

高效液相色谱-蒸发光散射检测法在大观霉素质量控制中的应用

吴 燕^{1*}, 郭成明¹, 张胜强²

(¹天津市药品检验所, 天津 300070; ²中国药科大学药物分析学教研室, 南京 210009)

【摘要】 目的: 应用高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC/ELSD)分析大观霉素的有关物质并检测其发酵液的含量。方法: 色谱柱: Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.04 mol/L 三氟醋酸水溶液; 漂移管温度: 50 ℃, 雾化气体(空气)压力: 3.0×10^5 Pa。结果: 本法可满足大观霉素有关物质检测的需要, 方法专属性高, 检测限为 50 ng; 对大观霉素发酵液的测定结果与微生物法结果相关性良好($r = 0.9999$); 大观霉素进样量在 4.25~16.99 μg 范围内, 其峰面积对数与进样量对数线性相关($r = 0.9997$)。结论: 本方法操作简单, 准确性、重现性好, 灵敏度高, 不但可用于大观霉素成品的质量控制, 而且可满足大观霉素的生产在线监测。

【关键词】 大观霉素; 高效液相色谱法; 蒸发光散射检测; 含量测定; 有关物质

【中图分类号】 R917 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2005)01-0040-04

大观霉素是临床上一类常用的抗菌药物^[1], 其含量测定的方法, 中国药典 2000 年版采用微生物效价法^[2], USP 26 版、EP 2002 版采用衍生化气相色谱法^[3,4]; 对其有关物质的检查, 中国药典 2000 年版、EP 2002 版均采用薄层色谱法^[2,3], USP 26 版未收载该药物的有关物质检查方法。成盐的大观霉素易溶于水, 极性较强, 在反相高效液相色谱系统 ODS 柱上保留差, 而且大观霉素仅在紫外区末端 200 nm 附近有吸收, 使用紫外检测器检测较困难, 因此 HPLC-UV 法在大观霉素质量分析中的应用受到限制。本文参考有关文献, 引入蒸发光散射检测器作为检测手段^[5-9], 同时在流动相中添加离子对试剂, 建立了大观霉素有关物质检测的 HPLC/ELSD 法。该方法简便、易行, 准确度高, 并在线生产的监测中达到了质控的目的, 具有一定的应用价值。

1 仪器与材料

岛津 LG-10A 高效液相色谱系统; Sedex 75 型蒸发光散射检测器; XWK-A 小型无油空气泵; 三氟醋酸(Tedia 公司); 水为自制重蒸水; 大观霉素标准品(中国药品生物制品检定所); 盐酸大观霉素、硫酸大观霉素样品、大观霉素发酵液(山东鲁抗医药集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 大观霉素样品有关物质测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.04 mol/L 三氟醋酸水溶液; 漂移管温度: 50 ℃, 雾化气体(空气)压力: 3.0×10^5 Pa, 灵敏度: 6。

2.1.2 自身对照溶液的制备 精密称定盐酸大观霉素样品适量, 加水稀释成浓度分别为 0.01, 0.025, 0.05, 0.10, 0.20 mg/ml 的溶液, 摇匀, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称定大观霉素样品适量, 加水制成 5 mg/ml 溶液, 摇匀即得。按“2.1.1”项下条件进样 20 μl 分析(见图 1)。

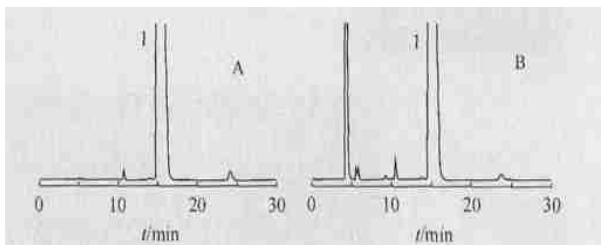


Fig 1. Chromatogram of related substances by HPLC

A. spectinomycin hydrochloride; B. spectinomycin sulfate; 1. spectinomycin

2.1.4 专属性试验 对样品进行以下处理后按“2.1.1”项下条件, 分别测定(图 2~图 5)。

(1) 取样品适量, 加 1 mol/L 硫酸 1 ml, 放置 1 h

后,加水稀释成 5 mg/ml 溶液;

