

抗生素微生物检定法 及其标准操作

胡昌勤 刘炜 主编

化学工业出版社

KANGSHENG SU WEISHENG WU JIANDING FA JIQI BIAOZHUN CAOZUO

内 容 简 介

本书为抗生素分析技术丛书之一,重点介绍抗生素微生物检定法的基本原理及应用。对2000年版中国药典和部标准中收录的大环内酯类,氨基糖苷类,多肽、多烯类等抗生素品种的微生物检定法的标准操作规范、操作关键点及注意事项等逐一进行了详细的介绍。

本书具有较强的实用性,是指导药检人员准确理解和执行中国药典抗生素微生物检定法的专业工具书之一;对从事抗生素分析、质量控制、新药开发、教学、科研工作者及相关行业人员有一定参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

抗生素微生物检定法及其标准操作/胡昌勤,刘炜
主编. -北京:气象出版社,2004.11
(抗生素分析技术丛书)
ISBN 7-5029-3875-3

I. 抗… II. ①胡…②刘… III. 抗生素-微生物
检定-方法 IV. R978.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2004)第115069号

抗生素微生物检定法及其标准操作

胡昌勤 刘炜 主编

责任编辑:王桂梅 终审:徐明

封面设计:阳光图文工作室 责任技编:陈红 责任校对:石宝成

* * *

气象出版社出版

(北京市海淀区中关村南大街46号 邮编:100081)

北京市北中印刷厂印刷

新华书店总店北京发行所发行 全国各地新华书店经销

网址:<http://cmp.cma.gov.cn> E-mail:qxcs@263.net

* * *

开本:787×1092 1/16 印张:14.125 字数:362千字

2004年11月第一版 2004年11月第一次印刷

定价:58.00元

ISBN 7-5029-3875-3/R·0064

序

抗生素微生物检定法是利用抗生素对微生物生长的抑制能力来表征抗生素量的、经典的抗生素分析技术,虽然伴随着 HPLC 等化学分析方法的发展,越来越多的抗生素微生物检定法已逐步被化学分析方法所取代,但对于多组分抗生素,抗生素微生物检定法仍具有无法替代的优越性。

在我国,抗生素微生物检定法作为抗生素质量控制的基本方法目前仍在药品质量标准中被广泛收载。抗生素微生物检定法的影响因素较多,实验技巧性较强,故掌握起来相对困难,特别是对初学者,而有关介绍抗生素微生物检定法的专著国内尚未见。为推动我国抗生素分析的进一步发展,中国药品生物制品检定所邀请国内部分药检所从事抗生素分析的专家,撰写了本书。本书不仅系统地阐述了抗生素微生物检定法的基本原理,并对目前国内常用抗生素微生物检定法检验的品种,逐一编写了标准操作规范,以供药品检定人员作为工具书查阅。

负责编写标准操作的各位编委,均为工作在药品检定第一线的年富力强的专家,不仅具有雄厚的理论基础,还具有丰富的实践经验。他们是:

李 军(山东省药品检验所)

王 玉(深圳市药品检验所)

张 玫(江苏省药品检验所)

张亚杰(辽宁省药品检验所)

余 立(北京市药品检验所)

成双红(中国药品生物制品检定所)

山东省药品检验所的黄萍、李玉杰、杨娜、谢元超,中国药品生物制品检定所的杨亚利、姚尚辰、王明娟等同志为本书撰写了部分内容。可以说,本书是首次对国内药检系统数十年从事抗生素微生物检定法检验工作的系统总结。

面对着一个飞速发展的应用领域,有待于进一步对其进行深入研究,但由于时间仓促,水平有限,书中的错误和不妥之处在所难免,敬请各位读者指正。

胡昌勤 刘炜

2004 年 8 月

目 录

序

1 中国药典抗生素微生物检定法	(1)
1.1 抗生素微生物检定法概况	(1)
1.2 中国药典抗生素微生物检定法——管碟法	(2)
2 抗生素微生物检定法标准操作	(27)
2.1 红霉素	(27)
2.2 琥乙红霉素	(32)
2.3 依托红霉素	(36)
2.4 硬脂酸红霉素	(41)
2.5 阿奇霉素	(46)
2.6 克拉霉素	(52)
2.7 罗红霉素	(56)
2.8 乙酰螺旋霉素	(63)
2.9 麦白霉素	(70)
2.10 麦迪霉素	(75)
2.11 乙酰麦迪霉素	(79)
2.12 吉他霉素	(82)
2.13 乙酰吉他霉素	(87)
2.14 硫酸链霉素	(90)
2.15 硫酸庆大霉素	(95)
2.16 盐酸大观霉素	(103)
2.17 硫酸巴龙霉素	(108)
2.18 硫酸核糖霉素	(113)
2.19 硫酸新霉素	(117)
2.20 妥布霉素	(121)
2.21 硫酸西索米星	(126)
2.22 硫酸奈替米星	(130)
2.23 单硫酸卡那霉素	(135)
2.24 硫酸卡那霉素	(140)

2.25	硫酸阿米卡星	(145)
2.26	硫酸小诺霉素	(149)
2.27	硫酸依替米星	(153)
2.28	金霉素	(157)
2.29	四环素	(161)
2.30	土霉素	(167)
2.31	盐酸去甲万古霉素	(172)
2.32	硫酸卷曲霉素	(177)
2.33	杆菌肽	(182)
2.34	硫酸黏霉素	(188)
2.35	制霉菌素	(192)
2.36	两性霉素 B	(196)
2.37	氯霉素	(200)
2.38	磷霉素	(205)
3	抗生素微生物检定法试验指导原则	(209)
3.1	检定方法的建立	(209)
3.2	检定方法的验证	(211)
附录		(215)
附录 1:	附表	(215)
附录 2:	抗生素微生物检定法实验结果的合并计算	(216)
附录 3:	抑菌圈测量仪检定规程	(217)
附录 4:	抗生素生物效价测定实验室自检标准	(220)

