

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.07.04

超高效液相色谱法测定原料药中泰地罗新的含量

汤文利^{1,2}, 郭玉秋^{1*}, 李有志¹, 赵延东³, 魏秀丽¹,
王艳芬¹, 赵晓雨¹, 梁萌¹, 门晓冬¹, 宋祥彬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, 济南 250100;

2. 山东省蛋鸡技术创新中心, 济南 250102; 3. 山东久隆恒信药业有限公司, 山东德州 251100)

[收稿日期] 2023-01-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 07-0025-08 [中图分类号] S859.79

[摘要] 本实验建立超高效液相色谱法(UPLC)测定泰地罗新原料药中泰地罗新及其异构体的含量。采用 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.05 mol/L 磷酸氢二钾缓冲液(磷酸调 pH 值至 8.2) - 乙腈(45:55), 检测波长 289 nm, 流速 0.5 mL/min, 柱温: 40 °C, 进样量: 1 μL。通过光谱图、保留时间和峰面积参数对泰地罗新进行定性、定量检测。泰地罗新在 0.2 - 2.4 mg/mL 的范围内呈良好的线性关系($R^2 = 0.9992$); 方法检测限为 0.2 mg/mL, 定量限为 0.6 mg/mL; 精密性、重复性、稳定性完全满足检测需求。该方法快速、准确、分离度好, 可快速检测泰地罗新原料药中泰地罗新及其异构体的含量。

[关键词] 超高效液相色谱法; 原料药; 泰地罗新及其异构体; 含量

Determination of Tildipirosin in Drug Substance by Ultra High Performance Liquid Chromatography

TANG Wen-li^{1,2}, GUO Yu-qiu^{1*}, LI You-zhi¹, ZHAO Yan-dong³, WEI Xiu-li¹,
WANG Yan-fen¹, ZHAO Xiao-yu¹, LIANG Meng¹, MEN Xiao-dong¹, SONG Xiang-bin¹

(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, Jinan 250100, China; 2. Shandong Technology Innovation Center of Laying Hens, Jinan 250102, China;

3. Shandong Jiu Long Hi Since Pharmaceutical Co., Ltd Dezhou, Shandong 251100, China)

Corresponding author: GUO Yu-qiu, E-mail: guoyuqiugood@163.com

Abstract: In this experiment, an ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) was established to determine the content of tildipirosin and its isomers in the raw drug of tildipirosin. Using ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), the mobile phase was 0.05 mol/L potassium hydrogen phosphate

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2022CXPT022); 山东省科技型中小企业创新能力提升工程项目(2022TSGC2549)

作者简介: 汤文利, 研究员, 从事饲料和兽药产品质量监督检验、标准制修订等工作。郭玉秋, 畜牧师, 从事饲料和兽药产品质量监督检验、标准制修订等工作。汤文利与郭玉秋为共同第一作者。

通讯作者: 郭玉秋。E-mail: guoyuqiugood@163.com

buffer solution (adjust the pH value of phosphoric acid to 8.2) – acetonitrile (45:55), the detection wavelength was 289 nm, the flow rate was 0.5 mL/min, the column temperature was 40 °C, and the injection amount was 1 μL. Qualitative and quantitative detection of tildipirosin was carried out by means of spectrogram, retention time and peak area parameters. Tildipirosin has a good linear relationship in the range of 0.2 – 2.4 mg/mL ($R^2 = 0.9992$). The detection limit of the method was 0.2 mg/mL, and the quantitative limit was 0.6 mg/mL. The precision, repeatability and stability fully met the detection requirements. It showed that the method was fast, accurate and has good resolution. It could be used for rapid determination of the content of tildipirosin and its isomers in the raw drug of tildipirosin.

Key words: ultra high performance liquid chromatography; drug substance; tildipirosin and its isomers; content

目前, 呼吸系统的高发病率和死亡率是全球猪、牛养殖业面临的主要问题^[1-4], 我国用于治疗 and 预防猪、牛呼吸道疾病的大环内酯类药物主要是泰乐菌素、替米考星, 但随着长时间的使用, 各地都发生了不同程度的耐药现象, 且出现多次给药才能见效、用量大、残留多等问题。

泰地罗新作为全新的大环内酯类抗生素产品, 是泰乐菌素的衍生物, CAS 号 328898-40-4, 分子式为 $C_{41}H_{71}N_3O_8$, 熔点为 192 °C, 溶于极性有机溶剂 (如丙酮、甲醇等), 水中微溶^[5], 结构式见图 1。

