

文章编号: 1001-8689(2019)01-0088-06

柱后衍生化-HPLC 法测定硫酸卡那霉素注射液 及滴眼液的含量

张杨慧^{1,2} 蒋孟虹² 秦峰² 刘浩^{2,*}

(1 中国医药工业研究总院, 上海 201203; 2 上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: **目的** 新建硫酸卡那霉素注射液及滴眼液含量的高效液相色谱-柱后衍生化-荧光检测方法。**方法** 色谱柱为 Zorbax Eclipse Plus C₁₈(4.6mm×100mm, 3.5μm); 流动相为 pH3.4 的缓冲液(取庚烷磺酸钠一水合物 4.35g 和无水硫酸钠 16g, 加水溶解并稀释至成 1000mL, 用冰醋酸调节 pH 值至 3.4±0.1)-甲醇(74:26); 柱温为 35℃; 流速为 1mL/min。柱后衍生化试剂为邻苯二甲醛溶液; 流速为 0.3mL/min; 衍生化反应温度为 45℃; 荧光激发波长为 340nm, 发射波长为 455nm。**结果** 卡那霉素 A 在 0.0973~583.8μg/mL 浓度范围内线性关系良好($r=0.9999$), 硫酸卡那霉素注射液和滴眼液的平均回收率分别为 99.6% 和 99.3%, RSD 为 0.63% 和 0.66%($n=9$)。**结论** 本方法检测灵敏度高, 重复性好, 简便快速, 结果准确可靠, 可作为硫酸卡那霉素注射液及滴眼液的含量测定方法。

关键词: 卡那霉素; 高效液相色谱法; 柱后衍生化; 含量测定

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Determination of the content in kanamycin sulfate injection and eye drops by HPLC with post-column derivatization

Zhang Yang-hui^{1,2}, Jiang Meng-hong², Qin Feng² and Liu Hao²

(1 China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2 Shanghai Institute of Food and Drug Control, Shanghai 201203)

Abstract Objective To establish a method of HPLC with post-column derivatization for the determination of the content in kanamycin sulfate injection and kanamycin sulfate eye drops. **Methods** A Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column(4.6mm×100mm, 3.5μm)was used, the mobile phase was buffer (containing 1-heptanesulfonate sodium salt and sodium sulfate)-methyl alcohol (74:26), the column temperature was 35℃, and the flow rate was 1mL/min. The OPA solution was used for the post-column derivatization at a flow rate of 0.3mL/min. The temperature of the post-column reaction was 45℃. The fluorescence was detected by an excitation and emission wavelength of 340 and 455nm respectively. **Results** The calibration curve was linear in the range of 0.0973~583.8μg/mL ($r=0.9999$). The average recovery rates of kanamycin sulfate injection and kanamycin sulfate eye drops were 99.6% and 99.3%, and RSD values were 0.63% and 0.66% ($n=9$). **Conclusion** The method is rapid and versatile, and ensures excellent results in terms of sensitivity and reproducibility. It enables the content determination of kanamycin sulfate injection and kanamycin sulfate eye drops.

Key words Kanamycin; HPLC; Post-column derivatization; Content

收稿日期: 2018-01-03

作者简介: 张杨慧, 女, 生于 1994 年, 在读硕士研究生, 研究方向为氨基糖苷类抗生素质量分析与研究, E-mail: zhangyh0987@163.com

* 通讯作者, E-mail: Liuhaol968@hotmail.com

卡那霉素 (kanamycin) 属于 2-脱氧链酶胺双取代衍生物类的氨基糖苷类抗生素, 由卡那霉素链霉菌 (*Streptomyces kanamyceticus*) 所产生, 具有广谱抗菌作用^[1](主成分卡那霉素 A 及其主要杂质化学结构如图 1 所示), 尤其对革兰阴性菌及青霉素、链霉素、红霉素等产生耐药性的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、产气杆菌、肺炎杆菌和痢疾杆菌有很强的抗菌作用。Umezawa^[2]于 1957 年发现卡拉霉素, 1958 年由日本明治制药株式会社首先开发生产, 国内于 1965 年从云南西双版纳土壤中分离得到卡那霉素链霉菌, 并研究试制成功国产的卡那霉素。

