维普资讯 http://www.cqvip.com

13-16 TQ464.1 Q503

高纯度1,6—二磷酸果糖分离精制新工艺

生物医学工程研究室 于明安 余惠媛

A 提 要 本文报道了1,6—二磷酸果糖(FDP)发酵液通过沉淀—吸附—重结晶法,代替国外反渗析法或联合柱色谱分离—分子膜过滤—冷冻干燥法分离精制FDP的新工艺。本工艺简便地解决了反渗析法纯化过程中高达50%FDP严重损失问题,避免了过程冗长的柱色谱分离过程易引起的细菌性污染所导致的FDP破坏和复杂价昂的分子膜过滤器及冷冻干燥,突破了FDP难以结晶的关键技术,所用设备简单,便于工业生产。经4升规模试验研究表明,FDP总收率达80%,纯度达99%,高于国外文献报道及意大利进口冻干粉指标。

关键词 1,6—二磷酸果糖;分离精制;重结晶
中图分类号 Q503;Q533

合成,酶促反应

1,6—二磷酸果糖(Fructose—1,6—diphosphate,FDP)是细胞内糖代谢的中间产物。其药用价值是八十年代以来,为Markov[1]等人首先发现,继由意大利Biomedical Foscama制药公司利用酶工程技术生产,迅速上市的以心血管系统为主的新药。FDP广泛用于急性心肌梗塞,严重心肌缺血、外周血管疾患、各种类型的休克等缺血缺氧性疾病的急救。此外,经我国50多家大型医院及医科院校的临床试用证明[2],在各类外科手术中可作为重要辅助用药,对各类型肝炎引起的深度黄疸、转氨酶升高及低白蛋白血症有肯定疗效。近年来,药用FDP需求剧增。因而,研究与开发FDP已引起国内外广泛关注[3~7]。

酶促反应合成FDP的基本原理为(图1),利用啤酒或面包酵母细胞,以单糖或蔗糖等和磷酸盐为底物,经酵母酶促磷酸化反应转化成FDP,积聚于反应介质中。显然,FDP发酵液是一复杂的多相体系。除FDP外,尚含有酵母细胞、蛋白质、单糖及其磷酸酯、无机磷酸盐等未作用的培养基杂质。FDP为性

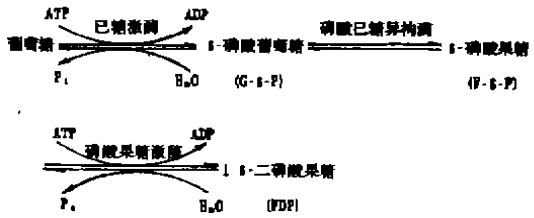


图1 葡萄糖连续磷酸化生成FDP

质活泼的高能化合物,受热或分离过程过长都会破坏或分解。此外,单糖磷酸酯、无机磷酸盐等杂质与FDP性质相近,致使FDP的分离精制相当困难。Leisola等人[3]采用反渗

维普资讯 http://www.cqvip.com

析技术纯化 FDP，结果发现竟有高达 50%的 FDP 丢失。意大利 Diana 等人[4]报道用联合柱色谱（阳离子、阴离子树脂两次上柱）分离—洗脱—分子膜过滤—冷冻干燥直接制取注射用 FDP 冻干粉。其设备昂贵，生产周期长，FDP 收率低（按柱色谱分离溶液浓度计算，约为 43%）。我室从 1987 年起对 FDP 立项研究，89 年完成酵母酶促磷酸化反应的最适条件及固定化载体的试验。此后，突破了关键技术，建立了新工艺。1992 年进行药厂放大中试，获得满意结果。93 年通过重庆市科委鉴定。本文报道的 CTAB 透性啤酒酵母生物合成高浓度 FDP 发酵液，经沉淀—吸附—重结晶，得到高纯度 FDP 结晶粉，简化分离精制药用 FDP 的新工艺，国内外尚未见报道。

材料和方法

1. 材料

(1)交联聚苯乙烯型树脂，上海树脂厂

(2)氯化钙，分析纯，国营重庆无机化学试剂厂

2. 方法

(1) 生物合成 FDP[6]十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)透性啤酒酵母 400g 加入发酵培养基中，于 30℃，pH6.0，250 次／分钟振荡发酵 4 小时。

