



隨身課堂

《药物分析》

第十六章 抗生素类药物的分析

药学系 药学教研室 刘燕老师



学习目标

- 1.掌握抗生素类药物的化学**结构特点与分析方法**间的关系； β -内酰胺类抗生素的性质、**鉴别方法**；氨基糖苷类抗生素的**鉴别方法**，四环素类抗生素的**性质和鉴别方法**。
- 2.熟悉 β -内酰胺类抗生素的含量测定方法、聚合物的检查方法、四环类抗生素有关物质的来源、检查方法（包括降解产物及异构体）。
- 3.了解本类药物的其它分析项目与方法。



教学内容

1. 抗生素类药物分析的特点，抗生素类药物质量分析的鉴别、检查、效价测定。
2. β -内酰胺类抗生素的化学结构、典型药物与理化性质
3. β -内酰胺类抗生素鉴别试验、特殊杂质检查和含量测定
4. 氨基糖苷类抗生素的化学结构、典型药物与理化性质
5. 氨基糖苷类抗生素鉴别试验、特殊杂质检查和含量测定
6. 四环素类抗生素的化学结构、典型药物与理化性质。
7. 四环素类抗生素鉴别试验、特殊杂质检查和含量测定
8. 抗生素类药物高分子杂质的检查



1. 抗生素含量测定采用微生物检定方法有什么优缺点？

2. 硫酸链霉素药物可以发生哪两项特征反应？分别是由什么成分发生的？





第一节 概述



一、抗生素类药物的定义和特点

青霉素于1929年被Fleming发现，至1943年链霉素的发现者赛尔曼·瓦克斯曼才给出了抗生素的定义。

认为：微生物代谢产生的能抑制他种微生物生长活动甚至杀灭他种微生物的化学物质。

1. 抗生素的定义（比较确切的）

抗生素是生物（包括微生物、植物、动物）在其生命活动中产生的（或并用化学、生物或生化方法衍生的），能在低微浓度下有选择地抑制或影响他种生物功能的化学物质的总称。



2. 抗生素的特点

抗生素的来源：生物合成（发酵），化学合成或半合成
生物合成与化学合成药物相比，其结构、组成更复杂，
抗生素的特点为：

（1）化学纯度较低

有三多：即同系物多，如庆大霉素、新霉素等含有多个组分；异构体多，半合成 β -内酰胺抗生素、氨基糖苷类抗生素具有旋光性，均存在光学异构体，如药用巴龙霉素为两个立体异构体巴龙霉素 I 和巴龙霉素 II 的混合物；降解物多，如四环素类存在脱水、差向异构体。



2. 抗生素的特点

(2) 活性组分易发生变异

微生物菌株的变化、发酵条件改变等均可导致产品质量发生变化，如组分的组成或比例的改变。

(3) 稳定性差

抗生素分子结构中通常含有活泼基团，而这些基团往往是抗生素的活性中心，如青霉素、头孢菌素类结构中的 β -内酰胺环，链霉素结构中的醛基等均具有稳定性差的特点。



二、抗生素类药物的分类（ P380 ）

1. 根据产生抗生素的生物来源分类
2. 根据抗生素的作用对象分类
3. 根据抗生素的作用机制分类
4. 根据抗生素的**化学结构**分类

前者对于临床选用抗生素带来一定方便，后者有利于抗生素工业生产和质量分析研究。按照**化学结构分类**共分为以下九大类。



根据抗生素的化学结构分类

- (1) β -内酰胺类抗生素
- (2) 氨基糖苷类抗生素
- (3) 四环类抗生素
- (4) 大环内酯类抗生素
- (5) 多烯大环类抗生素
- (6) 多肽类抗生素
- (7) 酰胺醇类抗生素
- (8) 抗肿瘤类抗生素
- (9) 其他抗生素



三、抗生素类药物的细菌耐药性（ P381 隨身課堂

在长期的抗生素选择之后出现的对相应抗生素产生耐受能力的微生物，统称耐药菌。所谓细菌**耐药性**（bacterial resistance）又称**抗药性**，是指细菌产生的对抗菌药不敏感的现象，是细菌自身生存过程的一种特殊表现形式。

1. 耐药性的种类：固有耐药性、获得性耐药性

2. 耐药的机制

（1）产生灭活酶 （2）抗菌药物的作用靶位改变

（3）降低细菌内膜的通透性 （4）影响主动流出系统



四、抗生素药物的质量分析

抗生素类药物的质量控制方法与一般化学药品一样

通过鉴别、检查、含量（效价）测定三个方面来判断其质量的优劣。

由于抗生素类药物的特点，其分析方法可分为理化方法和生物学法两大类。



(一) 鉴别试验

抗生素类药物的鉴别试验主要为**理化方法**，常用方法有：

1. 官能团的显色反应

如 β -内酰胺环的羟肟酸铁反应；链霉素的麦芽酚反应、坂口反应。对于抗生素盐类，通常鉴别酸根或金属离子或有机碱。

2. 光谱法

包括红外光谱与紫外吸收光谱的鉴别。



(一) 鉴别试验

3. 色谱法

包括TLC和HPLC法。

4. 生物学法

是检查抗生素灭活前后的抑菌能力，并与已知含量的对照品对照后进行鉴别，此法已很少应用。



(二) 检查

抗生素类药物的检查项目包括：

1. 影响产品**稳定性**的检查项目

结晶性、酸碱度、水分或干燥失重等；

2. 控制**有机和无机杂质**的检查项目

溶液的澄清度与颜色、有关物质、残留溶剂、炽灼残渣、重金属等；

3. 与**临床安全性**密切相关的检查项目

异常毒性、热原或细菌内毒素、降压物质、无菌等；



(二) 检查

4. 其他检查项目

对于多组分抗生素还要进行组分分析等（如硫酸庆大霉素的“庆大霉素C组分的测定”）。此外，有些抗生素还规定“悬浮时间与抽针试验”（如注射用普鲁卡因青霉素）、“聚合物”（如 β -内酰胺类抗生素）、“杂质吸光度”（如四环素类抗生素）等。



(三) 含量或效价测定

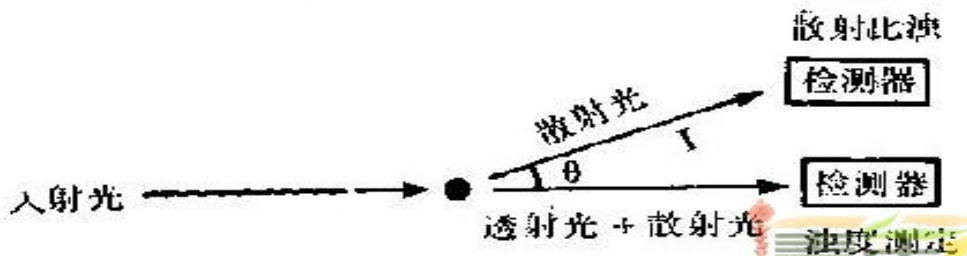
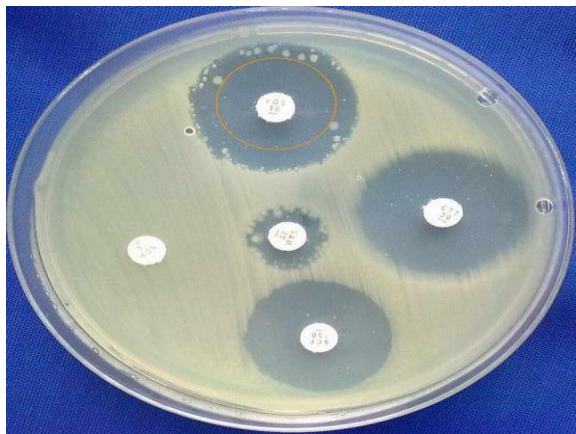
1. 微生物检定法
2. 理化方法
3. 抗生素活性表示方法



(三) 含量或效价测定

1. 微生物检定法

本法系在适宜条件下，根据量反应平行线原理设计，通过检测抗生素对微生物的抑制作用，计算抗生素活性（效价）的方法。测定方法可分为管碟法和浊度法。



(三) 含量或效价测定

微生物检定方法：测定抗生素抑菌或杀菌的能力。

优点：？

(1) 与临床效果一致，(2) 灵敏度高，(3) 干扰物质少

缺点：？

(1) 操作繁琐，(2) 培养时间长，(3) 测定误差大

随着抗生素类药物的发展和分析方法的进步，理化方法逐渐取代了生物学法。对于分子结构复杂、多组分的抗生素，生物学法仍然是首选的效价测定方法。



（三）含量或效价测定

2. 理化方法

以理化方法测定主药含量

优点：

（1）准确度高，（2）简单、快速

缺点：

（1）不一定代表生物效价，（2）易受杂质干扰

各国药典所收载的抗生素的理化方法主要是HPLC法



(三) 含量或效价测定

3. 抗生素活性表示方法

以效价单位表示，即指每毫升或每毫克中含有某种抗生素的有效成分的多少。

效价用单位（U）或微克（ μg ）表示。一种抗生素有一个效价基准。如：1mg青霉素钠定为1670 U，1mg庆大霉素定为5900U、1mg 硫酸卡那霉素定为670U...

