

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.8.10

高效液相色谱法测定二甲基半胱胺截短侧耳素的研究

李金明, 黄 凯*, 李 冀, 魏丽娟

(河北远征药业有限公司 河北省兽药工程技术研究中心, 石家庄 050041)

[收稿日期] 2016-12-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 08-0059-03 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 建立了以高效液相色谱法测定盐酸沃尼妙林关键中间体二甲基半胱胺截短侧耳素含量的检测方法, 色谱条件为 SepaxC18 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 3 μ m) 流动相为乙腈-磷酸缓冲液 (pH2.5) ($V/V=40:60$), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 205 nm。对该检测方法进行了系统适用性、线性、精密度、重现性稳定性、检测限、定量限以及回收率的考察, 结果均良好, 提示该方法可以用于盐酸沃尼妙林关键中间体的含量检测。

[关键词] 高效液相色谱法; 盐酸沃尼妙林中间体; 二甲基半胱胺截短侧耳素; 含量测定

Determination of Dimethyl Cysteaminy Pleuromulin by HPLC

LI Jin-ming, HUANG Kai*, LI Ji, WEI Li-juan

(HeBei Yuanzheng Pharmaceutical Co., LTD, Hebei Engineering Research Center of Veterinary Drugs, Shijiazhuang 050041, China)

Corresponding author: HUANG Kai, E-mail: 634601790@qq.com

Abstract: An HPLC method for the determination of dimethyl cysteaminy pleuromulin, a key intermediate of valnemulin hydrochloride, was established. The mobile phase consisted of acetonitrile-phosphate buffer (pH2.5) ($V/V=40:60$) with a flow rate of 1 mL/min and a detection wavelength of 205 nm. The chromatographic conditions were SepaxC18 (150 mm×4.6 mm, 3 μ m). The linearity, precision, reproducibility, detection limit, quantitation limit and recovery rate of the method were tested. The results were reproducible and could be applied to the content control of the key intermediates of valnemulin hydrochloride.

Key words: HPLC; intermediates of valnemulin hydrochloride; dimethyl cysteaminy pleuromulin; content determination

盐酸沃尼妙林 (ValnemuLin Hydrochloride) 属截短侧耳素类的半合成抗生素, 主要用于猪支原体肺炎、猪痢疾、猪结肠炎和猪回肠炎的治疗的动物专用抗生素类药物, 能够有效的避免人畜的交叉耐药性, 且其具有广谱、高效、低残等优点^[1]。盐酸沃尼妙林是第一个全欧洲批准的药用预混剂, 应用非

常的广泛。

盐酸沃尼妙林是由二甲基半胱胺截短侧耳素与 D-缬氨酸邓盐合成得到^[2], 二甲基半胱胺截短侧耳素的含量以及投料量将会对产品的质量造成较大的影响, 而目前在国内外未发现对其利用高效液相色谱法检测的报道^[3-4]。本研究旨在通过高效

作者简介: 李金明, 高级工程师, 从事兽药研发工作。

通讯作者: 黄 凯。E-mail: 634601790@qq.com

液相色谱法对二甲基半胱胺截短侧耳素的含量进行检测,从而进一步保证产品盐酸沃尼妙林的质量。

1 材 料

1.1 仪器 Agilent1100 高效液相色谱仪, SepaxC18 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 3 μm)。

1.2 样品 二甲基半胱胺截短侧耳素为河北远征药业有限公司生产,批号:20130902、20130910、20130918。二甲基半胱胺截短侧耳素对照品:自制样品经精制,并经 european pharma-copoeia 对照品标定后使用;含量:99.1%。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[5-6] 流动相:乙腈-磷酸缓冲液(pH2.5)(V/V=40:60),磷酸缓冲液(pH2.5):取0.94 g 磷酸氢二钠和8.7 g 磷酸二氢钾溶于适量水中,并加水至1000 mL,磷酸调pH至2.5。稀释液:乙腈-水(50:50)检测波长:205 nm;柱温:45℃,流速:1 mL/min;进样量:10 μL。

