

英迈 CAD-妥布霉素含量测定-应用简报

英迈仪器 Instrumax



1、前言

电喷雾检测器(charged aerosol detector, CAD)是最近几年发展起来的一种新型通用型检测器,它的检测与被测物质的分子结构无关,被测物质也不需要被电离,只要被测物质属于半挥发性或不挥发性化合物就可以采用 CAD 检测。同时, CAD 是一种质量敏感型检测器,被测物质响应值大小由所检测样品的质量决定,只要所检测样品的质量一致,其测得的响应值基本趋于相同,并且能得到较低的检测限和较高灵敏度。

电雾式检测器(CAD)是英迈仪器研发团队经过多年潜心研究和反复实验所取得的重大科技成果。该检测器采用先进的电与雾化技术,可以实现对微量样品的高灵敏度、高精度检测。

妥布霉素(Tobramycin)别名托普霉素,是一种氨基糖苷类抗生素。氨基糖苷类抗生素不含共轭结构,紫外吸收较弱,不适合直接利用紫外检测器的常规方法分析。2020 版《中国药典》妥布霉素原料有关物质检测采用蒸发光散射检测器(ELSD),ELSD 与 CAD 相比灵敏度低,重复性差;含量检测项使用微生物检定法,方法专属性较差。《USP》现行标准中妥布霉素的有关物质检测是采用薄层色谱法,无法对各杂质进行深入分析;含量检测方法是样品衍生化处理后通过紫外检测器检测,操作比较繁琐。为此美国药典委员会于 2023 年 1 月发布的征求意见稿^[1],采用 HPLC-CAD 方法检测妥布霉素的有关物质和含量。

本文参考征求意见稿方法,采用英迈仪器 CAD 结合安捷伦 SB-C18 柱对妥布霉素含量测定方法进行考察,本方法专属性强、灵敏度高、重复性好,线性佳,能够满足妥布霉素原料及相关制剂的质量控制需求。

2、仪器和材料:

仪器: Agilent1200 液相色谱仪+CAD 检测器(英迈仪器,型号: CADetector a1)

试剂: 纯水(屈臣氏蒸馏水), 乙腈(色谱纯), 三氟乙酸(分析纯)

样品: 妥布霉素样品(用户老师友情提供)

3、方法与结果:

2.1 色谱条件:

色谱柱：Agilent ZORBAX SB C18, 4.6mmx250mm, 3.5 μ m

柱温：10 $^{\circ}$ C 流速：0.8mL/min

进样量：25 μ L

流动相 A：0.3%TFA 水溶液 流动相 B：0.3%TFA 乙腈溶液

梯度洗脱

CAD 条件：

仪器型号：英迈仪器 CADetector a1

漂移管温度：40 $^{\circ}$ C

雾化气流：3L/min

电晕电流：1 μ A

电晕气流：1L/min

增益：0.2

2.2 样品制备：

(1) 空白溶剂：流动相 A

(2) 对照溶液-即原料配制的样品溶液

对照品储备液：取妥布霉素对照品约 18mg (0.018g)，精密称定，置 100ml 量瓶中，加稀释剂（流动相 A）约 10ml 使溶解并稀释至刻度，摇匀即得。**浓度为 180.0 μ g/mL**

线性溶液 1：精密量取含量对照品储备液 3ml，置 50ml 量瓶中，用稀释剂稀释至刻度，摇匀即得。**浓度为 10.8 μ g/mL**

线性溶液 2：精密量取含量对照品储备液 2ml，置 25ml 量瓶中，用稀释剂稀释至刻度，摇匀即得。**浓度为 14.4 μ g/mL**

线性溶液 3：精密量取含量对照品储备液 1ml，置 10ml 量瓶中，用稀释剂稀释至刻度，摇匀即得。**浓度为 18.0 μ g/mL**

线性溶液 4：精密量取含量对照品储备液 3ml，置 25ml 量瓶中，用稀释剂稀释至刻度，摇匀即得。**浓度为 21.6 μ g/mL**

线性溶液 5：精密量取含量对照品储备液 3ml，置 20ml 量瓶中，用稀释剂稀释至刻度，摇匀即得。**浓度为 27.0 μ g/mL**

2.3 实验结果:

2.3.1 专属性

空白不干扰主峰测定，专属性良好。

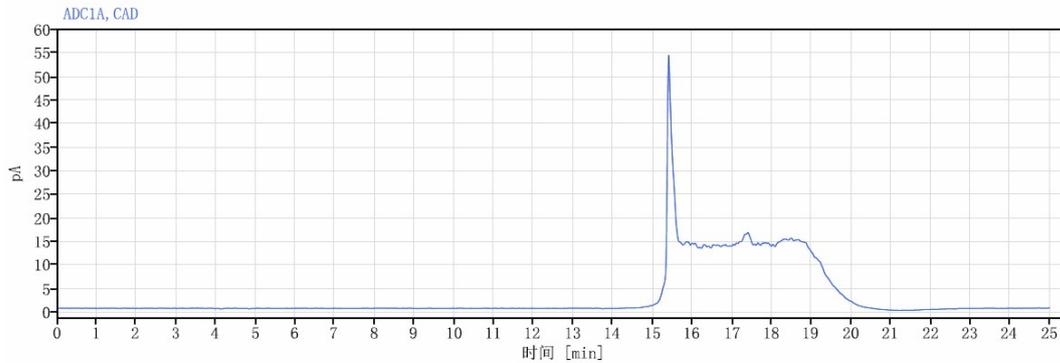


图1 空白梯度（未进样）

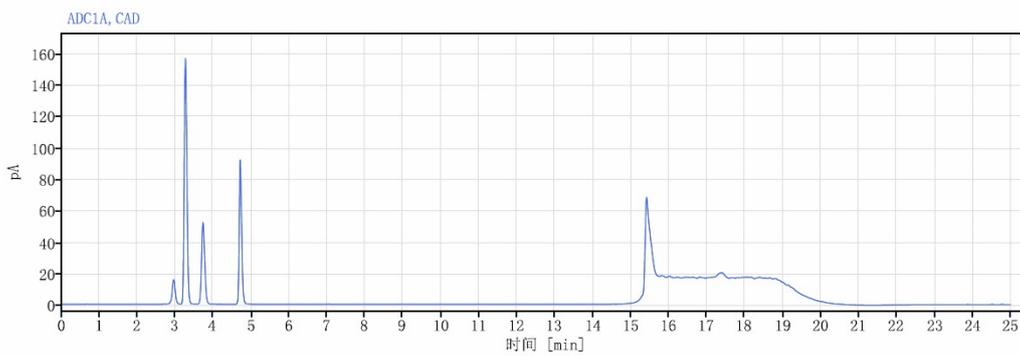
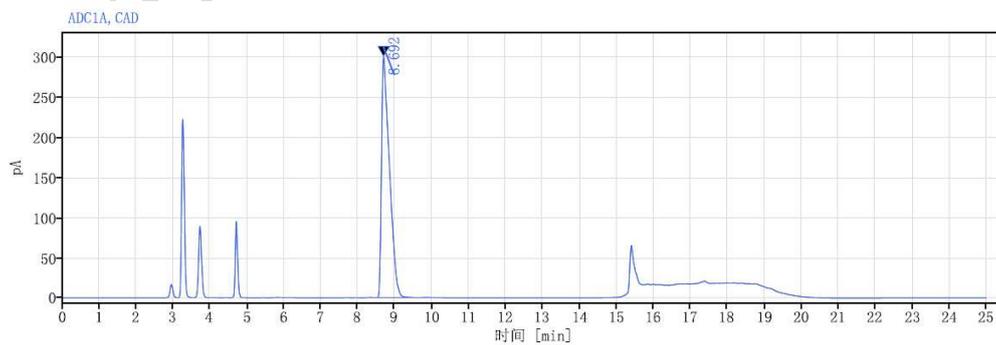


