



一株来源于酒曲的纤溶酶产生菌的鉴定及其酶学性质

曹兴南, 王海宽, 孙岩, 戚薇

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 从酒曲中分离到一株纤溶酶产生菌, 经形态及 ITS 序列分析鉴定为菊芋小孢根霉 (*Rhizopus microsporus* var. *tuberosus*)。酶学性质研究表明, 该纤溶酶的最适作用温度为 37 °C, 最适作用 pH 为 7.0。在 37 °C 保温 4 h 酶活力仍保存 95%, 57 °C 下保温 4 h 后仍有一定酶活。该酶具有广泛的酸碱适应性, 在 pH < 3.4 时仍残留部分活性; 最稳定的 pH 范围是 6~8。Zn²⁺、Cu²⁺ 对酶活有抑制作用, Na⁺、Ca²⁺、Mn²⁺ 对酶活具有明显的促进作用。该酶在人工肠液中具有较好的稳定性, 37 °C 保温 4 h 后残余酶活仍然保持在 80% 以上, 有望制成注射剂应用于临床。

关键词: 纤溶酶; 菊芋小孢根霉; 酶学性质

中图分类号: Q93 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2011)05-0013-06

Identification of Producing Fibrinolytic Enzyme Strain from Starter and Its Enzymatic Properties

CAO Xing-nan, WANG Hai-kuan, SUN Yan, QI Wei

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: A strain producing fibrinolytic enzyme was isolated from starter. The strain was identified as *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* based on the morphological and ITS sequence. The enzymatic properties of the fibrinolytic enzyme secreted by the strain were determined. The properties tests suggest that the optimum temperature and pH were 37 °C and 7.0, respectively. The enzyme retained 95% of its initial activity by retaining for 4 h at 37 °C, and when it was treated at 57 °C for 4 h, the enzyme was still remained of activity. The enzyme had a wide range of pH adaptability, it still remained of part of activity when pH was adjusted to a level (pH < 3.4); and it remained enzyme activity in between the range of pH 6.0-8.0. Zn²⁺ and Cu²⁺ have a very clear function to restrain the enzyme activity whereas Na⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ showed obvious stimulation on the enzyme. The results show that the enzyme is stable in the artificial intestinal juice, it retained 80% of its initial activity by retaining for 4 h at 37 °C. It may be developed to injection used in clinical research.

Keywords: fibrinolytic enzyme; *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus*; enzymatic properties

近年来脑血栓、肺血栓、急性心肌梗死等血栓性疾病的致残率和致死率一直高居不下, 已经成为人类死亡的三大疾病之一, 正严重危害着人类的生命和健康。我国的心肌梗死率也在逐年上升, 因此, 如何提高血栓病的防治水平, 是医药学界亟需解决的问题。目前血栓性疾病的治疗方法主要有三种: 外科手术、抗凝以及药物溶栓疗法。其中, 外科手术的见效快, 可是手术操作复杂、费用高、有创伤、术后复发率

也高^[1-2]; 抗凝治疗只能抑制或防止血栓形成, 不能从根本上完全治愈^[3-4]; 而药物溶栓法是通过使用溶栓药物, 从而使血凝块中的纤维蛋白降解成可溶物质促使循环畅通^[5-6], 它与外科手术相比费用低, 与抗凝法相比死亡率低。因此, 药物溶栓疗法是目前临床界应用最广泛、最有效的治疗手段。人们已经通过多种途径提取出了纤维蛋白溶解酶(简称纤溶酶)作为溶栓药物。

收稿日期: 2011-03-10; 修回日期: 2011-06-20

基金项目: 天津市科技支撑计划项目(09ZCKFNC00800, 10ZCKFNC01600)

作者简介: 曹兴南(1986—), 男, 江苏人, 硕士研究生; 通信作者: 戚薇, 教授, 博导, qiwei@tust.edu.cn.

