

使用超高效合相色谱 (UPC²) 进行脂溶性维生素胶囊分析

Andrew Aubin
沃特世公司 (美国马萨诸塞州米尔福德)

应用效益

- 各种脂溶性维生素配方的快速分析。
- Waters® ACQUITY UPC²™系统可成功地分析六种不同配方的脂溶性维生素。一种技术能够快速分析这些不同配方。
- 该系统通过让实验室在一个系统上，使用一种技术来分析各种FSV配方，从而简化脂溶性维生素分析。
- 每种脂溶性维生素配方都可以得到快速的分析，目标成分可很好地从赋形剂材料中解析出来。
- 维生素A、E和K1同分异构体被成功地分析、分离。

沃特世解决方案

ACQUITY UPC²系统
ACQUITY UPC²色谱柱工具包
Empower™ 3软件
ACQUITY UPC² PDA检测器

关键词

UPC²，脂溶性维生素，维生素E，维生素A，维生素D3，维生素K1，维生素K2

简介

脂溶性维生素 (FSV) (通常来自充油胶囊、充粉胶囊或压缩片粒) 的分析是一项具有挑战性的任务。最常见的情况是，这些配方的分析都采用正相色谱法，使用传统的正相溶剂 (己烷、叔丁醇、乙酸乙酯、二氯甲烷等)，采购和处理的成本相当高。用于FSV分析的其它分析色谱技术包括反相液相色谱法、气相色谱法、薄层色谱法和比色技术。超高效合相色谱 (UPC²™) 为脂溶性维生素分析提供了一种可行的技术，它是一种具备成本效益的、可持续的和绿色环保的替代技术，降低了有机溶剂的用量，分析时间快，保持了色谱数据的品质。使用 ACQUITY UPC² 系统分析了一系列FSV配方。被检验的配方有：维生素A、维生素A+D3、维生素E，维生素D3、维生素K1和维生素K2，如表1所示。这些实验的结果表明，UPC²有可能替代当今正在使用的许多分离方法成为唯一的一种技术。

活性成分	每胶囊/片粒的量	非活性成分
维生素 A	10,000 IU A	豆油、明胶、甘油、水
维生素 A & D3	10,000 IU A 2000 IU D3	豆油、明胶、甘油、水
维生素 D3	2000 IU D3	葵花籽油、明胶、甘油、水
维生素 E	400 IU E	豆油、明胶、甘油、水、 6号黄色淀、1号蓝色淀、 二氧化钛
维生素 K1	100 µg	纤维素、磷酸氢钙、硬脂酸、 硬脂酸镁、交联羧基纤维素钠
维生素 K2	50 µg	纤维素、硬脂酸镁、二氧化硅

表1. 脂溶性维生素配方。

实验

系统:	ACQUITY UPC ² 包括: 二元溶剂管理器、 样品管理器 合相管理器、 色谱柱管理器、 PDA检测器
色谱柱:	ACQUITY UPC ² BEH, 3.0 x 100mm, 1.7 μ m ACQUITY UPC ² HSS C ₁₈ SB, 3.0x 100mm毫米, 1.8 μ m ACQUITY UPC ² HSS C ₁₈ SB, 2.1 x 150mm, 1.8 μ m
数据系统:	Empower 3软件
分离方法:	每种分离方法的详细介绍包含在本应用文集的 单个结果和讨论部分中。

样本制备

充油胶囊(维生素A、A + D3、D3)——去除四种胶囊的外壳并分别溶解于10毫升的异辛烷中, 无需进一步前处理。去除单个维生素E胶囊的外壳并溶解于10毫升的异辛烷中, 无需进一步预处理。

