

## 應用高效液相層析儀對補助飼料中水溶性維生素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub>、Niacin 之一次同時檢驗試驗

林金梅\* 劉敏主 林士鈺 劉培柏

台灣省家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

**摘要** 補助飼料中水溶性維生素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub>、Niacin 一次同時檢驗以 PICB<sub>8</sub>、PICB<sub>7</sub>、PICB<sub>6</sub>、PICB<sub>5</sub> 作不同移動相，及以不同溶劑、不同波長、不同管柱測試比較結果，直接以移動相加至定容，以高效液相層析儀，BECKMAN OCTYL 4.6 × 250 mm 管柱，PICB<sub>5</sub> 5 mM 水溶液（以醋酸調 pH 至 3.25）：甲醇= 71：29 為移動相，於 275 nm 檢測波長下，補助飼料中水溶性維生素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub>、Niacin 成份之一次同時檢驗，可測得良好結果。Niacin 100 mcg/ml，Vit.B<sub>6</sub> 50 mcg/ml，Vit.B<sub>1</sub> 50 mcg/ml，Vit.B<sub>2</sub> 50 mcg/ml 之滯留時間分別約為 3.28，4.22，5.47，6.82 分。應用高效液相層析儀對補助飼料中維生素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub>、Niacin 一次同時檢驗，可避免接觸 BrCN 等有毒之有機溶劑，及繁雜費時的操作方法，減少人力、物力支出。

**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、麩皮、米糠等，因其含成份複雜，藥典中<sup>(1,8,10)</sup> 所載方法皆為原料葯或較單純之製劑，因其方法為各別操作再利用微生物法或螢光法或吸光度法測定，操作手續繁雜，且使用有毒之 BrCN，對檢驗人員健康有害，目前 HPLC 使用於各別維生素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub>、Niacin 之檢驗已有不同方法<sup>(2,4,5,6,7,9)</sup>，本試驗仍利用各種不同 PICB<sub>8</sub>、PICB<sub>7</sub>、PICB<sub>6</sub>、PICB<sub>5</sub>，為移動相及不同管柱不同波長來尋求一個同時檢測維生素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub>、Niacin 之最佳定性定量檢驗。

### 材料與方法：

#### 1. 儀器設備：

(1) 高效液相層析儀：

日立 L-6200A Intelligent 幫浦，L-4250 UV-Vis 檢測器

日立 L-6000 幫浦，U-3210UV 檢測器

日立 D-2500 積分器

(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 um Nylon-66 membrane filters)

#### 2. 試 藥：

辛烷磺酸胺鹽

(1-Octanesulfonic Acid Sodium Salt; PICB<sub>8</sub>)

庚烷磺酸胺鹽

(1-Heptanesulfonic Acid Sodium Salt; PICB<sub>7</sub>)

己烷磺酸胺鹽

(1-Hexanesulfonic Acid Sodium Salt; PICB<sub>6</sub>)

戊烷磺酸胺鹽

(1-Pentanesulfonic Acid Sodium Salt; PICB<sub>5</sub>)

LC 級 (Sigma 產品)

甲醇、乙腈 (Acetonitril) LC 級 (Merck 產品)

Tetrahydrofuran (THF), Hydrogenphosphate disodium (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) Merck 產品)

#### 3. 標準品：

維生素 B<sub>1</sub>，菸鹼酸 (Roche 產品)

維生素 B<sub>2</sub>，維生素 B<sub>6</sub> (日本藥局方標準品)

#### 4. 檢 品：

\*抽印本索取作者  
台灣省家畜衛生試驗所

一般送檢補助飼料，黃豆粉、魚骨粉、肉骨粉、玉米粉、麩皮、米糠。

#### 5. 檢測樣品萃取法：

秤取適量樣品以溶劑加至定容，振盪，0.45 μm 微量過濾遠心管，經微量遠心機遠心過濾，取 20 μl，注入 HPLC。

#### 6. 試驗方法：

本實驗乃對送至本所申請查驗登記之補助飼料，四種水溶性維生素在本實驗室可能檢出之相同條件，以不同方法加以進行，以便加以探討可能最佳同時檢驗條件。

(1) 本 HPLC 分析法乃參考 TOSOH.CO<sup>(9)</sup> 提供方法，稍以修改，其中 HPLC 移動相使用了 PICB<sub>8</sub>：

移動相：5 mM PICB<sub>8</sub> in 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Phosphate Buffer (以醋酸調 pH 值為 6.5)：Acetonitril = 80：20

