

用液相色谱二极管阵列检测器测定多氧霉素

孙忠松 刘钢 牛增元 马昕

(山东商检局化矿金检验所,青岛 266002)

摘要 在不同 pH 值的条件下,多氧霉素 B 的吸收光谱会发生变化。为此选择无干扰的吸收波长,优化测定条件,建立液相色谱—二极管阵列检测器定量及定性检测多氧霉素 B 的方法。本方法快速简便,准确可靠。

关键词 多氧霉素 B 液相色谱—二极管阵列检测器 pH 值

保丽安是日本科研制药株式会社生产的一种广谱性抗生素类杀菌剂,可用于水稻、小麦、水果等多种作物,其有效成分多氧霉素 B 是可可链霉菌素阿苏变种产生的代谢物^[1]。目前尚未见液相色谱二极管阵列检测器(HPLC-DAD)法测定保丽安中多氧霉素 B 的报道。我们根据在不同 pH 值的条件下多氧霉素 B 吸收光谱的变化,选择干扰小、有特征的吸收波长,并通过优化实验来选定色谱柱及流动相等条件,采用此法测定保丽安中多氧霉素 B。本方法快速、简便,具有较高的准确度和精密度,解决了进口农药保丽安的检验问题。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

HP 1090 高效液相色谱仪:配有 DAD 检测器;

色谱柱:250 mm×4.5 mm(内径),填料为 YWG-CN,粒径为 5 μm;

超声波水浴;

过滤器;

乙酸铵缓冲溶液:pH=4;

超纯水;

多氧霉素 B 标准样品:1540 Am Bu/mg,日本农林水产省农药检验所提供;

多氧霉素 B 标准工作液:准确称取标准样品 0.0200 g 于 50 mL 容量瓶中,加乙酸铵缓冲溶液溶解后稀释至刻度。

1.2 色谱条件

检测波长:270 nm;

流动相:pH=4 乙酸铵缓冲溶液;

流速:0.8 mL/min;

进样量:4 μL。

1.3 测定步骤

标准曲线的制作 分别注射标准工作液 1 μL、

2 μL、3 μL、4 μL、5 μL 作检测器线性测定,回归方程 $Y = 441.98082 X + 12.22534$, 相关系数 $r = 0.9997$ 。

样品的测定 为使测定值在仪器的检测线性范围内,根据样品中多氧霉素 B 的含量称取适量的样品,用 pH=4 乙酸铵缓冲溶液定容和超声溶解,采用外标法定量。标准品与样品的定容体积一致,进样量相同。样品在进样前需用微孔滤膜过滤。标准色谱图和样品图见图 1、图 2。

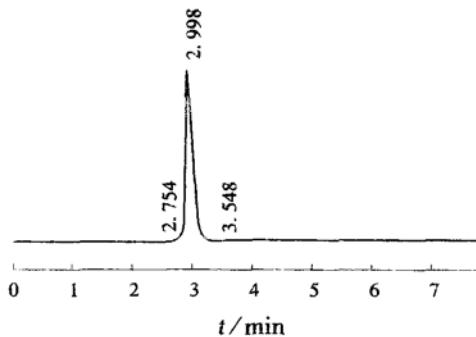


图 1 多氧霉素 B 的标准色谱图

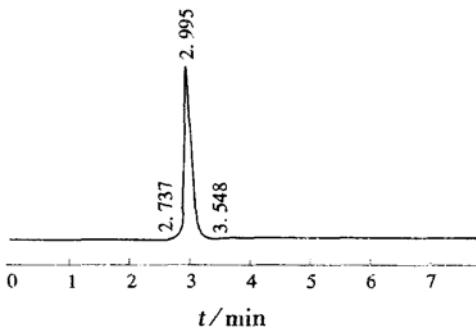


图 2 样品的色谱图

结果计算与表达 按下式计算样品中多氧霉素 B 的含量:

$$X = (A_1 \times G_2 / A_2 \times G_1) \times 100$$

式中:X——多氧霉素 B 的含量,%;



