

高效液相色谱法测定饲料中五种磺胺类药物的含量

王惠玉, 张佳佳

(海能未来技术集团股份有限公司, 山东 济南 250104)

摘要: 本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪测定饲料中五种磺胺类药物的含量。色谱条件: C₁₈ 色谱柱 (4.6×250mm, 5μm), 流速为 1.0mL/min, 柱温为 40°C, 进样量为 20μL, 检测器为紫外检测器, 检测波长为 270nm。实验结果: 重复性测试中, 将磺胺类药物混合标准溶液连续进样 7 针, 保留时间的 RSD 范围为 0.000%~0.040%, 峰面积的 RSD 范围为 0.061%~0.201%; 磺胺嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺喹恶啉的仪器检出限均不大于 0.010μg/mL, 仪器定量限均不大于 0.034μg/mL; 五种磺胺类药物在测定浓度范围内均具有良好的线性关系 ($R^2 \geq 0.9999$)。因此, Wooking K2025 高效液相色谱仪满足《GB/T 19542-2007 饲料中磺胺类药物的测定 高效液相色谱法》中五种磺胺类药物含量测定的需求。

关键词: 饲料;磺胺

磺胺类药物为人工合成的抗菌药, 用于临床已近 50 年, 它具有抗菌谱较广、性质稳定、使用简便、生产时不耗用粮食等优点。磺胺类药物在养殖临床用药过程的实用性强, 对许多革兰氏阳性菌和一些革兰氏阴性菌、诺卡氏菌属、衣原体属和某些原虫 (如疟原虫和阿米巴原虫) 均有抑制作用。

1 试剂与材料

水: 符合 GB/T6682 的一级水;

甲醇: 色谱纯;

乙腈: 色谱纯;

冰乙酸: 优级纯;

流动相: 在 1000mL 容量瓶中加入 800mL 水, 移取冰乙酸 (3.4) 3mL 置于水中, 再与 200mL 乙腈 (3.3) 混合, 摇匀, 过 0.22μm 滤膜, 脱气, 备用;

磺胺嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺喹恶啉混合标准溶液: 浓度为 100μg/mL;

五种磺胺类药物系列混合标准工作液: 将五种磺胺类药物混合标准溶液 (3.6) 用甲醇

稀释并定容配制成混合标准工作液，磺胺嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺喹恶啉五种磺胺类药物系列浓度依次为 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；

微孔滤膜：0.22 μm ，有机系；

碱性氧化铝 SPE 小柱：1000mg/12mL、120 \AA 。

2 仪器与设备

高效液相色谱仪：K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 CO 柱温箱、K2025UVD 紫外检测器、Wookinglab 色谱工作站；

分析天平：精确到 0.0001g；

固相萃取仪；

涡旋振荡器；

具塞锥形瓶：150mL；

容量瓶：50mL、1000mL，棕色带刻度。

3 测定步骤

3.1 样品前处理

3.1.1 提取

称取 2g（精确至 0.0001g）饲料试样于 150mL 具塞锥形瓶（4.5）中，加入 50mL 乙腈（3.3），于振荡器（4.4）中振荡提取 30min，过滤，滤液备用；

3.1.2 净化

准确吸取上述试样溶液 2mL，移入用 10mL 乙腈淋洗过的碱性氧化铝小柱（3.9）中，使其自然流出，待试样溶液全部流出后，吹干，用两次 2mL 流动相（3.5）洗脱，收集洗脱液，过 0.22 μm 的滤膜，续滤液待上机测定。

3.2 色谱条件

（1）色谱柱：C₁₈ 色谱柱，4.6 \times 250mm，5 μm 或者相当的色谱柱；

（2）流动相：见 3.5；

（3）流速：1.0mL/min；

（4）进样量：20 μL ；

（5）柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ ；

（6）检测器及波长：紫外检测器，检测波长为 270nm。

4 结果

4.1 重复性测试

按照上述色谱条件（5.2）进行采集，五种磺胺类药物混合标准溶液（磺胺嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺喹恶啉的浓度均为 $10\mu\text{g/mL}$ ）的色谱图如图 1 所示，积分结果如表 1 所示。

