doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2023.04.06

盐酸林可霉素乳房注入剂(泌乳期)有关物质检查方法的建立

韩宁宁,赵富华,王 轩,彭文绣,杨秀玉,戴 青,赵 晖*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022 - 10 - 21 [文献标识码]A [文章编号]1002 - 1280 (2023) 04 - 0040 - 06 [中图分类号]S859.79

[摘 要] 建立了盐酸林可霉素乳房注入剂(泌乳期)有关物质的检查方法。参考《中国兽药典》盐酸林可霉素注射液的含量测定色谱条件及有关物质限度范围,借鉴乳房注入剂含量测定的供试品提取方法,建立了有关物质检查方法,保证了方法的一致性和通用性。方法验证结果显示,本方法专属性较强,准确度和精密度符合要求,耐用性良好,适用于对盐酸林可霉素乳房注入剂进行有关物质检查,完善了标准对产品的质量控制功能,被收载入 2020 年版《中国兽药典》。

[关键词] 盐酸林可霉素乳房注入剂(泌乳期);有关物质;一致性;通用性

Establishment of The Method for Examination of Related Substances in Lincomycin Hydrochloride Intramammary Infusion (Lactating Cow)

HAN Ning - ning, ZHAO Fu - hua, WANG Xuan, PENG Wen - xiu, YANG Xiu - yu, DAI Qing, ZHAO Hui*

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

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

Abstract: A method for examination of related substances in lincomycin hydrochloride intramammary infusion (lactating cow) was established. With reference to the chromatographic conditions for the content determination and the limit range of related substances of lincomycin hydrochloride injection in Chinese Veterinary Pharmacopoeia, and with reference to the extraction method of the test sample for the content determination of lincomycin hydrochloride intramammary infusion, a method for examination of related substances in the preparation was established which ensured consistency and generality. The method validation results show that the method has strong specificity, high accuracy and precision, and good durability. It is suitable for examination of related substances in lincomycin hydrochloride intramammary infusion, and improves the quality control function of the standard. It was included in Chinese Veterinary Pharmacopoeia (2020).

Key words: Lincomycin hydrochloride intramammary infusion (lactating cow); examination of related sub-

作者简介: 韩宁宁,副研究员,从事兽药检验检测与质量标准研究工作

通讯作者: 赵 晖。E - mail: 171977364@qq.com

stances; consistency; generality.

林可霉素属于林可胺类抗生素,能特异性的阻止细菌 mRNA 与核糖体的有效结合, 阻断肽链延长,从而抑制细菌细胞内蛋白质合成,造成细菌死亡。其主要用于革兰氏阳性菌如链球菌、葡萄球菌的治疗,同时对部分革兰氏阴性菌如大肠埃希菌等也具有一定的抑菌效果[1-3]。盐酸林可霉素乳房注入剂是由林可霉素与油性基质混合制得的混悬型半固体制剂,用于奶牛泌乳期乳房炎的治疗[4]。

经国家兽药基础数据库[5]查询,目前有 26 家兽药生产企业获得了盐酸林可霉素乳房注入剂(泌乳期)的批准文号。该产品在市场上占有量大,产品性质稳定,质量标准成熟。因此,按照农业行业(国家)标准项目兽药国家标准制修订计划,将其收入 2020 版《中国兽药典》,有利于对其进行质量控制和监管。

盐酸林可霉素乳房注入剂(泌乳期)原质量标准收载于 2017 年版《兽药质量标准》(化学药品卷)[6]。该标准的主要缺陷是缺少有关物质检查项,无法对产品的安全性进行有效控制。因此,参考《中国兽药典》盐酸林可霉素注射液的含量测定色谱条件及有关物质限度范围,借鉴乳房注入剂含量测定的供试品提取方法,建立了有关物质检查方法,方法验证结果显示,该方法专属性较强,精密度和准确度符合要求,耐用性良好,被收载入 2020 年版《中国兽药典》[7]。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　供试品　共收集到来自 3 家兽药生产企业的 4 批样品,见表 1。

