生物资源　2026,48(5):445～460
Biotic Resources

“刊会融合”专栏

DOI:10.14188/j.ajsh.20260063

亚硝酸钠无氰前处理结合分段梯度HPLC测定复杂发酵液中维生素B_{12}

杨小雪[1†],方　智[2†],郭凤月[1],陈小蓉[1],杨业泽华[1],刘瑞桑[1*],代　俊[1*]

(1. 湖北工业大学 发酵工程教育部重点实验室/工业微生物湖北省重点实验室/工业发酵湖北省协同创新中心,湖北 武汉 430068;
2. 湖北广济药业股份有限公司,湖北 武穴 435400)

摘要:针对产维生素B_{12}菌株发酵液中菌体、色素和油脂等共存组分干扰目标峰识别以及传统氰化转化路线存在安全与操作负担的问题,建立了亚硝酸钠无氰前处理结合分段梯度高效液相色谱测定维生素B_{12}的方法。标准品和发酵液均经5%亚硝酸钠沸水浴60 min同条件处理,以氰钴胺素当量表征维生素B_{12}含量;采用Shim-pack GIS C_{18}色谱柱,以0.1%醋酸水溶液-甲醇分段梯度洗脱,在361 nm进行检测。未接种培养基、处理标准品、发酵液和处理前加标发酵液的色谱行为以及液相色谱-高分辨质谱(LC-HRMS)的精确质量和同位素包络共同支持目标峰身份。在0.45～17.86 mg/L范围内建立校准模型(Y=0.235 0X—0.030 4,R^2=0.996 0),实际样品进样浓度(6.3～6.8 mg/L)处于校准区间并高于定量限;6份独立前处理样品的测定结果的相对标准偏差(RSD)为1.83%,三水平加标回收率为83.7%～110.1%。30针短序列前后目标峰保留时间、峰面积和系统压力均值变化分别为－0.04%、－0.16%和0.33%。该方法不使用氰化物,还兼顾了复杂发酵基质中的目标峰识别、定量重复性和短序列运行的稳定性,可用于不同产维生素B_{12}菌株发酵样品的常规测定。

关键词:维生素B_{12};氰钴胺素当量;高效液相色谱;亚硝酸钠前处理;发酵液
中图分类号:O657.7＋2　　文献标志码:A　　文章编号:2096-3491(2026)05-0445-16

Determination of vitamin B_{12} in complex fermentation broth by cyanide-free sodium nitrite pretreatment and segmented-gradient HPLC

YANG Xiaoxue[1†], FANG Zhi[2†], GUO Fengyue[1], CHEN Xiaorong[1], YANG Yezehua[1], LIU Ruisang[1*], DAI Jun[1*]

(1. Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), Hubei Provincial Key Laboratory of Industrial Microbiology, Hubei Provincial Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, Hubei, China;
2. Hubei Guangji Pharmaceutical Co., Ltd., Wuxue 435400, Hubei, China)

Abstract: A cyanide-free sodium nitrite pretreatment combined with segmented-gradient high-performance liquid chromatography (HPLC) was developed for vitamin B_{12} determination in complex fermentation broth. Standards and

收稿日期:2026-09-30　修回日期:2026-10-09　接受日期:2026-10-19
作者简介:杨小雪(2002-),女,硕士生,研究方向为维生素B_{12}发酵及分析检测,E-mail:102410695@hbut.edu.cn;方智(1982-),男,高级工程师,主要从事维生素B_{12}发酵生产研究,E-mail:mcgodern@aliyun.com;† 为共同第一作者,对本文有相同的贡献
* 通信作者:代俊(1982-),男,博士,教授,研究方向为功能酵母与酿造微生物,E-mail:jundai@hbut.edu.cn;刘瑞桑(1984-),男,高级实验师,研究方向为发酵工程,E-mail:ruisangliu2009@hbut.edu.cn
基金项目:湖北省自然科学基金项目(2024AFB803)

引用格式:杨小雪,方智,郭凤月,等. 亚硝酸钠无氰前处理结合分段梯度HPLC测定复杂发酵液中维生素B_{12}[J]. 生物资源, 2026, 48(5): 445-460.
Yang X X, Fang Z, Guo F Y, et al. Determination of vitamin B_{12} in complex fermentation broth by cyanide-free sodium nitrite pretreatment and segmented-gradient HPLC [J]. Biotic Resources, 2026, 48(5): 445-460.

broth samples were treated identically with 5% sodium nitrite in a boiling-water bath for 60 min, and results were expressed as cyanocobalamin equivalent. Separation was performed on a Shim-pack GIS C_{18} column using 0.1% aqueous acetic acid and methanol with ultraviolet (UV) detection at 361 nm. Chromatographic comparisons of the uninoculated-medium blank, treated standard, broth and broth spiked before pretreatment, together with liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) accurate-mass and isotopic-envelope evidence, supported target-peak identity. The calibration range was 0.45—17.86 mg/L (Y=0.235 0X−0.030 4, R^2=0.996 0), and injected sample concentrations of 6.3－6.8 mg/L were within this interval and above the limit of quantification (LOQ). Six independently pretreated samples gave a relative standard deviation (RSD) of 1.83%, and recoveries at three spiking levels were 83.7%—110.1%. Across a 30-injection sequence, the mean changes in retention time, peak area and system pressure were −0.04%, −0.16% and 0.33%, respectively. The method avoids cyanide while providing selective peak recognition, repeatable quantitation and stable short-sequence operation for routine analysis of fermentation samples from different vitamin B_{12}-producing strains.

Key words: vitamin B_{12}; cyanocobalamin equivalent; high performance liquid chromatography (HPLC); sodium nitrite pretreatment; fermentation broth

0 引 言

维生素B_{12}(vitamin B_{12}, VB_{12})是钴胺素类化合物总称,氰钴胺素为其化学性质最稳定、最常用的标准品与商品化形式,是人体自身无法合成、必须外源摄入的水溶性维生素,长期缺乏可导致巨幼细胞性贫血及不可逆神经损伤[1],是食品营养强化剂、膳食补充剂及饲料添加剂领域的重要微量营养素[1]。市售VB_{12}几乎全部依赖微生物发酵生产[2-4]。脱氮假单胞菌(*Pseudomonas denitrificans*)、巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*)等传统菌株因代谢途径复杂、发酵周期长而制约生产效率[5-6];黏着剑菌(*Ensifer adhaerens*)作为新兴生产宿主,钴胺素合成基因簇完整、遗传背景清晰(近缘菌株Casida A已完成全基因组测序)、耐高密度发酵,已多次获欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)认定为合规饲料添加剂生产菌株[7-8],并经代谢工程手段实现产量提升[9-11]。图1(a)为氰钴胺素(VB_{12}商品化标准品形式)的结构[12-13],其咕啉环-钴中心-轴向配体构成天然辅酶形式(腺苷钴胺素、甲基钴胺素、羟钴胺素)与商品化形式(氰钴胺素),是本研究前处理方法设计的化学基础。

现有维生素B_{12}定量方法主要包括微生物法、紫外分光光度法和HPLC法。微生物法耗时较长且易受指示菌状态影响,紫外法易受蛋白质和色素等共存物干扰[14];HPLC具有分离和定量优势,已用于食品及发酵样品中维生素B_{12}测定[14-17],也广泛用于食品、药材及发酵液中其他成分的分析[18-23]。然而,既有方法多面向多维生素片剂、乳制品和饮料等基质[15-16,24-28]。总维生素B_{12}测定常采用氰化转化获得稳定的氰钴胺素响应,但含氰试剂增加了安全防护和废液处置负担。因此,复杂基质中的转化与定量仍面临挑战[29-30]。产维生素B_{12}菌株发酵液含有高浓度菌体、色素、油脂及多种钴胺素,其基质负荷明显高于上述食品样品。已有专利报道了酸化、亚硝酸盐处理及高效液相色谱-紫外检测(HPLC-UV)测定路线[31],也有研究采用HPLC-UV直接测定发酵液中的钴胺素[11],但尚缺少将无氰前处理、复杂基质分离和批量运行稳定性纳入同一流程的系统评价。因此,本研究需要解决的核心问题不是能否检出维生素B_{12},而是能否在不使用氰化物的条件下,使复杂发酵液获得可识别、可校准并可连续测定的色谱响应。

为考察方法在复杂发酵基质中的适用性,本研究选择由黏着剑菌野生型SW-2经常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变[32]和酶标仪双波长(550/650 nm)高通量初筛[33-35]获得的SW-2M7菌株发酵液作为代表性样品。SW-2M7菌株发酵液中的菌体、胞外多糖、色素和油脂类代谢物积累明显,能够对前处理、峰识别和连续进样形成较强的基质挑战。因此,SW-2M7在本研究中承担的是复杂基质验证载体,而不是方法适用范围的菌株限定。

本研究围绕3个相互关联的环节构建检测流程:首先,以亚硝酸钠替代氰化物,标准品与发酵液样品采用相同的前处理流程,全文以氰钴胺素当量作为响应量;其次,采用分段梯度实现目标峰分离、高比例有机相清洗和柱再平衡,作为一个样品标准的分析检测周期;最后,通过空白、标准品、处理前加标样品的色谱对照以及液相色谱-高分辨质谱(liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, LC-HRMS)一级质谱精确质量和同位素

