

毛细管电泳法高压快速分离分析菠菜中的水溶性维生素

胡晓琴¹, 尤慧艳^{1,2*}

(1. 大连大学环境与化学工程学院, 辽宁 大连 116622;

2. 中国科学院大连化学物理研究所, 中国科学院分离分析化学重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要 在毛细管电泳法中,通过双模对接高压电源可以获得0~40 kV甚至40 kV以上的超高电压。本研究在40 kV的超高电压下,以纯电解质水溶液为缓冲液,实现了蔬菜中通常含有的8种水溶性维生素(VB₁、VB₂、VB₆、VC、D-泛酸钙、D-生物素、烟酸和叶酸)的快速分离及菠菜样品的定量分析。通过考察电压、缓冲溶液浓度、pH值等因素对分离的影响,确定了优化的实验条件。结果表明,在40 kV高压下,采用25 mmol/L硼砂-硼酸溶液缓冲液(pH 8.8),菠菜中上述8种水溶性维生素在2.2 min内获得了较好的基线分离。用此方法对菠菜中的水溶性维生素进行定量分析,得到了令人满意的结果。水溶性维生素的线性相关系数范围为0.998 1~0.999 9,检出限为0.2~0.3 mg/L,在菠菜中的平均加标回收率为88.0%~100.6%,峰面积的相对标准偏差(RSD)为1.15%~4.13%。

关键词 双模;高压;毛细管电泳;水溶性维生素;菠菜

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2009)06-0835-05 栏目类别:研究论文

Fast separation and analysis of water-soluble vitamins in spinach by capillary electrophoresis with high voltage

HU Xiaojin¹, YOU Huiyan^{1,2*}

(1. Environmental and Chemical Engineering College, Dalian University, Dalian 116622, China;

2. Dalian Institute of Chemical Physics, Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, the Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: In capillary electrophoresis, 0–40 kV (even higher) voltage can be reached by a connecting double-model high voltage power supply. In the article, water-soluble vitamins, VB₁, VB₂, VB₆, VC, calcium D-pantothenate, D-biotin, nicotinic acid and folic acid in vegetable, were separated by using the high voltage power supply under the condition of electrolyte water solution as running buffer. The separation conditions, such as voltage, the concentration of buffer and pH value etc., were optimized during the experiments. The results showed that eight water-soluble vitamins could be baseline separated in 2.2 min at 40 kV applied voltage, 25 mmol/L sodium tetraborate buffer solution (pH 8.8). The water-soluble vitamins in spinach were quantified and the results were satisfied. The linear correlation coefficients of the water-soluble vitamins ranged from 0.998 1 to 0.999 9. The detection limits ranged from 0.2 to 0.3 mg/L. The average recoveries ranged from 88.0% to 100.6% with the relative standard deviations (RSD) range of 1.15%–4.13% for the spinach samples.

Key words: double-model; high voltage; capillary electrophoresis (CE); water-soluble vitamins; spinach

维生素是维持生物生长和代谢所必需的一类微量有机化合物。维生素分为水溶性和脂溶性两大类。水溶性维生素包括VC和B族维生素(VB₁、VB₁₂、VB₂、VB₆、烟酸、叶酸、胆碱、肌醇、泛酸和生物素等)^[1,2],是维持人体正常代谢功能所必需的生物

活性物质。这些药物的分析多是采用分光光度法^[3,4]、荧光法^[5,6]和高效液相色谱法^[7-9]。采用分光光度法和荧光法分析时因干扰因素多,谱峰相互重叠而无法同时测定多种维生素,常常需要多种方法相互配合才能完成,不利于快速分析;采用高效液

* 通讯联系人:尤慧艳,博士,教授,研究方向为电动分离理论及应用。E-mail: dlyhy@dicp.ac.cn.

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 20875088)和辽宁省博士后基金项目(No. BSH2006921042).

