

# 盐酸多西环素杂质 C 的制备及体外抗菌活性与毒性研究

张 娅<sup>1,2#</sup>, 张锦琳<sup>1#</sup>, 赵述强<sup>1</sup>, 袁耀佐<sup>1\*</sup>, 张 玮<sup>1</sup>, 樊夏雷<sup>1</sup>, 王亚楼<sup>2\*\*</sup>

(<sup>1</sup>江苏省食品药品监督检验研究院,南京 210008; <sup>2</sup>中国药科大学药物化学教研室,南京 210009)

**摘要** 采用高效制备液相色谱法从盐酸多西环素中分离制备高纯度杂质 C, 同时考察其毒性及体外抗菌活性。盐酸多西环素溶液首先经加热处理, 然后采用 Sapphire C<sub>18</sub>柱(21.2 mm × 250 mm, 5 μm)分离, 流动相为 0.1% 乙酸-乙腈(83:17), 流速为 20 mL/min, 收集 8.4 min 出峰的组分, 再通过旋转蒸发、调节旋蒸后溶液 pH、冷冻干燥等步骤制得目标物。采用高效液相色谱法测定目标物纯度, 运用紫外光谱、红外光谱、质谱及核磁共振等手段确证其结构, 比较盐酸多西环素杂质 C 与多西环素、美他环素、β-多西环素等相关物质对中国仓鼠肺(CHL)细胞的细胞毒性和遗传毒性、斑马鱼胚胎发育毒性以及体外抗菌活性。结果发现: 制备产物经结构确证为盐酸多西环素杂质 C, 其纯度达到 90.1%, 为目前文献报道最高。在对 CHL 细胞的细胞毒性和遗传毒性研究实验中, 盐酸多西环素杂质 C、多西环素、美他环素、β-多西环素对 CHL 细胞均有一定的细胞毒性, 畸变率均小于 5%, 但未见明显的遗传毒性; 在斑马鱼胚胎发育毒性实验中, 盐酸多西环素杂质 C 致畸性与致死性最强; 在体外抗菌活性实验中, 盐酸多西环素杂质 C 抗菌活性较弱, 其他相关物质抗菌活性由强到弱的顺序为: 美他环素、多西环素、盐酸多西环素杂质 C、β-多西环素。安全性和有效性试验提示盐酸多西环素杂质 C 属于毒性大且无效的杂质, 需要在质量标准中进行单独控制, 建议修订现行《中华人民共和国药典》中盐酸多西环素及其制剂的质量标准。

**关键词** 盐酸多西环素杂质 C; 制备型液相色谱; 毒性; 体外抗菌活性

**中图分类号** R917    **文献标志码** A    **文章编号** 1000-5048(2016)04-0463-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160412

**引用本文** 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):463-468.

**Cite this article as:** ZHANG Ya, ZHANG Jinlin, ZHAO Shuqiang, et al. Preparation of impurity C of doxycycline hydulate and its evaluation of *in vitro* antimicrobial activity and toxicity[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(4):463-468.

## Preparation of impurity C of doxycycline hydulate and its evaluation of *in vitro* antimicrobial activity and toxicity

ZHANG Ya<sup>1,2#</sup>, ZHANG Jinlin<sup>1#</sup>, ZHAO Shuqiang<sup>1</sup>, YUAN Yaozuo<sup>1\*</sup>, ZHANG Mei<sup>1</sup>, FAN Xialei<sup>1</sup>, WANG Yalou<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008;

