

柱前衍生化高效液相色谱法检测硫酸阿米卡星注射液中卡那霉素含量的改进

张明媛¹, 常 靓², 刘长海², 陈秋芬², 张军东², 陆 峰¹ (1. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433; 2. 上海信谊药厂有限公司药物研究所, 上海 201206)

[摘要] 目的 改进柱前衍生化-HPLC方法用于定量测定硫酸阿米卡星注射液中已知杂质卡那霉素。方法 采用更低浓度的样品检测溶液, 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 0.27% 磷酸二氢钾溶液(用2.2% 的氢氧化钾溶液调节 pH 值至 6.5)-甲醇(30:70); 检测波长: 340 nm; 进样量: 50 μl; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 °C。结果 卡那霉素在 2~80 μg/ml ($r=0.9998$) 浓度范围内呈线性关系, 平均回收率为 (93.08 ± 9.65)%, 样品稳定性提高。结论 本法专属性强, 灵敏度高, 准确度高, 为硫酸阿米卡星注射液的安全性评价提供了一个新的角度。

[关键词] 卡那霉素; 硫酸阿米卡星; 高效液相色谱法; 稳定性; 柱前衍生化

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)05-0343-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.05.006

An improvement method of pre-column derivatization LC-UV for assaying kanamycin in amikacin sulfate injection

ZHANG Ming-yuan¹, CHANG Liang², LIU Chang-hai², CHEN Qiu-fen², ZHANG Jun-dong², LU Feng¹ (1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Shanghai Sine Pharmaceutical Laboratories Co., Ltd, Shanghai 201206, China)

[Abstract] **Objective** To develop and evaluate the stable method for the determination of impurity D (kanamycin) in amikacin sulfate injection with pre-column derivatization HPLC. **Methods** The lower concentration of sample was used. An Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used for the chromatographic separations. The mobile phase consisted of mixture of a 2.7% solution of potassium dihydrogen phosphate adjusted to pH 6.5 (using 22 g/L solution of potassium hydroxide) and methanol (30:70, v/v). The flow rate was 1 ml/min. A 50 μl volume of each sample was injected. The column temperature was maintained at 30 °C. **Results** The linear range of kanamycin was 2~80 μg/ml ($r=0.9998$), accuracy was (93.08 ± 9.65)%. **Conclusions** The development method was successfully applied to the quantitative determination of kanamycin in amikacin sulfate injection and also offered a new perspective for safety evaluation of amikacin sulfate injection.

[Key words] kanamycin, amikacin sulfate, HPLC, stability indicating, pre-column derivatization

阿米卡星是一种从卡那霉素半合成而来的氨基糖苷类抗生素, 主要用于对耐庆大霉素, 卡那霉素和妥布霉素的革兰氏阴性菌的治疗^[1]。氨基糖苷类药物的毒副作用主要表现在肾毒性和耳毒性, 卡那霉素对两者的损伤发生率均高于阿米卡星。此外, 临床应用卡那霉素后还可产生造血系统毒性反应, 引起白细胞减少, 而阿米卡星未见有此类报道^[2-4]。因此, 控制硫酸阿米卡星注射液中卡那霉素的含量是非常必要的。由于在硫酸阿米卡星注射液中卡那霉素的含量很低, 又存在大量辅料干扰, 并且氨基糖苷类抗生素缺少可紫外检

测的生色基团, 给检测带来一定困难, 相关文献^[5-8]采用不同方法对其检测。英国药典 2010 版及中国药典均采用 2,4,6-三硝基苯磺酸作为衍生化试剂检测硫酸阿米卡星注射液的有关物质^[9,10], 但未对卡那霉素的含量进行专项的限制, 并且要求衍生化后样品存放于 10 °C 条件下^[10]。本研究针对硫酸阿米卡星注射液中的卡那霉素, 改进柱前衍生化-HPLC 的方法对其进行含量测定, 增大了样品的稳定性范围。为控制硫酸阿米卡星注射液的质量, 提高产品的安全性提供新的视角。

1 仪器与试剂

仪器: Agilent 1200 高效液相色谱仪, 自动控温进样器, 可变波长检测器, Agilent Chemstation 色谱工作站。

试剂: 卡那霉素对照品 (批号: 130556-200501,

[基金项目] 上海市科学技术委员会科研计划项目(11DZ920905)。
[作者简介] 张明媛(1988-), 女, 在读硕士。E-mail: zhang_mingyuan@hotmail.com。
[通讯作者] 陆 峰。E-mail: fenglufeng@hotmail.com。

