

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.03.10

苯甲磺酰截短侧耳素国家对照品的研制

韩宁宁, 戴青, 赵晖, 杨秀玉*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2018-12-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 03-0061-06 [中图分类号] S859.796

[摘要] 为研制首批苯甲磺酰截短侧耳素国家对照品, 对质量标准中的关键项目进行考察。苯甲磺酰截短侧耳素对照品为白色或类白色粉末, 红外光吸收图谱与 USP 溯源对照品图谱一致, 质谱法测定分子离子峰为 555.19 Da ($[M+Na]^+$), 高效液相色谱法测定其平均纯度为 99.7%, 可作为系统适用性对照品, 用于延胡索酸泰妙菌素及其制剂含量测定的系统使用性检查。

[关键词] 苯甲磺酰截短侧耳素; 国家对照品; 鉴别; 纯度

Development of Tosyl Pleuromutilin as National Reference

HAN Ning-ning, DAI Qing, ZHAO Hui, YANG Xiu-yu*

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

Corresponding author: YANG Xiu-yu, E-mail: yxyyang0903@163.com

Abstract: In order to develop the first batch of national reference of tosyl pleuromutilin, the key items in the quality standard were inspected. The national reference of tosyl pleuromutilin was white to almost white powder. The IR spectrum was consistent with the USP traceable reference. The molecular ion peak was 555.19 Da ($[M+Na]^+$) by mass spectrum. The average purity was 99.7% by high performance liquid chromatography. It can be used as a reference for the test of system applicability during the content determination of tiamulin fumarate and its related preparations.

Key words: tosyl pleuromutilin; national reference; identification; purity

延胡索酸泰妙菌素是截短侧耳素类半合成的动物专用抗生素。苯甲磺酰截短侧耳素是合成延胡索酸泰妙菌素的中间体。《中国兽药典》2015 年版一部收录了延胡索酸泰妙菌素及其可溶性粉与预混剂^[1]。在原料及制剂的含量测定过程中, 均需将延胡索酸泰妙菌素对照品与苯甲磺酰截短侧耳

素对照品混合配制为系统适用性对照品溶液以测定系统适用性。

经查询, 目前仅 USP 有该对照品供应, 但价格昂贵, 购买周期长。国家兽药基础信息查询系统^[2]显示, 目前泰妙菌素及其制剂的有效期内批准文号共 600 个, 其中原料文号 10 个, 预混剂文号 293

作者简介: 韩宁宁, 硕士, 从事抗生素检验检测工作。

通讯作者: 杨秀玉。E-mail: yxyyang0903@163.com

个,可溶性粉文号 297 个。如此众多的企业在泰妙菌素含量测定过程中均需使用苯甲磺酰截短侧耳素对照品进行系统适用性检查。然而,调研发现,在企业内部质量控制过程中,多使用自行生产的苯甲磺酰截短侧耳素原料充当系统适用性工作对照品,该原料无相应质量标准对其纯度进行控制。因此,研制苯甲磺酰截短侧耳素国家对照品对于延胡索酸泰妙菌素原料及制剂的生产及质量控制具有重要意义。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与设备 四级杆质谱仪(Waters XEVO TQD);高效液相色谱仪(HPLC)(Waters e2695 色谱系统,Empower 3 色谱工作站);二极管阵列检测器(PDA)(Waters 2998);XS205 分析天平(Mettler Toledo)。

1.2 药品与试剂 溯源对照品来源/批号:USP/FOC328;苯甲磺酰截短侧耳素原料药来源:山东胜利生物工程有限公司。甲醇和乙腈(MERCK 公司色谱纯试剂)。其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 分子量测定 分别取苯甲磺酰截短侧耳素原料与对照品适量,精密称定,用甲醇溶解并配制为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液直接进样。离子源为 ESI 源,正离子全扫描模式(ESI⁺)。毛细管电压 3.0 kv,锥孔电压 30 kv,脱溶剂温度 350 $^{\circ}\text{C}$ 。扫描范围 m/z 100~1000 Da,采集速率 1.5 spectra/s。