卡那霉素缺乏特征的紫外吸收^[3], 中国药典 2015 年版二部规定采用 HPLC-蒸发光散射检测 (ELSD) 法测定硫酸卡那霉素注射液和滴眼液的含量^[4]。ELSD 具有通用性强、价格低廉、维护要求低等优点, 但由于 ELSD 法的重现性较差, 灵敏度较低, 且流动相中所含的多氟羧酸类离子对试剂酸性较强, 影响色谱柱填料的稳定性, 不利于长期应用。美国药典第 40 版使用 HPLC-电化学检测的方法进行含量测定^[5]。虽然电化学检测方法具有灵敏度高的优点, 但仪器昂贵, 对操作人员的技术水平要求较高, 较难作为常规检测方法使用。

柱后衍生化技术是一种常用的在线处理技术, 具有不改变被分离组分的色谱行为、在流动相试剂的选择上限制较小、可以实现自动化在线衍生、具有良好的重现性等优点, 已在硫酸异帕米星注射液、妥布霉素滴眼液等氨基糖苷类抗生素的含量测定中

有应用^[6-7]。本文参考文献[6-7]建立的高效液相色谱-柱后衍生化-荧光检测法灵敏度高, 操作简便快速, 结果准确可靠, 可作为硫酸卡那霉素注射液及滴眼液含量测定的方法。

1 仪器与材料

仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪, 荧光检测器, Pickering PCX 5200 柱后衍生化系统。

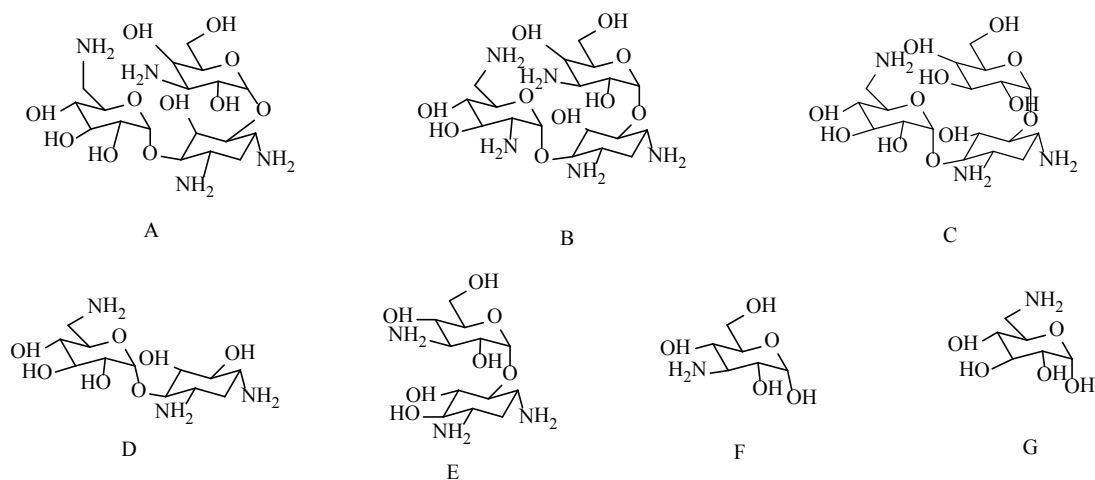
庚烷磺酸钠 (色谱纯) 由东京化成工业株式会社提供; 乙腈 (色谱纯) 由 Merck 公司提供; 冰醋酸、无水硫酸钠、硼酸、氢氧化钠和 2-巯基乙醇 (分析纯) 由上海凌峰化学试剂有限公司提供; 邻苯二甲醛 (色谱纯) 由北京百灵威科技有限公司提供; 水为高纯水。

