

发酵液中克拉维酸含量的测定方法*

王艳萍 左志晗 张 建 韩英素

(天津市食品营养与安全重点实验室,天津科技大学食品工程与生物技术学院,天津,300222)

摘 要 介绍了3种测定克拉维酸含量的方法,即高效液相色谱法、紫外分光光度法与生物效价法,3种方法测定结果进行分析研究,得出三种方法之间具有较好的相关性。高效液相色谱法及紫外分光光度法均基于克拉维酸与咪唑反应衍生后的衍生物在312nm处有特征吸收,且衍生后的色谱图在反相高效液相色谱柱上可有效避免发酵液中其他组分的干扰;生物效价法采用 *Klebsiella pneumoniae* ATCC29665 作为指示菌。由于3种方法测定结果之间具有相关性,可以根据不同的实验条件及实验目的选用不同的检测方法。

关键词 克拉维酸, 高效液相色谱法, 紫外分光光度法, 生物检测法, 相关性

克拉维酸 (clavulanic acid) 是由棒状链霉菌 (*Streptomyces clavuligerus*) 产生并第1个应用于临床的 β -内酰胺酶抑制剂^[1],其抗菌作用微弱,但是具有较好的抑酶作用,可增加 β -内酰胺类抗生素的稳定性,提高其疗效,临床上用于呼吸道,泌尿和生殖系统感染,皮肤和软组织感染以及一些重症感染等。文中对高效液相色谱法、紫外分光光度法和生物效价法3种方法测定发酵液中克拉维酸含量进行了比较,为克拉维酸制剂的进一步研究和开发提供了检测依据。

1 材料与方法

1.1 仪 器

日本岛津高效液相色谱仪: LC-10AT 泵, SCL-10A 控制系统; Shim-pack VP-ODS 色谱柱 (150 × 4.6), Shim-pack GVP (4.6 mm) 保护柱; 柱温: 室温; SPD-M10AE 二级管阵列检测器; Class-VP 色谱工作站; 25 μ L 微量进样器; BECKMAN ALLEGRA 64R 型高速离心机; Bio-Rad SmartSpec™3000 型紫外可见分光光度计; Milli-Q 超纯水纯化系统、恒温水浴锅、恒温培养箱、10 mL 移液管、Gilson 加样枪及枪头。

1.2 试 剂

克拉维酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 纯度 95.0%)、甲醇 (CH₃OH, 天津市康科德科技有限公司, 色谱纯)、咪唑 (天津市科密欧化学试剂开发中心, 分析纯)、H₃PO₄、KH₂PO₄、K₂HPO₄、HCl 均为分析纯, 氨苄青霉素 (中国药品生物制品检定所)、实验用水为经 Milli-Q 超纯水纯化系统处理的高纯水。克拉

维酸发酵样品: 由本实验室发酵制得。

1.3 菌 种

克拉维酸产生菌: 棒状链霉菌 (*Streptomyces clavuligerus*); 指示菌: 克雷伯氏肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumoniae* ATCC29665), 均由本实验室保存。

1.4 培养基

克雷伯氏肺炎杆菌培养基为 LB 固体 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 琼脂粉 20, pH=7.0, LB 培养基中氨苄青霉素的终浓度为 6 μ g/mL。

1.5 发酵液的处理

取不同发酵液于 13 000 r/min 离心 10 min, 上清液经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤作为待测样品。

1.6 分析方法

1.6.1 高效液相色谱法

1.6.1.1 色谱条件

流动相: KH₂PO₄ (0.1 mol/L)-6% 甲醇溶液, 磷酸调 pH 值至 3.2, 使用前经微孔滤膜 (0.45 μ m) 过滤; 体积流速: 1.5 mL/min; 检测波长: 312 nm^[2]。

1.6.1.2 标准曲线的绘制

咪唑溶液的配制: 称取 8.25 g 咪唑加入约 50 mL 纯水, 5 mol/L HCl 调 pH 至 6.8 ± 0.05, 定容至 100 mL。

克拉维酸标样的衍生^[3]: 配制浓度分别为 100、80、60、40、20 μ g/mL 的 1 号~5 号克拉维酸标样, 精确吸取各标样 100 μ L 加 500 μ L 咪唑溶液, 混匀, 30℃ 反应 12 min, 迅速冷却至 20℃, 制得衍生标样。精确量取各衍生标样 10 μ L 进样, 色谱图见图 1 和图 2。

1.6.1.3 发酵样品的测定

将处理后发酵样品按 1.6.1.2 方法衍生, 精确量取 10 μ L 进样, 测定克拉维酸含量, 结果见表 4。

第一作者: 博士, 教授。

* 天津市自然科学基金资助项目 (No. 043802711)