1 中国药典抗生素微生物检定法

1.1 抗生素微生物检定法概况

1.1.1 抗生素的定义

从 Flemming 1929 年发现第一种抗生素(青霉素)以来,经过近一个世纪的发展,抗生素(Antibiotics)已经成为一门独立的综合学科。抗生素领域在迅速发展,其含义也在不断被充实。1942 年,链霉素的发现者 Waksman 定义:“抗生素是微生物在代谢中产生的具有抑制它种微生物生长活动、甚至杀灭它种微生物的化学物质”。但是,由于抗肿瘤、抗寄生虫等抗生素的不断发现,使得抗生素的作用范围已远远超出了对微生物的作用;之后,又发现化学改造可以明显地改变已知抗生素的抗菌活性或毒性作用,推动了半合成抗生素的迅速发展;此时抗生素被定义为“是在低微浓度即可对某些生物的生命活性有特异抑制作用的微生物次级代谢产物及其衍生物”。近年来,由于化学合成工业的迅速发展,一些原来利用生物发酵的抗生素,已由化学合成方式生产,如氯霉素等;通过对传统抗生素的结构与功能的研究,人们设计出一些全新结构的全合成抗生素,如氨曲南、利奈唑烷等;故抗生素又被认为是对“在低微浓度即可对某些生物的生命活动有特异抑制作用的化学物质的总称”。

抗生素的抗菌效力通常用效价单位来表示,如青霉素以青霉素单位也称牛津单位(Oxford unit)表示其抗菌效力,最初的定义是“50ml 肉汤培养基中,能抑制标准金葡菌生长的最少青霉素量为 1 个青霉素单位(u)”。又如:硫酸链霉素的抗菌效力是以链霉素效价单位表示的,其硫酸链霉素的效价单位又是以具活性成分链霉素碱的重量表示的,即 1 链霉素效价单位 = $1\mu\text{g}$ 链霉素碱。以抗生素活性成分的重量计量抗生素的效价单位,已得到人们的共识,目前新开发的各类抗生素,无论其以各类盐的形式存在,或以其前药各类酯的形式存在,抗生素的效价单位均采用活性成分的重量 $1\mu\text{g}=1$ 效价单位的方法表示。在临床应用中,抗生素的抗菌效力可准确地反映抗生素的医疗价值。

1.1.2 抗生素微生物检定法

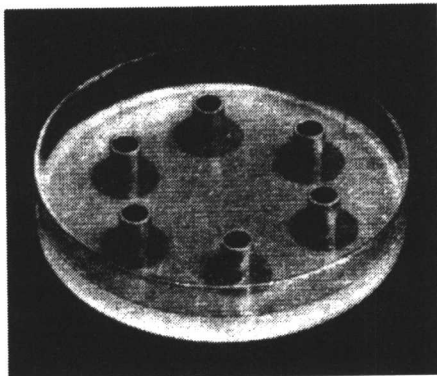
抗生素微生物检定法是国际上通用的、经典的抗生素效价测定方法。自 20 世纪 40 年代建立至今,在各国药典中被普遍采用。虽然伴随着 HPLC 等化学分析技术的发展,一些抗生素品种的效价测定已被化学分析法所取代,但由于 ①微生物检定法可直观、特异地反映出抗生素药品的抗菌活性;②多组分抗生素由于不同活性组分生物活性的差异,化学测定结果难以准确表征组分组成、含量和生物活性间的关系;③许多抗生素品种由于各种原因目前没有适当的化学分析方法表征其活性,故抗生素微生物检定法目前在各国药典中仍占有重要的地位,且短期内化学分析法不可能完全取代微生物检定法。

抗生素微生物检定法是利用抗生素在低微浓度下有选择地抑制或杀死微生物的特点,以

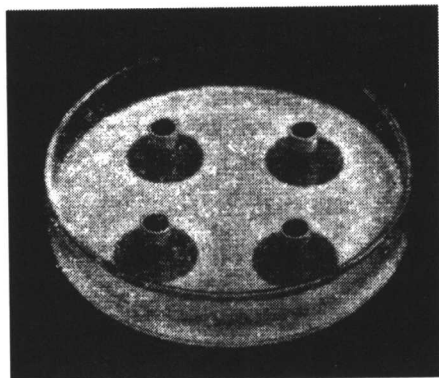
表 1.1.1 抗生素微生物检定方法比较

	稀释法	比浊法	扩散法
相同点	标准品、供试品抗菌效力的比较		
不同点	等量的试验菌菌液在不同浓度的抗生素液体培养基中的生长情况		不同浓度的抗生素溶液在含有试验菌固体培养基中的扩散情况
	含不同浓度抗生素的液体培养基中有无细菌的生长	用光度法测定含不同浓度的抗生素的液体培养基的浊度	测定不同浓度的抗生素溶液在固体培养基表面产生的抑菌圈大小
目的	抗生素最低抑菌浓度(MIC)的测定	抗生素抑菌效力的测定	
应用	用于新药研制及临床药敏试验等方面	抗生素效力的测定方法	

扩散法 { 垂直扩散——直线扩散
平面扩散 { 根据总量 { 点滴法
 { 纸片法
 { 根据浓度——管碟法(图 1.1.1)



(a)



(b)

图 1.1.1 抗生素微生物检定法——管碟法

(a)三剂量法(3·3法);(b)二剂量法(2·2法)

