

# 饲料添加剂中维生素 E 和维生素 B<sub>6</sub> 的反相液相色谱测定<sup>①</sup>

陈 翠 莲

(漳州大学食品化工系 漳州 363000)

袁东星 郑春阳

(厦门大学环境科学研究中心 厦门 361005)

**摘要** 采用反相高效液相色谱测定饲料添加剂中维生素 E 和维生素 B<sub>6</sub>。采用甲醇萃取维生素 E,回收率达 85%。方法重现性好,步骤简单,分析速度快。

**关键词** 维生素 E, 维生素 B<sub>6</sub>, 饲料添加剂, 反相色谱测定

**中国图书分类号** O 657. 8

维生素 E(V-E)、维生素 B<sub>6</sub>(V-B<sub>6</sub>)均为动物体所必须的维生素,饲料中添加 V-E和 V-B<sub>6</sub>,可以对动物强化补充这两种维生素。V-E属脂溶性维生素,目前,饲料添加剂中 V-E的常规分析方法有比色法<sup>[1]</sup>和荧光测定法<sup>[2]</sup>,样品均须皂化处理。采用比色法测定 V-E时,用乙醚提取 V-E,用显色剂显色,再进行比色测定。采用荧光法测定 V-E时,用正己烷溶解不皂化物,荧光测定 V-E的正己烷溶液。这两种测定方法的前处理麻烦,所用试剂种类繁多。近年来,已有用正相色谱<sup>[3]</sup>或反相色谱<sup>[4]</sup>进行 V-E的分离检测的,但仍需较为复杂的样品萃取、净化等处理步骤。C. Genestar<sup>[5]</sup>等人报道了用甲醇萃取药物中的 V-E,曹冶<sup>[6]</sup>报道了采用酶和混合溶剂萃取复合维生素的方法,两人均未报告萃取的回收率。本研究直接用甲醇萃取饲料添加剂中的 V-E,并用反相高效液相色谱法进行测定,整个实验只需一种试剂,步骤简单,实验结果表明,方法可行。

V-B<sub>6</sub>是水溶性维生素,经典的测定方法是荧光分析法<sup>[7]</sup>。方法复杂,分析时间长,所用试剂繁多,且氰化钾剧毒。本文探索了用反相液相色谱定量测定的方法,步骤简单,分析速度快。

## 1 实 验

### 1) 仪器与试剂

HPLC Waters 510泵、Waters U6K进样器、Micropak MCH-5 15 cm× 4 mm 色谱柱、Waters 484紫外可见分光光度检测器、上海大华仪表厂自动台式平衡记录仪、磁力搅拌器;高速离心机;微量注射器;超声波发生器等。

甲醇(HPLC级,使用前经 0.45 μm 膜过滤),磷酸氢二钾和磷酸二氢钾(均为分析纯),V-

<sup>①</sup> 本文 1997-09-03收到

E参照样品为由厦门鱼肝油厂提供的标示量 62.5% 的 V-E原油, V-B<sub>6</sub> 为美国 Chem Service 公司的产品,二次去离子水.

饲料添加剂来自厦门华鼎动物保健品公司,粒度为 80~100目.

### 2) 实验步骤

V-E样品的制备:准确称取 200 mg 样品于 100 mL 烧杯中,加入约 40 mL 甲醇,上盖一表面皿,外罩一暗色纸罩,用磁力搅拌器搅拌一定时间后,转移入 50 mL 容量瓶并用甲醇定容.溶液经离心机离心、过滤后备用.

V-B<sub>6</sub>样品的制备:准确称取 100 mg 样品,用水溶解后转移入 50 mL 容量瓶并稀释至刻度.若有不溶物,则离心过滤后备用.

HPLC条件:流动相为甲醇-水及缓冲溶液;流速为 1 mL/min;检测波长为 284 nm(测 V-E) 或 254 nm(测 V-B<sub>6</sub>).

## 2 结果与讨论

### 2.1 V-E的测定

V-E的甲醇溶液在 284 nm 有最大吸收峰,本工作采用反相液相色谱分离出饲料添加剂中的 V-E,以紫外检测器在 284 nm 处检测.

1) 萃取时间的选择 试验了不同的萃取时间对测定的影响,发现搅拌器的搅拌时间 1 h、2 h 或 3 h 对 V-E 含量的测定并无太大影响,但倘若能预先用甲醇将样品浸泡 3 h,则可获得较佳的萃取效率.本试验采用先浸泡 3 h,再搅拌 1 h 的方法.回收率为 85%,工作曲线的 R<sup>2</sup> 值均为 0.99 以上.

2) 样品测试 样品测试采用标准加入法,流动相选用 100% 甲醇,容量因子为 4.42.在不同的日子里,对同一添加剂样品进行 3 次测定,结果分别为 38.6%, 37.2% 和 38.5%.相对标准偏差为 2.0%,结果令人满意.

