

药物分析

第十六章 抗生素类药物的分析



人民卫生出版社

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

第一节	概述
第二节	β -内酰胺类抗生素
第三节	氨基糖苷类抗生素
第四节	四环素类抗生素
第五节	抗生素类药物中高分子杂质的检查



- 抗生素（Antibiotics）类药物是临床上常用的一类重要药物，临床使用的抗生素的主要是生物合成，经过发酵和提纯两步制得；也有少数是利用化学合成或半合成方法制得。ChP2015共收载抗生素类原料药及其各种制剂近500个品种。



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，即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。
- 一般认为，比较确切的抗生素的定义应为：**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。**



与化学合成药物相比，其结构、组成更复杂，表现为：

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. 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

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) 四环类抗生素
- (3) 氨基糖苷类抗生素
- (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

- 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
 2. 耐药的机制



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）测定三个主要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。抗生素的红外光谱分析时需注意，由于抗生素存在多晶现象：重结晶供试品和对照品；溶液法试验。



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；



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。



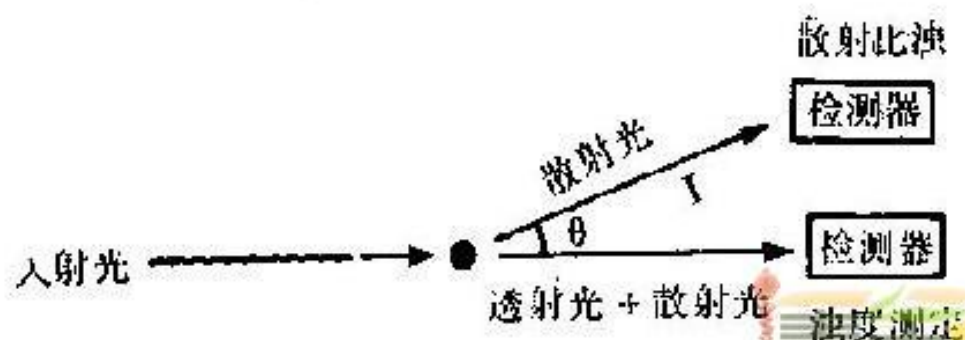
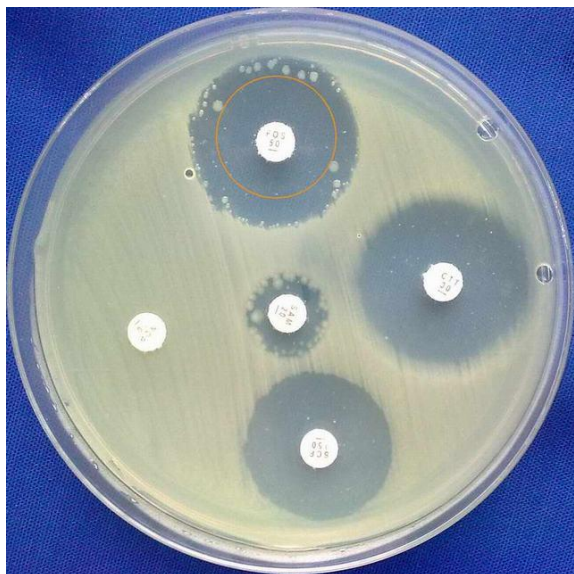
(三) 含量或效价测定

1. 微生物检定法
2. 理化方法
3. 抗生素活性表示方法



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。



- 微生物检定法的优点是灵敏度高、需用量小，测定结果较直观；测定原理与临床应用的要求一致，更能确定抗生素的医疗价值；而且适用范围广，较纯的精制品、纯度较差的制品、已知的或新发现的抗生素均能应用；对同一类型的抗生素不需分离，可一次测定其总效价，是抗生素药物效价测定的最基本的方法。



- 但其存在着操作步骤多、测定时间长、误差大等缺点，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。

2. 理化方法

- 提纯的产品以及化学结构已确定的抗生素，能较迅速、准确地测定其效价，并具有较高的专属性。
- 不足：含有具同样官能团杂质的供试品就不适用，或需采取适当方法加以校正；只能代表药物的总含量，并不一定能代表抗生素的生物效价。要求测定结果必须与生物效价吻合。
- 目前世界各国药典所收载的抗生素的理化方法主要是HPLC法，如 β -内酰胺类、四环素类、大环内酯类等抗生素大多采用HPLC法测定含量。



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。以上为抗生素的理论效价，实际样品往往低于该理论效价。



第二节

β -内酰胺类抗生素



- 本类抗生素包括青霉素类和头孢菌素类，它们的分子结构中均含有 β -内酰胺环，因此统称为 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。

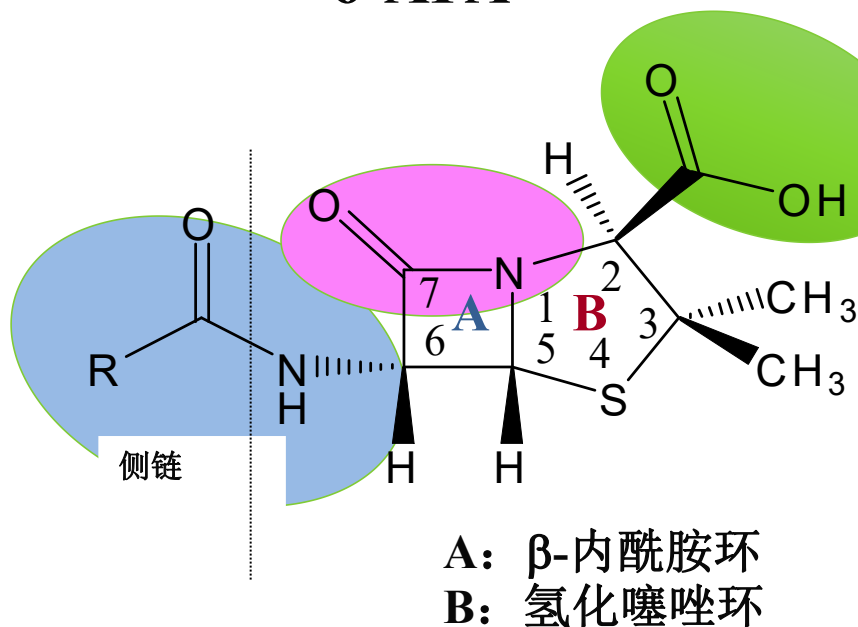


一、化学结构与性质

1. 化学结构 β -内酰胺环

青霉素类的基本结构

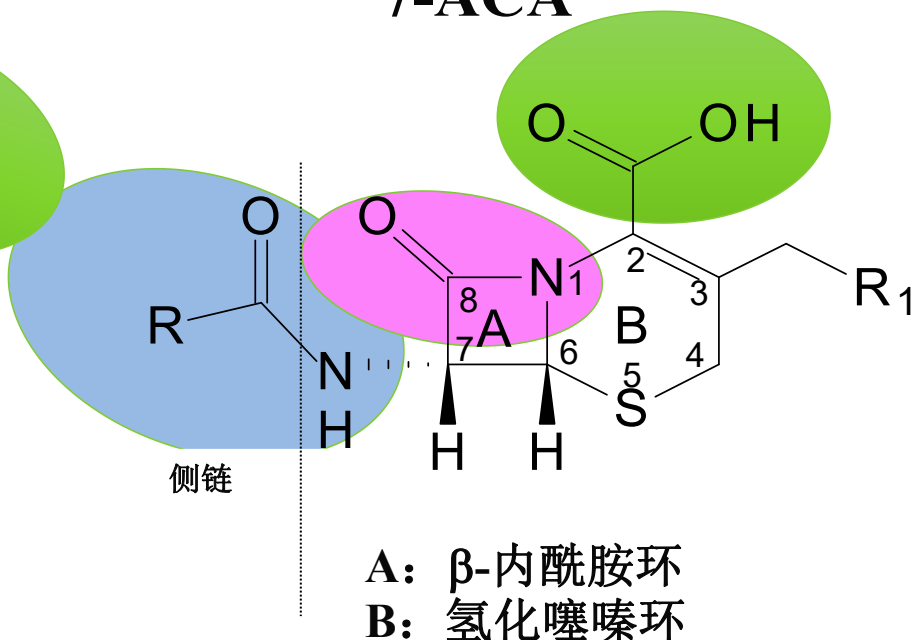
6-APA



青霉素类 (penicillins)

