



色谱技术 在氨基糖苷类药物检测的应用

Leo Zeng

广州太玮生物科技有限公司 市场·技术部

Marketing@techway-gz.com

020-62807236/62807938

(2014年10月)

色谱柱
标准品
前处理

关键实验耗材一站式服务商

引言

氨基糖苷类抗生素是由氨基糖与氨基环醇通过氧桥连接而成的苷类抗生素。

结构分析：

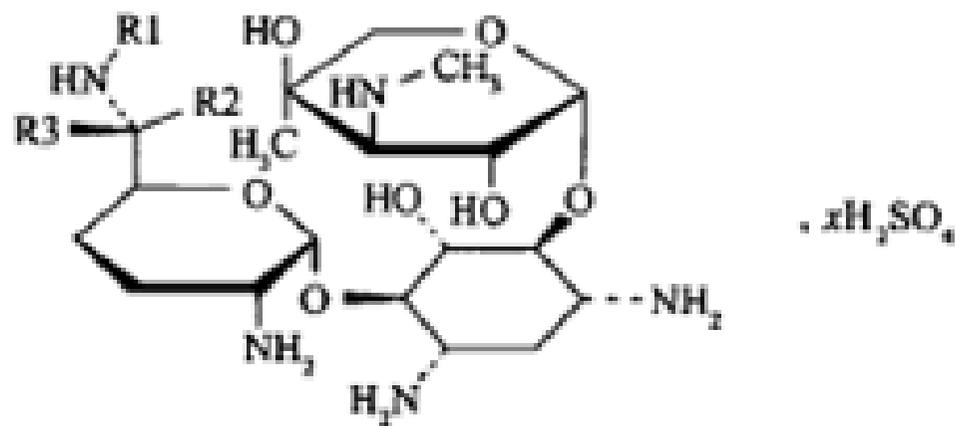
含多个碱性基团（氨基糖结构，碱性中心）

大极性基团（糖单元）

同时含有多种活性成分（多组分）

常与硫酸成盐

没有紫外吸收



引言

中国药典**2010**版收载品种：（**14**个品种及其制剂）

妥布霉素（制剂：注射液、滴眼液）

阿米卡星

硫酸阿米卡星（制剂：注射用、注射液）

盐酸大观霉素

硫酸小诺霉素（制剂：口服、片、注射液）

硫酸巴龙霉素（制剂：片）

硫酸卡那霉素（制剂：注射液、滴眼液、注射用）

硫酸西索米星（制剂：注射液）

引言

中国药典**2010**版收载品种：（**14**个品种及其制剂）

硫酸庆大霉素（制剂：片、缓释片、注射液、滴眼液、颗粒）

硫酸奈替米星（制剂：注射液）

硫酸依替米星（制剂：注射液、注射用）

硫酸核糖霉素（制剂：注射用）

硫酸链霉素（制剂：注射用）

硫酸新霉素（制剂：片、滴眼液）

引言

色谱方法检测项目：

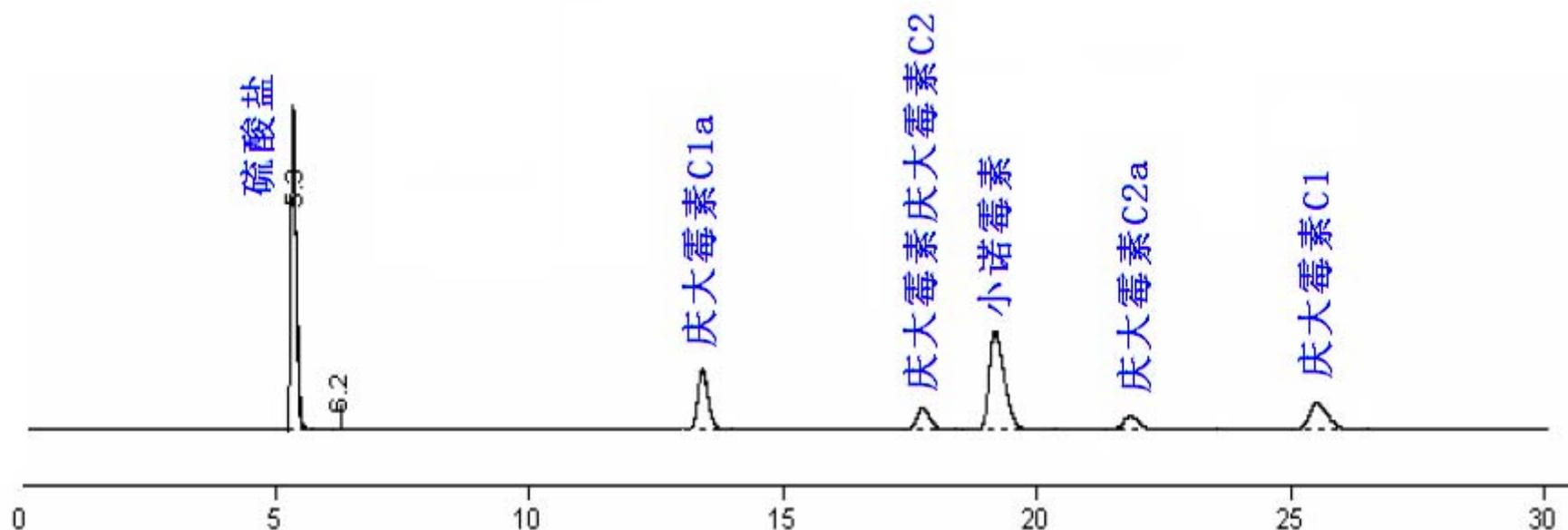
鉴别：薄层色谱或液相色谱保留值定性

特殊杂质检查：硫酸盐、关键组分

有关物质检查：HPLC、TLC

残留溶剂检查：GC

含量测定：HPLC



薄层色谱TLC

采用TLC法鉴别品种及使用薄层板类型

品种	薄层板	品种	薄层板
妥布霉素	硅胶G	硫酸西索米星	硅胶G
阿米卡星	硅胶H	硫酸庆大霉素	硅胶G
硫酸阿米卡星	硅胶H	硫酸依替米星	硅胶G
硫酸小诺霉素	硅胶G	硫酸核糖霉素	硅胶G
硫酸巴龙霉素	硅胶H	硫酸新霉素	硅胶H

薄层色谱TLC

采用TLC检测有关物质检查项目品种

盐酸大观霉素

薄层板：硅胶G

