

电化学液相色谱分析庆大霉素的方法

齐雪琴

(福建省福抗药业股份有限公司,福州 350002)

摘要:采用电化学检测器液相色谱测定硫酸庆大霉素组分及杂质,无需采用衍生化反应,可以直接进样,且检测灵敏度高、分离效果好。该方法在所测定的范围内具有良好的线性(相关系数 $r > 0.99$),重复测定及耐用性的相对标准偏差组分均小于 2%,杂质均小于 10%; C_{2a} 组分的最小检测浓度为 0.002mg/ml。结果表明该方法测定硫酸庆大霉素组分及杂质是一种简便、准确的分析方法。

关键词:硫酸庆大霉素;电化学液相色谱仪;紫外检测器高效液相色谱仪

中图分类号: O657.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-8143(2006)01-0004-04

Analysis method of Gentamicin with HPLC - PED

Qi Xueqin

(Fujian Fukang Pharmaceuticals Co. Ltd., Fuzhou, 350002, China)

Abstract: There are considerable advantages by testing gentamicin sulfate on composition and impurities with HPLC - PED method. Besides direct injection, high sensitivity and good resolution, derivation reactions would be avoided. Within the testing range in this experiment, a good linearity has been shown along with correlation coefficient exceeding 0.99. In addition, relative standard deviation of both repeatability and robustness in composition test respectively are less than 2%, while that in impurities test is less than 10%, and the detection limit of composition C_{2a} is as low as 0.002mg/ml. As can be seen from the testing results, for testing gentamicin sulfate on composition and impurities, HPLC - PED analysis method is convenient and accurate.

Key words: Gentamicin sulfate; High Performance Liquid Chromatograph of Ultraviolet Absorption Detector; Liquid Chromatograph of Pulsed Electrochemical Detector

1 引言

庆大霉素(Gentamicin)是在1963年发现的,1966年开始使用在临床,我国于1965年由中国科学院福建微生物研究所从福州湖泥内分离得到产生菌——小单孢菌(Micromonospora),经研究试制成功后并投入生产。庆大霉素是一种杀菌力较强的广谱抗生素,对多种革兰氏阴性菌和阳性菌有较强的抗菌作用。特别对绿脓杆菌和金色葡萄球菌有良好的抗菌作用。

庆大霉素的化学结构属于氨基糖苷类抗生素,它是一族由小单孢菌产生的四个庆大霉素主要组分 C_1 、 C_2 、 C_{1a} 、 C_{2a} 及许多庆大霉素次要组分组成的多组分抗生素。几个次要组分如西梭霉素、庆大霉素 C_{2b} 、加纳米星、庆大霉素B,还有 C_1 、 C_2 、 C_{2a} 的前体,因此色谱分离就成了重要的分析手段。最早的检测方法

有纸色谱,薄层色谱,离子交换液相色谱,反相液相色谱和毛细管电泳等。由于庆大霉素在紫外没有吸收峰,因此HPLC方法结合了柱前衍生来检测各组分, British Pharmacopoeia 2000, Europe Pharmacopoeia 4.0, United States of America Pharmacopoeia 28, 中华人民共和国药典 2000都是以HPLC方法结合了柱前衍生来检测庆大霉素各组分的。在这个系统中西梭霉素、庆大霉素 C_{2b} 、加纳米星、庆大霉素B都没有得到很好的分离。庆大霉素 C_{2b} 的出峰位置在 C_1 的上升处,在 C_1 区域没有很好的分离;西梭霉素的出峰位置在 C_{2a} 和 C_2 相连处,也没有得到很好的分离。

由于庆大霉素中有电活性分子, Europe Pharmacopoeia 4.5版采用脉冲电化学检测器(PED),使庆大霉素在外加电压的作用下,在检测池内产生电解反应,即在工作电极表面进行氧化还原反应,产生不同的电流,从而检测器能检测庆大霉素的各组分。

收稿日期:2005-7-28

作者简介:齐雪琴(1965~),女,工程师,从事仪器分析工作。E-mail: qixueqin@pub6.fz.fj.cn

脉冲电化学检测器使用了快速、连续多重的 3 种不同工作电位 (工作电位, 清洗正电位, 清洗负电位), 在极短的时间 (60ms 为增量) 不停采用多重顺序电位, 只要所设定的工作电位能保证所有被测的电活性分子都处于扩散控制平台区内, 就能检测庆大霉素的各组分及杂质。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

电化学液相色谱仪 DX-600 (Dionex 公司), 紫外检测器液相色谱仪 HP1100 (Agilent 公司), 超纯水制备仪 (MILLIPORE 公司), 超声波清洗器 (KQ-50 型); 苯乙烯-二乙烯基苯共聚物 (8mm) 色谱柱, 粒径: 100nm, 规格: 4.6 × 250mm (PLRP-S Polymer Laboratories, shroshire, uk)。

