

超高效液相色谱-质谱联用法分析非衍生化庆大霉素组分

Adam Bengtson, Fadi L. Alkhateeb, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

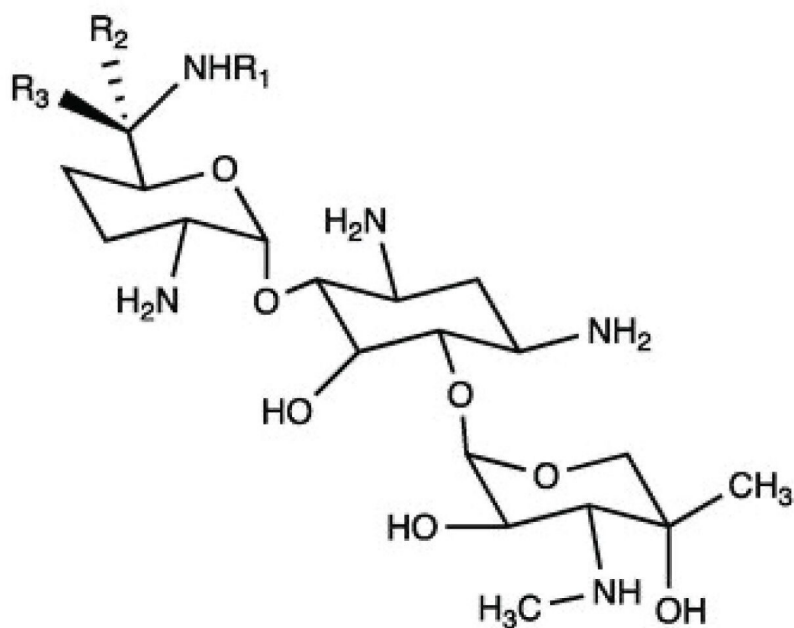
庆大霉素是一种不含发色团的氨基糖苷类化合物，常用作广谱抗生素治疗革兰氏阴性菌及部分革兰氏阳性菌感染。它由甲基化和毒性存在差异的不同相关组分组成。因此，分析和定量各种组分对于患者的安全性以及遵守监管机构的要求尤为重要。在本研究中，我们开发出一种基于亲水作用色谱(HILIC)的方法，使用配备Atlantis™ Premier BEH™ Z-HILIC色谱柱和ACQUITY QDa™质谱检测器的ACQUITY™超高效液相色谱™ H-Class系统快速分离庆大霉素C1、C1a、C2、C2a。利用眼用庆大霉素药物制剂对该方法进行了测试，并考察了Z-HILIC色谱柱填料的差异。与文献中报道的许多当前方法不同，本方法无需衍生化或氟化配对试剂。分离使用10 min等度洗脱，这缩短了样品之间的重新平衡时间，并且快速、准确且可重现地分离了庆大霉素组分。

优势

- 采用简便易用的紧凑型ACQUITY QDa检测器
- 无需衍生化或氟化配对试剂
- 等度分离可缩短平衡时间，从而更快速地分析样品
- 相同的仪器及类似方法可用于分离多种氨基糖苷类(AMG)抗生素

简介

庆大霉素是一种广谱氨基糖苷类抗生素，由庆大霉素C1、C1a、C2、C2a四种主要组分以及一种次要组分C2b混合而成，其结构如图1所示。庆大霉素通过绛红小单孢菌发酵制得。然而发酵面临着一个问题，即不同制造商在生物合成中选择的菌株不同，因此可能会获得不同组成的化合物。庆大霉素的不同“C”化合物在结构上只有甲基化程度的细微差异，但它们具有不同的毒性水平（尤其是耳毒性和肾毒性）。再加上药物的治疗指数狭窄，因此分离构成化合物变得尤为重要¹。1998年发生了几起因服用庆大霉素而导致的死亡事件，这再次反映了分离化合物的重要性；尽管未得到完全证实，但推测这些死亡是由相关化合物紫苏霉素和前体组胺引起的²。