中国食品药品检定研究院); 2,4,6-三硝基苯磺酸 (Sigma-Aldrich 批号:031M5021/080M5000); 甲醇为 HPLC 级(德国 Merck 公司); 供试品:硫酸阿米卡星注射液(0.2 g/2 ml, 上海信谊金朱药业有限公司, 批号: 080703、090601、100523、110524、110525、110526), 磷酸二氢钾、氢氧化钾、冰醋酸、吡啶为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相:0.27% 磷酸二氢钾溶液(用 2.2% 的氢氧化钾溶液调节 pH 值至 6.5)-甲醇(30 : 70); 检测波长:340 nm; 进样量:50 μl; 流速:1.0 ml/min; 柱温:30 ℃。

2.2 对照品储备液 取卡那霉素对照品适量, 精密称定, 加水溶解并定量稀释制成每 1 ml 中含 500 μg 的溶液。

2.3 供试品溶液 精密量取本品适量, 用水稀释制成每 1 ml 中含 2 mg 的溶液。精密量取 0.2 ml 置 10 ml 量瓶中, 加 1.0% 的 2,4,6-三硝基苯磺酸溶液 2 ml、吡啶 3 ml, 密塞, 强力振摇 30 s, 置 75 ℃ 水浴保温 2 h, 在冷水中冷却 2 min, 加冰醋酸 2 ml, 密塞, 强力振摇 30 s, 用水稀释至刻度, 摇匀。

2.4 专属性(强制破坏实验) 取本品(批号: 110525)10 支, 混匀。

2.4.1 酸破坏 精密量取上述混合液 1 ml 于 50 ml 量瓶中, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液 5 ml, 室温放置 10 d, 中和, 加水稀释至刻度, 摇匀。

2.4.2 碱破坏 精密量取上述混合液 1 ml 于 50 ml 量瓶中, 加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 5 ml, 室温放置 10 d, 中和, 加水稀释至刻度, 摇匀。

2.4.3 氧化破坏 精密量取上述混合液 1 ml 于 50 ml 量瓶中, 加 3% 过氧化氢溶液 5 ml, 室温放置 10 d, 加水稀释至刻度, 摇匀。

2.4.4 光照破坏 精密量取上述混合液 1 ml 于 50 ml 量瓶中, 在 4 500 lx 紫外灯下, 室温放置 10 d, 加水稀释至刻度, 摇匀。

2.4.5 热破坏 精密量取上述混合液 1 ml 于 50 ml 量瓶中, 130 ℃ 烘箱中放置 4 h, 放冷, 加水稀释至刻度, 摇匀。

精密量取上述破坏溶液各 0.2 ml, 按“2.3”项下衍生化方法处理, “2.1”项下色谱条件进样。结果如图 1, 通过破坏试验发现, 杂质卡那霉素峰显著增大, 但其他杂质峰均无明显变化。其中, 阿米卡星在 0.1 mol/L NaOH 溶液中最不稳定, 降解成卡那霉素最多, 达到 30%; 高温及酸性条件下卡那霉素也有所增加, 而氧化和光破坏条件下卡那霉素基本没有变化, 说明卡那霉素是硫酸阿米卡星的主要降解产物。卡那霉素主峰与阿米卡星主峰及其它各杂质峰分离度符合要求, 说明该色谱条件专属性强。

