

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.07.10

HPLC 法同时测定磺胺二甲嘧啶含量和泰乐菌素组分

任玉琴, 裘丞军, 吴望君

(浙江省兽药饲料监察所, 杭州 311199)

[收稿日期] 2018-03-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 07-0064-08 [中图分类号] S859.83

[摘要] 采用高效液相色谱法同时测定磺胺二甲嘧啶和泰乐菌素组分含量, 采用 C18 (4.6×250 mm, 5 μm) 色谱柱; 以 2 mol/L 高氯酸钠溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱; 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 280 nm。结果表明磺胺二甲嘧啶在 10~200 μg/mL 范围内具有良好的线性, 相关系数为 0.9997, 检出限为 0.05 μg/mL, 定量限为 0.15 μg/mL, 低、中、高 3 个浓度加标的平均回收率为 99.7%~100.1%, *RSD* 为 0.3%~0.5%, 泰乐菌素 D 峰与 A 峰的分离度 ≥3.2; 泰乐菌素 C 峰与磺胺二甲嘧啶分离度 ≥30, 该方法操作简便、准确、专属性强。

[关键词] 酒石酸泰乐菌素; 磺胺二甲嘧啶; 高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Sulfadimidine and Tylosin Compositions by HPLC

REN Yu-qin, QIU Cheng-jun, WU Wang-jun

(Zhejiang Province Institute of Veterinary Drug and Feed Control, Hangzhou 311199, China)

Abstract: In this paper, a HPLC method for simultaneous determination of the sulfadimidine and tylosin content was developed. The sample was analyzed on a C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) using 2 mol/L of sodium perchlorate-acetonitrile solution as the mobile phase for gradient elution (detection wavelength: 280 nm). The flow rate was 1.0 mL/min. The results showed good linearity ($R^2 = 0.9997$) for detecting sulfadimidine in the concentration range of 10~200 μg/mL. The limit of detection was 0.05 μg/mL and the limit of quantitation was 0.15 μg/mL. Three spiked concentrations were used in the measurement with average recovery of 99.7%~100.1% and relative standard deviation (*RSD*) of 0.3%~0.5%. The separation between the D peak and A peak of tylosin was greater than 3.2 and the separation between sulfadimidine and the C peak of tylosin was greater than 30. According to the results, this HPLC method is simple and accurate with high selectivity.

Key words: tylosin tartrate; sulfadimidine; HPLC

泰乐菌素属于大环内酯类抗生素, 主要用于敏感菌引起的畜禽各种革兰氏阳性菌、支原体感染, 磺胺二甲嘧啶为磺胺类抗菌药, 为广谱抑菌剂。泰

乐菌素和磺胺二甲嘧啶制成的复方制剂, 在作用机理上具有累加作用, 主要用于治疗畜禽革兰氏阳性菌和支原体感染, 也用于预防猪痢疾^[1], 市场上应

用最早的为“磷酸泰乐菌素、磺胺二甲嘧啶预混剂”^[2],被收载于《进口兽药质量标准》1999 年版,“酒石酸泰乐菌素、磺胺二甲嘧啶可溶性粉”^[3]作为地方标准上升到国家标准,被收载于《兽药国家标准汇编》第一册(兽药地方标准上升国家标准),该产品也是我国兽药企业生产较多的一个品种,兽药国家标准汇编中,泰乐菌素含量采用生物效价法测定、组分采用高效液相色谱(HPLC)法测定,磺胺二甲嘧啶(SM₂)含量采用紫外-可见分光光度法测定,方法繁琐。磺胺类结构中均存在共轭双键,在紫外区有吸收,特别是 SM₂ 与磺胺嘧啶有相同的官能团,用紫外-可见分光光度法测定含量和最大吸收波长作为鉴别,专属性不强。在动物源性食品中 SM₂ 残留测定均采用 HPLC 或 LC/MS-MS 法测定^[4-6],陶弥峰^[7]建立了液相色谱法测定营养品中磺胺类的残留;徐恩民^[8]等对氟苯尼考制剂中 SM₂ 等测定进行了研究;包洁华^[9]等用 HPLC 法测定酒石酸泰乐菌素有关物质的研究;HPLC 法测定磺胺二甲嘧啶和泰乐菌素^[10-12]已在各个领域得到应用。对泰乐菌素组分、磺胺二甲嘧啶含量的测定方法进行研究,建立了用 HPLC 法同时测定磺胺二甲嘧啶和泰乐菌素组分含量,方法简便、快速,专属性强。

