

四环素属抗菌素的微生物管碟测定法

王紹文 吳銓 鄭昌亮

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

四环素属抗菌素在生产或保存过程中常易形成异构物或脱水物,如异构金霉素,异构四环素,脱水四环素以及脱水异构四环素等。由于其性状与原抗菌素很类似而不易除去。这些脱水或异构物的抗菌活性均很低或接近零而其紫外綫吸收曲綫以及化学特性均与活性物质很近似^[1-3],因此用理化方法测定发酵液、半成品及成品的效价时,就难以代表抗菌物质的含量。为此在原理上应采用微生物测定法。抗菌素微生物效价测定普遍采用的常规方法为管碟法,但四环素的效价测定有些国家药典规定用比浊法,此法需用精密的光电比色計,否則結果不灵敏。为了探求四环素属抗菌素能否以管碟法测定,故进行考察。

試驗材料与与方法

玻璃双碟: 直径 90 毫米;深 15 毫米。

不銹鋼小管: 外径 8 ± 0.1 毫米;內径 6 ± 0.1 毫米;高 10 ± 0.1 毫米。

培养基:

甲种培养基(制备菌液用)

成分(i): 胰 5 克;酵母浸提粉(或倍量酵母膏) 1.5 克;肉膏 1.5 克;氯化鈉 3.5 克;葡萄糖 1 克;磷酸二氢鉀 3.68 克;磷酸二氢鉀 1.32 克;蒸餾水加至 1,000 毫升; pH 灭菌后为 7.0。

成分(ii): 胰 10 克;氯化鈉 5 克;肉浸液 1,000 毫升; pH 灭菌后为 7.0—7.2。

乙种培养基(为摊布双碟之菌层及底层用): 胰 6 克; 酵母浸提粉(或倍量之酵母膏) 3 克; 肉膏 1.5 克; 葡萄糖 1 克; 琼脂 15—18 克; 蒸餾水加至 1,000 毫升; pH 灭菌后为 6.5—6.6。

菌液之制备: 用普通琼脂斜面保存八选球菌(中检 28001)或腊样芽孢杆菌(中检 63509),每周接种一次。应用八选球菌时,于使用前一日,用甲种培养基 3 毫升洗下斜面上之細菌,种入盛有 300 毫升普通琼脂培养基之罗氏瓶內,在 26°C 培养 24 小时,用 20 毫升甲种培养基将菌洗下备用。应用腊样芽孢杆菌时,于使用前一星期,接种于罗氏瓶內,在 37°C 培养 7 日,以灭菌蒸餾水将芽孢洗下,于 65°C 加热 30 分钟,用灭菌蒸餾水将芽孢洗涤至少三次,再加热至 65°C 30 分钟。

玻璃双碟之准备: 每碟量入加热融化之乙种培养基 21 毫升(用腊样芽孢杆菌作試驗菌时則用 10 毫升),放置于水平玻板台面,令其凝固;另取盛有乙种培养基 100—150 毫升之三角瓶一个,加热使融化后冷却至 48°C (用腊样芽孢杆菌时可在 55 — 60°C 間),加入定量菌液,摻匀后于已加培养基之双碟中,各加 4 毫升令均匀摊布,再于水平玻板台面上使其凝固。

緩冲液: 用八选球菌作試驗菌时样品用 pH 6, 1% 磷酸緩冲液稀释,以腊样芽孢杆菌作試驗菌时用 pH 4.5, 1.36% 磷酸緩冲液。

試驗結果

(一) 試驗条件的控制与选择

1. 抑菌圈大小与边缘清晰度之控制: 抑菌圈大小与边缘清晰度受多种条件之影响^[9], 在固定温度(37°C)及上述培养基, 缓冲液及菌种之条件下, 控制菌层中菌液渗入量及不銹鋼小管中抗菌素量即能得到清晰而边缘整齐約 15—18 毫米之抑菌圈。用八选球菌作試驗菌时金霉素可用 10 单位/毫升左右之浓度; 四环素与土霉素用 20 单位/毫升左右之浓度;