用异辛烷对八片碾碎的维生素K1片进行超声处理30分钟。沉淀后, 将一小份萃取液通过一个1.0 μ m玻璃纤维过滤器直接过滤到样品瓶中。

去除八粒充粉维生素K2的外壳, 并用异辛烷进行超声处理30分钟。沉淀后, 将一小份萃取液通过一个1.0 μ m玻璃纤维过滤器直接过滤到样品瓶中。

结果与讨论

维生素 A

该维生素A的配方为源于鱼肝油, 含豆油、明胶、甘油和水等活性成分。如图1所示, 维生素A棕榈酸酯的两种主要形式(顺式和反式异构体, 分别为1.325分钟和1.394分钟)和赋形剂的小峰得以完全分离, 并标示于图中, 洗脱范围为2.0分钟至2.5分钟。该分离采用梯度模式, 二氧化碳和甲醇(含0.2%甲酸)在3min内从97:3变化到90:10, 主动背压调节器(ABPR)压力为2176 psi, 详细的参数如表2所示。使用该分离方法, 维生素A乙酸酯、棕榈酸酯和视黄醇被轻易分离, 如图2所示。

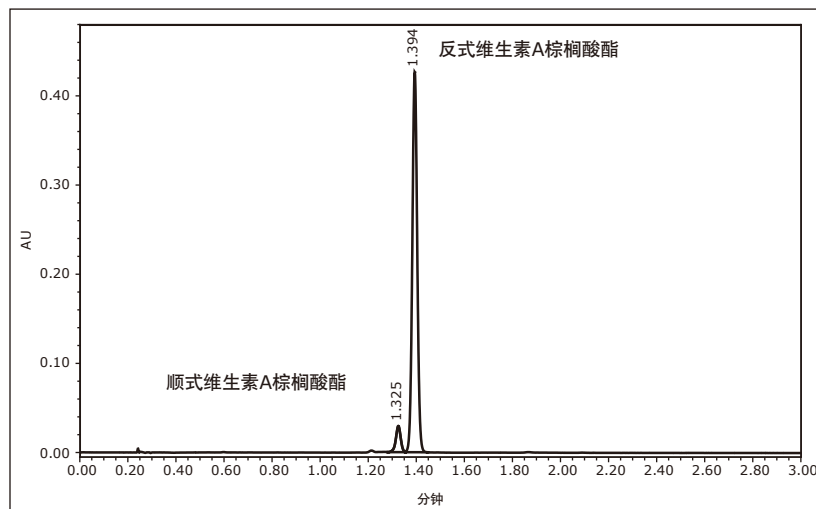


图 1. 维生素A胶囊组分的UPC²分离。

色谱柱	ACQUITY UPC ² HSS C ₁₈ SB, 3.0 x 100mm, 1.8μm
流速	2.0mL/min
梯度	3min内, 从97:3变化到90:10
流动相A/B	CO ₂ /甲醇(0.2%甲酸)
检测波长	UV@320 nm, 补偿(500 nm至600 nm)
进样量	1μL
ABPR压力	2176 psi
柱温	50 °C