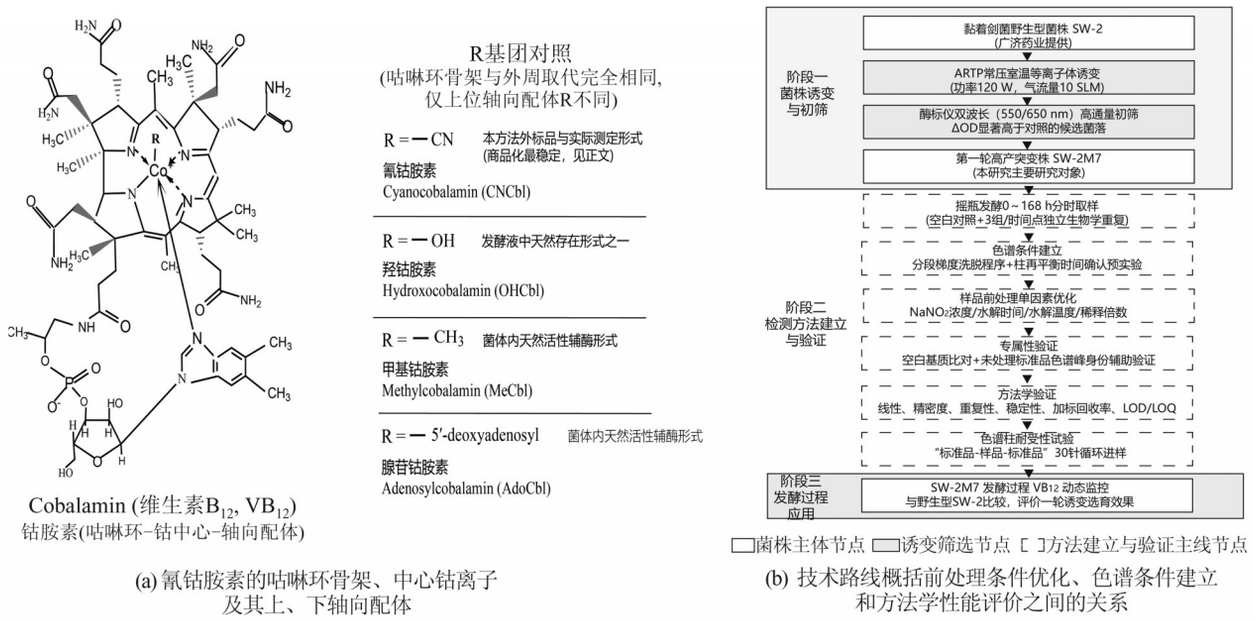


图1 氰钴胺素(维生素B_{12})结构示意图及氰钴胺素高效液相色谱(HPLC)检测方法技术路线图

Figure 1 Schematic structure of cyanocobalamin (vitamin B_{12}) and technical roadmap for the high-performance liquid chromatography (HPLC) method for cyanocobalamin

注:(a)中天然辅酶形式的上位轴向配体不同。本图以氰钴胺素为例绘制。

Note: In (a), natural coenzyme forms differ in the upper axial ligand. Cyanocobalamin is shown as the reference form.

包络辅助确认目标峰,并以独立前处理重复性、加标回收和30针短序列评价定量与批量运行测试相关性能。研究旨在建立一套参数明确、证据相互印证且可用于不同产维生素B_{12}菌株发酵样品的常规HPLC方法。技术路线见图1(b)。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黏着剑菌野生型菌株SW-2(广济药业提供);第一轮ARTP诱变候选高产菌株SW-2M7(本研究主要研究对象):以SW-2为出发菌株,经ARTP诱变结合酶标仪双波长(550/650 nm)高通量初筛获得,二者均保藏于本实验室;氰钴胺素(VB_{12})标准品(纯度≥98%,阿拉丁公司,CAS登记号:68-19-9);色谱级甲醇、色谱级冰醋酸:默克(Merck)或同等级别试剂;分析纯亚硝酸钠:国药集团化学试剂有限公司;18.2 MΩ·cm超纯水:Milli-Q超纯水系统制备;0.22 μm水系尼龙滤膜。

种子培养基:蔗糖45 g/L、大豆蛋白胨15 g/L、甜菜碱7 g/L、磷酸氢二铵1.2 g/L、硫酸铵2.0 g/L、尿素1.2 g/L、磷酸二氢钾0.9 g/L、七水硫酸镁1.5 g/L、七水硫酸锌0.02 g/L、硫酸锰0.02 g/L、七水硫酸亚铁0.025 g/L、生物素0.001 g/L、5,6-二甲基苯并咪唑0.009 g/L、氯化钴0.02 g/L和轻质碳酸钙0.5 g/L,pH为7.3～7.4,分装50 mL/250 mL三角瓶于115 ℃灭菌30 min。

发酵培养基:蔗糖95 g/L、大豆蛋白胨22 g/L、甜菜碱10 g/L、磷酸氢二铵1.5 g/L、硫酸铵5.0 g/L、尿素2.5 g/L、磷酸二氢钾1.0 g/L、七水硫酸镁3.5 g/L、七水硫酸锌0.07 g/L、硫酸锰0.02 g/L、七水硫酸亚铁0.03 g/L、生物素0.001 g/L、5,6-二甲基苯并咪唑0.08 g/L、氯化钴0.12 g/L、吐温-80 1 g/L和轻质碳酸钙2.5 g/L,调节后pH同为7.3～7.4,分装35 mL/250 mL三角瓶并于115 ℃灭菌30 min。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪(UltiMate 3000系列,配紫外检测器,检测波长361 nm),Thermo Scientific(Dionex Softron GmbH,德国);Shim-pack GIS C_{18}色谱柱(规格:4.6 mm×250 mm,5 μm),岛津公司;台式高速冷冻离心机,Eppendorf股份公司;电热恒温水浴锅(HHS系列,用于水解温度梯度考察),上海虞龙仪器设备有限公司;电磁炉(Midea C21-RT2166,额定功率2 100 W);美的十万分之一电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;恒温摇床(HNYC-202T,智能恒温培养振荡器),天津欧诺仪器股份有限公司;净化工作台(SW-CJ-2FD),上海博迅实业有限公司医疗设备厂;立式压力蒸汽灭菌器,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;

电热鼓风干燥箱(GZX-9240MBE),上海博迅实业有限公司医疗设备厂;ARTP诱变育种仪(用于菌株诱变选育);酶标仪(用于诱变菌株初筛)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株活化与发酵培养

发酵周期168 h(7 d)。以SW-2M7为主要监控对象,设置空白培养基组(3瓶)与正常接种发酵组(24瓶,含少量备用瓶)。接种后每隔24 h取样(24~168 h共7个时间点),各取3个独立摇瓶(每瓶为一个独立生物学重复),测定发酵液表观浊度(600 nm处吸光度,以下标注为OD_{600});因培养基含碳酸钙等不溶性成分及色素,该指标反映发酵液表观浊度而非严格意义上的菌体干重,仅作生长趋势的相对参考;并取样10 mL避光冷冻保存,用于后续VB_{12}测定;各时间点样品单独保存,不合并混匀。另取168 h发酵结束后的剩余发酵液充分混匀、分装保存,作为"基准底物"用于§1.3.4~§1.3.7中各项实验。

1.3.2 色谱条件

色谱柱:Shim-pack GIS C_{18}(4.6 mm×250 mm,5 μm),配GIS C_{18}保护柱;检测波长361 nm;流速1.0 mL/min;柱温40 ℃;进样量20 μL。流动相A为0.1%(*V*/*V*)醋酸水溶液,B为甲醇,分段梯度见表1。0~7 min采用70%A-30%B等度洗脱,使目标峰与邻近基质峰分离;7~7.5 min线性切换至15%A-85%B;7.5~12 min维持高有机相以洗脱部分强保留杂质;12~12.5 min回到初始比例;12.5~18 min重新平衡。总运行时间18 min;5.5 min重新平衡时长由连续循环试验的保留时间、峰面积和系统压力结果确定。

1.3.3 标准溶液配制

准确称取氰钴胺素标准品2.00 mg,以超纯水溶解并定容至2.00 mL,配制1.00 mg/mL储备液,避光、4 ℃保存。标准系列与样品采用相同的酸化、5%亚硝酸钠和加热处理;处理液按实际体积折算后配制0.45、0.89、1.79、3.57、5.36、7.14、8.93、13.39、17.86 mg/L共9个质量浓度点。独立配制3套标准系列,每点平行进样2次;选择其中一套代表性工作曲线进行样品定量,并以3套曲线斜率的RSD评价标准系列配制与响应的一致性。另配制未经酸化、亚硝酸钠和加热处理的氰钴胺素标准品,作为§1.3.5目标峰身份比对参比。

1.3.4 样品前处理及单因素优化

发酵液中可能共存羟钴胺素、腺苷钴胺素和甲基钴胺素等形式,其吸光系数、稳定性和色谱行为不同。已有研究表明,亚硝酸根可与羟钴胺素发生轴向配体取代反应[36]。前处理流程为:取发酵液(或标准储备液)2.00 mL,依次加入冰乙酸40 μL和5%亚硝酸钠溶液200 μL,混匀,在密闭容器中沸水浴60 min,冷却后于37 ℃放置45 min。样品处理液取1.50 mL,加超纯水5.00 mL,8 000 r/min离心15 min;取上清200 μL,加水800 μL,经0.22 μm滤膜过滤。定容稀释倍数D=21.67,连同试剂稀释因子f=1.12,总换算倍数为24.27。标准品与样品采用相同试剂比例和反应条件,使检测响应建立在一致的前处理化学条件上;本文结果按该条件下的氰钴胺素当量报告。

采用单因素试验设计(表2),以VB_{12}峰面积为评价指标;各水平进样时同步核查目标峰分离度及拖尾情况,均未见峰形明显异常。峰面积数据见§2.3中表3。依次对以下4个前处理参数进行优化,

表1 分段梯度洗脱程序

Table 1 Segmented gradient elution program

时间/min	A相(0.1%醋酸)/%	B相(甲醇)/%	阶段说明
0~7	70	30	等度分离段:目标峰与邻近基质峰分离
7~7.5	70→15	30→85	线性切换段
7.5~12	15	85	高有机相清洗段:洗脱部分强保留杂质
12~12.5	15→70	85→30	线性切换段
12.5~18	70	30	重新平衡段

注:柱体积估算用于初步设置重新平衡时间。18 min总周期下连续5次"空白基质-标准品-样品-标准品"循环中,目标峰保留时间的相对标准偏差(relative standard deviation,RSD)为0.22%、峰面积RSD为0.17%,柱前压力相对初始值的最大偏差为4.07%,据此确定5.5 min重新平衡段。

Note: Column-volume estimation was used to set the initial re-equilibration interval. During five consecutive blank-matrix-standard-sample-standard cycles within the 18 min method, the target-peak retention-time relative standard deviation (RSD) was 0.22%, the peak-area RSD was 0.17%, and the maximum deviation in system pressure from the initial value was 4.07%; these results supported selection of a 5.5 min re-equilibration step.