(2) 发酵液中 FDP 浓度测定[8]吸取 2ml 发酵液，加约 3ml5%三氯醋酸，在冰箱中保持 10 分钟。另加入 2.0M $NaHCO_3$ 中并在冰浴中保持 10 分钟，离心，上清液稀释至 100ml. 取 2ml 稀释液用于 FDP 浓度测定。

(3) 分离精制过程中 FDP 浓度测定　取 2ml 溶液，加入 2.0MNaHCO₃ 中和后加水稀释至 100ml。或取 1.0g 左右湿的 FDP 粗制品，加入饱和 $H_2C_2O_4$ 溶液 2ml. 离心，上清液加入 2.0M $NaHCO_3$ 中和后加水稀释至 100ml。取 2ml 稀释液用于 FDP 浓度测定。

(4) 无机磷测定[9]按照 Allen 的方法，测定发酵过程和分离精制过程中无机磷的含量变化。

(5)FDP 的初步分离　发酵完毕，于 4 升发酵液中加入 1.0M $HClO_4$ 至蛋白质沉淀完全，离心。上清液中加入 2.0M NaOH 中和至 PH8.5. 另加入 450ml 50%$CaCl_2$ 溶液，搅拌 15 分钟，加入等体积 95%乙醇，室温静置 30 分钟，减压过滤。沉淀用蒸馏水和 95%乙醇各洗两次，即得 FDP 粗制品。

(6)FDP 的精制　将 FDP 粗制品悬浮于适量蒸馏水中，加入经处理的交联聚苯乙烯型树脂（溶液：树脂＝20：1）及微囊型炭（自制），室温搅拌吸附 1 小时，过滤，吸附剂用蒸馏水洗涤两次，滤液用 2 N NaOH 中和后以乙醇为溶剂结晶，待晶体全部析出后，过滤。再用乙醇重结晶，过滤后经干燥即得高纯度 FDP 成品。

结果和讨论

1. 从发酵开始，每半小时取样分析，检测生物合成过程中 FDP 和无机磷酸盐浓度随时间的变化及发酵终点 FDP 的最高浓度与无机磷酸盐的最低浓度，结果如图 2 所示。从图中可见，FDP 浓度随发酵时间延长不断增

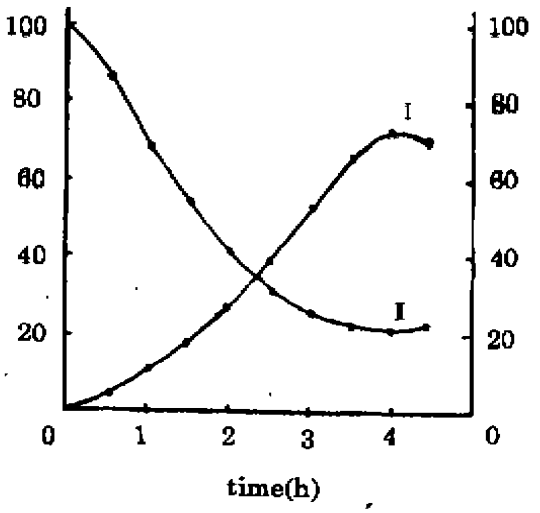


图 2　发酵过程中 FDP 和无机磷酸盐随时间变化

I：FDP　　I：无机磷酸盐

维普资讯 http://www.cqvip.com

大，直到 4 小时达到最大值 75g／L．无机磷酸盐浓度则随反应时间延长不断下降，4 小时达到最低点。

2．表 1 列出的结果是分离过程中 FDP 及主要杂质含量变化。从表中可见，发酵完毕至用 $CaCl_2$／乙醇沉淀、由于 FDP 中高能磷

表 1 分离过程中 FDP 及主要杂质含量变化

含量变化 / 分离过程	FDP (g／L)	无机磷酸盐 (g／L)	F－6－P (g／L)	FDP 收率 (%)
$HC10_4$	72	20	2.0	96
$CaCl_2$／乙醇	71	23	3.0	94

