

基于二维HPLC-MS法检测赖氨酸维B₁₂颗粒中3种成分含量



王晓慧¹, 刘益庆², 杨春¹, 苟琼心¹, 单如梦², 吴琦²

1. 江苏联合职业技术学院连云港中医药分院 (江苏连云港 222000)

2. 连云港市食品药品检验检测中心 (江苏连云港 222069)

【摘要】目的 建立二维高效液相色谱-三重四级杆质谱联用法, 检测赖氨酸维B₁₂颗粒中3种成分的含量。方法 一维色谱以0.005 mol/L磷酸二氢钾溶液(用氢氧化钾调节pH至5.5)-乙腈(92:8)为流动相; 将待测组分分离及捕集, 二维色谱以0.1%甲酸溶液为流动相A, 以0.1%甲酸甲醇溶液为流动相B, 进行梯度洗脱; 采用电喷雾离子源, 以正离子多反应监测模式对目标化合物进行定性定量分析。结果 盐酸赖氨酸、维生素B₁₂和肌醇分别在80.06~8.006×10⁶ μg/L、10.12~1.012×10³ μg/L、80.16~8.016×10⁶ μg/L范围内线性关系良好, r均为0.999 9; 平均回收率分别为98.71%、97.96%、98.55%, RSD分别为1.4%、1.3%、0.9% (n=9)。结论 该方法前处理简便, 可使用含盐流动相, 专属性好, 灵敏度高, 可同时对赖氨酸维B₁₂颗粒中3种成分进行定量分析。

【关键词】二维高效液相色谱-三重四级杆质谱联用法; 维生素B₁₂; 盐酸赖氨酸; 肌醇; 含量测定

【中图分类号】 R927.2

【文献标识码】 A

Determination of three components in lysine vitamin B₁₂ granules based on two-dimensional HPLC-MS

WANG Xiaohui¹, LIU Yiqing², YANG Chun¹, GOU Qiongxin¹, SHAN Rumeng², WU Qi²

1. Lianyungang College of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Joint Vocational and Technical College, Lianyungang 222000, Jiangsu Province, China

2. Lianyungang Food and Drug Inspection and Testing Center, Lianyungang 222069, Jiangsu Province, China

Corresponding author: LIU Yiqing, Email: 33359083@qq.com

【Abstract】 Objective To establish a two-dimensional high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method for the determination of three components in lysine and vitamin B₁₂ granules. Methods The one-dimensional chromatography used a mobile phase consisting of 0.005 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (adjusted to pH 5.5 with potassium hydroxide) and acetonitrile (92:8) for the separation and trapping. The two-dimensional chromatography employed gradient elution using 0.1% formic acid solution as mobile phase A and 0.1% formic acid-methanol solution as mobile phase B. Electrospray ionization (ESI) was used, and the target compounds were qualitatively and quantitatively analyzed in positive-ion multiple reaction monitoring mode. Results Lysine hydrochloride, vitamin B₁₂, and inositol showed good linear relationships in the ranges of 80.06-8.006×10⁶ μg/L, 10.12-1.012×10³ μg/L, and

80.16-8.016 $\times 10^6$ $\mu\text{g/L}^{-1}$, respectively, with r values of 0.999 9. The average recovery rates were 98.71%, 97.96%, and 98.55%, respectively, with $RSDs$ of 1.4%, 1.3%, and 0.9% ($n=9$). **Conclusion** The method is simple in pretreatment, compatible with saline mobile phases, specific, sensitive, and capable of simultaneous quantitative analysis of the three components in lysine vitamin B₁₂ granules.

【Keywords】 Two-dimensional high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method; Vitamin B₁₂; Lysine hydrochloride; Inositol; Content determination

赖氨酸维 B₁₂ 颗粒是由盐酸赖氨酸、维生素 B₁₂ 和肌醇等组成的复方制剂, 临床上主要用于加速儿童生长发育、增进食欲等, 现行标准 WS-10001-(HD-1392)-2003 收载于《国家药品标准化学药品标准地标升国标(第十五册)》^[1]。标准中仅对方剂中的盐酸赖氨酸进行检测, 维生素 B₁₂ 和肌醇均未涉及, 这给赖氨酸维 B₁₂ 颗粒的质量问题带来了较大的风险。

