

## 1201 抗生素微生物检定法

本法系在适宜条件下，根据量反应平行线原理设计，通过检测抗生素对微生物的抑制作用，计算抗生素活性（效价）的方法。

抗生素微生物检定包括两种方法，即管碟法和浊度法。

测定结果经计算所得的效价，如低于估计效价的 90% 或高于估计效价的 110% 时，应调整其估计效价，重新试验。

除另有规定外，本法的可信限率不得大于 5%。

### 第一法 管碟法

本法系利用抗生素在琼脂培养基内的扩散作用，比较标准品与供试品两者对接种的试验菌产生抑菌圈的大小，以测定供试品效价的一种方法。

#### 菌悬液的制备

**枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 悬液** 取枯草芽孢杆菌 (CMCC(B)63 501 或 CVCC717) 的营养琼脂斜面培养物，接种于盛有营养琼脂培养基的培养瓶中，在 35~37℃ 培养 7 日，用革兰染色法涂片镜检，应有芽孢 85% 以上。用灭菌水将芽孢洗下，在 65℃ 加热 30 分钟，备用。

**短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 悬液** 取短小芽孢杆菌 (CMCC(B)63 202 或 CVCC709) 的营养琼脂斜面培养物，照上述方法制备。

**金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 悬液** 取金黄色葡萄球菌 (CMCC (B) 26 003 或 CVCC1882) 的营养琼脂斜面培养物，接种于营养琼脂斜面上，在 35~37℃ 培养 20~22 小时。临用时，用灭菌水或 0.9% 灭菌氯化钠溶液将菌苔洗下，备用。

**藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 悬液** 取藤黄微球菌 (CMCC(B)28 001 或 CVCC1600) 的营养琼脂斜面培养物，接种于盛有营养琼脂培养基的培养瓶中，在 26~27℃ 培养 24 小时，或采用适当方法制备的菌斜面，用培养基 III 或 0.9% 灭菌氯化钠溶液将菌苔洗下，备用。

**大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 悬液** 取大肠埃希菌 (CMCC (B) 44 103 或 CVCC2081) 的营养琼脂斜面培养物，接种于营养琼脂斜面上，在 35~37℃ 培养 20~22 小时。临用时，用灭菌水将菌苔洗下，备用。

**肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 悬液** 取肺炎克雷伯菌 (CMCC (B) 46 117) 的营养琼脂斜面培养物，接种于营养琼脂斜面上，在 35~37℃ 培养 20~22 小时。临用时，用灭菌水将菌苔洗下，备用。

**标准品溶液的制备** 标准品的使用和保存，应照标准品说明书的规定。临用时照表 1 的规定进行稀释。

标准品的品种、分子式及理论计算值见表 2。

表 1 抗生素微生物检定管碟法试验设计表

抗生素类别	试 验 菌	培 养 基		灭菌缓冲液	抗生素浓度 范围 单位/ml	培养条件	
		编号	pH 值			温度 (℃)	时间 (小时)