1 材 料

1.1 试剂和药品 市售酒石酸泰乐菌素、磺胺二甲嘧啶可溶性粉,批号:13022501、20140301、14030601;泰乐菌素标准品,中国兽医药品监察所,批号 K0161305;磺胺二甲嘧啶对照品,批号: H0371008,含量 99.8%,中国兽医药品监察所;磺胺间甲氧嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺氯吡嗪钠、磺胺喹噁啉、磺胺甲噁唑对照品来源于中国兽医药品监察所;磺胺氯吡嗪钠、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺噻唑、磺胺脒、磺胺甲氧吡嗪对照品均来源于 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司。

1.2 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪;Agilent 1260 高效液相色谱仪;Waters2690 高效液相色谱仪;UV-2550 紫外分光光度计;Mettler Toledo 电子天平。

2 方法与结果

2.1 磺胺二甲嘧啶含量测定方法学建立

2.1.1 液相色谱条件 以 ECOSIL C18(4.6 mm×250 mm,5 μm)为色谱柱;流动相:2 mol/L 高氯酸钠溶液(用 1 mol/L 盐酸溶液调 pH 至 2.5±0.1)-乙腈,采用梯度洗脱方法(表 1);流速 1.0 mL/min;检测波长 280 nm;进样量 20 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Mobile phase gradient elution program		
时间/min	乙腈	2 mol/L 高氯酸钠溶液
0.0	20	80
2.0	20	80
8.0	40	60
30.0	40	60
35.0	20	80
40.0	20	80

2.1.2 标准溶液配制 取磺胺二甲嘧啶对照品适量,加 0.1 mol/L HCl 溶液溶解制成 20 μg/mL 溶液;取泰乐菌素对照品约 35 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇 10 mL 溶解,用水稀释刻度,将磺胺二甲嘧啶与泰乐菌素标准溶液混合,按上述色谱条件测定,结果磺胺二甲嘧啶和泰乐菌素 4 个组分有较好的分离,泰乐菌素 D 峰与 A 峰的分离度≥3.2;泰乐菌素 C 峰与磺胺二甲嘧啶分离度≥30(图 1)。

2.1.3 检测波长筛选 取 2.1.2 项下的标准溶液,在 200~400 nm 波长进行扫描,结果磺胺二甲嘧啶在 243 nm 处有最大吸收、在 300 nm 处有次吸收,酒石酸泰乐菌素在 300 nm 波长处有最大吸收,2010 版《中国兽药典》^[13]酒石酸泰乐菌素组分检测波长为 280 nm,美国药典(USP)^[14]和欧州药典(EP)^[15]标准中泰乐菌素组分检测波长均为 290 nm,因此选择 280、290 nm 进行考察。

按拟定的色谱条件,采用双波长测定,结果磺胺二甲嘧啶在 280 nm 处的响应值略高于 290 nm,泰乐菌素 C、B、D、A 组分在 290 nm 的响应值略高于 280 nm,因此本方法检测波长选择 280 nm,与《中国兽药典》一致。

