

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.7.06

甲苯咪唑国家对照品的研制

马秋冉, 杨星, 彭文绣, 于晓辉

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2021-01-27 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021)07-0035-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 以精制后的甲苯咪唑为原料研制甲苯咪唑国家对照品, 并进行质量评价。采用紫外分光光度法、红外分光光度法对原料进行鉴别, 采用质量平衡法定值, 同时采用容量法和高效液相色谱法加以佐证。结果显示, 紫外吸收图谱与标准规定一致、红外光吸收图谱与 USP 溯源对照品图谱一致; 以质量平衡法计算其含量为 99.8%, 容量法测定含量为 99.9%, 液相色谱外标法测定含量为 99.9%, 三种方法测定结果一致。本次研制的甲苯咪唑对照品可用于甲苯咪唑及其制剂的鉴别与含量测定。

[关键词] 甲苯咪唑; 国家对照品; 质量平衡法; 容量法; 高效液相色谱法

Development of Mebendazole as National Reference

MA Qiu-ran, YANG Xing, PENG Wen-xiu, YU Xiao-hui*

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

Corresponding author: YU Xiao-hui, E-mail: Shuilion@sina.com

Abstract: To develop the national reference of mebendazole, the refined mebendazole was used as raw material and the quality inspection was tested. The raw materials were identified by ultraviolet spectrophotometry and infrared spectrophotometry. The content of mebendazole was determined by the mass balance method, volumetric method and HPLC external standard method. The results show that, the UV spectrum was in accordance with the regulation, the IR spectrum was consistent with the USP traceable reference. The content of mebendazole was 99.8% by mass balance method, was 99.9% by volumetric method and was 99.9% by HPLC external standard method. The three determined contents were in accordance with each other. The national reference of mebendazole in this study can be used for the identification of the preparations of mebendazole.

Key words: mebendazole; national reference; mass balance method; volumetric method; HPLC

作者简介: 马秋冉, 助理研究员, 从事化学药品检验检测工作。

通讯作者: 于晓辉。E-mail: Shuilion@sina.com

甲苯咪唑是一种广谱驱虫药,可用于治疗蛔虫、蛲虫、钩虫和鞭虫的感染。甲苯咪唑在临床上主要用于水产养殖业^[1],其制剂为复方甲苯咪唑粉和甲苯咪唑溶液。目前 USP 和 EP 均有该对照品供应,但价格昂贵,购买周期长,给国内相关生产企业的研发与生产带来不便。因此,研制甲苯咪唑对照品不但可以确保《中国兽药典》2020 年版有效实施,还能降低企业生产成本,提高产品质量。

根据《标准物质定值的通用原则及统计学原理》^[2],本次研制分别采用质量平衡法、容量法、溯源对照品外标法 3 种方法对甲苯咪唑原料的含量进行定值研究。其中质量平衡法,以有关物质结果作为纯度结果,同时测定干燥失重、炽灼残渣等关键指标进行定值;容量法作为原料药的含量测定方法已被科研工作者普遍认可,其操作简便、定值准确;采用液相色谱外标法,以 USP 对照品作为溯源对照品进行定值,以确保含量赋值的准确性。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters e2695 高效液相色谱仪(Empower 2 色谱工作站);Waters 2998 二极管阵列检测器(PDA);Waters 2489 紫外检测器(UV);Mettler XS205 电子分析天平(精度 0.01 mg);TU-1901 紫外分光光度计;TENSOR27 傅里叶红外光度计;Heratherm OMH100 干燥箱;CWF 11/5 高温炉。

1.2 试剂 甲苯咪唑原料由江西博莱大药厂有限公司提供,批号为 20200320;甲苯咪唑对照品系统适用性对照品(来源/批号:EP/ Batch 1.2)、甲苯咪唑对照品(来源/批号/含量:USP/R096E0/99.7%)。

