

應用梯度高效液相層析儀及瞬間變換波長 UV 檢測器對 補助飼料中維生素 A、D₃、E 同時檢驗方法之開發

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析

摘要 補助飼料受檢樣品，先以少許 Dimethyl Sulfoxide 助溶，再加絕對酒精至定容，以高效液相層析儀，BECKMAN OCTYL 5u 4.6 mm×25 cm 管柱，應用高效液相層析儀幫浦，移動相由甲醇 100%、98%、95% 變換選擇，能變更 Vit. A、D₃、E 三支波峰間之距離，若檢驗時波峰有干擾，有分離之助益。使用瞬間變換波長（0~5 分 325 nm、5~6 分 265 nm、6~10 分 284 nm）比固定波長（280 nm）檢測器，Vit A、D₃ 的靈敏度皆可提高，Vit. E 則維持不變，補助飼料中維生素 A、D₃、E 之同時檢測可得更好之檢測效果。使用電化學檢測器，Merck RP-18 5 um 4.6 mm×25 cm 管柱 0.1M LiClO₄ 甲醇溶液：水=99：1 為移動相，Vit. A、D₃ 標準品經加鹼色化處理後 2 iu/ml、4 iu/ml，於 +1050 mV 伏特檢測下，也可極顯著提高靈敏度，但滯留時間太接近，Vit. E 則滯留時間延長而不太理想。

關鍵詞：高效液相層析儀，電化學檢測器，補助飼料，維生素 A、D₃、E

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很多，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，因其成份複雜，各藥典及 C.N.S.⁽¹⁾；A.O.A.C.⁽²⁾ 法中之補助飼料維生素 A、D₃、E 檢驗，通常須各別色化，有機溶劑抽取，UV 法或滴定法測定，其操作手續繁雜，對檢驗人員健康亦有害。目前 HPLC 法已廣泛使用於維生素 A、D₃、E 之檢驗^(4,5,6,7,9) 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 A、D₃、E 一次同時檢驗條件找尋一更精確、敏感、快速的同時分析補助飼料中維生素條件，達成一次同時更敏感精確的補助飼料中維生素之檢驗。

材料與方法

(一)儀器設備

1. 高效液相層析儀：
 - 日立 L-6000 Pump
 - 日立 L-62000A Intelligent Pump
 - L-4250 UV-Vis Detector
 - Σ 985 Ampero ECD Detector

2. 褐色玻璃瓶色化裝置（國產品）
3. 減壓濃縮裝置（國產品）

(二)試藥：

Lithium Perchlorate trihydrate (LiClO₄·3 H₂O)
G.R (Merck) Butylated Hydroxytoluene (BHT)(Sigma), 絕對酒精，氫氧化鉀，正己烷，甲醇，LC 級。Dimethyl Sulfoxide (DMSO) dried G.R Max 0.03 % H₂O (Merck)。

(三)標準品

維生素 A、D₃、E (Merck 產品)

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

(四)檢 品：

一般送檢補助飼料。

(五)試驗方法：

(A)280 nm 固定波長檢測

本檢測法乃本系開發之方法⁽⁴⁾。

(1)檢測樣品萃取法及淨化：

將受檢樣品、標準品各分別先以少許 Dimethyl Sulfoxide 無水級 (DMSO dried G.R max 0.03 % H₂O) 助溶後，再加無水乙醇至定容。

(2)液相分析儀分析條件：

移動相：甲醇 100 %

管 柱：μ-Bondapak C₁₈ 4.0 mm × 250 mm 或
BECKMAN OCTYL 5 μ 4.6 mm × 25 cm

檢測器波長：280 nm

(B)不同比例移動相比較

受檢樣品萃取及液相層析儀條件同方法 A，惟移動相使用甲醇 100 %，98 %、95 % 變換選擇，以比較不同移動相之分離結果。

(C)瞬間變換波長檢測

(1)檢測樣品萃取及淨化法同用方法 A

(2)液相分析儀分析條件：

移動相：甲醇 100 %

管 柱：BECKMAN OCTYL 5 μ 4.6 mm × 25
cm

檢測器波長：0~5 分 325 nm、5~6 分 265
nm、6~10 分 284 nm。

(D)電化學檢測器檢測比較

(1)檢測樣品萃取及淨化

受檢樣品先以加鹼皂化，本萃取及淨化法乃參考中華藥典 (III)⁽²⁾ 及 A.O.A.C.⁽⁸⁾ 法，稍加修改，即：

受檢藥品或標準品各分別移入褐色皂化瓶內添加抗氧化劑 (BHT) 約 0.2 gm 後，加無水乙醇 30 ml，於褐色玻璃裝置迴流加熱 30 分鐘，於冷後移入分液漏斗，用正己烷抽取、濃縮，再以甲醇溶解並定容。

(2)液相分析儀分析條件：

移動相：0.1 M LiC₁₀ 4 甲醇溶液：水 = 99：
1~94：6 (v/v)