硫酸卡那霉素对照品 (批号: 130556-201502, 中国食品药品检定研究院); 卡那霉素 B 对照品 (批号: 130548-200501, 中国食品药品检定研究院) (发酵副产物); 6-O(3-氨基-3-脱氧- α -D-葡吡喃糖基) 脱氧链霉胺 (批号: 7-APD-119-1, Toronto Research Chemicals) (降解产物); 硫酸卡那霉素注射液 [批号: 1612152, A 公司; 批号: 1701170121, B 公司; 批号: 1703021, C 公司; 批号: 1701191, D 公司; 批号: 151027, E 公司]; 硫酸卡那霉素滴眼液 (批号: 170203, 170202, F 公司)。

2 方法

2.1 色谱分离条件

色谱柱 Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (4.6mm×100mm, 3.5 μ m); 流动相: pH3.4 的缓冲液 (取庚烷磺酸钠一水合物 4.35g 和无水硫酸钠 16g, 加水溶解并稀释至



A: 卡那霉素 A; B: 卡那霉素 B; C: 卡那霉素 D; D: 4-O(6-氨基-6-脱氧- α -D-葡吡喃糖基)脱氧链霉胺; E: 6-O(3-氨基-3-脱氧- α -D-葡吡喃糖基)脱氧链霉胺; F: 3-氨基葡萄糖; G: 6-氨基葡萄糖

图 1 卡那霉素 A 及其主要杂质结构

Fig. 1 Chemical structures of kanamycin A and its chief related compounds

1000mL,用冰醋酸调节 pH 值至 3.4 ± 0.1) - 甲醇 (74:26) 流速: 1mL/min; 柱温 35°C ; 样品室温度 4°C ; 进样体积: $5\mu\text{L}$ 。

2.2 衍生化条件

衍生化试剂 [取邻苯二醛 0.8g、甲醇 300mL、2- 巯基乙醇 2mL 和硼酸盐缓冲液 (称取 72.0g 硼酸和 43.0g 氢氧化钠, 加水溶解并稀释至 4000mL, 用 1mol/L 硼酸溶液或 1mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 10.4 ± 0.1) 700mL, 混匀, 用 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤] 的流速为 0.3mL/min; 衍生化反应温度: 45°C ; 荧光检测器激发波长: 340nm, 发射波长: 455nm。

2.3 溶液的配制

系统适用性溶液: 取卡那霉素对照品约 10mg, 置于 50mL 量瓶中, 加 2mol/L 盐酸溶液 5mL, 振摇使混合均匀, 水浴加热 30min, 使卡那霉素 A 部分降解产生杂质 3 和杂质 4, 用 2mol/L 氢氧化钠溶液 5mL 中和, 加卡那霉素对照品 25mg 和卡那霉素 B 对照品 5mg, 振摇使溶解, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为系统适用性溶液。精密量取系统适用性溶液 $5\mu\text{L}$, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果表明, 卡那霉素 A 与卡那霉素 B 之间能完全分离 (分离度大于 7.0), 主峰与前相邻杂质峰也有效分离 (分离度大于 2.0) (图 2)。

供试品溶液: 精密量取硫酸卡那霉素注射液适量, 加水定量稀释制成约含卡那霉素 0.5mg/mL 的溶液。精密量取硫酸卡那霉素滴眼液适量, 加水定量稀释制成约含卡那霉素 0.5mg/mL 的溶液。

对照品溶液: 精密称取硫酸卡那霉素对照品适量, 加水溶解并定量稀释制成约含卡那霉素 0.5mg/mL 的

溶液。

3 方法学验证

3.1 专属性

分别取硫酸卡那霉素注射液及滴眼液空白辅料按“2.1”项下色谱条件进样分析。色谱图如图 2 所示。结果表明流动相及空白辅料均对卡那霉素主峰及杂质峰无干扰, 表明方法的专属性良好。

精密量取硫酸卡那霉素注射液适量, 加水定量稀释制成约含卡那霉素 5mg/mL 的溶液, 作为硫酸卡那霉素注射液样品储备液; 硫酸卡那霉素滴眼液原液即为其样品储备液; 分别取样品储备液 1mL 进行强酸、强碱、高温、光照、氧化破坏, 并用纯水稀释制成约含卡那霉素 0.5mg/mL 的溶液。按“2.1”项下色谱条件进样分析。色谱图如图 3 所示。主峰与降解杂质峰之间均分离良好, 新建方法的专属性良好。

