

饲料中维生素 D₃ 的含量检测

裴波

(安徽皖仪科技股份有限公司, 安徽 合肥 230088)

摘要: 本案例以甲醇为流动相, 使用 C18 色谱柱进行分离, 使用超高效液相色谱在 264nm 紫外波长处检测饲料中维生素 D₃ 的含量。

关键词: 超高效液相色谱法; 检测方法; 维生素 D₃

1 实验目的

- 1) 重现国标关于饲料中维生素 D₃ 的检测方案。
- 2) 对国标方法做出适当的调整以满足实际检测需求。

2 实验原理

维生素预混合饲料中的维生素 D₃ 用甲醇溶液提取, 试样注入高效液相色谱仪, 在 264nm 紫外波长处检测外标法计算维生素 D₃ 的含量。

3 实验材料、试剂耗材及仪器设备

3.1 实验材料

维生素预混合饲料 (湖州阳光饲料制造有限公司)。

3.2 试剂耗材

除特殊说明外, 本实验所用试剂均为分析纯, 水为超纯水。

3.2.1 维生素 D₃ 标准品。

3.2.2 维生素 D₃ 标准贮备液: 称取维生素 D₃ 标准品 100mg, 于 100mL 棕色容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释到刻度, 混匀, 4°C 保存。该贮备液的浓度为 1.0mg/mL。

3.2.3 维生素 D₃ 标准工作液: 移取维生素 D₃ 标准贮备液 100 μ , 于 100mL 棕色容量瓶中, 用纯甲醇稀释定容至 100mL。该工作液的浓度为 1 μ g/mL。

3.2.4 甲醇, 色谱纯。

3.3 仪器设备

3.3.1 实验室常用玻璃仪器:

3.3.2 电子 pH 计;