表 1　盐酸林可霉素乳房注入剂(泌乳期)样品信息

Tab 1　Information of samples of lincomycin hydrochloride intramammary infusion (lactating cow)

生产企业编号	产品批号
1	20170802
1	20170803
2	DDM180402
3	20170714

1.1.2 对照品　头孢喹肟对照品来源为中国兽医药品监察所,批号/含量:K0101503/84.6%。

1.1.3　仪器及设备　高效液相色谱仪(HPLC)(Waters e2695 色谱系统,Empower 2 色谱工作站);二极管阵列检测器(PDA)(Waters 2998);XS205 分析天平(Mettler Toledo)。

1.2　方法

1.2.1　含量测定方法的建立　盐酸林可霉素乳房注入剂质量标准中含量测定色谱条件与《中国兽药典》盐酸林可霉素注射液含量测定和有关物质的色谱条件均一致。因此,拟采用与上述一致的色谱条件,以保证标准的一致性和通用性。

注射液有关物质供试品溶液的浓度为 4 mg/mL,为保证杂质的充分检出,供试品溶液浓度拟与其一致。再借鉴乳房注入剂原质量标准中含量测定项下供试品的提取方法,适当提高供试品取样量,确定供试品溶液配制方法为:取本品约 2.0 g(相当于林可霉素 100 mg),精密称定,置具塞离心管中,加石油醚(沸程 90 ~ 120 ℃)10 mL,振摇 1 min,离心 5 min(3500 ~4000 转/分钟),弃去上清液,挥干,沉淀加水 12 mL 使溶解,转移至 25 mL 量瓶中,用流动相洗涤离心管,洗液并入量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

采用上述方法,测定 3 家企业林可霉素乳房注入剂及对应原料的有关物质,对二者进行比较,参考注射液有关物质限度,结合制剂测定数据,制定合理的杂质限度。

1.2.2　拟定有关物质方法　取本品约 2.0 g(相当于林可霉素 100 mg),精密称定,置具塞离心管中,加石油醚(沸程 90 ℃ ~120 ℃)10 mL,振摇 1 min,离心 5 min(3500 ~4000 转/分钟),弃去上清液,挥干,沉淀加水 12 mL 使溶解,转移至 25 mL 量瓶中,用流动相洗涤离心管,洗液并入量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加水 48 mL,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。精密量取供试品溶液和对照溶液各 10 μL,分别注入液相色谱仪,用十八烷基

硅烷键合硅胶为填充剂;以 0.05 mol/L 硼砂溶液(用磷酸调节 pH 值至 5.0) – 甲醇 – 乙腈(67∶33∶2)为流动相;检测波长为214 nm。记录色谱图至主成分峰保留时间的 3 倍。供试品溶液色谱图中如有杂质峰,除林可霉素 B 峰外,单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积(1.0%),各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的 2 倍(2.0%),供试品溶液色谱图中任何小于对照溶液主峰面积 0.05 倍的色谱峰可忽略不计。

1.2.3 *方法验证* 按照《中国兽药典》附录 9101 分析方法验证指导原则[3]要求进行了方法验证。

1.2.3.1 专属性

1.2.3.1.1 干扰试验 分别取溶剂空白、两种不同辅料及制剂,按照拟定方法配制成相应供试品溶液进行测定,采集色谱图,考察溶剂和辅料对制剂有关物质检查是否产生干扰。

1.2.3.1.2 破坏性试验[8] 分别取空白辅料及本品,照下述方法分别进行高温、氧化、碱降解、酸降解破坏后,制备成供试品溶液进行测定。

(1)空白辅料 取空白辅料约 2.0 g,照供试品溶液配制方法,配制空白辅料的供试品溶液。

(2)未降解 取本品约 2.0 g,照供试品溶液配制方法,配制未降解的供试品溶液。

(3)酸降解 分别取空白辅料及本品各约2.0 g,置具塞离心管中,加6 mol/L 盐酸溶液 1 mL,室温反应 1 小时,用6 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL 中和,照供试品溶液配制方法,配制酸降解供试品溶液。

