

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.06.09

HPLC 法测定复方磺胺嘧啶钠注射液的含量

王庆红,孙真峥,廖欢,谢丽丽,陈锡龙,赵贵*

(贵州省兽药饲料监察所,贵阳 550003)

[收稿日期] 2020-04-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 06-0061-05 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为建立兽药复方磺胺嘧啶钠注射液含量测定的高效液相色谱测定法。采用流动相为 0.1% 的磷酸溶液-乙腈(85:15, V:V), 色谱柱为 C18 柱, 柱温为 40 ℃, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 240 nm。采用外标法进行定量。磺胺嘧啶钠的线性范围为 12.5 ~ 200 μg/mL, 线性方程为 $Y = 44.873X + 11.999$, $r^2 = 1.000$; 甲氧苄啶的线性范围为 2.5 ~ 40 μg/mL, 线性方程为 $Y = 62.288X + 4.0826$, $r^2 = 1.000$, 方法的线性关系良好, 添加回收率均大于 98%, RSD 均小于 2%。结果显示该方法简单、精确、可操作, 可以用于测量复方磺胺嘧啶钠注射液中磺胺嘧啶钠与甲氧苄啶的含量。

[关键词] 磺胺嘧啶钠; 甲氧苄啶; 高效液相色谱法

Determination of the Content of Compound Sulfadiazine Sodium Injection by High Performance Liquid Chromatography

WANG Qing-Hong, SUN Zhen-Zheng, LIAO Huan, XIE Li-Li, CHEN Xi-Long, ZHAO Gui*

(Guizhou Provincial Supervisory Institute of Veterinary Drug and Feeds, Guiyang 550003, China)

Corresponding author: ZHAO Gui, E-mail: 1165273506@qq.com

Abstract: An HPLC method was developed to determine the contents of sulfadiazine sodium and trimethoprim in Compound Sulfadiazine Sodium Injection. Using C18 column as stationary phase of 0.1% phosphoric solution-acetonitrile (85:15), with flow rate of 1.0 mL/min, column oven temperature of 40 ℃ and wavelength of 240 nm. It was quantified by external standard. The linear range of sulfadiazine sodium was between 12.5 ~ 200 μg/mL and the regression equation was $Y = 44.873X + 11.999$, $r^2 = 1.000$. The linear range of trimethoprim was between 2.5 ~ 40 μg/mL and the regression equation was $Y = 62.288X + 4.0826$, $r^2 = 1.000$. The result show that the linear relationship of the method was good, the recovery rates were more than 98%, and the RSD was less than 2%. This method was simple and accurate, and easy to operate, could be used for determining the contents of sulfadiazine sodium and trimethoprim in the Compound Sulfadiazine Sodium Injection.

Key words: sulfadiazine; trimethoprim; HPLC

基金项目: 家禽产品质量安全监测与控制关键技术集成研究(黔科合支撑[2019]2318号); 贵州牛奶质量安全主要风险因子控制关键技术研究(黔科合支撑[2019]2320号)

作者简介: 王庆红, 实验师, 从事兽药检验检测相关工作。

通讯作者: 赵贵。E-mail: 1165273506@qq.com

磺胺类药物是一类应用普遍、效果良好的抗菌药物^[1-3],复方磺胺嘧啶钠注射液在养殖场中被大规模使用,不仅能够治疗畜禽的疾病^[4-5],而且还能增强畜禽的体质;在畜产品中兽药残留最大限度规定,磺胺最大残留量不超过 100 μg/kg^[6]。如使用不当、滥用或不遵守休药期,将会产生兽药残留^[7-9];同时兽药质量没有好的检测方法进行监管,也会给养殖行业带来较大的危害^[10]。

复方磺胺嘧啶钠注射液主要含有磺胺嘧啶和甲氧苄啶两个组分,在《中国兽药典》中测定磺胺嘧啶的含量使用的是“永停滴定法”,而测定甲氧苄啶使用的是“紫外-可见分光光度法”^[11-12],但检测繁琐,有机试剂较多,对人的身体伤害极大。