1.2 中国药典抗生素微生物检定法——管碟法

管碟法(又称杯碟法)是国际药典中抗生素药品检定的经典方法,也是中国药典收载的方法。

1.2.1 检定原理

1.2.1.1 抑菌圈的形成

在滩布试验菌的琼脂培养基平板上,安置不锈钢小管,在小管内加入抗生素溶液后,在培

养条件下,琼脂培养基中便产生两种互动作用:一种是抗生素溶液向培养基内呈球面扩散作用;另一种为试验菌的生长作用。抗生素在琼脂培养基中的浓度,随离开小管中心距离的增大而降低,即离开小管越远,琼脂培养基中抗生素浓度越低。当培养到一定时间,琼脂培养基中的两种互动作用达到动态平衡时,琼脂培养基中便形成透明的抑菌圈,即在抑菌圈中因抗生素浓度高于抑菌浓度,试验菌生长受到抑制,此处琼脂培养基呈透明状;在抑菌圈边缘抗生素浓度恰好等于抗生素最低抑菌浓度。

1.2.1.2 量-反应直线

根据两位微生物学者 Hamphrey 和 Light Brown 推导出的琼脂球面扩散动力学(图 1.2.1)公式:

$$r^2 = 4DT[\ln(M/H) - \ln C' - \ln(4\pi DT)] \quad (1.2.1)$$

式中: T 为抗生素扩散时间(h); M 为管中抗生素的量(μg); r 为抑菌圈的半径(mm); L 为管的高度(mm); H 为培养基的厚度(mm); C' 为抗生素最低抑菌浓度($\mu\text{g}/\text{mm}^3$); D 为扩散系数(mm^2/h)。该方程奠定了管碟法量-反应直线公式的基础。

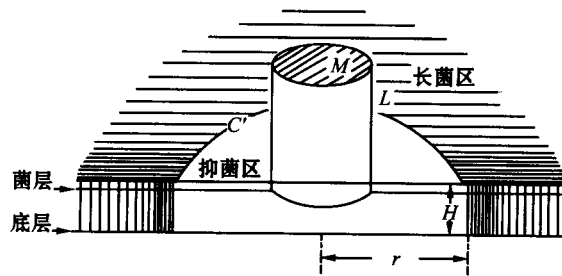


图 1.2.1 抑菌圈形成示意图

将琼脂球面扩散动力学公式(1.2.1)简化、移行,并将自然对数换成常用对数得:

$$\begin{aligned} \frac{r^2}{4DT} &= [\ln(M/H) - \ln C' - \ln(4\pi DT)] \\ &= \ln M - \ln H - \ln C' - \ln 4\pi DT \\ &= \ln M - (\ln H + \ln C' + \ln 4\pi DT) \\ &= \ln M - \ln C' 4\pi DTH \\ \ln M &= \frac{1}{4DT} r^2 + \ln C' 4\pi DTH \end{aligned} \quad (1.2.2)$$

$$\because \ln M = 2.3031 \lg M; \ln C' 4\pi DTH = 2.3031 \lg C' 4\pi DTH$$

$$\therefore \lg M = \frac{1}{9.21 DT} r^2 + \lg C' 4\pi DTH \quad (1.2.3)$$

管碟法量-反应直线方程(图 1.2.2):

$$Y = bX + c$$

其中: $Y = \lg M$; $X = r^2$; $b = \frac{1}{9.21 DT}$; $c = \lg C' 4\pi DTH$ 。

由球面扩散公式可知,抗生素总量的对数($\lg M$)与所形成抑菌圈半径的平方(r^2)呈直线关

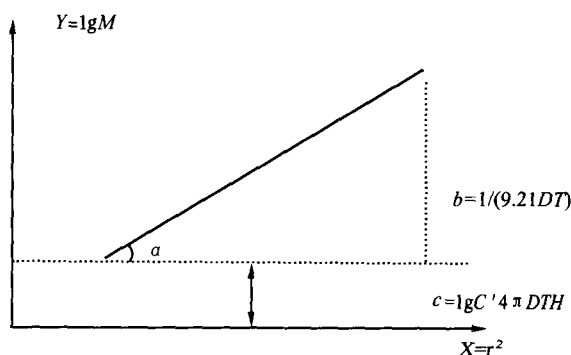


图 1.2.2 抗生素量-反应直线

系。由此奠定了以抑菌圈的大小来测定抗生素抗菌活性物质质量的理论基础。

1.2.1.3 量-反应平行线原理

抗生素微生物检定法基于量-反应平行线原理,即“在量-反应的指标中,当抗生素浓度的对数剂量和反应呈直线关系,且供试品和标准品的作用性质相同时,供试品和标准品的两条量-反应关系曲线相互平行”。

在管碟法实验中,在一定的剂量范围内,抗生素的对数剂量与其所致的抑菌圈的大小呈直线关系,这就在理论上决定了(活性)成分相同的抗生素标准品与供试品在一定剂量范围内产生的两条量-反应直线相互平行,符合量-反应平行线原理的基本要求。

1.2.1.4 管碟法

管碟法就是利用抗生素在固体培养基中的平面扩散作用,采用量-反应平行线原理和交叉实验设计方法,在相同实验条件下通过比较抗生素标准品(已知效价)和供试品二者对试验菌产生的抑菌圈(直径或面积)大小,来测定供试品效价的一种方法。

由管碟法量-反应直线方程 $\lg M = \frac{1}{9.21 DT} r^2 + \lg C' 4 \pi DTH$ 可知,抗生素所致的抑菌圈的大小,不仅受抗生素量多少的影响,而且与抗生素的最低抑菌浓度 C' 、琼脂层厚度 H ,抗生素在琼脂培养基内的扩散系数 D 和细菌生长到显示抑菌圈的时间 T 等因素有关,其中任何一种因素的改变,均能影响抑菌圈的大小。故在抗生素效价测定时,为消除各种干扰因素的影响,采用标准品与供试品在相同的试验条件下进行实验,测得相对效价的比率,再由已知的标准品效价计算出供试品的效价。

