

# 使用 Poroshell 120 EC-C18 分析綜合維生素錠的水溶性維生素

## 應用註解

製藥

### 作者

William J. Long  
Agilent Technologies, Inc.  
2850 Centerville Road  
Wilmington, DE 19809-1610  
USA

### 摘要

將原本於安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱（各種尺寸）開發的綜合維生素化合物分離方法，移轉至使用安捷倫 1260 快速分離 LC 的安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 4.6 mm × 75 mm (2.7 μm) 管柱。濃度梯度與流速均按比例調整，維持滯留指數，目標是針對每個管柱評估並判定最佳流速。新的分離方法將分析時間穩定維持在 5 分鐘，可使用較長管柱、較高流速，並仍然維持 400 bar 以下的壓力。使用的樣品製備方法，是將維生素錠溶解於水中，之後透過 0.45 μm 的針筒濾膜過濾或進行離心過濾。總共進行 800 次以上的注入，壓力並沒有顯著增加。

### 緒論

維生素是指生物體內無法自行合成充足數量的化合物，必須透過飲食攝取。維生素具有各種不同的生物化學作用。許多維生素是酵素輔因子的前驅物，協助酵素作為代謝過程中的催化劑。維生素也不一定是酵素催化劑，可能作為輔助酵素，成為在分子之間攜帶化學基或電子的可分離分子。



**Agilent Technologies**

維生素依據其溶解材料分為兩種類型。像是維生素 D 或 E 等脂溶性維生素，可於脂肪中溶解，之後再由血液吸收執行其功能。此類維生素一旦過量即儲存於肝臟，因此並不需要每日攝取。

相對的，水溶性維生素會溶解於水中，隨尿液排出體外而無法儲存，因此人體需要持續透過飲食攝取。水溶性維生素包括維生素 B 群與維生素 C。

維生素 B 群：硫胺、核黃素、菸鹼酸、磷酸吡多辛、葉酸、鈷胺素、泛酸以及稱為抗壞血酸的維生素 C，都廣泛存在於各種食品中。例如核黃素就可由肝臟、牛乳、深綠色蔬菜、全穀物和強化穀物產品和蛋類等食品中攝取。這些維生素影響著身體的許多部位，並在體內作為輔助酵素，協助人體由食品取得能量。維生素對維持正常食慾、良好視力、皮膚健康、神經系統健康和紅血球生成都非常重要。

在 1930 年代中期首次販售由酵母萃取的半合成維生素 C 補充藥丸之前，維生素只能透過食物攝取，因此飲食一發生變化（農作欠收導致）就可能改變維生素的攝取量。自 20 世紀中期以來，維生素已製造為日常化學商品並大量供應，是成本低廉的合成綜合維生素飲食補充品 [1]。

綜合維生素除了包含維生素以外，也包含其他賦形劑材料，例如纖維素、麥芽糊精、糊精、明膠、葡萄糖和大豆卵磷脂。由於藥丸體積大，並含有相對數量少但種類多的維生素，因此過去嘗試使用小顆粒管柱進行分析時，就受到阻塞問題的困擾。

逆相 HPLC 非常適合進行維生素分析。維生素的定性與定量分析，對臨床、食品與製藥應用非常重要。使用先前介紹於安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 1.8  $\mu\text{m}$  管柱開發的方法，將快速分離方法移轉至使用安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱 [2]。新方法仍維持速度快的特性，但是比較不會因為綜合維生素的賦形劑造成阻塞。

本項分析作業中，將使用安捷倫 Eclipse Plus C18 4.6 mm  $\times$  50 mm (1.8  $\mu\text{m}$ ) 管柱的方法，轉換為使用安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 4.6 mm  $\times$  75 mm 管柱，而使得注入體積增加，並減少阻塞風險。