3.3.3 超声波清洗器；

3.3.4 流动相过滤装置；

3.3.5 针头过滤器，0.45 μ m 或 0.22 μ m；

3.3.6 LC3000 增强型高效液相色谱仪（紫外检测器）；

3.3.7 艾杰尔高效液相色谱柱 Promasil C18，4.6mm \times 250mm，5 μ m。

4 实验方法及数据分析

4.1 色谱条件

4.1.1 色谱柱：Promasil C18，4.6mm \times 250mm，5 μ m。

4.1.2 流动相：甲醇。

4.1.3 流速：2.0mL/min。

4.1.4 柱温：30 $^{\circ}$ C。

4.1.5 波长：264nm。

4.2 试样溶液的制备

4.2.1 称取维生素预混合饲料 1.0g，置于 100mL 棕色容量瓶中，加入 80mL 的甲醇，混匀。

4.2.2 在 65 $^{\circ}$ C 超声波水浴中超声提取 30min。

4.2.3 待试样冷却至室温后，用甲醇稀释至刻度，充分摇匀，0.45 μ m 滤膜过滤，待测。

4.3 维生素 D₃ 主峰峰位确定

4.3.1 设置好高效液相色谱仪，分别向系统中注入 100 μ L 的维生素 D₃ 标准溶液和 100 μ L 试样，记录数据，如图 1 所示。

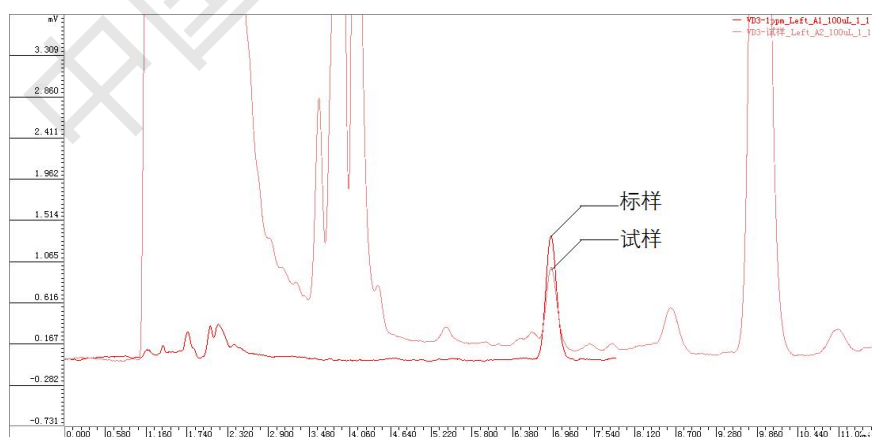


图 1 维生素 D₃ 标样和试样谱图叠加

4.3.2 如图 1 所示，图中所示标样为维生素 D₃ 的主峰，试样中维生素 D₃ 的峰和标样组分完全重合。

4.4 系统重复性测试

4.4.1 配制好液相色谱系统，向系统中注入 100 μ L 标样溶液，记录色谱图，重复 3 次，计算系统重复性。

4.4.2 重复性谱图叠加效果如图 2 所示，评价参数如表 1。

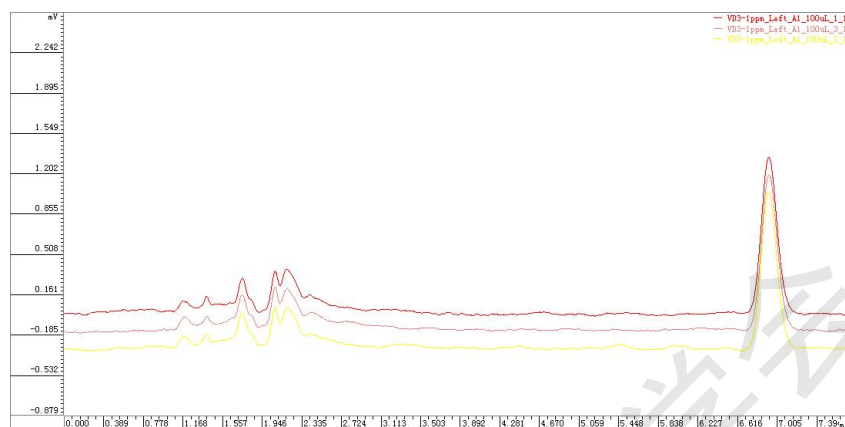


图 2 维生素 D3 连续三针谱图叠加效果

组份	文件名	峰面积	保留时间	峰高
VD ₃	VD3-1ppm_Left_A1_100 μ L_1_1	14834	6.924	1342
VD ₃	VD3-1ppm_Left_A1_100 μ L_3_1	14818	6.922	1336
VD ₃	VD3-1ppm_Left_A1_100 μ L_2_1	14812	6.915	1347
	RSD	0.08%	0.06%	0.41%

表 1 维生素 D3 重复性评价参数

4.4.3 根据图 2 和表 1 可知，在此色谱条件下，维生素 D₃ 的系统重复性良好，定性重复性参数为 0.06%，定量重复性参数为 0.08%。

4.5 检测限及定量限

4.5.1 测试样品配制：移取 1.0mL 维生素 D₃ 标准工作液于 10.0mL 的棕色容量瓶中，用甲醇稀释定容至刻度。

4.5.2 配置好液相色谱系统，向系统中注入 4.5.1 的溶液，记录色谱图，如图 3 所示。

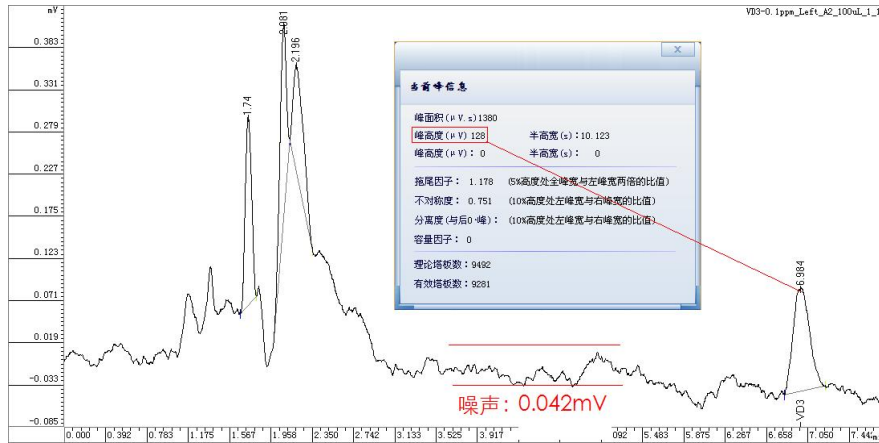


图 3 低浓度维生素 D3 谱图及峰信息

4.5.3 实验数据表明，主峰两侧的基线噪声为 0.042mV,平均峰高为 0.128mV。所以，仪器检测限为 $(2 \times 0.042 \times 0.1 \times 100) / 0.128 = 6.56\text{ng}$ ；定量限为 $(10 \times 0.042 \times 0.1 \times 100) / 0.128 = 65.6\text{ng}$ 。

