

超高效液相色谱-二极管阵列检测器 检测中药散剂中磺胺类药物

刘素梅¹ 韩立¹ 方忠意¹ 李华岑¹ 王丽² 张跃京¹ 臧合英¹

(1. 河南省兽药监察所 郑州 450008; 2. 郑州大学药学院 郑州 450001)

[收稿日期]2011-08-11 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280(2011)10-0028-04 [中图分类号]S853.7

[摘要] 建立了中药散剂中非法添加磺胺类药物检测的超高效液相色谱法。样品经甲醇提取、流动相稀释后进高效液相色谱仪进行检测分析。色谱条件: ACQUITY UPLC HSS T3(1.8 μm 2.1 \times 100 mm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.017 mol/L 的磷酸溶液系统, 检测波长范围 200~340 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 3 μL , 磺胺类药物在 0.2~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系。该方法简便、准确, 通过光谱比较, 可以准确地判断中药中是否添加有磺胺类药物并进行准确地定量计算。

[关键词] 中药散剂; 磺胺类药物; 超高效液相色谱; 二极管阵列检测器

Determination of Sulfonamides in Traditional Chinese Medicine Powder by UPLC-DAD

LIU Su-mei¹ HAN Li¹ FANG Zhong-yi¹ LI Hua-cen¹ WANG Li² ZHANG Yao-jing¹ ZANG He-ying¹

(1. Henan Provincial Supervising Agency of Veterinary Drugs, Henan Zhengzhou 450008, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Henan Zhengzhou 450001, China)

Abstract: A method of UPLC-PDA for determination of sulfonamides in traditional Chinese medicine was developed. The liquid chromatography separation was carried on ACQUITY UPLC HSS T3(1.8 μm 2.1 \times 100 mm) with acetonitrile-0.017 mol/L H_3PO_4 system as mobile phase. The wavelength range was 190~400 nm. The calibration curve was linear in the range of 0.2~200 $\mu\text{g/mL}$. The method was simple and would accurately detect sulfonamides in traditional Chinese medicine powder.

Key words: traditional Chinese medicine powder; sulfonamides; UPLC; DAD

随着食品安全逐渐成为全球性的热点话题,畜产品中兽药残留问题对动物性食品安全的影响逐渐凸显出来。中药在畜牧生产中作为药物或饲料添加剂用于防治动物疾病、提高动物生产性能、改善产品品质越来越受到重视。但有些不法企业为了增强中药的疗效,常在中兽药中非法添加化学药物,造成畜禽机体中毒,产品中兽药残留超标等问题,严重危害人们的健康。

磺胺类药物为化学合成抗菌药,其中有些成分具有抗原虫作用,如磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺

间甲氧嘧啶、磺胺喹噁啉、磺胺氯吡嗪、磺胺对甲氧嘧啶等。鸡球虫散和驱虫散为《中国兽药典》中收载的抗原虫的药物,本试验对这两种散剂中添加上述磺胺类药物进行了高效液相色谱法的研究^[1],利用二极管阵列检测器进行样品的全波长扫描,根据样品的色谱保留时间、吸收光谱进行定性检查,以色谱峰面积进行定量计算,可以快速准确地检查出中药中是否添加磺胺类药物及其含量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器设备 Waters UPLC 超高效液相色谱,二

作者简介:刘素梅(1980年-),女,硕士,研究方向为中药质量标准。E-mail: lsm216@hotmail.com

极管阵列检测器,Empower2 色谱工作站;MILLIPORE 超纯水器;METTLER XP205 电子天平。

1.2 试药及试剂 磺胺嘧啶对照品由中国兽医药品监察所提供,批号为 H0361103,含量为 100.0%;磺胺二甲嘧啶钠对照品由中国兽医药品监察所提供,批号为 H0371008,含量为 99.8%;磺胺间甲氧嘧啶钠对照品由中国兽医药品监察所提供,批号为 C0031007,含量为 99.4%;磺胺对甲氧嘧啶对照品由中国兽医药品监察所提供,批号为 H040105,含量为 100%;磺胺氯吡嗪钠对照品由中国兽医药品监察所提供,批号为 H0281207,含量为 100.0%;磺胺喹恶啉对照品由中国兽医药品监察所提供,批号为 H121104,含量为 99.0%;鸡球虫散由郑州神普科技有限公司提供;驱虫散由河南旭隆兽药有限公司提供;甲醇和乙腈为色谱纯试剂,水为超纯水,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 μm 2.1 \times 100 mm) 色谱柱;检测波长范围:190 ~ 400 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量为 3 μL ;流动相 A 相:0.017 mol/L 的磷酸溶液,B 相:乙腈,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流速/($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	A/%	B/%
0	0.3	87	13
3	0.3	87	13
11	0.3	75	25
16	0.3	87	13

