

国家那西肽标准品的研制与建立

张秀英,陆连寿,温芳,李翠,蒋卉,王在时

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2014-09-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2014) 12-0050-04 [中图分类号] S859.79

[摘要] 阐述了首批国家那西肽标准品的研制与建立。那西肽标准品为黄绿色粉末,质谱法测定分子量为 1220.15,用两种高效液相色谱法测定平均纯度为 94.26%,干燥失重和炽灼残渣的结果为 3.97%和 2.00%,用质量平衡法定值含量为 928 u/mg。

[关键词] 那西肽标准品;纯度;含量

Reparation and Establishment of First National Nosiheptide Standards

ZHANG Xiu-ying, LU Lian-shou, WEN Fang, LI Cui, JIANG Hui, WANG Zai-shi

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

Abstract: This article introduced the method of reparation and establishment for the first national nosiheptide standards. Nosiheptide standards was yellowish-green powder. The molecular weight was 1220.15 by MS. The average purity was 94.26% by HPLC. The result of loss on drying and residue on ignition were 3.97% and 2.00%. The content was 928 u/mg assigned by method of mass balance.

Key words: nosiheptide standards; purity; content

那西肽最早由法国罗纳普朗克公司试生产,后由日本三菱公司对那西肽生产菌进行了选育和试验研究,于 1987 年底被日本批准为法定的饲料添加剂。我国于 1998 年批准为国家三类新兽药,被农业部列为可在饲料中长期添加使用的饲料药物添加剂,对猪、鸡有促进生长和提高饲料转化率的作用^[1-2]。但由于迄今都没有国际或国家那西肽标准品,生产企业没有统一尺度确定那西肽原料和制剂的含量,我国药政药检部门对那西肽类产品也因为缺乏标准品而无法实施质量监督,因此急需研制和建立一批国家那西肽标准品。

1 仪器与材料

1.1 仪器 SYNAPT HDMS 质谱仪;岛津 2010A 高

效液相色谱仪,包括 SPD-M20A 二极管阵列检测器(PDA 检测器),SHIMADZU LC solution 色谱工作站;UV-3010 紫外分光光度计;METTLER XP105 电子天平(感量 0.1mg);DHG-9240 A 型电热恒温鼓风干燥箱;CWF11/5 型高温炉。

1.2 试剂与药品 那西肽标准品原料,浙江汇能动物药品有限公司和江苏奥赛动物药品公司共同制备;乙腈与甲醇为色谱纯;四氢呋喃、氨水、三氯甲烷、磷酸二氢钾与磷酸氢二钾为分析纯;Millipore 去离子水。

2 方法

2.1 分子量测定 ESI 负离子模式,毛细管电压 3 kv,锥孔电压 20 v,离子源温度 120 °C,脱溶剂气

基金项目:“十二五”科技基础性工作专项(2013FY113300-2)

作者简介:张秀英,副研究员,从事兽药检验、标准制修订和标准物质研制方面研究。E-mail:xiu1875@163.com

温度 350 ℃,脱溶剂气流量 800 L/h。取那西肽约 2.5 mg,置 50 mL 量瓶中,加 90%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,上机测试。

2.2 鉴别

2.2.1 紫外-可见分光光度法 取本品约 5 mg,加四氢呋喃 5 mL 使溶解,取上清液 1 mL,加甲醇-氨水(87:13)20 mL,在 405~411 nm 波长范围内测定最大吸收波长。

2.2.2 荧光鉴别 取本品约 10 mg,加三氯甲烷 2 mL 溶解后,置紫外光灯(365 nm)下检视,即显黄绿色荧光。

2.3 酸碱度 取本品 0.1 g,加水 40 mL 溶解后测定。

2.4 干燥失重 按《中国兽药典》干燥失重方法,105 ℃干燥至恒重^[3]。

2.5 炽灼残渣 按《中国兽药典》炽灼残渣方法测定^[3]。

2.6 纯度测定

2.6.1 高效液相色谱法一

2.6.1.1 色谱条件 根据参考文献方法^[4],采用 SHXBJX 苯基柱(200 mm×4.6 mm,5 μm),以乙腈-0.05%磷酸溶液(45:55)为流动相,流速为 1.0 mL/min,检测波长为 332 nm。理论板数按那西肽峰计算不低于 1500,主成分与相邻杂质峰的分度应不小于 1.5。