	庆大霉素 C1	C1a	C2	C2a	C2b
R1	CH ₃	H	H	H	CH ₃
R2	H	H	H	CH ₃	H
R3	CH ₃	H	CH ₃	H	H

图1.庆大霉素化合物的结构。

本方法使用Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱，一种填充两性离子（磺基甜菜碱）固定相并采用MaxPeak™ HPS技术的色谱柱；在HILIC模式下运行。这种两性离子固定相能够很好地保留强极性化学物质，因此可以很好地分离类似的化合物，如庆大霉素混合物中的化合物³。已经开发出几种使用C₁₈和HILIC色谱柱的方法，这些方法使用氟化配对试剂或衍生化来辅助分离化合物⁴⁻⁶。这些方法往往耗时较长且需要高离子强度⁶。华东理工大学的研究人员已经采用不同的色谱柱填料（例如两性离子Click TE-Cys）取得了成功。他们的方法需要较长的时间，并且需要离子强度较高的流动相以及蒸发光散射检测器，这可能会导致离子型化合物的积累⁶。

本应用纪要中概述的方法旨在将庆大霉素分离为它的四种主要组分，同时避免使用氟化配对试剂和衍生化。这是此方法的优势之一，因为当氟化配对试剂与质谱仪配合使用时，它们会导致离子抑制和仪器污染³。避免衍生化也很有帮助，因为它可以缩短样品制备时间并从整体角度上简化方法。本文介绍了沃特世所开发的一种类似方法，这种方法的额外优势在于能够分离和定量一组AMG，两种方法使用的仪器配置相同，仅在甲酸铵浓度和方法参数方面存在差异⁷。以下是使用Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱搭配AQCUITY QDa质谱检测器来分离和定量庆大霉素组分的方法。

实验

色谱柱的重现性

准备三根Atlantis Premier BEH Z-HILIC 1.7 μm 2.1 × 100 mm色谱柱，每根色谱柱填充不同批次（批号101、102、104）的填料；另外，准备第四根色谱柱，用来填充批号101的填料并且使用不锈钢2.1 × 100 mm色谱柱硬件。

样品描述

两个硫酸庆大霉素样品购自Sigma Aldrich (G1914, PHR0177)。在聚丙烯(PP)容器中使用LCMS级水(Burdick & Jackson)制备储备液，将储备液用PP容器储存于冰箱中。制备100 μg/mL硫酸庆大霉素样品并储存于10 °C下。

庆大霉素药物制剂样品

样品购自位于美国马萨诸塞州雅芳的Asaman，使用由Bausch & Lomb和Greenstone/Pacific Pharma制造的5 mL 0.3%庆大霉素滴眼液。使用MS级水将样品稀释至100 μg/mL。

方法条件

本方法使用250 μ L混合器替换100 μ L储备液混合器（部件号：[205000719 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/service-parts--kits/205000719-mixer-assembly-250-l-zirconia.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/service-parts--kits/205000719-mixer-assembly-250-l-zirconia.html)）。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY Ultra Performance LC H-Class Plus (250 μ L混合器)
检测:	ACQUITY QDa质谱检测器(Performance)
样品瓶:	2 mL聚丙烯样品瓶
色谱柱:	Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱, 1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm
柱温:	55 $^{\circ}$ C
样品温度:	5 $^{\circ}$ C
进样体积:	3 μ L
流速:	0.8 mL/min
流动相A:	溶于MS级水中的80 mmol甲酸铵(Burdick & Jackson) (未经调节的pH: 约6.3)
流动相B:	溶于MS级ACN中的0.1% (v/v)甲酸(Burdick & Jackson)
流动相百分比:	A: 48% B: 52%

质谱条件

质谱系统：	ACQUITY QDa
电离模式：	正
采集范围：	300至630 Da
毛细管电压：	0.8 kV
探头温度：	600 °C
锥孔电压：	12 V

数据管理

色谱软件：	Empower™ 3
-------	------------

结果与讨论

研究人员在另一个项目中分析一组氨基糖苷类化合物时注意到庆大霉素的分离⁷。庆大霉素峰分离为两个清晰的峰。尽管这两个峰未得到完全分离，但是这些分离条件已被用于单因素轮换试验方法开发方案的起点。

