

高效液相色谱法测定泰拉菌素含量的方法研究

刘晨晨¹, 查高峰², 申永存^{1*}

(武汉理工大学化学工程学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 利用高效液相色谱法测定泰拉菌素的含量, 采用 YMC Pack Pro C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 流动相为 V(甲醇): V(乙腈): V(50 mmol/L pH = 8 磷酸缓冲溶液) = 45: 25: 30, 流速为 2.0 mL/min; 检测波长为 210 nm; 柱温为 35℃; 进样量为 20 μL。泰拉菌素质量浓度在 10 ~ 100 mg/L 范围内具有良好的线性关系, $r = 0.9997$ 。该方法简便、准确, 灵敏度高, 重现性好, 可用于测定泰拉菌素的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 泰拉菌素; 含量测定

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2014)05-0175-03

Determination of tulathromycin by HPLC

LIU Chen-chen¹, ZHA Gao-feng², SHEN Yong-cun^{1*}

(College of Chemical Engineering, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract: HPLC is used to determinate the purity of tulathromycin in this study. Tulathromycin is detected on HPLC instrument fixed with a YMC Pack Pro C₁₈ (150 × 4.6 mm, 3 μm) column. The mobile phase is methanol-acetonitrile-50 mmol/L phosphate buffer (pH = 8) (45: 25: 30) at the flow rate of 2.0 mL/min. The detector is set at 210 nm. Column temperature and the injection volume is 35℃ and 20 μL, respectively. The calibration curve is linear ($r = 0.9997$) within the range of 10 - 100 mg/L for tulathromycin. This method is simple, accurate, highly sensitive and reproducible, which is suitable for the determination of tulathromycin.

Key words: HPLC; tulathromycin; assay

泰拉菌素 (Tulathromycin) 是新近上市且为动物专用的大环内酯类半合成抗生素, 属三胺类广谱抗生素, CAS 号为 217500-96-4, 分子式为 C₄₁H₇₉N₃O₁₂ (相对分子质量为 806), 分子结构式如图 1 所示。

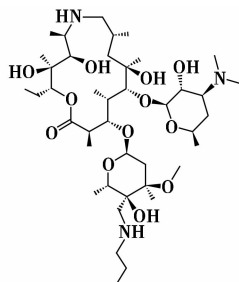


图 1 泰拉菌素分子结构式

泰拉菌素是广谱抗菌药, 对牛和猪呼吸系统疾病病原菌敏感, 具有用量少、生物利用度高、半衰期长、低残留和药效持久等众多优点, 这种高药效、低毒性兽药的应用前景非常广阔^[1-4]。

抗生素类药物含量测定的方法可以分为微生物检定法和物理化学分析法 (光谱分析法、电化学分析法、一般化学分析法、色谱分析法)^[5]。该药目前并未被中国药典收录, 关于泰拉菌素的质量控制国内尚未见文献报道, 国外文献仅报道了泰拉菌素在

猪、牛的肝、肾、肌肉等可食用组织的残留分析研究^[6-8]。为控制该药物的产品质量, 笔者参照中国药典 (2010 年版) 中大环内酯类药物阿奇霉素的检测方法^[9], 建立了反相高效液相色谱法测定泰拉菌素的含量。该法简便、准确、可靠, 所建立的方法经验证可适用于兽药生产企业和监管部门对泰拉菌素的质量控制与监测, 对于促进该药物的在国内的规模化生产和规范管理有着重大意义。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (包括四元梯度泵、自动进样器、柱温箱和二极阵列检测器, 美国 Agilent 公司生产); 8453 型紫外分光光度计 (美国 Hewlett Packard 公司生产); pHM240 酸度计 (法国 Radiometer analytical 公司生产), R200D 电子天平 (德国 Sartorius 公司生产); Milli-Q 超纯水处理系统 (法国 Millipore 公司生产)。

泰拉菌素标准品 (纯度为 98.5%, 辉瑞 Pfizer 公司生产, 批号 2201306、2201527、2201918); 泰拉菌素原料药 (由武汉理工大学化工学院药物合成研究室研制, 批号 120706、120712、120725); 甲醇和乙腈 (色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司生产), 磷酸

收稿日期: 2014-02-09

作者简介: 刘晨晨 (1988-), 女, 硕士生, 研究方向为手性药物和化工产品分析, liucewhut@163.com; 申永存 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向为药物化学, 通讯联系人, yongcunshen@163.com。

氢二钾和磷酸二氢钾(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司生产); 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: YMC Pack Pro C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3 μm); 流动相: V(甲醇): V(乙腈): V(50 mmol/L pH=8 磷酸缓冲溶液) (取磷酸氢二钾 5.59 g、磷酸二氢钾 0.41 g, 加水溶解稀释成 1 000 mL) 为 45: 25: 30; 流速: 2.0 mL/min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 35℃; 进样量: 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备