四氢呋喃、磷酸二氢钾、磷酸均为国产分析纯试剂, 无水硫酸钠、辛基磺酸钠、氢氧化钠均为进口 (Merck 公司) 分析纯试剂。庆大霉素标准品 (lot^o3e) 为欧洲标准品, 硫酸西梭霉素标准品 (LOT DC238) 为美国标准品, 加纳米星标准品 (QS-00404-2) 为福抗药业的工作标准品;

2.2 实验部分

流动相: 称取 60g 无水硫酸钠, 1.75g 辛基磺酸钠, 8ml 四氢呋喃和 50ml 0.2M 磷酸二氢钾 (称取 27.22g 磷酸二氢钾溶解于 1000ml 水中, 用磷酸调 pH 为 3.0) 溶于 1000ml 水中, 溶解并混匀。

柱后淋洗液: 取无碳酸盐的 20% 氢氧化钠溶液 1:25 稀释脱气后, 经 375μl 聚合物混合螺管, 无脉动加入; 流速约为 0.3ml/min。

样品溶液: 取硫酸庆大霉素样品 50mg, 加流动相溶解至 100ml, 配制浓度为 0.50mg/ml。标准品溶液: 参比溶液 (a): 取硫酸庆大霉素标准品 50mg 加流动相溶解至 100ml; 参比溶液 (b): 吸取参比溶

液 (a) 5ml 加流动相稀释至 100ml。

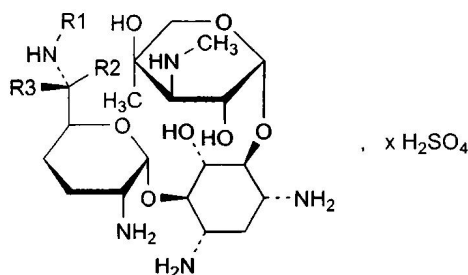
检测条件: 流速为 1ml/min; 分析时间为庆大霉素 C1 保留时间的 1.2 倍; 进样量为 20μL; 柱温为 50; 灵敏度约为 1μC; 检测器应保持在 35。检测器为 ED50 脉冲积分安培检测器, 配置 3mm 金工作电极, Ag/AgCl 参比电极和不锈钢池体为对电极; 检测电位为 +0.05V, 氧化电位为 +0.75V, 还原电位为 -0.15V。

测定: 参比溶液 (a) 中 C_{2a} 与 C₂ 的峰-谷比应不小于 2.0。小于参比溶液 (b) 中 C_{1a} 组分的平均峰面积可忽略不计。C 组分的出峰顺序为 C_{1a}、C_{2b}、C₂、C_{2a} 和 C₁。以峰面积归一法计算样品中各组分的含量。

3 结果与讨论

3.1 硫酸庆大霉素两种检测器测定方法的比较

硫酸庆大霉素样品中含有 C₁、C_{1a}、C₂、C_{2a} 及 C_{2b} 的结构式和分子式为:



Gentamicin	Mol Formula	R ₁	R ₂	R ₃
C ₁	C ₂₁ H ₄₃ N ₅ O ₇	CH ₃	CH ₃	H
C _{1a}	C ₁₉ H ₃₉ N ₅ O ₇	H	H	H
C ₂	C ₂₀ H ₄₁ N ₅ O ₇	H	CH ₃	H
C _{2a}	C ₂₀ H ₄₁ N ₅ O ₇	H	H	CH ₃
C _{2b}	C ₂₀ H ₄₁ N ₅ O ₇	CH ₃	H	H

