

计开口管读数。

### 实 验 结 果

表1 复方细胞色素C中细胞色素C的活性回收

测定次数	细胞色素C参照标准酶活性%	复方细胞色素C中Cyt-C酶活性%	误差%
1	100	96.8	-3.2
2	100	99.4	-0.6
3	100	98.7	-1.3
4	100	100.3	+0.3
5	100	99.5	-0.5
平均	100	98.94	+1.06

表2 复方细胞色素C中辅羧酶的活性回收

测定次数	辅羧酶参照标准酶活性%	复方细胞色素C中辅羧酶活性%	误差%
1	100	103.0	+3
2	100	104.1	+4.1
2	100	104.4	+4.4
4	100	103.4	+3.4
5	100	102.0	+2.0
平均	100	103.4	+3.4

### 讨 论

1. 取五次测定的平均值表明, 在复方细胞色素C中, Cgt.c的生物活性是同量单一状态Cgt.c酶活性的98.94%平均测定误差为1.06%, 单次误差均在±5%以下; 辅羧酶活性是同量单一状态的103.4%, 平均误差为3.4%, 单次误差均在±5%以下。

2. 因为微量检压测定误差允许范围为±5%, 所以用本法测得两物质生物活性的回收率为100%, 说明(1)可以在复合状态下直接测定出两物质的活性; (2)在复方制剂中, 二活性物质完全保持自己独特的生物活性。

3. 因为复方细胞色素C就是基于两物质对立统一的生物反应机理来提高细胞色素C对细胞呼吸赋活的能力, 所以复方细胞色素C的生物活性应是两物质作用的合, 其生物活性高于单一细胞色素C, 甚至可提高一倍。

## 坂口试剂法定量测定生化药物中精氨酸

陆森如 尚 灏\* 谢玉珊\*

坂口试剂能与精氨酸起特征的显色反应<sup>[1]</sup>, 但至今多用于对精氨酸的定性鉴定, 尚未见用于定量的报道, 本文通过正交试验对坂口试剂显色的最佳条件进行了探索, 成功地建立了另一种化学测定精氨酸的方法。该法与已有化学法比较, 不仅同样具有专一性较强、简便、灵敏等优点, 而且避免应用易产生沉淀的8-羟基喹啉<sup>[2]</sup>, 有一定的准确度, 并可用于对含精氨酸生物材料的测定。

### 实 验 部 份

#### 一、试剂、材料与仪器

##### 1.1 试剂:

##### 1.1.1 L-精氨酸标准溶液(1mg/ml) 准

确称取50mg L-精氨酸( $\alpha$ )<sub>D</sub><sup>20</sup> = +25~27°)

事先在105℃烘三小时, 用蒸馏水配制成50ml。

##### 1.1.2 坂口试剂甲液:

0.01% (0.02%, 0.03%)  $\alpha$ -萘酚乙醇溶液—准确称取10 (20, 30) mg  $\alpha$ -萘酚于小烧

\* 杭商院食品系1990届毕业生

杯中加入 5 克尿素, 用 95% 乙醇溶解并定容至 100ml;

### 1.1.3 坂口试剂乙液:

0.7% (1.4%、2.1%) 溴水溶液。

### 1.1.4 10% (20%、30%) NaOH 溶液。

1.2 材料: 由猪大脑提取的不同纯化阶段的 P 物质: (1) P 物质盐析物, (2) 脱盐后 P 物质。

### 1.3 仪器: 721 型分光光度计

### 二、实验方法:

在干燥洁净的具塞比色管中加入 1ml 测定液, 1ml 坂口试剂甲液, 0.5ml NaOH 溶液, 室

温下放置 5 分钟后, 加入 1ml 坂口试剂乙液及 0.5 毫升 NaOH 溶液, 混匀, 在一定温度下, 反应一段时间后, 以试剂空白为对照, 在一定波长下比色测定。

### 三、结果

#### 3.1 最大吸收波长的测定

取干燥洁净比色管两支, 空白管加蒸馏水 1.0ml, 测定管加 1.0ml 浓度为 50 $\mu$ g/ml 的精氨酸标准溶液, 然后按上述实验方法在室温下反应 15 分钟后, 于 490~530nm 范围内测定 O.D 值, 结果分别由表 1, 图 1 所示。

根据光吸收曲线, 选用 512nm 为测定波长。

表 1 不同波长下的光密度值

入(nm)	490	494	498	500	502	504	506	508	512
O.D值	0.235	0.245	0.254	0.257	0.260	0.261	0.265	0.265	0.265
入(mm)	514	516	518	520	522	524	526	528	530
O.D值	0.265	0.265	0.265	0.265	0.262	0.261	0.258	0.256	0.251