以腊样芽孢杆菌作試驗菌时, 金霉素可用 0.5 单位/毫升左右之浓度; 四环素与土霉素用 1.0 单位/毫升左右之浓度。

2. 小管中滴加抗菌素的时间差别及容积差别对抑菌圈直径的影响: 在各不銹鋼小管中滴加抗菌素溶液的时间差别及加于各不銹鋼小管中溶液之容积差别对于土霉素抑菌圈直径的影响见图 1 及图 2。

图 1 中加液时间与抑菌圈直径呈直线关系, 从计算出的方程式得知, 不銹鋼管中加样时间差如达 10 分钟, 则抑菌圈差别为 0.144 毫米, 折合效价約差 5%。

由图 2 知, 加液量的对数值与抑菌圈直径呈直线关系。小管中金霉素容量每增一倍时抑菌圈直径增 1.55 毫米, 折合效价則增加 70%。土霉素容量每增加一倍时抑菌圈直径增加 1.65 毫米, 折合效价則增加 75%。

3. 抗菌素浓度与抑菌圈直径之关系: 将抗菌素稀释成不同的浓度, 每碟安置不銹鋼小管六枚, 三枚中装参考浓度 (同抑菌圈控制时的浓度), 另外三枚空閑着, 使空閑管与装液管互相間隔。以三个碟为一組, 于每組之九个空閑管中各装入一种稀释度之抗菌素, 在 37°C 培养 16—18 小时 (用腊样芽孢杆菌作試驗菌时, 只培养 6—7 小时), 量取抑菌圈直径, 将每組三碟之参考浓度的抑菌圈直径及其他稀释液抑菌圈直径各求得平均值, 再将所有参考

浓度抑菌圈之直径求得参考浓度总平均值, 用各組参考浓度平均抑菌圈直径与参考浓度抑菌圈直径总平均值之差, 校正每組非参考浓度之抑菌圈。用此校正值与浓度的对数画成曲线, 得知用八选球菌作試驗菌时, 金霉素 4 单位/毫升至 29 单位/毫升之間, 其浓度的对

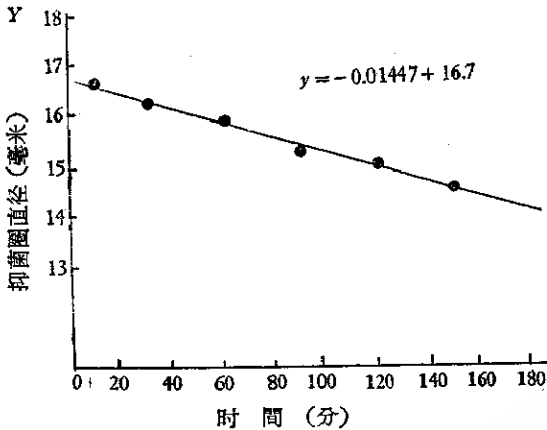


图 1 小管中加液时间与抑菌圈直径之关系 (土霉素 10r/毫升)

