

阿莫西林中蛋白残留的测定

郑 婷 刁 夏* 刘君臣

山西双雁生物科技有限公司 山西 大同 037000

摘要: 建立了考马斯亮兰法 (Bradford法) 测定阿莫西林中蛋白残留的检验方法。采用高效液相色谱法, GE Sephadex G-25填料色谱柱, 水为流动相, 检测波长280nm, 采集目标物质, 后经酶标仪测定吸光度。经方法学验证, 建立的方法专属性及系统适用性良好, 蛋白含量在1~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内线性关系良好, 方法回收率为99.40%, RSD为1.70%, 定量限和检测限分别为0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。所用方法灵敏准确, 适用于阿莫西林原料药中蛋白残留的测定。

关键词: 阿莫西林; 蛋白残留; Bradford法; 测定

阿莫西林(amoxicillin)是临床上常用的一种半合成青霉素类抗生素^[1], 具有抗菌谱广、耐酸性、杀菌作用强等优点^[2], 主要用于治疗尿路感染、消化性溃疡等疾病^[3]。其制备方法有化学合成法和酶法合成^[4], 由于酶法合成耗时少、反应条件温和、经济环保等优点^[5], 收到越来越多医药企业的青睐^[6]。而固定化青霉素酰化酶是酶法合成阿莫西林的关键酶, 该酶对人体而言是一种外源性蛋白, 进入人体会使人体发生不良反应, 所以检测阿莫西林中蛋白残留的大小至关重要。

课题组采用考马斯亮兰法 (Bradford法) 进行蛋白定量测定, 通过凝胶色谱法分离蛋白和阿莫西林, 并收集8.0分钟到18.5分钟的洗脱液 (此时间是蛋白的洗脱时间), 将收集到的洗脱液进行冷冻干燥, 然后用Bradford法测定制备物中的蛋白浓度, 最终得到阿莫西林中残留蛋白的含量。

1 实验

1.1 仪器与色谱条件

Agilent液相色谱仪, 色谱柱为 GE Sephadex G-25 填料, 规格26/10, 90 μm 。流动相为水, 流速为2.0ml/min, 柱温为室温, 进样体积500 μl , 检测波长 280nm; 酶标仪为Thermo Multiskan Spectrum, 96孔酶标板, Costar, Corning Incorporated, USA; 冷冻干燥机: FD-1A-50型, 北京博医康实验仪器有限公司; 高纯水机为 Sartorius Arium 611DI

1.2 试剂与材料

检品名称: 阿莫西林, 山西双雁药业有限公司, 批号 V3012403001、V3012403002、V3012403003、V3012403004;

牛血清白蛋白(BSA): 蛋白标准品, 总蛋白浓度100.0%, Biotechnology Grade, 批号: D00002555, 北京欣经生物技术有限公司提供;

蛋白染料为 Bradford 试剂, SIGMA. 批号: 033K9279; Na_2CO_3 为分析纯, 由国药集团化学试剂有限公司生产;

高纯水: 试验前新鲜制备。

1.3 溶液配制

1.3.1 对照品溶液配制: 精密称取 BSA约25mg, 置10ml量瓶, 加水溶解并定量稀释至刻度。以此溶液测定色谱柱的外水体积(V_0), 定位目标大分子物质(目标蛋白)色谱峰保留时间。

1.3.2 供试品溶液配制: 精密称取阿莫西林约1.0g, 加4% Na_2CO_3 溶解并稀释制成100mg/ml的溶液。

1.3.3 系统适用性溶液

精密称取阿莫西林约1.0g, BSA25mg, 加4% Na_2CO_3 溶液10ml溶解并稀释制成含阿莫西林100mg/ml和BSA2.5mg/ml的溶液。

1.3.4 BSA 标准蛋白贮备溶液I

精密称取约10.0mg的BSA 标准蛋白置100ml量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 制成100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的贮备液。