2.2 鉴别

2.2.1 液相鉴别 照纯度检查项下的色谱条件,取该检查项下的供试品溶液与对照品溶液进样,采集色谱图,考察供试品溶液主峰与对照品溶液主峰出峰时间是否一致,紫外光谱图是否一致。

2.2.2 红外鉴别 参考《中国兽药典》2015 年版一部延胡索酸泰妙菌素质量标准^[1]中红外鉴别方法,取苯甲磺酰截短侧耳素原料与对照品适量,采用溴化钾压片法制片,采集 4000~400 cm^{-1} 波段红外光谱图,考察二者是否一致。

2.3 纯度测定 采用《中国兽药典》2015 年版一部延胡索酸泰妙菌素质量标准^[1]中含量测定项下的色谱条件测定纯度,考察其纯度是否符合《兽药标准品、对照品、对照药材质量标准》^[3]中关于定位用对照品纯度不得低于 90.0% 的规定。十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;二极管阵列检测器,检测波长为 212 nm,同时在 200~400 nm 波长范围内记录光谱图。以甲醇-碳酸铵溶液[取碳酸铵 10 g,加水 800 mL 使溶解,加 6% 高氯酸溶液(取高氯酸 8.5 mL,加水至 100 mL,摇匀) 24 mL,用水稀释至 1000 mL,摇匀,滤过]-乙腈(49:28:23)为流动相;流速为 1.2 mL/min。分别取延胡索酸泰妙菌素对照品和苯甲磺酰截短侧耳素对照品适量,用流动相溶解并稀释制成每 1 mL 各约含 0.08 mg 的混合溶液,作为系统适用性溶液,取 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,泰妙菌素峰与苯甲磺酰截短侧耳素峰的分离度应大于 2.0,理论板数按泰妙菌素峰计算不低于 10000。取苯甲磺酰截短侧耳素原料适量,用流动相溶解并稀释制成每 1 mL 约含 0.08 mg 的溶液,作为供试品溶液,精密量取 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的 2 倍。按面积归一化法计算苯甲磺酰截短侧耳素的纯度。

3 结果与分析

3.1 分子量 苯甲磺酰截短侧耳素原料分子离子峰 $[M+Na]^+$ 为 555.19 Da,参见图 1。USP 溯源对照品分子离子峰 $[M+Na]^+$ 为 555.18 Da,参见图 2。二者分子量一致。

3.2 鉴别

3.2.1 液相鉴别 在纯度检查项下,212 nm 波长下的色谱图中,苯甲磺酰截短侧耳素原料色谱图中主峰与对照品溶液主峰保留时间一致,且为单一物质峰(纯度角度小于纯度阈值);在 200~400 nm 的波长范围内,两者紫外光谱图匹配(匹配角度小于匹配阈值),最大吸收波长一致,可判定二者为相同物质(图 3~图 4)。

