

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.03.11

加米霉素对照品标定方法的建立

张 聪¹, 姚路路¹, 侯 林¹, 樊丽博¹, 杨会鲜¹, 周德刚¹, 张晓会^{2*}

(1. 国家兽药工程技术研究中心, 河南洛阳 471000; 2. 洛阳惠中兽药有限公司, 河南洛阳 471000)

[收稿日期] 2018-12-10 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 03-0067-05 [中图分类号] S859.796

[摘 要] 建立了加米霉素对照品的标定方法。采用紫外光谱、红外光谱、核磁共振波谱、质谱和 X 射线单晶衍射进行结构确认, 高效液相色谱法进行纯度检查, 质量平衡法进行定量分析, 并采用定量核磁技术对赋值结果进行验证。结果显示, 加米霉素对照品原料纯度为 99.9%; 质量平衡法赋值结果为 98.8%, 定量核磁共振法验证结果为 98.3%。加米霉素对照品原料定量赋值结果准确、可靠, 能够用于加米霉素原料及制剂的鉴别和含量测定。

[关键词] 加米霉素; 对照品标定; 结构确证; 质量平衡法; 定量核磁共振

Establishment of Chemical Reference Substance of Gamithromycin

ZHANG Cong¹, YAO Lu-lu¹, HOU Lin¹, FAN Li-bo¹, YANG Hui-xian¹, ZHOU De-gang¹, ZHANG Xiao-hui^{2*}

(1. National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang, Henan 471000, China;

2. Luoyang Huizhong Veterinary Medicine Co., Ltd, Luoyang, Henan 471000, China)

Corresponding author: ZHANG Xiao-hui, E-mail: 13592030440@163.com

Abstract: To establish chemical reference substance of gamithromycin, the structure of the candidate material was characterized by ultraviolet-visible (UV), infrared (IR), nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectrum and x-ray single crystal diffraction. Its chromatographic purity was determined by HPLC. The results of qualitative identification of gamithromycin was 99.9%. The assigned value by mass balance method was 98.8%, in accordance with that obtained by quantitative NMR (98.3%). The structure and purity of the gamithromycin material met the requirements of CRS for assay. The accuracy of the assigned value obtained by mass balance method was accurate and reliable. Thus the gamithromycin material can be used for quality control.

Key words: gamithromycin; substance calibration; structural characterization; mass balance method; quantitative NMR

加米霉素是法国梅里亚公司开发研制的新一代半合成十五元氮杂环大环内酯类抗菌药物, 其注射液于 2017 年通过农业部进口兽药注册在我国上

市销售, 用于治疗 and 预防由溶血性曼氏杆菌、多杀性巴氏杆菌、睡眠嗜组织菌等主要病原菌引起的牛呼吸系统疾病^[1]。目前国内有多家单位开展加米

作者简介: 张 聪, 硕士, 从事新兽药质量研究。

通讯作者: 张晓会。E-mail: 13592030440@163.com

霉素及注射液的仿制研究^[2-4],但加米霉素法定对照品在国际和国内并无单位提供,干扰了加米霉素原料及其注射液的质量控制,本文研究建立了加米霉素对照品的标定方法,为其对照品的标定提供技术依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱系统(Waters e2695 型 HPLC;2998 型 PDA 检测器;Empower 3 色谱工作站软件),美国 Waters 公司;XBridge C18 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),美国 Waters 公司;AB265-S 电子分析天平,梅特勒托利多公司;Seven easy 型酸度计,梅特勒托利多公司;GZX-9070MBE 型电热鼓风干燥箱, SX2-2.5-10 型箱式电阻炉,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;磷酸氢二钠、磷酸为分析纯;甲醇、乙腈为色谱纯;水为超纯水。

1.2 试药 加米霉素对照品原料,由洛阳惠中兽药有限公司制备。

2 方法与结果

2.1 结构确证

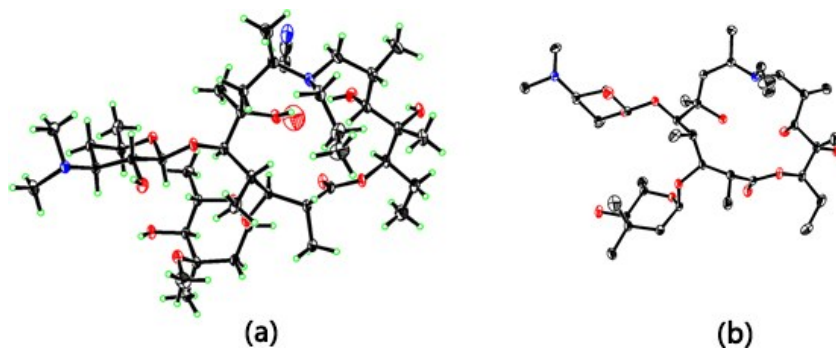
2.1.1 采用紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、质谱(MS)、核磁共振波谱(NMR)对加米霉素原料进行结构确认 测试方法及条件:UV 测定,供试品用乙醇溶解,浓度为 0.011 mg/mL,扫描范围 190~400 nm;IR 测定,采用 KBr 压片法,供试品与 KBr 的比例约

