

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.03.08

酒石酸沃尼妙林的制备和评价

朱馨乐, 徐士新*, 赵琪, 黄耀凌, 李建, 赵晖, 李丹, 孙雷

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2019-02-18 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 03-0047-07 [中图分类号] S859.796

[摘要] 制备了一种新型有机酸盐酒石酸沃尼妙林。通过扫描电子显微镜和 X-衍射对其物理化学性质进行研究。结果表明:酒石酸沃尼妙林具结晶性,盐酸沃尼妙林是无定形的。稳定性试验表明:光照 60 d,酒石酸沃尼妙林含量减少 3.5%,而盐酸沃尼妙林降幅为 18.2%;酒石酸沃尼妙林表现出比盐酸沃尼妙林更优的抗湿性,在 65%和 78%的湿度条件下放置 2 d,酒石酸沃尼妙林和盐酸沃尼妙林的吸水量分别为 1.30%,1.40%和 4.50%,9.71%。体外抗菌敏感性试验表明上述 2 种盐的抗菌效果相同。酒石酸沃尼妙林对光照和湿度的稳定性将有利于其有效应用在兽医临床领域。

[关键词] 酒石酸沃尼妙林; 结晶; 稳定性; 抗菌活性; 应用

Preparation and Evaluation of Valnemulin Hydrogen Tartrate

ZHU Xin-le, XU Shi-xin*, ZHAO Qi, HUANG Yao-ling, LI Jian, ZHAO Hui, LI Dan, SUN Lei

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

Corresponding author: XU Shi-xin, E-mail: xushixin1963@hotmail.com

Abstract: A novel organic acid salt: valnemulin hydrogen tartrate was prepared. Its physicochemical properties were studied by scanning electron microscopy (SEM) and powder X-ray diffraction (XRD). The results indicated that valnemulin hydrogen tartrate was crystalline whereas valnemulin hydrochloride was amorphous pattern. The stability studies showed that after sunlight irradiation for 60 days, the content of valnemulin hydrogen tartrate decreased only 3.5%, whereas valnemulin hydrochloride decreased 18.2%. Meanwhile, valnemulin hydrogen tartrate showed better anti-relative humidity (RH) ability than valnemulin hydrochloride. Under conditions of 65% and 78% RH for 2 days, the water absorption values of valnemulin hydrogen tartrate were 1.30% and 1.40%, whereas those of valnemulin hydrochloride were 4.50% and 9.71%, respectively. Finally, antimicrobial susceptibility test manifested that the above two salts of valnemulin exhibited similar antibacterial activity. The decreased hygroscopicity and improved photostability of valnemulin hydrogen tartrate will be beneficial for its effective application in veterinary clinical fields.

基金项目: 国家重点研发计划; 耐药菌防控新制剂和投药新技术研究 (2016YFD0501306)

作者简介: 朱馨乐, 博士, 副研究员, 从事晶型药物、抗菌药物筛选及兽药安全评价研究。

通讯作者: 徐士新。E-mail: xushixin1963@hotmail.com

Key words: valnemulin hydrogen tartrate; crystalline; stability; antibacterial activity; application

沃尼妙林(Valnemulin)是 20 世纪 90 年代中期正式上市的一种动物专用抗生素,属第二代截短侧耳素类(Pleuromutilin)半合成抗生素^[1-3]。具有毒性低、抗菌活性强、抗菌谱广、代谢快、不易产生耐药菌株、不易导致体内药物蓄积残留等优点,主要用于猪、牛、羊及家禽的支原体病和革兰氏阳性菌感染疾病的防治^[4-8]。1999 年欧共体批准沃尼妙林用于预防与治疗猪痢疾钩端螺旋体感染引起的和由肺炎支原体感染引起的猪地方性肺炎,2004 年,批准预防由结肠菌毛样短螺旋体感染引起的猪结肠螺旋体病和治疗由细胞内劳森菌感染引起的猪增生性肠病。沃尼妙林以盐酸沃尼妙林盐形式应用在兽医临床领域,但盐酸沃尼妙林极易水解,对温度和光照敏感,储存稳定性较差,需采用流化床工艺制备成颗粒剂使用,在制粒过程中会有 1/3~1/2 的有效成分损失^[9-10]。在动物口服给药时,由于适口性差、刺激性强而影响采食,不利于达到预期的治疗效果^[11-12]。因此,急需开发新的适用于兽医临床的应用形式。