2 方法与结果

2.1 性状

2.1.1 颜色 甲苯咪唑原料为白色结晶性粉末。与《中国兽药典》2015 年版(以下简称“兽药典”)中对甲苯咪唑颜色描述一致。

2.1.2 溶解度 分别考察甲苯咪唑原料在丙酮、三氯甲烷、水、甲酸、冰醋酸、乙醇中的溶解度,测定结果(表 1)与兽药典中对甲苯咪唑溶解度的规定一致。

表 1 甲苯咪唑原料溶解度

| Tab 1 The solubility of mebendazole raw material | | | | |
|--|-------|---------|-------|------|
| 溶剂 | 样品量/g | 溶剂体积/mL | 结果 | 结论 |
| 丙酮 | 0.01 | 80 | 溶解 | 极微溶解 |
| 三氯甲烷 | 0.01 | 80 | 溶解 | 极微溶解 |
| 二氯甲烷 | 0.01 | 100 | 未完全溶解 | 不溶 |
| 水 | 0.01 | 100 | 未完全溶解 | 不溶 |
| 甲酸 | 1.0 | 8 | 溶解 | 易溶 |
| 冰醋酸 | 0.1 | 95 | 溶解 | 微溶 |
| 乙醇(95%) | 0.01 | 100 | 未完全溶解 | 不溶 |

2.1.3 吸收系数 取甲苯咪唑原料约 50 mg,精密称定,加甲酸 5 mL 使溶解,用异丙醇定量稀释制成每 1 mL 中约含 10 μg 的溶液,在 312 nm 的波长处测定吸光度,考察吸收系数是否在 485 至 505 之间。结果测得吸收系数($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)为 489,符合兽药典规定。

2.2 鉴别

2.2.1 紫外鉴别 取 2.1.3 项下的溶液,考察甲苯咪唑在 312 nm 的波长处是否有最大吸收。结果见图 1,甲苯咪唑原料在 312 nm 的波长处有最大吸收。

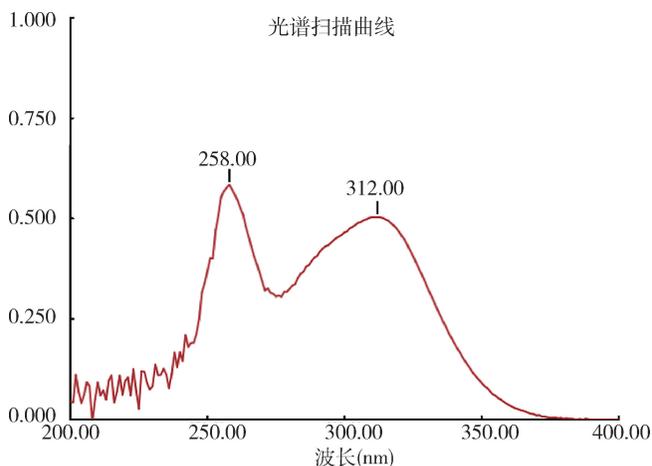


图 1 甲苯咪唑原料紫外吸收光谱图

Fig 1 UV spectrum of mebendazole raw material

2.2.2 红外鉴别 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,考察甲苯咪唑原料与甲苯咪唑 USP 对照品的红外光吸收图谱是否一致。结果见图 2 和图 3,甲苯咪唑原料的红外光吸收图谱与 USP 对照品的图谱一致。

