

高效液相色谱法测定配合与浓缩饲料中的叶酸含量

冯秀燕^{1*}, 魏秀莲¹, 杨宝良¹, 刘钧¹, 吴翠玲²

(1. 北京市饲料监察所, 北京 100107; 2. 安捷伦科技(中国)有限公司, 北京 100102)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱紫外检测法测定配合与浓缩饲料中的叶酸含量。**方法** 样品经 0.1 mol/L 碳酸钠溶液提取, 利用 EDTA 对金属元素的螯合作用和甲醇沉淀蛋白的作用去除金属元素及大分子蛋白对叶酸测定的干扰, 并通过阴离子交换柱净化富集, 洗脱液浓缩定容后供高效液相色谱仪测定。**结果** 叶酸在 0.1~250.0 μg/mL 的浓度范围内具有良好的线性关系, 样品回收率为 81.6%~94.6%, 相对标准偏差小于 10%, 检出限可达到 0.1 mg/kg, 定量限为 0.3 mg/kg。**结论** 本方法适用于配合与浓缩饲料中叶酸含量的测定。

关键词: 饲料; 叶酸; 高效液相色谱法

Determination of folic acid in formula feed and concentrated feed by high performance liquid chromatography

FENG Xiu-Yan^{1*}, WEI Xiu-Lian¹, YANG Bao-Liang¹, LIU Jun¹, WU Cui-Ling²

(1. Beijing Institute of feed control, Beijing 100107, China;
2. Agilent technologies (China) co., LTD, Beijing 100102, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of folic acid in formula feed and concentrated feed by high performance liquid chromatography(HPLC). **Methods** Samples were extracted by the solution of 0.1 mol/L Na₂CO₃. EDTA and methanol were applied to remove the distraction of metal elements and protein molecules by reasons of chelation of EDTA to metal elements and protein deposition of methanol. Through purification by ion exchange column, the eluent was used for the determination by HPLC after concentration and constant volume. **Results** Folic acid had a good linear relationship in the range of 0.1~250.0 μg/mL, and the average recoveries of samples were 81.6%~94.6%. The relative standard deviation was below 10%. The limit of detection was up to 0.1 mg/kg, and the limit of quantification was 0.3 mg/kg. **Conclusion** This method is suitable for the determination of folic acid in formula feed and concentrated feed.

KEY WORDS: feed; folic acid; high performance liquid chromatography

基金项目: 农业行业标准(2013-007, 2014-002)

Fund: Supported by the Agricultural Standard (2013-007, 2014-002)

*通讯作者: 冯秀燕, 高级畜牧师, 主要研究方向为动物营养与饲料。E-mail: fengxiuyan75@126.com

*Corresponding author: FENG Xiu-Yan, Senior livestock division, Beijing Institute of Feed Control, Chaoyang District, Beijing 100102, China. E-mail: fengxiuyan75@126.com

1 引言

叶酸是水溶性维生素 B 族中的一员, 在体内被还原酶还原为四氢叶酸, 成为多种代谢过程中的辅酶^[1]。叶酸的缺乏会影响到动物健康和生产性能^[2]。牛发良等^[3]研究发现叶酸缺乏时雏鸡免疫力低下; 另有研究发现, 补充叶酸可改进母猪繁殖性能、提高肉仔鸡生产性能^[4]; 赵学军等^[5]研究提出叶酸与胆碱能够为奶牛体组织提供一碳基团用于能量与蛋白质代谢、嘌呤与 DNA 的合成, 从而改善奶牛的生产性能。

