

海南霉素钠分子式的确证及 高效液相色谱 - 蒸发光散射检测方法的建立

温 芳, 张秀英, 王在时, 蒋 卉, 陆连寿

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2013-06-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2013)10-0043-04 [中图分类号] S859.796

[摘 要] 对 2003 年版《兽药质量标准》中收载的海南霉素钠质量标准部分检测项目进行修订研究, 用 Q-TOF 液质联用仪确证了海南霉素钠的分子式为 $C_{47}H_{79}O_{15}Na$ 。建立了海南霉素钠的高效液相色谱 - 蒸发光散射检测方法, 其线性范围为 0.5 ~ 2 mg/mL, 相关系数 r 为 0.9972, 检测限为 0.025 mg/mL, 定量限为 0.05 mg/mL。本试验可为完善海南霉素钠质量标准提供参考。

[关键词] 海南霉素钠; 分子式; 高效液相色谱 - 蒸发光散射法

Determination of the Molecular Formula and Establishment of an HPLC - ELSD Method of Hainanmycin Sodium

WEN Fang, ZHANG Xiu-ying, WANG Zai-shi, JIANG Hui, LU Lian-shou

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: The quality standard of hainanmycin sodium (2003 edition) was revised, and the molecular formula of hainanmycin sodium was confirmed as $C_{47}H_{79}O_{15}Na$ by Q-TOF. An HPLC-ELSD method for the determination of hainanmycin was established. The calibration curve was linear at the range of 0.5 ~ 2 mg/mL ($r = 0.9972$). Limit of detection and quantification was 0.025 mg/mL and 0.05 mg/mL respectively. That would be conducive for the revision of quality standard of hainanmycin sodium.

Key words: hainanmycin sodium; molecular formula; HPLC - ELSD method

海南霉素钠是我国批准的第一个一类新兽药, 产品有原料药和预混剂。《兽药质量标准》2003 年版收载了海南霉素钠质量标准, 但未给出分子式, 含量测定采用微生物效价测定法^[1]。为进一步完善和提高海南霉素钠质量标准, 满足检验检测工作需要, 本研究对原料药质量标准进行了修订研究。

1 材料与方法

1.1 材料 海南霉素钠原料药和标准品 (994.3

单位/mg), 山东胜利股份有限公司提供; 海南霉素对照品 (92.5%), 中国兽医药品监察所。枯草芽孢杆菌 CMCC 63501, 中国食品药品检定研究院。海南霉素专用培养基, 中国兽医药品监察所。液质联用仪 Q-Tof (配电喷雾离子源) 和高效液相色谱仪 2695, Waters 公司; 蒸发光散射检测器 2000ES, 奥泰公司; 抑菌圈测定仪 CHB-1; 北京潮声技术开发公司。三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸缓冲液 (pH = 7.1), 中国兽医药品监察所; 甲醇、甲酸, 色谱纯; 水为符

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划课题子课题“鸡肉中聚醚类抗球虫药物残留检测定值参考物的制备” (2011BAK10B07-4)

作者简介: 温 芳, 硕士, 助理研究员, 从事兽医药理与毒理学研究。E-mail: wenfang@ivdc.gov.cn

合 GB/T6682 规定的一级水。

1.2 海南霉素钠分子式的确证方法

1.2.1 Xevo G₂ Q-Tof 液质联用仪分析方法 色谱条件:流动相为0.1 %甲酸甲醇/水(V/V,90:10),流动注射。海南霉素工作溶液浓度为 20 ng/mL。质谱条件见表 1。

表 1 Q-Tof 液质联用仪质谱条件	
质谱参数	参考数值
ESI	正离子模式
质量范围	50~1000DA
毛细管电压	2.5kV
锥孔电压	35V
萃取锥孔电压	4V
离子源温度	100℃
脱溶剂器温度	250℃
锥空气流速	20L/h
脱溶剂器流速	300L/h
MS/MS 扫描碰撞能	20~55eV

1.2.2 元素分析及核磁分析方法委托中国科学院化学研究所进行检测。

1.3 用 HPLC-ELSD 方法测定海南霉素钠含量

1.3.1 色谱条件 用苯乙基键合硅胶为填充剂(pH 值适用范围 0.8~8.0);以甲醇-水-三氟乙酸(90:10:0.05)为流动相^[2];流速为 1.0 mL/min;用蒸发光散射检测器(参考条件:漂移管温度 110℃,载气流量为 2.5 L/min)检测。理论板数按海南霉素峰计算应不低于 3000,海南霉素峰与其他峰的分度度应符合要求。出峰顺序依次为钠和海南霉素。

1.3.2 方法的专属性 用含 0.05 % 三氟乙酸流动相、0.05 mol/L 氢氧化钠和 5 % 的双氧水分别配制浓度为 1 mg/mL 海南霉素钠溶液,在破坏 4 h 后分别测定。

1.3.3 线性范围考察 用甲醇:水(90:10)配制浓度分别为:2、1.5、1.0、0.75、0.5 mg/mL 的海南霉素溶液,分别进样 10 μL,重复测定三次,计算海南霉素浓度对数值与峰面积对数值的线性回归方程。

