

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.04.07

超高效液相色谱结合亲水相互作用色谱法测定普鲁卡因青霉素注射液中普鲁卡因和青霉素的含量

吴剑平, 姜 芹, 王 博, 严 凤, 张文刚, 黄士新*

(上海市兽药饲料检测所, 上海 201103)

[收稿日期] 2019-12-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 04-0041-06 [中图分类号] S859.2

[摘 要] 建立了超高效液相色谱结合亲水相互作用色谱法测定普鲁卡因青霉素注射液中的主成分含量的方法。精密量取 1.00 mL 样品悬浊液置分液漏斗中, 加入石油醚和甲醇震荡提取。静置分层后将下层提取液取出置容量瓶中以甲醇定容至刻度。提取液经稀释至适当浓度后过 0.22 μm 滤膜, 上机测定。目标物使用超高效液相色谱等度洗脱分离。以亲水相互作用色谱柱为固定相, 以 0.05 mol/L 甲酸铵溶液 (pH=4.00): 乙腈=10:90 为流动相。紫外二级管阵列检测器检测 235 nm 波长处吸收进行定量分析。实验结果表明, 该方法在青霉素含量 40 ~ 800 mg/mL, 普鲁卡因含量 50 ~ 1000 mg/mL 内线性关系良好 ($r>0.999$), 其添加回收率在 92% ~ 105%, $RSD<3\%$, 表明该方法具有较好的准确度与精密度。通过与《中国兽药典 2015 版一部》普鲁卡因青霉素注射液含量测定项下方法所测得结果的比较, 两者 $RSD<3\%$, 表明结果一致。

[关键词] 普鲁卡因; 青霉素; 超高效液相色谱; 亲水相互作用色谱

Determination of Procaine and Benzylpenicillin in Procaine Benzylpenicillin Injection by Ultra Performance Liquid Chromatogram with Hydrophilic Interaction Chromatography Method

WU Jian-ping, JIANG Qin, WANG Bo, YAN Feng, ZHANG Wen-gang, HUANG Shi-xin*

(Shanghai Municipal Supervisory Institute Veterinary Drugs and Feedstuff, Shanghai 201103, China)

Corresponding author: HUANG Shi-Xin, E-mail: yan508@163.com

Abstract: To determine procaine and benzylpenicillin in injection, an UPLC method combined with HILIC was established. 1.00 mL sample was accurately measured to a separating funnel, petroleum ether and methanol was added to extract the sample. After standing and demixed, the lower layer was transferred to a volumetric flask and filled with methanol to scale. The extract was diluted to a proper concentration and filtered by 0.22 μm film, then

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目 [(2016)3-2]

作者简介: 吴剑平, 硕士, 畜牧师, 从事兽药残留分析与研究。

通讯作者: 黄士新。E-mail: yan508@163.com

injected. The targets were separated by isocratic elution with UPLC. The stationary phase was HILIC column, and the mobile phase was 0.05 mol/L ammonium formate solution (pH = 4.00): acetonitrile = 90:10. The UV diode array was set to 235 nm to achieve the quantitation. The results showed that the method was with good linearity ($r > 0.999$) in the range of 40 ~ 800 mg/mL with benzylpenicillin and 50 ~ 1000 mg/mL with procaine. The recovery were between 92% and 105% and the *RSD* were lower than 3%, which showed the good accuracy and precision of the method. The results were compared to those measured by the determination of procaine benzylpenicillin for injection from china veterinary pharmacopoeia. The results were in agreement with the *RSD* were lower than 3%.