通常检测维生素 B₁₂ 主要采用 HPLC 法^[2-4]; 检测肌醇的方法主要有高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)法、GC 法^[5-7]; 检测盐酸赖氨酸需要在 HPLC 法基础上进行柱前衍生或柱切换^[8-10], 样品处理方法较为复杂, 操作步骤较为繁琐。很少有方法能同时测定维生素 B₁₂、盐酸赖氨酸和肌醇的含量。

HPLC-MS 法以液相色谱作为分离系统, 质谱为检测系统, 可同时实现对赖氨酸维 B₁₂ 颗粒中 3 种成分进行定量分析。考虑到该处方中辅料的淀粉和糖类直接进入质谱仪容易造成离子源污染, 本文采用二维 HPLC-MS 法^[11-15], 充分发挥多中心切割功能, 将淀粉及糖类物质从一维色谱系统中切出, 确保 3 种主药成分在二维色谱系统中精准定量, 现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 主要仪器

AB4500 二维高效液相色谱-质谱联用仪(AB SCIEX 公司); MS105 电子分析天平(瑞士梅特勒公司); 60k 型超声波清洗器(杭州宝珀超声波科技有限公司); Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司)。

1.2 主要药品与试剂

赖氨酸维 B₁₂ 颗粒(湖南方盛制药股份有限公司, 批号: 230703、241215、250812); 对照品盐酸赖氨酸(批号: 140673-202412, 纯度 99.9%)、维生素 B₁₂(批号: 100248-202407, 纯

度 90.2%)、肌醇(批号: 190077-202102, 纯度 100.0%)均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈(德国默克公司)与甲酸(上海 Aladdin 公司)均为色谱纯; 磷酸二氢钾、氢氧化钾(国药集团化学试剂有限公司)均为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件

一维色谱系统采用 Waters XTerra MS C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 以 0.005 mol/L 磷酸二氢钾溶液(氢氧化钾调节 pH 至 5.5)-乙腈(92:8)为流动相; 二维色谱系统采用 CAPCELL CORE C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 2.7 μm), 以 0.1% 甲酸溶液为流动相 A、0.1% 甲酸甲醇溶液为流动相 B 进行梯度洗脱(0~2.0 min, 3% B; 2.0~8.0 min, 3%~90% B; 8.0~10.0 min, 90% B; 10.0~13.0 min, 90%~3% B; 13.0~15.0 min, 3% B); 柱温均为 30 $^{\circ}\text{C}$, 流速均为 0.2 mL/min, 进样量均为 1 μL 。其中, 盐酸赖氨酸切割时间为 0~2.0 min, 淀粉和糖类切割时间为 3.0~6.0 min, 维生素 B₁₂ 和肌醇切割时间为 10.0~13.0 min。

系统流路连接见图 1, 其中接口采用 2 个 6 通阀实现流路完全对称, 平衡流动相时, 6 通阀“A”中, “6”和“1”相通, 一维色谱系统流动相直接进入一维检测器后进废液; 未切割时, 6 通阀“A”中, “1”和“2”相通, 6 通阀“B”中, “5”和“6”相通, “1”和“2”相通, 一维色谱系统流动相将待测组分带入捕集柱中, 二维色谱系统流动相直接进入二维检测器后进废液; 切割时, 6 通阀“B”中, “6”和“1”相通, “3”和“2”相通, 二维色谱系统流动相进入捕集柱, 将待测组分带入二维色谱柱, 经检测器后进入质谱仪分析检测。