溶栓药物的来源很广泛,主要包括动物、植物和微生物^[7]。微生物种类多,繁殖速度快,生长条件易于控制,因而可以通过控制发酵条件来获得大量的目的产物^[8]。微生物来源的溶栓药物可以分为两类:一类是纤溶酶原激活剂,例如链激酶(SK)和葡激酶(SaK),它们可以将血液中的纤溶酶原激活形成纤溶酶,使具有丝氨酸蛋白酶活性的纤溶酶降解纤维蛋白,从而起到溶栓的作用;另一类是纤溶酶类物质,它们不是间接地通过激活纤溶酶原降解血栓,而是通过直接降解纤维蛋白来溶解血。

纤溶酶一般是由芽孢杆菌^[9-12]、链霉菌^[13]、葡萄球菌属^[14]、华根霉^[15]等产生的。国内外对于小孢根霉的研究较少,而对小孢根霉产纤溶酶的报道还未涉及。莫新迎等^[16]对其产生耐酸性 α -淀粉酶的条件进行了研究,Arnthong等^[17]报道了小孢根霉产生葡糖淀粉酶,Mitchell等^[18]对小孢根霉产脂酶作了研究,Junior等^[19]研究了碱性磷酸酶的产生,本课题组研究发现其可以产生纤溶酶。

本实验室从酒曲中分离出一株纤溶酶产生菌的菌株,经鉴定为菊芋小孢根霉。通过体外溶栓实验证明此菌株有较好的溶栓作用。本文对小孢根霉液态发酵生产的纤溶酶的部分酶学性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

由本实验室从酒曲中分离得到菌株 Cq-1。

牛血纤维蛋白原、凝血酶和琼脂糖, Sigma 公司;其余试剂均为分析纯或生化试剂。

1.2 培养基

斜面培养基: PDA 培养基^[20]。

种子培养基(g/L): 糊精 20, 蛋白胨 15, pH 自然。

发酵培养基(g/L): 糊精 10, 蛋白胨 20, 豆粕 20, pH 自然。

1.3 培养方法

斜面培养方法: 保存菌种接入斜面培养基, 28 °C 恒温培养 5 d。

三角瓶液态发酵培养方法: 用无菌水将斜面上的孢子洗下, 转入装有玻璃珠的无菌生理盐水中, 振荡, 计数。将孢子悬液接入灭过菌的 70 mL 种子培养基中(孢子浓度为 3×10^6 mL⁻¹), 于 28 °C、150 r/min 条件下培养 11 h。液体种子 20%接种于 50 mL 发酵培养基中(500 mL 三角瓶), 28 °C、170 r/min 条件下

培养 60 h。

1.4 菌株 Cq-1 的鉴定

1.4.1 形态结构观察

菌株接种于 PDA 平板上, 28 °C 下复壮, 再于 28 °C 下培养。每隔 1 d 观察 1 次, 记录菌落形态特征和培养性状, 并测量菌落直径大小。待菌落产孢后, 挑取少量孢子和产孢结构, 显微镜下观察其个体形态。参考文献[21-22]方法, 进行种类鉴定。

1.4.2 序列测定

基因组提取采用三博远志真菌基因组提取试剂盒。按照说明书上方法进行操作。参照 White 等^[23]发表的 ITS 通用引物, 设计 ITS5(5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3')、ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 引物对。PCR 反应体系: dNTP(10 mmol/L) 1 μ L, Taq polymerase 1 U, ITS5 (10 μ mol/L) 2 μ L, ITS4(10 μ mol/L) 2 μ L, 模板 1 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, ddH₂O 50 μ L。PCR 扩增程序为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 60 s、35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增产物交由北京三博远志生物技术有限责任公司测序。

1.5 菊芋小孢根霉纤溶酶对纤溶酶原的激活作用

采用加热平板法^[24]。市售的纤维蛋白原含有纤溶酶原, 纤溶酶原在激活物的作用下转变成具有纤溶活性的纤溶酶, 从而促进纤维蛋白的溶解。经加热的纤维蛋白平板中的纤溶酶原会变性、失活而不能被激活。将配制好的血纤维蛋白阳性平板置 85 °C 保温 30 min, 冷却至室温制成阴性平板。阳性平板反映了直接溶解纤维蛋白及激活纤溶酶原间接溶解纤维蛋白的双重作用, 而阴性平板中纤溶酶原受热失活, 仅反映酶的直接纤溶活性。取粗酶液 10 μ L 分别点在阴性纤维蛋白平板和阳性纤维蛋白平板上检测纤溶活性, 以此判断纤溶酶溶解纤维蛋白的作用方式。

