

复合多糖生化 研究技术

张惟杰主编

上海科学技术出版社



58.17422
551

复合多糖生化研究技术

张惟杰 主编



上海科学技术出版社

24618



S0014790

1.

复合多糖生化研究技术

张惟杰 主编

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

新华书店上海发行所发行

上海市印刷三厂印刷

开本 850×1156 1/32 印张 12 字数 314,000

1987年 月第1版 1987年 月第1次印刷

印数 1—2,400

ISBN 7-5323-0525-2/Q·11

统一书号: 13119·1424 定价: 3.00元

本书作者名录

中国科学院化学研究所(北京)

于海妮 何慧珠 郑 苹 杨其民 竺 安
贺玉珍

中国人民解放军军事医学科学院二所(北京)

马立人 刘耀清 孙仲诏 陈轶兰 骆传环
耿俊贤

中国科学院微生物研究所(北京)

戈苏国 王俊英 那 安 张树政 钱世钧
曾宇成 韩文珍

中国科学院上海药物研究所

方积年

中国科学院环境化学研究所(北京)

王相明 孙思恩 陆德培 吴昌贤 李荣春
黄克武 蒋挺大 裴雅群

中国科学院青岛海洋研究所

史升耀 纪明侯 张燕霞

上海医科大学

朱正美 徐大顺 顾天爵

中国预防医学中心卫生研究所(北京)

刘秉慈 李玉瑞

中国科学院上海生物化学研究所

孙 册

东北师范大学生物系(长春)

李润秋 张翼伸

中国医学科学院心血管病研究所(北京)

张英珊

北京大学生物系

张惟杰

中国医学科学院血液学研究所(天津)

林大镛

天津市药物研究所

樊绘曾

中医研究院中药研究所

李铁林

中国科学院图书馆

张树庸

编者的话

本书是中国生物化学会在青岛召开的第一次糖的生化学术会议的产物,也是近几年内,我国老一辈生物化学家对糖的研究不断倡导和支持的结果。

随着人们对多糖和糖结合物在生命科学和实际应用中的作用的重视,以及多糖研究的蓬勃开展,复合多糖研究技术亦有迅速的发展和改进。我国糖的研究,也正在发展之中。从本书所反映的内容可以看出,由于勤奋的工作和不屈不挠的努力,一些实验室已经在糖的分析、分离方法,各种类型色谱、电泳,糖链结构分析,糖苷酶,各种特殊来源的多糖,凝集素和糖脂等方面,建立了不少方法。其中有的实验室已在这个领域工作多年,有了相当的经验。还有更多的实验室则刚刚开始,或出于各自工作的需要准备开展一些涉及糖的研究工作。这样,有一本糖的研究技术的书以供随时查阅,是多糖研究工作者的共同愿望。

本书的内容不求全,而力求其可靠性和可行性。也就是说,本书没有全面包括糖的研究中已有的各种方法;书内介绍的方法,大部分是作者在实验室亲自动手做过的,可以得到相应结果的。这样做的目的是使读者可以有一本供实验室使用的方法书,实验中如遇到问题可以向作者查询、磋商。同时,也正因为这样,本书也从一定角度反映了我国糖的研究在目前的水平和状况。希望随着我国糖的研究工作的不断发展,将会有方法学方面的续编陆续问世。

书内提到的一些特殊生化试剂,标出生产厂家仅仅是表明作者在自己实验中用的是该厂产品,可以得到文内所述的结果。近几年来,已有越来越多的生化试剂可以有国内厂家生产的产品,请

读者在使用中注意规格、型号的相应关系。

作为一本方法书，应该是正确无误的，但是由于编者的水平等原因，可能出现一些错误，请读者给予指正。

在本书的出版过程中，承中国生化学会袁士龙同志给予大力支持，又承郭虹、郭秋鹏同志给予帮助，谨向他们致以谢意。

张惟杰

序 言

糖类的研究经过一个相对寂静时期以后，近二十多年来又活跃起来了。过去认为糖类在生物体内的作用主要是作为能量资源，例如动物体内储存的糖元和植物体内储存的淀粉；或者是作为结构材料，例如植物细胞的纤维素等。近来由于多糖以及糖结合物的分离、纯化、组分测定和结构分析有了长足的进步，同时由于对糖类的生物学功能有了新的认识，例如糖结合物在细胞识别、细胞间物质运输和对免疫功能的调节等方面的作用，因此关于糖类的研究又引起人们的重视。

糖类的研究工作和蛋白质、核酸的研究工作相比，在我国还是一个薄弱的环节。1982年中国生物化学会在青岛召开了第一次糖的生化学术会议。在会议上，五十多篇论文的报告和讨论反映了我国目前糖的生化研究方面的成就，也说明我国这方面的研究工作已经有了一个较好的开端。这次学术会议对于糖类研究工作的开展，无疑将会起推动作用。本书是这次学术会议建议编写的一本关于糖化学和生化研究的工具书。生物化学研究工作的开展，在很大程度上取决于实验方法和研究技术的掌握。参加本书编写工作的作者都是在糖类领域里从事研究的生化工作者，具有第一手的经验。列入本书的实验研究方法，大多数是作者在自己实验室做过的。这本工具书的出版，将会起到交流各自经验和心得的作用；对于准备参加糖类生化研究的新手来说，也可以收到事半功倍的效果。

本书在总论中介绍糖类的分离、测定、结构分析的常用方法，也包括近年发展起来的气相色谱、高效液相色谱、质谱、红外光谱，核磁共振等新方法。一些糖苷酶类和结构分析用的工具酶的分离

纯化方法也在总论中作了介绍。在各论中,介绍真菌、酵母等微生物多糖,植物多糖,褐藻、红藻、海带等海藻多糖,以及蛋白聚糖、神经鞘糖脂、凝集素等的分离、纯化、鉴定等研究方法。各论中列举的材料,大都是我国产的多糖和糖结合物。为了读者方便,本书最后还对糖类生化的文献作了简单介绍。

我国地大物博,糖类资源也很丰富,而且有些真菌多糖还对生物体具有独特的生理作用,可以作为药用资源。随着社会主义现代化建设的开创,各个地区和海洋资源的开发,糖类研究必将越来越受到人们的重视。希望这本工具书的问世,能加速我国糖类基础和 application 研究的发展,为社会主义现代化建设服务。

张龙翔

目 录

编者的话

序言

总 论

一、糖的定量测定	1
(一)根据糖的还原性进行测定	1
1. 3, 5-二硝基水杨酸(DNS)比色法	1
2. Somogyi-Nelson 法	2
(二)将糖转变成糖醛衍生物进行测定	3
1. 地衣酚-硫酸法	3
2. 戊糖的测定(地衣酚法)	5
3. 苯酚-硫酸法	6
4. 蒽酮-硫酸法	7
(三)酶法测定糖	8
葡萄糖氧化酶法测葡萄糖	8
二、糖的色谱法和电泳法	10
(一)糖的纸色谱	10
1. 单糖和双糖的纸色谱	10
2. 寡糖和多糖的纸色谱	18
3. 多羟基醇的纸色谱	18
4. 糖酸的纸色谱	19
5. 氨基糖的纸色谱	20
6. 糖内酯的纸色谱	20
7. 糖磷酸酯的纸色谱	21
(二)糖的柱色谱	23
1. 糖的活性炭柱分离	23
2. 蜂蜜中寡糖的炭柱分级法	25

3. 糖的离子交换树脂柱分离	26
(三) 糖的亲色谱	29
花生凝集素(PNA)亲和柱在糖分离中的试用	34
(四) 糖的气相色谱	38
1. 糖的三甲基硅醚衍生物	39
2. 糖腈乙酸酯衍生物	41
3. 糖醇乙酸酯衍生物	43
4. 糖的三氟乙酸酯衍生物	46
5. 果糖与葡萄糖或甘露糖共存时的气相色谱定量法	48
(五) 糖的高效液相色谱分析	49
1. 单糖和双糖的分析	51
2. 寡糖的分离和测定	58
3. 糖脞全苯甲酸酯紫外标记法 分离和测定微量单糖和双糖	62
(六) 糖的薄层色谱	65
(七) 糖的电泳法	68
1. 红细胞膜上唾液酸的等速电泳	68
2. 多糖的滤纸电泳	70
3. 多糖的玻璃纤维素电泳	72
4. 多糖的醋酸纤维薄膜电泳	73
5. 多糖的凝胶电泳	73
三、糖链结构分析方法	76
(一) 多糖的分子量测定和纯度鉴定	77
1. 测定多糖分子量的方法原则	77
2. 渗透压法测定多糖分子量	81
3. 蒸气压法测定多糖分子量	84
4. 端基法测定多糖分子量	86
5. 光散射法测定多糖分子量	90
6. 粘度法测定多糖分子量	97
7. 高效液相色谱法测定多糖分子量	101
8. 多糖的纯度鉴定	108
9. 超过滤法及其在多糖化学研究中的应用	111
(二) 糖的红外光谱、质谱和核磁共振	121
1. 糖的红外光谱法	121

2. 糖的质谱法	128
3. 高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)脱机联用进行低聚糖 的结构序列分析	146
4. ^1H 和 ^{13}C 核磁共振光谱在多糖上的应用	150
(三)用于糖类结构分析的化学方法	155
1. 多糖的部分水解	155
2. O-糖苷键的稀碱水解(β -消除反应).....	158
3. N-糖苷键的胍解法	160
4. 高碘酸氧化	163
5. Smith 降解	164
6. 甲基化反应(Hakomori, 箱守仙一郎法).....	166
7. 甲基化反应(硫酸二甲酯法)	171
(四)糖苷酶及其底物的制备和测定	173
1. 一种产多糖链内切酶的微生物的培养以及内切酶作用条件	173
2. 从褶皱链霉菌(<i>Streptomyces plicatus</i>)分离提纯 β -N-乙 酰氨基葡萄糖苷内切酶-III.....	175
3. β -甘露糖苷酶的分离提纯	179
4. 从土壤细菌中初步分离 α -甘露糖苷酶和 $\alpha(1\rightarrow6)$ 甘露聚 糖内切酶	182
5. 枯草杆菌 α -淀粉酶的分离纯化	185
6. 红色红曲霉 α -葡萄糖苷酶的分离纯化	188
7. 茁霉多糖酶的分离纯化	192
8. β -葡萄糖苷酶的分离纯化	195
9. 硝基苯酚糖苷化合物的有机合成	200

各 论

一、微生物多糖和植物多糖	209
(一)细菌胞外多糖的纯化	209
粪产碱杆菌产粘变株(<i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>myxogenes</i>) 胞外酸性多糖的纯化	210
(二)真菌多糖和植物多糖的研究方法	211
1. 斜顶菌(<i>Clitophus caespitosus</i> PK)水溶性多糖的分离提纯.....	213

2. 香菇(<i>Lentinus edodes</i>)中碱溶性多糖的分离提纯	214
3. 大蒜球根中多糖的提取	215
(三) 酵母甘露聚糖的研究方法	217
1. 酵母甘露聚糖的分离提取	218
2. 选择性的乙酰解反应	220
3. 免疫学方法在酵母甘露聚糖结构研究中的应用	222
二、海藻多糖	226
(一) 海藻和海藻多糖中单糖成分的测定	227
1. 褐藻中单糖的气相色谱分析	227
2. 红藻中 D-半乳糖和 3, 6-内醚半乳糖的气相色谱分析	229
3. 红藻中 D-半乳糖和 3, 6-内醚半乳糖的比色分析	231
(二) 红藻多糖	234
1. 红藻多糖的分离与提取	236
2. 红藻多糖物理性质的测定	242
(三) 褐藻多糖	247
1. 褐藻胶	247
2. 褐藻糖胶	253
3. 海带淀粉	255
三、蛋白聚糖	259
(一) 蛋白聚糖(PG)和糖胺聚糖(GAG)的分离提取	263
1. 离子交换层析法分离蛋白聚糖(PG)	264
2. 糖胺聚糖(GAG)的一般提取方法	266
3. 透明质酸的分离提取	267
4. 4-硫酸软骨素的分离提取	269
5. 6-硫酸软骨素的分离提取	270
6. 软骨素的制备	272
7. 硫酸皮肤素的分离提取	273
8. 肝素的分离提取	275
9. 硫酸类肝素(或硫酸乙酰肝素)的分离提取	277
10. 硫酸角质素的分离提取	279
11. 刺参粘多糖的分离提取	281
(二) 糖胺聚糖(GAG)的组成分析及定量测定	283
1. 糖胺聚糖(GAG)的电泳法	284

2. 糖胺聚糖(GAG)各组分的定量分析.....	290
(三) 培养的动物细胞中蛋白聚糖(PG)的研究方法.....	299
1. 细胞培养和标记蛋白聚糖(PG)的提取.....	300
2. 离子交换柱层析分离蛋白聚糖(PG).....	303
3. 凝胶过滤柱层析分离蛋白聚糖(PG).....	304
4. 氯化铯(CsCl)等密度超速离心法分离蛋白聚糖(PG).....	305
5. 糖胺聚糖(GAG)和寡糖的分离、鉴定及蛋白聚糖(PG)结构的分析	306
6. 硫酸二糖的分析	312
四、神经鞘糖脂	313
(一) 神经节苷脂的分离和纯化	318
1. 分配分离法	318
2. 离子交换法	320
(二) 神经节苷脂的鉴定	322
1. 神经节苷脂的定量——唾液酸含量测定	322
2. 薄板层析(TLC)法	325
(三) 中性糖脂的分离和纯化	327
五、凝集素	330
(一) 凝集素的分离、纯化和鉴定.....	333
1. 凝集素的分离、纯化.....	333
2. 凝集素活力及纯度鉴定的一般方法	341
(二) 标记凝集素的制备	345
1. 放射性标记凝集素	345
2. 酶标记凝集素	349
3. 荧光标记凝集素	351
4. 铁蛋白标记凝集素	354
(三) 固相化凝集素的制备	355
1. Sepharose 4B的活化	355
2. ConA-Sepharose 4B的制备	356
3. RCA-Sepharose 4B的制备.....	357
4. RCA-Sepharose 4B(带己二胺“臂”)的制备.....	357
附录 有关糖类生化的文献查阅	360
后记	370



总 论

一、糖的定量测定

为了鉴定和测定生物材料中微量的碳水化合物，必须应用高度灵敏和高度特异性的方法。由于还原糖都含有自由醛基(如葡萄糖)或酮基(如果糖)，在碱性溶液中，还原糖能将金属离子(Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 等)或某些试剂还原，而糖本身氧化成各种羧酸类化合物；另外，糖或多糖用强酸处理脱水生成糠醛或其衍生物，这些化合物再与酚类或胺类化合物作用，生成有特殊颜色的物质。以上两点特性常成为测定糖含量的各种方法的依据，此外还有一类具有高度专一性和灵敏度的酶法测糖方法。

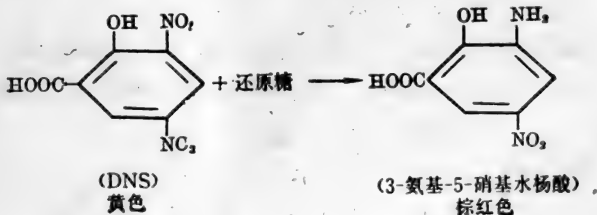
糖测定方法有许多种，在实际工作中可根据被测材料的种类、要求、条件等，选择其中一种或几种，但不论采用哪种方法，都应考虑以下几点，即重复性好，操作简单，特异性好，灵敏度高，经济。

(张树政)

(一) 根据糖的还原性进行测定

1. 3, 5-二硝基水杨酸(DNS)比色法

在碱性溶液中，3, 5-二硝基水杨酸与还原糖共热后被还原成棕红色氨基化合物，在一定范围内还原糖的量与反应液的颜色强度呈比例关系，利用比色法可测定样品中的含糖量。



【试剂】

3, 5-二硝基水杨酸试剂配法如下:

3, 5-二硝基水杨酸	1%
苯酚	0.2%
亚硫酸钠	0.05%
氢氧化钠	1%
酒石酸钾钠	20%

配好后存棕色瓶中一周后稳定。

【操作】

取待测样品(含糖 50~100 μ g)和对照(蒸馏水)各 1 mL, 分别加入 3 mL 的 DNS 试剂, 沸水浴煮沸 15 分钟显色, 冷却后用蒸馏水稀释至 25 mL, 用 72 型分光光度计比色(550 nm), 以对照液调零点。用预先以葡萄糖做好的标准曲线即可计算出样品中糖含量(葡萄糖溶液的浓度范围 0.4~1 mg/mL)。

该方法是半微量定糖法, 操作简便、快速, 杂质干扰较少, 尤其适合于批量测定, 例如用于糖化酶发酵过程中糖的分析。

【讨论】

(1) 若待测样品中含酸, 可加入 2% 的氢氧化钠。

(2) 显色剂不能放置过久, 否则, 标准曲线变动。

【文献】

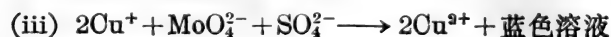
Sumner, J. B. et al., *Laboratory Experiments in Biological Chemistry*, Academic Press Inc., New York, p. 38, 1949.

Reese, E. T. et al., *Methods in Carbohydrate Chemistry*, by Whistler, R. L., Academic Press, 3: 141(1963).

(戈苏国)

2. Somogyi-Nelson 法

还原糖将铜试剂还原生成氧化亚铜, 在浓硫酸存在下与砷钼酸生成蓝色溶液, 在 560nm 下的光密度与还原糖浓度呈比例关系。



【试剂】

铜试剂 A: 将 25g 无水碳酸钠、25g 四水合酒石酸钾钠, 20g 碳酸氢钠和 200g 无水硫酸钠溶解在 800 mL 蒸馏水中, 待全溶后稀释到 1000 mL, 在不低于 20°C 室温下放置, 如有沉淀可过滤除去。

铜试剂 B: 配制 15% 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 每 100 mL 溶液中滴加 1~2 滴浓硫酸。

砷钼酸盐显色剂: 溶解 25g 钼酸钠在 450 mL 蒸馏水中, 在搅拌下加入 21 mL 浓硫酸, 加 25 mL 砷酸钠溶液(3g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶解在 25 mL 水中), 混合后, 37°C 保温 24 小时或 55°C 保温 25 分钟, 此试剂放在棕色有玻璃盖的瓶中。

【操作】

1 mL 样品液置于 25 mL 磨口试管中, 加入 1 mL 铜试剂(25 mL A + 1 mL B, 现用现配), 用水做空白对照。充分混匀, 在沸水浴中加热 20 分钟, 用冷水冷至室温, 加 1 mL 砷钼酸盐试剂, 用蒸馏水稀释至 25 mL, 在 560 nm 处测定光密度, 用预先以葡萄糖做好的标准曲线即可计算出样品中还原糖含量。

【讨论】

此方法重复性较好, 产物稳定, 测定范围 10~180 μg 。我们用此方法测定了糖化酶和其他糖苷酶的酶活力, 其测定范围以 25~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为宜。

【文献】

Nelson, N., *J. Biol. Chem.*, **153**:375 (1944).

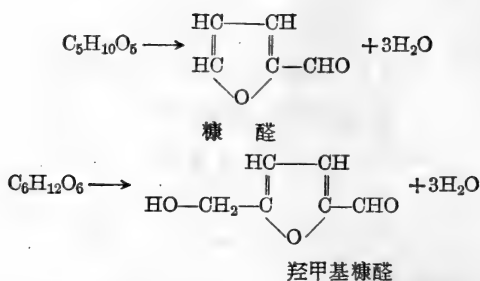
Ashwell, G., *Methods in Enzymology* ed. by Colowick, S. P. et al., Academic Press, New York, **3**: 85 (1957).

(戈苏国)

(二) 将糖转变成糖醛衍生物进行测定

1. 地衣酚(orcinol)-硫酸法

糖经浓无机酸处理脱水产生糠醛(戊糖)或糠醛衍生物(如羟甲基糠醛)(己糖), 生成物能与酚类化合物缩合生成有色物质:



通常使用的无机酸为硫酸,常用的酚为 α -萘酚、地衣酚、间苯二酚等。

【试剂】

(1) 地衣酚-硫酸试剂:

1) 60% 硫酸: 将 600 mL 冷却到 4°C 的浓硫酸小心地加入到 400 mL 冷水中, 4°C 贮存。

2) 1.6% 地衣酚水溶液置 4°C 贮存。地衣酚(甲基间苯二酚), 北京化工厂产品, 用前须从苯中重结晶, 必要时可用活性炭脱色。

使用前将 7.5 mL 60% 硫酸加入到 1 mL 地衣酚水溶液中, 即为地衣酚-硫酸试剂。

(2) 标准糖溶液: 配成已知浓度的甘露糖(或葡萄糖)水溶液, 或者, 如果已经知道糖蛋白中各种单糖比例, 最好按其比例配成已知糖的混合物, 预先做好标准曲线。

【操作】

将 8.5 mL 冷却到 4°C 的地衣酚-硫酸试剂分别加到 1 mL 标准糖溶液和含有 50~500 μg 糖的样品中, 试管向上三分之二处预先拉一细颈, 再将一小试管放在大试管的细颈处, 小管内放少量冷水, 成为一个冷却器。所有管(包括空白)都同时放入 80°C 水浴中加热 15 分钟(如样品中含有葡萄糖则必须继续加热 45 分钟, 因为葡萄糖显色比其他糖慢), 流动水冷却, 在 505nm 处测定, 用预先以甘露糖做好的标准曲线可计算出样品中糖含量。200 μg 甘露糖在 505 nm 给出的光密度值约为 0.51(1 cm 光程)。

【讨论】

(1) 该方法操作简便, 目前已广泛用于测定糖蛋白中总糖含量, 例如测定葡萄糖氧化酶、 α -淀粉酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、根霉葡萄糖淀粉酶中的糖含量, 同时也测定了一些卵蛋白、硫酸软骨素等物质中的糖含量。

(2) 该方法的缺点是, 氨基糖存在可导致颜色降低, 大量的色氨酸存在也可导致一些误差, 但对中性糖的测定结果是可靠的。

【文献】

Francois, C. et al., *Biochem. J.*, **83**:335 (1962).

Marshall, R. D. et al., *Glycoproteins* ed. by A. Gottschalk, Elsevier publishing company, Amsterdam, 1972, p. 283.

(戈苏国)

2. 戊糖的测定(地衣酚法)

戊糖与氯化高铁盐酸溶液或硫酸铁铵盐酸溶液一起加热, 与地衣酚试剂反应, 形成蓝绿色溶液, 用比色法定量测定戊糖含量。

【试剂】

0.1% 三氯化铁浓盐酸溶液。

100 mg/mL 地衣酚试剂: 取 1g 重结晶的地衣酚(从苯中重结晶)用 95% 乙醇溶解定容至 10 mL 即得, 使用时临时配制。

50 μ g/mL 的木糖标准溶液。

【操作】

于 3 mL 含有 10~30 μ g 五碳糖的试液中加入 3 mL 0.1% 三氯化铁盐酸溶液, 然后再加入 0.3 mL 新鲜配制的地衣酚溶液, 置沸水浴中 40 分钟, 冷却(必要时可稀释到一定体积), 在 670 nm 处测定, 用预先以木糖做好的标准曲线即可计算出戊糖含量。(在加热时, 可用带玻璃塞的试管以防蒸发。)

【讨论】

此方法可用于测定五碳糖, 方法简单。缺点是灵敏度较低, 且因蛋白质、杂糖等干扰不易测准确。

【文献】

Mejbaum, W., *Z. Physiol. Chem.*, **258**:117 (1939).

Ashwell, G., *Methods in Enzymology*. by Colowick, S. P., et al., Academic press, New York, **3**: 87 (1957).

(戈苏国)

3. 苯酚-硫酸法

苯酚-硫酸试剂可与游离的或寡糖、多糖中的己糖、糖醛酸(或甲苯衍生物)起显色反应,己糖在490 nm处(戊糖及糖醛酸在480 nm)有最大吸收,吸收值与糖含量呈线性关系。

【试剂】

浓硫酸:分析纯,95.5%。

80% 苯酚: 80克苯酚(分析纯重蒸馏试剂)加20克水使之溶解。可置冰箱中避光长期贮存。

6% 苯酚: 临用前以80% 苯酚配制。

标准葡聚糖(Dextran, 瑞典 Pharmacia), 或分析纯葡萄糖。

【操作】

(1) 制作标准曲线: 准确称取标准葡聚糖(或葡萄糖)20 mg于500 mL容量瓶中,加水至刻度,分别吸取0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6及1.8 mL,各以水补至2.0 mL,然后加入6% 苯酚1.0 mL及浓硫酸5.0 mL,静止10分钟,摇匀,室温放置20分钟以后于490 nm测光密度,以2.0 mL水按同样显色操作为空白,横坐标为多糖微克数,纵坐标为光密度值,得标准曲线。

(2) 样品含量测定: 吸取样品液1.0 mL(相当于40 μg 左右的多糖),按上述步骤操作,测光密度,以标准曲线计算多糖含量。

【讨论】

(1) 此方法简单,快速,灵敏,重复性好,对每种糖仅需制作一条标准曲线,颜色持久。

(2) 制做标准曲线宜用相应的标准多糖,如用葡萄糖制标准曲线,应以校正系数0.9校正糖的 μg 数,对其他同多糖亦如此。

(3) 对杂多糖, 分析结果可根据各单糖的组成比及主要组分单糖的标准曲线的校正系数加以校正计算, 可得较满意结果。

【文献】

Dubis, M., et al., *Anal. Chem.*, **28**: 350 (1956).

(张翼伸)

4. 蒽酮-硫酸法

糖类遇浓硫酸脱水生成糖醛或其衍生物, 可与蒽酮试剂缩合产生颜色物质, 反应后溶液呈蓝绿色, 于 620 nm 处有最大吸收, 显色与多糖含量呈线性关系。

【试剂】

2g/L 蒽酮试剂: 溶解 2g 蒽酮于浓硫酸 (A. R. 95.5%) 中, 当日配制使用。

0.1g/L 葡聚糖 (Dextran, 瑞典 Pharmacia) 溶液 (可加数滴甲苯防腐)。

【操作】

(1) 制作标准曲线: 取 0.1g/L 的葡聚糖溶液 0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.60、0.80 mL, 用蒸馏水补至 1.00 mL, 分别加入 4.00 mL 蒽酮试剂, 迅速浸于冰水浴中冷却, 各管加完后一起浸于沸水浴中, 管口加盖玻璃球, 以防蒸发。自水浴重新煮沸起, 准确煮沸 10 分钟取出, 用自来水冷却, 室温放置 10 分钟左右, 于 620 nm 比色, 以同样处理的重蒸馏水为空白, 进行比色, 以光密度为纵坐标, 糖的含量微克数为横坐标, 得标准曲线。

(2) 样品含量测定: 取糖浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右的样品溶液 1.00 mL, 加入蒽酮试剂, 同标准曲线制作之操作, 比色测定。根据标准曲线和样品浓度计算含量。

【讨论】

本方法可用于多糖、单糖含量测定。色氨酸含量较高的蛋白质对显色反应有一定干扰。

【文献】

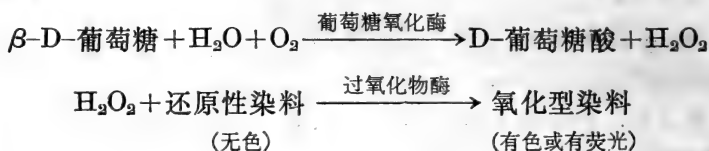
Brode, W. R., *Chemical Spectroscopy*, 2nd ed.

(张翼伸)

(三) 酶法测定糖

葡萄糖氧化酶法测葡萄糖

葡萄糖氧化酶专一地氧化 β -葡萄糖 (在葡萄糖溶液中, α -葡萄糖和 β -葡萄糖存在着动态平衡, 随着 β -葡萄糖的被氧化, 最终所有 α -型全部转变成 β -型而被酶所氧化), 生成葡萄糖酸和过氧化氢, 在有过氧化物酶同时存在时, 过氧化物酶催化过氧化氢氧化某些物质 (如联[邻]甲氧苯胺、联[邻]甲苯胺、酚酞、亚铁氰化钾等), 这些物质氧化后从无色转变成有色, 通过比色计算出葡萄糖含量。



【试剂】

葡萄糖氧化酶试剂组成如下:

- (1) 葡萄糖氧化酶液 (110 单位/mL): 10 mL.
- (2) 过氧化物酶 (上海东风试剂厂生产的辣根过氧化物酶): 25 mg 溶于 14 mL 水中.
- (3) 联(邻)茴香胺 ($\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{N}_2$, 即联甲氧基苯胺) 30 mg 溶于 6 mL 95% 乙醇中.
- (4) Tris-甘油缓冲液 (由 0.5 mol/L, pH 7.0 的 Tris 缓冲液加等体积的甘油混合) 70 mL (Tris 缓冲液: 61 g Tris + 85 mL 5 mol/L HCl, 用水稀释到 1000 mL).

混合上述四种成分, 总体积为 100 mL.

【操作】

取 2 mL 样品液放入试管中, 加入 2 mL 葡萄糖氧化酶试剂, 37°C 水浴反应 30 分钟, 加入 4 mL 2.5 mol/L 的硫酸终止反应, 摇匀. 用 72 型分光光度计于 525 nm 处测定, 按预先用葡萄糖做好的标准曲线计算出葡萄糖量 (用蒸馏水做对照).

此方法专一性高, 灵敏, 生成的颜色在 12 小时内稳定, 适用于

测定生成葡萄糖的各种酶反应。如果反应液中有其他还原物质存在时更显出此法的优越性。

【讨论】

(1) 在绘制标准曲线时，葡萄糖浓度在 $0\sim 90\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内，标准曲线为通过原点的一直线，若标准曲线不通过原点，适当增加葡萄糖氧化酶试剂中的过氧化物酶浓度即可纠正。

(2) 葡萄糖氧化酶试剂最好现用现配，放置冰箱暗处可保存半个月。

(3) 由于葡萄糖氧化酶液中同时混杂有麦芽糖酶和其他葡萄糖苷酶，如果为达到专一测定糖化酶活力的目的，最好用 Tris-甘油缓冲液。因为缓冲液中的两种成分都有抑制麦芽糖酶和其他 α -葡萄糖苷酶的能力。

【文献】

Papadopoulos, N. M. and Hess, W. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**:167, (1960).

唐国敏, *微生物学通报*, **5**(4): 33(1978)。

(戈苏国)

二、糖的色谱法和电泳法

(一)糖的纸色谱

单糖、双糖、寡糖、多糖及其衍生物都可通过纸色谱法得到满意的分离和鉴定。

1. 单糖和双糖的纸色谱

(i) 样品的制备及操作: 通常含有 $30\sim 40\mu\text{g}$ 的单糖混合物样品可得到成功的分离, 经洗脱可得到很好的回收。糖溶于水, 可配成 1% (W/V) 的浓度, 用微量吸管点样 ($2\sim 5\mu\text{L}$)。用合适的溶剂展开 (单向或双向), 可用 (特异的) 各种显色剂显色, 与已知糖的斑点颜色及 R_f 值进行比较而定性鉴定, 或将斑点洗脱下来, 用常用的微量分析方法定量测定。

(ii) 溶剂系统: 几种常用的溶剂系统以及应用范围列于表 1。

(iii) 显色剂:

① 氧化类显色剂

② 硝酸银显色剂 (根据 Trevelyan 的方法做了改进)

【试剂的配制】

A: 16% 硝酸银水溶液: 丙酮为 $1:9$ (V/V)。

B: 1% NaOH 乙醇溶液 (W/V)。

C: 6 mol/L 氢氧化铵。

【显色方法】

在层析纸上先喷试剂 A, 室温风干, 再将纸浸入试剂 B 中, 等斑点显出后, 再浸入 C 中以洗去滤纸上的氧化银, 然后用水冲洗一小时左右, 风干, 还原糖显棕黑色斑点。

【应用范围】

此显色剂应用于大多数的还原糖, 检出限度 $20\mu\text{g}$ 。

表 1 分离单糖和二糖用的展开剂

展 开 剂	被 分 离 的 混 合 物
1. 乙酸乙酯:吡啶:水=2:1:2(V/V)	木糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、
2. 乙酸乙酯:乙酸:水=3:1:3(V/V)	葡萄糖
3. 苯甲醇:乙酸:水=3:1:3(V/V, 用下层)	庚酮糖
4. 正丁醇:吡啶:水=45:25:40	乳糖、半乳糖、葡萄糖
5. 正丁醇:乙醇:水:NH ₃ =40:10:49:1 (V/V)	从尿中分离葡萄糖
6. 正丁醇:乙醇:水=10:1:2(V/V)	蜜二糖、果糖、葡萄糖
7. 正丁醇:乙酸:水=4:1:5(溶剂层)	葡萄糖、半乳糖、甘露糖等六碳糖, 阿拉伯糖、木糖等五碳糖, 乳糖等二糖
8. 正丁醇:吡啶:水=6:4:3(V/V)	鼠李糖、岩藻糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖等
9. 乙酸丁酯:乙酸:水=3:2:1(V/V)	用于分离中性糖
10. 异戊醇:吡啶:0.1 mol/L HCl =2:2:1(V/V)	用于分离中性糖
11. 正丁醇:乙醇:水=4:1:1(V/V)	用于分离戊糖
12. 乙酸乙酯:吡啶:水:乙酸=5:5:3:1	用于分离中性单糖

⑥ 过碘酸-联苯胺显色剂

【试剂的配制】

A: 0.01 mol/L 过碘酸钾水溶液(加热溶解)。

B: 0.1 mol/L 联苯胺的 50% 乙醇溶液 10 mL, 加丙酮 2 mL, 加 0.2 mol/L 盐酸 1 mL。

【显色方法】

将滤纸先以试剂 A 喷雾, 尽量少喷, 以后放入 30°C 温箱中, 氧化六分钟后再用试剂 B 喷雾, 此时背地呈蓝色, 斑点白色。

【应用范围】

凡有邻羟基的化合物均可显色。

② 胺类显色剂

① 苯胺-二苯胺显色剂

【试剂的配制】

2% 二苯胺丙酮溶液:2% 苯胺丙酮溶液:85% 磷酸为 5:5:1 (V/V).

【显色方法】

将滤纸用显色剂浸后风干,放 80°C 加热 10 分钟.

【应用范围】

此试剂应用于大多数的还原糖, 醛糖可呈现蓝、蓝紫或绿蓝色, 酮糖呈现棕色, 对葡萄糖和果糖同样灵敏, 检出限量为 10 μg. 此试剂也可用来区别 1, 4-与 1, 6-糖苷键, 如表 2 所示.

表 2 用苯胺-二苯胺试剂的显色表

糖	颜 色	
	浓	稀
麦芽糖 1, 4-	蓝 色	红紫
麦芽三糖 1, 4- 1, 4-	红 紫	红紫
潘糖 (panose) 1, 6- 1, 4-	蓝—黑	红紫—棕
异麦芽糖 1, 6-	暗蓝灰色	绿
异麦芽三糖 1, 6- 1, 6-	暗蓝灰色—棕色	绿
葡萄糖	暗蓝灰色	绿—棕

修改的苯胺-二苯胺试剂: 2% 二苯胺丙酮溶液 5 mL, 加 2% 苯胺丙酮溶液 5 mL, 再加三氯乙酸 5g, 其显色方法与上述相同. 此试剂对多种糖均能显色, 而且各有不同的颜色, 尤其是具有 1-4 键结合的双糖显鲜蓝色, 有特殊的鉴定意义.

② 苯胺-邻苯二甲酸显色剂

【试剂的配制】

邻苯二甲酸 1.6g 溶于水饱和的正丁醇 100 mL, 加苯胺 0.93g (相当于 0.9 mL).

【显色方法】

将纸用试剂喷雾后,置 105°C 加热 5~10 分钟,在此情况下,戊醛糖呈现鲜红色,己醛糖及糖醛酸为棕色,酮类不易显色;果糖、蔗糖、棉籽糖不显色,但果糖和糖醛酸与乙醛糖一样在紫外光下有荧光,而五碳糖一般无荧光,借颜色差异和有无荧光可区别五碳糖与六碳糖。此试剂比硝酸银试剂灵敏,尤其是对于戊醛糖和己醛糖更为灵敏,灵敏度为 1 μg。

③ 对甲氧基苯胺显色剂

【试剂的配制】

0.5g 对甲氧基苯胺溶于 2mL 比重为 1.75 的磷酸中,以乙醇稀释至 50mL,把对甲氧基苯胺磷酸盐沉淀下来,滤液(A)保留。沉淀部分溶于尽可能少的水中,以等量乙醇稀释,加磷酸至终浓度为 2%(B),将(A)和(B)混合。

【显色方法】

将滤纸用显色剂喷雾,置 95~100°C 加热 5 分钟,多种糖可显示不同的颜色。

④ 联苯胺显色剂

【试剂的配制】

0.5g 的联苯胺溶在 5mL 冰醋酸中,加 4g 三氯乙酸(事先溶于 5mL 水中),再加 90mL 丙酮。

【显色方法】

将滤纸浸入显色剂中,取出风干,置 100°C 加热 5 分钟,显色。

【应用范围】

此试剂对还原糖特异性好,岩藻糖、葡萄糖醛酸都能产生颜色斑点,对葡萄糖灵敏,对果糖不太灵敏。但一些非糖物质(例如无机物质)也能生色而产生干扰。

⑤ 酚类显色剂

① α-萘酚显色剂

【试剂的配制】

1% α-萘酚酒精溶液:85% 磷酸为 10:1(V/V)。

【显色方法】

用显色剂对滤纸喷雾,置 90°C 加热至出现斑点。

【应用范围】

酮糖不显色, 醛糖显色, 果糖及含有果糖的寡糖如蔗糖、棉籽糖显紫色。检出限度为 10 μg 。

① 甲基间苯二酚(orcinol, 地衣酚)显色剂

【试剂的配制】

0.5g 的甲基间苯二酚和 15g 三氯乙酸溶于 100 mL 水饱和的正丁醇中。冷处存放, 每周新配。

【显色方法】

滤纸喷此试剂后, 置 105°C 加热 2 分钟。

【应用范围】

此试剂对庚酮糖有专一性, 如景天庚酮糖显蓝; 庚醛糖和己醛糖无色, 己酮糖为黄色, 戊酮糖为灰绿色, 醛糖不显色。

② 间苯三酚显色剂

【试剂的配制】

冰醋酸 25 mL, 加 HCl 1 mL, 5% 间苯三酚乙醇溶液 2.5 mL。

【显色方法】

将层析纸喷此试剂后, 室温干燥, 放 90°C 加热 2 分钟。

【应用范围】

酮糖显橙黄色, 戊醛糖紫红色, 己醛糖不显色。

③ 间苯二酚显色剂

【试剂的配制】

1% 间苯二酚乙醇溶液: 2mol/L HCl 为 1:9 (V/V)。

【显色方法】

滤纸喷雾后, 置 80°C 加热 10 分钟。

也可按下列组成配制, 即 1% 间苯二酚乙醇溶液: 0.2 mol/L HCl 为 1:1, 层析纸喷雾后, 置 85°C 加热 15 分钟。

【应用范围】

酮糖显色, 醛糖不显色。

④ 间萘二酚显色剂

【试剂的配制】

0.2% 间苯二酚丙酮溶液:1 mol/L 磷酸溶液为 5:1(V/V).

【显色方法】

将纸浸入显色剂中,取出置 105°C 加热 5 分钟.

【应用范围】

只有酮糖显色.

④ 其他显色剂——双显色法

滤纸先以甲基间苯二酚显色剂喷雾显色后,再喷苯胺-邻苯二甲酸显色剂. 此方法可用于区别木酮糖与核酮糖,木酮糖紫色,核酮糖粉红色. 此试剂是我们自己修改的. Dickens 等人的双显色法是先喷三氯乙酸-甲基间苯二酚试剂, 100°C 干燥,然后再喷苯胺-二苯胺磷酸试剂, 100°C 加热. 戊醛糖及戊酮糖均可显色,室温时,酮糖显色快,而醛糖慢(见表 3).

表 3 戊醛糖及戊酮糖显色表

戊 糖	R _f *	单独的甲 基间苯二 酚-TCA**	苯胺-二苯胺-磷酸	
			单 独	再 喷***
D-核糖	0.59	无 色	红	无 色
D-核酮糖	0.66	棕黄色	黄棕	鲜粉红
D-木糖	0.44	无 色	红棕	无 色
D-木酮糖	0.59	红 紫	黄棕	灰-紫
核酮糖+木酮糖	0.64, 0.58	—	—	—
3-戊酮糖	0.63	棕 黄	—	橙

* 展开剂: 苯酚:水(4:1).

** 100°C 加热.

*** 先喷甲基间苯二酚-TCA, 热至 100°C, 第二次喷后不再加热.

⑤ 不同显色剂对各种糖的显色结果: 各种常见糖的纸色谱用以上显色剂进行显色, 将显色情况及其在紫外光下的变化列于表 4 中. 从表中看出, 根据不同糖对各种显色剂发色后表现的颜色不同和在紫外光下的颜色与荧光现象不同, 可以有效地将其区别.

糖的显色与样品的量有关, 与加热温度及时间也有关, 另外展

表 4 不同显色剂对

显色手段	甘油醛	赤藓糖	核糖	阿拉伯糖	木糖	来苏糖	葡萄糖	甘露糖	半乳糖	葡萄糖内酯	氨基葡萄糖	岩藻糖	鼠李糖
硝酸银	棕	棕	棕	棕	棕	棕	棕	棕	棕	棕	棕	棕	棕
过碘酸-联苯胺*	白	白	白	白	白	白	白	白	白	白	白	白	白
紫外光													
苯胺-二苯胺(1)	—		棕绿	棕绿	棕绿	棕绿	蓝灰	蓝灰	蓝灰	棕	微棕	灰	灰
苯胺-二苯胺(2)	蓝绿		棕绿	棕绿	棕绿	棕绿	蓝灰	蓝灰	蓝灰	棕	微棕	灰紫	灰紫
紫外光	亮									黄	黄绿		
苯胺-邻苯二甲酸	黄		红	红	红	红	棕	棕	棕	红棕	浅棕	棕	棕
紫外光							黄绿	黄绿	黄绿		黄绿		
对甲氧基苯胺	红棕		深棕	深棕	深棕	深棕	棕	棕	棕	粉红	极浅棕	棕黄	棕黄
紫外光												黄	黄
联苯胺	极浅棕		棕	棕	棕	棕	黄棕	黄棕	黄棕	红→粉红	黄	黄棕	黄棕
紫外光							黄绿边	黄绿边	黄绿边		黄绿		
α -萘酚	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
甲基间苯二酚	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
紫外光												黄	
间苯三酚	—		紫红	紫红	紫红	紫红	—	—	—	—	—	—	—
间苯二酚(1)	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
紫外光													
间苯二酚(2)	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
紫外光	紫蓝		蓝紫	蓝紫	蓝紫	蓝紫							
间萘二酚	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
紫外光													

“—”表示在可见光下无颜色反应,空白表示在紫外光下无荧光。

* 蓝地白斑。

各种糖的显色结果

葡萄糖	二羟丙酮	木酮糖	核酮糖	果糖	山梨糖	万寿菊糖	失水景天糖	麦芽糖	乳糖	纤维二糖	蜜二糖	蔗糖	单糖	松二糖	松三糖	棉籽糖
棕白	棕一	棕白	棕白	棕白	棕白	棕白	一白	棕白	棕白	棕白	棕白	一白	一	一白	一白	一白
蓝灰	微紫 微紫 黄	棕褐	灰蓝	橙红	橙黄	紫红	一	蓝	灰蓝	灰蓝	灰蓝	褐	一	亮黄 紫褐	褐	褐
红棕	黄	浅棕	浅棕	浅棕	浅棕	浅棕	一	棕	棕	棕	棕	一	一	一	一	一
黄绿	棕	黄	黄	黄	黄	黄	一	黄绿 极浅	黄绿	黄绿	黄绿	黄	一	黄	黄	黄
黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	一	黄	黄	黄	黄	黄	浅黄	亮黄	黄	黄
棕	棕	棕	棕	黄	黄	黄	一	黄	黄	黄	黄	黄	一	黄	黄	黄
一	黄绿边	一	一	黄	黄	黄	一	黄绿边	黄绿边	黄绿边	黄绿边	黄绿边	一	黄绿边	黄绿边	黄绿边
一	一	灰绿	灰绿	紫	紫	紫	一	一	一	一	一	紫	一	紫	紫	紫
一	一	黄	黄	蓝	蓝	黄	一	一	一	一	一	黄	一	黄	黄	黄
浅紫	一	灰蓝	灰蓝	橙黄	橙黄	橙黄	绿	一	一	一	一	橙	一	橙	橙	橙
一	紫	蓝	蓝	鲜红	红棕	棕	鲜红	一	一	一	一	鲜红	一	鲜红	鲜红	鲜红
一	浅粉	蓝褐	灰蓝	红棕	红棕	黄棕	灰紫	一	一	一	一	亮	一	黄	黄	黄
一	一	灰绿	浅黄	黄棕	黄棕	黄棕	蓝紫	一	一	一	一	黄	一	黄	黄	黄
一	一	一	一	一	一	一	一	一	紫	紫	紫	浅棕	一	浅棕	浅棕	浅棕

开溶剂也影响显色。有些颜色不稳定,随时间加长而变化,有些颜色具有不同的色调。表4中所记各色只是根据我们自己的判断,可能与文献报道的颜色有出入。为了对未知糖进行鉴定,最好同时与标准样品对比,不能仅根据文献报道决定。

2. 寡糖和多糖的纸色谱

寡糖和多糖可采用酸(硫酸或盐酸)水解方法将其水解成单糖,然后进行纸色谱。也可用某些溶剂系统直接将某些寡糖、多糖展开,介绍如下。

(i) 溶剂系统: 表5列出了某些常用于寡糖和多糖色谱的溶剂系统。

表5 用于寡糖和多糖色谱的溶剂系统

溶 剂 系 统	糖 种 类
正丁醇:乙醇:水=10:1:2(V/V)	寡糖
正丁醇:乙醇:水=4:1:5(V/V)	寡糖
乙酸乙酯:吡啶:水=8:2:1(V/V)	寡糖
正丁醇:吡啶:水=6:4:3(V/V)	寡糖
杂醇油(b. p. 121~139°C):吡啶:水=1:1:1(V/V)	寡糖
正丁醇:吡啶:水:苯=56:30:30:4.5(V/V)	棉籽糖
25% 丙醇溶液在 0.067 mol/L 磷酸盐缓冲液中(pH6.4)	粘多糖
75% 异丙醇(V/V):乙酸=9:1(V/V)	直链淀粉

(ii) 斑点的检出:

- ① 鉴定含有酮糖的寡糖用改进的 Seliwanoff 试剂。
- ② 鉴定棉籽糖可用 α -萘酚试剂。
- ③ 鉴定直链淀粉用苯胺-邻苯二甲酸试剂。
- ④ 鉴定还原性多糖用 Somogyi 试剂。
- ⑤ 鉴定粘多糖用甲苯胺蓝试剂。
- ⑥ 鉴定淀粉用 1% 碘乙醇溶液。

3. 多羟基醇的纸色谱

(1) 展开剂:

① 正丁醇:乙酸:水=4:1:5(V/V)

② 正丁醇:乙醇:水=4:1:5(V/V)

③ 乙酸乙酯:乙酸:水=3:1:3(V/V)

表6列出了多羟基醇在以上溶剂中的 R_f 值。

表6 多羟基醇的 R_f 值

糖 醇	溶 剂		
	①	②	③
肌 醇	0.06	0.07	0.08
山梨糖醇	0.18	0.17	0.19
卫 矛 醇	0.16	0.17	0.18
甘露糖醇	0.19	0.20	0.19
核 糖 醇	0.25	0.28	0.28
阿拉伯糖醇	0.22	0.28	—
木 糖 醇	0.20	0.24	—
赤 藓 糖 醇	0.35	0.31	0.34
甘 油	0.48	—	—
乙 二 醇	0.64	—	—

(ii) 斑点的鉴定:

① 硝酸银试剂: 对己糖醇和甘油的灵敏度是 $1\mu\text{g}$, 对乙二醇是 $10\mu\text{g}$ 。

② 溴甲酚紫显色剂: 40 mg 的溴甲酚紫溶解在 100 mL 95% 的含有 100 mg 硼酸和 7.5 mL 1% 的硼砂的乙醇溶液中, 在蓝色底上呈现黄斑点。

4. 糖酸的纸色谱

(i) 展开剂及应用范围:

① 吡啶:戊醇:水=7:7:6(V/V)。用于可溶性葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸和甘露糖醛酸。葡萄糖醛酸给出两个斑点, 其中一个是由内酯引起的。

② 苯:水=4:1(V/V)和正丁醇:乙酸:水=4:1:5(V/V), 双向展开。用于分离半乳糖醛酸。

③ 乙酸乙酯:乙酸:吡啶:水=5:1:5:3(V/V), 以及乙酸乙酯:乙酸:甲酸:水=18:3:1:4(V/V). 用于分离糖醛酸.

④ 分离酮糖酸可用下面两种溶剂:

正丙醇:正丁基甲基醚:甲酸:水=7:3:2:5(V/V). 正丁醇:水:丙酸=10:7:5(V/V).

⑤ 乙酸乙酯:乙酸:水=3:1:3(V/V). 用于分离葡萄糖醛酸、葡萄糖醛酸内酯和半乳糖醛酸.

(ii) 显色剂: 上面提到的许多鉴定单糖的试剂都能用于糖酸.

5. 氨基糖的纸色谱

(i) 展开剂:

① 吡啶:乙酸乙酯:水:乙酸=5:5:3:1(V/V).

② 吡啶:乙酸乙酯:水=11:40:6(V/V, 用底层).

③ 正丁醇:吡啶:1 mol/L HCl=5:3:2(V/V).

以上三种展开剂可用于分离氨基葡萄糖和氨基半乳糖, 也可用于分离 N-acetyl- 和 N-glycolylneuraminic acid 以及糖蛋白中的中性糖.

④ 乙酸丁酯:乙酸:水=3:2:1(V/V). 用于分开 N-glycolylneuraminic acid 和 N-acetylneuraminic acid.

⑤ 正丁醇:正丙醇:0.1 mol/L HCl=1:2:1(V/V). 用于分开 N-acetylsialic acid ($R_f=0.45$) 以及 N-glycolloylsialic acid ($R_f=0.34$).

(ii) 显色剂:

① 硝酸银试剂和苯胺-二苯胺试剂.

② Morgan-Elson 和 Elson-Morgan 试剂.

6. 糖内酯的纸色谱

表 7 列出了某些糖内酯在水饱和的正丁醇中(内含 1% NH_3) 的 R_f 值.

糖内酯的鉴定可用羟胺试剂, 滤纸用新鲜配制的由等体积的 1 mol/L $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 甲醇溶液和 1.1 mol/L KOH 甲醇溶液组

表7 糖内酯在正丁醇中的 R_f 值

糖 内 酯	R_f 值
D-木糖酸- γ -内酯	0.41
L-鼠李糖酸- γ -内酯	0.50
D-半乳糖酸- γ -内酯	0.35
D-葡萄糖酸- γ -内酯	0.32
D-葡萄糖酸- δ -内酯	0.22
D-甘露糖酸- γ -内酯	0.13

成的碱性溶液喷雾,在空气中干燥 10 分钟,用 1~2% FeCl_3 的 1% HCl 水溶液再喷一次,内酯形成蓝色或苯胺紫斑点。

7. 糖磷酸酯的纸色谱

糖磷酸酯的亲水性较大,以致在用通常分离氨基酸或糖所使用的溶剂时 R_f 值很小,因此要选用比较适当的方法分开这些化合物。

(i) 展开剂:分酸性和碱性两向展开。

酸性: 甲醇:甲酸(88% V/V):水=80:15:5(V/V)。

碱性: 甲醇: NH_4OH (比重 0.9015):水=60:10:30(V/V)。

先用酸性溶剂在 2°C 饱和 2 小时而后展开,室温风扇吹干,转 90 度,再用碱性溶剂饱和并展开。某些糖磷酸酯的 R_f 值列在表 8 中。

(ii) 显色剂: 每 100 mL 显色剂中包括: 5 mL 60% HClO_4 , 25 mL 4% (W/V) 钼酸铵, 10 mL 1 mol/L HCl , 60 mL 水。

将滤纸用上述显色剂喷雾,然后干燥,并将滤纸在 85°C 加热 5 分钟,然后在 0.6~0.8 千克下蒸 2 分钟,滤纸显示出均匀的蓝色,在氨气上熏时,背底的蓝色消失,而糖与钼酸铵形成的钼蓝仍保留。

【文献】

表 8 糖磷酸酯及正、焦、三磷酸酯在酸性及碱性展开剂中的 R_f 值

化 合 物	R_f 值	
	酸	碱
ATP		
adenosine triphosphate	0.12	0.15
AMP		
adenosine-3-phosphate	0.17	0.32
G-1-P		
glucose-1-phosphate	0.27	0.60
F-6-P		
fructose-6-phosphate	0.34	0.44
三多磷酸酯		
tripolyphosphate	0.37	0.06
G-6-P		
glucose-6-phosphate	0.38	0.48
F-1, 6-P		
fructose-1, 6-diphosphate	0.40	0.24
2-磷酸甘油酯		
2-phosphoglycerate	0.46	0.18
焦磷酸酯		
pyrophosphate	0.46	0.05
3-磷酸甘油酯		
3-phosphoglycerate	0.50	0.35
PEP		
phosphoenolpyruvate	0.52	0.46
正磷酸酯		
orthophosphate	0.63	0.28

Block, R. J. et al., *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis*, Chapter VI p. 127~156, Academic press. New York, 1955.

Bayly, R. J. et al., : *Nature*, **168**:510~511 (1951).

Marshall, R. D. et al., : *Glycoproteins*, by A. Gottschalk, Elsevier publishing company, Amsterdam. p. 256, 1972.

Spiro, R. G., *J. Biol. Chem.*, **235**:2860 (1960).

Bourrillon, R. and J. Michon, *Bull. Soc. Chim Biol.*, **41**:267 (1959).

Carsten, M. E. et al., *J. Biol. Chem.*, **238**:1724 (1963).

Trecolean, W. E. et al., *Nature*, **166**:444 (1950).

Cifonelli, J. A., and Smith, F., *Anal. Chem.*, **26**:1132 (1954).

- Harris, G. et al., *Chemistry and Industry*, 249 (1954).
Schwimmer, S. and Bevenue, A., *Science*, 123:543 (1956).
Partridge, S. M., *Nature*, 164:443 (1949).
Forsyth, W. G. C., *Nature*, 161:239 (1948).
Dickens, F. and Williamson, D. H., *Biochem. J.* 64:567 (1956).
Barrett, A. J. and Northcote, D. H., *Biochem. J.* 94:617 (1965).
Marshall, R. D. and A. Neuberger, *Glycoproteins* by A. Gottschalk, Elsevier publishing company, Amsterdam, p. 264 (1972).
Svennerholm, E. and Svennerholm, L., *Nature*(London), 181:1154 (1958).
Abdel-Akher, M. and Smith, F. J., *Am. Chem. Soc.* 73:5859~5860 (1951).
Baudurski, R. S. and Axelrod, B., *J. Biol. Chem.* 193:405~410 (1951).

(戈苏国 韩文珍 张树政)

(二)糖的柱色谱

1. 糖的活性炭柱分离

早在四十年代初, 活性炭柱色谱法就用于分离糖类。五十年代初, Whistler 等作了改进, 采用乙醇溶液的梯度洗脱, 使单糖、二糖、三糖、四糖和五糖之间得到分离。这个方法的特点是:

- ① 分离容量大, 150 mL 活性炭-硅藻土, 可分离 1g 混合糖。
- ② 适用范围广, 不但可用于不同聚合度的低聚糖(如木糖、木二糖、木三糖等)之间的分离, 也可以用于同聚合度的不同寡糖(如蔗糖、麦芽糖、纤维二糖……)之间的分离, 还可用于混合糖、糖酸、糖醇和糖的乙酯、氨基低聚糖及糖的甲基醚的分离。
- ③ 糖样中含有无机盐对分离没有影响, 糖样溶液的浓度也无关紧要, 通常可以是 1~10%。

【操作】

(1) 装柱: 活性炭柱层析流速较慢, 一般采用较粗的柱子, 柱子高度是直径的 5~10 倍。装柱前, 先将玻璃柱内壁洗刷干净, 下端衬填玻璃棉。然后, 将等重的粉状活性炭和硅藻土(O. P.) 在烧杯中混合均匀, 填充到玻璃柱中, 用一端带有大橡皮塞的玻璃棒在柱的顶端轻轻敲击(若在柱身敲击, 易造成横断面上的不均匀), 至炭面不再下降为止。在炭面上覆盖一层玻璃棉, 以防淋洗液破坏炭面。用浓盐酸(A. R.) 慢慢淋洗, 使活性炭活化及除去一些碱性物

质。然后用蒸馏水淋洗，直到流出液呈中性，并用 AgNO_3 溶液检查无氯离子。这是干法装柱。

湿法装柱是将称好重量的活性炭用 20% 盐酸或醋酸煮沸半小时，然后用蒸馏水洗至中性，再与等重的硅藻土用水调匀至成浆状，倾入柱中（不能有气泡），俟其自然沉降，在炭面上覆盖一片滤纸，用水淋洗至炭面不再下降，俟炭面上的水减少到一薄层时（不能流干），即可进样。

装柱对分离效果起着重要的作用，必须谨慎操作。

(2) 进样：进样亦是一个重要环节。一般是将糖样的水溶液轻轻加入柱内，若样品溶液体积较大，可分几次加入，每次待液面接近炭面时再加入。样品溶液加完后，用少量的水清洗样品瓶，再转入柱中。

(3) 洗脱：待样品溶液的液面接近炭面时，即可开始洗脱。洗脱有三种方法：

① 以 60% 乙醇溶液为洗脱液，用分部收集器收集。

② 分级洗脱：先用水洗出样品中的盐分和单糖，然后依次用 5%—15%—25%—35%—50% 乙醇溶液洗脱。每个级分的洗脱液经检查后，如果是单一组分，即已分离完毕；如果某一级分的洗脱液中有两个甚至三个组分，则需将此级分洗脱液重新上柱用相应浓度的乙醇溶液洗脱，直至完全分离。

③ 梯度洗脱：用分部收集器收集洗脱液。

对于较易分离的混合糖，用第一种洗脱方法就可获得满意的分离。对于较难分离、尤其是混合糖样品组分较多者，宜用梯度洗脱法。若还分离不好，则可在色谱柱外加一玻璃套管，在夹管中通 60°C 的恒温水。

检查：检验每个级分中的组分，可用高压液相色谱、薄层色谱、纸色谱等方法。

混合糖样被完全分离后，合并相同组分的洗脱液，在旋转薄膜蒸发器上除去溶剂（在 40°C 下）。若得到的是糖浆，则可加一些无水乙醇溶解之后，再行蒸去，如此反复 3~5 次，常可得到白色粉末

或固体,干燥后可计算粗收率. 最后重结晶,干燥,计算收率,测定比旋度. 粗产物的精制,亦可分别再次上柱分离.

【文献】

Bacon, J. S. D. and Bell, D. J. *J. Chem. Soc.*, 2528(1953); J. S. D. Bacon, *Biochem. J.*, 57:320(1954).

Barker, S. A., Foster, A. B., Stacey, M. and Webber, J. M. *J. Chem. Soc.*, 2218(1958).

(蒋英大)

2. 蜂蜜中寡糖的炭柱分级法

用活性炭吸附柱分离糖类时,可逐渐提高洗脱液的溶剂强度以分步洗脱分子量由小到大的糖类. 例如先用水洗脱单糖,再用5%乙醇(水溶液)洗脱双糖,用10%乙醇洗脱三糖,用15%乙醇洗脱四糖等.

【试剂】

活性炭,中国医药公司北京分公司分装,粒状. 用水漂洗除去细粉末,加5~10倍量的20%乙酸,煮沸数分钟并趁热过滤,用热水洗涤多次. 根据分离糖的量装入适当大小的玻璃柱内. 如不经乙酸处理,用蒸馏水淋洗炭柱二小时以上也可使用,但效果略差.

【操作】

装填一支 $\phi 15 \times 300$ mm的炭柱,将茶花蜂蜜3g溶于6 mL蒸馏水中,滤去絮状物后,加到炭柱顶端,依次用水洗脱单糖,用5%乙醇洗脱双糖,然后用7%和10%乙醇洗脱三糖加四糖的级分(前者含三糖较多,后者含四糖较多). 洗出液用地衣酚-硫酸显色法检查,直至不含糖为止. 这表明一个级分已全部洗脱,可换用强度更高的一种洗脱液. 洗脱液的用量根据糖的含量而定:对于3g蜂蜜中的单糖约需800 mL,双糖约需250 mL,对于三糖加四糖级分,两种洗脱液各需500 mL左右.

寡糖级分经减压除去大部分溶剂后,加入无水乙醇使之沉淀,过滤,干燥后可得白色粉末. 三糖加四糖级分共约0.4~0.5g. 进一步的分离需用纸色谱法.

【讨论】

活性炭的产品种类甚多，每种活性炭在使用前又可能经过不同的处理过程，因此吸附性能差别很大，这就造成所用的洗脱液的配比有一定变化。例如本文原理部分所说的洗脱液组成是来自参考文献，而操作部分所说的组成是针对实际使用的（北京医药公司）活性炭而摸索出来的。

【文献】

中国医学科学院药物研究所编，《中草药有效成分的研究》第一分册，人民卫生出版社，1972年。

（何慧珠 竺安）

3. 糖的离子交换树脂柱分离

糖类混合物的分离可采用多种方法进行。其中用得比较多的方法是离子交换树脂柱色谱法。离子交换树脂法是利用树脂对不同种类的糖在吸附作用上的差异，使混合物中各糖分达到彼此分离的目的。在实际分离工作中，常将离子交换树脂变换成某种结合型，如 Li^{+1} 、 Na^{+1} 、 K^{+1} 、 Ca^{+2} 、 Fe^{+3} 型或 Cl^{-1} 、 SO_4^{-2} 、 BO_3^{-1} 型树脂。具有某种结合型的强酸性或弱酸性阳离子树脂，强碱性或弱碱性或大孔球形阴离子树脂广泛应用于糖的分离。可以分离多种单糖的混合物，单糖、双糖、三糖、四糖和五糖组成的体系，多种单糖、去氧糖和糖衍生物的复杂样品，某些多糖样品，含有不同构型的吡喃糖苷及呋喃糖苷的混合物以及其他糖类的混合体系。影响离子交换树脂分离的因素很多，主要是树脂类型和粒度、洗脱剂种类、pH值和洗脱速率、分离温度和分离柱的长径比等。下面介绍两个实例。

(i) 茜草酸苷的糖分分离

【试剂】

茜草酸苷自中药茜草根提取而得。将所得茜草酸苷用稀硫酸水解，然后滤去残渣，滤液用强碱性阴离子交换树脂中和至 pH6~7。除去树脂后，滤液真空干燥，所得残渣用 87% 乙醇水溶液溶解，

得到的溶液待分离。

树脂为 100~200 目的 Dowex-1 树脂 (Cl 型), 装量为 30g。使用前, 用 1 mol/L NaOH 溶液将上述树脂转换成 OH 型。经用水充分洗涤后, 再用 1 mol/L H_2SO_4 使之转换成硫酸型。以上操作重复两次, 并用水洗至 pH6~7。再用 87% 乙醇水溶液淋洗 2 小时后待用。

分离柱为硬质玻管。柱体积为 0.4×38 cm。

【操作】

试验用流动法。将以上待分离的溶液 (1 mL 87% 乙醇水溶液溶解 80 mg 茜草酸苷水解产物得到的溶液) 逐滴从离子交换柱上端轻轻加入, 洗脱剂由蠕动泵控制流速 (洗脱速率为 27 mL/h) 进行洗脱。洗出液由部分收集器收集, 每管 3.5 mL, 共收集 80 管。弃去第 1~9 管。从第 10~26 管每管取洗出液 0.3 mL, 第 27~48 管取 0.5 mL, 第 49~80 管取 1 mL。洗出液不足 1 mL 者均用 87% 乙醇水溶液补充至 1 mL。然后分别向各管加入 3 mL 显色剂 (苯胺-85% 磷酸-冰乙酸), 摇匀之, 并置于沸水浴中保温 1.5 小时。冷至室温后, 于 365 nm 波长测其光密度。结果如图 1 所示。

第 15、35 和 60 管洗出液纸层析的结果, 表明样品中的鼠李

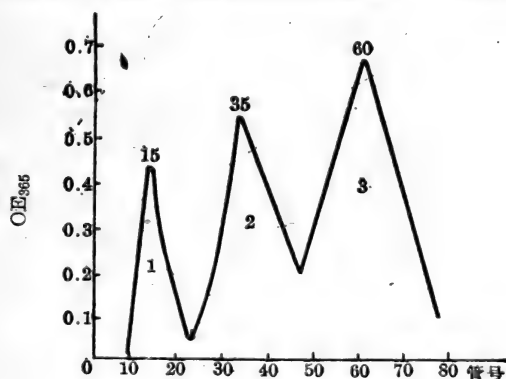


图 1 糖分洗出曲线示意图

1. 鼠李糖吸收峰 2. 木糖吸收峰 3. 葡萄糖吸收峰

糖、木糖和葡萄糖分离完全(图2)。

(ii) 阳离子交换树脂制备分离木糖和阿拉伯糖

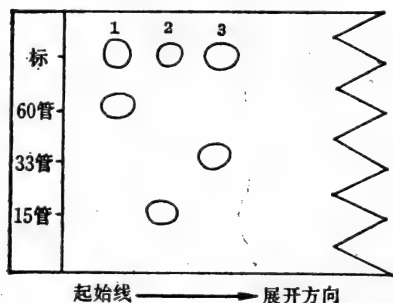


图2 第15、35和60管洗出液
纸色谱结果示意图

展开条件: 室温, 下行展开 12 小时

溶剂系统: 正丁醇:吡啶:水:苯

(1:5:3:3)

1. 葡萄糖 2. 木糖 3. 鼠李糖

美 DuPont 公司。装量为 28g。使用前, 用 1 mol/L CaCl_2 水溶液将树脂变换成 Ca 型。树脂床大小有 $0.8 \times 120 \text{ cm}$ 和 $1 \times 105 \text{ cm}$ 两种。

分离柱为一硬质玻璃套管。内管装树脂, 内外管间的环隙为恒温循环水夹套。

【操作】

试验采用顺流式动态法。准确配制的木糖(用量 1mg)和阿拉伯糖(用量 1mg)混合水溶液样品用注射器从树脂上部一次加入。待样品完全渗入树脂层后, 即沿分离柱壁逐滴加入洗脱剂进行洗脱。洗出液由 ZBS-1 型自动部分收集器收集。每管液量为 1.5 mL。用苯酚-硫酸法由 72 型光电分光光度计测定其糖含量。

对某糖厂的成品木糖进行制备分离, 得到图3的洗出曲线。

【讨论】

(1) 本试验可使木糖和阿拉伯糖分离完全, 得到纯度高的糖

【试剂】

木糖为结晶 D(+)-木糖, 分析纯, 上海试剂二厂。使用前在 100°C 烘 4 小时。

阿拉伯糖为结晶 L(+)-阿拉伯糖, 分析纯, 瑞士试剂。使用前未经处理。

洗脱剂为普通蒸馏水。

树脂为 Dowex 50W-X8, H 型, 200~400 目,

品。且因本法设备简单、操作容易、能耗小、分离费用低、可进行制备型分离等优点,因此,为制糖厂回收纯质木糖和阿拉伯糖提供了技术依据。

树脂分离法的缺点是,分离周期较长,且其他糖分的存在对分离有一些影响。

(2) 离子交换树脂使用前的预处理和装柱质量的优劣对分离和试验重复性有直接影响。经反复多次预处理又细心装填的分离柱有较好分离性能和较长使用寿命。

【文献】

Jandera, P. and J. Churáček, *J. Chromatogr.*, **98**:79 (1974).

Larsson, L. I. et al., *Acta Chem. Scand.*, **19**(6):1357 (1965).

吴昌贤、陆德培, *水解工业*, 1981年, 第2期。

(吴昌贤 孙仲诤)

(三) 糖的亲亲和色谱

目前分离多糖的常用方法其原理不外乎: 利用多糖混合物中各组分的分子量差异(分子过滤法, 高效或常压分子排阻色谱法), 利用它们在不同浓度有机溶剂与水的混合液中溶解度的差异(醇或丙酮分级沉淀法), 或对带可电离基团的酸性或碱性多糖来说利用其所带电荷的性质和多少的差异(离子交换或电泳法)等。但对于性质十分近似的多糖来说, 这些方法都由于选择性较差而只能作组族分离, 对多糖的结构实质不能提供更多有价值的信息。因此在多糖研究中目前最大的难题是由于缺乏有高度选择性的分离方法, 从而难以得到多糖纯品, 以致阻碍了进一步的化学结构鉴定和药理效价的研究。

用凝集素作亲和色谱来分离糖则具有较高的结构特异性和较广泛的可供选择的可能性。目前, 经过鉴定的凝集素已有近百种,

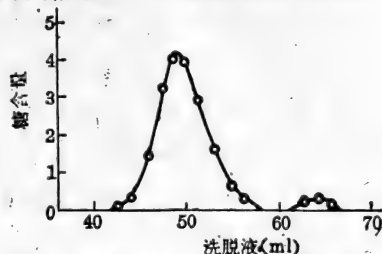


图3 某糖厂成品木糖的洗出曲线

试验条件: 分离柱, 1×105 cm, Dowex-50W(Ca^{2+}); 进样量, 27.4 mg; 洗脱速率, $0.15 \text{ mL/cm}^2 \cdot \text{min}$; 分离温度, 16°C 。

有不少都有商品供应。它们对糖或糖残基具有特定的选择性或专一性(参阅各论第 330 页)。有时有多种凝集素都对同一种糖或糖残基(或衍生物)具有亲和特性,但仔细分析,可以发现它们对与该糖残基连接的邻近糖残基或联键(α -或 β -糖苷键或连接位置)也具有一定程度的特异性。也就是说,凝集素识别多糖的能力可以达到 1 个、2 个甚至 2 个以上糖的结构单元。这样,就使凝集素对多糖的亲和有众多的可供选择的可能性。选用不同的凝集素亲和柱就可以试用于分离含各种结构特点的多糖。

要实施多糖的亲和色谱分离,首要的是制备凝集素亲和柱,也就是要将适当的凝集素通过各种手段化学键合在合适的填料基质上。装柱后按液相色谱分析的方式进行。

合适的填料基质是亲和色谱能否成功的重要环节。理想的亲和色谱填料基质应当具有以下性质:

① 孔度较大,允许分子量较大的多糖分子透入。

② 具有良好的亲水性和电中性,能与水溶性大的多糖分子相溶,并有较好的 pH 稳定性,以适用于各种缓冲液。

③ 带有一定数量的活性基团($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$ 等)以便较容易而温和地与凝集素相键合。

④ 有一定的刚性,能耐受一定的液压而不致破碎,以便用于加压系统,加快分离速度。

⑤ 粒度分布均一,以提高柱效。软性填料最好 $40\sim 60\ \mu\text{m}$,刚性填料最好 $10\ \mu\text{m}$ 左右。

近年来有不少厂商从事于研制用于亲和色谱的填料基质,有些还带有活性基团可以直接用来与凝集素或其他配基键合(表 9, 10),有些已经引入“手臂”以使键合的凝集素具有较大的结合自由度,一些将凝集素联接在填料上的产品最近几年也已问世(表 11)。

凝集素(一般是蛋白质或糖蛋白)与填料的结合要注意勿涉及或掩蔽凝集素分子上与糖结合的活性部位而使亲和活力受到影响。常用的活化剂及连接方式列示于表 12 中。

从表 12 可见,可以将填料上基团活化再与凝集素结合,也可

表9 用作亲和色谱填料的基质

种 型	商 品 名	排阻范围 (万道尔顿)	粒 度 (μm)	厂 商
交联葡聚糖	Sephadex G-200	0.1~20	40~120	Pharmacia
琼脂糖-丙 烯酰胺	Sephacryl S-200	0.1~8	40~105	Pharmacia
	S-300	0.1~40		
	S-400	1~200		
	S-500	4~2000		
	S-1000	50~10000		
	Ultrogel AcA		60~140	LKB
	202 Ac 20% A2%	0.1~1.5		
	54 Ac 5% A4%	0.1~7		
44 Ac 4% A4%	1~13			
	34 Ac 4% A3%	2~35		
	23 Ac 2% A2%	10~200		
琼脂糖及 交联琼脂糖	Sepharose		45~65	Pharmacia
	6% 6B/CL-6B	1~100		
	4% 4B/CL-4B	3~500		
	2% 2B/CL-2B	10~2000	60~140	
	Ultrogel		40~140	LKB
	6% A6	2.5~240		
4% A4	5.5~900			
	2% A2	12~2500		
乙烯单体 聚合物 (半刚性)	Fractogel TSK HW65F	1~100	32~63	Pierce
	Fractogel TSK HW75F	10~1000		
键合甘油基 (二醇)的 控孔玻璃	CPG/40 Glycophase	0.1~0.8	37~74	Pierce
	CPG/100Glycophase	0.1~3		
	CPG/240Glycophase	0.25~12.5		
	CPG/460Glycophase	1.1~35		

以使凝集素上基团(尤其是羧基)活化,再与填料结合。

进行糖的亲和色谱分离目前存在的主要问题是凝集素的价格太高,选择性还不够广泛。接合用的填料基质还多属于软性填料,不易用作高效色谱分离。最近有人试用半刚性的填料基质

表 10 带活化基团或“手臂”的亲合色谱填料基质

种 类	商 品 名	活性基团及“手臂”**	接合剂	厂 商
琼脂糖-丙烯酰胺	Act-Ultrogel AcA22	戊二醛=C ₆ (1)	本身	LKB
	Act-Magnogel AcA44	戊二醛珠内含磁化 Fe ₃ O ₄ (1)	本身	LKB
	Act-Ultrogel AcA34	接 6-氨基己酸手臂 6~14 μmol/mL(2)	EDC	LKB
	HMD-Ultrogel AcA74	接己二胺手臂 6~10 μmol/mL(1)	EDC 戊二醛	LKB
琼 脂 糖	CNBr 活化琼脂糖-4B	CNBr 活化后成品(1)	本身	Pharmacia
	CH-Sephacrose 4B	6-氨基己酸(1)	EDC	Pharmacia
	Aff-gel 202	-OCH ₂ CONH(CH ₂) ₂ NHCOCH ₂ CH ₂ COOH(1)	EDC	Bio-Rad
	AH-Sephacrose 4B	己二胺(1)	EDC 戊二醛	Pharmacia
	Aff-gel-10(80~180 μm)	CD 活化的 COOH 成品(1)	本身	Bio-Rad
	Aff-gel-15(80~180 μm)	CD 活化的 COOH 成品(1)	本身	Bio-Rad
	环氧活化 Sepharose 6B	环氧基(3)	本身	Pharmacia
	Act-SH-Sephacrose 4B	谷胱甘肽-S-S-吡啶(4)	本身	Pharmacia
	Aff-gel 401(80~180 μm)	-OCH ₂ OONH(CH ₂) ₂ NHCOCH ₂ (CH ₂) ₂ SH NHCOCH ₃ (4)	本身	Bio-Rad
	Aff-gel 102	-OCH ₂ CONH(CH ₂) ₂ NH ₂ (2)	EDC	
Reacti-Gel(6X)6%琼脂糖	碳二亚胺活化(1)	戊二醛 本身	Pierce	
Reacti-Gel(HW-65F)	碳二亚胺活化(1)	本身	Pierce	
Fractogel-TSK HW-65F	半刚性耐压 100psi			
键合甘油(二醇)基的控孔玻璃	CDI-Glycophase	碳二亚胺活化 50 μmol/g(1)	本身	Pierce

* 对被接合配基所带基团要求: (1)带氨基, (2)带COOH, 需用EDC活化配基, 再与基质结合, (3)带OH基, (4)带-SH或-S-S-基。

表 11 已联接凝集素的亲和色谱填料

品 名	专 一 性	需要的离子	固相化凝集素量 (mg/mL)	厂 商
伴刀豆凝集素-琼脂糖 ConA-Sepharose ConA-Ultrogel	Glc/Man	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	3~4	LKB Pharmacia
豌豆凝集素-琼脂糖 LCA-Ultrogel Lentil Lectin-Sepha- rose 4B	Man/Glc	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	2~4	LKB Pharmacia
麦胚凝集素-琼脂糖 WGA-Ultrogel	Glc-NAc Di-NAc- 甲壳二糖	—	3~4	LKB Pharmacia
蜗牛凝集素-琼脂糖 HPA-Ultrogel HPA-Sepharose	Gal-NAc	—	2~4	LKB Pharmacia
花生凝集素-琼脂糖 PNA-Ultrogel	Gal/Lactose	—	3~5	LKB

表 12 常用的活化剂及连接方式

填料上基团	活 化 剂	凝集素上基团
填料 $\begin{cases} \text{OH} \\ \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{cases}$	→ 溴化氰 (CNBr)	↘
	→ 碳二亚胺 (CDI 或 EDC)	→ —NH ₂
	→ 戊二醛	↗
填料—OH	→ 环氧基活化	→ —OH
填料—SH	→ 活性—SH 或 —S—S—	→ —SH
填料—NH ₂	← 碳二亚胺 (CDI 或 EDC)	← —COOH

(Fractogel TSK HW-65F, 一种乙烯单体聚合物)及刚性的 TSK-SW-3000 或 4000 填料, 或键合了甘油基(二醇)的控孔玻璃等新材料作为高效亲和色谱填料基质, 是值得注意的一个动向. 因为只有提高柱效的基础上才能使 K_D 值相差 0.1 或更少的两种组分完全分开.

判断亲和柱对某一糖样品亲和力大小的方法是比较其 K_D 值:

$$K_D = \frac{V_s - V_0}{V_t - V_0}$$

如果洗脱时用恒流泵, 则即可用保留时间来代替保留体积。 V_0 值用已知被完全排阻而被吸附的大分子如蓝色葡聚糖 2000 或血蓝蛋白来测定。 V_t 值用已知不被亲和柱吸附的单糖来测定。 V_s 即为样品的保留体积。

比较样品在不接凝集素的同样填料柱(空白柱)与凝集素亲和柱上样品的 K_D 值。如果 K_D 值增大即表示有缔合或亲和。

花生凝集素(PNA)亲和柱在糖分离中的试用

【试剂】

花生凝集素(Peanut agglutinin, 简称 PNA)是从花生仁提取的一种不含糖的蛋白质, 能与半乳糖特异地结合。本文中所用凝集素系按文献方法(郑新民等, 1983)提取。

CNBr 活化琼脂糖(Sephrose 4B), Pharmacia 厂出品。

琼脂糖 Sephrose 4B, Pharmacia 厂出品。

蓝色葡聚糖 2000, Pharmacia 厂出品。

0.01 mol/L HCl, 0.1 mol/L NaHCO_3 缓冲液 pH 8.3; 0.1 mol/L 醋酸、0.5 mol/L NaCl 缓冲液 pH 4; 0.2 mol/L 甘氨酸缓冲液 pH 8。均按常规方法用分析级试剂配制。

单糖样品葡萄糖、木糖、鼠李糖、半乳糖、乳糖均为分析纯。配制 5 mg/mL 水溶液。每次进样 15 μL 。

多糖样品本单位自制, 共六种(表 13)均配成 5 mg/mL 水溶液。每次进样 15 μL 。

【操作】

PNA-琼脂糖 4B 亲和填料的制备: 取 CNBr 活化 Sephrose 4B 2.5 g, 置 0.01 mol/L HCl 中浸泡, 洗涤。用量约 500 mL, 溶胀后凝胶体积约为 8 mL, 用碳酸氢钠缓冲液(0.1 mol/L NaHCO_3)洗至 pH 8.3, 取 PNA 80 mg, 溶于 15 mL 0.1 mol/L NaHCO_3 ,

表 13 六种试验用多糖的单糖分析

编号	多糖名称	半乳糖	葡萄糖	阿拉伯糖	木糖	岩藻糖	半乳糖醛酸
1	石松多糖	+	+	+	+	-	-
2	蜜环菌多糖	+	+	+	+	-	+
3	猴菇多糖PH	-	+	-	-	-	-
4	猴菇多糖PL	+	-	-	-	+	-
5	问荆多糖ED	+	-	+	-	-	-
6	问荆多糖EE	+	-	+	-	-	+

0.5 mol/L NaCl 缓冲液中, pH 为 8.3. 加至洗涤完毕的湿凝胶中, 再添加缓冲液使稠度适当. 在 4°C 搅拌 16 小时, 抽滤, 用少量缓冲液洗(洗、滤液合并, 对蒸馏水透析, 冷冻干燥回收 PNA, 从加入 PNA 量减去回收 PNA 计算实际 PNA 结合量). 结合物用 0.1 mol/L 乙酸, 0.5 mol/L NaCl 缓冲液洗至 pH 4. 加 14 mL 0.2 mol/L pH 8 的甘氨酸缓冲液, 室温(25°C)搅拌 2 小时或 4°C 搅拌过夜以封闭剩余的活性基团. 抽滤后再用上述碳酸氢钠缓冲液及醋酸缓冲液各 300 mL 交替洗涤 4~5 次. 最后用蒸馏水洗, 并加水拌成匀浆, 准备装柱.

“空白柱”和“亲和柱”的准备: 为了作平行对照, 我们用不加处理的 Sepharose 4B (Pharmacia 厂) 直接装柱作为“空白柱”, 而以接合不同量 PNA 的琼脂糖充装亲和柱. 亲和柱 I 的凝胶含 PNA 5 mg/mL, 亲和柱 II 的凝胶含 PNA 10 mg/mL.

柱体采用 $\phi 3.9 \text{ mm} \times 30 \text{ cm}$ 不锈钢柱, 在搅拌下以水匀浆法装柱. 柱出口处加以减压使柱体充装结实. 然后连接至高压泵 (Waters 6000 A 型往复泵) 上以 0.5 mL/min 的流速以蒸馏水流过 4 小时. 拆开柱头, 添加凝胶补足因柱内凝胶压实而出现的空缺. 装柱头后, 再开泵运行至柱体不再出现空缺为止. 空白柱及亲和柱均用同法充装.

柱体充装完毕后连接至监测仪上(用折光监测仪, 也可用自动收集器分管收集, 用比色法测各管中糖含量), 以双蒸馏水为流动相进行平衡和洗脱.

柱参数的测定: V_0 值用蓝葡聚糖 2000 测定, 进样 $15\mu\text{L}$, V_r 值采用葡萄糖所得值。

单糖及多糖的保留时间及 K_D 值测定: 进样后用秒表计算至出峰的最高值时的时间, 重复二次, 取平均值。误差不得超过 $\pm 1\%$ 。求出 t 及 K_D 值, 见表 14 及表 15。

表 14 各种单糖的色谱保留时间 (t) 及 K_D 值

糖	“空白柱”		亲和柱 I		亲和柱 II	
	t	K_D	t	K_D	t	K_D
蓝葡聚糖 2000	2'25"	0.00	6'20"	0.00	3'27"	0.00
葡萄糖	7'35"	1.00	14'55"	1.00	7'25"	1.00
鼠李糖	7'35"	1.00	15'0"	1.01	7'25"	1.00
木糖	7'40"	1.016	15'10"	1.029	7'30"	1.021
半乳糖	7'40"	1.016	16'0"	1.126	8'5"	1.177
乳糖	—	—	—	—	8'40"	1.316

流速: $0.5\text{mL}/\text{分}$; 溶剂: 双蒸馏水; 检测: 折光 $8x$ 。

表 15 各种多糖的色谱保留时间 (t) 及 K_D 值

编号	多 糖	“空白柱”		亲和柱 I*		亲和柱 II	
		t	K_D	t	K_D	t	K_D
	蓝葡聚糖 2000	2'25"	0.00	6'20"	0.00	3'27"	0.00
	葡萄糖	7'35"	1.00	14'55"	1.00	7'25"	1.00
1	石松多糖	4'15"	0.355	9'57"	0.421	6'0"	0.643
2	蜜环菌多糖	4'15"	0.355	10'50"	0.524	6'15"	0.706
3	猴菇多糖 PH	2'30"	0.016	6'55"	0.068	3'30"	0.013
4	猴菇多糖 PL	6'40"	0.822	13'20"	0.815	6'40"	0.811
5	问荆多糖 ED	2'25"	0.00	6'28"	0.016	3'27"	0.00
6	问荆多糖 EE	3'45"	0.258	9'50"	0.408	5'35"	0.538

* 流速: $0.25\text{mL}/\text{分}$, 其余均为 $0.5\text{mL}/\text{分}$; 溶剂: 双蒸馏水; 检测: 折光 $8x$ 。

【讨论】

(1) 溶剂的选择: PNA 与糖的结合是可逆的, 不很牢固。与 PNA 亲和性强的单糖如乳糖 ($K_D=1.3$) 仍可从柱上用双蒸馏水洗脱。如果洗脱溶剂中盐浓度增大, 则乳糖的 K_D 值还会减小, 直至

等于1(即无亲和)。

(2) 各种单糖 K_D 值与结构的关系: 表6中的数据表明各种单糖在PNA亲和柱上的 K_D 值是有差别的。葡萄糖、鼠李糖及木糖均无明显亲和, $K_D=1$ 。半乳糖及乳糖则有亲和, $K_D>1$ 。说明亲和柱有选择特异性。如果我们作进一步分析, 可以看出:

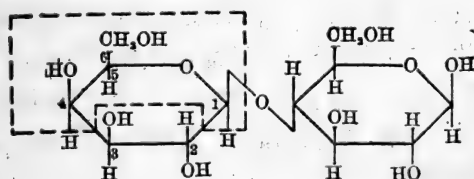
1) 乳糖与半乳糖在PNA柱上的 K_D 相比, 乳糖略大于半乳糖。这说明保留涉及半乳糖1-位糖苷键的构型, 甚至与第二个葡萄糖有一定关系。

2) 半乳糖与葡萄糖相比, 两种糖除4-位上立体构型不同外, 其余部分完全相同。这说明4-位的构型对亲和是至关重要的。

3) 半乳糖与鼠李糖相比, 虽然两种糖4-位构型相同, 但5, 6-位结构差别甚大。这说明5, 6-位结构对亲和也有一定影响。

4) 半乳糖与木糖相比, 4-位不同而2, 3-位构型完全相同。这说明2, 3-位不是亲和的关键部位。

综上所述, PNA-柱与单糖的结合, 似乎要求糖分子上有乳糖分子中虚线所勾划出的部分:



乳糖(4-O- β -D-吡喃半乳糖基D-葡萄糖)

(3) 固定相中PNA含量与多糖 K_D 值的关系: 亲和柱I中PNA含量为5mg/mL, 而柱II为其1倍: 10mg/mL。表7结果表明, 凡在亲和柱上有亲和的多糖, 其 K_D 值均为柱II > 柱I。说明明确因PNA的亲和所导致。因此键合的PNA量宜多于10mg/mL为宜。

(4) 制备亲和柱的载体填料的选择: 用琼脂糖珠作载体虽然渗透性及亲水性都很满意, 但因粒子刚性不够, 颗粒细度及均匀度均不理想, 因而柱效不够高。要从普通亲和色谱过渡到高效亲和

色谱则对填料的研究还要下功夫。表 1 中所列 Fractogel 及 OPG Glycophase 等填料或许有较高的柱效，这是值得今后研究的一个方向。

【文献】

唐传业, 生物化学与生物物理学进展, 1981, 1~9.

郑新民等, 上海免疫学杂志, 3: 65 (1983).

Methods in Enzymology, Vol. 28 part B p. 313~395; 1972 Academic Press.

(刘耀清 马立人)

(四)糖的气相色谱

采用气相色谱法测定糖类开始于 1958 年。气相色谱分析主要是利用试样中各组分在色谱柱中的气相和液相间的分配系数不同, 当气化后的试样被载气带入色谱柱中运行时, 样品组分就连续不断地在移动的气相和固定的液相之间进行反复多次的分配, 经过一定的柱长后, 便分别按分离顺序离开色谱柱进入检测器, 检测器产生的讯号经放大后, 在记录器上描绘出色谱峰, 成为各组分定性定量的依据。

气相色谱法测定糖类, 由于样品在气相中传递速度很快, 加上可以选用广泛的固定液和采用灵敏的检测器, 因而具有选择性强、分辨力好、灵敏度高以及分析速度快等优点。近几年来, 因毛细管色谱柱和程序升温技术的普遍使用, 使糖类的气相色谱测定方法得到更为广泛的应用。

采用气相色谱法测定糖类, 遇到的主要困难是糖类本身没有足够的挥发性, 必须在气相色谱分析之前预先转化成易挥发、对热较稳定的衍生物。另外, 由于糖的异构化, 在某些衍生物的制备过程中, 会产生衍生物的异构体, 使色谱分析时每种糖产生几个峰, 往往影响组分的分离和定量。在分析组分较复杂的样品时, 应选择适宜的衍生物制备方法, 以使每种糖得到单一的色谱峰。

在糖类的气相色谱分析中, 目前常用的衍生物有糖的三甲基硅醚衍生物、糖脲三甲基硅醚衍生物、糖腈乙酸酯衍生物、糖醇乙醚衍生物和三氟乙酸酯衍生物等。

1. 糖的三甲基硅醚衍生物



糖和六甲基二硅氮烷、三甲基氯硅烷在吡啶中反应,生成具有挥发性的三甲基硅醚衍生物,同时产生氯化铵沉淀。

【仪器和试剂】

气相色谱仪:采用氢火焰离子化检测器。

固定液:SE-30。

吡啶(A. R.)。

三甲基氯硅烷(C. P.)(上海试剂一厂)。

六甲基二硅氮烷(C. P.)(上海试剂一厂)。

标准单糖(A. R.): D-阿拉伯糖、D-木糖、D-葡萄糖、D-甘露糖、D-半乳糖等。

内标物:正二十烷(G. C.)。

【操作】

(1) 衍生物的制备:称取10mg固体糖样和5mg内标正二十烷,加入1mL吡啶摇动使其溶解后,再加入0.4mL六甲基二硅氮烷和0.2mL三甲基氯硅烷,振荡后在室温下反应5分钟,反应产物可直接进行气相色谱分析。

(2) 气相色谱分析条件:

1) 分离柱:色谱柱可用内径3mm长2m的玻璃柱。

担体:Chromosorb W AW DMCS(80~100目)。

固定液:10%SE-30。

2) 气相色谱操作条件:

气体流速:载气 N_2 : 20mL/min, H_2 : 16mL/min, 空气: 150mL/min。

柱温:195°C。

检测器温度:230°C。

气化室温度:230°C。

【讨论】

(1) 糖的硅醚化衍生物具有挥发性好,制备简便,反应迅速的

优点。该法适宜结晶糖样和组分简单糖样的测定。测定结晶糖样往往可以得到单峰，测定糖浆或非结晶糖样则会产生异构峰，给定性和定量带来一定困难。

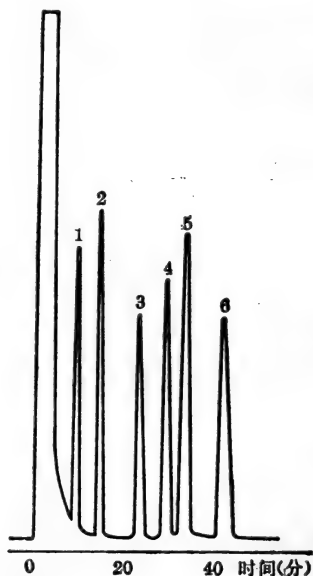


图4 糖的三甲基硅醚衍生物在SE-30柱上的出峰图

1. 阿拉伯糖
2. 木糖
3. 甘露糖
4. 半乳糖
5. 葡萄糖
6. 正二十烷(内标)

(2) 使用六甲基二硅氮烷和三甲基氯硅烷进行硅醚化反应会有氯化铵产生，使吡啶溶液变混浊。氯化铵的存在一般对色谱分析没有影响。静置或用离心法可使氯化铵沉淀。

(3) 在气相色谱分析时，为了减少吡啶峰的“拖尾”，可在硅醚化反应后，对反应产物用氯仿萃取法进行后处理，取衍生物的氯仿溶液进行气相色谱分析。

(4) 制备酮糖的三甲基硅醚衍生物，使用同样的硅醚化试剂需在 80°C 反应1小时或在室温下放置4小时以上反应才能完全。

(5) 当糖样在吡啶中不易溶解时，可置于 70°C 水浴中加热并振荡使其溶解，但对结晶糖样制备衍生物时的异构化现象会有所加剧。

(6) 水分能迅速与硅醚化试剂作用使其失去硅醚化反应能力。在衍生物制备时，通常要求使用干燥的样品并注意防止水分的进入。适当加大硅醚化试剂对糖样的用量比例，可使样品的允许含水范围有相应的增加。

(7) 测定由糖的水溶液制备的样品时会有异构峰产生。在组分定量时，可配制标准单糖水溶液放置24小时，待糖的异构体达到平衡后，再将其干燥并衍生化，测得每种糖的重量校正因子和异构体出峰面积的比例，这样在定量多峰和重叠峰时就能得到正确

的结果。

(8) 采用小型反应容器,可相应减少样品和试剂的用量。

(9) 本实验的气相色谱操作条件对测定单糖较为适宜,测定二糖和三糖时可采用程序升温。

(10) 使用氢火焰离子化检测器测定糖的三甲基硅醚衍生物时,产生的 SiO_2 容易敷着在检测器的电极上,因此对检测器需定期清洗。

(11) 有关复合硅醚化试剂的反应条件,一般在商品说明中均有介绍。

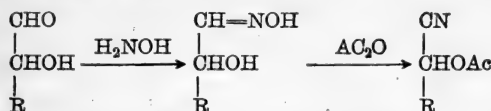
【文献】

Sweeley, C. C., et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**:2497 (1963).

李铁林等,分析化学, **9**(3):295(1981).

(李铁林)

2. 糖腈乙酸酯衍生物



糖和盐酸羟胺在吡啶中加热反应生成糖腈,加入醋酸酐后加热下继续反应生成具有挥发性的糖腈乙酸酯衍生物。

【仪器和试剂】

气相色谱仪:使用氢火焰离子化检测器。

固定液: ECNSS-M 或 OV-225。

吡啶(A. R.)。

盐酸羟胺(A. R.)。

醋酸酐(A. R.)。

标准单糖(A. R.): D-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖等。

内标物:肌醇六乙酸酯。

【操作】

(1) 衍生物的制备:称取 10 mg 固体糖样、10 mg 盐酸羟胺和

7 mg 内标, 加入 0.5 mL 吡啶, 放入 90°C 水浴中加热反应 30 分钟并振荡。取出后冷至室温, 加入 0.5 mL 醋酸酐, 在 90°C 下继续反应 30 分钟进行乙酰化, 反应产物可直接进行气相色谱分析。

(2) 气相色谱分析条件:

1) 分离柱: 色谱柱可用内径 2 mm 长 2 m 的玻璃柱。

担体: Chromosorb W AW DMCS (80~100 目)。

固定液: 3% ECNSS-M 或 3% OV-225。

2) 气相色谱操作条件:

气体流速: 载气 N₂: 20 mL/min, H₂: 30 mL/min, 空气: 200 mL/min。

柱温: ECNSS-M 柱 190°C, OV-225 柱 240°C。

检测器温度: 250°C。

气化室温度: 280°C。

【讨论】

(1) 糖腈乙酸酯衍生物气相色谱法具有衍生物制备简便、试剂易得等优点, 而且每种糖能得到单一的色谱峰。

(2) 为了减少溶剂峰的“拖尾”, 可将反应产物减压浓缩至干, 加入 0.5 mL 氯仿使残留物溶解后, 取样进行气相色谱分析。

(3) 应尽量减少样品的水分含量。若样品的水分偏高时, 乙酰化反应时应适当加大醋酸酐的用量。

(4) 酮糖衍生物在本实验的色谱柱上得不到衍生物色谱峰。

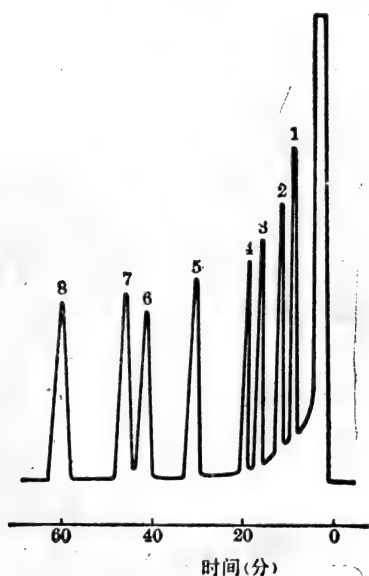


图 5 糖腈乙酸酯衍生物在 ECNSS-M 柱上的出峰图

1. 鼠李糖 2. 岩藻糖 3. 阿拉伯糖 4. 木糖 5. 甘露糖 6. 葡萄糖 7. 半乳糖 8. 肌醇乙酸酯(内标)

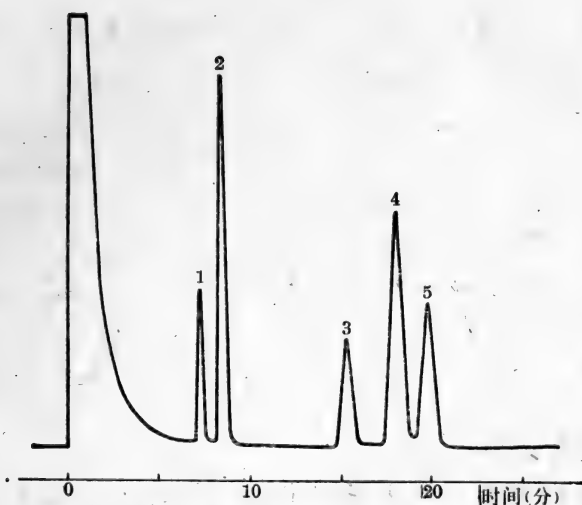


图6 糖醇乙酸酯衍生物在OV-225柱上的出峰图

1. 阿拉伯糖 2. 木糖 3. 甘露糖 4. 葡萄糖 5. 半乳糖

(5) 用该法测定二糖或三糖时,可采用程序升温.

(6) 采用小型反应容器,可相应减少样品和试剂的用量.

(7) 内标物肌醇六乙酸酯可按如下条件制备: 称取3g 肌醇(A.R.), 加入4.5克盐酸羟胺、45mL醋酸酐和3mL吡啶, 在90°C水浴中加热2小时并不断搅拌. 将反应液冷至室温倒入50mL冰水中, 使肌醇六乙酸酯析出. 过滤后加20mL水洗涤, 将压干后产物放入100°C烘箱中烘干备用. 制备的肌醇六乙酸酯用气相色谱检验应呈现单峰.

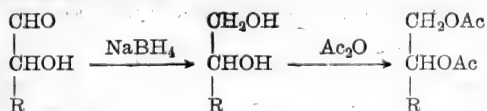
【文献】

Easterwood, V. M and Byron, J. L. Huff., *Svensk Pappi.*, **72**:768(1969).

李铁林、吴昌贤、张燕霞, 分析化学, **10**(5): 272(1982).

(李铁林)

3. 糖醇乙酸酯衍生物



糖在水中同硼氢化钠反应, 还原成相应的糖醇. 分解过量的

硼氢化钠, 除去硼酸根和水分, 将得到的干燥糖醇在吡啶中与醋酸酐加热反应, 生成糖醇乙酸酯衍生物。

【仪器和试剂】

气相色谱仪: 使用氢火焰离子化检测器。

固定液: ECNSS-M 或 OV-225。

硼氢化钠(A. R.)。

吡啶(A. R.)。

醋酸(A. R.)。

甲醇(A. R.)。

盐酸(A. R.)。

醋酸酐(A. R.)。

标准单糖(A. R.): D-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖等。

内标物: 肌醇(A. R.)。

【操作】

(1) 衍生物的制备

称取 10 mg 糖样、30 mg 硼氢化钠和 5 mg 内标物肌醇, 加入 2 mL 水, 振荡后在室温下放置 1.5 小时, 使糖还原成相应的糖醇。滴入醋酸分解过量的硼氢化钠, 至无气泡产生为止。溶液在 60°C 下减压浓缩至干。加入 0.1% (V/V) 盐酸甲醇溶液 2 mL, 振荡后减压蒸发至干, 重复 4 次以除去硼酸根。剩余物在 105°C 烘箱中加热 15 分钟除去水分。加入 0.5 mL 吡啶和 0.5 mL 醋酸酐, 封管后在沸水浴中反应 1 小时, 反应产物可直接进行气相色谱分析。

(2) 气相色谱分析条件

1) 分离柱: 色谱柱可用内径 2 mm 长 2 m 的玻璃柱。

担体: Chromosorb W AW DMCS(80~100 目)。

固定液: 3% ECNSS-M 或 3% OV-225。

2) 气相色谱操作条件:

气体流速: 载气 N₂: 20 mL/min, H₂: 30 mL/min, 空气: 200

mL/min.

柱温: ECNSS-M 柱 195°C, OV-225 柱 230°C.

检测器温度: 250°C.

气化室温度: 280°C.

【讨论】

(1) 采用糖醇乙酸酯衍生物气相色谱法测定糖时, 可以避免衍生物异构体的产生, 在色谱分析时每种糖可得到单峰, 但该法衍

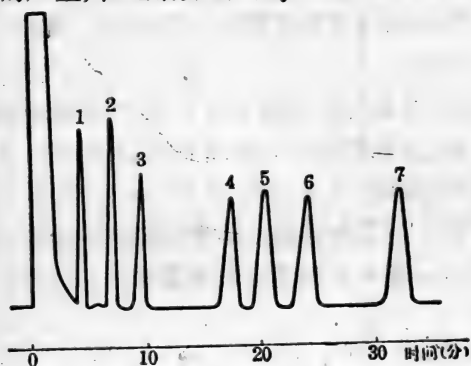


图7 糖醇乙酸酯衍生物在 ECNSS-M 柱上的出峰图

1. 鼠李糖 2. 阿拉伯糖 3. 木糖 4. 甘露糖 5. 半乳糖
6. 葡萄糖 7. 肌醇(内标)

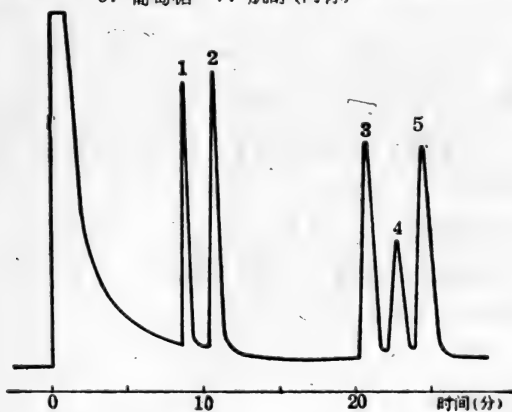


图8 糖醇乙酸酯衍生物在 OV-225 柱上的出峰图

1. 阿拉伯糖 2. 木糖 3. 甘露糖 4. 半乳糖 5. 葡萄糖

生化反应时间较长,操作比较麻烦。

(2) 硼酸根的存在会显著减慢糖醇乙酰化的反应速度,因此在还原反应后应将过量的硼氢化钠分解并除净硼酸根。

(3) 水分的存在会使醋酸酐水解,影响乙酰化反应的进行,因此在乙酰化反应前对糖醇要严格除去水分。

(4) 为减少溶剂峰的“拖尾”,可将反应产物减压浓缩至干,用0.5 mL 二氯甲烷将剩余物溶解后,取样进行气相色谱分析。

(5) 应用该法可进行糖醇样品的测定,测定时可直接按乙酰化方法进行反应。

(6) 采用该法进行糖的测定,有时不同糖可还原成同一糖醇。如葡萄糖、山梨糖经过还原均可得到山梨醇,果糖经过还原可得到山梨醇和甘露醇的混合物,在测定时应加以注意。

(7) 采用小型反应容器,可相应减少样品和试剂的用量。

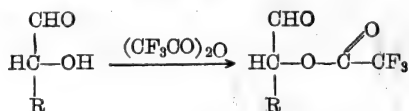
(8) 该法一般对单糖测定较为适宜。

【文献】

Borchardt, L. G. and Piper, C. V., *Tappi.*, **53**(2): 257(1970).

