

饲料中维生素 B₁ 的含量测定

裴波

(安徽皖仪科技股份有限公司, 安徽 合肥 230088)

摘要: 试样中维生素 B₁ 经酸性提取液超声提取后, 将过滤离心后的试样溶液注入高效液相色谱仪反相色谱系统中进行分析, 用紫外检测器检测, 外标法计算维生素 B₁ 的含量。

关键词: 饲料; 维生素 B₁

1 实验目的

1.1 重现国标中关于饲料中维生素 B₁ 的检测方法。

1.2 根据现有条件对国标方法做出合适的调整方案。

2 实验材料、试剂耗材及仪器设备

2.1 实验材料: 维生素预混合饲料 (1#多维)

2.2 试剂耗材: 除特殊说明外, 所用试剂均为分析纯, 水为超纯水。

2.2.1 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA), 优级纯。

2.2.2 庚烷磺酸钠 (PICB₇), 优级纯。

2.2.3 冰醋酸, 优级纯。

2.2.4 三乙酸, 色谱纯。

2.2.5 甲醇, 色谱纯。

2.2.6 乙醇溶液, 25% (v/v)。

2.2.7 提取液: 在已装入 700mL 去离子水的 1000mL 容量瓶中加入 50mgEDTA, 待全部溶解后, 加入 25mL 冰醋酸, 5mL 三乙胺, 用去离子水定容至刻度摇匀。取 860mL 上述溶液与 140mL 甲醇混合即得。

2.2.8 流动相: 在已装入 700mL 去离子水的 1000mL 容量瓶中加入 50mgEDTA, 1.1g 庚烷磺酸钠, 待全部溶解后, 加入 25mL 冰醋酸, 5mL 三乙胺, 用去离子水定容至刻度摇匀。用冰乙酸和三乙胺调节 pH 值至 3.40。取上述溶液 860mL 与 140mL 甲醇混合后, 用 0.45 μ m 滤膜过滤, 超声脱气, 待用。

2.2.9 维生素 B₁ 标准溶液

2.2.9.1 维生素 B₁ 标准贮备液: 准确称取维生素 B₁ (购自百灵威化学) 0.0500g 于 100mL 棕

色容量瓶中，加乙醇溶液超声 15min 待溶液全部溶解后，用乙醇溶液定容至刻度。此溶液浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存 3 个月。

2.2.9.2 维生素 B₁ 标准工作液：准确吸取 2.00mL 维生素标准贮备液（3.2.9.1）于 50mL 棕色容量瓶中，用流动相定容至刻度，该标准工作液的浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.3 仪器设备

2.3.1 实验室常用玻璃仪器

2.3.2 电子 pH 计

2.3.3 超声波清洗器

2.3.4 流动相过滤装置

2.3.5 针头过滤器，0.45 μm 或 0.22 μm

2.3.6 LC3000 增强型高效液相色谱仪（紫外检测器）

2.3.7 安捷伦高效液相色谱柱 TC- C18(2)，4.6mm \times 250mm，5 μm

3 实验方法及分析

3.1 色谱条件确定

3.1.1 参照 GB/T 14700-2002 的方法，初始条件如下：

色谱柱：C18，3.9mm \times 150mm，5 μm 。因手头没有此类型色谱，故采用 3.3.7 所述色谱柱。

流动相：0.80mL/min，根据需要作出调整。

温度：25-28 $^{\circ}\text{C}$

进样体积：10 μL ，此体积改为 20 μL 。

检测波长：246nm

3.1.2 维生素 B₁ 主峰确定

3.1.2.1 流速设置为 1.0mL/min，温度设置为 25 $^{\circ}\text{C}$ ，分别进一针标样空白和一针维生素 B₁ 标准工作液。实验谱图见图 1。

