

HPLC-ELSD 测定硫酸卷曲霉素原料及其制剂中硫酸根含量

王巨才¹, 姚永青²

(1. 海南省药品检验所, 海口 570216; 2. 河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

摘要 目的: 建立高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD法)测定硫酸卷曲霉素及其制剂中硫酸根含量。**方法:** 采用 GRACE Apollo C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 35 °C, 流动相为 0.2 mol·L⁻¹ 三氟乙酸溶液-甲醇(94:6), 流速 0.6 mL·min⁻¹, 进样量 20 μL; 漂移管温度为 110 °C, 载气流量为 2.8 L·min⁻¹, 增益为 1。**结果:** 硫酸线性范围为 0.015~0.300 mg·mL⁻¹(*r*=0.997 8), 日内 RSD 为 0.3%, 精密度为 0.4%~1.0%, 平均回收率为 101.6% (RSD=1.3%, *n*=9)。原料及其制剂的硫酸根含量为 19.3%~23.3%, 结合硫酸分子数为 1.7~2.0。**结论:** 经方法学验证, 本法能测定硫酸卷曲霉素原料及其制剂的硫酸盐成分含量, 可为其质量标准提高与质量控制提供参考。

关键词: 硫酸卷曲霉素; 多肽类抗生素; 环状多肽结构; 硫酸根; 蒸发光散射检测器; 高效液相色谱法; 滴定法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)01-0176-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.01.25

Determination of sulfate in capreomycin sulfate raw materials and its preparation by HPLC-ELSD

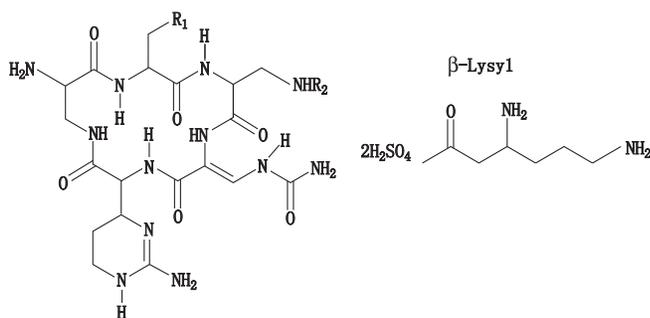
WANG Ju-cai¹, YAO Yong-qing²

(1. Hainan Institute for Drug Control, Haikou 570216, China; 2. Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

Abstract Objective: To develop a rapid and simple method for the separation and quantitation of sulfate in capreomycin sulfate and its preparation using HPLC coupled with evaporative light scattering detection (HPLC-ELSD). **Methods:** A GRACE Apollo C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was adopted. The column temperature was set at 35 °C. The mobile phase consisted of 0.2 mol·L⁻¹ trifluoroacetic acid-methanol (94 : 6) at a flow rate of 0.6 mL·min⁻¹, and the injection volume was 20 μL; The drift tube temperature of Alltech 2000ES was 110 °C, the flow rate of carrier gas was 2.8 L·min⁻¹, and the gain was 1. **Results:** The content determination of sulfate in capreomycin sulfate and its preparation by HPLC-ELSD was achieved. The linear range of sulfate was 0.015~0.300 mg·mL⁻¹ (*r*=0.997 8) with average recovery of 101.6% (RSD=1.3%, *n*=9), the inter-day RSD was 0.3%, and the precision was 0.4%~1.0%. The content of sulfate in capreomycin sulfate and its preparations was 19.3%~23.3%. The molecular number of sulfuric acid was 1.7~2.0. **Conclusion:** The new established HPLC-ELSD method shows good repeatability, linearity and robustness, which can be used as a reference of the improvement of quality control of sulfate in capreomycin sulfate and its preparations.

