

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.07.03

苄星氯唑西林国家对照品的研制

戴青, 韩宁宁, 赵晖, 杨秀玉*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2019-03-27 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 07-0018-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为了研制首批苄星氯唑西林国家对照品。对质量标准中的关键项目进行考察。采用红外分光光度法、高效液相色谱法对原料进行鉴别, 采用高效液相色谱法进行含量测定。结果显示, 红外光吸收图谱与 USP 溯源对照品图谱一致, 高效液相色谱法测定氯唑西林与二苄基乙二胺的含量和为 92.1%。研究建立的苄星氯唑西林国家对照品可用于苄星氯唑西林及其制剂的鉴别。

[关键词] 苄星氯唑西林; 国家对照品; 高效液相色谱; 鉴别

Development of Benzathine Cloxacillin as National Reference

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

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

Corresponding author: YANG Xiu-yu, E-mail: 2574090606@qq.com

Abstract: To develop the first batch of national reference of benzathine cloxacillin. The key items in the quality standard were inspected. Infrared spectrophotometry and HPLC was applied to identify raw materials. HPLC was applied to determine the content. The IR spectrum was consistent with the USP traceable reference. The content of cloxacillin and dibenzylethylenediamine was 92.1%. The first batch of national reference of benzathine cloxacillin established in this study can be used for the identification of benzathine cloxacillin and its preparations.

Key words: benzathine cloxacillin; national reference; HPLC; identification

氯唑西林为半合成青霉素, 耐酸耐青霉素酶, 主要对耐药金黄色葡萄球菌有很强的杀菌作用, 能有效治疗部分革兰阴性菌、葡萄球菌和链球菌引起的感染。苄星氯唑西林是氯唑西林的二苄基乙二胺盐, 其制剂主要为苄星氯唑西林乳房注入剂, 在兽医应用上主要用于治疗敏感菌引起的奶牛干乳期乳房炎^[1-2]。苄星氯唑西林以氯唑西林为主要

活性成分, 经国家兽药产品批准文号数据查询系统^[3]查询, 我国兽药生产企业中目前持有生产文号的苄星氯唑西林乳房注入剂生产企业有 16 家。《中国兽药典》2015 年版一部收录了苄星氯唑西林与苄星氯唑西林乳房注入剂^[4]。

《中国兽药典》2015 年版一部苄星氯唑西林质量标准中涉及到含量测定所需的氯唑西林对照品、

作者简介: 戴青, 硕士, 从事抗生素检验检测工作。

通讯作者: 杨秀玉。E-mail: 2574090606@qq.com

二苄基乙二胺对照品和鉴别所需的苄星氯唑西林对照品三种标准物质。目前氯唑西林和二苄基乙二胺含量测定可溯源至中国食品药品检定研究院的对照品,而红外鉴别所需的苄星氯唑西林对照品仅 USP 有供应,但国外对照品价格昂贵,购买周期长。因此,拟研制苄星氯唑西林对照品,用于苄星氯唑西林及其制剂的红外鉴别,对于兽药生产企业苄星氯唑西林及制剂的质量控制具有重要意义。