收稿日期:2009-06-15

相色谱法分析时也因仪器昂贵、运行成本高、分析时间长而受到限制。毛细管电泳(CE)是 20 世纪 80 年代后期在全世界范围内迅速发展起来的一种分离分析技术,它具有高效、快速、微量、自动化等特点,不但可通过改变操作模式和缓冲液的成分等调节选择性,而且可以根据不同的分子性质(如大小、电荷数、疏水性等)对各种样品进行有效的分离。目前采用毛细管电泳法分离水溶性维生素已有少量报道^[10-13],所用分离电压都在 30 kV 以下,迁移时间在 5~10 min。研究仅限于复方维生素 B 药片、注射用维生素水溶液、蘑菇等样品中的水溶性维生素,还未见对菠菜中的水溶性维生素进行分离研究的报道。本文采用毛细管电泳法对菠菜中常见的 8 种水溶性维生素(VB₁、VB₂、VB₆、D-泛酸钙、D-生物素、VC、烟酸和叶酸)的快速分离分析电泳条件进行了探讨,通过双模对接高压电源实现了 40 kV 以上的超高压,并通过优化其他条件,保证了系统的稳定性,在 2.2 min 内成功地分离了 8 种水溶性维生素,进一步提高了分离速度。在此基础上,以菠菜为实际样品进行优化分离与定量分析研究,拓展了毛细管电泳的应用范围。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效毛细管电泳仪:P/ACE™ MDQ(美国 BECKMAN 公司);PHS-3C 型精密酸度计(上海分析仪器厂);KQ-100E 型超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司);AL204 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。石英毛细管柱:内径 50 μm,总长 51 cm,有效长度 41 cm(邯郸市鑫诺光纤色谱有限公司)。

乙腈(DikmaPure,迪马公司);硼砂(分析纯,天津市永大化学试剂开发中心);氢氧化钠(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);水为二次去离子水;标准对照品为生化试剂,VB₁(国药集团化学试剂有限公司),VB₂(北京奥博星生物技术有限责任公司),VB₆、烟酸(天津市大茂化学仪器供应站),VC(沈阳新兴试剂厂),D-泛酸钙、D-生物素、叶酸(中国医药集团上海化学试剂公司);实验用菠菜为市售。所有溶液均经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,并用超声波脱气 5 min。

1.2 标准品和实际样品的制备

准确称取每种维生素标准品 10.00 mg,用二次去离子水定容至 100 mL 容量瓶中,配制成 100 mg/L 的标准溶液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,用超声波振荡后备用。

准确称取菠菜 10.00 g,研碎,置于 100 mL 的小烧杯中,加入 0.01 mol/L 盐酸溶液 40 mL,摇匀,于 50 °C 下水浴超声提取 45 min,过滤,滤渣用相同的条件重复提取两次,合并提取液。待提取液冷却后,取溶液 20 mL 在 2 000 r/min 转速下离心 10 min,取上清液 10 mL 移入 50 mL 容量瓶中,并用 0.01 mol/L 盐酸定容至刻度,充分摇匀,放置于冰箱中备用。

2 结果与讨论

2.1 双模高压电源的研制

在进行毛细管电泳实验时,为了获得较高的电渗流速度以达到快速分离的目的,需要在毛细管柱两端施加高电压。目前市售的电泳仪的最高电压一般都在 30 kV,而且只有在室内湿度较小的条件下才能达到最高值。本文采用双模对接法^[14]研制了一种新型的高压电源,不但可以提高电压,还可以增强电压的稳定性。实验中将一个 +30 kV 高压电源和一个 -30 kV 高压电源对接,亦即将正高压电源的负端和负高压电源的正端共接地。通过施加高压保护,可以在毛细管两端施加 0~60 kV 的高电压。图 1 给出了超高压毛细管电泳实验原理图。

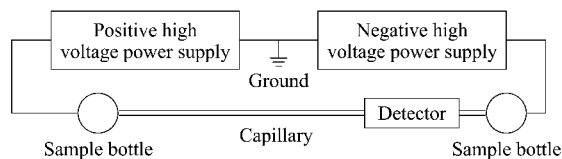


图 1 超高压毛细管电泳实验原理图

Fig. 1 Schematic of super high voltage CE experiment

2.2 操作电压对迁移时间和分离度的影响

理论和实验均证明,操作电压越高,分离速度越快。采用将高压电源模块双模对接的方法,可以根据需要将电压不断提高;但在高电压下焦耳热会增大且电极在缓冲液中易产生电解现象,因此实验中高电压的应用受到限制。本实验综合考虑各种分离条件的影响,在 40 kV 电压下成功地将 8 种水溶性维生素进行了基线分离,分离度在 1.56~3.89 之间;分析用时仅为 2.2 min,进一步提高了分离速度。操作电压对上述 8 种维生素的迁移时间的影响如图 2 所示。