(李铁林)

4. 糖的三氟乙酸酯衍生物



糖和三氟醋酸酐在四氢呋喃中加热进行反应,生成糖的三氟乙酸酯衍生物。

【仪器和试剂】

气相色谱仪:使用电子捕获检测器。

固定液:DC-550。

四氢呋喃(A. R.)。

三氟醋酸酐(A. R.)。

乙腈(A. R.)。

标准单糖(A. R.):D-木糖、D-半乳糖、D-葡萄糖等。

【操作】

(1) 衍生物的制备: 称取 1 mg 糖样, 加入 0.2 mL 四氢呋喃和 0.05 mL 三氟醋酸酐, 放入 50°C 水浴中加热反应 10 分钟并振荡。反应产物在室温下通 N₂ 气流蒸发至干, 加入 1 mL 乙腈溶解后, 取样进行气相色谱分析。

(2) 气相色谱分析条件:

1) 分离柱: 色谱柱可用内径 2 mm 长 2 m 玻璃柱。

担体: Gas-Chrom P (80~100 目)。

固定液: 5% DC-550。

2) 气相色谱操作条件:

气体流速: 载气 N₂, 90 mL/min。

柱温: 90°C。

检测器温度: 150°C。

气化室温度: 150°C。

【讨论】

(1) 糖的三氟乙酰酯衍生物的测定, 可采用高灵敏度的电子捕获检测器, 因而能使样品的用量显著减少。该法有衍生物的异构体产生。

(2) 糖的三氟乙酸酯衍生物在乙腈中比在四氢呋喃中稳定, 故最后将衍生物溶于乙腈中。

(3) 样品在衍生化前应充分干燥除去水分。

(4) 若将糖先还原成糖醇, 然后分解过量的硼氢化钠并除去硼酸根和水分, 再和三氟醋酸酐反应生成糖醇三氟乙酸酯衍生物, 则每种糖可得到单一色谱峰。

【文献】

Tamura, Z. and Imanari T., *Chem. Pharm. Bull.*, **15**(2):246(1967).

Handbook of derivatives for chromatography, 125(1977).

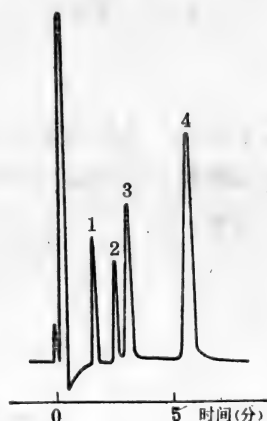


图 9 糖的三氟乙酸酯衍生物在 DC-550 柱上的出峰图

1. 木糖 2. 半乳糖 3. α -葡萄糖 4. β -葡萄糖

(李铁林)

5. 果糖与葡萄糖或甘露糖共存时的气相色谱定量法

用气相色谱(GC)法分析单糖时,常用的方法之一是将糖还原成糖醇,再转化为乙酸酯。但酮糖在还原后生成两种糖醇,例如果糖还原后生成葡糖醇和甘露醇,干扰了葡萄糖和甘露糖的测定,并使自身的测定也成为不可能。如果预先测定转化后这两种糖醇乙酸酯的GC峰面积比例,就可在果糖与葡萄糖或甘露糖共存时进行定量分析。

以果糖与葡萄糖共存为例(可含有其他糖,但不含甘露糖),令

$$K = \frac{a_{FG}}{a_{FM}}$$

a_{FG} , a_{FM} 分别为纯果糖经还原、乙酰化后,测得的葡糖醇乙酸酯和甘露糖醇乙酸酯的GC峰面积(进样量或浓度不拘),则对于样品分析有:

$$P_i = \frac{A_i W_s}{W F_i A_s} \times 100\%$$

$$P_G = \frac{(A_G - K A_M) W_s}{W F_G A_s} \times 100\%$$

$$P_F = \frac{A_M W_s}{W F_M A_s} \times 100\%$$

其中 P 为百分含量, A 为峰面积,下标 G 表示葡萄糖, F 表示果糖, M 表示甘露糖, i 表示其他糖, W 为样品重量, W_s 为加入的内标量,校正因子

$$F_i = \frac{\alpha_i W_s}{\alpha_s W_i}$$

α , W 各代表用已知糖样(不包括果糖)测得的峰面积和重量,下标 i 表示某糖(包括葡萄糖), s 表示内标物。

【试剂和仪器】

仪器: PYE-106 型气相色谱仪, DP-80 型电子积分器(英国 PYE-Unicam)。

色谱柱: 3% ECNSS-M(美国 Applied Science Laboratories)/Chromosorb WAWDMCS, 80~100 目, $\phi 1.5 \text{ mm} \times 1.5 \text{ m}$ 不锈

钢管。

检测器: 氢火焰离子化检测器。

载气: 氮。

柱温 190°C, 检测器温度 250°C, 汽化室温度 300°C。

积分器参数: 最小峰宽 16, 斜率灵敏度 16。

记录仪量程 10 mV, 纸速 5 mm/min。

【操作】

(1) 还原: 称取约 10 mg 样品加入约 10 mg 硼氢化钠, 并逐滴加入 1 mol/L 氨水使呈碱性。加入蒸馏水调整总体积为 2 mL 左右, 于室温下还原 1 小时。然后, 在 50°C 水浴上继续反应 40 分钟, 滴加冰醋酸使反应终止(无气泡产生), 溶液呈酸性。加入 1 mL 无水甲醇在 50°C 水浴上通干燥氮气吹干。重复此操作(加甲醇, 吹干)四次。

(2) 乙酰化: 继续加入约 1 mL 乙酸酐, 封管, 120°C 下反应 3 小时。打开反应管, 于 50°C 水浴中通氮气吹干。加入少量无水二氯甲烷, 滤去残渣。重复操作三次。若所得滤液体积太大, 可吹氮气浓缩。

【测定结果】

对果糖的衍生反应共进行 6 次, 每次的产物用 GC 法测定 4~5 次, 共测定 27 次, 得到 K 的平均值为 1.19, 标准偏差为 0.066。

应用此法成功地测定了蜂蜜中的果糖、葡萄糖和半乳糖, 与高效液相色谱法得到的结果相符合。

(竺安 于海妮)

(五) 糖的高效液相色谱分析

色谱分离主要利用样品组分在两个非互溶相(流动相与固定相)之间的平衡分配的不同, 达到分离的目的。流动相为气体的, 称气相色谱, 又称气液色谱(GLC)。流动相为液体的称液相色谱(LC)。高效液相色谱(HPLC)是在经典的柱层析原理的基础上, 采用分布窄、粒径通常为 5~10 μm 的颗粒作载体, 将洗脱剂(流

动相)以高压泵注入柱内,形成显著的压力降,样品组分迅速而又连续不断地在流动相和固定相之间进行反复多次平衡分配,彼此分离,并沿色谱柱向下迁移,迁移速率依赖于各组分在固定相和流动相之间的相对亲和性,对固定相亲和较弱的组分快速通过色谱柱,进入鉴定器,鉴定器产生的讯号经放大后,在记录器上描绘出色谱峰,其出峰时间和峰的面积作为各组分定性定量的依据(图10)。

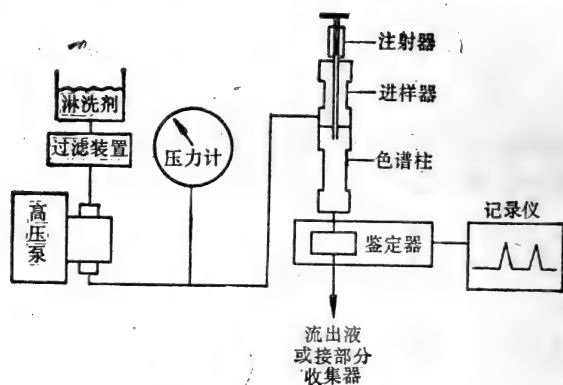


图10 高效液相色谱装置图

根据不同的固定相和在柱上不同的保留机理,可分为吸附色谱,分配色谱,离子交换色谱,凝胶色谱和亲和色谱。按固定相与流动相之间相对极性的大小,又可分为正相色谱和反相色谱。

高效液相色谱具有分离效率高、分辨率好、快速、简便,一般在常温下操作,样品用量少,毋须衍生化,流动相和固定相选择范围广,并且可以梯度洗脱等特点而被广泛采用,对于热不稳定的单糖、双糖、低聚糖(寡糖)的测定尤为适用,收集流出组分,可进一步与质谱、红外光谱等仪器联用进行分析鉴定。

糖的传统检测方法,采用柱后反应和可见光鉴定器,近年来常用灵敏度较低的示差折射鉴定器直接测定。为了提高分析灵敏度,预先制备糖的紫外标记衍生物(用紫外鉴定器)或荧光标记衍生物(用荧光鉴定器)进行色谱分离,虽然操作繁杂,但分析灵敏

度可大大提高。

本节着重介绍以下三种分析方法。

1. 单糖和双糖的分析

【仪器和试剂】

高效液相色谱仪: 配置示差折射鉴定器和记录仪。

色谱柱: $\phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ 不锈钢色谱柱, 配以自制柱头隔膜进样器。

固定相: 氨基键合固定相。

微量注射器(上海注射器三厂), 乙腈, 甲醇(A. R.)(北京化工厂)。

标准糖样: 各种 D-型(或 L-型)的标准糖样, 在确定的色谱条件下测定其保留时间 t_R , 供定性分析对照用。

内标物: 半乳糖醇、阿拉伯糖醇和甘露糖醇均可作定量分析内标。

30 W 超声波发生器。

【操作】

(1) 色谱柱的充填: 称取 3g 氨基键合固定相, 置于 100 mL 烧杯中, 加入 30 mL 乙二醇后, 将烧杯移入 30 W 超声波发生器内, 超声匀浆 5 分钟, 然后将匀浆液倒入连接有空色谱柱的填充缸内, 密封后与液相色谱仪上的输液泵连接, 用水作淋洗剂, 以 4 mL/min 的流速充填色谱柱, 系统最大压力为 400 kg/cm², 约 15 分钟后, 压力下降, 再继续淋洗 20 分钟, 取出色谱柱, 装入液相色谱仪测定系统。

(2) 柱效的测定及计算: 装入液相色谱系统的色谱柱, 用流动相乙腈-水-甲醇(80:10:5)以 2 mL/min 流速淋洗半小时后, 注入 5 μL 葡萄糖水溶液(20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。记录仪纸速为 20 mm/min, 记录色谱图见图 11。

按公式
$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

计算柱效率 N , 或称理论塔板数, W 为峰宽值(拐点处切线与基线

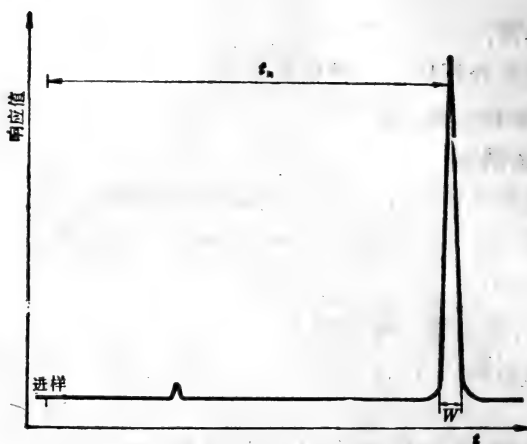


图 11 柱效 N 的测定

交点间的距离), t_R 为葡萄糖标样的保留值(进样处到峰顶之间的距离)。

(3) 液相色谱分析条件:

- 1) 仪器: Perkin-Elmer Series 3 或 YBS-01 型.
- 2) 鉴定器: LDC-1107 型示差折射计(灵敏度 16×10^{-8} RIU).
- 3) 色谱柱: $\phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ 不锈钢色谱柱.
- 4) 固定相: Amino-SIL-X-1 氨基键合固定相 $13 \pm 5 \mu\text{m}$ (Perkin-Elmer 公司).

5) 流动相: 氨基糖或双糖的分离, 用乙腈: 水: 甲醇 = 70:10:5 较适宜, 中性单糖的分离用乙腈: 水: 甲醇 = 90:10:5 为宜, 如果中性单糖与氨基糖或双糖的分离, 可适量降低流动相中乙腈的含量进行调节(图 12, 13, 14). 流动相使用前须在超声波发生器内超声脱气或真空脱气 5 分钟. 数据列于表 16.

6) 流速: 2 mL/min.

7) 操作温度: 室温.

(4) 单糖的定量内标校正曲线的绘制: 准确配制浓度为 $50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的葡萄糖(或其他糖)水溶液 2 mL 和浓度为 $50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的半乳糖醇(或甘露糖醇)水溶液 1 mL. 用移液管移取 0.1、0.2、

表 16 不同比例的流动相对糖类 t_R , K' 的影响

流 动 相	I		II		III		IV	
	乙腈:水		乙腈:水:甲醇		乙腈:水		乙腈:水:甲醇	
	60:15		60:10:5		70:15		70:10:5	
糖 样	t_R	K'	t_R	K'	t_R	K'	t_R	K'
D-赤藓糖	2'41"	0.894	2'29"	0.753	2'56"	1.071	2'31"	0.777
L-鼠李糖	3'20"	1.353	3'05"	1.177	3'44"	1.635	3'15"	1.294
D-核糖	3'24"	1.400	3'10"	1.235	3'46"	1.659	3'19"	1.341
L-来苏糖	3'42"	1.612	3'26"	1.424	4'12"	1.965	3'39"	1.577
D-木糖	3'44"	1.635	3'28"	1.447	4'15"	2.000	3'42"	1.618
D-岩藻糖	3'59"	1.812	3'47"	1.671	4'37"	2.259	4'08"	1.918
D-阿拉伯糖	4'18"	2.035	4'02"	1.847	5'00"	2.529	4'23"	2.094
D-山梨糖	4'28"	2.153	4'13"	1.977	5'18"	2.741	4'38"	2.271
D-果糖	4'38"	2.271	4'32"	2.200	5'32"	2.906	5'07"	2.612
D-甘露糖	4'53"	2.447	4'54"	2.459	5'55"	3.177	5'32"	2.906
N-乙酰氨基葡萄糖	4'54"	2.459	4'52"	2.435	5'57"	3.200	5'27"	2.847
D-葡萄糖	5'09"	2.635	5'01"	2.541	6'17"	3.435	5'41"	3.012
D-半乳糖	5'39"	2.988	5'36"	2.953	6'57"	3.906	6'24"	3.518
蔗糖	7'34"	4.341	8'01"	4.659	10'05"	6.112	9'42"	5.847
1-氨基半乳糖	8'10"	4.765	9'04"	5.400	10'31"	6.424	11'50"	7.353
麦芽糖	8'47"	5.200	9'31"	5.718	12'00"	7.471	11'48"	7.329
纤维二糖	8'52"	5.259	9'27"	5.671	12'11"	7.600	11'40"	7.235
乳糖	10'37"	6.494	11'48"	7.329	14'58"	9.565	14'43"	9.388
2-氨基葡萄糖	11'45"	7.294	12'55"	8.118	15'46"	10.13	17'16"	11.19
2-氨基半乳糖	16'00"	10.29	17'09"	11.11	20'31"	13.48	22'25"	14.82
t_0	1'25"		1'25"		1'25"		1'25"	
N	1111		1111		1123		1168	
基线噪音	2.6×10^{-6} RIU		1.3×10^{-6} RIU		3.2×10^{-6} RIU		1.3×10^{-6} RIU	

(续表)

流动相	V		VI		VII		VIII	
	乙腈:水		乙腈:水:甲醇		乙腈:水		乙腈:水:甲醇	
	80:15		80:10:5		90:15		90:10:5	
糖样	t_R	K'	t_R	K'	t_R	K'	t_R	K'
D-赤藓糖	2'51"	1.012	2'41"	0.894	2'59"	1.106	2'53"	1.035
L-鼠李糖	3'48"	1.682	3'38"	1.565	4'14"	1.988	4'01"	1.835
D-核糖	3'51"	1.718	3'41"	1.600	4'15"	2.000	4'02"	1.847
L-来苏糖	4'20"	2.059	4'10"	1.941	4'54"	2.459	4'39"	2.282
D-木糖	4'25"	2.118	4'15"	2.000	5'02"	2.553	4'45"	2.353
D-岩藻糖	4'49"	2.400	4'43"	2.329	5'33"	2.918	5'20"	2.765
D-阿拉伯糖	5'17"	2.729	5'06"	2.600	6'02"	3.259	5'49"	3.106
D-山梨糖	5'38"	2.977	5'31"	2.894	6'40"	3.706	6'23"	3.506
D-果糖	5'56"	3.188	6'05"	3.294	7'02"	3.965	7'07"	4.024
D-甘露糖	6'29"	3.577	6'51"	3.835	7'42"	4.435	8'09"	4.753
N-乙酰氨基葡萄糖	6'38"	3.682	6'53"	3.859	7'52"	4.553	8'10"	4.767
D-葡萄糖	6'57"	3.906	7'03"	3.977	8'25"	4.941	8'27"	4.965
D-半乳糖	7'43"	4.447	7'57"	4.612	9'25"	5.647	9'36"	5.776
蔗糖	12'24"	7.753	13'42"	8.671				
1-氨基半乳糖	12'39"	7.929	14'01"	8.894				
麦芽糖	14'55"	9.529	15'59"	10.282				
纤维二糖	15'12"	9.729	16'40"	10.76				
乳糖	18'40"	12.18	21'40"	14.29				
2-氨基葡萄糖	18'18"	11.92	20'29"	13.46				
2-氨基半乳糖	25'14"	16.81	28'21"	19.01				
t_0	1'25"		1'25"		1'25"		1'25"	
N	1156		1166		1183		1176	
基线噪音	4.5×10^{-6} RIU		1.3×10^{-6} RIU		4.5×10^{-6} RIU		1.3×10^{-6} RIU	

$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$ t_R —组分的保留时间, t_0 —流动相的死时间。

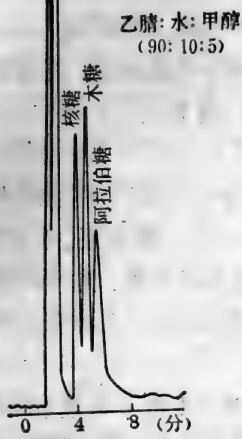


图 12 核糖、木糖、阿拉伯糖的分离图

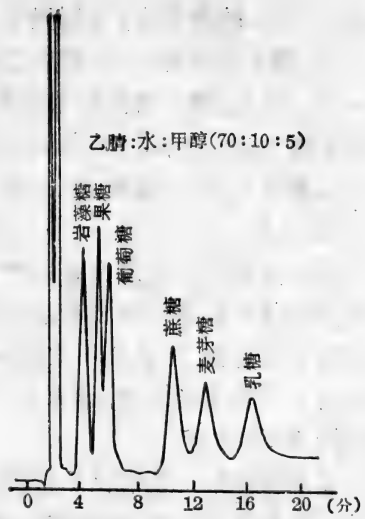


图 13 岩藻糖、果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的分离图

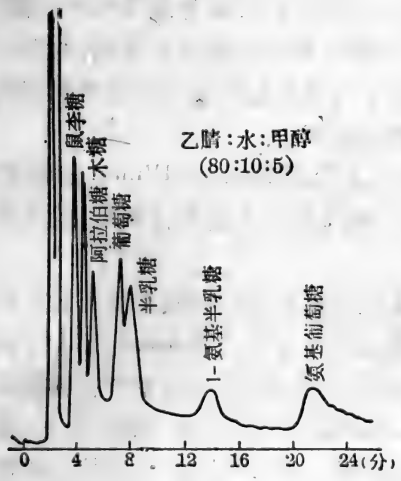


图 14 鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、1-氨基葡萄糖、2-氨基葡萄糖的分离图

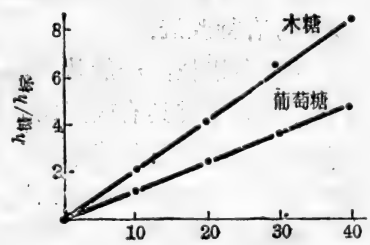


图 15 木糖、葡萄糖的内标校正曲线图

0.3、0.4 mL 的糖溶液, 分别置于 5 mL 试管内, 每一试管加入 0.1 mL 内标物半乳糖醇溶液, 然后添加蒸馏水, 使每管内溶液体积为 0.5 mL, 此时试管内溶液的糖浓度分别为 10、20、30、40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。内标物浓度为 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 在选用的条件下进行色谱分析, 用被测糖与内标物峰面积比(或峰高比)对含量作图(图 15)。

【讨论】

(1) 高效液相色谱仪商品牌号和种类繁多, 其工作原理大同小异, 均可使用, 进口仪器有成套附件, 包括高压输液泵、色谱柱、各种类型鉴定器、记录仪和微处理机等, 但价格昂贵, 国产高效液相色谱仪也已试制成功, 北京分析仪器厂 S401 型, 上海有机化学研究所 KYS 型等。

高压输液泵是色谱仪的主要部件, YBS-01 型平流泵(中国科学院上海科学仪器厂)性能较为稳定, 配以色谱柱、鉴定器和记录仪, 可以组装一套简易的高效液相色谱仪。

高压输液泵的清洗, 使用新泵或更换互不相溶的流动相时, 用丙酮或异丙醇清洗泵, 以 1~5 mL/min 的流量清洗 5~10 分钟, 若发现泵的实际流量小于额定流量时, 可用丙酮大量清洗, 约半小时, 甚至必要时将泵头卸下, 取出单向阀在超声波发生器内用丙酮超声清洗 5 分钟。鉴定器的清洗方法同上。

(2) LDC 1107 型示差折射鉴定器系 Perkin-Elmer 公司的产品, 北京分析仪器厂已试制成功 651 型示差折射检测器, 但灵敏度略低, 有待改进。

(3) 色谱柱: 一般认为碳水化合物色谱柱和氨基键合固定相色谱柱分离糖类具有较好的分离效果, 前者为 Waters 公司的商品牌号, 整柱出售, 价格昂贵。上海延安钢管厂专门生产各种规格不锈钢色谱空柱, 配以密封柱头隔膜进样器(图 16)和柱接头, 自行充填氨基键合固定相, 可以代替碳水化合物柱。色谱柱一般选用长度 200~300 mm, 内径 4~8 mm, 内表面抛光的专用不锈钢色谱柱, 用稀硝酸浸泡两分钟, 用水冲洗数次, 再用蒸馏水冲洗。

(4) AMINO-SI L-X-1 和 LiChrosorb NH_2 , 均系进口氨基

键合固定相,天津试剂二厂生产的 YWG-NH₂ 属于同一类的固定相。

(5) 专用装柱泵为气动放大大型输液泵, 输送液体的压力可达 50~70 MPa, 普通分析型液相色谱仪的输液泵也可用于装柱, 但效果不如专用装柱泵。

(6) 匀浆剂的选用, 要与固定相浸润, 使固定相能分散在匀浆剂中, 以及匀浆剂不影响固定相的色谱性能, 改变混合匀浆剂的比例, 可调节匀浆液的粘度, 以保证在适当的流速和压力下装填色谱柱, 以达到较为满意的效果。

(7) 评价试样中两组分的分离程度和是否适合于定量测定的要求, 通常以分离度 (R_s) 作指标, 当 $R_s=1$ 时, 两组分的色谱峰大约只有 2% 的重叠, 足以适合于定量测定; $R_s=2$ 时, 则两组分近于完全分离。

$$R_s = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2}$$

式中: t_{R_1} ——第一组分保留值;
 t_{R_2} ——第二组分保留值;
 W_1 ——第一组分的峰底宽度;
 W_2 ——第二组分的峰底宽度。

【文献】

Pryde, A. and Gilbert, M. T., *Applications of High Performance Liquid Chromatography*. 1979 Chapman and Hall Ltd., London.

斯奈德, L. R., 柯克兰, J. J., 现代液相色谱法导论(中译本), 1980, 化学工业出版社。

陆德培, 黄克武, 李荣春, 生物化学与生物物理学报, 14:501(1982)。

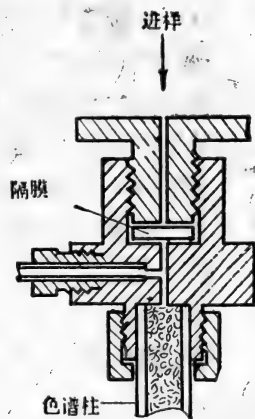


图 16 密封柱头隔膜进样器

(陆德培 黄克武)

2. 寡糖的分离和测定

(i) 木糖及若干 β 1→4 低聚木糖(寡糖)的分离和测定

【仪器和试剂】

高效液相色谱仪: 配置色谱柱、示差折射鉴定器和记录仪, 固定相及色谱柱的充填均同前(见第 51 页)。

木糖(A. R.)(上海试剂二厂), 木二糖(x_2), 木三糖(x_3), 木四糖(x_4), 木五糖(x_5), 木六糖(x_6), 木七糖(x_7)。

【操作】

(1) 色谱柱: $\phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ 不锈钢色谱柱。

(2) 鉴定器: LDC 1107 型示差折射鉴定器(灵敏度 8×10^{-8} RIU)。

(3) 固定相: YWG-NH₂ 氨基键合固定相($10 \mu\text{m}$)(天津试剂二厂), 或 AMINO-SIL-X-1 氨基键合固定相 $13 \pm 5 \mu\text{m}$ (Perkin-Elmer)。

(4) 流动相: 乙腈:水 = 70:30。

(5) 流速: 2 mL/min, 柱温: 室温。

表 17 低聚木糖的色谱数据

糖 组 分	t_R	K'	α	R_S
木 糖	1'21''	0.93	1.64	1.72
木二糖	1'46''	1.52		
木三糖	2'23''	2.41	1.58	1.88
木四糖	3'15''	3.64	1.51	1.88
木五糖	4'27''	5.35	1.46	1.84
木六糖	6'10''	7.81	1.46	1.95
木七糖	8'27''	11.07	1.42	1.85

木糖及低聚木糖(寡糖)的定量内标校正曲线: 按前法(见第 52 页)配置系列标准浓度的木糖及低聚木糖溶液, 以乙二醇为内标,

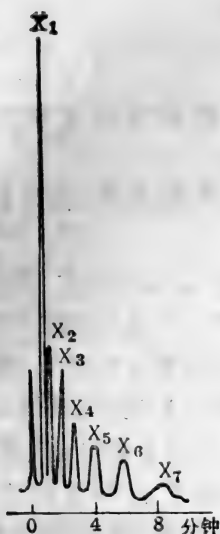


图 17 低聚木糖的分离纸色谱图

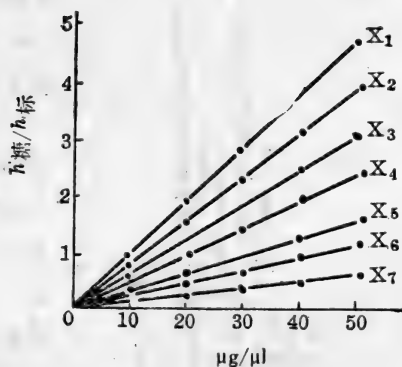


图 18 木糖和低聚木糖的内标校正曲线

在乙腈-水 (70:30) 为流动相, 流速为 2 mL/min 进行色谱分析. 结果见表 17 和图 17、18.

(ii) 葡萄糖及 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 低聚麦芽糖(寡糖)的分离和测定

【仪器和试剂】

高效液相色谱仪: 高压泵 Constametric II G 示差折射鉴定器 Refracto Monitor (均为美国 LDC).

色谱柱: $\phi 4 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$.

固定相: Polygosil 60-5 NH_2 (西德 Macherey-Nagel).

棉籽糖, 水苏糖 (荷兰 Packard-Becker).

【操作】

(1) 色谱柱: $\phi 4 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ 不锈钢色谱柱.

(2) 固定相: Polygosil 60-5 NH_2 (西德 Macherey-Nagel).

(3) 流动相: 乙腈-水混合液, 组成根据所需的分子量范围而定. 对于单糖至四糖的分离, 用乙腈-水 (65:35), 对于单糖至九糖或更高分子量的糖, 用乙腈-水 (60:40).

(4) 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 室温.

(5) 进样量: 糊精溶液进样 1 μ L.

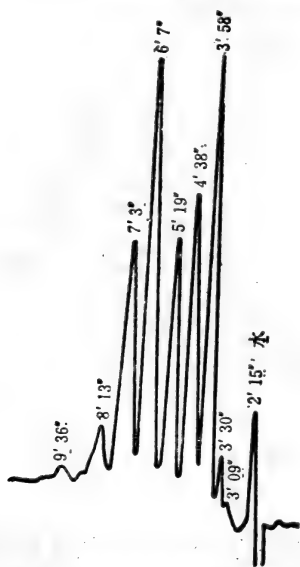


图 19 低聚麦芽糖的分离图

液相色谱结果见表 18 ($t_0 = 110''$)、图 19.

(iii) 低聚糖(寡糖)的定量方法(外标法)

以标准物或结构相近、聚合度相同的寡糖作为定量的标准。例如用棉籽糖和水苏糖分别作为三糖和四糖的标准物。通过一系列不同注射量的实验, 得到定量校正曲线。以蜂蜜分析(结果见表 19 及图 20)为例: 配制的标准液为葡萄糖加果糖(1:1 重量比) 15 mg/mL, 棉籽糖 10 mg/mL, 水苏糖 10 mg/mL。在与样品分析相同的操作条件下, 分别进样 1、2、3、4、5 μ L, 量出各组

分色谱峰的高度, 取三次测量的平均值对糖含量(μ g)作图, 得到定量校正线都是通过原点的直线。

组分含量计算法:

$$C_i = \frac{f_i h_i}{V C_s} \times 100\%$$

其中 C_i 为糖组分 i 的百分含量;

f_i 为糖组分 i 定量校正线的斜率 (μ g/mm 峰高);

h_i 为糖组分 i 的色谱峰高(mm);

V 为进样体积(6 μ L);

C_s 为蜂蜜样品溶液的浓度(mg/mL = μ g/ μ L)。

【讨论】

(1) 在作定性分析或选择分离条件时, 示差折射鉴定器可以不用恒温装置, 但在作定量分析时, 必须用恒温水浴保温, 以保持

表 18 糊精成分的色谱数据

糖 组 分	t_R	t'_R	K'
葡萄糖	189"	79"	0.718
麦芽二糖	210"	100"	0.909
麦芽三糖	238"	128"	1.16
麦芽四糖	278"	168"	1.53
麦芽五糖	319"	209"	1.90
麦芽六糖	367"	257"	2.34
麦芽七糖	423"	313"	2.85
麦芽八糖	493"	383"	3.45
麦芽九糖	576"	466"	4.24

表 19 茶花蜂蜜分析的色谱数据和定量结果*

糖 组 分	t_R	含 量 %
果 糖	204"	}43.7
葡萄糖	209"	
二 糖	250"***	未测定
棉 籽 糖	304"	5.5
水 苏 糖	366"	8.7

* 流动相: 乙腈-水(65:35)。

** 出现三个峰, 因含量很低, 未予定性和定量。

相应值的恒定。

(2) 用外标法做定量校正线的测定时, 应每次只注射一种糖的溶液。如果用微量注射器抽取甲糖溶液后又抽取乙糖溶液, 然后一次注射, 虽然可以一次得到两个以至多个数据, 但却会带来误差, 得到的定量校正线往往不通过原点。

(3) 本色谱体系一般适用于各种单元聚合的低聚糖(寡糖)的

分离和分析,低聚糖的出峰次序有规律地依赖于分子量的大小,若

以容量因子 K' 的对数值 $\log K'$ 与低聚木糖的聚合度 DP 作图,呈良好的线性关系(图 21)。在低聚麦芽糖和低聚纤维二糖的分析中也有相似的结果,本色谱体系也适用于多元聚合的低聚糖的分离和分析,糖的出峰次序不仅与低聚糖的分子量有关,而且与组成低聚糖的单糖性质密切相关。

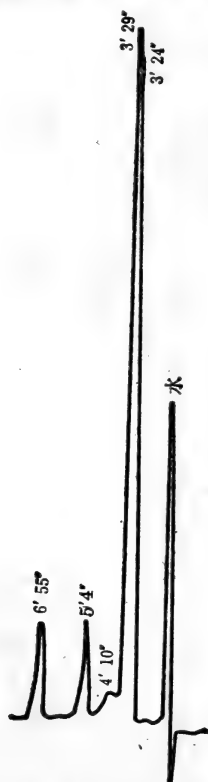


图 20 茶花蜂蜜色谱图

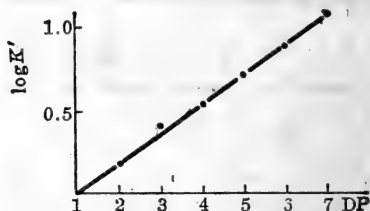


图 21 $\log K'$ 与低聚木糖的聚合度 DP 的关系

(4) 单糖和低聚糖的检测灵敏度为 4×10^{-9} mol.

【文献】

黄克武、李荣春、陆德培,生物化学与生物物理学报,14:507 (1982).

Ladisch, M. R. et al., *J. Chromatogr.*, 147: 185 (1978).

Natowicz, M. and p Baenziger, J. U., *Anal. Biochem.*, 105: 159 (1980).

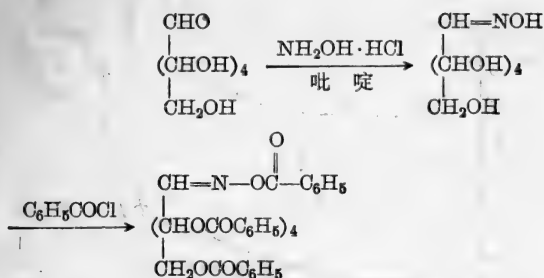
(黄克武 陆德培 贺玉珍 竺 安)

3. 糖脎全苯甲酸酯紫外标记法 分离和测定微量单糖和双糖

糖

单糖和某些双糖在溶液中由于糖的端基异构化作用(anome-

risation) 形成复杂的平衡体系, 因此, 直接苯甲酰化制备紫外标记衍生物, 导致一糖多峰。糖和盐酸羟胺首先反应, 生成糖脎, 然后苯甲酰化, 生成全苯甲酸酯的紫外标记的糖脎, 可以避免一糖多峰现象。



【仪器和试剂】

高效液相色谱仪, LC15 型紫外鉴定器(波长 254 μm)。

试剂: 羟胺盐酸盐, 苯甲酰氯, 乙腈, 甲醇, 吡啶, 氯仿, 二氧六圆, 石油醚均为 A. R.

标准糖样: 各种 D-型或 L-型标准糖样供定性对照用。

【操作】

(1) 糖脎全苯甲酸酯衍生物的制备: 取 0.1 mL 糖的吡啶溶液(浓度为 10 mg/mL), 置于 5 mL 具磨口塞试管中, 加入 0.1 mL 羟胺盐酸盐吡啶溶液(浓度为 10 mg/mL), 摇匀后, 在 80°C 水浴中加热 10 分钟, 冷却后加入 0.1 mL 苯甲酰氯, 再在 80°C 水浴中加热 60 分钟, 冷却后, 加入 2 mL 氯仿, 用 3 \times 1.5 mL 2 mol/L 盐酸洗涤, 再用少量水洗后, 以无水碳酸钠干燥, 取 5~20 μL 氯仿溶液进行色谱分析(图 22)。

(2) 高效液相色谱分析条件: 固定相: YQG-80(5 μm) (青岛海洋化工厂)。

流动相: 分离木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖时, 以石油醚: 二氧六圆 = 85:15 为宜(图 23); 分离果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖等以石油醚: 二氧六圆 = 4:1 为宜(图 24)。

流速: 2 mL/min. 操作温度: 室温。

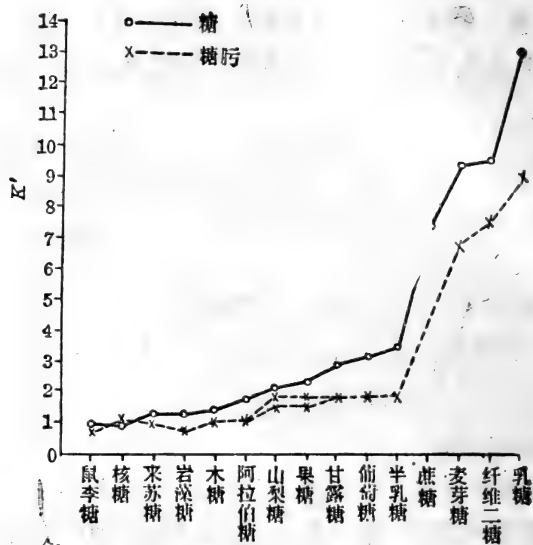


图 22 一些单糖和双糖的糖脲全苯甲酸酯衍生物的 K' 值

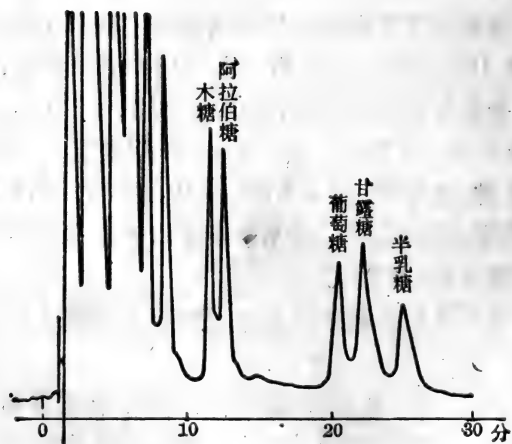


图 23 一些单糖的糖脲全苯甲酸酯衍生物的高效液相色谱图

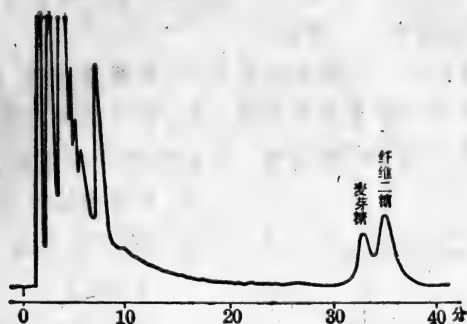


图 24 一些双糖的糖酐全苯甲酸酯的高效液相色谱图

【讨论】

(1) 糖酐全苯甲酸酯衍生物用紫外鉴定器检测，灵敏度为 $6 \times 10^{-11} \text{mol}$ (以葡萄糖为例)，较示差折射鉴定器测定单糖，灵敏度提高约 500~1000 倍。

(2) 衍生化后不仅分析灵敏度有所提高，而且对难分离的若干常见糖的分离度有明显改善，结构相似的葡萄糖、甘露糖和半乳糖以及麦芽糖和纤维二糖均能有效地分离。

(3) 本方法适用于生物样品中微量糖的分离和测定。

【文献】

黄克武、陆德培，中日分析化学讨论会论文集，p. 84(1983, 长春)。

Lehrfeld, J., *J. Chromatogr.*, **120**: 141 (1976)。

Thompson, J. M., *ibid.* **166**:201 (1978)。

(黄克武 陆德培)

(六) 糖的薄层色谱

薄层色谱法的原理与柱色谱、纸色谱法基本相同。当作为流动相的液体从由液体或固体组成的固定相的间隙中通过时，由于试样中的各组分在固定相和流动相之间的分配系数不同，随着流动相的移动各组分彼此互相分离开。

薄层色谱法按照机理可分为吸附、分配和离子交换三种。依技术特点又有一次展开、双向展开、多次展开、连续展开等。

薄层色谱法设备简单、操作方便，是一种快速、微量的分离技术，因此被实验室广泛采用。

分离糖的薄层色谱有硅胶色谱、纤维素色谱、硅藻土色谱及氧化铝色谱。由于糖是多羟基化合物，极性强的容易吸附，多采用含有无机盐水溶液制备硅胶薄板，使硅胶薄层吸附能力降低，斑点集中，对分离有所改善，样品承载量也可有显著提高。

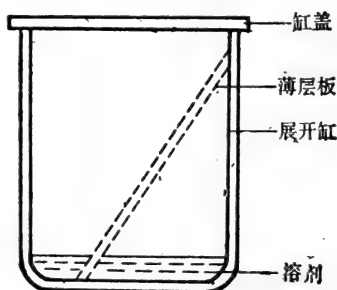


图 25 密闭式展开缸

【仪器】

(1) 密闭式展开缸：10×20 cm 或 5×20 cm 玻璃板(图 25)。

(2) 75-I(20×20 cm) 连续薄层层析展开仪(上海玻璃仪器二厂出品)(图 26)。

【操作】

(1) 薄层板的制备：称取硅胶 5 克于 50 毫升烧杯中，加入 0.3 mol/L 磷酸二氢钠水溶液 12 毫升。用玻璃棒慢慢搅拌至硅胶浆液分散均匀、粘稠度适中，然后倾倒在洗净、干燥的 10×20 cm 玻璃板上，倾斜玻璃板使硅胶浆液均匀地布满板面。将玻璃板放在平坦的地方，室温下静置过夜即可。用前在 110°C 下活化 1 小时。

(2) 展开剂：

丙酮：水 = 96：4

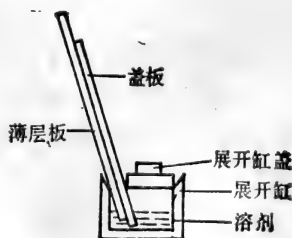
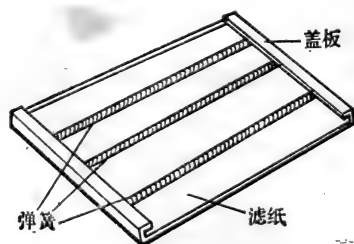


图 26 连续薄层层析展开仪

正丁醇:乙酸乙酯:异丙醇:醋酸:水:吡啶=35:100:60:35:30:30.

(3) 点样: 用10微升微量注射器吸取4~5微升混合液(每种糖检测量3~30微克,糖的总含量可达400~500微克). 在距薄层板下端1.5厘米,点间距1.5~2厘米,分次滴加,使点扩散后其直径不大于2~3毫米. 点样过程中可用钨丝灯泡或吹风机使样品干燥,也可自然干燥.

(4) 展开: 将点好样品薄层板,置于盛有展开剂薄层层析缸中,密闭式展开,溶剂距薄层上端约1厘米时取出,连续展开则不受此限.

(5) 显色: 将展开过的薄板,在室温下凉干至溶剂挥发干净. 再在100°C烘箱内烘烤30分钟,将1,3-二羟基萘硫酸溶液[0.2%1,3-二羟基萘乙醇溶液:浓硫酸=1:0.04(体积),用前混合]均匀喷洒在薄层板上. 此板在110°C烘烤10分钟即可显色.

薄层显色后,将样品图谱与标准样图谱进行比较,参考斑点颜色、相对位置及 R_f 值或 R_g 值,确定样品中有哪几种糖.

经过薄层分离后的糖可以在薄层上直接定量,如用薄层扫描,或者将斑点洗脱后比色测定.

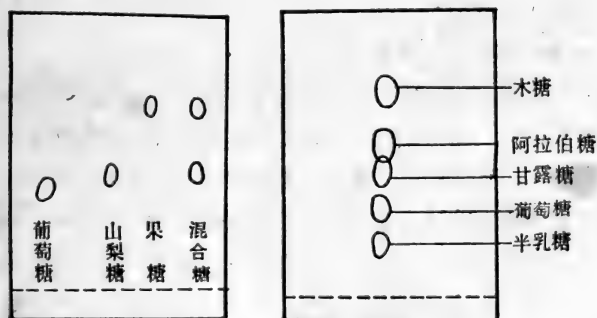


图27 糖的薄层层析图谱

展开剂: 丙酮:水=96:4

展开剂: 正丁醇:乙酸乙酯:异丙醇:醋酸
:水:吡啶=35:100:60:35:30:30

薄层: 含有0.3mol/L磷酸二氢钠硅胶G. 显色剂: 0.2%1,3-二羟基萘乙醇溶液+浓硫酸.

【讨论】

(1) 铺制薄板时, 硅胶及溶剂的用量根据薄板大小, 按前述薄层板的制备中用量按比例增减。

(2) 当密闭式展开时, 若有两种糖 R_f 值差异不大而不能分开时, 有时采用连续展开可能会得到分离, 如果糖与山梨糖连续薄层层析。

(3) 密闭式展开可用 R_f 值作为定性参考。连续薄层层析则选一标准物 G, 计算其 R_G 值。即样品糖迁移距离与标准糖 G 迁移距离之比。

(4) 进行定性、定量时, 应当控制在相同条件下重复薄层层析实验, 方能得到重复结果。

【文献】

Scherz, H. et al., *Chromatogr. Rev.* **10** (1968).

Ghebregabher, M., et al., *J. Chromat.* **127** (1976).

Bunelli, B. and Ciuffni, G., *J. Chromat.* **39**:407~417 (1969).

中国医学科学院药物研究所编著, 薄层层离及其在中草药分析中的应用, 1978年, 1~89页, 科学出版社。

(李荣春 裴雅群)

(七) 糖的电泳法

1. 红细胞膜上唾液酸的等速电泳

一般电泳利用离子在电场中迁移的速率不同而实现分离, 等速电泳也利用离子的迁移速率的差异, 但工作原理则不同。它以高于组分离子迁移速率的离子为前导电解质, 以低于组分离子的作为终末电解质, 并且它们的浓度都很低, 一般为 0.01 mol/L 。样品用微量注射器加在两者的界面附近 (不必准确地位于界面上), 电泳在聚四氟乙烯毛细管中进行。在进行恒电流电泳 (电流通通常为 $100 \mu\text{A}$ 左右) 时, 前导离子在前, 终末离子在后, 样品各组分离子在其间按迁移率递减而排列。高迁移率离子区带内, 电导大而电位梯度低, 反之亦然。在泳动过程中如果两个相邻区带分离开, 则其间形成离子很少的空白区带, 其电位梯度将急剧增高, 从而使

后面区带的离子加速赶上而与前面区带衔接。如果迁移率较小的离子进入前面迁移速率大的离子区带，或者迁移速率大的离子落到后一迁移率小的离子区带，都会由于电位梯度的差异而又回到各自原来的区带中去。因此，在进入平衡状态后，各区带互相衔接既不产生间隙，又不相互混合。在各区带内电位梯度均一，浓度均一，所有区带以相同的速度向前泳动，这就是等速电泳的名称的由来。各区带之间有清晰的界限，不因时间增长而变得模糊，这是它区别于一般色谱和电泳的特征，称之为自锐化效应(Selfsharpening effect)。区带宽度正比于组分的含量，因此定量方便。

【仪器和试剂】

LKB-TACHOPHOR 2127 等速电泳仪(瑞典)。β-丙氨酸，生化试剂，上海试剂二厂。TritonX-100，特纯，西德 Karl-Roth。冰乙酸，分析纯。水，二次蒸馏水，自制。前导电解质，0.005 mol/L 盐酸，含 0.2% TritonX-100，加 β-丙氨酸调至 pH=3.80；终末电解质，0.005 mol/L 乙酸。

【操作】

恒电流 50 μA，起始电压 2.5 kV，终了电压约为 17 kV。毛细管长度 610 mm，恒温 10°C，放大器增益 6.0。记录仪满标值，紫外检测为 0.2 V，热电偶检测为 0.1 V。记录仪速度，紫外检测为 120 mm/min，热电偶检测为 30 mm/min。

将红细胞膜(蛋白含量 2~4 mg/mL)，与等体积 0.2 mol/L 硫酸混合，在 100°C 水浴加热 1 小时，取出冷至室温，离心后取上清液分析，进样量 1~25 μL。

唾液酸区带出现时的电压约为 14 kV，在此之前开动记录仪走纸，即可记录到各区带的谱图(图 28)。分析完毕后，每次均应更换毛细管内的电解质，电极液槽内的电解液一般可用五次左右。

【讨论】

(1) 常用的硫代巴比妥酸法易受某些中性糖、氨基糖或脂肪酸的干扰。等速电泳法具有高的分辨力，不受这些物质的干扰，较为准确，重复性也好。样品可直接分析，不需预处理或衍生。

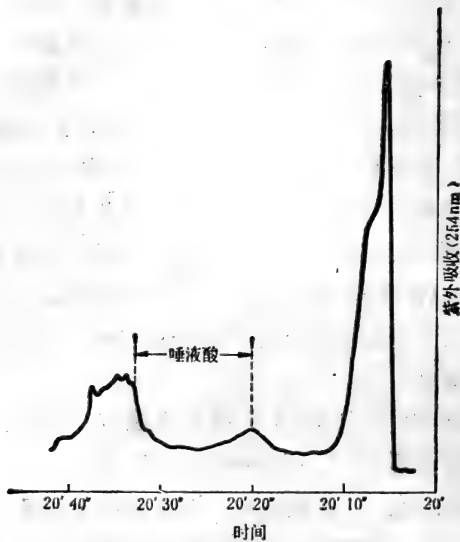


图28 正常人红细胞膜的0.025 mol/L 硫酸水
解产物的等速电泳图
膜蛋白含量 4.9mg/mL, 进样量8 μ L

唾液酸的线性范围为0.04~3.2 μ g, 最低检测浓度1.5 ppm, 测量相对误差 \leq 3%.

(2) 等速电泳也适合于其他酸性糖的分析. 蒸馏水必须纯净, 否则本底太大, 使分析难以进行. 各种试剂尽量用高纯度的.

(3) 样品中当硫酸根离子浓度高时, 会使分析周期拖长. 在需大进样量时, 可先用碳酸钡或氢氧化钡中和并离心除去硫酸钡.

【文献】

竺安, 等速电泳简介. 化学通报, 1980(11), 665.

Everaerts, F. M., et al., P. E. M., *Isotachopheresis*, Elsevier, Amsterdam, 1976.

Weiland, E. et al., *J. Chromatog.* 214:156 (1981).

(竺安 杨其民)

2. 多糖的滤纸电泳

中性多糖带净电荷少, 导电性弱, 在电场中移动速度慢, 常采

用较高电压或电泳时间稍长,才能收到较好效果。

电泳采用的缓冲液以硼酸盐较普遍,因糖类物质中的相邻羟基易与硼酸离子结合,生成硼酸复盐,以增加其导电性。根据多糖的不同特点,也常采用醋酸盐缓冲液、巴比妥缓冲液等。染色剂常用甲苯胺盐、茴香胺、高碘酸西夫试剂、阿利新蓝、碱性硝酸银等。

【试剂】

杭州新华滤纸或 Whatman No. 1 号滤纸。

缓冲液: 硼酸盐缓冲液, pH 10.0 (0.2 mol/L H_3BO_3 、0.2 mol/L KCl 各 125 mL, 0.2 mol/L NaOH 219.5 mL, 加水稀释至 1 升)。

染色剂: 高碘酸-西夫试剂, 配法如下:

高碘酸——1.2g 高碘酸溶于 30 mL 水中, 加入 15 mL 0.2 mol/L 醋酸钠及 100 mL 乙醇, 放置暗处, 可使用数日。

还原液——5g 碘化钾、5g 硫代硫酸钠溶于 100 mL 水中, 加入 150 mL 乙醇及 2.5 mL 2 mol/L HCl, 随加随搅动, 现用现配。

亚硫酸品红——2g 碱性品红溶于 400 mL 沸水中, 冷却至 50°C 过滤, 通入二氧化硫气体, 至溶液褪色即止 (试剂中过量的二氧化硫愈少, 试剂愈灵敏)。密封后放置暗冷处保存。如溶液又变红, 即不能使用。

亚硫酸盐冲洗液——加 1 mL 浓 HCl 及 0.4g 焦亚硫酸钾至 100 mL 水中。

【操作】

纸条 (8×24 cm) 用载玻片线形点样 (可用葡聚糖 0.4% 水溶液), 电压 400 V, 时间 2 小时, 经电泳 2 小时后, 取出纸条置乙醇中固定, 然后浸入高碘酸溶液中 5 分钟, 用 70% 乙醇溶液冲洗。置亚硫酸品红溶液中 25~45 分钟, 然后用亚硫酸盐冲洗液洗涤 3 次, 最后放入乙醇中脱水, 置玻板上风干, 有糖处呈现紫红色斑。如样品分子不均一, 则斑点宽, 颜色深浅不匀。

【文献】

Foster, A. B. *Chem. and Ind.* 828~829, 1952.

(张翼仲)

3. 多糖的玻璃纤维纸电泳

【试剂】

玻璃纤维纸: GB60 或 Whatman GF 83.

缓冲液: 硼酸盐缓冲液 (0.025 mol/L) pH 10.2.

染色剂: p-茴香胺硫酸试剂 (1% 茴香胺溶液, 用浓硫酸滴加至中性).

【操作】

(1) 将玻璃纤维纸剪切成 5×20 cm, 样品 (可用 0.4% 葡聚糖水溶液) 另点在 1×10 mm 的玻璃纤维纸条上 (用此纸条浸渍样品, 或点加样品至纸条上都可), 然后将此样品纸条紧贴在基线处, 使样品下渗至电泳纸条上, 移去样品条. 电压 800 V, 电泳 40 分钟, 取出纸条, 自然晾干, 喷雾染色剂茴香胺硫酸溶液, 100°C 烘烤 15 分钟, 显棕黄色均一色斑. 若样品不均一, 则色斑较宽, 显色不均一.

(2) 或将玻璃纤维纸切成 28×11 cm, 多糖样品点样成线 (用载玻片), 电压 400 V, 电泳 30 分钟. 取出玻璃纤维纸自然晾干后, 切分成 1 cm 宽条, 用 1 mL 水洗涤, 用酚硫酸法测多糖含量, 如样品纯, 则为一单峰. 若样品分子量在 130 万左右, 在上述条件下, 峰值位于自基线向负极 7.0 cm 处, 如图 29 所示.

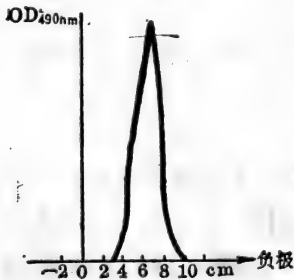


图 29 葡聚糖玻璃纤维纸电泳

【讨论】

(1) 玻璃纤维纸较疏松多孔, 点样时要避免扩散.

(2) 在上述实验条件下, 用不同种类葡聚糖, 在上述或类似实验条件下, 得到向阴极移动的结果.

(3) 如电泳中温度上升, 应采取冷却装置. 将电泳槽放置冰箱中进行, 效果也较好.

【文献】

梁忠岩、张翼伸, 高等学校化学学报, 4(3): 364~370(1980).

Tomoda, M. et al. *Chem. Pharm. Bull.* 20(4): 778~782(1972).

(张翼伸)

4. 多糖的醋酸纤维薄膜电泳

【试剂】

醋酸纤维薄膜. 缓冲液: 0.025 mol/L 硼酸盐缓冲液, pH12.5.
染色剂: 0.5% 甲苯胺蓝溶液.

【操作】

取醋酸纤维薄膜(2×8 cm)放在缓冲液中浸泡15~20分钟. 取出膜条, 夹在两层滤纸内吸去多余的缓冲液. 另切1×5 mm薄膜浸渍样品溶液约1 μL(10 μg), 紧贴在离膜条一端2 cm处, 使膜条点上细条状的多糖样品. 然后按一般常规电泳方法, 两端用纸搭桥, 电压250 V, 电泳时间20分钟. 取出膜条晾干后, 在甲苯胺蓝溶液中浸泡染色10分钟, 然后在90%的乙醇或1%醋酸中漂洗, 直至无糖区底色脱净为止. 如人参果胶(含有半乳糖醛酸的酸性杂多糖)染色得蓝色色斑.

【文献】

Darrell, G. M., *Carbohydr. Res.* 59: 531~537(1977).

Hsu, D. et al., *Anal. Biochem.* 46: 156(1972).

(张翼伸)

5. 多糖的凝胶电泳

(i) 琼脂糖(Agarose)电泳

【试剂】

琼脂糖制板(5.0×7.5 cm), 0.1 cm厚. 可直接用0.5%琼脂糖溶液或0.9%琼脂糖溶液以0.06 mol/L巴比妥缓冲液(pH 8.6)稀释成0.5%制板.

缓冲液: 0.06 mol/L巴比妥缓冲液或0.05 mol/L乙二胺缓冲液(pH 8.5).

染色剂: 甲苯胺蓝溶液(0.1%).

洗脱液(脱色用): 可用醋酸:乙醇:水(0.1:5:5).

【操作】

离琼脂糖板下端边缘 1 cm 处挖孔($\phi 0.2$ cm), 加样量 3~5 μ L (约含 1~10 μ g 多糖)。用毛细管或微量进样器点样。电压 150 V, 电泳 1~1.5 小时后, 染色并脱色, 斑点清晰, 是向阳极泳动。

样品以酸性多糖为宜, 因甲苯胺蓝不易使中性糖染色。

【文献】

Dietrich, C. P. et al., *J. Chrom.* 130:299~304(1977)。

(ii) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶垂直管型盘状电泳, 也曾用于中性多糖, 用高碘酸西夫试剂染色, 可得紫红色带, 如多糖分级不好, 则色带宽, 色不均一, 如有游离蛋白未除尽, 一般移动速度较快, 呈现较深的紫色窄带。

【试剂】

缓冲液: Tris-HCl 缓冲液, pH=9.1。

指示染料: 溴酚蓝。

染色剂: 凝胶用高碘酸西夫试剂染色(配法见“纸电泳”, 第 70 页)。

【操作】

点样用样品胶, 电压 500 V, 电泳 2 mA/管, 时间 2.5 小时。

【讨论】

多糖或糖蛋白的聚丙烯酰胺电泳后, 也可用麝香草酚溶剂混合物染色, 先把胶条浸入 0.2% 麝香草酚溶液中, 然后浸泡在 80% 硫酸 20% 乙醇的混合物中, 多糖或糖蛋白显红色。

如为硫酸软骨素类, 染色可用 0.1% 阿利新蓝(Alcian blue) 在 0.6 mol/L HCl 中。以后用 7% 醋酸、0.6 mol/L HCl 漂洗。

聚丙烯酰胺凝胶板状电泳同样适用。

【文献】

Racusen, D., *Anal. Biochem.* **99**:474~476(1979).

Laurence, J. R. et al., *J. Chrom.* **40**:145(1969).

(张翼伸)

三、糖链结构分析方法

长短不等的糖链，不但以寡糖和大分子多糖形式存在于自然界，而且作为糖蛋白、蛋白聚糖和糖脂的成分，活跃地参与许多重要的生命活动过程。与其他生物大分子一样，糖链的二级以上高级结构是以一级结构为基础的，不同的是，与蛋白质或核酸大分子比起来，糖链的一级结构“含义”要丰富得多。测定糖链的一级结构，包括解决以下几个问题：

- ① 糖链的分子量；
- ② 糖链的糖基组成，各种组成单糖的分子数比例；
- ③ 每一个单糖残基的 D-或 L-构型，吡喃环或呋喃环形式；
- ④ 各个单糖残基之间的联接次序；
- ⑤ 每个糖苷键所取的 α -或 β -异头异构形式；
- ⑥ 每个糖残基上羟基被取代情况，有两个以上羟基同时被取代，则意味着这个糖残基处在叉状链的分支点上；
- ⑦ 糖链和非糖部分(肽链、脂类物质等)联接点的情况。

显然，要弄清楚所有上列问题，不是一种技术或方法所能做到的。表 20 列出了糖链序列分析即一级结构测定常用的技术方法，包括物理学的方法——红外光谱、核磁共振等，化学的方法——甲基化反应、部分酸水解等，生物学的方法——工具酶应用、免疫学方法等。从各种技术方法的选择使用和巧妙配合中，得到来自各个角度的信息和数据，从而构成推断糖链一级结构的基础。当然，糖链结构的微观不均一性，使糖链的分子量测定和一级结构测定工作更加复杂化，这是研究工作者常常遇到的难题。

近十多年来，由于分析分离技术的发展，糖链的一级结构测定工作进展甚快。现在已有可能用几十微克到几毫克样品，在

表 20 测定糖链一级结构常用方法

解 决 的 问 题	常 用 的 方 法
分子量测定	凝胶过滤法, 质谱法, 蒸气压法等
单糖组成和分子比例	部分酸水解, 完全酸水解, 纸色谱, 气相色谱
吡喃环或呋喃环形式	红外光谱
联接次序	选择性酸水解, 糖苷酶顺序水解, 核磁共振
α -, β -异头异构体	糖苷酶水解, 核磁共振, 红外光谱
羟基被取代情况	甲基化反应-气相色谱, 过碘酸氧化, 核磁共振, 质谱法
糖链-肽链联结方式	单糖与氨基酸组成, 稀碱水解法, 胍解反应

几个月内, 得到糖链结构的大部分或几乎全部信息. 我国在糖链结构测定技术方法的各个方面, 都开始或已经做了一些工作. 比较起来, 在化学的和仪器分析的技术方法方面, 工作多一些, 在生物学方法方面, 尤其是工具酶的分离、提纯和应用方面, 还较为薄弱, 但是, 糖苷水解酶的研究已有一定的开展.

(张惟杰)

(一) 多糖的分子量测定和纯度鉴定

1. 测定多糖分子量的方法原则

多糖的分子量测定是研究多糖性质的一项较为重要的工作. 多糖的性质往往与它的分子量大小有关. 例如, 多糖溶液的粘度不但随浓度的增大而升高, 而且与多糖分子量大小有关. 一般说来, 分子量增大粘度增高, 在生物学研究中, 发现某些多糖由于分子量大小方面差别, 所产生的某些效应有一定差异. 以右旋糖酐为例, 右旋糖酐(Dextran)是由细菌(*Leuconostoc mesenteroides*, 简称为 L. m.)所产生的多糖, 单体分子均为葡萄糖. 分子量在 10 万~20 万的右旋糖酐, 使红细胞聚集成缙钱状的作用极为明显, 而分子量在 2 万~4 万的右旋糖酐, 对红细胞不但不起聚集作用, 相反, 使聚集的红细胞解聚. 多糖对红细胞起聚集和解聚作用, 不但存在于右旋糖酐, 不同分子量大小的羟乙基淀粉、羧甲基

淀粉和一些果胶等物质亦具有类似情况。

由于不同分子量大小的多糖,具有不同的性质,在多糖的应用中,如其作为试剂使用于某些实验时,往往需要在它的分子量大小方面作选择。譬如从血液中分离白细胞、血小板等,可使用分子量较大的右旋糖酐或羟乙基淀粉,使红细胞聚集,便于从血液中提取白细胞和血小板等成分。又如多糖在医疗应用中,治疗某些血栓性疾病,如冠心病、脑血栓、血管闭塞性静脉炎等,可选用低分子量的右旋糖酐或羟乙基淀粉;因为它们具聚集红细胞作用和起到改善毛细血管血流循环作用。可见,不论在多糖性质的研究,或是在它的用途等方面,都涉及到分子量方面的问题,往往需要测定它的分子量。因而测定分子量成为研究和制备多糖的一项经常性工作。

测定多糖分子量时,为了避免因存在杂质影响测定结果,需要把检测的样品(简称样品或检样)适当提纯,用于分子量测定的样品,纯度要求虽然不十分高,但至少要达到:(1)去除杂质和水分;(2)把不同化学结构的组分相互分开,使它们在测定分子量中,不相互干扰,例如某些 *L. m.* 菌株在蔗糖培养基上发酵,同时可产生两种溶解度不同的右旋糖酐。一种称为 S-右旋糖酐,另一种为 L-右旋糖酐,前者易溶于水,后者水溶性较差,这两种右旋糖酐的化学结构(此处指单体分子间链的配位)和分子量大小,都是存在一定差异的;(3)把不同分子量大小的组分相互分开,以美国的 NRRL-L. m.-B 512 菌种为例,此菌在蔗糖培养基上可同时产生两种不同分子量大小的右旋糖酐,这两种右旋糖酐的分子量相差较悬殊,组分 I 占发酵产物大部分,分子量可达百万,而组分 II 占小部分,分子量仅数万,这两组分的化学结构,基本上是一致的。

在用某些方法进行分子量测定时,需要先将小分子量的盐和单糖除去。提纯多糖的方法,可选用合适的有机溶剂,如乙醇、甲醇、丙酮等,配成适当浓度的水溶液作为沉淀剂,反复多次将所要提纯的多糖沉淀。多糖的纯化亦可用透析法、凝胶色谱法、超速离心法等。去除多糖的水分,可采用烘烤法,但烘烤温度不能过高,以防焦化,因此一般采用低温减压去除残留水分。某些多糖所含

的水分不易全部除去，例如右旋糖酐在减压下烘烤或在常压下 $104 \pm 1^\circ\text{C}$ 连续烘烤 6 小时，虽已达到恒重，但用卡尔·费休水分测定法，证明它仍含有 0.3% 的残留水分，此 0.3% 水分已不易去除，但对其分子量测定的影响不大。

常用于多糖分子量测定的方法，有渗透压法、蒸气压渗透计法、端基法、粘度法、光散射法、凝胶色谱法和超过滤法等。超离心法测定分子量，由于设备和操作等原因，目前在多糖分子量测定中应用不多。

由人为加工的高分子聚合物，一般来说，分子量是不均一的，多糖的分子量分布一般比较分散，所以一般所称的分子量是大小分子的平均数，即平均分子量，一个分子量较分散的样品，若用不同性质的分子量测定法测定它的分子量的结果，往往存在一定差异，用渗透压法、蒸气压渗透计法和端基法测得的分子量是属于数均分子量 (\bar{M}_n) 性质的，用光散射法测得的是样品的重均分子量 (\bar{M}_w)，而用粘度法测得的分子量称为粘均分子量 (\bar{M}_v)。下面把这三种不同性质的平均分子量的含义和计算作简单说明。

数均分子量的含义可以用下式表达：

$$\bar{M}_n = W / \sum_i N_i \quad (1)$$

W —样品重量，若将此样品按组分中的分子量大小分成若干分级，假定 i 分级的重量为 W_i ，此分级的分子量为 M_i 和所含的分子数目为 N_i ，则

$$W = \sum_i W_i \quad (2)$$

$$W_i = N_i M_i \quad (3)$$

或

$$W = \sum_i N_i M_i \quad (4)$$

将式(4)代入式(1)

$$\bar{M}_n = \sum_i N_i M_i / \sum_i N_i \quad (5)$$

假定有一个高分子溶液，它含有 100 个分子量为 10^3 ，100 个分子量为 10^4 ，和 100 个分子量为 10^5 的分子，那末它的数均分子

量:

$$\bar{M}_n = \frac{100 \cdot (10^3) + 100(10^4) + 100 \cdot (10^5)}{100 + 100 + 100} = 3.7 \times 10^4$$

从 \bar{M}_n 的计算可以看到, 数均分子量可视作为样品组分中大分子的算术平均数。

重均分子量的含义可以用式(6)表达

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i M_i W_i}{\sum_i W_i} \quad (6)$$

将式(3)代入式(6)

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} \quad (7)$$

用式(7)计算上例溶液的重均分子量:

$$\begin{aligned} \bar{M}_w &= \frac{(100) \cdot (10^3)^2 + (100) \cdot (10^4)^2 + (100) (10^5)^2}{(100) (10^3) + (100) (10^4) + (100) (10^5)} \\ &= 9.1 \times 10^4 \end{aligned}$$

粘均分子量的含义, 比数均和重均分子量的复杂, 如式(13)所示。

粘度法测定分子量, 是测定样品的特性粘度 ($[\eta]$)。需通过 mark-Houwink 经验式:

$$[\eta] = K M^\alpha \quad (8)$$

或 $M = \sqrt[\alpha]{[\eta]/K}$

计算样品的分子量, K 和 α 是两个参数, 其数值与样品的化学结构、所用的溶剂和实验温度等有关。

如果有一个样品, 经过分级划分, 其 i 分级的特性粘度为 $[\eta]_i$, 则

$$[\eta]_i = K M_i^\alpha \quad (9)$$

式(9)乘以 W_i ,

$$[\eta]_i \cdot W_i = K M_i^\alpha \cdot W_i$$

或

$$[\eta]_i = K M_i^\alpha \cdot W_i / W_i$$

$$[\eta] = K \frac{\sum_i M_i^\alpha \cdot W_i}{\sum_i W_i} \quad (10)$$

将式(3)代入式(10):

$$[\eta] = K \sum_i N_i M_i^{\alpha+1} / \sum_i N_i M_i \quad (11)$$

兹以 M_v 替代式(8)中的 M , 那末

$$[\eta] = K M_v^{\alpha} \quad (12)$$

式(12)等于式(11), $K M_v^{\alpha} = K \sum_i N_i M_i^{(\alpha+1)} / \sum_i N_i M_i$,

$$M_v = \left(\sum_i N_i M_i^{(\alpha+1)} / \sum_i N_i M_i \right)^{1/\alpha} \quad (13)$$

式(13)中的 α 值与高分子的性质等有关. 如果把上面所列举的高分子溶液当作为右旋糖酐溶液, 右旋糖酐溶液在以水为溶剂和在 25°C 下的 α 值, 常在 0.50 左右, 兹以 α 等于 0.50, 计算该高分子溶液的 \bar{M}_v ,

$$\begin{aligned} \bar{M}_v &= \left[\frac{(100)(10^3)^{1.5} + (100)(10^4)^{1.5} + (100)(10^5)^{1.5}}{100(10^3) + 100(10^4) + 100(10^5)} \right]^{1/0.5} \\ &= 8.6 \times 10^4 \end{aligned}$$

通过上面所举的三个计算例子, 说明同一个样品, 分别用数均法、重均法和粘均法测定它的分子量, 测定结果是有一定差别的, 三种测定分子量的方法, 以 \bar{M}_w 最高, \bar{M}_v 比 \bar{M}_w 为小, 但二者比较接近, 三者中一般以 \bar{M}_n 为最小. 上例的 \bar{M}_w 与 \bar{M}_n 比值: $\bar{M}_w/\bar{M}_n = 9.1 \times 10^4 / 3.7 \times 10^4 = 2.46$, 比值比较大, 这是由于该高分子溶液中的胶体分子的分子量比较分散. 如果样品中的胶体分子大小比较均匀, 其 \bar{M}_w 与 \bar{M}_n 比值应当较小, 或接近于 1, 如果样品的分子量组分是均一的, 那末二者比值应当等于 1. 因此 \bar{M}_w 与 \bar{M}_n 的比值, 常用以检验样品的分子量分布是否均匀的一种指标.

如上所述, 多糖的分子量一般是不均一的, 用不同性质的测定方法, 所得结果不免存在差异, 因此在说明多糖的分子量时, 应当把测定方法的性质作说明, 例如, $\bar{M}_w = 45\,000$, 或 $\bar{M}_n = 32\,000$.

(林大镛)

2. 渗透压法测定多糖分子量

利用膜渗透压计 (Membrane Osmometer, 简称 MO 仪) 可以测定分子量范围在 1 万 ~ 50 万之间的多糖分子量. 本法不需用

标准品。

如果把多糖水溶液装在半透膜制成的透析袋内，袋外为溶剂（水），水分子可以自由通过半透膜，多糖分子则不能通过透析膜。因此袋内的多糖分子必将吸引更多的水分子渗入袋内，形成一定的渗透压。渗透压可用大气压表示，也可用厘米液柱高表示。渗透压与溶液中溶质分子数有关。可以用范特荷甫公式表示：

$$\pi V = nRT$$

式中 π 为渗透压， V 为溶液体积， n 为溶液克分子数， R 为气体常数， T 为绝对温度。

因 $n = W/M$ ， $W = C \cdot V$ (W 为样品重量， M 为分子量)，代入上式简化后得

$$M = \frac{RT}{\left(\frac{\pi}{C}\right)_{C \rightarrow 0}} \quad (1)$$

有些作者认为应当计入溶剂在不同温度时的密度 D ：

$$M = \frac{RT}{\left(\frac{\pi}{C}\right)_{C \rightarrow 0}} \cdot D \quad (2)$$

【仪器和试剂】

本工作中采用的膜渗透压计为西德 Knauer 公司的膜渗透仪。仪器配用该公司特制的双层专为测定水溶性物质用的膜作为半透膜。溶剂为脱气蒸馏水。

仪器的主要部件是渗透池，由半透膜分隔成上下两池（图 30），下池底部中央有一压敏换能元件。操作时先将下池充满纯水，加上膜后

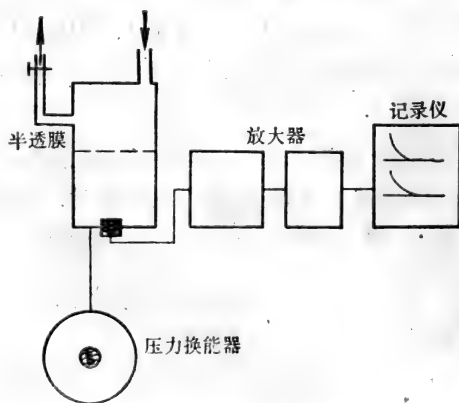


图 30 膜渗透压计示意图

再将上池充满测定的溶液。在恒温条件下使两池达成平衡，压力之差由换能器输出信号放大后记录，求得 π 值。

【操作】

(以右旋糖酐分子量的测定为例)

(1) 仪器准备：将脱气后的蒸馏水充满下池。浸泡好的半透膜覆盖于其上并注意勿使气泡进入。将上池压紧。按操作要求逐步旋紧中心螺丝(约需 8 小时)，装上针阀及校正杯进行仪器校正(约 12 小时)，取下针形阀及校正杯，装上进样管用溶剂充分冲洗后，开动记录仪，划出基线(12 小时)。

(2) 样品准备：每一测定的样品需配 3~5 个不同浓度的溶液。本试验中用右旋糖酐配制成 0.209 g/100 mL (C_1)，0.403 g/100 mL (C_2) 及 0.626 g/100 mL (C_3) 三种浓度的溶液。

(3) 样品测定：先用浓度为 C_1 的样品由进样管注入上池，清洗三次，再注满进行测量，直到记录仪达到平衡。划出的直线与基线之间的距离即为该浓度溶液的 π 值。

同法测定 C_2 、 C_3 溶液的 π 值。

(4) 分子量计算：将下表中各项列入：

样 品	1	2	3
浓度 C (g/100 mL)	0.209	0.403	0.626
渗透压 π	0.3	0.5	0.8
π/C	1.4354	1.2717	1.238

将 π/C 对 C 作图求得 $\pi/C_{C \rightarrow 0}$ 为 1.50, $t = 24^\circ\text{C}$, $D = 0.9973$, 代入公式(2)

$$M = \frac{RT}{\left(\frac{\pi}{C}\right)_{C \rightarrow 0} \cdot D} = \frac{848 \times (273 + 24)}{1.5 \times 0.9973} = 165\,000$$

【讨论】

(1) 渗透压法测定分子量，要求样品内不含分子量小至能透过半透膜的物质，否则不易达成平衡。

(2) 渗透压法成功的关键是找到合适的半透膜，要求空隙率

较大而孔度均匀,并有一定强度。

(3) MO 仪测定比较费时,宜一次准备多个样品,昼夜连续进行测量。可以用同一一次的基线数据。

【文献】

钱人元,高聚物分子量的测定。

Knauer 公司,膜渗透仪实验操作说明书。

(骆传环 马立人)

3. 蒸气压法测定多糖分子量

利用蒸气压渗透计(Vapor Pressure Osmometer, 简称 VPO 仪)可测定分子量范围在 500~10 000 之间的多糖分子量,方法简单、快速。

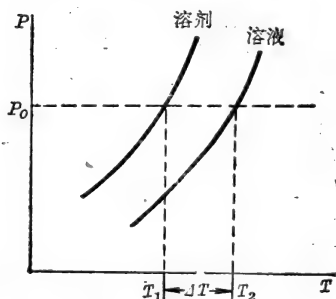


图 31 蒸气压(P)与温度(T)的关系曲线

根据稀溶液的热力学性质,我们知道在溶剂中溶有溶质时,沸点升高、蒸汽压下降。如果将蒸汽压(P)与温度(T)作图表示,则可得图 31 中的关系。从图 31 可以看到,在蒸汽压达到平衡的一个体系中,溶液的温度要高于溶剂的温度,才能使两者的蒸汽压相等。而在一定浓度时溶液比溶剂高出的温度又和溶

质的分子量有关。根据拉乌尔定律,可得如下公式

$$M = K \cdot \frac{C}{\Delta T}$$

式中 M 为溶液中溶质的分子量, K 为溶剂常数(可以用已知分子量的标准物测定而求得), C 为溶液浓度(mg/kg), ΔT 为溶液比溶剂提高的温度。因此用 VPO 仪测得 ΔT 后,即可计算出分子量。因本法与溶液中的粒子数有关,故得到的多分散样品的平均分子量为数均分子量。

【仪器和试剂】

VPO 仪:西德 Knauer 公司生产。其核心部件为一对匹配的

测温探头,由热敏电阻组成。

图 32 示两个热敏电阻探头伸入一密闭的恒温容器中,一个探头上悬挂溶剂液滴,一个探头上悬挂溶液液滴。两个探头之间的温度差 $\Delta T'$ 的信号经放大输至记录仪记录。

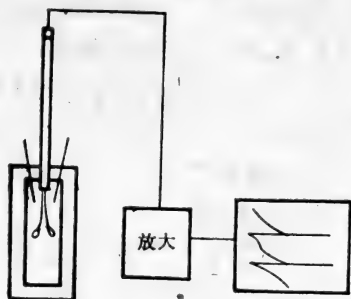


图 32 VPO 仪剖视示意图

【操作】

以测定菊糖衍生物 83-II 号样品为例。

(1) 标准样品的配制: 以标称分子量为 5000 的菊糖标准品(英国生产),用除气的蒸馏水配成溶液。

(2) 样品溶液的配制: 将 83-II 号菊糖衍生物(得自细叶蓟根)如上配成 14.38 mg/kg 的水溶液。

(3) 零线位置的确定: 先将标准液、样品液及溶液(脱气蒸馏水)分别吸入四支 1 mL 注射器内(蒸馏水用 2 支),插入仪器上的孔腔内,使平衡至 37°C (约需 1 小时)。

两支盛水的注射器使两个探头上均挂上液滴。液滴的大小可从观察窗观察。两液滴大小应基本相同,不宜过大或过小,否则液滴容易掉下或数据不稳定。

平衡 10 分钟后使记录仪记录 10 分钟,画出的直线即为零线位置。

(4) 样品测定: 用手推盛溶液的注射器使一个探头上挂上溶液液滴,另一探头则挂上新鲜的溶剂,让记录仪走低 10 分钟进行记录。画出的直线与刚才零线之间的距离即为该溶液的 $\Delta T'$ 值。

如上重复三次,取均值,得数值为 34。

(5) 标样测定及标准 K 值的计算: 用标准样品液按 4 进行,根据公式计算出 K 值为 10182。

(6) 样品分子量的计算: $M = 10182 / 1.9562 = 5200$

所以菊糖 83-II 的分子量为 5200。

【讨论】

(1) 蒸汽压法测定一定范围内的分子量,优点是快速简单,但选用标准品时要注意,最好是已知分子量的同一类物质,求得稳定的 K 值后再进行样品的测定。

(2) 样品中不能含有 NaCl、葡萄糖等小分子物质,否则所得均值偏低。

【文献】

钱人元,高聚物分子量测定。

Knauer 公司, VPO 仪器操作说明书。

(骆传环 马立人)

4. 端基法测定多糖分子量

用端基法测定分子量的基本原理,是测定单位重量样品中所含可测端基之数,即每克检样的可测端基的克当量数,或是每毫克中的毫克当量数,从而计算检样的分子量。例如,对某一种多糖的分子结构,业已明确知道,它每一个分子链含有一个可测端基和每毫克中所含的可测端基为 A 毫克当量,那末,该多糖的分子量应该是 $1/A$ 。可见检样的分子量,是它每毫克重量中所含可测端基的毫克当量数的倒数,在端基法测定分子量时,分子量计算的通式为: 检样重量(毫克)/可测端基(毫克当量数) = 检样的分子量 (M_n)。

所以用端基法测分子量要求检样的化学结构须具备如下二个条件: ① 每一个分子链端须具有可以用化学方法作分析的基团,以便采用一定的定量分析方法,对该端基作定量分析。② 检样的每一个分子链,它所含可测端基的数目,不但须明确,而且数目应固定不变。

大多数多糖是具有可测的还原性半缩醛端基的,对这类多糖,可采用不同的氧化法进行分析测定,在分析测定时往往需要一个已知分子量的参比物,而且参比物的化学结构需要与样品的化学结构相仿,因为具不同化学结构的高分子物,虽具有类似的还原性基团,但其化学性质在程度上往往存在差异。例如在测定淀粉

的分子量时，往往以麦芽糖作参比物，而测定右旋糖酐的分子量时，用异麦芽糖作参比物比较合适。因为前两者的葡萄糖基间是以 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 连接的，而后两者却是以 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 连结的聚合物。

与其他的分子量测定法相比，用端基法测定多糖分子量，所需仪器设备较为简单，也不需采用多个浓度的溶液测定，再以无限稀释，用作图外推法去计算样品的分子量，因而在多糖分子量测定中经常应用它。但本方法在实际应用中受到某些因素限制，除了上述的对检样化学结构方面的要求外，对分子量比较大的样品应用本方法是不适宜的。因为端基法分子量测定中，往往采用容量法或重量法，而分子量较大的多糖分子，相对地说在单位重量中所含可测端基之数比较少，这使分析测定受到一定影响，一般认为，分子量到达2万至3万时，实验误差已有可能到达20%左右。再者，如果有的多糖其端基团须经过化学转化方可作测定的话，那末转化反应必须完全，转化中不产生降聚作用，否则都将影响测定结果。下面介绍几种常用的测定多糖还原端基的定量分析方法。

(i) 3, 5-二硝基水杨酸比色法

本方法是利用还原糖与3, 5-二硝基水杨酸反应时，产生颜色。测定检样时，用一个已知分子量和已知浓度的溶液作参比，经过比色，计算检样的分子量。

【试剂】

3, 5-二硝基水杨酸溶液：称取666 mg经二次重结晶的3, 5-二硝基水杨酸，溶解于200 mL浓度为1 mol/L的氢氧化钾溶液。

【操作】

称取样品100~200 mg放入100×20 mm试管，加15 mL试剂，经过搅拌使样品溶解，然后在65°C的恒温水浴中保温1小时，待冷却至室温后，将反应液移入50 mL容量瓶，用水淋洗反应管多次，淋洗液并入容量瓶，添加水至刻度。

用同样方法，取试剂15 mL放入试管，经保温，待冷却到室温后，移入容量瓶加水到50 mL，作为对照溶液。比色时用500 nm滤光板。

如果检测的样品是淀粉,则可用麦芽糖作参比物。取麦芽糖 4 mg,与检样的显色反应同样操作,然后从 50 mL 容量瓶中取一部分作适当稀释,配制成几个不同浓度溶液,测定它们的光密度,作浓度-光密度曲线图。图中的麦芽糖浓度,可以用麦芽糖的毫克当量表示,读取样品的光密度之后,从该曲线查对其相应的毫克当量数(x),从而计算样品的分子量。

$$\bar{M}_n = \frac{\text{样品 (mg)}}{x}$$

(ii) 碱性铜盐试剂反应滴定法

以 Somogyi 氏碱性铜盐试剂氧化还原糖方法,测定多糖端基的半缩醛基团,从而计算出它的分子量。

【试剂】

碱性铜盐试剂: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 76.6 g, 酒石酸钾钠 40 g, 浓度为 1 mol/L 的氢氧化钠溶液 100 mL, 浓度为 10% 的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 的溶液 80 mL, Na_2SO_4 180 g, 加水配成 1000 mL。

0.01 mol/L 碘酸钾溶液。

2.5% 碘化钾溶液(用时新鲜配制)。

1 mol/L H_2SO_4 。

0.0025 mol/L 硫代硫酸钠溶液(临用前,以 0.02 mol/L 的硫代硫酸钠溶液稀释,经标定后使用)。

【操作】

精确称取样品 1~2 g,用蒸馏水溶解后,配制成 50 mL,称取两份 5 mL 分别置于两只容量为 100 mL 具磨砂口的三角烧瓶,另取一只 100 mL 具磨砂口的三角烧瓶盛放 5 mL 蒸馏水,作滴定对照用,向三角烧瓶中分别加入碱性铜盐试剂 5 mL,然后接上具磨砂接头的冷凝管,放入正在沸腾的水浴中,煮沸 30 分钟之后,小心地把它们从水浴取出,取时勿使瓶中溶液搅动,待冷至室温后,于各瓶中精确量加 0.01 mol/L 的碘酸钾溶液 15 mL,再加 2.5% 的碘化钾溶液 1 mL(须沿瓶壁加入,使沾在瓶壁上的反应液淋洗入瓶中,加液时勿使反应液搅动,避免受空气氧化),再加 1 mol/L 的

H_2SO_4 1.5 mL, 加毕后立即搅动混匀, 然后加 1% 可溶性淀粉 1 mL 为指示剂, 用 0.0025 mol/L 的硫代硫酸钠溶液滴定至蓝色退去为终点。

如果检测的样品是右旋糖酐, 参比物应以异麦芽糖为宜, 但是异麦芽糖的结晶纯化比较困难, 可改用龙胆二糖(gentiobiose)作参比物, 龙胆二糖是 β 结构 1 \rightarrow 6 的葡萄糖双糖, 实验证明, 异麦芽糖的还原性质为龙胆二糖的 93.9%, 因此用龙胆二糖作参比物去计算右旋糖酐的分子量需要经过校准。

用硫代硫酸钠溶液滴定测定龙胆二糖, 每 mL 0.0025 mol/L 的硫代硫酸钠相当于 0.216 mg 龙胆二糖, 因此样品(右旋糖酐)的分子量:

$$M_n = \frac{W \times 0.939}{V \cdot \left(\frac{0.216}{342.3}\right)}$$

式中: W = 样品的取量 (mg);

V = 滴定时用去的 0.0025 mol/L 的硫代硫酸钠体积 (mL)
(空白对照滴定值减去样品滴定值)。

经计算, 龙胆二糖的分子量为 342.3。

假如测定右旋糖酐分子量时, 取右旋糖酐 100 mg, 滴定右旋糖酐时, 用去 0.0025 mol/L 硫代硫酸钠溶液 14.12 mL, 消耗于对照的为 21.63 mL,

$$\text{则 } M_n = \frac{100 \times 0.939}{(21.63 - 14.12) \left(\frac{0.216}{342.3}\right)} = 1.98 \times 10^4$$

(iii) 把多糖转化为氰醇(cynohydrin)的测定法

把多糖(P)与氰化钾反应, 成为多糖氰醇(PCHOHCN), 然后在碱性条件下使氰醇水解, 释放出氨:



释放的氨用标准浓度盐酸吸收, 再用氢氧化钠滴定, 释放的氨的毫摩尔量, 即为多糖还原基团的毫摩尔量, 从而计算多糖的分子量, 本方法常用于纤维素等的分子量测定。

【试剂】

0.4 mol/L 醋酸, 0.8 mol/L 氰化钾溶液, 20% 氢氧化钠溶液, 0.01 mol/L 的标准盐酸, 0.01 mol/L 的标准氢氧化钠。

【操作】

精确称取样品 100~200 mg, 放在 500 mL 具磨砂口的圆底烧瓶中, 加蒸馏水 3 mL, 使样品吸水润湿, 再加浓度为 0.4 mol/L 的醋酸 5 mL 和浓度为 0.8 mol/L 的 KCN 溶液 5 mL, 盖上玻璃塞后于 39°C 温度保温 48 小时。然后用酸将反应液酸化至甲基红呈酸性, 通以空气, 驱逐反应液中残留的氰化物, 然后加浓度为 20% 的氢氧化钠溶液 10 mL。以蒸气蒸馏法将氨蒸出并吸收于一定体积 (V_{HCl}) 的标准盐酸中, 蒸馏完毕, 以标准氢氧化钠滴定盐酸(吸收溶液), 记录所消耗的氢氧化钠的体积 (V_{NaOH})。样品的分子量:

$$\bar{M}_n = \frac{\text{样品重量 (mg)}}{(V_{\text{HCl}} \times 0.01) - (V_{\text{NaOH}} \times 0.01)}$$

【文献】

Smith, F., Rex Montgomery, *Methods of Biochemical Analysis*, 3: 153~212, by David Glick, Interscience Pub. Inc. New York.

Isbell H. S., et al., *J. Research Natl. Bureau Standard*, 50:81, 1953.

Garmon, R. G., *Polymer Molecular Weight, Part I.* by Philip. E. Slade Jr. pp. 32~73. *Marcel Dekker Inc.* New York, 1975.

(林大辅)

5. 光散射法测定多糖分子量

当一个光束通过介质时, 在入射光方向以外的各个方向也能观察到光强现象, 这是由于光通过介质时产生光的散射。透明介质的光散射是由于介质内分子的热运动引起介质折光指数或介电常数的局部升落。一个单纯液体(溶剂)的光散射是由于溶剂密度的局部升落。而一个溶液的光散射, 除由于溶剂密度的局部升落外, 还存在着溶质浓度的局部升落。同一高分子溶液在同一温度下, 溶液的局部浓度升落的大小与溶液浓度和渗透压之间的变化 ($\partial\pi/\partial C$) 有关。当溶液中高分子物质的分子小于入射光在溶液中波长的 1/20 时, 溶液的光散射在 90° 散射角(指入射光方向

与散射光方向的角度)处的散射光强(R_{90})与入射光强的关系如下式:

$$R_{90} = \frac{KC}{\left(\frac{1}{RT}\right)\left(\frac{\partial\pi}{\partial C}\right)} = \frac{KC}{\frac{1}{M} + 2A_2C} \quad (1)$$

或

$$\frac{KC}{R_{90}} = \frac{1}{M} + 2A_2C \quad (2)$$

式中: R = 气体常数, T = 温度(K), A_2 = 维利第二常数, R_{90} = 散射介质的瑞利比(Rayleigh ratio).

$$R_{90} = r^2 \frac{I_{90}}{I_i} \quad (3)$$

式中 I_i = 入射光强, I_{90} = 在 90° 散射角, 距散射中心 r (cm) 处, 每立方厘米散射体积所产生的散射光强(需减去纯溶剂的散射光强)

$$K = \frac{2\pi^2 n^2}{\lambda^4 N} \left(\frac{\partial n}{\partial C}\right)^2 \quad (4)$$

式中 n = 溶剂的折光指数, λ = 入射光在真空中的波长(\AA), N = 阿佛加德罗常数, C = 检样溶液浓度(g/mL), $\partial n/\partial C$ = 检样溶液折光指数的浓度依赖性常数(对同一种多糖来说, 它是一个常数).

由于 I_i 比 I_{90} 大得多, 因此, I_{90}/I_i 的绝对值极小(R_{90} 在 10^{-4} 至 10^{-5} 数量级), 直接测定此比值是困难的, 因此一般都使用参比标准作相对测定, 常用的参比液体有苯、甲苯、二硫化碳和四氯化碳等. 这些液体的 R_{90} 值业由前人精确测定, 可借用前人的数据. 在实验测定中, 散射体积和 r 是固定的, 至于检样的 $\partial n/\partial C$ 值, 对同一种检样来说, 只需测定一次, 因它与分子量大小无关. 所以测定检样的分子量时, 只需测定检样溶液对参比液体在 90° 散射光强的比值, 即可计算检样溶液的 R_{90} .

从公式(2)可以看到, 当溶液浓度接近于零时($C \rightarrow 0$), 检样的分子量为 $\frac{KC}{R_{90}}$ 值的倒数, 因此需要把检样配成几个不同浓度的溶液后, 分别测定它们的 $\frac{KC}{R_{90}}$ 值, 然后作 $\frac{KC}{R_{90}} - C$ 图, 作图后可得到一条直线, 把直线往 $\frac{KC}{R_{90}}$ 轴引伸, 交点的截距即为浓度接近于

零的 $\frac{KC}{R_{90}}$ 值。

光散射测定分子量的光源，常用的是汞灯，经过滤光片，波长为 4358 Å。

溶液的散射光强是极微弱的，一般需用电子管倍增管放大。光强度之比，可以从灵敏度较高的检流计读取。光散射分子量测定记录表中的 G_{θ} (G_0 和 G_{90} 等) 是指检流计的读数。

【仪器】

光散射分子量测定仪，示差折光仪。

【操作】

(1) 溶液的配制：精确称取检样 3~4g，溶解于重蒸无离子水 100 mL 中。

(2) 溶剂和溶液的除尘：用于光散射测定的溶剂和溶液都必须经过除尘处理，除尘好坏是测定分子量的关键问题。溶剂和溶液中如存在尘粒将产生强烈散射光线而把溶液中溶质分子的散射光掩盖，为了提防样品中存在尘粒和得到较好的光散射数据，在样品的制备、级分、干燥、称量和配液等步骤中，都应采取防尘污染措施。

溶剂和溶液除尘方法常用的有超离心沉降或过滤处理法等。用离心法除尘，离心速度一般采用 1 万至 2 万转/分钟，半小时至 1 小时，离心完毕，取离心管时，尽量不使液体搅动，用移液管吸取上层清澈的液体，溶液的过滤除尘，一般先通过 3 号再通过 5 号垂熔漏斗，或用 3 号垂熔漏斗后再通过 0.2~0.45 μm 微孔滤膜。漏斗和滤膜在使用前必须充分冲洗，除去漏斗和滤膜内部的颗粒杂质。

水溶液的除尘纯化效果，比非极性有机溶液的为差。溶剂和溶液的除尘好坏，可以通过光散射仪测定它们的前后不对称系数，即测定它们在 45° (G_{45}) 和 135° (G_{135}) 的散射光比值，以溶剂的 G_{45}/G_{135} 不超过 1.02 和溶液 G_{45}/G_{135} 不超过 1.20 为宜。

(3) 样品溶液的 $\partial n/\partial C$ 测定：多糖溶液的 $\partial n/\partial C$ 值，一般为 10^{-1} 量级。测定 $\partial n/\partial C$ 时的溶液浓度常为 10^{-2} g/mL，溶液与溶

剂的折光系数之差 Δn 则为 10^{-8} 量级, 所以 Δn 的测定必须准确至 10^{-5} , 普通的折光仪已不能满足要求, 须用示差折光仪予以测定。

在一定温度和用单色光光源下测定溶剂的折光指数 n_0 , 和在同样条件下测定样品溶液的折光指数 n , 二者之差 $(n - n_0)$ 为 Δn 。如果将样品配成几个不同浓度溶液, 分别测定它们的折光指数后, 作 $\Delta n - C$ 图, 图中可得到一条直线, 直线斜率即为该样品的 $\partial n / \partial C$ 值。

检样溶液的 $\partial n / \partial C$ 值与它的分子量大小无关, 在分子量测定时所用的溶液浓度范围内 $\partial n / \partial C$ 值应当是恒定的。因此在测定同一种多糖的分子量时, 其 $\partial n / \partial C$ 值只需测定一次就可以, 但对另一种多糖的分子量测定, 则另需测定它的 $\partial n / \partial C$ 值。

用于 $\partial n / \partial C$ 值测定的光源, 应与分子量测定光源一致。测定时溶剂和溶液的温度应保持接近, 一般不超过 0.01°C , 样品溶液的浓度可配制在 $0.5 \sim 2 \times 10^{-2} \text{g/mL}$ 。

(4) 样品分子量测定: 测定分子量的散射池可采用半八角形的散射池(图 33), 池中先盛放溶剂, 测得溶剂的散射光强数据后往散射池中加样品溶液, 样品溶液的逐次加入, 使散射池内的液体浓度逐次增大, 这样可以测定不同浓度样品溶液的散射光强。数据的记录与处理见下表。

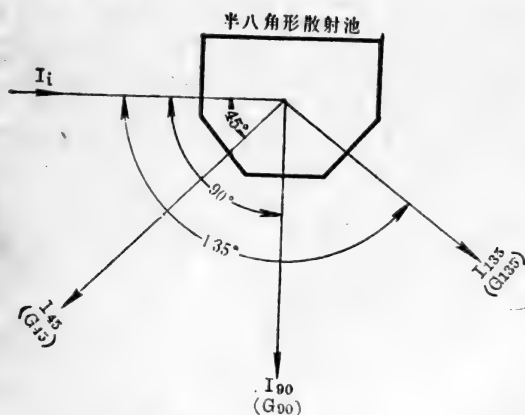


图 33 半八角形散射池

样品	溶剂	$\lambda(\text{nm})$	N_0	$\partial n/\partial C$	池 (g)	池+溶剂(g)
①	②	③	④	⑤	⑥	⑦

No. ⑬	$S(\text{g})$ ⑭	ΣW_i ⑮	$\frac{\Sigma W_i}{\Sigma W_i + W_0} \times 10^{-2}$ ⑯	$C_i \times 10^{-4}$ ⑰	$\frac{KC_i}{\phi} \times 10^{-6}$ ⑱	θ ⑲	F ⑳	G_0 ㉑
0						90		
						45		
						135		
1						90		
						45		
						135		
2						90		
						45		
						135		
3						90		
						45		
						135		
4						90		
						45		
						135		
5						90		
						45		
						135		
6						90		
						45		

测定记录

W_0 溶剂 (g)	C_0 (g/mL)	$\left(\frac{K'}{\phi}\right)(\partial n/\partial C)^2$	温度	日期
⑧	⑨	⑩	⑪ °C	⑫

G_0	$\frac{G_\theta}{G_0}$	$\Delta \frac{G_\theta}{G_0}$	$\frac{G_{\pi-\theta}}{G_\theta}$	$r \cdot \frac{G_{\pi-\theta}}{G_\theta}$	$1 - r \cdot \frac{G_{\pi-\theta}}{G_\theta}$	$\Delta \frac{G_\theta}{G_0} \times$ $\left[\frac{1 - r \cdot \frac{G_{\pi-\theta}}{G_\theta}}{1 - r \cdot \frac{G_{\pi-\theta}}{G_\theta}} \right]$	$\frac{KC_d}{R_\theta} \times 10^{-6}$
⑭	⑮	⑯	⑰	⑱	⑲	⑳	㉑

在半八角形散射池中放一支磁力搅拌棒(以便在添加样品原溶液后进行搅拌,使溶液混合均匀,然后测定其散射光强),盖上池盖后,称取重量并把重量数据记入记录表的第⑥格中(参见附表),然后将经过除尘处理的溶剂(水)装入池内,水的体积约30 mL,以液面稍高于入射光线的位置为合适,称取其重量,并把重量记录在表中第⑦格中,散射池中盛放溶剂的重量(即⑦~⑥),记入第⑧格中,将散射池放入光散射仪,测取溶剂的各散射角度的散射光强(G_0 , G_{45} , G_{90} 和 G_{135})(检流计读数,下同),并分别填写于表中横行 No. 0 的⑲和⑳,其 G_{45} 与 G_{135} 的比值不得超过1.02方符合溶剂除尘要求,如果达不到此要求需将溶剂重作除尘处理.

取一部分经过除尘处理的原溶液,测定它的密度(ρ). (实验采用称量法配制不同浓度的检测溶液,但在原溶液浓度较高情况下,需要作体积校正.)将另一部分溶液装在滴瓶中称取其重量(瓶与液),记录于表的 No. 0 的㉑中. 配制不同浓度检测溶液时,取滴瓶中的原溶液逐次往散射池添加,每次滴加6~8滴(合约0.3 mL),每次取液后,称取滴瓶重量,并记入表的竖行㉒,滴瓶所减轻的重量,相等于散射池增加的重量,把数据记录在竖行㉓. 竖行㉔是原溶液在散射池中的重量(或以 $\frac{\sum W_i \cdot \rho}{\sum W_i \cdot \rho + W_0} \times 10^{-3}$,合算为体积),在溶液浓度较低情况下, ρ 值接近于1,可略不计,㉕中的 G_i 为原溶液的浓度与㉔的乘积,是散射池中溶液的浓度,散射池中的溶剂在第一次滴加原溶液后的散射光强 G_0 和 G_0 (G_{45} , G_{90} 和 G_{135})分别记录入横行 No. 1 的⑲和⑳,其 G_{45} 和 G_{135} 间比值不得超过1.20,方符合溶液的除尘要求. 然后第二次往散射池添加原溶液,把计算和测得的数据,分别记录在表中横行 No. 2 各相应位置中. 以同样操作把原溶液往散射池添加,把数据记录在表的横行 No. 3, 4... 的相应位置中,一般需作5个或5个以上不同浓度溶液的测定,每次测得的 G_0 值应当是一致的. G_0 值的恒定与否与光源和仪器在工作过程中的稳定性有关.

第⑩中的 $K'(\partial n/\partial C)^2$ 为公式(4)的 K , ϕ 为仪器常数, 由仪器生产厂测定, 出厂时编写在仪器说明书内。因此⑩的 $\frac{K'}{\phi}(\partial n/\partial C)^2$, 在同一实验测定或测定同一类多糖的分子量时是不变的。第⑬是第⑰与第⑩的乘积; 第⑳为入射光的减光滤光片的成倍减光系数; 自第㉑至第㉓的“ G ”, 是溶液的各散射角的散射光强, 即反映在检流计的读数; 第㉔的 $\Delta \frac{G_\theta}{G_0}$ 为溶液的 G_θ/G_0 减去溶剂的 G_θ/G_0 , 即二者之差。至于第㉕, 当 $\theta=90^\circ$ 时, $\frac{G_{\pi-\theta}}{G_0}=1$; 第㉖中的 (r) 为 Fresnel 反射改正系数, $r=0.045$; 第㉗, 当 $\theta=90^\circ$, 即为 R_{90} 值; 第㉘ $\frac{KC}{R_{90}}$ 是第⑬除以第㉗的商。

经实验测定, 得到样品在不同浓度下的 $\frac{KC}{R_{90}}$ 值后, 作 $\frac{KC}{R_{90}}-C$ 图, 可得到一条直线, 将其伸延, 与 $\frac{KC}{R_{90}}$ 轴相交, 交点截距, 为 $C \rightarrow 0$ 的 $\frac{KC}{R_{90}}$ 值, 此值的倒数为样品的分子量。

【文献】

钱人元等, 高分子物的分子量测定, 科学出版社, 1958.

Casassa, H. et al., *Polymer Molecular Weight, Part II.* by Philip E. Slade Jr. *Marcel Dekker Inc.* New York, 1975.

岛津光散射仪, PC-21 型, 操作说明书。

(林大辑)

6. 粘度法测定多糖分子量

粘度法测定分子量, 所需设备较简单, 操作较易掌握, 因此常用于多糖的分子量测定。如上文所述, 粘度法分子量测定, 先是测定样品特性粘度 $([\eta])$, 然后通过换算方程, 即经验式 $[\eta] = KM^\alpha$ 计算分子量。

溶液的粘度 (η) 一般是随溶液浓度的递升而增高, 溶液粘度应该比溶剂粘度 (η_0) 为高, 二者的比值 (η/η_0) 称为相对粘变 (η_r) 。溶液的相对粘度, 常以溶液和溶剂在粘度计中的流出时间之比 (T/T_0) 表示。溶液与溶剂之间的粘度差 $(\eta - \eta_0)$, 和此差数与溶剂

粘度的比值 $[(\eta - \eta_0)/\eta_0, \text{或 } \eta_{r-1}]$, 称为增比粘度 (η_{sp}) . 单位浓度的增比粘度称为比浓粘度 $(\eta_{sp}/C, C = \text{溶液的浓度, 其单位为 g/100 mL})$, 检样的特性粘度为检样溶液在极度稀释时的比浓粘度 $(\eta_{sp}/C, C \rightarrow 0)$.

推导某一种多糖的特性粘度-分子量换算方程, 实际上是测求 Mark-Houwink 经验式中的 K 和 α 两个参数.

将该多糖按分子量大小分为若干分级, 必要时将该多糖进行部分水解, 将水解液分级划分, 以便取得一组分子量不同的分级物, 在同一条件(溶剂, 实验温度等)下, 分别测取它们的特性粘度 $[\eta]_i$, 并用光散射法(或其他方法)分别测定它们的分子量 (M_i) . 然后把这二套数据 $([\eta]_i \text{ 和 } M_i)$, 用最小二乘法或是把它们分别换算成对数后作 $\log M_i - \log [\eta]_i$ 图(以 $\log M_i$ 为纵坐标, $\log [\eta]_i$ 为横坐标), 可得一条直线. 直线引伸后, 与纵轴相交交点的截距为 $\log K$, 直线的斜率为 α , 求得 K 和 α 值后, 代入 Mark-Houwink 经验式, 即为该多糖的特性粘度-分子量换算方程.