Keywords: capreomycin sulfate; peptide antibiotics; cyclic polypeptide structure; sulfate; ELSD; HPLC; titration method

硫酸卷曲霉素为碱性水溶性多肽类抗生素,具有环状多肽类结构^[1],其含有4个极相似的组分(I_A, I_B, II_A, II_B),结构式见图1;因含多个氨基,因此可产生含不同当量硫酸根的硫酸盐产品^[2]。硫酸卷曲霉素结合两分子的硫酸,卷曲霉素I的硫酸盐理论含量为22%,卷曲霉素II的硫酸盐理论含量为26%。为保证卷曲霉素成盐的完全,确保硫酸卷曲霉素的质量和疗效,应对其硫酸根含量加以控制。硫酸根含量测定的经典方法为重量法^[3],操作烦琐费时;2005年版中国药典为容量法^[4],操作中所用氨水对实验人员刺激性较大,且滴定终点突跃不明显,初试者不易掌握。鉴于反相离子对高效液相色谱法操作简便,在无机离子测定方面的应用已日趋广泛,本文参考有关文献^[5-7],选用蒸发光散射检测器(ELSD),经优化建立了硫酸卷曲霉素原料及其制剂的硫酸根含量测定方法,对本品硫酸根含量制定了含量参考限度,以控制产品质量,同时为提高产品质量和制定质量标准提供了参考。



组分 (component)	R ₁	R ₂
卷曲霉素 I _A (capreomycin I _A)	OH	β-lysine
卷曲霉素 I _B (capreomycin I _B)	H	β-lysine
卷曲霉素 II _A (capreomycin II _A)	OH	NH ₂
卷曲霉素 II _B (capreomycin II _B)	H	NH ₂

图1 硫酸卷曲霉素结构式

Fig. 1 Structural formula of capreomycin sulfate

1 仪器、试剂与样品

Waters 2695 高效液相色谱仪, Alltech 2000ES 蒸发光散射检测器, Empower 色谱工作站, BP211D 电子天平。

三氟乙酸、甲醇为色谱纯,水为去离子水。

硫酸卷曲霉素原料(批号 HCS1211101、HCS1211102、HCS1211103, 华北制药华胜有限公司;批号 5120406、5120407、5120501, 浙江海正药业股份有限公司)及注射用硫酸卷曲霉素(批号 3120202, 规格 0.75 g, 浙江海正药业股份有限公司;批号 1203001, 规格 0.5 g;

批号 1104001、1204001, 规格 1.0 g, 南宁中科药业有限责任公司;批号 20100603、20110101、20110501, 规格 0.5 g, 和力达(信阳)药业有限责任公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 硫酸滴定液 取硫酸 3 mL, 缓缓注入适量冷水中, 冷却至室温, 加水稀释至 1 000 mL。用基准无水碳酸钠进行标定, 浓度为 0.054 29 mol·L⁻¹。

2.1.2 对照品溶液 精密量取硫酸滴定液适量, 用水定量稀释制成含硫酸根(SO₄²⁻) 0.075、0.15、0.30 mg·mL⁻¹ 的溶液作为对照品溶液(1)、(2)、(3)。

2.1.3 供试品溶液 称取硫酸卷曲霉素原料或注射用硫酸卷曲霉素装量差异项下内容物适量, 加水制成 0.8 mg·mL⁻¹ 的溶液, 即得。

2.2 色谱条件

采用 GRACE Apollo C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温 35 °C, 以 0.2 mol·L⁻¹ 三氟乙酸溶液-甲醇(94:6) 为流动相, 流速 0.6 mL·min⁻¹, 进样量为 20 μL; 蒸发光散射检测器漂移管温度为 110 °C, 载气(氮气) 流速为 2.8 L·min⁻¹。