1 仪器与试药

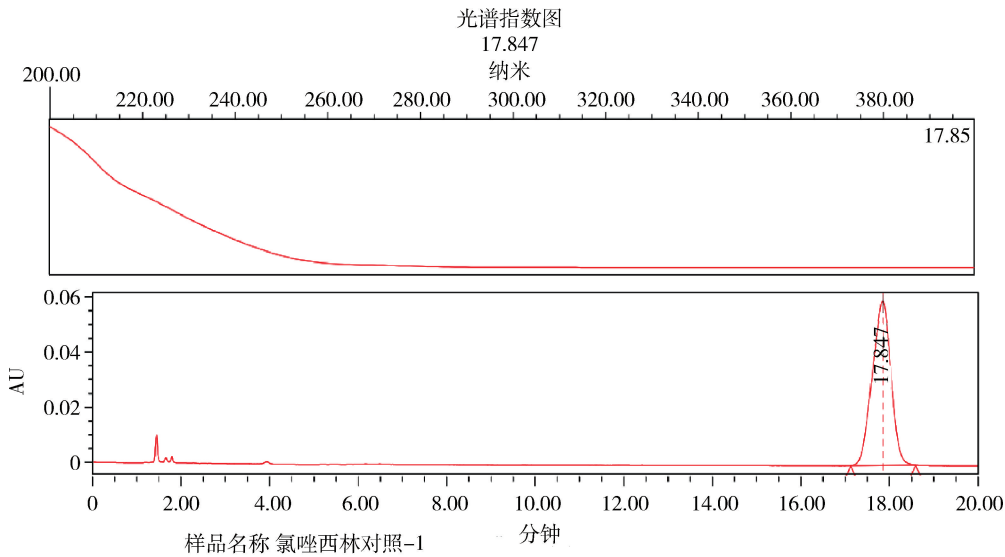
1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪(Empower 3 色谱工作站);Waters 996 二极管阵列检测器(PDA),Mettler Toledo XS205 电子分析天平(精度 0.01mg);Nicolet FT-550 傅立叶红外光度计;Metrohm 701 KF Titrino 卡氏水分测定仪;HANNA Instruments HI9017 酸度计。

1.2 试药 苄星氯唑西林原料药由郸城巨鑫生物科技有限公司生产,批号:201709001;氯唑西林对照品(批号:130423-200903,含量 91.0%)、二苄基乙二胺对照品(批号:130638-201301,含量 99.5%)均购自中国食品药品检定研究院;苄星氯

唑西林 USP 对照品批号:G1M102;乙腈为色谱纯;水为超纯水;磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、氢氧化钠、磷酸均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 液相鉴别 采用 2.6.1 与 2.6.2 项下的高效液相色谱条件,分别取两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保留时间是否一致,紫外光谱图是否一致。结果见图 1~图 4,在氯唑西林含量测定项下的色谱图中,苄星氯唑西林原料主峰与氯唑西林对照品溶液主峰保留时间一致,且纯度角度小于纯度阈值,为单一物质峰,在 200~400 nm 的波长范围内,二者紫外光谱图匹配角度小于匹配阈值,可判定为相同物质;在二苄基乙二胺含量测定项下的色谱图中,苄星氯唑西林原料主峰与二苄基乙二胺对照品溶液主峰保留时间一致,且纯度角度小于纯度阈值,为单一物质峰,在 200~400 nm 的波长范围内,二者紫外光谱图匹配角度小于匹配阈值,可判定为相同物质。



PDA结果表					
保留时间 (分钟)	纯度1 角度	纯度1 阈值	PDA匹配1 光谱名	PDA匹配1 角度	PDA匹配1 阈值
17.847	0.072	0.266	氯唑西林	0.000	1.058

