

УДК 615.074

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2022.55.17.004>

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИЛМИКОЗИНА ФОСФАТА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ-УФ

**З.Р. Якупова**, аспирант кафедры аналитической химии, сертификации и менеджмента качества ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань, [yakupovalab@yandex.ru](mailto:yakupovalab@yandex.ru)

**С.Ю. Гармонов**, доктор хим. наук, профессор кафедры аналитической химии, сертификации и менеджмента качества ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань, [serggar@mail.ru](mailto:serggar@mail.ru)

**Н.Н. Насибов**, канд. юрид. наук, генеральный директор ООО «Ветлайн», г. Москва, [007nemat@gmail.com](mailto:007nemat@gmail.com)

**И.М. Исламгалиева**, генеральный директор ООО «Инноветфарм», г. Казань, [ilsiyarpharm@mail.ru](mailto:ilsiyarpharm@mail.ru)

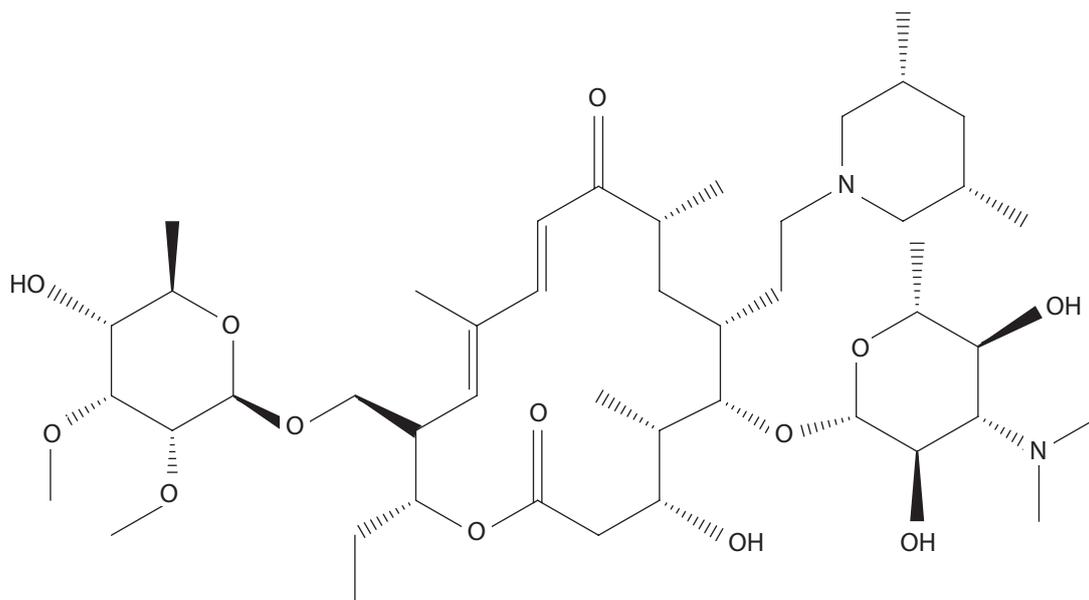
Разработана методика количественного определения тилмикозина фосфата в лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с целью обеспечения контроля качества выпускаемой продукции. Установлены оптимальные условия хроматографических определений суммы цис- и транспиперидинильных изомеров тилмикозина. Проведена валидация разработанной методики по показателям: «специфичность», «линейность», «правильность» и «прецизионность». Аналитические возможности разработанного способа показаны на примере определения тилмикозина фосфата в лекарственном препарате «Тилмикозин ВЛ 25».

**Ключевые слова:** тилмикозина фосфат, ветеринарные лекарственные препараты, ВЭЖХ-УФ, валидация, контроль качества

Тилмикозин – 20-деоксо-20-(3,5-диметил-1-пиперидинил)десмикозин – представляет собой полусинтетическое производное тило-

зина, которое является противомикробным средством из группы макролидов (рис. 1). Обладает широким антибактериальным спектром действия, особенно усиливая активность в отношении *Pasteurella multocida* и *Actinobacillus pleuropneumoniae* [1]. Тилмикозин состоит из суммы цис- и транспиперидинильных изомеров [2]. Согласно [3], содержание цисизомеров тилмикозина составляет от 82,0 до 88,0%, а содержание трансизомеров тилмикозина – от 12,0 до 18,0%.

