

氨基糖苷类抗生素在蒸发光散射检测器中响应因子的一致性考察

王明娟*, 胡昌勤, 金少鸿

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要: 目的 考察不同的氨基糖苷类抗生素在蒸发光散射检测器中的响应因子是否一致, 进而考察 ELSD 在该类药的有关物质检查、多组分同类物质的相对比例测定及氨基糖苷类新药基准品的建立等方面应用的可能性。方法 用 HPLC-ELSD 法测定了一组氨基糖苷类抗生素(阿米卡星、西索米星、奈替米星、依替米星和一类新药威替米星)的线性方程。色谱条件: Diamonsil C₁₈ 柱 150 mm × 4.6 mm, 5 μm; 流动相 0.2 mol·L⁻¹ 三氟醋酸-甲醇(94:6); 流速 0.6 mL·min⁻¹。检测器条件: 漂移管温度 110 °C, 气体流速 2.80 L·min⁻¹。结果 上述 5 种物质的线性方程间无显著性差异($P > 0.05$)。结论 5 种不同氨基糖苷类抗生素在蒸发光散射检测器中的响应因子一致, 可以尝试用 HPLC-ELSD 法测定该类药中的有关物质, 控制多组分药物的相对比例并建立一类新药基准品。

关键词: 氨基糖苷类抗生素; 响应因子; 高效液相色谱法; 蒸发光散射检测器

中图分类号: R917.795.01

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2002)03-0204-03

蒸发光散射检测器(evaporative light-scattering detector, ELSD)的多用途和优良的性能取决于其独特的检测原理: 惰性气体将色谱柱流出液雾化成微小液滴; 流动相在加热的漂移管中蒸发; 所剩样品颗粒在检测池中使激光发生散射而得以检测。ELSD 的响应值与样品的质量成正比, 物理性质类似的物质在 ELSD 中的响应因子近于一致^[1]。

氨基糖苷类抗生素为临床上最常用的抗感染药物之一, 由于该类药无特征紫外吸收, 其质量分析工作一直是难题。蒸发光散射检测器的出现为上述难题的解决提供了新的途径。目前国内外还未见有关采用 HPLC-ELSD 法分析氨基糖苷类抗生素的报道。为了探索蒸发光散射检测器在该类药质量分析工作中应用的可能性, 本文对氨基糖苷类抗生素在蒸发光散射检测器中的响应因子的一致性进行了考察。

材 料 和 方 法

仪器和试剂 Waters 510 型液相色谱仪; Alltech 500ELSD; 天津蓝珂全自动空气净化器; 大连江申工作站; 三氟醋酸, Sigma 公司产品; 水为重蒸水; 甲醇, HPLC 级, Sigma 公司产品。阿米卡星(amikacin)、西

索米星(sisomicin)、奈替米星(netilmicin)和依替米星(etimicin)标准品及威替米星(vertilmicin)基准品(一类新药)均由中国药品生物制品检定所提供。

色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm; 流动相: 0.2 mol·L⁻¹ 三氟醋酸-甲醇(94:6); 流速: 0.6 mL·min⁻¹。检测器条件: 漂移管温度 110 °C, 气体流速 2.80 L·min⁻¹。

溶液的配制 精密称取各标准品适量于 100 mL 量瓶中, 用重蒸水溶解并稀释至刻度, 使其终浓度为 0.5 mg·mL⁻¹。分别取上述标准品溶液各 5 mL 置 50 mL 量瓶中, 振荡混匀。

结 果

1 色谱条件

分别用 0.2 mol·L⁻¹ 三氟醋酸, 0.2 mol·L⁻¹ 三氟醋酸-甲醇(90:10, 94:6) 分析混合对照品溶液(流速均为 0.6 mL·min⁻¹), 结果 0.2 mol·L⁻¹ 三氟醋酸-甲醇(94:6) 效果最好, 仅需 30 min 即可将所选的 5 种氨基糖苷类抗生素完全分离。其典型的高效液相色谱分离图见图 1。

2 检测器条件优化

按厂家提供的检测器条件的推荐值及优化步骤, 以 0.5 mV 为最低可接受限度, 分别对漂移管温度、载气流速进行优化。实验结果表明, 当漂移管温度降至 105 °C 时, 噪音则增至 1.5 mV 以上, 故漂移管

