

抗生素质控分析中 HPLC 分析方法的理论与实践

抗生素质控分析中 HPLC 分析的基本理论

(上册)

胡昌勤 编著

化学出版社

抗生素质控分析中 HPLC 分析方法的理论与实践

抗生素质控分析中 HPLC 分析的基本理论

(上册)

胡昌勤 编著

气象出版社

内 容 简 介

本书系统地阐述了高效液相色谱(HPLC)法的基本理论,并结合药物分析,特别是抗生素分析的特点,重点讨论了如何利用这些基础理论解决质量控制中的实际问题。

全书共十三章,分上、下两册出版。上册六章,主要介绍建立高效液相色谱分析方法所涉及的基本理论、方法及如何对所建立的分析方法进行评价;下册七章,分别介绍对具体不同类别抗生素的分析方法,并对目前抗生素分析中的热点, Sephadex G-10 凝胶色谱系统分析、 β -内酰胺抗生素高分子杂质和毛细管电泳分析进行了介绍。

本书对从事药物分析,特别是从事抗生素分析、质量控制、新药开发、教学、科研工作者有参考和实用价值,亦可作为大专院校有关专业高年级学生和研究生色谱分析、药物分析课的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

抗生素质控分析中 HPLC 分析的基本理论/胡昌勤编著.
-北京:气象出版社,2001.3
ISBN 7-5029-3121-X

I. 抗… II. 胡… III. 抗生素-液相色谱-药物
分析 IV. R978.1
中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 15682 号

抗生素质控分析中 HPLC 分析的基本理论 (上册)

胡昌勤 编著

责任编辑:王桂梅 终审:周诗健

封面设计:王编 责任技编:陈红 责任校对:王敏

* * *

气象出版社出版

(北京市海淀区中关村南大街 46 号 邮编:100081)

北京市宏远兴旺印刷厂印刷

新华书店总店北京发行所发行 全国各地新华书店经销

* * *

开本:787×1092 1/16 印张:11.50 字数:294 千字

2001 年 3 月第一版 2001 年 3 月第一次印刷

印数:1~3000 定价:58.00 元

ISBN 7-5029-3121-X/R·0041

前 言

高效液相色谱技术是 20 世纪 70 年代后期发展最快的分析化学的分支,由于其在分离、检测过程中比较温和,故对沸点高、分子量大、极性高、热稳定性差的化合物表现出极强的生命力。在药物分析的各个领域已得到广泛地应用。目前,高效液相色谱法已是药品质量控制的最常规方法之一。

在中国,高效液相色谱技术已逐渐被各级药品检验实验室所掌握,中国药典中采用高效液相色谱法进行鉴别、相关物质检查、组分控制和含量测定的品种逐年增加,但各实验室对高效液相色谱法的理解及掌握程度却存在不同程度的差别。虽然国内已有一些介绍高效液相色谱技术的专著,且在许多药物分析的专著中都有专门章节介绍高效液相色谱法,但前者主要偏重于色谱理论,与药物分析的具体实例结合的不够;而后者,对液相色谱的基础理论相对介绍的较少,使得药物分析工作者读起来感觉针对性不强。中国药典从 1995 年版起,高效液相色谱法被广泛用于对抗生素药品的质控分析。在 1996 年召开的全国各省、市、自治区药品检验所抗生素室主任工作会议上,与会代表根据中国抗生素分析的现状,酝酿编辑、出版一套较为完整的抗生素分析丛书,并成立了以金少鸿、仇士林、袁雯玮、仲国英、莫履强等抗生素分析专家组成的编委会,以推动我国抗生素分析的进一步发展。

本书作为抗生素分析丛书中的一册,力图将高效液相色谱的基础理论与抗生素分析的实践相结合,使读者能较为全面地了解如何建立一种色谱方法,如何评价一种色谱方法,如何应用一种色谱方法;并对目前常见的抗生素品种的高效液相色谱方法逐一进行了评述。书中的实例基本上是抗生素分析的具体实例,很多来自中国药品生物制品检定所抗生素室近年来的工作,因此本书也是对中国药品生物制品检定所抗生素室近年来高效液相色谱法应用成果的系统总结。自 1995 年以来,先后有多位同事(薛闻鹂、丁宏、成双红、尹利辉、杨亚莉、王立新、顾立素、陈鸿波、姚尚辰、余方键、张斗胜)和硕士研究生(袁耀佐、刘巍、杨剑宁、代红、姜红、王明娟、朱斌、刘英、涂林、杨利红)在抗生素室从事高效液相色谱分析工作,没有他们的工作,该书就不可能面世。

在本书的编写过程中,先后得到多位同仁、朋友的鼓励与支持。张维民先生帮助修改了部分文稿并绘制了部分图稿,成双红女士协助绘制了部分化学结构式及图稿,张力女士帮助查找档案资料并协助校对书稿。香港澳美制药厂、珠海联邦制药有限公司为本书的出版提供了部分资金。当然,还有我的太太张靖溥和家人的长期鼓励与支持。在本书出版之际,我谨向他们致以最衷心的感谢。

