

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.11.07

超高效液相色谱法测定原料药中加米霉素的含量

魏秀丽¹,冯言言²,张传津^{1*},张琦¹,杨志昆¹,冯涛¹

(1. 山东省饲料兽药质量检验中心,山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室,动物源细菌耐药性监测与精准化用药山东省工程实验室,济南 250100;2. 齐鲁动物保健品有限公司,济南 250100)

[收稿日期] 2021-04-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 11-0047-06 [中图分类号] S859.83

[摘要] 建立超高效液相色谱-光电二极管阵列法(UPLC-PDA)测定加米霉素原料中主成分加米霉素的含量,采用反相超高效液相色谱法对加米霉素进行色谱分离和快速定量测定。ACQUITY UPLC™ CSH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)为分离柱,柱温:35 ℃;氨水(0.1:30)-乙腈为流动相(30:70)进行等度洗脱;流速:0.45 mL/min;进样量:1 μL;检测波长 208 nm。通过光谱图、保留时间和峰面积参数对加米霉素进行定性、定量检测。加米霉素在 80~1600 μg/mL 的范围内线性关系良好($R^2=0.9996$);方法检测限为 40 μg/mL,定量限为 80 μg/mL,系统适应性试验色谱柱耐受性良好,添加回收率 99.80%,完全满足检测需求。研究建立的 UPLC 方法色谱分离较好,分析速度较快,前处理简单,适用于加米霉素原料中主成分加米霉素含量的检测。

[关键词] 加米霉素;超高效液相色谱法;二极管阵列检测器

Determination of Gamithromycin in Drug Substance by UPLC

WEI Xiu-li¹, FENG Yan-yan², ZHANG Chuan-jin^{1*}, ZHANG Qi¹, YANG Zhi-kun¹, FENG Tao¹

(1. Shandong Center for Quality Control of Feed and Veterinary Drugs, Shandong Provincial Key Laboratory of Quality Safety Monitoring and Risk Assessment for Animal Products, Shandong Engineering Laboratory for Drug Resistance Monitoring and Precise Drug Use of Animal Origin Bacteria, Jinan 250100, China; 2. Qilu Animal Health Products Co., Ltd, Jinan 250100, China)

Corresponding author: ZHANG Chuan-jin, E-mail: 1153702137@qq.com

Abstract: In this study, a ultra-high performance liquid chromatography-photodiode array method (UPLC-PDA) was established to determine the content of gamithromycin. Reversed-phase HPLC method was used for chromatographic separation and rapid quantitative determination of gamithromycin. ACQUITY UPLC™ CSH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) was used as separation columns, Column temperature was 35 ℃; Ammonia water (0.1:30): acetonitrile was used as mobile phase (30:70) for equal elution; Flow rate was 0.45 mL/min; Volume of injection was 1 μL; Detection wavelength was 208 nm. Gamithromycin was

基金项目: 2015 年国家科技支撑计划“兽药安全与质量评价技术研究与应用”(BAD11B03-01)

作者简介: 魏秀丽,正高级兽医师,从事兽药和畜禽产品质量监督检验、标准制修订及新兽药研发工作。

通讯作者: 张传津。E-mail: 1153702137@qq.com

qualitatively and quantitatively detected by spectrogram, retention time and peak area parameters. The linear relationship of gamithromycin was good in the range of 80 ~ 1600 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0.9997$); The limit of detection of the method is 40 $\mu\text{g/mL}$, the quantitation of the method is 80 $\mu\text{g/mL}$, the chromatographic column of system adaptability test was well tolerated, and the recovery rate was 99.80%, which fully meet the testing requirements. This method has better chromatographic separation, faster analysis, simple pre-processing, It is suitable for the detection of the content of the main component of gamithromycin.