管柱：U-Bondapak C<sub>18</sub> 4.0 mm x 250 mm

檢測波長：280 nm

流速：1 ml/min

來測樣品萃取溶劑：直接以移動相或蒸餾水作溶劑。

(2) 本 HPLC 分析法乃參考林<sup>(3)</sup> 法，稍以修改。

一切條件同方法<sup>(1)</sup>，只檢測波長改為 254 nm，以比照不同波長之檢驗結果。

(3) 本 HPLC 分析法乃參考生達公司<sup>(2)</sup> 提供方法，稍以修改，其中 HPLC 移動相使用了 PICB<sub>7</sub>

移動相：3 mM PICB<sub>7</sub> 水溶液：Methanol = 75：25

管柱：U-Bondapak C<sub>18</sub> 4.0 mm x 250 mm

檢測波長：280 nm

流速：1 ml/min

檢測樣品萃取溶劑：25 % 甲醇

(4) 本 HPLC 分析法乃參考台灣巴斯夫公司<sup>(4)</sup> 提供方法，稍以修改，其中 HPLC 移動相使用了 PICB<sub>6</sub>：

移動相：0.08 % PICB<sub>6</sub> 水溶液：THF：

Acetonitril = 90：1：9，以醋酸調 pH 值至 2.8-3.0。

管柱：U-Bondapak C<sub>18</sub> 4.0 mm x 250 mm

檢測波長：280 nm

流速：1 ml/min

檢測樣品萃取溶劑：直接以移動相作溶劑。

(5) 本 HPLC 分析法乃參考 BASF CO<sup>(7)</sup> 提供方法，稍以修改，其中 HPLC 移動相使用了 PICB<sub>5</sub>

移動相：30 gm PICB<sub>5</sub> 加蒸餾水 2,000 ml 加甲醇 400 ml 再以醋酸調 pH 值至 3.25

管柱：U-Bondapak C<sub>18</sub> 4.0 mm x 250 mm

檢測波長：275 nm

流速：1.2 ml/min

檢測樣品萃取溶劑：直接以移動相作溶劑

(6) 本 HPLC 分析法一切條件同方法<sup>(5)</sup>，只移動相中甲醇量改為 500 ml，以期縮短波峰出現之滯留時間。

(7) 本 HPLC 分析法乃參考益弘公司<sup>(6)</sup> 提供方法，將方法移動相中 PICB<sub>5</sub> 濃度適以降低，且提高甲醇含量：

移動相：5 mM PICB<sub>5</sub> 水溶液 (以醋酸調 pH 值至 3.25)：甲醇 = 71：29

管柱：BECKMAN OCTYL 5u 4.6 x 250 mm

檢測波長：275 nm

流速：1 ml/min

檢測樣品萃取溶劑：直接以移動相作溶劑

(8) 回收率試驗：

將標準品直接添加至粉頭或粗糠中，再以方法 (7) 之分析方法，對添加前後之標準品加以分析，以求方法 (7) 之回收率。

(9) 空白試驗：

將黃豆粉、魚骨粉、肉骨粉、玉米粉、麩皮、米糠、以方法 (7) 之分析方法，以探求方法 (7) 檢驗過程中，一般常使用於補助飼料之賦形劑，是否對 Nicin，維生素 B<sub>6</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 之檢驗結果有所影響。

## 結果

方法 (1) 至方法 (7) 之結果如下表

	菸 鹼 酸	維 生 素 B <sub>6</sub>	維 生 素 B <sub>1</sub>	維 生 素 B <sub>2</sub>
方 法 (1) 濃 度 50 mcg/ml 波 長 280 nm 滯 留 時 間 波 峰 靈 敏 度	3.3 分鐘 ++	5.0 分鐘 +	6.9 分鐘 ++++	10.5 分鐘 +++
方 法 (2) 濃 度 50 mcg/ml 波 長 254 nm 滯 留 時 間 波 峰 靈 敏 度	3.2 分鐘 +++	5.0 分鐘 +	6.7 分鐘 ++++	10.1 分鐘 ++
方 法 (3) 濃 度 滯 留 時 間 波 峰 靈 敏 度	100 mcg/ml 1.5 分鐘 +++	40 mcg/ml 4.3 分鐘 +	20 mcg/ml 17.9 分鐘 ++	20 mcg/ml 26.7 分鐘 ++++
方 法 (4) 濃 度 100 mcg/ml 滯 留 時 間 波 峰 靈 敏 度	3.6 分鐘 ++	8.1 分鐘 +++	17.1 分鐘 +	19.9 分鐘 ++++
方 法 (5) 濃 度 100 mcg/ml 滯 留 時 間 波 峰 靈 敏 度	4.6 分鐘 ++++	7.0 分鐘 +++	15.9 分鐘 +	32.1 分鐘 ++
方 法 (6) 濃 度 100 mcg/ml 滯 留 時 間 波 峰 靈 敏 度	3.3 分鐘 ++++	5.7 分鐘 ++	11.0 分鐘 +	18.1 分鐘 +++
方 法 (7) 濃 度 50 mcg/ml 滯 留 時 間 波 峰 靈 敏 度	3.28 分鐘 +	4.22 分鐘 +++	5.47 分鐘 ++	6.82 分鐘 ++++

