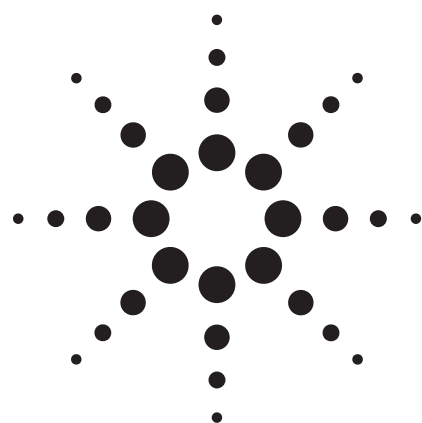


用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus 柱进行水溶性维生素的反相液相色谱分离



应用

制药, 食品/饮料

作者

Anna Glinko, Michael J. Bozym,
Michelle L. Owens 和
Karyn M. Usher
西彻斯特大学化学系
美国, 西彻斯特, PA 19383

Ronald E. Majors
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road,
Wilmington, DE, 19808, USA

摘要

用以下三种不同粒径、不同柱尺寸的 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C-18 固定相色谱柱分离 6 种 B 族维生素和维生素 C: 5 μm (4.6 $\times$ 150 mm); 快速分离 (RR)、3.5 μm (4.6 $\times$ 100 mm) 和快速分离高通量 (RRHT)、1.8- μm (4.6 $\times$ 50 mm)。采用简单的磷酸盐缓冲液和甲醇流动相梯度洗脱, 该方法是为补充美国药典 (USP) 方法而设计的, 在药典方法中这些维生素都是分别用不同方法在不同色谱柱上分离的, 有些还使用了离子对试剂。越短的色谱柱, 分离速度越快, 而分离度几乎保持不变。在 1.8 μm 柱上 3.5 分钟即可实现所有化合物的分离。当柱长更短、粒径更小时, 灵敏度有所提高。用所建立的

HPLC 方法分析了各种商品中的维生素, 包括多种维生素和多种软饮料。使用选定的色谱柱实现了良好分离, 但也可以用 RRHT 柱快速建立方法, 不会影响分离度和该方法所需要的速度。ZORBAX Eclipse Plus 柱显示了高柱效和卓越的性能, 拖尾最小。

前言

维生素是维持人体正常功能的必需营养素。日常需要量很少, 从 2.4 μg 到 90 mg [1]。维生素摄入不足可能引起许多健康问题, 例如肾损伤 (维生素 B), 坏血病或损伤免疫系统 (维生素 C)。除维生素 B6 和维生素 B12 外, 水溶性维生素不能在人体内贮存[1]。如果仅从膳食中摄取足够量的维生素, 每天补充一定的多种维生素可以确保人体内维生素保持一定的量。

许多维生素暴露在热、光和氧气条件下时很容易降解。已知抗坏血酸在水溶液中容易迅速降解。曾有人研究了在有氧和无氧条件下各种不同 pH 溶液中的降解[2]。还有文献报导玻璃容器内表面可能含有某能使抗坏血酸在短时间降解的物质。Margolis 和 Park 研究表明, 从自动进样器中用来装色谱样品的样品瓶上证明了这一点。他们的文章给出了防止此类降解的几点建议[3]。在我们的研究中, 维生素样品按需要每 4 小时



Agilent Technologies

配制一次。虽然得到的抗坏血酸相对标准偏差(%RSD)非常好,但这些进样都是在溶液配制好以后立即进行的。用配好的溶液连续进样时,几个小时之内我们可以看到抗坏血酸峰面积减小。

目前,美国药典(USP)已经有了分析我们研究所用维生素的标准方法,但还没有同时分析所有8种水溶性维生素混合物的USP方法。某些USP方法很复杂,要用离子对试剂(见表1)。离子对试剂常被用于改善分离度,但也可能导致色谱柱性能不可逆的改变[4]。抗坏血酸的USP方法目前还不是色谱方法。而且,这些USP方法不允许使用某些较新的色谱柱技术,例如,亚二微米粒径的短柱。

本研究的主要目标是建立一种能分离以下水溶性维生素的简单的高效液相色谱方法:抗坏血酸、维生素H、维生素B12、烟酰胺、维生素B5、维生素B6、核黄素(维生素B2)和维生素B1。它们的结构式列于图1。第二个目标是研究减小粒度对分离度、分离时间和系统压力的影响。

