

## HPLC-DAD 分析水溶性维生素

### 摘要

维生素是生命正常代谢过程中至关重要的化合物。它们不仅天然存在于许多食品中，目前也经常添加到加工食品中。此外，在饮食不规律的人群中，使用维生素补充剂已经愈发常见。维生素分为两种，即水溶性和脂溶性。其中水溶性维生素最为常见主要是硫胺素（B<sub>1</sub>），吡哆素（B<sub>6</sub>），钴胺素（B<sub>12</sub>），核黄素（B<sub>2</sub>），烟酸（B<sub>3</sub>），烟酰胺，抗坏血酸葡萄糖苷，维生素C和异抗坏血酸。

由于水溶性维生素的性质不稳定，因此在常规分析中具有一定难度。日常生活中影响水溶性维生素稳定性的因素有很多，如暴露在高温、强光、空气的条件下以及与其它的食品成分发生相互作用，均会影响水溶性维生素的稳定性。

通过使用带有二极管阵列检测器（DAD）的反相高效液相色谱（HPLC），很容易开发出检测水溶性维生素的方法。在定量分析中，由于维生素C和异抗坏血酸的不稳定性，其在样品制备过程中经常发生分解，因此建议建立单独的HPLC方法。

### 应用方案

使用SCION 6000 HPLC（配DAD检测器和C<sub>18</sub>, 5 μm反相柱）时，可以同时轻松鉴定9种目标化合物。制备的分析用标准品在四丁基铵中的浓度范围为0.1-50mg/L。为了分析维生素B<sub>1</sub>和B<sub>6</sub>，使用了盐酸盐。同时因为样品是富含维生素的健康饮料和营养补品，因此在样品制备过程中以1:10的比例稀释，然后通过0.45 μm过滤器过滤后待分析。

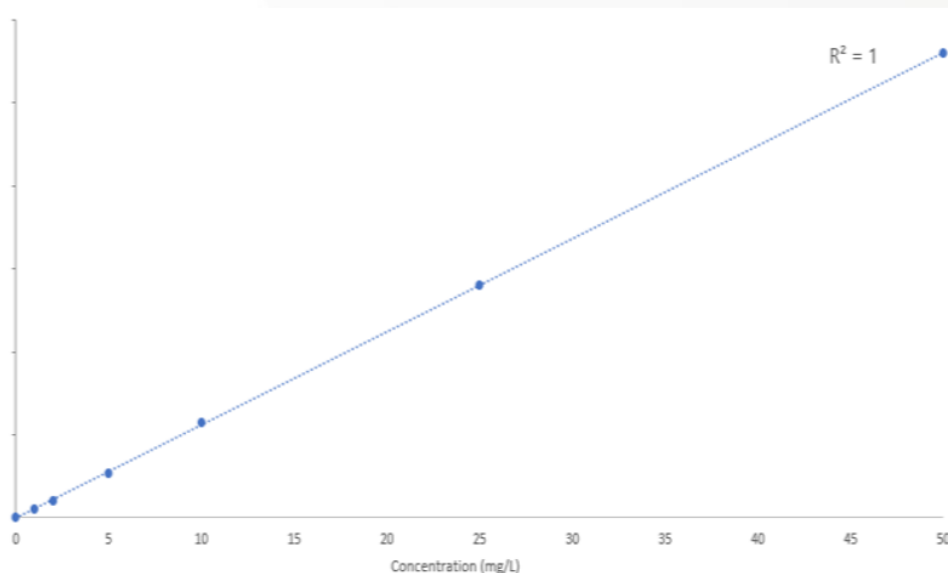
HPLC-DAD 的分析条件见表 1。

**Table 1.** Analytical conditions of the HPLC-DAD system

Conditions	
<b>Column</b>	C18 5 $\mu$ m x 4.6mm ID x 250mm
<b>Column Temp</b>	40°C
<b>Mobile Phase</b>	Phosphate buffer (pH 5.2): Acetonitrile (90:10 v/v)
<b>Phosphate Buffer</b>	10mM tetrabutylammonium hydroxide: 10mM monopotassium phosphate
<b>Flow Rate</b>	0.8mL/min
<b>Injection Vol</b>	10 $\mu$ L
<b>DAD</b>	260nm

