

中图分类号: R927.2; R977.2⁺3 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)13-0090-03
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.13.021



高效液相色谱法测定肠内营养混悬液中维生素C含量*

金舒, 申兰慧[△]

(江苏省无锡市药品安全检验检测中心, 江苏 无锡 214028)

摘要:目的 建立测定肠内营养混悬液中维生素C含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Acutfex YS-NH₂ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-1% 枸橼酸水溶液(80:20, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。结果 维生素C的质量浓度在 1.01~20.16 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 5, n=6$); 检测限为 0.13 ng/mL, 定量限为 0.42 ng/mL; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0% ($n=6$); 平均回收率为 98.15%, RSD 为 1.34% ($n=9$)。5 批样品中维生素C的含量为 120.18~233.95 μg/mL。结论 该方法操作简便、结果准确、灵敏度高, 可用于肠内营养混悬液中维生素C的含量测定。

关键词: 高效液相色谱法; 肠内营养混悬液; 维生素C; 含量测定

Content Determination of Vitamin C in Enteral Nutritional Suspension by HPLC

JIN Shu, SHEN Lanhui

(Jiangsu Wuxi Institute of Drug Control, Wuxi, Jiangsu, China 214028)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of vitamin C in Enteral Nutrition Suspension. **Methods** The chromatography column was Acutfex YS-NH₂ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-1% citric acid aqueous solution (80:20, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of vitamin C was 1.01-20.16 μg/mL ($r=0.999\ 5, n=6$), the limit of detection was 0.13 ng/mL, and the limit of quantification was 0.42 ng/mL. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.0% ($n=6$). The average recovery of vitamin C was 98.15% with an RSD of 1.34% ($n=9$). The content of vitamin C in five batches of samples was in the range of 120.18-233.95 μg/mL. **Conclusion** The method is simple, accurate, and highly sensitive, which can be used for the content determination of vitamin C in Enteral Nutrition Suspensions.

Key words: HPLC; Enteral Nutrition Suspension; vitamin C; content determination

肠内营养混悬液通常含维生素、氨基酸及多种微量元素, 用于临床肠内营养支持。维生素C又名抗坏血酸, 能阻止亚硝胺形成, 具有抗肿瘤和增强机体抵抗力的作用^[1]。测定食品和药品中维生素C含量的方法有滴定法^[2-4]、电化学法^[5-7]、分光光度法^[8-11]、离子交换色谱法^[12-13]等。目前, 肠内营养混悬液执行标准中采用滴定法测定维生素C含量, 但需在30 min内完成测定, 操作条件难以控制, 稳定性及专属性欠佳。为此, 本研究中针对维生素C在水溶液及碱性条件下易被氧化的特性, 优化样品处理方法, 建立测定肠内营养混悬液中维生素C含量的高效液相色谱法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), 配有二极管阵列检测器(DAD); Agilent 1290 型超

高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); X205 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司, 精度为 0.01 mg); KH-300E 型超声仪(昆山禾创超声仪器有限公司, 功率为 300 W, 频率为 40 kHz); 纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂

草酸、枸橼酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲醇(色谱纯, 德国 Honeywell 公司); 水为超纯水; 维生素C对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 100425-202105, 含量为 100.00%); 肠内营养混悬液(某厂, 批号分别为 101184263, 101178661, 101177145, 101184257, 101179536)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Acutfex YS-NH₂ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-1% 枸橼酸水溶液(80:20, V/V);

*基金项目: 江苏省市场监督管理局科技计划项目[KJ2022029]。

第一作者: 金舒, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药品检验, (电子信箱)kingjinshu2012@126.com。

[△]通信作者: 申兰慧, 女, 硕士研究生, 主任药师, 研究方向为药品检验, (电子信箱)5687956848@qq.com。

流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

取维生素C对照品10 mg,精密称定,置100 mL棕色容量瓶中,加水10 mL使溶解,再加1%草酸无水乙醇(临用新制)定容,作为对照品贮备液;精密量取5 mL,置50 mL棕色容量瓶中,加1%草酸无水乙醇(临用新制)定容,即得对照品溶液。精密量取样品1 mL,置25 mL棕色容量瓶中,加1%草酸无水乙醇(临用新制)20 mL,超声3 min,加1%草酸无水乙醇定容,摇匀,2~8℃静置30 min,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。取维生素C的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:精密吸取2.2项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有色谱峰出现,表明方法专属性良好。色谱图见图1。