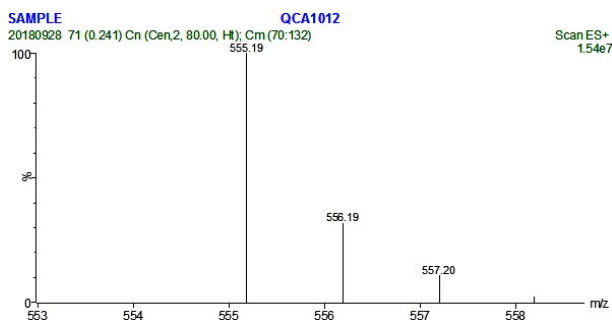


图 1 苯甲磺酰截短侧耳素原料质谱图

Fig 1 The MS spectrum of Tosyl Pleuromutilin material

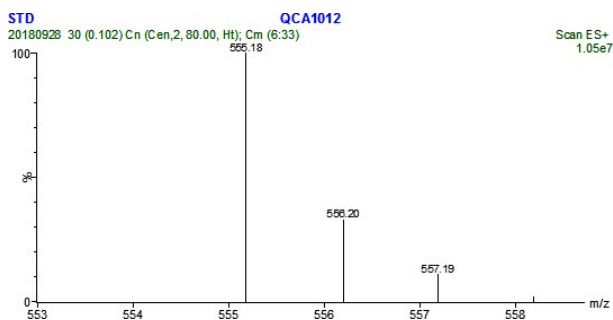


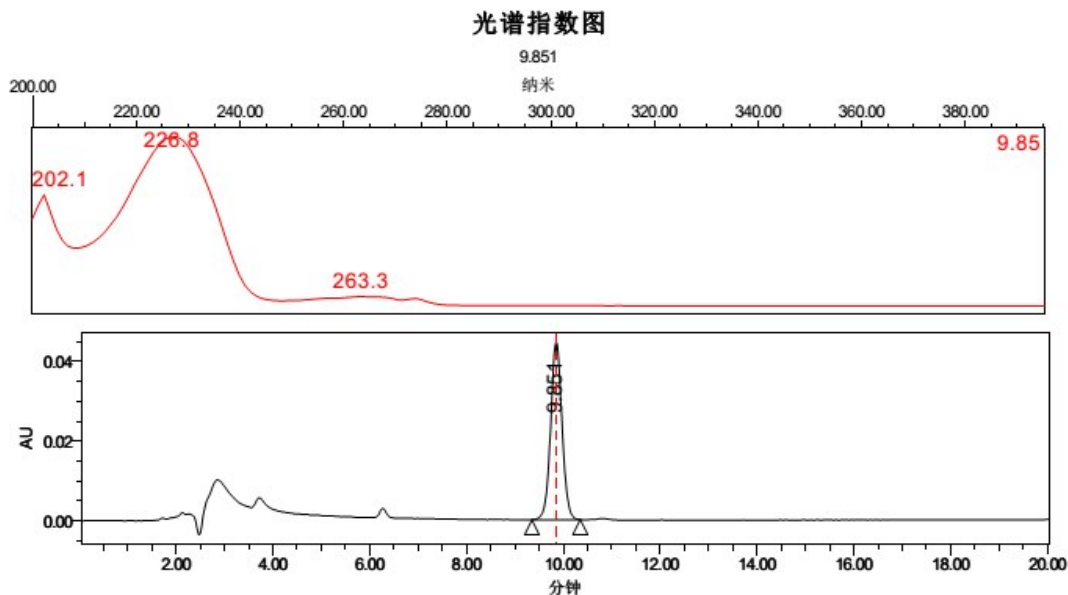
图 2 苯甲磺酰截短侧耳素 USP 对照品质谱图

Fig 2 The MS spectrum of Tosyl Pleuromutilin USP reference

样品名称: 苯甲磺酰截短侧耳素-USP
 样品类型: 未知
 瓶号: 8
 进样次数: 1
 进样体积: 20.00 ul
 运行时间: 20.0 Minutes

采集者: 韩宁宁
 采集方法组: hnn996
 处理方法: 01test
 通道名称: 212.0 纳米
 处理通道注释: 996 PDA 212.0 纳米 (PDA 200.0)

