

中图分类号: R927.2; R978.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)03-0067-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.03.015



反相离子对色谱法测定辅助生殖培养液中庆大霉素含量

赵丹妹¹, 李 柚², 康海华¹, 冷昕洋³, 刘振齐¹, 柯林楠^{1△}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102627; 2. 瑞士万通中国有限公司, 北京 100101; 3. 中国人民解放军联勤保障部队第九六二医院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:目的 建立测定辅助生殖培养液中庆大霉素含量的反相离子对色谱法。方法 辅助生殖培养液样品采用WCX固相萃取小柱富集、净化法进行前处理。色谱柱为Apollo C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 淋洗液为水(含0.7%三氟乙酸、0.025%五氟丙酸、0.2%NaOH, pH为2.6) - 乙腈(50:3, V/V), 检测器为柱后加碱 - 脉冲安培检测器, 以外标法定量。结果 庆大霉素C₁, C_{1a}, C₂, C_{2a}的质量浓度分别在0.550~10.996 μg/mL、0.526~10.512 μg/mL、0.584~11.688 μg/mL、0.356~7.124 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r > 0.9995$, $n = 6$); 检测限为0.2016 μg/mL, 定量限为0.6722 μg/mL; 回收率为92.66%~99.82%, $RSD < 5%$ ($n = 6$)。精子冷冻液中未检出庆大霉素, 颗粒细胞去除液、玻璃化解冻液、全程培养液、精子密度梯度分离液、精子制动液中庆大霉素的含量分别为17.54, 12.60, 15.08, 9.26, 11.12 μg/mL ($n = 6$)。结论 该方法前处理简单, 无须衍生化处理, 简便高效, 灵敏度高, 重复性好, 可用于多种辅助生殖培养液中庆大霉素的检测。

关键词:反相离子对色谱法; 脉冲安培检测法; 辅助生殖培养液; 庆大霉素; 含量测定

Content Determination of Gentamicin in Assisted Reproductive Culture Medium by Reversed Phase Ion Pair Chromatography

ZHAO Danmei¹, LI You², KANG Haihua¹, LENG Xinyang³, LIU Zhenqi¹, KE Linnan¹

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China 102627; 2. Metrohm China Limited Company, Beijing, China 100101; 3. The 962nd Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Harbin, Heilongjiang, China 150001)

Abstract: Objective To establish a reversed phase ion pair chromatography method for the content determination of gentamicin in the assisted reproductive culture medium. **Methods** The assisted reproductive culture medium samples were pre-treated by the WCX solid-phase extraction column enrichment and purification method. The chromatographic column was Apollo C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), and the eluent was water (containing 0.7% trifluoroacetic acid, 0.025% pentafluoropropionic acid, 0.2% NaOH, pH 2.6) - acetonitrile (50:3, V/V), the detector was the post-column alkali-pulse amperometric detector, and it was quantified by the external standard method. **Results** The linear ranges of gentamicin C₁, C_{1a}, C₂, and C_{2a} were 0.550 - 10.996 μg/mL, 0.526 - 10.512 μg/mL, 0.584 - 11.688 μg/mL, and 0.356 - 7.124 μg/mL ($r > 0.9995$, $n = 6$), respectively. The limit of detection was 0.2016 μg/mL, and the limit of quantification was 0.6722 μg/mL. The recoveries of gentamicin C₁, C_{1a}, C₂, and C_{2a} were in the range of 92.66% - 99.82%, with $RSDs < 5%$ ($n = 6$). Gentamicin was not detected in the sperm cryopreservation solution. The content of gentamicin in the granular cell removal solution, vitrification thawing solution, whole process culture solution, sperm density gradient separation solution, and sperm braking solution was 17.54, 12.60, 15.08, 9.26, and 11.12 μg/mL ($n = 6$), respectively. **Conclusion** The method is simple, efficient, highly sensitive, and reproducible with simple pre-treatment, and no need for derivatization, which can be used for the content determination of gentamicin in various assisted reproductive culture media.

