

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.11.08

乙酰氨基阿维菌素国家对照品的研制

戴青,陆连寿,赵富华,张秀英*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022-03-30 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 11-0056-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 以乙酰氨基阿维菌素为原料研制首批乙酰氨基阿维菌素国家对照品,并进行质量评价。采用高效液相色谱法和质谱法对原料进行结构确证,分装后的乙酰氨基阿维菌素对照品采用质量平衡法定值,同时采用高效液相色谱外标法加以佐证。结果显示,以质量平衡法计算乙酰氨基阿维菌素($B_{1a} + B_{1b}$)含量为 97.79%,液相色谱外标法测定含量为 98.18%,两种方法测定结果基本一致。本次研制的乙酰氨基阿维菌素对照品可用于乙酰氨基阿维菌素及其制剂的鉴别与含量测定。

[关键词] 乙酰氨基阿维菌素;国家对照品;质量平衡法;高效液相色谱法

Development of Eprinomectin as National Reference Standard

DAI Qing, LU Lian-shou, ZHAO Fu-hua, ZHANG Xiu-ying*

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

Corresponding author: ZHANG Xiu-ying, E-mail: xui1875@163.com

Abstract: To develop the first batch of national reference standard of eprinomectin, the quality of raw was tested. Eprinomectin material was identified by HPLC and MS. The content of eprinomectin reference standard packaged was valued by mass balance method and HPLC external standard method. The results show that, the content of eprinomectin was 97.79% by mass balance method and 98.18% by HPLC external standard method. The results of the two methods were basically consistent. The national reference of eprinomectin in this study can be used for the identification of the preparations of eprinomectin.

Key words: eprinomectin; national reference standard; mass balance method; HPLC

乙酰氨基阿维菌素是乙酰氨基阿维菌素 B_{1a} 和 B_{1b} 两个组分的混合物,主要组分为乙酰氨基阿维菌素 B_{1a} ,是一种高效、广谱、低残留的兽用驱虫药物,是美国食品药品监督管理局和欧盟批准的唯一

应用于泌乳奶牛无需弃奶的广谱驱虫药^[1-2],临床上主要用于防治畜类的虱、螨、蝇等各种内外寄生虫,目前制剂为乙酰氨基阿维菌素注射液和乙酰氨基阿维菌素浇泼剂。经国家兽药基础数据库查询,

作者简介:戴青,硕士,从事抗生素检验检测工作。

通讯作者:张秀英。E-mail: xui1875@163.com

目前我国在有效期内的乙酰氨基阿维菌素原料及制剂的兽药批准文号有 100 多个。《中国兽药典》一部收载了乙酰氨基阿维菌素与乙酰氨基阿维菌素注射液^[3],质量标准中均需用到乙酰氨基阿维菌素对照品来测定乙酰氨基阿维菌素($B_{1a} + B_{1b}$)的含量。美国药典委员会可供应乙酰氨基阿维菌素 USP 对照品,但国外对照品价格昂贵,购买周期长,给国内相关生产企业和检测机构的质量控制带来不便。因此,拟研制乙酰氨基阿维菌素对照品,用于乙酰氨基阿维菌素及其制剂的鉴别与含量测定,对于兽药生产企业乙酰氨基阿维菌素及制剂的质量控制具有重要意义。

本次研制分别采用质量平衡法与高效液相色谱外标法两种方法对乙酰氨基阿维菌素原料的含量进行定值研究。其中质量平衡法以色谱纯度、水分、残留溶剂、炽灼残渣等关键指标进行定值,高效液相色谱外标法以 USP 对照品作为溯源对照品进行定值,以确保含量赋值的准确性。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 2010A 高效液相色谱仪; Waters Synapt HDMS 质谱仪; Agilent 7890A 气相色谱仪; Mettler Toledo XS205 电子分析天平(精度 0.01 mg); Metrohm 701 KF Titrino 卡氏水分测定仪; CWF 11/5 高温炉。

1.2 试剂 乙酰氨基阿维菌素原料由浙江海正药业股份有限公司生产;乙酰氨基阿维菌素 USP 对照品批号 1237752,含量 95.1% (其中乙酰氨基阿维菌素 B_{1a} 含量 90.09%, B_{1b} 含量 5.01%);乙腈为色谱纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶解度 分别考察乙酰氨基阿维菌素原料在甲醇、乙醇、三氯甲烷、丙酮、水中的溶解度,测定结果(表 1)与兽药典中对乙酰氨基阿维菌素溶解度的规定一致。