头孢菌素的基本结构

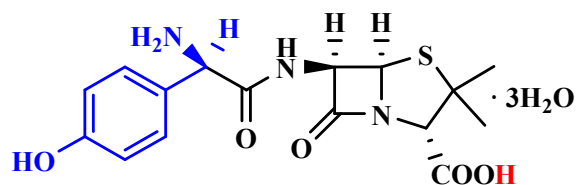
7-ACA



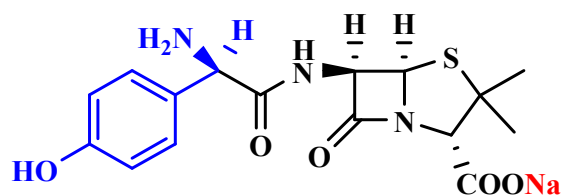
头孢菌素类 (cephalosporins)



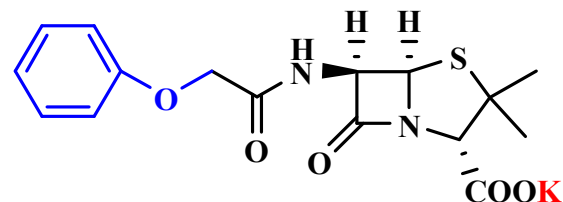
人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE



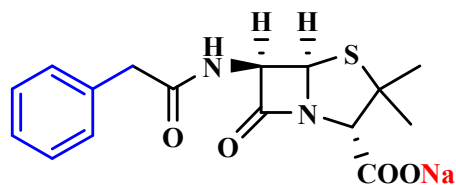
阿莫西林



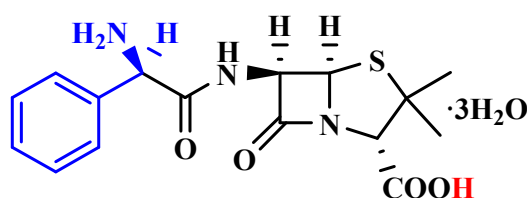
阿莫西林钠



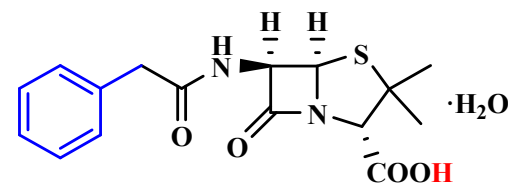
青霉素V钾



青霉素钠



氨苄西林



普鲁卡因盐基
普鲁卡因青霉素

β -内酰胺类抗生素部分原料药的物理性质、鉴别、检查和含量测定

药物名称	物理性质	鉴别	检查	含量测定
阿莫西林 Amoxicillin	白色或类白色结晶性粉末。 在水中微溶，在乙醇中几乎不溶。 $[\alpha]_D$ （水溶液） $+290^\circ$ 至 $+315^\circ$	1. TLC 或HPLC; 2. IR	①酸度；②溶液的澄清度； ③有关物质（HPLC）；④阿莫西林聚合物； ⑤残留溶剂（丙酮与二氯甲烷）； ⑥水分；⑦炽灼残渣	HPLC法



β-内酰胺类抗生素部分原料药的物理性质、鉴别、检查和含量测定

药物名称	物理性质	鉴别	检查	含量测定
阿莫西林钠 Amoxicillin Sodium	白色或类白色粉末或结晶；无臭或微臭；有引湿性。在水中易溶，在乙醇中略溶，在乙醚中不溶。 [α] _D （水溶液）+240° 至 +290°	1. TLC或HPLC； 2. IR； 3. 钠盐的鉴别	①碱度；②溶液的澄清度与颜色；③有关物质（HPLC）；④残留溶剂（乙醇与乙酸甲酯）；⑤2-乙基己酸；⑥水分；⑦可见异物；⑧不溶性微粒；⑨细菌内毒素；⑩无菌	HPLC法

β -内酰胺类抗生素部分原料药的物理性质、鉴别、检查和含量测定

药物名称	物理性质	鉴别	检查	含量测定
青霉素V钾 Phenoxymethylpenicillin Potassium	白色结晶或结晶性粉末；无臭或微臭。 在水中易溶，在乙醚或液状石蜡中几乎不溶。 $[\alpha]_D$ （水溶液） +215° 至+230°	1. HPLC； 2. IR； 3. 钾盐的鉴别	①吸光度； ②结晶性； ③酸碱度； ④有关物质（HPLC）； ⑤青霉素V聚合物；⑥水分	HPLC法



β -内酰胺类抗生素部分原料药的物理性质、鉴别、检查和含量测定

药物名称	物理性质	鉴别	检查	含量测定
氨苄西林 Ampicillin	白色结晶性粉末； 味微苦。 在水中微溶，在乙醇、乙醚或不挥发油中不溶； 在稀酸溶液或稀碱溶液中溶解。 $[\alpha]_D$ (水溶液) +280° 至+305°	1. TLC或HPLC； 2. IR	①酸度；②溶液的澄清度； ③有关物质（HPLC）；④N,N-二甲基苯胺（GC）； ⑤水分；⑥炽灼残渣；⑦重金属	HPLC法



β -内酰胺类抗生素部分原料药的物理性质、鉴别、检查和含量测定

药物名称	物理性质	鉴别	检查	含量测定
青霉素钠 Benzylpenicillin Sodium	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。 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	1. HPLC； 2. IR； 3. 钠盐的鉴别	①结晶性；②酸碱度；③溶液的澄清度与颜色；④吸光度；⑤有关物质（HPLC）；⑥青霉素聚合物；⑦干燥失重；⑧可见异物；⑨不溶性微粒；⑩细菌内毒素；⑪无菌	HPLC法

β-内酰胺类抗生素部分原料药的物理性质、鉴别、检查和含量测定

药物名称	物理性质	鉴别	检查	含量测定
普鲁卡因 青霉素 Procaine Benzylpenicillin	白色结晶性粉末； 遇酸、碱或氧化剂 等即迅速失效。 在甲醇中易溶， 在乙醇中略溶， 在水中微溶。 [α] _D （水溶液） +280° 至+305°	1. TLC或HPLC； 2. IR	①酸碱度；②溶液的澄清度与颜色；③有关物质（HPLC）；④青霉素聚合物；⑤残留溶剂（乙酸乙酯与正丁醇）；⑥水分；⑦抽针试验；⑧细菌内毒素；⑨无菌	HPLC法

2. 性质

- (1) β -内酰胺环的不稳定性： β -内酰胺环是该类抗生素的结构活性中心，其性质活泼，是分子结构中最不稳定部分
- (2) 旋光性



- (3) 酸性与溶解度：青霉素类和头孢菌素类分子中的游离羧基具有相当强的酸性
- (4) 紫外吸收特性：青霉素类分子中的母核部分无共轭系统，但其侧链酰胺基上R取代基若有苯环等共轭系统，则有紫外吸收特征。而头孢菌素类母核部分具有 $O=C-N-C=C$ 结构，R取代基具有苯环等共轭系统，有紫外吸收

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。
 - （一）色谱法
 - （二）光谱法
 - （三）呈色反应
 - （四）各种盐的反应



