

高效液相色谱/蒸发光散射法测定多黏菌素类 原料药中主成分含量

彭侃霖, 宋旭琴, 刘戎, 张嘉慧, 周豪, 丘镜莉, 贺利民*

(华南农业大学 兽医学院药理研究室, 广东 广州 510642)

摘要: 建立了高效液相色谱/蒸发光散射法测定多黏菌素 B 和多黏菌素 E 原料药中主成分含量的分析方法。采用 Phenomenex Kinetex Biphenyl 色谱柱(50 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm) 分离, 甲醇和 20 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.6% 甲酸) 为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.5 mL/min; 蒸发光散射检测器参数为: 漂移管温度 55 °C, 气体压力 20 psi, 增益 250。结果表明, 多黏菌素 B 和多黏菌素 E 在 10 ~ 200 μg/mL 质量浓度范围内线性良好, 检出限分别为 0.8 μg/mL 和 1.2 μg/mL, 定量下限分别为 2.6 μg/mL 和 4.0 μg/mL。批内回收率分别为 100% ~ 104% 和 101% ~ 103%, 批内相对标准偏差(RSD) 分别为 0.90% ~ 2.4% 和 0.90% ~ 2.6%, 批间回收率分别为 101% ~ 103% 和 101% ~ 102%, 批间 RSD 分别为 1.1% ~ 1.9% 和 1.3% ~ 1.7%。与微生物检定法相比, 该方法简便, 能够更准确地反映原料药中目标分析物含量, 精密度更高, 可用于多黏菌素 B 和多黏菌素 E 两种原料药的质量控制。

关键词: 多黏菌素 B; 多黏菌素 E; 高效液相色谱-蒸发光散射法; 原料药; 含量

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2020)05-0657-05

Determination of Main Components in Polymyxins Crude Drugs by High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detector

PENG Kan-lin, SONG Xu-qin, LIU Rong, ZHANG Jia-hui, ZHOU Hao, QIU Jing-li, HE Li-min*

(Veterinary Pharmacology Laboratory, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University,
Guangzhou 510642, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector was developed for the determination of main components in polymyxin B and polymyxin E crude drugs. Analytes were separated on a Phenomenex Kinetex Biphenyl column(50 mm × 4.6 mm id, 5 μm) by gradient elution with methanol and 20 mmol/L ammonium acetate aqueous solution containing 0.6% formic acid as mobile phases at a flow rate of 0.5 mL/min. The parameters for evaporative light scattering detector were as follows: drift-tube temperature: 55 °C, carrier gas pressure: 20 psi, and the gain: 250. Results showed that there were good linear relationships for the analytes in polymyxin B and polymyxin E in the concentration range of 10 - 200 μg/mL with their detection limits of 0.8 μg/mL and 1.2 μg/mL, and their quantitation limits of 2.6 μg/mL and 4.0 μg/mL, respectively. The intra-batch recoveries for polymyxin B and polymyxin E were in the ranges of 100% - 104% and 101% - 103%, with intra-batch relative standard deviations of 0.90% - 2.4% and 0.90% - 2.6%, respectively. The inter-batch recoveries were in the ranges of 101% - 103% and 101% - 102%, with inter-batch relative standard deviations of 1.1% - 1.9% and 1.3% - 1.7%, respectively. Compared with microbiological detection method, the developed method is simpler, more precise and more accurate in the detection of analytes in crude drugs, and could be applied to the quality control of polymyxin B and polymyxin E crude drugs.

Key words: polymyxin B; polymyxin E; high performance liquid chromatography - evaporative

收稿日期: 2019-12-26; 修回日期: 2020-02-18

基金项目: 国家自然科学基金(31572562); 广州市科技计划重点项目(201804020019)