表2. 维生素A的详细分离方法。

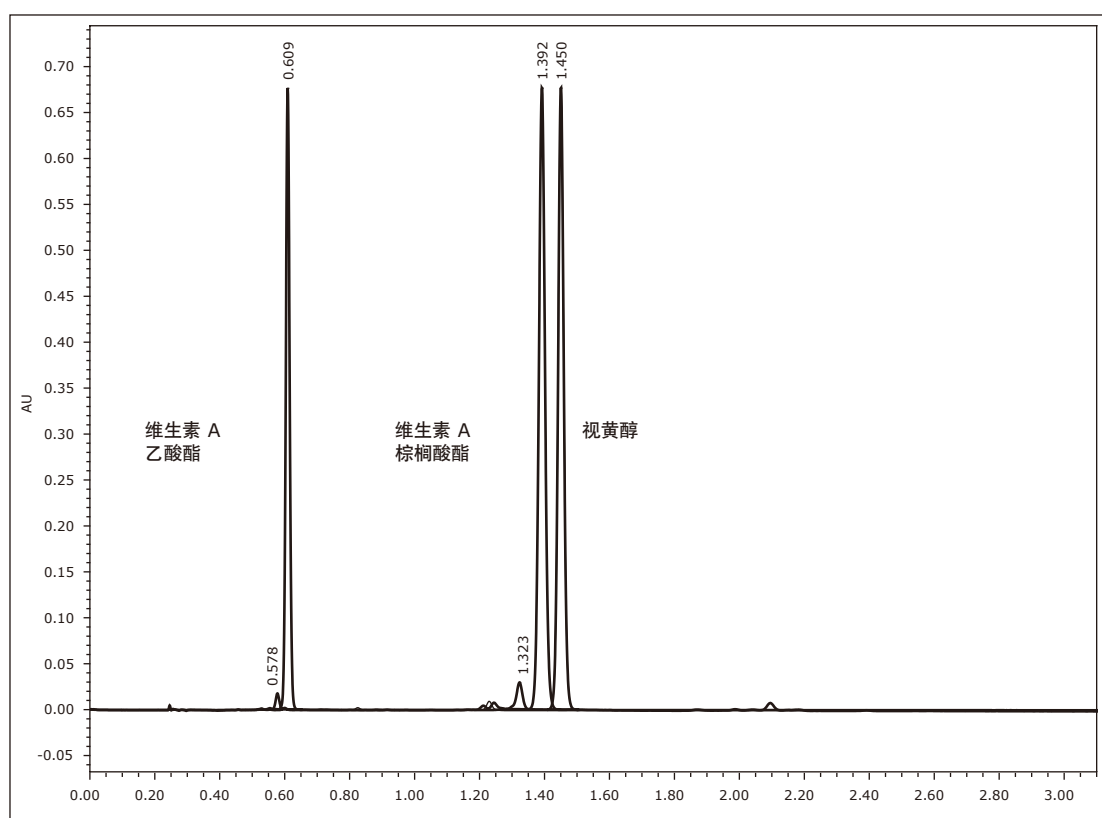


图 2. 维生素A乙酸酯、维生素A棕榈酸酯和视黄醇的分离。

维生素A + D3

与前例相似，维生素A+D的配方为：源于鱼肝油，含豆油、明胶、甘油和水等活性成分。同样，两种形式的维生素A棕榈酸酯(顺式和反式异构体，分别为2.626分钟和2.851分钟)在赋形剂峰之前出峰。为了将维生素D3 (VD3, 6.862分钟)从主要赋形剂和配方中所含的其它化合物中完全分离出来(如图3所示)，需要使用更长的色谱柱来提供足够的分离效率，才能完成该目标。系统具有足够的灵敏度，可轻松地检测到维生素D3的峰，如图3所示。

