

反相离子对色谱法同时 测定饲料中多种水溶性维生素

戴 军 程红专 王德和

(中央研究设计所)

摘要 本文首次提出一种简便、快速地同时测定配合饲料中多种水溶性维生素的反相离子对HPLC方法。此方法用合适的波长和灵敏度程序检测,以抑制和排除杂质峰的干扰;在样品预处理上,采取特殊措施以防止维生素的分解,减少杂质含量。

关键词 多种水溶性维生素;配合饲料;离子对色谱;程序检测

0 前 言

近年来,国外有人试用HPLC同时分离测定多种水溶性维生素^[1-5],但一般局限于药物分析;关于饲料这种比较复杂的体系中多种水溶性维生素的同时分析测定,国内外都未见报道。本文参考国外方法,针对饲料的具体情况,使用反相离子对色谱技术,编制合适的波长和灵敏度程序检测,来抑制和排除杂质峰的干扰,提高维生素响应值,并在样品预处理上,采取特殊措施以防止维生素的分解,减少杂质含量,从而成功地对预混合饲料中5种水溶性维生素进行了一次性同时分离和定量测定,用此方法研究不同工艺条件下饲料中各种维生素在生产贮存过程中的稳定性问题,取得较好的效果。此法比单个测定维生素省时、省力、省费用。

1 实验方法

仪器 Waters209型高压液相色谱仪。

试剂 皆A·R级(国产或进口)。

缓冲溶液(pH3.6) 在超纯水中加入适量的冰醋酸、三乙胺配制。

标准溶液 精确称取烟酸20—120mg,盐酸吡哆醇1—15mg,硝基硫胺素2—15mg,核黄素2—32mg,转入500ml棕色容量瓶中,加入10ml α -硫代甘油,400ml缓冲液,超声振荡30min,加入75ml甲醇,混匀,再用缓冲液稀释至刻度,作贮备液存冰箱中。

开机时,精确称取2—15mg抗坏血酸,转入100ml棕色容量瓶中,用上述贮备液稀释至刻度,再用0.45 μ 微孔膜过滤。

样品处理 准确称取样品10g左右,放入棕色广口瓶中,加入4.0ml冰醋酸和6.0ml α -硫代甘油,再加200.0ml缓冲液,强力搅拌30min,再加0.85g铜铁试剂,搅拌10min,静置1—1.5h,离心,取上清液用0.45 μ 微孔膜过滤。

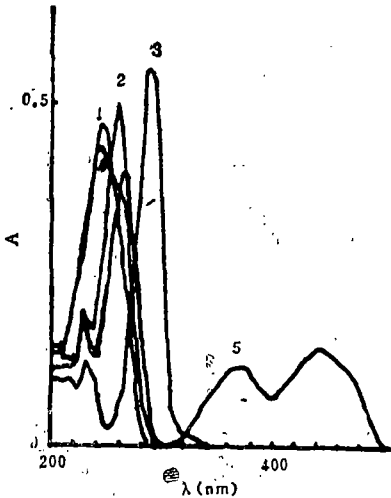
检测程序 我们测得5种水溶性维生素的紫外吸收曲线如图1所示。考虑到避免饲料样品中杂质的紫外吸收干扰,经试验得到最佳检测波长和灵敏度程序为:

0min $\xrightarrow[0.5\text{AuFs}]{254\text{nm}}$ 6min $\xrightarrow[0.05\text{AuFs}]{290\text{nm}}$
8.5min $\xrightarrow[0.05\text{AuFs}]{245\text{nm}}$
18min $\xrightarrow[0.05\text{AuFs}]{444\text{nm}}$ 27 min

色谱条件 色谱柱u Bondapak C₁₈ $\phi 3.9\text{mm} \times 30\text{cm}$ (Waters)流动相:经多种条件试验,得到最佳流动相组成为:甲醇:水=15:85(v/v)并含0.005mol/l庚烷磺酸钠,0.5%三乙胺,50mg/l的EDTA, pH=3.6(用冰醋酸和三乙胺调节)

流速: $\xrightarrow[0']{0.8\text{ml/min}}$ $\xrightarrow[17']{1.1\text{ml/min}}$ $\xrightarrow[21']{27'}$ $\xrightarrow[31']{0.8\text{ml/min}}$

积分仪衰减:1024纸速:5min/cm柱温:28℃(室温)



1—V-c 2—Vpp; 3 V-B6
4—V-B₁ 5—V-B₂

图1 5种维生素在流动相中的紫外吸收曲线

表1 各种维生素的线性回归方程

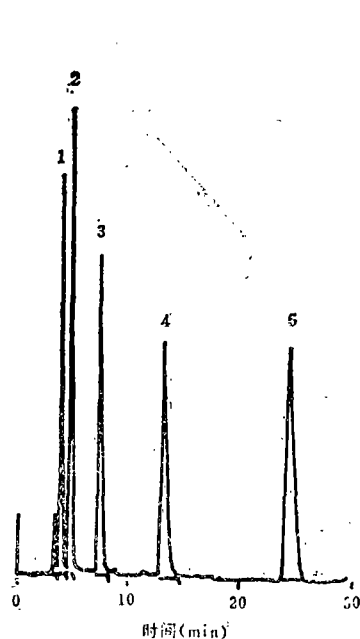
抗坏血酸 (V-C)	峰高(X)	107.479	226.713	377.512	510.099	644.905
	含量y(μg/ml)	26.64	53.28	79.92	106.56	133.2
	回归方程	$y = 0.19596x + 6.76091$				$r = 0.99954$
烟 酸 (Vpp)	峰高(X)	211.045	330.859	481.589	605.873	754.385
	含量y(μg/ml)	44.2	88.4	132.6	176.8	221
	回归方程	$y = 0.32418x - 21.95132$				$r = 0.99935$
酸盐吡哆醇 (V-B ₆)	峰高(X)	112.624	217.713	314.814	402.462	522.134
	含量y(μg/ml)	5.36	10.72	16.08	21.44	26.8
	回归方程	$y = 0.05329x - 0.64894$				$r = 0.99894$
硝基磺胺素 (V-B ₁)	峰高(X)	78.638	146.942	221.744	297.609	383.436
	含量y(μg/ml)	5.16	10.32	15.48	20.64	25.8
	回归方程	$y = 0.06776x + 0.18897$				$r = 0.99916$
核 黄 素 (V-B ₂)	峰高(X)	77.200	149.148	229.909	305.580	381.536
	含量y(μg/ml)	12.28	24.56	36.84	49.12	61.4
	回归方程	$y = 0.16046x + 0.14576$				$r = 0.99989$