泰地罗新在生产加工及贮藏过程中会产生泰地罗新异构体, 结构式见图 2。在中华人民共和国农业农村部公告第 391 号中含量测定项下, 明确规定按外标法以泰地罗新主峰和泰地罗新异构体峰的峰面积之和计算其含量, 且由于泰地罗新异构体分子结构、烯醇式理化性质与泰地罗新存在差异, 为了控制药物质量、优化药物制剂工艺, 均需检测泰地罗新异构体, 公告中在有关物质项下规定按峰面积归一化法计算, 异构体不得超过 2%。

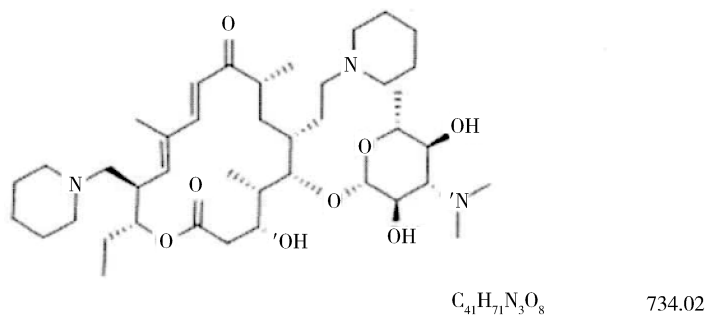


图 1 泰地罗新

Fig 1 Tildipirosin

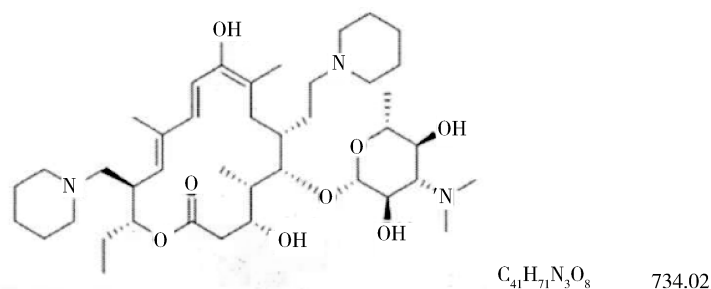


图 2 泰地罗新异构体

Fig 2 Tildipirosin isomer

泰地罗新对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌均有较强的抗菌活性^[6-8],尤其对引起猪、牛呼吸道系统疾病的病原菌尤为敏感^[9-11],对猪、牛的呼吸道疾病具有十分明显的治疗效果,药效强于泰乐菌素和替米考星,而且具备动物专用、用量少、一次给药全程治疗、超长的消除半衰期、生物利用度高和低残留等众多优点^[12]。将可以替代泰乐菌素、替米考星以及部分替代氟苯尼考等现用兽药的市场份额,对于遏制耐药性行动、保证畜牧业健康发展具有重要意义。

目前,农业农村部公告第 391 号中采用高效液相色谱法检测泰地罗新原料中泰地罗新的含量,本文检测泰地罗新主峰相对保留时间 23 min,异构体峰保留时间 26 min,公告规定运行时间为主峰保留时间的 2.5 倍,耗时较长,流动相使用量较大,且泰地罗新主峰及异构体峰分离度低。因此,本文研究了超高效液相色谱法(UPLC)对泰地罗新进行快速定量检测,大大缩短了检测时长,提高了检测效率,降低了流动相的消耗,减少了环境污染。流动相体系稳定,超高效方法专属性、重现性、精密度、线性和准确度良好,色谱峰不拖尾、分离度和理论塔板数高,为准确、快速控制泰地罗新质量提供检测依据。

由于泰地罗新含量是通过主峰和异构体峰面积之和进行计算,但此前专利及相关文献报道,均未对泰地罗新异构体峰进行考察,色谱图中也无异构体峰检出。本文对主峰和异构体峰均进行了考察,以异构体峰确定方法检测限、定量限,并对其与主峰的分离度等方面进行了检测,使试验更加科学准确、数据可靠。

1 材料与方法

1.1 试剂 泰地罗新对照品,含量 99.3%,购自中国兽医药品监察所;泰地罗新原料,购自山东久隆恒信药业有限公司;乙腈(色谱纯);磷酸二氢钾(分析纯);超纯水;