2.6.1.2 供试品测定 取本品适量,加乙腈适量超声 2 min 使溶解,放冷至室温,再用乙腈稀释至每 1 mL 中约含 50 μg 那西肽的溶液,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。按峰面积归一化法计算纯度。该方法由两人分别测定,取 5 份以上样品,每份样品重复测定 2 次。

2.6.2 高效液相色谱法二

2.6.2.1 色谱条件 根据参考文献方法^[5],采用 YMC Pro C18(250 mm×4.6 mm,5 μm,80 Å)色谱柱,以 pH 5.6 磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钾 8.91 g 和磷酸氢二钾 0.87 g,加水 1000 mL 使溶解,摇匀,即得)-乙腈-甲醇(54:43:3)为流动相,流速为 0.7 mL/min,检测波长为 330 nm。理论板数按那西肽峰计算不低于 1500,主成分与相邻杂质峰的分度应不小于 1.5。

2.6.2.2 供试品测定 取本品适量,用流动相超声

2 min 使溶解,放冷至室温,再用流动相稀释制成每 1 mL 中约含 50 μg 那西肽的溶液,精密量取 20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍。按峰面积归一化法计算纯度。取 5 份以上样品,每份样品重复测定 2 次。

2.7 含量定值 按质量平衡法进行定值^[6-7]。在无溯源对照品的计算下,计算一种对照品的含量是 100% 减去干燥失重的含量,减去无机杂质(炽灼残渣的量),再乘以所测定的纯度含量,作为该批对照品的含量。

3 结果

3.1 分子量 测得最高峰离子(负离子)结果为 1220.15(图 1)。根据那西肽分子式,负离子模式下那西肽最高峰丰度理论计算值为 1220.15(质谱仪自动计算),测定结果与理论值一致。

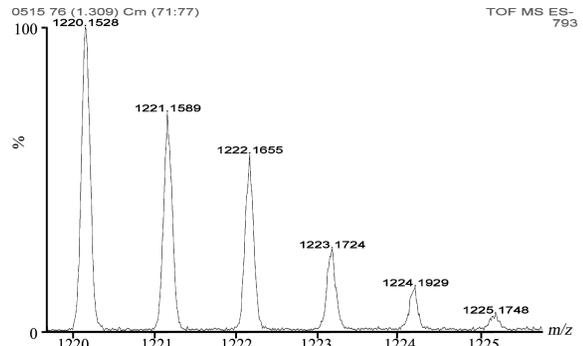


图 1 那西肽质谱图

3.2 鉴别

3.2.1 紫外-可见分光光度法 在 407~408 nm 波长处有最大吸收。三次测定的最大吸收波长分别为:407、408 和 407.5 nm,见图 2。

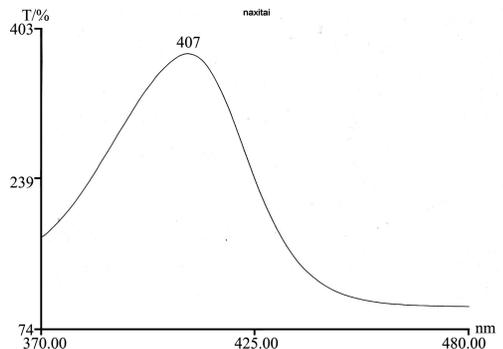


图 2 那西肽紫外吸收光谱图

3.2.2 荧光鉴别 结果显黄绿色荧光,呈正反应。

3.3 酸碱度 二次测定的酸碱度结果分别为 7.15 和 7.06,平均值为 7.1。

3.4 干燥失重 两人的测定结果分别为 3.94% 和 4.00%,平均值为 3.97%。

3.5 炽灼残渣 两人的测定结果分别为 2.02% 和 1.99%,平均值为 2.00%。

3.6 纯度测定

3.6.1 高效液相色谱法一 第一人测定主峰纯度为 94.28%,*RSD* 为 0.2%,主峰前后相邻两个副峰的纯度和为 5.17%;第二人测定主峰平均纯度为 94.71%,*RSD* 为 0.2%,主峰前后相邻两个副峰的纯度和为 4.90%;具体结果见表 1。两人间的相对偏差为 0.2%。液相色谱图见图 3。

