

参 考 文 献

- 1 Hill R E. Clinica Chimica Acta, 1990; **194**: 1
- 2 方慧生, 相秉仁, 安登魁. 药学进展, 1993; **4**: 196
- 3 Johnson R S, Biemann K. Biomed Environ Mass Spectrom, 1989; **18**: 945
- 4 Scoble H A, Biller J E, Biemann *et al.* Anal Chem, 1987; **239**: 327
- 5 Rubino F M. Spectroscopy Letters, 1992; **25**: 811
- 6 Grey C A, Steven C, Rivier J E *et al.* International Journal of Mass Spectrometry and Ion Process, 1993; **126**: 137
- 7 Roepsstorff P, Fohlman J. Biomed Mass Spectrom, 1984; **11**: 601
- 8 Rubino F M. Biological Mass Spectrometry, 1992; **21**: 451
- 9 Martin S A, Biemann K. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Process, 1987; **78**: 213
- 10 Johnson R S, Martin S A, Biemann K. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Process, 1988; **86**: 137
- 11 方慧生, 相秉仁, 安登魁. 中国药科大学学报, 1994; **25**: 177

The Application of Searching Sequence-Specific Ions Algorithm in the Interpretation of

Polypeptide Mass Spectra. Fang Huisheng, Xiang Bingren, An Dengkui (*Analysis & Computer Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China*).

Abstract An algorithm, called searching sequence-specific ions, is proposed here for interpretation of mass spectra of unknown polypeptide. This program is composed of three parts: searching, scoring and merging. The method successfully interpreted some unknown polypeptides' mass spectra. One of the major advantages of this program over algorithms described earlier is its scoring ability which can rank the confidence of every amino acid residues in the interpreted polypeptide. It greatly facilitates the determination of the amino acid sequence and provides a pathway for the application of mass spectra to biology.

Key words searching sequence-specific ions algorithm, mass spectra, polypeptide, sequence-specific ions

超临界 CO₂ 技术萃取蛋黄磷脂*

赖炳森** 毛中兴 沈晓京** 孙树秦

(解放军北京医学高等专科学校生物化学教研室, 北京 100071)

摘要 采用新型物理分离技术——超临界 CO₂ 萃取法, 提取天然蛋黄粉中的磷脂. 在 40 MPa, 先去除蛋黄粉中甘油三酯和胆固醇, 再萃取磷脂. 结果显示, 磷脂纯度为 95%, *N/P* 比值为 1.003, $\lambda_{\max}$ = 214 nm, 薄层层析显示磷脂着色点清晰, 并去除了绝大部分甘油三酯和胆固醇. 此法操作简单、产品质量高、安全和不污染环境. 还可得到天然纯蛋黄油和蛋白.

关键词 超临界 CO₂ 萃取, 磷脂, 蛋黄

磷脂是一类含磷酸根的脂类, 是生物膜的基本组成成分, 又是脂蛋白的载体, 具有重要生物学活性. 磷脂中含高度不饱和脂肪酸, 是

人体不饱和脂肪酸的重要来源. 磷脂分子又是

* 全军“八五”医药卫生科研基金资助项目.

** 联系人.

收稿日期: 1994-09-19, 修回日期: 1994-12-26

由极性和非极性两部分组成的典型的兼溶性分子,有良好的乳化功能,具有较高医用价值,它在化工、轻工、食品工业等方面也应用很广.发达国家中磷脂是不受限制的食品添加剂.随着我国人民生活水平不断提高,磷脂需求量越来越大.我们采用新型物理分离技术——超临界 CO_2 萃取(SFE- CO_2)法从天然蛋黄粉中萃取磷脂,获得满意结果.

1 SFE- CO_2 技术基本原理^[1,2]

超临界流体萃取是一种新型分离技术.所谓超临界流体是指在临界压力(P_c)和临界温度(T_c)以上相区内的气体.特点是其扩散系数和粘度接近气体,而溶剂性能却类似于液体.利用这一特性,可在超临界条件下,根据物质溶解性能差异,通过改变压力或温度来达到物质的分离.