采集时间: 2018/9/18 17:36:38 CST
 处理时间: 2018/9/19 8:18:50 CST



样品名称 苯甲磺酰截短侧耳素-USP; 样品瓶 8; 进样 1; 采集日期 2018/9/18 17:36:38 CST

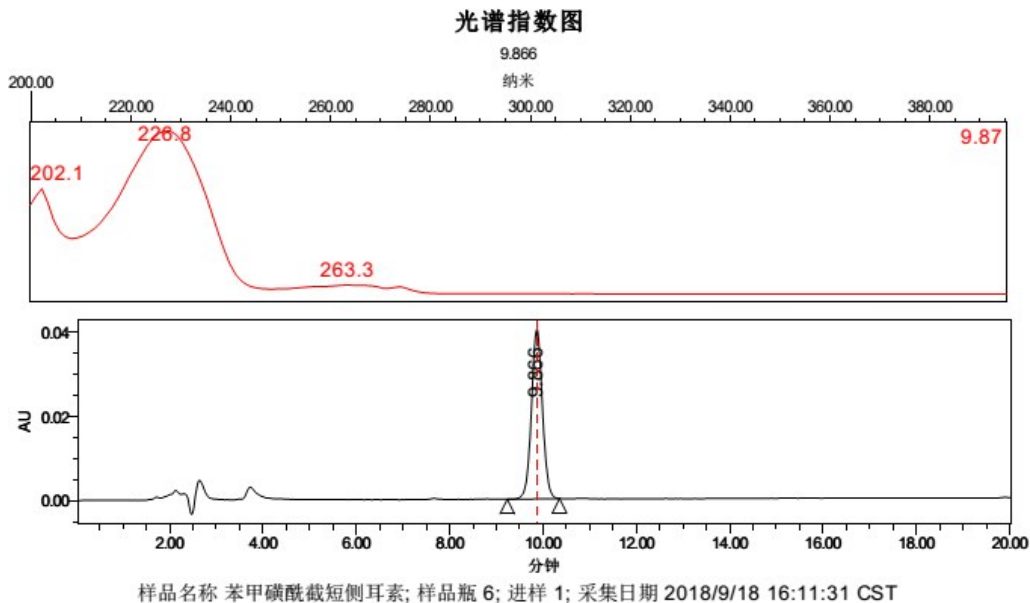
峰结果

保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	纯度1 角度	纯度1 阈值	PDA/FLR 匹配1 库名	PDA/FLR 匹配1 角度	PDA/FLR 匹配1 阈值	
1	9.851	728493	0.047	0.225	苯甲磺酰截短侧耳素	0.000	1.023

图 3 苯甲磺酰截短侧耳素 USP 对照品光谱指数图

Fig 3 The HPLC spectrum of Tosyl Pleuromutilin USP reference

样品名称:	苯甲磺酰截短侧耳素	采集者:	韩宁宁
样品类型:	未知	采集方法组:	hnn996
瓶号:	6	处理方法:	01test
进样次数:	1	通道名称:	212.0 纳米
进样体积:	20.00 ul	处理通道注释:	996 PDA 212.0 纳米 (PDA 200.0)
运行时间:	20.0 Minutes		
采集时间:	2018/9/18 16:11:31 CST		
处理时间:	2018/9/19 8:19:16 CST		



峰结果

保留时间 (分钟)	面积 (微伏·秒)	纯度1 角度	纯度1 阈值	PDA/FLR 匹配1 库名	PDA/FLR 匹配1 角度	PDA/FLR 匹配1 阈值	
1	9.866	661501	0.054	0.234	苯甲磺酰截短侧耳素	0.025	1.026