每个水平设3个平行处理，所有优化实验统一使用§1.3.1所述的168 h基准底物。

为考察亚硝酸钠用量对氰钴胺素标准品响应的影响，平行设置5%与12.5%亚硝酸钠处理组，各3个独立处理。两组均值采用独立样本t检验比较，RSD用于描述组内离散程度。单因素优化确定最终条件后，标准品与样品统一采用5%亚硝酸钠处理，试剂种类、加入量、反应时间和温度保持一致。

1.3.5 选择性及目标峰身份确认

以未接种培养基、经处理氰钴胺素标准品和SW-2M7发酵液来评价方法的选择性。空白培养基按最终前处理；样品色谱图包括D=10和D=50两种稀释水平，标准品同法处理。选择性判定依据为：空白在目标保留时间窗口无明显响应，样品目标峰

表2 单因素前处理条件优化设计

Table 2 Single-factor design for pretreatment condition optimization

优化顺序	考察因素	固定条件	考察水平
①先定	亚硝酸钠质量分数	沸水浴水解，水解时间30 min	5%、10%、12.5%、15%（4水平×3平行）
②再定	水解时间	最佳$NaNO_2$浓度，沸水浴水解	10、20、30、45、60 min（5水平×3平行）
③验证	水解温度	最佳$NaNO_2$浓度，最佳水解时间	80、90、100 ℃及沸水浴（4水平×3平行；80、90、100 ℃为恒温水浴锅，沸水浴为电磁炉）
④单独考察	稀释倍数	最佳前处理条件	5、10、20、30、40倍（5水平×3平行，均为处理液的定容稀释倍数D，不含f）

注："X倍稀释"均指处理液冷却后由超纯水引入的定容稀释倍数D，不含冰乙酸与亚硝酸钠引入的固定稀释因子f=1.12。D=50仅用于部分专属性色谱图和30针短序列考察；最终定量、独立前处理重复性和跨日测定采用D=21.67（总换算倍数$f\times D$=24.27）。不同D值对应的基质负荷不同，相关结果仅在各自试验条件下解释。

Note: The term X-fold dilution refers to the volumetric dilution factor D introduced with ultrapure water after cooling and excludes the fixed reagent-dilution factor f=1.12. D=50 was used only for selected specificity chromatograms and the 30 injection short-sequence test; final quantitation, independent-preparation repeatability, and cross-day measurements used D=21.67 (overall factor $f\times D$=24.27). Because matrix load differs among dilution levels, each result is interpreted only under its tested condition.

表3 单因素前处理条件优化结果

Table 3 Results of single-factor optimization of pretreatment conditions

因素	水平	峰面积（平均值±标准差，n=3）	RSD/%	显著性	氰钴胺素当量质量浓度/(mg·L^{-1})
亚硝酸钠质量分数/%	5	1.559 0±0.009 5	0.61	a	164.2±1.0
	10	1.335 6±0.024 3	1.82	c	无匹配曲线
	12.5	1.413 4±0.009 8	0.70	b	209.6±1.5
	15	1.325 9±0.012 9	0.97	c	无匹配曲线
水解时间/min	10	0.897 1±0.058 7	6.55	a	95.7±6.0
	20	1.366 7±0.028 6	2.09	b	144.4±3.0
	30	1.354 3±0.013 9	1.02	b	143.0±1.3
	45	1.542 2±0.010 5	0.68	c	162.4±1.1
	60	1.592 0±0.044 1	2.77	c	167.6±4.6
水解温度/℃（恒温水浴锅）	80	0.970 6±0.012 8	1.31	a	103.4±1.3
	90	1.114 5±0.046 1	4.14	b	118.2±4.8
	100	2.267 8±0.034 6	1.53	c	237.3±3.6
水解温度（电磁炉）	沸水浴	1.364 4±0.066 6	4.88	—	144.1±6.9

注：峰面积为色谱工作站给出的直接响应值。同一因素内不同小写字母表示差异显著（P<0.05，Tukey HSD）。亚硝酸钠5%水平按对应工作曲线换算，12.5%水平按同批匹配曲线换算；10%和15%未建立匹配曲线，不换算浓度。匹配曲线换算值用于比较不同响应口径。其余条件均采用5%亚硝酸钠。电磁炉沸水浴与恒温水浴锅为不同加热装置。

Note: Peak area is the direct chromatographic response. Different lowercase letters within one factor indicate significant differences (P<0.05, Tukey HSD). The 5% sodium-nitrite level was converted using the corresponding working curve and the 12.5% level using its batch-matched curve; no matched curves were established for the 10% and 15% levels. Matched-curve values were used to compare responses on a consistent basis. The induction-cooker boiling-water bath and thermostatic-water-bath results are presented separately because different heating devices were used.

与标准品保留时间一致,且目标峰与邻近基质峰明显分离。不同稀释水平用于同时考察较高基质负荷和较低基质负荷下的目标峰分离情况。

比较未经处理的氰钴胺素标准品、经处理标准品、处理发酵液和处理前加标发酵液的保留时间与共出峰行为。目标峰与标准品保留时间一致,加标后同一峰增强;LC-HRMS一级质谱进一步从精确质量、保留时间和同位素包络3个维度确认氰钴胺素相关离子。色谱与高分辨质谱证据相互印证,用于目标峰身份确认。

LC-HRMS一级质谱辅助身份确认取以下5份样品:S1为未经处理的氰钴胺素标准品(仅超纯水溶解);S2为按§1.3.4最终条件处理的氰钴胺素标准品;S3为同法处理的SW-2M7发酵液;S4为在前处理之前加入已知量氰钴胺素标准品的发酵液;S5为未接种空白培养基,同法处理。以氰钴胺素双电荷分子离子$[M+2H]^{2+}$(理论m/z 678.290 98)为提取离子,(提取窗口±10)×10^{-6},比较各样品目标峰的峰顶保留时间、实测精确质量、质量误差及峰顶扫描的同位素包络;同位素包络的相似性以各样品前4个同位素峰相对强度相对于S1的余弦相似度表征。仪器为Thermo Scientific Q Exactive四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪,配加热电喷雾离子源(heated electrospray ionization,HESI),Xcalibur软件采集。以下采集参数均按原始数据文件记录的仪器方法及运行状态列出。液相部分:流速0.2 mL/min;流动相A为水、B为甲醇(不含酸类调节剂),二者梯度为0~3 min A由90%线性降至10%(B由10%升至90%);3~6 min保持10%A,6.1 min回到90%A并平衡至10 min,单针运行时间10 min;柱温箱未控温;进样量S1、S2为1 μL,S3~S5为20 μL;0.01~9.99 min流路切入质谱。色谱柱为Agilent Poroshell 120 EC-C_{18}柱(2.1 mm×100 mm,2.7 μm),与HPLC-UV所用Shim-pack GIS C_{18}柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)规格不同,流动相体系(本法为水-甲醇,HPLC-UV为0.1%醋酸水溶液-甲醇)亦不同,二者仅前处理条件一致,色谱条件不可直接比较。质谱部分:正离子模式(S1另同时采集负离子扫描),喷雾电压3.5 kV,毛细管温度350 ℃,鞘气40、辅助气10(任意单位),辅助气加热器未开启,S-lens射频(radio frequency,RF)电平50;分辨率70 000,自动增益控制(automatic gain control,AGC)目标值3×10^6,最大注入时间200 ms,微扫描1次,质心模式采集,未使用锁定质量校正。S1采用m/z 500~2 000全扫描;S2~S5采用m/z 670~680窄范围扫描。本批数据仅采集一级质谱(MS1),未采集二级碎片信息。由于LC-HRMS与HPLC-UV的色谱条件不同,二者目标峰保留时间(约4.27 min与约4.8 min)不直接可比。

1.3.6 方法学性能评价

参照国际人用药品注册技术协调会(International Council for Harmonisation,ICH)Q2(R2)[37]及《中国药典》2020年版四部通则9101[38]的相关原则,对校准模型、连续进样、跨日测定、独立前处理重复性、稳定性、加标回收及检出限/定量限进行评价。各评价项目均采用最终确定的5%亚硝酸钠和沸水浴60 min前处理条件。

1)校准模型:以0.45~17.86 mg/L标准工作液的质量浓度(X)和峰面积(Y)建立工作曲线并报告决定系数;独立配制3套标准系列,每点平行进样2次,以曲线斜率及其RSD评价标准系列的一致性。

2)连续进样与跨日测定:同一份经前处理的SW-2M7样品同日连续进样7次,计算峰面积RSD;另按最终D=21.67方案连续3 d测定,计算峰面积和折算含量RSD,用于评价日常分析中的跨日响应一致性。

