

Schnelle Analyse wasserlöslicher Vitamine mit dem Smartline HPLC System

Zusammenfassung

Eine effiziente Basislinientrennung von Vitamin C und vier B-Komplex Vitaminen aus Vitamintabletten wurde an einer C18-Phase erreicht, die speziell für Anwendungen mit wässrigen mobilen Phasen entwickelt wurde. Die herausragende Leistung der vorgestellten Methode wurde durch den Einsatz des Smartline HPLC Systems und des statischen SmartMix Mischers erzielt.

Einleitung

Vitamine sind biologisch aktive Substanzen, die als Steueragenzien des normalen Wachstums und der Gesundheit von belebten Organismen fungieren. Während der Vitamingehalt von Nahrungsmitteln oft nur einige Mikrogramm pro 100 g beträgt, treten die Vitamine aber häufig begleitet von einem Überschuss chemisch ähnlich reagierender Substanzen auf. Die Analyse von wasserlöslichen Vitaminen mit traditioneller Umkehrphasen-HPLC ist nicht möglich, da die hoch polaren Verbindungen an den konventionellen C18-Säulen nicht retardiert werden. Thiamin und Ascorbinsäure (Vitamin C) zum Beispiel zeigen praktisch keine Retention an Standard C18-Material. Analytische Umkehrphasenmethoden mit Ionenpaar-Reagenzien wurden als potentielle Lösung des Problems vorgeschlagen. Diese Methoden tendieren jedoch zu einer ungenügenden Reproduzierbarkeit von Säule zu Säule, die von nicht voraussehbaren Vorgängen bei der Wechselwirkung der paarbildenden Reagenzien mit der Kieselgeloberfläche und der gebundenen Phase verursacht werden.

In diesem Beitrag konzentrieren wir uns auf die HPLC-Analyse von Vitamintabletten mit Vitamin C und vier B-Komplex Vitaminen: Thiamin(B1), Riboflavin(B2), Nicotinamid(B3) und Pyridoxin(B6). Es wurde eine speziell modifizierte C18-Phase und eine saure mobile Phase eingesetzt, um eine hinreichende Retention für eine gute Trennung zu erzielen.

Probenvorbereitung

Wasserlösliche Vitamine können aus einfachen Matrices wie homogenisierten Vitamintabletten im Ultraschallbad mit Wasser leicht extrahiert werden. Nur 250 mg der Gesamtprobe wurden in einen 50 ml Kolben gegeben, mit etwa 40 ml 0,5%iger Oxalsäure gerührt und etwa 20 min im Ultraschallbad behandelt. Dann wurde die Probe abgekühlt und mit 0,5%iger Oxalsäure auf 50 ml aufgefüllt. Vor der Injektion wurde die Probe durch ein 0,45 µm Spritzenfilter geleitet.

Experimentelles

Alle Standardlösungen wurden mit 0,5% Oxalsäure in bidestilliertem Wasser bereit. Ein vorläufiger Standard von drei wasserlöslichen Vitaminen wurde durch Einwaage von Thiamin (10 mg), Pyridoxin (20 mg) und Riboflavin (10 mg) in einen 100 ml Kolben und Auffüllen auf 100 ml mit 0,5%iger Oxalsäure hergestellt (V1). In einen zweiten 100 ml Kolben wurden 70 mg Ascorbinsäure und 20 mg Nicotinamid eingewogen, mit 70 ml 0,5%iger Oxalsäure verdünnt. Nach Zugabe von 10 ml der Lösung V1 wurde das Volumen mit 0,5%iger Oxalsäure auf 100 ml gebracht. Die Endkonzentration der Vitamine beträgt nun:

Thiamin	0,010 µg/µl
Pyridoxin	0,020 µg/µl
Riboflavin	0,010 µg/µl
Ascorbinsäure	0,70 µg/µl
Nicotinamid	0,20 µg/µl

