综 述

文章编号:1001-8689(2009')11-0641-09

抗生素提取技术及研究进展

王赟[1,2] 闫永胜[2] 胡仕平[2] 韩娟[2]
(1 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013;
2 江苏大学化学化工学院, 镇江 212013)

摘要: 文章主要介绍了双水相萃取、反胶团萃取以及膜分离技术等三种现代抗生素提取技术的基本原理、主要技术优势以及国内外的研究进展,总结了它们所面临的一些问题,并对其应用前景做了简单的展望。现有研究表明,这三种技术提取抗生素效果显著,对于改进传统抗生素生产工业具有广阔的前景。

关键词: 抗生素; 提取; 双水相萃取; 反胶团萃取; 膜分离
中图分类号:TQ028.3 **文献标识码:**A

Process development of antibiotic extraction

Wang Yun[1,2], Yan Yong-sheng[2], Hu Shi-ping[2] and Han Juan[2]
(1 School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013;
2 School of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013)

ABSTRACT Modern extraction technologies of antibiotics mainly concentrate on aqueous two-phase extraction (ATPE), reversed micellar extraction (RME) and membrane separation (MS) technology. The fundamental, technical advantages, research progress at home and abroad of these three kinds of novel extraction technology are discussed in this article. Finally, the existing problems are concluded and the applied foreground is simply forecasted. The research by now indicates that these extraction technologies have significant effect on extraction of antibiotics, and also have wide prospect for improving traditional production industry of antibiotics.

KEY WORDS Antibiotics; Extraction; Aqueous two-phase extraction; Reversed micellar extraction; Membrane separation

随着抗生素事业的不断发展,抗生素不仅仅用作抗菌药物,在农牧业、食品保藏等许多领域都显示了卓越的效果。根据结构不同,抗生素主要分为五类:β-内酰胺类抗生素(如青霉素,头孢菌素),氨基糖苷类抗生素(如链霉素、卡那霉素、庆大霉素),大环内酯类抗生素(如红霉素,麦迪霉素,螺旋霉素),四环类抗生素(如四环素),多肽类抗生素(如多粘菌素,杆菌肽,万古霉素),此外还包括多烯类抗生素,苯烃基胺类抗生素.蒽环类抗生素,环桥类抗生素以及其他类抗生素。

目前,国内抗生素生产使用的化工分离技术包括溶媒萃取法、离子交换法、吸附法与沉淀法,其中应用最多的为溶剂萃取法,其次为离子交换法。溶剂萃取法虽然在实际生产中应用广泛,但是仍然存在一些急需解决的问题:(1)工艺过程复杂,往往需要多次萃取,反萃以及 pH 值调节才能得到终产品,有机溶剂使用量大,从而导致物耗、能耗高,而且抗生素在长时间的提取过程中易变性失活;(2)常用的一些萃取溶剂(如醋酸丁酯)水溶性大,废液回收困难,生产消耗量高,此外,许多有毒的有机溶剂也在使用,如苯及其衍生物,环境污染严重;(3)萃取过程的乳化问题一直未

收稿日期:2009-02-24
基金项目:国家自然科学基金(20777029; 2097607);江苏省高校自然科学基金(07KJB610021)。
作者简介:王赟,女,生于 1982 年,在读博士研究生。主要从事分析化学和环境化学的科研工作。

能很好地解决，破乳剂的使用既影响萃取收率和产品质量，又增加了相分离过程的成本；(4)微生物发酵液成分复杂，使预处理过程很难进行；(5)目标产物与杂质，特别是同系物之间分离效果不明显。例如林可霉素的提取工艺主要是丁醇萃取法，该法对林可霉素和林可霉素 S 的分离基本没有效果，粗品中林可霉素 S 的含量往往高达 3 ~ 6%。离子交换树脂法具有成本低，设备简单，有机溶剂使用量少或完全不用有机溶剂等优点，已成为提取抗生素的重要方法之一，例如链霉素，卡那霉素，庆大霉素，多粘菌素，杆菌肽，万古霉素等抗生素的生产都可采用离子交换法。离子交换法的缺点是生产周期长，成品质量有时较差，在生产过程中，pH 值变化较大，故不适用于稳定性差的抗生素，另外不一定能找到合适的树脂等[1]。

随着现代社会的进步，人们对产品质量、生产能耗以及环境保护越来越重视。对于我国出口主导型的抗生素原料生产企业，为了应对利润空间的不断下降以及 WTO 对企业环境管理的要求，迫切需要开发一种简单、高效、安全、无毒的新型绿色分离技术。现代抗生素提取技术主要包括双水相萃取、反胶团萃取、膜分离提取。现有研究表明，这些新型分离技术提取抗生素效果显著，对于改进传统抗生素生产工业具有广阔的前景。下面主要介绍上述三种技术在抗生素提取中的研究进展情况。

1　双水相萃取(aqueous two-phase extraction, ATPE)技术

1.1　双水相萃取的基本原理

双水相体系(aqueous two-phase system, ATPS)是一种或几种物质在水中以一定浓度混合，在一定条件下形成互不相溶的两相水溶液体系。双水相萃取(ATPE)原理与常见的水-有机溶剂萃取法相似，都是依据物质在两相间的选择性分配。当物质进入双水相体系后，由于界面张力、疏水作用以及各种力的存在，使目标提取物在两相中不平衡分配，通过调节各影响因素，如成相盐的种类与浓度、中性盐的种类与浓度、pH 值、温度等，来提高目标产物的选择性，达到向单相富集的目的。

常规的双水相体系包括聚合物-聚合物-水体系以及聚合物-无机盐-水体系。近年来国内外研究人员相继开发了一系列新的双水相体系，主要包括离子液体-无机盐-水体系、有机小分子-无机盐-水体系以及表面活性剂双水相体系。由于 ATPS 中组分性质的多样性，到目前为止还未有一套完整统一的理论来解释不同体系的成相原理。

聚合物-聚合物-水双水相体系的形成主要是由于高聚物之间的不相溶性即高聚物分子的空间阻碍作用，相互无法渗透，不能形成均相，从而具有分离倾向，在一定条件下即可分为两相。一般认为，只要两聚合物水溶液的憎水程度有所差异，混合时就可发生相分离，且憎水程度相差越大，相分离的倾向也就越大[2]。

