

高效液相色谱 - 脉冲积分安培电化学 检测牛奶中的妥布霉素

蔡玉娥^{1,2}, 蔡亚岐¹, 牟世芬¹, 鲁毅强²

(1. 中国科学院生态环境研究中心 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085;

2. 北京科技大学 化学系, 北京 100083)

摘 要: 采用 C₁₈键合硅胶柱和脉冲积分安培电化学检测器对妥布霉素样品进行了分离检测。对两种检测电位波形进行了对比, 并选取了表现优良的检测电位。方法对妥布霉素的检出限 19 μg/L, 在 0.1 ~ 25 mg/L 范围内表现良好线性 ($r=0.9999$)。该方法应用于市售鲜奶的检测, 妥布霉素的回收率为 98%。

关键词: 妥布霉素; 液相色谱; 脉冲积分安培检测

中图分类号: O657.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2006)06 - 0117 - 03

Determination of Tobramycin in Milk by HPLC with Pulsed Integrated Amperometric Electrochemical Detection

CAI Yu-e^{1,2}, CAI Ya-qi¹, MOU Shi-fen¹, LU Yi-qiang²

(1. The State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Research Center for Eco-environmental Science, Chinese Academy of Science, Beijing 100085, China; 2. Department of Chemistry, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract: A new method was developed for the separation and determination of tobramycin in milk by HPLC using a C₁₈ column and pulsed integrated amperometric electrochemical detection. Two detection potential waveforms were compared and the one that gave the least noise level was selected. The linear range of the calibration curve for tobramycin was 0.1 - 25 mg/L with a correlation coefficient of 0.9996. The detection limit was 19 μg/L and the relative standard deviation was 1.8% ($n=10$). The spiked recovery was 98%. The method has been applied to the determination of tobramycin in milk sample.

Key words: Tobramycin; High performance liquid chromatography; Pulsed integrated amperometric electrochemical detection

妥布霉素 (结构式见图 1)自问世以来, 已广泛应用于临床, 成为目前世界临床应用最为广泛的氨基糖甙类抗生素之一。妥布霉素在兽药领域也获得了较广泛的使用, 因此其在肉类、奶类等人们常用的食品中也有存在。由于妥布霉素所具有一定的肾毒性和耳毒性, 所以对在制药、用药过程以及有关食品等样品中妥布霉素的进行快速、灵敏的测定很有必要。

目前, 常用的妥布霉素的分析方法主要有微生物法、毛细管电泳法、高效液相色谱法、液质联用等。微生物法是大多数抗生素类药物测定的药典规定方法, 但是操作繁琐, 重复性和专一性较差。高效液相色谱法因其准确、迅速、灵敏度高等优点而得到广泛的应用, 但是, 因为妥布霉素缺少强紫外吸收的基团, 故在使用紫外检测时需要衍生^[1]; 而使用 MS 检测因为仪器造价昂贵而无法普及使用^[2]; 电化学检测器在此类抗生素的检测中则表现出明显的高选择性, 高灵敏度及无需衍生的优势^[3]。

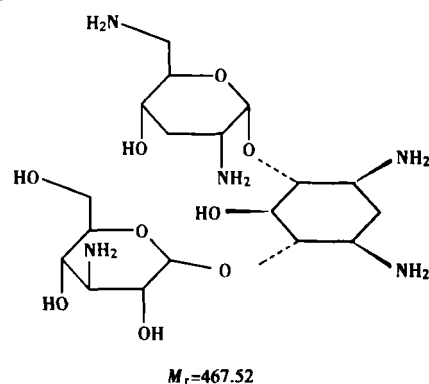


图 1 妥布霉素结构式

Fig. 1 Structure of tobramycin

收稿日期: 2005 - 10 - 25; 修回日期: 2006 - 01 - 03

基金项目: 国家重点基础研究计划 (973 项目) (2003 CB415001); 国家自然科学基金资助项目 (20577058, 20475060);

中国科学院优秀博士论文基金资助课题

作者简介: 蔡玉娥 (1978 -), 女, 山东德州人, 硕士研究生; 蔡亚岐, 联系人, Tel: 010 - 62849182, E-mail: caiyaqi@rcees.ac.cn

本文采用 C_{18} 色谱柱和电化学检测器对妥布霉素进行了分离检测, 该方法简便、快速、线性范围宽、灵敏度高, 已经成功地应用于牛奶样品的检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱系统, 包括 P680 高压梯度溶剂输送泵、ED50A 电化学检测器、LC20 柱温箱和 Chromeleon 6.5 色谱工作站 (美国 Dionex 公司)。Easypure LF 型超纯水系统 (美国 Bamstead); $0.22\ \mu\text{m}$ 尼龙膜。

