

药品检验

快速紫外分光光度法分析螺旋霉素发酵液含量

绍兴制药厂 (浙江绍兴市, 312000) 孟 铮

螺旋霉素是大环内酯类抗生素, 主要用于广泛应用于临床的乙酰螺旋霉素的合成原料。大多数厂家对于中间体含量的分析采用生物效价法。该方法较费时, 其结果不能及时指导生产, 难适应生产中间体质量控制的需要。本文建立了较为简便的紫外分光光度法, 确定在 $UV\ 231 \pm 1\text{ nm}$ 处测定, $2\text{—}30\ \mu\text{g/ml}$ 范围内线性关系良好 ($r = 0.9999$), 在24小时内吸光度稳定, 用于螺旋霉素发酵液含量控制, 结果较满意, 具有简便快速、灵敏度高等优点。

实验部分

一、仪器与试剂

岛津 UV-260 紫外/可见分光光度计, 国产 751 型紫外/可见分光光度计。

螺旋霉素为绍兴制药厂产品精制而成, 实验用发酵液为绍兴制药厂正常发酵生产样, 无水乙醇、氯仿为 AR 级。

二、实验方法与结果

1. 螺旋霉素备用液的配制: 精密称取螺旋霉素精制品 250 mg, 置 50 ml 量瓶中, 加无水乙醇溶解, 并稀至刻度, 摇匀, 即得。

2. 螺旋霉素紫外吸收图谱的测定: 准确吸取备用液 1 ml, 用无水乙醇稀释定容至 25 ml, 摇匀, 以无水乙醇作空白, 用岛津 UV-260 紫外分光光度计于 200—300 nm 波长处扫描测定, 结果见图 1 中曲线。螺旋霉素在 $231 \pm 1\text{ nm}$ 波长处有最大吸收。

3. 稳定性试验: 依上法步骤, 在 $231 \pm 1\text{ nm}$ 波长处测定不同时间的 A 值。结果表明, 在 24 小时内, 吸光度稳定不变。

4. 线性范围和回归方程: 准确吸取备用液 0.10、0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 ml, 用无水乙醇稀释定容至 25 ml, 摇匀, 以无水乙醇作空白, 在 $231 \pm 1\text{ nm}$ 处测定吸光度, 以吸光度与浓度作线性回归处理, 得线性方程为 $C = 28.9328A + 0.1918$, $r = 0.9999$ 。结果表明, SPM 浓度在 $2\text{—}30\ \mu\text{g/ml}$ 时, 吸光度与浓度呈良好的线性关系。



图 1 螺旋霉素紫外吸收图谱

5. 回收试验: 取 SPM 发酵液, 加入 $0.5\% (W/V) Al_2(SO_4)_3$, 搅拌, 过滤。取滤液用 NaOH 调 pH 9.5—10, 各吸取 5.00 ml 于 4 只 60 ml 分液漏斗中, 其中 3 只分别外加不同量 SPM 精制品, 作回收试验。各用 24 ml 氯仿萃取两次, 收集氯仿层于 50 ml 容量瓶中, 用氯仿稀释至刻度, 摇匀, 吸 1.00

ml 萃取液用无水乙醇定容至25 ml, 以含相同氯仿量的无水乙醇作空白, 在 231 ± 1 nm 处测定A值, 用回归方程 计算 含量, 扣除 SPM 发酵液含量后, 计算加量回收率, 结

果见表 1。其平均回收率($n = 6$)为99.7%, CV 为0.6%, 并表明发酵液经氯仿萃取纯化后, 杂质在 231 ± 1 nm 波长处对 SPM 吸收无影响。

表1 螺旋霉素加量回收试验

序 号	加 入 量 ($\mu\text{g/ml}$)	回 收 量 ($\mu\text{g/ml}$)	回 收 率 (%)	平均回收率 (%)	CV (%)
1	1000	990	1001	99.0	100.1
		994	992	99.4	99.2
		994	1004	99.4	100.4
2	2000	1980	2008	99.0	100.4
		1994	1982	99.7	99.1
		1998	2006	99.9	100.3
3	3000	2976	2979	99.2	99.3
		3018	2970	100.6	99.0
		3008	3016	100.3	100.5

7. 样品测定: 取 SPM 发酵液, 加入 0.5%(W/V) $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 搅拌, 过滤。取滤液用 NaOH 调 pH 9.5—10, 吸5.00 ml 于60 ml 分液漏斗中, 各用 24 ml 氯仿萃取两次, 收集氯仿层于 50 ml 量瓶中, 用氯仿稀释至刻度, 摇匀。吸 1.00 ml 萃取液用无水乙醇定容至 25 ml, 以含相同氯仿量的无水乙醇作空白, 在 231 ± 1 nm 处测定A值, 用回归方程计算含量, 并与效价法作比较, 结果见表 2。

表2 发酵液中SPM含量测定结果

批 号	本 法 (u/ml)	效 价 法 (u/ml)	偏 差 (u/ml)
910910	826	844	-18
910927	954	974	-20
911004	1300	1328	-28
911015	1808	1831	-23
911021	1004	1012	-8
911022	998	1021	-23
911102	1621	1632	-11
911104	1522	1548	-16

本法和效价法结果虽有差异, 但具有倾

向性, 不影响生产中间体质量控制。本法可快速得到结果, 及时指导工艺操作, 实用性较强。

讨 论

为了消除发酵液中杂蛋白的干扰, 选用硫酸铝除去杂蛋白。另外, 由于 SPM 显弱碱性, 且易溶于有机溶剂, 实验参考了同类抗生素红霉素的萃取条件^[1], 调整 pH 9.5—10, 使 SPM 最大限度地转入有机相中, 减少了测定误差。

氯仿在 231 ± 1 nm 处有吸收, 严格控制样品和空白液中氯仿量一致, 可提高分析准确度。

本法可用于发酵液生产中 SPM 含量的快速分析。其它中间体, 如滤液、BA 萃取液、结晶液等比发酵液纯净, 故本法有可能推广到发酵液以外其它中间体中。

参 考 文 献

[1] 郭行彦等主编. 抗生素生产工艺学, 北京. 化学工业出版社, 1982, 361~365。