

氟雷拉纳液相色谱分析方法 研究报告

项目单位：河北威远生物化工有限公司

2026 年 6 月

氟雷拉纳液相色谱分析方法研究报告

1 实验部分

1.1 方法提要

试样用甲醇溶解，以甲醇+水溶液为流动相梯度洗脱，使用以 C₁₈ 为填料的不锈钢柱和可调波长紫外检测器，在波长 265 nm 下对试样中的氟雷拉纳进行高效液相色谱分离，外标法定量。

1.2 试剂和溶液

甲醇：色谱级；

蒸馏水：新蒸二次蒸馏水或超纯水；

氟雷拉纳标样：已知质量分数≥98%。

1.3 仪器

高效液相色谱仪：具有可变波长紫外可见检测器。

色谱柱：150 mm×4.6 mm（内径）不锈钢柱，内装 C₁₈、5 μm 填充物（或具有同等效果的色谱柱）。

过滤器：滤膜孔径约 0.45 μm。

超声波清洗器。

1.4 高效液相色谱操作条件

流动相梯度洗脱条件：

时间 min	水（V/V） %	甲醇（V/V） %
0.0	34	66
25.0	34	66
25.1	5	95
30.0	5	95
35.1	34	66
45.0	34	66

流速：1.8 mL/min。

柱温：35 °C

检测波长：265 nm。

进样体积：5 μL。

保留时间：氟雷拉纳约 15.5min。

上述操作参数是典型的，可根据不同仪器特点对给定的操作参数做适当调整，以期获得最佳效果。

1.5 测定步骤

1.5.1 标样溶液的制备

称取0.05 g（精确至0.000 1 g）氟雷拉纳标样，置于50 mL容量瓶中，加入适量甲醇，超声振荡至溶解，冷却至室温，用甲醇定容，摇匀，即为标样储备液。准确移取上述溶液2 mL于另一10 mL容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀。

1.5.2 试样溶液的制备

称取含1.0 g（精确至0.000 1 g）氟雷拉纳的试样于50 mL容量瓶中，加入适量甲醇，超声振荡5 min，冷却至室温，用甲醇稀释至刻度，摇匀，过滤。建议根据检测情况适当优化样品称样量，推荐氟雷拉纳浓度约200mg/L。

注1：对于低含量固体样品，称样量对定容体积有影响的，应采用添加定量溶剂法。

注2：部分剂型需采用特殊的前处理方法，如颗粒剂、片状制剂等不均匀固体制剂通常需要研磨后再取样。

1.5.3 方法特异性确认

在测定前，按NY/T 2887—2016中3.3.1 a) 进行特异性确认。如不能达到要求，可根据不同仪器特点，对给定的操作参数做适当调整，直至方法特异性确认通过。

1.5.4 测定

在上述操作条件下，待仪器稳定后，连续注入数针标样溶液，直至相邻两针氟雷拉纳峰面积相对变化小于 1.2%后，按照标样溶液、试样溶液、试样溶液、标样溶液的顺序进行测定。

1.6 计算

将测得的两针试样溶液以及试样前后两针标样溶液中的氟雷拉纳峰面积分别进行平均，试样中氟雷拉纳的质量分数按式（1）计算：

$$w_1 = \frac{A_2 \times m_1 \times \omega}{A_1 \times m_2 \times 5} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- w_1 ——试样中氟雷拉纳的质量分数，%；
- A_2 ——试样溶液中氟雷拉纳峰面积的平均值；
- m_1 ——标样的质量的数值，单位为克（g）；
- ω ——标样中氟雷拉纳的质量分数，%；
- A_1 ——标样溶液中氟雷拉纳峰面积的平均值；
- m_2 ——试样的质量的数值，单位为克（g）；
- 5——标样稀释因子。

2 试验条件的选择

分析方法借鉴参考《兽药质量标准》中《氟雷拉纳》的测定方法，优化了检测方法参数。氟雷拉纳的紫外光谱图如图 1 所示，从图中可以看到氟雷拉纳最大吸收波长在 200nm，次大吸收波长在 265 nm 附近，综合考虑检测灵敏度、稳定性及不同浓度下的峰响应，同时也为了减少干扰，扩大线性范围，避免出现峰过载，选择波长 265 nm 为检测方法的检测波长。

因制剂成分复杂，将不同比例的流动相进行对比， Ψ （甲醇：乙腈：水）=42：42：16 三元流动相， C_{18} 、5 μ m、150*4.6mm 色谱柱，流速 1.0mL/min 进行分离，保留时间约 6min，目标峰与氟雷拉纳类似物分离度不彻底，加之制剂中助剂峰干扰，影响分析准确性。其次尝

试 Ψ (甲醇 : 水) = 75:25, C_{18} 、 $5\mu\text{m}$ 、 $150*4.6\text{mm}$ 色谱柱, 流速 1.2mL/min , 保留时间约 10min , 主峰前后有杂质干扰, 影响分析准确性。接下来尝试多比例甲醇+水, 色谱柱由 $250*4.6\text{mm}$ 优化为 $150*4.6\text{mm}$, 流速尝试 1.5mL/min 、 1.8mL/min , 最终确定 Ψ (甲醇 : 水) = 66:34 作为流动相, C_{18} 、 $5\mu\text{m}$ 、 $150*4.6\text{mm}$ 色谱柱, 流速 1.8mL/min , 该条件下, 与杂质能完全分离, 氟雷拉纳色谱峰峰形较好, 能够完全分离, 具有良好的精密度和准确度。

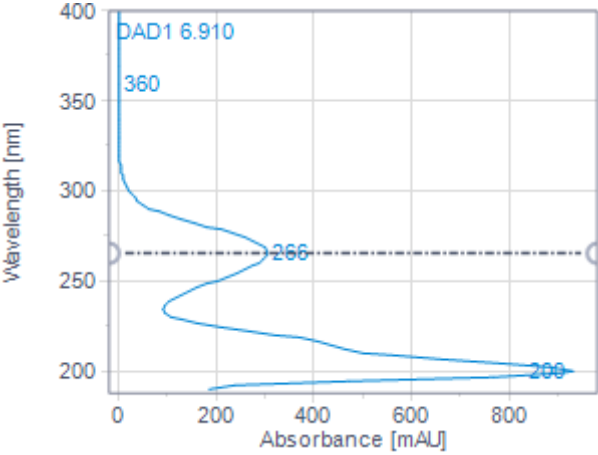


图1 氟雷拉纳紫外吸收图谱

3 实验结果与讨论

3.1 特异性

本试验中选择 1.8%阿维菌素乳油作为方法确认的代表性样品。代表性样品选择基于以下原则：乳油成分复杂、阿维菌素为发酵产物干扰成分较多，适合开发兼容性高的含隐性添加的制剂产品中氟雷拉纳的测定。

本试验采用 HPLC-DAD 峰纯度分析法来鉴别氟雷拉纳。标样和试样中的氟雷拉纳 HPLC-DAD 峰纯度角度<峰纯度阈值，如图 2~图 3，从色谱图可以清晰地看出，氟雷拉纳出峰处无其它物质干扰，符合定量分析要求。

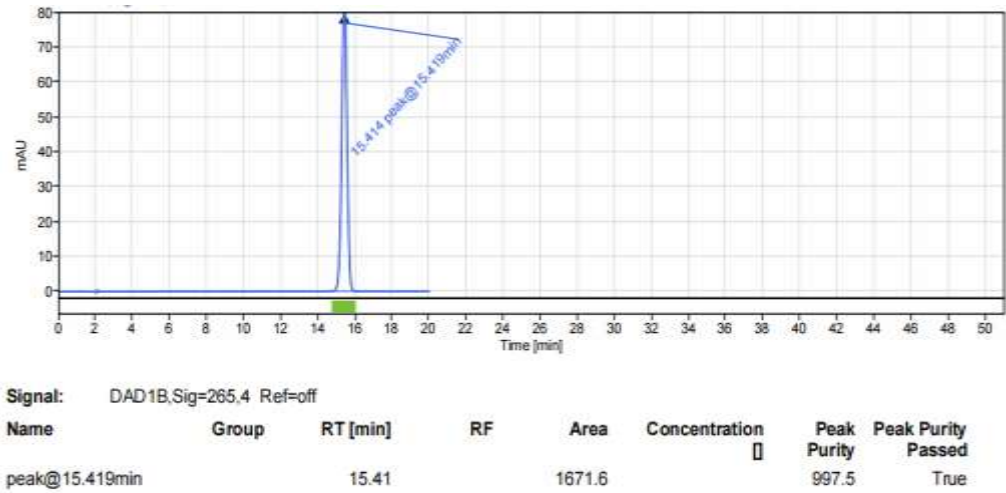


图2 氟雷拉纳标样中 HPLC-DAD 峰纯度色谱图

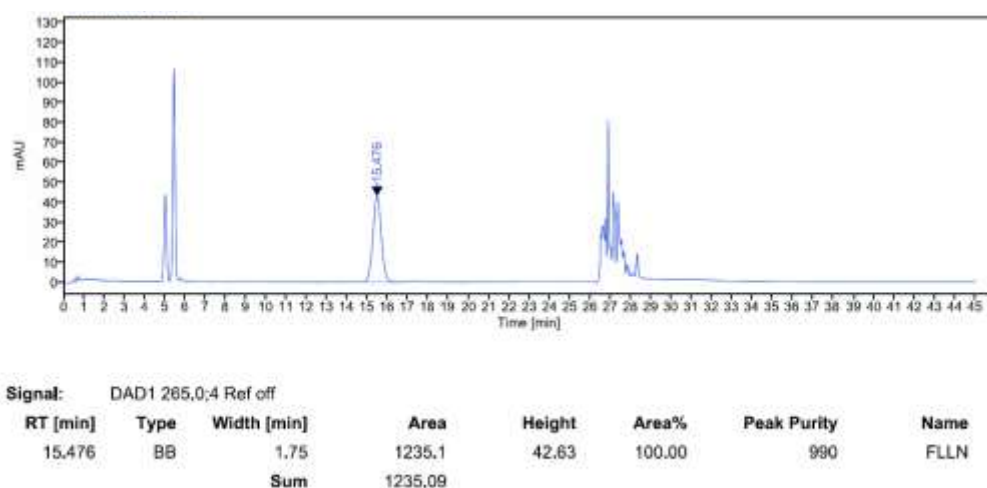


图3 1.8%阿维菌素乳油中氟雷拉纳 HPLC-DAD 峰纯度色谱图

3.2 线性关系试验

称取0.0509g氟雷拉纳标样，按1.5.1标样溶液的制备方法溶解并定容，摇匀，即为标样储备液。依次移取0.5mL、1.0mL、2.0mL、3.5mL、3.0mL、3.5mL标样储备液，配制6个不同浓度的杂质线性相关溶液，分别标记为Lin-1至Lin-6。在上述操作条件下，待仪器稳定后，按照Lin-1至Lin-6的顺序测定每个溶液中氟雷拉纳的峰面积。以氟雷拉纳质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线，结果见表1、图4。

