

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

Kim Van Tran, Peter Hancock

Waters Corporation

摘要

我们开发出一种稳定的分析方法，用于检测和定量复合维生素片及饮料中的10种水溶性维生素和咖啡因。Arc HPLC-PDA系统结合XSelect HSS T3 XP分析柱，能够在16 min内分离10种维生素和咖啡因。通过评价方法线性、准确度、重现性和稳定性，评估该系统和方法用于膳食补充剂和饮料产品常规分析的性能。

优势

- 一种高效的复合维生素片和维生素饮料检测方法，分析可在16 min内完成
- Arc HPLC-PDA系统结合XSelect HSS T3 XP色谱柱发挥优异的重现性、准确度和精密度

简介

维生素对于维持人体健康和促进生长至关重要。饮食摄入可能不足以获得每日所需的维生素含量。因此，许多制造商生产补充剂（包括复合维生素片和维生素增强饮料）来帮助消费者获得必需的含量。市面上许多热销产品（例如果汁、维生素水、功能饮料和运动饮料）都含有几种复合维生素。

美国食品药品监督管理局(FDA)规定了推荐的维生素摄入量，并要求准确编写产品标签，为消费者提供重要信息

，以防服药过量或过度摄入。食品和饮料制造商必须清晰标明产品中含有的维生素化合物、色素及其他添加剂。制造商必须遵守严格的法规要求，例如有关在食品中添加维生素和矿物质的欧盟法规(EC) No.1925/2006¹，或美国联邦法规(CFR)第21篇第101条 - 食品标签²和第104条 - 食品营养质量指南³。食品和饮料制造商在产品配制完成后，需要采用快速、可靠且具有成本效益的方法来分析产品营养成分，确保标示量正确无误⁴。

本应用纪要将概述一种稳定的分析方法，该方法开发用于检测和定量复合维生素片及维生素增强饮料中的10种水溶性维生素和咖啡因。分离过程使用Arc HPLC-PDA系统结合XSelect HSS T3 XP分析柱完成。

实验

材料与试剂

标准品和缓冲盐

维生素、咖啡因标准品和磷酸二氢钠购自Sigma-Aldrich。

磷酸购自Honeywell Research Chemicals。

复合维生素片和维生素饮料样品购自当地（美国马萨诸塞州）。

样品前处理

标样制备

用水制备大多数维生素和咖啡因单标，浓度为10 mg/mL；用100 mM氢氧化钠制备叶酸、生物素和核黄素标样。标准储备液储存于4 °C。用水连续稀释，制得浓度为100 µg/mL的维生素和咖啡因混标。标准曲线范围为0.4~100 µg/mL。由于抗坏血酸与其他维生素混合时不稳定，因此需要新鲜制备标准曲线混标以供分析。

成人和儿童复合维生素

将单独的成人和儿童复合维生素片一式三份分别放入50 mL离心管中，加入等份的水(50 mL)。将样品振摇10 min，然后离心5 min。收集上清液，再向沉淀物中加入50 mL水。将样品振摇10 min，离心5 min。收集上清液，并与第一份上清液合并。向沉淀物中加入20 mL 100 mM氢氧化钠，再振摇10 min，然后离心5 min。单独收集上清液并进样。样品中的维生素浓度各不相同；因此，通过减小样品稀释倍数，分别使用1 µL和10 µL的进样体积定量样品。

维生素饮料

用0.2 μm PVDF针式过滤器过滤维生素增强饮料。样品中的维生素浓度各不相同。因此，不进行样品稀释，使用1 μL和10 μL的进样体积定量样品。

液相色谱条件

液相色谱系统:	Arc HPLC系统
检测:	PDA单波长, 205 nm, 254 nm 2998 PDA谱图, 200~400 nm, 分辨率1.2 nm
样品瓶:	聚丙烯材质12 × 32 mm螺纹口样品瓶 (部件号186005220)
过滤器:	针式过滤器0.2 μm PVDF (部件号: WAT200806)
色谱柱:	XSelect HSS T3 XP色谱柱, 100 Å, 2.5 μm, 4.6 mm x 150 mm (部件号: 186006741)
柱温:	30 °C
样品温度:	5 °C
进样体积:	1 μL和10 μL
流速:	1.0 mL/min
流动相A:	25 mM磷酸钠, pH 3.0
流动相B:	甲醇
弱清洗液:	95:5水:甲醇

强清洗液： 50:25:25乙腈/水/异丙醇

密封件清洗液： 95:5水:甲醇

Gradient Table

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	1.00	99.0	1.0	0
3.60	1.00	92.0	8.0	6
4.00	1.00	65.0	35.0	6
10.00	1.00	65.0	35.0	6
12.00	1.00	99.0	1.0	6
14.00	1.00	99.0	1.0	6

数据管理

色谱软件： Empower 3色谱数据软件(CDS)

