

應用高效液相層析儀對飼料中之 必利美達民之分析

郭美月 林士鈺 陳忠松

台灣省家畜衛生試驗所

基於工作需要，探討以高效液相層析儀檢測飼料中之必利美達民 (Pyrimethamine)。利用逆相離子配色層分析法以Menthanol : Pic B 8 (60 : 40) 當移動相， μ -Bondapak C18 為層析管，在波長 280 nm 可得良好之分離效果，於此種層析條件下，標準液 1 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm, 10 ppm 等五種濃度與吸光反應強度呈現良好之線性關係，波峯面積之相對標準偏差 $\leq 2.3\%$ ，再現性 97.7%，顯示此分析系統安定性良好。

用三種前處理方法，比較其複雜性，選擇干擾波峯較少者。其前處理概要為以Acetonitrile 抽取經 n-Hexane 去油脂後通過三氧化二鋁管柱，再通過 SEP-PAK C18 Cartridge，用前述之逆相離子配色層分析法做回收率試驗。其結果飼料中必利美達民 0.5 ppm 及 2 ppm 之回收率分別為 70% 及 60%。本實驗必利美達民之最低檢出界限為 20 ng。

必利美達民 (Pyrimethamine) 是雞住血原蟲白冠病 (Leucocytozoonosis in chick) 之特效藥^(2,3)，因能致畸胎，又易在動物體內殘留。目前除了用於治療之外，禁止添加於飼料之中⁽⁴⁾。農委會及農林廳基於公共衛生上殘留問題的考慮，定期抽檢飼料。這種微量藥品添加於飼料中檢驗，非利用精密儀器不可，而在近 10 年來高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography) 及氣相層析儀 (Gas Chromatography) 在精密儀器上佔很重要的地位，氣相層析儀雖感度較高，但用做檢驗之電子捕捉偵測器 (E.C.D) 易受污染而影響檢驗結果之準確度。

必利美達民之檢測可資參考的歐、美、日文獻中大部份都是尿、血漿、血清、動物組織、雞蛋中之殘留檢驗^(2,3,7,10,11,12) 但因飼料成分相當複雜，照前述之文獻在前處理上可能會發生回收率差或干擾物質太多，而妨礙分離等種種困擾。

因為必利美達民是一種很容易解離的化合物，故一般採用離子配液相層析法 (Pairing ion chromatography) 或抑制離子化液相層析法 (Iron suppression chromatography) 等逆相層析法來分析。^(9,13) 本篇報告參考日本厚生省、堀義宏、Harris 等所發表的方法，並加以修改之。

材料與方法

高效液相層析儀：

Waters. Model 6000A 溶媒輸送系統，Model 440 uv 偵測器 280 nm 及 254 nm 之束光片，U6K 注射系統及 Data Module 積分器。

分析條件：波長 280 nm，流速 1 ml/min，記錄紙速度 0.5 cm/min，注射量 20 μ l。
分光光度計 (Spectrophotometer)：

Hitach Model 200-20 及 Model 056-1001 記錄器。掃描速度 120 nm/min，記錄紙速度 60 mm/min，Range 10 mv。

逆相層析管：

μ -Bondapak C₁₈ (Waters) 10 μ m \times 25 cm \times 3.9 mm，前端裝有 Guard-PAK μ Bondapak C₁₈ 之層析管保護裝置。

移動相：

MeOH : pic B8 (60 : 40) , 以 0.45 μm 濾膜過濾後以超音波振盪去氣。

萃取液：

1. Acetonitrile 。
2. 經 Acetonitrile 飽和過後之 n - Hexane 。
3. Menthanol 。
4. 15 % Acetonitrile 。
5. Acetonitrile ; Water ; Acetic acid (30 : 70 : 2) 。

1 \times 30 cm 褐色玻璃管，一端縮小至 4 mm 內充填 70 ~ 230 mesh , basic 之 Alumna 。
SEP PAK C₁₈ Cartridge (Waters) 。

1. 必利美達民原液：

精秤必利美達民對照標準品，(由日本農林水產省動物醫藥品檢查所提供) 溶於 MeOH 使濃度成 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 。

2. 必利美達民標準液：

以移動相稀釋必利美達民原液使成爲 1、2.5、5、7.5 及 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 。

移動相：

1. Acetonitrile : Water : Acetic acid 。
2. MeOH : phosphate buffer (PH 7.5) 。
3. MeOH : Pic B8 。

檢量線：

每種必利美達民標準溶液分析 5 次，計算波峯面積，面積之相對標準偏差必須小於 2.5% ，並作標準曲線及其迴歸方程式，以作爲定量之依據。

檢體的配製及前處理：

取蛋雞用飼料 (不含 Pyrimethamine) 分別添加 0.5 ppm 及 2 ppm 。以下列三種方法處理之，比較其複雜性並以第二種方法做加成試驗。

前處理流程圖如下：

1.

