

牛肺中肝素的提取

(北京食品研究所,北京 100076) 刘宗林 彭义交 郭洋 陈雪松

摘要 肝素是从牛肺或猪小肠中提取的一类化学物质,它是由D-葡萄糖胺、L-艾杜糖醛酸、葡萄糖醛酸交替组成的粘多糖硫酸酯,其分子量在3000~40000,平均15000。采用水浸、离子交换、洗脱、醇沉、磺化、洗涤、精制等方法,最后得到较为理想的产品。

关键词 肝素 磺化 粘多糖硫酸酯 离子交换 醇沉

中图分类号:TS202.3 文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2002)10-0054-02

肝素因其最初取自肝脏而得名(heparin),现肝素多是从猪肠粘膜或猪、牛肺中提取得到。它是由D-葡萄糖胺、L-艾杜糖醛酸及葡萄糖醛酸交替组成的粘多糖硫酸酯,其分子量为3000~40000,平均分子量15000左右,带有大量的负电荷,这与其抗凝作用有关。近年来,发现低分子量肝素(LMWH)分子量在1000~12000之间,平均分子量5000,是一种较为理想的抗栓药^[1]。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

氯化钠、氢氧化钠、95%的乙醇、乙醚、盐酸、氯磺酸、浓硫酸 均为分析纯;树脂 D204 杭州争光化工集团。

pHS-2 型酸度计,离子交换柱,UV-200 紫外-可见分光光度计(日本岛津),GT-2E 真空冷冻干燥机(德国产),LABOROTA4000 旋转蒸发器(德国 Heidolph)。

1.2 肝素的提取

1.2.1 浸提 取牛肺 10kg,加水 4kg 搅拌均匀,再加 20%NaCl 溶液 4000ml 搅拌均匀,浸提 2h。

1.2.2 酶解 将上述浸提液用 20%NaOH 溶液调 pH9.0,加热至 50℃,加入 40g 胰蛋白酶,同时不断搅

拌并保持温度 8h。

1.2.3 灭酶、离心、过滤 酶解后的牛浆液经巴氏灭菌后离心,离心后的渣滓再用 5%NaCl 溶液洗涤,再离心,最后弃渣。合并二次离心液,过滤其滤液即为肝素的浸提液。

1.3 离子交换树脂的收集与洗脱

1.3.1 离子交换树脂的洗涤、活化与测定 树脂的洗涤与活化是提高树脂交换效率的关键,本实验采用 4%稀酸洗——水洗至中性——4%稀碱洗——水洗至中性,如此重复三次。

洗涤后的树脂进行交换容量的测定^[2],树脂含水量的测定(按国标 GB5757-86 的方法测定)。

1.3.2 肝素的收集与洗脱

1.3.2.1 吸附 将收集的肝素滤液通过大孔型吸附树脂(D204),肝素几乎全部被树脂所吸附,其滤液不含有肝素,弃掉滤液。

1.3.2.2 洗脱 吸附了肝素的树脂,用其体积 0.5 倍量的 4mol/L 的氯化钠溶液洗脱 2h,按每升洗脱液补充 50g 的氯化钠固体,继续洗脱 1h,再向树脂中加入 0.5 倍量 4mol/L 的氯化钠 2 次,每次洗脱 2h,合并数次洗脱液,得浅黄色滤液。

1.4 肝素的精制与磺化

1.4.1 精制 将洗脱液用盐酸调 pH 至 2.5,过滤后,迅速调至中性,浓缩至一定的体积后加入 1.2 倍量的 95%乙醇沉淀 12h,待澄清后,过滤弃掉上清液,其沉淀按 5%浓度溶于 0.8% NaCl 溶液中,用 3mol/L NaOH 调 pH 至 11,过滤,滤液再以 2mol/L 的 HCl 调 pH2~4,过滤,取上清液;滤液用 3mol/L NaOH 调 pH6.5,加入 2.2 倍量 95%乙醇静置过夜,沉淀脱水后,真空干燥即得较为纯净的提取物肝素。

1.4.2 肝素的磺化 提取物进一步磺化是提高肝素活化能力^[3,4]的关键,其具体步骤如下:

1.4.2.1 混合酸的配制 将浓硫酸与浓氯磺酸按体积比 2:1 混合即为混合酸。

收稿日期:2002-07-10

作者简介:刘宗林(1949-),男,高工,研究方向 物理化学与结构化学。

1.4.2.2 肝素的磺化 称取提取物 50g, 在 0℃时加入 300ml 混合酸搅拌 1h, 升温到 25℃, 继续搅拌 1h; 按体积比 1:6 加入乙醚, 冰水浴 1h, 用 G₄ 漏斗过滤; 回收的沉淀用 20%NaOH 溶解, 调 pH 至 5~6, 加水稀释至 1000ml(若颜色较深加 H₂O₂); 将上述稀释液用冰水浴, 通过 G₃ 漏斗过滤, 再将滤液冰水浴, 用 G₃ 漏斗过滤, 保留滤液; 如此反复数次, 直到漏斗过滤时无沉淀为止。

