

抗生素生产工艺中高效液相色谱法的运用与市场前景

韩志伟 (华北制药华胜有限公司, 河北 石家庄 050000)

摘要: 抗生素是指以青霉素、四环素等为代表的一类结构新颖、活性显著的微生物次生代谢物。高效液相色谱技术凭借自身在色谱峰容量以及灵敏度方面的显著优势,极大地改变了检验、检测水平,被广泛应用于抗生素生产中。借助高效液相色谱技术进行检测,可确保检测数据准确,检验结果可信。本文就高效液相色谱法的原理、特点及在抗生素成分识别、质量检测等方面进行分析,为抗生素生产的质量安全检测提供依据。

关键词: 抗生素; 青霉素; 高效液相色谱 (HPLC); 市场前景

0 引言

HPLC 法是目前用于药物质量检验的一种有效方法。因此, HPLC 技术在制药过程监控方面的应用日益广泛。高效广谱抗生素青霉素能够通过阻断四肽侧链到五肽连桥,从而阻止细胞壁多肽的生成,达到抑制细菌增殖的目的。青霉素是一种具有广泛用途的抗菌药物,在医药中的地位是无可替代的^[1]。

由于酶抑制剂的广泛使用,青霉素的抗菌范围不断扩大,国内、外市场的需求越来越大,对其品质的要求也在不断提高。发酵液中残留的 PAA、PCG 等残留物质能否被及时获得,是青霉素生产过程控制的关键^[2]。残留苯乙酸是青霉素生物合成的关键前体物,但高浓度残留的苯乙酸会阻碍其正常生长与代谢。近年来,随着计算机控制技术在青霉素生产中的广泛应用,人们已经可以利用计算机对青霉素生产过程中的 pH 等参数进行控制^[3],不需要耗费大量的人力进行控制,但如何保证控制的准确性,并对青霉素生产中残留的 PAA 和 PCG 进行实时检测,仍需要进一步研究。本文探讨采用 HPLC 技术对青霉素的制备过程进行优化,从而为青霉素的生产过程提供可靠的理论基础,以提高产品质量。

1 相关概念

1.1 高效液相色谱法

HPLC 法是一种利用高压液体作为流动相进行色谱分析的方法。HPLC 技术已在化工、生物、食品安全、医药、医疗、环境监测等方面得到了广泛的应用。

1.1.1 分类

①固-液吸附层析: 根据组分与流动相之间竞争吸附位点的差异,将固定相作为固态吸附剂,实现对吸附剂的有效分离;

②液-液分布色谱法: 将固定相涂布或结合于惰性载体上,依据待分离组分的溶解度差异,实现对固

定相与流动相的有效分离^[4];

③成键色谱法: 正成键色谱法利用极性和不动键,主要依靠范德华力的定向力、诱导力或氢键力;反键式色谱法采用弱键固相色谱法,其分离机制可以用疏溶剂作用原理进行解释;

④凝胶层析: 凝胶层析也叫分子排斥层析,是一种以分子大小为序进行层析的层析方法。

1.1.2 仪表的构成和工作原理

HPLC 通常包括: 高压输液, 进样, 分离, 记录, 数据处理等。高效液相色谱技术,其基本原理是利用液体作为流动相,通过高压输注体系,将样品溶液通过进样装置进入流动相,再通过流动相加载到固定相,利用两相体系中各成分在两相中的分配系数不同,在两相之间进行多次的吸附-解吸,使各成分的运动速率发生显著差异,并将其分离为单个组分,依次排出色谱柱,通过检测器进行检测。

1.2 抗生素

抗生素是由微生物发酵后产生的部分产品,以及用“半合成”法制备的、在较低浓度下对特定微生物有一定的抑制或杀灭作用的物质。自从英国的微生物学家亚历山大·弗莱明在 1928 年发现了青霉素之后,抗生素就被广泛地用于人体的医学、畜牧业等工业^[5]。

四环素是链霉菌合成的一种广谱抗生素,其结构为多环并四苯胺基恶胺的母体,能与核蛋白 30S 亚单元结合,抑制其与核蛋白的结合,发挥杀菌和抗菌作用。四环素类抗生素以四环素、止霉素和金霉素为主,具有广谱的抗菌谱,对多种革兰氏阳性菌,革兰氏阴性菌,支原体,立克次氏体,衣原体等均表现出较强的抑制作用^[6]。甲妇王霉素、多西环素、二甲胺基四环素等是目前已知的一种半合成药物。金霉素、王霉素因其具有广谱的抗菌性能,价格低廉,在医药、畜牧业等领域有着广泛的用途^[7]。该类化合物是一类能

与酸碱作用形成盐类的两性材料,在酸性水溶液中相对稳定,而在中性或碱性水中容易降解,所以在临床上多以其盐酸盐的形态存在。

青霉素是一种广谱抗生素,对细菌感染具有很强的疗效。青霉素可以通过抑制细菌细胞壁的合成来发挥抗菌作用。在细菌细胞壁的合成过程中,青霉素能够和细菌细胞壁的合成酶结合,从而抑制细菌细胞壁的形成。细菌细胞壁对于细菌的生存至关重要,如果细菌细胞壁不能够形成,细菌就会失去保护,最终导致细菌的死亡。青霉素对许多常见的细菌感染都具有很好的疗效,尤其对革兰氏阳性菌(如链球菌和葡萄球菌等)的感染具有很强的抑制和杀菌作用。青霉素还可以用于治疗梅毒、炭疽病等疾病。大部分青霉素是通过注射或静脉给药的方式使用,以确保药物能够快速进入血液循环。

2 高效液相色谱法的技术发展特点

高效液相色谱法以液体为流动相,而在色谱中最关键的一个部分就是高压输液系统。这一方法借助高压输液泵,将比例或是极性不同的溶剂充分混合,向固定相的实验色谱柱中泵入制成的流动相,再借助进样阀向其中注入检测样品,以流动相和柱内相通,之后再完全分离柱内液体,将其慢慢渗入到检测器内并进行监测,从而完成试样化学分析。高效液相色谱法的应用主要借助三部分内容,分别是高效微粒固定相、新型高压输液泵以及高灵敏度检测器,三者合用将经典液相色谱法优势充分发挥了出来。

色谱柱方面,用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱,一般 10 ~ 30 cm 的柱长就能满足复杂混合物分析的需要。根据被分离物质的性质来选择合适的色谱柱,新购买色谱柱需经过充分活化测试符合性能要求后使用;色谱柱温度会影响分离效果,品种项下内容未指明色谱柱温度时系指室温。为改善分离效果可适当提高色谱柱的温度,设置高于室温 5℃,30 ~ 35℃ 属最佳实验柱温,柱温一般不宜超过 40℃。检测器方面可分为紫外—可见分光检测器、荧光检测器为选择性检测器,其响应值不仅与被测物质的量有关,还与其结构有关;其响应值与被测物质的量在一定范围内呈线性关系;不同的检测器,对流动相的要求不同。采用紫外—可见分光检测器所用流动相应符合相应标准对溶剂的要求;采用低波长检测时,还应考虑有机溶剂的截止使用波长。高效液相色谱仪的检测器要求灵敏度高、噪音低、线性范围宽、重复性好、适用范围

广等特点。目前,高效液相色谱法在具体应用时采用了高效色谱填料、小口径柱,借助高压输液泵使溶剂能够更快的流通,尽快通过色谱柱。由于高效液相色谱法所采用的高压输液泵工作效率非常高,因此在对药物成分进行检测时花费的时间较短,同时借助色谱柱进行分离,极大的提高了分离效果与检测速度。与经典柱色谱法相比,其能够更快的完成分离,部分甚至超过 1000 倍以上。因此,高灵敏、高压、高效和高速是高效液相色谱法主要特点,因此高效液相色谱法在临床上具有越来越广的应用范围。

现阶段,正处于发展中的高效液相色谱新技术主要有 3 种,分别是高效液相色谱法—蒸发光散射检测技术(HPLC-ELSD)、高效液相色谱—质谱联用技术(HPLC-MS)和快速高效液相色谱技术。HPLC-ELSD 技术通过结合蒸发光检测技术和高效液相色谱技术,让过去被含发色团的化合物检测范围所限制的问题得到了有效解决,进而使高效液相色谱技术被应用于更大的范围内。HPLC-MS 技术是在液相色谱技术上运用质谱仪把复杂的有机混合物给有效分离,该技术主要就是对质谱仪强大的组分鉴定能力予以了运用。快速高效液相色谱技术是基于高效液相色谱技术进一步优化了色谱参数,同时升级、改造了柱子,让柱子面对高压也能够较好的承受,使柱效增加,进而提高高效液相色谱技术的速度、效率,使检测可以在更短的时间内完成。

3 高效液相色谱法在青霉素生产工艺中的应用

在青霉素的生产过程中,磷酸盐 pH 值调节为 5.8,此时 HPLC 分析结果最佳。鉴于青霉素的生产与制备是一个连续的流程,为实现青霉素的实时检测,为青霉素的生产过程提供准确的数据支撑,可采用两台泵交替进行,保证 HPLC 的稳定可靠运行。在对青霉素进行检测时,可以适当地关掉探测器的数据处理器,从而达到延长仪器寿命的目的。

青霉素在生产、发酵期间,会产生大量的菌丝,同时也会进行重复的代谢,使得其在培养基中的特性和含量持续改变。在青霉素发酵过程中,适宜的发酵条件能够适当地延长产青霉素的分泌时间,能有效地延缓产青霉素菌丝的自溶时间,使其效价一直保持在高水平上^[8]。就产率而言,采用 HPLC 方法,不仅能提高青霉素的产率,还能提高其发酵效价。

在实际的青霉素生产过程中,若残留的苯乙酸含量过高,则会使青霉素效价上升的势头减缓,严重者

甚至会停滞生长,产生菌丝畸形,使发酵液粘度下降,糖分消耗减少。为此,应严格控制添加浓度和添加时间,并采取连续滴加的方法,以防止一次加入过量的苯乙酸,增加了苯乙酸的毒性,使其利用率降低。

HPLC法与碘量法相比,在青霉素发酵初期,两种方法测得的青霉素效价相差不大,但在中、后期,由于青霉菌在发酵过程中,会持续生成降解产物,而碘法不能区分青霉素与降解产物。

4 市场前景分析

抗生素是治疗感染疾病的关键药物之一,而高效液相色谱法在抗生素生产工艺中扮演着重要的角色。高效液相色谱法作为一种精密、高效、可靠的分析技术,被广泛应用于抗生素生产工艺中,用于监测和控制抗生素生产过程中的各种参数,确保产品质量符合标准。在当前全球范围内抗生素需求不断增长的背景下,高效液相色谱法在抗生素生产工艺中的市场前景可谓广阔。

首先,随着全球医疗卫生水平的提高,人们对抗生素的需求不断增加。包括世界卫生组织在内的各大机构不断呼吁对抗生素的生产与使用管理,这进一步推动了抗生素生产企业对产品质量的严格要求。高效液相色谱法作为一种高效的质量控制手段,能够帮助企业确保产品的纯度、稳定性等关键指标符合规定,因此在抗生素生产领域具有不可替代的重要性。

其次,随着生物技术和制药技术的不断发展,抗生素的生产工艺也在不断优化和提升。高效液相色谱法作为一种高效的分析技术,能够为抗生素生产企业提供快速、准确的分析结果,帮助他们更好地掌握生产过程中的关键参数,及时调整生产工艺,提高生产效率和产品质量。这种技术的应用不仅可以降低生产成本,还可以加速新产品的研发和上市,从而在市场竞争中占据优势地位。

此外,随着全球抗生素市场的竞争日益激烈,抗生素生产企业对产品质量和生产效率的要求越来越高。高效液相色谱法作为一种高度可靠的分析技术,能够为企业的稳定、精准的分析结果,有助于他们在市场竞争中脱颖而出,赢得更多客户信任。因此,抗生素生产工艺中高效液相色谱法技术的应用前景十分广阔。

综上所述,随着抗生素需求的增加和抗生素市场竞争的加剧,高效液相色谱法在抗生素生产工艺中的市场前景十分乐观。作为一种高效、可靠的分析技术,

高效液相色谱法不仅可以帮助企业确保产品质量,提高生产效率,还可以帮助他们在市场竞争中占据优势地位。因此,投资于抗生素生产工艺中的高效液相色谱法技术无疑是一个具有广阔发展前景的选择。

5 结语

作为一种高效广谱抗生素,青霉素的抗菌范围不断扩大,国内、外市场的需求越来越大,对其品质的要求也在不断提高,而高效液相色谱法广泛应用于抗生素生产检验中。高效液相色谱法以液体为流动相,主要借助高效微粒固定相、新型高压输液泵以及高灵敏度检测器,将经典液相色谱法优势充分发挥了出来。HPLC法与碘量法相比,在青霉素发酵中、后期,由于青霉菌在发酵过程中,会持续生成降解产物,而导致碘法不能区分青霉素与降解产物。由此凸显出来HPLC法的优势。

随着抗生素需求的增加和抗生素市场竞争的加剧,高效液相色谱法在抗生素生产工艺中的市场前景十分乐观。作为一种高效、可靠的分析技术,高效液相色谱法不仅可以帮助企业确保产品质量,提高生产效率,还可以帮助他们在市场竞争中占据优势地位。

参考文献:

- [1] 谢文佳,孙晓霞,王前,等.基于固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定饮用水中14种抗生素[J].轻工标准与质量,2021(5):67-72.
- [2] 刘晓杰,王晓雅,聂宁等.抗生素菌渣中蛋白质的提取工艺优化[J].广东化工,2022,49(16):35-38+7.
- [3] 颜洁,张群英.高效液相色谱法对土壤中抗生素残留检测研究[J].河南化工,2023,40(07):54-57.
- [4] 沈方.试析固相萃取——高效液相色谱法测定辣椒中甲基硫菌灵的残留量[J].中国化工贸易,2020,000(09):128-129.
- [5] 赵一飞,刘宗英.微生物发酵来源化学创新药申请上市药学研究的一般考虑[J].中国新药杂志,2023,32(02):159-162.
- [6] 彭碧宁,余创波,曾川,等.红曲红色素中桔青霉素检测方法的优化研究[J].中国食品添加剂,2022,33(08):208-215.
- [7] 曹广杰,刘静,王欢欢等.植源性抗生素牛至的提取工艺、作用及生产应用的相关研究[J].现代畜牧兽医,2022,(12):68-73.
- [8] 陈蕊,杨彬,段斌.气相色谱法在医药化工中的有效应用研究[J].中国化工贸易,2020,012(019):121-122.