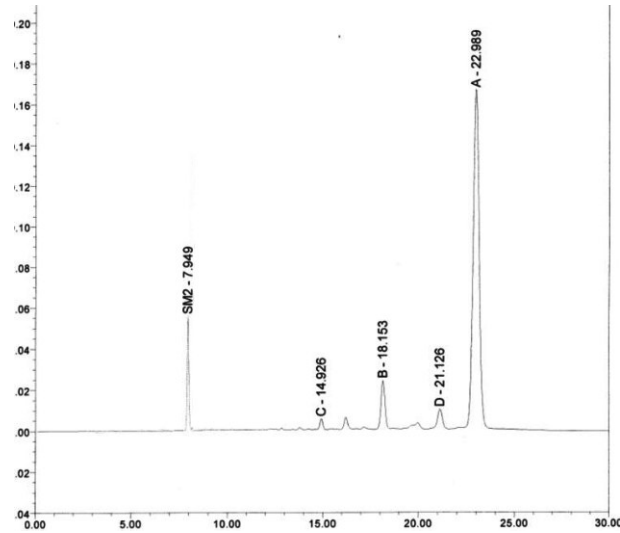


图 1 磺胺二甲嘧啶和酒石酸泰乐菌素混合标准溶液色谱图

Fig 1 Chromatograph of sulfadimidine and tylosin tartrate standard mixture

2.1.4 磺胺二甲嘧啶定量限和检测限考察 取磺胺二甲嘧啶标准溶液(2.1.2 项)适量,用水稀释成不同的上机浓度,按上述色谱条件上机分析,结果上机浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$,其 $S/N=3.9$;上机浓度为 0.15 $\mu\text{g/mL}$,其 $S/N=13$,磺胺二甲嘧啶检出限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$;定量限 0.15 $\mu\text{g/mL}$ (图 2、图 3)。

2.1.5 磺胺二甲嘧啶线性考察 取磺胺二甲嘧啶对照品约 20 mg,置 50 mL 量瓶,加 0.1 mol/L HCl 溶解至刻度,摇匀,精密量取适量,用水稀释成浓度为 10、20、40、80、160、200 $\mu\text{g/mL}$ 的上机液,按上述色谱条件进行分析,线性方程: $y=48.618X-63.982$, $R^2=0.9994$,在 10~200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内具有良好的线性。

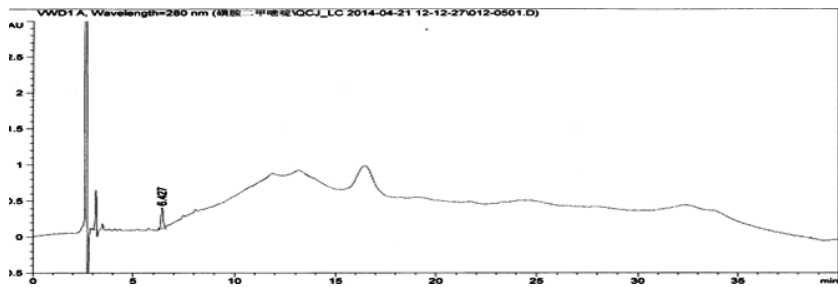


图 2 磺胺二甲嘧啶检出限 ($S/N=3.9$)

Fig 2 Tylosin limit of detection ($S/N=3.9$)

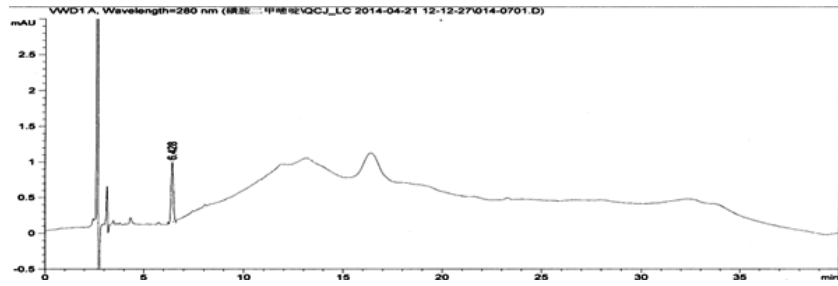


图 3 磺胺二甲嘧啶定量限 ($S/N=13$)