Key words: procaine; benzylpenicillin; UPLC; HILIC

普鲁卡因青霉素,其化学名为对氨基苯甲酰基 2-(二乙氨基)乙酯(6R)-6-(2-苯基乙酰氨基)-青霉素酸盐一水合物^[1],分子式为: $C_{13}H_{20}N_2O_2 \cdot C_{16}H_{18}N_2O_4S \cdot H_2O$, CAS No: 54-35-3。其属于内酰胺类抗生素,是在青霉素 G 的基础上研制出来的下一代长效青霉素,其克服了青霉素 G 作用时间短的缺点,主要用于革兰氏阳性菌感染,亦用于放线菌及钩端螺旋体等感染。在兽医临床领域,普鲁卡因青霉素作为使用最广泛的治疗乳牛乳腺炎、阴道炎和其他疾病的抗生素,获得了良好的疗效^[2-3]。目前《中国兽药典》2015 年版一部、《美国药典》USP36-NF31 及《英国药典》2013 年版兽药卷刊载了该产品^[4-6]。根据兽药典办[2012]9 号文件,按中国兽药典办的任务要求,曾于 2015 年对拟收载于《中国兽药典》2015 年版一部的普鲁卡因青霉素注射液进行了质量标准复核工作,对其中有关该产品各项目技术指标及检测方法进行了验证,并作了进一步的修订^[7]。随着检测技术的进步,超高效液相色谱(UPLC)正日益普及,其相比于传统液相色谱具有分离效率高,分析速度快,溶剂消耗小等优点^[8-11]。亲水相互作用色谱(HILIC)在分析极性化合物时比传统反相色谱更高的保留能力,可运用在强极性化合物的色谱分析中^[12-15]。在实际检测普鲁卡因青霉素注射液过程中发现一些问题有待解决:①由于其剂型为无菌油混悬液,对含量测定项下的精密量取一定体积较为不便;②普鲁卡因和青霉素为强极性化合物,两者保留差异较大导致单针分析时间过长;③由于普鲁卡因方法所

使用流动相中含有高比例盐和离子对试剂,对色谱柱损害较大。上述这些问题可以通过 UPLC 结合 HILIC 方法解决。

1 材料和方法

1.1 仪器 UPLC H-Class 超高效液相色谱、Empower2 控制软件、eλ-PDA 紫外二极管阵列检测器等(Waters, 美国)、高速冷冻离心机(Allegra X-22R, BECKMAN COULTER);电子天平(AL204, 梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 材料、药品与试剂 青霉素对照品(中国兽医药品监察所,批号:K0251509,93.6%),普鲁卡因对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100424-201102,99.8%),普鲁卡因青霉素注射液(某兽药生产企业,规格:10 mL:300 万单位,批号:190902-1,190902-2,190902-3,190902-4,190902-5)甲酸铵(分析纯),甲酸、乙腈、甲醇、正己烷、乙酸乙酯、丙酮、异丙醇、石油醚(色谱纯);去离子水(电阻率 $\geq 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

1.3 色谱条件 色谱柱 HILIC 分析柱(Thermo Accucore HILIC100 $\times$ 2.1 mm, 2.6 μm),柱温:30 $^{\circ}\text{C}$,流速:0.3 mL/min,进样量:5 μL ,流动相:A 为 0.05 mol/L 甲酸铵(用甲酸调节 pH = 4.00),B 为乙腈,A:B = 10:90 等度洗脱,紫外二极管阵列检测器测试 235 nm 波长处吸收。

1.4 前处理条件 精密量取 1.00 mL 样品置于 150 mL 分液漏斗中,另准备 10 mL 石油醚将移液管上挂壁液体全部清洗转移至该分液漏斗,加入 10 mL 甲醇,充分震荡 1 min,静置分层后收集下层液

于 50 mL 容量瓶中。再次加入 10 mL 甲醇重复上述操作,将下层液体合并于 50 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度并摇匀。精密量取 5.00 mL 瓶中溶液置 100 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,摇匀后吸取适量过 0.22 μm 尼龙滤膜后装入棕色进样瓶上机测定。

