

## 反相高效液相色谱法同时测定 9 种水溶性维生素

蒋晔, 刘红菊, 郝晓花

(河北医科大学药学院 石家庄 050017)

**摘要 目的:**建立反相高效液相色谱法同时测定维生素 C、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 磷酸钠、B<sub>6</sub>、B<sub>12</sub>、烟酰胺、泛酸、生物素、叶酸等 9 种水溶性维生素的分析方法。**方法:**采用梯度洗脱反相高效液相色谱法, Phenomenex C<sub>18</sub> 色谱柱(5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  250 mm), 流动相 A 为 0.05 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾缓冲液 - 乙腈(97:3); 流动相 B 为甲醇, 检测波长 210 nm, 流速 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>。**结果:**各种维生素含量测定方法的线性关系良好,  $r$  0.9998 - 0.9999, 回收率 99.21% - 100.3%, RSD 0.39% - 0.97%, 用该法测定了复合维生素注射用粉针剂水乐维他的含量。**结论:**本方法操作简便, 精密度好, 结果准确可靠。

**关键词** 反相高效液相色谱法; 水溶性维生素; 水乐维他

## RP - HPLC Determination of Nine Water - soluble Vitamins

JIANG Ye, LIU Hong - ju, HAO Xiao - hua

(Cortol of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

**Abstract Objective:** To establish RP - HPLC method for the analysis of nine water - soluble vitamins. **Methods:** RP - HPLC was adapted, on a column of Phenomenex C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  250 mm), gradient elution, using the mobile phase of A: 0.05 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate buffer (0.2% triethylamine, pH6.0) - acetonitrile (97:3) and B: methanol, at a flow rate of 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup> and the detection wavelenth of 210 nm. **Results:** In the linear range the correlation coefficients ranged from 0.9998 to 0.9999. The average recoveries were 99.21% - 100.3% with corresponding RSD of 0.39% - 0.97%. This method has been successfully applied for determination of nine water - soluble vitamins in compound vitamin injection. **Conclusion:** The method is rapid, accurate and reliable.

**Key words:** RP - HPLC; water - soluble vitamins; water - soluble vitamin in injection

水溶性维生素是人体生命活动中不可缺少的营养物质。因其化学性质和结构差别大, 分离测定困难。目前, 多种水溶性维生素的色谱分离方法有离子对 HPLC<sup>[1,2]</sup>、胶束 HPLC<sup>[3]</sup> 和非离子对 HPLC<sup>[4-6]</sup>, 前者因离子对试剂价格昂贵, 且对色谱柱柱效及泵损害大, 不适合作为常规分析方法。本文采用非离子对梯度洗脱 HPLC 对同时分离测定 9 种水溶性维生素(维生素 C, 烟酰胺, 维生素 B<sub>1</sub>, 维生素 B<sub>2</sub> 磷酸钠, 维生素 B<sub>6</sub>, 维生素 B<sub>12</sub>, 泛酸, 生物素, 叶酸), 各维生素色谱峰分离度良好, 分析时间短, 结果准确可靠, 可用于复合维生素制剂的含量测定。

### 1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: P99 II 二元梯度泵、UV99 紫外检测器(北京温分分析仪器技术开发公司)。

N2000 色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所)。甲醇、乙腈为色谱纯, 三乙胺、磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)为分析纯, 水为石英亚沸重蒸水。维生素 C(VC)、烟酰胺(VPP)、维生素 B<sub>1</sub>(VB<sub>1</sub>)、维生素 B<sub>2</sub> 磷酸钠(VB<sub>2</sub>)、维生素 B<sub>6</sub>(VB<sub>6</sub>)、维生素 B<sub>12</sub>(VB<sub>12</sub>)、泛酸、生物素(VH)、叶酸对照品购自 Sigma 公司。水乐维他复合维生素粉针剂<sup>[7]</sup>由华瑞制药有限公司生产(每瓶中组分为维生素 B<sub>1</sub> 3.0 mg、维生素 B<sub>2</sub> 3.6 mg、维生素 B<sub>6</sub> 4.0 mg、烟酰胺 40 mg、泛酸 15 mg、维生素 C 100 mg、生物素 60  $\mu$ g、叶酸 0.4 mg、维生素 B<sub>12</sub> 5.0  $\mu$ g、甘氨酸 300 mg、乙二胺四乙酸二钠 0.5 mg、对羟基苯甲酸甲酯 0.5 mg)。

### 2 色谱条件

色谱柱: Phenomenex C<sub>18</sub>, 5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  250 mm。

流动相 A: 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾缓冲液 (含 0.2% 三乙胺, pH6.0) - 乙腈 (97:3); 流动相 B: 甲醇。梯度洗脱, A: B (90:10)  $\xrightarrow{20 \text{ min}}$  A: B (60:40)  $\xrightarrow{10 \text{ min}}$  A: B (90:10)。检测波长: 210 nm。流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>。柱温: 室温。