使用换算方程时务必注意下列各点:

① 某多糖的换算式只适合于该多糖应用, 如前文所述, 不同种类或不同化学结构的多糖, 它们间的 K 值和 α 值往往有差异, 因此多糖 A 的换算方程不能用于多糖 B 的分子量换算.

② 样品的特性粘度测定所采用的实验条件, 务必与推导换算方程时所用条件相一致.

③ 多糖的分子量分布一般都较分散, 同一种多糖由于分子量分布情况不同, K 值或 α 值亦可能有差异, 因此, 检样的分子量分布状况需与推导换算式时所采用的相一致或相差不太多的情况下合适.

④ 分子量换算方程有其一定的换算范围, 超出此范围, 换算到的分子量值有一定偏差. 适用的分子量限制在 $\log M_i - \log [\eta]_i$ 图中的直线范围内, 若样品的特性粘度超出此直线范围, 则不适合作该样品的分子量换算, 因此对某一多糖来说, 它可以有多个分子量换算式, 如方程 A 适用于分子量 1 万至 10 万换算用, 而方程 B

乃应用于分子量 9 万至 20 万的换算。

【仪器】

乌氏粘度计：毛细管长度为 $140 \pm 5 \text{ mm}$ ，内径 $0.5 \pm 0.05 \text{ mm}$ 。B 球容积为 $3.35 \pm 0.5 \text{ mL}$ (图 1)，在 25°C ，用蒸馏水测定流出时间应在 120~180 秒间。

恒温水浴一套：可自行选料装配，选直径为 30cm 左右，高约 40cm 的玻璃缸，配置上电动搅拌器和维持恒温的装置，温度可调节 25°C 左右，并能将温度维持在 $\pm 0.05^\circ\text{C}$ 之内。

秒表：分度为 0.2 秒。

温度计：分度为 0.1°C ，用于测水浴的温度。

【操作】

样品烘烤至恒重后，精确称取 1~1.2g (称量精度 0.005g)，配成 50 mL (其浓度为 C_1)。此溶液经 3 号垂熔漏斗过滤，弃去初滤液，精密量取续滤液 10 mL，移放入乌氏粘度计 (图 34)，自管口 1 沿管壁加入，将粘度计垂直固定于恒温水浴中保温 10 分钟以上，使管内溶液温度与水浴温度平衡，然后测定溶液的流出时间。测定方法为：在管口 2 和管口 3 各接一根乳胶管，夹住管口 3 的胶管，自管口 2 处抽气，使检测液渐渐升入球 B，直至升到 B 球的刻度线 m_1 标线以上，先开放管口 3，再开放管口 2，使检样溶液在毛细管内自然下落，用秒表准确记录溶液下落所需时间，自球 B 的上标线 m_1 降至下标线 m_2 所需时间为 T_1 (秒)。然后，精密量取溶剂 5 mL 加入到粘度计中，将粘度计中的溶液稀释成浓度为 C_2 。添加溶剂的方法与加原样品溶液时相同。用同法测定其流出时间 T_2 (秒)。再依次精密量取溶剂 5 mL 和 10 mL，使粘度计中的溶液稀释为 C_3 和 C_4 ，并分别测定它们的流出时间 T_3 (秒) 和 T_4 (秒)，每次加入到粘度计中的溶剂，需经过



图 34 乌氏粘度计

3号垂熔漏斗过滤,弃去初滤部分,取用续滤部分,每次往粘度计中添加溶剂后,将粘度计轻轻摇动使加入的溶剂与溶液相混和,并经10分钟以上保温,方可测定流出时间。

读取每个浓度(C_1, C_2, C_3, \dots)的流出时间,需重复一次,前后2次的读数相差不超过0.2秒,取平均数。若前后二次相差超过0.2秒需作再次重复,测读其流出时间和取多次读数的平均数。量取溶液和溶剂可采用移液管吸取,移液管需经过标定,以免产生配液体积和浓度方面的误差,测试时的温度一般采用 $25 \pm 0.05^\circ\text{C}$ 的恒温水浴。

在检测样品溶液的粘度之前,先测定溶剂的粘度,其方法为:吸取溶剂约10mL,沿A球管壁加入粘度计,经10分钟以上保温,用测定溶液粘度的办法,测得溶剂的流出时间 T_0 (秒)。

粘度计中的原溶液(浓度为 C_1)经添加溶剂稀释后, C_2 的浓度为 $(2/3) \times C_1$; C_3 的浓度为 $\frac{1}{2} \times C_1$; 和 C_4 的浓度为 $\frac{1}{3} \times C_1$ 。

将各浓度溶液的相对粘度、增比粘度和比浓粘度的计算,汇集于表21,将表中的各比浓粘度与其相应浓度作图,可得一直线(图35)。在实际操作中,检样的浓度往往不是一个整数,这对作图很不方便,为了便于作图,可暂把它的浓度假定为一个完整数值,如1%,待作图和求得A点后,再将A除以样品的原浓度(C_1) (即把数字校正回来),其商为该样品的本质粘度(dL/g)或特性粘度(mL/g)。

表21 特性粘度测定中溶液的相对粘度、增比粘度和比浓粘度的计算

浓 度	相 对 粘 度	增 比 粘 度	比 浓 粘 度
C_1	$\eta_1 = T_1/T_0$	$\eta_{sp_1} = \eta_{r_1} - 1$	η_{sp_1}/C_1
C_2	$\eta_2 = T_2/T_0$	$\eta_{sp_2} = \eta_{r_2} - 1$	η_{sp_2}/C_2
C_3	$\eta_3 = T_3/T_0$	$\eta_{sp_3} = \eta_{r_3} - 1$	η_{sp_3}/C_3
C_4	$\eta_4 = T_4/T_0$	$\eta_{sp_4} = \eta_{r_4} - 1$	η_{sp_4}/C_4

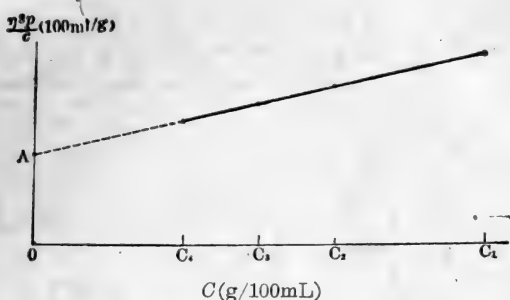


图 35 测定特性粘度时 $\eta_{sp}/c-C$ 图

【文献】

钱人元等, 高分子物的分子量测定. p. 25~47, 科学出版社, 1958.

中华人民共和国药典, 附录, 1977 年版.

(林大辑)

7. 高效液相色谱法测定多糖分子量

高效液相色谱技术中, 利用凝胶孔径来排阻特定大小分子的方法, 被称为排阻色谱法或凝胶渗透色谱法(简称 GPC)。按这种方法分离样品时, 样品分子与固定相表面之间无相互作用, 完全根据溶质分子能否渗透进入 GPC 柱填料颗粒的网孔, 而达到筛分大小分子的目的, 因此, 也叫分子筛。大分子通过 GPC 柱时, 完全被排阻在填料网孔之外, 只能在孔隙间的溶剂中流过, 它从柱上洗脱的体积为 V_0 ; 小分子则可以完全自由地进出填料颗粒网孔内的溶剂中(孔体积 V_i), 它从柱上的洗脱体积 $V_t = V_0 + V_i$; 在选择性渗透范围内的大小溶质分子, 其洗脱体积 V_e 一般应在 V_t 与 V_0 之间。

$$V_e = V_0 + (K_d \cdot V_i)$$

式中: K_d 为分配系数, 表示该溶质分子能达到的那部分网孔内的溶剂体积与填料颗粒网孔溶剂总体积之比, 即

$$K_d = (V_e - V_0) / V_i$$

在 GPC 中它表示溶剂的特性常数。GPC 法的示意图见图 36。

对于完全被填料颗粒网孔排阻的大分子, 因为 $V_e = V_0$, 则

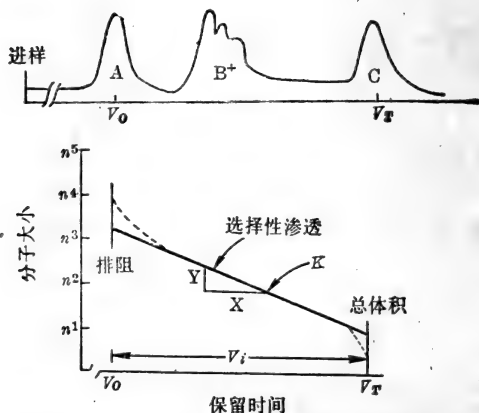


图 36 色谱图与相应的 GPC 校正曲线

$K_a=0$; 对于能自由进出网孔的小分子, $V_e=V_0+V_i$, 则 $K_a=1$. 在特定的 GPC 体系中 K_a 还随柱大小或形状而变, $K_a \cong K'$, K' 值总是在 $0 \sim 1$ 之间(选择性渗透).

若 $K_a > 1$, 则肯定有另外的机制在起作用, 例如溶质与填料发生吸附, 或使用混合溶剂时, 因凝胶内溶剂组成与流动相的溶剂组成在化学性质上有较大差异造成.

高效凝胶填料一般由刚性和半刚性的材料制成, 如果把填料在显微镜下观察, 可以看到表面具有一定网孔的大小颗粒, 粒度为 $10 \mu\text{m}$ 或更小的圆珠, 因而有一定比表面、孔容和孔径分布. 孔径可以从 $2 \sim 250 \text{ nm}$ 范围. 分子量小于 1000 时用 60 \AA 就可以; 孔径为 400 nm 时, 分子量在 7×10^6 也不被排阻. 所以分子量的测定范围很宽. GPC 填料性能有疏水性的, 如交联聚苯乙烯, 常用于分离分级脂溶性高分子化合物; 也有亲水性的凝胶(表 22), 常用于分离水溶性高分子化合物, 如蛋白质、酶和多糖等.

上述凝胶填料一般都可以分离多糖, 目前认为较好的是 Lonpak 系和 TSK 系的柱. Lonpak 系的柱主要用于分离多糖, 用水作洗脱剂. TSK 系柱既可以分离蛋白质, 又可以分离多糖, 用缓冲液如磷酸盐缓冲作洗脱剂. 这两类都有商品柱(日本昭和电工生产), 见表 23, 24.

表 22. GPC 水溶性填料

型 号	填 料 的 成 分
Bio-Gel P	聚丙烯酰胺凝胶
Bio-Gel A	琼脂糖凝胶
Porasil	去活化多乳硅胶
Bondagel	键合相硅胶, $\text{Si}(\text{RO})_n\text{CH}_3$
Lonpak	磺化聚苯乙烯-二苯乙烯凝胶
OHpak	聚乙烯醇凝胶
Sephadex	交联葡聚糖

表 23 Lonpak 系商品柱

型 号	排 阻 限	最大压力 (MPa)	应 用
Lonpak S-801	1000	3	单糖、双糖、三糖和低糖
S-802	5000	3	单糖、双糖、三糖和低糖
S-803	50000	3	多糖、淀粉、纤维素
S-804	500000	3	多糖、淀粉、纤维素
S-805	5000000	3	多糖、淀粉、纤维素
S-806	50000000	3	多糖、淀粉、纤维素

表 24 TSK 系商品柱

型 号	排 阻 限		柱 效	应 用
	蛋 白 质	右旋糖酐		
TSK G2000SW	500~6 万	500~2 万	16000/m	蛋白质、多肽、多糖、核糖体等
G3000SW	1000~30 万	1000~10 万	16000/m	
G4000SW	5000~100 万	5000~40 万	16000/m	

凝胶填料的耐高压性能,带来了高流量和高速分离效果,通常在 30 分钟内完成一次分析。这就使 GPC 法测定分子量具有比超速离心沉降法和经典的柱色谱法更为快速的优点,这对水溶性高分子化合物如多糖、蛋白质和酶等分子量测定特别有利,在很短时间内不易受霉菌的污染或促使蛋白质变性和酶的失活。

【仪器和试剂】

仪器: 高效液相色谱仪 Waters 244 型。

标准品: 葡聚糖(Dextran)分子量有 1180、3500、5700、10000、14700、42000、74500 和 200000, 还有葡萄糖、蔗糖(用于测 V_r) 和蓝色葡聚糖(用于测 V_0)。标准品最好不少于五个。

柱: μ -Bondagel E-linear (分子量范围 2000~2 000 000) 和 μ -Bondagel E-125(2000~50 000), 7.8 mm \times 30 cm.

洗脱剂: 双蒸馏水.

流速: 0.5 mL/min.

压力: 6.89×10^9 Pa.

检测器: RT 8X.

微处理机: M-730 型, Waters.

温度: 环境温度.

【操作】

(1) 柱的标定:

标准溶液的配制: 标准溶液的浓度主要取决于分子量, 分子量在 20 000 以下的用洗脱剂配制成 0.25%, 30 000~200 000 的配制成 0.1%, 400 000~2 000 000 的配制成 0.05%, 2 000 000 以上的配制成 0.01%, 要尽量降低溶液粘度, 并保证试样完全溶解.

进样: 进样体积通常每次 50 μ L 为好, 最多不超过 200 μ L, 以保证不改变分子量分布. 进样次序往往由小分子到大分子, 分别一个一个地进入, 或为节省时间大小分子搭配合并进样, 总之要保证正确地记录下与分子量相应的保留时间(RT).

绘制校正曲线: 将测得的保留时间综合如下:

葡聚糖分子量(\bar{M}_w)	保留时间(RT)(分)
葡萄糖	12.11
蔗糖	12.11
1180	11.62
3500	10.59
5700	10.30
10000	9.66
14700	9.40
42000	8.40
74500	7.95
200000	6.59
蓝色葡聚糖	6.30

在单对数坐标纸上作出 $\log \bar{M}_w - RT$ 校正曲线(图 37), 以供计算分子量用。或者将 \bar{M}_w 与 RT 按微处理机的 GPC 法输入计算, 得相关系数为 0.9957, 校正曲线方程:

$$\log \bar{M}_w = -0.4327047 \times 10^3 + 0.3037426 \times 10^6 (RT) - 0.606171 \times 10 (RT)^2 + 0.3843292 (RT)^3$$

按标定柱的色谱条件注入被测样品, 就能自动计算打印出分子量结果。该方程也可供手工计算某一保留时间的分子量, 以监测处理机是否正常工作。

(2) 多糖的分子量测定: 用 GPC 法测定多糖分子量时, 首先要选择合适的柱。每根柱的孔径不同, 分离分子量的范围亦不同, 选用哪一种性质的填料和用多大的排阻限和渗透限, 主要取决于被分离溶质的性质和可能的分子量大小。为提高柱

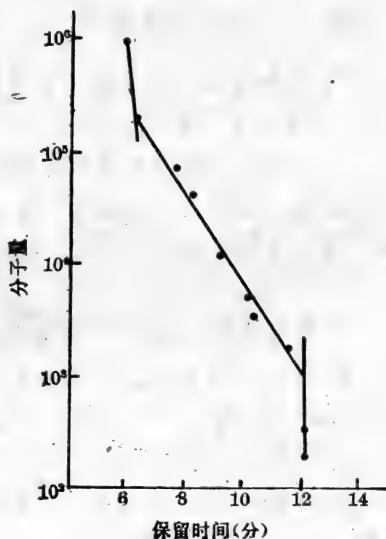


图 37 $\log \bar{M}_w - RT$ 校正曲线

效和分离度, 常用几根孔径大小不同的柱串联起来, 或几根相同的柱串联, 以及用一根柱再循环操作。在串联柱时, 孔径大的靠近进样器一端, 孔径小的靠近检测器一端。上述提供的水溶性填料一般都可以分离多糖。分离多糖时常用水或缓冲液作洗脱剂。由于溶解度的关系, 高聚物的分离温度很重要, 尤其对高分子有机化合物。对于多糖等水溶性大的分子在常温下就可以了。

在选定柱、溶剂等色谱条件后, 用已知分子量的标准品标定柱。再按标定柱的条件分析未知样品。

被分析的样品按标定柱的条件进行色谱, 把样品峰分割成若干条(图 38), 从 $\log \bar{M}_w - RT$ 校正曲线上查出每条保留时间 t_R 所

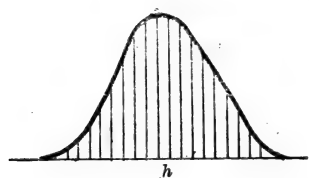


图 58 样品峰切割示意图

对应的分子量 M_{wi} , 代入下列公式:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum h_i \cdot M_{wi}}{\sum h_i}$$

和

$$\bar{M}_n = \frac{\sum h_i}{\sum \frac{h_i}{M_{wi}}}$$

算出每条 h_i 与相应分子量乘积之和除以 h_i 的总和, 得重均分子量 \bar{M}_w . 或依法算出数均分子量 \bar{M}_n .

目前高效液相色谱仪通常都带有微处理机或计算机, 它可以记录谱图, 同时又可以通过预置的计算公式或自编程序, 将标准品的 \bar{M}_w 与相应的 RT 输入, 进样后自动计算, 打印出报告结果.

因常用的 GPC 法有许多局限性, 目前已有用激光光散射仪作为 GPC 测分子量用的附加检测器, 通过两种检测器的数据直接测出样品谱图中每个点的绝对分子量, 不需要用标准品校准柱, 克服了有时因样品大分子与标准品的化学组成、分子结构和分子体积不同而带来的误差, 从而进一步提高了测量精度和速度, 这是分子量测量技术的又一大进步.

(3) 应用实例——植物多糖的分子量测定

柱: TSK, G3000 pW, 7.5 mm × 60 cm.

洗脱剂: pH 6.8 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液.

流速: 1.0 mL/min.

压力: 3.1 MPa

检测器: RI 8X.

温度: 环境温度.

用已知分子量的葡萄糖标定柱, 分子量与保留时间的线性相关系数为 0.99, 用微处理机计算分子量, 其结果与超离心沉降法的分子量比较见表 25, 看来有一定误差, 有待于进一步选择色谱条件.

表 25 超离心沉降分子量与 GPC 分子量比较

超离心沉降分子量 \bar{M}_s	GPC 分子量 \bar{M}_p	
	\bar{M}_w	\bar{M}_n
4200	1795	1750
8500	6870	4414
20000	2790	1919

H. J. Rodriguez 等用 0.5 mol/L Na_2SO_4 作洗脱剂, 在 Lichrospher SI 100 柱上测定肝素分子量, 得到与经典法比较一致的结果。

【讨论】

(1) 在高效液相色谱的固定相中, 凝胶填料相对地较软, 使用时特别注意不超过额定压力, 以免改变原来孔度大小。为了减小压力尽量采用低粘度的溶剂, 如果样品不怕热的话, 也可以适当提高柱温, 使粘度减小, 柱压降低, 加快分离速度。

(2) 要注意样品、柱填料和溶剂之间的相容性, 以免发生沉淀把柱堵塞。为抑制细菌生长, 洗脱剂中常加入 0.01% 的叠氮化钠。所用的洗脱剂一定要用 0.5 μm 微孔薄膜过滤, 或 G-6 耐酸漏斗过滤。

(3) 按理凝胶色谱填料的表面与样品分子间无相互作用, 但实际上两者不可能都是惰性的。在水作溶剂时, 分子量 $10^4 \sim 10^5$ 的植物多糖在 μ -Bondagel 柱上的保留时间预计该在 8~9 分钟, 实际却在 6.5 分钟左右, 其分子量比超离心的高一个数量级。这可能由于带酸性基团的分子不易进入预期大小的孔径内, 而表现出排阻在外的现象, 用一定浓度的盐溶液作洗脱剂, 此种情况有所改善。所以, 多糖的分子构型、带电荷情况等, 在选择色谱条件时都应加以考虑, 从而调整溶液的 pH、离子强度和离子种类等, 以减小离子间的静电效应, 以便正确地实现排阻色谱。

【文献】

Himmel, M E., et al., *J. Chromatogr.* **210** (3): 443~452 (1981).

(陈铁兰 马立人)

8. 多糖的纯度鉴定

纯度的概念是随着分离分析手段的进展而不断发展的。当一种方法已不能将某样品进一步分离时，即称为该方法下纯的样品，例如，色谱纯、电泳纯、超离心分析纯等。多糖是大分子，它的纯度标准不能用通常小分子化合物的纯度标准来衡量。因为即使是多糖纯品，也存在微观不均一问题。它的纯度只代表某一多糖的相似链长的平均配布。我们通常所说的多糖纯品实质上是一分子量范围的均一组分。目前常用的纯度鉴定方法有三种：超离心、高压电泳及凝胶层析。也有人将旋光测定作为一种纯度鉴定的标准。通常一种多糖的均一性必须要有上述二种以上方法的结果才能肯定。

(i) 超离心法

微粒在离心力场中移动的速度与微粒的密度、大小与形状有关。如果某一种多糖在离心力场作用下形成单一区带，则表明其分子的密度、大小和形状相似。

【仪器和试剂】

0.1 mol/L NaCl.

0.1 mol/L Tris-盐酸缓冲液.

分析用带照相设备的超速离心机。

【操作】

将多糖样品溶于水或 0.1 mol/L NaCl 或 0.1 mol/L Tris-盐酸缓冲液中，使多糖浓度为 1~5%，置离心管中，待离心机转速达恒定后（一般为 60000 r/min），每间隔 5~10 min 照相一次，共照相五次，从峰的数目和形状判断该多糖的均一性。

【文献】

Sugiwra, M. et al., *Japan J. Pharmacol.*, **90**:503~513 (1980).

(ii) 高压电泳法

多糖在电场作用下,按其分子大小、形状及其所负电荷的不同而移动不同的距离。中性多糖虽不带电荷,但它分子中若有顺式的邻位二醇,就能与硼砂形成复合物而带电荷。不同多糖的位阻因素决定了多糖与硼砂形成不同的复合物。所以在电场作用下,多糖的相对迁移率常因复合物的不同而不同。用玻璃纤维纸作载体时,电渗作用较大,中性多糖的硼砂复合物的总的电泳方向是向负极移动的。

【试剂和仪器】

玻璃纤维纸(Whatman, Glass Microfiber, Paper GF/B 或 GF/83)。

高压电泳仪。

pH9.3的硼砂缓冲液(0.025 mol/L 硼砂: 0.1 mol/L NaOH =1:1)。

【操作】

点样于玻璃纤维纸上,纸的宽度应小于5cm(否则电流强度太大,纸易烧断)。用硼砂缓冲液润湿玻璃纤维纸,置于高压电泳槽中,开启冷却器(可用循环冷水),开电源,慢慢升高电压,使达30~50 V/cm,开始计时,电泳时间30~120 min。电泳完毕后,使玻璃纤维纸阴干,喷对-甲氧基苯胺显色(120°C, 20 min)。显色后呈一个斑点,则证明为均一组分。或者,亦可不经显色,直接将纸条按一定长度(1cm)剪下,分别放入试管中,用水洗脱,然后用酚-硫酸法比色测定。

【讨论】

玻璃纤维纸上点样浓度很重要,太稀不显迹,太浓会拖尾巴,所以必须预先试验浓度。若没有玻璃纤维纸,可用纯丝的绸布代替之。酸性多糖可以用聚丙烯酰胺凝胶电泳或纤维素醋酸酯薄膜电泳。

【文献】

Lindberg, B. et al., *Methods in Carbohydr. Chem.* 7:116 (1976)。

(iii) 凝胶过滤法

多糖分子的大小和形状不同,在层析柱中的移动速度也不同,从分部收集中出现的峰的多少和形状,判断该多糖的纯度。

【试剂和仪器】

0.02~0.2 mol/L NaCl.

0.04 mol/L 吡啶-0.02 mol/L 醋酸(1:1).

葡聚糖凝胶(Sephadex).

HL-1 恒流泵.

ZBS-1 自动部分收集器.

【操作】

估计被测多糖的可能分子量,先选择合适的凝胶.对于 Sephadex 应选择 $G > 50$ 的各种规格.将凝胶溶胀、装柱,用缓冲液平衡一天.上样,分部收集流出液.例如,选用直径为 1.4 cm 的玻璃柱,装载 Sephadex G-200,柱高为 37 cm,用 0.05 mol/L NaCl 平衡一天,流速为 5~6 mL/h,然后样品上柱(10 mg),仍保持上述流速,按 3 mL 体积分部收集.用酚-硫酸法测定,画出流出体积与糖浓度的关系曲线.若为形状对称的单一峰,则表示为均一组分.

【讨论】

凝胶装柱必须一次装毕.平衡流速不应大于洗脱时流速.装柱高度与直径之比应在 20~30 之间.

【文献】

方积年等,生物化学及生物物理学报,12: 79 (1980).

(iv) 旋光测定法

不同分子量多糖在不同浓度的低级醇中具有不同溶解度.在一定浓度的低级醇中,分子量大的较分子量小的溶解度为小.所以,如果不同浓度的低级醇中得到的多糖沉淀的比旋度相同,则证明该多糖为均一组分.

【操作】

多糖溶于水,在搅拌下加入乙醇,使乙醇浓度达 10% 左右,离心取得沉淀.然后向上清液中续加乙醇,使乙醇浓度达 20~25%,

离心得第二次沉淀。前后两次沉淀分别干燥，相同条件下测定比旋度。

(方积年)

9. 超过滤法及其在多糖化学研究中的应用

超过滤是在常规微粒过滤基础上发展起来的细微粒子过滤新技术，是膜法分离的一种。通过孔径不同的半透膜，借助于外加压力所造成膜两侧的压力差，截留 $10\sim 100\text{ \AA}$ 的粒子。这样大小的粒子可以是溶液中的大分子或胶体溶液中的胶悬体，因此超过滤又名分子过滤。由于六十年代初成功地制造了高通量的超过滤膜和近十多年来新型高分子半透膜的发展，以及改进的超过滤器的不断出现，使超过滤技术迅速地发展到了实用阶段。超过滤技术具有设备简单，操作方便，不需加热或低温操作，不经任何化学物质处理，没有相的转移等优点，所以在化工、制药和食品等工业中以及在医学、生物学和环保等领域中都得到了广泛的应用。

近年来在多糖化学研究中也越来越多地采用超过滤技术，这是因为在多糖化学研究中能否分离出均一的多糖是非常重要的。可是提取的粗制多糖的水溶液大多是胶体溶液，粘度大而且不稳定，其所含组分的分子量差别悬殊，不同分子量的组分之间理化性质又很相近，所以制备出均一的多糖确有不少困难。尽管采用溶剂分步沉淀法、季胺盐沉淀法、盐析法和电泳法等可能制备出均一的多糖，但这些方法分离量甚少有时还会引起多糖的降解；而采用超过滤技术进行多糖的分离纯化，收率高且极少破坏。本文就实验室中应用超过滤技术的一般原理、超滤装置、超滤膜、操作注意事项和在多糖化学研究中的应用实例作一概要介绍，以期在多糖化学研究中能在更广的方面应用这一技术。

① 超过滤的一般原理：

超过滤原理示意图 39，将欲分离纯化的含有两种（或两种以上）分子量不同的溶质 a 和溶质 b 的溶液，用变速管泵或气体压力把溶液输送到超过滤系统中，由于流体静压的作用，溶液中的溶

质被压到超过滤膜的表面，这时小于膜分子量截留值的溶剂和小分子透过膜形成滤过液，即含有小分子溶质 b 的溶液。而大于膜

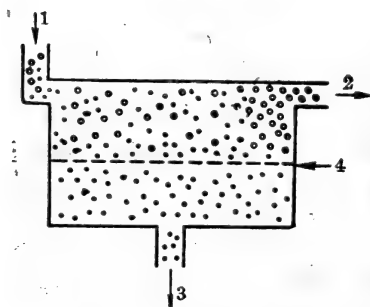


图 39 超过滤原理示意图

1. 含有溶质 a 、 b 的受压溶液
2. 含有溶质 a 的浓缩液
3. 含有溶质 b 的滤过液
4. 超过滤膜

分子量截留值的大分子被膜所截留，如果采用循环式超过滤系统，被截留的大分子溶质 a 随着加压溶液的流动被推出过滤系统形成滤不过液，即主要是含有大分子溶质 a 的浓缩液。这个过程反复进行多次，最终达到溶液中分子量不同的溶质 a 和溶质 b 的分离或纯化的目的。

但在实际操作中随着过滤过程的进行，过滤速度逐渐变慢，分离效果也明显变差，其原因

是由于被截留的大分子在膜表面沉积成一层凝胶层，即所谓“浓差极化” (concentration polarization) 现象，同时沉积的大分子又向溶液中扩散，当沉积与扩散达到平衡时，恒定的过滤速度可以保持。如果在过滤速度稳定后仍继续加大压力，平衡被破坏，结果沉积速度大于扩散速度，凝胶层不断地增厚压紧，这时不仅是过滤速度减慢，而且使小于膜分子量截留值的小分子也被截留，明显地影响了分离效果。产生“浓差极化”现象的倾向大小是同很多因素有关，为此人们设计了各种超过滤器减少“浓差极化”现象的产生，其中如装有搅拌器或振动片的搅拌式或带有导流槽的缝道式超过滤器，由于增加了液体流动的剪切力，过滤时不容易产生“浓差极化”，提高了过滤效果。美国 Millipore 公司的 Pellicon 超过滤系统则采用了“切线流” (tangential flow) 技术，效果也很好，就是在两片超过滤膜之间用一片聚酯纤维制成的网状截留隔板隔开 (图 40)，当加压的溶液水平地流过截留隔板时，液体以曲折波动方式迂回在网状截留隔板的上下 (图 41)，即产生所谓“切线流”，这种

迅速的但又是温和的波状流提供了较高的过滤速度，而把损伤易变分子或细胞的剪切力减到最小。所以 Pellicon 超过滤系统可以用于干扰素、酶和病毒等的浓缩，很少或不失活，这是其突出的优点。

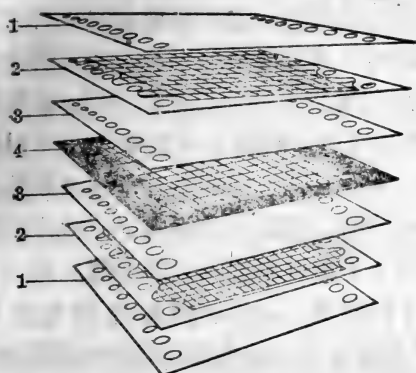


图 40 Pellicon 超过滤膜的组合单元

1. 聚乙烯垫片 2. 网状分隔板
3. 超过滤膜 4. 网状截留隔板

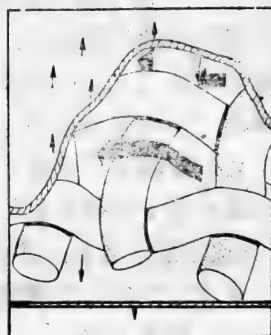


图 41 “切线流”示意图

② 超过滤器:

为工业和实验室应用而设计的各种超过滤器的结构和特点已有详细介绍的资料，不再赘述。在此仅介绍 Pellicon 超过滤系统(图 42)的结构特点，其设计在减少“浓差极化”和清除样品溶液中的颗粒方面有独到之处。

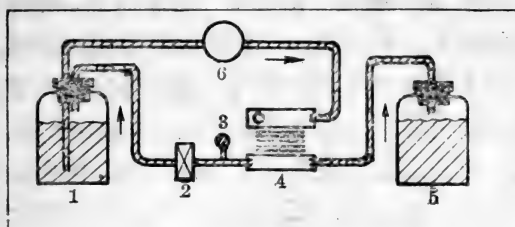


图 42 Pellicon 超过滤系统

1. 样品溶液 2. 针状阀 3. 压力表
4. 超过滤池 5. 滤过液 6. 泵

Pellicon 超过滤系统的主要部件是变速管泵和超过滤池，超过滤池由两块聚甲基丙烯酸酯塑料制成的歧管板(manifold plate)中间夹超过滤膜构成，在歧管板上有两套错开的过滤通道，即五孔通道和四孔通道，当两块歧管板紧紧地夹住超过滤膜时，板上的五孔通道上的五个孔正好对准超过滤膜上用密封层围着的五个孔；板上四孔通道上的四个孔正好对准超过滤膜上未被密封层围着的四个孔上。由于膜上的密封层起着控制液流方向的作用，结果五孔通道同膜的外侧相通，而四孔通道仅同膜的内侧相通。当用泵将样品溶液打入上层歧管板右侧的五孔进样通道时，溶液经膜上密封层围住的五个孔进入膜的外侧，在膜的外侧由于压力作用使小于超过滤膜分子量截留值的分子透过膜进入膜的内侧，而大于超过滤膜分子量截留值的分子被截留。这样在膜的外侧溶液被阻，并由下层歧管板左侧的五孔滤不过液通道流出即形成截留液。通过膜滤过的液体在膜的内侧流向下层歧管板右侧的四孔滤过液通道流出形成滤过液。由于膜外侧截留液的五孔通道是斜对向下流动的，结果使截留液的流动更为有力，有利于清除“浓差极化”现象。这样设计的超过滤器适合粘度较大的溶液的过滤，如蛋白质、多糖溶液等的分离纯化。

③ 超过滤膜：

超过滤膜是超过滤系统的核心部分，是由高分子材料制成的，如醋酸纤维素、聚砷、聚丙烯腈、聚酰胺、聚四氟乙烯等，但应用最多的是纤维素膜和聚砷膜。由于工艺不断改进，现在已能工业生产各种大小规格和各种不同分子量截留值的超过滤膜。超过滤膜的规格是以分子量截留值为标准的，也就是说溶液中溶质分子量超过膜分子量截留值时，这种溶质的大部分能被截留。当然分子量截留值实际上是近似值或统计平均值，因为球形分子就比相同分子量的线形分子易过滤，低分枝的分子就比相同分子量的高分枝的分子易过滤。

超过滤膜的结构大致有不对称膜、对称膜和介于二者之间的膜，过滤效果比较好的是具有双层结构的不对称膜。所谓不对称

膜是指膜的正反两面的结构不同，表面是紧密光亮而又很薄(0.1~10 μm)的表皮层，这层是超过滤膜主要起截留作用部分，在表皮层下面是多孔的支撑层(100~200 μm)，主要起支撑作用。Pellicon 超过滤膜就是由纤维素或聚砜制成的不对称膜，是以标称分子量极限(Nominal Molecular Weight Limits 缩写成 NMWL)作为膜截留的标准。由醋酸纤维素制造的 PS 系列膜，特点是通量大但很脆易碎；由聚砜制造的 PT 系列膜，特点是耐热耐酸碱不易碎但通量比 PS 系列小。Pellicon 超过滤膜有数层膜粘合在一起的组合(Cassette)膜(过滤面积 0.46 m^2)和单张的片膜(过滤面积 0.023 m^2)，可根据溶液量的多少分别选用。

④ 操作中注意事项：

⑧ 适宜过滤条件的选择：

操作压力：一般说来，压力大通量大。但如果超过滤后，浓缩液浓度较大或粘度过大时，压力过大不仅不能增加通量，相反却由于加重“浓差极化”现象，通量反而变小。因此操作压的选择得当是提高超滤效果的重要环节。

温度：超过滤通常是在室温进行，但有的溶液粘度较大也可加温(50°C左右)操作，温度高粘度降低且易清除沉积的大分子，在一定程度上升温可增加通量。然而遇热易变的物质过滤时还是室温或低温操作为宜。

滤过液和滤不过液的流速比例：应用循环式过滤器时，如果滤过液流速大于滤不过液流速，则使冲击沉积在膜表面的大分子的冲力减小，凝胶层不易清除而降低了通量。一般二者流速应控制大致相等或滤不过液的流速要稍大于滤过液的流速。

过滤的溶液应保持适当的浓度：在超过滤过程中，由于溶剂被大量滤掉，溶液浓度加大，粘度也变大，溶解度小的物质容易析出，这些都促进了大分子物质在膜表面的沉积，降低了过滤通量。因此滞留溶液应加入溶剂稀释到适当浓度后再循环过滤，超滤过程才能够正常进行。

⑨ 超过滤膜的清洗：当超过滤膜被阻塞而导致滤过液流速显

著降低,在更换新的分离溶液时,为了避免样品间交叉污染,为干燥贮存膜而需要彻底清洗膜,在这些情况下都要进行膜的清洗。

超过滤膜的清洗方法有两种,一个方法适用于非循环的超过滤系统,从系统中取下超过滤膜,浸泡在蒸馏水中令膜表面上的沉积物充分溶胀,然后用柔软的海绵擦拭除去沉积物(一定要小心不要使膜破裂,特别是纤维素膜很脆),再用 1 mol/L 盐溶液或 5% 醋酸溶液或适当的酶消解,以彻底清除阻塞在膜孔中的蛋白质或无机盐类,最后用蒸馏水漂洗干净后贮存。另一个方法适用于循环式超过滤系统,如 Pellicon 循环式过滤系统,膜不需从系统中取出来,可直接在系统中清洗,根据阻塞的情况大致有三种:

超滤粘度小的稀溶液用过的膜:这种膜阻塞轻,仅用蒸馏水或缓冲液清洗即可,清洗时关闭滤过液出口,打开滤不过液出口,用泵加压把蒸馏水或缓冲液压入过滤膜,反复冲洗膜外侧的沉积物,然后打开滤过液出口冲洗膜孔的阻塞物。最后从滤过液出口用泵把冲洗液压入膜中,从膜内侧反向冲洗,直至膜孔阻塞物彻底清洗干净为止。

膜表面残留物较粘时:用泵将 1 mol/L 盐溶液或 5% 醋酸溶液压入过滤膜,然后关闭所有出口密闭放置过夜,再用蒸馏水反复清洗除盐或酸和沉积物,最后按上法冲洗干净。

浓缩蛋白质或胶体溶液使用过的膜阻塞很牢固时:可用适当的酶消解法清除阻塞物,然后按第一种法洗净。

③ 超过滤膜的消毒和贮存:为了在超滤过程中保证无菌和防止贮存时细菌生长,超过滤膜在应用前或应用后都应进行消毒处理。常用的纤维素膜和聚砜膜可在过滤系统中直接用环氧乙烷或 2% 福尔马林充满过滤膜,密闭放置。临用前用无菌的水或缓冲溶液加压冲出消毒的气体或液体,然后反复冲洗干净后即可进行超滤或贮存。

超过滤膜的贮存可以不从超滤系统中取出,直接使消毒的气体或液体充满,密闭贮存,这样保证超过滤膜长期贮存不会发霉变质。如果从超滤系统中取出超过滤膜,可浸泡在 1% 乙醇或 2%

福尔马林溶液中贮存。也可把彻底清洗干净的超过滤膜室温风干后放在贮存盒中干燥贮存。

⑤ 超过滤在多糖化学研究中的应用实例:

⑧ 多糖的分子量分级:一般提取的多糖体大多数都是高分散性的,分子量分布范围较宽,不适宜进行化学分析。因此首先要采用种种方法以减少分散度,使分子量在较窄的范围内分布,也就是制备均一的多糖。多糖纯化的方法尽管很多,但均较麻烦,有时引起多糖的降解。当应用具有不同分子量截留值的超过滤膜进行超过滤时,则可快速简便地将高分散的多糖体分成几个分子量不同的组分,达到分子量分级的目的。

应用 Millipore 公司生产的 Pellicon 超过滤系统及其组合膜 PTHK 000 05 (NMWL 100 000), PTGC 000 05 (NMWL 10 000) 两种膜超过滤和透析袋透析进行柴胡多糖的分子量分级。

将柴胡粗多糖溶于水,用变速管泵以 0.1 MPa 的压力把样品溶液打入孔径为 $1\mu\text{m}$ 的 Fluorogard 滤棒 (Millipore 公司) 进行分级前的预过滤,滤除多糖溶液中可能存在的大颗粒,然后将澄清的溶液用管泵打入 Pellicon 超过滤系统,首先以 0.1 MPa 的压力通过 PTHK 000 05 超过滤膜,得滤不过部分 (I)。滤过部分再以 3 kg/cm^2 压力通过 PTGC 000 05 超过滤膜,得滤不过部分 (II)。滤过部分通过透析袋室温透析,得透不出的袋内部分 (III) 和透出的袋外部分 (IV)。这 4 个部分通过超速离心法测其分子量与估计分子量基本相符 (表 26)。

表 26 超过滤分级柴胡多糖各部分的分子量

分 级 部 分	估计分子量*	超离心法测得分子量
I	10 万以上	100955
II	1 万~10 万	28782
III	5 千~1 万	8099
IV	5 千以下	1112

* 根据超过滤膜的 NMWL 值和透析袋一般认为可透过分子量大约在 5000 左右。

其中部分(III)通过葡聚糖凝胶 G75 柱层析, 扩孔硅胶柱层析示差折光检测和超速离心均显示一个单峰, 表明(III)是均一成分。然而部分(IV)用同样方法检测则有几个峰, 证明 IV 是不均一的。

① 多糖的脱盐: 从植物中提取的多糖都含有相当数量的无机盐和小分子糖类, 尤其是分子量小于 5000 的小分子多糖所含无机盐更多。因为分子小又不能用透析方法除盐, 用其他方法虽能脱盐但方法烦琐。而用分子量截留值小的超过滤膜进行超滤, 无机盐及小分子量的糖均被滤掉, 就很方便。

应用 Millipore 公司生产的片膜 PSAC OHV-10 (NMWL 1000), 对柴胡小分子多糖进行脱盐处理。

柴胡小分子多糖(IV) (见实例 1) 含有较多的小分子糖类和无机盐, 按药典法测其灰分值可高达 47%, 用蒸气压法测其分子量为 1095。但是当把(IV)溶于水的水溶液以 0.35~0.4 MPa 压力打入 PSAC OHV-10 超过滤膜进行超滤, 滤不过部分用水稀释后再过滤, 反复 4~5 次, 最后滤不过部分乙醇沉淀后得部分(V)。干燥的多糖(V)再测灰分值仅有 8%, 测分子量为 3400。这结果说明通过分子量截留值小的超过滤膜进行小分子量多糖的超过滤, 不仅无机盐被大量除去而且小分子糖也被滤除, 使分子量分布更集中了, 多糖被进一步纯化了。

② 多糖溶液的浓缩: 多糖提取液一般都是浓度稀体积大, 因此在多糖分离前首先要进行浓缩, 但通常的浓缩方法都是加热情况下进行的, 应用超过滤法则完全可以在室温达到快速大量地浓缩多糖溶液。

应用 Amicon 公司的 Amicon thin-channel 超过滤系统 (TCF-10) 和 UM-10 超过滤膜 (具有亲水性, 中等流速, 分子量截留值 10000) 进行玉米粉水解得到的玉米浆的浓缩。

玉米浆 DE-43 的主要组成是葡聚糖, 但浓度只有 0.47%, 而且还有相当数量小分子糖类。为了浓缩纯化, 在 UM-10 膜上以 2.76×10^5 Pa 的压力, 平均流速 90 mL/h 进行超过滤, 得滞留液

54 mL 和滤过液 768 mL, 滞留液体积大为减少. 然后通过 Bio-Gel P-2 凝胶柱层析测定滞留液和滤过液糖含量, 用 5 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) (含有 0.01% 叠氮化钠) 洗脱, 流速 30 mL/h, 10 mL 一部分进行分步收集, 酚-硫酸法测糖含量, 以糖含量与洗脱体积作图得到洗脱曲线, 同玉米浆 DE-43 的洗脱曲线比较, 表明滞留液中低分子量糖比玉米浆 DE-43 原液减少了, 而滤过液中的低分子量糖比玉米浆 DE-43 原液明显地增加, 通过降低低分子量糖的比例达到浓缩和纯化的目的.

④ 多糖分子量的测定: 超过滤法测多糖的分子量是应用适宜的分子量截留值的超过滤膜, 以各种已知分子量不同的多糖作标准进行超滤测百分滤过量, 然后以百分滤过量对分子量作图得出标准曲线, 在相同超过滤膜和相同测定条件下测定样品的百分滤过量, 从标准曲线上即可求出近似的分子量.

应用 Amicon 公司生产的 Amicon 超过滤器 (Model MMC, 8 chambers) 和超过滤膜 PM-10 (分子量截留值 10000), XM-50 (分子量截留值 50000), XM-110A (分子量截留值 100000) 测定香菇菌丝多糖的近似分子量.

从人工培养的香菇菌丝提取的多糖是甘露聚糖. 粗制多糖经 Ecteola-纤维素柱层析和 Sephadex 柱层析纯化的精制多糖 KS-2, 具有明显的干扰素诱导作用和抗肉瘤-180 作用. 为测定 KS-2 的分子量, 首先将已知分子量的各种多糖溶于水或 0.15 mol/L NaCl (溶于 0.01 mol/L, pH 7.2 的磷酸盐缓冲液中), 制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 各取 5 mL 置 Amicon 超过滤器中超滤, 收集 2.5 mL, 取 0.5 mL 测糖含量, 比较滤前及滤后的糖含量, 算出百分滤过量 (三次平均值). 以百分滤过量对分子量作图得出三种膜的三条标准曲线 (图 43). 再用 KS-2 在三种膜上和相同测定条件下进行超滤, 结果 PM-10 XM-50 膜基本上完全截留 KS-2, 而 XM-110A 膜适合于 KS-2 的分子量测定. 从 XM-110A 膜上测得 KS-2 的百分滤过量, 然后再从 XM-110A 的标准曲线上得出 KS-2 的近似分子量约 $6 \times 10^4 \sim 9.5 \times 10^4$.

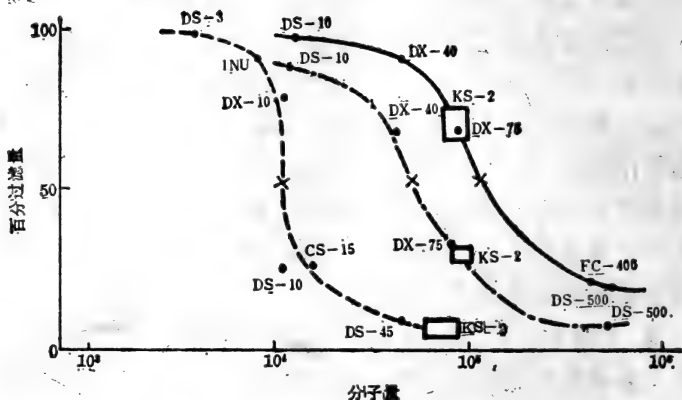


图 43 超过滤测 KS-2 分子量

----- 在 PM-10 上的标准曲线
 - · - · - 在 XM-50 上的标准曲线
 ———— 在 XM-110A 上的标准曲线
 × 50% 滤过量 □ KS-2 的百分滤过量

超过滤是一种效率很高的分离技术，设备简单，操作易掌握。唯制备孔径均匀的超过滤膜要求较高的技术条件，铺制符合要求的面积大的膜更不容易。国外已有几家公司生产各种规格的超过滤膜商品，国内仅有试制产品还没有工业产品出售。国内有些单位用研制的或自己手工铺制的超过滤膜分离纯化 mRNA、蛋白质和酶。根据不同的需要在多糖化学研究中试用手工制膜也是可能的。尽管超过滤技术用于多糖分离、纯化和鉴定的文献资料尚少，但由于超过滤技术具备独特的优点，今后这一技术必将在多糖的化学研究中得到更为广泛的应用。

【文献】

克莱德·奥尔(邵启祥译)，过滤理论与实践。国防工业出版社，第 395 页，1982 年。

Millipore Corp. Industrial Process Catalogue. 65.

刘国良等，医药工业。(8): 23 (1982)。

Winiska, R. D. et al. *J. Food Sci.* 45(5): 1259 (1980)。

Fujii, T. et al. *J. Antib.* 31: 1080 (1978)。

(耿俊贤 马立人)

(二) 糖的红外光谱、质谱和核磁共振

1. 糖的红外光谱法

红外光谱区域通常是指波数(ν)为 4000 cm^{-1} 至 200 cm^{-1} 的中红外区,用这样的红外光通过样品,再测量在各种波数下透过样品的光的强度,由仪器记录下来的曲线,即是红外光谱,其横坐标是波数,纵坐标是光的透射率(图 44)。在作定性用的谱图中,一般是不标出纵坐标的。

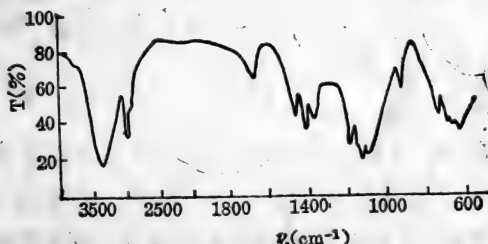


图 44 纤维素的红外光谱

红外光谱图上每一个吸收峰,都相应于分子中原子或官能团振动的情况。每一种化合物都具有其特殊的红外光谱(高分子化合物除外),因此,利用红外光谱可以帮助我们进行一些复杂化合物的定性及定量分析,检验分子中一些官能团和氢键的存在。当然,仅凭红外光谱一种手段是难以确定一种未知化合物的结构的,但对于已知化合物,借助于标准图谱是极易检识的。

现在,红外光谱法是有机化学和高分子化学研究中不可缺少的工具。五十年代,曾对糖类的红外光谱进行过广泛的研究,如不同糖的鉴别,进行微克级的定量测定,取代基的识别等等。过去曾有人认为红外光谱法在糖化学中用处不大。近十多年来,糖的生化(主要是多糖、寡糖和糖蛋白)研究引起了人们的重视,红外光谱技术也有了很大的发展。红外光谱法在糖类研究中的应用又增添了:识别吡喃糖和呋喃糖;确定多糖中各种吡喃糖的糖苷键的构型;在多糖分子中若存在甘露糖苷,则一定有 810 及 870 cm^{-1} 的特征吸收峰。另一个重要应用是取代多糖的定量分析,这对于很难找到合适溶剂的取代多糖的结构研究十分重要。

红外光谱法不破坏样品，这对于极难获得的糖的微量样品尤为重要。

要解析一张谱图，必须了解红外光谱的三个特征：谱峰的位置（用波数 ν 表示）是指示某一基团存在的最有用的特征；谱峰的形状往往也能提供有关基团的一些信息，如酰胺的羰基 ($\text{C}=\text{O}$) 和烯类的碳碳双键 ($\text{C}=\text{C}$) 均在 1650 cm^{-1} 附近有吸收，但酰胺的 $\text{C}=\text{O}$ 大都形成氢键，其谱峰较宽，而烯类的 $\text{C}=\text{C}$ 谱峰较窄，可以此区别；一种化合物的特征谱峰的强度可用来进行定量。

解析图谱，必须掌握如下的知识：

① 糖类的官能团分析：

$\text{O}-\text{H}$ 、 $\text{N}-\text{H}$ 和 $\text{C}-\text{H}$ ：糖类存在着分子间或分子内的氢键， $\text{O}-\text{H}$ 的伸缩振动在 $3600\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ 出现一种宽峰。酰化或醚化后，这组峰会消失；如果是部分羟基被取代，则这组峰相应减弱。一般说来，没有氢键的二级 $\text{O}-\text{H}$ 其吸收峰在 3630 cm^{-1} 附近，分子内的氢键在 3560 cm^{-1} 附近，分子间的氢键在 3400 cm^{-1} 以下。

$\text{N}-\text{H}$ 也在这个区域有伸缩振动，往往与 $\text{O}-\text{H}$ 难以区分。在有氢键的情况下， $\text{N}-\text{H}$ 的吸收峰要稍低于 $\text{O}-\text{H}$ 的波数，可以此加以区别。

$\text{C}-\text{H}$ 的吸收峰比较弱，而且出现在更低的区域 ($3000\sim 2800\text{ cm}^{-1}$)，在这区域的两组吸收峰是糖类的特征峰。在 $1400\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 所看到的不太尖的吸收峰是 $\text{C}-\text{H}$ 的变角振动。

$1200\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 间比较大的吸收峰是由两种 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动所引起的，其中一种是属于 $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ 的，另一种是糖环的 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 。一级、二级和三级醇的 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动由表 27 给出的数据予以区别。

$\text{C}=\text{O}$ 基：各种 $\text{C}=\text{O}$ 基的红外吸收见表 27。各种糖的乙酯均有 $1775\sim 1735\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰，各种糖的水化物均有 $1665\sim 1635\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰，非水化物则无此吸收。在此需要说明的是，多糖中乙酰氨基 ($-\text{NHCOCH}_3$) 的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动在 1648 cm^{-1}

表 27 糖类常见官能团的红外光谱

官能团	振动方式	红外吸收(cm^{-1})
羟基		
—OH	O—H 伸缩振动	3700~3100
	O—H 变角振动	一级 1075~1010 二级 1120~1105
—OD	O—D 伸缩振动	2700~2650
羧基		
—COOH	C=O 伸缩振动	1740~1680
	C—O 伸缩振动	1440~1395
	O—H 变角振动	1320~1210
—COO ⁻	C=O 非对称伸缩振动	1620~1550
	C=O 对称伸缩振动	1400~1300
酯基		
$\begin{array}{c} \text{—O—C—R} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	C=O 伸缩振动	1749~1725
	C—O 伸缩振动	1245
内酯		
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C—C—C—C—O} \\ \text{(}\gamma\text{-内酯)} \end{array}$	C=O 伸缩振动	1800~1760
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C—C—C—C—C—O} \\ \text{(}\beta\text{-内酯)} \end{array}$	C=O 伸缩振动	1750~1725
氨基		
—NH ₂ (一级氨基)	N—H 伸缩振动	3450~3380
	N—H 变角振动	1650~1500
>NH_2 (二级氨基)	N—H 伸缩振动	3460~3420
	N—H 变角振动	1650~1550
—NH ₃ ⁺	N—H 伸缩振动	3350~3150
	N—H 变角振动	1613, 1581, 1538
酰胺基		
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N—C—R(一级胺)} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	C=O 伸缩振动	1650
	N—H 变角振动	1650~1620
醚		
C—O—C(脂肪醚)	C—O 伸缩振动	1150~1060
C—O—C(环内醚)	C—O 伸缩振动	1150~1080

(续表)

官能团	振动方式	红外吸收(cm^{-1})
烷基		
— CH_2 —(次甲基)	C—H 伸缩振动	2926, 2853
	C—H 变角振动	1465
— CH_3 (甲基)	C—H 伸缩振动	2962, 2872
	C—H 变角振动	1450
羰基		
$\begin{array}{l} \diagdown \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagup \end{array}$	C=O 伸缩振动	1870~1540
—CHO	C=O 伸缩振动	1740, 1650
磺酰基		
—O— SO_2 —R	S—O 对称伸缩振动	1190~1170
	S—O 非对称伸缩振动	1370~1350
	C—O—S 伸缩振动(轴向配位)	890~880
	C—O—S 伸缩振动(赤道配位)	850~840
硫酸基		
—O— SO_3 —	S—C 伸缩振动	1240
	C—O—S 伸缩振动(轴向配位)	850
	C—O—S 伸缩振动(赤道配位)	820
磷酸基		
—O— PO_2 — O	P—O 伸缩振动	1300~1250
结晶水		3300, 1650~1600, 800

附近出现。乙酰氨基的确定, 对于象甲壳素(chitin)这样的多糖来说红外光谱是有用的。需要指出的是, 糖的种类不同, 如N-乙酰氨基葡萄糖和N-乙酰氨基半乳糖, 虽然均是在 C_2 上有一个 CH_2CONH —, 但吸收峰的位置有些不同。衍生化对乙酰氨基的吸收峰的位置也有影响, 一般是移向高波数。

C—O—C 基: 除了吡喃糖基的糖苷键及吡喃环的醚键有特征吸收峰外, 由O—H发生烷基取代形成的各种C—O—C键不能加以区别, 只能表示醚化的程度。

氨基: 一级和二级氨基的N—H变角振动出现在 $1650\sim 1590\text{ cm}^{-1}$, D-葡萄糖胺的 1621 以及 1601 cm^{-1} 的强吸收峰就是这种

N—H 变角振动.

血型多糖、甲壳素、硫酸软骨素-玻璃酸(糖醛酸)的糖都具有乙酰氨基, 而其中的 N—H 变角振动出现在 $1560\sim 1508\text{ cm}^{-1}$, 可是, 具有与硫酸基(Na 盐形式)结合的一NH—的肝素在这个区域内没有吸收峰, 所以这个吸收峰可以用来识别多糖中的一NH—是乙酰化的还是硫酸化的. 但是要注意, 在这个区域内还有乙酸酯的吸收峰.

② 糖的吡喃环的振动谱:

糖类分子振动的特征吸收在 $930\sim 960\text{ cm}^{-1}$ 区域, 立体结构造成的差异分述如下.

环的振动谱: 四氢吡喃环的非对称伸缩振动所造成的 C—O—C 骨架振动在 875 cm^{-1} 处出现吸收峰, D-葡萄糖吡喃糖有同样的环振动, 在 920 cm^{-1} 处有吸收峰. α -D-葡萄糖吡喃糖类化合物中这个吸收峰是比较强的, 而 β -型是比较弱的. 四氢吡喃环的对称伸缩振动在 813 cm^{-1} 出现吸收峰, D-葡萄糖吡喃糖环出现在 770 cm^{-1} 附近. 糖的吡喃环的波数低于四氢吡喃糖环, 是由于半缩醛环上的取代基造成的. 在多糖里, 这些吸收峰由于糖残基之间的结合键的不同而影响了这些吸收峰的数值的变化. 如 α -D-(1 \rightarrow 4) 结合键, α -D-(1 \rightarrow 3) 与 α -D-(1 \rightarrow 4) 交替结合键, 随着聚合度的增加, 吸收峰向高波数移动. 但对于大部分是 α -D-(1 \rightarrow 6) 结合键的葡聚糖和异麦芽糖来说, 没有明显的移动. 环的对称伸缩振动, 根据糖残基的种类或差向异构碳的构象不同而有所差异.

构型的确定: 糖的 α -和 β -的端基差向异构体, 是由端基的 C—H 变角振动造成的. α -型的差向异构体的 C—H 取平伏键, 在 $844\pm 8\text{ cm}^{-1}$ 处有一个吸收峰; β -型的 C—H 取直立键, 在 $891\pm 7\text{ cm}^{-1}$ 处有一个吸收峰. 但是, 海藻糖、阿洛糖和异阿洛糖的 α -和 β -型同时存在的情况下, 就不能以此来判断. 此外, 半乳吡喃糖及甘露吡喃糖在 875 cm^{-1} 附近看到新的吸收峰, 这是由于 C_2 和 C_4 位上的赤道键构型的 C—H 变角振动所造成的. 肌醇、环己连五醇 [$C_6H_7(OH)_6$] 这两种 C—H 的变角振动也出现在 875

cm^{-1} 处, 脱氧糖的次甲基所引起的吸收峰(横摇)是在 867 cm^{-1} , 而岩藻糖和鼠李糖等的脱氧糖在 967 cm^{-1} 出现吸收峰。由于在这附近还有很多其他的吸收峰出现, 所以很难准确判定它们。

吡喃环的特征吸收峰列于表 28。

表 28 吡喃环的特征吸收

振 动 类 型	特征吸收 (cm^{-1})
非对称环伸缩振动	917 ± 13
对称环伸缩振动	770 ± 14
α -端基差向异构的 C—H 变角振动	844 ± 8
β -端基差向异构的 C—H 变角振动	891 ± 7
端基差向异构 C—H 以外的赤道键的 C—H 变角振动	880 ± 8
环上次甲基的横摇振动	867 ± 2
末端次甲基的横摇振动	967 ± 6

Whistler 和 House (1953) 研究了 35 种单糖及其衍生物的一端基差向异构体的红外光谱。表 29 列举了几种游离单糖的吸收峰, 是以石蜡油为介质测定的。

表 29 几种吡喃糖的特征吸收

糖 类	特征吸收 (cm^{-1})
α -D-葡萄糖吡喃糖	855~833
β -D-葡萄糖吡喃糖	905~876
α -D-半乳吡喃糖	839~810
β -D-半乳吡喃糖	914~886
α -D-和 α -L-甘露吡喃糖	843~818
β -D-甘露吡喃糖	898~888
β -D-和 β -L-阿拉伯吡喃糖	855~830
α -D-木吡喃糖	760~740

③ 呋喃糖衍生物的吸收峰:

在呋喃环中, 由于环是对称的, C—H 键在环上下任何一个方向都是等同的, 所以 α -和 β -的吸收峰差异是很小的。

呋喃衍生物具有 A、B、C、D 四种类型的特征吸收区域。

A 型的吸收峰在 $924 \pm 13 \text{ cm}^{-1}$, 这是呋喃环的对称伸缩振动

所造成的，与此相对应的四氢呋喃的吸收峰在 913 cm^{-1} 。如果存在着两个以上这样的五元环时，一般说来，吸收峰是重复的，移向 $917 \pm 15\text{ cm}^{-1}$ 。对于呋喃糖的衍生物来说，C—H 的变角振动属于 D 型，出现在 $799 \pm 17\text{ cm}^{-1}$ ，这个吸收峰可以用来鉴定呋喃糖环。呋喃糖或羟基呋喃环在 $879 \pm 7\text{ cm}^{-1}$ 和 $858 \pm 7\text{ cm}^{-1}$ 处还出现吸收峰，分别称为 B 型和 C 型。这些吸收峰都是由环和取代基的伸缩振动以及次甲基的横向振动所造成的。上述各种吸收峰值

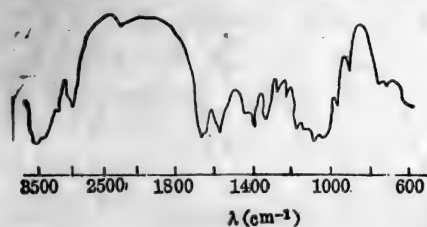


图 45 N-乙酰氨基葡聚糖的红外光谱

并不是可以完全套用的，由于仪器、操作技术、样品处理等原因往往总有一些偏差。图 45 是 N-乙酰氨基葡聚糖的红外光谱图 (KBr 压片法)。3500~3200 cm^{-1} 的两个宽峰是 O—H 和 N—H 的伸缩振动，存在着分子间和分子内的氢键。3000~2800 cm^{-1} 的一组峰是糖类 C—H 伸缩振动，1400~1200 cm^{-1} 的一些峰是 C—H 的变角振动。没有这两组峰，则可初步判断该化合物不是糖类化合物。1660 cm^{-1} 和 1630 cm^{-1} 是 $\text{CH}_3\text{CONH—}$ 的酰胺 I 谱带，表明是 β -多晶型。若无 1630 cm^{-1} 吸收，则为 α -多晶型，即是自然界中的甲壳素。1550 cm^{-1} 是 N—H 的变角振动。1250~950 cm^{-1} 之间的一组强峰，是吡喃糖环的醚键 (C—O—C) 和羟基的吸收峰。897 cm^{-1} 是吡喃糖 β -型 C—H 变角振动的特征峰，呋喃糖是不会有此吸收峰的。

图 46 是菊糖 (果聚糖) 的红外光谱图 (KBr 压片法)。果糖是呋喃糖，但

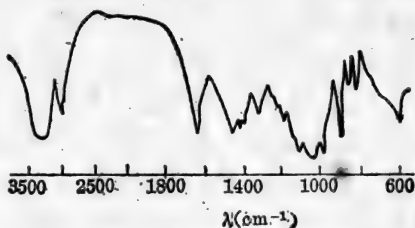


图 46 菊糖的红外光谱

3000~2800 cm^{-1} 之间也有两个峰。937 cm^{-1} 是呋喃环的对称伸缩振动所造成的，877 cm^{-1} 是次甲基的横向振动造成的，而 818

cm^{-1} 是呋喃环的 C—H 变角振动。这三个尖峰，与吡喃环的情况是完全不同的，以此可以区别呋喃糖和吡喃糖。

④ 样品制备：

取 1 mg 左右经干燥的糖样，与 100~200 mg 经干燥的 KBr 粉末在玛瑙研钵中轻轻研磨均匀，磨得愈细愈好，最好在红外灯下操作，以免 KBr 吸收空气中的湿气。样品或 KBr 吸湿后，将在 O—H 和 N—H 的高波数区域出现水峰，影响 O—H 和 N—H 的判断。经压片机压成薄片，随即上机测定。如果样品很少，可用一小片滤纸在中心处剪一小孔，衬上铝箔，放上试药，然后进行压片，这样可以进行微克级测定。除了 KBr 压片法，有时亦用石蜡油 (Nujol) 法，这时的红外吸收与 KBr 压片法不尽相同。

【文献】

Whistler, R. L. and House, L. R., *Anal. Chem.* **25**:1463(1953).

Jiang Tingda & Lu Fudao, *Int. J. Biol. Macromol.*, **9** (1):54 (1987).

(蒋挺大)

2. 糖的质谱法

质谱法研究糖的结构已有二十多年的历史。Reed 等人于 1958 年首先应用电子轰击法研究了几种单糖和二聚糖。在糖的结构研究中，质谱法是一种十分重要的手段。由于糖的难挥发性和热不稳定性，限制了电子轰击质谱法 (EI-MS) 对低聚糖的研究。后来发展了各种糖的衍生化方法，糖的衍生物不但提高了挥发性和热稳定性，而且便于结构解析，从而大大推进了质谱法在糖结构研究中的应用。最近有用质谱法研究五聚糖甲醚衍生物及六聚糖全乙酰化衍生物的报道。但是，对于聚合度较高的低聚糖来说，它们的衍生物的挥发度和热稳定性仍然太低，不能用 EI-MS 法来研究。另一方面 EI-MS 法中，由于所轰击的电子能量较高，处于激发态的分子离子严重碎裂，在谱图中难以得到分子离子峰，这对结构研究带来困难。为了对强极性的低挥发度的化合物进行质谱分析和研究，近年来陆续发展了各种软电离技术，其中主要有化学电离 (CI)，场致电离 (FI)，场解析电离 (FD)，化学解析或称直接

化学电离 (DCI), 以及最近几年发展起来的快速原子轰击法 (FAB). 这些软电离技术应用于糖的研究获得了明显的效果. 下面分别就这些技术在糖的研究中的一些应用作一介绍.

① 电子轰击法 (EI-MS):

电子轰击电离法是最通用最基本的方法, 它具有较好的重复性、较高的灵敏度和较多的碎片峰. 样品经气化后, 以分子状态在离子源中与具有一定能量的电子相碰撞, 从而使样品分子电离, 随后具有过剩能量的分子、离子碎裂成各种碎片离子. 这些碎片离子和分子离子经聚焦后, 在一定电场作用下被拉出离子源, 通过分析器, 把具有不同质荷比 m/z 的离子分开, 最后到达接收器. 在不同的质谱计中, 分析器亦各有不同. 在磁质谱计中, 分析器是磁场或磁场和电场的组合, 在四极质谱计中, 分析器是四极杆所组成. 接收记录系统可以用照相干板法和电记录法, 目前大部分质谱计采用后者, 并且配有计算机数据处理系统. 电子轰击质谱法中通常采用 70 eV 的电子轰击能量, 因为在 70 eV 附近, 电离效应较稳定. 有时为了得到较强的分子离子峰和较少的碎片峰, 轰击电子的能量为 20~12 eV 之间 (称为低电压质谱). 通常得到的质谱图中, 质荷比只测准到整数位, 称为低分辨质谱. 根据低分辨质谱, 可以对化合物进行鉴定, 根据裂解规律可以推断所含的基团以及该化合物的结构. 在高分辨率 (分辨在 5000 以上) 时所得到的质谱称高分辨质谱, 其质荷比 m/z 可测准到毫质量单位, 根据其精密质荷比可以计算出各碎片离子的元素组成. 此外, 有些离子还具有较高的内能, 在从离子源到接收器的飞行过程中还继续开裂生成较小的离子 m_2 和中性碎片, 由于一部分动能被中性碎片带走, 一般来说 m_2 离子不能在通常位置通过分析器, 只有在场自由区发生开裂的 m_2 可以用亚稳离子检测法来检测到. 其中有加速电压扫描法、电场与磁场联动扫描法等. 亚稳测定法通过对亚稳离子的研究, 可以弄清各离子之间的母、子关系, 这对质谱图的分析非常有用. 对于糖结构的研究亦是常用的有效的一种质谱技术.

电子轰击质谱法中, 糖样首先经衍生化, 提纯, 证明是纯品以

后可以直接导入法把样品导入质谱计的离子源；另一种进样方式是色谱-质谱联用，样品通过色谱分离之后进入离子源。此外还可以高压液相色谱-质谱联用，样品经高压液体色谱分离之后导入离子源。后两种进样方式的好处在于样品经衍生化后不必事先提纯就可进样，但是不容易得到准确的强度数据，也不易作亚稳研究。曾有报道低聚木糖全乙酰化物的高、低分辨 EI-MS、OI-MS 结果。实验是在 JEOL 公司的 JMS-D300S 质谱计及 JMA-2000S 数据系统上完成的。实验条件为：电离电压，70 eV；加速电压，8 kV；离化电流，300 μ A；分辨率，1500 (10% 谷)；离子源温度，120~

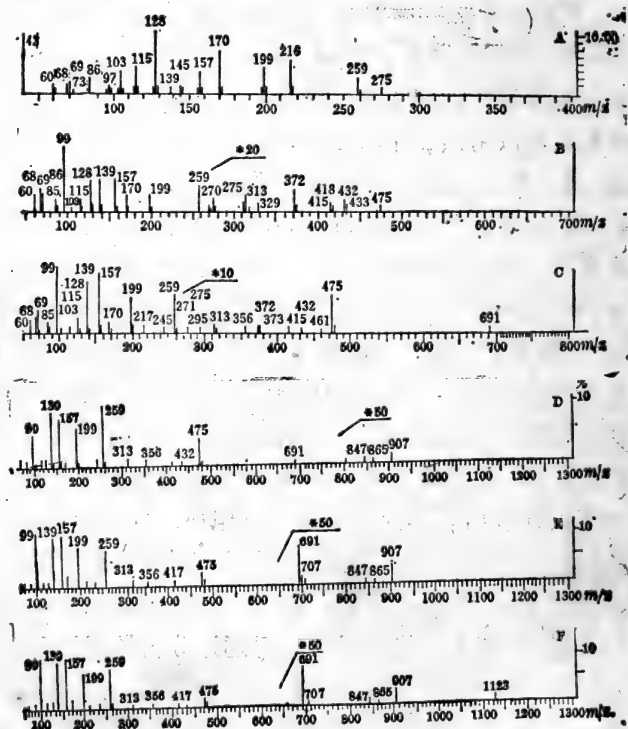


图 47 全乙酰化木糖-木六糖(1→4)的 EI 质谱

- A. 全乙酰化 D-木糖 B. 全乙酰化 β -D-木二糖
 C. 全乙酰化 β -D-木三糖 D. 全乙酰化 β -木四糖
 E. 全乙酰 β -D-木五糖 F. 全乙酰化 β -D-木六糖

250°C; 进样温度, 室温~35°C. 其 EI-MS 谱图示于图 47. 从图中可以观察到有规律的碎裂过程. 低质量区的碎片峰较强, 高质量区的碎片峰较弱, 所有这些化合物的 EI-MS 谱中均未观察到分子离子峰. 木糖全乙酰化化合物的最高质量碎片峰为 m/z 275 $[M-CH_3CO]^+$, 木二糖、木三糖、木四糖全乙酰化化合物的最高质量碎片峰为 $[M-CH_3COO]^+$, 而木五糖和木六糖全乙酰化化合物的最高质量碎片离子为 $[M-275]^+$, 即失去 $C_5H_6O_2(OAC)_3$ 基. 由图 47 中可以观察到, 所有各糖 EI-MS 中在低质量区碎片离子具有相同的质荷比.

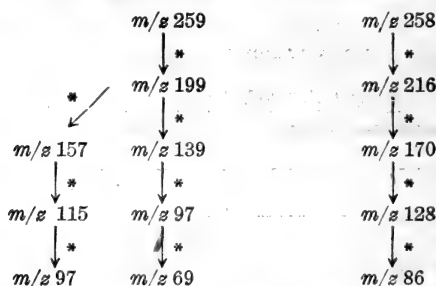
高分辨测定: 测定高分辨电子轰击质谱可以确定各碎片离子

表 30 全乙酰化木糖的高分辨测定结果

m/z	Δnu	元素组成
44.9973	-0.3	CHO ₂
60.0199	-1.0	C ₂ H ₄ O ₂
68.0261	0.0	C ₄ H ₄ O
69.0338	-0.0	C ₄ H ₅ O
85.0303	-1.3	C ₄ H ₅ O ₂
86.0374	0.5	C ₄ H ₆ O ₂
97.0293	0.3	C ₅ H ₅ O ₂
103.0395	0.0	C ₄ H ₇ O ₃
115.0388	-0.5	C ₅ H ₇ O ₃
128.0473	0.0	C ₆ H ₈ O ₃
139.0392	-0.1	C ₇ H ₇ O ₃
157.0496	-0.3	C ₇ H ₉ O ₄
170.0586	0.1	C ₈ H ₁₀ O ₄
199.0614	0.7	C ₉ H ₁₁ O ₅
216.0634	0.0	C ₉ H ₁₂ O ₅
259.0851	3.3	C ₁₁ H ₁₅ O ₇

的元素组成,从而有助于谱图的解析. 在糖的研究中它也是常用的一种技术. 木糖全乙酰化物的高分辨电子轰击质谱数据列于表 30. 其实验条件如下:分辨率为 6000;质量范围 40~300 u,扫描速度,20 秒/全程. 其他条件和低分辨时相同.

亚稳离子检测: 通过亚稳离子的检测,可以得到离子之间的关系. 但是用计算机接收,数据处理所得到的低分辨质谱图(图 47)丢失了亚稳峰. 以加速电压扫描由子离子找母离子的方法测定了木糖的全乙酰化物的各离子之间的关系如下:



同位素标记法: 质谱中的同位素标记技术在糖的研究中很早就被利用,有人报道全氘代乙酰化木糖及没有氘代的全乙酰化木糖的结果(图 48),指出 m/z 259 位移到 m/z 268,表明该离子中含有三个乙酰基. 而 m/z 170、 m/z 157 分别位移到 m/z 176 和 163,表明该离子中含有两个乙酰基,从而确定了这些离子的结构. 结合高、低分辨质谱、亚稳离子检测和同位素标记法的研究,再根据

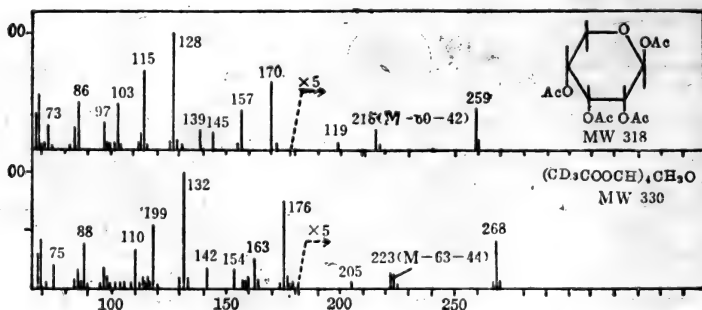


图 48 木糖全乙酰化和全氘代乙酰化物的质谱图

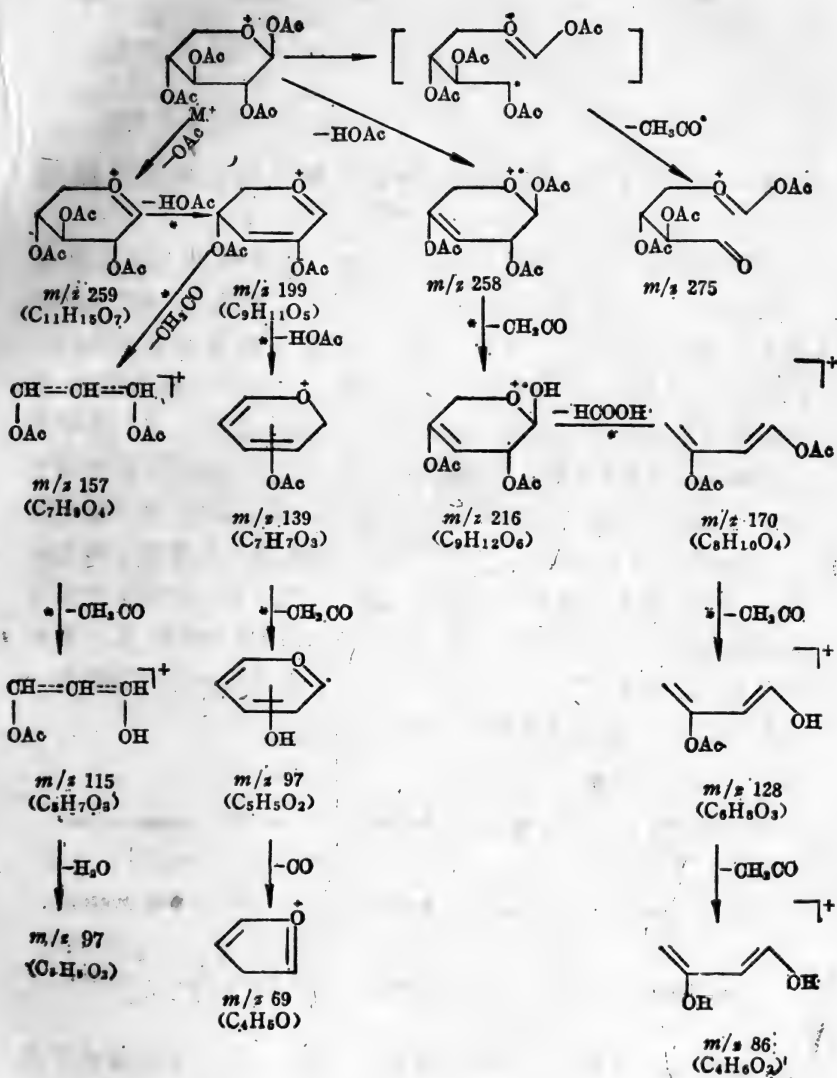


图 49 β -D-木糖四乙酸酯的裂解途径

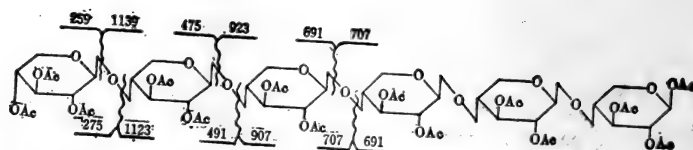
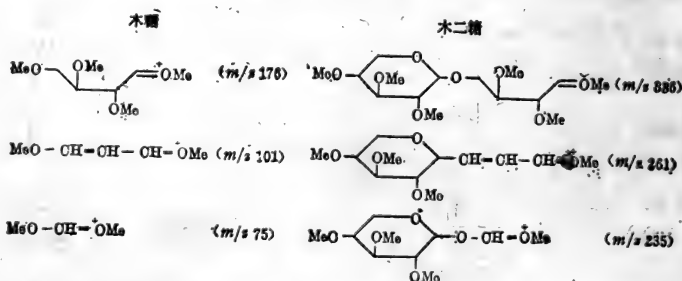


图 50 β -D-(1 \rightarrow 4) 木六糖十四乙酸酯的结构式及断裂方式

单糖的一般碎裂规律不难以确定木糖全乙酰化物的碎裂机理(图 49)。

低聚糖衍生物的碎裂方式较为清楚, 以 β -D-木二糖乙酰化衍生物到 β -D-木六糖乙酰化衍生物为例, 它们的 EI-MS 的碎片离子可以分为三类: 一类离子是由分子离子连续脱去 CH_2CO 、 CH_3CO 、 CHACO 、 HOAC 等所产生的离子, 它们处于高质量区。另一类离子是由各吡喃环之间的断裂而产生的(图 50), 它们集中于谱图中的中质量区。第三类的离子是一、二类离子再经环的开裂之后发生分解反应而产生的离子, 它们集中于低质量区, 并且强度较大, 与糖的结构关系密切。这些低质量区的强峰和木糖全乙酰化物的 EI-MS 谱相比, 具有相同的质荷比, 表明了他们之间具有相同的断裂方式。在全甲醚化低聚木糖的低电压 EI-MS 中, 有人报道了全甲醚化的木二糖、木三糖同全甲醚化木糖相同方式裂解的一系列离子, 如下面的几个离子便是一例:

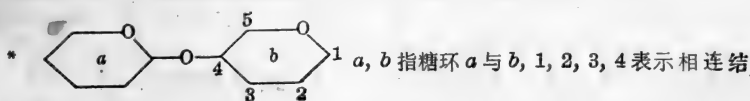


电子轰击质谱法还可以研究配糖连接方式, 不同的连接方式使得某些离子的相对强度发生变化, 据此来区分连接位置异构体, 如全甲醚化 D-木二糖有表 31 所示的关系。

其中 m/z 261、115 离子强度的变化可作如下理解: m/z 261 离

表 31 二聚木糖甲醚化衍生物联结方式的鉴定

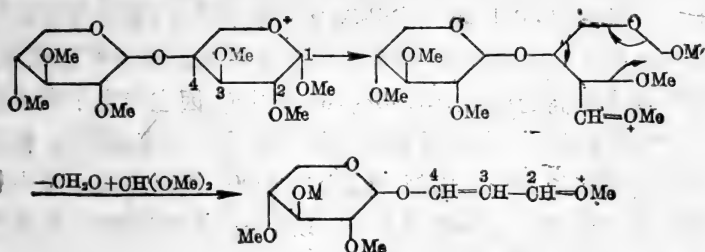
m/z	% Σ_{45}			
	$\alpha 1 \rightarrow 1b^*$	$\alpha 1 \rightarrow 2b$	$\alpha 1 \rightarrow 3b$	$\alpha 1 \rightarrow 4b$
261	0	1~5	0	1~5
115	1~5	1~5	10~20	1~5
101/88**	30	1	1	1
261/131	0	1	0	5



的碳位。

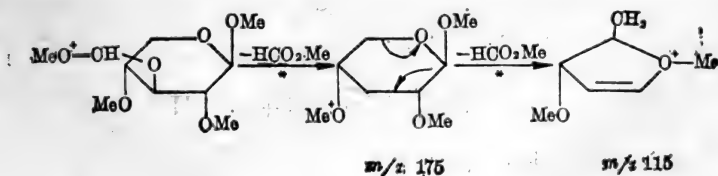
** 相对强度。

子的碎裂方式如下:

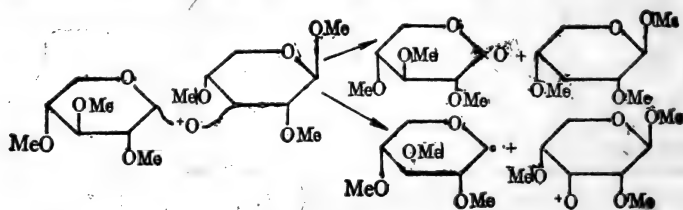


m/z 261

首先 C-3 位上的 $O\cdot CH_3$ 基转移到 C-1 位上, 然后断裂产生 m/z 261 离子。显然在 $1 \rightarrow 3$ 与 $1 \rightarrow 1$ 连结中, 上述反应不能或很难发生。所以不出现 m/z 261。亚稳检测证明 m/z 115 离子是由 m/z 175, m/z 235 裂解而来的。首先 α 、 b 两吡喃糖环之间断裂,



然后重排失去 HCOOMe 分子。对甲醚化的吡喃糖的研究表明： O^+CH_3 基最容易从碳-1 位上脱去，其次是碳-3 位。在 1→3 联接的全甲醚化木糖中， α 、 β 之间相联结的碳位都处于比较容易脱去取代基的，因此该化合物中，配糖键容易断裂：



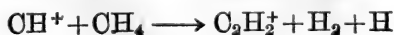
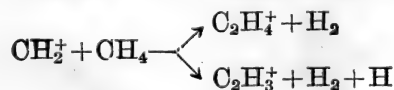
所以在 1→3 中 m/z 115 比其余联结方式中强的多。

② 化学电离质谱 (CI-MS)：

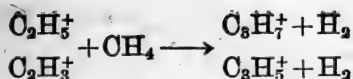
电子轰击质谱中虽然可以得到较多的、与分子结构相关的碎片离子，但是往往不能得到分子离子。而化学电离质谱由于所传递的能量较少，所以比较能得到较强的分子离子（准分子离子）。自 Munson 和 Field 在 1966 年提出此技术以来已获得广泛应用。CI 离子源要求较高的压力（13.33~133.33 Pa），因它与电子轰击质谱不同，它是通过分子离子反应达到使样品分子电离的目的。样品分子与反应剂气体分子的比例大约为 1:1000，所以在离子源中首先反应剂分子电离产生一系列离子。以甲烷为反应剂时，在离子源中有以下复杂反应：



离子-分子反应：

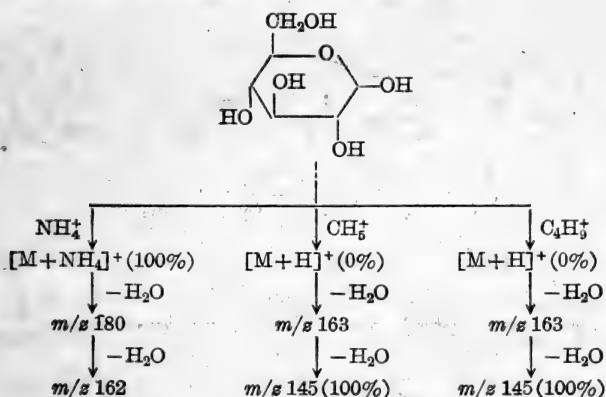


再次离子-分子反应：



其中 CH_5^+ 占离子数的 $\sim 47\%$, C_2H_5^+ 占 $\sim 40\%$, C_3H_5^+ 占 $\sim 6\%$. CH_5^+ 是一种很强的 Bronsted 酸, 与几乎所有的有机分子反应(质子转移分子), 从而得到样品的准分子离子. C_2H_5^+ 、 C_3H_5^+ 能与样品分子起加成反应产生 $[\text{M} + \text{C}_2\text{H}_5]^+$ 、 $[\text{M} + \text{C}_3\text{H}_5]^+$ 离子. 其他常用的反应剂还有异丁烷、氨、水、氢等, 它们在离子源中 ($\sim 133.3 \text{ Pa}$) 的主要离子分别是 C_4H_9^+ 、 NH_4^+ 、 $(\text{NH}_3)_2\text{H}^+$ 、 $(\text{NH}_3)_3\text{H}^+$ 、 H_3O^+ 、 $(\text{H}_2\text{O})_2\text{H}^+$ 、 $(\text{H}_2\text{O})_3\text{H}^+$ 、 H_3^+ .

在糖的研究中, 甲烷、异丁烷为反应剂时仍然很难得到准分子离子峰, 而往往得到的是失去一个分子水的离子. 如:



Dougherty 等 (1974) 用异丁烷和氨混合反应剂研究了十种二聚糖、六种三聚糖、四种四聚糖和两种五聚糖的全乙酰化衍生物的 CI-MS, 得到了比较满意的结果, 但是仍没有得到五聚糖的准分子离子峰. 用氨作反应剂获得了全乙酰化的 β -D-木糖 \sim β -D-木六糖的 CI-MS 所有各糖的准分子离子峰 (图 51). 实验条件如下: 样品, 全乙酰化 1 \rightarrow 4 联结的 β -D-木糖 \sim 木六糖, 经高压液体色谱纯化分离出或证明是单峰; 电离电压 200 V; 离子化电流 100 μA ; 离子源压力 13 \sim 133 Pa; 离子源温度 130 \sim 250 $^\circ\text{C}$ (视各糖的挥发性); 进样温度从室温到 380 $^\circ\text{C}$, 对于五聚糖和六聚糖采用

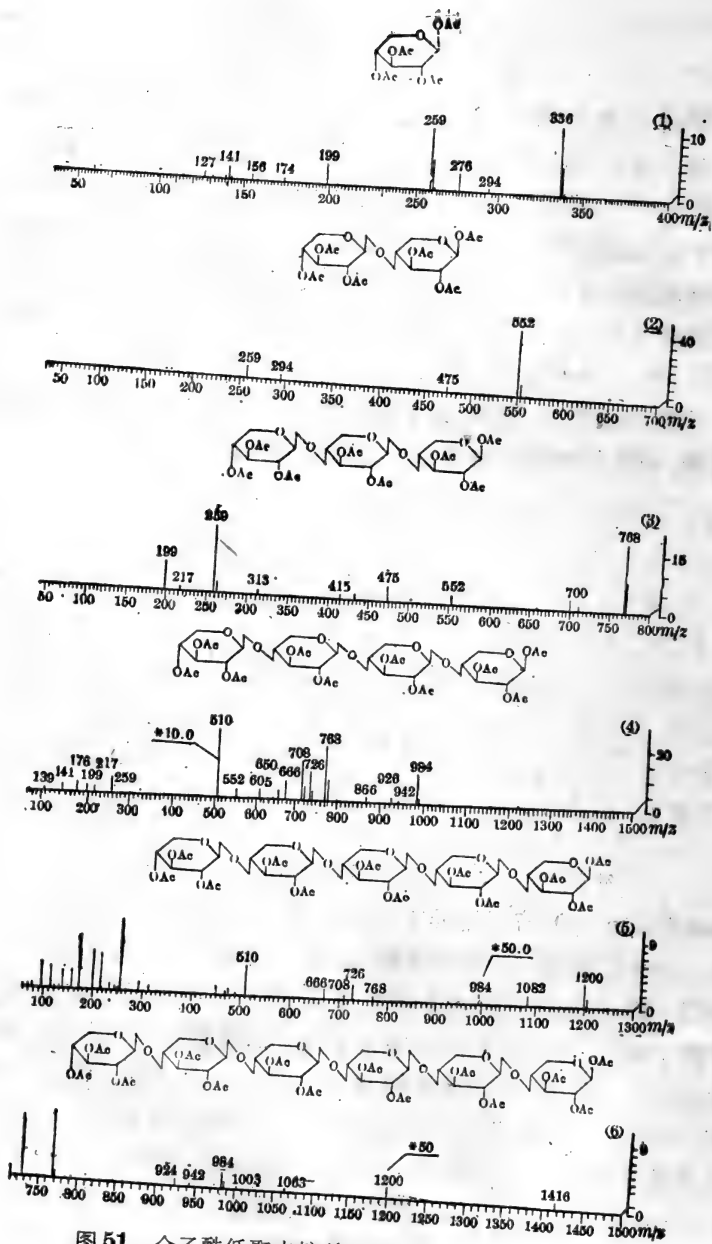


图 51 全乙酰低聚木糖(1)~(6)的 $\text{CI}(\text{NH}_3)$ 质谱

最快速升温(200°C/分)到 380°C, 样品迅速加热, 使汽化作用在汽化与热分解的竞争中处于较有利的地位。尽管如此, 准分子离子峰强度随着聚合度的增加而迅速减弱。在单糖到三聚糖时准分子离子峰是基峰, 到五聚糖、六聚糖就很弱了, 但仍可明显地辨认。在谱图中可见到, 高质量区中, 除准分子离子外, 还有较弱的 $[M+NH_4-CH_2CO]^+$, $[M+NH_4-AC]^+$, $[M+NH_4-HOAC]^+$, $[M+NH_4-HOAC]^+$ 等离子。此外, 从木三糖到木六糖的全乙酰化衍生物的 CI-MS 中, 出现很强的较低级聚合度的准分子离子峰和其脱乙酰酮离子峰。

CI-MS 法可以测定分子量的大小, 并且与其他软电离技术相比, 它又有较高的灵敏度, 操作方便, 对 EI-MS 是一个重要的补充。

③ 场致电离、场解吸电离质谱 (FI, FD-MS);

对于那类对热的和/或电子和振动激发敏感的, 因而在它们的 EI 和 CI-MS 中通常没有分子离子 M^+ 的化合物, 如糖类, 最好应用软电离方法研究它们。FI、FD 是使化合物在高强度电场中, $10^7 \sim 10^8$ V/cm 的条件下进行电离的方法。样品分子以气态在发射体附近电离的, 称 FI 方法, 若将样品涂在发射体表面上, 呈固体状态, 在高强电场下由于量子隧道效应而被电离的, 称 FD 方法。因此, 在仪器上 FI 和 FD 多以组合离子源结构作为 FD 的发射体, 通常用直径 $10 \mu\text{m}$ 的钨丝, 在 1.33Pa 苯乙腈气氛中, 在 1200°C 条件下进行活化。这样, 在钨丝上生长出许多 $20 \mu\text{m}$ 左右的碳针, 当将电位加到发射体和相对电极上, 一般在 $10 \sim 12$ 千伏条件下, 在碳针尖端附近, 形成高强电场, 足以使样品分子电离。测量时, 将样品溶液或悬浮液用微注射器滴在发射体上, 或是将发射体浸入样品溶液中, 待溶剂蒸发后, 样品留在发射体表面上。将发射体放入离子源后, 调节发射体位置使钨丝至相对电极为 2 毫米, 用丙酮气体以 FI 模式, 根据丙酮的 m/z 58 离子流将仪器调至最佳工作状态。之后, 用可程序控制的电流加热发射体, 则样品分子以离子状态从表面被解吸出来, 测得 FD 谱。在解吸过程中, 分子得到

了很少的低于0.1eV的激发能量，而分子气化所需的能量要比电离解吸所需能量大得多。因此，在FD条件下，分子离子的解吸是在显著降低的热效应条件下进行的。

FD谱具有以下特点：第一，在最佳阳极温度(BAT)条件下，分子离子 M^+ 或准分子离子 $[M+1]^+$ 常为基峰，碎片峰少而强度弱，谱图简单，易于解析；第二，当发射体温度高于BAT时，FD谱中也有碎片峰，碎裂往往是由于键的直接断裂引起，因此，碎片离子的出现，有利于化合物的鉴定；第三，在FD谱中，一般都能观察到比 M^+ 或 $[M+1]^+$ 质量更高的一系列峰，如 $[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$ 、 $[M+2Na]^+$ 、 $[2M+1]^+$ 等。这些峰的出现，对于化合物分子量测定的确认具有重要意义。在高分辨条件下，FD方法可以

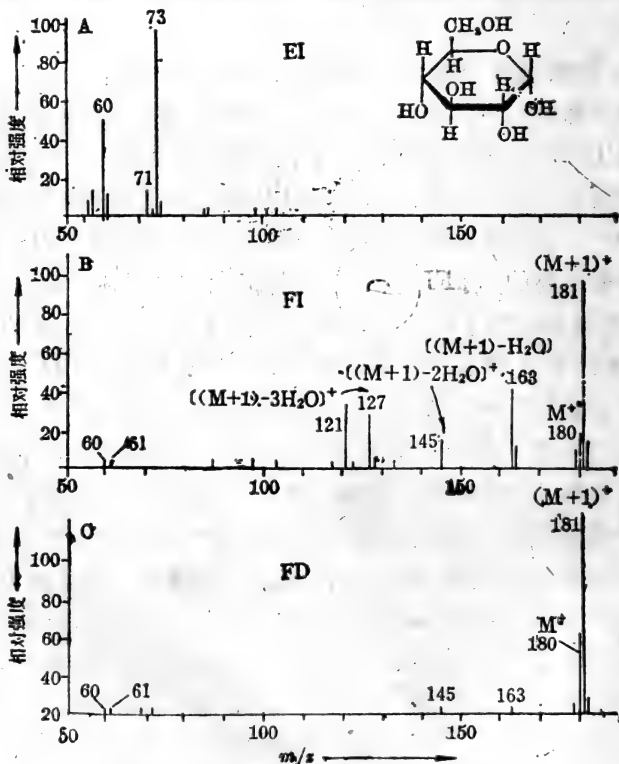


图 52 葡萄糖的 EI、FI 和 FD 质谱

精确测定化合物的分子量与元素组成，又可以得到对于结构剖析有意义的特征碎片离子，所以 FD-MS 对于化合物的结构鉴定是十分有用的。

Beckey 等首先应用 FI/FD-MS 研究了糖及其衍生物。用 FD-MS 测定的第一个化合物是 D-葡萄糖。该糖的 EI、FI 和 FD 谱示于图 52。FD 谱是一张典型的“单一峰”质谱，主要是 M^+ 和 $[M+1]^+$ ，而碎片峰的相对强度不超过 5%。在糖的 FI 谱中，观察到一些比较强的碎片峰，这些离子是由于热激发从母体分子中相继脱水生成的， M^+ 只有 5% 的相对强度，但 $[M+1]^+$ 仍为基峰。在 D-葡萄糖的 70 eV 的 EI 谱中，在 m/z 103 以上区中观察不到离子。

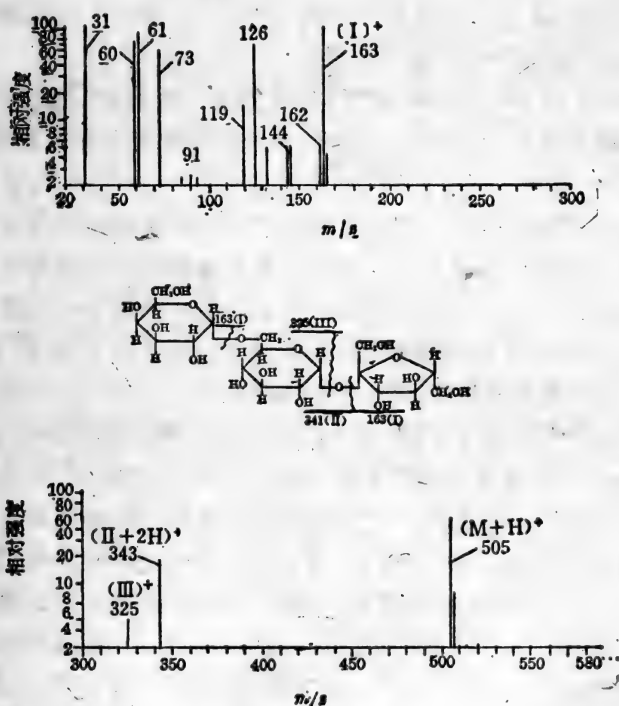


图 53 棉籽糖 FD 质谱

溶剂，二乙基亚砷；BAT, 19~25 mA

应用 FD-MS 研究了一种三糖——棉籽糖，其 FD 谱示于图 53。一般来说，三糖的 FD 质谱中，分子离子峰比起单糖 FD 谱中的分子离子峰的强度，有了明显的下降。这反映了由于具有更多的自由羟基官能团以及更强的氢键的生成所导致的更强的极性。 m/z 505, $[M+H]^+$ 的丰度为 55%。因此，应用 FD-MS 研究三糖是不成问题的。除了 m/z 30、31、60、61、91、119、144 这些典型的碎片外，残基的正离子(图 53) (I) m/z 163, (II) m/z 341 和 (III) m/z 325, 对于结构测定具有重要意义的碎片峰，也可以记录下来。键的直接断裂，伴随着质子传递，生成 $[II+H]^+$ ，这反映出棉籽糖的双糖残基。在配糖键处的键断裂给出碎片峰 m/z 163 和 325。根据分子离子峰以及这些特征的碎片峰，可以得到有关化合物结构的重要信息。这些碎片离子的生成，指出了构成糖分子的残基，对于糖的序列分析很有用。

Moor 和 Waight 等人(1974)研究了一系列的双糖、三糖和四糖的 FD 谱以及它们的全甲基化、全乙酰化的衍生物的 FD 谱。除水苏糖外，在所有的 FD 谱中，都能观察到 $[M+H]^+$ ，为化合物的测定提供了重要信息。作者还研究了不同的发射体加热电流对于分子离子碎片化的影响。全甲基化的低聚糖能产生强的分子离子峰，相反，全乙酰化的低聚糖产生很弱的分子离子峰，但较强的 $[M-60]^+$ 峰。在棉籽糖的 FD 谱图中观察到的双糖残基 $[II+2H]^+$ ，在四糖的 FD 谱图中也观察到了。

以上的结果表明，FD-MS 中低聚糖所产生的某些碎片，对于化合物的结构测定能提供重要信息。但是，毫无疑问，上述所介绍的 FD-MS 的主要优点，还是在于利用这种方法进行分子量的测定。如果就是为了这个目的，通过使用未加处理的钨丝(发射体丝)和通过使用碱金属盐来提高阳离子化过程，那就可以进一步的减少碎片化。对于低聚糖，往样品液中添加碱金属离子(C)的影响以及能产生高丰度的 $[M+C]^+$ 离子，也进行了研究。水苏糖、聚(乙烯醇)和 NaI 混合物的质谱表明，添加这些化合物会导致生成高丰度的 $[M+Na]^+$ 离子，并显著地降低了碎片化(图 54a)。

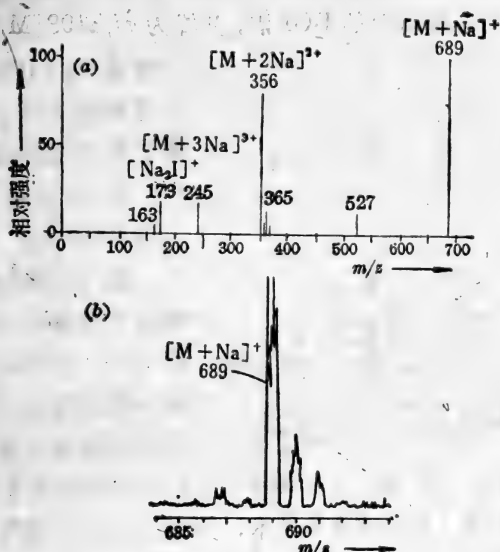
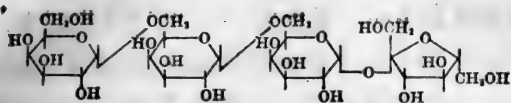


图 54 水苏糖的 FD 质谱

- (a) 水苏糖、聚乙烯醇、NaI 混合物(重量比 1:1:0.2)
 (b) 水苏糖溶于重蒸馏水中, 高分辨单次扫描

对于水苏糖, 不加碱金属离子, 当然也可以记录到 $[M+Na]^+$ 的峰, 只是强度低(图 54b), 因为来自生物物质如天然产物的含糖样品中, 总含有足够浓度的碱盐, 以引起正离子化。

④ 化学解吸质谱(DCI-MS):

DCI 是一种新发展起来的质谱软电离技术, 它的电离原理不同于 FD。DCI 电离方法是将被测物放入 CI 等离子体中的未活化处理的铼丝上, 不需要使样品气化。电离机理类似 CI 源。目前 DCI 方法已经成功地应用于研究一系列热不稳定的和/或强极性的化合物。DCI 谱也是谱图简单, 碎片峰少而弱, 占优势的峰是准分子离子峰, 如以 NH_3 作为反应气体时, 则 $[M+NH_4]^+$ 常为基峰。因此 DCI 谱图易于解析, 对化合物分子量的测定很有用, 其

缺点是由于碎片少不利于结构剖析。在 DCI 谱图中,除了 $[M + \text{NH}_4]^+$ 外,还可以观察到 $M + (\text{NH}_3)_2\text{H}^+$ 和 $(2M + \text{NH}_3)^+$ 这一类离子。这些离子的出现,对于化合物分子量测定的确认是有益的。

图 55 所示葡萄糖的 DCI 谱,基峰为 $m/z 198 [M + \text{NH}_4]^+$, 次强峰是 $m/z 180$, 它的相对丰度只有 10%, 它是准分子离子脱水生成的。

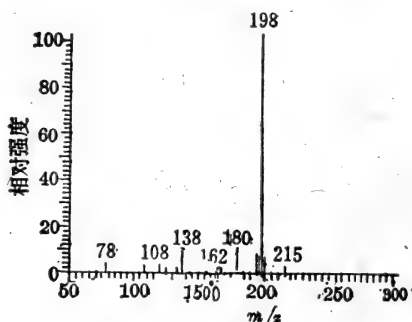


图 55 葡萄糖的 DCI 谱

⑤ 快速原子轰击质谱 (FAB-MS):

近年发展的一种称为快速原子轰击 (FAB) 的新的电离技术。这是一种比 FD 更为方便的方法。在用其他方法研究的化合物在质谱中不

能出现分子离子的情况下,用 FAB 方法可得到分子离子峰。

Barkor 等人研究 FAB 技术,并用这种技术研究了难挥发性有机物及热不稳定的化合物。原理上 FAB 方法与二次电离质谱法 (SI-MS) 相似。SI-MS 是用被加速的正离子,通常用 Ar^+ 轰击样品表面,由此产生的样品离子进入质谱仪的分析系统,而 FAB 则用快速中性原子,通常用 Ar 去轰击样品表面,使之产生样品离子。由于 FAB 使用的是中性原子,则所需的能量远远小于 SI-MS 中所使用的正离子所需能量,所以 FAB 是一种更有前途的软电离方法。FAB 方法具有以下优点: a) 对于难挥发性的和/或热不稳定的化合物以及盐类,能生成 $[M + \text{H}]^+$, $[M + \text{Na}]^+$, $[M + \text{K}]^+$ 的正离子,这对分子量测定非常重要; b) 可以得到碎片离子,便于对化合物结构进行讨论; c) 几乎生成等量的正、负离子,有利于谱图解析; d) 离子生成的时间长,便于测量; e) 可以得到稳定的强的离子束,有利于提高测试精度。

在 FAB 的实验中,将样品分散于一种极性液体 (底物) 中,通常用丙三醇作底物,因此,在 FAB 谱的低质量区,特别是在

m/z 200 以下的区域内, 有一系列丰度高的丙三醇的碎片峰, 以及双分子峰, 这对样品测试造成了干扰, 是不足之处. 当然也可以选用其他底物, 但底物峰总是存在的, 而且用数据系统也不能完全扣除.

