

饲料中维生素 B2 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 B₂ 经酸性提取液在 80°C~100°C 水浴煮沸提取后, 经过滤离心后的试样溶液注入高效液相色谱仪系统中进行分离, 用紫外检测器检测。外标法计算维生素 B₂ 的含量。

关键词: 饲料; 维生素 B₂

1 实验目的

1.1 重现国标中关于维生素 B₂ 的检测方案

1.2 根据具体情况对国标方法做出适当调整, 以满足实验需求。

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 **实验耗材:** 除特殊说明外, 以下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 冰乙酸, 优级纯。

2.2.4 三乙胺, 色谱纯。

2.2.5 甲醇, 色谱纯。

2.2.6 **提取液:** 在已装入约 700mL 去离子水的 1000mL 容量瓶中, 加入 50mgEDTA 待全部溶解后, 加入 25mL 冰乙酸、5mL 三乙胺, 用去离子水定容至刻度摇匀。

2.2.7 **流动相:** 在已装入约 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 冰乙酸和 5mL 三乙胺, 用去离子水定容至刻度摇匀。

用冰乙酸、三乙胺调节该溶液 pH 至 3.40, 用 0.45 μ m 滤膜过滤。取该溶液 860mL 与 140mL 甲醇混合, 超声脱气, 待用。

2.2.8 **维生素 B₂ 标准溶液**

2.2.8.1 **维生素 B₂ 标准贮备液:** 称取 0.0050g 维生素 B₂ (购自百灵威化学) 标准品于 100mL 棕色容量瓶中, 加入 1mL 冰乙酸。80°C~100°C 煮沸 30 分钟, 待冷却至室温后, 用去离子

水定容至刻度。此溶液浓度为 $50\mu\text{g/mL}$ ， 4°C 避光保存 6 个月。

2.2.8.2 维生素 B2 标准工作液：准确吸取 5.0mL 维生素 B2 标准贮备液于 50mL 棕色容量瓶中，用流动相定容至刻度。此标准工作液的浓度为 $5\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 仪器设备

2.3.1 实验室常用玻璃器皿。

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 恒温水浴锅， $0^{\circ}\text{C}\sim 100^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.6 针头过滤器， $0.45\mu\text{m}$ 或 $0.22\mu\text{m}$ 。

2.3.7 LC3000 增强型高效液相色谱仪（紫外检测器）

2.3.8 安捷伦高效液相色谱柱 TC-C18 (2)， $4.6\text{mm}\times 250\text{mm}$ ， $5\mu\text{m}$

3 实验方法及步骤

3.1 色谱条件：以下实验如无特殊说明，一律采用此方法。

色谱柱：安捷伦 TC-C18(2)， $4.6\text{mm}\times 250\text{mm}$ ， $5\mu\text{m}$ 。

流动相：如 3.2.7。

流速： $1.7\text{mL}/\text{min}$ 。

柱温： 28°C 。

进样体积： $20\mu\text{L}$ （满环进样）。

检测波长： 267nm 。

3.2 维生素 B2 主峰信息确定

3.2.1 向设置好参数的高效液相色谱仪上分别注入 $20\mu\text{L}$ 标样空白和 $20\mu\text{L}$ 维生素 B₂ 标准工作液，记录色谱图如下：