2.2 引湿性 根据兽药引湿性试验指导原则,将原料在恒温恒湿条件下(温度 25 ℃,相对湿度 80%)放置 24 h 后计算增重百分率,判定样品引湿性。结果测得样品的增重百分率为 8.7%,表明原

料有引湿性。为进一步判定试验条件下暴露时间对水分的影响,将原料在常规试验条件下(温度 25 ℃,相对湿度 40%)于天平室内敞口放置 10、20、30、40、50、60 min,分别计算增重百分率,结果见表 2,10 分钟内样品增重百分率小于 0.5%,随着放置时间延长,逐渐吸湿增重,表明称量时应控制好称量环境的湿度,快速称样。

表 1 乙酰氨基阿维菌素原料的溶解度

溶剂	样品量/g	溶剂体积/mL	溶解情况	结论
甲醇	1.0	0.9	溶解	极易溶解
乙醇	1.0	9.9	溶解	易溶
三氯甲烷	1.0	9.9	溶解	易溶
丙酮	1.0	9.9	溶解	易溶
水	0.01	100	未完全溶解	几乎不溶

表 2 乙酰氨基阿维菌素原料增重百分率

放置时间/min	增重百分率/%
10	0.3
20	0.6
30	0.8
40	1.0
50	1.1
60	1.4

2.3 高效液相色谱法结构确证 采用 2.6 项下的高效液相色谱方法,分别取供试品溶液与对照品溶液进样,采集液相色谱图,考察供试品溶液主峰与对照品溶液主峰保留时间是否一致。结果见图 1 ~ 图 2,在乙酰氨基阿维菌素含量测定项下的色谱图中,乙酰氨基阿维菌素原料主峰与对照品溶液主峰的保留时间一致。

2.4 高分辨质谱法结构确证

2.4.1 质谱条件 模式:ESI 正离子模式;毛细管电压:2kV;锥孔电压:10V;离子源温度:120 ℃;脱溶剂气温度:350 ℃;脱溶剂气流量:500L/h。

2.4.2 供试品溶液的制备 取乙酰氨基阿维菌素原料 25 mg,置 25 mL 量瓶中,用甲醇溶液溶解并稀

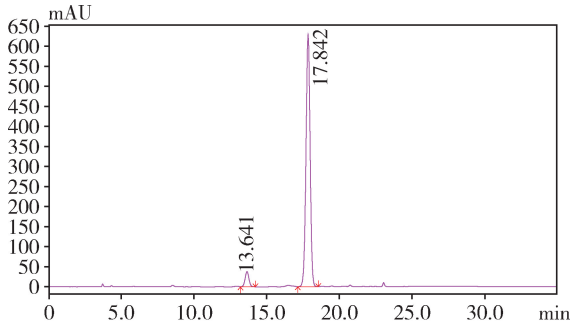


图 1 乙酰氨基阿维菌素 USP 对照品液相色谱图

Fig 1 Liquid chromatogram of eprinomectin USP reference

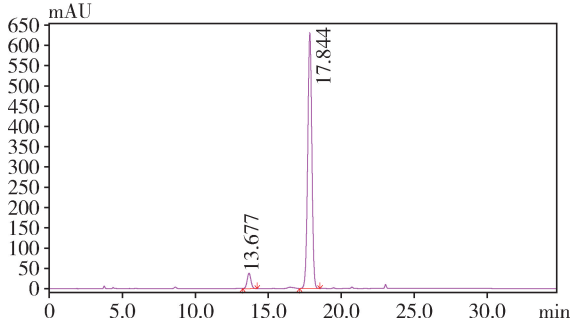


图 2 乙酰氨基阿维菌素原料液相色谱图

Fig2 Liquid chromatogram of eprinomectin raw material

释至刻度,再用 20% 甲醇溶液稀释制成每 1 mL 中含 1 μg 的溶液,进样测定分子量。

2.4.3 测定结果 在该质谱条件下,乙酰氨基阿维菌素理论分子量为 936.5086,供试品的测定分子量为 936.5085(图 3)。供试品的测定分子量与理论值一致。

2.5 质量平衡法定值

2.5.1 色谱纯度

2.5.1.1 液相色谱条件 色谱柱:Waters Sunfire C8 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);流动相:0.1% 高氯酸溶液(A)–乙腈(B),梯度洗脱(0 ~ 15 min, 45% A, 55% B;

