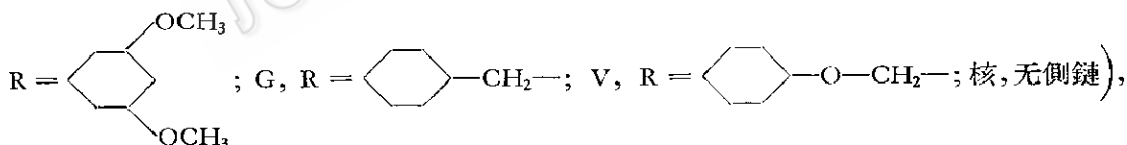


葡萄球菌及蜡样芽孢杆菌产生的青霉素 内酰胺酶测定新青霉素 1241 效价的研究

趙建西 鄭昌亮 田淑玲

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

青霉素自 1940 年临床应用以来,显示了卓越的疗效,但近年来耐药性葡萄球菌已达 90% 左右。许多学者进行青霉素分子改造的研究,来弥补青霉素的缺点。1959 年 Batchelor^[1] 制备了青霉素核在研究新青霉素方面开辟了新的途径。用半综合方法制备新青霉素现已有数千种,其中以 P 12 及新青霉素 1241 等效能较好。新青霉素 1241 对葡萄球菌产生的青霉素内酰胺酶稳定,对耐药性葡萄球菌有抑制作用,治疗耐药性葡萄球菌感染效果良好,但对青霉素敏感菌株的抑菌力小于青霉素 G,如对金黄色葡萄球菌 209 P 抑菌力小于青霉素 G 20 倍^[2,3],对八迭球菌的抑菌力也小于青霉素 G 20 倍。我国亦将生产新青霉素 1241,其生产工艺一般均系用大肠杆菌产生的青霉素酰胺酶裂解青霉素 G (亦可用青霉素 V),生成青霉素核 (6 APA),再与侧链 2,6-二甲氧基苯甲酸结合而成,又名 2,6-二甲氧基苯基青霉素钠盐,含一分子结晶水,因而新青霉素 1241 成品中有可能带入青霉素 G 或青霉素核,它们能够干扰新青霉素的效价测定,使测定结果偏高。由于新青霉素 1241、青霉素 G、V 及青霉素核的分子结构很相近,仅其侧链不同, (1241,



很难用一般化学方法有区别地测定它们的效价。本文主要研究应用耐药性金黄色葡萄球菌产生的青霉素内酰胺酶 (简称葡萄球菌酶) 及蜡样芽孢杆菌产生的青霉素内酰胺酶 (简称蜡样芽孢杆菌酶) 分别裂解青霉素 G 及新青霉素 1241, 当无青霉素核存在时, 可以用碘滴定法区别测定青霉素及新青霉素 1241 含量; 若有青霉素核存在, 可以用碘滴定法测定青霉素含量, 以微生物法测定新青霉素 1241 含量。

实验材料及方法

(一) 材料

青霉素内酰胺酶

1. 葡萄球菌酶 卫生部药品生物制品检定所保存耐药性金黄色葡萄球菌 147-号菌株, 普通斜面保存, 接种在普通肉汤中 37℃ 培养 22—24 小时, 培养液离心后备用。

2. 蜡样芽孢杆菌酶 按张治铨等的方法^[4]制备, 再精制为干燥白色粉末。

青霉素钾盐 重结晶青霉素钾盐, 每毫克 1600 单位。

青霉素核 重结晶青霉素核, 每毫克 2500 单位 (上海第三制药厂供应)。

青霉素 V 重结晶青霉素 V, 每毫克含 1675 单位。

新青霉素 1241 重结晶五次纯品(上海第三制药厂供应)。

(二) 实验方法

应用青霉素内酰胺酶裂解青霉素与新青霉素 1241, 用碘滴定方法^[6]测定它们的效价; 用葡萄球菌酶裂解青霉素 G, 以微生物法^[7]测定新青霉素 1241 效价; 微生物测定法, 按抗菌素检定暂行规则^[5]。

实 验 结 果

首先制备葡萄球菌酶以试验对不同类型青霉素的水解作用, 选用耐药性金黄色葡萄球菌 147 号菌株, 普通肉汤培养 22—24 小时, 用碘滴定法^[6]测定酶活力。制备的葡萄球菌酶对热不稳定, 60℃ 30 分钟灭活 80%, 100℃ 10 分钟完全灭活, 除菌滤器沙棒可以吸附 98% 以上。应用含菌体酶与青霉素作用, 结果如图 1, 酶与青霉素接触开始半小时作用极慢, 以后裂解青霉素量与时间成直线关系, 作用曲线不通过零点。离心去除菌体后如图 2, 青霉素与酶的作用是零级反应曲线。为什么当含有菌体时(此时酶单位/毫升比离心后酶单位/毫升高)与青霉素作用出现一“缓慢平行曲线”, 其原因不明, 但离心除去菌体的葡萄球菌酶, 可以满足本实验的要求。

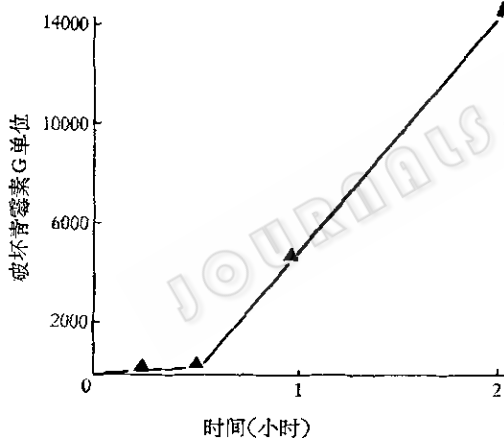


图 1 含菌体葡萄球菌酶对青霉素 G 作用

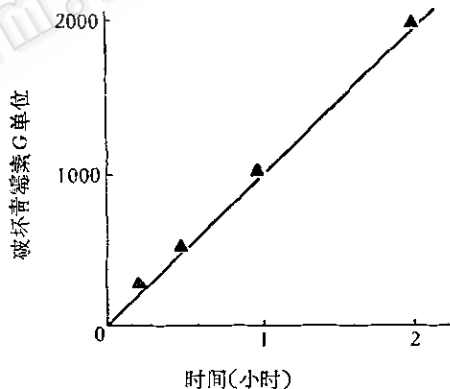


图 2 葡萄球菌酶对青霉素 G 作用

为了研究葡萄球菌酶与蜡样芽孢杆菌酶对不同类型青霉素的作用条件, 以寻找葡萄球菌酶对新青霉素 1241 无作用而能完全裂解青霉素的条件, 和蜡样芽孢杆菌酶能完全裂解新青霉素 1241 的浓度等, 必须进行有关动力学的探讨。

1. 葡萄球菌酶不同浓度对青霉素 G、V、核及 1241 的作用。由图 3 证明酶的浓度与作用速度成正比, 在相同的酶浓度下, 其作用速度: 青霉素 V > G > 核, 1241 不被裂解。

2. 不同浓度蜡样芽孢杆菌酶对新青霉素 1241 的作用。蜡样芽孢杆菌酶亦可裂解青霉素 G、V、核及 1241, 其作用速度: 青霉素 V > G > 核 > 1241; 由图 4 知它可以裂解新青霉素 1241, 因而有可能用蜡样芽孢杆菌酶裂解新青霉素 1241, 用碘滴定法测定其效价。

3. 葡萄球菌酶对青霉素 G 与 V 的作用。二次实验结果证明葡萄球菌酶裂解青霉素 G 与 V 时, 反应 1 小时, 两者速率比为 1:1.26, 图 5 (以 G 为 1)。

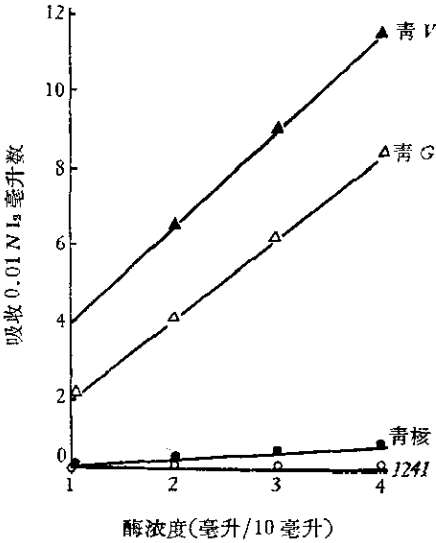


图3 葡萄球菌酶对青霉素 V、G、青核及 1241 作用速度。

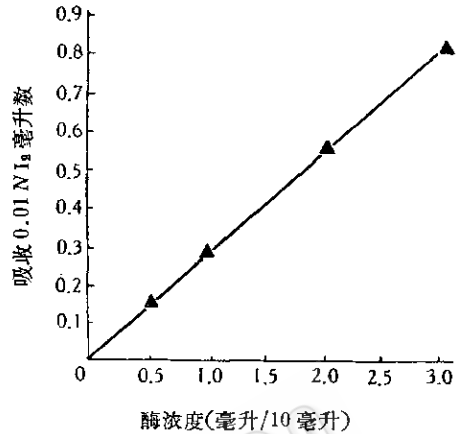


图4 蜡样芽孢杆菌酶对新青霉素 1241 作用。

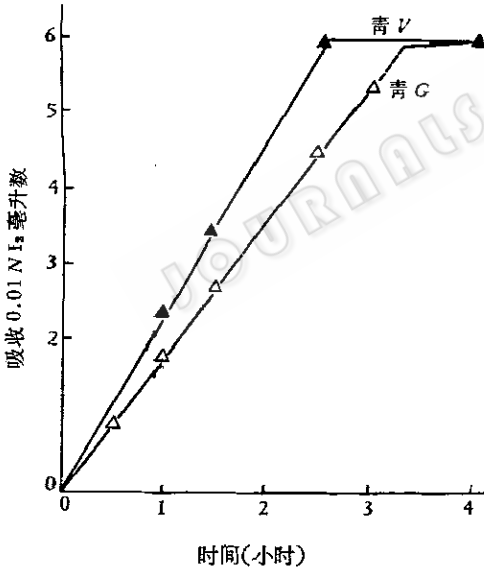


图5 葡萄球菌酶对青霉素 G 青霉素 V 作用。

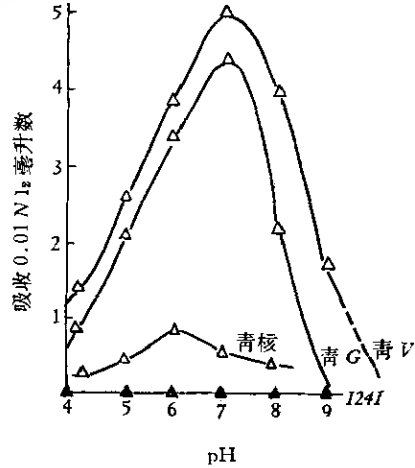


图6 不同 pH 葡萄球菌酶对青霉素 G、V、青霉素核及 1241 作用。

4. 葡萄球菌酶在不同 pH 对青霉素 G、V、核及 1241 的作用。葡萄球菌酶能够裂解青霉素 G、V 及核,在一定酶的浓度下对新青霉素 1241 无作用。在不同 pH 下酶的作用如图 6,葡萄球菌酶裂解青霉素 G 或 V 在 pH = 7.0 时作用速度最快,裂解青霉素核则以 pH = 6.0 时作用较大,在不同 pH 下此酶均不能裂解新青霉素 1241。蜡样芽孢杆菌酶裂解青霉素 G、V 及核时亦得相同的作用曲线,裂解新青霉素 1241 以 pH = 7.0 为最适 pH。因此采用 pH = 7.0 为酶裂解青霉素的条件,可以减少或不受青霉素核的干扰。

5. 高浓度葡萄球菌酶及蜡样芽孢杆菌酶对新青霉素 1241 的作用。酶的浓度与作用

速度成正比,加大酶的浓度时它对新青霉素 1241 的作用见图 7。当葡萄球菌酶的浓度 300 倍于新青霉素 1241 浓度,在 37℃ 2 小时,始能裂解新青霉素 1241 25%,因而说明当选用葡萄球菌酶浓度在作用物浓度 10 倍以下时,新青霉素 1241 不被裂解。

蜡样芽孢杆菌酶可以裂解新青霉素 1241,为了研究高浓度酶是否能完全裂解新青霉素 1241,准确称取新青霉素 1241 以 pH = 7.0 磷酸缓冲液稀释,取 5 毫升(5300 微克)加于碘量瓶中,加入不同倍数蜡样芽孢杆菌酶,总体积为 10 毫升,37℃ 作用 1 小时,以碘滴定法测定新青霉素 1241 量,当酶浓度为 50 倍时,新青霉素 1241 已完全裂解(图 8)。

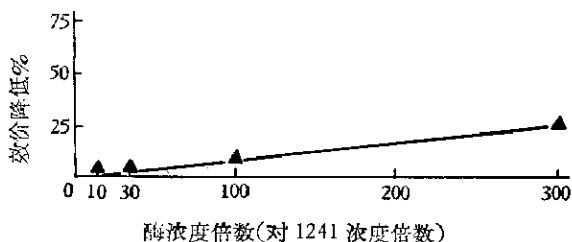


图 7 高浓度葡萄球菌酶对新青霉素 1241 作用。

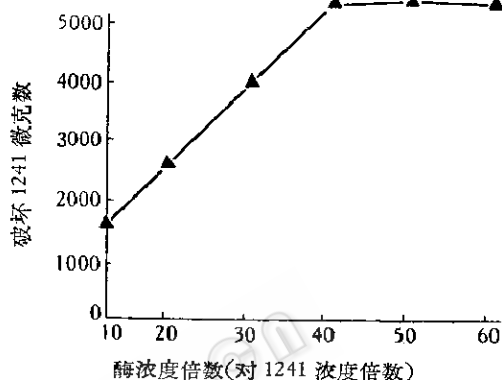


图 8 高浓度蜡样芽孢杆菌酶对新青霉素 1241 作用。

6. 新青霉素 1241 在 37℃ 条件下对葡萄球菌酶的稳定性。因为酶与新青霉素 1241 放在 37℃ 1—2 小时后,用微生物法测定,操作时间长,是否会因温度、时间的影响,使新青霉素 1241 的效价降低,及在此条件下青霉素 G 是否完全裂解。图 9 证明新青霉素 1241 与酶混合在 37℃ 4 小时,效价不降低;而青霉素 G 在酶浓度 (1:1.4) 作用 2 小时被完全裂解。

7. 葡萄球菌酶对青霉素 G 与新青霉素 1241 混合,或青霉素 V 与新青霉素 1241 混合时的作用。

若新青霉素 1241 样品混有青霉素 G 或 V,葡萄球菌酶对青霉素 G 或 V 裂解速度是否会受新青霉素 1241 存在的干扰,故将单独青霉素 G 或 V,及等分子浓度混合的青霉素 G (或 V) 与新青霉素 1241,比较葡萄球菌酶对它们的作用速度。图 10 证明葡萄球菌酶对

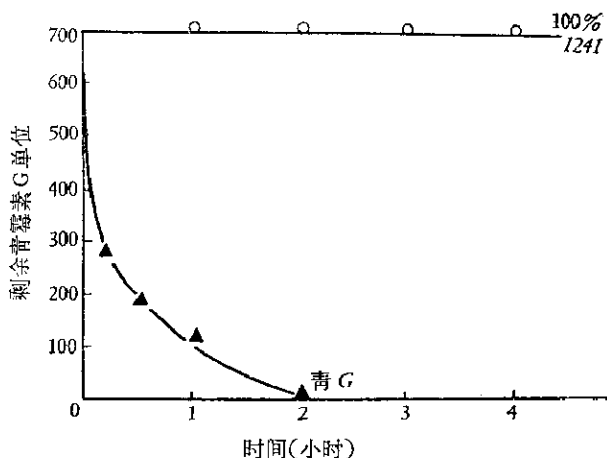


图 9 葡萄球菌酶对 1241、青霉素 G 在 37℃ 作用曲线 (微生物测定)。

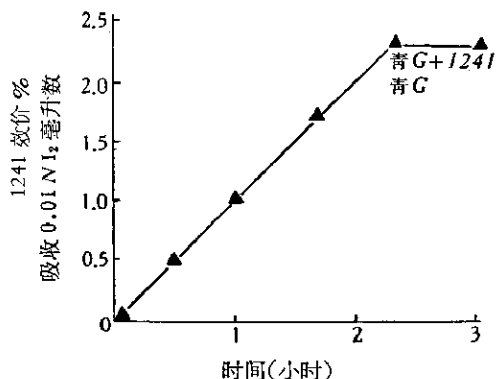


图 10 葡萄球菌酶对青霉素 G、与青霉素 G 混合等浓度 1241 的作用动力曲线。

青霉素 G 的裂解速度,与含有等分子浓度新青霉素 1241 混合样品的作用速度相同,青霉素 V 亦得相同结果。说明葡萄球菌酶裂解青霉素作用不受新青霉素 1241 的影响。

由以上有关动力学研究我们获得:

(1) 葡萄球菌酶在 $\text{pH} = 7.0$ 时对青霉素 G(V) 的作用速度最大,青霉素核裂解甚微,新青霉素 1241 不被裂解。

(2) 当葡萄球菌酶浓度(单位/毫升)在新青霉素 1241 浓度(微克/毫升) 10 倍以下时,新青霉素 1241 不被裂解, 37°C 保存 4 小时亦不降低效价。

(3) 葡萄球菌酶裂解青霉素 G(V) 的作用不受新青霉素 1241 存在的干扰。

(4) 蜡样芽孢杆菌酶浓度(单位/毫升)大于新青霉素 1241 浓度(微克/毫升) 50 倍以上, 37°C 1 小时可以完全裂解新青霉素 1241。

因而可以设计新青霉素 1241 效价的测定。

化学测定法

1. 青霉素 G 含量的测定 将葡萄球菌酶,加入以 $\text{pH} = 7.0$ 磷酸盐缓冲液稀释的样品中,空白试验取样相同,但加入用 100°C 加热 10 分钟灭活的葡萄球菌酶。放置 37°C 1 小时,以碘滴定法测定青霉素含量。

2. 新青霉素 1241 效价测定 样品用 $\text{pH} = 7.0$ 磷酸盐缓冲液稀释成每毫升约 1,000 微克,蜡样芽孢杆菌酶用 $\text{pH} = 7.0$ 磷酸盐缓冲液稀释成每毫升 60,000 单位。

样品测定,取 5 毫升样品加入 1 毫升蜡样芽孢杆菌酶,及 1 毫升灭活葡萄球菌酶,放置 37°C 1 小时。

空白测定,取 5 毫升样品加入 1 毫升葡萄球菌酶,及 1 毫升加热 100°C 10 分钟灭活的蜡样芽孢杆菌酶 1 毫升,放置 37°C 1 小时。

取出后,加入用 20% 醋酸盐缓冲液稀释的 0.010 N 碘液,15 分钟后用 0.010 N 硫代硫酸钠滴定。按下列公式计算:

$$\text{新青霉素 1241 (微克/毫升)} = K (\text{空白 } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ 滴定数} - \text{样品 } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ 滴定数})$$

$$K = 0.010 \text{ N 碘液 1 毫升相当新青霉素 1241 微克数}$$

(可以用标准品直接求出)

应用化学方法测定新青霉素 1241 效价,当样品中存在青霉素核时,会使结果偏高,故不宜采用。

微生物法测定新青霉素 1241 效价

Jones^[8] 报导可以应用管碟法测定 1241 效价,以八选球菌为指示菌。我们试验中亦证明 1241 浓度为 0.5—5 微克/毫升时,其浓度对数与抑菌圈直径成直线关系(图 11),即当抗菌素浓度为 c ,抑菌圈直径为 x ,斜率为 a ,截距为 b ,则:

$$\log c = ax + b$$

因而可以设计二剂量法测定其效价。

将样品与标准品用 $\text{pH} = 7.0$ 磷酸盐缓冲液稀释成 1000 微克/毫升,各加入葡萄球菌酶,放置 37°C 作用 1—2 小时,取出用 1% $\text{pH} = 6.0$ 磷酸盐缓冲液稀释,按[7]方法测定新青霉素 1241 效价。青霉素核之抑菌力甚微,每毫升 250 单位对八选球菌不显示抑菌作用,故不能干扰生物测定法的结果。

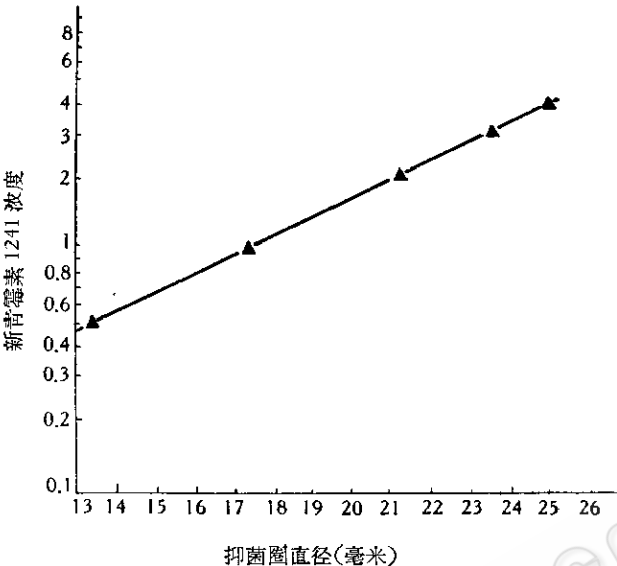


图 11 新青霉素 1241 标准曲线。

八迭球菌对青霉素 G 很敏感^[9]，在 0.04—0.5 单位/毫升，其浓度对数与抑菌圈直径成直线关系。由实验中亦证明八迭球菌对青霉素 G 比对新青霉素 1241 灵敏度大 20 倍，所以必须排除样品中可能存在的青霉素 G。

样品测定（回收试验）

称取一定量新青霉素 1241，加入不同量标准青霉素 G 及青霉素核，分别以碘滴定法及微生物法测定^[10]新青霉素 1241 的效价，结果如表 1—3 所示。

表 1 碘滴定法测定的青霉素 G 与新青霉素 1241 效价

样品编号	加入的青霉素 G 及新青霉素 1241 量	测定出青霉素 G 单位	回收率 (%)	测定出新青霉素 1241 量 (微克)	回收率 (%)
1	1241 4000 微克 G 2000 单位	2007	100.35	3925	98.12
2	1241 4000 微克 G 4000 单位	4005	100.12	4017	100.4
3	1241 4000 微克 G 1000 单位	1022	102.2	4071	101.77
平 均			100.89		100.09

由实验证明，用碘量法测定青霉素 G 含量不受青霉素核的干扰，两组结果相差在 1% 以下，当无青霉素核存在时用蜡样芽孢杆菌酶裂解新青霉素 1241，可用碘量法测定新青霉素 1241 效价。

微生物测定新青霉素 1241 效价，三剂量法测定其每组试验结果，误差变数在 0.0288—0.1305，F 值在 0.168—0.859，远远小于 2.84，因此认为设计方法可以用来测定新青霉素 1241 效价及青霉素含量。

表 2 有青霉素核存在时碘滴定法测定青霉素 G 含量(试验青霉素核的干扰作用)

样品编号	加入的青霉素 G, 新青霉素 1241 及青霉素核量	测定出青霉素 G 含量(单位)	回收率(%)
4	1241 4000 微克 G 2000 单位 核 100 单位	2007	100.35
5	1241 4000 微克 G 4000 单位 核 200 单位	3985	99.62
6	1241 4000 微克 G 1000 单位 核 500 单位	1012	101.2
平 均			100.39

表 3 微生物法测定新青霉素 1241 效价

样品编号	效价结果 (回收率, %)	误差变数 (S ²)	真 实 性				可信限率 (P = 0.95)	
			ab	aq	q	F	上限(%)	下限(%)
1	101.03	0.02888	0.0255	0.0489	0.0032	0.856	103.0	99.31
2	100.3	0.09623	0.0251	0.00187	0.0208	0.168	103.64	97.21
3	101.0	0.1305	0.00340	0.327	0.0059	0.859	104.50	97.53
平 均							103.71	98.01

摘 要

(一) 新青霉素 1241 在一定条件下, 不被耐药性葡萄球菌产生的青霉素内酰胺酶裂解。利用青霉素内酰胺酶裂解青霉素的专属性, 以破坏新青霉素 1241 样品中可能含有的青霉素。当无青霉素核存在时, 可用蜡样芽孢杆菌产生的青霉素内酰胺酶裂解新青霉素 1241, 用碘滴定法测定新青霉素 1241 效价; 有青霉素核存在时, 应用微生物法测定新青霉素 1241 效价。

(二) 利用葡萄球菌产生的青霉素内酰胺酶可以鉴别新青霉素中是否含有青霉素 G (或 V)。

(三) 葡萄球菌产生的青霉素内酰胺酶裂解青霉素 G 及 V 的作用速度比率, 在作用 1 小时为 1:1.26。进一步研究酶对其他新青霉素与青霉素 G 裂解速度的比率, 可以考虑作为定性鉴别青霉素类型之用。

参 考 文 献

[1] Batchelor, F. R., Doyle, F. P. et al.: *Nature*, **183**: 257, 1959.
[2] Paul, A. and Bunn, M. D.: *New York State Journal of Medicine*, **60**: 3074—3082, 1960.
[3] Alexander, M. and Rutenburg, M. D.: *New England Journal of Medicine*, **263**: 1174—1178, 1960.
[4] 张治铤、吴秉芬、俞毓馨、赵建西、郑吕亮、M. 列维托夫: 抗菌素研究-II, 235 页, 上海科学技术出版社。
[5] 抗菌素检定暂行规则, 卫生部 1954 年颁布试行。
[6] 张钟淑、俞毓馨、郑吕亮、M. 列维托夫: 抗菌素研究-II, 276 页, 上海科学技术出版社。

- [7] 上海药物检定所拟订, 新抗菌素 1241 检定规格(在刊登中)。
[8] Jones, A.: *The Analyst*, **86**: 670, 1961.
[9] Gyove and Randall: *Assay methods of Antibiotics*, p. 15.
[10] Krishbaum, A., Auct, B. and Kramer, J.: *Antibiotics and Chemotherapy*, **6**:660, 1956.

STUDY ON THE EZYMATIC ASSAY OF THE NEWER PENICILLIN 1241

CHAO CHIEN-SI, CHENG CHANG-LIANG AND TIEN SHU-LING

(*Institute of Control of Pharmaceuticals and Biologicals, Peking*)

The assay of the newer penicillin 1241 (2,6-dimethoxyphenyl penicillin) by means of penicillinase prepared from *Staphylococcus aureus* and from *Bacillus cereus* was studied. Although 2,6-dimethoxyphenyl penicillin is one of penicillinase-resistant penicillins, it was hydrolyzed by partially purified concentrated cell-free preparations of penicillinase derived from *B. cereus* (No. 63110). However, 2,6-dimethoxyphenyl penicillin was resistant to *Staphylococcal* penicillinase. In addition, benzylpenicillin was hydrolyzed by cell-free *Staphylococcal* penicillinase, and 6-amino-penicillanic acid was found practically biologically inactive and was very resistant to penicillinase at pH 7—8. According to these facts, an assay method with no interference by 6-amino-penicillanic acid, and by benzylpenicillin or phenoxymethylpenicillin was given.