

离子对 HPLC 法测定猪饲料中 3-吡啶甲醇含量

陈晓颖¹, 李跃龙², 肖田安², 邓国东², 杨大亮¹

(1 广东药学院, 广东广州 510006; 2 广东省兽药与饲料监察总所, 广东广州 510230)

[收稿日期] 2006-06-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2006)09-0028-03 [中图分类号] S816.73

[摘要] 建立了猪饲料中 3-吡啶甲醇含量测定方法。取氨基柱作为色谱柱, 以磷酸二氢钾 (0.025 mol/L): 乙腈: 庚烷磺酸钠 (0.25 mol/L) = 25: 75: 0.4 (V/V, pH 4.50) 为流动相, 检测波长 260 nm, 流速为 0.5 mL/min。饲料中 3-吡啶甲醇的检测限为 0.032 μ g/g, 定量限为 0.12 μ g/g。回归曲线方程为 $A = 24.75C + 0.43$, $r = 0.9993$, 平均回收率为 80% ~ 85%。

[关键词] 离子对 HPLC 法; 饲料; 3-吡啶甲醇

3-吡啶甲醇 (3-pyridylcarbinol) 常作为医药中间体使用, 作为扩血管药物能刺激血液循环加速^[1], 作为饲料添加剂能促进家畜生长发育, 但同时 3-吡啶甲醇也是一种对人体有害的兴奋剂。目前国内还没有检测饲料中 3-吡啶甲醇含量的方法, 本试验通过研究建立了一种高效液相色谱法检测饲料中的 3-吡啶甲醇。

1 材料与方法

1.1 色谱仪及色谱条件 Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 配 DAD 检测器, 检测波长 260 nm; 色谱柱为 NUCLEOSIL EC 100-5 NH₂ RP 柱 (250 mm × 4.6 mm), 德国 MN 公司。流动相为磷酸二氢钾 (0.025 mol/L): 乙腈: 庚烷磺酸钠 (0.25 mol/L) = 25: 75: 0.4 (V/V), 用稀 H₃PO₄ 调到 pH 4.50, 流速为 0.5 mL/min; 柱温 26 $^{\circ}$ C。

1.2 试剂与材料 3-吡啶甲醇, 批号 G101, 东京化成工业株式会社; 乙腈、甲醇为色谱纯; 三氯甲烷、磷酸二氢钾、磷酸为分析纯; 庚烷磺酸钠, 北京科技协作中心中国药品生物制品检定所研究分部; 252 中猪配合饲料 (不含 3-吡啶甲醇), 广东省广弘九江饲料有限公司。

1.3 分析溶液的制备

1.3.1 空白猪饲料溶液 将猪饲料样品粉碎, 取粉碎后的样品约 5 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加氯仿 50 mL, 超声 15 min, 过滤, 滤液置梨形瓶中。

用氯仿 10 mL 分次洗涤锥形瓶及滤渣, 合并滤液。滤液在 40 $^{\circ}$ C 水浴上旋转蒸发至约 1 mL, 转移至 10 mL 磨口离心管中, 用氯仿 3 mL 分次洗涤梨形瓶, 合并入离心管中。在氮气流 (40 $^{\circ}$ C) 下吹干, 加水 2.0 mL, 旋涡振荡 10 s, 经 0.45 μ m 滤膜过滤, 作为空白溶液。

1.3.2 对照溶液 精密称取 3-吡啶甲醇 10.52 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 得 3-吡啶甲醇浓度为 1.052 mg/mL 的对照品贮备液。吸取对照品贮备液 1.0 mL 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 得 3-吡啶甲醇浓度为 10.52 μ g/mL 的对照溶液。

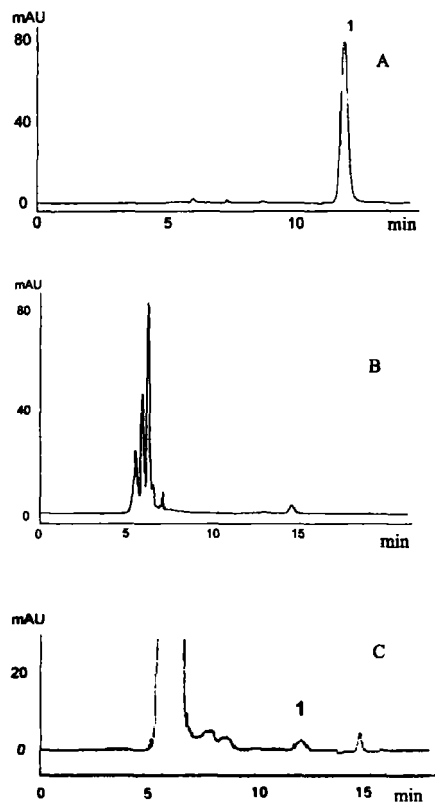
1.3.3 工作曲线用系列溶液 分别吸取一定量的对照溶液用氯仿稀释成浓度为 0.2104, 0.4208, 0.8416, 1.262, 1.683, 2.104 μ g/mL, 备用。

