

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2013.04.008

微生物比浊法测定硫酸庆大霉素颗粒效价

张胜波 屈胜环

(济宁市药品检验所,山东 济宁 272025;济宁市妇幼保健院,济宁 272000)

摘要 **目的** 建立微生物比浊法测定硫酸庆大霉素颗粒效价的方法。**方法** 以金黄色葡萄球菌为试验菌,菌液浓度为 1.0%,培养测定时间为 3~4h。**结果** 硫酸庆大霉素浓度在 0.2~1.0U/ml 的范围内,浓度的对数与吸光度成良好的线性关系: $A=0.6214-0.7187lgC$ ($r=0.9989$),平均回收率为 99.2%,RSD 为 0.25%。**结论** 微生物比浊法测定硫酸庆大霉素颗粒的效价简便、快速。

关键词 比浊法;硫酸庆大霉素颗粒;效价

中图分类号:R927 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-9760(2013)08-259-02

Determination of the potency of Gentamicin Sulfate Granules by turbidimetric method and analysis

ZHANG Sheng-bo, QU Sheng-huan

(Institute for Drug Control of Jining City, Jining 272025, China)

Abstract: Objective Establish a turbidimetric method for determination the content of Gentamicin Sulfate Granules. **Methods** The test organism was staphylococcus aureus, adjusted spore suspension of staphylococcus aureus inoculating with a 1.0% ratio, cultured at 37℃ for about 3~4h. **Results** The calibration curve was liner in the range of 0.2~1.0U/mL, while the calibration curve linear equation is $A=0.6214-0.7187lgC$ ($r=0.9989$), and the average recovery is 99.2% with RSD of 0.25%. Gentamicin sulfate in concentration in 0.2~1.0U/mL, within the scope of the concentration of the logarithm and absorbency into good linear relationship between the linear equation: $A=0.6214-0.7187lgC$ ($r=0.9989$), and the average recovery is 99.2%, and RSD is 0.25%. **Conclusion** Microbial turbidity method for the determination of Gentamicin Sulfate Granules titer is simple, accurate and fast.

Key words: Sturbidimetric method; Gentamicin sulfate granules; Potency

硫酸庆大霉素颗粒为临床最常用的一种氨基糖苷类抗生素,对各种革兰阴性细菌及革兰阳性细菌都有良好抗菌作用。由于硫酸庆大霉素为多组分抗生素,用化学方法检测其含量不能完全体现其抗菌活性。因此,目前我国质量标准中仍采用传统的抗生素微生物检定法(管碟法),由于管碟法操作过程繁琐、耗费时间长、影响因素多,常会导致测定结果可信限偏高、重现性差。再者,硫酸庆大霉素颗粒辅料较多,对检定用培养基灵敏度较差,试验中,常常出现含量测定结果超出高限较多的现象。因此,笔者采用微生物比浊仪在线培养检测,现报道如下。

1 试剂与仪器

WBS-101 微生物比浊法测定仪(北京先驱威锋技术开发公司),BT25S 赛多利斯电子天平。庆

大霉素标准品(中国食品药品检定研究院,编号:130326-201015,效价:610U/mg);硫酸庆大霉素颗粒(华北制药,下称 1 号样品;山西同达药业,下称 2 号样品;大同利群药业,下称 3 号样品,均为市售)。金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26 003]第 3 代;抗生素检定培养基Ⅲ号 pH7.0(北京市三药科技开发公司,批号:1008232);pH7.8 磷酸盐缓冲液。试验所需培养基,比色皿、刻度吸管均灭菌处理。

2 实验方法

2.1 菌液培养基制备

将金黄色葡萄球菌密集划线于营养琼脂斜面上,在(36±1)℃培养 16~17h 后,用灭菌水将菌苔洗下为菌原液。取菌原液,按 1.0% 比例加入到抗生素Ⅲ号培养基中为菌液培养基,适当稀释使得菌液培养基在 580nm 波长处的吸光度约为 1.0。

2.2 标准品溶液配制

取庆大霉素标准品适量,用灭菌水溶解稀释成100U/ml的溶液。

2.3 供试品溶液配制

取硫酸庆大霉素颗粒,精密称定,加灭菌水溶解稀释成100U/ml。精密量取适量,用磷酸缓冲液稀释成浓度为0.5U/ml和1.0U/ml的溶液。

2.4 测定方法

取灭菌比色皿分别精密加入供试品溶液1ml,再精密加入菌液培养基9ml,每个供试品溶液浓度平行4管,立即摇匀,置微生物比浊仪中37℃培养并在线测定吸光度。培养大约3h后,观察吸光度值在0.3~0.7之间时,即可终止实验,记录实验结果。

3 实验结果

3.1 线性关系考察

精密量取标准品溶液适量,分别用磷酸盐缓冲液稀释成浓度为0.2U/ml、0.4U/ml、0.6U/ml、0.8U/ml、1.0U/ml的溶液,照2.4方法测得吸光度,以浓度C的对数值为横坐标,以吸光度A为纵坐标,得线性方程 $A = 0.6214 - 0.7187lgC$ ($r = 0.9989$)。结果表明庆大霉素在0.2~1.0U/ml的浓度范围内,其对数值与吸光度有良好的线性关系。

3.2 加样回收试验

精密称取庆大霉素标准品与已知含量的供试品适量,按2.3方法溶解稀释成标准品与供试品溶液贮备液,分别等量精密量取两种溶液,用磷酸盐缓冲液分别稀释成浓度约为0.4U/ml、0.6U/ml、0.8U/ml的溶液,按2.4项下的方法测定吸光度,计算平均回收率为99.2%,RSD为0.25%,见表1。

表1 加样回收试验结果(n=9)

加入量 U/ml	实测量 U/ml	回收率 %	平均回收率 %	RSD %
0.3990	0.3974	99.6		
0.3990	0.3902	97.8		
0.3990	0.3898	97.7		
0.5984	0.5914	98.8		
0.5984	0.6021	100.6	99.2	0.25
0.5984	0.6012	100.5		
0.7979	0.8032	100.7		
0.7979	0.7826	98.1		
0.7979	0.7886	98.8		

3.3 精密度实验

取新制备的菌培养基10ml,分别加入30只比色皿中进行培养测定,待培养约3h后,记录在

0.3~0.7之间的30只比色皿的吸光度值,计算RSD为0.45%。

3.4 重复性实验

按精密度考察方法,培养60min时,手动连续测定5次,记录吸光度值,RSD为0.51%,说明本法重复性较好。

3.5 样品效价测定

取硫酸庆大霉素颗粒3批,按2.3项下方法配制1:2高低2个浓度的供试品溶液,照2.4方法测定,结果与原方法测定值比较,见表2。

表2 样品效价测定结果比较(%)

样品号	比浊法测定效价(可信限)	管碟法测定效价(可信限)
1	98.2(1.56)	100.2(4.72)
2	97.8(2.12)	99.8(4.85)
3	99.5(2.24)	102.9(5.12)

4 讨论

浊度法测定效价试验中,试验菌液的制备和质量是影响实验的重要因素。金黄色葡萄球菌在营养琼脂培养基上培养16~17h为宜,如按药典要求培养20~22h,菌液制备后,经菌液纯培养(30只比色皿)测定吸光度值不稳定(RSD=4.85%)。

硫酸庆大霉素颗粒标准品浓度的确定:经多次试验证明,试验菌液浓度适宜才能保证细菌生长曲线处于对数期,有效地被抗生素作用后产生较理想的吸光度值。采用二剂量法浓度比为1:2较适宜,以菌液的吸光度在0.3~0.7的范围内的时间为最佳,高低剂量吸光度差值在0.15~0.20之间,偏离平行($P>0.05$),可信限较理想。

精密加入比色皿中标准品溶液、供试品溶液与菌液培养基非常重要,是保证可信限的重要因素之一。笔者认为,采用定量精密加样器效果较佳。

笔者在实际工作中,曾采用管碟法多次测定硫酸庆大霉素颗粒的效价,结果显示,不同厂家培养基对检定结果有较大差异,主要是含量测定结果超出规定限度的近100%。这样给实验工作带来很大不便;而采用微生物浊度法检定就有效避免上述结果的发生,并且方法快速,简便,可靠性更高。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会.中国药典(二部)[S].北京:中国医药科技出版社,2010;附录.
- [2] 田光彩.标准曲线法测定硫酸庆大霉素片的抗生素效价[J].中国药业,2007,16(15):33.
- [3] 丁勃,杨娜,谢元超.比浊法测定抗生素效价中常见问题及分析[J].中国药品标准,2010,11(6):438-440.

(收稿日期 2013-04-25)