DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.028

文章编号: 1000-5404(1999)11-0849-03

毛发水解液中混合氨基酸的分离富集方法研究

技术方法

Study on the separation and enrichment of mixed amino acids in hair hydrolysate

张 莉,李 文,肖正华,张世德 (第三军医大学医学检验系分析化学教研室,重庆 400038)

【提要】 目的: 研究毛发水解液中混合氨基酸的分离富集方法。方法: 本文采用离子交换法 US双柱串联的方式使除盐和氨基酸的富集同时完成。结果: 混合氨基酸成品纯度大于 99%,回收率为 54.21%。结论: 离子交换法是一种较简便有效的分离富集混合氨基酸的方法。

国内有毛发水解生产胱氨酸厂近百家,生产中产生的母液含色素、铵盐、菌体蛋白、金属离子和 10几种游离 L氨基酸。为了更合理的利用资源,减少环境污染,必须对其进行深度开发。经絮凝、脱色处理后的水解液中氨基酸的含量较高,但同时存在约 15%的 NH_4Cl,使氨基酸的提取十分困难。目前国内外常用的从水解液中除盐制备混合氨基酸的方法有膜分离法[1]、电化学法[2,3]和离子交换法[4],本文采用了离子交换法,它的生产成本较低、操作简便有效。

1 基本原理

在一定 pH值的溶液中,根据氨基酸等电点的不同,它们能以阳离子或阴离子的形式在溶液中存在,对强酸性阳离子交换树脂而言,氨基酸的碱性越强,树脂对它的选择性越高,树脂与氨基酸间的亲和力越大。调节上柱液 pH值,使各种氨基酸均以阳离子形式存在,从而与阳离子交换树脂发生交换反应,此时水解液中的 NH_4^+ 和氨基酸富集在树脂柱上,Cl^- 随流出液流出。根据质量作用定律,选择适当浓度的氨水作洗脱剂,因氨基酸的亲和力小于 NH_4^+,所以被氨水洗脱下来,而 NH_4^+ 仍留在树脂柱内。洗脱液中有混合氨基酸和 NH_3,直接进行减压浓缩除氨,最后的浓缩液经结晶、精制就可得混合氨基酸成品。

该过程反应如下:

交换: $R-SO_3H + AN^+ = R-SO_3AN + H^+$

$R-SO_3H + NH_4^+ = R-SO_3NH_4 + H^+$

洗脱: $R-SO_3AN + NH_3 \cdot H_2O = R-SO_3NH_4 + AN^+ + OH^-$

式中 AN^+ —— 氨基酸阳离子:

$R-SO_3H$ —— 氢型强酸性阳离子交换树脂。

2 材料与方法

2.1 仪器和试剂

主要仪器: d 30 mm× 130 mm离子交换柱两支;减压蒸馏装置一套; pHS-3C型酸度计。

试剂: 732强酸性阳离子交换树脂,按国家标准 GB5476-85, GB1288-92进行预处理和再生; P-2改性聚合铝和聚丙烯酰胺;粉末活性炭(食用级)。

水解液: 提取胱氨酸后的毛发水解液,由胱氨酸生产厂提供。

2.2 样品的制备

取水解液调 pH5~ 9后,分别加入 0.025%~ 0.1%的 P-2改性聚合铝和聚丙烯酰胺进行连续絮凝,使水解液中的菌体蛋白和大部分金属离子絮凝沉降后过滤,弃去渣滤。滤液在 pH 3.5~ 4.0温度为 50°C~ 55°C下,加入 3% (W/V)活性炭,搅拌脱色 3次,得浅黄色样液,备用。

2.3 实验方法

将已处理好的氢型 732树脂各 140 ml装入两支离子交换柱中,两柱串联。取样液调 pH后上柱,然后用蒸馏水冲洗,以除去树脂柱内未发生交换的氨基酸、NH_4^+、Cl^- 等,最后用氨水洗脱,收集洗脱液至茚三酮反应转阴。洗脱液经减压蒸馏、结晶、精制即可得混合氨基酸成品。

2.4 氨基酸的分析测试方法

2.4.1 定性分析方法 利用茚三酮作显色剂,测试时取少量试液滴于滤纸上吹干除尽溶剂,再滴 0.1%茚三酮无水丙酮溶液 1滴,充分吹干后若呈紫色则表明试液中含氨基酸。