## 结果

所有目标化合物均具有良好的线性； $R^2$  值在 0.996 以上。在分析中，由于洗脱液中维生素的不稳定性，为了保证良好的线性，维生素 C、异抗坏血酸和维生素 B<sub>12</sub> 必须现用现配。图 1 显示了维生素 B<sub>6</sub> 的线性，该线性代表了上述三种目标化合物之外的所有目标化合物（ $R^2$  为 0.996）。

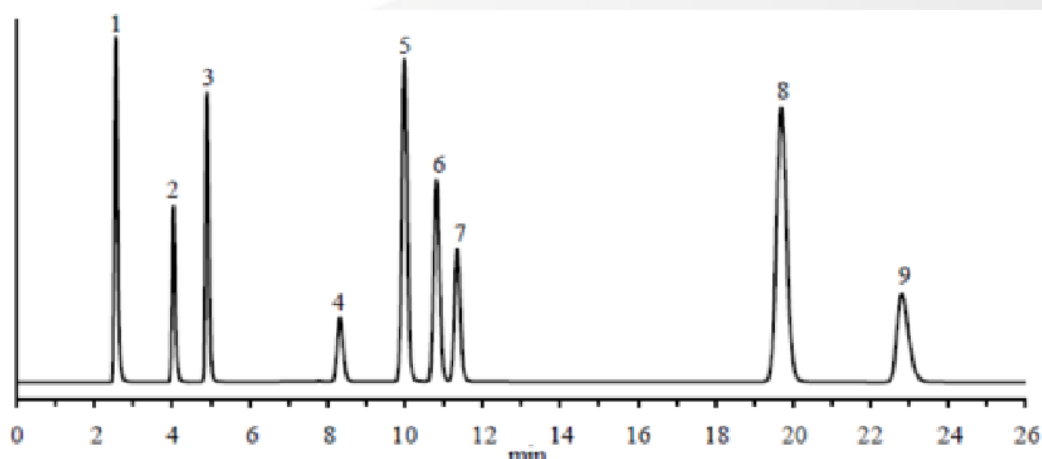


**Figure 1.** Calibration curve of Vitamin B6

表 2 列出了每种目标化合物以及图 2 的相应峰数。图 2 显示了 5mg / L 分析标准品的色谱图。图 2 突出显示了每种目标维生素的出色分离度和峰形。

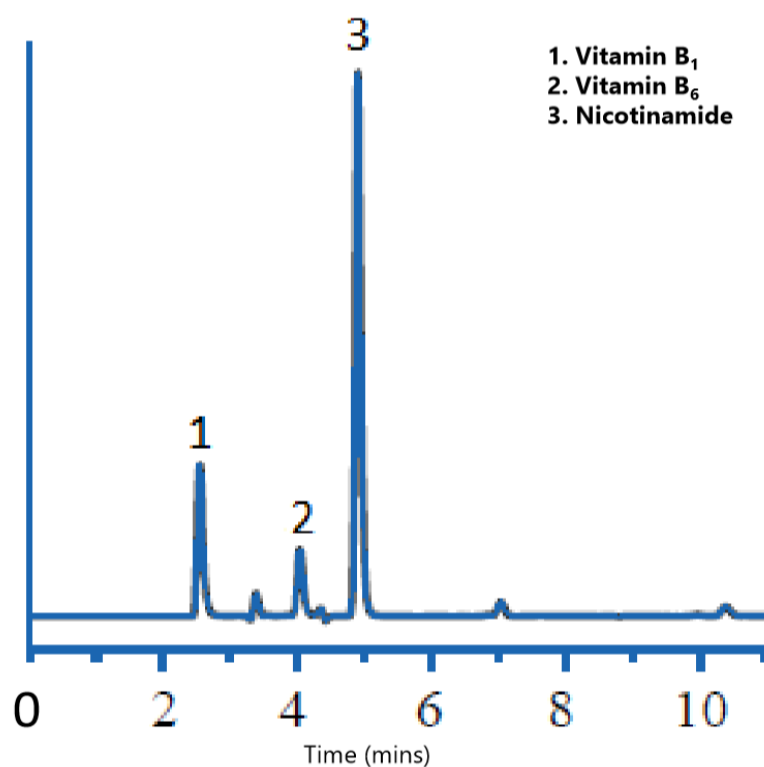
**Table 2.** Peak Identifiers/ Vitamin Name