应用 JMS-DX300 型质谱仪研究了水苏糖的 FAB-MS. 首先将水苏糖溶于丙三醇中, 再将它涂在样品架上, 送入离子源. 所得到的水苏糖的 FAB 谱示于图 56. 图中最强峰是 m/z 505, 它是 $(M+1-C_6H_{10}O_5)^+$ 离子, 准分子离子峰 $[M+1]^+$ 的强度是基峰的 25%. 此外, 在高质量区, 还有一个比较强的峰 m/z 759, 它是 $[M+1+G]^+$ 、(G-甘油分子). 同一个化合物的质谱示于图 57, 基峰是 m/z 689 $[M+Na]^+$, 次强峰是 356 $[M+2Na]^{2+}$. 在测试过程中, 为了易于得到 $[M+O]^+$ 离子, 预先向被测样品中参入少许 NaI. 比较这二张谱图可见 FD 和 FAB 是互为补充的软电离方法.

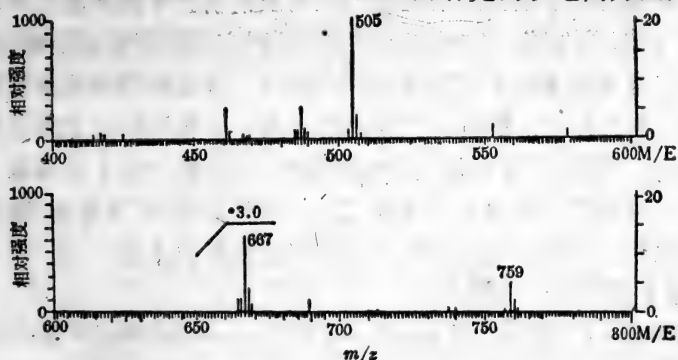


图 56 水苏糖的 FAB 谱

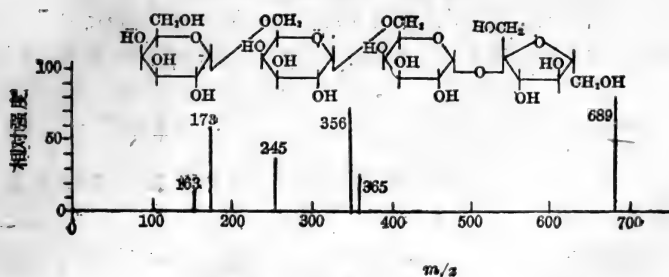


图 57 水苏糖的 FD 质谱

一般来说,对未经化学衍生化糖的分析, EI-MS 方法是得不到分子离子峰的,即使是经衍生化处理,双糖以上的糖也得不到分子离子的信息。因此,软电离技术,对于研究糖类是一种十分重要的分析技术。

⑥ 结论与前景:

质谱法已成为碳水化合物结构研究最有效的方法之一。应用 EI-MS、CI-MS 已经卓有成效地研究了经化学衍生化处理的低聚糖(已报道的达六聚糖)。GC-MS 和 LC-MS 的发展进一步促进了碳水化合物的研究工作。特别是近年来发展起来的一些软电离技术 FI、FD、DCI 和 FAB 等,对于研究碳水化合物类低挥发度、热不稳定的化合物来说,具有广阔的应用前景。因为这些电离技术在适当的实验条件下一般都能给出分子离子。应用高分辨测定,可得到精密分子量及元素组成。应用质谱新技术如联动扫描, MS/MS 方法,研究化合物的碎裂途径、不同方式的衍生化处理、同位素标志方法以及软电离技术的配合使用,可以得到有关糖环联接方式的有关信息。所有这些为糖的序列分析和结构鉴定提供有用的数据。质谱仪,特别是数据处理系统,近年来发展十分迅速,新一代仪器已经能测分子量大于万的化合物。不言而喻,质谱法在碳水化合物的研究中将会起到越来越重要的作用。

【文献】

Kozáčík, V., Mihalov, V. and Kováč, P., *Carbohydrate Research*, **88**: 189~201(1981).

Dougherty, R. C., Roberts, J. D., *J. Org. Chem.* **39**:451(1974).

Moor, J. and Weight, E. S. *Org. mass Spectrom.* **9**:903(1974).

Barbor, M., Donald R. S., Sealgwick and Tyler, A. N., *J. C. S. Chem Comm.* 325(1981).

(王相明 孙思恩)

3. 高效液相色谱-质谱 (HPLC-MS) 脱机联用进行低聚糖的结构序列分析

多糖的结构序列分析是在单糖和寡糖色谱分离分析的基础上,采用酸或糖苷酶降解成单糖或部分降解的方法降解为寡糖的

混合物,用高效液相色谱分离和测定,确定其单糖的组分和克分子比。混合寡糖经 HPLC 分离,收集各组分,得到纯品,并制备易挥发的衍生物(甲基化,乙酰化,三甲基硅烷化等),或混合寡糖样品直接制备成易挥发衍生物,经反相 HPLC 分离,并收集各组分,冰冻干燥后,各组分分别直接进行质谱鉴定,确定寡糖组成的糖单元以及单糖连接的可能顺序。用拼接“七窍板”的方法推断多糖的可能结构序列。

本实验以全乙酰化 β -D-1 \rightarrow 4 低聚木糖为模型,试图用 HPLC-MS 联机联用对低聚糖进行结构序列分析。

【仪器与试剂】

液相色谱仪: Perkin-Elmer Series 3 型,配以自制柱头隔膜进样器, LDC-1107 型示差折射检测器(灵敏度 8×10^{-7} RIU), Sigma 10 数据处理机。

质谱仪: JMS-D300S 质谱仪及 JMA-2000 数据系统。

旋光仪: Perkin-Elmer 241MC 数字显示自动记录。

色谱柱: $\phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ 不锈钢色谱柱。

固定相: Nucleosil ODS ($10 \mu\text{m}$)。

乙腈, 甲醇, 乙酸酐, 乙酸钠等 A. R.

【操作】

(1) 全乙酰化 β -D-(1 \rightarrow 4) 低聚木糖(寡糖)的制备: 按一般乙酰化的方法制备, 低聚木糖与乙酸酐-乙酸钠加热回流 4~6 小时, 反应产物倒入冰水中析出白色固体, 用适当的溶剂(甲醇, 乙醇, 乙腈等)重结晶。

(2) 液相色谱分析条件:

色谱柱: $\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$ 。

固定相: Nucleosil ODS $10 \mu\text{m}$ (Macherey-Nagel)。

流动相: 乙腈-水-甲醇(55:40:5)。

流速: 2 mL/min (室温)。

进样量: 定性测定约 $50 \mu\text{g}$, 供质谱分析用制备量分离, 根据样品的情况每个组分一次进样量可在 $100 \sim 250 \mu\text{g}$ 左右, 经色谱

表 32 全乙酰化 β -D-1 \rightarrow 4 低聚木糖(寡糖)的物理常数

全乙酰化低聚木糖	分子量	熔点 °C	$[\alpha]_D^{25}(\text{CHCl}_3)$
木糖四乙酸酯	318	125	-25.3(C1.0)
木二糖六乙酸酯	534	154~155	-74.5(C0.9)
木三糖八乙酸酯	750	108~109	-83.4(C1.0)
木四糖十乙酸酯	966	201~202	-83.7(C0.8)
木五糖十二乙酸酯	1182	261~262	-97.8(C0.5)
木六糖十四乙酸酯	1398	260~261	-102.0(C1.5)

分离后(见图 58 和 59, 色谱数据列于表 33), 收集各组分, 分别减压蒸去有机溶剂后, 在五氧化二磷(P_2O_5)存在下冰冻干燥, 得冻干粉, 供质谱直接进样。

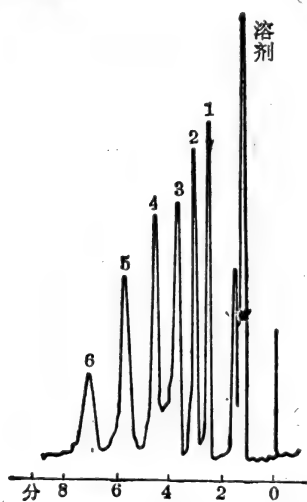
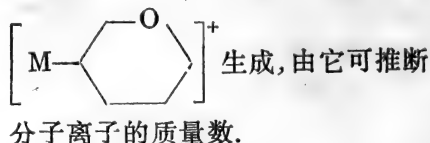


图 58 全乙酰化低聚木糖的分离色谱图

流动相: 乙腈-水-甲醇 (55:40:5)
流速: 2 mL/min

粉, 供质谱直接进样。

(3) 质谱分析: 样品 I-VI 进行 70 eV 电子轰击源质谱 (EI-MS) 和化学离子源质谱 (CI-MS)。主要碎片离子列于表 33。一个显著特征是有规律的碎裂过程, 从而在低质量区得到可相互比较的一系列强的碎片峰, 在高质量区得到了弱的碎片峰。然而, 它们是与全乙酰化木糖的残基数有关的特征离子。其最高质量的碎片离子是由 $[\text{M}-\text{AC}]^+$ 、 $[\text{M}-\text{ACO}]^+$ 或



为了直接得到准分子离子峰, 以氨为反应气体进行 CI-MS, 得到 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 在 I~III 的 CI-MS 谱中 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 为基峰, 随着糖的聚合度增大, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 峰的强度逐渐减弱, VI 的 CI-MS

表 33 全乙酰化低聚木糖的高效液相色谱和质谱数据

编 号	样 品	分 子 式	HPLC				MS*								
			CH ₃ CN:H ₂ O:CH ₃ OH (55:40:5)				EI**	m/z							
			t	K'	log K'	α			B ₂	CI (NH ₃)					
							[M+ NH ₄] ⁺ m/z(%)	m/z*** (%)	其他特征碎片离子 (%)						
I	木糖四乙 酸酯	C ₈ H ₁₆ O ₆ (CH ₃ CO) ₄ 318	2'37"	0.94	-0.028	1.42	1.60	336 (100)	275 (1.4)	139 (85.5)	157 (49.1)	199 (36.2)	259 (1.8)		
II	木二糖六 乙酸酯	C ₁₀ H ₁₂ O ₉ (CH ₃ CO) ₆ 534	3'09"	1.33	0.125			552 (100)	475 (0.1)	139 (68.6)	157 (76.5)	199 (35.5)	259 (35.4)	475 (0.1)	
III	木三糖八 乙酸酯	C ₁₂ H ₁₈ O ₁₁ (CH ₃ CO) ₈ 750	3'49"	1.83	0.262	1.37	1.65	768 (100)	691 (0.05)	139 (84.1)	157 (94.0)	199 (48.7)	259 (50.2)	475 (6.0)	
IV	木四糖十 乙酸酯	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₇ (CH ₃ CO) ₁₀ 966	4'40"	2.46	0.390	1.35	1.74	984 (18)	691 (12.7)	139 (73.8)	157 (92.4)	199 (52.2)	259 (57.2)	475 (11.5)	
V	木五糖十 二乙酸酯	C ₂₆ H ₃₀ O ₂₁ (CH ₃ CO) ₁₂ 1182	5'40"	3.20	0.505	1.30	1.66	1200 (0.3)	907 (0.4)	139 (55.4)	157 (75.4)	199 (30.5)	259 (34.0)	475 (2.9)	691 (0.07)
VI	木六糖十 四乙酸酯	C ₃₀ H ₃₆ O ₂₅ (CH ₃ CO) ₁₄ 1398	7'10"	4.31	0.644	1.35	1.99	1416 (0.2)	1123 (0.07)	139 (52.3)	157 (73.0)	199 (26.3)	259 (28.0)	475 (2.0)	691 (4.9)

* 直接进样的温度: I. 120°C II. 150°C III. 200°C IV. 300°C V. 380°C. 离子源温度: I. 120°C II. 150°C III. 200°C IV. 300°C V. 380°C.

** 除木糖外各峰强度以 m/s 97(100%) 归一化处理。

*** 最高质量碎片离子。

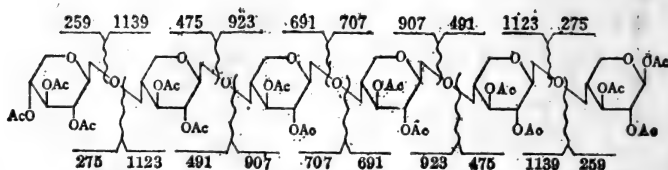


图 59 木六糖十四乙酸酯(VI)的质谱碎裂示意图

更弱,但仍可检测出来。因此 HPLC 作为多糖酸水解的分离分析手段, EI-MS 和 CI-MS 作为单糖或寡糖片段的鉴定方法, 得到各种寡糖可能的结构信息, 然后以重叠拼接的方法, 推断多糖的可能的结构序列 (一级结构)。(有关全乙酰化木糖和低聚木糖的质谱分析方法参见糖的质谱分析。)

【讨论】

多糖结构的复杂性是由于糖的多元羟基所形成的糖苷键的多样性 (1→4', 1→6', 1→3', 1→2', 1→1', 以及 α -或 β -构型等连接方式), 在适宜的色谱条件下, 部分不同连接的寡糖具有不同的保留时间 t_R , 并且质谱碎裂过程也有些差异, 结合 ^1H NMR 光谱或特异性的糖苷酶的应用, 确定苷键的构型 (α -或 β -构型)。

【文献】

陆德培、黄克武、李荣春, 生物化学与生物物理学报, 14: 501 (1982)。

黄克武、李荣春、陆德培, 同上 14: 507 (1982)。

陆德培等, 仪器仪表学报, 5: 221 (1984)。

G. B. Well, et al., *Anal. Biochem.*, 97: 184 (1979)。

G. R. Waller and O. C. Dermer *Biochemical applications of mass spectrometry* (1st Supplementary volume) Chapter 12; T. Radford and D. O. Dejongh John Wiley and Sons, New York, 1980, p. 225.

(陆德培 黄克武)

4. ^1H 和 ^{13}C 核磁共振光谱在多糖上的应用

核磁共振(NMR)的原理, 有关书中均有详述。它的操作均有专门人员进行, 所以不再叙述。下面仅介绍 NMR 在多糖研究中的应用。

^1H NMR 主要解决多糖结构中糖苷键构型问题。多糖的信号大多数集中在 $\delta 4.0 \sim 5.5$ ppm 范围。除 C1 上质子的信号在 $\delta 4.8$

~5.5 ppm 易解析外, 其他 C2~C6 上质子的信号堆集在 84.0~4.8 ppm 范围内, 用我国现有的 100 MHz 核磁共振仪是很难解析的。当然多糖上其他功能团用 ^1H NMR 是能够解析的。多糖中不同糖苷键的比例可以根据 C1 上质子峰的面积之比求得, 也就是说可以测定多糖中各种残基的比例。一般说 α 型吡喃糖其 C1 上质子的 δ 值超过 5.0 ppm, 而 β 型则小于 5.0 ppm。多糖的 ^1H NMR 的参考标准常是四甲基硅烷 (TMS)。测定的溶剂多是重水 (D_2O)。但重水本身有 HDO (~5.0 ppm) 及 H_2O (~4.0 ppm) 的讯号, 而 HDO 的讯号恰巧在糖苷键的讯号附近, 干扰较大。为了消除干扰, 可在重水中加一滴三氟醋酸, 使 HDO 信号发生顺磁位移。目前国外已有 400, 500 MHz 的 ^1H NMR 仪, 可能对多糖结构的解析更有用处。 ^1H NMR 最好在 90°C 左右测定, 这样峰形较尖, 易于解析。

^{13}C NMR 在多糖结构分析上的应用可谓是个重大发展。特别是带有微型计算机的脉冲傅利叶转换方法 (F.T) 在 ^{13}C NMR 上的应用, 使得天然丰度很低的 ^{13}C 多糖能得到清晰的光谱。 ^{13}C NMR 的化学位移范围较 ^1H NMR 为广, 其化学位移可达 200 ppm, 所以共振讯号分得开。不但能确定各种碳的位置, 而且还能区别分子的构型和构象。测定多糖的溶剂最好是氘代化溶剂, 常用的是重水 (D_2O), 也有人用氘代二甲亚砜 ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$)。其参考标准多数用 TMS。多糖样品的浓度一般配制成 50~100 mg/mL, 样品管的外径为 10~12 mm, 如果该多糖的溶解度较小, 则采用外径为 18 mm 样品管。也可用外径为 1 mm、25 μL 体积的微量管。多糖溶液的 pH 对测定光谱有影响, 一般采用较高的 pH, 这样可以破坏氢键。与 ^1H NMR 不同, ^{13}C NMR 的峰面积一般不反映碳的数目, 而峰的相对高度正比于碳的数目, 所以可以用峰的相对高度定量测定多糖中不同残基的比例。最常用的是根据不同位置的异头碳 (C1) 的峰的相对高度, 计算不同残基的相对比例。多糖的声噪比不大, 故大致要累加数万次才能得到清楚光谱。即使如此, 如果取代基或个别残基含量少于 5%, 还是不能出现共振讯号。温度

对光谱测定很有影响, 提高温度有利于多糖光谱的清晰度(一般测定温度 90~95°C)。必须指出, 温度升高, 各种碳的化学位移向低磁场移动。

对于右旋葡聚糖(dextrans), 其共振范围大致可划分三个区域: 90~95 ppm 为异头碳 C1 的共振; 70~75 ppm 为 C2、C3、C4 和 C5 共振; 60~70 ppm 为 C6 共振。如果 C1 发生 O-取代, 则其共振向低磁场位移, 大致在 97~102 ppm。同样, O-取代发生在 70~75 ppm 范围的 C2、C3、C4 或 C5 上, 则共振位移到 76~85 ppm; 对于 C6, 如共振在 62 ppm, O-取代后则位移到 68 ppm。上述规律最经得起检验的是 97~102 ppm 和 76~85 ppm。经验指出, $\alpha(1\rightarrow2)$, $(1\rightarrow3)$, $(1\rightarrow4)$ 的取代碳的特征共振 90°C 时大致上分别为 78、80 和 82 ppm。

对于葡聚糖类(glucans)可以用表34记载数值解析化学结构。

一般说 α 型连接的 C1 化学位移为 97~101 ppm, β 型的为 103~105 ppm。对于吡喃型及呋喃型多糖还可参考表 36。

表 34 葡聚糖不同位置碳的化学位移(TMS, ppm)

连接方式	异头碳构型*		化学位移	
	α	β	异头碳	连接碳
1, 2	α	α	97.5	77.1
		β	99.0	79.1
	β	α	103.9	82.1
		β	105.0	82.8
1, 3	α	α	99.8	80.8
		β		83.2
	β	α	103.9	84.2
		β		86.7
1, 4	α		101.0	78.5
	β		103.9	80.1
1, 6	α		99.4	67.4
	β		103.8	70.2

* α 为葡萄糖苷残基异头碳构型, β 为连接碳的残基异头碳构型。

表 35 Cellulose 的 ^{13}C NMR (TMS)

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	
还原末端	α	92.0	S	S	80.7	S	60.6
	β	96.3	S	74.9	80.7	75.1	60.6
内部残基	102.7	73.2	74.9	80.1	75.1	60.6	
非还原末端	S*		76.7	70.3	76.9	61.2	

* S 表示峰很小或被其他峰掩盖。

表 36 呋喃糖与吡喃糖的不同化学位移值比较 (ppm)

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OCH_3
β -D-呋喃核糖	102.9	76.8	74.6	84.2	64.4		
β -D-吡喃核糖	95.6	70.3	72.9	72.9	64.6		
α -D-甲基-呋喃葡萄糖	104.0	77.7	76.6	78.3	70.7	64.2	57
α -D-甲基-吡喃葡萄糖	100.7	73.0	74.7	71.2	72.7	62.3	56.4

用化学位移解决甘露聚糖的 α 或 β 构型是困难的, 但可用裂分常数决定。一般 $^1\text{J}_{\text{C-H}}=170\text{ Hz}$ 为 α 型, 160 Hz 为 β 型。

杂多糖的 ^{13}C NMR 光谱的解析完全可参照同多糖的方式来解析。表 37 为 α -D-葡萄糖吡喃糖(A), α -L-鼠李吡喃糖(B), α -D-半乳吡喃糖(C), β -D-半乳呋喃糖(D), β -D-葡萄糖吡喃糖酸(E), α -D-半乳吡喃糖(F) 和 β -D-葡萄糖吡喃糖(G) 等七个不同单糖残基的重复单位组成的杂多糖 K-41 的化学位移值, 其重复结构如图 60 所示。测定光谱的仪器为 62.84 MHz , 于 70°C 重水中测定。从表 37 中可知 187.75 ppm 为葡萄糖酸(E)的 $\text{C}=\text{O}$ 的共振讯号, 19.65 ppm 为鼠李糖(B)上 CH_3 的共振讯号。在异头碳 $99\sim 110\text{ ppm}$ 共振范围清楚呈现 7 个共振信号, 立刻就可肯定有 7 个残基组成。如果采用“抗门控实验”(antigated experiment) 技术, 还可从它们的相对强度计算出定量比。另外从门控去偶技术得到异头碳与异头质子间的裂分常数 $^1\text{J}_{\text{C-H}}$, 测得 5 个约为 170 Hz , 2 个约为 160 Hz 。从而可知重复结构中 5 个为 α 构型, 2 个为 β 构型。但实际上 $^1\text{J}_{\text{C-H}}$ 值只适合于吡喃糖, 呋喃型是不可靠

表 37 K-41 多糖的 ^{13}C NMR (TSP)

化学位移 (ppm)	碳 位 置	裂 分 常 数 (Hz)
187.75	C-6E	
109.00	C-1D	$^1J_{\text{C-1D,H-1D}} 172.5$
105.50	C-1G	$^1J_{\text{C-1G,H-1G}} 160.15$
104.80	C-1E	$^1J_{\text{C-1E,H-1E}} 160.0$
104.45	C-1B	$^1J_{\text{C-1B,H-1B}} 171.0$
101.55	C-1C	$^1J_{\text{C-1C,H-1C}} 169.5$
101.05	C-1F	$^1J_{\text{C-1F,H-1F}} 171.0$
99.50	C-1A	$^1J_{\text{C-1A,H-1A}} 170.0$
87.90	C-2D	$^1J_{\text{C-2D,H-2D}} \left. \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right\} 145 \sim 148$
86.10	C-3D	
85.15	C-4D	
79.90		$\left. \begin{array}{l} \text{C-3B} \\ \text{C-3C} \\ \text{C-4E} \end{array} \right\}$
79.55		
78.85	C-3G; C-5G	
78.70		
76.00		
75.90	C-2G	
75.75		
74.60, 74.35, 74.15		
75.80, 73.45, 72.95		
72.70, 72.40, 72.20		
71.95	C-6F	
70.85, 70.20		
68.75	C-6A	
65.95	C-6D	
63.75	C-6C, C-6G	
19.70	C-6B	

注 以 TSP 作内标于 D_2O 中。

的。据文献报道, L-阿拉伯呋喃糖与 D-半乳呋喃糖之值约为 172 Hz(β)和 175 Hz(α)。从表中可知 190 ppm 处的半乳呋喃糖之 $^1J_{\text{C-H}}$ 值为 172.5 Hz, 所以应该是 β 构型。所以 K-41 多糖重复单位中残基应为 4 个 α 构型和 2 个 β 构型。

多糖中其他取代基的大致化学位移如下: $\text{O}-\text{CH}_3$ 55~60

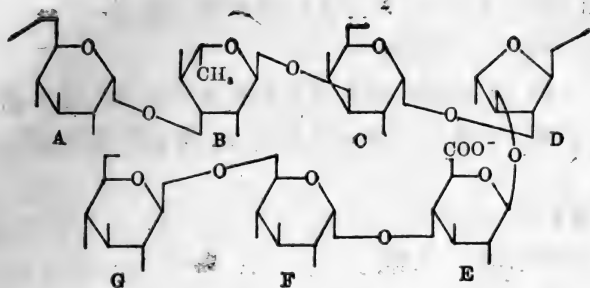


图 60 杂多糖 K-41 的重复结构单位

ppm; O—COCH₃ 19~20 ppm (CH₃) 和 165~170 ppm (C=O);
 N—COCH₃ 22~24 ppm (CH₃) 和 175~177 ppm (C=O); O—
 CH₂CH₂OH=26~30 ppm (OH₂) 和 128~135 ppm (C—O—C);
 O—C₆H₅CH=99~102 ppm (O—C—O)。

【文献】

Gorin, P. A. J., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **38**:13 (1981).

方积年: 国外药学 (抗生素分册), **3**(2):107(1982)。

(方积年)

(三) 用于糖类结构分析的化学方法

1. 多糖的部分水解

对多糖进行部分水解或选择性水解, 都可以把大分子裂解成较小片段。部分水解产物的基本结构常有代表性, 分子量较原样品小, 有利于进行各种分析。

经部分水解的多糖, 可用于分级; 对所生成的寡糖鉴定, 可以提供异头物构型与顺序的信息。例如水解产物中有龙胆二糖、龙胆三糖, 则表明其中有 $\beta(1\rightarrow6)$ 糖苷键, 如水解产物中有昆布二糖、纤维二糖等, 则表明其中有 $\beta(1\rightarrow3)$ 糖苷键或 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键。

控制酸的浓度、温度、时间等可以达到不同程度的部分水解的目的。一般说来, 呋喃型糖残基较吡喃糖残基易水解, 故在杂多糖或寡糖中, 呋喃型己糖或戊糖在轻微水解中先脱落下来。另外, 多糖中的 $(1\rightarrow6)$ 糖苷键对酸水解也相对稳定一些。

利用专一性的酶解,也可得部分水解产物。

(i) 香菇葡聚糖的部分水解

香菇多糖 Lentinan 是用热水自香菇中提得的葡聚糖,分子量 100 万,难溶于水。可利用甲酸助溶,并进行部分水解,然后分级。

【试剂】

85% 甲酸,95% 乙醇。

【操作】

部分水解:取 1 克样品碾成细粉末,用 85% 甲酸水解 20 分钟,温度控制在 85°C,反应物透析至无酸性后,加三倍乙醇沉淀。沉淀物经红外光谱分析,在 1720 cm^{-1} 有吸收,表明有甲酰基存在。

水解去掉甲酰基:将上面含有甲酰基的产物分散在水中,在水浴上加热 3 小时,以去掉甲酰基。

分级提取小香菇多糖:已降解的样品,用水 50 mL 提取,过滤,滤液加入酒精 150 mL,离心,得较均一的小香菇多糖 59 mg (8.9%),其平均分子量用 Somogyi-Nelson 方法测定为 16 200,分子量也可用葡聚糖凝胶 Sephadex G-20 柱离析测定。

利用此分子量较小的小香菇多糖作为代表,进行各种化学分析,得知为 $\beta(1\rightarrow3)$ 葡聚糖。

【文献】

Jones, J. K. N., *J. Chem. Soc.* 3292 (1950).

Sasaki, T., et al., *Carbohydr. Res.* 47: 99~104 (1976).

(ii) 半乳甘露(杂多糖)聚糖的逐步水解

半乳甘露聚糖(来自 rodlike ascocarps of *cordyceps cicadae*)中的半乳糖、甘露糖摩尔比为 4:3,可利用多糖链末端的呋喃型残基较易水解脱落,例如用酸逐步水解,首先释放的是末端半乳糖呋喃残基,中心组成部分是甘露糖残基,最后的大级分仅由甘露糖残基组成。

【试剂】

硫酸, 碳酸钡, 阳离子交换树脂 H^+ , 纸层析有关试剂。

【操作】

多糖样品 20 mg 与 5 mmol/L 硫酸 5 mL 封管加热, $100^{\circ}C$ 5 小时, 然后对无离子水透析, 外部溶液用碳酸钡中和, 过滤, 滤液经 Amberlite IR-120 H^+ (或国产碳酸型强酸性阳离子交换树脂) 柱除盐, 浓缩后, 用蒸发皿在水浴中蒸干, 残渣作纸色谱分析。

透析袋内部溶液在蒸发皿中蒸干, 残渣用 50 mmol/L 硫酸封管加热 $100^{\circ}C$ 4 小时, 溶液透析, 透析的外部溶液同上处理, 非透析部分再用 250 mmol/L 硫酸封管加热 $100^{\circ}C$ 5 小时后, 用碳酸钡中和, 过滤, 滤液同上处理, 作纸色谱分析, 分析流程见图 61。

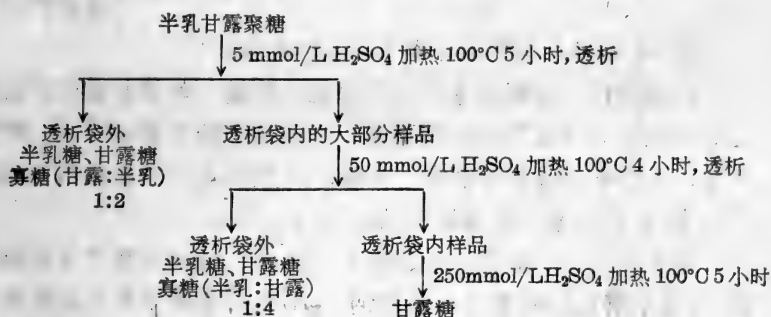


图 61 半乳糖甘露聚糖逐步水解流程

【文献】

Ukai, S. et al., *Carbohydr Res.* 100: 109~116 (1982).

(iii) 人参果胶的部分水解

从人参根部提取的人参多糖经脱淀粉后的人参果胶样品, 为含半乳糖醛酸较多的杂多糖, 其成分除半乳糖醛酸外, 尚含有半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖等。利用糖醛酸间苷键对酸特殊稳定性及呋喃糖不稳定性等, 采取部分水解, 获聚糖醛酸片段或其他片段。

【试剂】

硫酸, 95% 乙醇, 甲醇, 纸层析所用试剂。

【操作】

取人参果胶 0.1g 加 0.9% 的稀硫酸 8~10 mL, 封管 $100^{\circ}C$

水解 55 分钟, 冷却中和后, 加两倍体积 95% 的乙醇醇析, 将醇析的沉淀物完全酸水解或甲醇解, 用纸色谱或气相色谱分析, 沉淀物半乳糖醛酸含量有 81.7%, 半乳糖 18%, 而阿拉伯糖、鼠李糖几乎全部被水解下来而存在于乙醇上清液中(蒸去乙醇所得残渣经纸色谱或气相色谱检测)。

同上配方封管 100°C 水解 3 小时, 冷却中和后, 加两倍体积甲醇沉淀, 分析沉淀物, 聚半乳糖醛酸含量可达 99%, 是人参果胶中的聚半乳糖醛酸片段。

【文献】

张翼伸等, 人参多糖的研究(I), 东北师大学报自然科学版, 2, 97~104(1982).

(张翼伸)

2. O-糖苷键的稀碱水解(β -消除反应)

温和条件下的稀碱水解, 可以把与肽链上丝氨酸或苏氨酸的羟基相联的单糖或糖链水解下来. 与天冬酰胺相联的 N-型联键糖链, 不能被稀碱水解下来. 所以, β -消除反应在糖蛋白的结构分析中, 常被用来区别糖链和肽链的连接性质。

碱水解后, 一般用分子筛凝胶过滤法, 分离水解下来的寡糖链. 若在水解反应时加入四氢硼钠(NaBH_4), 水解下来的糖链的还原末端糖基立即被还原为糖醇, 很容易被识别出来。

肽链上与糖链相连的丝氨酸和苏氨酸, 在四氢硼钠存在下, 水解后分别转变为丙氨酸和 α -氨基丁酸. 但是, 因为不和糖链相联的羟基氨基酸也有非特异性地转变为丙氨酸和 α -氨基丁酸的可能性, 因此, 为了找到糖基联接的位置, 用亚硫酸钠代替四氢硼钠, 水解后, 只有原来和糖基相联的丝氨酸或苏氨酸定量地转变为磺基丙氨酸和 α -氨基- β -磺基丁酸。

下面以酵母甘露聚糖的 β -消除反应为例, 说明操作过程。

【试剂】

酵母胞壁甘露聚糖(提取方法见各论第 217 页), Dowex 50 (H^+) 树脂。

【操作】

酵母胞壁甘露聚糖 200 毫克溶于 100 毫升 0.1 mol/L NaOH 中, 置室温 (25°C) 18 小时。

加入 Dowex 50(H⁺) (或 2 mol/L 乙酸) 中和稀碱溶液以终止反应。用 pH 计或 pH 试纸监测至 pH=7。过滤除去 Dowex 50 颗粒 (或减压蒸馏除去过量的乙酸)。

冷冻干燥, 所得固形物溶于 4 毫升水中。

用生物胶分子筛过滤 (BioGel P₂ 柱 < 400 mesh, 2 × 200 cm), 水洗脱, 洗脱液取样用浓硫酸酚法监测含糖峰的出现, 得到洗脱图谱如图 62。分部收集大分子部分和各寡糖组分。A、B、C、...H 分别代表 Man, Man₂, Man₃, ... Man₈ 各组分。

【讨论】

(1) β-消除反应所用的碱液浓度、反应温度和反应时间, 可以因样品的不同而有较大幅度的变动。NaOH 浓度从 0.05~0.5 mol/L, 温度从 0~45°C, 反应时间从 15~26 小时不等。对一种新的糖蛋白样品, 宜试验不同条件, 以求在 O-型联键水解完全的前提下, 选择尽可能低的碱浓度和温度, 尽可能少的时间, 以避免其他的副反应。

(2) 如果样品为糖肽片段, 则应注意, 与处于氨基末端或羧基末端的羟基氨基酸相联的糖链, 不能被稀碱水解下来。即 β-消除反应只能水解下与氨基、羧基都被取代的羟基氨基酸相联的糖链。

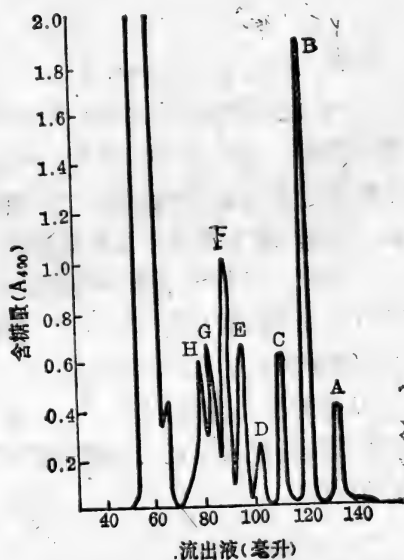


图 62 酵母胞壁甘露聚糖经稀碱水解后 BioGel P₂ 柱分子筛过滤后的洗脱图谱

(3) 如果样品量极少, 可以在水解反应时加入氚标记的四氢硼钠 (NaB^3H_4), 然后按照放射标记检测经凝胶柱分离的寡糖峰位置。

【文献】

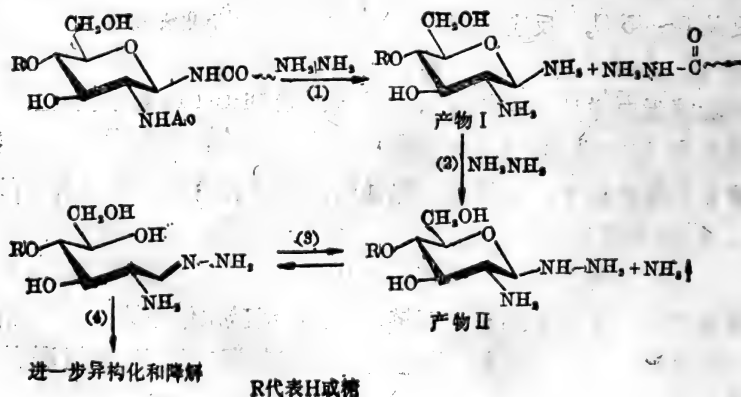
- Simpson, J., et al., *Biochemistry*, **11**: 1849 (1972).
 Nakajima, T., et al., *J. Biol. Chem.* **249**: 7679 (1974).
 Mclean, C., et al., *Analyt. Biochem.*, **55**: 72 (1973).
 Zhang W-J., et al., *J. Biol. Chem.*, **256**: 10073 (1981).

(张惟杰)

3. N-糖苷键的胍解法

研究糖蛋白糖链部分结构的最大问题是样品的纯度, 因为大部分糖蛋白在一个分子中含几个糖链。在结构分析之前必须将这些糖链分级分离, 即使只含单个糖链的糖蛋白, 糖链的分级分离仍是必要的, 因为通常会发现糖链的细微不均一性。

释放与天冬酰胺连接的糖链的方法有酶解和化学的方法。由于内切糖苷酶的底物专一性, 阻碍了糖苷酶用于与天冬酰胺连接的复合型糖链的研究。胍解法则没有任何限制。Matsushima 和 Fujii 最先使用胍解, 以后由 Bayard 和 Montreuil 发展。当具有天冬酰胺连接的糖链的糖肽和糖蛋白与无水胍一起加热, 将发生下列反应:



反应(1)和(2)进行得很快,反应(3)则比较慢,然而,一旦反应(3)的产物形成,即进行各种异构化和降解反应。Kobata 根据反应的性质,对胍解条件作了修改,用 N-乙酰化代替脱氨作用,并调整了胍解时间,将与天冬酰胺连接的糖链完整地释放。乙酰化后,释放的寡糖链的还原端就没有被降解的危险了,可以进行各种方法的纯化。不同的胍解时间,从各种糖蛋白释放的寡糖量不同。下面介绍 Kobata 的胍解方法。

【试剂】

无水胍: 将 80% 的水合胍 (50g) 与二甲苯 (500g) 和 CaO (500g) 混合,在圆底烧瓶中于室温放置过夜,混合物在装有氯化钙干燥管的回流冷却器中回流 3 小时,然后在脱水条件下蒸馏,收集在 93~94°C 蒸出的部分,无水胍与二甲苯分为两层,将下层的无水胍分出,装在有 Teflon 封闭的螺旋盖的密封小管中,在干燥、低温(4°C)、暗处储藏。

硼氢化钠(NaB^3H_4): 溶解于新鲜蒸馏的二甲基甲酰胺(60 mmol/L, 比放射性 200~400 mCi/mmol), 置于有螺旋盖的密封小管, 存放于 -10°C (在此条件存放, NaB^3H_4 溶液至少可保持稳定一年)。使用时将含有适量 NaB^3H_4 的溶液溶解于 0.05 mol/L NaOH 中。

麦芽三糖或 N-乙酰神经氨乳糖。

【操作】

胍解: 含 0.2~1 mg 与天冬酰胺连接的糖链的糖肽或糖蛋白, 悬浮在 0.5~1 mL 新鲜蒸馏的无水胍中, 在密封管中 100°C 加热 8~12 小时, 通常加热 1 小时后, 样品全部溶解。反应混合物在室温减压蒸干, 用浓硫酸吸收蒸发的胍, 残留物中加入二甲苯再蒸干, 如此反复数次, 将胍除净, 然后溶解于饱和 NaHCO_3 溶液, 加入乙酸酐, 将样品中的全部氨基乙酰化, 反应液通过 Dowex 50 w (H^+ 型) 柱, 并用 5 倍柱体积的蒸馏水洗脱, 将流出液和洗脱液合并, 减压蒸干, 在残留物中加入适量麦芽三糖或 N-乙酰神经氨乳糖, 作为内标准, 以此计算释放的寡糖链的量。然后将残留物溶于

微量蒸馏水,在 Whatman 3 号滤纸上进行层析,除去多肽部分的降解产物。用正丁醇-乙醇-水(4:1:1)为展层剂,下行展层 2 天,取出,在通风橱中凉干。将从原点至 5 cm 部分(寡糖留于此部分)剪下,用水洗脱,洗脱液减压蒸发至干,作 NaB^3H_4 还原。

硼氢化钠(NaB^3H_4)还原:将新鲜稀释的、含有 $3\mu\text{mol}$ (1mCi) NaB^3H_4 的 0.05 mol/L NaOH 加至已干燥的样品中,水浴 30°C 保温 4 小时,再加入 $70\mu\text{L}$ 含 7 mg NaBH_4 的 0.05 mol/L NaOH,继续保温 2 小时,使还原完全。然后加入 1 mol/L 乙酸,中止反应(乙酸分次滴入,至加入 1 滴乙酸不再产生很多气泡为止)。中和了的溶液通过 Dowex 50 w(H^+ 型)柱(2mL),用 5 个柱体积的蒸馏水洗脱,合并流出液和洗脱液,减压蒸干,加入甲醇,再减压蒸干,如此反复数次,至硼酸全部除净。残留物中加入 1~2 滴蒸馏水,样品溶解后在 Whatman 3 号滤纸上进行层析,以乙酸乙酯-吡啶-乙酸-水(5:5:1:3)为展层剂,下行展层 2 天。从糖肽或糖蛋白释放的放射性标记的寡糖醇与放射性标记的麦芽三糖醇或 N-乙酰神经氨乳糖醇,在层析中由于迁移速度不同,两者可完全分开,因此样品和内标准的放射性量在用水从纸上洗脱后,能准确测定。根据这些数值和样品的分子量可计算 1 mol 样品胼解释放的总糖链量。纸层析并能有效地除去 NaB^3H_4 ,它在层析中比内标准移动得快。层析完毕后,取出,凉干,在同位素扫描器中确定有放射性的部位,将其剪下,用水洗脱,洗脱液减压蒸干。这样得到的寡糖部分即可进行寡糖链结构分析。

一般胼解 10 小时,绝大部分与天冬酰胺连接的糖链可以完全释放。然而不同的样品释放寡糖的速度不同,因此,最适的胼解时间须通过实验确定。样品必须非常干燥,是十分重要的。

【文献】

Matsushima, Y. & Fujii, N., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **30**: 48~50 (1957).

Bayard, B. & Montreuil, J., *Methodologie de la Structure et du Metabolisme des Glycoconjugues*, pp. 208-18. CNRS, Paris, 1974.

Takasaki, S., Mizuochi, T. and Kobata, A., *Methods in Enzymology* Vol. 83, pp. 263-68. Ed. Ginsberg, V., Academic Press. (1982).

4. 高碘酸氧化

高碘酸可以选择性地断裂糖分子中连二羟基或连三羟基处,生成相应的多糖醛、甲醛或甲酸。反应定量地进行,每开裂一个C—O键消耗一分子高碘酸。通过测定高碘酸消耗量及甲酸的释放量,可以判断糖苷键的位置、直链多糖的聚合度、支链多糖的分枝数目等。

以葡聚糖为例,以1→2或1→4位键合的糖基经高碘酸氧化,平均每个糖基仅消耗一分子高碘酸,并且无甲酸释放。以1→3位键合的糖基不被高碘酸氧化。以1→6位键合的糖基或非还原末端基经高碘酸氧化,消耗二分子高碘酸,同时释放一分子甲酸。

如香菇多糖(Lentinan)经高碘酸氧化结果,平均每个葡萄糖基消耗0.57 mol的高碘酸,同时产生0.22 mol的甲酸(相对高碘酸消耗量,结果偏低),证明分子中一定存在连三羟基。由高碘酸消耗值(0.57),亦可以推算出1→3与1→6键(或分枝末端基)之比为5:2。当然还要配合Smith降解与甲基化试验才可做最后结论。

【试剂】

高碘酸钠溶液(15~20 mmol/L); 0.01 mol/L 标准碘液, 乙二醇, 0.01 mol/L NaOH; 碘酸钠溶液(0.015 mol/L)。

【操作】

精确称取多糖样品,加一定量15~20 mmol/L高碘酸钠溶液,置4~20°C条件下于暗处放置,间或振摇。于4, 24, 48...小时间隔时间取样稀释250倍后,使用紫外分光光度仪在223 nm处测定光密度。随着高碘酸被消耗,光密度值逐渐下降,直至达一稳定值。将测得样品溶液的光密度值与原高碘酸钠溶液的吸收值相比较。与等分子的碘酸钠溶液相比较,0.015 mol/L的高碘酸钠及碘酸钠溶液光密度值约为0.6和0.1。由所测高碘酸的浓度下降

的数值,即可推算出平均每个糖基消耗的高碘酸量。

此外,也可采用 0.1~0.25 mol/L 的高碘酸钠溶液对多糖进行氧化,用 0.01 mol/L 标准碘液滴定高碘酸消耗量。一般温度高、高碘酸浓度高则反应时间宜短。将样品溶液加乙二醇,放置 10 分钟,以中止反应还原剩余的高碘酸,然后用 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液滴定甲酸的释放量。

【讨论】

高碘酸氧化反应必须在控制的条件下进行,否则容易发生超氧化反应(over-oxidation),结果消耗过量的高碘酸,同时无规律地产生多量的甲酸。一般使多糖与最小量的高碘酸钠反应,溶液的 pH 值控制在 3~5,而且一定要在低温、避光处放置,同时需做空白试验。

【文献】

Miyazaki, T., et al. *Chem. Pharm. Bull.* **21**: 2545 (1973).

Aspinall, G. O. et al., *Chem. Ind. (London)* **7**: 1216 (1957).

Sasaki, T. et al., *Carbohydr. Res.* **47**: 99~104 (1976).

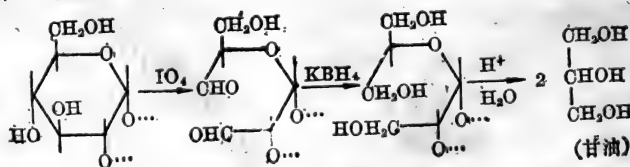
(李润秋 张翼仲)

5. Smith 降解

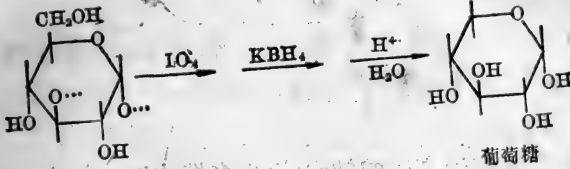
Smith 降解是将高碘酸氧化产物还原后进行酸水解或部分酸水解。由于糖基之间以不同的位置缩合,用高碘酸氧化后则生成不同的产物。将氧化产物用硼氢化合物(如硼氢化钾或硼氢化钠)还原成稳定的多羟基化合物,经酸水解后用纸层析或气相层析鉴定水解产物,由降解的产物可以推断糖苷键的位置。

以葡聚糖为例反应式如下:

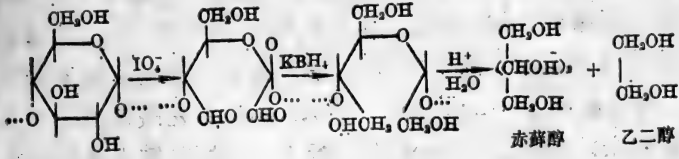
以 1-2 位键合



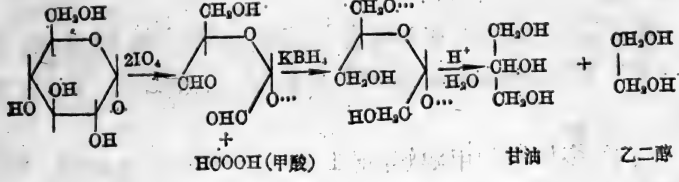
以1→3位键合



以1→4位键合



以1→6位键合



非还原末端基的降解产物亦为甘油。

由于在实验中需加入乙二醇以破坏剩余的高碘酸，终产物中检测乙二醇就没有意义了。一般以甘油、赤藓醇和葡萄糖(或其他糖)做为这几种糖苷键的特征终产物。虽然以1→2位、以1→6位结合的糖基或分枝末端基经 Smith 降解都有甘油产生，但以1→2位结合的糖基经高碘酸氧化不产生甲酸，可借以区别。

亦可以对高碘酸氧化的产物还原后进行缓和的部分酸水解，仅仅断裂乙缩醛键，获得未被高碘酸氧化破坏的多糖或寡糖片段。

例如，针裂蹄葡聚糖经 Smith 降解后，降解产物被完全水解，用气相色谱分析，检识出甘油、赤藓醇和葡萄糖。由此证明分子中存在1→3、1→4及1→6糖苷键或分枝末端基。多聚糖醇经部分酸水解获得甘油、赤藓醇及降解的多糖，该多糖经再次用高碘酸氧化，仅消耗微量的高碘酸，由此证明分子的主干为1→3葡聚糖。

1→6 及 1→4 糖苷键位于分枝或分子末端。

【试剂】

15 mmol/L 高碘酸, 甲醇, 乙二醇, 0.1 mol/L 醋酸, 2 mol/L 硫酸, 碳酸银, 无水甲醇-HCl (1 mol/L)。

【操作】

称取多糖溶于高碘酸钠水溶液, 多糖浓度一般为 0.1~0.5%。置避光处氧化至高碘酸的消耗量达一稳定值, 加乙二醇并搅拌 30 分钟以还原剩余的高碘酸。对流水透析 48 小时, 蒸馏水透析过夜, 于 40°C 以下减压浓缩至小体积, 加入硼氢化钾以还原多糖醛, 于室温、暗处搅拌 18~24 小时。用 0.1 mol/L 乙酸调 pH 至 5.5, 以分解剩余的硼氢化物, 对流水透析 48 小时, 蒸馏水透析过夜, 冻干获多糖醇。

取多糖醇 10 mg, 加 2 mol/L 硫酸, 封管水解 18 小时, 用碳酸钡粉末中和, 过滤, 残渣用少量水洗涤, 合并滤液与洗液, 减压蒸干。

或者, 多糖醇的甲醇解: 用 1 mol/L HCl-无水甲醇, 100°C 封管水解 10 小时, 用碳酸银粉末中和, 过滤, 残渣用甲醇洗涤, 合并滤液与洗液, 减压蒸干。

上述多糖醇的酸水解或甲醇解产物, 分别以三甲基硅烷衍生物进行气相层析, 3°C/min, 由 120~190°C 程序升温, 以标准品对照检识降解产物。也可以通过纸色谱或薄层色谱等方法检识。

【文献】

李润秋、张翼伸等, 药学学报. 18(16): 430~433 (1983)。

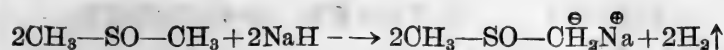
Sasaki, T. et al., *Carbohydr. Res.* 47: 99 (1976)。

(李润秋 张翼伸)

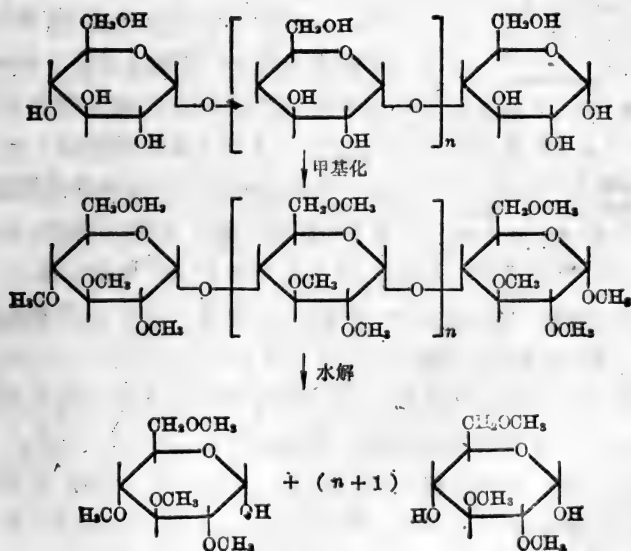
6. 甲基化反应(Hakomori, 箱守仙一郎法)

Haworth 的硫酸二甲酯甲基化方法已使用多年, 但它对于分子较大的寡糖或多糖需要反复多次地反应, 往往还不能完全甲基化。Hakomori 创造的二甲基亚磺酰阴离子法能非常有效地将糖羟基转化为醇钠, 再进一步用碘甲烷反应就可生成甲醚。反应方

程式如下:



此法快速、可靠,对寡糖和多糖都十分有效,一般只需要反应一次即可达到完全甲基化。反应在常温下进行并且以二甲亚砜为介质,这是一种强极性溶剂,能溶解大多数的多糖、糖蛋白和糖脂,因此适用范围很广,各种不同领域的工作者都乐于采用。得到的全甲基化多糖除还原末端(C-1位)上的甲基在一般水解条件下易于脱掉外,其他位上的甲基都很稳定而不被水解。因此将甲基化多糖水解后接着将新生成的羟基乙酰化,用气相色谱法分析生成的各种单糖的甲基衍生物,根据其甲基的数目和位置,就可以判断单糖的组成和连接键型。如以 $\alpha(1\rightarrow4)$ 葡聚糖为例,可用下列方程式表示:



2, 3, 4, 6-O-四甲基葡萄糖、2, 3, 6-O-三甲基葡萄糖这一套程序已成为寡糖、多糖及复合多糖结构分析的重要手段。

【试剂】

无水二甲基亚砷：二甲基亚砷(分析纯, 北京化工厂), 加入氯化钙并蒸馏, 得到的纯品加入 5 \AA 分子筛以保持干燥。

氢化钠(西德 Merck, 含量约 80%), 碘甲烷(分析纯, 太仓长江化工厂, 通过活性氧化铝柱以除去碘)。

【操作】

(1) 甲基亚砷酰负离子的制备：从矿物油中取出 80% 的氢化钠, 称取 2g 置于三口圆底烧瓶中, 用干燥的正戊烷洗三次, 每次 30 mL, 以除去包在氢化钠粉末外面的石蜡。倾去正戊烷。安装上冷凝管、温度计及插有粗针头的橡皮塞。用水泵减压抽去剩余的正戊烷, 通入干燥的氮气, 直至氢化钠呈粉末状。加入 30 mL 无水二甲基亚砷, 于 50°C 水浴上搅拌 20 分钟后, 注意观察温度计, 勿使温度高于 $60\sim 65^\circ\text{C}$, 反应物变为浅绿色。再搅拌 2 小时至无气泡产生为止。溶液呈墨绿色。

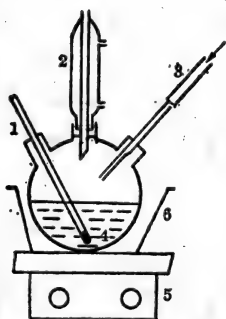


图 63 制备甲基亚砷酰负离子的装置

1. 温度计
2. 冷凝管
3. 通氮气管
4. 磁力搅棒
5. 磁力搅拌加热器
6. 水浴锅

反应完成后, 产物冷却到室温, 取出 0.1 mL, 用 5 mL 蒸馏水稀释, 以酚酞作指示剂, 用 0.1 mol/L 盐酸滴定。2 mL

左右滴定值表明反应完全, 产物质量较好。接着将产物迅速移至小瓶, 充氮封口保存在冰箱, 能用一个月。

(2) 糖的甲基化反应：根据样品的性质选择合适的温度将样品真空干燥约一昼夜。加入足够溶解样品的二甲基亚砷, 用电磁搅拌或超声波帮助溶解, 至溶液澄清后再搅拌一小时。在氮气保持下加入甲基亚砷酰负离子, 搅拌 1.5~2 小时。用水浴冷却, 逐滴加入碘甲烷, 保持在 30°C 下搅拌 0.5~1 小时。

后处理:寡糖和多糖的甲基化就其反应条件是大同小异的,但因其分子大小有别,采用的后处理方法不同。

寡糖甲基化产物的后处理:将得到的反应混合物倒入适量蒸馏水中,用氯仿萃取三次,再用水洗萃取液三次。将合并后的氯仿溶液通过无水硫酸钠柱子以除去水分。减压蒸馏除去氯仿,得到糖浆状甲基化产物。

多糖甲基化产物的后处理:将得到的反应混合物装入透析袋,在流动的自来水中透析一天左右,冷冻干燥成干粉状。

甲基化全过程的检查:用红外光谱观察 $3300\sim 3600\text{ cm}^{-1}$ 处有无羟基吸收峰。用三苯基甲烷(triphenyl methane)显色法检查反应物中甲基亚磺酰负离子是否过量。

例1 葡聚糖(分子量数万)的甲基化反应

称取 300 mg 样品于 $40\sim 50^\circ\text{C}$ 下真空干燥 3 小时,再于 70°C 下真空干燥 3 小时。加入 40 mL 二甲基亚砷,开动电磁搅拌,溶液澄清后再搅拌 1 小时。在氮气保护下加入 5 mL 1.9 mol/L 的甲基亚磺酰阴离子,开始出现大量絮状物,经搅拌后溶解。继续搅拌 1.5 小时后,用水浴冷却,逐滴加入碘甲烷 5 mL,保持在 30°C 以下,搅拌几分钟后反应物变得清亮呈桔黄色,1 小时后停止反应。将产物装入透析袋,在流动的自来水中透析一天,然后冷冻干燥。

例2 寡糖的甲基化反应

称取约 2 mg 样品, 40°C 下真空干燥 20 小时,加入 1 mL 二甲基亚砷,搅拌至样品溶解。在氮气流下加入 1.8 mol/L 左右的甲基亚磺酰阴离子 1 mL,搅拌 2 小时。滴加碘甲烷 0.4 mL,继续搅拌至反应物成为淡棕色透明胶液,反应物倒入适量蒸馏水中,用氯仿萃取三次。再用水洗萃取液三次。将样品的氯仿溶液通过一无水硫酸钠柱除水,减压蒸馏除去氯仿,得糖浆状甲基化产物。

(3) 甲基化糖的水解及乙酰化:甲基化多糖一般分二步水解。首先在样品中加入 90% 甲酸 1 mL,充氮,在封闭管里 100°C 油浴水解 6 小时。水解毕,抽气去除甲酸,再加 0.5 mL 2 mol/L 三乙酸,充氮,在封闭管里 100°C 油浴,第二步水解 5~6 小时,然后

再完全去除三氟乙酸。

甲基化寡糖水解只需一步，即用三氟乙酸就可。方法同甲基化多糖第二步水解。

上述水解物溶解在 0.5 mL 水中，加入 1~5 mg 氢硼化钠，在 30°C 还原 3 小时以上。加入适量 Amberlite IR-120 (H⁺) 树脂，终止还原反应且使混合物的 pH 在 4 以下。取出上清液（注意不要把树脂吸走），再加甲醇，再次取出上清液，然后把二次收集的上清液混合浓缩至干。硼酸（白色粉末）残留在混合物里，加甲醇溶解，再浓缩，反复加甲醇多次，直至白色粉末消失为止。

上述混合物加入 0.2 mL 乙酸酐和 0.2 mL 吡啶，在 100°C 浴乙酰化 1 小时，反应完加 0.5 mL 水，真空浓缩，待溶剂挥发干，再加甲醇洗去残留的吡啶，然后用 0.2 mL 甲醇或氯仿溶解样品，作气相色谱分析。

(4) 气相色谱分析：气相色谱仪装有火焰离子化检测器，用 0.3% OV275-0.4% GE-XF1150 柱，大小 3 mm × 2 m，装有 Shimalite W (80~100 目) 采取程序升温，柱温先在 120°C 保持 4 分钟，然后以每分钟 1°C 升温到 180°C，氮气为载气，流速为 50 mL/min。用微量注射器注射用甲醇或氯仿溶解的样品，注射量 2~5 μL，同时打开记录仪。与已知对照样品比较，从峰的位置（即滞留时间）及大小确定糖苷键的种类及相对量，并从中分析。

【讨论】

(1) 二甲基亚磺酰阴离子的制备反应对空气和温度很敏感，温度超过 85°C 分解反应加速，所以反应温度不应超过 70°C，而且必须在通氮气下进行。甲基化反应也必须在通氮气下进行，而且各种试剂必须干燥。试剂越是干燥，则甲基化次数越是少，所以二甲基亚砷必须用 4 Å 分子筛干燥，碘甲烷必须重蒸。

有的多糖不溶解于二甲基亚砷，可以先用 30% 氢氧化钠和硫酸二甲酯先甲基化一次（即 Haworth 法），然后再按上述方法甲基化。

(2) 有的难溶多糖，可经 Amberlite IR-120 (H⁺ 树脂) 处理，

制成 H⁺ 型多糖, 便于溶解。

(3) 水解条件不能过分强烈, 特别对寡糖。

(4) 在甲基化寡糖乙酰化时, 控制乙酰化时间十分重要, 不能过长。

(5) 在作气相色谱分析前, 一定要去除样品中的吡啶。

【文献】

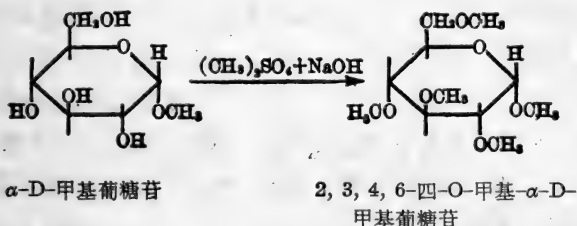
Hakomori, S., *J. Biochem. (Tokyo)* **55**:205 (1964).

Bauvala, H. et al., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **38**:391 (1981).

(于海妮 竺安钱世钧方积年)

7. 甲基化反应(硫酸二甲酯法)

在浓碱溶液中, 硫酸二甲酯是甲基糖苷的良好甲基化试剂。它首先由 Denham 和 Woodhouse 用于纤维素的甲基化, 随后 Haworth 证明此法对简单糖类及糖苷类都能适用, 从而被广泛地使用。反应方程式为



此法的优点是试剂便宜、操作简便, 而且以水作为溶剂, 大多数糖类易于溶解。缺点是甲基化不易完全, 如要得到全甲基化的产物, 往往需要反复多次反应才能完成。这种一次反应不完全的特点恰可被利用来制备部分甲基化糖, 所得混合物经适当分离纯化即可得到多种或甲基数目不同、或甲基位置不同的部分甲基化糖。此法以甲基糖苷作原料最为适宜, 但在严格控制反应温度的情况下, 还原性的糖也可以直接用作原料, 只是所得产率偏低。

【试剂及装置】

α -D-甲基葡萄糖苷(美国 Sigma 公司), 硫酸二甲酯(化学纯,

北京化工厂), 无水 D-葡萄糖(分析纯, 北京化工厂), 仪器装置如图 64.

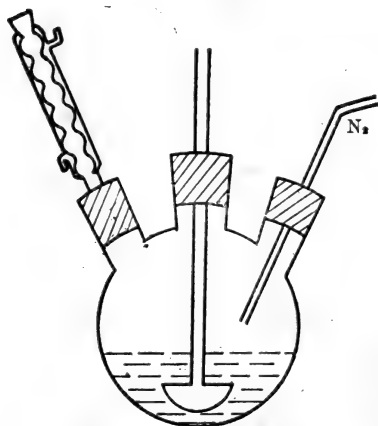


图 64 硫酸二甲酯法反应装置

【操作】

(1) α -D-甲基葡萄糖苷的甲基化: 量取 5 mL 水置于三口瓶中, 开动搅拌, 加入 5 g 甲基葡萄糖苷, 待其完全溶解后, 将水浴加热至 70°C. 在氮气保护下, 滴加 10 mL 硫酸二甲酯, 17 mL 30% 氢氧化钠. 在此温度下搅拌 1 小时后, 升温至 100°C, 继续反应半小时, 停止反应. 产物为无色透明溶液, 底部沉有

大量白色结晶, 是反应过程中生成的硫酸钠. 用浓硫酸中和反应产物至 pH=7, 离心后倾出上层清液, 并用 5×10 mL 氯仿萃取, 萃取液合并后, 再用 3×10 mL 蒸馏水洗涤. 萃取液(有机相)旋转蒸发至粘稠状, 经 HPLC 分离和质谱鉴定有 3-O-甲基甲基葡萄糖苷和 4-O-甲基甲基葡萄糖苷. 洗萃取液的水与水相合并, 旋转蒸发至 10 mL 左右, 又有白色沉淀析出, 再次离心, 弃去沉淀, 清液浓缩后经 HPLC 分离和质谱鉴定有 1-O-甲基甲基葡萄糖苷和 2-O-甲基甲基葡萄糖苷.

(2) D-葡萄糖的甲基化: 于三口瓶中加入 7 mL 水, 开动搅拌, 缓缓加入 5 g 葡萄糖, 如溶解不好, 可加热水浴. 待其完全溶解后, 冷至室温. 在氮气保护下, 滴加 10 mL 硫酸二甲酯. 在冰浴冷冻下, 以 0.5 滴/秒的速度缓慢滴入 17 mL 的 30% 氢氧化钠. 加完后撤去冰浴, 维持在 20°C 以下搅拌 1 小时, 然后逐步升温至 60°C, 保温搅拌 1 小时, 停止反应. 产物为褐色. 后处理同. 经 HPLC 分离及质谱鉴定水相中有一甲基葡萄糖苷和甲基 1-O-甲基葡萄糖苷, 有机相中有二甲基甲基葡萄糖苷和三甲基甲基葡萄糖苷.

【讨论】

采用还原性糖做原料时,氢氧化钠的滴加速度一定要慢,一定要保持低温,否则样品在过强的碱性条件和过热的环境中将受到破坏,从而使产率降低。

【文献】

Haworth, W. N., *J. Chem. Soc.*, **107**: 8(1915).

Е. В. Евтушенко и Ю. С. Оводов, *Хим. Природ. Соедин.* **1**:21(1982).

(贺玉珍 于海妮 郑 苹)

(四)糖苷酶及其底物的制备和测定

1. 一种产多糖链内切酶的微生物的培养以及内切酶作用条件

琥珀酸型聚糖是一种酸性多糖,琥珀酸通过酯键连接在多糖上。已知的几个 β -葡聚糖酶对这种多糖都不起作用。1972年,Harada等从土壤里分离出一株黄杆菌(*Flavobacterium*) M 64, 当此菌种在以琥珀酸型聚糖作为唯一碳源培养时,产生了一种能解聚多糖的胞外 β -聚糖酶(亦称胞外解聚酶)。经此酶水解,多糖降解为它的八糖重复单位。Abe等在1980年还发现,同样这株菌种还能产生一种胞内的聚糖酶(glycanase)和/或糖苷酶(glycosidase),它能将多糖的八糖重复单位再进一步降解成2个四糖。通过这两种酶的协同作用,结合甲基化分析,从而能很快地阐明所研究的琥珀酸型多糖的结构。

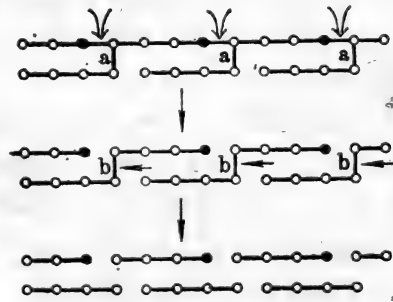


图 65 两种内切酶对多糖链的作用模型

○ 葡萄糖、半乳糖

∩ 胞外解聚酶所作用的键 a

← 胞内聚糖酶所作用的键 b

两种酶对多糖的作用模型见图 65。

(i) 黄杆菌 M 64 的培养及酶的提纯

提取胞外解聚酶时的基本培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.15 g,

KH_2PO_4 0.1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1mg, CaCl_2 1mg, NaCl 1mg, 琥珀酸型聚糖 0.8g, 水 1000 mL, 用 1 mol/L 氢氧化钠调 pH 7.2, 30°C 培养 24 小时, 得到种子培养液, 然后以 1:20 转到同样培养基里, 30°C 培养 3 天。离心去除细胞。上清液通过硫酸铵沉淀, DEAE-纤维素二次 Sephadex G-200 柱提纯。

提取细胞内聚糖酶时的基本培养基: 100 mL 基本培养基里除了上述的无机盐以外, 还包括: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 μg , $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7 μg , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 μg , H_3BO_4 , 10 μg , 琥珀酸型聚糖 0.5g, 调至 pH 7.2, 30°C, 培养 24 小时, 得到种子培养液。然后, 也以 1:20 比例转接到同种培养基里, 30°C, 培养 24 小时。离心所得细胞经超声破碎, 离心去细胞渣, 所得上清液通过硫酸铵分级沉淀, CM-纤维素, Sephadex G-150 柱。所得酶制剂用于实验。

(ii) 酶对多糖水解条件

琥珀酸型多糖与胞外解聚酶在 pH 5.8, 0.1 mol/L 乙酸缓冲液 30°C, 作用 1 天。寡糖同胞内聚糖酶在 pH 5.8, 0.1 mol/L 乙酸缓冲液, 30°C 作用 1 天。

琥珀酸型多糖被两种酶的连续消化: 多糖与解聚酶在 40°C 作用 5 小时(同上述缓冲液), 混合物煮沸 1 分钟, 再同胞内聚糖酶作用 5 小时, 煮沸 1 分钟, 通过 Amberlite IR-120(H^+ 树脂)柱, 流出物真空干燥, 再作纸层析分离。

【讨论】

(1) 从作用方式看来, 这里的胞外解聚酶实际上是一种半乳糖苷内切酶, 而胞内聚糖酶实际上是一种 β -葡萄糖苷内切酶。

(2) 由于解聚酶产量较少, 有时难于得到纯酶制剂。可直接从以多糖作为唯一碳源的培养液里得到经解聚酶水解多糖后所产生的多糖的水解物, 即多糖的重复单位。方法是, 用离心去除培养液细胞, 通过乙醇分级沉淀, 超过滤, 以及 Sephadex G-10 柱, 将未消化的多糖与多糖的水解物分开, 然后将多糖的水解物经 DEAE-纤维素柱进一步提纯。

以多糖本身作为诱导物,产生水解多糖的解聚酶的现象,不单是黄杆菌有,其他菌也有. Annamaria 就报道了 *Bacillus palustris* 也产生多糖诱导的多糖解聚酶. 当然,有些菌株不一定在所试多糖作为唯一碳源的培养基上生长. 也不是在这种条件下(以多糖作为唯一碳源)生长的菌株都能产生解聚酶. 这时,可变换合适菌株,或用其他方法.

【文献】

Harada, T., et al., *Agr. Biol. Chem.*, **36**(13): 2611 (1972).

Abe, J., et al., *Agr. Biol. Chem.*, **44**(8): 1877 (1980).

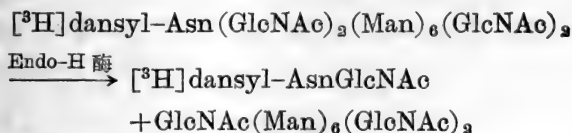
Hisamatsu, M., *Agr. Biol. Chem.*, **44**(5): 1049 (1980).

(钱世钧)

2. 从褶皱链霉菌 (*Streptomyces plicatus*) 分离提纯 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶-H

β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶-H (endo- β -N-Acetylglucosaminidase, 简称 Endo-H 酶) 能打断 N-结构的糖蛋白中和天冬酰胺相联的两个 N-乙酰氨基葡萄糖之间的联键. 由于它对所水解糖链的非还原端的专一性要求不很苛刻, 所以比起已知的其他几种糖苷内切酶, 在糖蛋白的糖链结构研究中它的应用比较广泛.

将褶皱链霉菌培养在以几丁质为唯一碳源的培养液中, 分泌于培养液中的 Endo-H 酶经醋酸锌和硫酸铵沉淀, 再经多次柱层析纯化. 在整个提取纯化过程中, 以 $[^3\text{H}]\text{dansyl-Asn}(\text{GlcNAc})_4-(\text{Man})_6$ 为底物, 进行酶活性的测定. Endo-H 酶对该底物的水解按下式进行:



反应后, 经纸层析将产物和底物分离. 在紫外光下, 根据荧光可以找到 $[^3\text{H}]\text{dansyl-AsnGlcNAc}$ 的位置, 剪下产物斑点, 洗脱后用液闪计数仪测定, 从而可以计算出酶的活性.

【试剂和材料】

菌种：褶皱链霉菌 (*Streptomyces plicatus*)。

孢子培养基：糊精 1g, 酪蛋白水解物 0.2g, 牛肉膏 0.1g, 酵母提取物 0.1g, 琼胶 2g 于 100 mL 水中高压灭菌 121°C, 30 分钟, 冷至 50°C 左右, 倒入平皿制成平板, 37°C 保温过夜, 使表面干燥备用。

种子和扩大培养液: 每升培养液中含 KCl 0.5g, K_2HPO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $FeSO_4$ 0.01g, 几丁质 (颗粒状经研磨成细粉) 10g。

底物 [3H]dansyl-Asn(GlcNAc) $_4$ (Man) $_6$ 的制备: 卵清蛋白经蛋白酶水解分离, 得到不同的糖肽片段。取其中 Asn-(GlcNAc) $_2$ (Man) $_6$ (GlcNAc) $_2$ 片段 0.26 μ mol, 和 [3H]Dansyl-Cl (250 μ Ci) 0.45 μ mol, $NaHCO_3$ 1 μ mol, 混合于 0.1 mL 总体积中, 室温下放置 24 小时。加入 0.4 mL 水, 及几滴冰醋酸, 使 pH 达 3.0。再经 Sephadex G-25 (0.9 \times 195 cm) 柱层析分离 [3H]dansyl-Asn-(GlcNAc) $_2$ (Man) $_6$ (GlcNAc) $_2$ 产物部分。加入适量的无 [3H] 标记的 dansyl-Asn-(GlcNAc) $_2$ (Man) $_6$ (GlcNAc) $_2$, 使放射比活性调节到 2.0×10^6 cpm/ μ mol。

【操作】

(1) 酶活性的测定方法 (用于提取纯化的各个步骤): 取 5 μ L 放射性底物 [3H]Dansyl-Asn(GlcNAc) $_4$ (Man) $_6$, 放射比活性为 2.0×10^6 cpm/ μ mol, 置于在冰浴中预冷的聚乙烯锥形微型离心管尖部, 再取 5 μ L 预冷的酶溶液 (用 0.2 mol/L 柠檬酸缓冲液 pH 5.5 配制), 和底物迅速混和, 然后在 37°C 保温 5~30 分钟 (视酶活力强弱), 迅速置冰浴中, 并立即取一定量 (5~10 μ L) 点样于层析滤纸 (Whatman, 3 MM) 上, 用正丁醇:乙醇:水 (2:1:1) 溶剂系统作上行层析 2 小时, 取出, 待溶剂挥发后, 在紫外灯下检查。底物的荧光斑点留在原点, 产物的荧光斑点已迁移一段距离, 用铅笔画出产物斑点范围。将产物斑点剪下, 剪成小条置于液闪杯中, 加 2 mL 水, 37°C 保温 30 分钟后, 再加入 15 mL 闪烁液, 用液闪计数

仪计数。从产物和底物的计数,算出酶活力。酶活力的单位规定如下:在规定的酶活力测定条件下,每分钟经酶促反应释放出 $1\mu\text{mol dansyl-AsnGlcNAc}$ 。用Folin-酚法测出蛋白质含量,可以计算出酶的比活力,即每毫克蛋白质的活力单位数。

(2) 褶皱链霉菌的培养:斜面保藏的褶皱链霉菌转接到生孢子琼脂培养基平板上 25°C 培养2星期,可见孢子长出。用无菌刮板把平板上的放线菌连培养基一起转入含有1L培养液的2L容量三角瓶中,作为种子瓶。每个直径9cm平板约用于2只三角瓶, 30°C 摇床培养3天后,再转接入扩大培养。扩大培养可以仍用2L三角瓶装1L培养液,每个三角瓶中接入50mL种子液,摇床培养。或者可以用30L圆柱形玻璃发酵缸,每缸装培养基15L,接入300mL种子液,通气搅拌培养, 30°C ,3天,每次可培养30~60L总体积。无论是种子液或扩大培养液,在培养结束时应呈乳白色、有泥土香味,表示褶皱链霉菌生长良好,有好的酶产量。

(3) 提取步骤:

醋酸锌沉淀:培养结束后,用玻璃纤维过滤掉菌丝体和残存的几丁质颗粒。向滤液中滴加 1mol/L ZnAc_2 ,每升滤液应加75mL,用电磁搅棒连续搅拌,并不时加入Tris碱,使pH维持在7左右。加完全部应加的 ZnAc_2 后,静置于室温下2小时,然后移至 4°C 过夜。以下操作都应在 4°C 冷室进行。

硫酸铵沉淀:倾去或吸去上清液,沉淀在 $4000\times\text{g}$ 离心10分钟。将从30L培养液所得的沉淀合在一起溶于最小体积的 0.3mol/L 柠檬酸缓冲液(pH5.5)中,加入硫酸铵使达0.4饱和度(每100mL溶液加22.5g硫酸铵),搅拌45分钟, $13000\times\text{g}$ 离心15分钟。向上清液中续加硫酸铵使达0.9饱和度(每100mL溶液加33.5g硫酸铵),搅拌45分钟, $13000\times\text{g}$ 离心15分钟。沉淀溶于最小体积的pH8.0的 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液中。然后移入透析袋中。先用15L pH8.0的 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液透析过夜,以除去 Zn^{++} 离子和硫酸铵,再两次用pH8.45的10

mmol/L 磷酸钾缓冲液 6 L 透析 24 小时。

DE-52 纤维素柱层析: DE-52 微粒纤维素装柱 (3.7 × 33 cm) 后, 用 pH 8.45 的 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液平衡, 将上步透析内液加到 DE-52 纤维柱上, 调整流速至 140 mL/h。待样品加完后, 再加同样缓冲液 500 mL 洗脱, 至洗脱液中不含蛋白质为止。换成线性梯度浓度洗脱, 将 1.5 L pH 8.45 的 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液置混匀室中, 另有 pH 8.45 的 320 mmol/L 磷酸缓冲液 1.5 L 置于贮存室中, 分部收集, 每管 20 mL。分别测定每个收集管的电导值, 大约在电导值 6 mS/cm (16°C) (约相当于 60 mmol/L 磷酸钾) 左右, Endo-H 酶被洗脱下来。分别测各收集管酶活, 将有酶活的各管合并, 冻干。冻干粉再溶于最小体积蒸馏水中, 用 pH 4.6 的 10 mmol/L 醋酸钠缓冲液 6 L 透析两次, 各 24 小时。

丙磺基葡聚糖 C-25 (Sulfopropyl Sephadex C-25) 柱层析: 上步透析内液加到预先用 pH 4.6 的 10 mmol/L 醋酸钠缓冲液平衡了的 Sulfopropyl Sephadex C-25 柱 (2 × 20 cm) 上去, 流速调整到 35 mL/h, 用平衡缓冲液洗脱至流出液中无蛋白质, 然后转入线性梯度浓度洗脱: 混匀室中置 pH 4.6 的 10 mmol/L 醋酸钠缓冲液 800 mL, 贮存室中置 pH 4.6 的 100 mmol/L 醋酸钠缓冲液 800 mL。将流速调整为 50 mL/h。分部收集, 每管 7 mL。含酶活性部分大约在醋酸钠浓度为 65 mmol/L, 即电导率为 2.8 mS/cm 处。经酶活性测定后, 合并有酶活各管, 冻干。然后再溶于最小体积蒸馏水中, 用 pH 8.45 的 5 mmol/L 磷酸钾缓冲液 1 L 透析两次, 每次 24 小时, 然后贮于 -20°C 冰箱中。

Sephadex G-75 柱层析: 将得自上步骤的两批透析液合并 (约相当于得自 60 L 发酵液的产品), 冻干, 溶于约 3 mL 蒸馏水中。加到用 pH 8.45 的 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液预先平衡好的 Sephadex G-75 柱 (1.5 × 190 cm) 中。用平衡缓冲液洗脱, 流速为 7 mL/h, 分部收集, 每管 5 mL。酶活性约出现于第 40~47 管。经测定后, 将有酶活性各管合并, 冻干。再溶于最小体积水中, 用 pH 7.1 的 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液 1 L 透析两次, 每次过夜。

从 60 L 培养液约可得到产品 40~60 酶活力单位。将产品分装于小试管中，每管约 100 μ L，含 2 酶活力单位。-20°C 贮存备用。酶活力可保持 2 年。

【讨论】

(1) 培养链霉菌所用几丁质应经预先处理，充分脱去钙质，研磨成细粉，利于链霉菌的生长和利用。

(2) 培养液用玻璃纤维过滤效果较好，既快，滤液又较为澄清。若滤液混浊，需用滤纸过滤或其他方法，得到澄清液体。

(3) 第一步滴加醋酸锌要慢一些，并随时用 Tris 粉末调节 pH 保持在 7 左右。不然会产生过多的 Zn(OH)₂，沉淀混入酶蛋白沉淀中，给以后的步骤带来困难。

(4) 从菌滤液起，各步骤中都可以取样测酶活力和蛋白质含量，计算酶的比活力和提取回收率。

(5) 经上述步骤纯化得到的 Endo-H 酶应是相当纯净的，测不出 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷外切酶、几丁二糖酶、 α -甘露糖苷酶、 β -甘露糖苷酶、糖基天冬氨酸酶以及蛋白水解酶活性。

【文献】

Methods in Enzymology 50: 574 (1978).

Tarentino, A. L., et al., *J. Biol., Chem.* 249(3): 811 (1974).

Hickey, R. T., et al., *J. Bacteriol.*, 64: 891 (1952).

Huang, C. G., et al., *Carbohydr. Res.* 13: 127 (1970).

(张惟杰)

3. β -甘露糖苷酶的分离提纯

β -甘露糖苷酶(β -mannosidase)是糖链结构分析工作中必要的工具酶。通常用来作分离 β -甘露糖苷酶的生物材料有菠萝蛋白酶(bromelain)、蜗牛消化液和鸡输卵管等。其中以蜗牛消化液最为合适，因为在蜗牛消化液中 β -甘露糖苷酶含量较高，而且 β -甘露糖苷酶比 α -甘露糖苷酶活性强得多，这是在其他材料中所不易见到的。

提取 β -甘露糖苷酶可以从蜗牛消化液及其丙酮干粉开始，也可以从市场上买到的 Glucosylase 或 Sulfatase 制剂开始，这些酶制

剂也都是从蜗牛消化液制得的,里面含有丰富的 β -甘露糖苷酶。

【试剂】

硫酸酯酶(Sulfatase)(Sigma公司),对硝基苯- β -D-甘露糖苷(Sigma公司),碱性磷酸钙(hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$),可以自己制备,柱色谱用DEAE-纤维素(Sigma公司)。

【操作】

(1) β -甘露糖苷酶活性测定:在下面叙述的各步都需要测定 β -甘露糖苷酶活性。取 $500\ \mu\text{mol/L}$ pH 3.5的 $0.05\ \text{mol/L}$ 甘氨酸-HCl缓冲液,内含 $2\ \text{mmol/L}$ 对硝基苯- β -D-甘露吡喃糖苷,再加入 $20\ \text{mL}$ 待测酶液, 37°C 保温2小时,然后加入 $3.5\ \text{mL}$ $0.2\ \text{mol/L}$ Na_2CO_3 ,溶液转呈黄色,测定 $400\ \text{nm}$ 处消光值。酶活力单位规定为 37°C 条件下,每小时放出 $1\ \mu\text{mol}$ 对硝基苯为一个活力单位。

以下所有提取操作在 4°C 冷室进行。

(2) 硫酸铵及丙酮分步沉淀:取硫酸酯酶制剂 $20\ \text{mL}$ 用 $1\ \text{L}$ pH 7.24的 $0.05\ \text{mol/L}$ 磷酸缓冲液透析过夜,然后透析内液,冻融3次,离心 $13000\times g$ 20分钟除去产生的沉淀。向上清液中加入固体硫酸铵至 0.32 饱和度, $13000\times g$ 离心20分钟,除去沉淀,上清液中续加固体硫酸铵使达到 0.59 饱和度,离心收集沉淀。沉淀溶于最少体积水中,用 $1\ \text{L}$ 水透析过夜。透析内液冻干。然后再按蛋白质浓度为 $0.3\sim 0.4$,将冻干粉溶于 $0.01\ \text{mol/L}$ 醋酸锌中(内含 $0.04\ \text{mol/L}$ 硫酸铵),用 $1\ \text{mol/L}$ NaOH将pH调至 6.1 ,边搅边加入冷的 50% 丙酮液(用等体积丙酮加pH 5.9的 $0.01\ \text{mol/L}$ 醋酸锌-醋酸缓冲液配制),使丙酮浓度最终为 40% 。 $13000\times g$ 离心20分钟除去沉淀,上清液中继续加冷丙酮溶液,使丙酮浓度最终达 70% 。 $13000\times g$ 离心20分钟,所得沉淀溶于最小体积pH 7.24的 $0.01\ \text{mol/L}$ 磷酸缓冲液中,用 $1\ \text{L}$ 水透析过夜。离心除去透析后的沉淀,上清液冻干。

(3) 碱性磷酸钙柱层析:以上步骤得到的冻干粉溶于 $6\ \text{mL}$ $0.005\ \text{mol/L}$ pH 6.8的磷酸缓冲液中,加入到预先用此缓冲液平

衡好的碱性磷酸钙柱(1.6×16 cm)上去, 约有70%的 β -甘露糖苷酶活性不被柱吸附直接流出来, 收集这部分流出液, 约30 mL, 然后用0.2 mol/L pH 6.8的磷酸缓冲液洗脱, 可把其余30%的 β -甘露糖苷酶和大部分 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶一起洗脱下来, 另外贮存。

(4) DEAE-纤维素柱层析: 取碱性磷酸钙柱上先洗脱下来的30 mL 主要含 β -甘露糖苷酶活性的溶液, 分三次(每次10 mL)加到预先用pH 6.8的0.005 mol/L 磷酸缓冲液平衡过的DEAE-纤维素柱(1.6×16 cm)上去, 用递增浓度的磷酸缓冲液分步洗脱, 0.005 mol/L (44 mL), 0.02 mol/L (24 mL) 和0.1 mol/L (92 mL), 流速调到15 mL/h, 每管4 mL。 β -甘露糖苷酶活力出现于0.02 mol/L 磷酸缓冲液洗脱时。 合并有 β -甘露糖苷酶活力的各管, 冻干, 溶于最少体积水中, 两次用水1 L 透析过夜, 分装, 贮存于-20°C。 这就是纯化了的 β -甘露糖苷酶。 在0.1 mol/L 磷酸缓冲液洗脱部分, 还含一部分 β -甘露糖苷酶活性, 但是和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性混在一起, 收集后, 可与上述步骤中0.2 mol/L 磷酸缓冲液洗脱部分合并, 重新纯化。

【讨论】

(1) 在以硫酸酯酶制剂为原料开始工作时, 注意硫酸铵分部沉淀, 需要分别测定在32%、59% 沉淀和上清液中酶活力的分配, 必要时要调整硫酸铵用量。

(2) 所得的 β -甘露糖苷酶虽然在凝胶电泳中还不是单一条蛋白质带, 但是应该已是不含 α -甘露糖苷酶和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活力了。

【文献】

Methods in Enzymology **28**: 769 (1972).

Sugahara, K. et al., *Biochem. Biophys. Acta.* **268**: 488~496 (1972).

Siegelman, H. W., et al., *Anal. Biochem* **13**: 402 (1965).

Li. Y. T., et al., *J. Biol. Chem.* **247**(11): 3677 (1972).

(张惟杰)

4. 从土壤细菌中初步分离 α -甘露糖苷酶和 $\alpha(1\rightarrow6)$ 甘露聚糖内切酶

酵母细胞壁外层的甘露聚糖是由甘露糖组成的糖蛋白。其主要糖链有二、三百个甘露糖残基组成，通过两个 N-乙酰氨基葡萄糖与肽链上的天冬酰胺相联(见本书第 217 页)。为了研究甘露聚糖的糖链结构，先后从土壤中分离出两种细菌，它们分别产生 α -甘露糖苷外切酶和 $\alpha(1\rightarrow6)$ 甘露聚糖内切酶。

产生 α -甘露糖苷外切酶的细菌是用野生型啤酒酵母的甘露聚糖为唯一碳源，从土壤中选择分离出来的，专性好氧，长杆形，不运动，不形成孢子。静止期时，菌体长 $2\sim 3\mu\text{m}$ ，宽 $1\mu\text{m}$ 。菌落圆形，黄色，革兰氏染色呈阳性反应。经鉴定初步确定为节杆菌属，定名为 *Arthrobacter* GJM-1。在以甘露聚糖为碳源时，该菌可分泌 α -甘露糖苷外切酶于培养基中。

产生 $\alpha(1\rightarrow6)$ 甘露聚糖内切酶的细菌是用啤酒酵母突变株 X2180-1A-5 的甘露聚糖为唯一碳源，从土壤中选择分离出来的一种杆菌 ($0.4\sim 0.5\times 5\sim 7\mu\text{m}$)，有外周鞭毛，革兰氏染色阴性，菌落薄而透明。X2180-1A-5 甘露聚糖的糖链的主要成分为 $\alpha(1\rightarrow6)$ 甘露聚糖的长链。该细菌的分类地位尚未作正式鉴定，暂称为土壤甘露聚糖分解菌。在以甘露聚糖为主要碳源的培养液中，该细菌分泌 $\alpha(1\rightarrow6)$ 甘露聚糖内切酶，实际上，从酶水解产物分析，至少包括 $\alpha(1\rightarrow6)$ 甘露糖苷内切酶和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶两类酶活性。

上述的酶类都未得到纯化，下面仅介绍粗酶制剂的提取过程。

(i) 从节杆菌 *Arthrobacter* GJM-1 分离 α -甘露糖苷酶

【试剂和材料】

菌株 *Arthrobacter* GJM-1 从土壤中分离得到。

培养基：啤酒酵母甘露聚糖* 1g， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 500mg， MgSO_4 200mg， $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg， $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50mg，酵母粉 500mg， K_2HPO_4 7.54g， KH_2PO_4 2.32g，水 1L。

* 从酵母提取甘露聚糖方法见本书第 217 页。

【操作】

(1) 酶活性测定方法: 在测定酶反应的1 mL混合液中, 有250 μg 甘露聚糖, 0.5 mL pH 6.8的0.1 mol/L磷酸钾缓冲液, 0.1 μmol CaCl_2 , 50 μg 牛血清清蛋白, 1~3 μg (待测) 酶蛋白。37°C保温1小时, 加入1 mL碱性铜试剂以终止反应。(碱性铜试剂的配法为: 24g无水 Na_2CO_3 , 12g酒石酸钾钠, 16g NaHCO_3 , 4g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 180g无水 Na_2SO_4 , 水1L)沸水浴煮25分钟, 自来水冲淡后, 加入1 mL砷钼酸试剂(砷钼酸试剂配法为: 25g $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 溶于450 mL水中, 加入21 mL浓 H_2SO_4 , 再和溶有3g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的25 mL水溶液混和, 37°C保温24~48小时, 贮于棕色瓶中), 剧烈振荡混匀, 加水至10 mL, 15分钟后, 测定560 nm处光密度。

(2) 酶的分离:

菌滤液制备: 在30°C摇床培养36小时后, 5 L菌液离心10 000 r/min 30分钟除去菌体。上清液分装在10只500 mL透析袋中, 用pH 6.8的0.01 mol/L磷酸钾缓冲液(内含 10^{-4} mol/L CaCl_2 , 称为缓冲液A)透析24小时, 每5只透析袋用10 L缓冲液A作为透析外液, 每12小时换液一次, 然后将透析内液冻干。

硫酸铵沉淀: 上步得到的冻干粉溶于pH 6.8的0.1 mol/L磷酸钾缓冲液(内含 10^{-4} mol/L CaCl_2 , 称为缓冲液B)中, 使蛋白质最终浓度为2.5 mg/mL, 约用200 L缓冲液B, 加固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [每1 mL酶液加入610 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], 静置于4°C, 沉淀过夜。然后12 000 r/min离心30分钟。所得沉淀再悬浮于50 mL 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中, 4°C静置过夜。然后15000 r/min离心30分钟。

Sephadex G-100 柱层析: 上步得到的沉淀溶于10 L缓冲液B, 使蛋白质最终浓度达到20 mg/mL。将此溶液分数次(每次约2.5 L)加到预先用缓冲液B平衡过的Sephadex G-100凝胶柱(2×100 cm)上去, 分部收集, 合并有酶活性各管, 超过滤法浓缩至25 mL(用Amicon 400型超过滤器, UM-1膜, 压力 4.8×10^5 Pa)。

DEAE-纤维素柱层析: 上步所得溶液用 pH 9.0 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (内含 10^{-4} mol/L CaCl_2 , 称为缓冲液 C) 透析过夜。透析内液加入到用缓冲液 C 平衡过的 DEAE 纤维素柱 (1.8 \times 12cm) 上去, 用缓冲液 C 洗至无蛋白质后, 用线性浓度梯度洗脱, 在混匀小室内装 250 L 缓冲液 C, 在装有连通器的贮存小室内装 250 mL 内含 0.6 mol/L KCl 的缓冲液 C, 分部收集, 将有活性各管合并超过滤法浓缩 (Amicon 50 型超过滤器, N_2 压力 2.7×10^8 Pa), 达最终蛋白质浓度为 2 mg/mL, -20°C 贮存备用。从 5 L 菌滤液约可得 29 mg 酶蛋白。

【讨论】

从酶作用产物分析, 此酶为 α -甘露糖苷酶, 可打断 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 、 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 、和 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 甘露糖苷键, 作用方式为外切, 所以产物为甘露单糖。

(ii) 从一种土壤细菌分离甘露聚糖内切酶

【试剂和材料】

菌株: 从土壤中分离得到的一株杆菌, 暂名土壤甘露聚糖分解菌。

培养基: 啤酒酵母突变株 (*Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A-5) 的甘露聚糖 3g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 500 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 400 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 20 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 60 mg, 酵母粉 500 mg, K_2HPO_4 7.54g, KH_2PO_4 2.32g, 水 1L。

【操作】

(1) 酶活性测定方法: 在 1 mL 的测定混合液中含有 250 μg 啤酒酵母 X2180-1A-S 的甘露聚糖, 0.5 mL pH 5.5 的 0.1 mol/L 柠檬酸磷酸缓冲液, 0.1 μmol CaCl_2 , 0.01 mL 待测酶液。37 $^\circ\text{C}$ 保温 1 小时。加入 1 mL 碱性铜溶液中止反应, 以下步骤同 α -甘露糖苷酶活性测定, 唯一不同的是最后于 500 nm 处读取光密度值。

(2) 粗酶制品的分离: 在 30 $^\circ\text{C}$ 摇床培养 24 小时后, 菌液离心 10 000 r/min 30 分钟, 除去菌体。上清液用 pH 6.9 的 0.01 mol/L 磷酸钾缓冲液 (内含 10^{-4} mol/L CaCl_2)。透析 24 小时, 然后冻干。

冻干粉溶于相同缓冲液中，使蛋白质最终浓度为 2 mg/mL，加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 65% 饱和度。静置几小时后，10 000 r/min 离心 30 分钟，所得沉淀溶于最少量的 pH 5.5 柠檬酸-磷酸缓冲液中（内含 10^{-6} mol/L CaCl_2 ），再用 pH 5.5 的 0.05 mol/L 柠檬酸-磷酸缓冲液（内含 10^{-6} mol/L CaCl_2 ）透析。所得粗酶制品贮于 -10°C 备用。

【讨论】

(1) 从酶作用产物分析，该粗酶制品包含有 $\alpha(1\rightarrow6)$ 甘露糖苷内切酶和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶。

(2) 粗酶制品的最适 pH 范围较宽，为 pH 5.5~7。该粗酶制品在 50°C 时活性最高，高于 50°C 后，迅速失活。

(3) 以冻干粉或 4°C 贮藏，粗酶制品的活性可保持 1 个月左右。

【文献】

Jones, G. H. et al., *J. Biol. Chem.* **244**: 1043 (1969).

Paleg, L. G. *Anal. Chem.* **31**: 1902 (1959).

Nelson, N., *J. Biol. Chem.* **153**: 375 (1944).

Nakajima, T., et al., *J. Biol. Chem.* **249**: 7685 (1974).

(张惟杰)

5. 枯草杆菌 α -淀粉酶的分离纯化

α -淀粉酶 [α -1, 4-glucan-4-glucanohydrolase, E. C. 3.2.1.1] 广泛地存在于动物、植物发芽的种子和微生物中，它是一种淀粉水解酶，从淀粉分子内部切开 α -1, 4 键而产生糊精和还原糖。因产物末端葡萄糖 C_1 碳原子为 α -构型，故称之为 α -淀粉酶。

α -淀粉酶是工业生产中应用最广、用量最大的酶类之一，特别在酿造、纺织、食品、医药、造纸等工业中有着广泛的应用，纯化的 α -淀粉酶可应用于淀粉的测定。

【试剂和材料】

菌株：枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) BF 7658 (中国科学院微生物所)

物研究所保存)。

培养基: 豆饼粉 4.5g; 玉米粉 9.5g; 磷酸氢二钠 0.8g; 硫酸铵 0.4g; 无水氯化钙 0.2g; 水 100 mL。

可溶性淀粉(浙江菱湖淀粉厂), 精碘, 碘化钾(分析纯), DEAE-纤维素DE22(Whatman), Sephadex G-100(Pharmacia)。

【操作】

(1) 测定方法:

吸取 0.5% 可溶性淀粉溶液 2 mL (0.2 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲液), 40°C 预热后再加入适当稀释度的酶液 1 mL, 在反应不同时间后, 从上述反应液中吸取 0.2 mL 加到 5 mL 1/6000 mol/L 碘液中, 在波长 700 nm 下测定光密度*(OD) (OD值最好在 0.1~0.7 范围内), 对照则用 1 mL 水代替酶液。在上述条件下, 每一分钟 OD 值降低 1% 所用的酶量定义为一个酶活力单位。

等电点测定: 采用琼脂糖凝胶薄层等电聚焦法。

分子量测定: SDS 凝胶电泳。基本按照 Weber 描述的方法进行。

纯度鉴定: 采用聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳方法, 凝胶浓度为 7%, 用考马斯亮蓝染色, 7% 乙酸脱色。

(2) 菌的培养:

250 mL 三角瓶中装入 25 mL 培养基, 1.2 公斤 30 分钟灭菌后, 接入 BF7658 斜面菌种一环, 振荡培养 48 小时, 在 5000 r/min 下进行离心, 除去菌体和残渣, 得粗酶液待用。

(3) 分离纯化:

硫酸铵沉淀: 粗酶液定体积后置于冰浴中, 边轻轻搅拌边加入硫酸铵至 60% 饱和度, 放入冰箱, 沉淀酶蛋白, 而后在 10 000 r/min 下冷冻离心, 得到酶蛋白, 按原发酵体积的 1/10 量加入蒸馏水, 得到酶液样品。

淀粉吸附: 在低温条件下, 按酶液体积每毫升称取 1 克淀粉, 水浸泡后, 进行酶的吸附, 用 0.2 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲液洗脱, 除去大量蛋白酶及其他杂蛋白。

丙酮分段: 由淀粉洗脱下来的酶液, 加入冷丙酮到 30~50% (V/V), 沉淀酶蛋白, 冷冻离心并弃去上清液, 沉淀的酶蛋白用适量水溶解。

DEAE-纤维素柱层析: DEAE-纤维素 DE₂₃ 预先用 0.5 mol/L NaOH-0.5 mol/L HCl-0.5 mol/L NaOH 交替浸泡半小时, 酸碱更换及最终均用蒸馏水洗至中性。将纤维素悬浮在 0.2 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲液中, 搅匀, 装柱 (2.8×25 cm), 用相同的缓冲液平衡, 取丙酮分段样上柱, 用含有 0.01 mol/L 醋酸钙相同的缓冲液洗脱, 分管收集, 在 280 nm 测吸光度并测酶活力及蛋白质。

Sephadex G-100 凝胶过滤: 纤维素柱上洗脱下来的样品, 将其中具有 α -淀粉酶活力的部分汇合, 取适当量, 上柱 (2.2×110 cm) 进行凝胶过滤, 把具有活力部分收集起来, 对 0.01 mol/L 醋酸钙水溶液透析, 冷冻干燥, 即得到纯酶样品。上述提纯步骤总结于表 38。

表 38 α -淀粉酶提纯步骤及结果

纯化步骤	活力		蛋白质		收率 %		比活力 u/mg	纯化 倍数
	总	u/mL	总	mg/mL	u	蛋白质		
原酶液	10.6×10 ⁵	1064	7400	7.4	100	100	144	1.0
硫酸铵沉淀	8.9×10 ⁵	4935	855	5.7	84	11.6	866	6.0
淀粉吸附	6.5×10 ⁵	2294	400	1.4	61	5.4	1639	11.4
丙酮沉淀	6.3×10 ⁵	9748	65	1.0	59	0.8	9748	67.7
DEAE-纤维素柱层析	5.8×10 ⁵	2922	33	0.16	54	0.5	18611	129.2
Sephadex G-100	4.7×10 ⁵	696	22	0.03	44	0.3	23200	161.1

【讨论】

(1) 提纯了的酶在凝胶电泳上呈现两条区带, 主带的比活力大约是次要带的 50 倍。它们的等电点分别是 4.2 和 4.5。分子量均为 96 000, 酶作用的 pH 范围是 5.5~7.0, 最适 pH 为 6.0。最适温度为 60~65°C, 钙保护的浓度在 0.01~0.015 mol/L。酶在 30~60°C 保温半小时是稳定的, 加钙后在 70、75、80°C 时, 酶的存

活率分别是99.2%、83.7%和60.7%。金属离子(1.0×10^{-3} mol/L) Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 有激活作用, 而 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 等有钝化作用。

(2) 由枯草杆菌 BF7658 产生的 α -淀粉酶的某些性质, 如含有一个主要成分和一个次要成分, 以及酶作用的最适 pH、温度等与前人的结果大致是相同的。但需注意的是, 在 BF7658 的发酵液中含有丰富的蛋白酶, 存放过的酶制剂, 在凝胶电泳中为不均一的区带, 故应采用新鲜发酵液进行分离纯化, 才能得到较满意的结果。

【文献】

Yamaguchi, K., et al., *J. Gen. Appl. Microbiol.* **15**: 97~107 (1969).

William. M. F. et al., *Progress In Industrial Microbiology.* vol.15. Elsevier. Scientific publishing (1979).

