

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.06.05

阿莫西林系统适用性国家兽药标准物质的研制

韩宁宁,赵富华,王 轩,彭文绣,杨秀玉,戴 青,赵 晖*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022-12-10 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 06-0035-06 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 试验借鉴了中国食品药品检定研究院阿莫西林系统适用性对照品制备工艺,在原工艺基础上进行了优化,增加了酸中和的关键步骤,研制了阿莫西林系统适用性国家兽药标准物质。通过工艺优化,显著提升了样品溶液稳定性;且与中检院的对照品对比,未知杂质明显减少,已知杂质均可清晰定位,尤其是阿莫西林闭环三聚体更易于辨识。本对照品的研制对阿莫西林原料及相关制剂的生产及质量控制具有重要意义。

[关键词] 阿莫西林系统适用性国家兽药标准物质;酸中和;工艺优化

Development of National Veterinary Drug Reference Substance for Amoxicillin System Suitability

HAN Ning - ning, ZHAO Fu - hua, WANG Xuan, PENG Wen - xiu, YANG Xiu - yu, DAI Qing, ZHAO Hui *

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

Corresponding author: ZHAO Hui, E-mail: 171977364@qq.com

Abstract: The preparation process of amoxicillin system suitability reference substance of NIFDC was used for reference, the original process was optimized, and the key step of acid neutralization was added in order to develop national veterinary drug reference substance for amoxicillin system suitability. The stability of the sample solution was significantly improved through process optimization; In addition, compared with the reference substance of NIFDC, the unknown impurities are significantly reduced, and the known impurities could be clearly located, especially the amoxicillin trimer is easier to identify. The preparation of this reference substance is of great significance to the production and quality control of amoxicillin raw materials and related preparations.

Key words: national veterinary drug reference substance for amoxicillin system suitability; acid neutralization; process optimization

阿莫西林是 β -内酰胺类人兽共用抗生素, 《中国兽药典》^[1] 中其有关物质和含量测定方法与

作者简介: 韩宁宁, 副研究员, 从事兽药检验检测与质量标准研究。

通讯作者: 赵 晖, E-mail: 171977364@qq.com

《中国药典》^[2]相同,均采用高效液相色谱,通过采集系统适用性对照品色谱图,观察其与标准图谱是否一致来评价方法的系统适用性。该系统适用性对照品是阿莫西林及其降解产物的混合物,包含阿莫西林、阿莫西林噻唑酸、2',5'-二酮哌嗪-2(R/S)阿莫西林、阿莫西林闭环二聚体、阿莫西林闭环三聚体和其他未知杂质。目前中国食品药品检定研究院(以下简称中检院)有该混合对照品供应。经国家兽药基础数据库查询^[3],国内有数百家兽药企业生产阿莫西林原料及相关制剂,相应产品质量控制的关键项目有关物质和含量测定均需使用阿莫西林系统适用性对照品。经调研,中检院的该对照品存在供货周期长、经常断货等现象,影响了兽用阿莫西林及制剂的日常检验检测。研制阿莫西林系统适用性国家兽药标准物质,对兽用阿莫西林原料及相关制剂的生产及质量控制具有重要意义。本试验借鉴了中检院阿莫西林系统适用性对照品制备工艺^[4],在原工艺基础上进行了优化,增加了酸中和的关键步骤,显著提升了样品溶液稳定性。按照改进后工艺制备的对照品,与中检院的对照品对比,未知杂质明显减少,已知杂质均可清晰定位,尤其是阿莫西林闭环三聚体更易于辨识。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 对照品 以中检院系统适用性对照品作为溯源对照品。

1.1.2 原料 已获得远征药业有限公司阿莫西林钠原料一批,共 250 g。通过将阿莫西林钠原料进行适宜条件的降解获得阿莫西林系统适用性对照品原料。

1.1.3 仪器 高效液相色谱仪(HPLC)(Waters e2695 色谱系统,Empower 2 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 方法