图 1 氯唑西林对照品光谱指数图

Fig 1 The HPLC spectrum of cloxacillin reference

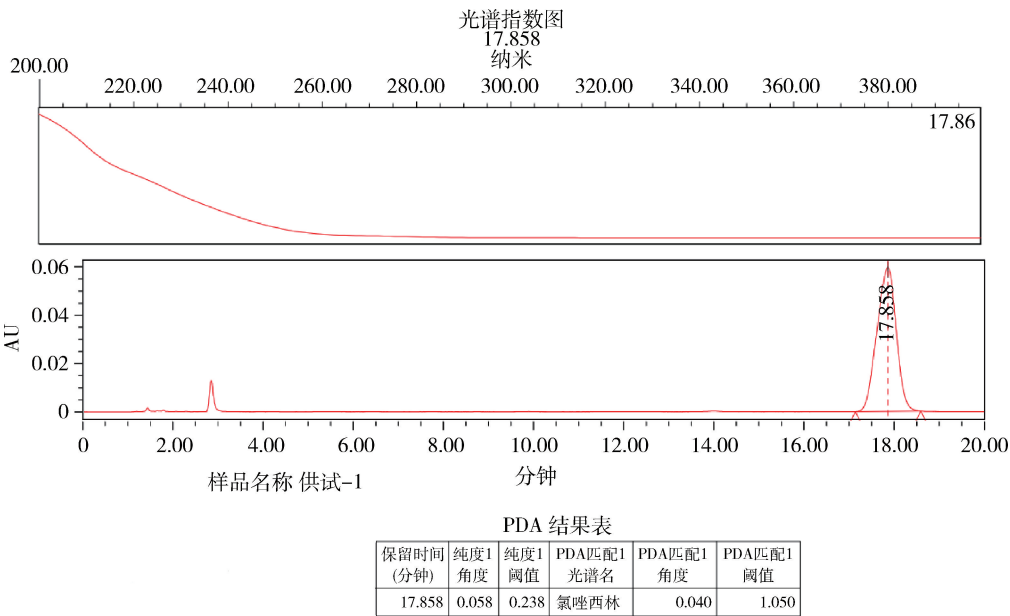


图 2 苄星氯唑西林原料氯唑西林光谱指数图

Fig 2 The HPLC spectrum of cloxacillin in benzathine cloxacillin raw material

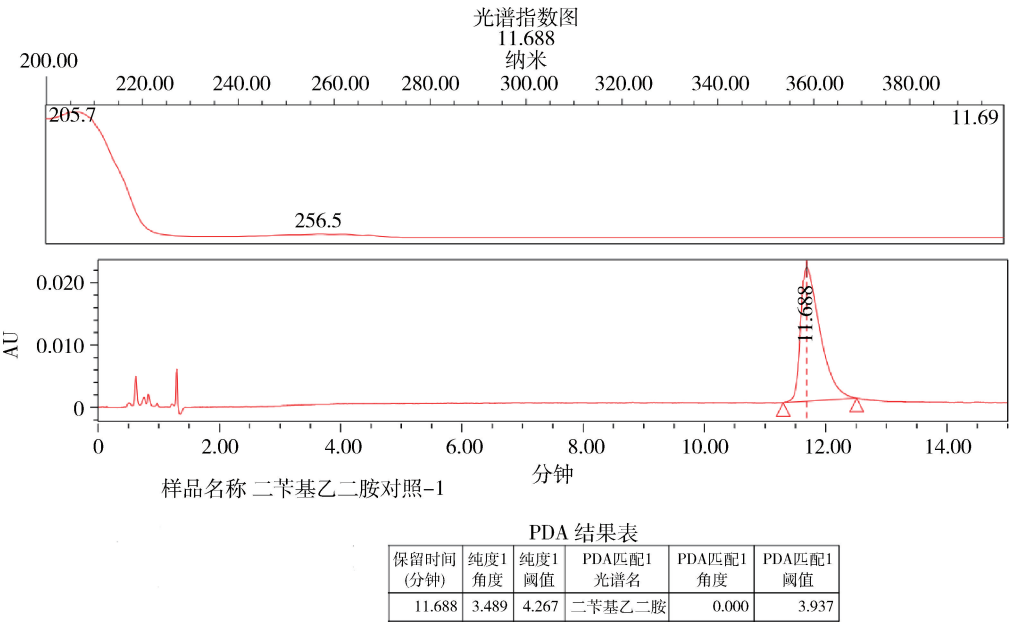


图 3 二苄基乙二胺对照品光谱指数图

Fig 3 The HPLC spectrum of dibenzylethylenediamine reference

2.2 红外光谱鉴别 采用溴化钾压片法进行测定,采集 4000 ~ 400 cm^{-1} 波段红外光谱图,考察苄星氯唑西林原料与苄星氯唑西林 USP 对照品的红外光吸收图谱是否一致。结果见图 5 ~ 图 6,苄星氯唑西林原料的红外光吸收图谱与 USP 对照品的

