

## 모세관전기영동을 이용한 수용성비타민의 분석

최원균·조재선

경희대학교 식품가공학과

### Determination of Water-Soluble Vitamins by Free Solution Capillary Electrophoresis

One-Kyun Choi and Jae-Sun Jo

Department of Food Technology, Kyunghee University

#### Abstract

This study was designed to investigate the method of the simultaneous determination of water-soluble vitamins (thiamine, ascorbic acid, riboflavin, folic acid, cyanocobalamin, pyridoxin, nicotinic acid) by free solution capillary electrophoresis. Factors affecting on the separation were pH of the buffer, applied voltage and temperature. On-column detection at 254 nm allowed accurate and reproducible determination of these compounds. All these compounds were separated within ca. 8 min with fused silica capillary at 20 kV.

Key word: Water-soluble vitamins, free solution capillary electrophoresis

#### 서 론

비타민은 생체의 영양 및 대사에 필요한 인자로 생체에서 생합성이 불가능하여 체외에서 섭취하여야 한다. 비타민은 용해도에 따라 수용성과 지용성으로 나뉘며 대개음식물에서 섭취하거나 결핍예방을 위해 비타민제제로 복용하기도 한다. 일반적인 수용성 비타민의 정량 방법은 전처리 과정이 복잡하고 시간소비가 많으며 동시에 분리되는 조건보다는 비타민을 우수한 성분별로 따로 분리해야만 하는 번거로움이 있었다. 때문에 1980년초부터는 고성능액체크로마토그래피를 이용하여 이온교환수지<sup>(1,2)</sup>, 역상컬럼<sup>(3~6)</sup> 등을 이용하여 2내지 5종류의 수용성비타민을 분리한 보고가 발표되기 시작하였다. 고성능 액체크로마토그래피를 이용하는 것은 분리의 장점이 있기는 하나 유기용매의 사용이 많고, 사용하는 컬럼이 고가이며, 유지비용이 많이 들고 사용하는 유기용매가 독성이 크므로 그 처리과정이 문제시 되고 있으며 gradient를 이용해야 하며 때때로 더 좋은 분리능이 요구된다. 이러한 문제들을 해결해 줄 수 있는 새로운 분석기인 모세관전기영동(CE)은 1979년에 Mikker 등<sup>(7)</sup>이 선보였고 Jorgenson과 Lukac 등<sup>(8)</sup>이 detector 시스템을 만들어 개발하기 시작한 것으로 현재 많은 분석논문들이 발표되고 있다<sup>(9,10)</sup>. CE는 용액 중에서 전기영동

의 문제점인 주울열에 의한 대류현상을 높은 표면적대부피의 비를 갖는 모세관을 사용하여 열을 모세관벽에 확산시킴으로서 문제점을 해결하여 분리능을 거의 이론치에 가깝게 올릴 수 있고 nl정도의 시료로도 분석이 가능하며 고전압을 사용하므로 분리시간을 단축시킬 수 있으며 고성능액체크로마토그래피에서 사용하는 검출기를 사용하여 attomole의 양을 감지할 수 있고 시료주입에서부터 data를 얻기까지 전자동화가 가능한 분석기기이다. CE가 전하를 띤 물질만을 분리할 수 있는 한계점을 Terabe 등<sup>(11)</sup>은 계면활성제를 사용하여 micelle을 형성시키므로서 분자들을 hydrophobicity에 따라 분리해내는 micellar electrokinetic chromatography를 개발하여 중성분자까지도 분석할 수 있게 되었다. 이 방법은 micelle의 농도에 따라 분리시간에 큰 영향을 미치므로 아주 정확하게 조정해야 하며 Sigeru 등과 다른 연구자들<sup>(12~16)</sup>은 이 방법으로 수용성비타민을 분리하였다.

본 연구에서는 micelle을 이용하지 않는 free solution CE로 7 종류의 수용성 비타민을 동시에 신속하게 분리할 수 있는 최적의 분석조건을 검토하였다.