1.3.4 检测限和定量限 以信噪比 3:1 作为方法的检测限,10:1 作为方法的定量限,测定海南霉素的检测限和定量限。

1.3.5 精密度考察 配制浓度约为 1 mg/mL 的

海南霉素溶液,进样量 10 μL,连续进样 6 次,计算峰面积的 RSD,应满足方法要求。

1.3.6 方法的耐用性考察 考察漂移管温度、气流量、柱温、流动相比比例以及流速发生微小变化时,对海南霉素分离度的影响。

1.4 海南霉素微生物检定法

1.4.1 菌悬液的制备 将接种于斜面的枯草芽孢杆菌用 5 mL 灭菌生理盐水洗下,取 1 mL,用 5 mL 灭菌生理盐水稀释,摇匀,备用。

1.4.2 平板的制备 底层:取 20 mL 培养基铺于培养皿作为底层;菌层:在培养基中添加 0.2 % 稀释后的菌悬液,摇匀,取 5 mL 铺于底层上。

1.4.3 工作溶液的配制 精密称定海南霉素对照品、海南霉素标准品和 2 份海南霉素原料药各约 50 mg,分别置 50 mL 容量瓶中,加 30 mL 无水乙醇并用三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液(pH=7.1)定容至刻度,配制成 1000 单位/mL 的工作溶液,分别精密量取 5.0 mL 至 50 mL 容量瓶中,用三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液(pH=7.1)定容至刻度得 100 单位/mL 的工作溶液,精密量取 2.0 mL 分别置 50 mL 和 100 mL 容量瓶中,用三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液(pH=7.1)定容至刻度得 2 单位/mL 和 4 单位/mL 的工作溶液,作为二剂量法效价测定的高低两个浓度。

1.4.4 微生物检定方法 依据 2010 年版《中国兽药典》附录 121 页抗生素微生物检定法^[6]中的二剂量法进行检定。

2 结果

2.1 液质分析结果 相关资料中提供的海南霉素钠的分子式为 C₄₇H₇₉O₁₅Na,理论计算值为 906.5317。液质联用仪 Q-Tof 分析得到的海南霉素钠分子量为 906.5318,解析得到分子式为 C₄₇H₇₉O₁₅Na,与相关资料提供的海南霉素钠分子式一致。其质谱图见图 1。

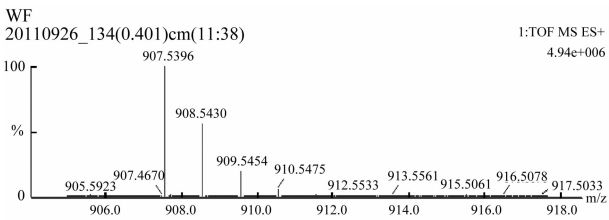


图 1 海南霉素一级质谱图

2.2 元素分析 委托中国科学院化学研究所对海南霉素钠进行元素分析,结果表明测定值和理论值一致,结果见表 2。

表 2 海南霉素钠 C 和 H 元素理论值与测定值		
元素分析值	C 百分含量/%	H 的百分含量/%
理论值	62.23	8.78
1	62.92	8.86
测定值 2	62.95	8.99
平均值	62.94	8.92
偏差值/%	0.71	0.14

2.3 核磁分析 对海南霉素钠原料药进行核磁分析并与相关资料进行对照,结果一致。

2.4 HPLC – ELSD 检测方法

2.4.1 方法的专属性在酸、碱和氧化破坏性试验中,海南霉素钠均发生降解,和降解杂质峰均完全分开,分离度分别为 5.8、1.7 和 6.5(图 2 – 图 4)。

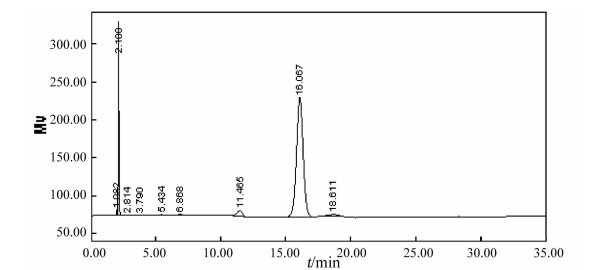


图 2 0.05% 三氟乙酸破坏 4 h 的色谱图

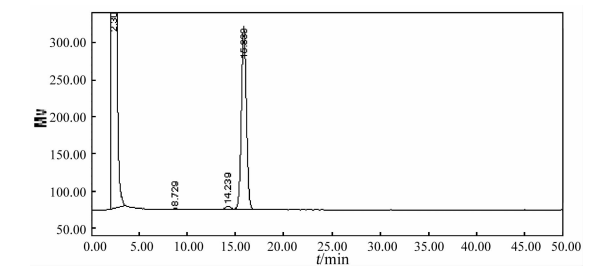


图 3 0.05mol/L 氢氧化钠破坏 4 h 的色谱图

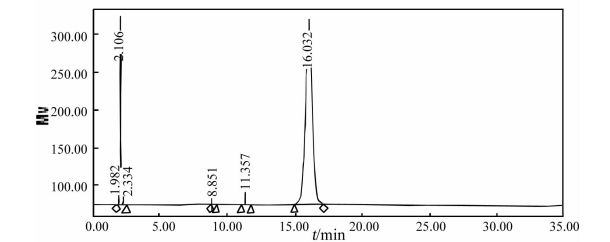


图 4 5% 过氧化氢破坏 4 h 的色谱图

2.4.2 线性范围考察 结果表明,海南霉素浓度在 0.5 ~ 2 mg/mL 之间时,其对数值与峰面积呈良好的线性关系,回归方程为 $y = 0.6489x - 4.5986$,