Peak No.	Vitamin Name
1	Vitamin B <sub>1</sub>
2	Vitamin B <sub>6</sub>
3	Nicotinamide
4	Vitamin B <sub>12</sub>
5	Ascorbic Glucoside
6	Vitamin C
7	Erythorbic Acid
8	Vitamin B <sub>2</sub>
9	Nicotine Acid

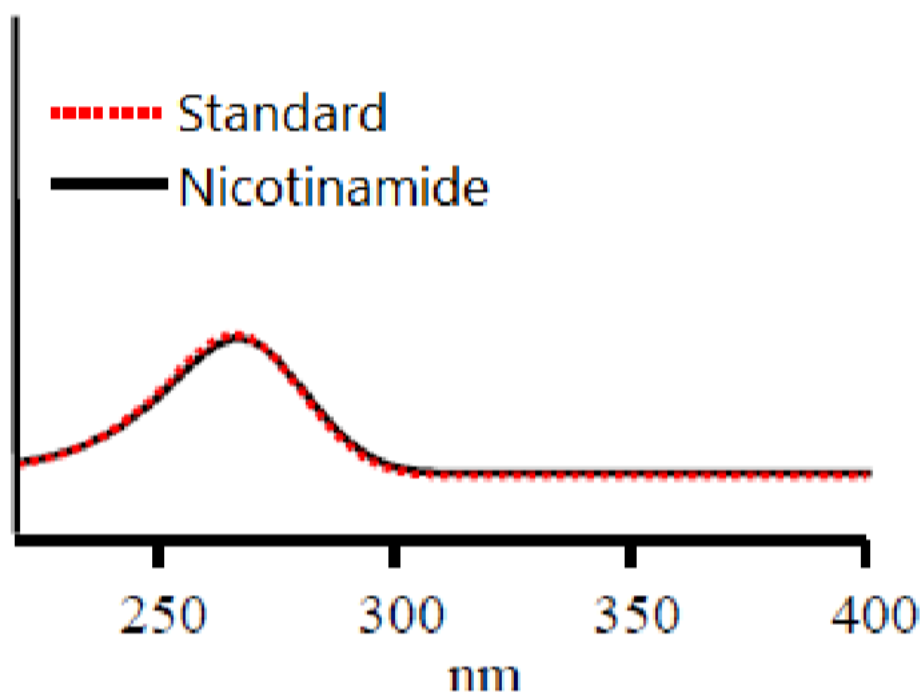


**Figure 2.** Chromatogram of 5mg/L analytical standard

图 3 显示了分析富含维生素的饮料样品时获得的色谱图。此外，图 4 突出显示了 Compass CDS 软件将目标分析物的吸收光谱与分析标准品的光谱进行比较的能力，从而提高了结果可信度。

