

胰蛋白酶消化法工作条件的研究及其应用

浙江医科大学 曾 苏 严济祥 史慧珍 刘志强

在生物药物分析中,采用枯草杆菌蛋白酶(Subtilisin Carlsberg)消化生物样品,释放与蛋白质结合的药物,已有大量的文献报道^[1-5]。但是国内该酶的生产较少,价格较贵,且不易获得。因此,我们采用胰蛋白酶(Trypsin)作为组织消化剂,对其工作条件、药物回收率进行了研究。并将建立的胰蛋白酶消化法,用于兔肝和血中安定、氯丙嗪、巴比妥、戊巴比妥和苯巴比妥的浓度测定,获得了满意结果。

一、材料和仪器

1. 胰蛋白酶(1:250) Difco进口分装
2. Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液
3. 751-G 紫外可见分光光度计 上海分析仪器厂
4. SIGMA 1 气相色谱仪 Perkin Elmer (USA)
5. ZS83-1 型内切式组织匀浆器 浙西机械厂

二、胰蛋白酶消化法工作条件的研究

酶浓度、介质 pH、消化温度和时间的影响,可用正交试验法加以选择。本实验采用 $L_{16}(4^4)$ 正交表,其表头设计如下:

表1 正交试验因素及其水平安排

因 素	A	B	C	D
水 平	酶 浓 度 (mg/g组织)	介 质 pH	消化温度 (℃)	消化时间 (hr)
1	30	7.4	40	1
2	40	8.1	50	2
3	50	8.6	55	3
4	60	9.0	60	4

方法取 2g 肝组织的匀浆,加入安定 35μg,混匀。加胰蛋白酶消化质,按文献[6]

叙述的方法提取,用紫外分光光度法^[7]测定其含量。测定结果及其方差分析^[8]列于表 2 和 3。

表2 正交试验结果

试 验 号	A	B	C	D	E	药物含量 (μg/g)
1	1	1	1	1	1	12.11
2	1	2	2	2	2	15.07
3	1	3	3	3	3	14.97
4	1	4	4	4	4	15.13
5	2	1	2	3	4	15.36
6	2	2	1	4	3	13.85
7	2	3	4	1	2	14.89
8	2	4	3	2	1	14.48
9	3	1	3	4	2	15.05
10	3	2	4	3	1	15.85
11	3	3	1	2	4	13.47
12	3	4	2	1	3	15.48
13	4	1	4	2	3	14.84
14	4	2	3	1	4	13.83
15	4	3	2	4	1	14.85
16	4	4	1	3	2	13.16

$\Sigma 1$ 57.28 57.36 52.59 56.31 57.29

$\Sigma 2$ 58.58 58.60 60.76 57.86 58.17

$\Sigma 3$ 59.85 58.18 58.33 59.34 59.14

$\Sigma 4$ 56.68 58.25 60.71 58.88 57.79

极差(R) 3.17 1.24 8.17 3.03 1.85

离差平方和(S) 1.495 0.206 11.08 1.351 0.459

$\Sigma 1-4$ 分别代表正交表中 1-4 水平所对应数据的和。

表3 方差分析表

方差来源	离 差 平 方 和	自由度	均 方	F 值	P 值
A	$S_A = 1.495$	1	1.495	4.50	
C	$S_C = 11.08$	1	11.08	33.32	<0.05
D	$S_D = 1.351$	1	1.351	4.06	
误差	$S_e = S_B + S_E = 0.665$	2	0.3325		

$F_{1-0.05}(1,2) = 18.5$

上述分析结果表明:每克组织加入50mg酶,在pH8.1的缓冲液中,于50℃消化3hr,胰蛋白酶消化法的效率最高。

三、回收率试验

取2g肝组织,用pH8.1的Tris缓冲液匀浆,加入安定100μg或氯丙嗪90μg,混匀。于不断搅拌下,加入100mg酶,置50℃恒温水浴保温3hr。然后经分离提取,用GLC^[1]测定药物回收率。结果与胃蛋白酶消化法^[9]相近。

表4 药物回收率(R%±SD) n=3~7

方 法	安 定	氯 丙 嗪
胰蛋白酶消化法	86.94±5.66	85.11±7.35
胃蛋白酶消化法	85.67±3.45	84.58±8.85

表5 兔肝和血中药物浓度*(μg/g或μg/ml) n=3~4

试 样	安 定	氯 丙 嗪	巴 比 妥	戊 巴 比 妥	苯 巴 比 妥
肝	7.57±0.98	184.29±17.59	24.36±1.69	5.28±0.66	210.05±2.21
血	1.60±0.16	7.01±0.40	16.78±1.97	1.35±0.12	165.87±17.63

*C±SD

与胰蛋白酶的最佳pH范围和最佳温度范围相吻合^[10]。

3. 胰蛋白酶消化法,具有一般酶消化法的优点;其药物回收率与胃蛋白酶消化法比较(t检验)无显著性差异;并且酶的来源方便,价格便宜。因而与其它酶消化法一样,可方便地用于生物药物分析工作。

参 考 文 献

- [1] 曾苏等:法医学杂志 1987 (2):24
[2] Osselton, M. D. et al.: Analyst, 1978 103:1160

四、兔肝和血中一些安眠镇静类药物的测定

取大白兔(由浙医大动房提供),禁食12小时,分别于饲料中拌入一定量药物,任兔自然进食。给药剂量是安定和氯丙嗪250mg/kg;巴比妥类300mg/kg。4小时后将兔处死。取兔肝组织和全血,按回收率测定方法,用GLC测量其浓度,结果见表5。

五、讨 论

1. 正交试验结果的极差和方差分析均表明温度对酶消化法的影响较大,应严格控制。这是由于酶的本质是蛋白质,一般60℃以上活性显著丧失;80℃以上绝大多数的酶丧失全部活性^[9]。

2. 本实验选出的酶消化法的工作条件,

- [3] Dickson S T, et al.: J Anal Toxicol, 1980, 4:74
[4] Queree E A, et al.: Ibid, 1985, 9:10
[5] 胡乃钊、严济祥主编:新编毒物分析化学,群众出版社,1986,154—155
[6] 曾苏等:现代应用药理学,1987, (2):5
[7] 徐婉等:常见毒物的微量分析,第一版,北京,群众出版社,1982, 123—129
[8] 周怀恒主编:数理统计,第一版,济南,山东教育出版社,1984,162—165
[9] 南京药学院主编:生物化学,人民卫生出版社,1979,53
[10] Sipis T et al.: Biochem, 1970, 9:2766