

## 技术与方法

## 发酵液内氨甲酰妥布拉霉素的定量测定

方佩静 姜淑珍 叶绪慰

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘要** 报道了应用一种以测量图象面积为指标的 Zy-300A 多功能抑菌圈测量仪,能够精确、稳定、快速地测定发酵液经薄层层析生物显迹后单组分氨甲酰妥布拉霉素的抑菌斑面积,然后从绘制的标准曲线中直接读取氨甲酰妥布拉霉素在发酵液中的含量,从而排除了其他组分对测定的干扰。试验证明,用 Zy-300A 多功能抑菌圈测量仪测定抗生素薄层层析生物显迹的抑菌斑,具有线性宽、精密度高、重复性强、操作简单方便等优点。本方法的建立为抗生素的纯品检定和多组分抗生素发酵、分离和纯化提供了准确的定量数据。

**关键词** 氨甲酰妥布拉霉素, Zy-300A 多功能抑菌圈测量仪, 薄层层析

**分类号** Q93-31 **文献标识码** B **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-45-47

QUANTITATIVE DETERMINATION OF CARBAMOYLTOBRAMYCIN FROM  
FERMENTATIVE BROTH

Fang Peijing, Jiang Shuzhen, Ye Xuwei

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** In this paper, We describe a multi-functional inhibition zone measurement instrument model Zy-300A which makes measurement on any images. We could accurately measure the area of single inhibition spot of carbamoyltobramycin obtained in thin layer chromatography with bioautographic detection, then directly reading the amount of the component in fermentative broth from the standard curve of the single component, thereby eliminating the interference of other components.

It is shown by experiments that its advantages were the high precision, good replication, wide linear range, high speed and convenient operation etc.. We have provided accurate quantitative data for assay of the amount of pure antibiotics and fermentation, isolation and purification of multi-component antibiotic in the established method.

**Key words** carbamoyltobramycin, Zy-300A multi-functional inhibition zone measurement instrument, thin layer chromatography

暗黑链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) AS 4. 1098 可产生一种属于氨基糖苷类的抗生素复合物<sup>[1]</sup>, 该复合物主要由三个活性组分: 阿普拉霉素, 氨甲酰卡那霉素 B 和氨甲酰妥布拉霉素组成。后二个组分经水分别生成适于临床应用的卡那霉素 B 和妥布拉霉素。用于生物测定的检定菌对所有组分均敏感, 因此通常

所用的营碟扩散法中抑菌圈的大小只表示该抗生素复合物生物活性的总效价。1987 年 Gy. B. Kiss 等<sup>[2]</sup>组建了苜蓿根瘤菌 41 的阿普拉霉素和氨甲酰卡那霉素抗性变株, 该菌株可对氨甲酰妥布拉霉素作专一性定量, 但国

内尚未应用。1993 年国内学者为解决抑菌圈生物测定中繁杂的手工测量和计算分析,研制成功了一种 Zy-300A 多功能抑菌圈测量仪,由于它是采用独特的 CCD 扫描技术,经过图象处理,可自动记录图象面积的一种电脑测量仪,因此用它精确测量发酵液经薄层层析生物显迹后的单组分的抑菌斑面积,通过绘制的标准曲线,进行直接定量。本文报道测量的结果。

1 材料与方法

1.1 材料

发酵液:本实验室的暗黑链霉菌(*Streptomyces tenebrarius*) AS 4. 1098 诱变株发酵产生。

标准氨甲酰妥布拉霉素:本实验室制备。

硅胶板:青岛海洋化工厂分厂生产,规格 100 × 200mm,厚度 0.20~0.25mm。

薄层层析溶剂系统:正丙醇:甲醇:氨水(2.5:2:2)

生物显迹检定菌:枯草芽孢杆菌(*B. Subtilis*) AS 1.339

生物显迹培养基:上层:蛋白胨 0.5g,牛肉膏 0.3g,酵母浸膏 0.1g,琼脂 1.5g,用 100mL 蒸馏水配制, pH7.5。下层:琼脂 1.5g,用 100mL 蒸馏水配制,自然 pH。

1.2 方法

生物显迹:双层琼脂扩散法。测定盘于 37℃ 温箱培养 16h。

单组分定量:用 Zy-300A 多功能抑菌圈测量仪测量抑菌斑面积,从标准曲线中直接读取发酵液中单组分的含量。

2 结果

2.1 二种方法测量抗生素效价的比较

用普蝶扩散法和薄层层析生物显迹抑菌斑定量测定抗生素效价,结果见表 1。

表1 二种方法测量抗生素效价的比较

	菌株				
	A	B	C	D	E
普蝶扩散法	3834	2644	3196	2929	2685
抑菌斑定量测定	2740	2140	2547	2280	2410

结果表明,发酵液未经层析分离,测得效价为该抗生素复合物生物活性总效价,次要组分含量越小,干扰就越小,则单组分氨甲酰妥布拉霉素效价越接近普蝶法测定的效价,如菌株 E。

2.2 氨甲酰妥布拉霉素的标准曲线

在硅胶板上间隔点氨甲酰妥布拉霉素标准(1000μg/mL)0.4~2.0μL,在溶剂系统中展层后进行生物显影,用仪器测量抑菌斑面积。结果见表 2。作 logc~φ 曲线并回归其直线方程<sup>[3]</sup>,见图 1。

表2 不同浓度的氨甲酰妥布拉霉素薄层层析生物显迹后的抑菌斑面积值

		浓度c (μg/μL)				
		0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
抑菌斑面积φ	板 <sub>1</sub>	10.37	12.36	13.78	14.70	15.40
	板 <sub>2</sub>	10.91	13.34	14.61	15.46	16.20

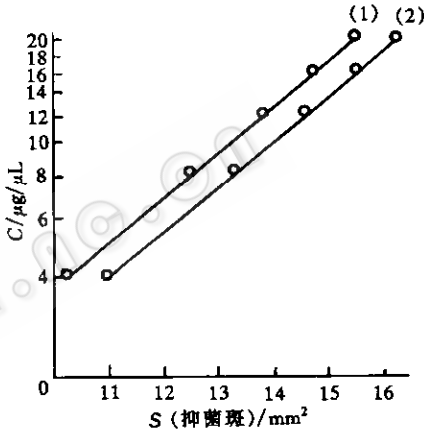


图1 氨甲酰妥布拉霉素在硅胶板上的标准曲线

板 1 线性回归得:

$$\log c = -1.1166 + 0.1376\phi \quad r_1 = 0.9994886$$

板 2 线性回归得:

$$\log c = -1.1542 + 0.1327\phi \quad r_2 = 0.9986624$$

从相关系数  $r_1$  和  $r_2$  数值很接近 1 表明,φ 和 logc 的线性关系很好,说明所配的直线是有意义的。板 1 和板 2 所绘制的标准曲线基本是平行的。由于硅胶板的差异及贴板扩散时间,菌液浓度和琼脂层的厚度等因素的影响,因此会出现同一浓度抗生素抑菌斑在不同板上大小不同的现象。测定时必须加一标准浓度作对照,以求出标准曲线上同一浓度的修正值,对样品测定数据加以修正,即可消除误差。

2.3 发酵液中氨甲酰妥布拉霉素的定量

按估计效价将发酵液稀释到合适浓度,在硅胶板上间隔点同一样品和标准品 1μL,薄层层析生物显迹后,用仪器测得抑菌斑面积平均值,修正样品测定值,从标准曲线上读出样品效价,乘以稀释倍数即为发酵

液中氨甲酰妥布拉霉素效价,结果见表3。由表3看出, 同一样品的效价,误差较小。为避免操作带来误差,每同一块板上点样的重复性是很好的,在不同板上测定 块板至少需点2个标准。

表3 不同菌株发酵液中氨甲酰妥布拉霉素的效价

	菌株							
	F		G		H		I	
	板1	板2	板1	板2	板1	板2	板1	板2
标准(mm <sup>2</sup> )	11.88	10.84	10.75	7.96	11.12	15.20	11.71	12.06
	11.28	11.65	10.81	8.86	11.27	15.22	10.74	12.29
样品(mm <sup>2</sup> )	12.02	11.03	11.69	9.05	11.91	16.38	12.01	13.48
	12.00	11.88	11.46	8.91	12.00	15.72	12.44	12.70
样品效价 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	2280	2120	2560	2400	2560	2600	2720	2640
平均效价 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	2200		2480		2580		2680	
相对测定误差(%)	7.02—7.55		6.25—6.67		1.54—1.56		2.94—3.03	

### 3 讨论

在新抗生素的研究中,纸层析,纸电泳,薄层层析是常用的鉴别手段,尤其对没有紫外吸收的氨基糖甙类抗生素更是如此。链霉菌 AS 4. 1098 产生的多组分抗生素,经高分辨率的硅胶板薄层层析生物显迹后,能得到清晰、集中的单组分氨甲酰妥布拉霉素的抑菌斑,其抑菌斑面积与它的浓度对数呈较好的线性关系,由于 Zy-300A 多功能抑菌圈测量仪解决了不规则形状抑菌斑面积的测量问题,因此可以对抗生素在发酵液中的单组分含量进行精确定量。这一方法也可用于纸层析,电泳等分离,鉴别技术中生物显迹抑菌斑面积的定量测定。在应用这一方法时,除单组分的抑菌斑面积与浓度应有较好的线性关系外,斜率不能过大,否则也会

影响试验的正确性,但生物显迹后的抑菌斑内出现杂菌、杂斑时,并不影响测量结果,说明该仪器有一定的抗干扰性。

**致谢** 本实验得到卫生部药品生物制品检定所丁宏同志的大力协助,特此致谢。

### 参 考 文 献

- [1] 刘 肃,章慧德,姜淑珍. 中国微生物学会 1979 年学术年会论文摘要汇编, 1979, 121~122.
- [2] Kiss Gy B. Acta Microbiol, 1988, 35(2): 89~92.
- [3] 中国科学院数学研究所统计组编. 常用数理统计方法, 北京: 科学出版社, 1973, 82~88.