毛细管区带电泳-间接紫外检测氨基糖苷类抗生素中硫酸根

徐伟东,刘浩*

(上海市食品药品检验所,上海 201203)

摘要 目的:用毛细管区带电泳-间接紫外检测技术检测氨基糖苷类抗生素中硫酸根。方法:采用非涂层弹性石英毛细管;背景电解质为含 0.2 mmol·L^{-1}十六烷基三甲基溴化铵的 15 mmol·L^{-1}铬酸水溶液(用三羟甲基氨基甲烷调节 pH 至 8.1);操作电压:-20 kV;检测波长:276 nm(间接检测);电泳过程中在进样端始终外加适当的压力使基线稳定。结果:本文方法的线性范围为 45~150 μg·mL^{-1};定量限约为 6 μg·mL^{-1};硫酸根与内标峰面积比的 RSD 为 0.6%(n=10);测定结果与采用英国药典方法的测定结果一致。结论:本方法适用于对氨基糖苷类抗生素中的硫酸根的测定。

关键词:毛细管区带电泳;间接紫外检测;硫酸根;氨基糖苷类;抗生素

中图分类号:R917 **文献标识码**:A **文章编号**:0254-1793(2011)10-1965-05

Determination of sulfate in aminoglycoside antibiotics by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection

XU Wei-dong, LIU Hao*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract **Objective:** To establish a capillary zone electrophoresis with indirect UV detection method for determination sulfate in aminoglycoside antibiotics. **Method:** Best results were achieved with the background electrolyte prepared by titrating of 15 mmol·L^{-1} chromic acid with tris(hydroxymethyl) methylamine to pH 8.1 and 0.2 mmol·L^{-1} cetyltrimethylammonium bromide was added finally and an applied voltage of -20 kV in a bare fused-silica capillary. Indirect UV detection was performed at a wavelength of 276 nm. The application of a small amount of inlet pressure during the separation assisted the attainment of a stable baseline. **Result:** The linear range for sulfate was 45-150 μg·mL^{-1}. The limit of quantitation was around 6 μg·mL^{-1}. The RSD for peak area ratio (the area of sulfate peak, divided by the area of the internal standard peak) was 0.6% (n=10). The results were agreed with those obtained with the method of British Pharmacopoeia. **Conclusion:** The proposed method is suitable for determination of sulfate in aminoglycoside; antibiotics.

Key words: capillary zone electrophoresis; indirect UV detection; sulfate; aminoglycoside antibiotics

氨基糖苷类抗生素通常以硫酸(反离子)盐的形式应用于临床,且硫酸根的含量与药品溶液的澄清度相关。现行英国药典和中国药典分别采用容量法和反相离子对-HPLC-蒸发光散射检测法测定氨基糖苷类抗生素中的硫酸根[1,2]。采用英国药典方法,实验中所用氨水对实验人员刺激性较大,滴定终点突跃不明显,且方法缺乏专属性;采用中国药典方法,硫酸根在死时间之前洗脱并与可能共存的其他离子之间分离较差。

从 20 世纪 90 年代早期开始,具有专属性强、柱效高、峰容量大、操作简单、样品量少和分析成本低等优点的毛细管区带电泳(CZE)技术在环境和水分析、化工和电镀工艺控制、临床检验和诊断以及农业和食品分析等领域的应用日趋广泛,并在很多应用方面替代了原先的 IC 技术[5~7];近年来,随着 IC 仪器的改进、新型填料的研制和毛细管 IC 的开发,IC 再次引起相关研究者的关注[3,4,8,9],IC 在药物分析方面的应用不断增加并为各国药典所收载,中国药典(2010)首次在附录中收载 IC 并有了具体应用的品种;但应用 IC 分析药物中的小分子杂质和反离

* 通讯作者 Tel:(021)50798183;E-mail:liuhao1968@hotmail.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

子,一般多用于结构和组成相对简单、稳定较性好的药物[8~11],而对于多组分、稳定性较差的药物则因IC的色谱选择性稍差和柱效较低而不易操作[12],此外,IC检测小离子通常采用的电导检测器的稳定性较差,蒸发光散射检测器和电喷雾检测器因检测的是小离子与流动相中的反离子形成的盐颗粒,故不可避免地受到这类检测器固有缺陷的影响[3,8,9]。