1.6 粗酶液的制备

菌体活化后, 摇瓶培养 60 h, 将发酵液在 8 000 r/min、4 °C 条件下离心 20 min, 取上清液经饱和度和为 70%的硫酸铵溶液进行盐析, 对沉淀物质进行除盐, 然后经真空冷冻干燥机制成粉末, 即得到纤溶酶粗酶粉。将粗酶粉溶于去离子水中, 配成浓度为 50 mg/mL 的粗酶液。

1.7 酶活测定方法

平板溶圈法, 参考文献[25]方法并稍加改进。

溶液 A: 0.2 g 血纤维蛋白原溶于 50 mL 巴比妥(pH 7.8)溶液中。溶液 B: 0.25 g 琼脂糖溶于 50 mL

医用生理盐水,加热溶解。

溶液 A 在 45 °C 水浴锅中保温 5 min, 溶液 B 在 45 °C 水浴锅中保温 30 min, 然后加入 200 U/mL 的凝血酶 1 mL, 混匀。分别取 5 mL 溶液 A 和 5 mL 溶液 B 铺在平板上混匀, 即为血纤维蛋白平板。

用尿激酶标准品做纤溶酶活性标准曲线, 37 °C 保温 6 h, 标准曲线采用指数回归, 其方程 $y = 0.1052 e^{4.013x}$, $R^2 = 0.9965$; 式中 y 为酶活力, x 为溶圈直径。取待测样品 10 μ L 点在血纤维蛋白平板上, 37 °C 保温 6 h 后测定溶圈直径, 通过上述回归方程计算待测样品酶活力。

1.8 酶学性质的初步研究

1.8.1 纤溶酶的最适作用温度

取粗酶液 10 μ L 点在血纤维蛋白平板上, 分别置 27、32、37、42、47、52、57 °C 下保温 6 h, 测定温度对酶活力的影响。以所测得酶活力最高的温度下的酶活力为对照, 设定其相对酶活力为 100%。

1.8.2 纤溶酶的最适作用 pH

配制 pH 为 2.8、3.4、4.0、4.6、5.2、5.8、6.4、7.0、7.6、8.2、8.8、9.4、10.0、10.6、11.2、11.8 的广范围的缓冲液, 制成不同 pH 的血纤维蛋白平板, 取粗酶液 10 μ L 点在不同 pH 的血纤维蛋白平板中 37 °C 恒温作用 6 h, 测定 pH 对酶活力的影响。以所测得酶活力最高的 pH 条件下的酶活力为对照, 设定其相对酶活力为 100%。

1.8.3 纤溶酶的温度稳定性

将粗酶液于 27、32、37、42、47、52、57 °C 下分别保温 0.5、1、2、4 h, 取出后迅速冷却在 pH 为 7.0 的血纤维蛋白平板上测定酶活。以未进行保温处理的粗酶液的酶活力为对照, 设定其相对酶活力为 100%。

1.8.4 纤溶酶的 pH 稳定性

配制 pH 为 3、4、5、6、7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, pH 为 8、9 的巴比妥钠-盐酸缓冲液, pH 为 10 的硼砂-氢氧化钠缓冲液, pH 为 11 的磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液和 pH 为 12 的氯化钾-氢氧化钠缓冲液, 浓度均为 0.02 mol/L。以体积比 1 : 1 分别与 pH 3 ~ 12 的缓冲液进行混合, 均匀混合后置 37 °C 恒温箱下保温 2、4、12、24 h, 调整酶液 pH 至 7.0, 以未进行处理的酶活力为对照, 设定其相对酶活力为 100%。

1.8.5 金属离子对纤溶酶的影响

用去离子水配制 10 mmol/L 和 1 mmol/L 的 NaCl、KCl、CaCl₂、MnSO₄、MgCl₂、CuSO₄、FeSO₄、ZnSO₄ 溶液, 取纤溶酶酶液与同体积的不同浓度金属

