

四环素类抗生素的 RP-HPLC 分析

杨大军 张 瑞

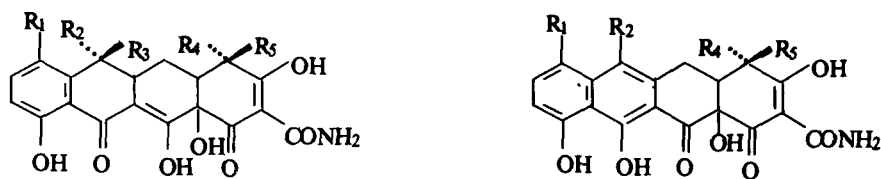
(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要 报道了用反相高效液相色谱分析去甲基金霉素等四环素类抗生素和它们的差向异构体以及其脱水物的方法。采用 Waters 10 C₁₈ 4.6 mm ID × 250 mm 的色谱柱, 以 14% 乙腈—3% 二甲基甲酰胺—83% 0.02 mol/L 柠檬酸水溶液为流动相, 流速 1.0 ml/min, UV 350 nm 检测, 可将四环素、去甲基金霉素、金霉素、去甲基金霉素和它们的差向异构体八种化合物完全分离; 以 15% 乙腈—15% 二甲基甲酰胺—70% 0.02 mol/L 柠檬酸水溶液为流动相, 流速 1.0 ml/min, UV 270 nm 检测, 可将上述抗生素及其差向异构体以及它们的脱水物十六种化合物分离。它们的发酵液经简单处理亦可直接进样分析。同时还考查了 pH、溶剂等因素对分析的影响。

关键词 四环素; 去甲基金霉素; 高效液相色谱法

四环素类抗生素在结构上有两个特点: 一是这一类化合物的结构十分相似, 具有相同的骨架, 只是个别取代基和取代基的空间位置不同, 见表 1; 二是这类抗生素在水中存在一电离平衡⁽⁸⁾, 一种抗生素总是以多种离子状态存在。四环素类抗生素的差向异构体及脱水物常常伴随它们存在, 这就使得它们的分离比较困难, 常用的微生物法、纸层析法、TLC 法对这类化合物的分离都不能令人满意, 为此我们进行了 HPLC 的分析研究。

Tab 1 Abbreviations and structures of the tetracyclines



Structure 1

Structure 2

Compound	Abbreviation	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Structure
Tetracycline	TC	-H	-CH ₃	-OH	-N(CH ₃) ₂	-H	1
Epi-tetracycline	ETC	-H	-CH ₃	-OH	-H	-N(CH ₃) ₂	1
Anhydro-tetracycline	ATC	-H	-CH ₃	—	-N(CH ₃) ₂	-H	2
Epi-anhydro-tetracycline	EATC	-H	-CH ₃	—	-H	-N(CH ₃) ₂	2
Demethylchlortetracycline	DMCTC	-Cl	-H	-OH	-N(CH ₃) ₂	-H	1
Epi-demethylchlortetracycline	EDMCTC	-Cl	-H	-OH	-H	-N(CH ₃) ₂	1
Anhydro-demethylchlortetracycline	ADMCTC	-Cl	-H	—	-N(CH ₃) ₂	-H	2
Epi-anhydro-demethylchlortetracycline	EADMCTC	-Cl	-H	—	-H	-N(CH ₃) ₂	2
Demethyltetracycline	DMTC	-H	-H	-OH	-N(CH ₃) ₂	-H	1
Chlortetracycline	CTC	-Cl	-CH ₃	-OH	-N(CH ₃) ₂	-H	1

四环素类抗生素的 HPLC 分析, 国外虽已有大量报道, 但未见有同时分离四环素(TC)、去甲基四环素(DMTC)、金霉素(CTC)、去甲基金霉素(DMCTC)以及它们的差向异构体的报道。已报道的方法主要有离子交换色谱法和反相色谱法。由于离子交换色谱法要求条件严格, 分离效果和柱效又都低于反相色谱法, 所以近年的报道以反相色谱法较多。反相色谱法用于四环素类化合物的分离主要分为两大类: 一是在强酸性(pH1~3)条件下分离^(1~6); 一是在弱酸性(pH3~5)条件下加入 EDTA, 利用 EDTA 与四环素等形成螯合物而进行分离^(7~9)。

