

在线微生物浊度法测定多维元素片中微量维生素 B₁₂ 的含量

卢京光 裴琳 杨龙华

(青岛市药品检验所, 青岛 266071)

摘要 目的: 建立在线微生物浊度法测定多维元素片中微量维生素 B₁₂ 的含量。方法: 以莱士曼氏乳酸杆菌为实验菌, 以缺乏维生素 B₁₂ 的培养基为检测培养基, 采用浊度法在线检测。结果: 维生素 B₁₂ 浓度在 0.02 ~ 0.10 ng · mL⁻¹ 范围内呈现良好线性关系 ($r = 0.9985$), 平均回收率为 101.8%。结论: 该方法快速、简便、灵敏, 在线检测结果准确可靠, 适用于多维元素片中微量维生素 B₁₂ 的含量测定。

关键词: 维生素 B₁₂; 钴维生素; 钴胺素; 多维元素片; 微生物浊度法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793(2011)09 - 1837 - 03

Determination of trace vitamin B₁₂ in multivitamin formula with minerals tablets by on - line microbial turbidimetric method

LU Jing - guang , PEI Lin , YANG Long - hua

(Qingdao Institute for Drug Control , Qingdao 266071 , China)

Abstract Objective: To establish a method for the determination of trace vitamin B₁₂ in multivitamin formula with minerals tablets. **Methods:** The test organism was *Lactobacillus leichmanii*. The medium without vitamin B₁₂ was used as assay medium and measured by on - line microbial turbidimetric method. **Results:** Vitamin B₁₂ curves were linear in the range of 0.02 - 0.10 ng · mL⁻¹ ($r = 0.9985$), and the average recovery was 101.8%. **Conclusion:** This rapid and simple method shows high sensitivity, which is suitable for the assay of trace vitamin B₁₂ in multivitamin formula with minerals tablets. The results are accurate and reliable by on - line method.

Key words: vitamin B₁₂; cobalamin; cobamide; multivitamin formula with minerals tablets; microbial turbidimetric method

维生素 B₁₂ (vitamin B₁₂, VB₁₂) 是含钴的化合物, 又称钴维生素 (cobalamin) 或钴胺素 (cobamide)。人体自身不能合成维生素 B₁₂, 只能从外源性食物、药物或保健食品中摄取。但人体只需要微量的维生素 B₁₂, 一旦摄入过量可能会引起过敏反应, 甚至过敏性休克。因此, 准确测定营养补充剂多维元素片 (multivitamin formula with minerals tablets) 中微量维生素 B₁₂ 的含量是非常必要的。

中国药典 2010 年版未收载微量维生素 B₁₂ 的含量测定方法, 国家食品药品监督管理局标准 WS - 170(X - 147) - 93 及美国药典^[1] 都将微生物浊度法作为制剂中微量维生素 B₁₂ 的含量测定方法。该方法的原理为生物检定的量反应平行线法, 利用维生素 B₁₂ 对特定微生物生长的促进作用, 在不含维生素 B₁₂ 的培养基中加入维生素 B₁₂ 对照品和样品, 通过培养液浊度值的变化比较培养液中细菌的生长速

率, 计算样品中维生素 B₁₂ 的含量。该法手工操作步骤烦琐, 培养温度的均匀性、培养基的均匀程度以及测定时间的一致性等因素均可影响测定结果的准确性, 对检验人员、操作步骤和实验环境等方面均要求较高。在线微生物浊度法因其培养温度恒定, 自动测定, 可获得即时检测数据等优点在 2010 年版中国药典中得以广泛应用, 但目前仅仅用于抗生素药品的效价测定^[2-5]。乳品中微量维生素 B₁₂ 的含量国家标准虽然采用微生物浊度法测定, 但至今仍限于手工操作^[6]。本文将在线微生物浊度法用于多维元素片中微量维生素 B₁₂ 的含量测定, 克服了手工测定烦琐、不易获取最佳检测时间的缺点, 获得了良好的标准曲线和生长曲线, 完全符合浊度法测定的要求, 可获得满意的实验结果。

1 仪器与试剂

CBZ - 1S 型抗生素光度测量仪, 配有石英比浊

第一作者 Tel: (0532) 85760851; E - mail: lujingguang68@126.com

管、动态恒温培养装置和自动检测软件(北京潮声弘业科技有限公司); GNP-9160型隔水式恒温培养箱(上海三发科技仪器有限公司), MLS-3750高压蒸汽灭菌锅(日本三洋公司)。

莱士曼氏乳酸杆菌(*Lactobacillus leichnamii*, ATCC 7830); 维生素 B₁₂对照品(批号 R0603-20, 含量 10.7 μg·mg⁻¹, USP RS); 多维元素片(每片含维生素 B₁₂ 9 μg; 批号 0805108, 0909201, 1005102), 由上海施贵宝制药有限公司生产; 莱士曼氏乳酸杆菌穿刺用培养基(批号 5200023)、莱士曼氏乳酸杆菌增菌培养基(批号 5354622)、维生素 B₁₂检定用培养基(批号 6339009), 均由美国 BD 公司生产; 山梨酸、无水柠檬酸、乳糖酸、十水磷酸氢二钠、焦亚硫酸钠均为分析纯试剂。