（一） 色谱法

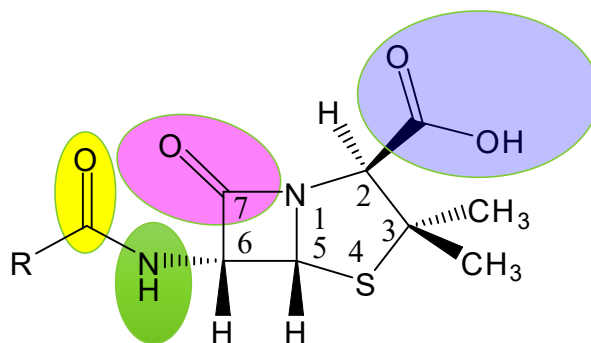
- 《中国药典》对鉴别试验中有HPLC法又有TLC法的，规定可在两种鉴别方法中选做一种。



(二) 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。



2. 紫外吸收光谱（UV）

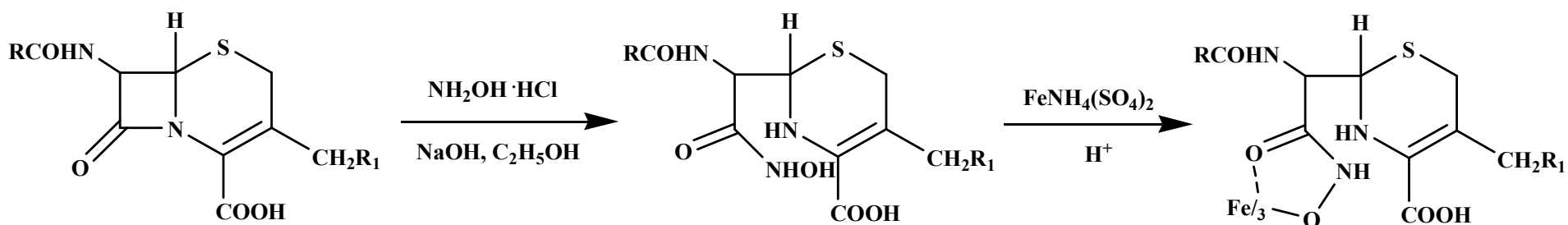
- 根据其最大吸收波长或最大吸收波长处的吸光度进行鉴定。
- 如头孢唑林钠的紫外鉴别法：取本品适量，加水溶解并稀释制成每1ml中约含16 μ g的溶液，在272nm的波长处测定吸光度，吸收系数（ $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ）为264~292。



(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。



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 青霉素类、头孢菌素类药品中，许多制成钾盐或钠盐供临床使用



三、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
- （二） 有关物质和异构体
- （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。



ChP2015头孢克洛含量的HPLC测定法

• 色谱条件与系统适用性试验： 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以磷酸二氢钾溶液（取磷酸二氢钾6.8g，加水溶解并稀释成1000ml，用磷酸调节pH至3.4）-乙腈（92：8）为流动相；检测波长为254nm。取头孢克洛对照品及**头孢克洛 δ -3-异构体**对照品适量，加流动相溶解并稀释制成每1ml中分别含头孢克洛及头孢克洛 δ -3-异构体约0.2mg的混合溶液，取20 μ l注入液相色谱仪，记录色谱图，头孢克洛峰与头孢克洛 δ -3-异构体峰的分离度应符合要求。



- 测定法 取本品约20mg，精密称定，置100ml量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，取20μl注入液相色谱仪，记录色谱图；另取头孢克洛对照品适量，同法测定。按外标法以峰面积计算出供试品中 $C_{15}H_{14}ClN_3O_4S$ 的含量。规定按无水物计算，含 $C_{15}H_{14}ClN_3O_4S$ 不得少于95.0%。



