# 抗生素药物质量分析方法研究进展

李婧  $^{1,2}$ ,方小伟  $^{1,2}$ ,张兴磊  $^{1,2*}$  (1. 东华理工大学,江西省质谱科学与仪器重点实验室,江西 南昌 330013; 2. 东华理工大学 分析测试研究中心,江西 南昌 330013)

[摘 要]抗生素类药品是临床中使用最为广泛的药品之一,在治疗感染性疾病方面发挥着极其重要的作用,其质量的优劣直接关系着该类药 品在临床上使用的安全和有效。文章就抗生素质量分析方法的研究现状进行了综述,主要包括微生物检定法,色谱分析法,质谱法,毛细管电

[关键词]抗生素; 质量分析; 微生物检定法; 色谱分析法; 质谱法

[中图分类号]TQ

[文献标识码]A

[文章编号]1007-1865(2015)09-0119-02

# Research Advances in Quality Analysis Technology for Antibiotics

Li Jing<sup>1,2</sup>, Fang Xiaowei<sup>1,2</sup>, Zhang Xinglei<sup>1,2\*</sup> (1. Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China Institute of Technology, Nanchang 330013; 2. The Research Center of Analysis and Testing, East China Institute of Technology, Nanchang 330013, China)

Abstract: Antibiotics is one of the most widely used drugs in clinical, playing an extremely important role in the treatment of infectious diseases, and its quality directly related to the safety and effect of such drugs in the clinical usage. In the paper, the research status of quality analysis methods of antibiotics was reviewed, including microbiological assay, chromatography, mass spectrometry, capillary electrophoresis, etc.

Keywords: antibiotics; quality analysis; microbiological assay; chromatography; mass spectrometry

抗生素是抗感染治疗和防治感染性疾病不可缺少的重要药 物,是临床中应用最为广泛的药物之一。仅2013年一年,我国抗 生素年产量便达到 12.12 万吨,出口量为 3.43 万吨。世界卫生组 织建议医用抗生素使用率不得超过30%,但是在中国的住院患者 中, 抗生素的使用率却高达70%。世卫组织去年4月的一份全球 调查报告显示,全球各地都发现了比例非常高的细菌耐药性问题 [1]。其药品安全小组的负责人迈克尔·迪茨说: "因为对抗生素的需求非常大,不难看到造假之人。"假劣抗生素的使用不仅延误 疾病的治疗,危害人类健康,而且还会导致超级细菌的出现。

目前常用的抗生素为微生物培养液提取物以及用化学方法合 成或半合成的化合物。抗生素的来源决定了它不同于一般的化学 合成药,在其分析检验及其质量控制方面具有一些自己的特点: (1)生物合成的抗生素几乎都是多组分的,一般含有生物发酵带来 的多种杂质,如同系物、异构体、转化或降解产物等;(2)一般供 药用的成品,主要组分占绝大多数,但也有的抗生素次要组分仍占相当数量;(3)工业生产上,菌种的经常选育,制造工艺的变动, 也有可能造成抗生素组分的改变和有关杂质成分的变化等等,使 产品质量发生波动,进而影响临床药效; (4)通常抗生素药物结构 较复杂,稳定性较差,易降解。所有这些,决定了抗生素药物有 较多的质量检验要求,需进行多方位的质量控制,以保证临床药 效的充分发挥,并尽可能降低和减少毒性和副作用。 对于抗生素质量分析的方法通常包括宏观分析和微观分析两

种。宏观分析即利用各种分离分析手段对各种抗生素的纯度(主要 活性成分及其有关组分)进行全面剖析,以达到对它们的本质有一 个宏观的了解。通过对纯度和组分的控制防止由于生产菌种和生 产工艺的不同造成品种的混淆或假冒现象的发生。微观分析即杂 质分析,任何影响药物纯度的物质都可以称之为杂质,可能是药 物中所含有的没有治疗作用的成分,也可能是影响药物的稳定性 和疗效的物质,甚至是对人体健康有害的物质。目前常用的分析 方法主要有微生物检定法、色谱法、毛细管电泳法和质谱法等。 本文主要就国内外抗生素分析检测方法的研究进展作一综述。

### 1 抗生素质量分析方法

1.1 微生物检定法 抗生素微生物检定法是测定抗生素效价(活性)的基本方法, 这是由抗生素的基本特性—抑菌能力所决定的。该方法直观地反 映了抗生素对微生物的杀菌或抑菌能力所决定的。该方法直然地及映了抗生素对微生物的杀菌或抑菌能力,且与实际使用效果一致。《中国药典》2010 年版(二部)<sup>21</sup>应用微生物检定法进行含量测定的抗生素品种有 93 个。微生物法检测成本相对低廉,适于推广使 用。但微生物检定法测定的是总效价,不能区分主成分和相关组 分或有关物质的量,不能准确反应抗生素的内在质量。