В ветеринарии тилмикозин назначается для профилактики и лечения микоплазмозов [4] и лечения респираторных заболеваний крупного рогатого скота, вызванных *Pasteurella haemolytica* [5,6]. Механизм бактериостатического действия тилмикозина заключается в блокировании белкового синтеза в микробной клетке на рибосомальном уровне. При пероральном введении тилмикозин хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта и проникает во все органы и ткани организма, прежде всего в ткани респираторной и дыхательной систем, а через 1,5–3 ч достигает



**РИС. 1.** Структурная формула тилмикозина фосфата

максимального уровня в сыворотке крови, при этом терапевтические концентрации антибиотика сохраняются в организме в течение 18–24 ч. Выводится препарат из организма в основном в неизменном виде, главным образом с желчью и частично с мочой.

На ветеринарном фармацевтическом рынке России тилмикозин представлен в виде гранул и растворов для орального применения. Для их контроля качества перспективно использование ВЭЖХ как универсального и высокочувствительного метода анализа, который отличается высокой точностью и воспроизводимостью. При этом важна разработка максимально унифицированных, экономичных и экспрессных методик подготовки пробы и хроматографических процедур. Реализация такого подхода, очевидно, позволит снизить расходы на проведение контроля и более широко внедрить ВЭЖХ в практику фармацевтического анализа.

**Цель** данной работы – разработка и валидация методики количественного определения тилмикозина фосфата в лекарственном препарате «Тилмикозин ВЛ 25» при использовании метода обращенно-фазной жидкостной хроматографии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе использовали стандартный образец тилмикозина фосфата (United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard, США) с содержанием цисизомера 806 мг/г и трансизомера 129 мг/г; 85%-ную фосфорную кислоту и триэтиламин (Honeywell, Германия); ацетонитрил (J.T. Baker Chemical Company, США). Для приготовления рабочих образцов лекарственного препарата «Тилмикозин ВЛ 25» использовали субстанцию тилмикозина фосфата (Shandong Jiulong Hisince Pharmaceutical Co.Ltd., Китай) с содержанием цисизомера 854 мкг/мг и трансизомера 146 мкг/мг. Для этого в мерную колбу на 100 мл помещают 32 г тилмикозина фосфата, 20 г пропиленгликоля, 2 г бензилового спирта, растворяют в воде очищенной и доводят объем до метки.

Для количественного определения тилмикозина фосфата использовали систему ВЭЖХ LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с УФ-детектором.

Хроматографическое разделение выполняли на колонке Sunfire C18 (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм). Элюирование осуществлялось в изократическом режиме. Подвижная фаза,

состоящая из 2,5% раствора триэтиламина и ацетонитрила (в соотношении 70:30 об. %), подавалась со скоростью потока 1,0 мл/мин. Объем пробы составлял 10 мкл. Детектирование выполняли при длине волны 289 нм. Время анализа – 5 минут.

Стандартный раствор тилмикозина фосфата с концентрацией 200 мкг/мл готовили путем растворения точной навески стандартного образца, состоящего из смеси цис- и трансизомера тилмикозина фосфата в 0,17% растворе ортофосфорной кислоты. Раствор использовали свежеприготовленным.

Для определения количественного содержания испытуемый раствор готовили следующим образом: около 2,0 г (точная навеска) препарата помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 30 мл раствора 0,17% ортофосфорной кислоты, обрабатывали в ультразвуковой ванне 5 минут, объем доводили до метки тем же растворителем и перемешивали. Аликвоту 2,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 80 мл растворителя, обрабатывали в ультразвуковой ванне 5 минут, объем доводили до метки тем же растворителем и перемешивали. Концентрацию лекарственного препарата в пробе (мг/мл) находили по внешнему стандартному образцу.

