

高效液相色谱法分析饲料中 VK_3

戴 军 唐 忠

(无锡轻工大学) (盐城面粉厂)

摘要 在 C_8 柱和 NH_2 柱上分别用反相离子对色谱法和离子交换法建立了预混料和配合饲料中 VK_3 (亚硫酸氢钠甲萘醌) 的 HPLC 分析方法, 并对 VK_3 在这两种分离模式中的保留值与流动相组成的关系作了较系统的研究。

主题词 甲基萘醌; 高效液体色谱; 饲料

中图分类号 O657.7

0 前 言

VK 是一类能促进血液凝固的萘醌衍生物。 K_1, K_2 为天然产物, K_3 为人工合成品, 且活性最强。动物缺乏 VK , 在有创伤时, 可引起流血不止。但大剂量 VK_3 及其衍生物又会引起动物贫血、脾肿大和肝肾伤害^[1]。因此, 在预混合饲料及全价配合饲料的研究和生产过程中, 必须对原料和产品中的 VK 含量进行准确的定量分析和控制。在饲料中强化的 VK 一般都是 VK_3 的亚硫酸氢钠盐, 即亚硫酸氢钠甲萘醌, 其分析方法目前主要有分光光度法和气相色谱法^[2,3], 前者需衍生, 操作麻烦, 易受杂质干扰, 仅适用于成分较简单的饲料添加剂样品, 后者需在热解气相色谱柱上转化为游离的 VK_3 才可测定。作者分别在 C_8 柱和 NH_2 柱上采用反相离子对色谱法和离子交换法两种分离模式建立了简便、快速、准确的直接测定饲料中 VK_3 的 HPLC 分析方法, 并对 VK_3 在这两种色谱体系中的保留行为与流动相组成的关系作了较系统的研究, 其结果对分析药物及其它样品中 VK_3 也应有一定的指导意义。

1 实 验

1.1 试剂

样品由本校饲料教研室和无锡联合生物技术公司提供; 标准品为生化试剂 (含量 94%), 上海试剂二厂生产; 甲醇为光谱纯, 上海振兴化工一厂生产; 水为超纯级, 无锡华晶公司生产。其它试剂皆为分析纯。

1.2 样品预处理

称取一定量样品 (预混料为 0.1~1g, 全价配合饲料为 3~5g) 于 100ml 棕色容量瓶中,

收稿日期: 1995-06-30

用甲醇-水(20/80, V/V)定容,超声振荡 10min,离心,用 0.45 μ m 微孔膜过滤,滤液供进样用。

若样品是鱼虾等水产颗粒饲料,因其中含有变性淀粉或糊精,在甲醇-水溶剂中会呈糊状,无法提取,故需先用少量 α -淀粉酶使之液化水解,再提取、离心、过滤,然后用 Sep-pak C₁₈小柱处理净化后再进样。

1.3 色谱条件

见表 1。

VK₃ 在模式 I 和 II 中的紫外光谱采集图相同,如图 1 所示,VK₃ 有三个吸收峰,表 1 选择 266nm 和 232nm 两个波长检测。

表 1 HPLC 分析 VK₃ 的色谱条件

分离模式	I 反相离子对色谱法	II 离子交换法
色谱柱	俄产 C ₈ , 120 \times 4mm(10 μ)	大连化物所 Nucleosil NH ₂ 250 \times 4mm(7 μ)
流动相	CH ₃ OH/H ₂ O, 20/80(V/V) 6mmol/L.(C ₂ H ₅) ₄ NBr	CH ₃ OH/H ₂ O, 15/85(V/V), 100mmol/L. KCl 10mmol/L. KH ₂ PO ₄ , pH3~4
流速	0.8ml/min	1.0ml/min
柱温	25 C	30 C
检测	UV 266(10)nm-450(60)nm MF1.0 或 232(8)nm-420(60)nm MF1.0	
仪器	HP 1050	

