

盐酸多西环素主要有关物质体外抗菌活性及毒性的研究

缪文玲¹, 赵述强^{2,3}, 张锦琳², 张娅², 袁耀佐^{2*}, 张玫², 张靖溥⁴

(1. 江苏卫生健康职业学院, 南京 211800; 2. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210019;

3. 中国医药城, 泰州 225300; 4. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要 目的: 比较盐酸多西环素与其主要有关物质体外抗菌活性及毒性, 为制定该品种有关物质控制限度提供参考依据。**方法:** 采用纸片扩散法和常量肉汤二倍稀释法考察盐酸多西环素主要有关物质的抗菌活性; 采用中国仓鼠肺细胞 (CHL) 和斑马鱼动物模型评价其毒性。**结果:** 多西环素主要有关物质的抗菌活性由强至弱顺序为美他环素、4-表多西环素 (杂质 C)、 β -多西环素、2-乙酰-2-脱氧甲酰多西环素 (杂质 F); 细胞毒性由大至小的顺序为杂质 F、 β -多西环素、杂质 C、美他环素; 致斑马鱼胚胎死亡和发育畸形由强至弱的顺序为杂质 C、美他环素、杂质 F、 β -多西环素。**结论:** 盐酸多西环素中毒性较强且抗菌作用较弱的杂质 C 及杂质 F 应单独的控制。

关键词: 盐酸多西环素; 四环类抗生素; 杂质; β -多西环素; 美他环素; 表多西环素; 土霉素; 乙酰-脱氧甲酰多西环素; 体外抗菌活性; 斑马鱼动物模型

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 12-2202-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.12.13

Study on antibacterial activity and toxicity of main related substance in doxycycline hydrochloride

MIAO Wen-ling¹, ZHAO Shu-qiang^{2,3}, ZHANG Jin-lin², ZHANG Ya²,
YUAN Yao-zuo^{2*}, ZHANG Mei², ZHANG Jing-pu⁴

(1. Jiangsu Health Vocational College, Nanjing 211800, China; 2. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019, China;

3. China Medical City, Taizhou 225300, China; 4. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical

Science & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To compare the *in vitro* antibacterial activity and toxicity of doxycycline hydrochloride with that of its main related substance, and to provide the reference basis for developing the limit of related substance in doxycycline. **Methods:** The *in vitro* antibacterial activity was evaluated by the disc diffusion test and broth macro dilution antifungal susceptibility test. The toxicity of doxycycline's substances was evaluated by Chinese hamper lung cell and zebrafish embryo model. **Results:** The order of main substances' antibacterial activity from the strong to the weak was from metacycline, 4-epidoxycycline (impurity C), β -epidoxycycline, to acetyl-2-decarbamoxydoxycycline

* 通信作者 Tel: (025) 86251130; E-mail: yzyz7256@sina.cn

** 第一作者 缪文玲 Tel: (025) 68170956; E-mail: miaowenling@163.com

赵述强 Tel: (025) 86251257; E-mail: zhaoshuqiang1983@163.com

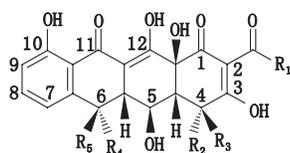
(impurity F). The related impurities' cytotoxicity was in the order of impurity F, β -epidoxycycline, impurity C, metacycline. The lethal and developmental toxicity order of main substances was from impurity C, metacycline, impurity F, β -epidoxycycline. **Conclusion:** The related impurities of impurity C and impurity F in doxycycline hydrochloride showed strong toxicity and weak antibacterial, so they should be individually controlled.

Keywords: doxycycline hydrochloride; tetracyclines; impurity; β -epidoxycycline; metacycline; epidoxycycline; oxytetracycline; acetyl-decarbamoyldoxycycline; *in vitro* antibacterial activity; zebrafish animal model

多西环素是以土霉素为原料研制成功的一种半合成广谱四环类抗生素^[1]。其临床应用于敏感的革兰氏阳性球菌和革兰氏阴性杆菌所致的上呼吸道感染、慢性前列腺炎、盆腔炎、痤疮、衣原体感染和立克次体感染等^[2-3]。其主要不良反应包括儿童牙齿变黄、胃肠道疾病、颅内压增高及过敏反应等^[4]。

随着人们对药物安全性认识和提高的要求,药物杂质对临床用药安全性、疗效及产品质量的影响备受关注,欧美等国家制订了相关的指导原则^[5],我国近年来对有关物质的研究工作也提到前所未有的高度。对于盐酸多西环素,尽管中国药典 2015 年版二部对其原料药和制剂中的单个杂质及各杂质总和有限度要求^[6],但对设定单独控制杂质及其限度的合理性仍缺乏依据,更多的是统计学的层面进行。按照“杂质谱控制(impurity profiles)”理念^[7],即“针对药品中的每一个杂质,依据其生理活性制定相应的质控限度”的要求,作者采用在线脱盐 LC-MS 技术对

代表性样品的杂质谱进行研究,发现制剂中既含有来源于原料的 β -多西环素、美他环素和 2-乙酰-2-脱氨甲酰多西环素(杂质 F),还含有降解 4-表多西环素(杂质 C),相关结构见图 1。为研究这些杂质的体外抗菌活性及对相关模型的活性,需要获得一定量杂质,其中杂质 β -多西环素和美他环素可以从中国食品药品检定研究院购得,而杂质 C 和杂质 F 目前无法从市场获得;为此,利用制备液相色谱,分别获得一定量的多西环素杂质 C、杂质 F 以供进行深入研究^[8-11]。本研究先采用纸片扩散法和常量肉汤二倍稀释法考察盐酸多西环素及主要有关物质的抗菌活性差异;采用中国仓鼠肺细胞(CHL)和斑马鱼动物胚胎模型评价盐酸多西环素与主要有关物质之间的相对毒性大小;依据上述结果,对现有质量标准中杂质控制的合理性进行评价,为制定最严谨的标准提供数据支撑。



化合物 (compound)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
多西环素 (doxycycline)	NH ₂	H	N(CH ₃) ₂	H	CH ₃
β -多西环素(杂质 A)[β -epidoxycycline(impurity A)]	NH ₂	H	N(CH ₃) ₂	CH ₃	H
美他环素(杂质 B)[metacycline(impurity B)]	NH ₂	H	N(CH ₃) ₂	R ₄ +R ₅ =CH ₂	
4-表多西环素(杂质 C)[4-epidoxycycline(impurity C)]	NH ₂	N(CH ₃) ₂	H	H	CH ₃
4-表-6-表-多西环素(杂质 D)[4-epi-6-epidoxycycline(impurity D)]	NH ₂	N(CH ₃) ₂	H	CH ₃	H
土霉素(杂质 E)[oxytetracycline(impurity E)]	NH ₂	H	N(CH ₃) ₂	OH	CH ₃
2-乙酰-2-脱氨甲酰多西环素(杂质 F)[acetyl-2-decarbamoyldoxycycline(impurity F)]	CH ₃	H	N(CH ₃) ₂	H	CH ₃

图 1 多西环素及各有关杂质的结构式^[9]

Fig. 1 Chemical structures of doxycycline and related substances in doxycycline

1 仪器与试剂

生物安全柜(苏净集团安泰公司);隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司);比浊仪(生物梅里埃中国有限公司);控温摇床(上海智诚有限公司);高压灭菌锅(SANYO公司);Millipore 纯化水仪(密理博公司);DP2-BSW 荧光显微镜(Olympus公司), ADMET Predictor 软件(上海凡默谷信息技术有限公司)。

盐酸多西环素原料药(批号 YD20140022CP), 江苏联环药业股份有限公司;对照品多西环素(批号 130485-201202)、美他环素(批号 130499-200802)、 β -多西环素(批号 130405-200907), 均购自中国食品药品检定研究院;盐酸多西环素原料药经 100 °C 加热破坏后利用制备型液相色谱纯化自制杂质 C(90.1%), 盐酸多西环素原料药经减压浓缩后利用制备型液相色谱纯化自制杂质 F(98.7%)。

中国仓鼠肺细胞, 中国食品药品检定研究院;斑马鱼野生型 AB 和 TU 品系, 中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所;水解酪蛋白琼脂培养基(MHA)(批号 20140819), 青岛海博生物技术有限公司;水解酪蛋白培养基(MHB)(批号 20140814), 青岛海博生物技术有限公司;大肠杆菌(ATCC25922, 批号 20111201), 广东环凯微生物科技有限公司;金黄色葡萄球菌(ATCC29213, 批号 A0246B), 广东环凯微生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 盐酸多西环素及其主要有关物质的体外抗菌活性考察

2.1.1 纸片扩散法 参考美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐的药敏试验方法^[12]及 Jennifer^[13]等报道的方法, 用 MHB 培养基分别配制质量浓度为 1 024 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的美他环素、多西环素、土霉素、 β -多西环素、杂质 C 及杂质 F 的溶液, 精取上述供试品溶液 20 μL 分别浸润药敏纸片并晾干, 将晾干后的各药敏纸片放于含有敏感细菌的固体培养基表面, 37 °C 恒温培养箱培养 18 h(如图 2), 测定抑菌圈直径大小。除杂质 F 外, 多西环素及其主要杂质“美他环素、土霉素、 β -多西环素、杂质 C”对大肠杆菌(ATCC25922)和金黄色葡萄球菌(ATCC29213)均有不同程度的抗菌活性, 在所选浓度下各物质的体外抗菌活性由强至弱顺序为美他环素、多西环素、土霉素、杂质 C。

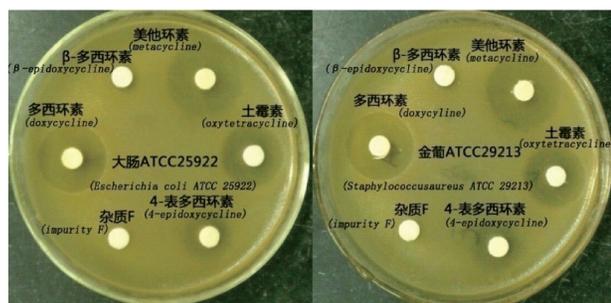


图 2 多西环素各有关物质的 K-B 纸片扩散法结果

Fig. 2 The kirby-bauer disk diffusion results of related substances in doxycycline

2.1.2 常量肉汤二倍稀释法^[14] 参照 CLSI 标准, 将“2.1.1”项中各供试品溶液按二倍稀释法制备样品梯度组后分别加入敏感菌株, 同时设立阳性对照(培养基+菌液)和阴性对照(仅培养基), 所有试管于 37 °C 恒温培养 18 h。当阳性对照和阴性对照管均符合规定时, 肉眼观察各供试品溶液及其稀释液试管的澄清情况, 无细菌生长管对应的最低药物浓度即为最低抑菌浓度(MIC), 主要有关物质的抗菌性能如表 1 所示。进一步证实多西环素及主要有关物质的抗菌活性由强至弱依次为美他环素、多西环素、土霉素、杂质 C、 β -多西环素、杂质 F。

2.2 中国仓鼠肺细胞(CHL)细胞毒性和遗传毒性考察

参照国家食品药品监督管理局“药物遗传毒性研究技术指导原则”^[15]的相关要求试验。分别精密称取多西环素、美他环素、土霉素、 β -多西环素、杂质 C 及杂质 F, 分别用适宜溶剂溶解(其中美他环素、土霉素、 β -多西环素为二甲亚砜溶解, 其余均为氯化钠注射液溶解), 制备梯度浓度(0、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的溶液, 以梯度浓度的多西环素及主要有关物质染毒 CHL 细胞, 设立代谢活化组[加 S_9 mix(代谢活化剂混合物), 细胞与药物接触 4 h]和非活化组[不加 S_9 mix, 细胞与药物接触 24 h], 观察细胞形态变化, 根据活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓖并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能的特性, 测定 540 nm 时的吸收度, 一定细胞数范围内, MTT 结晶形成的量与细胞数成正比, 计算 IC_{50} 以评估多西环素及主要有关物质的细胞毒性大小, 试验结果见表 2。

表 1 主要有关物质的抗菌性能

Tab. 1 Antibacterial properties of main related substance

菌株 (strains)	稀释倍数 (dilution)	多西环素 (doxycycline)	美他环素 (metacycline)	土霉素 (oxytetracycline)	β 多西环素 (β-epidoxycycline)	杂质 C (impurity C)	杂质 F (impurity F)
大肠杆菌 ATCC25922 (<i>Escherichia coli</i> ATCC25922)	1:4	-	-	-	-	-	-
	1:8	-	-	-	-	-	-
	1:16	-	-	-	-	-	+
	1:32	-	-	-	-	-	+
	1:64	-	-	-	+	-	+
	1:128	-	-	-	+	+	+
	1:256	-	-	+	+	+	+
	1:512	+	-	+	+	+	+
	1:1024	+	+	+	+	+	+
	1:2048	+	+	+	+	+	+
金黄色葡萄球菌 ATCC29213 (<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213)	1:4	-	-	-	-	-	-
	1:8	-	-	-	-	-	-
	1:16	-	-	-	-	-	+
	1:32	-	-	-	-	-	+
	1:64	-	-	-	+	-	+
	1:128	-	-	+	+	+	+
	1:256	-	-	+	+	+	+
	1:512	+	-	+	+	+	+
	1:1024	+	+	+	+	+	+
	1:2048	+	+	+	+	+	+
1:4096	+	+	+	+	+	+	
1:8192	+	+	+	+	+	+	

注 (note): + 有菌生长 (bacterial growth); - 无菌生长 (no bacterial growth)

表 2 多西环素及主要有关物质对 CHL 的细胞毒性和遗传毒性结果

Tab. 2 The Cytotoxicity and genotoxicity of doxycycline and main related substance to Chinese hamster lung cells

分析物 (analyte)	IC ₅₀ / (μg · mL ⁻¹)	
	+S ₉ mix 试验 (+S ₉ mix experiment)	-S ₉ mix 试验 (-S ₉ mix experiment)
多西环素 (doxycycline)	41.2	15.2
美他环素 (metacycline)	144.6	70.0
土霉素 (oxytetracycline)	94.6	57.7
杂质 C (impurity C)	133.6	57.8
杂质 F (impurity F)	72.9	29.2
β-多西环素 (β-epidoxycycline)	96.3	69.0

从表 2 结果可以看出,根据 IC₅₀ 值,其毒性由大至小依次为多西环素、杂质 F、土霉素、杂质 C、β-多西环素、美他环素。

在上述试验结果的基础上,再选取多西环素及其 5 种杂质近 IC₅₀ 值作为受试浓度,在加与不加 S₉mix 条件下分别染毒 CHL 细胞 4 h 和 24 h,观察这些药

物对染色体结构损伤的效应,结果显示:多西环素及主要有关物质对 CHL 细胞均有一定的细胞毒性,畸变率均小于 5%,未见明显遗传毒性。

2.3 斑马鱼胚胎发育毒性比较

斑马鱼动物模型对于药物毒性评价具有独特的优势,在对药物微量杂质的毒性评价方面,国内利用

模式生物斑马鱼已经建立了多种毒性评价模型,通过评价杂质与药物活性成分(API)的相对毒性,评估药物杂质的危害性^[16]。本研究利用药物胚胎毒性评价模型,评估多西环素及主要杂质之间的相对毒性。通过饲养液添加药物的给药途径,在标准环境下孵育,持续5 d,逐天观察受试动物胚胎发育情况,统计发育第3 d的畸形和死亡数/存活胚数。

如图3-A所示,斑马鱼胚胎经质量浓度为300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的多西环素作用72 h全部死亡;质量浓度为500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,胚胎在发育到48 h已全部死亡,所检测浓度范围内的毒性以致死为主。

如图3-B所示,斑马鱼胚胎经质量浓度为300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 β -多西环素作用120 h未见明显畸形,只是表现为发育略滞后;质量浓度为500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,胚胎至72 h几乎全部死亡,毒性以致死为主。

如图3-C所示,斑马鱼胚胎经质量浓度为500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的土霉素作用72 h后畸形率和死亡率均显著增加,至120 h几乎全部死亡。

如图3-D所示,斑马鱼胚胎经质量浓度为100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的美他环素作用后胚胎畸形率近40%,质量浓度为300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时畸形率近90%;质量浓度为500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,胚胎72 h的死亡率近100%。

如图3-E所示,斑马鱼胚胎经质量浓度为59 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的杂质C作用后即出现一定程度的畸形和死亡现象,畸形率与浓度正相关,质量浓度为300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,胚胎在72 h的死亡率达到100%。

如图3-F所示,斑马鱼胚胎经质量浓度为100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的杂质F作用后略有畸形,质量浓度为500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和700 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时的畸形率和致死率相当,表明其致畸范围较宽,两浓度持续作用120 h后均全部死亡。

综合图3知,多西环素和 β -多西环素未见明显致畸作用,杂质C致畸作用最强,美他环素次之,杂质F与土霉素的致畸作用相当且弱于美他环素;杂质C致死作用较强,其致死作用大于等于多西环素, β -多西环素与美他环素致死作用相当且弱于多西环素,土霉素的致死作用大于等于杂质F且弱于美他环素。

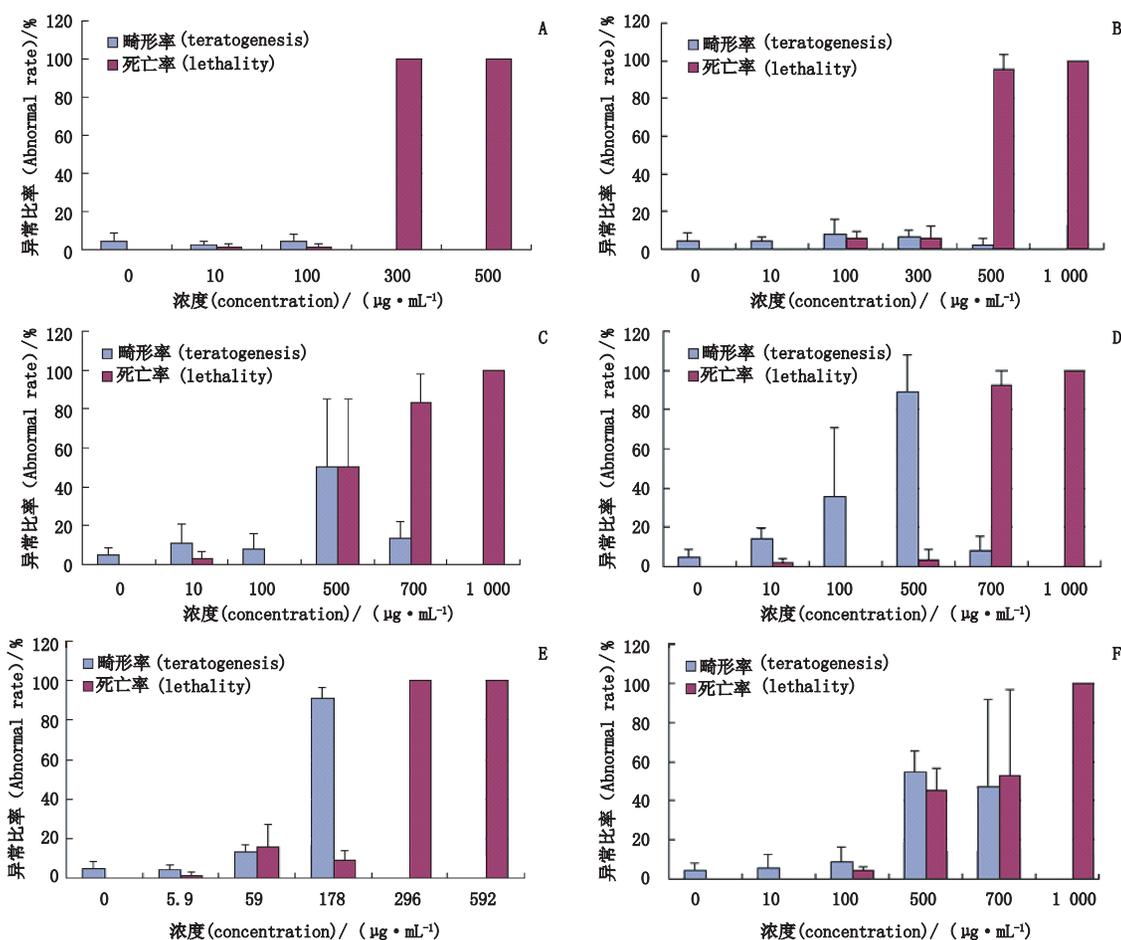
各有关物质致胚胎畸形的表型相似,只是严重程度略有差异,提示其毒性作用机理可能相似。致畸表型包括身体变短和弯曲、体表颜色浅,头和眼小、腹部大而圆、卵黄囊及其延伸结构变形、心脏缺陷及无正常胚动等(如图4)。

3 讨论

细菌对抗生素敏感性试验在控制细菌耐药性及合理使用抗生素等方面发挥着重要作用。根据药敏结果既可对抑菌效果进行定性,又可预测其临床效果,进而实现个体化治疗等^[17]。常量肉汤稀释结果显示多西环素各有关物质对大肠杆菌(ATCC25922)和金黄色葡萄球菌(ATCC29213)均有不同程度的抗菌作用,纸片扩散法结果进一步证实各有关物质间的抗菌活性差异,杂质C(热降解杂质)、杂质F及 β -多西环素的抗菌活性均明显低于主成分多西环素。分析多西环素及有关物质结构,均具有相同的十二氢化并四苯基本骨架结构,杂质C是多西环素的4位差向异构体, β -多西环素是多西环素的6位差向异构体,杂质F是多西环素2位碳脱酰胺产物。杂质C活性降低是由于4位碳上的二甲胺基形成空间位阻^[18-19],杂质F活性降低是由于缺失与细菌核糖体蛋白30S亚基结合所必需的酰胺基^[20],根据结构特点推测 β -多西环素活性降低亦有可能是空间位阻变化的原因。

斑马鱼是生命科学领域常用3种模式动物之一,因具有饲养成本低,实验周期短,与哺乳动物相似的生物结构及生理功能等优点而用于毒理学研究^[21-22]。国内已有专业机构利用斑马鱼胚胎毒性评价了多种药物杂质^[23]。在本研究中各有关物质的致畸性依次为杂质C、美他环素、杂质F/土霉素;致死作用依次为杂质C、 β -多西环素/美他环素、杂质F,该结果与四环素差向异构体具有较强毒性的报道相呼应^[24]。目前对四环类差向异构体的毒性机制研究甚少,Mcfarland^[25]报道认为化合物毒性的差异在于其LogP、偶极性-极化性和给出质子能力的差异,遗憾的是笔者采用ADMET预测软件未发现各有关物质结构与毒性差异的规律,仍有待后续深入研究。

参考国内外现行药典对盐酸多西环素片有关物质的规定(美他环素和 β -多西环素均不得过2.0%,其他单杂不得过1.0%,各杂质总和不得过5.0%),结合2014年度国家评价性抽验的153批次国产盐酸多西环素片有关物质统计数据[美他环素(0.06%~0.76%)、 β -多西环素(0.45%~1.74%)、杂质F(0.30%~0.98%)及杂质C(0.09%~0.96%),各杂质总和1.43%~3.43%],根据斑马鱼毒性实验与定量结构性理论^[26]以及本研究的抗菌活性和毒性结果,建议在制定盐酸多西环素片质量标准时,美他环素限度不得过1.0%, β -多西环素不得过2.0%,杂



A. 多西环素 (doxycycline) B. β -多西环素 (β -epidoxycycline) C. 土霉素 (oxytetracycline) D. 美他环素 (metacycline) E. 杂质 C (impurity C) F. 杂质 F (impurity F)

图 3 多西环素及主要有关物质致畸及致死结果

Fig. 3 The teratogenesis and lethality results of main related substances and doxycycline