#### 재료 및 실험방법

##### 시약 및 장치

실험에 사용된 비타민 표준물질들 즉 티아민(B<sub>1</sub>), 리보플라빈(B<sub>2</sub>), 니코틴산, 아스코르브산(C), 엽산(folic acid), 피리독신(B<sub>6</sub>), 시아노코발라민(B<sub>12</sub>)은 Merck사 제품 1급 표준시약을 사용하였고 tris와 NaOH는 Beck-

Corresponding author: One-Kyun Choi, RM. #303, Samwon Bldg. 210-1, Nonhyun-Dong, Kangnam-Ku, Seoul 135-010, Korea

man제품을, sodiumphosphate는 기시다화학(주) 1급시약을 사용하였다. 물과 메탄올은 HPLC용으로 J&T Baker 제품을 사용하였다. 모세관은 J&W Scientific사의 fused silica 제품을 사용하였으며 기기는 Beckman Model P/ACE 2000을 사용하였다. 표준용액 및 완충용액의 조제 표준용액은  $B_2$ 은 15% 메탄올에 녹였으며 염산은 running buffer에 녹이고  $B_{12}$ , 니코틴산,  $B_6$ ,  $B_1$ 과 C는 각각 증류수에 150 ppm이 되도록 녹여 갈색병에 넣어 냉장 보관하여 사용하였으며 수용성비타민은 빛과 pH에 민감하여 쉽게 파괴되므로 분석과정중 이점에 주의를 기울였다. 완충용액은 각각 20 mM의 tris와 sodiumphosphate( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )를 제조한 후 일정비율로 혼합하여 pH 6에서 10까지 제조하고 millipore 0.45 um filter로 여과한 후 사용하였다.

### 분석조건

본 실험에 사용된 모세관은 fused silica이며 완충용액은 20 mM의 tris와 sodiumphosphate였고 전압은 15 kV에서 25 V까지 적용하였다. 0.1 M NaOH와 물로 1분간 모세관 내부를 세척하여 모세관내부의 이온들을 고르게 한 후 사용할 완충용액을 1분간 훌려주고 양극 쪽의 모세관 끝에서 시료를 5초간 20 psi로 가압주입한 다음 모세관 양끝을 완충용액에 연결하고 고전압을 걸어주어 시료를 분리하여 음극쪽의 자외선 검출기로 검출하였다. 분리가 끝난 후 완충용액, 0.1 M NaOH, 물의 순서로 다시 세척하였다. 이 과정은 모두 System Gold (Beckman) software에서 control하였다. 이 때 적용한 온도범위는 15~30°C 까지였다.

### 결과 및 고찰

#### 완충용액의 pH가 분리에 미치는 영향

pH를 6에서 10까지 조절하여 분리되는 순서를 조사하였다. 완충용액의 pH변화에 따른 7종의 수용성 비타민의 분리시간은 Fig. 1에 나타내었다. 이 때 적용한 전압은 10 kV였다. pH 6의 완충용액을 사용하였을 경우는 시료간의 stacking현상으로 peak가 서로 겹쳐졌으며 특히 염산, 니코틴산의 peak가 겹쳤으며 이들은 pH 8 이상의 완충용액에서 뚜렷이 분리되었다. 전장내에서 electroosmotic flow<sup>(17)</sup>에 의해서만 이동하는 중성물질인  $B_{12}$ 는 초기에  $B_2$ 와 겹쳤으나 이들은 pH 7 이상에서 곧 분리되었다. Nichi 등<sup>(13)</sup>은 이에 대하여 완충용액과의 phenolic hydroxyl group의 분해정도 때문이라고 발표했다. 양성이온을 띤  $B_1$ 은 Fig. 1에서 보여주듯이 중성비타민보다 더 먼저 분리되었다. 이와는 대조적으로 C나 니코틴산같은 음이온을 가진 비타민은 중성 비타민보다 더 늦게 분리되었다. 이것은 음이온 물질들이 양극쪽에서 전기적으로 음극방향으로 밀려 나오기 때문으로 생각된다. pH 10의 완충용액을 사용하였더니 pH 8이나 9에서 원만한 분리를 나타냈던  $B_6$ 와  $B_{12}$ 의 peak가 가깝게 나

