

流动注射化学发光测定硫酸阿米卡星

慕苗¹, 高娟², 亢玉红¹, 高平强¹ (1. 榆林学院化学与化工学院, 陕西 榆林 719000; 2. 榆林市药品检验所, 陕西 榆林 719000)

摘要: 目的 建立测定注射液中硫酸阿米卡星的新方法。方法 采用高灵敏度的化学发光分析法, 结合流动注射技术, 测定药物制剂中硫酸阿米卡星的含量。通过单因素试验和正交试验对鲁米诺、高锰酸钾及氢氧化钠 3 因素进行优化。结果 该化学发光体系的最优条件: 鲁米诺溶液浓度为 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、高锰酸钾溶液浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、氢氧化钠浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。硫酸阿米卡星浓度在 $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与相对化学发光强度成良好线性关系, 相关系数为 0.991 7, 检出限为 $7.5 \times 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在体系最佳条件下, 对浓度为 $1.0 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的硫酸阿米卡星溶液平行测定 11 次, RSD 为 2.4%, 回收率均 >96%。结论 该法简便快速, 结果准确可靠, 可用于注射液中硫酸阿米卡星的含量测定。

关键词: 硫酸阿米卡星; 流动注射; 化学发光

中图分类号: R914.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)07-0948-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.07.004

引用本文: 慕苗, 高娟, 亢玉红, 等. 流动注射化学发光测定硫酸阿米卡星[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(7): 948-951.

Determination of Amikacin Sulfate by Flow Injection Chemiluminescence Method

MU Miao¹, GAO Juan², KANG Yuhong¹, GAO Pingqiang¹ (1. Chemistry and Chemical Engineering Department, Yulin College, Yulin 719000, China; 2. Yulin Institute for Drug Control, Yulin 719000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the new method of detecting amikacin sulfate injection. **METHODS** The optimal chemiluminescence of experiment were determined by chemiluminescence coupled with flow injection. Three effects of luminol, potassium permanganate, sodium hydroxide were investigated using single-factor and orthogonal experiments. **RESULTS** The optimal conditions for amikacin sulfate determination were as follows: Luminol $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, potassium permanganate $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, sodium hydroxide $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Under the optimum experimental conditions, the relative chemiluminescence intensity was linearly related to the concentration of amikacin sulfate from $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9917$). The detection limit of amikacin sulfate was $7.5 \times 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (3σ), with RSD of 2.4% for 11 determinations of $1.0 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ amikacin sulfate. The recovery rates were >96%. **CONCLUSION** The proposed method is simple and accurate. The result is satisfactory. It can be used to determine the content of amikacin sulfate injection.

KEY WORDS: amikacin sulfate; flow injection; chemiluminescence

硫酸阿米卡星(amikacin sulfate, AMK)是一种半合成的氨基糖苷类抗菌药物, 用于治疗妥布霉素和卡那霉素抗性菌株及革兰阴性杆菌的严重感染^[1]。长期或过量使用 AMK 会引起不良反应, 损害肾脏和听觉。因此, 建立检测 AMK 含量的测定方法对药品安全监督和临床使用具有重要的实际意义。目前已报道测定 AMK 的检测方法有分光光度法^[2]、瑞利散射法^[3]、HPLC^[4-5]、荧光法^[6]、离子色谱法^[7]等。

化学发光分析法因其具有设备简单、线性范围宽、灵敏度高、无背景干扰等优点而备受人们关注。流动注射化学发光法作为一种有效的痕量分析技术, 为药物分析提供了很好的手段, 已广泛应用于医药、生物、食品、微生物、环境分析等领域^[8-9]。利用化学发光分析法测定 AMK 的含

量也有报道, 但其检出限较高^[10]。基于 AMK 在碱性条件下对鲁米诺-高锰酸钾化学发光体系的化学发光信号有强烈的增敏作用, 本研究结合流动注射技术建立了一种直接测定 AMK 的流动注射化学发光新方法, 并采用正交试验优选出最佳测定条件, 为 AMK 的测定提供客观的实验依据。

1 仪器、试剂

1.1 仪器

IFFM-E 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈分析仪器有限公司); IFFS-A 型多功能化学发光检测器(西安瑞迈分析仪器有限公司); FA1004 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司)。

1.2 试剂

鲁米诺(南京奥多福尼生物科技有限公司, 批号: 20140704); 高锰酸钾(成都市科龙化工试剂厂,

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2014QK132); 陕西省教育厅专项研究计划(16JK1891)

作者简介: 慕苗, 女, 硕士生, 实验师 Tel: (0912)3891144 E-mail: mumiao521@163.com

批号: 20090513); AMK(中国食品药品检定研究院, 批号: 1401025, 纯度: 99.6%); AMK 注射液(齐鲁制药有限公司, 批号: 2121741FA, 规格: 2 mL: 0.2 g); 氢氧化钠(天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号: 20140407)。