Feed 10 g (含量 0.5 ppm 時取 20 g)

├── 100 ml MeOH , Shake 60 min

├── 過濾

濾液

├── 45°C 減壓蒸餾

殘渣

├── 10 ml 0.1 M HCl + 10 ml Hexane 溶解 (重複 2 次)

├── 5 ml 0.1 M HCl 洗減壓蒸餾瓶

分液漏斗合液①

├── Shake 1 min 取酸層入分液漏斗②

①②內之 Hexane 各以 5 ml 0.1 M HCl 洗後

分液漏斗②

├── Hexane 15 ml Shake

├── 取酸層入分液漏斗③

分液漏斗③

├── CHCl₃ 洗

├── 加 5 ml 1 M NaOH

├── 以 CHCl₃ 15 ml 3 次抽取

抽出液

— 45°C 減壓蒸餾

殘渣

— 以 MeOH 溶出、通過 Alumina Column 後蒸乾

殘渣

— 以 Mobil phase 定容 (5 ppm)

— 以 0.45 μ 之 membrane filter

HPLC

2.

飼料 10 g

— Acetonitrile 50 ml

— Shake 30 min

— 離心 15 min (3000 rpm)

上清液

— 用經 Acetonitrile 飽和之 n-Hexane 洗淨

— 45°C 減壓蒸餾

殘渣

— MeOH 溶解

— 通過 Alumina column

— 濃縮

殘渣

— 加 15% 乙晴 5 ml 溶解

— 通過 SEP-PAK C_{18} Cartridge

— 以 Acetonitrile : H₂O : Acetic acid (30 : 70 : 2) 溶液 10 ml 洗出

— 減壓蒸餾

殘渣

— Mobil phase 定容 (5 ppm)

HPLC

3.

Feed 10 g

— 5% Isobutanol benzene 60 ml Shake 15'

— 遠心分離 (3000 rpm) 15' (重覆 2 次)

上層集合液

— 揮發濃縮 (45°C) 成 5 ml

— 在分液漏斗以 5 ml 0.5 N HCl 抽出 2 次

鹽酸層集合液

— 以 Benzene 10 ml 洗一次

— 0.5 N-NaOH 中和

— 加 0.2 M 枸橼酸 5 ml

— 以 5% Isobutanol benzene 15 ml 抽出 2 次

Isobutanol benzene 集合液

三以 1 ppm、2.5 ppm、5 ppm、7.5 ppm、10 ppm 五種濃度標準溶液做檢量線（參考表二），各濃度 5 次波峯面積之相對標準偏差 $\leq 2.3\%$ ，再現性 $\leq 97.7\%$ ，顯示這個分析系統安定性良好。濃度和吸光反應強度之相關性很高（ $r=0.9996$ ），在 1~10 ppm 之間均可準確的檢量（誤差在被準許範圍內）。

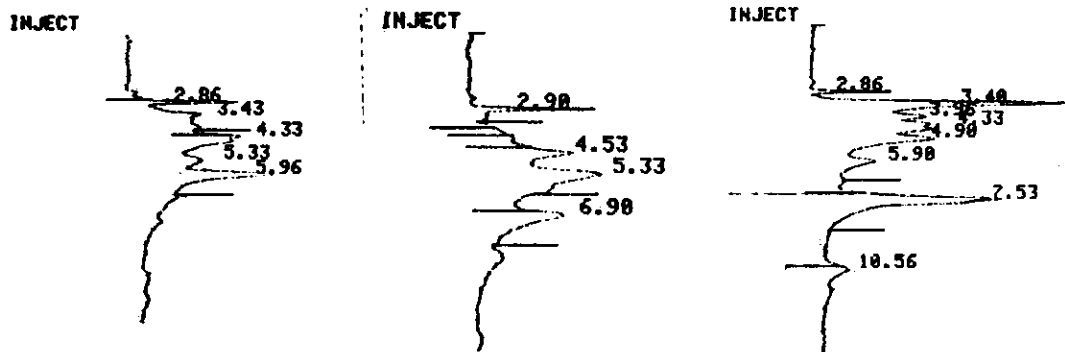
表二、不同濃度之必利美達民標準液的再現性、相關性及檢量線

Area conc	1	2	3	4	5	\bar{X}	SD	C.V	再現性
1 ppm	138070	135137	135317	141957	136694	137435	2791.4	2 %	98 %
2.5 ppm	321497	333623	338869	332572	342349	333782	7932	2.3%	97.7 %
5 ppm	673056	674799	689635	668567	678107	676832.8	7941	1.2%	98.8 %
7.5 ppm	1052500	1051615	1070534	1066110	1076495	1063450.8	11038.6	1 %	99 %
10 ppm	1408045	1413108	1438567	1447449	1472875	1436008.8	26471	1.8%	98.2 %