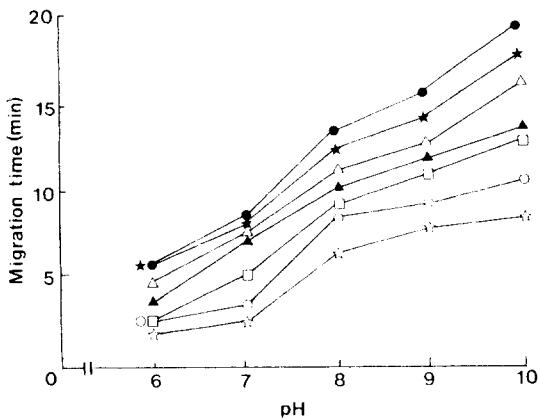


Fig. 1. Effect of pH on the migration time in free solution capillary electrophoresis of vitamin  $B_1$ (☆),  $B_2$ (○),  $B_6$ (▲),  $B_{12}$ (□), C(△), folic acid(★) and nicotinic acid(●)

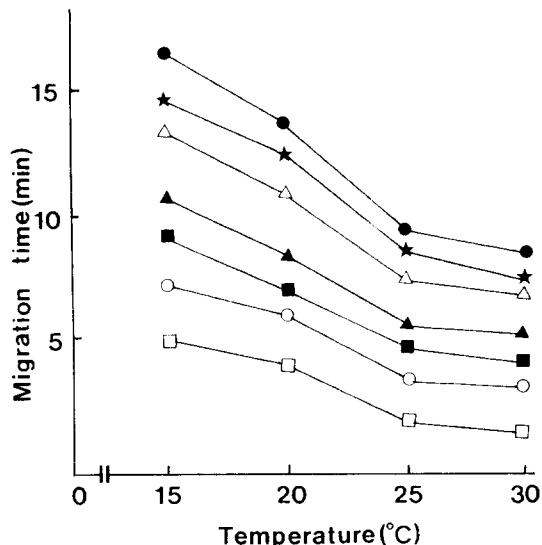


Fig. 2. Effect of temperature on the migration time in free solution capillary electrophoresis of vitamin  $B_1$ (□),  $B_2$ (○),  $B_6$ (▲),  $B_{12}$ (■), C(△), folic acid(★) and nicotinic acid(●)

타나기 시작했으며 이는 비타민의 pKa에 의한 영향때문으로 생각된다.

이 결과에서 완충용액의 pH는 시료의 unit pKa보다 높은가 낮은가를 고려해야하며 비교적 낮은 pH에서는 빨리 이동하나 불완전한 분리를 하게됨을 알 수 있었다. 효과적인 분리가 된 것은 pH 8에서였으며 14분내에 모두 검출되었다. Fujiwara 등<sup>(12)</sup>은 micellar electrokinetic chromatography로 수용성비타민을 분석할 때 최적완충용액의 pH는 9라고 보고하였으며 Fu Xiaoyun 등<sup>(14)</sup>은 6.8이라고 보고 하였는데 이러한 최적 pH의 차이는 완

총용액제조시 pH와 이온강도를 조절해 주는 염의 첨가와 micellar electrokinetic chromatography를 위하여 그들이 사용한 sodiumdodesylsulfate 등의 영향때문인 것으로 생각된다.

#### 모세관의 온도가 분리에 미치는 영향

Joule열의 발생을 항상 고려해야하는 CE를 이용한 정량분석에는 peak의 재현성을 위해서는 정확한 온도조절이 필요하다. 따라서 본 실험에서는 15~30°C 까지 온도를 조절하면서 비타민 분리시간의 변화 및 분리양상을 보았다. 이때 사용한 buffer는 앞의 결과에서 효과적인 분리를 나타냈던 pH 8로 조정하여 사용하였고 10 kV에서