1.2.1 阿莫西林系统适用性对照品制备工艺的优化

1.2.1.1 按照文献工艺降解 将文献工艺同比例

缩小,取阿莫西林钠原料 1.2 g,用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液 8 mL 溶解,60 °C ± 2 °C 30 min 后,得小试液体样品。取上述样品 1 mL,加阿莫西林有关物质流动相 A 74 mL,混匀,得 2 mg/mL 的供试品溶液。采集色谱图,与标准图谱比较。将该溶液 5 °C 放置 24 h 后,再次进样测试稳定性。

1.2.1.2 降解工艺的优化 按照原文献工艺进行反应后,加入等量盐酸进行中和,以使反应终止。改进后的小试工艺为:取阿莫西林钠原料 1.2 g,用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液 8 mL 溶解,60 °C ± 2 °C 30 min 后,加 0.01 mol/L 盐酸溶液 8 mL,混匀,得小试液体样品。取上述样品 1 mL,加阿莫西林有关物质流动相 A 36.5 mL,混匀,得 2 mg/mL 的供试品溶液。采集色谱图,与标准图谱比较。将该溶液 5 °C 放置 24 h 后,再次进样测试稳定性。

1.2.1.3 冻干工艺 照 1.2.1.2 项操作得小试液体样品,加入甘露醇 1.2 g 溶解,冻干。冻干机型号为 Genesis™ 中型冻干机。冻干参数: -50 °C 3 h, -12 °C 24 h, 26 °C 8 h;压力: ≤70 MPa。冻干后立即测定的样品色谱图,与标准图谱比较。将冻干样品 4 °C 保存 3 d 后,再次进样测试稳定性。

1.2.1.4 终产品工艺 取阿莫西林钠原料 30 g,用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液 200 mL 溶解,60 °C ± 2 °C 水浴 30 min 后,加 0.01 mol/L 盐酸溶液 200 mL,加入甘露醇 30 g 溶解,冻干,冻干参数同 1.2.1.3 项。研磨后分装。

1.2.2 溶液稳定性的考察

1.2.2.1 有关物质溶液稳定性的考察 取冻干后固体样品 4 mg,加入阿莫西林有关物质流动相 A [0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(取 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液,用 2 mol/L 氢氧化钾溶液调节 pH 值至 5.0) - 乙腈(99:1)] 2 mL,溶解,混匀,照阿莫西林有关物质项下的色谱条件进样,采集 0 h 色谱图。将上述液体样品置 5 °C 保存 2、4、6、12 h 后进样,采集色谱图,按峰面积归一化法计算各特定杂质峰含量,测试溶液稳定性。

1.2.2.2 含量测定溶液稳定性的考察 取冻干后固体样品 1 mg,加入阿莫西林含量测定流动相 2 mL,

溶解,混匀,照阿莫西林含量测定项下的色谱条件进样,采集0 h 色谱图。将上述液体样品置5℃保存2、4、6、12 h 后进样,采集色谱图,按峰面积归一化法计算各特定杂质峰含量,测试溶液稳定性。

1.2.3 结构确证

1.2.3.1 光谱鉴别 照 1.2.2.1 项配制供试品色谱图,取中检院系统适用性对照品同法配制对照品色谱图,比对上述两色谱图中 4 个特定杂质的纯度和光谱图,以确证二者是否一致。

1.2.3.2 质谱鉴别 采用 ACQUITY H-Class

UPLC/Xevo G2XS QTOF,以 0.1% 甲酸-乙腈(50:50)为流动相,采用 ESI⁺ 离子源进行测定。考察特定杂质的观测分子量是否与理论分子量一致。

2 结果与分析

2.1 阿莫西林系统适用性对照品制备工艺的优化

2.1.1 按照文献工艺降解 降解后样品立即进样,采集色谱图,与标准图谱比较,结果二者一致。但该溶液 5℃放置 24 h 后,大部分阿莫西林降解为阿莫西林噻唑酸。分析为氢氧化钠存在于溶液中,使降解反应在低温下亦可进行(图 1)。

