

庆大霉素功能组分的定量分析方法研究

费盛华 彭奇均

(江南大学化学与材料工程学院 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号 214122)

摘要 针对目前庆大霉素功能组分含量检测方法的成本昂贵和使用仪器的限制, 建立了一种快速经济准确的薄层色谱结合比色法, 以甲醇-氯仿-25% 氨水(1:1:1)为展开剂, 碘蒸汽一次显色, 收集斑点以乙酰丙酮及甲醛为显色剂, 进行二次显色, 并建立 420nm 处的浓度-吸光度曲线。结果表明, 庆大霉素在 2—100mg 范围内线性关系良好 $r=0.9986$, 三组分含量测定误差分别为 0.188%、0.265%、3.701%。本法仅使用最简便宜得的仪器与药品就能够对庆大霉素各功能组分进行定量分析测定, 适合于工业分离中检测应用。

关键词 庆大霉素, 功能组分, 薄层色谱-比色法。

中图分类号: O 657. 32

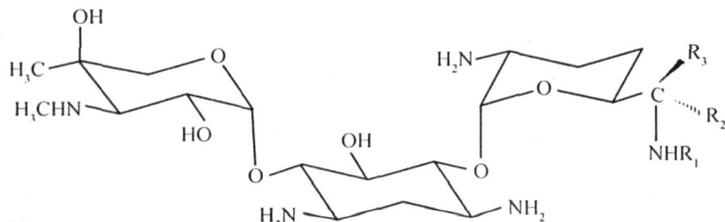
文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2007)06-1049-04

1 前言

庆大霉素(Gentamicin, GM)是由小单孢菌属发酵产生的一组结构相近的多组分抗生素^[1], 对多种革兰氏阴性菌和阳性菌有较强的抗菌作用。其化学结构属于氨基糖苷类化合物, 其中以 C 族复合物(C₁, C₂, C_{1a}, C_{2a})为主, 以及一些小组分(图 1)。起主要作用的 C 族复合物由于在化学结构上的差异, 生物活性和毒性也不相同。C₁ 组份毒副作用小, 不易耐药。但疗效不如 C₂ 和 C_{1a}。而 C₂ 和 C_{1a} 虽疗效高但毒性大且易耐药。这四种组分的含量也是国际上 GM 合格与否的检测标准, 并将这四种组分称为 GM 的功能组分。在生产过程中, GM 功能组分的组成及比例常因发酵菌种的变异及纯化工艺的变化而变化, 因此对 GM 功能组分的控制成为其质控最重要的环节^[2]。

常见 GM 的检测方法有紫外分光光度法、比色法、旋光法、间接原子吸收法等^[3], 但都是将 GM 作为一个整体来检测, 在用于不需要具体功能组分含量的方面, 如发酵液、药物制剂、血液等中 GM 含量的测定是可以满足需要的。此外还有柱前衍生-HPLC 法^[4]、薄层扫描仪^[5]、电化学检测器^[6, 7]、蒸发光散射检测器^[8, 9]、核磁共振(NMR)^[10]等方法可用于 GM 功能组分的检测, 但是仪器的限制和辅助检测试剂的昂贵, 如柱前衍生-HPLC 法中用到昂贵的流动相庚烷磺酸钠等, 又使得这些方法不适用于工业生产中 GM 功能组分的检测应用。



	R ₁	R ₂	R ₃
庆大霉素 C ₁	CH ₃	H	CH ₃
庆大霉素 C ₂	H	H	CH ₃
庆大霉素 C _{1a}	H	H	H
庆大霉素 C _{2a}	H	CH ₃	H

图 1 庆大霉素 C 族复合物结构示意图

基金项目: 国家技术创新计划资助项目(项目编号: 02CJ-05-05-05)

联系人, 手机: (0) 13485040933; E-mail: feishenghua@126.com

作者简介: 费盛华(1983—), 女, 甘肃省兰州市人, 硕士研究生, 研究方向为化工分离。

收稿日期: 2007-07-23; 接受日期: 2007-08-02

近年来发现 GM C_{1a}组分可作为合成抗菌药物依替米星的前体药物,因此需要由 GM 复合物中分离出 GM C_{1a}组分^[11]。我国在 20 世纪 80 年代就开始了 GM 组分分离的研究,但是对各组分含量的测定都是采用薄层色谱-目测法^[12],通过薄层色谱一次显色后仅用观察法确定斑点面积大小从而定量,其误差达到 90% 以上。因此对其功能组分分离的过程中如何进行含量的测定显得非常重要。

本文研究了一种检测 GM 功能组分含量的方法,其特点是快速、准确、经济,适合于工业分离中应用。方法是将 TLC 和比色法相结合,采用 TLC 进行定性分离,碘蒸汽一次显色后收集斑点,以乙酰丙酮及甲醛为显色剂,进行二次显色,使 GM 各组分形成二氢吡啶衍生物,此化合物的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH=3.6)在 420nm 波长处有肩峰吸收^[14],利用此吸收建立校准曲线,进行定量测定。通过二次显色解决了 GM 功能组分薄层色谱检测法只能定性不能定量的问题。