2.3 缓冲溶液浓度对迁移时间和分离度的影响

本实验中选择缓冲溶液浓度为 10~50 mmol/L 的范围对 8 种水溶性维生素的迁移时间和分离度(R_s)进行分离研究。理论与实践均表明,增加缓冲溶液浓度,可以降低电渗流速度,因此选择浓度较低的缓冲溶液有利于快速分离。缓冲溶液浓度与 8 种

维生素的迁移时间的关系如图 3 所示。但研究表明缓冲溶液浓度对 R_s 的影响也较为明显。综合考虑各种因素发现,在缓冲溶液浓度为 25 mmol/L 时,峰形对称性好,且能够达到基线分离, R_s 在 1.68 ~ 6.02 之间。

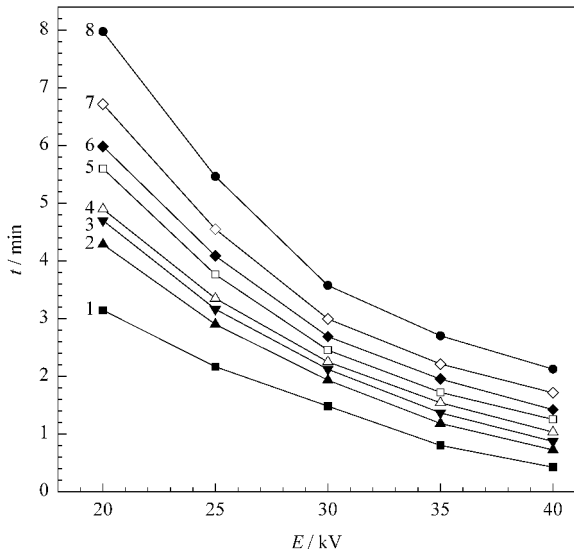


图 2 操作电压对迁移时间的影响

Fig. 2 Effect of applied voltage on migration time

Buffer solution : 25 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_3\text{BO}_3$ (pH 8.8); injection : 5 kV \times 3 s ; detection wavelength : 214 nm.

Curves : 1. VB_1 ; 2. VB_2 ; 3. D-biotin ; 4. VB_6 ; 5. calcium D-pantothenate ; 6. VC ; 7. nicotinic acid ; 8. folic acid.

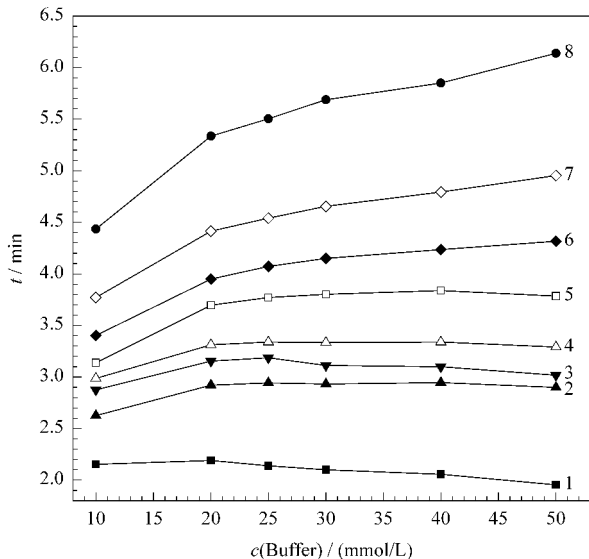


图 3 缓冲溶液浓度对迁移时间的影响

Fig. 3 Effect of buffer concentration on migration time

Applied voltage : 25 kV. Other conditions are the same as in Fig. 2.

For curve identifications , see Fig. 2.

2.4 缓冲溶液酸度对迁移时间和分离度的影响

缓冲溶液的 pH 不仅强烈影响熔融石英毛细管内表面的特性,而且影响样品的带电性,改变电渗流的大小。因此,溶液 pH 的调节与控制是优化分离

的重要因素。本实验采用 25 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_3\text{BO}_3$ 作为缓冲溶液,考察了 pH 在 7.2 ~ 9.6 范围内 8 种水溶性维生素的迁移时间与缓冲溶液 pH 间的关系,结果如图 4 所示。实验结果表明,pH 对迁移时间的影响不明显,但对分离度有影响。当 pH 为 8.8 时 8 种水溶性维生素达到了较好的基线分离, R_s 在 1.63 ~ 5.53 之间。

