文章编号: 1008-1542(2008)01-0030-03

截短侧耳素的 HPLC 测定

吴雪萍[1,2], 孙凤霞[3], 苏为科[1], 陈仁尔[1]

(1. 浙江工业大学药学院, 浙江杭州 310032; 2. 浙江升华拜克生物股份有限公司, 浙江德清 313200; 3. 河北科技大学化学与制药工程学院, 河北石家庄 050018)

摘 要: 建立了 HPLC 法测定截短侧耳素的含量, 采用 Agilent Extend C_8 色谱柱, 流动相为乙腈-甲醇-0.02 mol·L^{-1} 的磷酸二氢钾缓冲液(35∶10∶55, 体积比), 流速为 1.00 mL·min^{-1}, 检测波长为 205 nm。截短侧耳素质量浓度在 40~2 400 μg·mL^{-1} 范围内线性关系良好(r^2 = 0.999 9), 定量限为 0.08 μg, 检测限为 0.04 μg。

关键词: 截短侧耳素; 高效液相色谱法; 二萜烯类抗生素

中图分类号: O657.7+2 文献标识码: A

Determination of *pleuromutilin* by HPLC

WU Xue-ping[1,2], SUN Feng-xia[3], SU Wei-ke[1], CHEN Ren-er[1]

(1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou Zhejiang 310032, China; 2. Zhejiang Shenghua Biok Biology Company Limited, Deqing Zhejiang 313200, China; 3. College of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang Hebei 050018, China)

Abstract: A HPLC method for the determination of *pleuromutilin* was developed. The sample was separated on a Agilent Extend C_8 eluted at a flow rate of 1.00 mL·min^{-1} with mobile phase of acetonitrile-methanol-phosphate buffer (35∶10∶55, V/V), pleuromutilin was detected and quantified by the absorbance at 205 nm. The linearity was obtained over the range of 40~2 400 μg·mL^{-1} for *pleuromutilin*(r^2 = 0.999 9). The quantitative limit is 0.08 μg, and the detection limit is 0.04 μg.

Key words: *pleuromutilin*; HPLC; diterpene antibiotic

截短侧耳素是一种二萜烯类抗生素, 从截短侧耳素经半合成可得到延胡索酸泰妙菌素。截短侧耳素和延胡索酸泰妙菌素作为抗生素类药物, 被广泛用作兽药, 以饲料添加剂形式使用[1~6]。邹祥的报道采用高效液相色谱法测定发酵液中截短侧耳素的含量, 其流动相为甲醇 0.1 mol·L^{-1} 和磷酸二氢钾(50∶50, 体积比, 下同), 色谱柱 Shim-pack VP-ODS C_{18}(5 μm, 4.6 mm×200 mm), 该方法适合发酵液中截短侧耳素的含量测定[1], 不适合截短侧耳素成品的测定, 因为成品含有的杂质 A 及其他杂质等未能检出。在截短侧耳素生产过程与合成延胡索酸泰妙菌素生产过程中, 截短侧耳素的含量与杂质对合成的延胡索酸泰妙菌素质量标准[7,8]有重大影响, 所以在此建立截短侧耳素含量与杂质的检测方法具有重要意义。

1 仪器与试剂

液相色谱仪(日本岛津 LC-20AT 型), 包括紫外检测器(SPD-20AT$_{VP}$型)和 LC-solution 色谱工作站。

收稿日期: 2007-09-24; 修回日期: 2007-11-15; 责任编辑: 王海云

作者简介: 吴雪萍(1973-), 女, 浙江浦江人, 工程师, 主要从事质量检验、药物分析方面的研究。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

对照品(99.1%(质量分数),经 IR,NMR,MS 结构鉴定)、杂质 A、截短侧耳素样品,均由浙江升华拜克生物股份有限公司科研中心提供。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱: Agilent Extend C_8(5 μm, 4.6 mm × 250 mm);流速为 1 mL·min^{-1};检测波长为 205 nm;进样量为 20 μL;柱温为 30 ℃;流动相为乙腈-甲醇-浓度为 0.02 mol·L^{-1}的磷酸二氢钾缓冲液(35∶10∶55),其中磷酸二氢钾缓冲液的配制方法为称取 2.72 g 磷酸二氢钾,加 1 000 mL 水溶解,用 10 mol·L^{-1}的 KOH 调 pH 值至 7.5±0.1,用 0.45 μm 滤膜过滤。

