

饲料中维生素 B₁₂ 测定的系统适应性

裴波

(安徽皖仪科技股份有限公司, 安徽 合肥 230088)

摘要: 本案例以正磷酸溶液和乙腈为流动相, 使用 C18 色谱柱进行分离, 使用超高效液相色谱, 利用紫外检测器检测饲料中维生素 B₁₂。

关键词: 超高效液相色谱法;检测方法;维生素 B₁₂

1 实验目的

验证饲料中维生素 B₁₂ 测定的系统适应性

2 实验原理

试样中维生素 B₁₂ 用水提取, 经高效液相色谱反相柱分离, 其峰面积与维生素 B₁₂ 的含量成正比。

3 实验材料、试剂耗材及仪器设备

3.1 实验材料

湖州阳光饲料有限公司提供的维生素预混饲料。

3.2 试剂耗材

除特殊说明外, 本实验所用的试剂均为分析纯, 水为去离子水。

3.2.1 乙腈: 色谱纯;

3.2.2 正磷酸溶液: 3%的正磷酸水溶液;

3.2.3 25%乙醇溶液;

3.2.4 维生素 B₁₂ 标准溶液

3.2.5 维生素 B₁₂ 标准贮备液: 准确称取 0.1000g 维生素 B₁₂ 标准品, 溶解于 100 乙醇溶液中, 并稀释定容至刻度, 摇匀。该标准贮备液浓度为 1.0mg/mL。

3.2.6 维生素 B₁₂ 标准工作液: 准确吸取维生素 B₁₂ 标准贮备液 (3.2.4.1) 1.0mL 于 50mL 容量瓶中, 用流动相稀释定容至刻度, 摇匀。该标准工作液的浓度为 2.0μg/mL。

3.3 仪器设备

3.3.1 实验室常用玻璃仪器;

