1202 青霉素酶及其活力测定法

培养基

胨	15g	0.1%硫酸亚铁($FeSO_4 \cdot 7H_2O$）溶液	0.5ml
氯化钠	4g		
枸橼酸钠	5.88g	20%硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$）溶液	1ml
磷酸氢二钾	4g		
甘油	50g	肉浸液	1000ml

混合上述成分，调节 pH 值使灭菌后为 7.0～7.2，分装于 500ml 锥形瓶内，每瓶 80ml，在 115℃灭菌 30 分钟。

青霉素酶溶液的制备

取蜡样芽孢杆菌(Bacillus cereus)〔CMCC(B)63 301〕的斜面培养物，接种至上述一瓶培养基内，在 25℃摇床培养 18 小时后，取此培养物接种至其余各瓶培养基内，每瓶接种 10ml，同时每瓶加入无菌青霉素 4500 单位，在 25℃摇床培养 24 小时，再加无菌青霉素 2 万单位，继续培养 24 小时，再加无菌青霉素 2 万单位，继续培养 24 小时，离心沉淀菌体，调节 pH 值至约 8.5，用滤柱滤过除菌，滤液用无菌操作调 pH 值至近中性后，分装于适宜容器内，在 10℃以下贮存，备用：

酶活力测定

青霉素溶液的制备　称取青霉素钠(钾)适量，用磷酸盐缓冲液(pH7.0)溶解成每 1ml 中含青霉素 1 万单位的溶液。

青霉素酶稀释液的制备　取青霉素酶溶液，按估计单位用磷酸盐缓冲液(pH7.0)稀释成每 1ml 中约含青霉素酶 8000～12 000 单位的溶液，在 37℃预热。

测定法　精密量取青霉素溶液 50ml，置 100ml 量瓶中，预热至 37℃后，精密加入已预热的青霉素酶稀释液 25ml，迅速混匀，在 37℃准确放置 1 小时，精密量取 3ml，立即加至已精密量取的碘滴定液(0.005mol/L)［精密量取碘滴定液(0.05mol/L)10ml，置 100ml 量瓶中，用醋酸钠缓冲液(pH4.5)稀释至刻度］25ml 中，在室温暗处放置 15 分钟，用硫代硫酸钠滴定液(0.01mol/L)滴定，至近终点时，加淀粉指示液，继续滴定至蓝色消失。

空白试验　　取已预热的青霉素溶液 2ml，在 37℃放置 1 小时，精密加入上述碘滴定液(0.005mol/L)25ml，然后精密加青霉素酶稀释液 1ml，在室温暗处放置 15 分钟，用硫代硫酸钠滴定液(0.01mol/L)滴定。按下式计算：

$$E=(B-A)\times M\times F\times D\times 100$$

式中　E 为青霉素酶活力，单位/(ml·h)；

B 为空白滴定所消耗的上述硫代硫酸钠滴定液的容量，ml；

A 为供试品滴定所消耗的上述硫代硫酸钠滴定液的容量，ml；

M 为硫代硫酸钠滴定液的浓度，mol/L；

F　为在相同条件下，每 1ml 的上述碘滴定液(0.005mol/L)相当于青霉素的效价，单位；

D 为青霉素酶溶液的稀释倍数。

【附注】磷酸盐缓冲液(pH7.0)　　取磷酸氢二钾 7.36g 与磷酸二氢钾 3.14g，加水使成 l000mL

醋酸钠缓冲液(pH4.5)　　取冰醋酸 13.86ml，加水使成 250ml；另取结晶醋酸钠 27.30g，加水使成 200ml，两液混合均匀。