表1 氟雷拉纳线性关系测定结果表

编号	质量浓度，mg/L	峰面积	相关系数
Lin-1	50.3	311.3	R ² =0.9980
Lin-2	100.7	618.8	
Lin-3	201.4	1241.3	
Lin-4	251.7	1549.5	
Lin-5	302.0	1868.7	
Lin-6	352.4	2278.1	
注：氟雷拉纳标样质量分数为 98.9%。			

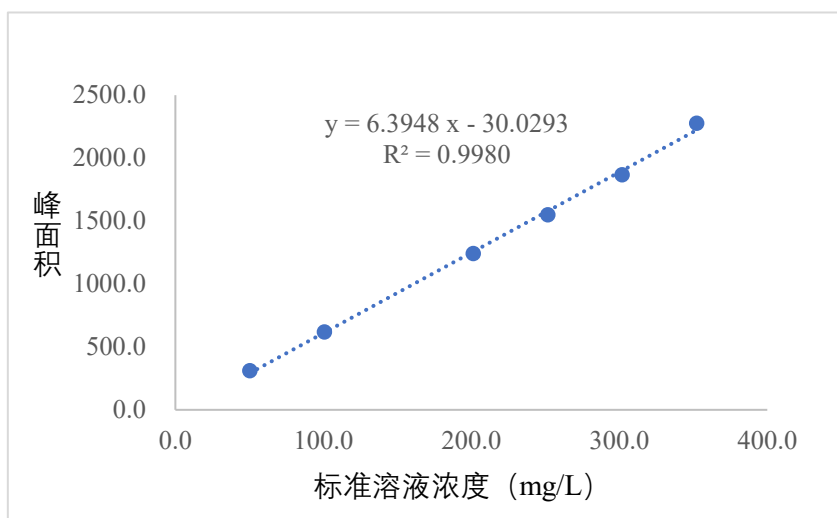


图4 氟雷拉纳标准工作曲线

从表 1 和图 5 可以看出在上述操作条件下,当氟雷拉纳质量浓度在 50.3 mg/L~352.4 mg/L 之间,与相应的峰面积具有良好的线性关系,计算得回归方程为 $Y=6.3948X-30.0293$, 相关系数 $R^2=0.9980$, 可以满足定量分析要求;本方法中氟雷拉纳标样质量浓度为 201.4mg/L (进样体积 5 μ L)。

3.3 精密度试验

3.3.1 1.8%阿维菌素乳油

按 1.5.2 试样溶液的制备方法配制 6 个 1.8%阿维菌素乳油精密度溶液,分别标记为 P-1 至 P-6。

以杂质线性相关溶液 Lin-3 为标样溶液,在上述操作条件下,待仪器基线稳定后,进行测定,结果见表 2。

表2 1.8%阿维菌素乳油中氟雷拉纳的精密度结果

编号	称样质量, g	峰面积	氟雷拉纳质量分数, %
Lin-3	0.0509	1252.4	/
P-1	1.0144	1244.3	0.983
P-2	1.0066	1220.3	0.972
P-3	1.0148	1249.7	0.987
P-4	1.0277	1263.1	0.985
P-5	1.0036	1231.6	0.984
P-6	1.0077	1229.7	0.978
Lin-3	0.0509	1259.9	/
氟雷拉纳质量分数数据统计		最大值, %	0.987
		最小值, %	0.972
		极差, %	0.015
		平均值, %	0.98
		标准偏差, %	0.0055
		变异系数 RSD, %	0.6

从表 2 可以看出, 1.8%阿维菌素乳油中氟雷拉纳质量分数测定结果的 RSD 为 0.6%, 小于修改的 Horwitz 公式 $2^{(1-0.51\log C)} \times 0.67 = 2.7$, 表明杂质分析方法精密度的测定结果符合要求。

3.4 准确度

称取约 0.5 g (精确至 0.0001 g) 1.8%阿维菌素乳油样品于 50 mL 容量瓶中, 再移取 3.2 中描述标准储备液 5mL 转移至已称好的 1.8%阿维菌素乳油样品中, 按 1.5.2 制备方法配制 5 个准确度溶液, 标记为 H1~H5。

以线性相关溶液 Lin-3 为标样溶液, 在上述操作条件下, 待仪器基线稳定后进行测定, 结果见表 3。

表3 1.8%阿维菌素乳油中氟雷拉纳准确度试验结果

溶液名称	样品质量, g	标样转移体积, mL	峰面积	实测质量, g	回收率, %	平均回收率, %
Lin-3	/	/	1259.9	/	/	100.1
H-1	0.5170	5mL	1269.9	0.01011	100.20	
H-2	0.5191	5mL	1276.6	0.01017	100.99	
H-3	0.5149	5mL	1265.5	0.01008	100.00	
H-4	0.5040	5mL	1246.8	0.00993	99.20	
H-5	0.5171	5mL	1268.8	0.01010	100.00	
Lin-3	/	/	1268.7	/	/	

注: 氟雷拉纳标样质量分数为 98.9%。

从表 3 可以看出 1.8%阿维菌素乳油中氟雷拉纳平均回收率为 100.1%, 具有良好的准确度。

3.5 定量限

待仪器稳定后, 将稀释后的标准溶液进行色谱分析, 截取一段时间的基线噪音 N, 然后记录峰响应信号 H, 约 10 倍噪音为定量限。通过以下计算得氟雷拉纳的定量限分别为 1.13 ppm, 具有良好的定量限。

定量限见谱图 26。

氟雷拉纳浓度 $C=1.01\text{mg/L}$

$S/N= 8.9$

氟雷拉纳定量限 $=10 \times C / 8.9 = 10 \times 1.01 / 8.9 \text{ mg/L}$, 计算得定量限=1.13 ppm。

3.6 非分析物的干扰

称取空白样品 1.0064g 于 50 mL 容量瓶中, 加入适量甲醇, 超声振荡 5 min, 冷却至室温, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过滤。空白样品谱图见附图 27。

称取 0.0506 g 氟雷拉纳原药, 置于 50 mL 容量瓶中, 加入适量甲醇, 超声振荡至溶解, 冷却至室温, 用甲醇定容, 摇匀。准确移取上述溶液 2 mL 于另一 10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过滤。氟雷拉纳原药溶液谱图见附图 28。

由以上附图看出, 不带助剂的氟雷拉纳原药保留时间约在(15.548)min, 空白溶液不干扰杂质的测定。

3.7 实验室间协同验证结果

将用于建立方法的 1.8%阿维菌素乳油样品发送至其他 3 家协同验证单位, 按照已建立

的方法进行协同验证试验。协同验证试验应在 2 个不同日期对样品含量进行重复测定，每次测定应当日制备标样溶液和 2 个试样溶液，按照标样溶液、试样溶液 1、试样溶液 1、标样溶液、试样溶液 2、试样溶液 2、标样溶液的顺序进行测定，分别计算试样 1 和试样 2 的结果，每个样品 2 个不同日期测定得到 4 个结果。

各单位试验操作条件见表 8，试验结果见表 9~10，数据统计结果见表 11。

表4 各单位的协同验证试验操作条件

单位名称	试验操作条件		
	色谱柱：		
	流动相梯度洗脱条件：		
	时间 min	XX（V/V） %	0.1%甲酸溶液（V/V） %
流速：			
柱温：			
检测波长：			
进样体积：			

	色谱柱：		
	流动相梯度洗脱条件：		
	时间 min	XX（V/V） %	0.1%甲酸溶液（V/V） %
流速：			
柱温：			
检测波长：			
进样体积：			

	色谱柱： 流动相梯度洗脱条件：		
	时间 min	XX (V/V) %	0.1%甲酸溶液 (V/V) %
流速： 柱温： 检测波长： 进样体积：			

	色谱柱： 流动相：		
	时间 min	XX (V/V) %	0.1%甲酸溶液 (V/V) %
流速： 柱温： 检测波长： 进样体积：			

表5 200g/L XXX 悬浮剂中 XXX 协同验证试验结果

单位名称	Day1 (XXX 质量分 数, %)		Day2 (XXX 质量分 数, %)		平均 值, %	标准偏 差, %
	1	2	1	2		

表6 20%XXX 水分散粒剂中 XXX 协同验证试验结果

单位名称	Day1 (XXX 质量分数, %)		Day2 (XXX 质量分数, %)		平均值, %	标准偏差, %
	1	2	1	2		

表7 各单位协同验证试验数据统计结果

有效成分	200g/LXXX悬浮剂中XXX	20%XXX水分散粒剂中XXX
总平均值 Y, %		
试验单位数 p		
重复性标准偏差 S _r , %		
再现性标准偏差 S _R , %		
重复性限 r		
再现性限 R		
重复性相对标准偏差 RSD _r , %		
再现性相对标准偏差 RSD _R , %		
霍维茨值 RSD _R (Hor), %		

从统计结果看, 200g/L XXX悬浮剂中XXX再现性相对标准偏差RSD_R为 %, 20%XXX水分散粒剂中XXX再现性相对标准偏差RSD_R为 %, 都小于相应的Horwitz公式 $2^{(1-0.51\lg C)}$ 理论计算值, 表明不同单位间的检测结果符合性良好, 本研究报告建立的XXX液相色谱分析方法可以满足日常检测工作需要。