* 通讯作者: 贺利民, 博士, 研究员, 研究方向: 食品质量安全与残留检测, E-mail: liminokhe@scau.edu.cn

light scattering detector; crude drugs; content

多黏菌素类(Polymyxins)药物是从多黏芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)中提取的非核糖体途径合成的环多肽类抗生素,主要包括 A、B、C、D 和 E 等品种^[1]。其中,多黏菌素 B 主要成分为多黏菌素 B₁ 和 B₂;多黏菌素 E(Colistin, 又称克利斯汀)主要成分为多黏菌素 E₁ 和 E₂(图 1)。多黏菌素类抗生素对革兰氏阴性杆菌(如大肠杆菌、肺炎杆菌、绿脓杆菌等)具有较强的抗菌作用,如多黏菌素 E 作为兽药广泛应用于治疗呼吸道、肠道和泌尿系统感染等疾病^[2]。此外,多黏菌素 E 还具有提高饲料转化率,促进动物生长的作用,曾被农业部列为可在牛、猪和鸡饲料中添加使用的药物添加剂^[3]。但其在畜牧业生产中的广泛、大量和长期使用,不仅具有潜在肾毒性及神经毒性作用,还会增大细菌耐药性风险,危害人类健康^[4-6]。为此,我国农业农村部第 2428 号公告明确规定停止多黏菌素 E 用于动物促生长,但保留其在动物中的药用功能^[7]。

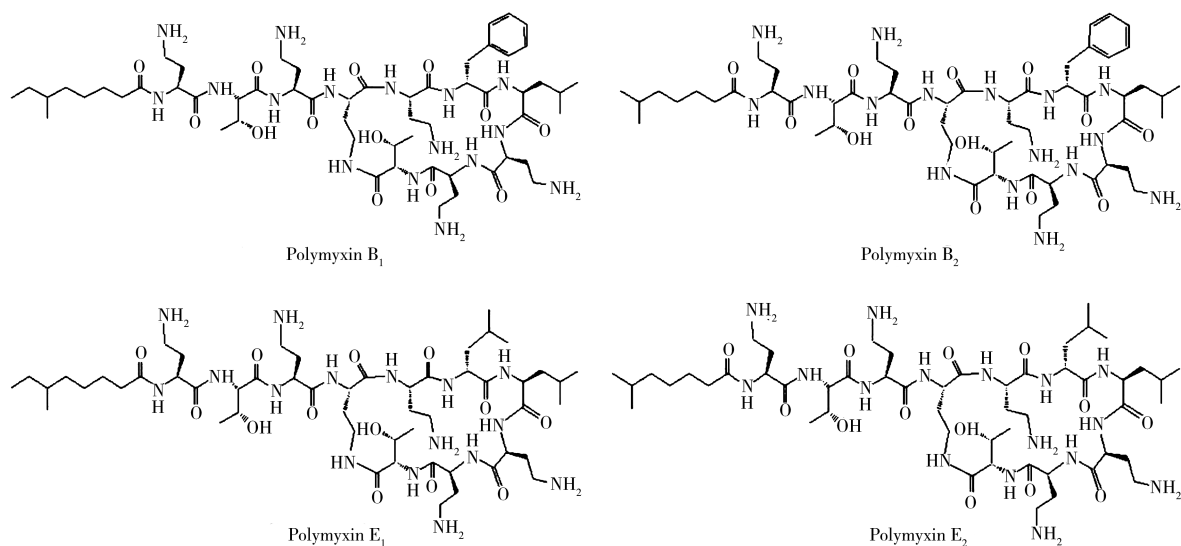


图 1 多黏菌素 B 和多黏菌素 E 的结构式

Fig. 1 Chemical structures of polymyxin B and polymyxin E

多黏菌素 B 和 E 均由相应生产菌发酵后提取制备,组分复杂,对其产品质量保证和控制具有较高要求。目前,饲料及饲料添加剂中多黏菌素 B 和 E 的检测主要有微生物检测法^[8]、毛细管电泳法^[9]及高效液相色谱法^[10](High performance liquid chromatography, HPLC)。《中华人民共和国药典》2015 年版^[11]则采用抗生素微生物检定法,但其操作步骤多,环境洁净度要求较高,且测定结果重复性差^[12],难以体现实际效价。朱曦等^[13]建立了高效液相色谱/紫外检测法(High performance liquid chromatography ultraviolet detection, HPLC/UVD)测定硫酸黏菌素多种剂型中多黏菌素 E 的含量,但因多黏菌素类药物紫外吸收较弱,需在远紫外区测定,结果易受其他杂质影响。Kimura 等^[14]建立了间接荧光法分离测定多黏菌素类药物,但需增加衍生步骤,操作难以控制,精密度不高。因此,建立快速、灵敏、可靠的检测方法对原料药质量控制具有重要意义。蒸发光散射检测器(Evaporative light scattering detector, ELSD)作为一种通用型检测器,其响应不依赖于化合物的光学特性,适用于检测无光学吸收或吸收弱的物质^[15-16]。本文开发了一种分别测定多黏菌素 B 和多黏菌素 E 原料药中各自成分含量的 HPLC/ELSD 分析方法,为该类药物与制剂的分析和质量监控提供技术支撑。