收稿日期: 2005-01-24

1.6.2 紫外分光光度法

1.6.2.1 标准曲线的绘制

咪唑溶液的配制参见 1.6.1.2。

克拉维酸标样的衍生:配制浓度分别为 80、70、60、50、40、30、20 $\mu\text{g/mL}$ 的 1 号~7 号克拉维酸标样,衍生时分为 A、B 两个系统:A 系统样品为 500 μL 咪唑加 100 μL 1~7 号克拉维酸标样,参比为 500 μL 咪唑加 100 μL 纯水;B 系统样品为 500 μL 纯水加 100 μL 1~7 号克拉维酸标样,参比为纯水,衍生条件与 1.6.1.2 中高效液相色谱法标样的衍生方法一致,在 312 nm 分别测定其吸光度即 A_{312A} 和 A_{312B} ,计算不同浓度下的 $(A_{312A} - A_{312B})$ 。

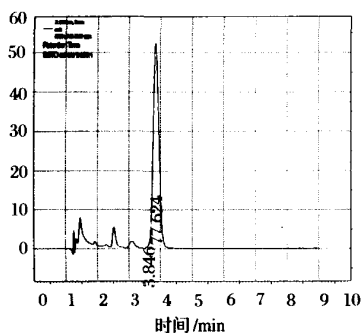


图 1 克拉维酸标样液相色谱图

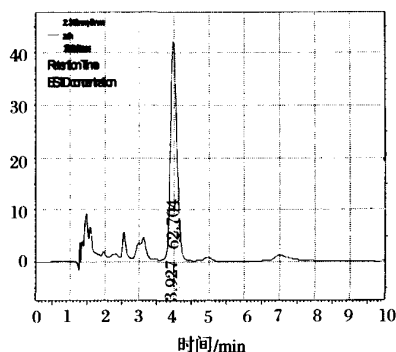


图 2 发酵液的液相色谱图

1.6.2.2 发酵液样品的测定

取各处理后发酵样品 100 μL ,按 1.6.2.1 方法进行衍生,测定其有效物质克拉维酸含量,结果见表 4。

1.6.3 生物效价法

1.6.3.1 菌悬液及磷酸盐缓冲液的制备

菌悬液:检定菌于 LB 固体平板在 37℃ 培养 24 h,用适量生理盐水将菌苔洗下,此菌液于 4℃ 保存。

磷酸盐缓冲液:称取 K_2HPO_4 2 g 与 KH_2PO_4 8 g,加水定容至 1 L,滤过,115℃ 灭菌 30 min。

1.6.3.2 双碟平板的制备

在 90mm 的培养皿内加入熔化的底层琼脂培养基 5.0 mL,待凝固后,再加入融化并冷却致 55℃ 左右的菌层 LB 固体培养基 10.0 mL,菌层培养基中含 6 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素,并含适量菌悬液。

1.6.3.3 标准曲线的绘制

用无菌磷酸盐缓冲溶液配制浓度分别为 33.44、26.75、21.40、17.12、13.70、10.96、8.77 $\mu\text{g/mL}$ 的 1 号~7 号标准品溶液,剂距 $r = 1:0.8$ 。取浓度为 16.72 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液,此浓度定为中心点浓度。将无菌滤纸片贴在已制备好的双碟平板上中心点,它与各剂量纸片的位置与杯碟法相同。用加样枪精密吸取以上各剂量溶液 3 μL 于滤纸片上,每个剂量 9 片以上中心点 63 片以上,待纸片稍干后置于 37℃ 培养箱培养过夜,测量各剂量抑菌圈及中心点浓度的直径。

1.6.3.4 发酵样品的测定

按 1.6.3.3 中方法测定各处理过的发酵液样品,每个发酵样品平行做 5 板,测量各剂量抑菌圈的直径,计算各发酵样品与中心点浓度抑菌圈直径的差值,校正其有效物质克拉维酸含量,结果见表 4。

2 结果

2.1 高效液相色谱法

2.1.1 标准曲线的绘制

以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标绘制标准曲线,所得回归方程为 $y = 8433.96x - 4221.08$,相关系数为 $r^2 = 0.99949$,在 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性最好。

2.1.2 回收率的测定

取未知浓度处理后的发酵样品,按 1.6.1.2 中的方法衍生后测定其有效物质克拉维酸含量,加入已知量的克拉维酸标样的衍生物,同法进行测定,计算其回收率。结果回收率在 100.51%~101.15% 之间(见表 1),平均回收率为 100.88%,满足要求。

2.1.3 重现性的测定

任取一样品,衍生后重复 5 次测定含量,结果求得克拉维酸的变异系数 $\text{RSD}(n=5)$ 为 0.184,表明本法重复性良好。

2.2 紫外分光光度法

2.2.1 标准曲线的绘制

计算不同浓度标样的 $A_{312A} - A_{312B}$,以该差值作为纵坐标,对应的标准品克拉维酸浓度为横坐标绘制工作曲线,回归方程为 $y = 0.0181x + 0.0964$,相关