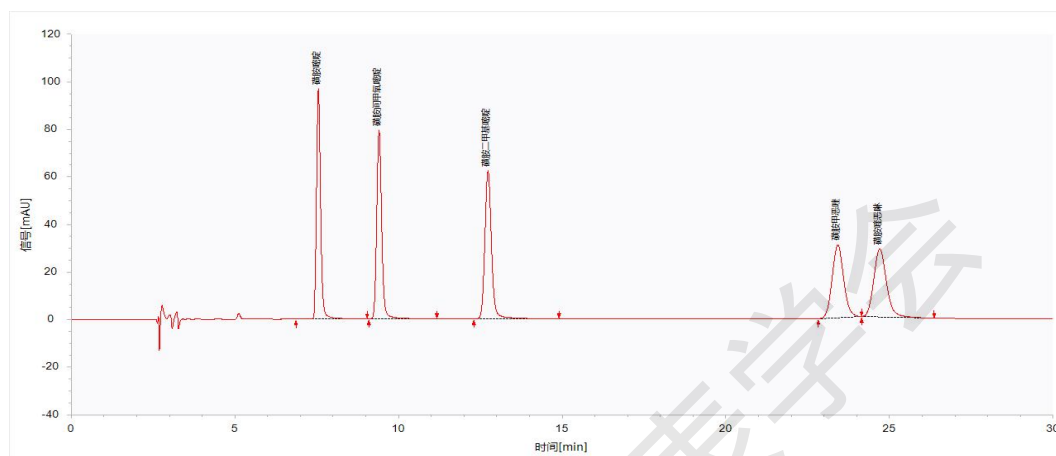


图 1 五种磺胺类药物混合标准溶液的色谱图

表 1 五种磺胺类药物混合标准溶液积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔板 数	分离度	对称/拖尾因子
磺胺嘧啶	7.567	844.797	96.844	19126	-	1.20
磺胺间甲氧 嘧啶	9.417	836.648	79.214	20051	7.63	1.15
磺胺二甲基 嘧啶	12.742	872.481	62.282	21091	10.78	1.16
磺胺甲恶唑	23.433	757.361	30.658	20976	21.43	1.14
磺胺喹恶啉	24.717	773.292	28.631	20548	1.92	1.14