Fig 3 Tylosin limit of quantitation($S/N=13$)

2.1.6 磺胺二甲嘧啶准确度与精密度试验 模拟“酒石酸泰乐菌素、磺胺二甲嘧啶可溶性粉”处方: 10%酒石酸泰乐菌素+10%磺胺二甲嘧啶+10%无水碳酸钠,用无水葡萄糖加至 100%。按处方量的 80%、100%、120%添加磺胺二甲嘧啶、酒石酸泰乐

菌素,进行加标回收试验。每一浓度制备 4~5 份,分别置 50 mL 容量瓶,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 5 mL,置 50 mL 容量瓶,用水稀释至刻度,摇匀;另称取磺胺二甲嘧啶对照品 9.75 mg,置 50 mL 容量瓶,加 0.1 mol/L HCL 溶液溶解至刻度,

摇匀,精密量取 5 mL,置 50 mL 容量瓶,用水稀释至 20 μ L 注入高效液相色谱仪,记录色谱图,按外标刻度,摇匀。按上述色谱条件进行分析,精密量取 法以峰面积计算,试验结果见表 2。

表 2 磺胺二甲嘧啶准确度与精密度试验结果

Tab 2 Accuracy and precision of tylosin measurements								
处方	份数	SM ₂ /mg	酒石酸 泰乐菌素/mg	无水碳酸钠+ 无水葡萄糖/mg	SM ₂ 检测量/mg	SM ₂ 回收率/%	回收率 平均值/%	RSD/%
80%	1	10.79	9.50	10.54+96.06	10.72	99.4	99.7	0.3
	2	10.46	11.28	10.27+95.80	10.37	99.1		
	3	9.90	10.67	11.10+97.96	9.86	99.6		
	4	10.40	10.85	10.66+94.08	10.46	100.6		
100%	1	12.70	13.07	12.93+88.96	12.77	100.6	100.1	0.4
	2	12.28	12.67	13.16+87.63	12.29	100.1		
	3	12.40	12.85	13.10+88.05	12.33	99.4		
	4	12.74	12.47	12.66+86.72	12.76	100.2		
	5	13.07	13.18	13.08+87.89	13.10	100.2		
120%	1	15.13	15.55	15.78+81.15	15.00	99.1	99.8	0.5
	2	15.11	14.86	15.96+80.44	15.14	100.2		
	3	15.10	14.98	15.69+80.38	15.12	100.1		
	4	15.00	15.28	15.41+81.26	15.04	100.3		
	5	15.03	15.26	15.57+79.95	14.92	99.3		

上述试验结果表明,磺胺二甲嘧啶含量测定平均回收率在 99.7%~100.1%之间,RSD 为 0.3%~0.5%,方法的准确度和精密度均满足要求。

2.1.7 磺胺二甲嘧啶含量测定上机液放置稳定性试验 取批号为 14030601、13022501 和 20140301

样品,加 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取适量,用水定量稀释制成每 1 mL 中约含磺胺二甲嘧啶 0.08 mg/mL 的溶液,按上述色谱条件,放置不同时间重复测定,结果磺胺二甲嘧啶峰面积变化极小,该方法中溶液非常稳定(表 3)。

表 3 含量测定溶液放置稳定性试验

Tab 3 Sample stability test							
批号	放置 0 h SM ₂ 峰面积	放置 40 min SM ₂ 峰面积	放置 2 h SM ₂ 峰面积	放置 4 h SM ₂ 峰面积	放置 8 h SM ₂ 峰面积	放置 16 h SM ₂ 峰面积	放置 24 h SM ₂ 峰面积
14030601	3943	3942	3937	3932	3930	3928	3941
13022501	4105	/	4106	4119	4121	4129	4129
20140301	3941	/	3934	3935	3932	3938	3942