HPLC-Parameter

Säule:	ProntoSil 120 5µm C18 AQ 150 x 3 mm (Bestellnummer 15CF184PSJ)
Eluent A:	50 mM H ₃ PO ₄ (eingestellt auf pH 2,5)
Eluent B:	ACN
Gradient:	0-2 min 99% A; 2-8,5 min 30% A; 8,5-11 min 30% A; 11,02-15 min 99% A
Fluss:	0,6 ml/min
Druck:	77 bar
Detektion:	UV bei 268 nm oder Wellenlängenprogramm (siehe Abb. 1)
Inj. Vol.:	10 µl
Temperatur:	40 °C

Instrumentierung

KNAUER Smartline HPLC-System mit Autosampler 3900, Pumpe 1000 mit 10 ml/min Pumpenkopf, statischem SmartMix Mischer, Manager 5000 mit Degassereinheit und Niederdruckgradientenmodul, Säulenofen 4000 und UV Detektor 2600 mit analytischer Durchflusszelle.

Ergebnisse

Weil jedes der Vitamine ein Absorptionsmaximum bei leicht unterschiedlichen Wellenlängen hat (Abb. 1) wurde zur Optimierung der Empfindlichkeit mit einem Wellenlängenzeitprogramm gemessen. Abbildung 2 zeigt das Chromatogramm einer Vitamintabletten-Probe. Die Analysenergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