2 实验部分

2.1 仪器与药品

棱光 752N 紫外可见分光光度计(中国上海精密科学仪器有限公司);玻璃点样毛细管(华西医科大学仪器厂);薄层析硅胶 G(青岛海洋化工厂);玻璃板(10cm × 20cm)。

GM 标准品(中国药品生物制品检定所,批号:130326-200314);GM 样品(河南路德药业有限责任公司提供);羧甲基纤维素钠、氯仿、甲醇、氨水(25%)、碘、醋酸钠、冰醋酸、乙酰丙酮、甲醛均为分析纯。实验用水为去离子水。

2.2 方法与结果

2.2.1 TLC

薄层板采用硅胶 G 与 0.1% 羟甲基纤维素钠(CMC-Na) 溶液制备(使用前于 105℃ 下活化 2h);展开剂为甲醇-氯仿-25% 氨水(1:1:1, V/V/V);展开槽在使用前用展开剂饱和 1h;点样量为点样毛细管一管,即 0.2μL。供试品平行点样 4 次。薄层板展开 18cm 时从展开槽中取出,挥散氨的气味并放冷至室温。放入碘熏缸中熏 15—30min,即可显现清晰的黄色斑点。结果见图 2。

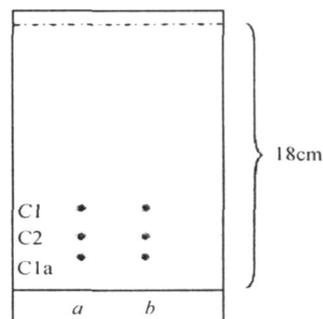


图 2 GM 的 TLC 分离结果
a——标准品; b——供试品。

2.2.2 比色法

(1) 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH=3.6)的配制

醋酸钠 5 g, 加冰醋酸 20mL, 再加去离子水稀释至 250mL, 备用。

(2) 显色剂的配制

乙酰丙酮 0.8mL, 36% 甲醛溶液 1.7mL, 加醋酸-醋酸钠缓冲液至 30mL, 摇匀备用(需临用前配制)。

(3) 方法

将薄层色谱板上同一组分的斑点刮下于小型称量瓶中,加 1mL 水搅拌溶解,离心沉淀,取上层清液于 10mL 试管中,加入显色剂 3mL,摇匀,沸水浴加热 20min,冷至室温后在 420nm 处测吸光度。

3 结果和讨论

3.1 精密度实验

分别配制 2、5、10、15、20 mg/mL GM 标准溶液, 各浓度平行点样 3 次。无须展开, 每一个点作为一个样品按 2.2.2(3) 方法测定其吸光度, 各浓度平均 RSD 分别为 1.9%、1.5%、1.2%、0.7%、0.6%。

3.2 稳定性实验

取 20 mg/mL GM 标准溶液分别平行点样 1、2、3、4、5 次, 收集斑点制样, 待碘挥发完全后, 按 2.2.2(3) 方法进行测定, 结果其 RSD 分别为 2.3%、1.9%、1.5%、1.1%、1.3%。

3.3 重复性实验

取 20 mg/mL GM 标准溶液点板层析后, 每张板平行点样 4 次, 待碘挥发完全后, 按 2.2.2 中(3) 方法测定 6 次, 结果 C_{1a} 、 C_{2a} 、 C_1 的相对标准偏差分别为 1.9%、2.3%、3.3%。

3.4 GM 检测浓度范围

分别配制 2—160 mg/mL GM 标准溶液, 按薄层色谱条件点板, 无须展开, 分别将斑点刮下于小型称量瓶中, 再按 2.2.2 中(3) 方法进行吸光度测定, 得到 GM 校准曲线, 见图 3。求得回归方程 $y = 0.00892x - 0.02393$, $r = 0.9986$, 线性范围为 2—100 mg/mL。

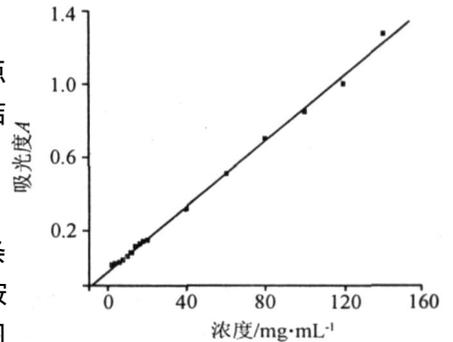


图 3 庆大霉素校准曲线

3.5 样品含量的测定

取 GM 样品溶液 20 mg/mL 点板, 每张板平行点样 4 次, 按 2.2.1 下方法展开显色收集斑点, 待碘挥发完全后(即无黄色), 按 2.2.2 中(3) 方法进行测定。将所得吸光度

代入回归方程中求得浓度, 并与药典法测定的标准含量进行对比, 得到 RSD。结果见表 1。

表 1 实验结果与标准含量比较 (%)