妥布霉素标准品购自中国药品生物制品检定所, 其 $250\ \text{mg/L}$ 标准水溶液 $4\ ^\circ\text{C}$ 冷藏, 其稀溶液现用现配; 四氢呋喃 (THF) (色谱纯) 购自 Sigma 公司; 硫酸钠 (优级纯) 购自天津市津科精细化工研究所; $0.2\ \text{mol/L}$ 的磷酸二氢钾 (AR) 溶液, 用 $0.2\ \text{mol/L}$ 的磷酸 (AR) 调节 $\text{pH} = 3$, 作为缓冲溶液; 所用水均为 $18.3\ \text{M}\Omega$ 去离子水。

1.2 样品处理

取鲜奶 $3\ \text{mL}$ 于聚丙烯塑料管中, 加入 $500\ \mu\text{L}$ 20% (φ) 乙酸 (用以除去蛋白), 摇匀, 再加入 $2.5\ \text{mL}$ 水, 摇匀, 放入冰箱于 $4\ ^\circ\text{C}$ 冷冻 $1\ \text{h}$ (有利于蛋白沉降), 取出后以 $3\ 000\ \text{r/min}$ 转速离心 $10\ \text{min}$, 取上清液, 稀释 10 倍, 用 $0.22\ \mu\text{m}$ 尼龙膜过滤, 进样检测。

样品加标处理: 取鲜奶 $3\ \text{mL}$ 于聚丙烯塑料管中, 加入妥布霉素的标准溶液, 其余操作同上。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Acclaim Polar Advantage 2 C_{18} 柱 ($2.1\ \times 150\ \text{mm}$)。流动相为 $52\ \text{g/L}$ 硫酸钠, $1.5\ \text{g/L}$ 辛基磺酸钠, 0.3% (φ) 四氢呋喃, 5% (φ) 磷酸缓冲液, 流速为 $0.20\ \text{mL/min}$ 。柱后加入 $0.5\ \text{mol/L}$ 氢氧化钠, 流速为 $0.05\ \text{mL/min}$; 柱温为 $55\ ^\circ\text{C}$, 进样量: $25\ \mu\text{L}$ 。峰面积定量。

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择

欧盟药典中规定使用的色谱柱是 PLRP-S 苯乙烯二乙烯基苯聚合物反相柱, 但该色谱柱在应用于妥布霉素分析过程中存在保留时间不稳定和重复性差等问题。而 Polar Advantage 2 C_{18} 色谱柱是具有一定亲水性的键合硅胶柱, 它平衡时间短, 性能稳定, 所以本实验采用该柱进行分离实验。

2.2 检测电位的选择

通常用于抗生素检测的波形有两种^[3-4] (表 1), 本文对它们进行了简单的比较。在对妥布霉素 $10\ \text{mg/L}$ 的标准溶液的检测中, 二者的响应值没有明显差别, 但前者的噪音值比后者的噪音值高, 所以实验中采用电位波形 2。

2.3 检出限、线性范围和精密度

在选定的色谱条件下, 分别用电位波形 2 考察了方法的线性范围和检出限。该方法对妥布霉素检测的线性范围为 $0.1\sim 25\ \text{mg/L}$, 相关系数 r 为 $0.999\ 9$, 检出限 ($S/N = 3$) 为 $19\ \mu\text{g/L}$ 。将 $10\ \text{mg/L}$ 的妥布霉素标准溶液连续进样 10 次, 得到其峰面积的相对标准偏差为 1.8% , 表明该色谱体系具有很好的精密度。

2.4 实际样品分析及加标回收率

采用本方法对某市售鲜奶样品进行检测, 妥布霉素未检出。对样品进行加标回收实验 ($10\ \text{mg/L}$ 妥布霉素标准溶液测定色谱图见图 2, 图 3 为鲜奶样品色谱图和样品加标色谱图), 加入 $1\ \text{mg/L}$ 妥布霉素标准溶液的回收率为 98% 。从图谱可以看出, 基体对所测化合物干扰不严重。

表 1 检测电位波形

Table 1 Detection of potential waveforms

Potential waveform 1		Potential waveform 2	
Time t/ms	Potential V/V	Time t/ms	Potential V/V
0	0.10	0	0.05
0	0.10	200	0.05
300	0.60	400	0.05
301	0.60	410	0.75
420	0.60	600	0.75
421	-0.80	610	-0.15
720	-0.80	1 000	-0.15

