



# 嘉南藥理科技大學教師補助專題研究計畫成果報告

計畫編號：90-AC-13

執行期限：90年01月01日至90年12月31日

主持人：劉常興

## 一、中文摘要

以液相層析法同時偵測多種油溶性的維生素 A、D 和 E，並於 12 分鐘內完成。八種油性維生素的分離，係利用 Hypersil C<sub>18</sub> (25 cm×4.6 mm i.d.) 的分離管，使用氘甲烷：二氯甲烷：甲醇(60：20：20，v/v/v) 的移動相，流速 1.0 mL min<sup>-1</sup>，紫外光吸收偵測器並利用波長變化的技巧。分析的油溶性維生素分別為視網醇，醋酸視網醇，棕櫚酸視網醇，β-胡蘿蔔素，第二鈣化醇，第三鈣化醇，維生素 E 和醋酸維生素 E；偵測極限分別為 0.03，0.01，0.55，1.84，0.02，0.02，0.01 和 0.16 ng mL<sup>-1</sup>。

## 關鍵詞：

液相層析法  
油溶性維生素  
化妝品與藥品

## Abstract

A HPLC method for the simultaneous determination of fat-soluble vitamins is described. Total analysis time is 12 min. Eight fat-soluble vitamins could be separation on a Hypersil C<sub>18</sub> (25 cm × 4.6 mm i.d.) using acetonitrile – methylene – chloride – methanol (60:20:20, v/v/v) as mobile phase at 1.0 mL min<sup>-1</sup> with wavelength-programmed ultraviolet-visible absorbance detection. The limit of detection are 0.03, 1.01, 0.55, 1.84, 0.02, 0.02, 0.01 and 0.16 ng mL<sup>-1</sup> for retinol, retinyl acetate, retinyl palmitate, β-carotene, ergocalciferol, cholecalciferol, tocopherol, tocopherol acetate.

## Keywords:

Column liquid chromatography

Fat-soluble vitamins

Cosmetic and pharmaceutical products

## 二、緣由與目的

油溶性維生素，包括維生素 A、D 和 E 在人體常扮演著重要的角色，如關係著惡性腫瘤、心血管疾病、凝血（γ-羥基的不活性凝結因子）和骨骼鈣化[1]。因此油溶性維生素含量可運用於有關惡性腫瘤、心肌衰弱、出血與軟骨症……等的臨床鑑定。油溶性維生素的毒性試驗 [2~3]。雖然過去對偵測油溶性維生素 A, E [4-14], and D [20-25] 利用液相層析法使用紫外光、螢光、質譜、電化學、電鑄偵測。光譜的偵測是使用層析管與特定的波長 325，265，284 和 250 nm 分對維生素 A、D<sub>3</sub> 和 E 偵測 [4]。對油溶性維生素 A、D<sub>3</sub> 和 E 使用碳電極 (1300 mV) 的安培測定法 [7]。維生素 A 醇、胡蘿蔔素、維生素 K 的偵測使用梯度流析或而後使用庫侖還原法以螢光偵測 [13,15]。然而，就現有的資料並沒有同時對化妝品與藥品的棕櫚酸視網醇、β-胡蘿蔔素和第三鈣化醇的鑑定。本篇報告最主要是利用紫外光吸收的波長變化同時偵測市售化妝品與藥物中所含有的維生素 A、D 和 E。並利用非極性液相層析法 (NARP) 之技術，分離混合的油溶性維生素。由於 NARP 流析液完全為有機溶劑，可以增加樣品的溶解度，因此可得到分離效率佳的層析結果、同能減少樣品的需求量、及流析液的用量，並可以增加層析的壽命。



### 三、結果與討論

#### 實驗條件

偵測器：ultraviolet-visible absorbance detection  
(wavelength-programmed)

分離管柱為：Hypersil C<sub>18</sub> (25 cmx 4.6 mm i.d.)。

移動相：acetonitrile：methylene chloride：methanol  
=(60：20：20)

流速：1.0 mL min<sup>-1</sup>

儀器設定：

時間 (min)	波長 (nm)
0 ~ 4.5	320
4.5 ~ 8.5	267
8.5 ~ 10.1	450
10.1 ~ 12.0	313

偵測：

320 nm → 視網醇；醋酸視網醇

267 nm → 第三鈣化醇；維生素 E；醋酸維生素 E

450 nm → β-胡蘿蔔素

313 nm → 棕櫚酸視網醇

#### 回收率

我們將已知量的標準品加入樣品中，再和樣品以相同處理方法計算出百分回收率以証實我們實驗方法的可信度，由表 I 結果所示，回收百分率在 95 %~100 % 之間。

#### 應用於化妝品與藥品

我們都知道油溶性維生素在人體是不可缺的物質，所以適當的補充是有必要的，因此在市面買上都可以買含油溶性維生素化妝品或藥品。我們分別測定市售的商品如保養品及藥品中維生素 A、D 與 E (圖 2A、2B)，其定量結果如表 2 所示。