以上为抗生素的理论效价，实际样品往往低于该理论效价。



第一节 概述小结

一、抗生素类药物的定义和特点

- (1) 化学纯度较低（三多：同系物多、异构体多、降解物多）
- (2) 活性组分易发生变异
- (3) 稳定性差

二、抗生素类药物的分类（按结构分）

三、抗生素类药物的细菌耐药性（了解）

四、抗生素药物的质量分析（鉴别、检查、含量测定）

分析方法：理化方法和生物学法





第二节

β -内酰胺类抗生素

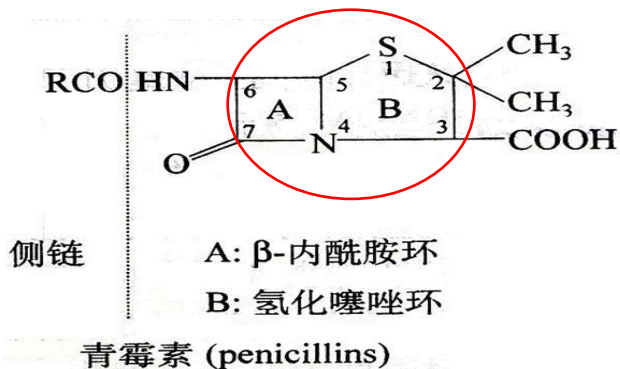


发展史

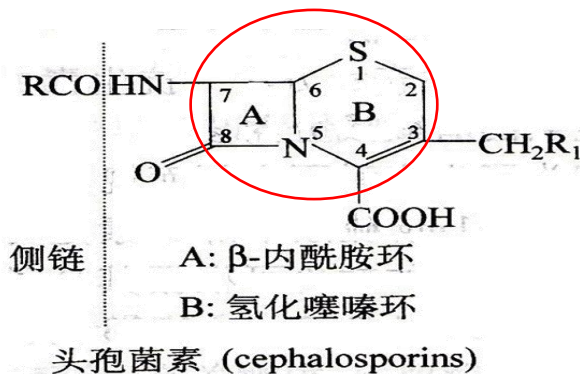
- 1929年，弗来明（ Alexander Fleming ）发现青霉素。
- 1958年，谢汉合成6-氨基青霉烷酸（ 6-APA ）成功，开创了**半合成青霉素**的时代。
- 1961年，头孢菌素C被发现，头孢菌素迅速发展。
- 80年代：广谱**碳青霉烯类**上市。



β-内酰胺类抗生素 包括青霉素类和头孢菌素类



青霉素类：母核
6-APA (6-氨基青霉烷酸)



头孢菌素类：母核
7-ACA (7-氨基头孢霉烷酸)

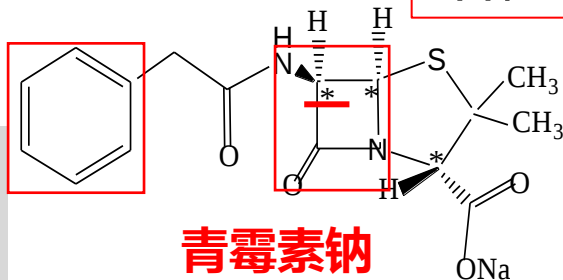
随着R---的不同就有不同的β-内酰胺类药物 (表16-1)



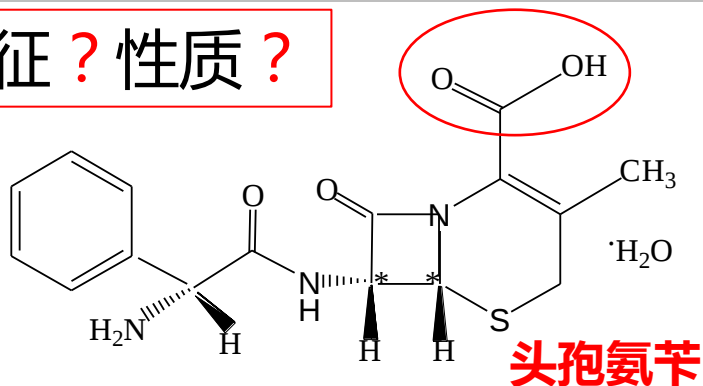
一、结构与性质

(一) 结构

结构特征 ? 性质 ?



青霉素钠



头孢氨苄

(二) 性质

1. 酸性与溶解度
2. 不稳定性
3. 旋光性
4. 紫外吸收特征

青霉素类：
6-APA为母核

代表药物：青霉素钠、青霉素钾、
阿莫西林、哌啦西林钠等

头孢菌素类：
7-ACA为母核

代表药物：头孢拉定、头孢氨苄、
头孢羟氨苄、头孢噻肟钠等



二、鉴别试验

本类药物的鉴别试验，现版ChP、USP、BP采用的方法主要为HPLC、IR和TLC法。

以青霉素钠（钾）为例

- （一）色谱法：薄层色谱法、**高效液相色谱法**
- （二）光谱法：紫外分光光度法、**红外分光光度法**。
- （三）显色反应：羟肟酸铁反应
- （四）钠、钾盐的焰色反应 **钠黄、钾紫**、钙砖红、钡黄绿



二、鉴别试验

(一) 色谱法

- 《中国药典》对鉴别试验中有HPLC法又有TLC法的，规定可在两种鉴别方法中选做一种。

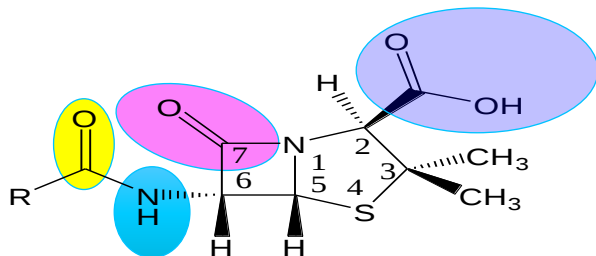


二、鉴别试验

(二) 光谱法

1. 红外吸收光谱 (IR)

该类抗生素的 β -内酰胺环羰基的伸缩振动 ($1750 \sim 1800\text{cm}^{-1}$) , 仲酰胺的氨基、羰基的伸缩振动 (3300cm^{-1} , 1525 cm^{-1} , 1680 cm^{-1}) , 羧酸离子的伸缩振动 (1600cm^{-1} , 1410cm^{-1}) 是该类抗生素共有的特征峰。



二、鉴别试验

2. 紫外吸收光谱 (UV)

根据其最大吸收波长或最大吸收波长处的吸光度进行鉴定。

如

头孢唑林钠的紫外鉴别法：取本品适量，加水溶解并稀释制成每1ml中约含16 μ g的溶液，在272nm的波长处测定吸光度，吸收系数 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) 为264 ~ 292。

