

◆ 开发与分析 ◆

柱前衍生化反相高效液相色谱法 测定春雷霉素

张佳庆, 杨闻翰*, 张 丹, 侯德粉

(沈阳沈化院测试技术有限公司, 沈阳 110021)

摘要: 本文建立一种经过简单的衍生化处理, 可利用常规的反向高效液相色谱(RP-HPLC)对春雷霉素含量进行测定的方法。在碱性条件下, 将春雷霉素与氯甲酸-9-芴甲酯(FMOC-Cl)反应后, 采用反向高效液相色谱法, 以乙腈和水为流动相, 使用XDB-C₁₈色谱柱和紫外可变波长检测器, 在265 nm波长下对反应产生的衍生物进行测定; 采用液质联用法, 明确春雷霉素衍生物的结构信息。结果表明, 在0.039 6~0.415 4 mg/L范围内, 春雷霉素衍生物的质量浓度与其峰面积间呈良好的线性关系($R^2 \geq 0.999$)。该方法的平均回收率为98.8%; 相对标准偏差(RSD)为0.4%。该方法衍生反应快, 衍生物稳定, 具有较高的精密度和准确度。本次试验结果可为春雷霉素产品的分析方法提供新的思路。

关键词: 柱前衍生; 春雷霉素; 氯甲酸-9-芴甲酯; 反向高效液相色谱; 液质联用

中图分类号: TQ 450.7 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1671-5284.2022.03.009

Determination of Kasugamycin by RP-HPLC with Precolumn Derivatization

ZHANG Jiaqing, YANG Wenhan*, ZHANG Dan, HOU Defen

(Shenyang Research Institute of Chemical Industry Co., Ltd., Shenyang 110021, China)

Abstract: The method of routine reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with simple derivatization treatment was established for the determination of kasugamycin. The derivative produced by reacting kasugamycin with 9-fluorenylmethylchloroformate (FMOC-Cl) in alkaline condition was quantified by RP-HPLC at 265 nm using the mixture of acetonitrile and water as mobile phase, and application of XDB-C₁₈ column and ultraviolet detector. The structure of kasugamycin derivative was identified and determined by LC-MS. The results showed that there was good linear relationship ($R^2 \geq 0.999$) between the mass concentration of kasugamycin and its peak area in the range of 0.039 6-0.415 4 mg/L. The average fortified recovery of kasugamycin was 98.8%, and relative standard deviations (RSD) was 0.4%. The derivative was rapidly achieved and stable based on this method, and the method had the characteristics of higher precision and accuracy. The finding could provide a novel idea for analytical method of kasugamycin.

Key words: precolumn derivatization; kasugamycin; FMOC-Cl; RP-HPLC; LC-MS

春雷霉素(Kasugamycin)是一种低毒、内吸性杀菌剂, 通过内吸治疗作用来发挥其药效。春雷霉素的前身是一种由小金色放线菌产生的抗菌素^[1], 最早由中国科学院微生物研究所于1964年在江西土良地区发现。自春雷霉素上市以来, 在全世界范围内被广泛应用于农业生产上^[2]。它对稻瘟病、桃树流

胶病、穿孔病、西瓜细菌性角斑病等病害的防治具有显著作用^[3]。

春雷霉素属于碱性物质, 其结构特点为极性大, 易溶于水, 故在液相色谱行为上表现为色谱的保留时间短^[4-5], 对于结构相近的生产杂质, 很难达到理想的分离效果, 从而给检测的准确度造成了影响。

收稿日期: 2021-12-30

作者简介: 张佳庆(1983—), 男, 硕士, 辽宁沈阳人, 工程师, 主要从事农药标准的制定、检测与分析研究。E-mail: zhangjiaqing01@sinochem.com

通信作者: 杨闻翰(1985—), 男, 硕士, 辽宁丹东人, 高级工程师, 主要从事农药标准的制定、检测与分析研究。E-mail: yangwenhan@sinochem.com