链霉素	枯草芽孢杆菌 (CMCC (B) 63 501 或 CVCC717)	I	7.8~8.0	7.8	0.6~1.6	35~37	14~16
卡那霉素	枯草芽孢杆菌 (CMCC (B) 63 501 或 CVCC717)	I	7.8~8.0	7.8	0.9~4.5	35~37	14~16
吉他霉素	枯草芽孢杆菌 (CMCC (B) 63 501 或 CVCC717)	II <sup>①</sup>	8.0~8.2	7.8	20~40	35~37	16~18
安普霉素	枯草芽孢杆菌 (CMCC (B) 63 501 或 CVCC717)	I	7.8~8.0	7.8	5.0~20.0	35~37	16~18
盐霉素	短小芽孢杆菌 (CMCC (B) 63 202 或 CVCC709)	IV	6.5~6.6	6.0	10.0~40.0	35~37	14~16
庆大霉素	短小芽孢杆菌 (CMCC (B) 63 202 或 CVCC709)	I	7.8~8.0	7.8	2.0~12.0	35~37	14~16
红霉素	短小芽孢杆菌 (CMCC (B) 63 202 或 CVCC709)	I	7.8~8.0	7.8	5.0~20.0	35~37	14~16
新霉素	金黄色葡萄球菌 (CMCC (B) 26 003 或 CVCC1882)	II	7.8~8.0	7.8 <sup>②</sup>	4.0~25.0	35~37	14~16
土霉素	藤黄微球菌 (CMCC (B) 28 001 或 CVCC1600)	II	6.5~6.6	6.0	10.0~40.0	35~37	16~18
金霉素	藤黄微球菌 (CMCC (B) 28 001 或 CVCC1600)	II	6.5~6.6	6.0	4.0~25.0	35~37	16~18
杆菌肽	藤黄微球菌 (CMCC (B) 28 001 或 CVCC1600)	II	6.5~6.6	6.0	2.0~12.0	35~37	16~18
黏菌素	大肠埃希菌 (CMCC (B) 44 103 或 CVCC2081)	VI	7.2~7.4	6.0	614~2344	35~37	16~18
泰乐菌素	藤黄微球菌 (CMCC (B) 28 001 或 CVCC1600)	II	6.5~6.6	6.0	2.5~10.0	35~37	16~18
大观霉素	肺炎克雷伯菌 (CMCC (B) 46 117)	II	7.8~8.0	7.0	50~200	35~37	16~18

注：①加 0.3% 葡萄糖。② 含 3% 氯化钠。

表 2 抗生素标准品品种与理论值

标准品品种	标准品分子式或品名	理论计算值 (单位/mg)	标准品品种	标准品分子式或品名	理论计算值 (单位/mg)
链霉素	(C <sub>21</sub> H <sub>39</sub> N <sub>7</sub> O <sub>12</sub> ) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	798.3	杆菌肽	杆菌肽锌	
卡那霉素	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub> ·H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	831.6	红霉素	C <sub>37</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>13</sub>	1000
新霉素	硫酸新霉素		盐霉素	C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> O <sub>11</sub> Na	970.3
庆大霉素	硫酸庆大霉素		泰乐菌素	C <sub>46</sub> H <sub>77</sub> NO <sub>17</sub>	1000
土霉素	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> ·2H <sub>2</sub> O	927	大观霉素	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·2HCl·5H <sub>2</sub> O	670.9
金霉素	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ·HCl	1000	吉他霉素	吉他霉素	
安普霉素	C <sub>21</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>11</sub> ·5/2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	687.6	黏菌素	硫酸黏菌素	

**供试品溶液的制备** 精密称 (或量) 取供试品适量, 用各品种项下规定的溶剂溶解后, 再按估计效价或标示量照表 1 的规定稀释至与标准品相当的浓度。

**双碟的制备** 取直径约 90mm、高 16~17mm 的平底双碟, 分别注入加热融化的培养基 (表 1) 20ml, 使在碟底内均匀摊布, 放置水平面上使凝固, 作为底层。另取培养基适量加热融化后, 放冷至 48~50℃ (芽孢可至 60℃), 加入规定的试验菌悬液适量 (能得清晰的抑菌圈为度。二剂量法标准品溶液的高浓度所致的抑菌圈直径在 18~22mm, 三剂量法标准品溶液的中心浓度所致的抑菌圈直径在 15~18mm), 摇匀, 在每 1 双碟中分别加入 5ml, 使在底层上均匀摊布, 作为菌层。放置在水平台上冷却后, 在每 1 双碟中以等距离均匀安置不锈钢小管 (内径为 6.0mm±0.1mm, 高为 10.0mm±0.1mm, 外径为 7.8mm±0.1mm) 4 个 (二剂量法) 或 6 个 (三剂量法), 用陶瓦圆盖覆盖备用。

