

药物分析

第十七章 合成抗菌药物的分析



人民卫生出版社

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

掌 握

喹诺酮和磺胺类药物结构、性质和分析方法

熟 悉

喹诺酮和磺胺类药物有关物质的检查

了 解

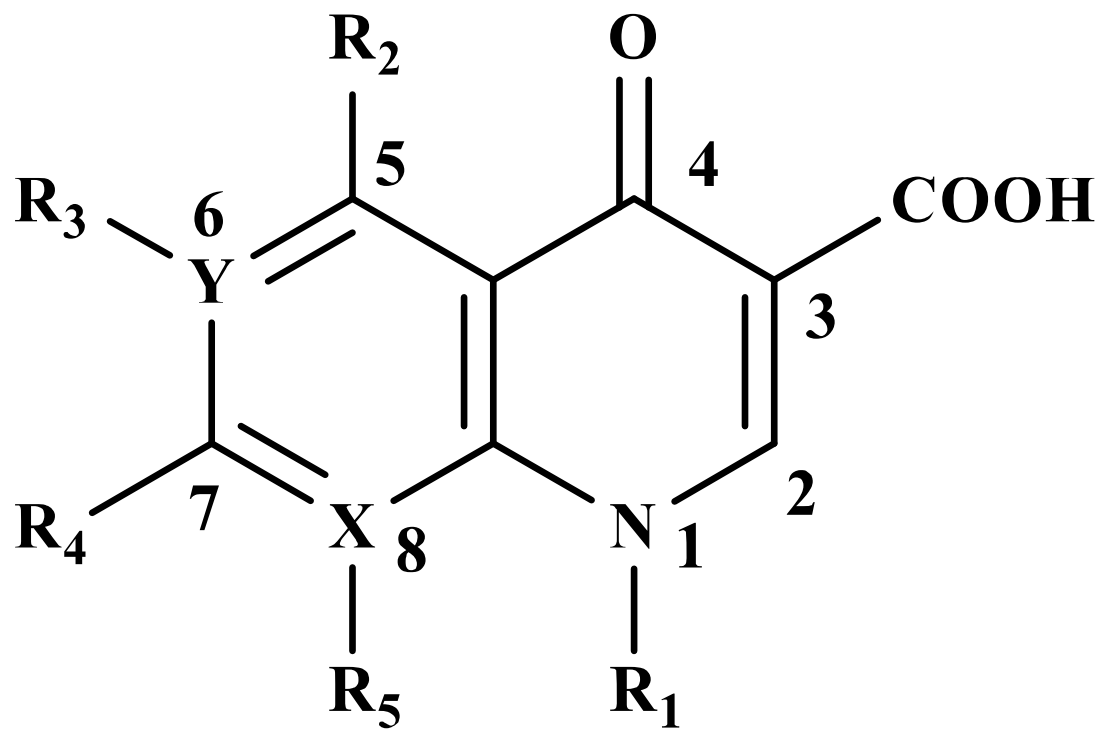
喹诺酮和磺胺类药物的体内分析



第一节

喹诺酮类药物的分析

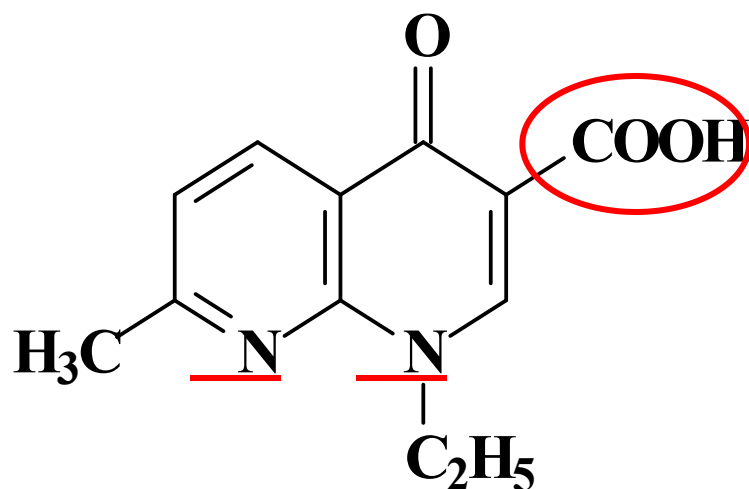




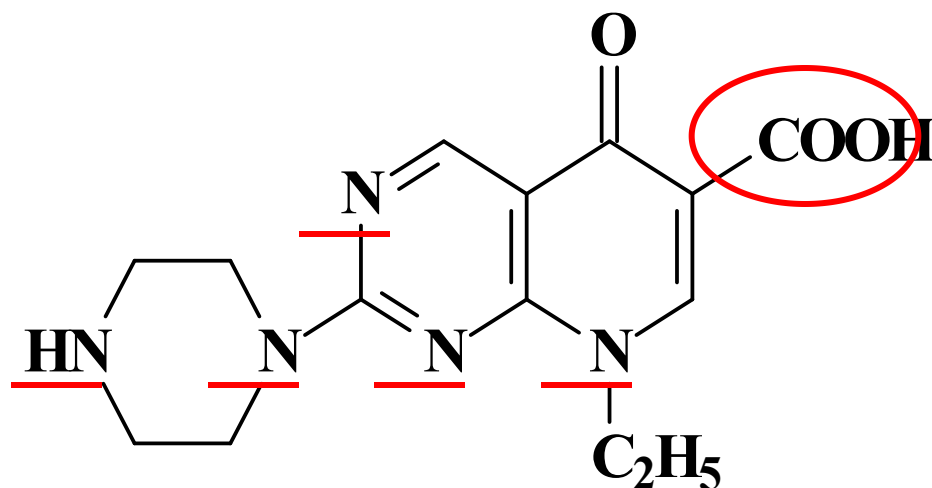
结构通式



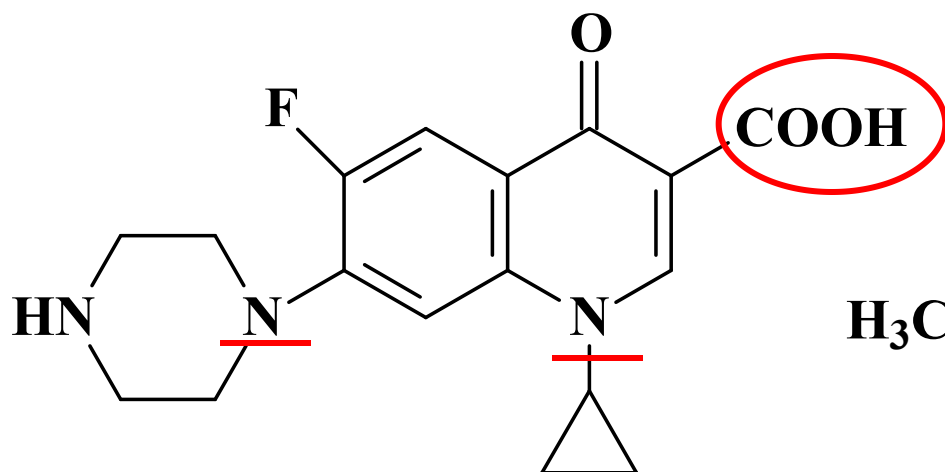
一、典型代表药物的结构



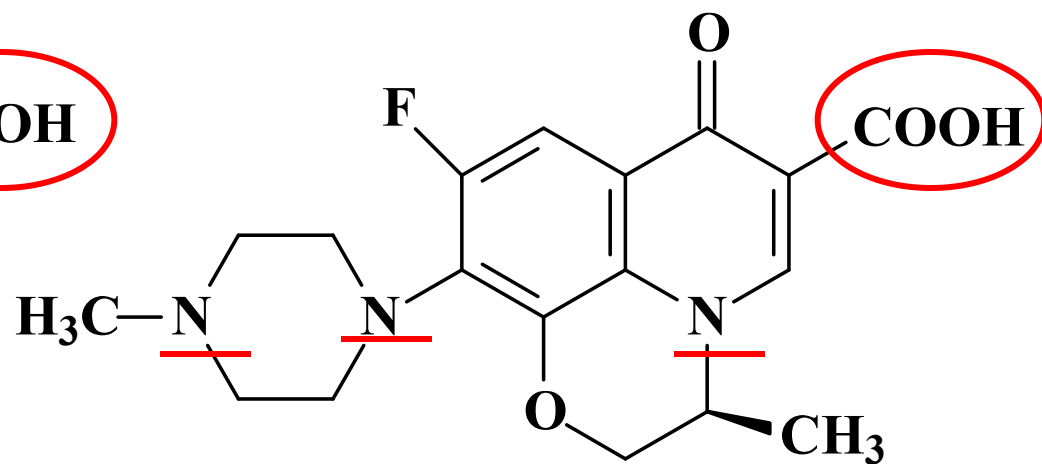
萘啶酸
Nalidixic Acid



吡哌酸
Pipemidic Acid

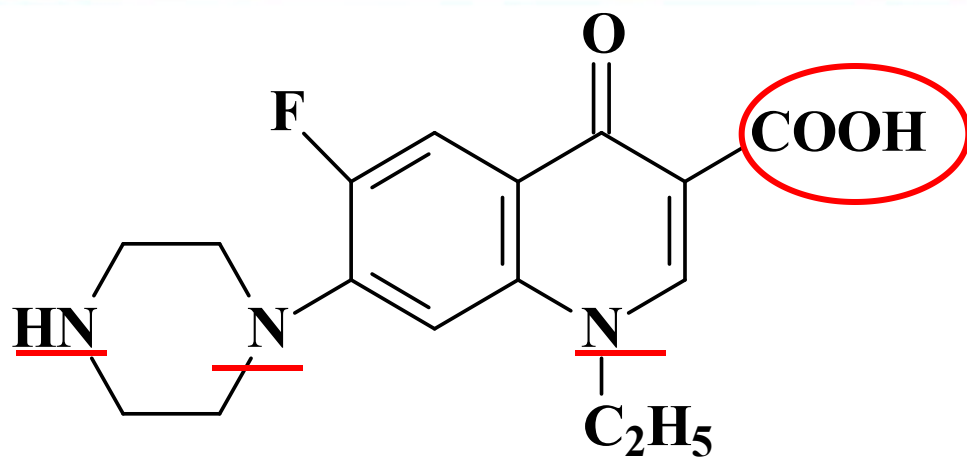


环丙沙星
Ciprofloxacin

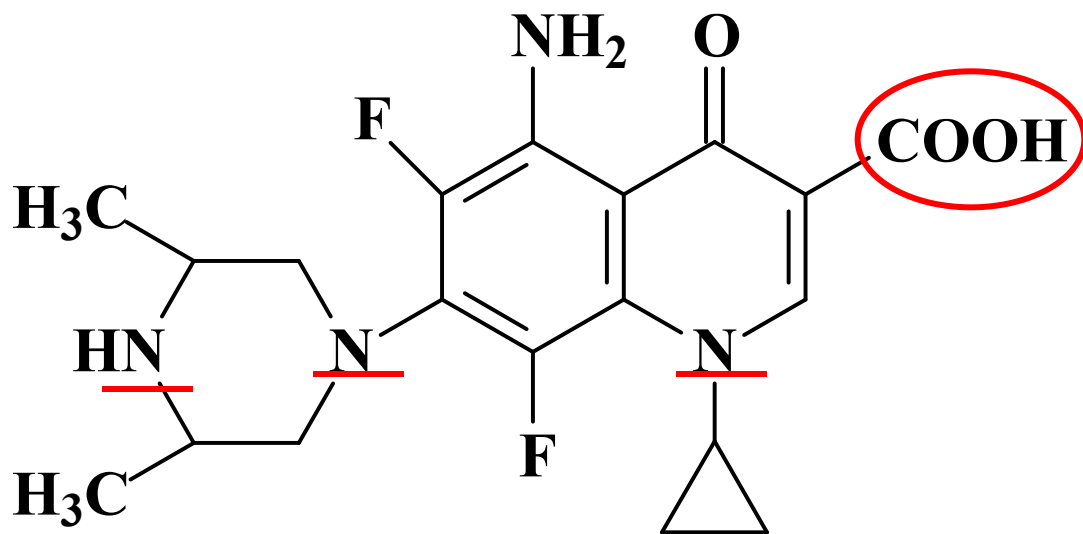


左氧氟沙星
Levofloxacin





诺氟沙星
Norfloxacin