目前,对于春雷霉素含量测定的液相色谱分析方法,一般选择较为复杂的流动相配制体系,通常采用一定浓度的十二烷基磺酸钠水溶液作为基本的流动相,再配合一定比例的有机相。然而,大浓度的缓冲盐体系对色谱柱损耗严重,影响色谱柱的寿命,提高了检测成本。本研究开发了柱前衍生方法,对春雷霉素的结构进行了衍生化,通过增加衍生基团,使春雷霉素具有良好的紫外吸收特性。通过调整春雷霉素的极性,可实现在乙腈-水为流动相体系下,对春雷霉素的原药含量进行分析。此法检测灵敏度高,重现性好,经济实用,并且可以同时实现对春雷霉素原药中一般杂质的有效分离,为春雷霉素产品的分析提供了一种创新性的思路。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Acquity-Micromass Quattro premier液质联用仪,美国沃特世公司; Dionex U3000高效液相色谱仪,美国赛默飞世尔公司; Agilent Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),安捷伦科技(中国)有限公司; XS205DU电子天平,梅特勒托利多科技(中国)有限公司;四硼酸钠、甲醇、乙腈,以上均为色谱纯,美国SIGMA ALDRICH公司;醋酸(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;标准品春雷霉素(纯度98.0%),国家农药质检中心(沈阳);春雷霉素原药,河北安米诺氨基酸科技股份有限公司;氯甲酸-9-芴甲酯(FMOC-CD),北京百灵威科技有限公司。

1.2 仪器条件

色谱条件。柱温:30℃;流速:1.0 mL/min;进样量:5 μL;检测器波长:265 nm。采用梯度洗脱,洗脱程序见表1。

表1 流动相梯度比例

时间/min	乙腈/%	水/%
0	25	75
8.0	25	75
8.1	75	25
15.0	75	25
15.1	25	75
20.0	25	75

质谱条件。离子源模式:ESI⁺;电离电压:3.5 kV;锥孔电压40 V;气帘气流速:50 L/h;裂解气流速:600 L/h;裂解气温度:400℃;离子源温度:120℃;分子量采集范围设置:100~600(m/z)。

1.3 溶液配制

1.3.1 标准溶液的配制

称取春雷霉素标准品0.05 g(精确至0.000 1 g)置于烧杯中,用水溶解,稀释并定容于50 mL容量瓶中作为标样母液。取1.0 mL母液置于烧杯中,再加入1 mL 125 mmol/L四硼酸钠溶液来调节酸碱度,之后加入1.5 mL 4 g/L FMOC-Cl乙腈溶液作为衍生化试剂。将溶液放置在30℃水浴中反应20 min,待衍生完全后,将溶液冷却至室温,再用甲醇-水(1:2, V/V)稀释并定容于10 mL容量瓶中,用0.45 μm滤膜过滤,备用。

1.3.2 试样溶液的配制

称取春雷霉素样品0.05 g(精确至0.000 1 g)置于烧杯中,用水溶解,稀释并定容于50 mL容量瓶中作为样品母液。其余操作步骤与标准溶液的配制相同。

1.4 测定

待仪器状态稳定后,对标样溶液和试样溶液进行测定,取样品和标样2针的平均峰面积进行公式的计算。

1.5 数据分析

根据标样溶液和试样溶液的峰面积,按式(1)计算样品中春雷霉素的质量分数 w 。

$$w/\% = \frac{A_2 \times m_1 \times P}{A_1 \times m_2} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_1 、 A_2 分别为标样溶液和试样溶液中春雷霉素衍生物峰面积的平均值, mAU·min; m_1 、 m_2 分别为标样和试样质量, g; P 为标样中春雷霉素的质量分数, %。

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

对春雷霉素标样及其衍生物进行紫外光谱扫描(图1)。春雷霉素未衍生化之前的最大紫外吸收峰在207 nm附近,且无其他波长的特征吸收峰,所以在对未衍生化的春雷霉素进行色谱分析时,只能选择较低的紫外波长,此段波长的干扰较大,而经过衍生化的春雷霉素在265 nm附近出现了特征的紫外吸收峰。在该波长处,样品的灵敏度较高,无低波数的溶剂干扰,能够满足液相色谱紫外检测器的分析要求,因此选择的检测波长为265 nm。