实验部分

岛津 LC-4A 高效液相色谱仪, 带有可变波长岛津 SPD-2AS 紫外检测器、岛津 C-R2A 数据处理机、岛津 SIL-2AS(25 μ l) 自动进样器。色谱柱为 Waters 10 C₁₈ 4.6 mm ID \times 250 mm 柱。

所用试剂均为分析纯, 水为去离子水。盐酸去甲基金霉素为 Sigma 产品, 盐酸四环素及差向异构体、脱水物和金霉素为中国药品生物制品检定所标准品, 去甲基四环素及其它差向异构体和脱水物为自制。

去甲基金霉素等抗生素的分析

以 14% 乙腈—3% 二甲基甲酰胺—83% 0.02 mol/L 柠檬酸水溶液为流动相, 流速 1.0 ml/min, UV 350 nm 检测, 可将 TC, DMTC, CTC, DMCTC 和它们的 4 位差向异构体完全分离, 见图 1D。

洗脱溶剂的比较

文献报道洗脱溶剂用二甲基甲酰胺(DMF)时的峰对称性优于乙腈, 乙腈又优于甲醇⁽⁸⁾。在我们的实验中也证实了这一点。选用单一有机溶剂的分离效果都不理想, 见图 1 A, B, C, 为此选择了分离较好的乙腈为主, 加入少量可使峰形改良的 DMF, 以 14% 乙腈中加 3% 二甲基甲酰胺比较合适(图 1D), 可使上述八种抗生素达到基线分离。

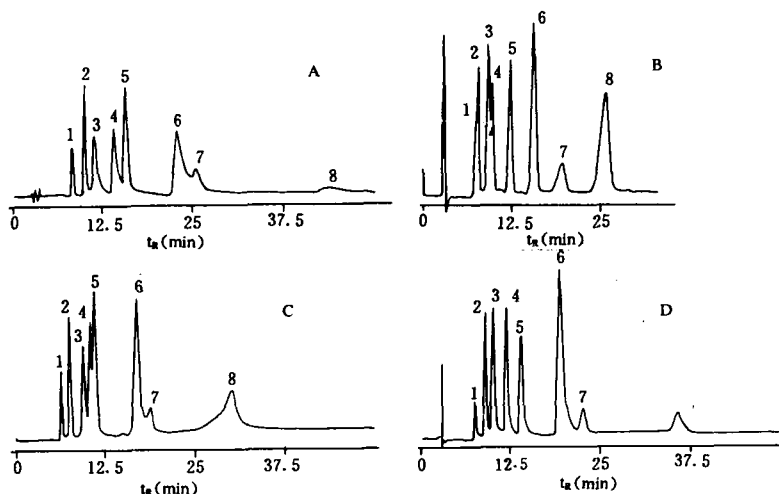


Fig 1 Chromatograms of tetracyclines on Waters 10 C₁₈ 4.6 mm ID \times 250 mm with various eluents. A. Acetonitrile—0.02 mol/L citric acid (14:86.); B. Dimethylformamide—0.02 mol/L citric acid (25:75.); C. Methanol—0.02 mol/L citric acid (25:75.); D. Acetonitrile—dimethylformamide—0.02 mol/L citric acid (14:3:83), Detector: UV, 350 nm. Temperature: 25 $^{\circ}$ C. Flow rate: 1 ml/min. Peaks: 1 = epi-demethyltetracycline; 2 = epi-tetracycline; 3 = demethyltetracycline; 4 = tetracycline; 5 = eip-demethylchlortetracycline; 6 = demethylchlortetracycline; 7 = epi-chlortetracycline; 8 = chlortetracycline.

pH 的影响

分别试验了强酸性条件和加入 EDTA 的弱酸性条件, 结果表明在峰对称性和分离度上, 前者优于后者。酸性增强, 保留时间延长, 峰对称性变好, 各峰之间分离度增大, 但酸性太强又影响色谱柱的使用寿命, 因此选择 pH 2.5 左右, 既能达到完全分离的要求, 峰形也好, pH 又在色谱柱的使用范围(2~8)之内。