Key words: gamithromycin; ultra-high performance liquid chromatography; photodiode array detector

加米霉素为动物专用大环内酯类抗生素,其制剂加米霉素注射液主要治疗对加米霉素敏感的溶血性曼氏杆菌、多杀性巴氏杆菌引起的牛呼吸道疾病,治疗对加米霉素敏感的胸膜肺炎放线杆菌、多杀性巴氏杆菌、副猪嗜血杆菌引起的猪呼吸道疾病^[1-2]。加米霉素抗菌谱广^[3],抗菌活性强,药代动力学特征优良^[4-5],临床疗效好^[6-8],毒副作用小^[9-10],与同类产品替米考星相比,安全性高,无耐药性,对猪牛呼吸系统疾病的防治起到了关键作用,保障了食品安全^[11-12]。在中华人民共和国农业农村部公告第 16 号等文献中对加米霉素及其注射液均采用普通高效液相色谱方法^[13-17]检测,但检测时间比较长,所用流动相量比较大,本实验进行了原料药中加米霉素含量测定的超高效液相色谱-二极管阵列检测法(UPLC-PDA)研究。超高效液相色谱法大大缩短了检测用时。另流动相用量极大减少,减少试验耗材的用量,可极大减少对环境的污染,并降低废液处理的成本。本试验建立的超高效液相色谱法具备精准快捷、经济环保的特点,能有效控制加米霉素原料的质量,可作为企业及相关检验机构的检测方法。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂 加米霉素对照品,含量 98.5%,齐鲁动物保健品有限公司提供;乙腈为色谱纯;氨水为分析纯;超纯水。加米霉素原料,来自齐鲁动物保健品有限公司产品。

1.2 仪器 Waters Acquity™ Ultra performance LC 超高效液相色谱仪,美国 waters 公司;配 Waters 2695 高效液相色谱仪,美国 waters 公司,配二极管阵列检测器。

1.3 方法

1.3.1 供试品溶液制备 取本品精密称定 16 mg,加乙腈:水(70:30)溶解,并定容至 20 mL。

1.3.2 标准储备液的制备 精密称取加米霉素对照品 16 mg(折含量后),加乙腈:水(70:30)溶解,并定容至 10 mL,配制成 1600 $\mu\text{g/mL}$ 储备液。

1.3.3 标准工作液的制备 取储备液适量,配制成标准工作液:每 1 mL 含加米霉素 1200、800、400、200、80、40、20 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。

1.3.4 色谱操作条件及参数 色谱柱:CSH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm);以乙腈为流动相 A,氨水(0.1:30)为流动相 B,以 70:30 的比例进行等度洗脱;二极管阵列检测器,扫描范围 190 ~ 400 nm,检测波长为 208 nm,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,进样室温度 10 $^{\circ}\text{C}$,流速为 0.45 mL/min,进样量 1 μL 。

1.3.5 重复性试验 精密吸取加米霉素对照品储备液,制成每 1 mL 含加米霉素 400 μg 的对照品溶液,重复配制 6 份,进样,计算其峰面积 RSD。精密吸取上述对照品溶液,重复进样 6 次,计算其峰面积 RSD。

1.3.6 准确度试验 取本品精密称定 14.4 mg 至 20 mL 容量瓶,加 1600 $\mu\text{g/mL}$ 标准储备液 1 mL,加乙腈:水(70:30)溶解,并定容至 20 mL。平行做六份上机测定,按外标法以峰面积计算加米霉素的回收率和 RSD。

1.3.7 检测限和定量限的测定 对加米霉素的标准工作液,进行 UPLC 的分析,并逐级降低其浓度,以溶液检测时的信噪比 $S/N \geq 3$ 作为检测限、 $S/N \geq 10$ 作为定量限。

1.3.8 不同色谱条件样品检测比较 分别使用高

效液相色谱仪(参照农业农村部公告第 16 号文^[1],流速:1.2 mL/min;进样量:10 μL,紫外检测器)和超高效液相色谱仪(流速:0.45 mL/min;进样量:1 μL,二极管阵列检测器)在不同的色谱条件下运行,对同一样品中加米霉素的含量和出峰时间分别进行比较。

2 结果与分析

2.1 色谱分离 在优化的色谱条件下,测得加米霉素色谱峰峰形良好,且均达到基线分离,在 1.3.4 项条件下,加米霉素对照品和加米霉素原料样品,色谱保留时间约为 4.2 min,分离度均满足要求。

2.2 线性 在选定的色谱条件下,使用等度洗脱的方法,可以有效地分离目的峰,加米霉素在 80 ~ 1600 μg/mL 的范围内,线性回归方程为 $y = 272.2x + 193.23$, $R^2 = 0.9996$ 。其标准曲线见图 1。

