

庆丰霉素光电比色效价测定*

安徽省白湖农场试验站

庆丰霉素的效价测定是用生物法,需要一定的设备。我们研究了用光电比色法测定庆丰霉素的效价的条件。与生物法测定相比较,光电比色测定的效价稍微偏低。现报告如下。

原 理

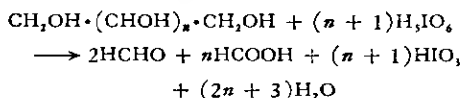
庆丰霉素的分子式尚未确定。但它一般是以春雷霉素纯品作为相对标准来进行其生物效价测定的。在庆丰霉素的官能团分析中,对高碘酸试剂的反应为阳性,这说明在它的分子中一定也含有多羟基这样的官能团^[1],而可在 Malaprade 反应^[2]的基础上,与高碘酸作用,根据作用减少的高碘酸而进行光电比色定量测定,其步骤如下:

1. 将发酵液或固体发酵物浸泡液稀释至约300—400 微克/毫升后,经过调整 pH 7 等预处理,沉淀,滤去杂质。

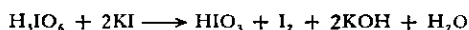
2. 滤液分两份,第二份滤液 8 毫升加 1 克强酸氢型阳离子树脂进行交换吸附,除去其中庆丰霉素。

3. 第一、二两份滤液均调整至 pH 7,根据预备试验所提供的数据加入一定量的水和一定过量的高碘酸。

4. 在遮光条件下,准确放置 1 小时,进行 Malaprade 反应,使高碘酸还原而减少。



5. 剩余的高碘酸,在使用硼砂缓冲溶液改变为碱性的环境下,用碘化钾还原恰至碘酸为止。



6. 由碘化钾释出的相应数量的碘,通过它的黄色,以第一份滤液作对照溶液(其消光为零),在 1—2 分钟时间内迅速进行第二份溶液光电比色测定。

方法中提到的若干问题,如:预处理、遮光、准确放置 1 小时、碱性、操作迅速、采用抵消法等,都是需要特别注意的,使得到的结果可靠。

分 析 方 法

一、试剂

(一) 20% 碘化钾溶液

称 20 克碘化钾,加水溶解至 100 毫升,贮棕色瓶中备用。

(二) 硼砂碱性缓冲溶液

称 5 克硼砂及 2.5 克硼酸,加水 100 毫升,加热溶解,放置冷却后备用。

(三) 10% 氢氧化钠溶液

(四) 5% 盐酸溶液

(五) 高碘酸溶液

先配制 1.5% 浓度的高碘酸溶液,取一部份稀释至 0.3%,备测定消光系数时使用,1.5% 高碘酸供试样测定时使用。

(六) 2,000 ppm 春雷霉素标准液**

准确称取 100 毫克春雷霉素纯品,移入 50 毫升量瓶,加水溶解,并加水稀释至刻度,混匀(如需保存,最好先配浓度较大的春雷霉素的 0.25% 的苯甲酸溶液作贮备液,用前,取一定量此贮备液,加水稀释至 2,000 ppm)。

(七) 强酸氢型阳离子交换树脂

所用系苯乙烯磺酸钠型树脂,需转化氢型后方可使用。先以三倍树脂容积的 5% 盐酸浸渍半小时,最好 1 天,并经常搅拌,然后以倾泌法用蒸馏水洗涤多次,以尽可能洗至流出液不再呈色时最好。带水移至漏斗的滤纸内,以约三倍树脂容积的 5% 盐酸进行淋洗,接着用蒸馏水洗至 pH 6—7 为止(用广范试纸检验)置烘箱中 100℃ 烘干,装瓶备用。用过的树脂可按照此法再生后使用。

二、消光系数求法

取 5 支试管,第 1 支不加春雷霉素,用 1 毫升微量吸管量取 0.1、0.2、0.3、0.4 毫升春雷霉素标准液(相当于春雷霉素 200、400、600、800 微克),按次加入其余 4 支干净的试管中,依次加水 1.6、1.5、1.4、1.3、1.2 毫升(各补足至 1.60 毫升),再各加 0.3% 高碘酸 0.4 毫升,混匀,置暗处,遮光准确放置 1 小时。迅速地各加硼砂缓冲液 1.5 毫升,立即急摇数下,充分混匀,再迅速地各加碘化钾溶液 0.5 毫升,又充分混匀,