$r = 0.9981$ 。

2.4.3 检测限和定量限 以信噪比 3:1 为检测限,10:1 为定量限,得到该方法检测限为 0.025 mg/mL,定量限为 0.05 mg/mL。

2.4.4 精密度考察 6 次测定峰面积的平均 RSD 为 1.0%,可满足方法要求。

2.4.5 方法的耐用性考察 由表 3 实验数据可知,漂移管温度、气流量、柱温、流动相比比例以及流速发生微小变化时,均不影响海南霉素的分离效果。

表 3 方法耐用性试验结果统计表			
测定色谱条件	保留时间/min	分离度	
正常色谱条件	16.643	8.29	
漂移管温度/℃	105	16.167	14.99
	115	16.177	7.19
气流量/(L · min ⁻¹)	2.3	16.156	7.94
	2.8	16.006	7.62
柱温/℃	33	17.360	6.61
	37	16.065	4.67
甲醇: 水: 三氟乙酸	88: 12: 0.05	24.563	24.7
	92: 8: 0.05	11.426	8.70
流速/(mL · min ⁻¹)	0.8	22.234	12.60
	1.2	14.849	9.98

2.5 微生物检定法效价测定结果 我所制备的海南霉素对照品(效价值 925 单位/mg)测定海南霉素原料药的效价及山东胜利股份提供的海南霉素标准品(994.3 单位/mg)测定海南霉素原料药的效价结果见表 4。

表 4 海南霉素原料药及对对照品效价测定值			单位/mg
海南霉素	用中监所对照品测定效价值	用厂家提供标准品测定效价值	差值
原料药 1	903	990	87
原料药 2	938	995	57
对照品	925	978	53

由以上试验结果可知,我所制备海南霉素对照品测定厂家提供的 2 批原料药效价值与厂家测定结果差值的偏差小于 5%,且满足 2003 年版质量标准要求,所以我所制备海南霉素对照品(效价值 925 单位/mg)可用于海南霉素效价测定。

3 讨论

比较了 C18 柱和苯基色谱柱的分离效果:C18

柱在约 47 min 分离出海南霉素, 峰形平, 拖尾因子大于 8; 苯基色谱柱在约 16 min 分离出海南霉素, 峰形尖锐, 拖尾因子小于 1.2, 确定用苯基色谱柱进行分离。

用液质联用仪 Q-Tof 得到的两个碎片基团虽然从厂家和相关资料提供的结构式上能得到合理解释, 但不足以对分子结构式进行确证, 并且厂家和相关资料中提供的分子结构式在侧链结构上有所不同, 所以暂不能确定海南霉素钠的分子结构式。

蒸发光散射检测器是一种通用型的质量检测器, 检测时基线稳定, 灵敏度、重现性均较好, 因此中在中药、没有紫外吸收或紫外吸收较弱的药品检测具有较广应用价值^[3-5]。用 HPLC-ELSD 方法测定海南霉素钠可将各组分有效分离^[6], 提高了测定方法的专属性, 并且应用 HPLC-ELSD 方法测定过程简单、快速, 测定结果较抗生素微生物效价测定法更为准确。

本研究对厂家工作标准品和中国兽医药品监察所制备的海南霉素对照品的效价进行了对比研究。中国兽医药品监察所制备海南霉素对照品也可赋值效价单位, 用于海南霉素微生物检定法含量

测定。

在本试验中, 还对海南霉素钠残留溶剂进行了研究, 通过气相色谱顶空进样测定, 未检测到工艺过程中使用的甲醇溶剂, 但检测到几个含量较高的杂质峰。与进样石油醚样品进行比对, 部分峰可比对上, 这可能和生产工艺中最后两步用石油醚提取有关, 建议对生产工艺进一步改进, 提高产品质量。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部. 兽药质量标准二〇〇三年版[S].
- [2] 中国兽医药品监察所. 兽药残留检测标准操作规程[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009: 251-257.
- [3] Rissler K. High-performance liquid chromatography and detection of polyethers and their mono(carboxy)alkyl and -arylalkyl substituted derivatives [J]. J Chromatogr A, 1996, 742: 1-54.
- [4] 魏 泱, 丁明玉. 蒸发光散射检测技术[J]. 色谱, 2000, (5): 22-25.
- [5] 冯埃生, 邹汉法, 汪海林, 等. 影响高效液相色谱/挥发激光散射检测器检测性能基本因素的考察[J]. 药物分析杂志, 1996, (6): 414-417.
- [6] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二〇一〇年版一部[S].

(责任编辑: 李文平)