1.4.3 肝素的提纯 将磺化后的滤液进行真空浓缩, 直到有沉淀析出为止; 加入 2.8 倍 95%乙醇洗脱, 静止过滤, 将回收的沉淀用水溶解至近饱和状态, 再继续加入 2.8 倍 95%乙醇洗脱, 静止过滤, 回收沉淀; 如此反复数次, 得到较为理想的肝素为止。

1.4.4 样品的干燥 将上述沉淀脱水、冷冻干燥即得到所需的高纯度肝素。

1.4.5 工艺流程



2 分析与讨论

2.1 酶解条件的控制

酶解条件的控制^[5]是提高肝素浸提率的关键, 其中温度和 pH 是两个主要因素, 其具体变化如图 1、图 2。

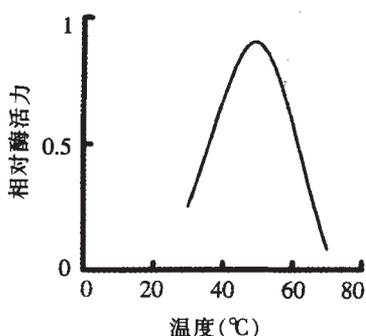


图 1 温度对胰蛋白酶活性的影响

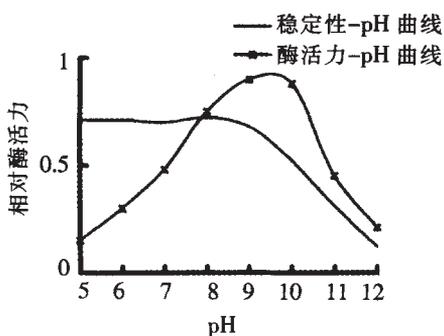


图 2 pH 对胰蛋白酶稳定性的影响

从图 1、图 2 可以看出, 温度在 50~55℃, pH 9.0 左右时, 酶能保持较好的生物学特性, 浸提效果最好, 由于温度热惯性较大, 控制起来比较困难, 因此我们把温度控制在 50±2℃, pH 9.0, 肝素的提取效果较为理想。

2.2 大孔型吸附树脂(D204)理论交换容量与实际交换容量的关系^[2,6,7]

理论交换容量相当于总交换容量, 是指经干燥至恒重的单位重量(1g)或单位体积(1ml)树脂在水中所具有的可交换的离子的当量数; 实际交换容量是指在某一工作条件下树脂所表现出来的交换容量。由于生物大分子所具有的特性: 分子量大, 树脂孔道对其空间排阻作用大, 使之不能与所有的离子交换活性中心接触; 被吸附的生物分子会妨碍其它未被吸附的分子与离子交换基团发生作用; 分子本身带多价电荷, 可与多个离子交换基团发生作用。因此, 树脂的实际交换容量一般都低于总的交换容量。我们在肝素提取时采用大孔型吸附树脂是为了减少生物分子的非特异性吸附, 使生物大分子容易进入离子交换剂内部, 以提高树脂的实际交换容量, 其实际交换容量能达到总交换容量的 70% 以上。

3 结论

牛肺的浸提需要在高渗溶液中进行, 其 NaCl 溶液的浓度应保持在 10% 左右。酶解的条件根据蛋白酶工作的最佳条件及活性单位来确定, 加入量一般为理论值的 1.5 倍。

树脂的交换容量应是理论交换容量的 2 倍, 以提高肝素的得率, 因为牛肺中的脂肪会给树脂造成污染, 降低树脂的交换能力。

磺化是提高肝素活性的关键步骤, 控制好磺化条件, 反应需在冰水浴中进行, 要反复提纯磺化后的产物, 要真空干燥或冷冻干燥。

参考文献

- 冯仁田, 王福清. 低分子肝素的作用机制及其临床研究进展. 中国生化药物杂志, 1998, 19(5)
- 何炳林, 黄文强主编. 离子交换与吸附树脂. 上海科技教育出版社, 1995, 2
- 肝素生物活性的鉴定. 中华人民共和国药典(95)第二部, 附录 XID
- 夏旭东. 低分子量肝素钠活性测定方法的探讨. 中国生化药物杂志, 1998, 19(5)
- 陈石根, 周润琦编著. 酶学. 上海: 复旦大学出版社, 2001, 2
- 孙彦编著. 生物分离工程. 北京: 化学工业出版社, 1998, 10
- 俞俊棠, 唐孝宣主编. 生物工艺学. 华东理工大学出版社, 1997, 4