司帕沙星
Sparfloxacin



二、喹诺酮类药物的理化性质

1

酸碱两性

2

溶解性

3

紫外吸收

4

旋光性

5

分解反应

6

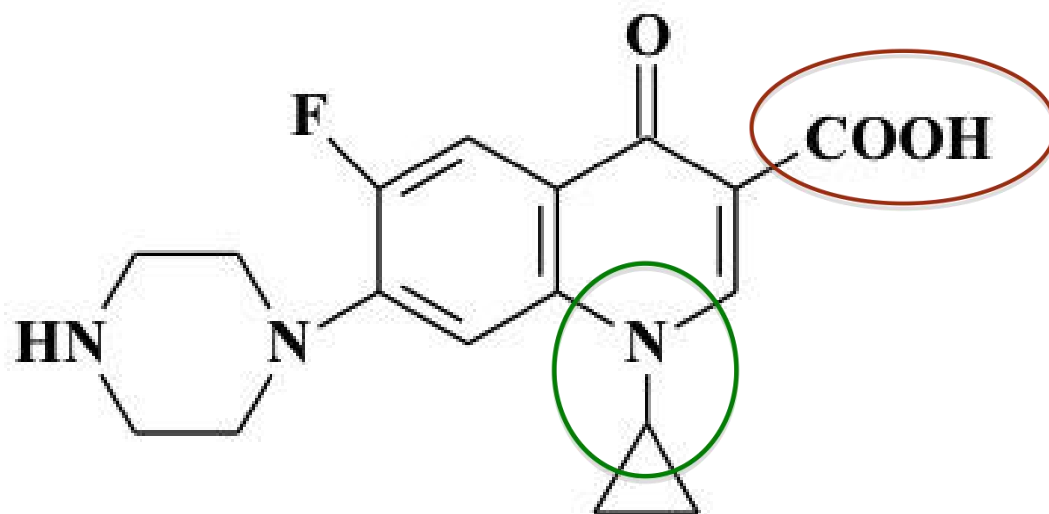
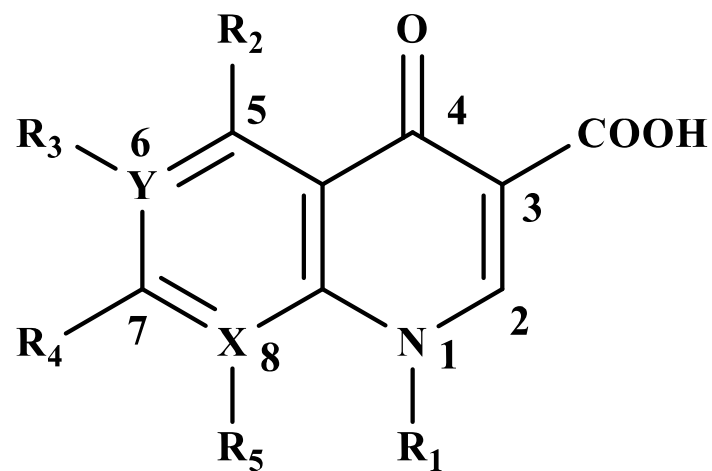
与金属离子反应

7

荧光特性



酸碱两性



溶解性

- 在水和乙醇中溶解度小
- 在碱性和酸性水溶液中有一定溶解度
- 盐类在水中易溶



紫外吸收

- 分子结构中具有共轭系统，在紫外区有特征吸收
- 溶剂：酸水or碱水



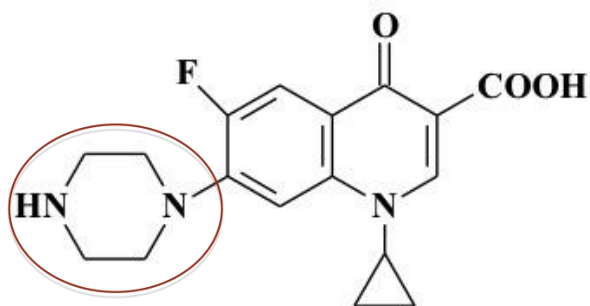
旋光性

- 左氧氟沙星具有旋光性



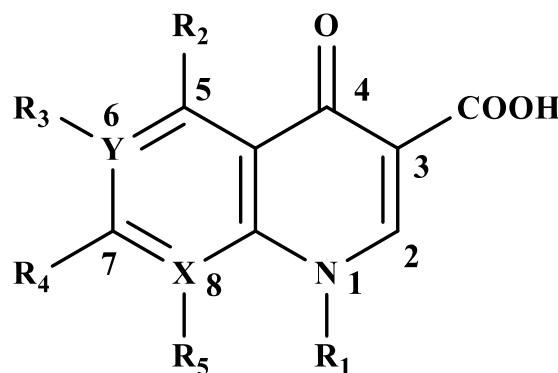
分解反应

- 喹诺酮类抗菌药分子结构中的哌嗪基具有还原性，遇光易氧化
- 对患者会产生光毒性反应
- 因此应注意避光

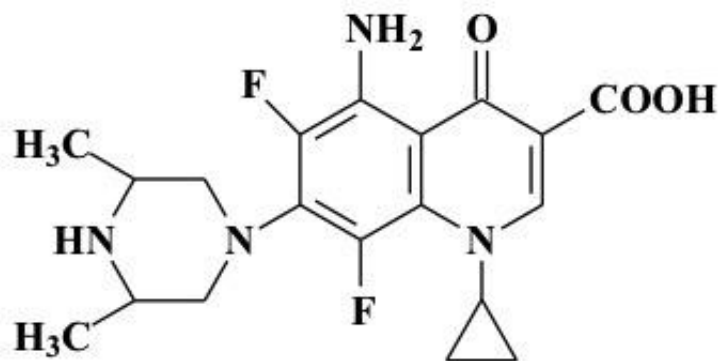


与金属离子反应

- 分子结构中3、4位为羧基和酮羰基的喹诺酮类药物，极易和金属离子（如钙、镁、铁和锌离子等）形成螯合物，降低药物的抗菌活性
- 这类药物不宜和牛奶等含钙和铁离子的食物或药品同时服用