## 實驗

本次分析使用安捷倫 1260 快速分離 LC (RRLC) 系統：

- G1312B 二元幫浦 SL 推送移動相 A：25 mM 磷酸鈉 pH 2.5 溶於水及 B：甲醇。梯度沖提自 1% B 開始，維持該濃度，之後增加至 12% B，最後成為 30% B，維持該濃度，然後重新平衡至初始條件。系統配置脈動緩衝器及標準混合器
- G1367E 自動液體取樣器 (ALS) SL。使用 5  $\mu\text{L}$  的注入量
- G1316B 柱溫箱 (TCC) SL，溫度設定為 35  $^{\circ}\text{C}$
- G4212C 光二極體陣列偵測器 (DAD) SL，訊號設定為 230、4 nm，未使用對照訊號，使用 G4212-60008 微型流動液槽 (10-mm 路徑，1- $\mu\text{L}$  變異)
- 使用 ChemStation 版本 B.04.02 控制 HPLC 及處理資料
- 安捷倫 Poroshell 120 EC-C18，4.6 mm  $\times$  75 mm，2.7  $\mu\text{m}$ ，p/n 697975-902

請參閱參考資料 2 瞭解本次研究的目標化合物及其個別結構。化合物溶解於水中（濃度為 1 mg/mL）用於進行識別。下列化合物向 Sigma Aldrich 購買：硫胺（維生素 B<sub>1</sub>）、核黃素（維生素 B<sub>2</sub>）、菸鹼酸、維生素 B<sub>6</sub>、葉酸、維生素 B<sub>12</sub>、生物素、泛酸及抗壞血酸。另外還向 Sigma Aldrich（美國賓州 Bellefonte 廠房）購買單磷酸鈉及磷酸。甲醇（高純度）向 Honeywell Burdick and Jackson（美國密西根州 Muskegon 廠房）購買。使用的水為 18 M $\Omega$  WMilli-Q 水（美國麻州 Bedford 廠房）。綜合維生素錠於當地藥局購買。（One a Day Women's Active Metabolism，Bayer HealthCare，美國紐澤西州 Morristown 廠房）。

藥丸溶解時先使用砵、杵個別研磨，而後將其全部（每顆藥丸約 1.6766 g）與 100 mL 的水移轉至 150 mL 的塑膠瓶。此後將瓶子密封並劇烈搖晃 5 分鐘。產生的混濁溶液利用過濾（使用 0.45  $\mu\text{m}$ ，30 mm 的再生纖維素濾膜（p/n 5061-3364）與 10 mL 針筒或於聚丙烯試管中離心（6000 rpm 轉速 5 分鐘）進行淨化。產生的透明溶液移轉至安捷倫 MS 分析手寫樣品瓶（p/n 5190-2278）。

## 結果及討論

由原始方法移轉至本方法，選擇長度較長的管柱，並依據比例使用較高流速。先前的研究顯示，安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 (以 75 mm 取代之前使用的 50 mm 管柱) 可於較高的線性速度 (1.5 mL/分鐘取代 1 mL/分鐘) 獲得更優異的峰容量 [3]。此外在較大的 Poroshell 管柱，也可能使用更高的注入量(應與管柱容量成比例)。安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 (以 75 mm 取代之前使用的 50 mm 管柱) 及 Poroshell 120 EC-C18，在先前研究時已顯示出非常相近的選擇性 [4,5]。此外較大的管柱也比較不會受到額外管柱效應的影響，例如使用冷卻的自動取樣器時需要的額外管路 [6]；本項建議由 Huber [7] 在之前的水溶性維生素分析注意事項中提出。本項分析中，濃度梯度開始時沖提順序出現些微變化。這可能是因為管柱孔性變化 (由全多孔性變為表面多孔性)、儀器的滯留體積，或是每次分析之間的平衡時間。圖 1 顯示依據最大波峰，按比例調整出典型的樣品層析圖，。左上角顯示的擴

大層析圖，代表強度較低的波峰。右邊則顯示層析條件，以及按照沖提順序列出的化合物清單。

本管柱注入 800 次以上的維生素錠萃取物，壓力並沒有增加。其中部分原因是 2 μm 的管柱入口濾片，相較於 2 μm 以下管柱與全多孔性 3 μm 管柱使用的較小孔性濾片，比較不容易堵塞 [8]。使用離心樣品淨化方法進行至少 100 次注入後，系統壓力並沒有任何變化。在此情況下，過濾被視為速度較快的方法，且產生最終樣品需要的步驟也比較少。0.45 μm 再生纖維素濾膜的阻力低於 2 μm 以下管柱需要使用的 0.2 μm 濾膜。圖 2 顯示每次注入的壓力變化點繪圖，此圖為 3 天中是使用 6 L 的磷酸緩衝液的情況下，壓力由 177 增加至 179 bar 的情形。

