

得 AMP、GMP 和 CMP。

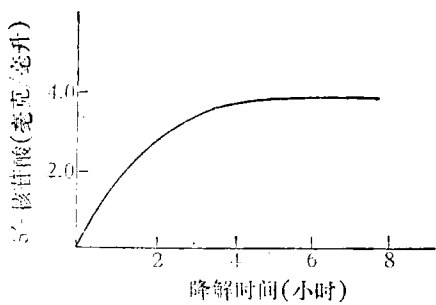


图 4 固定化 5-磷酸二酯酶降解核酸的时间曲线

在整个试验中，来自 145 升发酵液制得的

76.3 公斤湿重固定化酶反复降解 23 批核酸溶液，每批降解时间在 10 小时左右，平均降解率 70.24%，共处理了 203.7 公斤纯核酸，得 AMP、GMP、CMP 的总量为 86.14 公斤，总回收率达 42.27%，核苷酸产品质量符合要求。固定化酶新工艺所得的产品与该厂原工艺的比较如表 2。

按原工艺 145 升发酵液只能降解 1450 升 0.5% 核糖核酸，而这些发酵液经固定化后实际降解核酸为 46,000 升，故发酵液利用率至少提高 30 倍。按此，每天降解 10 公斤核酸的工厂全年只需发酵液 2500 升。

表 2 固定化酶工艺与原工艺降解效果比较

采用工艺	日期	批数	降解 RNA 总量	平均降解率	AMP/RNA	GMP/RNA	CMP/RNA
原工艺	1977 年 9 月	28 批	284.8 公斤	69.26%	11.96%	19.01%	9.41%
原工艺	1977 年 11 月	21 批	185 公斤	70.3 %	13.92%	19.67%	9.71%
固定化酶工艺	1977 年 12 月	23 批	203 公斤	70.2 %	13.98%	18.82%	9.47%

固定化 5-磷酸二酯酶在 4℃ 可保藏一年，活力没有可察觉的改变。故固定化酶可在适当季节短期制备供全年使用，避免了夏季发酵罐易染菌而影响生产的缺点。

固定化酶制备的方法简单，取材容易，从经济上讲是可取的。由于酶在整个产品成本中所占比重不大，故其优越性主要表现在有利于生产调节及产品的产量和质量稳定，以及可以节省一定的劳动力。

1978 年 5 月在全国固定化酶研究及应用学术交流会上通过了此工艺的技术鉴定。目前固定化酶反应器还需进一步改进。

参 考 文 献

[1] 袁中一：《生物科学动态》，1979 年，4 期，1 页。
[2] Mosbach, K.: "Methods in Enzymology vol. 44 Immobilized Enzymes", Academic Press, Inc., New York.
[3] Chang, T. M. S.: "Biomedical Application of Immobilized Enzymes and Proteins", Plenum Press, New York and London, 1977.
[4] 上海生物化学研究所固相酶组：《生物化学与生物物理进展》，1974 年，1 期，57 页。
[5] ———：《生物化学与生物物理学报》，1977 年，9 卷，187 页。
[6] Ogata, K: "The microbial production of nucleic acid-related compounds, Advances in Applied Microbiology", (Perlman, D. ed.), p. 209, 1975.
[7] 上海生物化学研究所固相酶组：《生物化学与生物物理进展》，1977 年，6 期，17 页。

[本文于 1979 年 6 月 26 日收到]

肝 素 的 简 易 化 学 测 定 法

季 钟 煜 蒋 传 葵

(中国科学院上海生物化学研究所)

1962 年 Bitter 曾报道^[1]，糖醛酸(uronic acid)的硼砂硫酸液与咪唑(carbazol)所产生的显色

反应，其效果迅速而稳定，从而改进了著名的 Dische 反应条件，可作为糖醛酸的定量分析法。

至今,此法已广泛用于肝素的测定^[2,3]。1967年 Vachek^[4] 曾采用 298 毫微米光密度法测定肝素含量。

最近,我们在制备肝素琼脂糖时,改进了上述二法,建立了肝素的简易化学测定法,本法能测定 1—160 微克范围的肝素。

测定方法

吸取 0.3 毫升肝素水溶液,加入 3 毫升 90% 硫酸水溶液(或 0.025 M 硼砂的 90% 硫酸水溶液),充分搅匀,置于 90℃ 水浴内,经常搅动,10 分钟取出,冷至室温,半小时后测量 298 毫微米光密度(以水作为对照)。另作空白试验,其中不加肝素,以水代之,加热同上,也测量 298 毫微米光密度(以水作为对照)。两次光密度的差值,即可代表肝素含量。

标准曲线 称取肝素标准品(苏州生化制药厂出品,药理效价为 150—164 单位/毫克,符合国家标准),配成 400 微克/毫升水溶液。然后分别吸取几份不同量的肝素水溶液,按上述测量并绘制标准曲线,见图 1。重复性良好,直线范围很宽,即使光密度高达 1.34 时,仍能表示样品内含 160 微克肝素。

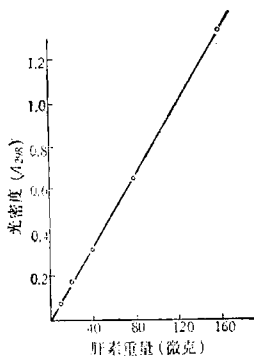


图 1 标准曲线

结果与讨论

硫酸溶液的冷热影响 据文献 Bitter 把硼砂硫酸液用液氮冷却至 -70℃,然后才小心地加入样品溶液^[1]。我们发现,把肝素溶液加到室温硫酸(或硼砂硫酸)中,由于浓硫酸的稀释热,可使试管内温度升高达 50℃,这时 298