<sup>2</sup> Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** This study aimed to isolate and prepare highly purified impurity C from doxycycline hydulate by a preparative HPLC method and to inspect the toxicity and *in vitro* antimicrobial activity of the impurity C of doxycycline hydulate. The solution of doxycycline hydulate treated with heat produced a solution containing 10% of impurity C which was firstly separated by the Sapphire C<sub>18</sub>(21.2 mm × 250 mm, 5 μm) column with 0.1% acetic acid-acetonitrile(83:17) as the mobile phase at 20 mL/min. Secondly, rotary evaporation of the eluted solution at the time of 8.4 min was performed at 50 °C to remove organic solvent. Then the target product was prepared after freeze drying of evaporated solution adjusting pH to 1.8 with formic acid. The target product was identified with ultraviolet absorbance (UV), infrared (IR), mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR),

and its purity was determined by HPLC. Meanwhile, cytotoxicity and genotoxicity in the Chinese hamster lung cells, toxicity on the development of zebrafish embryos and *in vitro* antimicrobial activity were compared among impurity C of doxycycline hydiate, doxycycline, metacycline and  $\beta$ -doxycycline. Results showed that prepared product was confirmed to be the impurity C of doxycycline hydiate. Its purity was 90.1%, which had been the highest so far. In the cellular toxic tests and genetic toxic tests of Chinese hamster lung cells, impurity C of doxycycline hydiate, doxycycline, metacycline and  $\beta$ -doxycycline were somewhat toxic to Chinese hamster lung cells. Toxicity gradually decreased from doxycycline, impurity C of doxycycline hydiate,  $\beta$ -doxycycline to metacycline from  $-S_9$  mix test results; toxicity gradually decreased from doxycycline,  $\beta$ -doxycycline, impurity C of doxycycline hydiate to metacycline from  $+S_9$  mix test results; the aberration rate of all the tested related substances was less than 5%, and no obvious genotoxicity was found. According to test results of the development of zebrafish embryos, impurity C of doxycycline hydiate showed the strongest teratogenicity and lethality. Invitro antimicrobial tests revealed that impurity C of doxycycline hydiate had a weaker antimicrobial activity, and invitro antimicrobial activity potential of the tested compounds followed the order: metacycline, doxycycline, impurity C of doxycycline hydiate,  $\beta$ -doxycycline. Studies on safety and effectiveness indicated that impurity C of doxycycline hydiate belonged to toxic and ineffective impurity and need to be controlled individually in quality standard. A useful suggestion was given to revise the quality standard of doxycycline hydiate and its preparation in the current *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*.

**Key words** impurity C of doxycycline hydiate; ; preparative liquid chromatography; toxicity; *in vitro* antimicrobial activity

<sup>#</sup>ZHANG Ya and ZHANG Jinlin contributed equally to this work

盐酸多西环素(doxycycline hydiate)为半合成四环素类抗生素,具有广谱抗菌作用,主要应用于牙周炎、社会获得性肺炎、莱姆关节炎、布鲁氏菌病、恙虫病、支原体与衣原体感染等<sup>[1-4]</sup>。自“9·11”事件后,世界各国特别是美国高度重视生物恐怖性疾病<sup>[5]</sup>,而炭疽杆菌为生物恐怖性疾病病原体之一,盐酸多西环素作为次选药物对治疗炭疽有显著疗效,因此,对其质量的深入研究也随之得到重视。在2014年国家评价性抽验品种盐酸多西环素片的探索性研究过程中,从来源于不同企业的盐酸多西环素片中检出盐酸多西环素杂质C、美他环素、 $\beta$ -多西环素、2-乙酰-6-脱碳酰胺多西环素4种含量大于0.1%的共性杂质,有必要对这4种杂质进行定性与定量研究。其中,美他环素、 $\beta$ -多西环素对照品可从中国生物制品检定研究院购买;2-乙酰-6-脱碳酰胺多西环素目前无市售杂质对照品,本课题组也对其进行了制备和鉴定(另文发表);市售的盐酸多西环素杂质C的纯度仅70%,且价格昂贵。因此本文拟对盐酸多西环素杂质C进行进一步研究,即制备高纯度盐酸多西环素杂质C,测定其紫外光谱、红外光谱、核磁共振、质谱以确证其结构;另外,比较盐酸多西环素杂质C与多西环素、美他环素、 $\beta$ -多西环素等相关物质的毒性

及抗菌活性,为制定盐酸多西环素的质量标准提供理论参考。

## 1 材 料

### 1.1 药品与试剂

盐酸多西环素原料药(批号:YD20140022CP,江苏联环药业股份有限公司);多西环素(批号:130485-201202)、美他环素(批号:130499-200802)、 $\beta$ -多西环素(批号:130405-200907,中国生物制品检定研究院);乙腈、三氟乙酸为色谱纯;其余试剂均为市售分析纯。

