

文章编号: 1001-8689(2018)02-0211-05

庆大霉素组分差异对效价测定可靠性测验的影响

韩宁宁 戴青 于丽娜 王静文 徐媛 赵晖*
(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

摘要: **目的** 对庆大霉素组分差异与效价测定可靠性测验的关系进行探究, 以期得到导致可靠性测验不符合规定的组分差异限值。**方法** 按照《中国药典》2015版二部庆大霉素品种下庆大霉素C组分检查项的液相色谱-蒸发光散射检查法进行组分含量测定, 按照《中国药典》2015版四部微生物检定法进行管碟法与浊度法的测定。**结果** 庆大霉素供试品与标准品 C_2+C_{2a} 相对百分含量差异超过4%时, 即会导致三剂量法可靠性测验不符合规定。**结论** 应关注多组分抗生素组分差异对效价测定准确性的影响, 并在相应质量标准中对允许的组分含量范围进行进一步细化。

关键词: 庆大霉素; C组分相对百分含量的差异; 效价; 可靠性测验

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Influence of the differences of gentamicin components on the reliability test of the potency determination

Han Ning-ning, Dai Qing, Yu Li-na, Wang Jing-wen, Xu Yuan and Zhao Hui
(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081)

Abstract Objective To explore the relationship between the differences of gentamicin components and the reliability test of the potency determination and to further get the limited value of the differences of components which would lead to the inconformity of the reliability test. **Methods** The content of the components was determined by the method of liquid chromatography-evaporative light scattering detection according to the gentamicin C components of gentamicinin Chinese Pharmacopoeia (Vol II, 2015). The potency was determined by the cylinder plate method and the turbidimetric method according to the microbiological assay in Chinese Pharmacopoeia (Vol IV, 2015). **Results** The reliability test of the three-dose method could not meet the requirements when relative percentage differences of C_2+C_{2a} between the gentamicin test sample and the standard is more than 4%. **Conclusion** Attention should be paid to the effects of the differences of components in multicomponent antibiotics on the accuracy of the potency determination, and the allowable content range of components in the corresponding quality standard should be further refined.

Key words Gentamicin; Differences of relative percentage content of C components; Potency; Reliability test

效价测定要求供试品与标准品具有同质性^[1], 二者才会产生平行的剂量反应曲线。对于多组分抗生素而言, 尤其是当各组分对整体效价贡献不一致时, 供试品与标准品每种组分的差异过大则可能会导致二者

产生异质性, 进而影响剂量反应曲线的平行, 在效价测定过程中即表现为可靠性测验不符合规定。

庆大霉素(gentamicin, GM)是由小单孢菌属(*Micromonospora purpurea*)发酵产生的一组结构相近

收稿日期: 2017-03-21

作者简介: 韩宁宁, 女, 生于1984年, 助理研究员, 主要从事抗生素检验检测工作, E-mail: hnn19841001@126.com

*通讯作者, E-mail: 171977364@qq.com

的多组分氨基糖苷类抗生素,其主要由 C_1 、 C_{1a} 、 C_2 和 C_{2a} 4个活性成分组成,另外还有其他几个微量组分。杨利红等^[2]已研究了庆大霉素4种组分对其效价的贡献,分别为 C_{1a} 1286.98(单位/mg)、 C_1 739.61(单位/mg)、 C_{2a} 1079.52(单位/mg)和 C_2 1095.74(单位/mg)。前期试验已发现,当原料药与标准品 C_2+C_{2a} 相对百分含量相差达9%时会导致三剂量法可靠性测验不符合规定^[3]。本文对市场上抽取的6批组分含量各异的庆大霉素原料药采用管碟法和浊度法两种方法分别进行了二剂量和三剂量效价测定,考察可靠性测验各项参数是否符合规定,以求得出对可靠性测验产生质变性影响的组分差异限值。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

WBS-100微生物浊度法测定仪(北京先驱威锋技术开发公司);CHB-1型抗生素效价测量仪(北京潮声技术开发公司);高效液相色谱仪(HPLC)(Waters e2695色谱系统,Empower色谱工作站);2000ES型蒸发光散射检测器(ELSD)(Alltech);XS205分析天平(Mettler Toledo)。