1 实验部分

1.1 仪器与设备

Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),配 2424 蒸发光散射检测器;AG204 型精密电子分析天平(瑞士 Mettler 公司);Milli-Q Advantage A10 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

多黏菌素 E 对照品(含量 84.7%,批号: P689400,加拿大 Toronto Research Chemicals 公司);多黏

菌素 B 对照品(含量 92.6%, 批号: 50410, 德国 Dr. Ehrenstrofer 公司); 多黏菌素 B 原料药 1 号、多黏菌素 E 原料药 1 号和 2 号均购于市场; 甲醇、甲酸(色谱纯, 美国 Fisher scientific 公司); 乙酸铵(色谱纯, 美国 Tedia 公司)。

1.3 对照品溶液的制备

精密称取多黏菌素 B 和多黏菌素 E 对照品适量, 分别置于 10 mL 棕色容量瓶中, 以 0.1% 甲酸水溶液稀释至刻度, 超声、摇匀, 配成 1 mg/mL 的对照品储备溶液。分别取 0.25、0.50、1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 定容, 超声, 配成 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品工作液, 备用。

1.4 供试品溶液的制备

分别精密称取 13.2 mg 多黏菌素 B(标示含量为 75.6%) 和 11.0 mg 多黏菌素 E(标示含量为 90.5%) 供试品, 置于 10 mL 容量瓶中, 用初始比例流动相稀释至刻度, 超声处理 5 min, 以流动相定容, 混匀, 配成 1 mg/mL 溶液后, 按“1.3”方法稀释配成 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 的供试品溶液。

1.5 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Kinetex Biphenyl column(50 mm \times 4.6 mm i. d., 5 μm); 流动相: A 为甲醇, B 为 20 mmol/L 乙酸铵(含 0.6% 甲酸)。多黏菌素 B 梯度洗脱程序: 0~1 min, 15% A; 1~6 min, 15%~50% A; 6~9 min, 50% A; 9~11.5 min, 50%~15% A; 11.5~16.0 min, 15% A。多黏菌素 E 梯度洗脱程序: 0~1 min, 15% A; 1~10 min, 15%~50% A; 10~13 min, 50% A; 13~15.5 min, 50%~15% A; 15.5~18.0 min, 15% A。流速: 0.5 mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 50 μL 。ELSD 参数: 漂移管温度 55 $^{\circ}\text{C}$, 载气压力 20 psi, 增益 250, 动力模式为冷却模式。

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择

目前分离多黏菌素类药物的色谱柱主要为 C_{18} 柱^[17], 实验考察了 Phenomenex Kinetex Biphenyl(50 mm \times 4.6 mm i. d., 5 μm)、Waters symmetry C_{18} (4.6 mm \times 250 mm i. d., 5 μm) 及 Elite Hypersil BDS C_{18} (4.6 mm \times 250 mm i. d., 5 μm) 色谱柱对目标药物分离度的影响。结果显示, 2 种 C_{18} 色谱柱均表现为分析物保留差、拖尾、响应低, 而 Kinetex 联苯柱较 C_{18} 色谱柱有更好的保留, 且其分离度高、峰窄、无拖尾。另外, 采用 C_{18} 色谱柱分析时, 通常需要在流动相中添加七氟丁酸等离子对试剂或添加高浓度磷酸溶液以增加分析物的保留、改善分析物峰形、提高灵敏度^[18], 但这会损耗色谱柱性能从而降低其使用寿命。Biphenyl 联苯基色谱柱对各类化合物均具有出色的保留和色谱性能, 100% 水相稳定, 由双环结构所产生的高密度电子云可起到类似弱阳离子交换的作用, 使得碱性化合物的保留增强, 其对多黏菌素类极性化合物显示出高选择性和卓越的分离能力, 因此本文选择 Phenomenex Kinetex Biphenyl(50 mm \times 4.6 mm i. d., 5 μm) 色谱柱进行实验。