(2) 取样品适量,加 1 mol/L 氨水 1 ml,放置 1 h 后,加水稀释成 5 mg/ml 溶液;

(3) 取样品适量,加 20% 双氧水 1 ml,放置 1 h 后,加水稀释成 5 mg/ml 溶液;

(4) 取样品适量,于烤箱中 120 °C 加热 1 h,取出后,加水稀释成 5 mg/ml 溶液。

样品在上述破坏条件下产生各类降解产物与主峰均可得到良好分离,该色谱条件可用于样品的有关物质分析。

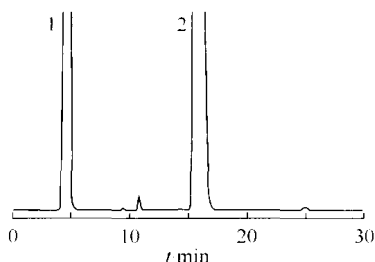


Fig 2. Chromatogram of acid degradation sample

1. SO_4^{2-} ; 2. spectinomycin

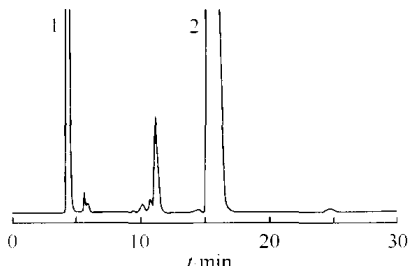


Fig 3. Chromatogram of alkali degradation sample

1. SO_4^{2-} ; 2. spectinomycin

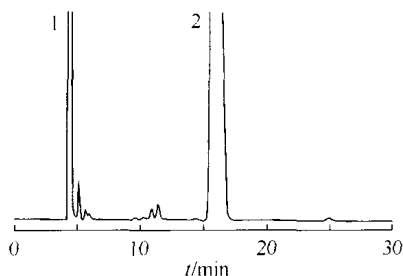


Fig 4. Chromatogram of oxidation degradation sample

1. SO_4^{2-} ; 2. spectinomycin

2.1.5 线性试验 分别精密量取浓度为 0.01, 0.025, 0.05, 0.10, 0.25 ng/ml 的自身对照溶液,按“2.1.1”项下条件,进样 20 μl 分析。进样量在 0.202~ 5.062 μg 范围内,大观霉素峰面积对数(x)与其进样量对数(y)回归方程为: $y = 0.7324x - 3.856$, $r = 0.9984$ 。

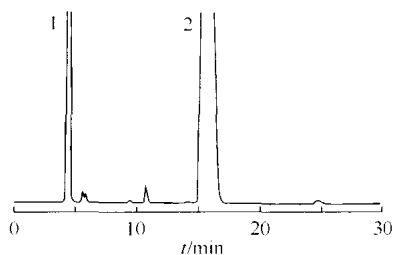


Fig 5. Chromatogram of thermo-degradation sample

1. SO_4^{2-} ; 2. spectinomycin

2.1.6 溶液稳定性试验 取盐酸大观霉素样品(批号: 020701),制成浓度约为 5.0 mg/ml 溶液,0, 1, 3, 8, 10, 26 h 测定有关物质总量(%) 分别为 4.41, 4.47, 4.56, 6.17, 6.46, 9.10。其中, t_R 为 0.65~ 0.75 的有关物质在水溶液中室温放置不稳定,其含量有逐渐增加的趋势。 t_R 为 0.35~ 0.60 和 0.95~ 1.60 的有关物质的含量基本变化不大。总体来看,有关物质测定供试品溶液不宜室温长久放置,供试液室温下 6 h 内基本稳定。