3)重复性:取同一批次发酵液,独立进行前处理(移取、加酸、加亚硝酸钠、水解、离心、定容稀释)6份,测定后计算含量RSD。

4)稳定性:取1份经前处理样品,于0、6、12和24 h进样,计算各时间点相对0 h的峰面积变化,据此确定前处理后样品的进样安排。

5)加标回收率:采用定容式加标设计,取发酵液2.00 mL共4份,分别加入质量浓度1.00 mg/mL的氰钴胺素标准溶液0、13、26、39 μL,依次以超纯水补足39、26、13、0 μL,使4个水平加入的总体积均为39 μL、待处理液体积一致(2.039 mL),避免加标改变体积所引入的换算偏差;按§1.3.4最终条件统一加冰乙酸40 μL与5%亚硝酸钠溶液200 μL处理,按D=21.67稀释进样。由于各水平体积一致,回收率可直接按式(1)以质量浓度计算:

$$\rho_{理论加入}=C_{标}\times V_{标}/V_{待处理}$$

$$回收率/\%=(\rho_{加标}-\rho_{未加标})/\rho_{理论加入}\times100\% \quad (1)$$

式中,$\rho_{理论加入}$为加标在待处理液中引入的理论质量浓度。

6)检出限(LOD)与定量限(LOQ):

$$LOD=3.3\delta/S、\ LOQ=10\delta/S \quad (2)$$

按《中国药典》2020年版四部通则9101所列公式,以

工作曲线残余标准差δ和斜率S估算LOD与LOQ；将样品实际进样浓度与校准区间及LOQ进行核对，以确认样品采用插值定量。

1.3.7 短序列连续进样考察

采用“标准品-样品-标准品”短序列：起始5针为经同法处理的50 mg/L氰钴胺素标准品，第6～25针为D=50的SW-2M7样品，末尾5针再次进标准品，共30针。比较起始和末尾标准品的保留时间、峰面积、理论塔板数及系统压力，以评价连续样品分析前后的系统稳定性。

1.4 数据处理与统计分析

采用Excel 2019及SPSS 26.0对数据进行整理与统计分析，结果以“平均值±标准差”表示，采用单因素方差分析（one-way ANOVA）比较各处理组间差异，方差齐性经Levene检验确认后，组间两两比较采用Tukey真实显著性差异（honestly significant difference，HSD）法；两组间比较采用独立样本t检验。P<0.05判定为差异显著，P<0.01判定为差异极显著。数值修约按GB/T 8170—2008《数值修约规则与极限数值的表示和判定》执行[39]。图表绘制采用Origin 2021。

发酵液中VB_{12}质量浓度按公式（3）计算：

$$\rho=\rho'\times f\times D \tag{3}$$

式中，ρ为发酵液中VB_{12}的质量浓度/（mg/L）；ρ'为由标准曲线回归方程计算得到的进样溶液中VB_{12}质量浓度/（mg/L）；f为前处理中冰乙酸与亚硝酸钠引入的稀释因子，f=（2 000＋40＋200）/2 000＝1.12；D为处理液经超纯水定容稀释的倍数，样品与标准品的取值不同：样品固定为D=（1.50＋5.00）/1.50×5＝21.67，即§1.3.4所述离心前1.50 mL处理液加5.00 mL水的4.33倍稀释，与离心后200 μL上清液加800 μL水的5倍稀释之积；标准工作液则按§1.3.3所述各取样体积分别取值。由于标准品与样品采用完全相同的取样体积与加试剂体积，f对二者的影响一致，故样品发酵液VB_{12}质量浓度按$\rho=\rho'\times1.12\times21.67=\rho'\times24.27$计算；本研究以进样溶液的真实质量浓度作为标准曲线横坐标，故计算时须显式乘以该因子。

2 结果与分析

2.1 目标峰身份的正交确认

HPLC-UV色谱图显示，未处理氰钴胺素标准在约4.8 min出现主峰；经酸性亚硝酸盐处理后，目标峰附近响应发生变化，并在约6.3 min出现次级峰。处理发酵液与同法处理标准在HPLC目标保留时间附近共出峰。为避免仅凭保留时间和紫外响应判定峰身份，进一步采用LC-HRMS比较标准品、处理样品、处理前加标样品和未接种培养基空白。

在m/z 678.290 98±10^{-5}取离子流图中，S1、S2、S3和S4的峰顶保留时间分别为4.268 4、4.270 0、4.257 4和4.252 9 min，实测m/z分别为678.289 37、678.289 79、678.290 59和678.289 86，对应质量误差分别为-2.37×10^{-6}、-1.74×10^{-6}、-0.57×10^{-6}和-1.65×10^{-6}，见图2（a）和（b）。S1～S4均呈现约0.50 Da间隔的双电荷同位素峰簇；S2、S3和S4相对于S1的前4个同位素峰相对强度余弦相似度分别为0.999 92、0.999 96和0.999 99，见图2（c）。S5在标准品固定保留时间窗口内未出现显著对应峰，其积分面积仅为S3的0.55%；S4中同一保留时间和同一精确质量离子的固定窗口面积较S3增加59.61%。精确质量、同位素包络、空白背景和加标响应四方面结果一致，支持处理后发酵液目标峰为氰钴胺素相关离子。

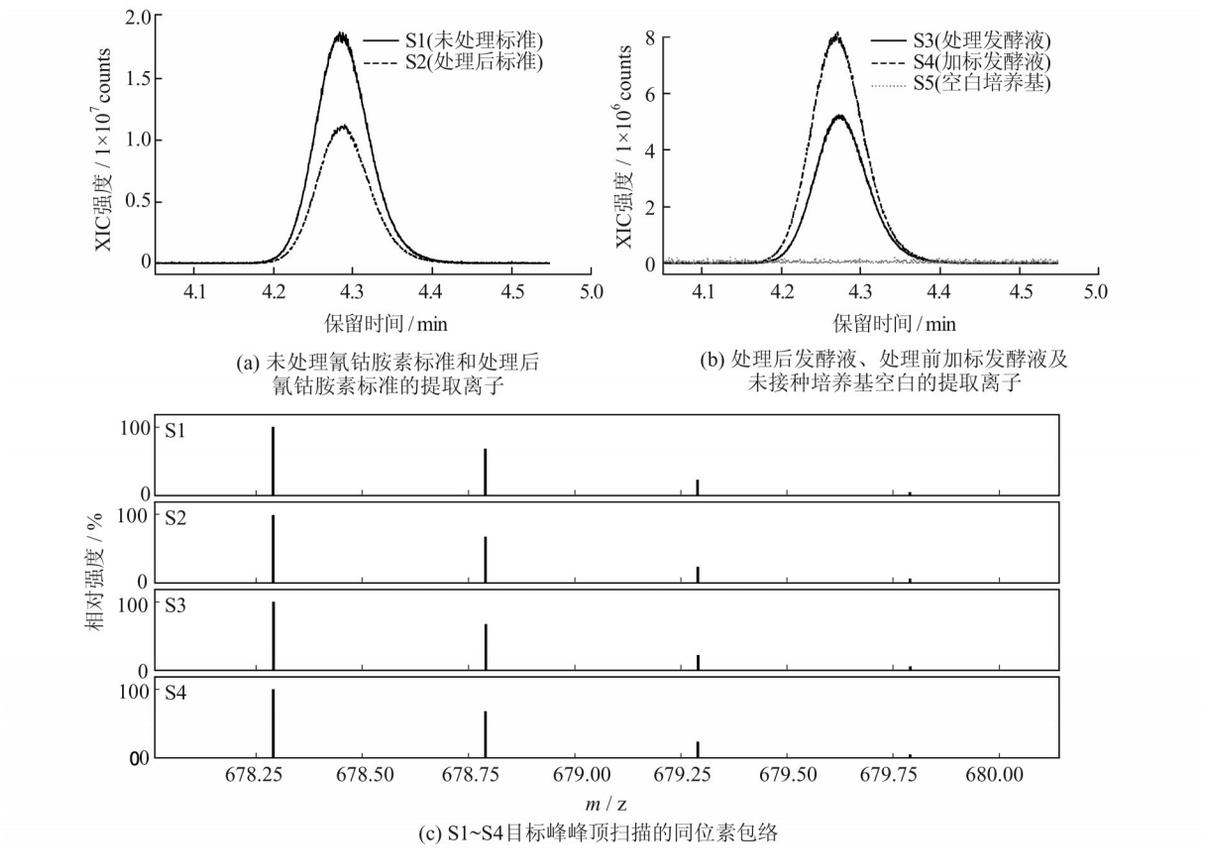
2.2 分段梯度的建立与连续进样依据

维生素B_{12}在紫外-可见区的主要吸收带包括278、361和550 nm。综合响应强度及发酵液蛋白质等共存物干扰，本研究选择361 nm检测[15]。流动相中加入0.1%醋酸，旨在改善反相C_{18}条件下的目标峰峰形[40]；7.5～12 min高有机相段用于洗脱部分强保留组分，两处0.5 min线性切换用于减小流动相突变引起的基线扰动。最终色谱程序由多套流动相比例、酸度、等度/梯度组合和重新平衡时长的探索结果确定，后续方法学性能评价均采用同一套固定条件。

柱再平衡确认试验中，18 min总周期连续循环5次后，目标峰保留时间RSD为0.22%（最大漂移0.028 min），峰面积RSD为0.17%，柱前压力相对初始值的最大偏差为4.07%，均满足预设标准。据此采用12.5～18 min的5.5 min重新平衡段。该结果表明，高有机相清洗后系统能够在下一针进样前恢复稳定的保留时间、响应和压力状态。

2.3 无氰前处理条件的确定

单因素优化使用同一批发酵液（168 h）作基准底物。亚硝酸钠质量分数为5%、10%、12.5%和15%时，峰面积分别为1.559 0±0.009 5、1.335 6±0.024 3、1.413 4±0.009 8和1.325 9±0.012 9 mAU/min，组间差异显著（F=148.03，P<0.001），见图3（a）；5%组高于其余各组，因此，将其选为固定条件。不同亚硝酸钠水平会改变标准品响应，只有5%和12.5%水平建立了匹配曲线。



(a) 未处理氰钴胺素标准和处理后氰钴胺素标准的提取离子

(b) 处理后发酵液、处理前加标发酵液及未接种培养基空白的提取离子

(c) S1~S4目标峰峰顶扫描的同位素包络

图2 LC-HRMS提供的目标峰身份与选择性辅助证据

Figure 2 LC-HRMS supporting evidence for target-peak identity and selectivity

注:提取离子为氰钴胺素[M+2H]$^{2+}$,理论m/z 678.290 98,质量窗口±10^{-5}。S5在标准保留时间窗口内无足够目标信号,故未作自身基峰归一化并纳入图(c)。标准品与基质样品的进样体积和采集模式不同,图中信号强度不用于样品间定量比较。

Note: The extracted ion is cyanocobalamin [M+2H]$^{2+}$, theoretical m/z 678.290 98, (mass window±10)×10^{-6}. S5 showed no sufficient target signal within the standard retention-time window and was therefore not base-peak normalized or included in panel (c). Injection volumes and acquisition modes differed between standards and matrix samples, so signal intensities in this figure are not used for quantitative comparison between samples.