系数 $r^2=0.9965$, 在 $20\sim 80\ \mu\text{g/mL}$ 范围内具有良好的线性关系。

表1 HPLC法测定克拉维酸的回收率($n=4$)

测定次数	1	2	3	4
样品浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	35.99	35.99	35.99	35.99
加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1	1.5	5	4
实测量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	37.18	37.80	38.43	40.39
回收率/%	100.51	100.83	101.15	101.01
平均值/%	100.88			

表2 紫外分光光度法测定克拉维酸的回收率($n=4$)

测定次数	1	2	3	4
样品浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	43.18	43.83	45.27	46.78
加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.05	1.05	1.05	1.05
实测量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	43.83	45.27	46.78	48.65
回收率/%	99.1	100.9	101.0	101.7
平均值/%	100.68			

2.2.2 回收率的测定

取未知浓度处理后的发酵样品,按1.6.2.1中的方法衍生后测定其有效物质克拉维酸含量,加入已知量的克拉维酸标样的衍生物,同法进行测定,计算其回收率,结果回收率在99.1%~101.7%(见表2),平均值为100.68%,满足要求。

2.2.3 重现性的测定

任取一样品,衍生后重复5次测定含量,结果求得克拉维酸的变异系数RSD($n=5$)为0.223,表明本法重复性良好。

2.3 生物效价法

2.3.1 标准曲线的绘制

以标样与中心点浓度抑菌圈直径的差值为横坐标,克拉维酸浓度为纵坐标在双周半对数坐标纸上标点绘制标准曲线,回归方程为 $y=2.2254x+18.25$, $r^2=0.9354$,在 $8\sim 34\ \mu\text{g/mL}$ 范围内线性较好。

2.3.2 生物法测定的可靠性实验

以已知效价为 $950\ \mu\text{g/mg}$ 的克拉维酸样品假设为未知样品,估计效价分别为700、800、900、1000 $\mu\text{g/mg}$ 进行纸片法测定,结果见表3。数据显示,已知效价为 $950\ \mu\text{g/mg}$ 的同一样品,设定不同的估计效价进行测定^[4],结果在957.60~997.50之间,测定的相对误差均不大于5%,符合药典要求。

2.4 三种测定方法测定结果的比较

对于相同的发酵液,分别采用上述3种方法测定其有效物质克拉维酸的含量,测定结果见表4。

表3 生物法可靠性实验

项目	试验区组			
	1	2	3	4
标准剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	30	30	30	30
估计效价/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	700	800	900	1000
平板个数	3	3	3	3
测定效价(P_T)	997.50	981.73	957.60	973.94
实际效价/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	950	950	950	950
相对误差/%	5.00	3.34	0.80	2.52

表4 三种检测方法测得的样品中克拉维酸含量 $\mu\text{g/mL}$

Number	HPLC法	紫外分光光度法	生物效价法
1	15.906	48.496	19.355
2	18.872	53.950	24.369
3	21.772	62.215	31.600
4	56.052	106.843	67.635
5	72.008	118.579	86.020

由以上实验结果可知,采用高效液相色谱法所测发酵液克拉维酸含量略低于生物效价测定法测定结果,这是因为生物法测得的结果为发酵液中各组分总的抗菌活性,因此测得的含量均略高。而紫外分光光度法所测结果远远高于高效液相色谱法,但紫外分光光度法所测克拉维酸含量高低的趋势是与高效液相色谱法相吻合的。主要原因是高效液相色谱法测得的为经色谱柱分离后的纯的克拉维酸样品在312 nm处的吸光度,而紫外分光光度法所测为未经分离的发酵液中克拉维酸及与其结构类似的各组分在312 nm处的总的吸光度,因此测定结果较高。

通过比较发现,3种方法测定结果之间具有较好的相关性。3种测定方法测定发酵液中克拉维酸含量结果相关性见图3。

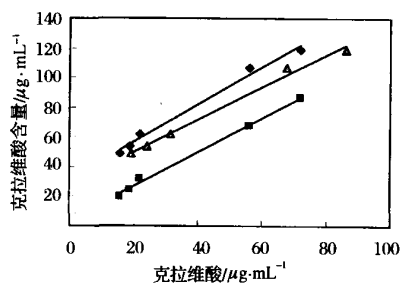


图3 三种测定方法的相关性

◆HPLC-紫外分光光度法: $y=1.2662+31.489x, r^2=0.9863$

■HPLC-生物效价法: $y=1.1514x+3.2855, r^2=0.9954$

▲生物-紫外分光光度法: $y=1.0947x+27.886, r^2=0.9911$

由图3可知,在该测定范围内,3种方法测定结果之间的相关性分别如下:以高效液相色谱法测定结果为横坐标,紫外分光光度法测定结果为纵坐标回归

方程为 $y = 1.2602x + 31.489$, 相关系数 $r^2 = 0.9863$; 以高效液相色谱法测定结果为横坐标, 生物检测法测定结果为纵坐标回归方程为 $y = 1.1514x + 3.2855$, 相关系数 $r^2 = 0.9954$; 以生物检测法测定结果为横坐标, 紫外分光光度法测定结果为纵坐标回归方程为 $y = 1.0947x + 27.886$, 相关系数 $r^2 = 0.9911$ 。