由表 1 中数据可知，五种磺胺类药物的分离度均大于 1.5，可以达到基线分离；五种磺胺类药物的拖尾因子均小于 1.2，具有良好的峰型。

将五种磺胺类药物混合标准溶液连续进样 7 针，叠加的色谱图如图 2 所示，结果见表 2。

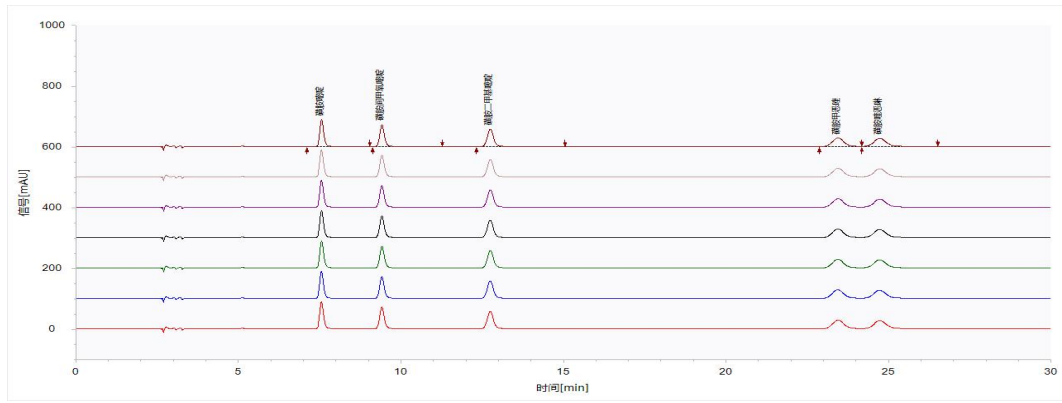


图 2 五种磺胺类药物混合标准溶液连续进样 7 针叠加的色谱图

表 2 五种磺胺类药物混合标准溶液连续进样 7 针重复性数据统计

目标物		1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD %
磺胺嘧啶	保留时间	7.575	7.567	7.575	7.575	7.575	7.575	7.575	7.574	0.040
	峰面积	775.502	775.445	775.870	775.719	776.801	776.227	776.042	775.944	0.061
磺胺间甲氧嘧啶	保留时间	9.425	9.425	9.425	9.425	9.425	9.425	9.425	9.425	0.000
嘧啶	峰面积	768.681	766.044	767.668	767.904	768.400	769.417	767.324	767.920	0.141
磺胺二甲基嘧啶	保留时间	12.758	12.758	12.758	12.758	12.758	12.758	12.758	12.758	0.000
	峰面积	798.522	799.684	797.759	798.057	801.073	799.721	799.926	799.249	0.148
磺胺甲恶唑	保留时间	23.458	23.450	23.450	23.450	23.458	23.458	23.458	23.455	0.018
	峰面积	695.211	694.537	695.399	694.755	695.848	696.163	695.928	695.406	0.088
磺胺喹恶啉	保留时间	24.742	24.733	24.733	24.733	24.742	24.742	24.742	24.738	0.019
	峰面积	704.974	705.649	707.881	708.885	707.933	707.992	707.773	707.298	0.201

由表 2 中数据可知，五种磺胺类药物混合标准溶液连续进样 7 针，其中磺胺嘧啶保留时间的 RSD 为 0.040%，峰面积的 RSD 为 0.061%；磺胺间甲氧嘧啶保留时间的 RSD 为 0.000%，峰面积的 RSD 为 0.141%；磺胺二甲基嘧啶保留时间的 RSD 为 0.000%，峰面积的 RSD 为 0.148%；磺胺甲恶唑保留时间的 RSD 为 0.018%，峰面积的 RSD 为 0.088%；磺胺喹恶啉保留时间的 RSD 为 0.019%，峰面积的 RSD 为 0.201%，均具有良好的定性定量重复性。