### 2.2 V-B<sub>6</sub>的测定

V-B<sub>6</sub>溶液在 254 nm 有最大吸收峰,本工作采用反相液相色谱分离出饲料添加剂中的 V-B<sub>6</sub>,以紫外检测器在 254 nm 处检测.

1) 流动相甲醇浓度选择 A 泵输入 100% 甲醇, B 泵输入 10% (V/V) 甲醇-水溶液,通过调节两泵流量比以调节流动相中甲醇的浓度.以 V-B<sub>6</sub> 标样为试验样品,测得不同流动相中的容量因子  $k'$ , 列于表 1. 实验结果表明, 28% (V/V) 的甲醇溶液为流动相时,可以得到较好的峰形和合适的保留时间.

表 1 流动相中甲醇浓度对 V-B<sub>6</sub> 容量因子  $k'$  的影响

Tab. 1 The effect of methanol concentration in mobile phase on  $k'$  of V-B<sub>6</sub>

甲醇浓度 (% , V/V)	82	64	55	46	37	28	19	10
容量因子 $k'$	0.617	0.733	0.933	1.23	1.60	2.19	2.55	6.35

2) 流动相 pH 值对色谱峰形和出峰时间的影响 保持流动相中甲醇浓度为 28% (V/V), 使磷酸盐的浓度为 0.04 mol/L, 改变磷酸一氢钾和磷酸二氢钾的量, 以调节溶液的 pH 值分别

为 4.7, 6.3, 7.1, 8.0 等。实验发现, 在所试验的 pH 范围内, 色谱峰形和出峰时间基本无变化。

3) 离子浓度对色谱峰形和出峰时间的影响 保持流动相的甲醇浓度为 28% (V/V), pH 为 7.1, 变化磷酸盐总浓度。实验发现, 随着磷酸盐浓度的增大, 出峰时间略有减小, 但变化不大。观察色谱峰形, 发现磷酸盐浓度高即离子强度大时, 峰形锐, 拖尾小。

4) 样品测试 样品测试采用标准工作曲线法。流动相选用 28% 甲醇 (V/V), 0.06 mol/L 磷酸氢二钾溶液, pH 值为 7.1。所测容量因子为 2.18。工作曲线的  $R^2$  值均达到 0.999 以上。同一样品在不同日子的两次测定结果, 分别为 82.5% 和 83.0%。

### 3 结 语

本研究工作采用反相高效液相色谱法测定饲料添加剂中 V-E 和 V-B<sub>6</sub>, 前处理简单, 所使用的药品普通易得, 分析结果的重现性好, 结果满意。

### 参 考 文 献

- 1 梁冬生, 张辉. 预混合饲料中维生素 E 的测定, 第一法 比色法, 饲料添加剂分析手册. 北京: 国家饲料质量监督中心, 1994 178~ 179
- 2 梁冬生, 张辉. 预混合饲料中维生素 E 的测定, 第二法 荧光分析法, 饲料添加剂分析手册. 北京: 国家饲料质量监督中心, 1994 179~ 181
- 3 梁冬生, 张辉. 预混合饲料中维生素 A 和维生素 E 的测定方法, 饲料添加剂分析手册. 北京: 国家饲料质量监督中心, 1994 186~ 188
- 4 梁冬生, 张辉. 预混合饲料中维生素 A D E 的测定, 第一法 直接提取反相色谱法, 饲料添加剂分析手册. 北京: 国家饲料质量监督中心, 1994 184~ 186
- 5 Genestar C, Grases F. Determination of vitamin A in pharmaceutical preparation by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Chromatographia*, 1995, 40 143~ 146
- 6 曹治. 高效液相色谱仪快速测定复合维生素的方法研究. *中国饲料*, 1997, 8 35~ 37
- 7 梁冬生, 张辉. 预混合饲料中维生素 B<sub>6</sub> 测定, 饲料添加剂分析手册. 北京: 国家饲料质量监督中心, 1994 193~ 196

## Determination of Vitamin E and Vitamin B<sub>6</sub> in Feed Additives with High Performance Liquid Chromatography

Chen Cuilian

(Dept. of Food Ind. Chem., Zhangzhou Univ., Zhangzhou 363000)

Yuan Dongxing Zheng Chunyang

(Environ Sci. Res. Cent., Xiamen Univ., Xiamen 361005)

**Abstract** A method of determination of Vitamin E and Vitamin B<sub>6</sub> in feed additives with reversed phase HPLC has been developed. Methanol is used to extract Vitamin E directly with the recovery of 85%. The method is simple, fast, and reproducible.

**Key words** Vitamin E, Vitamin B<sub>6</sub>, Feed additive, Reversed phase HPLC