4 原始谱图

4.1 线性色谱图

5 空白溶剂高效液相色谱图

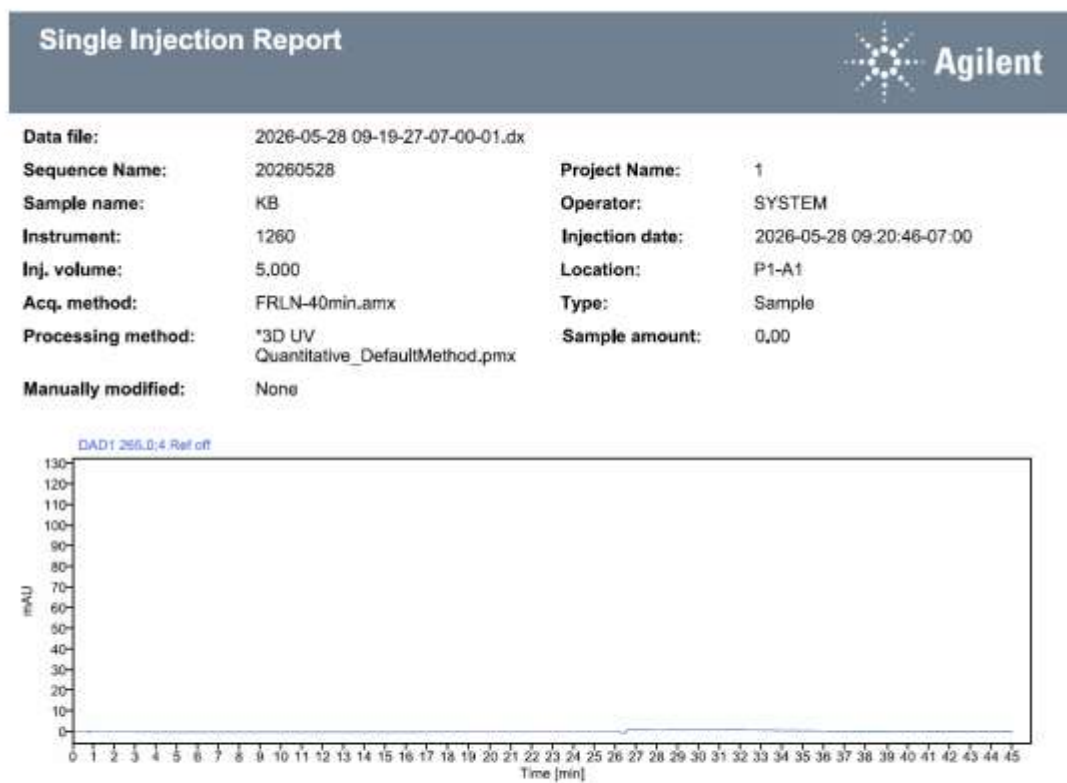


图5 氟雷拉纳线性溶液 Lin-1 高效液相色谱图

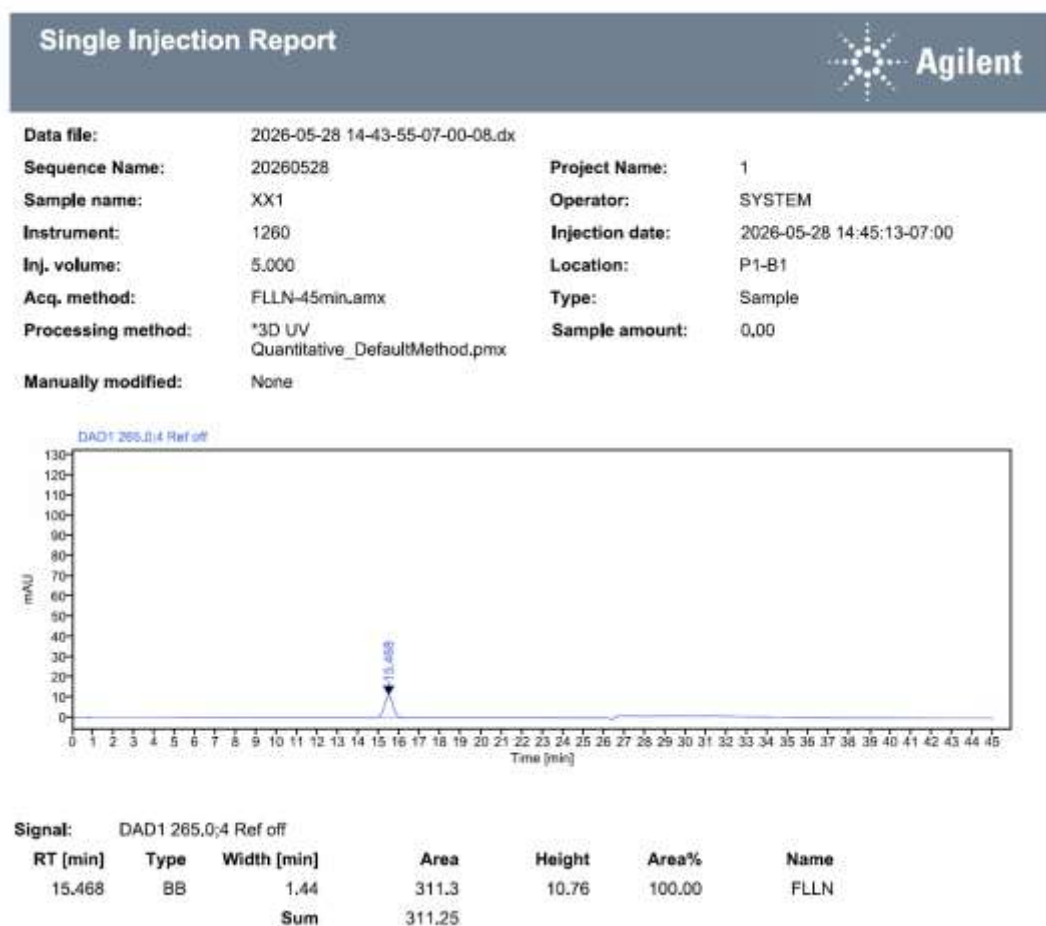


图6 氟雷拉纳线性溶液 Lin-2 高效液相色谱图

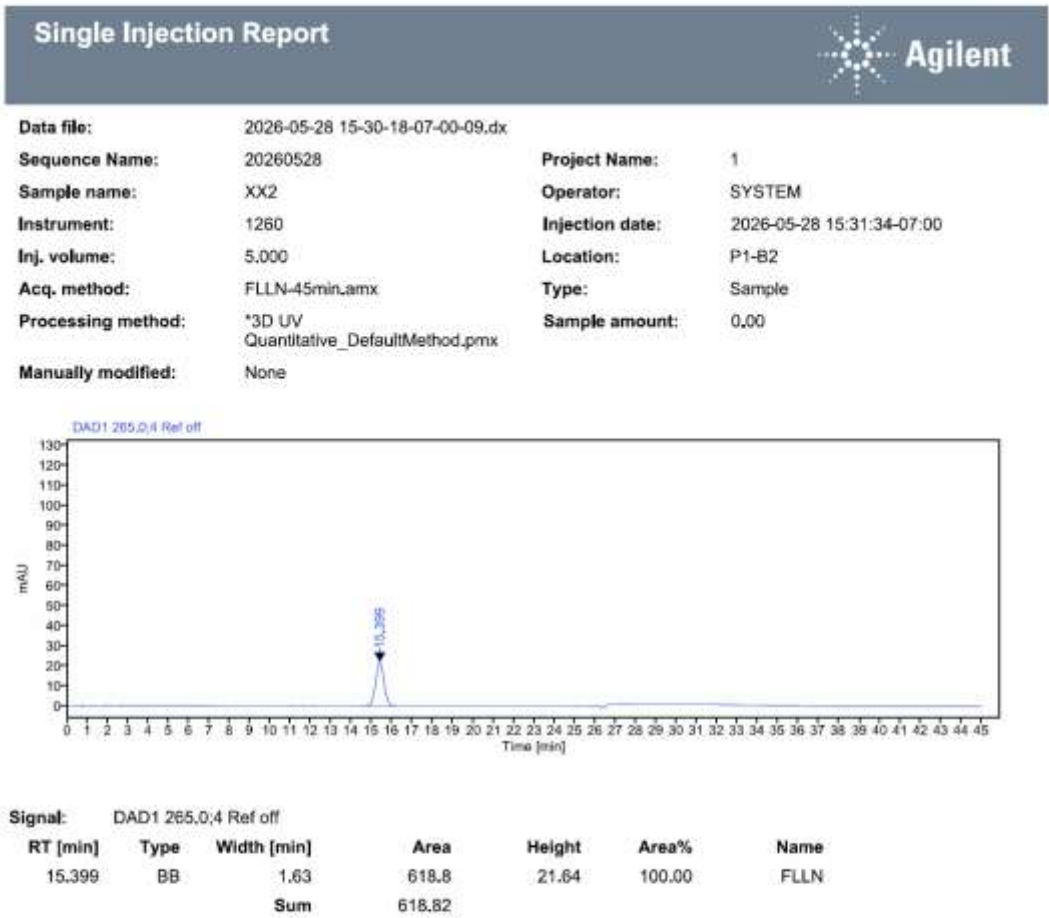


图7 氟雷拉纳线性溶液 Lin-3 高效液相色谱图

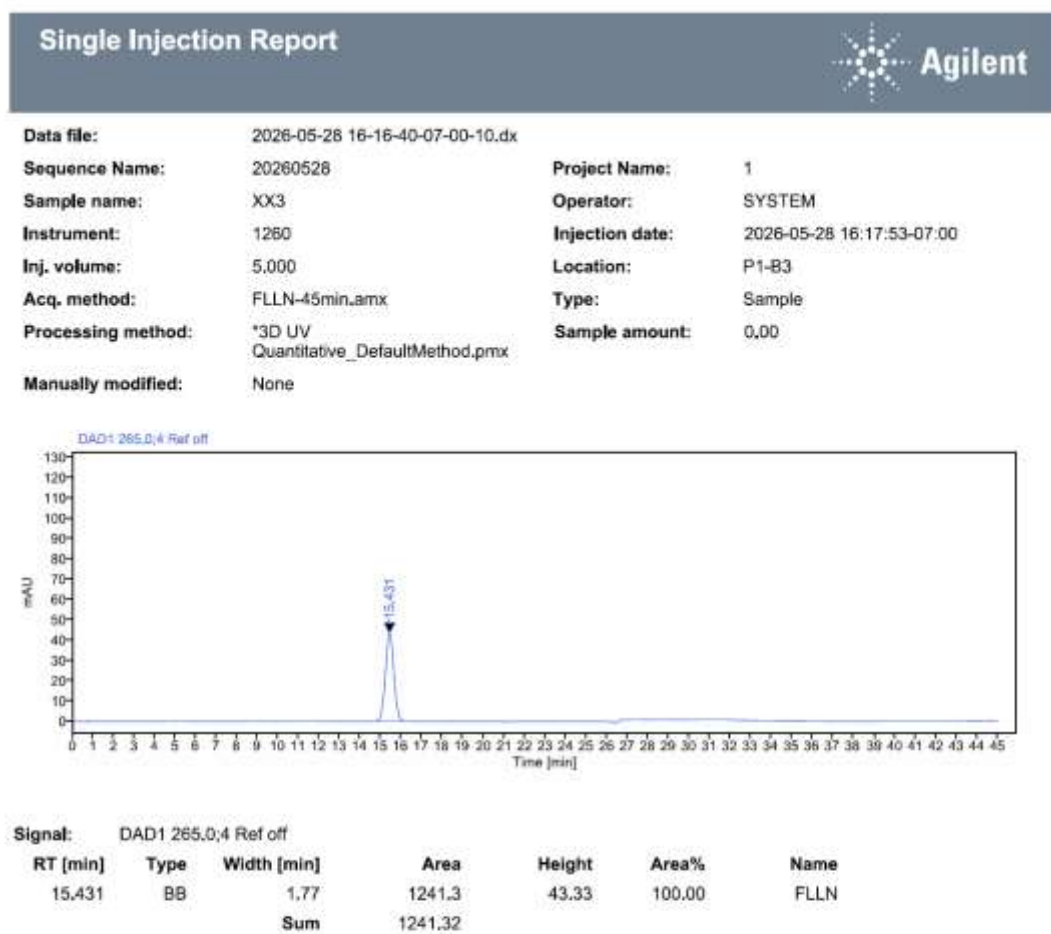


图8 氟雷拉纳线性溶液 Lin-4 高效液相色谱图

