

抗生素 LY-92 的分光光度测定法

顾觉奋 孔爱英¹

(中国药科大学抗生素研究室,南京 210009;

¹ 中国人民解放军总后勤部药品检定所,北京 100071)

摘要 根据抗生素 LY-92 与显色剂反应呈色,建立了用分光光度法测定其化学效价的方法。以碱性苦味酸钠盐溶液为络合剂与抗生素 LY-92 形成黄色的络合物。紫外光谱证明其在 377 nm 处有最大吸收,测定其吸收度,用标准曲线法计算 LY-92 的浓度。本法简便,测定速度快,产物在 5~120 min 稳定,灵敏度高(表观吸收系数: $\epsilon_{377} = 1.75 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$)。线性范围 0~37.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。用该法测定抗生素 LY-92 的发酵菌丝体原液、洗脱液、吸附液、粗品、精品等样品的化学效价,适合生产过程中的质量控制。

关键词 抗生素 LY-92; 苦味酸钠; 效价; 紫外分光光度法

抗生素 LY-92 是由金黄色链霉菌产生的,属大环多内酯类抗生素。是类似于四活菌素的化合物。其传统的效价测定法是微生物二剂量法,此法花费时间长,且操作手工化。我们参考了大量关于四活菌素的理化特性^[1~3],研究了一种速度快、灵敏度高的化学分析法。用碱性苦味酸钠为络合剂与抗生素 LY-92 形成稳定的络合物,呈现淡黄色,于 377 nm 处用分光光度法测定 LY-92 含量,浓度在 0~37.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内呈线性关系($r = 0.9998$)。本法专属性好,很多无机干扰离子如 Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ 在 20 μg 内对测定结果无显著影响,操作简单,适宜生产单位推广使用。由于适于发酵菌丝体原液、吸附液、粗品等各种样品的测定,故适合于对生产过程中的中间体各个环节的质量控制。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂);苦味酸(AR, 广东台山化工厂);二氯甲烷(AR, 宜兴市化学试剂厂);无水硫酸钠及

其它试剂(南京化学试剂厂);抗生素 LY-92 (自制)。旋转薄膜蒸发仪(中国药科大学玻璃房)。

1.2 方法

1.2.1 试剂配制

400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准抗生素 LY-92 溶液 精密称取干燥的 LY-92 固体 0.0200 g, 置于 50 ml 容量瓶中, CH_2Cl_2 试剂定容至刻度。

234 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的苦味酸钠溶液 精密称取苦味酸干燥固体 0.0214 g, 用 50 ml 蒸馏水溶解, 再用 0.2 mol/L NaOH 液滴定至中性, 添加 NaOH 0.4 g, 转移至 100 ml 容量瓶中, 定容到刻度, 得 0.1 mol/L 碱性苦味酸钠。

415 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的苦味酸钠溶液 精密称取苦味酸 0.1985 g, 以后步骤同前, 最后添加 NaOH 2 g, 定容于 500 ml 容量瓶中。

1.2.2 样品处理及测定方法 将不同样品溶液置于梨形瓶中, 水浴温度控制在 50°C 以下, 用旋转薄膜蒸发仪将溶剂蒸干, 然后, 以 CH_2Cl_2 溶解样品, 转移至容量瓶中定容。取适

收稿日期 1995-04-04

量加入装有 5 ml 碱性苦味酸钠的刻度管内, 以 CH_2Cl_2 定容至 15 ml, 密塞后剧烈振荡 1 min, 静置 1 min, 取下层有机相, 无水硫酸钠脱水, 过滤, 10 min 后, 在 721 型分光光度计于 377 nm 处测定吸收度 A_{377} 值。

2 实验结果

2.1 最佳实验条件的选择

2.2.1 最大吸收波长的确定 按测定方法在 721 型分光光度计上分别测定抗生素 LY-92、苦味酸钠及两者的络合物的二氯甲烷溶液在 350~460 nm 之间的吸收度, 绘出其吸收光谱图(图 1)。

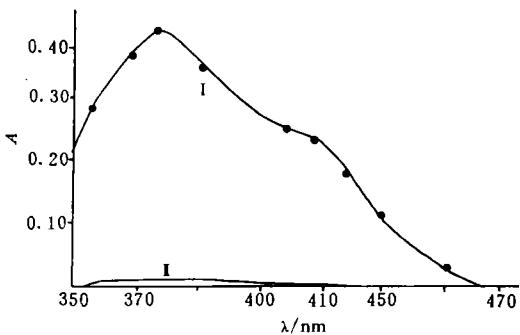


Fig 1. Absorption curve
I. Antibiotic LY-92-sodium picrate complex; II. Blank reagent

