

井冈霉素效价测定的两种方法

上海市农药研究所

井冈霉素经离子交换层析分离可得到 I、II、III、IV 四个组份,经理化鉴定,其中 II、III 两个组份分别为 Validamycin A、B。目前主要采用稀释法和比色法测定井冈霉素的效价。现分述如下。

井冈霉素效价稀释测定法

一、材料准备

(一) 指示菌

水稻纹枯病菌 (*Pellicularia sasakii*)

(二) 培养基的种类及成份

1. 土豆蔗糖培养基 (简称 PDA): 20% 土豆煮沸 30 分钟后的提取液,蔗糖 20 克,琼脂 15—20 克,水加至 1,000 毫升,自然 pH, 1.2 公斤/厘米² 灭菌 30 分钟。

2. 丕氏培养基 (%): 酵母膏 1, 蔗糖 3, 天冬素 0.2, 磷酸二氢钾 0.1, 硝酸铵 0.3, 硫酸镁 0.1, 琼脂 1.5—2.0, 水 100, pH7, 0.8 公斤/厘米² 灭菌 30 分钟。

3. 琼脂培养基: 琼脂 1.2—2.0, 1.2 公斤/厘米² 灭菌 30 分钟。

(三) 配制

1. 标准品配制: 精确称取井冈霉素 A 15 毫克于 50 毫升容量瓶中,用灭菌蒸馏水稀释至刻度,即为 300ppm 井冈霉素水溶液,此液可保存 1 个月。

2. 指示菌的培养: 在内径 85 毫米的培养皿内倒 20 毫升丕氏培养基,挑取在 PDA 斜面上生长 7 天的纹枯病菌块置于培养皿中央。28℃ 培养 48 小时,纹枯病菌菌丝扩展至 70 毫米以上时,用灭过菌的打孔器 (内径 5 毫米) 在离培养皿中央较远处取菌块备用。

二、测定方法

(一) 样品效价测定

吸取 1 毫升稀释样品 (或标准品), 及 9 毫升熔化的 1.2—2.0% 琼脂培养基于内径 85 毫米的培养皿中,充分混匀,冷凝后将直径 6 毫米的塑料垫片置于培养皿中央,将上述直径 5 毫米的纹枯病菌块放在塑料垫片上,28℃ 培养 40—48 小时,观察结果。

(二) 样品效价计算

井冈霉素发酵液的效价可用稀释单位和重量单位表示。稀释单位: 使纹枯病菌产生不正常分枝,生长受到抑制的最大稀释倍数。重量单位: 由于纯样品使纹枯病菌产生不正常分枝的最低浓度为 0.01ppm, 因此重量单位即为稀释单位乘以 0.01。

在正常情况下,含 0.01ppm 标准品的培养皿中,纹枯病菌菌丝可长到培养皿边缘 (平皿内径为 85 毫米),并产生不正常分枝 (即菌丝顶端分叉多)。0.02ppm 也能使菌丝产生不正常分枝,但是菌丝长不到培养皿边缘。被测样品在培养皿中抑制纹枯病菌菌丝生长情

况,相当于标准品 0.01ppm 时,此时样品稀释倍数乘以 0.01 即为样品的效价。

三、各种因素对测定效价的影响

(一) 琼脂

选用各地生产的四种琼脂做对比试验,结果不同牌号及相同牌号不同批次的琼脂对测定都有不同程度的影响,因此,测定之所用琼脂,必须用标准作对照,即井冈霉素A 使纹枯病菌产生不正常分枝的最低浓度为0.01ppm 时方可使用。

(二) 培养基

丕氏培养基厚度对效价测定影响不大,一般采用 20 毫升为宜。由于丕氏培养基某些原料不易获得,经试验用 PDA 加入 0.5% 的酵母膏可以代用。试验结果见表 1。

