

碱性去活柱反相高效液相色谱法分析红霉素肟及相关化合物

曹志凌, 梁建华, 姚国伟, 杨新林

(北京理工大学生命科学与技术学院, 北京 100081)

摘要: 采用碱性去活(BDS) C_{18} 柱分离测定了红霉素肟及相关化合物。以0.02 mol/L磷酸氢二钾(用磷酸调pH 7.2)-乙腈-甲醇(体积比为50:40:10)为流动相,检测波长为210 nm,柱温为35℃。红霉素肟E、Z异构体及相关化合物红霉素A、红霉素A 8- β -脱水-6- β -半缩酮和红霉素A 6- β -9,12-螺缩酮五种组分分离完全,检测限($S/N=3$)为6.0~24.0 ng,线性关系良好,方法准确可靠,用于实际样品分析时取得较好的效果。

关键词: 反相高效液相色谱法(RP-HPLC); 红霉素肟(erythromycin A oxime); 相关化合物(relative compounds); 碱性去活柱(base-deactivated column)

中图分类号: O658 文献标识码: B 文章编号: 1000-8713(2007)06-0946-02 栏目类别: 技术与应用

红霉素肟(erythromycin A oxime, EAO)是合成新型红霉素类抗生素如克拉霉素、阿奇霉素、罗红霉素和地红霉素等的共性前体,由红霉素和盐酸羟胺反应得到^[1,2]。红霉素肟的合成产物主要为红霉素肟E、Z异构体,还有未进行反应的红霉素A(erythromycin A, EA)及其降解产物红霉素A 8- β -脱水-6- β -半缩酮(erythromycin A 8- β -dehydro-6- β -hemiketal, EAH)和红霉素A 6- β -9,12-螺缩酮(erythromycin A 6- β -9,12-spiroketal, EAS)等相关物质^[3]。红霉素肟中其他组分均可以继续衍生化为相关杂质,影响抗生素产品质量,因此需要建立有效分离测定红霉素肟的分析方法。

文献报道用高效液相色谱法分析红霉素肟^[4-6],这些方法均采用普通 C_{18} 柱和酸性或中性流动相,色谱峰常表现为拖尾,分离不完全,特别是EA与EAO两种异构体无法分离,不能对EA组分进行测定。红霉素肟及相关化合物的分子结构非常相近,而且有叔胺基团,显碱性,这些因素使得它们在传统硅胶柱上的分离效果不够理想。针对上述问题,本文采用Hypersil碱性去活(BDS) C_{18} 反相柱,建立了红霉素肟的高效液相色谱分析方法,可以分离包括EA在内的上述5种组分,峰形对称,方法简便并已用于红霉素肟样品分析。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

高效液相色谱仪:岛津LC-10 AT VP泵、SPD-10 A VP检测器;N2000色谱工作站(浙江大学);乙腈、甲醇为色谱纯,磷酸氢二钾、磷酸为分析纯,水为娃哈哈公司纯净水。红霉素A购于西安制药厂,其

余标样均为自制,并经过分析鉴定,红霉素肟合成样品为自制。

1.2 色谱条件

色谱柱:Hypersil BDS C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)。流动相:0.02 mol/L磷酸氢二钾(用磷酸调pH 7.2)-乙腈-甲醇(体积比为50:40:10),流速1.0 mL/min,检测波长:210 nm;柱温:35℃;进样量20 μ L。

1.3 样品制备

精密称取EAO-E异构体、EAO-Z异构体和EA、EAH、EAS标样适量,用流动相溶解并稀释制成质量浓度分别为5.0, 1.0, 3.0, 0.2, 2.5 g/L的标准样品混合溶液。取红霉素肟合成样品适量,同法制成5 g/L的溶液。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

在同等条件下,用BDS柱分析红霉素肟较普通硅胶柱时间短,分离度好,原因是BDS反相硅胶填料经过碱钝化处理,减少了硅胶上残余基团与碱性分析物之间的相互作用。

提高流动相的pH值,可以抑制组分的碱性解离,使得保留值增加,分离度和峰对称性得到改善。考虑色谱柱的pH使用范围,选定pH为7.2,此条件下峰形对称,分离完全。

乙腈作为有机相的整体效果比甲醇好,但加入少量的甲醇可以提高EAS和EAH的分离程度。通过用不同配比的流动相进行分析,发现磷酸氢二钾缓冲液、乙腈和甲醇的最佳配比为50:40:10。结果显示,在15 min内,上述5种被测组分均能被完全