本研究提出了一种沃尼妙林酒石酸盐的制备方法,理化性质研究表明酒石酸沃尼妙林有良好的晶形,性质稳定,易于储存;生产制剂时,不需专用的高温高压设备,通过与饲料简单混合即可制成预混剂,而且在制备过程中能避免有效成分的损失;在口服时,晶态盐由于改良了适口性而更容易被动物接受,扩展了沃尼妙林在兽医临床上的应用范围(图 1)。

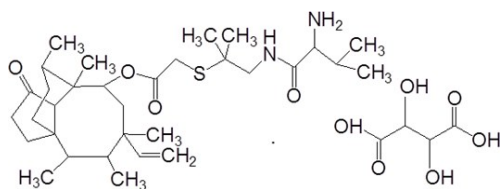


图 1 酒石酸沃尼妙林分子结构式

1 材料与方法

1.1 仪器与设备 D8 ADVANCE XD-3 X-射线粉末衍射仪(德国 Bruke 公司);Phillips XL30 SEM-FEG 扫描电子显微镜(荷兰 Eindhoven 公司);Waters 2695 高效液相色谱仪,配 UV 检测器(美国 Waters 公司);AG-285 电子天平(瑞士 Metteler 公司)。

1.2 试剂与药品 沃尼妙林为康倍德化学品有限公司制备(含量 95.92%);盐酸沃尼妙林来源为龙翔公司(含量 96.30%,生产日期:201005);N, N-二甲基乙酰胺、酒石酸均为分析纯;乙腈、甲醇为色谱纯,德国默克公司;水为超纯水;酒石酸沃尼妙林标准品来源为 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司(含量 98.70%,批号:Y0000533)。

1.3 酒石酸沃尼妙林的制备 在室温的条件下,将 8 g 沃尼妙林溶于 50 mL 乙腈与 N, N-二甲基乙酰胺(60 : 40, V/V)组成的混合溶剂中,然后将 1.6 g 酒石酸加到沃尼妙林溶液中,在温度 60 ℃ 的条件下反应 2.0 h,直至该反应液澄清,让反应液冷却至室温,结晶,过滤,真空过夜干燥,得到酒石酸沃尼妙林晶体。

1.4 理化性质分析 扫描电镜(SEM)分析:使用荷兰 Eindhoven 公司 Phillips XL30 SEM-FEG 扫描电镜观察酒石酸沃尼妙林与盐酸沃尼妙林固体粉末,操作电压 15 kV。X-射线衍射分析:使用由布鲁克公司的 Bruker-D8 ADVANCE XD-3 X-射线衍射仪测定盐酸沃尼妙林和酒石酸沃尼妙林的 X-射线衍射谱。在 40 kV/30mA、CuK- α 1X 射线(波长=1.5406 埃)条件,在 2θ 为 $5^\circ \sim 40^\circ$ 的范围,使用 0.2 秒钟计数/0.018°步长以连续模式运行的测角计测定。

1.5 盐酸沃尼妙林与酒石酸沃尼妙林的稳定性试验

1.5.1 光照射试验 取真空干燥至恒重的样品适量,参照(2006-2011)《兽药研究技术指导原则汇编》中兽用化学药物稳定性研究技术指导原则,将含量为 99.7%酒石酸沃尼妙林和 99.0%盐酸沃尼妙林平铺于表面皿中,在照度为 4500 ± 500 LUX 的条件放置,于 0(对照)、5、10、25、60 d 取样,用高效液

