

# 浅谈抗生素效价测定中的影响因素

常仁厚(江苏省丰县药品检验所 丰县 221700)

**摘要** 本文就抗生素效价测定中影响实验结果的因素,如培养基的质量、试验用菌、培养温度及时间、测量误差和标准品等,根据文献报道作一分析,提供同仁们参考。

**关键词** 抗生素;抑菌圈;生物检定法

抗生素含量测定的主要方法是微生物检定法,各国药典均有收载。中国药典 1995 年版用微生物检定法收载品种 23 种、65 个剂型,其质量的优劣直接关系到使用者的安全和有效。微生物检定法的优点是其检定原理与临床医疗要求基本一致,可以直接表示抗生素对微生物的作用并通过生物检定统计分析,使实验结果更趋于准确。但由于检定操作中影响实验结果的因素较多<sup>[1]</sup>,为了减少实验误差、保证实验结果的准确性和可靠性,现结合几年来的实践,就培养基的质量、试验用菌、培养温度及时间、测量误差和标准品等主要影响因素进行分析,报告如下:

## 1 培养基的影响

**1.1 培养基质量** 在微生物检定法中培养基质量占很重要的地位,它不仅影响细菌的生长,使抗生素的最低抑菌浓度发生变化,还能影响抗生素的扩散系数和时间,如此就会影响抑菌圈直径的大小与边缘的清晰度和实验结果的准确性。培养基成分中以胨和琼脂影响最大。因此,对培养基原材料必须预先试验,挑选统一的品牌使用。

**1.2 培养基酸碱度** 在抗生素微生物检定中常用固体成品培养基。实验表明,成品培养基 pH 值往往偏低,直接影响细菌生长速度及抗生素在琼脂培养基内的扩散。因此,在配制成品培养基时, pH 值最好调整到细菌最适宜的浓度,同时,培养基生产厂在成品培养基出厂前应做各项试验检查。另据文献报导<sup>[2~5]</sup>,一些抗生素,特别是氨基糖苷类抗生素可通过增加培

养基的 pH 值来提高测定结果的准确性。如磷霉素的微生物检定法采用 pH 值 9.0 的培养基,在不改变其它检定条件下,检定结果符合微生物检定的要求,并优于现行标准检定的结果,且抑菌圈边缘更清晰、圆整,直径大小适宜,高低剂量直径之差较大,从而提高了试验的准确性。

## 2 试验用菌的影响

**2.1 菌种纯化** 合理选择实验用菌种,是建立微生物生物检定法的关键,它应具备显示临床特点,对抗生素主要成分敏感、灵敏、稳定,抑菌圈清晰,易于培养和保存等特性。当菌种老化、衰退或污染其它杂菌时,可出现抑菌圈边缘不清晰,此时需要挑选典型性状的单个菌落进行分离纯化培养。为保持菌种的新鲜,每隔 2~3wk 应传代 1 次。不经常用的菌种接种于半固体培养基内或冻干保存。

**2.2 菌龄** 试验菌的菌龄对抑菌圈边缘清晰度有一定影响。笔者对当天菌、15d 菌、1mo 菌、5mo 菌液分别进行试验,结果:当天菌抑菌圈最清晰,15d 菌也清晰,30d 菌尚清晰,5mo 菌不清晰。菌液洗下后,贮存于灭菌注射用水中使用,以最多不超过 3mo 使用最为适宜。使用中如发现抑菌圈边缘不圆整,用 65℃ 加热清除菌体可得满意结果。

**2.3 菌层培养基温度** 培养基温度过高可使部分试验菌被杀死,导致抑菌圈破裂。一般菌层培养基的温度应控制在杆菌 65~70℃,球菌 48~50℃,霉菌不超过 48℃ 为宜。

## 3 缓冲液 pH 的影响

缓冲液的 pH 值浓度是控制抑菌圈大小和

清晰度的重要条件之一。一般来说,碱性抗生素在偏碱性的缓冲液条件下抗菌活性较强,酸性抗生素在偏酸性条件下抗菌活性较强<sup>[6]</sup>。氨基糖苷类及大环内酯类等碱性抗生素选用偏碱性的缓冲液, pH 值 8.0~8.2 所致抗菌活性强,抑菌圈大而清晰。如庆大霉素的微生物检定,高剂量的抑菌圈直径往往达不到 18~24mm 的要求,同时高低剂量抑菌圈直径相差较小,且抑菌圈边缘欠清晰,使卡尺测定引入误差,难以用抑菌面积测定分析仪直接测量,再加上检定中使用的原材料、操作条件方法等因素的影响,使整个试验结果的统计分析总不能令人满意。实验证明,庆大霉素抑菌圈的直径随缓冲液 pH 的增大而增大,在 pH7.8~9.8 的范围内,每增加一个 pH,抑菌圈直径约增加 5mm,当 pH 大于 8.8 时,溶液的高低剂量(2:2)所致抑菌圈直径之差大于 2mm。硫酸小诺霉素选用 pH9.0~10.5 缓冲液<sup>[5]</sup>,在不改变其它检定条件下,检定结果均符合生物检定的要求,并优于现行药典检定结果。

#### 4 培养温度及时间的影响

药典对抗生素的培养温度及时间均有具体规定,培养温度过高或过低都会影响抑菌圈大小和圆整程度。一般靠近孵箱较近处,细菌生长较快,造成局部生长速度不平衡,抑菌圈略小些。因此孵箱内各部分的温度应力求均匀一致。但某些抗生素,如氯霉素,在规定时间内培养也可出现抑菌圈不清晰的现象,经延长 2~3h 或更长时间后抑菌圈边缘清晰。

#### 5 测量对试验结果的影响

测量抑菌圈直径是获得试验结果的重要环

节。目前,国内多使用游标卡尺测量,测量时视线必须与读数刻度垂直,读数才能准确。同时测定一个抑菌圈后,必须将卡尺退回零点或移动一下,再测量第 2 个抑菌圈,以免发生主观错觉而影响获得客观的真实数据。另外,用卡尺测量时可采用“十”字交叉法对每个抑菌圈作两次互为垂直的直径测量,取其平均值,2 次测量结果直径相差不得超过 0.1mm。

#### 6 标准品的影响

抗生素生物检定法所选用的标准品在性质上尽可能与供试品相一致,所以衡量标准品的质量,主要应视所定效价单位的精确度和在性质上与供试品的相对一致性的程度来作评价。某些制剂中含较大量影响抗菌活性的添加剂,在制备标准品溶液时,应加入相同量的添加剂以消除对测定的影响。对光敏感和在水中溶解度差的抗生素,在制备溶液时,注意避光,使标准溶液和供试品溶液中所含有机溶剂浓度相当,从而消除对测定结果的影响。

#### 参考文献

- 1 张治锁编著. 抗生素药品检验. 北京: 人民卫生出版社, 1987. 35
- 2 胡功允. 庆大霉素微生物检定条件的探讨. 药物分析杂志, 1990, 10(5): 289
- 3 常高翔. 庆大霉素微生物法效价测定的改进. 药物分析杂志, 1994, 14(3): 42
- 4 李庆等. 磷霉素微生物法检定条件的探讨. 药物分析杂志, 1992, 12(1): 55
- 5 郑桂英. 硫酸小诺霉素微生物检定条件的改进. 药物分析杂志, 1996, 15(3): 48
- 6 中国药典 1990 年版二部注释. 1181

(收稿: 1999-05-18)