聚合物-无机盐-水双水相体系的形成普遍认为是盐析作用的结果。对于聚合物溶液来说，加入少量电解质并不会影响其稳定性，至等电点也不会发生聚沉，只有加入更多的电解质才会使其聚沉，这一现象称为盐析。发生盐析作用的主要原因是去水化作用，当聚合物溶液中加入中性盐，中性盐对水分子的亲和能力大于聚合物，破坏了聚合物表面的水化层直至其减弱或消失。有些聚合物分子带电，少量电解质的加入可以引起动电电势(ζ)的降低，但并不能使它失去稳定性，这时聚合物分子仍是高度水化的，只有加入更多的盐才会出现盐析现象。成相盐由于阴阳离子水化能力以及电荷的不同，盐析能力也有差异。

离子液体-无机盐-水双水相这一概念最早是有由 Gutowski 等[3]提出的。该体系的形成实质上与聚合物-无机盐-水体系相近，是离子液体与无机盐争夺水分子的过程，离子液体的水化能力与成相盐的盐析能力决定分相能力，离子液体的水化能力越差，成相盐的盐析能力越强则分相能力越强，反之越弱。

表面活性剂双水相体系既包括非离子型表面活性剂组成的 ATPS，也包括离子型表面活性剂组成的 ATPS。表面活性剂混合溶液分相主要是由于表面活性剂浓度超过临界胶团浓度(critical micelle concentration, CMC)后表面活性剂分子会自组织成球状、棒状、层状等多种形态的胶团。目前有两种模型描述这种现象：相分离模型和多级平衡模型。前者将胶团假设为一个宏观的相与水相平衡，后者将表面活性剂溶液当作一个大小不一的胶团与单体分子平衡共存的系统。

有机小分子-无机盐-水双水相体系的研究国内外才刚刚起步，常用的有机小分子为乙醇、正丙醇、异丙醇、丙醇等亲水性有机小分子。一般认为该体系的形成是有机溶剂与成相盐竞争水分子形成缔合物的结果。

1.2　双水相提取抗生素的技术优势

双水相萃取技术之所以能够成为抗生素提取工程中的研究热点，主要是由于该技术表现出了以下优势：(1) 双水相萃取技术能够从发酵液中直接提取抗生素，避免了发酵液的过滤处理和酸化操作，简化了工艺

流程;(2) 两相界面张力小(10^{-7} ~ 10^{-4} mN · m^{-1}),有助于两相间传质;(3) 体系所需设备简单,可以利用原有有机溶剂萃取生产中使用的混合、离心与分离设备,此外可运用现有萃取原理按比例放大试验参数,非常适用于工业生产,国外已实现了计算机控制的连续化生产;(4) 安全、无毒,不存在有机溶剂残留的问题;(5) 操作条件温和,整个操作在常温常压下进行,能够保持抗生素分子的活性,特别是聚合物双水相体系,对抗生素活性还具有一定的保护作用;(6) 能够运用反应-萃取耦合技术,将抗生素制备与产物提取过程在双水相体系中同时进行,这可以有效解决产物积聚导致产率降低的问题,简化工艺流程。

1.3 双水相提取抗生素的研究进展

双水相萃取技术始于 20 世纪 50 年代,目前已广泛应用于生物工业、食品工业、医药工业、分析检测等领域,成功实现了蛋白质[4]、核酸[5]、细胞[6]、氨基酸[7]、抗生素[8]、植物有效成分[9]、金属离子[10]等的分离纯化。ATPS 提取了包括青霉素[11]、头孢菌素[8]、红霉素[12]、乙酰螺旋霉素[13]、万古霉素[14]在内的多种抗生素,其中研究最多的是 β-内酰胺类抗生素的双水相萃取技术。

Guan 等[11]研究了青霉素在 PEG2000-$(NH_4)_2SO_4$ 双水相体系的分配行为。结果显示,在含 8 % PEG2000 和含 20 % $(NH_4)_2SO_4$ 的双水相体系中,青霉素的分配系数为 58.39,富集系数为 3.53,回收率达到了 93.67 %。这证明了双水相提取青霉素的可行性。此外,作者还进行了反萃研究,将醋酸丁酯加入到 PEG 富集的上相,达到相平衡后的分配系数为 60.99,富集系数为 6.30,所得产率为 92.42%。这说明了双水相萃取,醋酸丁酯反萃提取青霉素的可行性,简化了操作流程,大大减少了有机溶剂的使用量。

Yang 等[15]利用 PEG-$(NH_4)_2SO_4$ 双水相体系提取抗生素,在此体系中头孢菌素 C 的分配系数 K_c 大于 1,而去乙酰头孢菌素 C 的分配系数 K_d 小于 1,添加丙醇、甲醇、乙醇、异丙醇和正丁醇有利于提高 K_c,而使 K_d 进一步下降,这说明通过调节双水相萃取影响因素有望解决结构相近抗生素的分离难题。此外,作者还对比了头孢菌素在过滤液、不同批次发酵液、稀释液中的分配系数,结果非常相近,这也说明 ATPE 可以直接从发酵液中提取抗生素,大大简化操作流程。

Bora 等[8]用 PEG-硫酸盐/磷酸盐双水相体系对头孢氨苄和氨基头孢菌酸二元混合物的分配进行了研究。实验结果显示该法对于头孢氨苄具有高选择性,表明 ATPE 作为头孢氨苄生物合成下游工程中的一种分离技术具有良好的前景。

聚合物-盐双水相萃取抗生素的研究较多,但是反萃研究较少,而且由于聚合物价格高,回收困难以及高盐浓度的废水不能直接排放,在实际应用中受到环保制约,限制了该体系的工业化应用。

离子液体是一种可替代传统挥发性有机溶剂的绿色溶剂,它具有良好的物理化学稳定性;几乎没有蒸气压;无可燃性;具有溶剂和催化剂的双重功效;许多有机或无机离子在其中都具有良好的溶解性;可通过改变阴阳离子组合进行优化设计。将离子液体应用于双水相技术,形成新型"离子液体双水相体系"(ionic liquids aqueous two-phase system, ILATPS),无疑会拓宽双水相体系的应用范围。近年来,陆续出现了 ILATPS 提取抗生素的报道。

