

文章编号:1671-6833(2011)04-0099-04

毛细管电泳-电致化学发光法测定盐酸林可霉素

邵蓓新¹, 张颖², 李建军², 屈凌波^{2,3}

(1. 郑州大学第五附属医院 药剂科, 河南 郑州 450052; 2. 郑州大学 化学系, 河南 郑州 450001;
3. 河南工业大学 化学化工学院, 河南 郑州 450001)

摘要: 基于盐酸林可霉素对联吡啶钌($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)在铂电极上电化学信号的增敏作用, 结合毛细管电泳(CE), 建立了毛细管电泳-联吡啶钌电致化学发光(CE- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -ECL)测定盐酸林可霉素的新方法. 考察检测电位、检测缓冲液浓度和 pH 值、分离电压、进样电压和进样时间、分离缓冲液的浓度和 pH 值等实验条件对盐酸林可霉素分离检测条件的影响, 确定了检测盐酸林可霉素的实验条件. 在优化的实验条件下, 盐酸林可霉素在 $5 \times 10^{-8} \sim 9 \times 10^{-6}$ g/mL 范围内呈良好线性, 检出限为 1.55×10^{-8} g/mL. 该方法可用于盐酸林可霉素注射液中含林可霉素的含量测定, 测定的回收率为 99.62% ~ 100.31%.

关键词: 毛细管电泳(CE); 电致化学发光(ECL); 联吡啶钌($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$); 盐酸林可霉素

中图分类号: R917 **文献标志码:** A

0 引言

盐酸林可霉素(Lincomycin Hydrochloride)又名盐酸洁霉素, 结构如图 1. 对革兰阳性球菌有较高的抗菌活性, 主要适应于敏感葡萄球菌属、链球菌属、肺炎链球菌及厌氧菌所致的呼吸道感染、皮肤软组织感染等疾病, 在临床上得到了广泛的应用.

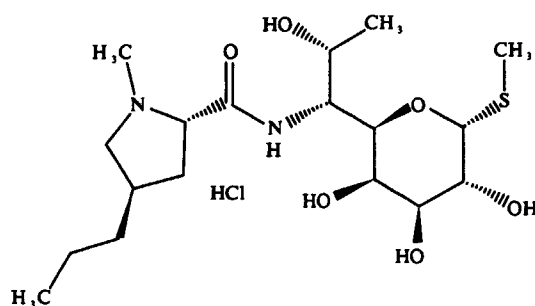


图 1 盐酸林可霉素的结构

Fig.1 Molecular structure of lincomycin hydrochloride

林可霉素药物制剂的质量控制方法主要有微生物测定法^[1]、高效液相色谱法^[2-4]及分光光度法^[5,6]. 微生物测定法虽然测定准确, 但测定周期长, 操作复杂且难以区分林可霉素及其它抗生素药物; 高效液相色谱法虽然准确, 但成本昂贵, 常使用大量的有毒试剂甲醇、己腈等, 给环境带来

较大的污染; 紫外分光光度法虽操作简便、快速, 但灵敏度较低, 一般只用做林可霉素兽药生产过程质量控制.

毛细管电泳-联吡啶钌-电致化学发光方法(CE- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -ECL)是 20 世纪 90 年代才发展起来一种现代分析技术, 具有仪器简单低廉、样品用量小、基本不使用有毒试剂等特点^[7,8], 非常符合当代提出的节能环保的分析理念. 近年来, 该技术成为药物分析领域的一个研究热点^[9-11]. 实验发现, 盐酸林可霉素对 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 在铂电极上的电化学反应具有明显的增敏效应. 据此建立了测定盐酸林可霉素 CE- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -ECL 新方法. 结果表明, 所建立的方法简便快速, 准确度高, 分析成本低且绿色环保, 可用于各种林可霉素制剂的质量控制.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

MPI-A 型毛细管电泳电化学发光分析检测系统(西安瑞迈电子科技有限公司), 柱端检测池采用传统三电极系统, 铂盘工作电极(直径 500 μm), 辅助电极(铂电极)和参比电极(Ag/AgCl); 雷磁 PH 计(上海精科); 石英毛细管(25 μm i. d, 40 cm)(河北永年光导纤维厂).