相色谱(HPLC)仪测试。

1.5.2 引湿性试验 取适量样品平铺于称量瓶中,在温度 30 ℃,湿度 65%和 78%的条件下分别放置 24、48 h,取样测试水分吸收量。

1.5.3 高效液相色谱(HPLC)分析 沃尼妙林的含量测定和杂质测定方法参考欧洲药典《盐酸沃尼妙林的测定》,配置 UV 检测器的 Waters 2695 系统,十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂的Waters X-
-Bridge 柱(4.6 mm×150 mm,3 μm particle size)进行分离测定。

1.6 体外抑菌试验菌株 参照美国临床实验室标准化委员会(CLSI)推荐的微量肉汤稀释法测定酒石酸沃尼妙林与盐酸沃尼妙林的抑菌效果,比较所选试验菌株的最小抑菌浓度(MIC)。质控菌株:肺炎链球菌 ATCC 49619 和其他分离菌株:胸膜肺炎放线杆菌、副猪嗜血杆菌、多杀性巴氏杆菌,猪链球

菌、溶血巴氏菌、金黄色葡萄球菌,来源于中国兽医药品监察所菌种保藏中心。

2 结果与分析

2.1 扫描电镜(SEM)分析 酒石酸沃尼妙林与盐酸沃尼妙林的扫描电镜结果列于图 2。可以看出两种盐有不同的形貌,酒石酸沃尼妙林呈现杆状结晶形状,而盐酸沃尼妙林呈现出大块、易碎的片状固体结构。

2.2 X-射线衍射分析 酒石酸沃尼妙林与盐酸沃尼妙林的 X-衍射谱分析结果列于图 3。从图 3 可以看出酒石酸沃尼妙林在 5.563, 6.361, 8.741, 10.560,11.223,11.891,12.775,13.486,15.048,16.384, 17.689 和 17.689(2θ ± 0.2°)处呈现出特征峰,然而盐酸沃尼妙林的 X-衍射谱无特征峰出现,只有一个坡度变化宽展而缓和的吸收峰。

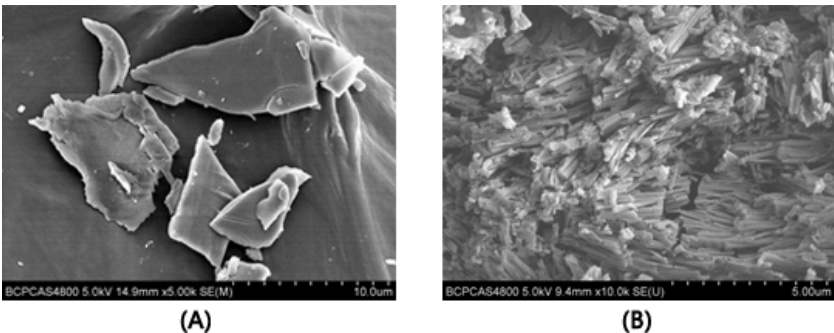


图 2 盐酸沃尼妙林 (A)和酒石酸沃尼妙林(B)的扫描电镜图像

Fig 2 Scanning electron micrographs (SEM) of valnemulin hydrochloride (A) and (B) valnemulin hydrogen tartrate crystal