Jiang 等[16]在研究中综合运用亲水性离子液体和憎水性离子液体从发酵液中提取青霉素 G,并回收到水相中。在缓冲盐的存在下,亲水性离子液体 $[C_4mim]BF_4$ 能够形成离子液体双水相体系(ILATPS)将青霉素提取至离子液体富集相,同时将杂蛋白留在另一相。接着将憎水性的离子液体加入到上述离子液体富集相,体系转变为憎水离子液体相与水相平衡体系。此时,大多数亲水性离子液体 $[C_4mim]BF_4$ 转移到憎水离子液体富集相,而大部分青霉素转移到共轭水相。与醋酸丁酯-水体系以及高聚物-盐双水相体系提取抗生素相比,混合离子液体体系显示了如下优势:(1) 青霉素在中性条件下有效萃取至离子液体富集相,所以避免了出现在有机溶剂体系中的蛋白质乳化现象;(2) 憎水离子液体能够将亲水离子液体从青霉素富集相分离出来,所以,混合离子液体双水相体系中的反萃问题得到了解决。

Soto 等[17]在室温下用离子液体提取阿莫西林和氨苄青霉素,Cull 等[12]用疏水性离子液体萃取红霉素均取得了很好的效果。研究说明了 ILATPS 提取抗生素的可行性,该法目前和传统的有机溶剂法相比,生产消耗较高,但是随着离子液体生产成本下降,该技术将逐步满足工业需求。

2 反胶团萃取(reversed micellar extraction, RME)技术

2.1 反胶团萃取的基本原理

反胶团是表面活性剂分子在非极性溶剂中自发形成的分子聚集体,又称为反胶束、逆胶束,结构如 Fig. 1 所示。从图上看,表面活性剂的亲水基向内,亲油基朝外,形成球状聚集体,内部溶解了一定量的水,称为微水池或微水相。反胶团的微水池能溶解可溶性极性物

质。反胶团体系由表面活性剂（＜10%）、助溶剂、水（0～10%）和有机溶剂（80% ～90%）构成。人们用 Wo 表征反胶团系统中的含水量，这一参数显示了反胶团的大小以及每个反胶团结构中表面活性剂分子数目。最简单的反胶团体系是由一种表面活性剂溶解在有机溶剂中构成的单一反胶团体系。在单一反胶团体系的基础上又逐步发展了混合反胶团体系和亲和反胶团体系。混合反胶团体系由两种或两种以上的表面活性剂构成，与单一反胶团萃取体系相比，在活性、产率和选择性发面有明显的优势。亲和反胶团体系是指在反胶团中间加入与目标提取物有特异亲和作用的助表面活性剂，加入少量亲和配基即可大大提高目标产物的选择性和提取率，现已成为反胶团萃取研究的热点。影响反胶团萃取的因素包括表面活性剂种类与浓度、助表面活性剂的种类和浓度、水相 pH 值、水相离子强度、水相盐的种类、有机溶剂的种类以及温度。

反胶团萃取抗生素过程如 Fig. 2 所示。首先，在宏观两相，即有机相与水相界面上的表面活性剂与邻近的抗生素分子发生相互作用，在两相界面上逐步形成包含有抗生素分子的反胶团，此反胶团扩散进入有机相，从而实现了抗生素的提取，通过改变水相条件可实现反萃。

Chang 等[18]在研究反胶团萃取蛋白质的研究中发现，在反胶团体系中，只有少量的反胶团包容了蛋白质，大部分反胶团内部是空的，两种胶团之间存在一种动态平衡。反胶团之间交换物质非常频繁。

2.2　反胶团萃取抗生素的技术优势

反胶团萃取作为一种新型的液液萃取技术，对蛋白质、氨基酸、抗生素等生物活性物质的提取表现出了如下优势：(1) 生物活性物质通过反胶团萃取进入有机相，胶团的表面活性剂层能够阻隔生物活性分子与有机溶剂接触，成为保持生物分子活性的屏障，此外反胶团的“微水池”也能保护生物活性分子不易失活；(2) 亲和配体的加入可以提高目标产物的提取率和选择性；(3) 可以从发酵液中直接提取抗生素，操作简单，可实现连续化生产；(4) 反胶团可以重复使用，降低生产消耗。

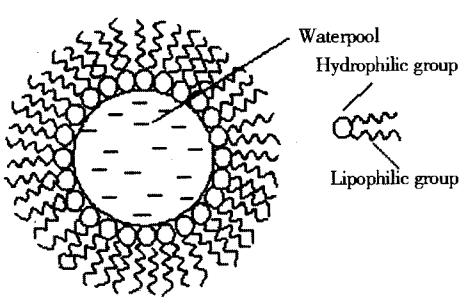


Fig. 1　Sketch map of reversed micellar structure

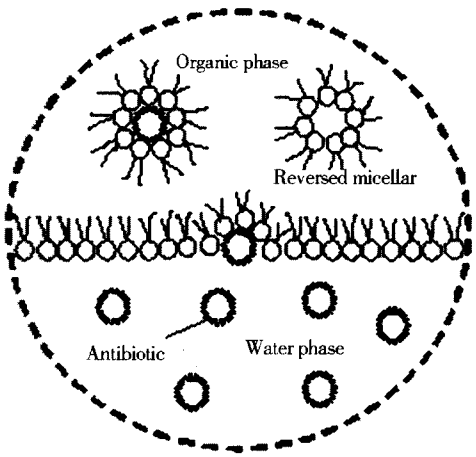


Fig. 2　Sketch map of extraction of antibiotics with reversed micellar

2.3　反胶团萃取抗生素的研究进展

反胶团萃取法作为一种新型的生物产品分离方法，受到了大家的关注。其中研究最多的为反胶团萃取分离蛋白质[19]，从 20 世纪 70 年代发展至今已有 30 多年的历史，而反胶团萃取分离抗生素的研究才刚刚起步，国内外的报道很少。

Hu 等[20]研究了二-2-乙基已基磷酸钠（NaDEHP）/异辛烷反胶团萃取氨基糖苷类抗生素新霉素和庆大霉素。结果显示，氨基糖苷类抗生素能被有效萃取至反胶团溶液中，在适当条件下经一步萃取的萃取率可达 80% 以上，而且萃取至反胶团相的抗生素很容易能够被反萃到二价金属阳离子（如 Ca^{2+}）水溶液中。抗生素萃取率在很大程度上受到水相料液中 pH 值和盐浓度的影响。在 pH 值为 8.5～11 时，萃取率随 pH 值升高而急剧下降；随着 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度上升，萃取率也下降。作者提出了一个简单的萃取－反萃机理：在萃取过程中，抗生素分子主要是通过静电相互作用萃取至反胶团的微水池；在反萃过程中，由于二价阳离子破坏反胶团体系，萃取到反胶团相中的抗生素重新释放回到水相中。