2 方法

2.1 试剂配制

①鲁米诺标准溶液($1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 准确称取鲁米诺 0.442 g, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶解并定容于 250 mL 棕色量瓶中, 混匀避光保存, 1 周后使用。②高锰酸钾标准溶液($1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 准确称取 0.1580 g 高锰酸钾, 用二次蒸馏水溶解并定容于 100 mL 量瓶中, 在半个月内使用。③氢氧化钠标准溶液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 准确称取氢氧化钠 2 g, 用二次蒸馏水溶解并定容于 500 mL 量瓶中, 静置后使用。④AMK 标准液($1.0 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$): 准确量取 1 mL(约 1 g)AMK 溶液用二次蒸馏水溶解并定容于 1 000 mL 量瓶中, 用时逐级稀释, 现配现用。

2.2 测定方法

流动注射化学发光流程见图 1。a、b、c、d 4 个管道分别进高锰酸钾溶液、AMK 样品或空白溶液、水和鲁米诺溶液。将高锰酸钾与 AMK 混合后, 由水载流再与鲁米诺溶液混合进入检测系统进行检测。以水作空白测得化学发光强度为 I_0 , 待基线稳定后将一定浓度的 AMK 样品溶液注入, 测得其化学发光强度为 I_s 。以相对化学发光强度 $\Delta I = (I_s - I_0)$ 与质量浓度(c)的线性关系进行定量。

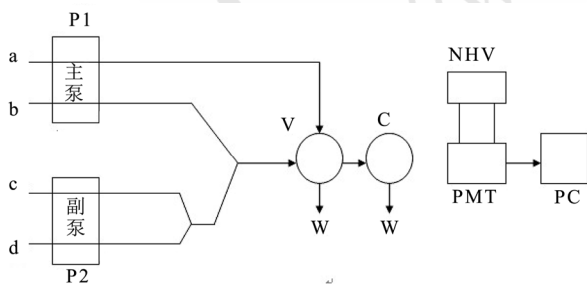


图 1 流动注射化学发光流程图

P1、P2—蠕动泵; V—进样阀; C—流通池; PMT—光电倍增管; NHV—负高压; PC—电脑; W—废液; a—高锰酸钾溶液; b—样品或空白样品; c—载流水; d—鲁米诺。

Fig. 1 Flow injection chemiluminescence flow chart

P1, P2—pump, V—valve; C—flow cell; PMT—photomultiplier tube; NHV—negative high voltage; PC—personal computer; W—waste; a— KMnO_4 solution; b—sample solution or blank solution; c—water; d—luminol solution.

2.3 单因素试验

2.3.1 氢氧化钠浓度对化学发光强度的影响 在高锰酸钾浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、鲁米诺浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、AMK 浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下, 按“2.2”项下方法考察浓度为 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠对相对化学发光强度的影响。

2.3.2 鲁米诺浓度的影响 在高锰酸钾浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、氢氧化钠浓度 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、AMK 浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下, 按“2.2”项下方法考察 $1.0 \times 10^{-5} \sim 9.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的鲁米诺对相对化学光强度的影响。

2.3.3 高锰酸钾浓度的影响 在氢氧化钠浓度 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、鲁米诺浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、AMK 浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下, 按“2.2”项下方法考察浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \sim 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高锰酸钾对相对化学发光强度的影响。

2.4 正交试验

以单因素实验结果为基础, 选取高锰酸钾浓度、氢氧化钠浓度以及鲁米诺浓度 3 个因素设计正交试验, 每个因素选 3 个水平, 见表 1。

表 1 正交试验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal test $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$			
水平	因 素		
	A 高锰酸钾浓度	B 氢氧化钠浓度	C 鲁米诺浓度
1	5×10^{-6}	0.1	1×10^{-4}
2	1×10^{-5}	0.2	5×10^{-4}
3	5×10^{-5}	0.3	1×10^{-3}

3 结果与讨论

3.1 AMK 的动力学曲线

在碱性介质中, 鲁米诺与高锰酸钾溶液混合后产生微弱化学发光, 加入 AMK 溶液后, 化学发光强度随着 AMK 溶液浓度的增大而大大增强。由此可见, AMK 溶液加入鲁米诺-高锰酸钾体系的化学发光有较强增强作用, 加入样品 2 s 后, 体系的化学发光强度达到最大值, 4 s 化学发光强度回落到基线, 表明该体系的发光为快速发光, 基于此作用建立检测 AMK 的流动注射化学发光新方法。

