

在线二维柱切换法同时测定饲料中维生素 A、D 和 E 的含量

张艳海 金燕

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

饲料，脂溶性维生素，多维分离，双三元液相色谱

引言

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。GBT17817-2010、17818-2010 和 17812-2010 采用 HPLC 法分别测定饲料中维生素 A、D 和 E 的含量，样品均需要经过皂化、乙醚萃取过程，通常 Vitamin A 和 Vitamin E 在样品中含量较高，受基质干扰较少，可直接进样分析；但 Vitamin D 含量较低，易受基质干扰，需要经过制备液相色谱的净化，收集含有 Vitamin D 的流出物后，再以 RP 或 NP-LC 进行分析，前处理过程极其繁琐。本实验拟采用在线二维中心切割方法，同时完成维生素 ADE 的测定。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系统，包括有带在线脱气单元的双三元梯度泵，自动进样器，柱温箱，DAD

一维分析柱：Acclaim C18，120Å，3 × 150mm × 3μm

二维分析柱：Acclaim Polar Advantage II C18 120Å

4.6 × 150mm × 3μm

柱温：30 °C

检测波长：263 nm, 280nm, 325nm

进样量：5 μL；

流动相组成：

一维分离泵：A，甲醇；B，水；

二维分析泵：A，甲醇；B，乙腈；C，水

一维和二维梯度分离程序见表 1，表 2。

系统连接见图 1。



表 1. 一维分析泵及阀切换时间

时间 (min)	Flow mL/min	A%	B%	阀切换时间	右阀位置	左阀位置
0	0.5	85	15	0	1-2	1-6
1.5	0.5	85	15	17	1-10	1-6
15	0.5	100	0	17.6	1-2	1-6
30	0.5	100	0	25.0	1-2	1-2
30.2	0.5	85	15	35.0	1-2	1-6

表 2. 二维分析泵梯度

时间 (min)	A%	B%	C%
0	10	0	90
18.0	10	0	90
20.0	60	40	0
35.0	60	40	0
36.0	10	0	90

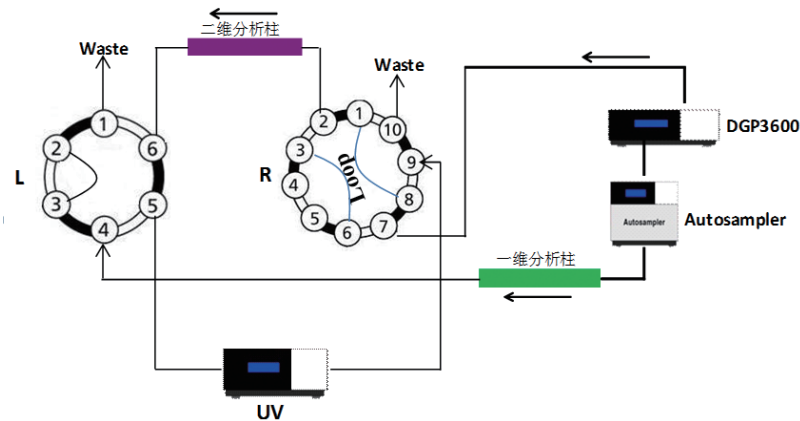


图 1. 系统连接图 (Loop 环体积 500μL)

样品前处理

精密称取饲料样品 5 g，于 150 mL 锥形瓶中，加入 5g/L 的维生素 C 乙醇溶液 100mL，再加入 500g/L 的氢氧化钾溶液 25mL，在沸水浴回流 30 分钟，不时振荡，防止样品附着在瓶壁上，皂化结束分别用少量水自顶端冲洗其内部，取出锥形瓶并冷却至 40℃。将皂化液转移至 500mL 分液漏斗中，以石油醚萃取 3 次，

每次 100mL，合并萃取液，萃取液以水洗涤 3~5 次，至中性 (pH 试纸测试)，收集石油醚层，经过无水硫酸钠脱水。低温减压回收石油醚，至 1~2mL 时转移至 10mL 棕色瓶中，氮气吹干，再以 3~5mL 甲醇使溶解并转移至 10mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，摇匀，待用。未用完溶液放入 4℃ 冰箱保存。