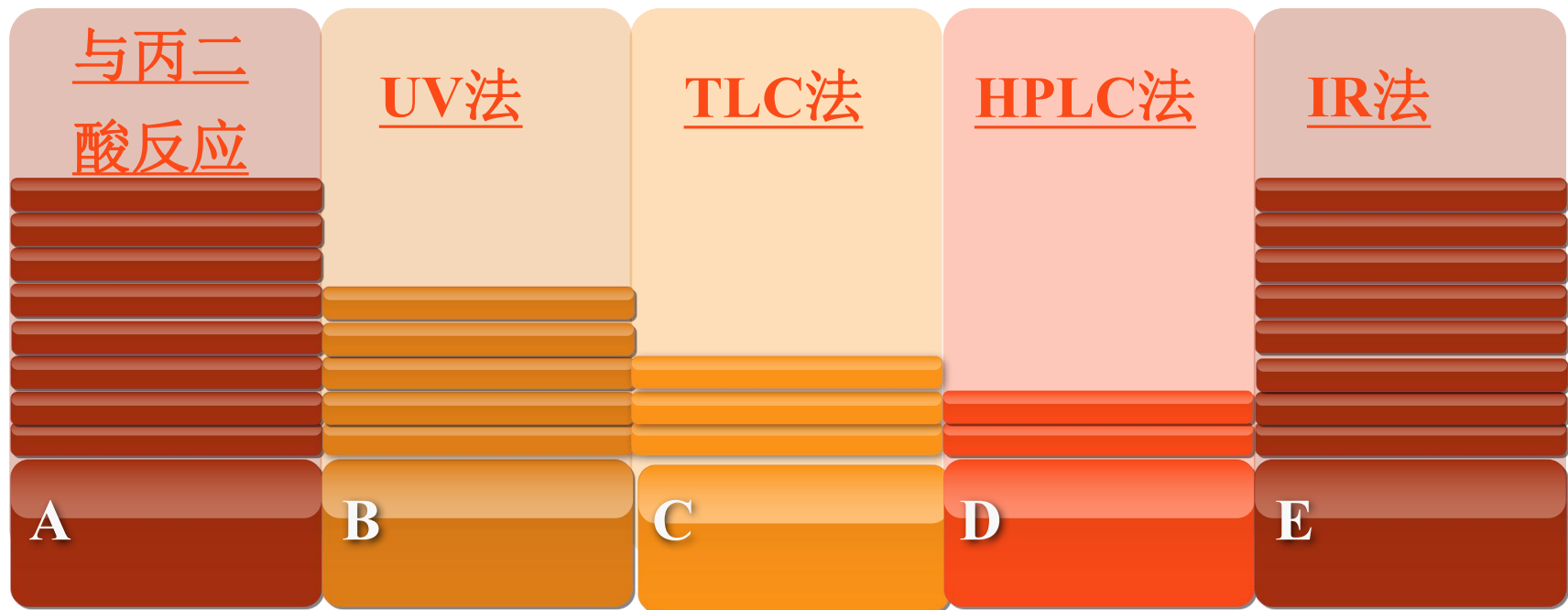
荧光特性



Name	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
司帕沙星	250	276
环丙沙星	275	336
洛美沙星	240	271
氧氟沙星	300	362



三、鉴别试验



四、有关物质检查

- 左氧氟沙星光学杂质（右氧氟沙星）
- 环丙沙星中有关物质的HPLC检查



五、含量测定

非水溶液滴定

- ChP2015吡哌酸原料药含量采用非水溶液滴定法

紫外法

- ChP2015吡哌酸片含量测定采用UV

HPLC法

- 盐酸洛美沙星
- 左氧氟沙星



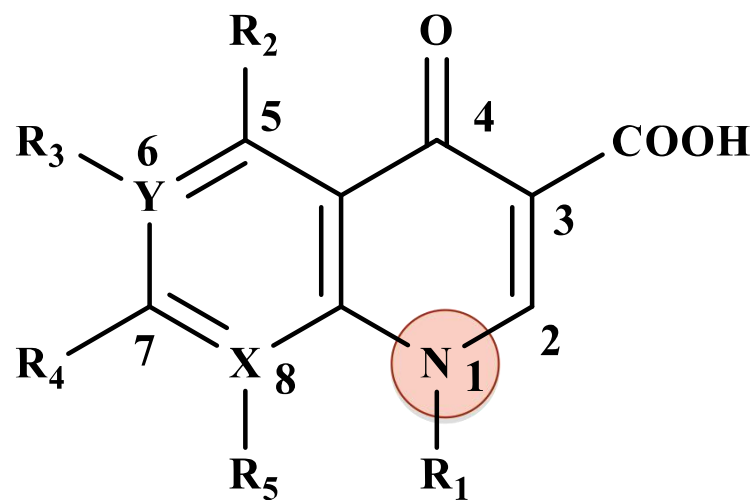
示例

- ChP2015采用与丙二酸反应对诺氟沙星软膏和乳膏进行鉴别。

诺氟沙星乳膏

【鉴别】

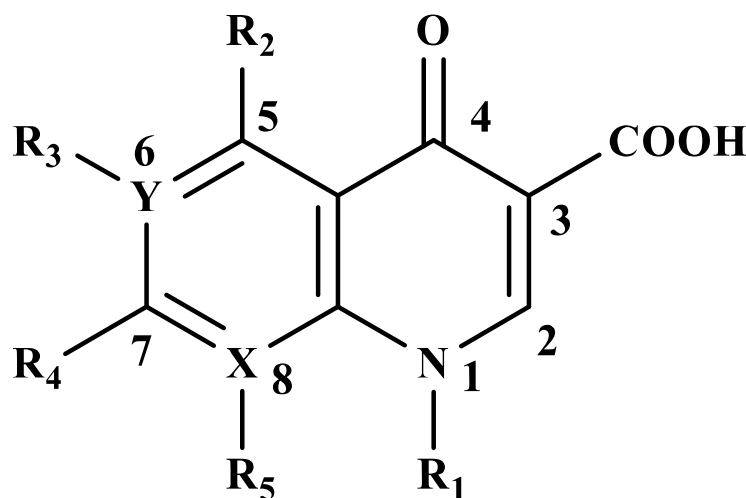
- 取含量测定项下的供试品溶液5ml，置水浴上蒸干，残渣中加丙二酸约50mg与醋酐1ml，在水浴中加热10分钟，溶液显红棕色。



左氧氟沙星的UV鉴别

【鉴别】

- 取供试品适量，加0.1mol/L 盐酸溶液溶解并稀释制成每1ml中约含5 μ g 的溶液，在226nm与294nm波长处有最大吸收，在263nm波长处有最小吸收。



ChP2015对氧氟沙星、诺氟沙星和氟罗沙星用TLC法鉴别。

氟罗沙星

【鉴别】

- 取供试品与氟罗沙星对照品适量，分别加二氯甲烷-甲醇（4：1）制成每1ml含1mg的溶液，分别作为供试品溶液与对照品溶液；另取氟罗沙星对照品与氧氟沙星对照品适量，加二氯甲烷-甲醇（4：1）制成每1ml含氟罗沙星1mg和氧氟沙星1mg的混合溶液，作为系统适用性试验溶液。



