

亲水作用液相色谱法测定注射液中 泰地罗新含量

吴家鑫^{1*}, 刘敏², 尚飞³, 张传良¹, 宋敏¹, 齐鹏¹, 梁景乐¹

(1. 中牧实业股份有限公司农业部兽用生物制品与化学药品重点实验室,
北京市兽用多肽疫苗设计与制备工程技术研究中心, 北京 100095;

2. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029;

3. 北京化工大学分析测试中心, 北京 100029)

摘要: 采用 XBridge-BEH Amide (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 亲水作用色谱柱, 建立了泰地罗新的检测方法。确定了检测波长, 考察了流动相 pH、流动相盐体系、流动相洗脱方式对保留时间、对称因子和理论塔板数的影响。结果表明, 采用亲水作用色谱柱分离, 以乙腈 (含 10 mmol/L 甲酸铵, 0.125% 甲酸, 5% 水)–0.125% 甲酸水溶液 (含 10 mmol/L 甲酸铵) 为流动相梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30℃, 紫外检测波长为 280 nm, 在此条件下泰地罗新可以获得良好的分离效果。泰地罗新药物质量浓度与峰面积在 6.25~100 μg/mL 范围内线性关系良好, 相关系数 $R=0.999\ 9$, 检出限为 0.05 μg/mL, 定量限为 0.14 μg/mL, 批内添加回收率在 97.8%~102.1% 之间, 批内变异系数为 1.69%~3.12%; 批间添加回收率在 96.9%~104.3% 之间, 批间变异系数为 3.39%~4.05%。该方法能够快速、准确地检测泰地罗新含量, 且成本低廉, 可应用于药物生产中泰地罗新的质量控制。

关键词: 亲水作用色谱; 泰地罗新; 定量检测

中图分类号: O652.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2019)02-0231-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2019.02.052

Quantitative analysis of tildipirosin in a commercial medication by hydrophilic interaction liquid chromatography

WU Jia-xin^{1*}, LIU Min², SHANG Fei³, ZHANG Chuan-liang¹, SONG Min¹, QI Peng¹, LIANG Jing-le¹

(1. Key Laboratory of Biological Products and Chemical Drugs for Animals of the Ministry of Agriculture, Beijing Engineering Research Center of Design and Development of Synthetic Peptide Vaccines for Animals, China Animal Husbandry Industry Co., Ltd., Beijing 100095, China; 2. Beijing Key Laboratory of Bioprocess, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; 3. Analysis and Testing Center, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: An analytical method using XBridge-BEH Amide (150×4.6 mm, 5 μm) hydrophilic interaction chromatography column is formulated for the quantitative analysis of tildipirosin in a commercial injectable medication. The detection wavelength is determined and the effects of pH, buffer and elution mode of the mobile phase on the separation are investigated. Experimental results show that good separation efficiency can be obtained for tildipirosin under the following conditions: hydrophilic interaction liquid chromatography is used; acetonitrile-0.125% formic acid aqueous solution is used as the mobile phase that has a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; the temperature of the column is maintained at 30℃ and the UV absorption of tildipirosin is monitored at wavelength of 280 nm. The linearity between the concentration of tildipirosin and peak area exhibits good in the range of 6.25–100 μg·mL⁻¹, the correlation coefficient $R=0.999\ 9$. The LOD and LOQ are 0.05 μg·mL⁻¹ and 0.14 μg·mL⁻¹, respectively. The inter-assay recoveries varied from 97.8% to 102.1% and the coefficients of variation ranged from 1.69% to 3.12%. The intra-assay recoveries vary between 96.9% to 104.3% and the intra-assay variation coefficients range from 3.39% to 4.05%. This novel method can determine fast and accurately the content of tildipirosin at a low cost, which can be used for quality control of tildipirosin in a drug production process.