4.6 线性范围测定

4.6.1 配制不同浓度的维生素 D₃ 标准工作液五组，浓度分别为 0.5μg/mL、1.0μg/mL、2.5μg/mL、5.0μg/mL 和 10.0μg/mL。

4.6.2 分别向设置好的液相色谱系统中注入 100μL 的各浓度溶液，记录色谱图。

4.6.3 不同浓度的维生素 D₃ 谱图叠加（图 4）及浓度和峰面积的对应关系表（表 2）。

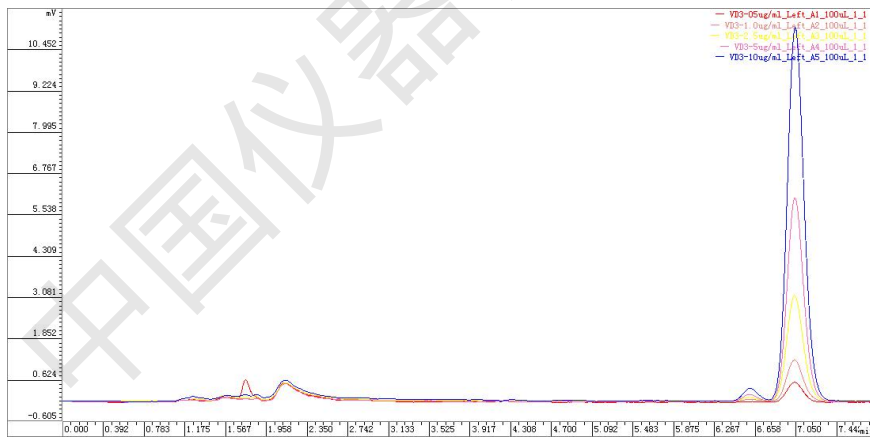


图 4 不同浓度的维生素 D3 谱图叠加

浓度(μg/mL)	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0
峰面积 (μV·S)	6486	13778	35270	68352	125257

表 2 维生素 D3 的浓度和峰面积的对应关系

4.6.4 根据上表，以峰面积作为纵坐标，以浓度做为横坐标，做出标准工作曲线如图 5，线性方程为： $y = 12484x + 2389.6$ ，线性相关系数 $r = 0.9986$ ，线性关系良好。

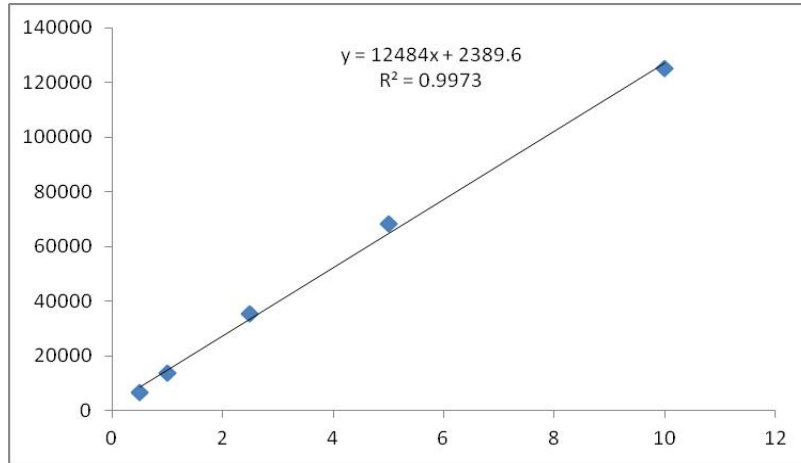


图5 维生素D3不同浓度标准曲线

参考文献:

- [1] GB/T 17818-2010 饲料中维生素D₃的测定高效液相色谱法