实验部分

本实验在配置自动进样器和80 Hz 二极管阵列检测器的Agilent 1200 SL 高分离度快速液相色谱(LC)(安捷伦科技公司, Santa Rosa, CA)上进行。等梯度和二元梯度都用该系统完成。本研究所用的色谱柱为: 5 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C-18 固定相, 4.6 mm x 150 mm (部件号: 959993-902)、3.5 μm ZORBAX Eclipse Plus C-18 固定相, 4.6 mm x 100 mm (部件号: 959961-902) 和 1.8-μm ZORBAX Eclipse Plus C-18 固定相, 4.6 mm x 50 mm (部件号: 959941-902) 等规格。

维生素标样来自 Sigma Aldrich 公司 (Milwaukee, WI)。用二极管阵列检测器高速全光谱 UV-VIS 检测鉴定混合标样、添加剂中的维生素, 确证维生素饮料。

表 1. USP 方法 (USP31-NF 26, 2008 年 5 月, 参考文献 5) 的试剂和要求

维生素	所需试剂	拖尾因子 (TF)	%RSD tr
维生素 B6	冰醋酸、辛烷磺酸钠、 甲醇、水	—	< 3%
维生素 B1	辛烷磺酸钠、磷酸、盐酸、 乙腈、水	< 2	< 3%
维生素 B12	甲醇、水	—	—
维生素 B5	磷酸氢钾、磷酸、甲醇、水	—	< 2%
维生素 H	高氯酸钠、磷酸、二甲基亚砷、 乙腈、水	—	< 3%
烟酸	辛烷磺酸钠、甲醇、乙腈、 冰醋酸、水	< 2	< 2%
维生素 B2	冰醋酸、EDTA-二钠、醋酸钠、 三乙胺、甲醇、水	—	< 2%