硫酸根离子不具备光吸收特征,故选用CZE法时通常与间接光度检测技术联用[3~7]。背景电解质中最常用的探针离子为铬酸根,十六烷基三甲基溴化铵或十四烷基三甲基溴化铵一般作为电渗流调节剂加入到背景电解质中[13]。选用未涂布的熔融石英毛细管,被分析离子以与电渗流相同的迁移方向向阳极迁移。

Altria等以含5 mmol·L^{-1}铬酸钠和0.5 mmol·L^{-1}十四烷基三甲基溴化铵的水溶液为背景电解质,测定了药品中的氯离子和硫酸根离子[14]。该背景电解质的不足之处在于缓冲容量极低。有研究表明,没有缓冲容量的背景电解质在电泳过程中其pH可改变几个单位[15]。因此,具有较高缓冲容量的背景电解质可稳定电渗流并显著改善组分迁移时间的重现性。Doble等以具有一定缓冲容量的含0.5 mmol·L^{-1}十四烷基三甲基溴化铵、5 mmol·L^{-1}铬酸和20 mmol·L^{-1}三羟甲基氨基甲烷的水溶液为背景电解质,显著改善了组分迁移时间和峰面积的重现性[16]。但实验结果显示,亚硝酸根和硫酸根在该系统中几乎同时迁移。此外,样品离子浓度较高时,在氯离子后迁移的离子(包括硫酸根离子)均呈拖尾的三角尺形状,显示存在较严重的电迁移扩散(electro-migration dispersion)现象。其原因在于样品离子和同离子(铬酸根)之间较大的淌度差异。而为了得到较好的分析结果精密度,采用较高的样品离子浓度是必须的。本文采用一种改进的CZE-间接紫外检测检测技术对氨基糖苷类抗生素中的硫酸根进行测定。

1 仪器与试药

1.1 仪器 德国Agilent G1600AX型毛细管电泳仪。

1.2 试药 硫酸盐对照品:取在110 ℃干燥至恒重的硫酸钾,按照中国药典2005年版的方法(Supplement 1)测定其中的SO_4^{2-}含量,结果为54.13%(以干品计),RSD=0.1%(n=10);再用经典的重量法验证,SO_4^{2-}含量为54.39%(以干品计),RSD=0.2%(n=4)。硫酸卡那霉素、硫酸新霉素和硫酸庆大霉素(上海新先锋药业有限公司),硫酸多粘菌素B(丹麦Dumex-Alpharma公司)。铬酸(≥99.0%)和三羟甲基氨基甲烷(≥99.8%)(均英国BDH公司),十六烷基三甲基溴化铵(95.0%,澳大利亚Ajax公司),其他试剂均为国产分析纯,水为美国Millipore Milli-Q Gradient A10纯水仪制备。

2 电泳条件

非涂层弹性石英毛细管(50 μm×64.5 cm,有效柱长为56 cm,德国Agilent公司);每日使用前用0.1 mol·L^{-1}氢氧化钠溶液冲洗10 min;背景电解质:含0.2 mmol·L^{-1}十六烷基三甲基溴化铵的15 mmol·L^{-1}铬酸水溶液(用三羟甲基氨基甲烷调节pH至8.1);操作电压:-20 kV;毛细管温度:25 ℃;检测波长:276 nm(间接检测);进样方法:进样端加压,5 kPa,4 s。分析过程中在毛细管进样端(阴极)持续施加1.5 kPa的压力。新毛细管依次用1 mol·L^{-1}氢氧化钠溶液、1 mol·L^{-1}盐酸溶液、乙腈和水分别冲洗处理5 min。2次进样中间用背景电解质冲洗毛细管2 min。用水标记电渗流。

3 溶液制备

3.1 内标溶液 取硝酸钠适量,用水溶解并定量稀释制成每1 mL中约含0.2 mg的溶液

3.2 对照品溶液 取在110 ℃干燥至恒重的硫酸盐对照品约20 mg,精密称定,置100 mL量瓶中,用内标溶液溶解并稀释至刻度,摇匀。

3.3 供试品溶液 取供试品适量,精密称定,置100 mL量瓶中,加内标溶液溶解并稀释至刻度,摇匀。供试品溶液每1 mL中约含硫酸根0.1 mg。典型电泳图如图1所示。

