

毛细管电泳高频电导检测克林霉素的含量^{*}

徐健君¹, 翟海云¹, 陈缙光², 蔡沛祥¹
(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州510275;
2. 中山大学药学院, 广东 广州510089)

摘要:建立了毛细管电泳高频电导法测定克林霉素含量的方法。考察了各种实验条件对分离和检测的影响。以2.4 mmol/L 甘氨酸+0.80 mmol/L 柠檬酸+4.0 mmol/L H_3BO_3 (pH=6.5) 为电泳介质, 分离电压20.0 kV。在优化条件下, 克林霉素的峰形良好, 出峰时间快, 线性范围为1.500~120.0 $\mu g/mL$, 检出限为0.5 $\mu g/mL$ 。回收率达93.6%~98.9%。

关键词:毛细管电泳; 高频电导检测; 非接触式电导检测; 克林霉素; 盐酸克林霉素胶囊

中图分类号: O657.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 05-0055-04

克林霉素 (Clindamycin) 又称氯洁霉素^[1], 于1966年首次由 Magerlein 等以氯离子取代林可霉素分子中第7位的羟基合成而得。其抗菌活性强, 抗菌谱广, 尤其对革兰氏阳性菌具有明显抗菌活性, 已成为由革兰氏阳性菌如金葡菌、链球菌、肺炎双球菌所引起的骨髓炎、败血症、呼吸道感染、五官感染及软组织感染的常用药。目前, 国内外主要采用高效液相色谱法^[2-7]来测定克林霉素的含量, 我国2000年版药典采用HPLC外标法测定^[8], 而采用毛细管电泳法测定克林霉素含量的报道比较少^[9]。本文建立毛细管电泳高频电导法测定盐酸克林霉素胶囊中克林霉素的含量, 并与中国药典HPLC法进行对比, 获得了令人满意的结果。与HPLC相比, 该方法具有快速、简便、低耗、无污染等特点。而且所用的高频电导检测装置^[10], 即非接触式电导检测装置, 避免了电极与溶液直接接触, 不存在电极污染中毒的问题, 安装方便, 不仅寿命长、成本低, 而且灵敏度较高、使用非常方便。

1 实验部分

1.1 仪器

高压电源 (自制, 按文 [11]), 高频电导检测器 (自制, 按文 [10])。石英毛细管 (150 μm , id), 河北永年光导纤维厂生产。数据工作站, 中山大学化学与化学工程学院赖^[12]研制, 信号采集使用台湾EVOC出品的PCL-711B型A/D卡; 数据记录与处理在普通P4微机上完成。

1.2 试剂

克林霉素对照品 (中国药品生物制品检定所), 三-(羟甲基) 氨基酸甲烷 (Tris, GR, 香港分装); β 环糊精 (β -CD)、甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮、柠檬酸、醋酸、脲、甲酰胺、盐酸、 H_3BO_3 、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、NaOH、NaAc、硼酸、硼砂, 均为国产, AR级; 甘氨酸为生化试剂; 实验用水为二次蒸馏水。

盐酸克林霉素胶囊 (重庆桑田药业有限公司生产), 150 mg/粒。

1.3 对照品和样品溶液的制备

精确称取 $w=87.2\%$ 克林霉素标准品 10.0 mg, 加双蒸水溶解并定容于 10.0 mL 的容量瓶中, 得质量浓度为 1.00 mg/mL 的对照品溶液。

取盐酸克林霉素胶囊 20 粒, 内容物精密称定、混匀、研细, 再精密称取约 100 mg, 加双蒸水溶解并定容于 100 mL 的容量瓶, 即得待测样品溶液。

1.4 毛细管的处理

毛细管柱在使用前, 先用 0.10 mol/L NaOH、 H_2O 、运行缓冲液分别洗 15, 5.0, 10 min。每 2 h 或更换新缓冲液时处理 1 次, 每次进样后用缓冲溶液冲洗 30 s。

1.5 电泳条件

毛细管 150 μm id $\times$ 60.0 cm (有效长度 54.0 cm), 缓冲液 2.4 mmol/L 甘氨酸+0.80 mmol/L 柠檬酸+4.0 mmol/L H_3BO_3 , 重力虹吸进样, 进样高度为 20.0 cm, 进样时间为 10.0 s, 分离电压为 20.0

* 收稿日期: 2004-04-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20375049); 广东省自然科学基金重点资助项目 (021808)

作者简介: 徐健君 (1979年生), 女, 硕士研究生; 通讯联系人: 陈缙光; E-mail: chenzg@gzsums.edu.cn

kV。高频电导检测器的输出信号经数据工作站采集到微机中进行实时数据处理、图形显示和数据文件存储。实验在恒温 (25 °C)、恒湿 (相对湿度 60%) 的条件下进行。在此条件下, 克林霉素与 H_2O 的分离情况见图 1。可见水空白溶液不干扰测定。

