

干扰了 MSF 的释放。Pritchard 还在淋巴细胞与抗原作用的上清液中分离到分子量为 8,000 和 20,000 的 MSF 类物质,认为 MSF 与 MIF 并不一样;而 Preece 却报道,他分离到分子量为 2,300 的 MSF,认为 MSF 与 MIF 相类似。我们相信,本实验原理的进一步阐明,将对淋巴细胞和巨噬细胞免疫功能的研究有很大的促进作用。

用。也可能在阐明本实验的原理过程中,更进一步扩大本实验的应用范围,或发现更为灵敏而有效的方法,以致代替本实验。

主要参考资料

- [1] 梁子钧、施永德:《生物化学与生物物理进展》,1976年,第1期,第54页。

[本文于 1977 年 7 月 1 日收到]

离子交换法精制辅酶 A 的新工艺

南京大学生物系生化教研室辅酶 A 研制组

无锡第三制药厂

辅酶 A (简称 CoA) 的分离精制早期是用氧化亚铜共盐沉淀法。此法得率低,工序繁杂,原料昂贵,而且含有有害物质,污染环境,损害健康,不宜大规模生产。随着科学技术的发展,一些新技术得到广泛应用。近年来,CoA 的精制采用了阴离子树脂分离法,DEAE-纤维素分离、葡聚糖凝胶——Sephadex G25 过滤法,亲和层析分离法等。后两种方法虽能得到高纯度的 CoA 产品,但不适用于大规模的工业生产,适用于大规模工业生产的还是阴离子树脂分离法。

我国的 CoA 生产是在文化大革命中开始的,采用的是上述经典方法。此法除有上述缺点外,产量亦甚低,远远不能满足需要。最近,建立了 PTA (磷酸转乙酰化酶)-紫外法测定 CoA,发现我国生产的 CoA 含量不高,仅有数批含量达到 50%,一般的为 20% 左右,最低仅含 11.66^[1],因此,建立一个提取 CoA 的有效方法是很需要的。

离子交换法在国内曾有报道^[2],但 GMA 树脂不易得到,而且它的粗丙酮粉纯度仅为 80 微米/毫克左右,我们筛选了二十多种阴离子树脂,发现国产树脂 714, 290, 330 和 717 对 CoA 都有较好的分离能力,由于 717 来源广,取材易,因此着重地进行了反复试验和扩大试验,同时对 714 树脂也进行了反复试验。为了提高纯

度,在 717 离子交换工艺分离 CoA 的基础上,又采用了大孔吸附剂脱盐代替 Ba(OH)₂ 沉淀阴离子的工艺,取得了较好的结果,产品纯度达到 50% 左右,得率达 52%。

一、材料和方法

1. 材料来源

717 阴离子树脂系无锡树脂厂产品;290 阴离子树脂系南开大学化工厂产品;714 阴离子树脂系上海产品;330 树脂由华北制药厂提供;769 活性炭系上海产品;大孔吸附剂¹⁾系华北制药厂产品;CoA 对照品系无锡第三制药厂最优产品。(磺胺法测定为 400 微米/毫克,后经 PTA-紫外法标定 CoA 为 208 微米/毫克,含量约为 50%);磷酸转乙酰化酶和乙酰磷酸二锂盐由本组制备;其他试剂与材料均为一般商品。

2. 分析方法

CoA 含量分析采用磷酸转乙酰化酶-砷酸解离法^[3]和磺胺乙酰化法^[4]。自由巯基的测定(还原效果的检查)采用硝普盐定量法^[5]。CoA 定性分析采用纸层析和纸电泳。

1) 大孔吸附剂是华北制药厂自己生产、自己使用的商品,他们称大孔吸附剂为“小白球”或“白球树脂”。这种树脂没有活性基团,不起离子交换作用。

二、实验与结果

CoA 发酵液煮沸十分钟,滤去菌体,滤液用 732(H⁺) 阳离子树脂搅拌到 pH 2.5—3.0, 滤去树脂和沉淀。滤液加入 2% 的 Ba(HO)₂ (即 100 毫升滤液中加 2 克固体 Ba(OH)₂), 边加边搅拌, 有白色沉淀出现(主要是 BaSO₄) 时, 再用饱和 KOH 调 pH 7.0—8.0, 此时白色沉淀更多(见表 1)。取滤液上 717(Cl⁻) 柱或 717 树脂搅拌吸附 6 小时, 树脂用量为发酵液的 40% (体积比)。上样或搅拌吸附毕, 用蒸馏水反复洗涤至清, 改用 40 倍床体积的 0.01NHCl 0.02 M NaCl 溶液洗涤杂质, 洗毕, 用蒸馏水反复冲至无混