Содержание тилмикозина фосфата (С) в мг на 1 мл в препарате вычисляли по формуле:

$$C \left( \frac{\text{мг}}{\text{мл}} \right) = \frac{S_x \times m_{st} \times 50 \times 100 \times P \times \rho_{20}}{S_{st} \times m_x \times 100 \times 2}, \quad (1)$$

где  $S_x$  – сумма площадей пика трансизомера тилмикозина и цисизомера тилмикозина на хроматограмме испытуемого раствора;  $S_{st}$  – сумма площадей пика трансизомера тилмикозина и цисизомера тилмикозина на хроматограмме стандартного раствора;  $m_x$  – навеска испытуемого препарата, г;  $m_{st}$  – навеска стандартного образца субстанции тилмикозина фосфата, г;  $\rho_{20}$  – плотность испытуемого

препарата, г/мл; P – содержание тилмикозина фосфата в стандартном образце субстанции тилмикозина фосфата, в мг/мг.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектр поглощения водного раствора субстанции тилмикозина фосфата содержит характерный максимум при 289 нм (рис. 2), который можно использовать в качестве аналитической волны детектирования в условиях разделения в хроматографической системе.

Были проведены исследования по выбору оптимального состава подвижной фазы для наилучшего разделения изомеров тилмикозина фосфата в течение наиболее короткого времени с целью оптимизации аналитической процедуры. Опробованы подвижные фазы «ацетонитрил – растворы ортофосфорной кислоты» при различных соотношениях органических и водных компонентов. Однако при данной подвижной фазе не наблюдалось наличия отдельных пиков изомеров тилмикозина фосфата, что не позволяло осуществить их эффективное разделение. При дальнейшем улучшении элюационных свойств изомеров и разделении их смеси обратили внимание

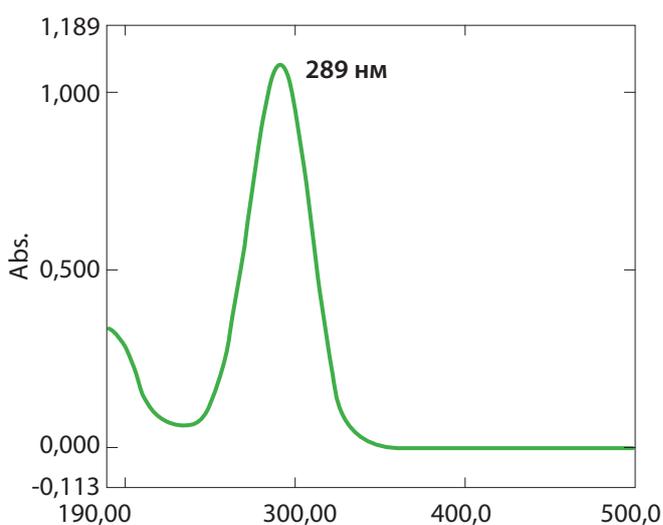


РИС. 2. Спектр поглощения водного раствора тилмикозина фосфата ( $l = 1$  см, концентрация тилмикозина фосфата 200 мг/мл)