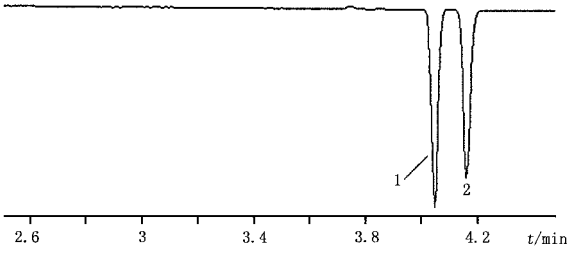

图1 硫酸卡那霉素样品溶液的电泳图

Fig 1 Electropherogram of kanamycin sulfate sample solution

1. NO_3^- 2. SO_4^{2-}

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4 方法与结果

4.1 线性关系试验 精密称取在 110 ℃干燥至恒重的硫酸盐对照品约 28 mg,用内标溶液溶解并定量稀释制成分别含硫酸根约 150,120,105,75,60,45 μg·mL^{-1}的 6 份溶液。取 6 份溶液在上述电泳条件下分别进样分析。以浓度(C)为纵坐标,硫酸根与内标物的峰面积比(R)为横坐标回归,回归方程为:

$C = 102.5R + 0.63$ $r = 0.9999$

表明硫酸根在 45 ~ 150 μg·mL^{-1}范围内呈良好的线性关系。

4.2 精密度试验 取对照品溶液连续进样分析,硫酸根和硝酸根迁移时间的 RSD 均为 0.7%(n = 10)或 1.5%(n = 30);硫酸根与硝酸根峰面积比的 RSD 为 0.6%(n = 10),硫酸根峰面积的 RSD 则为 1.3%(n = 10)。取定量限溶液连续进样分析,硫酸根与内标物的峰面积比的 RSD 为 3.5%(n = 10)。

4.3 检测限和定量限 精密量取对照品溶液适量,用内标溶液稀释后进样,检测限按信噪比 3∶1 计为 2 μg·mL^{-1},定量限按信噪比 10∶1 计为 6 μg·mL^{-1}。

4.4 重复性试验 取同一批硫酸卡那霉素供试品,配制成 6 份溶液,分别进样分析,硫酸根含量的平均值为 15.84%(RSD = 0.2%,n = 6);在第 2 d 和第 3 d 分别再次进样分析这 6 份溶液,结果分别为 15.65%和 15.71%。

4.5 回收率试验 精密称取已知硫酸根含量的硫酸卡那霉素供试品 9 份,每份分别精密加入硫酸盐对照品 1126 mg(n = 3)、2252 mg(n = 3)和 3378 mg(n = 3),用内标溶液溶解并稀释至刻度,摇匀。测得回收率的平均值为 100.5%(RSD = 1.3%,n = 9)。

4.6 样品测定 取硫酸卡那霉素和硫酸新霉素分别测定,硫酸根含量分别为 15.84%(n = 6)和 28.22%(n = 4);采用英国药典容量法对同一批供试品进行测定,相应的测定结果分别为 16.05%(n = 4)和 28.59%(n = 4)。显然,2 种方法的测定结果基本一致。

5 讨论

5.1 采用中国药典 2010 年版方法[2],以三氟醋酸作离子对试剂,可使荷正电的氨基糖苷类抗生素在色谱柱上保留,但固定相表面因吸附了三氟醋酸根而荷负电,产生的静电排斥力可使荷负电的硫酸根在死时间之前洗脱,硫酸根与供试品溶液中可能共存的其他离子尤其是无机阴离子等的分离较差(图 2),故测定时宜降低供试品溶液的浓度以增加硫酸根与其他离子之间的分离度,增加测定结果的准确性。

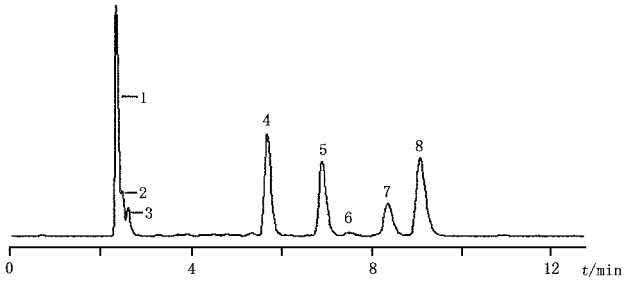

图 2 添加 KCl 和 NaH_2PO_4 的硫酸庆大霉素样品溶液的色谱图

Fig 2 Chromatogram of gentamicin sulfate sample solution spiked with KCl and NaH_2PO_4