首先考察流动相组成的影响。最初考察了从低于50%的水相开始到以85%结束的梯度方法。就梯度方法而言，非常平缓的梯度可实现良好的分离，因此本研究在等度洗脱条件下进行。检查了从85%水相降至40%的等度洗脱。研究发现，在48%的水相百分比条件下可以很好地保留良好峰形的峰。在对较低的水相百分比进行测试时，发现峰的锐度会降低，导致更难以积分。由于峰得到良好保留，因此将柱温从50 °C提高至55 °C以缩短保留时间，同时保持峰形。本研究评估的下一个变量是缓冲液浓度。使用8、25、40和80 mM甲酸铵。结果表明，甲酸铵浓度也会显著影响分离。从表1中可以看出，浓度越高，导致峰越窄且锐度越高。研究还表明，更高的甲酸铵浓度能够缩短运行时间，同时保持或改善分离，如图2所示。如文献所提出的，浓度越高越好，但过高的浓度会增加基线噪音并导致其他灵敏度问题，从而对QDa性能产生不利影响。一般而言，与QDa配合使用的甲酸铵浓度保持在10 mmol左右，但在本方法中始终保持为80 mmol⁸。采用80 mmol所获得的一致性可能是由于混合器尺寸从储备液

混合器的100 μL 增加到了250 μL 。其他文献指出，更低的pH值（约4）较为理想²⁻⁴；在本方法中，发现未经调节的pH（约6.3）能够更好地产生更尖锐的峰，获得更高的响应和更一致的结果。发现较高的MS探头温度(600 $^{\circ}\text{C}$)可提供更出色的灵敏度。