3 讨论

评价生物测定法测定发酵过程中产物的效价是衡量发酵产品质量的一个重要参数^[5], 该方法具有真实、直观、可靠, 但影响因素多, 且克拉维酸极不稳定, 其活力又是靠被克拉维酸保护的青霉素的活力显示的, 因此测定时的影响因素比其他抗生素更多, 不适用于发酵过程中大量发酵液的检测。

紫外分光光度法可以解决生物测定法测定克拉维酸中的复杂性、难度大和时间长等问题, 但主要适用于成品中克拉维酸含量的测定, 不能准确测定发酵液中的含量, 可以通过测定其相对含量的高低, 用于发酵液中克拉维酸含量高低的比较。

高效液相色谱法测定发酵液克拉维酸含量较为准确, 且该方法采用了克拉维酸与咪唑试剂进行衍生化反应, 不仅解决了极性的克拉维酸在通常的反向色谱柱上有很好的保留时间的问题^[6], 还使克拉维酸极不稳定而影响测定准确性的问题迎刃而解, 该方法具有操作简便、快速、准确等特点, 不仅适用于成品及半成品的检测, 也适用于发酵液中克拉维酸含量的常规检测, 结果令人满意。

文中首次将 Albert 等人^[3]报道的利用紫外分光光度法对克拉维酸进行测定的方法应用于发酵液中

克拉维酸的测定, 由于紫外分光光度法与 HPLC 法对发酵液的测定结果之间具有的相关性, 因此紫外分光光度测定发酵液的结果虽然比真实值高, 但是具有可靠性, 能反映发酵液中克拉维酸含量的高低, 且紫外分光光度法与 HPLC 法相比具有操作简单, 不受实验条件限制, 以及操作方法简便快捷等优点, 这对于克拉维酸高产菌株的选育工作是十分有意义的。

通过比较可以得出, 3 种检测方法各有利弊, 可根据发酵过程中不同的要求及不同的实验条件选用不同的检测方法, 本课题的研究为克拉维酸检测方面的工作提供了依据。

致谢: 本文的研究过程得到了美国 University of Florida Dr. Jin 的帮助, 在此表示衷心地感谢!

参考文献

- 1 Brown A G, Butterworth D, Cole M, et al. Naturally occurring lactamase inhibitors with antibacterial activity [J]. J Antibiot, 1976, 29: 668
- 2 Mark Foulstone, Christopher Reading. Assay of amoxicillin and clavulanic acid, the components of augmentin, in biological fluids with high-performance liquid chromatography [J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1982, 22(5): 753
- 3 Albert E Bird, Jeanne M Bellis, Brian C Gasson, et al. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole [J]. Analyst, 1982, 107: 1241
- 4 黄喜桂, 谢炜炜, 林文良, 等. 棒酸的生物检定 [J]. 福建药学杂志, 1990, 2(4): 11
- 5 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(二部) [S]. 北京: 人民卫生出版社, 化学工业出版社, 1995. 407
- 6 Christine E, Robert C, Neville H, et al. Investigation into the use of derivatization with imidazole for the detection of clavam compounds by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Anal Commun, 1996, 33: 215

Determination of Clavulanic Acid Concentration in Fermentation Broth

Wang Yanping Zuo Zhihan Zhang Jian Han Yingsu

(College of Food Science and Bioengineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin, 300222, China)

ABSTRACT High performance liquid chromatography (HPLC), spectrophotometry and bioassay methods were used to determine the concentration of clavulanic acid in fermentation broth in the present paper. The relationship between the results of these three methods was investigated. It is found that the results of the three methods are correlation. HPLC and spectrophotometry methods were based on the absorbance at 312 nm from the reaction of clavulanic acid imidazole. This derivative chromatographs from reverse-phase HPLC columns clear of interfering components in fermentation broth while the bioassay method use *Klebsiella pneumoniae* ATCC29665 as the indicator organism. Because of the correlation of the results determined by three methods we can select different methods based on different conditions and purpose.

Key words clavulanic acid, highperformance liquid chromatography (HPLC), spectrophotometry, bioassay method, correlation