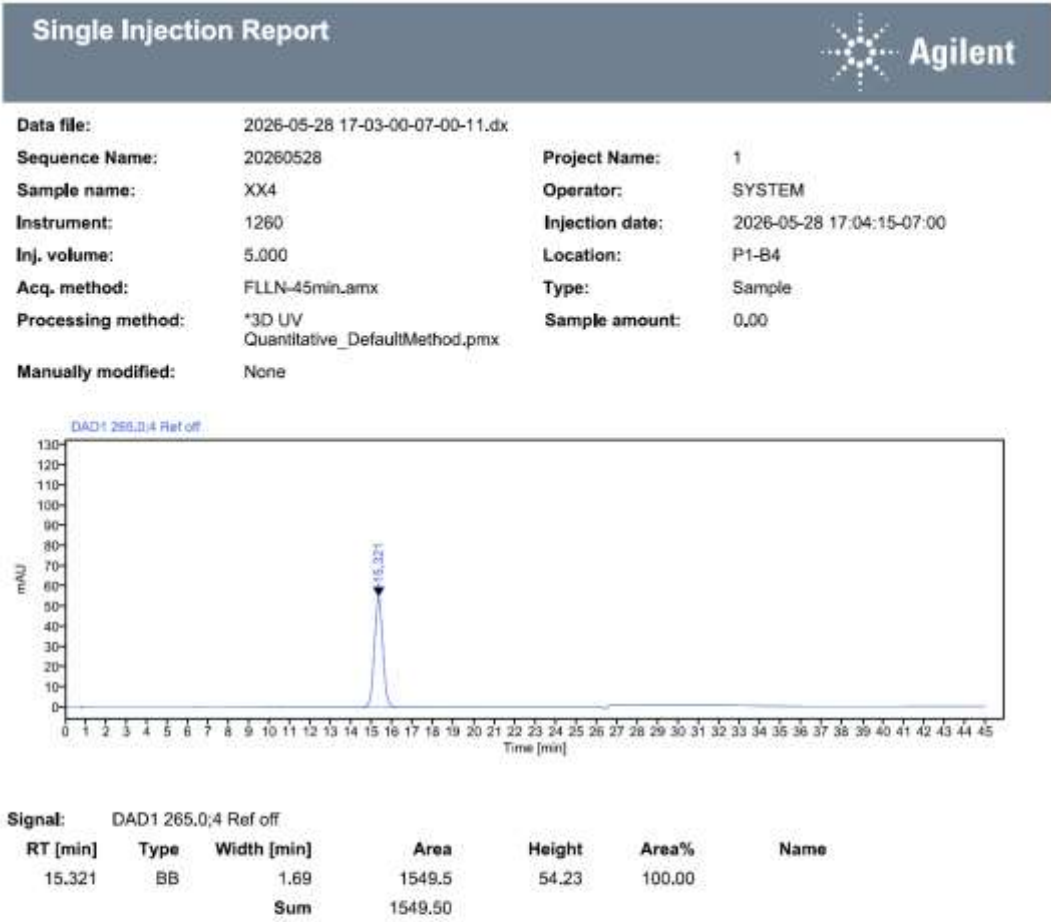


图9 氟雷拉纳线性溶液 Lin-5 高效液相色谱图



图10 氟雷拉纳线性溶液 Lin-6 高效液相色谱图



5.1 精密度色谱图

图11 1.8%阿维菌素乳油精密度标样溶液高效液相谱图

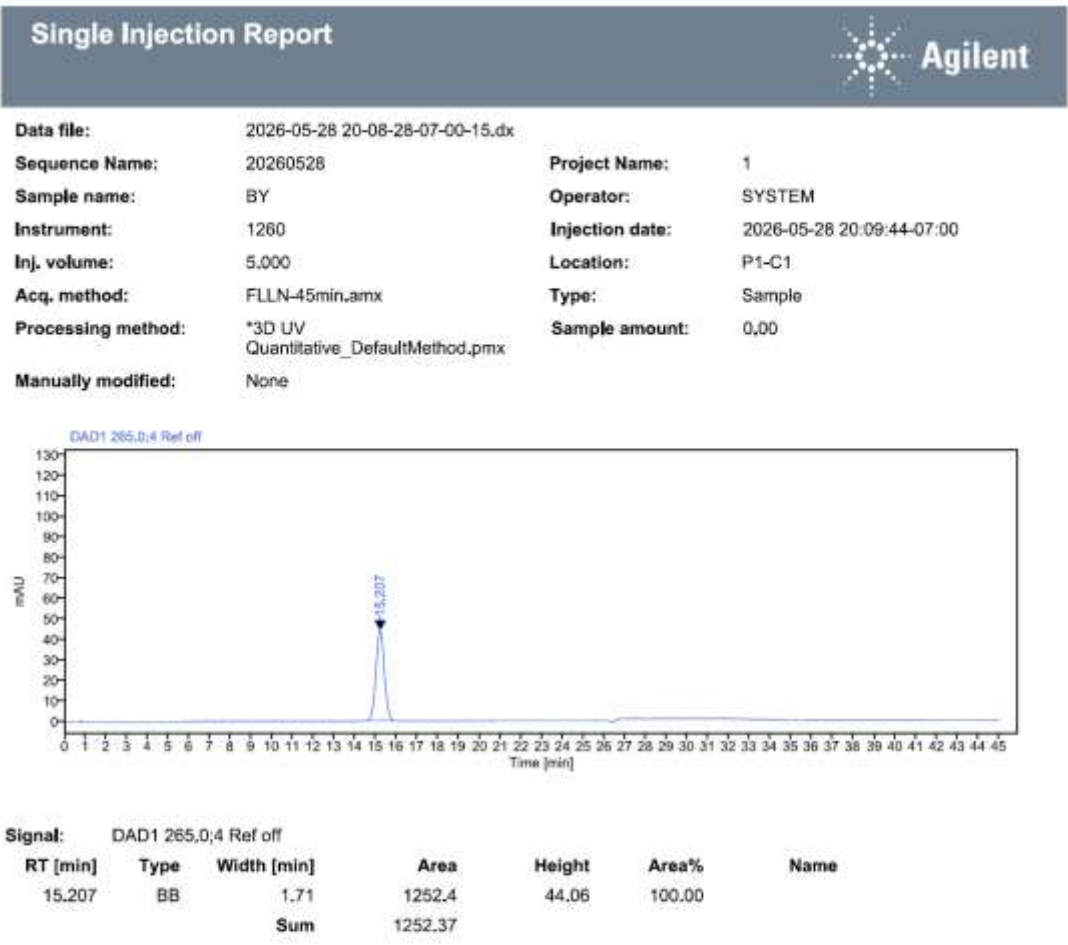


图12 1.8%阿维菌素乳油精密度溶液 P-1 高效液相色谱图



图13 1.8%阿维菌素乳油精密度溶液 P-2 高效液相色谱图

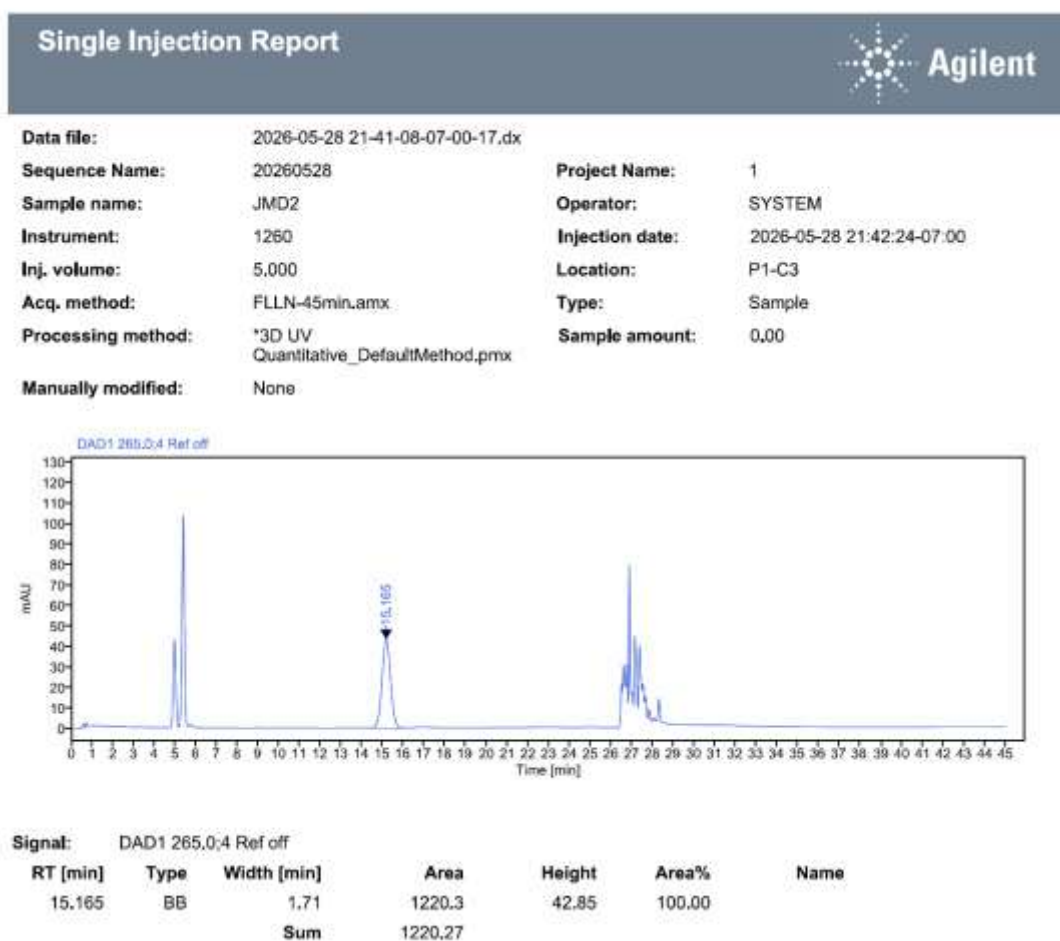


图14 1.8%阿维菌素乳油精密度溶液 P-3 高效液相色谱图

