

高效液相色谱法测定磺胺间甲氧嘧啶的含量

陈锡龙

(贵州省兽药饲料监察所, 贵阳 550003)

[收稿日期] 2016-10-08 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 02-0016-04 [中图分类号] S859.2

[摘要] 建立了兽药磺胺间甲氧嘧啶钠注射液中磺胺间甲氧嘧啶含量的高效液相色谱测定法。以 C18 为固定相, 0.1% 磷酸溶液 - 乙腈 (80:20) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 柱温 40 ℃, 检测波长 270 nm, 采用外标法进行定量。磺胺间甲氧嘧啶的线性范围为 5.0 ~ 100.0 μg/mL, 回归方程为 $Area = 40.333 \times Amt - 18.843$ ($n = 5$), 相关系数大于 0.999。从高 (120%)、中 (100%) 和低 (80%) 三个添加水平的检测结果可以看出, 磺胺间甲氧嘧啶的回收率为 96.27% ~ 98.30%。该方法简单, 准确, 精密度好, 回收率高, 可以用于测量磺胺间甲氧嘧啶钠注射液中磺胺间甲氧嘧啶的含量。

[关键词] 磺胺间甲氧嘧啶; 含量; 高效液相色谱法

Determination of Sulfamonomethoxine by HPLC

CHEN Xi-long

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

Abstract: An HPLC method has been developed to determine the content of sulfamonomethoxine in sulfamonomethoxine sodium injection, using C18 column as stationary phase, with a mobile phase of 0.1% phosphoric solution - acetonitrile (80:20) and wavelength of 270 nm. It was quantified by external standard method and the linear range of sulfamonomethoxine was between 5.0 and 100.0 μg/mL. And the regression equation was $Area = 40.333 \times Amt - 18.843$ ($n = 5$) with the correlation to be more than 0.999. The average recoveries at three different levels of 120%, 100% and 80% of the sample ranged between 96.27% and 98.30%. This method was simple and accurate, and had a good precision and high recoveries as well, could be used for determination of sulfamonomethoxine in sulfamonomethoxine sodium injection.

Key words: sulfamonomethoxine; content; HPLC

目前, 兽用药品磺胺间甲氧嘧啶 ($C_{11}H_{12}N_4O_3$) (钠) 的含量测定采用永停滴定法^[1-2], 相对于高效液相色谱法, 永停滴定法较繁琐、耗时, 且不利于及时发现药品中的其他非法添加成分。采用高效液相色谱法测定兽药含量是检测技术发展的未来趋势, 也是提高检测效率的必然要

求。本研究建立了磺胺间甲氧嘧啶钠注射液中磺胺间甲氧嘧啶钠 (以磺胺间甲氧嘧啶计) 含量的高效液相色谱测定法, 并根据《兽药质量标准分析方法验证指导原则》对新建立方法的准确度、重复性、精密度、专属性、耐用性及线性等进行了研究。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 Agilent 1260 infinity 高效液相色谱仪(配紫外检测器); BP211D 型电子分析天平(德国塞多利斯公司); 超声波清洗器(KQ-300DE, 昆山市超声仪器厂); 磺胺间甲氧嘧啶对照品(中国兽医药品监察所, 批号: C0031007, 含量: 99.4%); 磺胺间甲氧嘧啶钠注射液分别由四川维尔康动物药业有限公司、成都博大金点生物技术有限公司和四川好益多动物保健品有限公司提供(批号分别为: 20150601, 20151218, 20160201; 标示含量为: 10 mL: 1 g、10 mL: 1 g 和 10 mL: 0.5 g); 乙腈为色谱纯; 水为高纯水; 其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: Zorbax SB C18 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm); 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$; 流动相为 0.1% 磷酸溶液 - 乙腈 (80: 20); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 270 nm; 进样体积 10 μL 。在此色谱条件下, 对照品溶液和供试品溶液色谱图见图 1、图 2。