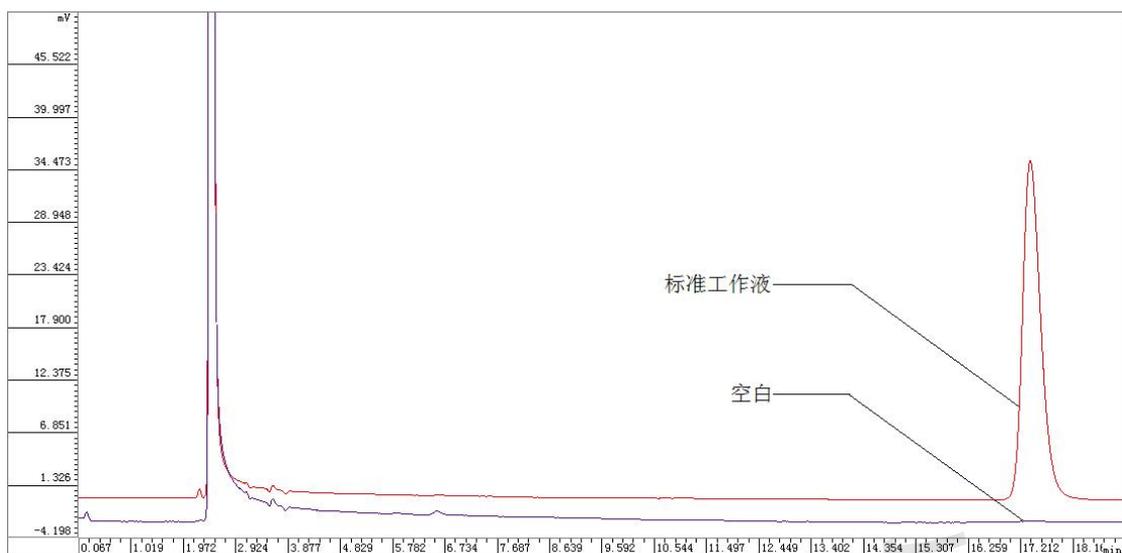


图1 标样空白与维生素 B1 标准谱图对比

3.1.2.2 17.38min 附近只有标准品出峰，而空白在此刻没有峰，这说明此峰即为维生素 B₁ 的峰，前面的大峰为溶剂峰。

3.1.3 优化色谱柱温度

3.1.3.1 在原始色谱条件的基础上，流速改为 1.5mL/min，温度依次设置为 25℃、28℃和 30℃，其他条件不变。

3.1.3.2 三种方案的谱图叠加效果如图 2。

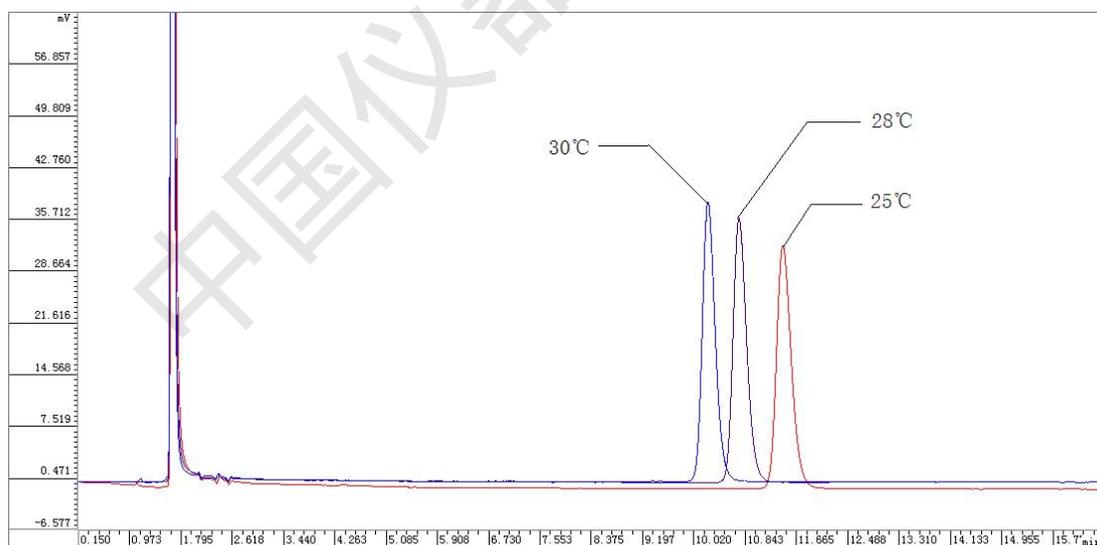


图2 不同温度下 VB1 保留时间的变化