收稿日期: 2011-02-17; 修订日期: 2011-05-04

作者简介: 邵蓓新(1965-), 女, 河南郑州人, 本科, 主要从事临床药学和药品的检验分析工作; 通讯作者: 屈凌波(1963-), 男, 河南南阳人, 博士, 教授, 主要从事药物分析和化学生物学研究, E-mail: qulingbo@zzu.edu.cn.

盐酸林可霉素标准品(河南天方药业股份有限公司提供,经 HPLC 检测,纯度大于等于 95%);盐酸林可霉素样品(上海禾丰制药有限公司);联吡啶钉纯品(美国 Alfa Aesar 公司);实验所用缓冲溶液均由磷酸氢二钠、磷酸二氢钠(天津市科密欧化学试剂公司,分析纯)配制而成;实验其余试剂均为分析纯,水为水森活纯净水(可口可乐公司)。实验所用缓冲溶液均为磷酸缓冲液。

1.2 实验方法

毛细管第一次使用前的活化:用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液冲洗过夜,然后用纯净水冲洗至中性,再用 15 mmol (pH = 7.0) 的磷酸盐缓冲液平衡。工作电极使用前使用 0.05 μm 粒径的氧化铝粉末抛光,用纯净水冲洗干净并擦干后放置在正对毛细管出口末端处,在显微镜下调节工作电极和毛细管间的距离约为 $200 \pm 10 \mu\text{m}$,进行检测前,对工作电极进行循环伏安扫描处理至化学发光强度稳定。

光电倍增管的电压设置为 +800 V。检测电位为 1.15 V,采用 14 kV $\times 10$ s 电驱动进样,分离电压 12.5 kV,电泳缓冲溶液为 15 mmol/L (pH = 6.5) 的磷酸盐缓冲液。实验前检测池中充满 5 mmol/L 三联吡啶钉溶液和 60 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH = 7.0) 350 μL ,3 h 后更换新鲜的三联吡啶钉和磷酸盐缓冲溶液,以保证实验的重现性。在样品进入检测池检测后,记录其毛细管电泳谱图,以峰高定量。

1.3 溶液配制及样品处理

在暗室里准确称取盐酸林可霉素标准品 0.010 0 g 于 100.0 mL 棕色容量瓶中溶解后用水森活纯净水定容,溶液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。然后逐级稀释配制出一系列浓度做工作曲线。

随机抽取标示量为 0.3 g/mL 的盐酸林可霉素注射液 5 支,取内容物注射液混匀后精密吸取适量,配制为 1.5×10^{-5} g/mL 的储备液。向 1.5×10^{-7} g/mL 样品中分别加入盐酸林可霉素标准溶液 1.2×10^{-7} g/mL、 1.5×10^{-7} g/mL、 1.8×10^{-7} g/mL 来测定样品回收率。

2 结果与讨论

2.1 检测电位的优化

在 CE-ECL 体系中,检测电位是影响 ECL 强度的重要因素。实验表明,检测电位在 1.00 ~

1.35 V 范围内,盐酸林可霉素的 ECL 强度随着检测电位的增大先增加后减小,当检测电位为 1.15 V 时,盐酸林可霉素的 ECL 强度达到最大,而后随电压增大而减小。实验选择检测电位为 1.15 V。

2.2 检测条件的优化

检测池中 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的浓度以及检测池中缓冲溶液的浓度和 pH 是影响检测的主要因素。

电化学发光信号随检测池中 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的浓度的增大而增大,但同时仪器的噪声也会随之增大。实验中以最大的信噪比 (S/N) 为指标,考察了 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 浓度在 1 ~ 10 mmol 变化中对 S/N 的影响。实验表明:当 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 浓度为 5 mmol 时,有最大的信噪比。