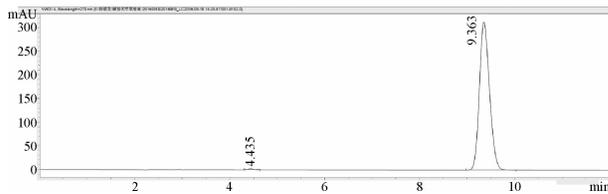


图 1 磺胺间甲氧嘧啶对照品溶液色谱图 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

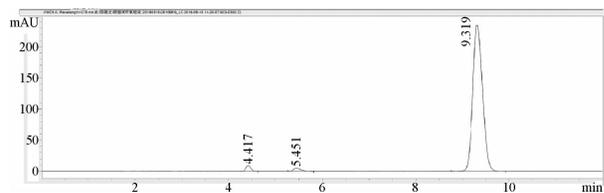


图 2 磺胺间甲氧嘧啶钠注射液供试样品溶液色谱图 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

1.2.2 对照品溶液的制备 准确称取磺胺间甲氧嘧啶对照品 50 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加盐酸 1 mL 溶解后, 再加水稀释至刻度, 混匀, 即得浓度为 1.0 mg/mL 的磺胺间甲氧嘧啶对照品贮备液。精密量取 1.0 mg/mL 的磺胺间甲氧嘧啶对照品贮备液 10 mL 置于 100 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 即得 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的磺胺间甲氧嘧啶对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备 取磺胺间甲氧嘧啶钠注射液适量, 置于 100 mL 容量瓶中, 加 2 mL 盐酸溶解后, 再加水稀释至刻度, 混匀。然后, 按标示量稀释制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。

2 结果与分析

2.1 线性范围 精密量取 1.0 mg/mL 的磺胺间甲氧嘧啶对照品贮备液 0.5、1、2、5、10 mL, 分别置于 100 mL 容量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 得含磺胺间甲氧嘧啶浓度分别为 5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照溶液系列。精密吸取各对照溶液 10 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 分别进样两针。磺胺间甲氧嘧啶浓度在 5.0 ~ 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, 色谱峰有良好的线性关系, 回归方程为 $\text{Area} = 40.333 \times \text{Amt} - 18.843$, 相关系数大于 0.999, 标准曲线数据见表 1。

表 1 磺胺间甲氧嘧啶对照品溶液的标准曲线数据表

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	平均值	
1	5	184.5	195.5	190.0	$\text{Area} = 40.333 \times \text{Amt} - 18.843$ $R^2 = 0.9999$
2	10	389.2	387.8	388.5	
3	20	788.9	789.1	789.0	
4	50	1979.3	1970.8	1975.0	
5	100	4024.4	4025.1	4024.8	

2.2 精密度 取 C 公司提供的批号为 20151218 的磺胺间甲氧嘧啶钠注射液, 精密量取 1000 μL , 置 100 mL 容量瓶中, 按 1.2.3 项制备成供试品溶液, 分别作 6 个平行, 每个样品进样 1 针, 进行含量测定。以测定结果峰面积的相对标准偏差表示试验的精密度, 精密度 RSD 为 1.10%, 表明方法的精密度良好(表 2)。

表 2 精密度及含量测量结果

样品批号	序号	取样量/ μL	峰面积/ $\text{mAU} \cdot \text{s}$	$RSD/\%$
20151228	1	1000	3312.74	1.10
	2	1000	3396.07	
	3	1000	3388.05	
	4	1000	3410.43	
	5	1000	3415.34	
	6	1000	3379.36	

2.3 准确度 精密量取批号为 20150601 的磺胺间甲氧嘧啶钠注射液 500 μL , 按高 (120%)、中 (100%) 和低 (80%) 三个浓度水平分别添加磺胺间甲氧嘧啶标准品, 制得向已知含量制剂中添加已