2.2 流动相的选择

采用 ELSD 检测时, 在选择挥发性流动相前提下, 实现对大分子多黏菌素类极性化合物的有效分离和获得高的分析灵敏度至关重要^[19]。本实验比较了甲醇或乙腈为有机相, 水、甲酸水或酸化乙酸铵水溶液为水相时, 对目标药物分离度和峰形的影响。结果显示, 当仅使用典型的流动相(如乙腈-水或甲醇-水)时, 待测物的分离度和峰形均不理想; 添加甲酸后, 目标物峰形改善, 分离度和响应值均有增加, 但乙腈体系逊于甲醇体系。此外, 流动相使用乙酸铵缓冲溶液可减少分析物的二次保留, 改善峰拖尾问题。因此, 实验最终选择甲醇-20 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.6% 甲酸)为流动相, 此条件下目标分析物峰形尖锐、分离度好、灵敏度高。

2.3 蒸发光散射检测器条件的优化

ELSD 信号响应只与流出物中化合物的浓度相关, 适用于检测无发色基团的药物^[20]。本文通过优化漂移管温度、载气压力及增益, 以获得最佳 ELSD 条件。结果表明, 目标药物响应随着漂移管温度升高而增强, 但温度高于 55 $^{\circ}\text{C}$ 后, 药物会由于过度雾化而响应下降, 因此选择漂移管温度为 55 $^{\circ}\text{C}$; 载气压力与流动相及化合物的挥发性有关, 当载气压力高于 30 psi 时, 药物几乎无响应, 因此选择最

低的载气压力 20 psi; 增益为仪器响应的放大倍数, ELSD 增益增加, 被测化合物的响应值增大, 但基线噪音也随之增大, 综合考虑最终增益设定为 250。在此 ELSD 条件下, 目标化合物均能获得良好的响应。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 在上述优化色谱条件下, 分别取同质量浓度(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的对照品溶液、供试品溶液和试剂空白溶液进样, 获得相应的色谱图(图 1), 由图可见, 多黏菌素 B 和 E 各主成分分离良好, 在其相应保留时间附近无干扰峰。