(王俊英)

6. 红色红曲霉 α -葡萄糖苷酶的分离纯化

α -葡萄糖苷酶(α -D-Glucoside glucohydrolase, E. C. 3.2. 1.20) 为一种糖苷水解酶, 其特点是从底物的非还原末端开始水解底物的 α -1, 4-葡萄糖苷键, 且水解麦芽糖等寡聚底物的速度远高于水解淀粉等大分子底物的速度, 所得产物为 α -葡萄糖。该酶广泛存在于动物、植物、微生物中。

【试剂和材料】

菌种: 红色红曲霉 (*Monascus ruber*) AS 3.897 为微生物所菌种保存室提供。

试剂: 麦芽糖(A. R. 北京化工厂), 可溶性淀粉(浙江菱糊淀粉厂), 葡萄糖氧化酶(110 u/mL, 北京化工厂), SE-Sephadex C-50, Sephadex G-100(瑞典 Pharmacia), DEAE-纤维素(英国 Whatman)。

【操作】

(1) 测定方法:

α -葡萄糖苷酶活力的测定: 1% 麦芽糖(pH 4.5, 0.05 mol/L 乙酸缓冲液溶液)1 mL, 加酶液 0.5 mL, 40°C 保温 30 分钟, 100°C

加热 10 分钟,定容到 10 mL,取 1 mL,用葡萄糖氧化酶法测定产生的葡萄糖,在上述条件下,每小时产生 1 mg 葡萄糖为 1 活力单位。

葡萄糖淀粉酶活力的测定:除底物改为 1% 可溶性淀粉外,其余操作同上。

蛋白质的测定:柱层析时测层析各管的 $A_{280\text{nm}}$,一般测定用 Lowry 法。

聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳:凝胶浓度 7%,电极缓冲液 pH 8.3,电泳后凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色。

(2) 菌的培养及粗酶的抽提:

种曲培养:麸皮 10 g,装 250 mL 三角瓶内,加 1% 乳酸 15 mL,灭菌后接种红色红曲霉斜面,32°C 培养 3 天左右。

麸曲培养:2 kg 麸皮,按 1:1.5 加 1% 乳酸,混匀后装曲盘,灭菌,接种 3~4 瓶种曲,32°C 培养 5 天后,加入 pH 5.0、0.01 mol/L 乙酸缓冲液 6 L,室温浸泡 3 小时,过滤即得粗酶抽提液。

(3) 酶的提纯:

硫酸铵分段:在粗酶抽提液中加固体硫酸铵到 45% 饱和度,离心去沉淀后,再加硫酸铵到 75% 饱和度,离心取沉淀,冷冻干燥或真空干燥后即得粗酶粉。

聚乙二醇 6000 分段:将粗酶粉溶于 pH 5.0、0.02 mol/L 乙酸缓冲液,且对该缓冲液透析去盐后,加聚乙二醇 6000 到 20% 浓度 (mg/mL),4°C 冰箱放置 4 小时后,离心取沉淀,溶于 pH 5.0、0.02 mol/L 乙酸缓冲液。

SE-Sephadex C-50 柱层析:取上一步提纯的样品对 pH 4.4、0.02 mol/L 乙酸缓冲液透析后,上到已用该缓冲液平衡好的 SE-Sephadex C-50 柱上(2.0×24 cm),然后用同一缓冲液洗脱,到无蛋白质洗出来时,再用 0.5 mol/L NaCl 阶段洗脱。分部收集,20 分钟 1 管,保持流速在 15 mL/h 左右。根据蛋白质与活力测定结果,取活力峰部分合并。

Sephadex G-100 凝胶过滤:取第三步提纯的样品 15 mL,上

到已用 pH 5.0, 0.05 mol/L 乙酸缓冲液 (含 0.05 mol/L NaCl) 平衡好的 Sephadex G-100 柱上 (2.2 × 95 cm), 用同一缓冲液洗脱, 分部收集, 20 分钟 1 管, 流速约为 12 mL/h. 根据测定结果, 取活力峰部分合并.

DEAE-纤维素柱层析: 将上一步提纯得到的样品对 pH 7.2, 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液透析后, 上到已用该缓冲液平衡的 DEAE-纤维素柱上 (2.0 × 24 cm). 用含 0.065 mol/L NaCl 的同一缓冲液洗到无蛋白质流出来时, 再用 0.065~0.8 mol/L NaCl (分别溶于 400 mL 起始缓冲液中) 梯度洗脱, 分部收集, 20 分钟 1 管, 保持流速在 15 mL/h 左右. 由测定结果, 合并活力峰部分, 且对 pH 4.6, 0.02 mol/L 乙酸缓冲液透析.

制备型凝胶电泳: 经 DEAE-纤维素柱层析提纯得到的活力峰部分, 经凝胶电泳分析, 仍有两个成分. 将两成分所在部位的凝胶切下来抽提, 经测定, 两者均有 α -葡萄糖苷酶活力. 为方便起见, 称 R_m 值较大的成分为 G-I, 较小的为 G-II. 用一般凝胶色谱法不易将两者分开, 故采用垂直板型凝胶电泳法将两者分开. 凝胶板大小为 7.6 × 16.5 × 0.2 cm, 凝胶浓度 7%, 电极缓冲液 pH 8.3. 每块板加样品 5 mL (含蛋白 8 mg). 电泳完后, 由快速染色法 (0.1% 考马斯亮蓝 R-250 染 2 分钟, 7% 乙酸脱色) 确定酶蛋白在凝胶上的位置, 将该处的凝胶切下, 用 pH 4.5, 0.05 mol/L 乙酸缓冲液抽提. 多次电泳后, 将 G-I、G-II 的凝胶抽提液分别合并. 过滤后对 pH 4.5, 0.02 mol/L 乙酸缓冲液透析. 经制备电泳提纯的 G-I、G-II 用 10%、7%、5% 浓度凝胶作盘状电泳鉴定, 结果都为均一, 整个提纯过程见表 39.

【讨论】

在以上提纯过程中, Sephadex G-100 凝胶过滤, 这一步效果不很理想, 故采用制备电泳分开 G-I、G-II 时, 这一步也可以省去.

根据对 G-I、G-II 性质的研究, 表明两者的最适温度为 50°C, 最适 pH 5.0, 在 pH 4.0~7.0 之间稳定. G-I、G-II 的耐热性较

表 39 α -葡萄糖苷酶的提纯

提 纯 步 骤	蛋白质 总含量 (mg)	α -葡萄糖苷酶				葡萄糖淀粉酶		α -葡萄糖 苷酶 葡萄糖 淀粉酶	
		总活力 (u)	比活 (u/mg)	收率 (%)	提纯 倍数	总活力 (u)	比活 (u/mg)		
粗酶抽提液	57,840	888,850	13.5	100	1	146,620	2.5	5.4	
硫酸铵分段	10,496	504,000	48.0	56.9	3.6	55,200	5.3	9.1	
聚乙二醇 6000 分段	1,680	398,160	237.0	45.0	17.5	19,606	11.7	20.3	
SE-Sephadex G-50 柱层析	704	399,550	567.4	45.1	42.0	11,314	15.9	35.2	
Sephadex G-100 柱层析	426	249,822	586.0	28.2	43.4	8,860	20.8	28.2	
DEAE-纤维素柱层析	229	169,728	738.5	19.1	54.7	4,406	19.2	38.5	
制备电泳	G-I	24	12,302	520.2		38.5	597	25.5	20.6
	G-II	8	4,368	554.7		41.1	182	23.1	23.9

差,在 55°C 保温 5 小时, 60°C 保温 1 小时,即丧失其大部分活性。SDS-凝胶电泳分析结果表明,在 100°C 以 SDS 处理后,G-I、G-II 都显示为二个亚基构成,分子量分别为 46 000 与 55 000。在 30°C 以下处理,则都显示为分子量为 110 000 的均一成分。经薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦法分析,二者的等电点均为 3.9 左右。G-I 水解麦芽糖、麦芽三糖、寡聚糊精、普通糊精、可溶性淀粉、糖元及霉菌多糖的相对速度分别为 100, 86, 108, 49, 12, 1.5, 3.5; G-II 的相对水解速度则为 100, 91, 102, 50, 14, 1.5, 2.7。G-I 作用于麦芽糖、麦芽三糖、寡聚糊精、普通糊精、可溶性淀粉的米氏常数分别为 0.082, 0.208, 0.294, 0.725, 1.09, G-II 作用于麦芽糖、麦芽三糖的米氏常数则为 0.079, 0.217。这些结果表明该酶对聚合度大的底物及带有 α -1, 6-葡萄糖苷键分枝底物的作用都较差。该酶能水解麦芽糖醇、松二糖,但不能水解蔗糖、甲基 α -葡萄糖苷,表明该酶的底物特异性虽不严格,但也不同于一些酵母产生的 α -葡萄糖苷酶,后者水解蔗糖及甲基 α -葡萄糖苷的活力很高。G-I、G-II 作用于可溶性淀粉的产物只有葡萄糖。作用于麦芽糖、

麦芽三糖时,除了主要产物葡萄糖外,亦产生聚合度大于麦芽糖的不同链长的转移产物.该酶水解产物的构型为 α -型,与葡萄糖淀粉酶相反.抑制剂试验表明, Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^+ 、 Zn^{2+} 、Tris、SDS及松二糖等对G-I、G-II都有强烈的抑制作用;D-葡萄糖酸- δ -内酯、 Pb^{2+} 也有一定的抑制作用. PCOMB(对-氯汞苯甲酸)、EDTA则没有抑制作用. Ba^{2+} 对G-I、G-II有显著的激活作用. G-I、G-II均为糖蛋白,含糖量分别为9.1%, 8.5%. 根据以上讨论, G-I与G-II的性质非常接近,而与葡萄糖淀粉酶有着明显的区别.

【文献】

唐国敏,微生物学通报, 5(4): 33~34, (1978).

曾宇成、张树政,微生物论文集, p. 59~74, 科学出版社, 1985.

曾宇成、张树政,微生物论文集, p59~74, 科学出版社 1985.

(曾宇成)

7. 茁霉多糖酶的分离纯化

产气气杆菌(*Aerobacter aerogenes*)茁霉多糖酶(Pullulanase E. C.3.2.1.41)与植物、酵母和其他微生物来源的异淀粉酶一样,能专一性地水解支链淀粉分支点的 α -1, 6-葡萄糖苷键.但它又不同于异淀粉酶,它不作用于天然糖元,而能专一性地水解茁霉多糖为麦芽三糖.江西食品发酵所对该酶的培养条件和粗酶制剂的某些性质做了报道,我们对该酶又进行了进一步纯化,并对其性质进行了探讨.

【试剂和材料】

菌种: 产气气杆菌 10016.

斜面培养基: 葡萄糖 1g, 牛肉膏 1g, 蛋白胨 1g, NaCl 0.5g, 琼脂 1.5~2.0g, 加水到 100 mL, pH 7.0~7.2.

摇瓶培养基: 可溶性淀粉 1.5g, 蛋白胨 0.05g, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0.8g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, KCl 0.05g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, 加水到 100 mL.

茁霉多糖, α -、 β -、及 γ -环状糊精(日本林原公司产品),

Sephadex G-100 (Pharmacia 产品), 糯米淀粉(江西食品发酵所), 3, 5-二硝基水杨酸, N-溴代琥珀酰亚胺(NBS) (北京化工厂产品)。

【操作】

(1) 酶活力测定方法:

碘色增加法: 反应体系为 1% 糯米淀粉 2.5 mL, 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 5.8) 0.5 mL, 在 50°C 水浴中预热 5 分钟, 然后加入 0.5 mL 酶液, 准确反应 1 小时。取出 2 mL 反应液加到 25 mL 0.01 mol/L 硫酸中终止反应, 再加入 2 mL 0.01 mol/L 碘-碘化钾溶液, 用蒸馏水稀释到 50 mL, 室温放置 15 分钟, 在 620 nm 测定吸光度(用蒸馏水做对照)。吸光度每增加 0.01 为一个酶活力单位。

3, 5-二硝基水杨酸法: 反应体系同上, 在 50°C 反应一小时后, 在沸水浴中煮沸 10 分钟终止反应。取 1 mL 反应液与 3 mL 3, 5-二硝基水杨酸试剂混合, 在沸水浴中煮 15 分钟, 冷至室温, 用蒸馏水稀释到 25 mL, 在 550 nm 测定吸光度(用蒸馏水做对照)。

(2) 菌的培养:

斜面菌种在普通恒温箱中 30°C 培养 2 天。

摇瓶于 500 mL 三角瓶中装 100 mL 培养液于旋转摇床 (200 转/分) 30°C 培养 4 天。发酵液经过滤后用硫酸铵盐析, 取 0~60% 硫酸铵饱和度部分, 低温干燥得到粗酶制剂。

(3) 酶的纯化:

第一步, 提取。2g 粗酶制剂加 20 mL 蒸馏水于 30°C 水浴中保温半小时, 过滤。将滤液对蒸馏水透析 20 小时。

第二步, Sephadex G-100 凝胶过滤。取 7 mL 透析液上到预先用 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液平衡好的 Sephadex G-100 柱上 (1.2 × 110 cm), 并用相同缓冲液洗脱收集流出液, 30 分钟 1 管, 每管 5 mL, 合并活力峰部分 (10~20 管)。

第三步, 用聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳进一步纯化。电泳槽用有机玻璃板制成, 阴极槽为 210 × 40 × 40 mm, 阳极槽为 210 ×

40×130 mm, 凝胶板面积为 170×100×2 mm. 取 6 mL 活力峰部分进行电泳. 胶浓度 7%, 电流 40~50 mA, 使用 Tris-甘氨酸缓冲液 (pH 8.3) 电泳 1~1.5 小时, 从胶边上切下一小条染色, 放回原处做对照, 切下相应的酶区带部分, 用 5 mL 蒸馏水浸泡 24 小时, 对水透析, 用 Disc 凝胶电泳鉴定为均一区带, 提纯 3 倍. 各步提纯结果见表 40.

表 40 茁霉多糖酶的纯化

提 纯 步 骤	总蛋白 (mg)	总酶活 (u)	比 活 (u/mg)	回 收 率 (%)	
				蛋 白	酶 活
提 取 液	20.6	2445	119	100	100
Sephadex G-100	3.7	1754	474	18	71
垂直板电泳	2.4	828	345	12	34

【讨论】

茁霉多糖酶作用的最适 pH 为 5.3~5.8, pH 稳定范围在 4.3~8.6 之间. 最适温度为 50°C, 超过 50°C 酶很快失活 (50°C 4 小时, 只保留 10% 的活力). 酶作用于糯米淀粉的米氏常数 (K_m) 为 2.0×10^{-2} g/mL, 用凝胶薄层等电点聚焦电泳测定此酶的等电点为 3.8, 用 SDS 凝胶电泳测定它的分子量为 51000~52000, 金属离子 (10^{-3} mol/L) Hg^{2+} (0)、 Cu^{2+} (5)、 Al^{3+} (7)、 Fe^{3+} (11) 对该酶有明显的抑制作用 (括号中数字代表保留的相对活力). β -环状糊精对该酶有强烈的抑制作用, 其抑制常数 K_i 为 0.55×10^{-5} mol/L, α -和 γ -环状糊精对酶也有抑制作用, 但较弱. 色氨酸修饰剂 NBS 对酶活力有很强的抑制作用, 表明色氨酸残基对茁霉多糖酶的活力是十分必需的. 茁霉多糖酶的底物特异性是水解支链淀粉和茁霉多糖中的 α -1, 6-葡萄糖苷键, 而不能水解 α -1, 4- β -1, 4-右旋糖酐中的 α -1, 6-糖苷键以及天然糖元. 茁霉多糖酶是糖蛋白, 总糖含量为 6.5~7%, 用气相色谱测定出的糖组分 (每分子中残基数) 如下: 半乳糖 (8), 葡萄糖 (6), 甘露糖 (2), 鼠李糖 (2), 阿拉伯糖 (1), 在每克分子酶中共含 19 个糖残基. 将酶用 0.2 mol/L

的 NaOH 在 45°C 保温半小时后, 在 240 nm 产生了明显的光吸收, 表明发生了 β -消除反应, 在有硼氢化钠 (1 mol/L) 存在下, 则引起丝氨酸和苏氨酸残基的减少 (分别为 4 个和 3 个), 以及甘氨酸、丙氨酸的增加 (分别为 2 个和 4 个), 表明蛋白质中的碳水化合物侧链与肽链连结中有 O-糖苷键存在。

【文献】

江西食品发酵所, 微生物学报, 16(4): 282~290 (1976).

戈苏国等, 微生物学报, 20(4): 415~420 (1980).

杨寿钧等, 微生物学报, 21(1): 68~72 (1981).

戈苏国等, 生物化学与生物物理学进展, 4: 29~32 (1984).

(戈苏国)

8. β -葡萄糖苷酶的分离纯化

β -葡萄糖苷酶可以从康氏木霉 (*Trichoderma koningii*) AS 3.4001 的粗纤维素酶制剂中制备。该酶特异性地水解 β -葡萄糖苷键, 配糖基可以是醇、酚、羟基、腈等。

【试剂和材料】

菌种: 从土壤中分离, 经紫外线及钴 60 照射所得的白色变异株。

水杨苷, 2-硝基酚 β -葡萄糖苷, (B. D. H 公司出品), 纤维二糖 (新中化学厂出品), 苦杏仁苷, β -乳糖, (E. Merck 公司出品), 丙烯酰胺 (天津化学试剂一厂出品), 甲叉双丙烯酰胺 (北京化工厂出品), Sephadex G-75 (40~120 μ m), DEAE-Sephadex A-50 (40~120 μ m) (为瑞典 Phamacia 公司出品)。

【操作】

(1) 测定方法:

酶活力的测定: 取 0.5 mL 待测液, 加入 0.5 mL 0.5% 的水杨苷 (溶于 0.1 mol/L, pH 4.6 醋酸缓冲液中), 50°C 保温 30 分钟, 用 Somogyi 法测定还原糖。在实验条件下, 水解出的还原糖在 660 nm 的吸光度值为 1 时规定为 1 个酶活力单位 (u)。

蛋白质的测定: 采用 Lowry 法及在 280 nm 测吸光度。

纯度鉴定: 采用聚丙烯酰胺圆盘电泳法。

分子量测定: 采用 SDS 电泳法。

(2) 粗酶的制备:

培养基的组成: KH_2PO_4 2.0g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.0g, 蛋白胨 2.0g, 尿素 0.1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, CoCl_2 2mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6mg, ZnCl_2 1.7mg, 木屑粉(水曲柳, 粒度 400 目) 15g, 自来水 1L, 用 50% 醋酸调 pH 5~6。

培养条件: 30~31°C, 旋转式摇床 190 转/分培养 5 天后过滤。

酶制剂: 将上述培养物滤液用 80% 饱和度硫酸铵沉淀, 离心除去上清液, 将沉淀物风干研碎即得粗酶制剂。

(3) β -葡萄糖苷酶的分离纯化:

Sephadex G-75 凝胶过滤: 称取 9g 粗酶粉, 浸在 20 mL 蒸馏水中过夜, 4°C, 离心 (9000 r/min) 30 分钟, 将上清液上到预先用 0.1 mol/L, pH 5.6 醋酸-醋酸钠平衡好的 Sephadex G-75 柱 (2.5×5.5 cm) 上, 用同样缓冲液洗脱, 结果见图 66。

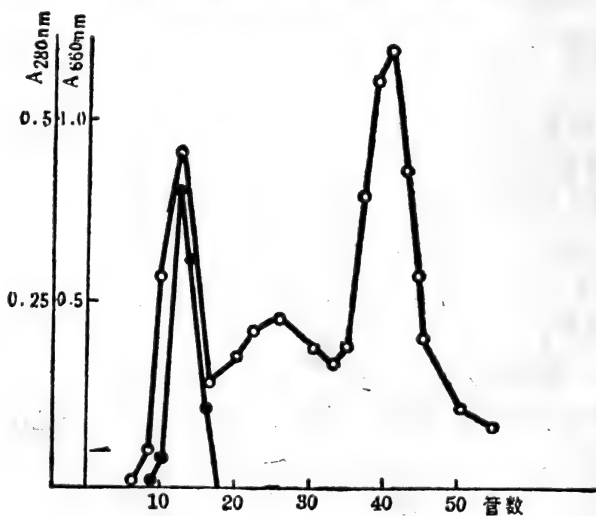


图 66 β -葡萄糖苷酶在 Sephadex G-75 柱上的层析图谱

●—● β -葡萄糖苷酶活力 ○—○ 蛋白质在 280 nm 的吸光度
层析温度 5~8°C, 流速 5 mL/15 分钟, 每管收集体积 5 mL

DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析: 将图 66 中具有 β -葡萄糖苷酶活力部分(9~20)管合并, 共 60 mL, 上到用 0.1 mol/L, pH 5.6 醋酸-醋酸钠缓冲液平衡好的 DEAE-Sephadex A-50 柱(2.2×47 cm)上。先用起始缓冲液洗脱, 然后改用浓度梯度盐液洗脱, 结果见图 67。

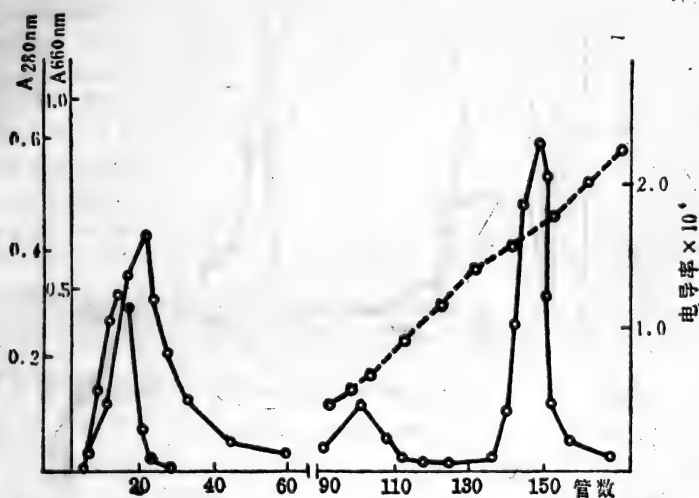


图 67 β -葡萄糖苷酶在 DEAE-Sephadex A-50 柱上的层析图谱
○-○ 盐梯度

ConA-Sepharose 亲和层析: 将图 67 中具有 β -葡萄糖苷酶活力部分(8~30)管合并, 共 105 mL, 上到用 0.1 mol/L pH 5.6 醋酸-醋酸钠缓冲液(含有 0.1 mol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂)平衡好的 ConA-Sepharose 柱(2.0×12 cm)上, 用起始缓冲液洗脱, 结果见图 68。

Sephadex G-100 凝胶过滤: 将图 68 中具有 β -葡萄糖苷酶活力部分(10~30)管合并, 共 100 mL, 冷冻干燥后溶于 5 mL 蒸馏水中, 上到用 0.02 mol/L pH 4.6 醋酸缓冲液平衡好的 Sephadex G-100 柱上(1.5×200 cm), 用起始缓冲液洗脱。结果见图 69。

收集图中 β -葡萄糖苷酶活力部分(42~46)管合并, 冷冻干

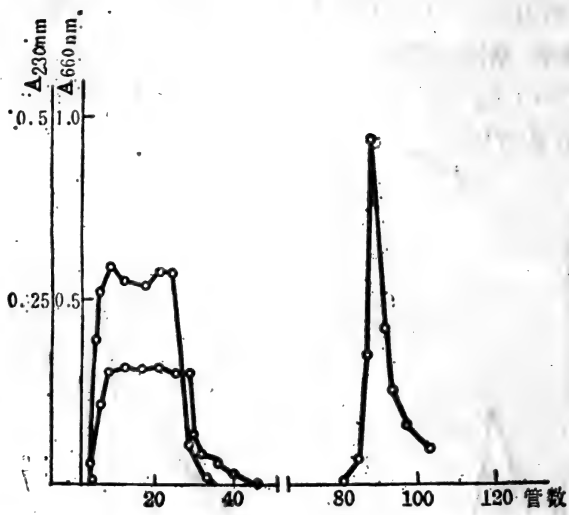


图 68 β -葡萄糖苷酶在 ConA-Sepharose 柱上的层析图谱
操作条件及图表示法同图 66

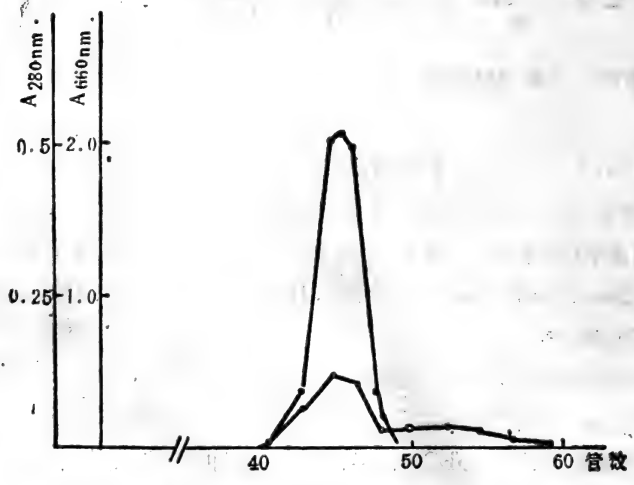


图 69 β -葡萄糖苷酶在 Sephadex G-100 柱上的层析图谱
操作条件及图表示法同图 66

燥,如需高纯度样品,在该柱上再重复分离一次可得满意效果。

提纯后的 β -葡萄糖苷酶在聚丙烯酰胺凝胶电泳上显示为单带。

(4) 酶的提纯: 全过程总结见表 41。

表 41 β -葡萄糖苷酶的提纯

提 纯 步 骤	总蛋白 (mg)	总活力 (u)	比 活 (u/mg)	提纯倍数	回收率 (%)
粗 酶	1468.5	38277.0	26.1	1	100
Sephadex G-75	300.0	18463.0	61.5	2.4	48.2
DEAE-Sephadex A-50	87.9	9654.0	109.8	4.2	25.2
ConA-Sepharose	5.3	8020.0	1513.2	58.0	21.0
Sephadex G-100	2.6	5294.0	2036.0	78.0	13.8

【讨论】

(1) 一般性质: β -葡萄糖苷酶的分子量为 77 000,最适作用温度 60°C,最适作用 pH 5.0, pH 稳定范围 4.0~9.0 (20°C), 75°C 处理 30 分钟活力全部丧失。

(2) 底物特异性: β -葡萄糖苷酶可以水解醇苷(纤维二糖、 β -乳糖)、酚苷(2-硝基酚- β -葡萄糖苷、水杨苷)及氰苷(苦杏仁苷)等多种葡萄糖苷。

(3) 这里介绍的 β -葡萄糖苷酶的纯化方法摘自纤维素酶连续分离纯化程序,其中亲和层析一步可以非常有效地将 β -葡萄糖苷酶与纤维素酶系中所有其他组分分离,因为酶系中仅此酶为非糖蛋白,不被该柱吸附。此外, Sephadex G-100 柱必须足够长,才能获得满意的分离效果。

汪大受等(1980)报道过另一分离纯化 β -葡萄糖苷酶的方法,详见参考文献。

【文献】

那安等, 真菌学报, 2(1): 50~58 (1983)。

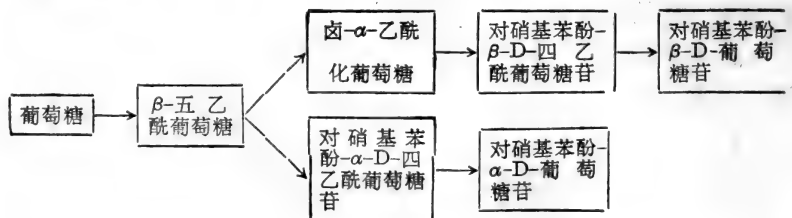
汪大受等, 生物化学与生物物理学报, 12(3): 293~300 (1980)。

(那 安)

9. 硝基苯酚糖苷化合物的有机合成

糖苷酶在分析糖链结构中具有其独特的价值。在糖苷酶的测定中常用的底物有三类：① 低分子天然底物，例如乳糖、棉籽糖、麦芽糖等；② 高分子天然底物，如半乳糖苷神经酰胺（糖脂）和去唾液酸去半乳糖的 α_1 酸性蛋白及去唾液酸的羊颌下腺粘蛋白（糖蛋白）等；③ 人工合成的，配基为发色团的底物，这种底物一般常用芳香族类的糖苷，如苯酚- α -N-乙酰氨基半乳糖苷、对硝基苯酚- β -D-葡萄糖苷、4-甲基伞形酮- β -D-N-乙酰氨基葡萄糖苷等。利用1, 2类底物时，只能定量检测被糖苷酶水解出来的糖。这种糖定量法往往必须先除去反应体系中未水解的底物以及酶蛋白，手续复杂，即使利用偶联酶促反应，可避免除去未水解的底物及酶蛋白的一些步骤，但需要适当的工具酶及相应的辅助物质（如邻联茴香胺、 NAD^+ 、ATP等），操作起来也不方便。利用第3类底物——人工合成的芳香族底物时，除了可用糖定量法检测外，还可用配基定量法。例如，测定被酶水解出来的原来结合在糖上的苯酚、对硝基苯酚或4-甲基伞形酮等的含量。用配基定量法检测酶活性，则不需要在反应体系中除去酶蛋白及未反应的底物，通常测定苯酚可用4-氨基安替比林或Folin-Ciocaltean试剂，至于测定对硝基苯酚和4-甲基伞形酮，只要把溶液的pH调节到10~11，就可用分光光度法或荧光法测定，因此不仅手续简便且灵敏度也高。为此，我们特介绍作为糖苷酶底物的对硝基苯酚糖苷的合成方法。

以葡萄糖为例，合成其对硝基苯酚- β -或 α -糖苷分别经过以下步骤：



合成对硝基苯酚- β -糖苷时，先将糖与醋酐反应，以无水醋酸

钠为催化剂,在高温条件下生成 β -五乙酰糖。此生成物与卤化剂(Br或Cl)反应,生成卤- α -乙酰化糖,后者再与对硝基苯酚钠反应,生成对硝基苯酚 β -乙酰化糖苷,最后再脱乙酰基,生成对硝基苯酚 β -糖苷。

合成对硝基苯酚 α -糖苷时,使 β -五乙酰糖在熔融状态,以氯化锌为催化剂,与对硝基苯酚缩合,生成对硝基苯酚 α -乙酰化糖苷。后者脱乙酰基,生成对硝基苯酚 α -糖苷。

① 糖的乙酰化:还原糖常存在着几种不同的环状结构,所得到的乙酰化异构体的种类则依赖于乙酰化时所用的温度和催化剂。

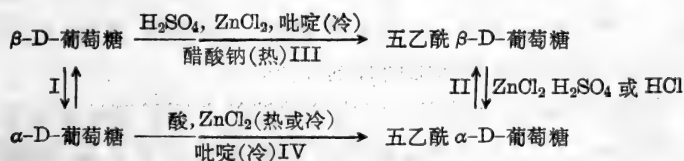


图 70 葡萄糖的乙酰化

以葡萄糖为例,在低温(0°C)条件下,反应 I 和反应 II 仅能很缓慢地达到异构平衡,而进行乙酰化反应 III 或 IV 并不发生异构化,因此,使用吡啶作为催化剂时,在低温条件下, α -醛己糖仅可生成 α -五乙酰糖, β -醛己糖生成 β -五乙酰糖。

在高温和酸性催化剂条件下,乙酰化糖之间易发生异构化(反应 II),所得到的产物依赖于反应 II 的平衡点。以葡萄糖为例,五乙酰糖混合物在平衡状态下,含有 90% α -和 10% β -五乙酰葡萄糖。许多五乙酰糖在平衡状态下都是 α -型占优势,所以常用酸性催化剂(例如氯化锌)和比较高的温度($20\sim 110^\circ\text{C}$)从 α -或 β -糖来生产 α -乙酰化糖。

在高温和以醋酸钠为催化剂情况下,反应 I 的 α -和 β -糖之间趋向平衡,而乙酰化糖之间(反应 II)的平衡却不进行。由于 β -糖的乙酰化比 α -糖的乙酰化快得多,所以主要产物是 β -乙酰化糖。

α -乙酰化糖尚可从 β -乙酰化糖以反应 II 而制备。

② 乙酰糖卤化:乙酰化糖的还原端碳原子上的乙酰基(醛糖

的1号碳原子和酮糖的2号碳原子)比其他乙酰基活泼,能够被卤原子取代,所产生的化合物——乙酰糖卤化物是糖及其衍生物合成过程中重要的中间物质。由于氟化乙酰糖活泼性太差而碘化乙酰糖又不太稳定,故用Br或Cl作为卤代原子,而不用F或I。

制备溴化乙酰糖的试剂是溶解HBr在冰醋酸,该试剂与 α -乙酰化糖和 β -乙酰化糖都很容易反应而产生溴- α -乙酰糖和溴- β -乙酰糖,二者还可以可逆地相互转化。但从热力学角度看, α -型异头物更稳定,故 β -型易向 α -型转化,而且 β -型异头物在分离过程中易于水解。所以得到的产物通常是 α -型。

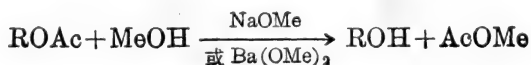
制备氯- α -四乙酰氨基葡萄糖常以醋酐为溶剂,HCl为供氯试剂。由于溴- α -四乙酰氨基葡萄糖不稳定,故不用溴取代。

③ 对硝基苯酚乙酰化糖苷的制备:

Koenigs-Knorr反应: 卤化乙酰糖的卤原子可被烷氧基、芳氧基和酰氧基取代,反应过程中C₁的构型发生Walden转换,原来是 α -构型的卤化乙酰糖,反应后生成 β -构型的糖苷,故本法适于制备 β -糖苷。

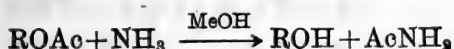
Helferich法: 乙酰化醛糖中C₁乙酰基比其他乙酰基活泼,不仅易被卤原子取代,在加热和酸性催化剂(氯化锌或对甲基苯磺酸)存在下还易被苯氧基取代。反应产物的构型究竟是 α -还是 β -型,与反应条件关系很大,否则会产生相当多量的二种异头物。如用对甲基苯磺酸为催化剂及短时间加热有利于 β -异头物生成;如用氯化锌为催化剂和较长时间加热,有利于 α -异头物生成。反应时真空蒸馏除去醋酸可改善得率。

④ 脱乙酰化: 脱乙酰基时,必须使糖的羟基的完整性不受影响,对于氨基糖,还要使N-乙酰基不致脱落下来,故通常用酯交换反应进行这一过程。在无水甲醇溶液中,以甲醇钠或甲醇钡为催化剂,可使乙酰化糖与甲醇发生酯交换反应,以生成相应的糖和醋酸甲酯:



对于反应产物不容易在甲醇溶液中结晶的糖苷，则用氢氧化钡的无水甲醇溶液脱乙酰基，反应完毕后，再用离子交换法除去 Ba^{++} ，然后减压蒸发甲醇，再用其他溶剂结晶反应产物。

氨的无水甲醇溶液也可用于酰化糖苷的脱乙酰基：



下面举几个具体例子。

(i) 对硝基苯酚- β -D-葡萄糖苷(P-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside)的合成

β -D-五乙酰葡萄糖(Penta-O-acetyl- β -D-glucopyranose)的制备：4g 粉末状的无水醋酸钠与5g 干燥的葡萄糖混合放入200 mL 的圆底烧瓶，加入25 mL 醋酐，沸水浴加热、迴流，并经常搅动，约30 分钟后可见溶液已澄清，继续沸水浴2 小时，得棕黄溶液，倒入盛有250 mL 冰水的烧杯中，搅拌，约3 小时后，烧杯下部的糖浆逐渐粘稠而析出结晶，倾去上层液体，用冷水洗结晶二次，过滤，收集结晶，干燥得淡黄色粗制品。

粗制品在乙醇中重结晶二次(如颜色较深，可使用活性炭)，得白色棱柱形结晶7g，熔点 $132^\circ C$ ， $[\alpha]_D^{20}$ 为 $+4^\circ$ (氯仿)。

溴- α -D-四乙酰葡萄糖(tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl bromide)的制备：

3g 红磷悬于30 mL 冰醋酸，于冰水浴中逐滴加入18g 溴，完毕后放置半小时，用细砂芯漏斗抽气过滤，滤液即为溴试剂，如不立即使用，密封低温保存。

取5g β -五乙酰葡萄糖放入有玻璃塞的烧瓶中，加入7.2 mL 溴试剂，轻轻摇动，全部溶解后室温放置2 小时，然后加入15 mL 氯仿。此混合物倒入500 mL 冰水中，用分液漏斗将氯仿层分出，用同样体积的冰水洗二次(振摇)，再用等体积的饱和 $NaHCO_3$ 液洗一次，分出氯仿层，加入无水硫酸钠使氯仿液脱水，过滤，滤液中加入0.3g 活性炭，轻轻搅拌1 小时后过滤，滤液在 $50\sim 60^\circ C$ 水浴中减压蒸发，所得糖浆溶于等体积的乙醚中， $0^\circ C$ 放置24 小时，白

色结晶用布氏漏斗收集。熔点 84°C ，在乙醚或二异丙醚中重结晶得纯产物，得量 4.7g，熔点： $88\sim 89^{\circ}\text{C}$ ， $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 为 $+198^{\circ}$ （氯仿）。

对硝基苯酚- β -D-四乙酰葡萄糖苷(P-Nitrophenyl tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranoside)的制备:

取 5g 溴- α -四乙酰葡萄糖及 3.8g 对硝基苯酚在 50 mL 丙酮中搅摇 5~10 分钟，然后加入 1 mol/L NaOH 液 28 mL，继续搅 2~3 分钟到全部溶解。5 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 小时，见有大量针状结晶，过滤收集结晶，用水洗到结晶呈白色，用乙醇重结晶，得雪白的细长棱柱体结晶，得 2.2g，熔点 $174\sim 175^{\circ}\text{C}$ ， $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 为 -40.8 （氯仿）。

对硝基苯酚- β -D-葡萄糖苷的制备:

将 2g 对硝基苯酚 β -D-四乙酰葡萄糖苷悬于 50 mL 无水甲醇中，37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 分钟后，加入 1 mol/L 甲醇钠无水甲醇液 2 mL，混匀溶解，0 $^{\circ}\text{C}$ 放置一天，得针状结晶，过滤收集结晶，用无水乙醇重结晶，得量 0.8 克，熔点 165°C ， $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 为 -79.6° （甲醇）。[有文献报道，熔点 164°C ，比旋光度 -103° （水）]。

(ii) 对硝基苯酚- β -D-半乳糖苷(P-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)的合成

其步骤与合成对硝基苯酚- β -D-葡萄糖苷相同，也经历五乙酰化，卤化，对硝基苯酚- β -四乙酰糖苷及对硝基苯酚- β -糖苷等几个步骤。每步操作用量同上，各步骤的产物分别为:

β -五乙酰半乳糖(penta-O-acetyl- β -D-galactopyranose):
得量 5.5g，熔点 141°C ； $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 为 $+25.6^{\circ}$ （氯仿）。

溴- α -四乙酰半乳糖(tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl bromide)，得量 4g，熔点 $83\sim 84^{\circ}\text{C}$ ， $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 为 $+215^{\circ}$ （氯仿）。

对硝基苯酚- β -四乙酰半乳糖苷(P-nitrophenyl tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranoside)，得量 2.1g，熔点 $144\sim 145^{\circ}\text{C}$ ， $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ 为 -8.3° （氯仿）。

对硝基苯酚- β -D-半乳糖苷，得量 1g，熔点 170°C ， $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 为 -74.7° 。（如脱乙酰基后在无水甲醇中重结晶，熔点为 $181\sim 182^{\circ}\text{C}$ 。）

(iii) 对硝基苯酚 β -D-N-乙酰氨基葡萄糖苷(P-nitrophenyl α -acetamide- α -deoxy- β -D-glucopyranoside) 的合成

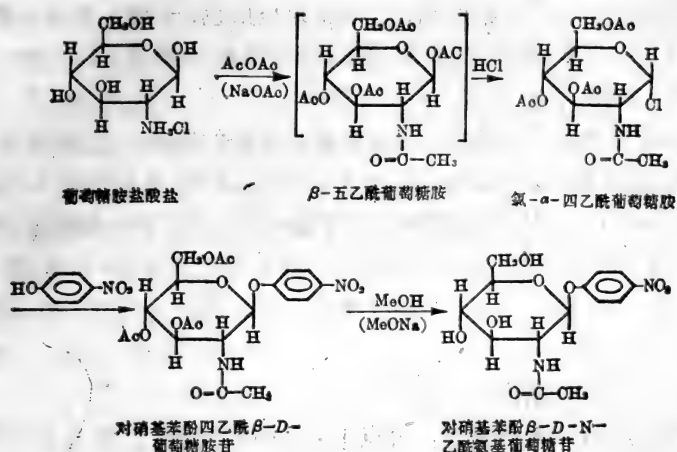


图 71 对硝基苯酚- β -D-N-乙酰氨基葡萄糖苷合成步骤

氯- α -四乙酰氨基葡萄糖 (acetochloroglucosamine) 的制备: 干燥的粉末状的氨基葡萄糖盐酸盐 30g 与无水醋酸钠 15g 悬于 300 mL 醋酸酐中, 配置回流装置, 沸水浴加热 2 小时, 经常搅拌, 约半小时后溶液已澄清, 反应得到的棕黄色溶液冷却到 0~5°C, 通入干燥的 HCl 到饱和, 盖紧, 室温放置 48 小时以上, 加入 400 mL 氯仿, 随后倒入盛有 1 升冰水的烧杯中, 用分液漏斗分出的氯仿液中加入饱和 NaHCO₃ 溶液, 摇动混和, 再分出氯仿液, 如此 3~4 次, 直到无 CO₂ 气泡产生为止。最后用水洗氯仿液, 分离得淡黄色氯仿液, 加入无水 MgSO₄ 及活性炭各 5 克, 搅动 1 小时, 过滤, 所得的无色滤液减压蒸发成糖浆, 加入少量无水乙醚, 即可得到氯- α -四乙酰氨基葡萄糖结晶置于干燥器中保存。产量 25~30g, 熔点 124~126°C, $[\alpha]_D^{20}$ 为 +113° (氯仿)。

对硝基苯酚四乙酰 β -D-氨基葡萄糖苷 (P-nitrophenyl 2, 3, 4, 6-tetracetyl- β -D-glucosaminide) 的制备: 25g (68.5 mmol/L) 氯- α -四乙酰氨基葡萄糖和 19g (138 mmol/L) 对硝基苯酚在 250

ml 丙酮中搅摇 5~10 分钟, 然后加入 1 mol/L NaOH 138 mL, 继续搅动 2~3 分钟, 到全部溶解。5°C 放置 24 小时, 可见大量细长的针状结晶, 过滤收集结晶, 用水洗到呈白色, 干燥。此为对硝基苯酚 2, 3, 4, 6-四乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷。得量 12~13g, 熔点 236~239°C, $[\alpha]_D^{20}$ 为 -47° (吡啶)。

对硝基苯酚-N-乙酰- β -氨基葡萄糖苷的制备: 上述四乙酰糖苷结晶 10g, 悬于 250 mL 无水甲醇中, 37°C 水浴加热 5 分钟, 加入 10 mL 1 mol/L 甲醇钠的无水甲醇溶液, 搅动到全部溶解 (约 5 分钟), 5°C 放置 24 小时, 收集结晶, 即为对硝基苯酚-N-乙酰- β -氨基葡萄糖苷。得量 6.5g, 熔点 210~212°C, $[\alpha]_D^{20}$ 为 $-15^\circ \pm 2$ (水)。

以上有关数据也有如下报道:

四乙酰氨基葡萄糖苷: 熔点 133~134°C, $[\alpha]_D^{18}$ 为 $+118^\circ$ (氯仿); 熔点 127~128°C, $[\alpha]_D^{18}$ 为 $+108^\circ$ (氯仿)。

对硝基苯酚-2, 3, 4, 6-四乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷: 熔点 241°C, $[\alpha]_D^{18}$ 为 -46.75° (吡啶); 熔点 240°C, $[\alpha]_D^{18}$ 为 -46.2° (丙酮); 熔点 233°C, $[\alpha]_D^{16}$ 为 -40° (丙酮)。

对硝基苯酚-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷: 熔点 214°C, $[\alpha]_D^{16}$ 为 -25.5° (吡啶); 熔点 210°C, $[\alpha]_D^{22}$ 为 -18° (丙酮: 水为 1:1); 熔点 204°C, $[\alpha]_D^{20}$ 为 -18.6° (水)。熔点为 204°C 的系含一个结晶水分子的结晶。

(iv) 对硝基苯酚- α -D-甘露糖苷 (P-nitrophenyl α -D-mannopyranoside) 的合成

β -五乙酰甘露糖 (penta-O-acetyl- β -D-mannopyranose) 的制备: 基本方法同 β -五乙酰葡萄糖。5g 甘露糖、2.5g 无水醋酸钠与 45 mL 醋酐混合, 沸水浴回流 1.5 小时, 冷却后倒入 250 mL 冰水中, 搅拌 3 小时后, 少量多次加入固体 Na_2CO_3 至不冒气为止, 此时有棕色粘稠的糖浆, 加入 50 mL 氯仿搅拌 10 分钟后分出氯仿层, 加入 4g 无水硫酸镁除水。将干燥的氯仿液减压蒸发, 即得 β -五乙酰甘露糖浆。

对硝基苯酚- α -D-四乙酰甘露糖苷 (P-nitrophenyl tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranoside) 的制备: 12.5g 对硝基苯酚、12.5g β -五乙酰甘露糖放入圆底烧瓶中, 于 120~130°C 油浴加热熔融后, 加入新鲜煅烧过的氯化锌粉末 5g, 搅拌混匀, 见有大量气泡产生, 继续油浴, 同时减压抽气. 1 小时后室温放置, 冷却到约 60°C 时加入 200 mL 苯, 苯溶液用等体积水洗二次后, 用等体积的 1 mol/L NaOH 水溶液洗若干次 (约耗用 1 mol/L NaOH 液 2~3 升) 到溶液近乎无色, 再用等体积水洗二次, 分出苯层.

苯层中加入 CaCl_2 及活性炭各 3g, 搅拌 1 小时后过滤, 滤液在 35~40°C 水浴下减压蒸发, 所得糖浆加热溶于无水乙醇, 5°C 放置 24 小时, 即得白色棱柱体形的结晶, 用无水乙醇再重结晶一次, 即为产品对硝基苯酚- α -D-四乙酰甘露糖苷, 得量 10.7g, 熔点 156~157°C, $[\alpha]_D^{20}$ 为 +105° (氯仿).

对硝基苯酚- α -D-甘露糖苷的制备:

5g 对硝基苯酚- α -D-四乙酰甘露糖苷悬于 60 mL 无水甲醇中, 加入 0.2 mol/L 甲醇钠的无水甲醇溶液 0.5 mL, 沸水浴回流 5 分钟, 溶液减压蒸发到原来体积的 2/3, 0°C 放置一天, 收集结晶, 用少量水重结晶, 为对硝基苯酚- α -D-甘露糖苷白色层状结晶. 得量 2.7g, 熔点 183~184°C, $[\alpha]_D^{20}$ 为 +145° (水).

(v) 对硝基苯酚- α -D-半乳糖苷 (P-nitrophenyl α -D-galactopyranoside) 的合成

β -五乙酰半乳糖的制备: 见本书第 204 页.

对硝基苯酚 α -D-四乙酰半乳糖苷 (P-nitrophenyl tetra-O-acetyl- α -D-galactopyranoside) 的制备: 与制备对硝基苯酚- α -D-四乙酰甘露糖苷的方法相同, 用 5g 对硝基苯酚, 5g β -五乙酰半乳糖及 2g 氯化锌参加反应, 得白色结晶对硝基苯酚- α -D-四乙酰半乳糖苷 2.5g, 熔点 133°C, $[\alpha]_D^{20}$ 为 +208° (氯仿).

对硝基苯酚- α -D-半乳糖苷的制备:

将 2g 对硝基苯酚- α -D-四乙酰半乳糖苷悬于 100 mL 无水甲醇, 在冰水浴中冷到 0°C, 滴加 0.2 mol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 无水甲醇液,

使反应液 pH 为 9, 0°C 放置 24 小时至固体全部溶解。反应后的甲醇溶液, 流经用甲醇平衡过的 H⁺ 型国产 732 阳离子交换树脂层析柱 (2×15 cm), 流速 10 mL/分, 收集流出液, 用 50 mL 甲醇洗柱。收集液减压蒸发除去甲醇, 所得结晶用最少量无水乙醇加热溶解, 0°C 放置过夜, 收集结晶, 为对硝基苯酚- α -D-半乳糖苷。得量 0.9 g, 熔点 169°C, $[\alpha]_D^{20}$ 为 +225° (水)。

(vi) 对硝基苯酚- α -D-葡萄糖苷 (P-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside) 的合成

β -D-五乙酰葡萄糖的制备: 见第 203 页。

对硝基苯酚- α -D-四乙酰葡萄糖 (P-nitrophenyl tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranoside) 的制备: 48 g 对硝基苯酚与 30 g β -五乙酰葡萄糖混合, 125°C 油浴熔融后加入 7 g 氯化锌, 见有大量气泡产生, 减压抽气, 125°C 油浴加热 1 小时, 随后冷却到 60°C, 加入 400 mL 苯, 用等体积水洗二次后, 用等体积 1 mol/L NaOH 水溶液洗若干次到溶液近乎无色, 再用水洗二次, 分出苯层, 加入 CaCl₂ 及活性炭各 6 g, 搅拌 1 小时后过滤, 滤液 35~40°C 水浴减压蒸发, 得糖浆, 此为对硝基苯酚四乙酰葡萄糖苷的 α 、 β 二种异头物构型的混合物, α 型为主 (α 型是 β 型的 1.5 倍), 用 60 mL 无水乙醇加热溶解后室温放置, 3 天后收集结晶, 所得结晶在乙醇中重结晶若干次, 到熔点不变为止。晶形无色针状棱柱体, 得量 16.5 g, 熔点 113°C, 比旋光度 +200° (氯仿)。

对硝基苯酚- α -D-葡萄糖苷的制备: 与对硝基苯酚- α -D-半乳糖苷的制备同, 2 g 对硝基苯酚- α -D-四乙酰葡萄糖苷经 Ba(OH)₂ 脱乙酰, 得多边棱柱体结晶, 得量 0.7 g, 熔点 216°C, 旋光度 +215° (水)。[有文献报道, 熔点 216~217°C, $[\alpha]_D^{23}$ +227.9° (甲醇); 熔点 210°C, $[\alpha]_D^{20}$ +215° (水)。]

(徐大顺 顾天爵)

各 论

一、微生物多糖和植物多糖

(一) 细菌胞外多糖的纯化

一般多糖提纯的方法大多也适用于细菌胞外多糖的纯化，这里只介绍几种最常用的提纯手段。

细菌在合适的条件培养以后，通常将所得的培养液进行高速离心，去掉菌体等不溶物，然后将含有细菌胞外多糖的上清液再进行其他各步提纯。

① 有机溶剂沉淀：多糖在有机溶剂里溶解度极小，通过有机溶剂沉淀是细菌胞外多糖纯化最常用的方法。一般来说，胞外多糖首先是通过有机溶剂把它沉淀下来，纯化的最后一步，也往往用有机溶剂沉淀，然后再冲洗，冷冻干燥。最常用的有机溶剂是乙醇、丙酮。

沉淀往往是在 pH 7.0 左右进行，因为在此 pH 条件，多糖比较稳定。此外，还需考虑溶液的离子强度，所加有机溶剂的量等，而这些条件只能通过实验来确定。

② 季铵盐沉淀：在酸性、中性或弱碱性条件下，一些季铵盐如溴代十六烷基三甲铵 (cetyltrimethylammonium bromide, 简称 CTAB) 和十六烷基盐酸吡啶 (cetylpyridinium chloride, 简称 CPC) 能与酸性多糖形成不溶于水的盐，以此可把酸性多糖从中性多糖中分离出来。

沉淀方法很简单，首先把 CPC 或 CTAB 等配成 1~10% 溶液，将其加入到多糖溶液中去，产生沉淀，少量的氯化钠 (0.02

mol/L 或更少)可增加沉淀聚集速度。多糖合适的浓度在 0.1~1% 之间,每毫克多糖所要加入的季铵盐量不要超过 3 毫克。

在加入季铵盐以后,可稍加温(如 37°C)放置几分钟,使沉淀聚集。对于低电荷密度的低分子量多糖,加入季铵盐以后,放置时间可长一些,甚至放置过夜。

通过离心、过滤等方法可得到 CPC-多糖或 CTAB-多糖复合物,这种复合物能溶解在盐溶液里和有机溶剂里。再用透析等方法除掉 CPC 或 CTAB,从而得到所需多糖。

中性多糖也能用此方法沉淀,但需使多糖形成硼酸盐复合物,或在很高 pH 条件下进行沉淀。

③ 离子交换柱层析:存在离子化基团的多糖也能用离子交换柱层析进行进一步纯化。常用的树脂是 DEAE-纤维素。

在接近 pH 6 时,酸性多糖很易吸附在 DEAE-纤维素柱上。酸性基团越多,吸附能力越强。根据它们酸性基团的含量,可用几种方法把多糖洗脱下来:④ 保持 pH,增加缓冲液浓度,这仅适用于弱酸性多糖;⑤ 逐渐增加碱性溶液强度;⑥ 逐渐增加酸性溶液强度。

对于中性多糖,在 pH 5~6,它们通常不能吸附或很少吸附在柱上。然而在碱性条件,它们能吸附在柱上,再逐渐增加洗脱液的 pH,把它洗脱下来。此外,还可将柱转变成硼酸盐形式,能与硼酸盐形成复合物的多糖吸附在柱上,不与硼酸盐形成复合物的多糖则先通过了柱。洗脱时可逐渐增加硼酸盐的浓度。

从柱上洗下来的多糖可用糖分析中一些敏感的颜色反应方法来测定。

④ 其他方法:用氯仿,酚-水,蛋白酶,核酸酶除去多糖中含有的蛋白质、核酸,用超过滤法除去一些低分子量物质等,也是经常使用且非常有效的纯化方法,这里就不再一一列举了。

粪产碱杆菌产粘变株(*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*)胞外酸性多糖的纯化

【试剂】

十六烷基盐酸吡啶(C.P.C), Sigma 公司。

Amberlite IR-120, Aldrich 公司。

【操作】

(1) 培养液离心, 去除细胞及不溶物, 在上清液里加入二倍体积丙酮, 沉淀出多糖, 按此方法重复三次, 所得沉淀用丙酮洗涤, 以脱去纤维多糖中水分。干燥, 得粗制品。

(2) 为了进一步纯化, 将上述多糖溶解在水里, 并通过 Amberlite IR-120 柱。

(3) 在柱的流出物里加入 10% C.P.C 溶液, 离心得到 CPC-多糖复合物沉淀。

(4) 将 CPC-多糖复合物溶解在 10% 氯化钠溶液, 离心以除去少量杂质。

(5) 在离心所得上清液里, 加入乙醇, 沉淀出多糖。

(6) 把离心所得多糖溶于水里, 对水透析除去氯化钠和 CPC。

(7) 用丙酮再次沉淀, 离心所得多糖用丙酮、乙醚和石油醚冲洗, 最后真空干燥得纯多糖。

【文献】

Whistler, R. L., *Methods in Carbohydrate Chemistry*, vol V. General Polysaccharides.

Misaki, A., et al., *Biochemistry*, 8:4645 (1969).

(钱世钧)

(二) 真菌多糖和植物多糖的研究方法

真菌多糖和植物多糖的分离、提纯、鉴定方法与其他多糖基本相同。

利用多糖溶于水或酸、碱、盐溶液而不溶于醇、醚、丙酮等有机溶剂的特点, 从不同材料中进行提取。提取时一般先将原料物质脱脂与脱游离色素, 然后用水(冷或热水)、稀酸、稀碱、稀盐溶液进行提取, 提取液经浓缩后即以等重或数倍的甲醇或乙醇、丙酮等沉淀析出, 所获粗多糖需经反复溶解与醇析。

从不同材料中提取多糖,究竟以何种溶剂提取为宜,须根据具体情况,先以小量样品摸索,观察何者提取分离效率较高,并注意用不同溶剂提取有何不同的特点,既可先后用水、稀酸或稀碱、稀盐提取,也可分别用水、稀酸、稀碱、稀盐提取,所得到的产物常常是不相同的。

提取中要防止降解。稀酸提取时间宜短,温度最好不超过 5°C ;用稀碱提取时,为防止降解,常在 N_2 气流下提取,或加入硼氢化钾,稀酸、稀碱提取液均应迅速中和或迅速透析。稀碱提取液也可用含酸酒精沉淀。

含有糖醛酸或硫酸基团等的多糖,可在盐类或稀酸溶液中直接醇析,而使多糖以盐的形式或游离形式析出。

采用醇析或其他溶剂沉淀所获得的多糖,常杂有较多的蛋白质需要脱除,脱除蛋白质的方法有多种,例如选择能使蛋白质沉淀而不使多糖沉淀的酚、三氯乙酸、鞣酸等试剂来处理,但用酸性试剂时间宜短,温度宜低,以避免多糖降解。

脱蛋白较好的方法是 Sevag 方法,用氯仿、戊醇(或丁醇)按 4:1(或 5:1, 9:1)比例混合后,加至样品中振摇,样品中的蛋白质与混合液形成凝胶,可用离心法除去。利用蛋白质水解酶(如胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、链霉蛋白酶等)使样品中蛋白质部分降解后,再用 Sevag 方法则效果更好一些。某些多糖因含有酸、碱性基团,易与蛋白质相互作用,虽不是糖蛋白,也较难脱除。对碱稳定的糖蛋白,在硼氢化钾存在下,用稀碱温和处理,可以把这种结合蛋白质分开。

植物、真菌等来源的多糖,因可能含有酚类化合物,如暴露在空气中提取或干燥时,颜色加深,这类色素可用 H_2O_2 氧化脱色,但温度不能高于 50°C ,否则多糖发生部分降解。

一般提取的多糖样品,常是多糖的混合物。多糖进一步提纯常按分子量大小、分子形状或化学组成等特点进行分级,分级的方法有多种,如用有机溶剂、十六烷基三甲基氢氧化铵、斐林试剂、DEAE 纤维素柱等方法。

多糖样品经反复溶解与沉淀,脱蛋白、脱色、分级沉淀等后,其纯度判断一般可根据其中单糖残基摩尔比恒定,电泳或密度梯度超速离心呈现单一的带或峰,凝胶柱层析呈现一较窄的峰等。

下面列举三例以供参考。

1. 斜顶菌(*Clitophus caespitosus* PK)水溶性多糖的分离提纯

用热水从斜顶菌子实体中提取多糖,脱去蛋白后,经甲醇分级,DEAE-纤维素柱层析,获得单一级分的葡聚糖,分子量约为13万。

【材料和试剂】

斜顶菌子实体(吉林省伊通县产),95%酒精,无水酒精,乙醚, P_2O_5 ,甲醇,Lowry法试剂,链霉蛋白酶(pronase), $CHCl_3$,戊醇或丁醇, H_2O_2 ,氨水,NaOH,DEAE纤维素,纸层析,气相层析有关试剂。

【操作】

(1) 提取:取斜顶菌子实体残渣1kg(曾用乙醇脱脂2~3次),用5kg热水提取(95~100°C)6小时,尼龙布过滤,提取4~5次,滤液合并,浓缩至1.5升,离心弃去滤渣,向上清液中加入三倍95%乙醇,沉淀过夜,离心,收集沉淀,依次用95%乙醇、无水乙醇或甲醇、乙醚离心洗涤,然后置装有 P_2O_5 和NaOH的真空干燥器中抽空干燥,得粗多糖粉末(灰色),得率8%。

(2) 脱蛋白:粗多糖含蛋白质较多,用Lowry法测定蛋白质含量为37.5%。用酶法与Sevag法结合进行脱蛋白。取粗多糖2g溶于40mL水中,用 Na_2CO_3 调pH至7.8,加蛋白酶0.05~0.1g,甲苯2mL 39°C保温三昼夜,对自来水透析两昼夜,对蒸馏水透析半日,溶液浓缩至20mL,用Sevag方法脱蛋白五次,然后用3倍95%乙醇醇析得脱蛋白多糖,用水溶解再醇析,重复2~3次。

用酚硫酸法测得脱蛋白多糖总糖含量98.1%。经纸层析和气相色谱分析,表明此多糖由葡萄糖、岩藻糖和甘露糖组成,其摩尔

比为 3.6:0.15:1.0.

(3) 分级: 取 1% 的多糖溶液, 在搅拌下滴加甲醇至 1:0.5 (V/V), 过夜, 离心, 以 33% 甲醇洗沉淀, 同上干燥得第一级分 CS_1 , 上清加甲醇至 1:1 同上处理得第二级分 CS_2 , 上清加甲醇至 1:1.5 得 CS_3 . 将 CS_1 再经 DEAE 纤维素 (OH^-) 型柱层析, 水洗脱后, 以 0.1 mol/L NaOH 洗脱, 中和、透析、浓缩、醇析、干燥后得单一级分的(葡聚糖) CS'_1 . CS'_1 、 CS_2 、 CS_3 分别完全酸水解, 经

表 42 斜顶菌水溶性多糖的分级沉淀

沉淀时甲醇浓度(%)	级 分	沉 淀 量 (%)	葡 萄 糖	甘 露 糖	岩 藻 糖
33	CS_1	11	单一葡萄糖	0	0
33~50	CS_2	41	3.0	1.0	0.2
50~60	CS_3	32	5.2	1.0	0.1

纸层析或气相层析确定其组成成分.

(4) 脱色: CS_1 等均略现灰色, 将 0.5% 多糖溶液(灰褐色), 用氨水调 pH 至 8, 在 50°C 以下滴加 20% H_2O_2 , 至溶液为淡黄色, 保温 2 小时, 对流水及蒸馏水透析, 浓缩后用乙醇醇析, 同上样品干燥, 可得白色粉末.

(5) 纯度试验: CS_1 在玻璃纤维素电泳上呈现一个峰(800 V, 40 分钟), 在琼脂糖 4B 柱上呈现一个峰, 以标准的已知分子量葡聚糖相比较, 分子量为 150 万(用粘度法测定为 132 万).

【文献】

梁忠岩、张翼伸, 高等学校化学学报. 4(3): 364~370(1983).

(张翼伸)

2. 香菇(*Lentinus edodes*)中碱溶性多糖的分离提纯

从香菇中用热水提取出多糖后, 用稀碱液又可提取出一些多糖, 经分级等手续可获较单一的级分.

【材料和试剂】

干香菇子实体, 3% 三氯乙酸, 1 mol/L NaOH, 醋酸, 甲醇, 乙醚, 纸层析有关试剂.

【操作】

(1) 用碱提取: 取香菇干子实体 1 公斤, 用 3% 三氯乙酸提取一次, 用热水提取二次后, 残渣分散在 1 mol/L NaOH 中 2 小时 (室温 N_2 流下), 过滤所得碱提取液, 用醋酸中和得沉淀, 离心收集。沉淀再溶解在 1 mol/L NaOH 中, 少量不溶物离心去掉, 用醋酸中和再获沉淀, 重复操作五次, 然后将沉淀用水、甲醇、乙醚依次洗涤, 空气干燥。产品 59.1 g 为碱溶多糖部分。用酸完全水解后经纸层析检查有葡萄糖、甘露糖、木糖。

(2) 分级: 用甲醇分级沉淀得到一葡聚糖。多糖 1 克溶解在 0.5 mol/L NaOH 100 mL 中, 搅拌下滴加甲醇 77 mL, 得一沉淀 (P_1), 离心收集, 用甲醇乙醚依次洗涤干燥, 获干沉淀物 (粉末) 258 mg。向上清液同上操作再滴加甲醇 23 mL, 得沉淀物 (P_2), 同样分离干燥得 P_2 沉淀物 384 mg, 再向上清滴加甲醇 30 mL, 直至沉淀完全, 得 P_3 沉淀物 228 mg。分别测其比旋, 并用酸完全水解 P_1 , P_2 , P_3 , 作纸层析, 其组成成分如表 43。仅 P_3 为单一葡聚糖。

表 43 甲醇分级香菇碱溶多糖

级 分	重 量 (mg)	[α] _D	组 成		
			葡 萄 糖	甘 露 糖	木 糖
原样品	1000	197	++	+	+
P_1	258	192	+	+	+
P_2	384	196	++	+	+
P_3	228	258	++	-	-

注: ++表示大量存在, +表示存在, -表示没有。

【文献】

Shida, M. et al., *Carbohydr. Res.* **60**:117~127 (1978).

(张翼伸)

3. 大蒜球根中多糖的提取

大蒜球根中含有不同组分的多糖混合物, 用不同的提取与分级方法, 可以得到不同级分不同组分的多糖。

【试剂】

0.5% 草酸铵, 乙醚, 石油醚, 冰醋酸, 95% 乙醇, 无水酒精, 氨水, 5% CaCl₂, 丙酮, DEAE 纤维素, NaCl.

【操作】

(1) 用 0.5% 草酸铵提取: 1 kg 去皮大蒜球根, 在酒精中捣碎, 用尼龙布过滤, 用乙醚与石油醚等量混合物 500 mL, 回流 2 小时, 冷却后尼龙布过滤, 反复脱脂五次, 残渣空气干燥, 得棕色糊状物 183 g. 加入 0.5% 草酸铵 1.2 升, 在沸水浴上加热搅拌 4 小时, 冷却后尼龙布过滤, 上清用冰醋酸酸化至 pH 4.5, 用 4 倍体积酒精沉淀多糖, 用无水酒精、乙醚依次洗涤, 得白色无定形粉末 (A), 经酚硫酸法分析总糖含量 61.2%, 经改进的咔唑法测得其中含半乳糖醛酸达 22.8%, 另有半乳糖、阿拉伯糖、鼠李糖等 (P. O. 或 G. L. C.).

(2) 用水代替草酸铵提取: 脱脂蒜泥 200 g 用水提取, 可把其中的富半乳糖醛酸部分多糖分离出来, 并获得富半乳糖部分的多糖, 其流程用图 72 简述.

对 A、B、C 等级分分析 (G. L. C.) 其组成如表 44.

表 44 多糖 A, B, C, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆ 与 B₇ 的组成

多糖 级分	[α] _{D20} (1.0)	灰分 (%)	组 成					其他糖存在	
			半乳糖醛 酸 (%)	总糖 (%)	半乳糖 (%)	阿拉伯 糖 (%)	鼠李糖 (%)	葡萄糖	果糖
A	-11.99	4.06	22.8	51.2	24.1	7.2	3.1	++	++
B	-5.94	3.79	12.5	76.6	21.1	3.6	1.1	++	++
C	-35.92	0.24	2.8	92.8	-	1.3	-	+++	+++
B ₂	-43.77	0.16	1.6	94.2	1.1	2.7	-	+++	+++
B ₃	+43.59	2.64	28.9	51.4	49.3	10.2	6.3	+	+
B ₄	+59.94	8.17	54.0	28.5	25.8	4.6	3.0	+	+
B ₅	+66.5	2.68	9.3	80.9	81.4	5.7	-	-	-
B ₆	+70.0	0.12	-	97.3	97.1	1.6	-	-	-
B ₇	+45.23	6.32	27.1	50.4	46.1	7.1	7.8	+	-

注: 在 G. L. C. 中+++表示较大峰, ++表示中等峰, +表示很小的峰.

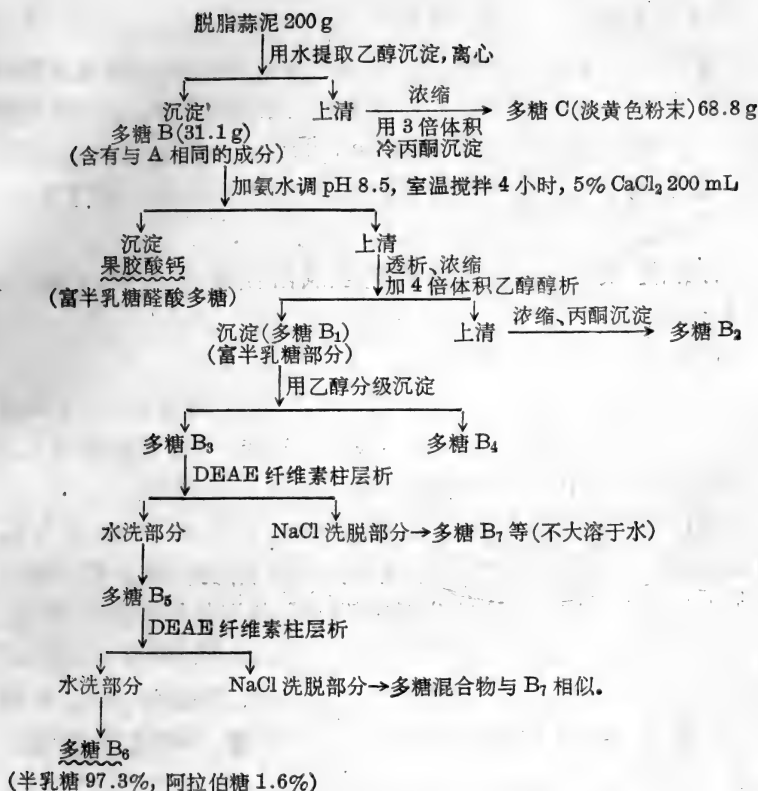


图 72 从大蒜球根中提取多糖的流程图

【文献】

Das, N. N., et al., *Carbohydr. Res.* **56**: 337~349 (1977).

(张翼伸)

(三) 酵母甘露聚糖的研究方法

酵母细胞壁外包着一层胶状的糖蛋白, 称为酵母胶, 因为它的糖的成分主要是甘露糖, 所以又称为甘露聚糖(mannan)。对这层甘露聚糖的结构研究, 不但有利于阐明酵母细胞壁的结构与功能, 而且关系到酵母接合时的细胞识别因子, 以及酵母细胞分泌到原生质膜外的糖蛋白(如蔗糖酶等)的生物合成等方面的研究。

下面介绍酵母甘露聚糖研究中常用的几种方法。

1. 酵母甘露聚糖的分离提取

酵母甘露聚糖在细胞壁外，因而比较容易抽提。现在常用的分离方法是，用柠檬酸缓冲液在高压灭菌条件下抽提，然后用乙醇沉淀，再用溴代十六烷基三甲铵(cetarlone，一种去污剂)沉淀除去杂蛋白，再利用和硼酸的结合把糖蛋白(甘露聚糖)沉淀下来。

【试剂】

柠檬酸，溴代十六烷基三甲铵，氢氧化钠，硼酸，甲醇，乙酸，乙醇，氯化钠。

【操作】

(1) 面包酵母细胞收获后，用0.9% NaCl溶液洗二次，然后再用pH 7.2的0.02 mol/L柠檬酸缓冲液洗一次，最后悬浮于上述柠檬酸缓冲液中，每100克湿细胞用50 mL缓冲液。

(2) 将上述细胞悬浮液放在高压灭菌锅内，1 kg蒸气压(125°C)90分钟。取出冷却后，离心，3000转/分，20分钟。倾出粘稠浅黄色上清液，沉淀部分再加75 mL相同的柠檬酸缓冲液，混匀，再经高压灭菌90分钟。取出冷却后，离心，3000转/分，20分钟。倾出上清液与第一次离心上清液合并，共约150 mL，冷却至4°C左右，加入3倍体积(约450 mL)冷甲醇，出现乳白色沉淀，在4°C放置过夜。

(3) 离心，3000转/分，20分钟，取得白色沉淀，用氮气流吹干(或放置干燥器中干燥)。将白色粗提物称重，按每4g溶于100 mL水的比例溶于水中；另取小烧杯，溶解4g于50 mL水中。将溴代十六烷基三甲铵溶液慢慢倾入100毫升粗提物溶液中，同时用电磁搅拌，出现白色蛋白质沉淀，在室温下放置过夜。

(4) 离心，3000转/分，20分钟，保留上清液，用50 mL水洗沉淀部分，再离心，两次上清液合并，弃去沉淀。按比例每200 mL上清液加入100 mL 1%硼酸溶液。在电磁搅拌同时，慢慢滴加1 mol/L NaOH，调pH至8.8，出现白色絮状的甘露聚糖沉淀，4°C放置过夜。

(5) 离心，3000转/分，20分钟。倾去上清液，沉淀用0.5%

pH 8.8 的硼酸钠溶液洗一次，离心收集沉淀。将沉淀再溶于 50 mL 2% 乙酸溶液中，加入 1g 乙酸钠晶体，待充分溶解后，加入 3 倍体积乙醇，甘露聚糖呈白色沉淀。

(6) 离心，3000 转/分，20 分钟，倾去上清液，依次先用 2%

100 g 湿酵母细胞/50 mL 0.02 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 7.0)

高压灭菌 (1 kg, 125°C, 90 分钟)

冷却，离心，3000 转/分，20 分钟

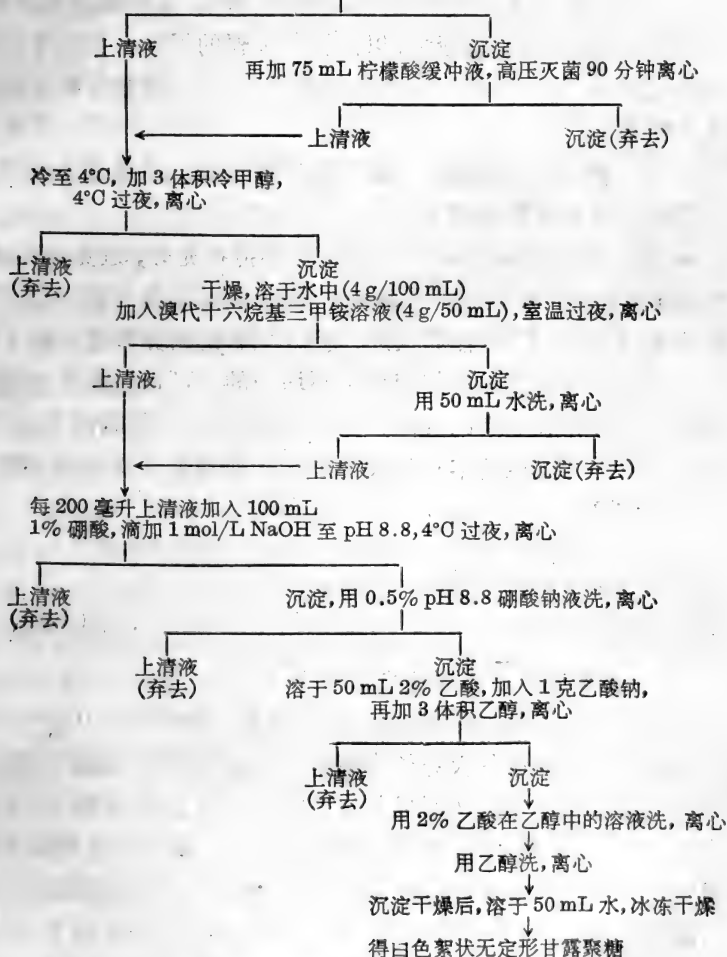


图 73 提取酵母甘露聚糖流程图

乙酸在乙醇中的溶液,再用纯乙醇洗沉淀。两次都离心收集沉淀。最后用氮气流缓缓吹干。

(7) 得白色脱水了的甘露聚糖沉淀,再溶于 50 mL 水中,冰冻干燥,得到白色絮状无定形甘露聚糖。

提取的操作流程见图 73。

【讨论】

(1) 从第一次柠檬酸缓冲液的抽提液起,每步骤都可以取样,用浓硫酸-酚法测定总糖量,以计算各步骤的得率。在用 3 倍体积甲醇沉淀后,会失去相当一部分总糖量,这是不能被甲醇沉淀的小分子糖物质。

(2) 溴代十六烷基三甲铵的加量很重要,用量过多反而会使一部分蛋白质沉淀不完全。

(3) 滴加 1 mol/L NaOH 时,务必搅拌充分,避免局部过碱。至 pH 8.8 时,应立即停止滴加。整个提取过程都要小心避免碱性条件,以免发生 β -消除反应,使 O-型联键的寡糖链水解下来。

(4) 这样得到的甘露聚糖是不均一的。可以用离子交换柱和电泳等方法作进一步的分离。应该说明的是,天然状况下,存在于细胞壁外的甘露聚糖本身是大小不均一的各种分子的混合物。

【文献】

Ballou, C., *Advances in Microbial Physiology*, **14**: 93~158 (1976).

Lloyd, K. O., *Biochemistry*, **9**: 3446~3453 (1970).

(张维杰)

2. 选择性的乙酰解反应

酵母甘露聚糖中的 N-型联接多糖链,常常是由 100~200 多个甘露糖单位联成的大分子多糖链。这条多糖链的特点是,有一条由 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键联成的主链骨架,由骨架向侧面伸出由 $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ 糖苷键构成的寡糖侧链。选择性乙酰解反应可以特异地打断 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键;其打断 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键的速率比打断 $\alpha(1\rightarrow2)$ 、 $\alpha(1\rightarrow3)$ 糖苷键的速率快得多, (分别为 20:1 和 200:1)。所以选用合适的反应条件,可以使大分子多糖链实际上

全从 $\alpha(1\rightarrow6)$ 联接的骨架处断开,生成若干种寡糖侧链,这样使大分子甘露聚糖的结构分析工作变得容易得多(图74)。

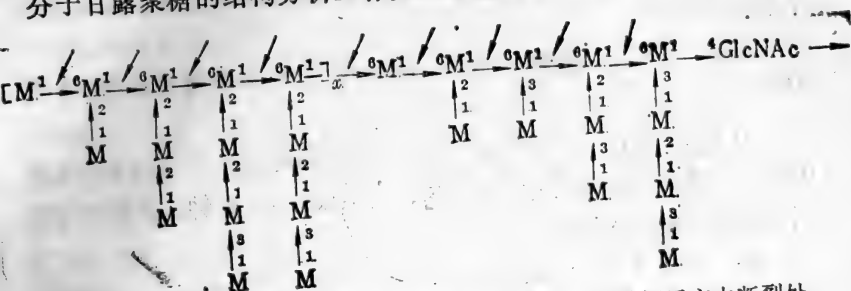


图74 酵母甘露聚糖中 N-型联接多糖链,箭头示乙酰解反应中断裂处

另外,由于侧链的非还原末端结构常常是甘露聚糖抗原性的决定簇所在,所以在乙酰解反应中得到的侧链寡糖片断,可以作为半抗原,方便地用于免疫化学研究。

【试剂】

无水吡啶,碳酸氢钠,乙酸酐,无水硫酸钠,浓硫酸,无水甲醇,冰醋酸,甲醇钠,三氯甲烷,甲苯,盐酸, Dowe $\times 50$ (H^+) 树脂。

【操作】

(1) 称取甘露聚糖 50 mg, 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 5 mL 无水吡啶, 5 mL 乙酸酐, 密封。用水浴或蒸气浴加热, $100^{\circ}C$, 24 小时。观察甘露聚糖应完全溶解, 但是整个溶液呈深茶褐色。

(2) 将圆底烧瓶移至真空旋转干燥器上干燥, 或用氮气流使干燥, 至浓浆状。加入甲苯, 混匀, 再干燥, 反复多次, 直至把吡啶完全驱赶掉(试试, 嗅不出吡啶气味)。

(3) 加入 5 mL 冰醋酸, 5 mL 乙酸酐, 0.5 mL 浓硫酸, 轻轻摇匀, 使固形物完全溶解, 成茶褐色溶液, 密封。置于 $40^{\circ}C$ 水浴中, 12 小时。

(4) 加入 10~20 mL 无水吡啶, 中和酸性, 以终止乙酰解反应。置真空旋转干燥器上, 或用氮气流吹, 使浓缩至 2~3 毫升体积。加入 5 mL 二氯甲烷, 3 mL 水, 振荡摇匀后, 移入离心管内。

(5) 离心 2000 转/分, 5 分钟, 吸去上层水层。以下依次用

3 mL 水, 3 mL 1 mol/L 盐酸, 3 mL 1 mol/L 碳酸氢钠, 最后用 3 mL 水, 以洗涤二氯甲烷层。每次都是振荡, 离心, 吸管吸去上层水层。

(6) 加入无水硫酸钠, 振荡, 除去水分, 用玻璃纤维过滤, 滤液用氮气吹干。

(7) 干燥后的固形物溶于 3 mL 无水甲醇, 加入 1 mL 0.5 mol/L 甲醇钠(在甲醇中)。摇匀, 室温放置 30 分钟, 最后用 pH 试纸检查, 须仍呈强碱性。

(8) 加入 Dowex 50(H⁺) 树脂中和, 至 pH 7.0 左右。玻璃纤维滤去 Dowex 树脂。用氮气流吹干。所得乙酰解产物溶于水, 经分子筛凝胶过滤, 用生物胶 Bio-Gel P-2 柱分离得寡糖链。

【讨论】

(1) 操作的第(1)步。是乙酰化反应步骤, 使糖基的自由羟基都乙酰化, 以保证样品能充分溶解于乙酰解反应所用试剂中(第(3)步)。而第(7)步为脱乙酰基反应, 使乙酰解产物仍变回到中性寡糖。

(2) 操作第(2)步, 除去吡啶务必仔细, 不然剩余的吡啶有可能中和一部分乙酰解反应中所用的酸, 使反应条件不能标准化。

(3) 乙酰解反应本身(第(3)步)用 40°C 温度较好。温度太高, 会形成硫酸-乙酸复合物, 使反应条件的酸度降低。反应的时间是可变动的。如果多糖链分子量较小, 可以把时间缩短到 6~8 小时或更短一些。总之, 在使 $\alpha(1\rightarrow6)$ 键充分断裂, $\alpha(1\rightarrow2)$ 、 $\alpha(1\rightarrow3)$ 键尽量保持完整的前提下, 选择恰当的时间。

(4) 乙酰解反应的专一性, 决定于各类糖苷键在乙酰解反应条件下水解速率之比。如果多糖链中有 β -糖苷键存在, 或有其他糖基(如半乳糖, 葡萄糖)存在, 其乙酰解速率会有不同, 对乙酰解反应结果的解释则要十分小心。

(张惟杰)

3. 免疫学方法在酵母甘露聚糖结构研究中的应用

将酵母甘露聚糖或酵母菌体注射入兔体内, 可以产生抗甘露

聚糖的抗血清。免疫化学研究表明,甘露聚糖的抗原决定簇在于非还原末端糖基的结构。所以,应用免疫化学方法,可以提供关于糖链结构的重要信息。

常用的免疫方法之一是琼脂免疫双扩散法。用已知其专一性的抗血清(如抗 α Man¹→³Man末端结构的抗血清)试验多种未知的甘露聚糖,有抗原-抗体复合物沉淀线产生,说明那种甘露聚糖具有相应的非还原末端结构(α Man¹→³Man末端结构)。琼脂双扩散法的操作较为简单,这里不具体介绍了,可参看有关免疫学方法的书。

另一个常用的免疫学方法是半抗原抑制反应。当抗血清的专一性和样品(甘露聚糖)的结构都不十分清楚的情况下,用若干种已知结构的寡糖短链作半抗原,试验其对抗原-抗体复合物沉淀的抑制作用。强的抑制作用预示有与该半抗原结构相近的免疫决定簇结构存在。下面着重介绍一下半抗原抑制反应的实验方法。

【试剂和仪器】

Tris, 氯化钾, TritonX-100, Folin-酚法定蛋白试剂, 台式高速离心机及小锥形塑料离心管。

【操作】

(1) 抗血清的制备: 酵母细胞收获后,用0.9%氯化钠溶液洗三次,最后悬浮于0.9%氯化钠溶液中,1g湿重细胞/100 mL,置75°C水浴,90分钟,以杀死酵母细胞。然后摇匀,分装在小试管内,每管2~3 mL,4°C冰箱贮存,作免疫注射用。

取兔2~3只,从耳静脉注射上述细胞悬液,每周三次,每次1 mL,持续一个月。停止注射后一星期,经兔耳动脉取血,室温下凝固过夜,以获取血清。血清中含有抗该种酵母的甘露聚糖的抗体,作为抗血清用于下面实验中。

(2) 抗原-抗体复合物沉淀曲线:

1) 配制试剂: 0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液, pH 7.5, 内含2 mol/L KCl, 2% Tritonx-100。样品甘露聚糖的水溶液1毫克/毫升。

2) 按下面表格加样,可以直接加在台式高速离心机所用的锥形小塑料管中,有利于后面的操作步骤(单位:微升)。用振荡混匀器混匀后,置室温2小时,然后置4°C过夜。

管 号	1	2	3	4	5	6
抗血清	50	50	50	50	50	50
Tris 缓冲液	50	50	50	50	50	50
甘露聚糖溶液	0	10	20	30	40	50
水	50	40	30	20	10	0

3) 在4°C冷室中用高速台式离心机离心4分钟,得到的抗原-抗体复合物沉淀用冷却至4°C的0.9%氯化钠溶液洗两次。

4) 移至室温下,向每支小管中加Folin试剂I 1 mL (50 mL 2% 碳酸钠在0.1 mol/L 氢氧化钠中的溶液,在使用当天,再加入1毫升0.5% 硫酸铜在1% 酒石酸钾钠中的溶液),放置37°C温箱10分钟,使蛋白质溶液全部溶解。

5) 再向每支小管中加入Folin试剂II 0.1毫升,混匀,室温下显色20分钟,测750 nm下的光密度。

6) 以加入的甘露聚糖量为横坐标,750 nm光密度读数为纵坐标,得到一条沉淀曲线,从而可以找到沉淀最多时所用的甘露聚糖量。

(3) 半抗原抑制曲线:

1) 配制半抗原寡糖溶液,每1微升含10微克分子。

2) 按下表加样,仍使用锥形小塑料离心管(单位:微升)。混匀后,置室温2小时,然后置4°C冷室过夜。

管 号	1	2	3	4	5	6	7	8
抗血清	50	50	50	50	50	50	50	50
半抗原	0	5	10	15	20	25	30	0
Tris 缓冲液	50	50	50	50	50	50	50	50
水	30	25	20	15	10	5	0	50
	混匀, 37°C 放置 2 小时, 取出后续加							
甘露聚糖液	20	20	20	20	20	20	20	0

3) 从得到抗原-抗体复合物沉淀后洗涤到 Folin 酚法显色, 方法同前。

4) 每管的 750 nm 光密度读数减去第 8 管(空白对照)读数后, 按下式计算出不同半抗原用量时, 抗原-抗体复合物沉淀被抑制的百分数。

$$\text{抑制百分数} = \frac{\text{OD(无半抗原时即第 1 管)} - \text{OD(有半抗原时)}}{\text{OD(无半抗原时即第 1 管)}}$$

5) 以半抗原用量为横坐标, 抑制百分数为纵坐标, 作图, 可以画出一条抑制曲线。比较几种不同半抗原的抑制曲线, 哪种半抗原抑制作用最强, 意味着在样品甘露聚糖与抗血清的反应中, 有与该种半抗原结构类似的非还原末端结构作为抗原决定簇。

【讨论】

(1) 作为半抗原的短链寡糖, 可以来自 β -消除反应, 也可以来自乙酰解反应, 或来自人工合成及其他来源。但是, 都必须要求半抗原的结构是清楚的。

(2) 免疫用兔子, 要作免疫前血清检查, 看其是否含有抗免疫用酵母的抗体。制备所得的抗血清, 在使用前, 先用同种或异种酵母细胞通过细胞凝集反应, 测定其抗血清效价及专一性。

(3) 在沉淀曲线及抑制曲线实验中, 要注意:

1) 抗原-抗体复合物的离心、洗涤各步, 必须在 4°C 冷室中进行, 用预先冷却的 0.9% NaCl 洗, 以避免复合物沉淀溶解。

2) 在加 Folin 试剂 II 显色前, 务必检查蛋白质沉淀是否已充分溶解。

【文献】

Ballou, C. E., *J. Biol. Chem.*, **245**: 1197 (1970).

Kabat, E. A., *Experimental Immunochemistry*, 2nd Edition, p. 675~686 (1961).

Douglas, R. H., et al., *J. Biol. Chem.*, **255**: 5979 (1980).

(张惟杰)

二、海藻多糖

海藻按照所含色素的不同分为黄藻、金藻、蓝藻、绿藻、褐藻和红藻等。其中藻体大、数量多、生长于近海、采集较易而又具有工业利用价值的以褐藻和红藻为主。

海藻多糖系海藻中所含的各种高分子碳水化合物。它们都是水溶性的，具有高粘度或凝固能力，这些海藻多糖也统称为藻胶。

对海藻胶质的应用已有悠久的历史。据说大约一千年前我国南方就用红藻麒麟菜类水煮制胶冻作食品。以后传至日本，到1660年一日本人偶尔在一个冬天发现了琼胶的天然冻干制造法，其后就沿用此法生产干琼胶。1842年德国使用卡拉胶于酿酒业。1881年英国人Stanford从褐藻发现了褐藻胶以来，海藻工业（实际上是生产海藻多糖）大为发展。后来从各类海藻陆续分离出各种多糖，例如从褐藻中分离出海带淀粉、褐藻糖胶、泡叶藻胶等；从红藻分离出叉红藻胶、海萝胶、红藻淀粉、木糖胶、甘露糖胶等；从绿藻分离出石莼胶、刚毛藻胶等，还从海洋高等植物海草中的大叶藻属分离出大叶藻胶。但至今能进行工业生产的海藻多糖，只有褐藻胶、琼胶、卡拉胶、叉红藻胶等。在应用与化学方面作过较多研究的有褐藻糖胶和海带淀粉。褐藻胶主要用于纺织工业中作印花浆，食品工业中作稳定剂、增稠剂，医药工业中作赋形剂、弹性印模料等。琼胶主要用于食品工业中作凝冻、果酱、增稠剂等，在医药卫生方面作细菌培养基、弹性印模料，从琼胶分离出的琼胶素在生化诊断和研究中广泛地使用。卡拉胶主要用于食品工业中作乳化剂、分散剂、增稠剂、固定化酶载体等。褐藻胶由甘露糖醛酸和古罗糖醛酸构成，琼胶和卡拉胶由半乳糖及半乳糖衍生物构成，褐藻糖胶由岩藻糖、木糖、半乳糖和葡萄糖醛酸构成，海带淀粉由葡

葡萄糖构成

(纪明侯·史升耀)

(一)海藻和海藻多糖中单糖成分的测定

1. 褐藻中单糖的气相色谱分析

褐藻中一般存在着鼠李糖、岩藻糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖。测定这些单糖最好采用气相色谱分析法,不仅灵敏度高,而且分离较好。分析时,将海藻先用酸水解,然后将所含单糖转化为易挥发的糖腈乙酯,就可得到分离较好呈单峰的色谱图,各单糖的回收率均能达到85%以上。

【试剂】

固定液, EONSS-M 或 OV-225; 担体, chromosorb W. AW. DMCS (80~100 目); 吡啶(A. R.), 乙酸酐(A. R.), 氯仿(A. R.), 盐酸羟胺(A. R.), 肌醇乙酯(G. C.); 标准单糖(A. R.): D-木糖、L-鼠李糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-甘露糖、甘露醇、L-岩藻糖。

【操作】

(1) 海藻样品标准单糖的水解: 将干海藻于80°C烘干、粉碎,全部过60目筛。精确称取0.5g放在试管中(或10mL安瓿瓶中)加入7mL 10.5 mol/L硫酸,待样品完全浸透后封管,加上金属套管于沸水浴中加热水解8小时,取出冷至室温开管。水解液全部移入50mL小烧杯,用蒸馏水洗涤试管数次并入烧杯内,用碳酸钡在65°C恒温下中和至中性,抽滤、水洗,滤液用适量氢型阳离子交换树脂(732型)脱盐,放置4小时后抽滤,再用7 mol/L氢氧化铵溶液中和至pH=6~6.5,溶液减压浓缩至干,放真空干燥器里用五氧化二磷真空干燥过夜。同时称取5~10 mg各种标准单糖混合后按上述操作进行水解。

(2) 单糖的衍生化: 将上述水解后的样品和标准单糖的干固体物分别移入具塞试管中,各自加入50 mg盐酸羟胺,25~50 mg肌醇乙酯和1 mL无水吡啶,待全部溶解后于90°C恒温下加热反应30分钟,取出冷至室温再加入0.6 mL醋酸酐,仍保持90°C继

续加热反应 30 分钟。反应物冷至室温，先注入 1 mL 蒸馏水，摇匀再加入 1 mL 氯仿萃取，吸出氯仿萃取液（下层），如此重复萃取三次，将氯仿萃取液合并减压浓缩至干，最后加入 0.3 mL 氯仿溶解干固体。取此液 0.5~5.0 μL 进行气相色谱分析。

(3) 气相色谱分析：

色谱柱：3 mm \times 3 m 玻璃柱，填充涂有 4% ECNSS-M 固定液的 chromosorb W. AW. DMCS (80~100 目) 担体。

色谱温度：柱温 200 $^{\circ}\text{C}$ ，检测器温度 250 $^{\circ}\text{C}$ ，汽化室温度 260 $^{\circ}\text{C}$ 。

气体流速：氮气（载气）30 mL/min，氢气 25 mL/min，空气 200 mL/min。

(4) 结果与计算：定性分析是按上述操作方法得到样品的色谱峰，分别计算出样品各组分出峰的相对保留时间，与各标准单糖的相对保留时间对照即能得到定性结果。

定量分析采用内标法，按下列公式计算各糖的含量。

$$W_x = \frac{A_x \times W_i}{A_i \times K}$$

式中： W_x = 样品中单糖的重量 (mg)；

W_i = 样品中加入内标的重量 (mg)；

A_i = 样品中内标的峰面积 (mm^2)；

A_x = 样品的峰面积 (mm^2)；

K = 校正因子 (响应值)，

$$K = \frac{A_s \times W_i}{A_i \times W_s}$$

W_s = 标准单糖的重量 (mg)；

W_i = 标准单糖中内标的重量 (mg)；

A_s = 标准单糖的峰面积 (mm^2)；

A_i = 标准单糖中内标的峰面积 (mm^2)。

【讨论】

(1) 注意海藻中甘露醇的干扰：褐藻中含有大量的甘露醇，

特别是海带、马尾藻等褐藻所含甘露醇比其他单糖的含量高十几倍,分析时往往干扰甘露糖和葡萄糖的分离。因此,除去大量的甘露醇有利于分析结果。

(2) 注意加入内标物的重量: 褐藻中各单糖的成分受海藻产地、品种和生长季节的影响很大。定量测定时,内标物(肌醇乙醚酯)的取量要根据定性结果来决定。因此,在定性时根据各单糖峰和内标峰的比例,不同海藻分别加入不同量的内标物,才能获得较满意的色谱峰。

(3) 控制单糖的取样量: 根据标准单糖的色谱图,鼠李糖、岩藻糖和木糖出峰早,峰形高而尖。其他糖出峰慢,峰形平缓。因此,取样时鼠李糖、岩藻糖和木糖只须 5 mg,而甘露糖、葡萄糖和半乳糖则须 10 mg,在此范围内,一般可得到相对应的色谱图。

【文献】

李铁林等,分析化学, 10(5): 272~275 (1982)。

Easterwood, V. M. et al., *Svensk Papperstidn.* 72: 768~772 (1969)。

(张燕霞)

2. 红藻中 D-半乳糖和 3, 6-内醚半乳糖的气相色谱分析

红藻中主要含有 D-半乳糖和 3, 6-内醚半乳糖,其中 3, 6-内醚半乳糖对酸很不稳定,不能采用一般酸水解的方法。本实验采用甲醇分解,严格控制甲醇-HCl 中 HCl 的浓度和甲醇分解时的温度及时间,可以得到较满意的分析结果,两者的回收率均能达到 94% 以上。

【试剂】

固定液: 硅酮(SE-30)。担体: 酸洗硅醚化白色硅藻土(80~100目)(chromosorb W. AW. DMCS)。甲醇(A. R.), 硫酸(A. R.), 氯仿(A. R.), 氯化钠(A. R.), 正十七烷(G. C.) (内标物), D-半乳糖(A. R.), 硅醚化试剂(Silyl-8), 3, 6-内醚半乳糖。

【操作】

(1) 无水甲醇-HCl 的制备: 取 500 mL 甲醇置于 1000 mL 圆底烧瓶中,加入 100 g 氧化钙。装上冷凝管,出口处加氯化钙干

燥管于 75~80°C 恒温回流 4 小时, 冷至室温后进行蒸馏, 收集 64~65°C 的馏分即为无水甲醇。用浓硫酸和氯化钠反应产生氯化氢气体, 在浓硫酸和氯化钙干燥后, 通入冰水冷却过的无水甲醇直至吸收饱和为止。根据吸收前后的重量算出 HCl 在甲醇中的百分浓度。使用前用无水甲醇配制出所需浓度的甲醇-HCl 溶液。

(2) 红藻样品和标准单糖的甲醇分解: 将干燥的红藻或红藻多糖样品于 80°C 烘干、粉碎全部过 60 目筛。精确称取 30 mg 置于 10 mL 安瓿瓶中, 沿瓶壁徐徐加入 1 mL 1.0~1.5% 甲醇-HCl 溶液。将安瓿瓶放冰水浴中冷却数分钟后封管, 加上金属套管于 80°C 加热分解 12 小时, 取出冷至室温开管。甲醇分解液用碳酸银中和、过滤、无水甲醇洗涤数次, 滤液和洗涤液合并移入试管 (18×100 mm 14 号标准具塞试管) 于 80°C 恒温蒸发至干, 放真空干燥器里用五氧化二磷真空干燥过夜。

(3) 甲基糖苷硅醚化衍生物的制备: 将上述甲醇分解后的干固物加入 10 μ L 正十七烷 (内标物) 和 0.2 mL 硅醚化试剂 (Silyl-8) 充分震荡后放置 4 小时, 取 0.4~1.0 μ L 进行气相色谱分析。

(4) 气相色谱分析:

色谱柱: 内径为 3 mm、长 3 m 玻璃柱, 填充涂有 10% SE-30 酸洗硅醚化白色硅藻土 (80~100 目) (chromosorb W. AW. DMCS)。

色谱温度: 柱温 185°C, 检测器和汽化室温度均为 230°C。

气体速度: 氮气 (载气) 20 mL/min, 氢气 25 mL/min, 空气 200 mL/min。

【讨论】

(1) 选择甲醇-HCl 的浓度: 甲醇分解过程中, D-半乳糖比较稳定, 而 3, 6-内醚半乳糖对酸特别敏感。所以, 对含有内醚糖的样品必须选好甲醇-HCl 中 HCl 的浓度, 根据我们实验结果, 选用 1.0~1.5% 甲醇-HCl 浓度为好。

(2) 甲醇分解时间: 甲醇分解时间的长短对 D-半乳糖影响不大, 而对 3, 6-内醚半乳糖则不然。根据实验结果, 掌握在 12 小时

为宜。

(3) 样品的取量: 按本实验的要求, 对红藻或红藻多糖的取样量必须控制在 35 mg 以下。这样, D-半乳糖和 3, 6-内醚半乳糖的色谱峰面积与样品的重量才能呈良好的线性关系。

【文献】

李铁林等, 分析化学. 9(3):295~298 (1981).

Nozawa, Y. et al., *J. Chromatogr.* 45: 244~249 (1969).

Sweeley, C. C., et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 85(16): 2497~2507 (1963).

(张燕霞)

3. 红藻中 D-半乳糖和 3, 6-内醚半乳糖的比色分析

根据 Yaphé 报道, 间苯二酚可与果糖和 3, 6-内醚半乳糖显红色反应, 两者浓度在 0.25 mmol/L 以下时具有近乎相同的消光值-克分子浓度的比色曲线, 而它不与半乳糖显色。蒽酮则可以与果糖、3, 6-内醚半乳糖以及半乳糖显绿色反应。基于这一显色特性和比色原理, 可采用间苯二酚比色法测定红藻多糖中的 3, 6-内醚半乳糖的含量, 而且可用果糖代替 3, 6-内醚半乳糖作标准糖, 不须从红藻多糖中分离纯化出标准的 3, 6-内醚半乳糖。再用蒽酮比色法测出两糖的总和, 计算亦可得红藻中 D-半乳糖的含量。

【试剂】

间苯二酚(A. R.)(水重结晶三次), 蒽酮(A. R.)(石油醚-苯重结晶), 硫酸(G. R.), 盐酸(G. R.), 1:1 乙缩醛(G. R.).

【操作】

(1) 试剂的配制:

间苯二酚试剂: 溶液 A, 取 150 mg 间苯二酚溶于 100 mL 蒸馏水, 置棕色瓶保存在冰箱里。溶液 B, 取 1 mL 1:1 乙缩醛移入 100 mL 容量瓶用蒸馏水冲至刻度摇匀。再取此液 4 mL 配成 100 mL 溶液置棕色瓶保存在冰箱里。比色前取 9 mL 溶液 A 和 1 mL 溶液 B 与 100 mL 12 mol/L 盐酸混合摇匀。

蒽酮试剂: 称取 0.2 g 蒽酮溶于 100 mL 80% 硫酸(V/V).

(2) 3, 6-内醚半乳糖的比色测定:

标准糖比色曲线的制作: 准确称取 0.04~0.05 g 果糖(代替 3, 6-内醚半乳糖作标准), 用饱和苯甲酸溶液配成 100 mL 储备液。取 1, 2, 3, 4, 5 mL 储备液各配成 100 mL 不同浓度标准糖溶液。取 1 mL 不同浓度标准糖液分别移入具塞试管中(14号, 18 × 100 mm), 将试管置于冰水浴冷却数分钟, 分别加入 5 mL 新配制的间苯二酚试剂, 震荡均匀于 80°C 恒温下加热反应 10 分钟, 取出于冰水浴冷却 1.5 分钟, 即在 550 nm 波长下进行比色, 测出不同浓度标准果糖的消光值对其克分子浓度作出标准比色曲线。

样品中 3, 6-内醚半乳糖的测定: 准确称取 0.05~0.06 g 红藻多糖样品置 50 mL 小烧杯中, 先加 40 mL 煮沸蒸馏水浸泡, 待样品溶胀后, 加热使之完全溶解再移入 100 mL 容量瓶, 溶液冷至室温即冲至刻度, 再取 5 mL 此液配成 100 mL 溶液。取 1 mL 冲稀液按上述标准糖的比色操作, 测得样品的消光值, 从标准比色曲线查得样品中 3, 6-内醚半乳糖的克分子浓度, 乘以分子量 144 和校正系数 1.087 即为 3, 6-内醚半乳糖的含量。

(3) 半乳糖的测定:

标准 D-半乳糖比色曲线的制作: 准确称取 0.04~0.05 g D-半乳糖用蒸馏水配成 100 mL 储备液, 取 1, 2, 3, 4, 5 mL 储备液再配成 100 mL 溶液, 即成为不同浓度标准半乳糖溶液。分别吸取 1 mL 不同浓度标准糖液移入具塞试管中, 先在冰浴中冷却数分钟, 即沿试管壁徐徐加入 5 mL 蒽酮试剂, 震荡后于 80°C 恒温下加热反应 20 分钟, 取出冷至室温, 在 640 nm 波长下进行比色, 测得消光值, 对其浓度作出果糖和半乳糖的标准比色曲线。

样品中半乳糖的测定: 从测 3, 6-内醚半乳糖的样品溶液吸取 1 mL 移入具塞试管中, 试管放在冰水浴冷却数分钟按标准半乳糖比色操作进行比色, 得到两糖总的消光值。通过间苯二酚比色法测得样品中 3, 6-内醚半乳糖的克分子浓度, 从蒽酮比色法的标准比色曲线可查出相应 3, 6-内醚半乳糖的消光值, 这样, 总消光值减去此消光值即为 D-半乳糖的消光值, 再从 D-半乳糖标准比色曲线查得样品中 D-半乳糖的浓度。

(4) 结果与计算: 若按上述标准比色曲线查算 D-半乳糖和 3, 6-内醚半乳糖的含量, 要求操作条件极为严格, 否则很难获得重复性较好的结果。因此, 我们采用样品和标准糖同时比色的方法, 按下列公式计算分析结果。

3, 6-内醚半乳糖含量的计算公式:

$$C_x = \frac{A_x}{A_{og}} \times C_{og} \times 144 \times 1.087$$

式中: C_x = 样品中 3, 6-内醚半乳糖的浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$);

A_x = 间苯二酚比色时样品的光密度;

A_{og} = 间苯二酚比色时果糖的光密度;

C_{og} = 果糖的浓度 ($\mu\text{mol}/\text{L}$);

144 = 3, 6-内醚半乳糖的分子量;

1.087 = 果糖作标准时校正系数。

D-半乳糖含量的计算公式:

$$C'_x = \frac{C_g}{A_g} (A_x - A_y)$$

$$A_y = \frac{A_{og}}{C_{og}} \times C_x$$

式中: C'_x = 样品中 D-半乳糖的浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$);

C_g = 标准 D-半乳糖的浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$);

A_g = 蒽酮比色法标准 D-半乳糖的光密度;

A_x = 蒽酮比色法样品总的光密度;

A_y = 计算出样品中 3, 6-内醚半乳糖的光密度;

A_{og} = 蒽酮比色法时果糖的光密度;

C'_{og} = 蒽酮比色法时果糖的浓度 ($\mu\text{mol}/\text{L}$);

C_x = 间苯二酚比色样品中 3, 6-内醚半乳糖的浓度 ($\mu\text{mol}/\text{L}$)。

【讨论】

(1) 试剂的保存: 间苯二酚试剂的溶液 A 和溶液 B 都可以在冰箱中保存一个月。但两者和盐酸混合后只能稳定 3 小时, 因此, 本实验必须注意试剂的保存时间和比色前相混合。蒽酮试剂一般

在 4°C 保存较稳定, 最好也在比色前配制。

(2) 显色时间和显色温度: 间苯二酚试剂测定 3, 6-内醚半乳糖时 80°C 显色时间 10 分钟, 蒽酮试剂与这两种糖在 80°C 显色时间 20 分钟都能获得最大消光值。

(3) 比色时间: 间苯二酚与果糖和 3, 6-内醚半乳糖显色后遇光极易褪色, 操作时尽量避光并在 15 分钟内比色完毕。蒽酮试剂显色后比较稳定, 一般要求 1 小时内比色完毕。

【文献】

张燕霞等, 海洋湖沼通报, 4: 48~54 (1980).

