

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.10.07

泰拉霉素国家对照品的标定研究

戴青,张秀英,杨秀玉,韩宁宁,王轩,季璇,赵晖*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022-04-23 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 10-0035-06 [中图分类号] S859.796

[摘要] 为了有效控制泰拉霉素原料及注射液的产品质量,研制了泰拉霉素国家对照品。采用精制后的泰拉霉素为原料进行本批对照品的研制,原料分装后进行质量检测及均匀性评价,并标定含量。采用红外分光光度法、费休氏水分测定法等对其进行理化分析,利用高效液相色谱法进行有关物质测定及均匀性检验,采用质量平衡法进行标准物质含量计算,并通过差示扫描量热法对质量平衡法的准确性进行验证。研制的泰拉霉素国家对照品的含量为 98.3%,采用多种不同方法对本品进行定性定量研究,确保了国家标准物质标定结果的准确性。本对照品可用于泰拉霉素原料及注射液的鉴别与含量测定,对于提高和保证兽药产品质量具有重要意义。

[关键词] 泰拉霉素;国家对照品;质量平衡法;含量测定

Study on the Calibration of National Reference Standard of Tulathromycin

DAI Qing,ZHANG Xiu-ying,YANG Xiu-yu,HAN Ning-ning,WANG Xuan,JI Xuan,ZHAO Hui*

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

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

Abstract: In order to effectively control the quality of tulathromycin raw materials and injection products,national reference standard of tulathromycin was developed. The refined tulathromycin tartrate was used as raw material. The quality inspection and uniformity evaluation were tested after dispersal. Infrared spectrophotometry and Karl Fischer moisture method were applied for physical and chemical analysis. HPLC was applied for determination of related substances and uniformity test. The content of reference standard was calculated by mass balance method, which was also confirmed by DSC method. The content of national reference standard of tulathromycin was 98.3%. Different methods were applied for qualitative and quantitative research to ensure the accuracy of the calibration results. It is of great significance to improve and ensure the quality of veterinary drugs.

Key words: tulathromycin; national reference standard; mass balance method; content determination

基金项目: 兽药行业公益性重点专项“兽用化学药品检验用部分标准物质研究”(GY202003)

作者简介: 戴青,硕士,从事抗生素检验检测工作。

通讯作者: 赵晖。E-mail:171977364@qq.com

泰拉霉素是由美国辉瑞动物保健公司开发的动物专用新型大环内酯类抗生素,主要用于治疗牛和猪呼吸系统感染性疾病^[1-2],目前临床上广泛应用的制剂为泰拉霉素注射液。泰拉霉素由 15 元氮杂内酯环(泰拉霉素 A)和 13 元氮杂内酯环(泰拉霉素 B)两种同分异构体组成^[3],该两种同分异构体均是泰拉霉素中的抗菌活性成分,原料药中泰拉霉素 B 含量较少,但泰拉霉素 A 与泰拉霉素 B 这两个异构体在溶液中易发生转化,且处于平衡,需要以两个异构体之和对含量进行控制。目前,各国药典均未收载泰拉霉素原料药及相关制剂的质量标准,均无泰拉霉素国家标准物质供应,调研发现,在企业内部质量控制过程中,多使用自制工作对照品。因此,为了更好地对产品进行质量控制,研制了泰拉霉素国家对照品,对于泰拉霉素原料及注射液的生产及质量控制具有重要意义。

1 仪器与试药

1.1 仪器 e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);2489 型紫外检测器(美国 Waters 公司);2998 型二极管阵列检测器(美国 Waters 公司);AUTOPOL V 型自动旋光仪(美国 Rudolph 公司);TENSOR 27 型傅里叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司);7890A 型气相色谱仪(美国 Agilent 公司);AX205 型电子天平(美国 Mettler 公司);701KF 型水分测定仪(瑞士 Metrohm 公司);DSC Q200 型差示扫描量热仪(美国 TA 公司)。