2.4.2 定量分析方法[5] 应用甲醛法可定量测定氨基酸中的氨基氮,对于毛发水解后用氨水或碳铵中和沉降胱氨酸的生产工艺,水解液中含大量氯化铵,它和氨基酸与甲醛会发生相似反应,甲醛法实质上测得的是水解液中氨基酸和铵盐的总氮含量,蒸馏法可测定未经消解的水解液中铵盐的氮含量。将甲

作者简介: 张 莉,女,26岁,助教,硕士

收稿日期: 1998-10-08;修回日期: 1999-07-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

醛法测得的总氮量和蒸馏法测得的铵盐氮含量进行差减,可得到水解液中氨基酸总氮量。

3 讨论

3.1 上柱方式

在离子交换法中有正上柱和反上柱两种上柱方式,正上柱法的交换容量比反上柱时大,若上柱液中含较多菌体蛋白等固形物,易堵塞树脂柱,这时应采用反上柱方式。由于水解液已经过絮凝处理除去了菌体蛋白,所以采用正上柱方式。水解液中含约 15% NH_4^+ 和少量未被絮凝沉降的金属离子,它们对氨基酸的交换容量影响较大,为充分发挥树脂的交换能力,提高氨基酸的纯度和浓度,应用双柱串联法,第一个柱主要交换 NH_4^+ 和金属离子,在第二个柱上交换氨基酸。

3.2 上柱条件

对上柱效果影响较大的因素有上柱液的 pH值和上柱流速,用氨基酸的交换吸附效果为考查指标,以上柱率表示,分别对两种因素进行考查,结果见表 1。

(注: 上柱率 = $\frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100\%$ 式中 C_1—— 上柱液中氨基酸氮含量,g·L^{-1}; C_2—— 流出液中氨基酸氮含量,g·L^{-1}。)

表 1 上柱条件与氨基酸交换吸附效果关系

实验号	1	2	3	4	5
pH值	1.5	2.5	3.5	4.5	5.0
上柱率 (%)	79.82	92.30	72.23	64.24	63.21
流速 (ml·min^{-1})	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
上柱率 (%)	89.72	92.30	84.07	82.83	78.65

pH值对离子交换效果的影响有两方面,一是对树脂交换基团离解的影响;二是对水解液中氨基酸的存在形式有影响。上柱时,流速过小就增加了上柱时间;流速过大,交换过程还未达到平衡水解液就向下移动,不能充分发挥树脂的交换能力。由实验发现,当 pH2.5的水解液以 4.0 ml·min^{-1}的流速上柱时,氨基酸的交换效果最佳。

3.3 洗脱条件

对洗脱效果影响较大的因素有洗脱剂浓度和洗脱流速,以氨基酸的回收率作为考查指标,分别对它们进行优化实验,实验结果见表 2。

表 2 洗脱条件与氨基酸洗脱效果关系

实验号	1	2	3	4	5
浓度 (mol·L^{-1})	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
回收率 (%)	32.54	59.17	81.07	63.91	51.48
流速 (ml·min^{-1})	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
回收率 (%)	66.27	74.56	82.15	61.54	50.89

洗脱剂的浓度是根据被洗脱离子与树脂间的亲和力大小等情况来决定的,一般而言,洗脱剂浓度高些,被洗脱下来的离子比较集中,但若其浓度过高,就会使洗脱剂消耗过多,造成浪费;如果浓度过低,又会使洗脱时间加长。最后由实验确定洗脱剂氨水浓度为 3.0 mol·L^{-1},流速为 4.0 ml·min^{-1}。

3.4 浓缩与精制

洗脱液的碱性较强,氨基酸在碱性条件下受热易引起构型的变化而失去生物活性,因此利用减压蒸馏法进行浓缩,在得到混合氨基酸粗品的同时除去洗脱液中的氨。粗品经溶解、脱色、减压浓缩后结晶,晶体在 60℃~ 80℃下干燥 1~ 2 h可得混合氨基酸成品,呈白色晶体状。

4 结论

由双柱串联的离子交换法分离富集混合氨基酸的方法,其最大的优点是在除去 NH_4^+、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Cl^- 等离子的同时,得到杂质含量少的混合氨基酸洗脱液,再经浓缩、精制即可得混合氨基酸成品。本文通过实验确定该方法的各种条件,为最终实现提取胱氨酸后毛发水解液的综合利用提供了可能,并为今后进一步分离提取单一氨基酸创造了条件。