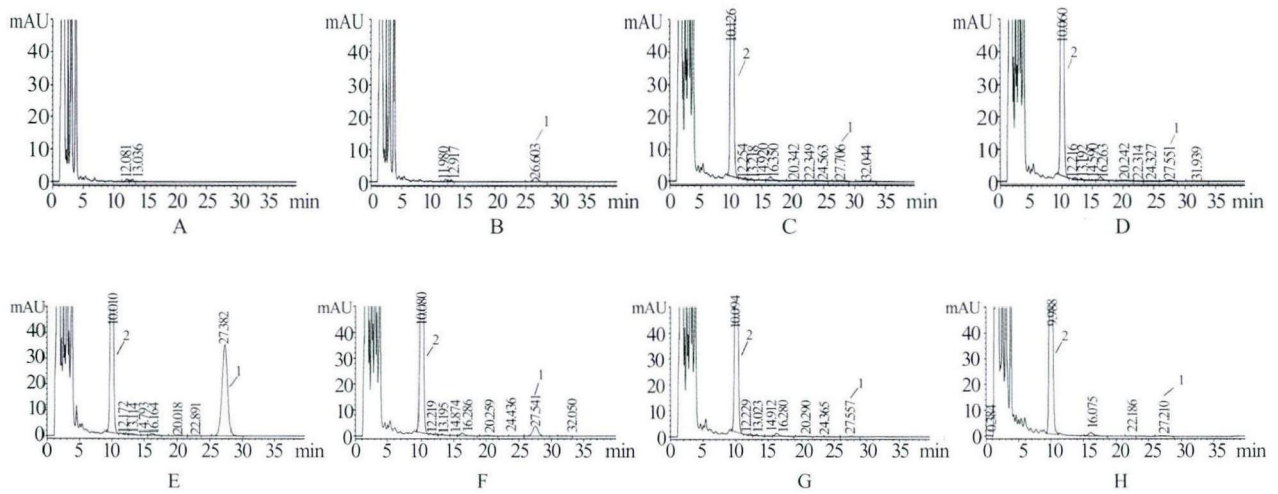


图 1 硫酸阿米卡星注射液的专属性实验色谱图

A-空白溶剂; B-卡那霉素标准品(20 μg/ml); C-未破坏制剂; D-酸破坏; E-碱破坏; F-氧化破坏; G-光破坏; H-热破坏(1-卡那霉素峰, 2-阿米卡星峰)

2.5 定量限 取卡那霉素对照溶液, 逐级稀释, 按“2.3”项下衍生化方法处理, “2.1”项下色谱条件进样, 至卡那霉素色谱峰信噪比(S/N)约为 10 时为

止, 卡那霉素的定量限为 0.04 μg/ml。

2.6 精密度 平行配制卡那霉素对照溶液(20 μg/ml)6 份, 按“2.3”项下衍生化方法处理, “2.1”项下

色谱条件进样,计算卡那霉素峰面积 RSD。结果重复性 RSD 为 2.36% (<15%),不同分析人员在不同天按相同操作测定,计算 12 个卡那霉素峰面积数据 RSD,结果中间精密度 RSD 为 6.87% (<20%),符合有关物质检查要求。

2.7 线性关系 精密吸取卡那霉素对照品储备液适量,加水配制浓度为 2、5、10、20、40、60、80 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素标准溶液,按“2.3”项下衍生化方法处理,“2.1”项下色谱条件进样。以峰面积为纵坐标,进样浓度为横坐标作图,得线性方程: $A = 4.824 6C - 1.953 8$,相关系数 $R^2 = 0.999 6$,线性关系良好。

2.8 准确度 精密量取已知卡那霉素含量的阿米

卡星注射液样品 9 份各 0.2 ml,分别准确加入浓度为 2、20、80 $\mu\text{g/ml}$ 的卡那霉素对照品溶液(每个浓度 3 份)各 0.2 ml,照“2.3”项下的衍生化方法处理,“2.1”项下色谱条件进样。结果平均回收率为 100.06%,RSD 为 3.40% (<10%, $n = 9$),回收率合格。

2.9 样品测定 取硫酸阿米卡星注射液样品 6 批(批号:080703、090601、100523、110524、110525、110526)照“2.3”项下的衍生化方法处理和“2.1”项下色谱条件进样,每批次平行配制 3 份,记录色谱信息。结果见表 1。结果显示卡那霉素的含量随时间逐渐增大。

表 1 6 批硫酸阿米卡星注射液中卡那霉素含量测定结果($\bar{x} \pm s, \%$)

批次	080703	090601	100523	110524	110525	110526
卡那霉素	0.53 ± 4.44	0.22 ± 1.52	0.17 ± 1.81	0.17 ± 1.15	0.16 ± 5.76	0.13 ± 2.25

3 讨论

英国药典要求检测硫酸阿米卡星注射液中有关

物质的样品浓度为 10 mg/ml,并将样品保存于 10 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,笔者考察了不同样品浓度,不同保存条件下卡那霉素的稳定性,结果见图 2。