结果与讨论

以不同的流动相、pH条件和温度条件开展多次实验，评估水溶性维生素和咖啡因分析的方法条件。在分离方法中

选择25 mM磷酸钠(pH 3)和柱温30 °C。评估维生素和咖啡因的吸光度以确定各种维生素的最大吸收。除泛酸钙(B5)和生物素(B7)只能在205 nm波长下检出外，大部分维生素都能在254 nm和205 nm的波长下检出。为缩短分析时间，本研究采用吸收波长205 nm和254 nm来分析维生素和咖啡因。维生素和咖啡因的保留时间和紫外吸光度如图1所示。

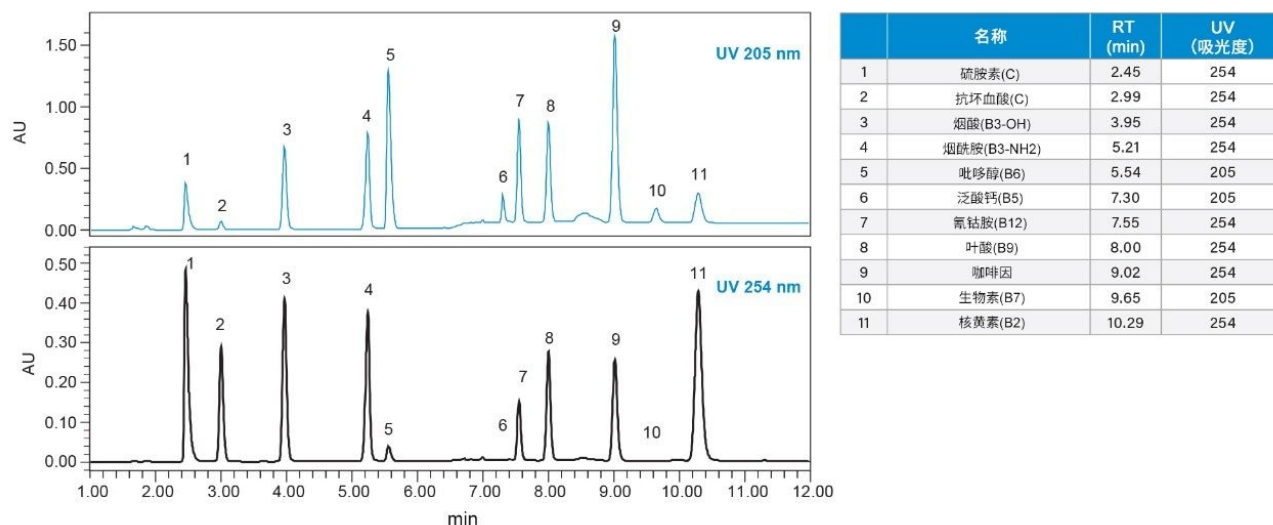


图1.205 nm和254 nm波长下，10种维生素和咖啡因的分离结果

标准曲线：线性、峰面积精密度和保留时间

用水连续稀释水溶性维生素和咖啡因，制备多点标准曲线。标样重复制备两份，每个浓度水平重复进样6次。生成的标准曲线范围为0.4~100 µg/mL，表现出良好的线性($R^2 > 0.999$)。约4 h后观察到抗坏血酸（维生素C）降解($R^2 > 0.9983$)。由于维生素C的稳定性不佳，因此其标样在制备后立即运行，以获得该化合物的线性曲线。维生素和咖啡因的标准曲线如图2所示。