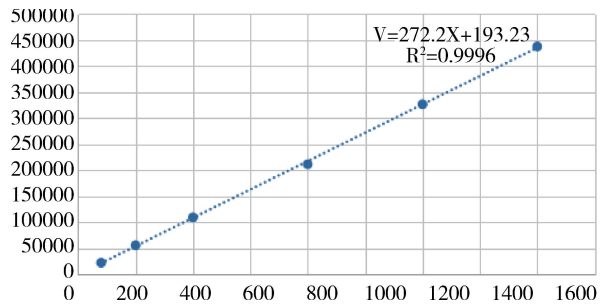


图 1 加米霉素标准曲线

Fig 1 Standard curve of gamithromycin

2.3 重复性试验 在选定的色谱条件下,配制 400 μg/mL 加米霉素对照品溶液,重复配制 6 份,进样,测得加米霉素峰面积 RSD 为 0.43%;取 400 μg/mL 加米霉素对照品溶液,重复进样 6 次,测得加米霉素峰面积 RSD 为 0.26%,均满足实验要求。

2.4 准确度实验 加米霉素的平均回收率为 99.80%, RSD 分别为 0.32% (表 1)。

2.5 检测限和定量限 40 μg/mL 加米霉素对照品溶液信噪比 ≥ 3 为检出限,80 μg/mL 加米霉素对照品溶液信噪比 ≥ 10 为定量限(图 2、图 3)。

表 1 加米霉素添加回收实验结果 (n = 6)

Tab 1 Experimental results of gamithromycin fortified recovery (n = 6)

加米霉素	1	2	3	4	5	6
加入原料/mg 含量(99.57%)	14.41	14.43	14.39	14.51	14.42	14.46
原有量/mg	14.348	14.368	14.328	14.448	14.358	14.398
加入标准 品量/mg	1.576	1.576	1.576	1.576	1.576	1.576
测得量/mg	15.921	15.943	15.899	16.025	15.922	15.974
测得加 入量/mg	1.573	1.575	1.571	1.578	1.564	1.576
回收率/%	99.81	99.94	99.68	100.13	99.24	100.00
平均回收率/%	99.80					
RSD/%	0.32					

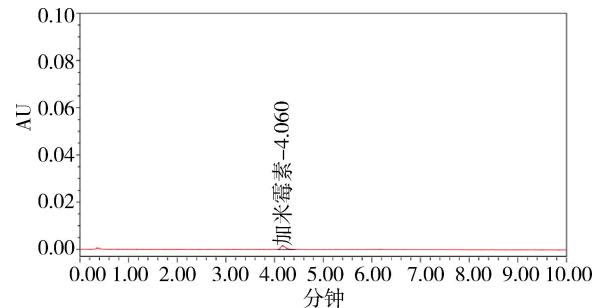


图 2 40 μg/mL 加米霉素原料色谱图 UPLC 1 μL

Fig 2 40 μg/mL gamithromycin drug substance chromatogram UPLC 1 μL

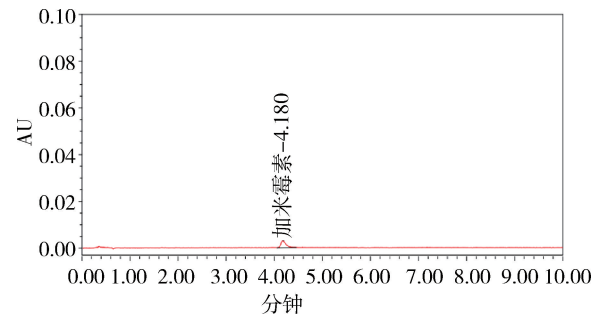


图 3 80 μg/mL 加米霉素原料色谱图 UPLC 1 μL

Fig.3 80 μg/mL gamithromycin drug substance chromatogram UPLC 1 μL

2.6 不同色谱条件样品检测结果的比较 不同色谱条件下的主成分理论塔板数、保留时间等参数的比较见表 2。

表 2 不同色谱条件下的主成分不同色谱参数的比较

Tab 2 Comparison of principal components with different chromatographic parameters under different chromatographic conditions

加米霉素	UPLC	HPLC(农业农村部公告第 16 号)	是否满足要求
平均理论塔板数	约 7280	约 12800	是
保留时间	约 4.2 min	约 21.5 min	是
对称因子	约 1.5	约 1.6	是
运行时间	10 min	40 min	是
流 速	0.45 mL/min	1.2 mL/min	是
运行一针所需流动相体积	4.5 mL	48 mL	是