1.2 色谱分析法

1.2.1 薄层色谱法(TLC)

[收稿日期] 2015-03-16

[基金项目] 国家自然科学基金(21305011)

[作者简介] 李婧(1988-), 女, 山东人, 硕士研究生, 主要研究方向为生物及有机质谱分析。\*为通讯作者。

TLC 是一种快速、灵敏、高效地分离微量物质的方法,是最简单的色谱技术之一,具有操作方便、设备简单、分离效率高、 乙酯-正已烷-氨水(10:1.5:1.5)为展开剂,碘蒸气中显色。通过 对全国 30 家生产企业的样品分析,方法的 Rf 值适中,且实验室 重现性好,所建立的方法适宜于基层现场快速鉴别。此外,TLC 作为一种快速鉴别方法配备在药品检测车上,在基层药品现场打 假中发挥着重要作用。另外,TLC 还可与其它技术联用用于药物定量。Krzek J 等<sup>[4]</sup>采用高效薄层色谱-光度法进行兽用制剂中大观 霉素的鉴定及定量分析,检测波长 421 nm,回收率 102.54 %。 1.2.2 气相色谱法

气相色谱法(GC)以气体为流动相,具有选择性高、分离效率 高和分析速度快等特点,在分析检测领域一直起着非常重要的作用。但由于大多数药物极性大、沸点高,不容易被气化,需要制备成易于挥发的衍生物才可进行气相色谱分析,严重制约了气相色谱在药物分析领域中的应用。Hoebus J等<sup>[5]</sup>用六甲基二硅烷柱 前衍生测定大观霉素,采用填充柱气相色谱法,在75%~125%的 浓度范围内,呈良好的线性,杂质的定量限为0.1%。

1.2.3 高效液相色谱法

高效液相色谱法(HPLC)是目前最为常用的方法,配有紫外或 者荧光检测器,测定范围更广,几乎所有的抗菌药物均可以通过 HPLC 法进行检测分析。陆进方等<sup>61</sup>采用高效液相色谱法测定盐酸 林可霉素滴眼液中林可霉素的含量,色谱柱为十八烷基硅烷键合 硅胶柱,流动相为 0.05 mol/L 硼砂溶液(用 85 %磷酸调节 pH 至 5.0)-甲醇-乙腈(60:36:4), 流速 1.0 mL/min, 紫外检测波长为 214 nm, 在 1.32~3.96 mg/mL 范围内线性关系良好, 平均回收率 为 100.2 %,RSD=1.71 %。

1.3 紫外-可见分光光度法

紫外可见分光光度法经济实用,重现性好,其仪器简单,维 护成本低,普及率高,分析程序较简单,适用于医院快检,药厂中间产品检验,专业院校教学科研等。《中国药典》2010 年版<sup>[2]</sup> 用紫外-可见分光光度法进行含量测定的抗生素品种有 11 种。任 新彩等[7]采用紫外-可见分光光度法对阿奇霉素干混悬剂的中间体 含量进行了测定,并与抗生素微生物检定法进行了对比,结果发现,两种方法测得的结果没有显著差异,并且紫外-可见分光光度 法具有操作简单,快捷的特点,能有效地应用于阿奇霉素干混悬 剂的中间体含量测定。杨开金等<sup>81</sup>采用紫外分光光度法与抗生素 微生物检定法分别测定土霉素片含量,虽然用两种不同的方法测 定土霉素片的含量结果略有差异,但误差范围不超过2%,能满 足定量分析的要求。

1.4 毛细管电泳法

毛细管电泳(CE)是 20 世纪 80 年代后期发展起来的一种分离 分析技术,具有分离效率高、速度快、样品用量少的特点。对于 非挥发性及热不稳定的物质,无法采用 GC 法和 HPLC 法进行含 量测定,毛细管电泳法(CE)的优越性即凸显出来。FLURER 和 PHARM 利用毛细管区带电泳直接用紫外检测法测定了12种氨基 糖苷类抗生素及其杂质(庆大霉素、链霉素、双氢链霉素、卡那霉 需等),方法有良好的精密度(RSD=3%),定量限在 50 μg·mL·<sup>1[9,10]</sup>。 Michalska 等<sup>111</sup>采用 任细管区带电泳(MEKC)对厄他培南及其杂质进行了有效分离与测定。Pajchel 等<sup>[12]</sup>采用 CE 法对甲砜霉素、氟 苯尼考、氯霉素及甲砜霉素的 4 种相关杂质(二氯-氮-[(1R)2-氧-1-羟基甲基-2-(4-甲基磺酰基)乙基]乙酰胺,2,2-二氯-氮-[(1R, 2R)-2-羟基-1-羟基甲基-2-(4-巯苯基)乙基]乙酰胺,2,2-二氯-氮-[(1R, 2R)-2-羟基-1-羟基甲基-2-(4-甲基磺酰基)乙基]乙酰胺,氮-[(1R, 2R)-2-羟基-1-羟基甲基-2-(4-甲基磺酰基)乙基]乙酰胺等进行了分 离检查,实验结果准确,线性关系及精密度好。 1.5 质谱法

