

應用高效液相層析儀對補助飼料中維生素 B₁、B₂、B₆、菸鹼酸之同時檢測方法的開發

林金梅* 劉敏主 林士鈺

台灣省家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

摘要 補助飼料受檢樣品，直接以移動相加至定容後，以高效液相層析法測定之，其條件為 BECKMAN OCTYL 5 μ 4.6 \times 250 mm 分析管柱，移動相由 (1-pentanesulfonic Acid Sodium Salt; PICB₅) 5 mM 水溶液 (以醋酸調 pH 至 3.25) : 甲醇 = 70 : 30 至 75 : 25 v/v，變換選擇，能變更維生素 B₁、B₂、B₆、菸鹼酸四支波峰間之距離，以避開干擾波峰，有助分離。使用瞬間變換波長螢光檢測器 (0~3.8 分 260 nm, 3.8~4.8 分 290 nm, 4.8~6.0 分 246 nm, 6.0~7.0 分 266 nm) 比固定波長 (275 nm) 檢測器，對 Vit. B₁、B₆、Niacin 的靈敏度皆可提高，但 Vit. B₂ 則維持不變。

關鍵詞：水溶性維生素，補助飼料，高效液相層析儀，同時分析

緒 言

補助飼料維生素製劑廣泛使用於家畜維生素缺乏症及提高飼料利用效率促進生長，其所含維生素濃度比一般維生素製劑低，且補助飼料中常同時存在有礦物質、胺基酸、微量金屬及黃豆粉、或魚骨粉、肉骨粉、玉米粉、麩皮、米糠等，複雜成份，而於藥典中^[1, 8]所載方法皆為針對原料藥或較單純之製劑，且其方法為各別操作再利用微生物法、螢光法或吸光度法測定，操作手續繁雜，並使用有毒之溴化氫，對檢驗人員健康有害。目前高效液相層析儀使用於各別維生素 B₁、B₂、B₆、菸鹼酸之檢驗已有不同方法^[2, 4, 5, 6, 7, 8]，本試驗仍利用梯度高效液相層析儀及瞬間變換波長 UV 檢測器，對本系完成之應用高效液相層析儀對補助飼料中維生素 B₁、B₂、B₆、菸鹼酸一次同時檢驗⁽⁴⁾ 找尋一更精確、敏感、快速的分析方法。

材料與方法

(一)儀器設備：

- (1) 高效液相層析儀
 - 日立 L-6000 幫浦
 - 日立 L-6200A 智慧型幫浦
 - L-4250 紫外光、可視光檢測器
- (2) 褐色容量玻璃瓶
- (3) 微量遠心機 (Micro-Haematocrit centrifuge)
- (4) 微量過濾遠心管 (Microfilterfuge TM Tubes, 0.45 μ m Nylon-66 membrane filters)

(二)試藥：

- 戊烷磺酸胺鹽 (1-Pentanesulfonic Acid Sodium Salt; PICB₅)
- 甲醇 (Methanol) LC 級

(三)標準品：

- 維生素 B₁、B₂、B₆、菸鹼酸 (Roche 產品)

(四)檢品：

- 一般送檢補助飼料

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

(五)試驗方法：

1. 275 nm 固定波長檢測

本檢測法乃本系開發之方法

(1) 檢測樣品萃取及淨化：

將受檢樣品、標準品各稱取適量，加入移動相作溶劑至定容，振盪後以 0.45 μm 微量過濾遠心管，經微量遠心機過濾，取 20 μl，注入 HPLC。

(2) 液相分析儀分析條件：

移動相：5 mM PICB₅ 水溶液（以醋酸調 pH 值至 3.25）：甲醇 = 72：28

管柱：BECKMAN OCTYL 5 μ 4.6 × 250 mm

檢測波長：275 nm

流速：1 ml/min

2. 不同比例移動相比較

受檢樣品萃取及液相層析條件同方法 1。惟移動相使用 PICB₅ 5 mM 水溶液（以醋酸調 pH 至 3.25）：甲醇 = 70：30；72：28；75：25 變換選擇，以比較不同移動相之分離結果。

