

# HPLC法测定复方替米考星颗粒中有效成份含量

宋艳红<sup>1</sup>, 孙浩<sup>2</sup>, 马晋东<sup>2</sup>, 王仲琴<sup>1</sup>, 柴桂珍<sup>1</sup>

(1 山西省兽药监察所, 太原 030027; 2 山西农业大学, 山西太谷 030801)

[收稿日期] 2010- 02- 04 [文献标识码] A [文章编号] 1002- 1280(2010)08- 0027- 04 [中图分类号] S859. 796

**[摘要]** 采用 HPLC 法同时测定了复方替米考星颗粒中替米考星、磺胺二甲氧嘧啶及甲氧苄啶的含量。色谱柱为 Eclipse XCB- C<sub>18</sub> (250 mm @4.6 mm, 粒径 5 μm), 流动相为磷酸二丁胺缓冲液- 乙腈- 四氢呋喃- 水 (25 B115 B55 B805), 检测波长 280 nm, 流速 1.0 mL/min。出峰顺序为甲氧苄啶、磺胺二甲氧嘧啶、替米考星反式结构、替米考星顺式结构, 理论塔板数分别为 7963、15714、3282、8701。两峰之间的分离度分别为 24.29、3.92、2.91; 拖尾因子分别为 0.92、0.90、0.97、0.94。替米考星、磺胺二甲氧嘧啶、甲氧苄啶的浓度线性范围分别是 6.25~125 Lg/mL ( $R^2 = 0.996$ ), 3.125~62.5 Lg/mL ( $R^2 = 0.996$ ), 0.625~12.5 Lg/mL ( $R^2 = 0.999$ ); 平均回收率分别为 99.17%、99.06% 和 99.39%; RSD 分别为 0.8%、0.9% 和 0.9%。该法快速、灵敏、准确, 适用于同时测定复方替米考星颗粒中三种成份的含量。

**[关键词]** 替米考星; 磺胺二甲氧嘧啶; 甲氧苄啶; 高效液相色谱法; 含量

## Determination of Active Ingredients in Compound Trimicosin Particles by HPLC

SONG Yan- hong<sup>1</sup>, SUN Hao<sup>2</sup>, MA Jin- dong<sup>2</sup>, WANG Zhong- qin<sup>1</sup>, CHAI Gui- zhen<sup>1</sup>

(1. Shanxi Institute of Veterinary Drug Control, Taiyuan 030027; 2. Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801; China)

**Abstract** An HPLC method has been developed to determine trimicosin, sulfamethazine and trimethoprim. Eclipse XCB- C<sub>18</sub> column (250 mm @4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was 2- butylamine phosphate buffer- acetonitrile- tetrahydrofuran- water (25 B115 B55 B805), the wavelength was 280 nm, the flow rate was 1.0 mL/min. The peaks in order was trimethoprim, sulfamethazine, trimicosin trans- structure and trimicosin cis- structure. Theoretical plate numbers was 7963, 15714, 3282, 8701. The separation between two peaks was 24.29, 3.92, 2.91 respectively. Tailing factor was 0.92, 0.90, 0.97, 0.94. The linear concentration range of trimicosin, sulfamethazine and trimethoprim was 6.25~125 Lg/mL ( $R^2 = 0.996$ ), 3.125~62.5 Lg/mL ( $R^2 = 0.996$ ), 0.625~12.5 Lg/mL ( $R^2 = 0.999$ ); the average recoveries was 99.17%, 99.06% and 99.39% with RSD of 0.8%, 0.9% and 0.9%. This method is rapid, sensitive and accurate suitable for simultaneous determination of three ingredients in compound trimicosin particles.