### 1.2 仪 器

LC-20AP 制备型全自动高效液相色谱仪、HPLC 色谱仪、LC/MS-IT-TOF 质谱仪、UV-2550 紫外分光光度计(日本岛津公司);Nicolet 5700 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Nicolet 公司);Bruker Avance-400 核磁共振仪(德国 Bruker 公司);比浊仪(法国生物梅里埃公司);Millipore 纯水仪(美国 Millipore 公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 盐酸多西环素杂质C的制备

2.1.1 制备液相色谱条件 色谱柱:Sapphire C<sub>18</sub>

(21.2 mm×250 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:0.1%乙酸-乙腈(83:17);流速:20 mL/min;柱温:室温;进样体积:5 mL;检测波长:280 nm。

**2.1.2 制备样品溶液** 精密称取盐酸多西环素原料药适量,加水溶解并稀释制成10 mg/mL的盐酸多西环素水溶液,并在100 °C水浴破坏2 h(含盐酸多西环素杂质C约10%),即得。

**2.1.3 制备杂质** 精密量取制备样品溶液5 mL注入制备型全自动高效液相色谱仪,色谱图见图1。收集8.486 min的流出组分,然后在50 °C旋转蒸发去除有机溶剂,用甲酸将旋蒸后的溶液的pH调节至1.8,最后采用冷冻干燥制得目标杂质。

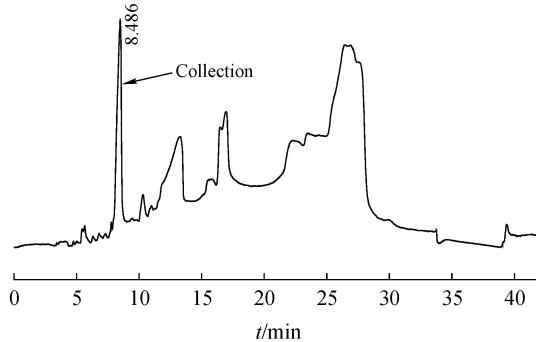


Figure 1 Chromatogram of preparative liquid chromatography

## 2.2 制备获得杂质的纯度测定

按文献[6]方法测定,采用面积归一化法计算制备获得杂质的纯度为90.1%(图2)。

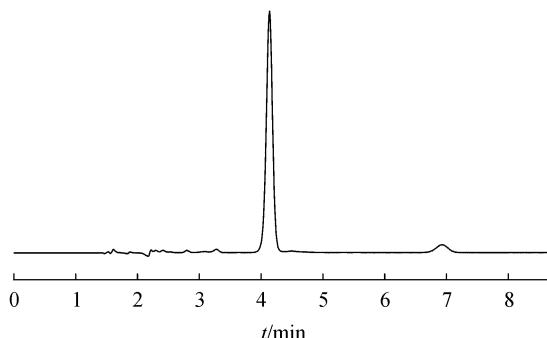


Figure 2 Chromatogram of the impurity of doxycyclinehydiate. Column: Sapphire C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), maintained at 35 °C. Mobile phase: a mixture of a buffer solution (0.25 mol/L ammonium acetate solution: 0.1 mol/L ethyldiaminetetraacetic acid disodium: triethyamine = 100:10:1) adjusted to pH 8.8 with glacial acetic acid and acetonitrile (85:15). UV detection: 280 nm

