

毛蚶体内 B₁₂ 的提取和 B₁₂ 中 ⁶⁰Co 的测定*

杨嘉东

(国家海洋局第三海洋研究所)

维生素 B₁₂ (C₆₃H₉₀CoN₁₄O₁₄P) 又名钴胺素, 是一种含钴的有机化合物。在动物的肝脏、肌肉、乳品、蛋黄和某些贝类中含量丰富。许多海洋生物能利用海水中的痕量钴来合成 B₁₂。我国有关水产部门曾对毛蚶体内 B₁₂ 的提取进行过研究, 测得每克毛蚶鲜肉中含有 B₁₂ 0.65—0.85 微克^[1]。⁶⁰Co 是海洋放射性污染物中重要的放射性同位素之一, 毛蚶又是我国北方天然的野生贝类, 经测定, 毛蚶可吃部分对 ⁶⁰Co 的浓集系数为 2.4×10^2 左右^[2]。在研究毛蚶对 ⁶⁰Co 浓集能力的过程中, 对毛蚶体内 B₁₂ 的提取及 B₁₂ 中 ⁶⁰Co 的放射性强度也作了测定。

一、实验部分

1. 实验材料

毛蚶 (*Arca Subcrenata* Lischke), 取自天津的野生种。

扁藻 (*Platymonas* sp.), 自行繁殖。

2. 试剂及其配制

⁶⁰Co 放射性纯度大于 99.9%, 放射性强度为 10 微居里/毫升¹⁾; 称取 B₁₂ (系晶体, 其含量为 97.54%) 25.6 毫克, 溶于 25 毫升容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度 (即为 1000 微克 B₁₂/毫升的贮存液), 测定前稀释 50 倍作为 B₁₂ 的标准使用液。

R₁₂₂H⁺ 离子交换树脂装柱后, 用同体积的 50% 酒精洗去油脂, 流速为每分钟 2—3 滴, 通毕, 浸泡 1 小时后用蒸馏水冲洗, 再用 3.5 倍体积的 2N 盐酸以同样的流速通过树脂床, 然后以蒸馏水冲洗至 pH 为 1.5 备用。

用蒸馏水配成含有 9% 丁醇、0.5% 亚硫酸钠、3.4% 氨水的混合液作为解吸剂。其他

试剂如苯甲醇、氰化钠、亚硝酸钠、氯化钠、氢氧化钠、盐酸、氯仿和乙醚等均为分析纯试剂。

3. 主要仪器设备

主要仪器设备有: 72 型分光光度计; 电动搅拌器和恒温水浴锅; 离子交换柱 (15 × 250mm); FH-408 型自动定标器和 FJ-367NaI 闪烁探头。

4. 实验方法

(1) 毛蚶的活性培养²⁾: 从海区取来的毛蚶, 先在室内于盐度为 28% 左右的海水 (18—20°C) 中驯养一个月以上, 使其适应室内的实验环境, 然后按 1 个/2 升的海水密度, 在 ⁶⁰Co 的放射性强度为 5×10^{-8} 居里/升的海水中进行示踪培养, 以扁藻为饵料, 定时投饵, 每周换水一次, 每次在投放 ⁶⁰CoCl₂ 之前先加入稳定同位素 (CoCl₂), 使其浓度为 4ppb, 以减少池壁 (用白瓷砖砌成) 对 ⁶⁰Co 的吸附。待到毛蚶对 ⁶⁰Co 的吸收达到平衡以后 (16 周以上), 再与不加 ⁶⁰CoCl₂ (但同样加入 CoCl₂) 的对照池及放养在自然海区的毛蚶作比较, 测定其体内的 B₁₂ 和 B₁₂ 中 ⁶⁰Co 的放射性强度。

(2) 毛蚶体内 B₁₂ 的提取³⁾, ^[1]: 清洗脱壳。毛蚶外壳分别用 5% 柠檬酸钠溶液和自

* 本文系《⁶⁰Co、¹³⁷Cs 在几种海洋生物中浓集问题的初步研究》的一部分, 是在蔡福龙同志的主持下完成的。

1) ⁶⁰Co 为中国科学院原子能研究所提供的 ⁶⁰CoCl₂ 溶液。

R₁₂₂H⁺ 离子交换树脂, 由福州抗菌素厂提供。

2) 此项工作由浓缩因子测定小组成员轮流观察、投饵和换水。

3) 维生素 B₁₂ 的工艺规程, 1976。福州抗菌素厂。(内部)