面对着一个飞速发展的应用领域,加之时间仓促,水平有限,书中的错误和不

妥之处在所难免,敬请专家和广大读者批评指正。希望随着高效液相色谱技术在抗生素分析中的深入应用,将做更多、更新的工作来充实丰富本书已经涉及和尚未涉及的内容。

胡昌勤

2001 年 2 月

目 录

前言

1 抗生素及其质量分析进展	(1)
1.1 抗生素药品的质控分析	(1)
1.1.1 抗生素药品的特点	(1)
1.1.2 抗生素药品质控分析的基本原则	(2)
1.1.3 抗生素质控分析的进展	(6)
1.2 生物体内抗生素样品的分析	(7)
1.2.1 生物体内抗生素分析的目的	(7)
1.2.2 生物体内抗生素分析的特点	(7)
1.2.3 生物体内抗生素分析方法	(7)
1.3 抗生素工业生产过程中的样品分析	(8)
1.3.1 抗生素工业生产过程中样品分析的目的	(8)
1.3.2 生产过程中抗生素分析方法的特点	(9)
2 高效液相色谱仪及其进展	(10)
2.1 高效液相色谱法的发展史及其特点	(10)
2.1.1 色谱法的发展史	(10)
2.1.2 色谱法的分类	(12)
2.1.3 高效液相色谱法	(12)
2.1.4 高效液相色谱法的特点	(13)
2.2 高效液相色谱仪及其进展	(14)
2.2.1 高压输液系统	(14)
2.2.2 进样系统	(20)
2.2.3 色谱柱系统	(23)
2.2.4 高效液相色谱检测器	(30)
2.2.5 高效液相色谱的数据处理系统	(43)
2.2.6 高效液相色谱专家系统	(45)
3 高效液相色谱柱技术	(47)
3.1 高效液相色谱过程动力学	(47)
3.1.1 液相色谱的分离机制	(48)
3.1.2 液相色谱的分离过程	(50)
3.1.3 分离过程中色谱区域的扩展	(54)
3.1.4 色谱柱效率及影响因素	(55)
3.1.5 色谱峰的形状	(60)
3.2 高效液相色谱过程热力学	(65)
3.2.1 溶质在色谱柱中的保留	(65)
3.2.2 固定相对溶质保留值的影响	(65)
3.2.3 流动相对溶质保留值的影响	(80)
3.2.4 色谱条件对溶质保留值的影响	(86)
3.3 高效液相色谱分离条件的选择——多元混合物分离理论	(87)
3.3.1 色谱分离的优化指标	(87)

3.3.2	色谱分离优化方法	(93)
4	高效液相色谱定性、定量分析法	(110)
4.1	高效液相色谱定性分析法	(110)
4.1.1	利用对照品鉴别色谱流出物	(110)
4.1.2	估测色谱分离物的结构特性	(112)
4.2	高效液相色谱定量分析法	(116)
4.2.1	绝对含量测定法	(116)
4.2.2	相对含量测定法	(120)
4.3	高效液相色谱分析中的误差分析	(121)
4.3.1	色谱分离参数对实验结果的影响	(121)
4.3.2	色谱峰分离度对实验结果的影响	(124)
4.3.3	结果处理中引入的误差	(126)
5	高效液相色谱检测技术	(130)
5.1	衍生化技术	(130)
5.1.1	衍生化反应	(130)
5.1.2	衍生化反应的分类	(137)
5.2	间接检测技术	(140)
5.2.1	间接检测的基本原理	(140)
5.2.2	间接检测的应用	(141)
5.3	衍生化反应分析氨基糖苷类抗生素	(142)
5.3.1	OPA 柱前衍生化分析庆大霉素 C 组分	(143)
5.3.2	2,4,6-三硝基苯磺酸柱前衍生化分析硫酸阿米卡星	(144)
5.3.3	苯基异硫氰酸酯(PITC)柱前衍生化分析氨基糖苷类抗生素	(144)
5.3.4	依替米星标准品的纯度分析	(145)
5.3.5	间接检测技术分析氨基糖苷类抗生素	(148)
6	抗菌药物质量分析中高效液相色谱分析方法的建立及评价方法	(150)
6.1	抗生素质量分析中 HPLC 色谱条件的推荐原则	(150)
6.1.1	基本原则	(150)
6.1.2	β -内酰胺类抗生素 HPLC 分析系统的推荐原则	(153)
6.1.3	氨基糖苷类抗生素 HPLC 分析系统的推荐原则	(155)
6.1.4	其它抗菌药物 HPLC 分析系统的推荐原则	(156)
6.1.5	最佳柱长、担体粒度和最佳流速的选择	(157)
6.2	高效液相色谱峰纯度的评价	(157)
6.2.1	仪器方法	(157)
6.2.2	化学计量学方法	(159)
6.3	高效液相色谱分析方法的有效性评价	(160)
6.3.1	概述	(160)
6.3.2	有效性及参数评价方法	(161)
6.3.3	有效性评价参数的选择	(161)
6.3.4	评价参数	(164)
6.3.5	稳定性研究实验方法的考察	(174)
6.3.6	总结	(175)
	参考文献	(176)

1 抗生素及其质量分析进展

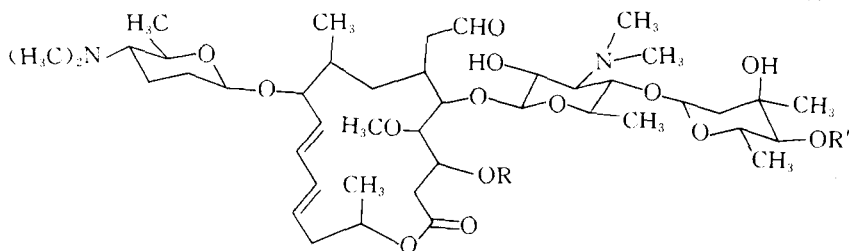
从 Flemming 1929 年发现第一个抗生素青霉素以来,经过近一个世纪的发展,抗生素 (Abtibiotics) 已经成为一门独立的综合学科。抗生素领域在迅速发展,其含义也在不断被充实。1942 年,链霉素的发现者 Waksman 定义:“抗生素是微生物在代谢中产生的具有抑制它种微生物生长活动、甚至杀灭它种微生物的化学物质”。但是由于抗肿瘤、抗寄生虫等抗生素的不断发现,使得抗生素的作用范围已远远超出了对微生物的作用;之后,又发现化学改造可以明显地改变已知抗生素的抗菌活性或毒性作用,推动了半合成抗生素的迅速发展;此时抗生素被定义为“是在低微浓度即可对某些生物的生命活性有特异抑制作用的微生物次级代谢产物及其衍生物”。近年来,由于化学合成工业的迅速发展,一些原来利用生物发酵的抗生素,已由化学合成方式生产,如氯霉素等;通过对传统抗生素的结构与功能的研究,人们设计出一些全新结构的全合成抗生素,如氨曲南、利奈唑烷等。故抗生素又被认为是对“在低微浓度即可对某些生物的生命活性有特异抑制作用的化学物质的总称”。