Yaphe, W., *Anal. Chem.* 32: 1327~1330 (1960).

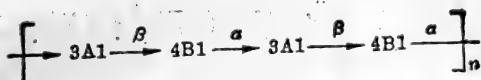
Yaphe, W., et al., *Anal. Biochem.*, 13: 143~148 (1965).

(张燕霞)

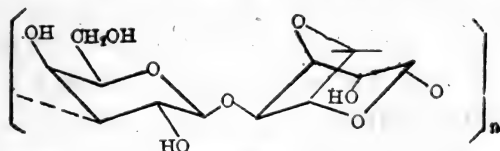
(二) 红藻多糖

红藻中含有的各种红藻胶, 是当前红藻工业利用的主要对象。这些红藻胶实质上都是多糖。历史上最早的海藻工业是琼胶工业, 其后卡拉胶工业逐步兴起。目前琼胶和卡拉胶组成红藻工业的主体。在文献报道上提过的红藻胶名称, 除琼胶和卡拉胶外还有类琼胶、麒麟菜胶、海萝胶、叉状藻胶、沙菜胶、银杏藻胶、紫菜胶等。类琼胶过去曾用以指类似琼胶而在化学组成与物理性质上又与琼胶不同的一些红藻多糖, 而麒麟菜胶和海萝胶等名称则用以具体指明该藻胶是由哪种海藻提取出来的。近年来多数学者倾向于将红藻多糖按其化学组成来分类, 分成琼胶和卡拉胶两大类。以 D-和 L-半乳糖为基本构成单位者属琼胶族; 只以 D-半乳糖为基本构成单位者属卡拉胶族。由不同种类海藻提取的多糖, 根据它的化学组成可分别划归琼胶族或卡拉胶族。麒麟菜胶、银杏藻胶等名称现在已很少应用。麒麟菜、沙菜和银杏藻等都是制造卡拉胶的原料, 其产品都称卡拉胶。琼胶也是一样, 不论由石花菜来的还是由江篱来的都叫琼胶, 而不分开叫石花菜胶或江篱胶。

琼胶和卡拉胶都是由半乳糖和半乳糖的衍生物构成的长链型多糖, 其基本结构可用下式表示:



在琼胶中 1→3 联结的 A 是 D-半乳糖，1→4 联结的 B 是 3, 6-内醚-L-半乳糖或 L-半乳糖。同时，在半乳糖残基上不同程度地联结着硫酸基、甲氧基或丙酮酸基。理想的琼胶素分子只有 1→3 联的 D-半乳糖和 1→4 联的 3, 6-内醚-L-半乳糖二者交替联结而成。琼胶中含有这种琼胶素分子越多者，其强度越高。



琼胶素

在卡拉胶中 1→3 联结的 A 和 1→4 联结的 B 都是 D 型的半乳糖或其衍生物。Rees 等按照分子组成和结构的不同将卡拉胶分成七种类型，分别称为 κ -卡拉胶、 μ -卡拉胶、 ν -卡拉胶、 ι -卡拉胶、 θ -卡拉胶、 λ -卡拉胶和 ξ -卡拉胶，其组成见表 45。

表 45 不同类型卡拉胶的组成

卡拉胶种类	1→3 联结的 A	1→4 联结的 B
κ	半乳糖-4-硫酸	3, 6-内醚-半乳糖
μ	半乳糖-4-硫酸	半乳糖-6-硫酸
ι	半乳糖-4-硫酸	3, 6-内醚-半乳糖-2-硫酸
ν	半乳糖-4-硫酸	半乳糖-2, 6-二硫酸
θ	30% 为半乳糖 70% 为半乳糖-2-硫酸	3, 6-内醚-半乳糖-2-硫酸
λ	30% 为半乳糖	半乳糖-2, 6-二硫酸
ξ	70% 为半乳糖-2-硫酸 半乳糖-2-硫酸	半乳糖-2-硫酸

卡拉胶的性质与其组成和结构有关，在已经有工业生产的三种卡拉胶中， κ -卡拉胶的凝固性能最好，但粘度小， ι -卡拉胶的凝固性能居中，而 λ -卡拉胶完全不能凝固，但粘度最高。

由于海藻的种类、生长环境、藻体的世代以及采集季节等的不同

同,它们所含卡拉胶的数量与类型有不同程度的变化。在数量上;少的只有百分之几,多的可高达80%。在类型上,有的海藻只含有一种卡拉胶,如耳突麒麟菜或配子体世代的角叉菜基本只含有 α -卡拉胶,但更多的常是二种或二种以上卡拉胶的混合体,而且,即使是同一类型的卡拉胶,由于原料不同和制造方法不同,所得产品的规格也不是一样的。

1. 红藻多糖的分离与提取

(i) 琼胶的提取与纯化

琼胶的制备主要有两种方法,一种是以石花菜为原料的,可以直接用热水提取,不用碱处理便能制得凝固性能良好的琼胶;另一种方法是以江篱为原料者,必须先经碱处理,然后再用热水提取。因为一般江篱所含的琼胶凝胶强度很低,达不到使用的要求。为了改进其性能,需用碱处理以提高其凝胶强度。碱处理能使联在半乳糖的3位或6位上的硫酸基被除去,同时使该半乳糖残基转变成3,6-内醚-半乳糖。硫酸基妨碍形成凝胶,而3,6-内醚-半乳糖则有利于形成凝胶,所以碱处理能显著地提高江篱琼胶的凝胶强度,有时甚至比石花菜做的还高。

① 以石花菜为原料的制备方法:石花菜从海里采来后检去别的海藻和杂物,淡水洗净,放日光下晒,每日喷洒淡水1~2次,进行日光漂白,约4~5日后藻体成浅黄色,晒干备用。取20g晒干的石花菜放3000 mL大烧杯中,自来水洗2~3次,蒸馏水洗1次,加入600~800 mL蒸馏水,放入加压锅中,在0.5公斤压力下加热提取1小时,取出用纱布过滤,渣子再加300 mL水,在同样压力下提取半小时,用纱布过滤,渣子弃去。将两次粗滤液合并,再用铺有脱脂棉的布氏漏斗抽气过滤,滤液放冷使凝固,切条,将凝胶条放搪瓷盘上,放进低温冰箱中在约 -10°C 冻结。至完全冻透取出,将冻成冰的凝胶从搪瓷盘上取出,敲碎,放入为胶液体积1.5倍的95%酒精中,室温下放置,偶尔搅拌使冰块化冻脱水,用尼龙筛绢过滤,手挤去水和酒精,然后再用85%酒精400 mL浸洗一次,同样用筛绢过滤,挤干,然后放在大培养皿中在红外线灯

下烘干,最后粉碎得琼胶。

② 以江篱为原料的制备方法:江篱采到后同石花菜一样进行日光漂白晒干,取 20 g 漂白晒干的江篱放于 500 mL 烧杯中,加入 32% NaOH 至浸过藻体,在 30°C 左右浸泡处理 5 天(室温亦可),倒去碱液,反复用水浸洗,通常洗一天,次日洗至中性,用 0.1% 醋酸 400 mL 浸 20 分钟,再用水洗二次,然后加 600 mL 水,放加压锅中加热提取,其余同前。

③ 琼胶的纯化:有的琼胶由于生产工艺不当,操作马虎,或掺杂作假等原因使产品质量低劣,不能应用。这样的产品可用适当的方法进行纯化以除去杂质。粗制琼胶中所含的杂质主要有两类,一类是溶于水的,一类是不溶于水的。溶于水的可以采用水洗、冷冻、压榨脱水或有机溶剂沉淀等方法除去。不溶于水的则可采用过滤或离心的方法除去。一般是先用冷水洗,洗去冷水可溶性杂质,再将琼胶加热溶化趁热过滤,以除去水不溶性杂质,然后再冷冻,化冻时又进一步除去溶于水的杂质。

【操作】

粗制条状琼胶 20 g 放 2000 mL 烧杯中,加 1000 mL 蒸馏水搅拌洗涤,洗 3 次,用筛绢过滤,弃去洗涤水。加 1000 mL 蒸馏水加热使琼胶溶化,通过脱脂棉过滤,滤液放冷凝固,切条,然后再用前述冷冻干燥方法,即制得纯化的琼胶。需特别纯者可重复操作。

【讨论】

(1) 胶液经脱脂棉过滤后其透明度可以满足一般的需要,如果要求更高则需加助滤剂 545(Celite 545)过滤,这样可以得到几乎和水一样透明的滤液。

(2) 用上述方法制得的琼胶通常为浅黄色,一般不影响使用,如果需要很白时则需要进一步漂白。可在凝胶切成条状后用有效氯浓度为 0.05~0.10% 的 NaOCl 溶液漂白,大约漂 30 分钟后滤去漂白液,再用水浸洗几次以除去漂白剂,然后再进行冻结。

(3) 有的石花菜在提取时难出胶,可在煮胶之前将石花菜放在 0.05~0.10% 左右的稀盐酸溶液中浸 20 分钟,然后再煮胶。江

篙经碱处理后一般都难出胶,如果经上述 0.1% 醋酸浸泡后,胶仍难以溶解出来时可适当增加醋酸的浓度。不论石花菜或江篙对酸都很敏感,一旦酸量过多凝胶强度将受到明显破坏,故用酸量必须谨慎考虑,兼顾琼胶的产率和凝胶强度。

【文献】

史升耀、唐湛祥,水产学报, 6(1): 51~58 (1982).

徐氏基金会,水产加工业, 71~75, 95~130 (1977).

Tseng, C. K., (曾呈奎) Colloid Chemistry, Theoretical and Applied. 6:629~734 (1946).

(史升耀)

(ii) 琼胶素的分离制备

琼胶是由琼胶素和琼胶酯(agarpectin)二者混合而成。琼胶中所含琼胶素与琼胶酯的比例随原料和制造方法而异。琼胶素是由 D-半乳糖和 3, 6-内醚-L-半乳糖构成的中性不带电荷的多糖,而琼胶酯除这二种单糖外还有少量葡萄糖醛酸,有时在半乳糖残基上不同程度的联有硫酸基、甲氧基和丙酮酸基等,构造比琼胶素复杂,是带电荷的多糖。因此琼胶酯灰分高,电渗大,凝胶强度低,对某些蛋白质等物质有吸附作用,这是它不如琼胶素之处。

琼胶素与琼胶酯在化学组成与结构上的不同,造成它们之间物理化学性质上的不同,琼胶素的制备原理便是利用这些性质上的差异而使之分开的。如二甲基亚砷法是利用它们溶解度的不同,琼胶素易溶解于 70°C 的二甲基亚砷中而琼胶酯难溶,将粉末状琼胶与二甲基亚砷在 70°C 加热一定时间后过滤,便可以将琼胶酯除去;试剂沉淀法是加一种能使琼胶素或琼胶酯二者之一沉淀的试剂,如加十六烷氯化吡啶到琼胶溶液中,它能与琼胶酯形成沉淀,然后过滤或离心除去;离子交换法,琼胶酯分子上带有硫酸基和羧基,当用 DEAE-纤维素或 DEAE-葡聚糖凝胶处理时,琼胶酯便被吸附在交换剂上,而琼胶素不被吸附,二者便被分开。制备琼胶素的方法较多,现介绍两种方法,一是二甲基亚砷法,该法优点是操作十分简单,缺点是质量不是很好。另一种方法是先经碱处理后用离子交换法,这个方法操作步骤比前者稍多些,但产品

质量极好。

① 二甲基亚砷法：粉末状琼胶 20 g 放 2000 mL 三角烧瓶中，加 1000 mL 二甲基亚砷在 70°C 连续搅拌 1 小时，尼龙筛绢过滤，滤液减压浓缩至原来体积的 2/3，然后成细流状倒入三倍量的丙酮中，得白色沉淀，放置过夜使沉淀沉集在底部，用尼龙筛绢过滤，用手挤压，再用丙酮浸洗三次，每次 500 mL，洗后挤干，放搪瓷盘上，放入真空烘箱中约 40°C 抽空干燥，得白色琼胶素。

② 碱-DEAE-纤维素法：取琼胶 20 g (最好成条状或薄片状)，加 600 mL 5% NaOH 在 60~65°C 处理 4 小时，倒去碱液，水洗至近中性，加入 0.4% 漂白粉溶液 (预先经过滤纸过滤，再用酸调至中性) 600 mL 漂白，约漂 20~30 分钟至颜色成白色为止，充分水洗以除去剩余漂白粉，加 1000 mL 水加热使琼胶溶化，通过纸浆抽气过滤，滤液放冷凝固，切条，用尼龙滤布将凝胶条包起来，用压榨机压榨脱水，约可除去 90% 的水，再在 60°C 左右烘干。

取上述碱处理过的琼胶 7.5 g，加 500 mL 水加热溶化，当温度降至 75°C 时加入 60 g 湿的 DEAE-纤维素 (大约相当于干重 15 g，DEAE-纤维素是中国科学院上海有机化学研究所实验厂生产的)，维持在 75°C 处理 1~1.5 小时，有时搅拌，通过纸浆过滤，滤液放冷凝固，切条，再同前一样压榨脱水，烘干，再粉碎，得琼胶素产品。

如果没有压榨脱水设备，可以将滤液慢慢地倒进为胶液体积 4~5 倍的乙醇或丙酮中，使琼胶素沉淀下来，离心或过滤使沉淀与溶液分离，沉淀再用乙醇或丙酮洗二次，50°C 烘干。

【讨论】

(1) 应选择凝胶强度高的琼胶作原料，否则产品的凝胶强度虽比起始原料好，但不能很高。因目前的方法只能通过减少琼胶酯和其他杂质的含量，以及碱处理使在 3 位或 6 位上联有硫酸基的半乳糖转变成 3, 6-内醚-半乳糖这两条途径来提高凝胶强度。如果在琼胶的制造过程中由于加酸过多等原因使琼胶大分子水解成小分子，则凝胶强度下降。对这样的小分子，现有的制造琼胶素

的方法是无法使之再聚合起来的。

(2) 琼胶素的质量规格主要有：电渗、硫酸基和灰分含量、凝胶强度、融点和凝固点等，由于所用原料和制造方法的不同，产品质量差别相当大。硫酸基含量一般为 0.3~0.5%，高纯度的硫酸基含量低于 0.15%，纯度越高电渗越小，凝胶强度一般在 400~600 g/cm² 左右，最高的可达 1000 g/cm²。

【文献】

史升耀、刘万庆、石光汉、朱光福，海洋科学，1979(1)，10~15。

史升耀，海洋药物(1)，25~29(1982)。

Araki, C., *Bull. Chem. Soc. Japan*, **29**: 543~544 (1956)。

Hjerten, S., *Biochim. Biophys. Acta.* **53**: 514~517 (1961)。

(史升耀)

(iii) 珠状琼胶素凝胶的制备

用上述方法制成的琼胶素是无定形的白色粉末，这种粉末不能直接用于凝胶层析或亲和层析等，为了制造适合这类用途的产品，必须将琼胶素进行再加工，以制成微小圆形的珠状琼胶素凝胶 (beaded agarose gel)，如瑞典 Pharmacia 厂生产的 Sepharose 便是这类产品。它的制造方法主要有两种，喷珠法和搅拌法。根据我们的经验以搅拌法较好。该法是将琼胶素溶于水，配成一定浓度的胶液，然后用与水不相溶的有机溶剂在表面活性剂的存在下混合激烈搅拌，使胶液成微小液滴分散在有机溶剂中，冷却，使胶液凝固成半固体状凝胶。

【操作】

称取 5.417 g 12 号琼胶素(青岛海洋渔业公司水产品加工厂生产)放 500 mL 烧瓶中加 130 mL 蒸馏水，配成 4% 浓度，放加压锅中加热溶化，另取 200 mL 甲苯和 60 mL 四氯化碳以及 1.2 g 司本-80 混合并预热至 65°C，将此混合溶剂倒进烧瓶中与已溶解的胶液混合，将烧瓶立即装上搅拌器开始搅拌，搅拌速度由慢到快，激烈搅拌 5 分钟，然后在烧瓶外面用冷水冷却并继续搅拌 6 分钟停止。用尼龙过滤布袋在布氏漏斗上过滤，乙醚洗数次再用水洗数次，将珠状凝胶加 35°C 的水放抽滤瓶中，联到水泵上在磁力

搅拌下抽气以除去乙醚，最后用 60 目和 120 目筛子流水过筛，筛去大于 60 目和小于 120 目的粒子，得大小为 60~120 目的珠状琼胶素凝胶。因开始浓度为 4% 故相当于 Sepharose 4 B，加入 NaN_3 至浓度为 0.02% 作防腐剂。

【文献】

史升耀、刘万庆、石光汉、朱光福，海洋科学。(1): 10~15 (1976)。

Hjerten, S., *Biochim. Biophys. Acta.* 79: 393~398 (1964)。

(史升耀)

(iv) 卡拉胶的提取制备

卡拉胶与琼胶之间最明显的差异表现在凝固性能上。琼胶的凝固性基本不受外加电解质的影响，而卡拉胶(主要指 κ -卡拉胶)受电解质的影响极大，完全不加电解质时它几乎不能凝固，而少量的电解质如加入 0.2% 的 KCl 便能很明显地提高它的凝胶强度。 λ -卡拉胶不论加电解质与否均不能凝固，但粘度比 κ -卡拉胶高。

含有卡拉胶的红藻种类很多，主要的有麒麟菜属、角叉菜属、杉藻属、沙菜属、蜈蚣藻属和海萝属等的海藻。由于原料种类不同，以及所需要的卡拉胶的种类和性质的不同，制备方法也随之而异。有的卡拉胶易溶于冷水，所以用冷水提取便可以，对这样的海藻在水洗时必须快速。多数海藻以加热提取较好。

① 一般卡拉胶的制备法：从海里采来琼枝，淡水洗，然后进行日光漂白晒干(参阅石花菜的漂白)。将漂白晒干的琼枝剪碎，称取 20 g 放烧杯中，水洗，加 1000 mL 水，放沸水浴中搅拌加热 3 小时，用尼龙筛绢粗滤，除去渣子，滤液加入 20 g 助滤剂 545，如果粘度太大难过滤时应适当多加，用布氏漏斗放二层滤纸抽气过滤，得澄清液，放冷凝固(必要时可在滤液中加入少量 KCl，以增强其凝固性)，将凝固好的凝胶切成细条，置搪瓷盘上放入低温冰箱中，约 -10°C 冷冻，待完全冻透之后取出，加 1500 mL 95% 酒精融化脱水，用尼龙筛绢过滤，挤压去水和酒精，再用 400 mL 85% 酒精浸洗一次，过滤，挤压去酒精，放红外灯下干燥。

② 碱处理法：这种方法主要是为了提高产品的凝胶强度，产率一般不如前一方法高。

取漂白晒干剪碎的琼枝 20 g 放烧杯中加入 500 mL 32% NaOH, 室温浸泡 3 天, 倒去碱液, 反复用水浸洗至中性, 加 800 mL 水放沸水浴中搅拌加热 3 小时, 用尼龙筛绢粗滤, 滤液加 10 g 助滤剂 545, 经二层滤纸抽气过滤, 滤液放冷凝固, 切条, 冷冻。冻后加 1200 mL 95% 酒精融化脱水, 再用 300 mL 85% 酒精浸洗一次, 烘干。

③ κ -卡拉胶与 λ -卡拉胶的分离: 有些海藻同时含有 κ -和 λ -两种卡拉胶, 用这种海藻作原料时产品便是这两种胶的混合物。为了使这二者分开, 可利用 λ -卡拉胶在 40°C 时易溶于 KOH 溶液, 而 κ -卡拉胶难溶的特点使之分离。

晒干漂白的海藻 20 g 放烧杯中水洗, 加入 400 g 1.2% (W/W) KOH, 再加水至 800 g, 此时 KOH 的浓度约为 0.6%, 在 40°C 提取 48 小时, 有时搅拌, 用尼龙筛绢粗滤, 滤液加入 10 g 助滤剂 545, 经滤纸精滤, 滤液倒入二体积的异丙醇中, 得沉淀, 用尼龙筛绢过滤, 沉淀再用 85% 异丙醇浸洗二次, 烘干得 λ -卡拉胶。将尼龙筛绢过滤出来的海藻渣子转移到烧杯中, 加 800 mL 水在沸水浴中提取 2 小时, 同样先用尼龙筛绢过滤, 再加助滤剂精滤, 滤液倒入二体积的异丙醇中得沉淀, 将沉淀过滤, 再用异丙醇洗二次, 烘干得 κ -卡拉胶。

【文献】

史升耀, 海洋科学. (2): 47~53 (1981).

Stoloff, L., *Industrial Gums*. 83~115 (1959).

Moirano, A. L., *Food Colloids*. 347~381 (1977).

(史升耀)

2. 红藻多糖物理性质的测定

(i) 凝固性: 一些红藻胶的稀水溶液在加热溶化后放冷时能形成半固体状透明的凝胶。红藻胶的这一性能是红藻胶所具有的最独特的性能, 它的用途很多都与此有关, 因此凝固性能的优劣是红藻胶最主要的一项指标。测定凝固性能的方法主要有两类, 一类是测定在一定浓度、一定温度等条件下将凝胶压破所需的压力。

叫凝胶强度；另一类是测定形成凝胶所需琼胶等样品的最低浓度，叫凝固能力。

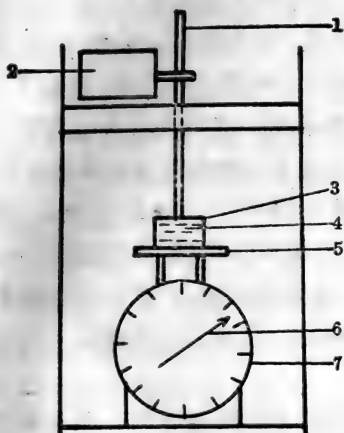


图75 凝胶强度测定器示意图

1. 压杆 2. 马达 3. 玻璃皿
4. 凝胶 5. 秤盘 6. 指针
7. 弹簧秤

指针继续转动，压力继续增加，一旦凝胶承受不住压力时，凝胶便被压破，就在此时指针退回，注意指针在退回前所达到的最高点，此点便是该样品的凝胶强度，以克/厘米²表示。

简易凝胶强度测定器见图76，用铝板做一Y形漏斗，漏斗用来放钢珠，漏斗下部接一不锈钢的柄，柄装在1.5cm厚的金属板上钻开的孔中，可以上下移动。不锈钢柄的下端是面积为1.0 cm²的压头。测定时将压头放在凝胶表面，慢慢地向漏斗里加钢珠，使压在凝胶表面上的压力逐渐增加。注意凝胶的表面，至凝胶表面被压破时停止加钢珠，称所加钢珠的重量再加漏斗的重量就是该样品的凝胶强度。

① 凝胶强度的测定：凝胶强度测定器见图75，此测定器的上部是一根压杆，压杆由马达驱动使之等速慢慢下压，压杆下端是不锈钢做的表面积为1.0 cm²的压头。测定时，此压头放在待测凝胶的表面，凝胶用小玻璃皿盛着，玻璃皿放在弹簧秤上方的称盘上，当接通电源后压杆向下移动，逐渐压紧凝胶，其压力通过凝胶传到弹簧秤上，使弹簧秤上的指针转动，这时注意指针转动所指向的刻度。当凝胶能承受住压在它上面的压力而不被压破时，

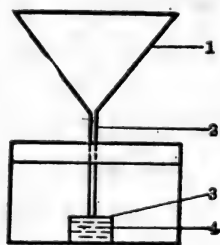


图76 简易凝胶测定器示意图

1. 漏斗 2. 不锈钢柄
3. 玻璃皿 4. 凝胶

【操作】

先称 1.00 g 样品在 105°C 烘 4 小时测定其水分含量，然后称取扣除水分等于干重 1.00 g 的样品，加 100 mL 蒸馏水配成 1.0% 浓度的胶液。样品在水中浸泡数小时后放压力锅中在 5×10^4 Pa 压力加热半小时，取出搅拌，如果没全溶则须放入压力锅中再加热一段时间，至完全溶解为止，搅匀，趁热倒入 4 只直径 35 mm 高 25 mm 的玻璃皿中(或类似的小烧杯中)，每只 25 mL，放置使凝固，最少放 4 小时。有的卡拉胶凝固温度低，在室温下不能凝固者，须放在 5°C 左右的冰箱中。凝固后都放入 30°C 的恒温箱中，恒温 1 小时后逐个取出，用上述的凝胶强度测定器测定。

【讨论】

(1) 简易式凝胶强度测定器不能用于凝胶强度低于漏斗重量的样品。

(2) 测定时样品的浓度对凝胶强度影响很大，有的规定统一用 1.0%，也有的规定用 1.5%，但定下之后便不宜随便更改。

(3) 自胶液倒入玻璃皿到测定这段时间应注意防止液面和胶面水分的蒸发。

② 凝固能力的测定：样品定水分同前，用水配制一系列不同浓度的胶液(一般在 0.2~0.5% 左右)，浓度间隔每个相差 0.05%，加热溶化后取 10 mL 胶液放入直径 15 mm 的试管中，在 20°C 直立放置 20 小时后，能凝固不流动所需的最小百分浓度，为该样品的凝固能力。

(ii) 凝固点的测定

红藻胶在水中加热溶化，放冷，到一定温度便凝固成透明的半固体状凝胶，此凝固时的温度便是凝固点，或叫凝固温度。

【操作】

配 1.0% 胶液(同前)，取 10 mL 加热溶化后的胶液放入内径 15 mm 试管中，通过橡皮塞插入一支精密温度计(刻度 0.2°C)，水银部分在液面之下，将试管垂直地放在一只可控制温度的水浴里，水浴装有加热和冷却两种装置，控制使温度慢慢下降，每分钟

约下降 1°C ，时时将试管倾斜 45°C 角，观察液面的流动情况，至倾斜 45°C 角液面凝固不流动时的温度便是凝固点。

(iii) 融点的测定

将凝固的凝胶加热时，到某一定温度凝胶便又融化，此融化时的温度称为“融点”或“融化温度”。

琼胶的凝固点和融点相差约 50°C ，差别的大小与原料种类和制造方法有关。

【操作】

取 15 mL 1.0% 胶液（配制方法同前）放入一内径 22 mm 大试管中，通过橡皮塞插入一支精密温度计（刻度为 0.2°C ）使水银球在液面下，室温垂直放置 20 小时，至少 4 小时使凝固，通过橡皮塞的另一孔小心放入一粒不锈钢珠（ $\phi 3\text{ mm}$ ）放在凝胶表面上，将试管垂直固定在可控制温度的水浴里，慢慢加热，使每分钟约上升 1°C ，注意观察不锈钢珠的位置，当凝胶融化时珠子一下子便沉至试管底部，记录此时的温度便是该样品的融点。

【讨论】

在测定卡拉胶样品的凝胶强度、凝固能力、凝固点和融点时，由于多数卡拉胶在纯水中没有电解质存在，不能凝固或凝固很弱，故在测定时常加入一定数量的某种电解质，以提高其凝固性，最常加的电解质是 KCl，浓度一般定为溶液的 0.2% (mg/mL)。在此同一条件下比较其凝固性。

(iv) 粘度的测定

琼胶的粘度通常很低，而且差别小，多在 $10^{-3}\sim 10^{-2}\text{ Pa}\cdot\text{s}$ 之间，故琼胶的粘度一般不测。卡拉胶类有的粘度较大，高的可达数 $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ，作增稠剂和乳化剂等用，对这类卡拉胶来说，粘度是主要的一项指标。

【操作】

配 1.0% 胶液 50 mL（同前），加热溶化后待凉至 65°C 时倒入 Hoppler 落球式粘度计的盛胶液的玻璃管中，玻管下端在装入胶液前先盖紧，倒胶液时小心避免带进气泡，如果带进气泡可用细玻

棒将气泡赶出来。选择适当的金属球或玻璃球放在胶液里，将玻管上端盖紧，玻管外面的水与一精密的带有水泵的恒温水浴相连，使循环的水准确地调节在 60°C 。转动粘度计，使球在胶液中上下通过数次，以使胶液温度与外面水浴的温度平衡。然后用秒表测量球下落的时间，反复测 4~5 次，至基本恒定止，再计算成以 $(\text{Pa}\cdot\text{s})$ 为单位的粘度。

(v) 透明度的测定

红藻胶形成的凝胶具有相当好的透明度，透明的程度与海藻种类和制造方法等有密切关系。通常热的琼胶溶液比凝固后的凝胶的透明度高，而 α -卡拉胶的透明度又比琼胶的好。测定透明度有两种方法，一是分光光度计法，用仪器测量透光度；二是目测法，用肉眼观测。前者比较客观、准确，但仪器较贵，后者不需要仪器，简便易行，但准确性不如前者。

① 分光光度计法：在可见光范围内 ($380\sim 780\text{ nm}$) 红藻胶凝胶的透光度随波长而增加，而且与胶液的浓度有关，浓度大的透光度小。我们选定的浓度是 1.0%，波长是 420 nm 和 660 nm 。

配 1.0% 胶液(同前)倒入 1.0 cm 比色皿中，放冷使完全凝固后，用分光光度计(72 型或 721 型分光光度计均可)测定在 420 nm 和 660 nm 两处的透光度，以水作对照。

② 目测法：配 1.0% 胶液(同前)倒入 2.0 cm 比色皿中，放冷，完全凝固后，将比色皿的透光面放在“标准近视力表”上，用肉眼通过凝胶观看表上的符号，该表符号从大到小分为 12 排，分别有数字代表，符号最大的为 0.1，最小的为 1.5，其间分别为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 和 1.2。用肉眼所能看清的最小符号其相应的数字便是该样品的透明度。

【文献】

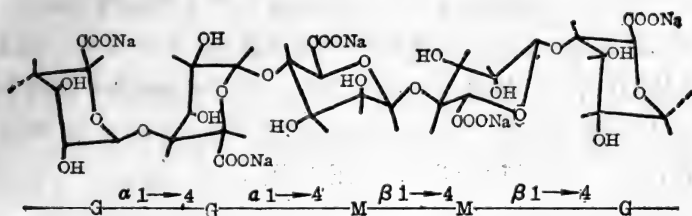
柳川铁之助，寒天，日本产业图书株式会社，1946。

Hong, K. C. et al., *Tohoku J. Agr. Res.* 17(3): 241~247 (1967)。

(史升耀)

(三) 褐藻多糖

褐藻胶(algin, alginate 或 alginic acid)是褐藻共有的一种细胞间多糖,是由 β -1, 4-D-甘露糖醛酸(M)和 α -1, 4-L-古罗糖醛酸(G)不规则地联结起来的线形长链分子。



褐藻胶

褐藻胶中的 M 和 G 是以 M-嵌段、G-嵌段和 MG-嵌段存在。分子中 M/G 比值以及各嵌段的分布,与褐藻胶的物理化学性质和应用有直接关系。用以生产褐藻胶的主要原料有海带、巨藻、泡叶藻、墨角藻等。

褐藻糖胶系 1913 年 Kylin 由褐藻中发现的一种细胞间多糖。它主要是以 Cl, 2, 少数以 Cl, 3 和 Cl, 4 键合的 α -L-岩藻糖 4-硫酸酯的多聚物,并且还含有不同比例的半乳糖、木糖、葡萄糖醛酸和少量蛋白质。褐藻糖胶具有抗凝血、清血脂作用,对有毒重金属离子的络合作用等。褐藻糖胶在墨角藻、海带、裙带菜中含量较高,可用作分离的原料。

海带淀粉亦称褐藻淀粉,是 Schmiedeberg 首先从褐藻提取出来的胞内多糖。它主要是由 β -1, 3-D-葡萄糖组成,可能有两种形式:一为葡聚糖还原末端联结有一分子甘露醇,称为 M-链;一为全由葡聚糖组成的 G-链。除主要为 β -1, 3 糖苷联结外,尚有少量 β -1, 6 链间糖苷键。

1. 褐藻胶

(i) 褐藻胶的分离与提纯

称取 10.0 g 剪细至约 0.5cm 的干海带(马尾藻可取 20.0 g),加入 200 mL 0.1 mol/L HCl 处理 1 小时,水洗,加 200 mL 1%

甲醛溶液(以40%甲醛液作为100%计)浸泡一夜,水洗,加入500 mL 1% Na_2CO_3 溶液于60°C提取1小时(马尾藻加800 mL Na_2CO_3 溶液,于70~75°C提取),纱布过滤,渣子再加400 mL 0.5% Na_2CO_3 溶液(马尾藻加600 mL)同温度提取1小时。两次滤液合并,先用玻璃丝、棉花,后用滤纸过滤。然后滤液中加入稀盐酸(3:10),搅拌,至pH 2。生成的褐藻酸凝胶用纱布滤出,水洗数次,加入适量2% NaOH 溶液,搅拌至全溶。加入适量 NaClO 溶液漂白15分钟。注入2倍量乙醇,生成絮状褐藻酸钠,继而以85%和95%乙醇依次洗涤脱水,最后于30°C减压干燥。

【文献】

纪明侯、史升耀,海洋科学集刊,1:188~195(1962)。

曾呈奎、纪明侯,海洋科学集刊,1:140~158(1962)。

(纪明侯)

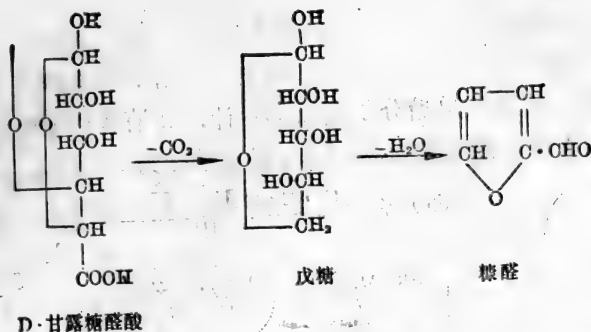
(ii) 褐藻胶的测定

测定褐藻中褐藻胶的含量或褐藻胶的纯度,有重量法和容量法。

重量法:与上述分离方法相同,此法所得百分率与工业生产中的提取率相近似,适于生产单位对原料的监测。但并不能反映藻体中实际的含量,因受提取条件、褐藻胶分子量大小等因素的限制,一般比实际含量要低。

容量法:有滴定法和 CO_2 法两种。

滴定法:称取0.5g干藻粉(100目),加10 mL 0.1 mol/L H_2SO_4 过夜,水洗后,用20 mL水洗至烧杯中,加入等体积的 Na_2CO_3 溶液,50°C搅拌2小时,过滤,以20 mL 1.5% Na_2CO_3 溶液洗,然后水洗(10 mL \times 3)。合并,加30 mL 10% CaCl_2 溶液放置2小时,过滤,加入20 mL 1 mol/L HCl 搅拌数分钟。先以 HCl -乙醇液(10 mL 1 mol/L HCl +50 mL 乙醇)洗,继而以乙醇洗至无 Cl^- 反应。加入50 mL水,30 mL 0.5 mol/L $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ 溶液,摇动1小时,以0.1 mol/L NaOH 溶液滴定游离的乙酸(酚酞作指示),算出褐藻酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)的百分比。



CO_2 法——褐藻酸用 19% HCl 加热水解，生成 CO_2 和糠醛，从 CO_2 的生成量计算褐藻的含量。

称取 0.50 g 干海藻粉(100 目)(如测褐藻酸钠称取 0.20 g)，加入 20 mL 0.2 mol/L H_2SO_4 溶液放置一夜，过滤，水洗。将藻渣同滤纸一起放入如图 77 所示分解瓶中，先抽气排出整个系统中的 CO_2 气，然后于分解瓶中注入 30 mL 19% HCl [100 mL 浓 HCl (37%) 注入 113 mL 水中混合)，两吸收瓶中各加入 25 mL 0.05 mol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液。分解瓶以砂浴加热至 140°C ，沸腾 2 小时后再注入 30 mL 19% 酸，继续加热 2 小时。其间生成的 CO_2 经过锌粒和脱水剂除去盐酸气 and 水分，通入 0.05 mol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$

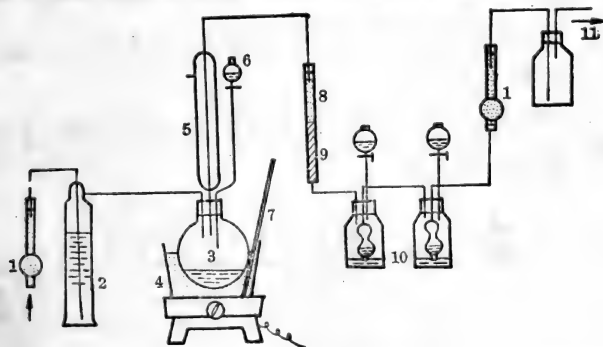


图 77 CO_2 测定装置

1. 空气入口，烧碱石棉(Ascarite) 2. 50% NaOH 溶液 3. 分解瓶 4. 砂浴
5. 冷凝管 6. 19% HCl 7. 温度计 8. 锌粒(20号筛孔) 9. 脱水剂(Dehydrite) 10. 0.05mol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液 11. 空气出口，抽气

溶液中被吸收。最后合并两瓶中的 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液，以 0.1 mol/L HCl 滴定剩余的 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ，减去空白值后算出样品中的褐藻酸含量。褐藻酸单糖分子量以 176 计，其钠盐以 198 计， CO_2 的理论生成量对褐藻酸为 25.0%，对其钠盐为 22.2%。

$$\text{CO}_2\% = \frac{0.022 \times M_1 \times V_1 \times 100}{W}$$

$$\text{Na-alg}\% = \text{CO}_2(\%) \times \frac{100}{22.2}$$

$$V_1 = V_2 - V_3, \quad V_3 = \frac{V_4 \cdot M_4}{M_1}$$

式中： V_1 ： $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 消耗 mL；

V_2 ： $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 原始体积 (mL)；

V_3 ： $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 剩余体积 (mL)；

V_4 ： HCl 使用体积 (mL)；

M_1 ： $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 的摩尔数；

M_4 ： HCl 的摩尔数；

W ：样品重量(无水物, g)。

或者从下式也可算出：

$$\text{Na}\cdot\text{alg}\% = \frac{(t_2 - t_1) \times 0.1 \times 198 \times 100}{W}$$

式中： t_2 ：滴定 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 原始体积(空白)所消耗 0.1 mol/L HCl 体积(mL)；

t_1 ：滴定剩余 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 所消耗 0.1 mol/L HCl 体积(mL)；

W ：样品重量(mg)。

表 46 不同方法测定褐藻中的褐藻胶含量

褐藻	采集日期与地点	CO ₂ 测定法			重量法 褐藻酸钠 (%)
		海藻样品 重量(g)	CO ₂ 生成量 (g)	褐藻酸钠 (%)	
海蒿子	1954.6.16.青岛	0.6030	0.0279	20.8	12.6
海蒿子	1954.11.15.青岛	0.5728	0.0318	25.0	19.3
海带	1959.5.12.大连	0.6530	0.0325	22.4	—
海带	1959.4.18.青岛	0.9620	0.0547	25.6	23.4
海带	1959.5.14.烟台	0.7090	0.0370	23.5	—

【文献】

纪明侯、张燕霞, 海洋科学集刊, 1: 196~205 (1962).

Cameron, M. C. et al., *J. Soc. Chem. Ind.* 67(4): 161~164 (1948).

(iii) 甘露糖醛酸(M)与古罗糖醛酸(G)的定量测定

褐藻胶的水解: 称取 50 mg Na-alg 样品置玻璃管中, 在冰水冷却下加入 0.5 mL 80% H_2SO_4 溶液, 室温 (20°C) 水解 18 小时, 于冰水冷却下加入 6.5 mL 蒸馏水使硫酸浓度为 1 mol/L, 封闭试管, 于沸水浴中加热水解 5 小时, 冷后转移至小烧杯中, 加稍过量的 $CaCO_3$ 中和, 抽滤, 用水洗至滤液体积为原水解液的两倍, 用以分离 M 和 G.

M 和 G 的分离: 首先将蒸馏水浸泡过的 Dowex 1×2 阴离子树脂 (200~400 目) 装入 28×2 cm 玻璃层析柱中, 然后加入 10% NaOH 溶液使树脂转变成 OH 型, 再用乙酸淋洗树脂使转变成乙酸型, 最后以 0.5 mol/L 乙酸充分淋洗. 水解液在上柱前加 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 8, 使内酯转变成糖醛酸钠盐. 水解液进柱后用 1L 0.5 mol/L 至 2 mol/L 乙酸进行线性梯度洗脱 (0.3 mL/min), 用部分收集器计时收集洗脱液. 待洗脱液流尽后, 树脂以 0.5 mol/L 乙酸充分淋洗, 可重复使用.

洗脱液的定性鉴定: 从各接收管吸取 0.03 mL 洗脱液, 滴加滤纸上, 喷以显色剂 (0.93g 苯胺和 1.66g 邻苯二甲酸溶于用水饱和的 100 mL 正丁醇中) 置 105°C 烘箱中烘 5 分钟. 滤纸上出现二大组斑点: 前一组为 G, 后一组为 M. 据此, 将两糖醛酸的洗脱液分别归并在一起, 测量体积, 进行比色定量.

比色测定与计算: 吸取 2 mL 含糖醛酸的试液, 注入具玻塞试管中, 加入 0.04 mL 80% 苯酚溶液, 摇匀, 置 50°C 水浴中保温, 快速加入 5 mL 浓硫酸, 充分摇荡使均匀, 放置 20 分钟后于 485 nm 波长下以分光光度计测光密度, 按下式算出 M/G 比值:

$$M/G = \frac{M_o \times M_c \times 0.68}{G_o \times G_c}$$

式中: M_o , G_o : 分别为 M 和 G 的洗脱液体积 (mL);

M_0, G_0 : 分别为每 1 毫升洗脱液所含 M 和 G 的量 (mg);

0.68: 水解时两糖醛酸的破坏比率校正系数。

M 和 G 标准溶液的制备和工作曲线: 在测定 M 与 G 之前, 必须先制备标准的 M 和 G 溶液。其基本步骤与糖醛酸的水解与分离相似。

称取 4.0 g Na-alg, 在冰水冷却下与 40 mL 80% H_2SO_4 相混合, $20^\circ C$ 水解 18 小时, 边冰水冷却, 边加入 520 mL 蒸馏水使酸浓度降至 1 mol/L, 于沸水浴中回流 5 小时。冷后加 $CaCO_3$ 中和, 抽滤, 洗涤, 滤液减压浓缩至约 100 mL, 加 2 g 活性炭脱色。过滤后的水解液以 NaOH 溶液调 pH 至 8, 加入到已处理成乙酸型的 Dowex 1 \times 2 阴离子树脂柱 (50 \times 4 cm) 中, 以 10 L 0.5~2 mol/L 乙酸进行梯度洗脱。用部分收集器以 120 mL/h 的速度收集洗脱液。同上定性鉴定。分别合并含 M 和 G 的洗脱液, 各减压浓缩至约 30~40 mL, 通过阳离子交换树脂, 减压浓缩至糖浆, 加 30 mL 乙醇溶解, 再浓缩至糖浆, 反复 2~3 次, 以除去微量乙酸至 0.001 mol/L 以下。加入 30 mL 蒸馏水和少量阴离子树脂 (OH⁻ 型), 除去色泽和残存的阴离子 (至无 Cl⁻ 反应)。过滤, 滤液中加 0.5 mol/L NaOH 溶液使 pH 至 8, 放置半小时。通过强酸性阳离子交换树脂柱使糖醛酸钠盐再转变成糖醛酸。取一定量溶液, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液滴定 (酚酞指示), 确定溶液中糖醛酸的含量。以此配制成 40~200 μg 的浓度系列, 以 1 mol/L 乙酸稀释。于上述条件进行比色测定, 绘制浓度对光密度的工作曲线。

测得几种褐藻的褐藻胶的 M/G 比值如表 47 所示。

表 47 几种褐藻所含褐藻胶的 M/G 比值

褐藻酸钠来源	M/G 比值
半叶马尾藻 (<i>Sargassum hemiphyllum</i>)	1.06
裂叶马尾藻 (<i>Sarg. Siliquastrum</i>)	1.13
海带 (<i>Laminaria japonica</i>)	2.01

【文献】

纪明侯等, 海洋与湖泊. 12(3): 240~248 (1981).

(纪明侯)

2. 褐藻糖胶

(i) 褐藻糖胶的分离

褐藻糖胶的分离方法有多种, 这里只介绍氢氧化铅络合物沉淀法和乙醇沉淀法.

氢氧化铅络合物沉淀法: 取 100 g 磨细的干褐藻, 加 300 mL 水, 于沸水浴上提取 24 小时, 用布过滤, 滤液中加入醋酸铅 [$3 \text{ g Pb(OAc)}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶于 10 mL 水], 然后加 30 mL 饱和的 Ba(OH)_2 溶液, 至溶液呈微红色(酚酞指示). 将生成的白色沉淀离心分离, 水洗二次. 离心沉淀物加硫酸 (100 mL 水 + 30 mL 2 mol/L H_2SO_4), 摇动分解一夜. 离心除去 BaSO_4 沉淀, 热水洗二次. 离心液与洗液通过透析、减压浓缩, 加乙醇至 85% 浓度, 则得粗褐藻糖胶沉淀.

乙醇沉淀法: 称取 20 g 磨细干褐藻, 加入 200 mL 0.1 mol/L HCl, 于 70°C 提取三次, 每次 1 小时. 离心, 离心液加 NaOH 中和, 50°C 减压浓缩至小体积, 加乙醇至 30% 浓度使褐藻胶沉出, 过滤. 滤液再加乙醇至 60% 浓度, 得粗褐藻胶(褐藻糖含量约 30%).

【文献】

Percival, E. G. V., et al., *J. Chem. Soc.* 717 (1950).

Black, W. A. P., et al., *J. Appl. Chem.* 1: 505~517 (1951)

(ii) 褐藻糖胶的提纯

乙醇重沉淀法: 将粗褐藻糖胶溶于水, 加乙醇至 30% 浓度, 除去不溶物, 然后继续加乙醇至 70% 浓度, 并加少许 NaCl, 生成的沉淀经乙醇、乙醚洗, 干燥即为提纯的褐藻糖胶.

季胺盐沉淀法: 将粗褐藻糖胶溶于 0.5 mol/L KCl 或 CaCl_2 溶液中, 加入 5% 季胺盐(十六烷氯化吡啶, CPC) 水溶液 (1 mg 褐藻糖胶加 2 mg CPC 的比例), 形成褐藻糖胶-CPC 络合物沉淀, 离

心分离,再溶于 2 mol/L KCl 或 CaCl₂ 中,加入 2 倍乙醇使生成沉淀,经乙醇、乙醚洗,干燥即为提纯的褐藻糖胶钾或钙盐。

【文献】

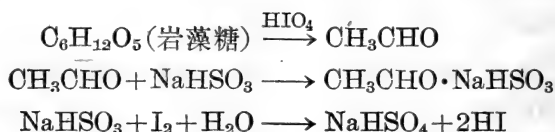
Black, W. A. P. et al., *J. Sci. Food Agr.* **3**: 122~129 (1952).

Anno, K. et al., *Agr. Biol.Chem.* **30**(5): 495~499 (1966).

(iii) 岩藻糖的测定

对岩藻糖胶的定量分析,是测定其主要组分 L-岩藻糖的含量。因为,如上所述,褐藻糖胶中除主要含岩藻糖外,尚含有不同比例的硫酸基、糖醛酸、木糖、蛋白质等组分,因此,目前尚不能从岩藻糖的测定值来推算褐藻糖胶的实际含量。

测定的基本原理:这里介绍 HIO₄ 氧化法。褐藻糖胶水解后生成的岩藻糖遇到 HIO₄ 被氧化成乙醛气体,用 NaHSO₃ 吸收。然后加入 NaHCO₃ 溶液使结合状态的乙醛释放出来,以 0.01 mol/L 碘溶液滴定 NaHSO₃,由此算出岩藻糖的含量(岩藻糖分子量为 164.16)。



依据上列式子,每测定 1 个岩藻糖分子,需要消耗 1 个碘分子。即每 164.16 g 岩藻糖,相应于用去 2 L 1 mol/L 的碘溶液,亦即相应于用去 200 000 mL 0.01 mol/L 的碘溶液。

$$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5(164.16) = 2 \text{ L } 1 \text{ mol/L } \text{I}_2 = 200 \text{ 000 mL mol/L} \times 1/100 \text{I}_2$$

$$\text{岩藻糖 \%} = \frac{\text{mol/L} \times 1/100 \text{I}_2(\text{mL}) \times 164.16 \times 100}{200 \text{ 000} \times \text{样品重}(\text{g})}$$

式中 mol/L × 1/100 I₂(mL) = 滴定用去的 0.01 mol/L 碘溶液的毫升数。

称取 0.5 g 海藻粉末,放入图 78 所示试管 A 中(φ 2.5 cm × 20 cm),加入 5 mL 2.5% H₂SO₄,于沸水浴中回流水解 3 小时。加 NaHCO₃ 中和,再多加 1 g NaHCO₃,0.2 g 丙氨酸,14 mL 0.1 mol/L 亚砷酸钠溶液和 0.5 mL 液体石蜡,B 管中加 4 mL 亚硫

酸氢钠溶液(制备法: 于饱和的 Na_2CO_3 溶液中通入 SO_2 , 直至溶液转为绿色, 然后稀释 10 倍), 加水稀释至 25 mL. C 管中加入 1 mL 亚硫酸氢钠, 加水稀释至 25 mL.

由分液漏斗进口通入 N_2 一分钟, 加入 3.5 mL 0.5 mol/L HIO_4 , 接上 N_2 使 HIO_4 流入 A 管中, 关闭活塞, 使发泡约 2 分钟, 开塞, 通入 N_2 , 使流速逐渐增至 800 mL/分, 通气 2 小时半后, 将 B 和 C 管的内容物洗至三角烧瓶中,

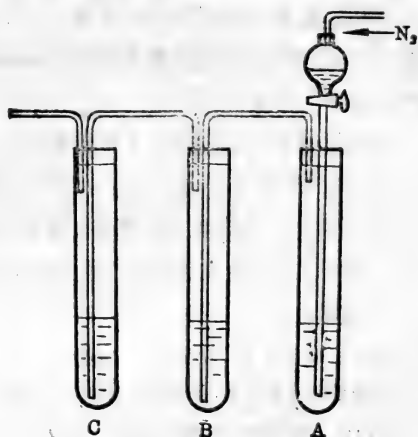


图 78 褐藻糖测定装置

以 0.1 mol/L I_2 溶液滴定过剩的 NaHSO_3 , 近终点, 改用 0.01 mol/L I_2 液滴至终点(淀粉指示). 然后加入过剩的饱和 NaHCO_3 溶液去掉蓝颜色. 此时以 0.01 mol/L I_2 溶液滴定由醛-亚硫酸化合物释放出的 NaHSO_3 , 至蓝色维持 2 分钟不变即为终点. 也可以将海藻加酸水解后制成乙酰化衍生物用气相色谱仪测定岩藻糖含量.

【文献】

Cameron, M. C. et al., *J. Soc, Chem, Ind.* **67**(4): 161~164, (1948).

(纪明侯)

3. 海带淀粉

(i) 海带淀粉的分离

欧洲产许多海带属和墨角藻属褐藻含有水可溶性和不溶性两种海带淀粉, 其化学结构彼此基本相似, 只是链长略有不同.

按 Black 等的分离方法, 称取 1000g 克劳氏海带 (*Laminaria cloustonii*) 藻粉 (80 目), 加入 10 L 0.09 mol/L HCl 和 15 mL 40% 甲醛, 室温搅拌 30 分钟. 用布过滤, 水洗三次. 滤液和洗液经搅拌 3 小时, 放置三天, 则沉出不溶性海带淀粉. 离心, 乙醇、乙

醚洗,干燥。离心液以NaOH中和,减压浓缩至约1L,加入乙醇至85%浓度,沉出可溶性海带淀粉。离心,乙醇、乙醚洗,干燥。

我国褐藻中海带淀粉含量不多,海带中的含量一般为1%左右;马尾藻中以南方产的铜藻(*Sargassum honeri*)的含量较高,提取得率约为4%。

分离方法与上述步骤大致相似:取切碎成0.5cm长的干铜藻,加入10倍量0.1mol/L HCl,搅拌浸泡2~3小时,滤取浸液,加乙醇至50%浓度,静置,滤去沉淀。滤液中再加乙醇至85%浓度,生成的沉淀用滤纸过滤,以无水乙醇洗涤,干燥。

【文献】

Black, W. A. P., et al., *J. Appl. Chem.* 1: 505~517 (1951).

广东汕头制药厂等,海藻工业资料, 1: 25~29 (1977).

(ii) 海带淀粉的提纯

将粗海带淀粉加10倍热水,搅拌溶解,离心,除去不溶物。离心液通过阳离子树脂交换柱,用水冲洗,洗液加乙醇至85%浓度(加入少量NaCl),沉淀出的海带淀粉经离心、干燥,提纯后的海带淀粉含量约80%。

【文献】

Black, W. A. P., et al., *J. Appl. Chem.* 1: 505~517 (1951).

(iii) 海带淀粉的定量测定

按照Shaffer和Somogyi法测定试液经酵母处理前后的还原力,以计算葡萄糖含量。

【试剂】

酵母悬浮液:取25g干酵母,水洗二次,离心,加100mL水。或取60g新鲜啤酒酵母加200mL水。

S&S试剂:将25g Na_2CO_3 , 20g NaHCO_3 , 25g酒石酸钾钠盐, 7.5g含水 CuSO_4 , 1g KI和0.8917g KIO_3 加水溶解,稀释至1L。

【操作】

称取1g海藻粉末,加40mL 0.5mol/L H_2SO_4 ,于沸水浴中

加热回流 8 小时, 冷后过滤。吸取 10 mL 滤液于 250 mL 容量瓶中, 加入 20~30 mL 水, 以 0.1 mol/L NaOH 溶液中和, 加水至 250 mL 刻度。此为水解试液。

取 15 mL 酵母悬浮液, 抽气过滤, 将抽干的酵母饼移至 100 mL 三角烧瓶中, 加入 6 mL 待分析的水解试液, 摇匀, 置 38°C 回流摇动 10 分钟。冷后以 G4 漏斗抽滤, 取 5 mL 滤液移入大试管 (2.5 cm × 20 cm) 中, 加入 5 mL S&S 试剂, 混合。此为第一管。

另取 5 mL 原始水解液, 加入 5 mL S&S 试剂, 混合。此为第二管。

取 5 mL 蒸馏水, 加入 5 mL S&S 试剂, 混合。此为第三管, 作为空白测定。

第四管为对酵母的空白测定。取 5 mL 酵母悬浮液的滤液 (即取 10 mL 酵母悬浮液过滤, 滤饼加 6 mL 蒸馏水, 过滤的滤液), 加入 5 mL S&S 试剂, 于 38°C 摇动 10 分钟。

将各试管放沸水浴中加热 15 分钟。取出, 放冷水中冷至 30°C。加入 2 mL KI-草酸钾溶液 (各为 2.5%) 和 5 mL 1 mol/L H_2SO_4 , 摇动试管使 Cu_2O 和碘化物溶解。5 分钟后以 0.005 mol/L $Na_2S_2O_3$ 溶液滴定游离碘 (淀粉作指示)。

举例:

海藻样品重量 1.105 g

$Na_2S_2O_3$ 溶液滴定值:

- | | |
|--------------------------|----------|
| i) 第一试管 (酵母 + 水解试液 + 试剂) | 22.30 mL |
| ii) 第二试管 (水解试液 + 试剂) | 13.58 mL |
| iii) 第三试管 (蒸馏水 + 试剂) | 25.00 mL |
| iv) 第四试管 (酵母悬浮液滤液 + 试剂) | 24.80 mL |

滴定差 (由于葡萄糖以外的糖): $24.80 - 22.30 = 2.50$ mL

滴定差 (由于葡萄糖): $25.00 - 13.58 - 2.50 = 8.92$ mL

据测定 1 mg 葡萄糖 = 9.02 mL 0.0025 mol/L $Na_2S_2O_3$ 溶液

$$\begin{aligned} \text{海带淀粉}\% &= \frac{8.92}{9.02} \times \frac{1}{1000} \times \frac{162}{180} \times \frac{250}{5} \times \frac{40}{10} \times \frac{100}{1.105} \times \frac{100}{95} \\ &= 17.0 \end{aligned}$$

式中, 180: 葡萄糖的分子量; 162: 葡萄糖无水物; 95/100: 葡萄糖的回收率。

现在也可以将海藻酸水解液制成乙酰化衍生物后用气相色谱仪测定其葡萄糖含量。

【文献】

- 纪明侯、史升耀, 海洋科学集刊. **1**: 188~195 (1962).
纪明侯、张燕霞, 海洋科学集刊. **1**: 196~205 (1962).
纪明侯等, 海洋与湖沼. **12**(3): 240~248 (1981).
曾呈奎、纪明侯, 海洋科学集刊. **1**: 140~158 (1962).
广东汕头制药厂等, 海藻工业资料. **1**: 25~29 (1977).
Anno, K., et al. *Agr. Biol. chem.* **30**(5): 495~499 (1966).
Black, W. A. P., et al., *J. Appl. Chem.* **1**: 505~517 (1951).
Black, W. A. P., et al., *J. Sci. Food Agr.*, **3**: 122~129.
Cameron, M. C., et al., *J. Soc. Chem. Ind.* **67**(4): 161~164.
Larsen, B., *Handbook of Phycological Methods* 143~149 (1978).
Partridge, S M., *Nature* **164**(4167): 443 (1949).
Percival, E. G. V., and A. G. Ross. *J. Chem. Soc.* **1950**: 717~721. (1950).

(纪明侯)

三、蛋白聚糖

蛋白聚糖 (proteoglycan, PG), 是一类重要的生物大分子物质, 是结缔组织中基质的成分, 也是一切细胞外的基质成分。细胞外基质是由纤维状胶原蛋白、弹性蛋白与非纤维状的蛋白聚糖组成。蛋白聚糖有很强的亲水性, 能使组织占有较大的体积。1967年 Balas 提出蛋白聚糖这个名称, 专指含有糖胺聚糖 (GAG) 的糖蛋白。蛋白聚糖的旧称是粘蛋白。糖胺聚糖的旧称是粘多糖或酸性粘多糖。蛋白聚糖与一般糖蛋白不同, 其所含主要为乙酰氨基糖和糖醛酸, 而且糖的含量远远大于蛋白质的含量。而一般糖蛋白分子中, 蛋白质的含量大于糖的含量, 所含糖为中性糖、碱性糖或两性糖, 以不规则分支的寡糖形式存在。

糖胺聚糖是多聚阴离子, 为长链不分支的糖, 具有羧基与硫酸基团。其基本单位是由糖醛酸与乙酰氨基糖组成的二糖, 再重复聚合为糖胺聚糖。现已确定结构的糖胺聚糖有七种, 即透明质酸 (HA)、4-硫酸软骨素 (Ch-4-S 或 C-4-S)、6-硫酸软骨素 (Ch-6-S 或 C-6-S)、硫酸皮肤素 (DS)、硫酸角质素 (KS)、肝素 (Hp) 及硫酸类肝素或硫酸乙酰肝素 (HS) (表 48, 图 79)。

除透明质酸外, 其余六种 GAG 都与蛋白质以共价键相连。多数是通过一个三糖单位以-O-糖苷键与蛋白质肽键中的丝氨酸相连。

GAG—半乳糖—半乳糖—木糖—丝氨酸。

硫酸角质素是通过N-乙酰半乳糖胺以-O-糖苷键与丝氨酸或苏氨酸相联, 或通过N-糖苷键与蛋白质的天冬酰胺相连 (图 80)。

在软骨中蛋白聚糖含量较高, 因此常用软骨作为蛋白聚糖或糖胺聚糖的研究材料。1970年 Hascall 等证明一个蛋白聚糖单

表 48 糖胺聚糖的组成和分布

名称	基本结构单位	分子量 ($\times 10^3$)	二糖的分子数	主要存在部位
透明质酸 (HA)	葡萄糖醛酸 N-乙酰氨基葡萄糖	4~8000	500~2500	滑液、脐带、皮肤、软骨、基底膜、玻璃体、结缔组织
4-硫酸软骨素 (Ch-4-S)	葡萄糖醛酸 4-硫酸-N-乙酰氨基半乳糖	5~10	60	骨、软骨、皮肤、角膜、血管
6-硫酸软骨素 (Ch-6-S)	葡萄糖醛酸 6-硫酸-N-乙酰氨基半乳糖	5~10	60	骨、软骨、皮肤、角膜、血管
硫酸角质素 (KS)	半乳糖 6-硫酸-N-乙酰氨基葡萄糖	4~19	10~20	角膜、软骨
肝素 (Hp)	2-硫酸艾杜糖醛酸 6-硫酸-N-硫酸氨基葡萄糖 葡萄糖醛酸 6-硫酸-N-乙酰氨基葡萄糖	6~25	10~20	肝、肺、肠
硫酸类肝素 (硫酸乙酰肝素) (HS)	艾杜糖醛酸 6-硫酸-N-乙酰氨基葡萄糖 葡萄糖醛酸 N-乙酰氨基葡萄糖	—	10~20	肝、肺、细胸膜、动脉
硫酸皮肤素 (DS)	艾杜糖醛酸 4-硫酸-N-乙酰氨基半乳糖	5~40	40~60	皮肤、韧带、心瓣膜、动脉壁

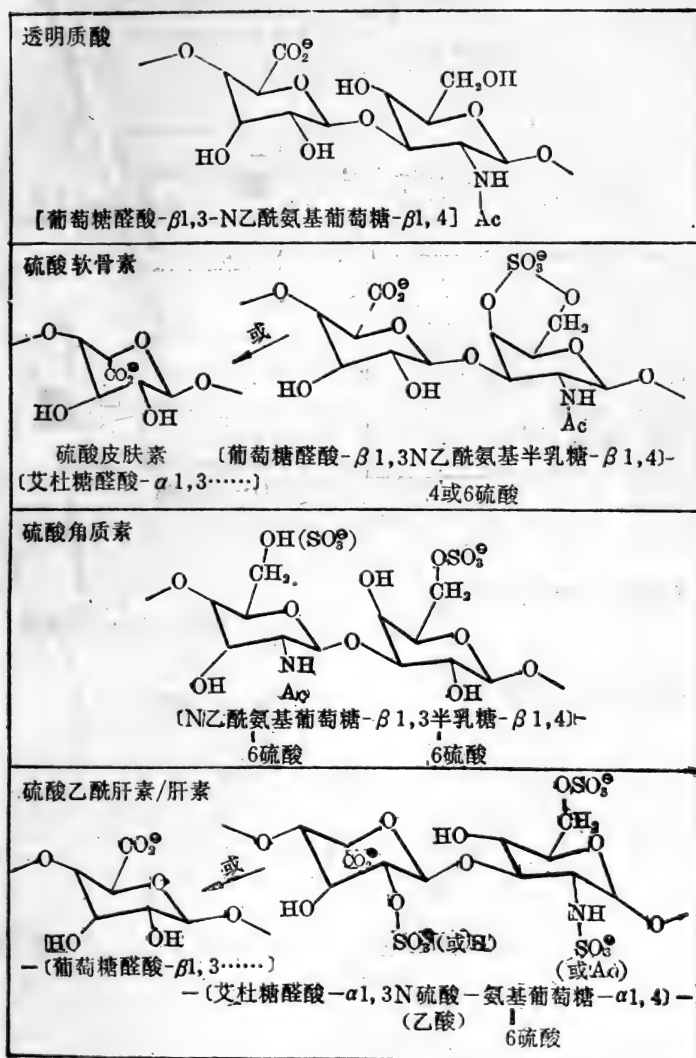


图 79 几种糖胺聚糖的重复二糖单位

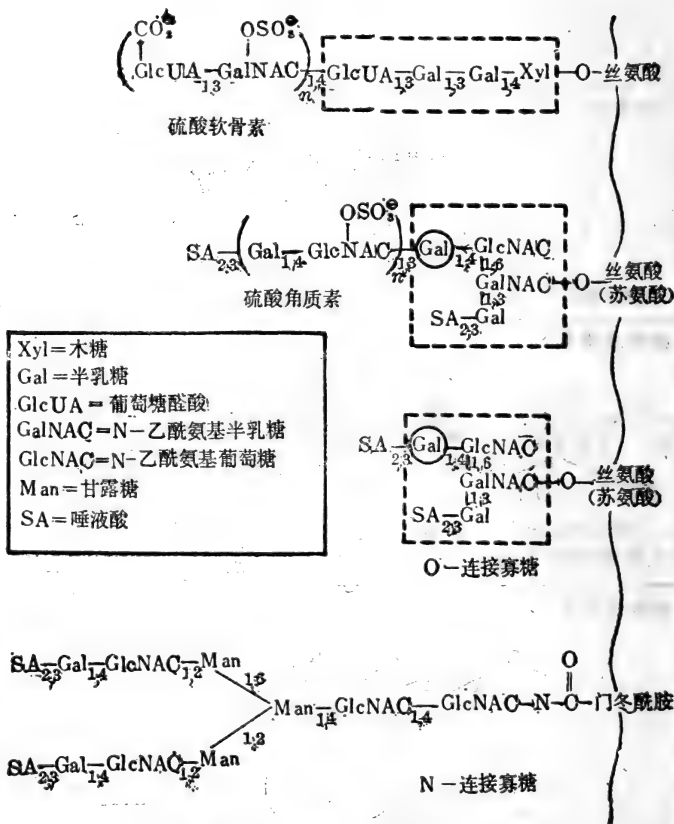


图 80 软骨蛋白多糖中复合多糖的结构

硫酸软骨素及硫酸角质素的重叠二糖单位及其与核心蛋白共价键结合的特殊连接区(虚线所示)。O-连接寡糖与硫酸角质素相同的连接处以圆圈表示。N-连接寡糖的确切结构有待进一步阐明

体的分子量约为 $0.5 \times 10^6 \sim 4.0 \times 10^6$, 含有很多硫酸软骨素及硫酸角质素, 还有少数寡糖。它们都联结于一个核心蛋白, 核心蛋白的分子量约为 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 。约有 200 个这样的蛋白聚糖单体再与透明质酸相连组成一个聚集体(图 81)。聚集体中的透明质酸链, 分子量约为 1.6×10^6 , 聚集体的分子量约为 350×10^6 。此外在聚集体中还至少有二种连接蛋白(link protein a 及 b), 它

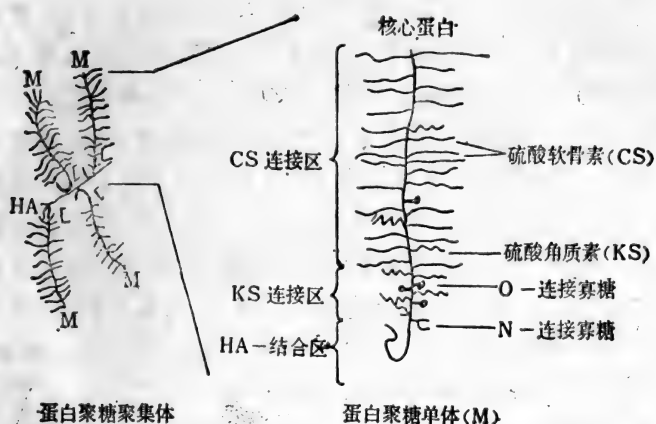


图 81 软骨蛋白聚糖单体结构示意图

左: 四个连有 GAG 链的单体(M)连结在中心的透明质酸上, (L)为连接蛋白。
右: 软骨蛋白聚糖单体。

表 49 软骨蛋白聚糖聚集体的组分

组 分	分 子 量	长 度 (cm)
PG 聚集体	$30 \times 10^6 \sim 210 \times 10^6$	1000~4000
PG 单体	$2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$	100~400
HA	$0.2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$	450~4200
核心蛋白	2×10^5	300
连接蛋白 a	4×10^4	
连接蛋白 b	6.5×10^4	
CS	$2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$	20~30
KS	$3 \times 10^3 \sim 7 \times 10^3$	6

们的分子量分别是 51 000 及 47 000(表 49)。其作用是稳定透明质酸与蛋白聚糖单体的连接, 否则聚集体不稳定, 易解聚。

(李玉瑞)

(一) 蛋白聚糖(PG)及糖胺聚糖(GAG)的分离提取

尽管现今公认糖胺聚糖(GAG)只是相应蛋白聚糖整体分子结构中的“含糖片段”, 但无论在组织、细胞或分子水平上阐明这类聚糖的结合性质或生物功能方面, 或在研究外源性 GAG 的药理活性

方面(如以惊人规模扩大生产的肝素已成为心血管外科、器官移植和人工脏器不可缺少的药物或材料),以及探讨这类聚糖代谢异常的病理学意义(包括肿瘤、动脉粥样硬化症等)和它们在统称为粘多糖症的遗传病的临床诊断价值等方面,人们对 GAG 的特殊兴趣有增无减。因而提取、分离纯化 GAG 对开展上述工作至为重要。

已知蛋白聚糖分子中的糖胺聚糖片段通过共价键而与蛋白部分结合。此外, GAG 还通过静电效应或立体化学效应与其他蛋白质成分发生专一性程度不一的结合。因此,制备 GAG 时常采用降解蛋白质的手段以使与之结合的 GAG 释放。蛋白酶水解法以及碱水解法使蛋白质与糖分离是目前在 GAG 提取方法中广为应用的。利用各种 GAG 在乙醇中和盐溶液中的溶解度特点和它们电荷密度间的差异,可对含多种 GAG 的溶液进行分级分离,包括乙醇分级沉淀法,季铵盐分级解离法和离子交换层析法等,从而获得单一的聚糖。必须指出,由于各种 GAG 分子量的高度分散性和它们结构、活性的不均一性,适用于一般生物大分子的另外两种分离方法——利用分子形状和分子大小不同的分离方法以及利用生物功能的专一性的纯化方法,常常不能用于各种 GAG 分子间的分离。与此相反,由前述方法所得的单一多糖却可按分子量大小或生物活性作进一步分级。

1. 离子交换层析法分离蛋白聚糖(PG)

蛋白聚糖为多聚阴离子,经 4mol/L 盐酸胍提取后,在 DEAE 离子交换层析柱上,用含不同浓度盐(0, 0.15, 2 mol/L NaCl)的尿素溶液洗脱,可与胶原及其他杂蛋白分开。蛋白聚糖可用 2 mol/L NaCl 尿素溶液洗脱下来,其他蛋白则出现在 0~0.15 mol/L NaCl 尿素溶液中。

【试剂】

DEAE-32 纤维素:

盐酸胍提取液: 将盐酸胍按 4 mol/L 浓度溶于 0.05 mol/L 乙酸盐缓冲液中, pH 5.8。

7 mol/L 尿素; 用前依次用阴、阳离子交换层析处理,所用阴、

阳离子交换树脂为一般制备去离子水的树脂即可。

含 7 mol/L 尿素的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 6.5~6.8)。

含 0.15 mol/L NaCl、7 mol/L 尿素的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 6.5~6.8)。

含 2 mol/L NaCl、7 mol/L 尿素的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 6.5~6.8)。

前述四种含尿素的试剂在临用前均按如下浓度添加防腐剂: 0.1 mol/L 6-氨基己酸, 0.01 mol/L EDTA, 10 mmol/L N-乙基顺丁烯二酰亚胺。

【操作】

新鲜软骨 2 g 去除脂肪, 剪成小块, 加少许 4 mol/L 盐酸胍提取液, 用捣碎机将软骨捣碎。加 30 mL 4 mol/L 盐酸胍提取液, 4°C, 搅拌 24 小时。离心 (12 000 r/min, 30 分钟) 保留上清液, 将沉渣再重复提取一次, 两次提取液合并。用超滤法将提取液浓缩至原体积的 1/20~1/30。浓缩的提取液对 7 mol/L 尿素的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 6.5~6.8) 充分透析。DEAE 纤维素 (Cl-型) 层析柱, 用上述缓冲液平衡。上样, 将透析好的蛋白聚糖提取液小心均匀地加在柱上。洗脱、监测及收集可分别用 2~3 倍柱床体积的含 0、0.15、2 mol/L NaCl 的 7 mol/L 尿素、0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 6.5~6.8) 顺序洗脱, 同时用紫外吸收分析仪监测, 收集 2 mol/L NaCl 洗脱液的洗脱峰。收集液对水透析、浓缩, 冷冻干燥即得蛋白聚糖制品。

【讨论】

(1) 氯化铯密度梯度离心法提取蛋白聚糖, 需价昂的氯化铯及长时间的超速离心, 本方法毋须上述条件, 较经济易行。

(2) 氯化铯密度梯度离心法不适于由 PG 含量较低的组织中提取蛋白聚糖, 本法则无此局限性。

(3) 本法所提取的蛋白聚糖制品几乎不含胶原蛋白。

(4) 本法由 Antonopoulos 初次报道时未用酶抑制剂, 现证

实,在提取过程中加入少量酶抑制剂是必要的。

(5) 经透析后若有凝胶样物质产生,可用离心法除去。

【文献】

C. A. Antonopoulos, et al., *Biochimica et Biophysica Acta*. 338:108~119(1974).

(刘秉慈)

2. 糖胺聚糖(GAG)的一般提取方法

组织中可含有一种或一种以上的 GAG, 其与蛋白质相结合的化学键, 可用稀碱水解法和蛋白酶水解法切断, 用三氯乙酸沉淀蛋白, 离心后, 上清液中的 GAG 可进而用三倍体积的乙醇沉淀获得。

此种提取方法所得到的是各种 GAG 的混合物, 可用于 GAG 总量测定(如阿利新兰法测定 GAG 总量), 各种 GAG 可用乙酸纤维素膜电泳法分离, 并计算各种 GAG 的相对含量。

【试剂】

胰蛋白酶液: 将胰蛋白酶溶于 pH 7.4 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中, 5 mg/mL。

木瓜蛋白酶液: 按每毫升 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中含 5 mg 木瓜蛋白酶、0.9 mg EDTA、0.4 mg 半胱氨酸配制。

【操作】

(1) 将新鲜组织(如软骨、肺组织等)去除脂肪, 剪成小块, 于 95% 酒精中浸泡 2~3 小时, 再移入丙酮液中浸泡 2 小时, 用滤纸包好, 在索氏抽提器中脱脂 16 小时。

(2) 将已脱水脱脂的样品放置过夜干燥(或在 80°C 以下烘干)后, 粉碎至细粉末状。

(3) 稀碱消化: 组织粉 100 mg, 加 0.1 mol/L NaOH 2 mL, 浸泡过夜, 翌日以 0.1 mol/L HCl 中和至 pH 7 左右, 沸水浴放 40 分钟, 调 pH 至 7.4, 加等体积 0.2 mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液及少量甲苯。

(4) 蛋白酶水解: 加胰蛋白酶 1 mL, 37°C, 保温 24 小时, 经常震摇。再加木瓜蛋白酶 1 mL, 37°C 保温 24 小时, 经常震摇。

(5) 酶水解毕,加 60% 三氯乙酸至终浓度 10%, 4°C 放置过夜. 于 4°C 离心(12 000 r/min, 20 分钟), 弃去沉淀.

(6) 上清液中加三倍体积的乙醇,放置 24 小时,离心(12 000 r/min, 30 分钟), 弃上清液.

(7) 沉淀用少量乙醇洗数次,冷冻干燥,即得 GAG 粗制品.

【讨论】

(1) 经验证明,单用一种酶水解常不能完全,胰蛋白酶和木瓜蛋白酶合并使用(先用胰蛋白酶,后用木瓜蛋白酶),水解才能完全.

(2) 若水解不充分,可依次用胰蛋白酶和木瓜蛋白酶重复一次,并适当加大酶的用量.

(刘秉慈)

3. 透明质酸的分离提取

透明质酸(hyaluronic Acid)系由 β -D-葡萄糖醛酸和 2-乙酰氨基-2 去氧- β -D-葡萄糖分别以(1 \rightarrow 3)和(1 \rightarrow 4)糖苷键形成的多糖链,存在于多种结缔组织的基质中,尤以牛眼玻璃体、牛关节滑液和人脐带中含量为高,其中人脐带是公认的制备透明质酸最适生物材料. 鉴于透明质酸常与 4-硫酸软骨素、6-硫酸软骨素等 GAG 共存,因此经蛋白水解酶降解蛋白聚糖分子的蛋白部分后,可利用各种 GAG 和季铵盐(如氯化十六烷基吡啶)生成的复合物在氯化钠溶液中解离所需的临界盐浓度不同而将所得的 GAG 混合物分级分离. 已知引起透明质酸氯化十六烷基吡啶复合物解离所需盐浓度远较其他含硫酸基的 GAG 为低,因此选择适当的低盐浓度,在其他 GAG 复合物保持不溶性的同时,透明质酸季铵盐优先解离而成游离的可溶性聚糖,从而获得本聚糖纯品.

【试剂】

10% 氯化十六烷基吡啶: 以 0.18 mol/L 氯化钠配制,如放置有结晶析出,可以温热助溶.

助滤剂 Celite 545 (BDH); 胃蛋白酶 (1:3000), 胰蛋白酶 (1:250),

【操作】

取 400 克已去血块及其他异物的新鲜人脐带，绞碎后加等量水，用组织捣碎机制成匀浆。加入 4 mL 甲苯作防腐剂。在 50°C 保温自溶 12 小时后，反应液明显稀薄。以 4 mol/L 盐酸调 pH 至 2.0，并加入胃蛋白酶 10 克，搅拌下酶解 2 小时，组织块大部分液化，再以 5 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 8.6，加入胰蛋白酶 0.8 克，搅拌，酶解 8 小时。反应液仅剩少量残渣。经助滤剂 Celite 545 抽滤，得澄明液体。将此溶液以水稀释一倍，在搅拌下加入 60 mL 10% 氯化十六烷基吡啶，此时溶液出现絮状沉淀。加入助滤剂 36 克，搅拌 0.5 小时，真空抽滤，将分离得到的沉淀物以 600 mL 0.4 mol/L 氯化钠混悬，在 30~40°C 下搅拌解离 2 小时，抽滤得清液。残渣继续以 0.4 mol/L 氯化钠重复解离 2 次，每次 300 mL，每次搅拌解离 1 小时。合并解离液，加入两倍体积乙醇，冷处过夜，离心收集沉淀，以乙醇、丙酮洗涤，得干燥透明质酸粗品 1.25 克。

将粗透明质酸制成 0.5% 水溶液，在搅拌下慢慢加入 2 倍体积乙醇，随后加入乙酸钠使浓度达 1%，即出现大量沉淀，冷藏过夜，离心收集沉淀。沉淀先后用 80% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇在组织捣碎机内粉碎脱水，后以丙酮洗涤。于五氧化二磷真空干燥后，即为透明质酸成品(钠盐) $[\alpha]_D^{19} = -65^\circ$ 。平均每 100 克新鲜脐带可得成品 0.28 克。

【讨论】

(1) 以胃蛋白酶及胰蛋白酶降解，共需 10 小时左右。酶解液以等体积水稀释后盐浓度约在 0.18 mol/L 左右。此浓度即可保证全部 GAG 被氯化十六烷基吡啶沉出，又可除去残留蛋白质，大大简化为达到同一目的的同类方法。鉴定氯化十六烷基吡啶沉淀 GAG 的程度和反应液盐浓度有密切关系，所以酶促反应调 pH 时加酸碱液应小心控制，以免盐浓度变化太大而影响聚糖回收或去除杂蛋白效果。

(2) 所得混合 GAG 用 0.4 mol/L 氯化钠解离获取透明质酸后，其他 GAG 仍以不溶性的季铵盐复合物形式吸附于助滤剂上，

后者可以 1.2 mol/L 氯化钠解离回收, 其中所含 6-硫酸软骨素有制备价值。

【文献】

张兆伟等, 生物化学与生物物理学进展, (3):56 (1982)。

(樊绘曾)

4. 4-硫酸软骨素的分离提取

4-硫酸软骨素(Chondroitin 4-Sulfate)是软骨蛋白聚糖分子中占优势的 GAG。由 β -D-葡萄糖醛酸和 2-乙酰氨基-2-去氧-4-O-硫酸基- β -D-半乳糖两种糖基分别通过(1 \rightarrow 3)和(1 \rightarrow 4)糖苷键连接而成。除各种软骨外, 也存在于皮肤、角膜等组织中。猪、牛的鼻、喉软骨是大量制备 4-硫酸软骨素的合适材料。在软骨蛋白聚糖中, 4-硫酸软骨素糖链以其还原末端通过寡糖区(半乳—半乳—木—)与核心蛋白链中丝氨酸羟基形成戊糖肽联键。后者对碱敏感, 在 0.5 mol/L 氢氧化钠中, 室温下放置, 即可释出聚糖链。经胰酶去蛋白后, 利用 4-硫酸软骨素在乙醇溶液中溶解度特别是该聚糖钙盐在乙醇溶液中的溶解度特点即可进行分级, 去除其他 GAG(硫酸角质素及 6-硫酸软骨素)而纯化。

【试剂】

胰酶(药用标准)。

【操作】

剔除非软骨组织的新鲜牛(或猪)鼻软骨, 洗净后绞碎, 经多次丙酮脱水, 空气干燥, 保存备用。取上述干燥软骨制剂 100 g, 与 500 mL 0.5 mol/L 氢氧化钠相混, 室温下, 搅拌 4.8 小时后经尼龙布过滤, 收集滤液。残渣另以 200 mL 0.5 mol/L 氢氧化钠重复抽提, 历时 24 小时。合并两次滤液, 以 6 mol/L 盐酸调 pH 至 8.5 左右, 按滤液体积之 0.4% 加入胰酶。在 50°C 下, 加 1% 甲苯防腐, 搅拌, 随时观察 pH 值变化, pH 下降时用 5 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 8.5, 8 小时终止反应, 调 pH 至中性。过滤所得滤液加乙醇使含醇量达 66%, 放置过夜, 沉淀部分经抽滤收集, 先后以 95% 乙醇、无水乙醇、丙酮洗涤, 得粗 GAG 聚糖 20 克。

粗 GAG 10 克, 溶于 200 mL 水中(如不澄明, 离心去沉淀), 清液继加 10 mL 冰乙酸、5 克无水氯化钙, 溶解后, 加入等体积无水乙醇。沉淀过夜, 倾去清液, 离心收集沉淀。后者转移至含磁芯 1000 mL 平底烧瓶中, 以 400 mL 水溶解, 加入 15 mL 冰乙酸及 1 克氯化钙, 在电磁搅拌下, 慢慢加入 200 mL 无水乙醇。加毕加塞, 放置过夜。经离心可得少量沉淀(勿弃去, 可与下批粗糖合并, 供精制用), 所得清液在搅拌下, 慢慢加入无水乙醇至呈微微混浊止(约 25 mL), 静置过夜, 继加 50 mL 无水乙醇(此时乙醇浓度为 40%)。加塞静置一周后 GAG 呈结晶状沉淀析出。离心收集沉淀, 以少许 40% 乙醇、无水乙醇、丙酮顺序洗涤后, 即可得纯品 4-硫酸软骨素(钙盐)约 6 克。除去沉淀后的清液可续加 200 mL 无水乙醇, 将残留粗 GAG 全部沉出, 供下批精制用。上述 4-硫酸软骨素钙盐用水溶解后经强酸型离子交换树脂(732)1×7 钠型柱脱钙, 流出液按体积加氯化钠至 5%, 搅拌下加两倍体积无水乙醇沉淀, 又经无水乙醇-丙酮洗涤后, 在室温下减压干燥, 即得 4-硫酸软骨素(钠盐), $[\alpha]_D^{19} = -25^\circ$ 。

【讨论】

- (1) 丙酮干燥软骨制剂便于保存, 而新鲜洗净软骨同样适用。
- (2) 用碱解法提取简便易行, 适于生产。由于碱法引起糖链降解, 因此得率较酶法为低。另外用酶法提取时可以同时分离硫酸角质素, 后者在碱解法中会引起脱硫与异构化反应, 欲综合利用应考虑酶法提取。
- (3) 鉴于各种软骨蛋白聚糖中, GAG 组成的不均一性, 4-硫酸软骨素糖链中可嵌入少量 6-硫酸软骨素双糖单位, 因此叙及成品纯度时应注意。

【文献】

成都制药三厂, 医药工业。(7):6 (1977)。

(姜芸曾)

5. 6-硫酸软骨素的分离提取

6-硫酸软骨素(chondroitin-6-Sulfate)在组成糖基、异头

体构型和糖基间的连接方式上都和 4-硫酸软骨素相同,唯硫酸基与 α -乙酰氨基-2-去氧半乳糖的 C₆ 伯醇羟基通过酯键相连. 鲨鱼软骨、河鲟头盖软骨、人脐带、心瓣、脊索瘤中所含硫酸软骨素主要为 6-硫酸软骨素,后者经 1.2 mol/L 氯化钠解离所得粗制品,通过乙酸钙-乙醇分级可除去在较低浓度乙醇中沉出的核酸和硫酸皮肤素、硫酸乙酰肝素等.

【试剂】

乙酸钙缓冲液(pH4.6): 溶解 125 克乙酸钙(含 1mol 结晶水)于 2.4 升水中加入 71 mL 冰乙酸后,调至所需 pH.

【操作】

人脐带酶解液以等体积水稀释后,加入氯化十六烷基吡啶生成 GAG 复合物的沉淀,以 0.4 mol/L 氯化钠分级解离透明质酸后,所得残渣多批合并后继以 1.2 mol/L 氯化钠在 30~40°C 下搅拌解离,按各批残渣相当于所投料脐带,每 100 克用 50 mL 盐液解离,共三次,每次半小时. 合并抽滤液,根据滤液体积,加 1.5 倍无水乙醇,所得沉淀依次以 95% 乙醇、无水乙醇、丙酮洗涤,在五氧化二磷中真空干燥,即得粗 6-硫酸软骨素. 平均每千克脐带约得粗糖 1.5 克.

1 克上述粗制品,置于 500 mL 平底烧瓶中,以 200 mL 乙酸钙缓冲液溶解,在强力电磁搅拌下,缓缓加入 58 mL 无水乙醇,加塞,4°C 静置过夜(偶尔振摇). 低温离心,清液(可能混浊)放置达室温后,在强力搅拌下,缓缓加入 40 mL 无水乙醇,4°C 过夜,低温离心去沉淀(主要为硫酸乙酰肝素等). 清液放达室温后,在强力搅拌下缓缓再加入 50 mL 无水乙醇,4°C 过夜,偶尔振摇,次日离心所得沉淀用 60 mL 水溶解,经强酸型树脂 732(Na 型)柱,另用适量水洗柱,流出液合并,加氯化钠使浓度达 5%,并加两倍体积无水乙醇,4°C 过夜,次日离心收集沉淀,依次以乙醇、无水乙醇、丙酮洗涤,在五氧化二磷中真空干燥,得量为 0.5 克. 成品 $[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$.

【讨论】

(1) 严格控制钙盐浓度及沉淀聚糖的乙醇浓度是分离纯化的关键。操作中应避免乙醇加入过快，造成局部乙醇浓度过高，使6-硫酸软骨素提前析出，影响得量。

(2) 静置沉淀和低温离心温度也应保持一致。

(3) 一般认为人脐带中不含4-硫酸软骨素而为6-硫酸软骨素。然而，据 Roden 介绍，若经软骨素酶(E.C. 4.2.2.4)降解，并对所生成的双糖进行分析，表明GAG中6-硫酸软骨素双糖单位占总量80%，4-硫酸软骨素约占10%，未硫酸化的软骨素双糖单位占10%，进一步证实GAG结构的杂合性和结构的不均一性。

【文献】

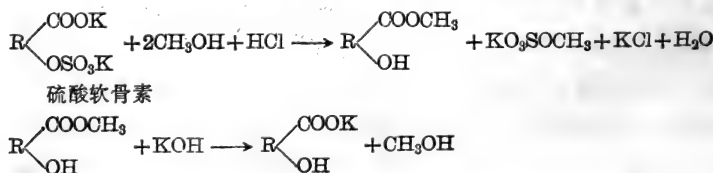
Roden, L., et al., *Methods in Enzymology*, **28**: 73, Acad. Press, New York, 1972.

(樊绘曾)

6. 软骨素的制备

软骨素(chondroitin)具有和前述两种硫酸软骨素相同的糖基组成、异头体构型和糖基连接方式。不同处在于糖链上无硫酸酯基。

一般认为软骨素可能是硫酸软骨素生物合成的中间体(未修饰母体)，但在角膜、主动脉、白细胞、胎盘、羊水及尿中都有其存在，特别是未足月胎盘中软骨素含量较高。由于硫酸软骨素制取较易，利用硫酸软骨素脱硫酸反应制软骨素极其方便，其反应如下：



第一步硫酸软骨素甲酯化及脱硫酸化在HCl/CH₃OH中反应完成，继之在氢氧化钾中皂化去甲酯，即第二步反应。

【试剂】

无水甲醇(试剂甲醇以无水硫酸钠干燥，过滤备用)，乙酰氯，0.1 mol/L 氢氧化钾。

【操作】

以碱解法制得的牛(或猪)鼻软骨硫酸软骨素粗制品作原料。取粗制品按 1:20(mg/mL)溶于 5% 氯化钠,离心去不溶物,加入 1.25 体积无水乙醇,放置过夜,离心收集沉淀,依次以 60% 乙醇、无水乙醇、丙酮洗涤,60°C 下,真空干燥,即为可供下步反应用的硫酸软骨素精品(主要为 4-硫酸软骨素,但含少量异构体)。

取预先研成细末并干燥的上述精制聚糖 5 克,加至预先配制的 1000 mL 甲醇与 5 mL 乙酰氯的混合液中(混合 2~3 小时后供用),室温下(25~30°C),在加塞烧瓶中进行电磁搅拌,24 小时后,反应混合液经离心收集悬浮沉淀,另以新配制的酸性甲醇在相同条件下重复反应两次,每次一天。第三次收得的沉淀,溶于 100 mL 水,加 600 mL 乙醇,离心沉淀,再以无水乙醇、丙酮脱水,得 2.4 克软骨素甲酯。取 2 克软骨素甲酯,溶于 100 mL 0.1 mol/L 氢氧化钾中,室温放置一天,加入含 10 mL 水、1 mL 冰乙酸、1 克乙酸钠的混合液,再加乙醇 400 mL,离心所得沉淀依次经 80% 乙醇、无水乙醇、丙酮洗涤干燥,得成品 1.5 克, $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ$ 。

【讨论】

(1) 本制备中,要求无水条件(包括原料干燥)较严,否则会引起糖链断裂的副反应。

(2) 脱硫酸基反应系非均相反应,硫酸软骨素粉碎程度及连续搅拌也十分重要。

【文献】

Schubert, M., *Methods in Carbohydrate Chemistry*. 5: 109 (1965).

(樊芸曾)

7. 硫酸皮肤素的分离提取

硫酸皮肤素(dermatan sulfate)是以 α -L-艾杜糖醛酸和 2-乙酰氨基-2-去氧-4-O-硫酸基- β -D-半乳糖分别通过(1 \rightarrow 3)和(1 \rightarrow 4)糖苷键连结的多糖。在猪皮、牛肺中含量较高,也可在腱、主动脉、心瓣等组织中检出。猪皮经蛋白酶作用而释放各种 GAG,后者可在控制的盐浓度下,利用季铵盐分级沉淀除去透明质酸和肝

素，获得杂有硫酸软骨素的硫酸皮肤素制剂。制剂中的硫酸皮肤素通过在碱性条件下与班氏试液(Benedict reagent)生成不溶性铜复合物而与杂质分离纯化。

【试剂】

结晶木瓜蛋白酶；酶反应缓冲液：0.5 mol/L氯化钠中含0.01 mol/L乙二胺四乙酸和0.01 mol/L盐酸半胱氨酸(pH 6.5)；10%氯化十六烷基吡啶；班氏试液：173克枸橼酸钠，100克无水碳酸钠溶于800 mL水中，加热助溶，冷后加入100 mL含17.3克硫酸铜的水溶液，加水稀释到1000 mL，并过滤；助滤剂Celite。

【操作】

猪皮经丙酮脱脂干燥并磨碎后供用。1 kg猪皮干燥制剂混悬于5 L缓冲液中，加入7500单位结晶木瓜蛋白酶，65~70°C下保温，搅拌50小时。向酶解液中加入100克Celite作助滤剂，经含300克Celite衬垫的直径27 cm的布氏漏斗过滤，滤瓶以2升0.5 mol/L氯化钠淋洗。滤液和洗液合并，继加75 mL 10%氯化十六烷基吡啶沉淀GAG。混合液在室温过夜。加入25克助滤剂，采用以10克助滤剂作衬垫的14cm布氏漏斗过滤，收集沉淀。将滤瓶悬于250 mL解离液(2 mol/L氯化钠：无水乙醇=100:15 V/V) 40°C下搅拌30分钟，经垂熔漏斗过滤，此操作再以100 mL上述解离液重复两次。合并液以3倍体积水稀释，出现的絮状沉淀以离心法收集。以100 mL上述解离液溶解，加入3倍体积无水乙醇，离心所得沉淀溶于由200 mL 1 mol/L氯化钠和40 mL乙醇配成的混合液中，再以3倍体积乙醇沉出聚糖。沉淀溶于100 mL水中，复以乙醇沉淀，经乙醇洗涤沉淀两次，丙酮洗一次后，于五氧化二磷存在下真空干燥，得粗制剂2.4克。

将粗制剂溶液与10 mL饱和氢氧化钠和80 mL班氏试剂混合。10分钟后以离心法收集胶状沉淀。用由水：饱和氢氧化钠：班氏试液=10:1:2(V/V/V)组成的混合液150 mL洗涤沉淀两次，将已洗涤的沉淀立即溶于最少量4 mol/L乙酸中，以氢氧化钠

中和后稀释至 100 mL 对流动水透析过夜。透析液通过强酸型阳离子树脂 50×4 (50~100 目, H⁺ 型) 2.2×20 cm 柱脱铜, 流速 5 mL/分, 收集瓶中先放入 10 mL 5% 碳酸氢钠。上述脱铜液以乙酸调至 pH 4~5, 浓缩至 20 mL 左右, 后加入两倍体积乙醇(有时可加入少量 2 mol/L 氯化钠以利硫酸皮肤素沉淀), 离心收得沉淀经无水乙醇、乙醚洗涤, 在室温下真空干燥(五氧化二磷), 得量 0.85 克, $[\alpha]_D^{20} = -70^\circ$ 。

【讨论】

(1) 以铜盐沉淀法分离纯化硫酸皮肤素, 简便、快速, 而且成品纯度好。由于沉淀时使用强碱条件, 在使糖肽链断裂的同时, 也可能引起部分糖链降解。

(2) 成品中含少量葡萄糖醛酸, 是硫酸皮肤素糖链中嵌入硫酸软骨素片段引起的, 来源于硫酸皮肤素生物合成过程中不完全修饰(指糖链中葡萄糖醛酸在差向异构化酶作用下转化为艾杜糖醛酸的酶促反应)。这部分片段可利用透明质酸酶的特异降解作用去除之。但由于酶的内切作用, 会引起聚糖平均分子量的降低。

【文献】

Cifonelli, J. A., et al., *Biochemical Preparations*, 12: 5 (1968).

(樊绘曾)

8. 肝素的分离提取

肝素(heparin)是随来源不同而在结构上极不均一、在聚合程度上高度分散的一类 GAG, 其主要代表的重复双糖单位为 2-O-硫酸基- α -L-艾杜糖醛酸和 2-N-硫酸基-2 去氧-6-O-硫酸基- α -D-葡萄糖通过(1→4)连接而成(又称三硫酸双糖单位)。同时糖链中还含有 β -D-葡萄糖醛酸和 2-N-硫酸基-2 去氧-6-O-硫酸基- α -D-葡萄糖通过(1→4)连结的双糖单位(又称二硫酸双糖单位)。从牛肺、猪肠粘膜分离获得的商品肝素平均分子量在 12 000 左右, 而从大鼠皮肤、小鼠肥大细胞瘤所得肝素平均分子量达一百万, 又称大分子肝素。商品肝素中三硫酸双糖单位和二硫酸双糖单位以 2:1 比值存在。

猪肠粘膜肝素用对其化学稳定的碱性水液提取，经热变性除去大量杂蛋白后，由于提取液所含盐浓度(0.6~0.8 mol/L)可保证强碱型阴离子树脂对肝素的强烈吸附交换，同时防止对杂质蛋白质或核酸吸附交换，后以递升浓度的盐液分级洗脱，肝素仅在高浓度盐液洗下。所得粗制肝素，利用等电点(pH 1.9)和乙醇分级除去混杂的酸性蛋白和低硫酸 GAG。

【操作】

新鲜猪肠粘膜按 5% 量加入氯化钠，在水浴中加温至 55°C，以 5 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 9.0~9.5，搅拌保温 2 小时，后升温至 95°C，保温 15 分钟，过滤除去凝聚物。待放冷至温度 40°C 时按滤液体积的 3% 加入 29Q(Cl⁻型)树脂，搅拌 1 小时，抽滤分取树脂，用水冲洗至水液澄清为止。收集树脂，以 2 倍于树脂体积 1.4 mol/L 氯化钠洗涤，搅拌 0.5 小时，继以 2 倍体积 1.3 mol/L 氯化钠搅拌 0.5 小时，收集树脂，先后以 1.5 倍体积和 1 倍体积的 4 mol/L 氯化钠搅拌洗脱，每次 1 小时，合并洗脱液，加等体积乙醇沉淀，离心收集沉淀，后者以 1:20 溶于水，再加等体积无水乙醇，沉淀依次经乙醇、丙酮洗涤，即得粗制肝素。

粗制肝素按 1:20 溶于水中，加 6 mol/L 盐酸调 pH 至 1.9，出现沉淀立即离心除去，以 5 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 11.0，按清液体积的 5% 加入 30% 过氧化氢，60°C 下保温 1.5 小时(反应过程中 pH 下降，应加碱调整)。放冷，以 6 mol/L 盐酸调 pH 至 6.5~7.0，加入氯化钠，使浓度达 5%，加等体积乙醇，低温放置过夜，离心收集沉淀，以乙醇、丙酮依次洗涤，脱水，干燥。[α]_D²⁰ = +48°。本品抗凝效价为 165 u. s. p 单位/mg。

【讨论】

(1) 肝素的盐解提取工艺虽和其他 GAG 的提取法颇不雷同，没有酶解之类的步骤，但必须注意到猪肠粘膜在盐水提取前已经历广泛的组织自溶以及肠粘膜中所含的细菌的降解作用。

(2) 利用阴离子树脂吸附肠粘膜提取液中微量肝素所起的浓缩效果以及树脂不断再生反复使用的经济效益，极大提高了本方

法的工业化应用价值。由本法生产的商品肝素是临目前床应用的主要来源。

(3) 鉴于肝素结构和活性的不均一性,即使同种来源,例如猪肠粘膜肝素,仍可按其钡盐的溶解度、不同分子量范围以及对抗凝血酶 III 亲和性的差异进行再分级,获得在化学组成分析上基本一致,而在抗凝、降血脂及抑制免疫活性、溶血活性等方面迥异的各种组分。

【文献】

上海生物化学制药厂,医药工业,1977 (3) (24)。

Nader, H. B., et al., *Int. J. Biol. Macromol.* 3: 356 (1981)。

Biachini, P., et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 220: 406 (1982)。

(樊绘曾)

9. 硫酸类肝素(或硫酸乙酰肝素)的分离提取

硫酸类肝素,又称硫酸乙酰肝素, Heparan Sulfate 是在结构上近似于肝素的一类 GAG, 其组成包括由 β -D-葡萄糖醛酸和 2-乙酰氨基-2-去氧-6-O-硫酸- α -D-葡萄糖通过 (1 \rightarrow 4) 连结的双糖单位和以 α -L-艾杜糖醛酸与 α -N-硫酸基-2-去氧-2-氨基-D-葡萄糖通过 (1 \rightarrow 4) 连接的双糖单位。平均每一双糖单位含硫酸基的比值可为 0.5~2.0。硫酸类肝素的化学组成视不同来源而异。不同硫酸类肝素在分子量分布、电泳迁移率、乙酰基及硫酸基含量以及艾杜糖醛酸与葡萄糖醛酸比例等方面有明显不同。硫酸类肝素广泛存在于动物细胞表面,但制备材料主要限于牛肺、人脐带。

经蛋白酶消化的牛肺组织释出的多糖除硫酸类肝素外,还有硫酸皮肤素、硫酸软骨素和肝素等多种 GAG。所得粗糖中尚含核酸。其中硫酸皮肤素借助于前者 and 班氏试液的铜盐生成沉淀除去,6-硫酸软骨素借助透明质酸酶降解法除去,核酸的去除利用去氧核糖核酸酶和核糖核酸酶。硫酸类肝素和肝素借助于离子交换层析法分级,两者分别在低浓度盐液和高浓度盐液洗脱。

【试剂】

结晶木瓜蛋白酶, E. Merk 产品; 链霉蛋白酶 120 000 u/g,

上海生化研究所东风试剂厂；去氧核糖核酸酶 800 U/mg；核糖核酸酶 44 U/mg；睾丸透明质酸酶 20 000 I·U/mg，上海生化制药厂；0.005 mol/L 乙二胺四乙酸-0.005 mol/L 半胱氨酸-0.1 mol/L 乙酸缓冲液 (pH 5.5)；班氏试液。

【操作】

新鲜牛肺除尽软骨等杂质，绞碎后置于 4 倍体积丙酮中脱水，每天倾泻更换丙酮，重复两次。滤干残渣，在 20~25°C 干燥后粉碎至细末备用。取 1 kg 上述丙酮粉混悬于 5 升乙酸缓冲液中，加入 7500 单位的结晶木瓜蛋白酶，60°C 下保温 24 小时，以 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷溶液调反应液 pH 至 7.3，按反应液体积每升加 0.2 克链霉菌蛋白酶，37°C 下水解 2~5 天，离心取清液，对蒸馏水透析一天。后按每升透析液，加 50 mL 氯化十六烷基吡啶比例，在搅拌下滴加，5°C 下保持一天，离心取沉淀，后者以氯化钠饱和的 95% 乙醇洗涤两次，再以无水乙醇洗涤，在五氧化二磷中真空干燥，得粗聚糖混合物 7 克。

将上述粗聚糖溶于 350 mL 0.125 mol/L 乙酸钠-0.05 mol/L 氯化镁溶液中，加入 70 mg 去氧核糖核酸酶及 35 mg 核糖核酸酶，37°C 保温两天。以离心法取清液，按其体积加入 2 倍体积乙醇，5°C 静置一天，离心所得沉淀，依次以 80% 和 95% 乙醇洗涤干燥。

取上述除去核酸的粗聚糖 1 克，溶于 100 mL 水中，加入 10 mL 饱和氢氧化钠溶液及 80 mL 班氏试液，置 20~25°C 1 小时，以离心法去胶状沉淀，沉淀以 150 mL 10:1:2 (V/V/V) 水:饱和氢氧化钠溶液:班氏试液洗涤，将清液与洗液合并，以 4 mol/L 乙酸中和，然后对蒸馏水透析。经透析的溶液，通过强酸型阳离子树脂 AG5×4(H⁺) 柱 (2×25 cm)，以 100 mL 水洗柱，合并流出液及洗液，加入 1.25 克乙酸钙，减压下将上述混合液浓缩至约 4 mL，加入 2 倍体积乙醇，冷藏一天后离心，以 95% 和无水乙醇洗涤干燥。

按上步所得粗聚糖按 1:200 溶于 0.2 mol/L 氯化钠，通过相当 200 克强碱型阴离子树脂 AG1×8(Cl⁻) (200~400 目) 柱 (3×45 cm)，顺序以 0.5、0.9、1.2、1.4、1.6 和 2.0 mol/L 氯化钠各

500 mL 分级洗脱, 按 5 mL/管收集, 测定各管己糖醛酸含量. 将 0.9、1.2、1.4 mol/L 各段中高峰管分别归并, 透析脱盐并减压浓缩冻干. 从不同段所得的硫酸类肝素中硫酸基含量不同, 低浓度洗脱部分硫酸基含量低.

