

# HPLC 法测定饲料中维生素 A、维生素 D<sub>3</sub> 和维生素 E

王安群, 邓益群, 彭凤仙

(长沙环境保护技术学院, 湖南 长沙 410004)

**摘要:**建立了以  $w(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 95\%$  乙醇直接提取, 高效液相色谱仪在波长 280 nm 和 254 nm 处连续测定饲料中维生素 A、维生素 D<sub>3</sub> 和维生素 E 的方法。色谱柱为大连依利特 Hypersil ODS C<sub>18</sub> (25 cm  $\times$  4.6 mm  $\times$  5  $\mu\text{m}$ ), 流动相为甲醇-水, 流速为 1.2 mL/min。维生素 A、维生素 D<sub>3</sub>、维生素 E 的质量浓度分别在 1.0 mg/L ~ 20.0 mg/L、0.5 mg/L ~ 15.0 mg/L、2.5 mg/L ~ 50.0 mg/L 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 检测限分别为  $0.3 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ 、 $0.04 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ 、 $5.0 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ , 相对标准偏差分别为 1.6%、2.7%、2.4%, 平均回收率分别为 99%、102%、98%。

**关键词:** 高效液相色谱法; 维生素 A; 维生素 D<sub>3</sub>; 维生素 E; 饲料

中图分类号: O657.7<sup>+</sup>2

文献标识码: B

文章编号: 1006-2009(2005)02-0033-02

## To Detect Vitamin A, Vitamin D<sub>3</sub> and Vitamin E in Feed with HPLC

WANG An-qun, DENG Yi-qun, PENG Feng-xian

(Changsha Environmental Protection Technology Institute, Changsha, Hunan 410004, China)

**Abstract:** To detect Vitamin A, Vitamin D<sub>3</sub> and Vitamin E in feed, which to directly extract with  $w(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 95\%$  glycollic, with HPLC in 280 nm and 254 nm. Chromatographic column was Hypersil ODS C<sub>18</sub> (25 cm  $\times$  4.6 mm  $\times$  5  $\mu\text{m}$ ), mobile phase was methanol-water, velocity of flow was 1.2 mL/min. When the mass concentration of Vitamin A, Vitamin D<sub>3</sub> and Vitamin E was 1.0 mg/L ~ 20.0 mg/L, 0.5 mg/L ~ 15.0 mg/L, 2.5 mg/L ~ 50.0 mg/L, there had a well lineal relationship. Detection limit was  $0.3 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ ,  $0.04 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ ,  $5.0 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ . Relative standard deviation was 1.6%, 2.7%, 2.4%, recovery rate was 99%, 102%, 98%.

**Key words:** HPLC; Vitamin A; Vitamin D<sub>3</sub>; Vitamin E; Feed

维生素是维持机体正常活动必不可少的物质, 适量的各种维生素作为饲料添加剂能促进禽畜生长, 增强禽畜体质, 产生显著的经济效益。目前常采用分光光度法<sup>[1]</sup>或皂化后用乙醚、石油醚<sup>[2]</sup>、丙酮、正己烷<sup>[3,4]</sup>提取再用高效液相色谱法 (HPLC) 测定脂溶性维生素 A、维生素 D<sub>3</sub>、维生素 E, 手续较为繁琐。今在多年的分析检测基础上, 参阅文献<sup>[5]</sup>, 建立了一种快速简便的测定方法。

### 1 实验

#### 1.1 主要仪器和试剂

Waters 244 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司, 配 2487 紫外检测器和江申色谱工作站; 依利特 Hypersil ODS C<sub>18</sub> 色谱柱, 25 cm  $\times$  4.6 mm  $\times$  5  $\mu\text{m}$ , 大连中科院化物所; 溶剂及试样过滤处理系统,

Millipore 产; 维生素 A、维生素 D<sub>3</sub>、维生素 E, Emerck 产; 实验用水为去离子水经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。

#### 1.2 色谱条件

柱温室温; 流动相  $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 98 : 2$ , 流量 1.2 mL/min; 紫外检测器, 波长维生素 A、维生素 E 为 280 nm, 维生素 D<sub>3</sub> 为 254 nm; 灵敏度 0.5 ~ 0.05 AUFS。

#### 1.3 样品预处理和测定

称取 0.2 g ~ 2 g 样品 (多维样品称 0.2 g, 预混料视含量为 0.5 g ~ 2 g), 加入  $w(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 90\%$  乙醇 5 mL, 浸泡 10 min, 再补加无水乙醇 5 mL, 于超声波发生器中超声提取 30 min, 用

收稿日期: 2004-03-23; 修订日期: 2005-01-30

作者简介: 王安群 (1962—), 女, 江西吉安人, 高级工程师, 学士, 从事环境监测教学工作。

0.45 μm 滤膜过滤,在给定色谱条件下测定。维生素 A、维生素 D<sub>3</sub>、维生素 E 色谱峰见图 1。

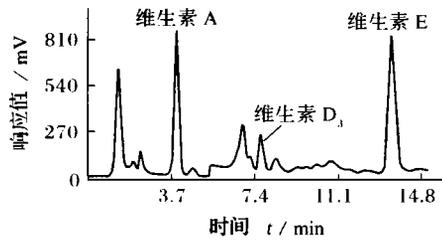


图 1 维生素 A、维生素 D<sub>3</sub>、维生素 E 色谱峰

## 2 结果与讨论

### 2.1 流动相的选择

测定多维样品时,流动相可选用纯甲醇,峰型很好。由于预混料类样品成分复杂,若用纯甲醇为流动相,分离效果不佳。当  $V(\text{甲醇})/V(\text{水}) = 95/5$  时,出现峰拖尾现象,选用  $V(\text{甲醇})/V(\text{水}) = 98/2$ ,达到了很好的分离效果。

