

在线富集毛细管液相色谱法 分析脂溶性维生素和 β -胡萝卜素

王书娟¹, 贾 丽^{*1}, 陈德平²

- (1. 华南师范大学激光生命科学教育部重点实验室, 激光生命科学研究, 广州 510631;
2. 汕头市进出口商品检验检疫局, 汕头 515041)

摘 要: 以硅胶基质 ODS 整体柱为分离柱, 建立了毛细管液相色谱 - 紫外/可见光度法测定脂溶性维生素和 β -胡萝卜素的方法。对流动相组成、流速、样品溶解液和进样体积等参数进行了系统优化, 采用溶剂梯度区带压缩效应作为在线富集技术来提高检测灵敏度。与传统的进样方式相比, 采用溶剂梯度区带压缩在线富集技术时, 在不损失分辨率的前提下, 可通过增大进样体积将脂溶性维生素和 β -胡萝卜素的检测灵敏度提高 34~60 倍。方法可用于检测玉米中的痕量维生素 E。

关键词: 毛细管液相色谱; 在线富集; 脂溶性维生素; β -胡萝卜素

中图分类号: O657.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2009)03-023-04

维生素是维持人和其他动物正常生理功能的一类重要物质。虽然人体只需要微量的维生素就能维持健康, 但缺乏维生素会引起严重的疾病。食物是维生素的主要来源。根据维生素溶解性的不同可将其分为两大类: 水溶性维生素和脂溶性维生素。对脂溶性维生素的检测方法主要有高效液相色谱法^[1~3]、胶束电动色谱法^[4, 5]和电色谱法^[6, 7]。

毛细管液相色谱(CLC)具有流动相和样品消耗低, 环境污染小等优点。但是 CLC 中的主要问题是由进样体积小和柱上紫外检测光程小而引起的检测灵敏度降低。为了提高 CLC 的检测灵敏度, 需要采用样品富集技术。溶剂梯度区带压缩效应是一种柱上富集技术, 该技术把样品溶解在洗脱能力比流动相弱的溶解液中, 在进样过程中样品在柱头富集, 通过大体积进样来提高样品的检测灵敏度^[8, 9]。本文以硅胶基质 ODS 整体柱为分离柱, 以紫外/可见检测器作为检测手段, 以溶剂梯度区带压缩效应作为在线富集方法, 建立了毛细

管液相色谱法来分析痕量的脂溶性维生素和 β -胡萝卜素。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

TriSep2100 pCEC 色谱仪(Unimicro Technologies)配有高压泵, 可变波长的紫外/可见(UV/Vis)检测器, 六通进样阀, 恒比例分流装置和数据采集系统; 硅胶基质 ODS 毛细管整体柱(200 mm $\times$ 0.2 mm i. d.)购自 CL Sciences 公司(Tokyo, 日本); 真空离心浓缩仪(Christ RVC 2-18, Osterode am Harz, 德国); ELGA 超纯水系统(ELGA, 英国)。

维生素 D₂(VD₂), 维生素 E(VE), 维生素 K₁(VK₁), 维生素 A(VA)及 β -胡萝卜素均购自 Sigma 公司(USA); 甲醇, 乙腈及四氢呋喃均为色谱纯, 购自 SK 化学试剂公司(韩国)。

配制样品用的水由 ELGA 超纯水系统提供。所有的溶液在使用前都经过超声脱气并用 0.45 μ m 的滤膜(Sartorius, 德国)过滤。

* 收稿日期: 2008-02-25; 修订日期: 2008-06-02

基金项目: 国家自然科学基金(20575041)、广东省科技厅(2007B020710007)和教育部留学回国启动基金项目资助

作者简介: 王书娟(1983-), 女, 硕士研究生; E-mail: jiali@scnu.edu.cn

1.2 色谱条件

色谱柱为硅胶基质 ODS 毛细管整体柱 (200 mm $\times$ 0.2 mm i. d.); 流动相, 甲醇; 流速, 30 $\mu\text{L}/\text{min}$; UV/Vis 检测, VD_2 和 VE 的检测波长为 290 nm, VK_1 为 250 nm, VA 为 325 nm, β -胡萝卜素为 452 nm; 温度, 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 标准溶液的配制

准确称取一定量的标准品, 维生素标准液用 V(甲醇):V(四氢呋喃) = 50:50 配制, 质量浓度为 1 mg/mL, β -胡萝卜素标准液用四氢呋喃配制, 质量浓度为 0.1 mg/mL。样品标准液储存在棕色玻璃瓶中, 放入 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内备用。