成品需经半乳糖胺检查, 如为阳性, 将聚糖样品以 1:100 溶于含 0.15 mol/L 氯化钠的 0.1 mol/L 乙酸缓冲液中 (pH 6.0), 加入透明质酸酶, 使每毫升反应液达 500 单位, 37°C 下保温 24 小时, 加入 2 倍体积乙醇, 离心回收聚糖即得.

【讨论】

(1) 本法系以牛肺为起始原料进行聚糖提取分离, 若以工业生产牛肺肝素的副产物为原料既缩短流程又可收综合利用之益. 所谓肝素副产物系指低盐浓度氯化钠洗脱树脂吸附的牛肺 GAG 部分.

(2) 本法中除去核酸时采用核酸酶降解法. 若在氯化十六烷基吡啶沉淀后, 以 0.6 mol/L 氯化钠解离, 即可除去核酸. 牛肺是制取硫酸皮肤素的重要原料之一. 以班氏试液所得硫酸皮肤素铜盐沉淀, 可以一步纯化该聚糖, 其化学组成和猪皮来源的不全相同.

【文献】

Linker, A., *Methods in Carbohydrate Chemistry*. 7: 89, Acad. Press, New York, 1976.

(樊绘曾)

10. 硫酸角质素的分离提取

硫酸角质素 (keratan sulfate) 主要由 β -D-半乳糖和 2-乙酰氨基-2-去氧-6-O-硫酸基- β -D-葡萄糖分别通过 (1 \rightarrow 4) 和 (1 \rightarrow 3) 连结而成的重复双糖单位组成. 在相应的角膜和软骨蛋白聚糖中, 硫酸角质素糖链与核心蛋白的糖肽键和其他 GAG 与核心蛋白的糖肽键不同, 前者糖链还原性端基和天冬酰胺的氮原子成键, 后者则和苏氨酸羟基的氧原子形成糖肽键. 根据来源, 硫酸角质素分角膜硫酸角质素 (KSI) 和软骨硫酸角质素 (KSII). 硫酸角质素实际组成和结构远比上述的重复双糖单位复杂, 它可能含有支链结构, 并含杂有诸如甘露糖、岩藻糖、木糖、唾液酸和半乳糖胺等糖基, 其

中有些是位于糖链的非还原性末端。另外，不同来源 KSI 和 KSII 中的硫酸基也不均一，部分硫酸基位于半乳糖 C₆ 上。

鉴于角膜硫酸角质素可被强碱型阴离子交换树脂强烈吸附，仅高浓度氯化钠方能洗脱，而组织的蛋白酶水解液中其他聚糖（主要是软骨素及硫酸软骨素）都可以在低盐浓度下洗脱，所以很易分离纯化。洗脱软骨硫酸角质素的盐浓度比角膜硫酸角质素低，与硫酸软骨素相近，故在高峰管中可杂有硫酸软骨素，视需要通过乙醇分级除去之。

【试剂】

结晶木瓜蛋白酶；0.01 mol/L 乙二胺四乙酸-0.01 mol/L 盐酸半胱氨酸缓冲液（pH 6.5）；莫氏试液（0.4 g α -萘酚加至 100 mL 浓硫酸中）。助滤剂 Celite。

【操作】

(1) 600 克（湿重）牛角膜在 1 升缓冲液中加 1 克木瓜蛋白酶消化，在 65°C 下保温 24 小时。经助滤剂 Celite 去除不溶性残渣，滤液浓缩至 500 mL，加入 4 倍乙醇，使沉淀。所得糖浆状沉淀溶于水，除去不溶性杂质，水液对蒸馏水透析 24 小时（换水数次），沉淀经助滤剂过滤除去，得粗糖混合液约 2 升。经强碱型树脂 Dowex 1 \times 2 (Cl⁻) 柱 (11 \times 30 cm)，按次以水 (3~4 升)，1.0、1.5、2.0、3.0、和 4.0 mol/L 氯化钠洗脱，以莫氏试液测试，每步洗脱体积 3~6 升，分别收集于若干管中。

2.0、3.0、4.0 mol/L 氯化钠洗脱液中含硫酸角质素，各管分别归并后透析和浓缩，用 4 倍乙醇沉淀。必要时加乙酸钠至 1~2%，使沉淀完全。沉淀依次用乙醇、丙酮洗涤，干燥。3.0、4.0 mol/L 流分的 KSI 分别占总得量的 74% 和 5%，2.0 mol/L 流分中硫酸角质素占总得量的 21%，若成品中检查含半乳糖胺，表明含硫酸软骨素杂质，可按下法除去：取 2.0 mol/L 流份聚糖 1.19 克溶于 112 mL 含 5% 乙酸钙的 0.5 mol/L 乙酸中，搅拌下加入乙醇，使乙醇浓度至 40%，混合液于 4°C 放置 3 小时，离心后清液加乙醇至 66%，收集沉淀，先后以 80% 乙醇、无水乙醇、丙酮洗

液，即得纯品 KSI，由 2.0、3.0、4.0 mol/L 洗脱的 KSI 的硫酸基和氨基葡萄糖的分子比值分别为 1.04、1.23 和 1.29。

(2) 500 克牛鼻软骨丙酮粉混悬于缓冲液 (pH 6.5) 中，以 250 mg 木瓜蛋白酶在 65°C 下水解 24 小时。经助滤剂 celite 除去不溶物，清液加 1.25 倍体积乙醇沉淀 (沉淀部分主要为 4-硫酸软骨素)，清液经浓缩去乙醇后对蒸馏水透析，取相当含 1.0~1.2 克己糖胺的聚糖水液，加样于 Dowex 1×2 (Cl⁻ 型) 柱，顺序以蒸馏水、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 mol/L 氯化钠洗脱，KSII 主要集中于 1.5 mol/L 和 2.0 mol/L 氯化钠洗脱液中 (两者分别占总得量的 40% 和 30%)，而 3.0 mol/L 和 4.0 mol/L 中含 KSII 分别各占 10%。

— 1.5 mol/L 和 2.0 mol/L 洗脱液经检查，若含硫酸软骨素，则参照角膜硫酸角质素中所述乙醇分级法先除去杂质，后以乙醇沉出。1.5、2.0、3.0、4.0 mol/L 洗脱的 KSII 中硫酸基与葡萄糖胺分子比值分别为 0.75、0.93、1.07 和 1.08。

【讨论】

(1) 由于角膜硫酸角质素的糖肽键以及两种硫酸角质素聚糖结构的特点，若以碱法提取，不能降解角膜硫酸角质素糖链与核心蛋白间的糖肽键，却使两种聚糖中葡萄糖胺 C₆ 的硫酸基脱落，形成 3, 6-内醚葡萄糖胺，因此酶法降解成为提取硫酸角质素的唯一途径。

(2) 由于硫酸角质素和季铵盐不能形成溶解度很小的复合物，所以分离纯化时主要依靠离子交换层析法。

(3) 不同氯化钠浓度下洗脱的硫酸角质素的组成不同，说明此聚糖明显的不均一性。

【文献】

Rochen, L., et al., *Methods in Enzymology*, 28: 73 (1972).

(樊芸曾)

11. 刺参粘多糖的分离提取

刺参粘多糖是存在于海参纲动物刺参体壁和内脏中的一种硫

酸粘多糖,其一级结构尚未阐明(因此称为刺参粘多糖,而不称为糖胺聚糖或蛋白聚糖)。组成分析表明其中含半乳糖胺、葡萄糖醛酸、岩藻糖三种糖基并高度硫酸酯化,具有对抗实验肿瘤、促进机体免疫功能和抗凝血作用。和肝素不同,它的抑制凝血酶的作用不依赖于抗凝血酶 III。其他海参纲动物体壁中也有十分类似的多糖存在。

提取时使用蛋白水解酶降解组织蛋白,所得多糖混合物利用粘多糖与钾离子生成水溶性差的钾盐,去除与其共存的杂质多糖,从而得以提纯。下列方法基本适用于多种海参体壁粘多糖的提取与纯化。

【试剂】

胃蛋白酶(1:3000);胰匀浆:新鲜猪胰,剔除脂肪组织等,切碎加等量蒸馏水,按每克胰脏加入 1 mg 胰蛋白酶,在组织捣碎机中制成匀浆,冷藏备用。4mol/L 乙酸钾缓冲液(pH 7.0)。

【操作】

取绞碎刺参体壁,加 0.15 倍体积水,并加适量甲苯防腐,于 50°C 下,不断搅拌数小时,至参体逐渐由稠变稀,用盐酸调 pH 至 2.0~2.5,按投料量加入 0.4% 胃蛋白酶,50°C 保温,继续搅拌,保持原 pH,酶水解 14 小时后终止。上述酶解液用 5 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 8.5,加入预先化冻胰匀浆,用量为刺参量的 0.15 倍。搅拌,调 pH 至 8.5,在 50°C 下继续酶解,保持 pH 8.5,8 小时后终止反应。加热至近沸,趁热过滤,待冷至室温后,用稀盐酸调滤液 pH 至 7.0 左右,缓缓加入乙醇,使含醇量达 40%,4°C 过夜,即有沉淀析出,次日离心收集沉淀,用乙醇-丙酮顺序洗涤,脱水,干燥,即为刺参粘多糖粗品,得率为 0.4% 左右。

取上述粗品按 1:20(mg/mL)用水溶解,离心去不溶物,清液加氢氧化钾使成 1 mol/L,60°C 保温 1 小时,用乙酸中和,加乙酸钾,使总钾盐浓度为 2 mol/L,冷藏过夜,冷冻离心收集沉淀部分,用适量水溶解,氢氧化钾调 pH 至 10~11,在 60°C 下加 30% 过氧化氢(用量为样品体积的 5%),合计 1 小时,冷却后,加等体

积 4 mol/L 乙酸钾缓冲液 (pH 7.0), 冷藏过夜, 冷冻离心所得沉淀依次用 80% 乙醇、无水乙醇、丙酮充分洗涤至干, 成品即刺参粘多糖(钾盐)。

【讨论】

(1) 联合使用胃蛋白酶及胰组织匀浆由刺参体壁提取多糖效果较好, 胰组织匀浆来源方便, 制备简单。

(2) 以乙醇沉淀酶解时, 乙醇浓度不宜过高, 以 36~40% 为佳。此浓度下沉淀的粗多糖中粘多糖的含量高, 而杂质如聚岩藻糖硫酸酯较低。以此为基础, 进行乙酸钾沉淀方能得纯一的刺参粘多糖。

(3) 纯一的产品, 如加至 60°C 下温热的 0.5 mol/L 乙酸钾溶液 (pH 7.0) 使之饱和后静置冷却, 可呈结晶析出, $[\alpha]_D^{19.5} = 68.7^\circ$ 。

【文献】

樊绘曾等, 药学学报, 15: 263(1980)。

樊绘曾等, 中药通报, (4): 27(1982)。

(樊绘曾)

(二) 糖胺聚糖(GAG)的组成分析及定量测定

糖胺聚糖(GAG)主要由己糖胺和己糖醛酸(或己糖)的重复双糖单位构成。其中己糖胺包括葡萄糖胺和半乳糖胺; 己糖醛酸包括葡萄糖醛酸和艾杜糖醛酸; 己糖指半乳糖; 另外还有 6-去氧己糖, 即岩藻糖。多数 GAG 无论经蛋白酶降解或碱降解提取, 除硫酸角质素(可能包括透明质酸)外, 都含有木糖和半乳糖组成的寡糖连结区($\rightarrow\text{Gal}\rightarrow\text{Gal}\rightarrow\text{Xyl}\rightarrow$), 硫酸角质素的侧链结构中含甘露糖、岩藻糖及唾液酸等, 这些“杂糖”仅占总糖量的极小部分。半乳糖在硫酸角质素中, 约占总糖量的一半, 岩藻糖在刺参粘多糖中约占总糖量的三分之一。另外, 多数 GAG 分子中含数量不同的硫酸基(包括 O-取代和 N-取代)。本文着重介绍己糖胺、己糖醛酸、己糖、6-去氧己糖和硫酸基的测定方法。

GAG 的组成分析不仅提供了某种 GAG, 或由某种 GAG 再分级所得的各个组分的化学组成的信息, 而且可以根据已知的各

种 GAG 的组成糖基及各成分间的分子比值有助于确定新发现的 GAG 的基本特征。当然,阐明新的 GAG 结构有赖于包括物化、化学、酶学以及免疫学技术在内的各种结构测定方法的运用。此外,个别组成分析方法还可用于某种 GAG 的定量。在 GAG 提纯过程中,选用灵敏、简便的组成分析方法对分级沉淀,解离液或洗脱液进行示踪或鉴别更是必不可少的

根据对 GAG 中己糖胺、己糖醛酸、硫酸基及其他己糖的鉴别测定和含量分析结果,可将其分为六类:

- (1) 透明质酸:含葡萄糖胺、己糖醛酸,不含硫酸基;
- (2) 软骨素:含半乳糖胺、己糖醛酸,不含硫酸基;
- (3) 4-硫酸软骨素、6-硫酸软骨素和硫酸皮肤素:含半乳糖胺、己糖醛酸和硫酸基,其中硫酸皮肤素通过己糖醛酸的 C/O 比值测定而与硫酸软骨素相区别;
- (4) 刺参粘多糖:含半乳糖胺、己糖醛酸和硫酸基,并含岩藻糖;
- (5) 肝素及硫酸类肝素:含葡萄糖胺、己糖醛酸和硫酸基。后者在 C/O 比值以及 O-硫酸基及 N-硫酸基的含量上都有明显差异;
- (6) 硫酸角质素:含葡萄糖胺、己糖及硫酸基,不含己糖醛酸。

下述 GAG 组成分析方法是目前国内外有关实验室的常用方法。简便、灵敏、专一性高是多数方法的共同点。必须指出,企图通过鉴别,得到定量而组成比准确的样品,应预先经过纯度鉴定——经超离心分离、电泳和色谱等法中的两类方法测试而确认为“单一”GAG 者。

(樊绘曾)

1. 糖胺聚糖(GAG)的电泳法

(i) 糖胺聚糖(GAG)乙酸纤维素膜双向电泳法

GAG 是多聚阴离子,各种 GAG 所带电荷密度不同,泳动率不同。在两种缓冲液中,依次在两个方向进行电泳,可将 GAG 清晰地分离开来。

【试剂】

乙酸纤维素膜; GAG 标准液, 含 HA、DS、HS、HP、C-4-S、C-6-S、KS 的溶液; 0.1 mol/L 吡啶-0.47 mol/L 甲酸溶液 (pH 3.0); 0.1 mol/L 乙酸钡 Ba(Ac)₂ (新鲜配制); 脱色液; 含 10% (V/V) 乙醇, 0.1% (V/V) 冰乙酸的 0.03 mol/L 氯化镁溶液; 染色液: 将阿利新蓝按 0.2% (mg/mL) 溶于脱色液中。

【操作】

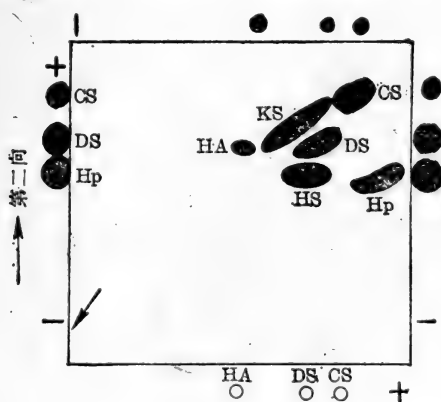
(1) 将乙酸纤维素膜裁成 8×8 cm², 小心平放入盛有 0.1 mol/L 吡啶-0.47 mol/L 甲酸 (pH 3.0) 电泳液的盘子中, 使它漂浮于液面上, 迅速润湿, 若整块薄膜深浅一致, 则表明薄膜质地均匀, 可使用。若润湿时, 在薄膜上出现深浅不一的条纹或斑点时, 表明薄膜质地不匀, 应重新选膜。

将选用的薄膜用镊子轻压, 使之全部浸入缓冲液中, 浸泡 30 分钟后取出, 夹在清洁的滤纸中, 轻轻吸去多余的缓冲液。

(2) 制作“滤纸桥”。剪裁合适的滤纸条, 取双层附着在电泳槽支架上, 使其一端与支架前沿对齐, 另一端浸入缓冲液中。

(3) 将 0.1 mol/L 吡啶-0.47 mol/L 甲酸电泳液倒入电泳槽内, 用平衡装置使两极槽内液面平衡 15 分钟。

(4) 在膜无光泽的一面点样。点样区位于 8×8 cm² 正方形



第一向
 □ GAG 双向电泳图谱

薄膜右下角离边缘 1×1 cm 处。将毛细管头印在点样区内，管内的样品即可自动被“吸”到薄膜上（注意切不可用力把膜弄破）。

(5) 将点样的薄膜架在电泳槽支架的滤纸桥上，无光泽面向下，平衡 10 分钟后，通电 55 分钟 (8 V/cm)。

(6) 第一向电泳完毕后，取出薄膜，用电风扇吹至半干，更换 $0.1 \text{ mol/L Ba}(\text{Ac})_2$ 电泳液，重复 2、3 步骤。将半干的薄膜浸泡于 $0.1 \text{ mol/L Ba}(\text{Ac})_2$ 电泳液中 1~2 分钟，待浸透后取出，架在电泳支架上，方向与第一次电泳方向成 90° ，平衡 10 分钟，通电 60 分钟 (8 V/cm)。

(7) 染色。电泳完毕，取下薄膜，浸泡于染色液中染色 30 分钟，然后在四个漂洗盘中分别漂洗 10、5、15、5 分钟，洗去多余的染料。再将薄膜夹在干净的滤纸中，吸去多余的电泳液。

【文献】

Hata, R., et al., *Anal. Biochem.*, **52**: 652~656 (1973).

(刘秉慈)

(ii) 糖胺聚糖(GAG)在乙酸铜缓冲液中的电泳

在乙酸铜电泳液中，以 HA 作标准，各种 GAG 的迁移率为：HA, 1.00; HS, 1.43; DS, 1.57; C-4-S, 1.66; C-6-S, 1.68; KS, 1.86; Hp, 2.02.

【试剂】

电泳液：20 g 乙酸铜，100 mL 冰乙酸，加 900 mL 去离子水 (pH 3.1)。

表 50 GAG 在不同缓冲体系中电泳的相对迁移率

电 泳 液	pH	Hp	C-4-S	C-6-S	DS	HS	KS	HA	CS
0.1 mol/L 吡啶-0.47 mol/L 甲酸	3.0	1.1	1.0	1.00	0.91	0.87	0.85	0.63	0.64
0.1 mol/L 磷酸盐	6.7	1.1	1.0	1.00	1.0	0.86	0.77 ^a	0.68	0.72
0.1 mol/L 乙酸钡	8.0	0.61	0.93	1.00	0.78	0.61	0.83	0.74	0.74
0.1 mol/L 乙酸铜	5.3	0.31*	1.1	1.00	0.94	0.70 ^a	1.2 ^a	0.43	0.76
0.1 mol/L 乙酸锌	6.3	0.88*	0.97	1.00	0.84	0.76	0.93	0.68	0.74
0.1 mol/L 乙酸铜	2.6	0.87	1.0	1.00	—	0.74	1.1	—	—

* 呈宽带。

其他参见 GAG 双向电泳法。

【操作】

同 GAG 双向电泳法，仅有如下改动：乙酸纤维素膜大小为 $2 \times 8 \text{ cm}^2$ 。在距阴极端 1.5 cm 处点样，注意使样品均匀分布在点样区而形成具有一定宽度、粗细均匀的直线。电泳条件为 0.4 mA/cm ，通电 80 分钟。

【讨论】

GAG 乙酸纤维素膜电泳方法很多，表 50 列举了八种 GAG 在 6 种缓冲液中的相对迁移率。

【文献】

Hronowski, L., *Anal. Biochem*, **93**: 60 (1979).

(刘秉慈)

(iii) 电泳法中各种糖胺聚糖(GAG)相对含量的测定

GAG 经乙酸纤维素膜电泳法分离后，用阿利新蓝染色，可生成 GAG-阿利新蓝复合物。该复合物在含有 0.094 mol/L 硫酸的二甲基亚砷溶液中充分分解，并具有最大的光吸收。

【试剂】

二甲亚砷(分析纯)内含浓硫酸 0.094 mol/L 。(其他参看“双向电泳法”)

【操作】

(1) GAG 乙酸纤维素膜电泳及染色方法同前。

(2) 将染色的乙酸纤维素膜晒干后，把着色的各条 GAG 区带剪下，并在染色区带前剪下大小相同的一条空白带用作对照。

(3) 将相应的膜带放入试管中，加含 0.094 mol/L 硫酸的二甲基亚砷 2 mL ，放在 37°C 水浴中 30 分钟，充分震摇使乙酸纤维素膜溶解，冷却后，于 677 nm 处测定光吸收。

【讨论】

由于染色本底的存在，作为对照的空白区带应与染色的 GAG 区带大小相同。

【文献】

(刘秉慈)

(iv) 糖胺聚糖(GAG)的琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶电泳技术在 GAG 分离制备和鉴别定量方面的应用于近年日益受到重视,随着新的电泳缓冲液的引入,特别是在把有关工具酶对各种 GAG 的特异降解作用和各种 GAG 季铵盐复合物有不同的解离盐浓度等性质成功地和电泳技术结合以后,大大提高了琼脂糖电泳对各种 GAG 的鉴别能力,并扩大了它的应用范围. 此处介绍的方法可用于 GAG 的鉴别或制备中的纯度鉴定.

一般而言, GAG 在巴比妥缓冲液中相对电泳迁移率决定于它们的电荷密度,即电荷密度愈高,迁移率愈大;而在二胺类缓冲液系统中迁移率取决于 GAG 与二胺类相结合的程度. 除透明质酸和硫酸角质素外,其他 GAG 由于和二胺化合物发生静电结合引起“表观”电荷密度的降低而使电泳迁移率降低. 原阴离子密度最高的肝素,其迁移率在此类缓冲液中最低. 硫酸软骨素和硫酸皮肤素电荷密度相同,但由于空间结构不一,而影响其和二胺类结合,因此在二胺类缓冲液中的电泳迁移率也不同. 在丙二胺缓冲液中刺参粘多糖的泳动速度最慢,而在癸二胺系统中肝素和刺参粘多糖则不发生泳动.

【试剂】

巴比妥缓冲液 0.06mol/L (pH 8.5); 1,3-丙二胺 0.05mol/L (pH 8.5); 1,10-癸二胺 0.03 mol/L (pH 10.3); 十六烷基三甲基溴化铵溶液 0.1%; 甲苯胺蓝溶液 0.1% (以乙酸:乙醇:水=0.1:5:5 配制); 脱色液(即染色液的空白溶剂).

【操作】

以上述三种缓冲液配制 0.5% 琼脂糖液, 65°C 水浴中加热至溶. 取 4.5 mL 该液加至已调至水平的 6×10 cm 玻璃板上, 室温下放置, 凝固(约 10 分钟)后挖孔加样. 加样量 1 微升含 2~4 微克(样品及标准糖胺聚糖分别以不同缓冲液配制样液, 各样液中加入少量甲酚红作示踪剂), 加样完毕, 将板两端以粗布或数层厚

滤纸与电极缓冲液相连。固定电压 150 V, 电泳 1.5~2.5 小时, 视示踪剂移动 3.5 cm (巴比妥缓冲液) 或 4.5 cm (二胺系统) 时停止通电。

。电泳结束后, 将凝胶板置于十六烷基溴化铵液中 1 小时 (最好保持 25°C 左右), 取出后测定标准 GAG 及样品的白色斑点位置。以干燥滤纸铺盖于凝胶上小心轻压脱水数次, 在 80°C 烤箱中干燥。冷却后将干板置于甲苯胺蓝液中染色 10 分钟, 以脱色液漂洗至背景无色为止 (时间宜短)。

【讨论】

(1) 在巴比妥缓冲液中, GAG 的相对电泳迁移率顺序如下: 肝素、刺参粘多糖 > 4-硫酸软骨素、6-硫酸软骨素、硫酸皮肤素 > 硫酸乙酰肝素 > 硫酸角质素 > 透明质酸; 在丙二胺缓冲液中, 4-硫酸软骨素、6-硫酸软骨素 > 硫酸皮肤素、硫酸角质素 > 透明质酸、硫酸乙酰肝素 > 肝素 > 刺参粘多糖; 在癸二胺系统中, 4-硫酸软骨素、6-硫酸软骨素 > 硫酸皮肤素 > 硫酸乙酰肝素 > 硫酸角质素、肝素、刺参粘多糖。其中硫酸角质素、肝素和刺参粘多糖保留在原点不动。由上述结果可见, 通过三种缓冲系统可鉴别大多数糖胺聚糖, 但 4-硫酸软骨素和 6-硫酸软骨素仍无法使用本法鉴别。

(2) 凝胶板以十六烷基三甲基溴化铵溶液固定后各种 GAG 均呈白色斑点。经干燥染色即呈蓝色或紫色斑点。其中透明质酸在脱色时斑点消失, 各种单硫酸 GAG 呈蓝色, 而肝素及刺参粘多糖呈红紫色。

(3) 丙二胺缓冲液可用乙二胺或己二胺代替, 所得电泳图谱中各 GAG 的相对迁移率仍保持同一趋势。

(4) 最近 Biachini 建立一种不连续琼脂糖电泳新方法。即将 GAG 样品先后在乙酸钡缓冲液 (0.04 mol/L, pH 5.8) 和丙二胺缓冲液 (0.05 mol/L, pH 9.0) 中进行单向电泳。此时可将肝素进一步分成快速 (F)、中速 (I) 和慢速 (S) 三区带, 其中硫酸类肝素和肝素 (F) 区带重叠。另外作者提出的双向电泳法, 即以巴比妥缓冲液作第一向电泳, 又以先后进行的乙酸钡缓冲液、丙二胺缓冲液

的不连续电泳作第二向电泳,可将各种 GAG 完全分离。

【文献】

Dietrich, C. P., et al., *J. Chromatogr.* **130**: 299 (1977).

Biachini, P., et al., *Ibid.*, **196**: 455 (1980).

(姜绘曾)

2. 糖胺聚糖 (GAG) 各组分的定量分析

(i) 阿利新蓝法测定糖胺聚糖 (GAG) 总量

GAG 与阿利新蓝可以迅速生成可溶性的 GAG-阿利新蓝复合物。由于 GAG-阿利新蓝复合物与阿利新蓝具有不同的光吸收,可用比色法测出 GAG-阿利新蓝复合物的含量,从而得知 GAG 的含量。

【试剂】

阿利新蓝 8GX 染液: 将阿利新蓝 8GX 按 1.4 mg/mL (W/V) 溶解于 0.5 mol/L 乙酸钠溶液中 (用前临时配制)。

GAG 标准液: 包括 HA、DS、HS、Hp、C-4-S、C-6-S、KS 的标准液。当粗略了解样品中各种 GAG 的相对含量时,应按比例配制 GAG 标准液;若样品中各种 GAG 相对含量为未知或 GAG 标准品不全时,可用 CS 做标准配制标准液。

【操作】

(1) 绘制标准曲线: 于试管中分别加入 0.1 mL 含 10、20、40、60 μg 的 GAG 标准液,空白对照管中加 0.1 mL 去离子水。准确加入 1.5 mL 阿利新蓝染液,混匀。10 分钟后,用 0.5 cm 厚度比色杯,于 480 nm 比色测定,绘制标准曲线。

(2) 样品中 GAG 总量的测定: 方法同“绘制标准曲线”,仅将 GAG 标准液 0.1 mL 改为样品液 0.1 mL 即可,通过标准曲线求出样品中 GAG 的含量。

【讨论】

(1) 本法较糖醛酸法及己糖胺法简便、迅速。使用样品量少,仅为 0.1 mL,约 10 μg 。可用于血及尿中 GAG 含量的测定。

(2) GAG 与染料可于 5 分钟内反应完毕,60 分钟后, GAG-

染料复合物生成沉淀, 将影响测定结果, 因此, 必须在混合后 10~30 分钟内比色完毕。

(3) 染料溶液能将玻璃器皿染上蓝色, 可用浓硫酸洗掉。

(刘秉慈)

(ii) 己糖胺的测定

GAG 中己糖胺须先行酸水解成单糖后, 在碱性条件下与乙酰丙酮(2, 4-二酮)反应形成生色原, 后者在酸性反应液中与对二甲氨基苯甲醛呈色, 呈色反应与己糖胺含量成线性关系。如在 80~100°C 下, 葡萄糖胺和半乳糖胺皆与乙酰丙酮反应形成生色原, 而在 0°C 下, 仅半乳糖胺发生反应。根据样品中己糖胺在两种条件下显色能力的比较, 即可鉴别己糖胺。

【试剂】

乙酰丙酮试液(A): 量取 0.3 mL 乙酰丙酮于 10 mL 0.7 mol/L 碳酸钠中, 另以固体碳酸钠调上述溶液 pH 至 9.8。

乙酰丙酮试液(B): 量取 1 mL 乙酰丙酮试液溶于 24 mL 0.5 mol/L 碳酸钠中。

对二甲氨基苯甲醛试液: 取对二甲氨基苯甲醛 0.8 克溶于 30 mL 1:1 乙醇-浓盐酸混合液中。

上述试液均需临时配制。

盐酸葡萄糖胺与盐酸半乳糖胺贮备液 1 mg/mL, 标准溶液 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

【操作】

(1) 己糖胺的鉴别:

精取样品加适量 4 mol/L 盐酸使成 8 mg/mL, 封安瓶中于 100°C 烘箱中水解 14 小时, 取 0.75 mL 稀释至 10 mL (此时盐酸浓度为 0.3 mol/L)。

低温乙酰丙酮反应: 取 0.5 mL 上述样品水解稀释液(含己糖胺量 200 μg)置于冰冷却的带塞试管中, 每管加入 1 mL 乙酰丙酮试液(A), 放置 18 小时。冷冻下, 加入 10 mL 90% 乙醇和 1 mL 对二甲氨基苯甲醛, 边加边摇, 先在 60°C 下保温 30 分钟, 后在

20~25°C 冷却 1 小时后, 测光吸收(530 nm) 为 AL 。

高温乙酰丙酮反应: 取 0.5 mL 上述样品水解稀释液于带塞试管中, 在 80°C 水浴中保温 1 小时, 又在 20~25°C 水浴中冷却 5 分钟, 加入 10 mL 90% 乙醇和 1 mL 对二甲氨基苯甲醛试液, 振摇, 1 小时后测光吸收(530 nm) 为 AH 。

$AH/AL \approx 1$, 为半乳糖胺。

$AH/AL \gg 1$, 为葡萄糖胺。

(2) 己糖胺含量测定:

标准曲线绘制: 分别取己糖胺标准溶液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mL 于带塞试管中, 各加水至 5 mL, 加 1 mL 乙酰丙酮试液(B), 置沸水浴中 25 分钟, 用冰迅速冷却后, 各管加无水乙醇 3 mL 及对二甲氨基苯甲醛 1 mL, 强力振摇, 20~25°C 下放置 1 小时, 以 0 mL 管为空白, 测光吸收(530 nm)。

样品测定: 取样品 2mg 左右, 置 10 mL 容量瓶中, 加 6 mol/L 盐酸 1.5 mL, 沸水浴中水解 1 小时, 冷却后用氢氧化钠中和至中性, 用水稀释至刻度。取 2 mL 样液, 加水至 5 mL。余按“标准曲线绘制”法测定光吸收值, 并通过标准曲线求出样品中己糖胺含量。

【讨论】

(1) 现已肯定, 以 Elson-Morgan 反应为基础的各种 GAG 中己糖胺的含量测定并非定量完成。问题在于酸水解一步。由于 GAG 中与己糖胺(多数为 N-乙酰化己糖胺)相联结的葡萄糖醛糖苷键对酸水解十分稳定, 特别象肝素分子中 N-硫酸基团对酸极不稳定而易脱落, 结果使邻近的葡萄糖胺糖苷键由于游离氨基的质子化而进一步对酸水解稳定, 造成水解不全, 为此不得不提高催化 GAG 水解的酸浓度, 结果发生己糖胺的部分破坏, 使测定值偏低。根据我们对不同酸水解条件下标准己糖胺的稳定性观察以及同一 GAG 在不同条件下己糖胺回收实验, 认为 6 mol/L 盐酸, 沸水浴中水解 1 小时, 聚糖中的己糖胺回收率最高, 而此时标准己糖胺的破坏率又相对地最低(约 5%)。最近 Bhargava 采用 6 mol/L 盐酸 95°C 水解肝素测定葡萄糖胺含量时给与测得值以 12% 补偿水

解丢失的校正值。我们认为不论校正与否，每个实验室为测定己糖胺含量制订水解的标准条件看来是十分必要的。

(2) 据 Wagner 最近报告，鉴别 GAG 中己糖胺的低温乙酰丙酮反应可改用 25°C 保温 2 小时以代替原法中 0°C 18 小时。尽管此时半乳糖胺呈色率（即反应灵敏度）较原法为低，但葡萄糖胺仍保持其对乙酰化反应的惰性。

【文献】

Rondle, C. J. M., et al., *Biochem. J.* **61**: 586 (1955).

Wagner, W. D., *Anal. Biochem.* **94**:394 (1979).

Ludoweig, J., et al., *Anal. Biochem.* **19**: 80 (1967).

(樊贇曾)

(iii) 己糖醛酸的测定

各种 GAG 除硫酸角质素外，皆含己糖醛酸。其中，硫酸皮肤素和肝素分子中所含己糖醛酸主要为艾杜糖醛酸；硫酸乙酰肝素中含部分艾杜糖醛酸；其他 GAG 则仅含葡萄糖醛酸。由于缺乏艾杜糖醛酸作标准，一般以葡萄糖醛酸作参比。测定己糖醛酸所用方法，包括咔唑(carbazole)法和地衣酚(orcino)法。咔唑法的原理在于样品中的己糖醛酸在浓硫酸作用下形成生色原，后者定量地与咔唑呈色。地衣酚法中，样品所含的己糖醛酸经反应液中盐酸作用优先脱羧，生成和戊糖一致的色原，后者定量地与地衣酚呈色。由于 GAG 中己糖醛酸的种类及糖苷键连接方式不一，结果对两种显色反应的灵敏度不同，从而成为鉴别己糖醛酸的 O/O 比值测定法的基础。

A. 咔唑法

【试剂】

浓硫酸，0.1% 咔唑试液（50 mg 咔唑溶于 50 mL 95% 乙醇），葡萄糖醛酸贮备液 1 mg/mL，葡萄糖醛酸标准溶液 100 μ g/mL。

【操作】

(1) 标准曲线绘制：精确吸取 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL 葡萄糖醛酸标准溶液于带塞试管中，各管加水至 1 mL。在冰水浴中向各管加入 6 mL 浓硫酸，摇匀后，改在 85°C 水浴中保持

20 分钟, 取出后冷至室温。各管加 0.2 mL 吡唑液, 在室温下保持 2 小时, 测定光吸收(530 nm), 以浓度对光吸收作标准曲线。

(2) 样品测定: 取 1 mL 样品溶液(内含相当于 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 己糖醛酸)于带塞试管中, 在冰水浴冷却下加 6 mL 浓硫酸, 余同标准曲线制备操作。由所测光吸收值通过标准曲线求出相当葡萄糖醛酸量。

【讨论】

(1) 本法特异性高, 对 GAG 毋需预先处理即可与硫酸反应。加入吡唑后, 务必摇匀。硫酸的质量对测定的成败关系重大, 如试剂级硫酸中含有某些金属离子及氧化剂(如氯)即产生异常的绿色反应而使实验失败, 此情况极为多见, 为此应经仔细选择, 保留某一批号硫酸供本测定专用。

(2) 吡唑溶液宜新鲜配制。

(3) Bitter-Muir 的改进法*除缩短反应时间外还提高了反应的灵敏度, 但由于本法对艾杜糖醛酸呈色率提高更显著, 对于鉴别己糖醛酸的 C/O 测定反而不利。

B. 地衣酚法

【试剂】

地衣酚试液: 400 mg 地衣酚溶于 155 mL 浓盐酸中, 另加 45 mL 含 0.33% 三氯化铁的 0.01 mol/L 盐酸, 临用前配制; 葡萄糖醛酸贮备液 1 mg/mL; 葡萄糖醛酸标准溶液 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

* Bitter-Muir 改进法如下:

【试剂】

0.025 mol/L $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 浓硫酸试液; 葡萄糖醛酸内酯标准溶液 40 $\mu\text{g/mL}$, 用苯甲酸饱和水溶液配制; 0.125% 吡唑无水乙醇液。

【操作】

(1) 分别取 40 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的标准葡萄糖醛酸内酯溶液 0.2~1.0 mL, 加水至 1 mL。在冷却的条件下缓慢加入 5 mL 硼砂硫酸试液, 边加边摇, 使反应液温度不超过室温。后在沸水浴中加热 10 分钟, 取出后冷却至室温, 加 0.2 mL 吡唑试液, 摇匀, 于沸水浴中加热 15 分钟, 冷却后测 OD 值 530 nm, 绘制标准曲线。

(2) 取 1 mL 样品溶液, 余同标准曲线制备操作, 由所测得 OD 值通过标准曲线求出样品中葡萄糖醛酸含量。

【操作】

(1) 标准曲线制备: 0~0.5 mL(按 0.1 mL 递升)于带塞试管中, 各管补加水使总体积为 1 mL, 另外加 3 mL 地衣酚试液, 在沸水浴加热 90 分钟, 放冷, 测定 660 nm 光吸收, 以浓度对光吸收做标准曲线。

(2) 样品测定: 样品溶液配制, 使每毫升溶液中含相当 0.1 μ mol/L 己糖醛酸的样品, 余操作同标准曲线制备。通过标准曲线求得己糖醛酸的含量。

【讨论】

(1) GAG 组成中的氨基己糖对于本反应无干扰。若含中性己糖, 则反应后呈棕色, 这一现象发生于硫酸角质素鉴别试验中。

(2) 岩藻糖的干扰可以忽略。如有的 GAG 中该糖含量高时(如刺参粘多糖)应以相应量的岩藻糖作对照, 求出光吸收扣除校正。

(3) 己糖醛酸鉴别的 C/O 比值测定: 各种 GAG 样品通过吡啶法和地衣酚法测定, 即可分别求出其中己糖醛酸相当于葡萄糖醛酸的含量, 以 O 代表吡啶法测得值, 以 C 表示地衣酚法测得值。C/O 比值很易求得。由于艾杜糖醛酸在吡啶反应中呈色仅为葡萄糖醛酸的 25~35%, 而在地衣酚反应中呈色约比葡萄糖醛酸高 15%, 故组成中糖醛酸以艾杜糖醛酸为主的硫酸皮肤素的 C/O 值在 0.3 左右; 而组成中糖醛酸为葡萄糖醛酸的各种 GAG 的 C/O 值为 1。肝素中己糖醛酸主要为艾杜糖醛酸, 但 C/O 比值在 2 以上, 其原因尚不清楚。由于各实验室采用地衣酚法沸水浴加热时间不一(20、40 和 90 分钟), 各类 GAG 的 C/O 比值会有所变动, 但趋势不变。

【文献】

Kinoshita, T. et al., *J. Biochem.* **77**: 399 (1975).

Dische, Z., *J. Biol. Chem.* **167**: 139 (1947).

(樊绘曾 李润秋 张翼伸)

(iv) 硫酸基的测定

除透明质酸和软骨素外,其他 GAG 分子中皆含硫酸基:两种硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素及刺参粘多糖含 O-硫酸基;肝素、硫酸乙酰肝素则含 O-硫酸基和 N-硫酸基。两种硫酸基比值随来源而异。利用盐酸水解法,两种硫酸基都可与无机钡离子反应并在含明胶的溶液中保持悬浊状态。比浊测定表明此悬浊液的光吸收与硫酸基呈线性关系,由此测得总硫酸基含量。又利用亚硝酸可以水解 GAG 的 N-硫酸基,生成物脱硫酸氨基己糖基,在亚硝酸作用下进一步降解转化为 2,5-脱水甘露糖,后者与吡啶盐酸试剂生成有色化合物而定量。由总硫酸基含量减去 N-硫酸基部分即为 O-硫酸基含量。

A. 总硫酸基测定

【试剂】

1 mol/L HCl。

氯化钡-明胶试液:将 1.5 克明胶溶于 300 mL 水中(于 60~70°C 助溶),置 4°C 过夜,取 2 克氯化钡溶于 200 mL 上述溶液中,静置 2~3 小时,如有沉淀,离心除去,4°C 冷藏,一周内使用。

明胶试液:即配氯化钡-明胶试液余下的 100 mL 0.5% 明胶水液,冷藏备用。

3% 三氯乙酸试液。

标准硫酸基溶液:硫酸钾在 105~110°C 干燥恒重。精确称取 543.5 mg,置于 100 mL 容量瓶中,加 1 mol/L HCl 至刻度,取出 5 mL 于 25 mL 容量瓶中,以 1 mol/L HCl 稀释至刻度(600 μ g/mL)。

【操作】

(1) 标准曲线制备:精确吸取 0~0.2 mL 标准溶液(按 0.04 mL 递升)于带塞试管中,各管以 1 mol/L HCl 补加至总体积 0.2 mL,另加入 3.8 mL 3% 三氯乙酸和 1 mL 氯化钡-明胶试液,混合后在室温下静置 15~20 分钟,测定(360 nm)光吸收,以 0 管作对照,得 A_1 ;另以同样标准溶液系列,唯以明胶试液代替氯化钡-明胶试液,以 0 管作对照,测定光吸收(360 nm),得 A_2 ,以 A_1-A_2

对硫酸基浓度作标准曲线。

(2) 样品测定: 精确称量样品, 以 1 mol/L HCl 作溶剂, 配制 1.5 mg/mL 样品液, 封闭管在 10°C 下加热 $2\sim 3$ 小时, 冷却后吸取 0.2 mL 进行分析, 余操作同标准曲线制备。

B. N-硫酸基的测定

【试剂】

5% 亚硝酸钠, 新鲜配制; 33% 乙酸: 1 份冰乙酸加 2 份水;
12.5% 氨基磺酸铵; 5% 盐酸: 1 份盐酸与 7 份水混合; 1% 吡啶乙醇溶液, 新鲜配制。

葡萄糖胺标准溶液: 取 10.77 mg 盐酸葡萄糖胺溶于 100 mL 水中, 用前配制。

【操作】

(1) 标准曲线制备: 取葡萄糖胺标准溶液 $0\sim 0.25 \text{ mL}$ (按 0.025 mL 递升) 于带塞试管中, 加水使各管总体积达 0.25 mL , 继加 0.25 mL 亚硝酸钠试液并混合, 另加 0.25 mL 乙酸试液, 摇匀后在 $20\sim 25^\circ\text{C}$ 下保持 90 分钟 (每隔 15 分钟振摇一次)。加入 0.25 mL 氨基磺酸铵溶液, 摇匀, $20\sim 25^\circ\text{C}$ 下保温 30 分钟, 再加 2 mL 盐酸试液和 0.1 mL 吡啶试液, 混匀, 加盖, 在沸水浴上加热 5 分钟, 加 1 mL 乙醇, 立即混合, 以试剂空白作对照, 测定光吸收 (492 nm)。

(2) 样品测定: 吸取 $3 \text{ mg}/10 \text{ mL}$ 样品溶液 0.25 mL 于带塞试管中, 余操作同标准曲线制备。根据所测光吸收从标准曲线求出 N-硫酸基含量。

【讨论】

(1) 本法是测定 GAG 中 2-N-硫酸基-2-去氧-己糖胺的定量方法。含 2-N-乙酰基-2-去氧己糖胺及-O-硫酸化糖基的 GAG 均不呈色。

(2) DNA (去氧核糖核酸) 可引起干扰, 其呈色率约为肝素的三分之一。因此测试样品应预先通过测定 260 nm 处有无特征吸收查 DNA, DNA 的影响也可通过未经亚硝酸降解反应 (免去加

亚硝酸钠即可)的聚糖溶液直接显色所得光吸收值进行校正。

【文献】

Dodgson, K. S., et al., *Biochem. J.* **84**: 106 (1962).

Lagunoff, D., et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **99**: 396 (1962).

(樊绘曾)

(v) 己糖和6-去氧己糖的测定

半乳糖和岩藻糖分别是构成硫酸角质素和刺参粘多糖的主要糖基之一。岩藻糖也是硫酸角质素糖链中的一种微量成分。

GAG中己糖在硫酸存在下,可与地衣酚反应定量生成红色缩合物,此反应不受GAG中其他糖基(包括岩藻糖)的干扰。聚糖中的6-去氧己糖在浓硫酸存在下和盐酸半胱氨酸反应生成在396 nm处有最大吸收的化合物。为了消除中性己糖的干扰反应,利用己糖生成物在396 nm和427 nm两波长吸收相等,而6-脱氧己糖在427 nm处无吸收,且其浓度和 $A_{396} - A_{427}$ 差值成正比,从而消除了中性己糖的影响。

A. 己糖的含量测定

【试剂】

60% 硫酸: 在搅拌下将300 mL浓硫酸缓缓加至200 mL水中(以冰冷却),为A液;

1.6% 地衣酚水液为B液;

地衣酚-硫酸试液: 7.5份A液与1份B液相混,用前配制。

半乳糖标准溶液: 称取36 mg半乳糖溶于100 mL水中($2 \mu\text{mol/L}$),用前配制。

【操作】

(1) 标准曲线制备: 取0~0.4 mL标准溶液(按0.04 mL递升)于带塞试管中,各管加水使总体积至0.4 mL,另加3.4 mL地衣酚-硫酸试液,80°C水浴加热15分钟,冷却后以试剂空白作对照,测读光吸收(565 nm),按浓度对光吸收作标准曲线。

(2) 样品测定: 取0.4 mL样品溶液(内含相当1毫克分子半乳糖),加3.4 mL地衣酚-硫酸试液,余操作同标准曲线制备,查

标准曲线求出含量。

【讨论】

(1) 己糖胺或己糖醛酸对本反应无干扰，然本法对各种中性己糖都能呈色，唯不同己糖的克分子消光系数不一，所以本法只适用于已确认半乳糖且无其他己糖的定量测定。

(2) 半乳糖氧化酶法是特异性高的半乳糖定量方法，然样品先需进行酸水解(溶于1 mol/L 盐酸中，封闭管在沸水浴中加热3小时)后方能测定。

B. 6-去氧己糖的含量测定

【试剂】

硫酸试液：6份硫酸缓缓加入1份水中，4°C 贮存备用；3% 盐酸半胱氨酸试液，临用前配制。岩藻糖标准溶液，20 μg/mL。

【操作】

(1) 标准曲线制备：取0~1 mL 标准溶液(按0.1 mL 递升)于带塞试管中，各管加水使总体积至1 mL。在冰浴冷却下，加入4.5 mL 硫酸试液，摇匀，在20~22°C 水浴中放置数分钟后，加塞，在100°C 水浴中加热3分钟，取出后用流动水冷却。各管再加入0.1 mL 3% 盐酸半胱氨酸试液，加完后立即混匀，放37°C 水浴中保温1.5小时，放置室温后，以试剂空白作对照测定396 nm 和427 nm 处光吸收值，由 $A_{396} - A_{427}$ 差对岩藻糖浓度作图。

(2) 样品测定：取1 mL 样品溶液(内含相当0.1 mmol 岩藻糖)于带塞试管中，在冰水浴冷却下，加入4.5 mL 硫酸液，余操作同标准曲线制备，查标准曲线求出含量。

【文献】

Dische, Z., et al., *J. Biol. Chem.* **175**: 595 (1948).

(樊绘曾)

(三) 培养的动物细胞中蛋白聚糖(PG)的研究方法

体外细胞培养系统是研究组织中蛋白聚糖的生物合成及降解的有力工具。本节例举培养的猴主动脉平滑肌细胞合成的蛋白聚糖的有关实验方法加以说明。蛋白聚糖(PG)和糖胺聚糖(GAG)

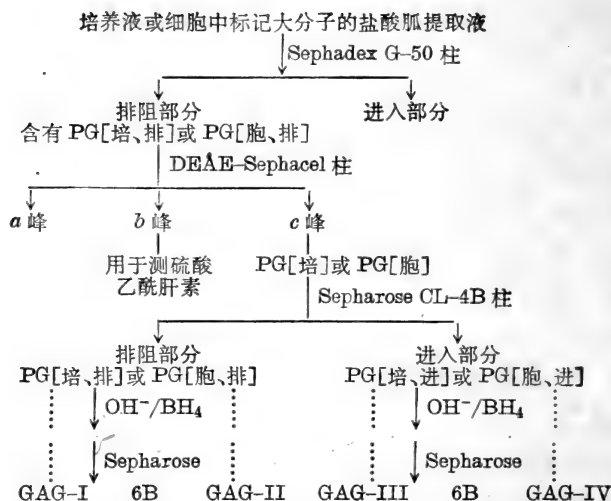


图 83 蛋白聚糖(PG)及其糖胺聚糖(GAG)的分离和鉴定流程图

的分离和鉴定方法分成六个实验方法来叙述, 前后有一定的联系(图 83)。

1. 细胞培养和标记蛋白聚糖(PG)的提取

1954 年首次用裂解提取法(即在水或低浓度盐溶液中高速匀浆提取), 并发现蛋白聚糖与糖胺聚糖(GAG)不同, 及至 1969 年用解聚提取法(不用匀浆仅用高浓度的盐溶液即可由软骨薄片中提取)可有效地提取软骨中的 PG, 提取效率与使 PG 解聚的能力有关。目前较广泛采用 4 mol/L 盐酸胍溶液(也有用 8 mol/L 尿素溶液)做为解聚提取液, 因其可使蛋白质变性及大分子中的非共价键断开, 提取物为蛋白聚糖的单体。有时为提取结合在膜上或细胞内的 PG, 须加入去污剂如 Triton X-100、脱氧胆酸或 CHAPS(3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate)等。提取液中还常加入蛋白酶抑制剂, 常用的提取液含有 4 mol/L 盐酸胍, 0.1 mol/L 6-氨基己酸, 0.01 mol/L EDTA-Na₂, 0.05 mol/L 乙酸钠, 1 mmol/L 苯甲脒盐酸盐, 1 mmol/L 苯基甲磺酰氟, 10 mmol/L N-乙基马来酰亚胺等。以乙酸调 pH 至 6.0。这一 pH 比酸性蛋白酶的最适 pH 高而又比中性蛋白酶的最适 pH

低。有时根据实验需要也可用含有蛋白酶抑制剂的 0.5 mol/L 盐酸胍(聚合提取液)提取, 提取物为 PG 的聚合物。如此提取出的 PG 经纯化后未见有降解。

(i) 细胞培养及标记

【试剂】

Dulbecco-Vogt 改良的 Eagle's 基础培养基: GIBCO Laboratories, U.S.A.

非必需氨基酸: 同上。

[³⁵S] 硫酸盐 (约 10 mCi/mL) 及 [6-³H] 葡萄糖胺 (38 Ci/mmol): New England Nuclear, U.S.A.

【操作】

将猪尾猴 (*Macaca nemestrina*) 处死后, 取内膜组织种入 Dulbecco-Vogt 改良的 Eagle's 基础培养基中 (外加非必需氨基酸、丙酮酸及 5% 同种血清), 置 5% CO₂ 及 95% 空气的湿孵化箱 (37°C) 中培养。

待生长到融合, 将细胞用胰蛋白酶消化, 传代。传代细胞接种入 75 cm² 的 T 形培养瓶中 (~0.3 × 10⁶ 个细胞/瓶), 每瓶 10 mL 培养液, 隔天换一次培养液。

传代三次后第七天细胞接近融合时, 换成含有 50 μCi/mL [³⁵S] 硫酸盐及 25 μCi/mL [6-³H] 葡萄糖胺的培养液, 继续保温 36 小时。以下实验用三瓶 (约 6 × 10⁶ 个细胞) 培养细胞。

【文献】

Ross R., *J. Cell Biol.* 50:172~186 (1971).

(ii) 蛋白聚糖的提取(解聚提取)

【试剂】

盐酸胍 (ultrapure): Bethesda Research Laboratories, U.S.A.

【操作】

将上述培养瓶中的培养液取出, 加入固体盐酸胍 (0.38g/mL) 使成约 3 mol/L, 分装, -60°C 保存待用。将细胞层以 5 mL 4

mol/L 盐酸胍液(含 0.1 mol/L 6-氨基己酸, 5 mmol/L 苯甲脒盐酸盐, 5 mmol/L EDTA-Na₃, 50 mmol/L 乙酸钠, 0.1 mmol/L 苯基甲磺酰氟及 10 mmol/L N-乙基马来酰亚胺, pH 5.8) 提取 24 小时(4°C)。将提取液分装, 于 -60°C 速冻, 保存备用。培养皿上的细胞层经提取后约有标记大分子总活性的 2% 残留(未被提取)。

【文献】

Oegema T. R., et al., *J. Biol. Chem.* **250**: 6151~6159 (1975).

Wight T. N., et al., *J. Cell Biol* **96**: 167~176 (1983).

(iii) 除去未参与的同位素及盐类

根据标记大分子与未参与的同位素分子及盐类分子大小悬殊, 可用凝胶柱层析法将其分开。

【试剂】

交联葡聚糖 G-50 (Sephadex G-50, Fine): Pharmacia Fine Chemicals, Sweden.

尿素: Bethesda Research Laboratories, U. S. A.

CHAPS: Calbiochem, U. S. A.

Triton X-100: Sigma, U. S. A.

【操作】

用交联葡聚糖 G-50 柱层析(床体积约 8 mL, 0.8×16 cm)。交联葡聚糖事先用 8 mol/L 尿素、0.15 mol/L NaCl、0.05 mol/L 乙酸钠缓冲液(pH 6.0)平衡, 上述溶液中尚含去污剂(0.5% V/V Triton X-100 或 0.5% g/100mL CHAPS, 详见下)。上柱样品量为 2 mL, 以平衡用的 8 mol/L 尿素缓冲液洗脱, 每 0.6 mL 收集一管。收集排阻部位的标记大分子。未参与的同位素及盐类在进入部位洗脱。取一定量的排阻部位洗脱液测放射性(Beckman LS-9000 液体闪烁计数器, 下同)以计算回收率及标记大分子在培养液及细胞层中的分布。排阻部位放射性的计算发现三瓶培养细胞(约 6×10^6 个细胞)的培养液共有 ^3H 活性 5.7×10^5 Bq, ^{35}S 活性 2.7×10^5 Bq, 亦即回收率分别为 78% 及 85%。

【文献】

Yanagishita M., et al., *J. Biol. Chem.* **254**: 12355~12364 (1979).

Antonopoulos C. A., et al., *Biochim. Biophys. Acta.* **338**: 108~119 (1971).

(张英珊)

2. 离子交换柱层析分离蛋白聚糖(PG)

1974年开始用离子交换柱层析纯化4 mol/L盐酸胍提取液中的PG,因盐酸胍为电解质,故须先将提取液中的4 mol/L盐酸胍以柱层析法或透析等法换成8 mol/L尿素,这样PG仍可维持在解聚状态,同时也可进行离子交换柱层析。常用的离子交换树脂为DEAE-纤维素(氯化物型,如DEAE-Sephacel),用0.15~2.0 mol/L NaCl的8 mol/L尿素,0.05 mol/L Tris或乙酸钠缓冲液(pH 6.0)阶段或连续梯度洗脱。阶段洗脱时如用(a)8 mol/L尿素,(b)0.15 mol/L NaCl、8 mol/L尿素,(c)2.0 mol/L NaCl、8 mol/L尿素,则85~90%的PG洗脱在2 mol/L NaCl部分,而其他大分子则在(a)及(b)部分;如用线性连续梯度洗脱还可将某些不同的PG分开。这样不用超速离心机亦可将PG初步提纯或分离。

【试剂】

DEAE-Sephacel: Pharmacia Fine Chemicals, Sweden.

【操作】

将标记的大分子混合物(即经交联葡聚糖G-50的排阻部分)以DEAE-Sephacel柱层析(床体积2 mL)。DEAE-Sephacel离子交换树脂事先以8 mol/L尿素、0.15 mol/L NaCl、0.05 mol/L乙酸钠、0.5% Triton X-100溶液(pH 6.0)平衡。以含0.15~1.5 mol/L NaCl的上述8 mol/L尿素缓冲液连续梯度洗脱,流速约2.5 mL/小时,每0.8 mL收集一管,总洗脱体积约46 mL,每管取一定量测放射性。

培养液和细胞层的层析谱类似,其中约43%的 ^3H 活性未与DEAE-Sephacel结合,而在NaCl梯度开始前洗脱出,这部分为糖蛋白(glycoprotein)-蛋白,无 ^{35}S 活性,说明这种细胞不合成含

硫酸盐的糖蛋白。NaCl 梯度开始后,先洗脱出一个仅有³H活性的小峰 a (约在 0.2 mol/L NaCl 处),随后有两个紧接着的一小、一大³H-及³⁵S-双标记的 PG 峰(b 及 c, 约分别在 0.4 及 0.5 mol/L NaCl 处)。c 峰为主要的 PG 峰(为硫酸软骨素-PG 及硫酸皮肤素-PG),在培养液中分别各占³⁵S 及³H 总活性的 96% 及 53%。小峰 b(含有硫酸乙酰肝素-PG)含有其余的³⁵S 活性,其中³H活性在培养液中为 2%。

【文献】

Antonopoulos C. A., et al., *Biochim. Biophys. Acta* **338**:108~119 (1974).

Okayama M., et al., in *proceedings of the 6th International Symposium on glycoconjugates* (Yamakawa T. et al. eds) p.371, Japan Scientific Press, Tokyo (1981).

(张英珊)

3. 凝胶过滤柱层析分离蛋白聚糖 (PG)

此法较广泛地用于 PG 的分离及鉴定。由于能分离的量较少故不宜于大量制备,但在细胞培养生物合成的研究中样品量少,常用本法分离不同的 PG。较常用的凝胶有不同孔径的琼脂糖等。洗脱液可为聚合的也可为解聚的。如用聚合洗脱液应注意防止细菌或霉菌生长。分析少量放射性标记的 PG 样品需加入非标记的 PG 载体(>1~2 mg/mL)及去污剂以得到较好的回收率。有的去污剂如 Triton X-100 不易除去,分离的样品如欲进行再聚合则不能有去污剂,故须使用能透析除去去污剂如 CHAPS。PG 经碱性氢硼化物降解后生成的 GAG 及寡糖,或经不同的蛋白酶降解生成的 GAG-肽片断,亦可用凝胶过滤柱层析法分离或鉴定,并可进而研究 PG 的结构。经已知不同分子量的 GAG 校正过的凝胶层析柱(如 Sepharose 6B)也可测未知 GAG 的分子量。

【试剂】

Sepharose CL-2B 或 CL-4B: Pharmacia Fine Chemicals, Sweden.

【操作】

将经 DEAE-Sepharcel 柱层析所得的³⁵S 标记的主峰(前述的 c 部分)以 Sepharose CL-4B 柱层析(0.7×100 cm),以 4 mol/L

盐酸胍、0.05 mol/L Tris、0.05 mol/L Na_2SO_4 、0.5% Triton X-100 (V/V) 或 0.5% CHAPS (g/100mL), pH 7.0 的溶液洗脱。每管收集体积约 0.5 mL, 各取一定量测放射性。分别合并可得排阻部分及进入部分, 定为 PG[培、排]、PG[胞、排]、PG[培、进]、PG[胞、进], 分别代表来自培养基或细胞, 排阻或进入部分[见第 306 页]。如用 Sepharose CL-2B 柱层析则在进入部位洗脱出相应的 ① 及 ② 两个峰。峰 ① 及 ② 经特异的酶降解后证实分别为 CS 及 DS。另从 K_{av} 可知培养液及细胞层中的 CS-PG 分子大小相同, 而前者的 DS-PG 分子大于后者的。

【讨论】

用 Sepharose 柱层析时, 4 mol/L 盐酸胍洗脱液中如加入 0.5% Triton X-100, 则同位素标记的 PG 的回收率可达 90%, 否则仅 70%。

【文献】

Yingshan Chang, et al., *J. Biol. Chem.* **258**:5679~5688 (1983).

(张英珊)

4. 氯化铯 (CsCl) 等密度超速离心法分离蛋白聚糖 (PG)

1966 年首先使用此法提纯 PG。由于 PG 中 GAG 与蛋白质的比值高因而其密度大, 离心时沉于管底, 而蛋白质及其他糖蛋白的密度小遂移至管的上部, 这样即可将 PG 与其他物质分离。可先将组织的解聚提取液透析 (4°C) 到 0.5 mol/L 盐酸胍 (有时为防止 PG 与其他大分子结合而沉淀可透析到 0.75 mol/L), 此时, 大部分 (50~90%) PG 可再聚合。目前常用的步骤如下: 将 PG 的解聚提取液对 0.5 mol/L 盐酸胍液 (含有蛋白酶抑制剂) 透析 (4°C), 如为聚合提取液则可直接离心。如透析后的提取液有不溶物则需离心除去 (45 000 g, 20 分钟, 4°C)。加入 CsCl (1.1 g/g 溶液) 使其密度达 1.60 g/mL, 当 CsCl 溶解后常有沉淀, 可离心 (45 000 g, 20 分钟, 4°C) 除去。取清亮的溶液以水平转头 (Beckman SW 50.1) 或角转头 (Beckman 50 Ti) 离心, 约 35 000 r/min, 48~72 小时, 10°C。PG 聚合物 (A_1) 在管底部的 1/4~1/5 处, 可用切管

法或底部打孔法收集之。所得到的 PG 聚合物(A₁)可再在解聚条件下(4 mol/L 盐酸胍)以CsCl 等密度超速离心,则大部分 PG 单体(A₁-D₁)在管底部的1/4~1/5处,仅有少量密度较低的 PG 进入上部,连接蛋白则在上部的1/4处(可用凝胶过滤法再进一步提纯),中间部分有少量密度低的 PG 及透明质酸。

亦可用解聚提取液或经离子交换柱层析后初步分离的 PG 样品进行 CsCl 等密度离心。

在密度较大(底部)的 PG 部分中主要污染物为糖元及核酸,特别是在细胞较多而 PG 含量较低的组织(如动脉壁)尤为突出。此时,可将底部的样品再以氯化十六烷吡啶沉淀而提纯之。

【试剂】

氯化铯(CsCl): Biological Grade, Bethesda Research Laboratories U. S. A.

【操作】

将培养液及细胞层经 DEAE-Sephacel 的 c 部分(见第303页)分别各取一定量加到 4.5 mL 4 mol/L 盐酸胍溶液中,再加入固体 CsCl 使其密度达 1.43 g/mL。超速离心(Beckman SW 50.1 转头, 35 000 r/min, 72 小时, 10°C)形成解聚密度梯度。将离心管切成 8 等分(B-1 至 B-8), 收集样品。每份取一定量计数并测密度。培养液及细胞层中大部分放射性(分别为 75% 及 79%)集中在离心管底部密度大于 1.51 g/mL 处。

(张美珊)

5. 糖胺聚糖(GAG)和寡糖的分离、鉴定及蛋白聚糖(PG)结构的分析

用碱或碱性氢硼化物处理蛋白聚糖样品,可使 GAG 或寡糖与核心蛋白间的 O-连接键[亦即木糖(或 N-乙酰氨基半乳糖)与核心蛋白中丝氨酸残基间的糖苷键]断开而产生自由的 GAG(或寡糖)链。核心蛋白中的丝氨酸残基脱水形成 2-氨基丙烯酸,而木糖为糖链的还原末端,在碱性条件下逐渐外切(去皮反应)。糖链还原末端的醛基为去皮反应的基础,如加入氢硼化物将木糖还原

为木糖醇即可有效地防止进一步降解。以往认为 N-连接寡糖对弱碱稳定，但近来有作者发现这种链也会有一部分被断开。除碱水解外还可用蛋白酶(如木瓜蛋白酶等)降解，此时产物为连有 GAG 或寡糖的小肽。

PG 经上法降解所产生的 GAG 及寡糖可用分子筛凝胶(如 Sepharose 6B 或 Bio-Gel P-10)柱层析法分开。GAG 的平均链大小(分子量)可用经 OS 分子量标准校正过的 Sepharose 6B 柱而测得。

GAG 链可按下列法鉴定之：

① 选择性酶降解：如软骨素酶。软骨素酶 ABC 可消化硫酸软骨素(OS)及硫酸皮肤素(DS)，而软骨素酶 AC-II 则只能消化 OS。这种消化作用为 β -消除反应，产物为 $\Delta^4, 5$ 不饱和的二糖。其他如链霉菌透明质酸酶及内半乳糖苷酶可分别选择性地降解透明质酸及硫酸角质素。

② 选择性化学降解：如亚硝酸可降解硫酸乙酰肝素(HS)生成 2, 5-脱水甘露糖。

【试剂】

Sepharose 6B, Pharmacia Fine Chemicals, Sweden.

Bio-Gel P-10, Bio Rad Laboratories U. S. A.

软骨素酶 ABC (Chondroitinase ABC, *Proteus vulgaris*) 及软骨素酶 AC-II (Chondroitinase AC-II, *Arthrobacter aureus*) 通过 Miles Laboratories 得到的 Seikagaku Kogyo 的产品。

木瓜蛋白酶(2 \times 重结晶)及胰蛋白酶(经二苯基氨甲酰氯化物处理过)。

标准硫酸软骨素。

[1- 14 C]半乳糖胺 (50 mCi/mmol)。

[14 O]半乳糖胺醇：以 1 mol/L NaBH_4 及 0.01 mol/L NaOH 还原 [14 O]半乳糖胺 (25 $^\circ\text{C}$, 4 小时)，再以冰乙酸中和即得。

【操作】

取一定量经提纯的PG样品对水透析(4°C),冻干。加入含1 mol/L NaBH₄的0.05 mol/L NaOH液(OH⁻/BH₄),保温24小时(45°C),经冰乙酸中和后, Sepharose 6B柱(0.7×100 cm)层析,以0.5 mol/L 乙酸钠(pH 7.0)洗脱,分析GAG; Bio-Gel P-10柱(0.7×100 cm)层析,以0.5 mol/L 乙酸吡啶(pH 5.0)洗脱,分析寡糖,将收集的各部分取一定量测放射性。

经OH⁻/BH₄处理的培养液或细胞中的PG在Sepharose CL-4B层析的排阻部分,即PG[培、排],PG[胞、排],在Sepharose 6B柱(用已知分子量的硫酸软骨素校正过)的层析谱中几乎全部³⁵S活性均洗脱为一个单一、对称的峰(K_{av} 0.41),设为GAG-I和GAG-II(见后文酶水解部分),其平均分子量约相当于43 000。约30%的³H总活性洗脱在接近V_r处的另一个峰(寡糖及糖肽部分)。

而方法[(三)-3]中,经Sepharose CL-4B层析的进入部分,即PG[培、进], PG[胞、进]经OH⁻/BH₄处理后Sepharose 6B柱层析情况各有不同。培养液中PG进入Sepharose CL-4B部分,即PG[培、进]在OH⁻/NaBH₄处理前的完整大分子, K_{av}为0.32,而OH⁻/BH₄处理后产生的GAG, K_{av}则为0.45,设为GAG-III(见后文酶水解部分)。同时约有15%的³H总活性在随后洗脱出的糖肽及寡糖部分,故PG[培、进]含有一个或数个GAG链连接在结合有寡糖的核心蛋白上。细胞中PG进入Sepharose CL-4B部分,即PG[胞、进]与PG[培、进]不同。其处理前的完整大分子及OH⁻/BH₄处理后的GAG链在Sepharose 6B柱层析的K_{av}均为0.45,设为GAG-IV(见后面酶水解部分),约有9%的³H总活性为糖肽及寡糖,故PG[胞、进]很可能为单一的GAG链连接在有少量糖肽或寡糖的小肽上。当然,PG[胞、进]也可能为自由的GAG链,而寡糖可能来自于PG[胞、排]的污染。GAG-III和GAG-IV的K_{av}都为0.45(Sepharose 6B),与硫酸软骨素中的GAG相同,故其平均分子量也是43 000。

将经Sepharose 6B柱层析分离出的GAG收集之,对蒸馏水透析后,冻干。临用前取一定量加入相应的缓冲液使溶,再加入4-

硫酸软骨素载体 (0.5mg/mL). 分别以软骨素酶 ABC (0.25u/mg 硫酸软骨素载体, 缓冲液为 0.1 mol/L Tris, 0.1 mol/L 乙酸钠, pH 7.3) 及软骨素酶 AC-II (0.5 U/mg 硫酸软骨素载体, 缓冲液为 0.1 mol/L 乙酸钠, pH 6.0) 消化 (37°C, 3 小时)、冻干. 以相应的缓冲液溶解后, 用 Bio-Gel P-10 (0.7×100 cm, 洗脱液为 0.5 mol/L 乙酸吡啶, pH 5.0) 及 Sepharose 6B (0.7×100 cm, 洗脱液为 0.5 mol/L 乙酸钠, pH 7.0) 柱层析分析之.

GAG-I, GAG-II, GAG-III, GAG-IV 的 GAG 均可被软骨素酶 ABC 完全消化为二糖. GAG-I、GAG-II 也几能完全为软骨素酶 AC-II 完全消化. 因分子筛凝胶过滤柱层析难于将不同的 PG 完全分开, 故所残留的极少量很可能来自相应的小分子 GAG-III 和 GAG-IV (其中含有较大量不能为软骨素酶 AC-II 所消化的 GAG). 这一结果说明 GAG-I 及 GAG-II 为硫酸软骨素 PG. GAG-III、GAG-IV 有相当大部分 (分别为 24% 及 31%) 不能为软骨素酶 AC-II 所降解. 因此说明这两种 PG 中有艾杜糖醛酸残基. 由于软骨素酶 AC-II 的内消化酶作用弱, 故不能被消化的碎片内可能还有葡萄糖醛酸, 因而实际上其艾杜糖醛酸的含量会比层析图谱所示为少. 不能被消化的碎片在 Sepharose 6B 柱的洗脱位置晚于 GAG-III 及 GAG-IV 中未经消化亦即完整的 GAG, 故其中许多 (或全部) GAG 中既含有葡萄糖醛酸, 也含有艾杜糖醛酸. 故 GAG-III 及 GAG-IV 为硫酸皮肤素 PG.

PG 中除含有上述 GAG 链外, 还含有寡糖. 所以经 OH^-/BH_4 处理后, 在各自的 Bio-Gel P-10 柱层析的分析图谱中各种 GAG 均在排阻部位洗脱, 寡糖峰均在进入部位洗脱. GAG-I 及 GAG-II 后面均各有两个寡糖峰. 其中第一个寡糖峰占 ^3H 总活性 6~7%, 第二个则占 25~29%. GAG-III 及 GAG-IV 后面第一个寡糖峰亦各占 ^3H 总活性的 7%; 第二个寡糖峰在 GAG-III 后面的为 8%, 在 GAG-IV 后面的最多也只有 2%, 亦即很可能没有. GAG-III 后面这种寡糖很可能来自 PG [培、排] 的污染, 由于 PG [培、排] 中 O-连接寡糖含量高, 故如有 2~3% 的污染, 即可使 PG [培、进] 中有

8% ^3H 总活性在 O-连接寡糖处洗脱。另取 PG[培、排]的一部分经 OH^-/BH_4 处理、Bio-Gel P-10 柱层析后, 收集排阻的 GAG 峰及两个寡糖峰, 加 4 mol/L HCl 在充氮密封管内水解 10 小时 (100°C)。样品经干燥、重建后, 以氨基酸分析仪 (Beckman 117 型) 用 0.2 mol/L 枸橼酸钠、0.1 mol/L 硼酸钠缓冲液 (pH 5.28) 洗脱, 柱温度 50°C 。收集洗脱各部分测放射性。加入半乳糖胺、葡萄糖胺、半乳糖胺醇 (galactosaminitol) 及葡萄糖胺醇 (glucosaminitol) 各 50 nmol/L 做为载体, 再加入 [^{14}C] 半乳糖胺及 [^{14}C] 半乳糖胺醇各约 50 Bq 作为内标准以监测 ^3H 标记物的洗脱位置及回收率。由表 51 中可见 GAG 峰中 ^3H -活性的 98% 为半乳糖胺, 也与这部分为硫酸软骨素的结果一致。第一个寡糖峰中 ^3H 活性的 90% 为葡萄糖胺而无半乳糖胺醇, 并且软骨肉瘤及卵巢滤泡液 PG 所含糖肽也在这一位置, 故第一个寡糖峰为 N-连接寡糖 (亦称糖肽)。第二个寡糖峰中大部分 ^3H 活性为半乳糖胺醇 (71%), 有少量葡萄糖胺及半乳糖胺, 故这一峰主要为 O-连接寡糖亦即通过 N-乙酰半乳糖胺以糖苷键与丝氨酸或苏氨酸的残基相连接。

PG[培、排] 的一部分用木瓜蛋白酶 (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.1 mol/L Tris-0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液, pH 7.3, 并含有 5 mmol/L EDTANa_2 及 5 mmol/L 半胱氨酸盐酸盐的溶液中保温 4 小时, 65°C) 或胰蛋白酶 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.1 mol/L Tris-0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液, pH 7.3, 保温 3 小时, 37°C) 消化、Sephrose 6B 柱层析。未消化的 PG[培、排] 主要在排阻部位洗脱。经木瓜蛋白酶消化后的 Sephrose 6B 柱层析图谱有两个峰, 一个 [^3H]-及 [^{35}S]-双标记峰 (K_{av} 0.37), 稍早于 OH^-/BH_4 处理后的 GAG 峰, 另一个 ^3H 总活性 25% 的糖肽峰随后洗脱。胰蛋白酶消化后的第一个峰洗脱稍早 (K_{av} 0.30), 第二个峰 (糖肽) 与木瓜蛋白酶消化的类似。

将经胰蛋白酶消化、Sephrose 6B 柱层析分离出的硫酸软骨素-肽及糖肽部分分别收集, 并以 OH^-/BH_4 处理, 再以 Bio-Gel P-10 柱层析。仅 O-连接寡糖可以从硫酸软骨素-肽片段中释放出来, 所有的 N-连接寡糖及其余的 O-连接寡糖则在糖肽部分。故

PG[培、排]中约 10% 的 ^3H 总活性为硫酸软骨素-肽中的寡糖。这部分寡糖全部为 O-连接的, 故约 1/3(10~29%)的寡糖位于核心蛋白上相当接近硫酸软骨素的连接点, 不论木瓜蛋白酶或胰蛋白酶都不能将其断裂下来。从表 51 可知, O-连接寡糖中半乳糖胺醇与硫酸软骨素链中半乳糖胺的比值为 1/6*, 每个硫酸软骨素链中应含有 90~100 个半乳糖胺残基(根据分子量为 43 000 计算), 故每有一个硫酸软骨素链应有 15 个 O-连接寡糖。基于软骨肉瘤 PG 的 N-连接寡糖的研究, 已知这种寡糖位于核心蛋白远离硫酸软骨素链的连接处而在与透明质酸结合点附近, 很可能 PG[培、排]中的 N-连接寡糖也类似。

表 51 己糖胺及己糖胺醇的分析*

部 分**	己糖胺或己糖胺醇的 %			回收 (%)
	葡萄糖胺	半乳糖胺	半乳糖胺醇	
GAG(排阻部分)	2	98	0	86
寡糖峰-1(25~28 部分)	90	10	0	68***
寡糖峰-2(30~36 部分)	17	13	71	45***

* PG[培、排]经 OH^-/BH_4 处理后, Bio-Gel P-10 柱层析洗脱的各个峰。

** 参看文内说明。

*** 寡糖部分 ^3H 活性回收率低可能由于唾液酸残基中的 ^3H 活性在酸性水解时被破坏。

将 Bio-Gel P-10 及 Sepharose 6B 柱层析所洗脱下的二糖峰收集, 冻干备用。

硫酸乙酰肝素常用亚硝酸处理以鉴定之。取经 DEAE-Sephacel 离子交换柱层析的小峰 b[见(三)-2], 对水透析后, 冻干, 以亚硝酸试剂(临用前将冷至 -5°C 的 $0.5 \text{ mol/L Ba}(\text{NO}_3)_2$ 及

* 第二个寡糖峰中半乳糖胺醇与 GAG 峰中半乳糖胺中 ^3H 活性的比可按下式算出(参看表 51):

$[0.71(\text{半乳糖胺醇中的 } ^3\text{H 活性}\%) \times 0.45(\text{柱回收率}) \times 0.29(\text{O-寡糖的 } ^3\text{H 活性}\%)] \div [0.98(\text{半乳糖胺中 } ^3\text{H 活性}\%) \times 0.86(\text{柱回收率}) \times 0.65(\text{硫酸软骨素中的 } ^3\text{H 活性}\%)] = 1/5.9.$

0.5 mol/L H_2SO_4 等体积混合, 离心除去 $BaSO_4$, 用上清) 处理, (室温, 10 分钟), 用 2 mol/L 氨基磺酸铵除去剩余的亚硝酸, 再以 Bio-Gel P-10 柱层析 (0.7×100 cm, 0.5 mol/L 乙酸吡啶, pH 5.0 洗脱), 发现其中 96% 以上的 ^{35}S 活性对亚硝酸敏感, 即在进入部位洗脱, 说明 b 峰中含硫酸乙酰肝素。

【文献】

Lohmander, L. S., et al., *J. Biol. Chem.* **255**:6084~6091 (1980).

Carlson D. M., *J. Biol. Chem.* **243**:616~626 (1968).

Yanagishita M. et al., *J. Biol. Chem.* **254**:911~920 (1978).

Spiro R. G. et al., *J. Biol. Chem.* **249**:5704~5717 (1974).

Wasteson Å., *J. Chromatogr.* **59**:87~97 (1971).

Shively J. E. et al., *Biochemistry*, **15**:3932~3942 (1976).

(张英珊)

6. 硫酸二糖的分析

【试剂】

4-硫酸、6-硫酸及 O-硫酸二糖标准, Seikagaku Kogyo Co. LTD, Japan.

【操作】

以少量蒸馏水溶解已冻干的, 经 Bio-Gel P-10 及 Sepharose 6B 柱层析收集的二糖部分(经软骨素酶 ABC 消化所得的), 并加入 O-硫酸 (Di-OS)、4-硫酸 (Di-4S) 及 6-硫酸 (Di-6S) 二糖标准各 $5\mu L$ 。将上述样品进行纤维素薄板层析 (1 mm 厚度, 面积 20×20 cm), 以 1-丁醇:冰乙酸:2mol/L NH_4OH (2:3:1, V/V) 展开。在 232nm 紫外光下定位, 标出紫外光吸收区, 然后从原点开始每隔 0.5 cm 刮下, 测放射性。GAG-I 经软骨素酶消化后所得二糖中 6-S (63%) 约为 4-S (37%) 的两倍; 由 GAG-II 所得的结果类似, 未发现 O-S 或双-S 的二糖; 而 GAG-III 得二糖中 4-S (66%) 约为 6-S (34%) 的两倍; GAG-IV 所得二糖结果与 GAG-III 中的类似。用二糖标准品分别层析, 可知各个二糖的相对位置。

【文献】

Saito H., et al., *J. Biol. Chem.* **243**:1536~1542 (1968).

(张英珊)

四、神经鞘糖脂

神经鞘糖脂(简称鞘糖脂 glycosphingolipids)是除磷脂及胆固醇以外细胞质膜中的重要脂质,它由一分子长链的神经鞘氨醇(sphingosine)、一分子长链的脂肪酸及一条寡糖链组成(图 84)。

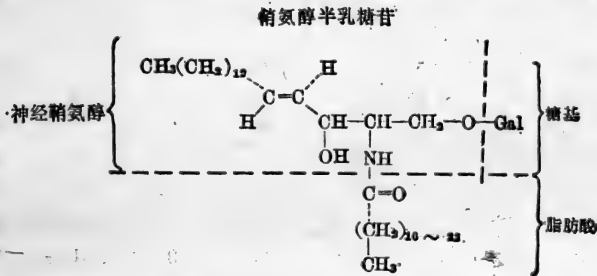


图 84 鞘糖脂的分子组成(以鞘氨醇半乳糖苷为例)

神经鞘氨醇: 是一类化合物,其碳链长度一般为 18~20 碳,有的为饱和烃,有的含 1~2 个双键;羟基的数目也不等,其命名及类别见 Karlsson K. A. (1970) *Lipids* 5:878~891. 哺乳动物中常见的为 $\Delta^4,5$ 18 碳神经鞘氨醇。

脂肪酸: 鞘糖脂中的脂肪酸,碳链长度 16~26 碳,有些脂肪酸含双键,有些还有羟基。

寡糖链: 组成单糖有葡萄糖、半乳糖、氨基葡萄糖、氨基半乳糖及岩藻糖。如果寡糖链中含有唾液酸时,则称为神经节苷脂(gangliosides),以区别于不含唾液酸的中性鞘糖脂(neutral glycosphingolipids)。

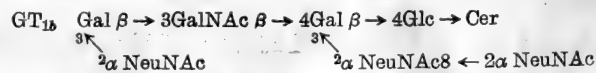
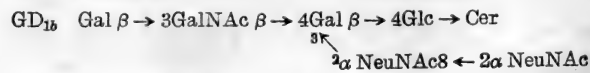
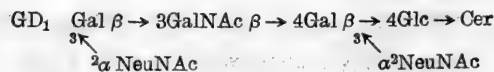
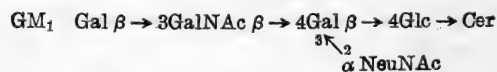
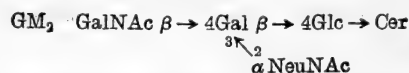
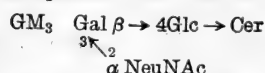
鞘糖脂的分类,除了上述酸性的神经节苷脂和中性鞘糖脂以外,还有含硫酸根的硫酸鞘糖脂(sulfatides)。

鞘糖脂中寡糖链有 15 种基本类型,这是指目前已在生物界中

表 52 肝鞘糖脂中的神经鞘氨醇

神经鞘氨醇	t18:0	d18:0	d18:1	d18:2	t20:0	d20:1
	占总神经鞘氨醇百分比(%)					
中性鞘糖脂						
葡萄糖脑酰胺	3	4	87	3	2	1
半乳糖脑酰胺	1	3	92	3	1	2
乳糖脑酰胺	2	4	86	4	2	3
球三糖脑酰胺	2	4	86	5	2	3
球四糖脑酰胺	2	5	86	4	1	3
神经节苷脂*						
GM ₃	4	5	83	3	2	4
GD ₃	3	4	85	3	2	5
LM ₁	3	3	89	3	1	2
GM ₁	2	4	70	2	1	21
GD _{1a}	2	4	65	2	2	27
GD _{1b}	2	4	51	1	1	43
GT _{1b}	1	2	56	2	1	38

* 神经节苷脂的 Svennerholm 简写法:



以上 G=ganglioside(神经节苷脂); M, D, T 分别表示该分子内含 1, 2, 3 个唾液酸, 数字表示在薄层层析中迁移位点的顺序。

发现者。这 15 种基本类型及其命名是 1978 年由 IUPAC-IUB 生化命名委员会提出的(表 53)。例如前述 GM₁ 属节四糖; GM₂ 属节三糖。

表 53 糖脂的分类

属	缩写符号	结 构*
节三糖 (Gangliotriose)	Ggose ₃	GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
节四糖 (Gangliotetraose)	Ggose ₄	Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
异乳四糖 (Neolactotetraose)	nLcose ₄	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
异乳六糖 (Neolactoexoase)	nLcose ₆	Galβ-1-4GlcNAcβ-1-3Galβ-1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
异乳八糖 (Neolactooctaoase)	nLcose ₈	Galβ1-4Glcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
球三糖 (Globotriose)	Gbose ₃	Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
异球三糖 (Isoglobotriose)	iGbose ₃	Galα-1-3Galβ-1-4Glcβ1-1'Cer
球四糖 (Globotetraose)	Gbose ₄	GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
异球四糖 (Isoglobotetraose)	Gbose ₄	GalNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
乳三糖 (Lactotriose)	Lcose ₃	GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
乳四糖 (Lactotetraose)	Lcose ₄	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
粘三糖 (Mucotriose)	Mcose ₃	Galβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
粘四糖 (Mucotetraose)	Mcose ₄	Galβ1-3Galβ1-4Galβ1-4Glcβ1-1'Cer
半乳二糖 (Galabiose)	Gaose ₂	Galα1-4Galβ1-1'Cer
半乳三糖 (Galatriose)	Gaose ₃	Gal?1-4Galα1-4Galβ1-1'Cer

* Gal, 半乳糖; GalNAc, N-乙酰氨基半乳糖; Glc, 葡萄糖; Cer, 脑酰胺; GlcNAc, N-乙酰氨基葡萄糖。

糖脂的合成是由糖苷转移酶催化。各种糖有其各自的转移酶。下面举一个神经节苷脂的生物合成过程。在糖苷转移酶的催化下,中性鞘糖脂-乳糖脑酰胺的糖链逐步延长,形成一系列神经节苷脂(图 85)。

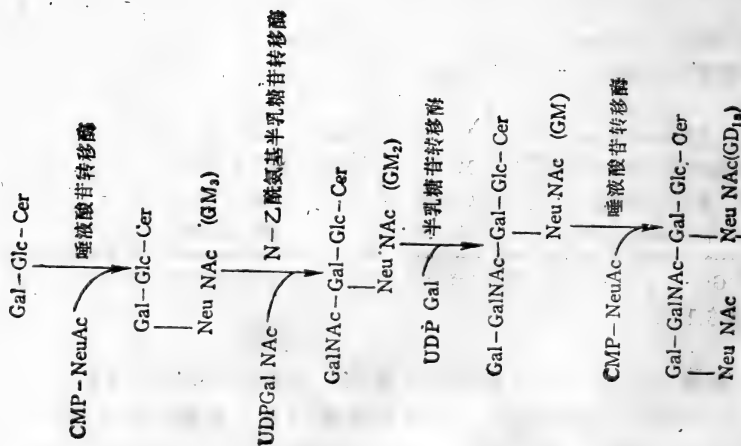


图 85 神经节苷脂中糖链的生物合成

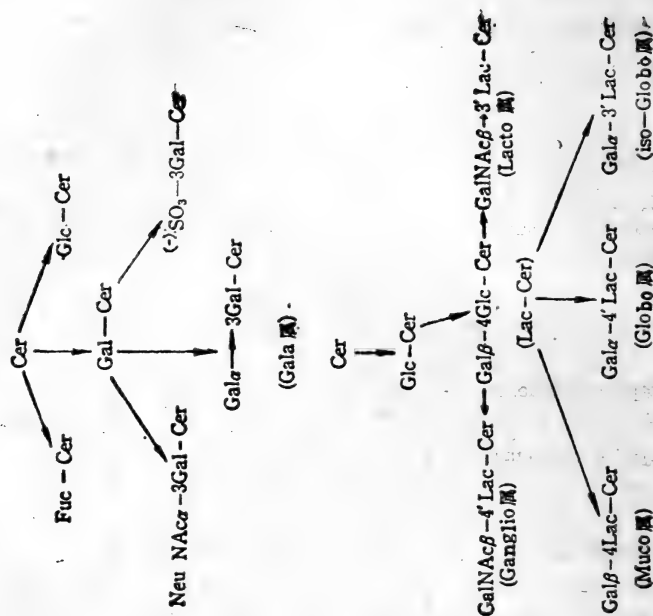


图 86 生物合成中各类寡糖链的关系

前述鞘糖脂寡糖链的 15 种类型,从生物合成角度看彼此是紧密相关的,现用图 86 表示。

唾液酸(sialic acid)是一个总称,代表神经氨酸(neuraminic acid)的一系列衍生物。图 87 是神经氨酸分子结构的三种表示方式,I 为开链式,II、III 为 N-乙酰神经氨酸的吡喃形式。

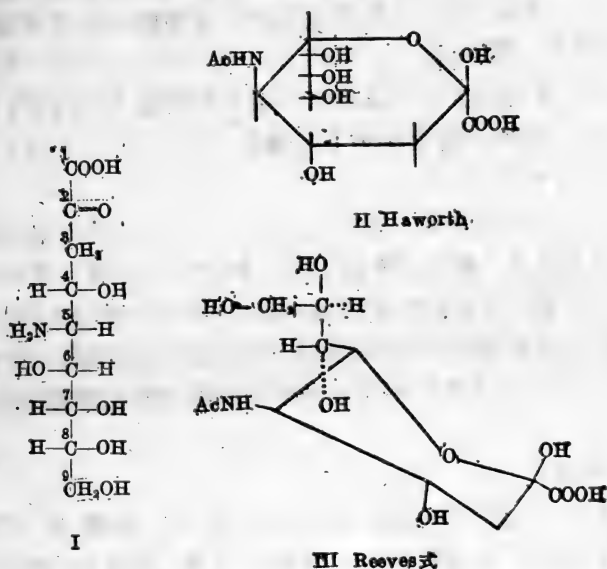


图 87 神经氨酸分子结构

根据神经氨酸-NH₂基上的取代基,唾液酸被分为两大类,一类为 N-乙酰神经氨酸,用 NeuNAc 或 NANA 表示;另一类为 N-乙二醇神经氨酸,用 NeuNG 或 NANG 表示。大多数哺乳动物中兼有两种类型,唯有人体内仅存在 NANA。

唾液酸分子中的 4 个羟基上可以结合乙酰基、乙二醇、甲基或乳糖,所以唾液酸的种类很多。

鞘糖脂的功能:一般认为细胞内的鞘糖脂聚集于细胞表面膜的外侧,和糖蛋白一起,组成细胞表面的糖被(glycocalyx)。近年来越来越多的资料证明细胞表面的寡糖链是和细胞的粘着、受体功能、抗原性以及分化、识别、生长等有关,其中,有些功能已被普

遍接受,例如鞘糖脂具有抗原性,象 A、B、H、Mn、Le 血型抗原决定簇是糖蛋白或糖脂的寡糖链;神经节苷脂是霍乱毒素、破伤风毒素等细菌毒素的受体,也可作为糖蛋白激素(如促甲状腺激素,人绒毛膜促性腺激素等)的受体。

近年又发现一些神经节苷脂是大肠癌、黑色素瘤等的肿瘤相关抗原。此外,神经节苷脂在神经系统中的功能及神经疾病中的意义,也有大量报道。

在人肝癌研究中也发现其神经节苷脂显著与正常肝不同。

(一) 神经节苷脂的分离和纯化

1. 分配分离法

自从 Folch 等最先提出用分配分离方法来提取脑和其他组织中的脂类及分离神经节苷脂以来,经过多种改进,至今仍广泛应用。它主要利用神经节苷脂可从氯仿-甲醇相中分配到含水较多的上层水相中的基本原理进行分离纯化。以下介绍 1965 年 Suzuki 提出的改良法,这曾应用于脑及外周神经组织的糖脂提取,可以提高得率。

【操作】

提取:新鲜组织加 19 倍体积氯仿(C)-甲醇(M)(C:M 的体积比为 2:1)。用捣碎器制成匀浆。也可先加甲醇,捣碎,再加氯仿捣碎。制成的匀浆冰浴致冷后过滤,滤纸先用氯仿洗涤,去除滤纸中脂质。保留滤液(I),滤渣加 10 倍体积氯仿-甲醇(2:1)内含 5% H_2O ,再提取一次。过滤,保留滤液(II),滤渣重复上述操作抽提一次,过滤,弃去滤渣,留滤液(III)。合并滤液(I)、(II)及(III)。

分配法分离神经节苷脂:上述滤液中加入 0.2 倍体积 0.1 mol/LKCl 或 NaCl 溶液,充分混合后静置或低速离心使分层。吸出上层液(I),测定体积,不要将两层间的疏松沉淀吸出。下层液中加入氯仿-甲醇-0.58% NaCl 或 0.74% KCl 液按 3:48:47 混合,此组分接近理论上层液组成,加入量为补足吸去的上层液(I),充分混和,再静置或低速离心分层,吸出上层液(II)。重复上述处理,得上层液(III)。合并上层液(I)、(II)及(III),在旋转减压蒸馏器

中减压蒸馏至半量(可加少量正丁醇或甲苯防止泡沫)。最后冰冻干燥,冻干物为白色粉末状。冻干物加少量蒸馏水,移入透析袋中,对蒸馏水透析1~2天。

如果提取大量组织样品,称重,加入3倍量蒸馏水打成匀浆,再加入10倍体积冰冷的丙酮,制成丙酮粉。然后用含5% H₂O的氯仿-甲醇(2:1)混合液提取丙酮粉中的脂质。

提取小量样品时,可在玻璃管中直接用旋涡振荡器(vortex)或超声波处理数小时;也可再加电磁搅拌以利提取。脱水的样品或长期保存于低温下脱水的样品,应用含5% H₂O的氯仿-甲醇混合液提取。

【讨论】

(1) 分配分离的上层会混杂少量磷脂及一些其他脂类。

(2) 极性低的神经营苷脂(如 GM₄)难以定量提取,这对血糖脂含量高的外周神经组织及 GM₄含量高的灵长类、鸟类等脑组织的提取影响尤为明显,即或下层经过六次提取,对 GM₄仍不能充分提取。

1973年 Tettamanti 等介绍了用四氢呋喃来提取的方法,这样可以定量回收神经节苷脂并避免了用氯仿-甲醇提取时糖蛋白部分溶入的弊病。组织先在1体积 pH 6.8、0.01 mol/L 磷酸钾盐缓冲液(PB)中匀浆,而后加入8体积的四氢呋喃,12,000×g 离心10分钟,不溶物再用 PB-四氢呋喃(1:4)液提取三次,合并提取物,加入0.3体积乙醚,使之形成两相,有机相加入0.1体积水再分配提取,收集合并水相经透析后得神经节苷脂粗提品。据报道本法比用氯仿-甲醇提取的得量高,但磷脂污染也明显增加。对低极性神经节苷脂的提取效力未做专门鉴定。

1980年 Svennerholm 及 Fredmen 报道了另一种改良法,其操作包括用20体积氯仿-甲醇-水(4:8:3)提取组织中脂类两次,然后调节以上三种溶剂组成为4:8:5.6,下层用0.5体积甲醇及0.33体积0.01 mol/L KCl 再提取,混合各次上层液神经节苷脂粗提取物,再通过对水透析除去小分子物质。本法与四氢呋喃提

取法比较,神经节苷脂的提取量提高3% (从大脑灰质), 或15% (从大脑白质)。然而,此法并未说明从大脑中对GM₄的提取情况,因此对低极性神经节苷脂含量高的组织是否合用还是个问题,而且也没解决怎样从提取物中除去混杂的硫酸脂及各种磷脂的问题。

2. 离子交换法

1972年 Yu 及 Ledeen 提出一种新型的方法来提取神经节苷脂。他们利用 DEAE-Sephadex 这种弱阴离子交换树脂将神经节苷脂和其他酸性脂类吸附,而将其与大量的中性及兼性解离的脂类分离,酸性脂类可用含盐有机溶剂定量洗脱,然后再通过碱水解。透析及硅胶柱层析逐步除去伴随神经节苷脂一起被洗脱的其他酸性脂类及低分子量的酸性杂质,最后一步硅胶柱层析还可除去经以前各步处理仍残存的少量蛋白质。本法的另一优点是避免应用分配分离,从而使各种神经节苷脂包括低极性的GM₄均可很好地回收,所得神经节苷脂的纯度也高,其中与脂类结合的磷含量很低。

【操作】

提取: 取样品若干克(脑组织1~2g, 外周组织或其他组织2~4g)加10~15倍体积氯仿-甲醇(1:1)混合液,室温下用玻璃匀浆器匀浆5分钟,置冰箱中冷却,用脱脂的滤纸或中等孔径的烧结玻璃过滤,保留滤液(I)。滤渣用10倍体积C:M(1:1)液,匀浆器匀浆,过滤,得滤液(II)。滤渣再重复抽提一次,得滤液(III)。合并滤液(I)、(II)及(III),量其总体积,最后调节M:C:水的比例,使之达到60:30:8(溶剂A之组成),最终体积约为200mL。例如用1g脑组织,每次提取均为10倍体积,最终得提取液为30mL,其M:C:水为15:15:0.8,(1g组织中含水约为0.8g)则应加入105mL甲醇、45mL氯仿及7.2mL水使之达到60:30:8,总体积为188mL,接近200mL。

DEAE-Sephadex 柱层析: 称2.2g DEAE-Sephadex A-25置一小瓶中;加30mL溶剂B [M:C:0.8 mol/L NaAc(醋酸钠)水溶液之混合液]不时振荡混和5~10分钟,静置,吸去上层清液。如

此重复洗树脂三次。溶剂 B 最好新鲜配制，最后让树脂浸泡在溶剂 B 中过夜。然后用 30 mL 溶剂 A (M:C:水为 60:30:8) 洗树脂 3~4 次，最后悬浮于 10 mL 溶剂 A 中倒入外径为 14 mm 的层析柱中，柱中先放少许溶剂 A，让树脂自然沉降，溶剂流出，再用 60~80 mL 溶剂 A 洗涤以除去全部醋酸钠。

将前述 200 mL 提取液倒入层析柱中，流速不超过 1 mL/分可保证酸性脂类全部吸附于柱上。假如由于柱的上部被小量变性蛋白质堵塞，则可轻轻搅动顶部，以保持流速。如果在顶部加一层细玻璃珠可避免上述现象的发生。200 mL 提取液通过后，用 100 mL 溶剂 A 洗脱，流速可稍快。此流出液及洗脱液中有胆固醇、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、脑苷脂、中性糖脂等。如果需要的话，这些脂类还可进行分离纯化。神经节苷脂将吸附在柱上，除非超过柱的负载或有盐类存在溶剂中。最后用 180 mL 溶剂 B 洗脱，神经节苷脂及其余酸性脂类均被洗下。

碱处理及透析：上述由溶剂 B 洗下的流份含酸性脂类及醋酸钠，减压蒸干后，加 0.1 mol/L NaOH 的甲醇溶液 15 mL，温和地超声使溶解。然后加热至 35~40°C 2~3 小时，之后迅速减压蒸去甲醇，残渣移入透析袋中，用蒸馏水 20 mL 分次将残渣洗入透析袋中，并加入 1 mL 0.5 mol/L EDTA (四钠盐) 以消除二价金属离子。在冷处对蒸馏水透析两天，袋内容物冰冻干燥。

硅酸柱层析：这最后一次层析是为了去除未被碱分解的酸性脂类(例如硫酸脂、游离脂肪酸等)。硅酸可用 Unisil 硅酸 200~325 mesh (clarkson 厂) 或用 Iatrobeds (日本 Iatron 厂)。两者都含有一些杂质，可被氯仿-甲醇洗脱，将出现于薄板层析上近唾液酸神经节苷脂处，呈黄棕色。大部分杂质可经预处理除去。2g Unisil 或 Iatrobeds (6RS-8060) 置 30 mL 离心管中，用 M:C:2.5 mol/L NH_4OH 60:30:8 混合液洗涤四次，每次让硅酸自然沉降，弃去上层清液；然后用 M:C:H₂O 60:30:8 洗涤四次，最后悬于 5~10 mL 后一溶液中，倒入小柱(外径 14 mm)。待硅酸沉降后，依次用后一溶液 30~40 mL，C:M(1:1) 溶液 20 mL 及 C:M (95:5) 溶液

20mL 洗柱。最后把前述神经节苷脂样品(即已经透析与冰冻干燥)溶于 4 mL C:M (1:1) 溶液中,轻微超声,如有不溶物质(蛋白质)则用离心除去,再加入 6mL 氯仿,将此 10 mL 脂质样品上柱。硫酸酯、脂肪酸等在第一流份即 25 mL C:M (4:1) 液中被洗出,流速调节在 0.5 mL/分。神经节苷脂在 90 mL C:M (1:1) 洗脱液中洗出。较少量样品则可用 1 g 硅胶,以 10 mL 吸管为层析柱。如硫酸脂在第一流份中未被完全洗出,则第二流份即神经节苷脂流份可再经第二根柱层析分离之。

将洗脱液分别减压蒸干待进一步分析。

【讨论】

(1) 小量样品(如含神经节苷脂量 50 μ g)则整个方法规模可缩小,如 DEAE-Sephadex A-25 仅用 0.7 克,其他试剂也用 1/3 量即可。这样对水透析时样品体积可减少。此外,为避免透析时样品丢失的危险,可改用 Sephadex G-50 脱盐。

(2) 很少数的神经节苷脂的唾液酸部分含有 O-乙酰基,如经上述碱水解可使乙酰基脱落,为此可省去碱水解,但在这种条件下层析纯化的神经节苷脂样品中混有酸性磷脂,如丝氨酸磷脂及肌醇磷脂。在 TLC 时这两种磷脂的层析速度比大多数神经节苷脂快,在中性或含氨展开体系中它们的层析位置略在 GM_3 之前。

(3) 神经节苷脂可通过硅胶柱层析进行制备。Kawamura 及 Taketomi 介绍了应用 Silicagel G 及 Kieselguhr-G 各半量装柱分离脑中神经节苷脂, Seyfried 等介绍了放大前述离子交换法来分离大量肝组织中的神经节苷脂的方法。

(4) 吸附层析所用的 Iatrobeads 可以回收反复使用。用过的 Iatrobeads 加入约二倍体积氯仿-甲醇(1:1)液间断振荡数次后静置除上清液,反复洗三次,再改用甲醇洗三次,弃上清液后待自然干燥即可。

(二) 神经节苷脂的鉴定

1. 神经节苷脂的定量——唾液酸含量测定

神经节苷脂的量通常可以其中唾液酸部分的含量来表示。唾液酸定量的方法早期是通过唾液酸与某些试剂如地衣酚(oroic acid)、二甲基氨基苯醛(dimethylaminobenzaldehyde)及间苯二酚(resorcinol)等生成特殊的颜色,然后用比色法测定。目前仍广泛应用的是经 Jourdion 改进的间苯二酚法。以上方法可以测定结合的及游离的唾液酸,而硫代巴比妥酸法先经酸水解则可专门测定游离的唾液酸。

(i) 间苯二酚-盐酸法

本法可以测定 10~30 μg 结合或游离的唾液酸,甚至降至半量也可用此法测定。

含唾液酸 10~30 μg 的样品水溶液 2 mL 加间苯二酚试剂工作液(最好用苯重结晶的间苯二酚 2 g 溶于蒸馏水 100 mL,此为贮存液,可于 4°C 保存数月。取贮存液 10 mL 加含 0.1 mol/L 硫酸铜的水溶液 0.25 mL,浓盐酸 80 mL,加水至 100 mL,混匀置室温 4 小时后贮于 4°C,此为工作液。此液呈黄色,如变绿色则应重配),试管加盖于 100°C 煮沸 15 分钟,迅速冷却,再加醋酸正丁醇-正丁醇(85:14)4 mL,振荡提取后置水浴 15 分钟,离心取上层有机相在 580 nm 测光密度。如样品中可能混有己糖或其他糖类,则应同时测 450 nm 的光吸收,因为己糖、己酮糖、戊糖及其 2-脱氧同类物所产生的干扰色素均在 450 nm 有最大吸收峰,但因它们在 580 nm 也有一定程度吸收,所以唾液酸测定结果应用下列公式校正:

$$A_{580} = \frac{(A_{580} \times R_H - A_{450}) R_S}{R_S \times R_H - 1}$$

式中: A ——吸光度;

R_S ——唾液酸在 580 nm 及 450 nm 的光密度比;

R_H ——干扰色素在 450 nm 及 580 nm 的光密度比。

在测定神经节苷脂纯品并以相应的标准品为标准时,则不用上述校正。用牛或大鼠脑神经节苷脂的混合物为标准品是很方便的,它们的纯品含唾液酸 30~32%。(纯化方法:在透析前加入

EDTA·4Na 使神经节苷脂成钠型, 最后再经甲醇-乙醇混合液结晶以除去游离唾液酸, 所得固体充分干燥后称重。)也可用游离的唾液酸为标准, 但用神经节苷脂为标准可自动校正其他糖的干扰。近年有报道指出用 620 nm 测光吸收比 580 nm 的测定结果为好, 可减少其他糖的干扰。

(ii) 过碘酸-间苯二酚法

由于过碘酸氧化以酮苷形式结合的唾液酸生成结合的醛, 后者可与间苯二酚生成很强的颜色, 其最大吸收峰在 630 nm, NeuNAc 及 NeuNG 的克分子消光系数各为 27900 及 27000, 比单独用间苯二酚的灵敏度要高三倍, 而且由于从酮苷结合的唾液酸生成的醛在 37°C 以过碘酸进一步氧化时是稳定的, 从游离唾液酸生成的醛则被破坏, 而后者在 0°C 时稳定, 根据上述特性可以分别测定结合、游离及总唾液酸量。本法的不足之处是一些神经节苷脂(如 GD_{1b}, GT_{1b}, GD₃, GQ_{1b}等)由于有 NeuNAc(2→8)NeuNAc 连接能耐受过碘酸的氧化。此外, 唾液酸的 C₆ 上如有三碳的侧链取代基时则过碘酸不能和该化合物发生反应。

(iii) 硫代巴比妥酸法

这是一种灵敏度较高, 广泛采用的方法, 基本原理是游离唾液酸被过碘酸氧化生成 β-甲酰丙酮酸(β-formyl pyruvic acid), 后者与 2-硫代巴比妥酸反应生成有色物质, 其最大吸收峰为 549 nm, NeuNAc 及 NeuNG 的克分子消光系数各为 57 000 及 46 000。其灵敏度可测 3 μg 的 NeuNAc, 实际应用中 1.5~2 μg 水平亦可测定。由于结合唾液酸不能生成颜色, 所以测定前样品必需先经酸水解。此外, 需将色素提取到有机溶剂中, 以增强颜色, 提高灵敏度。

【步骤】

(1) 样品水解: 含结合唾液酸 5~40 μg(可低到约 2 μg) 样品, 加入 0.125 mol/L 硫酸水溶液 0.5 mL 中, 试管加盖, 80°C 水浴 1.5~2 小时。

(2) 唾液酸测定: 上述水解液加 0.25 mL 25 mmol/L 过碘

酸钾, 37°C 水浴 10 分钟, 即加 0.2 mL 2% 亚砷酸钠 0.5 mol/L HCl 液, 振荡待黄色消失, 加 2 mL 0.1 mol/L 硫代巴比妥酸液(该液用 NaOH 调至 pH 9), 摇匀, 加盖, 沸水浴 7.5 分钟, 即冷却, 再加 5 mL 酸化正丁醇液(含 5% 12 mol/L HCl 与 1-丁醇), 加盖振荡 4 分钟, 放置分层后, 3000 r/min 离心 5 分钟, 吸出上层正丁醇液, 于 549 nm 比色。

【讨论】

(1) 本法测定值一般偏低, 其原因有二: 一是唾液酸的水解有时不完全, 在测定脑神经节苷脂时, 因有与非末端半乳糖相连的唾液酸, 这比末端唾液酸水解速度慢, 则影响更为明显。经过比较, 牛脑神经节苷脂用本法测定的数值仅为间苯二酚法或气相色谱法测定值的 60%。另一是经热酸处理时, 部分唾液酸可被破坏, 在上述热酸条件下, 大约每小时损失 9%。如果用游离唾液酸为标准时, 必须对结果加以校正, 而以相同神经节苷脂为标准则不必校正。

(2) 2-脱氧核糖、蔗糖及由 2-脱氧核糖、3, 5-二脱氧己糖及某些未饱和脂类经过碘酸氧化生成的丙醛均可生成色素, 这对测定有干扰。高度不饱和脂肪酸自动氧化生成的丙醛及其他产物可与硫代巴比妥酸反应生成与唾液酸生成相同的有色物, 对此可用经验公式校正。

(3) 测定植物样品时, 2-酮、3-脱氧酮酸类也可生成 β -甲酰丙酮酸, 后者与过碘酸反应而引起误差。

2. 薄板层析(TLC)法

TLC 现已成为对神经节苷脂混合物进行分离、鉴定的标准方法, 其灵敏度高, 分离效果好, 且较简便易行。常用硅胶 G(或硅胶 G 与 Kieselguhr G 各半)板。国外商品硅胶 G60 HPTLC 板 (EMLaboratories, Inc, Elmsfold, N. Y. USA 或 E. Merck, Darmstadt, Germany) 分离效果满意, 国内已有黄岩曙光化工厂试制的 TLC 板, 分离效果有待试验。

【步骤】

(1) 层析板预处理;

一般使用前先经 85~100°C 活化 30~60 分钟. 然后层析缸内四壁铺满滤纸, 加入新鲜配置的展开剂, 加盖密闭平衡至少 2 小时.