收稿日期: 2001-06-04。

作者简介: 王明娟(1976-), 女, 硕士。

* Tel: (010) 67017755 - 317 或 318, E-mail: redhan@china.com

温度设为 110 ℃, 噪音低于 0.5 mV。载气流速大于或等于 2.80 L·min⁻¹ 时, 噪音水平均在 0.2 mV 左

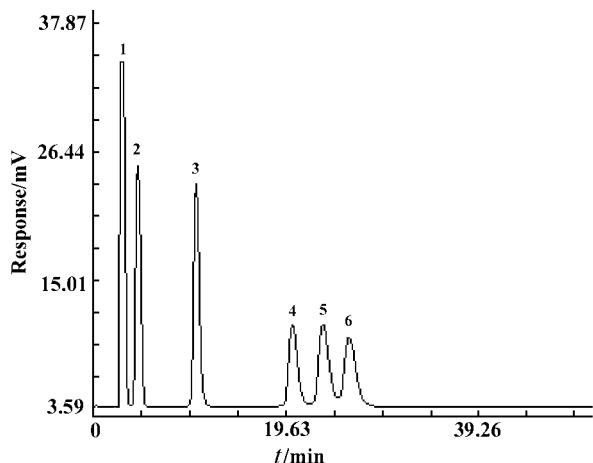


Figure 1 Liquid chromatographic (LC) separation of sulfate ion (1), amikacin (2), sisomicin (3), netilmicin (4), etimicin (5) and vertilmicin (6, a new drug) on a Diamonsil C₁₈ column

Mobile phase: 0.2 mol·L⁻¹ trifluoroacetic acid+ methanol (96:4); Flow rate: 0.6 mL·min⁻¹

右。根据蒸发光散射检测器的原理载气流速越小, 形成的物质粒子越大, 相应的响应值越大, 故载气流速选择 2.80 L·min⁻¹。

3 线性方程

取混合对照品溶液, 分别进样 10, 15, 20, 25, 30 和 40 μL (n=2)。分别以峰面积的对数(Y), 进样量(μg)的对数(X)作线性方程为 amikacin: Y=1.46 X + 5.07, r=0.9997; sisomicin: Y=1.51 X + 5.03, r=0.9997; netilmicin: Y=1.52 X + 4.88, r=1.000; etimicin: Y=1.46 X + 4.85, r=0.9999; vertilmicin: Y=1.41 X + 4.90, r=0.9998。

4 响应因子一致性的考察

从上述线性方程中看出, 响应因子差别最大的是威替米星与奈替米星。用方差分析法判别这两个样本的线性方程间是否有显著性差异(张承训, 韩少梅. 医学统计学讲义. 中国协和医科大学基础医学研究所, 1998), 结果见表 1。

表 1 结果表明, 奈替米星与威替米星的回归方程间的差异不显著, 5 种氨基糖苷类抗生素在蒸发光散射器中的响应因子基本一致。

Table 1 Significance testing for the calibration curves of netilmicin and vertilmicin

| Source | df | Σ(x - \bar{x}) ² | Σ(x - \bar{x})(y - \bar{y}) | Σ(y - \bar{y}) ² | b | Analysis of variance | | | | |
|-------------|----|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-------|----------------------|---------|----------|------|----------|
| | | | | | | df | SS | MS | F | P |
| Netilmicin | 5 | 0.234 | 0.355 | 0.540 | 1.517 | 4 | 0.00143 | 0.000358 | 5.25 | > 0.05* |
| Vertilmicin | 5 | 0.237 | 0.330 | 0.467 | 1.390 | 4 | 0.00751 | 0.00188 | | |
| Total | | | | | | 8 | 0.00894 | 0.00112 | | |
| Mutual-b | 10 | 0.471 | 0.685 | 1.007 | 1.454 | 9 | 0.0108 | 0.0012 | | |
| Parallelism | | | | | | 1 | 0.00186 | 0.00186 | 1.66 | > 0.05** |

