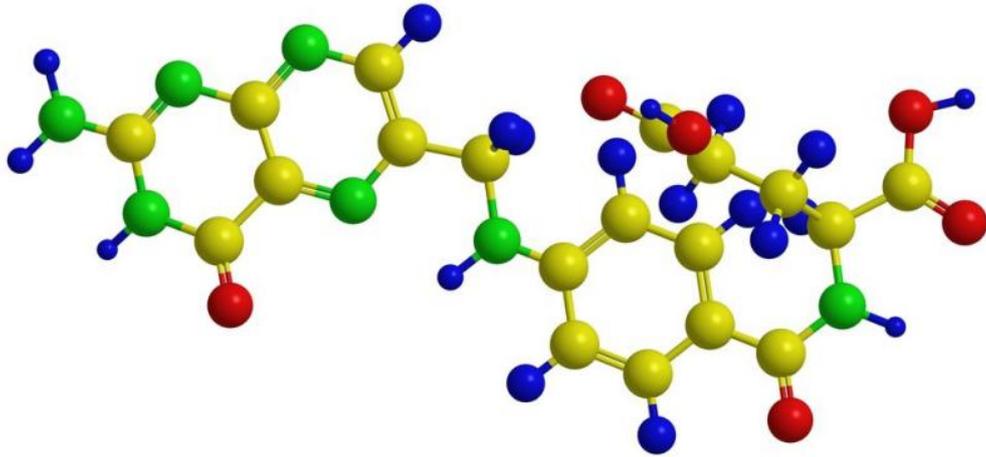


高效液相色谱法检测预混饲料中叶酸的含量

叶酸属于维生素 B 复合体，是一种常见的水溶性维生素，因最早是从菠菜叶中提取纯化而得，所以被命名为叶酸。



叶酸具有促进骨髓中幼细胞成熟的作用，同时参与不同酶系统中辅酶及嘌呤的合成，对 DNA 和 RNA 的合成十分重要。作为一种重要的营养素，在不同生理阶段补给叶酸，能够改善机体的生长性能和免疫机能，对动物机体的许多生理功能产生促进作用。



饲料中添加叶酸对维持母猪的繁殖性能和促进胚胎早期发育有着重要作用。研究表明，母猪日粮添加饲料级叶酸可提高胚胎存活率，稳定提高窝产仔数。

实验部分：

预混饲料中叶酸的含量测定 高效液相色谱法

【仪器与试剂】

仪器与设备: 悟空 K2025 高效液相色谱仪; 分析天平(精确到 0.0001g); 涡旋振荡器; 超声波清洗机; 离心机; 容量瓶(100mL、1000mL, 棕色带刻度)。

试剂与材料: 符合 GB/T6682 的一级水; 甲醇(色谱级); 冰乙酸(优级纯); 庚烷磺酸钠(色谱纯); 三乙胺(优级纯); 无水碳酸钠; 0.45 μm 滤膜; 叶酸标准品(含量 $\geq 95.0\%$)。

【样品前处理】

称取试样 0.5 g (精确到 0.001 g), 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 加入约 70 mL 水、4 mL 2 mol/L 碳酸钠溶液, 置于超声水浴中超声提取 10 min, 期间摇动 2 次; 待冷却后加水至约 95 mL, 再次检查试样溶液 pH 值, 确认 pH 值为 8~9, 否则滴加少量碳酸钠溶液调节; 用水定容至刻度, 摇匀。取部分试液离心 5 min, 取上清液过滤, 待上机测定。

【色谱条件】

a) 色谱柱: C_{18} 4.6 \times 150mm, 5 μm 或者相当的色谱柱;

b) 流动相: 称取 1.1g 庚烷磺酸钠、50 mg EDTA 溶于约 1000 mL 水中, 加入 20 mL 冰乙酸、5 mL 三乙胺混匀, 用冰乙酸、三乙胺调节溶液 pH 值为 4.0, 过 0.45 μm 滤膜。取上述溶液 800 mL 与 200 mL 甲醇混合, 备用;

c) 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$;

d) 进样量: 20 μL ;

e) 流速: 1.0 mL/min;

f) 波长: 282nm。

【结果与讨论】:

1. 叶酸标准溶液色谱图如图 1 所示:

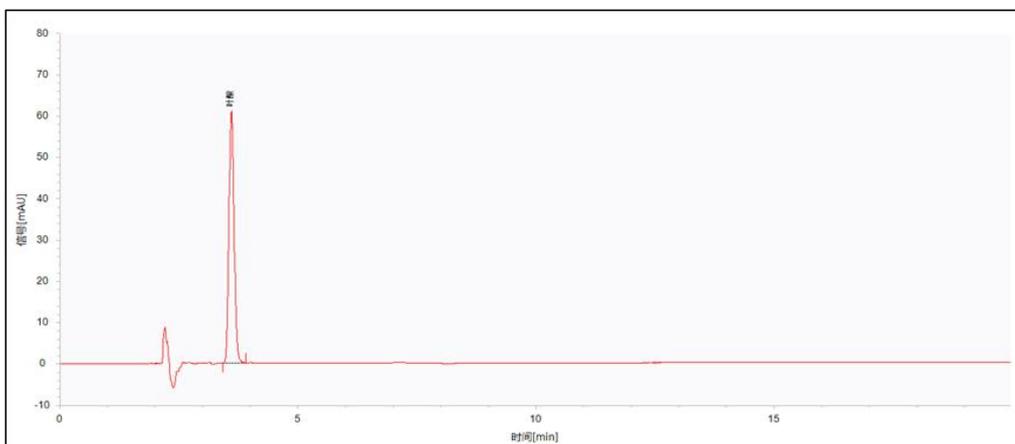


图 1 叶酸标准溶液 (5 $\mu\text{g/mL}$) 色谱图

2. 将叶酸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。经计算仪器针对叶酸的检出限为 0.00939 $\mu\text{g/mL}$, 定量限为 0.0313 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 灵敏度测试数据