抗生素分析是依据抗生素的发展而产生,并伴随着抗生素的发展而发展的抗生素分支学科。抗生素学科的发展,不断为抗生素分析提出新要求;分析化学、分析仪器及计算机等学科的发展,使得抗生素分析手段不断充实,进而又促进了抗生素学科的发展。依据抗生素分析的服务对象,抗生素分析可主要分为抗生素成品药品的质控分析、生产过程中的控制和抗生素体内分析等。

1.1 抗生素药品的质控分析

1.1.1 抗生素药品的特点

(1) 抗生素药品的纯度一般较化学药品低。抗生素药品的生产,目前一般由微生物在工业条件下发酵,再经化学纯化、精制和化学修饰等中间过程,最后制成适当的制剂。与一般的化学合成药品相比较,抗生素药品的结构、组成更复杂,表现为:①同系物多,如庆大霉素含有 C_{1a} , C_1 , C_2 和 C_{2a} 等组分;国产一类新药必特螺旋霉素是将碳霉素 4"-异戊酰转移酶基因克隆到可产生螺旋霉素的宿主菌中,对螺旋霉素成功进行酰化改造后得到的新抗生素。由于 4"-异戊酰转移酶对于底物的选择不专一,必特螺旋霉素是一组以 4"-异戊酰螺旋霉素为主的 4"-酰化螺旋霉素,按 4"-酰基上碳原子数目的不同可分为乙酰、丙酰、丁酰及异戊酰螺旋霉素等,其结构如图 1.1 所示;②异构体多,如多数半合成 β -内酰胺抗生素均存在光学异构体;③降解物多。



异戊酰螺旋霉素Ⅲ	$R = \text{COCH}_2\text{CH}_3$	$R' = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
异戊酰螺旋霉素Ⅱ	$R = \text{COCH}_3$	$R' = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
异戊酰螺旋霉素Ⅰ	$R = \text{H}$	$R' = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
异丁酰螺旋霉素Ⅲ	$R = \text{COCH}_2\text{CH}_3$	$R' = \text{COCH}(\text{CH}_3)_2$
异丁酰螺旋霉素Ⅱ	$R = \text{COCH}_3$	$R' = \text{COCH}(\text{CH}_3)_2$
丁酰螺旋霉素Ⅲ	$R = \text{COCH}_2\text{CH}_3$	$R' = \text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
丁酰螺旋霉素Ⅱ	$R = \text{COCH}_3$	$R' = \text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
丙酰螺旋霉素Ⅲ	$R = \text{COCH}_2\text{CH}_3$	$R' = \text{COCH}_2\text{CH}_3$
丙酰螺旋霉素Ⅱ	$R = \text{COCH}_3$	$R' = \text{COCH}_2\text{CH}_3$
乙酰螺旋霉素Ⅲ	$R = \text{COCH}_2\text{CH}_3$	$R' = \text{COCH}_3$
乙酰螺旋霉素Ⅱ	$R = \text{COCH}_3$	$R' = \text{COCH}_3$
螺旋霉素Ⅲ	$R = \text{COCH}_2\text{CH}_3$	$R' = \text{H}$
螺旋霉素Ⅱ	$R = \text{COCH}_3$	$R' = \text{H}$
螺旋霉素Ⅰ	$R = \text{H}$	$R' = \text{H}$

图 1.1 必特螺旋霉素组分结构

(2) 抗生素的活性组分易发生变异。由于抗生素的生产和生物发酵有关,微生物菌株的变异、发酵条件的改变等均可导致产品质量的波动,如多组分抗生素,菌株或发酵条件的改变,可导致组分组成或比例的变化。

(3) 抗生素药品的稳定性一般较化学药品差。抗生素的分子结构中通常含有较活泼的化学结构,该结构通常又为抗生素的活性中心,如 β -内酰胺抗生素的 β -内酰胺环、链霉素中的醛基等。在贮存过程中,这些活泼基团易受外界环境的影响而发生变化,导致抗生素药品的稳定性较一般化学药品差。

1.1.2 抗生素药品质控分析的基本原则

抗生素药品的质控分析和其它化学药品一样,一般可分为鉴别、原料的一般检查项、制剂的一般检查项和含量测定四个方面。

(1) 鉴别试验。鉴别试验的目的是验证某抗生素或其制剂,通常鉴别试验应包括对抗生素本身的鉴别和对抗生素盐的酸根或金属离子的鉴别。如对青霉素钠的鉴别应包括对青霉素的鉴别及对钠离子的鉴别;对硫酸链霉素的鉴别应包括对链霉素的鉴别和对硫酸根的鉴别。

对抗生素分子的鉴别通常可采用以下方法:

① 检测抗生素分子中的特定官能团。利用抗生素分子中存在的特定官能团鉴别抗生素是简便、易行的方法,但由于官能团反应有时并非是该抗生素的特有反应,因此需要多种反应相互补充。以链霉素的鉴别反应为例:链霉素和双氢链霉素中的胍基和 8-羟基喹琳在一定的条件下均可产生颜色反应;但链霉素中的链霉糖经碱水解可生成麦芽糖,麦芽糖遇三价铁离子(Fe^{3+})形成紫色络合物;而双氢链霉素经碱水解不能形成麦芽糖。故链霉素的鉴别反应可选择胍基和麦芽糖两项反应。

② 光谱分析。测定抗生素分子的紫外光谱或红外光谱,与已知的对照品或对照谱图进行比较,是抗生素鉴别的较专属方法。由于同类抗生素分子的紫外光谱差别较小,故红外光谱较紫外光谱在鉴别试验中更具有普遍意义。由于抗生素常存在多晶型现象,利用红外光谱进行鉴别时,如发现供试品和对照品或对照谱图不一致时,最好用相同溶剂同时重结晶供试品和对照品,使之处于相同晶型的情况下再进行测定。有时,多晶效应是由于研磨和压片过程中的晶相

