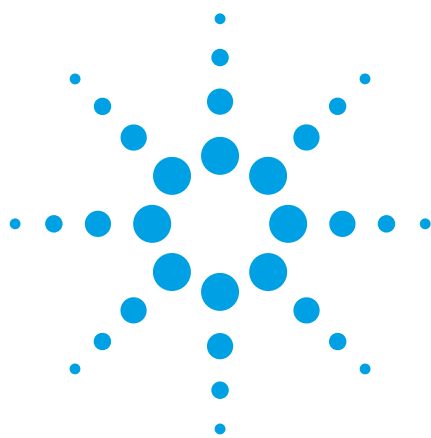




使用 Poroshell 120 EC-C18 分析复合维生素片中的水溶性维生素

应用报告

制药

作者

William J. Long
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19809-1610
美国

摘要

将原来在不同尺寸 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱上建立的 9 种复合维生素化合物的分离方法，转移到安捷伦 1260 快速分离高分离度液相色谱仪的 Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6 mm × 75 mm, 2.7 μm 色谱柱上。按比例改变梯度和流速，根据每根色谱柱的最佳流速，使保留因子保持不变。新的分离条件将分析时间保持在 5 分钟左右，在更高的流速下可以使用更长的色谱柱，压力仍保持在 400 bar 以下。将维生素片溶解在水中，进行样品制备，然后用 0.45 微米注射式滤膜过滤或离心。经过 800 多次进样，压力基本上未增加。

前言

维生素是有机体内的合成量不足，必须通过膳食摄取的一类化合物。各种维生素有不同的生物化学功能。许多维生素具有辅酶因子前体的功能，帮助酶在代谢催化过程中发挥作用。维生素也可以作为辅酶，不与酶催化剂发生紧密结合，而是以可拆分分子的形式在分子之间转运化学基团或电子。



Agilent Technologies

根据维生素的溶解性将其分为两种类型。脂溶性维生素，如维生素 D 或 E，先溶解在脂中然后随着血液流动并发挥其作用。过量的这类维生素储存在肝脏中。由于其可以被储存，所以不需要每天从膳食中摄取。

相比之下，水溶性维生素则不能储存，将随尿液排出。因此，我们需要在饮食中不断供给。水溶性维生素是指 B 族维生素和维生素 C。

B 族维生素（包括：硫胺、核黄素、尼克酸、磷酸吡哆醛、叶酸、维生素 B₁₂、泛酸），以及抗坏血酸或维生素 C，广泛分布于食物中。例如，核黄素可以从肝脏、牛奶、深绿色蔬菜，以及全麦制品和蛋类中获得。它可以在机体的许多部位发挥作用。其具有辅酶功能，帮助机体从食物中获得能量。其对于保持正常的食欲、良好的视力、健康的皮肤、健康的神经系统，以及血红细胞的形成也非常重要。

过去，维生素的获得只能通过食物摄取，或者可以通过改变饮食来改变摄入维生素的类型和量，直到二十世纪三十年代中期，才出现酵母提取和半合成的维生素辅助片商品。二十世纪中叶以后，出现了广泛而廉价的合成复合维生素膳食补充剂商品化合物 [1]。

这些片剂中除了含有我们需要的各种维生素以外，还有其它赋形剂，如，纤维素、麦芽糊精、明胶、葡萄糖、大豆卵磷脂等。由于片剂体积较大并且复合维生素的含量相对较小，用小粒径色谱柱进行分析时，容易发生阻塞问题。

反相 HPLC 非常适用于维生素的分析。维生素的定性和定量分析在临床、食品和医药等应用中极为重要。我们将以前报导过的使用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 1.8 μ m 色谱柱开发的快速分离方法，转换到 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱上 [2]。新方法保持了快速的特点，但更不容易被复合维生素片中的赋形剂堵塞。

本文中，我们将用 Agilent Eclipse Plus C18 4.6 mm $\times$ 50 mm, 1.8 μ m 色谱柱建立的方法，转化到 Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6 mm $\times$ 75 mm 色谱柱上。增加了进样量，降低了堵塞的风险。

实验部分

本文使用安捷伦 1260 快速分离高分离度液相色谱（RRLC）系统：

- G1312B SL 型二元泵，流动相 A: 25 mM 磷酸钠水溶液，pH 2.5, B: 甲醇。梯度洗脱从 1% B，保持这一浓度，然后逐渐升至 12% B，最后达到 30% B，保持这一浓度，然后再平衡至初始条件。系统配置脉冲阻尼器，安装标准混合器
- G1367E SL 型自动液体进样器（ALS），进样体积为 5 μ L
- G1316B SL 型柱温箱（TCC），温度设为 35 $^{\circ}$ C
- G4212C SL 型二极管阵列检测器（DAD），信号设置为 230, 4 nm，不使用参比波长，使用 G4212-60008 微量流通池（10 mm 光程，1 μ L 偏差）
- 用 B.04.02 版化学工作站控制 HPLC 并处理数据
- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 mm $\times$ 75 mm, 2.7 μ m 色谱柱，部件号 697975-902