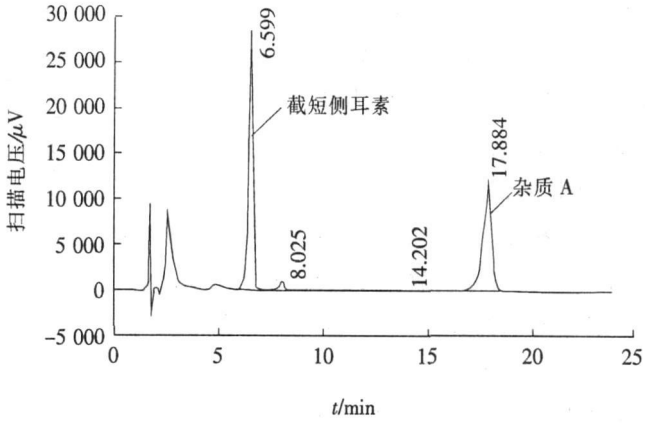

图 1　截短侧耳素系统适用性溶液图谱

Fig.1　Chromatogram of *pleuromutilin* system suitability solution

在上述色谱条件下,截短侧耳素峰的理论塔板数为 8 887,截短侧耳素峰与杂质 A 峰的分离度为 26.6,色谱图见图 1。

2.2　检测波长的选择

以流动相为参比,在 190~310 nm 波长范围内对截短侧耳素进行紫外扫描,结果显示在 205 nm 处有吸收峰。故选择 205 nm 为检测波长。

2.3　溶液配制

1)系统适用性溶液(SST):精密称取25 mg截短侧耳素工作对照品和 25 mg 杂质工作对照品,至 50 mL 容量瓶中,加入 10 mL 乙腈溶解,用水-乙腈(体积比为 1∶1,下同)混合溶剂稀释至刻度。

2)4 000 μg·mL^{-1}的截短侧耳素对照品贮备液的制备:称取 0.4 g 截短侧耳素放入 100 mL 容量瓶中,加入 20 mL 乙腈溶解,用水-乙腈混合溶剂稀释至刻度,摇匀,备用。

3)对照品溶液:精密称取 100 mg 截短侧耳素对照品,放入 50 mL 容量瓶中,加入 10 mL 乙腈溶解,用水-乙腈混合溶剂稀释至刻度,摇匀,备用。

4)样品溶液:精密称取 100 mg 截短侧耳素样品,放入 50 mL 量瓶中,加入 10 mL 乙腈溶解,用水-乙腈混合溶剂稀释至刻度,摇匀,备用。

2.4　专属性试验

精密称取对照品各 100 mg,共 3 份,分别放入 50 mL 的量瓶中,分别加入 6 mol·L^{-1}盐酸、6 mol·L^{-1}氢氧化钠溶液和 30%(质量分数)的双氧水各 2 mL,60 ℃水浴加热 1 h,冷却后加 10 mL 乙腈,用水-乙腈混合溶剂定容,作为酸性介质、碱性介质和氧化性介质降解试验溶液。依法进样测定,结果显示,在上述色谱条件下,截短侧耳素与生成的分解产物均能完全分离。

2.5　线性试验

取对照品贮备液 0.5, 2.5, 10, 25, 30 mL,分别放入 5 个 50 mL 量瓶中,用水-乙腈混合溶剂定容,制成 5 个不同浓度的系列对照品溶液。依次进样测定,记录峰面积,以截短侧耳素的浓度 ρ为纵坐标,峰面积 A 为横坐标,进行线性回归。得回归方程 ρ= 0.001 4A − 7.353, r^2= 0.999 9, S= 2.32 × 10^{-5}。表明在 40~2 000 μg·mL^{-1}质量浓度范围内,线性关系良好。按信噪比(S/N)为 10∶1,得截短侧耳素的定量限为 3.3 ng;按信噪比(S/N)为 3.3∶1,得截短侧耳素的检测限为 1.1 ng。按此质量浓度将溶液稀释得实际定量限为 0.08 μg,检测限为 0.04 μg。线性曲线见图 2。

2.6　精密度、重现性和稳定性

取对照品贮备液 10, 12.5, 15 mL,各置 3 个 25 mL 量瓶中,用水-乙腈混合溶剂定容,制成低、中、高 3 种质量浓度的溶液(1 600, 2 000, 2 400 μg·mL^{-1}),各测定 3 次,得截短侧耳素含量 RSD 分别为 0.49%, 0.58%和 0.53%。

取同一批样品共 6 份,分别按"2.3"项下方法制备得含量测定用供试品溶液,依法测定,得截短侧耳素含

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

量 *RSD* 为 0.88%。取截短侧耳素对照品溶液, 分别于 0, 12, 24, 48 和 72 h 进样测定, 得截短侧耳素峰面积 RSD 为 0.57%, 表明该溶液在 72 h 内稳定。

2.7 回收率试验

精密称取已知含量的截短侧耳素样品 100 mg(3 批), 分别放入 50 mL 量瓶中, 用水-乙腈混合溶剂稀释至刻度, 摇匀。分别精密量取 3 个 1 mL, 各置 10 mL 量瓶中, 共 9 份, 每批样品中精密加入对照品溶液(1 600, 2 000和2 400 μg·mL^{-1}), 各 4 mL, 摇匀。进样测定, 计算得截短侧耳素的平均加样回收率为 99.1%, RSD 为 0.69% (n= 9)。加样方法见表 1。