为 1:200;¹H-NMR 测定为 500 MHz,¹³C-NMR 测定为 500 MHz,供试品采用 CDCl₃ 溶解;MS 测定,离子化方式为 ESI⁺。

结构确认结果如下:UV λ_{max}:204 nm;IR ν:3534、2969、2937、2876、2831、2795、1735、1637、1458、1421、1380、1349、1295、1279、1249、1166、1135、1109、1094、1075、1058、1016、1004、983 cm⁻¹;ESI-MS *m/z*:777.54 [M+H]⁺; ¹H NMR(CDCl₃):δ 0.89, 0.98, 0.99, 1.08, 1.22, 1.30, 1.54, 1.70, 1.91, 2.01, 2.30, 2.74, 3.01, 3.14, 3.29 3.55, 3.62, 4.08, 4.23, 4.38, 5.00。¹³C NMR(CDCl₃):δ 177.60, 105.09, 96.47, 77.92, 77.30, 7.05, 76.79, 75.31, 74.27, 72.79, 70.39, 69.23, 65.60, 64.97, 59.27, 49.37, 46.87, 42.48, 40.37, 34.97, 32.53, 28.95, 22.06, 21.55, 21.16, 17.82, 16.02, 15.23, 14.54, 12.92, 12.09, 11.35。以上数据与文献^[3,5]报道数据一致,表明对照品原料化学结构与加米霉素相同。

2.1.2 采用 X 射线单晶衍射法对加米霉素原料进行结构确认 单晶培养条件:取对照品原料 0.1 g,置洁净容器内,加乙腈溶解,室温放置,缓慢挥发溶剂至晶体长成。

对照品原料 X 射线单晶衍射测定结构单元见图 1,绝对构型与加米霉素相同。



a 含溶剂的结构单元 b 去除氢的结构单元

a Structural Unit Containing Solvents b Structural unit for hydrogen removal

图 1 对照品原料结构单元

Fig 1 Structure Unit of reference material

2.2 HPLC 纯度检查

2.2.1 色谱条件 参考欧洲药典 EP8.0 版阿奇霉素有关物质检查方法^[6] 并进行优化,采用 Waters XBridge C18(250 mm×4.6 mm 5 μm) 色谱柱;流动相 A 为 0.01 mol/L 磷酸氢二钠溶液(稀磷酸调 pH 值至 8.9)-甲醇-乙腈(90 : 2.5 : 7.5),流动相 B 为 0.01 mol/L 磷酸氢二钠溶液(稀磷酸调 pH 值至 8.9)-甲醇-乙腈(28 : 18 : 54),线性梯度洗脱,柱

温 30 ℃;流速为 1.0 mL/min,检测波长为 205 nm。
2.2.2 供试品测定 称取对照品原料适量,加稀释液[1.73 g/L 磷酸二氢铵溶液(氨水调 pH 值至 10.0)-甲醇-乙腈(35 : 35 : 30)]溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 10 mg 的溶液,作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。扣除保留时间 4 min 前的溶剂色谱峰,按峰面积归一化法计算纯度,结果见图 2 和表 1。

表 1 纯度测定结果
Tab 1 The results of purity test

编号 No.	1	2	3	4	5	6	平均值 mean	RSD/%
纯度/% Purity	99.93	99.93	99.94	99.94	99.93	99.93	99.93	0.01

