

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

林金梅* 劉敏主 劉培柏

台灣省家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

補助飼料受檢樣品，先以 Dimethyl Sulfoxide 助溶，再加絕對酒精至定容，以高效液相層析儀， μ -Bondapak C₁₈ 4.0×250 mm 管柱，100% 甲醇為移動相，於 280 nm 檢測波長下，脂溶性維生素 A、D₃、E 成份之一次同時檢驗，可測得良好結果。Vit. A 100 iu/ml, Vit. D₃ 200 iu/ml, Vit. E 0.15 iu/ml 之滯留時間分別為 4.3, 5.7, 6.7 分。若 Vit. A 之波峰有干擾，或補助飼料中 Vit. A 成份含量較低時，受檢樣品之前處理改用加鹼皂化法，即可得良好結果。

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，可減少接觸有毒之有機溶劑及繁雜費時的操作方法，減少人力支出。

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⁽¹⁾及 C.N.S.; 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 之個別檢驗^(5,6,7,10)，本試驗仍利用 HPLC 來達成補助飼料中維生素 A、D₃、E 之檢驗，且最終目的找尋一條件，達成一次同時對維生素 A、D₃、E 之定性定量檢驗。

試驗材料與方法

(一)儀器設備：

* 抽印本索取作者

台灣省家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

1. 高效液相層析儀：日立 L-6000 幫浦，U-3210 UV 檢測器。
2. 褐色玻璃瓶皂化裝置。
3. 減壓濃縮裝置。
4. 試料前處理用管柱：TOSOH TOYOPAK ODS-M。

(二) 試藥：

Butylated Hydroxytoluene (BHT)(Sigma)，絕對酒精、氫氧化鉀、正己烷、硫酸鈉、Dimethyl Sulfoxide (DMSO)、甲醇 LC 級 (Merck 產品)。

(三) 標準品：

維生素 A (USP 級)，維生素 D₃、維生素 E (Sigma 產品)。

(四) 檢品：

一般送檢補助飼料、黃豆粉、魚骨粉、肉骨粉、玉米粉、麩皮、米糠。

(五) 試驗方法：

本實驗乃對送至本所申請查驗登記之補助飼料，三種脂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。

(A) 固相萃取法：

(1) 檢測樣品萃取及淨化

本萃取及淨化方法為參考 TOSOH⁽⁹⁾ 法，稍以修改：受檢樣品或標準品，置於 25 ml 褐色容量瓶中，加 1% 醋酸 5 ml 通氮氣經 30 秒後，蓋上蓋子，於 55 °C 水浴加熱 2 分鐘，冷卻至室溫，加異丙醇 10 ml，振盪 2 分，靜置 1 分，開始固相萃取。試料前處理用管柱，先用 2 ml 甲醇沖洗，再以 1% 醋酸 2 ml 沖洗、抽乾，置入前述經處理 2 ml 樣品，流出液丟棄後，再加異丙醇：1% 醋酸 (55:45) 溶液 1 ml，及甲醇：水 (80:20) 溶液 0.25 ml，再吹乾 1 分鐘，加入 0.5 ml Methylene

Chloride，再加 0.01 % BHT in acetone 溶液 1.5 ml，以幫浦加壓，沖出液注入 HPLC。

(2) 液相分析儀分析條件：

移動相：Acetonitril：Methanol：
H₂O=47:47:6

管柱： μ -Bondapak C₁₈ 4.0 mm ×
250 mm

檢測器波長：280 nm

(B) 加鹼皂化法：

(1) 檢測樣品萃取及淨化

本萃取及淨化方法乃參考中華藥典(Ⅱ)

(2) 及 A.O.A.C.⁽⁸⁾ 之方法，稍加修飾，大概如下：

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 及 90% 氫氧化鉀溶液 3 ml，於褐色玻璃裝置迴流加熱 30 分鐘，放冷後移入分液漏斗中，用正己烷抽取、濃縮，再加甲醇溶解至定容，注入 HPLC。

(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

檢測器波長：280 nm

(C) 不同管柱比較：

受檢樣品及標準品操作，液相層析儀分析條件，同方法(B)。

唯採用 Nucleosil 5 C₁₈ 4.0 x 150 mm 管柱，以比較不同分離管之結果。

(D) 有機溶媒萃取法 I：

(1) 檢測樣品萃取及淨化：

本萃取及淨化方法及參考 Tart⁽¹⁰⁾ 法，稍以修飾：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 x
250 mm