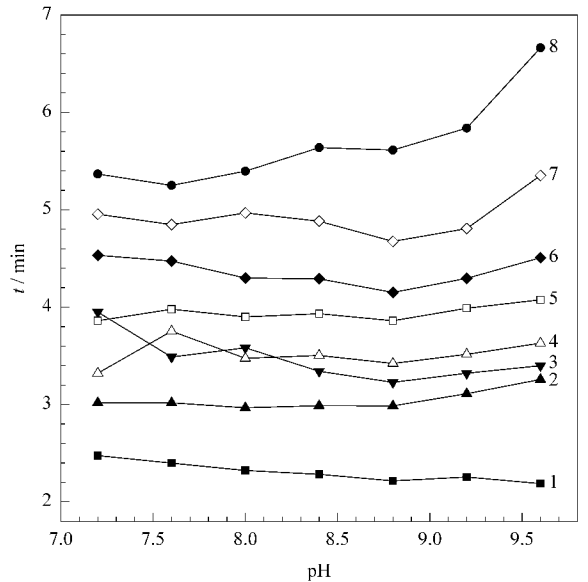


图 4 缓冲溶液 pH 对迁移时间的影响

Fig. 4 Effect of buffer pH on migration time

Applied voltage : 25 kV. Other conditions are the same as in Fig. 2.

For curve identifications , see Fig. 2.

2.5 其他条件对迁移时间和分离度的影响

实验中考察了进样量、缓冲溶液的种类、有机溶剂对水溶性维生素迁移时间和分离度的影响。最终确定最佳进样量为在 5 kV 电压下进样 3 s。参照文献报道^[15-17],比较了 3 种缓冲溶液 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-SDS}$ (十二烷基硫酸钠)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 和 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_3\text{BO}_3$ 对分离的影响,结果表明 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-H}_3\text{BO}_3$ 体系更适合于水溶性维生素的超高压快速分离。经考察发现添加有机溶剂乙腈等虽然可以减弱电极的电解程度,提高分离度,但迁移时间大大延长,影响分离速度。

2.6 优化条件下 8 种水溶性维生素的毛细管电泳分离

配制 VB_1 、 VB_2 、D-生物素、 VB_6 、D-泛酸钙、VC、烟酸和叶酸的质量浓度分别为 50.00、45.00、5.00、40.00、40.00、10.00、50.00 和 20.00 mg/L 的混合标准溶液,在缓冲溶液为 25 mmol/L 硼砂-硼酸溶液(pH 8.8)、操作电压为 40 kV、电动进样 5 kV \times 3 s、检测波长为 214 nm 的优化分离条件下,上述 8 种维生素的电泳分离谱图如图 5a 所示。