流动相 A 为 25 mM NaH₂PO₄ (pH = 2.5), 流动相 B 为甲醇。流速 1.0 mL/min。全部色谱条件列于表 2。

流动相梯度与柱规格按比例匹配变化, 以保持溶剂-强度选择性 (k^*) 不变 (见表 3)。

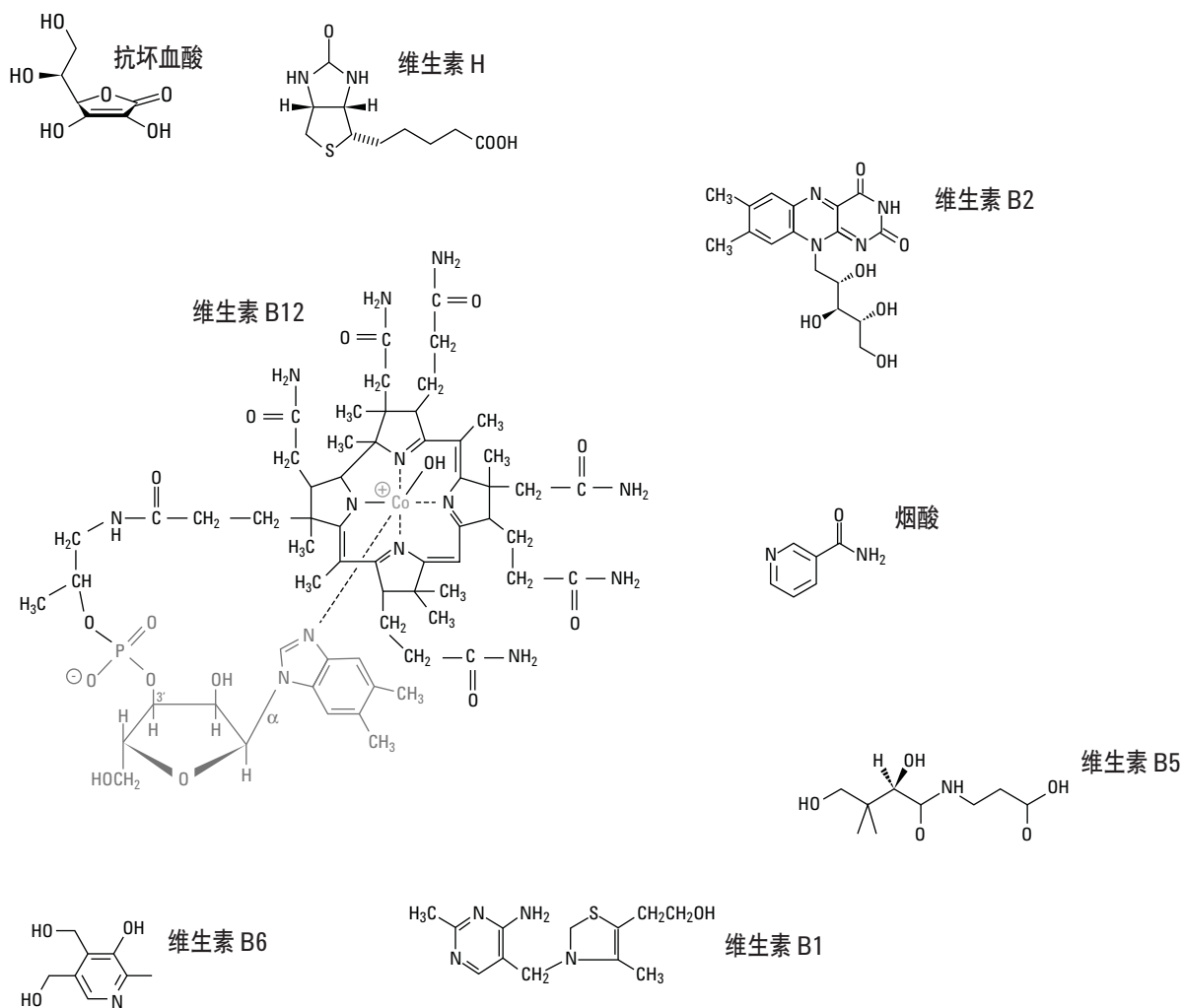


图 1. 本实验所用水溶性维生素的结构

表 2. 色谱条件

液相色谱仪	Agilent 1200 SL
流动相 A	25 mM NaH ₂ PO ₄ pH = 2.5
流动相 B	甲醇
流速	1.00 mL/min
柱温	35 °C
检测	220 nm, 无参比
响应时间	0.05 s
进样体积	体积可调: 5 μ m, 5 μ L 3.5 μ m, 3.3 μ L 1.8 μ m, 1.7 μ L
检测器流通池	微量流通池 (2 μ L)

表 3. 保持 k^* 相同的梯度

%B	5 μ m	3.5 μ m	1.8 μ m
1	0.00 min →	0.00 min →	0.00 min
12	1.50 min	1.00 min	0.50 min
30	1.53 min	1.03 min	0.51 min

用分析天平或微量天平分别称取一定量的各种维生素标准品，溶解于 10 mL 水中，配制各标样和混合标样。所有要分析维生素的样品均从当地购买。维生素水 (Glaxo, Flushing, NY) 不经稀释直接进样。其它样品制备方法如下:维生素咀嚼片(Berkley & Jensen 儿童多种维生素和矿物质营养补充咀嚼片, Natick, MA) 粉碎后溶解于 100 mL 水中。成人片剂 (Equate Adult Multivitamin, Walmart, Bentonville, AR) 用类似方法处理。表 4 列出了标样和维生素片的最终浓度。进样前，样品用安捷伦注射式 Econofilter 过滤器过滤，该过滤器为再生纤维素，直径 25-mm，孔隙 0.20-μm (部件号 5185-5830)。

结果和讨论

色谱重现性

每种维生素连续进样的%RSD 值见表 5。表 5 中的这些数值是根据 7 次连续进样计算得到的。在表 5 中，除保留时间、峰面积和拖尾因子（峰高 5%处）的 RSD%值外，还列出了用 1.8-μm 柱进行重现性考察的标准溶液中各种维生素的浓度。某些 USP 方法要求保留时间的%RSD 低于 2%或 5%（见表 1）；维生素 B12 方法没有这种要求。表 5 显示，所有%RSD 值均在合理的范围内，并低于要求的限量。