管碟法的特点是样品用量少、灵敏度高,但凡具抗菌活性的物质都会干扰测定结果,所以存在专属性差、操作繁琐、影响因素多的缺陷。

1.2.2 检定的影响因素

准确有效地进行抗生素效价测定,必须以管碟法的扩散原理和量-反应平行线原理来指导和解决实际工作中的问题。

1.2.2.1 抑菌圈质量的控制

(1) 抑菌圈的形状:实验中抑菌圈常有破裂、不圆,甚至无圈的现象,其原因是多方面的,如在滴加抗生素溶液时药液溅出、毛细滴管碰到钢管使抑菌圈出现破裂不圆等。双碟、钢管、钢管放置器内有残留抗生素污染(如庆大霉素、平阳霉素等容易吸附在钢管、玻璃容器的表面),试

验菌龄过老、菌层培养基加菌液时,培养基温度偏高或受热时间过长,使检定菌部分被烫死,致使抑菌圈破裂甚至无圈。稀释抗生素溶液用的缓冲液 pH 值和盐浓度也可影响抑菌圈的圆整。如:四环素族的抗生素,当缓冲液 pH 值过低或过高,相邻抑菌圈可相互影响而成椭圆形。又如:氨基糖苷类抗生素,当缓冲液 pH 值偏低、盐浓度偏高或标准品与供试品溶液中盐浓度不等时,会出现无抑菌圈或呈向心性、椭圆形抑菌圈。当抑菌圈过大或钢管位置不规则时,相邻圈之间的抗生素浓度超过最低抑菌浓度,而使抑菌圈扩大呈椭圆形等。

(2) 抑菌圈大小的控制:由管碟法量-反应直线方程(1.2.4)可见:

$$\begin{aligned}\therefore \lg M &= \frac{1}{9.21 DT} r^2 + \lg C' 4\pi DTH \\ r^2 &= 9.21 DT (\lg M - \lg C' 4\pi DTH) \\ M &= C_0 V = C_0 AL \\ \therefore r^2 &= 9.21 DT (\lg C_0 AL - \lg C' 4\pi DTH) \quad (1.2.4)\end{aligned}$$

式中, D 为抗生素扩散系数(mm^2/h); T 为抗生素扩散时间(细菌刚生长到显示抑菌圈所需的时间,单位:h); M 为管中抗生素的总量(μg); H 为培养基的厚度(mm); C' 为最低抑菌浓度($\mu\text{g}/\text{mm}^3$); r 为抑菌圈的半径(mm); C_0 为抗生素浓度($\mu\text{g}/\text{mm}^3$); V 为钢管的体积(mm^3); A 为钢管的截面积(mm^2); L 为钢管的高度(mm)。

抗生素抑菌圈的大小是受 $C_0, V, A, L, C', D, T, H$ 及其相互作用所控制的。当抗生素浓度 C_0 不变时,体积 V (即加样量) 之对数与抑菌圈直径(或面积 r^2) 呈直线关系。故钢管中滴加抗生素的体积应保持一致,且应严格限定钢管(A, L) 的大小(重量、直径、高度)。抑菌圈的大小受 T 值增减的影响,故预先延长抗生素的扩散时间会使抑菌圈变大。操作中若各钢管中加液时间不同,差值为 Δt ,则 T 变成 $T + \Delta t$,此时可影响抑菌圈的大小。所以一组双碟加样时,应尽量缩短加液间隔的时间,并保持加样速度的均匀性,以减小误差。抑菌圈大小受抗生素扩散系数 D 的影响。新霉素和多粘菌素若在缓冲液中加入 3% 氯化钠或在培养基中加一定的盐或吐温等可增加抗生素的扩散能力,使抑菌圈增大。

(3) 抑菌圈边缘清晰度的控制:抑菌圈边缘的清晰度是影响测量误差的重要因素之一。导致抑菌圈不清晰的原因,有抑菌圈在形成过程中抗生素的扩散系数紊乱、不均一,不符合动力学公式中各项之间的关系或各种扩散系统交叉所致。如试验菌菌种放置时间过长,菌群中个体生长周期不一,则对抗生素的敏感度不同,往往使抑菌圈形成双圈或多层圈,造成边缘模糊不清。培养基原材料的成分及质量、pH、盐浓度及培养时间都有可能影响抑菌圈边缘的清晰度。多组分抗生素,各组分的抗菌活性不同,扩散系数也不完全一致,其交叉作用可能影响抑菌圈边缘的清晰度。

1.2.2.2 标准品与供试品的同质性

抗生素效价测定方法依据的原理是量-反应平行线原理,即标准品与供试品的剂量反应直线是相互平行的,若不平行,则斜率不等,计算结果将产生较大的误差。造成二者不平行的原因,除操作上可能引入的误差外,主要是标准品与供试品内在质量的不同所致。如多组分抗生素标准品所含的抗菌活性物质或影响抗菌活性(增强或拮抗)物质的量与供试品有所不同,则可使量-反应直线不平行。多组分的庆大霉素测定时,因不同样品的组分比例不完全相同,所以

测定误差较大。用于制备标准品溶液和供试品溶液的缓冲溶液 pH、盐浓度的差异,导致供试品溶液与标准品溶液表现为非同质。供试品(尤其是制剂)较标准品中含有额外的维生素、氨基酸、无机盐及糖类等生长物质,在低营养条件的培养基上,这种差异将影响细菌的生长速率。所以,当已知供试品中的添加剂对细菌生长有影响或供试品中赋形剂含量较大时,可在标准品中加入相同量的添加剂或赋形剂,以抵消此影响。对化学稳定性较差的抗生素,由于供试品和对照品在配制过程中的降解,在测定过程中也可能由同质变为非同质。故在对标准品、供试品溶液的配制中,对某些对光敏感的多烯类抗生素,试验过程中应注意避免光线直射;对有差向异构特性的抗生素(如四环素等),尤其应注意 pH、盐浓度、温度和光照对抗生素差向化的影响,保证标准品与供试品的同质性。