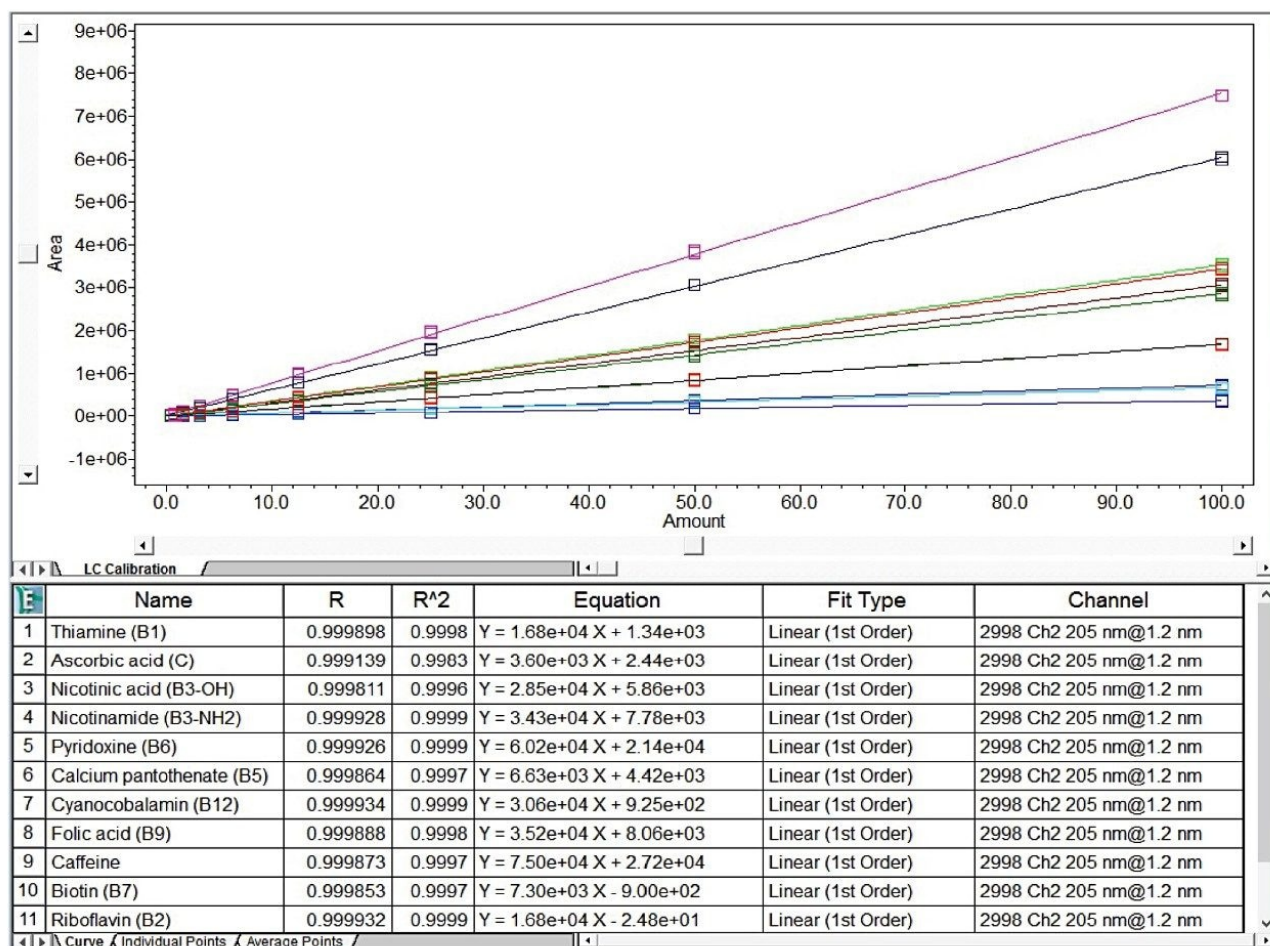


图2.205 nm紫外波长下，10种维生素和咖啡因在0.4~100 μg/mL范围内的标准曲线

计算维生素和咖啡因LOD与LOQ所依据的信噪比(s/n)分别为3:1和10:1，是利用Empower软件测得的峰到峰结果。s/n值通过分析205 nm和254 nm下的紫外吸光度获得。在254 nm波长下计算s/n所用0.4 μg/mL样品的代表性色谱图显示了大多数维生素的LOQ水平（图3）。不同浓度水平生物素、泛酸钙和氰钴胺的s/n使用205 nm波长数据获得。表1汇总了维生素和咖啡因的LOD、LOQ和峰拖尾因子。