2 结果

2.1 色谱分离 在 1.1 项色谱条件下分别取 3-吡啶甲醇对照溶液 (10.52 μ g/mL) 和空白溶液各 10 μ L 注入色谱仪, 记录色谱图 (图 1A、B)。3-吡啶甲醇和样品中相邻色谱峰的分离度大于 1.5; 理论板数以 3-吡啶甲醇计算大于 4000。

2.2 线性与范围 吸取不同浓度的工作曲线用对照溶液各 10 μ L, 分别进样测定, 以峰面积 (y) 对对照溶液系列浓度 (x) 进行回归, 得回归方程 $y = 24.75x + 0.43$, $r = 0.9993$ 。试验表明 3-吡啶甲醇

浓度在 0 2104~ 2 104 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 峰面积与浓度线性关系良好。



A. 3-吡啶甲醇对照溶液; B 空白饲料溶液;
C 空白饲料 + 3-吡啶甲醇; 1 3-吡啶甲醇峰
图 1 高效液相色谱图

2.3 添加回收率及精密度测定 分别精密量取 1.262 $\mu\text{g/mL}$ 对照溶液 0.5、1.0、2.0 mL 加入已称有 5.0 g 空白猪饲料粉末的具塞锥形瓶中, 按供试品溶液的制备方法处理并测定, 每一浓度水平做 6 个平行, 色谱图见图 1C。3 个浓度平均回收率分别为 80.7%、83.8%、85.3%; *RSD* 分别为 7.7%、5.9% 和 5.0%, 结果见表 1。

2.4 检测限和定量限的确定 称取已粉碎的饲料 20 份, 每份 5.00 g, 按 1.3.1 项下的方法处理, 进行 HPLC 测定。求出空白样品在所测药物出峰时间处的噪音平均值和标准差。以空白样品噪音平均值加上 3 倍标准差的峰面积所对应的药物浓度为最低检测限, 以空白样品噪音平均值加上 10 倍标准差的峰面积所对应的药物浓度为定量限。根据回归方程计算, 检测限为 0.032 $\mu\text{g/g}$, 定量限为 0.12 $\mu\text{g/g}$ 。

表 1 猪饲料中 3-吡啶甲醇的回收率试验

添加量	测得量	加样回收率	平均加样	<i>RSD</i>
/mg	/mg	%	回收率 %	%
0.6312	0.4986	79.0	80.7	7.7
	0.5465	86.6		
	0.4293	68.0		
	0.5631	89.2		
	0.4868	77.1		
	0.5326	84.4		
1.2624	1.0542	83.5	83.8	5.9
	1.0065	81.3		
	0.9862	78.1		
	1.0002	79.2		
	1.1109	88.0		
	1.1724	92.9		
2.5248	2.3123	91.6	85.3	5.0
	2.0642	81.8		
	2.1019	83.2		
	2.2967	91.0		
	2.1502	85.2		
	2.0005	79.2		

3 讨论与结论

3.1 3-吡啶甲醇作为尼古丁的代谢物, 曾有报道用 C_{18} 柱可以对它进行分析^[2]。但根据文献^[3,4]报道的流动相不能把 3-吡啶甲醇与饲料中的其它杂质分离, 改变流动相的各种配比仍然无法达到分离。经过对饲料成分的分析, 发现配合饲料中添加了多种维生素, 其中维生素 B 族中的烟酸、维生素 B_6 与 3-吡啶甲醇结构非常相似, 都以吡啶环和环上的羟基为主要结构, 因此 C_{18} 柱无法满足分离此类化合物的要求。上海安谱公司曾用 NH_2 柱有效分离维生素 B 族各种维生素。因此改用 NH_2 柱, 经试验分离效果明显改变。

3.2 水溶性维生素的 HPLC 分离中, 采用的流动相主要有乙腈: 磷酸二氢钾的十二烷基磺酸钠溶液 (22: 78)^[5]、乙腈: 磷酸二氢钾 (0.1 mol/L): NaCD_4 (0.1 mol/L) (pH 3.5)^[6]、磷酸二氢钾溶液 (0.05 mol/L) 与甲醇梯度洗脱^[7]、磷酸二氢钾和庚烷磺酸钠水溶液-甲醇-三乙胺 (85: 15: 0.4), 用磷酸调 pH 至 2.8^[8] 等。本试验通过摸索最终确定流动相为磷酸二氢钾 (0.025 mol/L): 乙腈: 庚烷磺酸钠 (0.25 mol/L) = 25: 75: 0.4 (V/V , pH 4.50), 可以满足分析要求。