檢測器波長：280 nm

(E)不同有機溶媒比較：

(1)檢測樣品萃取及淨化：

(a)受檢樣品或標準品直接採用絕對酒精為
萃取液加至定容。

(b)受檢樣品或標準品加入萃取液甲醇後於
50~60°C水浴超音波處理 20~30 分
鐘，再加甲醇至定容。

(2)液相分析儀分析條件：同方法D。

(F)機溶媒萃取法 I：

本方法乃參考 ROCHE Co. LTD⁽⁶⁾方
法，稍以修飾。

(1)檢測樣品萃取及淨化：

受檢樣品及標準品採用 tetrahyd-
rofuran (THF)：H₂O=70:30 溶液為萃
取液加至定容。

(2)液相分析儀分析條件：

移動相：THF：H₂O=70:30

管柱： μ -Bondapak C₁₈ 4.0 x 250
mm

(G)空白試驗：

(1)檢測樣品萃取及淨化：

將魚骨粉、肉骨粉、黃豆粉、玉米粉、
麩皮、米糠，同方法D操作。

(2)液相分析儀分析條件：

同方法D，以探求方法D檢驗過程中，一
般常使用於補助飼料之賦形劑，是否對維生
素 A、D₃、E 之檢驗結果有所影響。

加鹼皂化法之結果(圖1、2)，Vit. A、D₃、
E 標準品 100 iu/ml，200 iu/ml，0.15 iu/ml
之滯留時間分別為 4.3 分，5.7 分，6.7 分(圖1
);受檢樣品 Vit. A 200 iu/ml，Vit. D₃ 30 iu
/ml，Vit. E 0.2 iu/ml 之液相層析圖譜(圖2);方
法C之結果(圖3)，Vit. A、D₃、E 標準品 25
iu/ml，400 iu/ml，0.3 iu/ml 之滯留時間分別
為 3.0 分，6.1 分，6.6 分;方法D之結果(圖4、
5)，Vit. A、D₃、E 標準品 150 iu/ml，20 iu
/ml，0.5 iu/ml 之滯留時間分別為 4.5 分，5.9
分，7.1 分(圖3)，受檢樣品 Vit. A 150 iu/ml，
Vit. D₃ 20 iu/ml，Vit. E 0.1 iu/ml 之液相
層析圖譜(圖5);方法 E之結果(圖6)，Vit. A、
D₃、E 標準品 50 iu/ml，400 iu/ml，0.15 iu
/ml 之滯留時間分別為 4.5 分，8.5 分，14.8 分，
受檢樣品 Vit. A 100 iu/ml，Vit. E 0.5 iu/ml
之液相層析圖譜(圖6-1);空白試驗之結果見(圖
7、8)。

檢測樣品經皂化處理(方法B)，或經先以少
許 DMSO 助容，再以無水乙醇定容(方法D)，
用 μ -Bondapak C₁₈ 管柱，100% 甲醇當移動
相，280 nm 波長下，Vit. A、D₃、E 都可得
分離良好之波峰，而後者之操作過程，比前者皂
化處理省時且方便。

μ -Bondapak 5-C₁₈ 管柱(方法B)與
Nucleosil 5-C₁₈ 管柱(方法C)之比較，由圖1、2、
3 知前者波峰出現結果較佳，後者干擾波峰多;
不同廠牌管柱，管柱長度不同，結果會有影響。

萃取溶媒選擇方面(方法D、E)由圖4、6，
前者 Vit. D₃ 20 iu/ml 與後者 Vit. D₃ 400iu/
ml 之波峰幾乎相等，知方法D之萃取效果優於方
法E，且實驗操作過程省時。

方法F為 ROCHE 之補助飼料中 Vit. A、
D₃、E 檢驗規格，此法為針對 Vit. A acetate：
Vit. A Palmitate=70:30 之該公司 Vit. A 產
品，我們同時用方法D加以檢驗該公司產品，比

較兩者之檢驗成績，結果幾乎完全一樣。

方法A固相萃取法，對補助飼料中 Vit. A、D₃、E 之一次同時檢驗，本次實驗結果並不適當。空白試驗，由圖7、8可知，一般常使用於補助飼料之賦形劑，在D法之檢驗過程中，對維生素 A、D₃、E 之檢驗結果，不會有影響。

