

春雷霉素高效液相色谱分析方法

吴国旭¹, 毕富春², 翟立红³

(1.天津渤海职业技术学院 环境工程系, 天津 300402; 2.南开大学 元素有机化学研究所, 天津 300071;
3.河北省廊坊市诺农生物工程有限公司, 河北 廊坊 065000)

摘要: 研究用HPLC定量分析2%春雷霉素水剂方法。色谱条件: 5 μm ODS不锈钢柱; 流动相: 乙腈-1.0%SDS水溶液(体积比20:80); 流速: 1.2 mL/min; 可变紫外检测器: 波长215 nm。春雷霉素在0.25~4.0 mg进样范围内和峰高呈线性。相关系数值为0.9997。春雷霉素分析的回收率在98%~102%之间, 变异系数小于2%。

关键词: 春雷霉素; 离子对; 高效液相色谱法

中图分类号: TQ450.7 文献标志码: A 文章编号: 1006-0413(2010)12-0902-02

The Analytical Method for Kasugamycin by HPLC

WU Guo-xu¹, BI Fu-chun², ZHAI Li-hong³

(1. Department of Environmental Engineering, Tianjin Bohai Vocational Technical College, Tianjin 300402, China;
2. Institute of Elemental Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China;
3. Langfang Ruonong Bioengineering Co., Ltd., Langfang 065000, Hebei, China)

Abstract: The analytical method for kasugamycin has been studied by HPLC. Conditions of HPLC were as follows. Column stainless steel, VP-ODS, 5 μm . Mobile phase was acetonitrile-1.0% SDS water solution(20:80, by vol). Flow rate 1.2 mL/min and measuring wavelength 215 nm. This method was linear and reproducible over the range of 0.25-4.0 mg analyte. The correlation coefficient was 0.9997. The recoveries were ranged between 98 and 102%. The variation coefficient was less than 2%.

Key words: kasugamycin; ion-pair; HPLC

春雷霉素(kasugamycin)为农用抗生素,对防治水稻稻瘟病等多种作物病害有效,对环境友好,是较理想的杀菌剂。春雷霉素特点为极性大、易溶于水、无特征的紫外吸收,表现为在液相色谱柱上保留时间短,不能与杂质完全分离,给分析检测带来困难。Insmad Pharmaceuticals公司^[1]采用柱前衍生化方法,结合一个疏水性发色团,以改变春雷霉素的色谱行为,使保留时间延长,并使具有特征的紫外吸收。但是该方法操作复杂,需要的步骤多、费时,在衍生化反应中产生HF气体,对操作人员的毒性大,并且需要特殊的冷冻设备,使衍生物不被分解,以保证分析结果的准确性。为了克服上述由衍生化带来的麻烦,牛长群等^[2]通过分析条件的优化,建立了反相离子对高效液相色谱法。作者采用此方法在分析2%春雷霉素水剂时,在岛津LC-10AT vp Plus津高效液相色谱仪上,春雷霉素的保留时间太长,不利于快速分析检测,根据我们仪器的特点进行较大改进,并测出春雷霉素的吸收波长为205 μm ,也获得很好的分析结果。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

岛津LC-10AT vp Plus高效液相色谱仪、SPD-10A vp Plus可变波长紫外检测器、CBM-10AT vp Plus数据处理工作站(SHIMADZU CORPORATION)。

收稿日期:2010-05-04, 修返日期:2010-09-08

作者简介:吴国旭,男,副教授,主要从事环境监测与分析。E-mail: guoxuwu@163.com。

乙腈(色谱纯)、磷酸(分析纯)、十二烷基硫酸钠(SDS, 分析纯)、春雷霉素标样(99.0%, 日本进口), 2%春雷霉素水剂(华北制药集团)。重蒸二次蒸馏水。

1.2 色谱条件

色谱柱: 250 mm \times 4.6 mm(i.d.)不锈钢柱, 内装VP-ODS, 粒径5 μm (SHIMADZU CORPORATION)。检测波长: 215 nm; 柱温: 室温; 流动相: 乙腈-1.0%SDS水溶液体积比20:80, 磷酸调节pH值为2~3。流速: 1.2 mL/min; 进样量: 5 μL 。在上述色谱条件下, 春雷霉素保留时间约14.5 min(见图1)。

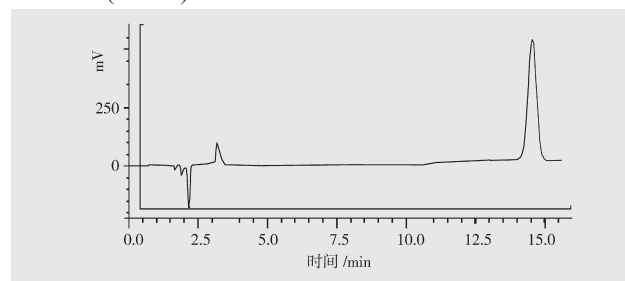


图1 2%春雷霉素水剂中春雷霉素的高效液相色谱图

2 测定步骤

2.1 标准曲线溶液的配制

准确称取春雷霉素标准品100 mg于25 mL容量瓶中,

用水稀释至刻度,振摇、溶解成为质量浓度4.0 g/L的母液。用重蒸二次蒸馏水依次将母液稀释为0.25、0.5、1.0、2.0 g/L的溶液。在选定的条件下分别进样,记录各个质量浓度的色谱峰面积和峰高,以质量浓度(x)对峰面积和峰高(y)进行回归,求出直线回归式及相关系数。