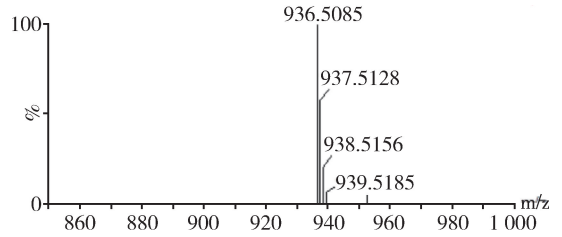


图 3 乙酰氨基阿维菌素原料质谱图

Fig 3 Mass spectrum of eprinomectin raw material

15 ~ 25 min, 5% A, 95% B; 25 ~ 30 min, 45% A, 55% B; 30 ~ 35 min, 45% A, 55% B); 流速:1.5 mL/min; 检测波长:245 nm; 柱温:40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量:20 μL 。

2.5.1.2 供试品溶液的制备 取分装后的乙酰氨基阿维菌素原料 25 mg, 置 50 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.5.1.3 测定结果 采用峰面积归一化法分别计算乙酰氨基阿维菌素 B_{1a} 和 B_{1b} 的色谱纯度, 结果 B_{1a} 纯度为 96.60%, B_{1b} 纯度为 2.40%, 二者之和为乙酰氨基阿维菌素纯度 99.00%。

2.5.2 残留溶剂 据查阅乙酰氨基阿维菌素原料企业的生产工艺可知, 原料合成过程中所使用的有机溶剂为乙醇、甲醇和丙酮, 因此采用顶空气相色谱法测定这三种有机溶剂的含量。

2.5.2.1 气相色谱条件 色谱柱: Agilent HP-5 色谱柱(5% 苯基-95% 甲基聚硅氧烷为固定液); 程序升温: 起始温度 50 $^{\circ}\text{C}$, 保持 10 min, 再以每分钟 10 $^{\circ}\text{C}$ 的速率升温至 180 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min; 进样口温度: 200 $^{\circ}\text{C}$; 氢火焰离子化检测器温度: 250 $^{\circ}\text{C}$; 顶空瓶平衡温度: 80 $^{\circ}\text{C}$; 平衡时间: 30 min。

2.5.2.2 供试品溶液的制备 取分装后的乙酰氨基阿维菌素原料 0.5 g, 置 20 mL 顶空瓶中, 精密加入二甲基甲酰胺 5 mL, 摇匀, 即得。

2.5.2.3 对照品溶液的制备 精密称取甲醇、乙醇和丙酮各适量, 分别用二甲基甲酰胺稀释制成 48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乙醇对照品溶液、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的甲醇对照品溶液和 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丙酮对照品溶液。

2.5.2.4 测定结果 取对照品溶液和供试品溶液分别顶空进样测定, 结果供试品中甲醇和丙酮的含量均低于检测限, 因此忽略不计。按外标法计算供

试品中乙醇的含量,结果为 0.05%。

2.5.3 水分 照《中国兽药典》一部附录 0832 测定水分,结果为 1.15%。

2.5.4 炽灼残渣 照《中国兽药典》一部附录 0841 测定残渣量,结果为 0.02%。

2.5.5 质量平衡法计算结果 质量平衡法计算公式为含量 = 色谱纯度 × (1 - 水分 - 残留溶剂 - 炽灼残渣) × 100%,按照这公式分别计算乙酰氨基阿维菌素 B_{1a} 与 B_{1b} 的含量,结果为 B_{1a}: 96.60% × (1 - 1.15% - 0.05% - 0.02%) × 100% = 95.42%; B_{1b}: 2.40% × (1 - 1.15% - 0.05% - 0.02%) × 100% = 2.37%。乙酰氨基阿维菌素 (B_{1a} + B_{1b}) 含量为 97.79%。

2.6 高效液相色谱外标法定值

2.6.1 液相色谱条件 同 2.5.1.1 项下色谱条件。

2.6.2 供试品溶液的制备 取分装后的乙酰氨基阿维菌素原料 25 mg,置 50 mL 量瓶中,用 80% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.6.3 对照品溶液的制备 取乙酰氨基阿维菌素 USP 对照品 25 mg,置 50 mL 量瓶中,用 80% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.6.4 系统适用性溶液的制备 取对照品溶液 1.5 mL,置液相进样瓶中,加 1 滴 1 mol/L 氢氧化钠溶液,放置 20 min 后进样。系统适用性溶液色谱图见图 4,乙酰氨基阿维菌素 B_{1b} 峰、B_{1a} 峰、杂质 C + D 峰和杂质 E 峰的相对保留时间分别为 0.77、1.00、1.05 和 1.29,各峰间分离度均符合要求。