由图可见, 空白对照液的吸收光谱近似一条直线, 且吸收度很小。

苦味酸钠-抗生素 LY-92 的络合物在 377 nm 处有最大吸收峰, 且波峰很明显, 从而确立对抗生素 LY-92 进行化学定量测定是可行的。

2.1.2 苦味酸钠与抗生素 LY-92 最佳配比的选择 精密吸取苦味酸钠溶液(浓度为 234 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 0.1, 0.2, 0.3, 0.5……6.0, 7.0 ml, 加入到刻度管内, 定量加入 1 ml 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗生素 LY-92 液, 下层二氯甲烷加至 10 ml 定容, 旋塞振荡, 静置分层, 取下层干燥测吸收值 A_{377} , 结果见表 1。

由表 1 可知, 用连续摩尔比法测定最佳配比, 加入苦味酸钠从 0.1~1.0 ml, 吸收值 A_{377} 呈线性增加, 1.0~5.0 ml 时 A_{377} 缓慢增

Tab 1. Optimum proportion between sodium picrate and antibiotic LY-92(1 ml)

No.	Volume of sodium picrate, ml	A ₃₇₇			
		1	2	3	A
1	0.1	0.170	0.170	0.171	0.170
2	0.2	0.221	0.220	0.221	0.221
3	0.4	0.230	0.231	0.230	0.230
4	0.5	0.321	0.320	0.320	0.320
5	0.6	0.360	0.361	0.360	0.360
6	0.8	0.439	0.400	0.400	0.400
7	1.0	0.440	0.441	0.440	0.440
8	2.0	0.489	0.490	0.491	0.490
9	3.0	0.499	0.499	0.499	0.499
10	5.0	0.509	0.509	0.509	0.509
11	6.0	0.509	0.509	0.509	0.509
12	7.0	0.509	0.509	0.509	0.509

加, 大于 5 ml 则其吸收值保持不变, 达到一个平台期。可见, 加入 5 ml 的苦味酸钠溶液, 能使抗生素完全络合。

2.1.3 稳定性实验 抗生素 LY-92 与苦味酸钠络合后的络合物存在于有机相 CH_2Cl_2 中, 由于碱性溶液下的苦味酸钠与抗生素 LY-92 生成一个多元螯合物, 结构稳定, 且保持时间长, 在测定时, 由于二氯甲烷极易挥发, 故要在比色池上加盖。从图 2 可见络合物在 120 min 内 A_{377} 很稳定。

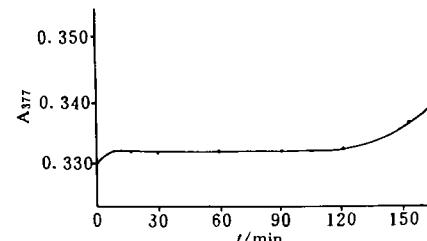


Fig 2. Stable time of colour

2.2 工作曲线的绘制

2.2.1 标准曲线的绘制 分别精吸 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ml 浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗生素 LY-92 标准溶液, 放入加有 415 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的苦味酸钠 5 ml 的刻度管中, 用 CH_2Cl_2 定容至 15 ml, 按上述测定方法测定 A_{377} , 以吸收度为纵坐标, 浓度(C)为横坐标, 作标准曲线, 结果见表 2。回归直线方程 $Y = 0.02023C + 6.5 \times 10^{-3}$, $r = 0.9998$ ($n = 8$)。

Tab 2. Preparation of standard curve

No.	Volume of sodium picrate, ml	Conc. of LY-92, $\mu\text{g}/\text{ml}$	A_{377}
1	5	4	0.158
2	5	8	0.177
3	5	12	0.255
4	5	16	0.332
5	5	20	0.417
6	5	24	0.488

2.2.2 线性范围的确定 线性范围的确定
见表 3。

Tab 3. Determination of linear range

No.	Volume of sodium picrate, ml	Conc. of LY-92, $\mu\text{g}/\text{ml}$	A_{377}
1	5	0.00	0.005
2	5	7.52	0.195
3	5	15.04	0.330
4	5	22.56	0.468
5	5	30.08	0.598
6	5	37.60	0.720

回归线性方程: $Y = 0.01789C + 0.0515$,
 $r = 0.9994$ ($n = 4$)。其中 C 为 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Y 为吸收度。