2.1.2 质谱条件

采用电喷雾离子源, 在正离子模式下进行检

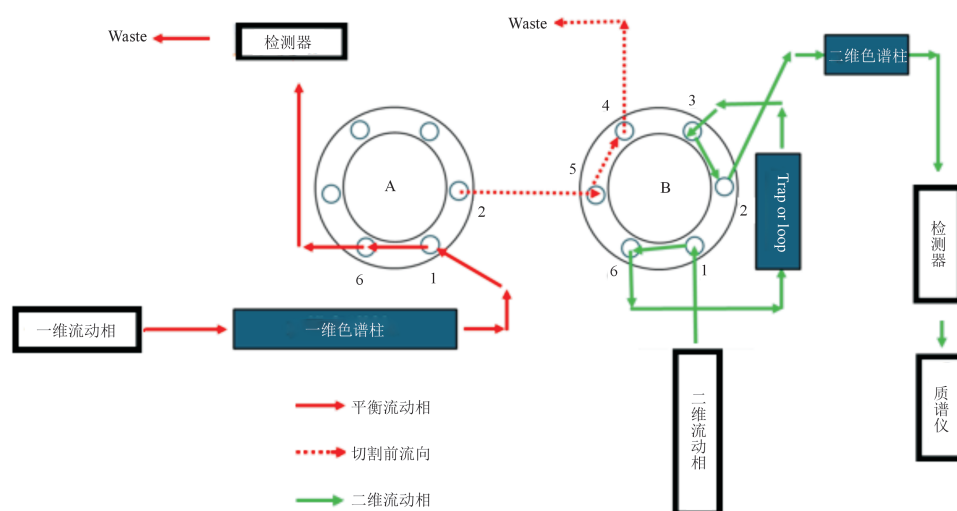


图1 多中心切割二维液相系统连接示意图

Figure 1. Schematic diagram of multi-center cutting in a two-dimensional liquid phase system

测；喷雾电压设为5.0 kV，离子源温度550 °C，气帘气、喷雾气及辅助加热气的压力分别为35、50、50 psi；质谱采集采用多反应监测模式，其他质谱参数见表1。

表1 3种成分质谱参数及母离子、子离子信息

Table 1. Mass spectrometry parameters and parent ion and daughter ion information for three components

成分	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (V)	碰撞气能量 (V)
盐酸赖氨酸	147.1	82.1*, 129.1	20	12、9
维生素B ₁₂	678.6	147.1*, 359.1	40	40、30
肌醇	123.1	80.2*, 53.1	22	20、12

注：*表示定量离子。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液

取盐酸赖氨酸、维生素B₁₂和肌醇对照品适量，精密称定，加80%乙腈溶液溶解并定量稀释制成每1 mL中约含0.1 mg的溶液，作为混合对照品储备溶液；精密量取混合对照品储备溶液适量，加80%乙腈溶液定量稀释制成每1 mL中分别含盐酸赖氨酸和肌醇80、8 000、8.0×10⁴、8.0×10⁵、8.0×10⁶ μg/L，含维生素B₁₂10、50、100、200、1 000 μg/L的溶液，作为系列混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液

取本品约1 g，精密称定，置100 mL量瓶中，加80%乙腈溶液溶解并稀释至刻度，超声处理（功率：200 W，频率：30 kHz）30 min，经0.22 μm滤膜过滤，即得。

2.2.3 阴性样品溶液

按处方比例称取蔗糖、淀粉等适量，并按

“2.2.2”项下方法制成阴性样品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验

取阴性样品溶液、100 ng/mL混合对照品溶液及供试品溶液，分别按“2.1”项下分析条件进行测定，记录色谱图（图2）。结果表明，阴性样品在目标成分出峰位置无干扰，对照品与供试品中

