

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.09.05

替米考星含量测定方法的改进研究

王 轩, 杨秀玉, 韩宁宁, 戴 青, 汪 霞, 赵 晖*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2021-03-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 09-0031-06 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 建立了高效液相色谱法测定替米考星原料及其制剂的中替米考星的含量。采用 C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以 10% 三氟乙酸-乙腈(65-35)为流动相, 流速 1.0 mL/min, 进样量 10 μL, 检测波长为 280 nm, 柱温 30 ℃。结果表明, 当替米考星浓度为 0.01 ~ 2.0 mg/mL 时, 替米考星顺式峰和反式峰面积和与浓度线性关系良好($R^2 = 0.9998$), 无杂质干扰, 重复性、稳定性和精密度的相对标准偏差 < 0.8%, 检出限为 0.8 μg/mL, 替米考星顺式峰和反式峰的分离度符合规定, 顺-8-差向异构体能够实现良好分离。该方法操作简便, 准确度高, 重复性好, 提高了替米考星及其制剂质量控制的检测效率, 为其质量标准的改进提供了依据。

[关键词] 高效液相色谱法; 含量测定; 替米考星

Improved Method for Determination of Tilmicosin

WANG Xuan, YANG Xiu-yu, HAN Ning-ning, DAI Qing, WANG Xia, ZHAO Hui*

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

Corresponding author: Zhao Hui, E-mail: 171977364@qq.com

Abstract: A method was established for the determination of tilmicosin and its preparations, including premix, injection, and solution by the high-performance liquid chromatography. C18 column was applied (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of 10% trifluoroacetic acid-acetonitrile (65-35) at a flow rate of 1.0 mL/min. The injection volume was 10 μL, the detection wavelength was 280 nm, the column temperature was 30 ℃. The results showed a good linear relationship was achieved in the range of 0.01 ~ 2.0 mg/mL ($R^2 = 0.9998$). The RSDs of precision, stability, and reproducibility were lower than 0.8%. The limit of detection was 0.8 μg/mL. The resolution between *cis*-form and *trans*-form tilmicosin was more than 1.5. Moreover, the *cis*-8-epimer could be separated effectively. This method could improve the detection efficiency with convenient operation, high accuracy, and good reproducibility, which provides methodological basis for improving and promoting the quality standards.

Key words: high-performance liquid chromatography; determination; tilmicosin

基金项目: 北京市科学技术协会青年人才托举工程项目

作者简介: 王 轩, 硕士, 主要从事兽药抗生素检测与研究。

通讯作者: 赵 晖。Email: 171977364@sina.com

替米考星($C_{46}H_{80}N_2O_{13}$)是一种动物专用的大环内酯类抗生素,主要用于治疗胸膜肺炎放线杆菌、巴氏杆菌及支原体感染等,比泰乐菌素具有更强的抗菌活性^[1-2]。替米考星在兽医临床治疗中已得到非常广泛的应用,且拥有多种剂型。《中华人民共和国兽药典》2015 年版一部^[3]共收载替米考星原料及替米考星注射液、替米考星预混剂和替米考星溶液三种制剂类型,其含量测定方法均为高效液相色谱法,以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以水-乙腈-磷酸二丁胺溶液-四氢呋喃(805:115:25:55)为流动相,按外标法以替米考星顺式异构体和反式异构体峰面积的和计算含量。但在实际使用过程中发现该色谱条件下替米考星的顺-8-差向异构体峰位于其顺式异构体峰和反式异构体峰之间,但现行《中国兽药典》标准中只对替米考星顺式异构体峰和反式异构体峰的分离度进行控制,故顺-8-差向异构体峰易对替米考星含量测定结果造成干扰^[3]。同时,在该流动相体系中含有四氢呋喃,易对以塑料管为输液介质的液相色谱仪造成损害,大大缩短仪器的使用寿命,增加试验成本。已发表的文献中,替米考星及其制剂的含量测定方法以高效液相色谱法为主^[4-6],色谱条件与《中国兽药典》标准大多一致。因此,建立一种便捷、高效的替米考星的含量测定方法是非常必要的。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂 Waters 2695 高效液相色谱仪配有二极管阵列检测器(PDA2998)和色谱工作站处理软件 Empower 3(美国 Waters 公司)、AX205 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。三氟乙酸、乙腈为色谱纯,水为超纯水。