线性关系考察:精密吸取2.2项下对照品贮备液适量,加1%草酸无水乙醇(临用新制)稀释成每1 mL分别含维生素C 1.01, 2.02, 5.04, 10.08, 15.12, 20.16 μg的系列对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以维生素C质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 18\,926X + 3\,901.9$ ($r = 0.999\,5, n = 6$)。结果表明,维生素C的质量浓度在1.01~20.16 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定:精密吸取2.2项下对照品贮备液适量,加1%草酸无水乙醇(临用新制)稀释为系列质量浓度,按2.1项下色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)为3时的质量浓度为检测限,以 S/N 为10时的质量浓度为定量限。结果检测限为0.13 ng/mL,定量限

为0.42 ng/mL。

精密度试验:精密吸取2.2项下对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果的 RSD 为0.21% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为101184263)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于室温放置0, 2, 4, 8, 12, 24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为0.96% ($n = 6$),表明维生素C于室温放置24 h内稳定性良好。

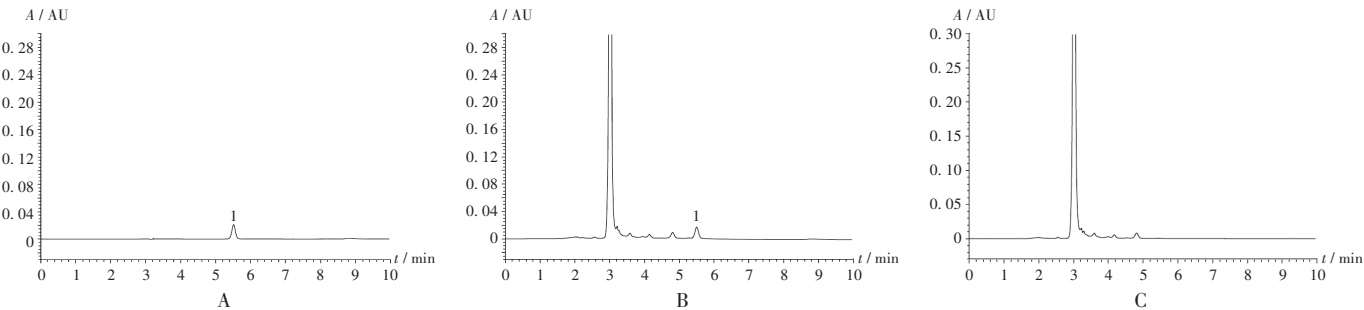
重复性试验:取样品(批号为101184263)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果的 RSD 为0.68% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取0.5 mL已知含量的样品9份,分别准确加入相当于各组分含量80%, 100%, 120%的对照品贮备液适量,各3份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n = 9$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 9$)					
样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
57.1	34.0	89.7	95.88		
57.1	34.0	90.3	97.65		
57.1	34.0	90.8	99.12		
57.1	57.0	113.4	98.77		
57.1	57.0	114.1	100.00	98.15	1.34
57.1	57.0	113.7	99.30		
57.1	80.0	135.8	98.38		
57.1	80.0	134.5	96.75		
57.1	80.0	135.1	97.50		

耐用性试验:在相同色谱条件下,分别考察不同色谱柱[Agilent Zorbax NH₂柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),



1. 维生素C
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Vitamin C

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

phenomenex Luna 5u NH₂柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Acutefx YS - NH₂ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)]对含量测定的影响,结果待测组分与相邻杂质峰均能完全分离,且分离度均大于1.5,表明方法耐用性良好。

2.4 样品含量测定

取5批(批号分别为101184263,101178661,101177145,101184257,101179536)样品各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,测定完成后,剩余未开封的样品按存储条件放置1年后再次测定。结果见图2。

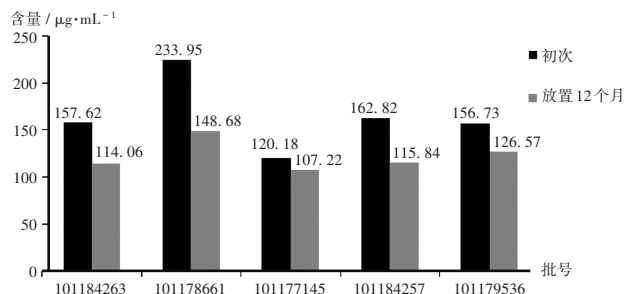


图2 样品中维生素C含量测定结果

Fig. 2 Results of the content determination of vitamin C in samples

3 讨论

3.1 流动相选择

肠内营养混悬液中的成分复杂,需采用合适的色谱条件将待测物完全分离。本研究中考察了不同流动相比对待测物测定结果的影响,发现提高水相比比例可增加待测物与相邻杂质峰间的分离度。结果显示,以甲醇-1%枸橼酸水溶液(80:20, V/V)为流动相时,能使维生素C与相邻杂质峰完全分离,峰形对称,响应值高,且在测定过程中处于较稳定的状态。故选择流动相为甲醇-1%枸橼酸水溶液(80:20, V/V)。