Fadnavis 等[21]用二-(2-乙基已基）琥珀酸磺酸钠（AOT）/异辛烷反胶团体系萃取分离了红霉素、土霉素、青霉素及放线菌酮，在温和的试验条件下均得到了很高的萃取率。Fadnavis 等还研究了用该体系直接从发酵液中萃取土霉素，萃取率和产品纯度都高达 90% 以上，这说明直接从发酵液中选择性萃取并高效回收

抗生素的可行性。Fadnavis 等认为反胶团萃取抗生素除了静电作用和疏水作用，溶质与水形成的氢键也起了重要的作用。如苄青霉素有羧基，红霉素有羟基可与水形成氢键，因此这两种抗生素的萃取率都不高。

Su 等[22]在 AOT/异辛烷反胶团体系中加入亲和助表面活性剂 D-丙氨酰-D-丙氨酸酯或 DL-丙氨酰-DL-丙氨酸酯，构成亲和反胶团溶液萃取万古霉素，萃取率达到 90% 以上，直接从发酵液中萃取万古霉素同样能有很高的选择性。低 pH 值和低盐浓度料液有利于萃取；相反，pH 值升高，有利于万古霉素反萃到水相中。

我国吴子生等报道了反胶团相转移法提取青霉素 G 的研究[23]。在室温及 pH 值在 5～8 的条件下，提取率在 90% 以上，且保持了青霉素 G 的稳定性。吴子生等认为非蛋白类活性物质青霉素 G 在十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)/正辛醇:氯仿(4:1，*V/V*)反胶团体系中的相转移机理为离子对静电作用与胶团溶解机理。

李夏兰等[24]探讨了 AOT/异辛烷反胶团体系萃取红霉素时各种因素对萃取及反萃效率的影响。试验结果显示，水相 pH 值在 5.0～6.4 之间变化时，乳糖酸红霉素的萃取率变化不大，当 pH 值大于 6.4 时，萃取率下降很快；而在研究 pH 值对反萃率的影响时发现，pH 值在 8.0～11.0 的范围内，随着 pH 值增大，萃取率也相应增大。这是由于乳糖酸红霉素的 pI 值为 6.37，pH 值小于 6.37 时，抗生素带正电，与反胶团内表面所带的负电荷相反，且电荷差值越大，越有利于萃取，而 pH 值大于 6.37 时，抗生素带负电，与反胶团内表面电荷相同，斥力增大，因此萃取率明显减小。反萃时情况恰好相反。此外，作者还进一步研究了反胶团提取氨基糖苷类抗生素的可能性，将磷酸二(2-乙基已基)酯(HDEHP)、磷酸三丁酯(TBP)、异辛烷形成反胶团，与卡那霉素溶液或发酵滤液混合、振荡、离心。结果表明，该反胶团体系萃取抗生素是可行的。反胶团萃取率与水相 pH 值、盐浓度密切相关。反胶团的萃取率还与水相 pH 的调节方式有关。用缓冲溶液调节时，萃取率与 pH 值无关，用氨水调节时水相 pH 值与反胶团的萃取率密切相关。盐浓度是影响卡那霉素萃取率的主要因素之一。萃取时在两相分层清楚的基础上尽可能地采用低盐浓度是保持高萃取率的关键。当 KCl 浓度为 0.05 mol/L，萃取前水相 pH 值为 10，HDEHP 浓度为 1mol/L 时，HDEHP-TBP-异辛烷反胶团萃取发酵滤液的萃取率为 88.6 %，而目前工业上离子交换法提取卡那霉素发酵滤液的单级萃取率一般为 82 %～86 % 左右[25]。

从上述研究可以看出，目前应用于抗生素提取的反胶团体系相当有限，离子型表面活性剂的毒性限制了该技术在下游工程中的应用[26]，所以一些研究者建议使用两性离子表面活性剂，如大豆磷脂，从而得到具有生物相容性的反胶团体系[27]。

3 膜分离(membrane separation，MS)技术

3.1 膜分离技术基本原理

用天然或人工合成的高分子膜，以外界能量或化学位差为推动力，对混合物进行分离、分级、提纯和浓缩的方法，统称为膜分离法[28]。目前应用于抗生素提取的膜分离技术主要包括超滤(ultrafiltration，UF)，反渗透(reverse osmosis，RO)，纳滤(nanofiltration，NF)，微滤(microfiltration，MF)和液膜(liquid membrane，LM)萃取。

3.1.1 超滤(UF) 超滤是指在一定压力作用下，当含有大分子溶质和小分子溶质的溶液通过膜表面时，溶液中的溶剂和小分子溶质透过膜，而尺寸大于膜孔(1～50 nm)的大分子溶质(相对分子质量在 500 以上)被截留的分离过程。其分离原理是筛分，膜孔的大小和形状对分离起主要作用。超滤主要用于分离溶液中的大分子、胶体、微粒。

3.1.2 反渗透(RO) 反渗透主要是利用溶剂或溶质对膜的选择性原理，膜材料的化学性质为主要影响因素。反渗透法可以使溶液脱去溶剂，达到浓缩的目的。

3.1.3 纳滤(NF) 纳滤是一种由反渗透发展起来的膜分离技术，最初被称为“疏松型”反渗透膜，其分离机理是筛分效应和电荷效应。它具有两个基本特征：①可以截留相对分子质量为几百的有机小分子，约为 200～1000；②对于不同价态离子的截流率不同。这是由于 NF 膜表面分离层可以由聚电解质构成，膜表面带有一定的电荷(大多数为负电荷)，它们通过静电相互作用，阻碍多价离子渗透，使其在低压下仍能具备较高脱盐能力。

3.1.4 微滤(MF) MF 是指在压差作用下，将溶液中大于膜孔的微粒、细菌等悬浮物(0.02～10 μm)截留下来，达到溶液脱粒子的目的。一般用于超滤、纳滤和反渗透的预处理。

3.1.5 液膜(LM)萃取 LM 是指两液相间形成的界面膜，按构型可分为乳化液膜(emulsion liquid membrane，ELM)和支撑液膜(supported liquid membrane，SLM)。ELM 主要由表面活性剂，流动载体和膜溶剂组成。SLM 主要由载体、多孔支撑体和膜溶剂组成。液膜萃取的传质机理主要分为三类[29]：单纯

迁移、Ⅰ型促进迁移和Ⅱ型促进迁移。

①单纯迁移　膜中不含流动载体，内外相不含与待分离物质发生化学反应的试剂，依据待分离组分（A和B）在膜中溶解度和扩散系数不同，从而导致待分离组分在膜中渗透速度不同实现分离。分离机理如 Fig. 3 所示。