4.2 仪器灵敏度测试

灵敏度测试的色谱图如图 3 所示，计算结果见表 3。

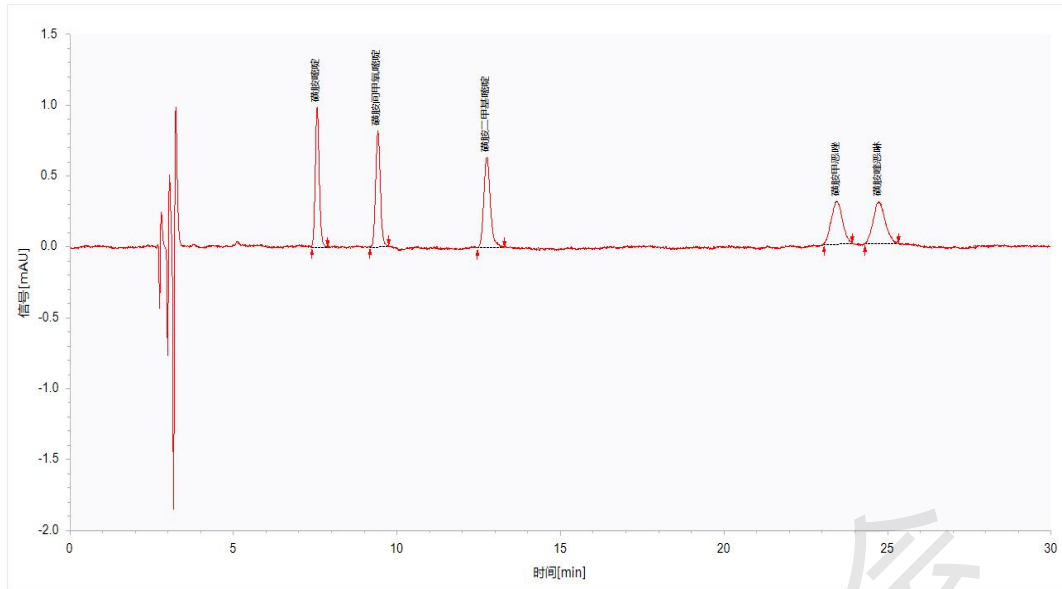


图 3 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

目标物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
磺胺嘧啶	0.100	0.988	0.010	98.8	0.0030	0.010
磺胺间甲氧嘧啶	0.100	0.816	0.010	81.6	0.0037	0.012
磺胺二甲基嘧啶	0.100	0.638	0.010	63.8	0.0047	0.016
磺胺甲恶唑	0.100	0.302	0.010	30.2	0.0099	0.033
磺胺喹恶啉	0.100	0.298	0.010	29.8	0.010	0.034

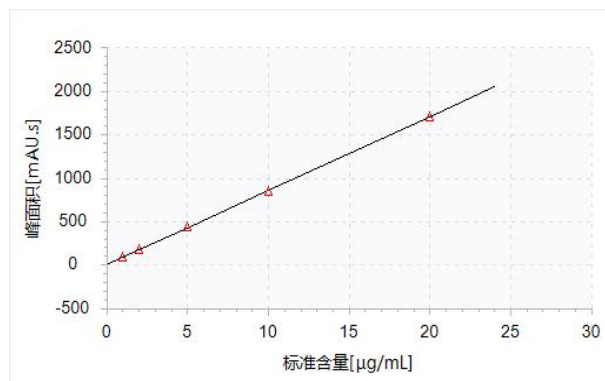
由表 3 中数据可知,磺胺嘧啶的仪器检出限为 $0.0030\mu\text{g/mL}$,仪器定量限为 $0.010\mu\text{g/mL}$;磺胺间甲氧嘧啶的仪器检出限为 $0.0037\mu\text{g/mL}$,仪器定量限为 $0.012\mu\text{g/mL}$;磺胺二甲基嘧啶的仪器检出限为 $0.0047\mu\text{g/mL}$,仪器定量限为 $0.016\mu\text{g/mL}$;磺胺甲恶唑的仪器检出限为 $0.0099\mu\text{g/mL}$,仪器定量限为 $0.033\mu\text{g/mL}$;磺胺喹恶啉的仪器检出限 $0.010\mu\text{g/mL}$,仪器定量限为 $0.034\mu\text{g/mL}$ 。

4.3 含量测定

4.3.1 校准曲线

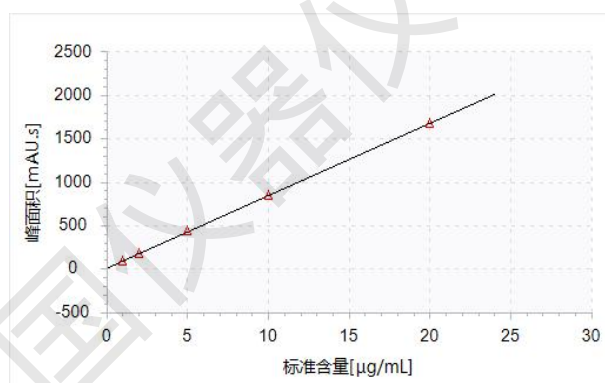
将配制好的五种磺胺类药物系列混合标准工作液 (3.7) 在 HPLC 上进行测定,以浓度

为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，线性方程及确定系数见图 4~图 8，叠加色谱图见图 9。五种磺胺类药物在测定浓度范围内，曲线的确定系数 R^2 均大于 0.9999，线性关系均良好。



