

药品中抗生素含量检测方法研究

欧阳蕾

(广西梧州制药(集团)股份有限公司, 广西 梧州 530011)

摘要 在现代医疗中, 抗生素作为抗菌物质其身影无处不在, 收录进药典的抗生素药品已经高达370种左右, 常见的抗生素含量测定方法也有超过3种以上, 常见的方式有高效液相色谱法、抗生素微生物检测法、可见分光光度法, 也有些是用滴定法来检测含量的, 这些检测方式各有侧重也各有优势, 工作人员需要酌情使用。以上这些检测方法有一定的重复性, 经过药典的不断改编和收录, 新方法的加入能够解决传统方法之间不协调的问题。不得不提到的现象是抗生素滥用已经成为严重的生态毒害, 这也从侧面反映了对抗生素含量的测定已经成为解决这一困扰的关键手段。本文将围绕药品中抗生素含量检测方法展开论述, 希望能为有关工作者提供参考。

关键词 药品; 抗生素含量; 微生物检测法; 管碟法; 比浊法

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 2097-3365(2024)04-0094-03

抗生素是一类次级代谢产物, 它是由动植物、微生物产生的具有抗病原体 and 活性的物质, 主要的作用是干扰、抑制细菌的发育功能。将抗生素添加在药品中能够起到抑制细胞壁合成的作用, 对细菌的细胞膜具有穿透性, 起到抑菌、杀菌、消炎的效果。抗生素大多数会被使用在细菌感染的治疗中, 有些抗生素可以治疗阴性杆菌导致的感染, 还有一些抗生素含有内酰胺类物质可以对抗高端螺旋体感染。四环素就是人们常见的一种抗生素, 它可以用来治疗螺旋体感染, 对抗其它类型的恶性肿瘤。除了人体用药之外, 家畜动物感染也经常使用抗生素, 例如红霉素、替米考星治疗金黄色葡萄球菌引起的各项感染病症, 又比如利用林可酰胺类抗生素可以治疗坏死性肠炎和奶牛急性乳腺炎, 这充分说明了药物中抗生素的存在是不可避免的, 然而抗生素的耐药性问题终究还是爆发了出来, 如果不加以控制将会影响公共健康, 这里的控制不是禁止抗生素添加, 而是要用科学的手段检测抗生素的含量。

1 微生物检测法

微生物检测法指的是查看抗生素对微生物的生长和发育是否具有明显的抑制作用, 以此为依据来计算抗生素的活性, 常用的方式和手段包括管碟法和比浊法两种。采用微生物检测法灵活性较高, 灵敏度也较强, 能够直接显示该项抗生素是否具有抗菌能力, 因此这种方法被广泛地使用在多种抗生素类药物的检测中。

1.1 管碟法

目前国际上较为常用的方式是管碟法, 管碟法能

够对抗生素的效价展开有效测定, 使用管碟法需要依靠琼脂作为介质, 查看抗生素的扩散作用。抗生素在琼脂之中放置可以形成抑菌圈, 计算抑菌圈的大小可以推算出生物活性以及其前后变化情况。目前管碟法在各个国家的抗生素微生物检测中都得到了广泛的使用并取得不错的效果, 采用管碟法时要观察抗生素在培养皿的扩散情况^[1]。一般而言, 抗生素浓度由上到下会形成自然弧度和梯度, 中心浓度较高, 边缘浓度较小, 如果抗生素浓度已经大于最低抑制浓度, 就说明样本中的细菌已经被有效抑制, 从而不能有效繁殖, 说明抗生素有效, 从肉眼上可以看到透明的抑菌圈。要根据扩散定律计算抗生素总量和抑菌圈直径之间的关系, 经过实践可以发现二者之间呈现出线性关系, 工作人员可以根据此项现象来计算抗生素的生物活性。我国药典所收录的抗生素检测方法大多数是高效液相色谱法, 其次就是微生物检测方式, 适合用微生物方式做出检测的包括青霉素、红霉素、氨基糖苷类抗生素, 还包括卡纳霉素盐酸、大观霉素, 也包括四环素类抗生素例如土霉素。和中国药典相比, 欧盟和美国药典采用管碟法的案例数量较多, 例如在检测大观霉素、酒石酸泰乐菌素的时候, 采用管碟法都可以有效地测试微生物含量。

除了在常规药品中检测抗生素含量之外, 使用管碟法可以检测饲料添加剂是否存在非法添加物, 也可以检测非法添加物质中是否含有禁用抗生素。例如, 在兽药散剂中使用管碟法展开抗生素检测就可以查出

卡纳霉素生物以及其中间产物。使用管碟法的时候也可以检测物质生物活性,测试重组蛋白是否具有生物化学活性,从而计算重组蛋白是否能有效抑制大肠杆菌的生长。有学者发现,管碟法还可以测试乳酸菌菌株对抗生素的药物是否具有耐药性和抵抗性,这种方法适合用来检测组分程度较为复杂的发酵类药物,这是它的优势和特别之处,采用高效液相色谱法等其它方式不能完全替代。在使用管碟法的时候有一定的技术要求,工作人员需要具备较强的专业理论知识和操作经验,同时它的操作步骤相对较为复杂,容易受到外界环境因素的不良干扰。相对于管碟法而言,使用高效液相色谱法并不存在这些问题,有一些药物的抗生素含量测定可以采用高效液相色谱法来替代。目前在测定乳糖酸红霉素的时候,官方建议的方式就是高效液相色谱法,在检测的过程中会更加方便,也可以用该方法来测量分拉霉素的含量。和传统的微生物抗生素检测方式相比,后者在检测时精密程度较好并且方便快捷。但必须认识到的是,虽然微生物检测方式容易受到环境的影响,产生一定的误差,但是将它用来测试多组分抗生素拥有其它方法不可替代的优势,因此这种方式依然是主要的检测手段,在未来一段时间内还会被广泛推广。

1.2 比浊法

比浊法也是常用的微生物检测手段之一,它可以在液体培养基中查看抗生素是否对细菌有生长抑制作用,其主要的工作思路是测试培养细菌的培养皿浊度值大小,从而和对照组产生比较。因此,比浊法也是对抗生素有效定效定价的一种方式,这种方式特别适合悬浊液的检测^[2]。和管碟法检测相比,比浊法不对环境做太高的要求,也不要求检测器具和仪器具备过高的灵敏程度。有些学者利用比浊法检测了药品乳剂中夫西地酸的含量并通过了科学验证,采用比浊法可以检测对象的吸光度和浓度,并支持展开重复实验,这种方式的精密程度和平均回收率都较好,因此可以大大提高检测数据的准确度。比浊法还可以成功地检测泰乐菌素的含量并计算线性关系,如果要用比浊法进行微生物的检测,其必要条件是确保试验菌稳定性较强,因此这一过程中对微生物数量的控制非常关键。将其用于抗生素含量检测中耗时较短,在某种程度上可以替代传统的扩散检测法,该项检测技术不使用有机溶剂,减少了化学污染产生的概率和可能性,但是这种方法在实际过程中不常使用,主要是由于样品含

有杂质,容易滋生细菌,不适合有色浑浊液的样品检测,并且比浊法试管需要具有较高的透明度,培养基要求较为清澈,若完全满足以上要求会导致成本提升。

2 高效液相色谱法

高效液相色谱法的英文简称是 HPLC,它是柱色谱的常用形式之一,将其运用在药品检测中可以有效测定抗生素含量,这种方式可以在高压状态下检测样品混合物,将其输入色谱柱固定相之中计算吸附和分配系数的差异,达到不同介质分离的效果,再利用两种色谱柱的相对移动进行元素交换,从而达到不同物质分离的效果。高效液相色谱法可以运用在各种类型的化工产业和医药产业中,除了药品含量检测还可以被医学和化学药品行业所采纳^[3]。我国药典收录了将近两百种高效液相色谱法的测定方式,占整体测试方式的 73% 左右,在测试氨基糖苷类抗生素的时候这一方法特别适用,比如检测盐酸大观霉素和硫酸依替米星试剂的时候就可以经常使用,也可以用高效液相色谱法检测酰胺醇类抗生素,比如琥珀氯霉素和盐酸林可霉素。可以用该项方法作为检测手段的还包括四环素类药物,例如抗生素、盐酸土霉素、盐酸多西环素^[4]。除了人体用药之外,兽药质量标准相关文件也规定了高效液相色谱法可以检测的范围,占整体兽药检测技术的 36%,比如在检测大环内酯类抗生素的时候就可以用来测试酒石酸泰万菌素的抗生素含量,经常使用的大环内酯类抗生素包括硫酸卡那霉素、泰乐菌素以及相关衍生物,还可以用来检测阿莫西林、苯唑西林和普鲁卡因青霉素等药剂。相对于其他的检测方式,高效液相色谱法在检测抗生素含量时操作更加方便,对环境要求不高,成本较低,因此适用范围较大。利用高效液相色谱法发展的反向分支可以用来检测头孢洛林浓度,计算其相关系数,这种方法经过验证适合用在原料药的检测中。有些学者利用高效液相色谱法检测万古霉素的样品抗生素含量并成功地将其运用在医药领域,为人体健康服务。还有一些学者设置了 LiChroCARTRP-18 色谱柱,测定了硫酸头孢喹酮的浓度含量,高效液相色谱法展开抗生素含量的测定具有较强的重复性能,尤其是对头孢类药物的抗生素含量检测可以通过数据的反复比对建立验证模型。

3 可见分光光度法

可见分光光度法也叫紫外 UV 方法,在波长 800nm 以内可以检测待测样本的吸光度,这种方式经常用于

物质鉴别和杂质的测定,当光束穿透待测溶液和待测样本的时候,物质的吸光程度会随着波长的变化而发生改变,可见分光光度法可以用在定量测量上检测溶剂吸光程度,再和对照组的吸光度进行比较,用科学的系数计算法查看样品溶液浓度^[5]。我国药典收录了诸多可见分光光度法检测抗生素含量的先例,从而将此方法确定为官方检测手段之一。常见的包括放线菌素和注射用放线菌素,还可以用此方式来检测酰胺醇类抗生素,例如琥珀氯霉素及其衍生物,这种方法在使用时需要借助恩诺沙星可溶性粉,它的运用方便各种药物品质的检测,操作方式较为便捷,并且可以有效测定抗生素含量百分比。相对于经常使用的高效液相色谱方式,可见分光光度法不需要使用昂贵的仪器,经济性较好,性价比较高,这种方式可以运用在常规药品的抗生素检测中,比如在350nm以下的波长范围中可以检测吸光度小于270nm的药品,相关系数可以设置为0.9996,回收率较好,超过100%。通过紫外方法可以检测恩诺沙星纳米乳的线性范围和平均回收率,从而计算出抗生素含量。利用紫外法也可以测试其他霉素预混剂的含量大小。以上这些成功的运用案例都是可见分光光度法的成功表现,和微生物检测方法相比较,这种方式较为简单快捷,不会对环境产生过高的要求。还有一些学者利用紫外方法测试了克拉霉素含量和大观霉素含量,它在操作时相对较为简便,因此具有良好的推广价值,但是其缺点也是显著的,那就是紫外线会受到吸光度的影响而发生波动,导致待测样本发生不平行的问题,相近波长不能彼此区分,重复性也不好。在未来随着技术改进,这项技术可以和高效液相色谱法综合使用。

4 毛细管电泳法

毛细管电泳法是除了管碟法、可见分光光度法和高效液相色谱法之外的又一大方法,它的工作原理是把弹性石英毛细管作为分离通道,用高压电流作为驱动,对待测样本药品的分配行为差异展开检测和分离。目前常用的头孢菌素抗生素含量的检测已经有了多种和毛细管电泳法相关的检测手段,这些检测手段并用可以同时多种抗生素含量的分析,使用毛细管电泳方法和高效液相色谱法一样,其效率都较高,分离能力较强,但是毛细管电泳方法相对于前者不会消耗大量的试剂,但是这种方法也有一点缺陷,那就是不太灵敏,因此在未来还要对毛细管电泳法展开技术革

新与拔高。随着现代科技的手段发展,更多的新方法将被用于抗生素含量的测定。比如有些学者采用干燥绿植片作为工具,对传统的微生物检测方式展开替代,检测了恩拉菌素预混剂中有效成分的含量,这项技术在使用时相对较为简单,也可以重复实验,最大限度地避免了微生物检测法容易出现的外界干扰因素,大量样品也可以同时检测,不需等待。还有些学者利用催化剂例如金纳米颗粒检测了卡纳霉素的含量,TMB物质可以氧化于过氧化氢,产生吸光度较强的蓝色物质,在加入一定的试剂之后,柠檬酸可以催化过氧化氢的反应,从而快速灵敏的测量微生物的含量。更关键的是,检测抗生素含量的方式和手段也可以用来临床使用,为医生提供新的治疗工具,在治疗后有利于患者的康复和保健。并且学者发现,大观霉素利用中性介质可以产生更多的衍生物,从而补充了传统的光谱测定方式,建设了荧光法。荧光法的测试又是一大进步,目前在药物监测系统和抗生素含量检测中都发挥了不错的作用。

5 结语

抗生素检测对药品的疗效有着非常重要的作用,检测药品中的抗生素含量可以采用多元化的检测方法,这些抗生素的检测方法各有自身的特点,并且都能满足不同药品中抗生素的检测要求,药品检测中常见的抗生素的检测方法有:微生物检测法、高效液相色谱法、可见分光光度法,不同的检测方法也有不同的工具和分支,有关工作人员要酌情选择,以提高抗生素含量检测的准确性。在未来更应加大研发力度,研制出更加高效、便捷、精准且经济的抗生素检测方法。

参考文献:

- [1] 陈凌平,曹坤,马宗庆.抗生素类药品网络监控系统设计及应用[J].中国医院用药评价与分析,2006(01):59-60.
- [2] 赵健,李野.遏制抗生素滥用是药品监管的重要责任[J].中国药业,2004(12):4-5.
- [3] 台订定“动物用抗生素、麻醉、剧毒及生物药品管理办法”[J].台湾农业探索,1997(03):37.
- [4] 郭清峰,缴香琴,毛巍巍.对大环内酯类抗生素现行药品标准鉴别项的思考[J].中国药事,1995(04):249,264.
- [5] 洋阳.不含抗生素,化学药品的禽类添加营养粉液的制作方法[J].精细与专用化学品,1992(10):36.