值为 6.86 磷酸盐缓冲液洗去残留血清和其他杂质,最后用 0.5ml 40% 甲醇洗脱,洗脱液即为上机液。

1.4 标准工作溶液制备

精密称取 VitB₂ 标准品 10mg 用 0.1mol/L 盐酸溶液定容至 100ml 作为贮备液 I,吸取贮备液 I 1ml 定容至 100ml 作为贮备液 II,再吸取贮备液 II 1ml 定容至 25ml 作为工作液,此工作液 VitB₂ 含量为 40ng/ml。

1.5 测定方法

分别吸取 20 μ l 上机液和标准工作液注入高效液相色谱仪中,测出 VitB₂ 峰面积,外标法计算血清中 VitB₂ 含量。本方法最低检出浓度为 0.8ng/ml。

2 结果与分析

2.1 前处理最佳方法选择

2.1.1 蛋白沉淀法试验

吸取血清加入 30% 三氯醋酸混匀,于沸水浴中加热 20min,高速冷冻离心后取上清液。该法过程长,操作步骤多,稀释倍数大, VitB₂ 易损失,结果不稳定。重现性差。

2.1.2 VitB₂ 碱性转化为光黄素法试验

该法可以增高响应值,但是,用氯仿萃取液乳化现象较严重,萃取不完全,回收率低。

2.1.3 Oasis C₁₈ 小柱前处理方法试验

采用 Oasis C₁₈ 小柱吸附 VitB₂,血清中易污染分析柱并影响色谱分离和检测灵敏度的蛋白质和极性杂质被分离出来,使得 VitB₂ 色谱峰峰形单一,变窄(见图 1)且柱效、柱压稳定,在连续测定了 200 多份血清样本后柱效尚能保持良好。所以我们选择此法。

2.2 Oasis C₁₈ 小柱对 VitB₂ 的吸附能力和解吸水平考察

2.2.1 吸附能力试验

将 50ng、100ng、150ng、200ng、250ng、300 ng VitB₂ 分别注入 Oasis C₁₈ 小柱中,按本法处理测定的结果表明,Oasis C₁₈ 小柱对 VitB₂ 有很好的吸附能力,至 300 ng 均未见泄漏。该吸附量已大大超过每

毫升人体血清中 VitB₂ 含量水平^[3],满足本实验要求。

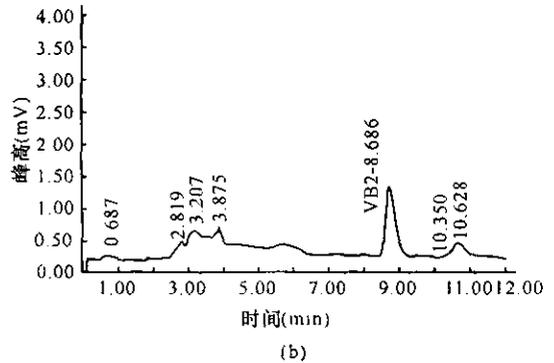
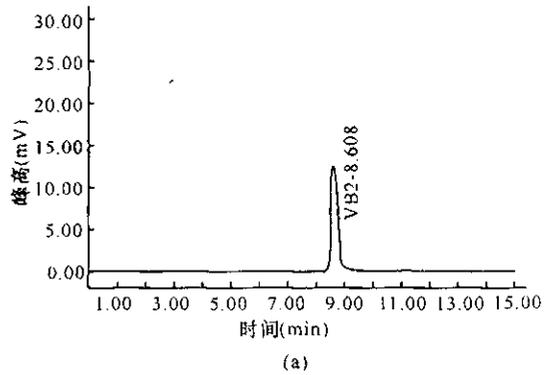


图1 标准品(a)和样品(b)色谱图

2.2.2 解吸水平试验及洗脱液浓度选择

以 150ng 为吸附量,用 10%、20%、30%、40%、50%~100% 甲醇溶液为洗脱液,按本法操作收集洗脱液进行测定的结果表明,用 40% 甲醇溶液作为洗脱液,洗脱率最高(>95%,见图 2)且 VitB₂ 峰形对称,尖锐。故选用 40% 甲醇溶液作为洗脱液。