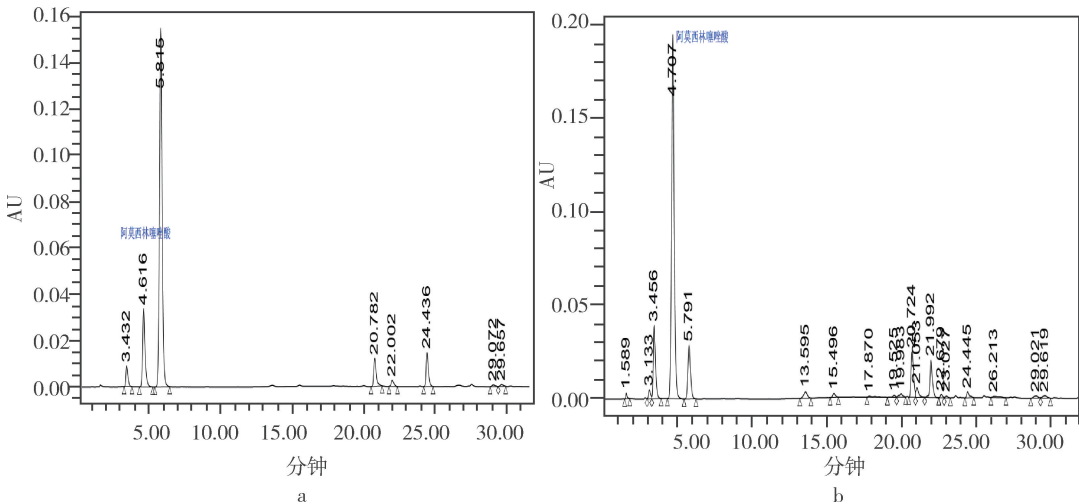


图 1 a:按照文献工艺小试样品色谱图;b:按照文献工艺小试样品 5℃ 24 h 色谱图

Fig 1 a: Chromatogram of bench-scale sample according to the process in the literature;

b: Chromatogram of bench-scale sample at 5℃ for 24 hours according to the process in the literature

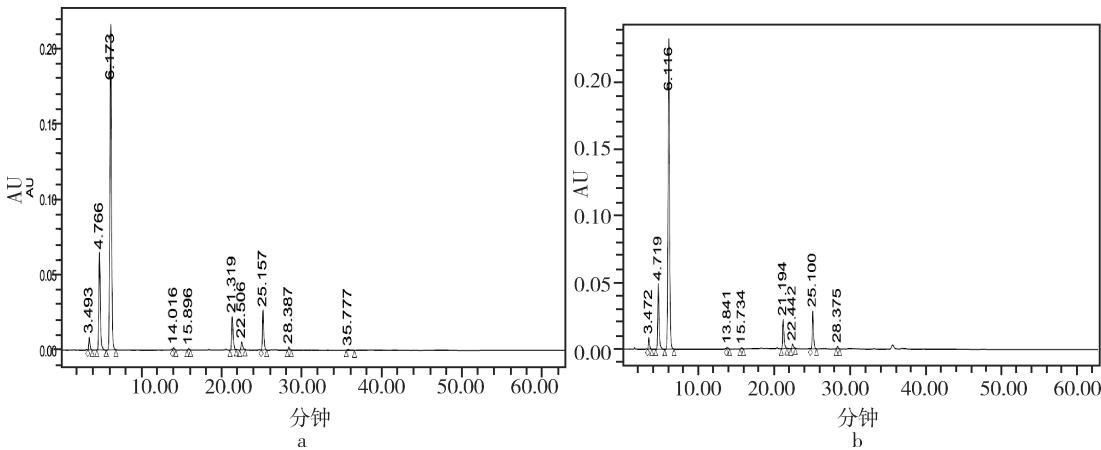


图 2 a:优化工艺后小试样品色谱图;b:优化工艺后小试样品 5℃ 24 h 色谱图

Fig 2 a: Chromatogram of bench-scale sample after optimizing the process;

b: Chromatogram of bench-scale sample at 5℃ for 24 hours after optimizing process