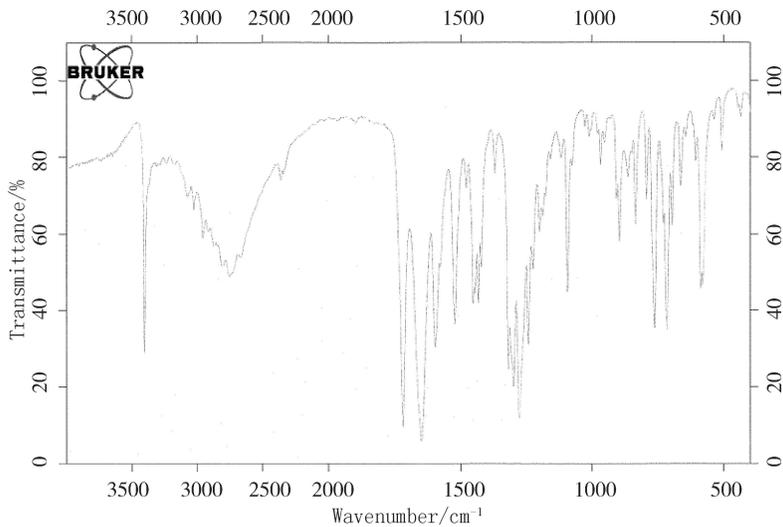


图 2 USP 对照品红外光吸收图谱

Fig 2 IR spectrum of USP reference material

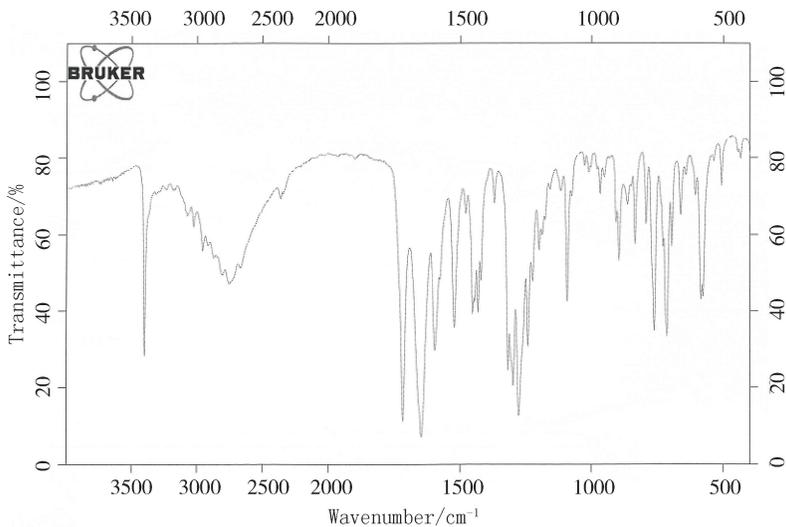


图 3 甲苯咪唑原料红外光吸收图谱

Fig 3 IR spectrum of mebendazole raw material

2.3 质量平衡法定值

2.3.1 有关物质 参照《欧洲药典》9.0 中甲苯咪唑质量标准进行测定。

2.3.1.1 液相色谱条件 色谱柱: Waters Xbridge C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 7.5 g/L 乙酸钠溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 15 min, 80% A, 20% B; 15 ~ 20 min, 70% A, 30% B; 20 ~ 25 min, 40% A, 60% B; 25 ~ 26 min, 80% A, 20% B; 26 ~ 30 min, 80% A, 20% B); 流速:

1.2 mL/min; 检测波长: 250 nm; 进样量: 10 μL; 柱温: 40 °C。

2.3.1.2 供试品溶液的制备 取甲苯咪唑原料约 25 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加 N,N - 二甲基甲酰胺 (DMF) 使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.1.3 对照溶液的制备 精密量取供试品溶液 1 mL, 置 200 mL 量瓶中, 加 DMF 稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 DMF 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.1.4 系统适用性溶液的制备 取甲苯咪唑系统适用性对照品(含杂质 A、B、C、D、E、F 和 G) 5 mg 溶于 5 mL DMF 中,摇匀,即得。

2.3.1.5 测定结果 为避免单人操作产生误差,故选用两名实验室人员分别进行独立的有关物质考察试验。精密量取系统适用性溶液、供试品溶液和对照溶液各 10 μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。在系统适用性色谱图(图 4)中,杂质 A、B、C、D、E、F、G 和甲苯咪唑峰与相邻色谱峰的分离度

均符合要求。从色谱图(图 5)测定结果看,甲苯咪唑原料有关物质包括七个已知杂质和两个未知杂质。按自身对照法以峰面积计算,甲苯咪唑原料纯度分别为:99.90%、99.90%、99.92%、99.92%,均值($n=4$)为 99.91%。

2.3.2 干燥失重 参照《中国兽药典》2015 年版一部附录 0831 测定,测得甲苯咪唑原料减失重量分别为 0.13%、0.10%、0.14%、0.12%,均值($n=4$)为 0.12%。

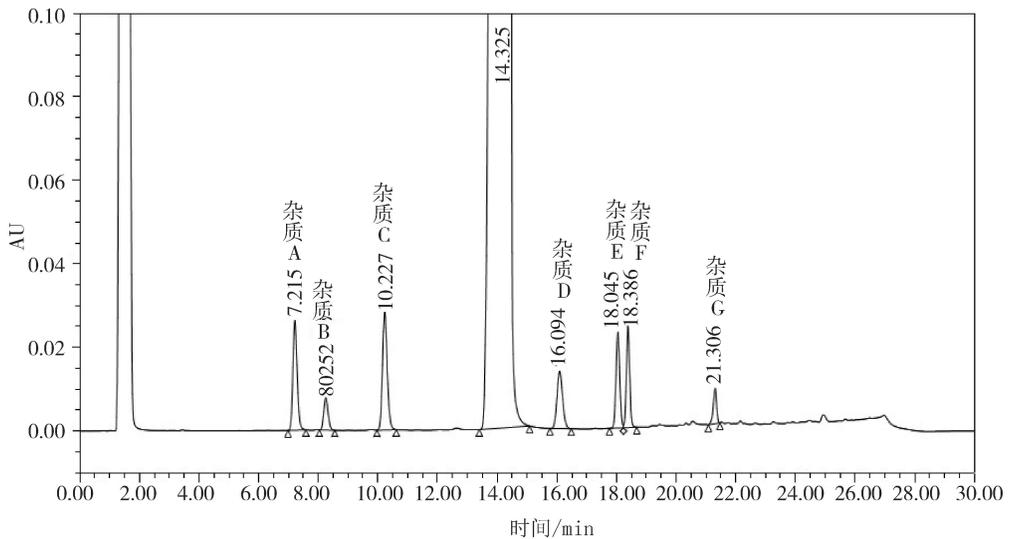


图 4 有关物质考察的系统适用性溶液色谱图

Fig 4 Liquid chromatogram of system suitability solution in related substance test

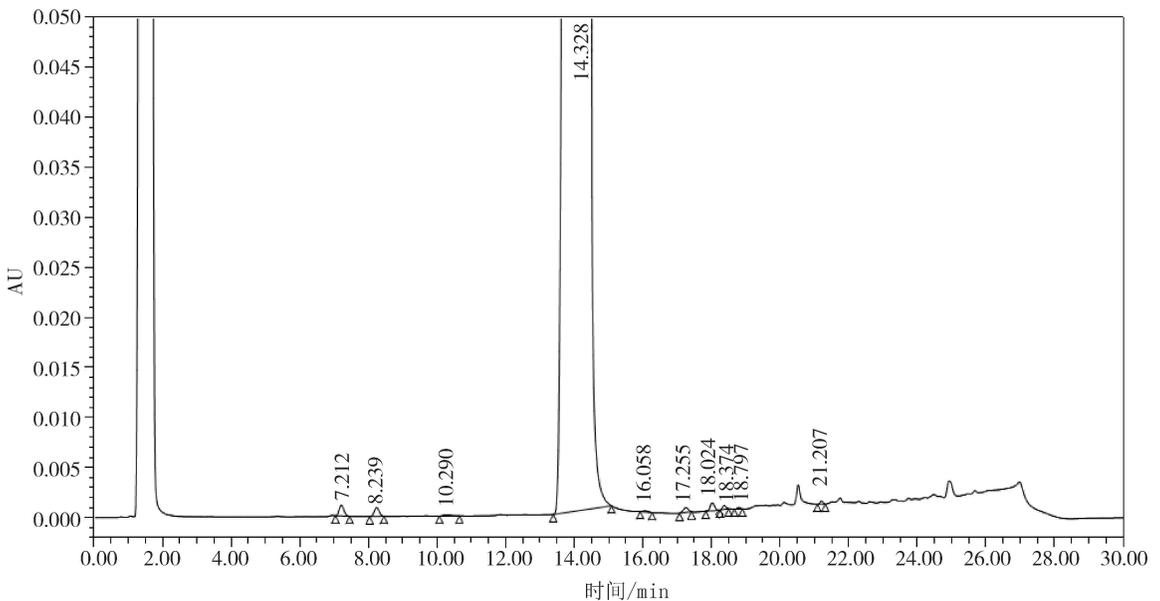


图 5 有关物质考察的供试品溶液色谱图

Fig 5 Liquid chromatogram of test solution in related substance test

2.3.3 炽灼残渣 炽灼残渣反映无机杂质的量。参照《中国兽药典》2015 年版一部附录 0841 测定, 测得甲苯咪唑原料中炽灼残渣含量分别 0.036%、0.020%、0.040%、0.040%, 均值($n=4$)为 0.034%。

2.3.4 质量平衡法计算结果 采用含量 = 色谱纯度 $\times (1 - \text{干燥失重含量} - \text{炽灼残渣含量}) \times 100\%$ 计算甲苯咪唑原料中甲苯咪唑含量为 $99.91\% \times (1 - 0.12\% - 0.034\%) \times 100\% = 99.76\%$

2.4 容量法定值 参照《中国兽药典》2015 年版一部中甲苯咪唑质量标准进行测定。取本品约 0.25 g, 精密称定, 加甲酸 8 mL 溶解后, 加冰醋酸 40 mL 与醋酐 5 mL, 照电位滴定法(附录 0702 第一法), 用高氯酸滴定液(0.1 mol/L)滴定, 并将滴定结果用空白试验校正。按照含量 = $F \times (V - V_{\text{空}}) \times T / W_{\text{供}} \times 100\%$ 计算甲苯咪唑含量, 其中 $T = 29.53 \text{ mg/mL}$, F 为高氯酸滴定液(0.1 mol/L)经标定后的浓度值。测定结果分别为 99.91%、99.85%、99.93%、99.93%、99.87%, 均值($n=5$)为 99.90%。

2.5 液相色谱外标法定值 参照 USP43 - NF37 中甲苯咪唑质量标准进行测定。

2.5.1 液相色谱条件 色谱柱: Waters Xbridge C_{18} (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm); 流动相: 7.5 g/L 乙酸铵溶液(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱(0 ~ 15 min, 80% A, 20% B; 15 ~ 20 min, 70% A, 30% B; 20 ~ 25 min, 40% A, 60% B; 25 ~ 26 min, 80% A, 20% B; 26 ~

30 min, 80% A, 20% B); 流速: 1.2 mL/min; 检测波长: 250 nm; 进样量: 10 μL ; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.5.2 供试品溶液的制备 取甲苯咪唑原料约 25 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加 DMF 使溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 DMF 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.5.3 对照品溶液的制备 取甲苯咪唑对照品约 25 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加 DMF 使溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 DMF 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.5.4 杂质 D 储备液的制备 取杂质 D 5 mg 置 50 mL 量瓶中, 加 DMF 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.5.5 系统适用性溶液的制备 取甲苯咪唑对照品约 25 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加 DMF 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加杂质 D 储备液 125 μL , 加 DMF 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.5.6 测定结果 精密量取系统适用性溶液、供试品溶液和对照溶液各 10 μL , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图。在系统适用性色谱图(图 6)中, 甲苯咪唑峰与杂质 D 峰的分度为 6.8, 符合兽药典规定。平行制备 5 份供试品溶液, 测定结果分别为 100.14%、100.10%、99.86%、99.68%、99.72%, 均值($n=5$)为 99.90%。

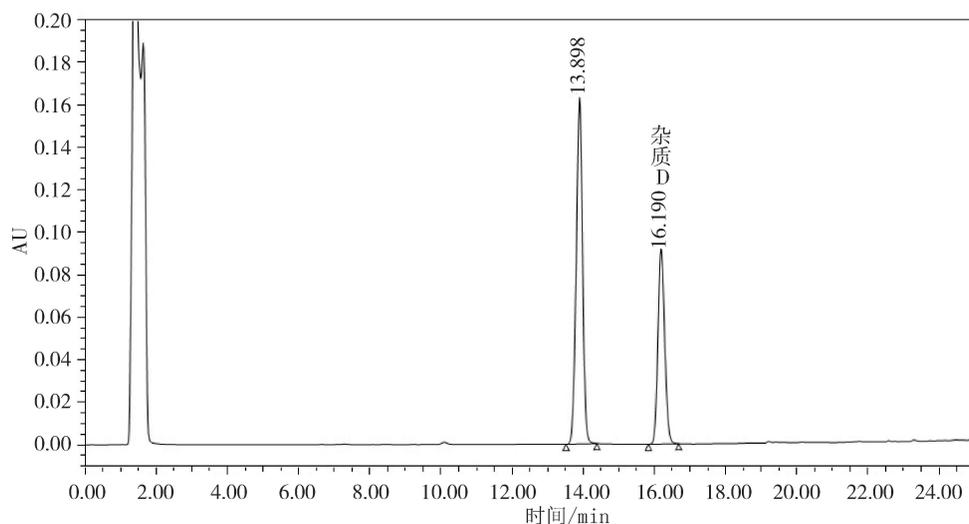


图 6 高效液相色谱外标法系统使用性溶液

Fig 6 Liquid chromatogram of system suitability solution in assay

3 讨论

国家对照品的研制过程中,最重要的就是确保定值准确。《标准物质定值的通用原则及统计学原理》中列出 5 种定值方式,单一实验室通常采用两种或更多不同原理的独立参考法定值。因此,本次研究采用质量平衡法、容量法、高效液相色谱法 3 种不同原理的定值方法测定甲苯咪唑的含量,测定结果基本一致,相互佐证,充分说明了定值的准确性。

有效期是标准物质的重要变量,也是研制中关注的重点之一^[3]。目前,欧洲药品质量管理局(EDQM)、美国药典委员会(USP)和中国食品药品检定研究院(NIFDC)等机构均采用定期检测稳定性后,通过网站等方式告知客户是否稳定,能否继续使用的方式代替规定有效期。这种方式不但避免了由于有效期制定过长产生的用户测定结果偏差的情况,还能减少有效期制定过短带来的浪费现象。本次研制的甲苯咪唑对照品也不规定有效期,通过定期监测稳定性的方式来保证在售对照品的产品质量。

参考文献:

- [1] 韩飞,张曼,张周,等. 甲苯咪唑在水产养殖中的研究进展[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2014, 30(7): 197-198.

Han F, Zhang M, Zhang Z, *et al.* The research progress of mebendazole in aquatic culture. *China animal science and veterinary medicine*[J]. 2014, 30(7): 197-198.

- [2] 国家质量监督检验检疫总局. JJF 1343-2012 标准物质定值的通用原则及统计学原理[S]. 2012.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. JJF1343-2012 General and Statistical Principles for Characterization of Reference Materials[S]. 2012.
- [3] 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]. *Chines Pharmaceutical Affairs*, 2018, 32(3): 317-322.
- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版一部[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. People's republic of China veterinary pharmacopoeia 2015 Part I [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015.
- [5] EP 9.0 [S]. 2017: 2983-2984.
- [6] USP 43-NF 37 [S]. 2019: 4968-4969.

(编辑:李文平)