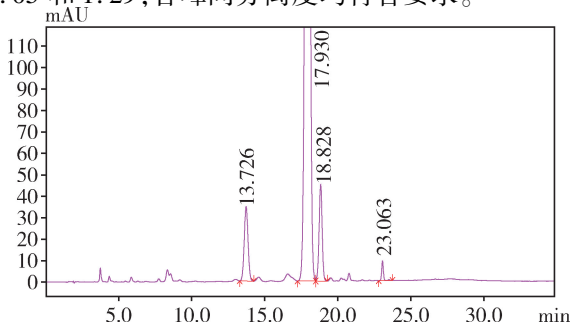


图 4 系统适用性溶液液相色谱图

Fig 4 Liquid chromatogram of system suitability solution

2.6.5 方法专属性研究 为进一步确定杂质的分离情况,应在测定前进行专属性试验考察。在 10 mL 供试品溶液中分别加入 3 滴盐酸、1 mol/L 氢氧化钠溶液和 30% 过氧化氢溶液,放置 30 min 后进样,另取 10 mL 供试品溶液水浴加热 5 分钟,放冷后进样测定,结果乙酰氨基阿维菌素均产生了杂质峰,但主峰与杂质均能较好地分离,表明该方法具有较好的专属性,见图 5 ~ 图 8。

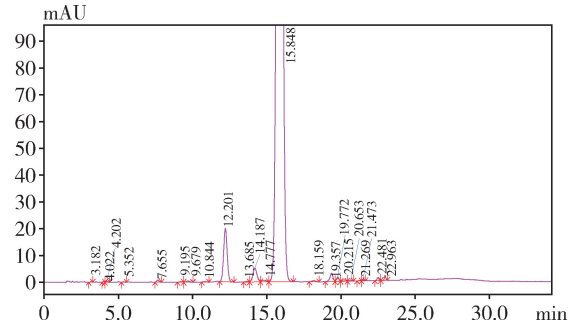


图 5 酸破坏试验液相色谱图

Fig 5 Liquid chromatogram of acid destructive test

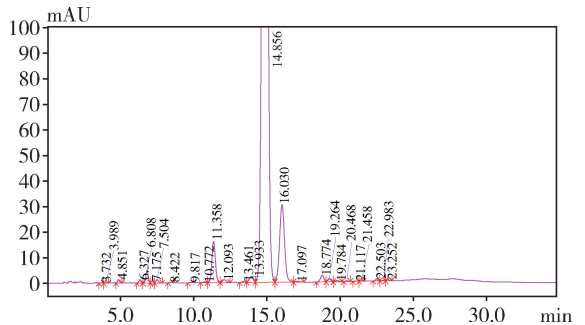


图 6 碱破坏试验液相色谱图

Fig 6 Liquid chromatogram of alkali destructive test

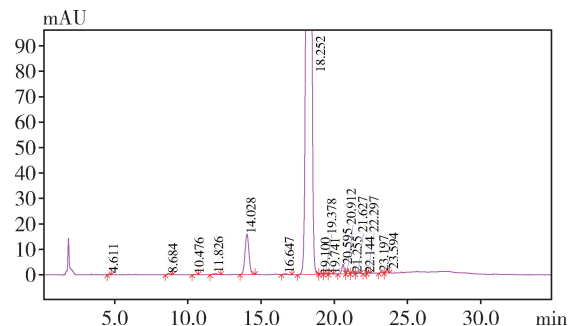


图 7 氧化破坏试验液相色谱图

Fig 7 Liquid chromatogram of oxidation destructive test

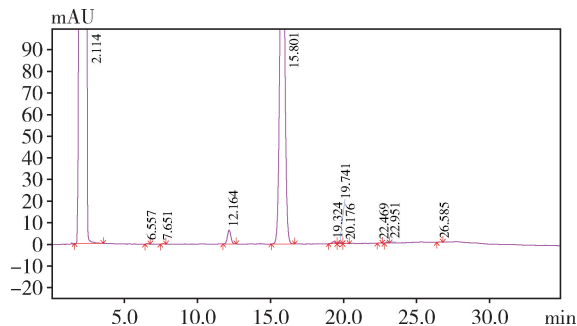


图 8 加热破坏试验液相色谱图

Fig 8 Liquid chromatogram of heating destructive test

2.6.6 测定结果 由三个不同实验室按照该方法进行协作标定,平均结果为乙酰氨基阿维菌素 B_{1a} 含量 95.79%, B_{1b} 含量 2.39%。乙酰氨基阿维菌素 ($B_{1a} + B_{1b}$) 含量为 98.18%。

2.7 稳定性影响因素试验 按《中国兽药典》一部附录稳定性试验指导原则要求,进行高温(60℃)、高湿(相对湿度90%)和光照(4500lx)试验的稳定性影响因素试验,分装后的样品在放置5d和10d后,按2.5.1项下方法考察乙酰氨基阿维菌素的纯度变化。纯度结果见表3,高湿条件下样品几乎无变化,高温对样品略有影响,10d后纯度下降0.28%,光照对样品影响较大,10d后纯度下降2.10%。