綜合以上，本實驗認為對達成一次同時維生素 A、D₃、E 之定性定量檢驗條件為方法D之條件。

討 論

1. 以少許 DMSO 助溶，無水乙醇作溶劑，C₁₈ 層析管，甲醇為移動相，波長 280 nm 處，可一次同時定性及定量檢驗。唯補助飼料中，所含 Vit. A、D₃、E 成份濃度高低不一，且鹽類不同，故有時會讓同時一次分析三種維生素，變成技術上沒有辦法克服；若為含量濃度導致

檢驗時波峰不能同時很恰當的出現，請作不同濃度稀釋，再分別注入 HPLC，也就能得到理想的結果。

2. 如需單獨檢驗 Vit. A，檢驗波長可選用 326 nm；單獨檢測 Vit. D₃，波長可選用 265 nm (圖9)；Vit. E，則選用 284 nm，可分別提升敏感度；三種維生素一齊檢測則選用波長 280 nm。
3. 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。
4. 一般補助飼料中，脂溶性維生素添加以 Vit. A acetate、Vit. D₃、Vit. E acetate 為多，檢驗時 Vit. A 受到干擾之可能性最大；含維生素 A 補助飼料中，大部份干擾物質均可在加鹼皂化時將其除去，且適合於 Vit. A 含量較低的補助飼料之檢驗 (純合成維生素原料或其一般高濃度製劑，則不需皂化)。

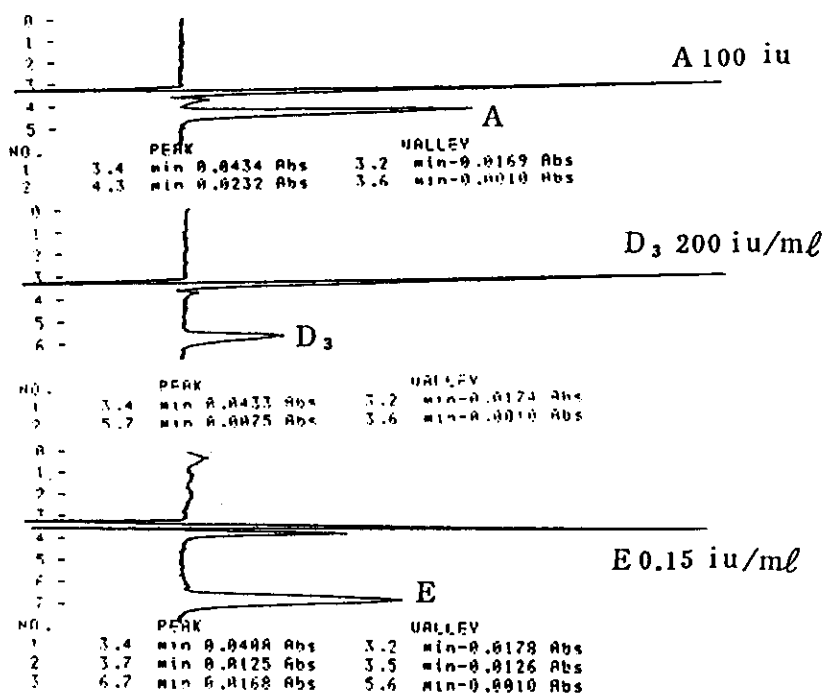


圖1 維生素 A、D₃、E 標準品，經色化處理後，HPLC 層析圖。

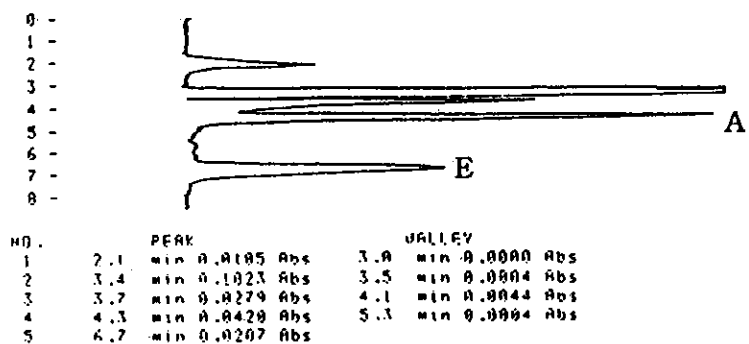


圖2 受檢樣品經色化後，維生素 A、D₃、E, 200 iu/ml, 30 iu/ml, 0.2 iu/ml 之層析圖 (Vit D₃ 含量低，未被檢出)