Таблица 1

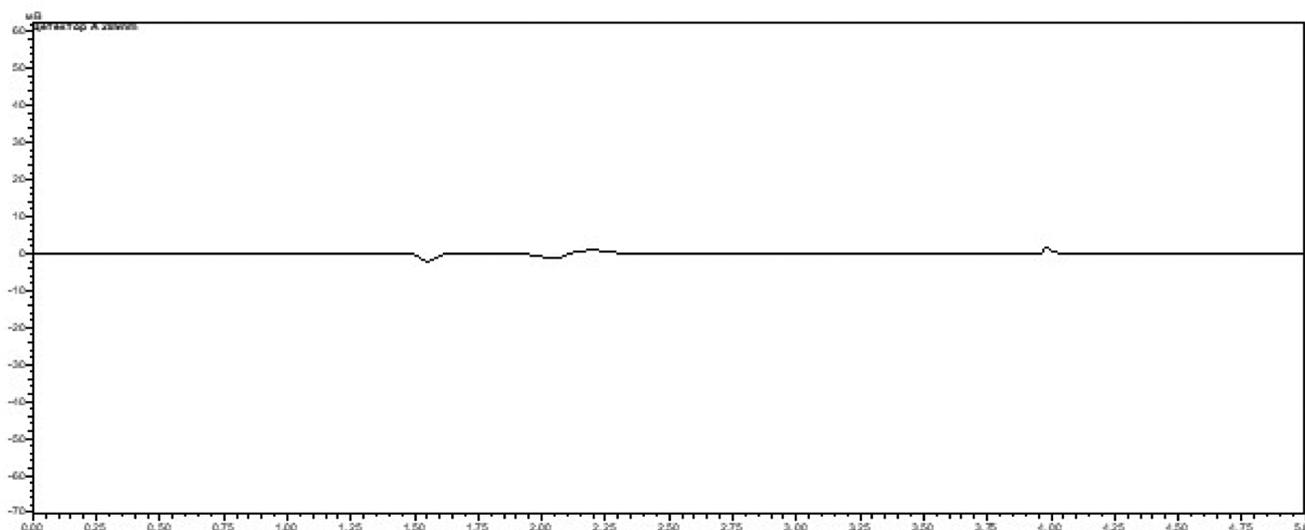
**РЕЗУЛЬТАТЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ОПРЕДЕЛЕНИЙ ТИЛМИКОЗИНА  
В ЛЕКАРСТВЕННОМ ПРЕПАРАТЕ «ТИЛМИКОЗИН ВЛ 25»**

№ п/п	m, г	S трансизомера	S цисизомера	ΣSi	C, мг/мл	x <sub>i</sub> (W), %
1	2,0142	324 514	2 097 271	2 421 784	250,81	100,32
2	2,0211	321 876	2 101 651	2 423 527	250,13	100,05
3	2,0094	320 309	2 100 051	2 420 359	251,26	100,50
4	2,0002	323 166	2 065 306	2 388 471	249,09	99,64
5	2,0514	327 744	2 133 012	2 460 756	250,22	100,09
6	2,0001	321 504	2 063 853	2 385 357	248,78	99,51

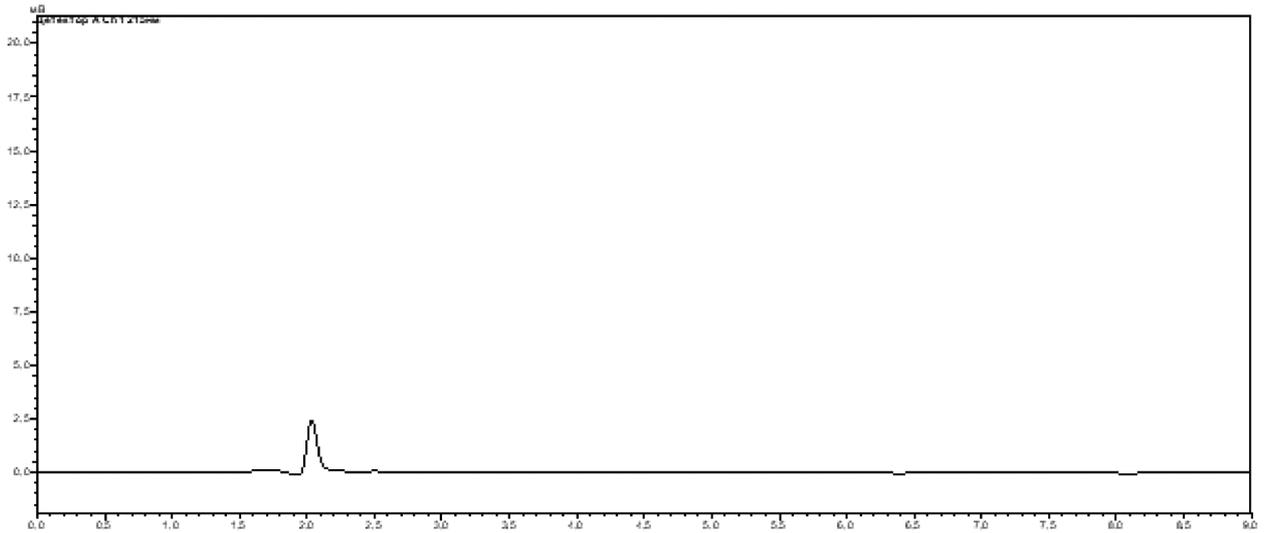
на тот факт, что добавление модификатора триэтиламина позволило осуществить разделение компонентов. В последующем были апробированы подвижные фазы «ацетонитрил – растворы триэтиламина» при разных процентных соотношениях. Наилучшее разделение пиков изомера тилкозина было достигнуто при соотношении компонентов подвижной фазы с 2,5% раствором триэтиламина и ацетонитрила – 70:30 (по объему).