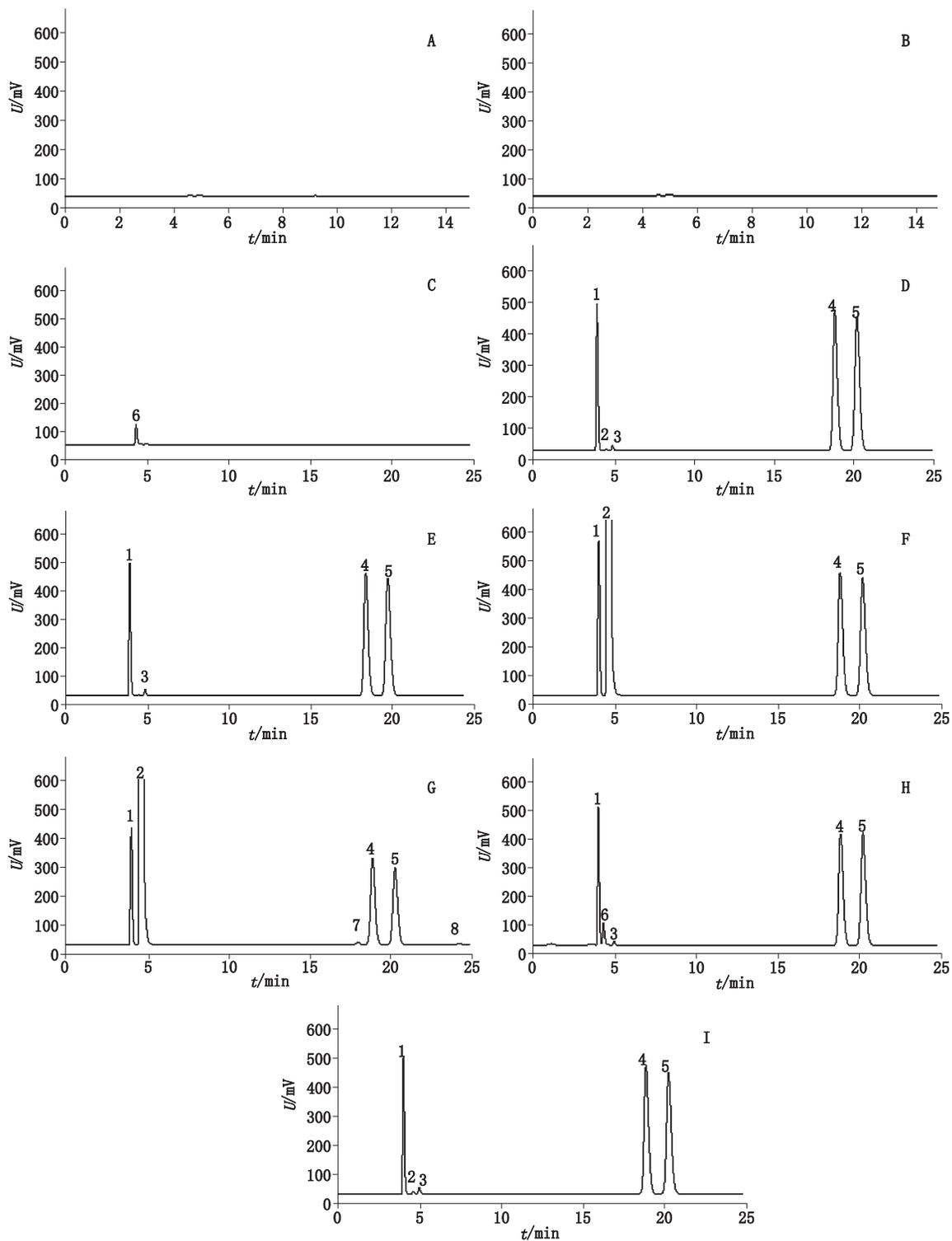
在上述色谱条件下, 取对照品溶液(2) 连续进样, 硫酸根离子峰面积的 RSD 应不大于 2.0%。

2.3 专属性试验

2.3.1 辅料 硫酸卷曲霉素和注射用硫酸卷曲霉素均不含辅料, 氯离子在漂移管的 110 °C 高温中挥发不干扰硫酸根测定, 见图 2。

2.3.2 降解试验 取硫酸卷曲霉素原料(批号 HCS1211101) 80 mg, 加水溶解并稀释至 50 mL, 备用。精密吸取该溶液 5 mL, 水浴中加热 60 min, 用水定容至 10 mL, 即得热破坏溶液; 精密吸取该溶液 5 mL, 加 1 mol·L⁻¹ 盐酸 2.5 mL, 室温放置 60 min 后, 加 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2.5 mL 中和, 即得酸破坏溶液; 精密吸取该溶液 5 mL, 加 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2.5 mL, 室温放置 60 min 后, 加 1 mol·L⁻¹ 盐酸 2.5 mL 中和, 即得碱破坏溶液; 精密吸取该溶液 5 mL, 加 30% 过氧化氢溶液 3 mL, 室温放置 60 min 后, 加水 2 mL, 混匀, 即得氧化破坏溶液; 精密吸取该溶液 5 mL, 于 4500 lx 光照 24 h 后用水稀释至 10 mL, 即得光破坏溶液。

