Waters™

应用纪要

第1部分：在Alliance™ iS HPLC System上重现水溶性维生素的HPLC分析方法

Kimberly Martin, Lise Gauthier, Paula Hong

Waters Corporation

摘要

随着维生素补充剂越来越受欢迎，人们需要确保这类产品符合其产品描述。高效液相色谱(HPLC)是确保产品符合标签声称内容的重要分析工具之一。然而，由于维生素的化学特性多样，使用单一模式的色谱方法进行分析相当有挑战性。使用亲水作用色谱(HILIC)分析水溶性维生素可以成功保留强极性的维生素[1]。 此外，这些维生素存在于复杂基质中，因此样品前处理往往棘手又繁琐。

在受法规监管的实验室中，随着旧系统更新和替换为新系统，将这些方法迁移至其他HPLC系统的能力至关重要。在本研究中，我们将在不同的HPLC系统之间迁移采用梯度HILIC条件的水溶性维生素分析方法。本文将展示在传统和新型HPLC系统上获得相同定量结果的能力。方法迁移研究选用了传统Alliance e2695系统和Alliance iS HPLC System。该研究分为两部分，第2部分将讨论在Alliance iS HPLC System上重现脂溶性维生素的HPLC方法。

优势

- 使用Alliance iS HPLC System定量复合维生素补充剂中的水溶性维生素
- 分析方法可从传统HPLC系统轻松迁移至Alliance iS HPLC System

简介

许多实验室都会定期进行维生素分析。对于膳食补充剂实验室而言，在整个生产过程中检测样品以确保原料和成品中含有预期浓度的正确维生素组分是十分重要的。美国21 CFR 101.9(g)(4)规定，考虑到分析方法变异性，产品中添加的I类原料必须至少达到标签上标示值的100%[2]。 标签不符合此要求的产品将被视为违标产品，这进一步凸显了分析检测的重要性。

分析维生素时，样品前处理可能会比较棘手，因为某些复合维生素制剂中可能存在基质干扰物。在某些情况下，通过额外稀释样品、进行固相萃取或液-液萃取可以缓解这个问题。对于更复杂基质，可能需要额外净化样品或进行多次萃取[3]。

除了维生素本身带来的各项分析挑战之外，典型的分析实验室还会配备许多台HPLC系统供分析使用。不仅如此，随着实验室不断更新仪器，他们可能还希望利用现代化技术的优势。鉴于以上影响因素，在不同系统之间迁移方法，并确保每套系统在分析给定样品时都能产生相同的定量结果，就显得非常重要。

本研究将展示将多维生素分析方法从传统HPLC系统（具体为Alliance e2695 HPLC系统）迁移至Alliance iS HPLC System的过程。两套系统得到了相当的定量结果，具体数据将在正文中展示。

实验

制备水溶性维生素标准样

使用购自Sigma-Aldrich的标准品制备烟酰胺、吡哆醛、烟酸、核黄素、硫胺素、维生素B_{12}和叶酸标准样。制备两种单独的储备液。储备液1为DMSO溶液，含1 mg/mL核黄素以及2 mg/mL维生素B_{12}和叶酸。储备液2为乙腈:水(20:80)溶液，含1 mg/mL吡哆醛以及2 mg/mL烟酰胺、烟酸和硫胺素。用乙腈:水(20:80)制备混合储备液，其中含50 µg/mL烟酰胺、烟酸、核黄素、硫胺素、维生素B_{12}和叶酸，以及25 µg/mL吡哆醛和核黄素。用乙腈:水(20:80)进一步稀释储备液，制得维生素B_{12}和叶酸（复合维生素补充剂样品中所含的维生素）浓度为1.57、3.13、6.25、12.5、25和50 µg/mL的标准曲线样品。

注：维生素B_{12}和叶酸对光敏感，使用棕色玻璃器皿防止降解。

水溶性复合维生素补充剂的样品前处理

在50 mL离心管中，将10片复合维生素片溶于25 mL水中，制得复合维生素补充剂样品。振荡样品30 min，然后

在3900 rpm下离心10 min。取10 mL上清液至干净的50 mL离心管中，用乙腈按1:1的比例稀释。还需要使用水:乙腈(20:80)额外稀释样品供定量分析使用。