**Key words** trimicosin; sulfamethazine; trimethoprim; HPLC; content

复方替米考星颗粒系用替米考星、磺胺二甲氧嘧啶、甲氧苄啶等按一定比例配制而成的新型制剂。它克服了替米考星单方抗菌谱窄, 不适合我国

养殖业以混合感染为主的疫病防治的要求等缺点, 利用协同抗菌增效机理, 将新一代抗生素替米考星与磺胺二甲氧嘧啶和抗菌增效剂甲氧苄氨嘧啶按

基金项目: 山西省科技攻关项目 (20080311037)

作者简介: 宋艳红 (1979年-), 女, 兽医师, 主要从事中兽药, 兽药残留检测工作。E- mail: sxssyjcssyh@126.com

通讯作者: 柴桂珍, 研究员, 主要从事兽药管理及检验工作。E- mail: cgz102@163.com

最佳配比进行复方。临床主要用于革兰氏阴阳性敏感菌引起的感染,如呼吸道、消化道、泌尿道感染<sup>[1-2]</sup>。该制剂具有抗菌谱广、抗菌效力强等优点。但目前尚无同时测定替米考星、磺胺二甲氧嘧啶及甲氧苄啶含量方法的报道。本试验旨在建立高效液相色谱法同时检测上述三种成份含量的方法。

1 实验材料

1.1 仪器 Agilent1200 高效液相色谱仪,配 G1314B型 VWD 检测器,美国安捷伦公司; KQ-250E型超声波清洗器,昆明市超声波仪器有限公司; DELTA320酸度计,瑞士梅特勒公司; BP-602N梅特勒电子天平; BP-211D电子天平,北京赛多利斯天平有限公司。

1.2 药品及试剂 替米考星对照品,批号 K0310711,含量 91.0%,中国兽医药品监察所;磺胺二甲氧嘧啶对照品,批号 46H1351,含量 99.0%,SIGMA公司;甲氧苄啶对照品,批号 H0160704,含量 100.0%,中国兽医药品监察所。供试品为实验室自制小样。替米考星原料,含量 86.0%,山西奥信动物药业有限公司提供;磺胺二甲氧嘧啶原料药,含量 98.0%,市场购入;甲氧苄啶原料药,含量 100.0%,市场购入。乙腈为色谱纯;水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件<sup>[3]</sup> 以 Eclipse XCB-C<sub>18</sub>柱(250 mm @4.6 mm, 5 Lm)为色谱柱,以磷酸二丁胺缓冲液-乙腈-四氢呋喃-水(25 Bl 15 B5 B805)为流动相,检测波长 280 nm,进样量 10 LL,流速 1.0 mL/min,柱温 30 e。出峰顺序为甲氧苄啶、磺胺二甲氧嘧啶、替米考星反式结构、替米考星顺式结构。理论塔板数大于 3000,分离度大于 1.5,拖尾因子均在 0.90~1.10

2.2 溶液的配制

2.2.1 磷酸二丁胺缓冲液的配制 取二丁胺 16.8 mL,加磷酸溶液(1y 10) 70 mL,边加边搅拌,放置冷却后,用磷酸调节 pH 值至(2.5?0.1),加水至 100 mL,摇匀,即得。

2.2.2 稀释液的配制 取水 900 mL,加入磷酸 5.71 g 用 12.5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至(2.5?0.1),加水至 1000 mL,摇匀,即得。

2.2.3 0.5 mg/mL 甲氧苄啶对照液的配制 精密称取甲氧苄啶对照品 25 mg 置 50 mL 容量瓶中,加乙腈 10 mL 使溶解,用稀释液稀释至刻度,摇匀。

2.2.4 复方替米考星对照液的配制 精密称取替米考星对照品 25 mg 磺胺二甲氧嘧啶对照品 12.5 mg 精密加入 2.2.2 项下 0.5 mg/mL 甲氧苄啶对照液 5 mL,置同一 50 mL 容量瓶中,加乙腈 10 mL 超声使溶解,用稀释液稀释至刻度,摇匀。

2.2.5 供试品溶液的配制 精确称取供试品 80 mg 置 100 mL 容量瓶中,加乙腈 20 mL 超声使溶解,用稀释液稀释至刻度,摇匀;精密量取该溶液 1 mL,置 50 mL 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀。