第三节

氨基糖苷类抗生素



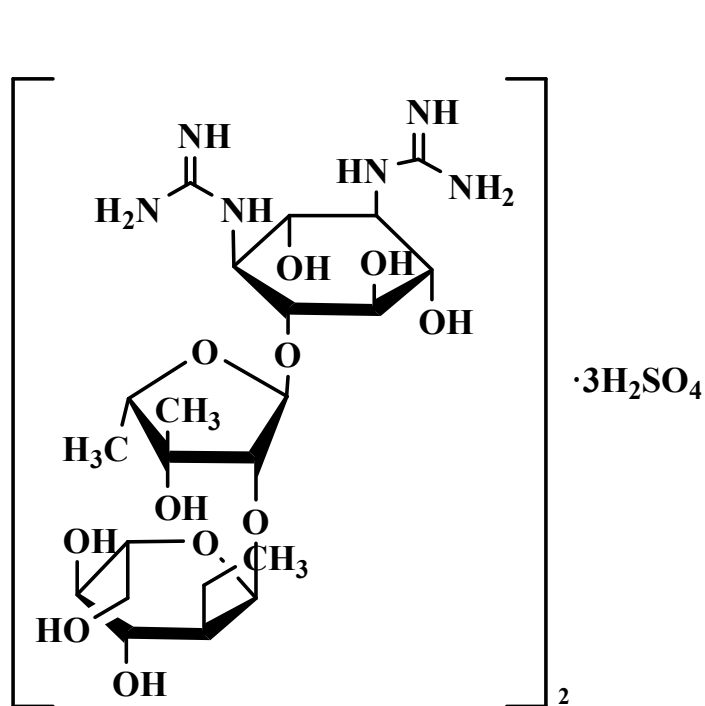
人民卫生出版社

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

- 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）。

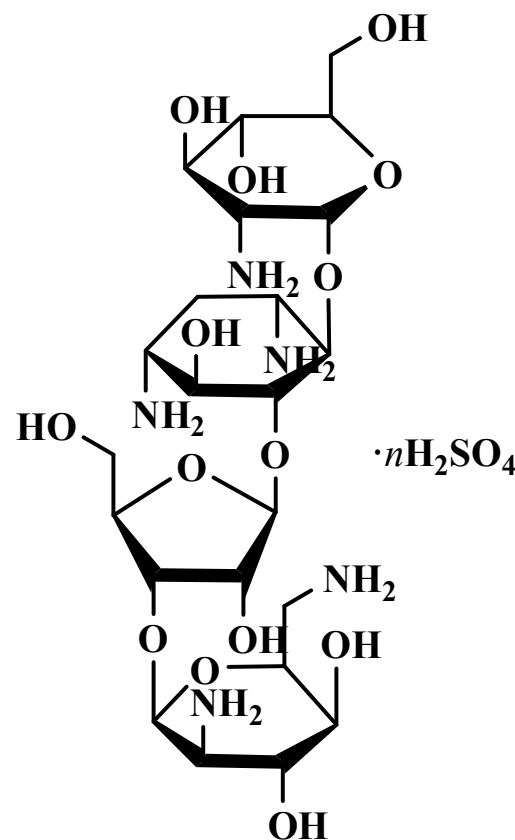


一、化学结构与性质



硫酸链霉素

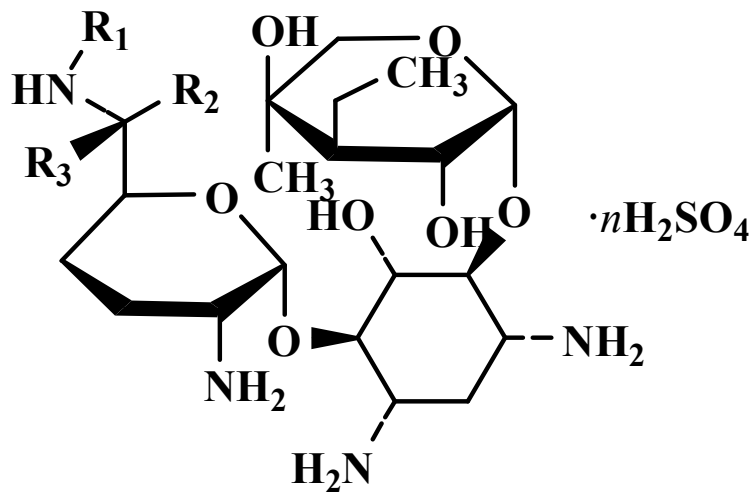
Streptomycin Sulfate



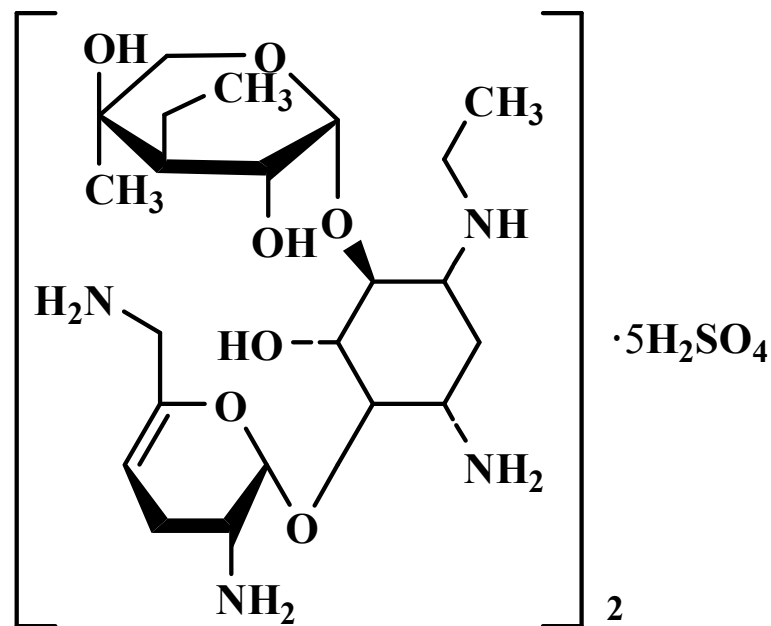
硫酸巴龙霉素

Paromomycin Sulfate



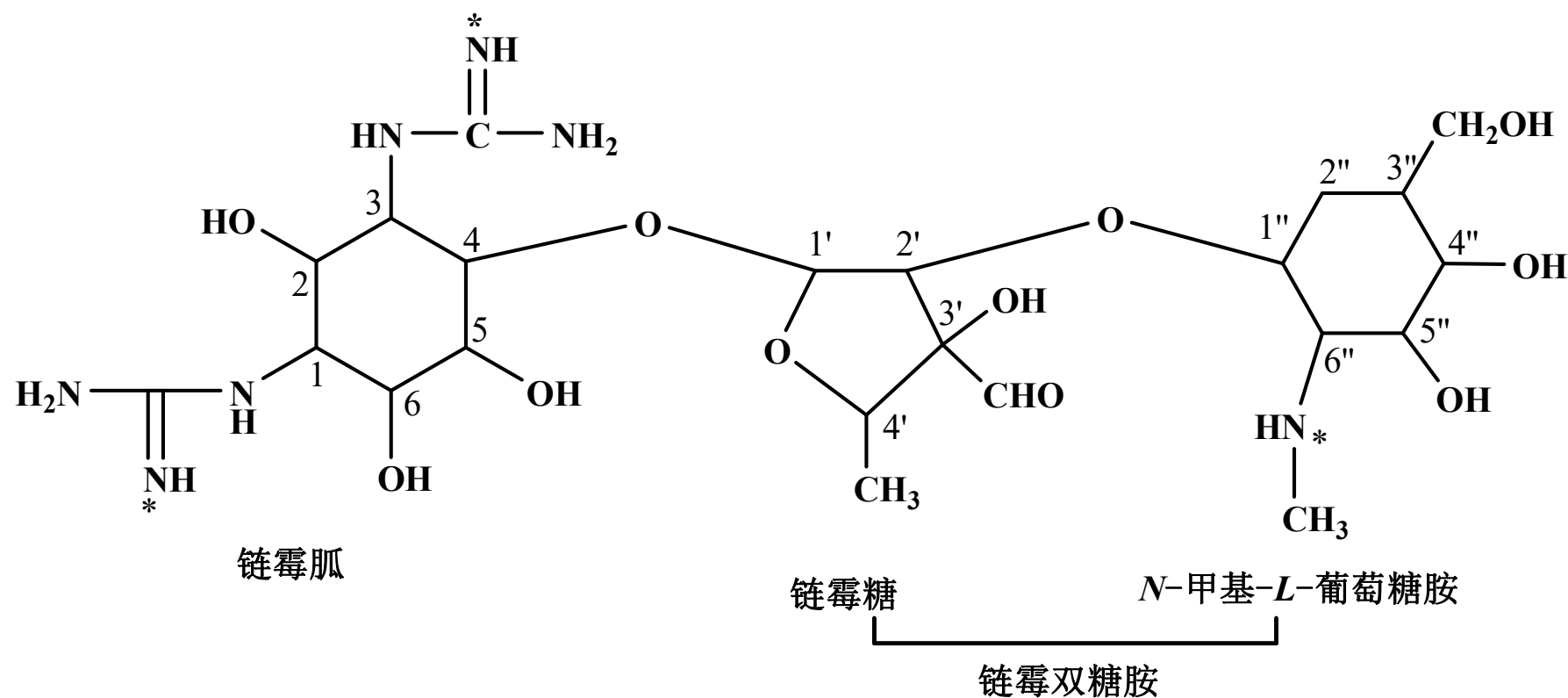


硫酸庆大霉素
Gentamycin Sulfate

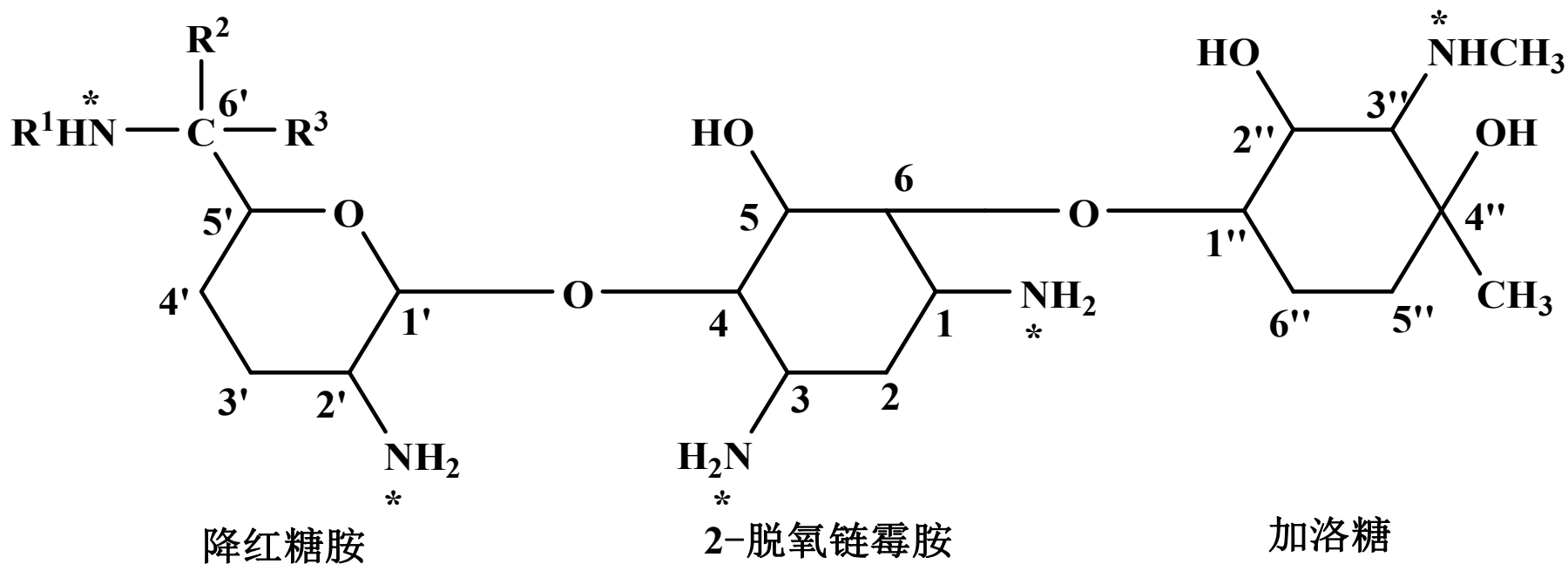


硫酸奈替米星
Netilmicin Sulfate

(一) 结构



链霉素



庆大霉素

（二）性质

1. 溶解度与碱性

- 该类抗生素的分子中含有多个羟基（故也称多羟基抗生素）和碱性基团（分子式中有*号处），同属碱性、水溶性抗生素，能与矿酸或有机酸成盐，临床上应用的主要为硫酸盐。他们的硫酸盐易溶于水，不溶于乙醇、三氯甲烷、乙醚等有机溶剂。

