

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年生化学制药进修班学员。

于 495 毫微米测定吸收值。由测定值与空白值之差从标准曲线查出样品水解底物的毫克数。每 20 分钟水解 1 毫克底物所需酶量定为一个弹性蛋白酶活力单位。

二、实验结果

1. 树脂型号的选择

将酶提取液(步骤见结果部分 5) 分别加入

各种型号预处理的树脂, 吸附 4 小时。测定酶活力, 结果是 Amberlite CG-50 对弹性蛋白酶具有较高吸附量(表 1)。

2. 盐浓度对树脂吸附酶量的影响

改用不同浓度的 pH 4.5 醋酸缓冲液进行提取和测定树脂对酶的吸附量, 发现在 pH 4.5 的 0.1 M 醋酸缓冲液中各型树脂均有较大吸附量(表 2)。

表 1 数种树脂对弹性蛋白酶的吸附量

树脂型号	Amberlite CG-50	AIC-84	151	D-64	001×1.8 ⁻¹	001×1.8 ⁻²	001×1	001×3
吸附量 (单位/克湿树脂)	827.5	492	121	477	453	465	0	0

表 2 盐浓度对树脂吸附酶量的影响

树脂型号	不同盐浓度中, 树脂吸附酶量 (单位/克湿树脂)			
	0.02M	0.05M	0.10M	0.15M
Amberlite CG-50	418.5	430	827.5	790
151	0	0	120	80
AIC-84	170	135	492	470
O-64	2.40	130	477	450

3. pH 对树脂吸附酶量的影响

改变提取缓冲液的 pH, 测定各型树脂的吸附酶量(见表 3), 在 pH 4.5; 0.1 M 醋酸缓冲液中, 各型树脂的吸附酶量较高。

表 3 提取缓冲液的 pH 值对树脂吸附酶量的影响

树脂型号	不同 pH 缓冲液中, 树脂吸附酶量 (单位/克湿树脂)			
	pH 7.4	pH 5.6	pH 4.5	pH 3.5
Amberlite CG-50	418	450	827.5	430
151	50	110	120	105
AIC-84	170	200	492	185
D-64	250	150	477	140

4. Amberlite CG-50 分离弹性蛋白酶的工艺条件

根据上述实验结果, 选定 Amberlite CG-50 树脂分离弹性蛋白酶最适工艺条件为:

(1) 静态吸附时间: 提取液酶浓度为 20 单位/毫升, 盐浓度是 pH 4.5, 0.1 M 醋酸缓冲液时, 静态吸附 3—4 小时可达最大吸附量(图 1)。

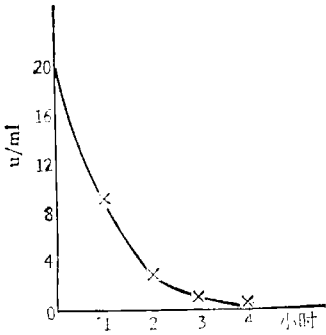


图 1 Amberlite CG-50 静态吸附弹性蛋白酶的时间曲线

(2) 洗脱液盐浓度: 吸附了酶的树脂经 pH 4.5, 0.1 M 醋酸缓冲液漂洗后, 氯化铵缓冲液搅拌洗脱 1 小时, 我们结果证明以 1 M 氯化铵洗脱最合适(见图 2)。

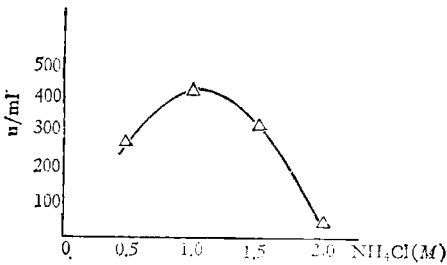


图 2 氯化铵浓度对洗脱的影响

(3) 洗脱液 pH 的影响: pH 为 7.2, 9.3, 11.0 的三种 1 M 氯化铵-碳酸铵缓冲液对洗脱的影响证明 pH 9.3 时洗脱效果较佳。

(4) 洗脱温度和洗脱时间的选择: 20℃、25℃ 及 35℃ 的洗脱量基本相同, 说明温度影响不大, 如图 3 所示, 静态搅拌洗脱 1 小时后即可达到最高值。

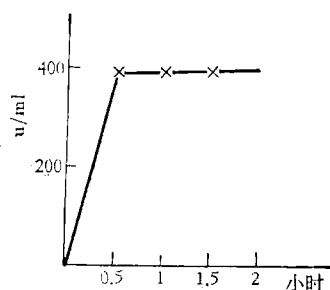


图 3 从 Amberlite CG-50 树脂上洗脱弹性蛋白酶的时间曲线

5. 用 Amberlite CG-50 树脂中制备药用弹性蛋白酶

新鲜胰脏 10 公斤, 绞碎、加入 5 倍量 pH 4.5, 0.1 M 醋酸缓冲液于常温 (20—25℃) 搅拌提取 2 小时, 经滑石粉助滤清, 加入预处理过的 Amberlite CG-50 树脂(待吸液: 树脂 = 30:1), 搅拌吸附 4 小时, 滤出树脂, 用适量 0.1 M, pH 4.5 醋酸缓冲液漂洗树脂 2 次, 除去洗涤液后, 树脂用 1 M, pH 9.3 的氯化铵-碳酸铵缓冲液于常温搅拌洗脱 1 小时, 分离树脂, 用少许洗脱液再洗一次树脂, 合并洗脱液, 以 2 N 醋酸调 pH 近中性, 过滤, 清液冷至 -5℃, 在搅拌下慢慢加入三倍冷工业丙酮, 继续搅拌 10 分钟, 于 -5℃

静置沉淀数小时。虹吸去丙酮, 离心收集沉淀, 以冷丙酮、乙醚洗净, 真空干燥, 即得胰弹性蛋白酶。经配料压片、包肠溶片(每片含弹性蛋白酶 150 单位)即可供临床使用。每 10 公斤胰脏平均可得 48.6 克药用弹性蛋白酶, 活力平均为 25.8 单位/毫克。

三、讨 论

我们的结果证明, 以离子交换树脂法制备弹性蛋白酶, 工艺简单, 生产周期短, 收率和效价都较满意。用 Amberlite CG-50 树脂进行工厂制备, 洗脱液平均收率为提取液的 87%, 比活为 25.6 单位/毫克。成品平均收率为提取液的 55%, 比活力为 26.4 单位/毫克。已采用此工艺路线正式投产, 产品经 206 例临床验证, 本品降低血清胆固醇总有效率达 80% 以上(显效率为 58%), 降低甘油三酯总有效率达 65% 以上(显效率为 57%), 对扩张脑动脉, 改善脑血流图, 缓解心绞痛发作等也有一定疗效。

参 考 文 献

- [1] Hall, D. A. et al.: *Biochem. J.*, **73**, 350 1959.
- [2] 日本公开特许公报 49-66882, 1974.
- [3] Smillie, L. B. et al.: *Biochem. J.*, **101**, 232 1966.
- [4] Nakao, Junko.: *C. A.* **88**, 84994e. 1978.
- [5] Partridge, S. M. et al.: *Biochem. J.*, **61**, 21. 1955.
- [6] Shotton, D. M.: *Methods in Enzymology*, Vol. 19, 113, 1970, Academic Press, New York and London.
- [7] Gertler, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **242**(10), 2522, 1967.

【本文于 1980 年 3 月 24 日收到】

YG-2 型荧光分光光度计的试制

林波海 李治湘 朱粉玉 曹绍梁 刘茹兰

赵 红 石志远 崔承七 贾文英

(中国科学院生物物理研究所)

中国科学院生物物理研究所于 1975 年研制成功我国第一台荧光分光光度计, 并试制了

三台样机, 1978 年底经设计定型会鉴定, 认为接近国外七十年代同类型仪器的水平, 为我国