管 柱：BECKMAN OCTYL 5 μ 4.6 mm × 25
cm

E.C.D. 檢測器伏特：+1050 mV (vs. Ag/AgCl)

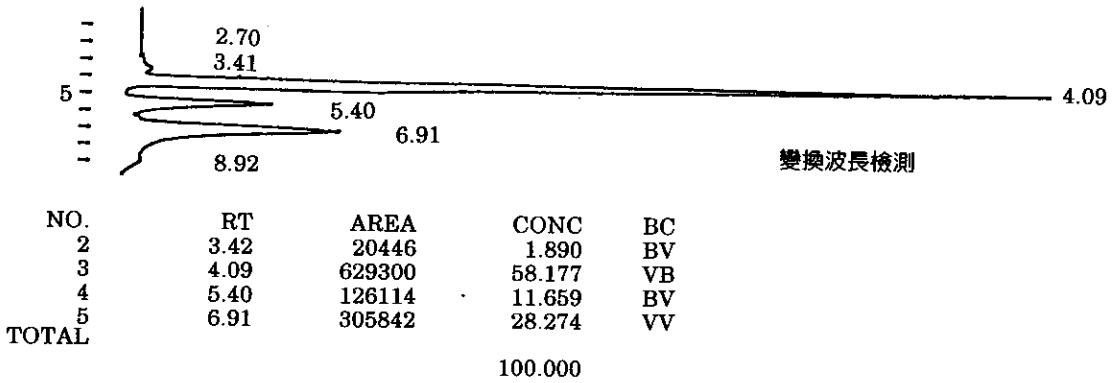
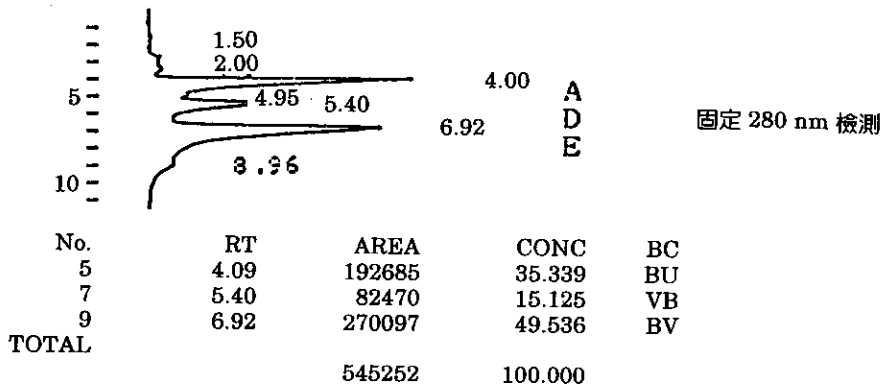
流 速：0.8 ml/min

結果

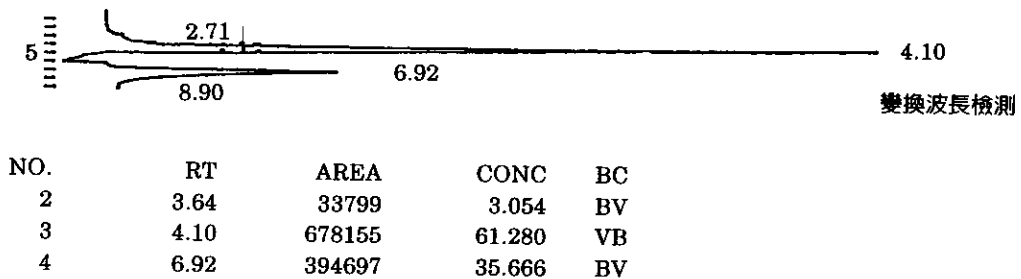
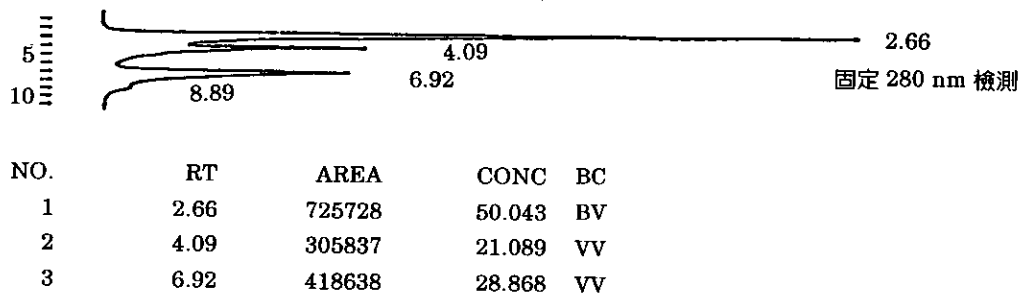
方法 B 不同比例移動相比較結果，移動相由 100 % 甲醇，98 %、95 % 變換選擇，能漸漸加寬三支檢測波峰間距離。

