

高效液相色谱法测定 6 种水溶性维生素

杨明远¹ 李敏²

(1. 吉林省疾病预防控制中心, 长春 130062; 2. 吉林省伊通县结核病防治所)

水溶性维生素包括 Vit C、Vit B₁、Vit B₂、Vit B₆、Vit B₁₂、烟酸、叶酸、生物素、泛酸等。在以前的测定中应用较多的方法有光度法、微生物法、酶标法等, 这些方法费时且不能同时测定。高效液相色谱法可快速分离、能同时测定多种水溶性维生素。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂

- 1.1.1 日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪;
- 1.1.2 日本岛津 SPD-10A 紫外检测器, 日本岛津 CTO-10A 柱温箱;
- 1.1.3 Le-parmer 超声波发生器;
- 1.1.4 酸度计;
- 1.1.5 磁力搅拌器;
- 1.1.6 离心机;
- 1.1.7 甲醇(色谱纯), 甲酸(分析纯), 甲酸铵(分析纯)、Vit B₁、Vit B₂、Vit B₆、Vit C、烟酸、烟酰胺(优级纯)。

1.2 步骤

1.2.1 样品处理及测定

准确取粉碎后样品 1.0 g 加 1 ml 0.000 1 mol/L 盐酸溶解, 用水定容至 25 ml。超声波提取 5 min。离心, 取上清液过 0.22 μm 滤膜进高效液相色谱仪, 与标准系列比较, 根据保留时间定性, 吸收峰高或峰面积定量。

1.2.2 液相色谱参考条件

紫外检测器检测波长 254 nm; 色谱柱为 PC₈-10/S 25.4(250 mm × 4.0 mm, 粒径 5 μm); 流动相为 0.100 0 mol/L 甲酸铵-甲酸(pH 4~5)+ 甲醇(3:1); 柱温 30 °C; 流速 1.0 ml/min。

1.2.3 标准曲线

准确称取 Vit B₁、Vit B₂、Vit B₆、Vit C、烟酸、烟酰胺(优级纯)标准对照品各 0.100 0 g, 用水溶解并定容至 100 ml 作为储备液, 此时溶液浓度相当于 1 mg/ml, 再配成 0~100 μg/ml 的标准系列。进高效液相色谱仪, 以浓度为横坐标, 峰高或峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

2 结果

用本方法分别对成人复合维生素片和儿童复合

维生素片进行测定, 结果见表 1。

表 1 成人复合维生素片与儿童复合维生素片测定结果(mg/100 g)

型别	Vit B ₁	Vit B ₂	Vit B ₆	Vit C	烟酸	烟酰胺
成人型	12.6	11.8	12.3	124.3	2.7	3.9
儿童型	3.5	3.1	2.8	25.6	1.1	1.3

3 讨论

3.1 样品前处理

测定的 6 种水溶性维生素在酸性水溶液中稳定性好, 对碱性不稳定。考虑到 Vit B₂、Vit B₆ 吸附到玻璃壁、试样成分上的能力很强, 必须在酸性条件下提取和溶解, 因此采用低浓度的盐酸做溶剂。但是 Vit B₁₂ 在中性以下难于溶解, 因此采用添加乙腈或碳酸氢钠溶液进行提取和溶解为好。维生素化合物对光均不稳定, 应避光操作。

3.2 固定相和流动相的选择

水溶性维生素的水溶液是离子及分子的混合体, 实验发现 C₈ 柱对其分离有较高的选择性。C₁₈ 柱烷链长, 憎水性强, 对 Vit C、Vit PP 等小分子作用弱, 保留时间短, 几乎同时被洗脱, 而对较大的分子 Vit B₂ 保留时间长, 峰平不易检出, 故采用 C₈ 柱。

3.3 pH 值对分离的影响

结果表明, 当 pH 值 < 4.5 时, 对 Vit C 的峰面积影响最大, 且 Vit B₁ 和 Vit PP 的色谱峰分离度变差; 当 pH 值 < 3 酸度较大对色谱柱不利; pH 值 > 5 时 Vit B₁、Vit B₂ 在碱性或中性条件下分解, 选用 pH = 4.5, 在该条件下分离较好, 且各种维生素能共存。

3.4 水溶性维生素溶液的稳定性实验

大多数维生素对光、热、氧、酶和溶液 pH 值较敏感, 易被氧化分解, 故应尽量避光并低温操作。在实验过程中, 采用其他酸都不理想, 后采用 0.000 1 mol/L 盐酸做溶剂, 结果比较稳定。

3.5 最低检出限和方法的精密度及准确度

采用该方法对同一样品平行测定 6 次, 并对样品进行加标回收实验, 相对标准偏差分别为 ≤ 4.5%, 回收率均为 92.0%~102.0%。

(收稿日期: 2005-07-19)