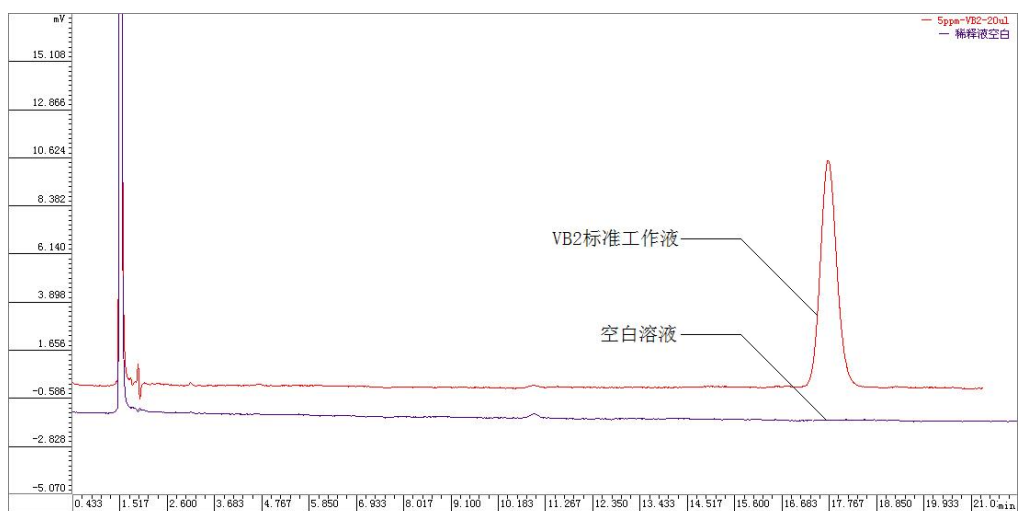


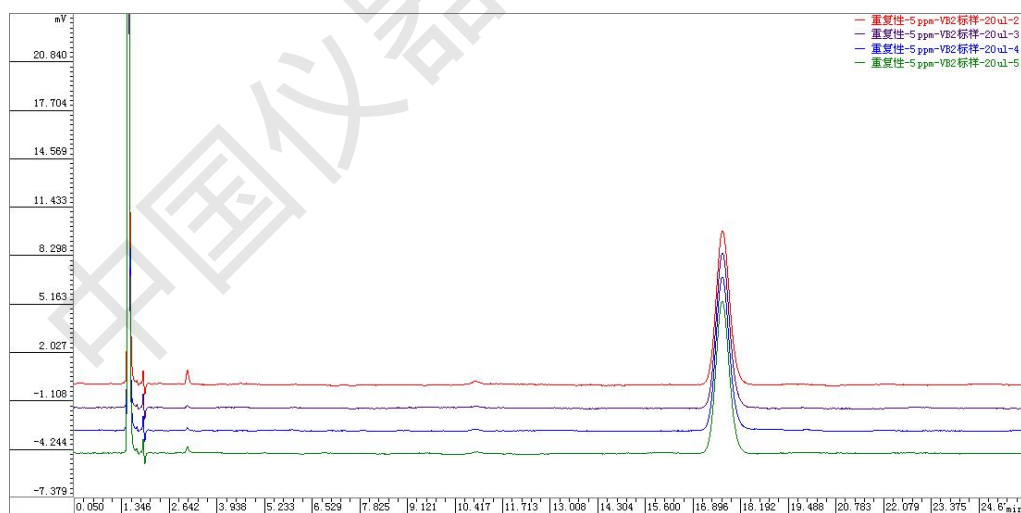
图1 VB₂标准工作液与空白溶液色谱图对照

3.2.2 如图1所示，在17.745min处只有标准品出峰，而空白溶液在此处没有明显的峰，所以我们可以认为此峰即为维生素B₂的峰。前面的大峰在工作液和空白中都有，且位置位于于色谱柱的死体积内，可认为是溶剂峰。

3.3 系统重复性实验

3.3.1 选择维生素B₂标准工作液进样，连续进样4针，考察系统重复性。

3.3.2 实验谱图及数据如下。



组份	文件名	峰面积	保留时间	峰高	半高峰宽
VB ₂	5ppm-VB ₂ 标样-20μL-2	259195	17.694	9953	24.452
VB ₂	5ppm-VB ₂ 标样-20μL-3	259103	17.692	9996	24.339
VB ₂	5ppm-VB ₂ 标样-20μL-4	256510	17.693	9874	24.393
VB ₂	5ppm-VB ₂ 标样-20μL-5	256370	17.682	9839	24.466
	最大值	259195	17.694	9996	24.466
	最小值	256370	17.682	9839	24.339
	平均值	257794.5	17.69	9915.5	24.413
	误差	1565.5	0.006	71.8	0.058
	RSD	0.61%	0.03%	0.72%	0.24%