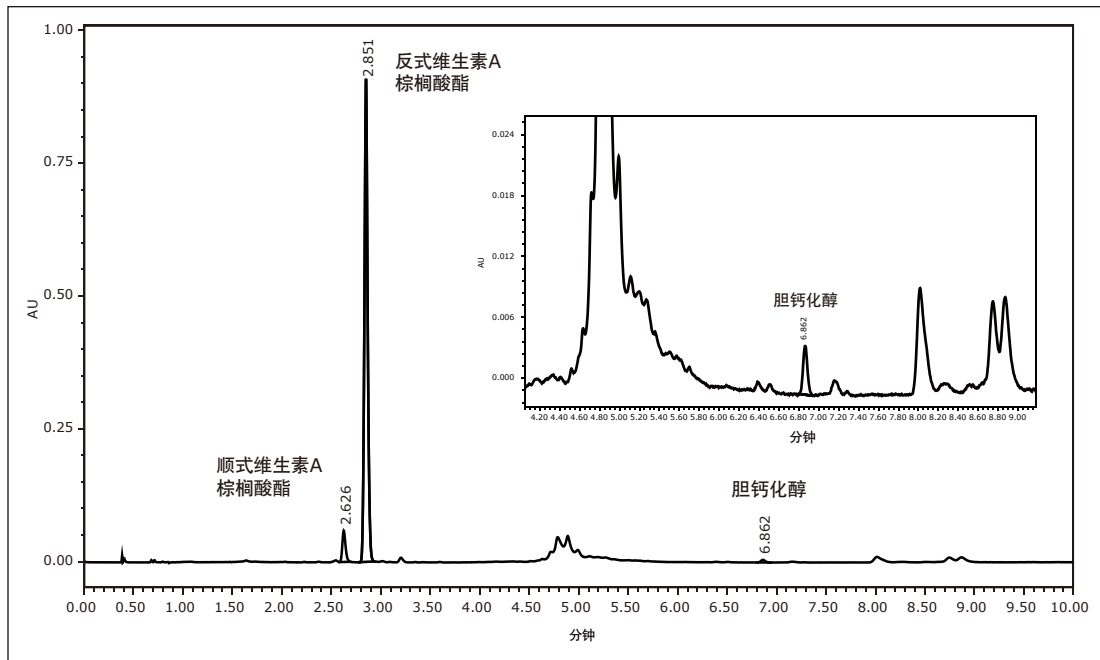


图3. 维生素A+D3胶囊组分的UPC²分离。

该分离采用二氧化碳和甲醇(含0.2%甲酸)进行梯度洗脱,按99:1到90:10的比例在10分钟内完成,详细信息如表3所示。

色谱柱	ACQUITY UPC ² HSS C ₁₈ SB, 2.1 x 150mm, 1.8 μ m
流速	1.0mL/min
梯度	10min内,从99:1变化到90:10
流动相A/B	CO ₂ /含0.2%甲酸的甲醇
检测波长	UV @263 nm, 补偿(500 nm至600 nm)
进样量	1 μ L
ABPR压力	2176 psi
柱温	50 °C

表3. 维生素A+D3和仅含D3的分离方法细节。

维生素D3

使用与维生素A+D3相同的分离条件(如表3所示),维生素D3(胆钙化醇,6.867分钟)被轻松地
从胶囊赋形剂材料(标记为主要成分为葵花籽油)中分离出来,如图4和表3所示。