②Ⅰ型促进迁移　在接受相内添加与溶质发生不可逆化学反应的试剂（R），使待迁移的溶质（A）与其生成不能逆扩散透过膜的产物（P），从而保持渗透物在膜相两侧的最大浓度差，以促进溶质迁移。分离机理如 Fig. 4 所示。

③Ⅱ型促进迁移　在制乳时加入流动载体，载体分子（R1）先在外相选择性地与某种溶质（A）发生化学反应，生成中间产物（R1A），然后这种中间产物扩散到膜的另一侧，与液膜内相中的试剂（R2）作用，并把该溶质（A）释放到内相，而流动载体又扩散到外相侧，重复上述过程。

分离机理如 Fig. 5 所示。整个过程中，流动载体没有被消耗，只起了搬移溶质的作用，被消耗的只是内相中的试剂。这种含流动载体的液膜在选择性、渗透性和定向性三方面更类似于生物细胞膜的功能，使分离和浓缩同时完成。

3.2　膜分离提取抗生素的技术优势

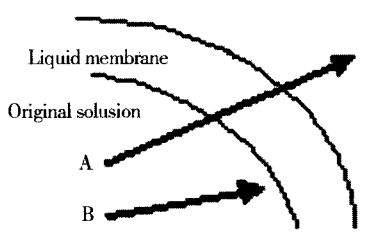


Fig. 3　Simple transfer-separation mechanism

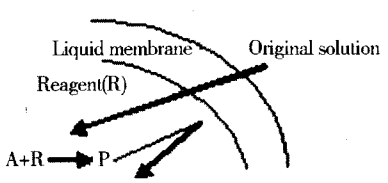


Fig. 4　Model I stimulative transfer-separation mechanism

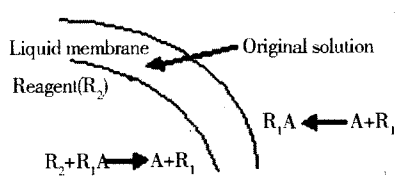


Fig. 5　Model II stimulative transfer-separation mechanism

各种膜分离技术具有不同的分离机理，在抗生素提取中分别体现了各自独特的技术优势。如采用超滤法可在不使用破乳剂的情况下，有效去除青霉素发酵液中起乳化作用的蛋白质及其他大分子物质，消除乳化现象，提高萃取率以及产品质量，非常适用于抗生素提取的预处理过程；反渗透法在室温条件下即能分离、浓缩热敏性的抗生素，与原有的真空/薄膜浓缩方法相比，具有很大的优势；纳滤膜截留物质的相对分子质量介于超滤和反渗透膜，一般在 200 ~ 1000 之间，对于抗生素的提取有其独到之处；液膜萃取法可在 pH 值为 5 ~ 7 条件下提取抗生素，降低了青霉素失活的机率，特别是利用促进迁移的机理，可以从复杂发酵液中高效提取目标抗生素。各种膜分离技术在具备各自优点的同时也存在一些共同的特点：膜分离过程在常温常压下进行，分离过程不发生相变，能耗小，特别适用于于热敏性物质的分离、提纯，工艺流程大大简化，操作方便，一般只需简单的加压输送。

3.3　膜分离提取抗生素的研究进展

目前，膜分离技术在抗生素提取中的应用十分活跃，主要包括：①应用于抗生素生产[30,31]，取代或部分取代原有的抗生素提取技术；②应用于废水处理[32~34]，回收其中的抗生素；③应用于抗生素残留检测[35,36]，提取微量/痕量抗生素残留。

在抗生素提取中，超滤常被用作溶剂萃取法的预处理过程，去除发酵滤液中具有双亲基团的生物高分子物质（主要是蛋白质），从而解决传统“破乳法”不能彻底解决的乳化难题。Li[30] 等在溶剂萃取法提取青霉素之前用超滤法处理发酵液中起乳化作用的高分子，如多糖和蛋白质，并与真空旋转过滤及微滤法进行对比。结果发现只有超滤法能有效去除其中的高分子，大大改善了后续萃取操作的相分离过程，不需使用离心萃取装置，体系只依靠重力作用就能很好地分相，避免了使用破乳剂，提高了萃取率和产品质量。作者还将超滤法应用于红霉素和麦迪霉素的提取，同样获得了满意的效果。Morao 等[31] 用超滤法预处理去甲基氯四环素（DMCT），与传统的旋转真空过滤进行对比，两者产量相同，但是超滤法不需要添加助滤剂和凝聚剂，滤液质量明显优于传统方法，渗透液中完全不含悬浮固体。此外，研究中采用的两套超滤系统（管式和平板式）对 DMCT 异构体的截留能力均大于 DMCT。我国的李十中等[37] 采用超滤/萃取法提取几种典型的抗生素，青霉素 G、红霉素和麦迪霉素，并同原提取工艺进行了对比，在不使用破乳剂的情况下即可很好地完成萃取，同时因降低或消除蛋白质对抗生素的“增

溶作用"而提高了产品收率和质量。作者同时还提出了生物高分子物质临界乳化分子量的概念,这样就可以选择相应切割分子量的超滤膜除去乳化剂,以达到防止乳化现象发生的目的。李十中等[38]还将超滤取代土霉素传统生产采用的树脂脱色单元操作,在实验中使用了切割分子量为 4960.5 u 的超滤膜。实验结果表明,超滤是取代树脂脱色的有效手段,可以充分纯化土霉素结晶液并改善结晶,脱色过程收率由树脂法的 95.3% 提高到 98.6%。如果超滤与净化剂预处理相结合,可以提高土霉素质量,并使土霉素结晶收率由 90.58 % 提高到 93.3%。