2.2 春雷霉素衍生物的色谱分析结果

经过衍生反应(图2),向春雷霉素引入衍生化试剂氯甲酸-9-芴甲酯(FMOC-CD)中的荧光团,从

而实现高效液相色谱分离及测定。同时,过量的 FMOC-Cl 会完全水解成衍生副产物 FMOC-OH, 其与春雷霉素衍生物的结构相似,因此具有相同的荧

光激发和检测波长。在以上色谱条件下,春雷霉素衍生物的保留时间为 6.8 min; 其水解衍生副产物 FMOC-OH 的保留时间为 12.1 min (图3)。

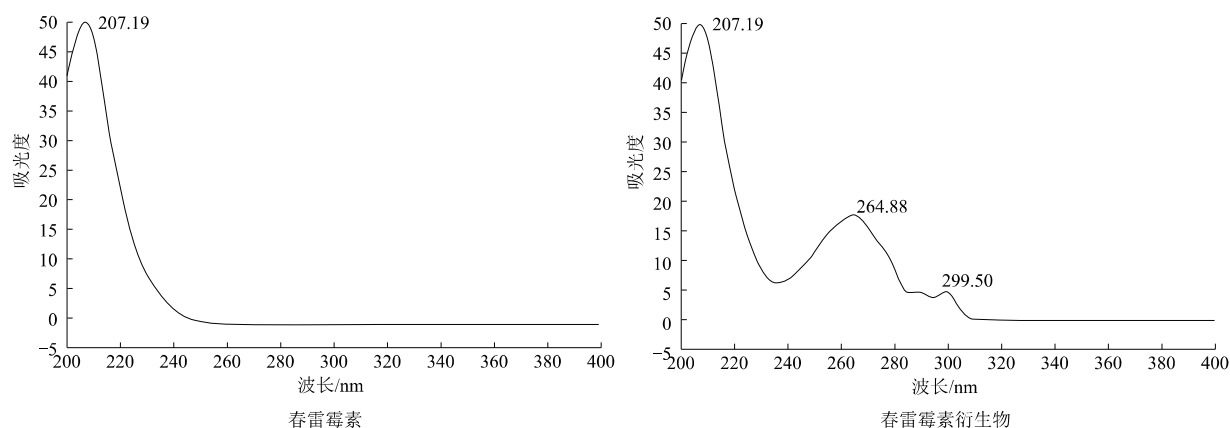


图 1 春雷霉素及其衍生物的紫外吸收对比图

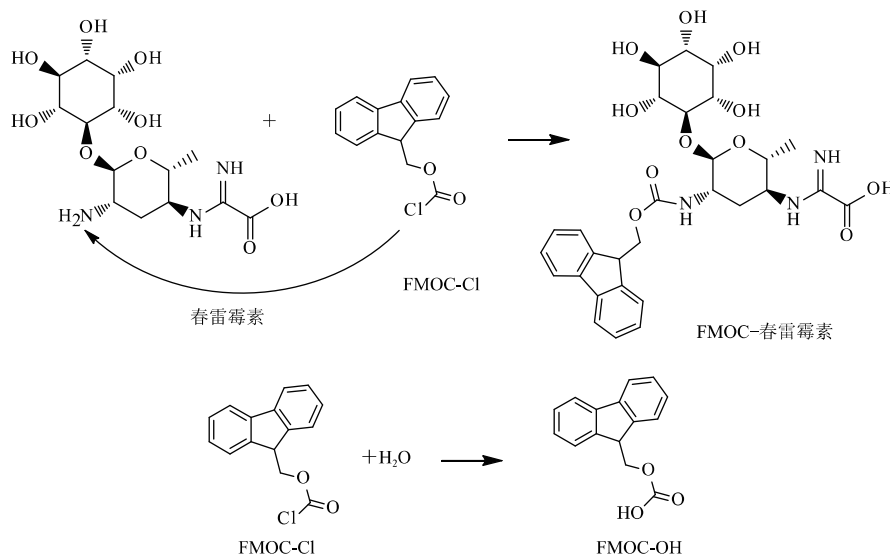


图 2 春雷霉素柱前衍生化反应示意图

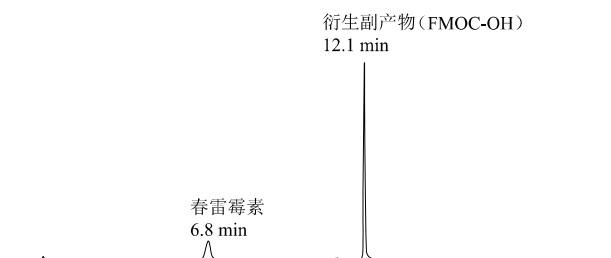


图 3 春雷霉素衍生后的液相色谱图

2.3 春雷霉素衍生物的质谱分析结果

将春雷霉素标样溶液在质谱条件下进行试验,通过质谱的断裂机理确定衍生化试剂(FMOC-Cl)对春雷霉素的衍生位置,以及春雷霉素衍生物的结构。春雷霉素衍生物的质谱图,见图4。

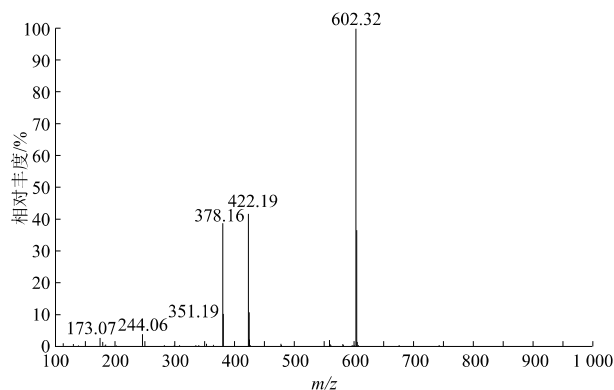


图 4 春雷霉素衍生物质谱图

2.4 线性范围

按照系列稀释方法配制6个质量浓度的春雷霉