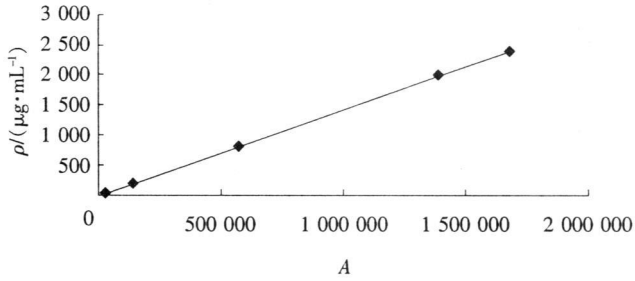

图 2 截短侧耳素线性曲线

Fig. 2 Line of *pleuromutilin*

表 1 用于回收率试验的系列溶液

Tab. 1 Solutions using for recovery rate experiment

10 mL 量瓶中加样方法	溶液 K	溶液 L	溶液 M
加入对照品溶液体积(1 600 μg/mL)/mL	4	—	—
加入对照品溶液体积(2 000 μg/mL) mL	—	4	—
加入对照品溶液体积(2 400 μg/mL)/mL	—	—	4
加入截短侧耳素样品体积/mL	1	1	1
对照品溶液质量浓度/(μg·mL^{-1})	1 600	2 000	2 400
对照品溶液质量浓度与 2 000 μg·mL^{-1}溶液的关系/%	80	100	120

2.8 样品测定

1) 含量测定 分别取对照品溶液和含量测定用供试品溶液进样测定, 按外标法以峰面积计算, 2 批成品的含量分别为 98.1% (质量分数) 和 98.5% (质量分数), RSD 分别为 0.42%和 0.59% (n= 3)。色谱图见图 3 和图 4。

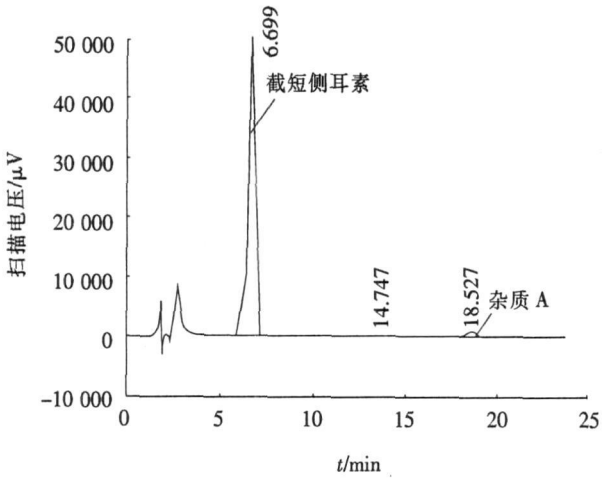

图 3 截短侧耳素对照品溶液图谱

Fig. 3 Chromatogram of reference solution for *pleuromutilin*

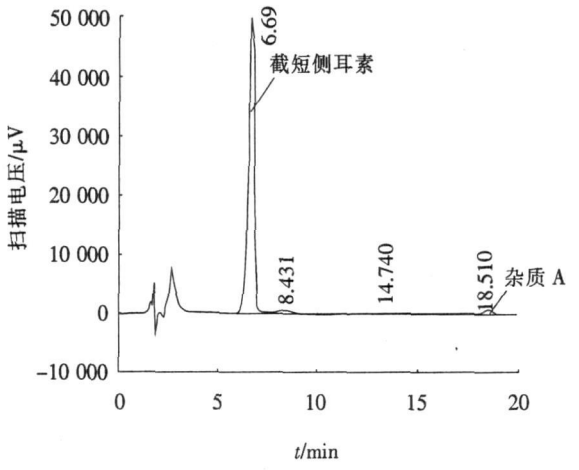

图 4 截短侧耳素供试品溶液图谱

Fig. 4 Chromatogram of test solutions for *pleuromutilin*

2) 有关物质测定 含量测试样品图谱中按面积归一含量检查杂质 A 和其他未知杂质(单个最大杂质峰), 总杂质、各杂质按样品图谱中的面积归一含量计算平均值(注: 去除空白图谱中所显示的对应时间的峰)。

3 讨 论

1) 柱温箱温度分别设定为 29 ℃, 30 ℃和 31 ℃, 对截短侧耳素对照品进行检验, 对照品 (下转第 **56** 页)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$$\Delta = \frac{R - R_0}{R_0} \times 100\% = \frac{p\, d_j}{2Et} \times 100\%。 \quad (16)$$