(2) 层析:

样品: 含 5~15 μg 唾液酸或 15~45 μg 神经节苷脂(于 10×20 cm 板)或含 1~5 μg 唾液酸(于 5×10 cm 板)的样品溶于 C:M (1:1)液中, 浓度约为 1~2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 少量多次小心点样(要求呈 1~1.5 cm 或 0.5~0.75 cm 细线条状), 自然干燥. 其后薄板放入预平衡好的层析缸内, 待展开剂上升接近板顶或正好到顶端时取出, 自然干燥或吹风机吹干.

展开剂: 常用氯仿-甲醇: 0.2% CaCl_2 水溶液体系, 三者可以不同比例配合, 如 60:40:9 或 55:45:10, 50:45:10, 50:40:10 等, 我们实验室应用 55:45:10 比例分离鉴定肝脏神经节苷脂取得良好分离效果. 最近 Rosner 推荐在同一个进展方向上, 分别用 C:M:12 m mol/L MgCl_2 :15 mol/L 氨水(60:35:7.5:3)及 C:M:12 m mol/L MgCl_2 (58:40:9) 序贯层析来进行含多唾液酸的神经节苷脂样品的分离、鉴定.

(3) 显色:

显色用间苯二酚试剂: 先以间苯二酚 2 g 溶于蒸馏水 100 mL (冰箱保存可用 1 月), 再以 10 mL 2% 间苯二酚水溶液+80 mL 浓盐酸(其中含 0.25 mL 0.1 mol/L 硫酸铜)加水到 100 mL. 使用前 4 小时配制, 放置冰箱可保存一周.

显色方法: 用喷雾器喷洒间苯二酚试剂, 要求为均匀细滴至板刚刚润湿为度, 喷后即加玻片封盖(两玻片间需用夹夹紧)110°C 显色 20 分钟, 神经节苷脂呈现紫蓝色斑点.

【讨论】

(1) 室温及湿度明显影响 TLC 分离效果. 湿度大时在硅胶板活化后应立即置干燥器, 且在点样后要再置真空干燥器抽干. 室温高时层析缸可放冰箱内以减慢进展速度, 减少样品扩散, 提高分离效果.

(2) 喷显色剂后加温显色时必需避免浓盐酸蒸发, 才可得名

显色斑。

(三) 中性糖脂的分离和纯化

1971年 Saito 和 Hakomori 提出的从脂类粗提取物中定量分离神经鞘糖脂的方法,至今仍被广泛应用,此法综合了 Folch 分配分离及 Radin 等硅藻土 (florisil) 柱层析分离的优点。此法既能应用于短糖链(一糖至四糖)的中性糖脂,也可定量地分离长糖链(五糖至八糖)的中性糖脂。此法整个操作过程可分为三个部分:

- (1) 用吡啶及醋酸酐将脂质进行酰化;
- (2) 用硅藻土柱层析将酰化的糖脂与其他非糖脂类分离;
- (3) 在氯仿-甲醇-甲醇钠中使糖脂脱酰化。

本法可成功地分离、鉴定微克量的糖脂。

提取: 1g 左右的小块组织加氯仿-甲醇(2:1)10 mL, 制成匀浆后离心, 保留上清液。沉淀加 C:M(1:2)10 mL, 再匀浆, 合并两次上清液, 减压蒸干或氮气吹干, 即粗提取物。

乙酰化: 蒸干的粗提取物置 P_2O_5 干燥器中真空干燥, 加 0.3 mL 干燥吡啶及 0.2 mL 醋酸酐, 充分混和, 室温放置 18 小时后, 加约 50 mL 干燥甲苯, 在旋转蒸发器中减压蒸干。

柱层析: 蒸干物溶于少量己烷(H)-1, 2-二氯乙烷(DCE) (H:DCE=1:4), 倒入层析柱中(Florisol 层析柱; Florisil 50~100 目, 柱为 0.7×10 cm), 用 15 mL H:DCE 液洗柱, 弃去洗脱液; 15 mL DCE 洗柱, 留洗脱液(1), 接着用 DCE-丙酮(1:1)或 DCE-甲醇(9:1)15 mL 洗柱, 留洗脱液(2)最后用 DCE-甲醇-水(2:8:1)15 mL 洗柱, 留洗脱液(3)。

脱酰化: 洗脱液(2)在旋转蒸发器中减压蒸干, 然后加 100~200 μ L 氯仿-甲醇(2:1)溶解沉渣, 再加 25~50 μ L 0.5% 甲醇钠溶液, 摇匀, 放置 30 分钟, 然后加少量乙酸乙酯中和, 在旋转蒸发器中减压蒸干; 加少量蒸馏水, 加温振荡, 成乳浊液, 置透析袋内, 放冰箱内对水透析, 最后冰冻干燥成干粉。

薄板层析分离: 层析板的选择及活化参阅神经节苷脂部分。自行铺制的薄板分离效果较差, 制法是用硅胶 G1g 加水 5 mL,

铺 2~3 mm 厚的薄板。可用作初步分析鉴定。

点样量：可参照中性糖脂中含糖量来确定点样量。

糖脂中含糖量的测定有多种方法，如以乙底酚、蒽酮、咪唑及 α -萘酚硫酸等为显色剂的显色法。这些方法都要先通过水解使糖脂中的己糖游离然后再进行测定，因此测定费时且重复性差。酚-硫酸显色法起初是用于水溶性糖的测定，其后 Worth 将其应用于快速测定糖脂中糖的含量。本法的优点是操作简便，不需先经水解，不受脂类水不溶性的影响。在 5~100 μg 葡萄糖或约 25~500 μg 脑苷脂范围内的光吸收呈线性，且重复性好。具体操作如下：样品溶于 0.2 mL 氯仿，加 1 mL 酚液（4% 酚（A-R）水溶液）混匀，用滴定管快速加入 5 mL 浓硫酸（A-R）（注意大量产热，在振动混匀试剂时勿溅出！）待冷却后在 490 nm 比色。

磷脂（卵磷脂、脑磷脂及神经鞘磷脂）及胆固醇对本法有一定干扰，如用纯化糖脂则不存在此问题。

展开剂：氯仿-甲醇-水（60:30:5）。

显色剂及显色方法：

α -萘酚硫酸法：0.5% α -萘酚（甲醇：水 1:1）液置喷雾器中，均匀喷雾于薄层板上，空气中干燥，喷 95% 硫酸于板上，至湿润即可，100°C 烤至显色。中性糖脂斑点呈灰蓝色。

二苯胺法：试剂为二苯胺 200 mg、丙酮 9.0 mL、苯胺 0.1 mL 混匀后，滴加 64% 磷酸 1 mL，边加边振摇。置喷雾器中，细滴喷雾后，即加盖清洁玻璃，夹紧 130~150°C 烤 20~30 分钟，含糖脂类显示鲜明蓝色。

【文献】

Nilsson, O. et al., *J Lipid Res* **23**: 327 (1982).

顾天爵、朱正美, 国外医学分子生物学分册, **3**(1): 23 (1981).

Magnari, J. L. *Science*, **212**(4490): 55 (1981).

Wilson, B. S. et al., *INT J. Cancer*. **28**: 293 (1981).

Zhu Zheng-mei, et al., *Acta Academica Medicinae Primariae Shanghai*, **10**(3): 81, (1983).

Folch, J. et al., *J. Biol. Chem.* **226**: 497 (1957).

Suzuki, K. *J. Neurochem.* **12**: 629 (1965)

- Tettamanti, G. et al., *Biochem Biophys Acta*. **296**: 160(1973).
- Svennerholm, L. et al., *Biochem Biophys Acta*. **617**: 97(1980).
- Yu, R. K. et al., *J. Lipid. Res.* **13**: 680(1972).
- Uero, K. et al., *J Lipid Res.* **19**: 863(1978).
- Kawamura, N. et al., *J. Biochem.* **81**: 1217(1977).
- Seyfrid, T N. et al., *J Lipid Res.* **19**: 538(1978).
- Klenk E et al., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **270**: 185(1941).
- Werner, I. et al., *Acta Soc Med Ups.* **57**: 230(1952).
- Jourdian, G. W. et al., *J Biol Chem*, **246**: 430(1971).
- Warren, J. J. *Biol. Chem.* **234**: 1971(1957).
- Svennerholm, L. *Biochem. Biophys. Acta.* **24**: 604(1957).
- Karlsson, K. A. *Biochemistry*, **13**: 3643(1974).
- Jourdian, G. W. et al., *J. Biol. Chem.* **246**: 430(1971).
- Yu, R. K. et al., *J. Lipid. Res.* **11**: 506(1970).
- Hess, H. et al., *J. Biol. Chim.* **239**: 32L5(1964).
- Brunngraber, E. G. et al., *Biochem. J.* **103**: 65(1967).
- Gutteridge, J. M. C. *Anal. Chem. Acta.* **70**: 107(1974).
- Posoner, H. *Anal. Biochem.*, **109**: 437(1980).
- Saito, T. et al., *J. Lipid. Res.* **12**: 257(1971).
- Radin, N. S. et al., *J. Biol. Chem.* **217**: 789(1955).
- Worth, H. G. J. *Clin. Chim. Acta*, **34**: 433(1971).
- Bruckner, J. Z. *Physiol. Chem.* **268**: 163(1941).
- Mallow, S. et al., *J. Biol. Chem.* **201**: 825(1953).
- Edman, P. V. *J. Biol. Chem.* **143**: 219(1942).
- Devor, A. W. *J. Amer. Chem. Soc.* **72**: 2008(1950).
- Dubois, M. et al., *Anal. Chem.* **28**: 350(1956).
- Siakotos, A. N. et al., *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* **42**: 913(1965).
- Smith, I. (Ed.) *Chromatographic Techniques 1st Edition* p. 168 Heinemann (1958).

(朱正美 顾天爵)

五、凝 集 素

凝集素(lectin)是一类具有糖专一性、能促使细胞凝集的蛋白质或糖蛋白。它首次被发现于蓖麻籽提取液。已检测的三千余种植物抽提液中,近千种具有血凝活力。其中属于豆科的有600余种,它们的凝集素含量丰富,如大豆(soybean)和刀豆(jacbean)的蛋白质中,凝集素占1.5~3.0%。到目前为止,已纯化并鉴定了性质的凝集素有100余种。不仅植物中存在凝集素,动物乃至人体内也有凝集素,被发现的已有数十种,其中若干种已经纯化。

凝集素的作用都与它的最重要的性质即糖结合专一性有关。根据这一特性提出的关于凝集素的定义,虽有几种不同的说法,但主要可以归纳为两种观点,这两种观点的差别在于是否考虑凝集素的凝集活性。Callow和Goldstein的意见是有糖结合专一性并有凝集细胞能力的物质才能称为凝集素;而Jermyn和Yeow及Horejši和Kocourek则认为具有糖结合专一性的化合物即为凝集素。

Balding等根据有些凝集素的血凝活力被单糖或寡糖以外的物质抑制,就是说,它们对于除糖以外的物质表现专一性,赋予凝集素一词以更广泛的含意:凝集素包括所有非免疫原的,能凝集细胞或沉淀含糖大分子的蛋白质或糖蛋白。

第一个被纯化的凝集素是伴刀豆凝集素(ConA)。Sumner和Howell于1936年从刀豆(*Canavalia ensiformis*)种子纯化了这一凝集素,并发现纯化的ConA能沉淀溶液中的糖元和淀粉,ConA的血凝作用被蔗糖抑制。由此他们提出:ConA的血凝作用可能是它与红细胞表面的糖作用的结果,植物凝集素具有糖结合专一性,它们广泛的生物学活性亦基于与糖结合的专一性,是生物体内物质相互识别和生物体识别外环境物质的一条重要途径。

本世纪四十年代, Boyd 等发现某些凝集素对人的血型抗原具有专一性, 大约 10 年后 Watkins 和 Morgan 确立了血型专一性与糖专一性之间的关系。

自六十年代末 Morell 等发现哺乳动物肝细胞膜上有与半乳糖专一结合的蛋白质后, Hudgin 等利用亲和层析技术从兔肝纯化了这种蛋白质, 同时证明它具有凝集红细胞和促使淋巴细胞有丝分裂的活性, 因此这一蛋白质被称为是第一个纯化的膜凝集素。此后, 不仅在多种动物的许多细胞膜上检测到具有糖结合专一性的蛋白质, 在其他生物体包括病毒、细菌、真菌、粘菌、高等植物等的细胞膜上也检测到具有糖结合专一性的蛋白质。

凝集素的糖专一性通常是用半抗原抑制技术来确定的。抑制凝集素与含糖大分子之间的沉淀反应, 或凝集素的血凝作用所需浓度最小的单糖, 定为凝集素专一的糖。但有些凝集素的血凝作用或沉淀反应不被单糖抑制, 则用含不同糖分子数的寡糖作抑制剂来确定凝集素的具有糖结合专一性。

虽然绝大多数植物或低等动物含只对一类糖及其衍生物专一的一种凝集素(或几种同工凝集素), 但也有含两种或两种以上不同糖专一性的凝集素的例子, 如从荆豆中可分离出对 N-乙酰氨基葡萄糖专一的和对 α -L-岩藻糖专一的两种凝集素。根据现有资料, 按结合糖的类型, 凝集素可分为六类, 它们专一结合的糖分别为: (1) D-甘露糖(或 D-葡萄糖)、(2) N-乙酰氨基葡萄糖、(3) N-乙酰氨基半乳糖、(4) D-半乳糖、(5) L-岩藻糖和(6) 唾液酸。从植物分离的凝集素中, 除麦胚凝集素(简称 WGA)外尚未发现对唾液酸专一结合的凝集素。凝集素有限范围的糖专一性, 可能反映检测方法(血凝作用)的缺点, 因为除对红细胞表面存在的糖专一结合的凝集素以外, 其他的可能被遗漏。事实上, 用与白花苜蓿共生的固氮菌作为测试生物, 在白花苜蓿的抽提液中检测到对 2-脱氧葡萄糖专一的凝集素, 2-脱氧葡萄糖是苜蓿固氮菌的荚膜多糖的成分。

凝集素除对糖的种类具有专一性外, 有些凝集素还对糖的异头异构体、糖苷键的种类、糖分子中各个碳原子上的游离羟基、糖

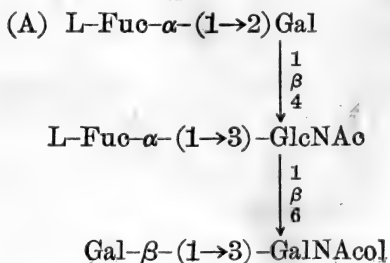
基在糖链中的位置或寡糖分子的构象专一。此外，凝集素分子上结合糖的位点的形状和大小亦与其糖结合专一性有关。

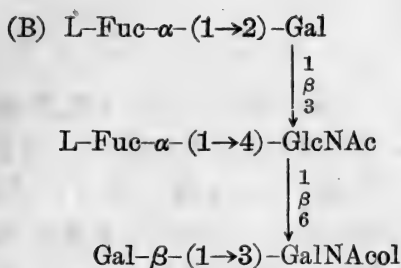
基于凝集素与糖分子专一地和可逆地结合的特性，凝集素已被广泛地用于分离纯化含糖高分子。利用凝集素分离糖蛋白始于 Sumner，他用 ConA 分离酵母蔗糖酶。凝集素亲和技术不仅用于分离纯化各种可溶性糖蛋白，例如血浆蛋白、干扰素等，亦可用于膜糖蛋白的分离纯化，例如胆碱受体、胰岛素受体等。糖组成和寡糖链结构有细微差异的糖蛋白或糖脂，亦可用凝集素亲和技术得到分离，例如甲种胎儿球蛋白的若干分子变种可用固定化 ConA、扁豆凝集素或蓖麻凝集素来分离。蛋白酶水解人 IgG 产生的糖肽，其糖链结构大致可分为四种类型，它们与 ConA 的亲合性不同，因此可用 ConA-Sephrose 层析柱将它们分离。有关这一领域的知识正在日渐增加，在积累一定资料后，有可能根据糖肽在凝集素亲和柱上的行为，推知它们的糖链结构特性。

含有糖基化碱基的不同种 tRNA，亦可利用它们与各种凝集素的不同结合能力得到分离。并可从它们与何种凝集素结合，推知它们所含有的糖基。

利用凝集素分离带有不同表面糖分子的细胞是近些年来发展的新技术，目前已广泛应用于各类淋巴细胞的分离纯化。

除用以分离含糖大分子和细胞外，凝集素对人 A、B、O 型血球糖决定簇的化学结构作出的贡献已为人们所共知。在测定糖链结构方面，凝集素是一类很有用的试剂。由于它严格的糖专一性，在某些情况下有独到之处，例如从人卵巢囊液分离的血型已糖苷，甲基化分析只说明存在：





但不能确定是 A 还是 B, 因为它们的甲基化产物相同。欧洲百脉根凝集素能专一识别 Gal- β -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc 的单-或双-L-岩藻糖衍生物, 很容易地确定了这种己糖苷的结构应是 A 不是 B, 弥补了甲基化方法不能区别的缺陷。

(一) 凝集素的分离、纯化和鉴定

在亲和层析技术建立以前, 多数采用传统的蛋白质分级分离等一般方法纯化凝集素, 如硫酸铵分级沉淀、离子交换层析、分子筛凝胶过滤、超离心等。以上方法现在有时仍使用, 但用得更多的方法是凭借凝集素专一地和可逆地与糖结合的特性, 利用固定化的糖衍生物作为亲和和吸附剂来纯化这类蛋白质。其原理与其他具有专一结合位置的生物聚合物, 如抗原和抗体的亲和、酶与底物或抑制剂的亲和相似。由于凝集素不修饰与它结合的化合物, 反应更为简单。

分离凝集素通常先用生理盐水或缓冲液抽提样品。含脂质较多的物质, 一般用易挥发的有机溶剂和甲醇、低沸石油醚等作预抽提, 除去脂质和其他脂溶性物质。抽提液经硫酸铵分级沉淀, 取含凝集素活性部分, 利用亲和层析技术进行纯化。

下面介绍几种常用凝集素的纯化和鉴定方法。

1. 凝集素的分离、纯化

(i) 伴刀豆凝集素(ConA)

【材料和试剂】

刀豆(*Canavalia ensiformis*), 购自海南岛, 系从美国引种。
Sephadex G-50 或 G-75, 系 Pharmacia Fine Chemicals 产

品。

【操作】

刀豆 (*Canavalia ensiformis*, 不是我国食用刀豆) 种子 100 g, 磨成粉, 加入冷生理盐水 600 mL, 4°C 搅拌 2~3 小时, 或置冰箱过夜。4°C, 10 000×g 离心 30 分钟, 残渣用 400 mL 冷生理盐水如前法再抽提一次。合并两次抽提液, 置冰浴中, 加入固体硫酸铵至 30% 饱和, 在冰箱中放置 2 小时或过夜。4°C, 10 000×g 离心 30 分钟, 取上清液, 置冰浴中, 加入固体硫酸铵至 80% 饱和, 置冰箱过夜。4°C, 10 000×g 离心 30 分钟, 取沉淀, 溶解于生理盐水中, 并对生理盐水透析, 至外透析液中测不出 SO_4^{2-} (用 BaSO_4 沉淀反应检测); 然后对 1 mol/L NaCl 溶液作平衡透析。将经平衡透析的内透液, 吸附于经 1 mol/L NaCl 溶液预平衡的 Sephadex G-50 或 G-75 柱 (2.5×45 cm)。先用 1 mol/L NaCl 溶液流洗, 至洗液的光密度 ($\text{OD}_{280\text{nm}}$) 低于 0.02, 改用含 0.1 mol/L 或 0.2 mol/L 葡萄糖的 1 mol/L NaCl 溶液洗脱, 分管收集, 将 $\text{OD}_{280\text{nm}}$ 大于 0.5 的各管合并, 对蒸馏水透析至外透液中测不出葡萄糖 (用酚-硫酸法测定), 冷冻干燥, 得 ConA 1~1.5 g。产率的高低与刀豆的来源有关, 同一品种不同产地的刀豆, 凝集素含量亦可能有差别。

纯度及活力鉴定: 用上法纯化的 ConA, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (电泳缓冲液为 pH8.9 的 Tris-甘氨酸缓冲液), 考马斯亮蓝染色, 在胶上出现 3~4 条着色带 (单体、二聚体和四聚体, 亦可能有片断亚基)。用新鲜兔血球测血凝活力, 使新鲜兔血球 50% 凝集的最低蛋白质浓度 (根据 ConA 的消光系数 $E_{280\text{nm}}^{1\%} = 13.7$ 计算) 为 1~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (血凝活力允许 ± 2 倍的误差), 不同来源的刀豆, 血凝活力可能有差异。

(ii) 麦胚凝集素 (WGA)

麦胚凝集素可用多种亲和吸附剂制备, 如卵粘蛋白-Sepharose 4B, 甲壳素, 猪胃粘蛋白糖肽-Sepharose 等。本文介绍用甲壳素作亲和吸附剂的方法, 甲壳素可从试剂厂购置, 毋需自己制备, 并

能反复使用。

【试剂】

麦胚：由轧麦厂加工。

DEAE-纤维素(DE-52)：Whatman产品。甲壳素(颗粒状)上海试剂二厂生产。

三羟甲基氨基甲烷(Tris)：上海新华化工厂生产。

【操作】

麦胚(混有碎麦粒和麦麸)1 kg加0.5 mol/L甲酸3L, 4°C搅拌4小时, 纱布过滤。滤液于4°C, 16 000×g离心15分钟, 取上清液, 置冰浴中, 加固体硫酸铵至40%饱和, 置冰箱过夜。4°C, 16 000×g离心15分钟, 弃去上清液, 沉淀用40%饱和硫酸铵溶液洗涤一次, 然后溶于pH 7.8, 0.010 mol/L Tris-HCl缓冲液, 离心除去不溶物质。上清液对同一缓冲液透析, 至外透液测不出 SO_4^{2-} , 离心除去少量不溶物质, 上清液留待过DEAE-纤维素柱。

DEAE-纤维素柱：上清液通过经pH 7.8, 0.01 mol/L Tris-HCl缓冲液预平衡的DEAE-纤维素柱(3.0×20 cm), 部分杂蛋白被吸附除去, WGA在流出液中(约175 mL)。将溶于pH 7.8, 0.01 mol/L Tris-HCl缓冲液的10 mol/L脲溶液加至流出液中, 使溶液的最终脲浓度为3 mol/L。然后将此溶液进行亲和层析。

甲壳素亲和层析柱：甲壳素(颗粒状)先经0.05 mol/L HCl—蒸馏水—0.05 mol/L NaHCO_3 —蒸馏水顺次洗涤至 $\text{OD}_{280\text{nm}}$ 低于0.01。再用含3 mol/L脲的pH 7.8, 0.01 mol/L Tris-HCl缓冲液平衡。将从DEAE-纤维素柱流出的含有WGA的溶液吸附于经如上处理的甲壳素柱(3.5×15 cm), 先用平衡柱的缓冲液洗脱, 至洗脱液 $\text{OD}_{280\text{nm}}$ 低于0.01, 改用含0.5 mol/L甲酸的上述缓冲液洗脱, 分管收集, 流速30 mL/h, 将 $\text{OD}_{280\text{nm}}$ 大于0.2的各管合并, 对蒸馏水充分透析后, 冷冻干燥, 得纯WGA 70 mg。不同品种或不同批的原料, 麦胚凝集素的含量和产率不同, 杂质较多的原料每公斤只能得纯WGA 10~20 mg。

鉴定：纯化的WGA在SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳(胶

浓度 10%，电泳缓冲液 pH7.0, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液), 考马斯亮蓝染色, 显示一条蛋白质着色带。从不同品种麦胚纯化的凝集素同工凝集素的种类和量不同。已纯化的凝集素若在 DEAE-纤维素柱上进一步分离, 可得到二个或三个组分, 有些品种的麦胚, 含有四种同工凝集素。血凝活力测定采用新鲜兔血球, 使血球 50% 凝集的最低蛋白质浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。从不同品种麦胚纯化的 WGA, 血凝活力可能有差异。

(iii) 蓖麻凝集素 (RCA_1)

【试剂】

Sephacrose 4B 或 6B, Sephadex G-100 Pharmacia Fine Chemicals.

乳糖, 上海试剂二厂生产。

【操作】蓖麻 (*Ricinus communis*) 籽 1 kg, 砸碎后置于 pH7.2 的 0.005 mol/L 磷酸缓冲液 (内含 0.2 mol/L NaCl 溶液) (以下简称 PBS) 中, 4°C 浸泡过夜。置搅切器中搅碎, 在冷室 ($6\sim 8^\circ\text{C}$) 中搅拌 2~3 小时, 双层纱布过滤。滤液于 4°C , $17\ 000 \times g$ 离心 30 分钟, 取上清液 (注意: 在倾向上清液时勿搅乱浮在表面的脂层, 勿使其随上清液倾出, 若因不慎, 脂层混入上清液倾出, 可用滤纸过滤除去)。置冰浴, 加入固体硫酸铵至 60% 饱和, 在冰箱中置放 4 小时或过夜。 4°C , $10\ 000 \times g$ 离心 30 分钟, 沉淀用 60% 饱和硫酸铵溶液离心洗涤一次, 然后溶于 pH 7.2 PBS, 并对同一缓冲液透析 (外透液每次 3~5L, 换液 3 次)。透析后溶液中的沉淀离心除去, 上清液进行亲和层析。

Sephacrose 柱亲和层析: Sephacrose 4B 或 6B 柱 ($5 \times 50 \text{ cm}$) 先用 pH 7.2 PBS 平衡, 然后将上清溶液吸附于柱上, 用与平衡柱相同的缓冲液洗去不亲和吸附的物质, 至洗液 $\text{OD}_{280\text{nm}}$ 低于 0.01, 改用含 0.1 mol/L 或 0.2 mol/L 乳糖或半乳糖的 PBS 解吸附, 流速 40~50 mL/h, 分管收集。将含有凝集素 ($\text{OD}_{280\text{nm}}$ 大于 0.5) 的各管合并, 对蒸馏水透析, 至外透液测不出糖 (用酚-硫酸法或蒽酮-硫酸法测定)。将透析液冷冻干燥, 得蓖麻凝集素 (RCA_1) 和蓖

麻毒素(RCA_{II})混合物 180 mg. 此时的血凝活力(使新鲜兔血球 50% 凝集所需的最低蛋白质浓度)为 0.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

经凝胶过滤可将 RCA_I 和 RCA_{II} 进一步分离. Sephadex G-100 和 Bio-GelP-100 均有较好的分离效果.

Sephadex G-100 柱层析: 将冷冻干燥的 RCA_I 和 RCA_{II} 混合物 50 mg 溶于少量 pH7.2 PBS, 加入经 pH7.2 PBS 预平衡的 Sephadex G-100 柱(1.2 \times 100 cm)用同一缓冲液洗脱, 得 2 个蛋白质峰, 第一峰为 RCA_I, 第二峰为 RCA_{II}. 分别对蒸馏水透析, 冷冻干燥, 得 RCA_I 35 mg, RCA_{II} 2.2 mg.

鉴定: 纯化的 RCA_I 和 RCA_{II} 经聚丙烯酰胺凝胶电泳(胶浓度为 7.5%, 电泳缓冲液为 pH8.9, Tris-甘氨酸缓冲液), 考马斯亮蓝 R 250 染色, RCA_I 和 RCA_{II} 分别显示一条蛋白质着色带. 血凝活力测定: 纯化的 RCA_I 使新鲜的兔红细胞 50% 凝集的最低蛋白质浓度为 0.1~0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

不同品种蓖麻籽的 RCA_I 和 RCA_{II} 含量不同, 因此纯化的 RCA_I 和 RCA_{II} 的得率不同. 蓖麻籽的储藏时间亦影响凝集素的得率, 一般新鲜的蓖麻籽得率较高. 纯化的 RCA_I 的血凝活力亦可略有差异.

(iv) 花生凝集素(PNA)

纯化花生凝集素的方法有去唾液酸胎球蛋白-Sepharose、酸处理的 Sepharose、交联的阿拉伯半乳糖、乳糖-淀粉凝胶等多种方法, 下面介绍用乳糖-淀粉凝胶和酸处理的 Sepharose 为亲和吸附剂纯化花生凝集素的全过程.

① 以乳糖-淀粉凝胶为亲和吸附剂

【试剂】

乳糖-淀粉凝胶: 制备方法见附注 1.

甘氨酸: 上海生化所东风生化试剂厂生产.

三羟甲基氨基甲烷(Tris): 上海新华化工厂生产.

【操作】

花生(*Arachis hypogaea*) 100 g, 磨碎, 石油醚(沸点 30~60°C)

脱脂,得脱脂花生粉 50~60 g,加入含 0.15 mol/L NaCl 的 0.001 mol/L 磷酸缓冲液(以下简称 PBS), pH7.0, 250 mL, 搅切器中搅切 1~2 分钟,冷室(6~8°C)搅拌 1~2 小时,4°C, 10 000×g 离心 20 分钟. 沉淀用 pH7.0 PBS 再抽提一次,合并两次抽提液,置冰浴中,加入固体硫酸铵至 60% 饱和,4°C 放置 4 小时或过夜. 4°C, 10 000×g 离心 20 分钟,沉淀用 60% 饱和硫酸铵溶液洗涤一次,离心,除去上清液,沉淀溶于 pH7.0 PBS,并对同一缓冲液透析(外透液 2~3 L,换液 3~4 次),少量不溶物离心除去. 内透液吸附于经 pH7.0 PBS 预处理的乳糖-淀粉凝胶柱[附注(1)](2.5×15 cm),用同一缓冲液洗脱,至洗脱液 OD_{280nm} 低于 0.01,然后用含 0.5 mol/L NaCl 的 pH4.0、0.05 mol/L 甘氨酸-HCl 缓冲液洗脱. 流速 30 mL/h,分管收集,将有血凝活力的各管合并,对蒸馏水充分透析后,冷冻干燥,得纯化的 PNA 36 mg. 凝集素得率随花生产地而异,含量低的,100 g 花生仁只能分离到约 10 mg PNA.

鉴定:纯化的 PNA 分别作碱性(pH8.9,甘氨酸-Tris缓冲液为电泳缓冲液)和酸性(β -丙氨酸-乙酸缓冲液, pH4.0 为电泳缓冲液)聚丙烯酰胺凝胶电泳(胶浓度 7.5%),考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色,均显示一条蛋白质着色带. 经神经氨酸苷酶处理的羊红细胞作血凝活力测定,使羊红细胞 50% 凝集的最低蛋白质浓度为 1.96 μ g/mL.

② 以酸处理的 Sepharose 为亲和吸附剂

【试剂】

Sepharose 6B, Pharmacia Fine Chemicals 酸处理方法见附注(2).

乳糖、半乳糖,均系上海试剂二厂生产.

【操作】

花生仁 500 g,脱脂,缓冲液抽提,硫酸铵沉淀,离心,透析均同

①法. 经离心除去少量不溶解物质后的上清液,吸附于酸处理的 Sepharose 6B[附注(2)]柱(2.6×36 cm),先用 pH7.0 PBS 将作特

异性吸附的蛋白质洗去,再用含 0.1 mol/L 或 0.2 mol/L 乳糖或半乳糖的 pH7.0 PBS 解吸附,将有血凝活力的各管合并,对蒸馏水透析至外透液测不出糖,冷冻干燥,得纯 PNA 54 mg 左右,使人红细胞凝集的最低蛋白质浓度为 1.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(v) 大豆凝集素(SBA)

半乳糖胺-Sepharose, N-乙酰氨基半乳糖-Sepharose, 酸处理的 Sepharose, 猪胃粘蛋白糖肽-Sepharose 均可用于纯化大豆凝集素。下面介绍用酸处理的 Sepharose 和半乳糖胺为亲和吸附剂的方法。它们在开始时抽提步骤相同。

大豆(*Glycine max*)100 g 磨成粉,加入 500 mL 0.9% NaCl 溶液,在组织捣碎器中搅切 2 分钟,置冰箱过夜。4°C, 9000 \times g 离心 30 分钟,上清液(约 350 mL)置冰浴中,加固体硫酸铵至 50% 饱和,置冰箱中 2~4 小时。4°C, 9000 \times g 离心 15 分钟,沉淀弃去,上清液置冰浴中,加入固体硫酸铵至 80% 饱和,冰箱内放置过夜。4°C, 9000 \times g 离心 15 分钟,沉淀溶于 0.9% NaCl 溶液,并对同一 NaCl 溶液透析,至外透液测不出 SO_4^{2-} ,然后对 0.01 mol/L 磷酸缓冲液-0.9% NaCl 溶液(以下简称 PBS) pH7.2 平衡透析。少量沉淀经离心除去,清液中的大豆凝集素分别用两种亲和吸附剂进行纯化。

① 以半乳糖胺-CH-Sepharose 为亲和吸附剂

【试剂】

CH-Sepharose, Pharmacia Fine Chemicals.

半乳糖胺,美国 Sigma 厂产品。

半乳糖胺-CH-Sepharose 的制备方法见附注(3)。

【操作】

相当于 50 g 大豆粉的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80% 饱和的沉淀部分,透析后吸附于用 PBS 预处理的半乳糖胺-CH-Sepharose 柱(1.5 \times 12 cm),并用同一缓冲液洗去不吸附部分,然后用含 0.1 mol/L D-半乳糖的 0.01 mol/L PBS, pH 7.2,解吸附。流速 30 mL/h,分管收集,每管 3 mL,将 OD_{280nm} 大于 0.25 的各管合并,对蒸馏

水透析,按消光系数 $E_{280\text{nm}}^{1\%} = 15.7$ 计算,得 SBA 54 mg. 冷冻干燥后置冰箱保存.

鉴定:纯化的 SBA 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳(胶浓度 10%,电泳缓冲液为 pH7.0, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液),考马斯亮蓝 R_{250} 染色,显示一条着色深的主带和二条着色较浅的带,它们的迁移率比主带大. 血凝活力测定采用新鲜兔红血细胞,使兔红血细胞 50% 凝集的蛋白质浓度为 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ (按 $E_{280\text{nm}}^{1\%} = 15.7$ 计算).

② 以酸处理的 Sepharose 6B 为亲和吸附剂

【试剂】

Sepharose 6B, Pharmacia Fine Chemicals. Sepharose 6B 的处理方法见附注(2).

【操作】

50 g 大豆粉抽提液(上柱样品同①)加至已用 PBS 平衡的酸处理 Sepharose 6B 柱($3 \times 12 \text{ cm}$). 样品上柱后用 PBS 将未吸附的蛋白质洗净,至 $OD_{280\text{nm}}$ 小于 0.01. 然后用含 0.2 mol/L 乳糖的 0.01 mol/L PBS 或 0.05 mol/L 甘氨酸-HCl, pH4.0 解吸附如①,得 SBA 54 mg. 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定(电泳条件同①),凝胶上显示二条主带,一条着色深,另一条着色浅,但成扩散状,后者的迁移率接近电泳指示剂前沿. 还有四条极浅的着色带,其中二条带的迁移率介于两条主带之间,另两条的迁移率比着色深的主带小. 用 Sephadex G-200 凝胶过滤,可将呈扩散状的着色较浅的带与着色深的主带分开.

血凝活力测定表明,呈扩散状的着色带可能是杂蛋白. 从经酸处理的 Sepharose 柱洗脱的活性部分,使新鲜兔红细胞 50% 凝集的蛋白质浓度为 $7.8 \mu\text{g}/\text{mL}$. 经 Sephadex G-200 柱分离后,在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示着色深的一条主带部分的血凝活力为 $5.2 \mu\text{g}/\text{mL}$.

以上两种亲和吸附剂纯化 SBA 的结果表明 SBA 的得率两者相同,但纯度上有明显差别. 用半乳糖胺-OH-Sepharose 柱,只需

一次分离即可得到较纯的SBA。但制备这种亲和吸附剂的原料目前国内没有生产,均需进口,价格也比较昂贵。用酸处理的Sephadex 6B为亲和吸附剂,所得SBA纯度较差,再经Sephadex G-200凝胶分离后的SBA纯度虽与用半乳糖胺-CH-Sephadex纯化的相似,但Sephadex凝胶过滤,大量制备较为困难。

(孙 册)

2. 凝集素活力及纯度鉴定的一般方法

① 活力鉴定: 一般用凝集素血凝活力的大小来衡量凝集活力。血凝实验通常在室温进行。待测样品在小试管或血凝板上作倍比稀释,然后加入适当体积的2%红细胞,1.5~2小时后,肉眼或显微镜下观察结果,以能产生可见凝集的凝集素最大稀释度的倒数作为此凝集素的效价。允许有一管(或一孔 ± 2 倍)的误差,即测定效价为64,可能是32至128。亦可用分光光度法测定,根据红细胞下沉的速度与凝集素浓度之间存在比例关系,凝集素与红细胞反应一定时间后,在620 nm测未下沉红细胞悬液的光吸收,从光吸收值计算凝集素的凝集活力。

使用的红细胞可以是新鲜的人红细胞或动物红细胞,常用的是兔红细胞。亦可用经修饰的红细胞,如经过木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、神经氨酸苷酶或其他酶的适当程度消化的红细胞。这样的处理常常使细胞对凝集素的作用更敏感。也有人用固定化的红细胞[固定方法见附注(4)]。使用固定化的红细胞的优点是不需要每次采血,固定化的红细胞,如保存条件适当,可使用3~6个月。

利用血凝板检测血凝活力的程序: 第一步,在“V”型血凝板中每孔加入25 μL 红细胞缓冲液(0.075 mol/L磷酸缓冲液-0.075 mol/L氯化钠),pH7.2;第二步,取凝集素样品25 μL ,加入第一孔,混匀后取出25 μL ,加入第二孔,混匀后再取出25 μL ,加入第三孔,以此类推,作倍比稀释;第三步,血凝板置于微型混和器上震动,同时每孔加入25 μL 2%红细胞悬液,红细胞加毕后继续震动1分钟;第四步,红细胞板在室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$)或4 $^{\circ}\text{C}$ 放置1.5~2小时,肉眼观察结果。无凝集时红细胞沉于“V”型孔底部,呈

一小圆点;凝集时红细胞相互集聚形成一片网络,不下沉。

血凝活力以产生血凝作用(50%凝集)所需的最低凝集素浓度(以凝集素量或蛋白质量表示 $\mu\text{g}/\text{mL}$)或最低浓度的倒数 $(\mu\text{g}/\text{mL})^{-1}$ 表示,亦可用凝集素样品的稀释倍数即效价表示。必须指出的是以效价表示凝集素的血凝活力,要同时说明凝集素样品的初始浓度,否则无法比较。

② 纯度鉴定:鉴定凝集素纯度的方法与鉴定一般蛋白质的方法基本相同。目前,较为简便、较为普遍使用的方法是聚丙烯酰胺凝胶电泳,经考马斯亮蓝或银染色(银染色比考马斯亮蓝灵敏50~100倍),着色带即是蛋白质带,纯物质应只显示一条着色带。但有的具有同工凝集素的纯化产品可出现不止一条着色带,有的凝集素如ConA,同时存在几种不同的聚合体,亦可出现一条以上的着色带。此外,超离心、凝胶过滤等鉴定蛋白质纯度的方法亦可用于鉴定凝集素纯度。这些方法的具体步骤,可参看有关蛋白质研究方法的文献。

③ 糖蛋白鉴定:凝集素多数是糖蛋白,但也有些凝集素分子中不含共价结合的糖基,鉴定一种凝集素是否为糖蛋白,主要检测分子中是否含有共价结合的糖基。检测方法可以在聚丙烯酰胺凝胶电泳后做糖染色,也可在溶液中进行糖的显色反应。

(a) 电泳凝胶的糖染色法

常用的糖染色的方法有过碘酸-Schiff试剂和阿尔新蓝(Alcian blue)染色。

过碘酸-Schiff试剂染色:电泳完毕后,将凝胶取出,浸入10%冰乙酸-20%甲醇溶液,换液数次,过夜。然后用含7%冰乙酸的1%过碘酸溶液于4°C,黑暗中氧化1小时,随即用10%冰乙酸充分浸洗凝胶,换液数次,至凝胶中残留的过碘酸全部洗净。最后用Schiff试剂于4°C在黑暗中染色1小时。染色后的凝胶可保存于含1%偏重亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)和0.1 mol/L HCl的溶液中。

这一方法主要是染唾液酸含量高的糖蛋白,对唾液酸含量低

或不含唾液酸的糖蛋白不灵敏。

Schiff 试剂的配制: 0.8 g 碱性品红溶解于 200 mL 蒸馏水 (40~50°C), 冷至室温后, 加入 1.37 g 偏重亚硫酸钠和 2.1 mL 浓盐酸, 搅拌, 并加入一匙活性炭, 再搅拌数分钟, 直至溶液颜色全部褪净。然后, 用滤纸过滤, 将无色透明的 Schiff 试剂贮存于棕色瓶中, 保存于冰箱内。

(b) 阿尔新蓝染色

电泳完毕后, 将凝胶取出, 置于 12.5% 三氯乙酸中固定 30 分钟, 用蒸馏水轻轻漂洗。然后放入含 7% 冰乙酸的 1% 过碘酸溶液中氧化 1 小时, 用蒸馏水充分漂洗, 除去多余的过碘酸。再放入 0.5% 的偏重亚硫酸钠溶液中, 以还原残留的过碘酸。30 分钟后, 用蒸馏水充分洗涤。最后用 0.5% 阿尔新蓝 (溶于 7% 冰乙酸) 溶液染色 4 小时。

④ 溶液中的糖显色法: 常用的显色剂有蒽酮-硫酸和苯酚-硫酸。

蒽酮-硫酸显色法: 样品溶液 1 mL, 加入 2 mL 0.2% 蒽酮-浓硫酸溶液, 室温放置 15 分钟。含糖样品变绿, 不久变青绿色, 己糖、戊醛糖、6-脱氧己糖、糖醛酸等均能显色。于 620 nm 比色, 此法可用于糖的定量测定。

苯酚-硫酸显色法: 样品 2 mL, 加入 80% 苯酚 0.1 mL 和浓硫酸 5 mL, 摇匀, 室温放置 30 分钟。具有游离还原基的己糖、双糖、寡糖、聚糖包括它们的甲基化衍生物, 显桔黄色, 光吸收高峰在 485~490 nm, 本实验室取 489 nm 波长比色。苯酚-硫酸试剂与戊糖、甲基戊糖和糖醛酸反应物的最高光吸收在 480 nm。氨基糖则不与之作用。亦可用于糖的定量测定。

附注

① 乳糖-淀粉凝胶亲和吸附剂的制备: 4g 可溶性淀粉和 800 mg 乳糖, 悬浮于 10 mL 蒸馏水, 加入 15 mL 5 mol/L NaOH, 于 37°C 边搅拌边滴加 10 mL 环氧氯丙烷(epichlorohydrin), 至成胶状, 37°C 保温 1 小时, 研碎, 用蒸馏水充分洗涤后备用。

② Sepharose 6B 的酸处理: 将 50 mL Sepharose 浸泡于 0.2 mol/L HCl, 随即移入玻璃砂芯漏斗, 并用 0.2 mol/L HCl 于室温洗涤数次, 抽干, 呈湿饼状, 转移至 100 mL 0.2 mol/L HCl 中, 于 50°C 水浴震荡保温 2 小时。然后在玻璃砂芯漏斗中顺次用蒸馏水、含 1 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液 pH6.0 洗涤。再经所需缓冲液(含 1 mol/L NaCl)平衡洗涤, 即可使用。

③ 半乳糖胺-CH-Sepharose 4B 的偶联: CH-Sepharose 4B(4.5 g) 在 0.5 mol/L NaCl 溶液中泡胀, 并用同一溶液洗涤三次, 离心, 沉淀用蒸馏水洗涤, 除去 NaCl, 将凝胶悬浮于蒸馏水中, 使成 75 mL 的浆状液。室温下, 边搅拌边加入 300 mg 半乳糖胺盐酸盐, 并用 0.1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 5.0, 随即加入固体 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐 [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide HCl, 150 mg], 在 5 分钟的过程中加完毕, 10 分钟后 pH 上升至 5.3, 以后则保持恒定。继续搅拌 1 小时, 然后在室温放置 20 小时。然后, 顺次用 1 mol/L NaCl, 含 1 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.6), 含 1 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L 甲酸钠缓冲液 (pH3.0), 含 1 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.6), 蒸馏水, 上柱所需缓冲液洗涤, 即可使用。若不立即使用, 将凝胶保存于 2 mol/L NaCl 溶液中。

④ 固定红血球的方法: 新鲜全血加入抗凝剂(柠檬酸钠、EDTA 或肝素), 4°C 静置 2~7 天。离心, 用 PBS(0.02 mol/L 磷酸缓冲液-0.1 mol/L NaCl 溶液 pH7.2)洗涤五次。然后用 PBS 将红细胞配成 5% (V/V) 悬液, 加入等体积 2.5% 的戊二醛(用 PBS 稀释, pH7.2), 并加入 NaN_3 至最终浓度为 0.5%, 如 pH 有改变, 调至 7.2, 混匀, 室温, 用同步搅拌器 (50 r/m) 缓慢搅拌 10~18 小时。经戊二醛固定的细胞, 用 PBS 洗涤三次。然后如上步骤再经甲醛固定。最后, 红血球用 PBS 洗涤三次, 并用 PBS 配成 10% (V/V) 的细胞悬液, 保存于 4°C。

(孙 册)

(二) 标记凝集素的制备

标记凝集素可用于细胞膜上糖蛋白或糖脂的定位, 或用于电泳分离后糖蛋白或糖脂的显示, 亦可用于组织化学的定位观察. 标记凝集素可有多种不同的类型, 常用的有放射性、荧光、酶、铁蛋白、血蓝蛋白等几种标记的凝集素. 标记凝集素的制备方法与标记抗体相似.

1. 放射性标记凝集素

放射性标记凝集素用于定量测定较为合适, 但亦可用于放射自显影技术, 作定位鉴定. 放射性标记的凝集素以标记方法和放射源而言, 有多种类型, 本文仅介绍几种放射性碘标记凝集素的制备步骤.

为了使结果可靠, 用于标记的凝集素必须很纯, 没有其他蛋白质的污染; 标记的方法应不导致凝集素生物活力的改变. ^{125}I 或 ^{131}I 标记的常用方法是 Greenwood 的氯胺 T 氧化法, 亦可用乳过氧化物酶和 H_2O_2 为氧化剂.

(i) ^{125}I -WGA 的制备

【试剂】

纯化的麦胚凝集素 (WGA), 制备方法见第 334 页. Na^{125}I , 由原子核所提供; 卵粘蛋白, 按 Fredericq 等方法提取; 牛血清清蛋白, 按 Cohn 等方法制备; 卵粘蛋白-Sepharose 4B, 制备方法见第 355 页.

【操作】

10 μL 含 200 μg WGA 的 0.2 mol/L pH7.4 的磷酸缓冲液 (以下简称 PB), 与 100 μL 含 1.5~2 mCi 无载体 Na^{125}I 的溶液混匀, 加入 20 μL 含氯胺 T 100 μg 的 PB, 于室温剧烈振摇 50 秒, 然后加入 20 μL 含 200 mg 偏重亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 的 PB, 终止反应. 取 1 μL 测标记率. 将 1 μL 样品加至 1 mL 1% 牛血清清蛋白 (BSA) 中混匀, 测放射性 (总放射性). 然后加入等体积的 7% 三氯乙酸 (TCA) 溶液, 混匀, 静置 2 分钟, 离心, 倾去上清液, 沉淀用含 3% TCA 的 PB 离心洗涤五次, 测沉淀的放射性.

$$\text{标记率} = \frac{\text{沉淀放射性}}{\text{总放射性}} \times 100\%$$

^{125}I -WGA 的标记率为 40~60%。混合液通过经 0.1 mol/L pH7.4 的 PB 预平衡的卵粘蛋白-Sephadex 4B 柱 (1 mL), WGA 吸附于柱上。用预平衡柱的缓冲液, 将未反应的游离碘洗去, 洗至洗脱液基本不含放射性 (接近本底)。然后用 0.2 mol/L 乙酸解吸附, 将吸附于卵粘蛋白-Sephadex 柱上的 ^{125}I -WGA 洗下, 分管收集, 每管 1 mL, 置井型计数器内计数, 将放射性最高的 1 或 2 管合并, 滴加 NaOH 溶液中和, 并立即加入牛血清蛋白, 作为保护剂。纯化的 ^{125}I -WGA 的比放射性在 2~4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ WGA, 存放于 -20°C 冰箱, 可用一个月。

(ii) ^{125}I -半夏蛋白的制备

半夏蛋白是从半夏块茎中分离的一种植物蛋白, 不含中性糖。凝胶过滤法测定分子量为 44 000; SDS-PAGE 测定分子量为 10 500。与甘露聚糖专一结合, 但不与葡萄糖的聚糖结合, 在这一点上与已知的对甘露糖专一的凝集素不同, 已知的与甘露糖结合的凝集素也与葡萄糖结合。半夏蛋白具有凝集细胞和促淋巴细胞分裂的作用, 它的凝集细胞和促细胞分裂的作用都具有供体专一性。

【试剂】

纯化的半夏蛋白: 系陶宗晋等制备 (参见第 358 页文献)。

Na^{125}I 、牛血清蛋白: 按 Cohn 等方法制备 (见文献)。

Sephadex G-50: Pharmacia Fine Chemicals 产品。

【操作】

20 μL 含 300 μg 半夏蛋白的 0.2 mol/L pH7.4 PB 溶液中, 加入 1 mCi 无载体 Na^{125}I , 混合后, 加入 20 μL 含氯胺 T 100 μg 的 PB, 于室温剧烈振摇 50 秒。然后, 加入 20 μL 含偏重亚硫酸钠 200 μg 的 PB, 终止反应。取 1 μL 测标记率, 约为 7%。反应液加入经牛血清蛋白饱和及 0.1 mol/L、pH7.4 PB 预平衡的 Sephadex G-50 柱 (0.8 \times 25 cm), 然后用预平衡柱的缓冲液洗脱, 分管收集, 每管 1 mL, 置井型计数器计数, 得到 2 个放射性峰, 第

一个峰为标记半夏蛋白,第二个峰是未反应的 Na^{125}I 。纯化了了的 ^{125}I -半夏蛋白溶液中,立即加入等体积 1% 牛血清清蛋白。 ^{125}I -半夏蛋白的比放射性为 $2\sim 3 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 半夏蛋白。 -20°C 冰箱保存,可用一个月。

(iii) ^{125}I -ConA 的制备(氯胺 T 法)

【试剂】

纯化的 ConA 制备方法见第 333 页。

Na^{125}I 、牛血清清蛋白、Sephadex G-50 均见第 346 页。

【操作】

10 μL 含 200 μg ConA 的 0.1 mol/L pH7.4 PB 中,加入 1 mCi 的无载体 Na^{125}I ,混合后,加入 20 μL 氯胺 T(含氯胺 T 100 μg),室温剧烈振摇 50 秒,然后加入 20 μL 含偏重亚硫酸钠 200 μg 的 PB,终止反应。取 1 μL 测标记率,为 60~70%。将反应混合液加入经 0.1 mol/L pH7.4 PB 预平衡的 Sephadex G-50 柱(1 mL),用预平衡柱的缓冲液洗去未反应的游离 Na^{125}I ,至洗出液中的放射性接近本底。然后,用含 0.2 mol/L 葡萄糖的 0.1 mol/L pH7.4 PB 解吸附,分管收集,每管 1 mL,置井型计数器计数,将放射性最高的 1 和 2 管合并,并立即加入等体积 1% 牛血清清蛋白。然后对 0.1 mol/L, pH7.4 PB 透析,每次 1000 mL PB,换液三次。纯化的 ^{125}I -ConA 的比放射性为 $2\sim 3 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 蛋白质。存放于 -20°C 冰箱可用一个月。

标记凝集素的比放射性与所用 Na^{125}I 的比放射性有关,我们用的 Na^{125}I 的比放射性,一般不低于 50 mCi/mL。

(孙 册)

(iv) ^{125}I -ConA 的制备(乳过氧化物酶法)

ConA 的碘标一般多用氯胺 T 方法,所得碘标物比放射性高($\sim 1.7 \times 10^6$ Bq/mg 蛋白质),但 ConA 活性保存时间较短,我们应用乳汁过氧化物酶(LP)法进行标记,再经 Sephadex G-50 亲和层析纯化,得到高比放射性($8.3 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^6$ Bq/mg 蛋白质)高活性的 ^{125}I -ConA,产物分装置低温冰箱保存,可用 2 个月左右。

标记: ConA 250 μg 溶于 0.2 mol/L PBS (NaCl 浓度为 0.15 mol/L) 100 μL , 加入乳汁过氧化物酶 20 μg (约 20 μL) 及 Na^{125}I 1.0 mCi (约 20 μL), 反应是在 25°C 左右进行. 一分钟后加入 0.03% H_2O_2 5 μL 边加边轻轻振荡, 以后每分钟加一次共 4~5 次. 继续反应 5 分钟后加冰冷 0.05 mol/L PBS (NaCl 浓度为 0.15 mol/L) 以停止反应. (注意: 加入 H_2O_2 量因 Na^{125}I 中的还原性保护剂含量的多少, 需作适当调整.)

分离: 标记的 ^{125}I -ConA 与未反应的 ^{125}I 的分离, 可采用 Sephadex G-25 分子筛分离. 虽然 Sephadex G-50 是 ConA 的亲吸附剂, 但因 Sephadex G-25 的筛空较小, ^{125}I -ConA 排阻在外, 仅极少量吸附于表面, 故仍可用分子筛分离两者.

Sephadex G-25 柱 (1 \times 20 cm) 先经 0.05 mol/L PBS 平衡, 再用血红蛋白溶液 (于 0.05 mol/L PBS 液中, 1 mg/mL) 1~2 mL 将柱饱和. 然后将标记的混合溶液上柱; 最后用 0.5 mol/L PBS 洗脱, 洗脱速度约 24 滴/分, 每 20 滴收一管; 测定各管的 cpm (每分钟计数), 合并第一峰各管为所需的 ^{125}I -ConA.

纯化: 用亲和层析法纯化.

Sephadex G-50 柱 (1 \times 15 cm) 用 0.05 mol/L PBS 平衡. 然后把上述第一峰上柱, 上柱速度以每分钟流出液为 6 滴. 样品全部进柱后, 用 1 个床体积 PBS 洗脱, 流速同上, 然后再用 0.05 mol/L PBS 洗脱, 但流速加快, 直至洗脱液的 cpm 值明显降低且基本稳定; 最后改用 0.2 mol/L 葡萄糖 (0.05 mol/L PBS 液) 洗脱 (流速可以快一些), 每管收集 20~30 滴, 测定各管的 cpm 值, 合并数值高的管.

透析: 把上述纯化的 ^{125}I -ConA 装入透析袋, 对 0.05 mol/L PBS 透析 24 小时, 白天每 3~4 小时换一次 PBS 液, 待葡萄糖已充分透析去除, 测定袋内溶液的 cpm 及 A_{280} , 计算比放射性. 最后加入血红蛋白约 1 mg/mL, 以保护 ^{125}I -ConA. 分装小管, 低温冰箱保存, 可用约二个月.

(朱正美 顾天爵)

2. 酶标记凝集素

酶标记凝集素既可用于完整细胞, 亦可用于组织切片。其优点是同一标本既可作光学显微镜观察, 在经锇酸固定后, 又可作电子显微镜观察。

辣根过氧化物酶(简称 HRP)和碱性磷酸酯酶(简称 ALP)是常用的两种酶, 但这两种酶用来标记 ConA 都不理想, 因为它们都是糖蛋白, 能和 ConA 非共价结合。标记时加入甲基 α -甘露糖苷或葡萄糖可保护 ConA 的糖结合位点。然而, 当除去反应液中的糖后, ConA-HRP 分子间仍可形成非共价结合, 出现沉淀, 使 ConA-HRP 活性下降。用不含糖的细胞色素过氧化物酶(简称 C-Pox)替代 HRP, C-Pox 与 ConA 不会形成非共价结合, 可避免产生沉淀。

凝集素与过氧化物酶偶联, 在方法上与抗体相似, 有一步法和两步法两种。

(i) 半夏蛋白-HRP 的制备(两步法)

【试剂】

辣根过氧化物酶(RZ=3), 上海生化所东风生化试剂厂生产。纯化的半夏蛋白。

甲基 α -甘露糖苷, 上海试剂二厂生产。

【操作】

将 10 mg HRP 加至 0.2 mL 1.25% 戊二醛溶液(用 0.1 mol/L pH6.8 磷酸缓冲液稀释), 室温放置 18 小时, 对含甘氨酸(2 mg/mL)的 0.9% NaCl 溶液 500 mL 透析, 终止反应。4 小时后改为对 0.9% NaCl 溶液透析 24 小时, 共换液三次。在经透析的活化 HRP 溶液中加入 0.9% NaCl 使最终体积为 1 mL。再加入 0.1 mL 1 mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液(pH9.5)。半夏蛋白 10 mg 和甲基 α -甘露糖苷 200 mg 溶于 1 mL 的 0.9% NaCl 溶液, 室温放置 30 分钟, 然后缓慢滴加至 HRP 溶液中, 4°C 放置 24 小时, 加硫酸铵至 50% 饱和, 离心, 弃去上清液, 沉淀用 50% 饱和硫酸铵洗两次, 然后溶解于 pH7.2 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液-0.15

mol/L NaCl 中(以下简称 PBS)。4°C 对 PBS 透析,每次 1L,换液三次,离心,除去少量沉淀,上清液中加入防腐剂 NaN_3 (2%),分装于安瓿瓶中,置冰箱保存,可使用三个月,如加入甘油在 -20°C 保存,则可保存六个月至一年,但加甘油的酶标记蛋白往往使背景着色较深。

(ii) RCA-HRP 的制备(一步法)

【试剂】

纯化的蓖麻凝集素(RCA_1)。

乳糖,上海试剂二厂生产。

Sepharose 4B 或 6B, Pharmacia Fine Chemicals 产品。

HRP(RZ=3),上海生化所东风生化试剂厂产品。

【操作】

10mg RCA_1 和 36 mg 乳糖溶于 1 mL pH6.8, 0.1 mol/L PBS 溶液,室温放置 30 分钟,加入 10 mg HRP,混匀,放置 5 分钟,加入 0.05 mL 1% 戊二醛,室温温和搅拌 2 小时。4°C 对含甘氨酸(2 mg/mL)的 pH7.2、0.1 mol/L PBS 透析,停止反应,然后对 pH7.2、0.1 mol/L PBS 透析 24 小时,换液三次。内透液用 Sepharose 吸附,先用 PBS 洗去 HRP-HRP 复合物,吸附于 Sepharose 的 RCA_1 -HRP 和 RCA_1 - RCA_1 复合物,则用含 0.2 mol/L 乳糖的 PBS 解吸附, RCA_1 -HRP 和 RCA_1 - RCA_1 两种复合物未能分开。洗脱液于 4°C 对 PBS 透析,除去乳糖。透析后溶液经离心除去少量沉淀,上清液中加入少量 NaN_3 (1%),分装于安瓿瓶。冰箱保存 1~2 个月,活性基本不变。

【讨论】

制备 ConA-HRP 和 WGA-HRP,不论用一步法或用两步法,在偶联反应完成后,分别除去保护凝集素糖结合位点的甲基 α -甘露糖苷和 N-乙酰氨基葡萄糖后,逐渐出现沉淀(ConA 更甚),得到的标记凝集素活力均较低,不适于用作探针。

(iii) ConA-C-Pox 的制备

【操作】

含 42 mg ConA 的 pH7.2, 0.1 mol/L PBS 1 mL 与含甲基 α -甘露糖苷 (1 mol/L) 的 pH7.2, 0.1 mol/L PBS 1 mL 混和, 室温放置 1 小时, 加入 0.5 mL C-Pox (10 mg), 混匀, 5 分钟后加入 1% 戊二醛, 使最终浓度为 0.025%, 温和搅拌 1 小时, 对含甘氨酸 (2 mg/mL) 的 pH7.4, 0.1 mol/L PBS 透析, 停止反应. 4 小时后, 换不含甘氨酸的同一缓冲液, 继续透析 24 小时, 换液三次. 然后与 Sephadex G-200 混和, 室温放置 1 小时, 砂芯漏斗过滤, PBS 洗涤, 除去聚合的 C-Pox. 结合于 Sephadex 的 ConA-C-Pox 和 ConA-ConA 复合物, 用含 1 mol/L 甲基 α -甘露糖苷的 pH7.4 0.1 mol/L PBS 洗脱, 4°C 对同一缓冲液透析, 除去甲基 α -甘露糖苷. 加入防腐剂, 置冰箱储存.

(iv) ConA-ALP 的制备

【操作】

ConA (mg/mL) 和 ALP (mg/mL) 溶于含 0.5 mol/L NaCl、0.5 mmol/L CaCl_2 和 10 mmol/L MnCl_2 的 pH7.2, 0.05 mol/L PBS 中. 然后在混合液中加入戊二醛, 使最终浓度为 0.1%, 室温放置 1.5 小时, 加入乙醇胺 (最终浓度 0.1 mol/L), 继续在室温放置 2 小时, 经 Sephadex G-200 柱纯化, 吸附于柱上的 ConA-ALP 复合物用甲基 α -甘露糖苷洗脱, 对大量 PBS 透析, 除去甲基 α -甘露糖苷, 得到的 ConA-ALP 复合物, 加入防腐剂, 置冰箱保存.

(朱正美 顾天爵)

3. 荧光标记凝集素

用荧光标记的凝集素作探针较为简便, 是目前常用的一种方法. 但不能在电子显微镜下观察, 看不到细胞细微结构的变化, 是其不足之处.

(i) ConA-FITC 的制备

【试剂】

纯化的 ConA, 制备方法见第 333 页.

异硫氰酸荧光素 (FITC), 沈阳药学院制药厂产品.

【操作】

将 ConA (5 mg/mL) 与 FITC (fluorescein isothiocyanate, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 溶于 pH9.0、0.15 mol/L 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 溶液, 25°C 保温搅拌 20 小时, 对含 1 mmol/L CaCl_2 、1 mmol/L MnCl_2 、1 mmol/L MgCl_2 、0.5 mol/L NaCl 的 pH7.0、0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液充分透析, 除去未反应的荧光素, 储存于暗冷处。

这样制备的 ConA-FITC 其 280 nm 与 495 nm 光密度之比为 0.90。

(孙 册)

(ii) ConA-FITC 的制备(固相化法)

ConA 与异硫氰酸荧光黄(FITC)结合的方法虽有报道, 但结合物(ConA-FITC)的 F/P 值(光密度 $A_{495\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$)较低, 国外商品 F/P 值为 1 左右, 但制备方法不明。本实验应用 ConA 的固相标记法, 方法简便, 重复性好, 结合物 F/P 值达 1.2 左右, 且与未结合前 ConA 对兔红细胞凝集效价相同, 应用于组织切片、单细胞及凝胶电泳分离后糖蛋白的染色效果良好。

ConA 固相化-亲和吸附: 称取 ConA 10 mg 溶于 PBS (0.1 mol/L NaCl 溶于 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 pH7.4) 1 mL 中, 加 200 mg Sephadex G-50 (预先经 PBS 浸泡) 混匀, 置 4°C 冰箱过夜。次日, 吸出上清液, 用少量(约 0.5 mL) PBC 洗 Sephadex G-50 三次; 合并各次上清液, 测蛋白质含量, 计算 ConA 吸附率, 一般为 80~90%。

ConA 吸附率

$$= \frac{\text{ConA 蛋白质总量}(\text{mg}) - \text{上清液中蛋白质质量}(\text{mg})}{\text{ConA 蛋白质总量}(\text{mg})} \times 100\%$$

以上蛋白质质量是测定溶液的 $A_{280\text{nm}}$, 按 ConA 的百分消光系数 ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 13.7$) 计算。

ConA 与 FITC 结合: 称取 FITC 1 mg, 溶于 PBS 1 mL, 逐滴加入 ConA-Sephadex 中, 混匀, 轻摇 20 分钟放置暗处 4~6 小时(约 25°C), 然后装入层析柱, 用黑纸包住以避光, 柱用 PBS

洗,直至洗出液无明显荧光为止。改用 0.2 mol/L 葡萄糖(溶于 PBS 液中)洗下结合于 Sephadex G-50 上的 ConA-FITC, 收集有荧光部分的洗脱液。

透析及浓缩: 上述洗脱液对 PBS 透析, 去除葡萄糖后, 再用聚乙二醇(分子量=20 000)浓缩至 3 mL 左右。装于小管放在低温冰箱保存, 可用一月左右。

ConA-FITC 质量鉴定:

F/P 值测定——吸出结合物 0.2 mL, 加 PBS 2.8 mL(或两者均用半量)测定 $A_{490\text{nm}}$ 及 $A_{280\text{nm}}$, 查 FITC 标准曲线得其浓度 $\mu\text{g/mL}$ 值, OD_{280} 按 ConA 的百分消光系数代入下式计算得 ConA mg/mL 值。

$$\begin{aligned} & \frac{A_{280}}{13.7} \times 10 \text{ mg/mL} \times \text{样品稀释倍数} \\ & = \text{ConA 蛋白质 mg/mL} \\ \text{F/P} &= \frac{102 \times 10^3 (\text{ConA 分子量})}{389 (\text{FITC 分子量}) \times 10^8} \times \frac{\mu\text{g/mL FITC}}{\text{mg/mL ConA}} \\ &= 0.26 \frac{\mu\text{g/mL FITC}}{\text{mg/mL ConA}} \end{aligned}$$

凝集活性测定——ConA-FITC(1 mg/mL)倍比稀释, 各管加入兔红细胞悬液($1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$)在 37°C 保温 30 分钟, 观察凝集反应, 记录血细胞出现凝集的最低稀释度。

荧光染色——细胞或组织切片加入 ConA-FITC 液(含蛋白质约 0.1 mg/mL)适量, 37°C 保温 30 分钟, 后用 0.1 mol/L PBS (pH8.0)洗, 在荧光显微镜下观察。

【讨论】

(1) 本方法有两个优点, 一是 ConA 亲和吸附于 Sephadex G-50 使之固相化, 保护了它与糖反应的基团, 使 ConA 在反应过程中性质稳定, 不易失活, 因而 ConA 活性受加入 FITC 量、反应温度及时间等影响小。二是被 Sephadex G-50 吸附的 ConA 是有活性的分子, 原料中无活性或低活性的分子及反应中失活的分子, 均随溶液流出, 达到了分离的目的。

(2) Sephadex-ConA 与 FITC 在 pH7.4 条件下进行反应, 生成的 ConA-FITC 用葡萄糖易于洗脱, 如 pH 偏高, 反应后 Sephadex G-50 上可见明显荧光, 但难以用糖洗脱, 此时如用甘氨酸-盐酸缓冲液 (pH3) 洗脱, 洗脱物立即加 NaHCO_3 中和, 也可得活性较高的产品, 但得量稍低。

(朱正美 顾天爵)

4. 铁蛋白标记凝集素

以铁蛋白标记的凝集素作探针, 只能用于电子显微镜观察. 但由于它的电子密度大, 所得电镜图像比酶标记的清晰.

ConA-铁蛋白复合物的制备

【试剂】

ConA, 纯化方法见第 333 页.

马脾铁蛋白, 上海生化研究所东风生化试剂厂生产.

Sephadex G-200、Sephacrose 2B, 均系 Pharmacia Fine Chemicals 产品.

甲基 α -甘露糖苷, 上海试剂二厂生产.

【操作】

42 mg ConA 溶于 1 mL pH7.2、0.1 mol/L PBS, 与 1 mL 含 1 mol/L 甲基 α -甘露糖苷的同上 PBS 混和, 室温放置 30 分钟, 加入 2 mL 马脾铁蛋白 (130 mg), 室温搅拌 5 分钟, 滴加 0.1 mL 1% 戊二醛, 使最终浓度为 0.025%. 温和搅拌 1 小时, 对含甘氨酸 (2 mg/mL) 的 pH7.4、0.1 mol/L PBS 透析, 终止反应. 复合物与悬浮在 pH7.4、0.1 mol/L PBS 的 Sephadex G-200 混和, 室温放置 1 小时. ConA-铁蛋白和 ConA-ConA 复合物与 Sephadex 结合. 砂芯漏斗过滤, PBS 洗涤, 除去聚合的铁蛋白. 结合于 Sephadex 的 ConA-铁蛋白和 ConA-ConA 复合物, 用含 1 mol/L 甲基 α -甘露糖苷的 PBS 洗脱.

Sephacrose 2B 柱 (2.5 × 35 cm) 进一步纯化. 甲基 α -甘露糖苷洗脱液转移至经 pH7.4、0.1 mol/L PBS 预平衡的 Sepharose

2B 柱 (2.5 × 35 cm) 进行层析, 用预平衡柱的同一缓冲液洗脱, 分管收集, 测 340 nm 光密度定铁蛋白量, 将含 ConA 和铁蛋白量相等的 (以铁蛋白含量与 ConA 含量分别对收集的管数作图, 取两条曲线相交的部份) 各管合并。4°C, 对洗脱缓冲液透析, 然后加入防腐剂, 置冰箱保存。

我们制备的 ConA-铁蛋白复合物, 没有进一步用 Sepharose 2B 纯化, 有关纯化资料, 系摘自文献。

(朱正美 顾天爵)

附注

(i) 卵粘蛋白-Sepharose 的偶联方法

20 mL (沉积体积) 溴化氰活化的 Sepharose 4B 凝胶, 经 pH9.0、0.1 mol/L NaHCO₃ 缓冲液充分洗涤后, 迅速转移至 30 mL 含 120 mg 卵粘蛋白的上述缓冲液中。4°C 温和搅拌 4~6 小时, 放冰箱过夜。砂芯漏斗过滤, 然后将凝胶悬浮于 50 mL 含 0.2 mol/L 甘氨酸的 NaHCO₃ 缓冲液, pH9.0, 室温搅拌 1 小时, 过滤, 顺次用上述 NaHCO₃ 缓冲液—2 mol/L NaCl 溶液—0.2 mol/L 乙酸溶液洗涤, 每次均洗至流出的洗液 OD_{280nm} 光密度低于 0.02, 再用蒸馏水洗去乙酸, 最后用上柱缓冲液平衡, 即可使用, 或加入防腐剂储存于冰箱。

卵粘蛋白与 Sepharose 4B 用上述方法偶联的偶联率为 70~80%。卵粘蛋白-Sepharose 可反复使用多次。[Sepharose 活化方法见下文]

(朱正美 顾天爵)

(三) 固相化凝集素的制备

根据凝集素具有糖结合专一性的特点, 把凝集素固相化, 制成亲和吸附剂, 可用于分离、纯化各种糖蛋白和细胞, 是一种很有价值的工具。

硅藻土、Bio-Gel 等都可以作为固相化凝集素的载体, 但用最普遍的载体是 Sepharose。

1. Sepharose 4B 的活化

【试剂】

Sephacrose 4B, Pharmacia Fine Chemicals 产品。

乙腈, 上海试剂一厂生产。

溴化氰, E. Merck 产品。

【操作】

Sephacrose 4B 先用蒸馏水洗涤几次, 除去防腐剂后, 以凝胶: 水 = 1:1 的比例, 配成悬浮液。

将 100 mL 的 2 mol/L 碳酸钠溶液加到 100 mL Sephacrose 4B 悬浮液中, 缓慢地搅匀。然后加快搅拌速度, 立即加入 10 mL 含溴化氰的乙腈溶液(每 mL 乙腈加 1 g 溴化氰), 继续激烈搅拌 8~10 分钟后, 迅速将 Sephacrose 4B 凝胶倒入粗砂芯玻璃漏斗内抽滤, 并顺次分别用冰冷的 1000 mL 0.1 mol/L 的碳酸氢钠溶液, 1000 mL 的蒸馏水, 1000 mL 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH8.0) 洗涤, 洗毕, 把凝胶抽干成为湿饼状, 尽快转移到准备偶联的凝集素溶液中。从开始过滤到转移入凝集素溶液的过程在 1~2 分钟内完成。(上述活化过程是有毒的, 应在通风柜中进行操作。)

(朱正美 顾天爵)

2. ConA-Sephacrose 4B 的制备

【试剂】

ConA: 纯化方法见第 333 页。

溴化氰活化的 Sephacrose 4B: 见第 355 页。

甲基 α -甘露糖苷: 上海试剂二厂生产。

【操作】

将 500 mg 的 ConA, 3.9 g 甲基 L-甘露糖苷溶解于 100 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH8.0) 中, 然后加入上述活化的 Sephacrose 4B 凝胶, 于 4°C, 温和搅拌 4~8 小时, 置冰箱过夜。次日用砂芯漏斗过滤, 并用 200 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH8.0) 洗涤一次后, 将 ConA-Sephacrose 凝胶加到 200 mL 含 0.2 mol/L 甘氨酸的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH8.0) 中, 温和搅拌 1 小时, 以封闭残存的活化基团。最后在砂芯玻璃漏斗上过滤, 并顺次用

500 mL 的蒸馏水-500 mL 含 0.5 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.6)-500 mL 含 0.5 mol/L NaCl、1 mmol/L $MnCl_2$ 、1 mmol/L $MgCl_2$ 、1 mmol/L $CaCl_2$ 的 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.6) 洗涤。洗涤后的 ConA-Sephrose 4B 可以直接装柱进行亲和层析, 或加入防腐剂(如 0.2% 的 NaN_3 或 0.01% 的 Merthiolate), 置冰箱存放备用。偶联率为 70~80%。

(朱正美 顾天爵)

3. RCA-Sephrose 4B 的制备

【试剂】

溴化氰活化的 Sepharose 4B: 见第 355 页。

RCA₁: 纯化方法见第 336 页。

乳糖: 上海试剂二厂生产。

【操作】

100 mL 溴化氰活化的 Sepharose 4B 凝胶, 用冷 pH9.0、0.1 mol/L $NaHCO_3$ 缓冲液充分洗涤, 迅速转移至 100 mL 含 300 mg RCA 和 3.6 g 乳糖的上述 $NaHCO_3$ 缓冲液中, 4°C, 温和搅拌 4~6 小时, 放置冰箱过夜, 用砂芯漏斗过滤, 然后将凝胶悬浮于 100 mL 含 0.2 mol/L 甘氨酸的 pH9.0、0.1 mol/L 碳酸氢钠缓冲液。室温, 温和搅拌 1 小时, 过滤, 顺次用上述 $NaHCO_3$ 缓冲液-2 mol/L NaCl 溶液洗涤, 每次均洗至洗液的 280 nm 光密度低于 0.02。用蒸馏水充分洗涤后, 再用所需缓冲液平衡洗涤, 即可装柱使用。或加防腐剂, 置冰箱储存备用。

用上述条件制备的 RCA-Sephrose 4B 的偶联率在 90% 以上。

(朱正美 顾天爵)

4. RCA-Sephrose 4B(带己二胺“臂”)的制备

制备 RCA-Sephrose 4B 的另一方法是在载体与 RCA 偶联前先接一“手臂”, 然后 RCA 再与“手臂”偶联。

【试剂】

溴化氰活化的 Sepharose 4B: 见第 355 页.

己二胺: 上海试剂一厂产品.

RCA_I: 纯化方法见第 336 页.

【操作】

100 mL 溴化氰活化的 Sepharose 4B 凝胶, 用冷的 pH9.0, 0.1 mol/L NaHCO₃ 缓冲液充分洗涤后, 迅速转移入 100 mL 40% 己二胺 (用 HCl 调至 pH10.0), 4°C, 温和搅拌 4~6 小时, 置冰箱过夜. 砂芯漏斗过滤. 然后将凝胶悬浮于 100 mL 含 0.2 mol/L 甘氨酸的上述 NaHCO₃ 缓冲液, 室温, 温和搅拌 1 小时, 过滤. 用 NaHCO₃ 缓冲液充分洗涤后, 将 Sepharose 4B 凝胶移入 100 mL 含戊二醛的 pH9.0、0.1 mol/L NaHCO₃ 缓冲液, 室温, 温和搅拌 10 分钟, 过滤, 用同一缓冲液充分洗涤, 将未作用的戊二醛洗净. 然后将凝胶转移入 100 mL 含 300 mg RCA 和 3.6 g 乳糖的 pH9.0、0.1 mol/L NaHCO₃ 缓冲液, 室温, 温和搅拌 15~20 分钟. 过滤, 将凝胶再次悬浮于含甘氨酸 (0.2 mol/L) 的 NaHCO₃ 缓冲液, 室温, 温和搅拌 1 小时. 过滤, 顺次用蒸馏水—2 mol/L NaCl—蒸馏水—亲和吸附时所用缓冲液洗涤, 然后装柱, 即可使用. 或加防腐剂, 置冰箱保存备用.

固定化的凝集素亲和吸附剂, 可多次反复使用, 不用时悬浮于适当的缓冲液并加上防腐剂, 在 10°C 以下保存, 勿使其结冰.

(孙册)

【文献】

- Hunter, W. M. et al., *Nature*. **124**: 495 (1962).
Marchalonis, J. I. *Biochem. J.*, **113**: 299 (1969).
Cuatrecasa, P. *Biochemistry*. **12**: 1312 (1973).
Fredericq, E. et al., *J. Biol. Chem.*, **181**: 199 (1949).
Cohn, E. J. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **68**: 459 (1946).
陶宗晋等, *生物化学与生物物理学报*. **13**: 77 (1981).
孙册等, *生物化学与生物物理学报*. **15**: 333 (1983).
朱正美、顾天爵. *细胞生物学杂志*. **4**(3): 21~24 (1982).
陶宗晋等, *生理学报*, **35**: 107 (1983).
Huet, C. H. et al., *Exptl. Cell Res.*, **75**: 523 (1972).

- Stobo, J. D. et al., *Exptl. Cell Res.*, **70**: 443 (1972).
- Yamada, K. et al., *Histochemistry*, **67**: 31 (1980).
- Furlan, M. et al., *Anal. Biochem.* **96**: 208 (1979).
- 朱正美、顾天爵, *生物化学与生物物理学进展*. **2**: 53 (1981).
- Garth, L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **68**: 942 (1971).
- March, S. C. et al., *Anal. Biochem.*, **60**: 149 (1974).
- Dulaney, J. T. *Anal. Biochem.* **99**: 254 (1979).
- Cuatrecasas, P. *J. Biol. Chem.* **245**: 3059 (1970).

附录 有关糖类生化的文献查阅

随着糖类生化研究不断取得新的进展，糖类生化有关文献也与日俱增。下面介绍有关糖类生化文献查找的主要途径。

1. 糖类生化文献在期刊上的反应

根据美国化学文摘(*Chemical Abstracts*)有关糖类生化文献在各种期刊出现的频率，以下一些期刊常刊载糖类生化文献。

(1) *Journal of Virology* 病毒学杂志 简称 *J. Virol.* 1967年创刊，美国微生物学会出版。专门刊载细菌和动植物病毒方面的文献。

(2) *Journal of Biological Chemistry* 生物化学杂志 简称 *J. Biol. Chem.* 1905年创刊，初系月刊，后改半月刊。美国生化协会出版。主要登载生物化学与分子生物学基础研究，包括技术和方法、研究论文和简报。内容涉及到大分子化学与代谢，低分子量物质的化学与代谢。

(3) *Carbohydrate Research* 碳水化合物研究 简称 *Carbohydr. Res.* 1965年创刊，荷兰 Elsevier Publishing Co. 出版。国际性刊物。主要刊载研究论文，内容涉及碳水化合物的各个方面。文章主要用英文发表。

(4) *Agricultural and Biological Chemistry* 农业生物化学 简称 *Agri. Biol. Chem.* 1923年创刊，日本农艺化学学会用英文出版的学术刊物。内容包括农业化学、生物化学等方面的研究论文。

(5) *Biochemical and Biophysical Research Communication* 生物化学与生物物理研究通讯 简称 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1959年创刊，美国学术出版社出版。及时报道生物化

学与生物物理方面的研究消息，便于研究人员尽快地了解研究动向及成果。通讯文章较为简短。

(6) *European Journal of Biochemistry* 欧洲生物化学杂志 简称 *Eur. J. Biochem.* 其前身为 *Biochemische Zeitschrift*, 1906年创刊, 1967年改为现名, 半月刊, 欧洲生化学会联合会主编, Springer 出版(西德)。主要发表关于生化、分子生物学和细胞生物学研究论文。英文。

(7) *Federation of European Biochemical Societies Letters* 欧洲生物化学联合会快报 简称 *FEBS Lett.* 1968年创刊, 荷兰Elsevier Science Publishers 出版, 主要发表生物化学、生物物理及分子生物学领域, 包括蛋白质化学、酶学、核酸、细胞生化、代谢、免疫化学等方面的研究成果简报。多用英文, 间用德、法文。

(8) *Proceedings of National Academy of Sciences of the U. S. A.* 美国国家科学院院报 简称 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1863年创刊, 是美国国家科学院机关刊物。专门发表该院成员及由他们所推荐的其他科学工作者的科研成果。生物化学与分子生物学文献与日俱增。

(9) *Virology* 病毒学 1955年创刊, 原系月刊, 1976年改年出14期, 美国学术出版社出版。主要刊载病毒学领域研究论文。

(10) *Analytical Biochemistry* 分析生物化学 简称 *Anal. Biochem.* 1960年创刊(美国)。经常发表以化学、物理学和生物学理论为基础的有定性、定量技术方面的论文。

(11) *Journal of Molecular Biology* 分子生物学杂志 简称 *J. Mol. Biol.* 1959年创刊, 美国学术出版社出版。主要刊载关于分子水平上生物结构的本质、产生方式与复制和功能的关系等方面的论文。

(12) *Journal of Cell Biology* 细胞生物学杂志 简称 *J. Cell Biol.* 1955年创刊, 美国纽约洛克菲勒研究所出版社出版。文章涉及如何利用生物物理和生物化学新技术, 如电子显微镜、超薄切片技术、负染色技术、X衍射法等, 研究细胞的超微和亚显微结构。

主要用英文,有时也用法、德文。

(13) *Journal of General Virology* 普通病毒学杂志 简称 *J. Gen. Virol.* 1967年创刊,英国普通微生物学会编辑,剑桥大学出版社。主要发表细菌、动植物病毒等方面的研究论文。

(14) *Biochemical Journal* 生物化学杂志 简称 *Biochem. J.* 1906年创刊,英国剑桥大学出版社。是英国生物化学学会的机关刊物,主要刊载有关生物化学方面的研究论文,涉及新陈代谢、生物合成、生物氧化还原等方面的文献。

(15) *Biopolymers* 生物聚合物 1963年创刊,美国纽约 Interscience Publishers 出版。主要刊载生物聚合物的性质与功能及其合成典型聚合物的实验与理论方面的研究论文。

(16) *Biotechnology and Bioengineering* 生物工程学和生物工艺学 简称 *Biotechnol. Bioeng.* 1959年创刊,美国纽约 Interscience Publishers 出版。介绍关于生物系统及其活动的各个方面的利用和控制,以及各实验室为此而进行的各类研究和试验,包括新技术和新装置的使用等。

(17) *Journal of General Microbiology* 普通微生物学杂志 简称 *J. Gen. Microbiol.* 1947年创刊,英国普通微生物学会编辑,剑桥大学出版社。专载普通微生物学方面的论文,包括细菌、真菌、藻类、原生动物和病毒的各种活动,以及它们的构造、发育、生理、遗传、进化、细胞、分类和生态等方面的研究论文。各卷附作者、主题与目次索引。

(18) *Nature* 自然 英国,1869年创刊,周刊。是历史悠久的综合性自然科学杂志。其中以生物、生化、分子生物学等方面研究论文较多。此外有各国科研机构及其工作介绍,会议和讨论会纪要,世界科学新闻及书评等。

(19) *Journal Biochemistry* 生物化学杂志 简称 *J. Biochem.* 1922年创刊,日本生化学会编辑出版。用英文刊载普通生物化学方面的研究论文及需要迅速发表的初步研究简讯,包括碳水化合物、类酯、酶、生物大分子构象、核酸与蛋白质的生化遗传学、代谢

调节、低分子化合物代谢等方面内容。

(20) 蛋白质, 核酸, 酵素 *Protein Nucleic Acid and Enzyme*
1956 年创刊, 日本(共立)出版(东京都)。刊载蛋白质、核酸、酶的生物化学研究方面的综述、实验讲座、研究课题、学会动态和书评等。

(21) 日本农艺化学会志 *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan* 1924 年创刊, 日本农艺化学会, 东京都。主要发表有关农作物的生化研究方面的文章。

(22) 细胞 (*The Cell*) 1969 年创刊, 日本东京都。主要发表关于细胞的结构、功能以及光学和电子显微镜的应用方面的文章。

(23) 遗传 (*The Heredity*) 1969 年创刊, 日本东京都。内容涉及生物科学的各个方面, 包括研究进展的综论, 基础知识讲座、实验教材介绍等。是一种以遗传为中心的综合性生物学杂志。

(24) *Прикладная Биохимия и Микробиология* 应用生化学与微生物学 1965 年创刊, 苏联科学院编辑。刊载研究文章与简讯。

(25) *Биоорганическая Химия* 生物有机化学 1975 年创刊, 苏联科学院编辑。刊载研究文章与简讯。刊载研究参与生命活动重要过程的有机化合物及其性质、结构和生物功能方面的文章。

2. 刊载糖类生化进展与方法的连续出版物

(1) *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 糖的化学和生物化学进展 前名 *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 糖的化学进展, 1969 年第 24 卷改为现名, W. W. Pigman 等主编, 美国学术出版社出版。1945 年出第一卷。*索书号: 54.531/A 244。

(2) *Methods in Carbohydrate Chemistry* 糖的化学方法 由 R. L. Whistler 主编, 美国学术出版社 (Academic Press) 出版。1962 年出第一卷。*索书号: 54.561/W 576。

系中国科学院图书馆图书分类号, 下同。

其中第三卷: *Cellulose* 纤维素 1963 年出版, 407 页, 带图, 有参考文献.

第五卷: *General Polysaccharides* 一般多糖 1964 年出版, 463 页, 带图, 有参考文献.

第七卷: *General Methods, Glycosaminoglycans and Glycoproteins* 普通方法, 糖胺聚糖和糖蛋白 1976 年出版, 293 页, 带图, 有参考文献.

第八卷: *General Methods* 一般方法 1980 年出版, 349 页, 带图, 有参考文献.

(3) *Methods in Enzymology* 酶学方法 1955 年出第一卷, 由 Colowick Sidney P. 等主编, 美国学术出版社出版. 内容有核酸、蛋白质、酶、糖、脂、维生素、生物膜等专题的研究方法. 索书号: 58.17435/C 719.

其中下列几卷为糖的生化内容:

第八卷: *Complex Carbohydrate* 复合糖 由 Elizabeth F. Neufeld 和 Victor Ginsburg 主编. 1966 年出版, 759 页, 带图.

第九卷: *Carbohydrate Metabolism* 糖代谢 由 Willis A. Wood 主编. 1966 年出版. 777 页, 带图, 有参考文献.

第二十八卷: *Complex Carbohydrate Part B* 复合糖 1972 年出版. 由 Victor Ginsburg 主编. 1057 页, 带图, 有参考文献.

第四十一卷: *Carbohydrate Metabolism Part B* 糖代谢 由 W. A. Wood 主编, 1975 年出版, 537 页, 带图表. 本卷收入与糖代谢有关的酶.

第五十卷: *Complex Carbohydrate Part C* 复合糖 1978 年出版, 由 Victor Ginsburg 主编. 628 页.

第八十三卷: *Complex Carbohydrate Part D* 复合糖 1982 年出版, 由 Victor Ginsburg 主编, 684 页.

(4) *Carbohydrate Chemistry* 糖化学 1982 年, 第 13 卷, Buslington House 出版.

3. 糖类生化的重要专著和会议录

I. 专著

(1) *Carbohydrate* 碳水化合物(糖类) 英国 London Butterworths 出版, 344 页。这是 MTP 国际科学评论有机化学第一辑的第 7 卷。其中包括糖蛋白和微生物多糖类的方法文章。*索书号: 54.561/A 841.

(2) *The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry* 糖化学和生物化学 美国学术出版社, 1972 年出版。由 Pigman Ward 和 Horton Derek 主编, 642 页, 带图。*索书号 54.561/P 631 C (2).

(3) *Complex Carbohydrates, their chemistry, biosynthesis and functions* 复合糖类, 化学、生物合成和功能 由 Sharo Nathan 编, 1975 年出版, 466 页。*索书号: 54.561/5532.

(4) *Glycoproteins* 糖蛋白 1966 年由英国 London Elsevier 出版。Gottschalk Alfred 主编, 628 页, 带图。*索书号 54.5613/G 687.

(5) *The Metabolism and Function of Glycoproteins* 糖蛋白的功能和代谢 英国 London 生物化学学会出版, 1974 年出版, 176 页。R. M. S. Smellie 和 J. G. Beeley 编, 带图, 有参考文献。*索书号: 59.51715/B 615:1974.

(6) *Glycoconjugates* 糖的结合物 美国学术出版社, 1977 年出版。560 页, 带图, 有参考文献。内容为哺乳动物的糖蛋白和糖脂的论文。*索书号 59.51715/H 816.

(7) *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* 糖蛋白和蛋白聚糖的生物化学 由 W. J. Lennarz 主编, Plenum Press 公司出版, 1980 年出版, 381 页。

II. 会议录

(1) *Plateles, cellular response mechanisms and their biological significance* 血小板、细胞反应机制和生物学意义 系欧洲分子生物学组织于 1980 年 4 月 14~16 日在 Weizmann 科学研究所举行学术会议的会议录。由 A. Rotman 等编, 1980 年

Chichester Wiley 出版. 327 页, 带图, 有参考文献. *索书号: 59.521083/E53:1980.

(2) *Carbohydrate-Protein interaction* 糖与蛋白质的相互作用 美国化学学会于 1977 年 8 月 31~9 月 1 日在 Chicago 举行的 174 次会议的会议录. 由 Irwin J. Goldstein 主编, 1979 年出版. 222 页, 带图, 有参考文献. *索书号: 58, 1742083/A5120:1977.

(3) *Glycoconjugate Research* 糖结合物研究 此书系 1977 年 9 月在 Woods 举行的糖的第四次国际讨论会的会议录. 由 J. D. Gregory 等编, 1979 年美国学术出版社出版. *索书号: 59.51715/I61:1977.

(4) *Glycoconjugates* 糖结合物 1981 年 9 月 20~25 日在日本东京举行的糖的第六次国际讨论会的会议记录. 由 T. Yamakawa 等编. 日本东京出版. 531 页, 带图, 有参考文献. *索书号: 59.51715/261:1981.

(5) International Symposium on Carbohydrate Chemistry, 5th 糖化学第五次国际讨论会 1970 年 8 月 17 日~22 日在法国巴黎举行. 内容涉及到糖蛋白等方面. *Pure and Applied Chemistry* 理论和应用化学杂志 1971, Vol. 27, No. 4 为此次会议出了专辑.

(6) International Symposium on Carbohydrate Chemistry, 6th 糖化学第六次国际讨论会 1972 年 8 月 14 日~18 日在美国 Madison 举行. 会议录见 *Pure and Applied Chemistry*, 1973, Vol. 35, No. 2.

(7) International Symposium on Carbohydrate Chemistry, 8th 糖化学第八次国际讨论会 1976 年 8 月 16 日~20 日在日本东京举行. 会议录见 *Pure and Applied Chemistry*, 1977, Vol. 49, No. 8.

(8) International Symposium on Carbohydrate Chemistry, 9th 糖化学第九次国际讨论会 1978 年 4 月 10 日~14 日在伦敦

举行。会议录见 *Pure and Applied Chemistry*, 1978 年 Vol. 50, No. 11~12.

(9) International Symposium on Carbohydrate Chemistry, 10th 糖化学第十次国际讨论会 1980 年 7 月 7 日~11 日在澳洲 Sydney 举行。会议录见 *Pure and Applied Chemistry*, 1981, Vol. 53, No. 1.

(10) International Carbohydrate Symposium, 11th 糖化学第十一次国际讨论会 1982 年 8 月 22 日~28 日在加拿大 Vancouver 举行。会议录见 *Pure and Applied Chemistry*, 1983, Vol. 55, No. 4.

4. 检索糖类生化文献、数据等的主要参考工具书

I. 文摘、索引

(i) 西文部分:

(1) *Chemical Abstracts* 美国化学文摘 简称 *CA*. 从此文摘的关键词索引(Keyword Index)入手。

例如:关键词 糖、生化(Carbohydrate, Biochemistry), 糖蛋白(Glycoprotein, Glucoprotein), 糖脂(Glycolipid, Glucolipid), 糖结合物(Glycoconjugates), 凝集素(Lectin)等。另外,根据学术会议录的报道或日常积累了解有关作者,也可方便地从此文摘的作者索引(Author Index)获取文摘。

(2) *Biological Abstracts* 美国生物学文摘 简称 *BA*. 使用此文摘可从关键词索引(Keyword Index)和著者索引(Author Index)入手,也可从该文摘的大类中去检索。

例如:取 *BA* 翻到书前页(Section Headings)部分,检出:

Biochemistry

Biochemical Methods, Carbohydrate

.....

.....

Biochemical Studies, Carbohydrate

.....

.....

可从“生化”(Biochemistry)的下位类“糖的生化方法”、“糖的生化研究”两部分都可方便地检出有关文献。

还可从美国生物学文摘(BA)的概念索引(Concept Index)去查找文献。翻到(BA)后面附的Concept Index部分。按字顺检出Biochemistry, 从它的下位类, 十分方便地可查出糖(Carbohydrates)的文献。

(3) *Dissertation Abstracts International* 国际学位论文文摘 欲查学位论文可从此入手。每期文摘后附关键词篇名索引(Keyword Title Index)。例如, 关键词 Carbohydrate Biochemistry, Glycoprotein, Glucoprotein, Glycolipid, Glucolipide, Glycoconjugates, Lectin (凝集素)等。

(4) *Chemical Title* 化学题录 欲查最新文献除从前面所述主要期刊的最新期刊里去查找, 更方便的方法是通过美国化学题录(Chemical Title)去检索。此工具书附有关键词索引(Keyword In-Context Index)和著者索引(Author Index)。例如: 欲查糖蛋白(Glycoprotein)文献, 首先取 Chemical Title, 1983, No. 12 (June, 13) 从 Keyword In-Context Index 检出关键词 Glycoprotein, 得出 BBACAQ-0757-0140。然后, 往前翻到杂志目录(List of Periodicals)部分按字序检出 BBACAQ, 得出刊名 Biochim. Biophys. Acta. 再翻到书目(Bibliography)部分按字序查出BBACAQ Biochim. Biophys. Acta, 看卷号、页号 0140, 即可十分方便地得出作者和篇名目录:

0140: Quarles RH, Barbarash GR, Figlewicz DA, Purification and partial characterization of the myelin associated glycoprotein from adult rat brain.

(ii) 日文部分

(1) 利用“化学抄报”去检索文献: 在“化学抄报”的类目里, 以“化学と生物”、“生化学”、“化学の领域”、“J.Biochem.”部分去找文献。

(2) 从科学技术文献速报化学·化学工业编(国外编, 国内编)。

去找: 翻到书前页的目次部分, 从“生化学”一类的下位类“糖质化学”可方便地检出所需文献。此外, 也可利用此速报后面所附的关键词索引(キーワード索引)去查找文献。

(iii) 俄文部分

从苏联文摘杂志(*Реферативный Журнал*)的生物化学(Биологическая Химия)部分去查找。利用此文摘可以从主题索引(Предметный Указатель)或著者索引(Авторский Указатель)入手查找文献。

II. 手册

(1) *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: (Lipids, Carbohydrates and Steroids)* 生物化学和分子生物学手册, 碳水化合物和脂类部分。由美国化学橡胶公司(CRC)出版(1975)。本手册的第三部分为脂类和碳水化合物。从本手册糖(Carbohydrate)部分可查出: 天然醛糖, 天然酮糖, 糖的磷酸酯, 哺乳动物的器官的复合糖, 寡糖, 粘多糖, 脂多糖等的衍生物、分子式、熔点、旋光性、色谱等物理化学特性等有价值的数据资料。*索书号: 58.173073/H236(3):C。

(2) *Handbook of Biochemistry Selected Data for Molecular Biology* 生物化学手册 The Chemical Rubber Co., 2nd., 1970。本手册是美国化学橡胶公司(CRC)出版的整套手册中的一种。由美国国家卫生研究院 H. A. 索伯尔博士主编, 在许多生化学家的直接合作下写成。此手册是现代生物学各学科的重要参考手册。A 部分为缩写与命名, 其中也包括碳水化合物、脂类等的缩写与命名的规则。D、H 部分, 分别介绍生物活性物质和生物大分子, 着重叙述了它们在自然界存在的状态、物理性质、化学性质、物化性质和生化特性, 分离、分析和制备方法。其中 D 部分是讲碳水化合物。书末附有全册的主要术语索引。*索书号: Y58.173073/H236(2)。

(张树庸)



后 记

近年来的学术会议,尤其是国际性的会议,就出版会议文件而言,已经基本上放弃了刊行单卷或多卷会议录的形式,代之的是会议撮要。这种改革适应了时代的要求,因为篇幅较长的译文,刊行费时,出版往往在一到二年以后,会议组织者一般建议作者投某一事先联系的定期学术刊物,只在论文题目附注说明是某一学术会议的论文,或者也可以安排一次会议专号。这类安排的出版时间一般不会落后。

这本小书,不纯粹是会议上报告的论文,大部分是会后补充或改写的,因此就不完全是一册会议录,但是在出版的时间上是拖了很久的,对于作者或编辑来说,出版拖了时间,总不会感到舒服,可是迟出比不出还是强得多,象这本小书,应该两年出版的拖到了四年,自然是迟了,但终究是出版了,读者有物可读,书中所记,均属作者累积的经验,对研究糖的读者,仍具有参考价值。

这本小书,在青岛的“糖”会议上,众议由北京大学的张惟杰同志承担总的工作,他欣然应允了。书迟迟地不能出版,最为着急的莫过于惟杰同志了,他为此奔走于京津沪与东北等地之间,并赖书信往返以维系联络,此书终于出现在读者面前。虽然迟了,仍能起一定作用,饮水思源,作为“做糖写糖”的鼓吹者,我愿对本书的作者、编者以及许多出过力的同志表示衷心的感谢!

沈昭文

到期	1988.9.8.
来源	两单书
书价	3.00元
单据号	150700
	88.9.8

借者单位	借者姓名	借出日期	还书日期
←	[Signature]	91.1.15.续	
已借出	91.3.12		
91	91.7.3.续		
		3日	

58.17422
551

24618

注 意

- 1 借书到期请即送还。
- 2 请勿在书上批改圈点，折角。
- 3 借去图书如有污损遗失等情形须照章赔偿。

京卡0701

ISBN 7-5323-0525-2/Q·11

科技新书目, 151·256

统一书号, 13119·14.4

定 价: 3.00 元