### 3 标准溶液的配制

取各种维生素对照品适量, 精密称定, 加 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾缓冲液 (pH 6.0) 配制浓度分别为 VC 1.03 mg · mL<sup>-1</sup>、VPP 7.26 × 10<sup>-2</sup> mg ·

mL<sup>-1</sup>、VB<sub>1</sub> 3.90 × 10<sup>-2</sup> mg · mL<sup>-1</sup>、VB<sub>2</sub> 4.28 × 10<sup>-2</sup> mg · mL<sup>-1</sup>、VB<sub>6</sub> 3.82 × 10<sup>-2</sup> mg · mL<sup>-1</sup>、VB<sub>12</sub> 3.63 × 10<sup>-3</sup> mg · mL<sup>-1</sup>、泛酸 0.157 mg · mL<sup>-1</sup>、VH 3.22 × 10<sup>-2</sup> mg · mL<sup>-1</sup>、叶酸 0.312 mg · mL<sup>-1</sup> 的混合标准溶液。临用新配。

### 4 线性关系

配制一定浓度的混合对照品储备液, 分别取 2, 5, 10, 15, 20 μL 进样, 以峰面积 A 对浓度 C (mg · mL<sup>-1</sup>) 进行回归处理, 结果见表 1。

表 1 回归方程、线性范围、相关系数实验结果

Tab 1 Results of regression equation, linear range and correlation coefficients

组分 (component)	回归方程 (regression equation)	线性范围 (linear range) / mg · mL <sup>-1</sup>	r
VC	$A = 1.71 \times 10^6 C + 3.58 \times 10^4$	0.206 ~ 2.06	0.9998
VPP	$A = 2.49 \times 10^7 C + 3.52 \times 10^4$	$1.45 \times 10^{-2} \sim 1.45 \times 10^{-1}$	0.9998
VB <sub>1</sub>	$A = 6.87 \times 10^6 C - 1.43 \times 10^3$	$7.80 \times 10^{-3} \sim 7.80 \times 10^{-2}$	0.9998
VB <sub>2</sub>	$A = 8.11 \times 10^6 C + 7.14 \times 10^2$	$8.56 \times 10^{-3} \sim 8.56 \times 10^{-2}$	0.9999
VB <sub>6</sub>	$A = 1.83 \times 10^7 C + 4.37 \times 10^4$	$7.64 \times 10^{-3} \sim 7.64 \times 10^{-2}$	0.9998
VB <sub>12</sub>	$A = 1.85 \times 10^7 C - 1.85 \times 10^2$	$7.26 \times 10^{-4} \sim 7.26 \times 10^{-3}$	0.9999
泛酸 (Pantothenic Acid)	$A = 2.61 \times 10^6 C + 8.15 \times 10^3$	$3.14 \times 10^{-2} \sim 0.314$	0.9999
VH	$A = 1.92 \times 10^6 C + 1.56 \times 10^3$	$6.44 \times 10^{-3} \sim 6.44 \times 10^{-2}$	0.9999
叶酸 (Folic Acid)	$A = 1.82 \times 10^6 C + 1.17 \times 10^4$	$6.24 \times 10^{-2} \sim 0.624$	0.99999

### 5 回收率实验

在已知量的样品溶液中, 加入 80%, 100%, 120% 的已知量的各种维生素标准品, 配制供试溶液, 取 20 μL 进样, 按色谱条件进行测定。各维生素的平均回收率分别为 VC 99.65%, RSD < 0.39%; VPP 99.28%, RSD < 0.45%; VB<sub>1</sub> 100.3%, RSD < 0.62%; VB<sub>2</sub> 100.2%, RSD < 0.96%; VB<sub>6</sub> < 99.21%, RSD < 0.69%; VB<sub>12</sub> 99.75%, RSD < 0.58%; 泛酸 99.62%, RSD < 0.66%; VH 99.89%, RSD < 0.97%; 叶酸 100.2%, RSD < 0.47%。

### 6 精密度实验

配制工作溶液浓度 80%, 100%, 120% 3 个浓度的各维生素标准混合溶液, 各重复进样 3 次, 每次 20 μL, 按色谱条件项下进行测定, 各组分峰面积 RSD 在 0.19% ~ 0.70% 范围内。

### 7 最低检测限实验

取线性范围测定项下的对照品溶液, 进行对倍稀释, 取 20 μL 进样, 以色谱条件项下进行测定, 以 S/N 为 3 时的量为最低检测限。测得最低检测限分别为: VC 16 ng; VPP 1.8 ng; VB<sub>1</sub> 10 ng; VB<sub>2</sub> 15 ng; VB<sub>6</sub> 4 ng; 泛酸 40 ng; VB<sub>12</sub> 4 ng; VH 0.03 ng; 叶酸 6 ng。

### 8 样品测定

取水乐维他粉针剂 1 支, 用 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾缓冲液 (pH6.0) 溶解并转移至 5 mL 棕色量瓶中, 摇匀, 作为 VH 和 VB<sub>12</sub> 供试品溶液。精取上述溶液 1 mL 置 25 mL 棕色量瓶中, 用缓冲液稀释至刻度, 摇匀, 作为其他水溶性维生素。取上述溶液各 20 μL 进样, 按色谱条件项下进行测定, 记录峰面积, 外标法定量, 测定结果见表 2, 色谱图见图 1。