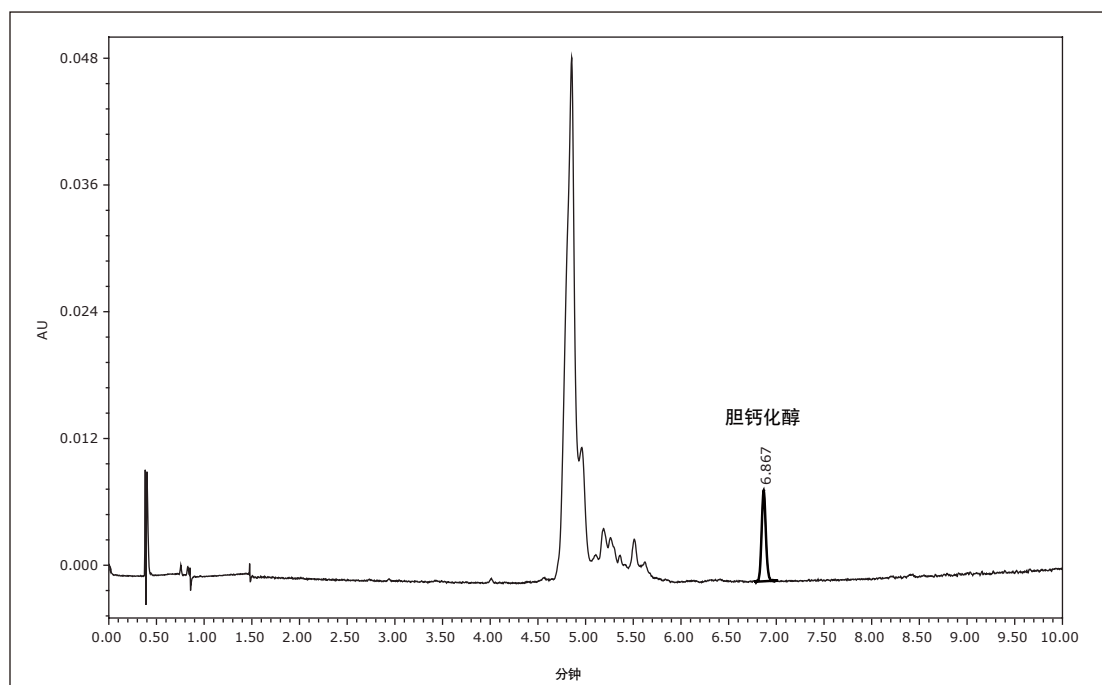


图4. 维生素D3胶囊组分的UPC²分离。

维生素 E

针对维生素E胶囊开发出一种非常快速的梯度分析法(运行时间约90秒),可轻松地将4种生育酚异构体(α 、 β 、 γ 、 δ -VE)基线分离。该分离方法采用梯度洗脱,二氧化碳和甲醇按98:2至95:5的比例在1.5分钟完成,详细信息如表4所示。

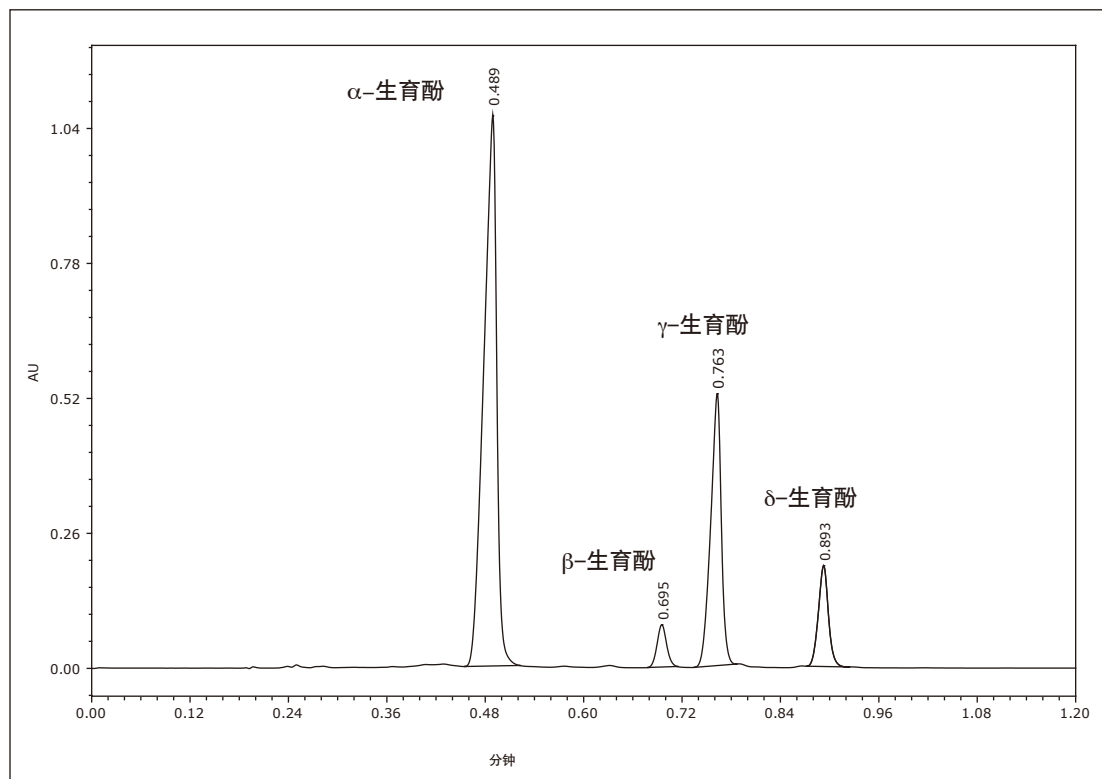


图5. 维生素E胶囊组分的UPC²分离。

色谱柱	ACQUITY UPC ² BEH, 3.0 x 100mm, 1.7 μ m
流速	2.5mL/min
检测	UV @ 293 nm, 补偿 (500 nm至600 nm)
梯度	98:2至95:5, 1.5min
流动相A/B	二氧化碳/甲醇
进样量	1 μ L
ABPR压力	1885 psi
柱温	50 $^{\circ}$ C