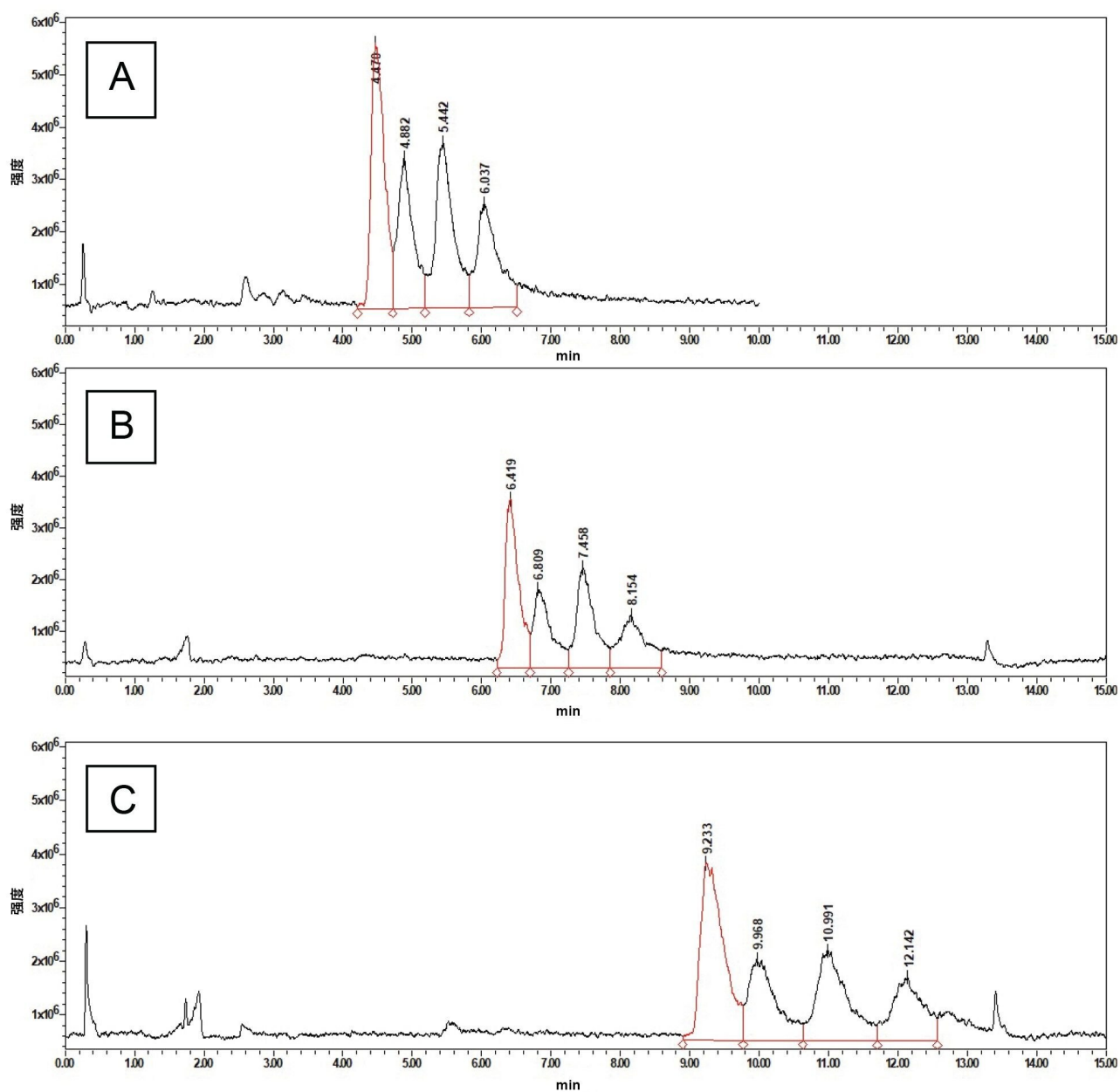


图2. 甲酸铵浓度对方法的影响。使用该百分比的水性流动相时，较低的浓度不会在该时段内洗脱。A: 80 mmol; B: 40 mmol; C: 25 mmol。所有色谱图均通过9个水平的平均值进行了平滑处理。

半高峰宽	C1 (min)	C2 (min)	C2a (min)	C1a (min)
25 mmol	0.369	0.411	0.437	0.521
40 mmol	0.209	0.270	0.255	0.363
80 mmol	0.166	0.202	0.215	0.298

表1.在不同甲酸铵浓度下得到的半高峰宽。

所开发的方法能够成功分离庆大霉素混合物的4种主要组分：C1、C1a、C2和C2a。在所有进样中，每个峰的分离度均大于1.390，且发现某些峰的分离度高达1.873，如图3所示。

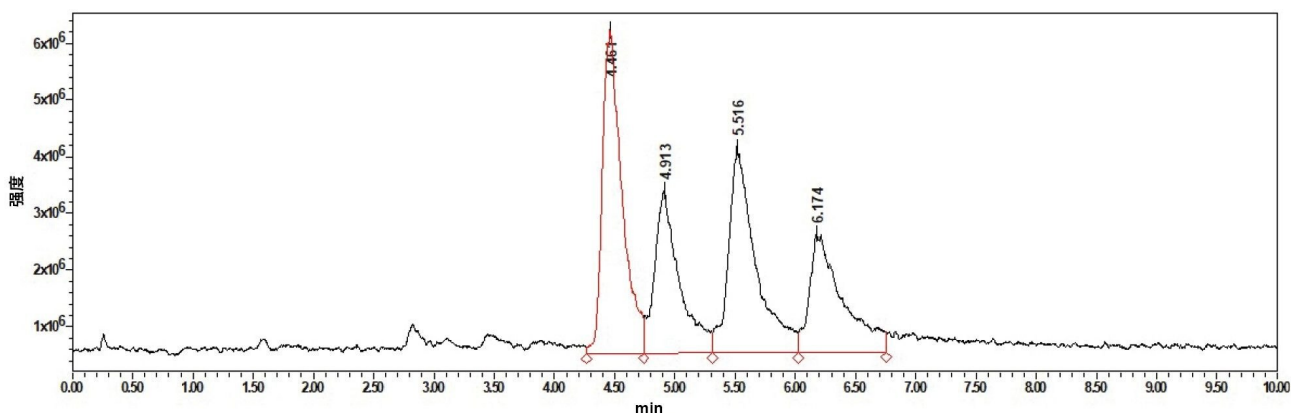


图3.分离庆大霉素取代基的最终方法结果。基于七次进样平均值的分离度分别为 1.489 ± 0.099 、 1.869 ± 0.088 、 1.783 ± 0.090 （95%置信区间）。