3.2 供品溶液制备方法选择

为防止维生素C在提取时被氧化破坏,常用酸溶液作为提取溶剂。由于肠内营养混悬液中含有大量蛋白质、脂肪、膳食纤维等物质,需用有机试剂除去基质的影响。本研究曾尝试以甲醇、乙腈、无水乙醇为提取溶剂,结果三者除去样品基质的效果相当,由于无水乙醇毒性较低,故选择无水乙醇为提取溶剂。维生素C具有强还原性,极易被氧化破坏^[14-15]。为防止维生素C在提取时被氧化分解,可在提取溶剂中加入适量草酸。本研究中考察了不同浓度草酸无水乙醇溶液对维生素C提取效果的影响,浓度为1%时的提取效果最好。故最终选择1%草酸无水乙醇为提取溶剂。

3.3 样品定性研究

肠内营养混悬液的成分复杂,难以单纯通过保留时间确定待测成分,故对其进行定性研究。本研究中考察了供试品溶液与对照品溶液的紫外光谱图,结果图

谱一致。另外,采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法分析供试品溶液和对照品溶液,结果2种溶液的一级质谱图和二级质谱图均一致。可见,按2.2项下方法制备供试品溶液可行。

3.4 样品含量测定结果分析

由图2可知,样品放置12个月后,维生素C含量呈下降趋势。除因维生素C易被氧化分解外,也可能由于肠内营养制剂中成分复杂,营养物质丰富,容易腐败,从而影响维生素C的含量,提示生产厂家在投料生产时需控制维生素C的投样量,严格控制微生物限度,可考虑适量增加抗氧化剂以提高维生素C的稳定性。

3.5 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、结果准确、灵敏度高,可用于肠内营养混悬液中维生素C的含量测定。

参考文献

- [1] 李野,尹利辉,高尚,等.食品和药品中维生素C含量测定方法的研究进展[J].药物分析杂志,2016,36(5):756-764.
- [2] 牛占旗,牛锋,焦魁良,等.HPLC测定维生素C注射液有关物质含量[J].中国药理学杂志,2010,45(24):1948-1950.
- [3] 谢志方.氢氧化钠两点电位滴定法测定维生素C含量[J].广州化工,2011,39(15):125-127.
- [4] 郑艳青,刘向国,冯德民,等.维C银翘颗粒中维生素C含量的测量不确定度分析[J].中国药业,2013,22(18):58-59.
- [5] 杜宝中,李春艳,赵洁,等.动态库仑法测定药物中抗坏血酸含量[J].药物分析杂志,2008,28(8):1347-1351.
- [6] 丁宇,姜效军.维生素C的指示离子方波极谱法研究[J].药物分析杂志,2006,26(9):1320-1322.
- [7] 余小娜,苏趁意.NiHCF/石墨烯膜电极用于电化学检测抗坏血酸[J].许昌学院学报,2023,42(5):58-61.
- [8] 开启余.紫外分光光度法测定VC银翘片中维生素C含量[J].福建分析测试,2015,24(3):35-37.
- [9] 肖彦春,雷恩春,关秀杰,等.测定蔬菜中还原型维生素C两种方法的比较[J].湖北农业科学,2011,50(5):1035-1037.
- [10] 程炜.浅谈Vc含量的测定方法[J].河北企业,2014(7):106.
- [11] 李安荣,杨玲莉,夏代全.紫外分光光度法测定维生素C银翘片中维生素C含量[J].中国药业,2002,11(8):44-45.
- [12] 刘慧,姜伟化,贺霞,等.离子交换色谱法测定复方维生素咀嚼片中维生素C的含量[J].中国新药杂志,2013,22(8):971-974.
- [13] 舒开继,黄选忠.离子色谱法测定药品中抗坏血酸[J].化学分析计量,2022,31(10):35-39.
- [14] 张馨媛,井乐刚.不同水果中维生素C含量及降解动力学的研究[J].哈尔滨师范大学自然科学学报,2022,38(2):68-74.
- [15] 王志恒,刘晓妍,邱博,等.不同材质营养袋中全肠外营养液维生素C稳定性考察[J].中国药业,2021,30(7):30-34.

(收稿日期:2023-06-14;修回日期:2024-01-16)