转变所致,此时应采用溶液法试验。

③色谱分析。薄层色谱法和 HPLC 是目前最常用的色谱鉴别方法。其基本原理基于相同色谱条件下,供试品和对照品应具有相同的保留值。其它可用于鉴别实验的色谱方法有纸层析法、电泳法等。色谱法是专属性较高的鉴别方法,随着色谱分析方法的普及,其应用也越来越广泛。

由于抗生素结构的多样性,在进行鉴别反应时,不应仅依靠一种鉴别反应,而应采用多种不同机理的反应,已达到相辅相成之效果。如对卡那霉素的鉴别,EP1999 年增补版中采用 TLC 法和颜色反应两种方法联合鉴别,这里显色反应作为一种辅助鉴别方法,首先确定供试品是否属于氨基糖苷类化合物,进而提高了 TLC 鉴别的可靠性。又如阿米卡星的鉴别,EP1999 年增补版中采用 TLC 法和红外法联合鉴别。氨基糖甙类抗生素分子主要为饱和的碳氢化合物,分子中的氨基、羟基等并非是红外光谱鉴别的最适基团,因此红外光谱图所能提供的结构特征峰并不丰富,单独采用红外光谱对氨基糖甙类抗生素进行鉴别,通常得不到满意的结果。在此,红外光谱法可作为 TLC 鉴别方法的补充。

(2)原料的一般检查项。设立一般检查项的目的,通常是为了检查药品是否符合医疗使用的要求、药品是否在可控状态下生产及推测药品的稳定性能否满足贮存条件的需要等。与临床应用密切相关的指标包括:异常毒性、热原、细菌内毒素、降压物质、无菌等;与产品稳定性有关的指标包括:结晶性、水分(干燥失重)、酸碱度等;判断药品是否在 GMP 条件下可控生产的指标包括:残留溶剂、粒度、重金属、炽灼残渣等。通常采用组分分析、比旋度,控制多组分抗生素的组成;采用相关物质分析、溶液的澄清度与颜色、控制产品中有机杂质的含量;采用炽灼残渣表征产品中无机杂质的含量。

(3)制剂的一般检查项。设立制剂一般检查项之目的与原料的一般检查项之目的相同,故许多检查项目与原料相同,并设有特殊的检查项目以确定制剂生产是否符合各种制剂的相应要求。其特殊的检查项目包括:

①含量均匀度及片重(装量差异)。该检查项目是为了保证不同支/片(囊)药品的含量均一。对于小剂量(规格)药品,需要检查含量均匀度,而对于含量相对较大的药品,采用装量差异或片重差异表征不同支/片(囊)药品的均一性。

由于含量均匀度测定对测定方法的专属性要求不高,虽然国外亦较多采用 HPLC 法测定含量均匀度,但国内通常首先选用 UV 法测定。

②溶出度及崩解度。溶出度和崩解度是口服制剂的特有检查项目。溶出度是一种模拟口服固体制剂在胃肠道中崩解和溶出的体外试验法。作为一种制剂质控手段,溶出度检查可以反映药物的晶型、粒度、处方组成、辅料等性质、生产工艺的差异等,是评价药物口服制剂的内在质量的重要指标。对水溶性较好的药品,通常仅需检查其崩解度,而水溶性不好的药品,则需要检查溶出度。虽然,有时选用的溶出度测定条件并不能反映药品在体内的实际溶出情况,但利用溶出度控制生产工艺的稳定性同样具有重要的意义。

(4)含量测定。抗生素的含量测定是抗生素分析的核心,按其分析方法可分为微生物检定法和化学分析法两大类。

①微生物检定法。微生物检定法是以抗生素对微生物的杀伤或抑制程度为指标来衡量抗生素效价(Potency)的方法。实验中供试品必须与效价已知的标准品相比较才能确定出自己的效价。由于抗生素微生物检定法的测定结果比较直观;而抗生素分子的结构、组分比较复杂,在药物的开发初期一般尚没有发展出较专属的化学测定方法,使得抗生素微生物检定法成为抗

生素含量测定的最基本方法。目前,对多组分抗生素,微生物检定法仍是首选的含量测定方法。

抗生素微生物检定法有杯碟法和比浊法两种。虽然两种方法一般可通用,但比浊法更有利于自动化操作,且手工操作比浊法更易控制实验误差。抗生素微生物检定法的基本原理为量反应平行线法,应用抗生素微生物检定法测定效价时,应采用生物统计的原理和方法对实验结果进行可靠性分析及误差估计,以确保实验结果准确可靠。

②化学测定法。化学测定法是利用化学分析的手段测定抗生素活性成分的方法。对结构和组分已知的抗生素,其含量测定方法包括:特定官能团分析法和分离分析法两类。通常利用特定官能团来测定抗生素的含量,其专属性较分离分析法差,但对于反应类型已知的化学反应有时可省略对照品,且方法也相对简便。