2 实验方法

2.1 实验用菌液的制备及加菌比例 取莱士曼氏乳酸杆菌新鲜穿刺培养物接种至增菌培养基, 于 35~40 °C 培养约 8 h, 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃去上清液, 沉淀菌用维生素 B₁₂ 检定用培养基同法洗涤 2 次, 加入检定用培养基 10 mL, 混匀, 调整该菌液浓度使其在 580 nm 处吸光度约为 1.0, 即为实验用菌液。临用时取实验用菌液按 2.0%~5.0% 的量加入至检定用培养基, 混匀。

2.2 pH 4.5 缓冲液的配制 称取无水柠檬酸 1.1 g、乳糖酸 1.205 g、十水磷酸氢二钠 3.3 g、焦亚硫酸钠 1.0 g, 加水溶解并稀释至 100 mL, 于 121 °C 灭菌 15 min, 冷却至室温备用。

2.3 线性关系考察 精密称取维生素 B₁₂ 对照品适量, 加水振摇溶解并稀释成 1.0 μg·mL⁻¹ 的对照品储备液; 精密量取对照品储备液适量, 加水稀释至含

维生素 B₁₂ 分别为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 ng·mL⁻¹ 的系列对照品溶液。临用前于 121 °C 灭菌 5 min 后迅速置冷水中冷却。精密量取已加入菌液的检定培养基 5 mL 至已灭菌、干燥的比浊管中, 分别精密加入上述对照品溶液 1.0 mL, 每个浓度至少加 3 管, 并加灭菌水补充总体积至 10 mL, 立即混匀, 放置于在线微生物浊度测定系统; 另取 2 只已灭菌、干燥的比浊管, 分别加入已加入菌液的检定培养基 5 mL, 其中 1 只加入 0.06 ng·mL⁻¹ 的维生素 B₁₂ 对照品溶液 1.0 mL, 并加灭菌水补充至 10 mL, 混匀, 作为阳性对照管; 另 1 只加灭菌水补充至 10 mL, 混匀, 作为阴性对照管(即空白管), 置于在线微生物浊度测定系统中 37 °C 在线培养, 并于 580 nm 波长处在线测定吸光度并绘制生长曲线, 以 1000 倍浓度的对数值 (lg 1000C) 为横坐标, 吸光度 (A) 为纵坐标绘制标准曲线。线性方程为:

$$A = 84.919 \lg 1000C + 307.300 \quad r = 0.9985$$

结果表明, 维生素 B₁₂ 浓度在 0.02~0.10 ng·mL⁻¹ 范围内呈现良好线性关系。

2.4 精密度试验 取“2.7”项下同一份供试品溶液, 并按其方法分别取 4.0 mL 重复测定 6 次, 结果平均值为 104.8%, RSD 为 1.0%, 表明本方法具有较好的精密度。

2.5 重复性试验 分别精密称取同一批样品 5 份, 按“2.7”项下方法测定, 测定结果平均值为 105.6%, RSD 为 1.9% (n=5), 表明本方法重复性良好。

2.6 回收率试验 选取批号为 0805108 的样品进行加样回收试验, 取样并加入对照品溶液, 按“2.7”项下方法进行测定, 并计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果

Tab 1 Results of recovery

取样量 (sample amount) /g	加标量 (added) /μg	测样量 (measured volume) /mL	测得量 (sample content) /μg	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) /%
1.00945	9.0	1.0	9.25	101.8	101.8 (RSD=1.4%)
		4.0	9.31	102.4	
		1.0	9.19	102.0	
1.00110	9.0	4.0	9.05	100.4	
		1.0	9.58	104.0	
		4.0	9.26	100.1	
1.02321	9.0	1.0	9.58	104.0	
		4.0	9.26	100.1	

2.7 样品测定 精密称取样品片粉适量(约相当于维生素 B₁₂ 9 μg) 至 250 mL 量瓶中, 加 pH 4.5 缓冲液 125 mL 振摇溶解 30 min 并加水稀释至刻度, 摇匀, 精密量取适量加水稀释成约 0.04 ng·mL⁻¹ 的溶液。临用前于 121 °C 灭菌 5 min 后迅速置冷水

中冷却。精密量取供试品溶液 1.0 mL、4.0 mL, 按照“2.3”项下方法同时在线测定供试品溶液和对照品溶液的吸光度, 以标准曲线法计算含量。3 批样品测得含量结果均符合国家标准规定。结果见表 2。

表 2 多维元素片中维生素 B₁₂ 含量测定结果

Tab 2 Results of vitamin B₁₂ content in multivitamin formula with minerals tablets

样品批号(batches of sample)	每片标示维生素 B ₁₂ 含量(labeled content of vitamin B ₁₂ in each tablet) /μg	测样量(measured volume) /mL	每片测得维生素 B ₁₂ 值(sample content of vitamin B ₁₂ in each tablet) /μg
0805108	9	1.0	9.5
		4.0	9.3
0909201	9	1.0	9.2
		4.0	9.3
1005102	9	1.0	9.5
		4.0	9.4

