

# 发酵液中丁二酸的分析

林应锐\*

(中国科学院微生物研究所, 北京)

分析与其它二元酸混杂着的丁二酸时, 多用气相色谱法<sup>[1]</sup>。但该法必须先除去其它杂质, 然后经过定量酯化才能进行分析, 操作颇繁杂。近年采用液体色谱法<sup>[2]</sup>, 较为方便。但该法所需仪器日前尚未普及。我们在工作中设计了不必先分离掉反丁烯二酸,  $\alpha$ -酮戊二酸和苹果酸等杂质, 直接分析发酵液中丁二酸的方法, 较为简捷, 可用于处理大量样品的常规分析, 准确性在 90% 以上。

## 一、原理

在酸性高锰酸钾的沸腾溶液中, 丁二酸不受氧化, 而反丁烯二酸和苹果酸则被氧化掉<sup>[3]</sup>,  $\alpha$ -酮戊二酸可以定量地被氧化为丁二酸<sup>[4]</sup>。如此, 可于酸性条件下加入高锰酸钾至发酵液中一起煮沸进行氧化, 使之只留下丁二酸, 再将反应液调至中性, 加入硝酸银, 过滤除去丁二酸银沉淀, 再用氯化钠回滴过量的银盐, 由此得出丁二酸总量<sup>[3,5,6]</sup>, 然后减去由比色法测定之发酵液中  $\alpha$ -酮戊二酸含量<sup>[7]</sup>, 即能获得原来发酵液中丁二酸的真正含量。

## 二、操作方法

将 20 毫升 10% 硫酸溶液加至 20 毫升含上述有机酸钙盐沉淀的发酵液样品中, 搅拌数分钟后, 过滤, 用 25 毫升量筒收集 20 毫升滤液。将滤液转至 50 毫升三角瓶中, 用少量水洗量筒, 洗液合并至三角瓶中, 小心加入高锰酸钾粉末, 待反应缓和之后, 在加热条件下继续加入

高锰酸钾, 至煮沸条件下出现极少棕色沉淀且在 2—3 分钟内不消失为止。煮沸浓缩至体积为 10 毫升左右。冷却后, 滴加 30% 氢氧化钠至碱性 (用酚酞指示剂或 pH 试纸测定)。将样品转移至量筒内, 用少量水洗三角瓶, 洗液合并并在量筒内, 定容至 20 毫升。过滤除去氢氧化物沉淀, 在另一 25 毫升量筒里收集 10 毫升滤液, 加入一滴 0.1N 硝酸溶液使酚酞褪色 (pH6—7)。滤液移至三角瓶中, 再用盛此滤液的量筒量取 20 毫升 0.2N 硝酸银溶液加入三角瓶中, 随后用 20 毫升水洗涤量筒, 洗液并入三角瓶中, 振荡均匀, 静置片刻, 过滤除去银盐沉淀, 用量筒收集 25 毫升滤液倒至三角瓶中, 再用少量水洗量筒, 洗液合并并在三角瓶里, 加入 4—6 滴 2% 重铬酸钾溶液, 用标准的 0.1N 氯化钠溶液滴定至红棕色褪去呈淡黄色为止。

## 三、结果计算

按以下公式计算丁二酸含量:

丁二酸(毫克/毫升) =  $(A - V) 59.1N / S - 0.8Ca$

A: 滴定 10 毫升硝酸银溶液所用去之氯化钠溶液毫升数;

V: 滴定样品所用去之氯化钠溶液毫升数;

N: 氯化钠溶液的实际当量浓度;

S: 最终用于滴定时所用原发酵液样品毫升数(2.5 毫升);

\* 田静同志提供  $\alpha$ -酮戊二酸比色分析结果。

$\alpha$ : 用比色法测得的  $\alpha$ -酮戊二酸浓度 (毫克/毫升);

59.1 是丁二酸的当量; 0.8 是丁二酸分子量和  $\alpha$ -酮戊二酸分子量之比, 即后者变成前者的变换因数。

#### 四、方法的准确性

为了证明此方法的可靠性, 用标准丁二酸和其它三种酸配制溶液进行分析, 所得结果见表 1。

表 1 标准样品分析结果

标准样品组成 (毫升)		A	B	C	D
	丁二酸	10	0	10	10
	$\alpha$ -酮戊二酸	0	10	10	10
	反丁烯二酸(40 毫克/毫升)	0	0	0	10
	苹果酸(16 毫克/毫升)	0	0	0	10
	蒸馏水	50	30	20	0
分析结果(毫克/毫升)		25.8	6.7	34.6	35.0
		25.3	6.6	34.3	34.8
			6.7		34.0
平均值		25.6	6.7	34.5	34.6

由表 1 可见, 分析结果表明, 在杂酸存在下(即样品 C 和 D)的相对误差都小于 10% (C

$-(A+B)/(A+B) = 6.8\%$ ;  $D-(A+B)/(A+B) = 7.1\%$ )。三种杂酸的总浓度为  $10 + 6.7 + 4 = 20.7$  毫克/毫升, 可高达丁二酸浓度 (25.6 毫克/毫升) 的 80%, 其中反丁烯二酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和苹果酸的浓度可分别相当于丁二酸浓度的 40%、27% 和 16%, 说明上述三种杂酸存在时, 对丁二酸的分析无大影响。

用比色法测定上述  $\alpha$ -酮戊二酸溶液, 其浓度为 8.5 毫克/毫升, 相当于氧化后能生成 6.8 毫克/毫升 (8.5 毫克/毫升  $\times$  0.8) 丁二酸, 这与实测数据 (6.7 毫克/毫升) 的相对误差小于 2%。说明在此条件下,  $\alpha$ -酮戊二酸确实能定量氧化成丁二酸。故可在滴定分析结果中将其扣除。

#### 参 考 文 献

- [1] Rumsey, T. S. and C. H. Noller: *J. Chromat.*, **24**(2): 325—334, 1966.
- [2] Hyakutake, H. and T. Hanai: *J. Chromat.*, **108**(2): 385—390, 1975.
- [3] Lemjakov, N.: *Anal. Chem.*, **26**: 1227—1228, 1954.
- [4] Krebs, H. A.: *Biochem. J.*, **32**: 108—112, 1938.
- [5] Tasman, A. and L. Smith: *Rec. Trav. Chim.*, **67**: 404, 1948.
- [6] Dimotaki-Kourakou, V.: *Ann. Fals.*, **54**: 70, 1961.
- [7] Koepsell, H. J. and E. S. Sharpe: *Arch. Biochem. Biophys.*, **38**: 443, 1952.