실험하였다. Fig. 2에서 보여주듯이 15°C에서는 분리시간이 17분 걸렸으며 온도가 올라감에 따라 분리시간이 단축되어 30°C에서는 불과 8분 밖에 걸리지 않았다. 온도상승은 완충액과 혼합된 시료의 점도가 감소됨에 따라 electrophoretic mobility가 증가하여 migration velocity가 빨라져 일반적으로 분리시간이 단축되나<sup>(18)</sup> 30°C에서는 단일 peak로 나와야 할 표준물질이 여러번 연속 분리를 시도하면 때때로 여러갈래로 나뉘어지는 경우가 발생하였다. 이것으로 보아 30°C에서는 시료의 변성 때문일 것으로 생각된다. 또한 작은 온도변화에도 분리시간에 큰 차이를 나타내었으므로 항상 정확한 온도에서 시도해야 분리시간이 일정함을 알았다. 실제로 온도의 변화는 분리순서에는 영향을 끼치지 않았으며 peak의 분리도와 분리시간으로 보아 25°C에서 분리하는 것이 적당하다고 판단되었다.

#### 적용한 전압이 분리에 미치는 영향

25°C에서 완충액은 pH 8을 사용하여 분석에 적용한 전압이 수용성 비타민분리에 미치는 영향을 조사하였다 (Fig. 3). 10 kV 적용시 분리시간이 14분이던 것이 더 높은 전압을 적용할수록 시료의 electrophoretic mobility가 빨라져 짧은 시간에 분리되어 25 kV에서는 5.5분에 분리되었다. 낮은 전압에서는 높은 전압에서보다 peak가 완만해지는 일반적인 경향을 보였다<sup>(17)</sup>. 또한 전압의 상승은 분리시간의 단축과 분리능이 높아져 이론단수가 높아지지만 20 kV보다 더 높은 전압에서는 더 향상되지는 않았다. Xiaoyun 등<sup>(14)</sup>은 12.4 kV에서 7종의 비타민을 15분에 분리하였다고 발표하였는데 이것은 사용한 buffer의 차이로 인한 즉, Ohm의 법칙에 근거한 일정 buffer에서 전압과 전류의 상관관계를 나타내주는 그래프상에서 Joule열에 의한 직선에서의 편차정도 때문인 것으로 생각된다. 또한 Fujiwara 등<sup>(12)</sup>은 전압대신 전류를

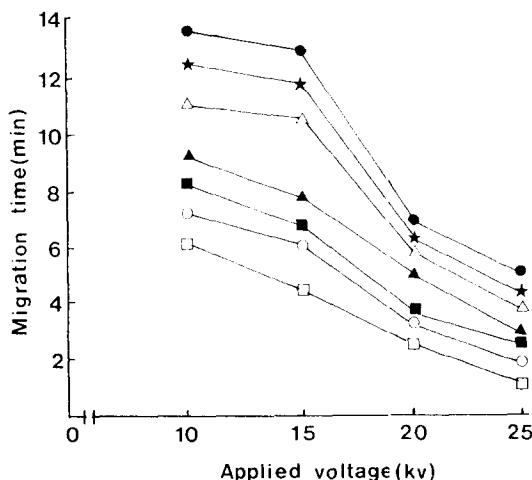


Fig. 3. Effect of applied voltage on the migration time in free solution capillary electrophoresis of B<sub>1</sub>(□), B<sub>2</sub>(○), B<sub>6</sub>(▲), B<sub>12</sub>(■), C(△), folic acid(△) and nicotinic acid(●)

