

HPLC 分析庆大霉素组分条件的系统研究

陶巧凤 黄宗玉 (浙江省药品检验所, 杭州 310004)

摘要 系统考察了各国药典 HPLC 分析庆大霉素 C 组分方法中各种因素的影响, 如流动相组成与流速、反离子试剂浓度、待测溶液稳定性等。在上述研究基础上建立的 HPLC 梯度洗脱法, 在 30 min 内即可完成样品分析, 并且 C_1 与相邻各峰也获得了良好分离。该法为庆大霉素质量控制及其质量标准的改进, 提供了新的有效方法。

关键词 HPLC 庆大霉素 梯度洗脱 质量控制

HPLC 分离分析庆大霉素 C 组分 (C_1 、 C_{1a} , C_2 、 C_{2a}) 作为控制庆大霉素质量的有效手段已被 BP、USP 和中国药典等采纳。样品采用邻苯二醛试剂柱前衍生化, 用离子对反相色谱法进行分离测定。但是由于庆大霉素中组分较多, 不易完全分离,

常会引起分析结果的较大误差, 直接影响到庆大霉素质量的控制。本文通过分析上述各国药典现行庆大霉素 C 组分的 HPLC 方法, 考察了流动相醇水比例、离子对试剂浓度、待测溶液的稳定性等因素, 对庆大霉素 C 组分保留行为的影响。建立的梯度洗

脱 HPLC 法, 30 min 内即可使庆大霉素 C 组分与相邻各峰获得良好分离, 适于常规分析, 并为庆大霉素产品的质量控制及其质量标准的改进, 提供了新的有效手段。

1 实验与方法

1.1 药品与试剂 硫酸庆大霉素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号3269112), 硫酸庆大霉素原料(华东制药厂)。邻苯二醛、硫乙醇酸、庚烷磺酸钠、异丙醇、冰醋酸、甲醇均为分析纯。

1.2 HPLC 系统 Waters HPLC 仪配备490紫外检测器和820色谱工作站。分析柱: Spherisorb C₁₈ 5 μm (100 mm×φ4.6 mm)。检测波长: 330 nm 流速: 1.2 ml/min

1.3 方法^[1-3] 样品经邻苯二醛试剂衍生化, 以含庚烷磺酸钠的甲醇:水:冰醋酸为流动相, 经色谱分离, 采用归一化法计算各组分的百分数。

2 结果与讨论

2.1 流动相中醇水比例的影响

庆大霉素 C 各组分对流动相中醇水比例十分敏感(表 1)。甲醇浓度减少可使 C₁ 与相邻峰分离, 但整个分析周期拖长, 甚至无法完成分析。当 C₁ 的

容量因子调整为 2—7 即保留时间控制在 5 min 左右时, 分析周期适当, 但 C₁ 与相邻峰无法分离。可见采用恒比流动相洗脱时, 若要在较短分析时间内使庆大霉素 C₁ 与相邻峰分离有一定困难。

表 1 流动相中醇水比例的影响

		CH ₃ OH:H ₂ O			70:25
		65:30	67:28	69:26	
保 留 时 间 (min)	C ₁	11.3	8	5.8	4.2
	C _{1a}	>60	37.5	24	15
	C _{2a}	—	55	34	21
	C ₂	—	>60	40	24
分离度 C ₁ 与相邻峰		完全分离	部分分离	重叠	重叠
(R) C _{2a} 与C ₂		—	>1.5	>1.5	1.2~1.5

*庚烷磺酸钠浓度40g/l

2.2 离子对试剂浓度的影响

在流动相中醇水比例固定时, 改变离子对试剂浓度, 庆大霉素 C 组分分离情况也随之变化, 当庚烷磺酸钠浓度 >5.0 g/L 时, 在 C₁ 前分离出另一个峰, 但不能完全分开, 这样直接影响到归一化法计算的分析结果(表 2、图 1、图 2)。因此, 离子