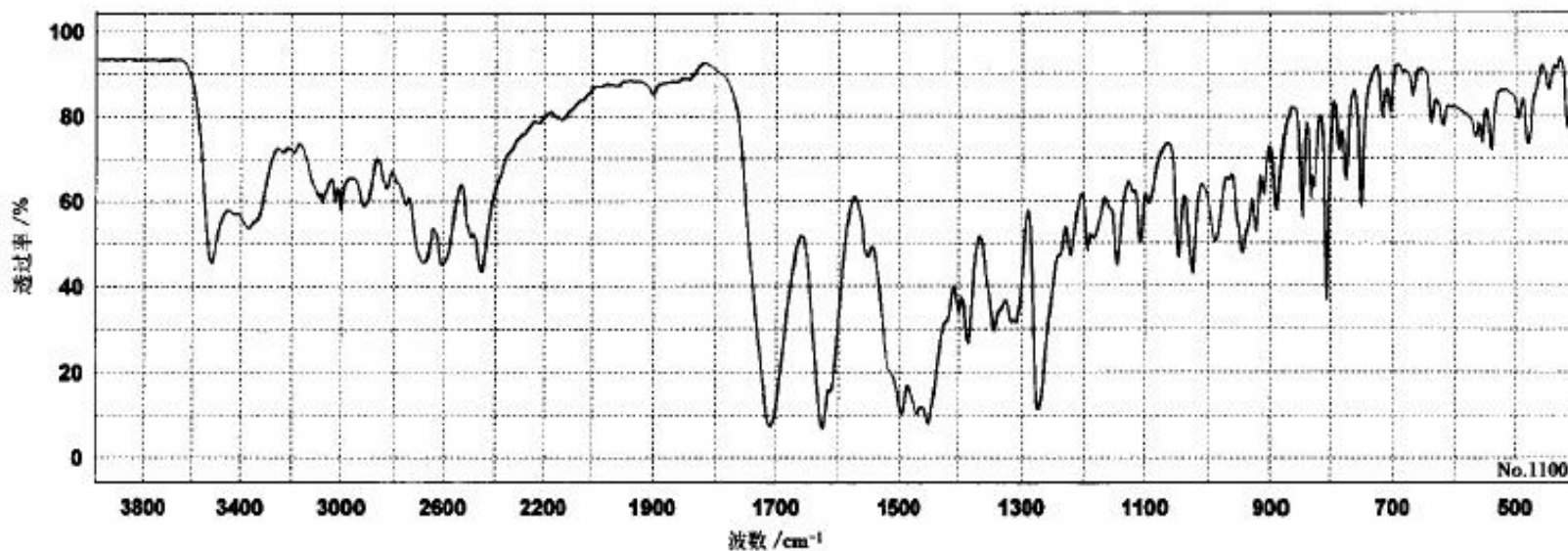
- 吸取上述三种溶液各2 μ l，分别点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上，以乙酸乙酯-甲醇-浓氨溶液（5：6：2）为展开剂，展开，取出，晾干，置紫外灯（254nm）下检视，系统适用性试验应显示两个清晰分离的斑点，供试品溶液所显主斑点的位置和荧光应与对照品溶液主斑点的位置和荧光相同。



- **ChP2015规定：**喹诺酮类药物含量测定项下的供试品主峰应与相应对照品主峰的保留时间一致。**ChP2015**收载的喹诺酮类药物均采用高效液相色谱法进行鉴别。



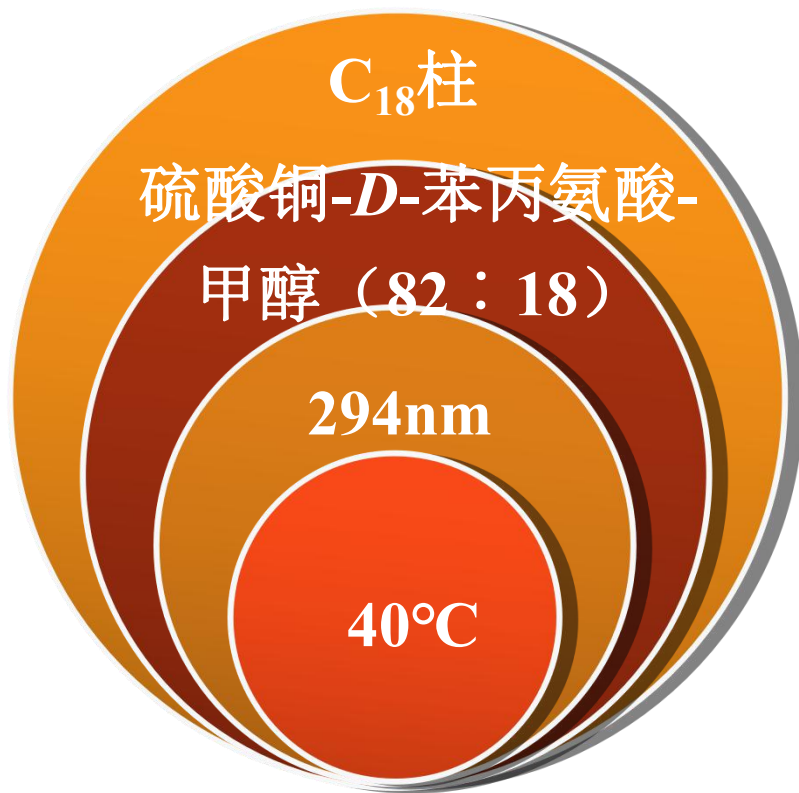
- **盐酸环丙沙星**的鉴别：供试品的红外光吸收图谱应与对照的图谱一致。



配合交换手性流动相法（HPLC）

左氧氟沙星光学杂质检查

色谱条件



1.0mg/ml

· 供试品溶液

10μg/ml

· 对照品溶液

20μg~1mg

· 氧氟沙星-左氧对照品

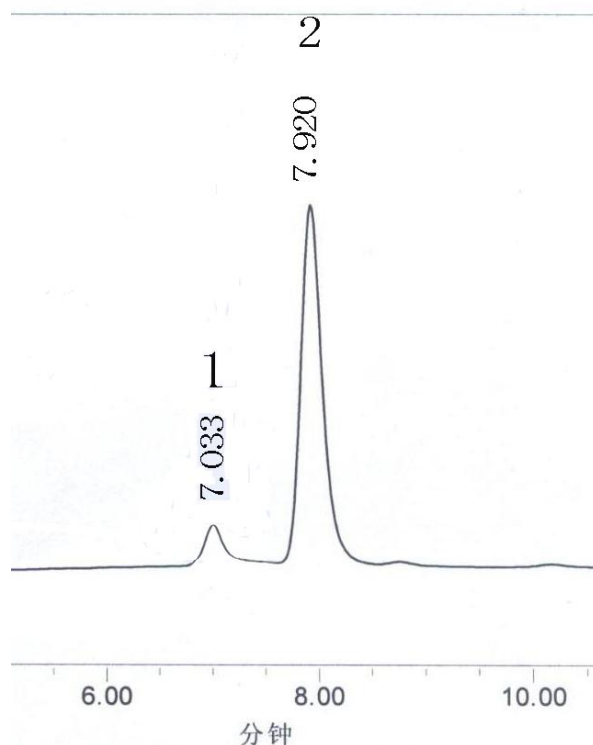
各20μl

· 进样



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

- **判断：** 供试品溶液色谱图中右氧氟沙星峰面积不得大于对照溶液主峰面积（1.0%）。



左氧氟沙星中的光学异构体分离图谱

1.右氧氟沙星； 2.左氧氟沙星

环丙沙星中有关物质检查

- 供试品溶液：取供试品约25mg，精密称定，加7%磷酸溶液0.2ml溶解，用流动相A稀释制成约0.5mg/ml的溶液。
- 对照溶液：精密量取适量供试品溶液，用流动相A定量稀释制成约1 μ g/ml的溶液。



- 杂质A对照溶液：精密称取杂质A对照品约为15mg，置100ml量瓶中，加6mol/L氨溶液0.6ml与水适量溶解，用水稀释至刻度，摇匀，精密量取1ml，置100ml量瓶中，用流动相A稀释至刻度，摇匀，备用。
- 混合溶液：称取氧氟沙星对照品、环丙沙星对照品和杂质I对照品各适量，加流动相A溶解并稀释制成每1ml中约含氧氟沙星5 μ g、环丙沙星0.5mg和杂质I 10 μ g的混合溶液。



- C18柱；流动相A：0.025mol/L磷酸溶液-乙腈（87:13）（用三乙胺调节pH值 3.0 ± 0.1 ），流动相B为乙腈，进行梯度洗脱，流速为1.5ml/min。
- 精密量取供试品溶液、对照溶液和杂质A对照品溶液各20 μ l，分别注入液相色谱仪，以278nm和262nm为检测波长，记录色谱图。