3. 瞬間變換波長檢測

(1) 檢測樣品萃取及淨化法同用方法 1。

(2) 液相分析儀分析條件：

移動相：PICB₅ 5 mM 水溶液（以醋酸調 pH 至 3.25）：甲醇 = 72：28

管柱：BECKMAN OCTYL 5 μ 4.6 × 250 mm

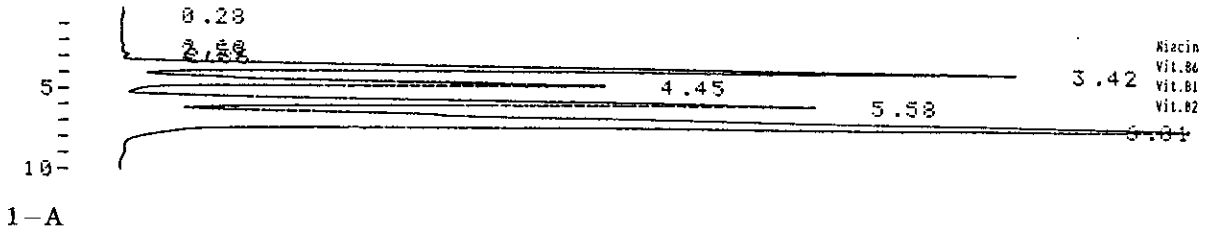
檢測波長：0~3.8 分 260 nm、3.8~4.8 分 290 nm、4.8~6.0 分 246 nm、6.0~7.0 分 266 nm。

結 果

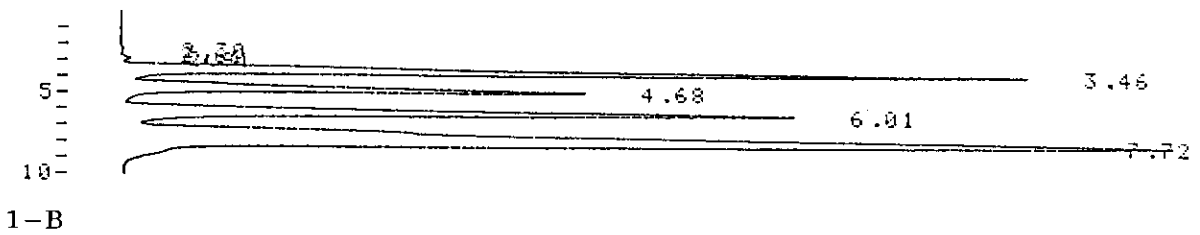
方法 2 不同比例移動相比較結果，移動相由 PICB₅ 5 mM 水溶液（以醋酸調 pH 至 3.25）：甲醇 = 70：30、72：28、75：25 變換選擇，能漸漸加寬四支檢測波峰間距離且全部滯留時間於 10 分鐘內。（圖 1）其中以最後一組之移動相組合具有最理想的分離效果。

方法 3 瞬間變換波長檢測結果（圖 2、3）知瞬間變換波長檢測器對補助飼料中維生素 B₁、B₂、B₆、菸鹼酸之同時檢驗，可提高檢測靈敏度效果優於固定波長。

CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 00:36



CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 00:52



CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 00/00/00 06:06

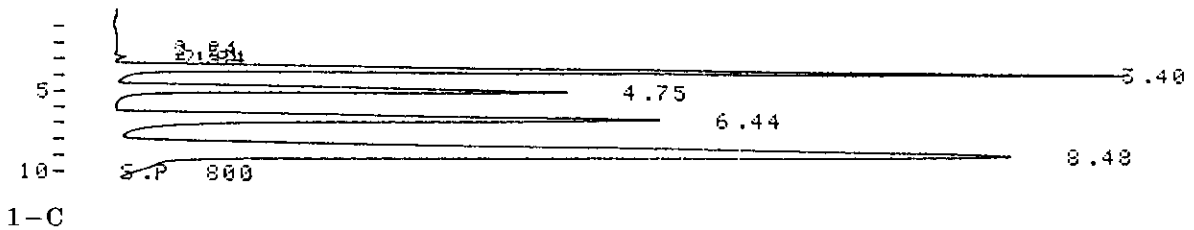
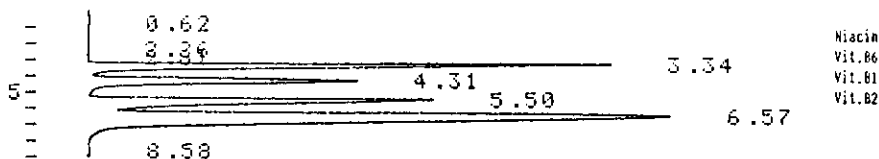


