

饲料中维生素 B₆ 的含量测定

裴波

(安徽皖仪科技股份有限公司, 安徽省合肥市 230088)

摘要: 试样中维生素 B₆ 经酸性提取液超声提取后, 注入高效液相色谱仪反相色谱系统中进行分离, 用紫外检测器检测, 外标法计算维生素 B₆ 的含量。

关键词: 饲料; 维生素 B₆

1 实验目的

- 1.1 重现国标关于饲料中维生素 B₆ 的检测方案。
- 1.2 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, 本实验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 盐酸溶液, $c(\text{HCl})=0.1\text{mol/L}$: 量取 2.15mL 的浓盐酸置于 25mL 容量瓶中, 用去离子水溶解并定容至刻度。
- 2.2.7 提取液: 在已装入约 700mL 去离子水的容量瓶中, 加入 50mgEDTA 待全部溶解后, 加入 25mL 冰乙酸和 5mL 的三乙胺, 用去离子水定容至刻度摇匀。取 860mL 该溶液与 140mL 甲醇混合, 即得。
- 2.2.8 流动相: 在已装入约 700mL 去离子水的容量瓶中, 加入 50mgEDTA 和 1.1g 的庚烷磺酸钠, 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。用冰乙酸和三乙胺调节该溶液的 pH 值至 3.40, 过 0.45 μm 滤膜过滤。取该溶液 860mL 与 140mL 甲醇混合, 超声脱气, 待用。

2.2.9 维生素 B6 标准溶液:

2.2.9.1 维生素 B6 标准贮备液:准确称取维生素 B6 标准品 0.0500g 于 100mL 棕色容量瓶中,加盐酸溶液(3.2.6)约 2/3 体积,超声 15min,待全部溶解后,用盐酸溶液定容至刻度。此溶液的浓度为 500 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C 冰箱避光保存 3 个月。

2.2.9.2 维生素 B6 标准工作液 A:准确量取 2.00mL 维生素 B6 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 2.0 μ g/mL。

2.2.9.3 维生素 B6 标准工作液 B:准确:准确量取 0.25mL 的维生素 B6 标准工作液 A(3.2.9.2)于 10mL 容量瓶中,用流动相定容至刻度,摇匀。该标准工作液的浓度为 0.5 μ g/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 μ m 或 0.22 μ m;

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 μ m。

3 实验方法及数据分析

3.1 色谱条件

以下实验如无特殊说明,一律采用此方法。

3.1.1 色谱柱:安捷伦 TC-C18(2),4.6mm \times 250mm,5 μ m;

3.1.2 流动相:如 3.2.8;

3.1.3 流速:1.7mL/min;

3.1.4 柱温:28 $^{\circ}$ C;

3.1.5 进样体积:20 μ L(手动满环);