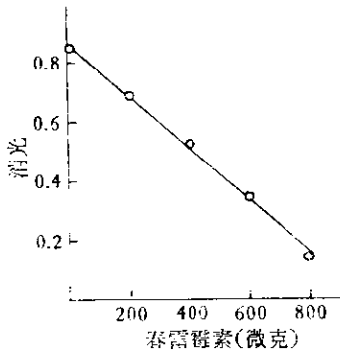
* 承上海植物生理研究所等单位的帮助,表示感谢。

** 因所用春雷霉素系上海十八药厂产品,含量 96%,故标准液实际浓度不到 2000 ppm。

各加水 1 毫升,混合(溶液总体积均为 5 毫升),以水为对照溶液,用 440 及 480 毫微米两片滤光片,581 型光电比色计,在 1—2 分钟时间内进行溶液消光的测定。

将春雷霉素微克数与溶液消光值作图,应成直线。消光值的差数被对应春雷霉素微克数的差数除,即得消光系数。

【例】如测得春雷霉素 0、200、400、600、800 微克溶液的消光值分别为 0.854、0.686、0.523、0.347、0.140。绘制成图,为一直线。则因春雷霉素差数为 800—0 微克时的消光值差数为 0.854—0.140,故得消光系数为 0.00085。



春雷霉素与消光值图

三、操作方法

1. 将发酵液或固体发酵物浸泡液稀释至每毫升约 300—400 微克庆丰霉素,取 25 毫升。用氢氧化钠溶液小心进行中和,恰至广范试纸 pH 7。50—60℃ 温水浴保温 3—5 分钟后,经干滤纸过滤。在中和过程中,使用的氢氧化钠溶液体积宜少,应不明显增大发酵液体积;使用的氢氧化钠溶液也最好勿滴入过头,一方面免用盐酸回滴,另一方面又不致产生太多钠盐,使以后树脂处理效果受到影响。

2. 称强酸氢型阳离子树脂 1 克于一干试管中(20×150 毫米),移入上述滤液 8 毫升,充分振荡 10 分钟,使其中庆丰霉素为树脂所交换吸附,经干滤纸过滤。此时,溶液已为树脂交换释出的氢离子所酸化,应同上节小心用氢氧化钠溶液点滴中和,再调整恰至广范试纸 pH 7。用过的树脂可集中收集起来,进行再生后重复使用。

3. 取 4 支 5 毫升刻度试管,先做预备试验。于试管中分别移入上述未经树脂处理的滤液 1 毫升,分别移入 1.5% 高碘酸 0.4、0.6、0.8、1 毫升,另依次加水 0.6、0.4、0.2、0 毫升,各补足至 1 毫升(先加水,后加高碘酸),立即混匀,置暗处遮光放置 1 小时,然后同消光系数求法的操作,各加硼砂缓冲溶液 1.5 毫升,急摇数下混匀,各加碘化钾溶液 0.5 毫升,又急摇数下混匀,然后各加水 1 毫升混合,尽快用光电比色计比色,

以上操作应迅速进行。仍以水为对照溶液,消光为零。以溶液的透光率落在 20—40% 为好。预备试验提供何种数量的高碘酸比较适宜,为下一步的测定做好准备。

应注意,上述操作法 1 中发酵液或固体发酵物浸泡液稀释至每毫升 300—400 微克庆丰霉素,对照预备试验是否成功关系很大。如过多地稀释,庆丰霉素含量过少,预备试验所加高碘酸无甚消耗,各溶液的呈色都很深,看不出多大差异;如过少地稀释,则庆丰霉素含量过多,则预备试验所加高碘酸数量不够,消耗已尽,各试管溶液呈色均浅,亦看不出多大差异。如遇到这些情况,就应重新考虑发酵液或固体发酵物浸泡液的稀释浓度。

4. 另取两支 5 毫升刻度试管进行测定:

(1) 于第一试管移入 1 毫升树脂处理滤液,于第二试管移入 1 毫升树脂未处理滤液。

(2) 依据预备试验提供的数量加进高碘酸,余用水补足至试管内溶液总体积为 2 毫升(亦先加水后加高碘酸),混匀。

(3) 随即置暗处遮光放置 1 小时。

(4) 恰 1 小时,两试管均加 1.5 毫升硼砂缓冲溶液急摇数下混合,又速加 0.5 毫升碘化钾溶液急摇数下混合。

(5) 尽快地各加 1 毫升“相互抵消”的滤液或清水(较简便的是加清水,常易成功,除非树脂处理与不处理滤液本身的颜色差异较大,一般误差亦不大,略偏低)。所谓加“相互抵消”的滤液,就是对第一管(原来是用树脂处理滤液的)加用树脂处理滤液 1 毫升,对第二管(原来是未用树脂处理的滤液),加树脂处理滤液 1 毫升。这样处理,在于保持两试管内的最终溶液的基本情况大体相同,因而可消除因基本情况不能相同所产生的一些影响。这个方法我们叫做“抵消法”。

(6) 急摇混合,迅速在 1—2 分钟时间进行光电比色。以第一管溶液的消光为零,作为对照溶液,测定第二管溶液的消光。作对照溶液的消光应调整到零,如有时因溶液呈色较深,光电比色计指针达不到零时,可选一适合读数作零点,测出其差数。每一测定应做重复。快速操作对结果有较大影响。

四、计算

庆丰霉素(单位/毫升) = $\frac{\text{被测溶液的消光}}{\text{消光系数}} \times \text{稀释倍数}$

【例】取 10 倍稀释的某发酵物的浸泡液按上述测定流程操作,得溶液消光值 0.249,如消光系数测定为 0.00085,该发酵物浸泡液庆丰霉素含量为 $\frac{0.249}{0.00085} \times 10 = 2929$ 单位。又因春雷霉素标准液系

以 96% 含量春雷霉素配制的, 校正后, 应得 $2929 \times 0.96 = 2812$ 单位。

试 验 部 份

一、预处理

发酵液或固体发酵物浸泡液的稀释液, 是否需要经过调整 pH 7 等预处理沉淀滤去杂质呢? 想探明预处理是否必要, 曾取 50 倍稀释的未经接种的固体培养基 (为麦麸: 细糠: 玉米粉: 大糠 = 3:3:3:1, 拌水灭菌) 浸泡液, 分经过预处理与不经过预处理两组, 各按用树脂处理与不用树脂处理方法进行含量的消光差数的测定, 得表 1 结果。

表 1 消光差数的测定

样 号	经 过 预 处 理			不 经 过 预 处 理		
	用树脂处理	不用树脂处理	消光数	用树脂处理	不用树脂处理	消光数
1	0.301	0.301	0	0.254	0.240	+0.014
2	0.328	0.323	+0.005	0.292	0.276	+0.012
3	0.332	0.325	+0.007	0.337	0.347	-0.010
4	0.350	0.347	+0.003	0.370	0.355	+0.015

注: 均取样 0.5 毫升加水 1.1 毫升后以 0.3% 高碘酸 0.4 毫升进行 Malaprade 反应。

因系空白测定, 不含庆丰霉素, 故消光差值理应为零。表中经过预处理的结果近似于零; 但不经过预处理的一般消光差数较大, 个别还出现负值。这说明, 预处理是必要的。

二、遮光

取庆丰霉素固体发酵物浸泡稀释液 1 毫升 4 份, 加 0.3% 高碘酸溶液后, 分遮光、散射光曝光、直射光曝光 3 个处理, 放置 1 小时后进行比色测定, 得消光结果如表 2。

表 2 光线对消光的影响

消 光 处 理		样 品		1	2	3	4
遮 光		0.745	0.475	0.668	0.903		
曝 光	散 射 光	0.733	0.456	0.646	0.903		
	直 射 光	0.272	0.046	0.143	0.565		

试验说明, 在暗处遮光下作用十分重要。否则, 会过多地消耗高碘酸, 特别在直射光曝光下更为严重。

三、作用时间

取 2,000 ppm 标准液 0、0.1、0.2、0.3 毫升, 按消

光系数求法操作, 但改变暗处遮光放置时间分别为 0、15、30、45、60、75 分钟等 6 个处理, 得消光结果如表 3。

表 3 反应时间对消光值的影响

消光放置时间(分钟)	2,000ppm标准液(毫微米)	0	0.1	0.2	0.3
0		0.842	0.830	0.848	0.830
15		0.833	0.721	0.614	0.535
30		0.848	0.699	0.562	0.441
45		0.833	0.695	0.535	0.377
60		0.839	0.670	0.500	0.328
75		0.848	0.670	0.476	0.288