将上述 5 份破坏后的溶液分别进样 20 μL, 记录色谱图, 结果卷曲霉素在热、酸、碱、氧和光照条件下降解产物对硫酸根测定均无干扰, 表明本法测定硫酸根专属性良好, 见图 2。



A. 水 (water) B. 0.2 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 (0.2 mol · L⁻¹ hydrochloric acid solution) C. 15% 过氧化氢溶液 (15% hydrogen peroxide solution) D. 未破坏供试品溶液 (no destruction solution) E. 热破坏溶液 (thermal destruction solution) F. 酸破坏溶液 (acid destruction solution) G. 碱破坏溶液 (alkali destruction solution) H. 氧化破坏溶液 (oxidative destruction solution) I. 光降解溶液 (photo destruction solution)

1. 硫酸根 (SO₄²⁻) 2. 钠离子 (Na⁺) 3. 未知杂质 (unknown impurity) 4. 卷曲霉素 I_A (capreomycin I_A) 5. 卷曲霉素 I_B (capreomycin I_B) 6. 过氧化氢溶液中的杂质 (impurity in hydrogen peroxide solution) 7. 降解产物 (degradation product) 8. 降解产物 (degradation product)

图 2 降解试验色谱图

Fig. 2 HPLC-ELSD chromatograms of degradation test

2.4 线性关系考察

精密吸取硫酸滴定液(0.054 29 mol·L⁻¹)适量,分别加水制成0.299 8、0.223 6、0.149 9、0.117 1、0.075 1和0.015 0 mg·mL⁻¹的对照品溶液,进样20 μL,记录色谱图;对质量浓度的对数值与相应的硫酸根峰面积对数值进行回归,回归方程:

$$Y=1.886X+8.061 \quad r=0.997 8$$

线性范围为0.015~0.30 mg·mL⁻¹。

2.5 检测限与最低定量限测定

分别取0.015 0 mg·mL⁻¹硫酸对照品溶液40和45 μL进样测定,其检测限与定量限分别为0.30 μg(信噪比为3)和0.68 μg(信噪比为10)。

2.6 精密度试验

取低(0.075 1 mg·mL⁻¹)、中(0.149 9 mg·mL⁻¹)、高(0.299 8 mg·mL⁻¹)浓度的硫酸对照品溶液,分别进样3次,计算硫酸根峰面积的RSD分别为1.0%、0.7%和0.4%;取0.149 9 mg·mL⁻¹浓度的硫酸对照品溶液,一天内重复进样6次,日内RSD为0.3%;表明进样精密度良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取批号为HCS1211102的硫酸卷曲霉素原料9份,分别精密加入硫酸滴定液(0.054 29 mol·L⁻¹)1.970、2.815和3.660 mL,然后加水稀释至100 mL,进样后,记录色谱图。按硫酸标准曲线计算测求得硫酸的量,计算低、中、高浓度回收率($n=3$)分别为100.2%、102.8%和101.8%,RSD为0.1%~1.3%。

2.8 溶液稳定性

取0.8 mg·mL⁻¹的注射用硫酸卷曲霉素的供试品溶液,在室温(25℃)下于0~12 h,每隔1 h进样1次,结果硫酸根在12 h内的峰面积RSD为0.99%,说明供试品溶液稳定性良好。