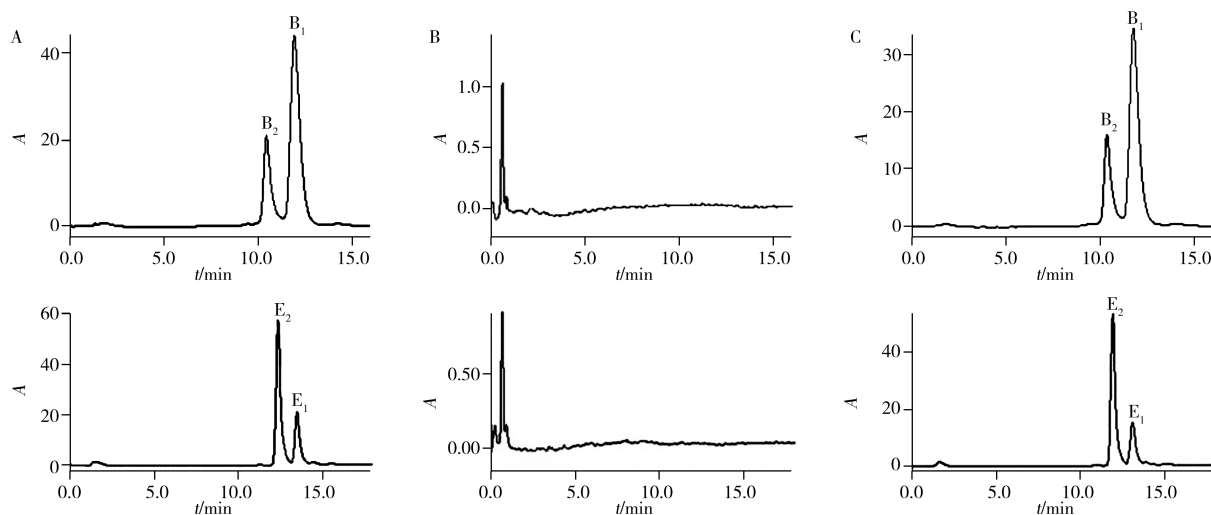


图 2 多黏菌素 B 和多黏菌素 E 的液相色谱图

Fig. 2 Typical HPLC chromatograms of polymyxin B and polymyxin E

A. reference substance; B. the corresponding reagent blank control solution; C. sample solution

2.4.2 线性范围、检出限与定量下限 分别准确移取多黏菌素 B 和多黏菌素 E 对照品储备液, 用初始流动相稀释配成质量浓度为 10、20、50、100、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液, 在优化条件下进样测定, 多黏菌素 B 峰面积以 B_1 与 B_2 峰面积之和计, 多黏菌素 E 峰面积以 E_1 与 E_2 峰面积之和计。经蒸发光散射检测器检测获得 ELSD 色谱图, 以质量浓度的对数(x)为横坐标, 峰面积对数(y)为纵坐标, 绘制标准曲线。结果显示, 多黏菌素 B 和 E 在 10~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围内线性良好, 回归方程分别为 $y=0.6345x-1.942$ ($r=0.9988$) 和 $y=0.5689x-1.525$ ($r=0.9995$)。以 3 倍信噪比($S/N=3$)对应的质量浓度计算得检出限(LOD)分别为 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 以 $S/N=10$ 计算得定量下限(LOQ)分别为 2.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.4.3 精密度 准确吸取“1.3”配制的多黏菌素 B 和多黏菌素 E 对照品溶液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 在优化条件下测定, 同一天内连续进样 6 次, 计算峰面积, 以其相对标准偏差(RSD)表示仪器精密度。结果表明, 多黏菌素 B 及多黏菌素 E 对照品峰面积的 RSD 分别为 1.2% 和 1.0%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 回收率实验 分别准确移取 1 mg/mL 对照品溶液各 0.20、0.50、1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加入“1.4”配制的 1 mg/mL 供试品溶液 0.25 mL, 用初始比例流动相定容至刻度, 摇匀、超声, 分别配成低、中、高 3 个添加浓度, 每个浓度配制 3 份, 连续测定 3 批次。分别计算同一批($n=3$)和 3 批次($n=9$)的平均回收率及 RSD。结果显示, 多黏菌素 B 和多黏菌素 E 在 3 个添加浓度下的批内回收率分别为 100%~104% 和 101%~103%, 批内 RSD 分别为 0.90%~2.4% 和 0.90%~2.6%; 批间回收率分别为 101%~103% 和 101%~102%, 批间 RSD 分别为 1.1%~1.9% 和 1.3%~1.7%。该方法准确、可靠, 完全满足药物含量分析的精密度和回收率要求。

2.4.5 稳定性 取多黏菌素 B 原料药 1 号与多黏菌素 E 原料药 1 号供试品溶液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 分别在 0、2、4、8、12、16、24 h 进样测定, 并计算各待测物峰面积。结果显示, 多黏菌素 B 与多黏菌素 E 峰面积的 RSD 分别为 0.7% 与 0.8%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 实际样品检测

取多黏菌素 B-1 号和多黏菌素 E-1 号、E-2 号原料药样品, 采用本方法在优化条件下处理并测

定; 并用灭菌生理盐水分别配制多黏菌素 B 和多黏菌素 E 供试品溶液和对照品溶液, 按照《中国兽药典》2015 版和《中国兽药质量标准》2017 年版微生物检定法中的比浊法测定溶液的 OD(光密度)值, 通过计算得到供试品药物含量, 结果见表 1。结果显示, 本方法与微生物检定法测定结果相差不大, 但本方法的 RSD 明显低于微生物检定法。

表 1 高效液相色谱/蒸发光散射法与微生物检定法测定结果比较($n=3$)
Table 1 Comparison of the results obtained from HPLC/ELSD and microbial assay($n=3$)

Analyte	Labeled content/%	Dected content(RSD)/%	
		HPLC/ELSD	Microbial assay
Polymyxin B-1	75.6	76.9(1.2)	78.1(6.0)
Polymyxin E-1	90.5	92.4(1.1)	88.7(10.5)
Polymyxin E-2	86.2	80.1(1.2)	77.2(11.9)