3.2 重复性

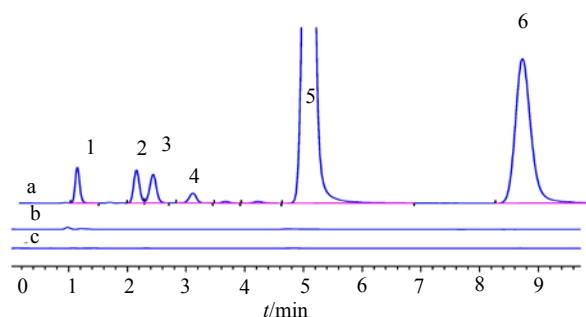
精密量取同一批号的硫酸卡那霉素注射液 6 份, 按“2.3”项下方法配制成供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定其含量, 按外标法以峰面积计算, 平均含量为 102.4%, $\text{RSD}=0.75\%(n=6)$; 同法对硫酸卡那霉素滴眼液的含量测定方法进行重复性考察, 平均含量为 104.9%, $\text{RSD}=0.66\%(n=6)$, 结果表明该方法重复性良好。

3.3 回收率

精密称取硫酸卡那霉素对照品适量 (约相当于卡那霉素 20、25 和 30mg), 各 3 份, 分别置于 50mL 量瓶中, 并按 100% 比例加入辅料, 加水溶解, 作为 80%、100% 和 120% 的注射液供试溶液, 按“2.1”项下的色谱条件测定含量, 3 个浓度水平下平均回收率分别为 100.1%、99.8% 和 98.9%, $\text{RSD}=0.63\%(n=9)$; 同法对硫酸卡那霉素滴眼液的含量测定方法进行回收率考察, 3 个浓度水平下平均回收率分别为 99.8%、98.9% 和 99.3%, $\text{RSD}=0.66\%(n=9)$, 结果表明该方法回收率良好。