2.1.8 方法专属性试验

2.1.8.1 磺胺类产品干扰试验 《中国兽药典》2010 年版共收载了磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺氯吡嗪钠、磺胺喹噁啉、磺胺甲噁唑、磺胺

氯吡嗪钠、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺噻唑、磺胺脒、磺胺甲氧吡嗪 11 种磺胺类产品,取上述对照品适量,加 0.1 mol/L HCl 溶液溶解制成 20 μ g/mL 溶液;另取泰乐菌素对照品约 35 mg,精密称定,置 100 mL 量

瓶中,加甲醇 10 mL 溶解,用水稀释刻度。

取混合标准溶液按上述色谱条件测定,结果磺胺二甲嘧啶与另 10 种磺胺类、泰乐菌素 4 个组分均能有效分离(图 4)。混合标准溶液组分出峰顺序依次为:磺胺脒、磺胺噻唑、磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲氧吡嗪+磺胺对甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺氯吡嗪、磺胺氯吡啶、磺胺喹噁啉、泰乐菌素 C、泰乐菌素 B、泰乐菌素 D 和泰乐菌素 A。

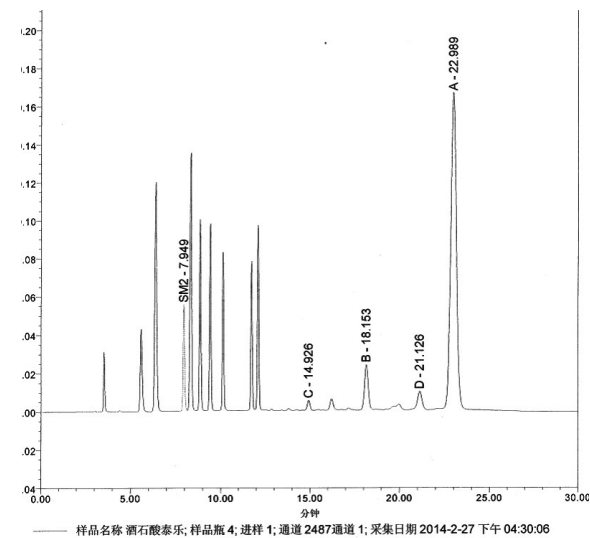


图 4 酒石酸泰乐菌素和 11 种磺胺混合标准溶液色谱图

Fig 4 Chromatograph of tylosin tartrate and sulfonamides standard mixture

2.1.8.2 酸降解试验 取酒石酸泰乐菌素与 11 种磺胺类对照品约 15 mg,置 25 mL 容量瓶,加 0.1 mol/L 盐酸溶液至刻度,放置 2.5 h,用 NaOH 溶液调 pH

值至中性,按上述色谱条件上机测定,结果酒石酸泰乐菌素在酸性环境中降解明显,磺胺二甲嘧啶与各降解峰分离良好(图 5)。

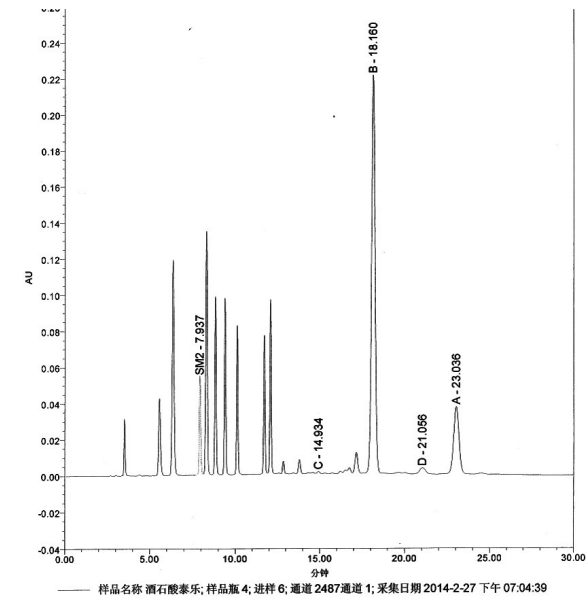


图 5 酸降解后酒石酸泰乐菌素和磺胺类混合标准溶液色谱图

Fig 5 Chromatograph of sulfonamides standard mixture and tylosin tartrate after acid hydrolysis