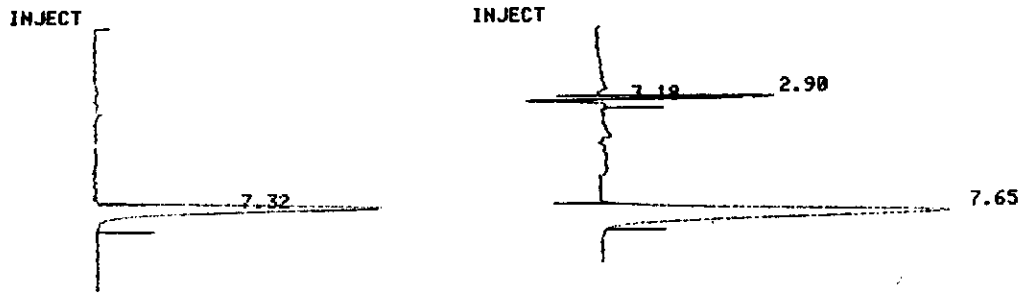
$$r = 0.9996 \quad y = 0.171 + 0.0000069 x$$

0.02 AuFs 面積單位：微伏 / 秒

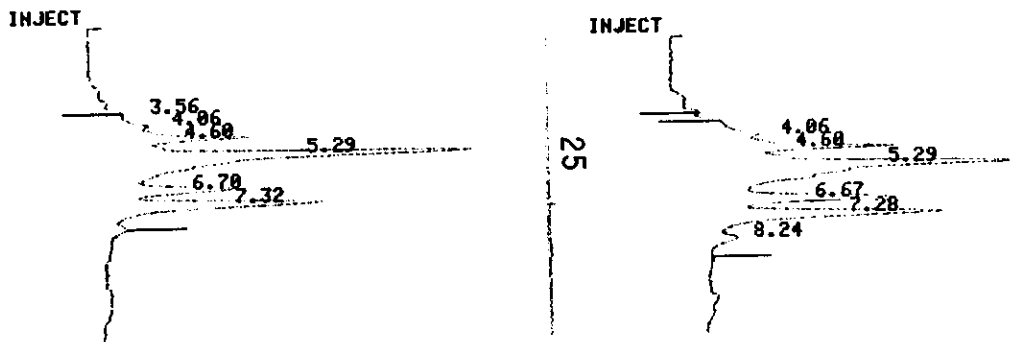
三蛋雞飼料以前述三種前處理方法萃取之後打入 HPLC，比較三種方法之複雜性。（參考圖一），第 3 種方法在必利美達民之滯留時間（7.30~7.80）有一妨害波峯存在，故無法採用。第一種方法能把雜質去除得較乾淨但做回收率試驗時發現波峯變高，滯留時間延長。（參考圖二）第 2 種方法雖在 6.90 分時也有一妨害波峯存在，但它和必利美達民波峯之分離率在 1 左右，故可分離，因此採用第 2 種前處理方法做回收率試驗。