1. SO_4^{2-} 2. $H_2PO_4^-$ 3. $K^+ + Na^+$ 4. 庆大霉素 C_{1a}(gentamicin C_{1a}) 5. 庆大霉素 C_2(gentamicin C_2) 6. 小诺霉素(micronomicin) 7. 庆大霉素 C_{2a}(gentamicin C_{2a}) 8. 庆大霉素 C_1(gentamicin C_1)

5.2 采用文献[16]的背景电解质,以 0.2 mmol·L^{-1}十六烷基三甲基溴化铵代替 0.5 mmol·L^{-1}十四烷基三甲基溴化铵,亚硝酸根和硫酸根在该系统中仍然几乎同时迁移。进一步的研究结果显示,与文献[17]所示一致,离子强度和 pH 8 ~ 9 对这些完全解离的阴离子的分离选择性影响较小。与其他文献[18]报道不同的是,随着十六烷基三甲基溴化铵浓度的增加(0.1 ~ 0.5 mmol·L^{-1}),电渗流增加,阴离子的迁移时间相应地减少,阴离子之间的分离度降低。但电渗流调节剂也不宜过低,因其浓度较高时可加速系统的平衡和稳定。为此,本文中十六烷基三甲基溴化铵的浓度选择为 0.2 mmol·L^{-1}。

5.3 背景电解质中的铬酸浓度可显著影响分离选择性。随着铬酸和三羟甲基氨基甲烷浓度(pH 8.5)的降低,毛细管表面的硅羟基在碱性水溶液中逐渐水解而荷负电,致使荷正电的电渗流调节剂因静电相互作用而在毛细管表面的吸附量增加,电渗流增强,所有阴离子因迁移方向与电渗流相同而导致迁移时间相应地减少,但亚硝酸根和硫酸根之间的分离改善。铬酸浓度在 2.0 ~ 2.2 mmol·L^{-1}之间时,两者之间基线分离且均在氯离子之后迁移,但除氯离子因与同离子(铬酸根)的淌度几乎相同而峰形较为对称外,其他阴离子的峰形均展宽且硫酸

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

根和亚硝酸根的峰形均拖尾;铬酸的浓度大于 10 mmol·L^{-1}时,硫酸根在硝酸根之后迁移且与其他阴离子均几乎基线分离。

5.4 已知探针离子浓度较高时,电迁移扩散减少,进样高浓度样品溶液仍可得到较好的峰形和重现性[19]。背景吸收在检测器的线性范围内时,探针离子的浓度应尽可能的高,以便得到较宽的线性范围,这样也有利于进样时样品的堆积效应[20]。如以含 0.2 mmol·L^{-1}十六烷基三甲基溴化铵的 15 mmol·L^{-1}铬酸水溶液(用三羟甲基氨基甲烷调节 pH 至 8.1,三羟甲基氨基甲烷的 pK_a 值在 25 ℃时为 8.1)为背景电解质,则所有具有相似淌度的阴离子均与硫酸根基线分离且所有离子的峰形均对称(阴离子浓度为 0.05 ~ 0.2 mmol·L^{-1}),均具有较高的理论板数,显示较高的样品堆积效应。在该系统中,叠氮离子在硫酸根和草酸根之间迁移且与硫酸根基线分离,氟离子与氯离子同时迁移,亚硫酸根在钨酸根之后迁移,枸橼酸根和硼酸根同时迁移且均在钨酸根之后迁移。虽然与文献报道的迁移顺序(溴离子、氯离子、硫酸根、亚硝酸根、硝酸根、草酸根、钼酸根,叠氮离子、钨酸根、枸橼酸根和氟离子)稍有差异,但没有任何离子干扰硫酸根和硝酸根的检测(图 3)。

