

使用3465电化学检测器分析药品中的阿米卡星和卡那霉素

Jinchua Yang, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

根据美国药典(USP)专论，利用HPAEC-PAD对阿米卡星(AMI)和卡那霉素(KAN)进行分析。仪器设置包括ACQUITY™ Arc™系统和3465电化学检测器(ECD)。使用Empower™ 3色谱数据软件(CDS)进行仪器控制和数据采集。分析性能满足USP对两种分析物在分离度、拖尾因子和重现性方面的系统适应性要求。3465 ECD在足以分析AMI和KAN的浓度范围内表现出优异的线性响应。使用该设置分析阿米卡星注射液样品的结果令人满意，证明ACQUITY Arc系统和3465 ECD检测器适用于分析药品中的阿米卡星和卡那霉素。

优势

- 配备3465 ECD的ACQUITY Arc能够可靠地分析阿米卡星和卡那霉素，满足USP性能要求
- 3465 ECD在足以分析阿米卡星和卡那霉素的浓度范围内表现出优异的线性响应

简介

阿米卡星和卡那霉素是密切相关的氨基糖苷类抗生素，常用于治疗细菌感染和结核病。KAN分离自细菌卡那霉素

链霉菌。AMI源自KAN，通过KAN的一个氨基酰化而生成。图1为AMI和KAN的结构。USP已发布AMI和KAN专论，其中使用配备脉冲安培检测(PAD)的高性能阴离子交换色谱(HPAEC)进行分析¹⁻⁵。本应用纪要介绍了在配备3465 ECD的ACQUITY Arc系统上对AMI和KAN进行的HPAEC-PAD分析，证明了该系统用于分析药品中AMI和KAN的性能和适应性。

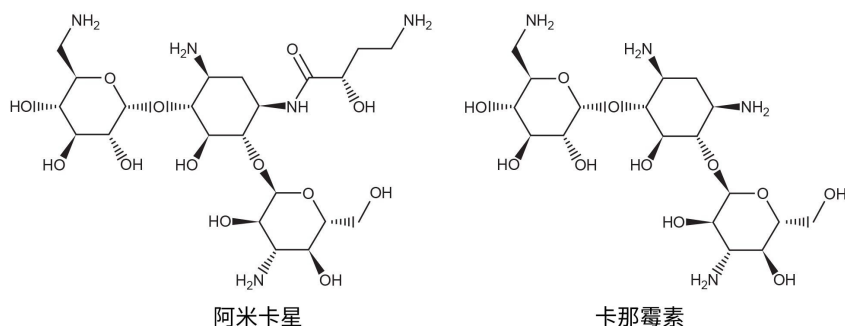


图1.阿米卡星和卡那霉素的结构。

实验

标准品和试剂

硫酸卡那霉素和阿米卡星(CRM)购自Sigma-Aldrich, Inc. (美国密苏里州圣路易斯)。阿米卡星注射液(250 mg/mL)购自当地供应商。低碳酸盐氢氧化钠(NaOH)溶液 (50% w/w, 经认证, Fisher Chemical™, 碳酸盐 ≤0.10%) 购自Fisher Scientific Co. (美国宾夕法尼亚州匹兹堡)。甲醇 (用于HPLC) 购自Honeywell Research Chemicals (美国卡罗来纳州夏洛特)。去离子水(>18.2 Mohm·cm)在内部制得。

制备

将KAN和AMI标准品溶于去离子水中，制得浓度为10 mg/mL的标准储备液。用储备液制得浓度分别为0.008 mg/mL和0.020 mg/mL的KAN和AMI混标溶液。