基于以上几点,建立一种既能快速定性定量检测,又对人身伤害较小的方法很有必要。利用高效液相色谱仪对复方磺胺嘧啶钠注射液进行检测,一次性能测定两个组分,并且定量准确,操作简便。目前高效液相色谱仪测定复方磺胺嘧啶钠注射液几乎没有研究,因此建立高效液相色谱法测定复方磺胺嘧啶钠注射液不仅对兽药监管很有必要,而且对畜禽产品质量起到重要保障^[13]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与设备 Denver instrument TB-215 D 型电子分析天平(美国丹佛公司);Agilent 1260 infinity 高效液相色谱仪(配紫外检测器);

1.1.2 对照品 ①磺胺嘧啶对照品来源于中国兽医药品监察所,批号:H0361504,含量 99.5%;甲氧苄啶对照品来源于中国兽医药品监察所,批号:H0161210,含量 100.0%。

②原料药:磺胺嘧啶钠:洛阳市正牧生物科技有限公司;批准文号:兽药原字 162441631;批号:20180301;生产日期:20180308;含量:99.8%。甲氧苄啶:寿康富康制药有限公司;批准文号:国药准字 H37020335;批号:A-10111710094;生产日期:20171031;含量:99.3%。

1.1.3 试验样品 收集了 3 批不同公司生产的复方磺胺嘧啶钠注射液制剂样品,样品信息见下表:

表 1 试验样品信息	
Tab 1 Test sample information	
样品编号	规格
HC140	10 mL: 1.0 g 磺胺嘧啶钠 + 0.2 g 甲氧苄啶
HC106	10 mL: 1.0g 磺胺嘧啶钠 + 0.2 g 甲氧苄啶
HC143	10 mL: 1.0 g 磺胺嘧啶钠 + 0.2 g 甲氧苄啶

1.2 实验方法

1.2.1 对照品溶液的配制 精密称取磺胺嘧啶对照品约 50 mg 及甲氧苄啶约 10 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加甲醇 40 mL,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得磺胺嘧啶浓度约为 1.00 mg/mL 及甲氧苄啶浓度约为 0.2 mg/mL 的对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液 5 mL 置于 50 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,即得磺胺嘧啶浓度约为 100 μg/mL 及甲氧苄啶浓度约为 20 μg/mL 的对照品溶液。

1.2.2 供试品溶液的配制 精密量取复方磺胺嘧啶钠注射液 5 mL(10 mL:1.0 g 磺胺嘧啶钠 + 0.2 g 甲氧苄啶),置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度。另取上述稀释液 5 mL,置于 50 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。再另取第二次稀释液 5 mL,置于 50 mL 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

1.2.3 色谱方法 色谱柱:为 Waters Symmetry C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 色谱柱。柱温 40℃;进样量:20 μL;测定波长 240 nm;流动相 A(0.1% 磷酸溶液)与 B(乙腈)85:15 等度洗脱。按外标法以峰面积计算含量,其中,磺胺嘧啶结果乘以 1.0878,即为供试品中磺胺嘧啶钠(C₁₀H₉N₄NaO₂S)的含量。在此色谱条件下,磺胺嘧啶和甲氧苄啶两主峰附近均没有明显的干扰峰,并且对照品溶液和样品溶液主峰分离度好、保留时间一致,说明该方法专属性良好,色谱图见图 1。

2 结果与分析

2.1 线性及范围 精密量取对照品贮备液 20 mL 置于 100 mL 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,得含磺胺嘧啶 200 μg/mL、含甲氧苄啶 40 μg/mL 的样品,依次吸取 10 mL 到 20 mL 分别得磺胺嘧啶 12.5、

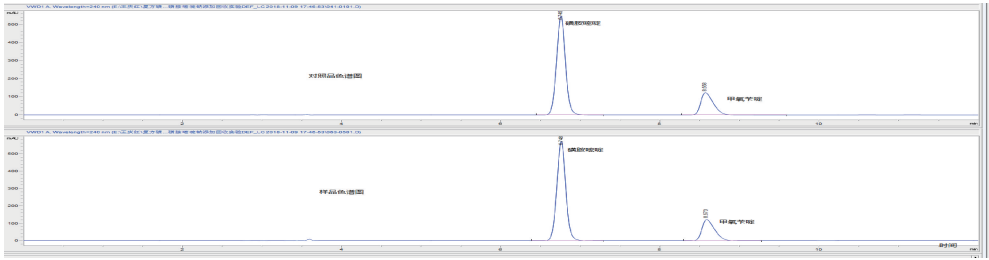


图 1 复方磺胺嘧啶钠浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 对照品和样品图谱

Fig 1 Chromatograms of reference substance of compound sulfadiazine sodium (100 $\mu\text{g/mL}$)