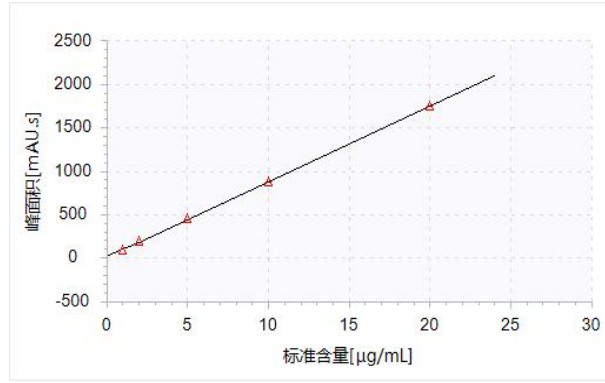
方程式	$y=85.06174*x+0.16082$
相关系数(R)	0.9999
确定系数(R^2)	0.9999

图 4 磺胺嘧啶系列标准溶液的校准曲线



方程式	$y=83.67885*x+2.78832$
相关系数(R)	0.9999
确定系数(R^2)	0.9999

图 5 磺胺间甲氧嘧啶系列标准溶液的校准曲线

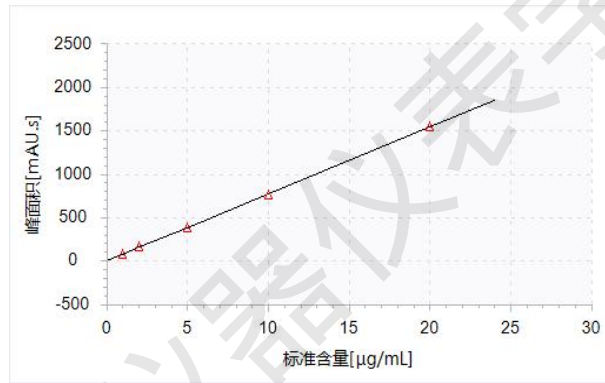


方程式 $y=87.00539*x+3.90156$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R²) 0.9999

图 6 磺胺二甲基嘧啶系列标准溶液的校准曲线

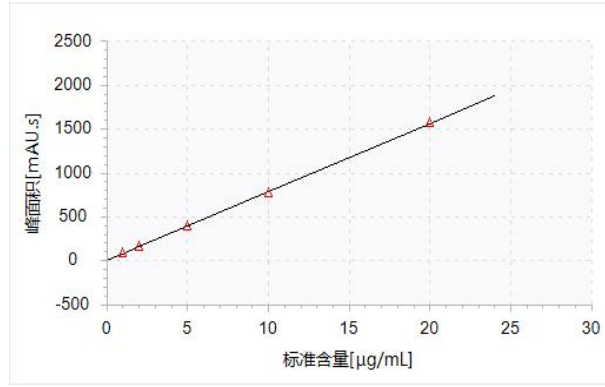


方程式 $y=76.76380*x-2.28639$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R²) 0.9999

图 7 磺胺甲恶唑系列标准溶液的校准曲线



方程式 $y=87.00539*x+3.90156$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R²) 0.9999