3.3 在该流动相条件下, 氨基柱的寿命较短, 所以应尽快完成实验。

3.4 该方法操作简单, 灵敏度高, 检测限、回收率、

重复性和线性范围较好, 适用于猪饲料中 3-吡啶甲醇含量的测定。

参考文献:

[1] 田明祥. 3-吡啶甲醇的合成 [J]. 辽宁化工, 1999, 28(3): 138 - 139

[2] Rop P P, Grimadi F, Oddoze C. Determination of nicotine and its main metabolites in urine by high-performance Liquid chromatography [J]. Journal of chromatography, 1993, 612(2): 302- 309.

[3] 杨大进, 保健食品中吡啶甲酸铬的检测方法研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2001, 13(3): 8- 10.

[4] 于忠伟, 魏 伟. 三氯吡啶醇、三氯吡啶醇钠的高效液相分析 [J]. 农药, 1997, 12(36): 22- 23.

[5] 宗永辉, 胡晓炜. 反相高效液相色谱法检测叶金胶囊中维生素 B₆ 的含量 [J]. 医药导报, 2003 9(22): 638- 640

[6] 张剑韵, 黄金龙, 早川亨志 (日). 采用高效液相色谱技术分析生物体内维生素 B₆ [J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(4): 638- 640

[7] 成志强, 孙成均, 黎源倩. 反相高效液相测定食品和多维片中 8 种水溶性维生素 [J]. 分析化学研究简报, 2001, 29(9): 1068- 1071

[8] 王自然, 伏光华. 离子对高效液相法测定复方甲硝唑片中甲硝唑和维生素 B₆ 的含量 [J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(5): 102 - 108.

Determination of 3-Pyridylcarbinol Content in Feed by HPLC

CHEN Xiaoying¹, LI Yuebing², XIAO Tianan², DENG Guo-dong², YANG Da-liang¹

(1. Guangdong University of Pharmacy, Guangzhou, Guangdong 510006

2. Guangdong Municipal Supervisory Institute of Veterinary Drugs and Feedstuffs, Guangzhou, Guangdong 510230 China)

Abstract In order to detect the content of 3-pyridylcarbinol in feed, an Ion-RP-HPLC method was established. The chromatographic conditions were: NUCLEOSIL EC (250 mm × 4. 6 mm) 100-5 NH₂ RP column; KH₂PO₄ (0. 025 mol/L) : CH₃CN : C₇H₁₅SO₃Na (0. 25 mol/L) = 25 : 75 : 0. 4 (V/V, pH 4. 50) as mobile phase; detection wavelength at 260 nm; flow rate of 0. 5 mL/min. Results showed that the linear range of detection was between 0. 2104~2. 104 μg/mL, $r = 0. 9993$. The average recovery was (80. 7 ± 7. 7) % for 0. 3 μg/mL; (83. 8 ± 5. 9) % for 0. 6 μg/mL; (85. 3 ± 5. 0) % for 1. 2 μg/mL. The determination limit was 0. 12 μg/g.

Key words Ion-RP-HPLC; feed; 3-pyridylcarbinol

兽药地方标准升国家标准目录 (3)

序号	标准名称	规格	兽药品种编号
14	复方磺胺间甲氧嘧啶注射液	10mL: 磺胺间甲氧嘧啶 1g+ 甲氧苄啶 0. 2g	6027
		50mL: 磺胺间甲氧嘧啶 5g+ 甲氧苄啶 1g	6028
		100mL: 磺胺间甲氧嘧啶 10g+ 甲氧苄啶 2g	6029
15	复方磺胺间甲氧嘧啶钠溶液	50mL: 磺胺间甲氧嘧啶钠 5g+ 甲氧苄啶 1g	6030
		100mL: 磺胺间甲氧嘧啶 10g+ 甲氧苄啶 2g	6031
16	诺氟沙星粉	2. 5%	6032
		5%	6033
		10%	6034
17	葡萄糖酸钙溶液	30%	6035
18	复合阿司匹林可溶性粉	质量标准规定了处方	6036
19	复方乌洛托品可溶性粉	质量标准规定了处方	6037
20	马度米星铵溶液	100mL: 0. 25g(马度米星)	6038
		100mL: 0. 5g(马度米星)	6039
		100mL: 1g(马度米星)	6040