2. 旋光性

- 本类抗生素分子结构中含有多个氨基糖，具有旋光性。



3. 苷的水解与稳定性

- 一般的化学反应只能将它们分解为一分子苷元和一分子双糖。
- **链霉素**的硫酸盐水溶液，一般以pH5~7.5最为稳定，过酸或过碱条件下易水解失效。在**酸性**条件下，链霉素水解为链霉胍和链霉双糖胺，进一步水解则得N-甲基-L-葡萄糖胺；**碱性**也能使链霉素水解为链霉胍及链霉双糖胺，并使链霉糖部分发生分子重排，生成麦芽酚（maltol），这一性质为链霉素所特有，可用于鉴别和定量。



- 硫酸庆大霉素、硫酸奈替米星等对光、热、空气均较稳定，水溶液亦稳定，pH2~12时，100℃加热30分钟活性无明显变化。



4. 紫外吸收光谱

- 链霉素在230nm处有紫外吸收。庆大霉素、奈替米星等无紫外吸收。



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



(一) 茆三酮反应

- 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，可与茆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。
- 硫酸小诺霉素的茆三酮反应鉴别法：取本品约5mg，加水1ml溶解后，加0.1%茆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) 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。

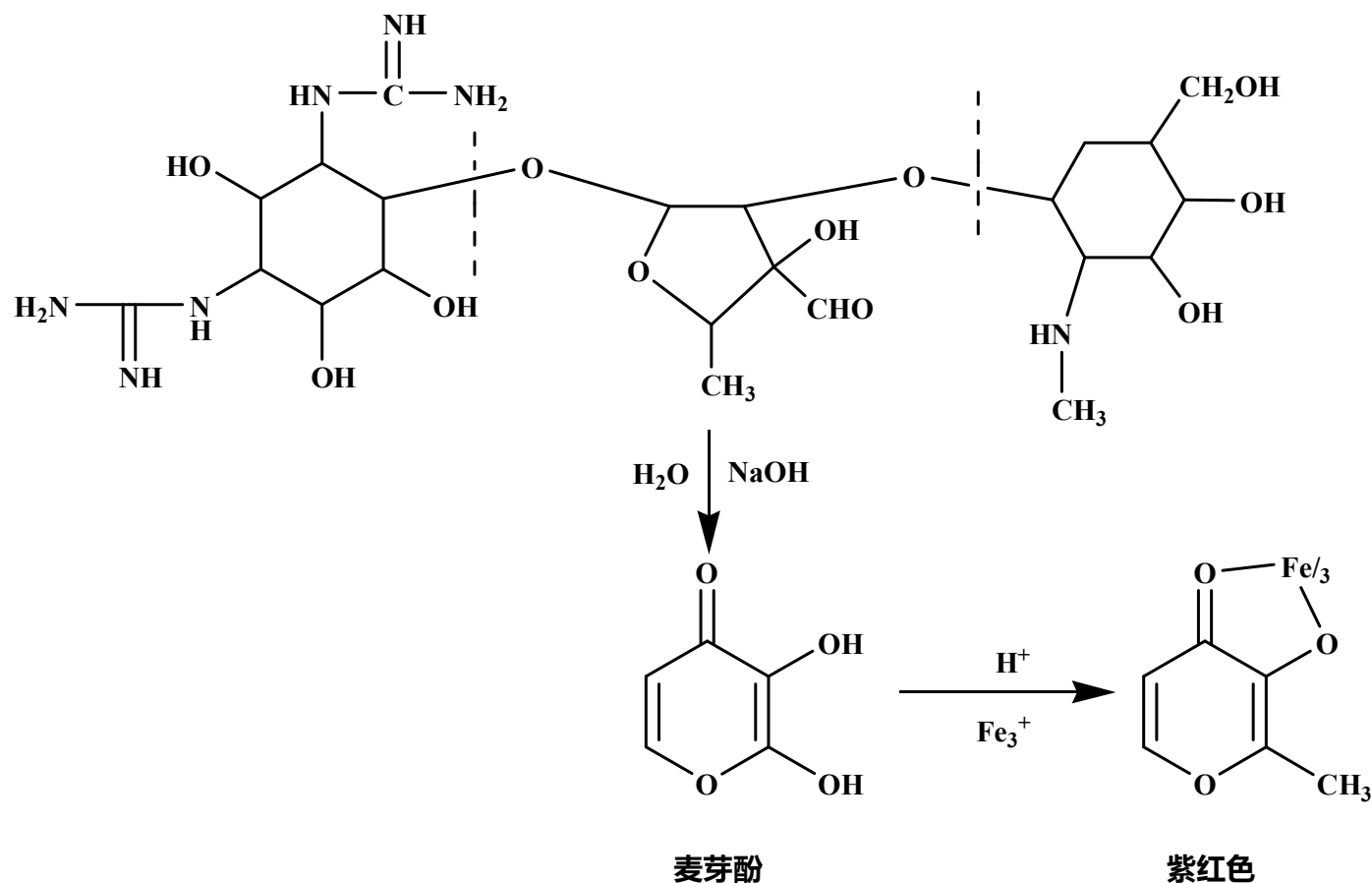


★（三）*N*-甲基葡萄糖胺反应

- 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（链霉糖）的特征反应

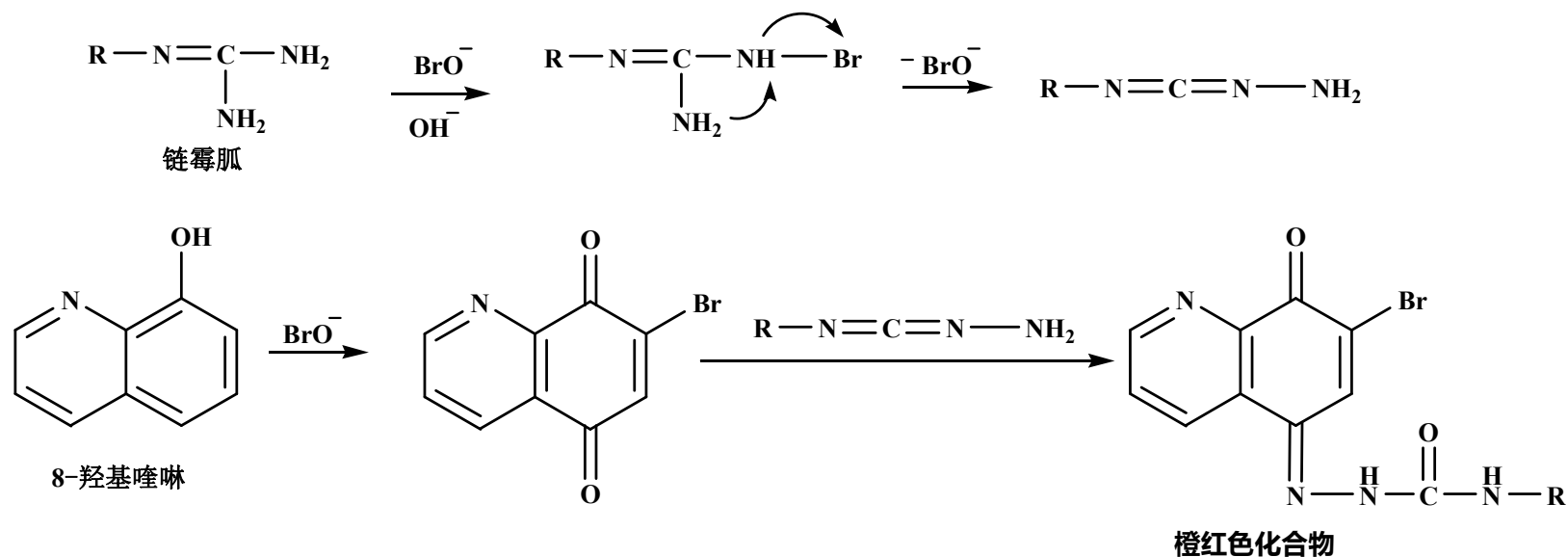


- 硫酸链霉素的麦芽酚反应鉴别：取本品约20mg，加水5ml溶解后，加氢氧化钠试液0.3ml，置水浴上加热5分钟，加硫酸铁铵溶液（取硫酸铁铵0.1g，加0.5mol/L硫酸溶液5ml使溶解）0.5ml，即呈紫红色。



★（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。



- 硫酸链霉素的坂口反应鉴别：取本品约0.5mg，加水4ml溶解后，加氢氧化钠试液2.5ml与0.1% 8-羟基喹啉的乙醇溶液1ml，放冷至约15℃，加次溴酸钠试液3滴，即显橙红色。



(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

- ChP2015、USP38-NF23和BP2014均采用TLC法对本类抗生素进行鉴别。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