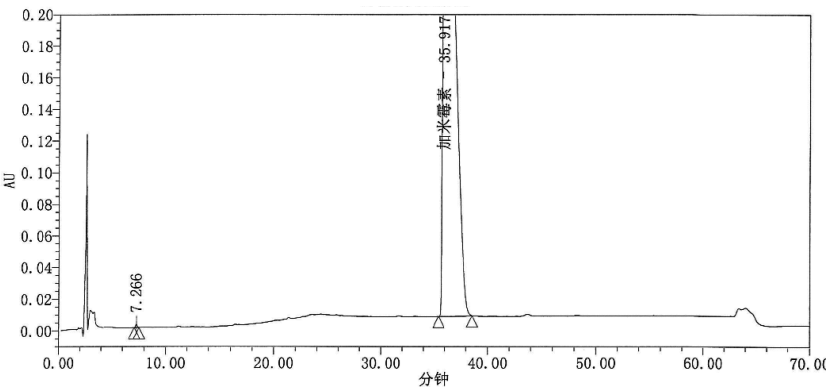


图 2 对照品原料纯度测定色谱图
Fig 2 The chromatogram of reference material Purity test

2.3 干燥失重 按《中国兽药典》2015 年版一部^[7]干燥失重测定法(附录 0831)测定,结果见表 2。
2.4 炽灼残渣 按《中国兽药典》2015 年版一部^[7]炽灼残渣测定法(附录 0841)测定,结果见表 3。

表 2 干燥失重测定结果

Tab 2 The results of Loss on drying

编号 No.	1	2	平均值 mean
结果 Result	1.06%	1.04%	1.05%

表 3 炽灼残渣测定结果

Table 3 The results of residue on ignition

编号 No.	1	2	平均值 mean
结果 Result	0.095%	0.098%	0.10%

2.5 定量赋值 加米霉素对照品原料定值采用国际通用的质量平衡法确定含量,同时采用定量 NMR 技术对质量平衡法赋值准确性进行验证。
2.5.1 质量平衡法赋值结果 含量(%) = 纯度×

$(1 - \text{干燥失重} - \text{炽灼残渣}) \times 100\%$, 结果为 $99.93\% \times (1 - 1.05\% - 0.10\%) \times 100\% = 98.8\%$ 。

2.5.2 定量 NMR 法验证结果 依据《中国药典》2015 年版四部^[8]通则 0441 核磁共振波谱法, 试验

采用内标法, 以马来酸作为内标, 样品用氘代乙醇溶解后, 以加米霉素 1H 谱中的 2.66(3H) 信号峰与内标物 1H 谱中的 6.26(1H) 信号峰(图 3) 计算供试品的含量, 定量 NMR 法含量测定结果为 98.3%。

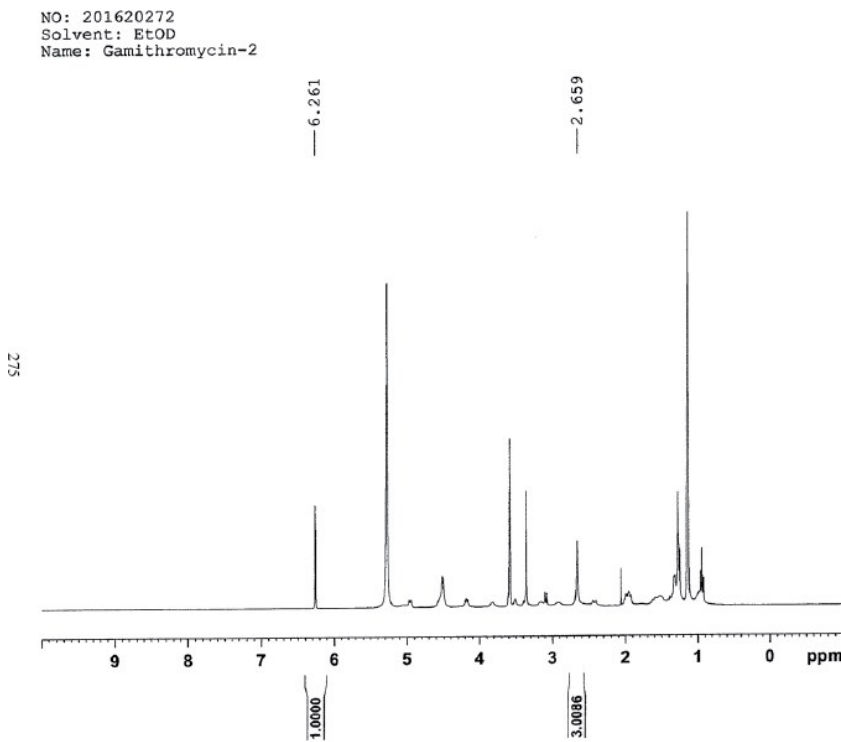


图 3 加米霉素定量核磁共振光谱图

Fig 3 The spectrogram of Quantitative nuclear magnetic resonance

2.6 对照品原料稳定性考察 加米霉素对照品原料, 用安瓿瓶分装, 50 mg/瓶, 放入药品稳定性试验箱中, 在 $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $75\% \pm 5\%$ 条件下放置