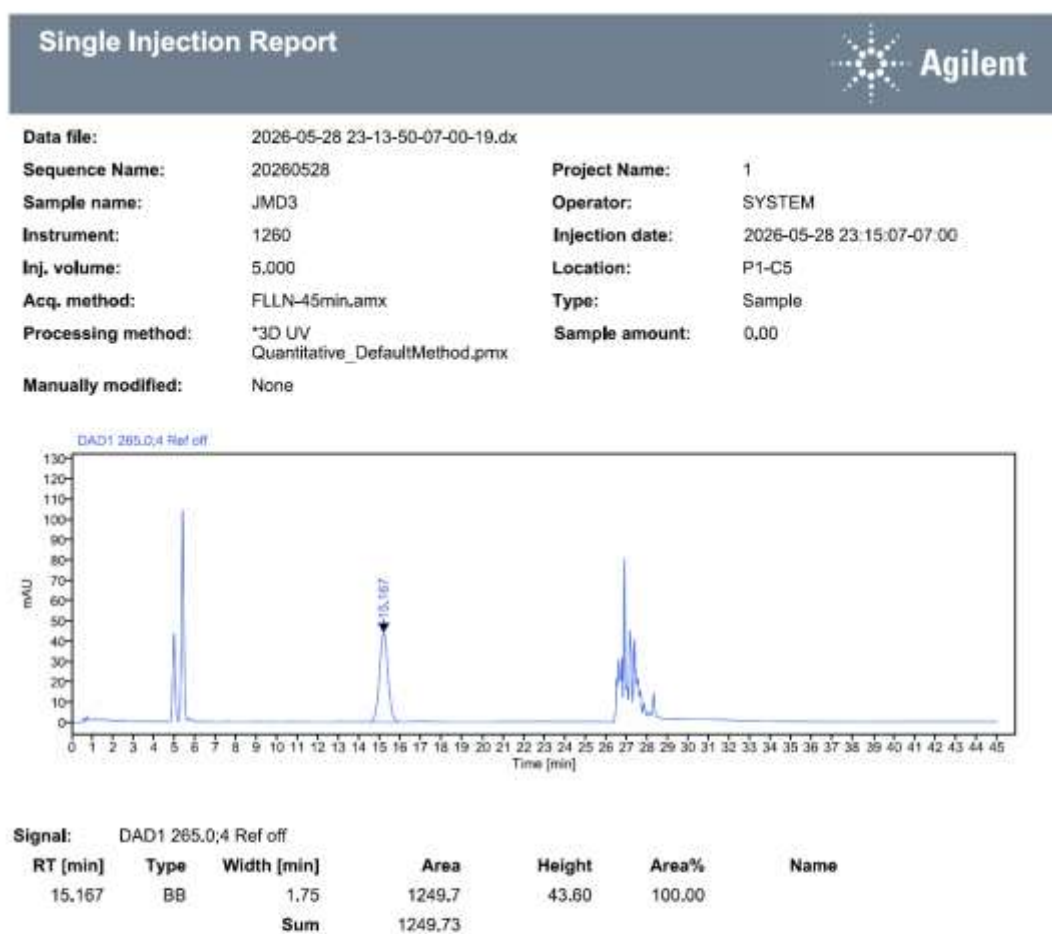


图15 1.8%阿维菌素乳油精密度溶液 P-4 高效液相色谱图

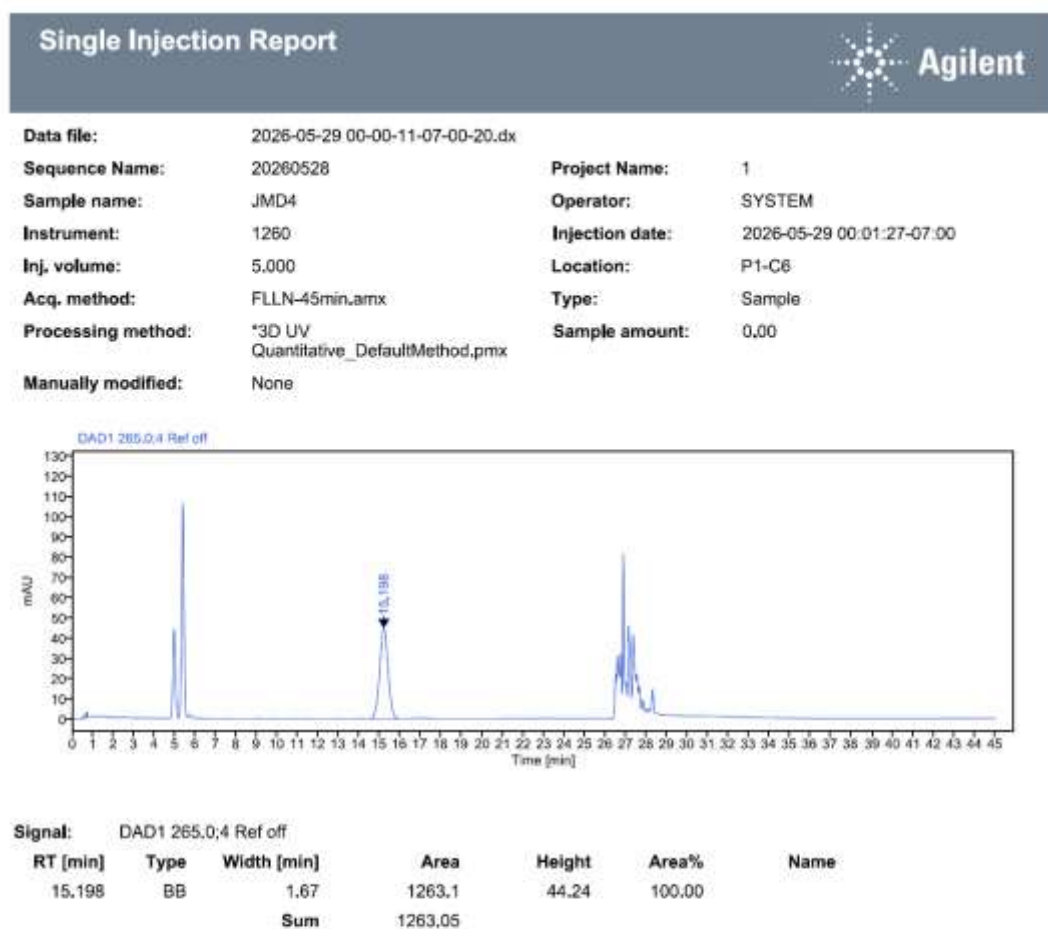


图16 1.8%阿维菌素乳油精密度溶液 P-5 高效液相色谱图

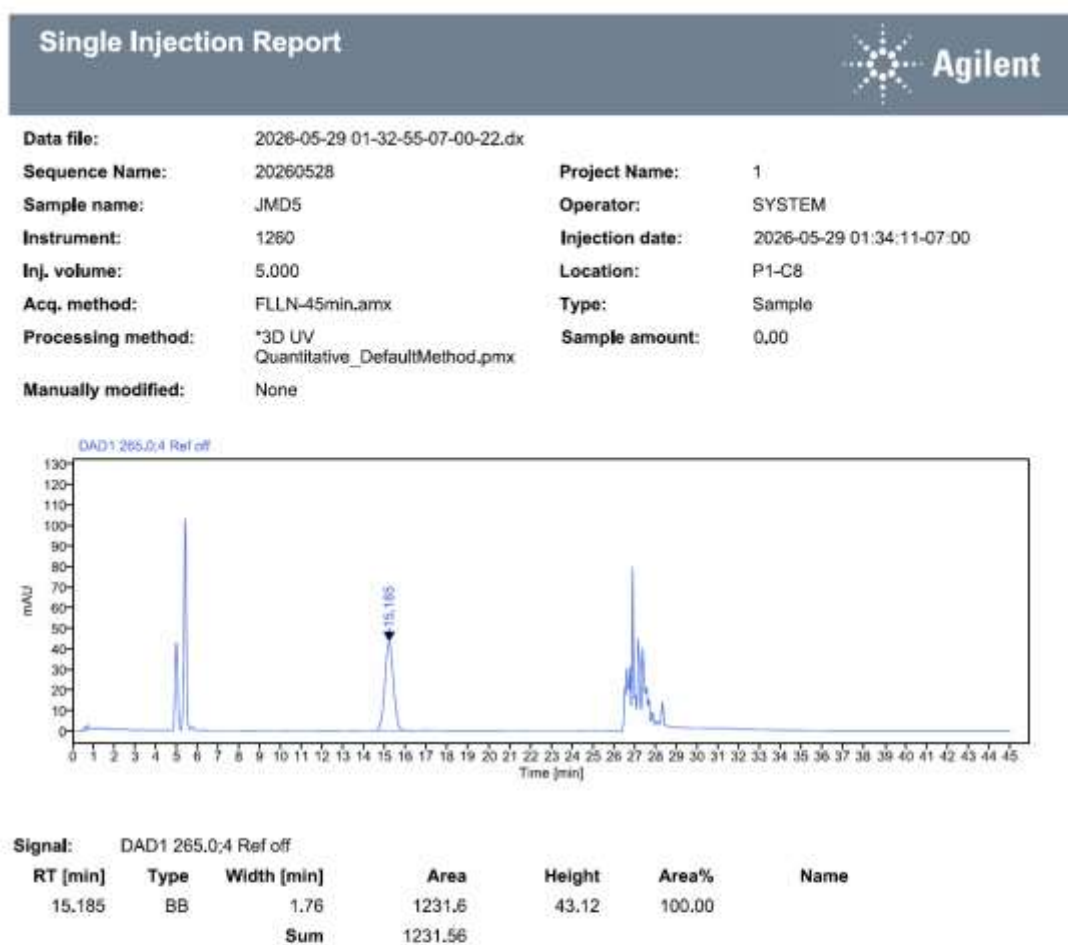


图17 1.8%阿维菌素乳油精密度溶液 P-6 高效液相色谱图

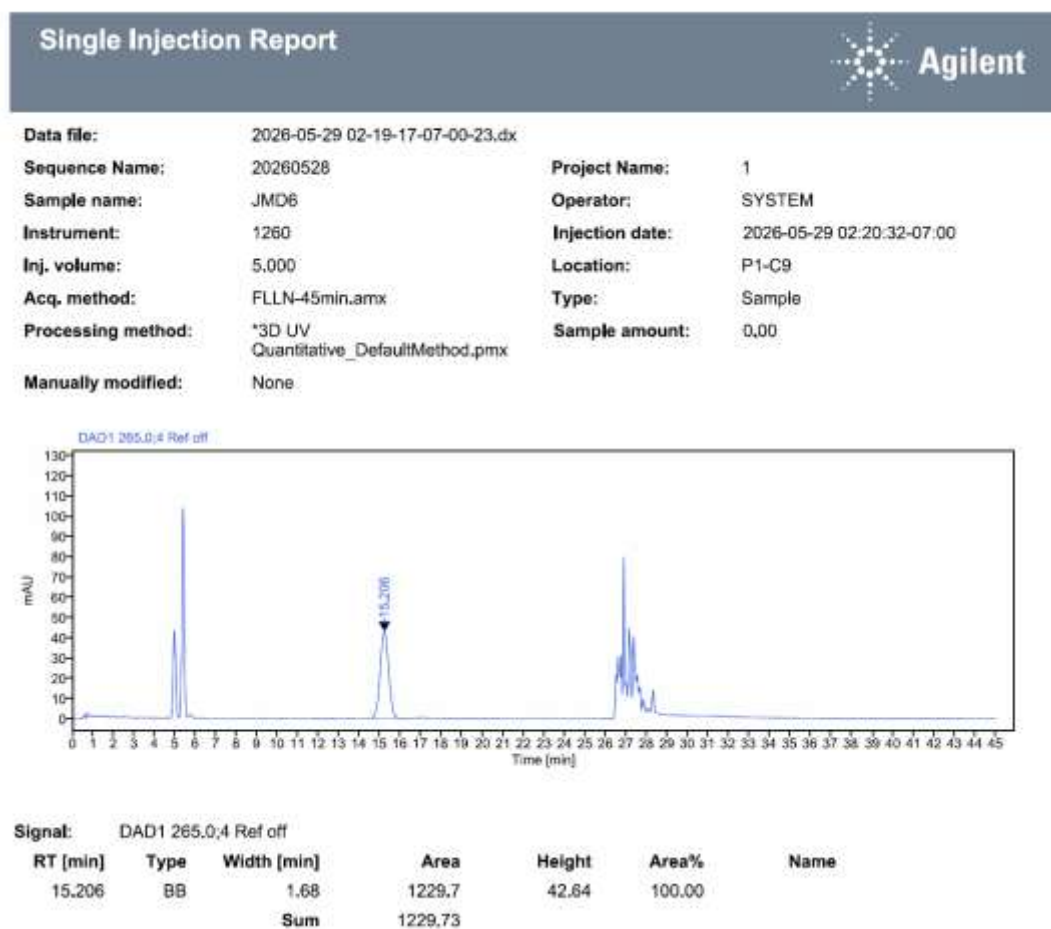
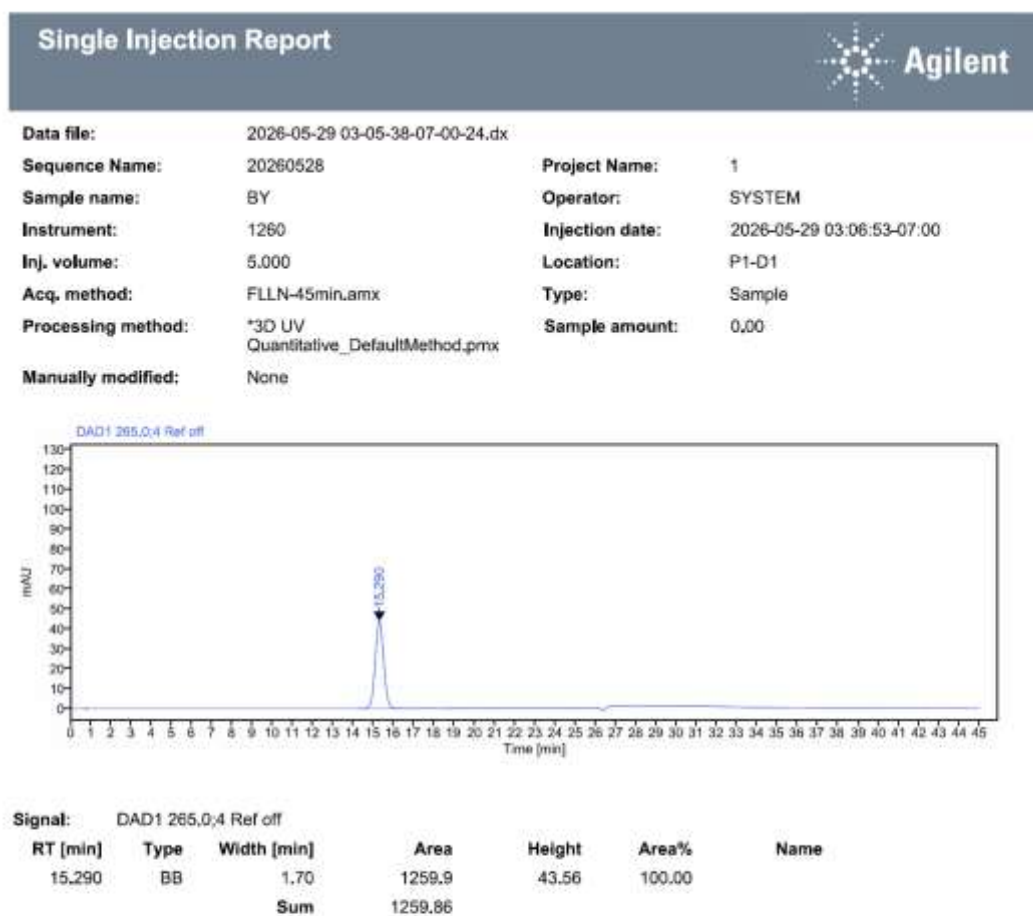