在保持 pH = 8.0 不变的条件下,配制浓度 20 ~ 100 mmol 的磷酸盐缓冲液,考察检测池中磷酸盐缓冲液浓度对 ECL 强度的影响。如图 2,在缓冲液浓度为 60 mmol 时, ECL 强度达到了最大值,因此实验选择 ECL 检测池中磷酸盐缓冲溶液的最佳浓度为 60 mmol。

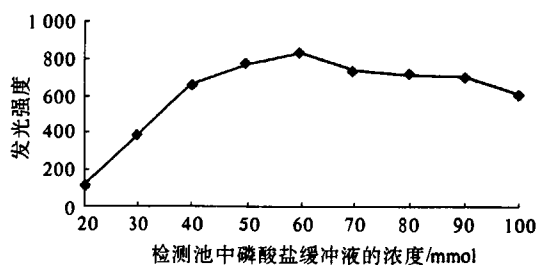


图 2 检测池中磷酸缓冲溶液浓度对 ECL 强度的影响

Fig. 2 The effect of buffer concentration in the detection cell on the ECL intensity

检测条件:10 $\mu\text{g/mL}$ 盐酸林可霉素;检测池中,5 mmol $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, pH 8.0 的磷酸盐缓冲液;分离缓冲液,30 mmol、pH 7.5 的磷酸盐缓冲液;电驱动进样,12 kV $\times 10$ s;分离高压,12.5 kV。

固定检测池中磷酸盐缓冲液浓度为 60 mmol/L,使 pH 在 5.0 ~ 9.0 范围内变化。实验发现:pH 为 7.0 时 ECL 强度达到最强值,之后随着 pH 升高, ECL 强度反而减小。因此,实验中电化学发光的检测最佳条件是 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的浓度为 5 mmol/L,检测池中磷酸盐缓冲液的浓度为 60 mmol/L, pH 值为 7.0。

2.3 电泳缓冲溶液的优化

在 CE-ECL 体系中,毛细管中运行缓冲液的 pH 和浓度是影响检测的主要因素。在 pH 为 5.0 ~ 8.0 范围考察磷酸缓冲液 pH 对 ECL 强度的影

响.如图3所示,在pH在5.0~6.5范围内,盐酸林可霉素的ECL强度随分离缓冲液pH值的增加而增加,当分离缓冲液pH值大于6.5后,ECL强度随分离缓冲液pH值的增加反而减小.因此本实验选择pH为6.5的分离缓冲液.

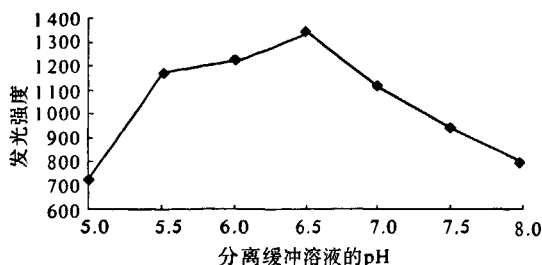


图3 分离缓冲溶液pH对ECL强度的影响

Fig.3 The effect of pH of separation buffer on the ECL intensity

检测条件:10 $\mu\text{g/mL}$ 盐酸林可霉素;检测池中,5 mmol $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$,60 μmol pH7.0的磷酸盐缓冲液;分离缓冲液,30 mmol的磷酸盐缓冲液;电驱动进样,12 kV $\times 10$ s;分离高压,12.5 kV.

固定分离缓冲溶液的pH=6.5,考察分离缓冲液浓度在5~40 mmol范围内,盐酸林可霉素ECL强度的变化.随着分离缓冲液浓度的增大,盐酸林可霉素的ECL强度先增加后减小,并在浓度为15 mmol处取得最大值.所以本实验选择分离缓冲溶液的最佳浓度为15 mmol.

2.4 分离电压的优化

考察分离电压在5~20 V范围内分离电压对ECL光强和迁移时间的影响.结果表明:随着分离电压增大,盐酸林可霉素的迁移时间逐渐缩短,但是ECL强度先增加后减小,当电压为12.5 kV时电化学发光强度最大,实验选择分离电压为12.5 kV.