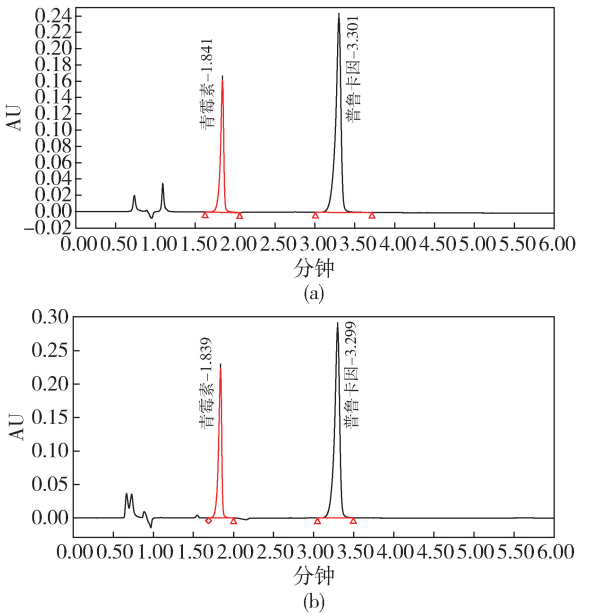
2 结果与分析

2.1 色谱系统适用性结果 取含青霉素 160 μg/mL、普鲁卡因 200 μg/mL 的标准品溶液 5 μL 上机测定 235 nm 波长处吸收,所获色谱图如图 1 所示,其系统适用性参数如下表 1 所示。实验结果表明,该色谱条件下青霉素与普鲁卡因均能满足《中国兽药典》2015 年版一部通则 0512 高效液相色谱法系统适用性试验下相应要求。

表 1 色谱系统适用性试验结果

Tab 1 Results of the chromatographic system suitability test				
化合物 Compound	保留时间 Retention Time/min	理论塔板数 Theoretical Plate	拖尾因子 Tailing Factor	分离度 Resolution
青霉素 Benzylpenicillin	1.841	10874	0.95	15.3
普鲁卡因 Procaine	3.301	14103	0.98	

2.2 线性定量范围 取青霉素和普鲁卡因对照品适量,用流动相溶解并稀释至每 1 mL 中分别含青霉素 1600 μg/mL 和普鲁卡因 2160 μg/mL 的标准品中间溶液,用流动相稀释至含青霉素 40、80、160、400、800 μg/mL 标准工作曲线溶液,其中含普鲁卡因分别为 54、108、216、540、1080 μg/mL。按 1.3 项色谱条件进样检测,将所得色谱图积分面积以 Y 表示,进样浓度以 X 表示,所得回归曲线如下表 2 所示,其线性相关系数 r 都大于 0.999。实验结果表明,该方法在供试品青霉素含量 40 ~ 800 mg/mL,普鲁卡因含量 50 ~ 1000 mg/mL 内线性关系良好(表 2)。



(a) 对照品 Standard; (b) 样品 Sample

图 1 超高效液相色谱图

Fig 1 Chromatography by UPLC

表 2 普鲁卡因青霉素标准曲线

Tab 2 Standard curve of procaine benzylpenicillin				
化合物 Compound	线性范围 Linearity range /(μg · mL ⁻¹)	斜率 Slope	截距 Y - Intercept	r
青霉素 Benzylpenicillin	40 ~ 800	3225	-3190	0.9996
普鲁卡因 Procaine	50 ~ 1000	12013	4831	0.9997

2.3 方法准确度与精密度 精密量取供试样品 20 份,其中 5 份作为本底样品直接按 1.3 项和 1.4 项方法进行检测获得样品的本底含量,剩余 15 份分成 3 批,每一批为一个添加含量水平,进行添加回收实验,其中一批添加青霉素 128 mg,普鲁卡因 86.4 mg;其中一批添加青霉素 160 mg,普鲁卡因 108 mg;剩余一批添加青霉素 192 mg,普鲁卡因 129.6 mg,取 5 批样品进行上述实验。分别按 1.3 项和 1.4 项实验条件进行检测后将结果扣除本底中的青霉素与普鲁卡因含量后计算回收率,所得结果如表 3 所示。实验结果表明,其添加回收率在 92% ~ 105%,RSD < 3%,满足《中国兽药典》2015

