

反相高效液相色谱法柱后调节 pH 胶束增敏荧光检测四环素类药物的研究*

傅承光 徐宏达

(河北大学理化分析研究中心 保定 071002)

摘要 研究了适于分离检测四环素类药物的高效液相色谱荧光检测方法。为提高分析灵敏度,使用了柱后调节 pH 技术。探讨了 pH 以及胶束浓度对荧光强度的影响。四种药物的检出限达 8.0~75.6pg 的水平。

关键词 反相高效液相色谱法,四环素,荧光检测,柱后 pH 调节,胶束

1 前言

在药物分析中,对四环素类药物的分析一直是使人瞩目的研究课题。应用高效液相色谱分析四环素类药物已有报道^[1,2],其灵敏度多处于 ng 级水平。近期已有荧光检测的文献发表^[3],由于使用了高聚合物多孔微球 C₁₈键合相柱,在流动相 pH 高达 12 条件下,测定了金霉素。本文使用常规的反相色谱条件,结合柱后调节 pH 及胶束增敏,建立荧光检测方法,进一步提高了灵敏度。4 种四环素类药物同时测定,检出限达到 8.0~75.6pg。

2 实验部分

2.1 仪器

美国 Beckman 114M 型单柱塞高压输液泵,日本 Shimadzu RF-535 荧光分光光度检测器,美国 Rheodyne 7125 型进样阀,美国 Aldex E-120-S-2 型柱后调节 pH 用输液泵,混合室(自制),Gould BS-271 型单记录仪,pH 测量池(自制)。

2.2 试剂

四环素、金霉素、脱氧四环素和脱水四环素均由北京中国生物制品与药品检定所提供。溴代十六烷基三甲胺、草酸、碳酸钾均为分析纯。甲醇为优级纯。石英三次重蒸馏水。

2.3 色谱条件

色谱柱:SHIMPACK C₈(5μm, 150×6.0mm i. d.)。流动相为甲醇:水(43:57, V/V),用草酸调节 pH 至 3.2,流量为 0.4mL/min。在柱后调节 pH 溶液中含有浓度为 0.15mol/L 的 K₂CO₃,并添加了浓度为 70mg/L 的溴代十六烷基三甲胺(CTMAB),溶剂为三次蒸馏水。调节柱后溶液的流量,使其在混

合室中与 pH 为 3.2 的柱流出液混合,混合液的 pH 被调节为 10.7,此值由荧光检测池后安装的 pH 测量池(自制,体积小于 1mL)测出,还可在线监测柱后的 pH 变化。荧光检测的激发波长为 385nm,发射波长为 470nm。应用此条件获得四环素类药物的标准混合物色谱图,见图 1。

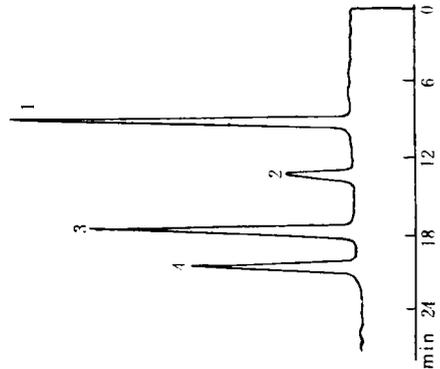


图 1 4 种四环素类药物标准混合物色谱图

1. 四环素, 2. 金霉素, 3. 脱氧四环素, 4. 脱水四环素。色谱条件见正文。

3 结果和讨论

3.1 四环素类药物的分离

四环素类药物分子的可离解基团,在反相流动相中可以离解;控制流动相的 pH 小于 3.3 时,只有 A 环第四碳原子上的二甲氨基基团离解为一价正离子^[4];它可与流动相中的草酸根形成离子对,满足了改善分离之目的。