表 1 用 Ba(OH)₂ 沉淀无机阴离子试验

发酵液体积		Ba(OH) ₂ 用量(克)	pH	沉淀杂 质情况	沉淀后 单位/ 毫升*	沉淀后 溶液体 积(毫升)	回收率 (%)
毫升	单位/ 毫升*						
5		0.1	4.5	少			
5		0.1	7.0**	多			
1100	282	22	7.0**	多	261	1090	92.5
1030	267.5	20.5	7.0**	多	240	1030	93.2

* 磷酸转乙酰化酶-砷酸解离法测定

** 饱和 KOH 溶液调

浊, 再改用 0.01 NHCl-0.5 M NaCl 溶液洗脱(八倍床体积), 洗脱液直接串联上 769 活性炭柱。活性炭柱的用量为发酵液的 8% (体积比)。炭柱上样毕, 用蒸馏水洗至流出液 pH 同水的 pH。吸附的 CoA 用 40% 丙酮(内含 0.28% 的氨)洗脱。图 1 为 200 毫升发酵液的活性炭柱洗脱图谱。洗脱液在 55℃ 以下真空浓缩至收集液体积的 1/20 左右, 浓缩液用浓氨水调 pH 至 7.0, 加进浓缩液体积 1/2 倍的 2-巯基乙醇还原 4 小时(温度 15—20℃)。还原情况见表 2。再真空浓缩至原体积, 用 pH 2.0 的 40 倍体积的丙酮沉淀 CoA, 得微黄色 CoA 产品。此工艺中如用 717 树脂搅拌吸附, 得率一般在 30% 左右, 纯度在 25% 以上, 本工艺扩大到 55 升发酵液试验, 证实结果是稳定的。如采用上柱吸附, 得率可达 48% 以上, 最高达到 82%, 纯度也在 25% 以

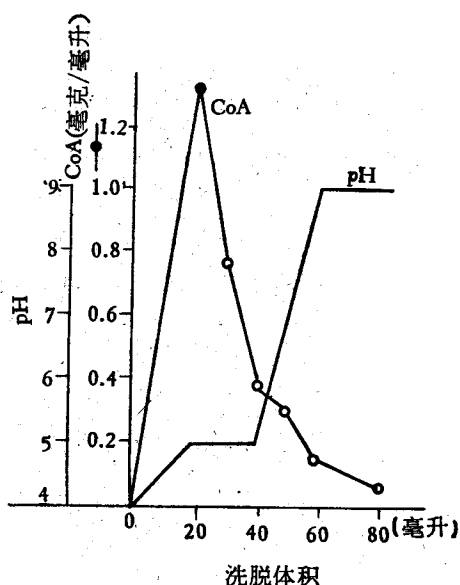


图 1 活性炭柱洗脱图谱

上。为了提高纯度, 采用了大孔吸附剂脱盐代替 Ba(OH)₂ 沉淀无机阴离子的工艺, 即去菌体发酵液用 2NHCl 调至 pH 1.5。滤去沉淀物, 上大孔柱(树脂用量同 717)。上完后用 pH 1.5 水(用 HCl 调)洗杂质, 洗至流出液色淡为止。改用 5% 丙酮水溶液(用氨水调 pH 8.0)洗脱 CoA, 洗脱液直接串联上 717 柱, 以后的步骤同前面所述, 结果得率达到 52%, 纯度可达 50%, 但色泽较黄。

表 2 CoA 还原条件试验***

编号	2-巯基乙醇用量*	还原 pH	时间(小时)	温度(℃)	产品 CoA 含量(%)	自由巯基含量(%)
1	0	—	—	—	34	1
2	1/4	4.5	2.0	15—20	45	15
3	1	7.0**	4.5	15—20	27	40
4	1/2	7.0**	4.0	15—20	29	48.5

* 2-巯基乙醇与 CoA 浓缩液的体积比

** pH 用浓氨水调

*** 用来还原的产品都是 Ba(OH)₂ 沉淀无机阴离子、717 分离、活性炭脱盐工艺的产品

另外, 在筛选 20 多种阴离子树脂中, 还发现 714 树脂有分离 CoA 的能力。把经 Ba(OH)₂ 处理的发酵液用 732(H⁺) 树脂调 pH 至 3.5, 通过 122 (Na⁺) 阳柱脱色, 流出液串上 714 柱 (Cl⁻), 然后 714 柱用 0.01N HCl-0.06M NaCl 洗