处理方法（更具体而言，积分参数）基本上是最大的偏差点，尤其是C1a峰结束点的确定。表4显示了六次不同进样的平均保留时间和标准偏差。由于相对标准偏差低于1%，因此可以得出结论，本方法具有良好的重现性。即便最后一个峰难以积分，本方法仍然使积分面积的相对标准偏差保持在小于5%。这些确切的值可参见表2和表3。

峰面积 %	C1	C2	C2a	C1a
平均值 %	32.066	20.143	27.677	20.113
STD	0.310	0.500	0.686	0.654
RSTD	0.97%	2.48%	2.48%	3.25%

表2.庆大霉素四个峰的面积百分比。可以看到C1a峰的RSTD最低，这不是因为峰形不一致，更主要是由于峰积分不一致。

峰面积	C1	C2	C2a	C1a
平均值	64091068	40258217	55331353	40213206
STD	1514286	1125810	2177412	1871773
RSTD	2.36%	2.80%	3.94%	4.65%

表3.由4个庆大霉素峰积分得到的峰面积。

RT	C1	C2	C2a	C1a
平均值	4.472	4.922	5.541	6.217
STD	0.0198	0.0210	0.0233	0.0326
RSTD	0.44%	0.43%	0.42%	0.52%

表4.四个庆大霉素峰的保留时间。

请注意，使用不同流动相组成进行色谱柱平衡可能需要长达30 min，否则保留时间可能会不一致。考虑使用SIR分析化合物，但是由于离子强度高，许多甲酸铵加合物形成了多种质量数，使SIR响应降低。利用TIC，以避免出现在SIR中观察到的低响应。这些化合物也非常相似，因此交叉干扰也是一个需要考虑的问题，并且有必要使用单四级质谱法分离化合物。

色谱柱填料批次重现性

本文考察了柱间重现性，以确保该方法兼容不同批次的填料。对本文开发的方法以及之前氨基糖苷类研究方法的再现性进行了测试。还检查了MaxPeak HPS技术与未键合的金属不锈钢色谱柱的影响，结果峰面积未见明显差异。HPS增加了氨基糖苷类化合物组的保留时间。采用HPS时，庆大霉素样品的相对标准偏差略有下降，如表5所示。发现两种方法的再现性均为可接受水平。由不同批次的填料所得到的保留时间和峰形有小幅变化。在六次不同的进样中，由各色谱柱得到的峰面积相对标准偏差均小于10%。各色谱柱的保留时间RSTD均低于1%，且在所有色谱柱和所有进样中所得到的保留时间RSTD均低于5%。因此，本方法在色谱柱填料的正常波动下可重现。

组分	C2		C2a		C1a	
色谱柱	平均值	RSTD	平均值	RSTD	平均值	RSTD
批次 101	1.092	0.1%	1.222	0.2%	1.366	0.1%
批次 102	1.092	0.2%	1.221	0.1%	1.358	0.2%
批次 104	1.096	0.1%	1.227	0.1%	1.368	0.2%
不锈钢 101	1.090	0.4%	1.220	0.4%	1.362	0.3%
所有色谱柱	1.093	0.3%	1.223	0.3%	1.364	0.4%

表5.四根色谱柱所得到的庆大霉素峰的相对保留时间，以及相对标准偏差百分比。

庆大霉素滴眼液制剂购自Greenstone/Pacific Pharma和Bausch & Lomb。滴眼液的浓度为3 mg/mL，因此必须进行稀释以免检测器过载。将样品用MS级水稀释至最终浓度为100 µg/mL。Bausch & Lomb提供的样品包含0.01%苯扎氯铵（一种防腐剂），而Greenstone提供的样品浓度未知。每个制造商所提供的样品含有不同的非活性成分混合物，两者均包含磷酸盐缓冲液（pH调节至6.5~7.5）。Greenstone所提供的样品额外包含由依地酸二钠和聚乙烯醇组成的添加剂。