CO_2 是不活泼气体,其 T_c 为 31.4°C , P_c 为 $73 \times 10^5 \text{ Pa}$,在 40°C , CO_2 的密度和介电常数随压力增高而增大,物质溶解特性也随之改变.在超临界条件下,许多物质都可溶解其中,当进入非超临界相区后,不同极性物质,根据其溶解度不同,便可分别析出.这样采用SFE- CO_2 技术可分离很多物质.

2 材料和方法

2.1 主要仪器和试剂

超临界技术设备(自制)、减压蒸馏装置、低温冷冻干燥机、半自动定氮仪、薄层层析装置、紫外分光光度计; CO_2 气体(北京酒精厂生产,纯度为99.5%);磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、神经鞘磷脂(SM)、溶血卵磷脂(LPC)标准品均为Sigma公司产品;新鲜蛋黄粉(北京禽蛋厂);商售磷脂为北京微生物培养基制品厂产品.

2.2 SFE- CO_2 法萃取磷脂基本过程^[3~7]

2.2.1 去除大部分甘油三酯(TG)和胆固醇(Ch):将蛋黄粉装入萃取器中,提高萃取压力,并保持一定温度,在超临界条件下连续萃取,直至分离器中不再分离出TG和Ch为止.

这样,萃取器内保留着去除TG和Ch的蛋黄粉.

2.2.2 溶出蛋黄粉中的磷脂:按一定比例和速度向萃取器中输注乙醇;保持一定萃取压力、温度和时间;最后从分离器中收集磷脂乙醇液.

2.2.3 浓缩磷脂、回收乙醇:收集的磷脂乙醇液经减压蒸馏、回收乙醇,蒸馏器中残余部分为高纯度浓缩磷脂.

2.2.4 磷脂贮存:磷脂经冷冻干燥处理后,贮存在 -40°C 冰箱中.

3 结 果

我们利用自制超临界 CO_2 技术设备,反复进行萃取蛋黄磷脂实验,并进行了一些指标检测.

3.1 蛋黄粉中各组成成分分析

称取200 g蛋黄粉装进萃取器,经SFE- CO_2 法萃取,各部分重量见表1.

表1 SFE- CO_2 萃取后蛋黄粉各部分质量

	A	B	C	合 计
质量/g	82.7	27.7	86.0	196.4
百分率/%	41.4	13.9	43.0	98.3

注: A代表超临界 CO_2 所萃取的TG和Ch质量; B代表由乙醇析出,干燥后的磷脂质量; C代表残留蛋黄粉(主要为蛋白质)质量.

结果表明: a. 200 g蛋黄粉中, TG和Ch占41.4%, 磷脂占13.9%, 蛋白质及其它占43%; b. 投料200 g, 回收196.4 g (A+B+C), 比投入量少3.6 g, 回收量为98.3%, 原因可能与蛋黄粉中水分丢失有关; c. 蛋黄粉磷脂含量为13.9%, 符合一般占14%左右的记载.

3.2 紫外吸收光谱测定

萃取的磷脂溶于无水乙醇中, 浓度为0.1%, 用紫外分光光度计测定其吸收光谱, 最大吸收峰在214 nm, 与化学法萃取磷脂的吸收峰相同. 曾治义等^[8]报道, 卵磷脂紫外最高吸收峰在215 nm, 本法与其相似.

3.3 样品中氮 (N)、磷 (P) 含量及 N/P 比值^[9]

磷含量用磷钼酸法^[10], 氮含量用微量凯氏定氮法^[11]. 用上述方法测定了 SFE-CO₂ 法萃取的磷脂, 化学法萃取的磷脂和市售磷脂三个样品中的氮 (N)、磷 (P) 含量和 N/P 比值 (表 2), 并计算出 100 g 样品中磷脂含量 (表 3).

表 2 三种磷脂样品中氮、磷量及 N/P 比值

	P/%	N/%	N/P 比值
SFE-CO ₂	3.77(1.2171)*	1.71(1.2207)*	1.003
化学法	3.79(1.2236)	1.78(1.2707)	1.038
市售	3.49(1.1042)	1.85(1.3207)	1.196

* 括号内数值为 P 和 N 的摩尔值.