3.1.3.3 如图 2 所示，在流速等其他条件不变的情况下，随着柱温的升高保留时间提前。但根据国标所述温度条件最高为 28℃，故选用此温度确定为色谱柱温。

3.1.4 流速的条件优化

3.1.4.1 在压力允许的范围内（20MPa），尽量提高流速，实验考察 1mL/min、1.5mL/min 和 1.7mL/min 流速下的保留时间变化。

4.1.3.2 不同流速下实验谱图叠加如图 3

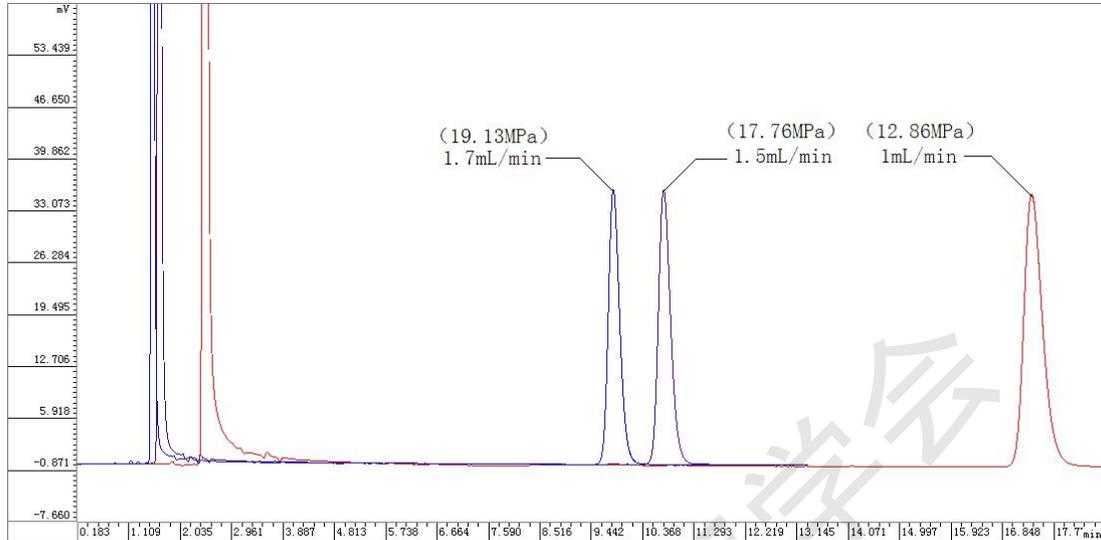


图 3 不同流速下 VB₁ 的保留时间变化

3.1.4.3 如图 3 所示，提高泵流速后，保留时间有大幅度减小，其中 1.7mL/min 流速下压力为 19.13MPa，适合本样品分析，故选择此流速为最佳值。

