

微生物浊度法测定硫酸新霉素效价方法探讨

江 勋,彭婷婷

(衡阳市食品药品检验检测中心,湖南 衡阳 421001)

摘 要: **目的** 建立浊度法测定硫酸新霉素效价含量的方法并验证方法的可行性。 **方法** 建立浊度法测定硫酸新霉素效价含量的方法,以金黄色葡萄球菌(CMCC(B)26003)为试验菌株,选取硫酸新霉素溶液0.40、0.60 U/mL两个剂量浓度(剂间比1:1.5),以抗生素检定培养基Ⅲ培养2~4 h,使用WBS-100微生物比浊法测定仪(测定波长530 nm)测定吸光度进行计算,并与管碟法测定结果相比较。 **结果** 硫酸新霉素溶液浓度在0.10~1.00 U/mL的范围内,浓度与吸光度呈较好的线性关系,符合技术要求。回收率为100.17%,精密度试验浊度法的RSD为0.22%($n=6$),优于管碟法的RSD 1.28%($n=6$)。 **结论** 浊度法操作简便、灵敏、准确、重现性好、可信限率低,可应用于硫酸新霉素效价含量测定。

关键词: 硫酸新霉素; 效价含量测定; 浊度法; 管碟法

中图分类号: R917

文献标识码: A

硫酸新霉素(Neomycin Sulfate),为新霉素的硫酸盐,易溶于水,属氨基糖苷类抗生素,为广谱抗生素,对大肠埃希菌、葡萄球菌属(甲氧西林敏感株)、棒状杆菌属、克雷伯菌属、变形杆菌属等肠杆菌科细菌有良好抗菌作用,目前市面所售产品主要为新霉素B和新霉素C的混合物。新霉素全身用药具有显著的肾毒性和耳毒性,因此目前仅限于口服或局部应用,主要应用于结肠手术前准备及肝昏迷时辅助治疗等。

抗生素微生物检定法是以抗生素的抗菌效能作为衡量其含量的方法,可直观地反映其抗菌活性,显示其临床特点^[1]。目前国内主要采用管碟法测定抗生素效价,其具有直观、准确、重复性好等优点,而被广泛采用,但整个实验耗时较长,影响结果的因素较多,其中任何一个环节操作不当就会造成很大误差,导致整组试验失败。而在国际上,抗生素效价测定方法则以管碟法和浊度法并用。相比管碟法而言,浊度法具有耗时短、操作简便、灵敏度高、人为影响因素少、测定结果准确度与精密度高等优点^[2]。2010年版《中国药典》中抗生素微生物检定法收录了35个品种测定的管碟法和22个品种测定的浊度法,对新霉素浊度法的测定效价浓度范围标注为0.92~1.50 U/mL,但并未确定具体的剂间比^[3]。本文采用浊度法测定硫酸新霉素的效价,使用0.40、0.60 U/mL浓度的二剂量法(剂间比1:1.5),

以拉丁方阵排列,实行全自动化培养操作,进行效价测定,并与传统的管碟法进行比较,以期建立一种简单、可信的硫酸新霉素效价测定方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料 金黄色葡萄球菌(CMCC(B)26003)、硫酸新霉素标准品(130309-200811,效价645 U/mg),均由中国药品生物制品检定所提供;抗生素检定培养基Ⅱ、培养基Ⅲ(由广东环凯生物科技股份有限公司提供)、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾。

1.2 仪器 WBS-100微生物比浊法测定仪(测定波长530 nm)、ZY-300IV多功能微生物抑菌圈测量仪,由北京先驱威锋技术开发公司提供;Mettler AE240电子分析天平;高压灭菌锅、恒温干燥箱。

1.3 浊度法实验方法

1.3.1 金黄色葡萄球菌菌悬液的制备 取金黄色葡萄球菌的营养肉汤培养物,接种于营养琼脂斜面上,在35~37℃培养20~22 h。临用时,用0.9%灭菌氯化钠溶液将菌苔洗下,制成金黄色葡萄球菌菌悬液,备用^[3]。

1.3.2 Ⅲ号培养基的制备 按照培养基的标示称取并加适量的水进行配制(pH 7.0~7.2),灭菌。

1.3.3 pH 7.8 磷酸盐缓冲液的制备 取磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) 5.59 g,磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 0.41 g,溶于1 000 mL水,灭菌,即得。

1.3.4 抗生素溶液的配制 精密称取标准品适量,加灭菌水制成浓度为 1 000 U/mL 的溶液,用 pH 7.8 的磷酸盐缓冲液分别稀释到 0.40、0.60 U/mL。(本实验选择剂间比为 1:1.5,抗生素最终浓度为 0.40、0.60 U/mL,该浓度可以根据培养结束后其吸收度大小在线性实验的范围内进行适当调整。)

