

新型复方氟苯尼考注射液中氟尼辛葡甲胺含量测定方法研究

程培培^{1,2}, 杨亚军², 刘希望², 李剑勇^{1,2*}

(1. 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 中国农业科学院 兰州畜牧与兽药研究所 / 甘肃省新兽药工程研究中心/甘肃省新兽药工程重点实验室/农业部兽用药物创制重点实验室, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 为了建立新型复方氟苯尼考注射液中氟尼辛葡甲胺含量的高效液相色谱测定方法, 选用 Hypersil ODS₂ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水 (体积比为 80 : 20), 检测波长为 254 nm, 柱温 30 °C, 流速 1 mL/min 进行测定。结果显示, 氟尼辛葡甲胺在该色谱条件下, 系统适应性良好; 在 27~889 μg/mL 的质量浓度范围内线性关系良好, 回归方程为 $Y = 9\,596.7X + 32\,979$, $R^2 = 0.999\,9$; 总平均回收率为 $(97.16 \pm 2.05)\%$, RSD 为 2.11%; 对 5 批样品中的氟尼辛葡甲胺进行含量测定, RSD 为 1.14%。表明该方法可用于新型复方氟苯尼考注射液中氟尼辛葡甲胺含量的测定。

关键词: 复方氟苯尼考注射液; 氟尼辛葡甲胺; 含量测定; 高相液相色谱法

中图分类号: S859.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)03-0142-05

Content Determination of Flunixin Meglumine in a Novel Compound Florfenicol Injection by High Performance Liquid Chromatography

CHENG Pei-pei^{1,2}, YANG Ya-jun², LIU Xi-wang², LI Jian-yong^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;
2. Gansu Provincial Engineering Research Center for New Animal Drug/Key Laboratory of New Animal Drug Project, Gansu Province/Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutical Development, Ministry of Agriculture/Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of CAAS, Lanzhou 730050, China)

Abstract: In order to establish the content determination method of flunixin meglumine (FM) in a novel compound florfenicol injection by high performance liquid chromatography (HPLC), Hypersil ODS₂ column (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) was used. The HPLC system used a mobile phase composed of methanol-0.1% phosphoric acid water (80 : 20, V/V) at a flow rate of 1 mL/min, the ultraviolet detector was set at 254 nm with column temperature was 30 °C. The HPLC system suitability of FM was good. A good linear correlation of FM was observed within the concentration range of 27~889 μg/mL ($R^2 = 0.999\,9$), and the average recovery rate was $(97.16 \pm 2.05)\%$ with RSD was 2.11%, the regression equation was $Y = 9\,596.7X + 32\,979$. The RSD of FM's content in 5 lots of novel compound florfenicol injection was 1.14%. The method was accurate, reliable, improved selective, simple, convenient and quick. The method of FM content determination in this novel compound florfenicol injection by HPLC could be used as the basis of quality control and establishing a quality standard.

收稿日期: 2013-10-29

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (1610322012005); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303038-4); 甘肃省科技重大专项计划项目 (1302NKDA024)

作者简介: 程培培 (1987-), 女, 河南洛阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 新兽药研究与开发。

E-mail: chengpeipei1117@163.com

* 通讯作者: 李剑勇 (1971-), 男, 甘肃秦安人, 研究员, 博士, 主要从事新兽药的研究与开发工作。E-mail: lijy1971@163.com

Key words: novel compound florfenicol injection; flunixin meglumine; content determination; high performance liquid chromatography(HPLC)