离子溶液混合, 放入 37 °C 恒温箱中保温 18 h, 测定其酶活力, 用纤溶酶与去离子水混合作对照, 设定其相对酶活力为 100%。

1.8.6 人工肠液对纤溶酶稳定性的影响

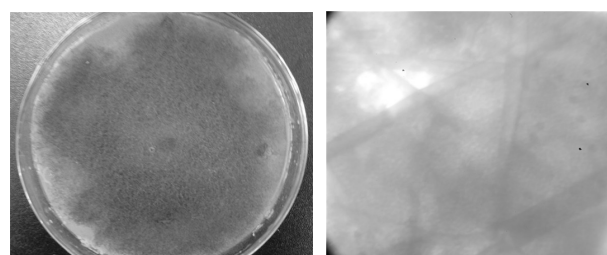
人工肠液参照《中华人民共和国药典》(2005 年版)^[26] 配制。取粗酶液 0.5 mL 加入到 1 mL 人工肠液中, 37 °C 分别保温放置 1、2、3、4 h, 取出迅速冷却测定酶活, 并以所加纤溶酶的总活性为标准计算残余酶活。

2 结果与分析

2.1 菌株的鉴定

2.1.1 菌株的形态特征

菌株 Cq-1 在 PDA 平板上的培养性状见图 1(a)。培养 1 d 后, 菌落直径只有 1.29 cm, 只有中心有菌落, 呈白色, 棉絮状, 生长缓慢; 2 d 后菌落直径就达到 5.21 cm, 在平板边缘也有少许菌落, 菌落整体仍呈现白色, 但有少许灰色, 生长比较迅速。培养 3 d 后, 菌落已经快速蔓延到整个平板, 菌落呈现灰白各半, 棉絮状, 培养基背面不变色(无色素产生)。培养 5 d 后, 菌落已经长满平板, 呈现灰黑色, 棉絮状。将含少量孢子的 Cq-1 菌丝挑取少许放入乳酸苯酚油中并摊开, 小心盖上盖玻片置于显微镜下观察, 形态见图 1(b)。



(a) 菌落形态

(b) 个体形态

图 1 菌株 Cq-1 的菌落形态和个体形态

Fig.1 Colony and individual characters of the Cq-1

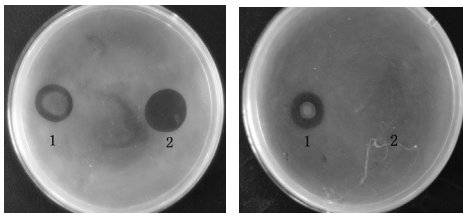
将菌株 Cq-1 以上形态及培养特征与《真菌分类学》^[20]、《半知菌属图解》^[21] 中相应科、属、种鉴定有关的内容进行对照, 初步鉴定出菌株 Cq-1 属于毛霉科, 根霉属。

2.1.2 ITS 基因序列测序结果分析

将 ITS 基因序列提交到 GenBank 进行 Blast 检索, 发现其与 *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* 同源性最高, 达到 99%, 确定为菊芋小孢根霉。

2.2 菊芋小孢根霉纤溶酶对纤溶酶原的激活作用

如图 2(a)和图 2(b)所示,在加热的阴性平板上尿激酶无活性,而在含纤溶酶原的纤维蛋白平板上有溶纤活性,说明尿激酶的溶纤作用是通过激活纤溶酶原.而菊芋小孢根霉纤溶酶无论在加热平板上还是在含纤溶酶原的平板上都表现出溶纤活性,前者溶圈垂直直径乘积是 14.86 mm × 15.08 mm,后者是 16.08 mm × 15.28 mm,两者并无显著差异,说明该酶的溶纤方式是直接溶解纤维蛋白,而不是激活纤溶酶原形成纤溶酶而水解纤维蛋白.



(a) 阳性平板 (b) 阴性平板
1.菊芋小孢根霉纤溶酶; 2.尿激酶

图 2 菊芋小孢根霉纤溶酶对纤溶酶原的激活作用

Fig.2 Activation of plasminogen by the fibrinolytic enzyme produced by *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus*

2.3 纤溶酶的酶学性质

2.3.1 最适作用温度

温度对纤溶酶相对酶活力的影响如图 3 所示.结果表明,在 27~37℃范围内,随温度的升高,酶反应速度加快,酶活力升高;高于 37℃,酶活力下降.该纤溶酶的最适作用温度为 37℃,说明其在人体生理温度下活力很高.