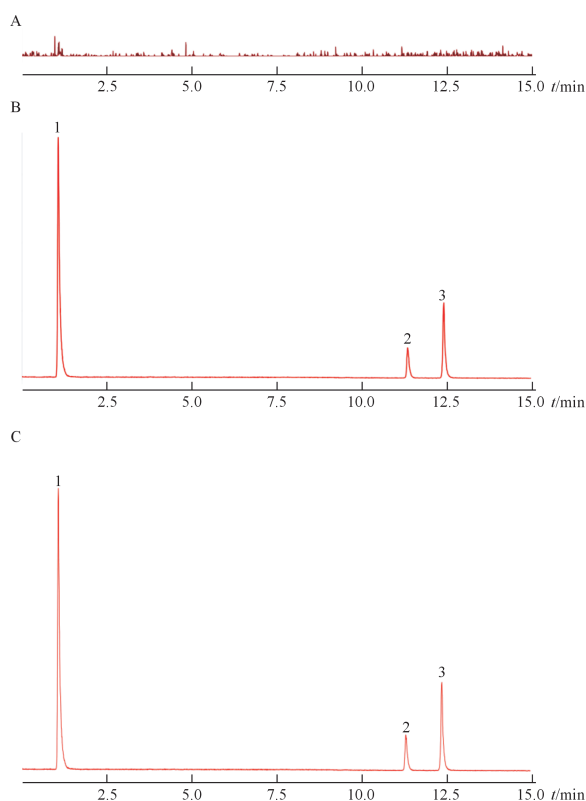


图2 系统适用性试验色谱图

Figure 2. Chromatograms of system suitability test

注：A. 阴性样品溶液；B. 混合对照品溶液；C. 供试品溶液；1. 盐酸赖氨酸；2. 维生素B₁₂；3. 肌醇。

待测成分色谱峰的理论塔板数及分离度均满足定量分析要求,表明该方法专属性良好。

2.3.2 线性范围、检出限与定量限

取“2.2.1”项下混合对照品溶液,以质量浓度为横坐标(X , $\mu\text{g/L}$)、峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,得到线性方程和回归系数 r ,根据信噪比为3和10分别计算检出限和定量限,

表2 3种成分线性范围、线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2. Linear ranges, linear equations, correlation coefficients, detection limits and quantification limits for 3 components

成分	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	线性方程	r	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
盐酸赖氨酸	40.03~4.003 $\times 10^5$	$Y=5.331\times 10^3X+3.000\times 10^6$	0.999 6	2.70	8.00
维生素B ₁₂	10.12~1.012 $\times 10^3$	$Y=680.34X-2.726\times 10^3$	0.999 9	0.30	1.00
肌醇	80.16~8.016 $\times 10^4$	$Y=897.88X-3.212\times 10^5$	0.999 6	2.70	8.00

2.3.4 稳定性试验

取批号为241215的供试品溶液,分别于室温放置0、2、4、8、16、24、48 h时按“2.1”项下分析条件进样测定,结果盐酸赖氨酸、维生素B₁₂和肌醇峰面积的RSD分别为0.9%、1.6%、2.2% ($n=7$),表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验

取批号为241215的样品,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下分析条件进样测定,结果盐酸赖氨酸、维生素B₁₂和肌醇的平均含量分别为3 0620、0.140 2、4 853 $\mu\text{g/g}$, RSD分别为1.8%、1.2%、1.6% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.3.6 回收率试验

取本品约0.1 g,精密称定,置100 mL量瓶中,分别加入约含有3种组分80%、100%和120%的低中高3种浓度的混合对照品溶液,平行制备9份,进行加标回收率试验。结果表明,盐酸赖氨酸、维生素B₁₂和肌醇的平均回收率分别为97.96%、98.71%、98.55%, RSD分别为1.3%、1.4%、0.9% ($n=9$),表明方法回收率良好。

2.4 样品测定

取3批样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下分析条件进样测定,盐酸赖氨酸、维生素B₁₂和肌醇的含量测定结果见表3。结果显示,赖氨酸维B₁₂颗粒的生产工艺和投料趋于稳定;但维生素B₁₂的测定结果均接近处方工艺要求的1.5 $\mu\text{g/g}$ 下限,提示该成分的投料量存在低于标称值的风险,生产过程中需重点监控。

结果见表2。

2.3.3 精密度试验

取批号为241215的供试品溶液,按“2.1”项下分析条件连续进样6次,结果盐酸赖氨酸、维生素B₁₂和肌醇保留时间的RSD分别为0.2%、0.3%、0.2% ($n=6$),峰面积的RSD分别为0.5%、1.1%、0.9% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

表3 3批市售样品中3种待测组分含量测定结果 ($\mu\text{g/g}$, $n=3$)

Table 3. Determination results of 3 components to be tested in 3 batches of commercially available samples ($\mu\text{g/g}$, $n=3$)

批号	盐酸赖氨酸	维生素B ₁₂	肌醇
230703	30 436	1.407	4 856
241215	30 282	1.396	4 802
250812	30 815	1.391	4 820
平均值	30 511	1.398	4 826
RSD (%)	0.90	0.61	0.57