尽管滴眼液的成分有所不同，但本方法能够将庆大霉素分离为其构成化合物。苯扎铵不保留在色谱柱上，而是在接近死体积时间处洗脱，Greenstone样品和Bausch & Lomb样品的洗脱时间分别为0.245 min和0.244 min。这种不同的模式确认了苯扎铵峰的鉴定结果。Greenstone样品未报告苯扎氯铵的浓度，但峰面积是Bausch & Lomb样品的两倍以上，表明浓度存在差异。所有四个庆大霉素峰均已分离，如图4和图5所示。

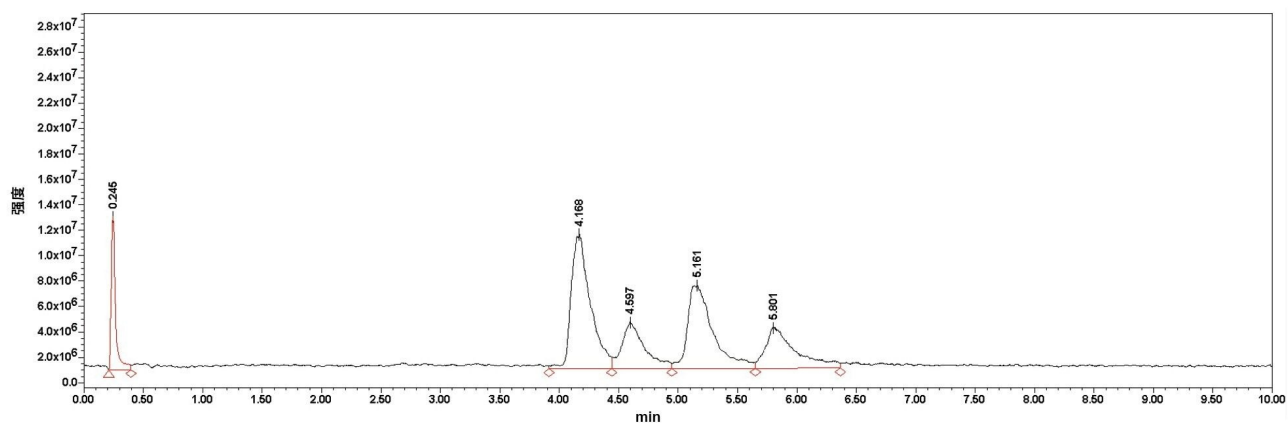


图4.浓度稀释至100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Greenstone庆大霉素滴眼液。由于苯扎铵峰增加了图表的y轴数据，因此峰看起来不太尖锐。