分离,峰形对称,其色谱图见图 1。

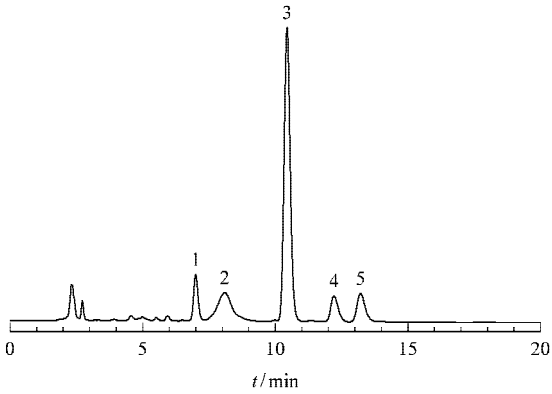


图 1 红霉素肟及相关化合物的色谱分离图

1. 红霉素肟-Z 异构体 (EAO-Z); 2. 红霉素 A (EA); 3. 红霉素肟-E 异构体 (EAO-E); 4. 红霉素 A 6,9-9,12-螺缩酮 (EAS); 5. 红霉素 A 8,9-脱水-6,9-半缩酮 (EAH).

实验表明,提高柱温,则各组分保留时间增加,分离度和峰形均得到改善;但柱温超过 40 °C 时,EAO-E 异构体和 EAS 的保留值逐渐趋近,且柱温过高也会影响色谱柱寿命,因此柱温选择在 35 °C 较适宜。另因红霉素肟及相关化合物的紫外吸收区都在紫外光区的末端,故选择 210 nm 作为检测波长。

2.2 标准曲线及检测限

取红霉素肟及相关化合物标样,按照选定的色谱条件进行分析,以峰面积 Y 对进样量 X (μg) 回归,得到回归方程(见表 1)。取标准样品混合溶液,逐步稀释进样,以 3 倍信噪比计算检测限。如表 1 所示,该法线性关系良好,线性范围和检测限均满足分析要求。各组分重复进样测定峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0.19% ~ 0.78%。

表 1 回归分析及检测限

组分	线性范围/ μg	回归方程	r^2	检测限/ ng
EAO-Z	0.2 - 60.0	$Y = 7.365 \times 10^4 X - 406$	0.9997	20.0
EA	0.2 - 60.0	$Y = 4.816 \times 10^4 X + 839$	0.9987	24.0
EAS	0.2 - 60.0	$Y = 2.796 \times 10^4 X + 519$	0.9996	15.0
EAH	0.1 - 60.0	$Y = 4.754 \times 10^5 X + 2102$	0.9993	6.0
EAO-E	0.2 - 100.0	$Y = 1.407 \times 10^5 X - 1659$	0.9995	10.0

Y : 峰面积; X : 进样量, μg 。

2.3 红霉素肟样品测试

取不同工艺条件下合成的红霉素肟样品进行测试,分析结果见表 2。数据表明,红霉素肟样品中均有未反应完全的 EA 存在,不同工艺条件下各组分含量差异较大。通过准确分析相关化合物,可为提高抗生素产品质量提供信息和依据。

表 2 红霉素肟样品中各相关化合物的质量分数 %

No.	EAO-Z	EA	EAS	EAH	EAO-E
1	4.61	0.27	1.17	3.43	89.72
2	10.10	2.14	3.27	15.15	71.36
3	2.28	1.25	0.88	0.94	92.29

参考文献:

- [1] Djokic S, Kobrebel G, Lazarevski G, Lopotar N, Tamburasev Z, Kamenar B, Nagl A, Vickovic I. J Chem Soc Perkin Trans: I, 1986: 1881
- [2] Murali K M, Suresh B M, Ketan D V, Ashok K K. USP 6051695, 2000
- [3] 邓志华, 梁建华, 孙京国, 姚国伟, 欧育湘. 中国药物化学杂志, 2003, 13(2): 89
- [4] 孙京国, 姚国伟. 分析化学, 2003, 31(9): 1089
- [5] 王静宇, 罗爱芹, 邓玉林, 顾峻岭, 马文. 北京理工大学学报, 2002, 22(6): 771
- [6] Miguel L, Barbas C. J Pharm Biomed Anal, 2003, 33(2): 211