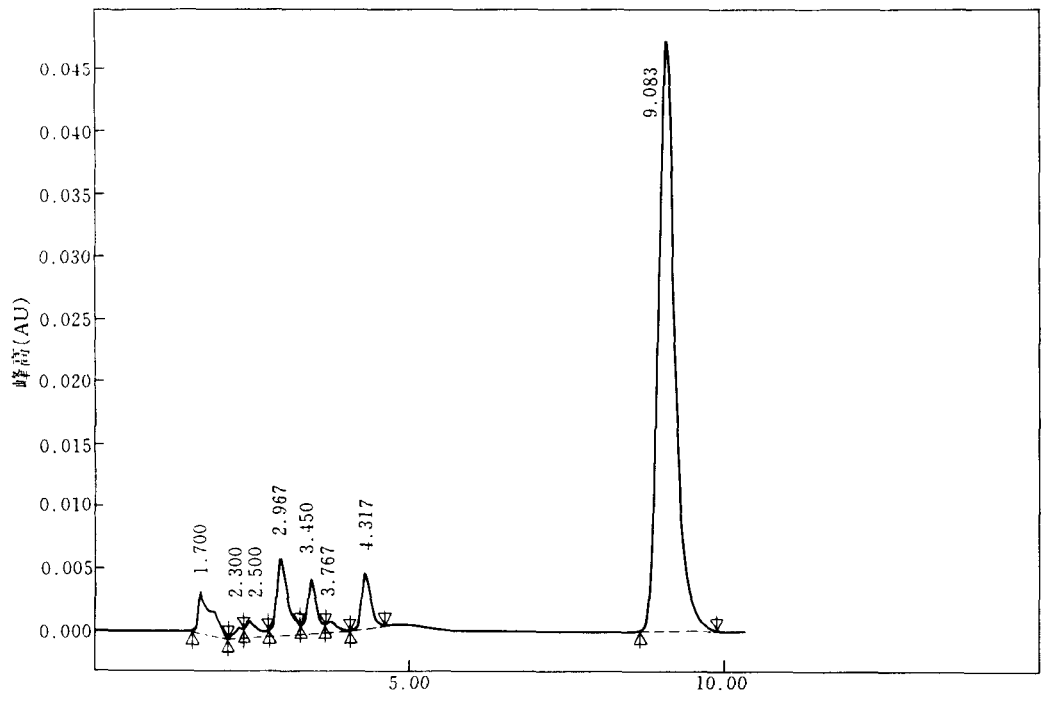
常用的特定官能团测定法又可分为直接测定法和间接测定法两类,其检测手段包括光谱分析法、电化学分析法和一般化学分析法。以青霉素类抗生素的含量分析为例,直接测定法可采用酸碱滴定法测定抗生素分子的羧基;间接测定法包括碘量法、电位滴定法、咪唑法等。碘量法测定,首先青霉素经碱水解形成青霉噻唑酸,然后与碘定量反应;电位滴定法测定,青霉素碱水解物中的巯基与硝酸汞定量反应,反应过程中以铂电极为指示电极,以硫酸亚汞电极为参比电极,根据反应中电位的变化判断反应终点;咪唑法测定,青霉素先经乙酰化后,由咪唑催化,在高汞盐溶液中被转化成青霉稀酸硫醇汞盐,在 325~345nm 波长处产生最大吸收,然后由分光光度法测定。

官能团测定法的准确性除了与方法本身的准确性有关外,主要影响因素来自供试品中杂质和反应试剂的非特异反应。故清楚地了解供试品中的各类杂质,进而选用较专一的测定方法是减少干扰、提高检测准确性的主要手段。

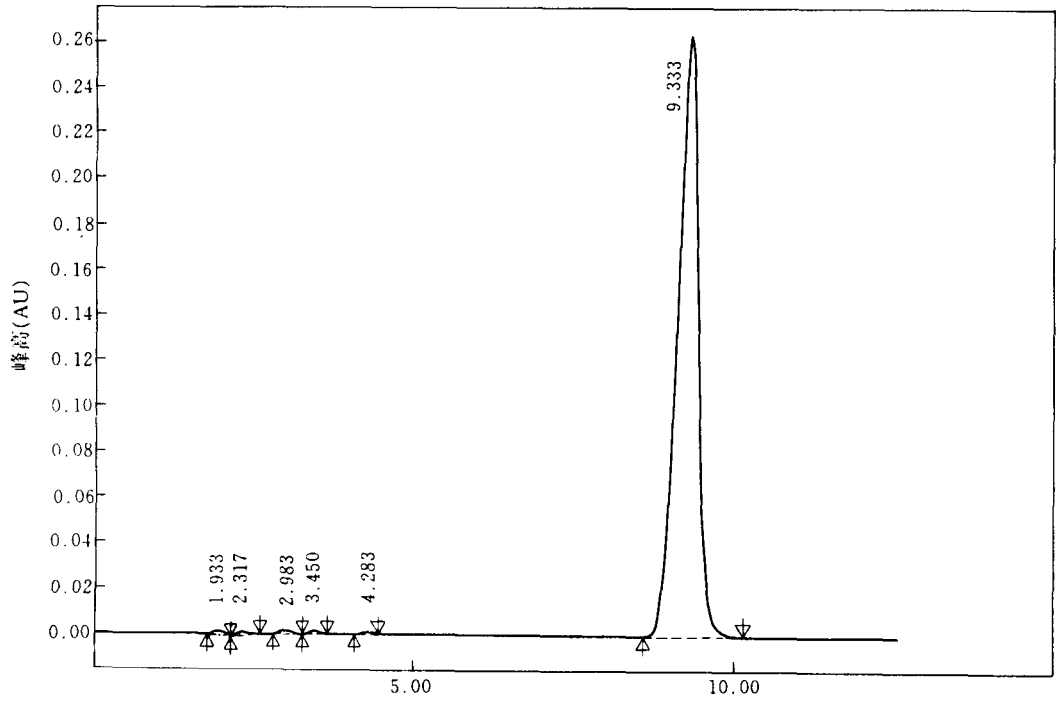
分离分析方法的基本原理是采用化学分离的手段使抗生素中的有效组分和杂质分离,进而准确测定抗生素活性组分的含量。如中国药典 1995 年版对利福平的测定,首先采用 TLC 方法,使利福平和其杂质分离,利福平斑点经洗脱后,再由 UV 法测定含量。该方法较 BP1993 年版利福平直接 UV 测定法的准确度大大提高。常用的分离手段是色谱法,利用 HPLC 法对单组分抗生素进行含量测定,是目前抗生素含量测定的发展方向。

③不同化学测定方法准确性的比较。以 HPLC 法和电位滴定法、咪唑法测定青霉素 V 钾原料及青霉素 V 钾片含量的比较为例。青霉素 V 中通常含有对羟基青霉素 V、青霉素 V 噻唑酸等杂质,在 HPLC 色谱图中(图 1.2),青霉素 V 的保留时间约 9min,对羟基青霉素 V 的保留时间约 3.4min,青霉素 V 噻唑酸的保留时间约 3min,并发现青霉素 V 溶液放置过程中产生保留时间约为 4.3min 的未知降解物,其片剂中存在保留时间为 2.3 和 4.3min 的未知杂质,可见 HPLC 法可将青霉素 V 和其诸杂质完全分离。