液相色谱条件

液相色谱系统：	Alliance e2695 HPLC 系统和Alliance iS HPLC System
检测：	配备10 mm HPLC流通池的TUV检测器
波长：	265 nm
采集速率：	2 Hz
样品瓶：	LCGC认证透明玻璃12 x 32 mm螺纹颈口全回收样品瓶，带瓶盖和预切割PTFE/硅胶隔垫，容积2 mL（P/N：186000307C）
色谱柱：	XBridge™ Amide色谱柱, 3.5 µm, 4.6 x 250 mm（P/N：186004870）
柱温：	30 °C
样品温度：	15 °C
进样体积：	25 µL
流速：	1.0 mL/min
流动相A：	100 mM乙酸铵，pH=5.5
流动相B：	乙腈
流动相C：	水

样品管理器清洗液：　　50:50 (v/v)水:乙腈

样品管理器清除液：　　20:80 (v/v)水:乙腈

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	%C	%D	曲线
初始	1.000	15.0	80.0	5.0	0.0	初始
4.00	1.000	15.0	80.0	5.0	0.0	6
19.00	1.000	15.0	55.0	30.0	0.0	6
19.01	1.000	15.0	80.0	5.0	0.0	6
30.00	1.000	15.0	80.0	5.0	0.0	6

数据管理

色谱数据系统：　　Empower™ 3，FR 3.7.0

结果与讨论

迁移水溶性维生素分析方法

分析营养补充剂中的维生素对于确保产品安全性以及产品标签声称量的准确性至关重要。本研究使用Alliance e2695系统和Alliance iS HPLC System分析了含有维生素B_{12}和叶酸的复合维生素样品。在这两套系统上运行分析时，使用同一批制备的流动相、标准样和样品，所用色谱柱也相同。两套系统得到的结果都与复合维生素补充剂样品的标签声称量做了比较，还比较了两套系统的结果。两套系统分析维生素标准样和复合维生素补充剂样品得到的示例色谱图如图1和图2所示。

该方法从Alliance e2695系统成功迁移到了Alliance iS HPLC System，因为无需额外调整方法就满足了所有系统适应性标准。两套系统的保留时间略有漂移。Alliance e2695系统的保留时间略早于Alliance iS HPLC System，如图1和图2所示。导致这种保留时间漂移的原因可能是两套系统的延迟体积有差异。

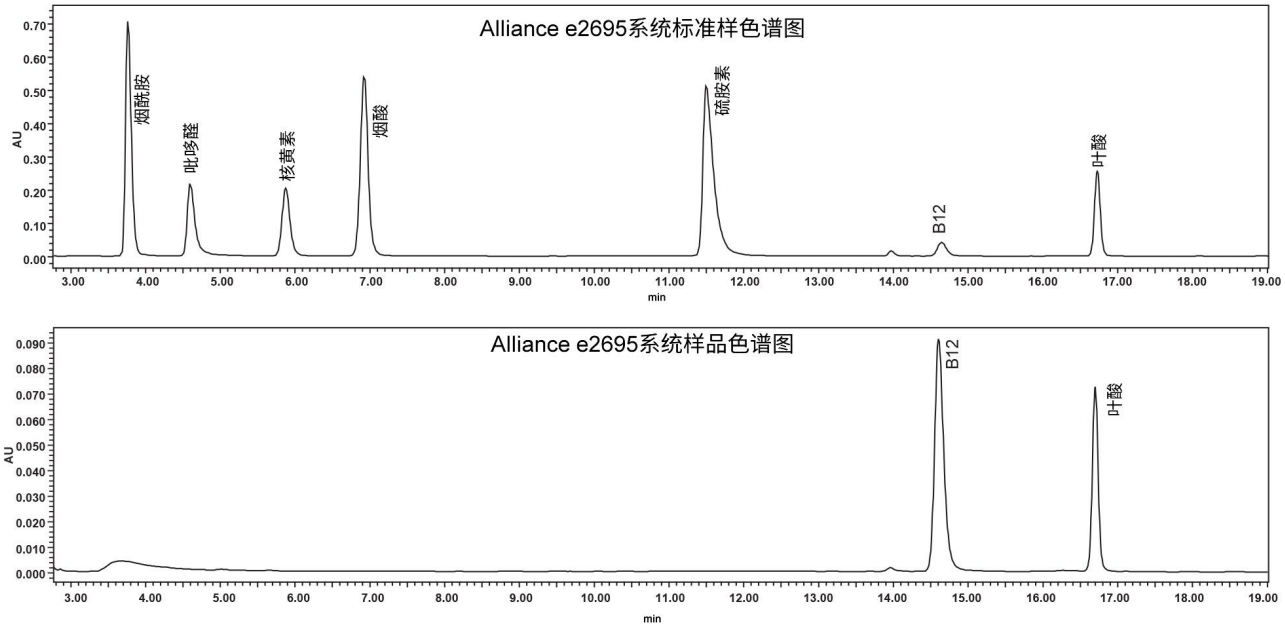

图1.在*Alliance e2695*系统上分析水溶性维生素标准样（上图）和维生素补充剂样品（下图）得到的色谱图

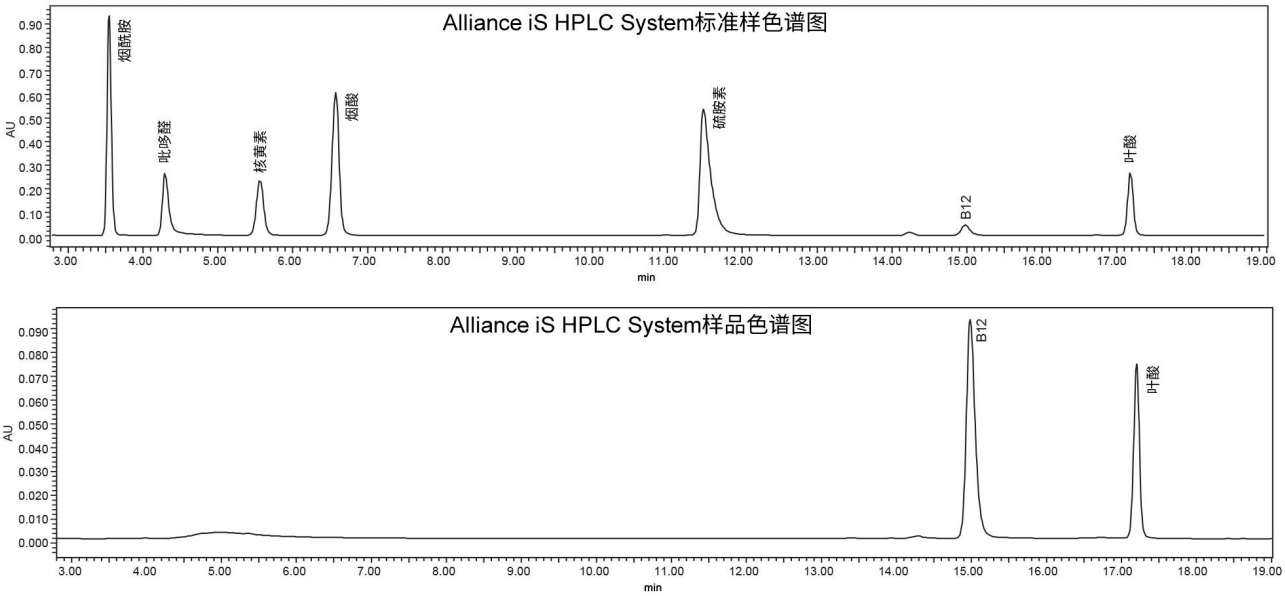

图2.在*Alliance iS HPLC System*上分析水溶性维生素标准样（上图）和维生素补充剂样品（下图）得到的色谱图

两套系统的结果相较于标示浓度的偏差百分比以及R^2如表1所示。两套系统的标准曲线R^2值均为0.9999，相较于标示浓度的偏差百分比都在±1.75以内。

Alliance e2695系统 浓度水平下(ppm)的%偏差							
化合物	R^2	1.57	3.13	6.25	12.5	25	50
维生素B_{12}	0.9999	0.49	-0.41	-0.50	0.07	0.58	-0.24
叶酸	0.9999	0.90	-1.47	0.05	0.27	0.51	-0.27

表1.*Alliance e2695*系统上维生素B_{12}和叶酸标准样(1.57~50 µ*g/mL)*的R^2以及各线性浓度水平下的偏差百分比结果

水溶性维生素系统适应性和补充剂样品结果

通过将制备的工作标准样重复进样五次并计算七种标准化合物各自的保留时间和峰面积%RSD来确定系统适应性。本研究还测定了吡哆醛与烟酰胺之间的分离度。Alliance e2695系统和Alliance iS HPLC System得到的结果相当，满足为该方法制定的系统适应性标准。结果见表2。

Alliance iS HPLC System 浓度水平下(ppm)的%偏差							
化合物	R^2	1.57	3.13	6.25	12.5	25	50
维生素B_{12}	0.9999	1.66	-0.11	-0.74	-0.74	-0.62	0.54
叶酸	0.9999	-1.72	-0.30	1.09	0.93	0.61	-0.60

表2.*Alliance iS HPLC System*上维生素B_{12}和叶酸标准样(1.57–50 µ*g/mL)*的R^2以及各线性浓度水平下的偏差百分比结果

这款复合维生素补充剂的标签声称每片含50 mg维生素B_{12}和7.6 mg叶酸。我们将使用Alliance e2695和Alliance iS HPLC Systems得到的维生素B_{12}和叶酸定量结果与标签声称值做了比较，结果如表3所示。两套系统均表现出良好的一致性，维生素B_{12}和叶酸的结果差异为0.3%和1.2%。

经测，复合维生素补充剂样品中维生素B_{12}和叶酸的总含量在标签声称量的±9%范围内。上述结果证明，使用Alliance e2695系统和Alliance iS HPLC System均可在商业相关浓度范围内定量测定复合维生素补充剂样品中的

维生素B_{12}和叶酸。值得注意的是，叶酸定量值比标签声称值低7.70%~8.60%。在确定产品是否违标之前，实验室应当全面验证分析方法适用于哪些样品基质，确保使用的样品具有代表性。

参数	可接受标准 (% RSD)	Alliance e2695 系统	Alliance iS HPLC System
峰保留时间			
烟酰胺	≤2.0	0.045	0.098
吡哆醛	≤2.0	0.048	0.078
核黄素	≤2.0	0.097	0.058
烟酸	≤2.0	0.133	0.076
硫胺素	≤2.0	0.067	0.099
维生素B_{12}	≤2.0	0.064	0.022
叶酸	≤2.0	0.052	0.015
峰面积			
烟酰胺	≤2.0	0.214	0.162
吡哆醛	≤2.0	0.277	0.099
核黄素	≤2.0	0.082	0.044
烟酸	≤2.0	0.23	0.042
硫胺素	≤2.0	0.07	0.041
维生素B_{12}	≤2.0	0.077	0.028
叶酸	≤2.0	0.298	0.026
吡哆醛和烟酰胺之间的USP分离度	≥2.0	4.531	5.243

表3.*Alliance e2695*系统和*Alliance iS HPLC System*上的水溶性维生素系统适应性结果

Alliance e2695系统				Alliance iS HPLC System				标签声称量与结果之间的差异
水溶性维生素	**称量样品中的标签声称量**	**结果 (mg)**	**与标签声称量的差异**	**水溶性维生素**	**称量样品中的标签声称量**	**结果 (mg)**	**与标签声称量的差异**	**不同系统之间的结果差异**
维生素B_{12}	50.00	53.44	6.90%	维生素B_{12}	50.00	53.28	6.60%	0.30%
叶酸	7.60	7.03	-7.70%	叶酸	7.60	6.95	-8.60%	1.20%

表4.复合维生素补充剂样品的定量结果与标签声称量(*mg*)

结论

分析营养补充剂中的维生素对于确保产品标签声称量的准确性至关重要。尽管复合维生素补充剂的分析可能存在某些挑战，本文所述的方法在传统Alliance e2695系统和现代Alliance iS HPLC Systems上都得到了可重现且可靠的结果。这两套系统获得的定量结果一致性非常好（偏差在1.2%以内），表明这种HILIC方法可以成功迁移至现代HPLC系统。复合维生素补充剂中水溶性维生素的定量结果一致性良好，偏差在标签声称量±9%范围内。

参考资料

1. Eric S. Grumbach and Kenneth J. Fountain.Comprehensive Guide to HILIC Hydrophilic Interaction Chromatography <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/education/715002531-comprehensive-guide-to-hilic-hydrophilic-interaction-chromatogra.html> .Waters Corporation, 2010.
2. 21 CFR 101.9: Food Labeling – Nutrition Labeling of Food <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-101> .(Current through 09/28/2023).
3. Kim Tran和Peter Hancock.使用配备PDA检测器的Arc HPLC系统分析饮料及复合维生素产品中的水溶性维生素和咖啡因, 沃特世应用纪要, 720007357ZH, 2021.

特色产品

Alliance iS HPLC System <https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-systems/alliance-is-hplc-system.html>

Alliance HPLC系统 <https://www.waters.com/534293>

ACQUITY UPLC和ACQUITY Premier可变波长紫外检测器 <https://www.waters.com/514228>

Empower色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>

720008159ZH，2023年12月

© 2025 Waters Corporation. All Rights Reserved.
使用条款 隐私策略 商标 招聘 法律和隐私声明 危险化学品生产经营许可证 Cookie Cookie 设置
沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号