2 结果与讨论

2.1 标准曲线和回收率试验

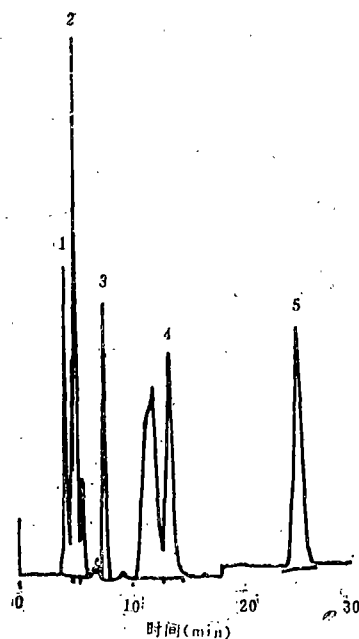
根据本饲料研究课题中维生素的强化量范围, 配制 5 个不同浓度的混合标样系列, 测得此标准曲线的一元回归方程于表(1)。

由外标法测得 6 种不同预混合饲料样品中 5 种维生素的平均回收率及变异系数于表(2), 混合标样和饲料样品色谱分离图分别见图 2 和图 3。



1 — V-C; 2 — Vpp; 3 — V-B₆;
4 — V-B₁₂; 5 — V-B₂

图 2 混合标样色谱分离图



1 — V-C 2 — Vpp; 3 — V-B₆
4 — V-B₁₂; 5 — V-B₂

图 3 饲料样品色谱分离图

表2 本法测定预混饲料中维生素的回收率及变异系数

维生素名	抗坏血酸	烟 酸	盐酸吡哆醇	硝基硫胺素	核黄素
平均回收率(%)	96.3	97.8	99.1	98.9	96.8
变异系数 (%)	4.9	4.5	3.8	3.4	10.0

2.2 其他样品的测定效果

本方法曾用于测定全价配合饲料和籽粒苋婴儿食品^[1]中多种水溶性维生素, 效果皆可, 只需在样品预处理和紫外检测程序上略加改变即行。

2.3 流动相组成对保留值和分离的影响

试验得知, 流动相组成在上述配比条件下(见实验方法)分离效果最佳。若在其他条件不变的情况下, 再增大三乙胺(作为调节剂)或甲醇的浓度, 维生素的保留时间都不同程度的变小, 部分峰重迭; 反之, 则使保留时间不同程度地变大, 分离也不理想。反离子试剂庚磺酸钠的最佳浓度为 0.005 mol/l 左右, 若较大偏离(增大或减小)此浓度, 保留时间都减小, 分离变差。反离子浓度增大引起保留值减小这一现象, 用一般离子对色谱的机理难以解释, 这可能

是因为反离子浓度达到一定值时, 离子对在流动相中的溶解度增大, 使原有的分配过程发生变化, 维生素的容量因子 K 值反而降低的缘故。另外, 降低pH值, 可提高维生素的稳定性, 但使保留时间都减小, 分离较差; 然而pH降至3.2时, 保留值又都稍有增大趋势。

2.4 α -硫代甘油和铜铁试剂对定量的影响

样品处理中, 添加一定量的 α -硫代甘油和铜铁试剂(N-亚硝基苯胺), 是为了抗氧化和络合金属元素, 以防止维生素的分解。若两者用量太少, 会使V-C回收率偏低, V-C峰前易产生较大的杂质峰而干扰V-C测定。

致 谢

本文承蒙本院饲料教研室刘当慧教授的审阅和指教, 谨表谢意。

参 考 文 献

- 1 Wills R B H, Shaw C G, & Schmit J A. J Chromatogr Sci, 1973; 15: 262—266
- 2 Tomlinson E, Jefferies T M, & Riley C M. J Chromatogr, 1978; 159: 315—318
- 3 Waters Associates Separation News, 1979; 3
- 4 Vandemark F L and Schmidt G J. J Liquid Chromatogr, 1981; 4(7): 1157
- 5 Fuk-Luen Lam Iraj Holcomb, and Salvatorea. Fusari J Assoc off Anal Chem, 1984; 67, 5

Simultaneous Determination of Water-Soluble Multivitamin in Feed by Reversed Phase Ion-pair Chromatography

Dai Jun Cheng Hongzhuan Wang Dehe

(Centre Institute)

Abstract This paper reports a simple and rapid methos of simultaneous determination of water-soluble multivitamins in formula feed by HPLC. A programmable multiwavelength detector is used to change both wavelength and sensitivity of detection automatically in order to optimize the detection of each vitamin. Specific procedure of sample preparation is made to protect vitamins against decomposition and to decrease interference from impurities.

Keywords Water-soluble multivitamin; Formula feed; Ion-pair chromatography; Programmable detection