1.2 仪器 WATERS ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪(美国 waters 公司,配二极管阵列检测器);Waters E2695 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 取供试品 75 mg,精密称定,置 50 mL 棕色量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,制成 1.5 mg/mL 的溶液,经 0.45 μ m 的微孔滤头过滤。

1.3.2 对照品溶液制备 取对照品 75 mg,精密称定,置 50 mL 棕色量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,制成 1.5 mg/mL 的溶液,经 0.45 μ m 的微孔滤头过滤。

1.3.3 标准储备液的制备 精密称取泰地罗新对照品 150 mg(折含量后),加乙腈溶解,并定容至 50 mL,配制成 3 mg/mL 储备液。

1.3.4 线性关系考察 取标准储备液(1.3.3)适量,配制成每 1 mL 含泰地罗新 0.2、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8、2.4 mg 的标准工作液。

1.3.5 UPLC 测定下色谱操作条件及参数 色谱柱:BEH C18 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm,1.7 μ m);流动相:0.05 mol/L 磷酸氢二钾缓冲液(磷酸调 pH 值至 8.2)–乙腈(45:55);二极管阵列检测器,扫描范围:190 ~ 400 nm,检测波长:289 nm;柱温:40 $^{\circ}$ C;流速:0.5 mL/min;进样量:1 μ L。结果按外标法,以泰地罗新主峰和泰地罗新异构体峰的峰面积之和进行计算。

1.3.6 UPLC 测定下重复性试验 取同一批泰地罗新原料,按“1.3.1”项下平行制备 6 份供试品溶液,在“1.3.5”条件下进行分析,计算其峰面积 *RSD*。

1.3.7 UPLC 测定下精密度试验 取一份 1.5 mg/mL 泰地罗新对照品溶液,按 1.3.5 色谱条件下重复进样 6 次,计算峰面积 *RSD*。

1.3.8 UPLC 测定下检测限和定量限 取泰地罗新的标准工作液,逐级稀释进样,按上述方法测定,以泰地罗新异构体峰的信噪比 $S/N \geq 3$ 作为检测限、 $S/N \geq 10$ 作为定量限。

1.3.9 不同色谱条件样品检测比较 取同一份样品,分别参照农业农村部公告第 391 号中的方法使用高效液相色谱仪和 1.3.5 色谱条件下使用超高效液相色谱仪进行检测,对比泰地罗新的含量和色谱参数。

1.3.10 稳定性试验 取同一供试品溶液,于室温下 0、2、4、6、8、12、24 h,按“1.3.4”项下方法进样,计算峰面积 *RSD*。

2 结果与分析

2.1 色谱分离 按照 1.3.5 的色谱条件,使用超高效液相色谱仪测定,泰地罗新对照品和泰地罗新原料样品色谱峰峰形良好,分离度高,主峰保留

时间约为 4.5 min,异构体峰保留时间约为 5.0 min。
2.2 线性 根据色谱图以浓度为横坐标,主峰和异构体峰面积之和为纵坐标分析得出,泰地罗新在 0.2 ~ 2.4 mg/mL 的浓度范围内具有良好的线性关系,线性回归方程为 $y = 3.52 \times 10^6 x - 1.81 \times 10^4$, $R^2 = 0.9992$ 。其标准曲线见图 3。

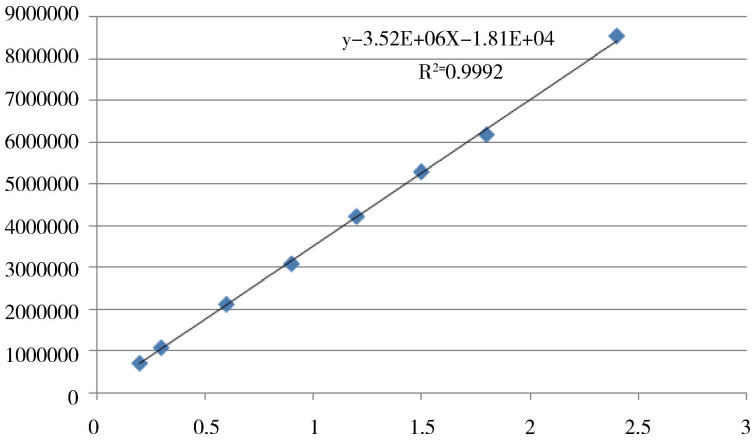


图 3 泰地罗新标准曲线
Fig 3 Standard curve of tildipirosin

2.3 重复性试验 取同一批泰地罗新原料,平行制备 6 份供试品溶液,进样,以泰地罗新主峰和泰地罗新异构体峰的峰面积之和计算,测得泰地罗新峰面积 *RSD* 为 0.69%,满足实验要求。