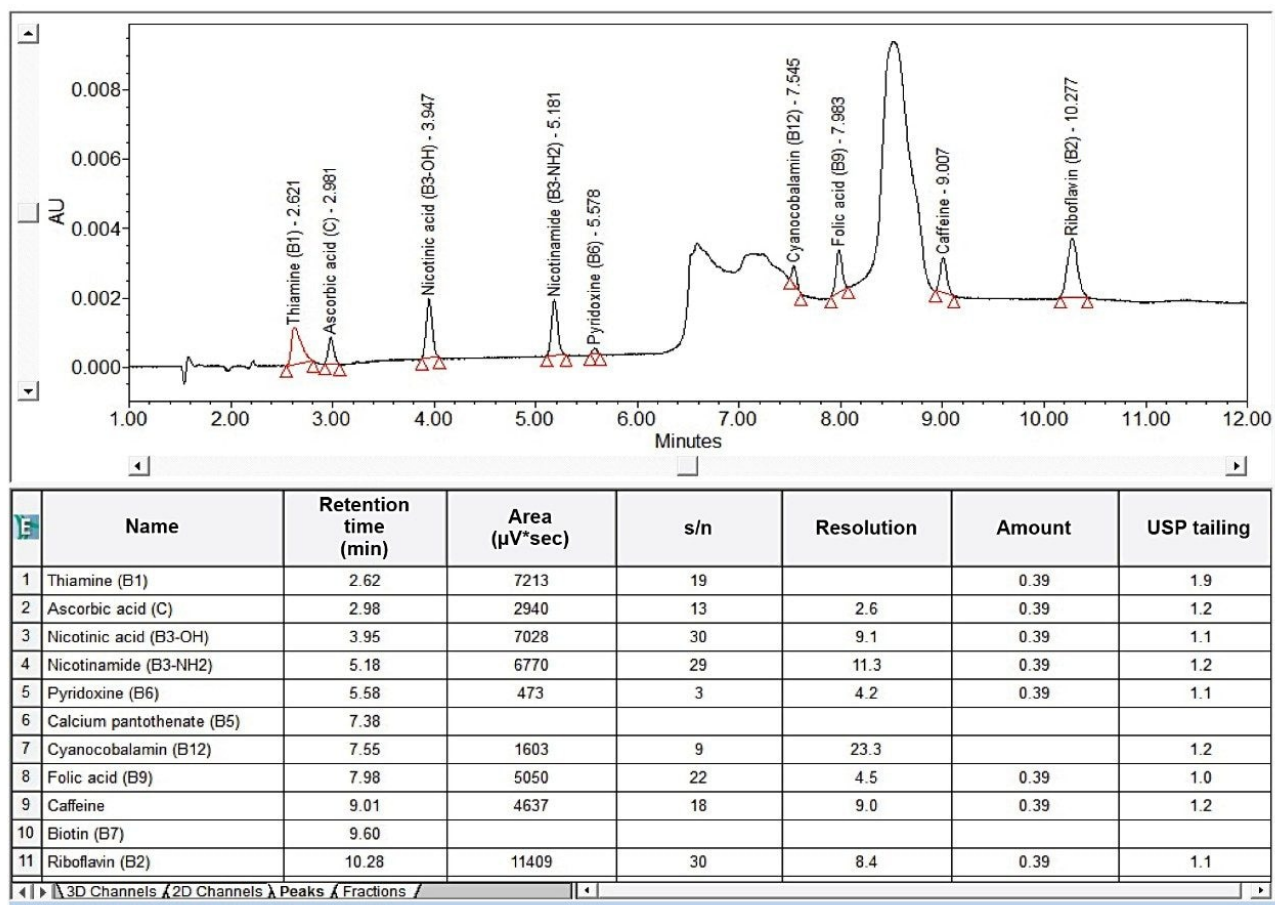


图3.254 nm波长下，维生素和咖啡因校准标样(0.4 $\mu g/mL$)的代表性色谱图以及LOQ和LOD浓度水平下的s/n

	化合物名称	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	s/n	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	s/n	USP拖尾因子
1	硫胺素(B1)	<0.4	19	<0.4	19	1.9
2	抗坏血酸(C)	<0.4	13	<0.4	13	1.2
3	烟酸(B3-OH)	<0.4	30	<0.4	30	1.1
4	烟酰胺(B3-NH ₂)	<0.4	29	<0.4	29	1.2
5	吡哆醇(B6)	<0.4	31	<0.4	31	1.1
6	泛酸钙(B5)	<0.8	9	<1.6	18	1.2
7	氰钴胺(B12)	<0.4	17	<0.8	17	1.2
8	叶酸(B9)	<0.4	22	<0.4	22	1.1
9	咖啡因	<0.4	18	<0.4	18	1.1
10	生物素(B7)	<1.6	9	3.13	19	1.2
11	核黄素(B2)	<0.4	30	<0.4	30	1.1

表1.205 nm和254 nm紫外波长下，维生素和咖啡因的LOD和LOQ

标准曲线各浓度水平下的保留时间和峰面积重现性按%RSD计算。大多数维生素和咖啡因的保留时间%RSD约为0.8%，维生素C除外，约为2%。大多数维生素的峰面积%RSD低于2%。保留时间精密度(%RSD)和峰面积精密度(%RSD)结果如图4A和4B所示。