3.2 四环素类药物的荧光检测

3.2.1 介质 pH 条件对荧光强度的影响

已知四环素在碱性条件下可以实现荧光光度测定。本文使用柱后调节 pH 方式,将流动相的 pH 由

* 为祝贺卢佩章先生(院士)七十华诞而作
本文收稿日期:1995年5月16日

3.2 调节至碱性的 pH 范围,实行荧光检测。但实验证明,随柱后 pH 调节碱液中表面活性剂 CTMAB 的添加与否获得的最佳 pH 各不相同。也研究了改变 CTMAB 浓度在 20~50mg/L 范围内对确定的 pH 影响反而不大;但随 CTMAB 浓度增大,有利于提高四环素类各组分相应的荧光强度。图 2 即表示在柱后碱液中添加了浓度为 20mg/L 的 CTMAB 之后,用于柱后调节 pH,取相同量标准混合物进样,测得不同 pH 条件下各组分的荧光强度。

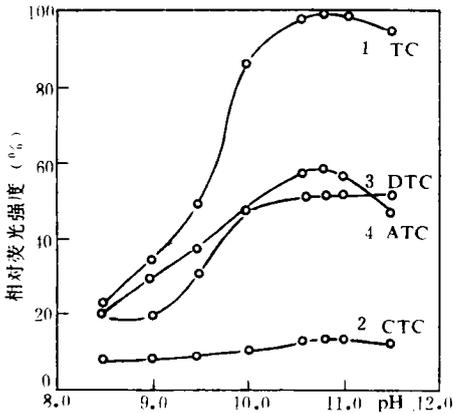


图 2 改变柱后流出液的 pH 对四环素类各组分相对荧光强度的影响

在柱后调节 pH 的溶液中, K_2CO_3 为 0.15mol/L。为适当提高荧光强度,在溶液中添加 CTMAB 20mg/L,此溶液与柱流出液混合后的 pH 值,即为图 2 中所示值。峰号同图 1。

图 2 表明在有 CTMAB 存在时,四环素类药物荧光检测的最佳 pH 条件为 10.7~10.8。

3.2.2 表面活性剂浓度对荧光强度的影响

为了选定四环素类各组分达到最大荧光强度时在碱液中添加 CTMAB 的最佳浓度,配制了含 CTMAB 浓度由 10mg/L 至 100mg/L 的柱后溶液系列,其中 K_2CO_3 的浓度固定为 0.15mol/L。实验中控制进入荧光检测池溶液的 pH 均为 10.7,观察

溴代十六烷基三甲胺浓度不同对四环素类各组分荧光强度的影响,见图 3。图 3 表明,最佳浓度为 70mg/L。由于表面活性剂的使用,使四环素类药物的荧光发射增强。这是因为在测定四环素分子荧光的介质中,添加了适量表面活性剂,改变了体系的微环境,使四环素分子处于有序的胶束之中,减少了由于碰撞引起的能量损失,保护了处于激发单重态的四环素分子,有利于辐射去活化过程,从而提高了量子产率,导致四环素分子荧光发射增强。

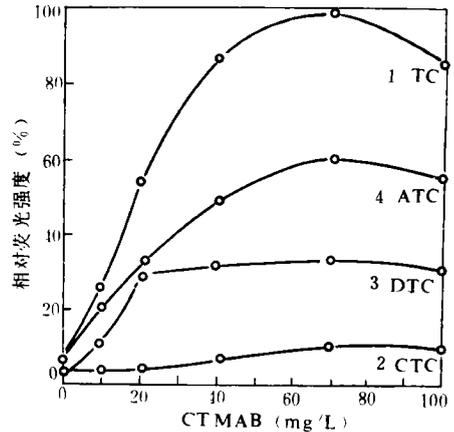


图 3 改变柱后调节 pH 溶液中的 CTMAB 浓度对四环素类各组分相对荧光强度的影响

固定柱后调节 pH 溶液中的 K_2CO_3 为 0.15mol/L。只改变 CTMAB 的浓度,此溶液与柱流出液混合后的 pH 值均控制为 10.7。图中峰号与图 1 相同。

3.3 定量参数

按照文中选定的分离、检测条件,平行试验 7 次,以检验方法的精密性。配制 6 个不同浓度的四环素标准混合液,每个混合液均按上述条件进行 7 次,以测得的色谱平均峰高(mm)对四环素类药物含量 (pg)求得回归方程和相关系数。以 2 倍信噪比求得检出限(pg),结果见表 1。