1.2 试药 原始发明厂泰拉霉素工作对照品(含量 99.0%,美国 Zoetis 公司);泰拉霉素原料由 Zoetis 公司生产;甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merk 公司);磷酸二氢钾(分析纯,中国上海源叶公司);实验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 样品制备 将精制后的泰拉霉素原料分装于棕色安瓿瓶中,每支 100 mg,置于 5 °C 冰箱储存,作为待标品,经理化分析、标定含量后贴签入库,作为国家对照品发放。

2.2 比旋度 取待标品适量,用乙腈溶解制成 40 mg/mL 的溶液,采用钠光谱 D 线(589 nm),测定

待标品溶液旋光度,测定结果为 -25° 。

2.3 红外光谱鉴别 分别取待标品与泰拉霉素工作对照品适量,用溴化钾压片,测定二者红外光吸收图谱,结果为二者红外光吸收图谱一致(图 1 ~ 图 2)。

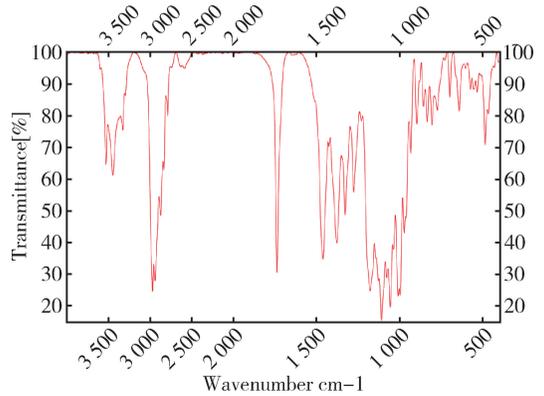


图 1 泰拉霉素工作对照品红外光谱图

Fig. 1 Infrared spectrum of tulathromycin working reference substance

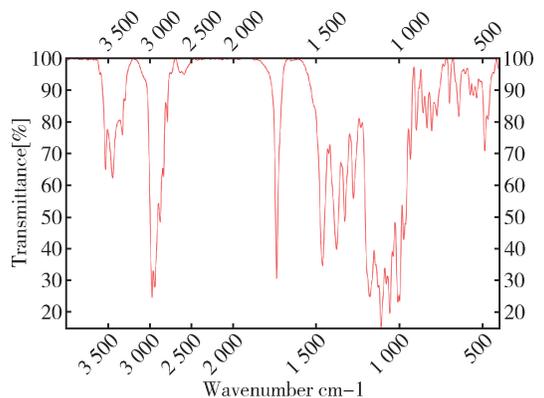


图 2 本批泰拉霉素对照品红外光谱图

Fig 2 Infrared spectrum of this batch of tulathromycin reference substance

2.4 有关物质

2.4.1 液相色谱条件 色谱柱 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm);以甲醇 - 乙腈 - 0.075 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (pH 7.0) (45:25:30) 为流动相;流速 1.0 mL/min;检测波长 205 nm;柱温 40 °C。待标品溶液质量浓度为 2 mg/mL,进样体积为 25 μL。采用自身对照法计算有关物质,测得总有关物质质量为 1.38%。

2.4.2 方法专属性 按照上述方法,在待标品溶液中加入 1 mol/L 盐酸溶液,室温破坏 2 h 进行酸降解;在待标品溶液中加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液,室温破坏 2 h 进行碱降解;在待标品溶液中加入 3% 双氧水溶液,室温破坏 2 h 进行氧化降解;将待标品在 120 ℃ 放置 8 h 进行高温降解;将待标品在 5000 lx 光照下放置 8 h 进行光照降解。分别测定各种破坏性试验条件下待标品的有关物质,并采用

二极管阵列检测器,进行峰纯度检查。破坏性试验结果见表 1,结果表明,酸、碱、氧化降解均易增加杂质含量,提示样品应避免接触强酸、强碱、氧化剂等,以防止产生过量杂质。各条件下主峰均可与相邻峰实现良好分离,且各杂质峰纯度角度均小于阈值,为单一物质峰,降解产物不干扰主峰测定,表明方法专属性良好。