1.3.5 抗生素溶液的分装 取高温灭菌的石英比色管 16 支,分配 dS1、dS2、dT1 及 dT2 各 4 支,分别作好标记,按照拉丁方阵顺序排列。将标准品溶液 dS1、dS2 及供试品溶液 dT1、dT2 各 1.00 mL 按编号加到相应的比色皿中,加入溶液时,均应在比色管的标记处沿管壁加入,以便培养基将沾在管壁上的抗生素溶液冲入管内。

1.3.6 预实验 接种试验菌量的确定需作预试验,取 2.1 的菌悬液适量进行纯菌培养(不加抗生素,仅加培养基),使培养后(37 ℃,一般 2~4 h)吸收度 A 在 0.3~0.7 之间。

1.3.7 培养基的分装 将浊度法试验用的培养基,在接种试验菌后以每管 9.00 mL 加抗生素溶液的标记处稍上方移入比色管中,沿管壁流入,并立即振荡,使抗生素溶液与培养基均匀混合。

1.3.8 培养 使用 WBS-100 微生物比浊法测定仪在 37 ℃ 培养 2~4 h。

1.3.9 测量与计算 使用 WBS-100 微生物比浊法测定仪选择波长 530 nm 进行在线快速测量(每 10 min 测量一次),并生成实时实验报告。

表 1 标准品溶液浓度及吸光度值

指标	0.10(U/mL)	0.20(U/mL)	0.30(U/mL)	0.40(U/mL)	0.50(U/mL)	0.60(U/mL)	0.80(U/mL)	1.00(U/mL)
lgC	-1.0000	-0.69897	-0.52288	-0.39794	-0.30103	-0.22185	-0.09691	0.00000
吸光度/A	0.9012	0.7524	0.6329	0.5511	0.4769	0.4169	0.3512	0.2801

2.2 回收率试验(自身对照法) 选择 90%、100%、110% 三个浓度点进行回收率实验。

标准品溶液的制备:取 1 000 U/mL 的标准品溶液 5.00 mL 置于 50 mL 容量瓶中,加入 pH 7.8 的磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,即得 100 U/mL 的溶液。分别取 100 U/mL 的溶液 0.40 mL、0.60 mL 置于 100 mL 容量瓶中,用 pH 7.8 的磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,即得 0.40、0.60 U/mL 的标准品溶液,作为浊度法实验用标准品溶液。

90% 处样品溶液的制备:取 1 000 U/mL 的标准

2 结 果

2.1 线性及其范围实验 精密称取标准品适量,加灭菌水制成 1 000 U/mL 的溶液后用 pH 7.8 的磷酸盐缓冲液稀释到表 1 中相应的浓度,按照浊度法操作在 0.10~1.00 U/mL 内进行线性及范围实验,结果见图 1、表 1。结果分析:相关系数 $R^2 = 0.9955$,说明在标准品溶液浓度(C)在 0.10~1.00 U/mL 的浓度范围内,培养一定时间(一般为 2~3 h)后,所测得的培养皿的吸光度 A 与 lgC 线性关系良好^[4]。其中,0.40、0.60 U/mL 浓度的标准品溶液吸光度分别为 0.551 1、0.416 9(应在 0.3~0.7 之间)。

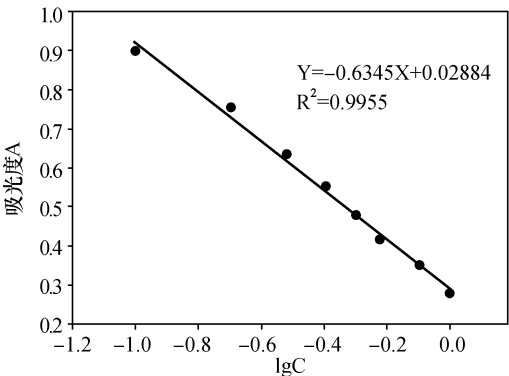


图 1 标准品溶液接种菌种后浓度的对数值(lgC)与吸光度(A)的线性关系

品溶液 4.50 mL 置于 50 mL 容量瓶中,加 pH 7.8 的磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,即得 90 U/mL 的溶液;分别取 90 U/mL 的溶液 0.40 mL、0.60 mL 置于 100 mL 容量瓶中,加 pH 7.8 的磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,即得 0.36、0.54 U/mL 的样品溶液,作为浊度法实验用 90% 点处的样品溶液备用。