氟尼辛葡甲胺(flunixin meglumine)是一种非甾体抗炎药^[1],具有抗炎、解热、镇痛作用。临床上用于治疗肉牛、奶牛、马由内毒素血症引起的炎症,控制呼吸系统疾病伴随的发热症状以及急性奶牛乳房炎等^[2]。氟尼辛葡甲胺和抗菌药物联用,治疗牛、猪呼吸系统疾病效果良好^[3-4]。为了能够更有效地治疗猪、牛呼吸系统原发或继发的细菌和支原体感染,将抗炎药物氟尼辛葡甲胺和动物专用的抗菌药物氟苯尼考配伍,选用合适的注射溶媒,研制出新型复方氟苯尼考注射液。测定氟尼辛葡甲胺含量,为复方氟苯尼考注射液质量控制的关键因素之一。目前,关于氟尼辛葡甲胺的含量测定方法多种多样,如电位滴定法^[5]、高效液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV)^[6-7]、高相液相色谱法结合离子束质谱法(HPLC-PB-MS)和常压离子质谱法(HPLC-API-MS)^[8]、液相色谱串联质谱法(LC-MS-MS)^[9-10]、毛细管电泳法(CE)^[11]、气相色谱-质谱联用法(GC/MS)^[12]、液相色谱质谱联用法(LC/MS)^[13]等。但以上方法操作复杂,并不适合药物中氟尼辛葡甲胺含量的测定。为此,本研究依据《中华人民共和国兽药典(一部)》^[5]和《兽药研究技术指导原则汇编(2006—2011年)》^[14]中的氟尼辛葡甲胺含量测定方法和质量控制方法验证指导原则,对氟尼辛葡甲胺含量的测定方法进行优化和方法验证,以期建立简便、快速、重现性好、准确可靠的氟尼辛葡甲胺含量测定方法,为该制剂的进一步深入研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 药品

氟尼辛葡甲胺对照品(含量 $\geq 98\%$,批号:041M4719V)购自 Sigma-Aldrich,苯甲酸钠(分析纯,含量 $\geq 99.5\%$,批号 100918)购自天津市光复精细化工研究所,不含氟尼辛葡甲胺的空白溶剂(批号 20130403)购自中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所,80%、100%、120%的新型复方氟苯尼考注射液(批号分别为 20130428、20130429、20130501)购自中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所,新型复方氟苯尼考注射液(中试品)(批号 20130417、20130424、20130426、20130427、20130428)购自湖南农大动物药业有限公司,甲醇、乙腈为(色谱纯)购自

Fisher Scientific。

1.2 仪器

2695 型高效液相色谱仪、2489 紫外检测器购自 Waters 公司,Sartorius BS110S 电子天平、ME235S 赛多利斯微量天平购自北京赛多利斯天平有限公司,KQ-600DE 型数控超声波清洗器购自昆山市超声仪器有限公司,溶剂过滤器购自 phenomen 公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil ODS₂ (5 μm ,4.6 mm \times 250 mm,大连依利特分析仪器有限公司);以甲醇-0.1%磷酸水(体积比为 80:20)为流动相;检测波长 254 nm;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;流速 1 mL/min;进样量为 10 μL 。

1.3.2 供试品溶液的配制 精密吸取 1 mL 的新型复方氟苯尼考注射液于 100 mL 的容量瓶中,用流动相甲醇-0.1%磷酸水(体积比为 80:20)稀释至刻度,摇匀,进样前用 0.22 μm 的尼龙滤膜过滤。

1.3.3 系统适应性试验 精密称取氟尼辛葡甲胺对照品 0.083 g 于 50 mL 容量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为储备液。另精密称取 0.033 g 苯甲酸钠于 10 mL 容量瓶中,用纯水溶解,并稀释至刻度,摇匀,备用。然后,精密量取氟尼辛葡甲胺对照品储备液 5 mL,置 25 mL 容量瓶中,精密加入苯甲酸钠溶液 5 mL,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为系统适用性试验溶液,进样前用 0.22 μm 的尼龙滤膜过滤,进样量为 10 μL ,记录色谱图。分析苯甲酸钠峰与氟尼辛葡甲胺峰的分离度,以及氟尼辛葡甲胺峰的理论板数。

1.3.4 杂质干扰试验 分别配制新型复方氟苯尼考注射剂样品溶液和不含氟尼辛葡甲胺的空白溶剂样品溶液,10 μL 进样,分析不含氟尼辛葡甲胺的空白溶剂对氟尼辛葡甲胺的色谱峰是否有干扰。

1.3.5 标准曲线的制作 参照文献^[5,14]的方法,精密称取氟尼辛葡甲胺对照品 0.022 70 g 于 25 mL 容量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取 5 mL 于 10 mL 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀。类似方法,依次倍比稀释,配制质量浓度分别为 889.84、444.92、222.46、111.23、55.62、27.81 $\mu\text{g/mL}$ 的氟尼辛葡甲胺对照品溶液,进样前用 0.22 μm 的尼龙滤膜过滤,进样量为 10 μL ,不同浓度的标准溶液分别进样 3 次,记录色谱图。以平

均峰面积(Y)为纵坐标,以质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标,进行线性回归,得回归方程。