表4. 维生素E的分离方法。

维生素 K1

采用简单的等度方法，包含99%二氧化碳和1%的甲醇 乙腈(1:1)，维生素K1片中的两个峰得到完全的基线分离 ($R_s > 2.0$)，如图6所示。两个峰的紫外光谱(紫外光位于246 nm通道时同时收集)是相似的，如图7所示，表明这两个峰是相关的。尽管没有得到确认(分析的时候没有每种异构体的单一标准品)，这两个峰很可能是叶绿醌(维生素K1)的立体异构体，详细信息如表5所示。

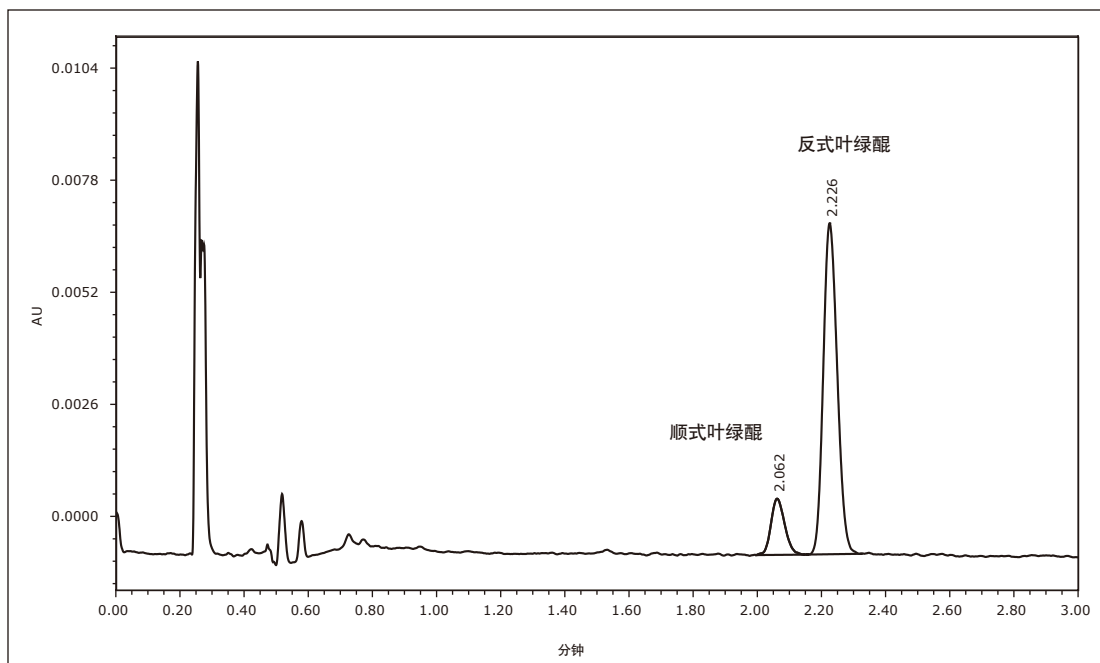


图 6. 维生素K1片组分的UPC²分离。

色谱柱	ACQUITY UPC ² HSS C ₁₈ SB, 2.1 x 150mm, 1.8 μm
流速	1.5mL/min
等度洗脱	99% A和1% B
流动相A/B	二氧化碳/甲醇:乙腈(1:1)
检测	UV @ 248 nm, 补偿(300 nm至400 nm)
进样量	2 μL
ABPR压力	1885 psi
柱温	50 °C