При оптимальных условиях хроматографического разделения проведено определение цис- и трансизомера в лекарственном препарате для ветеринарного применения «Тилмикозин ВЛ 25».

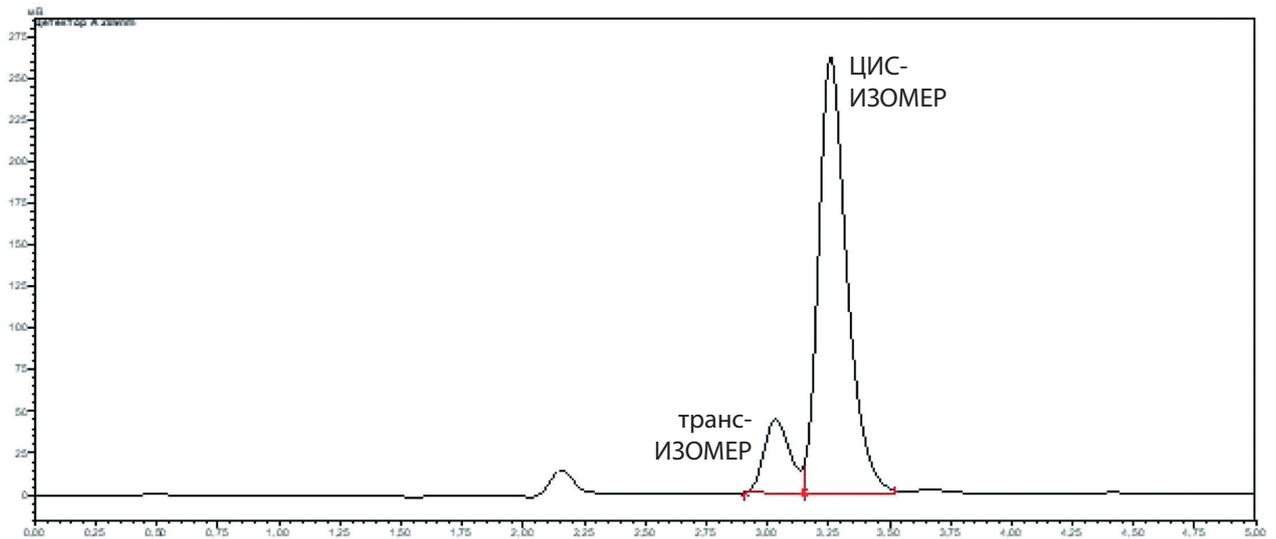
Валидацию аналитической методики количественного определения тилмикозина фосфата проводили согласно требованиям ГФ XIV [7]. Подтверждение *специфичности* проводили сравнением хроматограмм растворителя, раствора плацебо, стандартного раствора и раствора искусственного препарата (рис. 3–6). Специфичность аналитической методики считается доказанной, если на хроматограмме раствора плацебо отсутствуют пики в районе выхода пика действующего вещества препарата и выполняются все условия пригодности хроматографической системы. Вспомогательные компоненты, используемые при производстве лекарственного