图2 测试维生素 B2 系统重复性报告

3.3.3 如图 2 数据可以得到，保留时间重复性为 0.03%，峰面积重复性为 0.61%，符合系统的测试要求。

3.4 检测限

3.4.1 测试溶液配制：标准吸取 2.5mL 维生素 B₂ 标准工作溶液于 50mL 棕色容量瓶中，用流动相稀释至 50mL，制成 0.25μg/mL 的测试溶液。

3.4.2 连续进测试溶液 3 针，色谱图及数据如下图所示。

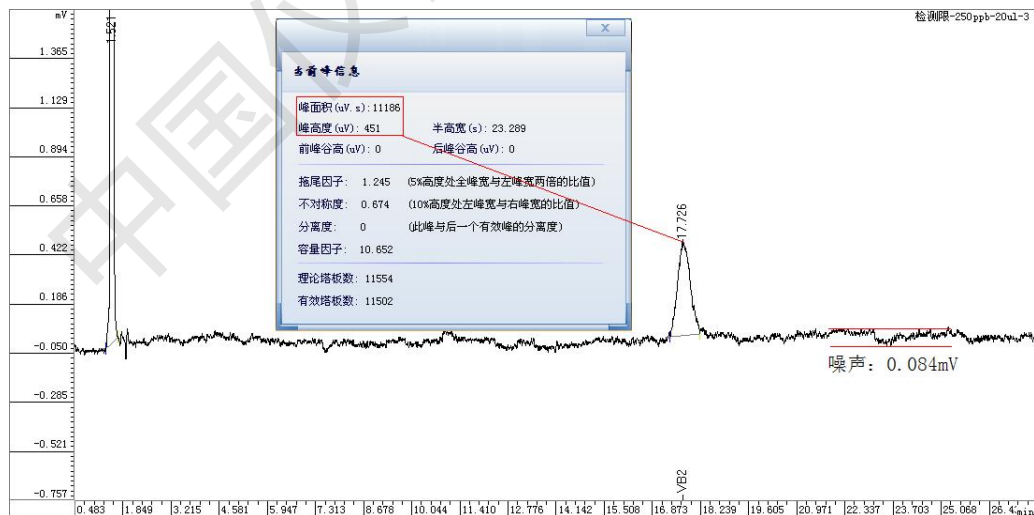


图3 检测限谱图

3.4.3 如图 3 所示，主峰两侧的噪声为 0.084mV，主峰峰高为 0.451mV，故检测限为：

$$(0.084\text{mV} \times 2 \times 0.25\mu\text{g/mL}) / 0.451\text{mV} = 0.0898\mu\text{g/mL}$$

3.5 线性范围测定

3.5.1 按照 3.2.8.2 的方法配制浓度分别为 1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 和 15 $\mu\text{g/mL}$ 的五个梯度浓度标准工作液，注入高效液相色谱仪中分析，谱图及数据记录如下。