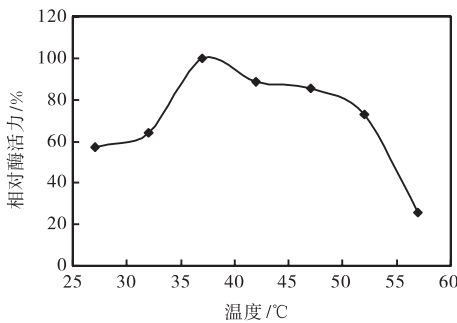


图 3 温度对纤溶酶相对酶活力的影响

Fig.3 Effect of temperature on relative enzyme activity of the fibrinolytic enzyme

2.3.2 最适作用 pH

pH 对纤溶酶相对酶活力的影响如图 4 所示.人体血液的 pH 在 7.35~7.45 之间,和此生理 pH 相比较,纤溶酶在 pH 6.4~8.2 范围的相对酶活均在 80% 以上,pH 低于 6.4 时酶活力迅速降低.在 pH 7.0 条

件下活力最高,最适作用 pH 为 7.0.

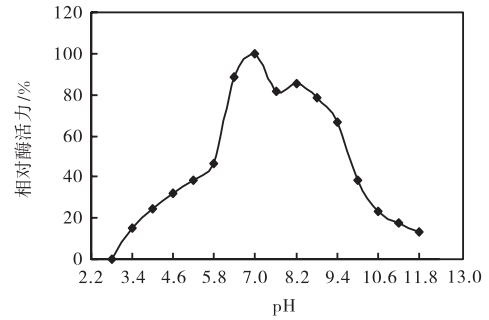


图 4 pH对纤溶酶相对酶活力的影响

Fig.4 Effect of pH on relative enzyme activity of the fibrinolytic enzyme

2.3.3 温度稳定性

温度对纤溶酶活力稳定性的影响如图 5 所示.37℃保温 4 h 酶活力保存 95%,47℃和 52℃下保温 4 h 酶活力均保存 35%,57℃下保温 4 h 后仍有一定酶活,说明该酶对高温较为敏感,但高温下仍可保持一定酶活,其在生理温度下较为稳定.

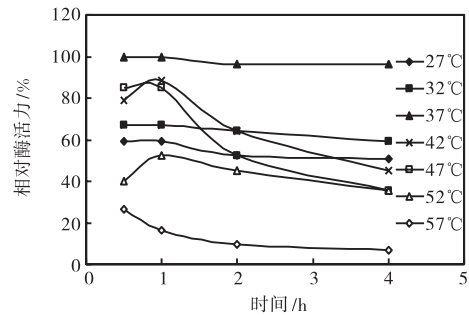


图 5 温度对纤溶酶活力稳定性的影响

Fig.5 Effect of temperature on stability of the fibrinolytic enzyme

2.3.4 pH 稳定性

纤溶酶的 pH 稳定性如图 6 所示.该酶的 pH 稳定性曲线是典型的钟罩形曲线,该酶最稳定的 pH 范围是 6~8,37℃保存 24 h 后残余酶活均保持在 90% 以上.

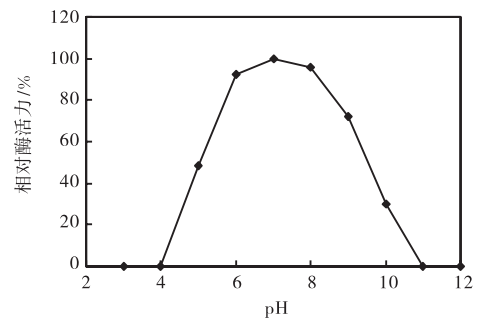


图 6 pH对纤溶酶活力稳定性的影响

Fig.6 Effect of pH on stability of the fibrinolytic enzyme

2.3.5 金属离子对纤溶酶的影响

不同金属离子对酶活性的影响如图 7 所示. 结果显示,除了 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 抑制纤溶酶的活性之外,其他金属离子都对酶有一定的激活作用,其中 Na^+ 、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 的作用较为明显,且当金属离子浓度为 10 mmol/L 时的激活作用比 1 mmol/L 时要高.

