

微生物浊度法与管碟法测定吉他霉素效价的比较研究

徐 嫒,韩宁宁,于丽娜,戴 青,赵 晖*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2016-07-31 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 11-0031-03 [中图分类号] S859.796

[摘 要] 为比较微生物浊度法和管碟法测定吉他霉素效价,以《中国药典》(2015年版)吉他霉素抗生素微生物检定法浊度法和《中国兽药典》(2010年版)吉他霉素抗生素微生物检定法管碟法为依据测定一批吉他霉素效价。结果显示:浊度法测定效价平均值为 1691 U/mg, *RSD* 为 0.9%;管碟法测定效价平均值为 1687 U/mg, *RSD* 为 1.0%,两种方法测定结果无显著性差异($P>0.05$)。本实验表明,浊度法测定吉他霉素效价与管碟法相比更加快速、便捷,而且可避免吉他霉素多组分的影响因素。

[关键词] 浊度法;管碟法;吉他霉素;效价

Comparison of the Antibiotic Potency of Kitasamycin by Turbidimetric Method and Diffusion Method

XU Yuan, HAN Ning-ning, YU Li-na, DAI Qing, ZHAO Hui*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to compare turbidimetric method with diffusion method for measuring of antibiotic potency of kitasamycin, a bath of kitasamycin potency was measured by turbidimetric method according to quality standards in Chinese Pharmacopoeia 2015 version and diffusion method according to quality standards in Chinese Veterinary Pharmacopoeia 2010 version. Results of potency average were 1691 U/mg by turbidimetric method with *RSD* of

作者简介:徐 嫒,硕士,从事抗生素检验工作。

通讯作者:赵 晖。E-mail:171977364@qq.com

- [5] 付新亮,方 博,王丽芳,等. 一株 H1N1 亚型猪流感病毒的分离鉴定及其遗传进化分析[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(5): 348-352.
- [6] Liu Jin-hua, Bi Yu-hai, Qin Kun, *et al.* Emergence of Europeanavian influenza virus-like H1N1 swine influenza A viruses in China [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(8): 2643-2646.
- [7] Qi X, Cui L, Jiao Y, *et al.* Antigenic and genetic characterization of a European avian-like H1N1 swine influenza virus from a boy in China in 2011[J]. Arch Virol, 2013, 158 (1): 39-53.
- [8] Yang H, Chen Y, Qiao C, *et al.* Prevalence, genetics, and transmissibility in ferrets of Eurasian avian-like H1N1 swine influenza viruses[J]. PNAS, 2016, 113(2): 392-397.
- [9] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, *et al.* Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses [J]. Arch Virol, 2001, 146(12): 2275-2289.
- [10] Moreno A, Di Trani L, Faccini S, *et al.* Novel H1N2 swine influenza reassortant strain in pigs derived from the pandemic H1N1/2009 virus [J]. Vet Microbiol, 2011, 149(3/4): 472-477.

(编辑:李文平)

0.9% and 1687U/mg by diffusion method with *RSD* of 1.0%. There was no significant difference as compared ($P > 0.05$). Results showed that compared with diffusion method, turbidimetric method is not only more rapid and convenient, but also could avoid cross-influence of the ingredients in kitasamycin.

Key words: turbidimetric method; diffusion method; kitasamycin; potency

抗生素微生物效价测定法包括管碟法和浊度法。《中国兽药典》(2010年版)^[1]收载吉他霉素及制剂的效价测定方法仅为管碟法。《中国药典》(2010年版)^[2]已收载吉他霉素效价测定的微生物浊度法。近些年相继有利用浊度法测定吉他霉素和吉他霉素制剂效价的报道^[3-5]。本实验在对吉他霉素原料药含量测定工作中,利用以上两种方法测定吉他霉素含量,并对结果进行了比较。

1 材料

1.1 药品与试剂 吉他霉素标准品,中国食品药品检定研究院(批号 0357-9901),含量:1462 U/mg;吉他霉素样品,生产企业提供(批号 KB-KT-1501003);抗生素检定培养基Ⅱ号[加0.3%葡萄糖(pH8.0,批号 160321)]、抗生素检定培养基Ⅲ号(pH7.0,批号 160329)、灭菌0.9%氯化钠溶液(批号 160321)、灭菌磷酸盐缓冲液(pH7.8,批号 160321)、营养琼脂培养基(批号 160321),北京中海动物保健科技公司;甲醛溶液(批号 1306192),国药集团。

1.2 菌种 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)CMCC(B)63501、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)CMCC(B)26003,中国食品药品检定研究院。

1.3 仪器 WBS-100 微生物比浊法测定仪、WBS-100 比浊仪专用比色皿、ZY-300G 钢管自动放置器,北京先驱威峰技术开发公司;CHB-1 抗生素效价测量仪,北京潮声技术开发公司;HTY-HZ 型培养基专用恒温箱,杭州高得医疗器械有限公司。

2 方法与结果

2.1 菌液制备

2.1.1 浊度法 取新鲜培养的金黄色葡萄球菌营养琼脂斜面(50 mL),用5 mL灭菌0.9%氯化钠溶液冲洗,取1 mL菌液加入5 mL灭菌0.9%氯化钠溶液得到稀释后的菌液,取适量稀释后的菌液加入抗生素检定培养基Ⅲ号,摇匀,制备成含稀释菌液2%的培养液,置于冰箱冷藏备用。