## 2.3 制备获得杂质的结构确证

**2.3.1 紫外吸收光谱** 制备获得杂质与多西环素紫外吸收光谱见图3。两者图谱对比发现:制备获

得杂质与多西环素紫外吸收光谱趋势基本相同,可见制备获得杂质与多西环素有相似的共轭结构。

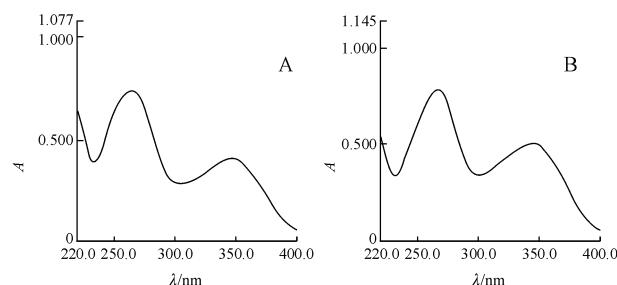


Figure 3 Ultraviolet spectra of the impurity of doxycycline hydiate (A) and doxycycline (B)

**2.3.2 红外吸收光谱** 采用KBr压片方式测得制备获得杂质有 $\nu_{\text{O-H}}$ 与 $\nu_{\text{N-H}}$ 混合叠加峰(3 369  $\text{cm}^{-1}$ )、 $\nu_{\text{C=O}}$ (1 652  $\text{cm}^{-1}$ )、不饱和苯环骨架振动(1 605  $\text{cm}^{-1}$ 、1 582  $\text{cm}^{-1}$ 、1 456  $\text{cm}^{-1}$ )、 $\delta_{\text{N-H}}$ (1 521  $\text{cm}^{-1}$ )、 $\delta_{\text{O-H}}$ (1 385 ~ 1 300  $\text{cm}^{-1}$ )、 $\nu_{\text{C-C}}$ (1 243  $\text{cm}^{-1}$ )、 $\nu_{\text{C-N}}$ (1 216, 1 170  $\text{cm}^{-1}$ )、 $\nu_{\text{C-O}}$ (1 115  $\text{cm}^{-1}$ )、 $\delta_{\text{C-H}}$ (1 000 ~ 900  $\text{cm}^{-1}$ )、 $\gamma_{\text{N-H}}$ (883  $\text{cm}^{-1}$ 、852  $\text{cm}^{-1}$ )、 $\gamma_{\text{C-H}}$ (822  $\text{cm}^{-1}$ 、807  $\text{cm}^{-1}$ )、 $\gamma_{\text{C=C}}$ (710  $\text{cm}^{-1}$ )、 $\gamma_{\text{O-H}}$ (663  $\text{cm}^{-1}$ 、619  $\text{cm}^{-1}$ )和苯环骨架变形振动(579  $\text{cm}^{-1}$ )等特征吸收峰,表明化合物结构中含有不饱和苯环、酰胺、叔胺、伯胺、芳香酮、酚、烯醇、饱和醇和三取代苯等结构。

**2.3.3 质谱** 制备获得杂质的准分子离子峰 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 为 $m/z$  445.159 8,  $\text{MS}^3$ 、 $\text{MS}^4$ 、 $\text{MS}^5$ 、 $\text{MS}^6$ 前体离子分别为 $m/z$  428.134 5, 321.076 0, 267.063 8, 252.041 0。根据氢碳比、氮规则及多级质谱信息,预测分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$ ,推断其可能的质谱裂解途径(图4)与盐酸多西环素杂质C的分子结构相符。

**2.3.4 核磁共振光谱** 制备获得杂质与多西环素<sup>1</sup>H谱见图5。测得制备获得杂质<sup>1</sup>H NMR( $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ , 400 MHz)  $\delta$ : 6.66 (1H, t,  $J$  = 7.6 Hz), 6.11 (1H, d,  $J$  = 7.2 Hz), 6.00 (1H, d,  $J$  = 7.6 Hz), 3.93 (1H, m), 3.33 ~ 3.28 (1H, m), 2.28 (6H, m), 2.21 (1H, m), 2.04 (1H, m), 1.95 ~ 1.89 (1H, m), 1.78 ~ 1.68 (1H, m), 0.73 (3H, d,  $J$  = 6.4 Hz);测得多西环素<sup>1</sup>H NMR( $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ , 400 MHz)  $\delta$ : 7.49 (1H, t,  $J$  = 8.4 Hz), 6.95 (1H, d,  $J$  = 7.6 Hz), 6.84 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz), 4.44 (1H, s), 3.62 ~ 3.58 (1H, m), 3.57 ~ 3.53 (1H, m), 2.98 (3H, s), 2.91