2.1.8.3 碱降解试验 磺胺二甲嘧啶在碱性条件下较稳定,因此,仅对酒石酸泰乐菌素进行碱降解试验。取酒石酸泰乐菌素对照品约 15 mg,置 25 mL 容量瓶,加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液至刻度,放置 5 h,用 HCL 溶液调 pH 值至中性,按上述色谱条件分析,结果酒石酸泰乐菌素在碱性环境中降解彻底,各降解峰对磺胺二甲嘧啶峰无干扰(图 6)。

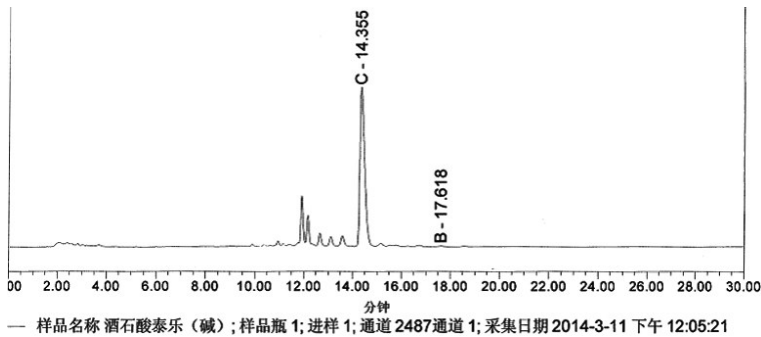


图 6 酒石酸泰乐菌素碱降解色谱图

Fig 6 Chromatograph of tylosin tartrate after alkaline hydrolysis

2.1.8.4 氧化破坏试验 取批号为 13022501 样品约 0.2 g,加 30%过氧化氢溶液 5 mL,放置 3 h,加水至 25 mL,按上述色谱条件分析,结果酒石酸泰乐