圖一、飼料以流程圖 1. 2. 3. 處理之層析圖



圖二、圖左：必利美達民之標準品的層析圖。圖右：添加必利美達民之飼料以流程圖 1. 前處理層析圖。



圖三、蛋雞飼料添加不同量之必利美達民的層析圖譜。左圖：0.5 ppm 右圖：2 ppm
註：以流程圖 2 處理。

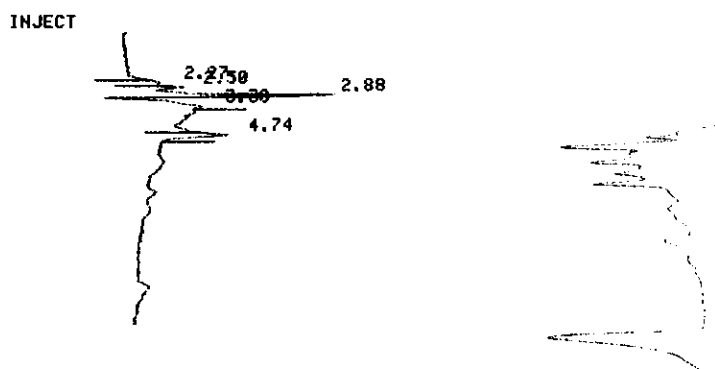
四回收率試驗結果，添加 0.5 ppm 及 2 ppm 之回收率為 70 % 及 60 %，相對標準偏差為 16.5 %、6.8 %。依公定書⁽⁶⁾規定飼料添加物之檢出上下限為 $\pm 15 \sim 30 \%$ 之間（視何種藥品之種類而定）是故本實驗之誤差在公定書允許之範圍內。

表三、飼料內添加 0.5 ppm 及 2 ppm 之必利美達民的回收率試驗

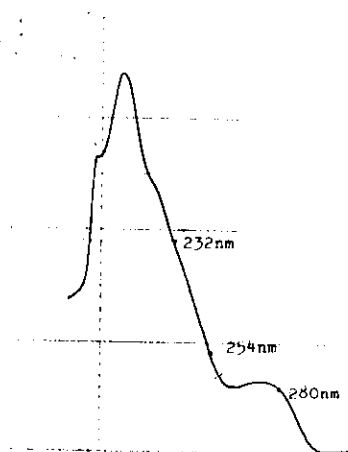
飼料之添加量	檢出量	回收率±相對標準偏差
0.5 ppm		
NO 1	0.3 ppm	70 ± 16.5 %
NO 2	0.4 ppm	
NO 3	0.3 ppm	
NO 4	0.4 ppm	
2 ppm		
NO 1	1.2 ppm	60 ± 6.8 %
NO 2	1.1 ppm	
NO 3	1.3 ppm	
NO 4	1.2 ppm	

討 論

比較波長 254 nm 及 280 nm 之層析圖 (參考圖四)，發現 254 nm 之干擾波峯較多，故不採用敏感度更好之 254 nm 及 232 nm 波長來檢測 (圖五)。



圖四 比較波長 254 nm (右) 及 280 nm 對飼料抽出物之選擇性

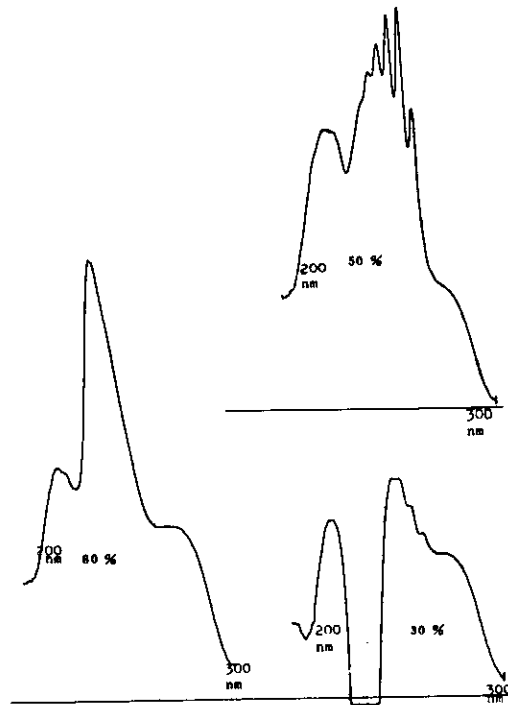


圖五 必利美達民之吸光圖譜

以 Acetonitrile: Water: Acetic acid 當移動相時，隨著 Acetonitrile 和水之比率的變動滯留時間和波峯高度、容積因素、波寬均隨之改變 (表一)。依據逆相層析理論^(1,14)，移動相極性越小，所分析之化合物在逆相層析管之滯留時間越短，但我們的實驗結果却與之相反。為了探討原因分別把移動相 (30%，50%，80%) 當溶劑，測必利美達民之吸收圖譜 (圖六)，從圖譜上看出，必利美達民在三個不同濃度溶劑之最大吸收波長有所改變，由此可知整個化合物之電子排列隨著溶劑濃度的改變而改變，因而影響其在分離管內的質量轉移速度，因此滯留時間增長，色析帶擴散，波峯變寬又有拖尾現象。

比較三種前處理 (圖一)，以第一種最為理想 (干擾波峯最少)，但是回收率差異甚大，其回收率均超過 100。推測可能在此種複雜的處理過程中必利美達民與飼料中的某些物質結合，而使波峯面積變大，滯留時間改變，因此本實驗不採用此種前處理。