2.4 精密度试验 取 1.5 mg/mL 泰地罗新对照品溶液,重复进样 6 次,以泰地罗新主峰和泰地罗新

异构体峰的峰面积之和计算,测得泰地罗新峰面积的 *RSD* 为 0.12%,满足实验要求。
2.5 检测限和定量限 以泰地罗新异构体峰的信噪比 $S/N \geq 3$ 作为检测限、 $S/N \geq 10$ 作为定量限。

结果表明检测限为 0.2 mg/mL,定量限为 0.6 mg/mL(图 4、图 5)。

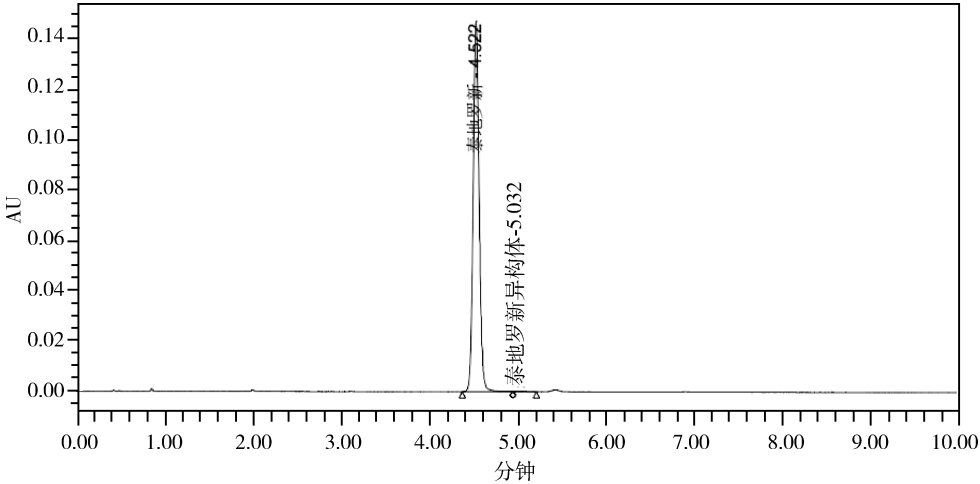


图 4 0.2 mg/mL 泰地罗新原料色谱图 (UPLC 1 μL)
Fig 4 0.2 mg/mL tildipirosin drug substance chromatogram (UPLC 1 μL)

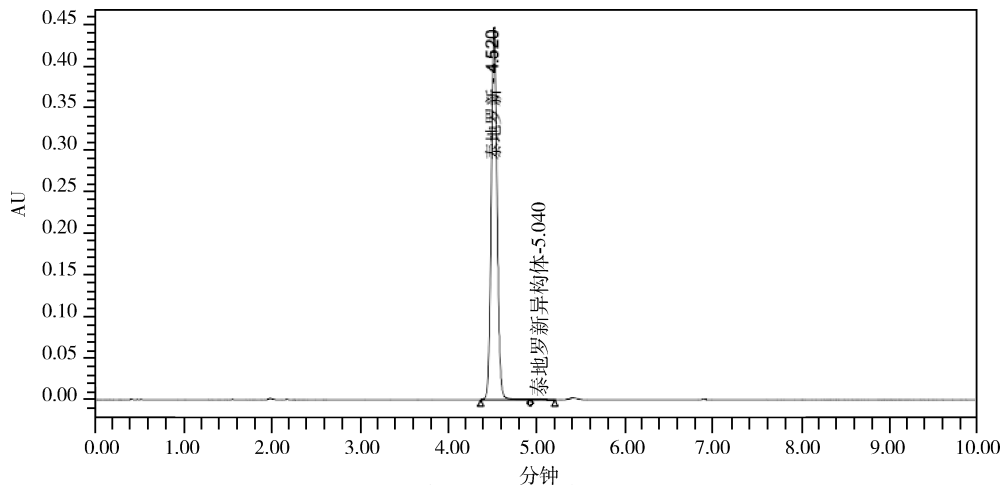


图 5 0.6 mg/mL 泰地罗新原料色谱图 (UPLC 1 μL)

Fig 5 0.6 mg/mL tildipirosin drug substance chromatogram (UPLC 1 μL)