2.9 耐用性

2.9.1 色谱柱 考察了不同品牌色谱柱[TSK-gel ODS-81Ts (Made in Japan) C₁₈、GRACE Apollo C₁₈、Thermo Scientific BDS Hypersil-C₁₈、YMC Pack Pro C₁₈ RS、VenusilASB C₁₈、Gemini-NX C₁₈、GRACE Alltima HP C₁₈ HL和Thermo Scientific Synchronis C₁₈],结果硫酸根与其他色谱峰均分离良好。

2.9.2 缓冲盐浓度、流动相pH和柱温 曾考察了缓冲盐浓度(0.19、0.21 mol·L⁻¹)、流动相pH(0.8、1.0)和柱温(33、37℃)的微小变动对硫酸根与其他色谱峰分离的影响,结果均无影响。

2.10 样品中硫酸根含量测定

精密量取对照品溶液(1)、(2)、(3)各20 μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,计算对照品溶液浓度的对数值与相应的主峰面积对数值的线性回归方程,相关系数(r)应不小于0.99;另取供试品溶液,同法测定,用线性回归方程计算样品中硫酸根的含量,见表1。原料及其制剂的硫酸根含量为19.3%~23.3%,硫酸分子数为1.7~2.0。同时按照中国药典2005年版硫酸庆大霉素的容量法进行硫酸根含量测定,原料及其制剂的硫酸根含量为19.0%~23.1%,见表1。

对滴定法和HPLC-ELSD法的硫酸根测定结果,采用配对样品 t 检验, sig.=0.668>0.05,表明2种方法在95%的可信区间,测定结果无显著性差异。

2.11 硫酸根限度标准的确定

硫酸卷曲霉素含两分子的硫酸根,硫酸卷曲霉素I的硫酸根理论含量为22%,硫酸卷曲霉素II的硫酸根理论含量为26%,目前硫酸卷曲霉素中卷曲霉素I归一化含量不低于98%,卷曲霉素II的含量很少,小于2%。因此,按照卷曲霉素I的理论含量22.4%的±5%计算为21.3%~23.5%,同时结合硫酸卷曲霉素原料及其制剂的硫酸根含量,建议将硫酸卷曲霉素中硫酸根含量限度制订为21.0%~24.0%。

3 讨论

3.1 色谱峰的鉴别

硫酸卷曲霉素为发酵生产工艺,产品中残留微量Na⁺、Cl⁻,因此曾对色谱峰进行了鉴别:分别取硫酸、硫酸钠和氯化钠适量以水配成适当浓度的溶液进样分析,主峰(SO₄²⁻)的保留时间均相同,SO₄²⁻与Na⁺、Cl⁻均达到基线分离。

3.2 样品溶剂和供试品溶液浓度的选择

反相离子对色谱中一般以流动相作溶剂为宜,加以为溶剂会产生系统峰。但硫酸卷曲霉素在水中易溶,同时由于供试品溶液进入蒸发光散射检测器时在喷雾口水全部雾化,因此对样品中硫酸根的测定无影响,故选择水作溶剂。对应于线性范围测定中的3份溶液,中间浓度的硫酸对照品溶液的质量浓度为0.15 mg·mL⁻¹,与0.8 mg·mL⁻¹硫酸卷曲霉素供试品溶液中的硫酸根峰面积相当,因此供试品溶液浓度定为0.8 mg·mL⁻¹。

3.3 硫酸卷曲霉素的成盐率

硫酸卷曲霉素目前生产工艺包括2种,一种是喷雾干燥无菌粉末直接分装,其性状为“白色或类白色

表 1 硫酸卷曲霉素及其制剂检验数据

Tab. 1 Results of sulfate in capreomycin sulfate and its preparation

生产企业 (manufacturer)	剂型 (preparation)	批号 (batch No.)	硫酸含量 / % (content of sulfate)		硫酸分子数 (molecules No. of
			HPLC	滴定法 (titrate)	H ₂ SO ₄)
A	硫酸卷曲霉素 (capreomycin sulfate)	HCS1211101	20.6	21.3	1.8
		HCS1211102	20.1	18.9	1.8
		HCS1211103	20.7	19.3	2.0
B	硫酸卷曲霉素 (capreomycin sulfate)	5120406	22.4	23.1	2.0
		5120407	23.3	23.0	2.0
		5120501	22.3	22.8	1.9
C	注射用硫酸卷曲霉素 (capreomycin sulfate for injection)	3120202	22.6	22.8	2.0
		1203001	23.1	22.1	2.0
		1104001	19.5	19.9	1.7
D	注射用硫酸卷曲霉素 (capreomycin sulfate for injection)	1204001	21.0	21.3	1.8
		20100603	19.3	20.8	1.7
		20110101	20.2	21.4	1.8
		20110501	21.4	22.0	1.9