取 6 mol/L 盐酸溶液 1 mL 和 6 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL,置具塞离心管中,室温反应 1 小时,照供试品溶液配制方法,配制酸降解溶剂空白溶液。

(4)碱降解 分别取空白辅料及本品各约 2.0 g,置具塞离心管中,加饱和氢氧化钠溶液(室温 30 ℃,约 29.5 mol/L)1 mL,室温反应 24 h,用浓盐酸溶液 2.5 mL 中和,照供试品溶液配制方法,配制碱降解供试品溶液。

取饱和氢氧化钠溶液 1 mL 和浓盐酸溶液 2.5 mL,置具塞离心管中,室温反应 24 h,照供试品溶液配制方法,配制碱降解溶剂空白溶液。

(5)氧化降解 分别取空白辅料及本品约2.0 g,置具塞离心管中,加 3% 双氧水溶液 1 mL,室温反应1 h,照供试品溶液配制方法,配制氧化降解供试品溶液。

取 3% 双氧水溶液 1 mL,置具塞离心管中,照供试品溶液配制方法,配制氧化降解溶剂空白溶液。

(6)高温降解 分别取空白辅料及本品,置锥形瓶中,在 105 ℃放置 7 h,分别取 2.0 g,置具塞离心管中,照供试品溶液配制方法,配制高温降解供试品溶液和空白溶液。

(7)光照降解 考虑到各企业的上市包装均为不透光的塑料注射器,在产品贮存和运输过程中均无接触强光照射的可能,故未考察强光照射降解的有关物质。

1.2.3.2 精密度 取有关物质检查项下对照溶液,照该方法重复进样 5 次,计算主峰保留时间、峰面积的 *RSD*,考察方法精密度。

1.2.3.3 溶液稳定性 取有关物质项下对照溶液,在室温放置 0、3、6、9、12 h 后采集色谱图,考察溶液稳定性。

1.2.3.4 定量限和检测限 配制不同浓度林可霉素对照品溶液并测定相应信噪比,以信噪比约为 3∶1 时的浓度为检测限,信噪比约为 10∶1 时的浓度为定量限。

1.2.3.5 线性 取林可霉素对照品适量,精密称定,用流动相溶解,分别制成 4 μg/mL、16 μg/mL、40 μg/mL、80 μg/mL 的溶液,采集色谱图。以峰面积与对照品浓度作图,用最小二乘法进行线性回归,考察供试品浓度与峰面积是否呈线性关系。

1.2.3.6 耐用性 采用供试品溶液对该方法的下列可变动因素——不同品牌的色谱柱、柱温及流速的耐用性进行考察。

1.2.4 *供试品测定* 取上述三家企业的四批供试品,按上述方法进行测定,以制订合理的限度范围。

2 结果与分析

2.1 *有关物质检查方法的建立* 通过比较制剂与对应原料杂质分布情况,发现企业 1 和 2 制剂与原料有关物质的杂质谱基本一致,制剂较原料有关物质的量稍有增加。企业 3 制剂较原料有关物质数目及含量均有明显增加,推测为制剂制备工艺控制不佳所致[9]。尽管如此,3 家企业的所有批次制剂

有关物质含量均低于注射液质量标准中的有关物质限量。因此本方法有关物质的限量参照《中国兽药典》盐酸林可霉素注射液质量标准中有关物质限量的规定：供试品溶液色谱图中如有杂质峰，除林可霉素 B 峰外，单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积（1.0%），各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的 2 倍（2.0%）。

表 2　各企业制剂与原料有关物质比较

Tab 2　Comparison on related substances of preparations and raw materials of various enterprises

