

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.03.06

离子色谱法测定酒石酸沃尼妙林中酒石酸的含量

张 骊, 王 轩, 赵 晖, 沈 昕, 王鹤佳, 顾进华*, 朱馨乐*

(中国兽医药品监察所(农业农村部兽药评审中心), 北京 100081)

[收稿日期] 2023-11-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 03-0038-06 [中图分类号] S859.2

[摘 要] 建立离子色谱-抑制电导检测法测定化学对照品中酒石酸盐的含量。以酒石酸沃尼妙林对照品为例, 采用 Dionex IonPac™ AS19 (4 × 250 mm) 阴离子交换色谱柱和 Dionex IonPac™ AG18 (4 × 50 mm) 保护柱, 以 22 mmol/L 氢氧化钾溶液为流动相, 流速为 1.0 mL/min 等度洗脱, 抑制电导检测器检测, 测定酒石酸盐中酒石酸的含量。结果表明, 该方法在 1.0 ~ 50 µg/mL 浓度范围内线性关系良好 ($r = 0.999$), 定量限为 0.5 µg/mL, 酒石酸沃尼妙林在 3 个水平的加样回收率分别为 98.79%、98.91% 与 96.50%, 平均回收率为 98.07% ($RSD = 2.20\%$, $n = 9$)。用此方法测定 3 个厂家共 5 批样品, 酒石酸沃尼妙林中酒石酸含量的数值与理论值基本一致。本文建立的离子色谱法准确、灵敏, 可用于酒石酸盐成盐比例与含量的测定。

[关键词] 离子色谱法; 化学对照品; 酒石酸; 酒石酸沃尼妙林

Determination of Tartaric Acid in Valnemulin Hydrogen Tartrate by Ion Chromatography

ZHANG Li, WANG Xuan, ZHAO Hui, SHEN Xin, WANG He-jia, GU Jin-hua*, ZHU Xin-le*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: ZHU Xin-le, E-mail: flyiyletter20088@163.com; GU Jin-hua, E-mail: Gujinhua@sohu.com

Abstract: To establish an ion chromatography method with suppressed conductivity detection for the tartaric acid determination in the chemical reference standards the tartaric acid content of valnemulin hydrogen tartrate was determined by an Dionex IonPac™ AS19 (4 × 250 mm) anion exchange column and Dionex IonPac™ AG18 (4 × 50 mm) guard column, using suppressed conductivity detector. An isocratic eluent of 22 mmol/L KOH was chosen as mobile phase, flow rate was 1.0 mL/min. Results manifested that a good linear relationship was observed within the range of 1.0 ~ 50.0 µg/mL ($r = 0.999$, $n = 6$). The limit of quantification was 0.5 µg/mL. The average spiked recovery was 98.07% at three concentration levels with RSD of 2.20% ($n = 9$). Five batches of in valnemulin hydrogen tartrate samples from 3 manufactures were tested using this validated method, and the contents of tartaric

基金项目: 中国兽医药品监察所兽药行业公益性重点专项 (GY202107)

作者简介: 张 骊, 副研究员, 从事兽药残留检验与安全评价研究。

通讯作者: 朱馨乐, E-mail: flyiyletter20088@163.com; 顾进华, E-mail: Gujinhua@sohu.com

acid were basically consistent with the theoretical values. The method is accurate and sensitive, which provides a reliable analytical method for the control of the proportion and content of the tartaric acid salts.

Key words: ion chromatography; chemical reference standards; tartaric acid; valnemulin hydrogen tartrate

盐酸沃尼妙林是新一代截短侧耳素(pleuromutilin)类半合成的动物专用抗生素,对霉形体、细菌及螺旋体都有良好的抗菌活性^[1-2]。目前,盐酸沃尼妙林的含量测定主要采用《欧洲药典》收载的检测方法,所采用的标准品为酒石酸沃尼妙林。经国家兽药基础数据库查询,国内有上百家兽药企业生产并申报了沃尼妙林原料和制剂,相应产品质量控制的关键项目——含量测定项需使用酒石酸沃尼妙林标准品,目前有国内企业提供和 EP 级 2 种标准品,由于酒石酸沃尼妙林是成盐化合物,其活性化合物与成盐离子的比例与物质的溶解性、pH 值等质量指标密切相关,是影响标准物质质量的关键因素之一^[3-7]。为加强沃尼妙林产品的生产及质量控制,有必要对酒石酸沃尼妙林标准品中酒石酸的含量及成盐比例进行研究。