柠檬酸含量的影响

流动相中不使用柠檬酸时, 分离情况和峰形都不好, 加入柠檬酸后, 各峰变的十分尖锐且易于分离。其含量对峰形和分离的影响不大, 浓度为 0.02 mol/L (pH \approx 2.5)左右, 其保留时间变化较小, 这时四环素等主要以阳离子存在, 它可和柠檬酸根形成离子对, 由于二甲氨基是差向异构的部位, 形成离子对后, 增大差向异构体之间的差别, 因而使其更好的分离。

离子强度的影响

在流动相中加入氯化钠提高离子强度, 随着离子强度的增加, 保留时间增长, 但对峰形和分离影响不大。

层析温度的影响

层析温度升高, 保留时间缩短, 对峰形和分离影响不大。

定量分析

标准曲线 分别测定各化合物不同进样量的峰面积, 得其标准曲线的回归方程如下: TC 进样量(μg) = $0.1059 + 1.4877 \times 10^{-5} \times$ 峰面积($0.1 \sim 8\mu\text{g}$), $r = 0.9999$; DMTC 进样量(μg) = $0.1073 + 2.4039 \times 10^{-5} \times$ 峰面积($0.2 \sim 10\mu\text{g}$), $r = 0.9999$; EDMCTC 进样量(μg) = $0.0891 + 3.2392 \times 10^{-6} \times$ 峰面积($0.2 \sim 4\mu\text{g}$), $r = 0.9997$; DMCTC 进样量(μg) = $0.1288 + 2.9328 \times 10^{-6} \times$ 峰面积($0.2 \sim 10\mu\text{g}$), $r = 0.9999$; CTC 进样量(μg) = $0.2989 + 6.5333 \times 10^{-6} \times$ 峰面积($0.2 \sim 3\mu\text{g}$), $r = 0.9992$ 。其相关系数均大于 0.999, 表明进样量与峰面积呈很好的线性关系。

回收率和变异系数 将各标准品按一定比例混合, 经分析计算得回收率和变异系数($n = 5$)分别为 TC: 101.84%, 1.33%; DMTC: 100.97%, 1.28%; EDMCTC: 99.02%, 2.51%; DMCTC: 101.24%, 1.87%; CTC: 98.98%, 2.86%。结果表明此法准确, 重现性良好。

四环素类脱水物的分离

TC, DMTC, CTC, DMCTC 四种四环素类抗生素由于不稳定可产生相应的四种 4 位差向异构, 它们又可产生相应的八种脱水物。对于脱水物的分离, 用二甲基甲酰胺时峰对称性明显好于乙腈和甲醇, 但使用单一有机溶剂也不能将它们全部分离。试验了多种混合溶剂以及梯度洗脱的方法, 以 15% 乙腈—15% DMF—70% 0.02 mol/L 柠檬酸水溶液为流动相, 对这 16 种化合物的分离效果较好(图 2); 以 35% DMF—5% 乙腈—60% 0.02 mol/L 柠檬酸水溶液为流动相, 可将 DMCTC 脱水物与其它四环素类脱水物完全分离。

检测波长的选择

由于发酵液中常有在 270 nm 有吸收而在 350 nm 无吸收的杂质, 故选择以 350 nm 检测, 可排除这些杂质的干扰, 但脱水物在 350 nm 无吸收, 在 270 nm 有吸收, 故在测定脱水物时以 270 nm 检测。

发酵液的分析

在发酵液中加入少量柠檬酸, 使菌丝中抗生素释放出, 同时沉淀蛋白质, 离心后, 上清液加入等体积的乙醇, 摇匀, 放置, 再离心去沉淀, 上清液经微孔滤膜过滤后即可进样分析。