3.6.2 高效液相色谱法二 测定主峰平均纯度为 94.01%,*RSD* 为 0.3%,主峰前后相邻两个副峰的纯度和为 5.41%,具体结果见表 1。液相色谱图见图 4。

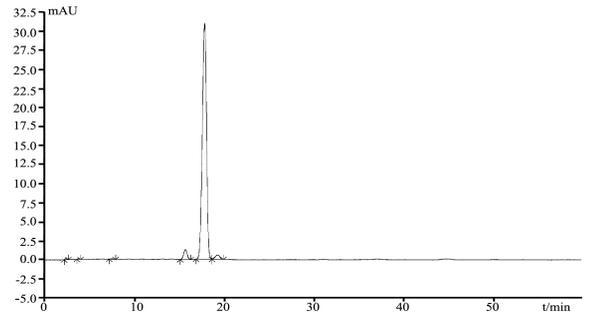


图 3 那西肽纯度测定方法一液相色谱图

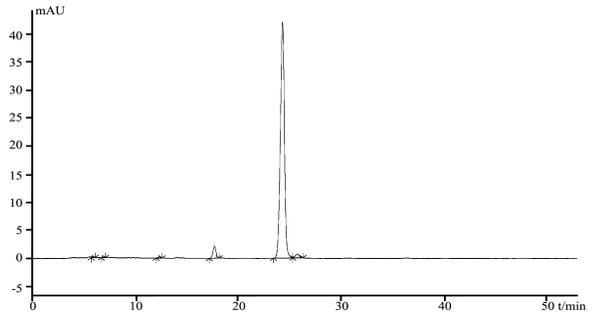


图 4 那西肽纯度测定方法二液相色谱图

表 1 纯度测定结果

方法	测定人	那西肽组分	测定结果/%							平均	<i>RSD</i>
			1	2	3	4	5	6	7		
方法一	甲	主峰	94.15	94.54	93.99	94.13	93.96			94.28	0.2
			94.58	94.35	94.46	94.43	94.22				
		副峰	5.14	5.01	5.38	5.21	5.33	/	/	5.17	
	乙	主峰	94.65	94.54	94.58	94.94	94.63	94.48		94.71	0.2
			94.82	94.71	94.65	94.99	94.97	94.55			
		副峰	4.82	4.90	5.06	4.70	5.01	5.13	/	4.90	
方法二	甲	主峰	94.38	93.99	93.64	94.27	94.16	93.99	93.67	94.01	0.3
			94.57	94.26	93.44	93.97	94.07	94.03	93.70		
		副峰	4.75	5.46	5.49	5.49	5.32	5.51	6.07	5.41	
			4.83	5.09	5.62	5.48	5.39	5.27	6.03		

3.7 含量定值 标准品的含量($\mu\text{g}/\text{mg}$) = $[1 - \text{干燥失重}(\%) - \text{炽灼残渣}(\%)] \times \text{纯度}(\%) \times 1000 \mu\text{g}/\text{mg}$, 这里纯度按两种方法测定的平均总纯度(以主峰和按相对活性因子换算后副峰的纯度和)计算, 含量为 928 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

4 讨论

本批那西肽标准品原料为黄绿色粉末。但在

我国兽药质量标准中规定那西肽为浅黄绿褐色或黄绿褐色粉末, 有特异气味。这是因为那西肽原料未完全精制, 含有的一些发酵副产物使颜色变为褐色。据文献报道, 那西肽纯品应是黄绿色物质, 呈粉末状或细针状结晶。两家公司提供的原料候选物均为黄绿色。