来水洗淨、擦干，然后称取 1000 克左右置于 2000 毫升烧杯中，加入沸水 500 毫升（以淹没毛蚶为适度），煮 20 分钟，去其外壳，收集蚶汤和蚶肉。

浸取。把蚶肉用手术剪刀剪碎后放在 1000 毫升烧杯中，加入 300 毫升蒸馏水和 0.5 克亚硝酸钠，调节 pH 至 6.0，在 $85 \pm 2^\circ\text{C}$ 的恒温水浴锅内加热搅拌浸取 1 小时左右，收集其浸取液。蚶肉再用 200 毫升蒸馏水和 0.4 克亚硝酸钠，同法进行第二次浸取。

上柱。合并浸取液和蚶汤，用 1:1 盐酸调节 pH 至 2.5，然后以每分钟 14—18 滴的流速通过 15 厘米高的 R_{122}H^+ 离子交换柱，以富集 B_{12} 。

解吸。用解吸剂以每分钟 10 滴左右的流速通过离子交换柱，直至流出液出现棕色时开始收集，其量共计 40 毫升左右。

氰化。用 1:1 盐酸把解吸液的 pH 调节至 5.0—5.5，加入 0.5 克氰化钠，搅匀后用 20% 氢氧化钠调 pH 至 9.5—10，放置半小时后再加入 12.5 克氯化钠，并调节 pH 至 11—11.5。

萃取。把氰化后的 B_{12} 溶液转入 60 毫升分液漏斗中，以苯甲醇萃取三次（每次 5 毫升），合并萃取液，每次以少量饱和的氯化钠溶液洗涤至中性。

反萃取。加入氯仿 15 毫升，以 pH 为 2.5 的盐酸水溶液反萃取数次（每次 1—2 毫升），直至反萃取液无色为止。合并反萃取液，以乙醚洗去残留的苯甲醇和氯仿，然后调节 pH 至 4—5，稀释至一定体积，以双氰络合物的形式测定其 B_{12} 的含量。

（3）提取液中 B_{12} 和 B_{12} 中 ^{60}Co 的测定¹⁾：双氰络合物标准曲线的绘制。在 10 毫升容量瓶中加入适量的 B_{12} （10—120 微克）标准使用液和 1 毫升 10% 氰化钠溶液，稀释至刻度后摇均匀，然后在 72 型分光光度计上于波长 550nm 处测定其光吸收，再用测得的光密度对 B_{12} 浓度作标准曲线。

样品中 B_{12} 的测定。移取一定量的提取液，按上述方法测定光密度，在标准曲线上查

出其相应的 B_{12} 含量，然后再计算其总含量。

B_{12} 中 ^{60}Co 强度的测定。把上述 B_{12} 的样品溶液（反萃取液）全部转移到特制的有机玻璃测量杯中，用蒸馏水稀释至 120 毫升后进行 γ -射线的计数测量，并用 ^{60}Co 的标准溶液作相对效率的校正。

二、结果与讨论

把对 ^{60}Co 吸收达到平衡的实验池的毛蚶，同不加 ^{60}Co （但同样按 4ppb 的浓度加入稳定同位素）培养的对照池的毛蚶和放养在自然海区的毛蚶，按上述操作程序来提取和测定毛蚶体内 B_{12} 的含量和 B_{12} 中 ^{60}Co 的放射性强度，测定结果如表。

由表中数据可以看出，在同样室内环境条件下培养的毛蚶，加入 $^{60}\text{CoCl}_2$ 的实验池内，其体内 B_{12} 的含量为 0.281—0.307 微克 B_{12} /克鲜肉重；没有加入 $^{60}\text{CoCl}_2$ 的对照池内，其 B_{12} 的含量只有 0.142 微克 B_{12} /克鲜肉重，也就是说实验池毛蚶体内的 B_{12} 含量比对照池毛蚶体内的 B_{12} 含量高 1 倍以上。这说明加入 $^{60}\text{CoCl}_2$ 的实验池毛蚶对 B_{12} 的合成能力比没有加入 $^{60}\text{CoCl}_2$ 的对照池的毛蚶大，这种合成能力的提高，可能是酶促进作用的结果。对于研究海洋环境中人工放射性同位素的生物学和生化效应问题，慢性的、低剂量的连续照射是最有实际意义的。但目前在这方面的研究还十分有限。