用 Malaprade 反应测定庆丰霉素, 作用不是瞬间即能完成的, 这和一般的无机化学反应不一样, 必须放置适当时间。看来, 60 分钟较好, 因为算出的消光系数, 不仅比较大, 而且由各点算得的数值基本相同。次为 75 分钟, 消光系数更大, 但由各点算得数值不及 60 分钟的相近。

四、作用溶液体积

加高碘酸后, 连发酵物浸泡稀释液在内溶液的总体积, 应固定为 2 毫升, 放置 1 小时。如体积改变, 将对测定产生一定影响。取 2,000 ppm 春雷霉素分别为 0.1、0.2、0.3 毫升; 使其总体积为 1、2、3 毫升, 进行消光测定, 结果见表 4。

表 4 溶液体积对消光的影响

消光溶液体积(毫升)	2,000ppm标准液(毫升)	0.1	0.2	0.3
1		0.647	0.492	0.337
2		0.699	0.549	0.385
3		0.750	0.560	0.441

试验表明, 作用溶液体积应彼此一致。如体积较大, 则高碘酸的消耗减少, 消光增大; 反之, 高碘酸的消耗就较多, 消光减小。

五、酸度及盐类

作用的溶液不仅需要有一定固定的体积, 而且, 还要有比较一致的酸度。操作法选取的酸度均为 pH 7。预处理的滤液调整至 pH 7, 树脂处理滤液亦调整至 pH 7。发酵物浸泡稀释液不同 pH 时, 测定的消光结果见表 5。

经树脂处理后, 溶液 pH 值明显减小。如在实际操作中疏忽了调整其酸度这一过程, 则从表中结果来

表 5 不同酸碱度对消光的影响

pH 值	2.5	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.5	9.0	9.5	11.0	12.5
消 光	0.432	0.430	0.407	0.407	0.400	0.396	0.393	0.397	0.292	0.297	0.498

注: pH 系以广范试纸检验,用 NaOH 及 HCl 调整。

看,因消光增大,就必将引起含量测定结果错误地偏高。

将可能存在于发酵物浸泡稀释液中的一般盐类如氯化钠(因浸泡时曾用盐酸调整酸度,分析时又用氢氧化钠中和)及苯甲酸钠(因常加 0.3% 苯甲酸钠防腐)等进行试验,得消光结果见表 6。

表 6 盐类对消光的影响

氯化钠量(毫克)	0	5	10	15	20	50
消 光	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.380
苯甲酸钠量(毫克)	0	1	2	3	5	10
消 光	0.393	0.393	0.387	0.378	0.367	0.347

注: 均用同一发酵物浸泡稀释液。

结果表明,氯化钠无大影响,苯甲酸钠影响较大。但一般实际测定的稀释液中的含量都远小于能发生影响的数量,故可不考虑。

另如浸泡稀释液中有葡萄糖等物质,则对消光的影响极大。但因其不被树脂交换吸附,树脂处理与不处理基本相同,并可互相抵消其影响,共同表现出较大的空白值。一般说来,对 600—700 微克庆丰霉素,仅须耗用 0.3% 的高碘酸不到 0.4 毫升,但实际样品测定时需增大用量至 1 毫升,提高浓度甚至到 1% 以上,原因可能在此。

六、碱性缓冲溶液的使用

暗处遮光放置作用 1 小时后,剩余高碘酸究竟应在酸性环境下测定或是在碱性环境下测定? 试验表明,在酸性环境下测定效果很差,直线性及差动灵活性均差。改用在碱性环境下测定后,则情况大变。春雷霉素不同含量的消光,结果见表 7。

表 7 春雷霉素不同含量的消光

消光处理	1,000ppm 标准液(毫升)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
酸性环境下测定		0.482	0.434	0.426	0.403	0.377	0.385
碱性环境下测定		0.530	0.423	0.330	0.237	0.174	0.086

注: 仅使用 0.3% 高碘酸 0.2 毫升。为改变溶液为碱性环境,操作中使用的是硼砂缓冲溶液 1.5 毫升;改变溶液为酸性环境,用 6NH₄SO₄ 1.25 毫升。

七、“抵消法”