1.4 样品处理

样品处理过程与文献[10]相似。准确称取 120 mg 玉米样品, 放置在 15 mL 的塑料离心管中, 加 4 mL 冰甲醇 (-20 $^{\circ}\text{C}$), 将其混匀后放置在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下静置提取 30 min, 将提取液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 5000 r/min 离心 30 min。取上层清液用 5-kDa-cutoff 的滤膜过滤, 滤液经 30 $^{\circ}\text{C}$ 减压蒸干后, 用 1 mL 甲醇 (1+1) 水溶液溶解, 并用 0.45 μm 的滤膜过滤。

2 结果与讨论

2.1 分离条件的优化

在优化分离条件的过程中, 流动相流速为 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, 以疏脉作为标准物质测出流动相分流后进入分离柱的流速为 2.4 $\mu\text{L}/\text{min}$; 定量环的体积为 1 μL , 样品溶液在分流后实际进入分离柱的样品量为 120 nL; 用甲醇 (1+1) 水溶液稀释维生素和 β -胡萝卜素的标准储备液, 得到脂溶性维生素的浓度分别为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 β -胡萝卜素 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品混合液用于分离条件的优化; VD_2 和 VE 的检测波长为 290 nm, VK_1 的检测波长为 250 nm, VA 为 325 nm, β -胡萝卜素为 452 nm。

2.1.1 流动相的选择 以乙腈作为流动相时, VE, VA, VK_1 和 β -胡萝卜素能够完全分离, 但 VD_2 和 VE 不能基线分离。当用甲醇作流动相时, 4 种脂溶性维生素和 β -胡萝卜素能够在 16 min 内完全分离。以甲醇为流动相时, 所分析物质的保留因子 (k) 分别为: 0.67 (VD_2), 0.83 (VE), 1.63 (VA), 3.05 (VK_1) 及 4.55 (β -胡萝卜素)。实验表明甲醇比较适合 4 种脂溶性维生素和 β -胡萝卜素的分离。

2.1.2 流速的影响 考察了在 15~30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 范围内的流速对分离效果的影响。当总流速为 15, 20, 25, 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时, 流动相分流后进入分离柱的线速度分别为 1.0, 1.3, 1.6, 1.9 mm/s。 VD_2 和 VE 的分离度随着流动相线速度的增加而降低, 从 2.2 降到 1.7。样品分离时间随着流动相线速度的增加而缩短。当线速度是 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时, 分离时间是 11 min。根据流速对分离时间和分离度的影响, 选择流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 进行下面的在线富集实验。

2.2 在线富集

在色谱分离中, 进样量增大一般会引起被分离物质的样品区带扩展, 进而导致分离度降低。但是, 应用在线富集技术时, 进样体积的增加不会导致柱效的降低。在实验中, 我们应用溶剂梯度区带压缩效应作为在线富集技术来提高检测灵敏度。该技术把样品溶解在洗脱能力比流动相弱的溶解液中, 在进样过程中待测物质会在柱头富集即样品区带会被压缩, 因此在一定范围内增大进样体积不会引起谱峰扩展, 从而使样品的检测灵敏度得到提高。

2.2.1 样品溶解液的影响 在定量环体积为 1 μL 的条件下 (分流后实际进样体积为 0.12 μL), 考察了样品溶解液中甲醇浓度对 4 种脂溶性维生素和 β -胡萝卜素分离的影响。图 1 给出了不同样品溶解液对待测物质分离的影响。以甲醇为样品溶解液时, 由于没有溶剂梯度区带压缩效应, 被分离物质的半峰宽最大, 如图 1(a) 所示。用甲醇体积分数高于 50 % 的甲醇水溶液做样品溶解液时, 半峰宽会随着甲醇浓度的减小而减小。甲醇体积分数小于 50 % 后, 甲醇浓度的减小对半峰宽的影响很小, 如图 1(b), 1(c) 所示。实验结果表明样品溶解液中甲醇小于 50 % 时, 4 种脂溶性维生素和 β -胡萝卜素能够得到较好的分离。

2.2.2 进样体积的影响 以甲醇 (1+1) 作为样品溶解液, 当进样体积是 1, 5, 10, 50, 100 μL 时, 分流后实际进入分离柱的样品体积分别为 0.12, 0.6, 1.2, 6, 和 12 μL 。实验结果表明当实际进样品体积在 0.12~12 μL 范围内时, 各待测物质的峰高随进样体积的增加而线性增加。图 2 给出了实际进样品体积为 12 μL 时的标准样品的色谱图。如图 2 和图 1(b) 所示, 由于溶剂梯度区带压缩效应的存在, 进样体积的增加对 VD_2 和 VE 的分离度几