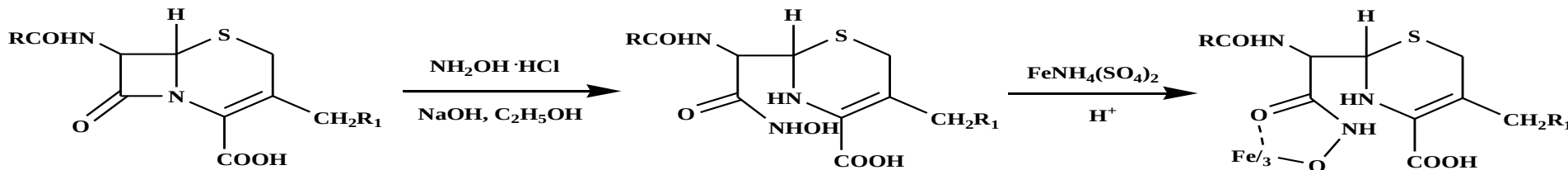


二、鉴别试验

(三) 呈色反应

1. 羟肟酸铁反应

青霉素及头孢菌素在碱性中与羟胺作用， β -内酰胺环破裂生成羟肟酸；在稀酸中与高铁离子呈色。



二、鉴别试验

2. 类似肽键的反应

本类药物具有-CONH-结构，一些取代基有 α -氨基酸结构，可显双缩脲和茚三酮反应。

3. 其他呈色反应

侧链含有-C₆H₅-OH（酚）基团时，能与重氮苯磺酸试液产生偶合反应而呈色。此外，本类药物还可与变色酸-硫酸、硫酸-甲醛等试剂反应而呈色。

（四）各种盐的反应

钾、钠离子的火焰反应



三、有关物质与检查

本类抗生素的杂质主要有**高分子聚合物**、**有关物质**、**异构体**等，一般采用HPLC法控制其限量，也有采用测定杂质的吸光度来控制杂质质量的。此外，有的还进行**结晶性**、**抽针与悬浮时间**等有效性试验，部分抗生素还检查**有机溶剂残留量**。

- (一) 聚合物 用**分子排阻色谱法**检查
- (二) 有关物质和异构体 HPLC
- (三) 吸光度
- (四) 有机溶剂
- (五) 结晶性



四、含量测定

各国药典收载的青霉素类和头孢菌素类的含量测定除少数几个样品采用抗生素微生物检定法测定外，大多采用HPLC测定方法。

如**头孢拉定**



色谱条件与系统适用性试验

色谱柱：十八烷基硅烷键合硅胶

流动相：水-甲醇-3.86%醋酸钠溶液-4%醋酸溶液（1564：400：30：6）

流速：每分钟0.7-0.9 ml

检测波长：254nm

系统适用性试验：取头孢拉定对照品溶液10份和头孢氨苄对照品贮备液（0.4mg / ml）1份，混匀，取10 μ l注入液相色谱仪测定，头孢拉定峰和头孢氨苄峰的分离度应符合要求。理论板数按头孢拉定峰计算不低于2500。



对照品溶液和供试品溶液的配制

头孢氨苄对照品贮备液制备

取头孢氨苄对照品约**20mg**，精密称定，置**50 ml**量瓶中，加流动相约30 ml，置超声波浴中使溶解（按照KQ-250型超声波清洗器标准操作规程操作），再加流动相稀释至刻度，摇匀。

对照品溶液的制备

取头孢拉定对照品适量（相当于头孢拉定约35mg），精密称定，置**50ml**量瓶中，加水约6 ml，置超声波浴中使溶解，再加流动相稀释至刻度，摇匀。

供试品溶液的制备

取本品约**70mg**，精密称定，置**100ml**量瓶中，加流动相约70 ml，置超声波浴中使溶解，再加流动相稀释至刻度，摇匀。



测定法 取供试品溶液10 μ l注入液相色谱仪，记录色谱图；另取头孢拉定对照品溶液，同法测定。按外标法以峰面积计算供试品中C₁₆H₁₉N₃O₄S的含量

$$\text{头孢拉定}\% = \frac{m}{m_s} \times 100\% = \frac{C_X \times D \times V_X}{m_s} \times 100\% = \frac{C_R \times \frac{A_X}{A_R} \times D \times V_X}{m_s} \times 100\%$$

$$\text{头孢拉定}\% = \frac{C_R \times \frac{A_X}{A_R} \times D \times V_X}{m_s} \times 100\%$$



例：取某片剂（规格为0.25mg）25片，精密称定（0.5225g），研细，精密称取适量（约相当于主药6mg）（片粉量：0.5028g），置100ml量瓶中，精密加入50%甲醇溶液50ml，微温，振摇使主药溶解，放冷，加50%甲醇溶液稀释至刻度，滤过，精密量取续滤液20μl注入液相色谱仪，记录色谱图，另取该药对照品适量，精密称定（11.2mg），同法配成100ml，同法测定。按外标法以峰面积计算其占标示量的百分比。已知：对照品峰面积：86.25；供试品峰面积：46.52。

解：依据：

$$\text{标示量}\% = \frac{C_R \times \frac{A_X}{A_R} \times V_X \times D \times \text{平均片重}}{m_S \times \text{标示量}} \times 100\%$$

$$\text{标示量}\% = \frac{\frac{11.2}{100} \times \frac{46.52}{86.25} \times 100 \times \frac{0.5225}{25}}{0.5028 \times 0.25} \times 100\% = 100.4\%$$

答：.....





第三节

氨基糖苷类抗生素

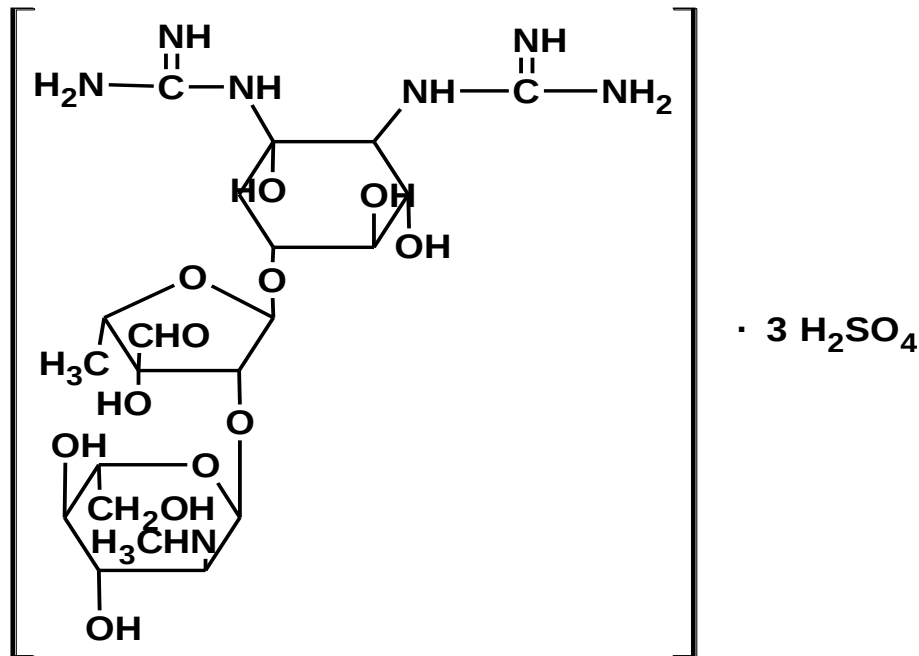


氨基糖苷类抗生素的化学结构都是以**碱性环己多元醇**为苷元，与**氨基糖**缩合而成的**苷**，故称为**氨基糖苷类**抗生素（Aminoglycosides Antibiotics）。