表 4. 色谱峰鉴定和维生素浓度

Pk #	维生素	标准溶液中的浓度 (g/L)	成人维生素片溶液中的浓度(g/L)	咀嚼片营养补剂溶液中的浓度(g/L)
1	抗坏血酸	8×10^{-2}	9×10^{-1}	6×10^{-1}
2	烟酸	4.5×10^{-2}	1.5×10^{-1}	2×10^{-1}
3	维生素 B6	9×10^{-2}	5×10^{-2}	2×10^{-2}
4	维生素 B5	2.4×10^{-1}	1×10^{-1}	1×10^{-1}
5	维生素 B12	9×10^{-2}	2×10^{-5}	6×10^{-5}
6	维生素 H	饱和	3×10^{-4}	4×10^{-4}
7	维生素 B2	1.5×10^{-1}	3.2×10^{-2}	1.7×10^{-2}

表 5. 采用 1.8-μm 柱各参数的%RSD

维生素	浓度 g/L	%RSD tr	%RSD 面积	%RSD TF
维生素 B1	1.20	0.7	0.3	1.3
抗坏血酸	0.11	0.2	0.9	0.6
烟酸	0.15	0.5	0.3	0.9
维生素 B6	0.09	0.3	1.8	1.9
维生素 B5	0.24	0.0	0.4	0.7
维生素 B12	0.18	1.4	0.9	0.4
维生素 H	饱和	0.2	2.9	4.2
维生素 B2	0.15	0.2	2.3	0.9

5% 峰高处拖尾因子的比较

表 6 列出在实验所用的三种 ZORBAX Eclipse Plus 柱上的保留时间和拖尾因子。这些柱子有非常惰性的表面，这些水溶性化合物几乎不拖尾。值得注意的是，在所用的各色谱柱上所有维生素的平均拖尾因子均小于 1.2。均在美国药典方法拖尾因子的合格范围之内（见表 1）。

表 6. 三种 Agilent ZORBAX Eclipse Plus 色谱柱上保留时间的 5%峰高处拖尾因子的比较

	5 μm		3.5 μm		1.8 μm	
	保留时间	拖尾因子	保留时间	拖尾因子	保留时间	拖尾因子
维生素						
抗坏血酸	2.10	1.1	1.41	1.2	0.76	1.2
烟酸	2.62	1.1	1.87	1.2	1.01	1.2
维生素 B6	3.03	1.1	2.25	1.3	1.31	1.3
维生素 B5	4.02	1.1	2.95	1.1	1.68	1.2
维生素 B12	4.47	1.1	3.33	1.1	1.98	1.2
维生素 H	6.33	1.1	4.69	1.1	2.63	1.0
维生素 B2	7.24	1.1	5.40	1.1	3.04	1.1
平均(Tf)	—	1.1	—	1.2	—	1.2

色谱柱之间的可缩放性

三种规格的色谱柱都得到了类似的洗脱曲线，如图 2 所示。ZORBAX 填料可以从 5- μm 和 3.5- μm 粒径的较长色谱柱直接过渡到 1.8- μm 填料的短柱。对于这 3 种色谱柱，进样相同混合物，采用表 3 中的相应梯度可得到相同的 k^* 值。

灵敏度的提高，比较三种不同色谱柱配置时

表 7 表明标准维生素混合物进样，在这三种不同规格柱子上时，维生素 B12 灵敏度的提高。进样体积需

根据柱长调整，因此不能用峰高直接进行比较，需要将进样量归一化，进行灵敏度比较。归一化以后，峰面积与进样量的比值是相同的。结果表明，峰高与进样量之比有显著差异。3.5- μm 柱与 5- μm 柱相比，灵敏度明显增高，而 1.8- μm 柱的灵敏度更高。表 7 给出了与 5- μm 柱相比灵敏度的提高。当色谱柱从 5- μm 柱换成 3.5- μm 柱后，灵敏度提高了 34%，当色谱柱从 5- μm 柱换成 1.8- μm 柱后，灵敏度提高了 52%。灵敏度增加的原因是小粒径带来的高分离能力（即，稀释因子更低），而不单是因为分析物在色谱柱上保留的时间更短。

表 7. 三种规格色谱柱灵敏度的比较（维生素 B12）

色谱柱	归一化的 进样量	面积	面积 %	峰高	% 峰高	% 灵敏度提高
5 μm	100	269	—	49	—	—
3.5 μm	66	171	64	48	98	34
1.8 μm	33	91	34	42	86	52