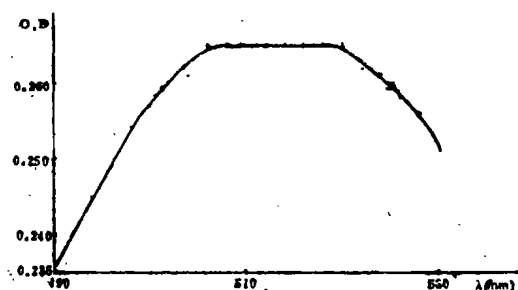


图 1 光吸收曲线

### 3.2 运用正交试验确定显色反应的适宜条件<sup>(3、4)</sup>

选用  $L_9(3^4)$  正交表进行统计分析

表 2 各因素水平表

因 素		A	B		C	D
			试剂浓度%			
水 平	碱度*(%)		甲	乙	温度(℃)	时间(分)
1	2.5		0.01	0.7	10	10
2	5.0		0.02	1.4	20	15
3	7.5		0.03	2.1	30	20

\* 指显色溶液中最终碱度

表 3 正交试验表  $L_9(3^4)$

因素 实验号	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

$$Q_i = \frac{1}{3} (I_i^2 + II_i^2 + III_i^2)$$

$$P = \frac{1}{9} \left( \sum_{i=1}^9 OD_i \right)^2$$

$$S_i = Q_i - P$$

表4 正交试验结果分析表

因素 实验号	A	B		C	D	O.D		$\overline{O.D}$
		甲	乙					
1	2.5%(1)	0.01%	0.7%(1)	10(1)	10(1)	0.175	0.210	0.193
2	2.5%(1)	0.02%	1.4%(2)	20(2)	15(2)	0.256	0.320	0.288
3	2.5%(1)	0.03%	2.1%(3)	30(3)	20(3)	0.445	0.445	0.445
4	5%(2)	0.01%	0.7%(1)	20(2)	20(2)	0.115	0.118	0.117
5	5%(2)	0.02%	1.4%(2)	30(3)	10(1)	0.175	0.180	0.178
6	5%(2)	0.03%	2.1%(3)	10(1)	15(2)	0.500	0.473	0.487
7	7.5%(3)	0.01%	0.7%(1)	30(3)	15(2)	0.048	0.049	0.0485
8	7.5%(3)	0.02%	1.4%(2)	10(1)	20(3)	0.240	0.230	0.235
9	7.5%(3)	0.03%	2.1%(3)	20(2)	10(1)	0.310	0.321	0.316
I <sub>i</sub>	0.926	0.359		0.915	0.687			
II <sub>i</sub>	0.782	0.701		0.721	0.824			
III <sub>i</sub>	0.600	1.248		0.672	0.797			
I <sub>i</sub> /3	0.309	0.120		0.305	0.229			
II <sub>i</sub> /3	0.261	0.234		0.240	0.275			
III <sub>i</sub> /3	0.200	0.416		0.224	0.266			
I <sub>i</sub> <sup>2</sup>	0.857	0.129		0.837	0.472			
II <sub>i</sub> <sup>2</sup>	0.612	0.491		0.520	0.679			
III <sub>i</sub> <sup>2</sup>	0.360	1.558		0.452	0.635			
Q <sub>i</sub>	0.610	0.726		0.603	0.595			
S <sub>i</sub> (平方和)	0.018	0.134		0.011	0.003			

注: I<sub>i</sub>为第i列“1”水平对应 $\overline{O.D}$ 之和

直观分析: 以O.D ( $\frac{I_i}{3}$ ,  $\frac{II_i}{3}$ ,  $\frac{III_i}{3}$ ) 为纵坐标, 因素水平为横坐标, 作图如下:

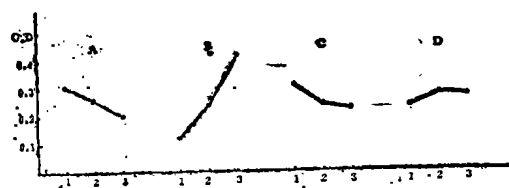


图2 直观分析图

方差分析: (见表5)

由直观分析和方差分析可得如下结果:

a. 最佳反应条件为: A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>即:

最终碱度: 2.5%; 试剂浓度: 0.03% α-萘酚乙醇溶液, 2.1% 溴水; 显色温度: 10℃ (但为便于控制温度选用15℃) 显色时间: 15分钟。

b. 由于  $F_{0.05} < F_B < F_{0.01}$ , 所以因素B对显色反应有显著影响;  $F_{0.2} < F_A < F_{0.1}$ , 所以因素A对显色反应有一定影响;  $F_c < F_{0.2}$ , 所以因素C对显色影响较小, 因素D对显色影响更小。各因素影响的主次顺序为  $B > A > C > D$