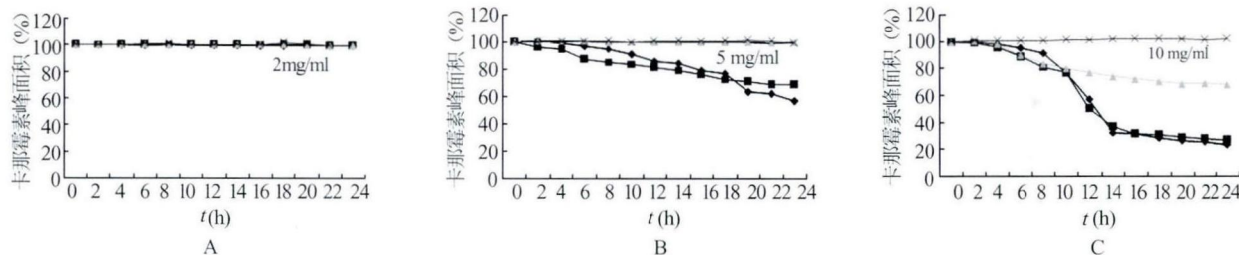


图 2 不同样品浓度保存于不同温度下,卡那霉素峰面积百分随时间变化图

A-2 mg/ml; B-5 mg/ml; C-10 mg/ml

—●—10 $^{\circ}\text{C}$; —■—15 $^{\circ}\text{C}$; —▲—25 $^{\circ}\text{C}$; —★—35 $^{\circ}\text{C}$

当样品保持 35 $^{\circ}\text{C}$ 时,各浓度中卡那霉素的峰面积在 24 h 内未发生显著变化。且当阿米卡星的含量为 2 mg/ml 时,环境温度的变化对检测杂质卡那霉素的含量没有明显影响。然而,当阿米卡星的浓度升高,并且将样品存放于温度较低的环境下,样品中卡那霉素的峰面积会随时间而显著下降,当阿米卡星浓度为 10 mg/ml,10 $^{\circ}\text{C}$ 环境存放样品时,尤为突出。

通过以上数据,分析造成这些现象的原因可能是:①阿米卡星及其有关物质与衍生化试剂 2,4,6-三硝基苯磺酸的反应是个可逆反应,该反应需在 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中完成,属吸热反应,但检测时,随着温度的降低,反应朝逆反应方向进行,使得卡那霉素与衍生化试剂之间的化学键断裂,卡那霉素不具紫外吸收而造成可检测到的峰面积减少;②卡那霉素的衍生

化产物与制剂中的其他辅料发生反应,随着样品浓度的升高,辅料的含量也相应增加,它们的存在可能会破坏卡那霉素衍生化后的产物。

因此,最终确定使用 2 mg/ml 的样品浓度,存放于室温下,检测硫酸阿米卡星注射液中卡那霉素的含量。

4 结论

本研究建立了一种柱前衍生化-HPLC 测定硫酸阿米卡星注射液中卡那霉素的方法,并对其进行了方法学考察。结果表明本方法能准确测定其中卡那霉素含量,从而为硫酸阿米卡星注射液中卡那霉素的测定提供一种稳定、特异、灵敏的检测方法。通过对不同批次硫酸阿米卡星注射液中卡那霉素含量的测定,建议可对硫酸阿米卡星注射液中增加卡那

素的检测项目并设定其检测限度。

【参考文献】

[1] Reynolds A, Hamilton-Miller J, Brumfitt W. Newer aminoglycosides-amikacin and tobramycin; An *in vitro* comparison with kanamycin and gentamicin[J]. *Brit Med J*, 1974, 3(5934): 778.

[2] Murillo-Cuesta S, Contreras J, Cediel R, *et al.* Comparison of different aminoglycoside antibiotic treatments to refine ototoxicity studies in adult mice[J]. *Lab Anim-uk*, 2010, 44(2): 124.

[3] Peloquin CA, Berning SE, Nitta AT, *et al.* Aminoglycoside toxicity; daily versus thrice-weekly dosing for treatment of mycobacterial diseases[J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 38(11): 1538.

[4] Penha FM, Rodrigues EB, Maia M, *et al.* Retinal and ocular toxicity in ocular application of drugs and chemicals-part II; retinal Toxicity of current and new drugs[J]. *Ophthalmic Res*, 2010, 44(4): 205.

[5] Ovalles JF, Brunetto MR, Gallignani M. A new method for the analysis of amikacin using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) derivatization and high-performance liquid chromatography with UV-detection[J]. *J Pharmaceut. Biomed.*, 2005, 39(1): 294.

[6] 李茜, 刘英, 韩春霞, 等. 离子色谱法测定硫酸阿米卡星原料及其制剂的有关物质[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(2): 318.

[7] 陈冠华, 潘淑萍, 胡江宁. 硫酸阿米卡星含量及有关物质的 HPLC-ELSD 测定[J]. *中国医药工业杂志*, 2005, 35(3): 171.

[8] 王明娟, 胡昌勤, 金少鸿. 硫酸阿米卡星注射液及有关物质的 HPLC 法分析[J]. *中国抗生素杂志*, 2001, 26(5): 345.