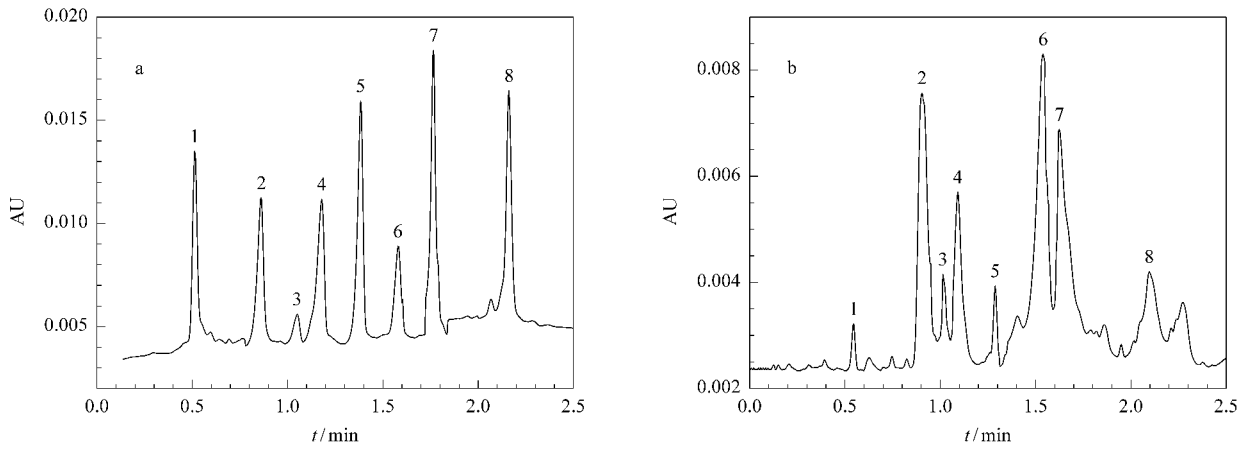


图 5 (a) 8 种水溶性维生素标准品和 (b) 菠菜中水溶性维生素的毛细管电泳分离谱图

Fig. 5 Electropherograms of (a) eight water-soluble vitamin standards and (b) the water-soluble vitamins in spinach
Peaks : 1. VB₁ ; 2. VB₂ ; 3. D-biotin ; 4. VB₆ ; 5. calcium D-pantothenate ; 6. VC ; 7. nicotinic acid ; 8. folic acid.

2.7 方法的评价

2.7.1 标准曲线

配制一系列不同浓度的水溶性维生素的标准溶液,在 2.6 节所述的优化条件下进行分离测定。以各水溶性维生素的色谱峰峰面积 Y 为纵坐标,其质量浓度 X (mg/L) 为横坐标,得到的线性回归方程见

表 1,可见各水溶性维生素在测定的质量浓度范围内线性关系良好。方法的检出限(以信噪比为 3 计)见表 1。另外,实验中测定迁移时间的相对标准偏差 (RSD) 为 0.13% ~ 1.84%,峰面积的 RSD 为 1.15% ~ 3.56%,说明此方法可以用于样品中水溶性维生素的含量测定。

表 1 水溶性维生素的线性回归方程、相关系数、线性范围和检出限

Table 1 Linear equations, correlation coefficients, linear ranges and detection limits of eight water-soluble vitamins

Vitamin	Linear equation*	Correlation coefficient	Linear range/(mg/L)	Detection limit/(mg/L)
VB ₁	$Y = 327.32X + 915.81$	0.9981	0.50 - 50	0.3
VB ₂	$Y = 347.71X + 600.25$	0.9999	1.25 - 50	0.2
D-Biotin	$Y = 879.57X + 1744.5$	0.9985	0.50 - 50	0.3
VB ₆	$Y = 343.18X + 4575.1$	0.9993	1.25 - 150	0.3
Calcium D-pantothenate	$Y = 490.59X + 1337.5$	0.9981	1.00 - 100	0.3
VC	$Y = 789.62X + 1062.9$	0.9981	5.00 - 150	0.3
Nicotinic acid	$Y = 431.67X + 1621.5$	0.9993	5.00 - 150	0.2
Folic acid	$Y = 1340.4X + 2800.0$	0.9994	0.50 - 10	0.2

* Y : peak area ; X : mass concentration , mg/L.

2.7.2 回收率与精密度

在已知含量的菠菜样品中分别添加维生素的标

准对照品,每个样品测定 5 次,进行回收率和精密度试验,结果见表 2。

表 2 菠菜样品中水溶性维生素的回收率和精密度 ($n = 5$)

Table 2 Recoveries and reproducibilities of different water-soluble vitamins spiked in a spinach sample ($n = 5$)

Vitamin	Added/ (mg/g)	Found/ (mg/g)	Recovery/ %	RSD/ %	Vitamin	Added/ (mg/g)	Found/ (mg/g)	Recovery/ %	RSD/ %
VB ₁	10.0	9.1	91.0	1.42	Calcium D-pantothenate	10.0	9.3	93.0	2.84
	30.0	28.4	94.7	1.56		30.0	28.4	94.7	1.94
	50.0	47.5	95.0	2.23		50.0	47.8	95.6	1.27
VB ₂	10.0	9.4	94.0	1.76	VC	10.0	8.8	88.0	3.26
	30.0	28.8	96.0	2.52		30.0	26.7	89.0	4.13
	50.0	48.4	96.8	1.83		50.0	44.7	89.4	3.57
D-Biotin	10.0	9.2	92.0	1.75	Nicotinic acid	10.0	9.6	96.0	2.37
	30.0	28.1	93.7	2.42		30.0	28.6	95.3	2.12
	50.0	48.8	97.6	1.28		50.0	50.1	100.2	1.27
VB ₆	10.0	9.7	97.0	1.60	Folic acid	10.0	9.3	93.0	1.42
	30.0	29.3	97.6	1.35		30.0	28.8	96.0	1.94
	50.0	50.3	100.6	2.18		50.0	49.3	98.6	2.14