1.3.6 精密度试验 将作标准曲线用的质量浓度为 889.84、444.92、55.62 $\mu\text{g/mL}$ 的 3 个样品,在同日内不同时间进样 5 次,求得日内精密度。将 3 个样品每天同一时间测定,连续进样 5 d,求得日间精密度。

1.3.7 回收率试验 制备相当于新型复方氟苯尼考注射液浓度 80%、100%、120% 的复方氟苯尼考溶液,每个浓度制备 3 份供试品,测定样品中氟尼辛葡甲胺的含量,并与真实值比较,计算回收率和相对标准偏差。

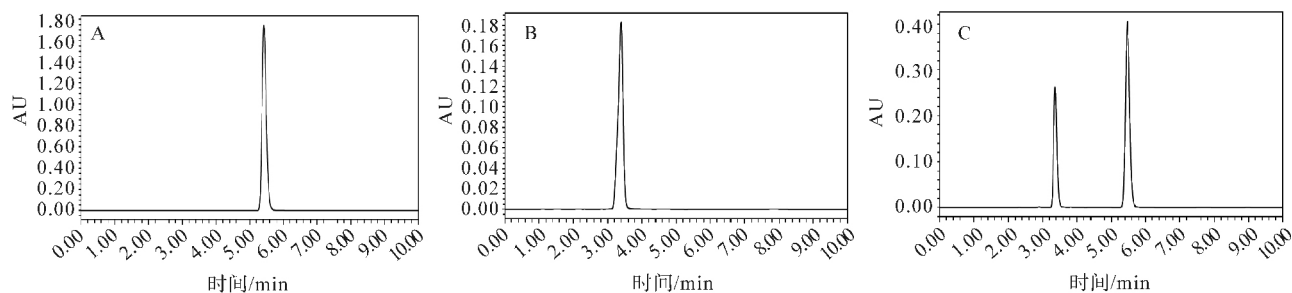
1.3.8 样品含量测定 将新型复方氟苯尼考注射液按照“1.3.2”项下的配制方法配制供试品溶液,进样量为 10 μL 。记录色谱峰面积,代入标准曲线,计

算样品溶液的浓度。同时,另取本品测定其相对密度^[5],将供试品换算成毫升数,计算即得。

2 结果与分析

2.1 系统适应性试验结果

将氟尼辛葡甲胺对照品、苯甲酸钠以及氟尼辛葡甲胺对照品和苯甲酸钠的混合溶液,各进样 10 μL ,得色谱图 1,从图中可以看出,氟尼辛葡甲胺的保留时间在 5.5 min,苯甲酸钠的保留时间在 3.4 min,氟尼辛葡甲胺与苯甲酸钠的分离度为 10.52,氟尼辛葡甲胺的理论板数为 9 198.7,符合《中华人民共和国兽药典(一部)》^[5]中“苯甲酸钠峰与氟尼辛葡甲胺峰的分度应大于 1.9,理论板数按氟尼辛葡甲胺峰计算不低于 1 500”的要求。