纳滤在抗生素浓缩方面显示了其独特的优势。Zhang 等[39]用哌嗪和均苯三甲酰氯界面聚合反应制备的纳滤复合膜进行抗生素的浓缩试验。在膜表面覆盖 PVA,可以使膜表面更亲水,更光滑,减少膜表面污垢沉积,延长膜的使用寿命。小试试验中抗生素从 12000 U/ml 浓缩至 110000 U/ml,中试试验中从 80000 U/ml 浓缩至 340000 U/ml。孙玫等[40]将泰乐星原工艺中的薄膜真空浓缩改进为耐溶媒纳滤膜浓缩,料液不需要加热即可浓缩,防止了料液的高温分解破坏,浓缩收率明显提高;在浓缩的同时,部分小分子杂质可以随水分子一起通过纳滤膜而除掉,成品质量明显提高,解决了用原工艺成品酪胺、溶解度不合格的质量问题;省去了原工艺浓缩中费用较高的蒸汽、冰盐水,经济效益可观。现纳滤工艺已成功地运用到泰乐星大生产中。Shi 等[41]用聚酰亚胺纳滤膜(HQDPA-DMMDA)浓缩青霉素 G 钠盐,在 2.0 MPa 压力下,自制超滤膜对于 19.7 g/L 青霉素溶液的截流率达到 85%。另外,NF 膜还成功地应用于红霉素、金霉素、万古霉素等多种抗生素的浓缩和纯化过程[42]。以上抗生素纳滤膜法浓缩、纯化的工艺大体相同,待浓缩的发酵母液加入料罐中,料液经过滤、加高压压入膜组件,浓缩液循环回料罐中,经一定时间循环,直至达到规定的浓缩倍数。研究表明,纳滤适用于多种抗生素的浓缩过程,若采耐酸、耐碱、耐溶剂的纳滤膜,则应用前景更广阔。

微滤一般用于超滤、纳滤、反渗透和其他膜分离技术的预处理,消除悬浮颗粒、细菌、絮凝剂等的影响。印度的 Adikane 等[43]采用管状陶瓷微滤膜从发酵液中提取青霉素 G。膜面流速提高 2.9 倍,平均通量提高了 1.8 倍,虽然青霉素 G 回收率相近,但是缩短了整个操作时间。经过 12 次循环后,膜通量没有显著改变,青霉素 G 回收率仍有 98 %,这从经济上讲非常具有应用价值。

反渗透膜技术在我国抗生素生产中已有应用。蓬莱反渗透设备厂生产的 NFB 系列板式反渗透装置早在 1992 年已成功应用于济宁抗生素厂的链霉素生产中,其产品质量完全达到国家标准,产品收率由 92.86 % 上升到 95.48 %,操作温度由 36 ℃下降到 20 ℃,每 1×10^{10} 个单位链霉素的炭耗由 0.35 kg 下降到 0.25 kg,完全取消了冷冻和蒸发过程,能耗和物耗大幅度降低[44]。板式反渗透装置在链霉素实际生产中的成功应用为我国 RO 膜在抗生素提取中的应用开辟了一条新路。曹学君等[45]利用 Millipore 公司的 Nonamax-50 型 RO 膜回收青霉素裂解液中残留的 6-APA。Nonamax-50 型膜对 6-APA 的截留率达 99 % 以上,而结晶母液中主要成分 NH_4Cl 和 KCl 都无阻碍地通透,透过液通透量大,在 1.0MPa 压力下达 400 ml/min 以上。在一定的压力下,采用全循环操作工艺截留 6-APA,使苯乙酸、青霉素 G、硼酸、NH_4Cl、KCl 以及 CH_2Cl_2 透过 RO 膜,透过液重新返回初滤液中再次进行浓缩。当操作压力为 2.0 ~ 3 MPa、温度为 6 ℃ ~ 10 ℃时,经过 Nonamax-50 型 RO 膜多次浓缩后,浓缩与结晶总收率达 84 % 左右,产品纯度符合企业标准。这一操作大大提高了经济效益,预计每年可得额外产值 576 万元以上(按 300d 计)。

液膜萃取技术经过将近 40 年的发展,受到人们的普遍关注,在抗生素提取(特别是青霉素[46-48])中的研究较多。我国的朱澄云等[46]用乳状液膜法从发酵液中提取青霉素 G,研究了石蜡用量、搅拌速率、载体用量、内相碳酸钠溶液浓度和表面活性剂用量对青霉素提取的影响,在最佳条件下提取率可达 76.5%,浓缩比为 6.0。他们进一步研究了提取青霉素时乳化剂和载体的配伍性能[47]。结果发现三辛胺(TOA)与 Span80 配伍提取青霉素时提取率和溶胀率分别为 93.8% 和 85%,两者配伍性能很好,适合提取青霉素。液膜的溶胀不仅与乳化剂有关,还受载体、内外相化学位梯度等影响。在液膜配方及操作参数选择适宜的条件下,以 Span80 作乳化剂,溶胀率可以达到很低,Span80 由于其低毒性不失为一种好的乳化剂。Lee 等[48]研究了混合表面活性剂 Span-80 和 PARABAR 9551 对于萃取率的影响,PARABAR 9551 是多胺类物质,相较于 Span-80 能在界面形成更紧密的吸附层,增加乳液稳定性。采用混合表面活性剂比采用其中一种的萃取率高。Marches 等最先将支撑液膜技术应用于青霉素的提取,描述了四丁基胺和青霉素作用生成离子团在膜相中的转移,两侧水相的 pH 值控制在 6.5 左右,保证了青霉素的稳定性,减少了损失[49]。支撑

液膜法提取的抗生素还包括头孢菌素C[50]、大环内酯类抗生素(红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素)[35]、氨基糖苷类抗生素(新霉素、庆大霉素、链霉素)[36]。

在抗生素提取中,常常是几种膜分离技术联合起来提取抗生素或是部分取代溶剂萃取法进行萃取,组合膜分离技术包括:超滤-纳滤[51]、超滤-纳滤-微滤[52]、微滤-超滤[53]、反渗透-超滤[32]、反渗透-纳滤[33]、微滤-反渗透[34]。膜分离技术在抗生素的预处理与后续分离、浓缩方面都显示了很好的效果,具有广阔的工业应用前景。

4　结论与展望

双水相技术、反胶团技术以及膜分离技术在抗生素提取工业中都是颇具应用前景的现代分离技术。但是要将这些技术应用于工业化大规模生产,应注意对以下问题进一步研究和探讨:①对于双水相萃取抗生素:应注意开发廉价双水相体系;研究反萃技术,循环利用成相物质;深入研究双水相成相和萃取机制,为实际应用提供理论指导;②对于反胶团萃取抗生素:应使用安全、无毒的表面活性剂,开发新型反胶团体系;同时需要进行反萃研究;③对于膜分离技术提取抗生素:应注意提高膜的稳定性、抗污染性,延长使用寿命;开发清洗技术;试验所用膜组件应由自制向标准化转变。

新型分离技术要取代抗生素传统提取技术,必须解决好以上问题。在提高产品质量的同时,降低生产成本,减少环境污染,开发出安全、无毒、高效、具有市场竞争力的新型抗生素提取技术,只有这样才能在实际生产中发挥重要作用。

参　考　文　献

[1] 顾觉奋,王鲁燕,倪孟祥,等. 抗生素[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2001: 129.

[2] 刘会洲,余江,常志东,等. 微乳相萃取技术及应用[M]. 北京:科学出版社, 2005:178.

[3] Gutowski E K, Broker A G, Rogers D R, *et al*. Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: Aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 6632 ~ 6633.

[4] Salgado J C, Andrews B A, Ortuzar M F, *et al*. Prediction of the partitioning behavior of proteins in aqueous two-phase systems using only their amino acid composition [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1178: 134 ~ 144.

[5] Duarte S P, Fortes A G, Prazeres D M F, *et al*. Preparation of plasmid DNA polyplexes from alkaline lysates by a two-step aqueous two-phase extraction process[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1164:105 ~ 112.

[6] Kamihira M, Kumar A. Development of separation technique for stem cells[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2007; 106: 173 ~ 193.

[7] Salabat A, Abnosi M H, Bahar A R. Amino acids partitioning in aqueous two-phase system of polypropylene glycol and magnesium sulfate[J]. *J Chromatogr B*, 2007, 858(1-2): 234 ~ 238.

[8] Bora M M, Borthakur S, Rao P C, *et al*. Aqueous two-phase partitioning of cephalosporin antibiotics: effect of solute chemical nature[J]. *Sep Purif Technol*, 2005, 45(2): 153 ~ 156.

[9] Tan T W, Huo Q, Ling Q. Purification of glycyrrhizin from glycyrrhiza uralensis fisch with ethanol/ phosphate aqueous two phase system[J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24(17): 1417 ~ 1420.

[10] Bulgariu L, Bulgariu D. The partition behavior of Zn(II) using halide ions extractants in aqueous peg-based two-phase systems[J]. *J Serb Chem Soc*, 2007, 72(3): 289 ~ 297.

[11] Guan Y X, Mei L H, Zhu Z Q. Technical aspects of extractive purification of penicillin fermentation broth by aqueous two- phase partitioning[J]. *Sep Sci Technol*, 1996, 31(18): 2589 ~ 2597.

[12] Cull S G, Holbrey J D, More V, *et al*. Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 69(2): 227 ~ 233.

[13] Guan Y X, Mei L H, Zhu Z Q. Recovery of antibiotics by aqueous 2-phase partition-partitioning behavior of pure acetylspiramycin solution in polyethylene-glycol potassium phosphate aqueous 2-phase system [J]. *Biotechnol Tech*, 1994, 8 (7):491 ~ 496.

[14] Lee C K, Sandler S I. Vancomycin partitioning in aqueous 2-phase systems-effects of pH, salts, and an affinity ligand [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1990, 35 (4): 408 ~ 416.

[15] Yang W Y, Lin C D, Chu I M, *et al*. Extraction of Cephalosporin C from Whole Broth and Separation of Desacetyl Cephalosporin C by Aqueous Two-phase Partition [J]. *Biotechnol and Bioeng*, 1994, 43(6): 439 ~ 445.

[16] Jiang Y Y, Xia H S, Guo C, *et al*. Phenomena and mechanism for separation and recovery of penicillin in ionic liquids aqueous solution[J]. *Ind Eng Chem Res*, 2007, 46 (19): 6303 ~ 6312.

[17] Soto A, Arce A, Khoshkbarchi M K. Partitioning of antibiotics in a two-liquid phase system formed by water and a room temperature ionic liquid [J]. *Sep Purif Technol*, 2005, 44(3): 242 ~ 246.

[18] Chang Q L, Liu H Z, Chen J Y. Extraction of lysozyme, α-chymotrypsin and pepsin into reversed micelles formed using

an anionic surfactant, lisooctane and water[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16: 970~973.

[19] Hagen A J, Hatton T A, Wang D I C. Protein refolding in reversed micelles[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 95(2): 285~294.

[20] Hu Z Y, Gulari E. Extration of aminoglycoside antibiotics with reverse micelles[J]. *J Chem Tech Biotechnol*, 1996, 65(1):45~48.

[21] Fadnavis N W, Satyavathi B, Deshpande A A. Reverse micellar extraction of antibiotics from aqueous solutions[J]. *Biotechnol Prog*, 1997, 13(4): 503~505.

[22] Su W D, Lee C K. Reversed micellar extraction of vancomycin: Effect of pH, salt concentration, and affinity ligands[J]. *Sep Sci Technol*, 1999, 34(8):1703~1715.

[23] 吴子生, 贾颖萍, 褚莹, 等. 反胶团相转移法提取青霉素G的研究[J]. 高等学校化学学报,1993, 14(10): 1427~1431.

[24] 李夏兰, 翁连进, 陈培钦. 反胶团萃取乳糖酸红霉素的研究[J]. 药物生物技术, 2003, 10(1): 29~32.

[25] 李夏兰, 翁连进, 陈培钦, 等. 磷酸二(2-乙基已基)酯-磷酸三丁酯-异辛烷反胶团萃取卡那霉素的研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(19): 491~494.

[26] Mazzola P G, Lopes A M, Hasmann F A, *et al*. Review Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques[J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2008, 83: 143~157.

[27] Schwarz M A, Raith K, Ruttinger H H, *et al*. Investigation of the interactions between drugs and mixed bile salt/lecithin micelles a characterization by micellar affinity capillary electrophoresis (MACE), PartIII[J]. *J Chromatogr A*, 1997, 781: 377~389.

[28] 汪茂山, 谢培山, 王忠东, 等. 天然有机化合物提取分离与结构鉴定[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 65.

[29] 吕宏凌, 王保国. 液膜分离技术在生化产品提取中的应用进展[J]. 化工进展, 2004, 23(7): 696~700.

[30] Li S Z, Li X Y, Cui Z F, *et al*. Application of ultrafiltration to improve the extraction of antibiotics[J]. *Sep Purif Technol*, 2004, 34:115~123.

[31] Morao A, Alves A M B, Cardoso J P. Ultrafiltration of demethylchlortetracycline industrial fermentation broths[J]. *Sep Purif Technol*, 2001, 22~23: 459~466.

[32] Li S Z, Li X Y, Wang D Z. Membrane (RO-UF) filtration for antibiotic wastewater treatment and recovery of antibiotics[J]. *Sep Purif Technol*, 2004, 34: 109~114.

[33] Kosutic K, Dolar D, Asperger D, *et al*. Removal of antibiotics from a model wastewater by RO/NF membranes[J]. *Sep Purif Technol*, 2007, 53: 244~249.

[34] Watkinson A J, Murby E J, Costanzo S D. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling[J]. *Water Res*, 2007, 41(18): 4164~4176.