1.2.2.3 斜率的控制

从公式 $\lg M = \frac{1}{9.21} \frac{1}{DT} r^2 + \lg C' 4\pi DTH$ 可知,在一定范围内,反应直线的斜率愈小愈好。因为斜率越小,直线越平缓,抗生素效价的微弱差别,由于斜率值在 0~1 之间,故可导致抑菌圈大小的差别较大,使得测定结果更精确。反之斜率大,生物反应的灵敏度降低,重现性差。

斜率的大小取决于 D (扩散系数, mm^2/h) 和 T (扩散时间, h): 抗生素扩散得越快,扩散系数 D 值越大,斜率越小;细菌生长的时间越长,抗生素扩散的时间就越长,斜率减小;反之则斜率增大。而扩散系数又与抗生素的分子量、培养基成分、试验菌以及 pH、盐浓度、琼脂含量等多种因素有关。

1.2.2.4 直线截距的控制

相同浓度的抗生素,截距小的抑菌圈大,效价测定的灵敏度高。截距的大小取决于 $\lg C' 4\pi DTH$ 的数值。除温度、扩散系数和抗生素最低抑菌浓度对截距有影响外,培养基厚度 H 也是影响因素之一。培养基厚度越薄,截距减小,抑菌圈增大。所以,制备双碟时应保持在相同实验组中,每只双碟中底层培养基和菌层培养基的厚度应保持一致性和均匀性。

1.2.3 检定方法

1.2.3.1 分类

管碟法根据试验设计的不同,可分为一剂量法(标准曲线法)、二剂量法和三剂量法。

- | | | |
|-------------|---|---|
| 管
碟
法 | { | 一剂量法(标准曲线法): 将标准品一组剂量对微生物的反应在对数坐标上制成直线图。相同条件下,测定供试品对微生物的反应值,在标准品的标准曲线上查出引起该反应的抗生素的相对浓度及效力 |
| | | 二剂量法(2·2法): 用标准品、供试品各两个剂量,采用量-反应平行线设计原理,在相同试验条件下,比较标准品和供试品二者对微生物所产生的效力 |
| | | 三剂量法(3·3法): 用标准品、供试品各三个剂量,采用量-反应平行线设计原理,在相同试验条件下比较标准品和供试品二者对微生物所产生的效力 |

1.2.3.2 效价计算公式的推导

以检定中最常用的二剂量法为例,其效价计算的公式推导如下(图 1.2.3):

令: θ 为供试品与标准品的效价比率, $\theta = M'_2/M_2 = M'_1/M_1 = P_T/P_S$

M'_2 和 M'_1 : 供试品高、低剂量

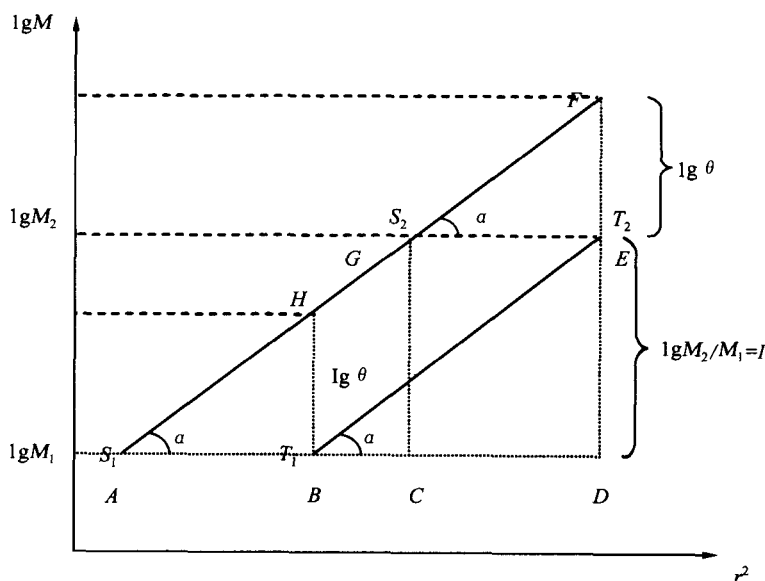


图 1.2.3 二剂量法量-反应平行线

M_2 和 M_1 :标准品高、低剂量

P_T :供试品效价

P_S :标准品效价

又: I 为剂间浓度比的对数(常数) $I = \lg M_2/M_1 = \lg M'_2/M'_1$

b 为斜率(回归系数) $b = \tan \alpha$

$$\Delta ABH \quad \lg \theta = b(T_1 - S_1)$$

$$\Delta GEF \quad \lg \theta = b(T_2 - S_2)$$

$$2\lg \theta = b(T_2 + T_1 - S_2 - S_1)$$

$$\Delta BDE \quad I = b(T_2 - T_1)$$

$$\Delta ACG \quad I = b(S_2 - S_1)$$

$$2I = b(T_2 + S_2 - T_1 - S_1)$$

$$\frac{2\lg \theta}{2I} = \frac{b(T_2 + T_1 - S_2 - S_1)}{b(T_2 + S_2 - T_1 - S_1)}$$

$$\lg \theta = \frac{(T_2 + T_1 - S_2 - S_1)}{(T_2 + S_2 - T_1 - S_1)} \times I$$

$$\theta = \lg^{-1} \left[\frac{(T_2 + T_1 - S_2 - S_1)}{(T_2 + S_2 - T_1 - S_1)} \times I \right]$$

可见,通过标准品、供试品高、低剂量所形成的抑菌圈的大小可计算二者的效比值,再由已知效价的标准品计算出供试品的效价。

1.2.3.3 实验操作及注意事项

抗生素效价测定管碟法的操作流程如下:

(1)实验操作:

预试验 ↓	确定最佳的试验条件:调整试验菌的浓度、使用量、抗生素终浓度、培养基等,使抑菌圈大小符合规定,即 2·2 法高剂量浓度标准品溶液所致的抑菌圈直径在 18~22mm;3·3 法中间剂量浓度标准品溶液所致的抑菌圈直径在 15~18mm
试验准备 ↓	双碟、钢管、毛细滴管、吸管的清洗及灭菌;容量瓶、定量吸管的清洗;培养基、缓冲液的准备、半无菌间的紫外消毒等
双碟的制备 ↓	每只双碟加底层培养基约 20ml。待培养基凝固后,将双碟放入 35~37℃ 培养箱中,待用
供试品、标准品溶液的制备 ↓	估计供试品的效价;根据实验要求设计供试品、标准品溶液稀释步骤;平行制备供试品、标准品相关剂量的溶液
菌层的制备 ↓	注意菌层培养基温度;根据预试验确定加入菌层培养基的菌液量;注意制备双碟菌层的速度,菌层的平整度
滴加抗生素溶液 ↓	注意:2·2 法和 3·3 法标准品、供试品溶液滴加顺序及高、低剂量溶液的滴加顺序;控制加样操作,以保证滴加样品溶液速度及量的均匀一致
双碟的培养 ↓	根据不同试验要求在培养箱中进行双碟的培养;在培养箱中水平叠放的双碟数以不超过三个为宜
抑菌圈的测量 ↓	抑菌圈测量仪的使用:每组试验双碟应在相同的测量参数下进行测量
结果的可靠性检验及效价计算	

(2) 效价测定操作中的注意事项:

① 试验环境:抗生素效价测定用实验室应注意防止抗生素及微生物的污染。实验室由两部分组成:用于样品处理的试验间和用于制备双碟的半无菌间。半无菌间要求有紫外灯、温控设备、稳固水平的试验台(如水泥台)、隔水式培养箱($36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)、恒温水浴箱。实验室温度应控制在 30°C 以下。

② 仪器用具:玻璃容器应清洗、灭菌;用于容量分析的(容量瓶、吸管)玻璃容器应标化,校正后方可使用。

双碟的规格应符合药典规定(直径约 90mm,高约 16~17mm);双碟需清洗、灭菌后使用。

钢管的规格应符合药典规定(内径 $6.0\text{mm} \pm 0.1\text{mm}$;高 $10.0\text{mm} \pm 0.1\text{mm}$,外径 $7.8\text{mm} \pm 0.1\text{mm}$,每组钢管重量差异不大于 $\pm 0.5\text{mg}$);钢管需清洗、灭菌后使用。

③ 抑菌圈测量仪:仪器的技术指标应符合抑菌圈测量仪检定规程(尤其是抑菌圈测定的准确度及精密度)的要求,并需进行定期检验,合格者方可用于抗生素抑菌圈的测量,出具检验报告。

④ 培养基:目前一般采用商品脱水培养基。注意在配制灭菌后调测培养基的 pH 值。

⑤ 缓冲液:缓冲液的 pH 值应符合试验要求,且以新鲜配置为好。

⑥ 试验菌:作为抗生素效价测定用的试验菌,一般要具备如下特点:a. 显示临床特点:对抗生素主要成分敏感,对杂质、降压物质及毒性物质无作用或作用很低;b. 灵敏、稳定、抑菌圈边缘清晰、测定误差小;c. 易于培养、保存,无致病性;d. 与同品种国际通用药典所用的试验菌一致,以便于效价单位的统一。

试验菌的菌龄对抑菌圈有一定影响。故检定时应保持菌种及菌液的新鲜。一般菌种一月

转种一次,冰箱冷藏保存。对易变异的菌株,如藤黄微球菌等在制备菌悬液前进行单菌分离;其他菌株可半年分离一次。

⑦标准品:抗生素标准品是用于效价测定的实物标准物质。抗生素国家标准品除国内自行研制的品种外,效价单位均与国际标准品或国际通用药典所使用的标准品活性单位一致。使用时:a. 标准品使用应参照标准品使用说明;b. 抗生素标准品的效价为湿品效价,使用前标准品不需干燥处理;c. 标准品(除特殊品种外)应保存在5℃冰箱内。开启使用过的标准品,应密封于干燥处保存,以防吸水。对于具强吸湿的标准品建议一次性称样,以防吸湿造成试验误差;d. 一定浓度的标准品溶液(1000u/mg)在5℃条件下放置,可使用的时间因品种不同而异。

1.2.4 检验结果的统计处理

1.2.4.1 可靠性检验

抗生素微生物检定法要求标准品 S 和供试品 T 的对数剂量-反应呈直线关系,且标准品 S 和供试品 T 的两条直线平行。

可靠性检验是利用生物统计方法验证标准品和供试品的量-反应关系是否显著偏离直线、偏离平行。对在一定概率水平下不显著偏离直线、偏离平行的实验结果,认为可靠,所得到的检验结果有意义。

(1)实验误差的来源:实验误差是客观存在的。

来源 { 偶然因素 { 生物的差异性
实验操作(操作人、仪器用具、反应值的测量等);
偏倚:又称系统误差,它不是偶然因素造成的,而是由于一个或几个使实验结果偏向某一方向的因素所致。如向钢管中滴加抗生素溶液时,若不采取标准品高、低剂量和供试品高、低剂量交叉进行的方法,则可能导致测定中的偏倚

(2)实验设计类型:抗生素微生物检定法包括二剂量法(图 1.2.4)和三剂量法(图 1.2.5),

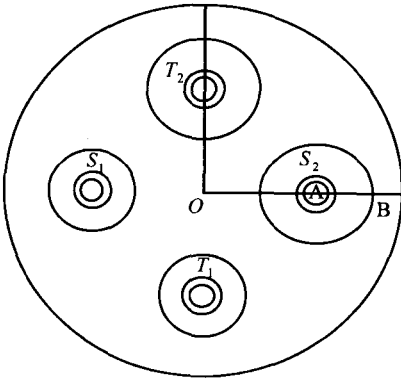


图 1.2.4 二剂量法示意图

S_2 : 标准品高剂量 T_2 : 供试品高剂量
 S_1 : 标准品低剂量 T_1 : 供试品低剂量

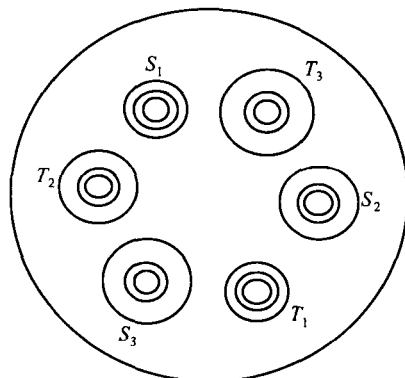


图 1.2.5 三剂量法示意图

S_3 : 标准品高剂量 T_3 : 供试品高剂量
 S_2 : 标准品中剂量 T_2 : 供试品中剂量
 S_1 : 标准品低剂量 T_1 : 供试品低剂量

均采用随机区组设计,即将实验对象分成区组,一个区组是一只双碟;每一区组中的容量(一只双碟所接受的钢管数)必须和剂量组数(二剂量法为 4,三剂量法为 6)相同。

如中国药典要求,二剂量法每次实验双碟数最少不少于 4 个,且按一定顺序在每一双碟中对角的钢管中分别滴加标准(S)高、低剂量溶液,其余对角钢管中滴加供试品(T)高、低剂量溶液。经培养每只双碟得到 4 个抑菌圈结果。三剂量法以此类推(表 1.2.1)。

表 1.2.1 二剂量法与三剂量法实验设计比较

实验设计	二剂量法	三剂量法
碟数(区组) m	至少 4 只	至少 9 只
剂量(容量) k	4	6
标准品 S 抑菌圈数	ds_1, ds_2	ds_1, ds_2, ds_3
供试品 T 抑菌圈数	dr_1, dr_2	dr_1, dr_2, dr_3
剂量浓度比	1:2 或 1:4	1:1.25

(3)可靠性检验的目的:生物统计是通过对实验数据的统计处理,判断来自同一总体的不同样本间的差异(实验组和对照组之间、不同区组之间、各组不同反应水平之间的差异)是偶然因素(生物差异性,实验操作)所造成的假象,还是有真正意义的差别(偏倚)。

抗生素生物检定法可靠性检验的目的是通过对抑菌圈测量结果的统计分析,对碟间、剂(高、低剂量)间、试品间(S, T)和回归、偏离平行、偏离直线(二次曲线、反二次曲线)等误差进行分析判断(表 1.2.2)。

表 1.2.2 二剂量法和三剂量法实验结果可靠性分析的参数

分析参数	二剂量 (2·2)法	三剂量 (3·3)法	结果判定
试品间(F_1)	✓	✓	应不显著($P>0.05$)
回归(F_2)	✓	✓	应非常显著($P<0.01$)
偏离平行(F_3)	✓	✓	应不显著($P>0.05$)
二次曲线(F_4)		✓	应不显著($P>0.05$)
反向二次曲线(F_5)		✓	应不显著($P>0.05$)
剂间(F_6)	✓	✓	应非常显著($P<0.01$)
碟间(F_7)	✓	✓	应不显著($P>0.05$)

(4)可靠性检验方法:

可靠性检验方法—— F 检验-方差分析。

均数 μ :总体的特征参数,表示总体中正态分布的一群变量的重心所在。

$$\mu = \frac{\sum x}{N}$$

式中 $\sum x$ 为总体中各变量之和; N 为总体中各变量的个数。

方差 δ^2 :总体的特征参数,表示总体中变量的分散程度。

$$\delta^2 = \frac{\sum (x - \mu)^2}{N}$$

式中 $\sum (x - \mu)^2$ 为总体中变量距重心的距离的平方和。

随机样本:指从总体中抽样得来的样本,其均数和方差表示为:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{N} \quad S^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

式中 $n-1$ 为自由度 f ; 随机样本的 $\bar{x}$ 和 S^2 是总体的 μ 和 δ^2 的估计。

① F 值的意义: 在同一总体中, 每个样本的方差 (S^2) 是总体方差 (δ^2) 的无偏估计量; 来自同一总体的两个样本的方差 S_1^2 和 S_2^2 的比值 F 接近 1。如果两个样本来自两个 δ^2 不等的总体, 其方差 S_1^2 和 S_2^2 的比值 F 将偏离 1。故 F 值可作为判断两个或两个以上的样本是否来自同一总体的标志。

② 检验假设: 实验中测定得到的各变异项的差异是偶然因素 (生物差异性, 实验误差) 所造成的, 没有本质上的差别, 用 H_0 表示; 以 μ 代表实验数据中各变异项差别的均数, 则 $H_0: \mu = 0$ 。通过对实验数据的统计处理, 判断 $H_0: \mu = 0$ 成立还是不成立。

③ 检验的判断:

检验过程:

a. 检验假设 $H_0: \mu = 0$ 。

b. 对实验数据进行统计处理, 求出各变异项的 f 值。

c. 确定一定概率水平的 f 值 (查 F 表): 实验数据的误差是客观存在的, 但误差分布有一定的规律, 差别超过一定范围的概率是很小的。根据“小概率事件在一次实验中几乎不可能出现”的原理, 同一总体中各变异项一定概率水平的误差范围是一定的。从 F 表中可查到一定概率水平下因偶然因素引起的误差 ($f_{(d_{f_1}, d_{f_2})0.01}$, $f_{(d_{f_1}, d_{f_2})0.05}$) 的大小。

d. 判断:

当各变异项的 (误差) f 值 $> f_{(d_{f_1}, d_{f_2})0.01}$ 时, 检验假设 H_0 不成立; 此时假设 $H_0 = 0$ 的概率 $P < 0.01$, 变异项的误差非常显著。

当各变异项的 (误差) f 值 $> f_{(d_{f_1}, d_{f_2})0.05}$ 时, 检验假设 H_0 不成立; 此时假设 $H_0 = 0$ 的概率 $P < 0.05$, 变异项的误差显著。

当各变异项的 (误差) f 值 $< f_{(d_{f_1}, d_{f_2})0.05}$ 时, 检验假设 H_0 成立; 此时假设 $H_0 = 0$ 的概率 $P > 0.05$, 变异项的误差不显著。

含义: 各变异项的 (误差) f 值 $> f_{(d_{f_1}, d_{f_2})0.05}$, 表示某组实验数据的误差超出了 95% 的概率水平所允许的误差范围, 此时检验假设 $H_0: \mu = 0$ 的假设不成立, 即假设 $H_0: \mu = 0$ 为错误假设, 错误假设出现的概率 $P > 0.05$, 表明该组实验数据的误差不是偶然因素引起的, 而是存在真正的系统误差, 称该组实验数据的误差显著。

1.2.4.2 可靠性检验方法

以二剂量法的可靠性检验为例: 通过对抑菌圈测量结果的统计分析, 对实验方法设计可能引入的误差项: 碟间、剂间 (高、低剂量)、试品间 (S, T) 和回归、偏离平行等误差进行分析判断。

根据实验设计, 以琥乙红霉素片效价测定结果为例 (表 1.2.3), 采用 F 检验 (方差分析) 的方法, 分两步对抑菌圈测量结果进行可靠性检验。

第一步: 双因素的方差分析。

通过对剂间项、碟间项 (组内项) 与误差项 S^2 进行 F 检验, 判断剂间项差异、碟间项差异是否有显著或非常显著的意义 (表 1.2.4 ~ 表 1.2.6)。

表 1.2.3 琥乙红霉素片效价测定原始记录

碟间		剂间				$\sum Y_m$
		$1\sim k(k=4)$				
		d_{S_1}	d_{S_2}	d_{T_1}	d_{T_2}	
$1\sim m(m=10)$	1	17.04	20.03	16.92	19.44	73.43
	2	17.38	19.89	17.29	19.50	74.06
	3	17.07	20.08	17.44	19.38	73.97
	4	16.83	19.26	16.79	19.37	72.25
	5	16.72	19.07	16.44	19.06	71.29
	6	17.93	19.64	16.60	20.31	74.47
	7	16.66	19.38	16.74	18.97	71.75
	8	16.92	19.21	16.62	19.12	71.87
	9	16.74	19.01	16.14	19.02	70.91
	10	17.29	19.39	16.82	19.09	72.59
$\sum Y_k$		170.58	194.95	167.79	193.25	726.58
		S_1	S_2	T_1	T_2	$\sum Y$

根据二剂量法原理可知：剂间项差异应非常显著($P<0.01$)；碟间项差异应不显著($P>0.05$)。

由双因素的方差分析原理可知：

差方和_(误差) = 差方和_(总) - 差方和_(剂间) - 差方和_(碟间)
自由度(f)_(误差) = f_(总) - f_(剂间) - f_(碟间)

表 1.2.4 双因素的方差分析计算

变异来源	差方和	自由度	方差	各变异项 F 值
误差项	差方和 _(误差) = 差方和 _(总) - 差方和 _(剂间) - 差方和 _(碟间)	$f_{(误差)} = f_{(总)} - f_{(剂间)} - f_{(碟间)}$	$S^2 = \text{差方和}_{(误差)} / f_{(误差)}$	
剂间项	$\sum (\sum Y_k)^2 / m - (\sum Y)^2 / mk$	$f_{(剂间)} = k - 1$	差方和 _(剂间) / f _(剂间)	方差 / $S^2 > f_{(0.01)}$
碟间项	$\sum (\sum Y_m)^2 / k - (\sum Y)^2 / mk$	$f_{(碟间)} = m - 1$	差方和 _(碟间) / f _(碟间)	方差 / $S^2 > f_{(0.01)}$
总变异	$\sum Y^2 - (\sum Y)^2 / mk$	$f_{(总)} = mk - 1$	差方和 _(总) / f _(总)	

表 1.2.5 双因素方差可靠性检验的计算实例——琥乙红霉素片效价测定

变异来源	差方和	自由度	方差	各变异项 F 值	$F_{(d_{f_1}, d_{f_2})0.01}$	P	检验意义
误差项	68.08 - 62.63 - 3.54 = 1.91	27	$S^2 = 1.91/27 = 0.0707$				
剂间项	132 613.2/10 - 527 947.6/40 = 62.63	3	62.63/3 = 20.8867	295.13	$F_{(3,27)0.01} = 4.60$	$P < 0.01$	剂间变异显著
碟间项	52 808.9/4 - 527 947.6/40 = 3.54	9	3.54/9 = 0.3933	5.56	$F_{(9,27)0.01} = 3.15$	$P < 0.01$	碟间变异显著
总变异	13 266.77 - 527 947.6/40 = 68.08	39					

注：剂间变异显著表示抗生素对数剂量与抑菌圈大小呈回归关系时，抑菌圈是随剂量的增加而有规律地变化；碟间变异显著：反映实验操作、实验条件等因素对实验结果的影响。