通过吸收值的测定, 37.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准品 1.2 ml, 其 A_{377} 大于 0.8, 给测量结果带来一定误差, 故线性范围在 0~37.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 在此范围内测定样品, 满足线性关系, 代入方程, 可求出化学效价。

2.3 样品的测定

2.3.1 样品测定前处理 将发酵菌丝体原液、吸附废液、洗脱液等各种样品溶液置于梨形瓶中, 水浴温度 50°C 以下, 在真空条件下, 用旋转薄膜蒸发仪蒸干, 待用。

2.3.2 测定 操作步骤按测定方法进行。

H-103 大孔吸附树脂吸附废液的含量测定 由图 3 中可见, 前两管的含量近似 0, 从第 3 管开始含量才逐渐增大。非极性大孔吸

附树脂能吸附非极性抗生素 LY-92 始漏点出现得较迟, 说明吸附能力是很理想的。

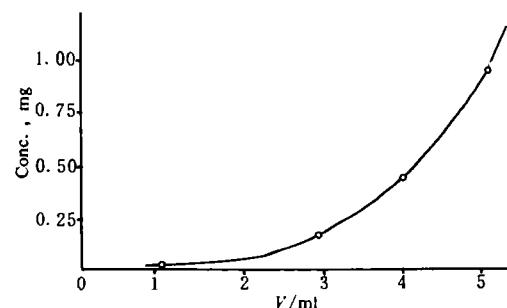


Fig 3. Curve of adsorption

解吸液的含量测定 选用丙酮进行解析, 从图 4 可知, 解吸液峰形集中, 效果较佳, 未见拖尾现象, 解吸率达到 82.3%。

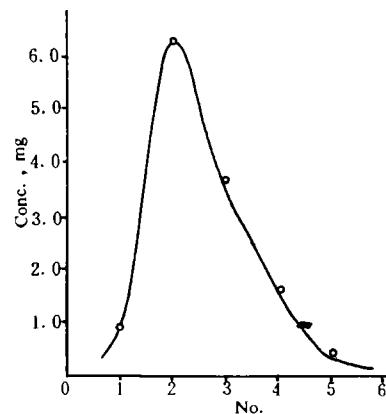


Fig 4. Curve of desorption

抗生素粗品和精品效价测定 精称干燥粗品 0.0096 g, 10 ml 容量瓶中以 CH_2Cl_2 定容。精称干燥精品 0.0130 g 于 25 ml 容量瓶中, 以 CH_2Cl_2 定容, 以下步骤按标准曲线项进行, 数据见表 4。

Tab 4. Determination of samples

Sample	Volume of Sodium picrate, ml	Volume of sample, ml	A_{377}	\bar{A}	Potency ^a , $\mu\text{g}/\text{mg}$
A	5	0.5	0.471 0.470 0.470	0.470	485.0
B	5	0.2	0.198 0.197 0.198	0.198	910.2

^aChemical potency

计算结果表明,从原发酵液得到的粗品(A)的效价还很低(485.6 u/mg),但从半成品经过H-103吸附树脂的吸附,洗脱,浓缩得到的粗品(B),其效价相当高(910.2 u/mg),与标准品相接近。

2.4 回收率的测定

采用标准添加法测定回收率,分别在样品中添加80、160 μg的标准样品液,按工作曲线项下进行测定,计算回收率,结果见表5。

Tab 5. Recovery tests of the samples

Sample	Added, μg	Found, μg	Recovery, %	R, %	RSD, %
1	80	77.12	96.40	97.63	1.3
	80	79.09	98.86		
	80	78.10	97.63		
2	160	160.66	100.41	99.68	0.8
	160	159.64	99.78		
	160	158.14	98.84		

测得的回收率在97.0%~100.0%,且相对标准偏差小,表明本方法的本底干扰小,结果可靠。

3 讨论

3.1 络合原理的推测

大环多内酯类抗生素如单活菌素、二活菌素、三活菌素、四活菌素,它们与碱金属离子能形成络合物,X-Ray的结构分析已得到证明^[4]。

抗生素LY-92属大环多内酯类抗生素,它是由四个相同的内酯结构组成的非极性化合物,在与苦味酸钠络合以前,空间结构比较平坦^[5];络合之后,立体结构发生明显变化,将Na⁺包围在其中,抗生素LY-92中的内酯8个氧与苦味酸钠络合,形成稳定的多元螯合物,螯合物以离子对形式被萃取到有机相中^[6]。通过有机相中螯合物的吸收值的测定,从而确立A₃₇₇与抗生素LY-92浓度的线性关系。