1.3.5 BSA 标准蛋白贮备溶液 II

取上述贮备溶液I 500 μl , 加水500 μl 稀释混匀, 制成50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的贮备液。

2 方法学验证

2.1 专属性

本法采用凝胶过滤法对未知目标蛋白组分进行分离、富集, 然后采用 Bradford法对蛋白进行特异性染色和测定。为排除凝胶过滤色谱法对蛋白组分分离、富集过程中可能残存的阿莫西林的影响, 进行标准溶液、供试品溶液及系统适用性溶液的进样分析, 试验显示 BSA 出峰时间约为8~13min, 阿莫西林出峰时间约为20~30min, 系统适用性溶液测试结果 BSA 与阿莫西林能有效分离。

2.2 线性

精密量取 BSA 标准蛋白贮备溶液 II 10、20、40、80、100、150、200、250和500 μ l 至 2ml 试管中，分别加水稀释至500 μ l；再分别向各管中加入500 μ l的Bradford试剂，混匀，制成标准蛋白浓度分别约为1、2、4、8、10、15、20、25和50 μ g/ml 的溶液。分别吸取各溶液150 μ l 至96孔板 (n = 3)，在595nm 波长下测定吸光值，以吸光度A 对浓度C(μ g/ml)做标准曲线。标准曲线回归方程为 $Y = 0.0079x + 0.01311.8171$ ， $r^2 = 0.9974$ ，表明蛋白浓度在1~50 μ g/ml 范围内线性关系较好。

表1 BSA标准蛋白溶液吸收值结果 (扣空白)

序号	BSA标准溶液浓度 (μ g/ml)	吸收值 (595nm)
1	1	0.01587
2	2	0.02587
3	4	0.05106
4	8	0.07798
5	10	0.09829
6	15	0.13850
7	20	0.16931
8	25	0.19953
9	50	0.41417

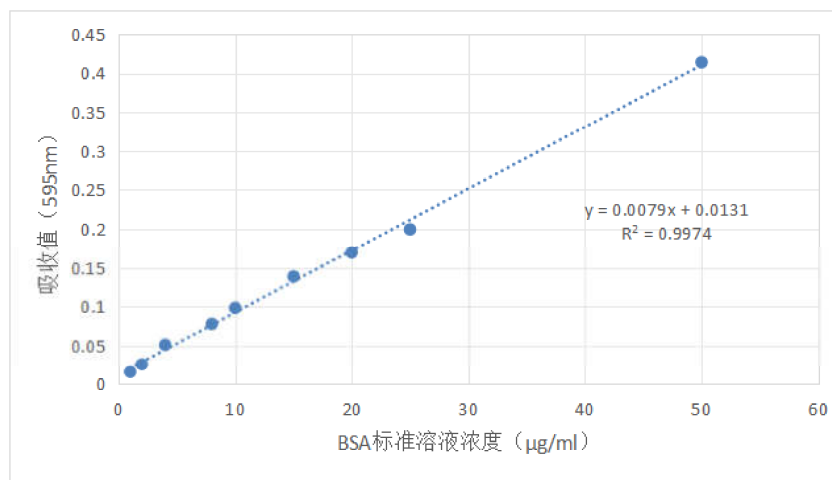


图1 BSA标准曲线

2.3 准确度

按照1.3.2项下方法制备供试品溶液，制备9份溶液，每3份为一组，三组分别加入10 μ g/ml的标准溶液0.2m、0.5ml和0.8ml，混匀，制备得到不同浓度的准确度溶

液。采用凝胶过滤法分离、富集目标蛋白的方式，采用Bradford法测定不同浓度溶液的蛋白残留。经检测表明该方法的加样回收率结果为99.72%，RSD为1.70%。

表2 不同浓度溶液回收率

样品含量 (μ g/ml)	加入量 (μ g/ml)	测定量 (μ g/ml)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
10.400	2.236	12.788	101.2	99.40	1.70
10.400	2.236	12.446	98.5		
10.400	2.236	12.156	96.2		
10.400	5.021	15.514	100.6		
10.400	5.021	15.205	98.6		
10.400	5.021	15.051	97.6		
10.400	8.056	18.548	100.5		
10.400	8.056	18.419	99.8		
10.400	8.056	18.751	101.6		