100% 处样品溶液的制备:同标准品溶液的制备。

110% 处样品溶液的制备:取 1 000 U/mL 的标准品溶液 5.50 mL 置于 50 mL 容量瓶中,加入 pH 7.8

的磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,即得 110 U/mL 的溶液;分别取 110 U/mL 的溶液 0.40 mL、0.60 mL 置于 100 mL 容量瓶中,加入 pH 7.8 的磷酸盐缓冲液稀

释至刻度,摇匀,即得 0.44、0.66 U/mL 的样品溶液,作为浊度法实验用 110% 点处的样品溶液备用。
按照浊度法操作过程进行实验,结果见表 2。

表 2 硫酸新霉素标准品溶液回收率测定(以高剂量抗生素溶液进行计算)

浓度点	理论浓度(U/mL)	测得量(U/mL)	回收率(%)	平均回收率(%)	偏离平行	平均可信限
90%	0.54	0.5439	100.72	100.23	合格	1.33
		0.5378	99.59		合格	1.97
		0.5421	100.39		合格	2.53
		0.6044	100.73		合格	1.73
100%	0.60	0.6011	100.18	100.24	合格	2.61
		0.5988	99.80		合格	2.25
		0.6611	100.17		合格	2.35
		0.6579	99.68		合格	2.54
110%	0.66	0.6598	99.97	99.94	合格	2.50
平均	—	—	100.17	—	2.20	

实验结果:三点的总平均回收率为 100.17%

2.3 浊度法精密度实验 取 2.2 标准品溶液为自身对照用浊度法进行精密度实验,共测定 6 次,测得结果分别为 644.09、647.03、646.31、647.46、646.49、648.22 u/mg,为标示量的 99.86%、100.31%、100.20%、100.38%、100.23%、100.50%。平均结果为 646.32 u/mg,为标示量的 100.20%。6 次测量结果的 RSD 为 0.22%,6 次测量结果的可信限率分别为 2.31%、1.97%、2.21%、1.95%、3.10%、1.61%,平均为 2.19%。

2.4 管碟法精密度实验 分别取 2.2 中 100 U/mL 的标准品溶液 4.00 mL、8.00 mL 于 50 mL 容量瓶中,加入 pH 7.8 的磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,即得 8.0、16.0 U/mL(剂间比 1:2)的标准品溶液,以自身对照用管碟法进行精密度实验^[3],使用抗生素检定培养基Ⅱ于 37℃培养 15 h,共测定 6 次,测得结果分别为 642.10、655.64、641.32、642.51、633.39、633.07 u/mg,为标示量的 99.55%、101.65%、99.43%、99.61%、98.20%、98.15%。平均结果为 641.34 u/mg,为标示量的 99.43%。6 次测量结果的 RSD 为 1.28%,6 次测量结果的可信限率分别为 3.35%、2.64%、2.79%、2.88%、3.54%、3.10%,平均为 3.05%。

3 讨 论

本文采用浊度法测定硫酸新霉素的实验浓度剂间比为 1:1.5,在该浓度下实验灵敏度高,结果稳定。其线性实验结果表明,硫酸新霉素溶液浓度在

0.10~1.00 U/mL 的范围内,浓度与吸收度呈较好的线性关系($R^2=0.9955$),故应在此浓度范围之内选定适宜的高低剂量。实验选取了 0.40、0.60 U/mL 两个剂量浓度,并选择 90%、100%、110% 三个浓度点进行回收率实验,平均回收率为 100.17%,精密度试验浊度法的 RSD 为 0.22%,优于管碟法的 RSD 1.28%。

以上结果表明:使用浊度法测定硫酸新霉素效价具有操作快捷简便、高灵敏度、结果准确、重现性好、人为影响因素较少、可信限率较低等优势。整个实验一般培养 2~4 h 即可得出结果,其所采用的 WBS-100 微生物比浊法测定仪具有全程恒温控制、自动振摇及定时测量、数据集成处理等一系列自动化操作系统,相比于管碟法而言,不仅缩短了实验周期,而且提高了实验效率和实验结果的可靠性,因此可应用于硫酸新霉素效价测定和制药企业产品质量控制等。

参考文献:

[1] 席志芳,袁红梅,党全训,等. 抗生素微生物检定法—比浊法测定红霉素含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(11):1865-1868.
[2] 王金龙,高燕霞,刘云,等. 浊度法测定四环素的效价[J]. 药物分析杂志,2007,27(12):1998-1990.
[3] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010年:附录 93-98.
[4] 周志敏,陈少萍. 比浊法测定氯霉素效价的研究[J]. 临床合理用药,2010,8[16]:63-64.

(本文编辑:蒋湘莲)