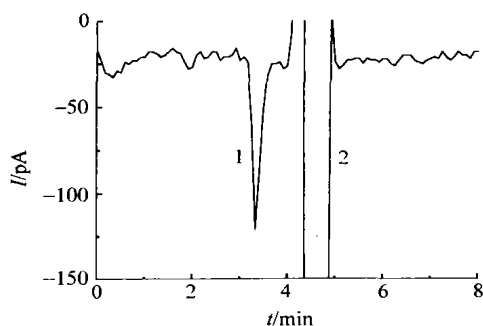


图 1 克林霉素的毛细管电泳色谱图

Fig 1 Electropherogram of clindamycin

1: 克林霉素; 2: 水

2 结果与讨论

2.1 缓冲溶液的选择

缓冲溶液的选择直接影响组分的分离和检测。实验考察了 NaAc-HAc 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 、柠檬酸钠-柠檬酸、 Tris -柠檬酸、 $\text{Tris-H}_3\text{BO}_3$ 、硼酸-硼砂、 Tris-HCl 、 NaH_2PO_4 -柠檬酸、甘氨酸-柠檬酸等几种缓冲体系不同的浓度、比例和 pH 值对分离的影响。结果发现: 在碱性的 $\text{Tris-H}_3\text{BO}_3$ 、硼酸-硼砂缓冲溶液中, 克林霉素不出峰; 而在 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ 、 Tris-HCl 缓冲液体系中克林霉素的峰位置与水峰太接近, 且电流较大; 在 Tris -柠檬酸、 $\text{Tris-H}_3\text{BO}_3$ 缓冲液体系中, 峰高较低, 峰形较差; 而在弱酸性缓冲溶液 NaAc-HAc 、柠檬酸钠-柠檬酸、 NaH_2PO_4 -柠檬酸、甘氨酸-柠檬酸中都有比较理想的分离效果, 尤其是甘氨酸-柠檬酸缓冲液体系在较高的分离电压下电泳电流很小, 出峰较快, 峰较高, 有利于实验条件的优化。比较了不同比例和浓度的甘氨酸-柠檬酸缓冲体系对分离的影响。结果发现, 比例不变时, 缓冲液浓度的加大, 分离度变大, 灵敏度降低, 出峰延迟。随着甘氨酸浓度的增加, 与水峰分离度加大, 但分析时间延长, 且灵敏度降低。优化的缓冲液浓度为 2.4 mmol/L 甘氨酸+0.8 mmol/L 柠檬酸。

2.2 添加剂的影响

缓冲液中的添加剂也是影响分离效果的一个重

要因素。在缓冲溶液中添加某种成分, 与管壁或与样品溶质之间的相互作用, 改变管壁或溶液相物理化学特性, 可进一步优化分离条件^[12]。实验考察了不同种类的添加剂 (甲醇、丙醇, 异丙醇, 丙酮, 脲, $\beta\text{-CD}$, 甲酰胺、 H_3BO_3) 和不同加入量对分离测定的影响。结果表明, 选用 H_3BO_3 作添加剂可有效提高克林霉素的检测灵敏度, 使峰形变得更尖锐、更对称。实验分别对添加 0.00 ~ 12.0 mmol/L H_3BO_3 的缓冲液体系对分离检测的影响进行考察, 发现当 H_3BO_3 加入量为 4.0 mmol/L 时效果最好。

2.3 分离电压和进样量

按毛细管电泳有关理论, 升高电压, 可提高分离度和缩短分析时间; 但分离电压过高, 在不能有效地驱散所产生的焦耳热情况下, 会引起柱效和分离度的降低。实验考察了 10 ~ 30 kV 电压范围内, 样品的分离情况。发现电压在 10 ~ 15 kV 时, 出峰慢, 峰较宽; 大于 22 kV 时噪音较大, 与水峰的分离度变差, 接近 30 kV 时容易放电。优化条件为 20.0 kV。

在进样高度为 20.0 cm 时比较了进样时间为 2 ~ 16 s 的分离检测效果。结果表明, 当进样时间延长时, 出峰时间减少, 峰高及峰面积呈增大趋势。但当进样时间大到一定程度后, 毛细管出现过载现象, 峰高增加的幅度减少, 峰面积也有所回落, 分离效果变差。综合考虑, 优化的进样时间为 10.0 s。进样时间为 10.0 s 的条件下考察了虹吸进样高度为 10, 15, 20, 25, 30 cm 的分离检测效果, 综合考虑, 选择的进样高度为 20.0 cm。

