

反相高效液相色谱法测定盐酸四环素 及其杂质4-差向四环素

黄宗玉 洪利娅 (浙江省药品检验所, 杭州 310004)

盐酸四环素是临床上常用的广谱抗生素,但在生产和贮存过程中易产生杂质,如4-差向四环素(4-ETC),4-差向脱水四环素(4-EATC),金霉素(CTC)等。这些杂质的结构和理化性质与四环素十分相似,但生物效价与毒性却不同,这些杂质体内吸收慢,血中浓度低,且毒性大。国内外药典均规定杂质限度,多采用薄层色谱法^[1,2],高效液相色谱法^[3]测定4-差向脱水四环素。本文作者参考文献^[4],对天美制药公司出口的三批四环素原料检验时,发现该原料中的最多杂质并不是4-差向脱水四环素,经薄层,液相与紫外联用,确认是4-差向四环素(4-ETC)。本文将报道盐酸四环素及4-差向四环素和4-差向脱水四环素在不同检测波长的色谱特性。

1 仪器及试剂

1.1 仪器 美国 Waters 高效液相色谱仪 510 泵 490 UV/VIS 检测器, U6K 进样器, 820 数据处理站。UV-260 紫外可见分光光度计。

1.2 试剂 盐酸四环素; 盐酸 4-差向四环素; 盐酸金霉素和盐酸 4-差向脱水四环素对照品(中国药品生物制品检定所); 盐酸四环素原料(浙江天台天美制药公司); 草酸铵、磷酸氢二铵、二甲基乙酰胺、磷酸等试剂均为分析纯。

2 色谱条件

色谱柱: 日本岛津公司(SHIM-PACK CLC-C₈), (0.6×15 cm), 10 μm 粒度; 流动相: 0.1M 草酸铵—0.2M 磷酸氢二铵—二甲基乙酰胺(700:50:250), 7.6±0.1 pH; 流速: 1.7 ml/min, 柱

温: $30 \pm 1^\circ\text{C}$; 检测波长: 380 nm 。

3 样品液相色谱图中最大杂质峰的确认

3.1 色谱保留时间

配制样品浓度为 0.5 mg/ml , 4-差向四环素与 4-差向脱水四环素对照品浓度均为 10 ng/ml 。按检测波长为 280 nm 色谱条件各进样 $10\text{ }\mu\text{l}$, 记录色谱图见图 1、2、3。从色谱保留时间表(见表 1), 说明样品中有 4-差向四环素, 未检出 4-差向脱水四环素。

表 1 色谱保留时间 (min)

峰号	样品	4-ETC对照品	4-EATC对照品
1	4.01	4.03	—
2	—	—	5.33
3	6.38	—	—

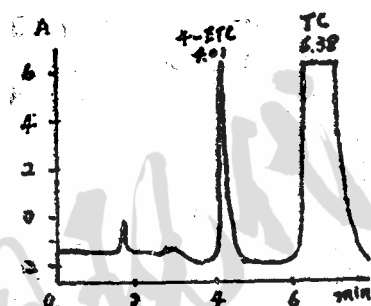


图 1 样品四环素色谱图

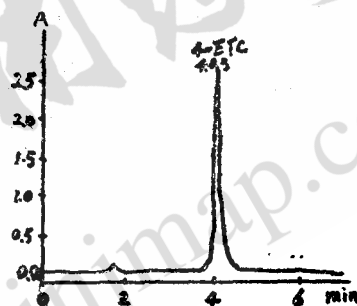


图 2 4-差向四环素色谱图

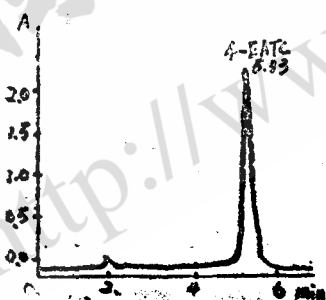


图 3 4-差向脱水四环素色谱图

3.4 薄层色谱

按中国药典(85版)和英国药典(80版)项下规定操作, 薄层色谱图见图 5、图 6, 样品除显盐酸四环素主斑点外, 还显示 4-ETC 斑点, 其荧光强度比相应对照 4-ETC 斑点弱, 未显示 4-EATC 斑点。薄层色谱说明样品中有杂质 4-ETC, 未检出 4-EATC 与液相结果一致。

