

柱后衍生化高效液相色谱法测定注射用硫酸阿米卡星

何丹¹, 杨林²

(1. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016; 2. 重庆市药品检验所, 重庆 400015)

摘要 目的: 建立柱后衍生化高效液相色谱法测定硫酸阿米卡星含量的方法。方法: 色谱柱为 Waters SunFire C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为含戊烷磺酸钠和冰醋酸的硫酸钠溶液-甲醇 (97:3); 柱温 25 ℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹。柱后衍生化试剂为邻苯二甲醛溶液, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 衍生化反应温度 45 ℃, 荧光激发波长 360 nm, 测定波长 440 nm。结果: 硫酸阿米卡星在 2.09~41.81 mg·L⁻¹ 浓度范围内线性关系良好 ($r = 0.9999$), 平均回收率 ($n = 9$) 为 98.6%。结论: 该方法简便快速, 结果准确可靠, 可用于注射用硫酸阿米卡星的含量测定。

关键词: 柱后衍生化; 高效液相色谱; 硫酸阿米卡星; 荧光检测

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)06-1025-02

Determination of amikacin sulfate injection by HPLC with post-column derivatization

HE Dan¹, YANG Lin²

(1. Chongqing University of Medical Science Chongqing 400016, China; 2. Chongqing Institute for Drug Control Chongqing 400015, China)

Abstract Objective To establish a method of HPLC with post-column derivatization for determination amikacin sulfate injection. **Methods** A Waters SunFire C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used, and the mobile phase was sodium sulfate solution (containing pentanesulfonate sodium salt and glacial acetic acid) - methanol (97:3), column temperature was 25 ℃, at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. OPA solution was used for post-column derivatization online at a flow rate of 0.5 mL·min⁻¹. The temperature of post-column reaction was set at 45 ℃, detected by fluorescence detector (λ_{ex} 360 nm, λ_{em} 440 nm). **Results** The calibration curve was linear in the range of 2.09-41.81 mg·L⁻¹ ($r = 0.9999$). The average recovery ($n = 9$) was 98.6%. **Conclusion** The method presented in this study showed good accuracy, more precision, simplicity and reproducibility as a recommendable option for quality control of amikacin sulfate injection and its related substances.

Key words post-column derivatization; HPLC; amikacin sulfate; fluorescence detection

硫酸阿米卡星 (amikacin sulfate) 是临床上较常用的氨基糖苷类抗生素, 因其无紫外吸收, 中国药典 2005 年版仍采用微生物检定法进行含量测定, 该方法耗时长, 操作烦琐。USP31 和 BP2008 则采用柱前衍生化法, 同样操作烦琐, 且影响因素多, 条件不易控制。本文建立的柱后衍生化高效液相色谱法操作简便、快捷, 且阿米卡星与杂质 A 能得到良好分离。

1 仪器与试剂

Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪; 2475 荧光检测器 (美国 Waters 公司); Milli-Q Academic 超纯水系统。

注射用硫酸阿米卡星 (规格 0.2 g·支⁻¹, 批号:

071001, 071112, 071113) 由企业提供; 硫酸阿米卡星对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 3358902); 杂质 A 对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 30335-200204); 水为超纯水; 甲醇为色谱纯 (山东禹王实业总公司化工厂); 其他试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters SunFire C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为含戊烷磺酸钠和冰醋酸的硫酸钠溶液 (取无水硫酸钠 28.4 g 加水 1000 mL 溶解后, 加戊烷磺酸钠 5.2 g 和冰醋酸 1.0 mL, 振摇使溶解) - 甲醇 (97:3); 柱温 25 ℃; 流速 1.0 mL·min⁻¹。衍生化试剂^[1,2]: 取硼酸 9.3 g 和

氢氧化钠 4.7 g 加水 1000 mL 溶解后, 用氢氧化钠或硼酸调节 pH 至 10.0 加聚氧乙烯月桂醚 1.0 g 2-巯基乙醇 2 mL 和邻苯二甲醛乙醇溶液 (0.8^{+10}) 10 mL, 振摇使溶解; 流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 衍生化反应温度为 45°C ; 荧光检测器激发波长 360 nm, 测定波长为 440 nm; 进样体积 10 μL 。

2.2 系统适用性试验 分别取硫酸阿米卡星与杂质 A 对照品适量, 加水溶解并稀释成每 1 mL 含硫酸阿米卡星和杂质 A 25 μg 的溶液, 按上述色谱条件进样 10 μL , 记录色谱图。结果表明阿米卡星峰与杂质 A 峰分离良好, 分离度大于 2.0 (图 1)。