乎没有影响。富集倍数被定义为富集后被分离物质的峰高与富集前的峰高之比。当实际进样品体积为 12 μL 时, 各种物质的富集倍数分别为 34 (VD_2), 51 (VE), 58 (VA), 60 (VK), 59 (β -胡萝卜素)。 VD_2 , VE 和 VA 的富集倍数随着他们的保留因子 (k) 的增加而增加, 而 VA , VK 和 β -胡萝卜素的富集倍数相似。

在实际进样体积 6 μL , 样品溶解液为甲醇 (1 + 1) 的条件下对脂溶性维生素和 β -胡萝卜素进行定量分析。

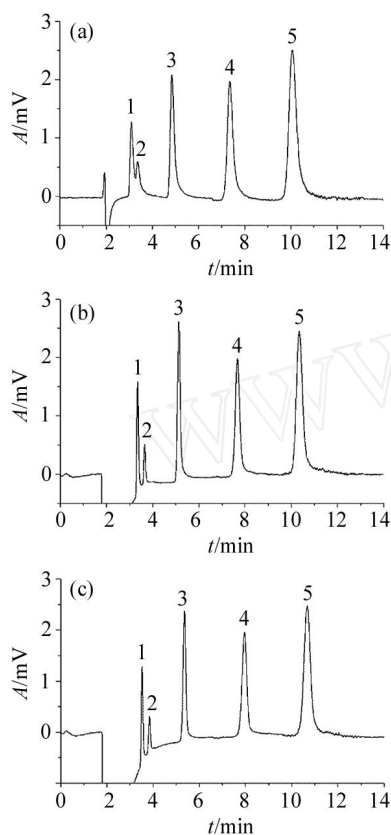


图 1 样品溶解液中甲醇浓度对 4 种脂溶性维生素和 β -胡萝卜素分离的影响

Fig. 1 Effect of the concentration of methanol in sample matrix on separation of four fat-soluble vitamins and β -carotene

(a) 甲醇; (b) 甲醇 (1 + 1); (c) 水

色谱条件: 流动相, 甲醇; 流速, 30 $\mu\text{L}/\text{min}$; 进样体积, 0.12 μL ; 每种脂溶性维生素浓度分别是 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, β -胡萝卜素 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$

1 - VD_2 ; 2 - VE ; 3 - VK ; 4 - VA ; 5 - β -胡萝卜素

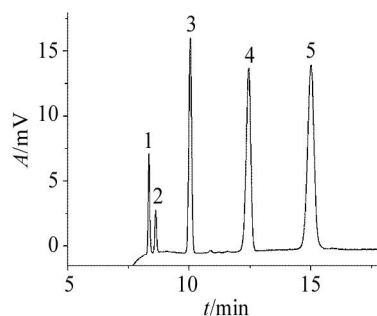


图 2 进样品体积为 12 μL 时的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of the vitamins and β -carotene at the injection volume of 12 μL Conditions

色谱条件: 流动相, 甲醇; 流速, 30 $\mu\text{L}/\text{min}$; 进样体积, 12 μL ; 每种脂溶性维生素浓度分别是 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, β -胡萝卜素 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$

1 - VD_2 ; 2 - VE ; 3 - VK ; 4 - VA ; 5 - β -胡萝卜素

2.3 标准曲线和线性范围

在上述实验条件下对一系列不同浓度的 4 种脂溶性维生素和 β -胡萝卜素进行测定。以峰面积 y 为纵坐标, 质量浓度 ρ 为横坐标作工作曲线。实验结果表明 4 种脂溶性维生素在 0.2~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, β -胡萝卜素在 0.04~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性良好。以信噪比等于 3 为标准, 计算各种脂溶维生素和 β -胡萝卜素的检测限。以各种脂溶性维生素的浓度均为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, β -胡萝卜素为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准混合液为测试液, 连续进样 6 次计算重现性 (迁移时间的 RSD 和峰面积的 RSD)。4 种脂溶性维生素和 β -胡萝卜素的重现性、回归方程及检出限见表 1。4 种脂溶性维生素和 β -胡萝卜素的检出限在 6~30 ng/mL 范围内, 迁移时间的 RSD 值小于 1.2%, 峰面积的 RSD 值小于 6.1%, 线性相关系数在 0.9933~0.9979 范围内。

2.4 玉米样品的分析

在优化的条件下, 对玉米样品进行分析。图 3 是玉米样品和标准样品的对比色谱图。玉米样品中脂溶性维生素和 β -胡萝卜素的确认方法采用以下两种方法: (1) 与对应标准样品的迁移时间对比; (2) 标准加入法。如图 3 所示, 玉米样品中只检测到 VE , 没有检测到其他维生素和 β -胡萝卜素。玉米样品中的 VE 含量为 $4.83 \pm 0.14 \mu\text{g}/\text{g}$ 。将与玉米样品中 VE 浓度接近的 VE 标准品加入到玉米样品中来测定所建立方法的回收率, 测得 VE 的回收率为 $100\% \pm 3.0\%$ 。