图 4 苯甲磺酰截短侧耳素原料光谱指数图

Fig 4 The HPLC spectrum of Tosyl Pleuromutilin material

3.2.2 红外鉴别 苯甲磺酰截短侧耳素原料红外光吸收图谱与对照品一致(图 5~图 6)。

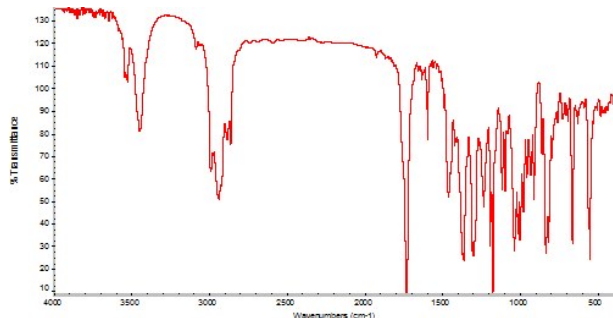


图 5 苯甲磺酰截短侧耳素 USP 对照品红外光谱图

Fig 5 The IR spectrum of Tosyl Pleuromutilin USP reference

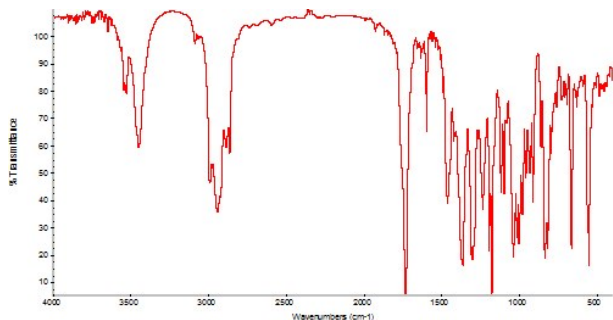


图 6 苯甲磺酰截短侧耳素原料红外光谱图

Fig 6 The IR spectrum of Tosyl Pleuromutilin material

3.3 纯度测定 溶剂空白、系统适用性及苯甲磺酰截短侧耳素原料色谱图参见图 7~图 9。2 个检验员各进样一份,每份重复进样 2 次。纯度结果见表 1。平均纯度为 99.7%,符合不低于 90.0%的规定。