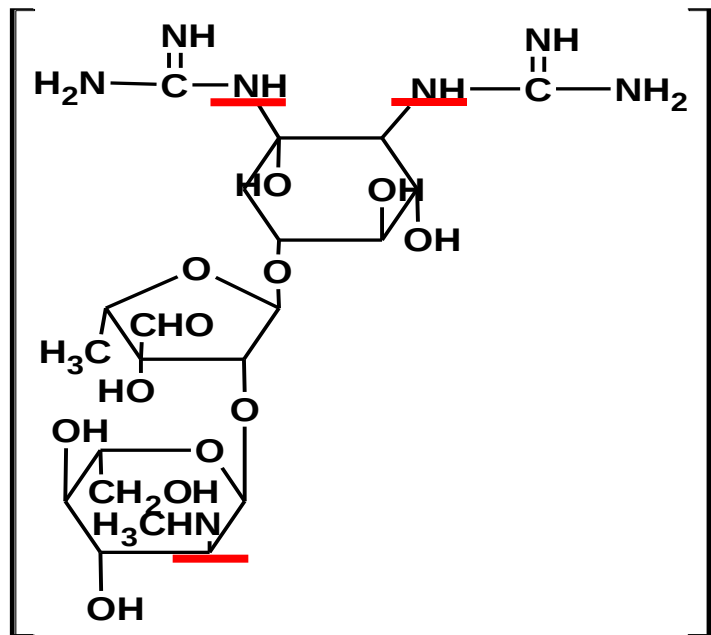
氨基环醇(碱性环己多元醇)与氨基糖缩合而成的苷类。

巴龙霉素



一、结构与性质

硫酸链霉素 为例



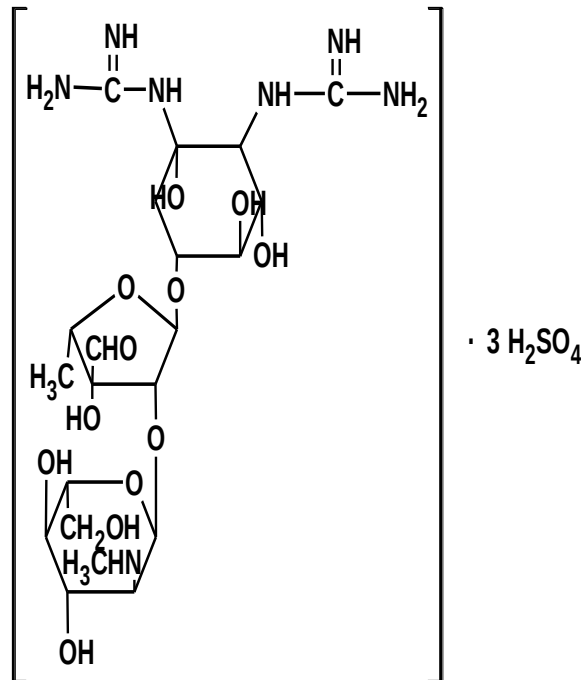
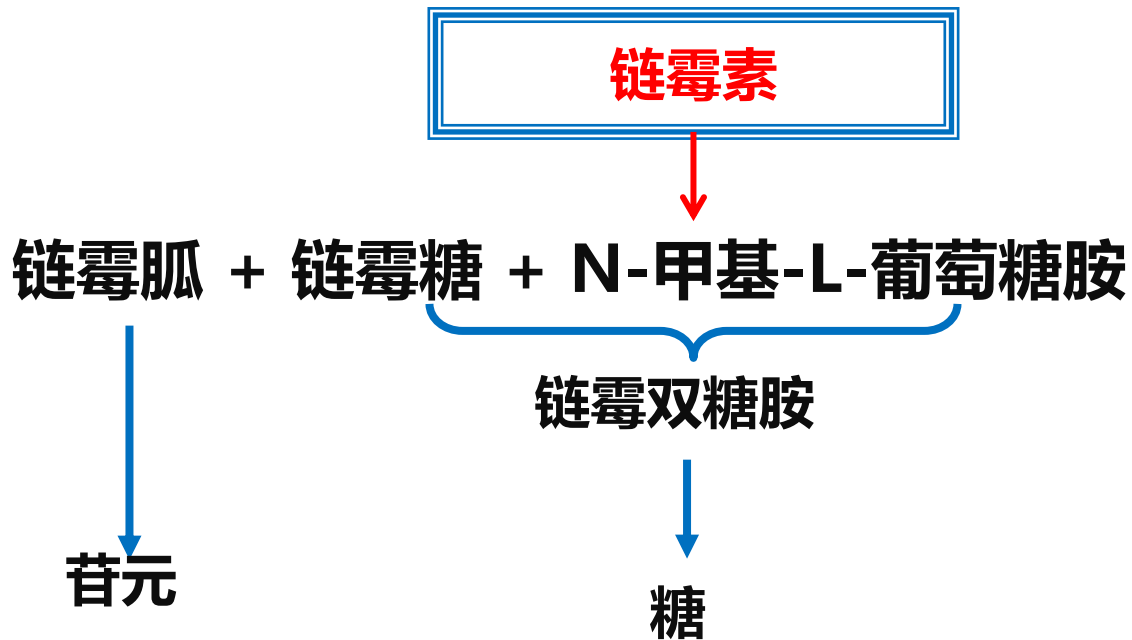
· 3 H₂SO₄

由一分子**链霉胍**(氨基环醇)和一分子**链霉双糖胺**结合而成的**碱性苷**。
分子中有**三个碱性中心**。
主要用于结核病治疗。



一、结构与性质

(一) 结构



一、结构与性质

(二) 性质

1. 碱性 多与硫酸成盐 碱性中心

2. 溶解性 (含多个羟基) -- 水溶性

3. 稳定性 (水解)

4. 旋光性 (含有氨基糖)

5. 紫外吸收性质

链霉素有230nm处有吸收收, 庆大霉素在紫外无吸收。

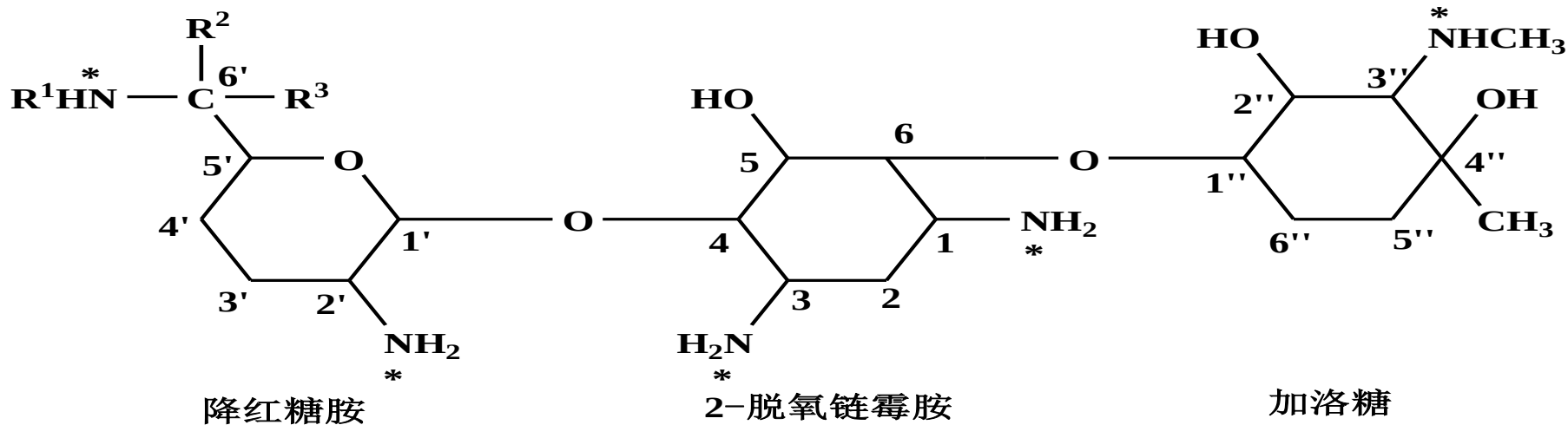
链霉素

3个

庆大霉素

5个





庆大霉素 (无共轭体系)



二、鉴别试验

- (一) 茚三酮反应
- (二) Molisch试验
- (三) *N*-甲基葡萄糖胺反应 (Elson-Morgan反应)
- (四) 麦芽酚 (Maltol) 反应
- (五) 坂口 (Sakaguchi) 反应
- (六) 硫酸盐反应
- (七) 色谱法
- (八) 光谱法