基于质谱的分析方法,因其卓越的分析特性而广泛的应用于 药物分析。在传统质谱分析中,通常需要对药品进行复杂的样品 预处理,从而极大的影响药品分析速度。近年来,无需样品预处理的常压直接离子化技术如 DESI<sup>[13,14]</sup>、DART<sup>[15,16]</sup>、AMS<sup>[17]</sup>、 ASAP<sup>[18]</sup>等则被报道应用于对药物的高通量分析。其中 DESI 技术 是典型的二维技术, 能够对非粉尘状固体表面进行直接分析。对 于液体样品则可以将样品溶液滴在承载表面(如聚四氟乙烯、纸张 等)上,然后进行 DESI-MS 检测。Huanwen Chen 等[19]利用 DESI 串联质谱技术对固体、膏状、液态的克霉唑等药物分别进行了检测,整个检测过程无需样品预处理,并通过传送带的使用,将取 样速度提高 3 倍速,从而进一步提高了检测通量。检测的 RSD 为 2%~8%,低至0.1%含量的杂质及成分均能被快速检测。

近年发展起来的表面解吸常压化学电离质谱法(DAPCI-MS) 综合了电喷雾解吸电离质谱(DESI-MS)无需样品预处理和常压化 学电离质谱(APCI-MS)灵敏度高的优点,可在常温、常压下直接对粉末样品、固体样品中的痕量物质进行解吸化学电离,并进行质谱分析。陈荣等<sup>[20]</sup>采用该离子源耦合串联质谱成功对市售阿莫 西林、诺氟沙星、罗红霉素及头孢拉定常用粉状抗生素及其降解物进行了检测,单个样品检测时间不到 1 min。Zhang Xinglei 等<sup>[21]</sup> 利用 DAPCI 离子源质谱技术,通过指纹图谱对 4 个厂家生产的阿 莫西林成功地进行了区分。

#### 1.6 核磁共振法

核磁共振法(nuclear magnetic resonance, NMR), 自 1945年 发现以来,由于该技术用于定量分析所需样品量大,灵敏度低等 诸多问题,很长一段时间限制了 NMR 在定量分析中的应用,长 期以来,只是作为结构测定的主要工具。近几十年来,由于在仪 器装置上的长足发展以及科研人员在核磁共振领域的活跃研究, NMR 也正在逐渐成为强有力的定量分析工具。目前美国、英国等 国药典均将 NMR 定量方法收载于其附录中。但在杂质检查方面 的应用,由于药物中的杂质含量很少,所以还不能用 NMR 准确 测定痕量杂质含量。不过国内有施燕红等<sup>[22]</sup>首次尝试将 NMR 法 用于药物异构体杂质的含量测定,通过同一基团的面积比计算出 了盐酸头孢吡肟中异构体杂质含量为30.39%。

#### 2 结论

微生物检定法虽能进行大批量样品的检测, 快速, 灵敏性高, 且在非实验室环境下可方便操作,但试验标准菌株会产生耐药性, 影响微生物方法检测灵敏度。HPLC 法测定抗生素,主要通过采 用对照品或相对保留时间对抗生素药品中的活性成分及杂质成分进行定位来进行识别。由于某些抗生素对色谱柱的保留行为易受 色谱条件的影响,这可能导致相对保留时间定位有误。高效毛细 管电泳结合了毛细管电泳和高效液相色谱的优点, 弥补了高效液 相色谱的不足,是一种简单高效的分析方法,尤其对于特殊杂质 的分离如手型杂质等具有很好的效果。但目前迫切需要解决该法 重现性差的问题,且该法不好操作,未经过系统培训的工作者难 以成功建立方法:用于杂质检测,还需要解决灵敏度不高的问题, 以达到痕量杂质的检测要求。近年来,各种无需样品预处理的质 谱离子化技术不断出现,为加大对药物的监管力度,扩大检测范 围,快速完成大批量药物检测提供了技术支持,具有广阔的应用 前景。但是, 当前质谱技术受设备要求高, 体积大, 成本高等因 素制约,在日常抗生素药物的质量控制中还没有得到广泛的应用。

总之,对抗生素药物质量的快速分析研究工作方兴未艾,很 多有实用意义的工作还有待进一步完成。

## 参考文献

[1] http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/. [2]邵明立. 中华人民共和国药典 (第二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版

[3]周志凌,冷智生,金建平,等.十四元环大环内酯类抗生素薄层鉴别方 法研究[J]. 中国药事, 2004, 18(7): 437-438.