2.6 UPLC 和 HPLC 色谱条件下样品检测结果的比较 UPLC 和 HPLC 色谱条件下的主成分平均理论塔板数、保留时间、拖尾因子等参数的比较见表 1。

表 1 UPLC 和 HPLC 色谱条件下的主成分不同色谱参数的比较

Tab 1 Comparison of different chromatographic parameters of principal components under UPLC and HPLC chromatographic conditions			
泰地罗新	UPLC	HPLC (农业农村部公告第 391 号)	是否满足要求
平均理论塔板数	约 21780	约 10700	是
保留时间	约 4.5 min	约 22.6 min	是
拖尾因子	约 1.0	约 1.6	是
分离度	约 3.6	约 2.1	是
运行时间	10 min	56 min	是
流速	0.5 mL/min	1.0 mL/min	是
运行一针所需流动相体积	5 mL	56 mL	是

由表 1 可见,UPLC 较 HPLC 色谱条件下,理论塔板数和分离度提高,拖尾因子、保留时间和运行时间大大降低,减少了所消耗的流动相的体积,完全满足检测要求且效率大幅提升。

下图 6 – 图 7 为泰地罗新对照品 UPLC 和 HPLC 检测光谱图,图 8 – 图 11 为 1.5 mg/mL 泰地罗新对照品及原料的 UPLC 和 HPLC 检测色谱图。

根据表 2,使用高效液相色谱仪(参照农业农村部公告第 391 号)和超高效液相色谱仪(1.3.5 色谱条件),对同一样品中泰地罗新的含量分别进行比较,相对偏差小于 1%,说明超高效液相色谱法可行有效,结果准确。