用去离子水将AMI注射液稀释至0.020 mg/mL AMI (基于标示浓度)，制得AMI注射液样品溶液。

将一定量的低碳酸盐50% w/w NaOH溶液与去离子水混合得到1 L NaOH溶液，制得115 mM和134 mM NaOH流

动相。去离子水在用于制备流动相之前经过脱气。流动相每天现配现用。

HPAEC-PAD条件

系统：	配备3465 ECD的ACQUITY Arc系统（QSM-R和SMFTN-R）
软件：	Empower 3 (3.6.1) 色谱数据软件
色谱柱：	Hamilton® RCX-10分析柱250 × 4.6 mm I.D. 7 μm (PEEK)，带有RCX-10保护柱
样品瓶：	PP样品瓶，容量700 μL，配有盖子和预切割隔垫（部件号：186005221）
温度：	30 °C（用于色谱柱和检测器流通池）
流通池：	配备一个金工作电极、一个HyREF参比电极和一个不锈钢辅助电极的FlexCell™，50 μm垫片（部件号：700013068）。
流动相：	115 mM或134 mM NaOH溶液（使用溶剂稳定套件在氮气下保护）（部件号：205001099）
SM清除/清洗溶剂：	去离子水
密封清洗溶剂：	水:甲醇8:2 (v:v)
流速：	0.5 mL/min
运行时间：	30 min
进样体积：	10 μL

定量环进样器离线时间：0.5 min

检测器：PAD

电位波形：见表1

ADF：0.02 Hz

步骤	时间 (s)	电位 (V)	积分
1	0.00	+0.04	—
2	0.30	+0.04	开始
3	0.50	+0.04	结束
4	0.51	+0.80	—
5	0.70	+0.80	—
6	0.71	-0.80	—
7	0.90	-0.80	—

表1.脉冲安培检测的电位波形。

使用高pH流动相

在使用这些流动相（pH高达13.1）时采取了额外的预防措施。预防措施包括：a)使用PEEK管路（内径0.004英寸）将进样阀连接至色谱柱并进一步连接至检测器流通池；b)进样后（在0.5 min时），使进样器定量环离线；以及c)每日使用后，用去离子水冲洗系统和色谱柱。在本研究中未观察到渗漏或残留（标准品和样品进样约500次）。

结果与讨论

检测器流通池

用于分析的检测器流通池由一个金工作电极、一个氢参比电极(HyREF)和一个辅助不锈钢电极组成。USP专论推荐使用包含一个金工作电极和一个银-氯化银参比电极的流通池。银-氯化银参比电极需要定期维护，而HyREF则不需要。辅助电极有助于改善检测的动态范围。考虑到以上这些因素，本研究使用包含一个金工作电极、一个HyREF参比电极和一个不锈钢辅助电极的FlexCell。

系统适应性测试

AMI和KAN的USP专论中规定了一套分析性能标准¹⁻⁵。除流动相外，两种分析物的分析条件相同。对于KAN，推荐使用115 mM NaOH溶液作为流动相；对于AMI，推荐使用134 mM NaOH溶液作为流动相。表2列出了USP标准以及使用包含0.008 mg/mL硫酸卡那霉素和0.020 mg/mL AMI的混标溶液在指定流动相条件下得到的测量结果。图2展示了在USP指定的流动相中由混标溶液获得的叠加色谱图。这些结果满足所有USP系统适应性要求（表2）。