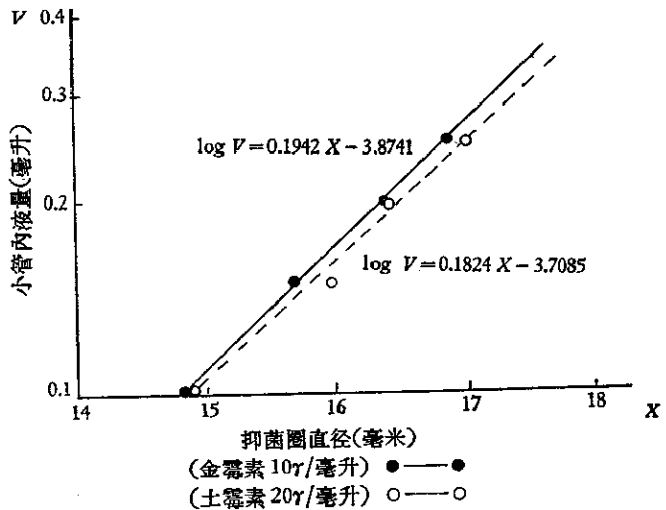


图 2 小管内液量与抑菌圈直径之关系

数与抑菌圈直径成直线关系；土霉素在 8 至 30 单位/毫升，四环素在 10 至 32 单位/毫升之間，其浓度的对数与抑菌圈直径成直线关系。用腊样芽孢杆菌作試驗菌时，金霉素在 0.2 至 1 单位/毫升之間，土霉素在 0.4 至 2.7 单位/毫升之間，其浓度的对数与抑菌圈直径成直线关系。即当抗菌素浓度为 C ，抑菌圈直径为 x ，斜率为 α ，截距为 b ；则：

$$\log C = \alpha x + b$$

几年来，由不同的試驗者用不同批的培养基和不同质量的抗菌素作了 18 条直线。各线的斜率见表 1。

表 1 四环素属直线斜率的比较

試 驗 菌 \ 抗 菌 素	金霉素直线斜率	土霉素直线斜率	四环素直线斜率
八 选 球 菌	0.1610	0.1544	0.1228
	0.1576	0.1552	0.1214
	0.1400	0.1433	0.1209
	0.1513	0.1477	0.1420
	0.1394		
平 均	0.1499	0.1494	0.1271
腊 样 芽 孢 杆 菌	0.2135	0.1691	
	0.2150	0.1636	
	0.2150		
平 均	0.2145	0.1669	

由表 1 的结果可知，每一个品种四环素对于一种試驗菌，在几年內不同次测定所得的斜率变化不大。但值得注意的是，各直线之截距相差很大，同一浓度的抗菌素所致的抑菌圈直径差别很大，例如金霉素 10 单位/毫升之抑菌圈直径由 16.2 到 19.7 毫米，土霉素 20 单位/毫升之抑菌圈直径由 15.7 到 18.0 毫米，四环素 20 单位/毫升之抑菌圈直径由 14.2 到 17.2 毫米，折合抗菌素浓度竟有数倍之差，故以抑菌圈直径的绝对值表示抗菌素的效价是不可靠的。

用腊样芽孢杆菌作試驗菌时，四环素属抗菌素之斜率較以八选球菌作試驗菌时为大，即以前者作試驗菌时，抗菌素浓度的差别对抑菌圈直径影响較小，精密度較低。但腊样芽孢杆菌对四环素属抗菌素的敏感度則比八选球菌高約 20 倍，用于测定抗菌素含量較低的发酵液或純度較低的样品时，显然較为有利。同时用腊样芽孢杆菌为試驗菌可在 6—7 小时得到测定结果，不必无菌操作。

(二) 相对效价测定的設計

由于四环素属抗菌素与上述二种試驗菌之关系在一定范围内为一直线，因此可以二剂量法或三剂量法等平行线法来設計相对效价的测定^[9]。由于每一品种在不同時間所作直线的平行度非常接近，因此又可設計标准直线法测定效价。

1. 标准直线法测定效价：用八选球菌作試驗菌制备金霉素标准直线时，标准品用 pH6 的缓冲液稀释至每毫升含 4—30 单位的各种浓度；制备四环素或土霉素标准直线时，可用每毫升含 8—36 单位的各种浓度。用腊样芽孢杆菌作試驗菌时，金霉素可用 pH 4.5 的緩