2.3 系统适应性试验 取供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件,进样 10 LL,系统适应性结果见表 1 和图 1~4 结果显示,替米考星反式、顺式峰、磺胺二甲氧嘧啶以及甲氧苄啶的理论塔板数均在 3000 以上,拖尾因子在 0.90~1.10,分离度均大于 1.5,说明该方法系统适应性良好。

表 1 系统适应性试验结果

名称	理论塔板数	拖尾因子	分离度
甲氧苄啶	7963	0.92	
磺胺二甲氧嘧啶	15714	0.90	24.29
替米考星反式	3282	0.97	3.92
替米考星顺式	8701	0.94	2.91

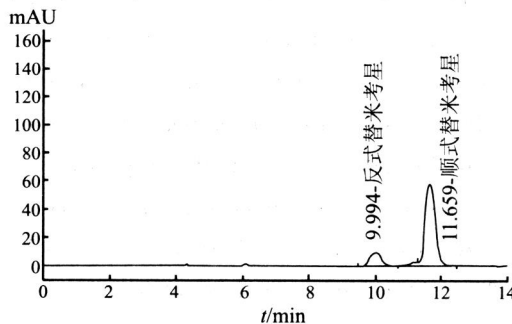


图 1 替米考星色谱图

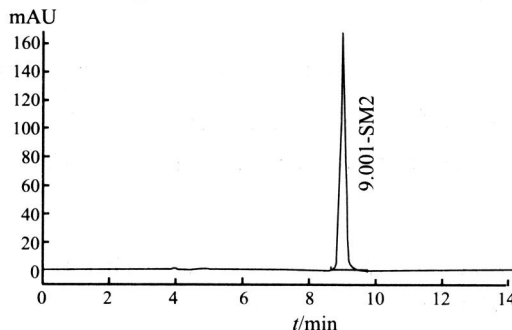


图 2 磺胺二甲氧嘧啶色谱图

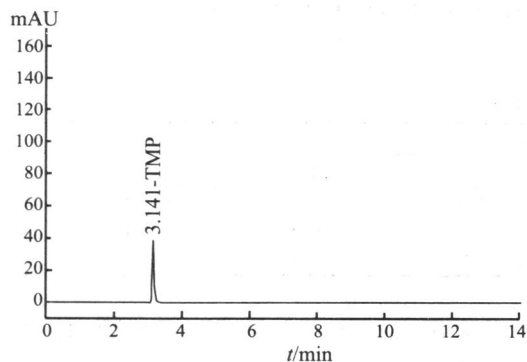


图3 甲氧苄啶色谱图

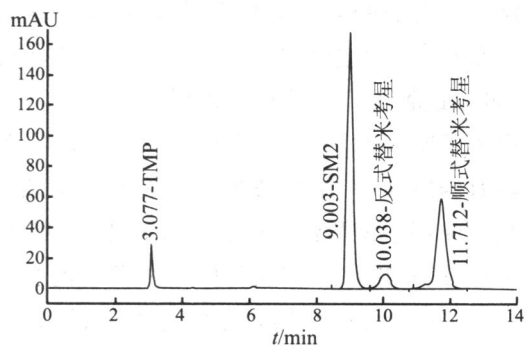


图4 复方替米考星色谱图

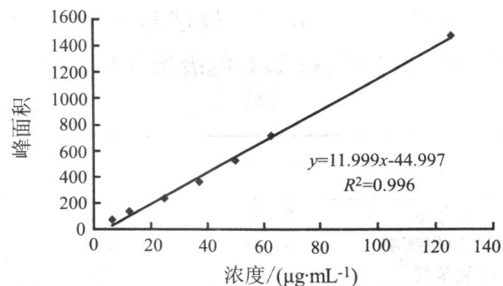


图5 替米考星线性关系图

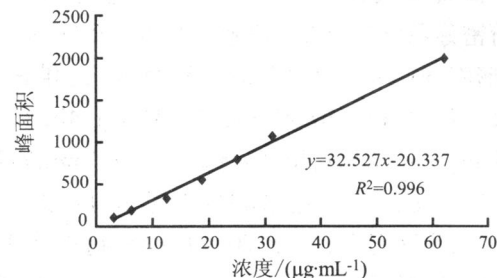


图6 磺胺二甲氧嘧啶线性关系图

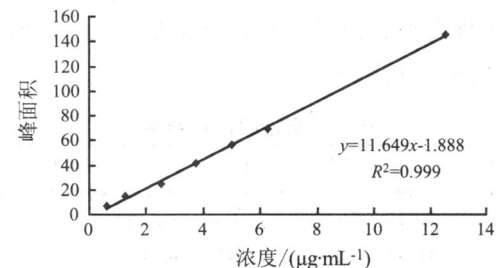


图7 甲氧苄啶线性关系图

2.4 线性关系考察 分别精密量取 2.2.4 项下复方替米考星对照液 2.5.1.25, 0.1, 0.075, 0.05, 0.025, 0.0125 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用稀释液稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 10 μL, 注入液相色谱仪, 按 2.1 项下色谱条件分析, 测定各自峰面积, 以浓度为横坐标 (x, Lg/mL), 以峰面积为纵坐标 (y), 进行线性回归, 结果见图 5~7。替米考星回归方程为  $y = 11.999x - 44.997, R^2 = 0.996$  在 6.25~125 Lg/mL 浓度范围内线性良好。磺胺二甲氧嘧啶回归方程为  $y = 32.527x - 20.337, R^2 = 0.996$  在 3.125~62.5 Lg/mL 浓度范围内线性良好。甲氧苄啶回归方程为  $y = 11.649x - 1.888, R^2 = 0.999$  在 0.625~12.5 Lg/mL 浓度范围内线性良好。