图 8 磺胺噻恶啉系列标准溶液的校准曲线

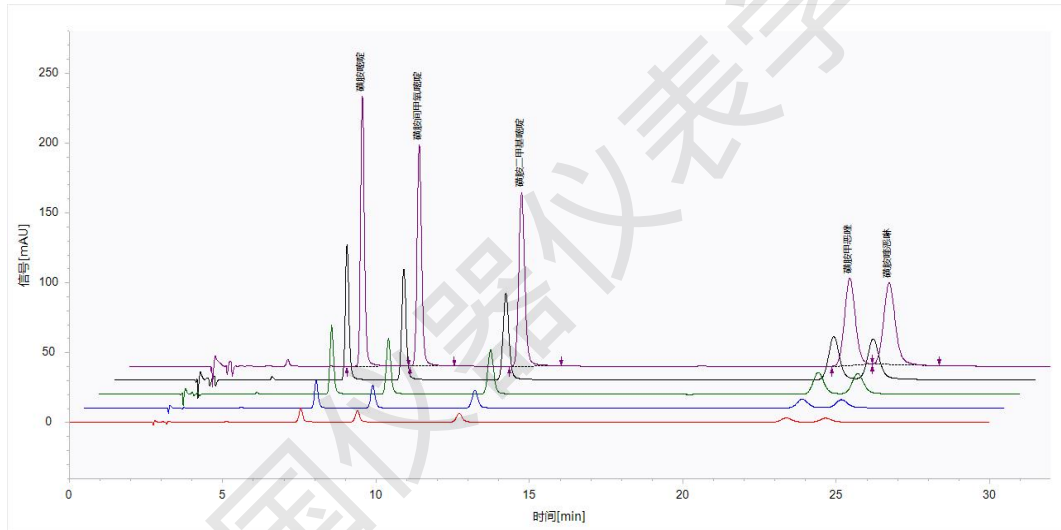


图 9 五种磺胺类药物混合标准溶液浓度系列曲线叠加色谱图

4.3.2 样品含量测定

以市售预混饲料为样品，按照 5.1 的流程对样品进行处理，并计算样品中五种磺胺类药物的含量。按照公式（1）进行计算，样品的色谱图如图 10，样品加标的色谱图如图 11 所示。

$$\omega = \frac{C \times V \times f \times 1000}{m \times 1000} \quad \text{----公式 (1)}$$

式中： ω ----为每种磺胺类药物（分别为磺胺嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺喹恶啉）的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)；

C ----为通过校准曲线计算的样品中每种磺胺类药物的浓度，单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)；