表 1 PDA 培养基代替丕氏培养基对测定的影响

标准品浓度 (ppm)	培养基	菌丝伸长情况(毫米)
0.01	丕氏 PDA	85
		85
0.02	丕氏 PDA	70
		78
0.03	丕氏 PDA	63
		50

(三) 塑料垫片

不放塑料垫片,对测定效价有显著影响。从表 2 中可看出:不放垫片提高了标准品对纹枯菌的最低抑制浓度。因此,在测定时必须使纹枯菌和含有井冈霉素的培养基用塑料垫片隔开。

表 2 塑料垫片对测定效价的影响

标准品浓度(ppm)	塑料垫片	皿内菌丝伸长情况(毫米)
0.01	放	85
	不放	85
0.02	放	75
	不放	85
0.03	放	62
	不放	80

此外,测定用的纹枯病菌以新鲜菌核最好,制备菌核的 PDA 培养基以“红旗”牌琼脂最好。

井冈霉素比色测定法

井冈霉素有效组份的分子中都含有葡萄糖,可以采用离子交换树脂分离后测葡萄糖的方法进行测定。

苯酚比色法,是用浓硫酸使井冈霉素中的葡萄糖分子脱水生成羟甲基糠醛,它与苯酚缩合成红色化合物,比色测定其颜色深浅即能定量反映出井冈霉素的浓度。

一、材料的准备

(一) 2.5% 苯酚溶液

在 100 毫升容量瓶中加入 10 毫升丙酮,然后吸入 2.5 毫升苯酚,再用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,置于棕色瓶中备用。

(二) 1×7(732) 阳离子交换树脂的处理

新鲜树脂用 2N 盐酸浸泡 4 小时,用蒸馏水洗至 pH5—6,再用 2N 氢氧化钠浸泡 2 小时,不断搅拌,然后用蒸馏水洗至 pH7—8,再用 2N 盐酸浸泡 2 小时,并不断搅拌,再用蒸馏水洗至 pH6—7。处理好的树脂,其交换容量为每毫升树脂可中和 0.01N 氢氧化钠 7 毫升以上时方可使用。

二、操作方法

(一) 标准曲线的绘制

准确称取井冈霉素纯品 50 毫克于 50 毫升容量瓶中,用蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀。再从该容量瓶中吸取 10 毫升溶液于 50 毫升容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,即得 200 微克/毫升标准液。

吸取 2、1.5、1、0.5 毫升标准液分别装入 4 支 25 毫升试管中,然后再依次吸入 0、0.5、1、1.5 毫升蒸馏水,配制成每毫升含 200、150、100、50 微克四种不同浓度的标准液。另取一支试管吸入 2 毫升蒸馏水作对照。然后在每支试管中分别加入 0.5 毫升 2.5% 苯酚液,于冷水浴中冷却。冷却时分别加入 5 毫升浓硫酸,快速摇匀,立即放入沸水浴中煮沸 3 分钟,再移入冷水浴中冷却,10 分钟后,用 72 型分光光度计在 560 毫微米波长处进行比色。以井冈霉素标准品浓度为横座标,光密度为纵座标,连结测出各点,绘出通过原点的直线,即为标准曲线。

(二) 样品测定

在 25 毫升滴定管中装入 10 毫升已处理好的 1×7 阳离子交换树脂,吸取 1 毫升发酵液用 15 毫升蒸馏水稀释后加入滴定管中,控制流出速度,使稀释液在 30—45 分钟内滴完。加入 250 毫升蒸馏水,洗去发酵液中残留糖分。然后用 1N 盐酸洗出井冈霉素,流出液用 50 毫升容量瓶收集至刻度,摇匀后吸取 2 毫升于 25 毫升试管中,再加入 0.5 毫升 2.5% 苯酚溶液。

按制标准曲线的条件进行显色,比色,测出光密度。

(三) 计算方法

被测样品浓度 = 光密度值相同的井冈霉素标准品浓度 × 稀释倍数。