2.5 精密度试验 取 2.2.4 项下复方替米考星对照液 0.1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用稀释液稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 10 μL, 注入液相色谱仪, 重复进样 6 次, 记录峰面积, 计算 RSD。表 2 结果表明, 该方法精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 6 & 12, 24 h 后测定其峰面积, 计算 RSD。表 3 结果表明, 溶液在 24 h 内稳定。

表 2 精密度试验结果 (n = 6)

药物	峰面积						平均值	RSD %
	1	2	3	4	5	6		
替米考星	549.10	548.11	552.07	551.01	549.54	550.11	549.99	0.3
磺胺二甲氧嘧啶	729.64	730.43	730.77	730.34	730.46	730.44	729.51	0.05
甲氧苄啶峰	54.408	55.012	53.923	54.231	54.541	55.135	54.542	0.8

表 3 稳定性试验结果

药物	峰面积						RSD %
	0 h	2 h	6 h	8 h	12 h	24 h	
替米考星	551.12	550.92	551.07	550.83	551.34	550.61	0.05
磺胺二甲氧嘧啶	761.66	761.00	762.80	760.23	761.81	762.01	0.1
甲氧苄啶	56.175	56.263	56.616	56.582	56.496	56.513	0.3

2.7 重复性试验 取同一供试品 5 份, 按 2.2.5 项下配制样品溶液, 按 2.1 色谱条件分析测定。表 4 结果表明, 该方法重复性良好。

表 4 重复性试验结果

药物	含量 /%					平均值	RSD /%
	1	2	3	4	5		
替米考星	53.85	53.72	53.99	53.64	53.56	53.75	0.3
磺胺二甲氧嘧啶	30.98	30.88	30.92	31.17	30.76	30.94	0.4
甲氧苄啶	6.19	6.23	6.31	6.25	6.27	6.25	0.6

2.8 回收率试验 用加样回收法进行回收率试验, 精密称取已知含量(替米考星 53.79%、磺胺二甲氧嘧啶 30.94%、甲氧苄啶 6.29%)的供试品 6 份, 每份各 40 mg(40.65 mg 40.41 mg 40.23 mg 40.37 mg 40.82 mg 40.53 mg), 置 100 mL 容量瓶中, 分别精密加入一定量的替米考星、磺胺二甲氧嘧啶和甲氧苄啶对照品, 加 20 mL 乙腈超声使溶解, 加稀释液稀释至刻度, 摇匀。精密量取 1 mL, 置 50 mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。按 2.1 色谱条件分析, 计算回收率, 结果见表 5。结果显示该方法回收率良好。