2.1.2 降解工艺的优化 将优化工艺后的小试样品立即进样,采集色谱图,结果与标准图谱一致。该溶液 5 ℃放置 24 h 后,采集的色谱图中各特定杂质所占比例未发生明显变化,溶液稳定性明显改善(图 2)。

2.1.3 冻干工艺 冻干后立即测定的样品色谱图与标准图谱一致。在 4 ℃保存 3 d 的固体样品色谱图与立即测定的色谱图一致。表明上述冻干工艺可基本保证产品稳定。

2.2 溶液稳定性的考察

2.2.1 有关物质溶液稳定性的考察 终产品制备所得的 2 mg/mL 的溶液在 5 ℃放置 12 h 内,各特定杂质峰含量无明显变化,溶液稳定(表 1)。

表 1 有关物质溶液稳定性考察结果

Tab 1 Investigation results of stability of related substance solution

时间 /h	阿莫西林 噻唑酸/%	2'5' - 二酮哌嗪 - 2 (S)阿莫西林/%	二聚体 /%	三聚体 /%
0	4.21	9.35	11.40	1.27
2	4.07	10.00	11.48	1.22
4	4.12	10.07	11.33	1.20
6	4.06	10.07	11.44	1.20
12	4.02	10.05	11.45	1.20

2.2.2 含量测定溶液稳定性的考察 终产品制备所得的 0.5 mg/mL 的溶液在 5 ℃放置 12 h 内,阿莫西林噻唑酸峰含量稍有降低,但仍可保证杂质峰清晰可辨(表 2)。

表 2 含量测定溶液稳定性考察结果

Tab 2 Stability investigation results of content determination solution

	时间				
	0 h	2 h	4 h	6 h	12 h
阿莫西林噻唑酸 百分含量/%	3.90	4.03	3.73	3.33	3.14

2.3 结构确证

2.3.1 光谱鉴别 终产品色谱图中,4 个特定杂质峰的纯度角度均小于纯度阈值,为单一物质峰。PDA 匹配角度均小于 PDA 匹配阈值,与中检院对照品中 4 个特定杂质的光谱图相似(表 3)。

表 3 PDA 光谱图匹配鉴别结果

Tab 3 PDA spectrum match and identification Results

	纯度 角度	纯度 阈值	PDA 匹 配角度	PDA 匹 配角度
阿莫西林噻唑酸	0.392	1.036	1.181	3.048
阿莫西林闭环二聚体	0.131	1.017	2.986	3.038
2'5' - 二酮哌嗪 - 2(S)阿莫西林	0.147	1.018	0.331	3.115
阿莫西林闭环三聚体	0.175	1.188	1.842	4.065

2.3.2 质谱鉴别 特定杂质的测定分子量与理论分子量一致。Q - TOF 测定结果见表 4。

表 4 Q - TOF 测定结果

Tab 4 Q - TOF determination results

	化学式	测定(<i>m/z</i>)	理论(<i>m/z</i>)	质量误差 /mDa
阿莫西林噻唑酸	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₆ S	384.1222	384.1224	-0.2
2'5' - 二酮哌嗪 - 2(S)阿莫西林	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	366.1114	366.1118	-0.4
二聚体	C ₃₂ H ₃₈ N ₆ O ₁₀ S ₂	731.2179	731.2163	1.6
三聚体	C ₄₈ H ₅₇ N ₉ O ₁₅ S ₃	1096.3149	1096.3131	1.8

2.4 标准图谱的比较 将本批对照品与中检院的对照品分别在阿莫西林含量测定和有关物质色谱条件下采集标准图谱,比较发现,二者杂质峰数目与位置基本一致,本批对照品各特定杂质峰高略低,但由于本批对照品除特定杂质外的其他未知杂质较中检院对照品更少,阿莫西林闭环三聚体附近杂峰干扰少,更清晰可辨(图 3)。