农业科学的研究结果已证明，小剂量 ^{60}Co 的 γ 射线的长期照射，不但不会抑制生物的发育，反而能促进生物的生长，提高作物单位面积的产量。例如，苏联科学家曾应用小量放射性物质（ 10^{-6} — 10^{-11} 居里/公斤土壤）作为肥料对许多农作物进行实验，结果发现，在西红柿的培植试验中，加入放射性磷，能使产量提高 25—38%；在施放放射性肥料的甜菜地里，甜菜的含糖量增加 0.2—1.5%，产量提高 10—18%；用 ^{60}Co 的 γ 射线连续照射生长在地

1) 抗菌素工业分析，化学工业部上海医药工业研究所编著，第 279 页。

毛蚶体内B₁₂的含量和B₁₂中⁶⁰Co的放射性强度表

测定结果 测定项目	样品来源	实验池	实验池	对照池	自然海区
		(1)	(2)		
毛重(克)		1080	1080	866	1000
鲜肉重(克)		463	456	370	485
B ₁₂ 的总含量(微克)		142	128	52.5	116
B ₁₂ 含量(微克B ₁₂ /克鲜肉重)		0.307	0.281	0.142	0.239
⁶⁰ Co强度(微微居里/微克B ₁₂)		55.5	50.7	0	0

里的荞麦,不但可以加速其发育,促其早熟,而且还不同程度地提高了单位面积的产量。我们对毛蚶体内B₁₂的测定结果也发现,放养在自然海区的毛蚶体内B₁₂的含量为0.239微克B₁₂/克鲜肉重,在自然环境中正常生长的毛蚶,其体内B₁₂的含量是室内对照的1.68倍,但仍比加有⁶⁰CoCl₂的实验池低20%左右。这说明,生长在自然海区的毛蚶可以从海水中摄取痕量钴来合成B₁₂,但其合成能力仍比加有⁶⁰CoCl₂的实验池毛蚶低。

B₁₂时,必须加以监测,而对于长时间的、小剂量的γ射线照射所引起的生物学与生化效应问题,有待于今后进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 过绍武、蒋维铮, 1965. 水产学报 2(4): 66.
 [2] 蔡福龙、吴晋平、陈其焕、杨嘉东、李平雨、何进全、林笔水等, 1980. 海洋学报 2(2): 81.

EXTRACTION OF VITAMIN B₁₂ FROM ARCA SUBCRENATA LISCHKE AND EFFECT OF ⁶⁰Co ON B₁₂ CONTENT

Yang Jiadong

(The Third Institute of Oceanography, National Bureau of Oceanography)

Abstract

This paper deals with the extraction procedures of vitamin B₁₂ from Arca Subcrenata Lischke and effect of ⁶⁰Co on B₁₂ content. One group of animals were maintained in a pool of sea water with ⁶⁰CoCl₂ (radioactivity of ⁶⁰Co is 5 × 10⁻⁸Ci/l), another was cultured without ⁶⁰CoCl₂, and those collected from the sea were used as control. The amount of B₁₂ was measured when the biological equilibrium of the uptake of ⁶⁰CoCl₂ was reached. The result shows that the amount of B₁₂ in the animals kept in the pool with ⁶⁰CoCl₂ is 0.294 μg per gram (fresh weight), the second being 0.142 μg, whereas the control being 0.239 μg, which implies that the animals under low level but long term gamma ray irradiation may enhance the synthesis of B₁₂.

由表中数据还可看出,从加有⁶⁰CoCl₂的实验池毛蚶体内提取的B₁₂中,每微克B₁₂含有⁶⁰Co的放射性强度为50.7—55.5微微居里。这就提醒我们在有放射性污染的海区,利用毛蚶加工生产蚶干或从蚶肉和蚶汤中提取