表 1 重现性、线性和检出限

Tab. 1 Reproducibility, linearity and detection limit

样品	回归方程 *	相关系数 <i>r</i>	RSD/ % (<i>n</i> = 6)		检出限 (S/N = 3) /(ng/mL)
			迁移时间	峰面积	
VD ₂	$y = 31.3\rho - 3.0$	0.9953	0.9	6.1	10
VE	$y = 10.3\rho - 1.3$	0.9979	1.0	5.0	30
VK ₁	$y = 63.9\rho + 4.5$	0.9933	1.0	2.7	8
VA	$y = 83.8\rho + 7.9$	0.9975	1.2	3.1	7
β胡萝卜素	$y = 127.5\rho - 1.1$	0.9974	1.2	3.4	6

* *y* - 峰面积 (mV/s) ; ρ - 质量浓度 (μg/mL)

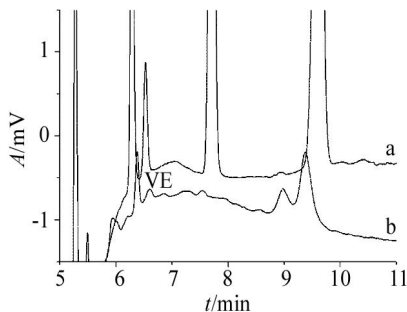


图 3 玉米样品和标准样品的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of the corn sample and the standard mixture

a - 标准样品; b - 玉米样品

色谱条件: 流动相, 甲醇; 流速, 30 μL/min; 进样体积, 6 μL; 标准样品中每种脂溶性维生素浓度分别是 1 μg/mL, β胡萝卜素 0.2 μg/mL

参考文献

[1] Ch áez-Serv í J L , Castellote A L , L ópez-Sabater M C .

J Chromatogr A , 2006 , 1122 (1 - 2) : 138

[2] Klejdus B , Petřlov á J , Pot řil D *et al.* Anal Chim Acta , 2004 , 520 (1 - 2) : 57

[3] Gomis D B , Fern ández M P , Guti érez Alvarez M D. J Chromatogr A , 2000 , 891 (1) : 109

[4] Duong L T H , Kraak J C , Kok W T. J Pharm Biomed Anal , 2000 , 22 (5) : 879

[5] Delgado-Zamarreño M M , González-Maza I , Sánchez-Pérez A *et al.* J Chromatogr A , 2002 , 953 (1 - 2) : 257

[6] Abidi S L , Rennick K A. J Chromatogr A , 2001 , 913 (1 - 2) : 379

[7] Fanali S , Catarcini P , Quaglia M G *et al.* J Pharm Biomed Anal , 2002 , 29 (6) : 973

[8] Takeuchi T , Jin Y , Ishii D. J Chromatogr A , 1985 , 321 : 159

[9] Vissers J P C , De Ru A H , Ursem M *et al.* J Chromatogr A , 1996 , 746 (1) : 1

[10] Jia L , Liu Y , Du Y *et al.* J Chromatogr A , 2007 , 1154 (1 - 2) : 416

Capillary liquid chromatographic determination of fat-soluble vitamins and β-carotene in corns with on-line concentration

WANG Shu-juan¹ , JIA Li^{*1} and CHEN De-ping² (1. Ministry of Education Key Laboratory of Laser Life Science & Institute of Laser Life Science , South China Normal University , Guangzhou 510631 ; 2. Shantou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau , Shantou 515041) , Fenxi Shiyanshi , 2009 , 28 (3) : 23~26

Abstract : A capillary liquid chromatographic method was developed for the simultaneous determination of fat-soluble vitamins and β-carotene , in which UV-Vis spectrometer was used as the detector and a monolithic silica-ODS column as the separation column. The parameters , including mobile phase composition , flow rate , sample matrix and injection volume , were optimized. Solvent gradient zone sharpening effect was utilized as an on-line concentration technique to enhance the detection sensitivity by injection of large volumes of the sample dissolved in a non-eluting solvent without compromising the resolution. Compared with the conventional injection mode , the enhancement in the detection sensitivities of fat-soluble vitamins and β-carotene using the on-line concentration technique was in the range of 34 to 60-fold. The developed method was successfully applied to evaluation of trace amounts of vitamin E in corns.

Keywords : Capillary liquid chromatography ; On-line concentration ; Fat-soluble vitamins ; β-Carotene