Key words: reversed phase ion pair chromatography; pulse amperometric detection; assisted reproductive culture medium; gentamicin; content determination

辅助生殖培养液是人类辅助生殖技术(ART)中胚胎体外培养所必需的, 其可为配子和受精卵提供生存和发育的能量组分。不同阶段使用培养液的质量会直接影响ART的成功率, 故应密切关注该类产品中各组分的质量安全^[1]。庆大霉素为氨基苷类广谱抗菌药物, 对革兰阳性菌和革兰阴性菌都有效^[2], 在辅助生殖培养液中常用来避免细菌感染^[3]。目前, 已知庆大霉素临床的毒性包括耳毒性^[4-6]、肾毒性^[7]、肾清除能力下降^[8]等。在胚胎毒性方面, 也有研究发现高浓度庆大霉素会

导致斑马鱼的胚胎存活率和畸形率发生显著变化^[9]。由于辅助生殖培养液的组分复杂, 基质效应影响较大, 目前尚无相关研究该产品中庆大霉素含量的测定方法。因此, 建立一种准确、高效的检测方法对其进行质量控制非常必要。庆大霉素是一种以C组分为主的多组分混合物^[10], 临床使用的庆大霉素主要由C₁, C_{1a}, C₂, C_{2a} 4种主要有效组分组成^[11], 它们的差异主要表现在绛红糖胺C-6位上的甲基化程度不同^[12-13]。目前, 庆大霉素的含量测定方法主要有微生物法^[14-15]、酶联免

第一作者: 赵丹妹, 女, 硕士, 主管技师, 研究方向为无源医疗器械和高分子生物材料的化学性能, (电子信箱) danmei_zhao@126.com。

△通信作者: 柯林楠, 女, 硕士, 主任技师, 研究方向为无源医疗器械的化学性能和标准化, (电子信箱) kelinnan@sina.com。

疫吸附试验(ELISA)法^[16]、柱前衍生化-高效液相色谱(HPLC)法、HPLC-蒸发光散射检测器(ELSD)法^[17-18]、间接分光光度法^[19]、旋光法^[20]等。但这些方法衍生化过程烦琐、测试样品要求受限制、不能获得各主要组分的含量,不适用于辅助生殖培养液中庆大霉素的含量测定。本研究中采用固相萃取技术处理辅助生殖培养液样品,采用柱后加碱-反相离子对色谱-脉冲安培检测法测定颗粒细胞去除液、玻璃化解冻液、全程培养液、精子冷冻液、精子制动液、精子密度梯度分离液6种样品中庆大霉素的含量,为辅助生殖培养液产品在临床前的注册检验和上市后质控中庆大霉素的定性定量提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

940 Professional IC Vario TWO / SeS / PP型离子色谱仪(瑞士Metrohm公司,配有安培检测器);CP225D型电子天平(德国Sartorius公司,精度为0.0001g);pH计(瑞士Mettler Toledo公司);WCX固相萃取小柱(美国Waters公司)。

1.2 试剂

三氟乙酸、乙腈(色谱纯,美国Honeywell公司);氢氧化钠(优级纯,德国Merck公司);98%五氟丙酸(东京化成工业株式会社);水为超纯水(电阻>18.2MΩ·cm);庆大霉素对照品(批号为130326-201716,637U/mg,分别含15.9% C₁、15.2% C_{1a}、16.9% C₂、10.3% C_{2a}),西索米星对照品(批号为130635-202102,含量按C₁₉H₃₇N₅O₇计为59.8%),均购自中国食品药品检定研究院。

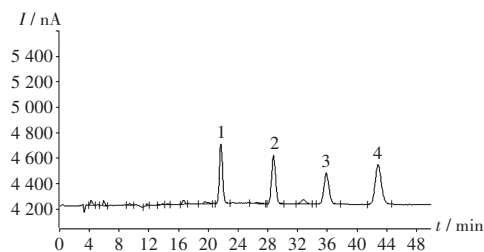
2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Apollo C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温: 35 °C;淋洗液: 水-乙腈(50:3, V/V, 1 L纯化水中加7 mL三氟乙酸、0.25 mL五氟丙酸、4 mL 50% NaOH溶液调pH至2.6,混匀,再加60 mL乙腈);淋洗液流速: 1.0 mL/min;柱后加碱溶液: 0.5 mol/L NaOH溶液;柱后加碱溶液流速: 0.3 mL/min;模式: 积分脉冲安培;范围: 200 μA;检测器温度: 35 °C;进样量: 50 μL。在此色谱条件下,系统适用性溶液中庆大霉素C_{1a}、C₂、C_{2a}、C₁的拖尾因子为1.049~1.133,分离度大于1.5,保留时间和峰面积的RSD均小于2.0%。色谱图见图1。