3.1.5 根据上述实验最终确定的色谱条件如下：

色谱柱：C18，4.6mm×250mm，5 μ m。

流速：1.70mL/min。

温度：28 $^{\circ}$ C。

进样体积：20 μ L。

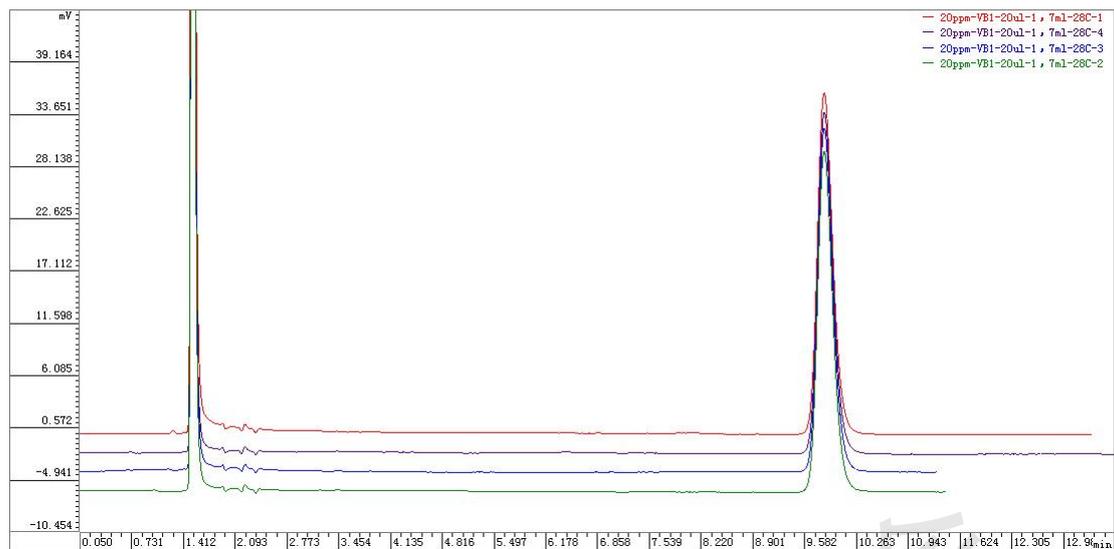
检测波长：246nm。

除另有说明外，以下实验均采用此色谱条件。

3.2 重复性实验

3.2.1 实验条件同 4.1.4。样品为 VB₁ 标准工作液，n=4，测试系统重复性。

3.2.2 实验谱图及数据



组份	文件名	峰面积	保留时间	峰高	半高峰宽
VB1	20ppm-VB ₁ -20μL-1, 7mL-28C-1	511951	9.836	36012	13.348
VB1	20ppm-VB ₁ -20μL-1, 7mL-28C-4	512698	9.838	36020	13.365
VB1	20ppm-VB ₁ -20μL-1, 7mL-28C-3	513327	9.839	36186	13.32
VB1	20ppm-VB ₁ -20μL-1, 7mL-28C-2	511020	9.837	35952	13.346
	最大值	513327	9.839	36186	13.365
	最小值	511020	9.836	35952	13.32
	平均值	512249	9.837	36042.5	13.345
	误差	993.8	0.002	100.4	0.019
	RSD	0.19%	0.02%	0.28%	0.14%

图4 系统重复性报告

3.2.3 如上数据可以看出，保留时间重复性为 0.02%，峰面积重复性为 0.19%，符合系统要求。

3.3 检测限实验

3.3.1 本实验检测限的确定采用 3 倍基线噪声所对应的标准品浓度。

3.3.2 实验所采用的样品为 VB₁ 标准工作液稀释 100 倍，即 200ppb。实验谱图及信息如图 5 所示。

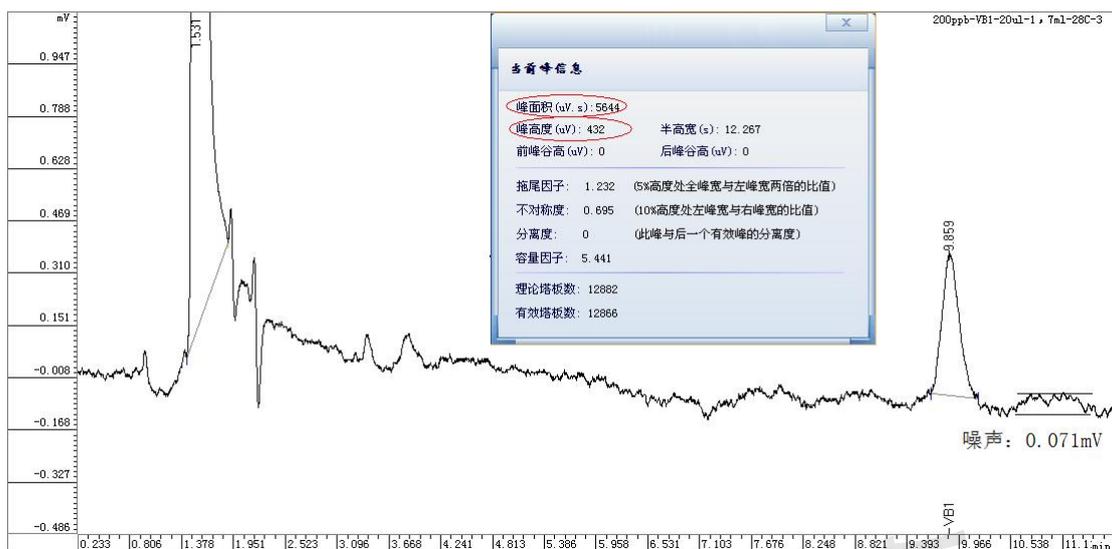


图 5 定量检测限谱图

3.3.3 如上图 5 所示，主峰两侧的噪声为 0.071mV，柱峰峰高为 0.432mV，故检测限为 $(0.071\text{mV} \times 2 \times 0.2\mu\text{g/mL}) / 0.432\text{mV} = 0.0657\mu\text{g/mL}$

3.4 线性范围测定

3.4.1 按照 3.2.9.2 的方法配置浓度分别为 5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、15 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 和 30 $\mu\text{g/mL}$ 的维生素 B₁ 六种标准溶液，注入高效液相色谱仪分析。谱图及数据见图 6 和表 1。