3.4 线性与范围

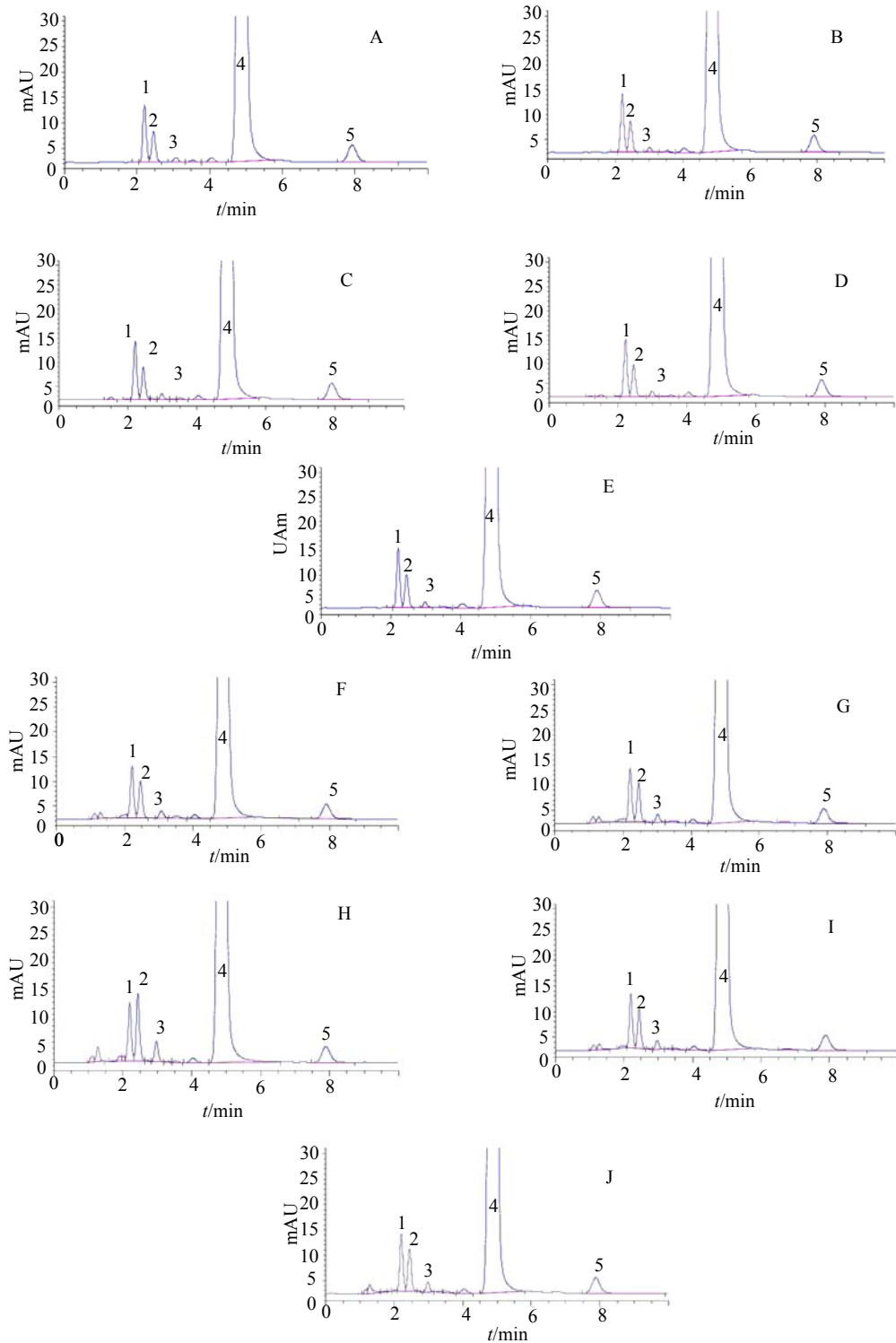
精密称定对照品适量置于 25mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。分别精密量取对照品储备液适量, 制成系列浓度分别为 0.0973、0.973、9.73、97.3、243.3、486.5 和 $583.8\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。按“2.1”项下的色谱条件测定, 以卡那霉素 A 峰面积 A 对浓度 C 进行线性回归, 得回归方程: $A=11.99C+15.73$, $r=0.9999$ 。结



1: 未知; 2: 未知; 3: 未知; 4: 6-O(3- 氨基 -3- 脱氧 - α -D- 葡萄糖基) 脱氧链霉素; 5: 卡那霉素 A; 6: 卡那霉素 B

图 2 系统适用性溶液 (a)、注射液空白辅料溶液 (b) 和滴眼液空白辅料溶液 (c) 典型色谱图

Fig. 2 Typical chromatograms for system suitability solution (a), injection solution of blank (b) and eye drops solution of blank (c)



A/F: 酸破坏; B/G: 碱破坏; C/H: 高温破坏; D/I: 光照破坏; E/J: 氧化破坏; 1: 未知; 2: 未知; 3: 6-O(3-氨基-3-脱氧- α -D-葡萄糖基)脱氧链霉素; 4: 卡那霉素 A; 5: 卡那霉素 B

图3 硫酸卡那霉素注射液(A~E)和滴眼液(F~J)专属性试验色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms for specificity test of kanamycin sulfate injection and eye drops

果表明, 卡那霉素 A 在 0.0973~583.8 μ g/mL 的范围内与卡那霉素 A 峰面积呈良好线性。

3.5 检测限与定量限

以信噪比 $S/N=3$ 计, 卡那霉素 A 的检测限为

0.12ng; 以信噪比 $S/N=10$ 计, 卡那霉素 A 的定量限为 0.39ng (以进样 5 μ L 计)。

3.6 稳定性

取供试品溶液, 分别在 0、6 和 18h 进样分析

考察溶液的稳定性,按外标法以峰面积计算,硫酸卡那霉素注射液平均含量为 101.3%,RSD 为 1.42%($n=3$),滴眼液平均含量为 106.4%,RSD 为 2.26%($n=3$),结果表明溶液在 18h 内稳定。