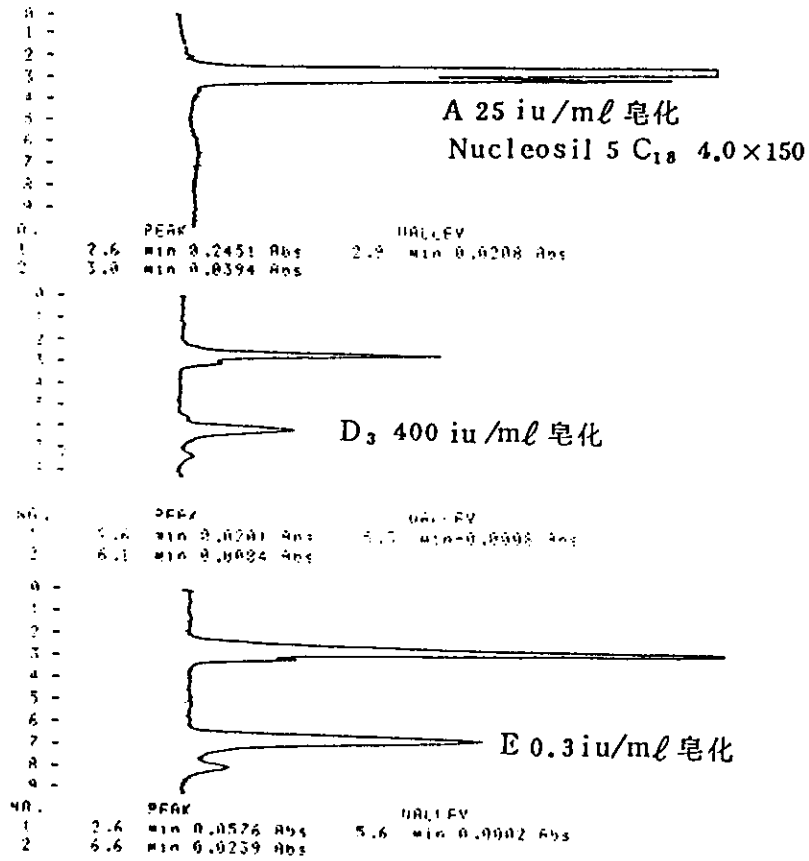


圖3 維生素A、D₃、E標準品 25 iu/ml, 400 iu/ml, 0.3 iu/ml 經皂化後之層析圖
管柱使用 Nucleosil 5 C₁₈ 4.0 x 150 mm 結果有干擾波峰，圖形不理想

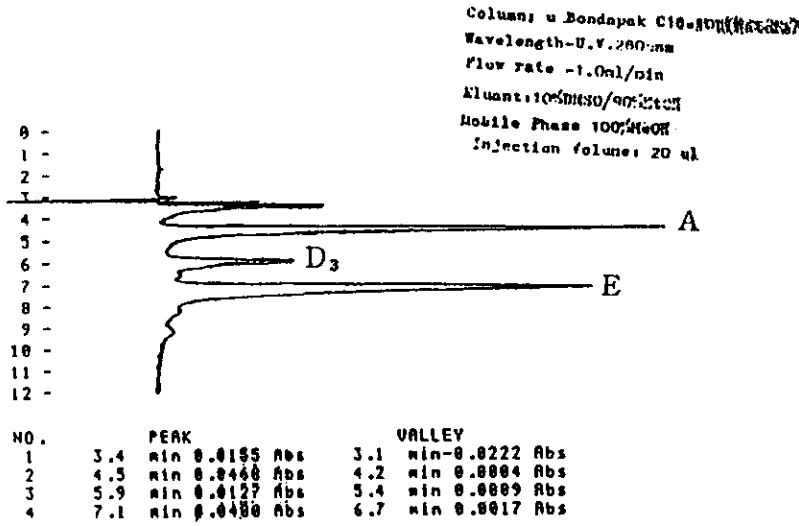


圖4 維他命 A、D₃、E 標準品 150 iu/ml, 20 iu/ml, 0.5 iu/ml 之層析圖 (有機溶媒萃取法 I)