目前, 叶酸已经成为一种常用的保障动物健康和良好生产性能的饲料添加剂, 关于动物对叶酸实际需要量得到广泛研究^[6-9]。农业部发布的《饲料添加剂安全使用规范》^[10]中规定, 不同配合饲料中的叶酸推荐用量为 0.3~2 mg/kg, 吉富罗非鱼获得最佳生长时对饲料叶酸需要量为 0.4 mg/kg^[6], 但关于饲料中叶酸的标准检测方法由于检测限太高目前还不能够满足实际检测的需求。GB/T 17813-1999《复合预混料中烟酸、叶酸的测定 高效液相色谱法》^[11]主要用于复合预混料和维生素预混料中叶酸的测定, 叶酸含量检出限为 500 mg/kg。GB/T 5009.211-2008《食品中叶酸的测定》^[12]采用的微生物方法需要菌种制备和传代, 较为繁琐。目前食品中叶酸的检测方法得到广泛研究^[13-16], 但是由于饲料与食品相比, 其基质更加复杂, 存在金属元素、沸石粉载体等广泛干扰元素, 所以目前食品中叶酸的检测方法尚不能直接应用于饲料中。本研究建立高效液相色谱法检测配合与浓缩饲料中叶酸含量, 为饲料中的叶酸检测提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器和试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(配紫外检测器或二极管阵列检测器, 美国安捷伦公司); Mettler Toledo MS 分析天平(梅特勒-托利多公司); KQ-500E 超声波振荡器(昆山市超声仪器有限公司); CF16RXII 离心机(Hitachikoki Co., Ltd); G560E 涡旋混合器(Scientific Industries, INC); S20pH 计(梅特勒-托利多); 0.22 μm 微孔滤膜(PTFE, 美国安捷伦公司); 固相萃取装置(美国 Waters 公司); 固相萃取柱(200 mg/6 mL, Bonel Elu+ Plexa PAX 或相当者, 美国安捷伦公司)。

甲醇(色谱纯, Honeywell); Na₂CO₃(分析纯, 国药集团); NaH₂PO₄(分析纯, 国药集团); EDTA(分析纯, 国药集团); GB/T 6682 规定的一级用水。

叶酸对照品(纯度大于 97.4%, 购自德国 DrEhrenstorfer 公司)。

供试饲料样品为大北农集团提供。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

叶酸标准储备液: 准确称取叶酸对照品 12.5 mg, 用 0.1 mol/L Na₂CO₃ 溶液溶解, 加入 100 μg 抗坏血酸并用水

定容至 50 mL 棕色容量瓶中, 配制成 250 μg/mL 的标准储备液。4 °C 避光保存, 有效期为 2 个月。

叶酸标准工作液: 准确量取 1.0 mL 叶酸标准储备液, 用水定容至 50 mL 容量瓶中, 稀释成 5.0 μg/mL 的标准工作溶液, 现配现用。

2.2.2 样品前处理

(1) 提取

准确称取配合与浓缩饲料试样 2.5 g(精确到 0.0001 g) 至 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 0.1 mol/L EDTA 溶液, 涡旋混合 2 min, 加入 25 mL 甲醇, 涡旋均匀混合 2 min, 全部转移至 50 mL 容量瓶, 再加入 10 mL 0.1 mol/L Na₂CO₃ 溶液, 蒸馏水定容至 50 mL。超声提取 15 min 后, 取 20 mL 样液于 50 mL 离心管, 10000 r/min 离心 10 min。准确移取上清液 10.0 mL 于 15 mL 离心管中, 在 40 °C 下氮气吹至 6.5 mL。

(2) 净化

PAX 固相萃取小柱先用 5 mL 甲醇活化, 再用 5 mL 水进行平衡后, 移取全部 6.5 mL 备用液过柱。取 5 mL 水冲洗盛放上清液的离心管, 充分转移至萃取柱中淋洗, 再用 5 mL 甲醇淋洗, 抽干 5 min, 用 6 mL 洗脱液, 每次 2 mL 分 3 次洗脱, 流速控制在 1 mL/min, 收集洗脱液; 洗脱液在 40 °C 下氮气吹至 1.0 mL 以下, 向残余物中加水定容至 1.0 mL, 超声 2 min, 混匀后过 0.2 μm 滤膜, 供高效液相色谱仪测定。

2.2.3 液相色谱条件

色谱柱: 耐碱性 C₁₈ 柱(可耐受 pH 值 10, 100 mm×4.6 mm, 2.7 μm)或相当者。柱温: 35 °C。检测器: 紫外检测器或二极管阵列检测器。检测波长: 280 nm。流速: 1.0 mL/min。进样量: 10 μL。流动相: A. 0.05 mol/L 磷酸二氢钠(PH=6.30); B. 甲醇; 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elute program

时间(min)	A(%)	B(%)
0	92	8
6	92	8
8	8	92
11	8	92
11.1	92	8
14	92	8

2.3 样品测定

按照 2.2.3 仪器条件下, 分别注入叶酸标准工作溶液和试样溶液进行测定。用液相色谱保留时间定性, 用标准工作溶液浓度做单点校准, 以色谱峰的峰面积进行定量计算; 或者以标准工作液中被测组分峰面积为纵坐标, 相应被测组分浓度为横坐标绘制工作曲线, 用工作曲线对试样进行定量。试样溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的