图18 1.8%阿维菌素乳油精密度标样溶液高效液相谱图



5.2 准确度色谱图

图19 1.8%阿维菌素乳油准确度标样溶液高效液相色谱图

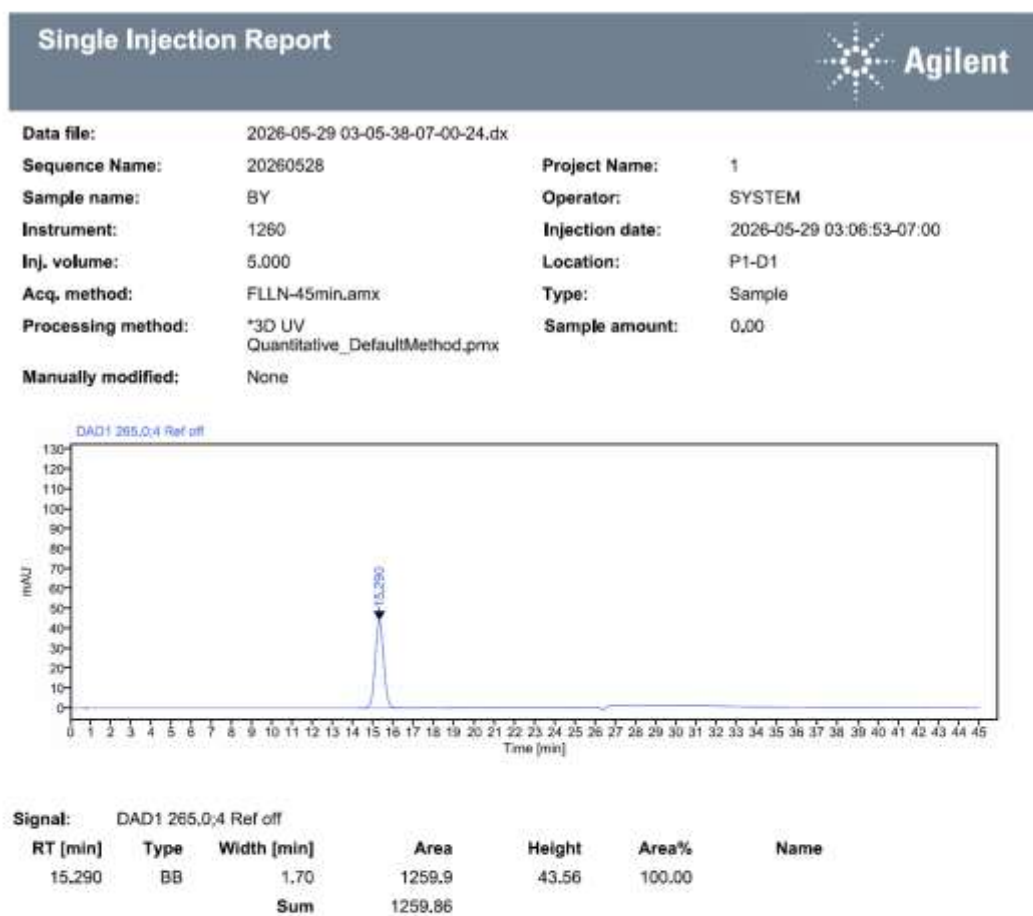


图20 1.8%阿维菌素乳油准确度溶液 H-1 高效液相色谱图

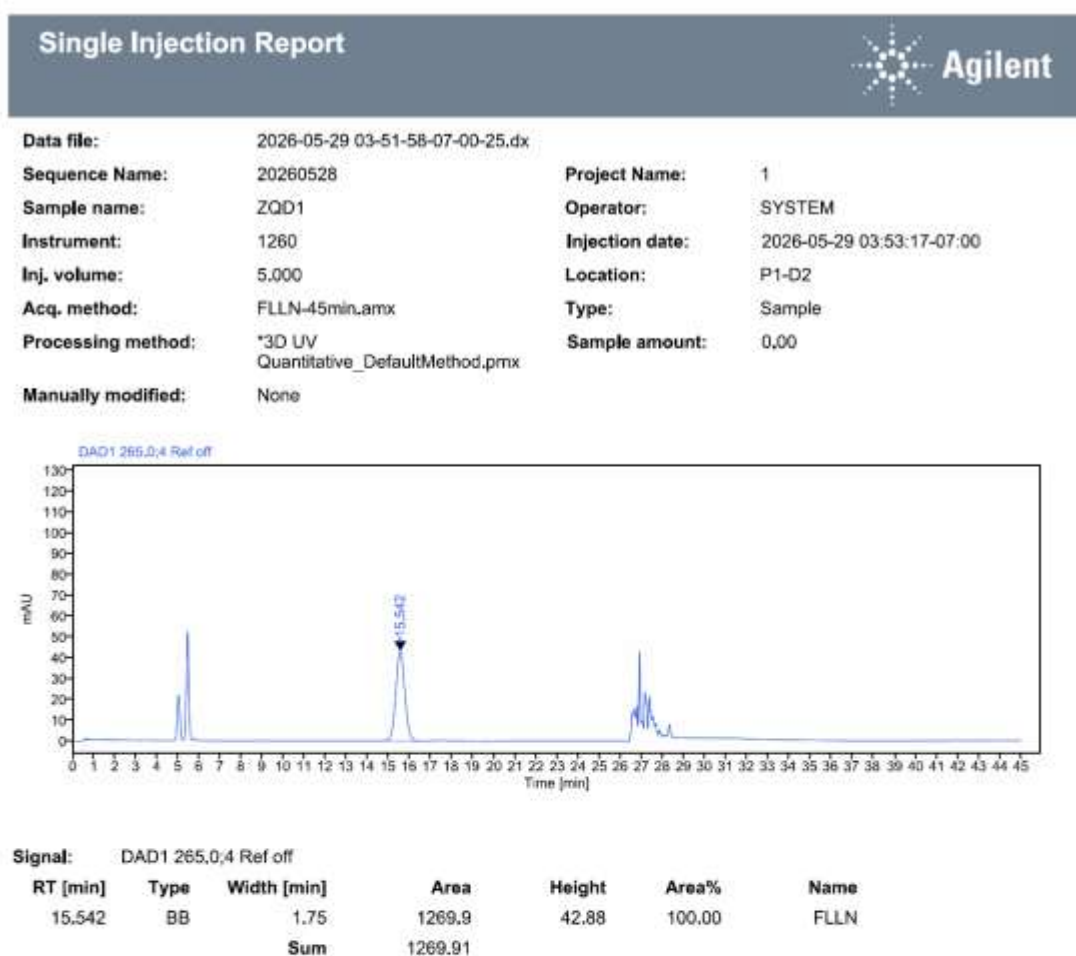


图21 1.8%阿维菌素乳油准确度溶液 H-2 高效液相色谱图

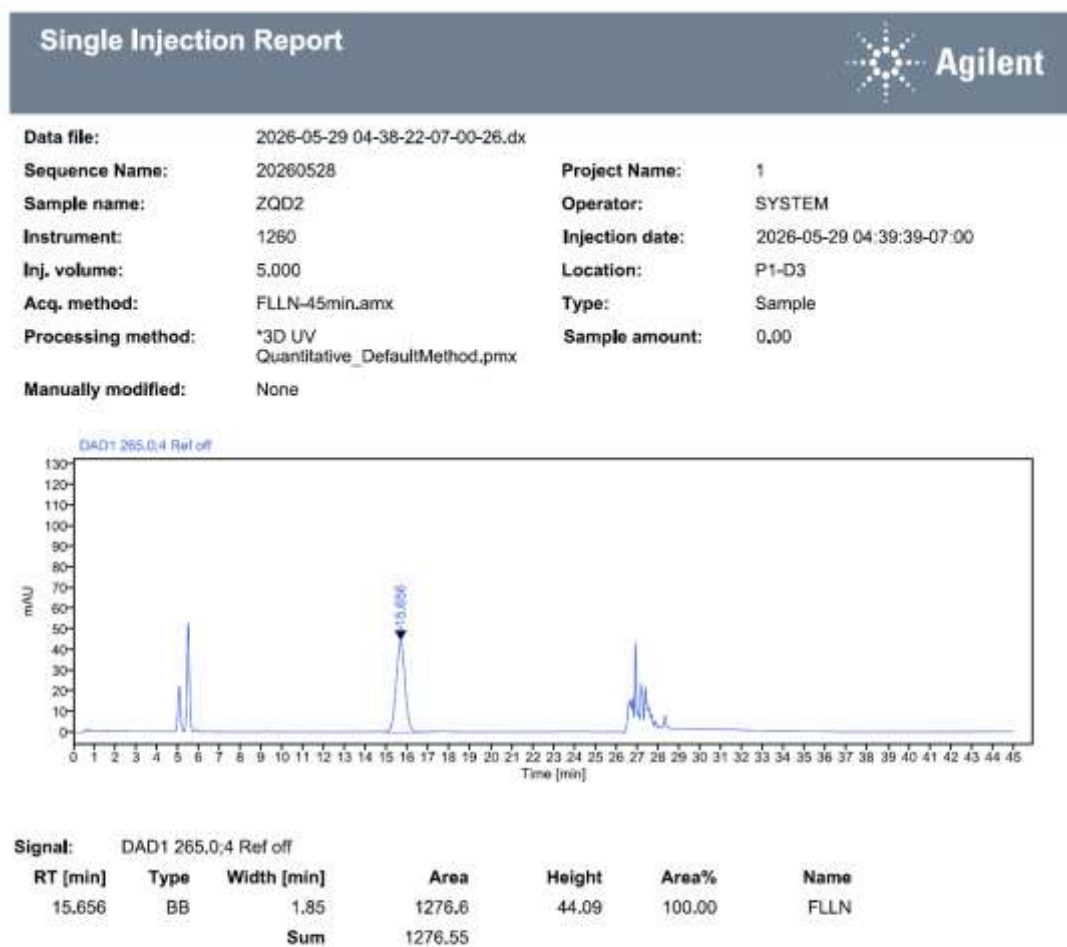