[9] *British Pharmacopoeia*. 2010 Volume III [S]. 2010.

[10] 中国药典 2010 版二部[S]. 2010: 984.

[收稿日期] 2012-12-17

[修回日期] 2013-04-08

(上接第 342 页)

[5] Jahbour S, Ziring B. Advantages of extended-release metformin in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Postgrad Med*, 2011, 123(1): 15.

[6] Schwartz SL, Gordi T, Hou E, *et al.* Clinical development of metformin extended release tablets for type 2 diabetes; an overview. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*[J]. 2008, 4(9): 1235.

[7] Cullen E, Liao J, Lukacsko P, *et al.* Pharmacokinetics and dose proportionality of extended-release metformin following administration of 1 000, 1 500, 2 000 and 2 500 mg in healthy volunteers [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2004, 25(6): 261.

[8] Sheiner LB, Rosenberg B, Marathe VV. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data[J]. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1977, 5(5): 445.

[9] Vozeh S, Steimer JL, Rowland M, *et al.* The use of population pharmacokinetics in drug development[J]. *Clin Pharmacokinet*, 1996, 30(2): 81.

[10] Aarons L, Balant LP, Mentré F, *et al.* Population approaches in drug development. Report on an expert meeting to discuss population pharmacokinetic/pharmacodynamic software [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1994, 46(5): 389.

[11] Hong Y, Rohatagi S, Habtemariam B, *et al.* Population exposure-response modeling of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *J Clin Pharmacol*, 2008, 48(6): 696.

[12] Charles B, Norris R, Xiao X, *et al.* Population pharmacokinetics of metformin in late pregnancy[J]. *Ther Drug Monit*, 2006, 28(1): 67.

[13] 厉伟兰, 刘晓东, 谢林, 等. 二甲双胍缓释片人体药代动力学及其相对生物利用度[J]. *江苏药学与临床研究*, 2006, 14(2): 72.

[14] 汤净, 钟国平, 刘伟东, 等. 国产盐酸二甲双胍缓释片的人体药代动力学及相对生物利用度[J]. *中国新药杂志*, 2005, 14(2): 197.

[15] 廉江平, 张鹏, 李小川, 等. 盐酸二甲双胍缓释片的药代动力学及相对生物利用度研究[J]. *西北药学杂志*, 2007, 22(5): 227.

[16] 陈勇川, 何菊英, 唐敏, 等. 盐酸二甲双胍缓释片人体相对

生物利用度及其药代动力学研究[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(21): 2148.

[17] 杨洁, 张银娣, 胡刚, 等. 盐酸二甲双胍缓释片人体药代动力学和相对生物利用度研究[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2007, 27(9): 920.

[18] 郑恒, 陈雅丽, 王莉, 等. 盐酸二甲双胍缓释片药物动力学及生物等效性研究[J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2007, 36(4): 517.

[19] 温新国, 张霖泽, 黄民, 等. 盐酸二甲双胍缓释片与国外上市品的药代动力学比较及体内外相关性研究[J]. *广东药学院学报*, 2005, 21(3): 284.

[20] Proctor WR, Bourdet DL, Thakker DR. Mechanisms underlying saturable intestinal absorption of metformin[J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(8): 1650.

[21] Robert F, Fendri S, Hary L, *et al.* Kinetics of plasma and erythrocyte metformin after acute administration in healthy subjects[J]. *Diabetes Metab*, 2003, 29(3): 279.

[22] Briggs GG, Ambrose PJ, Nageotte MP, *et al.* Excretion of metformin into breast milk and the effect on nursing infants[J]. *Obstet Gynecol*, 2005, 105(6): 1437.

[23] Pillans PI, Landsberg PG, Fleming AM, *et al.* Evaluation of dosage adjustment in patients with renal impairment[J]. *Intern Med J*, 2003, 33(1-2): 10.

[24] Stepensky D, Friedman M, Raz I, *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of the glucose-lowering effect of metformin in diabetic rats reveals first-pass pharmacodynamic effect[J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30(8): 861.

[25] Lee SH, Kwon KI. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling for the relationship between glucose-lowering effect and plasma concentration of metformin in volunteers[J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(7): 806.

[26] Sun L, Kwok E, Gopaluni B, *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of metformin for the treatment of type II diabetes mellitus[J]. *Open Biomed Eng J*, 2011, 5, 1.

[收稿日期] 2012-12-17

[修回日期] 2013-04-08