线性范围内。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的优化

叶酸检测多用反相色谱柱,本研究选用了 SB-C₁₈ 和 HPH-C₁₈ 色谱柱进行比较,发现 SB-C₁₈ 的分离效果虽然很好,但相比 HPH-C₁₈ 其耐碱性能明显要弱,在本方法的色谱条件下使用寿命非常短。而 HPH-C₁₈ 色谱柱既很好地解决了耐碱问题,在分离效果上也能够满足要求,所以最终选择了 HPH-C₁₈ 色谱柱。根据叶酸在紫外区的吸收特点,确定检测波长为 280 nm。

3.2 提取条件的确定

叶酸易溶于弱碱性溶液而微溶于水。用 0.1 mol/L 的 Na₂CO₃ 溶液提取叶酸,发现叶酸回收率不是很高,主要源于饲料配方复杂,含多种基质且微量元素中铁、铜、锌的存在也都对叶酸的提取造成了很大的影响。因此,从螯合金属元素等方面入手,以解决叶酸回收率低的问题。经试验研究,称取 2.5 g 试样加入 5 mL 的 EDTA、10 mL 的甲醇可满足检测要求。

3.3 净化条件的选择

本研究对不同种类、规格和厂家的柱子吸附能力进行了考察,选用 Waters C₁₈ 柱、Supelco C₁₈ 柱、Agilent PAX 柱,分别用 5 μg/mL 的标准溶液直接上柱,结果发现 Agilent 公司的 PAX 柱回收率可达 98% 以上,因此选用 PAX 柱来做净化,通过条件优化确定了本实验的净化条件: PAX 固相萃取小柱先用 5 mL 甲醇活化,再用 5 mL 水进行平衡后,移取全部 6.5 mL 备用液过柱;取 5 mL 水冲洗盛

放上清液的离心管,充分转移至萃取柱中淋洗,再用 5 mL 甲醇淋洗,抽干 5 min;用 6 mL 洗脱液,每次 2 mL 分 3 次洗脱,流速控制在 1 mL/min,收集洗脱液。

3.4 色谱图

空白饲料样品及空白添加样品的色谱图见图 1~5。由色谱图可见,在本实验条件下,被测物叶酸有良好的分离效果,空白饲料及添加样品无干扰。

3.5 线性范围、检出限和定量限

根据样品中叶酸的添加范围,配制了 6 个浓度梯度的叶酸标准系列工作溶液,分别为 0.1、0.5、2.5、10.0、25.0 和 250.0 μg/mL,在 2.2.3 色谱条件下进行分析,根据叶酸的浓度与峰面积的响应值进行线性回归分析,结果显示叶酸在 0.1~250 μg/mL 范围内线性范围良好,线性回归方程为: $Y=39.827X+5.4049$, $r=1.0000$ 。添加 1 μg/mL 的叶酸标准溶液 0.1 mL 于 1.0 g 空白饲料中(即添加浓度为 0.1 mg/kg),经提取后测定,叶酸的信噪比 $S/N>3$,表明方法的检出限可达到 0.1 mg/kg。添加 1 μg/mL 的叶酸标准溶液 0.3 mL 于 1.0 g 空白饲料中(即添加浓度为 0.3 mg/kg),经提取后测定,叶酸的信噪比 $S/N>10$,表明方法的定量限可达到 0.3 mg/kg。

3.6 回收率和精密度

在水产配合及蛋鸡浓缩饲料中添加 0.3 mg/kg 的叶酸,回收率可达到 76% 以上(见表 2)。以空白料为基础进行添加实验,以验证该方法的准确度和精密度。每种料中叶酸的添加 0.5、1.0 和 2 mg/kg 3 个浓度水平,每个浓度设 5 个平行,计算添加回收率和相对标准偏差。在 3 个浓度添加水平下,平均回收率范围为 81.6%~94.6%。试验数据表明,本方法可以满足检测分析的要求(见表 3)。