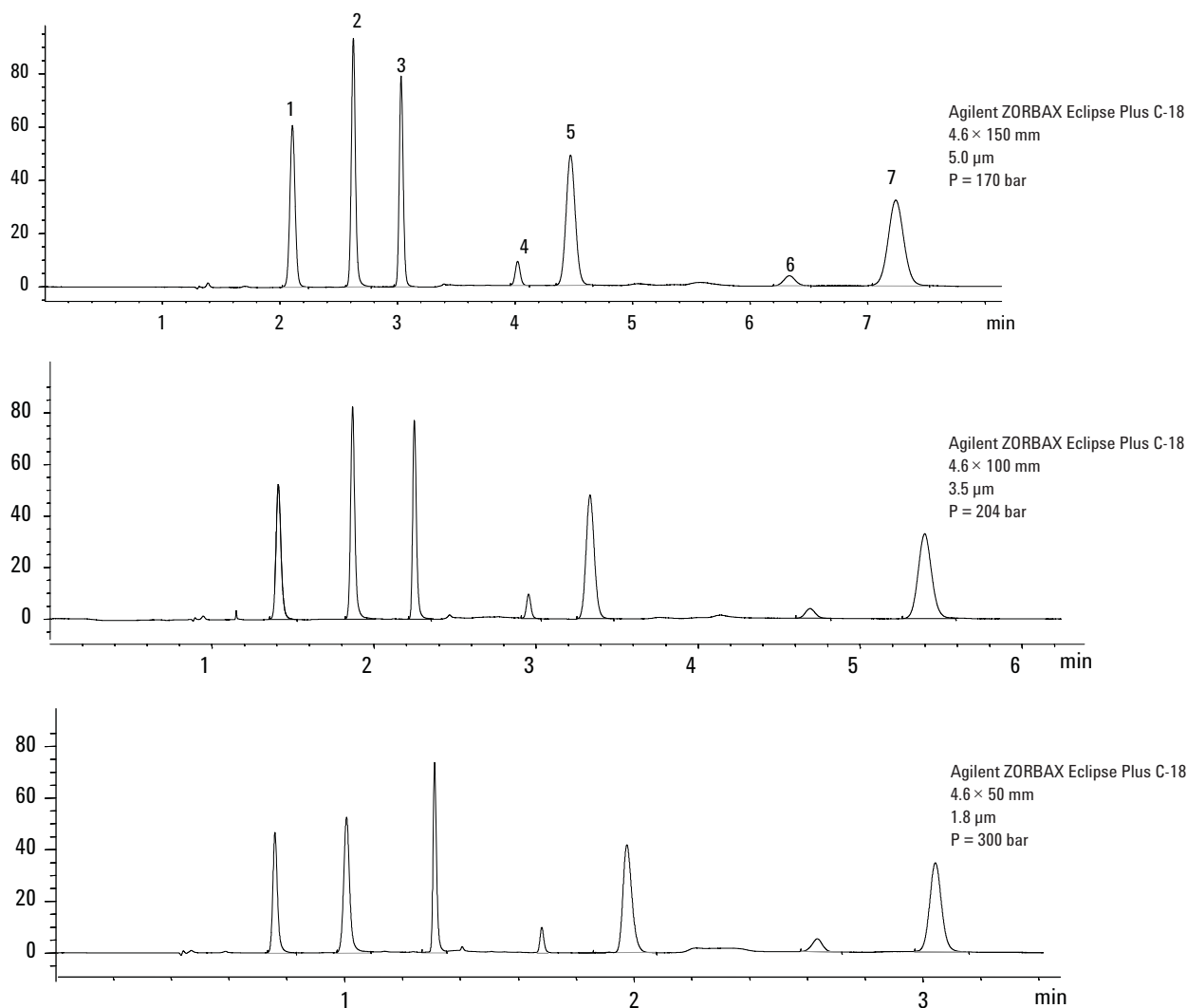


图2. Agilent ZORBAX Eclipse Plus C-18 色谱柱尺寸的可缩放性及对分析时间和压力的影响（条件如表 2 所示）

三种不同规格色谱柱分析速度和压力的比较

图 2 还表明在不同色谱柱上进行分析时分离时间的差异。采用 RRHT4.6 x 50 mm，1.8-μm 色谱柱，可以使分离时间从使用 4.6 x 150 mm，5-μm 色谱柱上的 8 分钟缩短到 3.5 分钟。如果采用更高流速，时间还可以进一步缩短。从图 2 的良好色谱峰分离度可见，流速还可以加快。但是，当增大流速时，由于存在其