本批制备的那西肽标准品为我国首批制备的

国家标准品,目前国际上也尚无同类标准品。为了准确测定那西肽的纯度,应考虑用两种不同原理的方法进行纯度测定,但由于那西肽熔融时同时分解,无法用差示扫描量热法测定那西肽的纯度,因此建立了两种不同色谱条件的 HPLC 方法,并采用两种不同原理的色谱柱进行纯度测定,以排除单一液相色谱条件测定的局限性。

那西肽具有生物活性,在兽药质量标准中用微生物法测定那西肽的含量。原则上生物效价标准品的定值应可溯源,但该产品的原始研发厂目前已不生产,该产品的主要生产地集中在中国,因此在无溯源标准品的情况下,根据抗生素标准品的定值理论进行定值,那西肽为单一成分的化合物,理论上应只按单一组分对该批那西肽标准品定值,我们用该方法定值的标准品测定了两个企业 22 批样品,结果将导致市场上的产品含量下降约为 8.6~13.1%。从液相色谱图上可看出,在主成分前后各有一个副产物峰,目前兽药质量标准是用生物效价计算总含量^[9],主峰和副产物峰均有一定的生物活性^[8],沿袭至今的定值方法是将副产物的生物活性也考虑在内。因此最后本批标准品以主峰与副产物的总活性进行定值,用该方法定值的标准品测定了上述 22 批样品,测定的产品测定结果均在标示量范围内。

本批标准品同时按质量平衡法对那西肽主成分进行了含量定值。根据质量平衡法原理,标准品含量(%) = [100% - 水分(%) - 残留溶剂(%) - 无机杂质(%)] × 纯度(%), 当用干燥失重方法可将标准品中的水分和残留溶剂全部挥发出来并使供试品达到恒重时,本公式中的水分和残留溶剂的测定结果可用干燥失重结果代替。由于那西肽标准品的原料采用甲醇进行精制,甲醇沸点为 64.7 °C, 在 105 °C 能全部挥发出去,试验证明那西肽对照品在该温度能很快干燥至恒重,说明水分和有机溶剂能

完全挥发,可用干燥失重结果代替水分和残留溶剂的测定。因此那西肽含量(%) = [100% - 干燥失重(%) - 无机杂质(%)] × 纯度(%) = (100% - 3.97% - 2.00%) × 94.26% = 88.63%。赋值结果为按 C₅₁H₄₃N₁₃O₁₂S₆ 计,含量为 88.6%。另对主成分定值主要是考虑到企业已改用高效液相色谱法测定那西肽的含量,用主成分定值的含量更能准确反映那西肽产品的质量。

那西肽为硫多肽类抗生素,比较不稳定,为了确定温度对标准品稳定性的影响,试验取标准品原料进行了 60 °C 高温试验,分别在 0、5 和 10 d 时测定,那西肽主峰纯度分别为 94.58%、94.28% 和 94.20%,纯度略有下降,但基本稳定,因此可按照抗生素标准品的常规贮存条件在 5 °C 以下保存。

参考文献:

- [1] 沈顺新,任银娥. 那西肽对猪生长性能的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(11): 151-152.
- [2] 孙小青,宋代军. 那西肽的饲用性质及其应用[J]. 饲料研究, 2007(12): 36-38.
- [3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二〇一〇年版一部[S].
- [4] 段红,翟科峰,刘瑞华,等. HPLC 测定那西肽预混剂中那西肽的含量[J]. 光谱实验室, 2012, 29(2): 836-839.
- [5] 张秀英,陆连寿,温芳,等. 高效液相色谱法测定那西肽的纯度[J]. 中国兽药杂志, 201347(7): 22-24.
- [6] General guide lines for the establishment, maintenance, and distribution of chemical reference substances.
- [7] 胡昌勤,成双红. 抗生素生物标准品的确定[J]. 中国药事 2001(15)4: 263-266.
- [8] 那西肽制品生物效价含量的高效液相色谱(HPLC)检测方法[P].
- [9] 中国兽药典委员会. 那西肽. 兽药国家标准(化学药品、中药卷)第一册[S].

(编辑:陈希)