2.2 标准工作液的制备 精密称取六种磺胺类药物各 100 mg 分别置 50 mL 量瓶中,加甲醇配成 2 mg/mL 的标准贮备液,临用前用流动相稀释成浓度为 0.2、0.5、1.5、20、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的标准混合工作液,过 0.2 μm 微孔滤膜,即得。

2.3 样品制备

2.3.1 参照《兽药使用指南》里磺胺类药物的用量及向有关兽药企业技术人员了解,磺胺类的添加量在 0.8% ~ 1% 左右,所以本实验按照磺胺类药物含量为 1% 的量进行添加。取鸡球虫散和驱虫散各 10 g 精密称定,分别精密加 6 种磺胺类药物各 0.1 g,充分混匀,制成阳性样品(即磺胺类药物含量为 1%)。

2.3.2 取鸡球虫散和驱虫散作为阴性样品。

2.4 供试品溶液的制备 取样品 1 g 精密称定,置锥形瓶中,精密加入 50 mL 甲醇,超声提取 30 min,静

置,精密量取上清液 5 mL 置 50 mL 量瓶中,加初始比例的流动相稀释至刻度,过 0.45 μm 滤膜,即得。

2.5 线性关系的考察 取磺胺类系列标准工作液,浓度由低到高依次进高效液相色谱仪,记录 277 nm 处色谱图,以对照品浓度为横坐标,相应的峰面积为纵坐标,进行线性回归,回归方程和相关系数见表 2,色谱图见图 1 ~ 图 5。

表 2 回归方程和相关系数

组分名称	回归方程	相关系数(r)
磺胺嘧啶	$Y = 35308x - 3516$	0.99996
磺胺二甲嘧啶	$Y = 26165x + 865$	0.99997
磺胺对甲氧嘧啶	$Y = 37171x - 12978$	0.99982
磺胺间甲氧嘧啶	$Y = 33588x - 14189$	0.99975
磺胺氯吡嗪钠	$Y = 35075x - 30841$	0.9990
磺胺喹恶啉	$Y = 32609x - 41075$	0.9982