3 讨论

一维色谱系统分别考察了水-甲醇/乙腈、0.1%甲酸溶液-甲醇/乙腈、10 mmol/L乙酸铵溶液-甲醇/乙腈、0.005 mol/L磷酸二氢钾溶液-甲醇/乙腈等流动相体系;二维色谱系统分别考察了0.1%甲酸-甲醇/乙腈、10 mmol/L乙酸铵溶液-甲醇/乙腈等流动相体系。结果表明一维色谱系统以0.005 mol/L磷酸二氢钾溶液(用氢氧化钾调节pH至5.5)-乙腈(92:8)为流动相、二维色谱系统以0.1%甲酸溶液(A)-0.1%甲酸甲醇溶液(B)为流动相,进行梯度洗脱,所得到的3种成分峰型最好,响应值最高。

该处方的主药成分有盐酸赖氨酸、维生素B₁₂、肌醇,这3种成分在处方中的含量差异极大,如盐酸赖氨酸处方含量高达30 mg/g,而维生素B₁₂处方含量却低至1.5 $\mu\text{g/g}$ 。此外,盐酸赖氨酸几乎无紫外吸收,常规液相方法无法定量分析,且操作较为复杂,通常需要采用正向色谱柱检测。

二维液相色谱可将分离机制不同且相互独立的2根色谱柱串联起来,具有峰容量大、选择性强、分离能力强等突出优点,联用质谱仪后,可显著提高方法的灵敏度和特异性,有效解决复方制剂成分处方含量差异性较大且无法同时分析检测的技术难题。本文通过考察不同的流动相,将处方中占比例较高的淀粉和糖类经一维含盐流动相带入废液,使其对待测组分不造成干扰;再通过摸索二维流动相,分别在不同时间段切割待测组分,可将3种待测组分得到有效分离,并精准定量,该方法科学、准确、高效、便捷,可提升赖氨酸维B₁₂颗粒的质量标准。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 国家药品标准化学药品地标升国标(第十五册)[S]. 2003: 16.
- 2 耿颖,黄慧芬,魏宁漪,等. HPLC法同时测定复合维生素B注射液中4种成分的含量[J]. 中国新药杂志, 2025, 34(15): 1647-1653. [Geng Y, Huang HF, Wei NY, et al. Simultaneous determination of four components in compound vitamin B injection by HPLC[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2025, 34(15): 1647-1653.] DOI: 10.20251/j.cnki.1003-3734.2025.15.011.
- 3 朱丹丹,叶丽芳,董宏然. HPLC法测定多种B族维生素微泡颗粒中维生素B₁₂的含量[J]. 中国食品添加剂, 2025, 36(5): 125-130. [Zhu DD, Ye LF, Dong HR. Determination of vitamin B₁₂ content in various B vitamin microbubble particles by HPLC method[J]. Chinese Food Additives, 2025, 36(5): 125-130.] DOI: 10.19804/j.issn1006-2513.2025.5.017.
- 4 刘兆宏,花锦. HPLC-DAD法测定草鱼肉质中的维生素B₁和维生素B₁₂的含量[J]. 中国饲料, 2024, (20): 79-83. [Liu ZH, H J. HPLC-DAD method for determining the content of vitamin B₁ and vitamin B₁₂ in grass carp meat[J]. China Feed, 2024, (20): 79-83.] DOI:10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20242020.
- 5 钱忠义,葛薇薇,仇雅静,等. 高效液相-电喷雾检测法测定赖氨酸肌醇维B₁₂口服溶液中肌醇的含量[J]. 中国药物警戒, 2022, 19(9): 959-961. [Qian ZY, Ge WW, Qiu YJ, et al. Determination of inositol in lysine inositol and vitamin B₁₂ oral solution by high performance liquid chromatography electrospray detection[J]. China Pharmacovigilance, 2022, 19(9): 959-961.] <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChdQZXJpb2RpY2FsQ0hJU29scjllRdWljajlPemd5d2pqMjAyMjA5MjA2GghpMjh3aXRrZg%3D%3D>.
- 6 蓝燕玲,潘云山,温才洁,等. 气相色谱法测定维生素预混料中肌醇的含量[J]. 山东化工, 2024, 53(17): 177-180. [Lan YL, Pan YS, Wen CJ, et al. Determination of inositol content in vitamin premixes by gas chromatography[J]. Shandong Chemical Industry, 2024, 53 (17): 177-180.] DOI: 10.19319/j.cnki.issn.1008-021x.2024.17.018.
- 7 刘文博. 气相色谱法测定保健食品中肌醇含量的方法研究[J]. 食品安全导刊, 2022, 16: 65-67. [Liu WB. Research on the method of determining inositol content in health food by gas chromatography[J]. Food Safety Guide, 2022, 16:65-67.] DOI:10.16043/j.cnki.cfs.2022.16.022.