表 2 水溶性维生素测定结果 (标示量 %, n=3)

Tab 2 Results of determination of water-soluble vitamins (labellet amount %)

批号 (Lot No.)	VC	VPP	VB <sub>1</sub>	VB <sub>2</sub>	VB <sub>6</sub>	VB <sub>12</sub>	泛酸 (Pantothenic Acid)	VH	叶酸 (Folic acid)
0306306	98.3	100.3	104.9	101.9	101.2	107.8	106.4	100.9	105.4
0306328	106.4	98.5	96.2	105.3	108.8	102.6	105.8	96.2	100.9
0307216	104.2	102.2	104.5	101.2	105.4	105.6	104.2	99.1	102.3

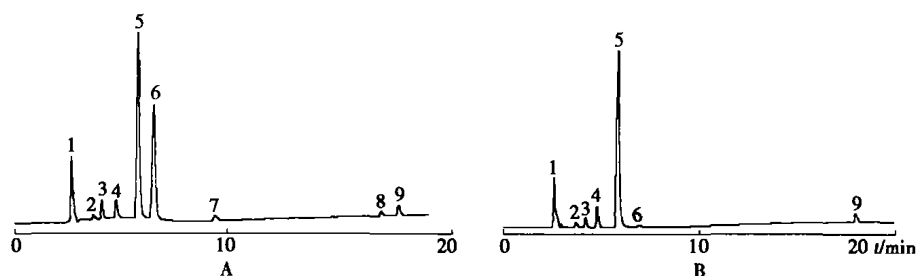


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms

A. 标准品 (Standards) B. 样品 (sample)

1. VC 2. VB<sub>1</sub> 3. VB<sub>6</sub> 4. 泛酸 (Pantothenic acid) 5. VPP 6. 叶酸 (Folic acid) 7. VH 8. VB<sub>12</sub> 9. VB<sub>2</sub>

## 9 讨论

本方法可一次测定水乐维他中9种水溶性维生素,但由于生物素和维生素B<sub>12</sub>与其他组分的含量相差太大,若用浓工作溶液一次进行测定,维生素C和烟酰胺则超出最大线性范围,故采用2个稀释度分2次测定。

复合维生素注射液中泛酸、生物素含量相对较低,且紫外吸收为末端吸收,吸收系数小,因此,选择210 nm为检测波长,可同时满足9种维生素的检测要求。

用0.05 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾缓冲液-甲醇体系进行梯度洗脱时,维生素B<sub>6</sub>与泛酸色谱峰重叠,缓冲液中加入3%的乙腈可使两色谱峰达到有效分离,乙腈量加大,则使维生素B<sub>12</sub>与杂质峰重叠。缓冲液中加入少量三乙胺可抑制维生素C、维生素B<sub>1</sub>及烟酰胺的拖尾现象,改善峰形,而对保留时间无影响。但三乙胺的比例越大,梯度洗脱的基线漂移现象越严重,因此,选择缓冲液中三乙胺的比例为0.2%,既可使色谱峰对称,又能保持色谱图基线平稳。

## 参考文献

- 1 ZHANG Song (张松), JIN Ren-ci (金人慈), ZHOU Jian-zhong (周建忠), *et al.* Reverse phase chromatographic analysis of water soluble vitamins with ion pair reagent (水溶性维生素制剂的反相离子对色谱分析). *Anal Test Technol Instrum* (分析测试技术与仪器), 1996, 2(2): 15
- 2 MAO Shun-yuan (毛舜元), YANG Guan-zhao (杨观兆), SHI Xin (施辛), *et al.* HPLC assay for multi-vitamins (高效液相色谱法测定多种维生素含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1995, 15(2): 25
- 3 FENG Yi-fan (冯毅凡), GUO Xiao-ling (郭晓玲), MENG Qing (孟青), *et al.* separation and determination of water-soluble vitamins in infant milk powder by Micellar performance liquid chromatography (胶束液相色谱法分离测定婴儿奶粉中的水溶性维生素). *Acad J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 1998, 14(3): 188
- 4 HUANG Hong-xia (黄红霞). The determination of water-soluble vitamins in food by high performance liquid chromatography (HPLC法测定蘑菇粉等中水溶性维生素的含量). *Strait Pharm J* (海峡药学), 1999, 11(4): 33
- 5 CHENG Zhi-qiang (成志强), SUN Cheng-jun (孙成均), LI Yuan-qian (黎源倩). Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in food and multivitamins tablets by reversed phase high performance liquid chromatography (反相高效液相色谱法同时测定食品和多维片中8种水溶性维生素). *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2001, 29(9): 1068
- 6 JIA Lin-yan (贾林艳), SONG Wei-xin (宋伟新), ZHUANG Zhi-ping (庄志萍), *et al.* The determination of water-soluble vitamins in tea by high performance liquid chromatography (高效液相色谱法测定茶叶中水溶性维生素的含量). *Quart Fore By-Prod Spec Chin* (中国林副特产), 2003, 19(2): 36
- 7 Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health, P R China. Part 2, Vol 5 (卫生部药品标准二部第五册). 1996. 44

(本文于2004年3月11日收到)