方法 (7) 移動相中 PICB<sub>5</sub> 水溶液濃度為只 5 mM，且又提高甲醇含量為 29%，全部四種水溶性維生素之滯留時間只需 10 分鐘（圖 1、2、3），且檢測結果均良好。

將標準品直接添加至粉頭作方法 (7) 之回收率試驗結果，Niacin, Vit B<sub>6</sub>、B<sub>1</sub> B<sub>2</sub> 之回收率，分別為 102.10%、100.7%、94.5%、100.2%，將標準品直接添加至粗糠作方法 (7) 之回收率試驗結果，Niacin, Vit B<sub>6</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 之回收率分別為 100.2%、98.6%、93.8%、99.6%（圖 4）。回收情形良好。

綜合以上，本實驗認為對達成一次同時 Niacin 及 Vit B<sub>6</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 之定性及定量檢驗條件為方法 (7) 之條件。

## 討論：

以 PICB<sub>8</sub>、PICB<sub>7</sub>、PICB<sub>6</sub>、PICB<sub>5</sub> 混合不同溶劑作移動相，以 254、275、280 nm 為檢測波長，U-Bondapak 或 BECKMAN 之 C<sub>18</sub> 為分離管柱，可得不同之檢測波峰，但以 BECKMAN 分離管柱，5

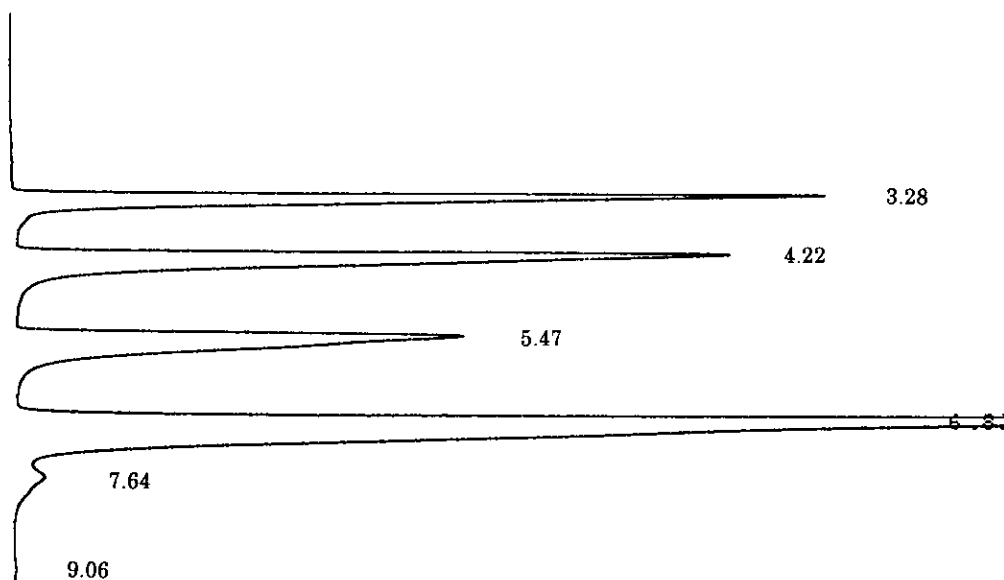
mM PICB<sub>5</sub>-Methanol = 71 : 29 為移動相及萃取液，275 nm 檢測波長，可得較好之檢測結果。唯補助飼料中，所含水溶性維生素成份濃度高低不一，故有時會讓同時一次分析四種維生素，變成技術上沒有辦法克服；若因含量濃度導致檢驗時波峰不能同時很恰當的現，如作不同濃度稀釋，再分別注入 HPLC，也就能得到理想的檢測結果。如能使用瞬間改變波長、流速、互換移動相、微電腦積分儀裝置，則檢驗所呈結果應更理想，此將為本實驗室往後繼續努力之目標。

參考文獻：

1. 中華藥典 III 1980。298, 384-385, 397-398, 455-456.
2. 分離水溶性維他命，生達公司，私人通信。
3. 林南曾。1973。維他命含量測定及鑑定。42-

60, 72-90, 95-109, 155-167.