精密称取泰拉菌素对照品适量, 置于 100 mL 容量瓶中, 用流动相溶解并定容, 制成每 1 mL 中含有 0.2 mg 的溶液, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 弃去初滤液, 续滤液即为对照溶液。

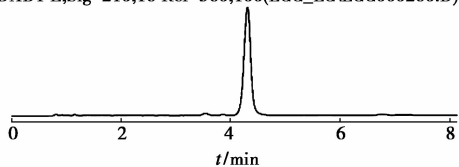
2.2.2 对照品溶液的制备

精密称取泰拉菌素样品适量, 置于 100 mL 容量瓶中, 用流动相溶解并定容, 制成每 1 mL 中含有 0.2 mg 的溶液, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 弃去初滤液, 续滤液即为供试品溶液。

2.3 系统适用性试验

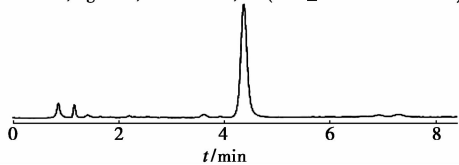
利用高效液相色谱仪在设定的色谱条件下对泰拉菌素对照品及样品进行分析, 结果如图 2 所示。由图 2 可知, 泰拉菌素的保留时间约为 4.2 min。

DAD1 E,Sig=210,16 Ref=360,100(LCC_LC/LC000260.D)



(a) 对照品

DAD1 E,Sig=210,16 Ref=360,100(LCC_LC/LC000255.D)



(b) 样品

图 2 泰拉菌素高效液相色谱图

2.4 线性关系考察

精密称取泰拉菌素对照品适量, 以流动相溶解并定量稀释成 100 mg/L 的溶液。依次配制成 10、20、25、50、75、100 mg/L 的溶液。用孔径为 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后, 取 20 μL 注入液相色谱仪。记

录色谱图以其质量浓度为横坐标 X , 主峰面积为纵坐标 Y 得到回归方程 $Y = 2.805 \times 10^4 X - 1.062 \times 10^4$ 。泰拉菌素质量浓度在 10 ~ 100 mg/L 范围内具有良好的线性关系, $r = 0.9997$ 。

取本品空白溶液, 按照含量测定项下操作, 得到空白样品图谱。取空白基线一段, 计算其噪音峰高, 采用逐级稀释法再将样品溶液用流动相稀释适当浓度进样, 使其峰高为噪音峰高的 3 倍, 方法的最低检测限为 100 μg。按信噪比为 10:1 计算, 方法的最低定量限为 300 μg。

2.5 精密度试验

取同一份样品的泰拉菌素溶液, 重复进样 6 次, 每次 20 μL, 按色谱条件项下进行测定, 记录所得峰面积并计算含量, RSD 值为 0.17%。表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

精密称取同一批号的泰拉菌素适量, 共 6 份, 按“2.2.1”所述方法制备供试品溶液, 各进样 20 μL, 记录所得峰面积并计算含量, 平均含量为 96.2%, RSD 为 0.57%, 表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

精密称取泰拉菌素对照品适量, 以流动相溶解并定量稀释成 50 mg/L 的溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 各进样 20 μL, 按照含量测定项下色谱条件测定, 记录所得峰面积。峰面积的 $RSD\%$ 为 0.64%, 表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.8 回收率试验

精密称取已知质量浓度的样品共 6 份 (100 mg/L), 分别置 100 mL 量瓶中, 精密加入泰拉菌素对照品适量, 按供试品溶液制备方法和测定条件, 测定泰拉菌素的质量浓度, 测定结果见表 1。

表 1 回收率试验结果 ($n=6$)

样品序号	加入质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	实测质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	回收率/%	平均回收率/%	相对标准偏差/%
1	100	27.1	126.7	99.7	
2	100	27.1	126.2	99.3	
3	100	27.1	127.0	99.9	99.77
4	100	20.15	120.44	100.2	
5	100	20.77	120.59	99.9	
6	100	20.89	120.37	99.6	0.31

2.9 含量测定

精密量取对照品溶液和样品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 按外标法以峰面积计算样品质量分数, 求出平均质量分数。以同样方法测定 3 批样品, 平行测定 3 次, 结果如表 2 所示。

表2 质量分数测定结果 (n=3)

批号	120706	120712	120725
质量分数/%	97.9	98.1	98.3
相对标准偏差/%	1.97	1.32	1.75

3 实验条件的选择

3.1 检测波长的选择

泰拉菌素为15元氮杂内酯环结构,其结构不含发色基团,仅有紫外末端吸收^[10],因此只能采用紫外的末端吸收进行检测。对泰拉菌素溶液在200~400 nm波长范围内进行紫外扫描,其最大吸收峰在208~210 nm,考虑到DAD检测器在测定过程中的稳定性和灵敏性,选择检测波长在210 nm。