素标准品溶液,在1.2所述色谱条件下进行测定。以质量浓度和峰面积为横、纵坐标绘制标准曲线,来验证方法的线性关系。线性方程为 $y=4\,887.3x-29.319$,相关系数(R^2)为0.999 5(图4), $R^2>0.999$,则春雷霉素衍生物的色谱峰面积与其质量浓度在0.039 6~0.415 4 mg/L范围内线性关系良好,

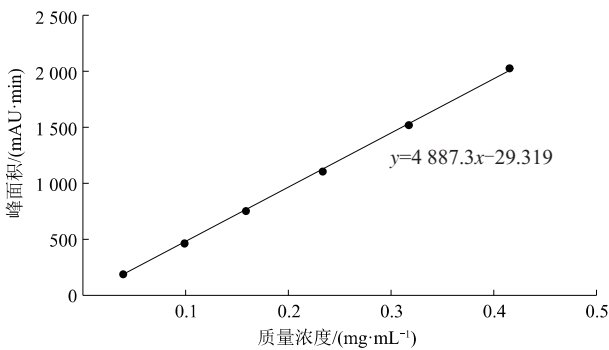


图 5 春雷霉素衍生物标准曲线

2.5 精密度与回收率的测定

按试样溶液的制备方法配制6个春雷霉素溶液。根据以上操作条件测定这6个样品溶液中春雷霉素的含量,结果见表2。在此春雷霉素样品中选取6个标样的添加水平,按本方法测定其中的春雷霉素含量,并计算添加回收率,结果见表3。从表2中可

以看出,所配制的6个春雷霉素样品中相对标准偏差(RSD)为0.4%;从表3中可以看出,计算得到的回收率为98.56%~99.31%。

表 2 春雷霉素精密度试验结果

编号	称样量/g	质量分数/%	平均值/%	RSD/%
1	0.075 32	66.35	66.31	0.4
2	0.076 37	66.12		
3	0.076 26	66.17		
4	0.076 03	66.23		
5	0.075 43	66.81		
6	0.076 14	66.19		