表 1 方法的线性范围、回归方程、相关系数、检出限和方法的精密性

化合物	线性范围 (pg)	回归方程	相关系数	检出限 (pg)	RSD (%)
四环素	70.1~7006	$Y=0.244X+0.951$	0.999	8.0	1.04
金霉素	120.9~12095	$Y=0.025X-0.675$	0.999	75.6	1.21
脱氧四环素	222.5~22250	$Y=0.054X+2.232$	0.998	35.9	1.52
脱水四环素	144.4~14440	$Y=0.058X-6.444$	0.998	35.2	1.12

上述结果表明,已建立的分析方法适于测定样品中痕量四环素类药物。方法的检出限优于近期发表的文献^[5]。

参 考 文 献

1 Oka H, Matsumoto H, Uno K. J Chromatogr, 1985;

325;265
2 傅承光,徐宏达.第六次全国色谱学术报告会文集(下册),上海,1987:L-48
3 Blanchflower W J, McCrachen R J, Race D A. Analyst, 1989;114(4):421

4 Know J H, Jurand J. J Chromatogr, 1979; 186:763

1992;623:153

5 Iwaki K, Okumura N, Yamazaki M. J Chromatogr,

Fluorescence Detection of Tetracyclines by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography/Post-Column pH Adjustment and Fluorescence Enhancement with Micella

Fu Chenguang and Xu Hongda

(Research Centre of Physical and Chemical Analysis, Hebei University, Baoding, 071002)

In this paper, a preliminary investigation of a reversed-phase high performance liquid chromatography-post column pH adjustment for fluorescent detection is presented for the analysis of tetracyclines, and in the pH adjustment solution a micelle (cetyl trimethyl ammonium bromide, CTMAB) for enhancing the fluorescence intensity of tetracyclines was added. The optimization of the analytical conditions was established, such as the optimal concentration of CTMAB was 70mg/L, the post-column pH value for fluorescence detection was 10.7~10.8 and the excitation and emission wavelengths were 385nm and 470nm respectively. The detection limits of tetracyclines (TC, CTC, DTC and ATC) were 8.0, 75.6, 35.9 and 35.2pg respectively.

Key words reversed-phase high performance liquid chromatography, tetracyclines, fluorescent detection, post-column pH adjustment, micelle

· 书讯 · 《高效液相色谱法及其专家系统》征购

由中国科学院大连化学物理研究所-国家色谱研究分析中心卢佩章、张玉奎研究员和梁鑫淼博士共同编著的《高效液相色谱法及其专家系统》一书由辽宁科学技术出版社正式出版。该书是基于大连化学物理研究所这个集体自七十年代初至今对高效液相色谱柱、仪器、色谱方法以及近几年发展的色谱专家系统的研究成果,通过作者系统地总结编写而成的。全书共 48.4 万字,分六章。书价 37 元/本,包装费 2.5 元/本,邮费 5.5 元/本,共 45 元。

新书《离子对高效液相色谱法》征购

中科院大连化学物理研究所-国家色谱研究分析中心邹汉法教授、张玉奎教授和卢佩章院士合著的《离子对高效液相色谱法》已于 1994 年 10 月由河南科学技术出版社出版发行。

本书共分十二章。第一章介绍了液相色谱法的发展史。第二、三章介绍了液相色谱中的基本参数及选择各种液相色谱分离模式的方法原理。第四~第六章介绍了离子对色谱法的保留机理和离子对色谱法分离条件最优化的方法。第七章是常用的离子对色谱检测器检测原理的介绍。第八~十二章是近来离子对色谱法在无机离子的分离分析、离子性手性对映体的分离、生物化学、临床医学和药品以及其他方面的应用举例和综述。

该书定价 15 元,邮费、包装费 5 元,合计 20 元。

欲购者请将款汇至:大连市中山路 161 号 国家色谱研究分析中心 于宋顺收,联系电话:3631841—355。