

硫酸链霉素液相色谱分析研究

王雪娟

(河北省农药检定所, 河北 石家庄 050031)

Analysis of Streptomycin Sulfate by HPLC

Wang Xuejuan (Institute for the Control of Agrochemicals of Hebei Province, Shijiazhaung Hebei 050031)

Abstract: An analytical method for the determination of streptomycin sulfate by reverse phase ion-pair chromatography was introduced in this paper. The standard deviation was 0.681, the average recovery was 100.0%, the RSD was 0.94%, the linear correlation was 0.999 7 respectively.

Key words: streptomycin sulfate; HPLC; analysis

摘要: 本文提出了采用离子对反相液相色谱分离技术测定硫酸链霉素含量的方法。经过方法验证试验, 该法平均回收率为 100.0%, 标准偏差为 0.681, 变异系数为 0.94%, 线性相关系数为 0.999 7, 证明方法准确可靠。

关键词: 硫酸链霉素; 液相色谱; 分析

中图分类号: S482.2; 0657.7*2 文献标识码: A 文章编号: 1002-5480(2006)06-09-04

1 前言

硫酸链霉素属抗生素类农用杀菌剂, 其作用特点是干扰细菌蛋白质的合成及信息核糖核酸于 30S 核糖体亚单位结合而抑制肽链的延长, 对革兰氏阴性菌和阳性菌均有较好的抑制作用, 对防治黄瓜细菌性角斑病具有较好的防治效果。对于硫酸链霉素含量的定量分析, 国内农药生产厂家大多采用中国药典中记载的生物效价法, 有的采用了分光光度法、硫酸钡沉淀法。生物效价法测定繁琐, 分光光度法不但测定时间长、杂质也易干扰; 硫酸钡沉淀法选择性不强。通过对国外文献的检索, 国外药典(包括美国药典 29 版、英国药典 2005 版)记载了采用电导色谱法测定硫酸链霉素含量的方法。目前我国的农药生产企业在质量控制分析中电导色谱应用少, 操作起来不很经济实用。在此基础上, 通过反复试验摸索和方法验证试验, 笔者建立了简便易行、容易工业化控制且

常用的液相色谱分析技术, 为该产品的质量检测提供了可靠的依据。

2 实验部分

2.1 仪器 Waters 600 液相色谱仪, 配紫外可变波长检测器, 工作站。

2.2 试剂与材料 乙腈, 优级纯; 磷酸钠, 分析纯; Milli-Q 去离子水; 离子对试剂: 己烷磺酸钠 (IPR- B₆), 浓度为 0.25mol/L; 硫酸链霉素标准品: 每毫克相当于 731 单位 (以链霉素计), 折链霉素含量为 73.1% (从中国药品生物制品检验所购买); 72%硫酸链霉素可溶粉剂样品 (由石家庄曙光制药厂提供)。

标准溶液的配制: 准确称取 0.05g 标准品于 10mL 容量瓶中, 再用水溶解, 摇匀, 备用; 样品溶液的配制: 准确称取相当于含硫酸链霉素标样为 0.05g 的样品于 10mL 容量瓶中, 再用水溶解, 摇匀, 备用。最后测得的硫酸链霉素含量以链霉素计。

收稿日期: 2006-02-24

2.3 操作条件 色谱柱: Luna C₁₈ (5 μm) 250mm×4.6mm 不锈钢柱; 流动相: 乙腈+水=7+93 (V/V), 其中水为 0.005mol/L 磷酸钠水溶液, 并加入 0.005mol/L IPR-B₆, 再用磷酸调节水溶液为 pH=5; 波长 =205nm, 进样量 10 μL。