试验表明,在呈色的稳定性方面单使用高碘酸和碘化钾反应,情况很好;如高碘酸与庆丰霉素作用后与碘化钾反应,比色测定的结果则稍差;用庆丰霉素发酵物浸泡稀释液,则结果很差,几乎没有比较稳定的时间。和以水作对照溶液进行测定的绝对稳定性是如此,和不用树脂处理滤液作对照溶液的相对稳定性也是如此。如使用“抵消法”,虽绝对稳定性仍差,相对稳定性却很好。一般在呈色 10 分钟内是比较稳定的。所以应迅速在 1—2 分钟时间内进行比色测定较好。结果见表 8。

表 8 高碘酸用“抵消法”测定庆丰霉素发酵物稀释液稳定性

发色时间(分)	用树脂处理	不用树脂处理	消光差数
2	1.155	0.906	0.249
5	1.009	0.757	0.252
10	0.928	0.671	0.257
15	0.854	0.572	0.282
20	0.783	0.468	0.315
25	0.724	0.400	0.324
30	0.678	0.328	0.350

此外,“抵消法”还可消除发酵物浸泡稀释液用树脂处理与不用树脂处理两者之间颜色差异(稀释液常带黄色,树脂处理后往往有些减退),因而,也可一定程度地减少误差,增进测定的可靠性。

八、使用试剂的先后顺序

试验还表明,在遮光处理 1 小时结束后,不仅需要“抵消法”和操作迅速,而且,在使用“抵消法”时还需按硼砂缓冲液、碘化钾、“相互抵消滤液”先后顺序加入。如按此顺序使用试剂而又迅速地进行操作,可得到满意的结果。

九、树脂用量

对于 5,000 微克春雷霉素,使用 1 克树脂即可全部吸附。振荡时间 5—30 分钟均可,溶液体积 4—10 毫升。在实际操作中,选取的振荡时间为 10 分钟,溶液体积为 8 毫升。

十、标准溶液的测定

应用本法测定庆丰霉素标准溶液,与实际的含量

表9 测定数与实际含量的比较

实际含量(微克)	测出量(微克)
0	5
100	103
200	195
300	310
400	390
500	495
600	610

比较,基本上是一致的,见表9。

十一、回收测定

以未经接种的固体培养基作为空白样品,于50倍水的浸泡稀释液中,分别加进定量的春雷霉素,用本法中的“抵消法”进行回收测定,结果见表10。测定表明情况良好。

表10 “抵消法”回收测定结果

加入量(微克)	测出量(微克)
400	414
320	340
240	258
160	187
80	90
220	206

十二、发酵样品的光电比色和生物测定比较

实际发酵样品含量用本法测定,亦获较好结果,与生物法测定结果比较,见表11。光电比色法测定结果稍低于生物法。

表11 光电比色法与生物法测定结果比较

浸泡液样号	本法结果 (单位/毫升)	生物法测定 (单位/毫升)
1	1,754	2,100
2	1,719	1,900
3	3,135	3,000

注:生物法测定结果系上海植物生理研究所农用抗菌素组供给。

结 论

1. 在Malaprade反应的基础上,借高碘酸的作用,以春雷霉素纯品为相对标准,进行庆丰霉素效价的光电比色化学法测定,已获成功。与生物法测定结果基本一致。

2. 只要严格地掌握了测定条件,如:预处理、遮光、作用的时间与体积、碱性环境、“抵消法”等,则测定效果良好,可靠性及重复性均佳。

3. 因不需要无菌操作和保温培养等条件,故和生物测定法比较,不仅成本低,且简易、快速。

4. 使用本法测定,有一架光电比色计就能满足要求,所以又是比较容易采用和推广的。

5. 这个方法同样地也可以作为春雷霉素效价的光电比色化学测定法使用。

参 考 资 料

- [1] 上海植物生理研究所:新农用抗菌素—庆丰霉素的研究总结资料,上海科学技术情报研究所,1973年。
- [2] 上海植物生理研究所农用抗菌素组:春雷霉素的土法生产和应用,1页,上海人民出版社,1972年。
- [3] I. M. Kolthoff & R. Belcher (梁树权译):容量分析,3,436—458页,科学出版社1972年。
- [4] 上海植物生理研究所农用抗菌素组:春雷霉素的土法生产及其应用,18—20页,上海人民出版社,1972年。