企业/批号	原料		制剂	
	单个杂质/%	总杂质/%	单个杂质/%	总杂质/%
企业 1/20170802	0.23	0.23	0.35	0.54
企业 1/20170803	0.23	0.23	0.31	0.45
企业 2/DDM180402	0.19	0.19	0.31	0.45
企业 3/20170714	0.16	0.16	0.32	0.92

2.2　方法学验证

2.2.1　专属性

2.2.1.1　干扰试验　结果显示，溶剂空白、注射用大豆油（企业 1、3 主要辅料）、轻质液体石蜡（企业 2 主要辅料）在林可霉素、林可霉素 B（与林可霉素相对保留时间为 0.4 ~ 0.7）及其他杂质出峰位置均无明显色谱峰，对有关物质测定均无干扰。

2.2.1.2　破坏试验　在酸、碱、氧化、高温等剧烈条件下，空白辅料未产生明显降解产物，不干扰有关物质检测。供试品对强碱及高温稳定，饱和氢氧化钠作用 24 小时或 105 ℃作用 7 小时有关物质未发生明显变化。在强酸和强氧化破坏条件下，有关物质明显增加，但仍可与原有关物质实现良好分离，且各有关物质峰纯度均小于阈值，为单一物质峰（见表 3）。

2.2.2　精密度　如表 4 所示，连续进样 5 针保留时间和峰面积 *RSD* 均小于 2.0%，显示方法精密度良好。

表 3　破坏性试验结果

Tab 3　Destructive test results

降解条件	酸降解	碱降解	氧化降解	高温降解
主峰与相邻峰分离度	3.7/7.5	4.9/4.4	3.9	4.7/4.3
RT = 50 min 杂质纯度角度/阈值	9.293/10.163	8.881/9.473	9.598/9.756	11.364/11.494
RT = 50 min 杂质与相邻峰分离度	14.0/3.7	2.2/4.9	7.3/3.9	2.4/4.7
RT = 72 min 杂质纯度角度/阈值	6.994/7.112	17.983/18.432	/	21.208/21.644
RT = 72 min 杂质与相邻峰分离度	7.5	4.4	/	4.3
RT = 16 min 杂质纯度角度/阈值	1.249/2.156	/	/	/
RT = 16 min 杂质与相邻峰分离度	4.8	/	/	/
RT = 20 min 杂质纯度角度/阈值	/	/	1.087/1.139	/
RT = 20 min 杂质与相邻峰分离度	/	/	2.7	/
RT = 27 min 杂质纯度角度/阈值	/	/	0.202/1.143	/
RT = 27 min 杂质与相邻峰分离度	/	/	2.7/7.3	/

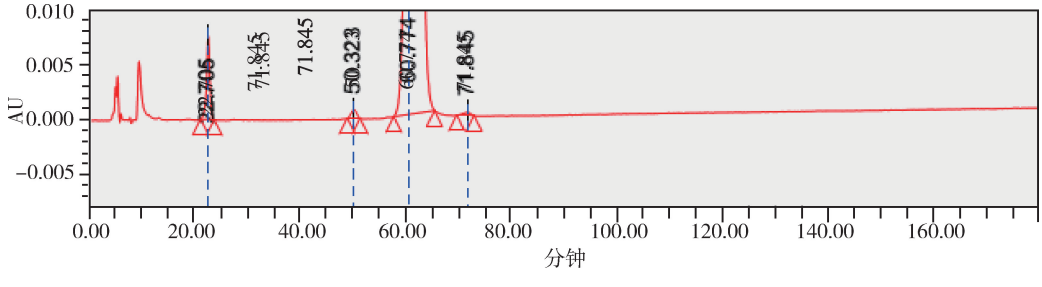


图 1　未降解供试品溶液色谱图

Fig 1　Chromatogram of undegraded test solution

表 4　精密度试验结果

Tab 4　Precision test results

编号	1	2	3	4	5	平均值	*RSD*(%)
保留时间/min	60.822	60.715	60.562	60.382	60.365	60.569	0.3
峰面积	166193	170224	171077	173209	172472	170635	1.6