25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 及甲氧苄啶 2.5、5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液系列,精密吸取各对照品溶液 20 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图。以磺胺嘧啶或甲氧苄啶色谱峰面积 (Area),对其相应浓度 (Amt, $\mu\text{g/mL}$) 进行线性回归,求得回归方程,可知磺胺嘧啶钠在 12.5 ~ 200 $\mu\text{g/mL}$ 及甲氧苄啶分别为 2.5 ~ 40 $\mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好。相关数据分别见表 2 和表 3。

2.2 准确度和精密度 按照《中国兽药典》中药物回收率添加方法,在已知含量的复方磺胺嘧啶钠供试品中加入一定质量的磺胺嘧啶和甲氧苄啶原料,使其制备后在供试品中的量为其含量的 80%,100% 和 120%,每个添加水平平行制备 3 份,其中磺胺嘧啶钠添加量为 200、250、300 mg,甲氧苄啶添加量 40、50、60 mg,按照 2.2.3 的方法测定峰面积,计算实际测得的量 (实测值),用实际测得的量比上样品的量与加入量的和,即得。回收率在 98% ~ 101%,准确度符合《中国兽药典》回收

率范围要求;以变异系数来衡量精密度, RSD 均小于 2%,精密度符合《中国兽药典》关于精密度的要求。

表 2 磺胺嘧啶钠溶液的标准曲线数据^[14]

Tab 2 Standard curve data of sulfadiazine sodium solution			
级别	浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	峰面积/($\text{mAu}\cdot\text{s}$)	线性方程
1	11.86	538.34	$Y = 44.873X + 11.999$ $r^2 = 1.000$
2	23.72	1078.96	
3	47.45	2141.30	
4	94.90	4276.70	
5	189.80	8525.68	

表 3 甲氧苄啶的标准曲线数据

Tab 3 Standard curve data of trimethoprim			
级别	浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	峰面积/($\text{mAu}\cdot\text{s}$)	线性方程
1	2.79	176.58	$Y = 62.288X + 4.0826$ $r^2 = 1.000$
2	5.58	350.96	
3	11.15	699.48	
4	22.30	1395.38	
5	44.60	2780.92	

表 5 磺胺嘧啶钠回收率测定结果

Tab5 Recovery results of sulfadiazine sodium						
样品编号	样品含量/mg	加入量/mg	实测值/mg	回收率/%	平均回收率/%	$RSD/\%$
HC106-1	236.30	195.32	437.07	98.75	99.7%	1.2
HC106-2	236.30	253.55	483.15	98.63		
HC106-3	236.30	302.23	540.46	99.64		
HC143-1	243.60	201.24	449.07	99.06	99.7%	0.4
HC143-2	243.60	249.77	498.56	99.06		
HC143-3	243.60	301.38	546.44	99.73		
HC140-1	249.38	200.54	445.22	101.06	99.7%	0.4
HC140-2	249.38	253.96	501.94	100.28		
HC140-3	249.38	303.16	546.54	101.10		

表 6 甲氧苄啶回收率测量结果

Tab 6 Recovery results of trimethoprim

样品编号	样品含量/mg	加入量/mg	实测值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
HC106-1	51.395	42.51	96.42	97.40	99.7%	1.1
HC106-2	51.395	52.60	104.20	99.80		
HC106-3	51.395	57.45	111.04	98.02		
HC143-1	50.595	43.25	95.96	97.86	99.7%	0.4
HC143-2	50.595	49.50	102.58	97.57		
HC143-3	50.595	60.58	112.90	98.48		
HC140-1	52.745	36.05	88.57	100.26	99.7%	0.6
HC140-2	52.745	53.02	107.02	98.84		
HC140-3	52.745	67.20	120.48	99.56		

2.3 溶液稳定性试验 精密量取含磺胺嘧啶钠浓度约为 100 μg/mL 及甲氧苄啶约为 20 μg/mL 的样品溶液 20 μL,分别约于 0、24、48 h 上机测定,每次进样 2 针,结果见表 7。磺胺嘧啶钠和甲氧苄啶色谱峰面积的相对标准偏差分别为:0.7% 和 1.9%,表明此法配置的溶液在 48 h 内稳定。