硫酸庆大霉素 5 批样品用两种检测器测定方法的结果数据作比较列于表 1。两种检测器测定的样品谱图见图 1 和图 2。

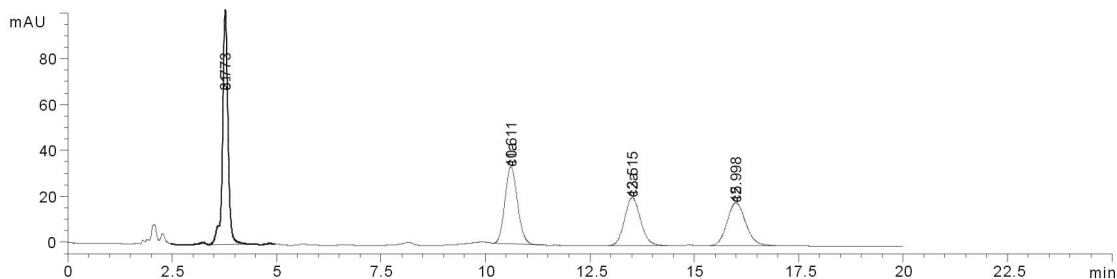


图 1 紫外检测器高效液相色谱检测的图谱

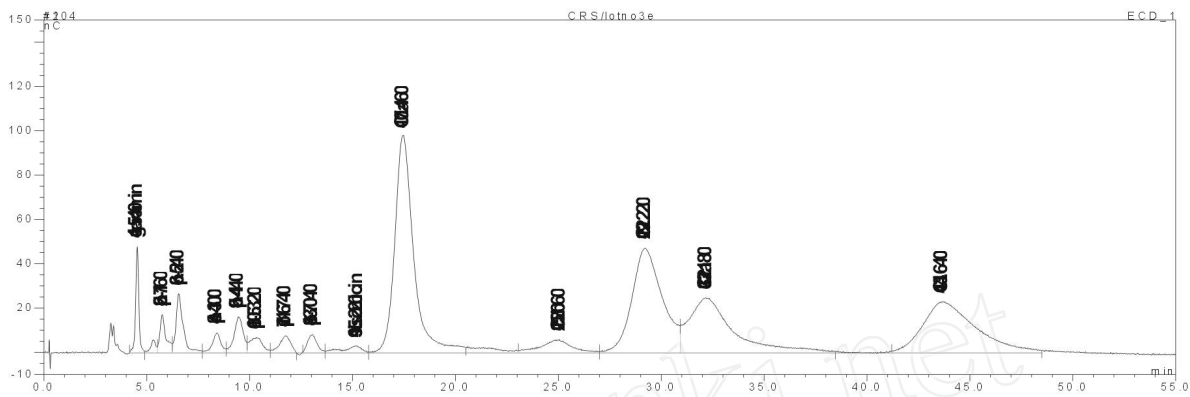


图 2 电化学检测器液相色谱仪检测的图谱

表 1 5批样品用两种方法测定的数据

批号	检测方法	C1 (%)	C _{1a} (%)	C _{2a} (%)	C ₂ (%)	C _{2b} (%)	单个杂质 (%)	杂质总和 (%)
FG0402714	紫外检测器液相色谱仪检测	29.32	26.26	16.72	27.70	/	/	/
	电化学检测器液相色谱仪检测	26.78	25.00	16.34	27.25	3.24	1.39	1.39
FG0402715	紫外检测器液相色谱仪检测	29.52	26.49	16.75	27.24	/	/	/
	电化学检测器液相色谱仪检测	28.11	24.60	16.27	26.60	3.01	1.40	1.40
FG0403037	紫外检测器液相色谱仪检测	30.83	24.34	16.37	28.46	/	/	/
	电化学检测器液相色谱仪检测	27.33	22.36	16.63	26.79	2.17	1.65	4.71
FG0403038	紫外检测器液相色谱仪检测	31.26	24.58	14.73	29.43	/	/	/
	电化学检测器液相色谱仪检测	28.57	21.55	15.73	26.84	2.73	1.60	4.58
FG0403039	紫外检测器液相色谱仪检测	31.84	24.77	15.41	27.99	/	/	/
	电化学检测器液相色谱仪检测	28.32	22.79	17.55	24.99	1.54	1.56	4.82

3.2 本方法检测硫酸庆大霉素组分及杂质方法的验证

3.2.1 方法的精密度考察

应用本法对同一样品平行测定 6 次,计算各组分及相关物质测定结果的相对标准偏差 (RSD)分别为 C_{1a}: 1.1%; C₁: 1.0%; C₂ + C_{2a} + C_{2b}: 0.2%;单个杂质: 1.6%;杂质总和: 1.6%。

3.2.2 方法的耐用性考察

采用本法更换同一型号不同批号的色谱柱;流动相主成分四氢呋喃的量改变 +1%和 -1%;柱温分别变更为 50 , 60 ;柱后淋洗液流速改变 +10%和 -10%;色谱条件改变后测定结果分别与基准条件时测定的原结果,计算其合并相对标准偏差 (RSD),列于表 2。

表 2 合并相对标准偏差 (RSD)

项 目	RSD (%)				
	C _{1a} (%)	C ₁ (%)	C ₂ + C _{2a} + C _{2b} (%)	单个杂质 (%)	杂质总和 (%)
色谱柱变化 (n = 12)	1.7	0.9	0.4	5.5	6.4
流动相变化 (n = 18)	0.9	0.7	0.3	2.1	2.1
柱温变化 (n = 18)	1.2	1.0	0.4	2.1	2.9
柱后淋洗液流量变化 (n = 18)	1.1	0.7	0.3	3.2	5.0