表5. 维生素K1的分离方法细节。

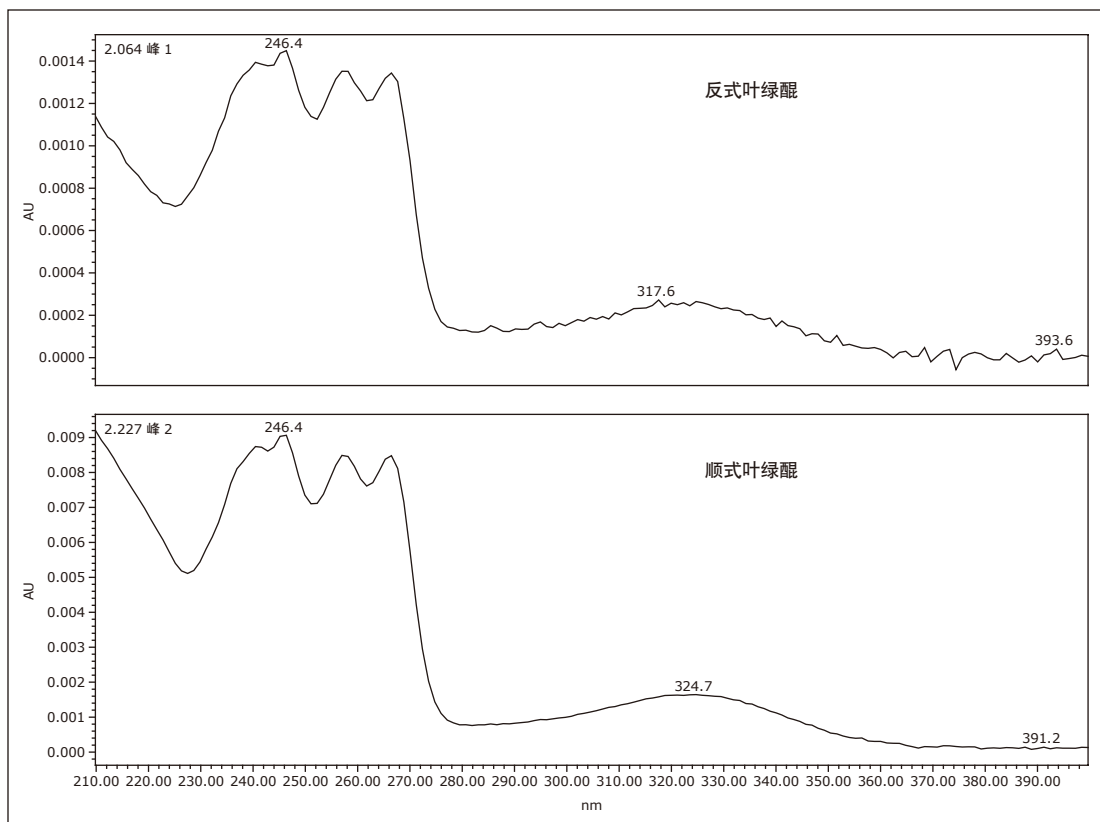


图7. 在2.064和2.227分钟检测到的维生素K峰的紫外光谱。

维生素 K2

维生素K2由甲基萘醌 (menaquinone, MK) 组成, 形式从MK-3到MK-14。不同形式的维生素K2的侧链长度由可变数量的非饱和异戊二烯单元构成。该制剂配方显示了一个主峰和多个较小的峰 (如图8所示), 采用95:5二氧化碳:甲醇的等度分离法, 被鉴定为MK-7 (数据无显示)。这一结果与胶囊标签上的说明是一致的, 即: 该配方应该主要含有MK-7。详情的分离方法如表6所示。