表 1 破坏性试验结果

Tab 1 Results of destructive tests

降解条件	分离度	杂质保留时间/min	杂质纯度角度	杂质纯度阈值	最大单一杂质/%	总杂质/%
酸	3.3	3.428	1.443	4.014	21.5	31.0
		4.063	4.377	4.422		
		5.732	4.375	4.653		
碱	2.9	5.376	2.645	6.544	2.4	6.0
		7.048	2.197	5.292		
		9.162	1.597	5.190		
氧化	3.2	5.918	4.758	5.959	21.3	23.5
		6.913	3.228	4.399		
		7.017	5.743	9.127		
高温	3.2	8.001	5.269	8.836	1.4	2.0
		17.529	19.227	22.310		
		7.349	7.926	12.294		
光照	2.5	10.992	21.600	28.140	1.0	1.7
		18.157	16.449	17.648		

2.4.3 检测限 将 2 mg/mL 的溶液进一步稀释为 1 μg/mL 的检测限溶液,测定信噪比。检测限溶液信噪比为 3:1,表明该方法泰拉霉素的检测限为 1 μg/mL。

2.4.4 线性与范围 配制 10 mg/mL 的贮备液,经一系列精密稀释,分别制成 5000、2000、1000、400、100、10、2 μg/mL 的溶液,采集色谱图,以峰面积与浓度作图,用最小二乘法进行线性回归。峰面积与浓度线性方程为: $y = 3414.7x - 5881.9$, $r = 1$ 。表明在 2 ~ 5000 μg/mL 范围内浓度与峰面积具有良好的线性关系。

2.4.5 溶液稳定性 将溶液于室温放置 12 h,期间不同时间进样采集色谱图,考察峰面积变化情况。溶液稳定性结果见表 2,峰面积 12 h 内 RSD 为 1.6%,小于 2.0%,表明该溶液室温放置 12 h 稳定性良好。

2.5 液相色谱鉴别 分别取待标品与泰拉霉素工作对照品适量,按照 2.4.1 项下色谱条件,测定二者主峰的保留时间,结果为样品高效液相色谱图主峰保留时间与泰拉霉素工作对照品的保留时间一致,且溶剂空白对泰拉霉素测定无干扰(图 3 ~ 图 5)。

表 2 溶液稳定性结果

Tab 2 Results of solution stability test

时间/h	峰面积	RSD/%
0	5439478	
1	5530112	
2	5586411	
3	5682166	
4	5656512	
5	5630876	
6	5540601	1.6
7	5472852	
8	5456707	
9	5464006	
10	5440617	
11	5450429	
12	5419551	

