

对硝基苯胺比色法测定土霉素

山东省临沂地区农业科学研究所化验室

(山东临沂)

由于土霉素发酵液中含有大量可溶性有机杂质,测定土霉素效价常用的三氯化铁比色法常因干扰而使结果偏高,甚至不能测定。我们试用对硝基苯胺作为显色剂比色测定土霉素,可以提高测定的准确性。

一、原理

土霉素与重氮化对硝基苯胺偶合生成一种染料,使溶液成强黄色,在一定浓度范围内,该黄色的深度与土霉素含量成正比。

二、试剂

1. 0.1N, 1N, 6N 盐酸溶液。
2. 对硝基苯胺溶液: 50 毫克化学纯的对硝基苯胺,溶于 25 毫升 1N 盐酸,过滤。
3. 2% 亚硝酸钠溶液。
4. 重氮化对硝基苯胺溶液: 25 毫升对硝基苯胺溶液,加入 1 毫升 2% 亚硝酸钠溶液,溶液颜色由黄色褪成微黄色。需现用现配。
5. 土霉素标准溶液: 若土霉素标准品的纯

度为 842 微克/毫克,可精确称取 29.69 毫克放入 50 毫升容量瓶中,加入 2.9 毫升 0.1N 盐酸溶液,溶解后用蒸馏水稀释至刻度,摇匀。此溶液含土霉素 500 微克/毫升,5℃ 下可使用 5 天。

三、测定方法

1. 制作标准曲线

按表 1 所示准备标准系列溶液,在各管中加入 1 毫升重氮化对硝基苯胺溶液,摇匀,放置 20 分钟后比色(用 420 毫微米波长光)。由所得光密度读数绘制标准曲线。

表 1 标准系列溶液的配制

试 管 号	1	2	3	4	5	6
土霉素标准液(毫升)	0	0.2	0.6	1.0	1.4	1.8
蒸馏水(毫升)	10	9.8	9.4	9.0	8.6	8.2
土霉素含量(微克)	0	100	300	500	700	900

2. 固体发酵产品效价的测定

称取样品 2 克,加 0.1N 盐酸溶液 20 毫升,浸泡 4 小时,不时摇荡,然后用滤纸过滤至滤液透明。

取滤液 1 毫升加蒸馏水 9 毫升及重氮化对硝基苯胺溶液 1 毫升,摇匀后放置 20 分钟比色。用蒸馏水代替重氮化对硝基苯胺作对照。由比色数据,根据标准曲线计算样品效价。

3. 液体样品的测定

用 6N 盐酸溶液酸化至 pH1.5—1.7 后,放置半小时,过滤,取清液按前法比色。

四、讨论

1. 化学方法与生物测定法结果的比较

用两种效价不同的样品测定,化学法测定结果为 1430 微克/毫升和 2600 微克/毫升,而

用生物测定法测定结果为 446 微克/毫升和 265 微克/毫升。二者绝对值相差很大,但具有一定相关性。因此化学测定法结果有一定参考价值,特别是对于生产过程控制,因其方法简便而有一定优越性。

2. 三氯化铁比色法与对硝基苯胺比色法的比较

用加入三氯化铁后有轻微混浊的和不混浊的两个样品,用两种方法比色测定,结果见表 2。由此结果可见,加三氯化铁后不混浊的样品,用两种方法测定的结果很接近;若发生混浊的,结果便偏高。用对硝基苯胺法显色的溶液显色后不发生混浊,结果应较准确。

表 2 两种比色方法的比较

效 价 (微克/毫升) 方法	样品	混浊样品	不混浊样品
三氯化铁法		3900	2250
对硝基苯胺法		3300	2210

3. 显色时间与显色深度的关系

用对硝基苯胺法比色测定时,显色深度随显色时间延长而增加,因此应严格控制显色时间,每管显色时间应当一致。

4. 显色温度的影响

在不同温度下显色,光密度读数有一定差异,因此最好在 21℃ 恒温水浴中放置。

5. 固体产品的浸提时间

浸泡 4 小时即可将样品中的土霉素完全浸出,不需像文献所说那样需要用 0.1N 盐酸溶液浸泡 24 小时。此外,气温低于 20℃ 时,应在保温箱中浸提,以保证浸提完全。