3.1.6 检测波长:280nm

3.2 1#多维饲料试样溶液制备

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

3.2.2 加入 2/3 体积的盐酸溶液提取液(3.2.7),超声波浴中提取 20min。

3.2.3 待溶液降至室温后,用提取液定容至刻度,0.45 μ m 膜过滤,待测。

3.3 维生素 B6 主峰信息确认

3.3.1 设置好高效液相色谱仪器系统参数，向系统中分别注入 20 μ L 标样空白溶液和 20 μ L 维生素 B6 标准工作液 A，记录色谱图如下：

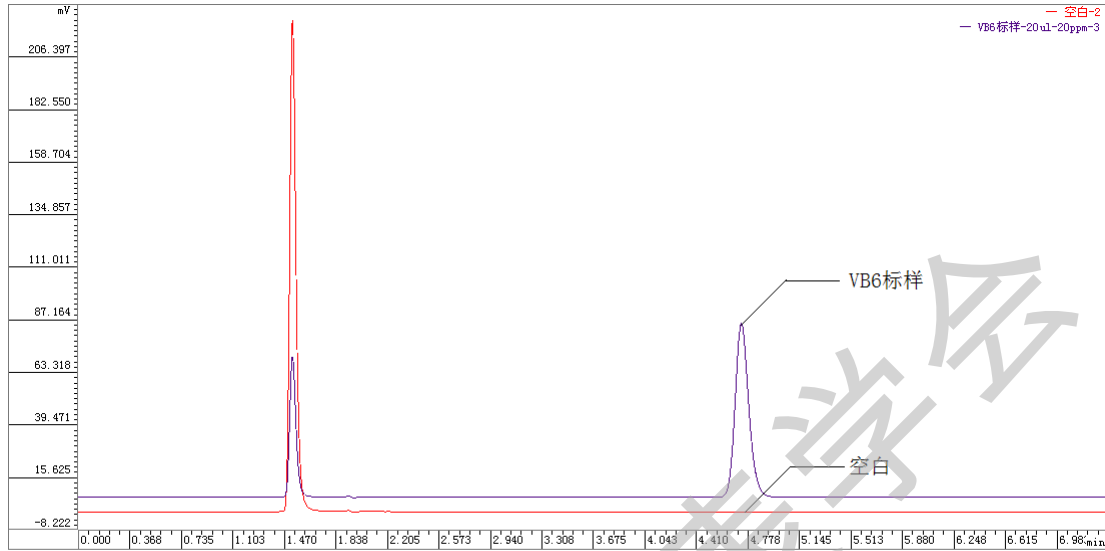
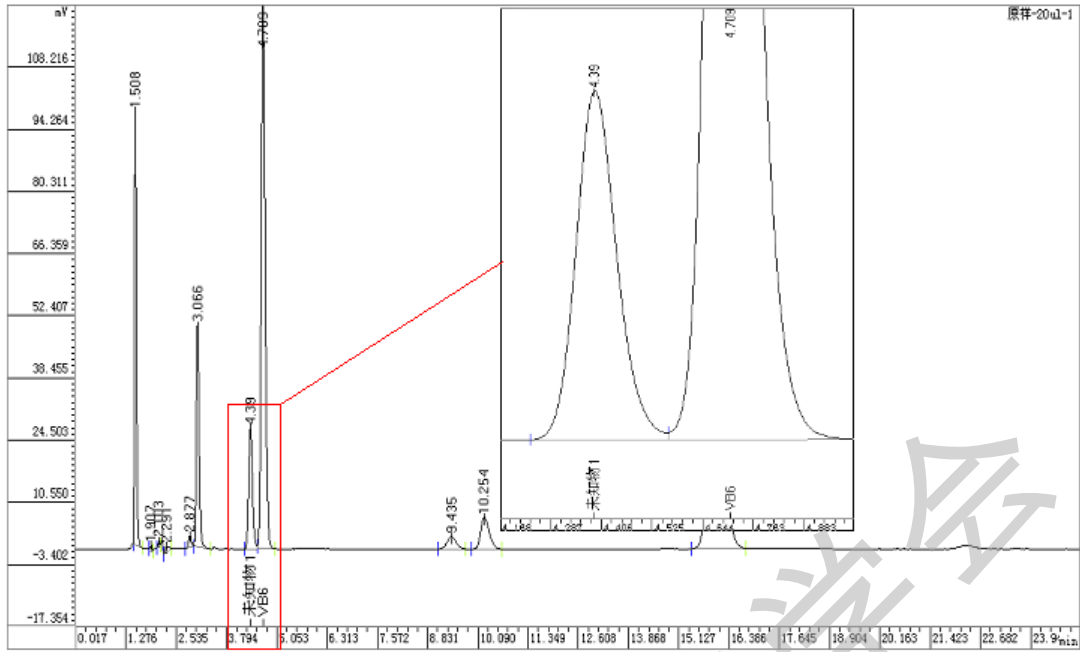