- 8 舒森,黄妮,周军,等. 柱前衍生-HPLC法测定葡萄糖酸钙锌口服溶液中盐酸赖氨酸含量[J]. 生物化工, 2025, 11(5): 128-131. [Shu S, Huang N, Zhou J, et al. Determination of lysine hydrochloride content in calcium zinc gluconate oral solution by pre column derivative HPLC method[J]. Biochemistry, 2025, 11(5): 128-131.] DOI: 10.20284/j.cnki.swbg.2025.05.022.
- 9 李昭,李昌亮,石笑弋,等. 复方赖氨酸颗粒质量标准研究及改进[J]. 中国药品标准, 2024, 25(6): 555-559. [Li Z, Li CL, Shi XY, et al. Research and improvement of quality standards for compound lysine granules[J]. Chinese Pharmaceutical Standards, 2024, 25(6): 555-559.] DOI: 10.19778/j.cbp.2024.06.004.
- 10 何虹,刘庄蔚,蒋洁,等. 不同方法测定口服五维赖氨酸葡萄糖中盐酸赖氨酸含量的研究[J]. 化学工程师, 2024, 38(5): 20-25. [He H, Liu ZW, Jiang J, et al. Study on the determination of lysine hydrochloride content in oral pentavitamin lysine glucose by different methods[J]. Chemical Engineer, 2024, 38(5):20-25.] DOI: 10.16247/j.cnki.23-1171/tq.20240520.
- 11 刘益庆,陈洪岩,杨晖,等. 二维高效液相色谱-质谱联用检测化妆品中乌洛托品等4种禁用物质的方法[J]. 香料香精化妆品, 2025, (2): 106-110. [Liu YQ, Chen HY, Yang H, et al. A method for the determination of four prohibited substances in cosmetics, including urotropine, by two-dimensional high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Flavor essence cosmetics, 2025, (2): 106-110.] DOI: 10.20099/j.issn.1000-4475.2024.0110.
- 12 江舸,郭志渊,刘峰,等. HPLC法和二维液相色谱-质谱联用法研究小儿复方氨基酸注射液中色氨酸有关物质[J]. 药学报, 2026, 61(2): 553-559. [Jiang G, Guo ZY, Liu F, et al Study on tryptophan related substances in pediatric compound amino acid injection by HPLC and two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2026, 61(2): 553-559.] DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1016.
- 13 金雅文,朱琼,郑忠辉,等. 盐酸伊伐布雷定有关物质的二维液相色谱-质谱联用分析[J]. 药物分析杂志, 2025, 45(10): 1816-1825. [Jin YW, Zhu Q, Zheng ZH, et al. Two dimensional liquid chromatography-mass spectrometry analysis of related substances in ivabradine hydrochloride[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2025, 45(10): 1816-1825.] DOI: 10.16155/j.0254-1793.2024-1319.
- 14 祝福利,杨红亮,左为东,等. 液相色谱-质谱法检测动物源性食品中β-受体激动剂残留研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(23): 111-121. [Zhu FL, Yang HL, Zuo WD, et al. Research progress on detection of β-receptor agonist residues in animal derived food by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2025, 16(23): 111-121.] DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250806003.
- 15 耿悦,田壮壮,陈民辉,等. 现代质谱技术在头孢类抗生素杂质谱研究中的应用[J]. 药学与临床研究, 2025, 33(4): 351-356. [Geng Y, Tian ZZ, Chen MH, et al. Application of modern mass spectrometry technology in the study of impurity spectra of cephalosporin antibiotics[J]. Pharmaceutical and Clinical Research, 2025, 33(4): 351-356]. DOI: 10.13664/j.cnki.pcr.2025.04.009.

收稿日期: 2026年04月12日 修回日期: 2026年05月29日
 本文编辑: 周璐敏 洗静怡