2.2.3　溶液稳定性　如表 5 所示，室温放置 6 小时内，峰面积基本无变化，9 小时后主峰面积稍有降低，但 12 小时内主峰面积 *RSD* 仍小于 2.0%。故该方法室温放置 12 小时溶液稳定性良好。

表 5　稳定性试验结果

Tab 5　Stability test results

放置时间/h	0	3	6	9	12	平均值	*RSD*(%)
峰面积	174997	174641	174547	174245	173661	174418	0.3

2.2.4　定量限和检测限　该方法检测限为 1 μg/mL，定量限为 4 μg/mL。

2.2.5　线性　如图 2 所示，林可霉素峰面积与浓度线性方程为：$y = 4494.6x - 2273.9$，$r = 0.9999$。该结果表明林可霉素在 4 μg/mL ~ 80 μg/mL 浓度范围内线性关系良好。

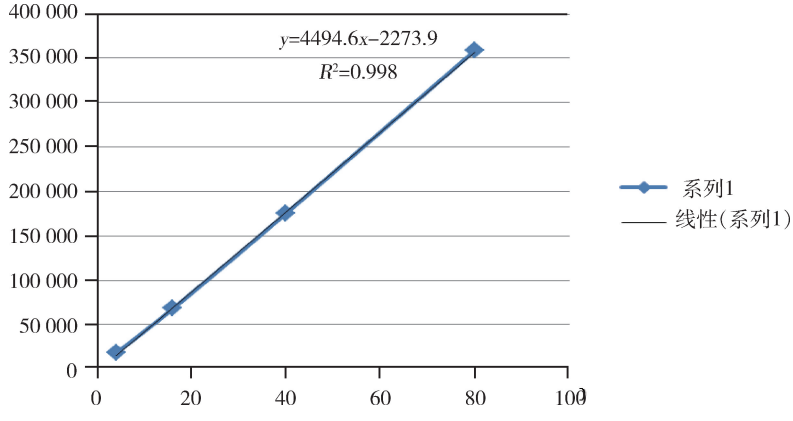


图 2　有关物质线性曲线

Fig 2　Linear curve of related substances

2.2.5　耐用性　如表 6 所示，对流速、柱温、色谱柱等条件进行微调，主峰与相邻峰分离度均大于 1.5，方法耐用性良好。

表 6　耐用性试验结果

Tab 6　Durability test results

变动因素	主峰与相邻峰分离度
Alltima C_{18} 250 ×4.6 mm	4.0/4.0
HSS T3 C_{18} 250 ×4.6 mm	3.8/3.5
YMC C_{18} 250 ×4. 6 mm	4.0/4.2
流速 0.4 mL/min	4.1/3.6
流速 0.5 mL/min	4.0/4.0
流速 0.6 mL/min	3.6/3.4
柱温 30 ℃	4.0/4.0
柱温 35 ℃	4.8/4.3
柱温 40 ℃	5.9/5.5

2.3　供试品测定　取上述三家企业的四批供试品，按有关物质项方法进行测定，结果见表 2。三家企业供试品有关物质均符合规定。

3　讨论与结论

本试验参考《中国兽药典》盐酸林可霉素注射液的含量测定色谱条件及有关物质限度范围，借鉴乳房注入剂含量测定的供试品提取方法，建立了盐酸林可霉素乳房注入剂有关物质检查方法。方法验证结果显示，本方法专属性较强，准确度和精密度符合规定，耐用性良好，可实现对盐酸林可霉素乳房注入剂有关物质的有效控制，完善了标准对产

品的质量控制功能,已被收载入 2020 年版《中国兽药典》。

在上述色谱条件下,企业 3 供试品色谱图中林可霉素主峰与相邻杂质峰之间可实现良好分离,但杂质谱较为复杂,各杂质之间无法实现完全分离,部分有关物质峰为非单一物质峰。与对应原料相比,制剂杂质明显增加,考虑是由于生产工艺参数控制不佳导致。由于其他企业不存在上述问题,为保证标准的一致性,仍采用与注射液一致的色谱条件。