2.5 进样时间和进样高压的优化

一般而言,采用电驱动进样时,随着进样时间和进样高压的增加,系统的ECL强度随之增加,但由于焦耳热效应,会使体系的理论塔板数下降.根据进样高压、进样时间以及理论踏板数的关系图(图4和图5),以获得较高的理论踏板数及较大的ECL强度为原则,实验选择14 kV的进样高压和10 s的进样时间.

2.6 线性范围、精密度和检出限

按照实验方法,在所选的最优的实验条件下,盐酸林可霉素的迁移时间为220 s左右.盐酸林可霉素在 $5 \times 10^{-8} \sim 9 \times 10^{-6}$ g/mL浓度范围内与峰高成良好的线性关系.回归方程为 $y = 280.08x$

+18.157,相关系数为0.999 6(y 为峰高, x 单位为盐酸林可霉素的浓度, $\mu\text{g/mL}$),得到盐酸林可霉素的CE-ECL线性范围、相关系数和检出限($S/N=3$)分别为: $5 \times 10^{-8} \sim 9 \times 10^{-6}$ g/mL,0.999 6, 1.55×10^{-8} g/mL.对 5×10^{-7} g/mL的盐酸林可霉素标准溶液连续测定7次,峰高和迁移时间的RSD分别为3.16%和1.98%.

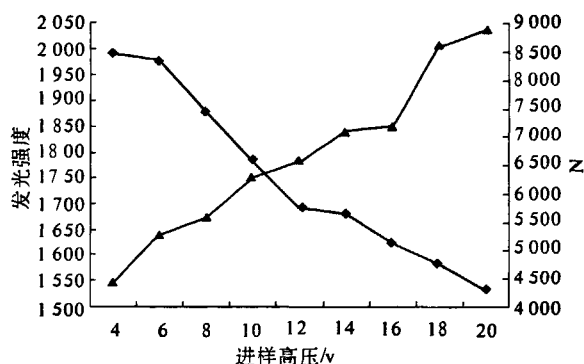


图4 进样高压对发光强度及理论踏板数的影响

Fig.4 The effect of injection voltage on the ECL intensity and number of theory plate

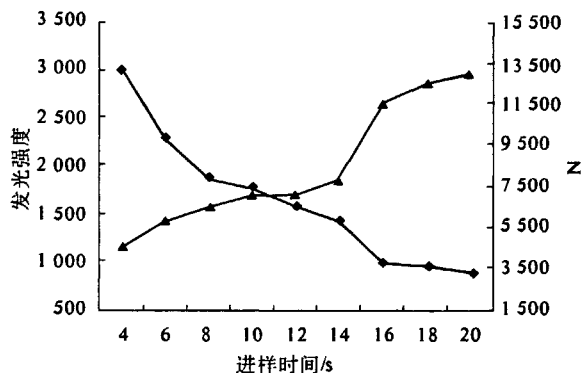


图5 进样时间对发光强度及理论踏板数的影响

Fig.5 The effect of injection time on the ECL intensity and number of theory plate

2.7 实际样品测定

盐酸林可霉素注射液的标示量为0.3 g/mL(国家药典中规定其含量范围为90.0~110.0%).实测量是0.29 g/mL($n=5$),为标示量的96.7%,在国家药典规定含量范围内.向盐酸林可霉素注射液中添加一系列高、中、低浓度的盐酸林可霉素标准液,进行回收率实验.测定回收率在99.62%~100.31%之间,表明该方法准确可靠.在240 s时间内即可完成一个样品的测试,相对于盐酸林可霉素质量控制的HPLC方法来说,分析时间缩短,且在实验过程中,没有使用任何有机有毒试剂,大大减少了对环境的污染.