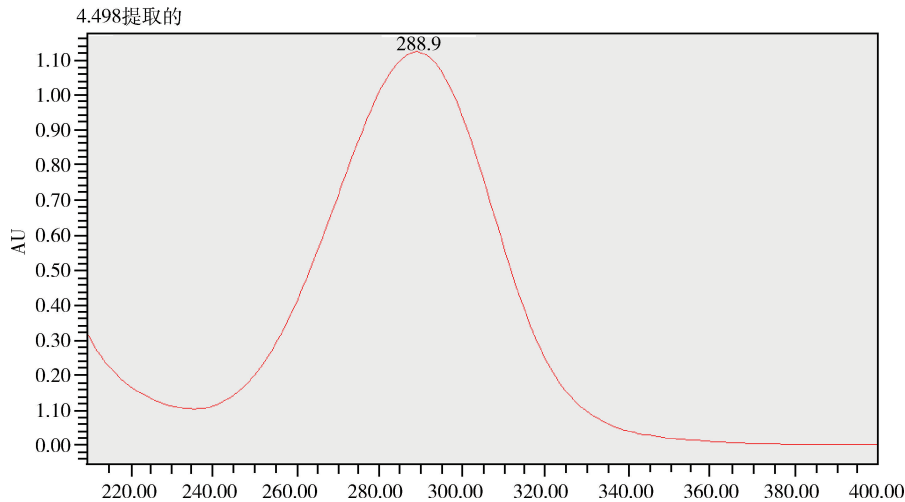


图 6 泰地罗新对照品 UPLC 光谱图

Fig 6 UPLC spectrogram of tildipirosin control

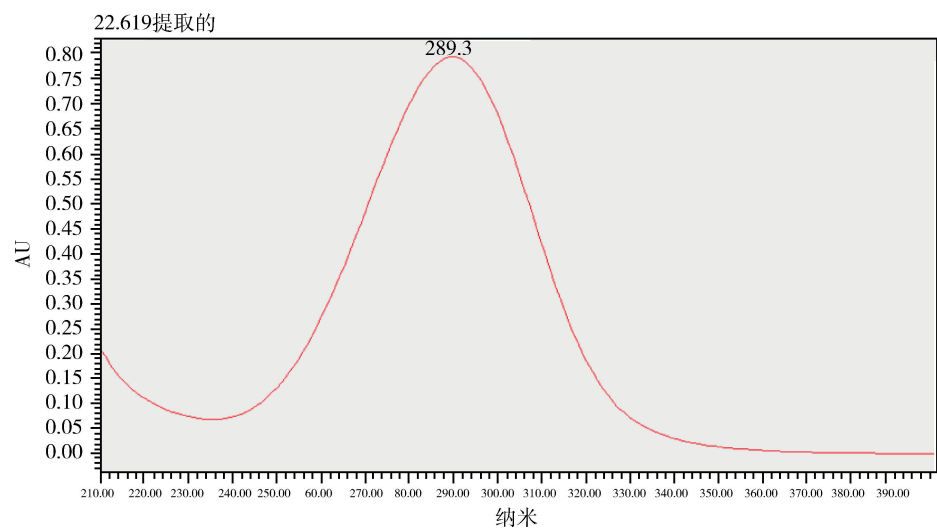


图 7 泰地罗新对照品 HPLC 光谱图

Fig 7 HPLC spectrogram of tildipirosin control

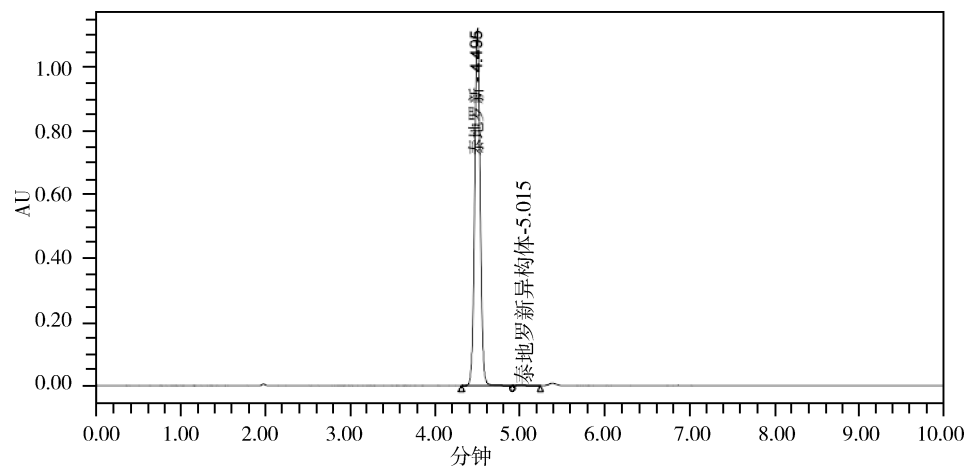


图 8 1.5 mg/mL 泰地罗新对照品 UPLC 色谱图(1 µL)

Fig 8 UPLC chromatogram of 1.5 mg/mL tildipirosin control(1 µL)

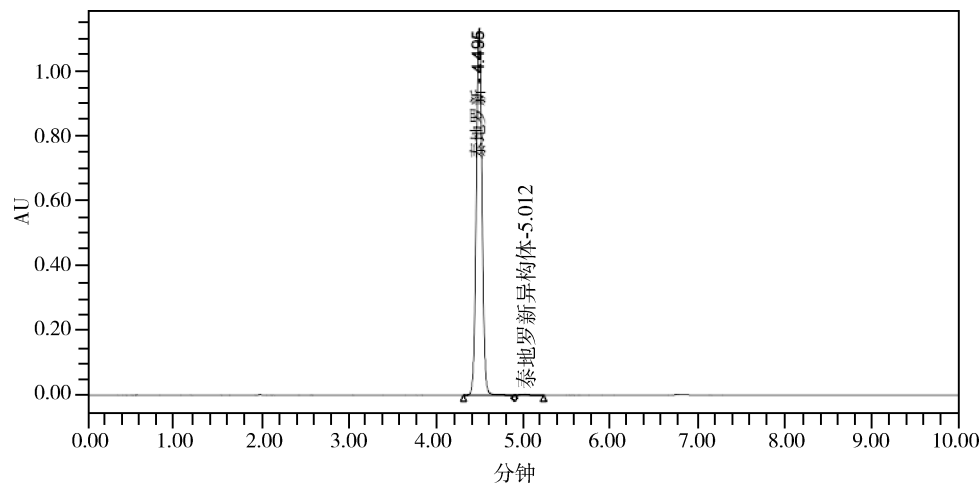


图 9 1.5 mg/mL 泰地罗新原料 UPLC 色谱图(1 µL)

Fig 9 UPLC chromatogram of 1.5 mg/mL tildipirosin drug substance(1 µL)