Key words: hydrophilic interaction liquid chromatography; tildipirosin; quantitative analysis

泰地罗新 (Tildipirosin) 是一种半合成类 16 元环大环内酯类抗生素, 为泰乐菌素的衍生物, 其结构特点为在大环内酯环上的 C20 和 C23 位置的哌啶基团以及 C5 位置的碳霉糖糖基^[1-2]。目前商品名为 Zuprevo 的泰地罗新无菌注射液被批准在欧盟国家上市^[3]。

近年来, 呼吸系统疾病的高发病率和死亡率是全球猪、牛养殖业面临的重要问题^[4-7]。泰地罗新可用于预防与治疗猪、牛等敏感菌引起的呼吸系统疾病^[1-3,8], 其作用机理与其他大环内酯类抗生素相同, 通过与敏感菌的核糖体 50S 亚基结合, 抑制敏感菌的蛋白质合成^[10]。泰地罗新的给药方式主要为

收稿日期: 2018-08-09; 修回日期: 2018-12-08

作者简介: 吴家鑫 (1982-), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向为兽药研发, 通讯联系人, icebergwujiaxin@163.com。

注射给药(猪为肌肉注射给药,牛为颈部皮下注射给药),这种给药方式既可以减轻操作压力,又可以提供最好的治疗效果^[1-2]。通过注射给药泰地罗新具有吸收迅速、达峰时间短、消除半衰期长、生物利用度高的特点,而且泰地罗新对支气管和肺具有较高的亲和力,实验证明,在各组织中,肺组织的药物浓度最高且作用持久^[1-2]。与替米考星和泰拉霉素 2 种大环内酯类抗生素相比,泰地罗新对呼吸系统疾病具有更好的疗效^[3]。

目前,泰地罗新的检测方法主要采用 HPLC-MS/MS 法^[10-11]。也有文献报道用 C18 色谱柱进行泰地罗新检测^[12]。亲水作用色谱是近年发展起来的新技术^[13],该技术可以实现对极性化合物的强保留,与反相液相色谱具有良好的互补性^[14-15]。笔者建立了一种利用亲水作用色谱检测泰地罗新的新方法。该方法能够快速、准确地检测泰地罗新含量,且成本低廉,对药物生产中泰地罗新的质量控制具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

液相色谱为 Agilent 1260, 配备二元梯度泵、真空在线脱气机和自动进样器。仪器控制、数据采集软件及数据分析软件采用 Agilent 公司的 ChemStation 系统。

泰地罗新工作对照品,中牧实业股份有限公司自制(已通过核磁及质谱确认其结构,化学纯度为 98.0%);泰地罗新注射剂 Zuprevo(质量浓度为 180 mg/mL)规格分别为 50、100 mL 和 250 mL,默沙东动物保健品公司生产;甲酸,色谱纯,Fisher 公司生

产;乙酸,分析纯,北京化工厂生产;甲酸铵,色谱纯,Fisher 公司生产;乙酸铵,色谱纯,Fisher 公司生产;氨水,分析纯,北京化工厂生产;乙腈,色谱纯,Fisher 公司生产;所有用水均为去离子水。

1.2 溶液配制

泰地罗新样品溶液:取适量泰地罗新注射液,利用甲醇溶解并定容至适当的浓度;泰地罗新对照品溶液:取适量泰地罗新工作对照品,利用甲醇溶解并定容至适当的浓度。

1.3 色谱条件

色谱柱为 XBridge-BEH Amide 氨基柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),柱温为 30℃,紫外吸收波长为 280 nm。流动相:A 相为乙腈(含 10 mmol/L 甲酸铵、0.125%甲酸和 5%水);B 相为 0.125%甲酸水溶液(含 10 mmol/L 甲酸铵);流速为 1 mL/min;进样体积为 10 μL。

梯度洗脱程序:0.00→5.00 min,90%→30% A 相流动相;5.00→5.10 min,30%→90% A 相流动相;5.10→8.00 min,90%→90% A 相流动相。

2 结果与分析

2.1 泰地罗新紫外检测波长的确定

以甲醇为参比,用甲醇配置泰地罗新标准溶液(质量浓度为 10 μg/mL),在 200~600 nm 区间内进行紫外扫描,结果如图 1 所示。由图 1 可以看出,其最大吸收波长为 287 nm。泰地罗新在主体结构上与泰乐菌素类似,其结构发光基团没有发生改变,中国兽药典(2010 版)规定:高效液相色谱法检测泰乐菌素的紫外检测波长为 280 nm。综合以上两方面的数据,选择 280 nm 作为泰地罗新的紫外检测波长。

(上接第 230 页)