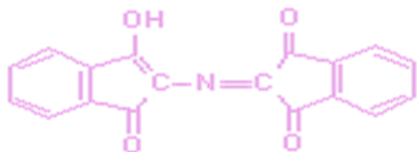
二、鉴别试验

(一) 茛三酮反应

本类抗生素为**氨基糖苷**结构，具有羟基胺类和 α -氨基酸的性质，可与茛三酮缩合成蓝紫色化合物。《中国药典》采用本法鉴别硫酸小诺霉素及其制剂。

硫酸小诺霉素的茛三酮反应鉴别法：

取本品约5mg，加水1ml溶解后，加0.1%茛三酮的水饱和正丁醇溶液1ml与吡啶0.5ml，在水浴中加热5分钟，即呈紫蓝色。



二、鉴别试验

(二) Molisch试验

具有五碳糖或六碳糖结构的氨基糖苷类抗生素经酸水解后，在盐酸（或硫酸）作用下脱水生成糠醛（五碳糖）或羟甲基糠醛（六碳糖）。这些产物遇 α -萘酚或蒽酮呈色。

阿米卡星的蒽酮呈色鉴别：

取本品约10mg，加水1ml 溶解后，加0.1%蒽酮的硫酸溶液4ml，即显蓝紫色。



二、鉴别试验

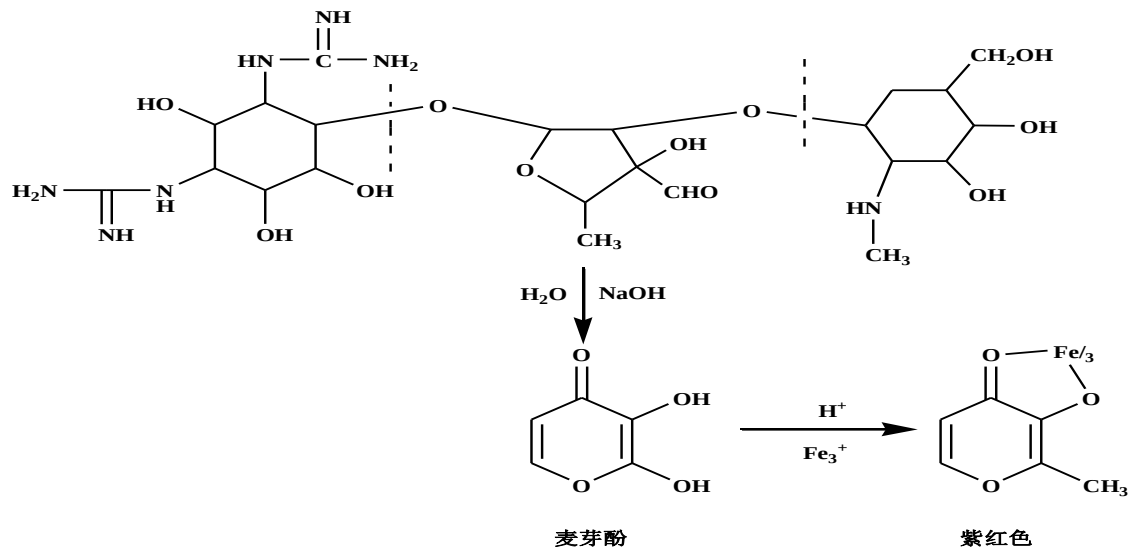
★（三）*N*-甲基葡萄糖胺反应

本类药物经水解，产生葡萄糖胺衍生物，如链霉素中的 *N*-甲基葡萄糖胺，硫酸新霉素、硫酸巴龙霉素中的 *D*-葡萄糖胺，在碱性溶液中与乙酰丙酮缩合成吡咯衍生物（Ⅰ），与对二甲氨基苯甲醛的酸性醇溶液（Ehrlich试剂）反应，生成樱桃红色缩合物（Ⅱ）。



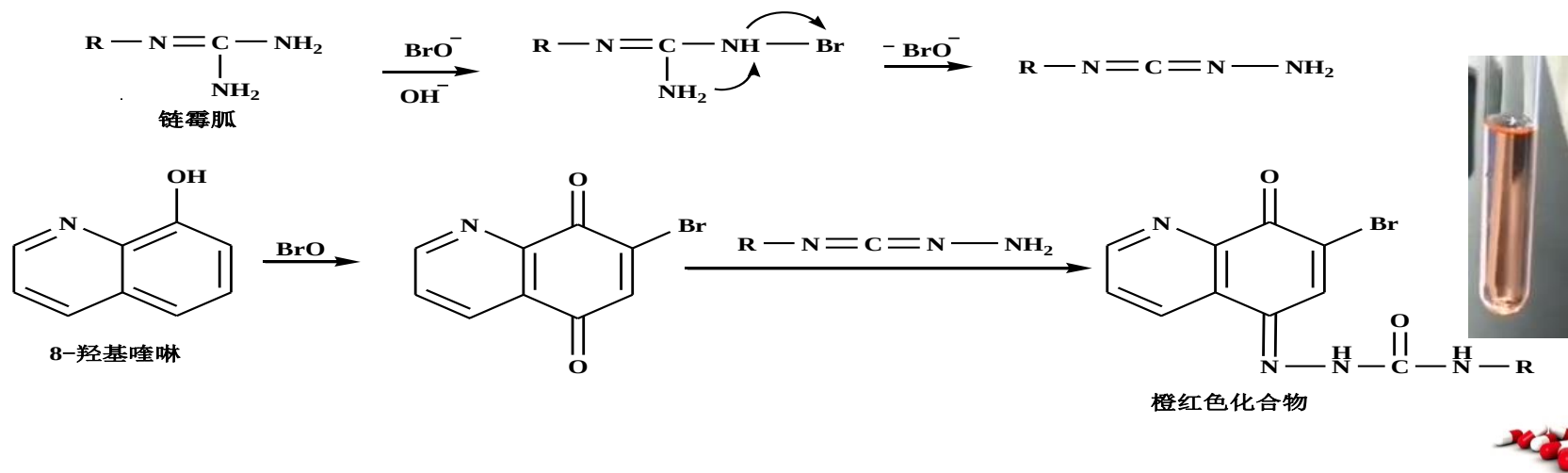
★ (四) 麦芽酚 (Maltol) 反应--链霉素的特征反应

链霉素水解生成的链霉糖，经脱水重排，生成麦芽酚。
麦芽酚在微酸下与三价铁离子(硫酸铁铵)络合，显紫红色。



★ (五) 坂口 (Sakaguchi) 反应

此为链霉素水解产物**链霉胍**的特有反应。本品水溶液加氢氧化钠试液，水解生成链霉胍。链霉胍和**8-羟基喹啉**（或 **α -萘酚**）分别同**次溴酸钠**反应，其各自产物再相互作用生成**橙红色**化合物。



二、鉴别试验

(六) 硫酸盐反应

本类药物多为硫酸盐，因此，各国药典都将**硫酸根**的鉴定作为鉴别这类抗生素的一个方法

(七) 色谱法

1. 薄层色谱法

多以硅胶为薄层板，三氯甲烷-甲醇-浓氨水为展开剂，**茚三酮**或**碘蒸气**为显色剂。

2. 高效液相色谱法

比较供试品溶液和对照品溶液的**色谱峰保留时间**进行鉴别。



例：ChP硫酸庆大霉素注射液的TLC鉴别：

取本品与硫酸庆大霉素标准品，分别加水制成每1ml中含2.5mg的溶液，照薄层色谱法试验，吸取上述两种溶液各2 μ l，分别点于同一硅胶G薄层板（临用前于105℃活化2小时）上；另取三氯甲烷-甲醇-氨溶液（1：1：1）混合振摇，放置1小时，分取下层混合液为展开剂，展开，取出于20～25℃晾干，置碘蒸气中显色，供试品溶液所显主斑点数、位置和颜色应与标准品溶液斑点数、位置和颜色相同。



