



多抗霉素的生物测定法

陈延钟

(中国科学院微生物研究所, 北京)

多抗霉素是我国不久前研制成的一种农用抗生素。目前我国生产的液体和粉状制剂, 其中都含有多在化学结构和理化性状方面十分相似的组分。这些组分中有许多对真菌有活性, 然而其活性随不同真菌而各不相同。在已知组分中, B 组分对烟草赤星病菌长柄链格孢 (*Alternaria longipes*) 及果树、蔬菜等的病原真菌的抑制能力最强, D 组分对水稻纹枯病菌佐佐木薄膜革菌 (*Pellicularia sasakii*) 最有效。因此, 在目前很难用化学方法测定各组分的情况下, 只能用生物测定法来测定其效价。以烟草赤星病菌为测定菌时, 称“赤星效价”, 用水稻纹枯病菌作测定菌时, 称“纹枯效价”。

虽然“赤星效价”和“纹枯效价”都可以反映多抗霉素的生物活性。但是用上述两种真菌测得的活性没有固定的换算关系。所以每份待测样品应根据其作用对象选定测定菌。由于多抗霉素很少被用于防治水稻纹枯病, “纹枯效价”的生物测定, 本文从略, 专就用杯碟法测定“赤星效价”作详细介绍。

一、测定用材料的准备

(一) 溶液的配制

1. 标准液*: 精确称取经多抗霉素 A 组分标准品标定的“多抗霉素工作标准”11.9 毫克, 在 100 毫升容量瓶中用磷酸缓冲液溶解, 此液体即为 100 赤星单位/毫升的标准液。置冰箱备用。使用时, 用 50 毫升容量瓶, 以磷酸缓冲液将其稀释成 50、25、12.5 赤星单位/毫升等浓度梯度。

2. 2500—3000 单位/毫升的链霉素液。

3. 磷酸缓冲液: 9 份 $M/15$ KH_2PO_4 溶液和 1 份 $M/15$ Na_2HPO_4 混合而成, $pH6.0$ 。

二、测定菌的培养与制备

1. 培养基 用土豆汁—葡萄糖培养基 pH 6.2, 斜面培养基用于培养菌种; 液体培养基用于在摇瓶中培养菌丝体, 500 毫升三角瓶装液 200 毫升; 用于测定时, 在 250 毫升三角瓶装 120 毫升, 底层用 2% 水琼脂。8 磅 30 分钟灭菌。

2. 培养 将在斜面培养基上长出的长柄链格孢的孢子接种摇瓶培养基, $28^\circ C$ 振荡培养 4 天后, 收集菌丝体, 在组织捣碎器中以 1 万转/分处理 2 分钟, 制备成悬浮液。或加无菌生理盐水和玻璃珠直接由斜面上制成孢子悬液, 倒入无菌三角瓶中备用。

三、操作步骤

1. 样品预处理: 样品为发酵液时, 需用无机酸酸化, 过滤除去蛋白质, 按可能的单位数作成几个稀释倍数的液体; 喷雾干燥产品和土法培养的固体产品则需用缓冲液浸泡过夜后再稀释。

2. 测定平板的制作: 测定工作台须校正水平面。测定器皿及环境应保持无菌状态。在测定盘 (33 厘米 \times 19.5 厘米) 中注入 50—60 $^\circ C$ 底层培养基, 放平。在融化并冷至 60 $^\circ C$ 的测定培养基中加入链霉素溶液 1 毫升, 待冷至 40—45 $^\circ C$, 再加入 5—10 毫升菌丝或孢子悬浮液, 混

* 此标准品系由金色产色链霉菌 (*Streptomyces aureochromogenes*) 4.896 产生的抗生素中, 经反复提纯而获得的多抗霉素 A 单一组分, 用烟草赤星病菌为测定菌时, 1 毫克此标准样品的抑菌效价为 1000 赤星单位。当多抗霉素浓度为 100 赤星单位/毫升时, 用烟草赤星病菌作测定菌时, 其抑菌圈直径约为 31 毫米。“多抗霉素工作标准”是用标准品标定的含多种组分的多抗霉素精制品, 用于每次测定时作为标准液。

匀,勿使产生气泡,倒在凝固的底层上。

3. 标准曲线: 在充分凝固并冷却了的测定平板上按约 37 毫米的间距放置不锈钢圈, 分别加入标准液和待测液, 置 28℃ 保温 18—20 小时, 测量抑菌圈直径。在测定大量样品时, 要求每个测定盘中有 4 种不同浓度的标准液, 测定抑菌圈直径后, 以每种标准液浓度时抑菌圈直径的平均值为横坐标, 浓度为纵坐标, 用半对数坐标纸作图, 制成标准曲线。在测定结果正常时, 标准液浓度应与抑菌圈直径成正比, 且每一测定盘中所得曲线应平行或重合。但由每一测定盘得到的标准曲线只适用于计算同一盘中待测样品的浓度。标准液浓度与抑菌圈直径的关系如下, 此时呈直线关系。

多抗霉素(赤星单位/毫升)	抑菌圈平均直径(毫米)
12.5	21.5
25.0	24.7
50.0	27.9
100	31.0

四、注意事项

由于多抗霉素由多种组分组成, 所测得效价是各种活性组分的总和, 因此测定结果的重复性较差。特别是测定生产过程中不同阶段产品效价时, 因为各组分间含量存在消长关系, 测

得的数据更不稳定。

为此, 测定时应注意:

1. 最好使用海燕牌琼脂 (青岛水产加工厂产品)。

2. 测定菌应避免多次转种传代, 培养时间不应超过 24 小时, 制备的悬液应有足够浓度, 加入测定培养基中时, 必须注意培养基温度不能超过 50℃。

3. 在 32℃ 以下和 26℃ 以上保温。

4. 待测样品中多抗霉素的浓度应在上列呈直线关系的范围之内, 当为 50 赤星单位/毫升时, 所得结果较可靠。标准曲线的斜率为 $\lg 30 - 35^\circ$ 时, 误差较小。

5. 测定样品应尽可能多, 特别是需高度稀释的成品样品, 更应多作重复由多个数据取平均值。由于其测定值一般易偏高, 误差范围在 $-10\% - +200\%$, 如计算平均值时取偏低值, 有利于减少误差。

6. 当抑菌圈出现暗影、边缘粗糙等时, 易扩大误差。此时应找出原因并加以改进。将土豆汁葡萄糖琼脂培养基改为含酵母膏 0.5%、葡萄糖 1%, K_2HPO_4 0.1%、pH6.2 的培养基, 可有效地避免暗影。

如果注意到上述诸点, 测定误差可控制在 $-10 - +30\%$ 之间。