

预混合饲料中 D-泛酸钙和 D-生物素的 UPLC 测定

雷萍

(上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所,上海 201106)

摘要:采用超高压高效液相色谱法(HPLC),在最优化条件下,以 ACQUITY UPLC BEH C18 为色谱柱、甲醇和三氟乙酸为流动相进行等梯度洗脱,可实现对预混合饲料中 D-泛酸钙和 D-生物素的联检。上述各组分在4 min内完全分离;各组分浓度与峰面积在 5~200 mg/mL 呈良好线性关系,检测下限(S/N=3)分别为 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

关键词:预混合饲料;D-泛酸钙;D-生物素;UPLC

中图分类号:Q503;S816.7 **文献标识码:**A

Determination of D-calcium pantothenate and D-biotin in premixed feeds by ultrahigh-performance liquid chromatography

LEI Ping

(Institute for Agro-Product Quality Standards and Testing Technology, SAAS, Shanghai 201106, China)

Abstract: Using ultrahigh-performance liquid chromatography(UPLC) could jointly determine D-calcium pantothenate and D-biotin levels in premixed feeds with an ACQUITY UPLC BEH C18 as a chromatographic column, methanol and trifluoroacetic acid as a mobile phase, and constant gradient elution. The above two components were completely separated within 4 minutes, and each component's concentration presented a good linear relationship with the peak area in the range of 5~200 mg/mL. The detection limit(S/N=3) was 1.5 $\mu\text{g/mL}$ for D-calcium pantothenate and 1.5 $\mu\text{g/mL}$ for D-biotin.

Key words: Premixed feed; D-calcium pantothenate; D-biotin; UPLC

D-泛酸钙和 D-生物素在生物代谢中具有重要的作用,动物一旦缺乏 D-泛酸钙和 D-生物素,会导致许多器官组织受损,出现生长缓慢、体重减轻、神经系统紊乱、皮肤和羽毛病变、肠道和呼吸道疾病^[1]以及呕吐、贫血、鳞状皮炎^[2]等症状,因此 D-泛酸钙和 D-生物素常作为重要的营养素添加到饲料中。

与目前普遍添加到饲料中的其他维生素类似,对于不同动物的不同生长阶段,D-泛酸钙和 D-生物素的添加量变化很大。为了对这两种维生素在饲料生产过程中的添加进行有效的质量控制,对饲料中 D-泛酸钙和 D-生物素的含量测定就显得尤为重要。目前,对于饲料中 D-泛酸钙和 D-生物素的检测存在下列问题:一是我国尚未制定关于饲料中泛酸钙的检测标准,应用茜素分光光度法^[3]、旋光度法^[4]测定 D-泛酸钙含量不能有效地区分真假 D-泛酸钙;二是饲料中 D-生物素溶解度较差^[5],存在回收率偏低的问题,不利于检测工作的开展;三是 D-泛酸钙和 D-生物素都属于水溶性物质,在利用 HPLC 测定过程中,饲料中还同时存在多种水溶性维生素,易对其测定产生干扰。

本研究在查阅国内外文献的基础上,并参考《GBT 18397-2001 复合预混合饲料中泛酸的测定高效液相色谱法》^[6]和《GBT 17778-2005 预混合饲料中 D-生物素的测定》^[7]方法,对试样提取条件、色谱测定条件进行改进,利用超高压高效液相色谱(UPLC),建立简便、快速的分析操作程序,较大程度地缩短样品前处理与上机时间,进而改善样品峰分离度,提高工作效率。

1 材料和方法

1.1 仪器

WATERS ACQUITY UPLC 超高压高效液相检测系统;ACQUITY TUV Detector;恒温超声波仪(0~60 $^{\circ}\text{C}$)。

收稿日期:2009-10-10 初稿:2010-08-01 二改稿

作者简介:雷萍(1977-),女,大学本科,实验师,研究方向:饲料中维生素、兽药的检测方法研究。E-mail:leiping@citiz.net

1.2 试剂

D-泛酸钙、D-生物素购自 Sigma 公司。三氟乙酸、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。两种标准储备液浓度均为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$,用去离子水配制,避光 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存。其他不同浓度的工作液,用去离子水稀释得到。

缓冲液:0.05%三氟乙酸(用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 2.5)。试液与运行缓冲液均经 0.22 μm 聚丙烯滤膜过滤后再使用。

1.3 样品处理

称取维生素预混料约 2 g(精确至 0.0001 g)、复合预混料 5~10 g(精确至 0.0001 g),置于磨口平底烧瓶中,加入 20.0 mL 0.05%三氟乙酸置超声波提取器中超声 15 min 后,用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 5~7,然后转移到 100 mL 容量瓶中,用去离子水稀释至刻度,然后用 0.22 μm 聚丙烯滤膜过滤。D-生物素可取滤液直接上机;D-泛酸钙可取滤液直接上机或由提取液进行适当稀释后过 0.22 μm 滤膜上机。