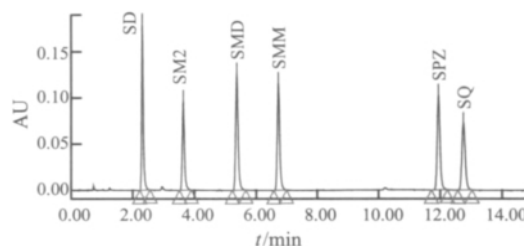


图 1 磺胺类药物对照品色谱图

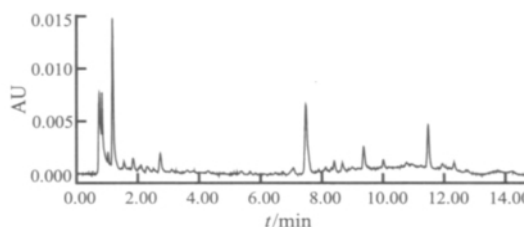


图 2 驱虫散阴性样品色谱图

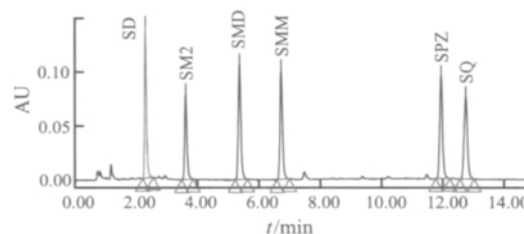


图 3 驱虫散阳性样品色谱图

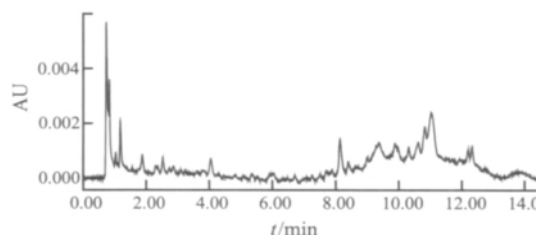


图 4 鸡球虫散阴性样品色谱图

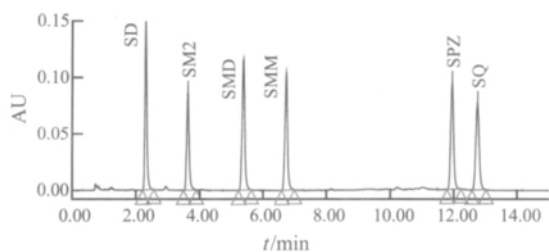


图5 鸡球虫散阳性样品色谱图

2.6 准确度和精密度考察 精密称取 2.3.1 项下的阳性样品 1 g,按照 2.4 项下供试品溶液的制备进行操作,进高效液相色谱仪分析,测定 6 种磺胺类组份的峰面积,计算回收率及 RSD,结果见表 3。

2.7 检测限的确定 分别取一个鸡球虫散和驱虫散阳性样品谱图,计算每个组分的信噪比(S/N),按 $S/N \geq 3$ 为检测限,确定鸡球虫散和驱虫散中,检

表3 回收率测定结果

名称	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
SD	驱虫散 97.75 97.72 97.62 101.23 99.81 98.8 1.6		
	鸡球虫散 102.15 101.03 97.75 97.63 98.66 99.4 2.0		
SM2	驱虫散 96.62 97.09 97.02 100.44 98.90 98.0 1.6		
	鸡球虫散 101.51 98.53 95.10 93.89 94.94 96.8 3.2		
SMD	驱虫散 96.75 96.74 96.98 100.20 98.62 97.8 1.5		
	鸡球虫散 100.48 100.11 96.83 96.65 97.94 98.4 1.8		
SMM	驱虫散 96.11 95.14 96.38 99.74 98.14 97.1 1.8		
	鸡球虫散 100.78 99.96 96.93 98.73 99.30 99.1 1.5		
SPZ	驱虫散 98.86 98.69 99.64 103.20 100.62 100.2 1.8		
	鸡球虫散 101.29 102.00 98.38 101.28 101.68 100.9 1.5		
SQ	驱虫散 102.14 102.11 102.32 105.05 103.11 102.9 1.2		
	鸡球虫散 106.18 106.26 103.38 105.63 106.02 105.5 1.2		

测限为 0.02%。

2.8 定量限 按照信噪比(S/N) = 10 为定量限,确定定量限为 0.05%。取驱虫散和鸡球虫散阴性

对照 1 g,加入阳性添加样品(1%) 0.05 g,各 5 份,按照供试品溶液的制备方法进行处理,进高效液相色谱仪分析,计算回收率,结果见表 4。

表4 定量限回收率试验结果

名称	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
SD	驱虫散 91.54 87.58 89.62 88.38 92.06 89.84 2.2		
	鸡球虫散 89.50 94.90 95.69 93.47 86.18 91.95 4.4		
SM2	驱虫散 100.96 102.53 98.71 103.5 101.92 101.52 1.8		
	鸡球虫散 101.50 98.53 101.10 99.89 97.08 99.62 1.8		
SMD	驱虫散 101.48 103.3 97.79 100.07 99.49 100.43 2.1		
	鸡球虫散 100.48 100.11 96.83 96.65 97.94 98.40 1.8		
SMM	驱虫散 85.51 89.57 91.13 86.52 88.29 88.20 2.6		
	鸡球虫散 92.71 93.18 94.88 92.43 89.68 92.58 2.0		
SPZ	驱虫散 101.56 95.01 100.84 94.55 99.56 98.30 3.4		
	鸡球虫散 94.7 95.45 94.86 94.63 92.40 94.41 1.2		
SQ	驱虫散 90.07 84.08 84.97 87.72 82.38 85.84 3.6		
	鸡球虫散 92.28 90.03 90.97 92.01 87.66 90.59 2.1		

2.9 专属性 取驱虫散、鸡球虫散阴性样品各 1 g,按照供试品溶液制备方法进行制备,进高效液相色谱仪分析,色谱图见图 2、图 4。由图可知,在该色谱条件下 6 种峰无干扰。

2.10 样品检测结果判定 供试品色谱图中如出现与相应对照品峰保留时间一致的色谱峰,查看该峰的光谱图,若与对照品光谱图无明显差异,最大吸收波长一致,则表示检出该组分。然后采用 277 nm 处峰面积,根据外标法计算含量。