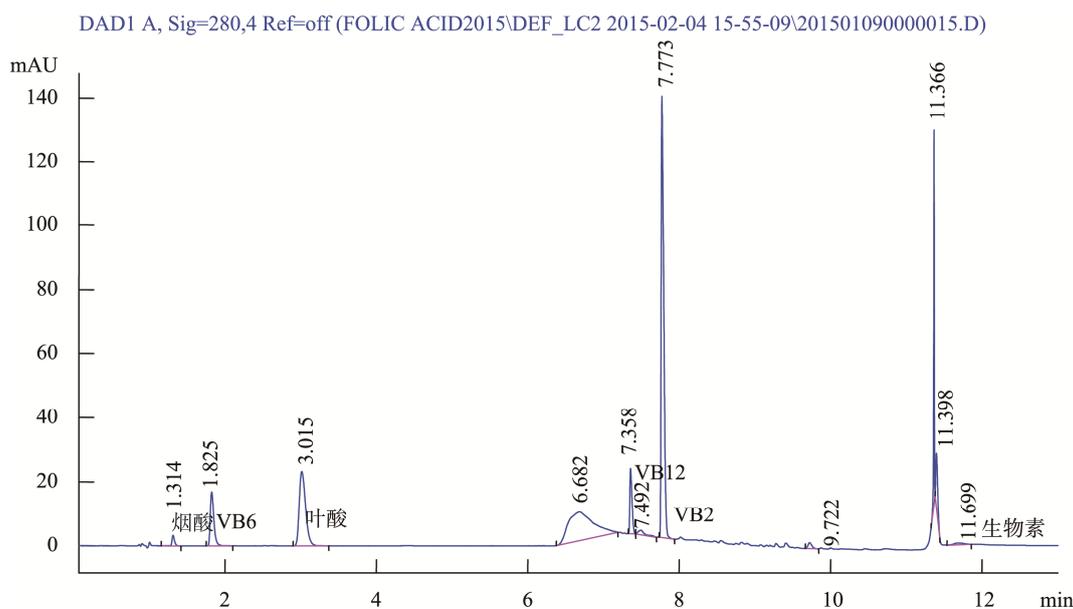


图 1 几种水溶性维生素的混标色谱图

Fig. 1 Chromatogram of mixed standard of several kinds of water soluble vitamins

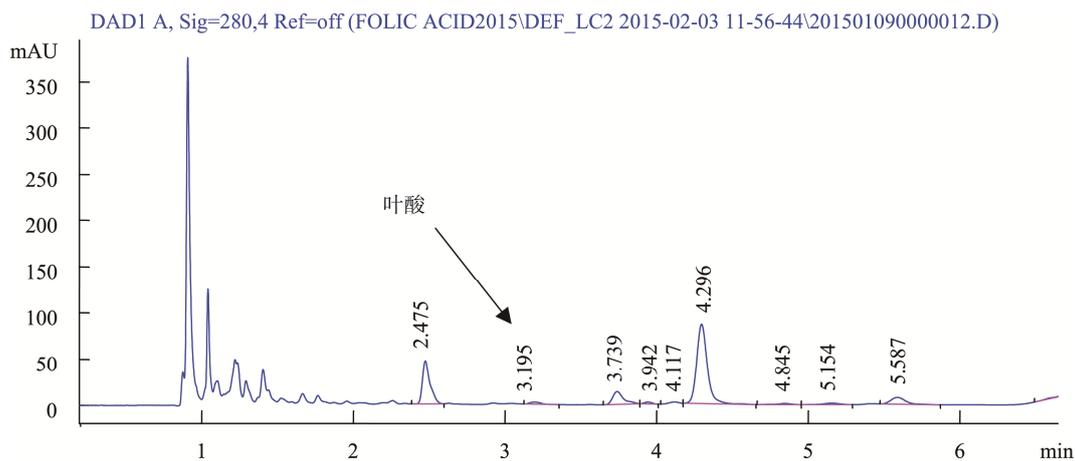


图 2 配合饲料空白样色谱图

Fig. 2 Chromatogram of formula feed(blank sample)