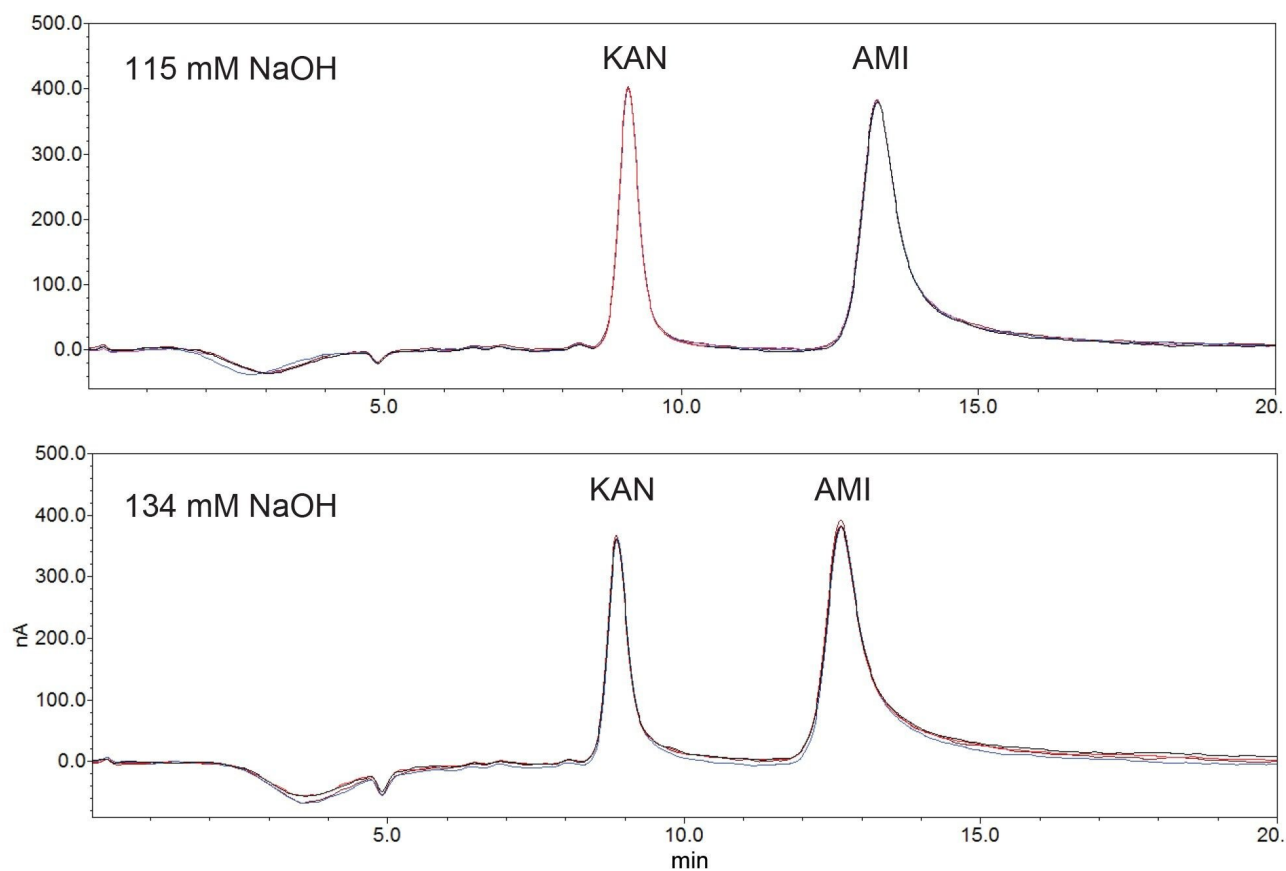


图2.在USP指定的流动相中获得的0.008 mg/mL硫酸卡那霉素和0.020 mg/mL阿米卡星的叠加色谱图($n=4$)。

参数	USP要求	卡那霉素 ¹	阿米卡星 ²
分离度(KAN/AMI)	≥ 3	4.9	4.5
拖尾因子	≤ 2	1.28	1.89
峰面积RSD (KAN)	$\leq 2\%$	1.0% ³	
峰面积RSD (AMI)	$\leq 3\%$		1.6% ³

注：1) 结果在115 mM NaOH流动相中获得；2) 结果在134 mM NaOH流动相中获得；3) $n=4$ 。

表2.USP系统适应性标准和检测结果。

线性

AMI和KAN的USP专论规定了单点（水平）校准，这要求检测器的响应与浓度之间存在线性（线性，过零点）关系。考察了检测器的响应线性。表3显示了在USP指定的流动相中得到的AMI和KAN浓度范围高达目标浓度的140%的校准结果。通过最小二乘回归将六个浓度水平的数据点拟合到直线（过零点）。两种分析物的相关系数值均为0.997，证明峰面积与分析物浓度之间存在出色的线性关系。本研究使用的进样体积为10 μ L。

分析物	目标浓度 (mg/mL)	浓度范围 (mg/mL)	流动相	方程	相关系数 (R)
AMI	0.020	0–0.0275	134 mM NaOH	$Y=1.05 \times 10^{12} X$	0.997
硫酸卡那霉素	0.008	0–0.0111	115 mM NaOH	$Y=1.28 \times 10^{12} X$	0.997

表3.硫酸卡那霉素和阿米卡星的校准结果。

样品分析

表4显示了两份AMI注射液样品的AMI分析结果。这些实测浓度结果在AMI的USP可接受标准范围内(90.0%~120.0%)。图3展示了这些样品重复进样三次所得到的色谱图。