3.7 耐用性

分别考察了供试品溶液在 Zorbax Eclipse plus C₁₈(10cm×0.46cm, 3.5μm, 1.0mL/min)、COSMOSIL C₁₈(25cm×0.46cm, 5μm, 1.5mL/min) 和 Tskgel ODS-100S(25cm×0.46cm, 5μm, 1.5mL/min)3 种不同品牌填料的色谱柱上的分离情况,结果各杂质峰均能和卡那霉素主峰得到有效分离,本方法的耐用性较好。

3.8 样品测定

按“2.3”项下方法分别制备供试品溶液及对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样,依照外标法计算含量,与 2015 版中国药典二部^[8]项下方法对比,结果见表 1。结果表明本文所建立的高效液相-

表 1 LC-柱后衍生化法与 LC-ELSD 法测定硫酸卡那霉素注射液及滴眼液含量结果的对比

品种	批号	柱后衍生化法	蒸发光散射检测法
		%	%
硫酸卡那霉素注射液	1701170121	101.8	100.7
	1703021	98.2	97.6
	1701191	101.9	102.8
	1612152	102.9	101.2
	151027	102.5	100.6

柱后衍生化-荧光检测法测得的含量与 HPLC-ELSD 法(药典方法)测得的含量基本一致。

4 新建立方法和中国药典方法的比较

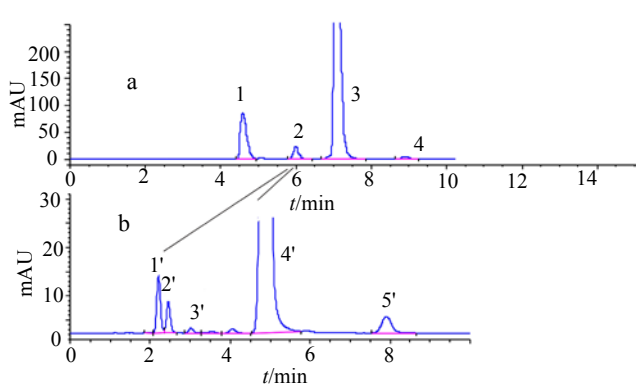
按中国药典方法试验^[4],以信噪比 $S/N=3$ 计,硫酸卡那霉素检测限约为 22.9ng,比柱后衍生化-HPLC 法低近 200 倍。柱后衍生化-HPLC 法较 HPLC-ELSD 法灵敏度高。

按中国药典方法试验^[4]发现,硫酸卡那霉素中有 3 个杂质会同时洗脱,如图 4 所示,HPLC-ELSD 系统分离所得编号为 2 的杂质实为 HPLC-柱后衍生化系统中 3 个杂质的混合物。柱后衍生化-HPLC 法较 HPLC-ELSD 法分离能力高。

5 讨论

5.1 色谱条件的优化

由于硫酸卡那霉素极性较强,在反相色谱条件



1: H₂SO₄; 2: 未知; 3: 卡那霉素 A; 4: 卡那霉素 B; 1': 未知; 2': 未知; 3': 6-O(3-氨基-3-脱氧-α-d-葡吡喃糖基)脱氧链霉素; 4': 卡那霉素 A; 5': 卡那霉素 B;

图 4 HPLC-ELSD 系统 (a) 与 HPLC-柱后衍生化-荧光检测系统 (b) 各色谱峰保留行为典型色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of impurities in ELSD (a) and post column derivization systems (b)

下保留较弱,本研究在流动相中加入离子对试剂,从而使被测组分在色谱柱上有适当的保留。考察了己烷磺酸钠,庚烷磺酸钠,辛烷磺酸钠 3 种离子对试剂。结果显示,随着烷基链的延长,卡那霉素及其有关物质保留均增强,考虑到分析时间的合理性,选择庚烷磺酸钠作为离子对试剂。