(3H, s), 2.84 ~ 2.81 (1H, m), 2.78 ~ 2.73 (1H, m), 2.61 ~ 2.55 (1H, m), 1.54 (3H, d,  $J$  = 7.2

Hz), 1.17 (1H, t,  $J$  = 6.8 Hz)。

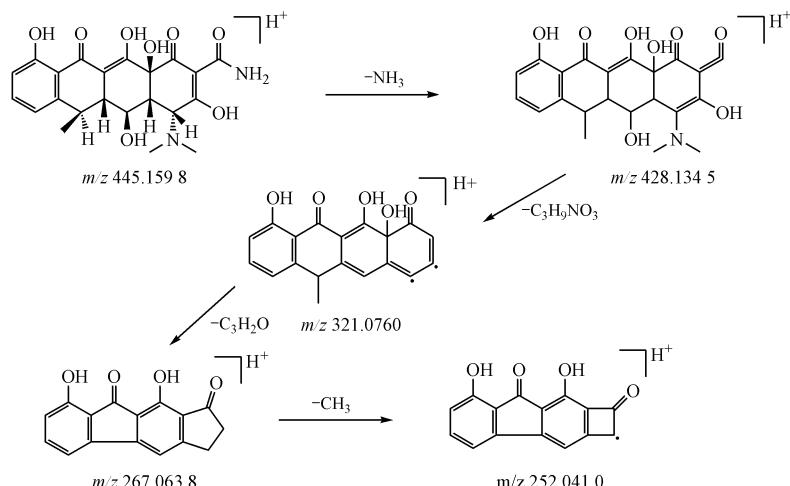


Figure 4 Plausible fragmentation pathway of the impurity of doxycycline hydulate

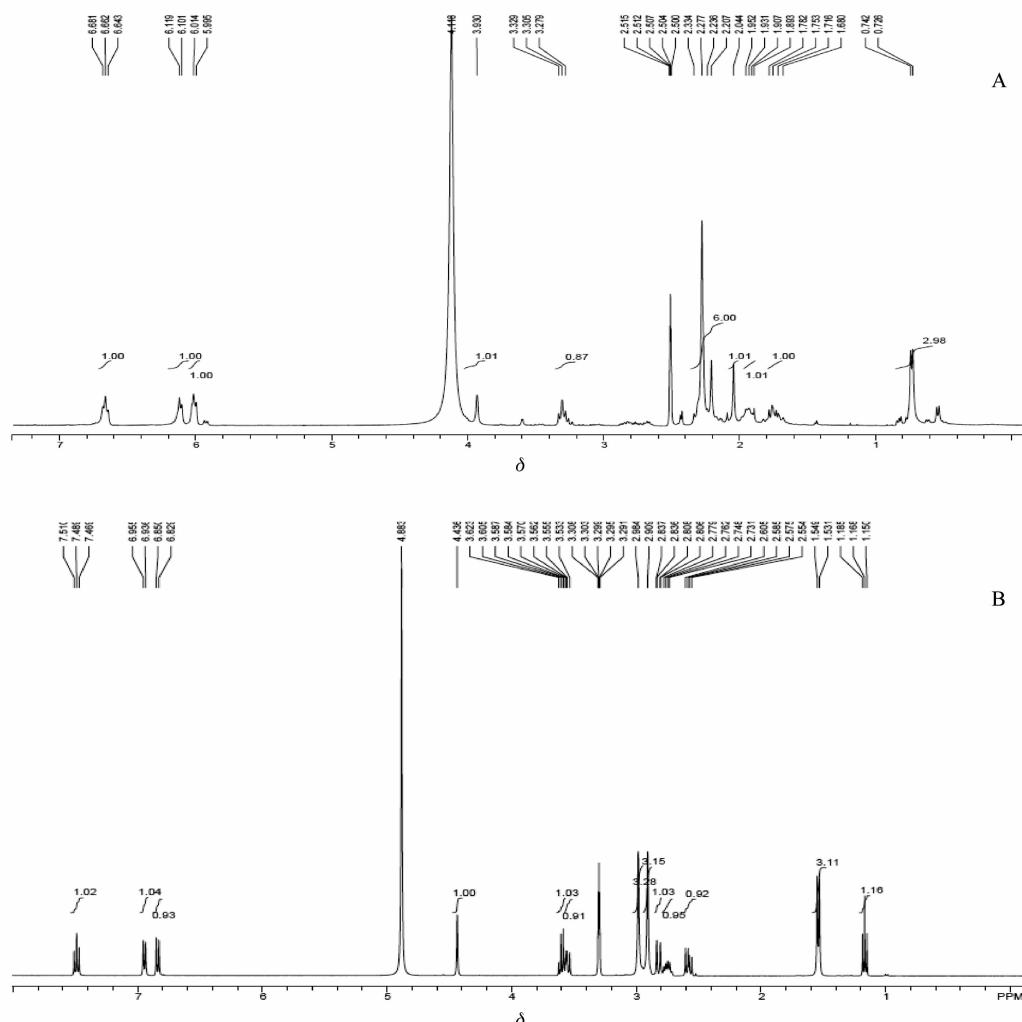
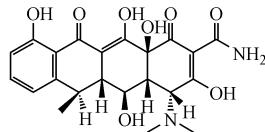