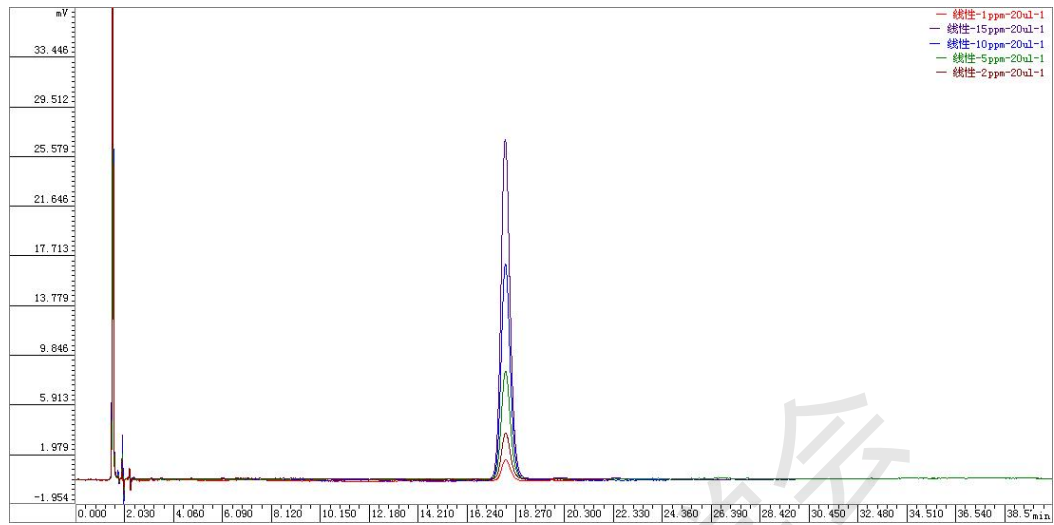


图 4 五种不同浓度的标准溶液谱图叠加

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	1	2	5	10	15
峰面积 ($\mu\text{V}\cdot\text{S}$)	41495	94786	224283	449386	708361

表 1 不同浓度的标准溶液与峰面积的对应关系

3.5.2 根据以上数据，按照浓度与峰面积的对应关系，做出标准工作曲线，如图 5 所示。

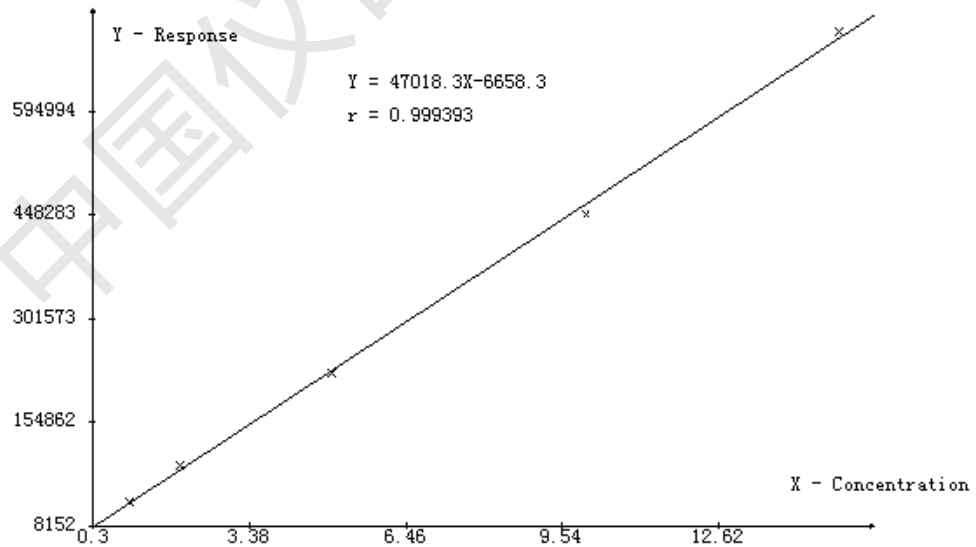


图 5 不同浓度 VB₂ 标准工作曲线

该工作曲线的线性方程为 $y=47018.3x-6658.3$ ，线性回归系数为 $r=0.999393$ 。线性范围良好，在此范围内可对样品中 VB₂ 的含量做出较为准确的定量。

3.6 加标回收率的测定

3.6.1 加标试样的制备方法

3.6.1.1 取 4 只 100mL 棕色容量瓶分别编号为 0、1、2、和 3。分别称取 0.25g1#多维饲料于各容量瓶中。

3.6.1.2 称取 0.005g、0.01g 和 0.015g 维生素 B2 标准品分别置于 1、2 和 3 号容量瓶中。向各容量瓶中加入 2/3 体积的提取液，于 80°C~100°C 水浴中煮沸 30 分钟。