- [6] 丁勇,吴红枚,王孟,等.聚间苯二甲酰对苯二胺(PPIA)数均分子量的测定[J].山东化工,2016,45(11):74-77.
- [7] 王明君,姚善涇.小角激光光散射法测定纤维素硫酸钠的分子量[J].过程工程学报,2009,9(6):1159-1163.
- [8] 冯茹森,郭拥军,张新民,等.疏水缔合聚合物分子量分布曲线的测定[J].高分子学报,2016(5):621-627.
- [9] Kim R Williams, Karin D Caldwell. Field-flow fractionation[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406: 1577-1578.
- [10] Greyling G, Pasch H. Fractionation of poly(methacrylic acid) and poly(vinyl pyridine) in aqueous and organic mobile phases by multidetector thermal field-flow fractionation[J]. Journal of Chromatography A, 2017, 1512: 115-123.
- [11] Roessner D, Kulicke W M. On-line coupling of flow field-flow fractionation and multi-angle laser light scattering[J]. Journal of Chromatography A, 1994, 687(2): 249-258.
- [12] Wagner M, Pietsch C, Tauhardt L, et al. Characterization of cationic polymers by asymmetric flow field-flow fractionation and multi-angle light scattering-A comparison with traditional techniques [J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1325(2): 195-203.
- [13] Ugo Till, Mireille Gaucher-Delmas, et al. Asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering and quasi-elastic light scattering for characterization of polymersomes: Comparison with classical techniques [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406: 7841-7853.
- [14] 赵希贤, 尤立华, 杨秉呼, 等. 土茯苓含量测定分离度和理论板数的调整[J]. 首都医药, 2013, 20(24): 69-70.
- [15] 叶祥喜, 宋燕西, 陈旭涛, 等. 高效液相色谱手性流动相添加剂拆分佐匹克隆对映体[J]. 分析测试学报, 2014, 33(4): 471-474. ■

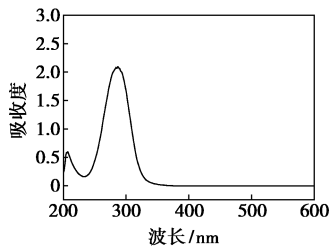


图1 泰地罗新的紫外全波长扫描

2.2 流动相 pH、缓冲体系和洗脱方法对分离效果的影响

亲水作用色谱(HILIC)在分离强极性和亲水性化合物方面具有较好的分离性能^[16]。因此选择HILIC色谱柱进行泰地罗新的色谱分析。考虑到泰地罗新是一种极性化合物,且为碱性^[14],因此pH对其色谱分析具有较大影响。通过考察pH为3.5、5.3和9.0时的分离效果发现,随着pH的不断增大,对称因子逐渐偏离1.0,理论塔板数也随之降低,如表1所示。通过比较可知,pH为3.5条件下泰地罗新的对称因子最接近于1.00,理论塔板数也最大,说明3.5是最适pH。在HILIC工作条件下,固定相表面会首先建立一个富集水的液体层,待分析物在流动相和该亲水层之间进行分配,从而实现分离^[17]。泰地罗新在中性和碱性条件下不溶于水,在酸性条件下溶于水,因此使用酸性流动相可以使泰地罗新更容易进入水层,增强保留,所以强化了色谱柱的分离效果,改善了峰型。

利用pH为3.5磷酸盐的无机盐缓冲体系进行梯度洗脱,其对称因子及理论塔板数都有所降低,因此,用甲酸铵体系能够达到更好的分离效果。而且磷酸盐在乙腈中的溶解性较差,容易析出,所以在该检测方案中也不宜采用。

通常流动相由几种不同极性的溶剂组成,通过改变流动相中各溶剂组成的比例改变流动相的极性,使每个流出的组分都有合适的容量因子,并使样品中的所有组分在最短时间内实现最佳分离。梯度洗脱可以缩短分析时间、提高分离能力、使峰型得到改善、减少拖尾现象、增加灵敏度,在高效液相色谱检测中有广泛的应用^[18]。梯度洗脱的方案为:流速为1 mL/min,梯度洗脱程序:0.00→5.00 min,90%→30% A;5.00→8.00,30%→90% A;等度洗脱方案为:流速为1 mL/min,A/B两相比比例为50/50。等度洗脱方法不能将泰地罗新进行有效分离,保留时间接近死体积时间,而且对称因子与理论塔板数都要远逊于梯度洗脱方法。因此,梯度洗脱方案优于等