本項分析也可使用其他波長，因為多種化合物形成黃色或甚至紅色溶液，代表能在光譜可見光區域吸收 [9]。對照波長應謹慎運用，因為選擇不當恐令對照吸收率高於分析波長的吸收率，進而造成負波峰。

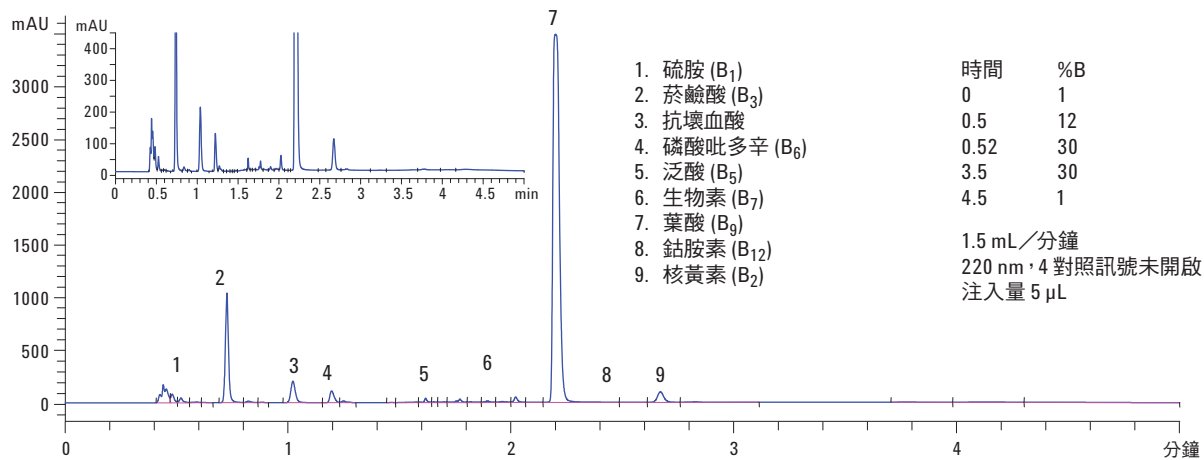


圖 1. 按照沖提順序排列的水溶性維生素

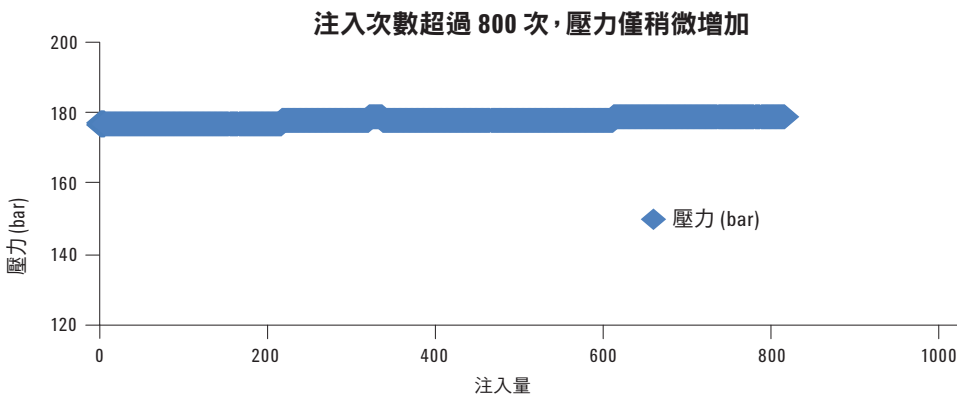


圖 2. 安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 在注入 800 次水溶性維生素錠之後，壓力幾乎維持不變

