

两种测定头孢力新的方法比较

乐华爱 韩文珍 王熾芝 张启先 矫庆华 王祯祥

(中国科学院微生物研究所,北京)

应用砵法^[1]测定酶法合成的头孢力新,在实际应用时发现数据偏高。所以又对 Marconi^[2]修

正 Smith^[3]的紫外分光光度计法进行了比较,本文报道了在我们的试验条件下,比较上述两种

方法测定酶法合成反应液中头孢力新的效果。

材料和 方法

1. 试剂: 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸 (简称 7-ADCA)和头孢力新 (Cephalexin) 由上海第五制药厂提供。D (-)-苯甘氨酸甲酯盐酸盐由太原制药厂提供。其它均为市售商品。

2. 菌种培养和酰化酶活力测定同前报^[4]。

3. 酶法合成反应系统及产物分析:

将 1% 7-ADCA, 3% 苯甘氨酸甲酯盐酸盐, 0.6u/ml 酶活力的湿菌体, 置于不同 pH 缓冲液中, 总体积为 10ml, 37℃ 水浴振荡反应不同时间, 分别取样分析。反应液离心后, 将上清液稀释, 分别用 Fujii^[1] 的碱法和 Marconi^[2] 的紫外分光光度计法测定反应液中头孢力新的含量。

结 果

一、标准样品的测定

不同含量的头孢力新, 分别于含 10ml pH 7.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的比色管中, 沸水浴煮 10 分钟。sp700 紫外分光光度计, 波长 295 nm, 光程 1cm, 测紫外吸收。紫外法分析, 头孢力新的含量在 0—40 $\mu\text{g/ml}$ 之间为直线关

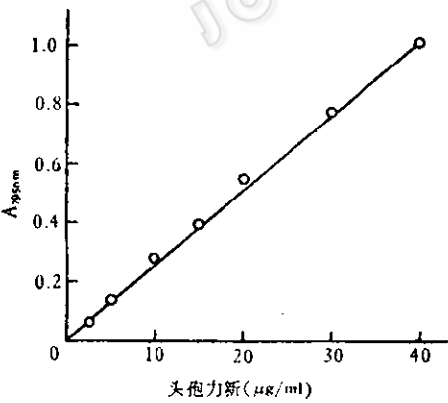


图 1 紫外法测定头孢力新标准曲线

系(图 1)。

不同浓度的头孢力新 2.5ml, 各加 1N NaOH 1ml, 25℃ 保温 1 小时, 721 型分光光度计, 波长 470nm, 1cm 光程比色杯比色。碱法分析,

头孢力新的含量在 0—0.8mg/ml 之间为直线关系(图 2)。

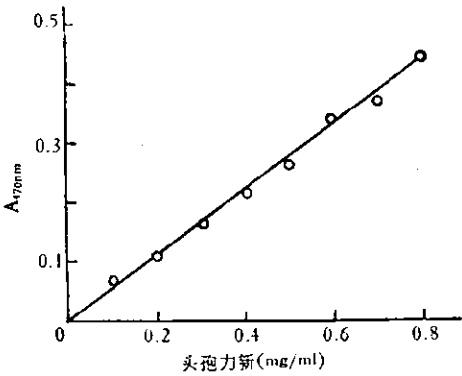


图 2 碱法测定头孢力新标准曲线

另外以 0.5% 头孢力新溶于 0.05M, pH6.8 的磷酸盐缓冲液为母液, 分别稀释 25 倍和 500 倍, 用碱法和紫外法同时测定 6 个标准样品, 分析结果列于表 1。对标准样品来说, 两种测定方法的分析结果都很相近。两者的误差和偏差都不大, 紫外测定的绝对误差为 0.19, 相对误差为 3.8%。碱法的绝对误差为 0.06, 相对误差为 1.2%。

二、酶法合成反应液的测定

不同 pH, 37℃ 保温不同时间的酶法反应液, 用两种测定方法的分析结果见表 2。在 pH 低(6.0 或 6.5), 反应时间短(1 小时), 两种方法

表 1 紫外法和碱法测定标准样品的比较

样品编号	头孢力新(mg/ml)		测定值的绝对误差	相对误差 (%)
	测定值	平均值		
紫外法				
1	4.83	4.81	0.02	0.4
2	4.85		0.04	0.8
3	4.70		0.11	2.3
4	4.97		0.16	3.3
5	4.68		0.13	2.7
6	4.83		0.02	0.4
碱 法				
1	5.09	4.94	0.15	3.0
2	5.25		0.31	6.3
3	4.91		0.03	0.6
4	4.85		0.09	1.8
5	4.68		0.26	5.3
6	4.85		0.09	1.8