2.1.2 管碟法 取新鲜培养的枯草芽孢杆菌营养琼脂斜面,用5 mL灭菌0.9%氯化钠溶液冲洗斜

面,在65℃恒温30 min,取适量菌液加入抗生素检定培养基Ⅱ号(加0.3%葡萄糖),摇匀,制备成含菌液1.0%的培养液,置于水浴中备用。

2.2 抗生素溶液配制

2.2.1 浊度法 分别取吉他霉素标准品和供试品适量,精密称定,按吉他霉素每2 mg加乙醇1 mL使溶解,用灭菌水定量制成每1 mL中含1000 U的溶液,照《中国药典》(2015年版)^[6]抗生素微生物检定法浊度法,用灭菌磷酸盐缓冲液进一步稀释得标准品和供试品高低剂量分别为2.0 U/mL和1.0 U/mL的待测溶液。

2.2.2 管碟法 分别取吉他霉素标准品和供试品适量,精密称定,按吉他霉素每2 mg加乙醇1 mL使溶解,用灭菌水定量制成每1 mL中含1000 U的溶液,照《中国兽药典》(2010年版)^[1]抗生素微生物检定法管碟法,用灭菌磷酸盐缓冲液进一步稀释得标准品和供试品高低剂量分别为40 U/mL和20 U/mL的待测溶液。

2.3 培养与测定

2.3.1 浊度法 取标准品溶液及供试品溶液各1.0 mL,加入对应的灭菌比色皿中,每管加入9.0 mL培养液,每个浓度的抗生素溶液做4份平行。另取两支比色皿,其中一支加入1.0 mL灭菌磷酸盐缓冲液和9.0 mL培养液,并立即加入0.5 mL甲醛溶液,混匀,作为空白对照;另一支加入1.0 mL灭菌磷酸盐缓冲液和9.0 mL培养液,作为阳性对照。将以上各比色皿置于微生物比浊法测定仪中,于37℃培养,仪器在线于530 nm波长处测定各支比色皿中金黄色葡萄球菌对数生长期不同培养时间点的吸光度值进行可靠性测验及效价计算。

2.3.2 管碟法 取平底双碟10块,分别加入20 mL加热融化的培养基Ⅱ号(加0.3%葡萄糖),置水平台面,均匀摊布,待凝固,作为底层。另取水浴中的培养液,每碟加入5 mL。使在底层摊布均匀,待凝固,作为菌层。培养基冷却后,在双碟中加入不锈钢小管,用陶瓦盖覆盖,静置约15 min;在每碟中对角的2个钢管中,分别滴加高低剂量的标准

品溶液,其余 2 个钢管分别滴加高低剂量的供试品溶液。将双碟置 37 ℃ 温室,加盖陶瓦盖,培养 16 ~ 18 h 后,测量各个抑菌圈直径,进行可靠性测验及效价计算。

2.4 效价测定 利用浊度法与管碟法分别测定,各得到 5 组数据,见表 1。两种方法的测定结果无显著性差异, $t = 0.35$, $t_{0.05,8} = 2.306$, $t < t_{0.05,8}$ ($P > 0.05$)。

表 1 浊度法与管碟法测定吉他霉素效价结果

测定次数	浊度法				管碟法			
	效价/ (U · mg ⁻¹)	可信限 率/%	平均效价/ (U · mg ⁻¹)	RSD/%	效价/ (U · mg ⁻¹)	可信限 率/%	平均效价/ (U · mg ⁻¹)	RSD/%
1	1676	3.6			1666	2.5		
2	1699	1.4			1694	3.2		
3	1691	1.3	1691	0.9	1684	2.7	1687	1.0
4	1711	3.3			1680	2.0		
5	1677	1.1			1712	3.4		

3 讨 论

试验结果表明,采用浊度法与管碟法测定吉他霉素原料药含量,可信限率均在 5% 以内。在抗生素生物效价测定方法中,微生物管碟法是传统测定方法,该方法操作较为复杂,影响因素较多,且耗时长,通常培养 16 ~ 18 h 后测定结果;浊度法较前者,操作简单,影响因素少,用时短,培养时间在 3 ~ 4 h,并且测定结果精密度较高。因吉他霉素的多组分性质,在管碟法测定中易出现抑菌圈边缘模糊和抑菌圈双圈现象,从而导致测定结果的可信限率和重现性不理想,浊度法通过抗生素在液体培养基中对试验菌生长的抑制作用,测定细菌浊度值的大小,通过比较标准品与供试品对试验菌生长的一致程度,以测定效价值,从而克服管碟法测定吉他霉素易出现的问题。本实验采用两种方法测定吉他霉素效价并进行比较,结果无显著差异。因此认为,

兽药检验机构和生产企业应用浊度法测定吉他霉素效价会更加快速、便捷,提高工作效率。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. 2010 年版. 一部. 北京:中国农业出版社,2011:71-72,附录 121-128.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2010 年版. 二部. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 93.

[3] 高艳霞,姜建国,韩 彬. 吉他霉素制剂的浊度法考察评价[J]. 中国药事,2009,23(9):872-871.

[4] 冯向东,高光伟. 浊度法测定吉他霉素的效价[J]. 西北药学杂志,2008,23(5):270-271.

[5] 霍天凤. 微生物浊度法测定吉他霉素片的效价[J]. 中外医疗,2012,12:117-118.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2015 年版. 四部. 北京:中国医药科技出版社,2015:160-165.

(编辑:李文平)