表 3 稳定性影响因素试验结果

Tab 3 Results of stability influencing factors

放置天数	高温条件样品 纯度(%)	高湿条件样品 纯度(%)	光照条件样品 纯度(%)
0天	99.00	99.00	99.00
5天	98.76	98.98	98.04
10天	98.72	99.03	96.90

3 讨论与结论

3.1 对照品含量赋值 《标准物质定值的通用原则及统计学原理》^[4]中列出5种定值方式,单一实验室通常采用两种或更多不同原理的独立参考方法定值。本研究采用质量平衡法与高效液相色谱外标法两种不同原理的定值方法测定乙酰氨基阿维菌素含量,测定结果基本一致,相互佐证,可以保

证定值的准确性。质量平衡法通常被认为是一种具有较高准确度的方法,其能够直接溯源到国际单位制中的质量单位,结果稳定性好,测量结果比其他方法更准确,世界卫生组织及欧洲药典推荐质量平衡法为药品标准物质定值方法^[5-6]。虽然本研究两种方法测定结果基本一致,但考虑到外标法溯源各人间偏差较大,因此本研究最终采用质量平衡法的定值结果对含量进行赋值。

3.2 对照品的稳定性 对照品具有较好的稳定性是标准物质的一个重要前提,使用中需要特别注意稳定性问题。本试验通过对该对照品进行高温、高湿和光照稳定性考察,结果表明该对照品对热和光照均比较敏感,因此应避光低温保存。同时为了保证对照品在保存条件下的含量值的准确性,根据兽药标准物质研制技术规范^[7]要求,我们还应对制备的对照品进行稳定性监测,即在规定的贮存条件下,定期地进行标准物质特性值的稳定性评估。分析该对照品的特性,由于该对照品采用安瓿分装,水分、残留溶剂和残渣都基本不会发生变化,因此最能反映该对照品的变化的特性值为纯度,因此确定第一次监测时间为一年后,以后每年定期测定一次。对该对照品的纯度进行考察,由1人进行测定,每次测定平行样不少于5份,测定的结果与原纯度结果相对偏差不得大于0.3%。

参考文献:

- [1] 耿响,刘希望,杨亚军,等.乙酰氨基阿维菌素缓释注射剂中乙酰氨基阿维菌素含量与有关物质 HPLC 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医,2021,48(12):4681-4689.
Geng X, Liu X W, Yang Y J, et al. Establishment of HPLC method for determination of eprinomectin and related substances in eprinomectin sustained-release injection [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 48(12): 4681-4689.
- [2] 冒玉娟,沈雁,张乐,等.乙酰氨基阿维菌素乳剂凝胶的制备及透皮给药特性评价[J]. 黑龙江畜牧兽医,2019,(15):138-141.
Mao Y J, Shen Y, Zhang L, et al. Preparation of eprinomectin emulsion gel and evaluation of its transdermal delivery characteristics [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2019, (15): 138-141.

- [3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2020 年版一部 [M]. 北京:中国农业出版社.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. People's republic of China veterinary pharmacopoeia 2020 Part I [S]. Beijing: China Agriculture Press.
- [4] 国家质量监督检验检疫总局. JJF1343 - 2012 标准物质定值的通用原则及统计学原理[S]. 2012 年版.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. JJF1343 - 2012 General and statistical principles for characterization of reference materials [S]. 2012 Edition.
- [5] 郑子繁,刘卫晓,金芜军,等. 质量平衡法及其在标准物质定值中的应用进展[J]. 生物技术进展,2020,10(6):623 - 629.
Zheng Z F, Liu W X, Jin W J, *et al.* Mass balance method and its application in the determination of reference materials [J]. Current Biotechnology, 2020, 10(6):623 - 629.
- [6] 张庆合,杨吉双,焦慧,等. 基于质量平衡法的有机物纯度测量技术进展[J]. 化学试剂,2020,42(8):931 - 939.
Zhang Q H, Yang J S, Jiao H, *et al.* Progress of organic purity measurement technology based on mass balance method [J]. Chemical Reagents, 2020, 42(8):931 - 939.
- [7] 陈亚飞,肖新月,何平,等. 标准物质稳定性考察规范解读和有效期管理方式的研究[J]. 中国药事, 2018, 32(3): 317 - 322.
Chen Y F, Xiao X Y, He P, *et al.* Interpretation of reference material stability investigation requirements and study on expiry date management methods[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2018, 32(3):317 - 322.

(编辑:陈希)