冲液稀释至每毫升含 0.2—1 单位的各种浓度。四环素及土霉素可用每毫升含 0.6—2.0 单位的各种浓度。

以八选球菌作试验菌时,金霉素样品可用 pH 6.0 的缓冲液稀释至每毫升约含 10 单位的溶液。如样品为四环素碱或土霉素碱则先用 0.1N 盐酸适量溶解,再用 pH 6 的缓冲液稀释至每毫升约含 20 单位的溶液。以腊样芽孢杆菌为试验菌时,金霉素样品可用 pH 4.5 的缓冲液稀释至每毫升约含 0.5 单位,如样品为四环素或土霉素,则用 pH 4.5 的缓冲液稀释至每毫升约含 1 单位的溶液。

2. 平行线法:以八选球菌作试验菌时,用 pH 6.0 的缓冲液稀释成每毫升含 8、10 及 12.5 单位的溶液。四环素及土霉素则相应稀释成每毫升含 16、20 及 25 单位的溶液。每一样品用九副双碟。

用八选球菌作试验菌以三剂量法测定同一批金霉素 11 次,测定二批四环素共 7 次及测定土霉素 8 批共 10 次,测得的效价按 Kirshbaum 等^[10]的方法计算,每次测定的误差结果平均可信限率为 $p = 0.95$,见表 2—4。

表 2 一批金霉素之样品用八选球菌三剂量法测定的结果

测定次号	效价结果 (%)	误差变数	真 实 性				可信限率 ($P = 0.95$)	
			ab	aq	q	F	下 限 (%)	上 限 (%)
1	99.63	0.06215	0.06673	0.00835	0.070023	0.7782	94.28	106.04
2	98.10	0.13781	1.9805	0.0975	0.011574	2.2278	94.92	109.48
3	99.53	0.01225	0.004	0.033	0.00037	1.13	98.36	102.28
4	100.44	0.06871	0.09	0.0231	0.01564	0.5237	95.19	105.04
5	101.60	0.0648	0.011025	0.1481	0.001875	0.8281	95.19	105.03
6	100.34	0.1215	0.01172	0.0168	0.1302	0.40	96.51	106.02
7	102.20	0.50485	0.095	0.2045	0.0408	0.2242	89.14	112.68
8	103.0	0.056	0.1225	0.1267	0.095	2.0489	91.10	110.21
9	104.10	0.1032	0.0544	0.0156	0.00926	0.256	93.70	106.98
10	103.48	0.0615	0.1	0.3912	0.00935	2.713	96.28	103.88
11	103.34	0.1477	0.3905	0.01302	0.003912	0.919	94.64	105.77
平			均				94.48	106.67

表 3 四环素样品用八选球菌三剂量法测定的结果 (2 批样品)

测定次号	效价结果 (%)	误差变数	真 实 性				可信限率 ($P = 0.95$)	
			ab	aq	q	F	下 限 (%)	上 限 (%)
1	102.61	0.0404	0.0025	0.0003	0.0092	0.09	96.53	104.67
2	103.68	0.0159	0.0025	0.0408	0	0.907	97.39	102.72
3	106.25	0.4225	0.1284	0.006689	0.1284	1.12	97.99	112.56
4	102.03	0.3855	0.3906	0.0317	0.0978	0.45	91.91	109.03
5	102.06	0.0425	0.147	0.0033	0.1408	2.28	104.73	111.86
6	100.51	0.699	0.0006	0.0316	0.0352	0.033	95.60	104.65
7	100.01	1.387	0.332	0.0008	0.1408	0.11	94.48	106.18
平			均				96.95	107.38

表 4 土霉素样品用八选球菌三剂量法测定的结果 (8 批样品)