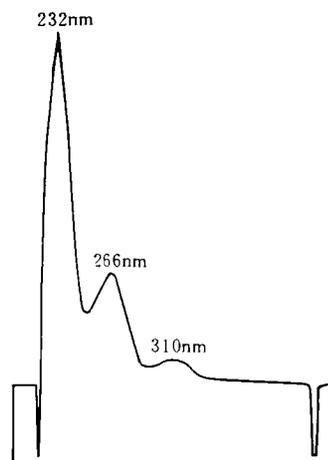


图 1 VK₃ 亚硫酸氢钠光谱采集图

扫描范围 220~400nm

2 结果与讨论

2.1 色谱体系的选择

在 VK₃ 亚硫酸氢钠分子结构中,虽然有芳环结构存在,但因为它是离子型化合物,故用一般的反相色谱法无法对它分离分析。离子交换法当然可行,但一般检测部门和工厂的仪器上都不具备标准的键合型阴离子交换柱。鉴于上述情况,作者根据被分析对象的结构特征,首选模式 I。为满足检测单位的不同要求,考虑到氨基柱为常用极性柱,且在酸性条件下,又可作为一种具有较好的化学稳定性和热稳定性(相对于离子交换树脂柱)的键合型弱碱性阴离子交换柱^[4],故也选择模式 II 作试验。结果表明(图 2,3),这两种分离模式的选择都是可行的,且易于推广。

对于模式 I,若换用 C₁₈柱,其它色谱条件基本不变,只需将流动相中甲醇的比例适当提高或将离子对试剂浓度适当减小即可。

2.2 反相离子对色谱法中流动相组成对 VK₃ 保留值的影响

2.2.1 离子对试剂的浓度 如图 4 中曲线 1 所示,在其它条件不变的情况下,随着离子对试剂浓度(C_Q)即四乙基溴化铵浓度的增大,其容量因子 k' 也增大,且增大速率逐渐减小。以 $\ln k'$ 对 $\ln C_Q$ 作一元线性回归得: $\ln k' = -0.0344 + 0.560 \ln C_Q$, 相关系数 $r = 0.9929$, 即 $\ln k'$ 与 $\ln C_Q$ 之间近似地线性正相关。

2.2.2 有机溶剂浓度 恒定(C₂H₅)₄NBr 浓度,容量因子 k' 随甲醇浓度的升高而迅速下降

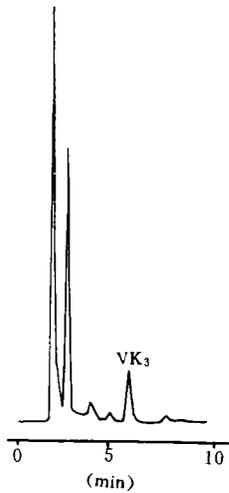


图2 猪的预混料色谱图

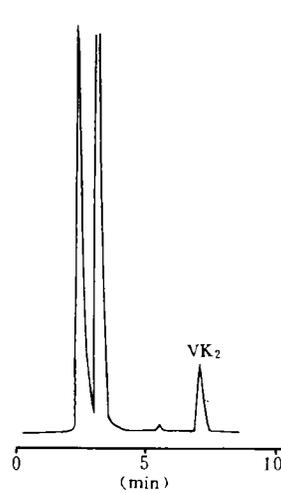
模式 I VK₃ 保留时间 6.026min

图3 鸡的预混料色谱图

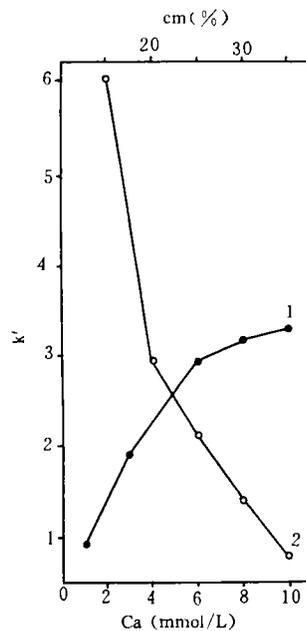
模式 I VK₃ 保留时间 7.06min

(图4曲线2),且 $\ln k'$ 与甲醇浓度 C_m 之间存在近似的直线关系: $\ln k' = 3.19 - 0.098C_m, r = -0.9919$. 利用此规律,可预见梯度洗脱复杂样品时VK₃的保留特征。