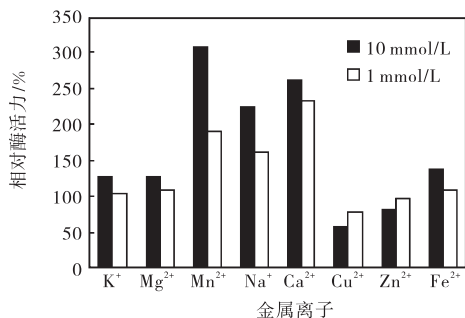


图 7 金属离子对纤溶酶的影响

Fig.7 Effect of ion on the fibrinolytic enzyme

2.3.6 人工肠液对纤溶酶稳定性的影响

人工肠液对纤溶酶稳定性的影响,见表 1. 纤溶酶在人工肠液中具有较好的稳定性. 37 °C 放置 4 h 后残余酶活仍然保持在 80%以上,胰蛋白酶对纤溶酶几乎没有影响. 由此可见肠道中的碱性环境以及人体 37 °C 的温和条件适于该酶的稳定.

表 1 人工肠液对纤溶酶稳定性的影响

Tab.1 Effect of artificial intestinal juice on stability of the fibrinolytic enzyme

时间/h	1	2	3	4
残余酶活/%	97.39	96.38	89.55	82.65

3 结 论

从酒曲中分离筛选得到产纤溶酶的菌株经鉴定为菊芋小孢根霉,并对该菌株产生的纤溶酶进行了酶学性质的研究,为该酶以后作为溶栓药物的开发提供了依据.

该纤溶酶最适作用温度为 37 °C,说明在人体生理温度下活力很高;对环境酸碱度不敏感,即使在 $\text{pH} < 3.4$ 时仍残留部分活性,说明该酶在通过胃的酸性环境后仍能保持一定的纤溶活性,而其最适作用 pH 为 7.0,最稳定的 pH 范围是 6~8;大部分的金属离子对其活性都有促进作用,其中 Na^+ 、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 作用较明显. 该酶在人工肠液中具有较好的稳定性,有望制成注射剂应用于临床.

参考文献:

[1] 张纪蔚. 肺栓塞的预防和治疗进展[J]. 中国实用外科

杂志,2005,25(4):246-248.

- [2] Kinsara A J, Al-Bogami S. Prosthetic valve thrombosis-case report and literature review [J]. European Journal of Internal Medicine, 2003, 14(7): 438-440.
- [3] 吕翠平,董小黎. 肺血栓栓塞的治疗进展[J]. 临床荟萃,2005,20(14): 836-838.
- [4] Losi M A, Golino P, Betocchi S, et al. Massive chronic atrial thrombosis[J]. International Journal of Cardiology, 2003, 90(2/3): 323-324.
- [5] Khan I A, Gowda R M. Clinical perspectives and therapeutics of thrombolysis[J]. International Journal of Cardiology, 2003, 91(2/3): 115-127.
- [6] 李鹤,郝晓元,雷田香,等. 中药抗血栓的实验研究进展[J]. 湖南中医学院学报,2006,26(3): 63-64.
- [7] 余巧燕,孙晋民. 溶栓药物的研究进展[J]. 医学理论与实践,2009,22(1): 30-32.
- [8] 史丰坤,刘建军,赵颖,等. 微生物来源溶栓药物的研究进展[J]. 山东轻工业学院学报:自然科学版,2008,22(4): 26-29.
- [9] Nakamura T, Yamagata Y, Ichishima E. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene, aprn, of *Bacillus subtilis* (natto) [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1992, 56(11): 1869-1871.
- [10] Kim W, Choi K, Kim Y, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(7): 2482-2488.
- [11] Choi N S, Chang K T, Maeng P J, et al. Cloning, expression and fibrin(ogen)olytic properties of a subtilisin DJ-4 gene from *Bacillus* sp. DJ-4[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 236(2): 325-331.
- [12] 阎家麒,童岩,臧莹安. 豆豉纤溶酶的纯化及其性质研究[J]. 药物生物技术,2000,7(3): 149-152.
- [13] 武临专,王以光. 链霉菌 C-3662 产生的纤溶活性蛋白酶的纯化与理化性质[J]. 中国生物化学与分子生物学学报,2001,17(1): 85-90.
- [14] Choi N S, Song J J, Chung D M, et al. Purification and characterization of a novel thermoacid-stable fibrinolytic enzyme from *Staphylococcus* sp. strain AJ isolated from Korean salt-fermented Anchovy-joet [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(3): 417-426.
- [15] 杜连祥,刘晓兰,路福平,等. 根霉 12^h 发酵产生纤溶酶的酶学性质[J]. 生物工程学报,2005,21(2): 323-327.