图2 空白溶剂（流动相 A）



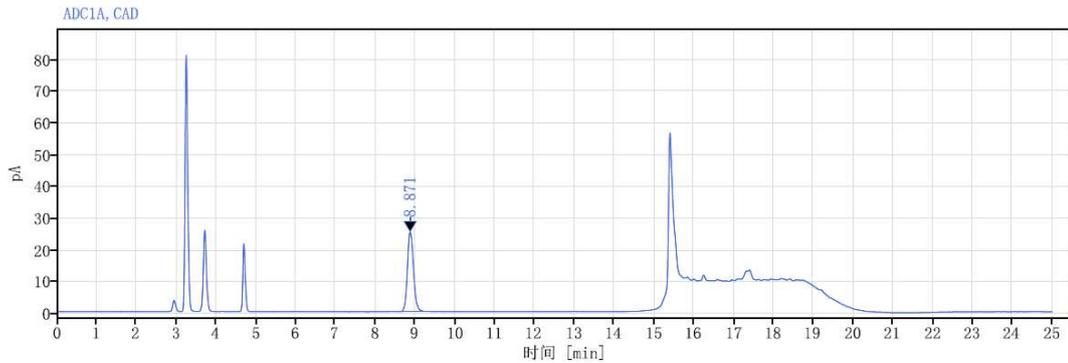
信号: ADC1A, CAD

保留时间 [min]	类型	峰宽 [min]	峰面积	峰高	峰面积%	名称
8.692	VV	1.14	4482.35	299.90	100.00	妥布霉素
总和			4482.35			

图3 妥布霉素对照储备液 180 μ g/mL 图

2.3.1 线性溶液 1-理论板数

线性溶液 1（浓度为 10.8 $\mu\text{g/mL}$ ），计算理论板数（USP），理论板数为 16600.5 (>3000)，色谱柱性能良好。



信号: ADC1A, CAD

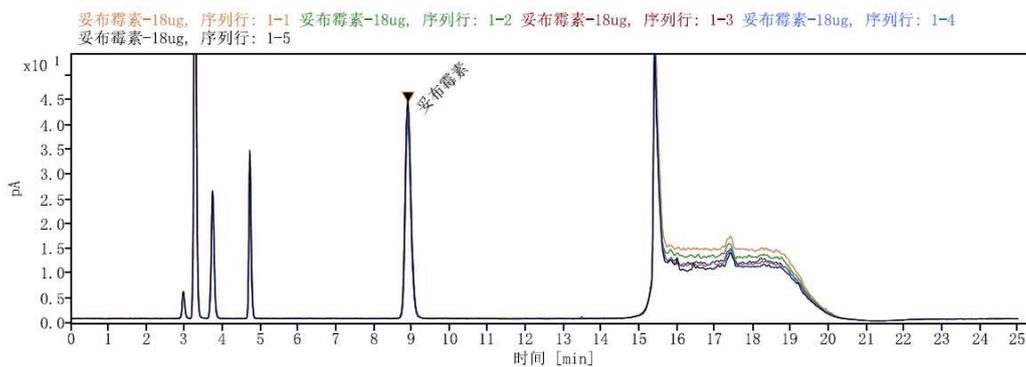
名称	保留时间 [min]	类型	峰宽 [min]	峰面积	峰高	峰 理论塔板数 USP
妥布霉素	8.871	BB	0.65	260.78	24.92	16600.5
总和				260.78		

图 4 妥布霉素对照品线性溶液 1（10.8 $\mu\text{g/mL}$ ）图

2.3.2 对照品进样精密度

浓度为 18.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液，连续进样 5 针，峰面积 RSD% 为 0.980% (< 2.0%)，精密度良好。

妥布霉素-18ug 样品:



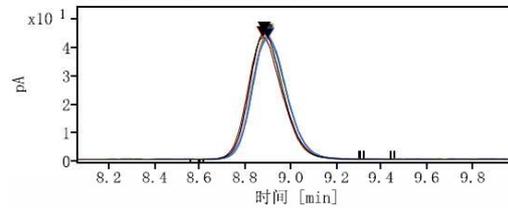
化合物名称	平均保留时间 (min)	保留时间 RSD (%)	保留时间稳定性	峰面积平均值	峰面积 RSD (%)	峰面积稳定性
妥布霉素	8.887	0.105	通过	459.343	0.980	通过

妥布霉素-18UG 稳定性测试结果

化合物: 妥布霉素
 预期信号: ADC1A
 预期保留时间 (min): 8.880

妥布霉素-18ug, 序列行: 1-1
 妥布霉素-18ug, 序列行: 1-2
 妥布霉素-18ug, 序列行: 1-3
 妥布霉素-18ug, 序列行: 1-4
 妥布霉素-18ug, 序列行: 1-5

保留时间稳定性结果: **通过**
 峰面积稳定性结果: **通过**



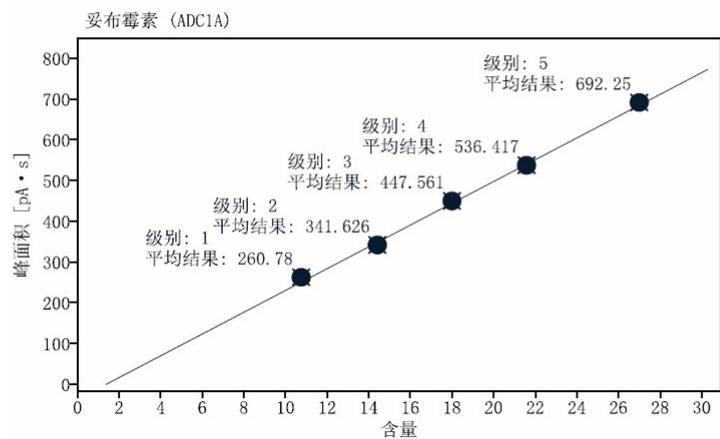
进样编号	样品瓶位置	进样体积 (ul)	进样日期	保留时间 (min)	峰面积
序列行: 1-1	4	25.000 uL	2025-03-24 12:19:57+08:00	8.891	462.887
序列行: 1-2	4	25.000 uL	2025-03-24 12:46:06+08:00	8.893	454.074
序列行: 1-3	4	25.000 uL	2025-03-24 13:12:14+08:00	8.875	455.031
序列行: 1-4	4	25.000 uL	2025-03-24 13:38:24+08:00	8.897	460.966
序列行: 1-5	4	25.000 uL	2025-03-24 14:04:32+08:00	8.880	463.756
平均值:				8.887	459.343
STD:				0.009	4.501
RSD:				0.105	0.980

2.3.3 对照品溶液线性

线性溶液 1 至线性溶液 5, 分别进样 1 针, 以线性溶液浓度与峰面积作线性回归方程。

结果显示线性相关系数 R 为 0.99918 (>0.995), 线性良好。

化合物: 妥布霉素 (ADC1A)
 预期保留时间: 8.880
 残余 STD: 7.89090
 R: 0.99918
 R²: 0.99835
 公式: $y = ax + b$
 a: 26.7758
 b: -35.8763
 c: 0.0000
 d:
 缩放标签: 峰面积 [pA · s]
 缩放类型: 无缩放



4、实验讨论：

- 1、由实验结果可知，空白梯度在 15~16min 有梯度峰，对实验无影响；空白溶剂在 2~5min 有 4 个峰，由于其与妥布霉素主峰保留时间相差较远，不干扰检测，故本次实验未做进一步排查与考察。
- 2、本实验从专属性、原料进样精密度、线性、制剂样品、制剂进样精密度等几个方面考察英迈 CAD 对样品的适用性，结果表明，英迈 CAD 样品检出、重复性、线性等结果良好，能够满足实验需求。

参考文献[1] USP-NF Draft for comments Tobramycin [S].