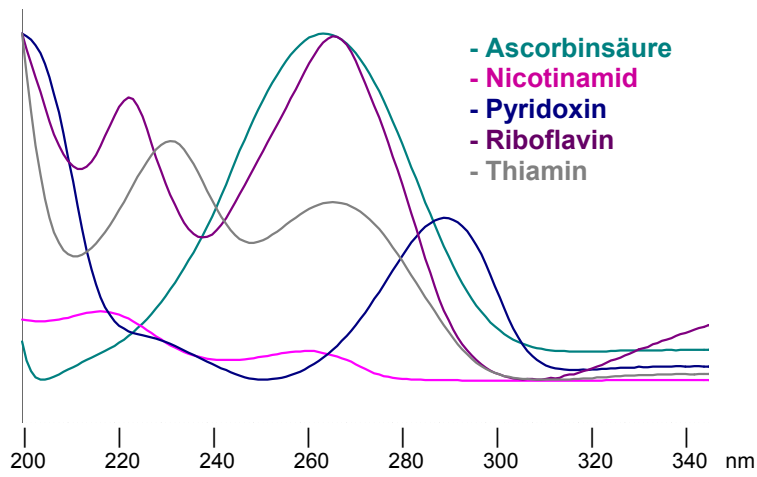


Abb. 1 Wellenlängenspektren von 5 wasserlöslichen Vitaminen

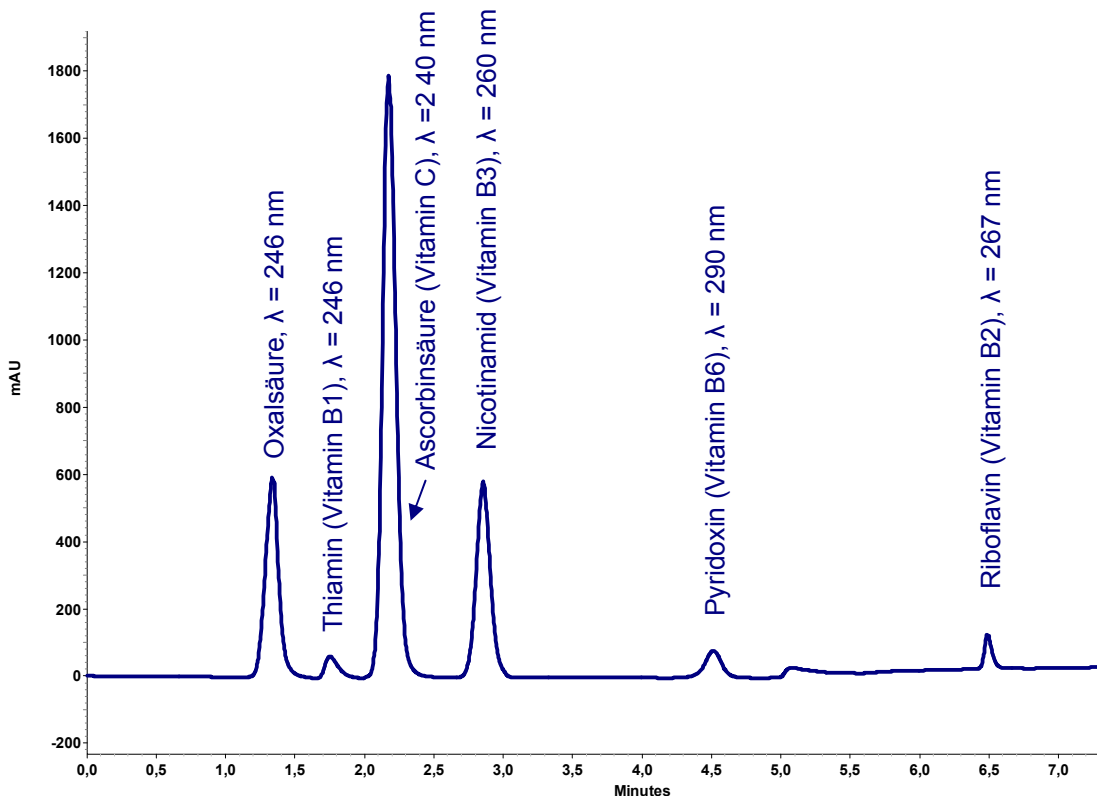


Abb. 2 Trennung von 5 Vitaminen einer Vitamintablette

Tabelle 1

Peak #	Substanz	t _R [min]	Fläche	Asymmetrie	ESTD [mg/Tablettenkern]
1	Oxalsäure	1,328	2877790	1,18	-
2	Thiamin (Vitamin B1)	1,742	509181	2,04	1,26
3	Ascorbinsäure (Vitamin C)	2,185	12239574	1,05	63,5
4	Nicotinamid (Vitamin B3)	2,877	4208215	1,00	16,2
5	Pyridoxin (Vitamin B6)	4,538	695962	0,90	1,71
6	Riboflavin (Vitamin B2)	6,436	395154	1,25	1,26

Leistungsfähigkeit der HPLC-Methode

Nachweisgrenze (Limit of detection, LOD, S/N-Verhältnis = 3)

Substanz	LOD [ng]
Oxalsäure	-
Thiamin (Vitamin B1)	17,5
Ascorbinsäure (Vitamin C)	59
Nicotinamid (Vitamin B3)	20
Pyridoxin (Vitamin B6)	8
Riboflavin (Vitamin B2)	2

Reproduzierbarkeit:

Retentionszeiten von 10 Läufen < 0,2 % RSD

Flächen von 10 Läufen < 3 % RSD

Schlussfolgerungen

Eine schnelle Trennung von 5 wasserlöslichen Vitaminen ist bei guter Peaksymmetrie leicht mit Umkehrphasen-HPLC realisierbar unter Verwendung einer ProntoSil C18 AQ Säule und einem Smartline HPLC-System. Durch die effiziente Gradientenmischung mit dem SmartMix Mischer konnte das Basislinienrauschen minimiert werden und dadurch eine sehr niedrige Nachweisgrenze der Analyten erreicht werden. Weiterhin wurde eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten von < 0,2% RSD erzielt.

Für weitere Informationen über diese Applikation oder in ihr erwähnte Produkte, besuchen Sie bitte www.knauer.net/weltweit um Ihren örtlichen KNAUER-Partner zu finden oder schreiben Sie an info@knauer.net.

Wissenschaftliche Gerätebau
Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH
Hegauer Weg 38
D-14163 Berlin, Germany

Telefon: +49-(0)30-809727-0
Fax: +49-(0)30-8015010
E-Mail: info@knauer.net
Internet: www.knauer.net