1.2 试药 替米考星对照品,批号 K0311805,含量 95.3%,中国兽医药品监察所;替米考星溶液,某市售产品,规格 25%;替米考星预混剂,某市售产品,规格 10%;替米考星注射液,某市售产品,规格 10 mL:3 g。

2 溶液的制备

2.1 对照品溶液 取替米考星对照品约 25 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加入 2 mL 乙腈,用 35%

乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 供试品溶液 替米考星预混剂:取供试品约 2.5 g(相当于替米考星 0.25 g),精密称定,置 50 mL 量瓶中,加入 2 mL 乙腈,用 35% 乙腈溶液溶解并稀释至刻度,超声 10 min,摇匀,精密量取上述溶液 5 mL 置 50 mL 量瓶中,用 35% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,即得;替米考星注射液:精密量取供试品 2 mL,用 35% 乙腈溶液稀释至刻度,超声 10 min,摇匀,精密量取上述溶液 5 mL 置 50 mL 量瓶中,用 35% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,即得;替米考星溶液:精密量取供试品 2 mL,用 35% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,精密量取上述溶液 5 mL 置 50 mL 量瓶中,用 35% 乙腈溶液稀释至刻度,超声 10 min,摇匀,即得。

2.3 色谱条件 色谱柱:Gemini C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:10% 三氟乙酸-乙腈(65:35);流速 1.0 mL/min;检测波长:280 nm;柱温 30 ℃;进样量 10 μL。

3 方法学验证

3.1 专属性和系统适用性试验 分别取空白溶液、对照品溶液和供试品溶液,按 2.3 项色谱条件进样,记录色谱图。结果表明,样品中杂质对替米考星的测定无干扰。替米考星的顺式和反式异构体峰的分离度为 1.92,理论塔板数按顺式计为 14051,按反式计为 6208,替米考星反式异构体峰、顺式异构体峰和顺-8-差向异构体的相对保留时间为 0.9、1.0 和 1.2。对照品溶液和供试品溶液色谱图见图 1。

3.2 线性关系考察 取替米考星对照品约 100 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,用乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。精密量取对照品储备液适量,用 35% 乙腈稀释制成 2.0、1.0、0.5、0.4、0.2、0.1、0.05、0.02、0.01 mg/mL 的系列对照品溶液。照 2.3 项色谱条件进样,记录色谱图,以对照品浓度 C 为横坐标,以替米考星顺式峰和反式峰的峰面积和 A 为纵坐标,绘制标准曲线。回归方程及相关系数为: $A = 12\ 106\ 885C + 61423$, $R^2 = 0.9998$ 。结果表明,替米考星在 0.01 ~ 2.0 mg/mL 浓度范围内呈现良好的线性关系。