酸键的不稳定性而造成的分解作用，致使其含量下降 5%左右，而无机磷酸盐等杂质却显示出增高趋势。在此初步分离阶段，通过沉淀作用除去了发酵液中大量酵母细胞、蛋白质及未反应完的葡萄糖等杂质。在精制阶段，经树脂及微囊型炭的特异性吸附作用，进一步除去了粗制品中的无机磷酸盐及单糖磷酸酯等杂质。结果见表 2。从表 2 可看出，当吸附剂用量为 100g 时，虽 FDP 收率高，但无机磷酸盐杂质也较多，用量为 200～250g 时，FDP 的收率随杂质含量的降低而较大幅度的下降。当用量 150g 时，杂质限量低但 FDP

表 2 精制过程中 FDP 及主要杂质含量变化

纯化过程 / 含量变化		FDP (g／L)	无机磷酸盐 (g／L)	F－6－P (g／L)	FDP 收率 (%)
经处理树脂，微囊型炭 (g)	100	68	8.9	0	90
	150	66	1.0	0	88
	200	60	0.2	0	80
	250	55	0.1	0	73

收率却较高。此后，溶液经结晶、重结晶和干燥后所得 FDP 结晶粉结果见表 3。从表 3 可看出，本工艺 FDP 收率和纯度都较国外高，而杂质含量却明显降低。

表 3 FDP 精制结果及比较

作　者	FDP (g／L)	无机磷 (%)	F－6－P (%)	FDP 收率 (%)	FDP 纯度 (%)
本　文	61	0.3	0	81	98～99
Leisola	～25	1～2	1	～50	83～85
意大利冻干粉		2	1.5		85

维普资讯 http://www.cqvip.com

本文首次报道了FDP分离精制新工艺。与文献报道工艺相比，新工艺简化生产条件，缩短生产周期、降低生产成本、提高产品质量，易于工业化生产。

参 考 文 献

1 markov. et al. Am Heart J. 1980;100.639.

2 杜振宁，吴梧桐. 药学进展 1992;16(3):145

3 Leisola M. et al. Acta Chem Scandinavica. 1974;28:555.

4 Diana M. et al Ger offen DE. 1985;3. 446. 927.

5 Bisso G M. et al. Process Biochemistry. 1986: 21(4):113.

6 Compagno C. et al. Biotechnology and Bioengineering. 1993. 42:398.

7 杜振宁，吴梧桐，中国药科大学学报 1992;23(3):169

8 于明安，徐昌喜，余惠媛. 生物医学工程学杂志 1995;12(2)

9 Allen J L. Biochem J. 1940:34:858

A NEW TECHNIQUE FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF HIGH PURITY FRUCTOSE—1. 6—DIPHOSPHATE

Yu Mingan, et al

Department of Biomedical Engineering

A new technique for isolation and purification of fructose—1, 6—diphosphate (FDP) from the fermentation mixture has been reported. Which utilizes precipitation, absorption and recrystallization instead of the reverse osmosis system or Chromatographic on cationic and anionic resins, molecular filtration and lyophilization. Thus, 4L of a fermention anionic was deproteinized and precipitated using 50% (W／W) $CaCl_2$ Solution. FDP was purified by ion exchange, microencapsulated charcoal treatment and recrystallization. The overall yield of FDP was 80% and the purity was 99%. The new technique shortened the production period and was easy to scale up for industrial application.

Key Words Fructose—1, 6—diphosphate; Isolation and purification; Recrystallization

(上接18页)

THE STUDY ON EXOCRINE FUNCTION OF FETAL PANCREAS——II

He Yanzheng, et al

Dept. of General Surgery. The First Hespital

The secretery function of trypsin and lipase of pancreas from 26 dead fetuses were studied. it further showed that the exocrine function of fetal pancreas is directly proportional to the pancreatic weight and fetal age. Although the level of trypsin and lipase in the duodenal juice of 38th week fetus is very lower than that of them in adult, fetal pancreas as a doner for transplantation, the pancreatic duct should be managed with ligation.

Key Words Fetal pancreas; Exocrine function; Transplantation