3.3.2 超声波清洗机；

3.3.3 高效液相色谱仪：LC3000 增强型，带紫外可调波长检测器；

3.3.4 超纯水装置；

3.3.5 离心机：3000r/min。

4 实验方法及数据分析

4.1 色谱条件：

4.1.1 色谱柱：Ultimate XB-NH₂ ， 4.6mm×250mm， 5μm；

4.1.2 流动相：3%正磷酸水溶液 260mL+乙腈 700ml，混合，过滤；

4.1.3 流速：1.5mL/min；

4.1.4 柱温：30℃；

4.1.5 检测波长：361nm。

4.2 维生素 B₁₂ 的峰位确定

4.2.1 设置好系统的参数，向仪器中注入 20ul 维生素 B₁₂ 标准工作液，记录色谱图，如图 1 所示。

4.2.2 维生素 B₁₂ 标准色谱图

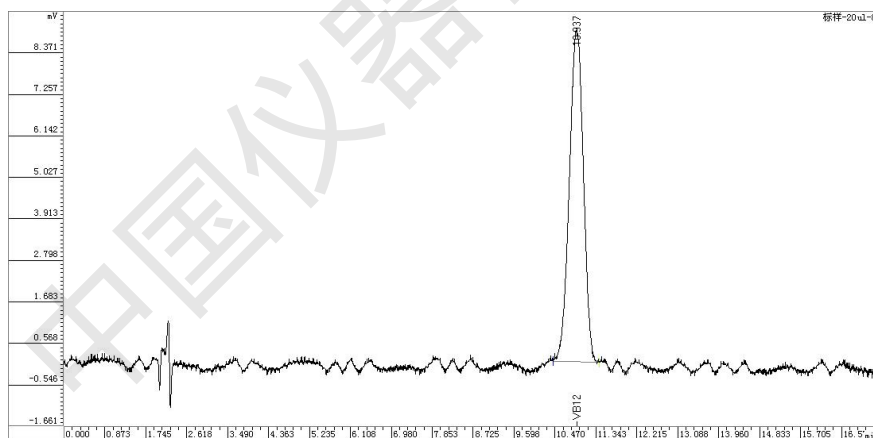


图 1 维生素 B₁₂ 标准色谱图

4.2.3 由上图可知，维生素 B₁₂ 在 4.1 所述色谱条件下，主峰的保留时间为 10.5min 左右。

4.3 定性定量重复性

4.3.1 设置好仪器参数，向其中连续进 4 针维生素 B₁₂ 标准共组液，记录色谱图及报表结果。

4.3.2 色谱图叠加效果及重复性结果。

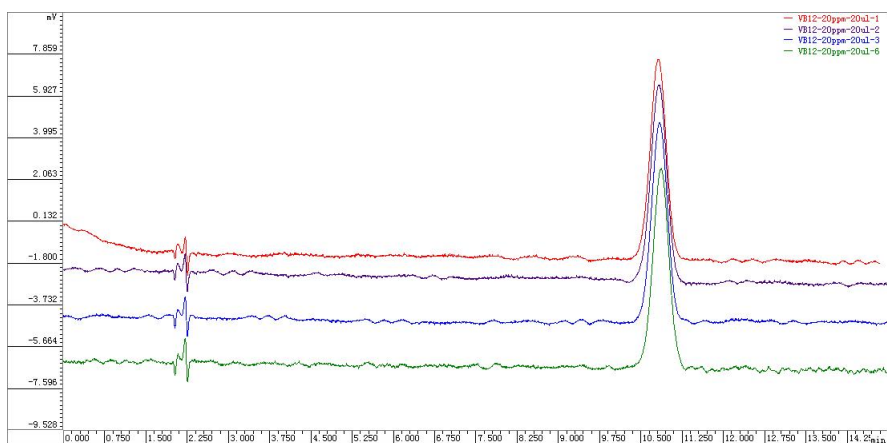


图 2 维生素 B12 谱图叠加

组份	文件名	峰面积	保留时间	峰高
VB12	VB12-20ppm-20ul-1	191827	10.822	9229
VB12	VB12-20ppm-20ul-2	193105	10.824	9147
VB12	VB12-20ppm-20ul-3	192828	10.84	9244
VB12	VB12-20ppm-20ul-6	191607	10.871	9246
	RSD	0.38%	0.21%	0.51%

表 1 维生素 B12 定性定量重复性数据

4.3.3 实验数据表明，四针进样的定性重复性为 0.21%；定量重复性为 0.38%，符合现行标准。

4.4 溶剂对样品峰形的影响

4.4.1 水溶解样品谱图

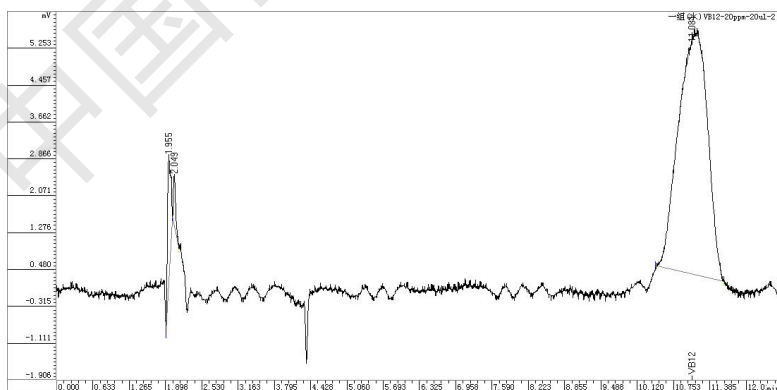


图 3 水溶解样品谱图

4.4.2 流动相溶解样品谱图

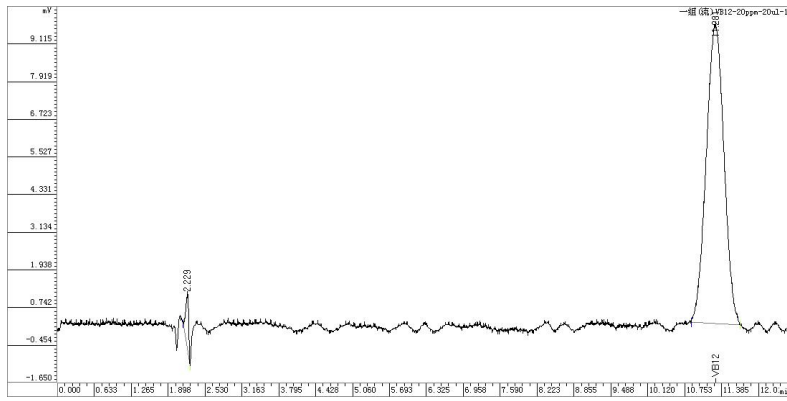


图 4 流动相溶解样品谱图

4.4.3 两种溶剂溶解样品的谱图叠加

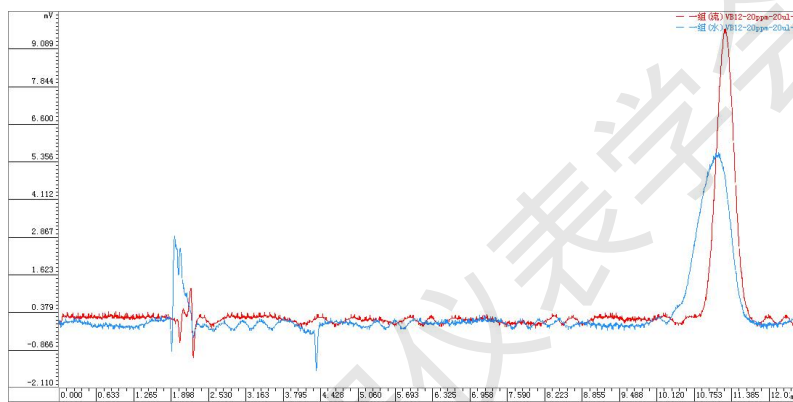


图 5 两种溶剂溶解样品的谱图叠加

红色为流动相溶解的样品；蓝色为水溶解的样品

4.4.4 根据以上实验可以看出，用水溶解样品会严重影响峰形，导致判峰不正确。而用流动相溶解样品所得的色谱峰形良好，有利于定性定量。

参考文献

- [1] GB/T 17819-1999 维生素预混料中维生素 B₁₂ 的测定高效液相色谱法