

7,8-二甲基-10-(D-1-核糖醇基)-异咯嗪粗产品的 HPLC-MS 分析

郭建宇¹, 鲁彦²

(1. 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234; 2. 上海应用技术学院 化工系, 上海 200235)

摘要: 报道了利用 HPLC-MS 方法分离分析半合成工艺生产的 7,8-二甲基-10-(D-1-核糖醇基)-异咯嗪粗产品的方法. 该方法以 C₁₈ 柱为色谱柱, 甲醇/水为流动相, 通过优化色谱条件, 使产品中各杂质组分都得到了很好的基线分离. 并对产品中各组分分别做了定性指派和定量分析.

关键词: 7,8-二甲基-10-(D-1-核糖醇基)-异咯嗪; 粗产品; 杂质; 分析; HPLC-MS

中图分类号: O657 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2006)01-0070-05

0 引言

7,8-二甲基-10-(D-1-核糖醇基)-异咯嗪(又名核黄素, 维生素 B₂, riboflavin), 是生命活动中不可缺少的维生素之一(以下简称核黄素), 对促进生物的生长发育有着重要的作用, 除了少量用于治疗口角炎和结膜炎以外, 还大量用作食品和饲料添加剂^[1-3]. 近年来工业生产中主要采用半合成工艺^[4,5], 即由上级反应产物 4,5-二甲基-N-(D)-脱氧核糖醇基-2-偶氮苯基苯胺(1-deoxy-1-[4,5-dimethyl-2-(phenylazo)phenylamino]-D-ribitol, 以下简称偶合物)与巴比妥酸通过环合反应得到核黄素的粗产品, 最后经过精制得到核黄素成品. 可见核黄素粗产品的质量将直接影响到下一步精制的收率, 因此建立核黄素粗产品分析方法, 对产品质量进行监控, 对于提高生产效率有十分重要的作用.

核黄素作为医药用品, 其质量标准在中华人民共和国药典^[6]和中国国家标准^[7], 以及美国药典^[8]、欧洲药典^[9]都已有严格的规定. 在中国与欧洲药典中, 均采用的是紫外-可见分光光度法, 美国药典采用的是荧光法测定含量. 但套用以上两种方法分析粗产品, 由于事先未对杂质进行分离, 很容易导致粗品分析结果偏高. 因此, 本文建立了一种简单易行的 HPLC-MS 分析方法, 对核黄素粗产品中的各杂质先进行分离, 再做定性、定量分析.

对于核黄素粗产品的高效液相色谱分析, 文献中曾有鲁彦^[10]的研究报道, 但用的是不大常见的反相氰基柱, 且未能对其所含的杂质进行定性归属. 为便于工厂实际操作, 本文在此基础上建立了一种简便、易行的核黄素粗品的 HPLC 分析方法, 即采用常见的 C₁₈ 柱, UV 检测器, 以水/甲醇为流动相, 成功地对粗品核黄素进行了分离分析. 应用液相色谱-质谱联用仪(HPLC-MS)对粗产品中各组分进行指派定性, 并用外标定量法测定了粗产品中各组分的含量.

收稿日期: 2005-11-07

基金项目: 上海师范大学博士启动基金(PL517).

作者简介: 郭建宇(1975-), 男, 博士, 上海师范大学生命与环境科学学院讲师.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国安捷伦公司 Agilent 1100 型高效液相色谱仪, DAD 紫外检测器. 美国安捷伦公司 HP1100 LC/MSD 液质联用仪, C18 色谱柱 (ZORBAX SB-C18, 5 μ , 150 mm \times 4.6 mm).

甲醇 (色谱纯). 二次蒸馏水, 经 0.45 μ m 滤膜过滤. 核黄素粗产品为自行合成, 核黄素标准品由粗产品经 5 次重结晶得到, 熔程为: 279.5 ~ 280.5 $^{\circ}$ C. 偶合物标准品为偶合物样品经 5 次重结晶得到, 熔程为: 175.5 ~ 176.5 $^{\circ}$ C. 巴比妥酸标准品为分析纯.