1. HPLC 法和电位滴定法测定青霉素 V 原料含量的比较。六批青霉素 V 钾原料电位滴定法和 HPLC 法测定结果的比较结果见表 1.1。两种方法的最大测定误差为 1.12%,经 t 检验,两组结果在统计学上无显著性差异。提示两种方法的测定结果具有可比性。由表 1.1 还可见,电位滴定法的测定结果普遍略高于 HPLC 法结果。这可能是虽然电位滴定法可扣除青霉素 V 开环降解物类杂质,如青霉素 V 噻唑酸等对测定结果的影响,但其它具有 β -内酰胺环结构的杂质,如对羟基青霉素 V 等仍对含量测定结果有影响,使得测定结果偏高。由于该类杂质在成品原料中的含量较少,故使两种方法的测定结果较为接近,但仍表明 HPLC 法较电位滴定法的专属性更强。



a 时间(min)



b 时间(min)

图 1.2 青霉素 V 的 HPLC 色谱图
(a 青霉素 V 及其杂质混合物; b 青霉素 V 片剂)

表 1.1 HPLC 法和电位滴定法测定青霉素 V 钾原料含量的比较

样品	电位滴定结果 (%)	HPLC 结果 (%)	偏差 (%)
1	100.35	99.29	1.06
2	99.67	98.55	1.12
3	100.17	99.06	0.91
4	100.22	99.25	0.97
5	99.18	98.80	0.38
6	99.39	99.16	0.23

Ⅱ. HPLC 法和咪唑法测定青霉素 V 片剂含量的比较。五批青霉素 V 钾片的 HPLC 法和咪唑法测定结果的比较见表 1.2。经 t 检验,两组结果在统计学上未显示有显著性差异,提示两种方法的测定结果亦具有一定的可比性。但由表 1.2 可见,咪唑法的测定结果普遍较 HPLC 结果偏高,两种方法的最大测定误差为 2.5%。HPLC 分析发现,片剂中除含有青霉素 V 钾原料中的诸杂质外,还有其它未知杂质。和电位滴定法一样,具有 β -内酰胺环结构的杂质对咪唑法测定的干扰作用将导致测定结果偏高,且赋性剂及由其引入的杂质亦可能影响咪唑法的测定,这可能是咪唑法测定结果普遍偏高的原因。提示 HPLC 法测定青霉素 V 钾片较咪唑法更具有专属性。由于片剂中青霉素 V 诸杂质的含量及种类普遍多于原料,故易导致咪唑法和 HPLC 法对片剂测定结果的差异较电位滴定法和 HPLC 法对原料测定结果的差异大。

表 1.2 HPLC 法和咪唑法测定青霉素 V 钾片含量的比较

样品	咪唑法结果 (%)	HPLC 结果 (%)	偏差 (%)
1	103.46	102.74	0.72
2	104.18	103.76	0.42
3	104.18	102.79	1.39
4	103.99	101.45	2.54
5	104.76	103.80	0.96

1.1.3 抗生素质控分析的进展

(1)测定方法仪器化。随着制药工业的发展,客观、准确地评价产品质量,用仪器分析法替代传统的手工观测、测定,已成为当今抗生素质控分析的发展方向。具体表现为:①HPLC 法迅速普及,广泛用于鉴别、含量测定、相关物质检查和组分测定;②抗生素微生物检定法已广泛使用由计算机控制的、利用 CCD 数字化扫描技术的抑菌圈测量仪进行测定;③传统的手工滴定法逐渐由电位滴定法所替代;④色度仪、浊度仪等光电一体化仪器正逐步替代颜色、澄清度等常规的裸眼观测。

(2)测定项目多样化、控制指标具体化。为全面保证药品的产品质量,仅用酸碱度、水分、含量、装量差异等传统的检查项目已不能满足现代质量控制的需要,针对具体产品的特点,已发展出多种特定的检查项目,如组分分析、高聚物分析、残留溶剂分析、释放度检查、溶出度检查等,以便多方位的控制产品质量,表现出质控分析项目的多样化。

另一方面,新制定的检查项目又有其明确的检查对象。如高聚物分析,一般仅针对过敏反应较严重的 β -内酰胺抗生素;有机溶剂残留量分析,仅针对采用溶媒结晶工艺生产的药品;降压物质检查一般仅针对发酵产品。即对每一特定的品种,甚至特定的生产工艺,都有其特定的质控标准。

质量控制标准的具体化还表现为,对一些生产工艺稳定,经多年检验产品质量也稳定的品种,取消一些原有的检查项目。如异常毒性检查和降压物质检查,在青霉素的质控标准中已取消。取消检查项目是慎重的,当生产工艺改变时,应恢复对取消项目的检查,以确保产品质量。

(3)体外实验将逐步取代动物实验。为克服动物实验误差大、影响因素较多之缺点,传统的动物实验正逐渐由体外实验所取代。最突出的例子是细菌内毒素检查法的应用。目前,除少数对细菌内毒素测定有干扰作用的抗生素尚保留家兔热原实验外,几乎所有的抗生素品种均可用细菌内毒素检查法替代家兔热原实验,并具有快速、准确之特点。

1.2 生物体内抗生素样品的分析

1.2.1 生物体内抗生素分析的目的

抗生素的作用对象是病原微生物,但作用场所却是机体。抗生素只有在机体的感染部位达到足够的浓度,才具有生物活性。目前对体内抗生素进行分析的目的可概括为:

(1)研究药品在机体各组织器官中的分别情况,以确定药品的有效作用部位,进而确定新药的适应症及药品与不良反应的联系。

(2)研究药品在机体内的吸收、代谢、消除速率,以确定给药剂量和给药时间间隔。

(3)进行药物生物利用度和生物等效性评价,以确保新剂型和仿制药品的临床效果。

(4)对治疗浓度和毒性浓度较接近的药物,对患者的血药浓度进行监测,以确保临床的安全有效。

总之,体内药物分析和新药的开发、应用关系密切。

1.2.2 生物体内抗生素分析的特点

(1)样本差异大。体内抗生素分析的主要任务是测定抗生素在体液(血液、组织液和尿液)中的浓度。由于机体的个体差异,来自不同个体的样本间的差异可能很大。机体的个体差异除了与机体的内在因素(如年龄、体重、健康状态等)有关外,还易受外界因素,特别是饮食条件的影响。故为得到正确的实验结果,实验中应尽可能选择较均一的个体,并实行饮食控制。此外,还应通过合理的实验设计、合理的结果处理方法和正确的评价方法,使个体差异的影响降至最低。

(2)样品浓度低。体内测定,抗生素样品在体液中的浓度通常较低,且样本量通常也较少。因此,体液抗生素分析方法的灵敏度一般要求较高,有时样品还需经过适当的富集才能用于测定。

(3)干扰因素多。体液测定的最主要干扰来源于其中存在的大量蛋白质。为避免蛋白质对测定的干扰,样品需经适当的前处理去除蛋白质或采用适当的对照克服蛋白质的干扰作用。

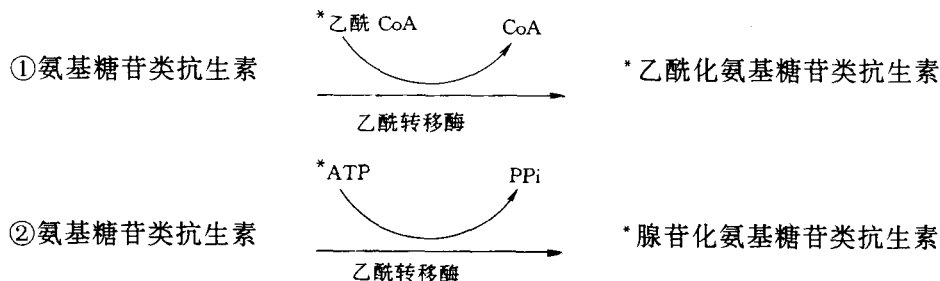
(4)实验周期长。体液样品通常不宜同时获得,有时一项实验需要数月才能完成。为保证不同时间采集、测定的样品具有可比性,测定方法应具有较高的重新性和再现性。

1.2.3 生物体内抗生素分析方法

(1)同位素示踪法。利用特制的带有某种放射性同位素标记的抗生素,可方便地研究药物在体内的吸收、分布和代谢情况。同位素示踪法的最大优点是灵敏度高,且测定方法相对较简单,缺点是特异性较差,有时无法区别原型药和代谢产物,且需要专门制备标记药物,并需要专门的检测设备及实验室。

(2)微生物测定法。利用体液中抗生素对微生物生长的抑制能力为指标,表征体液中抗生素的浓度。为提高方法的灵敏度及减少实验误差,实验中应选择敏感的指示菌,必要时可采用单层一薄层培养基,整个实验最好在大方盘中进行,其中设标准曲线。微生物测定法的优点是方法简单,对实验室的要求不高。但由于一些抗生素的代谢物也具有抗菌活性,故其方法的特异性不高。

(3)生化分析法。利用生物体内特异酶和抗生素的特异反应,测定抗生素浓度的方法。较成熟的方法有放射酶法(Redioenzymatic assay)。以氨基糖苷类抗生素血药浓度的测定方法为例,放射酶法的测定原理如下:



反应①和反应②分别利用由细菌中提取的乙酰转移酶和腺苷转移酶为特异酶,以 C^{14} 标记的乙酰辅酶 A 和 P^{32} 标记的 ATP 为底物,测定酶催化反应生成的放射性活性物质的量,并依据标准曲线计算抗生素的浓度。

放射酶法的优点在于不需要标记每一个特定的抗生素,一个特定的反应往往可适应一类抗生素的测定,且方法较简单、灵敏、准确。但由于实验中仍需要放射性标记物,故需要具备放射性活性测定的条件。

(4)免疫测定法。放射免疫法和酶免疫法均可用于生物体内抗生素的分析。此方法的关键是制备特异性抗体,如果抗体选择适当,方法的灵敏度和特异性均可优于其它分析方法,且适应于大批量样品的检测,故目前主要应用于临床样本的常规检验。

(5)化学分析法。虽然有些药品可利用荧光分析等方法直接测定血药浓度,但目前用于体液测定的主要方法是 HPLC 技术。除常规的紫外检测器外,荧光检测器、化学发光检测器及 HPLC 质谱联用技术也常用于对体内的药物分析,使得 HPLC 法具有较好的特异性和灵敏度。随着样品前处理方法的发展和自动进样技术的日趋普及,HPLC 方法已成为体内药物分析的常规方法。

1.3 抗生素工业生产过程中的样品分析

1.3.1 抗生素工业生产过程中样品分析的目的

传统的抗生素工业生产,通常包括生产(包括发酵和化学合成)和分离纯化两个主要部分。以链霉素生产为例,其主要生产工艺如图 1.3 所示,其中包括多极发酵和多层次的分离分化。

菌种→小罐发酵→中罐发酵→大罐发酵→发酵液处理→(除菌丝、蛋白等)

弱酸型离子→氨型树脂→脱色→精制浓缩→喷雾干燥→成品交换树脂

图 1.3 链霉素的主要工艺流程

在发酵过程中,为获得最大的产率,不仅要考虑单次发酵的发酵单位,还要考虑发酵周期及发酵过程中各种原材料的消耗情况等,希望以最小的消耗、最短的时间获得最大的经济效益。由于抗生素为微生物的次级代谢产物,微生物代谢的基本特征呈“反馈抑制”,即高浓度的产物抑制产物的进一步产生,故获得最大经济效益的最有效措施之一就是研究培养基—微生物代谢—产物抑制的关系,选择最佳培养基成分,并在发酵过程中对发酵液的抗生素浓度进行监测,使得发酵液中抗生素浓度达到抑制浓度时,及时转入下一级发酵(工艺)。