由表 2 可见,使用 waters 的 CSH C₁₈ 色谱柱理论塔板数非常高,性能是完全满足要求的。光谱图见图 4 ~ 图 5;色谱图见图 6 ~ 图 9。保留时间约为 4.2 min,满足检测需求。

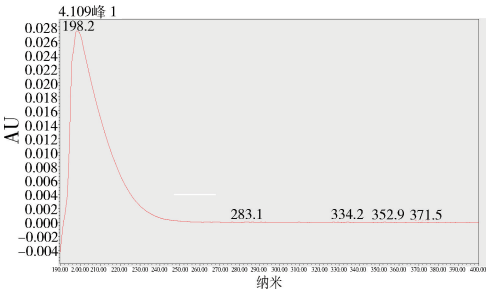


图 4 加米霉素对照品 UPLC 光谱图

Fig 4 UPLC spectrogram of gamithromycin control

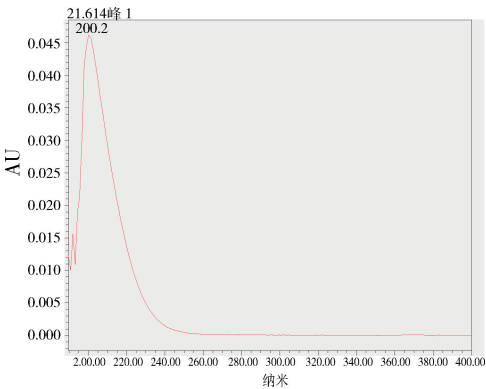


图 5 加米霉素对照品 HPLC 光谱图

Fig. 5 HPLC spectrogram of gamithromycin control

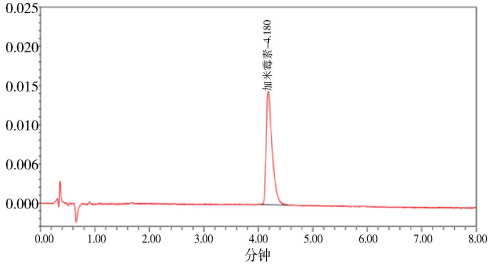


图 6 800 µg/mL 加米霉素对照品 UPLC 色谱图(1 µL)

Fig 6 UPLC chromatogram of 800 µg/mL gamithromycin control (1 µL)

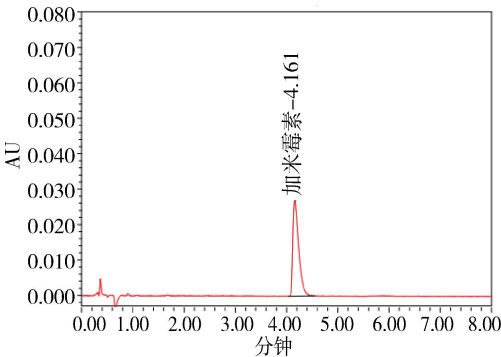


图 7 800 µg/mL 加米霉素原料色谱图 UPLC (1 µL)

Fig. 7 UPLC chromatogram of 800 µg/mL gamithromycin drug substance (1 µL)

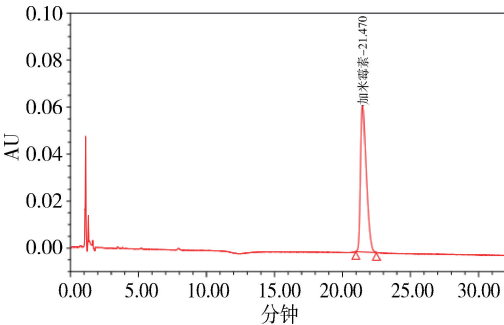


图 8 800 µg/mL 加米霉素对照品 HPLC 色谱图(10 µL)

Fig 8 HPLC chromatogram of 800 µg/mL gamithromycin control (10 µL)

使用 waters 超高效液相色谱仪(色谱条件见 1.3.4 项)和高效液相色谱仪(色谱条件见 1.3.7 项),对同一样品中加米霉素的含量(按无水物计算)分别进行了比较(表 3),无显著差异,相对偏差均小于 1%,表明本实验方法简单可行,结果精确可靠。