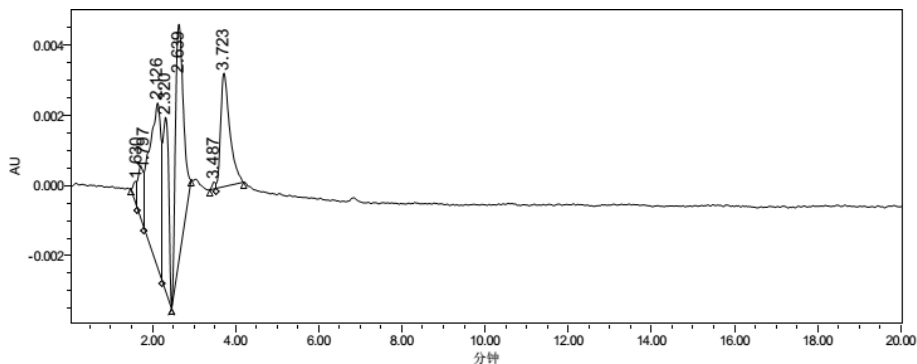


图 7 溶剂空白色谱图

Fig 7 The spectrum of solvent

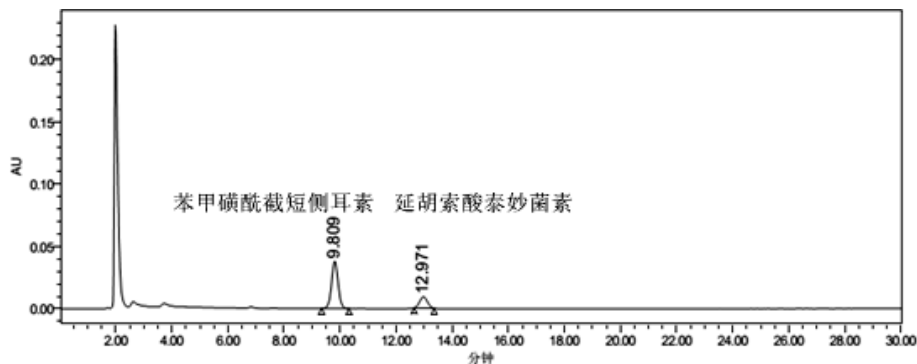


图 8 系统适用性色谱图

Fig 8 The spectrum of system applicability

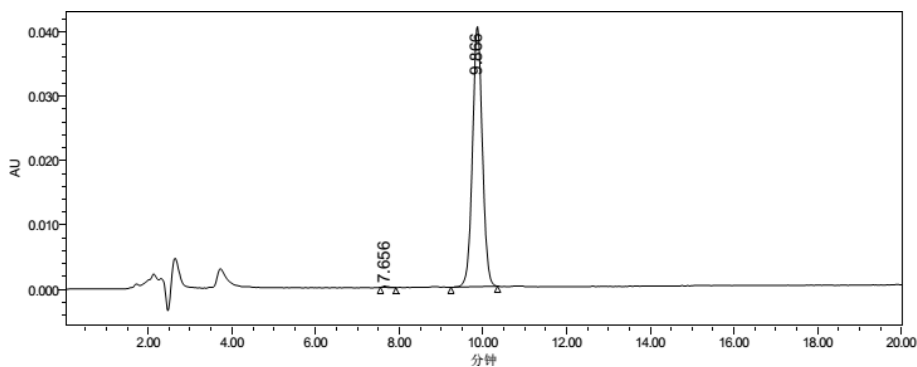


图 9 苯甲磺酰截短侧耳素原料色谱图

Fig 9 The spectrum of Tosyl Pleuromutilin material

表 1 苯甲磺酰截短侧耳素原料纯度测定结果

Tab 1 The purity test results of Tosyl Pleuromutilin material

	纯度 1/%	纯度 2/%
检验员 1	99.71	99.76
检验员 2	99.63	99.68
平均	99.7	

4 讨论与结论

4.1 纯度测定中色谱系统的选择 采用高效液相色谱法测定样品的纯度,一般需至少测定 2 种不同类型的色谱系统中的纯度,并将结果进行综合考量与计算。但由于苯甲磺酰截短侧耳素对照品仅在延胡索酸泰妙菌素含量测定过程中作为系统适用

性对照品使用,故没有考察其他色谱系统纯度的必要性。因此,在本试验设计过程中,纯度测定的色谱系统仅选择了延胡索酸泰妙菌素的含量测定色谱系统。

4.2 单一波段下计算得出的纯度结果是否可以反映样品的色谱纯度 上述纯度结果为 212 nm 波长

下面积归一化法计算的结果。同时采集了供试品 3D 色谱图(图 10),发现除溶剂空白峰外,供试品仅在 7.6 min 附近有杂质,该杂质最大吸收亦接近 212 nm。故 212 nm 下的纯度结果可以反映供试品的色谱纯度。

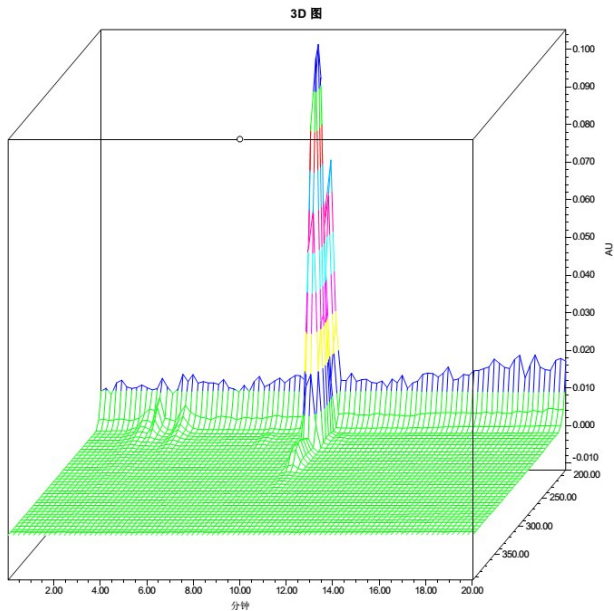


图 10 苯甲磺酰截短侧耳素原料 3D 色谱图

Fig 10 The 3D spectrum of Tosyl Pleuromutilin material

通过考察红外、分子量、纯度等关键质控项目,研制了苯甲磺酰截短侧耳素国家对照品,可作为系统适用性对照品,用于延胡索酸泰妙菌素及其制剂含量测定的系统使用性检查。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典一部[M]. 2015 年版. 北京: 中国农业出版社.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. The first volume of Chinese Veterinary Pharmacopoeia[M]. 2015 Edition. Beijing:

China Agriculture Press.

[2] 兽药产品批准文号数据查询系统[OL]. <http://124.126.15.169:8081/cx/>.
Veterinary drug product approval number data query system [OL]. <http://124.126.15.169:8081/cx/>.
[3] 兽药标准品、对照品、对照药材质量标准 2008 年版[S].
Quality standards of veterinary standards, references and reference herbs 2008 Edition[S].

(编辑:侯向辉)