以经济效益为指标对生产过程进行控制是抗生素各个生产环节的普遍控制原则。获得最大的经济效益是抗生素生产过程中实行产物监测的根本目的所在。其次,通过对不同生产工艺或不同工序产物的比较分析,有助于帮助发现产品主要质量问题的原因,进而促进改进工艺,提高产品质量。如通过对不同结晶工艺青霉素的比较,发现青霉素中致敏性高分子杂质的含量和结晶工艺关系密切。此外,对纯化阶段的产物进行分析,可及时掌握产品质量信息,确保成品符合质量标准之规定。

1.3.2 生产过程中抗生素分析方法的特点

抗生素生产过程中进行含量测定的主要目的是为了对生产过程实行最优化控制。故以此为目的的抗生素分析方法应简便、快速,对方法的灵敏度、特异性等要求不高。如链霉素生产中效价的测定采用麦芽酚显色法,而不采用药典中收载的微生物检定法。

近年来为适应工业自动控制的需要,分析方法朝着自动分析的方向发展。如头孢菌素C发酵液的测定,采用烟酰胺法,其自动分析仪包括采样器、比例泵、反应器、检测器、控制器和记录仪等部件,可自动完成从取样到结果分析整个过程。

适用于工业化生产控制的理想分析方法是采用各种生物传感器进行分析。已报道的各类生物传感器及其应用情况见表1.3。抗生素发酵过程中,利用生物传感器不仅可方便的进行含量分析,还使得“在线”连续监测成为可能。

表 1.3 生物传感器及其在抗生素分析中的应用

传感器类型	名 称	测定范围	相应时间
酶电极	青霉素电极	$10^{-2} \sim 3\text{mmol/L}$	2~4min
微生物电极	头孢菌素电极	60~500mg/L	
	庆大霉素电极	$1 \sim 20\text{mg/L}$ $8 \sim 70\text{mmol/L}$	3~10min ~1min
	制霉菌素电极	$1 \sim 800\text{mg/L}$	60min
酶场效应晶体管(ENFET)	青霉素-FET	$0.2 \sim 2.5\text{mmol/L}$	~10s
酶热敏电阻	头孢菌素热敏电阻	$0.005 \sim 10\text{mmol/L}$	
	青霉素热敏电阻	$0.05 \sim 500\text{mmol/L}$	

参 考 文 献

[1]李焕姿等. 中国抗生素杂志,1993(18):85
 [2]李家泰等. 中国临床药理学杂志,198(62):158
 [3]陈丽娟等. 医药工业,1987(18):163
 [4]张治铤. 抗生素药品检验. 北京:人民卫生出版社,1987
 [5]许春向等编著. 生物传感器及其应用. 北京:科学出版社,1993

2 高效液相色谱仪及其进展

2.1 高效液相色谱法的发展史及其特点

现代自然科学可以细分为许许多多复杂的专门领域,各个领域都在从事如何更好地发挥本学科特点的研究工作,其数量之大,发展之快是过去所不能比拟的,所有涉及到处理化学物质的研究领域,不管其研究目的如何,都存在着一个共同的问题,这就是怎样在短时间内,从一个由多组分构成的混合样品中,将其组分或目的物逐一加以分离、分析,并回收到高纯物质。在这样一些分离、分析技术中,色谱法可以说是十分有效的。特别是近年来,由于高效液相色谱仪的迅速发展,使得其无论是在以分析为目的的,诸如混合物的分离、定性、定量等,还是在以提取为目的的分离、精制等各个领域的利用率都显著地增加。

本章通过对高效液相色谱仪及其发展的介绍,揭示高效液相色谱法之特点。

2.1.1 色谱法的发展史

可广泛用于对混合物进行分离的手段概括为溶剂萃取法、蒸馏法、透析法、电解法以及色谱法等,其可靠性以色谱分离法为最高。在上述的分离方法中,色谱法是一种较新的分离方法,最早出现于本世纪初:1906 年俄国植物学家 Tsweet 发明的利用吸附原理对叶绿素 a, b 的分离方法首次被命名为色谱法(Chromatography),这一词汇来源于希腊文 Chroma(色)和 graphos(记录),原因在于这种方法是将叶绿素这样一些有色物质,在柱中作为不同颜色的吸附带来加以分离的,因而这种方法具有记录颜色的意义。正因为如此,他才被推崇为今日色谱法的创始人。

然而与色谱法有关的一些现象,早在 19 世纪中叶就已经被人们所了解。其起源及发展可简单地概述如下:1845 年 Thompson 等就对离子交换现象进行过研究;1861 年 Schonbein 等报导了纸的毛细现象;1931 年 Kuhn 对 Tsweet 报道的分离叶绿素的方法加以改良,然后将其应用于对多种植物色素的分离;1938 年 Reichstein 报道了流动色谱法(Flowing chromatography),即借助于流动相(溶媒)的作用,使试样(溶质)从柱的下端流出。这种方法的特点是试样从柱中洗脱后,即可得到溶解状态的目的物,又能采用适当的方法,对溶液中的目的物进行定量。

直到 20 世纪 30 年代末期,利用色谱法对混合试样进行分离时,仍是根据吸附原理,采用填充了吸附剂的色谱柱来进行的。1941 年 Martin 等首次报道了分配色谱法,利用溶质在流动相和固定相中溶解度的差异进行分离,在该论文中,他首先提出了在分配理论方面著名的塔板理论;1952 年 Alm 又报导了可采用两种流动相进行的液相梯度洗脱法(Gradient elution),使得分配色谱法得以进一步完善。

1944 年 Martin 等报道了采用滤纸做固定相的纸色谱法;1958 年 Stall 报道了薄层层析色谱法。纸色谱法和薄层层析色谱法的设备和操作都比较简单,至今仍在化学领域中得到广泛地应用。