2.4 毛细管内径和有效长度

比较了 50.0、100、150、200 μm 内径的毛细管的分离效果。内径增大, 峰高、峰面积也增大, 检测灵敏度提高; 但分离度下降, 并且电流也增大, 产生的焦耳热增多, 导致基线噪音增大; 内径减小, 则出峰时间延长, 灵敏度大幅度降低。综合效果 150 μm 最好。

实验还比较了毛细管长度为 50.0 ~ 70.0 cm (有效长度为 44.0 ~ 64.0 cm) 的分离效果。随着毛细管有效长度增加, 分离度变大, 基线噪音变小, 但出峰时间延迟, 峰高、峰面积降低, 灵敏度下降。随着毛细管有效长度变短, 分离速度加快, 但分离场强变大, 从而产生的干扰也就越大。优化毛细管长度 60.0 cm, 有效长度 54.0 cm。

2.5 优化实验条件下克林霉素的毛细管电泳图

实验选择的优化条件为: 分离介质 2.4 mmol/L 甘氨酸+0.80 mmol/L 柠檬酸+4.0 mmol/L H_3BO_3 ,

pH=6.5, 分离电压 20.0 kV; 20.0 cm 位差虹吸进样 10.0 s, 毛细管总长 60.0 cm, 有效长度 54.0 cm, 运行方向 (+)→(-)。优化条件下, 克林霉素对照品的毛细管电泳图见图 1。在该缓冲体系中, 杂质不带电荷, 不干扰待测物的测定, 选择性好。

2.6 线性范围

在优化的实验条件下, 1.5~120.0 μg/mL 范围内, 克林霉素的峰面积与浓度呈线性关系。线性方程为 $Y = -133.6 + 56.55X$ (Y 为峰面积, X 为浓度, 单位为 μg/mL), 相关系数 $r = 0.997$, 工作曲线见图 2。检出限为 0.5 μg/mL ($S/N = 3$)。方法重现性好, 峰面积的 RSD 为 1.86% ($n = 6$)。

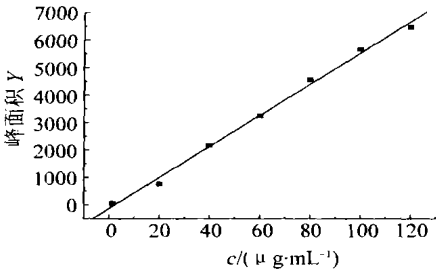


图 2 克林霉素的标准曲线
Fig 2 Calibration curve of clindamycin

2.7 样品分析和加标回收实验

在优化的实验条件下, 用微量注射器吸取待测样品溶液 0.300 mL 于 10.0 mL 容量瓶进行稀释后进样测定, 毛细管电泳图如图 1 所示, 各数据见表 1。根据回归方程计算出该稀释液中克林霉素的含量为 26.6 μg/mL, 由此得出平均每颗胶囊的克林霉素的含量为 136 mg/粒, 按摩尔质量换算即平均每颗胶囊的盐酸克林霉素的含量为 148 mg/粒 (胶囊规格: 150 ng/粒活性), 结果与采用中国药典 HPLC 法测定结果相近。将对照品溶液与样品溶液按不同比例混合, 测得标准加入回收率为 93.6%~98.9%。

表 1 克林霉素样品的测定结果和回收率

Tab 1 Determination results and spiked recovery for clindamycin in samples

本底值 (μg·mL ⁻¹)	加标量 (μg·mL ⁻¹)	检出量 (μg·mL ⁻¹)	回收率 /%	RSD($n=6$) /%
26.6	20.0	46.4	99.0	1.9
26.6	40.0	64.2	94.0	2.8
26.6	60.0	82.8	93.7	2.3

3 结 论

对于克林霉素含量的测定, HPLC 多采用外标法测定。但外标法要求条件高、误差较大, 须有定量加样环。本文建立了毛细管电泳高频电导法测定盐酸克林霉素胶囊中克林霉素的含量, 经考察结果看毛细管电泳法比 HPLC 测定结果灵敏度更高、检出限更低, 方法准确可靠并且毛细管电泳法更为简便快速大大缩短了分析的时间, 低成本。同时 CE 的方法已开始被称为 2000 年版中国药典所记载, 成为药物分析的法定方法, 因此毛细管电泳法在药品的质量控制中可望到更为广泛的应用。

参考文献:

[1] 中国药学杂志编辑部. 新药手册[M]. 天津: 科学技术出版社, 1998: 35—36.

[2] 夏振华, 张国峰. HPLC 测定盐酸克林霉素的含量[J]. 药物分析杂志, 1994, 14(6): 33—34.

