

文章编号: 1000-5463(2000)03-0052-04

利用毛细管电泳仪测定 B 族维生素含量 最佳电泳条件的探讨

魏振承 张孝祺 张名位 孙玲 池建伟 徐志宏 张雁

广东省农业科学院农业生物技术研究所 广州 510640

摘要: 探讨毛细管电泳对 B 族维生素的分离分析的最佳电泳条件。结果表明: 胶束电动力学毛细管色谱是分离分析 B 族维生素的一种有效的毛细管电泳操作模式; 不同缓冲液及其 pH 对分离结果影响很大, 100 mmol/L 硼酸钠缓冲液 (pH8.5) 比较适合 B 族维生素的分离分析; 毛细管温度、运行电压对分离也有较大影响。在 35 cm × 50 μm 未涂渍石英毛细管条件下, 采用 pH8.5、附加 50 mmol/L SDS 的 100 mmol/L 硼酸钠缓冲液, 毛细管温度 20℃, 运行电压 5~8 kV, 能将水溶性维生素有效地分离。应用该电泳条件对“们泰其”麦绿宝进行维生素 B₆、烟酸含量测定, 结果表明该测定方法重复性较好, 可以用于维生素的定性定量分析。

关键词: 毛细管电泳; 胶束电动力学; 毛细管色谱; 维生素; 测定

中图分类号: O657.8

文献标识码: A

维生素在人体新陈代谢中起着非常重要的作用。食品中维生素的含量是衡量其营养价值的一个重要指标。常规 B 族维生素测定方法需要进行复杂的样品前处理和化学反应, 费时费力。为了更好地检测食品中 B 族维生素的含量, 筛选出一种快速、简单的 B 族维生素测定方法就显得非常必要。

毛细管电泳 (HPCE) 是 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。毛细管电泳主要有 4 大特点: 高效、快速、微量、自动化, 只须通过改变操作模式和缓冲液的成分等因子, 就可以获得很大的选择性, 可以根据不同的分子性质 (如大小、电荷数、疏水性等) 对极广泛的对象进行有效的分离^[1]。利用毛细管电泳进行维生素分离分析已有个别报道^[2]。本文拟就毛细管电泳法进行 B 族维生素的分离分析的最佳电泳条件作比较深入的探讨, 为以后利用该技术进行食品的 B 族维生素测定打下基础。

1 材料与方 法

1.1 仪器

实验在美国 BioRad BioFocus 3000 毛细管电泳分析仪上进行, 毛细管 35 cm × 50 μm (购自河北永年光导纤维厂), 未涂渍柱。

收稿日期: 2000-02-24

第一作者简介: 魏振承, 男, 助理研究员

1.2 试剂

维生素 B₁、B₆、烟酸、核黄素(维生素 B₂)均为分析纯,用时配成一定浓度的混合液。硼酸,氢氧化钠,十二烷基硫酸钠(SDS)均为分析纯,所用水均为二次去离子水。

1.3 分离条件

采用胶束电动力学毛细管色谱分离方法,缓冲液为不同 pH,添加 50 mmol/L SDS 的硼酸钠溶液。样品室温度 20℃,毛细管温度 20℃~30℃,3psi * sec 压力进样,检测波长 200nm,电极正到负,运行电压 3~10 kV。

1.4 毛细管电泳法测定 B 族维生素含量的重复性试验

选用潮州市生物技术中心提供的“们泰其”麦绿宝进行毛细管电泳法测定维生素含量的重复性试验,具体方法如下:称“们泰其”麦绿宝 10 g,加入 pH8.5 的 10 mmol/L 硼酸钠 200 mL,提取 1 h,过滤。取滤液 30 mL,调 pH 至 8.5,加 SDS 至最终浓度为 50 mmol/L,用 pH8.5 的 10 mmol/L 硼酸钠定容至 50 mL,以此液作为测定液。用二次去离子水配制 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL 维生素 B₆、烟酸标准液,在相同条件下对不同浓度溶液进行多次毛细管电泳,测量其峰面积,然后取其平均值,将峰面积对浓度作图,并计算出回归方程,依此对样品中的维生素含量进行定量测定。