表 5 回收率试验结果

药物名称	含量 /mg	添加量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
替米考星	21.85	21.92	43.80	100.14	99.17	0.8
	21.72	21.85	43.45	99.45		
	21.62	21.97	43.43	99.26		
	21.70	21.99	43.45	98.91		
	21.94	22.42	43.87	97.81		
	21.78	21.98	43.64	99.43		
磺胺二甲氧嘧啶	12.58	8.99	21.54	99.70	99.06	0.9
	12.50	9.01	21.47	99.52		
	12.45	9.40	21.61	97.48		
	12.49	8.94	21.41	99.77		
	12.63	9.07	21.61	99.01		
	12.54	9.05	21.49	98.90		
甲氧苄啶	2.54	2.69	5.20	98.86	99.39	0.9
	2.53	2.67	5.22	100.91		
	2.51	2.73	5.24	99.84		
	2.52	2.69	5.20	99.51		
	2.55	2.68	5.20	98.83		
	2.53	2.71	5.20	98.41		

### 3 讨论

替米考星由泰乐菌素的一种水解产物半合成的畜禽专用抗生素, 药用其磷酸盐, 对革兰氏阳性菌、某些革兰氏阴性菌、支原体、螺旋体等均有抑制作用; 对胸膜肺炎放线菌、巴氏杆菌具有比泰乐菌素更强的抗菌活性, 对奶牛乳房炎的治疗尤其有效<sup>[4]</sup>。磺胺二甲氧嘧啶是传统应用的抗菌药和抗球

虫药, 在我国曾广泛用于畜禽的球虫病, 它与甲氧苄啶配伍作用于二氢叶酸合成酶和还原酶, 双重阻断细菌叶酸合成的第一步和第二步, 从而抑制细菌的生长繁殖<sup>[5]</sup>。通过合理配方将上述三种药进行复方, 可以达到更广谱的抑菌效果。

甲氧苄啶和磺胺二甲氧嘧啶具有弱碱性<sup>[6]</sup>, 替米考星具有弱酸性<sup>[7]</sup>, 结合替米考星液相色谱条件其流动相中使用了偏酸性的磷酸二丁胺缓冲液, 可以改善峰形, 防止拖尾。在试验操作中发现乙腈的用量对峰形影响比较大, 如果乙腈比例大, 则磺胺二甲氧嘧啶与替米考星的反式峰重合, 无法分离; 如果乙腈比例小, 甲氧苄啶与磺胺二甲氧嘧啶的峰无法分离。通过多次试验最终确定以磷酸二丁胺缓冲液 - 乙腈 - 四氢呋喃 - 水 (25 B115 B55 B805) 作为流动相。

本试验建立了 HPLC 法同时测定三种成份的含量测定方法, 操作简便、准确、重现性好, 可以作为复方替米考星颗粒剂的质量标准评估依据。

### 参考文献:

- [1] 孙永学, 陈杖榴. 替米考星在兽医临床上应用的研究进展概况 [J]. 兽药与饲料添加剂, 2002, 7(6): 22- 25
- [2] 郭腾, 吴连勇, 张家祥. 兽用抗菌新药替米考星研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2002, 36(7): 38- 39
- [3] 中华人民共和国农业部. 兽药质量标准 [S]. 2006 版. 57- 59
- [4] 李宏胜, 张继瑜, 李创勇, 等. 替米考星对奶牛乳房炎常见病原菌体外抑菌活性的试验研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005 (3): 57- 58.
- [5] 杨世杰. 药理学 [M]. 北京: 人民出版社, 2005 357- 372
- [6] Deborah E Dixon- Holland Stanley E Katz Drug Residues in Animal Issues- Competitive Direct Enzyme- linked Immunosorbent Assay for Detection of Sulfamethazine Residues in Swine Urine and Muscle Tissue [J]. Journal of Association of Official Analytical Chemists 1988(6): 83- 85.
- [7] 陈杖榴. 医药理学 [M]. 第 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2002: 61- 65.