表 3 春雷霉素回收率试验结果

编号	实测加标量/g	理论加标量/g	回收率/%	平均回收率/%
1	0.025 54	0.025 87	98.74	98.8
2	0.042 12	0.042 53	99.03	
3	0.062 35	0.063 15	98.74	
4	0.082 69	0.083 26	99.31	
5	0.100 99	0.102 47	98.56	
6	0.124 09	0.125 74	98.69	

2.6 春雷霉素衍生物结构的确证

根据春雷霉素衍生物的质谱图(图4), m/z 602、422、351和378为主要的质谱峰,通过质谱的一般断裂机理来确证春雷霉素衍生物的具体结构(图6),以此验证春雷霉素衍生物的分子量和各官能团信息。

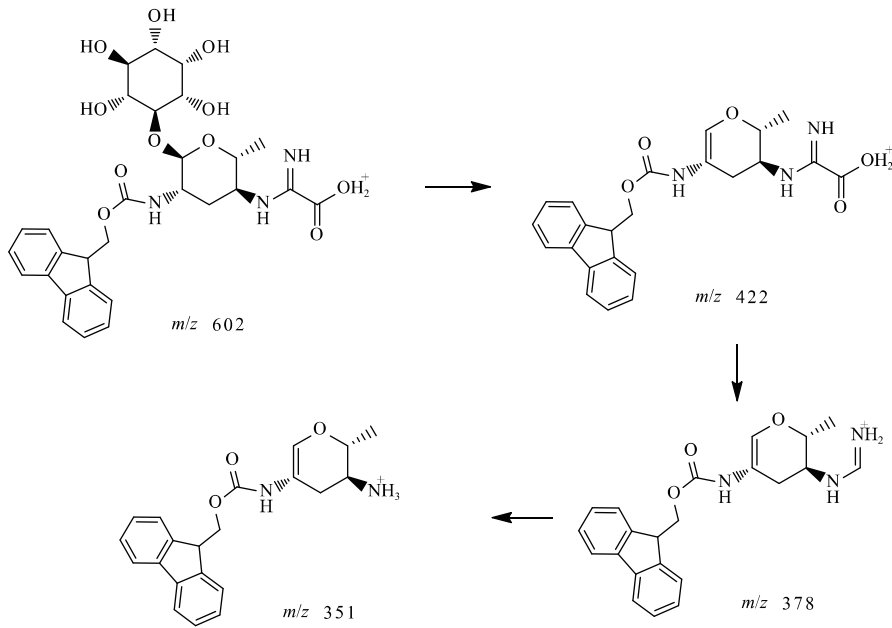


图 6 春雷霉素衍生物质谱断裂机理示意图

3 结 论

本文创新性地建立了柱前衍生方法对春雷霉素进行液相色谱分析,使用乙腈-水的流动相体系,

解决了在传统的春雷霉素分析方法中需要使用缓冲盐溶液作为流动相而导致的体系平衡缓慢、灵敏度低、对色谱柱损耗大以及杂质分离不理想等问题,提高了对春雷霉素产品分析的简便性及可靠性。此

外,本文也通过液质联用方法对春雷霉素衍生物进行了结构分析,阐明了春雷霉素柱前衍生化反应原理,并通过春雷霉素衍生化前后紫外全波长扫描图的对比,进一步证明了方法的科学性。本方法具有较高的精密度与准确度,可快速分离及测定春雷霉素有效成分的含量,线性相关性好,可为春雷霉素产品的分析提供新的思路,适用于各企业及相关检测机构对春雷霉素产品质量的监督与把控。

参考文献

[1] 汪桂,吴蕴,袁子雨,等.春雷霉素的研究现状及展望[J].生物加

工过程,2016,14(4):70-74.

[2] ISHIYAMA T, HARA I, MATSUOKA M, et al. Studies on the preventive effect of kasugamycin on rice blast[J]. Journal of Antibiotics, 1965, 18: 115-119.

[3] TOMLIN C D S. The pesticide manual: a world compendium[M]. Alton: BCPC, 2009.