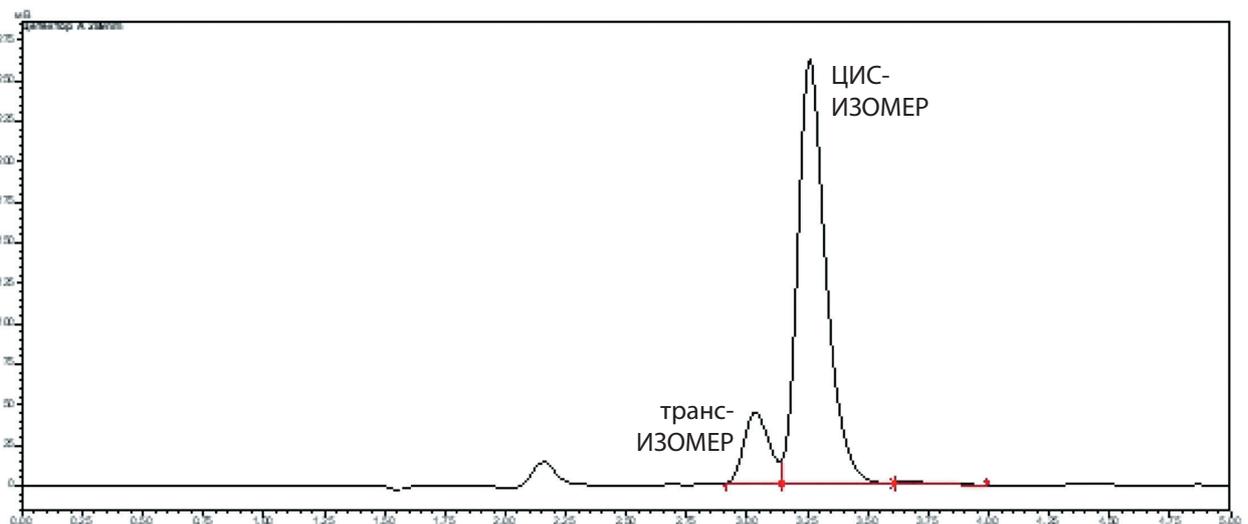
**РИС. 3. Хроматограмма растворителя**



**РИС. 4.** Хроматограмма образца плацебо



**РИС. 5.** Хроматограмма стандартного образца тилмикозина фосфата



**РИС. 6.** Хроматограмма образца лекарственного препарата «Тилмикозин ВЛ 25»

препарата, не имеют мешающего влияния при определении.

Хроматографическая система считается пригодной, если:

- относительное время удерживания пика трансизомера тилмикозина и цисизомера тилмикозина около 0,85 и 1 минуты соответственно;
- относительное стандартное отклонение от среднего результата площадей пиков трансизомера и цисизомера тилмикозина фосфата должно быть не более 2,0% (3 определения);
- фактор асимметрии пика цисизомера тилмикозина фосфата должен быть не более 2,0;
- эффективность хроматографической колонки (N) для пика цисизомера тилмикозина фосфата должна быть не менее 2000 теоретических тарелок;
- разрешение между пиками трансизомера и цисизомера тилмикозина фосфата – не менее 1,0.

Согласно полученным данным, параметр «специфичность» соответствует заявленным критериям приемлемости, удовлетворяются требования пригодности хроматографической системы, на хроматограмме растворителя и плацебо отсутствуют пики в районе выхода пиков тилмикозина фосфата.

*Линейность.* Проводили анализ 5 образцов стандартных растворов с соответствующими концентрациями, растворы хроматографировали не менее 3 раз. Градуировку проводили методом абсолютной калибровки. Линейная градуировочная зависимость отношения площади пиков от их концентраций описывается уравнениями регрессии с хорошими коэффициентами корреляции:

$$S = 20625 C \text{ (мг/мл)} + 105370 \text{ (} r^2=0,9996 \text{)}$$

для цисизомера тилмикозина;

$$S = 2969 C \text{ (мг/мл)} + 10166 \text{ (} r^2=0,9997 \text{)}$$

для трансизомера тилмикозина.