2.4 重复性

根据标准曲线制备中不同蛋白浓度溶液(1、2、4、

8、10、15、20、25和50 μ g/ml) 吸收值(含空白)之间的相对标准偏差(RSD) 评价本方法的重复性，结果该法RSD <

3.0%。

2.5 最低检出限

以水为空白,信噪比为3:1时的吸收值作为Bradford方法的检测限,结果为0.2 $\mu\text{g/ml}$ (500 μl),即0.001%。

2.6 最低定量限

以水为空白,信噪比为10:1时的吸收值做为Bradford方法的定量限,定量限结果为1.0 $\mu\text{g/ml}$ (500 μl),即0.005%。

3 样品测定

采用凝胶过滤法分离、富集目标蛋白的方式,精密

量取1.3.2项下供试品溶液500 μl 进样4次(相当于200mg供试品的量),收集8.0~18.5min的流出液于小烧杯中进行富集(简称为阿莫西林目标大分子收集液),富集液真空冻干约48小时。收集液冻干品加水1.0ml复溶,混匀。精密量取100 μl 溶液,分别加水400 μl ,再加Bradford试剂500 μl ,混匀。分别吸取各溶液150 μl 至96孔酶标板($n=3$),在595nm波长下测定吸光值。根据标准曲线方程计算浓度C($\mu\text{g/ml}$),再计算阿莫西林中残留蛋白的量。3批工艺验证批阿莫西林蛋白残留见表3。

表3 阿莫西林种残留蛋白的量

批号	吸收值(595nm)	平均值	残留蛋白浓度($\mu\text{g/ml}$)	蛋白残留/%
V3012403001	0.20302	0.20887	12.1	0.002
	0.21171			
	0.21189			
V3012403002	0.19211	0.18946	10.4	0.004
	0.18888			
	0.18740			
V3012403003	0.18446	0.18621	10.7	0.005
	0.18814			
	0.18604			

4 结论

酶法合成阿莫西林的生产工艺中,通常所使用的酶是固定化青霉素酰化酶,如果阿莫西林中含有该蛋白,不仅影响药品质量,部分人群也有可能致敏等一些不良反应^[7],所以在酶法制备的阿莫西林最终产品中,酶蛋白的残留要尽可能少甚至没有蛋白,进而保证药品对大部分人群的适用性和安全性^[8]。本课题组建立的阿莫西林蛋白残留方法可准确检测产品中蛋白残留量,为产品工艺研究提供有效的数据支持。

参考文献

- [1]王艳艳,朱科,康辉,等.酶法阿莫西林质量研究[J].河北化工,2008,31(4):31.
[2]朱科,王艳艳,丁海平,等.酶法制备阿莫西林的工艺优化研究[J].中国抗生素杂志,2011,36(1):44-47.

[3]I.Alemzadeh,G.Borghei,L.Va,etal.EnzymaticSynthesisofAmoxicillinwithImmobilizedPenicillinGAcylase[J].ChemistryandChemicalEngineering,2010,17(1):106-113.

[4]陈春秀.有机介质中酶促高效合成阿莫西林及其一锅法研究[D].杭州:浙江大学,2008.

[5]韦晓菊.合成用青霉素酰化酶的发酵与酶法合成头孢克洛[D].长沙:中南林业科技大学,2014.

[6]周跃男,王湛,赵小川,等.浅谈蛋白质的定量检测方法[J].食品研究与开发,2014,4(35):127-130.

[7]胡昌勤.抗菌药中高分子杂质的特性及抗菌药过敏反应(上)[J].中国药师,2006,9(3):238-240.

[8]再曼,王虎.西药阿莫西林的药理作用机制以及临床应用[J].世界最新医学信息文摘,2015,15(81):112-113.