毫微米光密度略有增加,我们认为这是肝素受到局部水解所致。我们曾采用冰盐浴冷却硫酸液,即可免除这一步的光密度增值。我们进一步发现室温加样和冰盐浴加样,若都经受 90℃ 水解 10 分钟,最后却得到相同的光密度,见表 1。因此,我们认为本法所加硫酸大为过量,可以省去冷却操作,直接在室温中进行。

表 1 加样时硫酸温度的影响

步骤	A ₂₉₈ 毫微米		
	空白	室温加样	冰盐浴加样
水解前	0.149	0.315	0.150
水解后	0.149	0.825	0.824

表中所列数据系 80 微克肝素在酸水解液中的 298 毫微米光密度

测定时加热时间的影响 当肝素在 90℃ 酸水解时,5 分钟已达完全。再延长加热时间,或室温放置过夜,其 298 毫微米光密度已恒定不变。见图 2。

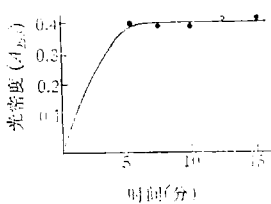


图 2 加热时间对光密度的影响
约 50 微克肝素,其它条件见正文

至于肝素水解液的紫外吸收光谱,如图 3 所示。其最大吸收峰在 300 毫微米附近。

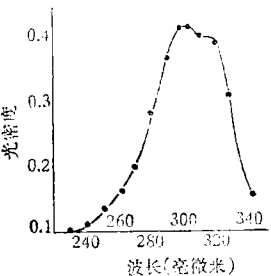


图 3 肝素水解液的紫外吸收光谱
50 微克肝素的硼砂硫酸溶液,图中各点光密度已减去空白读数

硫酸浓度的影响 如果使用 78.5—90%

范围内不同浓度的硫酸溶液来测定,则所得光密度基本相同,见表2。

肝素生物测定与化学测定的比较 如肝素样品纯度高,则二法测定值大致接近,但粗品的化学测定值偏低(见表2,编号6为粗品)。

表2 肝素生物测定与化学测定的比较

样品编号	生物测定 (单位/毫克)	化学测定 (单位/毫克)
1.	104.7	104.5
2.	99.4	103.5
3.	97	110
4.	102	104
5.	101	107
6.	60	28.3

肝素的硫酸溶液(或硼砂硫酸溶液),在90℃经10分钟水解后,直接测量298毫微米光密度的大小,其值与肝素含量成正比。此法方便可靠,能测定肝素百分纯度。

参 考 文 献

[1] Bitter, T. et al.: *Anal. Biochem.*, **4**, 330, 1962.
[2] Sternbach, H.: *European, J. Biochem.*, **60**, 51, 1975.
[3] Sien, V. and Bresciani, F.: *Biochem.*, **18**, 2369, 1979.
[4] Vachek, J.: *Czech. J. Biochem.*, **117**, 897 (cl G 01 n), March 15, 1966, *Appl. Oct.* 31, 1964.

[本文于1980年2月20日收到]

用离子交换树脂法制备药用弹性蛋白酶

吴梧桐 薛奕千* 王耀方**

(南京药学院生物化学教研室)

弹性蛋白酶(Elastase, EC 3.4.4.7)是广泛存于哺乳动物胰脏的一种肽链内切酶。近年来发现它具有降低血清胆固醇,阻止主动脉和冠状动脉斑块形成、降压、扩张血管,增加心肌血流量和提高血中cAMP含量等作用。临床用于治疗高脂血症,防止脂肪肝和动脉粥样硬化,对慢性支气管炎也有一定疗效。

弹性蛋白酶的制备方法较多,常见的有吸附法^[1]、盐析法^[2]、离交法^[3]等,最近还发展了亲和层析法^[4]。我们试用离交法制备药用弹性酶,操作简便,收率和活力都较满意。

一、材料和方法

1. 试剂和材料

弹性蛋白 按 Partridge^[5]的方法稍加修改。新鲜牛韧带去脂肪,捣碎,加5倍丙酮,混和回流45分钟,滤去丙酮,继与适量乙醚搅拌15分钟,除去乙醚的干粉加4倍0.1N氢氧化钠煮沸1小时,冷却后,过滤,水洗至pH近中性,添加适量蒸馏水匀浆,并于(0°—70℃)保温45分

钟,过滤,用丙酮脱水干燥,过200目筛,密封备用。

底物—刚果红弹性蛋白 按文献^[6]的方法制备。

离子交换树脂 Amberlite CG-50 (美国)系丙烯酸型大孔弱酸性阳离子交换树脂,交换容量8毫克当量/克;AIC-84及D-64, 001 × 1.8⁻¹, 001 × 1.8⁻², 001 × 1, 001 × 3 分别为上海师范大学树脂组及无锡树脂厂的试验产品,均系低交联度弱酸性阳离子交换树脂。

各型树脂均按常规方法处理和再生。

2. 酶水解刚果红弹性蛋白的活力测定

文献^[7]的方法略经修改。称取刚果红弹性蛋白20毫克,加入0.2M, pH8.8 硼酸缓冲液3毫升,置37℃水浴平衡后,加入酶浓度(2—3单位)样品2毫升,摇匀后,于37℃水浴中反应20分钟,加入5毫升0.5M, pH6.0 磷酸缓冲液,摇匀后离心15分钟(3000rpm),取上清液

* 江苏常州生物化学厂。

** 我院1976年生代制药进修班学员。