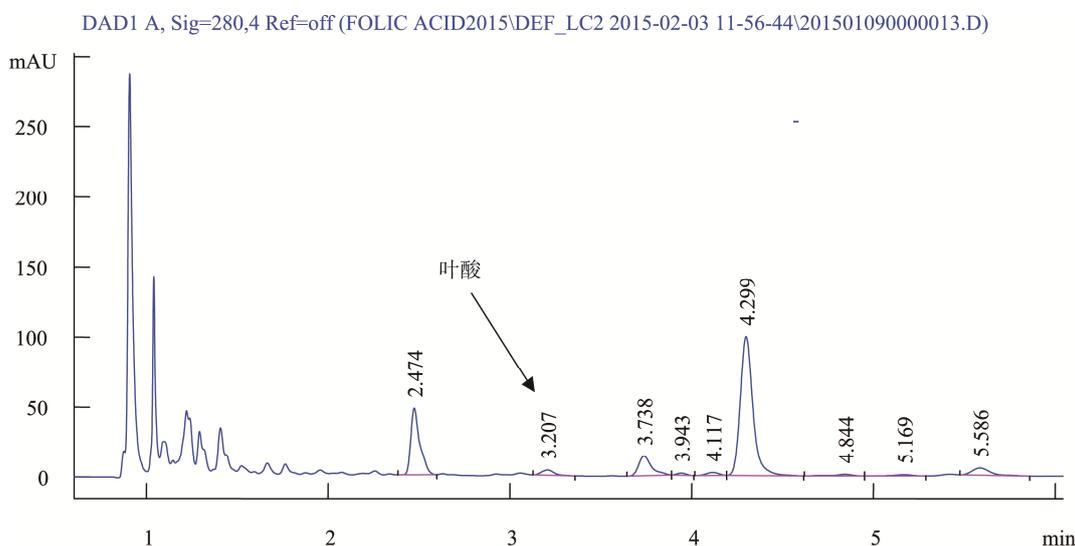


图 3 配合饲料添加 1.0 µg/g 的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of formula feed sample added 1.0 µg/g folic acid

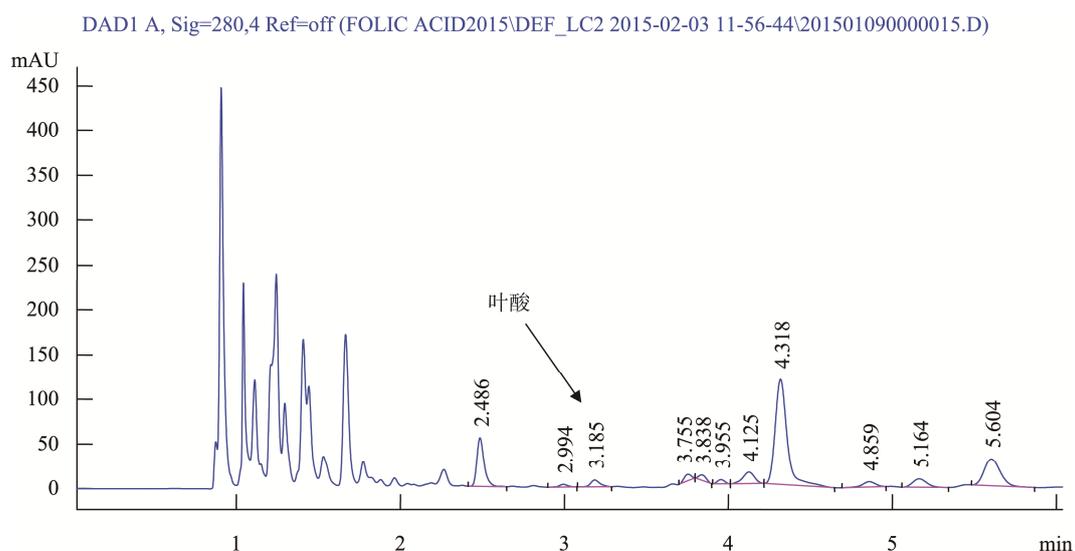


图 4 浓缩饲料空白样色谱图

Fig. 4 Chromatogram of concentrated feed(blank sample)