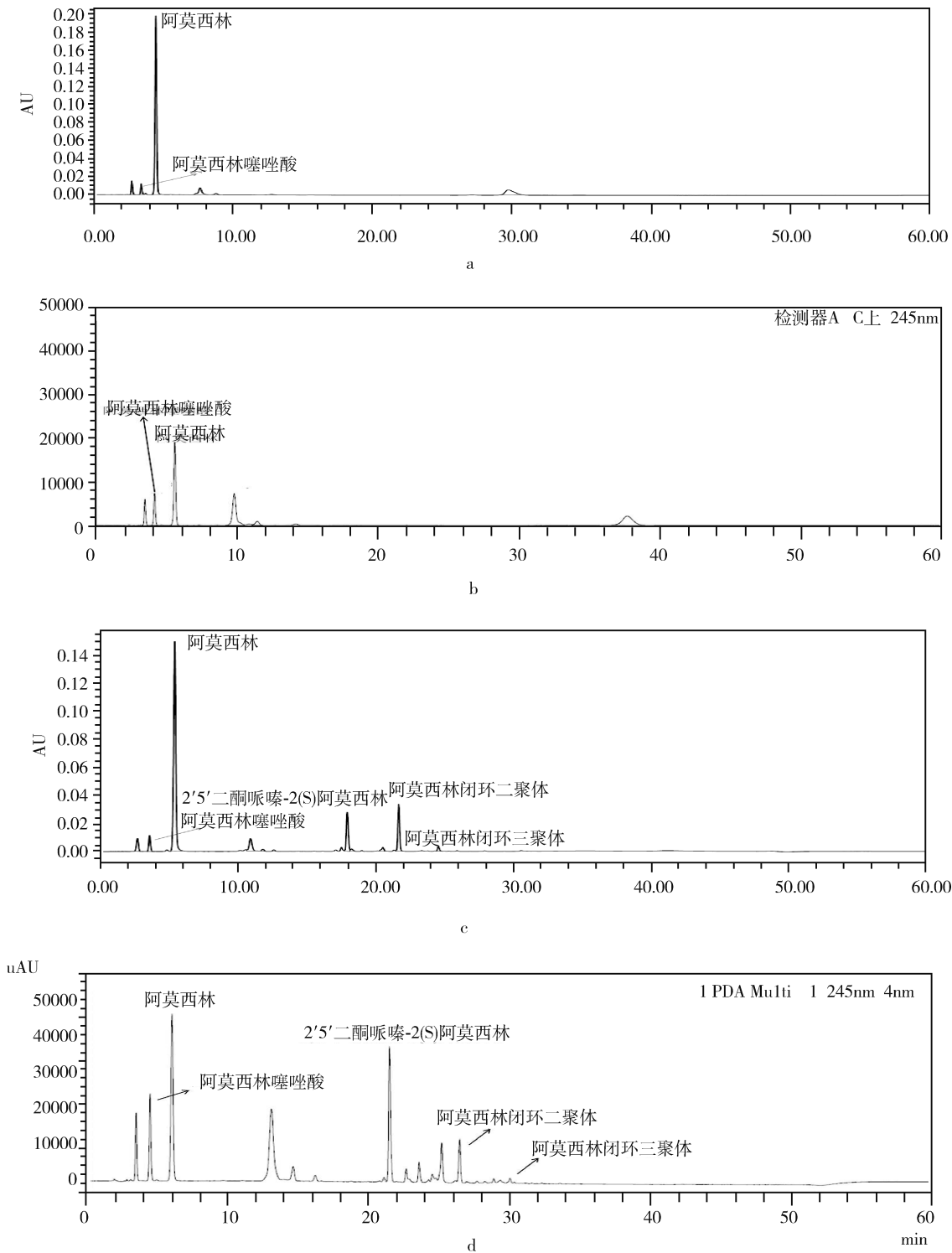


图3 a:本批对照品含量测定标准图谱;b:中检院对照品含量测定标准图谱
c:本批对照品有关物质标准图谱;d:中检院对照品有关物质标准图谱

Fig 3 a: Standard chromatogram for content determination of this batch of reference substance;
b: Standard chromatogram for content determination of reference substance of NIFDC;
c: Standard chromatogram for related substances of this batch of reference substance;
d: Standard chromatogram for related substances of reference substance of NIFDC