3.2 抗生素LY-92与碱性苦味酸钠络合

这是通过络合物晶体结构的X-Ray研

究证实的^[5],在络合反应中,氢氧化钠加速络合反应达到平衡,且抑制苦味酸的形成,苦味酸在377 nm处有吸收,如果在酸性或中性条件下,测定的吸收值除有络合物的吸收外,还包括苦味酸的吸收,其结果将不能正确反应A₃₇₇与抗生素浓度间的线性关系,故选择强碱性条件是十分重要的。

3.3 脱水剂的选择

苦味酸钠与抗生素LY-92络合产物存在于有机相中,如不脱水直接测A₃₇₇,则很不稳定,且出现混浊现象,影响测定结果。选择无水硫酸钠脱水,不增加干扰离子,使结果测定准确,实验证明加入3%脱水剂即可。

3.4 常见离子对测定结果的影响

自来水中存在许多微量的无机离子,如Fe³⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺等,可见发酵原液中的微量干扰离子对测定不会带来很大影响。在实验条件相同的情况下,分别加入20 μg的无机离子Mg²⁺、Ca²⁺、NH⁺、Zn²⁺测量偏差皆低,在3%~5%之间。所以,这些干扰离子在20 μg范围内对测定结果无大影响。

参考文献

- 1 Suzuki K, Nawata Y, Ando K. Tetranactin, A new miticidal antibiotics- V. Quantitative determination of macrotetrolide antibiotics. *Journal of Antibiotics*, 1971, 24(6):675
- 2 上野芳夫,大村智.微生物药品化学.第2版.东京:南江堂,1986.223~224
- 3 抗菌素生物理化特性编写组.抗生素生物理化特性 I.北京:人民卫生出版社,1981.298~299
- 4 Ando K, Morikami Y, Nawata Y. Tetranactin, A new miticidal antibiotic I. A Structure of Tetranactin. *Journal of Antibiotics*, 1971, 24(7):418
- 5 Iitaka Y, Sakamaki T, Nawata Y. The molecular structures of tetranactin and its alkali metal ion complexes. *Chemistry Letters*, 1972.1225
- 6 慈云祥,周天泽.分析化学中的配位化合物.北京:北京大学出版社,1986.135~162
- 7 Ando K, Oish H, Hirano S. Tetranactin, A new miticidal antibiotic I: Isolation, characterization and properties of Tetranactin. *Journal of Antibiotics*, 1971, 24(6):347
- 8 安登魁,张正行,盛龙生.药物分析.山东:济南出版社,1992.66~70

A Novel Chemical Potency Study on Antibiotic LY-92

Gu Juefen, Kong Aiying

Division of Antibiotics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract A novel chemical analysis method for determination of Antibiotic LY-92 potency was investigated by colorimetric analysis. The assay is based on the complex formation of the antibiotic with sodium picrate, followed by extraction of the complexes in an organic solvent. The complex compound had maximum absorption length at 377 nm. This reaction had stability colour; high sensitivity; ($\epsilon_{377} = 1.75 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$); wide linearity range of $0 \sim 37.6 \mu\text{g/ml}$ ($r = 0.9998$). A new colorimetric method was designed and the operating conditions of this analysis were established. The results obtained from further experiments showed that this method is also very easy and fast to be widely used for all kinds of samples.

Key words Antibiotic LY-92; Sodium picrate; Stability test; Potency; Ultraviolet spectrophotometry

应用酶工程技术生产 L-苯丙氨酸

由吴梧桐教授主持的国家科委“八五”攻关项目研究组应用基因工程技术构建高效表达芳香族氨基酸转氨酶的 CTB2 工程菌,再经固定化,用于从 L-苯丙酮酸转化生产 L-苯丙氨酸工程菌发酵收率>2.5%,菌体酶活力>2000 U/g·h⁻¹,底物转化率 90%,固定化细胞使用半衰期>40 d,产品纯度>98.5%,其他质量指标均符合药品标准,并已取得药品生产批准文号。本工艺技术水平与国际上报道的同类工艺研究水平相当,填补了我国应用固定化基因工程菌生产氨基酸的空白。

本研究还通过筛选获得 L-苯丙氨酸氨解酶的高产菌株 *R. rubra* CPU 9011,菌体发酵收率>3.0%,菌体酶活力 1080 U/g·h⁻¹,固定化细胞酶活力>580 U/g·h⁻¹,底物转化率 65.10%,固定化细胞使用半衰期 21 天,产品纯度>98.5%,质量符合药品标准。

本项目于 1996 年 2 月通过国家医药管理局组织的科技成果鉴定。