度洗脱方案。

流动相pH、缓冲体系和洗脱方法对泰地罗新分离效果影响的试验结果如表1和图2所示。

表1 流动相pH、缓冲体系和洗脱方法对分离效果的影响

pH	洗脱方式	缓冲体系	对称因子	保留时间/min	理论塔板数
3.5	梯度洗脱	A:乙腈(含10 mmol/L甲酸铵、0.125%甲酸、5%水) B:水(含10 mmol/L甲酸铵、0.125%甲酸)	0.98	4.500	17949
5.3	梯度洗脱	A:乙腈(含10 mmol/L乙酸铵、0.02%乙酸、5%水) B:水(含10 mmol/L乙酸铵、0.02%乙酸)	0.82	4.278	12952
9.0	梯度洗脱	A:乙腈(含10 mmol/L乙酸铵、0.04%乙酸、5%水) B:水(含10 mmol/L乙酸铵、0.04%乙酸)	0.61	3.943	11211
3.5	梯度洗脱	A:乙腈 B:水(含10 mmol/L磷酸氢二铵)	0.92	2.986	2156
3.5	等度洗脱	A:乙腈(含10 mmol/L甲酸铵、0.125%甲酸、5%水) B:水(含10 mmol/L甲酸铵、0.125%甲酸)	0.34	1.919	6482

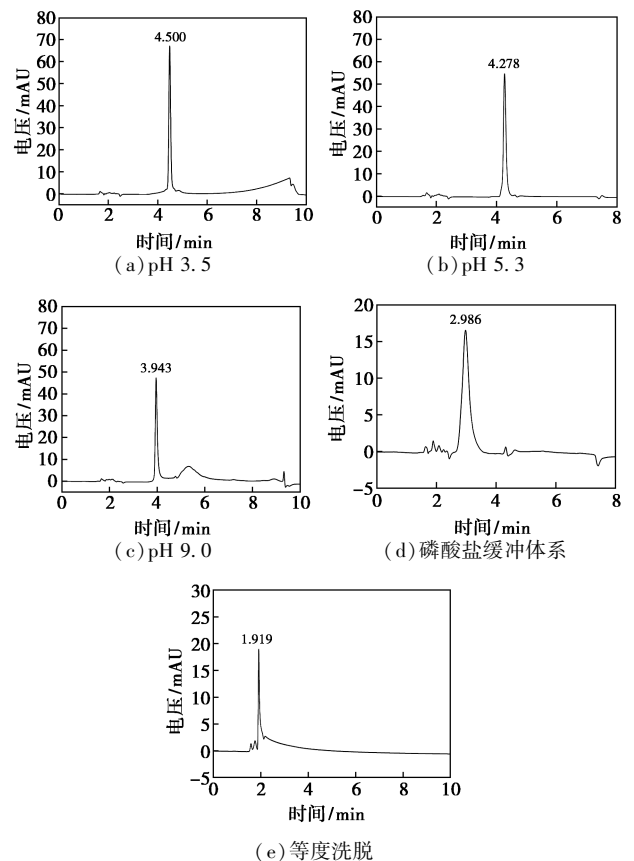


图2 流动相体系对泰地罗新分离效果的影响

2.3 线性关系、检测限与定量限

分别配置 6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液,进样 10 μL ,进行色谱分析,结果表明,泰地罗新在 6.25~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,峰面积(A)与其质量浓度(ρ , $\mu\text{g}/\text{mL}$)呈线性关系,其回归方程为 $A = 18.423\rho + 0.0894$, $R = 0.9999$ 。当色谱峰峰高为噪音 3 倍时,测得泰地罗新的检出限为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$,当色谱峰峰高为噪音 10 倍时,测得泰地罗新的定量限为 0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.4 添加回收率、准确度与精密度

设定 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个添加水平,并分别将泰地罗新对照品添加于甲醇中,进行添加回收试验,每个水平进行 3 次检测,连续检测 3 批不同样品,计算平均回收率、批内变异系数和批间变异系数,实验结果如表 2 所示。由表 2 可以看出,批内添加回收率为 97.8%~102.1%,批内变异系数为 1.69%~3.12%,批间添加回收率为 96.9%~104.3%,批间变异系数为 3.39%~4.05%。结果表明,该方法具有重复性好、准确度高的特点。