2.1.7 检测限试验 以信噪比 3 为限,该色谱条件下大观霉素有关物质检查检测限为 50 ng。

2.1.8 样品有关物质测定 分别取各批样品适量,参照“2.1.3”项制备供试品溶液,按“2.1.1”项下条件进行分析,依随行标准曲线法计算样品中有关物质的含量,以质量百分比计(见表 1)。

2.2 大观霉素发酵液含量测定

2.2.1 色谱条件 同大观霉素有关物质检测的色谱条件(见“2.1.1”项)。

2.2.2 标准品溶液的制备 精密称定大观霉素标准品(批号: 0354-200001, 657 $\mu\text{g}/\text{mg}$) 适量,加水制成 1 mg/ml 溶液,作为标准品贮备液。分别精密量取此溶液适量,加水稀释成浓度分别为 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 mg/ml 的溶液,摇匀,即得。

2.2.3 样品溶液的制备 精密量取供试品(发酵液、放罐液、解吸液) 10 ml,置于 15 ml 具塞离心管中;精密加入三氟醋酸 0.1 ml,混合均匀,3 000 r/min 离心 5 min;精密量取上清液适量,加水稀释成浓度约为 200~ 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液分析,依随行标准曲线法计算供试品中大观霉素的含量($\mu\text{g}/\text{ml}$)。

2.2.4 线性试验 分别取标准品溶液,按“2.2.1”项下条件进样 20 μl 分析。大观霉素进样量在 (4.25~ 16.99 μg) 范围内,其峰面积对数(x)与进

样量对数(y) 回归方程: $y = 0.781\ 2x - 1.311$, $r = 0.999\ 7$ 。

Tab 1. Results of related substances analysis

Drug	Batch	t_R	t_R	t_R	Sum (%)
		< 0.40 (%)	0.58~ 0.73 (%)	> 0.90 (%)	
Spectinomycin hydrochloride	221-1 ^a	4.31	2.94	3.31	10.56
	221-2 ^a	4.33	2.74	3.29	10.36
	057 ^a	0.32	2.36	2.62	5.30
	175-2 ^a	5.99	2.42	2.66	11.07
	030212 ^b	0.28	1.21	1.85	3.34
	020701 ^b	0.58	1.74	2.78	5.10
	010404 ^b	0.60	1.59	3.22	5.41
	011201 ^b	0.72	1.94	3.23	5.89
	047 ^a	2.49	4.03	2.82	9.34
	048 ^a	2.91	2.87	3.04	8.82
Spectinomycin sulfate	049 ^a	3.76	3.05	2.69	9.50
	0108002 ^a	4.89	2.83	5.58	13.28
	0205088 ^a	3.41	2.18	2.51	8.10
	0206092 ^a	2.69	2.10	2.63	7.42
	0302007 ^a	2.10	2.58	1.94	6.62

^abulk material; ^bpreparation

2.2.5 溶液稳定性试验 由放罐液与解吸液分别制备的含量测定供试液(浓度约 300 μg/ml)室温放置,分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 测定含量分别为:放罐液 1 563, 1 564, 1 603, 1 593, 1 605 μg/ml;解吸液 12 219, 12 131, 12 137, 12 411, 12 254 μg/ml, 供试液均在 8 h 内基本稳定。

2.2.6 重复性试验 日内精密度:于 1 日内对 73 h 发酵液(制成浓度约 300 μg/ml 供试液)连续测定 5 次,结果分别为:1 265, 1 274, 1 302, 1 243, 1 332 μg/ml, RSD 2.69%。