表 7 溶液稳定性试验结果

Tab 7 Stability measurement results

样品名称	药物组分	平均峰面积			RSD/%
		0 h	24 h	48 h	
复方磺胺嘧啶钠注射液	磺胺嘧啶钠	4400.72	4463.69	4446.65	0.7%
	甲氧苄啶	1435.93	1395.64	1448.55	1.9%

3 讨论与结论

3.1 流动相比比例的选择^[14-15] 比较了 3 种比例的流动相,即 0.1% 磷酸-乙腈(80:20)、(85:15)和(90:10),其中 0.1% 磷酸-乙腈(80:20)的流动相运行样品时,磺胺嘧啶色谱峰和甲氧苄啶色谱峰没有完全分离,0.1% 磷酸-乙腈(90:10)的流动相运行样品时,磺胺嘧啶色谱峰和甲氧苄啶色谱峰分离较好,但甲氧苄啶色谱峰出峰时间较长 30 min。而 0.1% 磷酸-乙腈(85:15)时,磺胺嘧啶色谱峰和甲氧苄啶色谱峰分离良好,磺胺嘧啶你和甲氧苄啶的出峰时间分别为 6.7 min 和 8.5 min,故选择流动相 0.1% 磷酸-乙腈的比例为 85:15。

3.2 样品处理溶剂的选择^[16-17] 由于磺胺嘧啶,甲氧苄啶在水中都几乎不溶,在酸中易溶,即分别选择两种溶剂比较。溶解分别选用两种溶剂系统的比较。溶剂一:先加 5 mL 盐酸再加流动相定容;溶剂二:前两步稀释选用甲醇定容。结果分析:选

用溶剂一在操作步骤上要注意细节,比如加盐酸到样品中摇匀后需要立即定容,步骤较繁琐,选用溶剂二在操作上更简便。前两步均用甲醇稀释的样品溶解更完全。

利用已建立好的“高效液相色谱法测定复方磺胺嘧啶钠注射液”对 50 批复方磺胺嘧啶钠注射液进行含量测定,方法不仅操作简便,定量准确,而且能够一次完成两个组分的测定,不需要分两次测定药物含量,添加回收率范围在 98%~101%,符合《中国兽药典》的高效液相色谱法添加回收的要求,可以作为《中国兽药典》复方磺胺嘧啶钠注射液方法的有效补充,对该类兽药质量监管提供了一种更为有效的检测手段,为畜产品质量起到保驾护航的作用。

参考文献:

[1] 赵玲钰. 磺胺嘧啶分子印迹电化学传感器的制备及其快速检

- 测食品中磺胺嘧啶药物残留[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 319–327.
- Zhao L Y. Preparation of sulfadiazine molecularly imprinted electrochemical sensor and its rapid determination of sulfadiazine residues in Food J. Food Sci, 2018, 39(22): 319–327.
- [2] 许旭, 耿丹丹, 迟晓峰, 等. 高效液相色谱光化学在线衍生荧光法检测鸡肉中 16 种磺胺类药物残留[J]. 食品科学, 2015, 36(22): 165–168. DOI: 10.7506/spkx1002–6630–201522031.
- Xu X, Geng D D, Chi X F, *et al.* Determination of 16 sulfonamide residues in chicken by High–performance liquid chromatography on–line derivatization with fluorescence detection. Food Sci, 2015, 36(22): 165–168. Doi: 10.7506/SPKX 1002–6630–201522031.
- [3] 程国栋, 吴小慧, 金珠, 等. 超高效液相色谱–串联质谱法测定调制乳中 3 种磺胺类药物残留[J]. 色谱, 2015, 33(8): 892–896. DOI: 10.3724/SP. J. 1123. 2015. 04008.
- Cheng G D, Wu X H, Jin Z, *et al.* Determination of three sulfonamide residues in prepared milk by High–performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Chromatography, 2015, 33(8): 892–896. Doi: 10.3724 Sp. J. 1123. 2015. 04008.
- [4] 张盼盼. 动物源性食品中磺胺类药物及增效剂残留检测分析方法的优化及应用[D]. 黑龙江大学, 2018.
- Zhang PP Optimization and application of analytical methods for determination of sulfonamide and synergist residues in foods of animal origin [D]. HEILONGJIANG UNI, 2018.
- [5] 陈永亮, 刘丹丹. 抗生素在鸡体内残留及控制技术研究[J]. 家禽科学, 2018, (12): 55–58.
- Chen Y L, Liu D D. Residues and control of antibiotics in chicken [J]. Poul Sci, 2018, (12): 55–58.
- [6] NY/T 1896–2010 兽药残留实验室质量控制规范. [S] Laboratory quality specification for veterinary drug residues in NY/T 1896–2010. [S]
- [7] 栾庆祥, 黄鑫, 孙鹏, 等. 超高效液相色谱法测定鸡肉中氯羟吡啶和磺胺类药物残留的方法研究[J]. 中国家禽, 2018, (第 11 期): 33–36.
- Luan Q X, Huang X, Sun J, *et al.* Study on the determination of chlorohydroxypyridine and sulfonamide residues in chicken by ultra–high performance liquid chromatography [J]. China Poul, 2018, 40(11): 33–36.
- [8] 张娟. 食源性动物饲料中磺胺类药物残留的检测及其研究[J]. 饲料工业, 2017, 38(2): 82–85.
- Zhang J. Determination and study of sulfonamide residues in feed-stuffs of food–borne animals [J]. Feed Ind, 2017, 38(2): 82–85.
- [9] 张元, 李伟青, 周伟娥, 等. 食品中磺胺类药物前处理及检测方法研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(23): 340–346. DOI: 10.7506/spkx10026630–201523061.
- Zhang Y, Li W Q, Zhou W, *et al.* Research progress of sulfonamide pretreatment and detection methods in Food [J]. Food Sci, 2015, 36(23): 340–346. DOI: 10.7506 / spkx10026630–201523061.
- [10] 马世柱, 陈楠, 黎小鹏, 等. 高效液相色谱法测定鸡蛋中磺胺类药物残留[J]. 现代农业科技, 2018, 11: 235–239.
- Ma S Z, Chen N, Li X P, *et al.* Determination of sulfonamides residues in chicken by high performance liquid chromatography [J]. Mod Agric Sci Technol, 2018, (11): 235–239.
- [11] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(一部)[M]. 2015 年版. 北京: 中国农业出版社.
- Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (part I) M. 2015 edition. BEIJING: Chin Agri Pub House.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部), 2015 年版[S].
- National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part II), 2015 edition[S].
- [13] 阎姣姣, 阎培安, 杨金宝. 兽药残留与抗生素的使用注意事项[J]. 现代畜牧科技, 2019, 49(1): 139–140.
- Yan JJ, Yan P A, Yang J B. Notes on veterinary drug residues and antibiotic use [J]. Mod Anim Sci Technol, 2019, 49(1): 139–140.
- [14] 张小华, 葛竹兴, 秦枫. PDA–RP–HPLC 法测定复方泰妙林注射液中泰妙菌素、磺胺嘧啶钠的含量[J]. 辽宁化工, 2007(12): 824–826.
- Zhang X H, Ge Z X, Qin F. Determination of Tylosin and sulfadiazine sodium in compound taimiulin injection by PDA–RP–HPLC. LIAONING Chem Ind, 2007; 12: 824–826.
- [15] 周洪英, 孙波, 叶建美. HPLC 测定新蚕药中磺胺嘧啶钠[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(22): 4710–4713.
- Zhou H Y, Sun B, Ye J M. Determination of sulfadiazine sodium in new silkworm medicine by HPLC [J]. HUBEI Agric Sci, 2011, 50(22): 4710–4713.
- [16] 陈锡龙. 高效液相色谱法测定磺胺间甲氧嘧啶的含量[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(2): 16–19.
- Chen X L. Determination of sulfamonomethoxine by High–performance liquid chromatography [J]. Chin J Vet Med, 2017, 51(2): 16–19.
- [17] 陈锡龙. HPLC 法测定复方磺胺对甲氧嘧啶片中磺胺对甲氧嘧啶的含量[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(7): 30–33.
- Chen XL. Determination of sulfamethoxine in compound sulfamethoxine tablets by HPLC [J]. Chin J Vet Med, 2014, 48(7): 30–33.