第三種前處理法雖然解析力不太理想 (圖三)，但其回收率再現性良好 (表三)，故採用此種方法。



圖六 以Acetonitrile: H₂O: Acetic acid 當溶劑，三種不同Acetonitrile 濃度對必利美達民吸光圖譜的影響

依據日人堀義宏的報告⁽³⁾，肉和蛋（添加 2 ppm、10 ppm）之回收率高達 90% 以上但我們的回收率只有 70%（0.5 ppm）、60%（2 ppm）可能是因飼料中干擾物質較多，故以 Acetonitrile 抽取時和必利美達民產生競爭作用，使必利美達民被抽取之量相對的減少之故。

誌 謝

本試驗承蒙日本農林水產省動物醫藥品檢查所之遠藤裕子小姐、野川浩正先生、佐佐木信夫先生提供所需標準品及有關文獻，謹致最高之謝意。本所陳素貞小姐、彭秀美小姐協助實驗室工作，台灣糖業公司新營副產加工廠提供飼料，於此一併誌謝。

參 考 文 獻

1. 高文弘：基礎液相色層分析。
2. 堀義宏：日本食衛誌 Vol 24, NO 5 高速液體クロマトグラフィにする鶏肉卵中合成抗藥劑の系統的分析法。
3. 堀 x 宏：日本食衛誌 Vol 24, NO 1 高速液體クロマトグラフィにする鶏肉及び雞卵中ピリメタミンの定量。
4. 飼料添加物使用規範。1985. 行政院農委會。
5. Cox, G. B. and Sugden, K. Analyst 1977. 102: 29-34. Determination of Pyrimethamine, Ethopabate and Sulfaquinoxaline in poultry Feeding stuffs by High-Performance Liquid Chromatography using a Weak cation-exchange column packing。

6. Feed additive compendium. 1983, The Miller publishing company, Virginia, U.S.A. °
7. Jones, G.R. P.R. Pyle and B.C Weatherley. Journal of Chromatography, 224 (1981) 492 ~ 495 measurement of Pyrimethamine in human plasma by Gas Liquid Chromatography °
8. J.R. Harris. P.G. Baker and J. W Munday, Analyst, Vol. 102 November 1977 Improved method for the determination of Pyrimethamine in poultry and rabbit feeding stuffs by Gas-Liquid Chromatography °
9. Journal of Chromatography, 156 (1978) 181-187 °
10. Journal of Chromatography, 305 (1984) 502-507 ° Stimultane ous measure- ment of Sulfadoxine N₄-acetyl Sulfadoxine and Pyrimethamine in hu- man plasma °
11. Journal of Chromatography, 306 (1984) 388-393 ° Rapid Gas Chromatogra- phy determination of Pyrimethamine in human plasma and urine °
12. M.D. Coleman G Edwarde and G. W. Mihaly Journal of Chromatography. 308 (1984) 363-369, High performance Liquid Chromatography method for the determination of Pyrimethamine and its 3-N-oxide metabolite in biological fluids °
13. Pamela Girgis -Takla and pandurang, Shirsat J. Assoc publ Analysts 1977, 15, 135- 140 ° The determination of Dapsone and Pyrimethamine in tablets by High-pressure Liquid Chromatography °
14. Waters 1985 LC school ° Taipei Taiwan °

The Analysis of Pyrimethamine in Feed by High Performance Liquid Chromatography

M.Y. Kuo, S.Y. Lin and C.S. Chen

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

In view of routine work, we search for the high performance liquid chromatographic method to detect pyrimethamine in feed. It can obtain good resolution by ion pair reverse phase chromatography using methanol: Pic B₈ (60:40) as mobile phase, μ -bondapak C18 as chromatographic column and 280 nm as detection wavelength. Under these conditions, it shows good linear effect between five standard concentrations (1, 2.5, 5, 7.5, and 10 ppm) and absorption intensity. In addition, its relative standard error of peak area is below 2.3% and the reproducibility is 97.7%. All of these results reveal the system stability is very well.

We use three clean-up methods to compare their complexity and select one which obtains the least interference peak. The principle of the clean-up method is that the feed is extracted by acetonitrile, defatted by n-hexane and past through alumina column and Sep-Pak C18 cartridge. The recovery test is done by ion pair reverse phase chromatography as mentioned above. The recovery of feeds are 70% and 60% individually when spike 0.5 and 2.0 ppm pyrimethamine. The detection limit is 20 ng in this experiment.