3 测定

3.1 在 2.3 色谱操作条件下测定 72% 硫酸链霉素可溶粉剂中硫酸链霉素含量 (以链霉素计), 典型色谱图 (图 1)。

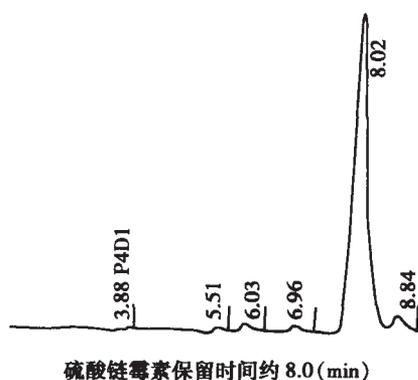


图 1 72% 硫酸链霉素可溶粉剂中硫酸链霉素液相色谱图

3.2 直接采用乙腈+水作流动相洗脱, 不加离子对试剂得到的硫酸链霉素样品色谱图 (图 2)。

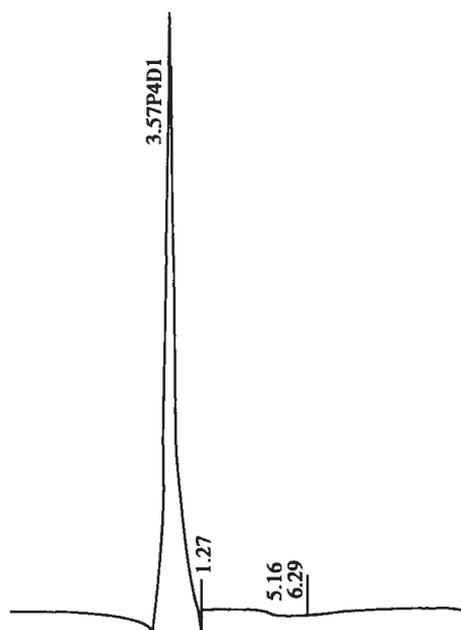


图 2 不加离子对试剂硫酸链霉素样品色谱图

4 结果讨论

4.1 离子对试剂种类及浓度的选择 硫酸链霉素在水中完全电离, 为较强的电解质, 单靠离子抑制不能在色谱柱上产生足够的保留。通过向以水为主要洗脱能力的流动相中加入带有相反电荷的离子对试剂, 使其生成中性络合物, 进而在非极性的反相固定相表面疏水缔合而保留。因此, 本文选择了弱酸性 IPR-B₆ 和 IPR-B₈ 作为离子对试剂, 因为 IPR-B₆ 疏水缔合、保留时间短, 且峰形尖锐, 最后确定 IPR-B₆ 作为络合试剂。在离子对试剂的浓度选择上, 在 0.005 ~ 0.02mol/L 之间进行了试验, 浓度越大, 出峰时间越快, 峰形愈尖锐。为保证样品的分离效率, 本文选择 0.005mol/L 作为离子对试剂的浓度。

4.2 流动相比比例的选择 该方法采用乙腈、水作为洗脱溶剂。乙腈与水的比例, 我们采用梯度洗脱法进行了筛选试验。乙腈比例高, 硫酸链霉素的流出峰太快, 与杂质不能很好分离; 乙腈比例低, 硫酸链霉素的流出峰太慢, 峰形易拖尾。最后, 我们确定乙腈+水=7+93 时为最佳, 主峰与杂质峰分离完全且美观, 分析时间也适宜。该条件可根据仪器、色谱柱的型号不同, 选择最佳的分析条件。

4.3 磷酸钠溶液浓度的选择 本试验也对磷酸钠溶液的浓度进行了筛选, 在 0.02 ~ 0.005mol/L 之间进行了选择。试验表明, 磷酸钠溶液的浓度变化对样品的色谱分离影响不明显, 但浓度过大, 缓冲液离子也有可能与反离子配对, 而且对色谱仪器零部件的损耗也较大, 因此, 该方法中采用了 0.005mol/L 的磷酸钠浓度作为离子对试剂的匹配浓度。

4.4 pH 的选择 调节流动相对水溶液的 pH 在 3~7 之间进行了选择, 对样品的分离影响不大, 但过酸对色谱柱的寿命有一定影响, 因此该实验中选择 pH 为 5。