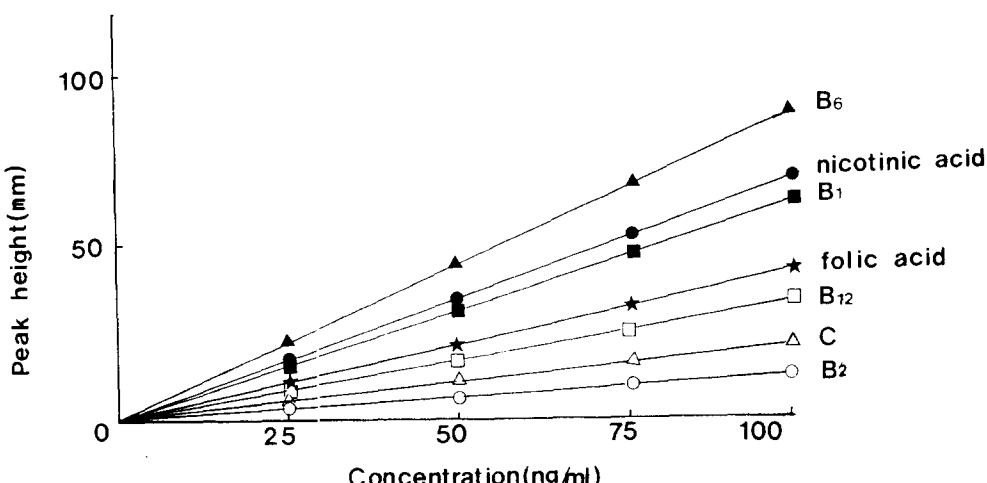


Fig. 4. Linearity study of B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, folic acid and nicotinic acid

**Table 1. Reproducibility of migration time and peak area of water soluble vitamins in CE**

Vitamin	Migration time(min)
	Mean± Standard deviation(CV, %)
Thiamin	2.32± 0.01(0.4)
Riboflavin	3.14± 0.03(1.0)
Cyanocobalamin	3.61± 0.03(0.8)
Pyridoxin	4.81± 0.06(1.2)
Ascorbic acid	6.27± 0.05(0.8)
Folic acid	6.84± 0.06(0.9)
Nicotinic acid	7.27± 0.10(1.4)

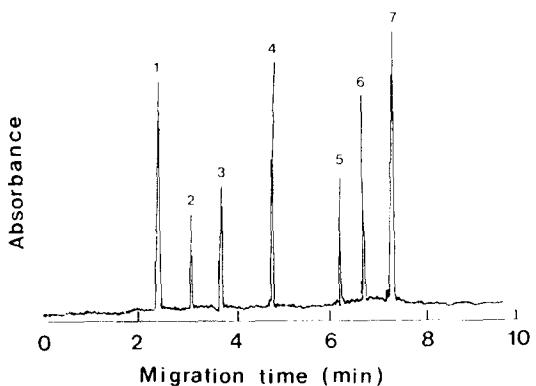
고정하여 분리한 보고도 있다. 이것은 이들이 사용한 micellar electrokinetic chromatography 법에 사용되는 sodiumdodesylsulfate가 전압고정시 전류의 일정함을 때로 방해하기 때문으로 생각된다.

#### 정량분석

각 vitamin 표준물질을 농도별로 제조하여 분리한 결과로 피크높이를 측정하고 Fig. 4와 같은 직선형의 정량곡선을 얻었다. 분리조건은 앞의 실험결과를 토대로 tris와 sodiumphosphate buffer를 pH를 8.0로 조정하여 사용하였으며 온도는 25°C로 분리에 적용한 전압은 20 kV로 하였다. 또한 peak의 재현성을 측정하기 위해 5회 주입하여 peak의 평균 migration time과 표준편차, 그리고 상관계수(CV)를 계산하였다(Table 1). 표준편차의 값은 0.01~0.1의 범위였으며 평균 CV는 0.9였다. 결과로 보아 좋은 재현성을 나타내주고 있음을 알 수 있었다. 이때 electrophorogram은 Fig. 5에 나타난 것과 같이 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub>, C, 염산 그리고 니코틴산의 순으로 분리되었다. 이것은 다른 연구자<sup>(12~16)</sup>들의 보고와 분리순서가 다소 차이가 있는데 그 까닭은 그들이 buffer에 음이온성 계면활성제를 첨가하여 free solution이 아닌 micellar electrokinetic capillary chromatography법을 사용하였기 때문이다. 또한 이들의 분리시간이 약 15분~20분 정도 소요되었으며 본 실험에서는 8분가량 소요되므로서 본 방법에 의한 분석속도가 두배 정도 빠른 것으로 나타났으며 분리도면에서는 큰 차이가 없었다. 그러므로 본 연구에서 본 바와 같이 수용성 비타민의 분석에는 free solution CE가 매우 효과적임이 밝혀졌다.