标准品色谱图

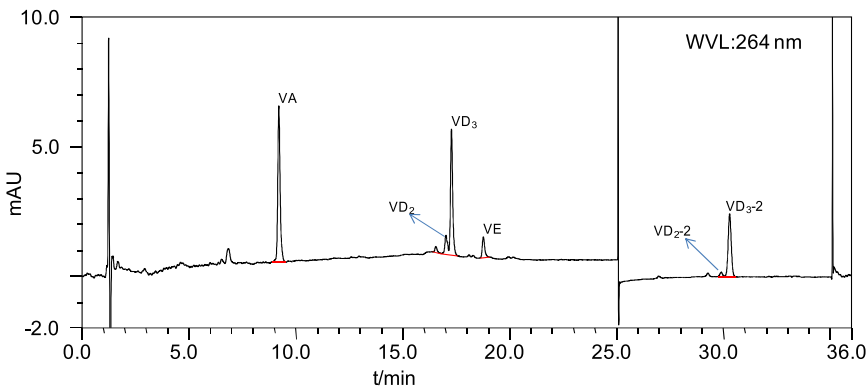


图 2. 混合标准品谱图

(0~25min 为第一维分离谱图；25~35min 为第二维分离谱图)

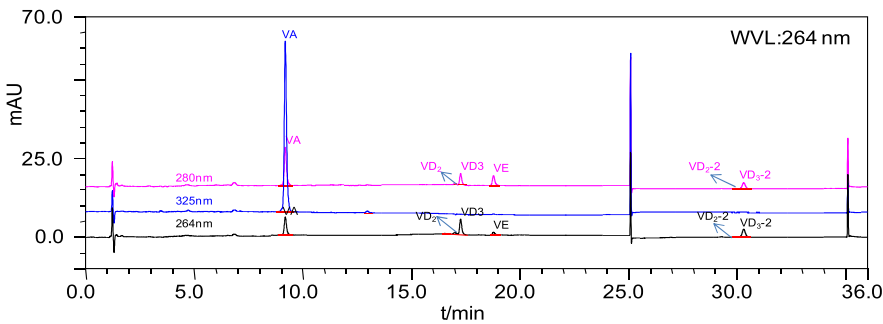


图 3. 混合标准品溶液在 264nm (下图)，325nm (中间图) 和 280nm (上图) 叠加谱图

实际样品的分析

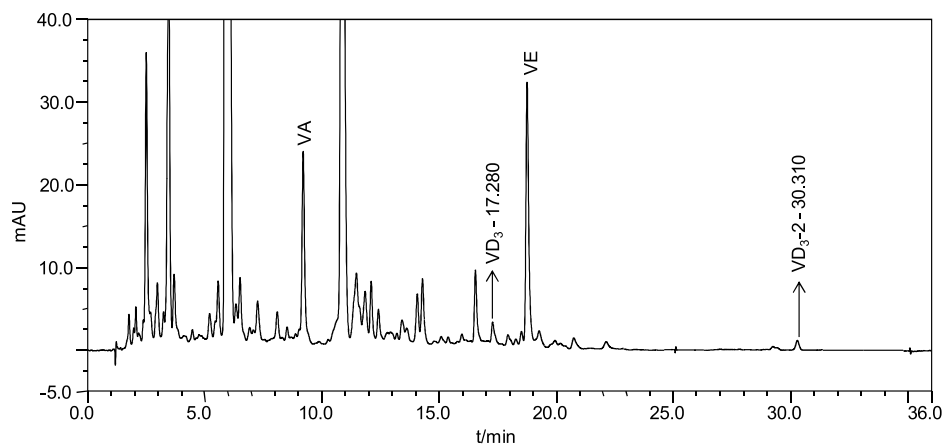


图 4. 浓缩饲料样品分离谱图

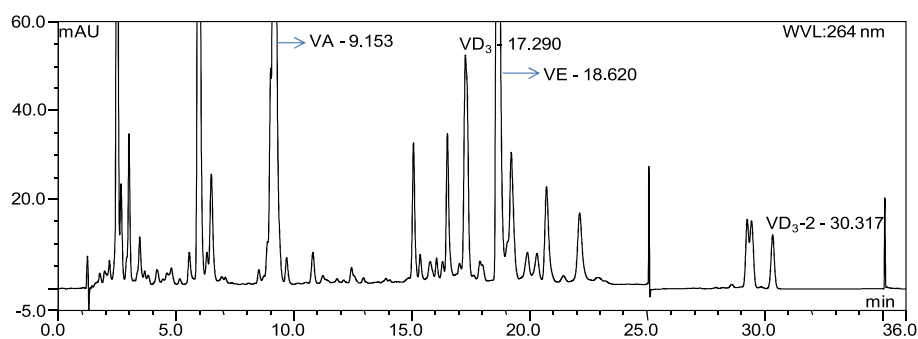


图 5. 猪复合预混合饲料分离谱图（0-25min 为一维分离；25-35min 为二维分离）

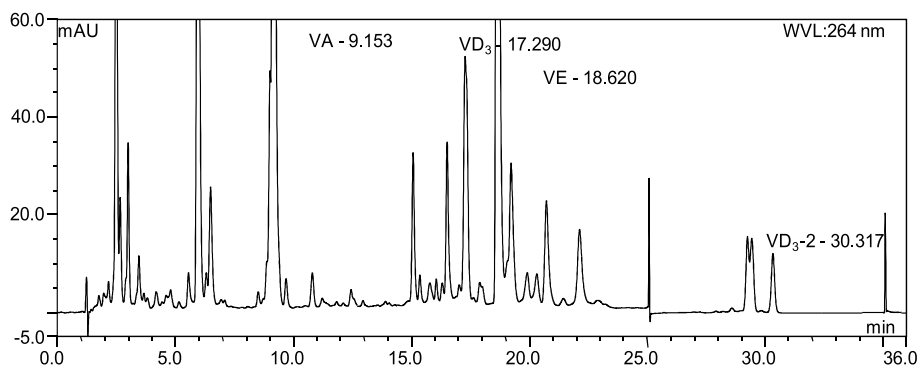


图 6. 猪复合预混合饲料分离谱图（264nm，0-25min 为一维分离；25-35min 为二维分离）

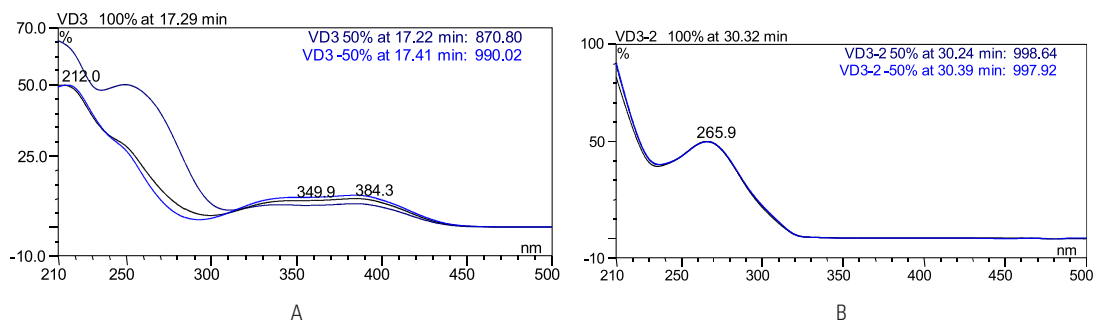


图 7. 猪复合饲料第一维（A）和第二维（B）分离中 VD3 色谱峰 UV 扫描图