圖 1 PICB₆ 5 mM 水溶液 (以醋酸調 pH 至 3.25) : 甲醇=70 : 30 (1-A)、72 : 28 (1-B)、75 : 25 (1-C) 分別作移動相維生素 B₁、B₂、B₆、菸鹼酸之層析圖四支檢測波峰間之距離，漸漸加大，且全部檢出之滯留間仍於 10 分鐘內。

CH. 1 C.5 2.50 ATT 7 OFFS 0 00/00/00 04:43

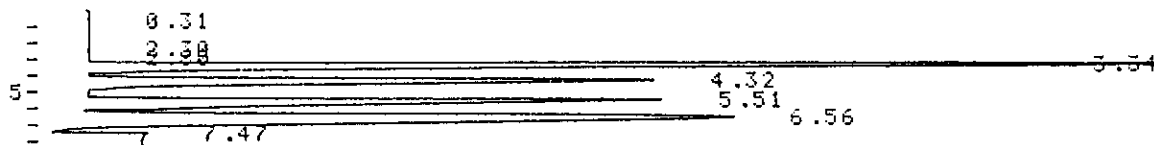


FILE: 0 CALC-METHOD: AREA % TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
4	3.34	1053890	19.871	VV
5	4.31	724162	13.654	VV
6	5.50	966348	18.220	VV
7	6.57	2559315	48.255	VV
TOTAL		5303715	100.000	
PEAK REJ:		100000		

2-A

CH. 1 C.5 2.50 ATT 7 OFFS 0 00/00/00 04:43



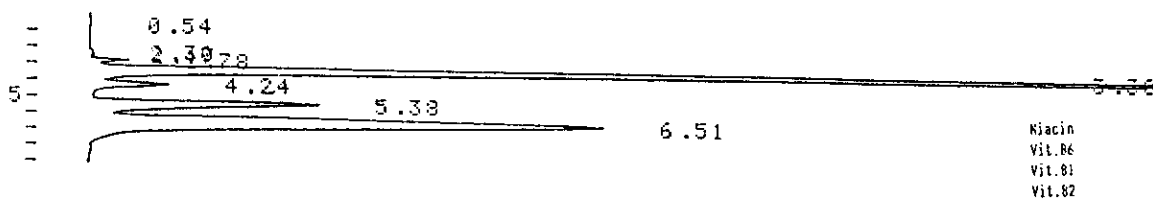
FILE: 0 CALC-METHOD: AREA % TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
4	3.34	2620334	29.148	VV
5	4.32	1647626	18.328	VV
6	5.51	1734168	19.290	VV
7	6.56	2787025	31.002	VV

2-B

圖 2 標準品維生素 B₁、B₂、B₆、菸鹼酸 (40 mcg/ml : 80 mcg/ml : 40 mcg/ml : 300 mcg/ml) 於固定波長 (275 nm) (2-A) , 及瞬間變換波長 (0-3.8 分 260 nm , 3.8-4.8 分 290 nm , 4.8-6.0 分 246 nm , 6.0-7.0 分 266 nm) (2-B) 之檢測層析圖 , 檢測所呈靈敏度 , 菸鹼酸提高約 2.5 倍 , 維生素 B₆ 提高約 2.3 倍 , 維生素 B₁ 提高約 1.8 倍 , 維生素 B₂ 則較無差異。

CH. 1 C.5 2.50 ATT 7 OFFS 0 00/00/00 05:08

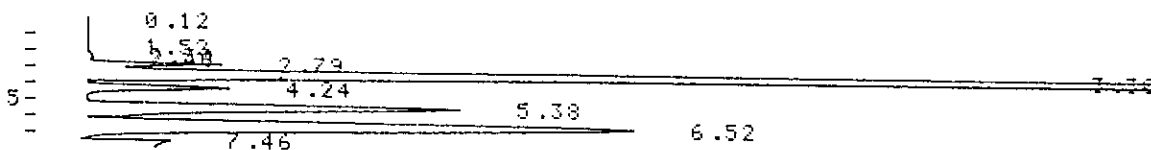


FILE: 0 CALC-METHOD: AREA % TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
5	3.30	3089586	49.186	VV
6	4.24	143827	2.290	TBB
7	5.38	752893	11.986	VV
8	6.51	2295174	36.539	VB
TOTAL		6281480	100.000	