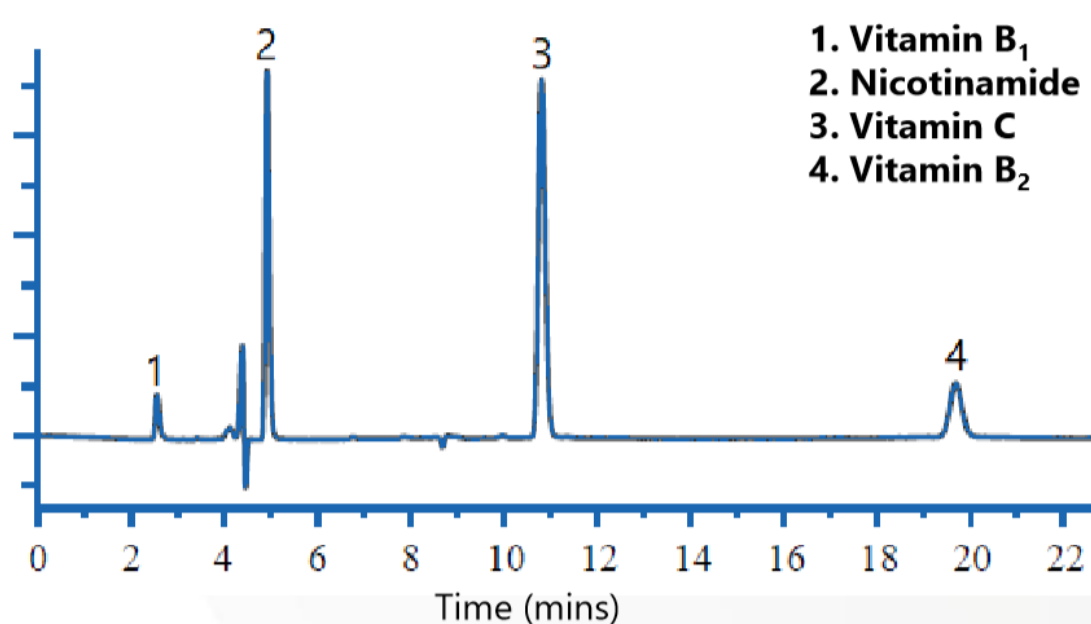


**Figure 3.** Chromatogram of vitamin enriched health drink

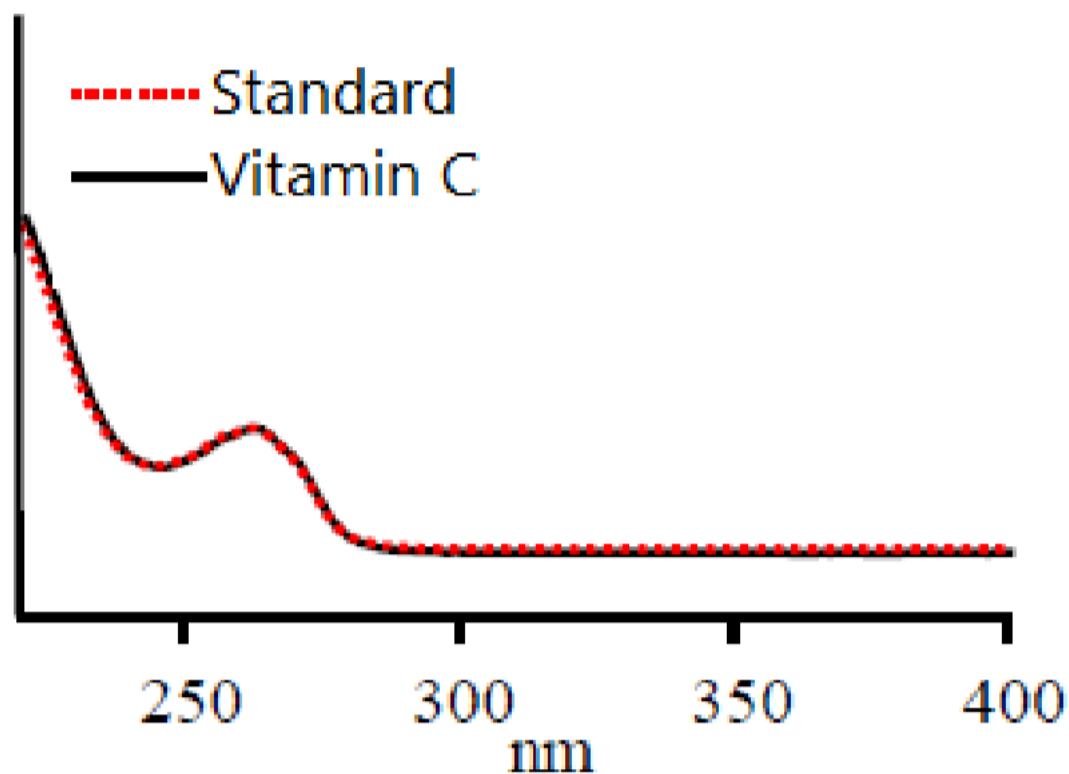


**Figure 4.** Absorption spectrum comparison of standard and health drink sample

图 5 显示了营养补品样品的色谱图，而图 6 详细显示了维生素 C 与分析标准品的吸收光谱比较。



**Figure 5.** Chromatogram of nutritional supplement sample



**Figure 6.** Absorption spectrum comparison of standard and nutritional supplement sample

营养补品比富含维生素的健康饮料多一种维生素，即维生素 C。两个样品中均含有维生素 B1 和烟酰胺。通过吸光度光谱的比较证实，鉴定出的目标化合物具有与该化合物的相应标准品完全相同的吸光度，因此结果准确可信。

## 结论

使用带有二极管阵列检测器和反相 C<sub>18</sub> 色谱柱的 SCION HPLC 可以轻松同时鉴定出 9 种水溶性维生素。由于维生素 C 和异抗坏血酸的不稳定特性，样品制备是此应用过程中必须考虑的关键因素。即使对于不稳定的维生素，SCION 6000 也观察到了极好的线性。同时 Compass CDS 软件可轻松比较吸收光谱，以进行鉴定。