测定次数	效价结果 (%)	误差变数	真 实 性				可信限率($P = 0.95$)	
			ab	aq	q	F	下 限 (%)	上 限 (%)
1	86.31	0.0678	0.4556	0.000578	0.003912	2.262	94.96	104.81
2	84.79	0.14	0.321	0.10704	0.00925	1.041	92.61	106.85
3	100.70	0.0128	0.0028	0.000533	0.00926	0.984	98.31	101.88
4	100.90	0.02425	0.0625	0.00148	0.0408	1.44	97.41	102.73
5	98.35	0.0556	0.0136	0.08898	0.062592	0.9902	95.68	104.52
6	101.00	0.03275	0.03674	0.01947	0.0389	0.9779	95.05	105.54
7	98.30	0.162	0.000069	0.000023	0.02835	0.3612	92.17	107.83
8	98.70	0.1285	0.0034	0.0161	0.0028	0.67	93.15	107.09
9	100.00	0.0137	0.002778	0.009259	0.02835	1.218	98.13	102.30
10	100.61	0.01441	0.0002778	0.004537	0.10083	2.444	97.80	102.38
平			均				95.53	104.59

同批样品連續测定多次，按英国药典 1958 年版附录误差的直接计算法计算。土霉素、金霉素及四环素结果平均可信限率($p = 0.95$)见表 5。

表 5 同批样品連續测定多次的可信限率

抗 菌 素	测定次数	测定平均效价	S^2	可信限率($P = 0.95$)	
				下 限	上 限
金 霉 素	11	1.0143	0.00381733	94.34	102.81
四 环 素	18	0.9639	0.00013972	101.05	106.44
土 霉 素	8	1.0091	0.00012325	96.52	101.67

3. 区别测定和影响测定的一些因素:

(1) 含有金霉素之四环素效价测定: 四环素及金霉素均有抑菌作用, 当四环素中含有金霉素时, 测得结果不能代表四环素的效价。

将四环素标准品溶液制成每 1 毫升含 1000 单位的溶液, 分别加金霉素 50 及 100 单位于 0.25N 氢氧化钠中 (每毫升 0.25N 氢氧化钠溶液中含四环素 100 单位), 于 37°C 灭活 20 分钟后以盐酸中和, 以不加金霉素并經同法处理的四环素标准品溶液作为测定的标准, 结果如表 6。

表 6 四环素中含有金霉素时管碟法测出结果

1000 单位中含金霉素量(单位)	先用 NaOH 灭活(为应有效价的%)	不用 NaOH 灭活(为四环素效价的%)
50	99	109
100	99	120

由上表说明, 四环素中如含有金霉素时, 需要先用适量氢氧化钠灭活, 结果方能代表四环素效价, 否则效价将偏高。测定时, 可将样品先制成每毫升 1000 单位的溶液, 准确吸取 2 毫升放入 100 毫升干燥容量瓶内加蒸馏水 13 毫升, 混匀后加入 1N 氢氧化钠 5 毫升, 再混匀后于 37°C 温箱中放置 20 分钟, 取出加 1N 盐酸 5 毫升, 用 pH6 缓冲液稀释

至刻度作为每毫升约含 20 单位的溶液,标准品亦按同法处理,以八迭球菌作试验菌,用上述的管碟法进行测定。

(2) 四环素中含有维生素 C 时管碟法测定: 四环素制剂中常加入维生素 C, 这种制剂常使管碟法测得结果偏低, 一定四环素中含不同量维生素 C: 1:0.5、1:1、1:2、1:4, 管碟法测定结果分别为应有效价的 96%、92%、89%、81%, 因此在测定含维生素 C 的四环素制剂时, 所用的标准品溶液中应加入同等比例的维生素 C, 即可抵消这种误差。

(3) 四环素异构体对效价测定的影响: 四环素异构体的抗菌作用甚微, 或完全无生物活性^[4], 但有的异构体如 4-叉向四环素 (4, epi-tetracycline 或称 quatrimycin) 在水溶液中放置后会变成四环素, 为了探求某些异构体对四环素的测定的影响, 根据文献方法制得 4-叉向四环素, 脱水 4-叉向四环素和脱水四环素, 用管碟法测定其抗菌活性, 结果每毫克的抗菌效价分别相当于四环素 93.3, 14.5 和 15.2 单位。由于抗菌活性很低故认为不致影响四环素活性测定的准确性。

(4) 土霉素的溶解程度对于效价测定的影响: 检品为土霉素碱时, 一般需先用少量酸溶解, 不同批的土霉素碱因生产工艺不同, 溶解度上存在差别, 有的制品含有蛋白质, 加酸量少时有极细小胶体颗粒出现, 虽进一步加 pH 6.0 缓冲液稀释至每毫升 20 单位, 测出效价有偏低现象, 适当增加溶解时的酸用量则可使测得效价相应提高, 不同批土霉素碱各按每 5 毫克、10 毫克加 0.1N 盐酸 1 毫升溶解, 测得的效价见表 7。

表 7 不同批土霉素碱用不同量盐酸溶解测得效价结果

样品编号	每 5 毫克加 0.1N 盐酸 1 毫升 (单位/毫克)	每 10 毫克加 0.1N 盐酸 1 毫升 (单位/毫克)	差 数
1	900	877	-23
2	880	839	-41
3	893	887	-6
4	890	863	-27
5	898	877	-21
6	880	853	-27
7	893	877	-16
8	887	850	-37
9	913	883	-30
10	883	860	-23
11	898	839	-59
12	883	860	-23
13	893	869	-24
14	898	848	-50

因此在测定土霉素碱时, 一般按每 5 毫克加 0.1N 盐酸 1 毫升使之完全溶解, 再按前述管碟法测定为宜。

摘 要

四环素属抗菌素在生产或保存过程中常易形成效价很低的异构物或脱水物, 由于其性状与原来抗菌素很类似, 用理化方法测出的效价, 其真实性差, 故须用生物效价法。但

四环素属抗菌素的管碟效力测定,文献很少记载,因此采用八迭球菌及腊样芽孢杆菌做为试验菌探讨。用八迭球菌作试验菌时,用金霉素 10 单位/毫升上下的浓度,可以出现适用的抑菌圈。土霉素、四环素可用 20 单位/毫升左右之浓度。以腊样芽孢杆菌作试验菌时,金霉素可用浓度为 0.5 单位/毫升左右;土霉素与四环素为 1.0 单位/毫升左右,试验证明(1)在不锈钢管中,加液时间(T)与抑菌圈直径(y)之间符合下列直线方程式:

$$y = \alpha T + b$$

(2) 不锈钢管内加液量为 V , 抑菌圈直径为 x , 则

$$\log V = \alpha x + b$$

其中 α 代表斜率, b 代表截距。

(3) 一定范围内四环素、土霉素、金霉素的浓度(c)与抑菌圈直径(x)的关系均为:

$$\log c = \alpha x + b$$

这些直线关系在不同试验者、不同次、不同培养基批号、不同的抗菌素制品的情况下,金霉素、土霉素和四环素所作的相应直线之间相隔几年仍相互接近平行,但各次所得直线截距相差很大,折合抗菌素浓度竟有差数倍者。

以腊样芽孢杆菌作试验菌时,四环素属抗菌素之斜率较以八迭球菌作试验菌种时为大,但腊样芽孢杆菌对四环素属抗菌素的敏感度则大于八迭球菌约 20 倍。

根据上述的探讨,设计了标准直线法和平行线法进行相对效价的测定,用于土霉素测定 18 次,金霉素测定 11 次,四环素测定 25 次,一般可信限率 ($p = 0.95$) 在 $\pm 5\%$ 以内。

本文对特殊样品的测定也进行了探讨,如四环素中含有金霉素时的效价测定;混有维生素丙的样品的测定;有四环素异构物时的测定;有胶状物质存在的土霉素样品的测定及杂质多的样品的测定等。

参 考 文 献

- [1] Doershuck, A. P., Bitler, B. A. and McCormick, J. R. D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**:4687, 1955.
- [2] McCormick, J. R. D., Fox, S. M., Smith, L. A., Bitler, B. A., Reichenthal, J., Origoni, V. E., Muller, W. A., Winterbottom, R. and Doershuck, A. P.: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**:3547, 1956.
- [3] Stephens, C. R., Conover, L. H., Gordon, P. N., Pennington, F. C., Wagner, R. L., Brunings, K. J. and Pilgrim, F. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**:1515, 1956.
- [4] Kaplan, M. A., Granatek, A. P. and Buckwalter, F. H.: *Antibiotics and Chemotherapy*, **7**:569, 1957.
- [5] McCormick, J. R. D., Fox, S. M., Smith, L. L., Bitler, B. A., Reichenthal, J., Origoni, V. E., Muller, W. H., Winterbottom, M. R. and Doershuck, A. P.: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**:2849, 1957.
- [6] Kaplan, M. A. and Buckwalter, F. H.: *Antibiotics Annual*, 507, 1957—1958.
- [7] Stephens, C. R., Conover, L. H., Pasternack, R., Hochstein, F. A., Moreland, W. T., Regna, P. P., Pilgrim, F. J., Brunings, K. J. and Woodward, R. B.: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**:3568, 1954.
- [8] 立岡米雄、緒方浩一、森本皎、樹下友治: *药学*, **75**: 1162, 1955.
- [9] 郑昌亮:“抗菌素讲演集”中国医学科学院抗菌素研究所编,人民卫生出版社出版,43 页,1959.
- [10] Kirshbaum, A., Arret, B., and Kramer, J.: *Antibiotics and Chemotherapy*, **6**, 660, 1956.

STUDY ON THE CYLINDER-PLATE ASSAY OF THE TETRACYCLINE GROUP

WANG SHAO-WEN, WU CHUAN AND CHENG CHANG-LIANG

(Institute of Control of Pharmaceuticals and Biologicals, Peking)

In the course of production and storage tetracyclines are liable to form isomeric and anhydrous forms. Although these forms have very weak biologic activity, they are very similar to their parent antibiotics in physical and chemical properties. Hence the physical or chemical methods of assay are not reliable. In this paper the study of the cylinder-plate assay is presented. The following results were obtained:

When *Sarcina lutea* was used as the test organism, nearly 10 u/ml of chlortetracycline, 20 u/ml of oxytetracycline or tetracycline were found to produce suitable inhibition zones; whereas, when *Bacillus cereus* was used as the test organism, the concentrations necessary to produce suitable zones were 0.5 u/ml, 1 u/ml and 1 u/ml respectively.

In the experiment it was found:

1. The relation between the time interval (T) during the filling of the cylinders and the corresponding diameters (Y) of zones followed the equation

$$Y = \alpha T + b$$

2. The relation between the volumes (V) of the antibiotics within the cylinders and the diameters (x) of the zones followed the equation

$$\log V = ax + b$$

3. There is a linear relation between the log concentrations (C) of each antibiotic and its corresponding diameters (x) of zones.

$$\log C = ax + b$$

The dose response lines obtained from different experimenters on different occasions and with different lots of preparations and assay media were found parallel or nearly parallel to each other when the same antibiotic was referred. However, the interception values of these lines were different. That means same concentration of the antibiotic may produce quite different values of diameters of the inhibition zones on different occasions equivalent to several times of its antibiotic activity.

When *B. cereus* was used as the test organism the slope of the dose response line was greater than that when *S. lutea* was used. The former is nearly 20 times more sensitive than the latter.

Based on the study mentioned above, the authors designed the cylinder-plate assay for the tetracyclines. 11, 18 and 25 assays respectively of chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline were made. The rates of fiducial limits ($P=0.95$) were found within $\pm 5\%$.

The authors discussed the assay methods for particular samples such as the assay of tetracycline when chlortetracycline, vitamin C or the isomeric forms of the antibiotic were present, and the assay of the oxytetracycline when colloid substances and other impure materials were present.