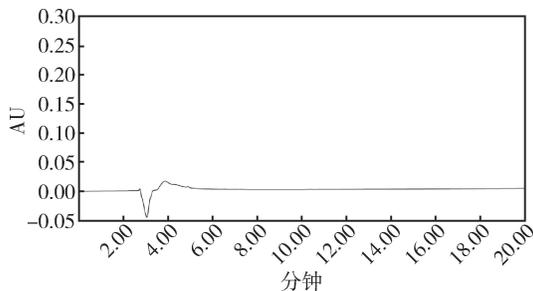


图 3 溶剂空白液相色谱图

Fig 3 Liquid chromatogram of solvent blank

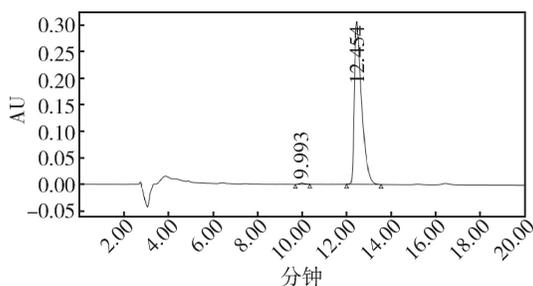


图 4 泰拉霉素工作对照品液相色谱图

Fig. 4 Liquid chromatogram of tulathromycin working reference substance

2.6 水分 按照《中国兽药典》2020 年版一部附录 0832 费休氏法,取待标品 3.0 g,精密称定,置于水分测定仪中,测定水分含量,结果为 0.19%。

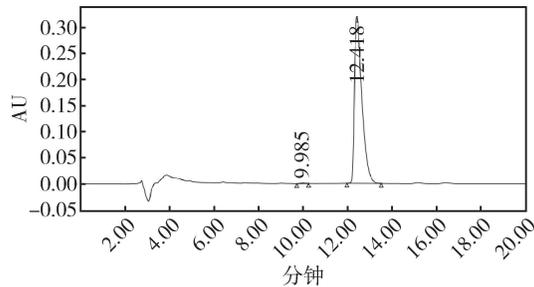


图 5 本批泰拉霉素对照品液相色谱图

Fig 5 Liquid chromatogram of this batch of tulathromycin reference substance

2.7 炽灼残渣 按照《中国兽药典》2020 年版一部附录 0841 炽灼残渣检查法,精密称取本品 1.0 g,置坩埚中,于 750 ℃ 下炽灼至恒重,计算遗留残渣量,结果为 0.09%。

2.8 残留溶剂 采用气相色谱法检测待标品合成工艺中使用的有机溶剂(庚烷、二氯甲烷、异辛烷)残留量。以 DB-624 毛细管柱(30 m × 0.32 mm, 1.8 μm) 为分离柱,以氮气为载气,柱温采用程序升温,起始温度 40 ℃,维持 5 min,再以 20 ℃/min 的速率升温至 90 ℃,立刻以 30 ℃/min 的速率升温至 225 ℃,维持 2 min。顶空进样,平衡温度 105 ℃,顶空平衡时间 60 min,供试品溶液的质量浓度为 30 mg/mL。采用外标法以峰面积计算。样品残留溶剂中仅检出异辛烷,残留量 0.01% (图 6 ~ 图 8)。

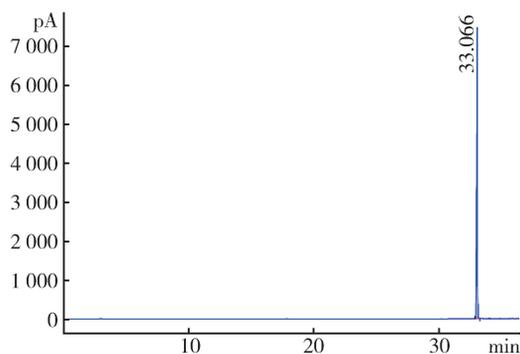


图 6 溶剂空白气相色谱图

Fig 6 Gas chromatogram of solvent blank

2.9 均匀性评估 随机抽取待标品 10 支,每支取样 2 次进行测定,采用高效液相色谱法,按照 2.4.1 项下色谱条件,取本品 20 mg,精密称定,制成质量