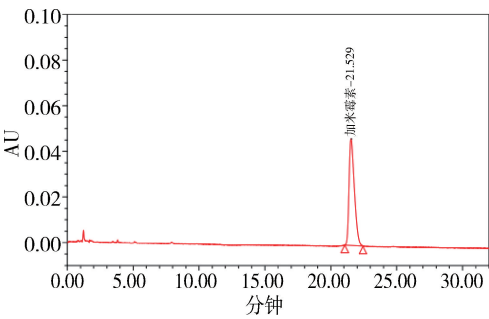


图 9 800 µg/mL 加米霉素原料 HPLC 色谱图 (10 µL)

Fig. 9 HPLC chromatogram of 800 µg/mL gamithromycin raw material (10 µL)

表 3 不同色谱条件下加米霉素含量检测结果表 (n=4)

Tab 3 Results of different chromatographic conditions for the content of gamithromycin (n=4)

不同批次加米霉素原料 中加米霉素的含量/%	HPLC	UPLC(本实验方法)
加米霉素原料 1	99.57	99.58
加米霉素原料 2	99.56	99.55
加米霉素原料 3	99.59	99.57

由于两种色谱方法均已通过其方法学验证,均可以准确控制其指标成分。从检测效率上看,优选超高效法(UPLC)。

3 讨论与结论

3.1 UPLC 方法波长的选择及定性鉴别 本研究将加米霉素的对照溶液利用 PDA 检测器采集其光谱图,在波长 190 ~ 400 nm 范围内进行扫描,加米霉素在 198.2 nm 左右有最大吸收,根据光谱图可以判断含有主成分,可以作为定性鉴别的手段;198.2 nm 信号噪音较大,最终选择同原农业农村部公告中 208 nm 作为检测波长,35 °C 柱温,保留时间约为 4.2 min。

3.2 UPLC 方法色谱柱耐用性实验 改变流速 0.44、0.46 mL/min,柱温 35 °C 不变,保留时间上下浮动 0.3 min 以内。改变柱温 33、37、40 °C,流速 0.45 mL/min 不变,保留时间上下浮动 0.3 min 以内,均能达到良好的分离度和精确的含量测定结果。色谱柱性能稳定,适合本项目加米霉素含量

的测定。

3.3 本方法与农业农村部颁布的质量标准^[13]的结果对比 本实验选择了兽药企业的加米霉素原料进行含量测定,分别采用高效液相色谱方法和超高效液相色谱方法,原料中加米霉素含量相对偏差均小于 1%。超高效液相流动相的流速为 0.45 mL/min,需要运行 10 min,每针运行需要 4.5 mL 流动相;高效液相色谱仪器流速为 1.2 mL/min,运行时间 40 min,每针运行需要 48 mL 流动相。超高效液相色谱更节约实验耗材溶剂等,每运行一针流动相节省 43.5 mL,并节约了 30 min 时间。在废液处理高成本的今天,超高效液相色谱方法更有优势,更经济和快捷。

本实验建立的超高效液相色谱法,对加米霉素原料中加米霉素进行定性和定量测定,方法快速,可以作为企业内控标准方法,具备精准快捷、经济环保的特点,能有效控制加米霉素原料的质量。

参考文献:

[1] 李先强. 兽用加米霉素研究与应用现状[J]. 动物医学进展, 2018, 39(12):180-184.

Li X Q. Current status of research and application of gamithromycin for veterinary use [J]. Advances in Animal Medicine, 2018, 39(12): 180-184.

[2] 李小娜, 梁小菊, 张莹雪, 等. 动物专用抗生素——加米霉素的研究进展[J]. 吉林畜牧兽医, 2019, 40(09): 92-93.

Li X N, Liang X J, Zhang Y X, et al. Research Progress——Ametracycline in animal - specific antibiotics [J]. Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2019, 40(09): 92-93. .

[3] 周德刚, 卢基忠, 李朋朋, 等. 加米霉素对牛呼吸道疾病相关病原菌临床分离株的体外药敏试验[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(02):113-116.

Zhou D g, Lu J Z, Li P P, et al. Drug sensitivity test in vitro of gamithromycin against clinical isolates of bovine respiratory disease - related pathogens [J]. Anhui Agricultural Science, 2020, 48(02):113-116.

[4] 王红霄, 邓 菲. 加米霉素注射液的生物利用度及药动学研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(12):1543-1547.

Wang H X, Deng F. Bioavailability and pharmacokinetics of gamithromycin [J]. Injection Chinese Journal of Antibiotics, 2018, 43(12):1543-1547.