3 结果与讨论

3.1 加入不同浓度对照品溶液和供试品溶液后莱士曼氏乳酸杆菌的生长曲线见图 1。由图 1 可见，加入不同浓度的维生素 B₁₂ 对照品溶液，培养 14 h 后菌液吸光度值呈现等比差值，菌株生长曲线有较好的对数生长期，适合浊度法测定。

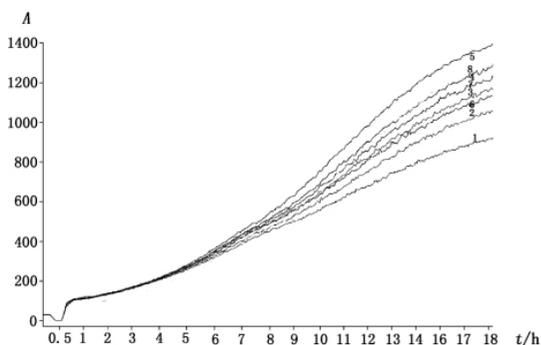


图 1 加入不同浓度对照品溶液和供试品溶液的莱士曼氏乳酸杆菌生长曲线

Fig 1 The growth curves of *Lactobacillus leichnamii* with different amounts of vitamin B₁₂

- 1. 对照品溶液 1(RS solution 1) 2. 对照品溶液 2(RS solution 2)
- 3. 对照品溶液 3(RS solution 3) 4. 对照品溶液 4(RS solution 4)
- 5. 对照品溶液 5(RS solution 5) 6. 样品溶液 1 mL(test solution 1 mL)
- 7. 样品溶液 4 mL(test solution 4 mL) 8. 阳性溶液(positive solution)

3.2 所用实验菌为莱士曼氏乳酸杆菌，该菌在中国药典浊度法中未载，其生长增殖速度较抗生素浊度法所用细菌相对缓慢，抗生素浊度仪原有软件在线测定时间仅在 18 h 以内，不能满足维生素 B₁₂ 测定的需要；同时微量维生素 B₁₂ 测定的样品浓度为 ng 级别，原有软件的计算精度也相对不足，作者通过与企业协商更改测试软件，延长软件采集时间和设备监测时间，提高软件的监测精度，使现有抗生素浊度仪能够同时具备抗生素效价测定和微量维生素 B₁₂ 含量测定的能力。

3.3 在线浊度法可以测定维生素 B₁₂ 的即时含量，在 4 ~ 30 h 之间每隔 5 min 测定 1 次标准曲线、相关

系数和含量，比较发现，每个检测点线性关系变化较大，含量结果也差别较大，在培养时间为 16 ~ 24 h 含量趋于稳定，但在这期间百余个检测点中，最佳线性关系和相关系数点却只有少数几个，这几个点只有在线测定才有可能准确捕获，手工测定因很难获取最佳检测时间而造成测定结果不准确。

3.4 本法与抗生素浊度法共用一套测定仪器，一旦比浊管、转子、量瓶等实验器皿存在抗生素残留，将会影响实验菌的灵敏度，从而影响结果的准确性，因此防止抗生素污染对于实验成功至为关键。实验前所涉及实验器具一定要彻底清洗，甚至破坏可能存在的抗生素残留，有条件的实验室可准备一套维生素 B₁₂ 测定专用器具，以彻底消除抗生素污染对测定结果造成的影响。

参考文献

- 1 USP 34 - NF29. 1323
- 2 ChP(中国药典). 2010. Vol II (二部) : Appendix(附录) 93
- 3 YANG Ya - li(杨亚莉), HU Chang - qin(胡昌勤). The additional and revised description of the Chinese Pharmacopoeia 2005 on the microbiological assay of antibiotics and the explanatory notes of procedures(中国药典 2005 年版微生物检定法的增修订情况及要点). *Chin J Antibiol(中国抗生素杂志)* 2005, 30(12) : 721
- 4 ZHANG Wen - ting(张文婷), LIU Xu - ping(刘旭平), WANG Qing - quan(王庆全). Content determination of micronomicin sulfate tablets by turbidimetric method(浊度法测定硫酸小诺霉素片的效价). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)* 2010, 30(2) : 346
- 5 FAN Bing(范兵), YANG Yan - li(杨雁莉), KANG Yong(康勇). Determination of kitasamycin by turbidimetric method(微生物浊度法测定吉他霉素的效价). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2008, 28(7) : 1114
- 6 ZHANG Li - hong(张丽宏), WANG Ke - xin(王克新), WANG Miao(王淼), et al. Application and discussion of microbiological method for assay of Vitamin B₁₂ in milk powder(微生物法测定乳粉中维生素 B₁₂ 的应用和探讨). *Chin Dairy Ind(中国乳品工业)* 2008, 36(10) : 58

(本文于 2011 年 3 月 17 日收到)