## 結論

相較於以傳統全多孔性顆粒充填的管柱，表面多孔性顆粒充填的 HPLC 管柱具有許多優勢。表面多孔性的 2.7- $\mu\text{m}$  安捷倫 Poroshell 120 EC-C18，其效率與選擇性相近於 1.8  $\mu\text{m}$  的安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱，並且沒有高背壓的問題。分析 800 個以上的樣品之後，顯示 2  $\mu\text{m}$  濾片可避免阻塞問題。

## 參考資料

1. H. Stephen Stoker。《一般、有機和生物化學》(General, Organic and Biological Chemistry)。第 5 版出版商：Boston, MA:Houghton Mifflin Co., 2006。
2. Anna Glinko、Michael J. Bozym、Michelle L. Owens、Karyn Usher 及 Ronald E. Majors。〈在安捷倫 ZORBAX Eclipse Plus 管柱進行水溶性維生素的逆相 HPLC 分離〉(Reversed-Phase HPLC Separation of Water-Soluble Vitamins on Agilent ZORBAX Eclipse Plus Columns)。安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication) 5989-9313EN，2008 年 8 月 6 日。
3. William Long 及 Anne E. Mack。〈使用 Poroshell 120 EC-C18 管柱快速分析環境酚〉(Fast Analysis of Environmental Phenols with Poroshell 120 EC-C18 Columns)。安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication) 5990-6156EN，2010 年 8 月 31 日。
4. 安捷倫技術注意事項 (Agilent Technical Note)。〈在 Poroshell 120 EC-C18 及 ZORBAX Eclipse Plus C18 管柱之間移轉方法〉(Transfer of Methods between Poroshell 120 EC-C18 and ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns)。安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication) 5990-6588EN，2011 年 2 月 9 日。
5. Anne E. Mack 及 William J. Long。〈使用多孔性外層表面多孔性安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱針對食品及飲料添加物進行快速低壓分析〉(Fast, Low Pressure analysis of food and beverage additives using a Superficially Porous Agilent Poroshell 120 EC-C18 Column)。安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication) 5990-6082EN，2010 年 7 月 8 日。
6. William J. Long 及 Anne E. Mack。〈減少試管體積最佳化管柱效能〉(Reduce Tubing Volume to Optimize Column Performance)。安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication) 5990-4964EN，2009 年 11 月 16 日。
7. Udo Huber。〈使用 HPLC 分析水溶性維生素〉(Analysis of Water-Soluble Vitamins by HPLC)，12/98，安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication) 5968-2971EN。
8. Long, W. 及 Mack, A.。〈使用安捷倫 1100 系列 LC 搭配安捷倫 Poroshell 120 EC-C18 管柱快速分析磺胺類藥物〉(Fast Analysis of Sulfa Drugs using the Agilent 1100 Series LC with Agilent Poroshell 120 EC-C18 columns)。安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication) 5990-5572EN，2010 年。
9. Detlef Wilhelm。〈在使用安捷倫 1200 系列快速分離率 LC 系統及反向移轉開發方法之後，使用安捷倫 1120 Compact LC 判定水溶性維生素〉(Determination of water soluble vitamins with the Agilent 1120 Compact LC after method development with the Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC system and back transfer)。安捷倫科技出版品 (Agilent Technologies Publication) 5990-4379EN，2010 年 6 月 15 日。
10. Dorothy J. Phillips、Mark Capparella、Uwe D. Neue a、Zoubair El Fallah。〈外層包覆新型小型粒子顆粒，加速分析並提供高分離率解析度〉(A new small particle packing for faster analysis with high resolution)。《製藥及生物醫學分析期刊 15》(Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 15) (1997) 1389-1395。

## 詳細資訊

有關本公司產品與服務的其他資訊，請造訪本公司的網站：  
[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

### [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

本文內容如有任何錯誤，或是因為提供、實行或使用本資料，造成附帶或衍生損害，安捷倫恕不負責。

本文件中的資訊、說明和規格可能隨時變更，恕不另行通知。

© 安捷倫科技公司，2011 年  
於美國印製  
2011 年 5 月 27 日  
5990-8107CHTW



**Agilent Technologies**