二、鉴别试验

(八) 光谱法

1. 红外吸收光谱
2. 紫外吸收光谱

例：硫酸庆大霉素的UV鉴别 取硫酸庆大霉素10mg，加水1ml和40%硫酸溶液5ml；在水浴中加热100分钟，冷却，用水稀释至25ml。取该溶液进行紫外扫描，在240~330nm范围内应**无最大吸收**。



三、有关物质及组分分析

杂质来源：合成过程中，提取、精制不完全，残存的活性较低的物质。

检查项目：

（一）有关物质检查 **主要采用TLC和HPLC法。**

（二）组分测定：本类抗生素多为同系物组成的混合物，同系物的效价、毒性各不相同，为保证药品的质量，必须控制各组分的相对含量，ChP、USP和BP4均采用高效液相色谱法测定庆大霉素C各组分的含量。（示例16-18、19、20）

（三）硫酸盐检查 **各国药典规定EDTA络合滴定法或HPLC法测定硫酸盐含量，作为组分分析。**



四、含量测定

《中国药典》采用**微生物检定法**和**高效液相色谱法**。

微生物检定法：系利用抗生素在琼脂培养基内的扩散作用量反应平行线原理的设计，比较标准品与供试品两者对接种的试验菌产生抑菌圈的大小，以测定供试品效价的一种方法。

ChP2020采用**HPLC-蒸发光散射法**测定硫酸卡那霉素、硫酸依替米星等药物的含量（示例16-23）。



• 1. 抗生素硫酸阿米卡星属于：

B

- A . β -内酰胺类抗生素
- B . 氨基糖苷类抗生素
- C . 四环素类抗生素
- D . 氯霉素类抗生素
- E . 大环内酯类抗生素



2.可发生坂口氏反应的药物是:

- A. 维生素C
- B. 庆大霉素
- C. 青霉素
- D. 红霉素
- E. 链霉素

E



3. 能和茚三酮发生呈色反应的物质有（多选）

- A . 链霉素
- B . 庆大霉素
- C . 土霉素
- D . 氨基酸
- E . 苯巴比妥

ABD



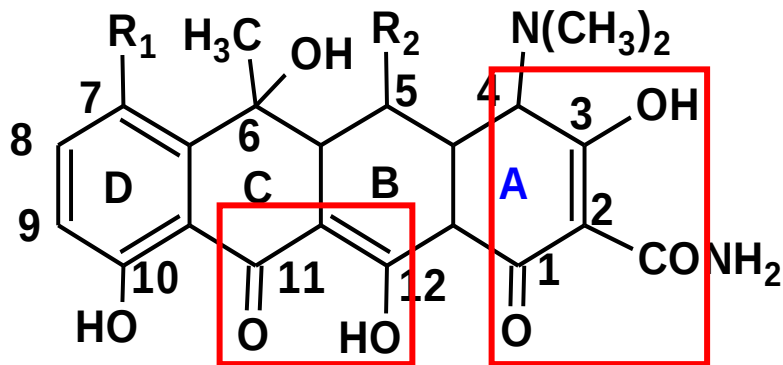
第四节

四环素类抗生素



一、结构与性质

(一) 结构



$R_1 = \text{Cl}$ $R_2 = \text{H}$ 金霉素

$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OH}$ 土霉素

$R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$ 四环素

A、B、C、D四个环组成的

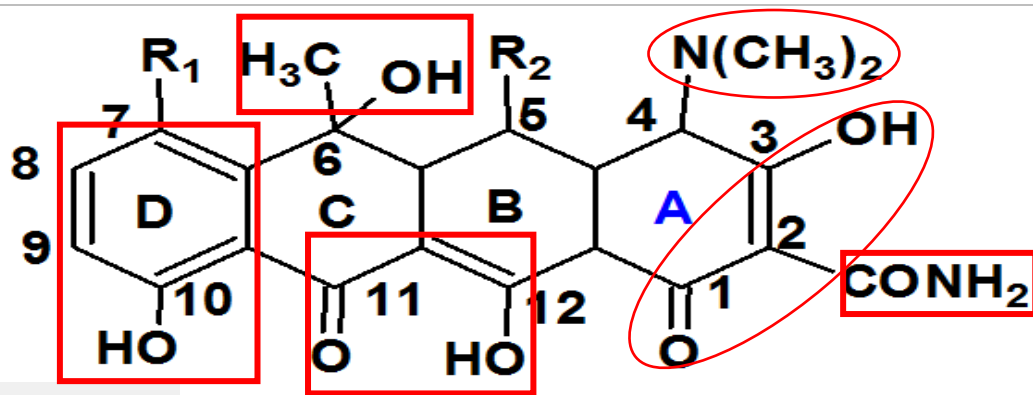
氢化并四苯衍生物



一、结构与性质

(一) 结构

结构特征？性质？



性质：

1. 酸碱两性
2. 稳定性 (降解)
3. 与金属离子络合
4. 与三氯化铁反应
5. 旋光性
6. 紫外吸收和荧光性质

结构特征：

1. $C_4-N(CH_3)_2$
2. C_2-CONH_2 、 C_6-OH 和 $-CH_3$
3. C_{10} -酚OH
4. 两个酮基和烯醇基的共轭体系