离子色谱法是无机离子、有机小分子离子检测的常用方法,具有分析快速、灵敏度高、专属性好、结果准确可靠等特点,用于药物质量控制和分析^[8-17]。本研究建立了离子色谱-电导检测器法检测酒石酸沃尼妙林中酒石酸的含量测定方法,计算酒石酸沃尼妙林中酒石酸的成盐比例,为评价化合物成盐率的合理性提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 仪器与设备 Dionex Aquion 离子色谱仪,配有 AERS-4 mm 型电导检测器,美国 Thermo Scientific 公司;AG-285 电子天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;FE 20 台式 pH 计,瑞士梅特勒-托利多公司;Advantage A10 超纯水系统,法国 Millipore 公司。

1.2 试剂与药品 酒石酸沃尼妙林(批号 K1390908,含量 98.6%)来自中国兽医药品监察所,其原料源于企业;酒石酸沃尼妙林 EP 对照品(批号 1.0,含量 98.7%)购自 EDQM(欧洲药品质量管理局);酒石酸沃尼妙林(批号分别为:20230710、20230725、20230822)为中国兽医药品监

察所自研,D-(-)酒石酸(批号 T0026),购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; SO_4^{2-} 标准溶液(批号 GBW(E)080267,含量 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),购自中国计量科学院;氢氧化钾淋洗液(Dionex EGC III KOH,序列号 161240299015),购自 Thermo Scientific 公司;水为纯化水。

1.3 溶液制备

1.3.1 系统适用性溶液 精密量取 SO_4^{2-} 标准溶液 1.0 mL 置 100 mL 量瓶中,用纯化水稀释至刻度,摇匀,精密取 1.0 mL 置 100 mL 量瓶中,加入 D-(-)酒石酸约 20 mg,用纯化水稀释至刻度,摇匀,精密量取 1.0 mL 置 20 mL 量瓶中,用纯化水稀释至刻度,摇匀。

1.3.2 标准溶液的制备 精密称取 D-(-)酒石酸约 100 mg 置 100 mL 量瓶中,用纯化水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为储备液。

1.3.3 供试品溶液的制备 精密称取酒石酸沃尼妙林供试品约 484 mg 置 100 mL 量瓶中,用纯化水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 5.0 mL 置 50 mL 量瓶中,用纯化水稀释至刻度,摇匀。

1.4 色谱条件 采用 Dionex IonPacTM AS19(4 × 250 mm)阴离子交换色谱柱,Dionex IonPacTM AG18(4 × 50 mm)保护柱,以淋洗液发生器产生的 22 mmol/L 氢氧化钾溶液做流动相,等度洗脱,流速 1.0 mL/min,检测方式为抑制电导检测,检测池温度 35 $^{\circ}\text{C}$,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样体积 10 μL ,采用 Chromeleon 7.0 色谱工作站用于数据采集与处理。

2 结果与分析

2.1 专属性试验 取空白溶剂(纯化水)、1.3.1 项下系统适用性溶液各 20 μL 注入离子色谱仪,记录色谱图。结果表明,空白溶剂不干扰酒石酸的检测,系统适用性溶液中酒石酸离子色谱峰的保留时间为 19.24 min,硫酸根离子色谱峰的保留时间为