6 个月, 分别于第 1、2、3、6 月取样, 对样品性状、熔点、纯度进行检查, 结果见表 4。

表 4 稳定性考察结果

Tab 4 The results of stability investigation

考察项目 Inspect item	0 月	1 月	2 月	3 月	6 月
性状 Character	白色结晶性粉末	白色结晶性粉末	白色结晶性粉末	白色结晶性粉末	白色结晶性粉末
熔点/ $^\circ\text{C}$ Melting point	174.8~176.2	175.3~176.5	174.4~176.3	175.1~176.4	175.0~176.3
纯度/% Purity	99.93	99.92	99.92	99.92	99.92

3 讨论与结论

3.1 加米霉素结构确证 加米霉素为十五元氮杂环大环内酯类化合物,化学结构中具有较多的手型碳原子,因此,单纯采用核磁共振方法难以确定每个手型中心的绝对构型,本研究通过溶剂结晶方法培养得到加米霉素单晶,采用 X-射线单晶衍射方法对加米霉素的绝对构型进行了测定。

3.2 质量平衡法赋值 本研究按质量平衡法对本批加米霉素对照品原料进行了含量定值^[9]。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^[10]。加米霉素对照品原料最后采用丙酮-水系统进行精制,在 105℃能全部挥发出去,试验证明加米霉素对照品原料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。

3.3 含量定值 为了准确标定加米霉素对照品原料的含量,采用了两种不同原理的方法进行测定。由于原研公司加米霉素质量标准并未公开,根据其结构特征,参考泰拉霉素质量标准^[11]及各国家阿奇霉素药典标准^[6,12],本研究建立了加米霉素 HPLC 纯度检测方法,并对采用的方法进行了方法学验证,以确保纯度检测结果的准确性。结果表明质量平衡法结果与定量 NMR 法结果相对偏差为 0.3%,两种方法标定结果一致。

本批加米霉素对照品原料的结构鉴定结果与其结构相符合,纯度大于 99%(HPLC 法),证明该批原料可以用于加米霉素对照品的制备。采用质量平衡法测得的加米霉素对照品原料含量为 98.8%,用定量 NMR 法测得的结果为 98.3%,两种方法测定结果差异较小,说明本批加米霉素对照品原料赋值结果准确,可作为加米霉素原料及其制剂研制过程中对照品使用。

科学, 2016, 44(31): 150-152.

Yang X Y, Hou L, Zhou D G. Research Progress of Gamithromycin[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(31): 150-152.

[2] 江志尧. 加米霉素及中间体的合成与抑菌活性研究[D]. 重庆:重庆大学, 2010.

Jiang Z Y. Research on the synthesis and Antibacterial Activity of Gamithromycin and it's Intermediate[D]. Chongqing: Chongqing University, 2010.

[3] 于丽佳. 加米霉素的合成与工艺路线研究[D]. 上海:中国农业科学院上海兽医研究所, 2012.

Yu L J. Study on the synthesis route of Gamithromycin[D]. Shanghai: Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012.

[4] 张茜茜, 邓菲, 路美玉. 加米霉素注射液特殊安全性试验研究[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(5): 63-71.

Zhang Y Q, Deng F, Lu M Y. Special Safety Research of Gamithromycin Injection [J]. Chinese Journal of Veterinary drug, 2018, 52(5): 63-71.

[5] Z·门德斯, A·C·S·汉黎奎斯, W·赫吉. 合成大环内酯化合物的方法[P]. CN102239174A. 2011-11-09.

Method for synthesizing macrolide compounds[P]. CN102239174A. 2011-11-09.

[6] 欧洲药品监督管理局. 欧洲药典 8.0 版[S].

European Directorate for Quality Medicines. European Pharmacopoeia 8.0 [S].

[7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版一部[S].

Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China 2015[S].

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版四部[S].

Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China 2015 [S].

[9] WHO. General guidelines for the establishment, maintenance, and distribution of Chemical reference substances [S].

[10] 张秀英, 陆连寿, 温芳, 等. 国家那西肽标准品的研制与建立[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(12): 50-53.

Zhang X Y, Lu L S, Wen F. Reproduction and Establishment of First National Nosiheptide Standards [J]. Chinese Journal of Veterinary drug, 2014, 48(12): 50-53.

[11] 农业部兽药评审中心. 兽药质量标准汇编(2006-2011 年)[S].

The ministry of agriculture veterinary drug evaluation center. Veterinary drug quality standards (2006-2011 年)[S].

[12] 英国药品委员会. 英国药典 2009[S].

British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia 2009 [S].

参考文献:

[1] 杨新艳, 侯林, 周德刚. 加米霉素的研究进展[J]. 安徽农业

(编辑:侯向辉)