1.4 液相色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C18(1.8 μm , 2.1 mm \times 100 mm);柱温箱温度:30 $^{\circ}\text{C}$;进样体积:5 μL ;流动相:A(甲醇):B[0.05%三氟乙酸(用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 2.5)]=25:75;流速:0.25 mL/min;波长:210 nm。

2 结果与分析

2.1 试样提取条件的选择

用 0.05%三氟乙酸作为溶剂先超声提取 D-生物素和 D-泛酸钙,再用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 5~7。

2.2 缓冲液酸度与浓度

选用甲醇-0.05%三氟乙酸体系作流动相,获得了满意的效果(图 1)。

饲料中的水溶性维生素如维生素 C、烟酸、维生素 B₁、维生素 B₆ 等在该色谱条件下在 D-泛酸钙之前出峰,维生素 B₂ 及脂溶性维生素如维生素 A 等在生物素之后出峰,不干扰测定(图 2)。

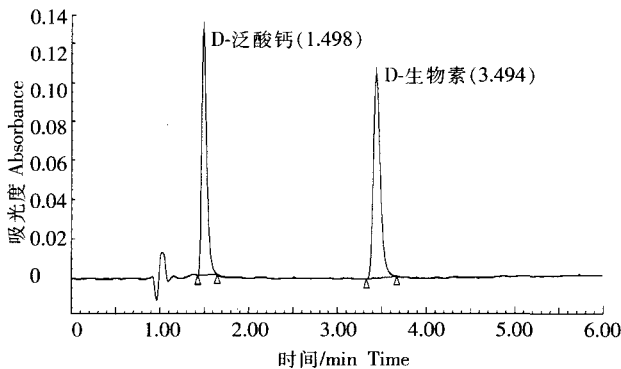


图 1 D-泛酸钙和 D-生物素标准样品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of D-calcium pantothenate and D-biotin standard samples

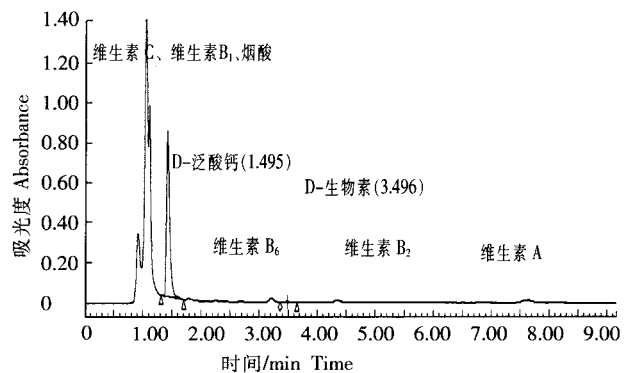


图 2 维生素 C、烟酸、B₁、B₆、D-泛酸钙、D-生物素、维生素 B₂ 及维生素 A 色谱图

Fig. 2 Chromatogram of vitamin C, niacin, vitamin B₁, vitamin B₆, D-calcium pantothenate, D-biotin, vitamin B₂ and vitamin A

2.3 重现性、线性范围、检测限及定量限

在上述优化条件下,将浓度均为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ D-泛酸钙标准溶液和 D-生物素标准溶液连续进样 7 次,重现性良好。峰面积的相对标准偏差(RSD)按出峰次序分别为 2.6% 和 2.9%。

配制一系列不同浓度(5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 D-泛酸钙标准溶液和 D-生物素标准溶液,在上述优化条件下测得峰面积,以峰面积对浓度作图,得到 D-泛酸钙和 D-生物素的工作曲线。以信噪比(S/N = 10)对应浓度确定定量限,以信噪比(S/N = 3)对应浓度确定检测下限(表 1)。

表 1 线性回归方程和检测下限

Table 1 Linear regression equations and detection limits

化合物 Compound	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	线性范围/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Linear range	检测限/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Detection limit
D-泛酸钙 D-calcium pantothenate	$y = 2.65 \times 10^3 x + 2\ 200$	0.9999	5~200	1.5
D-生物素 D-biotin	$y = 3.53 \times 10^3 x - 4\ 670$	0.9997	5~200	1.5