去杂质, CoA 用 0.01 NHCl-0.4 M NaCl 洗脱, 其他步骤同 717 工艺。结果得率在 24—42% 之间, 纯度在 25% 以上。

新工艺产品经无锡第三制药厂质检室及无锡市药品检验所进行效价、热原、毒性、重金属、钡盐、降压等试验, 参照 1975 年版中国药典试行标准检验结果均符合规定。同时由南京大学化学系做了红外光谱分析, 图谱经上海药物研究所的同志分析, 确定结构为 CoA。

三、讨 论

新工艺与原工艺相比, 具有收率高、设备简单、操作方便、材料易得, 不污染环境等优点。但外观色泽较差。脱色问题, 正在研究中。

CoA 的稳定性据文献[1]报道, 纯 CoA-SH 虽在干、冷却条件下, 每月仍有 1—2% 的失活。76 年 11 月新产品(纯度 29%) 到 77 年 6 月复测, 纯度为 23%, 每月失活 3%、纯度为 50% 的产品, 二个月后复测降到 48.4%, 平均月失活 1.6%。可见 CoA 成品纯度越高越稳定。

用 Ba(OH)₂ 沉淀阴离子的工艺来分离提取低单位发酵液(发酵不正常的发酵液)的 CoA 是得不到合格产品的, 而用大孔吸附剂脱盐的

工艺, 同样能得到纯度为 50% 的产品, 仅仅得率低一些, 在 30% 左右。这是因为低单位发酵液中, ATP 和 CoA 前体物质很多, 而在我们的工艺中, 717 树脂很难把 ATP、CoA 前体物质与 CoA 完善分离, 而大孔吸附剂能分离出大部分 ATP、CoA 前体物质。

工艺采用 2-巯基乙醇还原, 从表 2 编号 3 和 4 的还原结果看出, 产品中含有一定量的除 CoA 以外的巯基化合物, 纸层析和纸电泳图谱经硝普盐定性检定有两个以上显红色的斑点。为了提高 CoA 纯度, 也可考虑在吸附 CoA 的树脂柱上经还原处理, 然后再从柱上洗去除 CoA 以外的巯基物质。

参 考 文 献

- [1] 北京药物检验研究所等: 《药品与生物制品》, 1977 年, 第 3 期, 第 177 页。
- [2] 四川抗菌素研究所: 《医药工业》, 1975 年, 第 3 期, 第 31 页。
- [3] Abiko, Y. et al.: *The Journal of Biochemistry*, 61 (1), 10, 1967.
- [4] Kaplan N. O. et al.: *J. Biol. Chem.*, 174, 37, 1948.
- [5] Grunert, R. R. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 30, 217, 1951.

[本文于 1977 年 9 月 12 日收到]

(上接第 13 页)

$$\frac{\Delta T_R}{\Delta T_T} = \frac{a}{a + a'} \frac{t_0}{1 + 4F^2} \epsilon_T \phi \quad (2)$$

ϕ 是强烈依赖于水成份的一个物理量, 在给定的情况下为常量。由(2)移项得:

$$\Delta T_T = \Delta T_R \frac{a + a'}{a} \frac{1 + 4F^2}{t_0} \frac{1}{\epsilon_T \phi} \quad (3)$$

从(3)式可知: 物体与背景的温度差 ΔT_T 与液晶膜的 ΔT_R 、光学系统、大气吸收分子等有关。 ΔT_T 越小, 测量灵敏度越高, 系统能分辨的物体与环境的温度差就越小。液晶膜的灵敏度越高, 恒温系统的精度也要高。对红外光学系统来说, 要求集光本领大; 即孔径要大, F 数要小。考虑到液晶膜有横向热传导, 空间分辨率的要求影响测量灵敏度, 对于分辨细节的东西, 测量灵敏度就要降低, 最后由于液晶膜本

身空间分辨率的限制而无法分辨。

目前液晶红外热成像的能力方面, 美国陆军系统某夜视实验室得到了 4 公尺以外人头的热象, 并报道测量灵敏度可做到 0.2℃, 如果用线偏振光可望达到 0.02℃。也有报道测量灵敏度已达 0.01℃。关于空间分辨率有专刊报道达 50 对线/毫米, 响应时间为十分之一秒。

液晶热成像器件目前的水平与其它热成像器件相比, 在温度灵敏度、空间分辨率、响应时间、距离等方面还远远不足。但液晶热成像器件可在常温下工作, 结构简单、制作方便以及成本低方面却显出优越性, 从发展角度看可作为夜视手段之一。而在其它民用方面如工业、医学、农业等方面可望发挥独特的作用。

[本文于 1977 年 10 月 28 日收到]