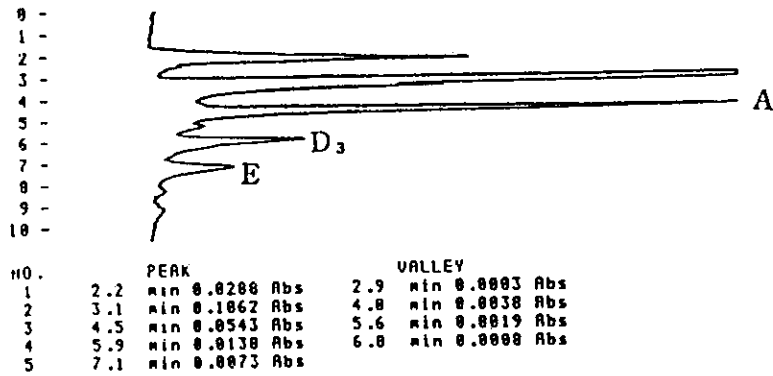


圖5 維生素 A、D₃、E 受檢樣品 150 iu/ml, 20 iu/ml, 0.1 iu/ml 之層析圖，條件同圖4

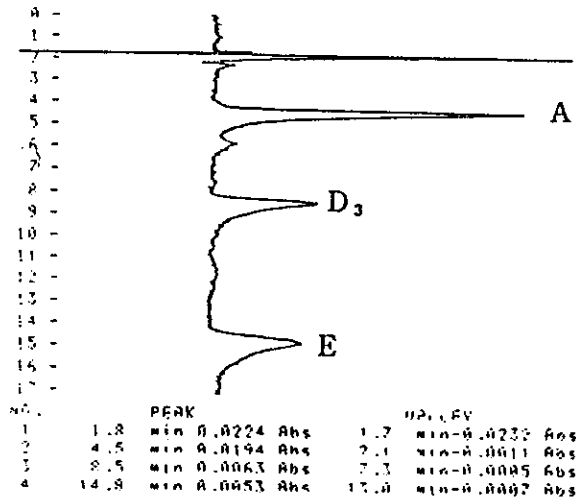


圖6 維生素A、D₃、E標準品 50 iu/ml, 400 iu/ml, 0.15 iu/ml之HPLC層析圖(直接溶於絕對酒精)

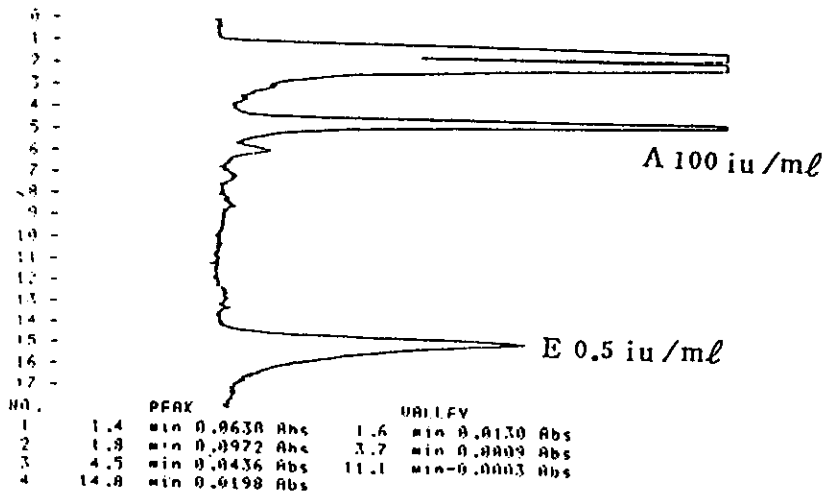


圖6-1 維生素A、E受檢樣品 100 iu/ml, 0.5 iu/ml之HPLC層析圖(直接溶於絕對酒精)