同理可得活塞环在常温时的径向相对过盈量 Δ_0 为 $\Delta_0 = \frac{p_0 d_j}{2E_0 t_0} \times 100\%$, (17)

式中: E_0 为常温时非金属环材料的弹性模量, Pa; p_0 为常温时环间比压, Pa。

要保证活塞环无背压, 必须存在一定的径向相对过盈量, 由式(16)、式(17)分析可知, 只要能保证环间比压大于 0 即可。然而, 环间比压和工作介质压力有关, 很难精确计算, 就现有资料看, 一般根据经验取0.01 MPa, 可保证装配过盈所产生的拉应力在允许的范围内[7]。式(17)是确定常温下非金属环内径的加工尺寸, 以获取所需的装配过盈量的主要依据。

4 结 语

无背压活塞环的最大优点就是运行寿命高、节省功耗, 压力越高, 这种优越性越明显。无背压活塞环的外侧为非金属环, 采用自润滑材料制造, 可实现无油润滑, 故无背压活塞环更适用于中高压无润滑压缩机[8~10]。为了使活塞环在具有良好的密封性能下正常工作, 必须对压缩机的运转排气温度工况加以控制, 使其尽量在设计状态下工作。利用本文所导出的热膨胀工作间隙和径向相对过盈量的计算公式, 可实现针对不同温升情况下的热膨胀工作间隙和径向相对过盈量的定量计算, 避免选取法的盲目性, 从而可依据相关公式计算并确定无背压活塞环的外径、非金属环的径向厚度和内径等结构尺寸, 对无背压活塞环进行正确设计、加工和装配, 确保活塞环的正常运行。

参考文献:

[1] 朱玉峰, 彭宝成. 无油润滑压缩机活塞环的研究进展[J]. 润滑与密封, 2003, (6): 88-91.
[2] 周 树, 黄允芳. 气体压缩机实现无油润滑的技术改造(三)[J]. 中国设备工程, 2001, (11): 52-54.
[3] 车云连. 无油润滑压缩机设计(三)[J]. 压缩机技术, 1979, (3): 16-24.
[4] 单金铭, 许才林. 关于填充聚四氟乙烯整体导向环热胀、过盈计算的讨论[J]. 深冷技术, 1982, (6): 12-14.
[5] 黄允芳. 有油润滑压缩机实现无油润滑的改装(一)[J]. 压缩机技术, 1992, (5): 21-30.
[6] 游河清. 整体无背压活塞环的工作间隙[J]. 压缩机技术, 1986, (4): 16-18.
[7] 谢康章. 无油润滑压缩机整体无背压活塞环设计[J]. 压缩机技术, 1982, (4): 7-9.
[8] 彭宝成, 宋金瓯, 赵志广, 等. 2V-6/7 型空压机的动平衡改进设计[J]. 河北科技大学学报, 2002, 23(4): 76-79.
[9] 宋金瓯, 彭宝成, 朱玉峰, 等. 压缩机等熵功的精确计算方法[J]. 河北科技大学学报, 2003, 24(1): 10-13.
[10] 彭培英, 彭宝成, 于新奇, 等. 全无油润滑压缩机的试验研究[J]. 河北工业科技, 2007, 24(6): 332-334.

(上接第 **32** 页)

溶液保留时间的 RSD 为 0.77%, 对应的峰面积的 RSD 为 0.98%。结果显示, 柱温箱温度对检测结果无显著影响。

2) 在 204 nm 和 206 nm 下检测截短侧耳素对照溶液的含量, 与 205 nm 检测结果对比, 对照品溶液保留时间的 RSD 为 0.50%, 对应的峰面积的 RSD 为 4.98%。结果表明, 此方法对检测器的精度有一定要求。

参考文献:

[1] 邹 祥. 高效液相色谱法测定发酵液中截短侧耳素的含量[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(3): 83-85.
[2] 郭 腾. 动物专用抗生素类新药沃尼妙林研究进展[J]. 兽药与饲料添加剂, 2003, 8(5): 8-10.
[3] MATOUS H F. Pleuromutilin derivative complexes[P]. US: 5578585, 1996-08-21.
[4] WALDVOGEL E. Novel process for the production of antibacterially active pleuromutilin derivatives[P]. US: 4107434, 1978.
[5] MICHAEL P, SCHLUSENER, KAI B, et al. Determination of antibiotics such as macrolides, ionophores and tiamulin in liquid manure by HPLC-MS/MS[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003, 375(7): 942-945.
[6] MICHAEL P, SCHLUSENER, MICHAEL S, et al. Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1003(5): 21-23.
[7] USP28-NF23, Tiamulin Fumarate[S].
[8] European Pharmacopoeia 5.0: 2572, Tiamulin for Veterinay Use[S].

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net