2.3 在氨基柱上离子交换法中VK₃保留值与流动相组成的关系

2.3.1 无机盐浓度的影响 在恒定甲醇和KH₂PO₄浓度,pH不变条件下,改变KCl浓度(C_{KCl})即改变流动相离子强度,其容量因子 k' 变化如图5曲线1所示。 $\ln k'$ 与 $\ln C_{KCl}$ 之间呈线性负相关: $\ln k' = 3.241 - 0.588 \ln C_{KCl}, r = -0.9994$. 符合卢佩章教授等^[5,6]提出的无机盐浓度对保留值影响的关系式: $\ln k' = A - B \ln C_s$.

2.3.2 甲醇浓度的影响 图5曲线2显示,随着甲醇浓度(C_m)的增大,VK₃保留值显著减小, $\ln k'$ 与 $\ln C_m$ 也呈负相关: $\ln k' = 1.606 - 0.400 \ln C_m, r = -0.9977$. 该变化趋势与邹汉法^[7]有关离子交换色谱中甲醇浓度对保留值的影响的研究结果相反,这可能是因为:从静电作用看,流动相中甲醇分子对离子色谱固定相的吸附作用(即与溶质竞争吸附作用)比水分子要弱,随着甲醇浓度增大,溶质VK₃与固定相的静电作用有所增强,这将使保留值增大。但从另一方面看,随着甲醇浓度的增大,溶剂与溶质的疏水作用增大,导致保留值减小。作者研究的溶质VK₃在所选定的NH₂柱离子交换色谱体系中(弱碱性阴离子交换),甲醇浓度增大所引起的疏水作用增大的幅度大于静电作用增强的幅度;而邹汉法等人的研究对象为苯和萘的一氨基或二氨基的一磺酸盐及二、三磺酸盐,分子极性较强,且固定相为强碱性阴离子交换

图4 C_s柱上流动相组成对VK₃保留值的影响

色谱条件:

1 C_m 为20% 2 C_a 为6mmol/L.

其它见条件表1

柱,因而甲醇浓度的变化所引起的疏水作用变化幅度小于静电作用变化的幅度,致使保留值随甲醇浓度的升高而增大。

2.3.3 pH的影响 图5曲线3表明,随着pH值降低即酸度增大,键合相NH₂的质子化程度增大,即离子交换基团数目增多,交换容量增大,因而保留值增大。质子化程度及交换容量随pH降低而增加的速率,在低酸度时(pH6.5→5.38)较慢,较高酸度(5.38→4.00)时较快,当酸度大到一定值时(pH4以下),又趋缓慢,即质子化程度和交换容量趋于饱和。pH在3~4之间较合适。此时,应注意:柱子平衡时间较长,需2h(1ml/min)左右,柱后流出液的pH值和VK₃保留时间才趋于稳定。

2.4 VK₃的定性

在样品分析时,除了用VK₃保留时间和添加标样峰面积增大法进行一般定性外,还利用仪器具有的在线瞬间采集紫外光谱图的功能,对VK₃峰定性并作峰纯度评估:在峰顶及两侧峰腰处分别采集光谱图,所得图谱的形状、吸收带位置及相对强度都与标准品谱图(图1)一致,因而确证所定性的峰确实为纯一的VK₃。

2.5 检测线性及检出限

配制VK₃系列标准溶液,分别在表1所列的条件下进样分析(进样10μl),以VK₃峰面积A(×10³)对其浓度C(μg/ml)作线性回归,得到回归方程和线性相关系数于表2。以1μg/ml VK₃标准液逐级稀释进样,测其峰高及基线噪音强度,以2倍信噪比计得选定条件下的检出限即最小检测浓度(进样10μl时)也列于表2。

表2 VK₃的检测线性及检出限

分离模式	检测波长(nm)	线性范围(μg/ml)	回归方程	相关系数	检出限(μg/ml)
I	266	1~100	$A = 47.337C - 26.475$	0.9998	0.3
	232	1~100	$A = 148.256C - 95.939$	0.9997	0.1
II	266	1~100	$A = 3.708C - 0.918$	0.9997	0.24
	232	1~100	$A = 119.918C - 2.291$	0.9996	0.09