展开剂：正丙醇-水-冰醋酸-吡啶（50：40：5：5）

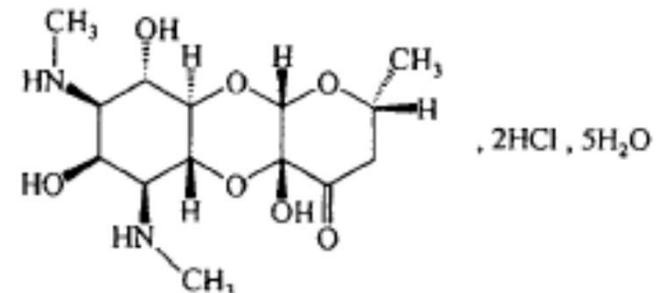
显色剂：**0.5%**高锰酸钾溶液

单个杂质限度：1%

盐酸大观霉素

Yansuan Daguanmeisu

Spectinomycin Hydrochloride



$C_{14}H_{24}N_2O_7 \cdot 2HCl \cdot 5H_2O$ 495.35

薄层色谱TLC

硅胶G与硅胶H

硅胶G：含粘合剂 CMC-Na

优点：板面硬度高，易于运输和存放
不会因为点样造成表面缺损
更平整、更均匀
商品化程度高

硅胶H：不含粘合剂

优点：需要强氧化性显色剂时使用
不会因为长时间加热引起表面变色



薄层色谱TLC

推荐产品（德国Merck薄层板）

订货号：	描述 规格	品牌	优惠价
965626-2010	硅胶G板 10*20cm 玻璃板 50 /PK	merck	询价
965721-2020	硅胶G板 20*20cm 玻璃板 25 /PK	merck	询价
965729-2010	硅胶GF板 GF254 10*20cm玻璃板 50 /PK	merck	询价
965715-2020	硅胶GF板 GF254 20*20cm玻璃板 25 /PK	merck	询价
965553-2020	硅胶G板 20*20cm铝板 25 /PK	merck	询价
965554-2020	硅胶GF板 GF254 20*20cm铝板 25 /PK	merck	询价
961153-2020	硅胶GF板 GSilica gel 60 F254 20*20CM 20/PK	merck	¥400
961154-2010	硅胶GF板 GSilica gel 60 F254 20*10CM 40/PK	merck	¥420
961155-2020	硅胶G板 Silica gel 60 20*20CM 20/PK	merck	¥400
961156-2010	硅胶G板 Silica gel 60 20*10CM 40/PK	merck	¥420
TLCDL2701	薄层切割刀 1/pk	---	¥300