- 本类药物也可根据组分检查或含量测定项下HPLC方法，通过比较供试品溶液和对照品溶液的色谱图进行鉴别。



- **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。



(八) 光谱法

1. 红外吸收光谱
2. 紫外吸收光谱



- 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

- (一) 有关物质检查
- (二) 组分测定
- (三) 硫酸盐检查



(一) 有关物质检查

- 现版各国药典对本类抗生素的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，如ChP2015对硫酸庆大霉素等规定了组分分析。



- 庆大霉素C1、C2、C1a对微生物的活性无明显差异，但其毒副作用和耐药性有差异，导致各组分的多少影响产品的效价和临床疗效。因此中、英、美、日等国药典均规定控制各组分的相对百分含量。**ChP2015**、**USP38-NF33**和**BP2014**均采用高效液相色谱法测定庆大霉素C各组分的含量。



- 庆大霉素无紫外吸收，当采用紫外检测器检测时，需进行衍生化处理。由于其具有强极性和水溶性，为获得理想的色谱结果，可采用**蒸发光散射检测器**或利用庆大霉素C组分结构中的氨基与**邻苯二醛**（o-phthaldehyde, OPA）、巯基醋酸在pH10.4的硼酸盐缓冲液中反应，生成1-烷基-2-烷基硫代异吲哚衍生物，在330nm波长处有强吸收。



- ChP2015庆大霉素中庆大霉素C组分的HPLC-蒸发光散射检测器检测；
- USP庆大霉素中庆大霉素C组分的衍生化紫外检测HPLC测定法；
- BP庆大霉素中庆大霉素C组分的HPLC柱后衍生化法电化学检测测定法。



(三) 硫酸盐检查

- 本类抗生素临床应用的主要为硫酸盐，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

- 氨基糖苷类抗生素的效价测定主要有**微生物检定法**和**HPLC法**。氨基糖苷类抗生素的HPLC测定法可分为离子交换（酸性条件下在阳离子交换柱上分离）、离子对（以烷基磺酸盐为反离子）和反相HPLC法，由于本类抗生素多数无紫外吸收，不能直接用紫外或荧光检测器，需进行柱前或柱后衍生化，或采用电化学检测器、蒸发光检测器检测。**ChP2015**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。



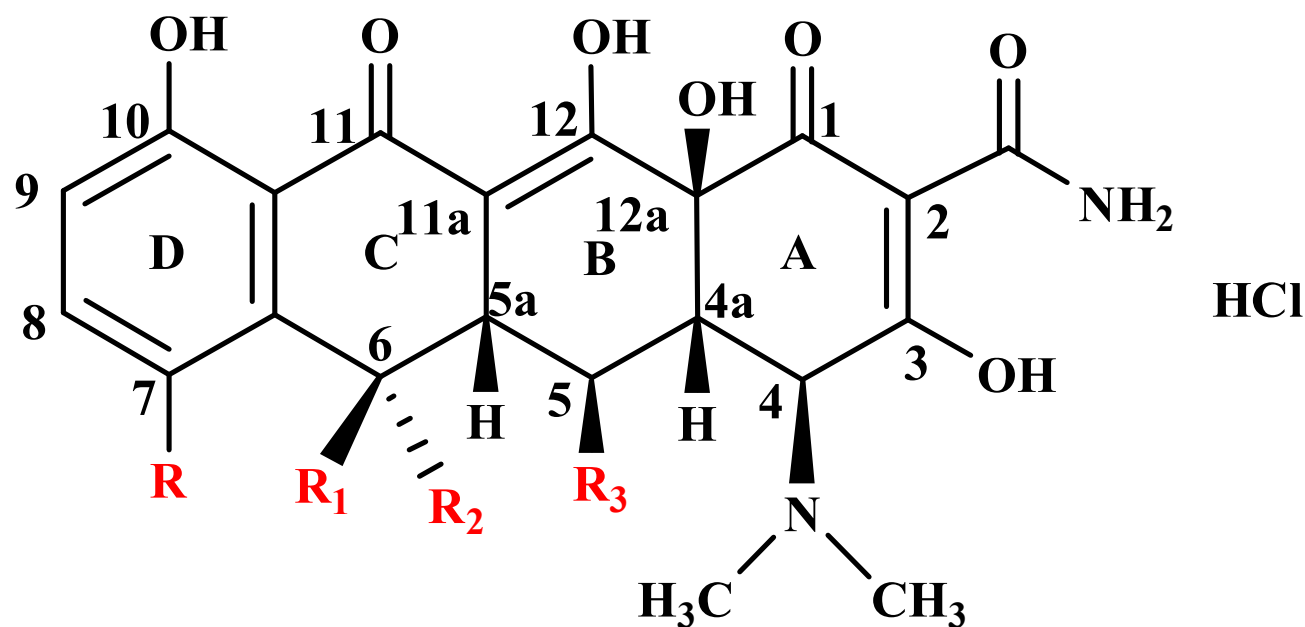
第四节

四环素类抗生素



(一) 结构

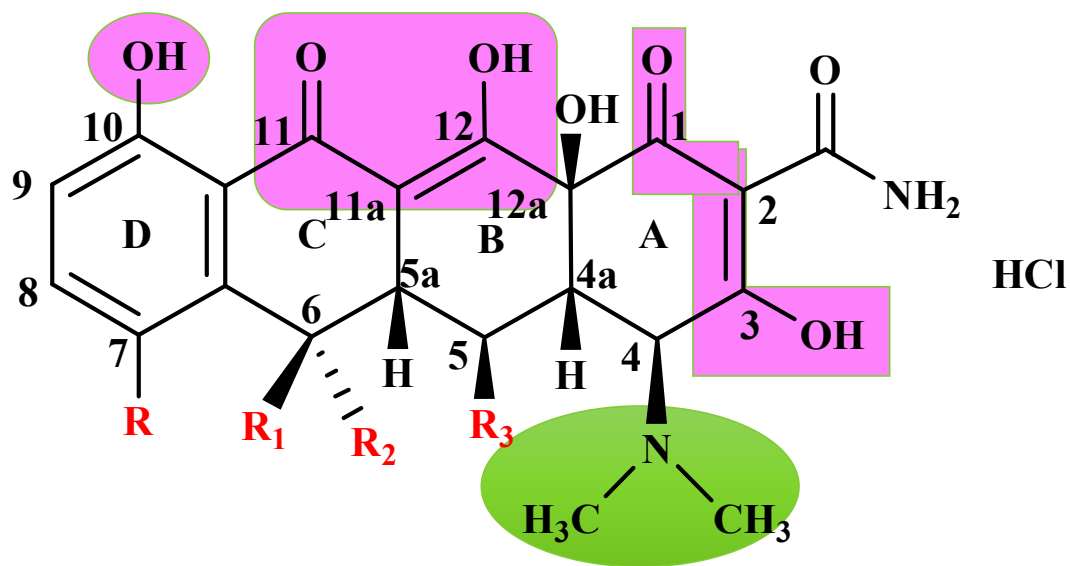
- 四环素类抗生素在化学结构上，都具有四个并苯或萘并萘环构成，故统称为四环素类（tetracyclines）抗生素。



