

高效液相色谱法检测预混饲料中维生素 B₁ 的含量

维生素 B₁ 是一种常见的水溶性的维生素，参与机体内辅酶的形成，并且不能自行合成，必须要从外界获取。



维生素 B₁ 适用于维生素 B₁ 缺乏症，具有维持正常糖代谢及神经传导的功能，也用于消化不良、神经炎等的辅助治疗，对于机体的生理功能、新陈代谢有着非常重要的作用。



维生素作为各种关键酶部分，畜禽缺乏时，易产生碳水化合物代谢障碍，食欲减退，生长迟缓，消化道疾病及繁殖障碍等症。



因此，在饲料中添加维生素 B₁ 能够有效的预防动物在生长发育过程中出现的上述症状。然而预混饲料中维生素 B₁ 含量的检测需要一个科学的实验方法，本次实验使用悟空 Wooking K2025 高效液相色谱仪对其进行检测。

实验部分

高效液相色谱法测定
预混饲料中维生素 B₁ 的含量

仪器与试剂

仪器与设备：

悟空 Wooking K2025 高效液相色谱仪，分析天平(精确到 0.0001g)，容量瓶(10、100、1000mL，带刻度)，涡旋振荡器等；



悟空 Wooking K2025 高效液相色谱仪

试剂与材料：

符合 GB/T6682 的一级水；甲醇(色谱级)；冰乙酸(优级纯)；三乙胺(分析纯)；庚烷磺酸钠(优级纯)；二水合乙二胺四乙酸二钠(优级纯)；酸性乙醇溶液；维生素 B1(硝酸硫胺素，纯度大于 99%)。

实验方法

样品前处理：

称取试样 0.25 g~0.5 g(精确到 0.0001 g)，置于 100 mL 棕色容量瓶中，加入提取液约 70 mL，边加边摇匀，置于超声水浴中超声提取 15 min，期间摇动 2 次，冷却，用提取液定容至刻度，摇匀。取少量溶液于离心机上 8000 r/min 离心 5 min，上清液过 0.45μm 微孔滤膜，待上机测定。

色谱条件

①色谱柱: C18 4.6×250mm，5μm 或者相当的色谱柱；

②流动相: 称取庚烷磺酸钠 1.1g、EDTA 50mg 于 1000 mL 容量瓶中，加入约 1000 mL 水，同时加入 25 mL 冰乙酸、约 10mL 三乙胺，超声使固体溶解，用 pH 计调节溶液 pH 为 3.7，过 0.45μm 滤膜，取 800mL 该溶液，与 200 mL 甲醇混合；

③柱温：25℃；

④进样量：20μL；

⑤流速：1.0 mL/min；

⑥波长：242nm。

结果与讨论

1、按照上述色谱条件进行采集，维生素 B1 标准溶液的色谱图 1 如下：

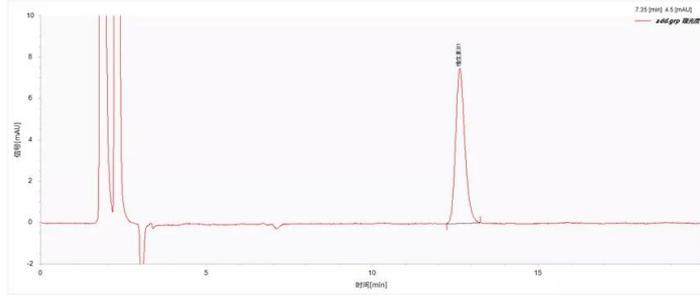


图 1 维生素 B1 标准溶液 (5µg/mL) 色谱图

2、将维生素 B1 标准溶液逐级稀释至信噪比 S/N 为 3 左右，计算仪器的检出限，数据结果见表 1。经计算仪器针对维生素 B1 检出限为 0.089µg/mL，定量限为 0.296µg/mL。

表 1 灵敏度测试数据

目标物	浓度(µg/mL)	峰高(mV)	噪声(mV)	S/N	LOD(µg/mL)	LOQ(µg/mL)
维生素 B ₁	0.1	0.230	0.068	3.382	0.089	0.296

3、将维生素 B1 浓度为 1µg/mL、2µg/mL、5µg/mL、10µg/mL 和 20µg/mL 的标准曲线溶液在 HPLC 上进行测定，绘制校准曲线，线性方程及相关系数见图 2，曲线的相关系数为 0.9999，线性关系良好。

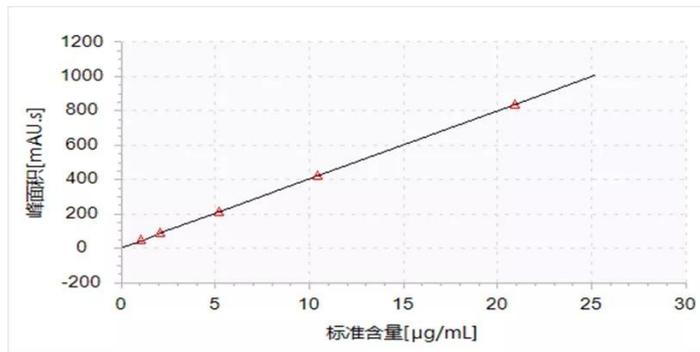


图 2 维生素 B1 标准溶液校准曲线

4、购买市售的预混饲料作为样品进行处理，并根据样品含量对样品进行加标回收实验。

经计算，此市售的预混饲料样品中维生素 B1 的含量为 769mg/kg，加标回收率为 93%。

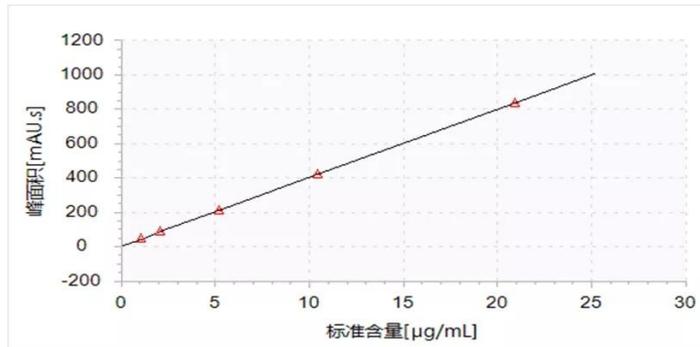


图 3 市售预混饲料样品色谱图

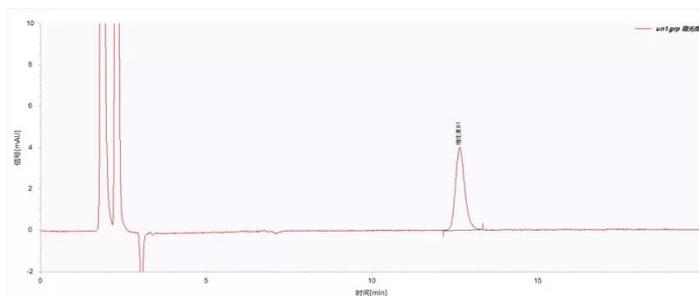


图 4 市售预混饲料加标回收实验色谱图

结果与讨论

通过对维生素 B1 线性、重复性、灵敏度的测试以及对市售预混饲料样品中维生素 B1 的含量进行测定。结果表明，使用悟空 Working K2025 高效液相色谱仪测定维生素 B1 线性关系良好，确定系数 R2 为 0.9999；连续进样 7 针，标准品保留时间的 RSD 为 0.060%，峰面积 RSD 为 0.269%，定性、定量均有良好的重复性；仪器检出限为 0.089 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，定量限为 0.296 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 完全满足饲料中维生素 B1 含量测定的需求。