Figure 5  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the impurity (A) and doxycycline (B)

两者氢谱数据对比发现:制备获得杂质与多西环素全部H的类型和耦合裂分关系基本一致,都含有3个芳环H、3种甲基、6个烷基CH氢共振峰,仅局部的化学位移和耦合裂分常数有明显差异,因此与表异构体特征一致;制备获得杂质的4位氢化学位移为3.93,而多西环素的4位氢化学位移为4.44;制备获得杂质的4位氮上两个甲基取代的化学位移为2.28(6H,m),而多西环素的4位氮上两个甲基取代的化学位移分别为2.98(3H,s)和2.91(3H,s)。因此,推测制备获得杂质为多西环素4位差向异构化化合物,即盐酸多西环素杂质C。

**2.3.5 结构确证** 经UV、IR、MS、NMR等光谱分析鉴定,确定本次分离制备的杂质为《欧洲药典》<sup>[7]</sup>中的盐酸多西环素杂质C[名称:(4R,4aR,5S,5aR,6R,12aS)-6-甲基-4-(二甲氨基)-3,5,10,12,12a-五羟基-1,11-二氧代-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-八氢-2-并四苯甲酰胺;4-表多西环素,分子式为C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>],其结构见图6。



**Figure 6** Chemical structure of impurity C of doxycycline hydrate

## 2.5 盐酸多西环素杂质C对CHL细胞的细胞毒性和遗传毒性

以梯度浓度的盐酸多西环素杂质C与多西环素、美他环素、 $\beta$ -多西环素在无S<sub>9</sub>mix( - S<sub>9</sub>mix)和有S<sub>9</sub>mix( + S<sub>9</sub>mix)作用下分别染毒CHL细胞24和4 h,MTT比色法计算IC<sub>50</sub>以评估各药物的细胞毒性大小;选取各药物近IC<sub>50</sub>作为受试浓度,在无和有S<sub>9</sub>mix作用下分别染毒CHL细胞24和4 h,观察各药物对染色体损伤效应。

**2.5.1 CHL细胞毒性的比较** 实验结果显示,盐酸多西环素杂质C、多西环素、美他环素、 $\beta$ -多西环素对CHL细胞均有一定的细胞毒性,在- S<sub>9</sub>mix试验中,其毒性水平与浓度呈正相关,根据Bliss法计算出IC<sub>50</sub>分别为57.84、15.19、70.03和69.02  $\mu$ g/mL,毒性由大到小依次为多西环素、盐酸多西环素杂质C、 $\beta$ -多西环素、美他环素;在+ S<sub>9</sub>mix试验中,根据Bliss法计算出IC<sub>50</sub>分别为