4 4-差向四环素的回收率

3.2 液相色谱和紫外联用

上述色谱峰流出时, 停泵, 490 检测器, 在 $200 \sim 400\text{ nm}$ 波长处扫描, 将获得光谱图与图 4 4-ETA 紫外光谱图作比较。样品最大杂质峰的光谱图与 4-ETC 最大峰的光谱图基本一致, 有二个最大吸收峰分别为 380 nm 和 280 nm 。

3.3 作不同检测波长的液相色谱图

样品和 4-EATC、4-ETC 溶液作检测波长为 280 nm 和 380 nm 液相色谱图进行比较, 样品色谱图中最大杂质峰面积, 与 4-ETC 的最大峰面积, 在 280 nm 检测时较小, 在 380 nm 检测时较大。与 4-EATC 的最大峰面积在不同检测波长时峰面积变化相反, 这进一步说明样品中最大杂质峰是 4-ETC。

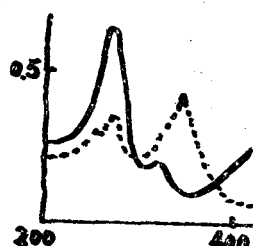


图 4 紫外光谱图

— 4-ETC --- 4-EATC

本文采用标准添加法测定四环素中 4-ETC 成份的回收率, 色谱系统同前, 在不同检测波长时测定结果见表 2。

5 样品的测定结果

采用本文色谱系统, 用外标法测定盐酸四环素中四环素及 4-ETC 的含量结果见表 3。

6 讨论

由于盐酸四环素的菌种或生产工艺不同, 使产

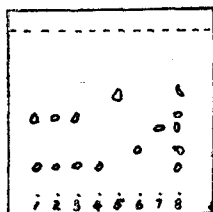


图5 中国药典(85)薄层色谱图

1. 2、3样品(5 mg/ml)
4. 4-ETC(0.2mg/ml)
5. ATC(0.025mg/ml)
6. 4-EATC(0.025mg/ml)
7. CTC(0.1mg/ml)
8. 含TC(0.05mg/ml)
4-ETC(0.2mg/ml)
ATC(0.025mg/ml)
4-EATC(0.025mg/ml)
CTC(0.1mg/ml)混合液

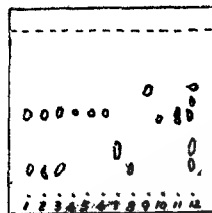


图6 英国药典(80)薄层色谱图

- 1,2,3. 样品(0.50%W/V)
4,5,6样品(0.005%W/V)
7. 4-EATC(0.0025%W)
V)
8. 4-ETC(0.020%W/V)
9. ATC(0.0025%W/V)
10. CTC(0.01%W/V)
11. TC(0.005%W/V)
12. 含7-11各种对照品混合液(浓度均与上述相同)

表2 4-差向四环素回收率(%)

编 号	检测波长 (nm)	
	280	380
1	85.3	98.5
2	86.1	97.8
3	77.4	100.8
4	104.0	101.6
5	107.3	97.7
平均值	92.0±12.9	99.3±1.8

表3 样品测定结果(%)

编号	TC	4-ETC
1	98.9	1.19
2	99.1	0.87
3	98.7	1.30

品中存在的杂质有明显不同,本实验的目的是为建立更适合某些盐酸四环素原料,主要杂质4-差向四环素的检验方法。当选择检测波长 380 nm 时,流动相几乎没有吸收,4-差向四环素的响应大,降低色谱检出限,在0.05—0.2 ng/ml 范围内,呈良好线性。柱温影响分离和响应,柱温增高四环素的理论塔板数也增高,但四环素在碱性流动相中加温使其变质,选择 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 柱温,使检测灵敏度较高,当温度在 10°C 左右时,流动相中盐要析出。

参 考 文 献

- 1 中国药典1985年二部 P365
- 2 英国药典1986年 P448
- 3 美国药典1990年 P1337
- 4 Omura S. Fast liquid chromatography of microlide antikiotics J. Antikiot. 1973, 26: 794