3 结 论

本研究首次建立了高效液相色谱/蒸发光散射法用于多黏菌素 B 及多黏菌素 E 原料药中主成分含量的测定, 该方法快速、准确、重现性好, 与传统的微生物检定法测定结果相当, 且精密度更高, 可用于多黏菌素 B 和多黏菌素 E 两种原料药的质量控制。

参考文献:

- [1] Wang Y, Li Y R, Han J Z, Gao D, Li X N. *Microbiol. Chin.* (王影, 李艳然, 韩隽竹, 高铎, 李欣南. 微生物学通报), **2017**, 44(1): 200-206.
- [2] Chen Z L. *Veterinary Pharmacology*. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press(陈杖榴. 兽医药理学. 第3版. 北京: 中国农业出版社), **2012**: 260-261.
- [3] Ministry of Agriculture. No. 168 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China(农业部. 中华人民共和国农业部公告第168号). [2001-09-04]. <http://www.moa.gov.cn/govpublic>.
- [4] Liu Y Y, Wang Y, Walsh T R, Yi L X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu L F, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu J H, Shen J. *Lancet Infect. Dis.*, **2016**, 16(2): 161-168.
- [5] Sin W M, Wong Y C. *TRAC - Trends Anal. Chem.*, **2003**, 22(11): 799-809.
- [6] Hasman H, Hammerum A M, Hansen F, Hendriksen R S, Olesen B, Agersø Y, Zankari E, Leekitcharoenphon P, Stegger M, Kaas R S, Cavaco L M, Hansen D S, Aarestrup F M, Skov R L. *Eurosurveillance*, **2015**, 20(49): 2-6.
- [7] Ministry of Agriculture. No. 2428 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China(农业部. 中华人民共和国农业部公告第2428号). [2016-07-26]. <http://www.moa.gov.cn/govpublic>.
- [8] Thomas A H, Thomas J M, Holloway I. *Analyst*, **1980**, 105(1256): 1068-1075.
- [9] Chaisuwan P, Moonta T, Sangcakul A, Nacapricha D, Wilairat P, Uraisin K. *J. Sep. Sci.*, **2015**, 38(6): 1035-1041.
- [10] Cancho-Grande B, Rodríguez-Comesaña M, Simal-Gándara J. *Chromatographia*, **2001**, 54(7/8): 481-484.
- [11] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia Part II of the People's Republic of China. Beijing: China Medical Science and Technology Press(国家药典委员会. 中华人民共和国药典二部. 北京: 中国医药科技出版社), **2015**: 1323-1366.
- [12] Ding B, Yang N, Xie Y C. *Drug Standards of China*(丁勃, 杨娜, 谢元超. 中国药品标准), **2010**, 11(6): 438-440.
- [13] Zhu X, Tian H Y, Xu J. *Hubei J. Anim. Vet. Sci.* (朱曦, 田慧云, 徐军. 湖北畜牧兽医), **2009**, (3): 7-8.
- [14] Kimura Y, Kitamura H, Araki T, Noguchi K, Baba M, Hori M. *J. Chromatogr. A*, **1981**, 206(3): 563-572.
- [15] Wang J W, Gong X H, Fan Q, Sun L, Wang X. *Chin. J. Vet. Drug.* (王静文, 龚旭昊, 范强, 孙雷, 汪霞. 中国兽药杂志), **2018**, 52(3): 45-51.
- [16] Li M G, Deng Q X, Dong L, Lv X L, Wang Y Q, Liao M A. *J. Anal. Sci.* (李梦鸽, 邓群仙, 董礼, 吕秀兰, 王永清, 廖明安. 分析科学学报), **2018**, 30(4): 513-516.
- [17] Morales-Muñoz S, de Castro M D L. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1066(1/2): 1-7.
- [18] Kaufmann A, Widmer M. *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 797: 81-88.
- [19] Song X Q, Xie J M, Zhang M Y, Zhang Y X, Li J F, Huang Q W, He L M. *J. Chromatogr. B*, **2018**, 1076: 103-109.
- [20] Ribeiro I A, Bronze M R, Castro M F, Ribeiro M H. *J. Chromatogr. B*, **2012**, 899: 72-80.

(责任编辑: 周启动)