3.2 进料流路的影响

考察溶液的不同混合方式对体系发光强度的影响, 实验结果表明: 按照如图 1 所示实验时, AMK 对鲁米诺-高锰酸钾体系的发光强度大且增敏效果明显, 故本实验选择该流路进行分析。

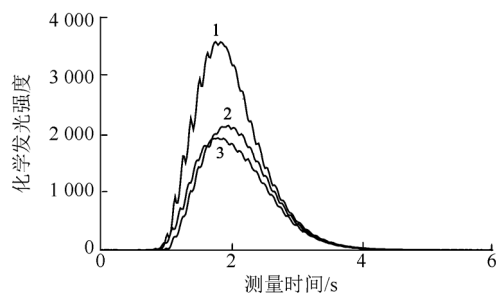


图2 化学发光动力学曲线

1-鲁米诺-高锰酸钾- $1.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AMK; 2-鲁米诺-高锰酸钾- $1.0 \times 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AMK; 3-鲁米诺-高锰酸钾-水。

Fig. 2 The kinetic curves of CL reactions

1-luminol-KMnO₄- $1.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AMK; 2-luminol-KMnO₄- $1.0 \times 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AMK; 3-luminol-KMnO₄-H₂O.

3.3 泵速

实验表明,在固定其他实验条件不变情况下,泵速对发光的影响主要是在峰形方面,对于发光强度影响相对较小。结合发光强度,峰形,重复性,运行时间等多个因素,最终确定主泵转速为 $65 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,副泵转速为 $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,采样速度为每次 40 s。

3.4 单因素实验结果

实验结果显示:在碱性介质中,鲁米诺-高锰酸体系有较强化学发光信号,反应介质浓度和氧化剂浓度、还原剂浓度对发光强度有很大影响,根据不同浓度范围的考察,选择 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠,鲁米诺的浓度为 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高锰酸钾的浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为优化条件,结果如图 3。

3.5 正交试验优化

在所选因素水平下,3 个因素的最佳组合为 $A_3B_1C_2$ (高锰酸钾浓度为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,氢氧化钠浓度 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,鲁米诺浓度 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。通过极差 R 的大小分析可知,各实验因素对相对化学发光强度影响程度不同,主次顺序为: $C > A > B$,即:鲁米诺浓度对 AMK 化学发光强度的影响最大,高锰酸钾浓度次之,氢氧化钠浓度对实验结果的影响最小。结果见表 2。

3.6 AMK 标准曲线、精密度和检出限

在体系最佳条件下,AMK 浓度在 $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与体系的相对化学发光强度呈良好的线性关系,线性方程为 $y = 236.62x + 4563.6$,即 $\Delta I = 2.3662 \times 10^{-5}C + 4563.6$,相关系数为 0.9917。根据 IUPAC 规定,计算本方法的检出限(3σ)为 $7.5 \times 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在体系最佳条件下,对浓度为

$1.0 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 AMK 溶液平行测定 11 次,RSD 为 2.4%,表明该方法测定 AMK 精密度良好。

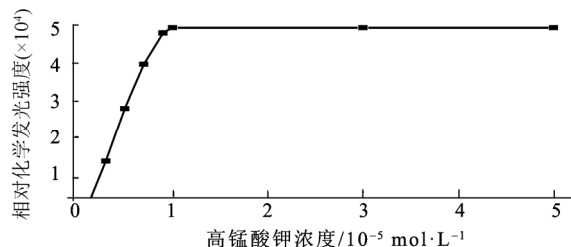
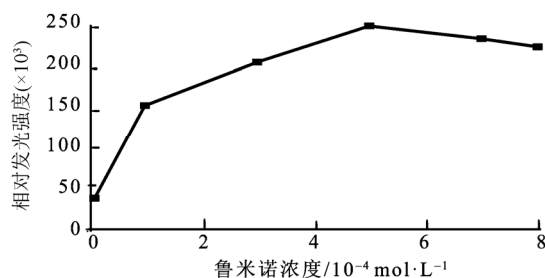
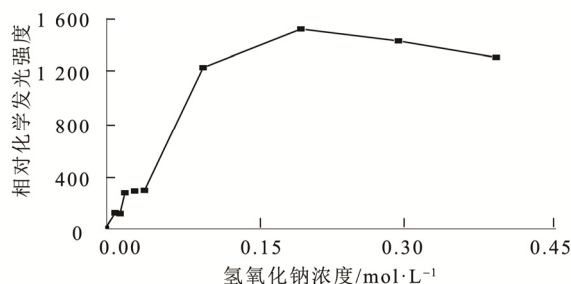


图3 氢氧化钠、鲁米诺、高锰酸钾浓度对相对化学发光强度的影响

Fig. 3 Effects of sodium hydrate,luminol,potassium hypermanganate concentrations on ΔI