方法 C 瞬間變換波長檢測結果 (圖 1、2) 知瞬間變換波長檢測器對補助飼料中維生素 A、D₃、E 之同時檢驗，可提高檢測靈敏度且可消除雜訊，效果優於固定波長。

方法 D 應用電化學檢測器檢測結果，標準品經加鹼皂化處理及應用梯度高效液相層析儀，檢測結果靈敏度顯著增加，但 Vit. A 及 D₃ 滯留時間很接近，雖增加移動相水的濃度，仍無法良好分離，且致 Vit. E 之滯留時間延長。



■ 1 維生素 A、D、E 標準品於固定 (280 nm) 及瞬間變換波長 (0-5 分 325 nm, 5-6 分 265 nm, 6-10 分 284 nm) 之檢測層析圖檢測所呈靈敏度, Vit. A 提高 4 倍, vit. D, 1.5 倍



■ 2 受檢樣品維生素 A、D、E 於固定 280 nm 及瞬間變換波長之檢測層析圖檢測靈敏度提高, 且干擾波峰減少

討 論

各藥典及 C.N.S.⁽¹⁾；A.O.A.C.⁽⁶⁾ 法中之補助飼料維生素 A、D₃、E 檢驗，通常須各別皂化，有機溶劑抽取，UV 法或滴定法測定，其操作手續繁雜，對檢驗人員健康亦有害。目前 HPLC 法已廣泛使用於維生素 A、D₃、E 之檢驗^(4,5,6,7,9) 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，以少許 DMSO 助溶，無水乙醇作溶劑，C₁₈ 層析管，100 %、98 %、95 % 甲醇梯度溶媒為移動相，不同甲醇比例移動相變換選擇，漸漸加寬三支檢測波峰之距離，在檢測波峰有干擾時有分離之助益，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（0~5 分 325 nm、5~6 分 265 nm、6~10 分 284 nm）檢測器，補助飼料中維生素 A、D₃、E 之同時檢測可得更好之結果，檢測所呈靈敏度 Vit. A 可提高約 4 倍，Vit D₃ 可提高約 1.5 倍；若使用電化學檢測器則靈敏度顯著提高，但受檢樣品分析結果則不甚理想，Vit. A 與 Vit. D₃ 無法分離，若增加移動相之水相比例，則 Vit. E 之滯留時間又更延長。

使用梯度高效液相層析儀對補助飼料中維生素 A、D₃、E 之一次同時檢驗，配合瞬間改變波長 UV 檢測器，則檢驗結果將更理想。電化學檢測器使用於單種 Vit. A 或 Vit. D₃ 或 Vit. E 之補助飼料檢測則能提高相當靈敏度，但對於三種維生素混合的補助飼料之同時檢驗，效果尚須進一步努力。

參考文獻

1. 中國國家標準 1983。205 經濟部中央標準局，台北。
2. 中華藥典 III 1980 附錄 33-34。
3. 林南曾。1973。維他命含量測定及鑑定 14-30，213-256。
4. 林金梅、劉敏主、劉培柏。應用高效液相層析儀對補助飼料中維生素 A、D₃、E 之一次同時檢驗試驗。省畜衛所研報。28：131-143，1992。
5. 日立科學機器分析 Data 集ビタミン 657，益宏公司，私人通信。
6. Delgado Zamarreno M.M. et al High-Performance Liquid Chromatography with electrochemical detection for simultaneous determination of Vitamin A、D₃ and E in milk. J Chromatoc 623：69-74, 1992.
7. Estimation of Vitamins and Carotenoids in Premix and Feeds BASF Co. LTD Private Communication.
8. Official Methods of Analysis A.O.A.C 832-834，854-860. 1984.
9. Tart Lee N. G. Method of Analysis of Vitamin D₃ Phirochem I.N.C. Private Communication.

Simultaneous Determination of Fat Soluble Vitamins in Premix by High Performance Liquid Chromatography

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

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

SUMMARY Premixes were pretreated with a little volume of dimethylsulfoxide, then absolute ethanol was added to 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. Changing methanol concentration in mobile phase to 100 % , 98 % and 95 %, the retention times of vitamins A , D₃ and E could be changed and get good resolution if interfering peaks appeared. Using changeable UV wavelength (0 - 5' 325 nm , 5 - 6' 265 nm, 6 - 10' 284 nm), the sensitivities of Vit. A and D₃ in premixes could increase than fixed wavelength 280 nm, but Vit. E wasn't. By using electrical chemical detection, Merck RP-18 5 μ 4.6 \times 250 mm column, 0.1 M LiClO₄ Methanol : H₂O = 99 : 1 mobile phase, alkaline saponified Vit. A , D₃ standards could also extremely increase sensitivity, but two peaks were too close and vit. E retarded too long.

Key words: *High Performance Liquid Chromatography, Electric Chemical Detector Premix, Vitamin A , D₃ , E.*

*Corresponding author

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