图谱一致。

2.3 酸度测定 取苄星氯唑西林原料 0.1 g,加水 10 mL 制成悬浮液,用苯二甲酸盐标准缓冲液和磷酸盐标准缓冲液校正仪器后测定 pH 值。结果测得 pH 值为 5.1。

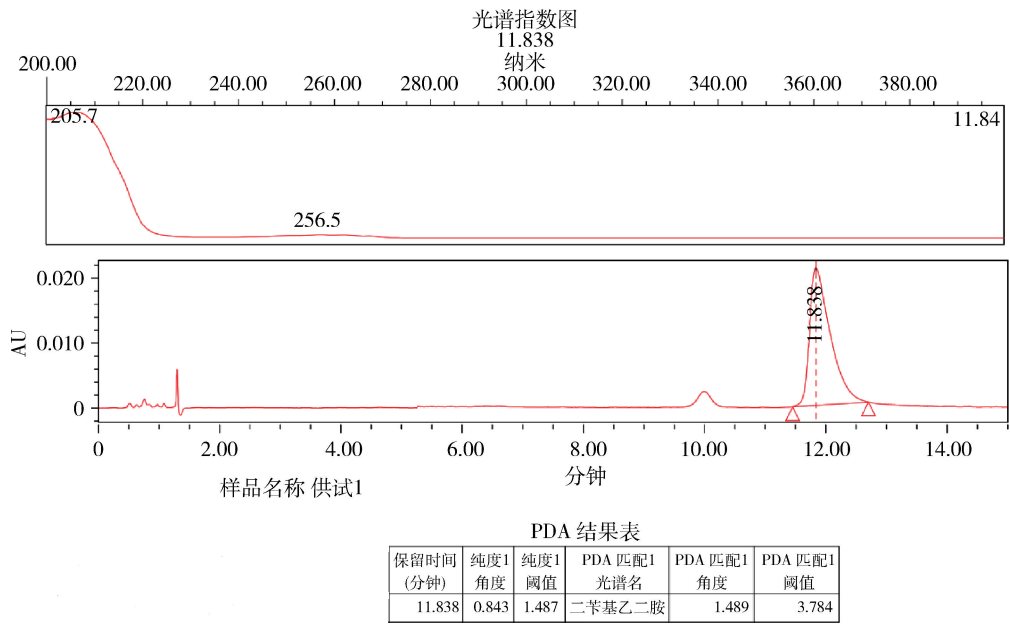


图 4 苄星氯唑西林原料二苄基乙二胺光谱指数图

Fig 4 The HPLC spectrum of dibenzylethylenediamine in benzathine cloxacillin raw material