### 2.2 样品的预处理

样品预处理的方法对维生素 A、维生素 D<sub>3</sub>、维生素 E 的提取率影响较大。参考文献 [3] 发现,采用乙醚、石油醚超声提取样品 30 min,维生素 A 只能提取 25%,维生素 D<sub>3</sub> 提取 20%,提取 1 h,维生素 A、维生素 D<sub>3</sub> 提取率变化不大。这是由于维生素 A、维生素 D<sub>3</sub> 在生产过程中,外表包裹了一层明胶和糊精,它们在乙醚、石油醚中难以溶解。今采取先用  $w(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 90\%$  乙醇浸泡,使维生素 A、维生素 D<sub>3</sub> 的外壳膨胀,再补加无水乙醇至  $w(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 95\%$ ,超声提取 30 min,维生素 A、

维生素 D<sub>3</sub>、维生素 E 的提取率均达到了 96% 以上。同时,还进行了  $w(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 100\%$ 、 $w(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 95\%$  和  $w(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 90\%$  乙醇的提取实验, $w(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 100\%$  乙醇超声提取 30 min,维生素 A、维生素 D<sub>3</sub> 提取率约为 50% 和 70%; $w(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 90\%$  乙醇提取,维生素 D<sub>3</sub> 有明显降解,维生素 E 峰有拖尾现象; $w(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 95\%$  乙醇提取,维生素 D<sub>3</sub> 稍有降解。在提取过程中,加入维生素 C 0.1 g,可防止维生素 A、维生素 D<sub>3</sub> 的降解。

### 2.3 标准曲线及检测限

配制 1.0 mg/L、2.5 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L、15.0 mg/L 和 20.0 mg/L 维生素 A,0.5 mg/L、1.2 mg/L、2.5 mg/L、5.0 mg/L、7.5 mg/L 和 10.0 mg/L 维生素 D<sub>3</sub> 及 0.5 mg/L、6.2 mg/L、12.5 mg/L、25.0 mg/L、37.5 mg/L 和 50.0 mg/L 维生素 E,在给定色谱条件下进行测定,以质量浓度  $x$  与峰面积  $y$  作线性回归,回归方程维生素 A:  $y = 2.89 \times 10^8 x - 5.27 \times 10^3$ ,  $r = 1.000$ ; 维生素 D<sub>3</sub>:  $y = 1.07 \times 10^8 x + 1.74 \times 10^5$ ,  $r = 0.9994$ ; 维生素 E:  $y = 2.14 \times 10^5 x + 5.6 \times 10^2$ ,  $r = 0.9986$ 。灵敏度 0.05 AUFS,信噪比 ( $S/N$ ) = 3 时,检测限维生素 A 为  $0.3 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ ,维生素 D<sub>3</sub> 为  $0.04 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ ,维生素 E 为  $5.0 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ 。

### 2.4 精密度与加标回收率

称取猪用预混合饲料 1.000 0 g 各 10 份,其中 5 份同时加入维生素 A、维生素 D<sub>3</sub>、维生素 E 标准品,经预处理后用高效液相色谱测定,结果见表 1。

表 1 维生素 A、维生素 D<sub>3</sub>、维生素 E 加标回收率与精密度试验

加标量 $m/\mu\text{g}$	回收量 $m/\mu\text{g}$				回收率 / %	相对标准差 / %	
维生素 A: 34.2	34.0	33.5	34.8	33.7	33.9	98~101	1.6
维生素 D <sub>3</sub> : 21.4	21.5	20.8	21.8	21.6	22.0	96~103	2.7
维生素 E: 113.0	112	109	115	110	114	96~102	2.4

从表 1 可见精密度和加标回收率均较好。采用乙醇提取样品高效液相色谱仪紫外检测器,在不同波长可一次测定维生素 A、维生素 D<sub>3</sub> 和维生素 E,方法简便、快捷、可靠。

### [参考文献]

- [1] 岳宁,杨振海. 进口饲料添加剂分析手册 [M]. 北京: 中国对外经济贸易出版社, 1993.  
[2] 詹益兴,金至清. 色谱应用实例 (第 2 集) [M]. 长沙: 湖南

科学技术出版社, 1993.

- [3] 曹治. 高效液相色谱仪快速测定复合维生素的方法研究 [J]. 中国饲料, 1997, (8): 35~37.  
[4] 陈翠莲,袁东显,陈猛. 预混合饲料中维生素 A、D、E 的微波萃取法 [J]. 分析科学学报, 1999, 15(1): 36~38.  
[5] SHARPLESS K E, MARGOLIS S, THOMAS J B. Determination of Vitamins in Foodmatrix Standard Reference Material's [J]. Chromatography A, 2000, (881): 171~181.

本栏目责任编辑 李延嗣 姚朝英