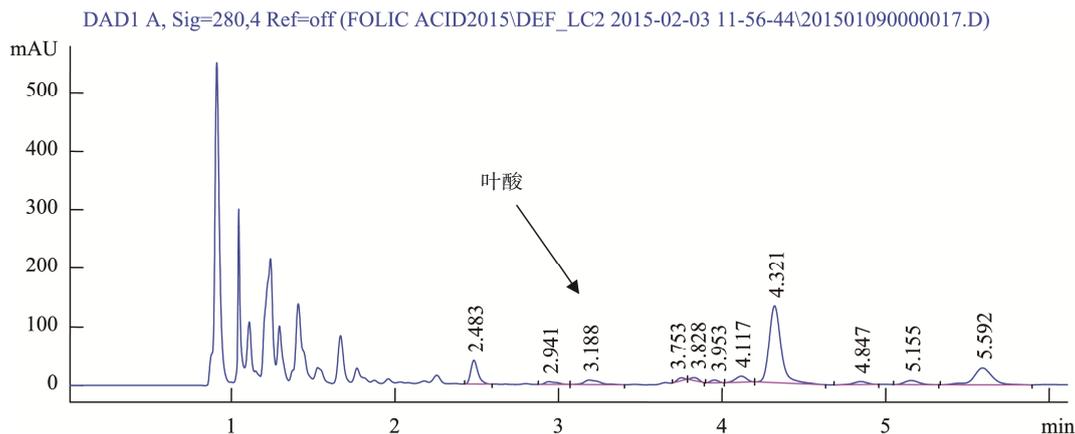


图5 浓缩饲料添加 2.0 µg/g 的色谱图

Fig. 5 Chromatogram of concentrated feed added 2.0 µg/g folic acid

表2 配合及浓缩饲料添加 0.3 mg/kg 叶酸后的回收率(n=5)

Table 2 Recoveries of formula feed and concentrated feed added 0.3 mg/kg folic acid(n=5)

饲料	添加浓度(mg/kg)	回收率 1 (%)	回收率 2 (%)	回收率 3 (%)	回收率 4 (%)	回收率 5 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
水产配合饲料	0.3	76	78	80.2	85.3	80.4	80.0	4.34
蛋鸡浓缩饲料	0.3	78.5	81.1	79.6	82.4	81.5	80.6	1.93

表3 回收率结果(n=5)

Table 3 Results of recoveries(n=5)

饲料	添加浓度(mg/kg)	回收率 1 (%)	回收率 2 (%)	回收率 3 (%)	回收率 4 (%)	回收率 5 (%)	平均回收率 (%)	RSD(%)	最大相对偏差 (%)
仔猪配合饲料 1	0.5	81.1	82.1	82.9	80.9	81.2	81.6	0.92	1.10
	1.0	85.6	82.7	89.2	90.7	92.3	88.1	3.97	5.49
	2.0	84.1	84.5	87.7	83.0	81.9	84.2	2.32	-3.42
草鱼配合饲料 2	0.5	78.7	83.1	85.9	88.7	87.6	84.8	4.23	5.97
	1.0	90.5	83.0	81.2	88.3	88.0	86.2	4.06	-5.42
	2.0	85.6	85.5	99.6	84.8	97.5	90.6	7.21	-8.03
肥育猪浓缩饲料 1	1.5	91.3	89.9	93.0	84.2	85.0	88.7	3.93	-4.97
	3.0	93.6	91.4	97.4	92.4	98.2	94.6	2.87	3.59
	6.0	90.8	89.4	90.5	92.5	94.8	91.6	2.06	2.93
蛋鸡浓缩饲料 2	1.5	84.3	89.2	86.8	75.1	90.7	85.2	6.46	2.93
	3.0	85.8	87.1	90.6	86.9	89.2	87.9	1.97	2.72
	6.0	86.5	91.2	89.6	93.2	95.1	91.1	3.25	4.74

4 结论

本研究采用高效液相色谱法测定配合与浓缩饲料中的叶酸,方法的回收率和精密度能够满足检测的要求,并大大降低了方法的检出限,拓宽了方法的适用范围,可适用于各种配合与浓缩饲料中叶酸的测定。本方法可为饲料监管、市场贸易中涉及的饲料中叶酸的测定提供技术依据。

参考文献

- [1] 杨玉柱,王储炎,焦必宁.叶酸的研究进展[J].产品加工(学刊),2006,(5):31-35.
Yang YZ, Wang CY, Jiao BN. Advancement of researches on folate [J]. Acad Period Farm Prod Process, 2006, (5): 31-35.
- [2] 薛琴,赵强元,刘敏,等.叶酸缺乏导致大鼠高同型半胱氨酸血症与行为学改变[J].军事医学,2013,37(3):219-222.