2.2 样品制备 取二甲基半胱胺截短侧耳素 40 mg,精密称定,置50 mL量瓶中,加50%乙腈水溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取10 μL注入液相色谱仪,记录色谱图(图1);另取二甲基半胱胺截短侧耳素对照品50 mg,同法测定(图2)。

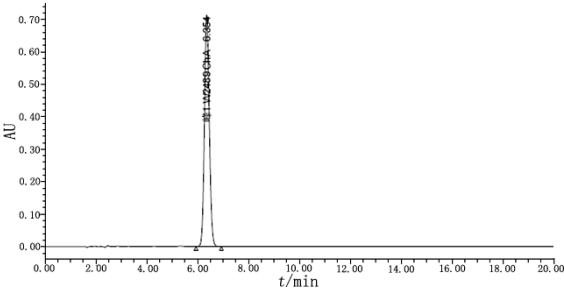


图 1 对照品色谱图

Fig 1 Chromatogram of reference substance

2.3 系统适用性试验 在此色谱条件下,二甲基半胱胺截短侧耳素峰的理论塔板数6000以上。

2.4 线性范围考察 取二甲基半胱胺截短侧耳素精制品约40 mg,精密称定,置50 mL量瓶中,加乙腈:水(50:50)溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量

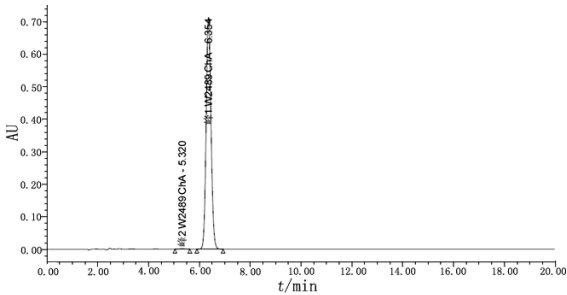


图 2 供试品色谱图

Fig 2 Chromatogram of test sample

取2.0、5.0、10.0 mL分别置50 mL量瓶中,加乙腈:水(50:50)稀释至刻度,摇匀;再精密称取100 mg、250 mg至50 mL量瓶中,摇匀。量取上述溶液各10 μL分别注入液相色谱仪,记录色谱图,量取峰面积,由峰面积(y)对溶液浓度(x)线性回归,得回归方程,结果见表1。结果表明:在0.03208~8.006 mg/mL浓度间,本法的线性良好。

表 1 线性与范围及相关系数测定结果

Tab 1 Results of linearity and range and correlation coefficients

溶液浓度 /(mg·mL ⁻¹)	峰面积	回归方程
0.03208	75.5	$y = 2179x + 56.81$ $R = 0.9999$
0.08020	192.9	
0.16040	381	
0.80200	1869.2	
2.00000	4514.5	
4.99200	10883.6	
8.00600	17503	

2.5 精密度、重现性及溶液稳定性实验

2.5.1 精密度试验 取精制品适量,精密称定,用流动相溶解并稀释,制成每1 mL约含二甲基半胱胺截短侧耳素0.8 mg的溶液,摇匀,作为供试溶液。每次进样10 μL,重复6次,对应峰面积分别是1841.8、1867.4、1824.1、1824.6、1847.2、1851.4, RSD为0.90%,表明本法精密度良好。

2.5.2 重现性考察 取本品,分别精密称定 6 份,用流动相溶解并稀释,制成每 1 mL 约含二甲基半胱胺截短侧耳素 0.8 mg 的溶液,摇匀,作为供试溶液。每次进样 10 μ L,对应含量分别为 94.2%、94.4%、94.1%、94.5%、95.0%、94.3%,*RSD* 值为 0.34%。结果表明,本法重现性良好。

2.5.3 稳定性考察 分别取二甲基半胱胺截短侧耳素于日内(0、2、4、6、8、12 h)测定,考察溶液的稳定性,对应峰面积分别是 1839.8、1850.3、1857.3、1848.8、1811.6、1829.1,*RSD* 为 0.91%。结果表明,二甲基半胱胺截短侧耳素常温下放置稳定,室温放置 12 h,盐酸沃尼妙林含量几乎无变化。