133.65、41.20、144.57和96.29  $\mu$ g/mL,毒性由大到小依次为多西环素、 $\beta$ -多西环素、盐酸多西环素杂质C、美他环素。

**2.5.2 CHL细胞遗传毒性比较** 盐酸多西环素杂质C、多西环素、美他环素、 $\beta$ -多西环素在无和有S<sub>9</sub>mix作用下CHL细胞染色体畸变率均小于5%,未见明显的遗传毒性。

## 2.6 斑马鱼胚胎发育毒性考察

在饲养液中分别添加盐酸多西环素杂质C、多西环素、美他环素、 $\beta$ -多西环素,在标准环境下孵育,持续5 d,逐天观察斑马鱼胚胎发育情况,统计发育第3天的畸形、死亡数占存活胚数的比例,采用Bliss方法计算半数致畸浓度和半数致死浓度。

**2.6.1 致畸性与致死性的比较** 实验结果显示,多西环素和 $\beta$ -多西环素未见明显致畸性,而当畸形率达90%时美他环素与盐酸多西环素杂质C的质量浓度分别为300和180  $\mu$ g/mL,说明盐酸多西环素杂质C致畸性最强。多西环素质量浓度为300  $\mu$ g/mL时胚胎在72 h全部死亡; $\beta$ -多西环素和美他环素质量浓度在300  $\mu$ g/mL时胚胎死亡率较低;盐酸多西环素杂质C在质量浓度约300  $\mu$ g/mL时胚胎死亡率达到100%,因此其致死性由强到弱排序为盐酸多西环素杂质C≥多西环素> $\beta$ -多西环素≈美他环素。

**2.6.2 胚胎异常表型分析** 当盐酸多西环素杂质C和美他环素导致胚胎发育出现异常时,主要表现为头和眼较小,体长变短而弯,腹部膨大等。两种药物导致胚胎畸形类别相似,只是严重程度不同,说明两者毒性机制可能相似。

## 2.7 体外抗菌活性评价

采用纸片扩散法对盐酸多西环素杂质C、多西环素、美他环素、 $\beta$ -多西环素进行抗菌活性定性及半定量研究,同时采用常量肉汤二倍稀释法检测各药物的最低抑菌浓度。实验结果显示:盐酸多西环素杂质C、多西环素、美他环素、 $\beta$ -多西环素对革兰阴性和阳性细菌均有不同程度的抗菌作用,其对大肠杆菌ATCC25922和金黄色葡萄球菌ATCC29213的抑菌浓度范围分别为8~16、2~4、1~2、16~32  $\mu$ g/mL,说明盐酸多西环素杂质C抗菌活性较弱,而美他环素、多西环素抑菌活力与已有报道一致<sup>[8~9]</sup>,其由强到弱依次为:美他环素、多西环素、

盐酸多西环素杂质 C、 $\beta$ -多西环素。

### 3 讨论

#### 3.1 盐酸多西环素杂质 C 制备条件的选择与优化

3.1.1 高效制备液相色谱条件的选择与优化 在对盐酸多西环素杂质 C 进行制备分离时曾分别采用水-乙腈体系、0.1% 乙酸-乙腈体系、《中华人民共和国药典》<sup>[6]</sup> 盐酸多西环素有关物质项下的色谱条件进行等度洗脱,结果发现中国药典条件下,峰形最好,分离度大,但流动相所含有的醋酸铵和乙二胺四醋酸二钠在后续分离纯化过程中不易除去;以 0.1% 乙酸-乙腈体系为流动相时,峰形较好,分离度较大,且乙酸在分离纯化过程中可除去;以水-乙腈体系为流动相时峰形较差,存在严重的拖尾现象,因此本实验选择 0.1% 乙酸-乙腈体系作为流动相,经进一步调整比例优化后确定 0.1% 乙酸-乙腈(83:17)为最优的色谱条件。