### 3.3 标准曲线的制作

用实验得出的最佳反应条件, 对不同浓度的精氨酸标准溶液进行比色测定, 所得结果如表6所示:

表5 方差分析表

方差来源	平方和(S)	自由度(f)	均方(S/f)	F	临界值
A	0.018	2	0.009	6.00	$F_{0.05}(2,2) = 19$
B	0.134	2	0.067	44.67	$F_{0.01}(2,2) = 99$
C	0.011	2	0.0055	3.67	$F_{0.1}(2,2) = 9$
D	0.003	2	0.0015	1	$F_{0.2}(2,2) = 4$
总和	0.166	8			

表6 不同浓度精氨酸的O.D值

Arg( $\mu\text{g}$ )	2.5	5.0	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0	60.0	70.0
O.D值	0.021 0.025	0.061 0.061	0.140 0.120	0.265 0.245	0.380 0.400	0.540 0.505	0.645 0.670	0.730 0.790	0.980 0.950
$\overline{\text{O.D}}$	0.023	0.061	0.130	0.255	0.390	0.523	0.658	0.760	0.965

用回归方程作标准曲线

测量值个数 (n)	精氨酸量 (X) ( $\mu\text{g}$ )	$\overline{\text{O.D}}$ 值 (y)	$X^2$	$y^2$	xy
1	2.5	0.023	6.25	0.0005	0.0575
2	5.0	0.061	25	0.0037	0.305
3	10.0	0.130	100	0.0169	1.30
4	20.0	0.255	400	0.0650	5.10
5	30.0	0.390	900	0.152	11.7
6	40.0	0.523	1600	0.274	20.9
7	50.0	0.658	2500	0.433	32.9
8	60.0	0.760	3600	0.578	45.6
9	70.0	0.965	4900	0.931	67.55
$\Sigma$	287.5	3.765	14031.25	2.454	185.433

$$a = \frac{\sum x^2 \sum y - \sum x \sum xy}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = \frac{14031.25 \times 3.765 - 287.5 \times 185.433}{9 \times 14031.25 - (287.5)^2} = -0.0109$$

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = \frac{9 \times 185.433 - 287.5 \times 3.765}{9 \times 14031.25 - (287.5)^2} = 0.0134$$

由此得回归方程为;

$$Y = bx + a = 0.0134x - 0.0109$$

据此作标准曲线如图 3 所示:

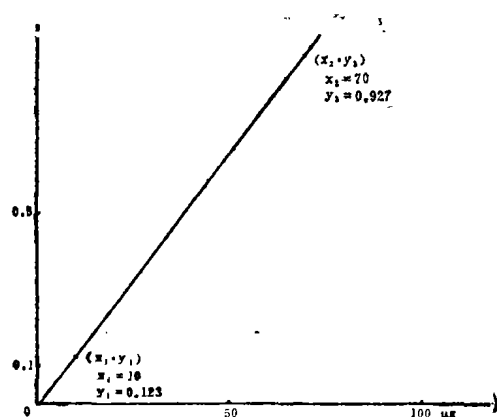


图 3 精氨酸标准曲线

$$\begin{aligned} \text{相关系数 } r &= \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{\sqrt{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \cdot \sqrt{\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}}} \\ &= \frac{185.433 - \frac{287.5 \times 3.765}{9}}{\sqrt{14031.25 - \frac{287.5^2}{9}} \cdot \sqrt{2.454 - \frac{3.765^2}{9}}} \\ &= 0.998 \quad \therefore x, y \text{ 之间相关性好。} \end{aligned}$$

表 7 回收率测定结果

试样量	精氨酸加入量	精氨酸测得值*	回收率
1 mg	0	27.94 μg	9.7%
1 mg	50 μg	75.63 μg	

\* 为五次实验平均值

表 8 精密度试验结果

实验次数 (n)	精氨酸含量* (μg/mg)	$\bar{x} \pm S$ (μg/mg)	CV%
1	27.70	28.91 ± 1.19	4.1
2	29.35		
3	29.35		
4	27.70		
5	30.45		

\* 为三次平行试验之平均值

### 3.4 回收率试验

#### 3.4.1 样品处理:

精确称取 0.05g 含精氨酸多肽 P 物质的猪大脑提取物试样于小烧杯中, 加入 10ml 80% 乙醇溶液室温放置 10 分钟转移至 50ml (容量瓶中, 用水定容过滤, 滤液备用另取同量试样加入 2.5 mg 标准精氨酸按上述方法作相同处理