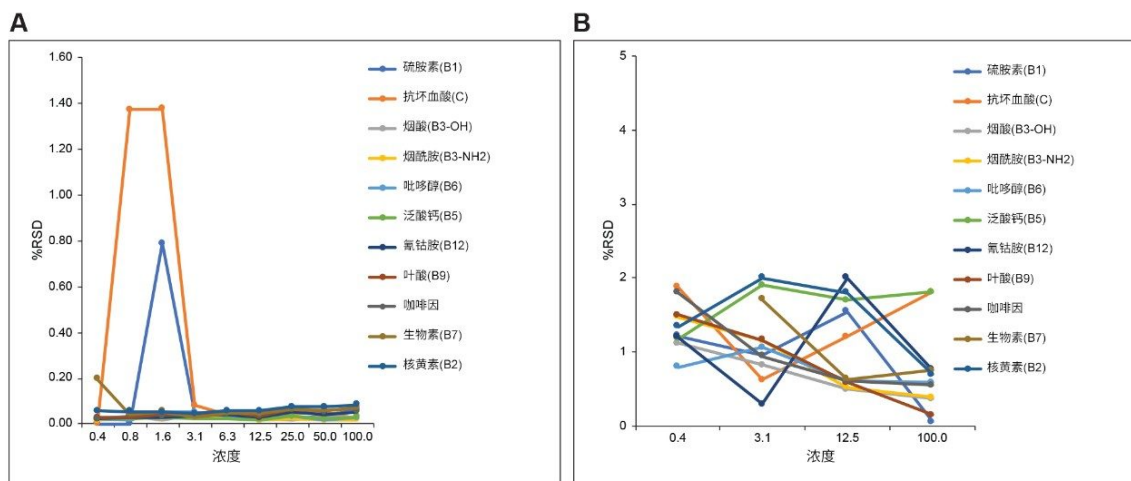


图4A.不同浓度标样中一些维生素的保留时间精密度(%RSD, $n = 6$)。B.不同浓度标样中一些维生素的峰面积精密度(%RSD, $n = 6$)。

方法稳定性

温度和pH影响:

在不同温度 (28 °C、30 °C和32 °C) 下评估方法性能。

当温度增加至32 °C时, 大部分维生素和咖啡因仍保持良好的分离度。但是, 烟酰胺和吡哆醇之间的分离度随温度升高而降低。结果如图5A所示。

在不同pH水平 (pH 2.8、pH 3.0和pH 3.2) 下评估方法性能。

当pH增加至pH 3.2时, 大部分维生素和咖啡因仍保持良好的分离度。硫胺素和抗坏血酸 (维生素C) 之间的分离度随pH值升高而降低。结果如图5B所示。

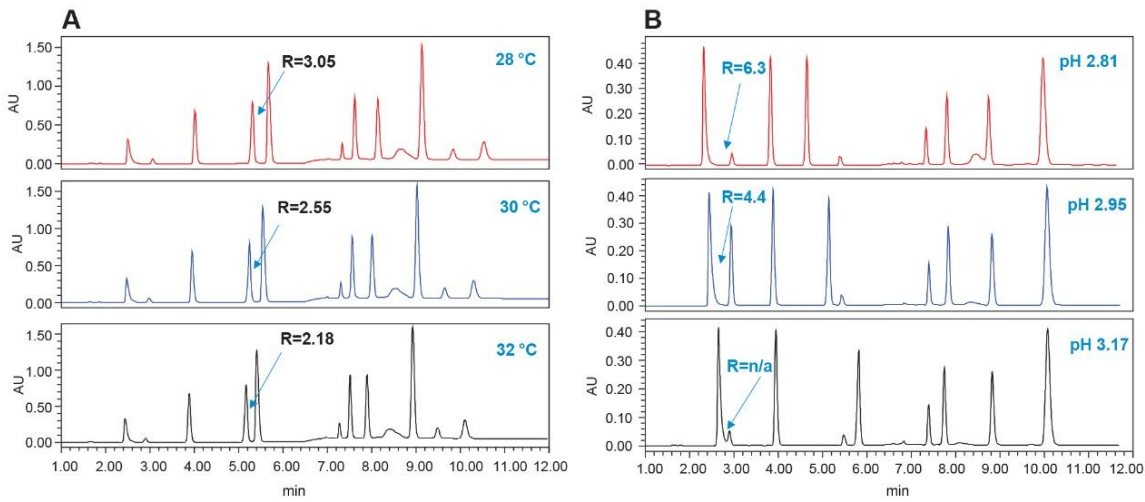


图5A.205 nm紫外波长下，温度对烟酰胺与吡哆醇分离度的影响。B. 254 nm紫外波长下，pH对硫胺素与抗坏血酸分离度的影响。

色谱柱使用寿命和压力迹线

集中使用该色谱柱评估分离方法以及分析的维生素产品的条件。色谱柱使用寿命的重现性是基于在初始梯度进样和大约800次进样后，100 μg/mL新鲜标样的保留时间；再次进样分析100 μg/mL新鲜标样。监测从第120次进样到第1000次进样的色谱柱压力迹线；在第1000次进样时，压力增加约200 psi。评估色谱柱使用寿命的代表性色谱图如图6A所示，压力迹线如图6B所示。