图22 1. 8%阿维菌素乳油准确度溶液 H-3 高效液相色谱图



图23 1.8%阿维菌素乳油准确度溶液 H-4 高效液相色谱图

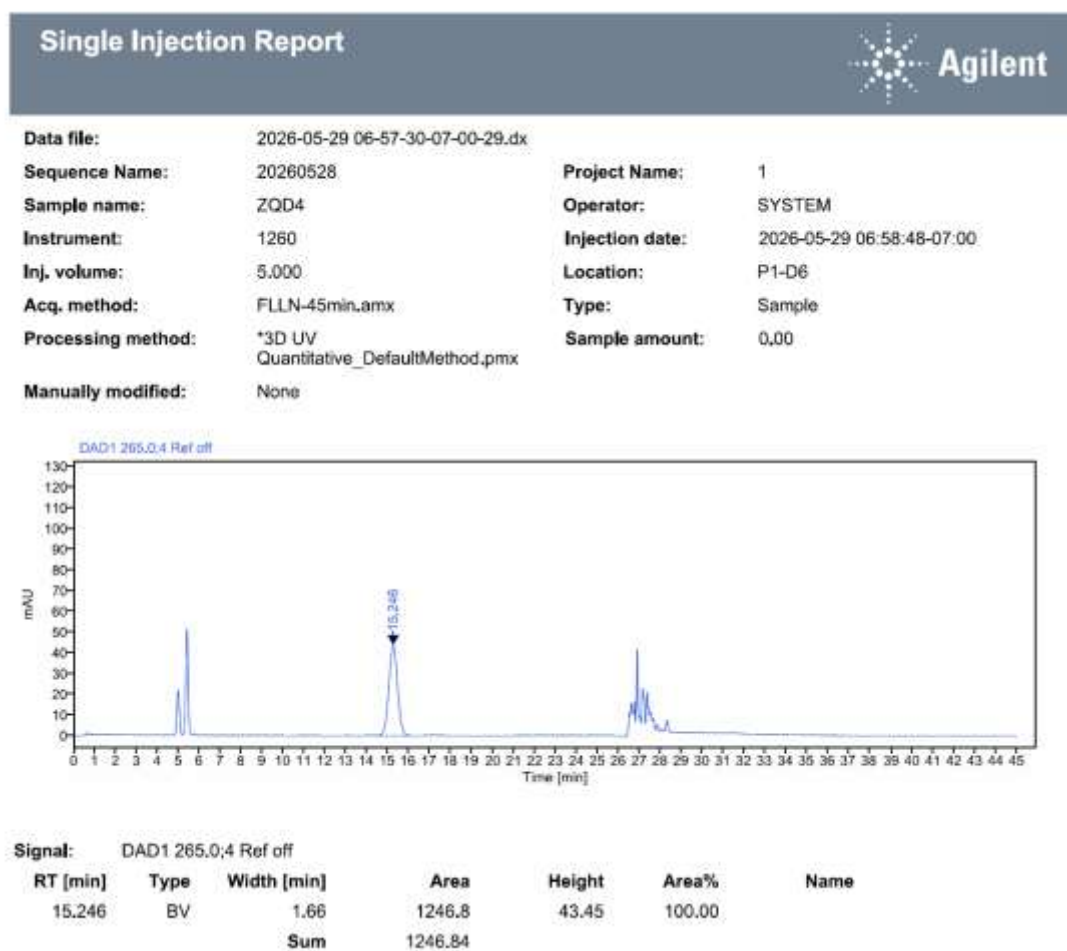


图24 1.8%阿维菌素乳油准确度溶液 H-5 高效液相色谱图

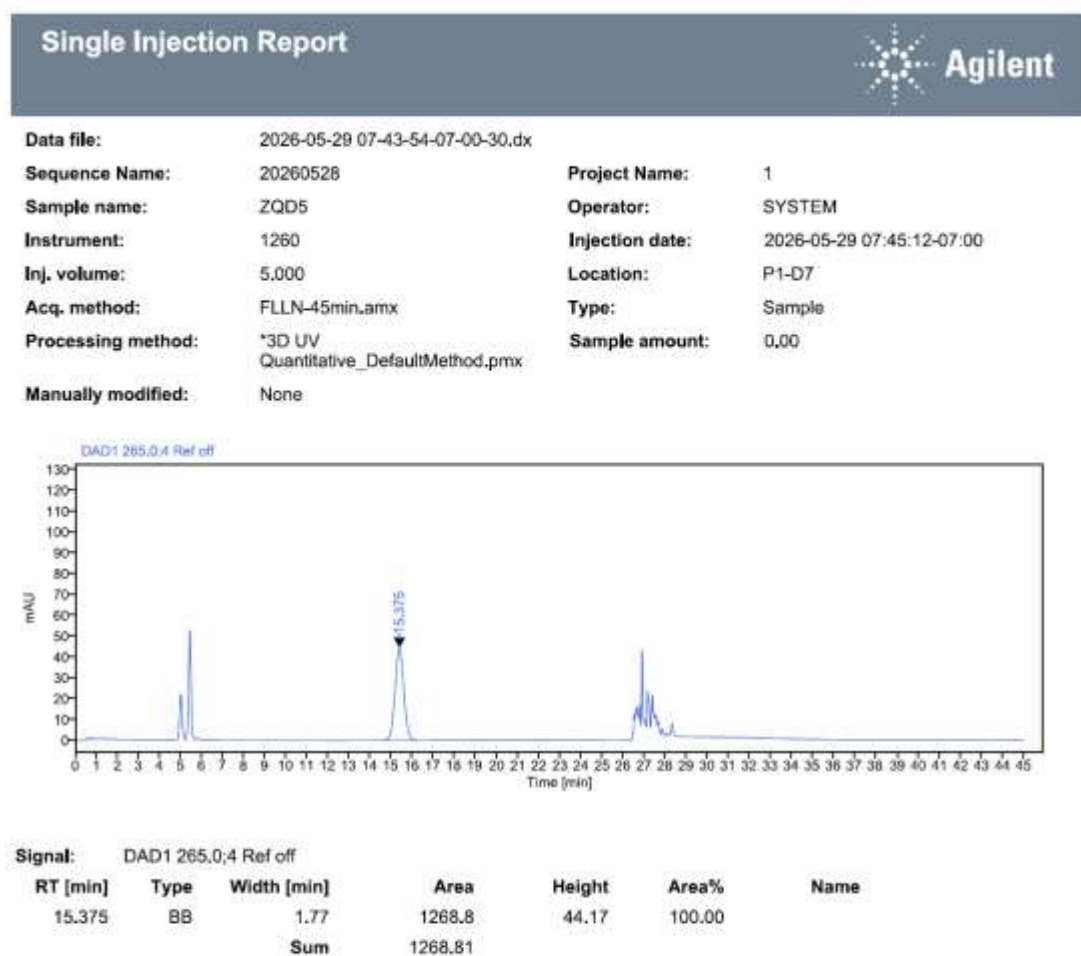
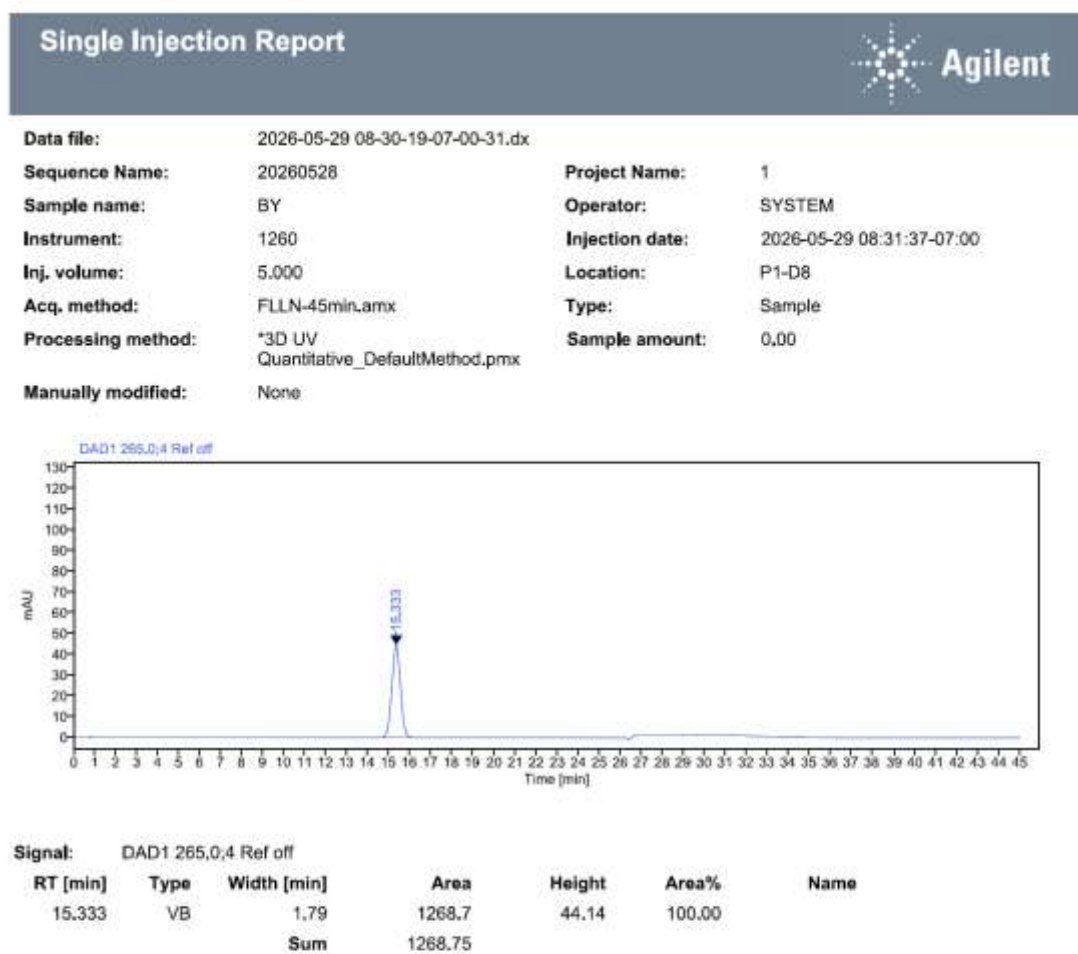
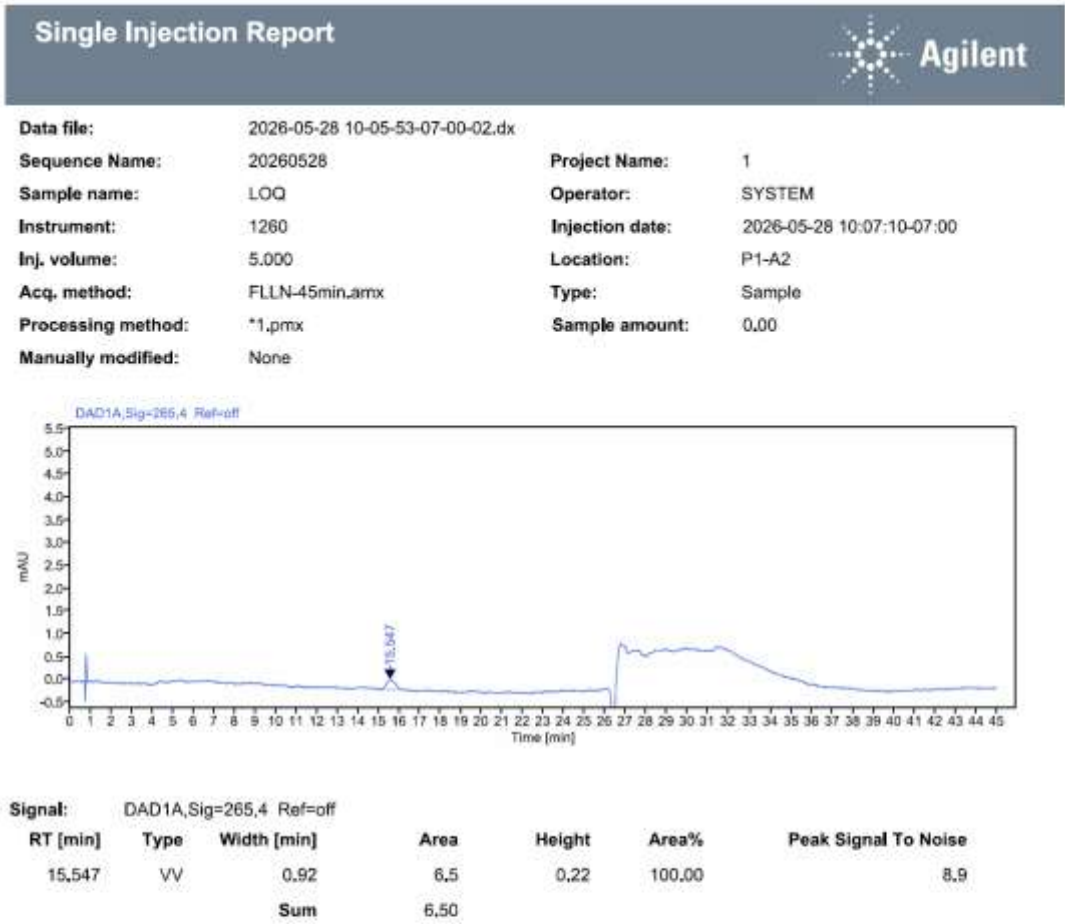