1.2 分析条件

HPLC 条件: 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流动相为甲醇: 水 = 75: 25, 流速 1.0 mL/min, 测定波长为 224 nm. 进样量 20 μ L. 外标法定量. 质谱条件: ESI 离子源, 干燥氮气温度 350 $^{\circ}$ C, 流量 11 L/min, 雾化器压力 60 psi, 扫描范围: 50 ~ 2000 m/z.

2 结果与讨论

2.1 HPLC 分离条件的确定

2.1.1 测定波长的选择

图 1 是核黄素标准品的 UV 扫描图谱, 由图可见核黄素在 224, 267 nm 处均有很强的吸收. 但考虑在粗产品中可能还含有反应原料的剩余, 且因其吸收波长在 250 nm 以下, 故确定检测波长为 224 nm, 以保证对产品中的主要成分和杂质均有较高的检测灵敏度.

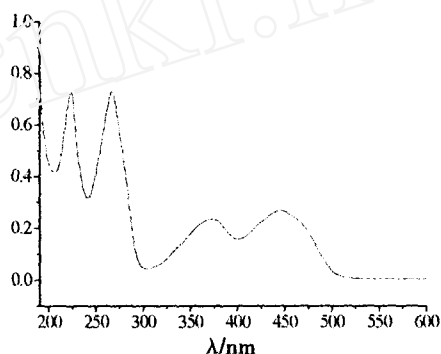


图 1 核黄素标准品的 UV 扫描图

2.1.2 流动相比对分离结果的影响

固定柱温为 30 $^{\circ}$ C, 在流动相体系为甲醇/水, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 224 nm 条件下, 依次改变甲醇与水的比例为 70: 30, 75: 25, 80: 20, 85: 15, 90: 10, 考察其对分离效果的影响. 由分离结果可知, 流动相比不同, 对核黄素及杂质的分离有很大的影响. 当流动相比为 80: 20, 85: 15 和 90: 10 时, 样品中各组分未能得到完全的分, 部分组分峰尚存在重叠现象. 当流动相比为 70: 30 和 75: 25 时, 由其色谱图可知样品中各组分均得到了很好的分离. 考虑 75: 25 的配比时各组分出峰较快, 峰形较好, 因此确定为最佳流动相比. 图 2 是最佳色谱操作条件下的核黄素粗产品的色谱图.

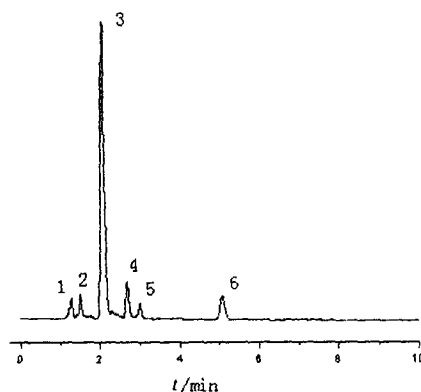


图 2 最佳色谱条件下核黄素粗产品的色谱分离图

2.2 HPLC-MS 定性分析

用 HPLC-MS 法测定核黄素粗产品中 6 个色谱峰的质谱数据列在表 1 中. 采用 HPLC 标准添加法, 即可判断图 2 中的峰 1, 3, 6 分别为巴比妥酸, 核黄素和原料偶合物, 该结果与 MS 定性分析的结果是一致的 (表 1). 可见反应的粗产品中尚有反应原料的残余. 对于峰 2 的成分, 由 MS 数据可以判断为核黄素的分解物. 核黄素在酸性或碱性溶液中, 容易发生分解, 反应方程式如图 3^[11]:

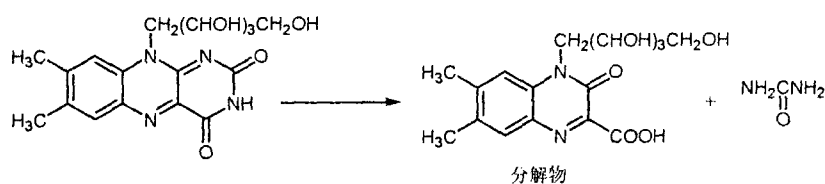


图3 反应方程式

因此杂质峰2的MS数据中352的分子离子峰可以解释为分解物的准分子离子加成物(M+K).即在粗产品的样品中,还可能有核黄素分解物的存在.对于杂质峰4和峰5成分,由于二者含量太少,所以其二级质谱所能提供的信息仍然很有限.但结合文献报道及已得到的MS数据,可以分别归属为感光黄素和光化色素.因为核黄素在碱性条件下遇光易分解产生微量的感光黄素,在中性及酸性条件下遇光则产生光化色素,其分解示意图如图4^[12]:

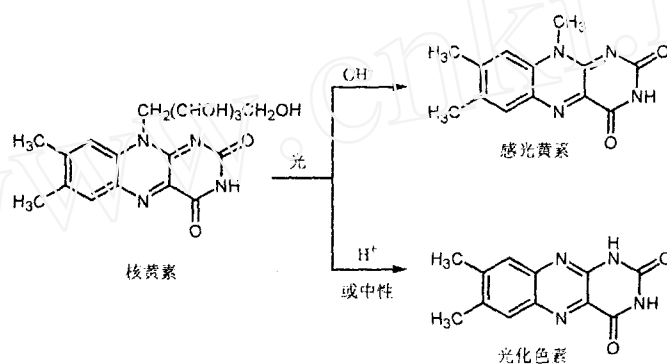


图4 分解示意图

峰4的质谱数据中295的离子碎片与峰5质谱数据中的281离子碎片相差14,同感光黄素(M=256)和光化色素(M=242)的分子量差值是一致的.故峰4质谱数据中的295碎片峰可以归属为感光黄素(M=256)的准分子离子加成物(M+K).同理峰5质谱数据中281的碎片峰可以归属为光化色素(242)的准分子离子加成物(M+K).

表1 核黄素粗产品色谱图中各峰的MS数据及相应的归属

| 峰序号 | 组分名称 | 离子碎片峰 |
|-----|--------|---|
| 1 | 巴比妥酸 | 129.0(M+H), 101.0 |
| 2 | 核黄素分解物 | 391(M+K), 257.9, 239.8, 194.9 |
| 3 | 核黄素 | 398.8(M+Na), 381.8, 355.8, 319.9, 278.8, 264.9, 239.7, 224.8, 143.9 |
| 4 | 感光黄素 | 294.9(M+K), 161.0 |
| 5 | 光化色素 | 280.9(M+K), 147.0 |
| 6 | 偶合物 | 359.9(M+H), 189.0, 147.0, 135.0 |

2.3 HPLC 定量分析

2.3.1 绘制核黄素标准品的工作曲线

按文献[5]的方法配制浓度分别为0.4mg/mL, 0.3mg/mL, 0.2mg/mL, 0.1mg/mL, 0.05mg/mL, 0.02mg/mL, 0.001mg/mL 和 0.0005mg/mL 的核黄素标样水溶液,在本文建立的色谱操作条件下进样测

试,得到线性回归方程为: $Y = -46.7596 + 32377.69X$, 相关系数: $r = 0.9999$. 信噪比为 10:1 时的最低定量限为 $0.5 \mu\text{g/mL}$.

2.3.2 精密度与回收率实验

取核黄素标样,配制成标准溶液,连续测定 6 次,计算 RSD,结果为 0.97%. 取任一核黄素粗产品,配制成浓度均为 0.3mg/mL 的样品溶液 3 份,采用标准加入法做回收率实验,结果见表 2.

表 2 核黄素回收率

| 加入(mg) | 检出(mg) | | | 相对标准偏差(%) | 平均检出(mg) | 回收率(%) |
|--------|--------|------|------|-----------|----------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | | | |
| 10.6 | 10.4 | 10.4 | 10.5 | 0.70 | 10.4 | 98.1 |
| 7.9 | 7.8 | 7.7 | 7.8 | 0.91 | 7.8 | 98.7 |
| 4.8 | 4.8 | 4.9 | 4.9 | 1.4 | 4.9 | 102.1 |

由表 2 数据可见,回收率测定的结果在 98.1% ~ 102.1% 之间,RSD 保持在 1.4% 以内,准确度和专属性均符合要求.