[4] 吴国旭,毕富春,翟立红.春雷霉素高效液相色谱分析方法[J].农药,2010,49(12):902-903.

[5] 钟红舰,范丽霞,刘进玺,等.亲水作用液相色谱串联质谱法测定土壤中春雷霉素含量[J].农药,2012,51(12):897-899.

(责任编辑:高蕾)

(上接第 37 页)

化氢,得到中间体 II 盐酸盐。在叠氮磷酸二苯酯(DPPA)的催化下,中间体 I 与中间体 II 盐酸盐反应得到目的产物氟雷拉纳。该路线原料易得,价格便宜,产率较高,达 86.7%,适用于工业化合成氟雷拉纳。

参考文献

[1] GASSEL M, WOLF C, NOACK S, et al. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid and *L*-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 45: 111-124.

[2] GARCIA-REYNAGA P, ZHAO C, SARPONG R, et al. New GABA/glutamate receptor target for [3 H]isoxazoline insecticide[J]. Chemical Research in Toxicology, 2013, 26(4), 514-516.

[3] KOUSSAKA H, FUKUYA S, MORIYAMA Y, et al. Process for production of isoxazoline-substituted benzamide compound: WO, 2010005048[P]. 2010-01-14.

[4] KOMOTA M. Compositions containing isoxazoline-substituted

benzamide compounds and other pesticides: JP, 2009108046 [P]. 2009-05-21.

[5] RENOLD P, ZAMBACH W, MAIENFISCH P, et al. Isoxazole-thietane derivatives as insecticides and their preparation and use in the combat or control of insects, acarines, nematodes and molluscs: WO, 2009080250[P]. 2009-07-02.

[6] YAOSAKA M, UTSUNOMIYA T, MORIYAMA Y, et al. Preparation of dihydroisoxazole derivatives and intermediates therefor: WO, 2009001942[P]. 2008-12-31.

[7] NAMBIAR S, GILLA G, NAGESHWAR G, et al. Improved process for the preparation of 2-amino-*N*-(2,2,2-trifluoroethyl)acetamide and salts thereof from 2,2,2-trifluoroethylamine hydrochloride and chloroacetyl chloride: WO, 2020222158 [P]. 2020-11-05.

[8] HEEMSTRA R J, ROSS R J, MARTIN T P, et al. *N*-amidoaryl cyclopropane carboxamide derivatives, their use as pesticides and their preparation: US, 20180098541[P]. 2018-04-12.

[9] BRUENING. Method for preparation of 2-amino-*N*-(2,2,2-trifluoroethyl)acetamide via palladium-catalyzed hydrogenolysis of carbamates: WO, 2012047543[P]. 2012-04-12.

(责任编辑:金兰)

美国环境保护署(EPA)为抗菌产品推出一个新型的环境设计(DfE)标志

6月11日,美国环境保护署(EPA)推出一个新型现代的环境设计(DfE)标志,该标志将在明年应用在消毒剂和杀菌剂等抗菌产品上。EPA的DfE标志可帮助消费者和商业购买者识别符合《联邦杀虫剂、杀菌剂和灭鼠剂法案》(FIFRA)要求在农药登记时的健康和标准以及其他严格标准的抗菌产品。要获得DfE标志的资格,产品中的每种成分都必须符合一套严格的化学和毒理学标准。在过去的几年中,消费者、学校和其他组织的参与度激增,他们想更多地了解其使用的产品如何影响他们的健康和环境。发布的更新标志让购买者更容易找到获得DfE认证的产品,这反过来将激励更多公司通过该认证。

DfE产品符合以下要求:评估人类健康和环境影响、产品性能、包装和成分。通过排除可能对幼儿产生负面影响、导致癌症或具有其他负面影响的成分,最大限度地减少对人类健康产生的任何可能风险;进一步保护鱼类和其他水生生物;尽量减少对空气或水道的污染,防止有害化学物质污染土壤;确保产品没有合规性、执行性或功效问题。DfE产品类似于“EPA注册”农药,因为其符合注册标准,DfE标志表明该产品已经过审查并符合FIFRA注册标准以及DfE认证的标准。

(金兰译)