#### 參考文憲

- (1) L. A. Kaplan and A. J. Pesce, *Clinical Chemistry Theory, Analysis, and correccation*, 3d. Mosby-Year Book, Inc. P.762 1996
- (2) O. Takahashi, *Toxicol. Lett.* 69, 257 (1993).
- (3) R. J. price, H. Mistry, P. T. Wield, A. B. Renwick, J. A. Beaman, and B. G. Lake, *Arch Toxicol.*, 71, 107 (1996)
- (4) D. Blanco, M. Pajares, V. J. Escotet, and M. D. Gutierrez, *J. Liq Chromatogr.* 17, 4513 (1994).
- (5) G. W. Chase, c. c. Akoh, R. R. Eiten miller, and W. O. Landen, *J. Liq. Chromatogr.* 18, 3129 (1995).
- (6) D. B. Gomis, V. E. Arias, L. E. F. Alvarez, and M. D. G. Alvarez, *Anal. Chim. Acta.* 315, 177 (1995)
- (7) M. M. D. Zamarreno, A. S. Perez, M. S. Rodriguez, M. C. G. Perez and J. H. Mendes. *Talanta* 43, 1555 (1996).
- (8) P. Andreoli, M. Careri, P. Manini, G. Mori and M. Musci, *Chromatographia* 44, 605 (1997)
- (9) B. E. Gong and J. W. Ho. *J. Liq. Chrom & Technol*, 20, 2389 (1997)
- (10) T. V. Vliet, *J. Chromatogr.* 553, 179 (1991)
- (11) J. Arnaud, I. Forties, S. Blachier, D. Kia and A. Favier, *J. Chromatogr.* 572, 103 (1991)
- (12) B. L. Lee, S. C. Chua, H. Y. Ong and C. N. Ong, *J. Chromatogr.* 581, 41 (1992).
- (13) K. S. Epler, R. G. Ziegler and N. E. Craft, *J. Chromatogr.* 619, 37 (1993).
- (14) M. H. Bui, *J. Chromatogr.* 654, 129 (1994).
- (15) B. E. Cham, H. P. Roeser, and T. W. Kamst, *clin. Chem.* 35, 2285 (1989).

Table I Recovery of fat-soluble vitamins from cosmetics and pharmaceuticals

Vitamins	Sample					
	Vitamin			Chinese herbs		
	Added $\mu\text{g mL}^{-1}$	Found $\mu\text{g mL}^{-1}$	Recovery (%, n = 3 <sup>a</sup> )	Added $\mu\text{g mL}^{-1}$	Found $\mu\text{g mL}^{-1}$	Recovery (%, n = 3 <sup>a</sup> )
Retinyl palmitate	10.00	9.25	93 (1.9 %) <sup>b</sup>	2.00	1.98	99(1.6 %)
$\beta$ -carotene	10.00	10.10	101 (5.6 %)	1.00	1.01	101(1.7 %)
Ergocalciferol	1.00	0.91	91 (1.4 %)	2.00	2.05	103(3.8 %)
Cholecalciferol	0.50	0.52	104 (0.8%)	2.00	1.97	99 (2.8%)

<sup>a</sup> Number of determination

<sup>b</sup> R.S.D., relative standard deviation

Table II Analytical results for the determination of fat-soluble vitamins in cosmetics and pharmaceuticals.

Sample	Concentration (w/w, 10 <sup>-3</sup> %) <sup>a</sup>		
	Retinyl palmitate	$\beta$ -carotene	Cholecalciferol
Body lotion	75 (3.4%) <sup>b</sup>	— <sup>c</sup>	—
Cream vitamin	1 1919 (5.0%)	—	—
	2 320 (0.05%)	—	1.44 (0.6%)
Liver oil	1 118 (0.9%)	—	—
	2 109 (1.4%)	—	—
Vitamin capsule	1 754 (1.6%)	—	—
	2 240 (1.7%)	—	—
	3 —	21 (5.5%)	5.51 (5.6%)
	4 —	59 (3.1%)	5.80 (4.7%)
	5 —	—	1.20 (2.8%)
	6 —	—	—
Chinese herbs	1 —	—	—
	2 —	—	—
	3 —	—	—
	4 —	—	—

<sup>a</sup> Number of determination (n=3)