2.3.3 对核黄素粗产品中主要杂质的定量分析

(1) 外标法测偶合物

配制浓度范围为 $0.001 \sim 0.1 \text{g/mL}$ 的偶合物标样的甲醇/水溶液,在本文建立的色谱操作条件下进行测定,测得 RSD = 1.9%, 相关系数 $r = 0.9997$. 信噪比为 10:1 时的最低定量浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$.

(2) 外标法测巴比妥酸

配制浓度范围为 $0.0006 \sim 0.1 \text{mg/mL}$ 的巴比妥酸标样的水溶液,在本文建立的色谱操作条件下进行测定,测得 RSD = 0.6%, 相关系数 $r = 0.9991$. 信噪比为 10:1 时的最低定量浓度为 $0.6 \mu\text{g/mL}$.

2.3.4 核黄素粗产品的定量检测

5 批自行合成的核黄素样品的实测结果列于表 3 中.

表 3 核黄素粗产品的定量分析

| 批次 | 成分(%) | | |
|----|-------|------|------|
| | 核黄素 | 偶合物 | 巴比妥酸 |
| 1 | 85.64 | 2.15 | 4.21 |
| 2 | 72.39 | 3.76 | 8.75 |
| 3 | 78.62 | 2.62 | 7.59 |
| 4 | 66.83 | 4.17 | 5.37 |
| 5 | 68.96 | 3.93 | 9.21 |

3 结 论

综上采用 LC-MS 方法分析确定了核黄素粗产品中的主要成分,并建立了一套新的、简便易行的核黄素粗品的 HPLC 分析方法,该方法具有经济、实用的突出特点,对仪器、试剂配置要求不高,检测过程方便快速,测定结果准确可靠,十分适用于工厂、企业的日常生产质量监控.

参考文献:

- [1] ARSLAN C. Effect of dietary probiotic supplementation on growth performance in the rock partridge[J]. Turk J Vet Anim Sci, 2004, 28: 887 - 891.
- [2] KURTOGLU V, KURTOGLU F, SEKER E, et al. Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol[J]. Food Addit Contam, 2004, 21: 817 - 823.
- [3] HORIUCHI J, HIRAGA K. Industrial application of fuzzy control to large scale recombinant vitamin B2 production[J]. J Biosci Bioeng, 1999, 87: 365 - 371.
- [4] ERNST H, LEININGER H, PAUST J. Preparation of ribitylylidine[P]. U S Patent 4806686, 1989.
- [5] WOLF R, REIFF F, WITTMANN R, et al. Process for the preparation of riboflavin[P]. U S Patent 4555158, 1982.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:化学工业出版社, 2005. 665.
- [7] GB/T 12391 - 1990, 食物中核黄素的测定方法[S].
- [8] US Pharmacopeia 28[S], 2005. 1723.
- [9] European Pharmacopeia 4[S], 2002. 1859.
- [10] 鲁彦, 张津枫, 邓国才, 陈荣梯. 4,5-二甲基-N-(D)脱氧核糖醇基-2-偶氮苯基苯胺环化反应产物的高效液相色谱分析[J]. 中国饲料, 2001, 4: 27 - 28.
- [11] WAGNER G. Purification and crystallization of riboflavin[P]. U S Patent 6150364, 2000.
- [12] 安登魁. 药物分析[M]. 济南: 济南出版社, 1992. 1354 - 1356.

HPLC - MS analysis of crude product of 7,8-dimethyl-10-(D-1- ribitol) -isoalloxazin

GUO Jian-yu¹, LU Yan²

(1. Colloge of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China;

2. Department of Chemical Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 200235, China)

Abstract: In this paper, a new analysis method for crude product of 7,8-dimethyl-10-(D-1-ribitol)-isoalloxazin using HPLC-MS was established. By using C₁₈ column and methanol/water was used as the mobile phase. Under the optimal chromatographic conditions, all the components in the crude product were well separated. These components were identified by the MS data and were quantitative analyzed by HPLC using external reference method.

Key words: 7,8-dimethyl-10-(D-1-ribitol)-isoalloxazin; crude product; HPLC-MS; analysis; impurities