Критерии приемлемости:

1. Коэффициент детерминации  $r^2 > 0,998$ .

2. Точка пересечения с осью ординат составляет  $\pm 3,0\%$  от ожидаемого значения (расчитанного с использованием коэффициентов регрессии) номинальной концентрации 100% стандарта.

*Правильность* разрабатываемой методики оценивали методом «введено – найдено». Испытание проводили на шести независимых образцах. В качестве критериев приемлемости выбрали следующие: степень извлечения для количественного определения от 98% до 102% (100% концентрация); относительное стандартное отклонение  $\leq 2,0\%$  (табл. 2).

Для оценки прецизионности методики по параметру «повторяемость» («сходимость») было проанализировано шесть образцов одним химиком в течение 1 дня на одном приборе. Для подтверждения внутрилабораторной прецизионности было проанализировано по 6 образцов двумя химиками в разные дни на разном оборудовании (табл. 3).

Критерии приемлемости: относительное стандартное отклонение результатов шести определений каждого сотрудника лаборатории должно быть не более 2%.

Предел обнаружения тилмикозина фосфата с использованием данной валидируемой методики составляет 1 мкг/мл, предел количественного определения – 0,1 мг/мл.

Согласно проведенным исследованиям была разработана методика количественного определения тилмикозина фосфата в лекарственном препарате «Тилмикозин ВЛ 25», метрологические характеристики которой удовлетворяют заявленным критериям для фармацевтического анализа.

## ВЫВОДЫ

1. При использовании метода обращенно-фазной ВЭЖХ разработана методика количественного определения тилмикозина фосфата в лекарственных препаратах с целью обеспече-

Таблица 2

**РЕЗУЛЬТАТЫ ВАЛИДАЦИИ ПО ПАРАМЕТРУ ПРАВИЛЬНОСТИ**

Введено					Найдено		Метрологические характеристики
С цис, мг/мл	С транс, мг/мл	С цис	С транс	Σ Si	С цис, мг/мл	С транс, мг/мл	
213,67	36,53	320 437	2 140 867	2 461 304	214,49	36,67	x = 250,35 S = 0,99 Sx = 0,39 εα = 1,73 A = ±1,73% Δ = 250,35±1,73%
213,67	36,53	330 563	2 114 662	2 445 225	214,46	36,66	
213,67	36,53	314 352	2 085 032	2 399 384	212,72	36,37	
213,67	36,53	312 011	2 084 385	2 396 396	213,43	36,49	
213,67	36,53	317 515	2 087 975	2 405 490	213,05	36,42	
213,67	36,53	327 552	2 130 745	2 458 297	214,66	36,70	

ния контроля качества выпускаемой продукции. Установлены оптимальные условия хроматографических определений суммы цис- и транс-перидинильных изомеров тилмикозина.

2. Проведена валидация разработанной методики. Согласно полученным результатам,

разработанная методика количественного определения тилмикозина фосфата в ветеринарных лекарственных препаратах удовлетворяет требованиям ОФС 1.1.0012.15 ГФ XIV «Валидация аналитической методики» по показателям: «специфичность», «линейность»,

Таблица 3

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ПРЕЦИЗИОННОСТИ МЕТОДИКИ ПО ПАРАМЕТРУ «ПОВТОРЯЕМОСТЬ» («СХОДИМОСТЬ»)**