本试验考察了 30、35 和 40℃ 不同色谱柱温对色谱分离的影响。试验发现,色谱柱温越低,容量因子越大,色谱峰保留时间越长,综合考虑保留时间,对称因子,分离度等因素,选择色谱柱温度为 35℃。

本试验考察了流动相中有机改性剂的种类对定量分析的影响。选择了甲醇和乙腈两种有机改性剂,结果显示,虽然乙腈的洗脱能力强于甲醇,但以乙腈为有机溶剂的色谱系统,其主峰拖尾严重,不利于定量分析。考察了不同比例的甲醇对色谱行为的影响,在主峰与相邻杂质峰得到有效分离的前提下,甲醇比例越高,主峰保留越弱,综合考虑对称因子,理论塔板数,保留时间等因素,确定缓冲液与甲醇比例为 74:26。

5.2 柱后衍生化条件的优化

在柱后衍生化试剂的选用时要考虑到衍生化产物的溶解度,衍生化试剂与流动相及制剂辅料可能发生的副反应等因素。常用的衍生化试剂有邻苯二甲醛(o-phthalaldehyde, OPA)^[6-7]、2,4-二硝基氟苯(DNFB)^[8]、2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)^[9]等。本研究中采用的柱后衍生化试剂为含有 2-巯基乙醇和邻苯二甲醛的溶液,其反应机制主要是在巯基乙醇的存在下,伯氨基与邻苯二甲醛快速反应生成强荧光

性吡啶取代衍生物,被荧光检测器检测。由于硫酸卡那霉素注射液和硫酸卡那霉素滴眼液中所含有的辅料[抗氧化剂(亚硫酸氢钠),等渗调节剂(氯化钠),抑菌剂(羟苯乙酯),缓冲剂(硼砂-硼酸体系),络合剂(依地酸二钠)等]均不含有伯胺类物质,所以辅料对主药的测定不产生干扰。

本试验考察了0.3、0.5和0.7mL/min衍生化试液的流速对衍生化情况的影响。试验中发现衍生化试液的流速对色谱峰响应的影响较小,且流速越快,柱后压力越大,考虑到衍生化试液的使用量及柱后压力的影响,选择柱后衍生化试液流速为0.3mL/min。

6 结论

本文建立的高效液相色谱-柱后衍生化-荧光检测法操作简便、抗干扰性强、柱效高、分离能力强、灵敏度高、准确度和精密度好,可弥补HPLC-ELSD法灵敏度较低,分离能力较差的缺点,可作为硫酸卡那霉素注射液和滴眼液的含量测定方法,有效控制硫酸卡那霉素的质量。

参考文献

- [1] 李忠琴. 卡那霉素A、B组分分离纯化新技术研究[D]. 福州:福州大学,2002.
- [2] Umezawa H, Ueda M, Maeda K, *et al.* Production and isolation of a new antibiotic: Kanamycin[J]. *J Antibiot*, 1957, 10(5): 181-188.
- [3] 王金凤, 杨化新, 朱俐, 等. HPLC-NQAD和HPLC-ELSD法测定硫酸卡那霉素注射剂的含量[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(4): 644-648.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015年版二部)[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 1316-1317.
- [5] 美国药典委员会. 美国药典(第40版)[S]. 国家处方集, 2017: 4742-4744.
- [6] 赵敬丹, 王曦, 刘浩, 等. 柱后衍生化-HPLC法测定硫酸异帕米星注射液的含量和有关物质[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(5): 363-368.
- [7] 何丹, 杨林. 柱后衍生化高效液相色谱法测定妥布霉素滴眼液的含量[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(10): 771-773.
- [8] 于华生, 陈东鸿, 马赛骏. HPLC柱前衍生法测定妥布霉素[J]. 海峡药学, 2001, 13(4): 28-30.
- [9] 薛晶, 崔学文, 胡昌勤. HPLC法测定人用皮卡狂犬病疫苗和皮卡佐剂中硫酸卡那霉素的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(10): 1911-1913.