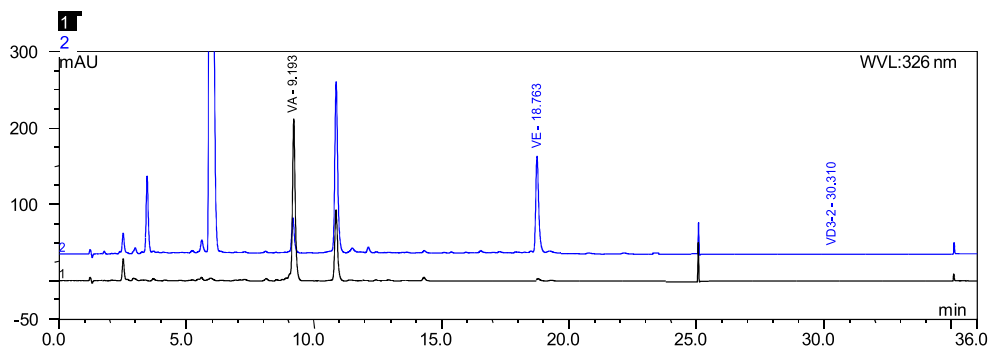


图 8. 猪复合饲料样品在 326nm (1) 和 280nm (2) 波长下叠加谱图

含量测定结果

表 3. 浓缩饲料含量测定结果 (n=2)

	取样量 g	测得含量 mg/100g
维生素 D3		0.0825
维生素 A	10.1260	5.345
维生素 E		72.706

表 4. 猪复合饲料含量测定结果 (n=2)

	取样量 g	测得含量 mg/100g
维生素 D3		0.808
维生素 A	10.0525	1.102
维生素 E		812.98

可行性分析

本文利用双梯度液相色谱 (DGLC) 建立了在线二维柱切换法同时测定饲料中脂溶性维生素 ADE 含量的方法, 与

常规方法比较, 本法简便、快速, 简化了样品前处理过程, 提高样品分析效率, 同时由图 7 可以看出, 采用二维色谱分离可以减少色谱峰的重叠, 改善方法的专属性。

赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司

免费服务热线: 800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

ThermoFisher
SCIENTIFIC