A. 氟尼辛葡甲胺对照品; B. 苯甲酸钠; C. 氟尼辛葡甲胺对照品和苯甲酸钠混合溶液

图 1 样品色谱分析

2.2 杂质干扰试验结果

由图 2 可以看出,氟尼辛葡甲胺的保留时间在 5.5 min,不含氟尼辛葡甲胺的空白溶剂对氟尼辛葡甲胺的 HPLC 测定无干扰。

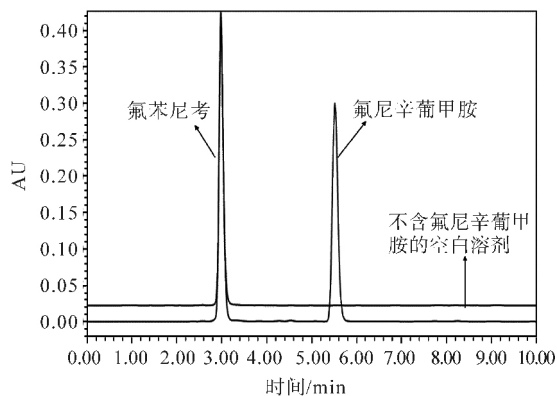


图 2 新型复方氟苯尼考注射液和不含氟尼辛葡甲胺的空白溶剂色谱

2.3 标准曲线绘制

图 3 为测定氟尼辛葡甲胺的标准曲线。由线性回归的结果可知,氟尼辛葡甲胺在 27~889 $\mu\text{g/mL}$

质量浓度范围内,线性关系良好,回归方程为 $Y = 9\,596.7X + 32\,979$, $R^2 = 0.999\,9$ 。

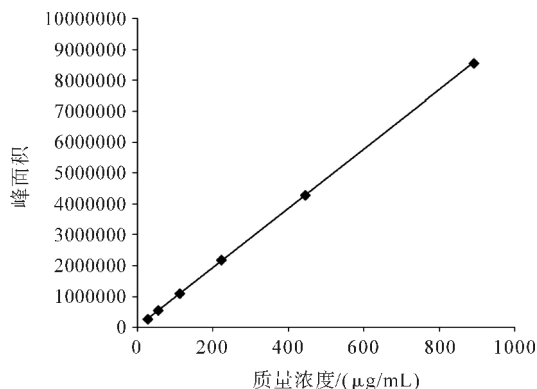


图 3 氟尼辛葡甲胺的标准曲线

2.4 精密度试验结果

由表 1 可知,将氟尼辛葡甲胺对照品的高、中、低浓度在同日内不同时间进样 5 次,求得日内精密度,每个浓度的 5 次结果的 RSD 均小于 5%。同时将 3 个样品每天同一时间测定,连续测定 5 d,得到其日间精密度,其 RSD 小于 5%(表 2)。表明该测定方法的

日内精密度和日间精密度均符合方法验证对精密度的要求,该测定方法可用于氟尼辛葡甲胺含量测定。

2.5 回收率试验结果

由表 3 可知,80%、100%、120%的新型复方氟 苯尼考注射液中,氟尼辛葡甲胺的回收率在 95.79%~98.53%,总平均回收率为(97.16±2.05)%,RSD 为 2.11%,符合回收率在 80%~120%的要求,说明该含量测定方法准确度高。

表 1 氟尼辛葡甲胺测定的日内精密度

样品质量浓度/ (μg/mL)	每次测定质量浓度/(μg/mL)					RSD/%
	1	2	3	4	5	
55.62	55.84	54.62	54.06	53.84	53.93	1.42
444.92	447.79	449.39	448.22	454.91	452.61	0.67
889.84	897.96	900.33	915.19	905.08	910.25	0.78

表 2 氟尼辛葡甲胺测定的日间精密度

样品质量浓度/ (μg/mL)	每次测定质量浓度/(μg/mL)					RSD/%
	1	2	3	4	5	
55.62	54.62	54.98	55.58	55.56	55.29	0.69
444.92	449.39	445.56	461.52	461.01	449.80	1.60
889.84	900.33	897.00	928.89	934.43	903.76	1.90

表 3 氟尼辛葡甲胺的回收率试验结果

分析物	新型复方氟苯尼考注射液浓度/%	样品编号	质量浓度/(mg/mL)	测定质量浓度/(mg/mL)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%	总平均回收率/%	RSD/%
氟尼辛葡甲胺	80	1	21.93	21.04	95.93	95.79±0.47	0.49	97.16±2.05	2.11
		2	21.99	21.15	96.17				
		3	21.94	20.99	95.27				
	100	1	27.92	27.61	98.91	98.53±3.06	3.11		
		2	27.92	28.30	101.38				
		3	27.98	26.66	95.29				
	120	1	32.89	31.76	96.53	97.17±1.24	1.28		
		2	32.89	31.70	96.39				
		3	32.89	32.43	98.61				

2.6 样品含量测定结果

对中试生产的 5 批新型复方氟苯尼考注射液产品进行含量测定,结果见表 4,氟尼辛葡甲胺的含量在 100.23%~102.70%,RSD 为 1.14%。表明该测定方法准确,精密度好,偏差小,可以用于该药物中氟尼辛葡甲胺的含量检测,为该注射剂质量标准的制定以及生产中的质量控制提供良好依据。

表 4 新型复方氟苯尼考注射液含量测定结果

序号	批号	含量/%	RSD/%
1	20130417	102.50	1.14
2	20130424	102.70	
3	20130426	100.23	
4	20130427	101.54	
5	20130428	101.07	