在参考文献 2 中列出了各目标化合物及其结构。将这些化合物溶解于水中，配制成 1 mg/mL 溶液，用于化合物鉴定。下列化合物购自 Sigma Aldrich 公司：硫胺（维生素 B₁）、核黄素（维生素 B₂）、烟酸、维生素 B₆、叶酸、维生素 B₁₂、维生素 H、泛酸和抗坏血酸。一磷酸钠和磷酸购自 Sigma Aldrich 公司 (Bellefonte, PA)。甲醇购自 Honeywell, Burdick 公司和 Jackson High Purity 公司 (Muskegon, MI)。水用 18 MW W Milli-Q 制备 (Bedford, MA)。复合维生素片购自本地药店。（每日女性活性代谢量，Bayer HealthCare 公司，Morristown NJ.）。

片剂用研钵碾碎，全部（约 1.6766 g/片）转移至 150 mL 塑料烧瓶中，用 100 mL 水溶解。盖封烧瓶，并剧烈振摇 5 分钟。得混悬溶液，通过过滤（使用 0.45 μ m, 30 mm 再生纤维素滤膜，部件号 5061-3364）和 10 mL 注射器，或加至聚丙烯试管中离心（6000 rpm，离心 5 分钟），使其澄清。然后，将所得澄清溶液转移至安捷伦质谱分析带书写签样品瓶（部件号 5190-2278）中。

结果和讨论

将原方法转为现方法的过程中，选用较长色谱柱，按比例提高流速。在之前的报道中，用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱（75 mm 替换原来使用的 50 mm 柱长），提高流速（1 mL/min 改变为 1.5 mL/min），将增加峰容量[3]。另外，在较大的 Poroshell 柱上，还可以根据柱体积按比例增加进样体积。之前的报道[4,5]表明，Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (75 mm 替代以前使用的 50 mm 柱)与 Poroshell 120 EC-C18 柱的选择性非常相似。而且，较大色谱柱受管线增加（冷却自动进样器所需，Huber [7]推荐在分析水溶性维生素时使用）等因素所致柱外效应的影响较小。在文中，我们注意到梯度开始时的洗脱顺序略有变化。这可能是由于色谱柱孔隙率（从全多孔改为表面多孔）、仪器驻留时间或每次分析之间平衡时间等因素的改变造成的。图 1

为典型的样品色谱图，按最大峰成比例显示。在左上角，展开的色谱图显示了强度较低的峰。色谱条件以及各组分洗脱顺序列于右侧。

维生素片提取物进样 800 多次，未见压力增高。部分原因是由于 2 μm 色谱柱入口筛板，与亚 2 μm 和 3 μm 全多孔柱的更小孔隙筛板相比，不容易被阻塞[8]。采用离心法使样品澄清，进样至少 100 次，也不会使系统压力发生改变。我们在本例中发现，过滤是一种更快速的方法，得到最终样品需要更少的步骤。0.45 μm 再生纤维素滤膜，与亚 2 微米柱所需的 0.2 μm 滤膜具有更小的阻力。图 2 显示了每次进样的压力变化曲线。请注意，在超过 3 天的时间内使用了 6 L 磷酸盐缓冲液，压力从 177 增加到 179 bar。