→更多 Merck 薄层板供货信息请电话咨询我公司

关键实验耗材一站式服务商

色谱柱
标准品
前处理

薄层色谱TLC

推荐产品

货号	描述	品牌
TLCQG-2020	硅胶G 20*20CM 10片/盒 10盒/箱 100片	青岛海洋
TLCQG-2010	硅胶G 10*20CM 10片/盒 20盒/箱 200片	青岛海洋
TLCQG-1010	硅胶G 10*10CM 20片/盒 20盒/箱 400片	青岛海洋
TLCQH-2010	硅胶H 10*20CM 10片/盒 20盒/箱 200片	青岛海洋
TLCQH-1010	硅胶H 10*10CM 10片/盒 20盒/箱 200片	青岛海洋



定量毛细管



展开缸



喷雾瓶



点样针

关键实验耗材一站式服务商

色谱柱
标准品
前处理

HPLC方法

鉴别：采用HPLC保留值定性品种（色谱条件同含量测定或有关物质检查）

阿米卡星、硫酸阿米卡星、硫酸小诺霉素、硫酸巴龙霉素、硫酸奈替米星、硫酸核糖霉素

采用HPLC硫酸盐检查品种：（色谱条件同含量测定或有关物质检查）

硫酸西索米星、硫酸庆大霉素、硫酸奈替米星、硫酸依替米星

HPLC方法

有关物质检查/组分检查

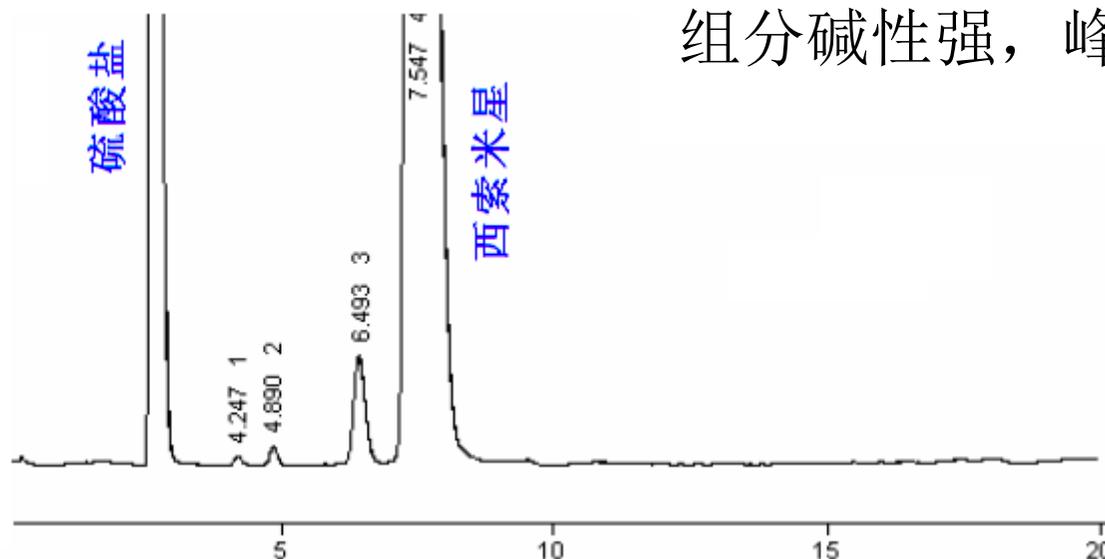
采用HPLC方法难点：

无紫外吸收，采用ELSD检测器

或柱前衍生，用UV检测器

组分复杂，难分离

组分碱性强，峰易拖尾，峰宽较大



HPLC-ELSD检测品种

品种	流动相	ELSD参数
妥布霉素	0.2M 三氟醋酸溶液	70~110°C, 3.0L/min
硫酸小诺霉素	0.2M 三氟醋酸-甲醇 (94: 6)	110°C, 2.8L/min
硫酸巴龙霉素	0.2M 三氟醋酸-乙腈 (90 : 10)	100°C, 2.8L/min
硫酸卡那霉素 (卡那霉素B)	0.2M 三氟醋酸-甲醇 (95: 5)	110°C, 3.0L/min
硫酸西索米星	0.3M三氟醋酸溶液-甲 醇-乙腈 (96: 3: 1)	110°C, 3.0L/min