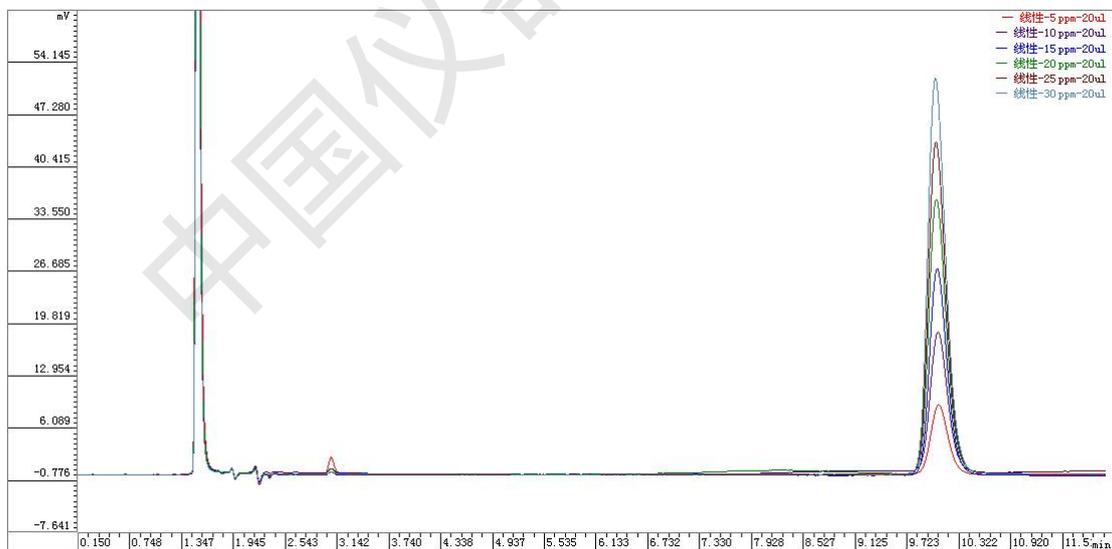


图 6 六种不同浓度的标准溶液色谱图叠加

浓度 (μg/mL)	5	10	15	20	25	30
峰面积 (μv · s)	130571	263851	390587	522594	635133	759957

表 1 不同浓度标准溶液与峰面积对应关系

3.4.2 根据以上谱图及数据结果，按照峰面积与浓度的对应关系，做出标准工作曲线，如图 7 所示。

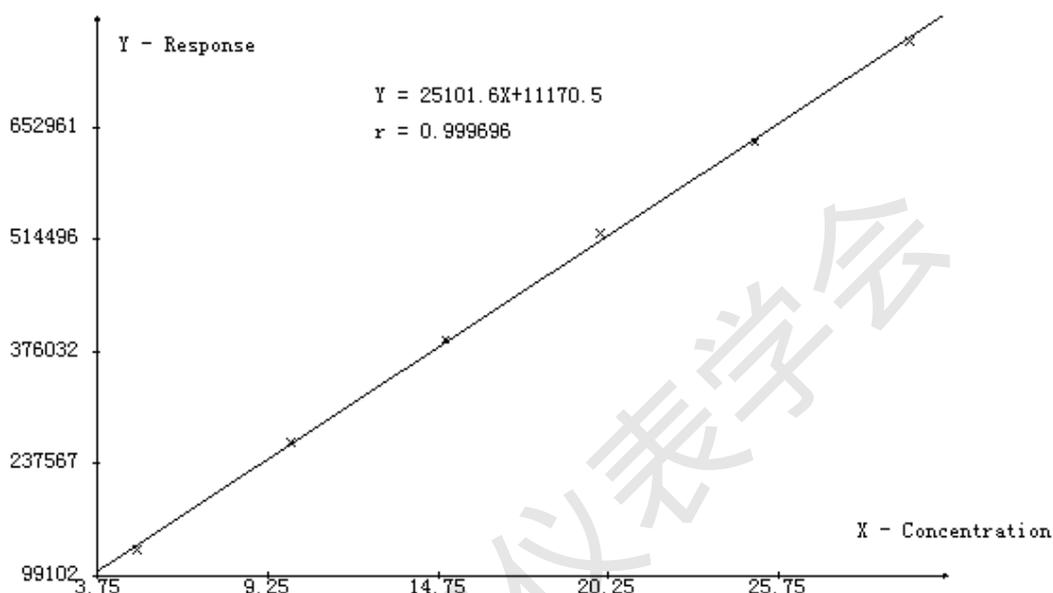


图 7 不同浓度 VB1 标准溶液工作曲线

该工作曲线的线性方程为： $y=25101.6x+11170.5$ ，回归系数 $r=0.999696$ 。线性范围良好，可用作样品的含量测定。

3.5 加标回收率测定

3.5.1 加标样品的配制方法

3.5.1.1 取四只 100mL 棕色容量瓶，编号为 0、1、2 和 3。分别称取 0.25g 维生素预混饲料（1# 多维）于各容量瓶中。向 1、2 和 3 号容量瓶中各加入一定量的维生素 B₁ 标准品，使其浓度分别为 10μg/mL、20μg/mL 和 30μg/mL。