知测定物的添加样品,每个浓度水平的添加样品分别制备3份供试样。按1.2.3项制成供试品溶液,进行含量测定。以磺胺间甲氧嘧啶的实际测定含量和理论含量(制剂中磺胺间甲氧嘧啶的已有量 +

添加量)的比值计算磺胺间甲氧嘧啶的回收率,结果见表3。结果表明,三个不同添加水平的磺胺间甲氧嘧啶的回收率均在96.27%~98.30%之间,方法符合《兽药质量标准分析方法验证指导原则》。

表3 准确度测量结果

编号	取样量/ μL	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ 添加量/mg	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ 理论含量/mg	实测平均含量/mg	回收率/%
H1	500	60.26	104.72	101.29	96.72
H2	500	60.58	105.04	101.44	96.57
H3	500	60.00	104.46	100.56	96.27
M1	500	50.82	95.28	93.02	97.63
M2	500	50.16	94.62	92.85	98.30
M3	500	50.37	94.83	92.34	97.37
L1	500	40.06	84.52	83.01	98.21
L2	500	39.85	84.31	82.59	97.96
L3	500	40.23	84.69	82.46	97.37

回收率 $R(\%) = \text{实测平均含量} / \text{理论含量} \times 100\%$

2.4 耐用性 取按准确度测定项下制得的样品,保持流动相比例和流速不变,在 Shimadzu LC2010 及 Agilent 1260 infinity 色谱仪上分别使用 Phenomenex Luna C18(5 μm , 4.6 mm \times 250 mm) 和 Zorbax SB C18(5 μm , 4.6 mm \times 250 mm) 色谱柱于 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行测试,考察方法的耐用性,结果表明,使用不同的仪器和色谱柱在相同的实验条件下测得的含量的相对偏差不大于 0.5%,耐用性良好。

2.5 专属性 在磺胺间甲氧嘧啶注射液样品测试色谱图中,标准出峰时间附近均未发现明显的干扰峰,可见方法的专属性良好。

2.6 稳定性 取 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的磺胺间甲氧嘧啶对照品溶液分别于约 0、24、48 h 测定含量,以峰面积计算相对标准偏差,磺胺间甲氧嘧啶的 RSD 为 0.38%,说明磺胺间甲氧嘧啶溶液在 48 h 内稳定。

2.7 含量测定 取批号为 20150601、20151228 和 20160201 的三批企业样品,分别测定磺胺间甲氧嘧啶钠的含量,按以上方法测定计算,结果表明该 3 批样品的平均含量分别为标示含量的 101.6%、96.3% 和 101.8%,而使用现行兽药典方法测得的结果分别为 102.4%、97.8% 和 103.4%。

3 讨论与小结

3.1 色谱条件及检测波长的选择 当前文献报道测量磺胺类药物的高效液相色谱法所使用的流动相系统有 0.1% 磷酸溶液 - 乙腈(90:18)^[1]、乙腈 - 甲醇 - 水 - 乙酸(2+2+9+0.2)^[3]、0.017 mol/L 磷酸 - 乙腈(80+20)^[4]、磷酸盐溶液 - 甲醇(65+35)^[5] 等,柱温主要有 30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$,检测波长

多为 270 nm^[6-7]、230 nm^[1,8]。在 200~400 nm 波长范围内对磺胺间甲氧嘧啶对照品溶液进行波长扫描,磺胺间甲氧嘧啶最大吸收峰为 295、250、230 nm,在 285、270、215 nm 处均有较强吸收峰。为尽量保持磺胺类药物液相色谱检测方法的一致性,同时也能获得较好的分离效果,选择 270 nm 作为检测波长,40 $^{\circ}\text{C}$ 作为色谱柱柱温,0.1% 磷酸溶液 - 乙腈(80:20)作为流动相。使用此色谱条件进行检测,磺胺间甲氧嘧啶的出峰时间适当,峰形良好。