表 2 批内、批间添加回收率及变异系数

添加水平/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率/%		变异系数/%	
	批内($n=3$)	批间($n=3$)	批内($n=3$)	批间($n=3$)
25	102.1	96.9	3.12	4.05
50	97.8	101.2	1.69	3.39
100	98.1	104.3	2.72	3.58

2.5 样品质量浓度的检测

以同样方法测定 3 种不同规格的泰地罗新注射液,平行测定 3 次,结果如表 3 所示。

表 3 实际注射液样品检测结果 ($N=3$)

样品规格/ mL	50	100	250
质量浓度/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	179.15	178.61	180.90
相对标准偏差/%	1.97	1.75	1.32

由表 3 可以看出,检测结果良好。

3 结论

建立了通过亲水作用色谱检测泰地罗新的分析方法,通过条件优化确定了最佳实验条件,并进行了方法学验证。结果表明,该方法能够快速、准确地检测泰地罗新质量浓度,且成本低廉,可应用于药物生产中泰地罗新的质量控制。

参考文献

[1] Menge M, Rose M, Bohland C, et al. Pharmacokinetics of tildipirosin in porcine plasma, lung tissue, and bronchial fluid (from live, non-

anesthetized cattle) [J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2012, 35(6): 550-559.

- [2] Rose M, Menge M, Bohland C, et al. Pharmacokinetics of tildipirosin in porcine plasma, lung tissue, and bronchial fluid and effects of test conditions on in vitro activity against reference strains and field isolates of *Actinobacillus pleuropneumonia* [J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2013, 36(2): 140-153.
- [3] 李伟岭, 杨芳, 于振海, 等. 泰地罗新研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(10): 50-53.
- [4] Lekeux P. Bovine respiratory disease complex: An European perspective [J]. Bovine Practitioner, 1995, 29: 71-75.
- [5] Cusack P M. Effect of mass medication with antibiotics at feedlot entry on the health and growth rate of cattle destined for the Australian domestic market [J]. Australian Veterinary Journal, 2004, 82(3): 154-156.
- [6] Duff G C, Galyean M L. Board-invited review: Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle [J]. Journal of Animal Science, 2007, 85(3): 823-840.
- [7] Gay E, Barnouin J. A nation-wide epidemiological study of acute bovine respiratory disease in France [J]. Preventive Veterinary Medicine, 2009, 89(3-4): 265-271.
- [8] Dieste-Perez L, Fraile L, De Miguel M J, et al. Studies on a suitable antibiotic therapy for treating swine brucellosis [J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2015, 38(4): 357-364.
- [9] Schlünzen F, Zarivach R, Harms J, et al. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria [J]. Nature, 2001, 413(6858): 814-821.
- [10] Dickson L C. Performance characterization of quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for 12 macrolide and lincosamide antibiotics in salmon, shrimp and tilapia [J]. Journal of Chromatography B, 2014, 967: 203-210.
- [11] Schneider J M, Lehotay S J, Lightfield A R. Validation of a streamlined multiclass, multiresidue method for determination of veterinary drug residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(15): 4423-4435.
- [12] 陈红丽, 马军, 张萍, 等. 高效液相色谱法测定泰地罗新的研究 [J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(6): 86-88.
- [13] 杨静, 董佳斌, 冶正得, 等. 原子转移自由基聚合制备 P_{DMAEMA} 亲水作用色谱固定相及其性能评价 [J]. 化学学报, 2012, 70(16): 1725-1730.
- [14] Wu J X, Liu M, Shang F, et al. Qualitative and quantitative analysis of tildipirosin by ultra-performance hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem high resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Chiang Mai Journal of Science, 2017, 44(3): 956-964.
- [15] 崔晓美, 陈树兵, 陈杰, 等. 基质分散固相萃取-亲水作用色谱-串联质谱法测定鲤鱼中 5 种生物胺的含量 [J]. 分析化学, 2013, 41(12): 1869-1874.
- [16] 沈爱金, 郭志谋, 梁鑫森. 亲水作用色谱固定相的发展与应用 [J]. 化学进展, 2014, 26(1): 10-18.
- [17] 郭亚丽, 袁琴, 李瑞萍, 等. 亲水作用色谱及其在环境分析中的应用进展 [J]. 色谱, 2012, 30(3): 232-238.
- [18] 朱彭龄. 梯度洗脱 [J]. 分析测试技术与仪器, 2010, 16(1): 56-59. ■