关键词 氨基酸;分离富集

中图法分类号 R341.7; R943 文献标识码 B

参考文献

[1] Masawaki T, Kishimoto H, Tone S. Analysis of volume and solute fluxes in separation of amino acids using a negatively charged membrane under pressure gradient[J]. J Chem Eng, 1992, 25(6): 708- 715.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[2] 黄玉秀,林伦民.电化学法制取动物毛中系列氨基酸新工艺[J].精细化工, 1996, 13(3): 58- 61.
[3] Sova V, Szilasi J. Application of industrial autofocusing in the purification of lysine[J]. Study Biophys, 1987, 119(1~ 3): 207- 209.
[4] Boruch M, Makowski J, Wachouicz M. Ion exchange processes in separation of nitrogen compounds from potato juice[J]. Technol Chem, 1990, 561(44): 37- 48.
[5] 张 莉,刘利萍,徐铭熙.毛发蛋白水解液中混合氨基酸的测定方法研究[J].氨基酸和生物资源, 1998, 20(4): 31- 34.

(编辑 张大春)

文章编号: 1000-5404(1999)11-0851-02

一种多用小动物离体心脏灌流装置的研制及应用

The preparation and application of a device for *in vitro* heart perfusion of small animal

万子兵,肖家思,闫淑枝 (第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

【提要】 目的: 探讨一种新的多用小动物离体心脏灌流装置。方法: 通过 26例大鼠同时离体左室顺行灌流两鼠双心脏,探讨该灌流装置的适用性。结果: 灌流心脏在 0~ 3h内各心功能指标均无明显变化。结论: 本多用小动物离体心脏灌流装置满足医学科研实验的要求,具有极高的推广应用价值。

自 Langendorff创建离体心脏满足流技术[3]以来,用于离体心脏灌流的装置也应运而生。国外早有定型配套的灌流装置出售,但由于其结构复杂、造价昂贵,致使国内许多医学科研工作者不敢问津而代之以就便器材临时组装,不符合科研实验的要求。我室根据 Langendorff等离体心脏灌流模型[3],结合本室科研实际进行改造,研制出了一种多用小动物离体心脏灌流装置。

1 材料与方法

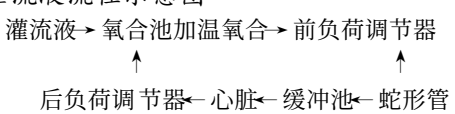
1.1 仪器配备

仪器配备: 温度控制器(自制),二道生理记录仪。

1.2 方法

以本装置利用本室建立的离体左室顺行灌流技术[5],以台氏改良液[6]对 26例大鼠行同时灌流两鼠双心脏;采用双心灌流技术[7],对 15例大鼠进行同一大鼠离体心脏左右心室同时灌流(双心灌流)。

1.3 灌流液流程示意图



1.4 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,行配对 t 检验。

2 结果

左室顺行灌流两鼠双心脏的心功能变化见表 1

表 1 左室顺行灌流两鼠双心脏的心功能变化

Time(min^{-1})	AP(kPa)	LVP(kPa)	+dp/dt(kPa·s^{-1})	-dp/dt(kPa·s^{-1})	CF($ml\cdot min^{-1}$)	CO($ml\cdot min^{-1}$)	HR($beat\cdot s^{-1}$)
0	8.2± 1.7	8.8± 1.2	130.2± 16.8	102.4± 16.2	12.0± 2.3	29.3± 12.3	205± 12
30	8.0± 1.2	9.0± 1.4	148.6± 13.2	118.3± 13.6	11.2± 3.1	29.4± 10.1	215± 10
60	8.3± 1.4	9.6± 1.4	153.2± 14.0	119.4± 15.4	10.9± 4.9	39.8± 9.2	228± 9
90	8.1± 1.3	9.5± 1.6	150.1± 13.6	117.3± 15.2	10.8± 5.3	31.6± 10.3	219± 12
120	7.8± 1.7	9.3± 1.2	148.6± 12.7	109.6± 13.4	11.4± 3.5	30.3± 8.6	218± 16
150	7.9± 1.2	9.1± 1.5	136.3± 11.8	107.8± 13.6	11.2± 4.2	29.6± 7.3	209± 14
180	7.6± 1.8	8.9± 1.8	128.2± 12.4	99.3± 15.7	10.9± 3.0	29.2± 11.8	201± 6

前负荷: 1.4 kPaH_2O;后负荷: 6.5 kPaH_2O; AP: 主动脉压; LVP: 左室内压;± dp/dt: 室内压最大上升和下降速率; CF: 冠脉流量; CO: 心输出量; HR: 心率。($P>0.05$)

作者简介: 万子兵,男, 28岁,助理实验师
收稿日期: 1998-12-10;修回日期: 1999-03-18
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net