日间精密度:连续 3 日内对 57 h 发酵液(制成浓度约 300 μg/ml 供试液)测定 5 次,结果分别为:1 223, 1 206 μg/ml(第 1 天);1 185, 1 141 μg/ml(第 2 天);1 192 μg/ml(第 3 天), RSD 2.56%;连续 2 日内分别对放罐液、解吸液(浓度均约 300 μg/ml)各测定 4 次,结果为:放罐液 1 585, 1 561 μg/ml(第 1 天), 1 602, 1 580 μg/ml(第 2 天), RSD 1.07%;解吸液 19 599, 20 619 μg/ml(第 1 天), 19 554, 19 628 μg/ml(第 2 天), RSD 2.59%。说明该方法重复性好。

2.2.7 回收率试验 精密量取 73 h 发酵液样品 5 ml,共 11 份,分别置于 15 ml 具塞离心管中;分别加入浓度为 1, 1.5, 2.0 mg/ml 的大观霉素标准品溶液 5 ml 于离心管中,分别作为回收液 1($n = 5$),回

收率 2($n = 3$),回收率 3($n = 3$);于离心管中均加入 TFA 0.1 ml, 3 000 r/min 离心 5 min;分别精密量取上清液 3 ml 置于 10 ml 量瓶中,加水定容,0.45 μm 滤膜滤过,按“2.3.1”项下条件取续滤液 20 μl 在进样分析(见表 2)。

Tab 2. Recovery of spectinomycin from test solution

Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	Mean (%)
5.27	5.28	100.03	100.64
5.27	5.41	102.54	
5.27	5.26	99.75	
5.27	5.20	98.63	
5.27	5.39	102.25	
7.51	7.50	99.38	98.36
7.51	7.40	98.44	
7.51	7.31	97.27	
10.01	9.72	97.23	96.47
10.01	9.61	96.10	
10.01	9.61	96.08	

2.2.8 样品测定 按“2.2.1”项下条件,分别测定由山东鲁抗医药集团有限公司提供的大观霉素在线生产中 41, 57, 73 h 发酵液、放罐液、解吸液 5 个样品,并与中国药典(2000 年版)微生物效价方法测定结果相比较(见表 3)。

Tab 3. Comparison of results of HPLC/ELSD and pharmacopeia method

Sample	Pharmacopeia method	HPLC/ELSD
	(μg/ml)	(μg/ml)
Fermented solution(41 h)	733	695
Fermented solution(57 h)	1 471	1 224
Fermented solution(73 h)	1 890	1 444
Out-jar solution	2 100	1 660
Unbond solution	22 000	20 146

2.2.9 相关性比较 以微生物效价法测定结果为 x 轴, HPLC/ELSD 法测定结果为 y 轴,建立线性方程为: $y = 0.922\ 9x - 170.15$, $r = 0.999\ 9$,表明两种方法相关性好。

3 讨论

1) 本文选用三氟醋酸(TFA)水溶液作为流动相,一方面酸性流动相有利于样品的离子化,另一方面 TFA 提供的三氟醋酸根阴离子与药物阳离子形成的离子对可有效延长药物在色谱柱中的保留时间,有利于样品中有关物质的分析。试验中发现,随着流动相中 TFA 浓度增加,药物的保留时间增大,当到达一定值后,再提高 TFA 浓度,则保留时间趋于恒定;同时流动相中 TFA 的浓度直接影

响了有关物质分离的个数与分离度。

2) HPLC/ELSD法和微生物效价法测定发酵液的含量,两者测定结果之间相关性较好($r = 0.9999$),但前者测定结果普遍偏低。色谱法由于将有关物质与大观霉素主峰良好分离,测定结果反映发酵液中大观霉素的真实含量;而效价法表明发酵液总体的抑菌力,测定结果偏高表明样品中部分有关物质也具有一定的生物活性。因此用 HPLC/ELSD 法替代微生物效价法不但可测定发酵液中大观霉素的准确含量,掌握放罐时间,而且该方法简便快速,克服了微生物法试验周期长、结果波动性大的不足。