2 结果与分析

2.1 缓冲液及其 pH 对 B 族维生素毛细管电泳分离的影响

实验采用 20 mmol/L KH₂PO₄(pH 分别为 7.0、8.0、9.0、10.0),SDS 浓度为 50 mmol/L,运行电压 10 kV,毛细管温度 20℃,维生素分离效果不理想,而在其它条件相同的情况下,采用 100 mmol/L 硼酸钠缓冲液(pH 分别为 7.0、8.0、8.5、9.0)则能实现维生素的良好分离。因此我们决定采用硼酸钠缓冲液对其它条件进行优化。实验表明:在其它条件相同的情况下,不同 pH 的硼酸钠缓冲液对不同维生素的出峰时间和出峰顺序有很大的影响,从而导致出峰顺序的改变(图 1)。总体来说,pH 越高,出峰时间越滞后。在 pH7.0 时,出峰顺序为维生素 B₆、烟酸、核黄素,维生素 B₁、烟酸与核黄素没有很好分开;在 pH8.0 时,出峰顺序为维生素 B₆、核黄素、烟酸、维生素 B₁,这时核黄素比烟酸先出峰,核黄素与烟酸已经分开;在 pH8.5 时,出峰顺序与 pH8.0 时相同,此时核黄素与烟酸能分开得非常理想;当 pH9.0 时,出峰顺序仍为维生素 B₆、核黄素、烟酸、维生素 B₁,但此时维生素 B₆ 与核黄素已不能理想地分开。

2.2 毛细管温度对 B 族维生素分离的影响

以运行缓冲液为 100 mmol/L 硼酸钠、pH8.5、50 mmol/L SDS,运行电压 5 kV,在不同的毛细管温度(20℃、25℃、30℃)下对分离的影响进行了试验。结果表明:温度越高,出峰越早,出峰时间间隔越小,但温度对出峰顺序没有影响。综合考虑上述结果,温度以 20℃为宜,温度过高,会造成出峰时间间隔过小,但如果温度过低,SDS 会析出。

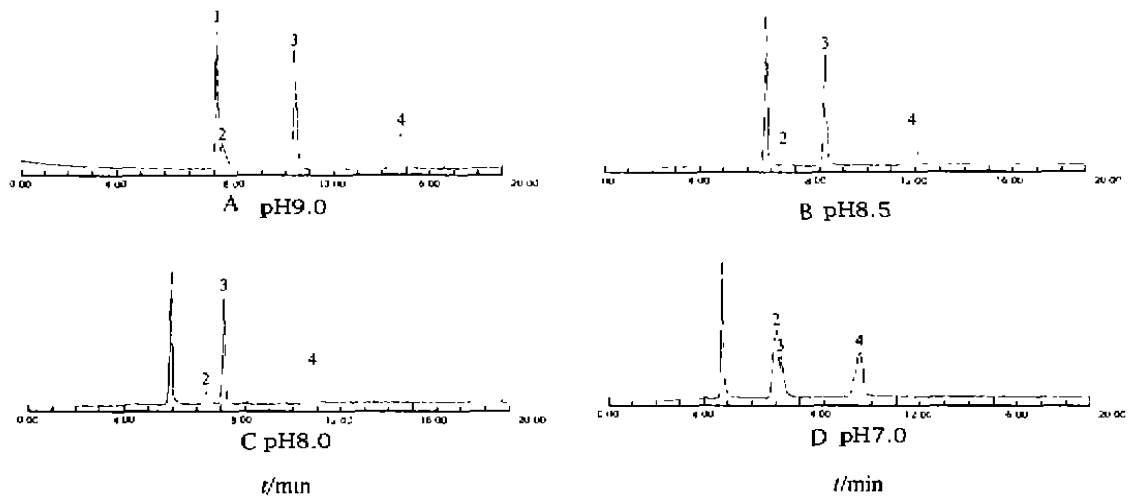


图 1 不同 pH 的硼酸钠缓冲液对维生素毛细管电泳分离效果的影响

Figure 1 The pH effect of sodium borate buffer on vitamin separation by capillary electrophoresis

条件:毛细管柱:35 cm×50 μm,未涂渍柱;缓冲液:100 mmol/L 硼酸钠;进样:3psi * sec;电压:5 kV, (+)→(-);检测:UV,200nm;毛细管温度:20℃;样品:0.1 mg/mL 维生素 B₁、B₆、烟酸、核黄素。

1: 维生素 B₆ Vitamin B₆ 2: 核黄素 Riboflavin 3: 烟酸 Nicotinic acid 4: 维生素 B₁ Vitamin B₁

Conditions: capillary: 35 cm×50 μm, uncoated; buffer: 100 mmol/L sodium borate; injection: 3psi * sec; voltage: 5 kV, (+)→(-); wavelength: UV, 200 nm; capillary temperature: 20℃; sample: 0.1 mg/mL vitamins B₁, B₆, nicotinic acid, riboflavin.

