

以微生物擴散分析法檢測抗生素力價

楊盛行* 王貞懿^a 蔡世源 魏嘉碧

國立臺灣大學農業化學系

(中華民國84年12月4日收到, 84年12月13日接受刊登)

摘 要

以微生物擴散分析法檢測抗生素力價時受使用菌株種類、菌株形態、檢測方式、培養基用量和標準液配置法等影響。當以 *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 和 *B. subtilis* ATCC 6633 為測定菌株時, 芽胞懸浮液比營養菌體敏感, 而以紙錠法或不銹鋼圓筒檢測時其準確度間無顯著性差異。分析盤培養基的厚度對準確度影響不大, 但以緩衝液配製抗生素標準溶液時比直接用蒸餾水配製時為佳。在固態基質中, 隨著抗生素濃度之增加, 如以生物檢測時, 其回收率增加, 但如以高效液相層析法測定時則影響不大。以高效液相層析法、分光光譜法和微生物檢測法所能檢測地靈黴素之最低濃度分別為 1.00, 0.10 和 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 。可見以微生物擴散分析法檢測抗生素之方法既簡便且靈敏。

關鍵字: 微生物擴散分析法, 地靈黴素, 紙錠, 高效液相層析, 紫外光光譜分析。

前 言

抗生素力價測定方法很多, 有薄層層析併用生物分析法、酵素免疫法、試管內的分析法、微生物擴散分析法、光譜分析法和高效液相層析法等⁽¹⁻⁶⁾。其中微生物擴散分析法不但簡單, 而且其準確性及精確性並不亞於其他之 AOAC 測定法, 是一可行之抗生素力價測定法。部分學者曾探討微生物擴散分析法之操作^(4,7,8) 和供試菌株^(1,4,7-11) 對微生物擴散分析法之影響。為進一步了解在抗生素力價檢測時, 菌株種類菌株形態、使用培養基體積、檢測方法以及標準抗生素之稀釋方法對力價測定之影響。本研究首先針對影響微生物擴散分析之因子加以檢討, 並比較生物檢測法、分光光譜法和高效液相層析法, 在抗生素力價測定上之應用, 以供今後在抗生素力價測定時之參考。

材 料 與 方 法

1. 供試菌株

Bacillus cereus var. *mycoides* ATCC 11778 和 *B. subtilis* ATCC 6633 係向 American Type Culture Collection 購買。

2. 培養基及培養方法

供試菌株培養於 Antibiotic medium No. 1 (Merck, Germany) 或 No. 8 (BBL, USA) (表一、二) 之斜面培養基上, 於 30°C 培養 17±1 小時而得營養細胞。而芽胞之製備如下: 首先添加 3 ml 生理食鹽水至 Antibiotic medium 斜面培養基上, 洗下菌體, 移至含芽胞培養基 (每 100 ml 抗生素培養基含 30 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 之洛式瓶 (200 ml) 中, 於 30°C 下培養一週生成芽胞。離心

* 現任職衛生署藥物食品檢驗局微生物組

表一 抗生素培養基 No. 1

Table 1. Antibiotic medium No. 1

Component	Content (g l ⁻¹)
Meat extract	1.5
Yeast extract	3.0
Peptone from casein	4.0
Peptone from meat	6.0
D (+)-glucose	1.0
Agar	15.0
pH	6.0±0.1

表二 抗生素培養基 No. 8

Table 2. Antibiotic medium No. 8

Component	Content (g l ⁻¹)
Pancreatic digest of gelatin	6.0
Yeast extract	3.0
Beef extract	1.5
Agar	15.0
pH	5.9±0.2

後以 100 ml 無菌生理食鹽水製備芽胞液，經 65°C 處理 30 分鐘，以 3,000 rpm 離心回收芽胞再分散於適量無菌生理食鹽水中，再經 65°C 處理 30 分鐘兩個循環後，以 500~1,000 rpm 離心 1 分鐘，除去不溶物後，上層芽胞液待冷卻後分裝至小瓶中儲存於 4°C 下備用。

生物檢測時，每 ml 培養基中接入 4.0~6.0×10⁶ 個芽胞或營養菌體於 30°C 下培養 18~24 小時。

3. 抗生素之生物檢測

地靈黴素 (Sigma Co., USA) 先以少量 0.1 N HCl 溶解後，以 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH 4.5 ±0.1) 或蒸餾水稀釋⁽¹²⁾。

於抗生素檢測分析盤中 (長 30 公分，寬 26 公分，不銹鋼製，信安儀器公司) 倒入 100 或 150 ml 抗生素培養基 No. 1，凝固後其上再倒入每 ml 含 5.0×10⁶ 個營養菌體或芽胞之抗生素培養基 No. 1 100 或 150 ml。凝固後放入已殺菌之紙錠 (直徑 8 mm, Toyo Seisakusho Co., Tokyo, Japan) 或不銹鋼圓筒 (外徑 8±0.1 mm，內徑 6±0.1 mm，高 10±0.1 mm，信安儀器公司)，各加入 50 μl 標準液或發酵萃取液，於 30°C 下培養 18~24 小時，以游標尺量測抑制圈直徑。

當以抗生素標準力價之對數值 (μg ml⁻¹) 為縱軸，抑制圈直徑 (mm) 為橫軸，可得標準曲線，而樣品抗生素濃度則以內差法計算之。

4. 高效液相層析法測定抗生素

抗生素抽出液首先以 0.46 μ Millipore 濾紙過濾後，取 20 μl 用高效液相層析儀測定之。使用 Shimadzu LC-5A 高效液相層析儀 (Shimadzu, Japan) Lichrospher 60 RP-Select B (5 μm) 管柱，使用 methanol: acetonitrile: water: 0.2 M phosphate buffer (pH 2.5)=10: 20: 60: 10 之移動相，其流速為 0.8 ml min⁻¹，用波長 350 nm UV 檢測器測定之 (2.56 AUFS)。

5. 分光光譜法測定抗生素

採用 Hitachi Spectrophotometer U-2000 (Hitachi, Japan) 測定之，並與標準曲線比較之。

6. 統計分析

利用 SAS 進行變異分析 (analysis of variance)⁽¹³⁾ 比較檢測結果。當 $p > 0.05$ 表示其差異性不顯著，而 $p < 0.05$ 表示其差異性顯著，如 $p < 0.01$ 則表示其差異性極顯著。

結果與討論

1. 檢測菌株對抗生素力價之影響

根據 AOAC 檢測抗生素力價時，可以使用 *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 和

B. subtilis ATCC 6633^(11,7-9)。因而本研究將兩種檢測菌株分別培養於抗生素培養基 No. 1，每 ml 培養基中含 $4.0\sim 6.0\times 10^6$ 個芽胞，使用紙錠法檢測，結果如表三所示。兩種檢測菌株所得地靈黴素力價具有極顯著性差異 ($P=0.0025$)。且兩者之地靈黴素之濃度對數 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) (y) 和抑制圈直徑 (mm) (x) 間有直線關係，其相關係數皆大於 0.996。以 *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 為檢測菌株時較 *B. subtilis* ATCC 6633 靈敏度略高。雖然上述兩株檢測菌株皆為 AOAC 所採用。國內測定肉及肉製品中四環素類抗生素之殘留使用 *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 為檢測菌株⁽¹⁴⁾，而對食品中抗菌性物質殘留或生乳中抗生素殘留則使用 *B. subtilis* ATCC 6633 為檢測菌株^(15,16)。可見如已知為四環素類之抗生素則使用 *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 為檢測菌株較為靈敏，而對未特定種類之抗生素檢測則以 *B. subtilis* ATCC 6633 為檢測菌株，因其對許多抗菌物質較敏感⁽¹⁵⁻¹⁷⁾。

表三 檢測菌株對地靈黴素力價之影響

Table 3. Bioassay of oxytetracycline with *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 and *S. subtilis* ATCC 6633

Log [OTC] ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Inhibition zone (mm)	
	<i>B. cereus</i> *	<i>B. subtilis</i> **
0	17.2	16.8
1	25.4	24.3
2	32.6	31.4
3	41.0	39.5
4	46.6	45.8

$P=0.0025$

Antimicrobial activity was assayed with 200 ml of Antibiotic medium No. 8, and 5.0×10^6 spores ml^{-1} by paper disc method. Standard solution of oxytetracycline was dissolved in 0.1 N HCl and diluted with 0.1 M phosphate buffer (pH 4.5 ± 0.1).

* $y=0.135 x-2.360, r^2=0.9963$

** $y=0.133 x-2.161, r^2=0.9978$

where $y=\text{Log [OTC]} (\mu\text{g ml}^{-1})$

$x=\text{Inhibition zone (mm)}$

2. 菌株形態對抗生素力價之影響

檢測抗生素力價時，一般皆使用芽胞懸浮液⁽¹⁴⁻¹⁸⁾，使用營養菌體是否對抗生素力價檢測上有所影響？由表四知以 *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 之芽胞檢測地靈黴素力價時比用營養菌體佳，兩者之間有極顯著之差異性 ($P=0.0002$)。但兩種菌體形態之地靈黴素濃度對數和抑制圈直徑間皆有直線關係，且相關性皆大於 0.996。

當以 *B. subtilis* ATCC 6633 芽胞和營養菌體檢測時其結果如表五所示，當以芽胞檢測時，其價力高於營養菌體，兩者之間有極顯著性差異 ($P=0.0013$)，地靈黴素之濃度對數和抑制圈直徑間亦有直線關係，且相關性極高(大於 0.994)。可見無論 *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 或 *B. subtilis* ATCC 6633 以芽胞檢測抗生素力價時皆比營養菌體靈敏，此可能是芽胞較具同步化，而營養菌體則因菌齡不一，因而對抗生素檢測較不靈敏。當以芽胞檢測時，可以一次大量製備而後分成小份置於 4°C 下儲存，待使用時再取出，而不必每次檢測時皆需製備。並且一次大量製備時可以減小每次製備時之個別誤差。如芽胞懸浮液無蒸發及污染之虞，則可長久使用。在 4°C 下分裝於小瓶之芽胞懸浮液可以儲存二個月其發芽率不受影響⁽¹⁷⁾。因而在檢測食品抗生素殘留時皆以芽胞懸浮液測定⁽¹⁴⁻¹⁸⁾。

表四 以 *B. cereus* var. *mycoides* 芽胞及營養菌體檢測地靈微素力價

Table 4. Bioassay of oxytetracycline with the spores and vegetative cells of *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778

Log [OTC] ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Inhibition zone (mm)	
	Spores*	Vegetative cells**
0	17.2	16.7
1	25.4	20.5
2	32.6	27.0
3	41.0	32.0
4	46.6	36.6

$P=0.0002$

Antimicrobial activity was assayed with 200 ml of Antibiotic medium No. 8, and 5.0×10^6 spores or cells ml^{-1} by paper disc method. Standard solution of oxytetracycline was dissolved in 0.1 N HCl and diluted with 0.1 M phosphate buffer (pH 4.5 ± 0.1)

* $y=0.134x-2.360, r^2=0.9963$

** $y=0.180x-2.710, r^2=0.9956$

where $y=\text{Log [OTC]} (\mu\text{g ml}^{-1})$

$x=\text{Inhibition zone (mm)}$

表五 以 *B. subtilis* 芽胞及營養菌體檢測地靈微素力價

Table 5. Bioassay of oxytetracycline with spores and vegetative cells of *B. subtilis* ATCC 6633

Log [OTC] ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Inhibition zone (mm)	
	Spores*	Vegetative cells**
0	16.4	16.0
1	24.6	19.6
2	32.3	27.7
3	43.3	37.5
4	52.7	43.8

$P=0.0013$

Antimicrobial activity was assayed with 200 ml of Antibiotic medium No. 8, and 5.0×10^6 spores or cells ml^{-1} by paper disc method. Standard solution of oxytetracycline was dissolved in 0.1 N HCl and diluted with 0.1 M phosphate buffer (pH 4.5 ± 0.1)

* $y=0.105x-1.50, r^2=0.996$

** $y=0.121x-1.38, r^2=0.994$

where $y=\text{Log [OTC]} (\mu\text{g ml}^{-1})$

$x=\text{Inhibition zone (mm)}$

3. 分析法對抗生素力價之影響

抗生素生物檢測時有紙錠法和不銹鋼圓筒法。如將紙錠直接沾取檢測液，再以濾紙吸去多餘水分，而後置於分析培養基上檢測時，由於每一紙錠所吸收之檢測液量可能不同，而造成定量上之誤差。本研究則先將紙錠或不銹鋼圓筒置於分析培養基上，分別加入 50 μl 檢測液（每一個紙錠可以吸收 50 μl 檢測液而不滲出）。其對抗生素力價之影響如表六和表七所示。由表六知以紙錠法和不銹鋼圓筒法利用 *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 檢測地靈微素力價時，兩者之間之差異性不顯著 ($P=0.3492$)。地靈微素之濃度對數和抑制圈直徑間有直線關係，相關係數大於 0.990。而利用 *B. subtilis* ATCC 6633 檢測地靈微素力價時，紙錠法和不銹鋼圓筒法兩者之差異性不顯著 ($P=0.1309$)。且地靈微素之濃度對數與抑制圈直徑有很好之相關性。為減少每一測定供試樣品體積上之差異，一般抗生素力價檢測法皆採用不銹鋼圓筒法⁽¹⁴⁻¹⁸⁾。但由本研究發現，如能將供試樣品體積固定，則使用紙錠法亦可獲得良好之結果。而且使用紙錠法檢測時較不銹鋼圓筒法方便^(10,11)。

4. 培養基使用量對抗生素力價之影響

一般微生物檢定抗生素時於內徑 85 ± 1 mm 徑之扁平培養皿中加入 10 ml 培養基^(14-16,18)。為降低實驗室廢棄物之產生量，而且維持其精確度，本研究依培養皿中培養基之厚度計算分析盤（長 30 公分，寬 26 公分）所需之培養基為 300 ml。不同培養基使用量對抗生素力價之影響如表八所示。由表八知，使用培養基 200 ml 或 300 ml 時，對其檢測抗生素力價上並無顯著性差異 ($P=0.1630$)。而且抗生素濃度之對數與抑制圈直徑有相當良好之直線關係 ($r^2 > 0.99$)。可見生物檢測時使用培養基之體積可以減少 1/3，而對抗生素力價檢測之準確度無影響，值得推廣。在實驗室減廢研究中，亦同時發現平板培養時，降低培養基之使用量 30%，測定總菌數時其準確度不變，但其存放之時間則略減⁽¹⁹⁾，因而在培養時間短之分析檢定上可酌量減少培養基體積而不影響其準確性。

表六 紙錠法及不銹鋼圓筒法對 *B. cereus* var. *mycoides* 檢測抗生素力價之影響

Table 6. Bioassay of oxytetracycline with the paper disc method and stainless steel cylinder method by *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778

Log [OTC] ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Inhibition zone (mm)	
	Paper disc*	Cylinder**
0	18.1	18.3
1	30.4	30.6
2	42.4	42.2
3	51.2	50.8
4	59.0	58.8

$P=0.3492$

Antimicrobial activity was assayed with 200 ml of Antibiotic medium No. 8, and 5.0×10^7 spores ml^{-1} . Standard solution of oxytetracycline was dissolved in 0.1 N HCl and diluted with 0.1 M phosphate buffer (pH 4.5 ± 0.1).

* $y=0.096 x-1.879, r^2=0.990$

** $y=0.098 x-1.928, r^2=0.990$

where $y=\text{Log [OTC]} (\mu\text{g ml}^{-1})$
 $x=\text{Inhibition zone (mm)}$

表七 紙錠法及不銹鋼圓筒法對 *B. subtilis* 檢測抗生素力價之影響

Table 7. Bioassay of oxytetracycline with the paper disc method and stainless steel cylinder method by *B. subtilis* ATCC 6633

Log [OTC] ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Inhibition zone (mm)	
	Paper disc*	Cylinder**
0	16.5	16.7
1	19.6	20.3
2	27.7	28.6
3	37.5	37.4
4	43.8	45.8

$P=0.1309$

Antimicrobial activity was assayed with 200 ml of Antibiotic medium No. 8, and 5.0×10^6 spores ml^{-1} . Standard solution of oxytetracycline was dissolved in 0.1 N HCl and diluted with 0.1 M phosphate buffer (pH 4.5 ± 0.1).

* $y=0.121 x-1.38, r^2=0.994$

** $y=0.112 x-1.37, r^2=0.999$

where $y=\text{Log [OTC]} (\mu\text{g ml}^{-1})$
 $x=\text{Inhibition zone (mm)}$

表八 不同培養基體積對 *B. cereus* var. *mycoides* 檢測抗生素力價之影響

Table 8. Bioassay of oxytetracycline by *B. cereus* var. *mycoides* with different volume of assay medium

Log [OCT] ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Inhibition zone (mm)	
	200 ml*	300 ml**
0	18.1	16.7
1	30.4	28.3
2	42.4	41.2
3	51.2	50.7
4	59.0	61.3

$P=0.1630$

Antimicrobial activity was assayed with Antibiotic medium No. 8, and 5.0×10^6 spores ml^{-1} by paper disc method. Standard solution of oxytetracycline was dissolved in 0.1 N HCl and diluted with 0.1 M phosphate buffer (pH 4.5 ± 0.1).

* $y=0.096 x-1.879, r^2=0.990$

** $y=0.088 x-1.460, r^2=0.996$

where $y=\text{Log [OCT]} (\mu\text{g ml}^{-1})$
 $x=\text{Inhibition zone (mm)}$

表九 不同抗生素稀釋劑對 *B. cereus* var. *mycoides* 檢測抗生素力價之影響

Table 9. Bioassay of oxytetracycline by *B. cereus* var. *mycoides* with standard oxytetracycline in different solvents

Log [OTC] ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Inhibition zone (mm)	
	Distilled water*	Phosphate buffer**
0	15.7	17.2
1	24.3	25.4
2	31.4	32.6
3	38.5	41.0
4	45.0	46.6

$P=0.0083$

Antimicrobial activity was assayed with 20 ml of Antibiotic medium No. 8, and 5.0×10^6 spores ml^{-1} by paper disc method. Standard solution of oxytetracycline was dissolved in 0.1 N HCl and diluted with 0.1 M phosphate buffer (pH 4.5 ± 0.1).

* $y=0.137 x-2.244, r^2=0.997$

** $y=0.134 x-2.360, r^2=0.996$

where $y=\text{Log [OTC]} (\mu\text{g ml}^{-1})$
 $x=\text{Inhibition zone (mm)}$

5. 不同抗生素稀釋液對抗生素力價之影響

部分抗生素其安定性受 pH 值影響很大，在抗生素標準溶液配製時，以蒸餾水或磷酸緩衝溶液稀釋時對抗生素力價之影響如表九和表十所示。以水和磷酸緩衝溶液稀釋抗生素時，其抗生素力價間有極顯著之差異性 ($P=0.0083$ 和 0.0008)。磷酸緩衝溶液稀釋地靈黴素時，其所得之抑制圈比以蒸餾水稀釋時大。因使用 pH 4.5 緩衝溶液，地靈黴素溶液較安定，較能顯現其藥性⁽¹⁷⁾。因而一般抗生素溶液配製時以使用緩衝溶液為宜⁽¹⁴⁻¹⁸⁾。

6. 固態基質中抗生素的回收

無論液態發酵或固態發酵，皆無法由培養基中完全回收抗生素。為了解固態發酵後，其抗生素之回收率，於 10 克甘藷渣固態培養基中添加抗生素後其回收率如表十一所示。當每克甘藷渣基質中添加 50 μg 地靈黴素，以 4 倍蒸餾水在室溫下抽取 5 分鐘時，發現以生物檢測時可以回收 $42.7 \pm 0.64\%$ 之抗生素，而隨著抗生素濃度提高，其回收率也提高，如每克基質添加 5 mg 地靈黴素時，其回收率可達 $68.7 \pm 1.80\%$ 。如其抽出液以高效液相層析法檢測抗生素力價時，則每克基質添加 50 μg 地靈黴素時，其回收率高達 $95.0 \pm 2.76\%$ 。如每克基質添加 5 mg 地靈黴素時，則因其濃度高，致使回收率略降至 $89.2 \pm 5.02\%$ 。可見以高效液相層析法檢測單一之抗生素時，其效果比生物檢測法優。但如在一般發酵培養基時，因供試菌株可能生產非單一之抗生素，如僅以其一種抗生素計算時，則其數值可能比生物檢測法測定某一類抗生素及總當量力價低⁽²⁰⁾。

表十 不同抗生素稀釋劑對 *B. subtilis* 檢測抗生素力價之影響

Table 10. Bioassay of oxytetracycline by *B. subtilis* with standard oxytetracycline in different solvents

Log [OTC] ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Inhibition zone (mm)	
	Distilled water*	Phosphate buffer**
0	16.5	16.2
1	19.6	21.3
2	27.7	30.2
3	37.5	40.0
4	43.8	47.3

$P=0.0008$

Antimicrobial activity was assayed with 200 ml of Antibiotic medium No. 8, and 5.0×10^6 spores ml^{-1} by paper disc method. Standard solution of oxytetracycline was dissolved in 0.1 N HCl and diluted with 0.1 M phosphate buffer (pH 4.5 ± 0.1).

* $y=0.121x-1.38, r^2=0.994$

** $y=0.114x-1.45, r^2=0.997$

where $y = \text{Log [OTC]} (\mu\text{g ml}^{-1})$

$x = \text{Inhibition zone (mm)}$

7. 地靈黴素力價測定之比較

抗生素力價之測定方法很多，有微生物擴散分析法、光譜分析法、高效液相層析法、薄層層析併用生物分析法、酵素免疫法和試管內分析法等⁽¹⁻⁶⁾。前已述及影響微生物擴散分析法之因子，為進一步了

表十一 由固態基質回收地靈黴素

Table 11. Recovery of oxytetracycline in solid substrate

Log [OTC] [$\mu\text{g}(\text{g sub.})^{-1}$]	Recovery percentage (%)	
	Bioassay method*	HPLC method**
5,000	68.7 ± 1.80	89.2 ± 5.02
2,000	63.8 ± 0.57	92.3 ± 3.68
50	42.7 ± 0.64	95.0 ± 2.76

Antibiotic was extracted by 4 volume of distilled water at room temperature with shaking 5 min.

* Antimicrobial activity was determined with 200 ml of Antibiotic medium No. 8, and 5.0×10^6 spores ml^{-1} of *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 1178 by paper disc method. Standard solution of oxytetracycline was dissolved in 0.1 N HCl and diluted with 0.1 M phosphate buffer (pH 4.5 ± 0.1).

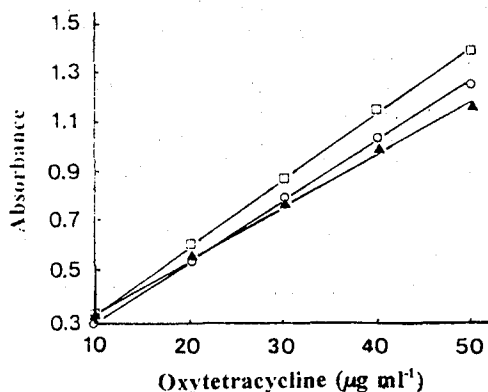
** Oxytetracycline concentration was determined by LC-5A Liquid Chromatograph with column Lichrospher 60 RP-Select B and eluted with the mixture of methanol: acetonitrile: water: 0.2 M phosphate buffer (pH 2.5) at ratios of 10: 20: 60: 10 as the mobile phase.

解各種抗生素力價分析法所可檢測之最低含量。而就微生物擴散分析法、光譜分析法、高效液相層析法三種加以比較。地靈黴素在磷酸緩衝液和水溶液中，於波長 270 nm 附近有主要之吸收帶，而在波長 223 nm 和 350 nm 有兩個次要吸收帶^(20,21)。Yang 和 Ling⁽²⁰⁾ 稱在地靈黴素水溶液中，於波長 275 nm 和 353 nm 有最大吸收帶，而於波長 232 nm 和 321 nm 有最低吸光值。Porter 指出地靈黴素在 0.1 N HCl 溶液中，於波長 267 nm 和 357 nm 有最大吸光值⁽²²⁾。可見抗生素在不同溶劑中，其吸收光譜略有差異。如以波長 223 nm、270 nm 和 350 nm 測定地靈黴素吸光值與濃度之關係時，發現它們在濃度 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 至 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 間有良好直線關係 (圖一)。由自動記錄器上可以發現其在 0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 濃度時，仍可讀出其吸光值。

當以高效液相層析法分析地靈黴素，用 UV 檢出器測其吸光值時，發現地靈黴素在移動相 methanol: acetonitrile: water: 0.2 M phosphate buffer (pH 2.5)=10:20:60:10 時，其滯留時間為 5.5 分鐘，且在濃度 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 至 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 下其吸光值與濃度之間有良好之直線關係。而在濃度 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 時，仍可由記錄器上檢出其吸光值。

由前述微生物擴散分析法知，當以 *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 芽胞為檢測菌株，使用 200 ml 分析培養基，用紙錠法檢測時，其最低之檢測濃度可達 0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (圖二)。

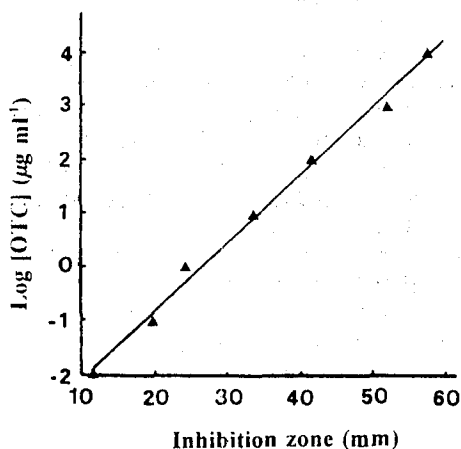
由上可知在抗生素力價檢測方法中，微生物擴散分析法最簡單，所需之儀器設備少。在檢測地靈黴素時可用 *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 芽胞，如對非特定之抗生素或抗菌物質則可用 *B. subtilis* ATCC 6633 芽胞。採用紙錠法或不銹鋼圓筒法，用 200 ml 分析培養基檢測，其最低之檢出濃度可達 0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 。而對單一且已知之抗生素則可用高效液相層析法，其最低檢出濃度為 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 。而分光光譜法因特性低，只僅可作為抗生素力價之參考，最低檢出濃度雖為 0.10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 。但仍需與其他方法配合方能確定。可見微生物擴散分析法是一簡便且準確性高之抗生素力價檢測法。



圖一 地靈黴素以紫外線吸收光譜法測定吸光值與濃度之相關性

Fig. 1. Correlation between absorbance and concentration of oxytetracycline with UV-spectrophotometry. Oxytetracycline was dissolved in 0.1 N HCl and diluted with 0.1 M phosphate buffer (pH 4.5±0.1)

▲—▲ $A_{223\text{nm}}$ $y=0.021x + 0.127$, $r^2=0.9969$
 □—□ $A_{270\text{nm}}$ $y=0.026x + 0.082$, $r^2=0.9995$
 ○—○ $A_{350\text{nm}}$ $y=0.024x + 0.064$, $r^2=0.9973$



圖二 地靈黴素以生物檢定法測定抑制圈直徑與濃度之相關性

Fig. 2. Correlation between inhibition zone and concentration of oxytetracycline with bioassay method. Oxytetracycline potency was assayed with 200 ml of Antibiotic medium No. 8, and 5.0×10^6 spores ml^{-1} of *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 by paper disc method. Standard solution of oxytetracycline was dissolved in 0.1 N HCl and diluted with 0.1 M phosphate buffer (pH 4.5±0.1). $y=0.131x - 3.445$, $r^2=0.993$.

參 考 文 獻

- (1) E. Neidert, P.W. Saschenbrecker and F. Tittiger: Thin layer chromatography/bioautographic method for identification of antibiotic residues in animal tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**: 197-200 (1987).
- (2) M.E. Mount and D.C. Failla: Production of antibodies and development of enzyme immunoassay for determination of monensin in biological samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**: 201-205 (1987).
- (3) M.S. Brady, R.J. Strobel and S.E. Katz: *In vitro* analytical system for determining the ability of antibiotics at residue levels to select for resistance in bacteria. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**: 2-10 (1988).
- (4) M.S. Brady and S.E. Katz: Microbial diffusion assay for antibiotics in feeds using a simplified design. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**: 717-720 (1988).
- (5) A.M. Wahbi: First derivative spectrophotometric determination of anhydrotetracyclines in tetracyclines. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**: 768-772 (1988).
- (6) E.E. Martinez and W. Shimoda: Liquid chromatographic determination of tetracycline residues in animal feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**: 477-480 (1988).
- (7) J.M. Katz and S.E. Katz: Microbiological assay for antibiotics in surface water *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**: 635-639 (1983).
- (8) M.S. Brady and S.E. Katz: Simplified plate diffusion system for microbial assays of antibiotics. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**: 641-646 (1987).
- (9) B. Grynne: Identification of small amounts of antibiotics by electrophoresis and bioautography. *Acta Path. Microbiol. Scan. Section B*, **81**: 583-588 (1973).
- (10) S.S. Yang and S.S. Yuan: Oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in solid state fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **6**: 261-268 (1990).
- (11) S.S. Yang and J.Y. Wang: Morphogenesis, biomass and oxytetracycline production of *Streptomyces rimosus* in solid state cultivation. *J. Appl. Bacteriol.*, **59**: (in press).
- (12) W. Horwitz: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists 813-829 (1984).
- (13) SAS Institute Inc.: SAS/STAT User's guide, Version 6, Cary, NC (1987).
- (14) 經濟部中央標準局: 肉及肉製品中殘留四環素類抗生素檢驗法 CNS-12322, N 6209, p. 1-4 (1988)。
- (15) 經濟部中央標準局: 食品中抗菌性物質殘留檢驗法 (嬰兒食品用) CNS-8860, N 6169, p. 1 (1982)。
- (16) 經濟部中央標準局: 生乳中抗生物質殘留檢驗法 CNS-3453, N 6069, p. 1 (1987)。
- (17) 傅祖慧: 日本、美國及我國的畜水產品殘留抗生素物質檢驗法, 臺灣區肉品發展基金會, 臺北 (1988)。
- (18) 經濟部中央標準局: 鮮肉之抗生物質殘留檢驗法 CNS-5916, N 6121, p. 1-2 (1987)。
- (19) 曾四恭、陳劉旺、何國榮、李水盛、楊盛行: 實驗室廢污減量及減廢。教育部, p. 155 (1991)。
- (20) S.S. Yang and M.Y. Ling: Tetracycline production of sweet potato residue by solid state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, **33**: 1021-1028 (1989).
- (21) 王貞懿: *Streptomyces rimosus* TM-55 於固態及液態培養生產四環素時之生理性質。博士論文, 國立臺灣大學農業化學研究所, 臺北市, pp. 280 (1991)。
- (22) J.N. Porter: Antibiotics. In: Industrial Microbiology, pp. 60-68. ed. by B.M. Miller and W. Litsdy, McGraw-Hill Book Co., New York (1976).

Determination of Antibiotic Potency With Microbial Diffusion Assay

S. S. YANG*, J. Y. WANG^a, S. Y. TSAI and C. B. WEI

Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R. O. C.

* *Present address: Division of Microbiology, National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health, Executive Yuan, Taipei, Taiwan, R. O. C.*

(Received on December 4, 1995; Accepted on December 13, 1995)

ABSTRACT

The sensitivity of microbial diffusion assay for antibiotic potency was affected by test organism, cell stage, assay medium volume and preparation of standard sample. *Bacillus cereus* var. *mycooides* ATCC 11778 was more sensitive than *S. subtilis* ATCC 6633 in oxytetracycline determination. The optimal conditions for microbial diffusion assay of oxytetracycline were the spore suspension of *B. cereus* var. *mycooides* ATCC 11778, with paper disc method (or stainless steel cylinder method), 200 ml of assay medium and preparation antibiotic solution with phosphate buffer. Antibiotics recovery from the solid substrate increased with the amount of antibiotics. The minimal concentration of oxytetracycline could be detected by microbial diffusion assay, UV-spectrometry, and HPLC method was 0.01, 0.10, and 1.00 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively.

Key words: Microbial diffusion assay, oxytetracycline, paper disc, HPLC, UV-spectrometry.