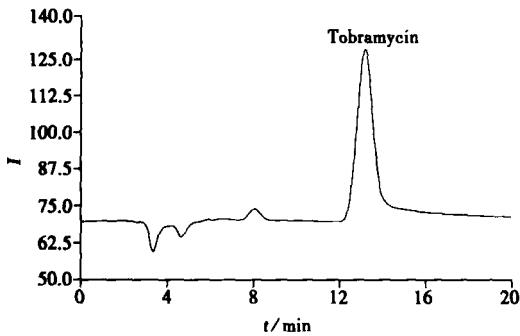


图 2 10 mg/L 妥布霉素标准溶液测定色谱图
Fig. 2 Chromatogram of 10 mg/L tobramycin standard solution

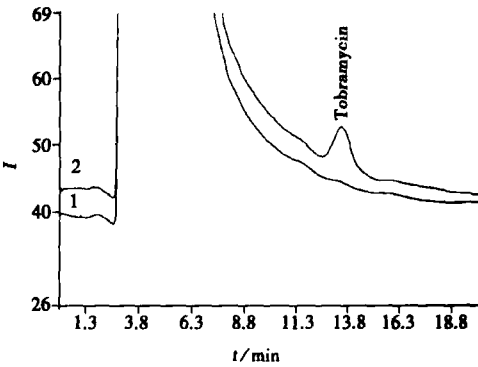


图 3 牛奶样品和牛奶样品加标色谱图
Fig. 3 Chromatograms of milk sample and spiked sample
1. 牛奶样品 (milk sample); 2. 牛奶样品加标 1 mg/L (spiked 1 mg/L sample)

参考文献：

[1] FONGE H, KAALE E, GOVAERTS C, et al B ianalysis of tobramycin for therapeutic drug monitoring by solid-phase extraction and capillary zone electrophoresis[J]. J Chromatogr, B, 2004, 810: 313 - 318

[2] KEEV L B G, LOCKHART S J, COOPER D P. Detemination of tobramycin in serum using liquid chromatography - tandem mass spectrometry and comparison with a fluorescence polarisation assay[J]. J Chromatogr, B, 2003, 794: 329 - 335

[3] SZÜNYOG J, ADAMS E, ROTES E. Analysis of tobramycin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection[J]. J Pharmaceutical Biomed Anal, 2000, 23: 891 - 896

[4] Application Note 66, [M]. Dionex Compony. [http: //www. dionex. com](http://www.dionex.com).

(上接第 116 页)

从涪陵中心医院取 3 支血清样，分别取 2 mL 加等量的 5% (φ)高氯酸以除去蛋白，混匀后振荡 2 min，置离心机中，在 3 000 r/min 下离心 10 min，分别取上澄清液 2 mL (编号 1、2、3)，加入 0.1 g · L⁻¹盐酸仑氨西林标准溶液 1.0、2.0、3.0 mL 制成样品溶液，再稀释定容至 1 000 mL，进行测定。结果见表 3。

表 3 血清中盐酸仑氨西林含量的测定

Table 3 Detemination of Lenampicillin hydrochloride in serum with the proposed CL method

Sample No	Original	RSD (n = 10)	Added	Total found	Recovery	RSD (n = 10)
	$\rho_0 / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$s_r / \%$	$\rho_A / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho_F / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$R / \%$	$s_r / \%$
1	0.102 8	2.9	0.100 0	0.207 4	104.5	3.3
2	0.199 3	3.5	0.200 0	0.397 1	98.9	3.2
3	0.310 5	3.6	0.300 0	0.599 2	96.4	3.7

参考文献：

[1] 王丽琴, 米亚嫫, 刘树春, 等. 盐酸仑氨西林片溶出度测定方法的研究[J]. 天津药学, 2004, 16(2): 21 - 22

[2] 刘 言. HPLC 法测定盐酸仑氨西林的含量及有关物质[J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(8): 472 - 474

[3] ISHIDA M, KOBAYASHI K, AWATA N, et al Simple high-performance liquid chromatography determination of ampicillin in human serum using solid-phase extraction disk cartridges[J]. J Chromatogr, B, 1999, 727(30): 245 - 248

[4] MARZO A, MONTIN, R PAMONTIM E, et al High-performance liquid chromatographic assay of ampicillin and its pro-drug lenampicillin[J]. J Chromatogr, A, 1990, 507(16): 235 - 239