Первый день				Второй день				Метрологические характеристики
Σ Si	С цис, мг/мл	С транс, мг/мл	Σ С, мг/мл	Σ Si	С цис, мг/мл	С транс, мг/мл	Σ С, мг/мл	
2 421 784	213,55	36,51	250,06	2 461 927	215,66	36,87	252,53	<b>Первый день</b> x = 249,86 S = 1,98 Sx = 0,79 εα = 3,48 A = ±3,48% Δ = 249,86±3,48%
2 423 527	213,96	36,58	250,54	2 450 888	214,88	36,74	251,61	
2 420 359	213,93	36,57	250,50	2 427 749	212,47	36,32	248,80	
2 388 471	211,53	36,16	247,69	2 389 829	212,66	36,36	249,02	<b>Второй день</b> x = 249,80 S = 1,81 Sx = 0,73 εα = 3,19 A = ±3,19%
2 460 756	215,89	36,91	252,80	2 391 414	211,85	36,22	248,07	
2 385 357	211,40	36,14	247,54	2 400 289	212,44	36,32	248,76	

«правильность», «сходимость» и «внутрилабораторная прецизионность». Достигнут предел обнаружения (3σ) тилмикозина фосфата 1 мкг/мл, предел количественного определения – 0,1 мг/мл. СКО не превышало 2% (n=5).

3. Аналитические возможности разработанного способа показаны на примере определения тилмикозина фосфата в лекарственном препарате «Тилмикозин ВЛ 25».

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Zheng Y. *Molecularly imprinted solid-phase extraction for determination of tilmicosin in feed using high performance liquid chromatography* / Y. Zheng, Y. Liu, H. Guo, L. He, B. Fang, Z. Zeng // *Analytica chimica acta*. 2011. V. 690. №2. P. 269–274.
2. Stobba-Wiley C.M., Readnour R.S. *Determination of tilmicosin residues in cow and sheep milk by liquid chromatography* // *Journal of AOAC International*. 2000. V. 83. №3. P. 555–562.
3. Агольцов В.А. *Эффективность и безопасность лекарственных препаратов при лечении экспериментальных и спонтанных микоплазменных инфекций* / В.А. Агольцов, Л.П. Падило, О.П. Бирюкова, М.М. Лугидова // *Ветеринария сегодня*. 2022. №2. С. 169–175.
4. *The United States Pharmacopeia: USP 29: The National Formulary: NF 24: by Authority of the United States Pharmacopeial Convention, Meeting at Washington, D. C., March 9–13, 2005*. V. 31 (3) P. 798.
5. Merrill J.K., Tonkinson L.V. *The effectiveness of Micotil for the treatment of bovine respiratory disease* // *The Bovine Practitioner*. 1989. P. 26–28.
6. Gorham P.E. *Tilmicosin as a single injection treatment for respiratory disease of feedlot cattle* / P.E. Gorham, L.H. Carroll, J.W. McAskill, L.E. Watkins, E.E. Ose, L.V. Tonkinson, J.K. Merrill // *The Canadian Veterinary Journal*. 1990. V. 31. №12. P. 826.
7. Валидация аналитических методик. ОФС.1.1.0012.15. Государственная фармакопея Российской Федерации. 2018. 14-е изд. Т. 1. С. 276–288.

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A TECHNIQUE FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF TILMICOSIN PHOSPHATE IN MEDICINAL PRODUCTS BY HPLC-UV

Z.R. Iakupova<sup>1</sup>, S.Yu. Garmonov<sup>1</sup>, N.N. Nasibov<sup>2</sup>, I.M. Islamgalieva<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia

<sup>2</sup> LLC Vetline, Moscow, Russia

<sup>3</sup> LLC Innovetpharm, Kazan, Russia

*A method for the quantitative determination of tilmicosin phosphate in medicinal preparations by high-performance liquid chromatography has been developed in order to ensure quality control of manufactured products. Optimal conditions for chromatographic determination of the sum of cis- and trans-piperidinyl isomers of tilmicosin have been established. Validation of the developed method was carried out according to the following characteristics: specificity, linearity, trueness and precision. The analytical capabilities of the developed method are shown by the example of the determination of tilmicosin phosphate in the drug «Tilmicosin VL 25».*

**Keywords:** tilmicosine phosphate, veterinary drugs, HPLC-UV, validation, quality control