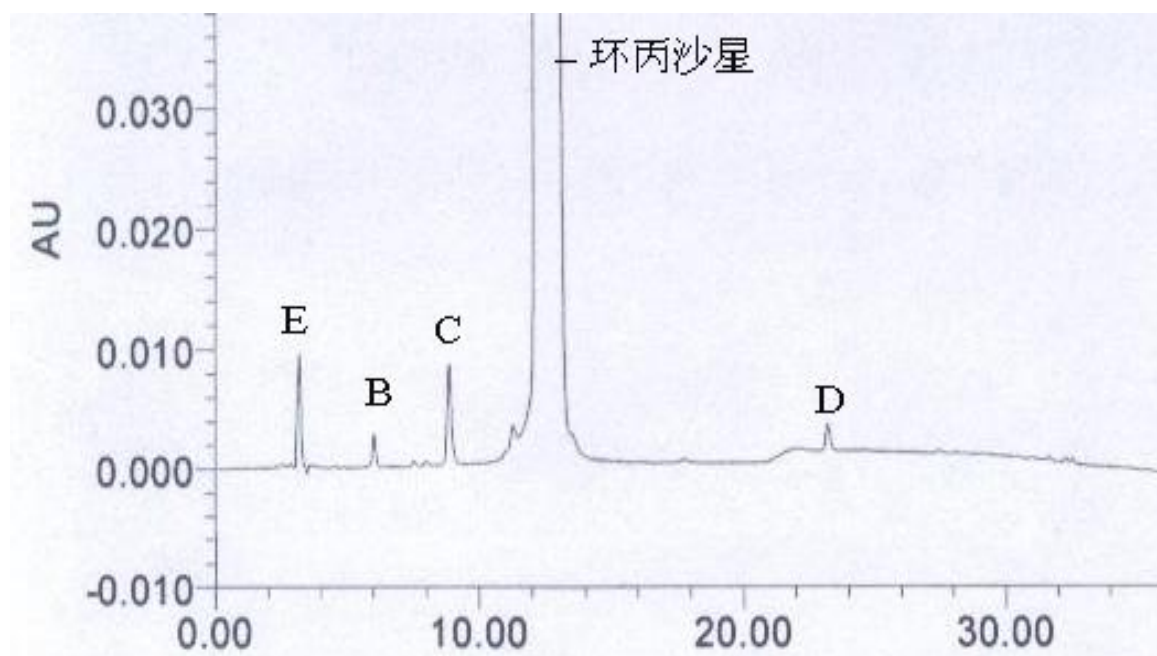


判断

- 供试品溶液色谱图中如有杂质峰，杂质A（262nm检测）按外标法以峰面积计算，不得超过0.3%；杂质B、C、D和E（278nm检测）按校正后的峰面积计算（分别乘以校正因子0.7、0.6、1.4和6.7），均不得大于对照溶液主峰面积（0.2%）；其他单个杂质（278nm检测）峰面积不得大于对照溶液主峰面积（0.2%），各杂质（278nm检测）校正后峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的2.5倍（0.5%）。



时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	100	0
16	100	0
53	40	60
54	100	0
65	100	0



环丙沙星中有关物质的分离图谱
 主峰为环丙沙星峰；
 B、C、D和E为有关物质峰

吡哌酸

【含量测定】

- 取供试品约0.2g，精密称定，加冰醋酸20ml溶解后，加结晶紫指示液1滴，用高氯酸滴定液（0.1mol/L）滴定至溶液显纯蓝色，并将滴定的结果用空白试验校正。每1ml高氯酸滴定液（0.1mol/L）相当于30.33mg的 $C_{14}H_{17}N_5O_3$ 。



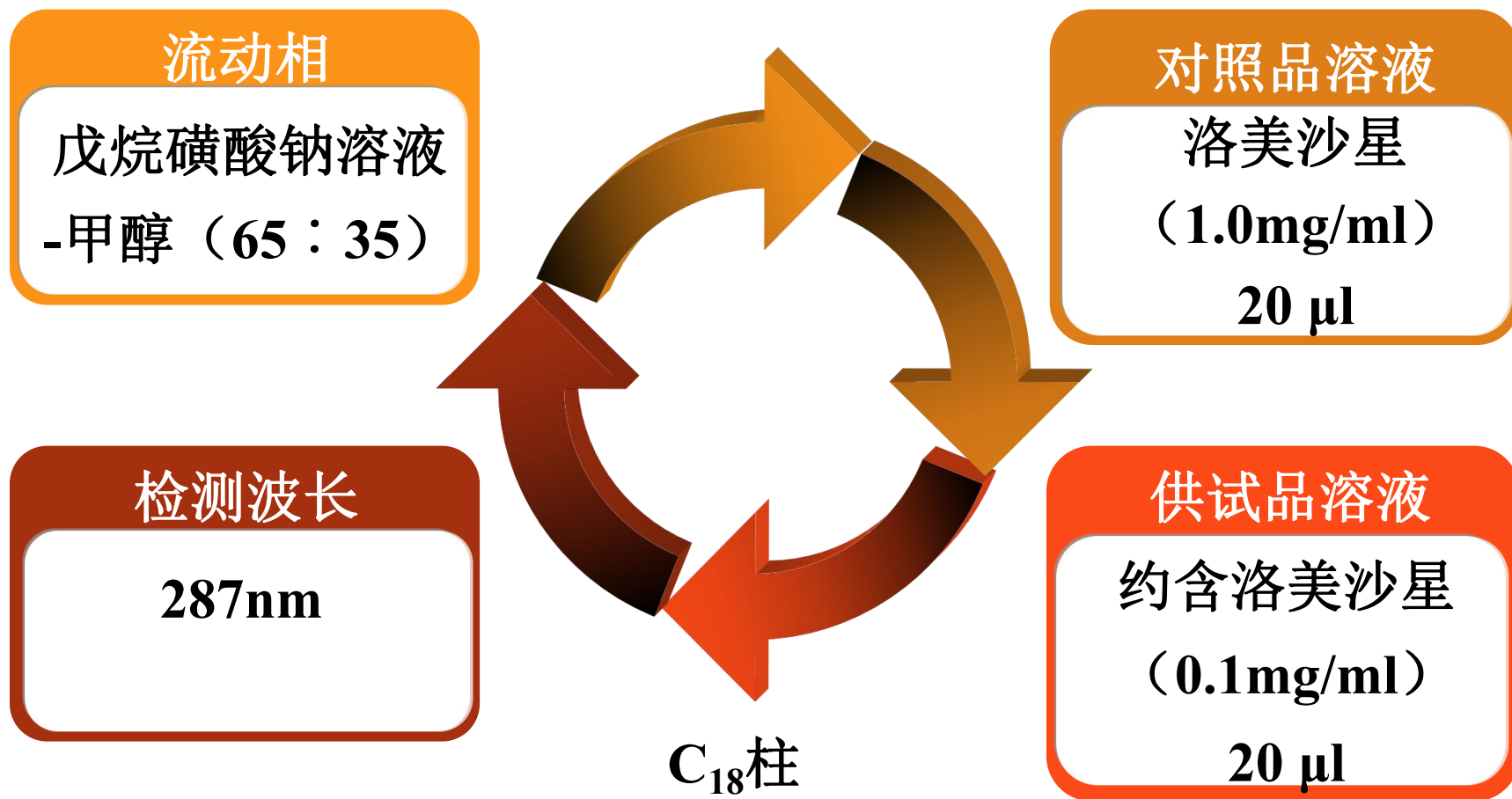
诺氟沙星乳膏

【含量测定】

- 精密称取供试品适量（约相当于诺氟沙星5mg），置分液漏斗中，加三氯甲烷15ml，振摇，用氯化钠饱和的0.1%NaOH溶液25、20、20和10ml分次提取，合并提取液，置100ml量瓶中，加0.1%NaOH溶液稀释至刻度，摇匀，滤过，精密量取续滤液10ml，用0.4%NaOH溶液稀释制成每1ml中约含5 μ g的溶液，在273nm波长处测定A；另取诺氟沙星对照品适量，精密称定，加0.4%NaOH溶液溶解并定量稀释制成每1ml约含5 μ g的溶液，同法测定，计算，即得。