1.2 菌株、样品、培养基与试剂

金黄色葡萄球菌CMCC(B)26003及短小芽孢杆菌CMCC(B)63202(中国食品药品检定研究院)。庆大霉素标准品[来源/批号/含量/组分:中国兽药药品监所/K0071502/630(单位/mg)/ C_{1a} =27.8%、 C_2 =24.6%、 C_{2a} =22.0%和 C_1 =25.7%];小诺霉素标准品(来源/批号:中国食品药品检定研究院/130342-201404);西索米星对照品(来源/批号:中国食品药品检定研究院/130635-201301)。庆大霉素原料药(来源/批号:烟台只楚药业有限公司/160310073;烟台只楚药业有限公司/15101666;四川长征药业股份有限公司/20151002;山东齐发药业有限公司/未标明批号;黑龙江格林赫思生物科技有限公司/201606002;华北制药集团河北华乐有限公司/Q160604)。抗生素检定I号培养基、抗生素检定III号培养基、pH值7.8的磷酸盐缓冲液、生理盐水及灭菌水均由北京中海生物科技有限公司提供配制。甲醇(Merck公司色谱纯试剂);三氟乙酸(Dikma公司色谱纯试剂);其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 HPLC-ELSD法测定庆大霉素原料药C组分

根据《中华人民共和国药典》(简称《中国药

典》)2015年版二部庆大霉素质量标准^[4]对6批庆大霉素原料药采用HPLC-ELSD法进行C组分的测定。

色谱条件与系统适用性试验:Waters XBrige C_{18} 色谱柱(250mm×4.6mm, 5 μ m);以0.2mol/L三氟乙酸-甲醇(96:4)为流动相;流速为0.6mL/min;蒸发光散射检测器检测(漂移管温度110℃,载气流量2.5L/min)。取庆大霉素、小诺霉素标准品和西索米星对照品各适量,分别加流动相溶解并稀释成含庆大霉素总C组分2.5mg/mL、小诺霉素0.1mg/mL和西索米星25 μ g/mL的溶液,分别量取20 μ L注入液相色谱仪,庆大霉素标准品溶液色谱图应与标准图谱一致,西索米星峰和庆大霉素 C_{1a} 峰之间,庆大霉素 C_2 峰、小诺霉素峰和庆大霉素 C_{2a} 峰之间分离度均应符合规定;西索米星对照品溶液色谱图中主成分峰高信噪比应大于20;精密量取小诺霉素标准品溶液20 μ L,连续进样5次,峰面积的相对标准偏差应符合要求。

测定法:分别取庆大霉素标准品适量,精密称定,加流动相溶解并稀释制成含庆大霉素总C组分1.0、2.5和5.0mg/mL的溶液作为标准品溶液(1)、(2)和(3)。取上述3种溶液各20 μ L,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,计算标准品溶液各组分浓度的对数值与相应的峰面积对数值的线性回归方程,相关系数(r)应不小于0.99;另取庆大霉素原料药适量,精密称定,加流动相溶解并稀释制成中含庆大霉素总C组分2.5mg/mL的溶液,同法测定,用庆大霉素各分量的线性回归方程分别计算供试品中对应组分的量(C_{Cx}),并按下式计算各组分含量(%、mg/mg)。

$$C_x(\%) = C_{Cx} / (m_l / V_l) \times 100\%$$

式中 C_x 为各组分含量(%、mg/mg); C_{Cx} 为由回归方程计算出的各分量的含量(mg/mL); m_l 为供试品重量(mg); V_l 为体积(mL)。

根据所得的各分量的量(C_x)按下式计算各分量的相对百分比例(C'_x)。

$$C'_x(\%) = C_x / (C_{1a} + C_{2a} + C_1) \times 100\%$$

2.2 管碟法测定庆大霉素原料药效价,考察可靠性测验参数

根据《中国药典》2015年版四部抗生素微生物检定法^[5],分别对6批庆大霉素原料进行管碟法二剂量与三剂量的效价测定。检定菌株CMCC(B)63202处理方法为营养琼脂大试管(3cm×15cm)培养7d后用6mL生理盐水洗脱,65℃水浴30min,得菌悬液,上层培养基菌悬液浓度为2%。二剂量法抗生素高/低浓

度分别为5/2.5(单位/mL)，三剂量法抗生素高/中/低浓度分别为5/4/3.2(单位/mL)。

通过对剂间变异的分析，以测验标准品和供试品的对数剂量和反应的关系是否显著偏离平行直线。二剂量法需分析回归和偏离平行项，三剂量法还需再分析二次曲线和反二次曲线，具体统计计算方法参见《中国药典》2015年版四部生物检定统计法^[6]。可靠性测验结果中，回归项应非常显著($P<0.01$)，偏离平行项应不显著($P>0.05$)，三剂量法除上述规定外，还需二次曲线和反向二次曲线各项均不显著($P>0.05$)。

2.3 浊度法测定庆大霉素原料药效价，考察可靠性测验参数

根据《中国药典》2015年版四部附录抗生素微生物检定法^[5]，分别对6批庆大霉素原料进行浊度法二剂量和三剂量的效价测定。检定菌株CMCC(B)26003处理方法为营养琼脂大试管(3cm×15cm)培养22h后用6mL生理盐水洗脱，将该菌悬液用生理盐水进行1:10稀释，得稀释菌悬液，抗生素检定III号培养基菌悬液浓度为稀释菌悬液的0.2%。二剂量法抗生素高/低浓度分别为0.3/0.2(单位/mL)，三剂量法抗生素高/中/低浓度分别为0.25/0.2/0.16(单位/mL)。

浊度法可靠性测验各项的规定及统计计算方法同管碟法。

3 结果与分析

3.1 不同厂家庆大霉素原料药C组分百分含量与标准品的差异

庆大霉素组分测定的色谱图如图1所示，组分测定结果如表1所示。由表1可知，同一厂家不同批次庆大霉素原料药(只楚160310073与15101666)C组

分百分含量接近，而不同厂家各组分含量与标准品差异各不相同，如C₂+C_{2a}的差异从-11.8%至1.3%不等，这与不同厂家使用的发酵菌株各有差异有关。考虑到庆大霉素C₂和C_{2a}理论效价非常接近^[2][(分别为1095.74和1079.52(单位/mg)]，且各国药典标准中C₂和C_{2a}均作为整体进行质控，因此除将各原料药C₁与C_{1a}与标准品进行比较外，将C₂与C_{2a}之和与标准品进行比较。

3.2 不同厂家庆大霉素原料药管碟法与浊度法可靠性测验结果比较

表2结果显示采用二剂量法时，6批原料药的管碟法与浊度法可靠性测验均符合规定。但采用三剂量法时，只楚/160310073、只楚/15101666及格林赫思/201606002这3批原料药的管碟法与浊度法可靠性测验均符合规定，但长征/20151002、华栎/Q160604及齐发/-这3批原料药管碟法与浊度法均有1项或2项甚至3项不符合规定(表2)。

3.3 对庆大霉素组分差异与可靠性测验数据的关系的统计分析

由于6批样本二剂量管碟法与浊度法可靠性测验均符合规定，因此仅统计三剂量法的相关数据。按照管碟法与浊度法可靠性测验均符合规定与否

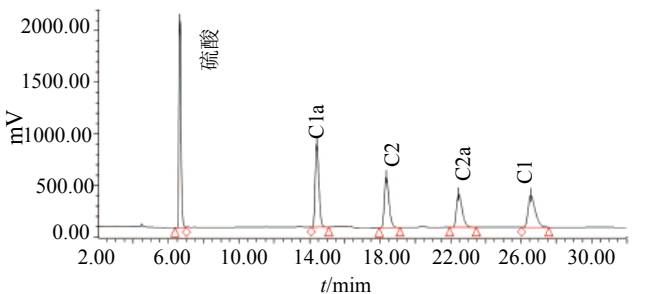


图1 庆大霉素组分测定色谱图
Fig. 1 Chromatogram of gentamicin components

表1 不同厂家庆大霉素原料药C组分相对百分含量与标准品的差异

Tab. 1 Differences of C components' relative percentage content between the active pharmaceutical ingredients (APIs) from different manufacturers and the standard of gentamicin						
组分	长征/20151002	华栎/Q160604	齐发/-	只楚/160310073	只楚/15101666	格林赫思/201606002
C _{1a} /%	31	27	29.8	23.8	23.2	24.9
C ₂ /%	19.7	26.8	29.3	23.7	26.2	19.7
C _{2a} /%	15.1	13.6	13.1	22.5	21.7	23.1
C ₁ /%	34.2	32.6	27.8	30	28.9	32.3
与标准品比较						
C _{1a} 相差/%	3.2	-0.8	2	-4	-4.6	-2.9
C ₁ 相差/%	8.5	6.9	2.1	4.3	3.2	6.6
C ₂ +C _{2a} 相差/%	-11.8	-6.2	-4.2	-0.4	1.3	-3.8

“-”：表示原料药组分相对百分含量比标准品低

表2 不同厂家庆大霉素原料药管碟法与浊度法可靠性测验结果

Tab. 2 The comparison of reliability detected by cylinder plate method and turbidimetric method among APIs of different manufactures

厂家/批号		长征/20151002	华荣/Q160604	齐发/-	只楚/160310073	只楚/15101666	格林赫思/201606002
管碟法二剂量	回归	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$
	偏离平行	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$
浊度法二剂量	回归	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$
	偏离平行	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$
管碟法三剂量	回归	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$
	偏离平行	$P>0.05$	$P<0.01$	$P=0.01$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$
	二次曲线	$P>0.05$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$
	反二次曲线	$P<0.01$	$P>0.05$	$P<0.01$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$
	回归	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$
	偏离平行	$P<0.01$	$P>0.05$	$P<0.01$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$
浊度法三剂量	二次曲线	$P>0.05$	$P<0.01$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$
	反二次曲线	$P<0.01$	$P>0.05$	$P<0.01$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$

分为两组：组1：二者均不符合规定(长征、华荣、齐发)；组2：二者均符合规定(只楚160310073及15101666、齐发)。

将上述两组的C组分相对百分含量与标准品的差异的绝对值计算均值(表3)。结果显示，对于组分C_{1a}而言，不符合规定的差异均值反而比符合规定的小，与试验设计预期相反，但两组均值本身比较接近(仅相差1.8%)，说明对本次试验收集到的6组样本而言，C_{1a}差异对可靠性测验的影响可忽略不计。

对C₁及C₂+C_{2a}的两组数据分别应用SPSS软件进行均值独立样本 t 检验(表4~5)。由两表结果可知，C₁及C₂+C_{2a}差异绝对值的显著性sig均大于0.05(分别为0.244及0.188)，判定方差等同性成立。经查表自由度 $df=4$ ， $\alpha=0.10$ 时 t 检验临界值为2.132。C₁差异绝对值的 $t=0.523<2.132$ ，C₂+C_{2a}差异绝对值的 $t=2.234>2.132$ ，因此判定C₁差异绝对值不具有显著性差异，C₂+C_{2a}差异绝对值在90%的置信区间内具有显著性差异。

由此可见，引起本试验6批样本效价测定可靠性测验产生差异的主要原因是其与标准品C₂+C_{2a}百分含量的差异。结合观察表1~2数据，将供试品与标准品C₂+C_{2a}的差异绝对值进行从大到小的排序，中位值为齐发/-4.2%和格林赫思/20160600 -3.8%。前者三剂量法可靠性测验不符合规定，后者符合规定，故C₂+C_{2a}

百分含量的差异限值为4%。

4 讨论

4.1 探究庆大霉素组分差异对效价测定可靠性测验影响的意义

4.1.1 为抗生素标准品制备标定中原料药的选择提供依据

抗生素标准品的制备标定一般均采用三剂量法。对于庆大霉素而言，当可溯源的标准品组分含量一定时，选取与其组分含量接近的原料药进行测定才可获得良好的可靠性测验结果，进而获得准确的标定值。根据本文结果，选择原料药时，应先对其进行HPLC-ELSD法组分含量测定，根据测定结果计算其与标准品的差异，当原料药与标准品C₂+C_{2a}相对百分含量差异超过4%时，即应更换原料药厂家或批次。这一过程可大大节约原料药选择的时间成本。其他多组分抗生素标准品的制备标定亦可采用相似的思路进行原料药的选择。

4.1.2 引起对多组分抗生素组分差异影响效价测定准确性的重视

庆大霉素为典型的多组分抗生素，且其中四种主组分所占相对百分含量比较接近，效价贡献差异较大，容易出现组分差异大影响可靠性测验的问题。对于其他多组分抗生素，如多黏菌素、吉他霉素、杆菌肽等，也可能出现类似问题。在检验过程中，对效价测定可靠性测验不符合规定的问题不要一味通过重复试验或删减菌碟而解决，可以尝试通过考察组分差异来解释。同时应注意组分差异过大时可靠性测验不符合规定的结果也是不准确的。

4.1.3 为庆大霉素质量标准中C组分百分含量范围的进一步细化提供依据

2010年版《中国药典》^[7]及《中国兽药典》^[8]

表3 可靠性测验符合规定与否的两组数据C组分差异的均值
Tab. 3 Mean value of the differences of C components from two groups divided by the results of the reliability test

组别	C _{1a} 差异绝对值的均值	C ₁ 差异绝对值的均值	C ₂ +C _{2a} 差异绝对值的均值
组1	2	5.8	7.4
组2	3.8	4.7	1.8

表4 C₁差异绝对值的均值独立样本t检验结果

Tab. 4 The mean independent t test results of the absolute value of C₁ deference

		莱文方差等同性检验		平均值等同性t检验			
		F	显著性	t	自由度	显著性(双尾)	平均值差值
C ₁	假定等方差	1.864	0.244	0.523	4	0.629	1.1333
	不假定等方差			0.523	3.011	0.637	1.1333

表5 C₂+C_{2a}差异绝对值的均值独立样本t检验结果

Tab. 5 The mean independent t test results of the absolute value of C₂+C_{2a} deference

		莱文方差等同性检验		平均值等同性t检验			
		F	显著性	t	自由度	显著性(双尾)	平均值差值
C ₂ +C _{2a}	假定等方差	2.516	0.188	2.234	4	0.089	5.5667
	不假定等方差			2.234	2.769	0.119	5.5667

对庆大霉素C组分的规定为相对百分含量均为：C₁应为25%~50%；C_{1a}应为15%~40%；C₂+C_{2a}应为20%~50%。2015版《中国药典》^[4]及《中国兽药典》^[9]对C组分的规定除相对百分含量外增加了绝对百分含量：C₁应为14%~22%；C_{1a}应为10%~23%；C₂+C_{2a}应为17%~36%。可见药典对每种组分的百分含量规定是十分宽泛的，相对百分含量允许的跨度达到了25%~30%。而根据本文结果，C₂+C_{2a}相对百分含量差异绝对值超过4%时，即可能引起效价测定的不准确。因而C₂+C_{2a}相对百分含量允许的跨度应不大于8%。

4.2 组分差异仅对效价测定三剂量产生影响但并未影响二剂量的原因

二剂量法的剂间比一般为2:1^[5](本文浊度法二剂量为保证高低剂量吸光度均可同时在0.3~0.7之间而采用剂间比1.5:1)，而三剂量法剂间比一般为1.25:1。二剂量法高低剂量之间更大的浓度差导致供试品与标准品的剂量反应曲线不易产生交叉，进而对偏离平行的影响减小。另外，二剂量法可靠性测验仅对回归、偏离平行进行了要求，但对于二次曲线和反二次曲线并无限制，也使其更容易符合规定。但是，由于本文仅选取了6批原料药作为样本，因此并不排除原料药与标准品组分差异进一步增大时二剂量法可靠性测验也无法符合规定的可能。

4.3 设计管碟法与浊度法同时考察可靠性测验的原因

管碟法为效价测定的经典方法，但对于多组分抗生素而言，由于不同组分效价各有差异导致各组分在同一培养基上的扩散程度不同，因而易产生双圈甚至多圈现象，进而导致测量的不准确。另外，管碟法还受人员熟练程度、培养基、环境等多种外界因素的影响，误差较浊度法大。浊度法测量原理与管碟法不

同，通过测量液体培养基的吸光度值的变化，避免了多圈现象的影响，因而可以更准确的反映可靠性测验参数的真实情况。本文试验设计管碟法与浊度法同时考察可靠性测验结果，可便于二法结果相互验证，避免假阳性或假阴性的统计结果。

4.4 样本量较少对本试验统计的影响

由于仅收集到6批庆大霉素原料药，经统计发现可靠性测验符合规定与否的两组数据C₁及C_{1a}与标准品的差异并不显著，因此仅得到了引起可靠性测验质变性影响的C₂+C_{2a}的差异限值。但基于文献报道4种组分效价贡献的差异性^[2]，以及供试品与标准品组分差异过大会引起可靠性测验不符合规定的推论，当来自不同厂家的样本量足够大时，可以得出引起可靠性测验质变性影响的C₁及C_{1a}差异限值。

参考文献

[1] 张治铨. 抗生素药品检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 1.

[2] 杨利红, 常艳, 姚尚辰, 等. HPLC法同时测定庆大霉素的组分纯度和效价活性[J]. 药学学报, 2012, 47(12): 1660-1666.

[3] 韩宁宁, 徐娜, 于丽娜, 等. 庆大霉素标准品制备中效价测定及原材料选择的研究[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(9): 37-40.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. (2015年版二部). 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1324-1326.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. (2015年版四部). 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 160-165.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. (2015年版四部). 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 182-200.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. (2010年版二部). 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 976-977.

[8] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. (2010年版一部). 北京: 中国农业出版社, 2010: 294-296.

[9] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. (2015年版一部). 北京: 中国农业出版社, 2015: 352-355.