3.6.1.3 冷却至室温后，加入 14mL 甲醇，用提取液定容至刻度，混匀。

3.6.1.4 用 0.45 μ m 滤膜过滤后，提取液稀释 20 倍，待测。

3.6.2 外标法计算每组样品中维生素 B2 的含量。

3.6.3 回收率数据及结果如下表。

组别	原样浓度	标准加入浓度	实测标样浓度	回收率
0	3.981 μ g/mL	--	--	--
1		2.5 μ g/mL	2.366 μ g/mL	94.64%
2		5.0 μ g/mL	4.856 μ g/mL	97.12%
3		7.5 μ g/mL	7.042 μ g/mL	93.89%

表 2 不同标准加入量所得回收率

3.7 维生素预混饲料中维生素 B2 的含量测定

3.7.1 试样制备

3.7.1.1 称取 0.25g 维生素预混饲料，置于 100mL 棕色容量瓶中。

3.7.1.2 加入 2/3 体积的提取液，于 80°C~100°C 水浴中煮沸 30 分钟。

3.7.1.3 冷却至室温后，加入 14mL 甲醇，用提取液定容至刻度，混匀，过滤。

3.7.1.4 用 0.45 μ m 滤膜过滤后，提取液稀释 20 倍，待测。

3.7.2 分别向高效液相色谱仪中注入 20 μ L 维生素 B2 标准工作液和试样（4.7.1），记录色谱和数据，外标法定量。实验谱图如下：

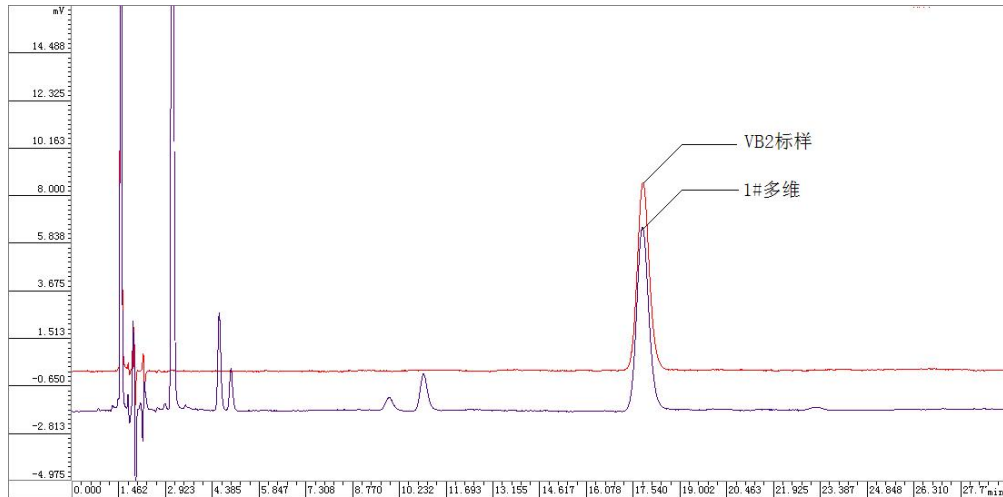


图 6 VB₂标准品与 1#多维样品谱图对比

3.7.3 外标法计算饲料中维生素 B₂ 的含量为：31848 $\mu\text{g/g}$ 。

4 实验结论

本实验旨在重现国标中关于测定饲料中维生素 B₂ 含量的方案，但在实验过程做出了一些改动（如上所述），使其更适用于实际问题的分析。经过改进后的方法定重复性为 0.61%，定性重复性为 0.03%；检测限为 0.0898 $\mu\text{g/mL}$ ；在 1 $\mu\text{g/mL}$ 至 15 $\mu\text{g/mL}$ 范围呈现良好的线性，线性相关系数 $r=0.999393$ ；加标回收率在 93.89%-97.12%之间；外标法计算维生素 B₂ 在预混合饲料中的浓度为 31848 $\mu\text{g/g}$ 。

参考文献：

- [1] GB/T 14701-2002 饲料中维生素 B₂ 的测定