[4] Krzek J, Kwiecień A, Starek M, et al. Identification and determination of oxytetracycline, tiamulin, lincomycin, and spectinomycin in veterinary preparations by thin-layer chromatography/densitometry[J]. Journal of AOAC International, 2000, 83(6): 1502-1506.

[5] Hoebus J, Yun L M, Hoogmartens J. An improved gas chromatographic assay for spectinomycin hydrochloride[J]. Chromatographia, 1994, 39(1-2):

[6]陆进方. 盐酸林可霉素滴眼液的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志,200, 34(12): 627-628.

[7]任新彩,李毅,王竹青,等.紫外可见分光光度法测定阿奇霉素干混悬 剂中间体的含量[J]. 河北化工, 2008, 31(3): 73-74.

[8]杨开金. 紫外分光光度法与抗生素微生物检定法测定土霉素片含量方法 比较[J]. 中国基层医药, 2006, 13(7): 1204-1204.

[9]Flurer C L. The analysis of aminoglycoside antibiotics by capillary electrophoresis[J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 1995, 13(7): 809-816.

[10]胡昌勤, 尹利辉. 毛细管电泳及其在抗生素分析中的应用[J]. 国外医 药: 抗生素分册, 2000, 21(5): 193-197.

[11] Michalska K, Pajchel G, Tyski S. Different sample stacking strategies for the determination of ertapenem and its impurities by micellar electrokinetic chromatography in pharmaceutical formulation[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(14): 2934-2942.

[12] Pajchel G<br/>, Michalska K<br/>, German R<br/>, et al. Assay of the related compounds thiamphenicol, florphenicol, and chloramphenicol CE[J]. Chromatographia, 2008, 68(7-8): 587-591.

[13]Kertesz V, Van Berkel G J. Scanning and surface alignment considerations electrospray chemical imaging with desorption spectrometry[J]. Analytical chemistry, 2008, 80(4): 1027-1032.

[14] Nyadong L, Harris G A, Balayssac S, et al. Combining two-dimensional diffusion-ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy, imaging desorption electrospray ionization mass spectrometry, and direct analysis in real-time mass spectrometry for the integral investigation of counterfeit pharmaceuticals[J]. Analytical chemistry, 2009, 81(12): 4803-4812.

[15]Kawamura M, Kikura-Hanajiri R, Goda Y. [Simple and rapid screening for psychotropic natural products using Direct Analysis in Real Time (DART)-TOFMS][J]. Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 2009, 129(6): 719-725.

[16]Fernández F M, Cody R B, Green M D, et al. Characterization of solid counterfeit drug samples by desorption electrospray ionization and direct - analysis - in - real - time coupled to time - of - flight mass spectrometry[J]. ChemMedChem, 2006, 1(7): 702-705.

[17] Martin A N, Farquar G R, Steele P T, et al. Use of single particle aerosol mass spectrometry for the automated nondestructive identification of drugs in multicomponent samples[J]. Analytical chemistry, 2009, 81(22): 9336-9342. [18]Petucci C, Diffendal J. Atmospheric solids analysis probe: a rapid ionization technique for small molecule drugs[J] . Journal of mass spectrometry, 2008, 43(11): 1565-1568.

[19] Chen H, Talaty N N, Takáts Z, et al. Desorption electrospray ionization mass spectrometry for high-throughput analysis of pharmaceutical samples in the ambient environment[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(21): 6915-6927. [20]陈荣,杨水平,申屠静灵,等.表面解吸常压化学电离串联质谱快速 检测粉末状抗生素药品[J]. 药物分析杂志, 2009, (10): 1628-1635.

[21]Zhang X, Jia B, Huang K, et al. Tracing origins of complex pharmaceutical preparations using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. Analytical chemistry, 2010, 82(19): 8060-8070. [22]施燕红, 刘松柏, 宋国强. 利用 NMR 测定盐酸头孢吡肟中杂质的含

量[J]. 波谱学杂志, 2003, 20(3): 259-264.

(本文文献格式: 李婧, 方小伟, 张兴磊. 抗生素药物质量分析方 法研究进展[J]. 广东化工, 2015, 42(9): 119-120)