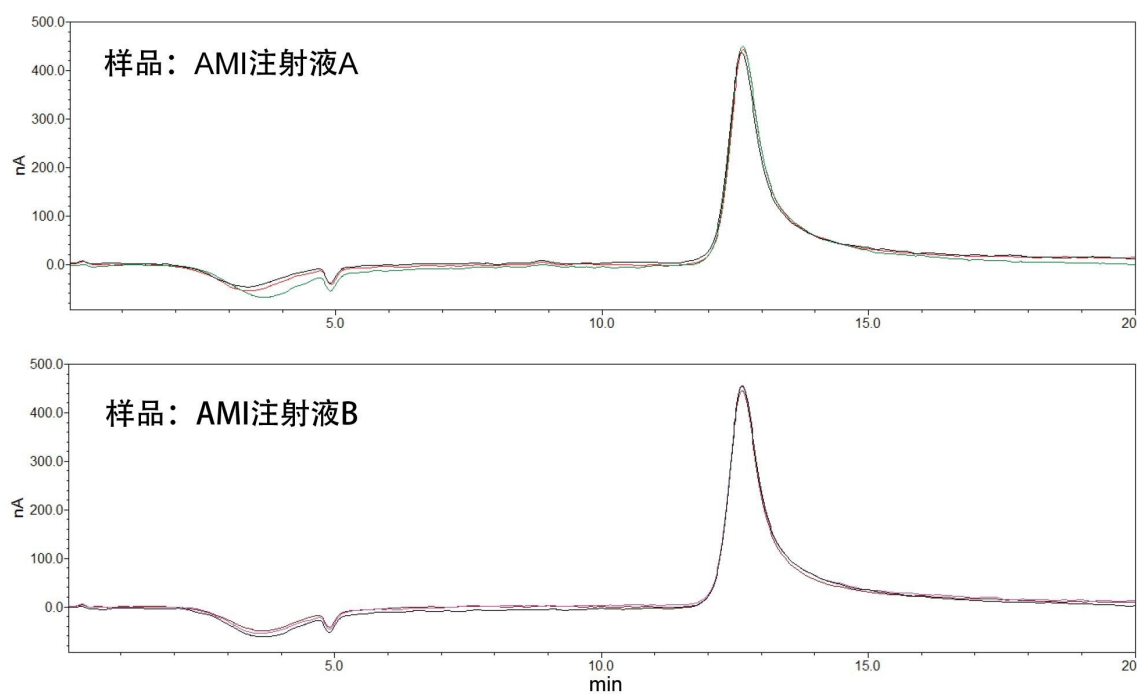


图3.阿米卡星注射液分析的叠加色谱图($n=3$)。

样品	标示浓度 (mg/mL)	实测浓度 ¹ (mg/mL)	与标示值之比	USP可接受标准
AMI注射液A	250	273 (1.8%)	109.2%	90.0%–120.0%
AMI注射液B	250	278 (2.8%)	111.2%	

1): 此处显示了三次测量的平均值和RSD。

表4.阿米卡星注射液的分析结果。

结论

本研究证明，配备3465电化学检测器的ACQUITY Arc系统在Empower 3 CDS控制下能够对药品中的AMI和KAN进行可靠而准确的分析。分析性能满足USP对AMI和KAN峰分离度、拖尾和重现性的性能要求。

参考资料

1. United States Pharmacopeia (2022), USP Monographs.Kanamycin Injection, USP43-NF38 – 2501.Rockville, MD: United States Pharmacopeia.
2. United States Pharmacopeia (2022), USP Monographs.Kanamycin Sulfate, USP43-NF38 – 2502.Rockville, MD: United States Pharmacopeia.
3. United States Pharmacopeia (2022), USP Monographs.Amikacin, USP43-NF38 – 219.Rockville, MD: United States Pharmacopeia.
4. United States Pharmacopeia (2022), USP Monographs.Amikacin Sulfate, USP43-NF38 – 220.Rockville, MD: United States Pharmacopeia.
5. United States Pharmacopeia (2022), USP Monographs.Amikacin Sulfate Injection, USP43-NF38 – 221.Rockville, MD: United States Pharmacopeia.

特色产品

ACQUITY Arc系统 <<https://www.waters.com/134844390>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

适用于液相色谱系统的3465电化学检测器 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=514431>>

720007647ZH, 2022年5月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

[沪 ICP 备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)