V ---为样品的定容体积，单位为毫升(mL)；

m ---为样品质量，单位为克(g)；

f ---为稀释倍数；

1000---为单位换算系数。

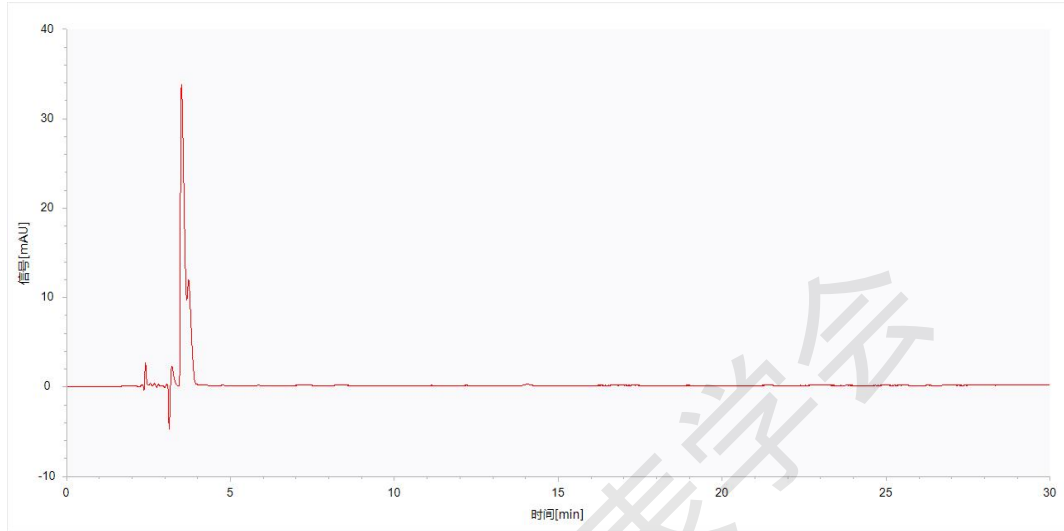


图 10 预混饲料样品的色谱图

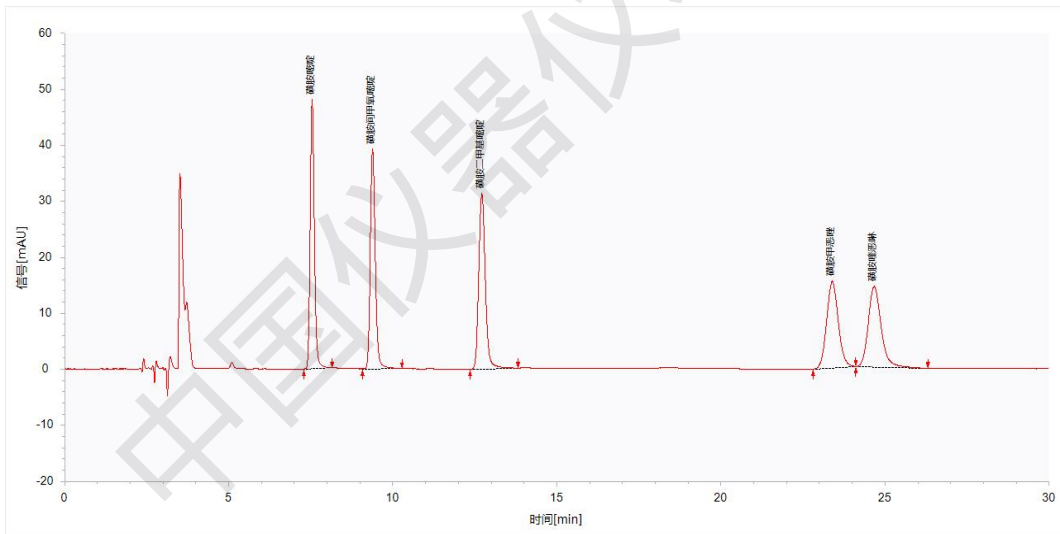


图 11 预混饲料样品加标的色谱图

依据公式(1)进行计算，此预混饲料样品中五种磺胺类药物的含量均为未检出，磺胺嘧啶的回收率为 100.1%，磺胺间甲氧嘧啶的回收率为 100.2%，磺胺二甲基嘧啶的回收率为 100.5%，磺胺甲恶唑的回收率为 101.0%，磺胺喹恶琳的回收率为 101.9%。

5 结论

通过对五种磺胺类药物的分离度、峰型、重复性、灵敏度、线性的测试以及对预混饲料样品中五种磺胺类药物的含量进行测定，实验结果：用 K2025 测定饲料中五种磺胺类药物，

五种磺胺类药物相邻两峰之间的分离度均大于 1.5，均可实现良好的分离；五种磺胺类药物色谱峰的对称因子均小于 1.2，均具有良好的峰型；重复性测试中，五种磺胺类药物混合标准溶液连续进样 7 针，五种磺胺类药物保留时间的 RSD 范围为 0.000%~0.040%，峰面积的 RSD 范围为 0.061%~0.201%，均有良好的定性定量重复性；磺胺嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺喹恶啉的仪器检出限均不大于 0.010 $\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限均不大于 0.034 $\mu\text{g/mL}$ ；在测定浓度范围内，五种磺胺类药物均具有良好的线性关系，确定系数 R^2 均大于 0.9999；此预混饲料中这五种磺胺类药物均未检出，磺胺嘧啶的回收率为 100.1%，磺胺间甲氧嘧啶的回收率为 100.2%，磺胺二甲基嘧啶的回收率为 100.5%，磺胺甲恶唑的回收率为 101.0%，磺胺喹恶啉的回收率为 101.9%。因此，Wooking K2025 高效液相色谱仪可以满足《GB/T 19542-2007 饲料中磺胺类药物的测定 高效液相色谱法》中五种磺胺类药物含量测定的需求。

附 1:

仪器配置清单

序号	单元
K2025 二元高压梯度系统	
A)	<u>Pump Unit</u> 泵单元
1	62Mpa 二元高压输液泵（内置溶剂托盘）
2	流动相瓶（肖特瓶，1L）
3	脱气机
4	四通道溶剂切换阀
5	自动在线清洗系统
B)	<u>Sample Injector</u> 进样器
1	自动进样器
2	样品瓶（2mL，含瓶盖）
3	脱气组件
4	100 μL 定量环
C)	<u>Column Oven</u> 柱温箱
1	色谱柱恒温箱（室温以下 10 $^{\circ}\text{C}$ 至 85 $^{\circ}\text{C}$ ）
2	色谱柱：ChromCore C ₁₈ 4.6 \times 250mm，5 μm
D)	<u>Detector</u> 检测器
1	紫外-可见光检测器
E)	<u>Workstation</u> 工作站
1	Wookinglab（中文版）

附 2:

悟空 Wooking K2025 高效液相色谱仪 (可靠、精准、友好、合规)