<sup>b</sup> Relative standard deviation

<sup>c</sup> — : not indicate

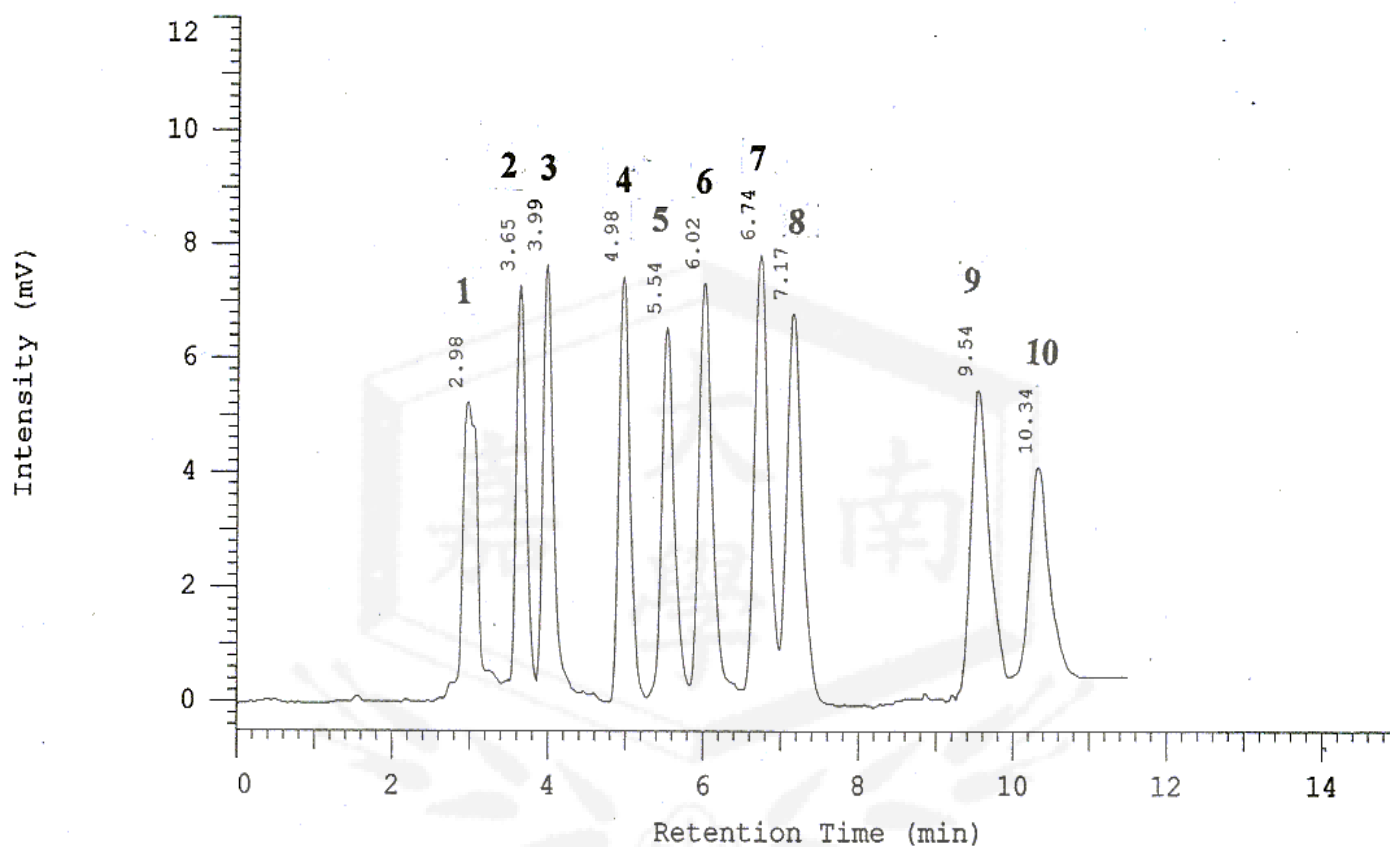


Figure 1. Separation of fat-soluble vitamin standards on Hypersil ODS (25 cm × 4.6 mm). The mobile phase consisted of acetonitrile- methylene chloride- methanol (60:20:20, v/v/v) Flow rate was 1.0 mL min<sup>-1</sup> and detection was at a wavelength-programmed. Peak identification: 1, menadione (4 ppm); 2, retinol (2 ppm); 3, retinyl acetate (0.6 ppm); 4, menatetrenone (2 ppm); 5, cholecalciferol (2 ppm); 6, tocopherol (50 ppm); 7, tocopherol acetate (40 ppm); 8, phylloquinone (2 ppm); 9,  $\beta$ -carotene (1 ppm); 10, rethyl palmitate (2 ppm). Chromatogram of a solvent blank obined by injecting the mobile phase. For chromatographic conditions :on Hypersil ODS (25 cm × 4.6 mm), the mobile phase consisted of acetonitrile- methylene chloride- methanol (60:20:20, v/v/v), flow rate was 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Detection : UV 320 nm (menadione, retinol and retinyl acetate), 267 nm (phylloquinone, menatetrenone, ergocalicferol, tocopherol and tocopherol acetate), 450 nm ( $\beta$ -carotene), 313 nm (retinyl palmitate).