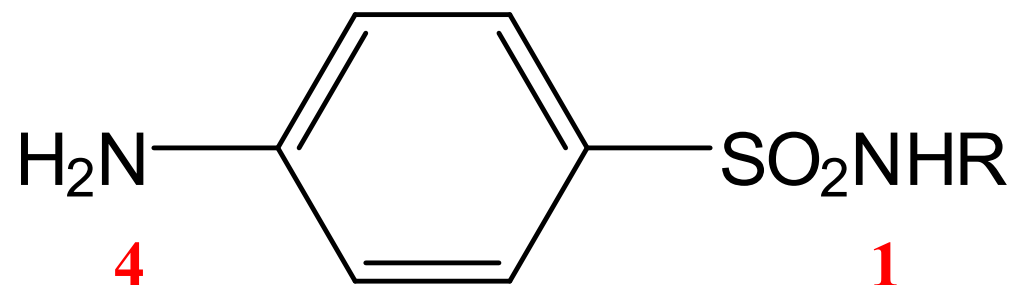
戊烷磺酸钠离子对HPLC测定盐酸洛美沙星的含量



第二节

磺胺类药物的分析

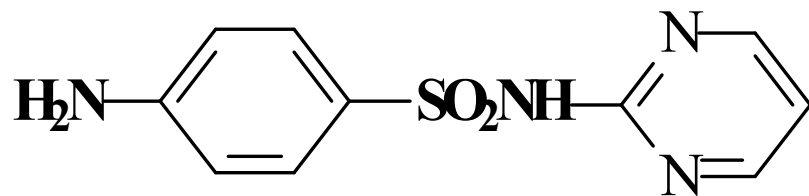




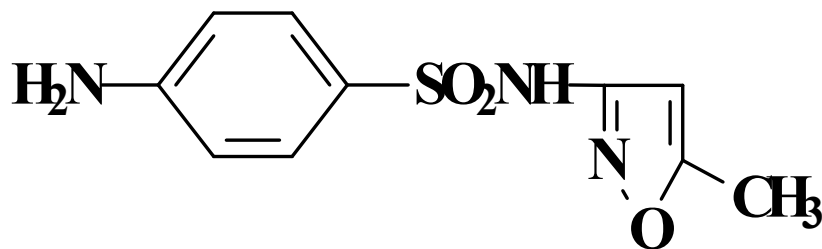
磺胺类药物的结构通式



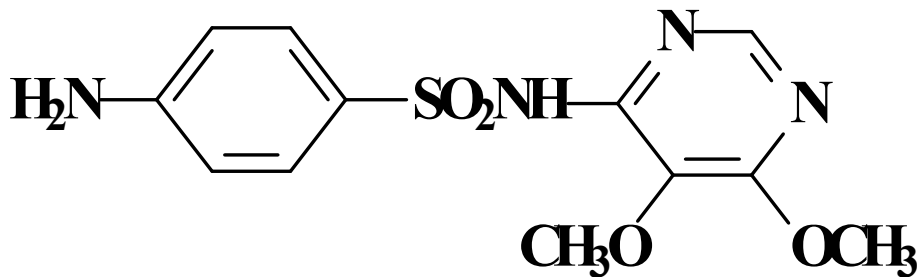
一、代表药物的化学结构



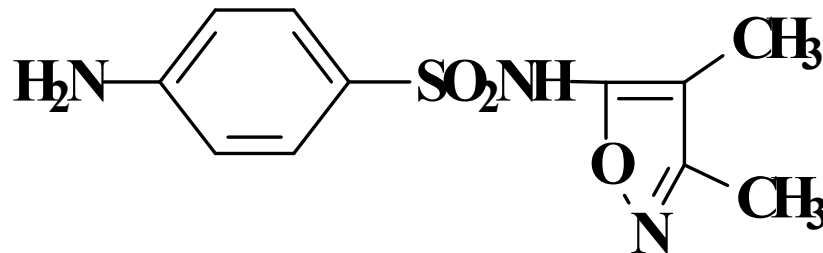
磺安密定
Sulfadiazine



磺安甲唑
Sulfamethoxazole



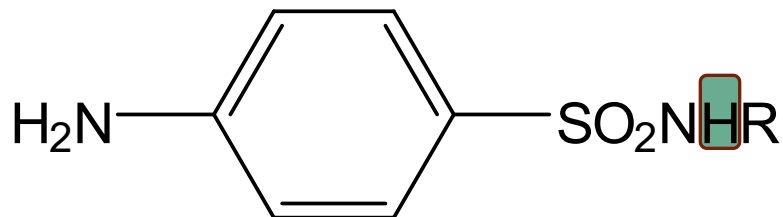
磺安多辛
Sulfadoxine



磺安异唑
Sulfafurazole



二、理化性质



取代基的反应

- 性状
- 酸碱两性
- 芳伯氨基反应
- 磺酰氨基反应

注：

- 白色或类白色结晶性粉末。
- 水不溶，溶于稀盐酸或氢氧化钠溶液，略溶乙醇、丙酮
- 磺酰氨基上的氢较活跃，可被金属离子取代，生成不同颜色的金属盐沉淀

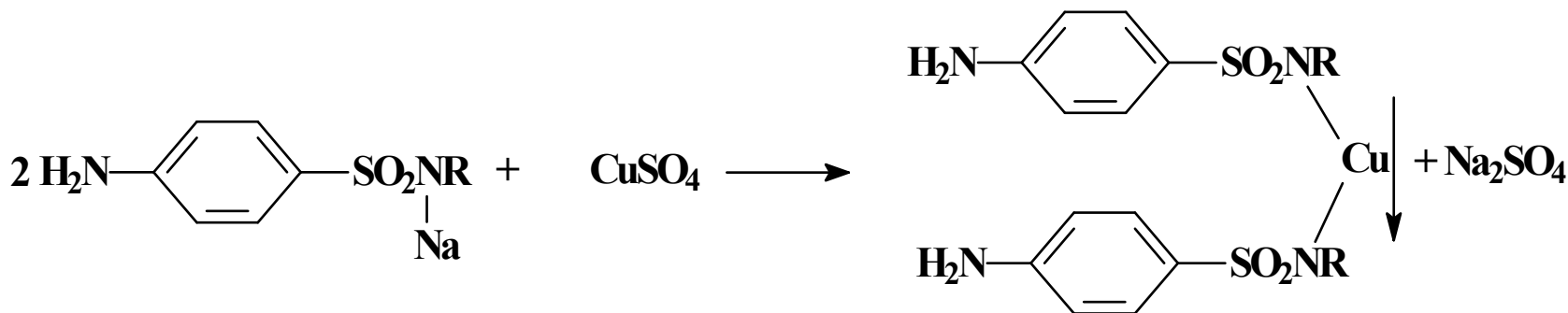
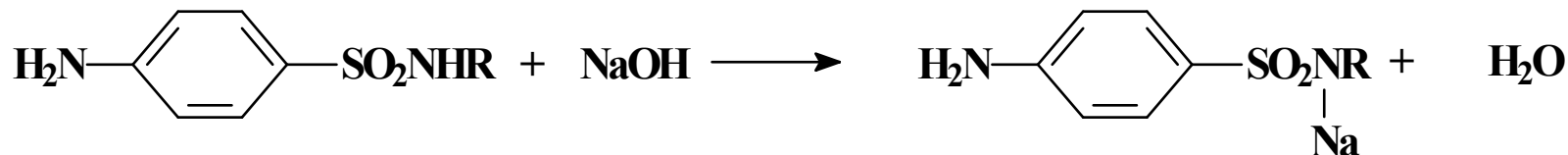