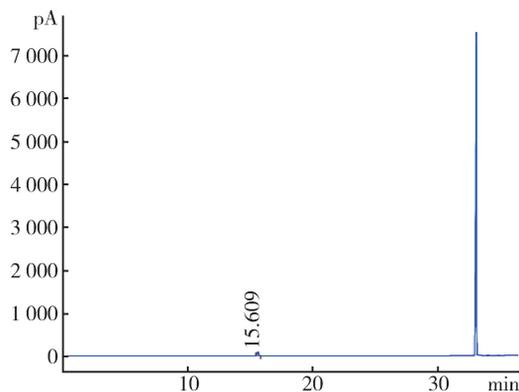


图 7 异辛烷气相色谱图

Fig. 7 Gas chromatogram of isooctane

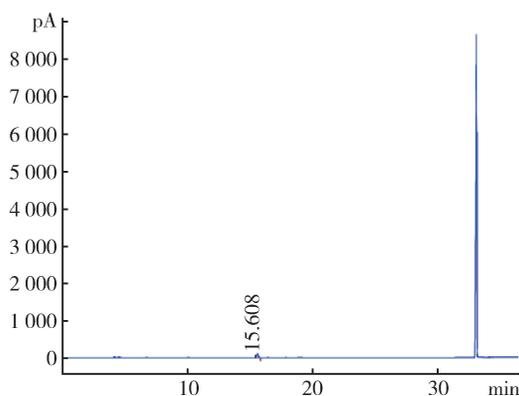


图 8 本批泰拉霉素对照品气相色谱图

Fig 8 Gas chromatogram of this batch of tulathromycin reference substance

浓度为 2 mg/mL 的溶液。以单位质量峰面积为结果,采用单因素方差分析法对测定结果进行均匀性评估。样品间自由度为 9,样品内自由度为 10,在约定自由度水平 $\alpha = 0.05$ 的显著水平下,计算临界值 $F_{0.05(9,10)}$,计算结果与查表得到的 F 临界值 3.02 比较,若计算值小于 3.02,则表明在 $\alpha = 0.05$ 的显著水平下,样品是均匀的。计算得样品均匀性单因素方差分析结果统计量 F 为 2.60,小于 3.02,表明研制的本批对照品均匀性良好,符合国家标准物质研制的要求。

2.10 含量测定

2.10.1 质量平衡法 根据质量平衡法的计算方法,采用以下公式计算泰拉霉素的含量:(1 - 有关物质) \times (1 - 水分 - 残留溶剂 - 炽灼残渣) \times

100%。根据质量平衡法计算公式,计算得泰拉霉素含量为 98.3%。

2.10.2 差示扫描量热法 采用差示扫描量热法对质量平衡法赋值结果进行验证。以不同升温速率,在 175 ~ 210 °C 温度范围内测定待标品中泰拉霉素的含量,结果见表 3,不同升温速率对测定结果影响不大。DSC 法升温速率一般低于 1 °C/min 时,体系接近平衡态,但有时为了节省时间和避免分解,可以用更快的升温速率,较快的升温速率有利于将分解效应与熔融效应分离。考虑到 1 °C/min 升温速率图谱基线不平衡,因此选取了 2 °C/min 和 5 °C/min 的升温速率进行多次测定,泰拉霉素含量为 98.5%,结果见表 4,图谱见图 9。

表 3 不同升温速率样品含量

Tab 3 Sample content at different heating rates

升温速率/(°C/min)	含量/%
1	98.42
2	98.46
3	98.43
4	98.52
5	98.50

表 4 样品差示扫描量热法测定结果

Tab 4 Results of DSC

升温速率/(°C/min)	称样量/mg	含量/%	平均含量/%	RSD/%
2	2.91	98.46	98.5	0.03
	2.10	98.51		
	2.51	98.48		
5	2.79	98.50	98.5	0.03
	2.54	98.52		
	2.77	98.55		

3 讨论与结论

化学标准物质的定值目前较为普遍的方法是质量平衡法,其能够直接溯源到国际单位制中的质量单位,是国际上标准物质定值推荐的常用方法^[4-5]。该方法赋值结果准确,但受影响因素较多,往往需要采用其他方法对质量平衡法的赋值结

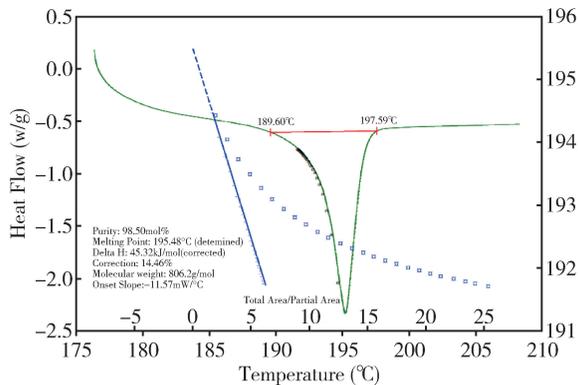


图9 本批泰拉霉素对照品差示扫描量热法图谱

Fig 9 DSC atlas of this batch of tulathromycin reference substance

果进行验证^[6]。差示扫描量热(DSC)法是研究应用最广泛的热分析技术之一,具备快速采集、操作简便等特点,越来越广泛地应用于标准物质的定值中^[7-8]。本研究针对泰拉霉素样品的特点,在标定国家兽药标准物质的过程中,采用质量平衡法、差示扫描量热法分别对泰拉霉素进行定值与验证,确保定值结果的准确性。