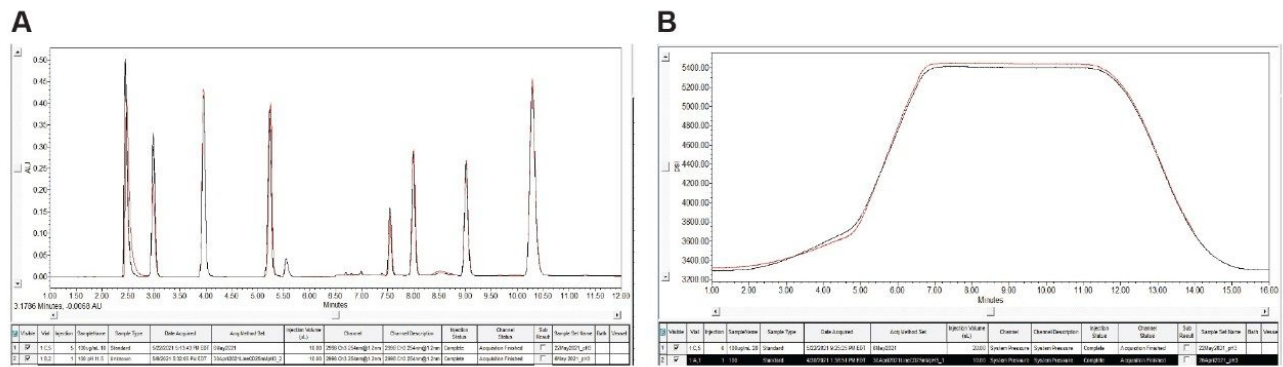


图6A.在相同梯度下进样700次后的色谱柱性能。B.在相同梯度下进样1000次后的色谱柱压力迹线。

残留

图7A显示了儿童用维生素片3次进样前后的空白进样色谱图。图7B显示了100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 维生素和咖啡因混标进样前后的空白进样色谱图。未在这些样品中观察到残留。

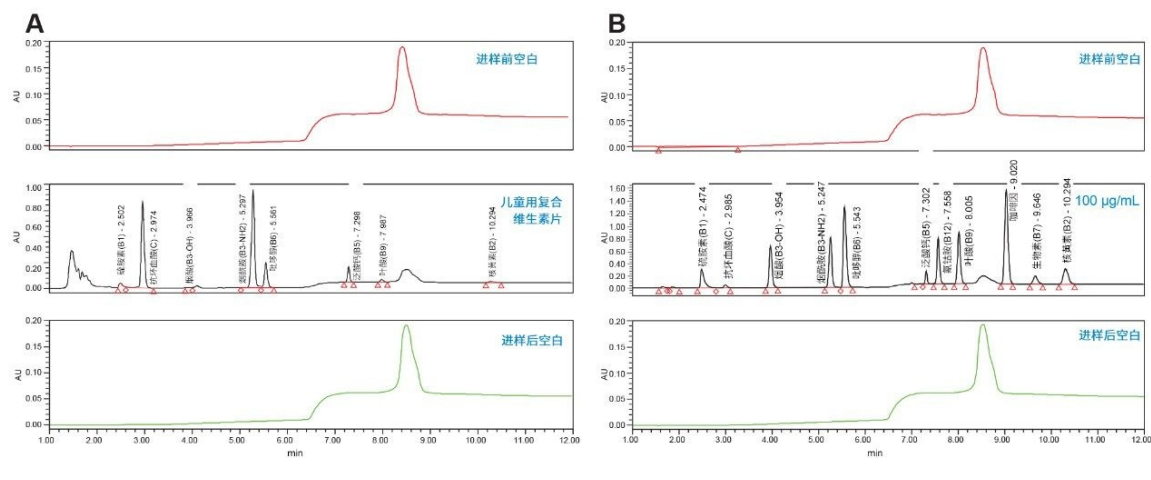


图7A.儿童用维生素残留观察。B. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 维生素和咖啡因残留观察。

复合维生素片和饮料分析

成人和儿童用复合维生素片中10种维生素的定量分析结果如表2所示。样品来自不同制造商，包含多种不同浓度的维生素。1 μL 进样体积用于定量样品中的高浓度维生素，例如维生素C；10 μL 进样体积用于定量样品中的生物素及其他低浓度维生素。较小的进样体积可用于浓缩样品，以减少样品稀释需求。但是，如果样品中含有极高浓度的维生素和咖啡因，则需要稀释样品以拟合线性曲线。在之前的研究中考察过Arc HPLC进样器的进样体积，结果表现出优异的线性和精密度⁵。

名称	成人用复合维生素片 标示含量	成人用复合维生素片 检出含量(%RSD)	儿童用复合维生素片 标示含量	儿童用复合维生素片 检出含量(%RSD)
硫胺素(B1) mg	1.5	1.6 (4)	1.2	1.3 (5)
抗坏血酸(C) mg	90.0	83.6 (2)	90.0	96.5 (1)
烟酰胺(B3-NH2) mg	20.0	22.5 (2)	12.0	12.6 (1)
吡哆醇(B6) mg	3.0	3.2 (4)	1.7	1.7 (5)
泛酸钙(B5) mg	10.0	13.3 (4)	5.0	6.5 (4)
氰钴胺(B12) µg	25.0	nd	2.4	nd
叶酸(B9) µg	500.0	381 (3)	240.0	250 (3)
生物素(B7) µg	30.0	nd	30.0	nd
核黄素(B2) mg	1.7	1.6 (2)	1.3	1.0 (5)

表2.维生素片产品的定量分析结果($n = 3$)