2.2 样品前处理与溶液制备

样品前处理: WCX固相萃取小柱使用前分别用3 mL水和3 mL甲醇活化,加1 mL辅助生殖培养液,先用3 mL水冲洗、弃去,之后用三氟乙酸-甲醇-水(1:6:100, V/V/V) 2 mL洗脱,收集洗脱液,经0.22 μm有机滤膜滤过,待离子色谱仪分析。



1. 庆大霉素 C_{1a} 2. 庆大霉素 C₂ 3. 庆大霉素 C_{2a} 4. 庆大霉素 C₁

图1 系统适用性溶液离子色谱图

1. Gentamicin C_{1a} 2. Gentamicin C₂ 3. Gentamicin C_{2a} 4. Gentamicin C₁

Fig. 1 Ion chromatogram of the system suitability solution

对照品溶液: 取庆大霉素对照品适量,精密称定,加水溶解成系列浓度的对照品溶液,现用现配。每个组分的含量按对照品标签中的百分含量进行计算。

系统适用性溶液: 取庆大霉素对照品和西索米星对照品各适量,加水溶解,制成庆大霉素、西索米星质量浓度分别为50, 10 μg/mL的系统适用性溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察与检测限、定量限确定: 取2.2项下庆大霉素对照品溶液,加水制成系列标准工作溶液,以标准工作溶液中每个组分的质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、该组分的定量离子峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表1,表明庆大霉素各组分的质量浓度与峰面积线性关系良好。以庆大霉素C组分中含量最低的C_{2a}计,以确保其中各C组分均被检出,以C_{2a}色谱峰信噪比(S/N)分别为3和10时的质量浓度确定该方法的检测限和定量限。结果庆大霉素的检测限为0.2016 μg/mL,定量限为0.6722 μg/mL; C_{2a}组分的检测限为0.0208 μg/mL,定量限为0.0692 μg/mL。

表1 线性关系考察结果(n=6)

Tab. 1 Results of the linear relation test (n=6)

庆大霉素组分	回归方程	r	线性范围(μg/mL)
C ₁	Y = 1.11685X - 7.78487	0.9996	0.550~10.996
C _{1a}	Y = 0.878349X - 10.9648	0.9999	0.526~10.512
C ₂	Y = 0.824974X - 7.80041	0.9999	0.584~11.688
C _{2a}	Y = 1.07598X - 4.91777	0.9998	0.356~7.124

加样回收试验与精密度试验: 以精子制动液作为研究对象,以外标法进行定量。向样品中分别加入质量浓度为8.43, 16.47, 24.13 μg/mL的对照品溶液,每个水平平行试验6次,按2.1项下色谱条件进样测定。结果见表2,表明仪器精密度和方法准确度均良好。

2.4 样品含量测定

取6种辅助生殖培养液(颗粒细胞去除液、玻璃化解冻液、全程培养液、精子冷冻液、精子密度梯度分离液、精子制动液),按2.2项下方法对样品进行前处理,按2.1项下色谱条件进样测定6次,按外标法计算含量。结果见表3。离子色谱图见图2,可见,不同辅助生殖

表2 精子制动液的加样回收试验和精密度试验结果 (n = 6)

样品含量(μg/mL)	加入量(μg/mL)	测得量(μg/mL)	回收率(%)	RSD(%)
11.12	8.43	19.12	94.90	3.96
11.12	16.47	27.56	99.82	2.52
11.12	24.13	33.48	92.66	3.10

表3 不同辅助生殖培养液中庆大霉素含量测定结果 (n = 6)

辅助生殖培养液	样品含量(μg/mL)	RSD(%)	辅助生殖培养液	样品含量(μg/mL)	RSD(%)
颗粒细胞去除液	17.54	2.84	精子冷冻液	-	-
玻璃化解冻液	12.60	2.43	精子密度梯度分离液	9.26	1.07
全程培养液	15.08	0.81	精子制动液	11.12	2.52

注: - 为未检出。

Note: - refers to not detected.