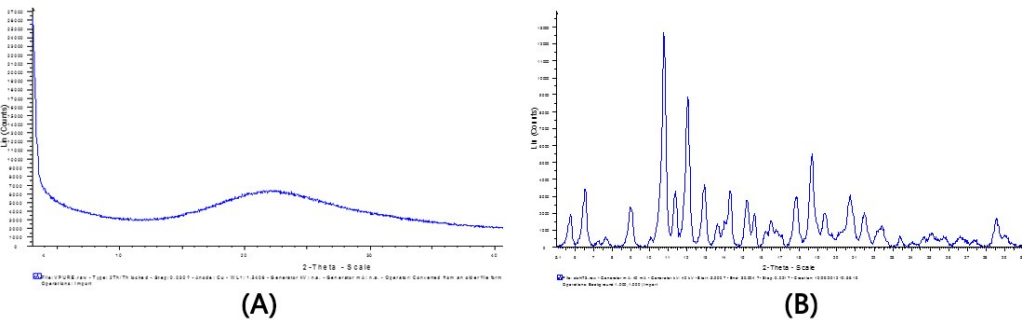


图 3 盐酸沃尼妙林 (A)和酒石酸沃尼妙林(B)的粉末 X-衍射光谱

Fig 3 X-ray powder diffractometry (XRD) spectra of valnemulin hydrochloride (A) and valnemulin hydrogen tartrate crystal (B)

2.3 稳定性试验 为了比较盐酸沃尼妙林和酒石酸沃尼妙林理化性质的稳定性,进行了光照和引湿性试验。图 4 为盐酸沃尼妙林和酒石酸沃尼妙林在 0(对照)、5、10、25、60 d 含量的变化,可以看出,光照 60 d 以后,酒石酸沃尼妙林的含量为 96.2%,与 99.7% 的初始含量相比,降解了 3.5%,然而盐酸沃尼妙林含量的降低较明显,由 99.0% 降至 80.8%,即减少了 18.2%。

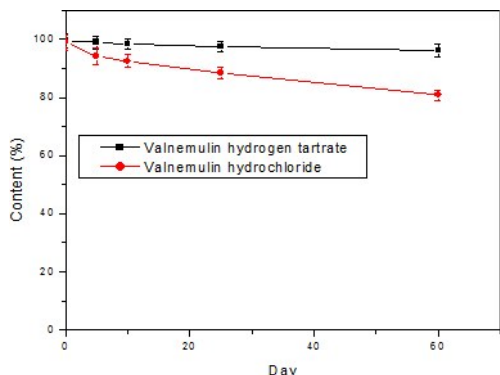


图 4 光照条件下酒石酸沃尼妙林和盐酸沃尼妙林中游离态沃尼妙林随时间变化曲线

Fig 4 Time courses of the free valnemulin levels of valnemulin hydrogen fumarate and valnemulin hydrochloride under irradiation condition.

图 5 列出了盐酸沃尼妙林和酒石酸沃尼妙林在相对湿度(RH)为 65% 和 78% 的条件下吸水量的变化。结果表明盐酸沃尼妙林,在湿度 65% 的条件下吸水量为 4.50%,而在湿度 78% 的条件下吸水量高达 9.71%,酒石酸沃尼妙林在上述条件下的吸水量分别为 1.30%、1.40%。

2.4 体外抑菌试验 为确定酒石酸沃尼妙林抑菌效果,进行了体外抑菌试验,并与盐酸沃尼妙林的 MIC 值进行了比较。如表 1 所示:酒石酸沃尼妙林与盐酸沃尼妙林对细菌的敏感浓度一致:对胸膜肺炎放线杆菌的最小抑菌浓度均为 4 $\mu\text{g/mL}$,对副猪嗜血杆菌的最小抑菌浓度均为 1~4 $\mu\text{g/mL}$,对多杀巴氏菌的最小抑菌浓度均为 16~32 $\mu\text{g/mL}$,对猪链球菌的最小抑菌浓度均为 1 $\mu\text{g/mL}$,对溶血巴氏菌的最小抑菌浓度均为 4 $\mu\text{g/mL}$,对金黄色葡萄球菌