3.2 样品提取方法的优化 在进行样品处理的过程中,分别采用 1 mL、3 mL 盐酸,1 mL、3 mL 20 g/L NaOH 溶液,少量乙腈等溶解样品,然后再加水定容。发现采用 1 mL 盐酸溶解处理样品后峰形最佳且测量的偏差最小,故选择使用 1 mL 的盐酸溶解处理样品后再加水定容。磺胺间甲氧嘧啶钠注射液加入盐酸处理时首先会产生白色沉淀,盐酸过量后白色沉淀会重新溶解。

本研究建立了磺胺间甲氧嘧啶钠注射液中磺胺间甲氧嘧啶含量的高效液相色谱测定法是可行的,各项方法学指标均比较理想,可以作为磺胺间甲氧嘧啶钠注射液中磺胺间甲氧嘧啶质量控制标准。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(二部)[M]. 二〇一〇年版. 北京:中国农业出版社.
- [2] 农业部兽药评审中心,兽药国家标准汇编——兽药地方标准上升国家标准(第一册)[M]. 北京:中国农业出版社. 2010:87-90
- [3] 中国兽医药品监察所. 中国兽医药品监察所兽药残留检验操作规程 CJCZ020[Z].

硫酸安普霉素可溶性粉中非法添加乙酰甲喹的 HPLC - PDA 检测方法的建立

戴青,于丽娜,张璐,韩宁宁,徐媛,赵晖*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2016-09-04 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 02-0019-05 [中图分类号] S859.83

[摘要] 为检测硫酸安普霉素可溶性粉中非法添加的乙酰甲喹,以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钠 3.0 g,加水 1000 mL 使溶解,加三乙胺 0.5 mL,用饱和氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0) - 甲醇为流动相,二极管阵列检测器(PDA),建立了 HPLC - PDA 检测方法,并采用峰纯度检查和光谱相似度检查辅助对照品比对方法,对非法添加药物进行确证。在此液相色谱条件下,乙酰甲喹与其他物质峰分离良好。按外标法以峰面积计算,乙酰甲喹的平均回收率为 98.1%,RSD 为 0.3%。该检测方法简便、准确、可靠,可用于测定硫酸安普霉素可溶性粉中非法添加的乙酰甲喹。

[关键词] 硫酸安普霉素可溶性粉;乙酰甲喹;峰纯度检查;光谱相似度检查

Determination of Mequindox in Apramycin Sulfate Soluble Powder by HPLC - PDA

DAI Qing, YU Li - na, ZHANG Lu, HAN Ning - ning, XU Yuan, ZHAO Hui*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: A method for the determination of mequindox in the apramycin sulfate soluble powder was developed by the high performance liquid chromatography with photo - diode array detector (HPLC - PDA). It was tested with C18 column, using phosphate buffer solution (taking the sodium dihydrogen phosphate 3.0 g, add 1000 mL water to dissolve, and add 0.5 mL triethylamine, adjusting pH to 7.0 by sodium hydroxide saturated solution) and methanol as the mobile phase. Peak purity test and spectrum similar test were helped to identify the mequindox. The mean recovery of mequindox was 98.1%, and RSD was 0.3%, respectively. In conclusion, the method is simple, accurate and reliable for the determination of mequindox in apramycin sulfate soluble powder.

作者简介: 戴青,硕士,从事抗生素检验检测工作。

通讯作者: 赵晖。E-mail: 171977364@qq.com

[4] 中华人民共和国农业部. 农牧发[2001]38号文件[S].

[5] 耿士伟,曲斌,姜加华,等. QuEChERS - UPLC - MS/MS 快速测定鸡肝中七种磺胺类药物残留[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(10): 16 - 19.

[6] 查玉兵,陈美,王晓芳,等. 高效液相色谱法测定猪肉中五种磺胺类药物残留量[J]. 分析仪器, 2008, (4): 44 - 45.

[7] 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.

[8] 杨武宁,崔艳莉. HPLC 法测定复方磺胺对甲氧嘧啶钠可溶性粉含量[J]. 中国动物保健, 2013, 15(8): 30 - 32.