目标物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
叶酸	0.01	0.115	0.036	3.2	0.00939	0.0313

3. 将系列叶酸标准溶液在 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 0.99999, 线性关系良好。

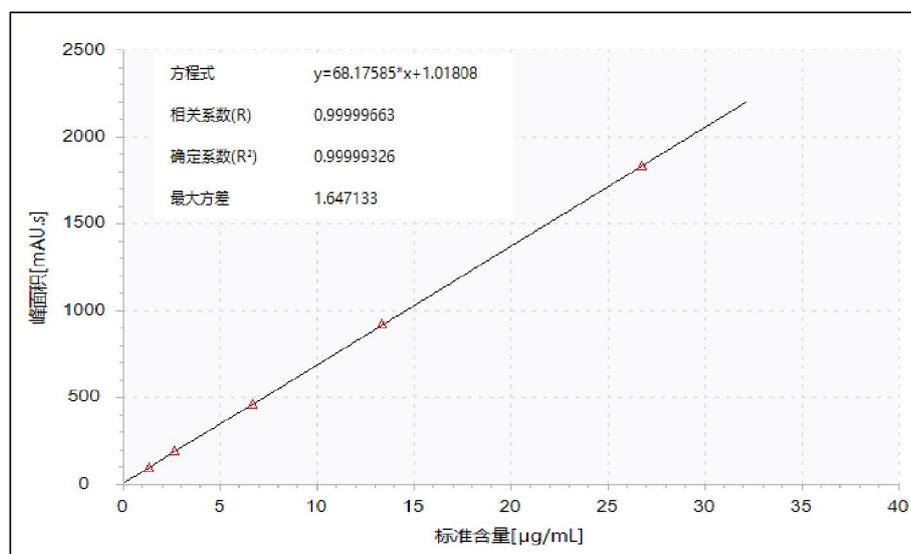


图 2 叶酸标准溶液校准曲线

4. 购买市售的预混饲料作为样品进行处理, 并进行加标回收实验, 样品加标回收色谱图如图 3; 经计算, 此市售预混饲料样品加标后叶酸含量为 75.2 mg/kg, 加标回收率为 93.8%。

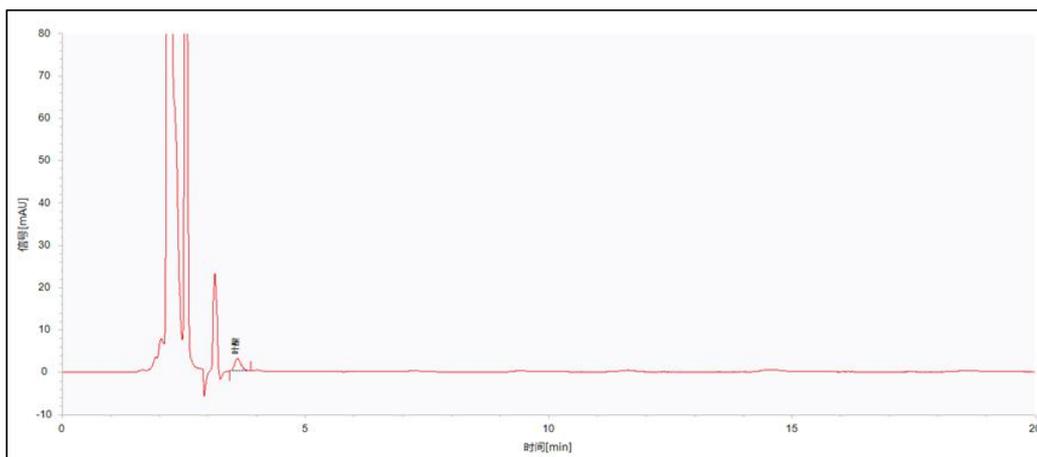


图 3 市售预混饲料加标回收色谱图

【结论】

使用 K2025 高效液相色谱仪测定饲料中的叶酸含量具有良好的线性关系, 确定系数 R^2 为 0.99999; 连续进样 7 针, 标准品保留时间的 RSD 为 0.084%, 峰面积 RSD 为 0.117%, 定性、定量均有良好的重复性; 仪器检出限为 $0.00939\mu\text{g/mL}$, 定量限为 $0.0313\mu\text{g/mL}$, 完全满足标准《GB/T 17813-2018 添加剂预混合饲料中烟酸和叶酸的测定 高效液相色谱法》针对饲料中叶酸含量测定的需求。