#### 检定法

**二剂量法** 取照上述方法制备的双碟不得少于 4 个, 在每 1 双碟中对角的 2 个不锈钢

小管中分别滴装高浓度及低浓度的标准品溶液，其余 2 个小管中分别滴装相应的高低两种浓度的供试品溶液；高、低浓度的剂距为 2：1 或 4：1。在规定条件下培养后，测量各个抑菌圈的直径（或面积），照生物检定统计法（通则 1431）中的（2.2）法进行可靠性测验及效价计算。

**三剂量法** 取照上述方法制备的双碟不得少于 6 个，在每 1 双碟中间隔的 3 个不锈钢小管中分别滴装高浓度（S<sub>3</sub>）、中浓度（S<sub>2</sub>）及低浓度（S<sub>1</sub>）的标准品溶液，其余 3 个小管分别滴装相应的高、中、低三种浓度的供试品溶液；三种浓度的剂距为 1：0.8。在规定条件下培养后，测量各个抑菌圈的直径（或面积），照生物检定统计法（通则 1431）中的（3.3）法进行可靠性测验及效价计算。

## 第二法 浊度法

本法系利用抗生素在液体培养基中对试验菌生长的抑制作用，通过测定培养后细菌浊度值的大小，比较标准品与供试品对试验菌生长抑制的程度，以测定供试品效价的一种方法。

### 菌悬液制备

**金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 悬液** 取金黄色葡萄球菌（CMCC（B）26 003 或 CVCC1882）的营养琼脂斜面培养物，接种于营养琼脂斜面上，在 35~37℃培养 20~22 小时。临用时，用灭菌水或 0.9% 灭菌氯化钠溶液将菌苔洗下，备用。

**大肠埃希菌(*Escherichia coli*) 悬液** 取大肠埃希菌（CMCC（B）44 103 或 CVCC2081）的营养琼脂斜面培养物，接种于营养琼脂斜面上，在 35~37℃培养 20~22 小时。临用时，用灭菌水将菌苔洗下，备用。

**白色念珠菌(*Candida albicans*) 悬液** 取白色念珠菌（CMCC（F）98 001）的改良马丁琼脂斜面的新鲜培养物，接种于 10ml 培养基 VII 号中，置 35~37℃培养 8 小时，再用培养基 VII 号稀释至适宜浓度，备用。

**标准品溶液的制备** 标准品的使用和保存，应照标准品说明书的规定。临用时照表 3 的规定进行稀释。

标准品的品种、分子式及理论计算值见表 2。

**供试品溶液的制备** 精密称（或量）取供试品适量，照各品种项下规定进行供试品溶液的配制。

**含试验菌液体培养基的制备** 临用前，取规定的试验菌悬液适量（35~37℃培养 3~4 小时后测定的吸光度在 0.3~0.7 之间，且剂距为 2 的相邻剂量间的吸光度差值不小于 0.1），加入到各规定的液体培养基中，混合，使在试验条件下能得到满意的剂量-反应关系和适宜的测定浊度。

已接种试验菌的液体培养基应立即使用。

表 3 抗生素微生物检定浊度法试验设计表

抗生素类别	试验菌	培养基		灭菌缓冲液 pH 值	抗生素浓度范围 (单位/ml)	培养条件 温度 (°C)
		编号	pH 值			
庆大霉素	金黄色葡萄球菌 (CMCC (B) 26 003 或 CVCC1882)	III	7.0~7.2	7.8	0.15~1.0	35~37
	链霉素	金黄色葡萄球菌	III	7.0~7.2	7.8	2.4~10.8

红霉素	(CMCC (B) 26 003 或 CVCC1882) 金黄色葡萄球菌	III	7.0~7.2	7.8	0.1~0.85	35~37
新霉素	(CMCC (B) 26 003 或 CVCC1882) 金黄色葡萄球菌	III	7.0~7.2	7.8	0.92~1.50	35~37
吉他霉素	(CMCC (B) 26 003 或 CVCC1882) 金黄色葡萄球菌	III	7.0~7.2	7.8	0.8~2.4	35~37
杆菌肽	(CMCC (B) 26 003 或 CVCC1882) 金黄色葡萄球菌	III	7.0~7.2	6.0	0.06~0.30	35~37
大观霉素	大肠埃希菌 (CMCC (B) 44 103 或 CVCC2081)	III	7.0~7.2	7.0	30~72	35~37
安普霉素	金黄色葡萄球菌 (CMCC (B) 26 003 或 CVCC1882)	III	7.0~7.2	7.8	2.9~7.2	35~37
泰乐菌素	金黄色葡萄球菌 (CMCC (B) 26 003 或 CVCC1882)	III	7.0~7.2	7.8	0.6~2.0	35~37

### 检定法

**标准曲线法** 除另有规定外,取适宜的大小厚度均匀的已灭菌试管,在各品种项下规定的剂量-反应线性范围内,以线性浓度范围的中间值作为中间浓度,标准品溶液选择 5 个剂量,剂量间的比例应适宜(通常为 1:1.25 或更小),供试品根据估计效价或标示量溶液选择中间剂量,每一剂量不少于 3 个试管。在各试验管内精密加入含试验菌的液体培养基 9.0ml,再分别精密加入各浓度的标准品或供试品溶液各 1.0ml,立即混匀,按随机区组分配将各管在规定条件下培养至适宜测量的浊度值(通常约为 4 小时),在线测定或取出立即加入甲醛溶液(1→3) 0.5ml 以终止微生物生长,在 530nm 或 580nm 波长处测定各管的吸光度。同时另取 2 支试管各加入兽药稀释剂 1.0ml,再分别加入含试验菌的液体培养基 9.0ml,其中一支试管与上述各管同法操作作为细菌生长情况的阳性对照,另一支试管立即加入甲醛溶液 0.5ml,混匀,作为吸光度测定的空白液。照标准曲线法进行可靠性检验和效价计算。

### 抗生素微生物检定法标准曲线法的计算及统计学检验

#### 标准曲线法的计算及可靠性检验

##### 1. 标准曲线的计算

将标准品的各浓度 1g 值及相对应的吸光度列成表 4。

表 4 抗生素标准品浓度 1g 值与吸光度表

组数	抗生素浓度 1g 值	吸光度
1	$x_1$	$y_1$
2	$x_2$	$y_2$
3	$x_3$	$y_3$
4	$x_4$	$y_4$

...	...	...
$n$	$x_n$	$y_n$
平均值	$\bar{x}$	$\bar{y}$

按公式 (1) 和 (2) 分别计算标准曲线的直线回归系数 (即斜率)  $b$  和截距  $a$ , 从而得到相应标准曲线的直线回归方程 (3)。

$$\text{回归系数: } b = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2} = \frac{\sum x_i y_i - \bar{x} \sum y_i}{\sum x_i^2 - \bar{x} \sum x_i} \quad (1)$$

$$\text{截距: } a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (2)$$

$$\text{直线回归方程: } Y = bX + a \quad (3)$$

## 2. 回归系数的显著性测验

判断回归得到的方程是否成立, 即  $X$ 、 $Y$  是否存在着回归关系, 可采用  $t$  检验。

假设  $H_0: b = 0$ , 在假设  $H_0$  成立的条件下, 按公式 (4) ~ (6) 计算  $t$  值。

$$\text{估计标准差: } S_{Y,X} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - Y)^2}{n-2}} \quad (4)$$

$$\text{回归系数标准误: } S_b = \frac{S_{Y,X}}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (5)$$

$$t = \frac{b - 0}{S_b} \quad (6)$$

式中  $y_i$  为标准品的实际吸光度;

$Y$  为估计吸光度 (由标准曲线的直线回归方程 (3) 计算得到);

$\bar{y}$  为标准品实际吸光度的均值;

$x_i$  为抗生素标准品实际浓度  $1g$  值;

$\bar{x}$  为抗生素标准品实际浓度  $1g$  值的均值。

对于相应自由度 ( $2n-4$ ) 给定的显著性水平  $\alpha$  (通常  $\alpha=0.05$ ), 查表得  $t_{\alpha/2(n-2)}$ , 若  $|t| > t_{\alpha/2(n-2)}$ , 则拒绝  $H_0$ , 认为回归效果显著, 即  $X$ 、 $Y$  具有直线回归关系; 若  $|t| \leq t_{\alpha/2(n-2)}$ , 则接受  $H_0$ , 认为回归效果不显著, 即  $X$ 、 $Y$  不具有直线回归关系。

## 3. 测定结果的计算及可信限率估计

3.1 抗生素浓度  $1g$  值的计算 当回归系数具有显著意义时, 测得供试品吸光度的均值后, 根据标准曲线的直线回归方程 (3), 按方程 (7) 计算抗生素的浓度  $1g$  值。

$$\text{抗生素的浓度 } 1g \text{ 值: } X_0 = \frac{Y_0 - a}{b} \quad (7)$$

3.2 抗生素浓度 (或数学转换值) 可信限的计算 按公式 (4) 和 (8) 计算得到的抗生素浓度  $1g$  值在 95% 置信水平 ( $\alpha=0.05$ ) 的可信限。

$$X_0 \text{ 的可信限: } FL = X_0 \pm t_{\alpha/2(n-2)} \cdot \frac{S_{Y,X}}{|b|} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(X_0 - \bar{x})^2}{\sum x_i^2 - \bar{x} \sum x_i}} \quad (8)$$

式中  $n$  为标准品的浓度数乘以平行测定数;

$m$  为供试品的平行测定数;

$X_0$  为根据线性方程计算得到的抗生素的浓度 1g 值;

$Y_0$  为抗生素供试品吸光度的均值。

3.3 可信限率的计算 按公式(9)计算得到的抗生素浓度(或数学转换值)的可信限率。

$$\text{可信限率 } FL\% = \frac{X_{0\text{高限}} - X_{0\text{低限}}}{2X_0} \times 100\% \quad (9)$$

式中  $X_0$  应以浓度为单位。

其可信限率除另有规定外, 应不大于 5%。

3.4 供试品含量的计算 将计算得到的抗生素浓度(将 1g 值转换为浓度)再乘以供试品的稀释度, 即得供试品中抗生素的量。

**二剂量法或三剂量法** 除另有规定外, 取大小一致的已灭菌的试管, 在各品种项下规定的剂量反应线性范围内, 选择适宜的高、(中、)低浓度, 分别精密加入各浓度的标准品和供试品溶液各 1.0ml, 二剂量的剂距为 2:1 或 4:1, 三剂量的剂距为 1:0.8。同标准曲线法操作, 每一浓度组不少于 4 个试管, 按随机区组分配将各试管在规定条件下培养。照生物检定统计法(通则 1431)中的(2.2)法和(3.3)法进行可靠性测验及效价计算。

#### 培养基及其制备方法

##### 培养基 I

胨	5g	琼脂	15~20g
牛肉浸出粉	3g	水	1000ml
磷酸氢二钾	3g		

除琼脂外, 混合上述成分, 调节 pH 值使比最终的 pH 值略高 0.2~0.4, 加入琼脂, 加热溶化后滤过, 调节 pH 值使灭菌后为 7.8~8.0 或 6.5~6.6, 在 115℃ 灭菌 30 分钟。

##### 培养基 II

胨	6g	葡萄糖	1g
牛肉浸出粉	1.5g	琼脂	15~20g
酵母浸出粉	6g	水	1000ml

除琼脂和葡萄糖外, 混合上述成分, 调节 pH 值使比最终的 pH 值略高 0.2~0.4, 加入琼脂, 加热溶化后滤过, 加葡萄糖溶解后, 摇匀, 调节 pH 值使灭菌后为 7.8~8.0 或 6.5~6.6, 在 115℃ 灭菌 30 分钟。

##### 培养基 III

胨	5g	磷酸氢二钾	3.68g
牛肉浸出粉	1.5g	磷酸二氢钾	1.32g
酵母浸出粉	3g	葡萄糖	1g
氯化钠	3.5g	水	1000ml

除葡萄糖外，混合上述成分，加热溶化后滤过，加葡萄糖溶解后，摇匀，调节 pH 值使灭菌后为 7.0~7.2，在 115℃ 灭菌 30 分钟。

#### 培养基 IV

胨	3g	酵母浸出粉	3g
葡萄糖	1g	琼脂	15~20g
水	1000ml		

除琼脂和葡萄糖外，混合上述成分，调节 pH 值使其比最终的 pH 值略高 0.2~0.4，加入琼脂，加热溶化后滤过，加葡萄糖溶解后，摇匀，调节 pH 值使灭菌后为 6.5~6.6，在 115℃ 灭菌 30 分钟。

#### 培养基 V

胨	10g	琼脂	20~30g
麦芽糖	40g	水	1000ml

除琼脂和麦芽糖外，混合上述成分，调节 pH 值使比最终的 pH 值略高 0.2~0.4，加入琼脂，加热溶化后滤过，加麦芽糖溶解后，摇匀，调节 pH 值使灭菌后为 6.0~6.2，在 115℃ 灭菌 30 分钟。

#### 培养基 VI

胨	8g	牛肉浸出粉	3g
葡萄糖	2.5g	酵母浸出粉	5g
氯化钠	45g	磷酸二氢钾	1g
琼脂	15~20g	磷酸氢二钾	3.3g
水	1000ml		

除琼脂和葡萄糖外，混合上述成分，调节 pH 值使比最终的 pH 值略高 0.2~0.4，加入琼脂，加热溶化后滤过，加葡萄糖溶解后，摇匀，调节 pH 值使灭菌后为 7.2~7.4，在 115℃ 灭菌 30 分钟。

#### 培养基 VII

蛋白胨	7.5g	氯化钠	5.0g
酵母膏	2.0g	葡萄糖	10.0g
牛肉浸出粉	1.0g	水	1000ml

除葡萄糖外，混合上述成分，加热溶化后滤过，加葡萄糖溶解后，摇匀，调节 pH 值使灭菌后为 6.5，在 115℃ 灭菌 30 分钟。

#### 营养琼脂培养基

胨	10g	琼脂	15~20g
氯化钠	5g	肉浸液 <sup>①</sup>	1000ml

除琼脂外，混合上述成分，调节 pH 值使比最终的 pH 值略高 0.2~0.4，加入琼脂，加热溶化后滤过，调节 pH 值使灭菌后为 7.2~7.4，分装，在 115℃ 灭菌 30 分钟，趁热斜放使凝固成斜面。

#### 改良马丁培养基

胨	5.0g	酵母浸出粉	2.0g
---	------	-------	------

---

硫酸镁	0.5g	琼脂	15~20g
磷酸氢二钾	1.0g	水	1000ml
葡萄糖	20.0g		

除葡萄糖外，混合上述成分，微温溶解，调节 pH 值约为 6.8，煮沸，加入葡萄糖溶解后，摇匀，滤清，调节 pH 值使灭菌后为  $6.4 \pm 0.2$ ，分装，在 115℃ 灭菌 30 分钟，趁热斜放使凝固成斜面。

培养基可以采用相同成分的干燥培养基代替，临用时，照使用说明配制和灭菌，备用。

#### 灭菌缓冲液

磷酸盐缓冲液 (pH6.0) 取磷酸氢二钾 2g 与磷酸二氢钾 8g，加水使成 1000ml，滤过，在 115℃ 灭菌 30 分钟。

磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 取磷酸氢二钾 9.39g 与磷酸二氢钾 3.5g，加水使成 1000ml，滤过，在 115℃ 灭菌 30 分钟。

磷酸盐缓冲液 (pH7.8) 取磷酸氢二钾 5.59g 与磷酸二氢钾 0.41 g，加水使成 1000ml，滤过，在 115℃ 灭菌 30 分钟。

磷酸盐缓冲液 (pH8.0) 取磷酸氢二钾 9.8g 与磷酸二氢钾 0.2g，加水使成 1000ml，滤过，在 115℃ 灭菌 30 分钟。