4. 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。
5. 高效能液相層析儀分析應用參考資料 I，建吾公司。1989。56-61, 128-130.
6. 日立科學儀器分析 Date 集 Vitamin, 益弘公司，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. Official Methods of analysis-A.O.A.C 1984 838-844, 870-873.
9. Raoud Extraction of Water Soluble Vitamins, TOSOH.
10. USPXX II 1990. 943-944, 1194, 1224, 1356-1357, 1539, 1544, 1546, 1765, 1766, 1778.



D-2500 07 / 05 / 82 13 : 37

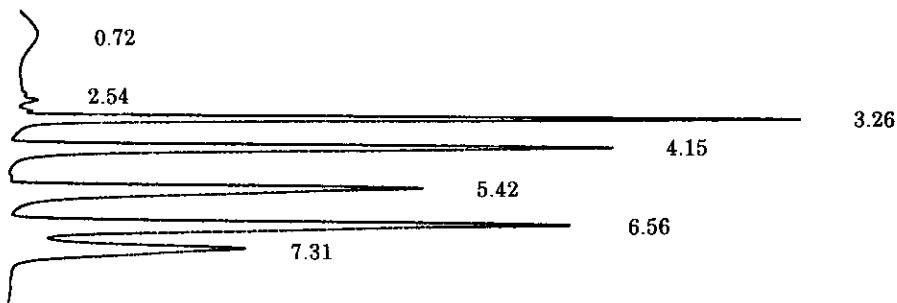
METHOD: TAG: 1 CH: 1

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

No.	RT	AREA	CONC	BC
1	3.28	473819	15.993	B V
2	4.22	595715	20.107	V V
3	5.47	476975	16.100	V V
4	6.82	1398643	47.209	V V
5	7.64	16619	0.561	T B B
6	9.06	896	0.030	B B
TOTAL		2962667	100.000	
PEAK REJ:		0		

■ 1 方法(7)分析標準品 Niacin 100 mcg/ml, Vit. B<sub>6</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 50 mcg/ml 之層析圖

CH. 1 C.S 5.00 ATT 6 OFFS 0 07/05/82 17:56



D-2500 07/05/82 17:56

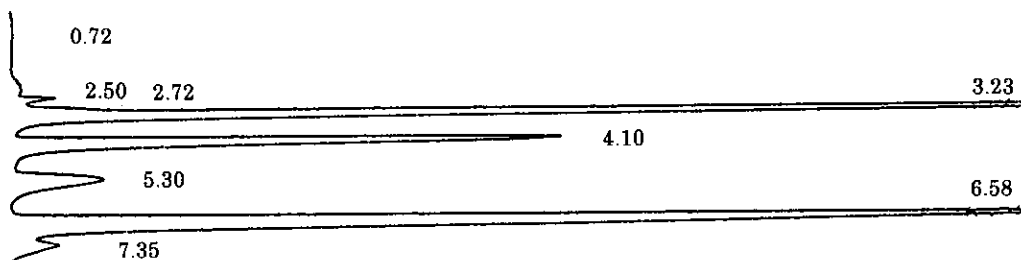
METHOD: TAG: 26 CH: 1  
 FILE: 0 CALC-METHOD: AREA % TABLE: 0 CONC: AREA

No.	RT	AREA	CONC	BC
5	3.26	459810	19.840	VB
6	4.15	481098	20.759	BB
7	5.42	463663	20.006	BV
8	6.56	596302	25.729	VV
9	7.31	316720	13.666	VB

TOTAL 2317593 100.000  
 PEAK REJ: 100000

■ 2 方法(7)分析 Niacin, Vit B<sub>6</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 受檢樣品 100 mcg/ml, 40 mcg/ml, 50 mcg/ml, 40 mcg/ml 之層析■