图25 1. 8%阿维菌素乳油准确度标样溶液高效液相色谱图



5.3 定量限色谱图

图26 定量限溶液高效液相色谱图



5.4 非分析物的干扰色谱图

图27 特异性-空白样品、非分析物干扰-空白样品高效液相色谱图

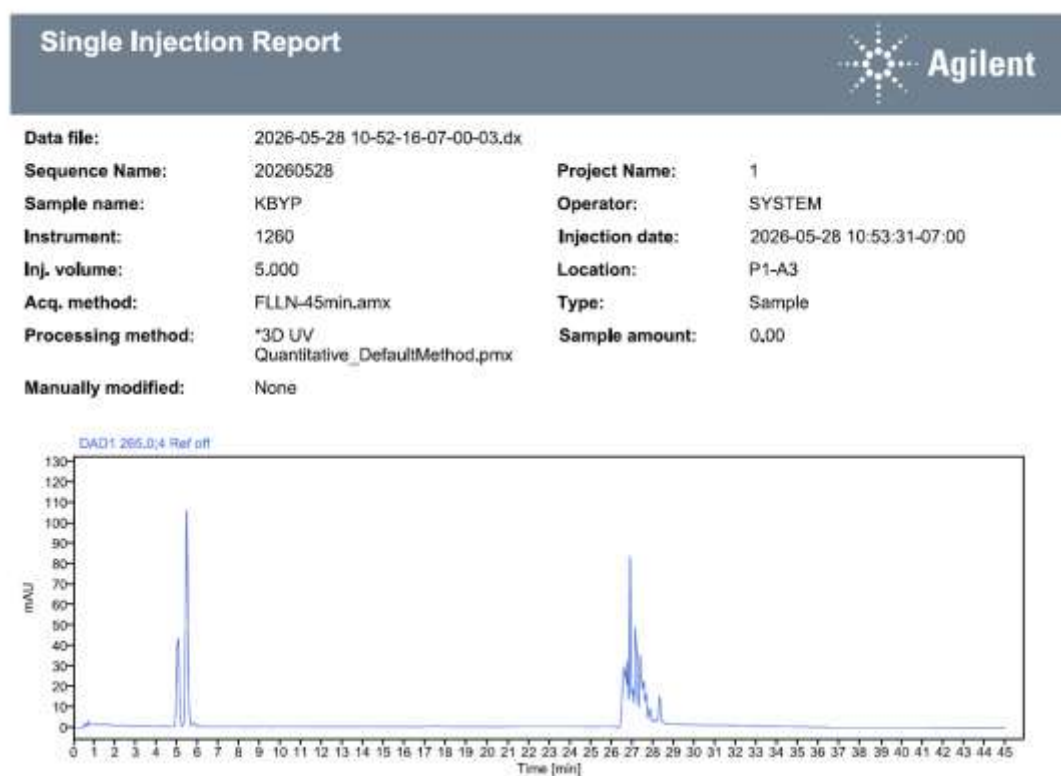
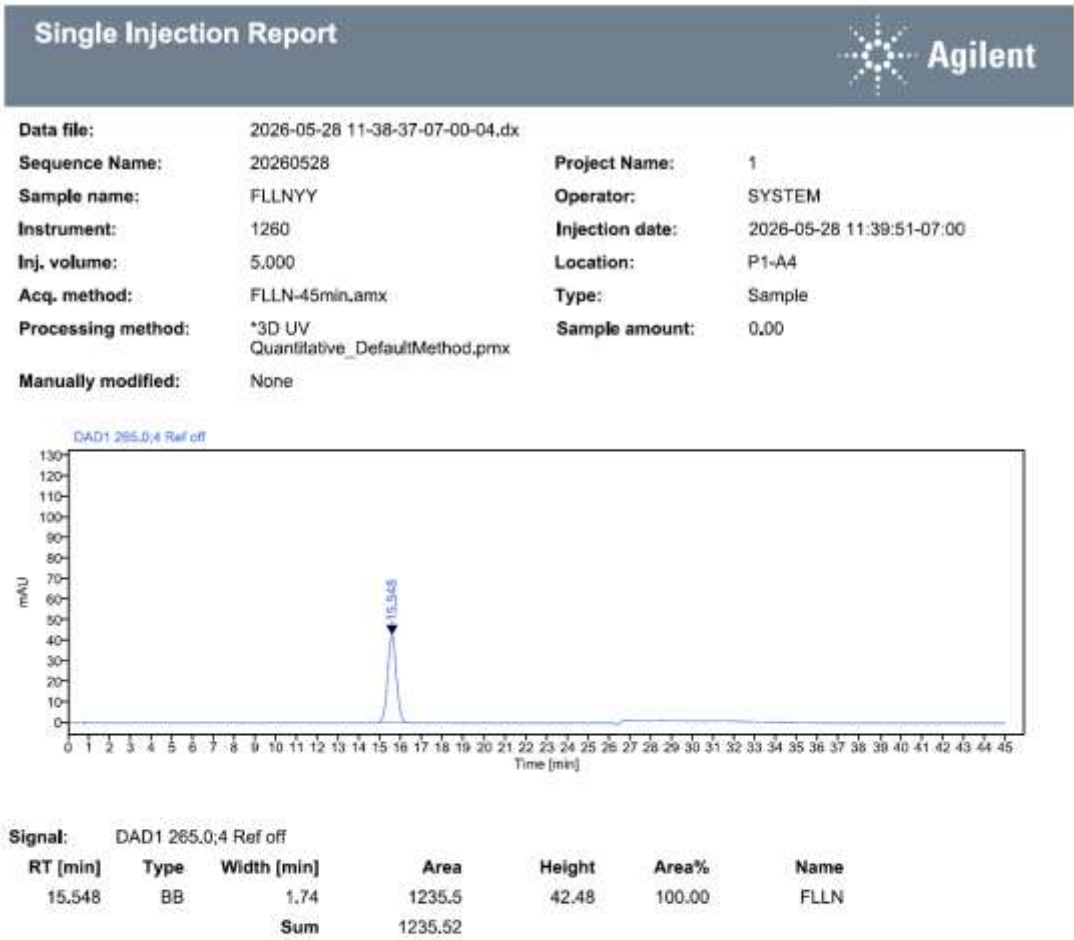


图28 氟雷拉纳原药溶液高效液相色谱图



5.5 协同验证色谱图

图29 200g/L XXX 悬浮剂高效液相色谱图 (XX 公司)

图30 200g/L XXX 悬浮剂高效液相色谱图 (XX 院)

图31 200g/L XXX 悬浮剂高效液相色谱图 (XX 公司)

图32 200g/L XXX 悬浮剂高效液相色谱图 (XX 公司)

图33 20% XXX 水分散粒剂高效液相色谱图 (XX 公司)

图34 20% XXX 水分散粒剂高效液相色谱图 (XX 院)

图35 20% XXX 水分散粒剂高效液相色谱图 (XX 公司)

图36 20% XXX 水分散粒剂高效液相色谱图 (XX 公司)