HPLC-ELSD检测品种

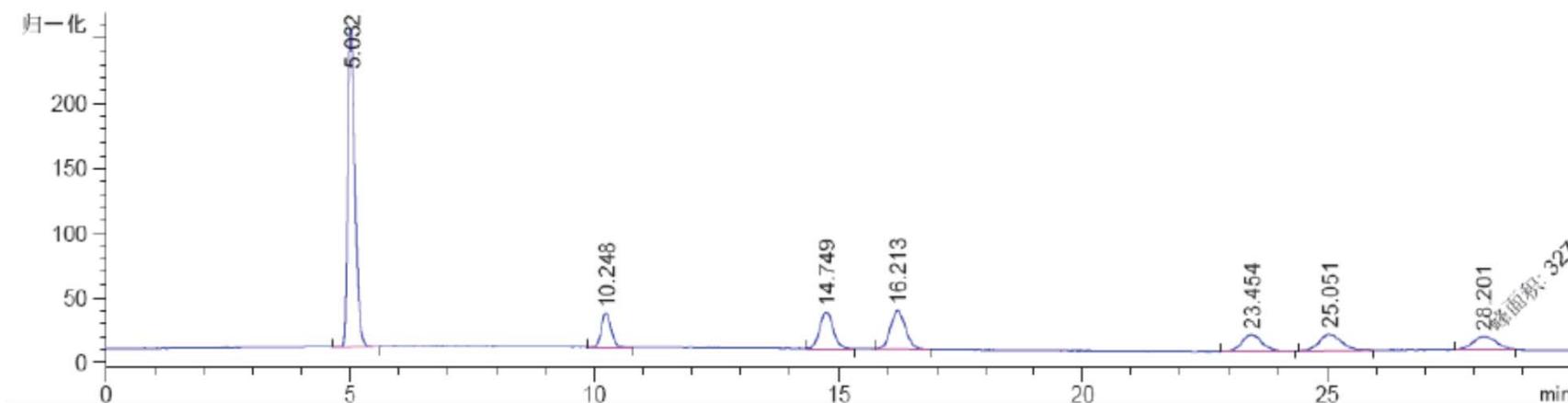
品种	流动相	ELSD参数
硫酸庆大霉素	0.2M 三氟醋酸-甲醇 (92: 8)	110°C, 2.8L/min
硫酸奈替米星	0.2M 三氟醋酸-甲醇 (84: 16)	100°C, 2.6L/min
硫酸依替米星	0.2M 三氟醋酸-甲醇 (84: 16)	100°C, 2.6L/min
硫酸核糖霉素	0.1M七氟丁酸酐混合 溶液（乙腈-四氢呋喃- 水=10 : 5: 85)	110°C, 3.0L/min
硫酸链霉素	0.15M三氟醋酸溶液	110°C, 2.8L/min

HPLC-ELSD检测品种

典型图谱：硫酸依替米星系统适用性试验图谱

色谱柱：

JADE-PAK C18 II 5um 250x4.6mm(0352-2546)



HPLC-ELSD检测品种

讨论：

1、ELSD检测器2005版药典正式收载；不同于UV检测器，影响因素更多，实验中应特别注意。

①线性范围更窄、不过原点，低浓度时线性差，要求样品配置浓度更高，不建议用外标一点法检测含量；推荐使用“随行标准曲线法”进样测定。

②流动相中有机相的比例变化会引起峰面积的变化，在线混合式，对仪器的混合精度和重现性有更高的要求；梯度洗脱时，基线通常比UV检测器稳定，但应严格考察峰面积的变化情况。

③ELSD载气流速和流动相挥发难易度有关。一般有机相比例越大，挥发性缓冲盐和酸碱调节剂浓度越低，所需载气流速越低。

HPLC-ELSD检测品种

讨论：

2、色谱柱的要求。标准中规定色谱柱pH稳定范围为0.8~8.0，但目前市面上没有完全符合色谱柱！当下使用比较多的色谱柱有：

Zorbax SB-C18（Agilent）

Xbridge BEH C18（Agilent）

Gemini C18 (Phenomenex)