2.3 运行电压对 B 族维生素分离的影响

在 100 mmol/L 硼酸钠缓冲液, pH8.5, 50 mmol/L SDS, 毛细管温度 20℃ 条件下, 不同运行电压对出峰时间有影响, 电压越高, 出峰越早, 但对维生素的出峰顺序没有影响。在运行电压为 10 kV 时, 所有维生素在 7 min 内出峰, 出峰时间间隔也很短; 电压为 8 kV 时, 各种维生素出峰时间延迟, 出峰间隔也增加; 电压为 5 kV 时, 各种维生素在 15 min 内出峰, 时间间隔也比较理想; 当电压为 3 kV 时, 出峰时间过于滞后, 维生素 B₁ 在 20 min 仍没有出峰, 综上所述, 电压为 5~8 kV 时, 各种维生素能得到良好的分离。

2.4 毛细管电泳测定 B 族维生素含量方法的重复性

采用 pH8.5, 添加 50 mmol/L 的 SDS 的 100 mmol/L 硼酸钠缓冲液, 压力进样, 毛细管温度 20℃, 运行电压 8 kV, 200 nm 检测, 对“们泰其”麦绿宝提取液进行毛细管电泳分析。根据麦绿宝测定液中维生素 B₆、烟酸峰的峰面积和其标准溶液的回归方程可以计算出测定液中维生素

表 1 “们泰其”麦绿宝中维生素 B₆ 和烟酸重复测试结果

Table 1 Reproducibility test of vitamins B contents measured by capillary electrophoresis

序号	维生素 B ₆ Vitamin B ₆	烟酸 Nicotinic Acid
1	47.00	5.17
2	46.70	5.25
3	46.74	5.25
4	46.15	5.06
5	46.90	5.15
6	46.34	5.17
7	46.32	5.19
8	46.10	5.06
平均值	46.53	5.16
标准差	0.35	0.07
变异系数	0.74	1.41

的含量,从而得出样品中维生素 B₆、烟酸的含量。8次测定结果及其重复性分析见表 1。从表 1 可以看出,应用毛细管电泳进行维生素含量测定的重复性较好,其变异系数均小于 1.5%。

3 结语

综合以上结果可以看出,利用毛细管电泳技术可以对 B 族维生素进行分离,关键是要选择适合的电泳操作模式,采用适合的缓冲系统,对各种运行条件进行优化。实验表明,采用 MECC 操作模式,以 pH8.5,附加 50 mmol/L 的 SDS 的 100 mmol/L 硼酸钠缓冲液,压力进样,毛细管温度 20℃,200 nm 检测,运行电压 5~8 kV,能对 B 族维生素进行有效的分离。利用毛细管电泳技术进行 B 族维生素含量测定的重复性也较好。与传统电泳相比,毛细管电泳(CE)具有高效、快速、微量、自动化的优势;与高效液相色谱(HPLC)相比,同属液相分离技术,它们遵循不同的分离机理,都有许多的分离模式,因此在很大程度上 CE 与 HPLC 可以互为补充,但从效率、速度、样品用量和成本来说,毛细管电泳都显示了一定的优势。毛细管电泳以出峰时间定性,峰面积定量,可以对食品中的 B 族维生素进行定性定量分析。

参考文献:

- [1] 林炳承著. 毛细管电泳导论[M]. 北京:科学出版社,1996.
- [2] 李关宾,范春生等. 三种维生素的毛细管电泳和胶束电动力学色谱法分离与安培电化学检测[J]. 色谱, 1997, 15(1):65~66.

INVESTIGATION ON ELECTROPHORESIS CONDITIONS OF VITAMINS B SEPARATION BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

WEI Zhen - cheng ZHANG Xiao - qi ZHANG Ming - wei
SUN Ling CHI Jiang - wei XU Zhi - hong ZHANG Yan

Agro - biotechnical Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China

Abstract: Investigation on the electrophoresis conditions of vitamins B separation by capillary electrophoresis showed that Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography (MECC) was a workable operating mode of capillary electrophoresis for vitamins B separation; different electrophoresis buffers and their pH had distinct effects on vitamins B separation, and 100mmol/L sodium borate (pH8.5) was a suitable candidate for electrophoresis buffer. Separation of vitamins B was also affected by the capillary temperatures and voltages. Under the conditions of 35cm × 50μm uncoated capillary, 100 mmol/L sodium borate (pH8.5) with 50mmol/L SDS, capillary temperature 20℃, voltage 5~8kV, vitamins B can be readily separated. The result also showed that the contents of vitamin B₆ and nicotinic acid determined by this method were highly reproducible.

Key words: capillary electrophoresis; micellar eletrokinetic capillary chromatography; MECC; vitamin; measurement

【责任编辑 黄玉萍】