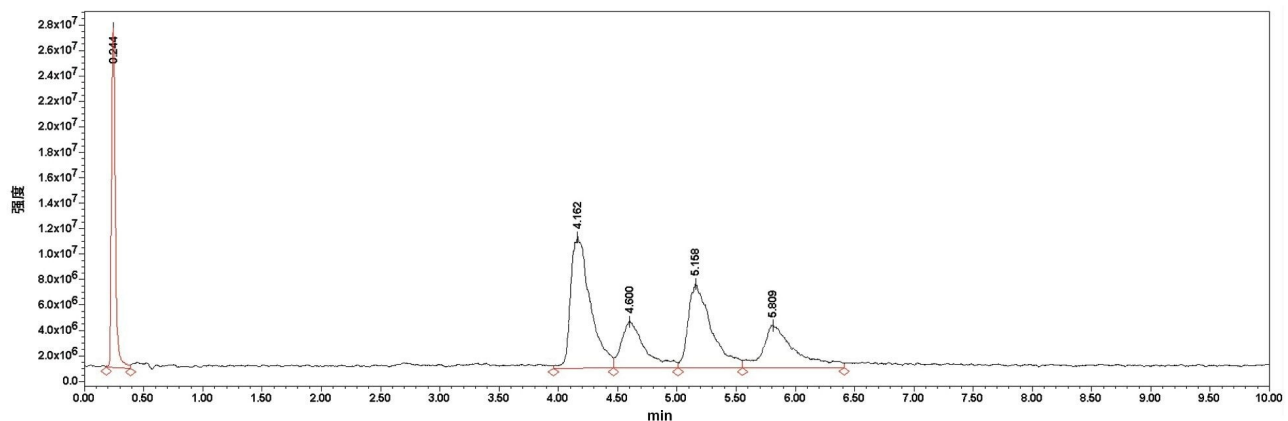


图5.浓度稀释至100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Bausch & Lomb庆大霉素滴眼液。

结论

本文介绍了新开发的一种分离庆大霉素的快速等度方法，通过将新型Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱与配备ACQUITY QDa检测器的Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统结合使用，能够在多个批次填料中产生一致且可重现的结果。这种简单的方法可快速分离庆大霉素的四种主要组分（C1、C1a、C2和C2a），同时避免了其他

庆大霉素分离方法的缺点，例如需要氟化配对试剂、复杂的分析前衍生化或较长的运行时间。

参考资料

1. Masamichi Kobayashi, Michihiko Sone, Masayuki Umemura, Toshitaka Nabeshima, Tsutomu Nakashima & Sten Hellström (2008). Comparisons of Cochleotoxicity Among Three Gentamicin Compounds Following Intratympanic Application, *Acta Oto-Laryngologica*, 128:3, 245–249, DOI: 10.1080/00016480701558948.
2. Wohlfart J, Holzgrabe U. Analysis of Histamine and Sisomicin in Gentamicin: Search for the Causative Agents of Adverse Effects. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2021 Dec;354(12):e2100260. doi: 10.1002/ardp.202100260. Epub 2021 Aug 24. PMID: 34427364.
3. Kumar P, Rubies A, Companyó R, Centrich F. Hydrophilic Interaction Chromatography for the Analysis of Aminoglycosides. *J Sep Sci*. 2012 Feb;35(4):498–504. doi: 10.1002/jssc.201100860. PMID: 22282410.
4. Stypulkowska, K., Blazewicz, A., Fijalek, Z. *et al.* Determination of Gentamicin Sulphate Composition and Related Substances in Pharmaceutical Preparations by LC With Charged Aerosol Detection. *Chroma* 72, 1225–1229 (2010). <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1763-y> <
<https://doi.org/10.1365/s10337-010-1763-y>> .
5. White LO, Lovering A, Reeves DS. Variations in Gentamicin c1, c1a, c2, and c2a Content of Some Preparations of Gentamicin Sulphate Used Clinically as Determined by High-Performance Liquid Chromatography. *Ther Drug Monit*. 1983;5(1):123–6. doi: 10.1097/00007691-198303000-00014. PMID: 6845395.
6. Wei J, Shen A, Wan H, Yan J, Yang B, Guo Z, Zhang F, Liang X. Highly Selective Separation of Aminoglycoside Antibiotics on a Zwitterionic Click Te-Cys Column. *J Sep Sci*. 2014 Jul;37(14):1781–7. doi: 10.1002/jssc.201400080. Epub 2014 Jun 5. PMID: 24798626.
7. Fadi L. Alkhateeb, Adam Bengtson, Paul D. Rainville, Simultaneous Separation and Quantification of Aminoglycosides Using Liquid Chromatography and Mass Spectrometry, 2022. Waters Application Note, [720007558](#).

8. McMaster, John Wiley, M. C. Appendix B Solvents and Volatile Buffers for LC/MS. In *LC/MS: A practical user's guide* (pp.139–140). essay, 2005.

特色产品

[ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/10138533>](https://www.waters.com/10138533)

[ACQUITY QDa质谱检测器 <https://www.waters.com/134761404>](https://www.waters.com/134761404)

[Empower色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720007609ZH, 2022年4月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号