的最小抑菌浓度均为 0.02 $\mu\text{g/mL}$,对质控菌株肺炎链球菌的最小抑菌浓度均为 16 $\mu\text{g/mL}$ 。

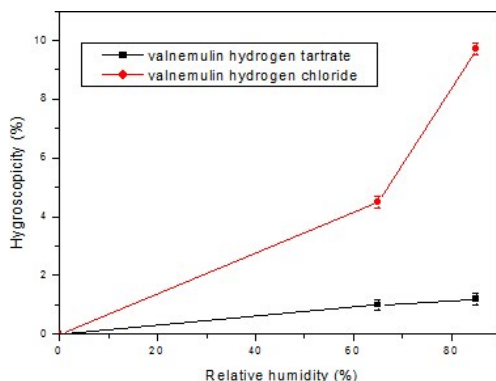


图 5 在 30 °C, 65% 和 78% 湿度条件下酒石酸沃尼妙林和盐酸沃尼妙林吸水量随时间变化曲线

Fig 5 Profiles of adsorption of water of valnemulin hydrogen tartrate and valnemulin hydrochloride samples at 30 °C, in 60% and 78% RH.

3 讨论与结论

3.1 外部形貌和内部结构形态分析 药物成盐是改善药物分子理化性质、提高其成药性的有效手段之一。在新药研发早期阶段,将候选化合物成盐可改善候选化合物的理化性质,如溶解度、结晶度、吸湿性、熔点和固态稳定性,减少其不良反应等^[13-15]。药物盐型的筛选对选择具有适宜药学性质的固态剂型有重要的指导作用。

由于药物与不同的盐类反应条件的差异:比如溶剂、温度、压力、晶种,会产生不同的晶体/无定形态,从而产生不同的物理化学特性和药学效果^[15]。本研究扫描电镜(SEM)分析结果体现出盐酸沃尼妙林和结晶型酒石酸沃尼妙林形貌上的显著差异;X-射线衍射分析表明盐酸沃尼妙林和结晶型酒石酸沃尼妙林有不同的 XRD 特征,盐酸沃尼妙林包含了一个宽展形状、无特征吸收的峰,说明盐酸沃尼妙林是无定形态,而酒石酸沃尼妙林的 X-射线衍射图中可以看到一组尖锐的强峰,且表现出较高的结晶度。沃尼妙林 2 种不同盐类的 XRD 的分析结果与药物稳定性分析一致,表明酒石酸沃尼妙林优良的稳定性归因于其晶体特性。

Tab 1 Antibacterial activity (MIC, $\mu\text{g/mL}$) of valnemulin hydrogen tartrate and valnemulin hydrochloride in vitro.

测试菌株	MIC ^a /(μg · mL ⁻¹)		测试菌株	MIC ^a /(μg · mL ⁻¹)	
	盐酸沃尼妙林	酒石酸沃尼妙林		盐酸沃尼妙林	酒石酸沃尼妙林
^b App-CVCC 259	4	4	^d PM-CVCC 429	32	32
^b App-CVCC 260	4	4	^d PM-CVCC 430	16	16
^b App-CVCC 261	4	4	^d PM-CVCC 431	16	16
^b App-CVCC 265	4	4	^d PM-CVCC 432	32	32
^c HPS-ATCC 3706	4	4	^c HPS-ATCC 3729	1	1
^c HPS-ATCC 3717	4	4	<i>Hemolytic Pasteurella</i> CVCC 3832	4	4
<i>Streptococcus suis</i> -CVCC SS2-9	1	1	<i>Hemolytic Pasteurella</i> CVCC 3840	4	4
<i>Streptococcus suis</i> -CVCC C55606	1	1	<i>Staphylococcus aureus</i> CVCC 26033	0.02	0.02
<i>Streptococcus suis</i> -CVCC ZN5995	1	1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> -CVCC 49619	16	16

3.3 MIC 试验

酒石酸沃尼妙林对革兰阴性和革兰阳性病原菌的体外抗菌活性试验 MIC 值与无定形盐酸沃尼妙林一致,二者有相同的抑菌活性,可以推断水溶液中,酒石酸沃尼妙林和盐酸沃尼妙林均可迅速解离,游离态的沃尼妙林碱发挥药效。酒石酸沃尼妙林与盐酸沃尼妙林药效的体外抑菌试验等效性,以及酒石酸沃尼妙林对光照、湿度的稳定性和动物饲喂适口性表明晶态的酒石酸沃尼妙林,具备潜在的应用价值。