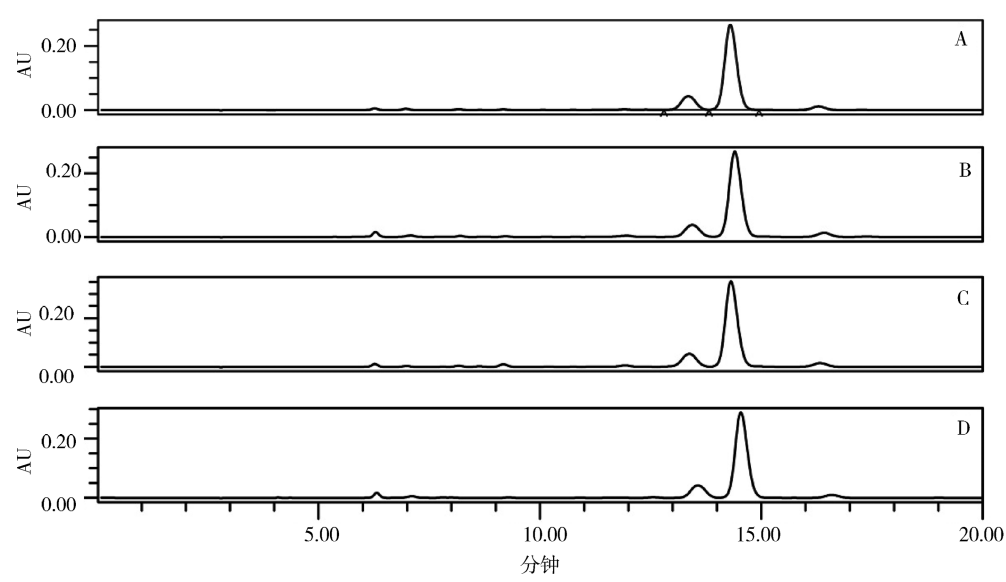


图 1 替米考星对照品 (A)、替米考星预混剂 (B)、替米考星注射液 (C) 和替米考星溶液 (D) 的色谱图

Fig 1 Chromatograms of tilmicosin reference (A), tilmicosin premix (B), tilmicosin injection (C), and tilmicosin solution (D)

3.3 检测限和定量限 取对照品溶液适量,用 35% 乙腈逐级稀释,照 2.3 项色谱条件进行测定。以信噪比 S/N 为 3 和 10 求得替米考星检测限为 $0.8\text{ }\mu\text{g/mL}$,定量限为 $2.7\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

3.4 准确度 以回收率试验考察方法的准确度。取替米考星对照品适量,精密称定,加入 2 mL 乙腈,用 35% 乙腈制成每 1 mL 中约含替米考星 10 mg 的溶液,作为对照品储备液。精密量取对照品储备液 1 mL,置 200 mL 量瓶中,用 35% 乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。取替米考星预混剂供试品约 0.25 g (相当于替米考星 25 mg)、替米考星溶液 0.1 mL,分别置于 50 mL 量瓶中,分别精密量取对照品储备液 1.00、1.25、1.50 mL,加入同一量瓶中,照 2.2 项下方法配制,每个浓度平行制备 3 份,得到预混剂回收率溶液和溶液回收率溶液;取替米考星注射液 0.1 mL,置 50 mL 量瓶中,分别精密量取对照品储备液 1.20、1.50、1.80 mL,加入同一量瓶中,照 2.2 项下方法配制,每个浓度平行制备 3 份,得到注射液回收率溶液。将对照品溶液、预混剂回收率溶液、注射液回收率溶液和溶液回收率溶液照 2.3 项色谱条件进样,记录色谱图,计算回收率。回收率试验结果见表 1。

3.5 精密度 精密吸取同一对照品溶液,照 2.3 项色谱条件连续进样 5 次,记录替米考星反式峰和顺式峰的峰面积和为 6869759、6838430、6867163、6839803、6825560, RSD 为 0.3%,反式峰保留时间为 15.935、15.834、15.753、15.694、15.638 min, RSD 为 0.7%,顺式峰保留时间为 17.184、17.080、16.983、16.921、16.855 min, RSD 为 0.8%。结果表明进样精密度良好。

3.6 重复性试验 分别取不同制剂的同一批供试品,照 2.2 项下方法制备供试品溶液 6 份,照 2.3 项色谱条件进行测定。替米考星预混剂的平均含量为 95.8%, RSD 为 0.8%;替米考星注射液的平均含量为 103.9%, RSD 为 0.2%;替米考星溶液的平均含量为 102.6%, RSD 为 0.8%。结果表明本方法重复性良好。

3.7 稳定性试验 取同一份对照品溶液和替米考星预混剂供试液,室温放置,分别在 0、6、12、16、20、36 和 48 h 照 2.3 项色谱条件进样,记录色谱峰面积,48 h 内替米考星对照品和替米考星预混剂的顺式峰和反式峰面积和的 RSD 分别为 0.43% 和 0.58%。结果表明制备好的对照品溶液和供试品溶液在 48 h 内稳定。