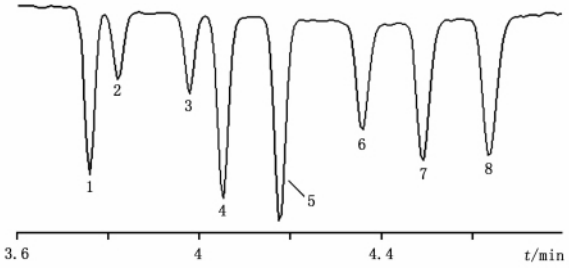

图 3 系统适用性试验电泳图

Fig 3 Electropherogram for the system suitability test

1. Br^- 2. Cl^- 3. NO_2^- 4. NO_3^- 5. SO_4^{2-} 6. 草酸根(oxalate) 7. 钼酸根(molybdate) 8. 钨酸根(tungstate)

5.5 氨基糖苷类抗生素在该系统中均荷正电并与阴离子的迁移方向相反,故不干扰阴离子的分析。分别进样分析水、背景电解质、0.2 mg·mL^{-1}硝酸钠溶液、0.2 mg·mL^{-1}硫酸钾对照品溶液以及硫酸卡那霉素溶液、硫酸庆大霉素溶液、硫酸新霉素溶液(均分别含 0.1 mg·mL^{-1}硫酸根,不含硝酸根)。所有电泳图均显示,本方法不存在干扰。进样分析硫酸根浓度高达 0.5 mg·mL^{-1}的 2 mg·mL^{-1}硫酸庆大霉素溶液,硫酸根的峰形仍对称、尖锐,且仍与硝酸根基线分离。故可采用较高的样品进样量以改善精密度。

5.6 采用间接紫外检测技术对探针试剂的纯度要求较高,否则基线噪音和波动均较大,探针试剂浓度高时尤其明显,故必要时须用重结晶等技术纯化探针试剂。有研究表明,在 CZE - 间接紫外检测过程中于毛细管进样端加压有时可显著改善基线漂移,且对于每一个特定的系统均存在所需最小压力[19,21]。本系统中,于毛细管进样端加压 1 kPa 以上时,可得较为平稳的基线,且压力越大,基线越平稳。此外,与文献一致,压力增加,峰高降低,柱效降低,组分之间的分离度相应降低[19],故压力不宜过大,最终选择为 1.5 kPa。方法的验证结果显示,在 CZE 过程中于毛细管进样端加压仍可获得满意的分析精密度。

5.7 虽然选用铬酸作探针离子时通常在 254 nm 处检测[13],但铬酸在本系统的背景电解质中的最大吸收波长约为 276 nm。采用间接紫外检测时,通常把检测波长和参比波长对调以便得到正的峰形[22]。但选用高波长如 480 nm 作为参比波长时,基线会因氘灯在可见光区域的光强度较低而噪音增加,故宜关闭参比波长以降低检测噪音。事实上,在本系统中参比波长选择为 480 nm 时,基线噪音至少增加 1 倍且基线的重现性较差。

5.8 虽然该背景电解质在室温避光可贮存 1 周以上,但随着贮存时间的延长,阴离子的迁移时间逐渐增加。其原因可能在于十六烷基三甲基的氧化。因此,建议该背景电解质在 3 日内使用。因该背景电解质具有较高的缓冲容量,使用同一瓶(0.6 mL)背景电解质可分析多达 20 份样品溶液,而组分的迁移时间和峰面积无显著变化。

参考文献

1 BP. 2011. Vol Ⅰ:992

2 ChP(中国药典). 2010. Vol Ⅱ(二部):976

3 Tyrrell E, Dicinoskia GW, Hildera EF, *et al*. Coupled reversed - phase and ion chromatographic system for the simultaneous identification of inorganic and organic explosives. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(20):3007

4 ZHU Yan(朱岩), YANG Bing - cheng(杨丙成). Capillary ion chromatography and related new technologies(毛细管离子色谱及相关新技术). *Chin J Chromatogr*(色谱), 2011, 29(5):373

5 Timerbaev AR. Inorganic species analysis by CE - An overview for

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2007 – 2008. *Electrophoresis*,2010,31(1):192

6 Johns C,Breadmore MC,Macka M,*et al*. Recent significant developments in detection and method development for the determination of inorganic ions by CE. *Electrophoresis*,2009,30(Suppl 1):S53

7 Foret F. Capillary electrophoresis of small ions using complex formation and indirect detection. *Electrophoresis*,2009,30(Suppl 1):S34

8 Liu X,Pohl C,Woodruff A,*et al*. Chromatographic evaluation of reversed – phase/anion – exchange/cation – exchange trimodal stationary phases prepared by electrostatically driven self – assembly process. *J Chromatogr A*,2011,1218(22):3407