(二) 性质

1. 酸碱性与溶解度

- 母核上C₄位上的二甲氨基[-N(CH₃)₂]显弱碱性；C₁₀位上的酚羟基(-OH)和两个含有酮基和烯醇基的共轭双键系统显弱酸性。



- 这类抗生素是结晶性物质，具引湿性。
- 其盐酸盐易溶于水，并溶于碱或酸性溶液中，而不溶于三氯甲烷、乙醚等有机溶剂。
- 四环素类抗生素的游离碱在水中的溶解度很小，其溶解度与溶液的pH有关，在pH4.5~7.2之间时难溶于水；当pH高于8或低于4时，水中溶解度增加。其盐类在水中会水解，当溶液浓度较大时，会析出游离碱。



2. 旋光性

- 四环素类抗生素分子中具有不对称碳原子，因此有旋光性，可用于定性、定量分析。各国药典测定该类抗生素的比旋度，如《中国药典》规定盐酸土霉素在盐酸（9→1000）溶液中的比旋度为 -188° 至 -200° ；盐酸四环素的比旋度为 -240° 至 -258° （0.01mol/L盐酸溶液）。盐酸多西环素的比旋度为 -105° 至 -120° [盐酸溶液（9→1000）的甲醇溶液（1→100）]。



3. 紫外吸收和荧光性质

- 本类抗生素分子内含有共轭双键系统，在紫外光区有吸收
- 紫外光照射下产生荧光，它们的降解产物也具有荧光。如：盐酸土霉素经酸性降解后，在紫外光下呈绿色荧光；盐酸金霉素经碱降解后在紫外光下呈蓝色荧光；盐酸土霉素经碱降解后呈绿色荧光，加热，荧光转为蓝色；盐酸四环素经碱降解后呈黄色荧光，可用于区别不同的四环素类抗生素。利用这一性质，在TLC鉴别法中常用于斑点检出。



★ 4. 稳定性

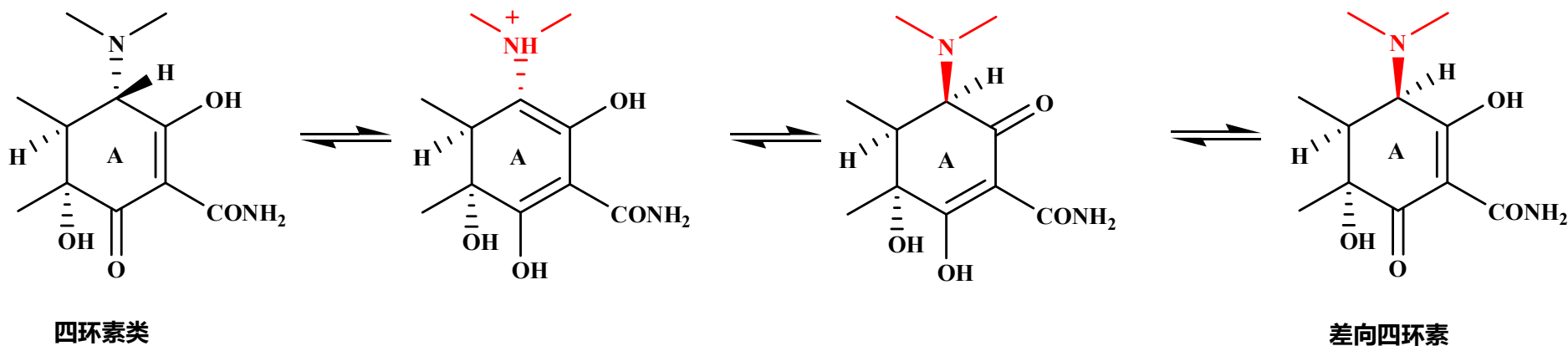
- 四环素类抗生素对各种**氧化剂**（包括空气中氧在内）、**酸、碱**都是不稳定的。干燥的四环素类游离碱和它们的盐类避光条件下保存均较稳定，但其水溶液随pH的不同会发生**差向异构化、降解**等反应，尤其是碱性水溶液特别容易**氧化**，颜色很快变深，形成色素。



(1) 差向异构化性质

- 四环素类抗生素在弱酸性（pH2.0~6.0）溶液中会发生差向异构化。A环上手性碳原子C₄构型的改变，发生差向异构化，形成差向四环素类（ETC），反应是可逆的。

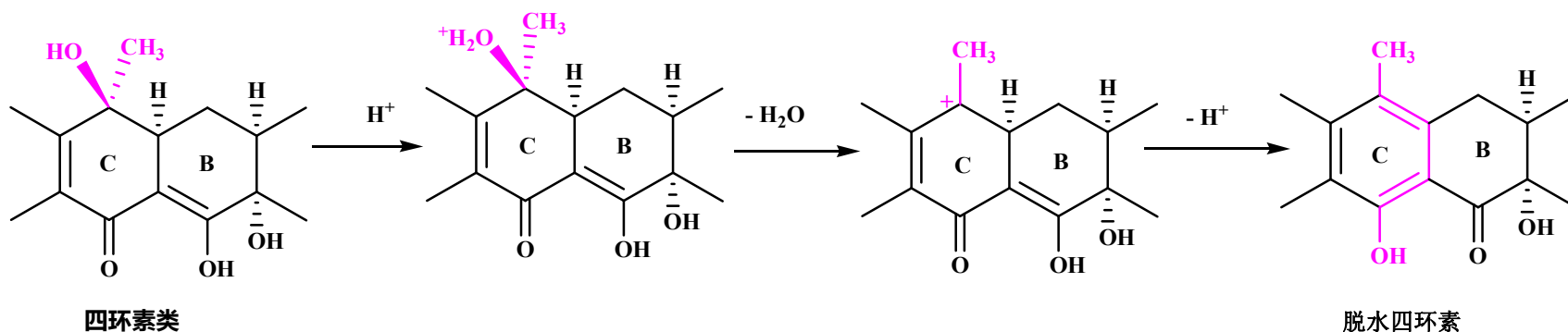




- 土霉素、多西环素、美他环素由于C₅上的羟基和C₄上的二甲氨基形成氢键，因而较稳定，C₄上不易发生差向异构化。
- 某些阴离子如磷酸根、枸橼酸根、醋酸根离子的存在，可加速这种异构化反应的进行。