三、鉴别试验

- 金属离子的取代反应
- 芳香第一胺反应（磺胺嘧啶、磺胺异噁唑、磺胺甲噁唑和磺胺多辛均具有芳伯氨基）
- 钠盐反应
- 高效液相色谱法
- 红外分光光度法



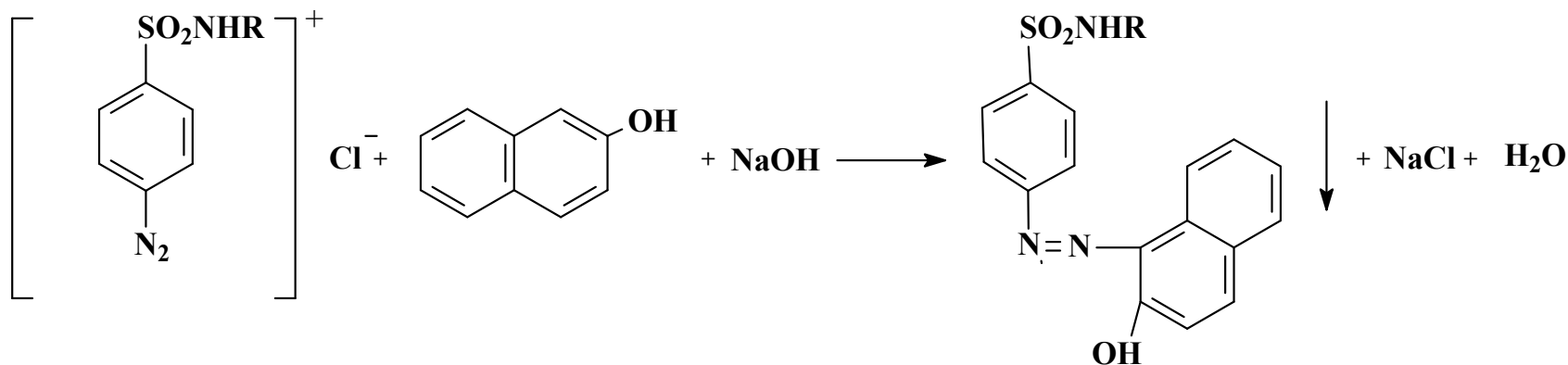
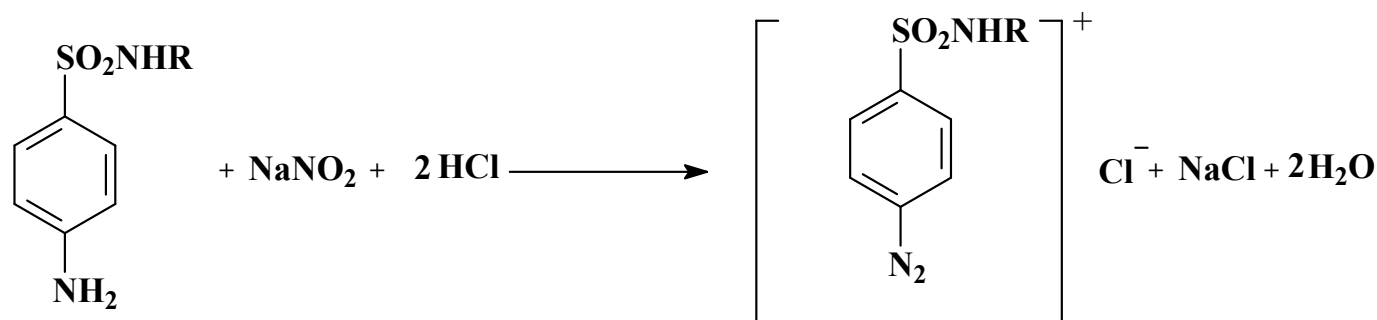
与金属离子反应原理



- 磺胺甲噁唑——草绿色沉淀
- 磺胺异噁唑——淡棕色，放置变暗绿色絮状沉淀
- 磺胺嘧啶——黄绿色沉淀，放置后变为紫色
- 磺胺多辛——黄绿色沉淀，放置后变淡蓝色
- 磺胺醋酸钠——蓝绿色沉淀



芳香第一胺反应



鉴别

- 钠盐反应
- 高效液相色谱法
- 红外分光光度法



四、有关物质检查

- 复方磺胺甲噁唑注射液中磺胺、对氨基苯磺酸和甲氧苄啶降解产物的TLC检查

【检查】

- 磺胺和对氨基苯磺酸
- 甲氧苄啶降解产物



磺胺和对氨基苯磺酸检查

- 供试品溶液：精密量取注射液1ml（相当于磺胺甲噁唑0.2g），置20ml量瓶中，加1%氨水的无水乙醇-甲醇混合溶液（95：5）稀释至刻度，摇匀。
- 对照品溶液（1）、（2）和（3）：取磺胺甲噁唑、磺胺与对氨基苯磺酸对照品各适量，精密称定，加1%氨水的无水乙醇-甲醇混合溶液（95：5）溶解，并分别稀释制成每1ml含磺胺甲噁唑10mg、磺胺0.05mg与对氨基苯磺酸0.03mg的溶液作为对照品溶液（1）、（2）和（3）。



- 薄层色谱条件：硅胶GF₂₅₄板；无水乙醇-甲醇-正庚烷-三氯甲烷-冰醋酸（28.5：1.5：30：30：10）为展开剂；紫外光灯（254nm）下检视；显色剂：对二甲氨基苯甲醛溶液。
- 结果判断：供试品溶液如显与磺胺对照品和对氨基苯磺酸对照品相应的杂质斑点，其颜色与对照品溶液（2）、（3）的主斑点比较，不得更深。



甲氧苄啶降解产物检查

- 供试品溶液：精密量取注射液1ml（相当于甲氧苄啶40mg），置50ml离心管中，加0.06mol/L盐酸溶液15ml，摇匀，加 CHCl_3 15ml，振摇，高速离心3分钟。水层置125ml分液漏斗中， CHCl_3 层再用0.06mol/L盐酸溶液15ml提取，合并水层。加入10%氢氧化钠溶液2ml，分别 CHCl_3 20ml提取3次，合并 CHCl_3 层，氮吹，残渣中精密加入三氯甲烷-甲醇（1：1）1ml使溶解。



- 对照品溶液（1）和（2）：甲氧苄啶对照品适量，精密称定，加三氯甲烷-甲醇（1：1）溶解并分别稀释制成每1ml中含40mg和0.2mg的溶液。



- 薄层色谱条件：硅胶GF₂₅₄板；三氯甲烷-甲醇-浓氨溶液（97：7.5：1）为展开剂；紫外光灯（254nm）下检视，再喷以10%三氯化铁-5%铁氰化钾混合溶液（1：1）
- 结果判断：供试品溶液如在比移值约为0.6~0.7内显杂质斑点，其颜色与对照品溶液（2）的甲氧苄啶主斑点比较，不得更深。



五、含量测定



示例（HPLC）

复方磺胺嘧啶片

【含量测定】

- 色谱条件与系统适用性试验 C_{18} 柱；乙腈-0.3%醋酸铵溶液（20：80）为流动相；检测波长220nm。理论塔板数按甲氧苄啶峰计算不低于3000，磺胺嘧啶与甲氧苄啶峰的分离度应符合要求。



- **HPLC测定方法** 取供试品10片，精密称定，研细，精密称取细粉适量（约相当于磺胺嘧啶80mg），置100ml量瓶中，加0.1mol/L NaOH溶液10ml，振摇，使磺胺嘧啶溶解，再加甲醇适量，振摇使甲氧苄啶溶解，用甲醇稀释至刻度，摇匀，滤过，精密量取续滤液5ml，置50ml量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀。



- 精密量取20 μ l，注入液相色谱仪，记录色谱图；另取磺胺嘧啶对照品约80mg和甲氧苄啶对照品10mg，精密称定，置同一100ml量瓶中，加0.1mol/L NaOH溶液10ml，振摇使甲氧苄啶溶解，用甲醇稀释至刻度，摇匀，精密量取适量，再用流动相定量稀释制成每1ml中约含磺胺嘧啶80 μ g与甲氧苄啶10 μ g的溶液，同法测定。按外标法以峰面积计算，即得。



示例（永停滴定法）

- ChP2015规定磺胺嘧啶钠、磺胺嘧啶锌、磺胺甲噁唑、磺胺多辛和磺胺醋酰钠等原料药和制剂及磺胺嘧啶原料药，采用永停滴定法进行含量测定。



磺胺多辛原料药

【含量测定】

- 精密称定磺胺多辛约0.6g，置烧杯中，加水40ml与盐酸溶液（1→2）15ml，置电磁搅拌器上，搅拌使溶解，再加溴化钾2g，插入铂-铂电极后，将滴定管的尖端插入液面下约2/3处，用亚硝酸钠滴定液（0.1mol/L）迅速滴定，随滴随搅拌，至近终点时，将滴定管的尖端提出液面，用少量水淋洗尖端，洗液并入溶液中，继续缓缓滴定，至电流计指针突然偏转，并不再回复，即为滴定终点。每1ml亚硝酸钠滴定液（0.1mol/L）相当于31.03mg的 $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ 。



示例（非水溶液滴定法）

磺胺异噁唑片

【含量测定】

- 取磺胺异噁唑片20片，精密称定，研细，精密称取细粉适量（约相当于磺胺异噁唑0.5g），加二甲基甲酰胺40ml使溶解，加偶氮紫指示液3滴，用甲醇钠滴定液（0.1mol/L）滴定至溶液恰显蓝色，并将滴定的结果用空白试验校正。每1ml甲醇钠滴定液（0.1mol/L）相当于26.73mg的 $C_{11}H_{13}N_3O_3S$ 。