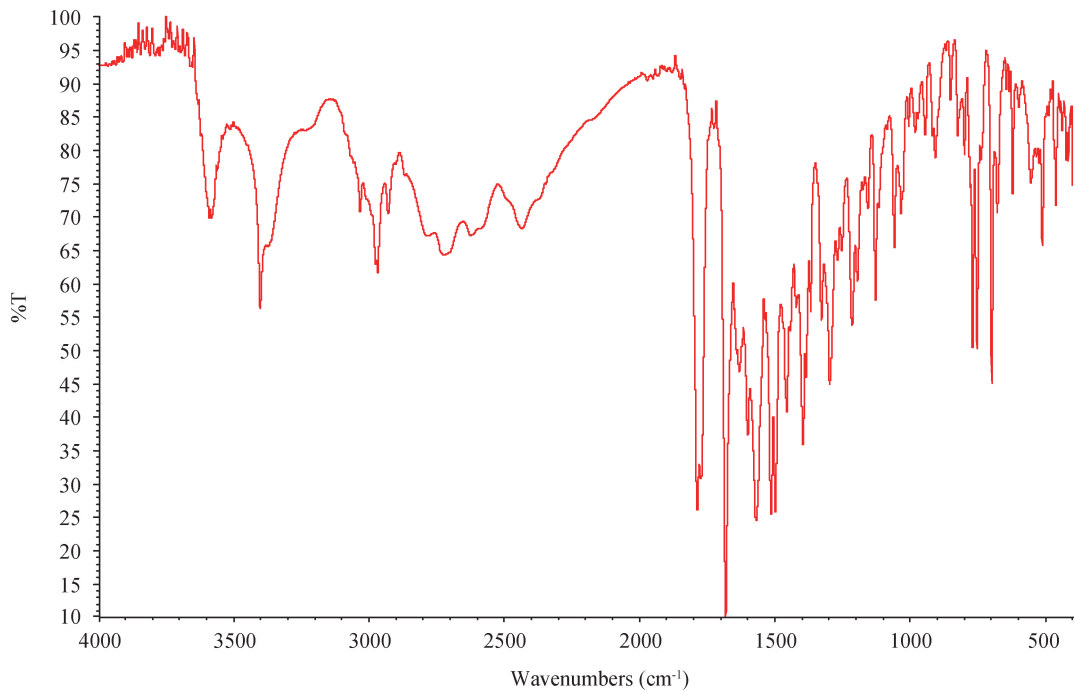


图 5 苄星氯唑西林 USP 对照品红外光谱图

Fig 5 The IR spectrum of benzathine cloxacillin USP reference

2.4 水分测定 取苄星氯唑西林原料,用卡尔·费休法测定其水分含量。结果测得水分分为 3.6%。

2.5 含量均匀性评价 采用 2.6.1 项下的高效液相色谱条件及测定法对本批苄星氯唑西林原料进

行了氯唑西林含量均匀性测试,并采用单因子方差分析法进行了统计检验。将样品等分成 10 份,每份取样 2 次进行测定,样品间自由度为 9,样品内自由度为 10,在约定的自由度水平 $\alpha = 0.05$ 的显著水

平下,计算临界值 $F_{0.05}(9,10)$, 计算结果与查表得到的 F 临界值 $F_{0.05}(9,10) = 3.02$ 比较,若计算值小于 3.02,则表明在 $\alpha = 0.05$ 的显著水平下,样

