浊度法测定盐酸米诺环素原料及其片剂的效价

高燕霞,姜建国,王茉莉(河北省药品检验所,石家庄 050011)

摘要:目的　建立浊度法测定盐酸米诺环素原料及其片剂效价的方法。方法:以金黄色葡萄球菌为实验菌,加菌量 2.0% ~ 4.0%(V/V),37 ℃ ±0.5 ℃培养约 4 h测定。结果:抗生素线性浓度为 0.03 ~ 0.10 μg·mL^{-1},原料二剂量法的平均回收率为 99.42%,RSD为 2.1%(n = 9);片剂二剂量法的平均回收率为 100.22%,RSD为 1.9%(n = 9)。结论:本方法灵敏,快速,影响因素较少,可作为测定盐酸米诺环素原料及其片剂的效价的方法。

作者简介:高燕霞,女,硕士,副主任药师　Tel:(0311)8521 2008 - 8028　E-mail:gyx990928@tom.com

关键词: 效价;浊度法;盐酸米诺环素;片剂
中图分类号: R917.105; R917.795　　文献标识码: B　　文章编号: 1007-7693(2008)07-0641-04

Content Determination of Minocycline Hydrochloride and its tablets by Turbidimetric Method

GAO Yan-xia, JIANG Jian-guo, WANG Mo-li(*The Institute for Drug Control of HeBei Province, Shijiazhuang* 050011, *China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a turbidimetric method for the content determination of Minocycline Hydrochloride and its tablets. **METHODS** The test orgnism was *Staphylococcus aureus* and cultured with fresh medium (pH7.0). Adjust spore suspension of *Staphylococcus aureus* inoculate with a 2.0% ~4.0% (V/V) ratio, at 37 ℃ ±0.5 ℃ for about 4 h. **RESULTS** The liner range was 0.04 ~0.10 μg·mL^{-1}. The average recovery of Minocycline Hydrochloride was 99.42% (RSD=2.1%, n=9). The average recovery of Minocycline Hydrochloride tablets was 100.22% (RSD=1.9%, n=9). **CONCLUSION** The method is sensitive, rapid and feasible to determine Minocycline Hydrochloride and its tablets.

KEY WORDS: Potency; Turbidimetric method; Minocycline Hydrochloride; Tablets

盐酸米诺环素(minocycline hydrochloride)又名二甲胺四环素是七十年代初开发的化学半合成四环素类抗生素,其抗菌谱与四环素类抗生素相似,主要用于衣原体、支原体、立克次体引起的感染,其抗菌作用强度比其他四环素类抗生素强,本品与四环素间有交叉耐药性。由于它具有较广的抗菌谱、较高的脂溶性,在许多抗生素难以透入的组织和体液中,均可达到较高的浓度,并能维持较长的时间,而且口服效果良好,因此,盐酸米诺环素是目前临床使用最广的一种四环素类抗生素。

盐酸米诺环素原料及其片剂一直采用HPLC法进行测定[1-3],生物效价测定法能直观反应样品的体外抗菌能力,一直被广泛应用。而作为应用最广的管碟法,因其操作繁琐,影响因素多,而使结果的准确性有待商榷。采用浊度法测定可克服上述不足。本文建立了浊度法测定盐酸米诺环素原料及其片剂效价的方法。通过对盐酸米诺环素原料及其片剂用比浊法测定其效价的研究发现,该方法切实可行,与HPLC法相比,数据无显著性差异。

1 仪器与试药

WBS-100全自动微生物比浊法测定仪、石英培养杯(厚度2 cm),北京先驱威锋技术开发公司;CBZ-1抗生素光度比浊法测量仪、石英培养杯(厚度1 cm),北京潮声公司。

金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)[CMCC(B)26003];;米诺环素对照品(批号:130514-200401)(菌种与标准品均由中国药品生物制品检定所提供)。盐酸米诺环素原料及其片剂原料分别由国内某厂生产。

抗生素检定培养基Ⅲ号(pH7.0,批号050107、060403)由北京三药科技开发公司提供(中国药品生物制品检定所监制);灭菌0.9%氯化钠溶液和磷酸盐缓冲溶液(pH6.0)均按中国药典2005年版二部附录[3]配制。

2 测定方法

2.1 一剂量法

2.1.1 菌液的配制　取金黄色葡萄球菌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18~22 h,临用时,用9 mL 0.9%灭菌氯化钠溶液洗下,取新鲜的菌悬液适量,加12%甲醛液1 mL杀灭,加生理盐水做适当的稀释,使得其在580 nm波长处的吸收值为1.0,记录其稀释所用的生理盐水的毫升数和1 mL 12%甲醛液的总毫升数,再将原菌液按此比例稀释,即为试验菌液。取试验菌液2.0~4.0 mL加至培养基100 mL中,摇匀,为实验菌液。

2.1.2 溶液的配制　标准品溶液:取盐酸米诺环素对照品适量,精密称定,用水溶解并稀释成1 000 μg·mL^{-1}的溶液,作为储备液备用;精密量取储备液适量,用磷酸盐缓冲溶液(pH 6.0)进一步稀释成0.03, 0.04, 0.055, 0.074, 0.10 μg·mL^{-1}的标准品溶液。

2.1.3 培养与测定　取标准品溶液1.0 mL,加入灭菌培养管中,再加入实验菌液9.0 mL,置抗生素比浊法测量仪内,于37 ℃培养。另取稀释溶剂1.0 mL,加9.0 mL空白培养基,混匀,作为空白对照,仪器在线于530 nm的波长处测定各管金黄色葡萄球菌对数生长期内不同培养时间下的吸光度值(A)。根据量反应平行线原理计算供试品的效价值。

2.2 二剂量法

2.2.1 溶液的配制　①标准品溶液:精密量取盐酸米诺环素标准品储备液适量,用磷酸盐缓冲溶液(pH 6.0)稀释制成0.08 μg·mL^{-1}和0.04 μg·mL^{-1}的标准品溶液。②供试品溶液:精密量取盐酸米诺环素原料及其片剂精密称定,用水溶解并稀释成1 000 μg·mL^{-1}的溶液,作为储备液备用;精密量取储备液适量,用磷酸盐缓冲溶液(pH 6.0)稀释制成0.08 μg·mL^{-1}和0.04 μg·mL^{-1}的供试品溶液。

2.2.2 菌液的配制　同"2.2.1.2"。

2.2.3 培养与测定　同"2.2.1.3"。

3 浊度法建立及评价

3.1 测定条件的选择

3.1.1 实验菌、培养基及加菌量的选择　盐酸米诺环素原料及其片剂为广谱抗生素,对革兰阳性菌有很好的抗菌作用。因此选择金黄色葡萄球菌作为实验菌。培养基为抗生素检定培养基Ⅲ号。曾采用大肠杆菌作为实验菌,但菌液敏

感度不如金黄色葡萄球菌。

在 CBZ-1抗生素光度比浊法测量仪上,加菌量为 0.5%,抗生素浓度为 0.03~0.10 μg·mL^{-1}时,4 h左右可达到适宜的菌液测定浓度;在 WBS-100全自动微生物比浊法测定仪上,加菌量为 1.0%为宜。

3.1.2 测定时间的选择 采用试验菌的不同传代次数(3、4、5代)及不同加菌量(0.5~1.5%),以不同抗生素浓度试验,观察试验菌的生长曲线。发现,当采用有足够灵敏度的试验菌时,在 4 h左右,线性范围内抗生素浓度溶液在 530 nm的吸收度可达到 0.3~0.7,符合紫外测定数据的要求,故选择测定时间为 4 h左右。

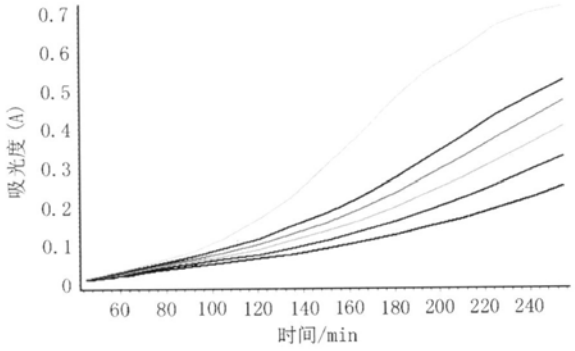

图 1 盐酸米诺环素生长曲线

Fig 1 The curve of increment of Minocycline Hydrochloride

3.2 线性与范围的测定

照抗生素微生物检定一剂量法测定,并以各组浓度标准品溶液所致菌液吸收度的值对溶液对数浓度进行线性回归,得回归直线方程:$Y = bX + a = 0.4579X + 0.8893$, $r = 0.9999$。结果表明:采用标准品溶液进行一剂量法试验,在 0.03~0.10 μg·mL^{-1}的浓度内,呈良好的线性关系。

3.3 回收率试验

3.3.1 精密称取盐酸米诺环素标准品及已知含量的盐酸米诺环素原料样品,精密称定,加 0.1 mol·L^{-1}盐酸溶液溶解并用水稀释成 800,1 000,1 200 μg·mL^{-1}的溶液,作为储备液备用;精密量取储备液适量,用磷酸盐缓冲溶液(pH 6.0)稀释制成 0.03和 0.06 μg·mL^{-1},0.04和 0.08 μg·mL^{-1},0.05和 0.10 μg·mL^{-1}的供试品溶液各 3份,在上述条件下测定,并计算加样回收率,平均加样回收率为 99.42%,RSD为 2.1%(n=9)。

3.3.2 精密称取盐酸米诺环素标准品及已知含量的盐酸米诺环素片剂样品,精密称定,加 0.1 mol·L^{-1}盐酸溶液溶解并用水稀释成 800,1 000,1 200 g·mL^{-1}的溶液,作为储备液备用;精密量取储备液适量,用磷酸盐缓冲溶液(pH6.0)稀释制成 0.03和 0.06 g·mL^{-1},0.04和 0.08 g·mL^{-1},0.05和 0.10 g·mL^{-1}的供试品溶液各 3份,在上述条件下测定,并计算加样回收率,平均加样回收率为 100.22%,RSD为 1.9%(n=9)

3.4 精密度试验

3.4.1 重复性试验 用一批已知含量的盐酸米诺环素原料及其片剂样品,共测定 6次,结果含量的 RSD分别为 1.2%和 1.1%,表明重复性良好。

3.4.2 中间精密度 考察测定结果的不同日期、不同分析人员及不同仪器之间的测定结果的差异。结果含量的 RSD为 1.1%和 1.3%,表明精密度良好。

3.5 适用性考察

主要考察了抗生素溶液,即贮备溶液和测定溶液稳定性对测定结果的影响。结果表明:本品的浓溶液和点样用稀溶液放置冰箱保存分别可稳定五天和两天,完全可以满足实验的需要。

3.6 样品测定

按上述浊度法测定法的二剂量法,进行试验,结果与原方法(即 HPLC法)比较,结果见表 1及表 2。

表 1 样品(原料)含量测定结果

Tab 1 Determination results of samples

批号	比浊法含量 /μg·mg^{-1}	HPLC法含量 /%
060101	867	86.0
060301	864	86.2
060501	855	86.0

表 2 样品(片剂)含量测定结果

Tab 1 Determination results of samples

批 号	比浊法含量 /%	HPLC法含量 /%
060101	93.94	94.26
060503	93.32	94.06
060712	94.38	95.74

4 讨论

4.1 试验中发现,菌液灵敏度对试验产生很大影响,灵敏度低的菌液会使高低浓度的抗生素所对应的浊度的吸收值无法拉开距离,从而影响到可信限率,所以菌液最好取自新鲜斜面,且在 3代左右。

采用 WBS-100全自动微生物比浊法测定仪进行测定时,所用同一斜面的菌液浓度为 4.0%,而采用 CBZ-1抗生素光度比浊法测量仪测定时为 2.0%,在石英培养杯的高度一致的前提下,主要原因是它的厚度影响所致。石英培养杯的厚度越大,所需菌液浓度越高,而石英培养杯的坚固程度也越大。

4.2 时间的一致性:主要是使每管的培养时间相等,实验时在试管中加入含试验菌液的培养基后,应立即加入标准品溶液和供试品溶液,混合均匀。必要时可先将培养基冷却至 2~4 ℃左右,再接种菌种,并在此温度下,将含菌培养基加至各试管中,可避免加注试管先后的误差。

4.3 采用本方法测定盐酸米诺环素时,抗生素浓度范围是 0.03~0.10 μg·mL^{-1},由于所加菌液及各方面均适合,所以相关系数 r达到 0.9999,比起要求的生物测定法的 0.99高出很多。这也说明在吸收值合适的时候,还可适当扩大抗生素的浓度范围,需要进一步的试验。

中国现代应用药学 http://www.chinjmap.com

参考文献

[1] Ch. P(2005) Vol Ⅱ (中国药典 2005年版.二部)[S]. 2005: 507, 508.

[2] 高燕霞等. HPLC法测定盐酸米诺环素的含量以有关物质[J]. 中国现代应用药学, 2006, 23(1): 94-96.

[3] 高燕霞等. HPLC法测定盐酸米诺环素片剂的含量及有关物质[J]. 华西药学杂志, 2005, 20(6): 531-534.

收稿日期: 2007-06-05

chinjmap.com