4.5 波长的选择 由于硫酸链霉素的紫外吸收波长较短, 通过紫外波长扫描得知, 硫酸链霉素的吸收最大吸收波长为 205nm, 在此波长条件

下, 溶剂干扰不严重, 因此, 该方法中选择了 $\lambda=205\text{nm}$ 为最佳吸收波长。硫酸链霉素的紫外扫描图 (图 3)。

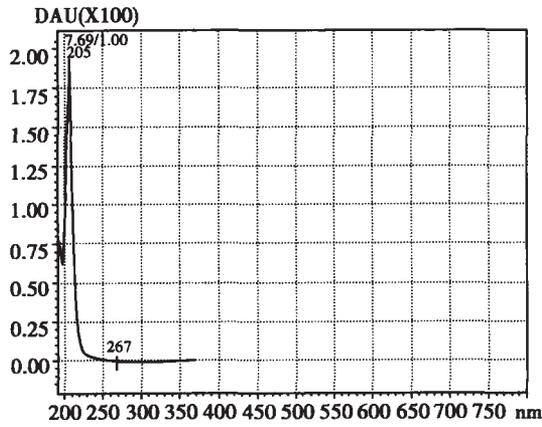
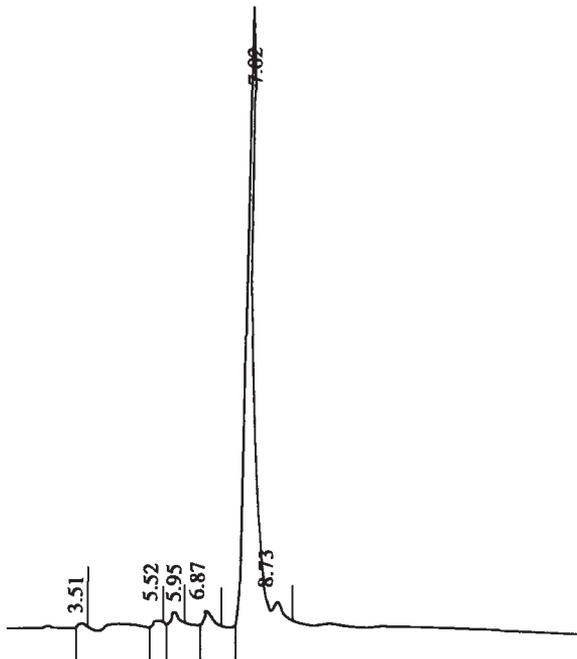


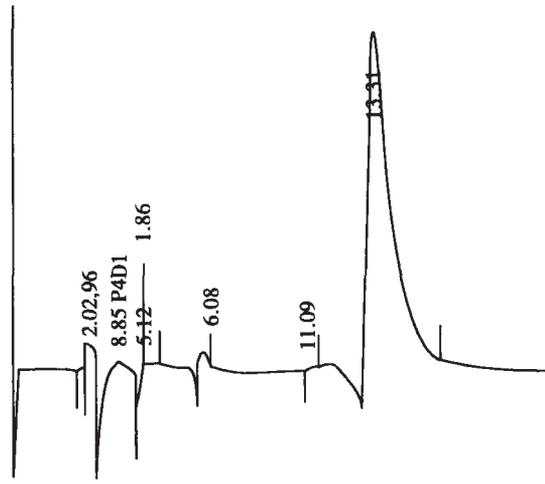
图 3 硫酸链霉素的紫外扫描图 $\lambda_{\text{max}}=205\text{nm}$

4.6 峰形的改善 对于硫酸链霉素这种强解离的电化学物质, 在反相液相色谱操作条件下洗脱时, 容易形成脱尾峰。因此, 通过试验, 往流动相中加入少量的三乙胺, 可减少拖尾, 改善峰形 (图 4、5)。



硫酸链霉素保留时间 7.9(min)

图 4 加入拖尾剂后的液相色谱图

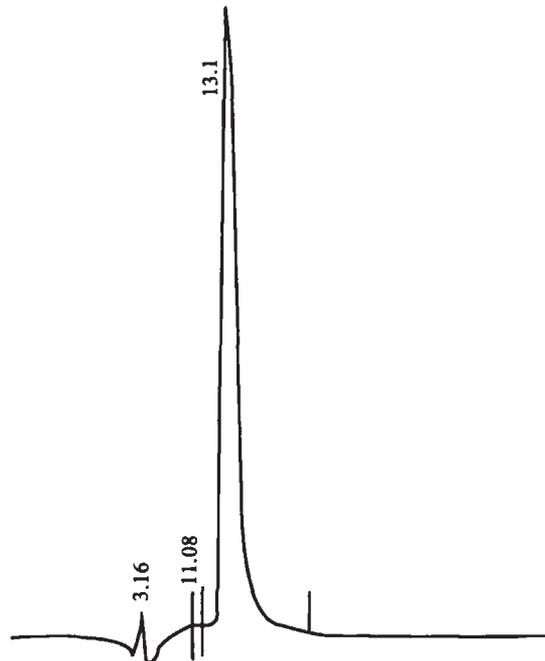


硫酸链霉素保留时间 13.3(min)