年版一部通则 9101 兽药质量标准分析方法验证指导原则中准确度与精密度项下相关要求。

表 3 方法准确度与精密度
Tab 3 Accuracy and precision of the method

化合物 Compound	添加量 Added concentration /(mg · mL ⁻¹)	含量 concentration /(mg · mL ⁻¹)				含量均值 Average concentration /(mg · mL ⁻¹)	回收率 均值/% Average recovery%	批内 Inter – assay RSD/%	批间 Between – assay RSD/%	
青霉素 Benzyl- penicillin	0	167.53	168.20	170.56	166.69	168.20	168.24	/	0.9	1.6
	128	297.9	298.54	293.81	294.32	293.42	295.6	99.5	0.8	2.4
	160	332.4	334.32	320.4	333.68	335.28	331.22	101.9	1.9	1.2
	192	368.88	359.28	359.86	354.67	352.75	359.09	99.4	1.7	1.3
普鲁卡因 Procaine	0	121.29	115.89	123.12	119.60	122.58	120.5	/	2.4	1.3
	86.4	199.86	208.64	203.42	205.08	205.67	204.53	97.3	1.6	2.0
	108	228.93	223.95	225.02	221.93	223.59	224.69	96.5	1.2	1.6
	129.6	253.26	248.4	253.86	244.6	249.23	249.87	99.8	1.5	1.5

2.4 溶解液与提取液的比较试验结果 尝试了多种不同极性溶解溶液,包括纯乙腈、乙酸乙酯、丙酮、异丙醇、正己烷和石油醚溶解样品。分别精密量取 1.00 mL 样品,以上述溶解液清洗移液管并转移至分液漏斗中,分别添加青霉素 160 mg,普鲁卡因 108 mg,之后采用 1.4 项中前处理条件进行净化,测得结果如表 4。比较了水、甲醇、乙腈、异丙醇的提取效率分别以上述 4 种提取液分次提取后稀释定容,上机测定,测得结果如表 5。实验结果表明,石油醚在进行溶解和转移样品时具有更好的溶解性且回收率最高,因此,选择石油醚来溶解、转移

样品和除去助剂;甲醇在进行提取时回收率最高,因此,选择甲醇作为提取剂。

2.5 与原药典方法比较结果 以市售某公司实际生产的普鲁卡因青霉素注射液产品(规格:10 mL:300 万单位,批号:190902 – 1,190902 – 2,190902 – 3,190902 – 4,190902 – 5)为样品,分别使用本方法与《中国兽药典》2015 年版一部普鲁卡因青霉素注射液含量测定项下方法进行 5 次重复检测后进行比较,结果如表 6 所示,两种方法所获结果的 RSD <3%,符合 9101 兽药质量标准分析方法验证指导原则,结果一致。

表 4 溶解液比较
Tab 4 Comparison of the solution

溶剂 Solution	现象 Phenomenon	普鲁卡因回收率 Recovery of procaine/%	青霉素回收率 Recovery of benzylpenicillin/%
乙腈 Acetonitrile	无法彻底洗净移液管,与样品溶液分层	25.3	22.1
异丙醇 Isopropanol	可彻底洗净移液管,与样品溶液分层	68.4	68.4
丙酮 Acetone	可彻底洗净移液管,与样品溶液互溶	89.1	89.0
乙酸乙酯 Ethyl acetate	可彻底洗净移液管,与样品溶液互溶	87.3	84.2
正己烷 Hexane	可彻底洗净移液管,与样品溶液互溶	93.6	92.9
石油醚 petroleum ether	可彻底洗净移液管,与样品溶液互溶	99.8	99.5

表 5 提取剂比较

Tab 5 Comparison of the extract

提取剂 Extract	普鲁卡因回收率 Recovery of procaine/%	青霉素回收率 Recovery of benzylpenicillin/%
水	94.6	35.1
甲醇	99.8	99.5
乙腈	92.8	93.1
异丙醇	44.7	45.2

表 6 方法比较(n=5)

Tab 6 Comparison of the methods (n=5)

方法 Methods	普鲁卡因 占标示含量 Procaine Labeled content/%	批内 In – batch RSD/%	方法间 Between methods RSD%	青霉素 占标示含量 Benzylpenicillin Labeled content/%	批内 In – batch RSD/%	方法间 Between methods RSD/%
新建方法 Established method	99.4	1.9	1.4	40.0	1.4	0.2
药典法 Veterinary pharmacopoeia method	102.3	2.2		40.2	0.9	