2.2 回收率测定

准确称取标准品312.5 mg(精确至0.000 2 g)置25 mL容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得标准品溶液。准确称取2%春雷霉素水剂试样4份,每份含有效成分25 mg(精确至0.000 02 g),置25 mL容量瓶中。每份分别准确加入标准品溶液4 mL,加水稀释至刻度。回收率的计算按朱会云介绍的公式进行^[3]。

2.3 标样溶液的配制

称取0.05 g(精确至0.000 2 g)春雷霉素标样,置于25 mL容量瓶中,用水稀释至刻度,振摇、溶解。

2.4 试样溶液的配制

称取含有0.05 g(精确至0.000 2 g)春雷霉素试样于25 mL容量瓶中,用水稀释至刻度,振摇、溶解。

2.5 测定

在上述操作条件下,待仪器基线稳定后,连续注入数针标样溶液,计算各针相对响应值,待相邻2针的相对响应值变化小于1.5%以后,按照下列顺序进样分析:标样溶液、试样溶液、试样溶液、标样溶液的顺序进行测定。

2.6 计算

将测得2针试样溶液以及试样前后2针标样溶液中春雷霉素的峰高或峰面积进行平均,质量分数X(%)按下式计算:

$$X(\%) = \frac{A_2 \cdot m_1 \cdot p}{A_1 \cdot m_2} \times 100$$

式中: A_1 为标样液溶液中春雷霉素峰高或峰面积的平均值
 A_2 为试样液溶液中春雷霉素峰高或峰面积的平均值
 m_1 为春雷霉素标样的质量(g)
 m_2 为试样样品的质量(g)
 p 为春雷霉素标样的质量分数(%)

3 结果分析

3.1 春雷霉素线性相关性的测定

以进样的质量浓度为横坐标,以峰高或峰面积为纵坐标,得出2条直线回归式,峰高为 $y=0.022\ 9+2.324\ 9x$,相关系数 r 为0.999 7。质量浓度对峰面积的直线回归式为 $y=-0.000\ 5+0.494x$,相关系数 r 为1.0。说明春雷霉素在进样量0.25~4.0 g/L的范围内和峰高或峰面积都是呈线性的,各点基本上在一条直线上。最低进样质量浓度的和最高相比为16倍,分析时应该取进样浓度的中间范围,即1.0~2.0 g/L的质量浓度为宜。

3.2 春雷霉素分析的准确度

春雷霉素标准品添加量为25 mg,进行含量测定。从表1看出:实测的添加量与已知添加量十分接近,回收率一般在98%~102%之间,说明分析方法是可靠的。

表1 春雷霉素分析的回收率

| 加标试样 测定值/mg | 试样 测定值/mg | 标样添加 量/mg | 实测添 加量/mg | 回收率/ % | 平均 回收率/% |
|----------------|--------------|--------------|--------------|-----------|-------------|
| 49.80 | 24.80 | 25.0 | 25.0 | 100 | 100.03 |
| 50.33 | 25.01 | 25.0 | 25.32 | 101.3 | |
| 50.05 | 25.01 | 25.0 | 25.04 | 100.2 | |
| 49.89 | 25.23 | 25.0 | 24.66 | 98.6 | |

3.3 春雷霉素分析的精密性

表2给出了3批2%春雷霉素水剂分析的精密性。对3批样品,每批样品4次采样分析,结果表明:分析的重复性较好,变异系数均小于5%,可以满足2%春雷霉素水剂分析的要求。

表2 春雷霉素分析的精密性

| 样品 | 取样序号(质量分数/%) | | | | 平均质量 分数/% | 变异 系数/% | 变异系数 允许范围 |
|----------|--------------|------|------|------|--------------|------------|--------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | | | |
| 2%春雷霉素水剂 | 2.09 | 2.08 | 2.02 | 2.05 | 2.06 | 1.54 | 5~10 |
| | 2.10 | 2.04 | 2.09 | 2.11 | 2.09 | 1.49 | |
| | 2.09 | 2.04 | 2.02 | 2.10 | 2.06 | 1.87 | |

4 讨论

在本仪器色谱工作站默认的条件下,峰面积的积分值变化较大,表中的峰面积为改变积分条件后的数据。而峰高则相对稳定,可直接用色谱工作站默认的条件,所以方法定量应优先选用峰高为宜。

春雷霉素的最高吸波长为205 μm ,分析时未采用此波长,主要原因是在最高质量浓度(4 g/L)时,会导致信号超过1 000 mv。根据不同仪器和色谱柱可在205~215 μm 之间选取。

十二烷基硫酸钠(SDS)的质量分数至关重要,直接影响春雷霉素的出峰时间。通过不同质量分数的SDS测定,在本文条件下,流速为1.0 mL/min、SDS为0.2%时,春雷霉素的保留时间约为45 min;SDS为0.5%时,其保留时间约为33 min;SDS为1.0%时,其保留时间约为17 min。

特别需要指出的是室内温度应在27 $^{\circ}\text{C}$ 以上,温度低时流动相中的十二烷基硫酸钠会发生沉淀,使分析不易进行。

参考文献:

- [1] TAMAMURA T, SATO K. Comparative Studies on *in vitro* Activities of Kasugamycin Clinically-used Aminoglycoside Antibiotics[J]. Jpn J Antibiot, 1999, 52(1): 57.
- [2] 牛长群, 祝仕清, 张惠敏. 反相离子对高效液相色谱法和高效毛细管电泳法测定春雷霉素[J]. 中国抗生素杂志, 2001, 26(5): 348-350.
- [3] 朱会云. 也谈回收率的计算[J]. 中国环境监测, 1996, 12(6): 53.

责任编辑: 李新