3-A

CH. 1 C.5 2.50 ATT 7 OFFS 0 00/00/00 05:19



FILE: 0 CALC-METHOD: AREA % TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
5	3.79	204842	1.713	VV
6	3.30	7737188	64.688	VV
7	4.24	318514	2.663	TBB
8	5.38	1271650	10.221	VV
9	6.52	2298940	19.221	VB

3-B

圖 3 受檢樣品維生素 B₁、B₂、B₆、菸鹼酸 (40 mcg/ml : 80 mcg/ml : 40 mcg/ml : 300 mcg/ml) 於固定波長 (275 nm) (3-A), 及瞬間變換波長 (3-B) 之檢測層析圖, 檢測所呈靈敏度, 菸鹼酸提高約 2.5 倍, 維生素 B₆ 提高約 2.2 倍, 維生素 B₁ 提高約 1.7 倍, 維生素 B₂ 則較無差異。

討 論

以移動相作溶劑，C₈ 層析管，PICB₅ 5 mM 水溶液（必須以醋酸調 pH 至 3.25）：甲醇 = 70 : 30 ; 72 : 28 ; 75 : 25 分別為移動相，不同甲醇比例移動相變換選擇，漸漸加寬四支檢測波峰之距離，在檢測有干擾之波峰時可使其分離得更好，若配合上梯度高效液相層析儀，則更能靈活運用；配合使用瞬間變換波長（0~3.8 分 260 nm，3.8~4.8 分 290 nm，4.8~6.0 分 246 nm，6.0~7.0 分 266 nm）檢測器及移動相 PICB₅ 5 mM：甲醇 = 72 : 28，補助飼料中維生素 B₁、B₂、B₆、菸鹼酸之同時檢測比林等^[4] 報告可得更好之結果，檢測所呈靈敏度菸鹼酸可提高約 2.5 倍，維生素 B₆ 可提高約 2.3 倍維生素 B₁ 可提高約 1.8 倍維生素 B₂ 則較無差異。（圖 2、3）

參考文獻

1. 中華藥典 III 298, 384 - 385, 397 - 398, 455 - 456. 1980。
2. 分離水溶性維他命，羅氏公司，私人通信。
3. 林南曾。維他命含量測定及鑑定。42 - 60, 72 - 90, 95 - 109, 155 - 167. 1973。
4. 林金梅、劉敏主、林士鈺、劉培柏。應用高效液相層析儀對補助飼料中水溶性維生素 B₁、B₂、B₆、Niacin 之一次同時檢驗試驗。省畜衛所研報。29 : 107 - 113. 1993。
5. 補助飼料中水溶性維生素檢驗規格，台灣巴斯夫公司，私人通信。
6. 高速液體クロマトグラフィーによる水溶性ビタミンの分析，三光公司，私人通信。
7. Estimation of Vitamins and carotenoids in premixes and feeds BASF CO. LTD Private Communication. BASF Animal Nutrition MEA/EC 1/1989 1 - 7.
8. USP x x III 1080 - 1081, 1347, 1379, 1749 - 1750. 1995。

Simultaneous Determination of Water Soluble Vitamins (B₁, B₂, B₆, Niacin) by High Performance Liquid Chromatography in Premixes

K. M. Lin,* M. C. Liu, and S. Y. Lin

Taiwan Animal Health Research Institute. The Branch
Institute of Animal Drugs Inspection

SUMMARY Premixes were added directly with mobile phase to a certain volume. After mixing and filtration, the filtrate was injected into a high performance liquid chromatography (HPLC) which was equipped with a BECKMAN OCTYL 5 μ 4.6 \times 250 mm column. The composition of mobile phase was the mixture of 5 mM PICB₅ solution (pH adjusted to 3.25 with acetic acid) and Methanol in the ratio of 70 : 30 changing into 75 : 25. The peaks of the four vitamins were separated better as the ratio of 5 mM PICB₅ solution was gradually increased in quantify. The detection sensitivity of Vit. B₁, B₆, and Niacin by using program changeable UV detector (0~3.8', 260 nm ; 3.8~4.8', 290 nm ; 4.8~6.0', 246 nm 6.0~7.0', 266 nm) was higher than that by using fixed wavelength at 275 nm, while it was unchanged for Vit. B₂.

Key words: *water soluble vitamins, Premix, High Performance Liquid Chromatography, Simultaneous Determination*

*Corresponding author

Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan, R. O. C.