菌素主峰全部降解,各降解峰与磺胺二甲嘧啶主峰分离良好(图 7、图 8)。

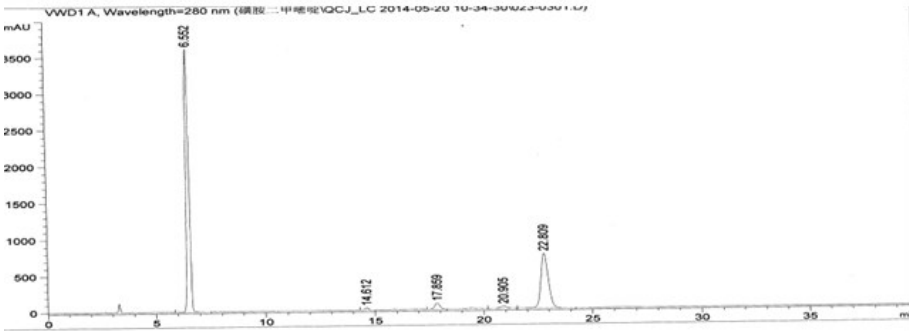


图 7 批号 13022501 样品溶液色谱图
Fig 7 Chromatograph of Sample 13022501

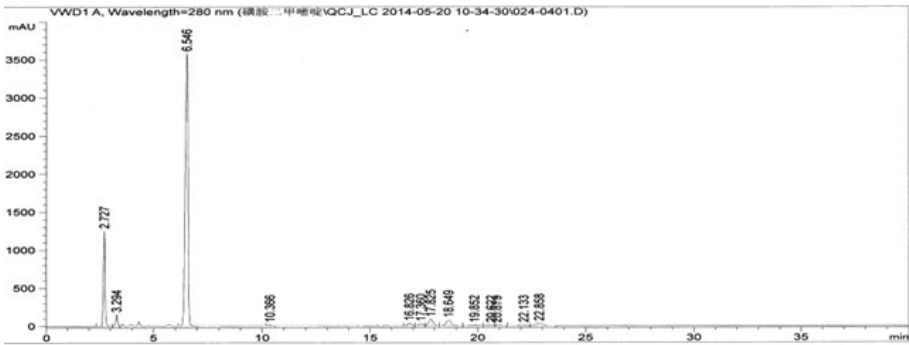


图 8 批号 13022501 样品氧化破坏色谱图
Fig 8 Chromatograph of Sample 13022501 after oxidation

2.1.9 方法耐用性考察 取 2.1.2 项下的溶液,按上述色谱条件,通过不同品牌的色谱柱,小幅改变流动相比例、柱温及不同液相色谱仪,考察该色谱条件的耐用性,结果磺胺二甲嘧啶与泰乐菌素分离度、峰面积未受影响,该方法有较好的重现性。

2.2 泰乐菌素组分测定

2.2.1 按拟定的方法测定 取样品约 0.35 g 与泰乐菌素对照品约 35 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加甲醇 10 mL 溶解,用水稀释刻度,照 2.1.1 项下的色谱条件试验,以泰乐菌素标准品溶液中 C、B、D、A 主组分峰定性供试品溶液的主组分峰,按峰面积归一化法(除磺胺二甲嘧啶峰外)计算,结果泰

乐菌素 D 峰与泰乐菌素 A 峰的分离度 ≥ 3.2 ;泰乐菌素 C 峰与磺胺二甲嘧啶分离度 ≥ 30 ,泰乐菌素 A 峰拖尾因子 0.93;理论板数按泰乐菌素 A 计算为 20507,系统适应性试验均符合要求,样品考察结果该色谱条件有较好的重现性。结果见表 4。

2.2.2 按《中国兽药典》方法对泰乐菌素组分定性考察 取泰乐菌素标准品适量,按《中国兽药典》2010 年版方法制备上机溶液和测定,结果泰乐菌素 C、B、D、A 组分的相对保留时间为 0.49、0.76、0.82、1,而标准品附带的色谱图中相对保留时间为 0.61、0.72、0.8、1, C、B、D 组分与《中国兽药典》规定的 0.5、0.7、0.8 有一定的出入。

表 4 泰乐菌素组分检查结果

Tab 4 Tylosin component test results

产品批号	组分 C 相对保留 时间/峰面积/%	组分 B 相对保留 时间/峰面积/%	组分 D 相对保留 时间/峰面积/%	组分 A 相对保留 时间/峰面积/%	泰乐菌素 A+B+C+D 峰面积/%
13022501	0.64/1.70	0.78/6.43	0.92/3.15	1/86.3	97.6
14030601	0.64/1.49	0.78/6.52	0.92/4.41	1/84.1	96.5
20140301	0.64/1.71	0.78/4.04	0.92/3.01	1/89.0	97.8

3 讨论与结论

通过酸、碱、氧化破坏、同类产品的干扰试验及方法耐用性考察,结果显示 11 种磺胺类产品和泰乐菌素组分在该色谱条件中有较好的专属性和重现性。该方法的建立,能同时完成磺胺二甲嘧啶含量和泰乐菌素组分测定,方法简便、准确、专属性强,能有效甄别其他磺胺类成分的非法添加,为产品质量控制提供较好的技术支持。

《中国兽药典》收录了众多的泰乐菌素系列产品,均采用相对保留时间来定位 C、B、D、A 组分,但在实际操作中,不同品牌、不同规格色谱柱影响组分的相对保留时间,定位有一定难度,给检测结果的准确性带来影响。USP 36 版也采用相对保留时间来定位泰乐菌素组分,EP 7.0 版采用对照品 C、B、D、A 组分定性样品中组分,目前泰乐菌素标准品附带含 C、B、D、A 组分色谱图,用泰乐菌素 C、B、D、A 组分对照品来定性样品中的组分能有效解决当前组分定性的不准确。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会.兽药使用指南 2010 年版[S]. Chinese veterinary pharmacopoeia commission. Veterinary drug use guide. 2010 edition[S].

