

中华人民共和国农业行业标准

NY/TXXXX—XXXX

中生菌素母药

Zhongshengmycin technical concentrate

(征求意见稿)

(本稿完成日期: 2020-11)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX

中华人民共和国农业农村部

发布

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规则起草。

本文件由中华人民共和国农业部种植业管理司提出并归口。

本文件起草单位：农业农村部农药检定所、陕西麦可罗生物科技有限公司、福建凯立生物科技股份有限公司、深圳诺普信农化股份有限公司。

本文件主要起草人：XXX、XXX。

# 中生菌素母药

## 1 范围

本文件规定了中生菌素母药的要求、试验方法、验收和质量保证期以及标志、标签、包装、储运。本文件适用于由中生菌素及其生产中产生的杂质组成的中生菌素母药。

注：中生菌素的其他名称、结构式和基本物化参数参见附录A。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 1600—2001 农药水分测定方法

GB/T 1601 农药pH值的测定方法

GB/T 1604 商品农药验收规则

GB/T 1605—2001 商品农药采样方法

GB 3796 农药包装通则

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 8170—2008 数值修约规则与极限数值的表示和判定

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 要求

### 4.1 外观

应为均匀的疏松粉末，不应有团块。

### 4.2 技术指标

中生菌素母药还应符合表1的要求。

表1 中生菌素母药控制项目指标

项目	指标	
	12%	26%
中生菌素质量分数(F+E+D+C+B), %	9.0 <sup>+2.2</sup> <sub>-2.2</sub>	20.0 <sup>+5.0</sup> <sub>-5.0</sub>
中生菌素生物效价, U/g	120000 <sup>+30000</sup> <sub>-30000</sub>	260000 <sup>+65000</sup> <sub>-65000</sub>
pH范围	3.5~6.5	
水分, % ≤	5.5	

## 5 试验方法

安全提示：使用本文件的人员应有实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规的规定。

### 5.1 一般规定

本文件所用试剂和水，在没有注明其他要求时，均指分析纯试剂和GB/T 6682—2008中规定的三级水。检验结果的判定按GB/T 8170—2008中4.3.3进行。

### 5.2 抽样

按GB/T 1605—2001中5.2.1进行。用随机数表法确定抽样的包装件；最终抽样量应不少于100 g。

### 5.3 鉴别试验

液相色谱法——鉴别试验可与中生菌素质量分数的测定同时进行。在相同的色谱操作条件下，试样溶液某一色谱峰的保留时间与标样溶液中中生菌素保留时间，其相对差值应在1.5%以内。

### 5.4 中生菌素质量分数的测定

#### 5.4.1 方法提要

试样用水溶解，以乙腈+混合盐溶液为流动相，使用以C<sub>18</sub>为填料的不锈钢柱和紫外检测器，在波长200 nm下对试样中的中生菌素进行反相高效液相色谱分离，外标法定量。

#### 5.4.2 试剂和溶液

乙腈：色谱纯。

水：新蒸二次蒸馏水或超纯水。

磷酸。

庚烷磺酸钠。

磷酸氢二钠。

混合盐溶液：称取4.5 g（精确至0.001 g）庚烷磺酸钠和16.25 g（精确至0.001 g）磷酸氢二钠，置于具塞玻璃瓶中，加入1000 mL水，超声波振荡15 min，冷却至室温，用磷酸调pH至2.5，摇匀，经滤膜过滤，并进行脱气。

中生菌素标样：已知中生菌素F质量分数， $\omega \geq 90.0\%$ ；中生菌素E质量分数， $\omega \geq 90.0\%$ ；中生菌素D质量分数， $\omega \geq 90.0\%$ ；中生菌素C质量分数， $\omega \geq 90.0\%$ ；中生菌素B质量分数， $\omega \geq 90.0\%$ 。

### 5.4.3 仪器

高效液相色谱仪：具有可变波长紫外检测器。

色谱数据处理机或色谱工作站。

色谱柱：250 mm×4.6 mm (i.d.) 不锈钢柱，内装C<sub>18</sub>、5μm填充物（或具有同等效果的色谱柱）。

过滤器：滤膜孔径约0.45μm。

微量进样器：50μL。

定量进样管：5μL。

超声波清洗器。

### 5.4.4 高效液相色谱操作条件

流动相：梯度洗脱条件见表2。

表2 梯度洗脱条件

时间/min	乙腈	混合盐溶液
0	85	15
2	85	15
10	78	22
20	78	22
22	85	15
30	85	15

流速：1.0 mL/min。

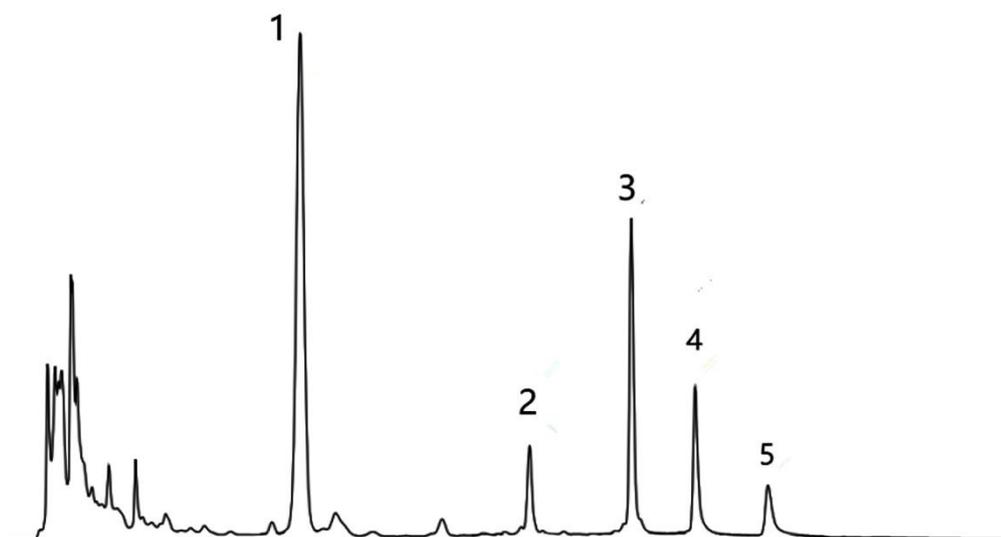
柱温：室温（温度变化应不大于2℃）。

检测波长：200 nm。

进样体积：10μL。

保留时间：中生菌素F约6.5 min，中生菌素E约11.6 min，中生菌素D约13.9 min，中生菌素C约15.3 min，中生菌素B约16.9 min。

上述操作参数是典型的，可根据不同仪器特点对给定的操作参数作适当调整，以期获得最佳效果。典型的中生菌素母药高效液相色谱图见图1。



说明:

- 1——中生菌素F;
- 2——中生菌素E;
- 3——中生菌素D;
- 4——中生菌素C;
- 5——中生菌素B。

图1 中生菌素母药高效液相色谱图

#### 5.4.5 测定步骤

##### 5.4.5.1 标样溶液的制备

分别称取0.025 g (精确至0.000 01 g) 中生菌素F、0.003 g (精确至0.000 01 g) 中生菌素E、0.015 g (精确至0.000 01 g) 中生菌素D、0.008 g (精确至0.000 01 g) 中生菌素C、0.005 g (精确至0.000 01 g) 中生菌素B的标样, 置于50 mL容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。

##### 5.4.5.2 试样溶液的制备

称取含0.025 g (精确至0.000 01 g) 中生菌素F的试样, 置于50 mL容量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 过滤。

##### 5.4.5.3 测定

在上述操作条件下, 待仪器稳定后, 连续注入数针标样溶液, 直至相邻两针中生菌素峰面积相对变化小于1.2%时, 按照标样溶液、试样溶液、试样溶液、标样溶液的顺序进行测定。

##### 5.4.5.4 计算

###### 5.4.5.4.1 中生菌素各组分质量分数的计算

将测得的两针试样溶液以及试样前后两针标样溶液中中生菌素峰面积分别进行平均。试样中生菌素F(E、D、C、B)质量分数按公式(1)计算:

$$\omega_{1(2,3,4,5)} = \frac{A_2 \times m_1 \times \omega_0}{A_1 \times m_2} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- $\omega_{1(2,3,4,5)}$ ——试样中生菌素F(E、D、C、B)质量分数, 以%表示;
- $A_2$ ——试样溶液中中生菌素F(E、D、C、B)峰面积的平均值;
- $m_1$ ——中生菌素F(E、D、C、B)标样的质量, 单位为克(g);
- $\omega_0$ ——标样中生菌素F(E、D、C、B)质量分数, 以%表示;
- $A_1$ ——标样溶液中中生菌素F(E、D、C、B)峰面积的平均值;
- $m_2$ ——试样的质量, 单位为克(g)。

###### 5.4.5.4.2 中生菌素(F+E+D+C+B)总组分质量分数的计算

中生菌素(F+E+D+C+B)总组分质量分数 $\omega$ (%)按公式(2)计算:

$$\omega = \omega_1 + \omega_2 + \omega_3 + \omega_4 + \omega_5 \cdots \cdots (2)$$

式中：

$\omega$ ——中生菌素(F+E+D+C+B)总组分质量分数，以%表示。

#### 5.4.6 允许差

中生菌素各组分质量分数两次平行测定结果之相对差应不大于10%，取其算术平均值作为测定结果。

### 5.5 中生菌素生物效价的测定

#### 5.5.1 方法提要

根据抗生素对其敏感菌的抑菌或杀菌作用，以枯草芽孢杆菌为试验菌，利用生物显影杯碟法测定中生菌素生物效价。

#### 5.5.2 试验菌

枯草芽孢杆菌 CMCC 63501。

#### 5.5.3 试剂和溶液

水：新蒸二次蒸馏水或超纯水。

磷酸氢二钾。

磷酸二氢钾。

营养琼脂培养基：配制过程见附录B。

抗生素检定培养基I号（高pH）：配制过程见附录B。

磷酸缓冲液：称取5.59 g（精确至0.001 g）磷酸氢二钾、0.41 g（精确至0.001 g）磷酸二氢钾，溶于1000 mL水中，用氢氧化钠溶液调整pH至7.8。

无菌水：将适量水装入锥形瓶中，加棉塞后用牛皮纸包裹，在121 °C下高压灭菌20 min。

中生菌素标样：已知中生菌素生物效价 $\geq 106000$  U/g。

#### 5.5.4 仪器和设备

电热恒温培养箱。

标准定量培养皿（平底双碟）：直径90 mm，高16 mm~17 mm，底部平整。

不锈钢小管：内径6.0 mm $\pm$ 0.1 mm，高为10.0 mm $\pm$ 0.1 mm，外径7.8 mm $\pm$ 0.1 mm。

灭菌锅。

无菌水平工作台。

#### 5.5.5 测定步骤

##### 5.5.5.1 枯草芽孢杆菌菌悬液的制备

取枯草芽孢杆菌（CMCC63501）的营养琼脂培养基斜面培养物，接种于盛有营养琼脂培养基的培养瓶中，于35 °C~37 °C培养7d，用革兰氏染色法涂片镜检，应有芽孢85%以上。用灭菌水将芽孢洗下，于65 °C加热30 min，备用。

##### 5.5.5.2 标样溶液的制备

称取0.1 g（精确至0.0001 g）中生菌素标样，置于100 mL容量瓶中，用水稀释定容，摇匀，作为标样溶液母液。

高浓度标样浓液的配制：用移液管移取5 mL标样溶液母液于50 mL容量瓶中，用灭菌磷酸缓冲液稀释定容，摇匀。

低浓度标样浓液的配制：用移液管移取5 mL标样溶液母液于100 mL容量瓶中，用灭菌磷酸缓冲液稀释定容，摇匀。

### 5.5.5.3 试样溶液的制备

称取含0.1 g（精确至0.0001 g）中生菌素的试样，置于100 mL容量瓶中，加灭菌水定容，摇匀。用移液管移取上述溶液5 mL于50 mL容量瓶中，用灭菌水稀释定容，摇匀，作为试样溶液母液。

高浓度试样浓液的配制：用移液管移取5 mL试样溶液母液于50 mL容量瓶中，用灭菌磷酸缓冲液稀释定容，摇匀。

低浓度试样浓液的配制：用移液管移取5 mL试样溶液母液于100 mL容量瓶中，用灭菌磷酸缓冲液稀释定容，摇匀。

### 5.5.5.4 双碟的制备

#### 5.5.5.4.1 培养基基层的制备

用灭菌大口吸管吸取 20 mL 溶化的抗生素检定培养基 I 号（高 pH）于平底双碟培养皿内，在碟底均匀摊布，静置凝固，作为培养基基层。

#### 5.5.5.4.2 培养基菌层的制备

取抗生素检定培养基 I 号（高 pH）加热溶化后，置水浴锅放置降温至 48℃~50℃（芽孢可至 60℃），加入适量试验菌悬液（以能得到清晰的抑菌圈为度，标准品浓液的高浓度所致的抑菌圈直径在 18 mm~22 mm 范围内），摇匀。在每个双碟培养皿中分别加入 5 mL 上述含菌培养基溶液，在底层上均匀摊布，静置凝固，作为培养基菌层。

#### 5.5.5.4.3 钢管的放置

在每个双碟培养皿中十字交叉等距离均匀安置 4 个不锈钢小管，保证各钢管下落的高度基本一致，静置 5 min~10 min，用陶瓷盖覆盖，备用。

#### 5.5.5.5 二剂量法滴加溶液

取不少于 4 个按照上述方法制备的平底双碟培养皿，在每个双碟培养皿中用润洗后的一次性吸管按照顺时针高浓度标准品溶液、高浓度试样溶液、低浓度标准品溶液、低浓度试样溶液的顺序进行滴加，滴加溶液至与钢管口平齐，滴加溶液的间隔不应过长，否则因钢管内溶液的扩散时间不同会影响测定结果。

#### 5.5.5.6 培养

滴加完毕后，用陶瓷盖覆盖双碟，平稳置于双碟培养皿托盘内，双碟培养皿叠放不应超过 3 层，以免受热不均，影响抑菌圈大小。将双碟培养皿托盘水平平稳地移入培养箱中间位置，在 35℃~37℃ 培养箱中培养 14 h~16 h。

#### 5.5.5.7 抑菌圈的测量

将培养好的双碟培养皿取出，取掉陶瓷盖，在保证抑菌圈不受影响的前提下，轻轻地将其中的钢管倒出。测量抑菌圈前，应检查抑菌圈是否圆整，如有破圈或圈不圆整，应舍弃该皿，以免造成测定结果的偏差。测量各个抑菌圈的直径。

### 5.5.6 计算

二剂量法效价按公式（3）计算：

$$P = \log^{-1} \left[ \frac{T_2 + T_1 - S_2 - S_1}{T_2 + S_2 - T_1 - S_1} \times I \right] \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

式中：

$P$ ——为生物效价的百分数，以%表示；

$S_2$ ——为标准品高浓度溶液所致抑菌圈直径的总和，单位为毫米（mm）；

$S_1$ ——为标准品低浓度溶液所致抑菌圈直径的总和，单位为毫米（mm）；

$T_2$ ——为试样高浓度溶液所致抑菌圈直径的总和，单位为毫米（mm）；

$T_1$ ——为试样低浓度溶液所致抑菌圈直径的总和，单位为毫米（mm）；

$I$ ——为试验中高浓度溶液与低浓度溶液的浓度比的对数值，即  $\log 2$ 。

测定效价按公式（4）计算：

$$P_T = P \times A_T \dots\dots\dots (4)$$

式中：

$P_T$ ——为测定效价，单位为 U/g；

$P$ ——为试样效价，以%表示；

$A_T$ ——为估计效价，单位为 U/g。

### 5.5.7 允许差

中生菌素生物效价两次平行测定结果之相对差应不大于10%，取其算数平均值作为测定结果。

## 5.6 pH 值的测定

按 GB/T 1601进行。

## 5.7 水分的测定

按 GB/T 1600—2001 中 2.2 进行。

## 6 验收和质量保证期

### 6.1 验收

应符合 GB/T1604 的规定。

### 6.2 质量保证期

在规定的储运条件下，中生菌素母药的质量保证期，从生产日期算起为 2 年。质量保证期内，各项指标均应符合标准要求。

## 7 标志、标签、包装、储运

### 7.1 标志、标签和包装

中生菌素母药的标志、标签和包装，应符合 GB 3796 的规定。

中生菌素母药包装采用铝箔袋或阻隔瓶包装，每瓶净含量 25 kg 或 50 kg；也可根据用户要求或订货协议采用其他形式的包装，但应符合 GB3796 的规定。

### 7.2 储运

中生菌素母药储运时，严防潮湿和日晒，不得与食物、种子、饲料混放，避免与皮肤、眼睛接触，防止由口鼻吸入。包装件储存在通风、干燥的仓库中。

## 附录 A

(资料性)

## 中生菌素的其他名称、结构式和基本物化参数

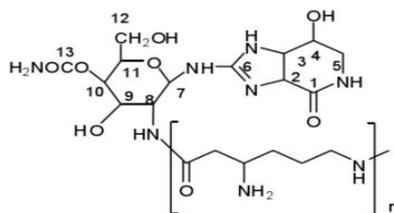
本产品有效成分中生菌素的其他名称、结构式和基本物化参数如下：

有效成分：*N*-糖甙（*N*-glycoside antibiotic）

产生菌：淡紫灰链霉菌海南变种（*Streptomyces lavendulae* var. *hainanensis*）

分子式分别为：中生菌素F  $C_{19}H_{34}O_8N_8$ 、中生菌素E  $C_{25}H_{46}O_9N_{10}$ 、中生菌素D  $C_{31}H_{58}O_{10}N_{12}$ 、中生菌素C  $C_{37}H_{70}O_{11}N_{14}$ 、中生菌素B  $C_{43}H_{82}O_{12}N_{16}$

结构式：其中中生菌素F（ $n=1$ ），中生菌素E（ $n=2$ ），中生菌素D（ $n=3$ ），中生菌素C（ $n=4$ ），中生菌素B（ $n=5$ ）



相对分子质量为：中生菌素F 502.53，中生菌素E 630.71，中生菌素D 758.89，中生菌素C 887.06，中生菌素B 1015.25

生物活性：杀菌

溶解性：极易溶于水，能溶于甲醇、乙醇等低级醇，不溶于丙酮、氯仿、乙酸乙酯等中等极性弱极性溶剂

稳定性：在酸性介质中、低温条件下稳定

附 录 B  
(资料性)  
培养基的配制

## B.1 营养琼脂培养基

### B.1.1 试剂和溶液

蛋白胨。

牛肉浸膏。

氯化钠。

琼脂。

氢氧化钠。

水：新蒸二次蒸馏水或超纯水。

氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH})=0.1\text{ mol/L}$ 。

### B.1.2 培养基的制备

称取10 g（精确至0.01 g）蛋白胨、3 g（精确至0.01 g）牛肉浸膏、5 g（精确至0.01 g）氯化钠，混合，再加入15 g（精确至0.01 g）琼脂于烧杯中，加水使其溶解，最后补充水至1000 ml，用氢氧化钠溶液调整pH至7.1~7.5，将配制好的培养基分装入500 mL锥形瓶中，加棉塞后用牛皮纸包裹，在121 °C下高压灭菌20 min。

## B.2 抗生素检定培养基I号（高pH）。

### B.2.1 试剂和溶液

蛋白胨。

牛肉浸出粉。

琼脂。

水：新蒸二次蒸馏水或超纯水。

磷酸氢二钾。

磷酸二氢钾。

氢氧化钠。

氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH})=0.1\text{ mol/L}$ 。

### B.2.2 培养基的制备

称取5 g（精确至0.01 g）蛋白胨，3 g（精确至0.01 g）牛肉浸出粉，3 g（精确至0.01 g）磷酸氢二钾于1000 mL烧杯中，先加入适量水，用玻璃棒搅拌，然后加热使其溶解，完全溶解后补充水至1000 mL，再加入20 g（精确至0.01 g）琼脂于烧杯中，加热使其溶解，最后补充水到所需体积，用氢氧化钠溶液调整pH至7.8~8.0，将配制好的培养基分装入500 mL锥形瓶中，加棉塞后用牛皮纸包裹，在121 °C下高压灭菌20 min。