3.2.3 线性测定

分别配制样品浓度为 0.4、0.45、0.5、0.55、0.6 mg/mL 的溶液。在拟定的色谱条件下测定,绘制工作曲线。以峰面积 A ($nC \cdot \text{min}$) 对浓度 C (mg/mL) 回归计算,结果表明线性关系良好。回归方程、相关系数列于表 3。

表 3 工作曲线

化合物	回归方程	相关系数 (r , $n=5$)
C_{1a}	$A = 0.00419C - 0.0311$	0.9972
C_1	$A = 0.00313C + 0.00182$	0.9978
$C_2 + C_{2a} + C_{2b}$	$A = 0.00204C - 0.0323$	0.9995

3.2.4 方法的检测限考察

配制适当浓度的标准品溶液,注入色谱仪,记录色谱图,其硫酸庆大霉素 C_{2a} 组分峰高应为基线噪音 2 - 5 倍,此浓度即为检测限。检测限为 0.002 mg/mL。

4 结论

通过对两种检测器检测方法的比较,采用紫外高效液相色谱仪检测硫酸庆大霉素,不但样品前处理时间长,而且无法分离 C_{2b} 峰和 C_1 峰,因此导致 C_1 组分和杂质分析不准确。采用电化学检测器液相色谱仪测定,样品无需前处理只要用流动相溶解,就可直接进样,本方法有很高的检测灵敏度,也有很

好的精密度和耐用性,具备较大的线性范围。但电化学检测器中的金电极较容易钝化必须经常抛光,且所用的试剂的纯度要高,这样才能得到较好的重复性。从上述实验结果可知,电化学检测器具有较高的准确性等特点,是一种高灵敏度的方法。

参考文献

- [1] British Pharmacopoeia 2000 · Gentamicin Sulphate · Page 748 ~ 749.
- [2] 中华人民共和国药典 [M], 北京: 化学工业出版社, 2000: 866 ~ 867.
- [3] Europe Pharmacopoeia 4.0 · Gentamicin Sulphate · Page 1238 ~ 1239.
- [4] Europe Pharmacopoeia 4.5 · Gentamicin Sulphate · Page 3700 ~ 3701.
- [5] United States of America Pharmacopoeia 28 · Gentamicin Sulfate · Page 895 ~ 896.
- [6] ICH 指导委员会. ICH 药品注册的国际技术要求 · 质量部分 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [7] 胡昌勤. 高效液相色谱法在抗生素质控分析中的应用 [M]. 北京: 气象出版社, 2001.
- [8] 张晓彤, 云自厚. 液相色谱检测方法 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [9] 牟世芬, 刘克纳. 离子色谱方法及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.

《福建分析测试》征稿简则

《福建分析测试》(FUJIAN ANALYSIS & TESTING)于 1992 年 10 月创刊,是福建省分析测试协会、福建省测试技术研究所主办的专业性学术期刊,国内外公开发行。重点报道分析测试技术的学术理论,有光谱、色谱分析仪器和技术的研究报道及其相关技术在石油、煤炭、化工、能源、冶金、轻工、食品、制药、化学、生化、医疗、环保、防疫、公安、农业、商检等领域应用,原始性、创新性科研成果、仪器与部件的维修和研发。

《福建分析测试》设有研究报告、研究快报、综述与进展、研究简报、技术与应用、仪器维修、管理工作等多种栏目,并载有色谱、光谱、无损检验等方面的书讯、省内学术活动简讯(包括会议征文及报道)等内容。适于广大分析工作者及大专院校师生阅读,也是图书、情报部门必备的科技参考资料。

研究报告:报道有创新性、学术水平较高或社会效益较大的完整的重要研究成果。

研究快报:扼要报道创新性显著、具有首报意义的研究成果。

研究简报:报道有一定特色的科研成果,或反映研究工作的部分或阶段性成果。

综述与进展:以自己的研究工作为基础,对当前国内外分析测试的新理论、新方法、新技术及其相关技术的最新研究进展、科研动向及应用成果进行综述或评论。

技术与应用:报道新技术、新装置的开发与应用及对前人方法的革新和改进。重点介绍实验方法和结果、结论。

仪器维修:报道检测实验相关的仪器应用、维护维修、现代仪器新进展。

管理工作:发表现代化实验室管理科学类文章。

以上各类文稿均应有中、英文摘要及相对应的中英文关键词。全文以 3500 字为宜,综述类文章不超过 7000 字(详见本刊“《福建分析测试》投稿要求”)

《福建分析测试》现已被十余种国内外主要检索刊物和数据库收录,加入中国期刊网、全国数字化期刊群,作者的著作权使用费及稿费与本刊稿费一次性付给。