5%和12.5%水平的氰钴胺素当量质量浓度(图3)分别按同批平行测定的匹配曲线(5%:Y=0.235 0X − 0.030 4; 12.5%: Y=0.162 1X+0.013 3)换算,均使用该批实际总换算倍数24.27。12.5%换算值高于5%,原因是标准品与样品对亚硝酸钠的响应敏感度不同(标准品曲线斜率下降约31%,样品峰面积仅下降9.3%),并不代表12.5%条件下真实转化效率更高,故匹配曲线换算结果仅用于说明响应口径的重要性,不用于判断各钴胺素形式的真实转化效率;10%与15%两水平未建立对应标准曲线,不予换算。匹配曲线换算结果仅用于说明响应口径的重要性,不用于判断各钴胺素形式的真实转化效率。

水解时间为10、20、30、45和60 min时,目标峰面积随时间的延长而总体增加(F=173.11,P<0.001),见图3(b)。综合目标响应和批量处理操作的一致性,最终采用沸水浴60 min作为固定水解条件。

恒温水浴温度为80、90和100 ℃时,目标峰面积依次增加,组间差异显著(F=1 303.50,P<0.001),见图3(c)。同时发现加热方式对响应量也有影响,同样是100 ℃,采用电磁炉沸水浴的,其响应量低于恒温水浴锅组的(P<0.001),提示升温速率和实际液温的时间历程可能会影响结果,不同水浴装置的方法转移需重新确认。为保持数据条件一致性本文均选用电磁炉沸水浴。

稀释倍数D=5、10、20、30和40时,峰面积与D的乘积相对极差小于3%,见图3(d)。按原始工作曲线先反算进样液质量浓度,再乘以各自的稀释倍数D与试剂稀释因子f,得到发酵液滴度,见

图3(f)。其中D=5的进样浓度30.80 mg/L,高于校准上限17.86 mg/L;D=40为3.89 mg/L,略低于公式估算LOQ 4.03 mg/L,这两个水平未完全满足校准有效性要求。D=10、20和30三个水平的进样浓度位于校准区间且高于LOQ,折算滴度的RSD为1.21%,彼此吻合。该滴度为按标准曲线先反算进样液质量浓度、再乘以各自的稀释倍数与试剂稀释因子f后得到的发酵液滴度;图3(f)中空心柱表示该水平未完全满足校准有效性要求(D=5超出校准范围上限,D=40略低于定量限);D=10、20、30三个水平同时满足校准范围与定量限要求,彼此吻合。综合基质负荷、信号强度、校准区间和操作体积,最终采用D=21.67(总换算倍数24.27);样品进样浓度约6.3~6.8 mg/L,位于现有数据支持的可靠定量工作范围5.36~17.86 mg/L。

2.4 同条件校准与有效定量区间

亚硝酸钠用量会系统性影响氰钴胺素标准品的色谱响应,因此,本方法可靠定量的关键是让标准品与样品经历相同的化学处理。5%与12.5%亚硝酸钠配对标准曲线的斜率在两个独立批次中均存在一致差异,据此将5%亚硝酸钠固定用于标准品和样品处理;12.5%曲线仅用于相应条件比较,不参与最终样品定量。

以进样溶液中氰钴胺素质量浓度(X,mg/L)和峰面积(Y)建立0.45~17.86 mg/L校准模型,回归方程为Y=0.235 0X−0.030 4,R^2=0.996 0,见图4(a)。3套独立配制标准系列的斜率分别为0.223 6、0.236 2和0.224 1,斜率RSD为3.13%。更重要的是,5.36~17.86 mg/L各校准点反算偏差均在±6.7%以内、RSD均低于4%(表4);最终样品进样浓度约6.3~6.8 mg/L,位于该数据支持的定量区间内并高于LOQ。因此,样品含量由同条件校准曲线插值获得,不依赖区间外推。

2.5 复杂发酵基质中的选择性

未接种培养基在目标保留时间窗口无明显响

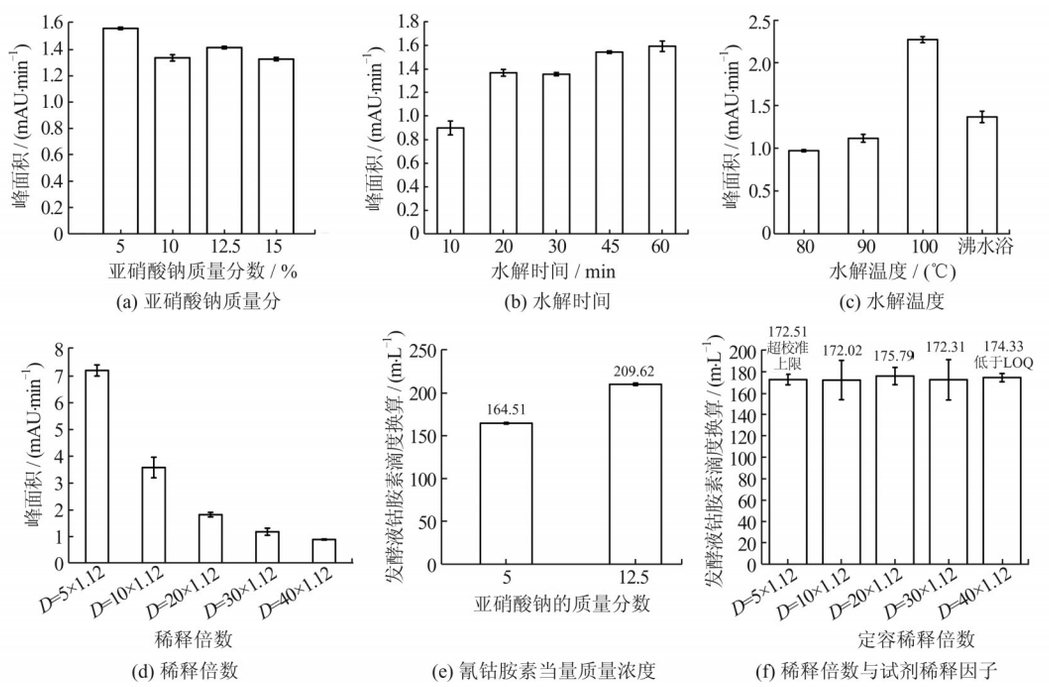


图3 前处理条件单因素优化结果(含a组、d组补充比较数据)

Figure 3 Single-factor optimization of sample pretreatment conditions (with supplementary comparison data for groups a and d)

注:数据为3次平行处理的平均值±标准差;除(c)图沸水浴组不参与恒温水浴锅三水平的显著性比较外,各因素内各水平间的显著性比较结果见正文§2.3,图中未逐组标注字母;图(f)中标注"超校准上限"和"低于LOQ"的柱表示该水平未完全满足校准有效性要求,详见正文§2.3。

Note: Data are mean±SD of 3 parallel treatments; except that the boiling-water-bath group in panel (c) does not participate in the significance comparison among the three thermostatic-water-bath levels, the significance comparison results among levels within each factor are given in Section 2.3 of the main text and letters are not marked group-by-group in the figure. In panel (f), the bars labeled "above calibration upper limit" and "below LOQ" indicate levels that did not fully meet the calibration−validity requirements; see Section §2.3 of the main text for details.

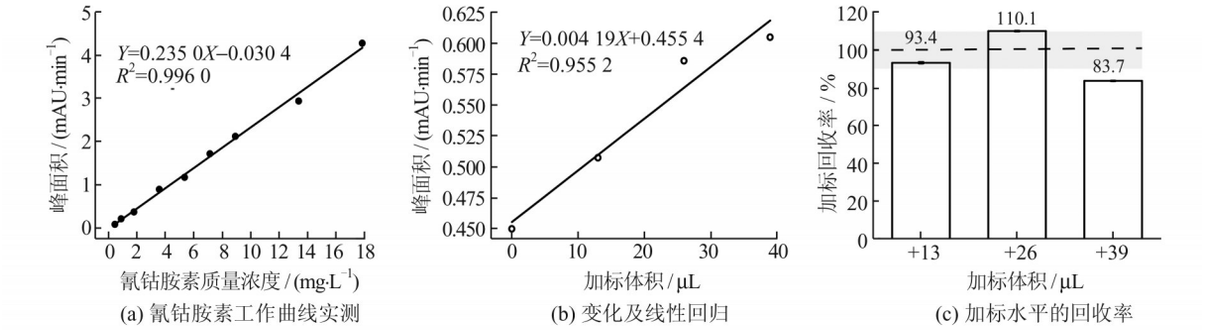


图4 氰钴胺素工作曲线及加标回收结果

Figure 4 Cyanocobalamin working curve and spiked-recovery results

注:(b)、(c)中每水平3份独立前处理;(c)中回收率为均值±标准差(n=3),灰带和虚线分别表示90%～110%参考区间和100%参考线。

Note: (b) and (c), each level underwent 3 independent pre-treatments; in (c), the recovery rate is presented as mean ± standard deviation (n=3), with the gray band and dashed line indicating the 90%－110% reference interval and the 100% reference line, respectively.