3.2 色谱柱的选择

由于泰拉菌素结构较特殊,使用普通的色谱柱分析导致色谱峰拖尾严重,因此对色谱柱的填料类型较为挑剔^[11]。采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,可显著改善峰形并避免填料在流动相中的溶解。因此笔者选用SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ MGII(5 μm,4.6 mm×250 mm)、YMC Pack Pro C₁₈(3 μm,4.6 mm×150 mm)、DIKMA Diamonsil C₁₈(5 μm,4.6 mm×250 mm)、Venusil ASB C₁₈(30 mm×2.1 mm,5 μm)和Kromasil C₁₈(3.5 μm,4.6 mm×150 mm)等5根填料基质和规格不同的色谱柱对色谱条件进行了筛选,结果选用YMC色谱柱时,基线平稳,主峰峰形对称,重现性好。

3.3 流动相的选择

通过调节流动相中缓冲溶液的pH、离子强度和有机溶剂(如乙腈或甲醇)的含量,从而控制泰拉菌素的离子化强度和溶解性,使其在色谱柱上获得适当的保留和有效的分离,而且能满足系统适用性要求。

3.3.1 流动相pH的选择

泰拉菌素含3个碱性的氨基基团,具有弱碱性和亲脂性,易溶于酸性溶剂和极性溶剂,在pH为6~8的水溶液中较稳定,在酸性或碱性条件下均不稳定。当pH为8.0时,峰形拖尾因子小,分离效果好,响应值较大,且分析时间短。

3.3.2 流动相中有机溶剂浓度的影响

参考美国药典和欧洲药典以及文献^[12]中大环内酯类药物所采用的流动相体系。乙腈和甲醇是大环内酯类药物的常用溶剂。通过对甲醇和乙腈的体积比考察发现,适当增加有机相中甲醇的比例有利于提高分离效能,但乙腈比例过低会导致保留时

间过长,主峰理论塔板数达不到要求,且不利于杂质的分离。当乙腈质量分数为25%时,保留时间适中,主峰理论塔板数符合要求。最终确定流动相V(甲醇):V(乙腈):V(50 mmol/L pH=8 磷酸缓冲溶液)为45:25:30。

4 结论

在优化色谱条件下,泰拉菌素在YMC色谱柱上得到了较好的分离效果和较高的灵敏度。该方法效能高,灵敏性高,适应性广,为泰拉菌素的含量检测提供了方法学参考。测定结果直观,其方法准确性和重现性满足质量控制要求。在测定化学性质稳定、有效成分单一的抗生素过程中,采用HPLC法可替代传统的容量分析法和微生物检定法^[13],使测定结果更加简便、客观、准确。

参考文献

- [1] Evamns N A. Tulathromycin: An overview of a new triamylide antimicrobial for livestock respiratory disease[J]. *Veterinary Therapeutics*, 2005, 6(2): 83-95.
- [2] 宋福杰,刘明春,邹美. 兽用抗菌药物土拉菌素研究进展[J]. *兽药与饲料添加剂*, 2006, 11(4): 4-6.
- [3] 闫彩虹. 新型动物专用抗生素泰拉菌素研究进展[J]. *禽畜业*, 2009, (10): 19-21.
- [4] 亢继俊,王丽霞,曾振灵. 动物专用大环内酯类新药—泰拉菌素[J]. *广东畜牧兽医*, 2012, 35(2): 7-10.
- [5] 钮伟民,刘晔,戴军,等. 动物性食品中大环内酯类抗生素的HPLC分析[J]. *食品与机械*, 2007, 23(6): 95-98.
- [6] Galler D, Hessong S, Beato, et al. An analytical method for the analysis of tulathromycin, an equilibrating trimiliade in bovine and porcine plasma and lung[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(8): 2179-2191.
- [7] Nowakowski M A, Inskeep P B, Risk J E, et al. Pharmacokinetics and lung tissue concentrations of tulathromycin, a new triamylide antibiotic, in cattle[J]. *Vet Ther*, 2004, 5(1): 60-74.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 二部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 395-396.
- [9] Eberhard S A, Janina S A, Monica V B, et al. Quantitative determination of the macrolide antibiotic tulathromycin in plasma and bronchoalve cells of foals using tandemmass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 850(1/2): 464-470.
- [10] E. U. European Medicines Agency. Committee for veterinary medicinal products tulathromycin, summary report MRL/894/04-FINAL[C]. London: EMEA, 2004.
- [11] Paeson J, Cypers W, Busson R, et al. Isolation of decomposition products of tylosin using liquid chromatography[J]. *J chromatogr*, 1995, 699: 99-106.
- [12] 潘强,陈国琪,赵晓冬,等. HPLC法测定注射用阿奇霉素的含量[J]. *中国药品标准*, 2004, 5(3): 57-58.
- [13] 张治琰. 抗生素药品检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 353-357. ■