品含量是均匀的。结果见表 1 ~ 表 2,其统计量 F 为 2.00,小于 3.02,表明本批原料均匀性良好,符合国家对照品研制的要求。

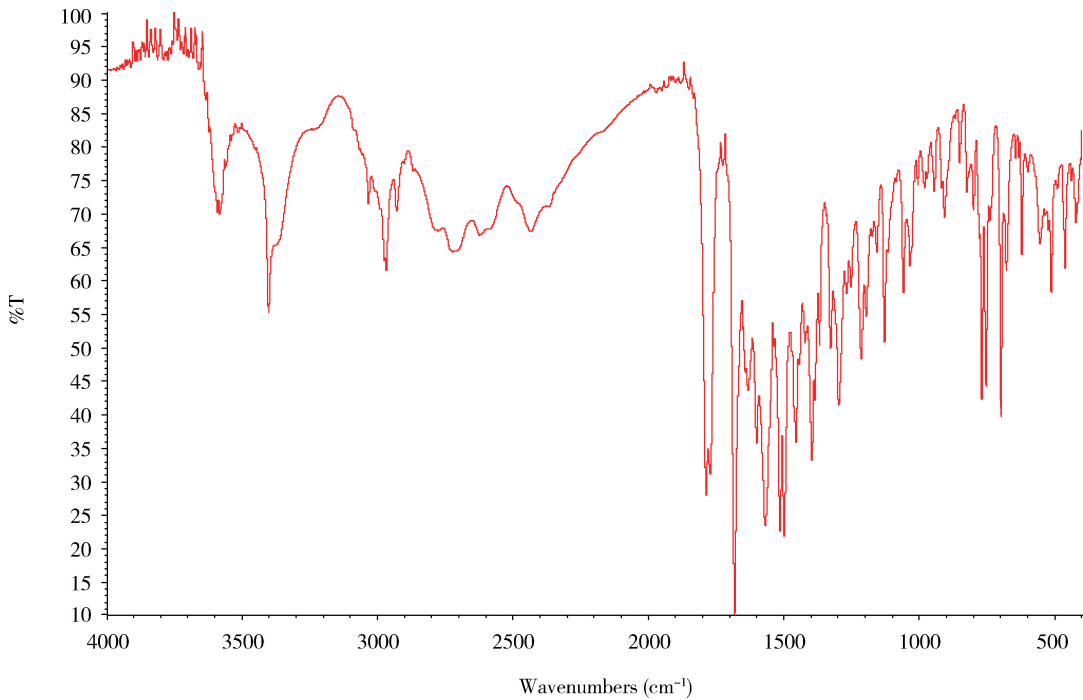


图 6 苄星氯唑西林原料红外光谱图

Fig 6 The IR spectrum of benzathine cloxacillin raw material

表 1 苄星氯唑西林原料氯唑西林含量均匀性结果

Tab 1 The content homogeneity results of cloxacillin

样品号	含量/%		平均含量/%	RSD/%
1	69.48	69.58	69.67	0.4%
2	69.65	69.19		
3	69.64	69.54		
4	69.86	69.80		
5	68.72	69.53		
6	69.96	70.08		
7	69.66	69.83		
8	69.81	69.77		
9	70.10	69.59		
10	69.94	69.59		

表 2 苄星氯唑西林原料均匀性的单因素方差分析结果

Tab 2 Result of one – way analysis of variance for content homogeneity

f_1	f_2	SS_1	MS_1	SS_2	MS_2	F
9	10	1.186	0.132	0.659	0.066	2.00

2.6 含量测定 《兽药标准品、对照品、对照药材质量标准》^[5]中关于化学对照品的基本技术要求中规定供检查用的对照品原料,一般纯度不低于 90.0%。而《中国兽药典》2015 年版一部苄星氯唑西林质量标准中涉及到氯唑西林和二苄基乙二胺两种物质的测定,采用的是两种液相色谱条件,目前没有建立用同一色谱系统同时测定这两种物质的方法,也无其有关物质的相关研究方法,因此拟分别采用氯唑西林和二苄基乙二胺的含量测定液相色谱条件对原料进行测定,确认二者符合质量标准规定即认为该原料符合使用要求。

2.6.1 氯唑西林

2.6.1.1 色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液 – 乙腈 (3 : 1),用磷酸调节 pH 值至 4.6 ± 0.2 为流动相;检测波长 220 nm;柱温 40 ℃。

2.6.1.2 测定法 取本品适量,精密称定,加稀释液(取磷酸二氢钠 3.15 g,加水 450 mL 使溶解,加乙腈 300 mL 混匀,用磷酸或 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.4)溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含氯唑西林 0.1 mg 的溶液,精密量取 10 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图;另取氯唑西林对照品适量,同法测定。按外标法以峰面积计算供试品中氯唑西林的含量。

2.6.1.3 结果 两名检验员各进样 5 份,每份重复进样 2 次。取两人的合并计算值,结果见表 3,色谱图见图 1~图 2。

表 3 苄星氯唑西林原料氯唑西林含量测定结果

Tab 3 The content determination results of cloxacillin

	测定次数	平均含量/%	S	方差 S ²	权重 W	WX
检验员 1	10	69.43	0.1202	0.0144	694.44	482.15
检验员 2	10	69.48	0.1544	0.0238	420.17	291.93

二者加权平均值为 69.45%,按无水物计算,氯唑西林含量为 72.1%。

2.6.2 二苄基乙二胺

2.6.2.1 色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(端基封尾);以 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节 pH 值至 5.1)–乙腈(87:13)为流动相;检测波长为 220 nm。

2.6.2.2 测定法 取本品约 0.1 g,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加稀释液(取磷酸二氢钠 3.15 g,加水 450 mL 使溶解,加乙腈 300 mL 混匀,用磷酸或 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.4)适量,超声溶解,用稀释液稀释至刻度,摇匀,取 10 μ L 注入色谱仪,记录色谱图;另取二苄基乙二胺对照品适量,同法测定。按外标法以峰面积计算供试品中二苄基乙二胺的含量。