[35] Msagati T A M, Nindi M M. The Use of Supported Liquid Membranes in the Extraction of Macrolides in Biomatrices[J]. *Microchim Acta*, 2004, 148: 199~214.

[36] Msagati T A M, Nindi M M. Application of supported liquid membranes in the multi-residue extraction of aminoglycoside antibiotics in milk and urine[J]. *Bull Chem Soc Jpn*, 2005, 78(12): 2135~2141.

[37] 李十中, 王淀佐, 胡永平. 抗生素提取过程中溶剂萃取技术新方法-超滤/萃取法[J]. 中国抗生素杂志, 2000, 25(1): 12~15.

[38] Li S Z, Wan Y H, Cui Z F. Ultrafiltration for isolation and purification of oxytetracycline from industrial fermentation broth[J]. *Chin J Antibiot*, 2004, 29(10): 579~584.

[39] Zhang W, He G H, Gao P, *et al*. Development and characterization of composite nanofiltration membranes and their application in concentration of antibiotics[J]. *Sep Purif Technol*, 2003, 30:27~35.

[40] 孙玫, 甘士喜, 尹德芳, 等. 纳滤膜技术在泰乐星提炼过程中的应用[J]. 中国抗生素杂志, 2000, 25(3): 172~174.

[41] Shi B L, Zhang Q R, Zhang H F. Concentration of benzylpenicillin sodium by polyimide nanofiltration membrane[J]. *J Appl Polym Sci*, 2007, 104(5): 3077~3081.

[42] 张新丽, 胡小玲, 岳红, 等. 膜分离技术在抗生素提取中的研究进展[J]. 化工进展, 2003, 22(11): 1165~1171.

[43] Adikane H V, Singh R K, Nene S N. Recovery of penicillin G from fermentation broth by microfiltration[J]. *J Membr Sci*, 1999, 162: 119~123.

[44] 张治国, 王世展, 姜作禹, 等. 板式反渗透装置在链霉素生产工艺中的应用[J]. 水处理技术, 1994, 20(6): 349~351.

[45] 曹学君, 邬行彦, 吴彤, 等. 反渗透法回收结晶母液中6-APA[J]. 生物工程学报, 1998, 14(4): 468~471.

[46] 朱澄云, 莫凤奎, 朱金良, 等. 乳状液膜法从发酵液中提取青霉素的研究[J]. 膜科学与技术, 2000, 20(6): 55~57.

[47] 朱澄云, 莫凤奎. 乳状液膜法分离技术中乳化剂与载体性能的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(6): 407~409.

[48] Lee S C. Continuous Extraction of Penicillin G by Emulsion Liquid Membranes with Optimal Surfactant Compositions[J]. *Chem Eng J*, 2000, 79(1): 61~67.

[49] 李剑, 崔巍, 刘静. 液膜分离技术及在医药化工中的应用[J]. 山东化工, 2007, 36(7): 17~20.

(下转第S8页)

兰阳性菌及阴性菌一般均有效，对其它革兰阳性球菌均有良好抗菌活性，肺炎链球菌和溶血性链球菌对本品较敏感。故本研究选用头孢唑林治疗轻症 CAP。头孢唑林钠的临床疗效肯定，但其稳定性较差，有效期仅为 18 个月。在存储、运输过程中易与胶塞相互作用，从而引起澄清度不合格。结构中的含硫基因易发生降解，使有关物质升高，对临床疗效产生一定影响。“五水头孢唑林”是三九企业集团深圳九新药业有限公司与中国药品生物制品检定所共同研制的，在 α 头孢唑林钠的基础上，两分子头孢唑林、十分子水和两个钠离子形成的单晶五水结构。头孢唑林和钠离子以配位键和共价键结合，晶态下头孢唑林分子排列配成一个隧道式空腔。水分子和钠离子存在于空腔之中，与头孢唑林一起形成五水大分子结构，呈稳定的五水晶体。经国家食品药品监督管理局的批准，商品名为“新泰林”。由于稳定的提高，其有效期增至 24 个月[2]。

本试验选择了出厂 1 年左右的五水头孢唑林钠与头孢唑林钠从临床疗效和药物不良反应相比较。结果表明，五水头孢唑林钠较头孢唑林钠总有效率高（85.7%/74.3%）。新泰林组细菌转阴率高于头孢唑林组（96.9%/87.9%）。可能因为无定型头孢唑林不够稳定，其不良反应发生率高于五水头孢唑林（11.4%/5.7% ）。但不良反应均较轻微，未发生心、肝、肾功能损伤及造血功能异常。结果表明在治疗革兰阳性菌感染为主的轻症 CAP，五水头孢唑林钠有更好的临床应用价值。

参 考 文 献

[1] 中华医学会呼吸病学分会. 社区获得性肺炎诊断和治疗指南（草案）[J]. 中华结核和呼吸杂志，1999，22(4)：199 ~ 201.

[2] 杨俊铃，马忠森，邱 晨. 五水头孢唑林钠（新泰林）治疗下呼吸道急性细菌性感染的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志，2006，22：326 ~ 327.

（上接第 649 页）

[50] Sahoo G C, Dutta N N, Dass N N. Liquid membraneextraction of Cephalosporin-C from fermentation broth[J]. *J Membr Sci*, 1999, 157: 251 ~ 261.

[51] Tessier L, Bouchard P, Rahni M. Separation and purification of benzylpenicillin produced by fermentation using coupled ultrafiltration and nanofiltration technologies [J]. *J Biotechnol*, 2005, 116: 79 ~ 89.

[52] 朱国民. 膜分离技术在 CPC-Na 盐提取中的应用[J]. 贵州化工，2005，30(4)：46 ~ 47(50).

[53] 何旭敏，何国梅，曾碧榕，等. 膜分离技术的应用[J]. 厦门大学学报，2001，40(2)：495 ~ 502.

（上接第 687 页）

[14] Yan J J, Ko W C, Wu J J. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IPM-2 metallo-β-lactamase, IPM-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 2368 ~ 2371.

[15] Poirel L, Heritier C, Tolun V, *et al*. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 15 ~ 22.

[16] Bradford P A, Urban C, Mariano N, *et al*. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmind-mediated AmpC beta-lactamase, and the foss of an outer membrane protein [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41: 563 ~ 569.

[17] 季淑娟，顾怡明，谭文涛，等. 中国部分地区大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌超广谱 β-内酰胺酶基因型研究[J]. 中华检验医学杂志，2004，27：590 ~ 593.