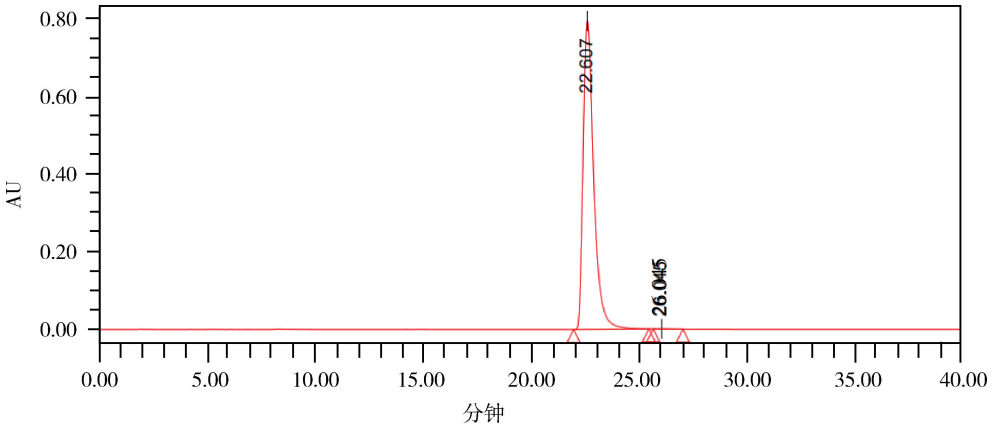


图 10 1.5 mg/mL 泰地罗新对照品 HPLC 色谱图 (10 μ L)

Fig 10 HPLC chromatogram of 1.5 mg/mL tildipirosin control (10 μ L)

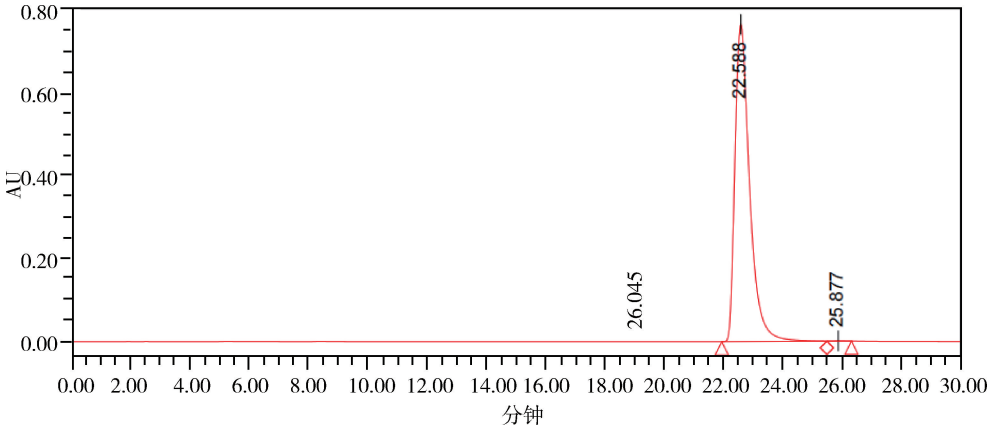


图 11 1.5 mg/mL 泰地罗新原料 HPLC 色谱图 (10 μ L)

Fig 11 HPLC chromatogram of 1.5 mg/mL tildipirosin drug substance (10 μ L)

表 2 UPLC 和 HPLC 色谱条件下泰地罗新含量检测结果

Tab 2 Results of content determination of tildipirosin under UPLC and HPLC conditions		
不同批次泰地罗新原料中 泰地罗新的含量/%	HPLC	UPLC
泰地罗新原料 1	99.2	99.3
泰地罗新原料 2	99.4	99.2
泰地罗新原料 3	99.1	99.4

通过保留时间和运行时间等方面,选择超高效液相色谱法 (UPLC) 更加高效。从样品理论塔板数、拖尾因子和分离度等方面,选择超高效液相色谱条件,理论塔板数更高,主峰与异构体峰的分离度更好。

2.7 稳定性试验 以泰地罗新主峰和泰地罗新异构体峰的峰面积之和计算,测得泰地罗新峰面积的 RSD 为 1.0%,说明供试品溶液稳定,实验条件满足要求。

3 讨论与结论

3.1 波长选择 在本试验条件下,利用超高效液相色谱仪 PDA 检测器对泰地罗新对照品溶液在波长 210 ~ 400 nm 范围内进行扫描,采集其光谱图,得到泰地罗新在 289 nm 左右有最大吸收,此与农业农村部 391 号公告中检测波长一致,相较个别专利中设定的 216 nm 的波长,提高了检测准确性。