由于方法的问题，很多用户还是会遇到各种问题，比如寿命短、基线噪音大、保留时间漂移、分离度不够、峰形不佳等……这些问题，与流动相中高浓度TFA有关。

Tip: 使用特别的色谱柱清洗方法，可帮助延长色谱柱寿命！
资料备索：technical@techway-gz.com

HPLC-ELSD检测品种

太玮科技推荐色谱柱：图谱见P15

JADE-PAK C18 II

JADE-PAK系列第二代升级C18，pH稳定范围1~11.5
 改善碱性化合物峰形
 改善复杂样品的分离
 更广泛的通用性

技术参数

JADE-PAK™	固定相描述	形状	粒径 (μm)	孔径 (Å)	碳载量 (%)	表面积 (m ² /g)	pH稳定范围
C18 II	十八烷基硅胶键合相，TMS封尾	球形	3, 5	120	17	330	1~11.5

HPLC-ELSD检测品种

讨论：

3、妥布霉素和硫酸链霉素用100%TFA纯水溶液，对色谱柱的损伤更大！

4、为什么要用这么大浓度的TFA？TFA除了作为一般的酸性调节剂抑制固定相游离硅羟基的活性外，在这些方法中更重要的角色是作为强碱性化合物的离子对试剂，与氨基糖苷组分的多个强碱性中心形成中性离子对，达到增强保留、改善分离和峰形目的。由于ELSD检测器在低浓度条件下，线性较差，必须适当增加样品的浓度，不得不相应提高离子对试剂TFA浓度，导致流动相 $\text{pH}<1$ ，不可避免地出现色谱柱寿命和稳定性问题！

柱前衍生，UV检测品种

阿米卡星和硫酸阿米卡星及其制剂

衍生试剂：2，4，6-三硝基苯磺酸

流动相：0.27%磷酸二氢钾溶液(pH6.5)-甲醇（30:70）

检测波长：340nm

推荐色谱柱：**JADE-PAK C18 II 5um 250x4.6mm(0352-2546)**

原理：阿米卡星上氨基与**2，4，6-三硝基苯磺酸**通过酯化反应引入吸光基团，用紫外检测器检测

HPLC方法

采用HPLC做含量测定品种

大多数氨基糖苷类抗生素用微生物检定法做含量测定项目，这与此类药物活性组分多有关。以下几个品种采用HPLC检测含量，方法与“有关物质检查”项相同。

阿米卡星/硫酸阿米卡星 柱前衍生，UV检测
硫酸卡那霉素、硫酸依替米星 ELSD检测

GC方法

采用GC 检测 残留溶剂 项目品种

阿米卡星/硫酸阿米卡星： 甲醇、乙醇、丙酮、乙腈

色谱柱：

6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷为固定相毛细管柱

推荐：TG-624 30mx0.32mmx1.8um(热电产品)

硫酸依替米星： 二氯甲烷

色谱柱：

5 % 二苯基-95%二甲基聚硅氧烷为固定液毛细管柱

推荐：TG-5MS 30mx0.25mmx0.25um(热电产品)

结 语

氨基糖苷类抗生素的HPLC分析，一直是色谱分析领域极具挑战性的项目！

大极性

强碱性

无紫外吸收

对仪器和色谱柱有更高的要求，限制了流动相选择的灵活性。

需要我们耗费更多的心力！



JADE-PAK 系列新成员

JADE-PAK C18II 第二代升级C18, pH稳定范围1~11.5

JADE-PAK 1.7um RP-18 高性能UPLC C18色谱柱

JADE-PAK Carbohydrate ES 碳水化合物专用柱, 适合蜂蜜检测

现正促销中!

sales@techway-gz.com

020-62807236



公司简介

广州太玮生物科技有限公司是一家专注于为色谱实验室提供关键性消耗品的专业公司。我们的骨干员工均有行业主流公司关键岗位的工作经历，对各知名品牌的产品都有更深入的了解，可以更准确地为我们的客户推荐最合适的产品。

代理品牌

ThermoFisher

Waters, Shimadzu, Merck, Agilent, Alltech, YMC ,
Sigma (Supelco)