- Xue Q, Zhao QY, Liu M, *et al.* Hyperhomocysteinemia induced by dietary folate restriction causes behavior changin in rats [J]. *Med Sci*, 2013, 37(3): 219–222.
- [3] 牛发良, 侯亚利, 秦秀丽, 等. 添加叶酸对雏鸡免疫功能的作用及意义 [J]. *张家口医学院学报*, 2002, 19(3): 3–4.
Niu FL, Hou YL, Yin XL, *et al.* Effect and meaning of appending folic acid on immunity function in the chicken [J]. *J Zhangjiakou Med Coll*, 2002, 19(3): 3–4.
- [4] 丑武江, 郭雄全, 葛文霞. 叶酸对肉仔鸡蛋白质及生产性能的影响研究 [J]. *新疆农业科学*, 2009, 46(5): 1140–1143.
Chou WJ, GuoXQ, GeWX. Effect of different levels of folic acid serum protein and production performance of Broilers [J]. *Xinjiang Agr Sci*, 2009, 46(5): 1140–1143.
- [5] 赵学军, 叶均安, 刘建新. 高产奶牛的叶酸、VB₁₂和胆碱营养及其相互关系 [J]. *饲料博览*, 2003, (3): 8–10.
Zhao XJ, Ye JA, Liu JX. The correlation of folic acid, VB₁₂ and choline in lactating cow [J]. *Feed Expo*, 2003, (3): 8–10.
- [6] 吴金平. 吉富罗非鱼对饲料叶酸、生物素和胆碱需要量研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
Wu JP. Studies on the requirement of folic acid, biotin and choline in the diet to GIFT tilapia reochromis niloticus [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015.
- [7] 高庆. 饲料添加叶酸对断奶仔猪生产性能和免疫功能的影响研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2011.
Gao Q. Effects of dietary supplementation with folic acid on growth performance and immune function in weanling pig [D]. Chengdu: Sichuan Agriculture University, 2011.
- [8] 葛文霞. 烟酸和不同水平叶酸对肉仔鸡生产性能和血清理化指标影响的研究 [D]. 石河子: 石河子大学, 2006.
Ge WX. Effects of nicotinic acid and different levels of folic acid on growth performance and physiological and biochemical serum indexes in broilers [D]. Shihezi: Shihezi University, 2006.
- [9] 钱瑛. 不同叶酸水平对母猪泌乳性能影响的研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2007.
Qian Y. Effects of dietary supplement of folic acids on the performance of lactating sows [D]. Chengdu: Sichuan Agriculture University, 2007.
- [10] 农业部公告第 1224 号. 《饲料添加剂安全使用规范》 [Z].
The department of agriculture announced No.1224. Use of feed additives safety [Z].
- [11] GB/T 17813-1999 复合预混料中烟酸、叶酸的测定高效液相色谱法 [S].
GB/T 17813-1999 Determination of nicotinic acid and folic acid in pre-mixed Compound by HPLC [S].
- [12] GB/T 5009.211-2008 食品中叶酸的测定 [S].
GB/T 5009.211-2008 Determination of folic acid in food [S].
- [13] 石丹, 包怡红, 贾云虹, 等. 反相高效液相色谱法检测婴幼儿配方乳粉中叶酸的含量 [J]. *食品工业科技*, 2009, (3): 319–321.
Shi D, Bao YH, Jia YH, *et al.* Determination of folic acid in infant formula milk powder by RP-HPLC [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2009, (3): 319–321.
- [14] 陶大利, 姜金斗, 张永胜. 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法测定乳粉中游离叶酸含量 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34(6): 88–91.
Tao DL, Jiang JD, Zhang YS. Determination of free folic acid content in milk powder by immunoaffinity column purification-HPLC [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2013, 34(6): 88–91.
- [15] 张培, 冯慧予. 高效液相色谱荧光-衍生法测定保健食品中叶酸方法的研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2009, 21(1): 41–43.
Zhang P, Feng HY. Determination of folic acid in health food by high performance liquid chromatography with fluorescence detector after derivation [J]. *Chin J Food Hyg*, 2009, 21(1): 41–43.
- [16] 刘波, 王晓工, 王心祥, 等. 高压液相色谱法测定婴幼儿配方乳粉中叶酸 [J]. *中国乳品工业*, 2003, 31(3): 39–41.
Liu B, Wang XG, Wang XX, *et al.* Determination of folic acid in infant formula milk powder by HPLC [J]. *China Daily Ind*, 2003, 31(3): 39–41.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



冯秀燕, 硕士, 高级畜牧师, 主要研究方向为动物营养与饲料。

E-mail: fengxiuyan75@126.com