3.1.2 pH 的选择 四环素类抗生素在不同的 pH 条件下,降解途径和异构化情况不同,产生的杂质各异。李伟明等<sup>[10]</sup>曾报道四环素类抗生素溶液的 pH 小于 2 或大于 9 时,差向化速度会很小。因此,本实验采用甲酸调节盐酸多西环素杂质 C 旋蒸后溶液的 pH 为 1.8,从而抑制盐酸多西环素杂质 C 向多西环素的转化。

3.1.3 干燥方式的选择 由于盐酸多西环素杂质 C 与多西环素存在动态平衡,高温时会促进盐酸多西环素杂质 C 向多西环素转化,因此本实验选择冷冻干燥方式制备盐酸多西环素杂质 C。

#### 3.2 稳定性考察

将盐酸多西环素杂质 C 贮存在 4 ℃ 条件下,1 年后按《中华人民共和国药典》<sup>[6]</sup> 方法测定其纯度仅为 68.5%。这主要是由于在贮存过程中部分盐酸多西环素杂质 C 转化为多西环素,致使盐酸多西环素杂质 C 纯度下降。因此,需进一步探索研究盐酸多西环素杂质 C 的贮存条件,提高盐酸多西环素杂质 C 的稳定性,延长其保存时间。

#### 3.3 质量标准制定应注意的问题

毒性及体外抗菌活性试验表明,美他环素毒性小、药效强,因此,在质量标准中无需再单独控制;而盐酸多西环素杂质 C 属于毒性大且无效的杂质,需要进行单独控制。在 2014 年国家评价性抽验样品盐酸多西环素片探索性研究过程中发现,90% 检测样品中盐酸多西环素杂质 C 含量均小于 0.5%,而对盐酸多西环素杂质 C 含量大于 0.5% 的样品调查发现,其制粒工艺中水分偏高,成品中的水分也偏高,因此建议盐酸多西环素杂质 C 的控制限度设定为 0.5%,这也可客观地反映盐酸多西环素及其制剂的工艺水平。本研究为制定盐酸多西环素的新质量标准奠定理论基础。

### 参 考 文 献

- [1] Griffin MO, Ceballos G, Villarreal FJ. Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: possible mechanisms of action [J]. *Pharm Res*, 2011, **63**:102-107.
- [2] Soni MP, Mahajan MV, Dhumal RV, et al. Genotoxicity evaluation of asymmetric lipid polymer hybrid nanoparticles of doxycycline hydrochloride following intravenous administration [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2013, **3**(5):421-427.
- [3] Chanta C, Phloenchaiwanit P. Randomized controlled trial of azithromycin versus doxycycline or chloramphenicol for treatment of uncomplicated pediatric scrub typhus [J]. *J Med Assoc Thai*, 2015, **98**(8):756-760.
- [4] Ruan Y, Han Z, Han X. Report: Clinical curative effect of traditional Chinese medicine combined with doxycycline in the treatment of genital *Chlamydia trachomatis* and urea plasma urealyticum infections [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2015, **28**(4 Suppl):1555-1557.
- [5] Wang YS, Zhou LM. Bioterrorism-related anthrax and antimicrobial therapy [J]. *Sichuan J Physiol Sci* (四川生理科学杂志), 2004, **26**(3):119-123.
- [6] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia*: part 2 (中华人民共和国药典:二部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2010:690-692.
- [7] European Pharmacopoeia Commission. *European Pharmacopoeia* 8.0: volume II [S]. France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2014:2110.
- [8] Fisher MW, Hillegas AB, Nazeeri PL. Susceptibility *in vitro* and *in vivo* of *Pseudomonas pseudomallei* to rifampin and tetracyclines [J]. *Appl Microbiol*, 1971, **22**(1):13-16.
- [9] Bryant JE, Brown MP, Gronwall RR, et al. Study of intragastric administration of doxycycline: pharmacokinetics including body fluid, endometrial and minimum inhibitory concentrations [J]. *Equine Veterin J*, 2000, **32**(3):233-238.
- [10] Li WM, Bao YY, Zhou QX. Degradation pathways and main degradation products of tetracycline antibiotics: research progress [J]. *Chin J Applied Ecol* (应用生态学报), 2012, **23**(8):2300-2308.