测定头孢力新的结果无大差别。但 pH 高(6.8 或 7.0), 反应时间长时, 则碱法测定值往往偏高, 有时超过 100% 的合成率, 甚至达 140%。同时进行薄层分析, 证明紫外法较准确, 碱法在 pH 高, 反应时间长时的结果是不可靠的。

表 2 两种方法测定酶法反应液效果的比较*

反应 pH	反应时间 (小时)	头孢力新合成率 (%)	
		紫外法	碱法
6.0	1	11.1	12.2
	2	19.3	15.9
	3	26.8	36.7
	4	33.0	45.3
6.5	1	17.0	17.4
	2	28.0	37.9
	3	38.5	53.2
	4	48.5	78.3
6.8	1	48.5	52.6
	2	57.5	86.3
	3	56.0	129.1
	4	51.0	140.8
7.0	1	45.5	64.3
	2	48.5	78.3
	3	48.5	110.8
	4	43.5	124.2

* 反应系统: 1%7-ADCA, 3% 苯甘氨酸甲酯盐酸盐, 0.05M 不同 pH 磷酸盐缓冲液, 0.6u/ml 酶量, 总体积 10ml, 37℃ 反应不同时间。

三、原料和产物对测定的干扰

为了寻找原因, 试验了原料和产物对这两种方法的干扰情况。将 1%7-ADCA, 3% 苯甘氨酸甲酯盐酸盐和 0.5% 头孢力新, 分别溶于 pH6.8, 0.05M 磷酸盐缓冲液中, 在无酶情况下, 37℃ 保温不同时间, 测定结果表明, 7-ADCA 和苯甘氨酸甲酯盐酸盐对两种测定方法都没有干扰。头孢力新在无酶情况下保温 4 小时, 紫外吸收没有增减, 对紫外法测定无干扰。而碱法测定在无酶情况下保温过的样品, 则随着保温时间的延长而光密度值逐渐增加, 在 4 小时时, 接近零时的 2 倍, 显示出虚假的头孢力新的增加, 按检测数计算零时的头孢力新为 5.26mg/ml, 而保温 4 小时者则为 9.68mg/ml。所以合成反应时间长, 用碱法测定是不可靠的。

讨 论

头孢力新通常采用微生物管碟法分析^[1], 另外还有萤光法^[6], β -内酰胺酶法^[7-9]。Fujii^[1]发现一种简单的比色法, 是基于头孢力新加碱在波长 470nm 处有吸收的特殊颜色反应。Marconi^[2]修正 Smith 的紫外分光光度计法, 是参考 Smith 分析氨基苄青霉素的条件, 将头孢力新改在 pH7, 100℃ 加热 10 分钟, 产生一个稳定的中间体, 在波长 295nm 测紫外吸收。测定头孢力新的方法很多, 纯化学的分析方法较简单, 而且近来多有采用^[10], 所以选用了后两种。

碱法和紫外法对测定标准头孢力新样品来说都是准确的, 尤以碱法简便。但测酶法合成反应液中的头孢力新, 则因合成反应的条件不同, 有很大的差别。碱法只限于反应 pH 低, 时间短可采用, 在 pH 高时间长时会出现头孢力新偏高的虚假结果。而紫外法在各种条件下, 测定数据较为可靠。因此作广泛的酶法合成条件试验时, 碱法测定是不适宜的。另外我们也用过高效液相层析法^[11]它可以将原料, 产物和副产物都分开并分别定量, 最为准确可靠, 但需要特殊仪器, 大量测定不便。

参 考 文 献

[1] Fujii, T. et al.: *Process Biochem.*, 11 (8): 21—24, 1976.
[2] Marconi, W. et al.: *Agric. Biol., Chem.*, 39: 277—279, 1975.
[3] Smith, J. W. G. et al.: *Analyst*, 92: 247—252, 1967.
[4] 张启先等: *微生物学报* 19(3): 302—308, 1979.
[5] Toyo Jozo Co. Ltd: *Brith Patent*, 1, 347, 665, 1974.
[6] Yu, A. B. C. et al.: *J. Pharm. Sci.*, 66: 213—216, 1977.
[7] Kato, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 44: 465—466, 1980.
[8] Takahashi, T. et al.: *Biochem. J.*, 137: 497—503, 1974.
[9] Takahashi, T. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 94: 4035—4037, 1972.
[10] Choi, W. G. et al.: *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 361—371, 1981.
[11] 王玉梅等: *生物化学与生物物理学报*, 14(6): 547—552, 1982.