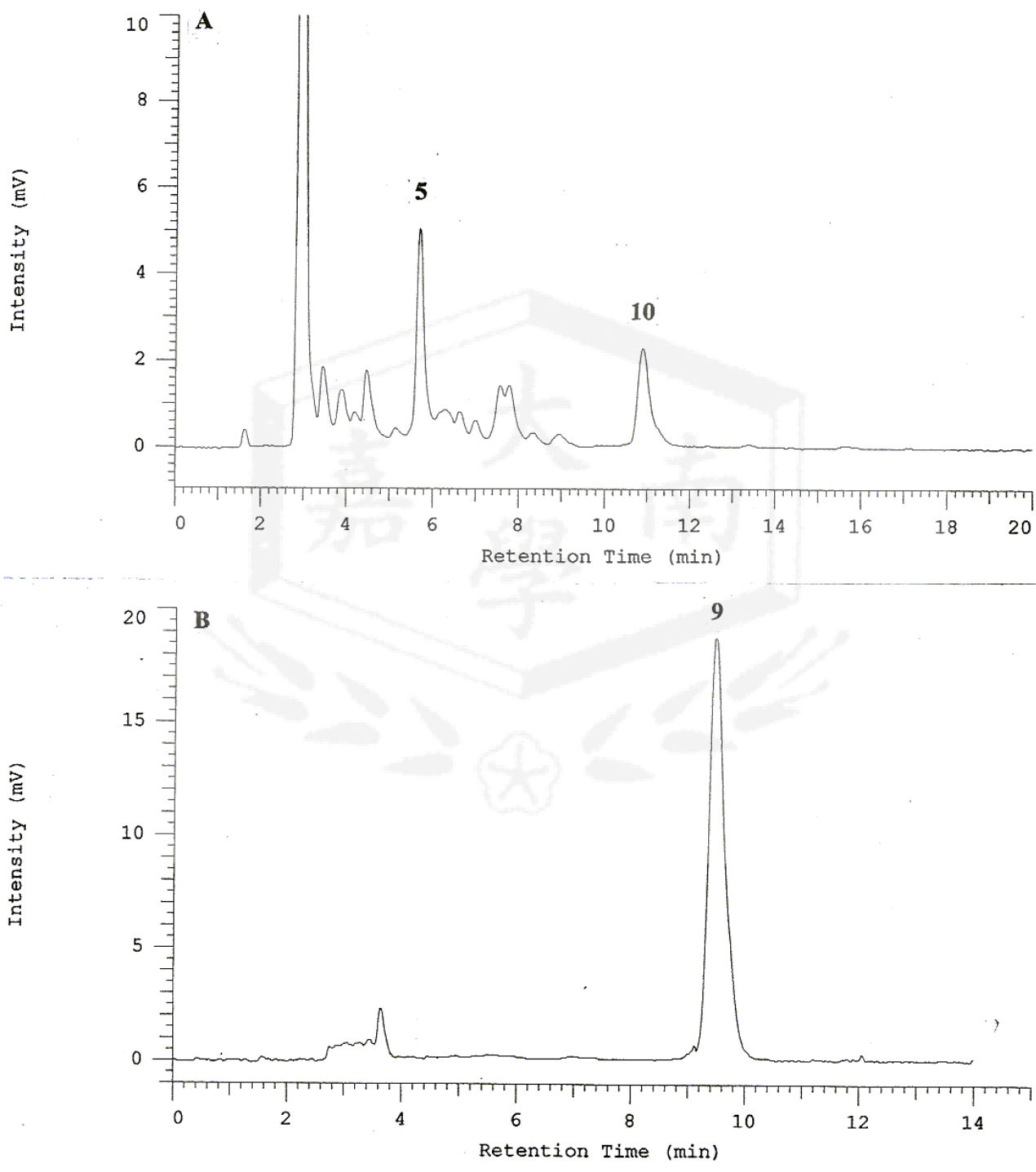


Figure 2. Fat-soluble vitamin profile a commercial (A) cream vitamin (B) vitamin capsule. Chromatographic conditions are given in Figure 1. Peak identification: 5, cholecalciferol(D<sub>3</sub>); 9,  $\beta$ -carotene; 10, rethyl palmitate (A palmitate).