- [16] 莫新迎,高梅莹,韩丹,等. 耐酸性 α -淀粉酶产生菌筛选及培养基优化[J]. 中国酿造,2010(4):85-88.
- [17] Arnthong J, Wanitchaploy B, Sakai K, et al. Statistical screening of factors affecting glucoamylase production by a thermotolerant *Rhizopus microsporus* TISTR 3518 using Plackett-Burman design[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(43):7312-7316.
- [18] Mitchell D A, Krieger N, Alberton D, et al. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater[J]. Food Technology and Biotechnology, 2010, 48(1):28-35.
- [19] 杜连祥,路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,2008.
- [20] Barbosa A, Guimarães L H S, Terenzi H F, et al. Purification and biochemical characterization of thermostable alkaline phosphatases produced by *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*[J]. Folia Microbiologica, 2008, 53(6):509-516.
- [21] 邵力平,沈瑞祥,张素轩,等. 真菌分类学[M]. 北京:中国林业出版社,1984.
- [22] Barnett H L, Hunter B B. 半知菌属图解[M]. 沈崇尧,译. 北京:科学出版社,1977.
- [23] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990:315-322.
- [24] 杨嘉树,李令媛,茹炳根. 蚯蚓体内一种纤溶酶原激活剂(e-pA)的分离纯化[J]. 中国生物化学与分子生物学报,1998,14(2):156-163.
- [25] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Arch Biochem Biophys, 1952, 40(2):346-351.
- [26] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2005.

(上接第12页)

用Arrhenius微分法和MKN积分法求得银杏萜内酯A、B、C和白果内酯的热分解动力学方程分别为 $d\alpha/dt = A \exp(-E/RT)^3 \alpha^{2/3}$ 、 $d\alpha/dt = A \exp(-E/RT)^2 (1-\alpha)^{3/2}$ 、 $d\alpha/dt = A \exp(-E/RT)^{3/2} (1-\alpha)^{4/3} [1/(1-\alpha)^{1/3} - 1]^{-1}$ 、 $d\alpha/dt = A \exp(-E/RT)^2 (1-\alpha)^{3/2}$; 表观化学能分别为16.92、92.88、167.80、89.05 kJ/mol, 动力学补偿效应表达式分别为 $\ln A = 0.280 E - 5.53$ 、 $\ln A = 0.307 E - 4.59$ 、 $\ln A = 0.302 E - 4.13$ 、 $\ln A = 0.333 E - 4.32$.

用热分析方法对传统中药中主要活性成分单体类化合物进行药物研究,可用较少的样品快速获得较多的信息,如药物的熔点、晶型变化、相变、纯度、水分等,可以作为药物鉴别的一种独特手段.

参考文献:

- [1] Braquet P. The ginkgolides: Potent platelet-activating factor antagonists isolated from *Ginkgo biloba* L. : Chemistry, pharmacology and clinical applications[J]. Drugs Future, 1987, 12(7):643-649.
- [2] 吴雪丰,王秋娟,楼凤昌. 银杏内酯对大鼠局灶性脑缺血的保护作用[J]. 中国药科大学学报,2001,32(2):141-145.
- [3] Bruno C, Cuppini R, Sartini S, et al. Regeneration of motor nerves in bilobalide-treated rats[J]. Planta Medica, 1993, 59(4):302-307.
- [4] 王秋娟,吴雪丰,刘文涛. 银杏内酯对体外PC12细胞拟缺血缺氧损伤及缺血继发性凋亡的作用[J]. 中国天然药物,2003,1(4):213-218.
- [5] 楼凤昌,凌娅,唐于平,等. 银杏萜内酯的分离、纯化和结构鉴定[J]. 中国天然药物,2004,2(1):11-15.
- [6] Jaracy S, Malik S, Nakanishi K. Isolation of ginkgolides A, B, C, J and bilobalide from *G. biloba* extracts[J]. Phytochemistry, 2004, 65(21):2897-2902.
- [7] Wesley W. Thermal analysis[M]. 3th edition. New York: John Wiley & Sons, 1986:101-150.
- [8] Zhang J J, Ge L G, Zhang X L, et al. Thermal decomposition kinetics of the Zn(II) complex with norfloxacin in static air atmosphere[J]. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 1999, 58(2):269-278.