表4 标准曲线校准点反算偏差与精密度

Table 4 Back-calculated deviations and precision of calibration points

质量浓度/(mg•L^{-1})	平均峰面积(n=6)/(mAU•min^{-1})	反算质量浓度/(mg•L^{-1})	相对偏差/%	RSD/%	是否≥LOQ
0.45	0.060 2	0.39	－13.6	8.99	否
0.89	0.174 9	0.87	－2.1	7.08	否
1.79	0.331 5	1.54	－13.8	5.69	否
3.57	0.816 1	3.60	0.9	6.42	否
5.36	1.159 8	5.07	－5.5	0.60	是
7.14	1.678 9	7.27	1.8	1.16	是
8.93	2.051 4	8.86	－0.8	2.62	是
13.39	2.906 6	12.50	－6.7	2.07	是
17.86	4.077 2	17.48	－2.1	3.85	是

注:反算质量浓度按工作曲线Y=0.235 0X－0.030 4计算;平均峰面积与RSD来自3套独立标准系列、每套每点平行进样2次所得的全部6个测定值。3套曲线斜率RSD为3.13%。样品进样浓度约6.3～6.8 mg/L,位于校准区间并高于LOQ。

Note: Back-calculated concentrations were calculated using the working curve Y=0.235 0X－0.030 4. Mean peak areas and RSDs were obtained from all six measurements at each level (three independently prepared series, each injected twice). The slope RSD of the three curves was 3.13%. Injected sample concentrations were approximately 6.3－6.8 mg/L, within the calibration interval and above the LOQ.

应;D=10和D=50的发酵液样品在约4.8 min处均出现与处理标准品保留时间一致的目标峰,且与2～3.5 min的主要基质峰实现分离(图5)。处理前加标后同一目标峰增强,未出现新的邻近干扰峰。上述色谱行为与LC-HRMS的精确质量、同位素包络和空白对照结果一致,表明该方法能够从复杂发酵液基质中选择性识别目标峰。

2.6 定量性能与操作重复性

2.6.1 完整分析链重复性与样品时效

方法学性能评价结果汇总于表5。50 mg/L氰钴胺素标准品连续进样3次的峰面积RSD为0.07%,表明仪器进样响应稳定。按最终前处理条件,同一份处理后发酵液连续进样7次,峰面积RSD为2.90%;结合6份独立前处理样品的含量RSD1.83%,见图6(a),说明从样品处理到色谱测定的完整分析链具有良好重复性。

按D=21.67方案连续3 d测定同一处理条件样品,峰面积RSD为5.89%,折算含量RSD为5.81%,反映该方法在日常跨日测定中的响应一致性。稳定性试验显示,处理液室温放置会导致响应下降。因此,跨日测定及批量分析中应统一控制样品从前处理完成到进样的时间。

同一批发酵液独立完成6份前处理,折算氰钴胺素当量为159.23±2.92 mg/L,RSD为1.83%,直接验证了移取、加试剂、水解、离心、稀释和进样所构成的完整操作流程具有良好重复

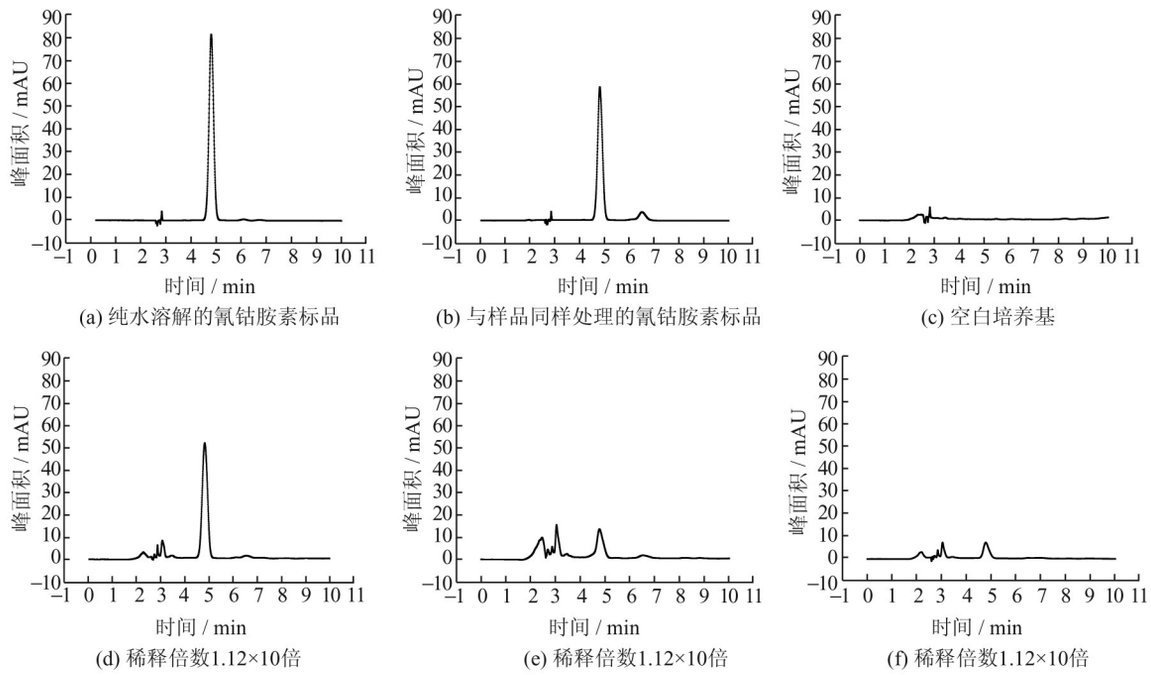


图5 测试条件下的选择性及色谱峰身份辅助比较

Figure 5 Chromatograms for selectivity under the tested conditions and supporting peak-identity comparison

注:(a),氰钴胺素标准品(50 mg/L,超纯水直接溶解,未经前处理);(d),处理前加入氰钴胺素标准品的SW-2M7发酵液,D=10;(e),经前处理SW-2M7发酵液,D=10;(f),经前处理SW-2M7发酵液,D=50。约4.8 min目标峰与标准品保留时间一致,且与主要基质峰分离;约6.3 min次峰与目标峰分离。

Note: (a), cyanocobalamin standard (50 mg/L, dissolved directly in ultrapure water without pretreatment); (d), SW-2M7 broth spiked before pretreatment, D=10; (e), pretreated SW-2M7 broth, D=10; (f) pretreated SW-2M7 broth, D=50. The target peak at approximately 4.8 min matched the standard retention time and was separated from the main matrix peaks; the minor peak at approximately 6.3 min was also separated from the target peak.

表5 方法学性能评价结果汇总

Table 5 Summary of method-performance evaluation

评价项目	结果
校准区间/(mg/L)	0.45～17.86
工作曲线	$Y=0.235\,0X-0.030\,4$, $R^2=0.996\,0$
独立标准系列斜率一致性	斜率0.223 6、0.236 2、0.224 1,RSD=3.13%(n=3)
同一处理液连续进样RSD/%	2.90(n=7)
跨日测定RSD/%	峰面积5.89,折算含量5.81(n=3)
独立前处理重复性RSD/%	1.83(n=6,含量口径)
处理液24 h峰面积变化率/%	−19.72;前处理后尽快进样并统一放置时间
加标回收率(低/中/高)/%	93.4/110.1/83.7(各水平n=3,组内RSD均<0.5%)
检出限LOD/(mg•L^{-1})	1.33
定量限LOQ/(mg•L^{-1})	4.03;样品进样浓度6.3～6.8 mg/L

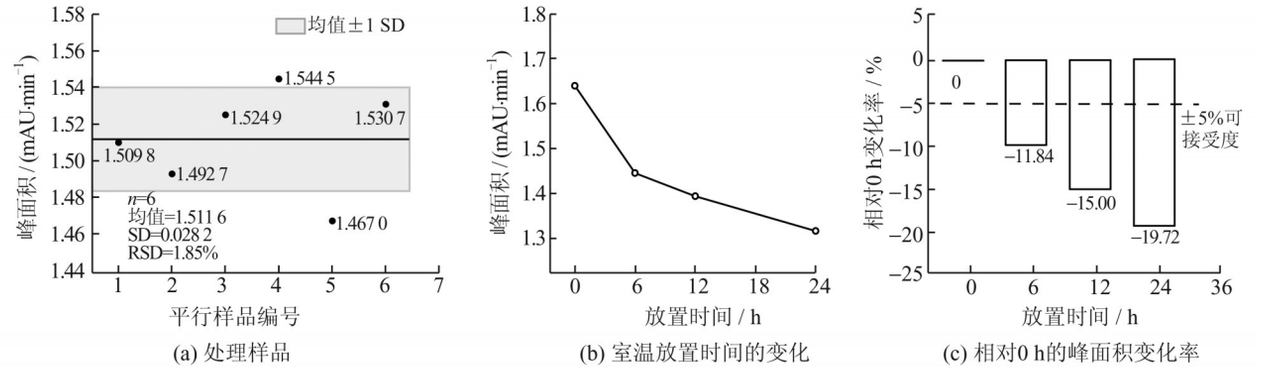
注:样品定量采用0.45～17.86 mg/L工作曲线;实际样品进样浓度为6.3～6.8 mg/L,高于LOQ。

Note: Samples were quantified with the 0.45−17.86 mg/L working curve, and the injected sample concentrations (6.3−6.8 mg/L) were above the LOQ.

性。处理液于0、6、12和24 h的峰面积相对0 h分别变化0、−11.84%、−15.00%和−19.72%,见图6(b～c)。据此将“前处理完成后尽快进样,并保持各批样品放置时间一致”作为方法操作要求。

2.6.2 加标响应与回收

为使回收率反映标准加入本身而不受体积变化干扰,采用定容式加标设计:4份2.00 mL发酵液分



(a) 处理样品　(b) 室温放置时间的变化　(c) 相对0 h的峰面积变化率

图6　独立前处理重复性与2M7-1处理液0~24 h稳定性

Figure 6　Independent-preparation repeatability and 0-24 h stability of pretreated 2M7-1 solution

注：24 h内峰面积下降19.72%，据此确定样品应在前处理后尽快进样，并在不同批次间统一放置时间。

Note: The response decreased by 19.72% within 24 h; samples should therefore be injected promptly after pretreatment with a consistent holding time across batches.