粉末”；一种是使用发酵浓缩液直接冻干，浓缩液作为中间品管理。原料及其制剂的硫酸根含量为 19.3%~23.3%，计算其硫酸分子数为 1.7~2.0，而硫酸卷曲霉素理论含两分子的硫酸根，某些批次原料与制剂硫酸根含量较低，说明其成盐不完全。查询文献[8]与河南省不良反应中心信息，注射用硫酸卷曲霉素由于肌注局部疼痛、硬结的不良反应较大，病人难以耐受，而成盐不完全会影响其吸收，进而影响其临床不良反应与有效性。因此，有必要控制硫酸根的含量。

3.4 滴定法和 HPLC-ELSD 法比较

传统滴定法测定硫酸根的含量，虽然成本低廉，但是操作过程烦琐，影响因素多。滴定过程需要始终保持供试品溶液的 pH 为 11，调节 pH 时还应注意避免反应离子及待测离子的损失，因此滴定耗时比较长；pH 的差异与乙醇加入时机的掌握影响滴定终点的灵敏度；同时在滴定过程中产生白色硫酸钡沉淀，使对滴定终点的判断较为困难。而 HPLC-ELSD 法测定硫酸根含量，方法专属性强，准确度与精密度高，方法简便易操作，克服了滴定法目视判断滴定终点的不足，能更为准确地对硫酸根的含量进行测定。

3.5 对照品溶液的选择

中国药典 2015 年版中硫酸滴定液是以基准无水碳酸钠进行标定，因此标定出的浓度与硫酸根是对应的，HPLC-ELSD 采用硫酸滴定液作为对照品溶液可

以直接溯源到基准物质无水碳酸钠，因此该方法准确度可靠并良好。

参考文献

- [1] Capreomycin [J]. *Tuberculosis*, 2008, 88 (2): 89
- [2] HERR EB JR, REDSTONE MO. Chemical and physical characterization of capreomycin [J]. *Ann NY Academy Sci*, 1966, 135 (2): 940
- [3] 中国药典 1990 年版. 二部 [S]. 1990: 693
ChP 1990. Vol II [S]. 1990: 693
- [4] 中国药典 2005. 二部 [S]. 2005: 930
ChP 2005. Vol II [S]. 2005: 930
- [5] 中国药典 2010 年版. 二部 [S]. 2010: 976
ChP 2010. Vol II [S]. 2010: 976
- [6] 刘浩, 潘颖, 仇仕林, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定基糖苷类抗生素中硫酸盐含量的研究. *药物分析杂志* [J]. 2001, 21 (6): 429
LIU H, PAN Y, QIU SL, *et al.* Research on determination of sulfate in aminoglycoside antibiotics by HPLC-ELSD [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2001, 21 (6): 429
- [7] 袁耀佐, 张玫, 钱文, 等. 高效液相色谱-电喷雾-离子阱质谱法推定硫酸依替米星中有关物质的结构 [J]. *分析化学*, 2010, 38 (6): 817
YUAN YZ, ZHANG M, QIAN W, *et al.* Characterization of related substance in etimicin sulfate sample by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass chromatography [J]. *Chin J Anal Chem*, 2010, 38 (6): 817
- [8] 逯中民. 66 例复治结核病患者卷曲霉素副反应分析并文献复习 [J]. *中国医药指南*, 2008, 6 (6): 28
LU ZM. The investigation of side effects of 66 retreatment tuberculosis patients who had used CPM and relative literatura review [J]. *Guide China Med*, 2008, 6 (6): 28

(本文于 2015 年 12 月 9 日收到)