表 1 回收率试验结果

Tab 1 Recoveries of tilmicosin in premix, injection, and solution

制剂类型	本底值 mg	加入量 mg	测定值 mg	回收率	平均回收率	RSD	
替米考星预混剂	12.18	9.94	21.95	98.3%	97.1%	0.9%	
	12.41	9.94	22.05	97.0%			
	12.22	9.94	21.77	96.1%			
	12.25	12.43	24.91	101.9%	101.6%	0.6%	
	12.19	12.43	24.89	102.2%			
	12.17	12.43	24.68	100.6%			
	12.28	14.91	26.87	97.9%			
	12.20	14.91	26.85	98.3%	98.0%	0.2%	
	12.57	14.91	27.16	97.9%			
	32.30	11.93	44.27	100.3%			
替米考星注射液	32.30	11.93	44.00	98.1%	99.1%	1.0%	
	32.30	11.93	44.08	98.7%			
	32.30	14.91	46.96	98.3%			
	32.30	14.91	46.86	97.7%	97.6%	0.6%	
	32.30	14.91	46.72	96.7%			
	32.30	17.90	49.83	97.9%			
	32.30	17.90	49.82	97.9%		97.9%	0.1%
	32.30	17.90	49.84	98.0%			
	替米考星溶液	25.41	9.94	35.42	100.7%	100.4%	0.2%
		25.41	9.94	35.36	100.1%		
25.41		9.94	35.39	100.4%			
25.41		12.43	37.68	98.7%	98.4%	0.5%	
25.41		12.43	37.70	98.9%			
25.41		12.43	37.55	97.7%			
25.41		14.91	40.13	98.7%	98.5%	0.2%	
25.41		14.91	40.06	98.3%			
25.41		14.91	40.10	98.5%			

3.8 耐用性试验 从柱温、流动相组成、色谱柱三方面考察替米考星检测方法的耐用性。调节柱温为 25 ℃、30 ℃ 和 35 ℃,结果表明,随着柱温升高,替米考星峰的保留时间逐渐前移,替米考星顺式峰和反式峰的分离度均符合要求;调节流动相组成为 10% 三氟乙酸-乙腈(60-40)、10% 三氟乙酸-乙腈(65-35)、和 10% 三氟乙酸-乙腈(70-30),结果显示,在不同流动相组成下,替米考星顺式峰和反式峰的分离度均符合要求;选择 3 款不同品牌色谱柱(Dikma Diamonsil C18, 4.6 mm × 250 mm,

5 μm; Alltima C18, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm; Gemini C18, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm),考察不同色谱柱对测定的影响,三款色谱柱结果显示,除保留时间有差异外,替米考星顺式峰和反式峰的分离度均符合要求。

4 样品的测定

取替米考星预混剂、替米考星注射液和替米考星溶液各一批,按 2.2 项下方法处理,按 2.3 项下色谱条件进行测定,每个样品平行制备两份,取平均值计算样品中替米考星含量。同时,使用《中华

《中华人民共和国兽药典》2015 年版一部收载的含量测定方法对三批样品进行测定,并与本方法结果进行比较,见表 2。

表 2 样品含量测定结果 (n=2)

Tab 2 The results of the sample content (n=2)		
样品	本方法	《中国兽药典》2015 年版一部方法
替米考星预混剂	96.1%	96.7%
替米考星注射液	107.0%	107.4%
替米考星溶液	102.6%	102.4%

5 讨论与结论

5.1 色谱条件的选择 现行标准中,替米考星及其制剂含量测定方法的流动相均采用乙腈-磷酸二丁胺溶液-四氢呋喃体系^[7-9],已发表的文献中也仅有一篇提出在流动相中可加入三氟乙酸以改善分离^[10]。本实验中配制了不同浓度的三氟乙酸溶液(1%、5%、10%和20%),结果发现,当三氟乙酸浓度较低时,替米考星顺式峰和反式峰间的分离度小于1.5,当使用10%三氟乙酸-乙腈(65:35)为流动相时,替米考星顺式峰和反式峰可实现基线分离。