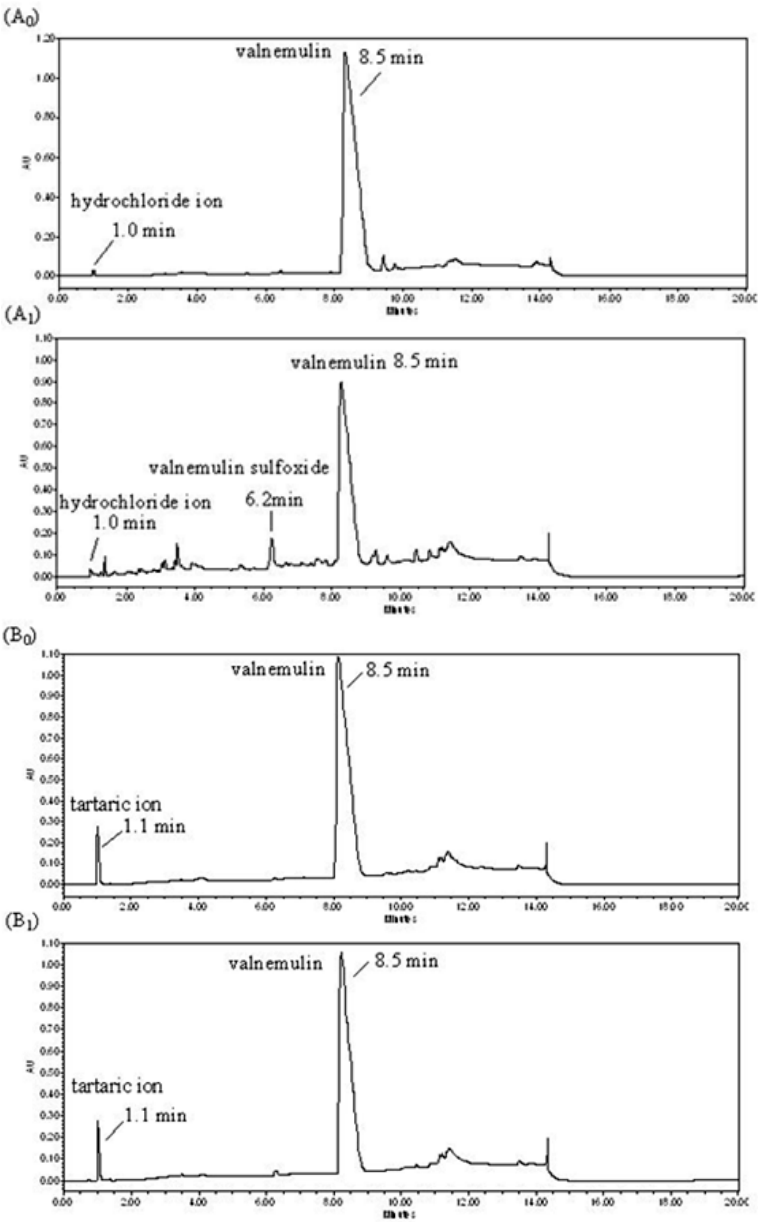


图 6 盐酸沃尼妙林(A)和酒石酸沃尼妙林(B)光照前(0 day)后(90 day)的高效液相色谱图

Fig 6 HPLC spectra of valnemulin hydrochloride (A) and valnemulin hydrogen tartrate(B) after irradiation for 0 and 90 days.