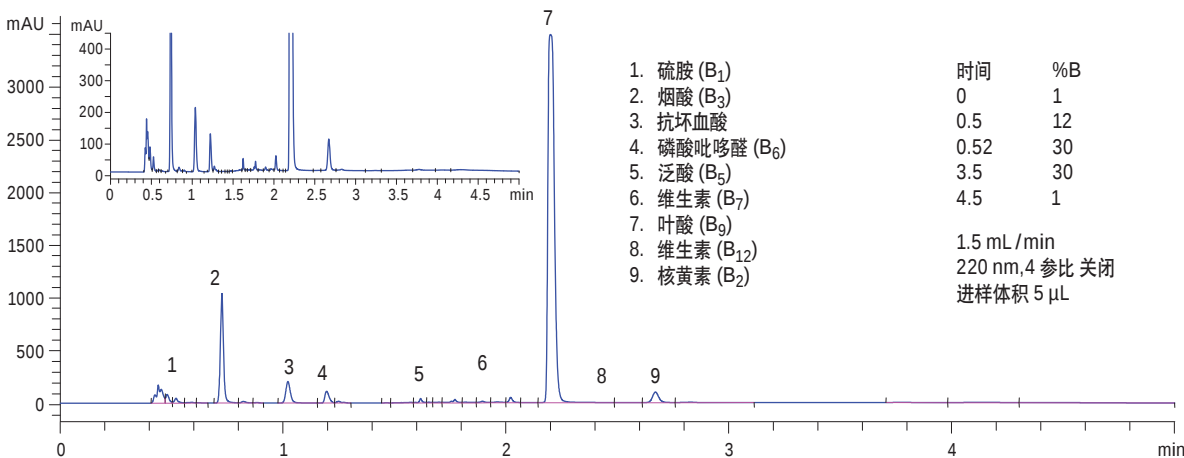


图 1. 水溶性维生素洗脱顺序

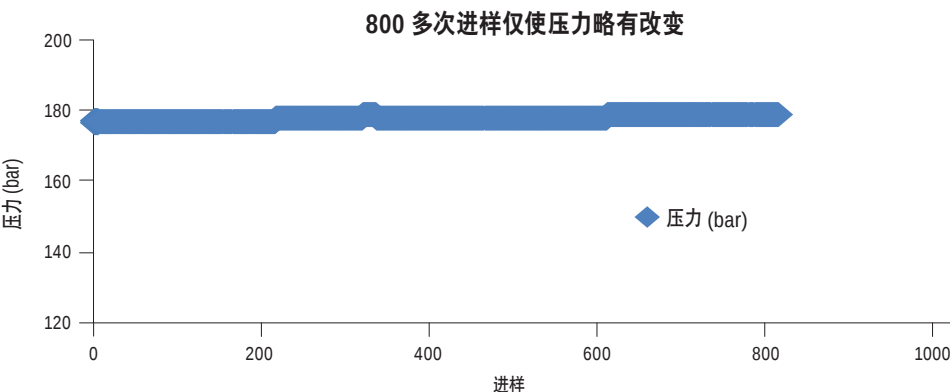


图 2. 水溶性维生素片在 Poroshell 120 EC-C18 柱上 800 多次进样后，压力仅有少许增加

本分析也可以使用其它波长，因为这些化合物中的一些在水中为黄色，甚至红色，表明其在可见光谱区域有吸收[9]。一定要注意，参比波长选择不当时，可能使参比吸收比分析波长的吸收更高，从而导致负峰。

结论

填充表面多孔填料的 HPLC 柱与填充常规全多孔填料的色谱柱相比，有许多优点。表面多孔 2.7 μm Agilent Poroshell 120 EC-C18 柱，提供了与 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 柱相似的柱效和选择性，但没有高压。2 μm 筛板在 800 多次分析后也不会发生阻塞。

参考文献

1. H. Stephen Stoker, "General, Organic and Biological Chemistry." 5 th Edition Publisher: Boston, MA: Houghton Mifflin Co., 2006.
2. Anna Glinko, Michael J. Bozym, Michelle L. Owens, Karyn Usher, and Ronald E. Majors, "用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus 柱进行水溶性维生素的反相液相色谱分离", 安捷伦科技出版物 5989-9313CHCN, 2008 年 8 月 6 日。
3. William Long and Anne E. Mack, "使用安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱快速分析环境中的酚类", 安捷伦出版物 5990-6156CHCN, 2010 年 8 月 31 日。
4. 安捷伦应用简报, "Transfer of Methods between Poroshell 120 EC-C18 and ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns," 安捷伦出版物 5990-6588CHCN, 2011 年 2 月 9 日。
5. Anne E. Mack and William J. Long "使用安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 表面多孔色谱柱对食品和饮料添加剂进行快速低压分析", 安捷伦科技出版物 5990-6082CHCN, 2010 年 7 月 8 日。
6. William J. Long and Anne E. Mack, "减小管路体积以优化色谱柱性能", 安捷伦科技出版物 5990-4964CHCN, 2009 年 11 月 16 日。
7. Udo Huber, Analysis of Water-Soluble Vitamins by HPLC, 12/98, 安捷伦科技出版物 5968-2971CHCN。
8. Long, W. and Mack, A. "使用 Agilent 1100 系列液相色谱配合安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱对磺胺类药物进行快速分析", 安捷伦科技出版物 5990-5572CHCN, 2010。
9. Detlef Wilhelm, "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," 安捷伦出版物 5990-4379CHCN, 2010 年 6 月 15 日。
10. Dorothy J. Phillips, Mark Capparella, Uwe D. Neue, Zoubair El Fallah, A new small particle packing for faster analysis with high resolution Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 15 (1997) 1389-1395.

更多信息

如需了解我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网页 www.agilent.com/chem/cn。

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。本资料中产品性能指标和规格如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011
中国印刷
2011 年 5 月 27 日
5990-8107CHCN



Agilent Technologies