它重叠的未知组分，市售维生素和饮料中的某些色谱峰无法鉴别。正如所预期的，当色谱柱填料粒度减小时，压力增加。图 2 显示了实验这三种色谱柱的系统压力（P，以 bar 表示）。使用 1.8-μm 色谱柱（RRHT）时，系统最高压力为 300 bar。正好在 Agilent 1100 (max. 400 bar)和 1200 SL (max. 600 bar) 系统的操作范围内。结果列于表 8。

表 8. 不同规格色谱柱的梯度分离结果（保持 k* 不变）

色谱柱规格			分离特征	
柱长 (mm)	粒径 (μm)	流速 (mL/min)	梯度时间 (min)	压力 (bar)
150	5	1	8	170
100	3.5	1	6	204
50	1.8	1	3.5	300

维生素补充剂中水溶性维生素的鉴定和定量

图 3 是了两种不同维生素补剂的色谱图。上图是成人多维片的色谱图，下图是 Berkley & Jensen 儿童多维咀嚼片的色谱图。样品中水溶性维生素的阳性鉴别峰在图 3 中用数字表明，其对应的名称见表 4。根据保留时间进行了初步鉴定，然后用紫外光谱图对每种维生素进行确证。混合标样中包含了 7 种水溶性维生素，后来又添加了第 8 种水溶性维生素，维生素 B1，以便对维生素补剂中的该维生素进行鉴别和定量。

在成人维生素片中，鉴别出了储备液中 7 种维生素中的 5 种。还鉴别出了维生素 H，但由于在样品中的浓度非常低，所以不能记录下准确的保留时间和峰面积。在儿童维生素咀嚼片中，鉴别出了储备液中 7 种维生素中的 6 种。除两次分析的维生素中鉴别到的这些维生素以外，死时间之后马上洗脱的第一个峰被鉴别为维生素 B1。人体对每种维生素的需要量各不相同。由于它们在样品中的浓度差别很大，我们无法得到一张所有维生素 UV-VIS 响应都呈良好峰形的色谱图。

例如，抗坏血酸、烟酸和维生素 B6 的需要量较大，在维生素片剂中其浓度较高。因此，这些峰在色谱图中就非常。图 3 中的色谱图显示，进样 15 µL，而混合标样的进样体积为 1.7 µL。选择这种体积是因为要观察较低浓度存在的维生素峰。在所有维生素色谱图中都没有找到维生素 B12，因为人体只需要非常少的量，维生素样品中只有几微克。表 9 给出了成人和儿童多种维生素片中维生素 B1、烟酸和维生素 B6 的定量数据。测定值与片剂瓶子上的标签完全一致。

我们还分析了一些常见的维生素和能量饮料。这些是无糖的红牛（红牛，N.A., Inc., Santa Monica, CA）和 strawberrykiwi 维他命水。在这些饮料中，一般都能鉴别出抗坏血酸、烟酸和维生素 B6，但即使添加已知量的维生素 B12，也没有在色谱图中找到维生素 B12 的峰。这是由于饮料中这种维生素的浓度很低。表 10 显示了无糖红牛和 strawberry-kiwi 维他命水中烟酸和维生素 B6 的定量数据。

表 9. 儿童和成人多种维生素片中维生素的定量结果

维生素	补充剂	理论值 (mg/tab)	测定值 (mg/tab)
维生素 B1	成人多种维生素	1.5	—
维生素 B1	儿童多种维生素	1.5	1.8
烟酸	成人多种维生素	20	22.6
烟酸	儿童多种维生素	20	22.2
维生素 B6	成人多种维生素	2	2.0
维生素 B6	儿童多种维生素	2	2.5