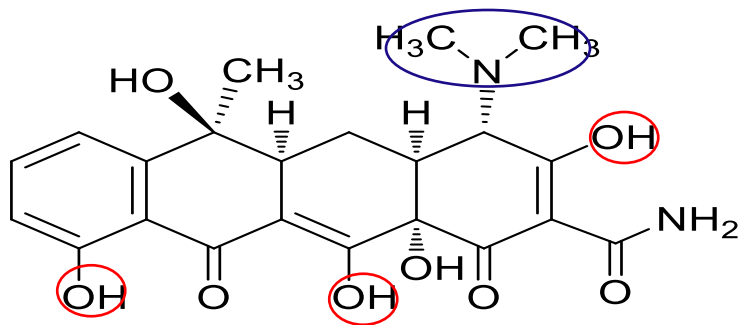
一、结构与性质

(二) 性质

1. 酸碱两性

酸性：酚羟基和烯醇羟基

碱性：二甲氨基

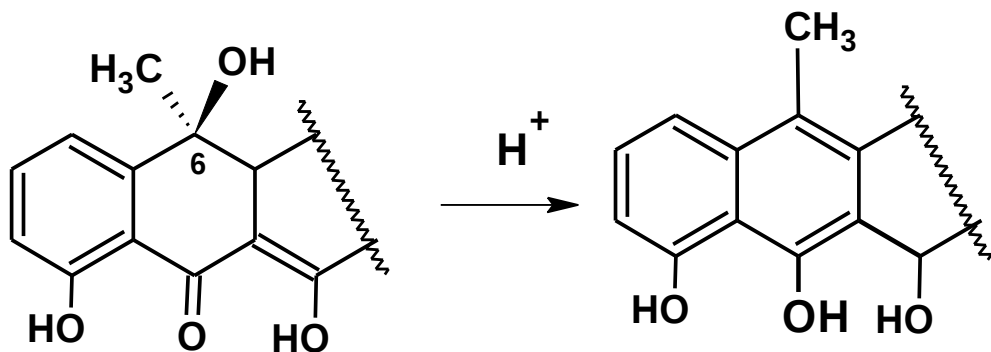


一、结构与性质

(二) 性质

2. 稳定性

(1) 酸性 $\text{pH} < 2$ 条件下， C_6 -羟基与 C_5 -氢发生消除反应，生成无活性的橙黄色脱水物。

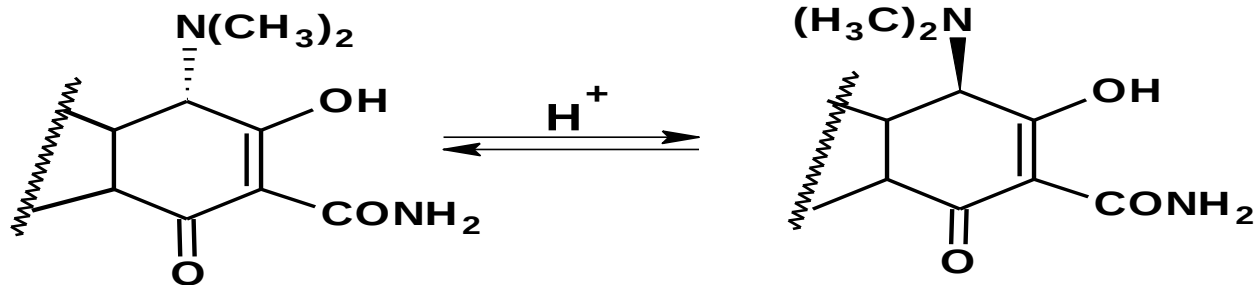


一、结构与性质

(二) 性质

2. 稳定性

(2) pH 2-6条件下： C_4 -二甲氨基易发生可逆的差向异构化反应。



差向异构化产物在酸性条件下，会进一步脱水，生成脱水差向异构化产物。二者抗菌活性减弱或消失，毒性增强

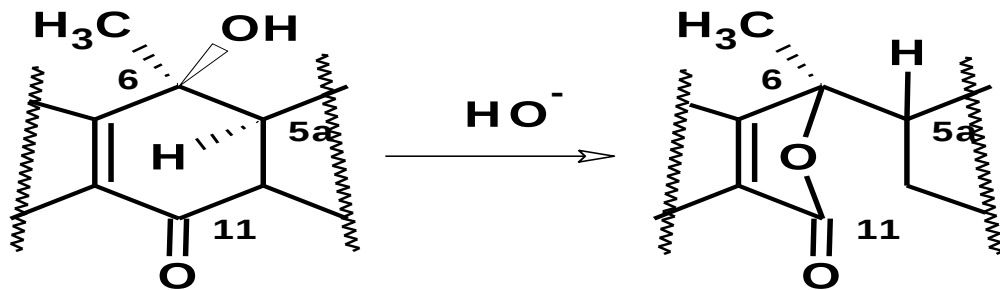


一、结构与性质

(二) 性质

2. 稳定性

- (3) 在碱性溶液中， C_6 -羟基能形成氧负离子，向 C_{11} 发生分子内亲核反应，使C环破裂，生成具有内酯结构的异构体。

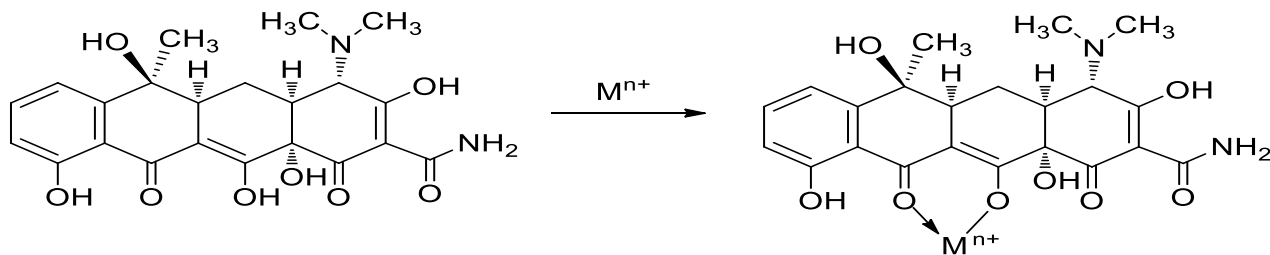


一、结构与性质

(二) 性质

3. 与金属离子络合

分子中存在的酚羟基和烯醇羟基与 Ca^{2+} ， Mg^{2+} 形成不溶性的黄色络合物，与铁离子形成红色络合物与铝离子形成黄色络合物



二、鉴别试验

1. 色谱法(TLC、HPLC)

采用高效液相色谱法鉴别盐酸四环素、盐酸土霉素、盐酸多西环素、盐酸金霉素。也有取用薄层色谱法

2. 光谱法

(1) 红外吸收光谱法

(2) 紫外吸收光谱法

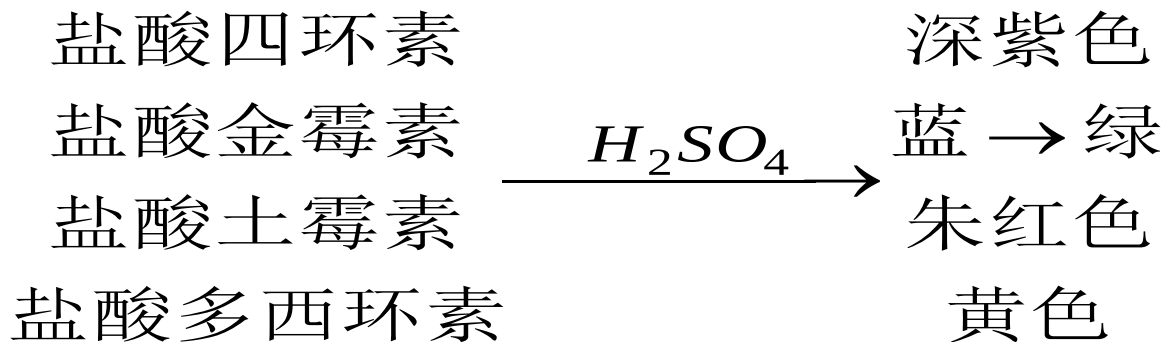


二、鉴别试验

3. 显色法

(1) 浓硫酸反应

与硫酸作用，会产生不同的颜色。



二、鉴别试验

3. 显色法

(2) 三氯化铁反应 (含酚羟基)

与三氯化铁反应显不同的颜色。

盐酸四环素		红棕色
盐酸金霉素	$FeCl_3$	深褐色
盐酸土霉素	→	橙褐色
盐酸多西环素		褐色





三、 杂质检查

- 1.有关物质 (HPLC)
- 2.杂质吸光度 (例 : [四环素](#))
- 3.残留有机溶剂

四、 含量测定

高效液相色谱法



1. 下列哪个药物会发生羟肟酸铁反应

A. 青霉素

A

B. 庆大霉素

C. 红霉素

D. 链霉素

E. 维生素C



2. 四环素在酸性条件下的降解产物是

A. 差向四环素

B. 脱水四环素

C. 异四环素

D. 去甲四环素

E. 去甲氧四环素

B



- 3. 四环素类抗生素的鉴别反应有（多选）
- A . 浓硫酸反应
- B . 荧光反应
- C . 三氯化铁反应
- D . 坂口反应
- E . 溴水反应

AC





第五节

抗生素类药物中高分子杂质的检查



抗菌药物是临床最常用的药物，也是较易发生不良反应的药物之一，其不良反应主要是药物所致的过敏反应，尤以 β -内酰胺类抗生素最为严重。



一、抗生素药物中高分子聚合物的定义、来源与分类

抗生素药物中的高分子杂质系指药物中分子量大于药物本身的杂质的总称。分子量一般在1000~5000D，个别可至10 000D。

高分子杂质的来源： β -内酰胺类抗生素高分子杂质有外源性和内源性两种。

外源性一般源于发酵工艺，为蛋白、多肽、多糖等杂质与抗生素结合的杂质。内源性系指抗生素药物自身聚合的产物。聚合物既可来自生产过程，又可在贮藏过程中形成，甚至在用药时也可以产生。



二、高分子杂质的控制方法

本类药物中高分子杂质的分离分析方法已有不少文献报道，主要有反相高效液相色谱、凝胶色谱和离子交换色谱等。其中根据分子量差异进行分离的**凝胶色谱**是一种简便易行的分离方法。经研究比较，选定Sephadex G-10（葡聚糖凝胶G）作为 β -内酰胺类抗生素高分子杂质分离色谱系统的凝胶介质。



