

藥物食品檢驗局七十一年調查研究年報 Ann. Rept. FDB 2: 48-53, 1982

抗生素常用標準品之標定 第一報：四環素類抗生素常用 標準品標定法之探討

李志恒 許鳳麟
柯錫津 游祥榮 洪其璧

摘要

運用 Tarcza 及 Garth 所設計的 Three-dose assays¹ 來作為 Tetracycline 及 Oxytetracycline 標準品之標定法，並檢討造成實驗偏差的可能原因。

鍵語：Three-dose assays, Tetracycline, Oxytetracycline

前言

抗生素的檢驗與研究為本局二組的業務項目之一，通常我們使用美國 U S P 等之抗生素一級標準品 (primary standard) 來標定常用標準品 (secondary or working standard)，以供作一般檢驗之用，並希望爾後提供給各學術研究單位及藥廠使用。本實驗即針對常用抗生素 Tetracycline 及 Oxytetracycline，用 Tarcza 及 Carth 二氏所創之方法加以標定，並根據實驗結果詳加探討，以作為爾後標定其他各種抗生素之參考。

材料與方法

一、材料

(一)一級標準品：Oxytetracycline, USP, 940 $\mu\text{g}/\text{mg}$; Tetracycline hydrochloride, USP, 990 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

(二)標定用原料抗生素：Oxytetracycline, Pfizer; Tetracycline, Lederle。

二、方法

Tarcza 及 Garth 的 Assays and Statistical Analyses for Antibiotic Standards¹

— cylinder-plate procedure, three doses assays. 茲將操作法簡說如下²：

抗生素：Tetracycline, Oxytetracycline。
乾燥狀態：未乾燥。

標準品之起始溶液：1 mg/ml in 0.1N HCl。

冷藏保存時間：1 天

稀釋用緩衝液：0.1 M Monopotassium phosphate buffer, pH4.5 \pm 0.05。

最終抗生素濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = 0.8, 1.0, 1.25。

供試菌種及 ATCC 編號：11778, *Bacillus cereus* var. *mycoides*。

培養溫度 ($^{\circ}\text{C}$)：30。

結果與討論

一、Tetracycline：

(一)第一次實驗 (表一)：

$$\text{observed } R = \frac{1.7}{1.2 + 1.3 + 0.9 + 1.7 + 1.3 + 1.4} \\ = 0.2179 < \text{critical } R (0.273)$$

$$\log \text{ potency, } M = \frac{* (U_1 + U_2 + U_3 - S_1 - S_2 - S_3)}{S_3 + U_3 - S_1 - U_1}$$

*：分子常數 (numerator constant)

藥物食品檢驗局調查研究年報 (Ann. Rept. FDB)

表一 Tetracycline 第一次實驗

Plate No.	S ₁	S ₂	S ₃	U ₁	U ₂	U ₃	Plate sum (Tr)
1	19.5*	20.0	21.6	20.4	20.5	20.8	122.8
2	20.2	20.0	21.0	20.8	20.2	21.5	123.7
3	19.0	19.6	20.9	20.0	20.0	21.6	121.1
4	19.2	20.4	21.6	20.0	20.5	21.6	123.3
5	19.5	20.5	21.8	19.8	21.0	21.7	124.3
6	19.3	19.8	21.0	20.2	20.2	21.5	122.0
7	19.2	20.5	21.4	19.1	20.2	20.3	120.7
8	19.0	20.9	21.0	19.9	20.4	21.0	122.2
9	20.1	20.5	21.0	20.0	21.3	21.3	124.2
Sum (Tt)	175.0	182.2	191.3	180.2	184.3	191.3	1,104.3 (T)
Range Δ	1.2	1.3	0.9	1.7	1.3	1.4	

* 單位：mm Δ ：垂直列內最大值與最小值之差。

$$\therefore M = 0.12921 (180.2 + 184.3 + 191.3 - 175.0 - 182.2 - 191.3) / (191.3 + 191.3 - 175.0 - 180.2) = 0.03442$$

換算成 Percent Potency,

$$P = 100 \times \text{antilog } M = 108.25 \%$$

而 error variance,

$$S^2 = \frac{\sum y^2 - \frac{\sum T_r^2}{6} - \frac{\sum T_t^2}{9} + \frac{T^2}{54}}{40} = 0.161825$$

<註> y = 個別反應，抑制圈量度，或單一觀察結果。〔individual response, zone measurement, or single observation〕

$\sum y^2$ = 所有 54 個抑制圈大小的平方和。〔sum of the squares of all 54 zone sizes〕

$$\frac{\sum T_r^2}{6} = \text{水平列總數的平方和除以處理數目(6)。}$$

〔sum of the squares of the totals of the horizontal rows divided by the number of treatments (6)〕

$$\frac{\sum T_t^2}{9} = \text{垂直行總數的平方和除以平碟數目(9)。}$$

〔sum of the squares of the totals of the vertical columns divided by the number of plates (9)〕

$$\frac{T^2}{54} = \text{水平行總數和的平方或垂直列總數和的平方(兩者須相等)除以觀察數目(54)。}$$

〔squares of the sum of the totals of the horizontal rows or the square of the sum of the totals of the vertical columns (they should be equal) divided by the number of observations (54) 40: 自由度。〔degrees of freedom〕

爲求知本實驗之有效性 (Validity)，並作 F-test :

$$ab = \frac{[(S_1 + U_3) - (S_3 + U_1)]^2}{36}$$

$$q = \frac{[(S_1 + U_1 + S_3 + U_3) - 2(S_2 + U_2)]^2}{108}$$

$$aq = \frac{[(U_1 + U_3 + 2S_2) - (S_1 + S_3 + 2U_2)]^2}{108}$$

四環素類常用標準品之標定

表二 Tetracycline 第二次實驗

Plate No.	S ₁	S ₂	S ₃	U ₁	U ₂	U ₃	Plate sum (Tr)
1	18.4	19.7	20.6	18.3	20.1	20.5	117.6
2	18.9	19.7	20.9	19.4	20.8	21.8	121.5
3	18.6	20.1	20.9	19.1	20.0	20.6	119.3
4	19.2	19.7	20.0	19.0	20.0	20.2	118.1
5	17.9	19.5	20.7	18.1	20.4	21.0	117.6
6	19.0	20.0	20.1	18.8	19.4	20.4	117.7
7	18.8	20.1	20.4	18.3	20.1	20.5	118.2
8	19.2	20.5	20.8	19.0	20.2	20.8	120.5
9	18.4	19.0	20.7	18.8	19.3	20.1	116.3
Sum (Tt)	168.4	178.3	185.1	168.8	180.3	185.9	1,066.8 (T)
Range	1.3	1.5	0.9	1.3	1.5	1.7	

$$F = \frac{ab + q + aq}{3S_2}$$

$$= 2.0057 < \text{Critical } F (2.84)$$

本實驗有效 (Valid)。

由於本實驗在有效範圍內，因而 the precision of the assay, C, 及 the confidence interval, L. 都可以加以決定。

$$C = \frac{(S_3 + U_3 - S_1 - U_1)^2}{(S_3 + U_3 - S_1 - U_1)^2 - 147.06 S^2}$$

$$= 1.0327$$

$$\frac{L}{2} = \sqrt{(C-1)(CM^2 + 0.02504)} = 0.0293$$

最後，the upper and lower 95% confidence limits 可以求得：

percent potency, upper limit of 95% confidence interval,

$$X_u = 100 \times \text{antilog} \left(CM + \frac{L}{2} \right) = 116.11\%$$

percent potency, lower limit of 95% confidence interval,

$$X_L = 100 \times \text{antilog} \left(CM - \frac{L}{2} \right) = 101.44\%$$

(⇨)第二次實驗 (表二)：

observed R = 0.2073 < critical R (0.273)

M = 0.01223 P = 102.86%

S² = 0.140142

F = 1.97 < critical F (2.84) 本實驗有效。

C = 1.0184 $\frac{L}{2} = 0.0215$

X_u = 108.14% X_L = 97.94%

二、Oxytetracycline：

(⇨)第一次實驗 (表三)：

observed R = 0.208 < critical R (0.273)

M = -0.03841 P = 91.54%

S² = 0.332625

F = 0.299 < critical F (2.84) 本實驗有效

C = 1.0787 $\frac{L}{2} = 0.0458$

X_u = 101.00% X_L = 81.81%

(⇨)第二次實驗 (表四)：

observed R = 0.263 < critical R (0.273)

M = -4.4695 × 10⁻³ P = 98.98%

S² = 0.1656

F = 0.287 < critical F (2.84) 本實驗有效。

藥物食品檢驗局調查研究年報 (Ann. Rept. FDB)

表三 Oxytetracycline 第一次實驗

Plate No.	S ₁	S ₂	S ₃	U ₁	U ₂	U ₃	Plate sum (Tr)
1	18.6	19.4	21.0	19.0	18.5	18.6	115.1
2	17.9	18.3	19.6	18.9	19.1	19.4	113.2
3	18.2	20.0	19.2	17.6	20.1	19.6	114.7
4	18.4	18.6	20.0	18.0	18.7	19.1	112.8
5	19.0	18.6	20.0	18.9	19.4	20.3	116.2
6	18.1	18.8	20.3	17.3	18.6	20.0	113.1
7	18.2	18.9	19.3	17.6	18.2	19.2	111.4
8	18.5	19.7	19.8	18.6	18.0	18.9	113.5
9	18.5	18.6	20.2	17.6	18.5	20.3	113.7
Sum (Tt)	165.4	170.9	179.4	163.5	169.1	175.4	1,023.7 (T)
Range	1.1	1.7	1.8	1.7	2.1	1.7	

表四 Oxytetracycline 第二次實驗

Plate No.	S ₁	S ₂	S ₃	U ₁	U ₂	U ₃	Plate sum (Tr)
1	19.0	19.6	19.7	17.5	20.2	20.5	116.5
2	18.5	19.4	21.1	17.7	19.0	20.5	116.2
3	18.8	19.2	20.5	18.8	19.1	20.2	116.6
4	18.5	19.5	19.9	18.6	19.3	20.2	116.0
5	19.2	20.2	21.2	19.4	19.4	20.8	120.2
6	18.8	19.7	20.2	19.0	19.8	19.8	117.3
7	18.8	19.4	20.4	18.5	19.4	20.8	117.3
8	18.8	20.1	20.2	18.9	20.3	20.7	119.0
9	18.8	20.1	20.9	19.5	20.2	21.3	120.8
Sum (Tt)	169.2	177.2	184.1	167.9	176.7	184.8	1,059.9 (T)
Range	0.7	0.9	1.2	2.0	1.3	1.5	

$$C = 1.02468 \quad \frac{L}{2} = 0.02487$$

$$X_u = 104.82\% \quad X_L = 93.41\%$$

由以上實驗結果可以得知，雖然各次實驗均屬有效，但偏差仍然相當大。檢討其原因，雖可大略

歸為兩類，一是操作（人爲）的誤差，一是生物（此指微生物）本身所引起的誤差，但如加以詳究，則底下各因素都可能是造成偏差的原因：

1. 稀釋過程中所使用的各種玻璃量器，其容量精確度如何，直接影響最終抗生素稀釋濃度的正確

四環素類常用標準品之標定

性，因此選用信譽較佳的廠牌就顯得非常重要。

2. 每位操作者的操作技巧若何，亦常影響實驗結果。

3. 由於各個鋼筒 (CUP) 本身容量的些微差異，以及添加量只是 0.28ml 的微量抗生素溶液，因而雖然使用 Micropipette 來操作，其誤差仍屬難免。

4. 瓊脂凝膠本身的強度與鋼筒下陷之程度有關，由於我們係採用人工放置鋼筒於瓊脂凝膠上，因而時間耗費較久，可能造成鋼筒下陷的程度不一，影響抗生素溶液的擴散速率。

5. 操作瓊脂凝膠板 (agar plate) 的平台及培養箱內的平台是否達到水平，也是影響擴散均勻與否的因素之一。

6. 抑制圈大小的觀察，因係採用肉眼來看，可能由於視差而導致不同的觀察結果。

7. 由於平板的數量較多，實驗結果的觀察常須使用約一個小時的時間，此亦可能使供試菌種再生長而造成抑制圈觀察結果的偏差³。

8. 菌種培養時間的差異有時會對抗生素形成不同的感受性，一般而言，在對數期 (log phase) 的菌種對抗生素的感受性最高。

9. 培養過程中形成於玻璃皿上的凝結水，對於菌種的生長當有或多或少的影響。

根據上述的各個因素來看，1 的缺失可由單一

廠牌、慎選器材而避免。2 的缺失可經由練習而克服。3、4 的缺點則可用機器操作來添加抗生素溶液及放置鋼筒，以縮短時間、減少誤差。5 的缺點也很容易解決，只要將平台調整到水平即可。6、7 的誤差則可能是實驗中最不易克服者，解決之道最好是求助於 Automatic Zone Reader，既省時又精確。至於 8、9 的缺點則可由嚴格控制培養時間及培養條件來改進。

由於抗生素標準品之標定在本局二組而言，尚屬嘗試性質，同時生物檢定的誤差亦較一般化學檢定者為大，因而實驗結果之不盡符合理想，實為意料中的事，為此我們檢討造成誤差的可能原因，從而尋求改進的方法，期能作為往後實驗的參考，以便早日建立我們國家自己的抗生素標準品。

參考文獻

1. Tarcza, Elsie., and Mary Ann Garth: Assays and statistical analyses for antibiotic standards. *J. Pharmacol. Sci.*, 67, (8) 1050-1053 (1978).
2. CFR, section 436, 1980.
3. Lorian, Victor. (Editor): Chapter 1. Procedure for testing antibiotics in agar media: Theoretical considerations. *Antibiotics in laboratory medicine* (1980).

藥物食品檢驗局調查研究年報 (Ann. Rept. FDB)

STUDIES ON THE STANDARDIZATION OF ANTIBIOTIC SECONDARY STANDARDS

I. A GENERAL CONSIDERATION TO THE STANDARDIZATION OF TETRACYCLINE SECONDARY STANDARDS

JIH-HENG LI, FONG-LING HSU, HSI-CHIN KO,
SHIANG-RONG YU AND CHI-BYI HORNG

ABSTRACT

In order to establish our own antibiotic standards, we used the three-dose assays designed by Tarcza and Garth to standardize tetracycline

and oxytetracycline. In this study, we also considered the possible causes that made the deviation of the results.