3 讨论与结论

3.1 溶解液与提取液的优化过程 由于普鲁卡因青霉素注射液为无菌油混悬液,其在常温下粘度较高,移液管上的油液不易完全被转移,原方法用称取一定重量后测算比重,最后换算成体积的方式进行,该方式需要用到大量样品溶液,且由于液体黏度大比重瓶不易清洗。通过查阅相关资料可知^[5-6],普鲁卡因(LogP = 2.10)和青霉素(LogP = 1.46)属于极性较大的化合物,在极性较小的溶解液中几乎不溶,而在极性较大的有机试剂中溶解性很好,故本方法拟用足量弱极性溶剂充分溶解油液并将移液管上的油液完全清洗转移至分液漏斗中,再用强极性提取液充分提取其中的普鲁卡因青霉素后稀释定容来解决前述问题。本研究尝试了多种不同极性溶解溶液,包括纯乙腈、乙酸乙酯、丙酮、异丙醇、正己烷和石油醚溶解样品,获得了 2.4 项中实验结果,证明石油醚在进行溶解和转移样品时具有更好的溶解性且回收率最高,因此选择石油醚来溶解、转移样品和除去助剂。而普鲁卡因和青霉素因极性较大,需用强极性溶剂提取后进行测

定,比较了水、甲醇、乙腈、异丙醇的提取效率,获得了 2.4 项中实验结果,证明甲醇在进行提取时回收率最高,因此,选择甲醇作为提取剂。

3.2 亲水相互作用色谱法在分析普鲁卡因和青霉素时的优势 亲水相互作用色谱(HILIC)的保留机制比较复杂,主要有分配机制和吸附机制(包括氢键作用、偶极间作用等),还涉及静电作用和离子交换等。普鲁卡因(LogP = 2.10)和青霉素(LogP = 1.46)都属于极性较大的化合物,在反相色谱柱上难以保留,因此,原药典方法选择氢氧化四丁基铵作为离子对试剂以加强对目标化合物的保留,但使用离子对试剂对色谱柱的使用寿命和方法的耐用性具有负面影响,且不可作为液质联用检测使用的流动相,不利于方法的拓展。因此,在建立新方法时考虑到这些因素改用 HILIC 方法,对普鲁卡因和青霉素都具有良好的保留,色谱系统适应性参数也符合药典相应要求^[4]。另外,HILIC 法进样溶剂一般为高比例有机试剂,这和样品前处理中溶解液、提取液和稀释液性质更接近,不必像反相色谱那样再做溶剂置换,这降低了操作中引入的误差,有利

于方法的精密度。

本研究建立了 UPLC 结合 HILIC 法测定注射液中普鲁卡因和青霉素含量的方法。精密量取样品,以石油醚充分洗涤转移和溶解样品,以甲醇提取后经乙腈稀释后进样测定。实验结果表明,该方法在定量范围内线性关系良好($r > 0.999$),其添加回收率在 92% ~ 105%, $RSD < 3\%$,表明该方法具有较好的准确度与精密度。通过与《中国兽药典》2015 年版一部普鲁卡因青霉素注射液含量测定项下方法所测得结果的比较,结果一致。

参考文献:

- [1] 刘慧勤,米祥忻,吕冠芳,等. 普鲁卡因青霉素特定杂质的合成制备[J]. 中国抗生素杂志,2018,43(12):1510-1513.
Liu H Q, Mi X X, Lv G F, *et al.* Synthesis and Preparation of Specific Impurity of Procaine Penicillin[J]. Chinese Journal of Antibiotics,2018,43(12):1510-1513.
- [2] 李翠霞. 青霉素钠与普鲁卡因青霉素的临床实践比较[J]. 当代医学,2013,19(31):129-130.
Li C X. Comparison of Penicillin Sodium and Procaine Benzylpenicillin in Clinical Practice[J]. Contemporary Medicine, 2013, 19(31): 129-130.
- [3] 孙丽萍. 青霉素在兽医临床上的应用[J]. 养殖技术顾问, 2010,(7):110.
Sun L P. Use of penicillin in Veterinary Clinic Practice [J]. Aquaculture Technical Advisor,2010,(7):110.
- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二〇一五年版一部[M]. 北京:中国农业出版社,2016:401.
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Chinese Veterinary Pharmacopoeia 2015 Edition Part I [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2016: 401
- [5] The United States Pharmacopoeial Convention. The 36nd revision of the United States Pharmacopeia(USP 36) and the 31th edition of the National Formulary (NF 31) [S]. Rockville: Twinbrook Parkway, 2013: 4717.
- [6] British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia (Veterinary) 2013[S]. London: British Pharmacopoeia Commission Office, 2013: 874.
- [7] 田恺,商军,闵钰婷,等. 普鲁卡因青霉素注射液质量标准复核[J]. 上海畜牧兽医通讯,2015,(4):12-15.
Tian K, Shang J, Ming Y T, *et al.* Review on quality standard of procaine penicillin injection[J]. Shanghai Animal Husbandry and Veterinary Communication,2015,(4):12-15.
- [8] Horie M, Saito K, Ishii R, *et al.* Simultaneous determination of

five macrolide antibiotics in meat by highperformance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A,1998, 812(1/2): 295-302.

- [9] 唐棣,金明露,葛荣,等. 高效液相色谱法测定山萮健胃颗粒中甘草酸的含量[J]. 中国兽药杂志,2019,53(11):34-38.
Tang D, Jin M L, Ge R, *et al.* The Content of Glycyrrhizic Acid in Shanlingjianwei Granule Determined by HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,2019,53(11):34-38.
- [10] 章安源,章安雯,牛华星,等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测扶正解毒散剂中非法添加物喹乙醇、乙酰甲喹[J]. 中国兽药杂志,2019,53(10):33-39.
Zhang A Y, Zhang A W, Niu H X, *et al.* Determination of Olaquinox and Mequinox Illegally Added in Fuzhengjiedusan by UPLC-MS/MS[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 53(10): 33-39.
- [11] 陈雪,林婷. UPLC-MS/MS 法测定牛奶中普鲁卡因青霉素 G 残留量[J]. 广州化工,2016,44(18):149-150.
Chen X, Lin T. Quantification of Penicillin G Procaine in Milk by UPLC-MS/MS[J]. Guangzhou Chemical Industry,2016,44(18):149-150.
- [12] 吴剑平,张鑫,李丹妮,等. 分散固相萃取结合亲水作用色谱-串联质谱法检测预混合饲料中 7 种抗病毒药物含量[J]. 中国兽药杂志,2016,(3):49-55.
Wu J P, Zhang X, Li D N, *et al.* Determination of 7 Antivirus in Premixed Feed by QuCHERS Combined with Hydrophilic Interaction Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2016,(3):49-55.
- [13] 蒲江华,赵峡,韩文伟,等. 亲水作用色谱在糖类化合物分析中的应用[J]. 分析测试学报,2017,36(1):145-150.
Pu J H, Zhao X, Han W W, *et al.* Application of Hydrophilic Interaction Chromatography in Analysis of Carbohydrates [J]. Journal of Instrumental Analysis,2017,36(1):145-150.
- [14] 刘雪红,张秀芹,侯颖,等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中 7 种氨基糖苷类药物残留[J]. 中国兽药杂志, 2015,49(3):48-52.
Liu X H, Zhang X Q, Hou Y, *et al.* Detection of Seven Aminoglycoside Residues in Milk by UPLC-MS-MS. Chinese Journal of Veterinary Drug [J]. 2015,49(3):48-52.
- [15] 赵静,李琛,郭自国,等. 固相萃取/高效液相色谱-串联质谱法测定水中百草枯与敌草快残留[J]. 分析测试学报, 2018,37(5):626-634.
Zhao J, Li C, Guo Z G, *et al.* Determination of Paraquat and Diquat Residues in Water by HighPerformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Solid Phase Extraction [J]. Journal of Instrumental Analysis,2018,37(5):626-634.