对照溶液在配制的过程中,未采用流动相直接进行稀释,而是加入了定量水后再加流动相稀释。主要是考虑供试品溶液的溶剂为水与流动相的混合液,为保证对照溶液与供试品溶液溶剂一致,以防产生溶剂效应[10],引起二者主峰出峰时间差异,在对照溶液的配制过程中采用了与供试品溶液相同比例的溶剂。

盐酸林可霉素乳房注入剂的市场占有量较大,目前有 26 家企业获得该品种的批准文号,但由于样品收集的各种限制,本试验仅收集到 3 个企业的 4 批样品。由于各企业生产工艺、制剂处方存在差异,杂质谱亦可能有所不同,因此不排除个别企业制剂的专属性存在干扰的可能。因此,企业在应用本方法进行检验时,需进行专属性的方法确认试验。

参考文献:

[1] 秦 燕. 林可霉素在治疗猪病中的应用分析[J]. 中国畜禽种业, 2021, 8: 155 - 156.
Qin Y. Analysis of the application of lincomycin in the treatment of swine disease [J]. *Chinese livestock and poultry seed industry*, 2021, 8: 155 - 156.

[2] 赵俊华. 林可霉素在养猪生产中的应用[J]. 当代畜禽养殖业, 2020, 2: 32.
Zhao J H. Application of Lincomycin in swine production [J]. *Contemporary livestock and aquaculture*, 2020, 2: 32.

[3] 王 忠, 王立奇. 林可霉素在兽医临床上的应用进展[J]. 兽医导刊, 2010, 150(2): 42 - 44.
Wang Z, Wang L Q. Application progress of lincomycin in veterinary clinic[J]. *Veterinary Guide*, 2010, 150(2): 42 - 44.

[4] 郭玉凡, 王 颖, 周衡等. 一种奶牛用盐酸林可霉素乳房注入剂及其制备方法: 中国, CN104382924A [P]. 2015 - 03 - 04.
Guo Y F, Wang Y, Zhou H, *et al*. A kind of lincomycin hydrochloride intramammary infusion for dairy cows and its preparation method: China, CN104382924A [P]. 2015 - 03 - 04.

[5] 国家兽药基础数据库[DB/OL]. http://vdts.ivdc.org.cn:8081/cx/#.
National veterinary drug basic database [DB/OL]. http://vdts.ivdc.org.cn:8081/cx/#.

[6] 中国农业出版社.《兽药质量标准》(化学药品卷), 2017 年版[S].
China Agriculture Press. Veterinary drug standards (Chemical drug volume), 2017[S].

[7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典, 2020 年版[S].
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Chinese Veterinary Pharmacopoeia, 2020[S].

[8] 胡泽铠, 罗 嫄. HPLC 加校正因子的主成分自身对照法测定呋塞米片中有关物质的含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(8): 1433 - 1439.
Hu ZK, Luo Y. Determination of related substances in furosemide tablets by HPLC - principal component self - control with correct factor[J]. *Chin J Pham Anal*, 2022, 42(8): 1433 - 1439.

[9] 肖 菁, 潘震宇, 李瑞莲等. 不同原料来源与灭菌工艺对胞磷胆碱钠注射液中有关物质的影响[J]. 中国药事, 2014, 28(1): 48 - 52.
Xiao J, Pan Z Y, Li R L, *et al*. Influences of different sources of raw materials and sterilization processes on related substances in citicoline sodium injection[J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 2014, 28(1): 48 - 52.

[10] 安 琪,孙 红,武林芝等. 高效液相色谱中溶剂效应的探讨及消除方法[J]. 广州化工, 2022, 50(8): 95 - 98.
An Q, Sun H, Wu L Z, *et al*. Exploration on causes and propose elimination method of sample solvent effect in HPLC [J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2022, 50(8): 95 - 98.

(编 辑:陈 希)