表2 流动注射化学发光法测定硫酸米卡星的正交试验结果

Tab. 2 The orthogonal experiment results for the determination of amikacin sulfate by FI-CL

实验号	因素				光强/Cd
	A	B	C		
1	1	1	1	1	41
2	1	2	2	2	171
3	1	3	3	3	247
4	2	1	2	3	4930
5	2	2	3	1	901
6	2	3	1	2	912
7	3	1	3	2	2787
8	3	2	1	3	642
9	3	3	2	1	3521
K_1	153.000	2586.000	531.667	1487.667	
K_2	2247.667	571.333	2874.000	1290.000	
K_3	2316.667	1560.000	1311.667	1939.667	
R	2163.667	2014.667	2342.333	649.667	

3.7 稳定性试验

将同一浓度 AMK 溶液分别于 0, 2, 4, 6, 8, 16, 24 h 重复测定相对化学发光强度, 其 RSD 为 1.9%, 表明 AMK 在 24 h 内测定结果稳定。

3.8 重复性试验

按样品测定“1.3”项下的方法, 对同一批号样品取样平行测定 5 次, 求得 AMK 含量 $9.6 \times 10^{-8} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 2.3%, 表明方法重复性较好。

3.9 回收率测定

取市售同一批 AMK 注射液 5 支, 去包装后混匀, 精密称取 5 份 0.5 mg 的 AMK, 分别加入 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL AMK 标准液加水定容于 100 mL 的量瓶中, 摇匀。按“1.3”项下方法进行含量测定, 平均回收率($n=5$)为 98.7%, RSD 为 2.1%, 结果见表 3。

3.10 样品测定

取市售同一批 AMK 注射液 5 支去包装后, 精密量取 0.1 mL 样品(相当于 10 mg 的 AMK), 加水定容至 100 mL, 摇匀。取适量逐级稀释至线性范围内, 在选定的最佳条件下按“2.2”项下的方法进行测定, 并计算得 AMK 含量为标示量 99.6%, RSD 为 2.8%。

表 3 AMK 回收率试验($n=5$)

Tab. 3 The recovery experiment of AMK($n=5$)

序号	原有量/ $10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$	加标量/ $10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$	测得量/ $10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收率/ %	RSD/ %
1	5.0	2.0	6.9	95.0	
2	5.0	4.0	9.1	102.5	
3	5.0	6.0	10.8	96.7	2.1
4	5.0	8.0	13.1	101.3	
5	5.0	10.0	14.8	98.0	

4 小结

基于 AMK 对鲁米诺与高锰酸钾之间的化学

发光反应具有显著的增敏作用, 本研究建立了测定 AMK 的流动注射化学发光的分析方法, 提高了 AMK 测定的灵敏度。该方法与 HPLC 等方法相比具有简单、快速等特点, 可用于药物制剂中的 AMK 含量的测定, 结果与标示量基本一致。

REFERENCES

[1] 齐嵘. 对阿米卡星在临床应用中出现的不良反应的探讨[J]. 中国现代药物应用. 2015, 9(4): 73-74.

[2] ZHANG W, DENG Y J. Ultraviolet spectrophotometric determination of the content of amikacin in liposomes [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2000, 17(6): 422-423, 426.

[3] HU R, PENG J J, FAN X Q, et al. Resonance rayleigh scattering spectral method for determination of AMK with Cd Se QDs as probe [J]. J Southwest Univ Nat(Nat Sci Ed)(西南民族大学学报: 自然科学版), 2009, 35(1): 119-123.

[4] ZHANG F M, WANG F, WANG J. The derivatization HPLC determination of the related substances and content of amikacin sulfate and its injection [J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2014, 39(8): 608-614.

[5] ZHANG F M, WANG J. The determination of HPLC method for the kanamycin and sulfate in amikacin sulfate using charged aerosol detector [J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2015, 40(5): 354-358.

[6] LI M X, WU L M, JIN Y F. Determination of amikacin based on fluorescence enhancing of CdTe quantum dots [J]. Chin J Anal Lab(分析试验室), 2015, 34(3): 288-291.

[7] LI Q, LIU Y, HAN C X, et al. Ion chromatography determination of related substances in amikacin sulfate raw materials and its preparations [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(2): 318-322.

[8] WU F Y, YU S L. Determination of alkaloid and rhubarb anthraquinones constituents in Kuhuang injection by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(1): 79-83.

[9] LIANG Y L, YAN N L, WU Y J, et al. Determination of sulfameter by chemiluminescence enzyme immunoassay based on alkaline phosphatase-adamantane [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(6): 550-553.

[10] YAN R F, ZHANG Z J. Flow injection post chemiluminescence analysis of Amikacin [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2009, 37(10): 1519-1522.

收稿日期: 2016-11-30

(本文责编: 李艳芳)