9 Zhang K,Dai L,Chetwyn NP,*et al*. Simultaneous determination of positive and negative pharmaceutical counterions using mixed – mode chromatography coupled with charged aerosol detector. *J Chromatogr A*,2010,1217(37):5776

10 LIU Hai – jing(刘海静),YANG Rui – rui(杨瑞瑞),YUAN Xiang – hui(袁向辉),*et al*. Ion chromatography method for the detection of residual sulfur dioxide in Chinese Angelica(离子色谱法测定当归中二氧化硫残留量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志),2011,31(4):752

11 LI Jing(李京),FAN Hui – hong(范慧红). Determination of the free and linked sulfate content of heparin and heparin – like materials(离子色谱法测定肝素及其类似物中游离和结合硫酸根). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志),2010,30(3):452

12 ChP(中国药典). 2010. Vol Ⅱ(二部):670

13 Doble P,Haddad PR. Indirect photometric detection of anions in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*,1999,834(1/2):189

14 Altria KD,Goodall DM,Rogan MM. Quantitative determination of drug counter – ion stoichiometry by capillary electrophoresis. *Chromatographia*,1994,38(9/10):637

15 Macka M,Andersson P,Haddad PR. Changes in electrolyte pH due to electrolysis during capillary zone electrophoresis. *Anal Chem*,1998,70(4):743

16 Doble P,Macke M,Andersson P,*et al*. Buffered chromate electrolytes for separation and indirect absorbance detection of inorganic anions in capillary electrophoresis. *Anal Commun*,1997,34(11):351

17 Jones WR,Jandik P. Controlled changes of selectivity in the separation of ions by capillary electrophoresis. *J Chromatogr*,1991,546(1/2):445

18 Wang P,Li SFY,Lee HK. Simultaneous determination of monofluorophosphate and fluoride in toothpaste by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*,1997,765(2):353

19 Johns C,Shaw MJ,Macke M,*et al*. Sensitive indirect photometric detection of inorganic and small organic anions by capillary electrophoresis using orange G as a probe ion. *Electrophoresis*,2003,24(3):557

20 Johns C,Macka M,Haddad PR,*et al*. Practical method for evaluation of linearity and effective pathlength of on – capillary photometric detectors in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*,2001,927(1/2):237

21 Johns C,Macke M,Haddad PR. Highly sensitive indirect photometric detection of cations by capillary electrophoreis with the cationic dye chrysoidine. *J Chromatogr A*,2003,997(1/2):87

22 Schoftner R,Pfeifer A,Buchberger W. Development of a simple CZE method for the analysis of an industrial cationizing reagent and its hydrolysis products. *J Sep Sci*,2002,25(3):507

(本文于 2011 年 3 月 22 日收到)

《中国现代应用药学》2012 年征订启事

《中国现代应用药学》创刊于 1984 年,是由中国药学会主办,中国科协主管,国内外公开发行的国家级综合性药学科技期刊。本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》药学类核心期刊(全国中文核心期刊),中国科学引文数据库入选期刊,并被美国《化学文摘》、《剑桥科学文摘(自然科学)》、《国际药学文摘》、《乌利希期刊指南》、《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》等国际重要检索系统收录。《中国现代应用药学》栏目涵盖面广,设有论著、综述、专栏,专栏包括药理、中药与天然药、药物化学、药剂、药物分析与检验、医院药学、临床、不良反应、药事管理等。本刊能全方位多角度地反映国内药学领域的最新进展,是国内广大医药工作者发表科研成果、交流信息、更新知识的重要学术平台,也是发布药品及相关领域产品广告的重点专业期刊媒体。本刊为月刊,每月 28 日出刊,大 16 开本,铜版纸精美印刷,每期订价 30.00 元,全年 360.00 元,国内统一刊号:CN 33 – 1210/R,国际标准出版物编号:ISSN 1007 – 7693,邮发代号:32 – 67,国外发行:中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱,100044),欢迎广大读者向本刊编辑部或当地邮局订阅。编辑部地址:杭州市中河中路 250 号改革月报大楼 10 楼,邮编:310003,电话:0571 – 87297398,传真:0571 – 87245809,E – mail:xdyd@chinajournal.net.cn,http://www.chinjmap.com。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net