图 1 维生素 B₆ 标准样即样品空白色谱图叠加

3.3.2 如图 1 所示，在 4.73min 除只有 VB6 标准样出峰，而标样空白溶液没有除峰，由此可判断此峰即为 VB6 主峰。

3.4 系统适应性

3.4.1 设置好液相色谱系统，向系统中注入 20 μ L 饲料试样（4.2），记录色谱图及系统参数，如图 2 所示。



分析结果表

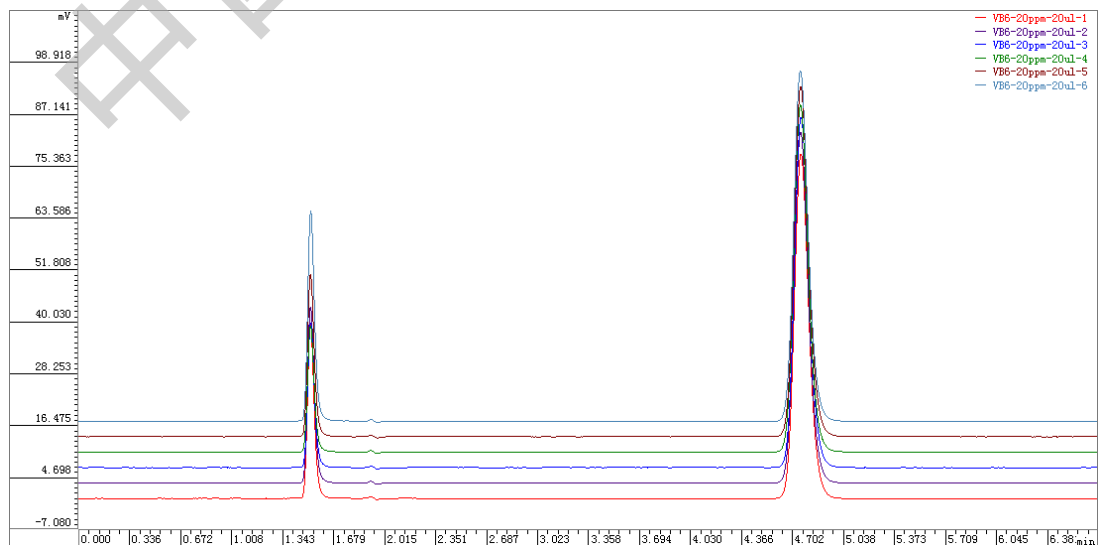
时间	名称	峰面积	峰高	理论塔板	对称度	拖尾因子	分离度
4.39	未知物1	180741	27087	9792	0.775	1.175	1.791
4.71	VB6	831766	123554	11069	0.777	1.173	15.78
总计:		1012507	150641				

图 2 饲料试样谱图及系统参数

3.4.2 如图 2 所示，在 VB6 主峰的左侧有一个较小的峰存在，这有可能会干扰主峰的定量。但通过查看系统信息可知，干扰峰和主峰的分离度为 1.791，主峰的柱效为 11069 个塔板，符合通行指标。

3.5 系统重复性测试

3.5.1 选择维生素 B6 标准工作液 A 进样，连续进样 6 针，考察系统重复性。实验谱图及数据如图 3。



组份	文件名	峰面积	保留时间	峰高	半高峰宽
VB ₆	VB ₆ -20ppm-20μL-1	536415	4.756	78207	6.44
VB ₆	VB ₆ -20ppm-20μL-2	545702	4.755	79607	6.437
VB ₆	VB ₆ -20ppm-20μL-3	543955	4.757	79511	6.424
VB ₆	VB ₆ -20ppm-20μL-4	539419	4.754	78832	6.425
VB ₆	VB ₆ -20ppm-20μL-5	542031	4.756	79368	6.413
VB ₆	VB ₆ -20ppm-20μL-6	544688	4.753	79562	6.428
	RSD	0.653%	0.036%	0.701%	0.152%