CH. 1 C.S 5.00 ATT 7 OFFS 0 07/05/82 17:34



D-2500 07/05/82 17:34

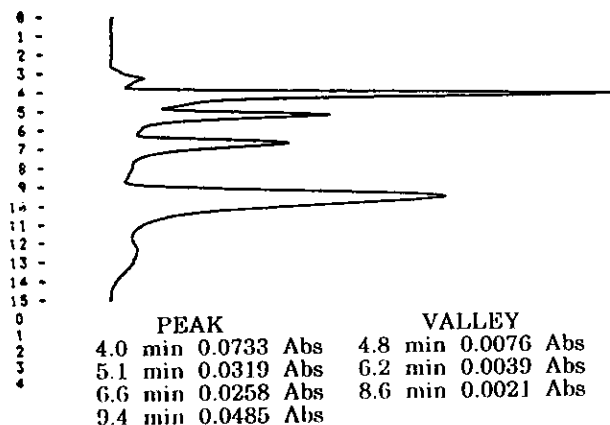
METHOD: TAG: 24 CH: 1  
 FILE: 0 CALC-METHOD: AREA % TABLE: 0 CONC: AREA

No.	RT	AREA	CONC	BC
1	0.72	13712	0.220	BB
2	2.50	31559	0.507	BV
3	2.72	53223	0.855	VV
4	3.23	2020332	32.469	VV
5	4.10	1048894	16.857	VB
6	5.30	291785	4.689	BB
7	6.58	2701980	43.424	BV
8	7.35	60781	0.977	TBB

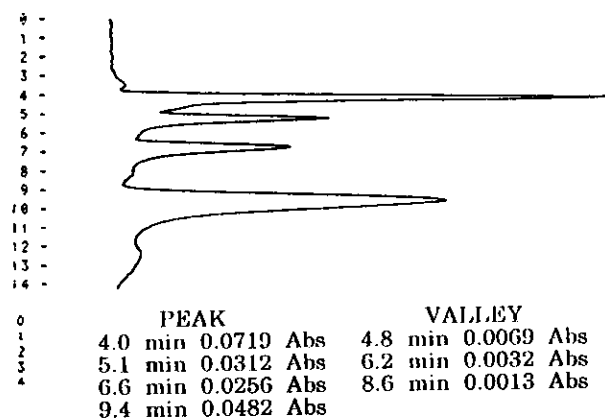
TOTAL 6222266 100.000  
 PEAK REJ: 0

■ 3 方法(7)分析 Niacin, Vit B<sub>6</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 受檢樣品 400 mcg/ml, 80 mcg/ml, 30 mcg/ml, 100 mcg/ml 之層析■

應用高效液相層析儀對補助飼料中水溶性維生素  
B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub>、Niacin 之一次同時檢驗試驗



■ 4-1 方法(7)以粉頭作回收率試驗之層析圖 Niacin, B<sub>6</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 之回收率分別為 102.1 %, 100.7 %, 94.5 %, 100.2 %



■ 4-2 方法(7)以粗糠作回收率試驗之層析圖 Niacin, B<sub>6</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 之回收率分別為 100.2 %, 98.6 %, 93.8 %, 99.6 %

## Rapid and Simultaneous Determination of Water Soluble Vitamins ( B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub>、Niacin ) in Premixes by High Performance Liquid Chromatography.

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

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, The Branch  
Institute of Animal Drugs Inspection

**SUMMARY** Premixes were pretreated directly with a little mobile phase, then added to the volume. After mixing and filtration, the filtrate was injected into a high performance liquid chromatography ( HPLC ) which was equipped with a BECKMAN OCTYL 4.6 × 250 mm column and 275 nm detector. The mobile phase was 5mM PICB<sub>5</sub> ( adjust to pH 3.25 with acetic acid ) : methanol = 71 : 29. Water Soluble Vitamins ( Niacin, B<sub>6</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> ) in Premixes could be determined simultaneously. The retention times of Niacin 100 mcg/ml, Vit. B<sub>6</sub> 50 mcg/ml, Vit. B<sub>1</sub> 50 mcg/ml, Vit. B<sub>2</sub> 50 mcg/ml were 3.28, 4.22, 5.47 and 6.82 minute, respectively. Using HPLC, the Water Soluble Vitamins (eg. Niacin, B<sub>6</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) in premixes can be determined rapidly and simultaneously and the risk of exposure to toxic organic solvents ( eg. BrCN ), the time and operation task can be reduced.

**Key Words:** *Water soluble vitamins, Premix, Simultaneous assay High Performance Liquid Chromatography.*

---

\*Corresponding author

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.