本研究研制了泰拉霉素国家对照品,采用质量平衡法与差示扫描量热法两种不同原理的定值方法测定泰拉霉素含量,结果分别为 98.3% 和 98.5%,两种方法标定结果基本一致,相互验证,可以保证定值的准确性。由于质量平衡法是世界卫生组织推荐的药品标准物质定值方法,能够更准确地反映本品的真实含量,因此,以质量平衡法的结果进行赋值,可作为国家对照品用于泰拉霉素及其制剂的含量测定。

参考文献:

- [1] 周巧仪,张桂君,马涛,等. 泰拉霉素在猪体内的药动学特征及其血浆蛋白结合率的研究[J]. 中国兽医科学,2017,47(9): 1173-1179.
- Zhou Q Y,Zhang G J, Ma T, *et al.* Studies on pharmacokinetics and plasma protein binding rate of tulathromycin in swine [J]. Chinese Veterinary Science,2017,47(9): 1173-1179.

- [2] 雍康,杨庆稳,刘震坤,等. 泰拉霉素治疗肉牛出血性败血症的疗效观察[J]. 畜牧与兽医,2016,48(12): 92-94.
- Yong K,Yang Q W,Liu Z K, *et al.* Efficacy of tulathromycin in the treatment of hemorrhagic sepsis in beef [J]. Animal Husbandry&Veterinary Medicine,2016,48(12): 92-94.
- [3] 亢继俊,王丽霞,曾振灵,等. 动物专用大环内酯类新药——泰拉霉素[J]. 广东畜牧兽医科技,2010,35(2): 7-10.
- Kang J J,Wang L X,Zeng Z L, *et al.* A new macrolide antibiotic tulathromycin for animals [J]. Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science,2010,35(2): 7-10.
- [4] 郑子繁,刘卫晓,金芜军,等. 质量平衡法及其在标准物质定值中的应用进展[J]. 生物技术进展,2020,10(6): 623-629.
- Zheng Z F,Liu W X,Jin W J, *et al.* Mass balance method and its application in the determination of reference materials [J]. Current Biotechnology,2020,10(6): 623-629.
- [5] 张庆合,杨吉双,熊慧,等. 基于质量平衡法的有机物纯度测量技术进展[J]. 化学试剂,2020,42(8): 931-939.
- Zhang Q H,Yang J S,Jiao H, *et al.* Progress of organic purity measurement technology based on mass balance method [J]. Chemical Reagents,2020,42(8): 931-939.
- [6] 刘博,任丽萍,张佟,等. 首批甘氨酸-L-酪氨酸国家对照品的标定研究[J]. 中国药学杂志,2020,55(22): 1890-1894.
- Liu B, Ren L P,Zhang T, *et al.* Verification of national reference standard of N-glycyl-L-tyrosine [J]. Chinese Pharmaceutical Journal,2020,55(22): 1890-1894.
- [7] 张雅军,吴先富,肖新月,等. 差示扫描量热法测定磺胺类化学对照品的纯度[J]. 中国现代应用药学,2022,39(1): 93-96.
- Zhang Y J,Wu X F,Xiao X Y, *et al.* Determination of the purity of sulfonamide chemical reference materials by differential scanning calorimetry [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy,2022,39(1): 93-96.
- [8] 常伟伟,彭辉. 差示扫描量热法测定对乙酰氨基酚原料药纯度[J]. 化学分析计量,2020,29(2): 36-39.
- Chang W W,Peng H. Determination of the purity of 4-acetamidophenol by differential scanning calorimetry [J]. Chemical Analysis and Meterage,2020,29(2): 36-39.

(编辑:侯向辉)