本研究制备了一种结晶态的沃尼妙林有机酸盐——酒石酸沃尼妙林,用 XRD 和 SEM 对其物理化学性质进行表征。XRD 和 SEM 结果表明酒石酸沃尼妙林的形貌和内部结构完全不同于盐酸沃尼妙林,前者具有高的结晶性,而后者是无定型模式。在光照条件下,酒石酸沃尼妙林具有比盐酸沃尼妙林更强的稳定性。盐酸沃尼妙林的光降解产物主

要是沃尼妙林氧化亚砷。在 65%和 78% RH 条件下盐酸沃尼妙林样品有吸湿性,而酒石酸沃尼妙林对湿度变化不敏感。抑菌敏感性测试试验表明酒石酸沃尼妙林和盐酸沃尼妙林盐有相同的抑菌活性。因此,酒石酸沃尼妙林贮存稳定、易于制备制剂、给药方便、减少人力物力、节约了养殖成本,具有应用潜力。

参考文献:

[1] Ripley P H, Zeisl E, Horkovics-Kovats S. Use of pleuromutilin derivatives for transdermal treatment of bacterial diseases [P]. US 6852756,2005.

[2] Chen L, Yang D, Pan Z, *et al.* Synthesis and Antimicrobial Activity of the Hybrid Molecules between Sulfonamides and Active Antimicrobial Pleuromutilin Derivative [J]. Chemical Biology & Drug Design,2015,86(2): 239-245.

[3] Tang Y, Luo J, Chen X, *et al.* Synthesis and *in vitro* antibacterial activity of four novel pleuromutilin derivatives [J]. Journal of the Chilean Chemical Society,2013,58(1): 1537-1540.

[4] Jordan F T, Forrester C A, Ripley P H, *et al.* *In vitro* and *in vivo* comparisons of valnemulin, tiamulin, tylosin, enrofloxacin, and lincomycin/spectinomycin against Mycoplasma gallisepticum[J]. Avian Diseases,1998,42(4): 738-745.

[5] Stipkovits L, Ripley P H, Tenk M, *et al.* The efficacy of valnemulin (Econor®) in the control of disease caused by experimental infection of calves with Mycoplasma bovis [J]. Research in Veterinary Science,2005,78(3):207-215.

[6] Stipkovits L, Ripley P H, Varga J, *et al.* Use of valnemulin in the control of Mycoplasma bovis infection under field conditions [J]. Vet Rec,2001,148: 399-402.

[7] Long K S, Poehlsgaard J, Hansen L H, *et al.* Single 23S rRNA mutations at the ribosomal peptidyl transferase centre confer resistance to valnemulin and other antibiotics in Mycobacterium smegmatis by perturbation of the drug binding pocket [J]. Molecular Microbiology,2009,71(5): 1218-1227.

[8] Li B B, Shen J Z, Cao X Y, *et al.* Mutations in 23S rRNA gene

associated with decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin in Mycoplasma gallisepticum [J]. Fems Microbiology Letters, 2010,308(2): 144-149.

[9] Koller K, Schwarz F. Formulation of valnemulin; US 6284792; 2001.

[10] Wieland-Berghausen S C, Rakoczi F J, Cron-Eckhardt B M. Microspherules containing a pleuromutilin derivative [P]. CA 2466671 C,2011.

[11] Schwarz F. Valnemulin formulation [P]. WO 2001041758 A3, 2002.

[12] Vanacker P, Amiens F R. Palatability enhancers and methods for enhancing palatability [P]. US 2011/0124743 A1,2011.

[13] Da S L, Montanari C M, Santos O M, *et al.* Quality evaluation of the Finasteride polymorphic forms I and II in capsules [J]. J Pharm Biomed Anal,2015,105: 24-31.

[14] Jia D, Staufienbiel S, Bodmeier R. Evaluation of a biphasic *in vitro*, dissolution test for estimating the bioavailability of carbamazepine polymorphic forms [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences,2017,105: 64-70.

[15] Ouyang J, Wang J, Hao H, *et al.* Determination and correlation of solubility and solution thermodynamics of valnemulin hydrogen tartrate in different pure solvents [J]. Fluid Phase Equilibria, 2014,372: 7-14.

[16] Zhu X, Xu S, Xu Q, *et al.* A preparation method of valnemulin hydrogen fumarate [P]. CN103073464 A, 2013.

(编辑:侯向辉)