将维生素片用50 mL水萃取2次，以提取水溶性维生素和咖啡因。然后用20 mL 100 mM氢氧化钠提取生物素、叶酸和核黄素，将提取的上清液单独进样，检测溶于氢氧化钠中的维生素。维生素片中氰钴胺(B12)和生物素(B7)的浓度均低于方法检测限和定量限。在205 nm和254 nm波长下分析成人用维生素片所得到的代表性色谱图如图8所示。

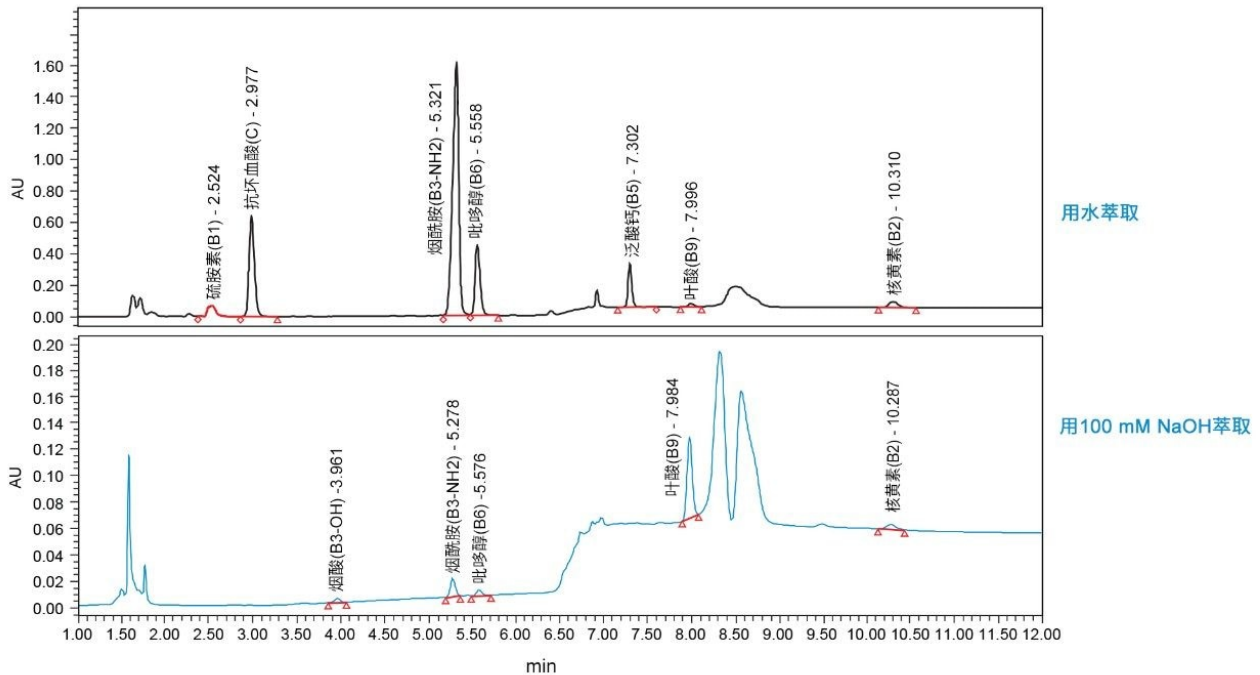


图8.依次用水和100 mM氢氧化钠萃取成人用复合维生素片，并在205 nm紫外波长下分析所得到的色谱图。

本研究分析了一些热销饮料（例如维生素增强水、运动饮料和功能饮料）中的维生素和咖啡因浓度。进样体积为1 μ L和10 μ L，在不稀释样品的情况下直接进样分析。饮料中氰钴胺(B12)的浓度低于该方法对氰钴胺的检测限和定量限。结果见表3，分析功能饮料所得到的代表性色谱图见图9。

	维生素水S4	维生素水S4	运动饮料S1	运动饮料S1	功能饮料R8	功能饮料R8
名称	标示值	检出值 (%RSD)	标示值	检出值 (%RSD)	标示值	检出值 (%RSD)
抗坏血酸(C) mg	180.0	饱和				
泛酸钙(B5) mg	5.0	6.1 (4)	0.8	0.9 (1.0)	3.5	3.91 (5)
氰钴胺(B12) μ g	2.4	nd (0)	0.4	nd (0)	2.7	nd
烟酰胺(B3-NH2) mg	16.0	22.5 (1)	2.4	2.2 (0)	22.4	24 (0)
吡哆醇(B6) 1.7 mg	1.7	2.1 (3)	0.3	0.1 (0)	6.1	6.4 (0)
咖啡因 mg					114.0	118 (0)

表3.维生素饮料产品的定量分析结果($n = 3$)