表 1 盐酸林可霉素注射液的回收率实验 (n=4)
Tab.1 Recoveries of Lincomycin hydrochloride in
Lincomycin hydrochloride injection (n=4)

样品编号	样品含量 $/1 \times 10^{-7}$ (g · mL ⁻¹)	加入量 $/1 \times 10^{-7}$ (g · mL ⁻¹)	测得总量 $/1 \times 10^{-7}$ (g · mL ⁻¹)	回收率 /%	RSD /%
1	1.45	0	1.45		4.12
2	1.45	1.20	2.64	99.62	2.12
3	1.45	1.50	2.95	100.00	0.39
4	1.45	1.80	3.26	100.31	2.24

3 结论

本研究通过实验条件的优化,建立了毛细管电泳-联吡啶钌电化学发光(CE-ECL)法测定盐酸林可霉素的新方法.该方法相对于药典规定的盐酸林可霉素检测的 HPLC 方法来说,该方法不仅可以达到 HPLC 测定的准确度要求,而且实验样品用量少,仪器简单便宜,运行成本低,实验过程中没有使用对环境有污染的有机试剂,为盐酸林可霉素制剂的质量控制提供了一种微量和环保的分析测定方法.

参考文献:

[1] 冯学忠,吴广辉,方炳虎,等.盐酸林可霉素紫外分光光度测定方法的建立[J].动物医学进展,2009,30(12):60-63.
[2] 朱建平,张菁,高艳霞,等.分光光度法测定盐酸林

可霉素、盐酸麻黄碱和克林霉素磷酸酯三种胶囊剂的含量[J].中国药理学杂志,1999,34(7):498.
[3] 魏国义,魏京海,钱春风,等. RP-HPLC 法测定林可霉素滴鼻剂中盐酸林可霉素和盐酸麻黄碱的含量[J].药物分析杂志,2003,23(4):332-334.
[4] 李红兵,仲娜.盐酸林可霉素滴眼液的 HPLC 法测定[J].中国药品标准,2002,3(3):42-43.
[5] 陆进方.盐酸林可霉素滴眼液的 HPLC 测定[J].中国医药工业杂志,2003,34(12):627-628.
[6] 中国药典,1990 年版.二部[M].北京:中国医药科技出版社,1990:496.
[7] YIN Xue-bo,DONG Shao-jun,WANG Er-kang. Analytical applications of the electrochemiluminescence of tris (2,20-bipyridyl) ruthenium and its derivatives [J]. Trends in Analytical Chemistry. 2004,23(6):432-441.
[8] YIN Xue-bo,WANG Er-kang. Capillary electrophoresis coupling with electrochemiluminescence detection: a review[J]. Analytica Chimica Acta,2005,533:113-120.
[9] 任小娜,宋青云,付周周,等.毛细管电泳电致化学发光法测定洛贝林的研究[J].分析实验室,2008,27(4):40-43.
[10] 彭志兵,吴正平.毛细管电泳电致化学发光法测定氢溴酸右美沙芬[J].化学试剂,2008,30(12):915-918.
[11] 周兴旺,吕鉴泉,曾昭睿.毛细管电泳电致化学发光法测定阿替洛尔[J].分析科学学报.2007,23(1):30-32.

Determination of Lincomycin Hydrochloride with Capillary Electrophoresis-Electrochemiluminescence

SHAO Bei-xin¹, ZHANG Ying², LI Jian-jun², QU Ling-bo^{2,3}

(1. Department of Pharmacy, The Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 3. Chemistry and Chemical Engineering School, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: A method of capillary electrophoresis (CE) with tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (Ⅱ) electrochemiluminescence (ECL) detection has been developed for the determination of Lincomycin hydrochloride. The effects of detection potential, concentration and acidity of phosphate buffer, separation voltage, injection voltage of tris (2,2'-bipyridyl) and time, concentration and acidity of separation buffer on the detection were investigated. Under optimized conditions, the calibration curve for Lincomycin hydrochloride showed a good linearity in the range of $5 \times 10^{-8} \sim 9 \times 10^{-6}$ g/mL, and the detection limits was 1.55×10^{-8} g/mL. The method was applied for the determination of lincomycin hydrochloride in the lincomycin hydrochloride injections with a recovery of 99.62% ~ 100.31%.

Key words: capillary electrophoresis; electrochemiluminescence; tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (Ⅱ); lincomycin hydrochloride