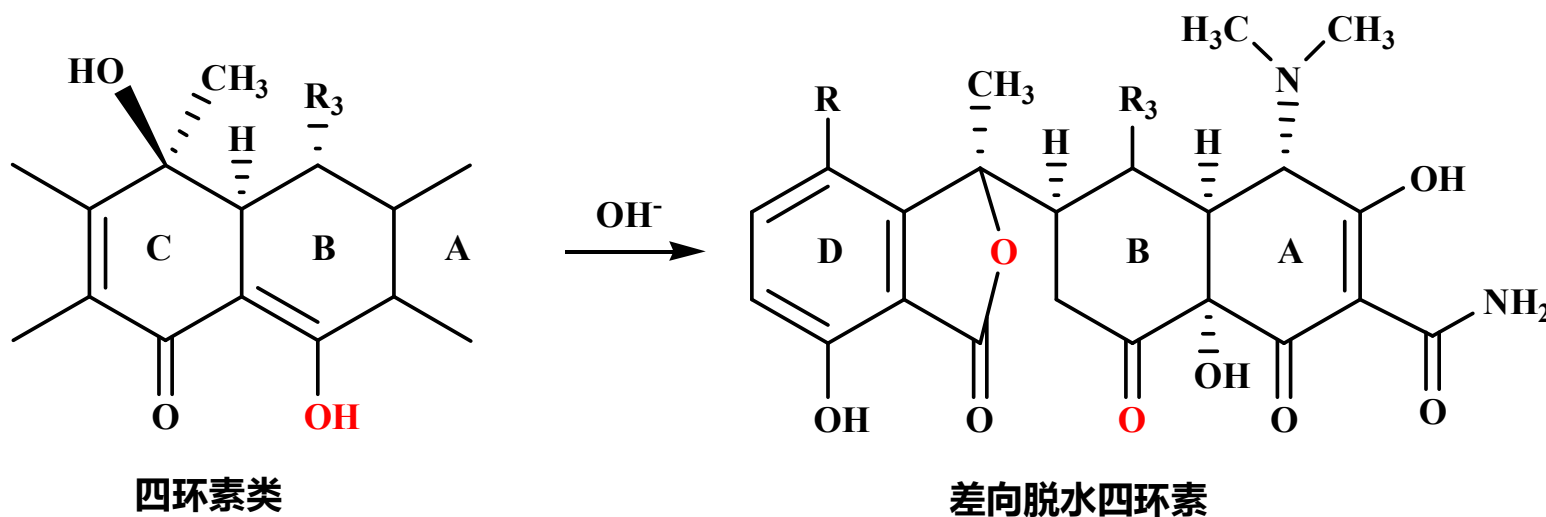
(2) 降解性质

- **酸性降解** 在酸性条件下 ($\text{pH} < 2$)，特别是在加热情况下，四环素类抗生素C₆上的醇羟基和C_{5a}上的氢发生反式消去反应生成**脱水四环素** (anhydrotetracycline, ATC)。



- 脱水四环素亦可形成差向异构体，称**差向脱水四环素** (4-epianhydrotetracycline, EATC)。

- **碱性降解** 在碱性溶液中，由于氢氧离子的作用，C₆上的羟基形成氧负离子，向C₁₁发生分子内亲核进攻，经电子转移，C环破裂，生成无活性的具有**内酯结构的异构体**。



二、鉴别试验

1. 高效液相色谱法
2. 薄层色谱法
3. IR光谱法
4. UV光谱法
5. 显色法



1. 高效液相色谱法

- **ChP和USP等**，均采用高效液相色谱法鉴别盐酸土霉素、盐酸四环素、盐酸多西环素、盐酸金霉素等。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. 薄层色谱法

- 由于薄层色谱法设备简单，操作容易，分离效果亦佳，ChP2015、BP2014都采用本法鉴别四环素类抗生素。
- 四环素类抗生素的薄层色谱法多采用硅藻土作载体，为了获得较好的分离，在黏合剂中加有甘油以及中性的EDTA缓冲液。EDTA可以克服因痕量金属离子存在而引起的斑点拖尾现象。



3. IR光谱法

- 《中国药典》收载的四环素类抗生素中，除土霉素外均采用了红外光谱法鉴别。



4. UV光谱法

- 本类药物的紫外鉴别法多以甲醇或水溶液为溶剂，《中国药典》规定**最大吸收波长**和**最小吸收波长**。



5. 显色法

- 四环素类抗生素遇**硫酸**立即产生颜色，不同的四环素类抗生素具有不同的颜色，有的有颜色变化，据此可区别各种四环素类抗生素。本类抗生素分子结构中具有酚羟基，遇三氯化铁试液即呈色。



四环素类抗生素的呈色反应

名称	浓硫酸呈色	三氯化铁呈色
盐酸四环素	紫红色→黄色	红棕色
盐酸金霉素	兰色、橄榄绿色→金黄色或棕黄色	深褐色
盐酸土霉素	深朱红色→黄色	橙褐色
盐酸多西环素	黄色	褐色
盐酸美他环素	橙红色	
盐酸米诺环素	亮黄色→淡黄色	
盐酸地美环素	紫色→黄色	



三、杂质检查

(一) 有关物质

- 四环素类抗生素中的有关物质主要是指在生产和贮存过程中易形成的异构杂质、降解杂质（ETC、ATC、EATC）等。**ChP2015、USP38-NF33和BP2014均采用HPLC法控制四环素类抗生素中的有关物质。**



(二) 杂质吸光度

- 四环类抗生素多为黄色结晶性粉末；而异构体、降解产物颜色较深，如差向四环素为淡黄色，因其不稳定又易变成黑色；脱水四环素为橙红色；差向脱水四环素为砖红色。此类杂质的存在均可使四环素类抗生素的外观色泽变深。因此和BP2014均规定了一定溶剂、一定浓度、一定波长下杂质吸光度的限量。



- **ChP2015规定的盐酸四环素的杂质吸光度测定方法：**取本品，在20～25℃时加0.8%氢氧化钠溶液制成每1ml中含10mg的溶液，置4cm的吸收池中，自加0.8%氢氧化钠溶液起5分钟时，在530nm的波长处测定，其吸光度不得过0.12（供注射用）。



四、含量测定

- 四环素类抗生素的含量测定，目前各国药典多采用高效液相色谱法。

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**1000~5000Da**，个别可至**10 000Da**。
- 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。

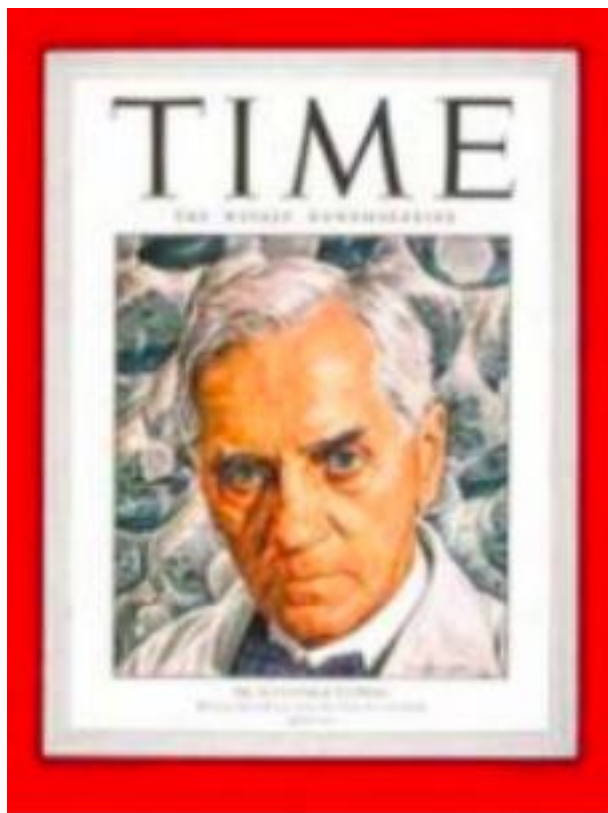


二、高分子杂质的控制方法

- 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。



Alexander Fleming



《时代周刊》封面上的弗莱明（1944年）



亚历山大·弗莱明偶然发现青霉素



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

Thank you very much!



人民卫生出版社

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE