文章编号：1001-8689(2020)03-0259-08

硫酸新霉素软膏的质量评价

黄敏文[1,2] 张倩[1,3,#] 侯玉荣[1,2] 施海蔚[1,2] 杭太俊[3] 张玫[1,2] 袁耀佐[1,2,*]
(1 江苏省食品药品监督检验研究院，南京 210019；2 国家局化学药物杂质谱研究重点实验室，南京 210019； 3 中国药科大学药物分析教研室，南京 210009)

摘要：目的 评价硫酸新霉素软膏的质量现状并分析存在的问题。**方法** 按法定标准检验与探索性研究相结合，对原料及国家计划抽验的 2 批次制剂进行检验，通过对软膏及原料的粒径、晶型、有关物质、杂质谱、含量测定方法等的考察，分析原料及制剂的质量状况及质量标准合理性。**结果** 按法定标准检验 2 批次硫酸新霉素软膏，合格率为 100%。探索性研究显示软膏含量均匀性欠佳，进一步分析原因，发现原料粒径大小及分布均欠均匀，且原料在存放及制剂过程中易发生转晶；针对质量标准中缺失的有关物质检查项，建立了硫酸新霉素含量测定及有关物质检查的 HPLC-PAD 方法，并对杂质谱进行研究；初步完成了 HPLC-PAD 法替代微生物检定法测定硫酸新霉素效价的量效一致性研究。**结论** 国内硫酸新霉素软膏质量总体良好；原料粒径不均匀及易发生结晶形态的转变，可能导致制剂含量均匀性欠佳；建议原料及软膏现行标准中增订有关物质检查项，用 HPLC-PAD 法替代传统的效价测定；建议原料药企业对原料工艺进行优化，以进一步提高产品质量。

关键词：硫酸新霉素；粒径；晶型；有关物质；杂质谱；含量测定；评价性抽验；质量分析
中图分类号：R978.1，R917 **文献标志码：**A

Quality consistency evaluation of neomycin sulfate ointment

Huang Min-wen[1,2], Zhang Qian[1,3], Hou Yu-rong[1,2], Shi Hai-wei[1,2], Hang Tai-jun[3], Zhang Mei[1,2] and Yuan Yao-zuo[1,2]
(1 Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019; 2 NMPA Key Laboratory for Impurity Profile of Chemical Drugs; 3 Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

Abstract **Objective** To evaluate the suitability of the standard and the quality condition of neomycin sulfate

收稿日期：2019-11-19
基金项目：国家科技重大专项 - 重大新药创制“药物一致性评价关键技术与标准”课题 (No. 2017zx09101001)
作者简介：黄敏文，女，生于 1979 年，博士，副主任药师，研究方向：现代药物分析，药物代谢动力学，E-mail：84687389@qq.com
并列第一作者：张倩，女，生于 1992 年，在读硕士研究生，研究方向：药物分析，E-mail：892979385@qq.com



第一作者：黄敏文，女，生于 1979 年，江苏省食品药品监督检验研究院化学二室，副主任药师。药物代谢动力学硕士，博士研究生，毕业于中国药科大学。多次承担国家药品评价性抽验工作，承担多版中国药典中多个品种的标准起草及标准提高工作，参与国家“十一五”、“十二五”课题项目。在国内外期刊上发表论文十余篇。



共同第一作者：张倩，女，生于 1992 年，在读硕士研究生，就读于中国药科大学。参与 2018 年国家药品评价性抽验工作。在国内核心期刊表论文 1 篇。



通讯作者：袁耀佐，男，生于 1968 年，博士，主任药师。江苏省食品药品监督检验研究院检院化学二室主任。中国药科大学、南京中医药大学和南京师范大学硕导，江苏省产业教授，USP(BIO4) 委员，中国药学会药分及抗生素专业委员会委员等。主要从事现代仪器分析及其在药品质量研究中的应用。在国内外期刊上发表相关论文 80 余篇，参编书籍 3 本，获批准专利 3 项。

ointment. **Methods**　According to the legal standard tests and exploratory studies, raw materials and two batches of preparations were tested. Through the investigation of the particle sizes, the crystal form, related substances, impurities spectrum, the content, the quality status of raw materials and preparations, and the rationality of quality standard were analyzed. **Results**　The pass rate of quality was 100% using the statutory methods in two batches of preparations. Exploratory research revealed that the content uniformity of the ointment was unsatisfactory. Further analysis of causes showed that the particle size and distribution of raw materials were not uniform. The raw materials were easy to be transgranular during storage and preparation. The HPLC-PAD method for the determination of neomycin sulfate and the detection of related substances was established, and the impurity spectrum was studied. The replacement of the microbial assay to the HPLC-PAD method for determining potency of neomycin sulfate was completed. **Conclusion**　At present, the quality of neomycin sulfate ointment meets the requirements of the current statutory standard. The uneven particle size of raw materials and the change of crystal form are easy to occur, which might lead to the poor uniformity of preparation content. It was proposed that the related substances tests should be included in the statutory standard of raw material and preparation and the HPLC-PAD method for the determination of potency of neomycin sulfate should be added. The manufacturers should optimize the production processes in order to improve the quality of products.

Key words　Neomycin sulfate ointment; Particle size; Crystal type; Related substance; Impurities spectrum; Content; Evaluative testing; Quality evaluation

硫酸新霉素 (neomycin sulfate) 是 1949 年 Waksman 等从新霉素链霉菌 (*Streptomyces fradiae*) 的代谢产物中分离得到的混合物，含有 A、B、C 3 个成分，主要成分为新霉素 B 和 C，新霉素 A 仅微量[1-2]。其作用机理主要与细菌核糖体 30S 亚单位结合，抑制细菌蛋白质的合成[3]。新霉素的耳、肾毒性较强，但由于其局部应用很少引起毒性反应或过敏性反应，常用于治疗皮肤感染性疾病[4-5]；同时由于新霉素口服极少吸收，在肠道内浓度很高，所以与其他抗生素混合口服可用于对肠道微生物群系的控制，适合于手术前的肠道消毒等。

经查询国家食品药品监督管理总局 (CFDA) 国产药品批准文号数据库，硫酸新霉素有片剂、滴眼液和软膏 3 种剂型。目前，国内仅有宜昌三峡制药有限公司和四川长征药业有限公司生产硫酸新霉素原料药，其中宜昌三峡制药有限公司为全球最大的硫酸新霉素原料生产企业。中国药典 (Chp2015)、日本药典 (JP17)、国际药典 (Ph.Int 7th)、美国药典 (USP41)、英国药典 (BP2018)、欧洲药典 (EP9.6)、韩国药典 (KP10) 和印度药典 (IP2018) 均收载了原料药[6-13]；USP41 和《卫生部抗菌素标准》1972 年版均收载了软膏。国产硫酸新霉素软膏共有批准文号 2 个，规格为 1g:5000 单位。

硫酸新霉素软膏为国家食品药品监督管理总局的 2018 年度国家药品计划抽验品种。本文在完成法定标准检验的基础上，结合探索性研究对检验结果进行进一步分析，进而对国产硫酸新霉素软膏及国内原料的质量现状进行评价，并从安全性和有效性角度对现行药品标准提出改进的建议。

1　仪器、试剂与试药

1.1　仪器

DionexICS-5000+ 离子色谱仪 (美国 Dionex 公司)；变色龙数据分析软件 (Chromeleon7.2 SR4)；Shimadzu LC-30AD 高效液相色谱仪；Shimadzu LCMS-IT-TOF 质谱仪；Thermo Dionex CSRS 300 4mm 在线膜抑制器；Shimadzu LC-8A 制备液相色谱仪；Alltech 2000ES ELSD 检测器；Nicolet 5700 型傅里叶变换红外光谱仪 (美国 Nicolet 公司)；BrukerAvance-400 核磁共振仪 (德国 Bruker 公司)；IKA RV10 旋转蒸发仪；CAM-IIIB 智能型抑菌圈测定仪 (上海波谱电脑系统工程有限公司)；BHC-1300IIA/B3 型生物安全柜 (苏净集团安泰公司)；Olympus DP70 正置荧光显微镜；Malvern Mastersizer 2000 型激光粒度分布测量仪 XS205 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司) 及 Milli-Q IQ7000 超纯水发生装置 (美国 Millipore 公司)。

1.2　标准品及菌株

新霉素 (中国食品药品检定研究院，批号：130309-201512，含量：652u/mg)，巴龙霉素 (中国食品药品检定研究院，批号：130371-200305)，新霉胺 (中国食品药品检定研究院，批号：130411-200908)，硫酸弗莱霉素 (EP，批号：F0450000)。

效价用菌株：金黄色葡萄球菌 (ATCC25923，广东环凯生物技术有限公司，批号：A0246B)

1.3 试剂与试药

五氟丙酸 (PFPA)(HPLC 级，Sigma-Aldrich 公司)；三氟乙酸 (TFA)(HPLC 级，J&K Scientific 公司)；50% 无二氧化碳氢氧化钠水溶液 (HPLC 级，Sigma-Aldrich 公司)；高纯氦气 (南京天泽气体有限责任公司)；大肠埃希菌 (ATCC25922，广东环凯生物技术有限公司，批号：E0006B)；

2 批次硫酸新霉素软膏均为 2018 年国家药品评价性抽验样品，涉及 1 个生产企业 (A 企业)；12 批次硫酸新霉素原料药 (来源于 B、C 两个生产企业各 6 批)。

2 试验方法

2.1 法定标准检验

按《卫生部抗菌素标准》1972 年版硫酸新霉素软膏标准进行检验。主要检验项目包括性状、化学鉴别 (1)、化学鉴别 (2)、装量、微生物限度、含量测定 (抗生素微生物检定法)。

2.2 探索性研究

2.2.1 软膏均匀性考察

按软膏管长轴方向沿中心剪开，将内容物分成 3 等份 (管前部、管中部、管后部)，每段精密称取适量，依法配制成供试品溶液，利用建立的 HPLC-PAD 法考察每段软膏的含量，并计算平均含量。

2.2.2 原料及软膏粒径的考察

采用 Malvern Mastersizer 2000 型激光粒度分布测量仪，测定原料与软膏的粒径分布。采用 Olympus DP70 正置荧光显微镜及标定过的目镜测微尺，测定测量视野内原料及软膏粒子的粒径。

2.2.3 原料及软膏多晶型的考察

采用 X 射线衍射仪 (岛津 6100)，2θ 角从 10° 扫描到 90°，对原料及软膏进行研磨，再填充于铝上，按照 2°/min 的步进速度进行扫描。

采用 Olympus DP70 正置荧光显微镜，取原料及软膏置载玻片上，加液状石蜡，在偏光显微镜下检视，观察晶体光学性质。

2.2.4 HPLC-PAD 法测定含量及有关物质

本文新建立了测定硫酸新霉素含量及有关物质的 HPLC-PAD 法。色谱条件如下：色谱柱：Thermo Acclaim™AmG (4.6mm×150mm，3μm)； 以 2%(*V*/*V*) 三氟乙酸溶液 [含 0.01%(*V*/*V*) 五氟丙酸 +0.6%(*V*/*V*) 氢氧化钠] 为流动相；流速：0.8mL/min；柱温：25℃；进样量：25μL。用积分脉冲安培电化学检测器检测，检测电极为金电极 (3mm 直径)，参比电极为 Ag/AgCl 复合电极，钛合金对电极，四波形检测电位，柱后碱液：50%NaOH 溶液 (1 → 25)，碱液流速：0.3mL/min。该方法通过了系统的方法学验证 [14]。

2.2.5 硫酸新霉素杂质谱研究

采用在线膜抑制脱盐技术辅助 LC-IT-TOF 法，即在分析柱后加装阳离子抑制器 [15]，样品经分析柱分离后随流动相进入膜抑制器，通过阴离子交换膜将离子对试剂的酸根用氢氧根替换，从而去除流动相中的离子对试剂后进入质谱检测，对新建立的 HPLC-PAD 法检出的硫酸新霉素中的杂质结构进行分析，研究硫酸新霉素杂质谱及来源。

2.2.6 含量测定的方法替代及量效一致性研究

采用高效液相色谱法替代传统的抗生素微生物检定法测定抗生素的生物效价 [16-22]。首先结合杂质谱研究及体外活性研究结果，确定硫酸新霉素的主要活性组分；再通过半制备液相色谱 - 蒸发光散射检测法，制备硫酸新霉素 B 及硫酸新霉素 C 单组分精制品，对结构进行确证，并采用质量平衡法测定二者的纯度；第三，采用三剂量抗生素微生物检定法分别测定精制品组分 B、C 的效价值，推导公式计算出硫酸新霉素的量效转换系数，最后通过交互作用考察及实际样品对转换系数进行验证。

3 结果

3.1 法定检验及发现的问题

按现行质量标准检验，2 批硫酸新霉素软膏均合格，合格率为 100.0%。但现行法定质量标准检验项目设置简单，缺少有关物质检查项及粒度检查项等，无法满足现代药品质量控制的需要。

3.2 探索性研究

3.2.1 软膏均匀性考察

对硫酸新霉素软膏的含量均匀性进行了考察，两个批次的硫酸新霉素软膏各平行做 3 份样品，前中末 3 段的 B 组分、C 组分含量均差别较大，且含量变化无明显规律 (B 组分含量 RSD% 为 2.2%~24.2%，C 组分含量 RSD% 为 13.8%~17.3%)，提示产品的均匀性欠佳。由于该软膏为混悬型软膏，主药与基质互不相溶，含量均匀性对软膏的有效性有一定的影响，有必要进一步分析产品均匀性欠佳的原因。

3.2.2 原料及软膏粒径分析

两批软膏的粒度经测定均小于 100μm。12 批原料样品中，有 2 批最大粒径大于 150μm，其中 1 批大于 180μm，均来源于原料药企业 A；镜下结果显示，原料药存在粒径尺寸大小不一、分布不均的现象 (图 1)。

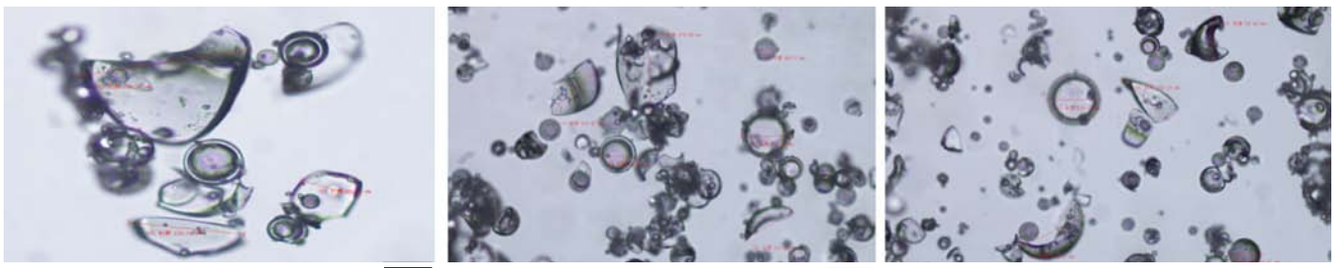


图 1　A 企业原料药在不同视野的镜下照片

Fig. 1　Images of A enterprise raw materials in different field of microscope

采用激光粒度仪分别对两个厂家来源的各 3 个批次原料进行粒度和粒度分布检查，结果显示，样品的加权残差均＜ 3%，符合厂家推荐要求，各批次样品粒度分布的 d(0.1) 在 8~12μm 区间、d(0.5) 在 30~47μm 区间、d(0.9) 在 90~138μm 区间，均小于 180μm，各厂家样品粒度分布 d(0.1)、d(0.5)、d(0.9) 在相当水平。

中国药典对硫酸新霉素原料药的粒度未有要求，但在调研过程中了解到，制剂生产企业 (上海通用药业股份有限公司) 对原料药的粒度要求为不得大于 150μm，本次所检的 12 批原料药样品中，有 2 批最大粒径大于 150μm，其中 1 批大于 180μm。根据仪器软件推算粒度详细分布数据结果显示，6 个批次原料均可见少量 (0.7%~4.2%) 大于 180μm 颗粒，其中批号为 201804013(A 企业)、20180801(B 企业) 的原料药分别可见少量 (1.0%、1.3%) 大于 1000μm 颗粒。提示国产对用于软膏剂的硫酸新霉素原料的粒度控制缺乏重视。

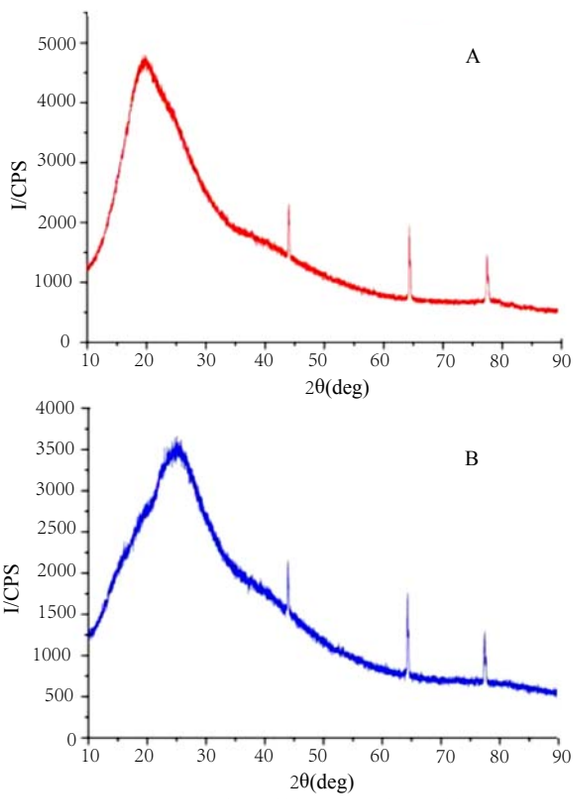
3.2.3　原料及软膏多晶型的考察结果

X 射线衍射图显示，原料药总体上均为非晶态，且宽峰的位置比较接近，2θ 角位于 25° 附近 (在 44°、65°、78° 附近的 3 个晶体衍射峰来自于基底铝板)，不同厂家之间有细微的差别 (图 2)。

偏光显微镜法测定结果显示：不同企业来源的硫酸新霉素原料绝大多数是以非晶态形式存在，虽有不同粒径的结晶，但形态不固定。而硫酸新霉素软膏中出现了大量的晶体 (图 3)，考虑到软膏中的辅料主要为凡士林，不会形成晶体，故而软膏中出现的结晶应来源于主成分。该结果表明无定型的硫酸新霉素原料在制剂及放置过程，可能分由无定型转变为结晶型。

3.2.4　HPLC-PAD 法测定含量及有关物质 [23-29]

在 EP9.0 硫酸新霉素有关物质测定的 HPLC-PAD 法基础上，对流动相进行了优化，增加了微量五氟丙酸，有效地改善了各杂质间的分离度，新霉胺 (新



A：A 企业原料；B：B 企业原料

图 2　硫酸新霉素原料的 XRD 图谱

Fig. 2　The XRD graph of raw material and ointment

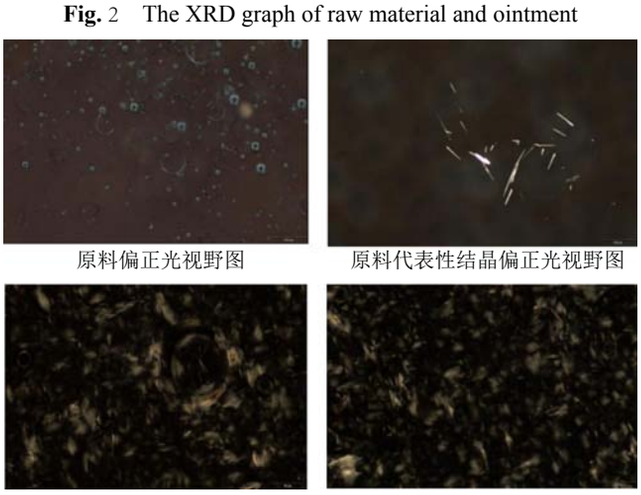


图 3　硫酸新霉素原料及软膏的偏光显微镜视野图

Fig. 3　The polarization microscope images of raw materials and ointment

霉素 A)、新霉素 B 及新霉素 C 与前后相邻杂质均分离良好，并且比欧洲药典方法多分离出新霉素 C 前相邻杂质，分离检测能力明显改善。采用四电位检测波形 (quadruple-potential waveform, QPW) 替代三电位检测波形 (triple-potential waveform，TPW) 施加电位的检测模式，使方法的耐用性有了极大的提高。

硫酸新霉素中共检出 12 个杂质峰，典型色谱图见图 4。两原料药生产企业产品中最大单个杂质分布在 0.7%~1.9% 之间，且最大单个杂质相同，均为乙酰新霉胺 I；软膏中的最大杂质亦为乙酰新霉胺。结合杂质谱研究，推测乙酰新霉胺为工艺来源 (表 1)，提示不同企业生产的硫酸新霉素软膏的原料工艺差异不大。两生产企业产品杂质总量分布在 3.6%~6.8% 之间。

采用在线膜抑制脱盐技术辅助 LC-IT-TOF 法测定了新霉素的杂质谱，除新霉素 B 和新霉素 C 外，共有 12 个相关杂质。通过一级二级质谱数据及对各已知组分及已知杂质的裂解规律比对，推定出 12 个

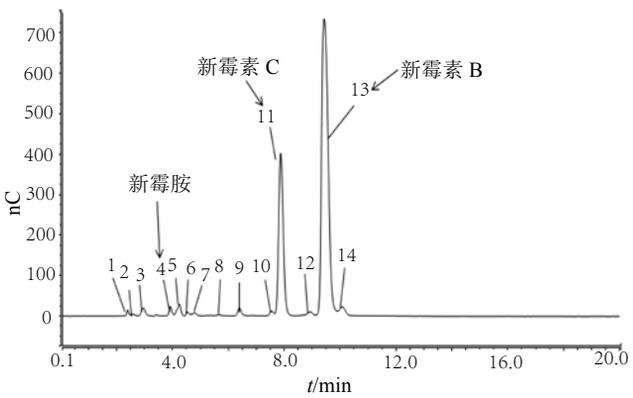


图 4　新霉素有关物质典型色谱图

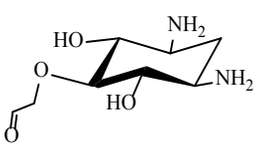
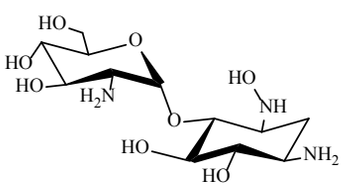
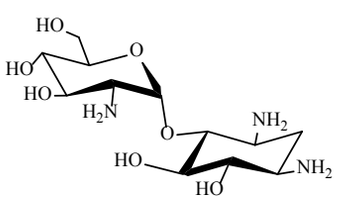
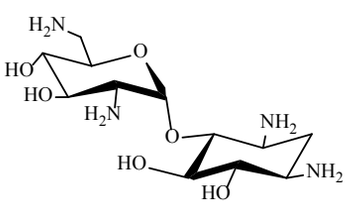
Fig. 4　Typical chromatogram of related substances for neomycin sulfate

杂质的结构 [30-32]；根据有关物质强制降解试验、稳定性试验相关资料及原料药中杂质的变化推测出各杂质可能来源，其中主要降解杂质为新霉胺，为新霉素 B 或新霉素 C 酸性降解杂质，其他杂质多为工艺杂质，杂质来源见表 1。

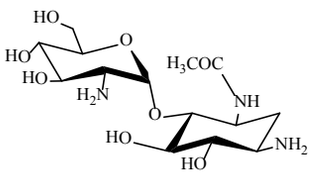
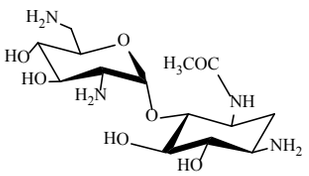
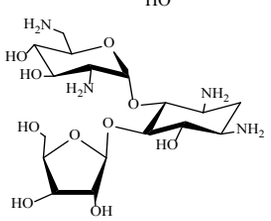
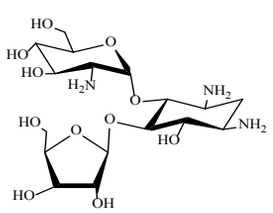
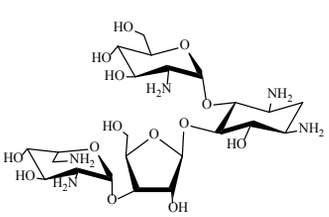
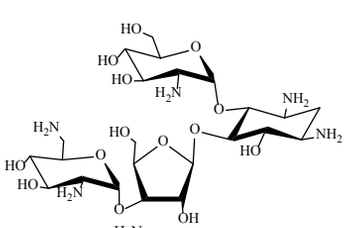
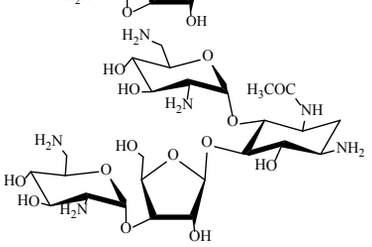
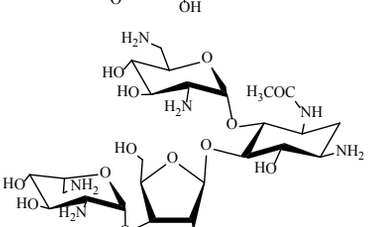
3.2.5　含量测定的方法转移及量效一致性研究结果

表 1　各杂质峰保留时间、推定结构及来源分析

Tab. 1　Retention time, structure and source analysis of peaks of related substances

峰编号	保留时间 /min	名称	结构	来源分析
1	2.392	杂质 1(1-O 位乙醛基 -2- 脱氧链霉胺)		工艺杂质、降解杂质
2	2.659	杂质 2(6- 羟基取代巴龙霉胺)		工艺杂质
3	2.959	杂质 3(巴龙霉胺)		工艺杂质
4	3.925	杂质 4(新霉胺)		工艺杂质、降解杂质

续表 1

峰编号	保留时间 /min	名称	结构	来源分析
5	4.142	杂质 5(乙酰巴龙霉胺)		工艺杂质
6	4.242	杂质 6(乙酰新霉胺)		工艺杂质
7	4.534	杂质 7(核糖霉素)		工艺杂质
8	4.792	杂质 8(2- 羟基取代核糖霉素)		工艺杂质
9	6.392	杂质 9(巴龙霉素 I)		工艺杂质
10	7.542	杂质 10(巴龙霉素 II)		工艺杂质
11	8.934	杂质 11(乙酰新霉素 B 的同分异构体)		工艺杂质
12	10.084	杂质 12(乙酰新霉素 B)		工艺杂质

杂质谱研究结果表明，硫酸新霉素有 4 个杂质的含量约 1%，分别为巴龙霉胺、乙酰新霉胺、巴龙霉素 I 及巴龙霉素 II。通过常量肉汤稀释法及抗生素微生物检定法等体外活性测定，结合杂质的结构，推测这 4 个主要杂质均不是新霉素的主要活性组分，因此将新霉素按新霉素 B 和新霉素 C 为主要活性组分的双组分抗生素进行研究 [33]。

通过半制备液相色谱与蒸发光散射检测器串联，首次制备获得新霉素 B 及新霉素 C 精制品，并进行了结构确证。采用质量平衡法，测定新霉素 B、新霉素 C 精制品的纯度分别为 66.007% 和 60.776%。采用抗生素微生物检定法分别测定精制品 B、C 的效价值，得到新霉素 B、C 组份的量效转换系数 (理论效价) 分别为 1123.989 和 640.764u/mg。

将新霉素 B、新霉素 C 精制品分别按 90%:10%、50%:50%、10%:90% 3 种比例混合，采用微生物检定法分别测定 3 种比例混合物的效价，将 3 种混合物的测定效价与计算效价进行比较，*P* 均 >0.05，即两效价结果间无显著性差异，表明各组分间无明显交互作用 (待发表)。

采用 A、B 两个企业的 12 批硫酸新霉素原料药对组分的量效转换系数进行验证。对 HPLC-PAD 法和微生物检定法得到的效价值进行配对 *t* 检验，*P*>0.05，测定结果没有显著性差异，即两个方法的效价测定结果是等效的。

4 讨论

本次评价性抽验结果显示，硫酸新霉素软膏总体质量较好，产品合格率 100%，但探索性研究表明，软膏的含量均匀性有所欠缺。进而对含量均匀性欠缺的原因进行分析，粒度可能是其较为关键的因素之一，软膏剂生产企业应加强对原料粒度的控制，必要时建议重视原料粉碎工艺的质量要求。此外，《新注册分类的皮肤外用仿制药的技术评价要求 (征求意见稿)》中提出“应对仿制品的晶型、制备过程和稳定性研究中的转晶现象加以深入研究，以阐明晶型可能对药物的安全性和有效性的影响”。研究发现，无定型的硫酸新霉素原料在制剂及放置过程，发生了结晶形态的转变，部分由无定型转变为结晶型，这同样也会影响软膏剂的均匀性。

现行质量标准应进一步完善。目前硫酸新霉素原料及软膏的现行质量标准中均缺失有关物质检查项，本文对硫酸新霉素的 12 个杂质进行了结构推定及来源分析，建议采用 HPLC-PAD 方法，对新霉胺等特定杂质进行控制。

本文完成了对硫酸新霉素的量效一致性研究，实现了利用 HPLC 分析法对多组分抗生素传统效价测定方法的替代，提高了检测方法的准确性，并简化了操作。

参 考 文 献

[1] Huang F L, Spiteller D, Neil A, *et al*. Elaboration of neosamine rings in the biosynthesis of neomycin and butirosin[J]. *Chem Biochem*, 2007, 8(3): 283-288.

[2] 范铭琦 , 赵敏 . 氨基糖苷类抗生素产生菌的代谢调控与菌种选育 [J]. 中国抗生素杂志 , 2005, 30(9): 576-S4.

[3] Chambers H F, Sande M A, Hardman J G, *et al*. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics[M]. 9th rev. ed. New York: Mc Graw Hill, 1996: 1103-1121.

[4] 李定刚 . 氨基糖苷类抗生素的研究应用概述 [J]. 北方牧业 , 2008, (2): 27.

[5] Davidson R N, Boer M D, Ritmeijer K. Paromomycin[J]. *Trans Roy Soci Trop Med Hygie*, 2009, 103(7): 653-660.

[6] 国家药典委员会 . 中华人民共和国药典 [S]. (2015 版二部). 北京 : 中国医药科技出版社 , 2015: 1363.

[7] European Directorate for the Quality of Medicine & Healthcare, European Pharmacopeia 9.0[S]. volume III. France: 2017: 3132-3134.

[8] British Pharmacopoeia Commission, British Pharmacopoeia 2019[S]. London (Endland): British pharmacopoeia commission, 2019.

[9] World Health Organization, The International Pharmacopoeia-Fifth Edition[S]. Switzerland, 2015.

[10] The United States Pharmacopeial Convention, The United States Pharmacopeial40-The National Formulary35[S]. (Volume III). Rockville, 2016: 5301.

[11] Pharmaceutical and Medical Device Regulatoryscience Society of Japan, Japanese Pharmacopeia XVII[S]. Tokyo, 2016: 966-967.

[12] Ministry of Food and Drug Safety, Korean Pharmacopoeia 10: part 1[S]. Cheongwon County, 2017: 860-861.

[13] Indian Pharmacopoeia Commission, Indian Pharmacopoeia 10[S]. India, 2010: 1763-1764.

[14] 张倩 , 黄敏文 , Wang F, 等 . HPLC-PAD 法测定硫酸新霉素含量及其有关物质 [J]. 中国药科大学学报 , 2019, 50(2): 193-199.

[15] 张婷婷 , 刘绿叶 , 张艳海 , 等 . 采用柱后抑制器技术降低流动相中三氟乙酸对质谱信号抑制作用的研究 [J]. 分析测试技术与仪器 , 2017, 23(1): 18-23.

[16] 国家药典委员会 . 中华人民共和国药典 2015 版 (四部) 通则 [S]. 北京 : 中国医药科技出版社 , 2015: 160.

[17] USP. 2005. <1223>Validation of Alternative Microbiological Methods[Z]. Pharmacopoeia Forum. 31(5): 1475-1486.

[18] The United States Pharmacopeial Convention, The United States Pharmacopeial40-The National Formulary35<81> Antibiotics-Microbial Assays[S]. 2017: 143-162.

[19] 王永红 . 两性霉素 B 降解产物研究及其 HPLC 方法与微生物测定法含量测定结果的量值统一 [D]. 北京 : 中国协和医科大学 , 2010.

[20] 常艳 , 姚尚辰 , 胡昌勤 . 《中国药典》2015 年版庆大霉素 C 组分限度修订—从相对含量到绝对含量的飞跃 [J]. 中国抗生素杂志 , 2016, 41(1): 1-15.

[21] 袁耀佐 , 张玫 , 胡昌勤 . 氨基糖苷类抗生素组分控制进展 [J]. 中国药学杂志 , 2017, 52(20): 1772-1779.

[22] 张如梦 . 硫酸核糖霉素量效一致性研究 [D]. 南京 : 中国药科大学 , 2018.

[23] 程军 , 刘延 . 高效液相色谱 - 电化学检测法在药物分析中的应用 [J]. 中国药学杂志 , 2017, 52(20): 1753-1771.

[24] Adams E, Schepers R, Roets E, *et al*. Determination of neomycin sulfate by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection[J]. *J Chromatogr A*, 1996, 741: 233-240.

[25] Rohrer J S. High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection for the determination of oligosaccharides in foods and agricultural products[M].Dionex Corporation, 1228 Titan Way, Sunnyvale, 2003.

[26] 李仁勇 , 梁立娜 , 牟世芬 . 高效阴离子交换色谱 - 脉冲安培检测食品中糖的应用进展 [J]. 食品与发酵工业 , 2010, 36(7): 97-101.

[27] 牟世芬 , 于泓 , 蔡亚枝 . 糖的高效阴离子交换色谱 - 脉冲安培检测法分析 [J]. 色谱 , 2009, 27(5): 667-674.

[28] 吴宇宁 . LC-PED 法在氨基糖苷类抗生素质量控制中的应用研究 [D]. 南京 : 中国药科大学 , 2015.

[29] 杨大军 , 许鸿章 , 陈汝贤 . 硫酸核糖霉素及新霉胺的反相高效液相色谱分析 [J]. 中国抗生素杂志 , 1990, 13(5): 378-379.

[30] Li B, Adams E, van Schepdael A, *et al*. Identification of gentamicin impurities by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom,* 2006, (20): 393-402.

[31] 袁耀佐 , 张玫 , 钱文 , 等 . 高效液相色谱 - 电喷雾 - 离子阱质谱法推定硫酸依替米星中有关物质的结构 [J]. 分析化学 , 2010, 38(6): 817-822

[32] Ang L, Joseph T, Chad E W. Investigation of an on-line two-dimensional chromatographic approach for peptide analysis in plasma by LC-MS-MS[J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877 (20-21): 1873-1881.

[33] 国家药典委员会 . 中华人民共和国药典 1990 版药典注释 [S]. 北京 : 化学工业出版社 , 1990: 802-805.