* Test for homogeneity of variance; ** Analysis of variance; x: Logarithm of injection volumn; y: Logarithmic of the detector response; df: Degree of freedom; SS: Sum of square; MS: Mean square; SS = Σ Σ(x_iy_j - \bar{x})²; MS = SS/df; F: Test for homogeneity; P: Probability

讨 论

氨基糖苷类抗生素无特征紫外吸收, 很难直接用传统的 HPLC 法(紫外检测器)分析。用衍生化技术虽然能部分解决其质量分析中的难题, 但由于衍生化方法的实验结果影响因素多, 无法明确判断该法检测到的杂质来源, 限制了衍生化方法在该类药的有关物质检查(或纯度分析)中的应用。另外, 衍生化产物间紫外吸收系数的差异, 影响了多组分药物相对比例测定结果的准确性。

ELSD 检测器为质量型检测器, 可准确检测难挥发或半挥发性化合物, 同时其灵敏度较示差折光检测器高, 基线平稳, 能与梯度洗脱相容, 更重要的是

不同物质在 ELSD 中的响应因子几乎一致, 使蒸发光散射检测器成为解决无紫外吸收物质分析难题的强有力途径^[1-3]。但目前国内外尚鲜见有关 ELSD 在氨基糖苷类抗生素中应用的报道。

本文考察了一组氨基糖苷类抗生素(阿米卡星、西索米星、奈替米星、依替米星及一类新药威替米星)在蒸发光散射检测器中的响应因子, 旨在考察 ELSD 在该类药的有关物质检查、多组分抗生素相对比例的测定及新药基准品建立方面应用的可能性。实验结果表明: 它们的线性方程差异不显著, 可以考虑将 ELSD 用于氨基糖苷类抗生素的杂质检查(或纯度分析)、多组分药物分析及未知基准品的含量测定。

REFERENCES:

- [1] Stolyhuo A, Colin H, Guiochon G. Use of light scattering as a detector principle in liquid chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1983, **265** :1 - 18 .
- [2] Fang L, Wan M, Pennacchio M. Evaluation of evaporative light-scattering detector for combinatorial library quantitation by reversed phase HPLC [J]. *J Comb Chem*, 2000, **2**(3) : 254 - 257 .
- [3] Deng HG, Cao YZ. A new mass detector for liquid chromatography [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1994, **14**(3) :61 - 63 .

ANALYSIS OF THE RESPONSE FACTORS OF DIFFERENT AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTICS DETECTED BY EVAPORATIVE LIGHT-SCATTERING DETECTOR

WANG Ming-juan, HU Chang-qin, JIN Shao-hong

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products , Beijing 100050 , China)

ABSTRACT: **AIM** To analyze if the response factors of different aminoglycoside antibiotics detected by evaporative light-scattering detector (ELSD) are the same. If they are, then ELSD can be applied to the quality analysis of this class of antibiotics. **METHODS** The response factors of five different aminoglycosides (amikacin, sisomicin, netilmicin, etimicin and vertilmicin) detected by ELSD were determined by using a Diamonsil C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) as analytical column and 0.2 mol·L⁻¹ trifluoroacetic acid-methanol (94:6) as mobile phase at a flow rate of 0.6 mL·min⁻¹, the temperature of the drift tube was set at 110 °C, and the flow of carrier gas at 2.80 L·min⁻¹. Detector responses (A) and the amount of injection of each substance (m) were fitted to the logarithmic regression: $\log A = b \log m + \log a$. **RESULTS** The linear regression equation obtained were: amikacin: $Y = 1.46 X + 5.07$, $r = 0.9997$; sisomicin: $Y = 1.51 X + 5.03$, $r = 0.9997$; netilmicin: $Y = 1.52 X + 4.88$, $r = 1.000$; etimicin: $Y = 1.46 X + 4.85$, $r = 0.9999$; vertilmicin: $Y = 1.41 X + 4.90$, $r = 0.9998$. The differences between them were negligible. **CONCLUSION** Different aminoglycosides can give the same responses with ELSD detection. So, the HPLC-ELSD methods can be applied to the analysis of impurities, the control of the ratio of multi-components drug and the determination of new substances by using another substance as reference, etc.

KEY WORDS: aminoglycoside antibiotics; response factor; HPLC; evaporative light-scattering detector