2.11 HPLC 色谱条件 由于条件局限,本实验采用的是超高效液相色谱-二极管阵列检测器进行试验研究。考虑到 UPLC 应用不如 HPLC 普遍,以 270 nm 为吸收波长,将色谱条件由 UPLC 的方法向 HPLC 进行了转换,具体色谱条件为: Waters 2695 高效液相色谱仪,2489 紫外检测器,Empower2 色谱工作站; XBridge C₁₈(5 μm 4.6 × 150 mm) 色谱柱,梯度洗脱程序见表 5,柱温为 30 ℃,进样量为 20 μL。

(下转第 33 页)

2.7 样品测定 取2.2项下供试品溶液,按1.2.1项下色谱条件测定峰面积,以外标法计算含量,并将计算结果乘以转换因子1.107。结果表明:硫酸小檗碱平均含量为10.7 mg/mL, RSD 为0.5% ($n=5$)。比滴定法测定结果10.4 mg/mL, RSD 为0.7% ($n=5$) 稍有偏高。

2.8 讨论 由于目前暂时无法购得硫酸小檗碱对照品,所以本实验采用盐酸小檗碱作为对照品对硫酸小檗碱注射液进行含量测定。因为无论硫酸小檗碱还是盐酸小檗碱其有效成分均为小檗碱,且分子中盐酸分子和硫酸分子在溶解于溶剂后即和小檗碱分离,溶液中小檗碱以离子态存在,所以通过测定供试品溶液中盐酸小檗碱的量再乘以转换因子即可求得硫酸小檗碱的含量。

转化因子的计算方法是基于以下的原理:直接以外标法计算所得含量是供试品中盐酸小檗碱的含量,先将其乘以盐酸小檗碱分子中小檗碱所占的分数(小檗碱分子量/盐酸小檗碱分子量)转化为小檗碱的含量,再将其除以硫酸小檗碱分子中小檗碱所占的分数(小檗碱分子量 $\times 2$ /硫酸小檗碱分子

量,一个硫酸小檗碱分子中有2个小檗碱分子故分子上需要乘以2)转化为硫酸小檗碱的含量。所以转换因子计算方法为:硫酸小檗碱分子量/(盐酸小檗碱分子量 $\times 2$) = $822.84/(371.82 \times 2) \approx 1.107$ 。

高效液相色谱法测定硫酸小檗碱注射液含量时,由于实验室盐酸小檗碱对照品量较少而未对其进行水分测定。对照品标签上无含量,也无使用说明书可查阅,计算时对照品含量未折去水分而按100%计,故可能造成结果比滴定法偏高。对照品含量的准确性是提高测量结果准确性的关键因素。

盐酸小檗碱溶液和硫酸小檗碱溶液吸收光谱几乎完全相同,说明溶液的吸收光谱主要是由小檗碱的光学特性决定的。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药规范一九九二年版一部[S].
- [2] 李华岑,张闪烁,张跃京,等. 高效液相色谱法同时测定诺氟沙星和盐酸小檗碱的含量[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(1): 14-15.

(上接第30页)

表5 HPLC 梯度洗脱程序

时间/min	流速/(mL \cdot min $^{-1}$)	A/%	B/%
0	1.0	87	13
5	1.0	87	13
24	1.0	75	15
25	1.0	87	13

3 讨论

3.1 实验过程中先后尝试了甲醇-乙腈-水-冰乙酸系统^[2]、乙腈-三乙胺溶液系统和乙腈-磷酸溶液系统^[3],最终确定柱效高、分离度好的乙腈-0.017 mol/L 磷酸溶液系统作为流动相。

3.2 中药中基质复杂,干扰成分比较多,采用二极管阵列检测器,通过光谱鉴别可以排除干扰,准确地检测中药中是否添加磺胺类药物。

3.3 经过对6种磺胺类药物的反复试验,甲醇对

这6种药物有很好的溶解性,因此,样品提取溶剂用甲醇。样品经过超声提取,提取效率高,同时考察了超声30 min和超声60 min的提取效果,结果两者没有显著差异,因此本实验选择了超声提取30 min的方法进行供试品溶液的制备。另外根据标准曲线线性范围,本实验选取了曲线中间点作为样品上机浓度。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二〇〇五年版二部[S].
- [2] 高迎春,苏梅,魏秀丽,等. 薄层色谱和液相色谱法鉴别中兽药散剂中掺加的磺胺喹噁啉钠[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(2): 23-25.
- [3] 动物源食品中磺胺类药物残留的检测方法-高效液相色谱法[S].