表 3 三种磷脂样品中磷脂百分含量

	P 计算	N 计算
SFE-CO ₂	95.0	95.0
化学法	95.4	98.8
市售	86.1	102.4

表 2 和表 3 结果表明: a. SFE-CO₂ 法从蛋黄粉中萃取的磷脂, 不论以磷为标准还是以氮为标准计算, 磷脂含量均为 95%, 两法测定结果一致. b. 三种样品结果比较, 以 P 计算, SFE-CO₂ 值与化学法萃取值相近似, 高于市售磷脂值. c. 从 N/P 比值看, SFE-CO₂ 法萃取磷脂的 N/P 比值为 1.003, 而化学法的 N/P 比值为 1.038, 与未除 NPN (非蛋白质含氮化合物) 的文献值 1.03~1.08 基本相符. 市售磷脂为 1.196, 大大超出文献记载值, 说明非磷脂含氮物质含量较多.

3.4 薄层层析^[8,12]

2% 磷脂乙醇液进行薄层层析. 氯仿: 甲醇: 水 (65: 25: 4) 为展开剂, 碘蒸气染色, SFE-CO₂ 萃取的磷脂样品薄层层析图谱见图 1. 三

种不同来源磷脂样品薄层层析图谱见图 2.

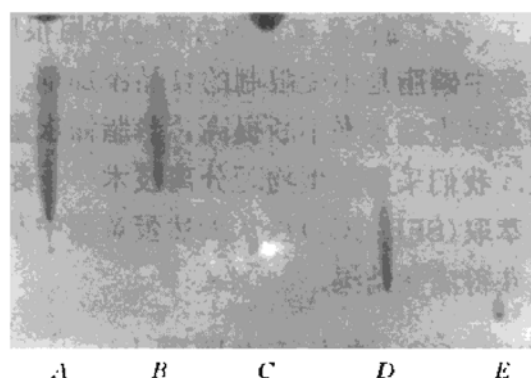


图 1 SFE-CO₂ 萃取的磷脂薄层层析图谱

A: SFE-CO₂ 法萃取磷脂; B: 磷脂酰胆碱; C: 磷脂酰乙醇胺; D: 神经鞘磷脂; E: 溶血卵磷脂.

图 1 表明, SFE-CO₂ 萃取的蛋黄磷脂样品碘蒸气着色点是 4 个, 其 R_f 值分别为 0.18、0.32、0.65 和 0.96. 同时层析的 4 种磷脂标准品的 R_f 值分别为: 溶血卵磷脂 0.18; 神经鞘磷脂 0.33; 磷脂酰胆碱 0.65; 磷脂酰乙醇胺 0.96. 可见, 本法萃取的蛋黄磷脂样品中包含 4 种磷脂——PC、PE、LPC 和 MS.

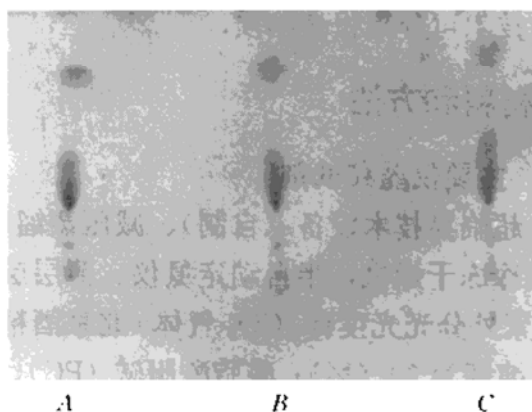


图 2 3 种磷脂薄层层析图谱

A: SFE-CO₂ 萃取的磷脂; B: 化学法萃取的磷脂; C: 市售磷脂.

由图 2 可见, SFE-CO₂ 法与化学法萃取磷脂的着色点的数目和颜色深浅度基本相似, 但前者清晰度优于后者. 市售磷脂着色点多, 成分较复杂. 从层析图谱比较说明, SFE-CO₂ 法

的效果优于化学法。

4 讨 论

磷脂在自然界中分布很广,种类繁多,主要有磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、神经鞘磷脂、溶血卵磷脂和磷脂酸。人体所需磷脂主要来自蛋黄和大豆等天然食物。随着科学技术发展及生活水平的提高,食物精加工后使磷脂减少,而机体对磷脂的需求量却增多,因此易导致磷脂营养相对不足。如何从富含磷脂的食物中提取高质量的磷脂精品补充机体需要是研究的重要课题。从天然食物中萃取磷脂的方法可归为两大类,一类是化学萃取法,即用氯仿、丙酮、乙醚等有机溶剂,经反复萃取可得到高质量磷脂;另一类是物理萃取法,即用超临界流体技术。我们采用 SFE-CO₂ 技术萃取蛋黄磷脂获得成功。国内采用此技术萃取蛋黄磷脂尚未见报道。用超临界 CO₂ 技术萃取蛋黄磷脂具有以下特点^[13,14]。

a. 操作简单、萃取磷脂纯度高。有机溶剂法萃取磷脂操作步骤较复杂,最初需 8 个步骤才能完成,经改进,仍需许多环节。而 SFE-CO₂ 技术,方法简便,经两个步骤即可完成。采用此技术萃取的蛋黄磷脂纯度可达 95%。与此同时,我们也采用丙酮、乙醇、石油醚等有机溶剂萃取蛋黄粉中的磷脂,对两种方法萃取的磷脂进行定氮、定磷及 N/P 比值分析,根据氮和磷的含量计算,两法的磷脂纯度均达到 95%,结果近似。分析 N/P 比值可看出,超临界萃取法的 N/P 比值为 1.003,非常接近 1.000 理论值,而有机溶剂法的 N/P 比值为 1.038。这表明,化学萃取的蛋黄磷脂中可能存在除磷脂以外的含氮化合物。可见, SFE-CO₂ 萃取蛋黄磷脂的纯度高。

b. 保证磷脂质量。SFE-CO₂ 法萃取磷脂是在 CO₂ 环境中、常温条件下进行的。无氧及比较温和的条件,对不稳定物质的萃取而言是十分理想的环境。磷脂分子中含大量不饱和脂肪酸,它们与磷脂的生物学功能有密切关系。在有氧及高温条件下不饱和脂肪酸易氧化,从而

损伤磷脂生物学功能。采用 SFE-CO₂ 技术,可减少磷脂在萃取过程中的氧化破坏,进而保证磷脂的质量。从层析图谱也可看出用 SFE-CO₂ 法萃取的磷脂图谱较化学法萃取的磷脂和商品磷脂更加清晰。

c. 磷脂中不含有害的有机溶剂,产品更加安全。化学法萃取磷脂使用了大量有机溶剂,尽管千方百计加以去除,磷脂中仍残留有机溶剂。这样使临床应用和食用受到限制。而 SFE-CO₂ 技术,用 CO₂ 为介质,萃取物与介质极易分离,通过改变压力就可达到分离目的。萃取中使用的医用乙醇经减压蒸馏,冷冻干燥便可去除,本法萃取的磷脂中,未检出残留乙醇。因此,经 SFE-CO₂ 技术萃取的磷脂是一种十分安全的产品。

d. 不污染环境。化学法使用的大量有机溶剂,有的易燃、易爆,长期接触对实验人员会产生有害影响;而超临界法采用 CO₂ 为萃取剂,无引燃性和化学反应性。无毒、无害、无污染、无致癌性、沸点低、便于清除、不会残留在产品中,对环境及实验人员都十分安全。

e. 可综合利用。用超临界 CO₂ 技术萃取蛋黄磷脂可得到三部分产品。第一部分是蛋黄磷脂;第二部分是蛋黄油,这是 TG 和 Ch 混合乳;第三部分是残留蛋黄粉,其主要成分是蛋白质。除磷脂外,其余两部分亦有开发价值,就是说用超临界 CO₂ 法获得的三部分产品都有应用价值,而有机溶剂萃取技术难于达到。由此可见,超临界 CO₂ 方法萃取蛋黄磷脂是一种比较理想的萃取方法。

参 考 文 献

- 1 丁 勇. 精细石油化工, 1990; 1: 123
- 2 曾美怡, 赵世善. 中草药, 1985; 16 (5): 17
- 3 長谷川峰夫. 卵黄磷脂質の製造法. 公開特許公報(A), 昭 60-224695, 1984: 821~825
- 4 門田則昭, 浅野悠輔. 卵黄リン脂質の製造法. 公開特許公報 (A), 昭 61-74508, 1984: 263~264
- 5 渡辺睦人, 村井真哉, 高橋秀和. レシチンの製造法. 公開特許公報 (A), 昭 62-179351, 1986: 307~310
- 6 Froning G W. J Food Sci, 1992; 57 (2): 95

- 7 Feral T. J Food Sci, 1992; **57** (2): 440
- 8 曾治义, 易建华. 武汉大学学报, 1984; **1**: 123
- 9 Lea C H, Rhodes D N, Stoll R D. Biochem J, 1955; **60**: 353
- 10 周文鸿, 徐宁宁, 陈庆才等. 药学通报, 1987; **22** (2): 77
- 11 Guebel W. Biotechnol Tech, 1991; **5** (6): 427
- 12 Singleton W S, Gray M S, Brown M L *et al.* JAOCs, 1965; **42**: 53
- 13 Lily O X, Karin E M, Milton L L. Anal Biochem, 1992; **200**: 7
- 14 郑荣波. 中药材, 1992; **15** (9): 23

The Extraction of Yolk Phospholipid by the Technique of Supercritical Fluid CO₂ Extraction. Lai Bingsen, Mao Zhongxing, Shen Xiaojing, Sun Shuqin (*Department of Biochemistry, Beijing Medical College of PLA, Beijing 100071, China*).

Abstract Phospholipid (PL) has higher med-

ical and nutritional values and widely applied in medical, food, chemical industry field etc. The natural PL of yolk powder was extracted by supercritical fluid CO₂ extraction (SFE-CO₂) technique. The phosphorus, nitrogen and PL contents, the N/P molar ratio, the triglyceride and cholesterol of the extraction were measured by means of biochemical method, thin layer chromatography, and spectral analysis. The results showed that extracted yolk PL is 95% in purity and its N/P molar ratio is 1.003. So the SFE-CO₂ technique can be used to obtain yolk PL with higher purity and quality.

Key words supercritical fluid CO₂ extraction (SFE-CO₂), phospholipid (PL), yolk

促甲状腺激素单克隆抗体的制备

刘一兵* 卓进 张杰 王衍真 贺佑丰

(中国原子能科学研究院, 北京 102413)

摘要 获得了抗促甲状腺激素 (TSH) 单克隆抗体杂交瘤细胞 20 株, 其中 T₇₄A₁₀ 小鼠腹水滴度为 1: 50 000, 亲和常数为 7.15×10^9 L/mol, T₇₁B₁₁ 小鼠腹水滴度为 1: 150 000, 亲和常数为 8.75×10^9 L/mol. 两个抗体与人绒毛膜促性腺激素 (HCG)、促卵泡激素 (FSH) 和促黄体生成激素 (LH) 的交叉反应分别小于 $1.1 \times 10^{-6}\%$ 、0.01% 和 0.016%. 将 T₇₄A₁₀ 和 T₇₁B₁₁ 应用于 TSH 免疫放射分析中, 得到了满意的结果.

关键词 促甲状腺激素 (TSH), 单克隆抗体, 免疫放射分析

自从 1975 年 Kohler 和 Milstein^[1] 经杂交瘤技术建立了第一株单克隆抗体以来, 单克隆抗体技术已被迅速地应用于生物化学、免疫学、医学等多个领域, 尤其是免疫化学中. 单克隆抗体的出现, 推动了一种新型的免疫分析方法——免疫放射分析 (IRMA) 的发展. 该方法较之放射免疫分析法 (RIA) 具有更高的灵敏度和特异性^[2~7].

发展高灵敏度检测 TSH 的分析方法对甲状腺功能的诊断, 尤其是预防由于先天性甲低而造成的先天性小儿痴呆症具有非常重要的意义. 高灵敏度的 TSH IRMA 法已成为新生儿先天性甲低筛选的首要指标. TSH IRMA 的建立必须以 TSH 单克隆抗体为基础.

* 联系人地址: 北京 275 信箱 39 分箱.

收稿日期: 1994-09-23, 修回日期: 1995-01-24