	实验结果	标准含量	相对误差
1(C_{1a})	32.962	32.9	0.188
2(C_2)	39.304	39.2	0.265
3(C_1)	27.734	28.8	3.701

4 结论

(1) 由实验结果可以看出, TLC 方法中 C_2 和 C_{2a} 斑点重合, 因此只能将其合并计算。为使斑点界限清晰, 准确收集, 展板高度选择 18 cm。碘蒸汽显色时间对测定结果有较大影响。时间太短则斑点边缘不清晰, 造成收集误差。时间太长又会使收集物颜色消退时间过长。因此碘蒸汽显色时间选择 15—30 min 为宜。斑点收集后, 尽量多放置一段时间确保碘挥发完全。每张板上平行点样量在 4—6 次为宜, 点样数量过多则斑点间距窄, 容易引起斑点边缘重叠, 造成测定误差。

(2) 本文将薄层色谱法和比色法相结合, 通过二次显色, 解决了 GM 功能组分薄层色谱一次显色只能定性不能定量的问题。检测结果与药典法测定的标准含量基本吻合, 准确度高。本方法所使用的仪器药品均普遍易得, 适合于工业生产中对 GM 功能组分分离过程的含量监测等。其不足之处在于此方法中 C_2 和 C_{2a} 组分未能分开, 因此工业分离中如果需要对 C_2 或 C_{2a} 组分分别定量, 则还需要进行进一步的研究。

参考文献

- [1] 顾觉奋. 抗生素[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001. 209.
- [2] 杨利红, 胡昌勤, 刘文英. HPTLC 法测定庆大霉素组分及其相关物质[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(2): 221—224.
- [3] 李刚, 袁汀. 硫酸庆大霉素含量测定方法研究进展[J]. 实用药物与临床, 2005, 8(2): 65—66.
- [4] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 866—867.
- [5] 贾忠, 袁继勇, 吕东煜. 薄层扫描法测定注射用硫酸庆大霉素中 3 组分的含量[J]. 中国药房, 2005, 16(3): 217—218.
- [6] 齐雪琴. 电化学液相色谱分析庆大霉素的方法[J]. 福建分析测试, 2006, 15(1): 4—7.
- [7] Adams E, Roelants W, De Paep R *et al*. Analysis of Gentamicin by Liquid Chromatography with Pulsed Electrochemical Detection[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1998, 18: 689—698.
- [8] Clarot I, Chambault P, Hasdenteufel F *et al*. Determination of Gentamicin Sulfate and Related Compounds by High-Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1031: 281—287.
- [9] Nikolaos C, Megoulas, Michael A. Koupparis. Development and Validation of a Novel LC/ELSD Method for the Quantitation of Gentamicin Sulfate Components in Pharmaceuticals[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, 36: 73—79.
- [10] 陈志伟, 谢狄霖, 陈忠等. 用核磁共振方法测定庆大霉素 C 组分比率[J]. 分析仪器, 2002, 4: 23—26.
- [11] 孙海远, 段修礼. 一种庆大霉素 C_{1a} 的制备方法[P]. CN: 1511839A, 2004-07-14.
- [12] 郑绳一, 叶霁青. 庆大霉素主要组分的分离和结构研究[J]. 抗生素, 1980, 5(1): 5—11.
- [13] 缪昌城, 林玲, 洪丽娜等. 国产庆大霉素 C 族组分的制备[J]. 抗生素, 1981, 6(5): 1—8.
- [14] 杨燕. 比色法测定庆大霉素合剂的含量[J]. 江苏药学与临床研究, 2000, 8(2): 26—27.
- [15] 柏亚林, 陈双璐. 比色法在庆大霉素注射液含量测定中的应用[J]. 中国药师, 2004, 7(11): 904—905.

Study on Quantitative Analysis Methods for Gentamicin Functional Components

FEI Sheng-Hua PENG Qi-Jun

(School of Chemical and Material Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214122, P. R. China)

Abstract A rapid and low-cost TLC-colorimetry procedure method for determination of gentamicin functional components was developed. A mixture of methanol-chloroform-25% ammonium hydroxide (1:1:1) was used as a developing reagent and iodine vapour as the first reveal reagent. Spots were collected. Acetyl acetone and formaldehyde were added as the second reveal reagents. The concentration-absorbance curve for gentamicin at 420nm is in the range of 2—100mg ($r = 0.9986$) with the RSD of 0.188%, 0.265% and 3.701% for the three compounds, respectively. This TLC-colorimetry technique with the cheapest and available apparatus is good for separation and detection of functional components. This method is recommendable for application in industry.

Key words Gentamicin, Functional Components, TLC-Colorimetry.

本刊可上网查阅

由于本刊在 2001—2009 年被《中国核心期刊(遴选)数据库》收录, 全文上网, 因此, 读者、作者均可直接上网查阅。网址:

<http://www.periodicals.net.cn>

<http://www.wanfangdata.com.cn>

<http://gpsys.periodicals.net.cn>

<http://gpss.chinajournal.net.cn>