别加入1.00 mg/mL氰钴胺素标准溶液0、13、26和39 μL，并以超纯水补足至相同加入体积39 μL，使各水平待处理体积均为2.039 mL；随后，统一加入冰乙酸40 μL和5%亚硝酸钠200 μL，按最终条件完成前处理和进样。

3组独立前处理共获得12个数据点。低、中、高3个加标水平的回收率分别为(93.4±0.4)%、(110.1±0.2)%和(83.7±0.2)%，平均回收率为95.7%，各水平组内RSD均小于0.5%。同时，峰面积随加标量增加呈线性响应，见图4(b)和(c)。回收率与标准加入响应从两个角度表明，该流程能够在复杂发酵基质中稳定反映目标物加入量的变化。

独立前处理重复性评价了移取、加试剂、水解、离心、稀释和进样构成的完整操作链；定容式加标回收则评价了基质中的标准加入响应。两类结果相互补充，构成该方法定量可靠性的核心证据。

2.6.3　检出限与定量限

按工作曲线残余标准差δ=0.094 7和斜率S=0.235 0进行公式估算，LOD为1.33 mg/L，LOQ为4.03 mg/L。最终方案下样品进样浓度约6.3~6.8 mg/L，高于LOQ且位于0.45~17.86 mg/L校准区间内，样品定量由工作曲线插值获得，无需外推。

2.7　30针短序列运行稳定性

在D=50、30针短序列条件下，起始和末尾各5针标准品的保留时间均值变化−0.04%，峰面积均值变化−0.16%，记录到的压力均值变化0.33%；理论塔板数增加21.2%(图7)。目标峰保留时间、响应和系统压力在连续样品进样前后保持稳定，说明分段梯度中的高有机相清洗和5.5 min重新平衡能够满足常规短批次分析的系统稳定性要求。

3　讨　论

本研究的主要进展不在于单独增加一种HPLC测定条件，而在于针对复杂发酵液建立了无氰前处理、目标峰识别和批量运行相互衔接的分析流程。与多维生素片剂、乳制品等相对洁净基质的测定方法[15-17]相比，采用5%亚硝酸钠沸水浴60 min，可避免使用氰化物，通过标准品与样品同条件处理统一氰钴胺素当量的响应口径；分段梯度在前7 min可完成目标峰与主要基质峰分离，随后，以高比例甲醇洗脱强保留组分，再经5.5 min重新平衡恢复下一针系统状态。前处理化学条件与色谱程序由此共同服务于复杂基质的稳定测定。

方法可靠性由3个层级的实验结果验证。第一，未接种培养基在目标窗口无明显响应，发酵液与处理标准品保留时间一致，处理前加标后同一峰增强，证明目标峰能够从复杂基质中被选择性识别。第二，LC-HRMS测得(−2.37~−0.57)×10^{-6}质量误差、约0.50 Da双电荷同位素间隔和0.999 92~0.999 99同位素包络相似度，为该峰属于氰钴胺素相关离子提供了独立支持。第三，样品进样浓度处于校准区间并高于LOQ，6份独立前处理结果RSD为1.83%，说明从样品处理到色谱测定的完整操作链能够稳定复现。LC-HRMS在本研究中用于辅助身份确认，而定量仍由同条件处理的HPLC校准体系完成。

加标回收率为83.7%~110.1%，各水平组内RSD均小于0.5%，表明不同加标量能够被稳定响应；30针短序列前后目标峰保留时间、峰面积和系统压力均值变化分别为−0.04%、−0.16%和

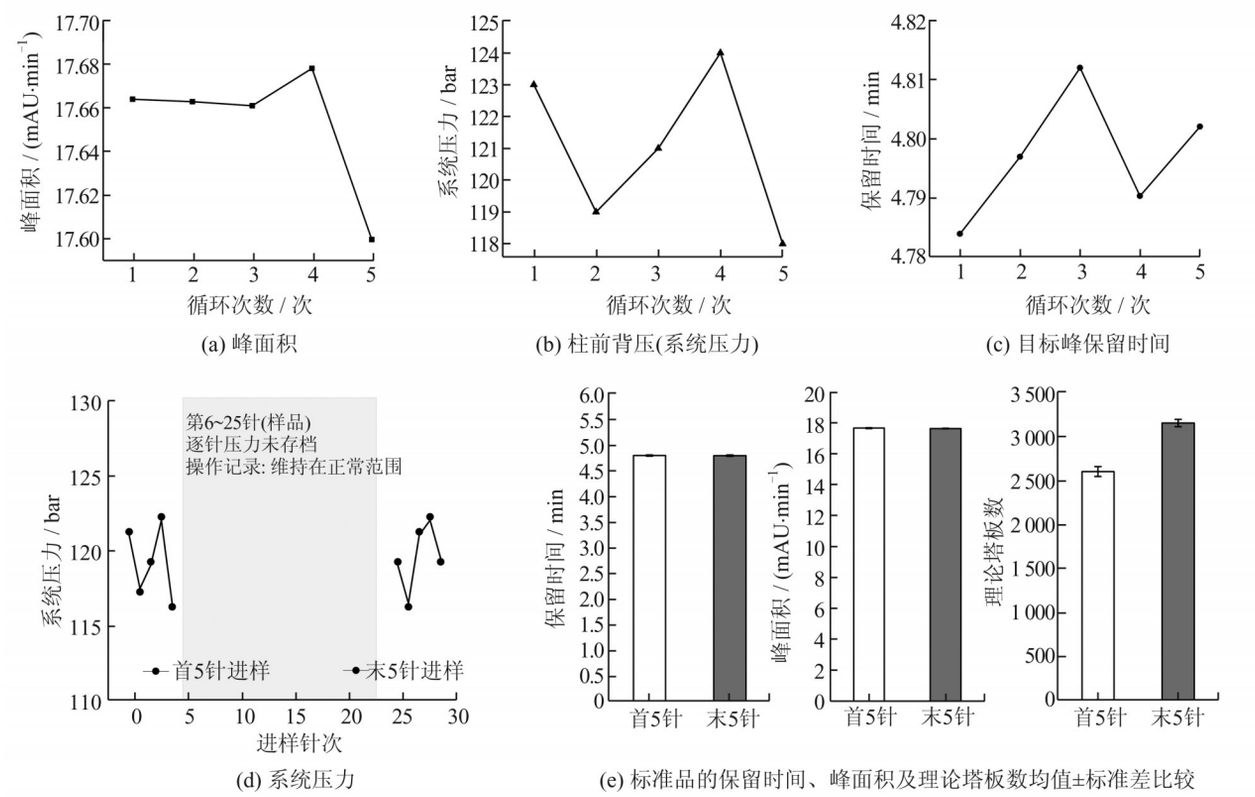


图7 柱再平衡时间确认预实验及连续30针进样过程中短序列系统性能考察结果

Figure 7 Column re-equilibration time confirmation experiment and short-sequence system performance during 30 consecutive injections

0.33%,说明高有机相清洗与重新平衡程序能够支持常规短批次分析。处理液室温放置24 h响应下降19.72%,据此将“前处理后尽快进样并统一放置时间”确定为方法操作要求。该方法面向的是复杂产维生素B_{12}发酵基质,而非某一特定菌株;应用于其他菌株或培养基时,可通过空白窗口、稀释倍数和加标回收确认其基质适用性。

4 结 论

本研究建立了亚硝酸钠无氰前处理结合分段梯度HPLC测定复杂发酵液中维生素B_{12}的方法。5%亚硝酸钠沸水浴60 min使标准品与样品在同一化学条件下获得可比响应;分段梯度兼顾目标峰分离、强保留基质清洗和柱再平衡。空白、标准品、发酵液与处理前加标样品的色谱对照以及LC-HRMS精确质量和同位素包络共同支持目标峰身份;6份独立前处理结果RSD为1.83%,三水平加标回收率为83.7%~110.1%,30针短序列前后保留时间、峰面积和系统压力变化均小于0.5%。该方法不使用氰化物,能够在复杂发酵基质中实现可靠峰识别、重复定量和稳定短序列运行,可用于不同产维生素B_{12}菌株发酵样品的常规检测。

参考文献

[1] Gharibzahedi S M T, Moghadam M, Amft J, et al. Recent advances in dietary sources, health benefits, emerging encapsulation methods, food fortification, and new sensor-based monitoring of vitamin B_{12}: a critical review[J]. Molecules, 2023, 28(22): 7469.

[2] Balabanova L, Averianova L, Marchenok M, et al. Microbial and genetic resources for cobalamin (vitamin B_{12}) biosynthesis: from ecosystems to industrial biotechnology[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(9): 4522.

[3] Temova Rakuša Ž, Roškar R, Hickey N, et al. Vitamin B_{12} in foods, food supplements, and medicines: a review of its role and properties with a focus on its stability[J]. Molecules, 2023, 28(1): 240.

[4] 张纪娇, 王会颖, 房欢, 等. 维生素B_{12}生物合成领域的十年回顾与技术进展[J]. 生物技术通报, 2025, 41(11): 62-74.
Zhang J J, Wang H Y, Fang H, et al. A decade review and technological advances in the field of vitamin B_{12} biosynthesis[J]. Biotechnology Bulletin, 2025, 41(11): 62-74.

[5] 王玲玲, 夏苗苗, 董会娜, 等. 筛选脱氮假单胞菌启动

子提高维生素B_{12}产量[J]. 生物技术通报, 2017, 33(8): 159-166.
Wang L L, Xia M M, Dong H N, et al. Enhanced production of vitamin B_{12} by screening the promoter in *Pseudomonas denitrificans* [J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(8): 159-166.

[6] Fang H, Kang J, Zhang D W. Microbial production of vitamin B_{12}: a review and future perspectives[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 15.