2.4 样品测定

在同一色谱分离条件下,对预混料中 D-泛酸钙和 D-生物素进行了分离检测(图 3)。

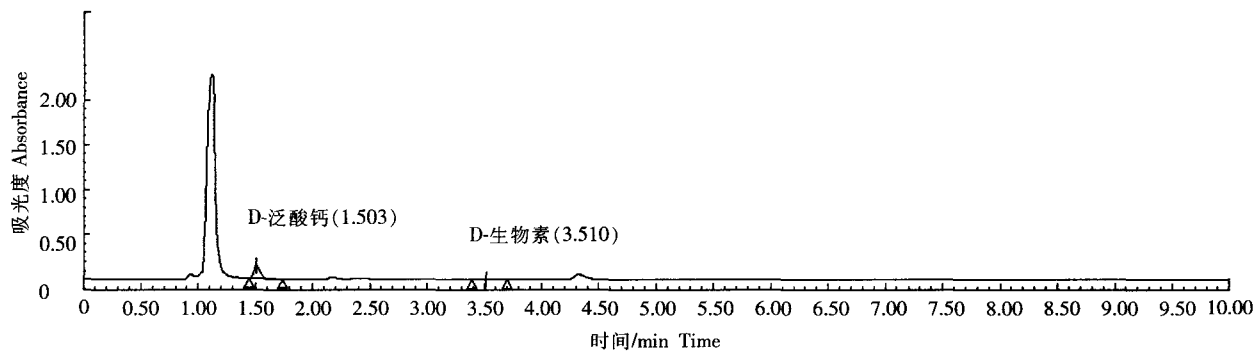


图 3 预混料样品中 D-泛酸钙和 D-生物素色谱图

Fig. 3 Chromatogram of D-calcium pantothenate and D-biotin in premix sample

2.5 回收率

采用标准加入法对预混合饲料进行了回收率试验(表 2),5 次测得的预混合饲料中 D-泛酸钙和 D-生物素的回收率及 RSD 分别为 98%(3.5%)、95%(4.1%),表明在上述优化条件下本方法具有可行性。

表 2 预混料中 D-泛酸钙和 D-生物素含量的分析结果(n=5)

Table 2 Assay results of D-calcium pantothenate and D-biotin in premix samples(n=5)

样品 Sample	组分 Ingredient	测得值/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Measured value	RSD %
维生素预混合饲料 Vitamin premixed feed	D-泛酸钙 D-calcium pantothenate	22 905	2.3
	D-生物素 D-biotin	673	3.9
复合预混合饲料 Composite premixed feed	D-泛酸钙 D-calcium pantothenate	5 308	2.2
	D-生物素 D-biotin	193	3.4

3 结 论

3.1 D-生物素在水溶液、甲醇、乙醇等常见溶剂中的溶解度较低^[5],而选用 0.05% 三氟乙酸作为溶剂则溶解效果好。考虑到泛酸钙易溶于水,其水溶液在 pH 5~7 比较稳定的特性,故本试验选择用 0.05% 三氟乙酸作为溶剂先提取生物素和泛酸钙,再用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 5~7,以促进生物素的溶解和降低泛酸钙在提取过程中的损失。

3.2 由于泛酸钙在水溶液中离解为泛酸,生物素分子带有羧基,是弱酸性化合物,在中性溶液中部分以离子形式存在,两种物质极性较强,因此在反向 C18 柱上几乎无保留。为此需在弱酸性介质的流动相中抑制生物素的电离,使生物素以分子形式存在,降低两者极性,增加其在 C18 柱上的保留值并改善峰形^[2]。本试验选用甲醇-0.05% 三氟乙酸体系作流动相,获得了满意的效果。

3.3 本方法利用 UPLC 实现预混合饲料中 D-泛酸钙和 D-生物素的联检,具有快速、简便、能使各组分较好的分离等特点,重现性和回收率较高,平均回收率达到 96% 以上。本方法同样适用于单一成分及多维预混料的测定,其测试成本低,有一定的推广价值。

参 考 文 献

- [1] 陈必芳,李 兰. 高效液相色谱法测定饲料中泛酸的研究[J]. 饲料工业,2002,23(2):39-42.
- [2] 余林梁,黄晓兰,吴惠勤. 饲料中生物素的高效液相色谱测定[J]. 分析测试学报,2003,22(5):102-104.
- [3] 彭爱红,邓清莲,吕禹洋. 茜素萘酚分光光度法测定泛酸钙[J]. 分析化学,2005(6):897.
- [4] 刘志祥,徐国荣. 应用旋光度法测定 D-泛酸钙的含量[J]. 畜禽业,2004(1):32.
- [5] 陈瑞莲,梁焯琼. 饲料添加剂 D-生物素的 HPLC 测定法[J]. 广东饲料,2009(6):35-36.
- [6] 陈必芳,李 兰. 复合预混合饲料中泛酸的测定高效液相色谱法[S]//中华人民共和国国家标准,GB/T 18397-2001. 北京:中国标准出版社,2001.
- [7] 钱 防,屈利文,杨 林,等. 预混合饲料中 D-生物素的测定[S]//中华人民共和国国家标准,GB/T 17778-2005. 北京:中国标准出版社,2005.