2.6.2.3 结果 由一人进行测定,样品平行制备 2 份,每份重复进样 2 次,以 4 次的平均值作为测定值,结果见表 4,色谱图见图 3~图 4。

表 4 苄星氯唑西林原料二苄基乙二胺含量测定结果

Tab 4 The content determination results of dibenzylethylenediamine

进样次数	含量/%	平均含量/%	按无水物计算的平均含量/%
1	19.08		
2	19.52	19.31	20.0
3	19.30		
4	19.36		

按无水物计算,二苄基乙二胺含量为 20.0%。
综上所述,按无水物计算,氯唑西林含量为 72.1%,二苄基乙二胺含量为 20.0%,二者含量之和为 92.1%,符合《中国兽药典》2015 年版一部苄星氯唑西林质量标准的规定。

3 讨论与结论

3.1 质量控制 由于《中国兽药典》2015 年版一部苄星氯唑西林质量标准中采用的是两种液相色谱条件分别对其中的氯唑西林和二苄基乙二胺进行含量测定,并分别报告二者的含量,目前没有建立用同一色谱系统同时测定这两种物质的方法,也无其有关物质的相关研究方法,因此本研究中以二者的含量作为主要质量控制指标。本研究建立的苄星氯唑西林国家对对照品主要供苄星氯唑西林及其制剂红外鉴别用,而要想获得优质的红外光谱,需除去样品中的水分^[6],因此在考察本对照品原料是否符合要求时均按照无水物来计算。

3.2 稳定性监测 药品标准物质的稳定性是标准物质重要的基本性质之一,用来描述标准物质的特性量值随时间变化情况,对照品使用中需要特别注意稳定性问题。长期稳定性是在规定的贮存条件下,在较长周期内定期地进行标准物质特性值的稳定性评估,考察标准物质的特性值保持在规定范围内的能力^[7-8]。根据兽药标准物质研制技术规范要求,今后将对苄星氯唑西林对照品进行长期稳定性考察,第一次考察时间为一年后,以后每年定期测定一次。原则上对氯唑西林及二苄基乙二胺含量进行考察,由一人进行测定,每次测定平行样不

少于两份,按无水物计算,氯唑西林与二苄基乙二胺含量应符合规定。

参考文献:

- [1] 苏晓东. 兽用 β -内酰胺类抗生素的规范使用[J]. 中国畜牧业,2018 (17):84.
- Su X D. Standardized use of veterinary β -lactam antibiotics [J]. China Animal Industry,2018 (17):84.
- [2] 狄良娇,杨树鑫,李文财,等. 苄星氯唑西林乳房注入剂的效果评价[J]. 黑龙江畜牧兽医,2018(5):195-198.
- Di L J,Yang S X,Li W C,*et al.* Evaluation of benzathine cloxacillin intramammary infusion[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine,2018(5):195-198.
- [3] 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 querysystem[OL]. <http://124.126.15.169:8081/cx/>.
- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典一部 2015 年版[S].
- Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Chinese Veterinary Pharmacopoeia, 2015 edition, I volume[S].
- [5] 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].

- [6] 黄瑞娟. 红外光谱技术在食品检测中的应用[J]. 现代测量与实验室管理,2015(1):9-14.
- Huang R J,Application of infrared spectroscopy in food detection [J]. Advanced Measurement and Laboratory Management,2015 (1):9-14.
- [7] 曹丽梅,赵宗阁,马玲云,等. 试论国家药品标准物质的稳定性及期间核查[J]. 中国药事,2012,26(1):5-7.
- Cao L M,Zhao Z G,Ma L Y,*et al.* Discussion on stability of national pharmaceutical reference standards and interval monitoring projects[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2012, 26 (1): 5-7.
- [8] 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)