3 讨论

本研究测定氟尼辛葡甲胺的色谱条件是按照《中华人民共和国兽药典(一部)》中甲醇-3.33%醋酸水(体积比为 70:30),^[5]进行优化,此时氟苯尼考峰较宽,理论板数不如甲醇-3.33%醋酸水(体积比为 80:20)时高。当用 0.1%磷酸水代替 3.33%醋酸水即甲醇-0.1%磷酸水(体积比为 80:20)时,色谱图较好,理论塔板数高,氟尼辛葡甲胺与苯甲酸钠分离度好,远大于 1.9,可用于氟尼辛葡甲胺的含量测定。国内关于氟尼辛葡甲胺的含量测定方法研究较少,余祖功等^[6]用甲醇-磷酸二氢钾缓冲液(体积比为 80:20,pH 值 3.5)进行色谱条件优化。国外主要研究氟尼辛葡甲胺在动物体内的药代动力学^[6-11,15]和药物残留^[13],样品中氟尼辛葡甲胺的含

量较小,需对样品进行处理,并且检测条件要求较高,测定氟尼辛葡甲胺的方法比较复杂,不适合药物中氟尼辛葡甲胺含量的测定。药物中氟尼辛葡甲胺的含量较高,样品处理简单,用高效液相色谱法即可检测。

本研究建立的新型复方氟苯尼考注射液中氟尼辛葡甲胺含量的测定方法符合检测要求,该方法简便、快速、重现性好,且结果准确可靠,可用于新型复方氟苯尼考注射液中氟尼辛葡甲胺含量的测定,为该注射液的质量评价以及质量标准的制定奠定基础,并为其进一步开发和研究提供依据。

参考文献:

- [1] Radi Z A, Khan N K. Effects of cyclooxygenase inhibition on the gastrointestinal tract[J]. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2006, 58(2-3): 163-173.
- [2] Yeiser E E, Leslie K E, McGilliard M L, *et al.* The effects of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis and flunixin meglumine administration on activity measures, feed intake, and milk parameters[J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(9): 4939-4949.
- [3] Balmer T V, Willams P, Selman I E. Comparison of carprofen and flunixin meglumine as adjunctive therapy in bovine respiratory disease[J]. *The Veterinary Journal*, 1997, 154(3): 233-241.
- [4] 李世江, 张克云, 张彬, 等. 氟尼辛葡甲胺注射液与氟苯尼考注射液联用对人工感染猪巴氏杆菌的治疗试验[J]. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(8): 120-122.
- [5] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(一部)[S]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 157-160, 附录 49, 附录 243-245.
- [6] 余祖功, 蒋春茂, 郭永刚, 等. 猪静注、肌注氟尼辛葡甲胺的药物动力学研究[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(9): 2068-2072.
- [7] Elmas M, Yazar E, Uney K, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin and flunixin meglumine and interactions between both drugs after intravenous co-administration in healthy and endotoxaemic rabbits[J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 177(3): 418-424.
- [8] Stanley S M R, Owens N A, Rodgers J P. Detection of flunixin in equine urine using high-performance liquid chromatography with particle beam and atmospheric pressure ionization mass spectrometry after solid-phase extraction [J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1995, 667(1): 95-103.
- [9] Daeseleire E, Mortier L, Ruyck H D, *et al.* Determination of flunixin and ketoprofen in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 488(1): 25-34.
- [10] Luo Y, Rudy J A, Ubaha C E, *et al.* Quantification and confirmation of flunixin in equine plasma by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2004, 801(2): 173-184.
- [11] Gu X L, Meleka-Boulesa M, Chen C L, *et al.* Determination of flunixin in equine urine and serum by capillary electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography B*, 1997, 692(1): 187-198.
- [12] Wasfi I A, Hadi A A, Alkatheeri N A, *et al.* Identification of a flunixin metabolite in camel by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B*, 1998, 709(2): 209-215.
- [13] Kissell LW, Smith G W, Leavens T L, *et al.* Plasma pharmacokinetics and milk residues of flunixin and 5-hydroxy flunixin following different routes of administration in dairy cattle[J]. *American Dairy Science*, 2012, 12(95): 7151-7157.
- [14] 农业部兽药评审中心. 兽药研究技术指导原则汇编(2006—2011 年)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 32-37.
- [15] Königsson K, Törneke K, Engeland I V, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of flunixin after intravenous, intramuscular and oral administration to dairy goats[J]. *Acta Vet Scand*, 2003, 44(3/4): 153-159.