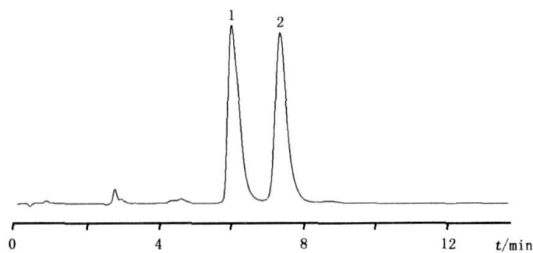


图 1 系统适用性色谱图

Fig 1 Chromatogram of system suitability test

1. 阿米卡星 (amikacin) 2. 杂质 A (impurity A)

2.3 线性试验 精密称取硫酸阿米卡星对照品 0.04181 g 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。分别精密量取对照品储备液 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 $2.09 \sim 41.81 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液。按上述色谱条件测定, 以峰面积 A 对浓度 $C (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ 进行线性回归, 回归方程为:

$$A = 3.13 \times 10^6 C - 5.794 \times 10^5 \quad r = 0.9999$$

以信噪比 $S/N = 10$ 计, 定量限为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果表明, 硫酸阿米卡星浓度在 $2.09 \sim 41.81 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验 取线性试验中浓度为 $16.72 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液, 连续进样 6 次, 测定阿米卡星的峰面积, RSD 为 0.60%, 符合精密度试验要求。

2.5 稳定性试验 取线性试验中浓度为 $16.72 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液, 室温下放置 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 分别进样测定阿米卡星峰面积, RSD = 0.83%, 表明溶液在 8 h 内基本稳定。

2.6 重复性试验 精密称取同一批注射用硫酸阿米卡星 6 份, 加水稀释成每 1 mL 约含 12.5 μg 的溶液, 按上述色谱条件测定其含量, 该批注射用硫酸阿米卡星平均含量为 96.3%, RSD 为 0.83% ($n = 6$)。

表明该方法重现性好。

2.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的注射用硫酸阿米卡星 10.0, 12.5, 15.0 mg 各 3 份, 分别一一对应地加入硫酸阿米卡星对照品 10.0, 12.5, 15.0 mg 用水溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件依法测定。结果低、中、高 3 种浓度的平均回收率 ($n = 9$) 分别为 99.3%, 98.4%, 98.1%; RSD 分别为 1.2%, 0.96%, 0.23%。总的平均回收率 ($n = 9$) 为 98.6%。

3 结果

3.1 样品测定 取注射用硫酸阿米卡星约 12 mg 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。按上述色谱条件进样 10 μL 分析, 3 批样品测定结果分别为标示量含量的 95.6%, 98.0%, 96.3%; RSD 分别为 1.2%, 0.98%, 1.0%。

4 讨论

4.1 在考察流动相系统时, 含戊烷磺酸钠和冰醋酸的硫酸钠溶液也可以对阿米卡星和杂质 A 进行有效分离, 但需要较长的分析时间, 且流动相不含有机相对色谱柱伤害大, 故加入 3% 的甲醇以达到缩短分析时间和保护色谱柱的目的。本文采用的流动相 pH 在 3.5 左右, 多数色谱柱都能耐受。

4.2 在配置柱后衍生化试剂时, 由于 2-巯基乙醇毒性大且易挥发, 故应在过滤脱气后再加入。由于邻苯二甲醛易氧化, 衍生化试剂配置完成后一般放置至第 2 d 即不宜使用, 所以每次测定需新鲜配置衍生化试剂, 在采用该法时应注意。

4.3 硫酸钠和醋酸钠及柠檬酸钠相比, 离子强度大, 更有利于阿米卡星和杂质的分离, 且峰形较好。故选择硫酸钠。

参考文献

- LIU Hong-cheng (刘宏程), YANG Guang-yu (杨光宇), MA Xue-tao (马雪涛), *et al* HPLC determination of residual carbamate insecticides crude drugs post column derivation method (测定中药材中氨基甲酸酯类杀虫剂残留的高效液相色谱柱后衍生法). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2006 26(6): 857
- WAN Dan-jing (万丹晶), CHEN Miao-fen (陈妙芬), ZHA Li-Yong-hong (翟咏虹). Determination of 18 kinds of amino acids in multi-amino acid tablets by RP-HPLC method and amino acid analyzer (用 HPLC 法和氨基酸分析仪测定多维氨基酸片中 18 种氨基酸). *Pharm Care Res* (药学服务与研究), 2006, 6(3): 212

(本文于 2008 年 5 月 26 日收到)