#### 요 약

7종의 수용성 비타민 즉, 티아민, 리보플라빈, 피리독신, 시아노코발라민, 아스코르브산, 염산, 니코틴산을 free solution capillary electrophoresis로 정량분석하였다. 최적 분리조건 설정을 위해 완충용액의 pH, 모세관의 온도 그리고 적용한 전압에 대해 실험한 결과 완충용액의 pH는 6에서는 겹치는 peak가 있었으며 pH 8에서는 최



**Fig. 5. Electropherogram of water-soluble vitamins**  
Peaks: 1-B<sub>1</sub>, 2-B<sub>2</sub>, 3-B<sub>12</sub>, 4-B<sub>6</sub>, 5-C, 6-folic acid, 7-nicotinic acid

적의 분리를 보여주었고 pH가 더 올라갈수록 분리도는 저하되었다. 모세관의 온도와 적용한 전압은 둘 다 높아질수록 분리시간은 단축되었으며 온도 25°C, 전압 20 kV에서 최적분리능을 보여주었고 그 이상의 각 조건에서는 두 경우 모두 분리능이 저하되었다. 앞의 최적조건에서 수용성비타민은 8분내에 분리되었으며 각 peak의 migration time의 편차는 0.01~0.1분(CV : 0.9%)이었다.

#### 문 헌

- Tryfiates, G.P. and Sattsangi, S.: Separation of vitamin B<sub>6</sub> compounds by ion-paired high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 227, 181(1982)
- Morrison, L.A. and Driskell, J.A.: Quantities of B<sub>6</sub> vitamins in human milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 337, 249(1985)
- Vanderslice, J.T. and Higgs, D.J.: HPLC analysis with fluorometric detection of vitamin C in food samples. *J. Chromatogr. Sci.*, 22, 485(1984)
- Wimalasiri, P. and Wills, R.B.H.: Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 318, 412(1985)
- Fellman, J.K., Artz, W.E., Tassinari, P.D., Cole, C.L. and Augustin, J.: Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.*, 47, 2048 (1982)
- Lam, F., Holcomb, I.J. and Fusari, S.A.: Liquid chromatographic assay of ascorbic acid, niacinamide, pyridoxin, thiamin, riboflavin in multivitamin mineral preparations. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67, 1007(1984)
- Mikker, F.E.P., Everaerts, F.M. and Verheggen, T.P.E. M.: High performance zone electrophoresis. *J. Chromatogr.*, 169, 11(1979)
- Jorgenson, J.W. and Lukacs, K.D.: Zone electrophoresis in open tubular glass capillaries. *Anal. Chem.*, 53, 1298(1981)
- Gordon, M.J., Huang, X., Pentoney, S.L., Jr. and Zare,

- R.N.: Capillary electrophoresis. *Science*, **242**, 224(1988)
10. Jorgenson, J.W.: High performance capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.*, **559**, 1(1991)
11. Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A. and Ando, T.: Electrokinetic separations with micellar solutions and opentubular capillaries. *Anal. Chem.*, **56**, 111(1984)
12. Fujiwara, S., Iwase, S. and Honda, S.: Analysis of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr.*, **447**, 133(1988)
13. Nishi, H., Tsumagari, N. and Kakimoto, T. and Terabe, S.: Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr.*, **465**, 331(1989)
14. Fu, Xiaoyun, Lu Jiande, Yan Lijun: Separation of some drugs by capillary electrohoresis. *Chinese J. Anal. Chem.*, **20**, 524(1992)
15. Burton, D.E. and Sepaniak, M.J., Maskarinec, M.P.: Analysis of B<sub>6</sub> vitamer by micellar electrokinetic capillary chromatography with laser-excited fluorescence detection. *J. Chromatographic Science*, **24**, 347(1986)
16. Lambert, D., Adjalla, C., Felden, F., Benhayoun, S., Nicolas, J.P. and Gueant, J.L.: Identification of vitamin B<sub>12</sub> and analogues by high performance capillary electrohoresis and comparison with high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **608**, 311(1992)
17. Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D.: Capillary electrophoresis. *Science*, **222**, 268(1983)
18. Jones Eli Grushka, A.E.: Nature of temperature gradients in capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.*, **466**, 219(1989)

---

(1993년 10월 2일 접수)