3.2 异构体峰的考察 泰地罗新含量是通过主峰和异构体峰面积之和进行计算,但据此前专利及相

关文献报道,均未对泰地罗新异构体峰进行考察,色谱图中也无异构体峰检出。本文对主峰和异构体峰都进行了考察,在重复性(RSD 为 0.69%)、精密度(RSD 为 0.12%)和稳定性(RSD 为 1.0%)等方面进行了检测,并以异构体峰确定方法检测限(0.2 mg/mL)和定量限(0.6 mg/mL),使试验科学准确、数据可靠。

3.3 与农业农村部公告第 391 号^[13]结果对比 采用高效液相色谱法和超高效液相色谱法对不同批次泰地罗新原料进行含量测定,相对偏差都小于 1%。在本试验条件下,超高效液相色谱法的优势:1、本方法流速为 0.5 mL/min,运行时间 10 min,每针运行仅需要 5.0 mL 流动相,与高效色谱法每针运行需 56 mL 流动相相比,大大缩短检测用时,节约了试剂、耗材,提高了检测效率,使流动相用量极大减少,废液处理的成本降低,减少了环境污染。2、高效液相色谱法进样量为 10 μ L 或 20 μ L,本方法采用超高效液相色谱法,进样量为 1 μ L,且进样浓度较 391 号公告降低,减小色谱柱的损伤,降低检测成本。3、超高效方法重复性、精密度、稳定性、准确度良好,色谱峰不拖尾,分离度高,理论塔板数高。

本文建立的超高效液相色谱法,准确、快速、环保,可以有效的对泰地罗新含量进行定性和定量的测定。

参考文献:

- [1] Lekeux P. Bovine respiratory disease complex: a European perspective[J]. *Bovine Practitioner*, 1995, 29: 71–75.
- [2] 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: 154–156.
- [3] 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: 823–840.
- [4] Gay E, Barnouin J. A nation-wide epidemiological study of acute bovine respiratory disease in France[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 89: 265–271.
- [5] 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

- Chen H L, Ma J, Zhang P, *et al.* Determination of tildipirosin by high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 48 (6): 86–88
- [6] BARTRAM D J, MOYAERT H, VANIMISETTI B H, *et al.* Comparative efficacy of tulathromycin and tildipirosin for the treatment of experimental *Mycoplasma bovis* infection in calves[J]. *Vet Med Sci*, 2016, 2(3): 170–178.
- [7] BERMAN J, FRANCOZ D, DUBUC J, *et al.* A randomised clinical trial of a metaphylactic treatment with tildipirosin for bovine respiratory disease in veal calves[J]. *BMC Vet Res*, 2017, 13(1): 176–181.
- [8] 郑雨微. 泰地罗新注射液在猪体内的残留量研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- Zheng Y W. Studies on residues of tildipirosin injection in pigs [D]. Changchun: Jilin University.
- [9] 李在建, 张书阅, 刘文强, 等. 泰地罗新在猪体内的药物动力学及生物利用度研究[J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(11): 60–63.
- Li Z J, Zhang S Y, Liu W Q, *et al.* Pharmacokinetics and bioavailability of Tildipirosin in pigs [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 50(11): 60–63.
- [10] 李在建, 张书阅, 刘文强, 等. 泰地罗新单次口服给药与连续饮水给药后在猪体内的药动学比较研究[J]. *内蒙古农业大学学报(自然科学版)*, 2019, 40(1): 1–5.
- Li Z J, Zhang S Y, Liu W Q, *et al.* The comparative studies of pharmacokinetics of tildipirosin in pig (single oral administration and continuous drinking water administration). *Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2019, 40(1): 1–5.
- [11] 闫超群, 黎健业, 张申, 等. 泰地罗新注射液在猪体内的药动学及生物利用度研究[J]. *中国农业科学*, 2018, 51 (19): 3807–3814.
- Yan C Q, Lin J Y, Zhang S, *et al.* Pharmacokinetics and Bioavailability of Tildipirosin Solution in Pigs [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(19): 3807–3814.
- [12] 李伟岭, 杨芳, 于振梅, 等. 泰地罗新研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2012, 46(10): 50–53.
- Li W L, Yang F, Yu Z M, *et al.* Progress of the Studies on Tildipirosin[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2012, 46 (10): 50–53.
- [13] 中华人民共和国农业农村部公告第 391 号[S]. Announcement of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs No. 391[S].