2.8 实际样品测定

将处理后的菠菜样品溶液用 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,在 2.6 节所述优化条件下进样分析。采用标准对照品加入法定性、外标法定量,得到菠菜中水溶性维生素 VB_1 、 VB_2 、D-生物素、 VB_6 、D-泛酸钙、VC、烟酸和叶酸的含量依次为 0.011 、 0.948 、 0.119 、 0.673 、 0.151 、 0.755 、 0.753 和 $0.084\ \text{mg/g}$,其毛细管电泳分离谱图见图 5b。

3 结语

本研究中采用双模对接的方法获得了超高电压。在 $40\ \text{kV}$ 的超高电压下,以纯电解质硼砂水溶液($\text{pH}\ 8.8$)为流动相,实现了蔬菜中通常含有的 8 种水溶性维生素 VB_1 、 VB_2 、 VB_6 、VC、D-泛酸钙、D-生物素和烟酸、叶酸的快速分离及菠菜样品的定量分析。通过考察电压、缓冲溶液浓度、 pH 值等对分离的影响,确定了优化的实验条件,并在此条件下对标准样品和实际样品进行了分离。结果表明,在高电压下,焦耳热效应得到了有效的控制,菠菜中的水溶性维生素在 $2.2\ \text{min}$ 内得到较好的分离,且定量重现性较好。

参考文献:

- [1] Wan X C. Tea biochemistry. Beijing: Chinese Agricultural Press(宛晓春. 茶叶生物化学. 北京:中国农业出版社), 2003: 347
- [2] Yuan K. Energy metabolize assistant-compound vitamin B. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press(源可. 能量代谢助手——复合维生素 B. 成都:四川科学技术出版社), 1998: 17
- [3] Yuan Y F, Zhen H S, Ou X H. Journal of Anhui Traditional Chinese Medical College(袁叶飞, 甄汉深, 欧贤红. 安徽中医药大学学报), 2006, 25(2): 40
- [4] Chen S H. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis(陈恕华. 理化检验: 化学分册), 2005, 41(7): 519
- [5] Liu C Y, Chen H Z, Chen S B, et al. Journal of Instrumental Analysis(刘春英, 陈华章, 陈时斌, 等. 分析测试学报), 1998, 17(1): 64
- [6] Zheng Y C, Xie D L. Fujian Analysis & Testing(郑玉聪, 谢狄霖. 福建分析测试), 2005, 14(4): 2307
- [7] Shen Y H, Zhang P, Kong X H, et al. Chinese Journal of Chromatography(申烨华, 张萍, 孔祥虹, 等. 色谱), 2005, 23(5): 538
- [8] Jiang Y, Liu H J, Hao X H. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(蒋晔, 刘红菊, 郝晓华. 药物分析杂志), 2005, 25(3): 339
- [9] Wu S J, Zhuang Z H, Zhu M L, et al. Chinese Journal of Chromatography(吴淑君, 庄志辉, 朱孟丽, 等. 色谱), 2006, 24(3): 319
- [10] Wei S L, Deng G H, Zheng Y N. Journal of Instrumental Analysis(韦寿莲, 邓光辉, 郑一宁. 分析测试学报), 2002, 21(2): 32
- [11] Shabangi M, Sutton J A. J Pharm Biomed Anal, 2005, 38: 66
- [12] Fotsing L, Fillet M, Bechet I, et al. J Pharm Biomed Anal, 1997, 15: 1113
- [13] Pan Z W, Li Y Q, Chen Y L, et al. Chinese Journal of Chromatography(潘仲巍, 李玉琴, 陈永雷, 等. 色谱), 2007, 25(4): 594
- [14] You H Y. China Patent(尤慧艳. 中国专利), 01234457. 5. 2003-03-25
- [15] Shi H, Qiu L Y, Jin Y, et al. Chinese Pharmaceutical Journal(施卉, 邱利炎, 金一, 等. 中国药学杂志), 2007, 19(42): 1503
- [16] Si X Y, Tan H R, Gao L P, et al. Journal of Anhui Agricultural Science(司雄元, 檀华蓉, 高丽萍, 等. 安徽农业科学), 2008, 36(3): 849
- [17] Si X Y, Tan H R, Shi T T, et al. Chinese Agricultural Science Bulletin(司雄元, 檀华蓉, 施婷婷, 等. 农业基础科学), 2008, 24(6): 112