#### 3.4.2 回收率测定:

分别吸取上述处理后的样液各 1ml, 按实验方法操作, 测得 O、D 值计算回收率, 结果如表 7 所示:

### 3.5 精密度试验

取同一批号含 P 物质的猪大脑提取物试样五份, 分别按上述样品处理方法处理, 然后分别取 1ml 样液, 按实验方法操作结果如表 8:

### 3.6 应用:

用本文所建立的方法分别测定了从猪大脑中提取的 P 物质盐析物及脱盐后 P 物质中精氨酸含量, 结果如表 9 表 10 所示。

表 9 P-物质盐析物中精氨酸含量

批号	精氨酸含量(%)*	平均
900215	1.29	1.30
900225	0.67	
900506	1.95	

表 10 脱盐后 P 物质中精氨酸含量

批号	精氨酸含量(%)*	平均
900227	4.28	4.01
900418	3.74	
900608	4.02	

\* 均为二次平行试验平均值, 并均以干燥品计。

由实验结果可见精氨酸含量明显地随着提取物纯化程度的提高而增大。

## 讨 论

1. 本文所建立的方法与已有方法比较, 具有专一性强、灵敏、快速、简便易行等优点, 但重现性不够理想, 这主要由于坂口试剂甲中的乙醇及试剂乙中的溴, 均是易挥发物质, 致使这两种试剂的浓度均不够稳定, 而试剂甲、乙的浓度恰恰是对显色有显著影响的因素, 为改善测定的重现性, 必需严格控制实验条件, 并且所有 O-D 值的测定均应在 10 分钟之内全部完成, 因为从实验得出显色 15 分钟后颜色的稳定

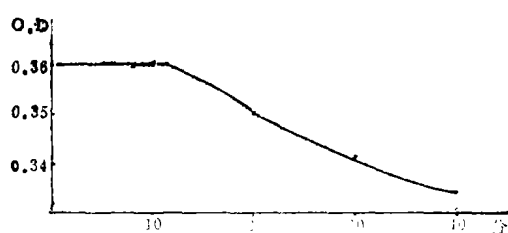


图 4 放置时间与光密度关系曲线

性如图 4 所示:

2. 本文中所测样品是以 P 物质为主的猪大脑提取物, P 物质是由 8 种氨基酸组成的 11 肽其排列顺序为-精-脯-赖-谷酰-谷酰-苯丙-苯丙-甘-亮-甲硫-NH<sub>2</sub> 精氨酸是末端氨基酸, 故可用本法显色测定, 并由测定结果表明精氨酸含量与其纯化程度有明显的对应关系, 因此有可能应用此法代替繁复费时的生物活性测定手段, 简便、快速地监控其纯化过程。

## 参 考 文 献

1. 潘家秀 等《蛋白质化学研究技术》  
1973 P23 科学出版社
2. 王妙虎 上海科技大学学报  
1989 (2) P94~7
3. 上海市科技交流站 正交试验设计  
法 1975 上海人民出版社
4. 董 刚等 食品研究与开发  
1988 (3) P12~15

# 胸腺肽对正常及带瘤小鼠胸腺 细胞及其亚群增殖反应的作用

杭州大学生物系 虞研原 葛云法

胸腺是机体重要的中枢免疫器官, 为 T 淋巴细胞发育, 特别是受体功能库及自我识别限制能力获得的主要场所<sup>[1]</sup> 研究正常及带瘤小鼠胸腺细胞增殖反应的变化, 可作为了解机体免疫力变化的一个指标, 由胸腺所产生的胸腺素对细胞 T 的发育、分化、成熟起着十分重要的作用。对调节机体免疫功能有一定作用<sup>[2,3]</sup>。胸腺肽作为胸腺所分泌的生物活性物质, 在诱导 Pre-T 细胞发育为胸腺细胞以及胸腺外成熟 T 细胞的功能中可能有调整作用<sup>[4]</sup>。并能提高

小鼠成熟 T 细胞分泌 IL-2 的能力, 本文报告<sup>3</sup>H-TaR 掺入法研究胸腺肽在体内、外对带瘤 (EAC 及 S<sub>180</sub>) 小鼠胸腺细胞及其亚群在含条件培养液 (CM) 和致有丝分裂原 (ConA) 诱导下转化反应的影响作为治疗肿瘤的辅助手段提供依据。

## 材 料 和 方 法

一、动物及肿瘤模型 BALB/C 纯系小鼠, 6~8 周龄。体重 17±2 克, 雄性, 肿瘤模型为艾氏腹水癌 (EAC) 及实体肉瘤 (S<sub>180</sub>)。