5.2 提取溶剂的选择 本方法比较了使用乙腈、甲醇、35%乙腈溶液作为提取溶剂对替米考星的影响,结果显示使用35%乙腈溶液效果最佳,在替米考星预混剂提取过程中先加入2 mL乙腈助溶以增加提取效率;分别比较了超声2、5、10 min对提取效率的影响,结果显示超声10 min能够提取完全。

5.3 注意事项 本方法对针对替米考星及其制剂含量测定方法进行研究,将原方法中流动相组成由水-乙腈-磷酸丁二胺-四氢呋喃体系转变为10%三氟乙酸-乙腈体系。三氟乙酸具有挥发性和一定的腐蚀性,在流动相配制过程中应在通风橱内进行,做好自身防护措施,可对试验人员进行有效防护。在实验结束后,应注意对色谱流路及色谱柱进行冲洗,可先用10倍柱体积低浓度的甲醇/乙腈-水溶液(约10%)进行冲洗,再用较高浓度的

甲醇/乙腈-水溶液(约50%)进行冲洗,最后用高浓度的甲醇/乙腈-水溶液(80%以上)进行冲洗,使得色谱柱中强吸附物质冲洗出来,同时可将系统中的三氟乙酸完全冲洗干净,减少其对仪器设备的损耗。

5.4 结论 本方法建立了一种用于替米考星及其制剂含量测定的高效液相色谱检测方法。与现行《中国兽药典》2015 年版一部标准相比,该方法操作简便,并能够有效将顺-8-差向异构体进行分离,提高了替米考星及其制剂质量控制的检测效率和准确度,为其质量标准的改进提升提供了方法学依据。

参考文献:

[1] Zhang N, Ba J, Wang S, *et al.* Pharmacokinetics and bioavailability of solid dispersion formulation of tilmicosin in pigs[J]. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2020, in press, <https://doi.org/10.1111/jvp.12929>.

[2] 梁劲康,吴志玲,黎乃添,等. 替米考星微囊的体外释放特性考察[J]. *中国兽药杂志*, 2017, 51(05): 41-47.

Liang J K, Wu J L, Li N T, *et al.* Study on in vitro Release Behavior of Tilmicosin Microcapsules[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2017, 51(05): 41-47.

[3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版(一部)[S]. Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. *Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (the first volume of 2015 edition)* [S].

[4] 闫春芝,赵红彦,秦朝英,高效液相色谱法测定替米考星含量[J], *中国兽药杂志*, 2006, 40(08): 26-27.

Yan C, Zhao H, Qin C, Determination of Tilmicosin by High Performance Liquid Chromatography[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2006, 40(08): 26-27.

[5] 刘德金,刘爱玲,刘桂兰,等,检测替米考星含量的高效液相色谱法改良[J], *南京农业大学学报*, 2011, 34(3): 24-139.

Liu D J, Liu A L, Liu G L, *et al.* Assay of Tilmicosin by an Improved HPLC Method[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2011, 34(3): 135-139.

[6] 马春芳,李敏,张雯,等, HPLC 法测定磷酸替米考星可溶性粉中替米考星含量的研究, *中国兽药杂志*, 2021, 55(3): 17-24.

- Ma C F, Li M, Zhang W, *et al.* HPLC Method for Determining Content of Tilmicosin in Tilmicosin Phosphate Soluble Powder[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2021, 55(3): 17–24.
- [7] 中华人民共和国农业部公告第 783 号[S].
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Announcement No. 783 [S].
- [8] 中华人民共和国农业部公告第 958 号[S].
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Announcement No. 958 [S].
- [9] 中华人民共和国农业部公告第 1025 号[S].
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Announcement No. 1025[S].
- [10] Foster D M, Sylvester H J, Papich M G. Comparison of direct sampling and brochoalveolar lavage for determining active drug concentrations in the pulmonary epithelial lining fluid of calves injected with enrofloxacin or tilmicosin[J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2017, 39, 1–9.
- (编辑:陈希)