表 2 不同离子对试剂浓度的影响

庚 烷 磺 酸 钠 浓 度		4.0		5.0		5.5	
(g/L)		A %	H %	A %	H %	A %	H %
对 照 品	C ₁	39.4	56.7	27.6	52.3	26.4	53.4
	C _{1a}	21.2	16.9	21.9	18.2	23.1	17.8
	C ₂ +C _{2a}	48.4	26.4	50.5	29.5	50.5	28.8

* CH₃OH:H₂O:冰HAc(70:25:5)

对试剂浓度以 5.0 g/L 为宜, C₁ 与相邻峰的分离情况应做统一规定, 否则对边缘产品的分析结果影响尤大。

2.3 待测溶液的稳定性

经邻苯二醛试剂衍生化后的样品溶液放置一段时间后, 色谱图上 C₁ 与 C_{1a} 之间有一弱小峰会逐渐增大, 而 C_{1a}、C_{2a} 则逐渐减小, 此时表明溶液已不稳定(图 3 和 4)。经色谱考察样品待测溶液常温下可稳定 4 h。

2.4 梯度洗脱 HPLC 法

鉴于庆大霉素待测组分欠稳定, 分析时间不宜过长, 并且为了将 C₁ 与相邻峰良好分离, 我们建

立了简便的梯度洗脱 HPLC 法分析庆大霉素 C。具体方法是: 庚烷磺酸钠浓度 5.0 g/L, CH₃OH:H₂O:冰HAc的起始比例是 65:30:5, 12 min 时变为 71:24:5。30 min 即可完成样品分析(图 5)。从图 5 可见 C₁ 与其相邻峰获得很好分离 R>1.5, 基线回零。采用上述方法分析了庆大霉素的实际样品, 结果列于表 3。

另外, 只要调整适当, 流动相流速 1 ml/min~1.5 ml/min 不同规格及长度 C₁₈ 柱、不同型号仪器均可获得相似的结果。

综上所述, HPLC 法分析庆大霉素 C 时, C₁ 的容量因子应控制在 2—7, 庚烷磺酸钠浓度以 5.0

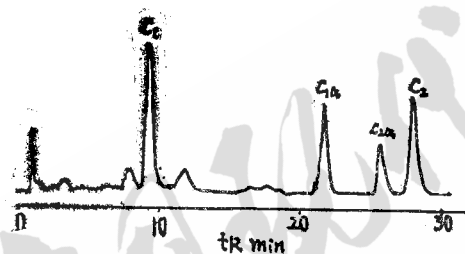


图5 梯度洗脱 HPLC 法分析
庆大霉素时的色谱图

表3 梯度洗脱法分析庆大霉素 e

	对 照 品		样 品 1		样 品 2	
	A %	H %	A %	H %	A %	H %
C ₁	30.6	37.7	27.3	36.3	24.8	32.6
C _{1a}	20.8	24.0	19.4	21.0	22.2	24.4
C ₂ + C _{2a}	48.7	38.3	53.5	42.8	53.0	43.0

g/l 为宜, 衍生化后的样品溶液应在 4 h 内测定。采用梯度洗脱法, 既可使 C₁ 与相邻峰完全分离, 又可使分析周期较为适宜, 而采用恒比流动相洗脱法是无法两者兼顾的。

收稿日期: 1994-05-30

Systematic Studies on the Condition of HPLC Method for Analysis of Contents of Gentamicin

Tao Qiaofeng, Huang Zongyu

(Zhejiang Provincial Institute for Drug Control, Hangzhou 310004)

Abstract This paper studies on the influences of various factors, including components of mobile phase, concentration of ion pair reagent, stability of solution to be determined, etc., in analyzing the contents of gentamicin by HPLC methods which were used in BP, USP, ChP. On the basis of above studies, the gradient elution HPLC method was developed. With this method, the analysis of sample was completed within 30 min, and the C1 was separated well with other peaks nearby. So, it provided a new efficient technique in quality control of gentamicin.

Key words HPLC Gentamicin Gradient elution Quality control