图 5 加入拖尾剂前的液相色谱图

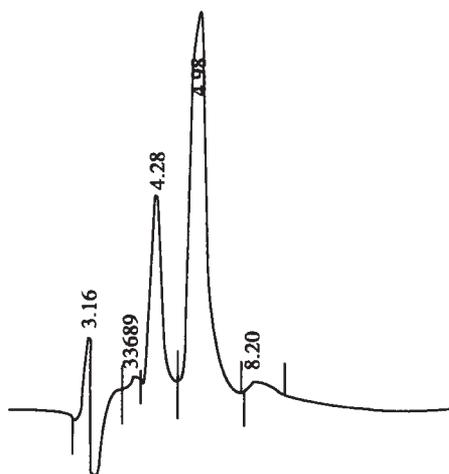
4.7 采用该方法对已经分解变质的硫酸链霉素标准品进行了分析, 样品分解前后谱图 (图 6、图 7)。

4.8 该方法曾对可能带来影响的因素如试剂、稀硫酸溶液进行了空白分析, 均没有带来分析干扰 (图 8、9)。



硫酸链霉素保留 4.8(min)

图 6 硫酸链霉素标准品分解前



磷酸链霉素保留时间 5.0(min)
图 7 硫酸链霉素标准品分解后

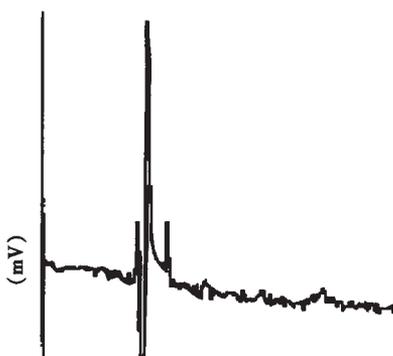


图 8 空白试剂液相色谱图

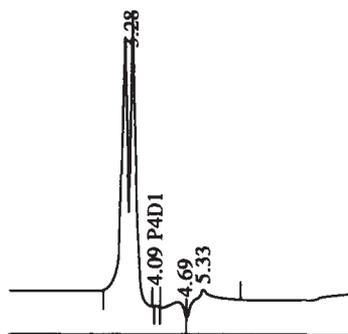


图 9 稀硫酸溶液液相色谱图

5 方法验证试验部分

5.1 待测组分的响应值与浓度的线性相关性 配制 4 个不同浓度的标样溶液，每一个浓

度的溶液进 2 针，以 2 针峰面积平均值为纵坐标，浓度为横坐标 (mg/mL)，得硫酸链霉素的标准曲线方程式为： $y=2.0849x+0.5367$ (浓度范围为 0.7 ~3.5mg/mL)，线性相关系数 R^2 为 0.9997。硫酸链霉素的标准工作曲线 (图 10)。

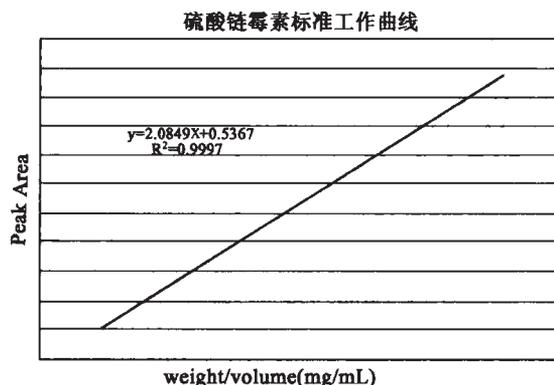


图 10 硫酸链霉素的标准工作曲线

5.2 精密度试验结果 采用该标准中所述方法对 72%硫酸链霉素可溶粉剂的同一个样品，平行测定 5 次，所得结果。

5.3 方法准确度测定结果 分别称取 5 个已知含量的样品，分别往其中加入一定体积的标样溶液，测定回收率结果。

6 结论

6.1 实验结果表明，该方法的准确度和精密度较高，线性关系良好，具有简便、快速、准确的优点，符合质量控制分析要求，是测定硫酸链霉素含量的可行分析方法之一。

6.2 该方法使用的流动相中含有无机盐，注意过度洗脱时要用纯水充分冲洗干净。