图3 维生素 B6 标样重复性

3.5.2 如图 3 所示，维生素 B6 在此系统下的定性重复性为 0.036%，定量重复性为 0.653%，符合通行指标。

3.6 检测限

3.6.1 设置好液相色谱仪器系统参数，向系统中注入 20μL 维生素 B6 标准工作液 B，记录色谱图。

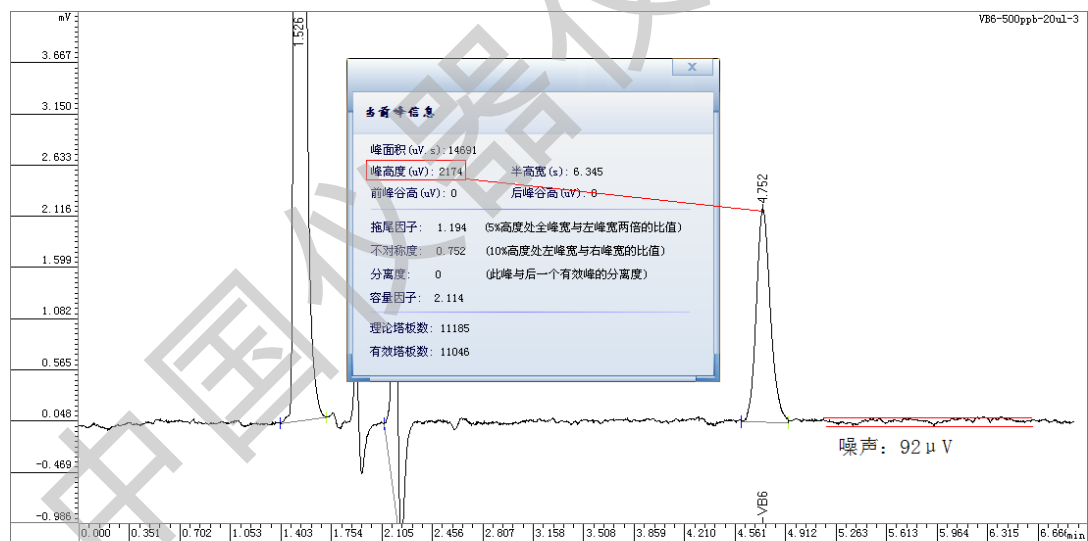


图4 维生素 B6 检测限谱图

3.6.2 如图 4 所示，主峰两侧的噪声为 0.092mv，主峰峰高为 2.174mv，所以检测限为： $(0.092\text{mv} \times 2 \times 0.5\mu\text{g/mL}) / 2.174\text{mv} = 0.0423\mu\text{g/mL}$ 。

3.7 线性范围测定

3.7.1 配制梯度浓度的标准工作液：移取 0.2mL、0.3mL、0.4mL、0.5mL、0.6mL 的维生素 B6 标准贮备液分别置于五只 10mL 的棕色容量瓶中，用流动相或提取液稀释至刻度，混匀，待用。