USP、EP、BP、中检院、DR. E、Accustandard 、TRC 、
Witega 、Chem Service、NIST 、 Chiron

公司简介

提供服务：

免费技术咨询、免费分析方法开发、定期《色谱讲堂》
上门的技术培训（免费、收费）、上门的实操培训（收费）
色谱技术交流群：263163524（色谱那些事）

当前位置：首页 > 最新资料 > 色谱讲堂

色谱讲堂栏目

- HPLC流动相的设计(2)-流动相pH的选择
- HPLC在线混合器精度测试方法
- HPLC流动相的设计（1）
- JADE-PAK色谱柱在中国药典一部的应用（3）
- JADE-PAK色谱柱在中国药典二部的应用（2）
- 糖精钠“假超标”问题解决方案分享
- JADE-PAK色谱柱在中国药典二部的应用（1）

- JADE-PAK色谱柱在中国药典一部的应用(2)-黄酮类和蒽醌...
- JADE-PAK色谱柱在中国药典一部的应用（1）
- 同时检测防腐剂、甜味剂和色素方案
- 美国药典（USP）C18色谱柱评价体系解读
- 高通量分离技术介绍（1）
- 大极性化合分析最佳解决方案
- 氨基硅胶键合相色谱柱的应用焦点问题探讨
- 反相色谱柱的清洗、维护保养建议（2）
- 反相色谱柱的清洗、维护保养建议（1）
- 碱性化合物拖尾解决方案(5)



公司简介

提供的产品：

- ★ HPLC/UPLC色谱柱、GC色谱柱、薄层板等色谱耗材；
- ★ SPE前处理小柱、散装SPE填料、针头式过滤器和微孔滤膜等样品前处理耗品；
- ★ 标准品和对照品；
- ★ 样品瓶、顶空瓶、氙灯、进样针、密封垫、石墨卡套、衬管等色谱仪器配件；
- ★ 移液器、电子天平、离心机等小型仪器设备；
- ★ 培养基等。

色谱柱
标准品
前处理



公司简介

自主品牌产品:

JADE-PAK 系列色谱柱: **可能是您最称手的色谱柱**

美国公司制造, 通用性强, 性能卓越

分离度和峰对称性的完美平衡

10种固定相, 质谱、分析、制备等规格可供

药物分析和食品分析大量代表性应用案例

[点击浏览: JADE-PAK色谱柱技术和应用资料](http://www.techway-gz.com/introduct/nav_4_57.aspx)

http://www.techway-gz.com/introduct/nav_4_57.aspx

促销火热进行中……



公司简介

TECHWAY 系列针式过滤器和滤膜 现正促销中……

- 采用进口滤膜，稳定可靠的品质，确保一致的实验结果
- 极低有机/微粒残留，极低的有机吸附，出色的滤过效率
- 用于HPLC/GC/IC进样前的样品和溶剂高效过滤、溶出度试验快速取样、UV测定前样品过滤等分析实验
- 延长色谱柱寿命，减小分析仪器维护



根据样品量选择针式过滤器规格

选择针式过滤器时，要考虑样品的体积，通常样品量小于 2ml 时，选用 4mm 直径的微型过滤器；样品量在 2-10ml 之间，选用 13mm 直径的过滤器，当样品量大于 10ml 时，选用 25mm 直径的针式过滤器。

用于处理 HPLC 样品和流动相时，如果使用的色谱柱粒径 $\geq 5\mu\text{m}$ ，可使用孔径 0.45 μm 的针式过滤器和滤膜；如果使用的色谱柱粒径 $\leq 3.5\mu\text{m}$ ，则推荐使用孔径 0.22 μm 的针式过滤器和滤膜。过滤有机-水混合溶剂时，要使用有机系的针式过滤器和滤膜。50mm 直径的滤膜过滤溶剂建议不要超过 1L，过滤缓冲盐不要超过 0.5L。

初滤液一定要弃去，以 13mm 直径的过滤器微粒，建议前 0.5ml 的要弃去。

关键实验耗材一站式服务商

色谱柱
标准品
前处理

广州太玮生物科技有限公司
服务宗旨：

专业、高效、诚信、
责任、品质、价值、服务、
急客户所需、一站式优质服务

感谢您的支持与信赖！

技术信息反馈和咨询：technical@techway-gz.com

销售咨询：sales@techway-gz.com QQ: 2864334418