16.20 min, 硫酸根离子与酒石酸根离子的分离度 >2.0, 表明方法专属性较好, 色谱图见图 1。

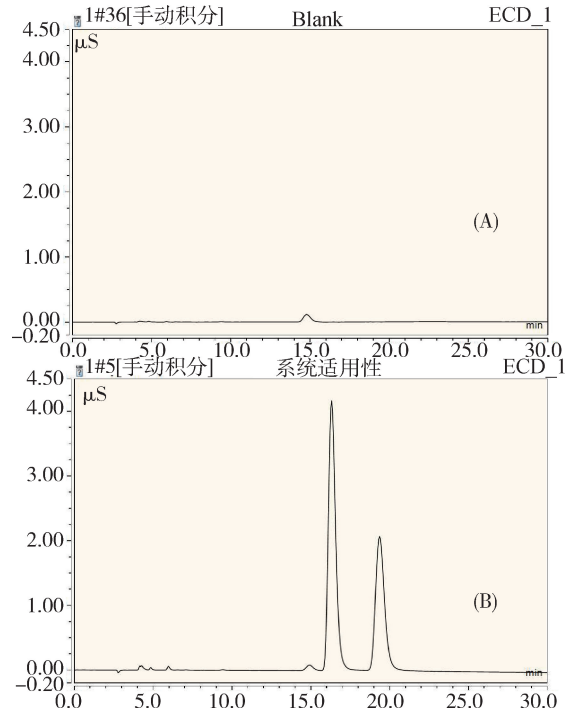


图 1 空白溶剂 (A)、系统适用性溶液 (B) 离子色谱图

Fig 1 Ion chromatograms of blank solution (A) and system suitability solution (B)

2.2 方法学的考察

2.2.1 线性关系考察 分别精密量取酒石酸储备液 5、2、1 mL 置于不同 100 mL 量瓶中, 用纯化水稀释并定容, 作为标准曲线溶液①、②、③(分别相当

于酒石酸浓度为 50、20、10 μg/mL), 再精密量取标准曲线溶液①、②、③各 10 mL 置于不同 100 mL 量瓶中, 用纯化水稀释并定容作为标准曲线溶液④、⑤、⑥(分别相当于 5、2、1 μg/mL)。以标准曲线溶液①~⑥所做色谱图的峰面积 A 对质量浓度 C 进行线性回归, 得回归方程: $Y = 0.1179x + 0.0587$, 相关系数 $r^2 = 0.999$, 表明酒石酸在 1~50 μg/mL 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.2 回收率试验 精密称取酒石酸沃尼妙林供试品(批号 20230725)约 100 mg 至 200 mL 量瓶中, 再分别精密称取 D - (-) 酒石酸约 16.8、21.0、25.2 mg 置于不同 200 mL 量瓶中, 用纯化水溶解并定容; 精密量取 5.0 mL 至 50 mL 量瓶中, 用纯化水稀释至刻度, 摇匀, 制成低(80%)、中(100%)、高(120%) 3 个质量浓度的加样回收率试验供试品溶液, 每个浓度水平配制 3 份。精密称取 D - (-) 酒石酸约 21.0 mg 置 200 mL 量瓶中, 加纯化水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 取 5.0 mL 至 50 mL 量瓶中, 用纯化水稀释至刻度, 摇匀, 作为加样回收率试验对照品溶液。取供试品溶液和对照品溶液各 10 μL 注入离子色谱仪, 按 1.4 项色谱条件进行测定, 记录色谱图, 结果见表 1。三批的平均回收率分别为 98.79%、98.91% 与 96.50%。酒石酸是平均加样回收率为 98.07%, RSD 为 2.20% (n=9), 表明方法回收率良好。

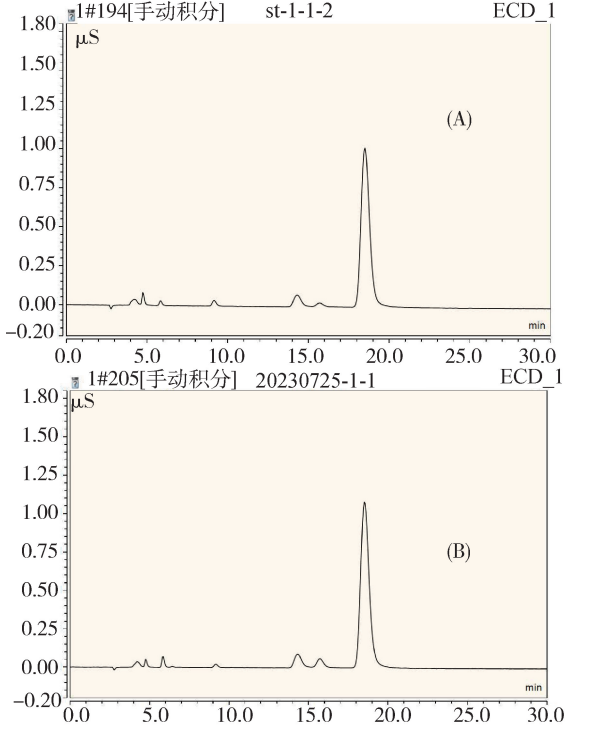
表 1 酒石酸加样回收率测定结果

Tab 1 Results of the recovery test of tartaric acid										
组别	样品含量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加入量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	批平均 回收率/%	回收率/%	RSD/ %	平均回收 率/%	平均 RSD/%		
低浓度	10.460	8.026	18.507	100.3	98.79	2.91	98.07	2.20		
	10.410	8.058	18.516	100.6						
	10.410	8.074	18.118	95.47						
	10.429	10.051	20.462	99.82						
中浓度	10.468	10.098	20.266	97.03	98.91	1.65				
	10.456	9.986	20.431	99.89						
	10.409	12.086	21.881	94.92						
	10.420	12.012	22.174	97.85					96.50	1.53
高浓度	10.410	12.084	22.100	96.74						

2.2.3 精密度与重复性试验 取 2.2.1 项下标准曲线溶液③,连续进样 6 次,酒石酸峰面积的 *RSD* 为 1.20%;精密称取酒石酸沃尼妙林适量,配制 6 份酒石酸浓度约为 21 μg/mL 的溶液,测定酒石酸含量分别为 20.47%、20.52%、21.42%、20.75%、20.29%、21.33%,平均值为 20.80%,*RSD* 为 2.27% (*n* = 6)。结果表明精密度与重复性良好。

2.2.4 定量限和检测限考察 取酒石酸标准曲线溶液,逐步稀释,按信噪比大于 10 计算,酒石酸的定量限为 0.5 μg/mL,按信噪比大于 3 计算,酒石酸的检测限为 0.3 μg/mL。

2.3 样品测定 按 1.3 项溶液制备,按 1.4 项色谱条件进行测定,典型色谱图见图 2,采用单点校正计算样品中酒石酸的含量,样品中的酒石酸含量的理论数值按分子式中所含酒石酸百分含量计,并按照以下式计算成盐率:成盐率计算公式 = (酒石酸% / 150.1) / (沃尼妙林% / 564.8),结果见表 2。



A 酒石酸对照品溶液;B 供试品溶液(批号:20230725)

图 2 酒石酸对照品溶液、酒石酸沃尼妙林供试品溶液色谱图
Fig 2 Chromatograms of tartaric acid reference standard solution(A) and sample solution (batch: 20230725) (B)

表 2 样品中酒石酸的含量测定结果

Tab 2 Results of the content of tartaric acid in the samples

生产厂家	批号	含量	成盐率	<i>RSD</i> /%	理论值
酒石酸沃尼妙林 EP	1.0	21.17	1.01		
酒石酸沃尼妙林自研 1	20230710	20.95	1.01		
酒石酸沃尼妙林自研 2	20230725	21.07	1.02	20.99	
酒石酸沃尼妙林自研 3	20230822	20.94	1.01		
酒石酸沃尼妙林	K0390908	20.54	0.991		

3 讨论与结论

本研究报道了离子色谱 – 电导检测器法测定酒石酸沃尼妙林中酒石酸含量,该方法灵敏度高,准确度好。采用建立的离子色谱法测定自研的 3 批次酒石酸沃尼妙林原料与 EP 对照品和企业提供的酒石酸沃尼妙林产品中的酒石酸含量,上述 5 批样品的测定结果表明,酒石酸的含量在 20.54% ~ 21.07% 范围,成盐率在 0.991 ~ 1.02 范围。由酒石酸沃尼妙林的结构式可知,当酒石酸沃尼妙林完全成盐时,酒石酸离子与沃尼妙林的理论摩尔比为 1:1。实际产品检测结果与其理论值基本一致,说明这些样品中酒石酸含量较为合理,成盐状态良好,成盐工艺适宜。为探索沃尼妙林成盐工艺的优劣,实际应用中有必要测定酒石酸沃尼妙林中的酒石酸离子含量,并计算酒石酸与沃尼妙林摩尔数比。本文通过建立离子色谱 – 抑制电导检测器法测定酒石酸沃尼妙林中酒石酸含量,考察了不同企业样品。以上结果对了解国内外生产的酒石酸沃尼妙林产品情况、评价产品的质量,促进企业提高产品质量具有一定的指导意义和实用价值。

此外,在化学对照品标定中,通常需要采用多种方法对照品的赋值进行分析和确证。在采用质量平衡法对化学对照品进行赋值时,通常无法采用 HPLC 色谱法直接测定成盐离子。因此在实际标定工作中,需要建立一个通用,准确的检测方法对成盐情况进行测定。因离子抑制色谱(IC)具有快速、方便、灵敏度高,分离柱的稳定性好、容量高、样品用量少,易实现自动化等优点,因此本文以酒石酸沃尼妙林为例建立的离子色谱法测定酒石酸含量的检测方法,专属性强、准确度和灵敏度高,可为酒

石酸沃尼妙林的质量控制提供参考,为化学对照品准确赋值提供另一项技术保证。

参考文献:

- [1] 杨秀玉,岳光,黄显会,等.沃尼妙林注射液的研制[J]. 中国兽医科学,2009,39(09):830-834.
Yang X Y, Yue G, Huang X H, *et al.* Development of valnemulin injection prescription [J]. Chinese Veterinary Science, 2009, 39 (09):830-834.
- [2] 邹懿,黄宇琪,胡昌华.截短侧耳素及其衍生物的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 2(34):65-73.
Zou Y, Huang Y Q, Hu C H. Progress in research of pleuromutilin and its derivative [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2009, 2(34):65-73.
- [3] 陈茜,伍雯琦,高丹玲.离子色谱法测定阿洛西林钠中钠离子含量与成盐率考察[J]. 海峡药学,2021,33(11):77-80.
Chen Q, Wu W Q, Gao D L. Determination of sodium ion and salt-forming rate in azlocillin sodium by ion chromatography [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2021, 33(11):77-80.
- [4] 刘朝霞,何兰,丁丽霞.国内离子色谱技术在化学药品质控中的应用[J]. 中国药师,2016,19(05):966-969.
Liu Z X, He L, Ding L X. Domestic application of ion chromatography in quality control of chemical drugs [J]. China Pharmacist, 2016, 19(05):966-969.
- [5] 闻宏亮,赵敬丹,秦峰,等.离子色谱法测定头孢噻吩钠中钠离子含量以及成盐率考察[J]. 中国药师,2015,18(02):212-215.
Wen H L, Zhao J D, Qin F, *et al.* Determination of sodium ion and salt-forming rate in cefalotin sodium by ion chromatography [J]. China Pharmacist, 2015, 18(02):212-215.
- [6] 钱敏,耿志旺,彭茗,等.离子色谱法测定头孢曲松钠中的钠离子含量以及成盐率[J]. 药物分析杂志,2015,35(03):435-439.
Qian M, Geng Z W, Peng M, *et al.* Determination of sodium ion and salt-forming rate in ceftriaxone sodium by ion chromatography [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(03):435-439.
- [7] Fang Z Y, Zhang B, Xing W H, *et al.* A series of stable, metastable and unstable salts of Imatinib with improved solubility [J]. Chinese Chemical Letters, 2022, 33(4):2159-2164.
- [8] 张雅军,陈忠兰,王青,等.离子色谱法测定盐酸莫西沙星中氯离子含量[J]. 中国药品标准,2021,22(03):235-237.
Zhang Y J, Chen Z L, Wang Q, *et al.* Determination of chloride ion in moxifloxacin hydrochloride by ion chromatography [J]. Drug Standards of China, 2021, 22(03):235-237.
- [9] 戴冬艳,朱静,吴珺,等.离子色谱法测定口服补液盐散(Ⅲ)中总氯和枸橼酸钠[J]. 现代药物与临床,2023, 38(06):1374-1377.
Dai D Y, Zhu J, Wu J, *et al.* Determination of total chloride and sodium citrate in Oral Rehydration Salt Powder (Ⅲ) by ion chromatography [J]. Drugs & Clinic, 2023, 38(06):1374-1377.
- [10] 严翠霞,张颖,孙珍,等.离子色谱法同时测定醋酸阿托西班原料药及其注射液中的三氟乙酸与乙酸[J]. 中国医药工业杂志,2023, 54(01):135-140.
Yan C, Zhang Y, Sun Z, *et al.* Simultaneous determination of trifluoroacetic acid and acetic acid in atosiban acetate bulk drug and its injection by ion chromatography [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2023, 54(01):135-140.
- [11] 邵方娴,储焜婧,陈民辉.离子色谱法测定聚苯乙烯磺酸钙散剂中的钠、钙含量及钾交换量[J]. 药物分析杂志,2022, 42(09):1570-1576.
Shao F X, Chu Y J, Chen M H. Determination of sodium, calcium and potassium exchange capacity in calcium polystyrene sulfonate by ion chromatography [J]. Chin J Pharm Anal, 2022, 42(09):1570-1576.
- [12] 于海英,牛水蛟,李俊婕,等.离子排斥色谱法测定药用软膏及乳膏中硼酸及硼砂的含量[J]. 药物分析杂志,2022, 42(07):1209-1215.
Yu H Y, Niu S J, Li J J, *et al.* Determination of boric acid and borax in ointment and cream drugs by ion exclusion chromatography [J]. Chin J Pharm Anal, 2022, 42(07):1209-1215.
- [13] 夏雪琴,罗钰颖,吕尚,等.离子色谱法同时测定乌梅中4种有机酸的含量[J]. 江西中医药大学学报,2022, 34(03):68-72.
Xia X Q, Luo Y Y, Lv S, *et al.* Determination of four organic acids in fructus mume by ion chromatography [J]. Journal of Jiangxi University of CM, 2022, 34(03):68-72.
- [14] 夏颖,严菲,李耕,等.离子色谱法测定环硅酸铝钠散中总钠和游离钠[J]. 中南药学,2022, 20(03):620-622.
Xia Y, Yan F, Li G, *et al.* Determination of total and free sodium in sodium zirconium cyclosilicate powder by ion chromatography [J]. Central South Pharmacy, 2022, 20(03):620-622.
- [15] 王春霞,盖成,王子梦,等.离子色谱法测定依达拉奉注射液中亚硫酸盐[J]. 化学分析计量,2023,32(08):85-89.
Wang C X, Ge C, Wang Z M, *et al.* Determination of sulfite ion

of edaravone injection by ion chromatography [J]. Chemical Analysis and Meterage, 2023, 32 (08):85 – 89.

[16] 王 娟,谢雨泽,李 赞,等. 离子色谱 – 串联质谱法测定茶叶中的氯酸盐和高氯酸盐[J]. 河北省科学院学报,2023,40(05): 57 – 63.

Wang J, Xie Y Z, Li Z, *et al.* Determination of chlorate and perchlorate in tea by ion chromatography – tandem mass spectrometry [J]. Journal of the Hebei Academy of Science, 2023, 40 (05):57 – 63.

[17] 刘朝霞,李 婕,吴健敏,等. 离子色谱法测定盐酸伐昔洛韦中的氯离子 [J]. 中国新药杂志,2017, 26 (03):271 – 273.

Liu Z X, Li J, Wu J M, *et al.* Determination of chloride ion in valacyclovir hydrochloride by ion chromatography [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2017, 26 (03):271 – 273.

(编 辑:侯向辉)