2.6 检测限和定量限的测定 取空白基线一段,测量其噪音峰高,再将供试品溶液稀释成适当浓度,量取 10 μ L 进样,以信噪比(*S/N*)为 3 时的浓度作为最低检测限浓度,并计算其最低检测限,经检测,其最低检出量为 0.15 μ g/mL。

取空白基线一段,测量其噪音峰高,再将供试品溶液稀释成适当浓度,量取 10 μ L 进样,以信噪比(*S/N*)为 10 时的浓度作为定量测定的最低浓度,经检测,其定量限为 0.25 μ g/mL。

2.7 回收率试验 分别精密称取二甲基半胱胺截短侧耳素对照品,置 50 mL 量瓶中,用 50 %乙腈水溶液稀释至刻度,摇匀,配成高(960 μ g/mL)、中(800 μ g/mL)、低(640 μ g/mL)三个浓度,按含量测定法进样,测定结果依次为 31.56、31.89、31.80、41.76、42.30、41.96、47.68、47.86、47.75 mg,计算得二甲基半胱胺截短侧耳素的回收率为 99.58%,*RSD* 为 0.55%(*n*=9)。结果表明,本法回收率效果良好。

3 讨论与结论

在对盐酸沃尼妙林的关键中间体二甲基半胱胺截短侧耳素的检测中运用了高效液相色谱法进行检测,并对其进行了系统适用性实验、线性范围、精密度、重现性、检测限等项目进行了考察,发现该方法适用性、准确性、重复性都能够满足质量控制的要求,且利用高效液相色谱能够更加直观、灵敏度高、适用性广泛。

通过本方法,对本公司生产的 20130409、20130418、20130424 三批中试二甲基半胱胺截短侧耳素进行了含量测定,其含量(以无水物计%)分别为 98.38%、98.64%、98.12%。

综上所述,运用该色谱条件对盐酸沃尼妙林的关键中间体二甲基半胱胺截短侧耳素进行检测,能够简单有效且直观的测定其含量,从而为合成盐酸沃尼妙林提供准确的实验数据,进一步保证产品盐酸沃尼妙林的质量。

参考文献:

- [1] 徐福亮,袁延文. 介绍一种新的动物专用抗生素-盐酸沃尼妙林及其在猪病防治上的应用[J]. 中国动物保健, 2005, (12): 40-42.
Xu F L, Yuan Y W. Introduction to a new animal-specific antibiotic, valnemulin hydrochloride and its application in the prevention and control of pig disease[J]. China Animal Health, 2005, (12): 40-42.
- [2] 吴汝林,王倩茹. 盐酸沃尼妙林的工艺研究[J]. 现代化工, 2009, 29(12): 60-61.
Wu R L, Wang Q R. Study on preparation of valnemulin hydrochloride[J]. Modern Chemical Industry, 2009, 29(12): 60-61.
- [3] 刘波,李金明,杨芳. 沃尼妙林及其盐酸盐的制备方法:中国, 101597248A[P]. 2009-12-09.
Liu B, Li J M, Yang F. The preparation method of valnemulin and its hydrochloride: China, 101597248A [P]. 2009-12-09.
- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. 2010 年版.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. China Veterinary Pharmacopoeia[S]. 2010 edition.
- [5] 金学平,吴旭乾,阮建兵,等. 截短侧耳素制备方法的研究概况[J]. 中国医药科学, 2012, 2(9): 69-70.
Jin X P, Wu X Q, Ruan J B, et al. Research progress on preparation of pleuromulin[J]. China Medicine and Pharmacy, 2012, 2(9): 69-70.
- [6] 吴雪萍,孙凤霞,苏为科,等. 截短侧耳素的 HPLC 测定[J]. 河北科技大学学报, 2008, 29(1): 30-33.
Wu X P, Sun F X, Su W K, et al. Determination of pleuromulin by HPLC[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2008, 29(1): 30-33.