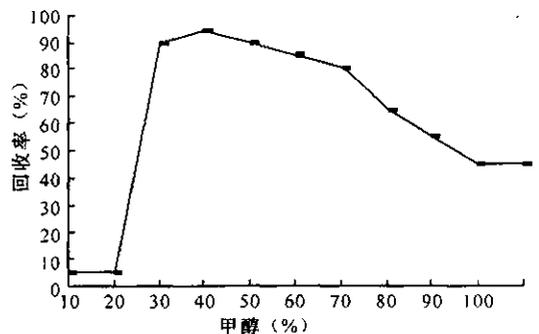


图2 解吸曲线

2.3 线性关系考察

分别吸取 VitB₂ 标准贮备液 II 1.0ml、5.0ml、10.0ml、15.0ml、20.0ml 定容至 100ml 配成浓度为 10ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、150ng/ml、200ng/ml 标准系列,在上述色谱条件下进样测定,由 VitB₂ 浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)绘制工作曲

(下转第 415 页)

示, 6 批样品中维生素 B₆ 的平均含量为 4.81 ~ 4.92mg/g, 相对平均偏差为 0.10% ~ 0.93%。

表 1 样品中维生素 B₆ 含量测定结果

样品批号	维生素 B ₆ 含量(mg/g)			相对平均 偏差(%)
	1	2	平均值	
20041120	4.85	4.90	4.88	0.51
20041121	4.89	4.80	4.84	0.93
20041122	4.90	4.91	4.90	0.10
20060402	4.82	4.88	4.85	0.62
20060403	4.79	4.83	4.81	0.42
20060404	4.87	4.95	4.92	0.71

3 结束语

本品为中西复方制剂, 成分比较多, 而且比较复杂, 为了排除杂质干扰, 必须选择一个符合的维生素 B₆ 含量测定的色谱条件。我们在试验过程中曾采用了多种流动相系统, 如乙腈-磷酸盐溶液、乙腈-水、甲醇-磷酸盐溶液、乙腈-醋酸溶液等, 分离效果均不理想, 采用本文所述流动相, 即甲醇-0.01% 三乙醇溶液(磷酸调 pH 值至 2.5)=1:99, 分离效果最佳。

参考文献[4]的方法, 我们曾分别采用甲醇、

50% 甲醇、水溶液、流动相四种溶剂对制剂进行超声提取。结果采用水溶液、流动相提取, 含量测定结果高于甲醇、50% 甲醇超声提取, 因为本品中含有中药成分, 采用水作为溶剂制备的样品溶液容易霉变、保存时间较短, 故采用流动相作为提取溶剂。

我们取样品 0.5g, 依法操作, 对不同超声时间的提取效果进行考察, 结果超声提取 30 min, 即可。

总之, 本方法简便、准确, 专属性强, 灵敏度高, 可以作为控制产品质量的指标之一。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂[S]. 第 19 册, 1998, 166.
- [2] 马郑红, 朱芸, 等. HPLC 测定脑络通胶囊中盐酸托哌酮的含量[J]. 华西药理学杂志, 2005, 21(1): 89-91.
- [3] 王锦, 张丽梅, 等. 高效液相色谱法测定脑络通胶囊中丹参酮 II A 的含量[J]. 解放军药学报, 2002, 18(3): 184-186.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

(上接第 412 页)

线, 得回归方程 $Y = 1554X + 1357$, $r = 0.999$, 浓度在 1~200ng/ml 范围线性良好。

2.4 精密度试验

连续进标准溶液, 测定 6 次, 由峰面积计算精密度得 $RSD = 1.2\%$

2.5 回收率试验

将标准溶液定量加入已测知含量的正常人血清, 制备 5 份, 按本法操作测定含量, 计算回收率的结果见表 1。

表 1 VitB₂ 回收率试验结果(n=5)

序号	VitB ₂ 含量(ng/ml)				回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
	样本含量	加入标准含量	测得总含量	回收含量			
1	15.4	20.0	34.4	19.0	95.0	98.0	3.8
2	15.4	20.0	34.1	18.7	93.5		
3	15.4	20.0	35.1	19.7	98.5		
4	15.4	20.0	35.6	20.2	101		
5	15.4	20.0	35.8	20.4	102		

从表 1 可知, 回收率为 93.5% ~ 102%, 平均 98.0%, 方法的准确性较高。

3 结论

本方法的平均回收率为 98.0%, RSD 为 3.8%, 最低检出浓度为 0.8ng/ml, 可以快速、简便、准确地检测人体血清中 VitB₂ 含量。可以为人体血液研究等提供可靠、准确的数据。

参考文献:

- [1] 刘景民. 维生素 B₂ 在人体中的作用[J]. 实用中西医结合杂志, 1996, 9(12): 720.
- [2] 张静, 刘书田. 电修饰电极对人体全血、血清及负荷 VitB₂ 尿样中 VitB₂ 的测定[J]. 药物分析杂志, 1991, 11(3): 131-135.