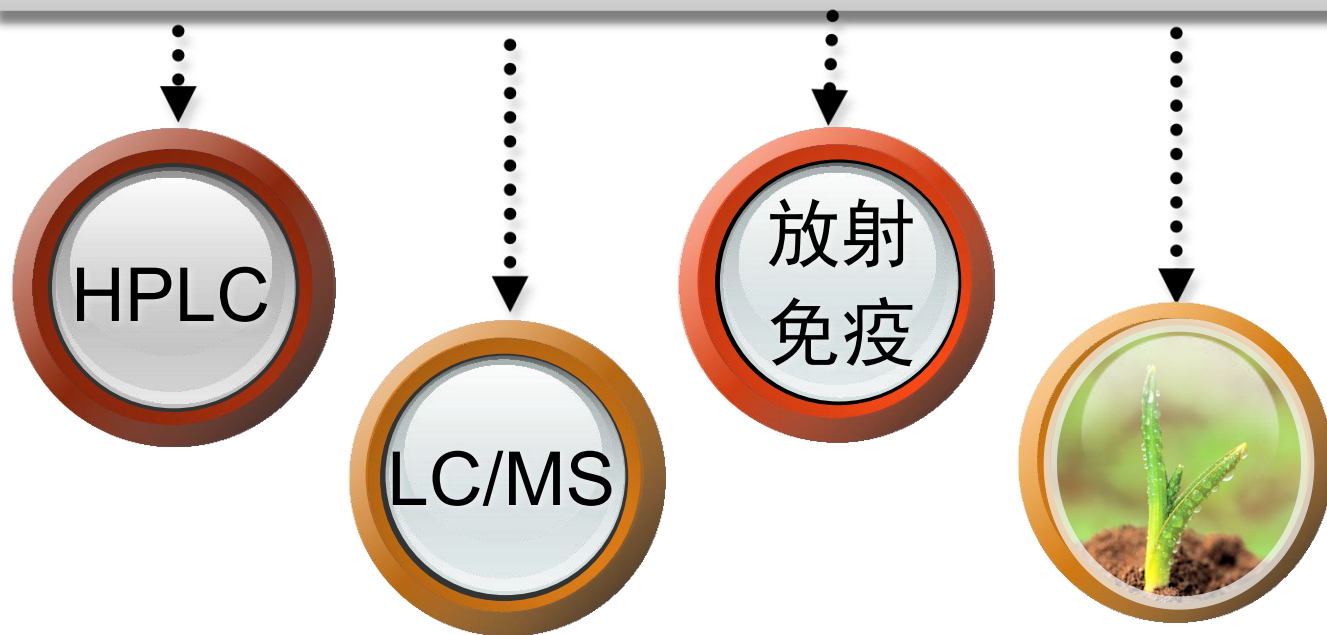
第三节

水产品中残留喹诺酮 和磺胺类药物的检查



一、水产品中残留喹诺酮类药物的检查

水产品中残留喹诺酮类药物的检查



样品前处理方法

碱性

0.1M NaOH

中乙腈
提取

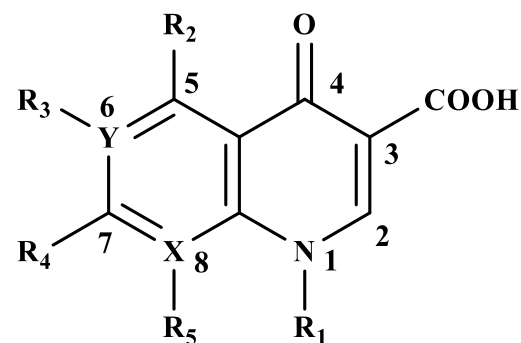
酸性

三氯乙酸
甲醇匀浆
提取

中性

乙酸乙酯/
乙腈提取

提 取

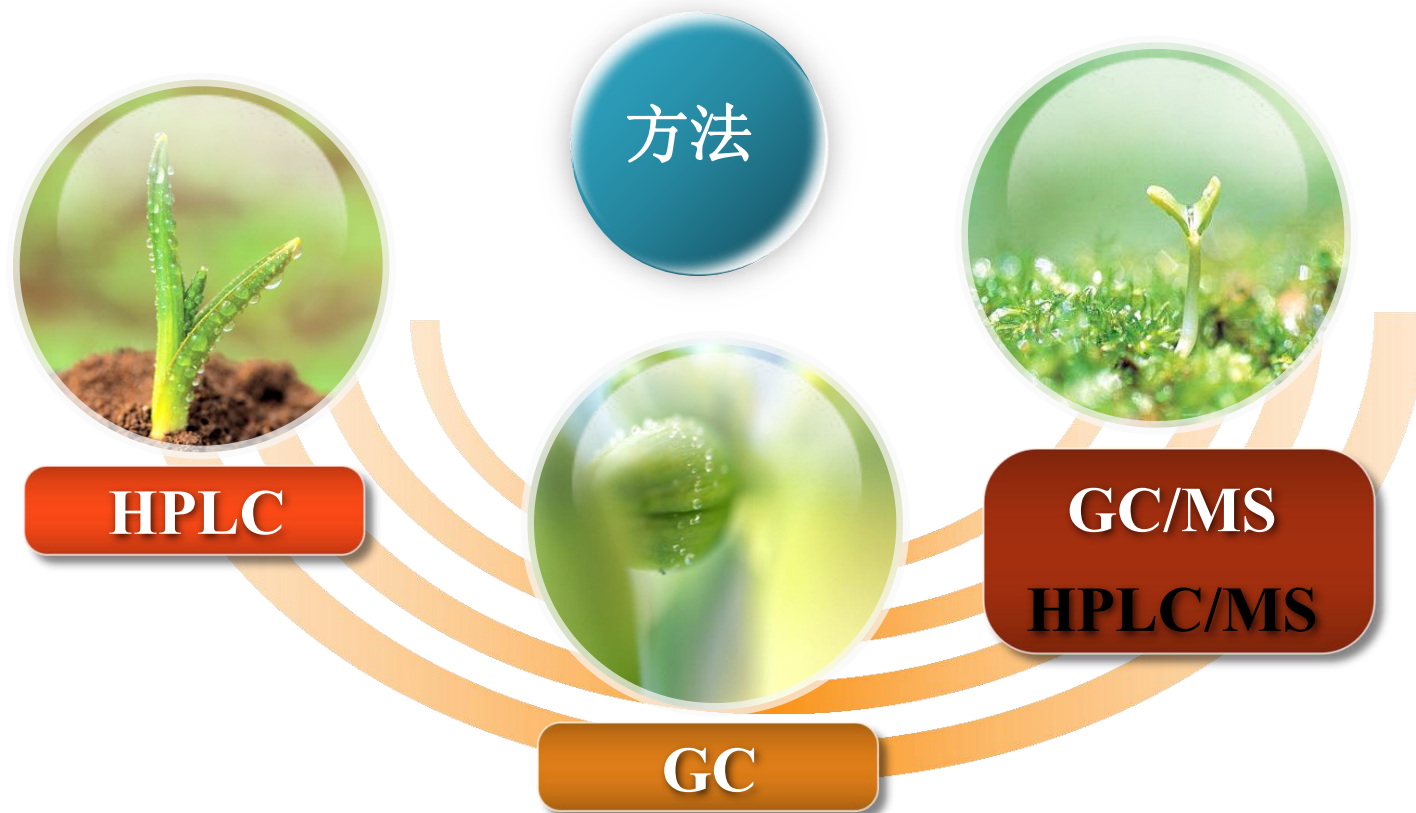


人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

样品前处理方法



二、水产品中残留磺胺类药物的检查



样品前处理方法

- 提取方法
 - 样品匀质化后对匀浆进行液-液萃取，提取溶剂有乙酸乙酯、乙腈和甲醇等。
- 净化方法
 - 固相萃取净化（固相萃取柱包括硅胶柱、
 - 氧化铝柱、C₁₈柱、氨基柱和离子交换柱等）



本章小结—喹诺酮类药物

- 结构：由吡啶酮酸并联苯环、吡啶环或嘧啶环等组成。
- 性质：酸碱两性，具有紫外吸收特征，遇光照易分解。
- 鉴别：叔胺基团与丙二酸的呈色反应；UV、TLC、HPLC和IR鉴别。
- 检查：喹诺酮类药物有关物质主要采用HPLC。
- 含量测定：《中国药典》主要采用非水溶液滴定法、UV和HPLC等测定其含量。



本章小结—磺胺类药物

- 结构：具有对氨基苯磺酰胺结构。
- 性质：显酸碱两性；含有芳伯氨基，可发生重氮化-偶合反应；磺酰氨基的氢原子，可被金属离子取代，生成不同颜色的金属盐沉淀。
- 鉴别：金属离子的取代反应、芳香第一胺反应、IR和HPLC法。
- 检查：特殊杂质检查，多采用TLC。
- 含量测定：ChP 2015主要采用HPLC、滴定法（非水溶液滴定法和沉淀滴定法）等。



思考题

- 左氧氟沙星原料药中右氧氟沙星的限量。采用配合交换手性流动相法测定，其原理是什么？
- 采用永停滴定法测定磺胺类药物含量时，为何要在强酸性中进行？
- 试述双波长法测定复方磺胺嘧啶片含量的原理。



Thank you very much!



人民卫生出版社

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE