

编号: 0104

内 部

科学技术成果报告

球 红 霉 素 的 研 究

《产生菌、试制、物理化学性质及临床药理》

科学技术文献出版社

科学技术成果报告

球红霉素的研究

(内部发行)

编辑者: 中国科学技术情报研究所

出版者: 科学技术文献出版社

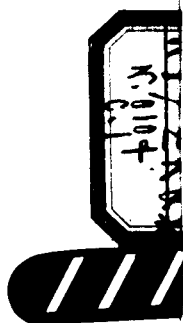
印刷者: 中国科学技术情报研究所印刷厂

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

开本 $787 \times 1092 \cdot \frac{1}{16}$ 1.25印张 32 千字

统一书号: 15176·238 定价: 0.35元

1978年6月出版



目 录

前 言

一、球红霉素产生菌的分类学特性.....	(1)
二、球红霉素的发酵、分离和精制.....	(5)
三、球红霉素的物理化学性质和鉴别.....	(6)
四、球红霉素的药理研究.....	(10)
I. 体外抗菌性能.....	(10)
II. 药理研究.....	(11)
五、讨论.....	(18)
六、结论.....	(19)
七、主要参考资料.....	(19)
附件:	
球红霉素微生物检定法.....	(19)

球红霉素的研究

《产生菌、试制、物理化学性质及临床药理》

福建省微生物研究所

福州抗菌素厂

上海第一医学院华山医院临床抗菌素研究室

前 言

近年来,由于抗菌素,激素等一些药物的广泛应用和心、脑、肾移植等大型手术的进行,深部真菌病的发病率有明显增加趋势。但是,国内外目前抗真菌药物的发展仍远不能满足临床的需要。

在贯彻敬爱的周总理关于医药界要“突破创新”指示的过程中,福建省微生物研究所从我国江西省南昌市土壤中分离到一株链霉菌新种——球孢玫瑰紫链霉菌,它产生的一种抗真菌物质——球红霉素(早期代号为抗菌素414),经物理化学和生物学特性的研究及鉴别,证明是一种新的芳香七烯类抗真菌抗菌素,它对念珠菌,隐球菌以及酵母菌等有较强的抑杀作用,有相似或稍低于两性霉素B的生物活性。药理试验表明,它的治疗指数与两性霉素B相近,而毒性则远比两性霉素B低。临床用于治疗由新型隐球菌,白色念珠菌引起的真菌感染,疗效确切。全身应用治疗55例深部真菌病,显效率60.0%,有效率92.7%,局部应用治疗真菌感染226例,显效率62.25%,有效率85.4%。其毒副反应也明显比两性霉素B轻。福州抗菌素厂进行了生产试制研究,上海第一医学院华山医院抗菌素研究室进行了临床药理等试验研究。

本材料综合报告球红霉素的产生菌、试制、物理化学性质及临床前药理的研究工作。

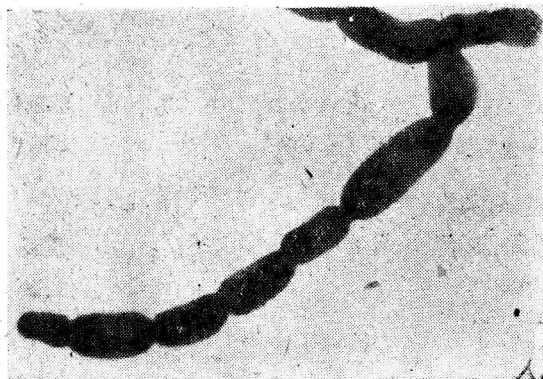


图 1

一、球红霉素产生菌的分类学特性⁽¹⁾

(一) 形态特征:

孢子丝短,直,波曲,时常聚集成丛状,有时见有1~3松螺旋形,大多数孢子

椭圆形及长椭圆形 (0.9~1.6×1.5~2.2微米及 1~1.6×2.4~3 微米)；少数孢子球形 (0.9~1.6微米)，偶见方柱形孢子，孢子外壁光滑 (图 1)。

(二) 培养特征:

球孢玫瑰紫链霉菌在各种培养基上28℃培养1个月的培养特征，见表一：

表一 球孢玫瑰紫链霉菌的培养特征

培养基	生长情况	气生菌丝颜色	基内菌丝颜色	可溶色素
查氏蔗糖琼脂	差，生长物多集中于斜面顶部，稀疏粉状	浅灰黄 (I b33'、I c33')	无色，斜面顶部乳黄 (I b33')	无
查氏葡萄糖琼脂	差，生长物多集中于斜面顶部，稀疏粉状	荔肉白 (I b22'、I b21') 或无气生菌丝	无色，斜面顶部乳黄 (I b33')	无
葡萄糖一天冬素琼脂	好，粉状	灰黄 (灰调 I c34')，粉色 (I d33'、I d43')，培养初期淡紫粉 (II b43'—II a43')	黄褐 (I d57')，基部间浅笋皮棕 (浅 II a77')	无或浅污黄
淀粉琼脂 (淀粉—硝酸盐)	差、薄、散粉状，具有多同心环，生长物集中于斜面顶部	浅灰调杏仁黄至乳黄 (I b33')，有时菌落间有淡粉色 (II a43')	无色，斜面顶部乳黄 (I b33')	无
淀粉琼脂 (淀粉—铵盐)	适中—好，粉状或皱茸状，具有同心环	淡紫粉 (II b43'—II a43') 间灰黄 (I c33') 或粉灰黄 (I d33')，菌落常间有绿黄灰 (I a34'—I a33')。生长初期浅紫粉红 (III a33')	浅黄褐 (I d56'—I d57')，基部紫红褐 (III a67'—III a77') 间咖啡或栗棕，菌落有时可达紫红调黑褐	无
营养琼脂	好，粉或茸状，具有同心环	莲子白 (I b32')，灰黄 (I b43') 间肉色 (I c23')	黄 (I c36')，基部黄褐 (I d57')	无或浅淡污黄
肉膏—蛋白胨琼脂	良好，粉状或皱褶，具有同心环	杏仁黄 (I 12') 至象牙黄 (I b23') 间粉灰黄 (浅 I d44'、I d33')	咖啡 (II a76')，栗棕 (II d77') 间赭石色	稍暗
葡萄糖—酵母膏琼脂	良好，皱茸状，粉状，具有同心环	玫瑰色 (II d43'—II a43')，边缘粉灰黄 (I d33') 或肉色 (I c23')	咖啡，栗棕，基部边间紫红褐 (III a67'—III a77') 或赭石色 (II d67')	稍暗

续表一

培养基	生长情况	气生菌丝颜色	基内菌丝颜色	可溶色素
克氏合成2号琼脂	良好, 茸粉状	浅灰黄 (灰调 I 12' 或 I b43')	黄至黄褐 (I c36'—I d57') 基部芒果棕 (II a67')	稍暗污黄
蕃薯汁—铵盐琼脂	良好, 粉状, 同心环	粉黄灰 (I d43') (I d54') 或灰黄 (灰调 I c44')	上部芒果棕, 基部咖啡间栗棕, 生长早期和中期边间紫红褐 (III a77')	稍暗
*Bennett 琼脂	良好, 茸粉状, 同心环	玫瑰色 (II d43') 间粉灰黄 (I d33', I d43')	芒果棕, 栗棕, 边间紫红褐 (III a67')	稍暗
马铃薯—葡萄糖浸汁琼脂	好, 粉状, 茸粉状	淡紫粉 (II b43') 淡粉 (II a33') 间肉色 (I c23') 或乳灰黄 (I b33')	黄褐 (I d57'), 基部咖啡边间紫红褐 (III a66') 或间赭石色	污黄
蕃茄膏麦片琼脂 (pH 7.0)	适中—好, 茸粉状, 同心环	浅灰黄 (I c33', I d33') 至玫瑰色 (II d43'—II a43'), 生长早中期间有浅紫色 (III a43'—浅 III a54')	黄褐 (I d57'), 斜面下部芒果棕边间水红色彩 (浅 II b44' 或 II d44')	污黄至浅褐
蕃茄膏麦片琼脂 (pH 不调约 5.5)	慢, 差, 仅在斜面顶部少许生长, 粉状	乳黄 (I b33'), 灰黄 (I c44')	浅绿黄 (I c57'—I c46'), 蜚蠊绿 (I c67')	无
马铃薯块	好, 良好, 附管壁同心环, 茸粉状	菊蕾白 (I a22') 或杏仁黄, 常带灰调, 间灰黄 (I b43')	山鸡黄 (I c57')—浅笋皮棕	咖啡或岩石棕
蕃薯块	良好, 茸粉—短絮状, 同心环	杏仁黄或有带灰调	笋皮棕或栗紫 (III a67')	笋皮棕或浅紫淡红褐至浅红调栗棕

*注: 1. 采用中国科学院编译出版委员会1957年版本的色谱。

2. *NZ—Amine成分以“polypepton”替代。

(三) 生理特性:

球孢玫瑰紫链霉菌在各种培养基上生理特性28℃培养观察一个月结果:

1. 明胶液化: 液化, 生长厚膜状, 气生菌丝乳白色, 基内菌丝淡黄(I_c45'), 培养基淡黄。
2. 硝酸盐还原: 弱。
3. 硫化氢反应: 阴性, 生长适中, 气生菌丝肉色, 粉状, 茸状, 具有同心环, 基内菌丝赭石色或黄褐色并带紫红色调, 无可溶性色素。
4. 形成酪氨酸酶: 阴性, 生长适中, 气生菌丝粉色, 旁边气丝间有灰黄色调, 粉状, 具有同心环, 基内菌丝风帆黄(Id47'), 基部芒果棕, 个别部位间赭石色, 无可溶性色素。
5. 纤维素利用: 不生长, 不利用。
6. 蔗糖转化: 阴性或弱。
7. 牛奶凝固与冻化: 能冻化并转为碱性, 但不凝固, 生长良好, 厚膜状, 气生菌丝乳白, 基内菌丝茉莉黄(I_a13')、芒果黄(I_a34') 偶有榴萼黄(I₆4'), 培养基上层淡褐色或浅红淡橙褐色。
8. 淀粉水解: 阳性, 需铵盐作氮源。
9. 碳源利用试验结果如表二:

表二、球孢玫瑰紫链霉菌碳源利用情况*

碳 源	生 长 情 况**	碳 源	生 长 情 况
D-阿拉伯糖	±	D-核糖	+++
L(+)-阿拉伯糖	+++	D-木糖	++—+++
L(+)-鼠李糖	—	L(+)-山梨糖	±—+
葡萄糖	+++	糊精	++—+++
半乳糖	+++	菊糖	+
D-果糖	++—+++	甘油	+++
D(+)-甘露糖	+++	卫茅醇	—
纤维二糖	+++	甘露醇	+++
乳糖	+—++	D-山梨醇	—
蜜二糖	±—+	水杨素	++
α, α海藻糖	+++	肌醇	±
麦芽糖	++—+++	柠檬酸钠	++—+++ (生长较慢)
D(+)-松三糖	—	琥珀酸钠	+++
棉子糖	—	丙酸钠	—
溶解淀粉	++—+++	对照	—

* (1) *培养15天的结果, 采用Pridham基础培养基

(2) **生长情况: +++生长良好; ++生长中度; +有生长但不好; ±生长很差几乎不生长; —不生长。

球孢玫瑰紫链霉菌在L(+)-阿拉伯糖、纤维二糖、半乳糖、D-果糖、葡萄糖、D(+)-甘露糖、D-核糖、α, α海藻糖、D-木糖、甘油、淀粉、甘露醇、糊精、麦芽糖、柠檬酸钠、琥珀酸钠上生长中度至良好。在乳糖、水杨素上有生长至生长适中。在蜜二糖、L(+)-山梨糖、菊糖上能生长但不好。在肌醇、D-阿拉伯糖生长很差、几乎不生长。在D(+)-松三糖、棉子糖、L(+)-鼠李糖、卫茅醇、D-山梨醇、丙酸钠上不生长。

二、球红霉素的发酵、分离和精制

(一) 发酵:

在葡萄糖——天冬素斜面培养基上,涂布球孢玫瑰紫链霉菌的沙土孢子或冷冻干燥孢子后,30℃培养8天生成为丰满的杏仁黄色孢子斜面,由此接种至同样培养基,以同样温度培养七天即为子瓶孢子。由子瓶孢子制成孢子悬浮液,接种至种子罐控制在 $28 \pm 1^\circ\text{C}$,空气流量1:0.5—1.0V/V/分,生长32—48小时后按10—20%接种量接种到发酵罐,温度 $28 \pm 1^\circ\text{C}$,空气流量1:2—2.5V/V/分,培养120小时左右放罐,进行分离提取。

培养基成份为:

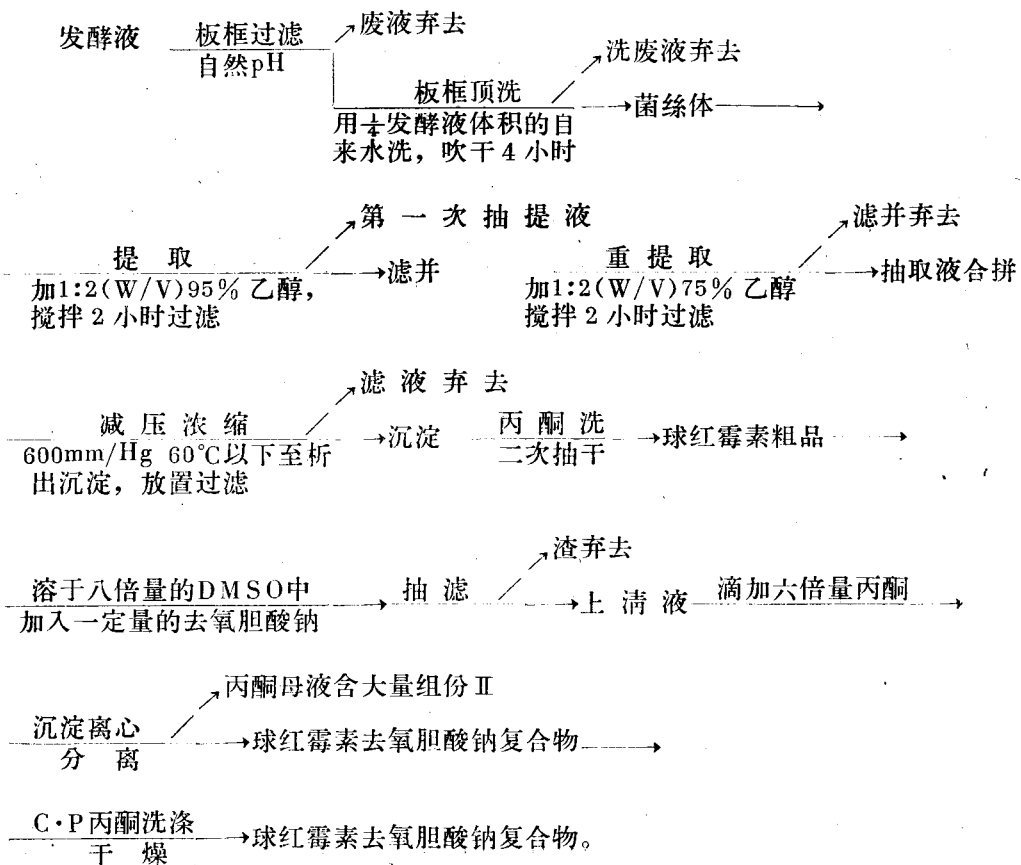
种子培养基:地瓜淀粉3.0%,玉米粉1.0%,葡萄糖1.0%,黄豆并粉1.5%,蛋白胨0.5%,磷酸二氢钾0.01%,花生油0.1%,碳酸钙0.5%,自然pH。

发酵培养基:地瓜淀粉4.5%,玉米粉1.5%,葡萄糖1.5%,黄豆并粉1.0%,酵母粉0.2%,蛋白胨0.8%,硫酸铵0.2%,花生油0.2%,磷酸二氢钾0.01%,泡敌0.006%,碳酸钙0.5%,自然pH。

球孢玫瑰紫链霉菌在上述培养条件下于5吨发酵罐中培养120小时,产生球红霉素和另一种七烯类抗菌素,它们的混合单位平均达到3454u/ml,球红霉素含量为51%。

(二) 球红霉素的分离、精制:

(1) 工艺流程:



(2) 粗品制备:

发酵液直接压入板框过滤, 滤完后用1/4体积自来水顶洗, 空气吹干。菌丝用工业酒精抽提一次 $\langle 1:2W/V \rangle$ 控制提出液乙醇含量为60~65%, 搅拌2小时, 板框过滤, 收集提取液。滤并复用75%工业乙醇(按 $1:2W/V$)浸泡并搅拌2小时, 同样控制其流出液中乙醇含量为60~65%, 滤渣在2500r/g弃之。

合併提取液, 进行薄膜浓缩(控制出口温度在50℃以下浓缩液乙醇含量在10%左右)至有少量沉淀析出, 放置过夜。虹吸去上清液, 底部沉淀用布氏漏斗抽滤, 后用工业丙酮浸泡搅拌过滤, 反复二次。丙酮总用量为1:5(W/V), 滤并复用C·P丙酮冲洗, 抽干, 磨成粉末即得粗品, 如生物效价在750~1500u/mg, 球红霉素含量不低于60%, LD₅₀在7mg/kg以上的可供接去氧胆酸钠用, 如不符合要求需进一步纯化。

(3) 接盐:

称取一定量的球红霉素粗品, 先加入适量二甲亚砜(DMSO)研磨, 后逐渐加入(DMSO)使其总量为1:10(W/V)搅拌半小时, 使充分溶解。

按以下公式称取去氧胆酸钠, 溶解于无热源水中, 在40℃加热, 使成溶液。

去氧胆酸钠用量=粗品×球红霉素成份百分率×0.82, 把(2)溶液边加边搅拌滴入(1)溶液中, 滴完后继续搅拌半小时, 使其结合完全滤去不溶物。

搅拌下, 将上述DMSO溶液滴加到4~6倍量(V/V)的丙酮液中, 析出过滤, 抽干, 得球红霉素去氧胆酸钠结合物。

(三) 球红霉素制剂:

称取符合要求的球红霉素去氧胆酸钠60克置于无菌的三角瓶中, 逐渐加入2500ml无热源水中, 并不断搅拌, 溶解后, 再加入20g磷酸氢二钠和8g磷酸二氢钠, 反复摇动使其溶解之, 最后加入2.5g活性炭, 摇匀, 置50~60℃水浴中保温15—20分, 取出, 冷却, 离心, 上清液进行灭菌过滤, 按需要量分装, 冷冻, 干燥即得成品。

三、球红霉素的物理化学性质和鉴别

(一) 样品的纯化:

取球红霉素粗品, 溶于适量的二甲亚砜, 滤除不溶物, 清液通过纤维素粉柱, 先以乙醚淋洗, 除去二甲亚砜, 然后以正丁醇饱和的水展开和洗脱, 收集洗脱液, 以正丁醇反复抽提, 在40℃以下减压浓缩, 析出黄色沉淀物, 经洗涤、真空干燥, 得鲜黄色无定形粉末。经纸层和薄层层析检查, 证明为单一组份。

(二) 理化性质:

球红霉素是鲜黄色无定形粉末, 无臭味, 无引湿性, 无明确的熔点(130℃开始变色), 在C 0.16—0.20的吡啶或二甲基甲酰胺溶液里, 均无明显的旋光读数。如在C 0.2的二甲基甲酰胺溶液中 $[\alpha]_D^{25} = -0.03^\circ$ 。

能溶于二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、吡啶、乙酸和二氧六环中, 但难溶或不溶于一般的有机溶媒。球红霉素稍溶于水(≥ 2 毫克/毫升), 在甲醇和在含2%氯化钙的甲醇液中的溶解度无明显的差别, 在含水的低级醇中溶解度都有明显的增大。

球红霉素具有一般七烯类化合物的特征显色反应, 即遇浓硫酸和浓盐酸呈兰色, 遇甲酸呈绿色, 能使高锰酸钾溶液和溴的四氯化碳溶液褪色。

表三、球红霉素与曲古霉素溶解度的差别 (毫克/毫升, T20°C)

溶 媒	溶 解 度	
	球 红 霉 素	曲 古 霉 素
蒸 馏 水	2.03	0
甲 醇	1.68	0.20
2 %CaCl ₂ —甲醇	1.70	0.86

表四、球红霉素水溶液 (1000单位/毫升)
在不同pH值和不同温度下的稳定性*

时 间 (小时)	pH	溫 度 效 价 值	0℃	28℃	60℃
			测出效价单位/毫升	测出效价单位/毫升	测出效价单位/毫升
1/2		3	—	—	219
		5			865
		7			984
		9			731
1		3	—	—	67
		5			578
		7			830
		9			560
2		3	894	779	10
		5	1009	989	448
		7	1065	1023	730
		9	1033	923	384
24		3	653	192	—
		5	1082	802	
		7	1082	876	
		9	964	670	
48		3	654	50	—
		5	961	445	
		7	1068	541	
		9	850	313	

* 开始浓度均为 1000 单位/毫升

球红霉素的水溶液(1000单位/毫升)在pH5.0—7.0范围内,在0℃下,于48小时内稳定,但对酸、碱和热均不甚稳定(表四)。其75%的乙醇溶液(1000单位/毫升),在4℃和28℃下,于48小时效价没有损失。

球红霉素的纸层析和薄层层析:

采用上行和圆纸二种纸层析(杭州新华滤纸),以白色念珠菌作生物显影。硅胶薄层层析(Kieselgel HF254 Nach Stahl 7739),以硫酸显影。选用了①水饱和的正丁醇+0.2%冰乙酸;②正丁醇饱和的水;③甲醇:水:浓氨水(20:4:1 V/V)为溶媒,将球红霉素与曲古霉素、克念菌素^[2]直接进行比较(见图2),结果证明:球红霉素不同于曲古霉素和克念菌素中的任何一个单组份。

球红霉素的纸上电泳:

在pH5、pH8的磷酸缓冲液中,~500伏,泳动分别为1和 $2\frac{1}{2}$ 小时,以白色念珠菌作生物显影,直接比较球红霉素、曲古霉素和克念菌素。结果是在二种pH值缓冲液下,曲古霉素、克念菌素均未移离原点,而球红霉素均移离原点趋向正极(见图3),提示球红霉素呈弱酸性,在文献上还未见有过此种性质的七烯抗菌素的报导。

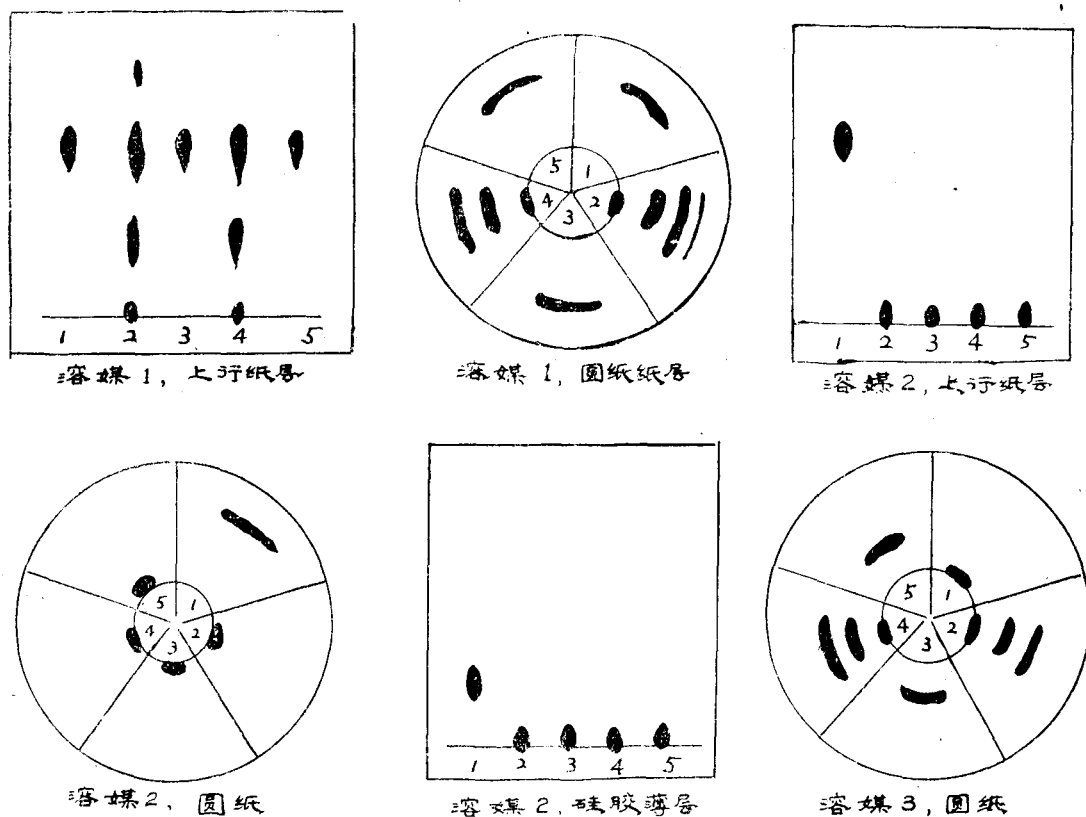


图2. 球红霉素与有关抗菌素层析行为比较

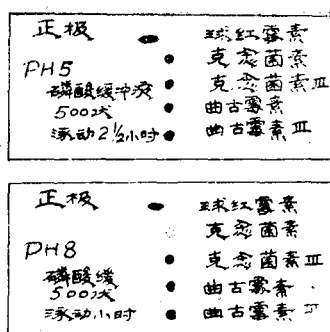


图 3

图注：溶媒 1. 湿丁醇 + 2% 冰乙酸

2. 正丁醇饱和的水

3. 甲醇：水：浓氨水 (20:4:1 V/V)

(1) 图中样品标记：

1. 球红霉素

2. 克念菌素

3. 克念菌素组份 III

4. 曲古霉素

5. 曲古霉素组份 III

(2) 克念菌素组份 III、曲古霉素组份 III 均为混合物经硅胶柱层析或板层析，以乙醇：水：浓氨水：环己醇 (8:1:1:1 V/V) 展开，所分离得的一个单组份。

(3) 纸层以生物显影 (白色念珠菌)；硅胶薄层以硫酸喷布显迹。

球红霉素的甲醇溶液具有七烯类抗菌素的特征的紫外吸收光谱：

$\lambda_{\max}$ (m μ)	402	381	360	337	320	288	220
1%							
E _{1cm}	643	835	769	413			

其红外吸收光谱的特征是 (KBr 压片)：

3440、2925、1710、1630、1596、1525、1450、
1405、1375、1285、1210、1173、1075、1040、
915、840、803、765、710 cm^{-1}

可以看出，球红霉素的紫外光谱在波长 288m μ 和红外光谱在 765 cm^{-1} 处均有明显的吸收峰，这提示在它的七烯产色团结构中具有顺式——非取代的双键，其位置应当在产色团的中间^[3]。

球红霉素的元素分析结果是：C 48.91%、48.77%、H 7.11%、7.49%；N 4.50%、4.81%。

(三) 部份降解产物和衍生物的性质

(1) 球红霉素用 1 NH_2SO_4 — CH_3OH 水解，可分得一氨基糖，与曲古霉素或制霉菌素中的氨基海藻糖 (mycosamine) 相比较，用六种鉴别溶媒系统进行纸层和薄层层析，上述三种样品的 R_f 值均一致，这表明球红霉素所含的氨基糖也是氨基海藻糖。

(2) 按照 Borowski 的碱降解抽提芳香酮的方法^[4]，分别从球红霉素、曲古霉素、抗菌素 5—74 (本所鉴定为表霉素类) 和二性霉素 B 中分出相当于芳香酮的物质，分别以乙醇和乙酸乙酯为溶剂，测定 300—340m μ 间的紫外吸收，结果如表四：

又按照Nakano的方法^[5],从球红霉素所得的乙酰芳香酮结晶为无色针晶,熔点157—160°C,紫外在287m μ 有最大吸收(在甲醇中),这与文献记载和由曲古霉素所得的相应产物的性质均一致。

表四、球红霉素和相关抗菌素碱降解产物性质的比较

降解产物	球红霉素	曲古霉素	抗菌素5-74	二性霉素B	文献报告对 氨基苯乙酮	文献报告 N-甲基对 氨基苯乙酮
在乙醇中紫 外吸收 $\lambda_{\max}$ m μ	320	320	328	无特征吸收	319	328
在乙酸乙酯中的 紫外吸收 $\lambda_{\max}$ m μ	307	307	314	无特征吸收	309	316

这证明,球红霉素含有对氨基苯乙酮(P-aminoacetaphenone)。它既区别于非芳香七烯类抗菌素,也区别于含N—甲基—对氨基苯乙酮的芳香七烯类抗菌素。

(3) 球红霉素的完全乙酰化物的性质:

按文献方法制备球红霉素的乙酰化物^[5],其特征为:橙黄色无定形粉末、无明确熔点120°C开始变色,直到220°C仍不熔化和分解;紫外吸收为, $\lambda_{\max}^{1\%1cm}$ 408⁽⁴⁰⁾,382^(52.5),360⁽⁶⁰⁾,325^(80.5),285^(70.5)(甲醇溶液)。文献上报导,非芳香七烯类化合物的乙酰化物,熔点为160—165°C,分解;芳香七烯类化合物的乙酰化物,熔点则为145—150°C,分解;球红霉素的乙酰化物无明确熔点,甚为特殊。

四、球红霉素的药理研究

I. 体外抗菌性能:

(一) 抗菌谱:

球红霉素对念珠菌、隐球菌以及酵母菌作用强,最低抑菌浓度0.1—3.12单位/毫升。对皮肤癣菌,对霉菌的敏感度因菌种,菌株的不同而有较大的范围,最低抑菌浓度为6.25—>100单位/毫升。对阴道毛滴虫最低杀虫浓度为25单位/毫升。对诺卡氏菌作用弱。对抗酸菌,细菌无效。(表六)

表六 球红霉素抗菌谱*

菌	株	培养基	最低抑菌浓度 (单位/毫升)
啤酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)		沙保弱氏	0.2
青酒酵母 (<i>Saccharomyces sake</i>)		沙保弱氏	0.2
产朊园酵母 (<i>Torula utilis</i>)		沙保弱氏	0.39
白地霉 (<i>Geotrichum candidum</i>)		沙保弱氏	0.39
白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>)		沙保弱氏	0.2
克柔氏念珠菌 (<i>Candida krusei</i>)		沙保弱氏	0.78

菌 株	培 养 基	最低抑菌浓度 单位/毫升
热带念珠菌 (<i>Candida tropicalis</i>)	沙保弱氏	3.12
新型隐球菌 (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	沙保弱氏	0.2
申克氏孢子丝菌 (丝状型) (<i>Sporothrix schenckii</i>)	沙保弱氏	200
絮状表皮癣菌 (<i>Epidermophyton floccosum</i>)	沙保弱氏	6.25
石膏样癣菌 (<i>Trichophyton gypseum</i>)	沙保弱氏	25
断发癣菌 (<i>Trichophyton tonsurans</i>)	沙保弱氏	100
裴氏着色芽生菌** (<i>Hormodendrum pedrosoi</i>)	沙保弱氏	25
尖端小孢霉** (<i>Monosporium apiospermum</i>)	沙保弱氏	>100
黄曲霉 (<i>Aspergillus flavus</i>)	沙保弱氏	25
黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	沙保弱氏	25
点青霉 (<i>Penicillium notatum</i>)	沙保弱氏	50
毛霉 (<i>Mucor</i> sp.)	沙保弱氏	100
根霉 (<i>Rhizopus</i> sp.)	沙保弱氏	>100
赤霉 (<i>Fusarium</i> sp.)	沙保弱氏	>100
地中海诺卡氏菌 (<i>Nocardia mediteranei</i>)	葡萄糖— 肉膏液	50
分枝杆菌 (<i>Mycobacterium</i> 607)	甘油肉膏液	>100
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i> 209p)	肉膏液	>100
枯草杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	肉膏液	>100
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i> O-111)	肉膏液	>100
阴道滴虫 (<i>Trichomonas Vaginalis</i>)	血清盐水	25***

*二倍液体稀释法；球红霉素微生物效价500单位/毫克。

**两性霉素B抗药菌，最低抑菌浓度>100微克/毫升。

***杀虫浓度。

(二) 抑菌和杀菌作用：

球红霉素对新型隐球菌和白色念珠菌有较强的抑菌、杀菌作用，其活性与两性霉素B相近。球红霉素的杀菌浓度分别是抑菌浓度的1—8倍，两性霉素B除白色念珠菌C₅外，也是1—8倍。(表七)。

II. 药理研究^[6]：

试验用的样品均为球红霉素的去氧胆酸钠复合物冻干品*，生物效价200单位/毫克，称取一定量，用5%葡萄糖或0.9%生理盐水配制。

以两性霉素B作对照**。

* 球红霉素去氧胆酸钠复合物由福州抗菌素厂生产供应，试验时未扣除去氧胆酸钠含量；病理检查由上海第一医学院附属华山医院病理室协助进行；电子显微镜工作由上海第一医学院生物物理教研组协助进行。

** 两性霉素B是Squibb & Sons厂产品，计算时已扣除去氧胆酸钠含量。

表七 球红霉素与两性霉素B的抑、杀菌作用比较

菌 株	球红霉素 (单位/毫升)		两性霉素B (微克/毫升)	
	抑菌浓度	杀菌浓度	抑菌浓度	杀菌浓度
新型隐球菌 CN ₁	0.2	0.39	0.1	0.2
新型隐球菌 CN ₂	0.39	0.39	0.2	0.39
新型隐球菌 CN ₃	0.2	0.78	0.1	0.39
新型隐球菌 CN ₄	0.39	0.78	0.2	0.39
新型隐球菌 CN ₅	0.2	0.39	0.2	0.2
新型隐球菌 CN ₆	0.2	1.56	0.2	0.78
新型隐球菌 CN ₇	0.2	0.78	0.2	0.2
白色念珠菌 C ₁	0.1	0.39	0.05	0.2
白色念珠菌 C ₂	0.2	1.56	0.1	0.39
白色念珠菌 C ₃	0.2	1.56	0.1	0.2
白色念珠菌 C ₄	0.2	0.2	0.1	0.2
白色念珠菌 C ₅	1.56	6.25	0.2	3.12
白色念珠菌 C ₆	0.2	0.39	0.2	1.56
白色念珠菌 C ₇	0.2	1.56	0.1	0.39
白色念珠菌 C ₈	0.2	0.78	0.1	0.2
白色念珠菌 C ₉	0.39	1.56	0.1	0.39
白色念珠菌 C ₁₀	0.2	0.78	0.1	0.1
白色念珠菌 CA ₂	0.2	0.78	0.1	0.1
白色念珠菌 CA ₃	0.39	1.56	0.1	0.2
白色念珠菌 CA ₄	1.56	6.25	0.2	0.78
白色念珠菌 CA ₆	0.2	0.39	0.1	0.1

甲、毒性试验:

(一) 小白鼠急性毒性试验 (LD₅₀) 和体内保护试验 (PD₅₀):

(1) 小白鼠急性毒性 (LD₅₀): 按常规方法进行, 静脉注入, 二次试验结果的平均值为: 球红霉素的LD₅₀为139.5±4.114毫克/公斤, 两性霉素B的LD₅₀为3.949±0.057毫克/公斤。

(2) 小白鼠保护试验: 用白色念珠菌 (代号CA—01) 静脉感染小白鼠, 每组10只, 每鼠感染菌量为 6×10^6 个活菌, 感染后30分钟, 分别静脉注射球红霉素或两性霉素B一次, 观察10天, 统计对照组和用药组动物的存亡数 (对照组在60~72小时内全部死亡)。按照机率单位法计算半数保护量 (PD₅₀) 及标准误差 (SPD₅₀), 二次实验结果的平均值: 球红霉素的PD₅₀±SPD₅₀为16.55±2.378毫克/公斤, 两性霉素B的PD₅₀±SPD₅₀为0.394±0.017毫克/公斤。

由此可见, 球红霉素的毒性比两性霉素B低, 球红霉素的治疗指数 (LD₅₀/PD₅₀) 为8.4。两性霉素B的治疗指数为9.9, 说明二者的治疗指数相近。

（二）麻醉狗的急性毒性试验：

用麻醉狗（异戊巴比妥30毫克/公斤）记录正常血压，呼吸及心电图。球红霉素均自静脉注入，剂量从1毫克/公斤开始，逐步递增，每次注射间隔15分钟。球红霉素最小的致死量为174.3毫克/公斤。小剂量注入对血压，呼吸和心电图均无影响；注射30毫克/公斤以上时，动物先是血压升高和脉压加宽，然后逐步恢复到较注前略高的水平。给予致死剂量时，动物出现血压轻度上升，然后迅速下降至0，此时出现呼吸抑制和心律紊乱；心电图可见室性心动过速，室性早搏二联律，心室性多源性自身节律，房室结性心动过速等，最后死亡。

（三）亚急性毒性试验：

狗15只（雌雄不等），分五组，每组3只，第一组注射剂量为5毫克/公斤，第二组为10毫克/公斤，第三组为15毫克/公斤，第四组为40毫克/公斤，第五组为对照组。

球红霉素均以5%葡萄糖液配成0.2%溶液，每次静脉推注的速度为5~10分钟左右，第四组自第二周起改为静脉滴注，滴注液浓度为0.25%，滴注速度为1小时左右。为减少局部刺激，第二、三、四组曾于给药的第一周在溶液中加入0.5~1毫克%地塞米松。

给药前测体重，红细胞计数，血红蛋白计数，白细胞计数及分类，谷一丙转氨酶（SGPT），血尿素氮，肌酐，血钾，尿常规及心电图1~2次，给药后每隔2~3周重复测定上述指标一次。各组动物均在最后一次给药后24小时放血处死，取各脏器作病理检查及组织内浓度的测定，其结果如下：

（1）一般情况：除第四组14号狗于用药总量达271.5毫克/公斤时死亡外，其余的狗均能如期接受给药总量。

（2）体重：用药初期，各狗的体重均稍有减轻，以后逐步回升或超过用药前水平。

（3）局部静脉刺激性：0.2~0.25%的球红霉素溶液对局部静脉有一定的刺激性，出现静脉管壁弹性减退、增厚；药液外漏时，可出现软组织肿胀、水肿。如用局敷中草药制剂（三圣散）治疗，2~3天内即可恢复正常。

（4）血红蛋白，红细胞，白细胞计数及分数，尿常规等检查在给药前后基本正常。

（5）血清SGPT和血钾，除14号狗在用药第四周SGPT升至>240单位外，其余的狗均正常。

（6）尿素氮及肌酐，第三组4号狗的尿素氮曾一度升至54毫克%，但继续给药和按原方案增加剂量过程中，又降至正常值。第四组的14号狗在死亡前尿素氮升至67.5毫克%。第四组狗的肌酐也有轻度升高，除14号狗外，其余两只狗在继续用药过程中又恢复至正常值。

（7）体温：用半导体点温计测定给药前和给药后1和1.5小时的体温，均无明显改变。

（8）心电图：用药前后均测定清醒状态下的心电图，第一组、第二组各有两只狗，第三组中有三只狗在用药第六周时，出现心肌轻度损害，但在继续用药过程中，心肌损害减轻或转为正常。有时在给药前测心电图有心肌损害，但给药后即刻测定心电图，心肌损害反而减轻或不明显，说明球红霉素对心肌损害的影响仅是动态性的改变。

（9）病理检查：各试验组动物均有局部静脉壁的损害，包括血栓后再管化和管壁炎症；第三、第四组的各狗肾脏均有一定损害，包括肾曲管水肿，间质钙化和炎症，第一、二组仅个别狗的肾曲管有水肿；第三、四组的个别狗有肝脏损害，表现为肝细胞水肿、变性和早期坏死，其余各组（包括对照组）中个别也有间质炎症。第四组中有两只狗显示心肌损害，一只狗的脑细胞有变性，其他脏器均无明显病变。

（四）脑室内注射球红霉素对家兔的影响：

表八、静脉注射球红霉素对猴的体温、心率及呼吸的影响

观察项目	猴 编 号		1 号 猴 ♀ (4.5公斤)					2 号 猴 ♂ (5 公斤)				
			给 药 前		给 药 后			给 药 前		给 药 后		
	给 药 前 后 检查 次数											
			1	2	即 刻	1 小时	2 小时	1	2	即 刻	1 小时	2 小时
体 温 (°C)			39.2	38.8	38.7	39.7	39.2	39.0	39.2	38.2	38.6	39.2
呼 吸 (次/分)			52	52	48	52	56	72	66	52	54	60
心 率 (次/分)			144	140	160	120	200	114	114	192	99	114

家兔三只，从侧脑室插管中注射球红霉素，浓度为0.025~0.05~0.1%，每次给药量40~80微克/公斤，三只兔共实验六次，从小剂量低浓度开始，逐步增加剂量，动物较易耐受。注药后除呼吸先加快，后减慢（有时动物的呼吸未见加快）和活动增多外，其余未见异常。2号兔一次给药量过大（0.1%，80微克/公斤），注射后出现惊厥，呼吸变慢变深，但在10分钟内自行恢复，说明球红霉素对中枢神经系统有一定刺激性。

（五）静脉注射球红霉素对猴的影响：

选用猴两只（雌雄各1），体重分别为4.5及5公斤，以5毫克/公斤的球红霉素一次静脉注射（药物浓度0.2%），给药前后测体温、呼吸、心率及一般情况，结果见表八。

从上表的结果看，球红霉素静注5毫克/公斤后，除1号猴的体温略有升高外，呼吸和心率基本无明显影响，局部静脉刺激性和心律、食欲、一般活动等也未出现改变。

（六）鞘内或小脑延髓池注射球红霉素对猴的影响：

（1）鞘内注射：猴，雌性，5.5公斤，共进行两次注射。第一次在清醒状态下作腰椎穿刺术。缓慢注入0.035%球红霉素1.2毫升（相当于77微克/公斤），并加地塞米松1毫克。第二次注入球红霉素0.05%1.1毫升（相当于100微克/公斤），未加地塞米松，注射后观察体温、心率、呼吸、肌张力、活动爬行、食欲等情况，均无明显变化。

（2）小脑延髓池注射：

上述鞘内给药的猴，经两周左右观察，无异常变化后，于清醒状态下作小脑延髓池穿刺，待脑脊液流出后，注入0.05%球红霉素0.88毫升（相当于77微克/公斤），注射后除当天上午活动及食欲稍减外，其他心率、呼吸、肌张力等均无明显异常。

乙、吸收，分布和排泄

（1）大鼠口服：

选大白鼠16只，分为4组，每组4只。空腹灌入球红霉素200毫克/公斤。灌胃后1、2、4、6小时分别断头取血，测定球红霉素在血中的浓度，结果发现，口服后血清中测不到球红霉素。

（2）家兔静脉注射后的血、尿浓度：