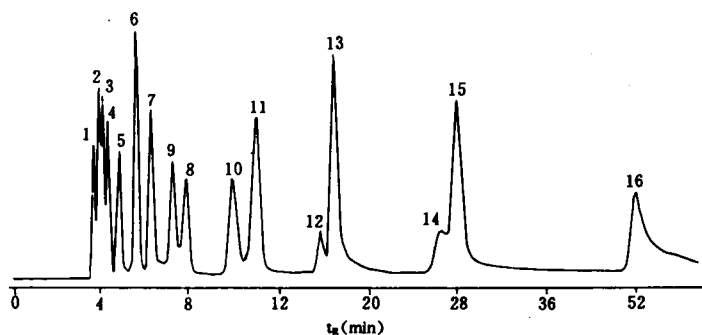


Fig2 Chromatogram of test mixtures of some tetracyclines and anhydrides on Waters 10 C₁₈ 4.6 mm ID×250nm. Eluent : acetonitrile — dimethylformamide — 0.02 mol/L citric acid (15 : 15 : 70); Detector : UV 270 nm ; Temperature : 35 °C ; Flow - rate : 1 ml/min ; Peak : peaks 1 ~ 8 are same as Fig 1 ; 9 = epi - anhydro - demethyltetracycline ; 10 = anhydro - demethyltetracycline ; 11 = epi - anhydro - tetracycline ; 12 = epi - anhydro - demethylchlortetracycline ; 13 = anhydro - tetracycline ; 14 = anhydro - demethylchlortetracycline ; 15 = epi - anhydro - chlortetracycline ; 16 = anhydro - chlortetracycline.

参 考 文 献

- 1 Tsuji K and Robertson JH. Analysis of tetracycline in pharmaceutical preparations by improved HPLC method. *J Pharm Sci* 1976 ; 65 : 400 .
- 2 Sharma JP, et al. Reversed phase HPLC determination of tetracyclines in urine and plasma. *J Chromatogr* 1977 ; 134 : 441.
- 3 De Leenheer AP and Nelis HJCF. Reversed phase HPLC of doxycycline. *Ibid* 1977 ; 140 : 293 .
- 4 Knox JH and Pryde A. Separation of tetracyclines by HPLC. *Ibid* 1975 ; 110 : 103 .
- 5 Iwuagwu MA. Reversed phase HPLC separation of tetracycline, anhydrotetracycline and their C4 - epimers. *Niger J Pharm Sci* 1986 ; 2 : 83 .
- 6 Oka H, et al. Improvement of chemical analysis of antibiotics. IX. A simple method for residual tetracyclines analysis in honey using a tandem cartridge clean - up system. *J Chromatogr* 1987 ; 389 : 417 .
- 7 Mack GD and Ashworth RB. A HPLC system for the analysis of tetracycline drug standards, analogs, degradation products and other impurities. *J Chromatogr Sci* 1978 ; 16 : 93 .
- 8 Knox JH and Jurand J. Mechanism of reversed phase separation of tetracyclines by HPLC. *J Chromatogr* 1979 ; 186 : 763.
- 9 Reeuwijk HJEM and Tjaden UR. HPLC of tetracyclines. *Ibid* 1986 ; 353 : 339 .

REVERSED PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF TETRACYCLINES

DJ Yang and R Zhang

(*Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050*)

ABSTRACT The present paper describes a quantitative determination method of tetracyclines by reversed phase high performance liquid chromatography.

The method used a Waters 10 C₁₈ 4.6 nm ID × 250 nm reversed phase column, with a mobile phase composed of 14% acetonitrile-3% dimethylformamide-83% water containing 0.02 mol/L citric acid (pH ≈ 2.5), the detector wavelength was set at 350 nm, and the flow rate was maintained at 1.0 ml/min. Demethylchlortetracycline, epi-demethylchlortetracycline, demethyltetracycline, epi-demethyltetracycline, tetracycline, epi-tetracycline, chlortetracycline and epi-chlortetracycline can be separated highly efficiently. The tetracyclines and their anhydro-products can be separated on the same column with 15% acetonitrile-15% dimethylformamide-70% 0.02 mol/L citric acid as the mobile phase, and detected at UV 270 nm.

Key words Tetracyclines; Demethylchlortetracycline; RP-HPLC