培养液中庆大霉素 C_{1a}, C₂, C_{2a}, C₁ 的出峰时间有差异,这是由于仪器状态、试验时间不一致所致,但均与标准品比对,确认为同一成分。

3 讨论

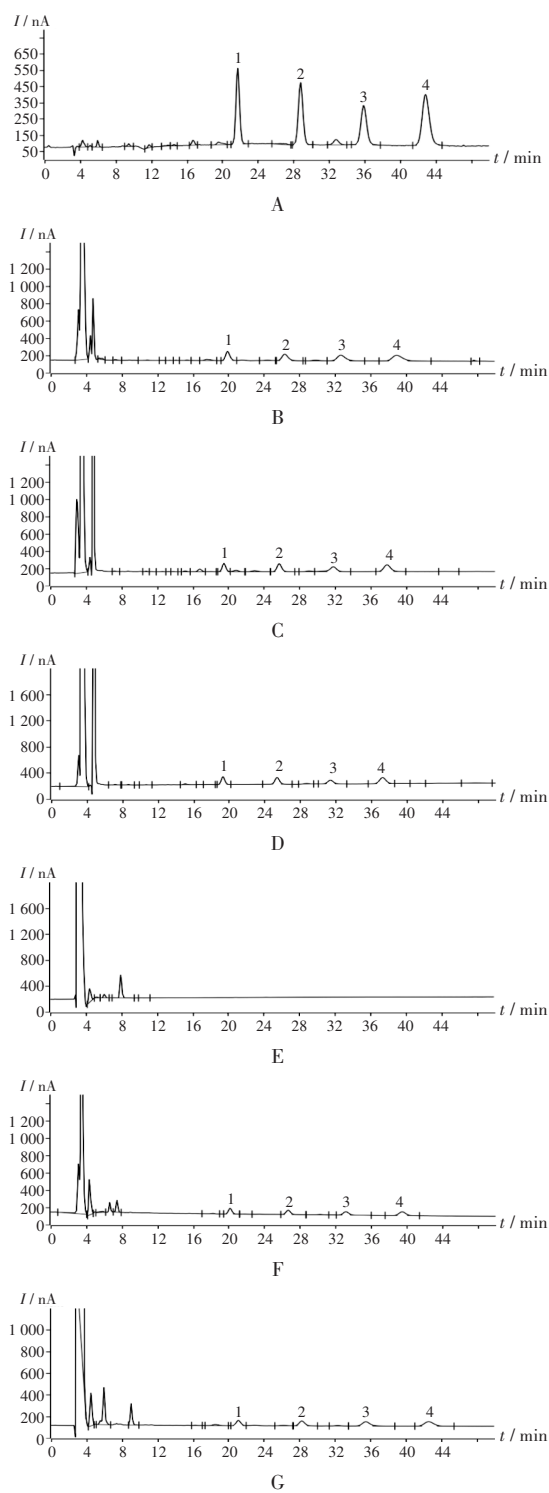
3.1 色谱条件选择

庆大霉素的结构中同时含有氨基和羟基,极性非常强,在硅胶键合十八烷基色谱柱(简称 C₁₈ 柱)上的保留较弱。而在适宜的 pH 条件下,庆大霉素的各组分及杂质分子和一些氟化试剂通过形成不同的疏水性离子对化合物在 C₁₈ 柱上被保留的强弱来实现分离^[21-22]。2023年版《美国药典》中采用反相离子对色谱-脉冲安培检测法测定庆大霉素中各组分的相对含量,该方法无流动相约束,适用范围广,无须衍生化,仅对电化学物质有响应,可避免其他干扰^[23]。为此,建立 2.1 项下色谱条件进行分析发现,该方法可满足辅助生殖培养液中庆大霉素各组分的准确定量分析。

3.2 样品前处理条件优化

前处理方法:辅助生殖培养液中含葡萄糖、蛋白质等干扰物,净化不充分会严重影响目标物的检测效果,甚至污染色谱柱和仪器。在前处理方法的选择中,分别使用超滤离心法和 WCX 固相萃取小柱净化法对样品进行前处理,比较目标物的检测效果。试验结果表明,前者色谱图中待测物附近有干扰物质,影响目标物的定量分析;后者待测物峰形良好且无干扰,可实现准确、定量分析。WCX 是以大孔 PS/DVB 为基质、经羧酸修饰的混合型弱阳离子吸附剂,其苯环有较强的疏水作用,羧基提供了弱阳离子交换的能力,可有效净化辅助生殖培养液中蛋白质等物质。故本研究中采用 WCX 固相萃取小柱对样品进行前处理。

洗脱液:为考察洗脱液配比对 WCX 固相萃取小柱洗脱辅助生殖培养液中庆大霉素效果的影响,洗脱液



1. 庆大霉素 C_{1a} 2. 庆大霉素 C₂ 3. 庆大霉素 C_{2a} 4. 庆大霉素 C₁
A. 混合对照品溶液 B. 颗粒细胞去除液 C. 玻璃化解冻液
D. 全程培养液 E. 精子冷冻液 F. 精子密度梯度分离液
G. 精子制动液

图2 不同辅助生殖培养液的离子色谱图

1. Gentamicin C_{1a} 2. Gentamicin C₂ 3. Gentamicin C_{2a} 4. Gentamicin C₁
A. Mixed reference solution B. Granular cell removal culture medium
C. Vitrification thawing solution D. Whole process culture medium
E. Sperm cryopreservation solution F. Sperm density gradient separation solution G. Sperm braking solution

Fig. 2 Ion chromatograms of different assisted reproductive media

三氟乙酸-甲醇-水分别制备2种不同配比(1:6:100, 1:12:100, V/V/V),按2.2项下方法处理精子制动液,同时分别加入质量浓度为8.43, 16.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液考察回收率;之后分别用2种洗脱液再次洗脱处理过精子制动液的WCX固相萃取小柱,考察对样品和加标品的洗脱效果。结果2种洗脱液的洗脱效果相当,样品和加标品中的庆大霉素在WCX固相萃取小柱中均有微量残留(残留量 $< 1.2 \mu\text{g}/\text{mL}$),但洗脱液为前者时的加标品回收率在80%~120%范围内,准确度较好。故本研究中洗脱液选择三氟乙酸-甲醇-水(1:6:100, V/V/V)。

洗脱液体积:WCX固相萃取小柱使用前分别用3 mL水和3 mL甲醇活化,加入1 mL样品时先用3 mL水冲洗、弃去;之后使用三氟乙酸-甲醇-水(1:6:100, V/V/V)洗脱,收集洗脱液,0.22 μm 有机滤膜滤过后直接进样测定。针对未添加庆大霉素的空白基质液、培养液和解冻液样品,分别尝试使用1, 2, 3 mL洗脱液洗脱小柱并做加标回收试验验证。结果1 mL空白基质中,庆大霉素加标至40 $\mu\text{g}/\text{mL}$,均可用1, 2, 3 mL洗脱液完全洗脱;1 mL培养液样品中,庆大霉素需2 mL以上洗脱液方可完全洗脱;解冻液样品与培养液中,庆大霉素需2倍样品量以上的洗脱液方可完全洗脱。解冻液中葡萄糖和蛋白质的含量较高,推测基体中葡萄糖和蛋白含量更高,庆大霉素的洗脱更难。可见,基体对样品中庆大霉素的洗脱影响较大,空白基体中加标1:1可完全洗脱,非空白基体中的庆大霉素需2倍样品量以上的洗脱液方可完全洗脱。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、结果准确,可避免辅助生殖培养液产品基质效应的干扰,能满足多种辅助生殖培养液中庆大霉素含量测定的要求。

参考文献

- [1] 赵丹妹,黄元礼,王春仁,等. 人类辅助生殖培养液的质量控制和安全性评价[J]. 中国医疗器械杂志, 2021, 45(6): 599-603.
- [2] VALDERA FA, NUUTILA K, VARON DE, et al. Topical Synthetic Platelets Loaded with Gentamicin Decrease Bacteria in Deep Partial-Thickness Burns[J]. J Surg Res, 2023, 291: 167-175.
- [3] ELSISI AEE, SOKAR SS, SHALABY MF, et al. Nephroprotective effects of febusostat and / or mirtazapine against gentamicin-induced nephrotoxicity through modulation of ERK 1/2, NF- κ B and MCP1[J]. Expert Rev Clin Phar, 2021, 14(8): 1039-1050.
- [4] CHATTERTON S, WANG C, SATYAN H, et al. A Prospective Study on the Vestibular Toxicity of Gentamicin in a Clinical Setting[J]. Otol Neurotol, 2022, 43(9): e1029-e1033.
- [5] KALMANSON OA, MCLOUGHLIN KC, KISER TH, et al. Debilitating Gentamicin Ototoxicity: Case Report and Recommendations Against Routine Use in Surgical Prophylaxis[J]. Ann Oto Rhinol Laryn, 2023, 132(12): 1686-1689.
- [6] 陈亮,刘天亮. 抗生素的耳毒性及其防治[J]. 中国药业, 2010, 19(7): 82-83.
- [7] O'SULLIVAN ME, SONG Y, GREENHOUSE R, et al. Dissociating antibacterial from ototoxic effects of gentamicin C-subtypes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(51): 32423-32432.
- [8] QUIROS Y, VICENTE-VICENTE L, MORALES AI, et al. An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin[J]. Toxicol Sci, 2010, 119(2): 245-256.
- [9] CHEN F, FAN W, LIN ZY, et al. Embryotoxicity evaluation of Gentamicin, an aminoglycoside antibiotic added to human embryo culture medium, using the zebrafish (*Danio rerio*) model[J]. Toxicology, 2023, 483: 153386.
- [10] 常艳,姚尚辰,胡昌勤. 《中国药典》2015年版庆大霉素C组分限度修订——从相对含量到绝对含量的飞跃[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(1): 1-15.
- [11] 姚永青,王立萍,刘英. 柱切换HPLC-ELSD法测定硫酸庆大霉素颗粒中庆大霉素C组分的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(6): 584-588.
- [12] 管瑞芹,王召旭,姜爱莉,等. 辅助生殖培养液中庆大霉素临床前安全评价思考[J]. 中国药事, 2022, 36(12): 1377-1382.
- [13] RODRIQUEZ M, CRETOSO DS, EUTERPIO MA, et al. Fast determination of underivatized gentamicin C components and impurities by LC-MS using a porous graphitic carbon stationary phase[J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407(25): 7691-7701.
- [14] 钱桂英,柏大为. 微生物检定法测定庆大霉素普鲁卡因胶囊中庆大霉素含量的不确定度分析[J]. 中国药房, 2011, 22(45): 4289-4291.
- [15] 李哲媛,康勇,范兵. 微生物比浊法测定硫酸庆大霉素注射液的效价[J]. 中国药业, 2005, 14(3): 38-39.
- [16] 刘少刚,吴洁. ELISA测定疫苗中庆大霉素含量的结果评价分析[J]. 中外医疗, 2011, 30(17): 128-129.
- [17] 张富东,余敏灵,袁茂华,等. 硫酸庆大霉素注射液C组分含量测定方法的改进[J]. 华西药学杂志, 2023, 38(4): 416-418.
- [18] 高燕霞,姜建国,张西如. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定硫酸庆大霉素注射剂中有关物质[J]. 中国药业, 2010, 19(6): 20-21.
- [19] 黄冬菊,林红华. 紫外分光光度法测定硫酸庆大霉素含量[J]. 福建畜牧兽医, 2001, 23(6): 43.
- [20] 黄冬菊,林红华,丘建华. 旋光法测定硫酸庆大霉素含量[J]. 福建畜牧兽医, 2002, 24(4): 2.
- [21] 于敏,张双庆,李佐刚,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定庆大霉素C组分含量及各组分响应因子[J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39(2): 122-127.
- [22] 李玮,胡昌勤,王明娟. 高效液相色谱法测定庆大霉素C组分的不同检测方式测定结果的比较[J]. 色谱, 2007, 25(4): 557-561.
- [23] 习玲玲,朱岩. 反相离子对色谱-脉冲安培电化学法测定硫酸庆大霉素中各组分含量[J]. 分析化学, 2006, 34(12): 1763-1766.

(收稿日期:2023-12-06;修回日期:2024-08-16)