3.5.1.2 加入 2/3 体积的提取液，超声提取 30min。

3.5.1.3 降至室温之后，加提取液至刻度，过滤，进样。

3.5.2 外标法计算每组样品中维生素 B₁ 的含量。

3.5.3 回收率数据集结果如下表所示

表 2 不同标准加入量的回收率

组别	原样浓度	标准加入浓度	实测标样浓度	回收率
0	23.72 $\mu\text{g/mL}$	--	--	--
1		10 $\mu\text{g/mL}$	10.21 $\mu\text{g/mL}$	102.10%
2		20 $\mu\text{g/mL}$	19.91 $\mu\text{g/mL}$	99.52%
3		30 $\mu\text{g/mL}$	29.59 $\mu\text{g/mL}$	98.63%

3.6 维生素预混合饲料中维生素 B₁ 的含量测定

3.6.1 标准工作液的配制如 3.2.9.2。

3.6.2 试样制备

3.6.2.1 称取 0.25g 维生素预混合饲料于 100mL 棕色容量瓶中。

3.6.2.2 提取方法如 4.5.1 所述。

3.6.3 向设置好参数的高效液相色谱仪中注入标准工作液和试样溶液 20 μL ，记录色谱图，如图 8。

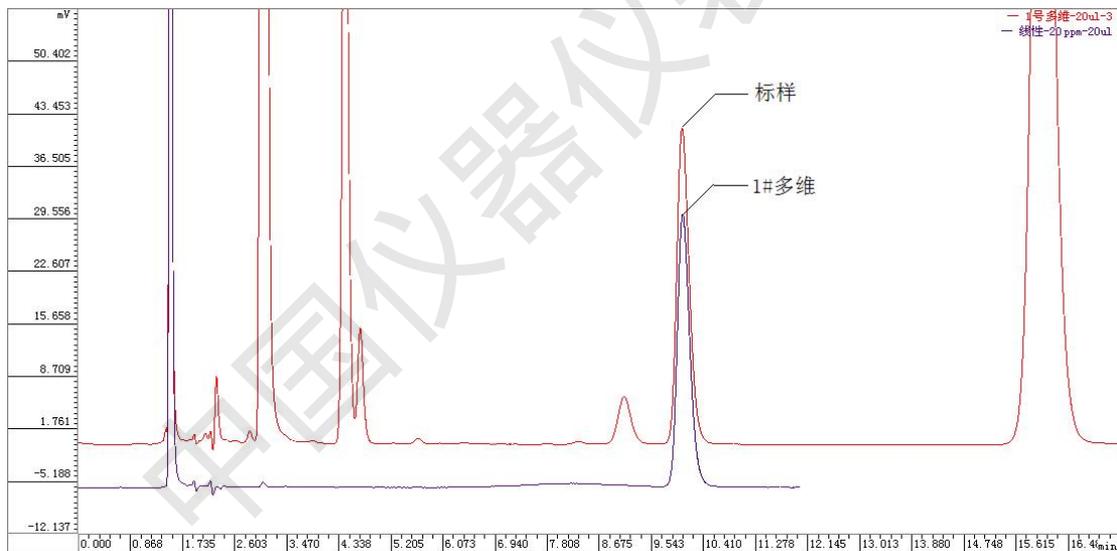


图 8. VB₁ 标准品与 1#多维样品谱图对比

3.6.4 外标法计算饲料中维生素 B₁ 的含量为：9488 $\mu\text{g/g}$

4 实验结论

本实验根据国标方法做出改动，经优化的实验条件如上所述。该方法的定量重复性为 0.19%；检测限为 0.0657 $\mu\text{g/mL}$ ；在 5 $\mu\text{g/mL}$ 至 30 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关系，线性相关系数 $r=0.999696$ ；回收率为 98.63%-102.10%；外标法计算维生素 B₁ 在预混饲料中的浓度为 9488 $\mu\text{g/g}$ 。

参考文献:

- [1] GB/T14700-2002 饲料中维生素 B₁ 的测定

中国仪器仪表学会