3 讨论与结论

阿莫西林系统适用性对照品的研制思路,类似于中药对照提取物^[5],都是采用混合对照品的形式^[6]实现对多个特定成分的定位和定性。化学药品或抗生素的杂质定位,多通过杂质对照品或确定相对保留时间的方式来实现。但杂质对照品往往不易获得或价格昂贵,相对保留时间受不同实验室、色谱柱、仪器等各种因素的影响而极易发生变化^[7-8],导致这两种杂质定位方式都存在各自的弊端。而降解杂质混合对照品,采用 API 原料,根据原料的降解反应途径^[9]而得,解决了杂质原料来源的问题,又可以通过混合对照品实时进样定位,保证了定位的准确性。这种杂质对照品的研制思路可加以推广应用,在其他兽药原料和制剂,尤其是兽医专用原料和制剂的系统适用性检查中发挥作用。

本试验借鉴了中检院阿莫西林系统适用性对照品制备工艺,在原工艺基础上进行了优化,增加了酸中和的关键步骤,通过酸中和中止了降解反应,避免氢氧化钠对阿莫西林进一步产生碱破坏,从而显著提升了样品溶液稳定性,保证了各杂质的量处于相对稳定的比例,提高了标准图谱的可参照性。

另外,由于及时中止了降解反应,使未知杂质的比例也明显减少,对已知杂质定位的干扰降低。尤其是阿莫西林闭环三聚体,中检院对照品的标准图谱中其本身比例较小,且周围杂峰较多,不易辨识。而本批对照品阿莫西林闭环三聚体周围几乎无杂峰干扰,易于辨识。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 阿莫西林[S]. 中华人民共和国兽药典, 一部, 2020 年版.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Amoxicillin[S]. Chinese Veterinary Pharmacopoeia, volume I, 2020.
- [2] 中国药典委员会. 阿莫西林[S]. 中华人民共和国药典, 二部, 2020 年版.

Chinese Pharmacopoeia Commission. Amoxicillin[S]. Chinese Pharmacopoeia, volume II, 2020.

- [3] 国家兽药基础数据库[DB/OL]. <http://vdt.s.ivdc.org.cn:8081/cx/#>.
National veterinary drug basic database [DB/OL]. <http://vdt.s.ivdc.org.cn:8081/cx/#>.
- [4] 李 玮, 张伟清, 李 翔, 等. 阿莫西林、氨苄西林混合降解杂质对照品的研究与应用[J]. 药学报, 2014, 49(9): 1310–1314.
Li W, Zhang WQ, Li X, *et al.* Development and application of reference materials containing mixed degradation products of amoxicillin and ampicillin [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2014, 49(9): 1310–1314.
- [5] 戴 宇, 邓 赟, 宋川霞, 等. 对照提取物的国内外发展研究概况[J]. 中药与临床, 2015, 6(4): 49–53.
Dai Y, Deng Y, Song CX, *et al.* The review of development on reference extracts at home and abroad [J]. *Pharmacy and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2015, 6(4): 49–53.
- [6] 陈 沛, 金红宇, 孙 磊, 等. 对照提取物在中药整体质量控制中的应用[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2): 185–195.
Chen P, Jin HY, Sun L, *et al.* Application of extractive reference substance in holistic quality control of traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(2): 185–195.
- [7] 张伟清, 胡昌勤. 反相 C18 液相色谱柱选择性理论及其应用[J]. 药学报, 2010, 45(5): 555–559.
Chen P, Jin HY, Sun L, *et al.* Application of extractive reference substance in holistic quality control of traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(2): 185–195.
- [8] Vervoort RJM, Debets AJJ, Claessens H A, *et al.* Optimization and characterization of silica – based reversed – phase liquid chromatographic systems for the analysis of basic pharmaceuticals [J]. *J Chromatograph A*, 2000, 897: 1–22.
- [9] Deshpande A D, Baheti K G, Chatterjee N R. Degradation of beta – lactam antibiotics [J]. *Curr Sci*, 2004, 87: 1684–1695.

(编辑:侯向辉)