A_1 ——样品的峰面积;
 A_2 ——标准品的峰面积;
 G_1 ——样品称样量,g;
 G_2 ——标准品称样量,g。

2 结果与讨论

2.1 测定波长的选择

多氧霉素 B 在碱性溶液中不稳定,在酸性条件下性质也有较大的变化,为此在不同 pH 值条件下测定其光谱吸收。波长在 400 nm 以上,多氧霉素 B 基本没有吸收,因此选定扫描的波长范围为 200~400 nm,如图 3 所示。

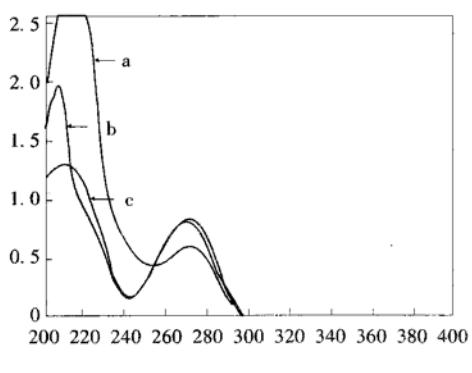


图 3 多氧霉素 B 的光谱吸收

从图中可以看出,pH 值在 7~3 之间时波长 230~340 nm 的光谱吸收没有变化。当 pH>9 或 pH<3 时波长 200~230 nm 的光谱吸收变化非常明显,表明在此条件下多氧霉素 B 的吸收强度变化大,不易准确定量,因此选定检测波长为 270 nm、pH=4 的乙酸铵缓冲溶液。在此条件下多氧霉素 B 的吸收光谱稳定,可以进行准确的定量测定。

2.2 色谱柱和流动相的选择

根据文献报道分析,抗菌素类药物常用的固定相有 C₁₈、C₈、氨基柱、氰基柱等^[2]。实验表明,多氧霉素 B 在 C₁₈、C₈、氨基柱上保留弱,样品中的杂质不能与多氧霉素 B 有效地分离,而在氰基柱上有较强的保留,分离效果好。

流动相的选择主要考虑 pH 值对分当 pH 值由小变大时,多氧霉素 B 在柱上当 pH 值 > 5 时峰形开始拖尾,影响定量;pH 值 < 3 会影响柱的寿命,因此最终选择 pH=4 的乙酸铵缓冲溶液。

2.3 DAD 的光谱定性研究

由于多氧霉素是含有 A 至 N 14 种不同同系物的混合物,为肽嘧啶核苷酸抗菌类,结构不同其药理性质也就不同。经典的分析方法如微生物法、分光光度法在定性方面有一定的局限性,本方法根据多氧霉素 B 在选定的 pH 值下有特征的光谱吸收,用液相色谱 - 二极管阵列检测技术对组分进行定性分析。

2.4 精密度和准确度实验

对同一样品进行 6 次测定计算,其标准偏差见表 1,标准品的添加回收实验见表 2。

表 1 多氧霉素 B 的精密度实验结果

测定次数	1	2	3	4	5	6
测定值/%	10.04	10.03	10.05	10.03	10.06	10.08
平均值/%			10.05			
标准偏差 S			0.02			
变异系数 CV/%			0.2			

表 2 在已知样品中加入标准品测定回收率

标准品添加量/mg	20	30	40
回收值/mg	19.8	29.8	39.8
回收率/%	99.0	99.3	99.5

从上述实验数据看出,回收率在 99% 以上,标准偏差为 0.02,本方法精密度好,准确度高。

3 结论

通过调变 pH 值选择合适的检测波长,利用液相色谱分离,二极管阵列检测器检测,建立进口农药保丽安中多氧霉素 B 的定量和定性方法。本方法快速、准确、可靠、满足了进口检验的要求。

参 考 文 献

- 王焕民,等.新编农药手册.北京:农业出版社,1989.
- 朱彭龄,等.现代液相色谱分析.兰州:兰州大学出版社,1989.

DETERMINATION OF POLYOXIN B BY HPLC-DAD

Sun Zhongsong, Liu Gang, Niu Zengyuan, Ma Xin

(Shandong I & E Commodity Inspection Bureau, Qingdao 266002)

ABSTRACT The absorbing spectrum of Polyoxin B is changed under different pH values. So the absorbing wavelength is selected, the operating condition optimized, and the quantitative and qualitative determination method on Polyoxin B by HPLC-DAD established.

KEYWORDS polyoxin B, HPLC-DAD, pH value