[3] 王巨才, 安华民. 盐酸克林霉素的反相 HPLC 法含量测定[J]. 药物分析杂志, 1994, 14(3): 38—39.

[4] 周学章, 邓旭明, 阎继业, 等. 反相高效液相色谱法测定克林霉素含量[J]. 动物医药进展, 2002, 23(3): 92—93.

[5] FIEGER-BUSCHGES H, SCHÜBLER G, LARSIMONT V, et al. Determination of clindamycin in human plasma by high-performance liquid chromatography using coupled columns[J]. J Chromatography B, 1999, 724(2): 281—286.

[6] YU L L, CHAO C K, LIAO W J, et al. Determination of clindamycin in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: application to the bioequivalence study of clindamycin[J]. J Chromatography B, 1999, 724(2): 287—294.

[7] MARTENS-LOBENHOFFER J, BANDITT P. Sensitive and specific determination of clindamycin in human serum and bone tissue applying liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. J Chromatography B, 2001, 755(1—2): 143—149.

[8] 中华人民共和国卫生部药典编委会. 中华人民共和国药典: 二部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 606—607.

[9] DEHOUCK P, SCHEPDAEL A V, HOOGMARTENS E R. Analysis of clindamycin by micellar electrokinetic chromatography with a mixed micellar system[J]. J Chromatography A, 2001, 932(1—2): 145—152.

[10] 陈缙光, 莫金垣. 毛细管电泳高频电导检测器的研制[J]. 高等学校化学学报, 2002, 23(5): 801—804.

[11] CHEN Z G, MO J Y, YANG X Y, et al. A new capillary electrophoresis apparatus with piezoelectric ceramics high voltage source and amperometric detector[J]. Chin Chem Lett, 1999, 10(3): 231—234.

[12] 邓延伟, 何金兰. 高效毛细管电泳[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 72—73.

(下转第 65 页)

Pollution Characteristics of Carbonaceous Aerosols during Summer Period in Guangzhou

LAI Sen chao¹, YE Ji peng², ZHANG Ying yi¹, ZOU Shi chun¹, Cao Jun ji³, LEE Shun cheng⁴

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Zhuhai Municipal Drainage Monitoring Center, Zhuhai 510920, Guangdong, China;

3. Institute of Earth Environment, Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710075, China;

4. Research Centre for Urban Environmental Technology and Management,
The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, China)

Abstract: To characterize carbonaceous aerosol pollution in Guangzhou, PM₁₀ and PM_{2.5} samples were collected using a mini volume sampler in three sites during June to July, 2002. The organic carbon (OC) and elemental carbon (EC) were analyzed by thermal/optical analysis method. The average mass concentrations of PM₁₀ and PM_{2.5} were 124.77 and 78.13 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$, respectively. The average concentrations of OC in PM₁₀ and PM_{2.5} were 22.3 and 15.80 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$, and EC were 7.78 and 5.90 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$, respectively. About 70%~80% of OC and EC occurred in PM_{2.5}. Moreover, OC/EC ratio either in PM₁₀ or in PM_{2.5} exceeded 2.0. These results suggest that there exists secondary of pollution organic aerosols in ambient air of Guangzhou. The meteorological conditions, especially the rainfall and wind speed have significant effect on the ambient concentrations of OC and EC, as well as OC/EC ratio.

Key words: PM₁₀; PM_{2.5}; organic carbon; elemental carbon; Guangzhou city

(上接第 57 页)

Determination of Clindamycin by Capillary Electrophoresis with High Frequency Conductivity Detection

XU Jian jun¹, ZHAI Hai yun¹, CHEN Zuan guang², CAI Pei xiang¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;

2. School of Pharmaceuticol Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: Determination of clindamycin by capillary electrophoresis with high frequency conductivity detection was first established. The key factors for separation and determination were studied and the best analysis conditions were obtained. The clindamycin in clindamycin hydrochloride capsules could be separated and detected in the running medium of 2.4 mmol/L glycine + 0.8 mmol/L citric acid + 4.0 mmol/L H₃BO₃ (pH=6.5) at separation voltage of 20.0 kV. Under the chosen conditions, the linear concentration of clindamycin ranged from 1.5 $\mu\text{g/mL}$ to 120.0 $\mu\text{g/mL}$, the limit of detection reached 0.5 $\mu\text{g/mL}$. The method was used for analysis of clindamycin in clindamycin hydrochloride capsules satisfactorily with a recovery of 93.6%~98.9%.

Key words: capillary electrophoresis; high frequency conductivity detection; contactless conductivity detection; clindamycin; clindamycin hydrochloride capsules