表 10. 普通饮料中维生素的定量

维生素	补充剂	理论值 (mg)	测定值 (mg)
烟酸	维他命水	12.5	12.1
烟酸	红牛，无糖	21.2	30
维生素 B6	维他命水	5.0	5.8
维生素 B6	红牛，无糖	2.1	2.4

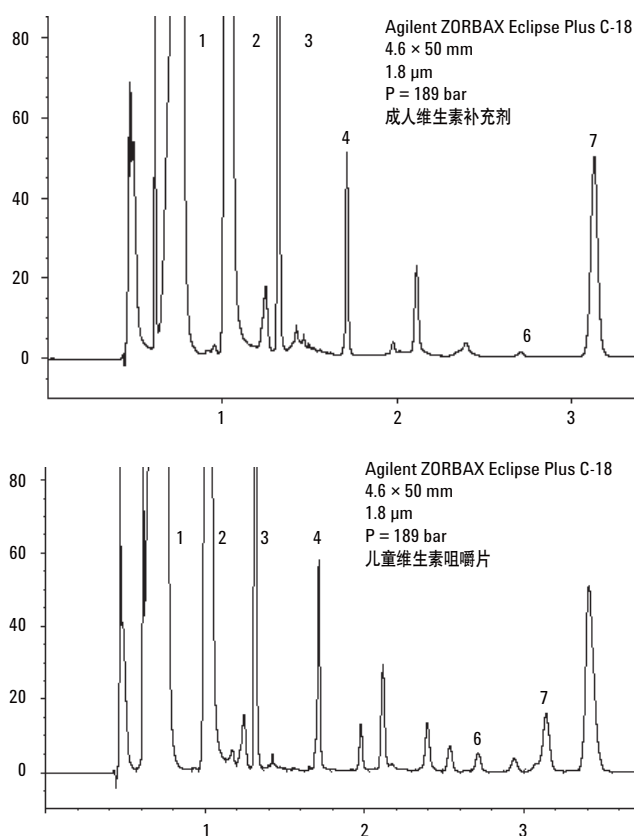


图 3. 相同条件下成人维生素补充剂溶液和儿童维生素咀嚼片的色谱图。条件同图 2，色谱峰标号所对应的维生素如表 4 所示

结论

用一种不使用离子对试剂的色谱方法分离了标准溶液中的水溶性维生素。根据保留时间和 UV 光谱图，在一种成人维生素补剂中鉴定出了 8 种维生素中的 6 种。用同样方法从一种儿童多维咀嚼片中鉴定出了 8 种维生素中的 7 种。两种片剂中都没有鉴别出维生素 B12，因为这种维生素在这些片剂中含量非常低，在维生素饮料中的浓度低于方法的检测限。并对这两种市售维生素片剂中的维生素 B1、烟酸和维生素 B6 进行了定量分析。对两种普通能量/维生素饮料中的烟酸和维生素 B6 进行了鉴别和定量。从而证明该方法适用于各种市售产品中维生素的鉴定。

本方法还表明，各种柱尺寸和粒径的 ZORBAX Eclipse Plus 柱，包括 RR 色谱柱，都非常适用于水溶性维生素的分离和鉴定。这些色谱柱柱效很高，而且，其非常惰性的表面使此类分离很少拖尾，具有卓越的性能。色谱柱尺寸的选择取决于所得数据的特定用途。颗粒较小的短柱分析时间更短，可以更快速地进行方法开发，并提供更高的分析通量，同时仍然保持足够的分离度。

参考文献

1. Gerald F. Combs, Jr., *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, San Diego: Academic Press, 1998
2. Jian-Ping Yuan and Feng Chen, "Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Solution," *J. Agric. Food Chem.*, 46 (12), 5078–5082, 1998
3. Sam A. Margolis and Edward Park, "Stability of Ascorbic Acid in Solutions Stored in Autosampler Vials," *Clinical Chemistry*, 47, 1463–1464, 2001
4. Lloyd R. Snyder, Joseph L. Glajch, and Joseph J. Kirkland, *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed., Wiley, New York, USA, 1997
5. U.S. Pharmacopeia National Formulary, USP 31 NF 26, May 1, 2008

更多信息

如果需要了解我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料如有更改恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2009

中国印刷
2009 年 9 月 6 日
5989-9313CHCN



Agilent Technologies