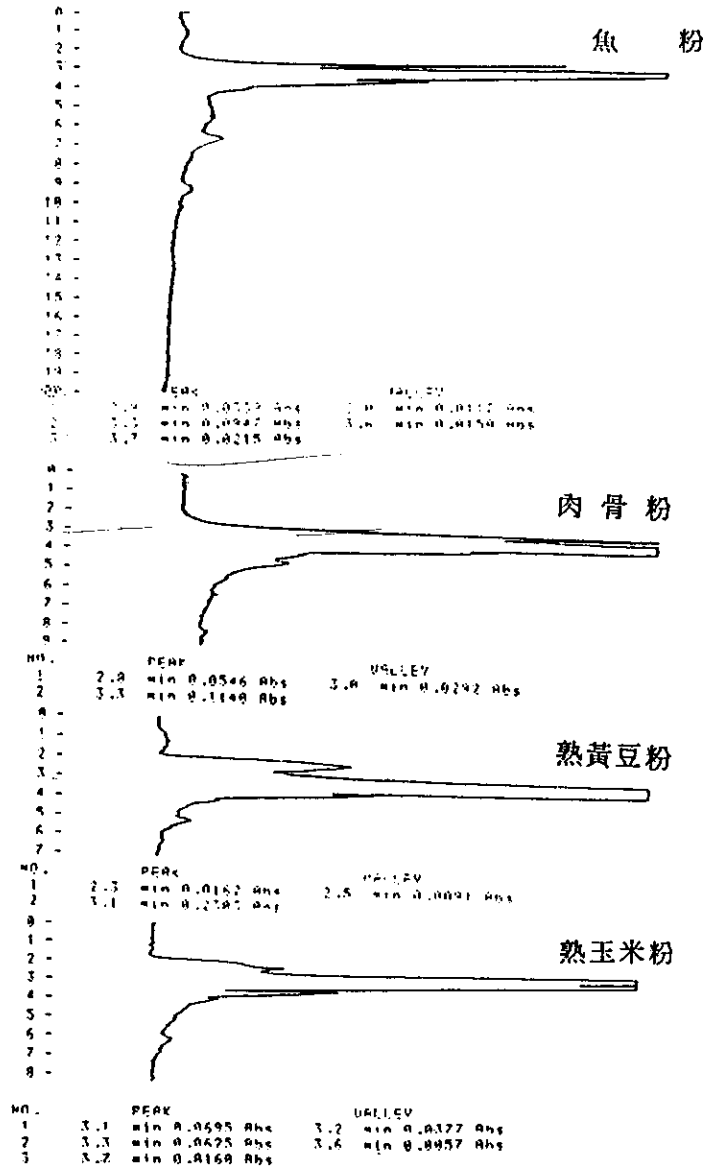


圖7 空白試驗

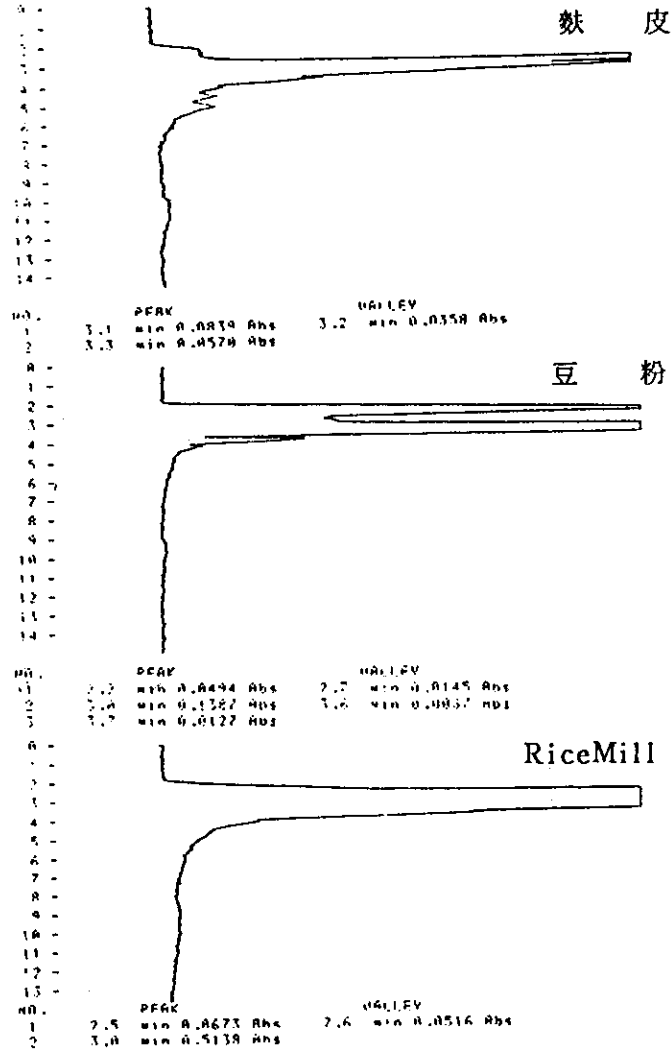


圖7 空白試驗(續)