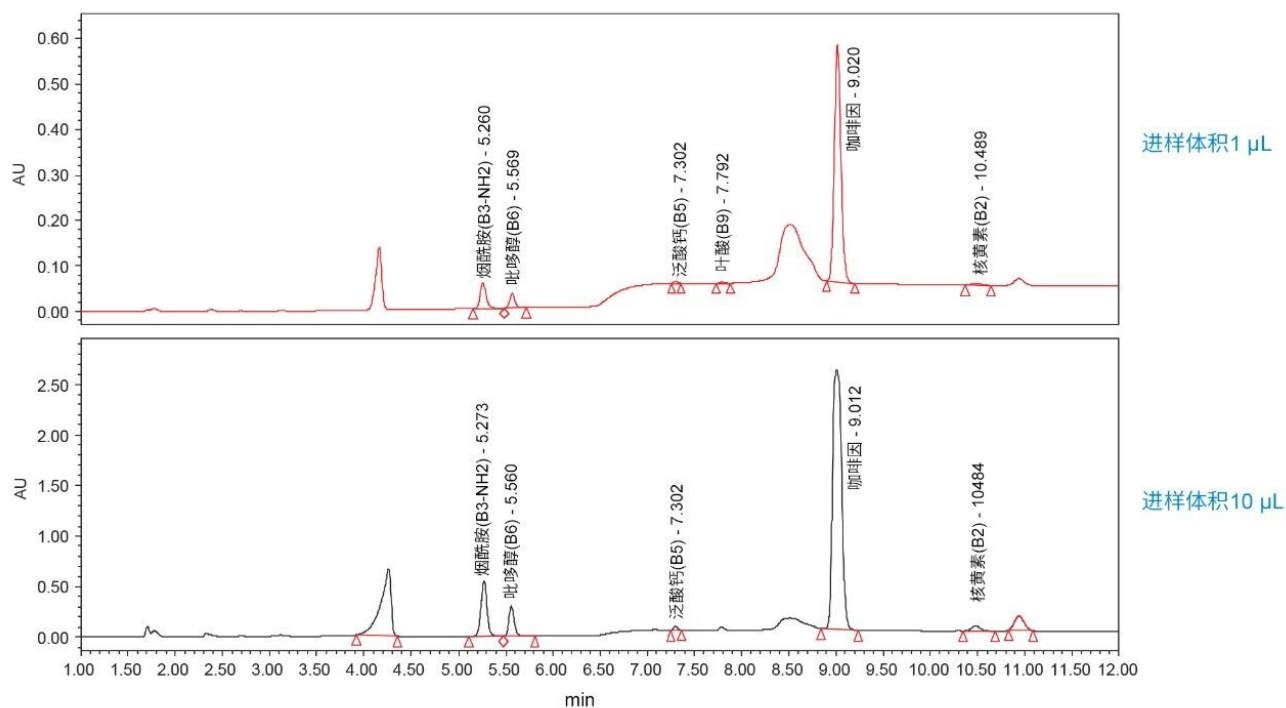


图9.在205 nm紫外波长下分析功能饮料所得到的色谱图

结论

Waters ARC HPLC-PDA系统结合XSelect HSS T3 2.5 μm 色谱柱，能够在16 min内分离10种维生素和咖啡因。

该方法表现出优异的线性、精密度和准确度。

XSelect HSS T3 XP色谱柱表现出优异的保留时间和柱压重现性。

该分析工作流程适用于在以下方面为饮料制造商提供支持：

- 各种复杂水溶性维生素的标准化分析。
- 尽量避免维生素及其他原料过量。
- 减少所需的方法数量。
- 快速确认营养价值、维生素规格和标签合规性。

参考资料

1. 网站：<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:40:4:0026:0038:EN:PDF> <
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:40%204:0026:0038:EN:PDF>> .
2. 网站：<http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi/t/text/text-idx?c=ecfr;sid=ea70279dd46> <
<http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi/t/text/text-idx?c=ecfr;sid=ea70279dd46%20%20173944383ce15180e06b4;rgn=div5;view=text;node=21%3A2.0.1.1.2;idno=21;co>
> .
3. 网站：<http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi/t/text/text-idx?c=ecfr;sid=ea70279dd46> <
<http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi/t/text/text-idx?c=ecfr;sid=ea70279dd46>> .
4. Benvenuti M, Riches E. The Rapid Analysis of 10 Water-Soluble Vitamins, Caffeine, and Six Common Food Dyes using ACQUITY UPLC with UV Detection. Waters Application Note, 720003188EN <
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2009/analysis-of-10-water-soluble-vitamins-caffeine-and-food-dyes-using-uplc-with-uv.html>> , 2009.

5. Yang J, Rainville P. 采用配备PDA检测器的Arc HPLC系统在不受阿斯巴甜降解物干扰的条件下分析软饮料添加剂.沃特世应用纪要, 720007219ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/analysis-of-soft-drink-additives-with-no-interference-from-aspartame-degradants-using-arc-hplc-system-with-pda-detection.html>> , 2021.

特色产品

Arc HPLC系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135068659>>

2998光电二极管阵列(PDA)检测器 <<https://www.waters.com/1001362>>

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

720007357ZH, 2021年9月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号