[2] 中华人民共和国农业部. 进口兽药质量标准 1999 年版[S]. Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Regulation on the import of veterinary medicine 1999 edition [S].

[3] 农业部兽药评审中心. 兽药国家标准汇编[S]. IVDC. The national standard of veterinary medicine[S].

[4] 张 宁. 高效液相色谱法测定鸡肉中磺胺类药物研究[J]. 天津农学院学报, 2017, 24(1): 34-37. Zhang N. Determination of Sulfanilamides Residues in Chicken

by High Performance Liquid Chromatography [J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2017,24 (1):34-37.

[5] GB/T 21316-2007. 动物源性食品中磺胺类药物残留量的测定 高效液相色谱-质谱/质谱法[S]. GB/T 21316-2007. Determination of sulfonamides Residue in Animal products by HPLC-MS/MS [S].

[6] 中华人民共和国农业部公告第 236 号. 动物源食品中磺胺二甲嘧啶残留检测方法 高效液相色谱[S]. Announcement of Agriculture Ministry P. R. China, NO.236. Determination of Sulfadimidine in Animal Products by HPLC[S].

[7] 陶弥峰. 运动营养品中磺胺类成分的残留检测[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(13):165-168. Tao M F. Determination of Sulfanilamide Residues in Sport Nutrition [J]. Food Research and Development, 2017, 38(13): 165-168.

[8] 徐恩民, 张 颖, 刘少宁, 等. 氟苯尼考制剂中磺胺二甲嘧啶和磺胺间甲氧嘧啶检测方法研究[J].山东农业科学, 2014, 46(7): 129-131. Xu E M, Zhang Y, Liu S N, et al. Study on the Detection Method of SM₂ and SMM in Fluorfenicol Preparations [J]. Shandong Agricultural Scieces, 2014, 46(7): 129-131.

[9] 包洁华,张金霞,郭强功,等. 高效液相色谱法测定酒石酸泰乐菌素有关物质的研究[J]. 中国兽药杂志, 2015,49(2):35-39. Bao J H, Zhang J X, Guo Q G, et al. Determination of Tylosin Tartrate Related Substances by HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015,49(2): 35-39.

[10] 李红英. 高效液相色谱法测定废水中泰乐菌素残留量[J]. 工业水处理, 2012, 32(1): 72-74. Li H Y. Determination of Tylosin Tartrate Residues in Waste Water by HPLC[J]. Industrial Water Treatment, 2012,32(1):72-74.

[11] 任惠丽, 杨元昊, 田强兵, 等. 高效液相色谱法测定水产品中泰乐菌素残留量[J]. 中国卫生检验杂志,2011, 21(10): 2371-2376. Ren H L, Yang Y H, Tian Q B, et al. Determination of Tylosin Tartrate Residues in Aquatic Products by HPLC [J]. 2011, 21

(10): 2371–2376.

[12] 汪莎莎. 动物性食品中泰乐菌素、泰万菌素、替米考星残留检测研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2011.

Wang S S. Development of methods for determination of Tylosin, Tylvaosin and Tilmicosin Residues in Animal Product[D]. Wu-Han: Huazhong agricultural university, 2011.

[13] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典. 2010 年版(一部)[S].

Chinese veterinary pharmacopoeia commission. Chinese veterinary pharmacopoeia. 2010 edition[S].

[14] The United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopoeia 36[S].

[15] European Pharmacopeia Committee. European Pharmacopoeia 7.0 [S].

(编 辑:侯向辉)