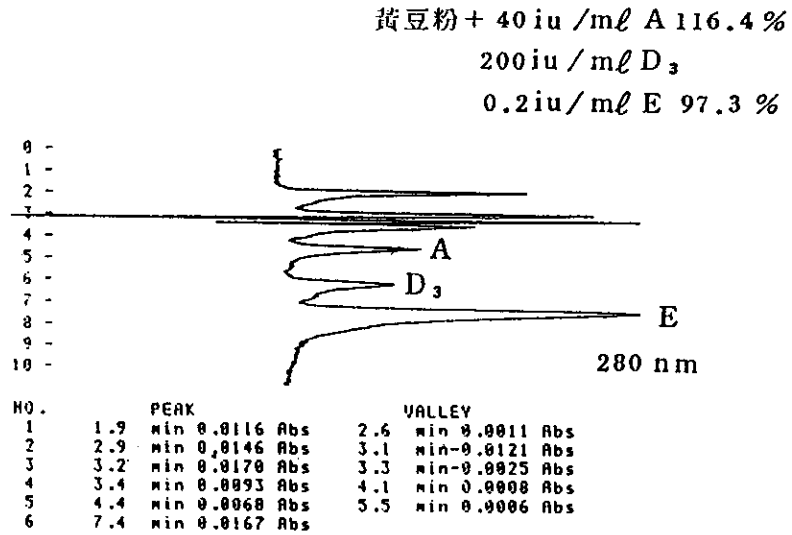


圖8 空白黃豆粉添加維生素標準品 A、D₃、E 40 iu/ml, 200 iu/ml, 0.2 iu/ml 之層析圖。

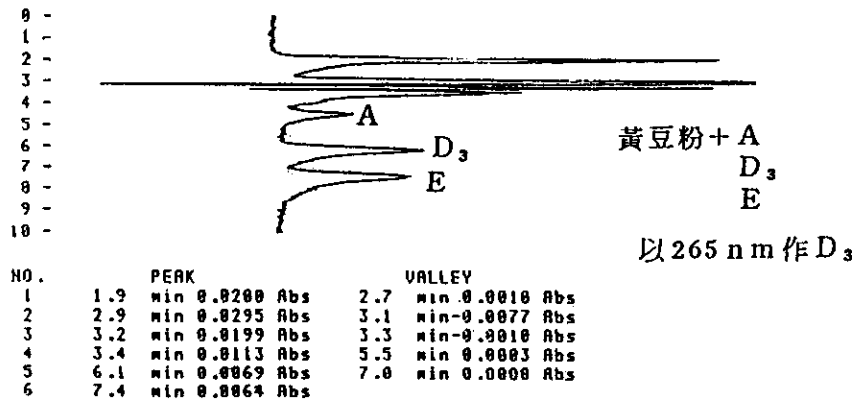


圖9 將圖8之檢測波長由 280 nm 改為 265 nm，對D₃ 可見較佳之波峰。

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Ⅱ1980 附錄 33-34。
3. 分離油溶性維他命，建吾公司，私人通信。
4. 林南曾。1973。維他命含量測定及鑑定 14-30, 213-256。
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. Analytical Methods for Vitamins and Carotenoids in feed ROCHE Co. LTD Private Communication.
7. Estimation of Vitamins and Carotenoids in Premixes and Feeds BASF Co. LTD Private Communication.
8. Official Methods of analysis-A.O.A.C. 1984 832-834, 854-860.
9. Rapid Extraction of Fat Soluble Vitamins, TOSOH. Co. L.T.D. Private Communication.
10. Tart Lee N. G. Method of Analysis of Vitamin D₃ Phibrochem I.N.C. Private Communication.

High Performance Liquid Chromatographic Rapid and Simultaneous Determination of Fat Soluble Vitamins (A, D₃, E) in Premixes.

K.M. Lin* M.C. Liu and P.P. Liou

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

SUMMARY

Premixes bulk sample was 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 μ -Bondapak C₁₈ 4.0 x 250 mm column and 280-nm detector. The mobile phase was 100% methanol. Fat soluble vitamins (A, D₃, E) could be determined simultaneously. The retention time of Vit. A 100 iu/ml, Vit. D₃ 200 iu/ml, and Vit. E 0.15 iu/ml were 4.3, 5.7, and 6.7 minutes, respectively. Alkaline saponification of the premixes bulk sample was found helpful in case of the peak of Vit. A has some interrupts or the concentration of Vit. A is lower.

By using HPLC, the fat soluble vitamins (A, D₃, E) in premixes can be determined rapidly and simultaneously and the risk of exposure to toxic organic solvents, the time and man power of operation can be reduced.

*Corresponding author

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