3) 在对大观霉素有关物质的检测中发现,制剂样品中有关物质总量随着贮存期的延长有增加趋势,其中硫酸壮观霉素个别批次样品甚至含有新的有关物质。虽然对有关物质尚未定性,对其抗菌活性尚不了解,在解释有关物质与样品质量的对应关系上证据不足,但对大观霉素中的有关物质有了初步数量上的感性认识,这是微生物效价法和气相色谱法所不能解决的问题。

4) 试验中发现,在样品有关物质的分析中,对主峰峰纯度的检查仍缺乏有力的证据,而这也是 ELSD 所不能解决的。今后有望通过使用 LC/MS 联用仪,

对峰纯度及有关物质的性质作进一步考察。

【参考文献】

- [1] 赵敏(Zhao M). 氨基糖苷类抗生素的发展现状和展望——记全国氨基糖苷类抗生素科研、生产和临床应用学术研讨会[J]. 中国抗生素杂志(*J Chin Antibiot*), 1999, **24**(4): 319-320.
- [2] 中华人民共和国药典. 二部[S]. 2000: 547-548.
- [3] American Pharmacopeia(USP). 2002. 1 708-1 709
- [4] European Pharmacopeia. 2002. 1 433-1 434
- [5] 孙守威(Sun SW), 张鲲(Zhang K). HPLC 通用质量型检测器——蒸发光散射检测器介[C]. 蒸发光散射检测器应用文献和技术参考. 第2版. 2002. 3-7.
- [6] Inchauspe G, Delrien P. Mechanism of selectivity in ion-pair high-performance liquid chromatography of aminoglycosides antibiotics using perfluorinated pairing ions[J]. *J Chromatogr*, 1987, **404**: 53-66.
- [7] 王明娟(Wang MJ), 胡昌勤(Hu CQ), 金少鸿(Jin SH). 采用 HPLC-ELSD 法分析小诺霉素及其有关物质[J]. 药物分析杂志(*Chin J Pharm Anal*), 2002, **22**(3): 205-208.
- [8] 王明娟(Wang MJ), 胡昌勤(Hu CQ), 金少鸿(Jin SH). 高效液相色谱-蒸发光散射检测法分析庆大霉素 C 组分[J]. 药物分析杂志(*Chin J Pharm Anal*), 2002, **22**(6): 461-464
- [9] 王明娟(Wang MJ), 胡昌勤(Hu CQ), 金少鸿(Jin SH). 氨基糖苷类抗生素在蒸发光散射检测器中相应因子的一致性考察[J]. 药学报(*Acta Pharm Sci*), 2002, **37**(3): 204-206.
- [10] 安登魁, 张正行, 盛龙生. 药物分析[M]. 济南出版社, 1992. 480-484

Quality Control of Spectinomycin Hydrochloride By HPLC/ELSD

WU Yan¹, GUO Cheng-Ming¹, Zhang Sheng-Qiang²

(¹Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070;

²Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

【ABSTRACT】 AIM: To establish an HPLC and evaporative light-scattering detection(ELSD) method for the related substance analysis of spectinomycin and content determination of spectinomycin fermented solution. **METHOD:** The Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used and the mobile phase consisted of 0.04 mol/L trifluoroacetic acid solution. The temperature of the drift tube was 50 °C and the gas pressure was 3.0 × 10⁵ Pa. **RESULT:** The chromatography system met the need of related substances analysis of spectinomycin with limit of detection of 50 ng; There was a good relationship between the method of HPLC/ELSD and biological method in content determination of fermentation solution of spectinomycin($r = 0.9999$). Within the range of 4.25~16.99 μg, there was a good linear relationship between the log value of the spectinomycin inject quantities and the log value of the peak areas($r = 0.9997$). **CONCLUSION:** The method is simple, accurate and reproducible. It is suitable for the quality control of spectinomycin preparations and the on-line analysis of the product.

【KEY WORDS】 Spectinomycin; HPLC; Evaporative light-scattering detection; Content determination; Related substance