3.7.2 取各浓度的标准工作液 20 μ L，注入设置好的高效液相色谱仪中，记录色谱图，如图及数据如下。

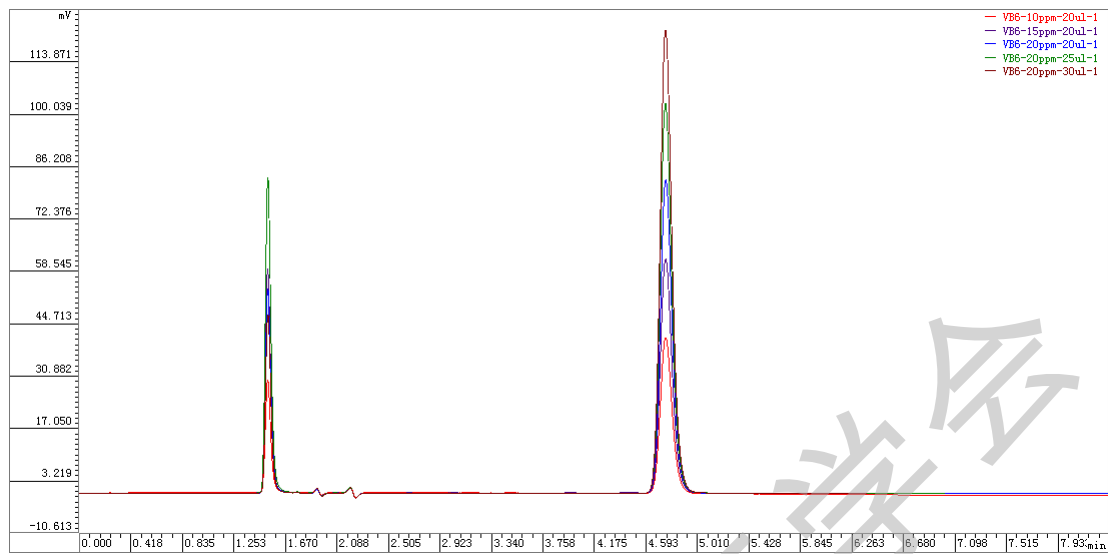


图 5 五种不同浓度维生素 B6 标准谱图叠加

浓度(μ g/mL)	1	2	3	4	5
峰面积 (μ V·S)	281327	422756	564026	700630	835227

表 1 不同浓度为的维生素 B6 标准溶液浓度与峰面积对应关系

3.7.3 根据表 1 的数据，按照浓度与峰面积的对应关系，做出标准曲线，如图 6 所示。

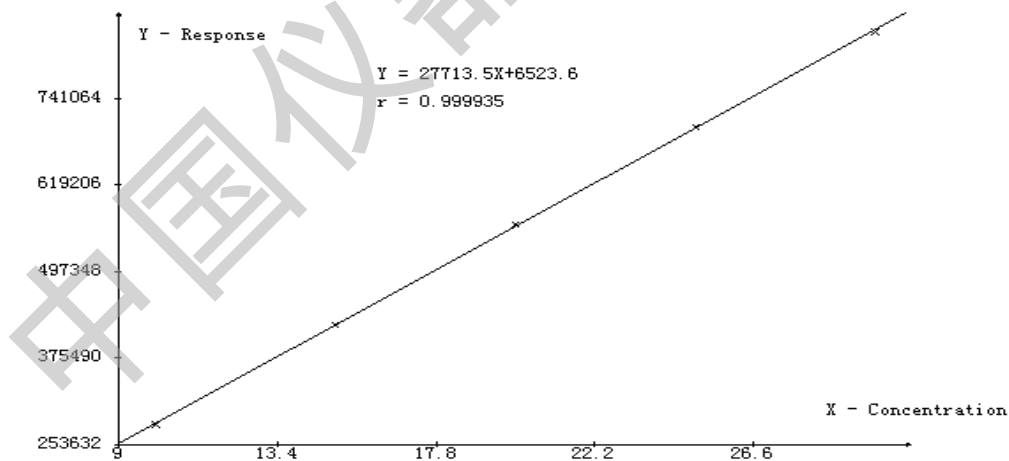


图 6 不同浓度维生素 B6 标准工作曲线

该工作曲线的线性方程为 $y=27713.5x+6523.6$ ，线性回归系数为 $r=0.999935$ 。线性范围良好，在范围内可对样品中的维生素 B₆ 含量做出较为准确的定量。

3.8 加标回收率测定

3.8.1 加标试样的制备方法

3.8.1.1 取四只 100mL 的棕色容量瓶，分别编号为 0、1、2 和 3。

3.8.1.2 准确称取四分 0.25g 的 1#多维饲料分别置于四只容量瓶中。

3.8.1.3 准确量取 2.0mL、4.0mL 和 6.0mL 的维生素 B6 标准贮备液，分别加入到 1、2 和 3 号容量瓶中。

3.8.1.4 按照 4.2 的方案处理四个容量瓶中的样品，用 0.45 μ m 滤膜过滤后，待用。

3.8.2 分别取不同标准加入量的四只容量瓶中的样品 20 μ L，注入设置好参数的高效液相色谱仪中，外标法计算各瓶的中维生素 B6 的浓度。

3.8.3 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	31.86 μ g/mL	--	--	--
1		10 μ g/mL	9.76 μ g/mL	97.60%
2		20 μ g/mL	19.32 μ g/mL	96.68%
3		30 μ g/mL	29.23 μ g/mL	96.64%

3.9 维生素预混合饲料中维生素 B6 的含量测定

3.9.1 试样制备：按照 4.2 的方法处理。

3.9.2 向设置好参数的高效液相色谱仪中注入 20 μ L 的维生素 B6 标准工作液 A 和 20 μ L 饲料试样，记录色谱图。

3.9.3 外标法检测饲料中维生素 B6 的含量为：12744 μ 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 B₆ 的含量的方法，实验过程中对分析方法做出调整，以符合实际的情况。改进方法后，定量重复性为 0.653%；定性重复性为 0.036%；检测限为 0.0423 μ g/mL；在 10 μ g/mL 到 30 μ g/mL 的范围内呈良好线性关系，线性相关系数为 $r=0.999935$ ；加标回收率在 96.64%到 97.60%；外标法计算饲料中维生素 B₆ 的浓度为 12744 μ g/mL。