[7] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Safety of vitamin B_{12} (in the form of cyanocobalamin) produced by *Ensifer adhaerens* CNCM-I 5541 for all animal species[J]. EFSA Journal, 2020, 18(12): e6335.

[8] Bampidis V, Azimonti G, de Lourdes Bastos M, et al. Safety and efficacy of a feed additive consisting of vitamin B_{12} (cyanocobalamin) produced by fermentation with *Ensifer adhaerens* CGMCC 21299 for all animal species (NHU Europe GmbH)[J]. EFSA Journal European Food Safety Authority, 2024, 22(4): e8752.

[9] Xu S, Xiao Z Q, Yu S Q, et al. Enhanced cobalamin biosynthesis in *Ensifer adhaerens* by regulation of key genes with gradient promoters[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2022, 7(3): 941-948.

[10] Liu Y H, Chang Y Y, Wang Q, et al. Effect of blocking the haem synthesis pathway and weakening the haem synthesis pathway for sirohaem on the growth of and vitamin B_{12} synthesis in *Ensifer adhaerens* Casida A [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2023, 46(12): 1825-1835.

[11] Liu Y H, Huang W, Wang Q, et al. Research on the targeted improvement of the yield of a new VB_{12}-producing strain, *Ensifer adhaerens* S305, based on genomic and transcriptomic analysis[J]. BMC Biotechnology, 2023, 23(1): 53.

[12] Moore S J, Lawrence A D, Biedendieck R, et al. Elucidation of the anaerobic pathway for the corrin component of cobalamin (vitamin B_{12})[J]. PNAS, 2013, 110(37): 14906-14911.

[13] Heldt D, Lawrence A D, Lindenmeyer M, et al. Aerobic synthesis of vitamin B_{12}: ring contraction and cobalt chelation[J]. Biochemical Society Transactions, 2005, 33(Pt 4): 815-819.

[14] GOVERNMENT CHEMIST. Vitamin B_{12}: a review of analytical methods for use in food [R]. London: GOV.UK, 2015.

[15] Van Wyk J, Britz T J. A rapid HPLC method for the extraction and quantification of vitamin B_{12} in dairy products and cultures of *Propionibacterium freudenreichii* [J]. Dairy Science & Technology, 2010, 90(5): 509-520.

[16] Wolle M M, Escavage J, Gray P J. Development and validation of a method for vitamin B_{12} measurement in nutritional products by HPLC-ICP-MS[J]. Food Analytical Methods, 2025, 18(11): 2442-2456.

[17] Fan Z H, Li Y J, Fan X, et al. Simultaneous determination of three active forms of vitamin B_{12} *in situ* produced during fermentation by LC-MS/MS[J]. Foods, 2025, 14(2): 309.

[18] 陈永波, 刘淑琴, 刘瑶, 等. 富硒产品中硒的形态分析及化学评分模式的建立[J]. 生物资源, 2021, 43(1): 79-85.
Chen Y B, Liu S Q, Liu Y, et al. Speciation analysis of selenium in selenium-enriched products and establishment of chemical scoring model[J]. Biotic Resources, 2021, 43(1): 79-85.

[19] 庄重, 沈青, 邱秀儒, 等. 海南习用药材酸藤子的质量标准研究[J]. 生物资源, 2024, 46(1): 79-86.
Zhuang Z, Shen Q, Qiu X R, et al. Study on quality standard for *Embelia laeta*, a native traditional medicine in Hainan[J]. Biotic Resources, 2024, 46(1): 79-86.

[20] 冀晓雯, 翟勇进, 栗平, 等. 钩藤质量标准历史沿革与质控技术研究进展[J]. 生物资源, 2025, 47(3): 222-233.
Ji X W, Zhai Y J, Li P, et al. Research progress on the historical evolution of quality standards and quality control technologies of Uncariae Ramulus Cum Uncis[J]. Amino Acids and Biotic Resources, 2025, 47(3): 222-233.

[21] 刘宗乐, 高林森, 张东东, 等. 高效液相色谱法测定乳酸菌发酵液中γ-氨基丁酸[J]. 中国酿造, 2022, 41(11): 233-238.
Liu Z L, Gao L S, Zhang D D, et al. Determination of γ-aminobutyric acid in lactic acid bacteria fermentation broth by HPLC[J]. China Brewing, 2022, 41(11): 233-238.

[22] 纪晓萌, 王真, 任南, 等. 高效液相色谱法测定肉制品中多种游离核苷酸[J]. 食品科学, 2025, 46(13): 341-350.
Ji X M, Wang Z, Ren N, et al. Determination of multiple free nucleotides in meat products by high performance liquid chromatography[J]. Food Science, 2025, 46(13): 341-350.

[23] 邓思思, 覃浩, 熊梅瑾, 等. 柱前衍生结合高效液相色谱荧光检测法快速测定奶粉中1-脱氧野尻霉素[J]. 食品科学, 2025, 46(4): 278-284.
Deng S S, Qin H, Xiong M J, et al. Rapid determination of 1-deoxynojirimycin in milk powder by precolumn

derivatization combined with high performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Food Science, 2025, 46(4): 278-284.

[24] 崔苏霞, 孟根花, 蔺婷娟, 等. 超高效液相色谱法同时测定配方乳粉中的烟酸、烟酰胺和VB_6[J]. 乳业科学与技术, 2023, 46(6): 29-33.
Cui S X, Meng G H, Lin T J, et al. Simultaneous determination of niacin, nicotinamide, and vitamin B_6 in formula milk powder by ultra performance liquid chromatography[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2023, 46(6): 29-33.

[25] 夏静, 俞婧, 孙磊, 等. 功能性饮料中9种水溶性维生素的HPLC-MS-MS同步检测技术[J]. 食品科学, 2014, 35(12): 196-199.
Xia J, Yu J, Sun L, et al. Simultaneous determination of 9 water soluble vitamins in drinks by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food Science, 2014, 35(12): 196-199.

[26] 黄雄风, 刘召金, 陈静, 等. 在线净化/固相萃取-高效液相色谱法测定饮料中的维生素B_{12}[J]. 分析测试学报, 2014, 33(1): 39-44.
Huang X F, Liu Z J, Chen J, et al. Determination of vitamin B_{12} in beverages by high performance liquid chromatography combined with on-line clean-up/solid-phase extraction[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2014, 33(1): 39-44.

[27] 李丹凤, 黄罗健, 朱健萍, 等. 胶束电动色谱法测定五维他口服溶液中维生素B_1、B_2、B_6、烟酰胺、泛酸钙与苯甲酸钠[J]. 分析测试学报, 2020, 39(9): 1155-1159.
Li D F, Huang L J, Zhu J P, et al. Simultaneous determination of vitamin B_1, B_2, B_6, nicotinamide, calcium pantothenate and sodium benzoate in five vitamins oral solution by micellar electrokinetic chromatography[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2020, 39(9): 1155-1159.

[28] 杨隆徽, 何春磊, 潘明飞, 等. 基于HPLC-MS/MS的合生元发酵乳B族维生素定量分析与品质评价[J]. 分析测试学报, 2026, 45(4): 850-859.
Yang L H, He C L, Pan M F, et al. Quantitative analysis of B vitamins in synbiotic fermented milk based on HPLC-MS/MS and quality evaluation[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2026, 45(4): 850-859.

[29] Wang M L, Schuster K, Asam S, et al. Challenges in the determination of total vitamin B_{12} by cyanidation conversion: insights from stable isotope dilution assays[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2023, 415(23): 5797-5807.

[30] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中维生素B_{12}的测定: GB 5009.285—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. National food safety standard — Determination of vitamin B_{12}in foods: GB 5009.285-2022[S]. Beijing: China Standards Press, 2022.

[31] 黑龙江新和成生物科技有限公司, 浙江新和成股份有限公司. 一种粘着箭菌及其制备方法和在生产维生素B_{12}中的应用: CN114231450A[P]. 2022-03-25.
Heilongjiang NHU Biotechnology Co., Ltd, NHU Company Ltd Zhejiang. An Ensifer adhaerens strain, its preparation method and application in vitamin B production: CN114231450A[P]. 2022-03-25.

[32] Ottenheim C, Nawrath M, Wu J C. Microbial mutagenesis by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP): the latest development[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2018, 5(1): 12.

[33] Cai Y Y, Xia M M, Dong H N, et al. Engineering a vitamin B_{12} high-throughput screening system by riboswitch sensor in *Sinorhizobium meliloti*[J]. BMC Biotechnology, 2018, 18(1): 27.

[34] 蔡莹瀛, 夏苗苗, 董会娜, 等. 常压室温等离子体(ARTP)诱变及高通量筛选维生素B_{12}高产菌株[J]. 天津科技大学学报, 2018, 33(2): 20-26.
Cai Y Y, Xia M M, Dong H N, et al. Mutation by using atmospheric pressure and room temperature plasmas and high-throughput screening method for improving vitamin B_{12} production[J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2018, 33(2): 20-26.

[35] 肖志强, 朱永明, 李江华, 等. 高通量筛选高产维生素B_{12}的诱变菌株: 黏着剑菌[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(19): 7-11.
Xiao Z Q, Zhu Y M, Li J H, et al. High-throughput screening of *Ensifer adhaerens* with improved vitamin B_{12} yield[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(19): 7-11.

[36] Zheng D H, Yan L, Birke R L. Electrochemical and spectral studies of the reactions of aquocobalamin with nitric oxide and nitrite ion[J]. Inorganic Chemistry, 2002, 41(9): 2548-2555.

[37] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Q2(R2): validation of analytical procedures[S]. Geneva: ICH, 2023.

[38] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 2020 edition, Part

Ⅳ[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.

[39] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 数值修约规则与极限数值的表示和判定: GB/T 8170—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of China. Rules for rounding off numerical values and expression and determination of limiting values: GB/T 8170-2008 [S]. Beijing: China Standards Press, 2008.

[40] Snyder L R, Kirkland J J, Dolan J W. Introduction to modern liquid chromatography[M]. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.