2.6 准确度和精密度

用上述选定的色谱条件和样品处理方法,分别在C₈柱和NH₂柱上(分别为分析方式I和分析方式II)以外标法测定了6种不同饲料样品中VK₃含量,并作加标回收试验测得回收率于表3。鸡的配合料和鱼的配合料的检测波长为232nm,其它4种样品的检测波长为266nm。表3表明,两种分析方式都能较准确、精密地用于饲料中VK₃的定量测定。

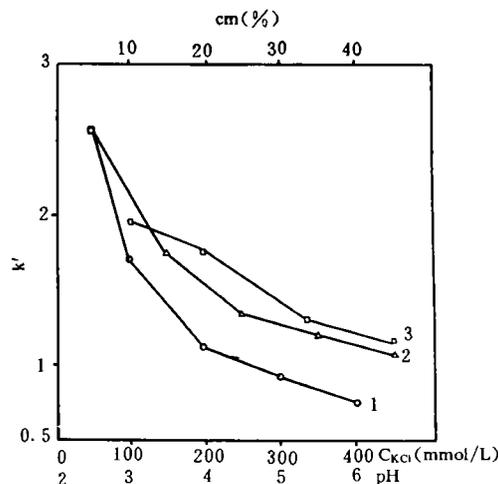


图5 氨基柱上流动相组成对VK₃保留值的影响

色谱条件:

1 C_m 15%, KH₂PO₄ 10mmol/L, pH 4.00

2 C_{KCl} 100mmol/L, KH₂PO₄ 10mmol/L, pH 3.95~4.00

3 C_{KCl} 100mmol/L, KH₂PO₄ 10mmol/L, C_m 15%,

其它条件见表1

表 3 6种饲料样品中VK₃测定结果及其回收率

样 品	分析 方式	平均含量(mg/kg) (n=5)	变异系数 (%)	加标量 (μg/g)	测得量 (μg/g)	回收率 (%)
鸡的预混料	I	156.5	2.85	150.3	304.1	98.2
	II	155.6	3.03	150.3	300.7	96.5
猪的预混料	I	354.3	2.41	100.2	452.1	97.6
	II	343.8	1.98	100.2	438.7	94.7
联合公司 预混料 1#	I	1869.0	1.44	501.0	2350.5	96.1
	II	1890.6	2.70	501.0	2380.4	97.8
联合公司 预混料 2#	I	577.7	1.56	300.6	878.9	100.2
	II	565.3	1.79	300.6	860.2	98.1
鸡的配合料	I	2.3	4.63	2.0	4.4	105.0
	II	2.1	4.12	2.0	4.0	95.0
鱼的配合料	I	3.0	4.99	2.0	4.9	95.0
	II	3.2	5.15	2.0	5.0	90.0

参 考 文 献

- 1 郑集. 普通生物化学(第二版). 高等教育出版社,1985
- 2 聂洪勇等. 维生素及其分析方法. 上海科学技术文献出版社,1987
- 3 赵洪亮. 饲料工业,1990,9:41
- 4 金恒亮. 高压液相色谱法. 原子能出版社,1987
- 5 Lu P C, Zou H F, Zhang Y K. Mikrochimica Acta, 1990,3:35
- 6 Zhang Y K, Zou H F, Hong M F, et al. Chromatographia, 1991,32:538
- 7 邹汉法等. 色谱,1994,12(4):232

Studies on HPLC Determination of Vitamin K₃ Sodium Bisulfite (Menadione Sodium Bisulfite) in Premix and Complete Feed

Dai Jun

Tang Zhong

(Wuxi University of Light Industry) (Yan Cheng Mill)

Abstract Two methods were developed for the determination of Vitamin K₃ sodium bisulfite (menadione sodium bisulfite) in premix and complete feed by reversed-phase ion-pair liquid chromatography (on the C₈ column) and ion exchange chromatography (on the NH₂ column). The relationships between the retention characteristics of Vitamin K₃ sodium bisulfite and the composition of mobile phase were studied.

Subject-words Menadione; High efficiency liquid chromatography; Feed