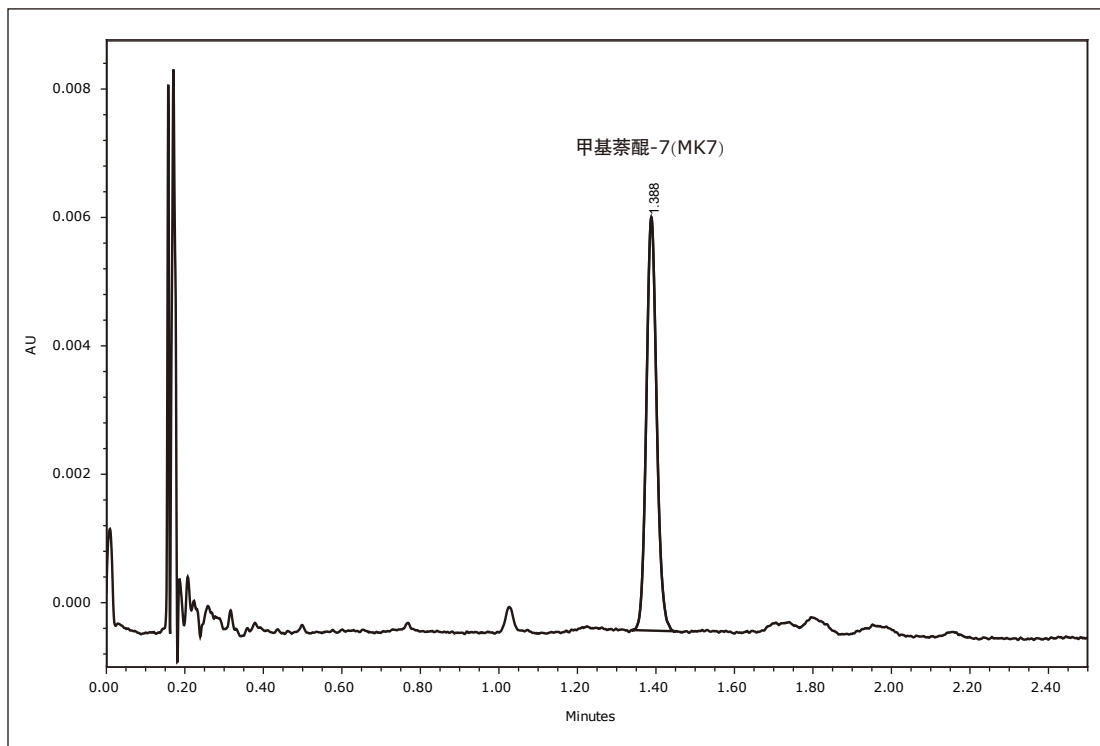


图8. 维生素K2胶囊组分的UPC²分离。

色谱柱	ACQUITY UPC ² HSS C ₁₈ SB, 2.1 x 150mm, 1.8 μm
流速	3.0mL/min
等度洗脱	95% A和5%B
流动相A/B	二氧化碳/甲醇
检测	UV @ 248 nm, 补偿 (500 nm至600 nm)
进样量	1 μL
ABPR压力	1885 psi
柱温	50 °C

表6. 维生素K2的分离方法细节。

结论

- 沃特世的ACQUITY UPC²系统可成功地分析六种不同配方的脂溶性维生素。
- 每种FSV配方都可以得到快速的分析，目标成分可很好地从赋形剂材料中分离出来。
- 维生素A、E和K1的同分异构体被成功地彼此分离。
- 该系统通过让实验室在一个系统上使用一种技术来分析各种FSV配方，从而极大地简化了FSV分析。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters是沃特世公司的注册商标。ACQUITY UPC²、UltraPerformance Convergence Chromatography、UPC²、Empower和The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2012年 沃特世公司 中国印刷
2012年6月 720004394ZH AG-PDF

沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010 - 5209 3866

上海: 021 - 6156 2666

广州: 020 - 2829 6555

成都: 028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司

香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800(400)820 2676

www.waters.com