A. 正常表型 (normal phenotype) B-H. 致畸表型 (teratogenesis phenotype)

图 4 各主要有关物质致畸表型

Fig. 4 The teratogenesis phenotype of main related substances of doxycycline

质 C 不得过 1.0%，杂质 F 不得过 0.5%，总杂不得过 4.0%。鉴于杂质 C 和杂质 F 对照品获得比较困难，研究过程中，分别测定了相关杂质与主成分多西环素之间的相对校正因子，结果多西环素、 β -多西环素、

杂质 F、美他环素、杂质 C 相对校正因子 ($n=3$) 分别为 1.00、1.17、1.05、0.78、0.98，均在 0.8~1.2 之间，因此均可采用不加校正因子主成分自身对照法，对于降解杂质 C 采用溶液加热破坏的方式获得杂质进行定位^[10]，杂质 F 则可以根据相对保留时间^[11]，其余几个杂质则可以借助杂质对照品进行定位，一方面最大程度地节约购买杂质对照品所需昂贵费用，另一方面可避免因购买国外杂质对照品所需周期长乃至无相对应照品提供而影响产品质量研究的尴尬局面。

致谢：江苏省食品药品监督检验研究院药理室在细胞毒性实验过程中给予的帮助。

参考文献

[1] 张红东. 盐酸多西环素的合成工艺研究[J]. 中国医药指南, 2010, 8(29): 43

ZHANG HD. Synthesis process research of doxycycline hydrochloride

- [J]. *Guide China Med*, 2010, 8(29): 43
- [2] MÄÄTTÄ M, KARI O, TERVAHARTIALA T, *et al.* Tear fluid levels of MMP-8 are elevated in ocular rosacea—treatment effect of oral doxycycline [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2006, 244(8): 957
- [3] WALKER DH, PADDOCK CD, DUMLER JS. Emerging and re-emerging tick-transmitted rickettsial and ehrlichial infections [J]. *Med Clin North Am*, 2008, 92(6): 1345
- [4] KIRCIK LH. Doxycycline and minocycline for the management of acne: a review of efficacy and safety with emphasis on clinical implications [J]. *J Drugs Dermatol*, 2010, 9(11): 1407
- [5] SNODIN DJ, MCCROSSEN SD. Guidelines and pharmacopoeial standards for pharmaceutical impurities: overview and critical assessment [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2012, 63(2): 298
- [6] 中国药典 2015 年版. 二部 [S]. 2015: 951
ChP 2015. Vol II [S]. 2015: 951
- [7] 胡昌勤. 化学药品杂质控制的现状与展望 [J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(15): 1727
HU CQ. Current situation and trend in impurity control of chemical drugs [J]. *Chin J New Drugs*, 2015, 24(15): 1727
- [8] 袁耀佐, 张玫, 钱文, 等. 国产盐酸多西环素原料中有关物质的结构鉴定及杂质谱考察 [J]. *中国药品标准*, 2011, 12(2): 106
YUAN YZ, ZHANG M, QIAN W, *et al.* Characterization of related substances and study of impurity profile in domestic doxycycline hydrochloride [J]. *China Stand Drug*, 2011, 12(2): 106
- [9] 张锦琳, 张娅, 赵述强, 等. 在线脱盐—高效液相色谱—离子阱—飞行时间质谱法鉴定盐酸多西环素有关物质结构 [J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(23): 2073
ZHANG JL, ZHANG Y, ZHAO SQ, *et al.* Structure identification of related substances in doxycycline hydrochloride by 2D-LC-IT-TOF/MS [J]. *Chin Pharm J*, 2015, 50(23): 2073
- [10] 张娅, 张锦琳, 赵述强, 等. 盐酸多西环素杂质 C 的制备及体外抗菌活性与毒性研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2016, 47(4): 463
ZHANG Y, ZHANG JL, ZHAO SQ, *et al.* Preparation of impurity C of doxycycline hydrochloride and its evaluation of *in vitro* antimicrobial activity and toxicity [J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(4): 463
- [11] 杨帆, 张娅, 张锦琳, 等. 盐酸多西环素 ChP 2015 标准检测的紧邻主成分后杂质的制备及鉴定 [J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(4): 695
YANG F, ZHANG Y, ZHANG JL, *et al.* Preparation and identification of the doxycycline hydrochloride impurity eluted right after the main component described in ChP 2015 [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(4): 695
- [12] COCKERILL F, COCKERILL FR, ADLER J, *et al.* Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement [M/OL]. (2011-01) [2017-06-20]. <http://www.yeec.com/uploadimages1/forum/2011-10/20111025257029027.pdf>
- [13] ANDREWS JM. Determination of minimum inhibitory concentrations [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48(Suppl 1): 5
- [14] WU G, YANG Q, LONG M, *et al.* Evaluation of agar dilution and broth microdilution methods to determine the disinfectant susceptibility [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2015, 68(11): 661
- [15] 国家食品药品监督管理局. 药物遗传毒性研究技术指导原则. 2007: [ZH]GPT2-1 [EB/OL]. (2007-10-23) [2017-06-20]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1616/90936.html>
CFDA. Guidelines for the Study of the Genetic Toxicity of Drugs. 2007: [ZH]GPT2-1 [EB/OL]. (2007-10-23) [2017-06-20]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1616/90936.html>
- [16] 孙雪奇, 张姐婕, 袁军, 等. 头孢他啶杂质 H 研究 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(9): 1605
SUN XQ, ZHANG HJ, YUAN J, *et al.* Study on ceftazidime impurity H [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(9): 1605
- [17] 华冬梅. 抗菌药物管理与抗菌药物合理应用的影响分析 [J]. *中国卫生产业*, 2016, 13(8): 155
HUA DM. Analysis of the impact of antimicrobial management and rational use of antibiotics [J]. *China Health Ind*, 2016, 13(8): 155
- [18] 张劲强, 梁岩, 董元华, 等. 差向异构对四环素类药物的发光菌毒性研究 [J]. *毒理学杂志*, 2006, 20(5): 279
ZHANG JQ, LIANG Y, DONG YH, *et al.* Toxicity of tetracyclines and their epimer-isomers on the luminescent bacterium [J]. *J Toxicol*, 2006, 20(5): 279
- [19] 孙广龙, 胡立宏. 四环素类抗生药的研究进展 [J]. *药学研究*, 2017, 36(1): 1
SUN GL, HU LH. Advances in the research of tetracyclines antibiotics [J]. *J Pharm Res*, 2017, 36(1): 1
- [20] 雷小平, 仇文升, 李安良. 药物化学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 571
LEI XP, ZHANG WS, LI AL. *Medicinal Chemistry* [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999: 571
- [21] TSANG M. Zebrafish: atool for chemical screens [J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2010, 90(3): 185
- [22] KLEE EW, SCHNEIDER H, CLARK KJ, *et al.* Zebrafish: a model for the study of addiction genetics [J]. *Hum Genet*, 2012, 131(6): 977
- [23] 胡昌勤. 对抗生素药品评价性抽验基本思路与方法的思考 [J]. *中国抗生素杂志*, 2013, 38(1): 1
HU CQ. Strategy on quality evaluation of post-marketing antibiotics in China [J]. *Chin J Antibiot*, 2013, 38(1): 1
- [24] 孔令如, 孙学兰. 四环素叉向异构体及其脱水物的毒性探讨 [J]. *药学报*, 1966, 13(4): 244
KONG LR, SUN XL. A study of the toxicity of the epimeric pairs of tetracycline [J]. *Acta Pharm Sin*, 1966, 13(4): 244
- [25] MCFARLAND JW. On the parabolic relationship between drug potency and hydrophobicity [J]. *J Med Chem*, 1970, 13(6): 1192
- [26] 沈甸甸, 施亚琴, 胡昌勤. 应用定量构效关系预测技术控制药物毒性杂质的探讨与展望 [J]. *中国药事*, 2011, 25(7): 710
SHEN DD, SHI YQ, HU CQ. Update on drug impurity control: (Q) SAR prediction for toxicity [J]. *Chin Pharm Aff*, 2011, 25(7): 710

(本文于 2017 年 10 月 25 日修改回)