小结

一、抗生素的概述（鉴别、检查、含量测定）

二、 β -内酰胺类抗生素（鉴别：羟肟酸铁、印三酮、金属火焰反应等呈色反应；含量：**磺苄西林钠**采用微生物检定法外，其余均采用HPLC法）

三、氨基糖苷类抗生素（鉴别：坂口、麦芽酚...；含量：微生物检定和高效）

四、四环素类抗生素【结构、性质、鉴别、检查、含量测定（高效）】





隨身課堂

《药物分析术》

抗生素类药物的分析

敬请关注下一节内容

合成抗菌药物的分析



环丙沙星

乳酸环丙沙星注射液

环吡酮胺

环吡酮胺乳膏

环孢素

环孢素口服溶液

环扁桃酯

环扁桃酯胶囊

环磷酰胺

环磷酰胺片

注射用环磷酰胺

环磷腺苷

注射用环磷腺苷

青蒿素

青蒿素哌嗪片

青蒿琥酯

青蒿琥酯片

注射用青蒿琥酯

青霉素V钾

青霉素V钾片

青霉素V钾胶囊

青霉素钠

注射用青霉素钠

青霉素钾

注射用青霉素钾

青霉胺

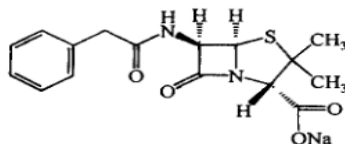
青霉胺片

苯丁酸氮芥

青霉素钠

Qingmeisuna

Benzylpenicillin Sodium

 $C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$ 356.38

本品为(2S,5R,6R)-3,3-二甲基-6-(2-苯乙酰氨基)-7-氧代-4-硫杂-1-氮杂双环[3.2.0]庚烷-2-甲酸钠盐。按干燥品计算,含 $C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$ 不得少于 96.0%。

【性状】 本品为白色结晶性粉末;无臭或微有特异性臭;有引湿性;遇酸、碱或氧化剂等即迅速失效,水溶液在室温放置易失效。

本品在水中极易溶解,在乙醇中溶解,在脂肪油或液状石蜡中不溶。

【鉴别】 (1)在含量测定项下记录的色谱图中,供试品溶液主峰的保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致。

(2)本品的红外光吸收图谱应与对照的图谱(光谱集 222 图)一致。

(3)本品显钠盐鉴别(1)的反应(通则 0301)。

【检查】 结晶性 取本品少许,依法检查(通则 0981),应符合规定。

酸碱度 取本品,加水制成每 1ml 中含 30mg 的溶液,依法测定(通则 0631),pH 值应为 5.0~7.5。

溶液的澄清度与颜色 取本品 5 份,各 0.3g,分别加水

节 pH 值至 3.4)-甲醇(72:14)为流动相 A,乙腈为流动相 B;检测波长为 225nm,流速为每分钟 1.0ml,柱温为 34℃。取青霉素系统适用性对照品适量,加水溶解并稀释制成每 1ml 中约含 4mg 的溶液,取 20μl 注入液相色谱仪,先以流动相 A-流动相 B(86.5:13.5)等度洗脱,待杂质 E 的第 3 个色谱峰(见参考图谱)洗脱完毕后,立即按下表进行线性梯度洗脱,记录的色谱图应与标准图谱一致。取灵敏度溶液 20μl 注入液相色谱仪,主成分色谱峰峰高的信噪比应大于 10。精密量取供试品溶液与对照溶液各 20μl,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。供试品溶液色谱图中如有杂质峰,各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积(1.0%)。供试品溶液色谱图中小于灵敏度溶液主峰面积的峰忽略不计。

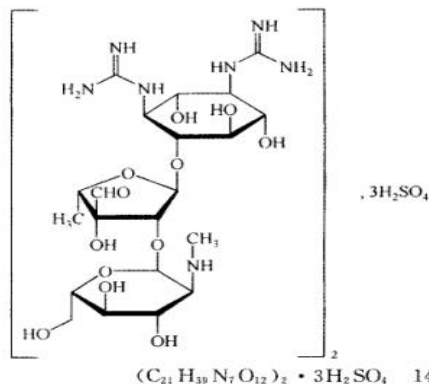
时间(分钟)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	86.5	13.5
$t_R + 2$	86.5	13.5
$t_R + 26$	64	36
$t_R + 38$	64	36
$t_R + 39$	86.5	13.5
$t_R + 50$	86.5	13.5

t_R :青霉素系统适用性对照品溶液中杂质 E 的第 3 个色谱峰的保留时间。

青霉素聚合物 照分子排阻色谱法(通则 0514)测定。

色谱条件与系统适用性试验 用葡聚糖凝胶 G-10(40~120μm)为填充剂,玻璃柱内径为 1.0~1.4cm,柱长为 30~40cm,流动相 A 为 pH 7.0 的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液[0.1mol/L 磷酸氢二钠溶液-0.1mol/L 磷酸二氢钠溶液(61:

注射用硫酸链霉素



(4)本品的水溶液显硫酸盐的鉴别反应(通则 0301)。

异常毒性 取本品,加氯化钠注射液制成每1ml中含2600单位的溶液,依法检查(通则1141),按静脉注射法给药,观察24小时,应符合规定。(供注射用)

试验,显相同的反应。

(2)在含量测定项下记录的色谱图中,供试品溶液主峰的保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致。

【检查】 酸度 取本品,加水制成每 1ml 中含 10mg 的溶液,依法测定, pH 值应为 3.5~4.5(通则 0631)。

溶液的澄清度 取本品,加水溶解并稀释制成每 1ml 中含 50mg 的溶液,溶液应澄清;如显浑浊,与 1 号浊度标准液(通则 0902 第一法)比较,不得更浓。

有关物质 临用新制。取装量差异项下的内容物,精密称取适量(约相当于盐酸甲氯芬酯 50mg),置 50ml 量瓶中,加溶剂[水(用磷酸调节 pH 值至 2.5)-乙腈(40:60)]适量,振摇使盐酸甲氯芬酯溶解,并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。照盐酸甲氯芬酯有关物质项下的方法测定。供试品溶液色谱图中如有杂质峰,单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 0.5 倍(0.5%),各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积(1.0%)。

干燥失重 取本品,在 105℃ 干燥至恒重,减失重量不得超过 1.0%(通则 0831)。

细菌内毒素 取本品,依法检查(通则 1143),每 1mg 盐酸甲氯芬酯中含内毒素的量应小于 1.0EU。

无菌 取本品,用 0.9% 无菌氯化钠溶液溶解并稀释制成每 1ml 中含 15mg 的溶液,经薄膜过滤法处理,用 0.1%

• 906 •

中国药典 2015 年版

保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致。

(3)本品的红外光吸收图谱应与对照的图谱(光谱集 332 图)一致。

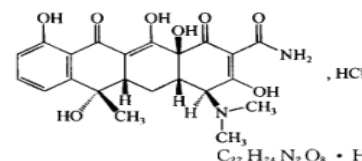
(4)本品的水溶液显氯化物鉴别(1)的反应(通则 0301)。



盐酸四环素

Yansuan Sihuan su

Tetracycline Hydrochloride



本品为(4S,4aS,5aS,6S,12aS)-6-甲基-4-(二甲氨基)-3,6,10,12,12a-五羟基-1,11-二氧代-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-八氢-2-并四苯甲酰胺盐酸盐。按干燥品计算,含盐酸四环素($C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$)不得少于 95.0%。

【性状】 本品为黄色结晶性粉末;无臭;略有引湿性;遇光色渐变深,在碱性溶液中易破坏失效。

本品在水中溶解,在乙醇中微溶,在乙醚中不溶。

比旋度 取本品,精密称定,加 0.01mol/L 盐酸溶液溶解并定量稀释制成每 1ml 中含 10mg 的溶液,依法测定(通则 0621),比旋度为 -240° 至 -258° 。

【鉴别】 (1)取本品约 0.5mg,加硫酸 2ml,即显深紫色,再加三氯化铁试液 1 滴,溶液变为红棕色。

(2)在含量测定项下记录的色谱图中,供试品溶液主峰的



盐酸四环素片

四环素、土霉素、差向脱水四环素、四环素、金霉素、脱水四环素,四环素峰的保留时间约为 14 分钟。4-差向四环素峰、土霉素峰、差向脱水四环素峰、四环素峰、金霉素峰间的分离度均应符合要求,金霉素峰与脱水四环素峰间的分离度应大于 1.0。