- [5] 邓菲,段鹏,孙晓蒙. 加米霉素注射液在猪体内残留消除研究[J]. 中国抗生素杂志,2019,44(09):1114-1118.
- Deng F, Duan P, Sun X M. Study on the Elimination of Residue in Pig with gamithromycin Injection [J]. Chinese Journal of Antibiotics,2019,44(09):1114-1118.
- [6] 冯言言,魏秀丽,郑莉,等. 加米霉素注射液治疗多杀性巴氏杆菌引起牛呼吸道疾病的临床疗效观察[J]. 中国兽医杂志,2019,55(09):97-100.
- Feng Y Y, Wei X L, Zheng L, *et al.* Clinical Observation on Treatment of Bovine Respiratory Tract Disease Caused by *Pasteurella multocida* Injection [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019,55(09):97-100.
- [7] 康彦,王振来,王红霄,等. 加米霉素注射液对猪呼吸道疾病治疗的临床试验[J]. 动物医学进展,2019,40(01):135-140.
- Kang Y, Wang Z L, Wang H X, *et al.* Clinical trial of gamithromycin injection for the treatment of respiratory diseases in pigs [J]. Advances in Animal Medicine,2019,40(01):135-140.
- [8] 邓菲,孙进,王红霄. 加米霉素注射液治疗牛呼吸系统疾病(BRD)的田间试验[J]. 中国兽医杂志,2018,54(01):105-108.
- Deng F, Sun J, Wang H X. Field trial of gamithromycin injection in the treatment of bovine respiratory system diseases (BRD) [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,2018,54(01):105-108.
- [9] 王海,邓菲,耿雅丽. 加米霉素注射液对靶动物猪的安全性试验研究[J]. 中国抗生素杂志,2018,43(12):1538-1542.
- Wang H, Deng F, Geng Y L. Experimental study on the safety of gamithromycin injection on target pigs [J]. Chinese Journal of Antibiotics,2018,43(12):1538-1542.
- [10] 肖天石,丁久恒,于泓潇,等. 加米霉素注射液在靶动物猪的安全性试验[J]. 中国兽医杂志,2018,54(08):109-111.
- Xiao T S, Ding J H, Yu H X, *et al.* Safety Test of gamithromycin Injection in Target Animal Pig [J]. China Chinese Journal of Veterinary Medicine,2018,54(08):109-111.
- [11] 康彦,王艳艳,邓菲. 加米霉素注射液对奶牛安全性的试验研究[J]. 中国奶牛,2018,(07):55-58.
- Kang Y, Wang Y Y, Deng F. Experimental Study on the Safety of Cows with gamithromycin Injection [J]. Chinese cows,2018,(07):55-58.
- [12] 张云茜,邓菲,路美玉. 加米霉素注射液特殊安全性试验研究[J]. 中国兽药杂志,2018,52(05):63-71.
- Zhang Y X, Deng F, Lu M Y. Experimental Study on Special Safety of gamithromycin Injection [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,2018,52(05):63-71.
- [13] 中华人民共和国农业农村部第16号公告[S].
- Announcement No. 16 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the people's Republic of China [S].
- [14] 张聪,姚路路,樊丽博,等. 加米霉素含量测定方法的建立[J]. 安徽农业科学,2019,47(03):199-201.
- Zhang C, Yao L L, Fan L B, *et al.* Establishment of a method for determination of gamithromycin [J]. Anhui Agricultural Sciences,2019,47(03):199-201.
- [15] 邓菲,王艳艳,段鹏. 加米霉素注射液含量的高效液相色谱检测法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医,2019,(04):149-153.
- Deng F, Wang Y Y, Duan P. Establishment of High Performance Liquid Chromatography for Determination of Aamithromycin Injection [J]. and Heilongjiang Livestock and Veterinary Medicine 2019,(04):149-153.
- [16] 段鹏,邓菲,路美玉. 高效液相色谱法测定加米霉素原药含量的研究[J]. 中国动物保健,2018,20(09):54-58.
- Duan P Deng F, Lu M Y. Determination of the content of gamithromycin by high performance liquid chromatography [J]. China Animal Health Care, 2018,20(09):54-58.
- [17] 张聪,姚路路,侯林,等. 加米霉素对照品标定方法的建立[J]. 中国兽药杂志,2019,53(03):67-71.
- Zhang C, Yao L L, Hou L, *et al.* Establishment of calibration method for gamithromycin reference substance [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,2019,53(03):67-71.

(编辑:侯向辉)