



# 酵母菌分类中泛醌类反相薄层层析的一种定性计算方法

张光兴 曹明耀\*

(河北大学生物系生化教研室,保定)

泛醌类(简称 UQ)是生物体内的一类非极性化合物。定性测定泛醌,是酵母菌分类中近年来采用的生化方法之一。

用反相薄层层析法分离鉴定 UQ 时,其同系物由于侧链碳原子数目不同有不同的  $R_f$  值<sup>[1]</sup>。因此,用这种方法可以鉴定  $Q_6-Q_{10}$  的全部天然组分。

Kärner 发现<sup>[2]</sup>,每相邻两种泛醌的  $R_f$  值之差是一个常数(0.12);Crane 等<sup>[3]</sup>则认为,这个差值是相对的,因每次层析而异。我们也发现,相邻两种泛醌的  $R_f$  值之差在不同层析条件下是不同的,因此不能用 0.12 这个数值来定性未知样品中的泛醌。

我们在考查  $R_f$  值形成的稳定条件的同时,提出了一种求  $\Delta R_f$  值并由此确定未知样品中 UQ 类型的方法。实验表明,这一方法简便可靠,不需要使用多种 UQ 标准品。现将方法报告如下。

## 材料和方法

### 一、实验材料

除 UQ<sub>10</sub> (含量 96%)由北京大学制药厂提供,硅胶 G 为上海化学试剂采购供应站经销者外,其它所有试剂和材料均为国产市售品。所用菌种皆由中国科学院微生物研究所提供。

### 二、薄板的制备

将硅胶 G:水=1:2.5 (重量/体积)于一分液漏斗内振摇数分钟后涂板(厚度 0.5 毫米左右),每块板(10×20 厘米)用硅胶 G2.5—2.7 克。涂好后置水平处自然风干,整理边沿,于

110℃ 活化 1 小时;待温度降至 50—70℃ 时取出,立即置干燥器内备用。

### 三、反相薄板的制备

将硅胶 G:水=1:3 (重量/体积)于一分液漏斗内振摇数分钟后涂板(厚度 0.25 毫米),自然风干,整理边沿后于 110℃ 活化 1 小时,待温度缓缓降至室温后置石蜡油(沸程>300℃)中浸渍 1 分钟,取出风干备用。

### 四、UQ 类样品的制备

据文献报道<sup>[4]</sup>,我们从产朊酵母(*Torula utilis*)制备  $Q_7$  和  $Q_8$ ;从大肠杆菌(*E. coli*)制备  $Q_8$ ;从啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)制备  $Q_{10}$ 。上述菌种按近藤圭二等人的方法<sup>[5]</sup>培养后,收集菌体进行皂化和抽提。其正己烷(或石油醚)抽提物作为粗品用来制备 UQ 类样品。

上述正己烷(或石油醚)抽提物用经我们稍加改动的 Crane 等的方法<sup>[6]</sup>制备标准 UQ 类样品。

欲测定的未知 UQ 类样品亦按照上述的同样方法制备。

### 五、反相薄层层析操作

在一张浸渍好的硅胶 G 薄板上同时点上两个已知 UQ 样品(其中之一为 UQ<sub>10</sub>)和 2—3 个未知样品。然后,以丙酮:水=95:5 (体积比,每 100 毫升混合液中加 0.5 毫升石蜡油,混匀)展层 1—1.5 小时后(溶剂前沿在 12—15 厘米之

\* 我系 1978 年毕业生。本系微生物教研室杨秀琴同志参加了部分工作。

间),取出在室温晾干。准确测量并算出  $R_f$  值、 $\Delta R_f$  值,并通过计算确定未知样品中的 UQ 类型。

## 计算方法及结果

Kärner 曾提出一个计算未知 UQ 样品侧链碳原子数( $Q_x$ )的公式<sup>[2]</sup>:

$$Q_x = 50 - \left[ \left( \frac{R_f Q_x - R_f Q_{10}}{0.12} \right) \times 5 \right] \quad (1)$$

上式中所用的已知样品为  $Q_{10}$ , 方程右侧的 50 是已知样品( $Q_{10}$ )的侧链碳原子数, 0.12 为两相邻 Q 类(即  $Q_6-Q_7$ ,  $Q_7-Q_8$ ,  $Q_8-Q_9$ ,  $Q_9-Q_{10}$ )的  $R_f$  值之差。因为这个差值在每次层析中不是恒定的,所以当对任一未知样品的 UQ 进行鉴定时,不能使用此公式,而需要将该公式推广为:

$$Q_x = Q_k - \left[ \left( \frac{R_f Q_x - R_f Q_k}{\Delta R_f} \right) \times 5 \right] \quad (2)$$

(2) 式中  $Q_k$  表示已知样品的侧链碳原子数,  $\Delta R_f$  为在一次层析中两种已知 Q 的  $R_f$  值之差被它们的级差\*所除之商(即两相邻 Q 类的  $R_f$  值之差),可由下式求得:

$$\begin{aligned} \Delta R_f &= \frac{R_f Q_A - R_f Q_B}{Q_B - Q_A} \\ &= \frac{\text{二种已知 Q 的 } R_f \text{ 值之差}}{\text{二种已知 Q 的级差}} \quad (3) \end{aligned}$$

(3) 式中  $Q_A$  和  $Q_B$  代表二种已知 Q 样品的级数;  $R_f Q_A$  和  $R_f Q_B$  分别代表  $Q_A$  和  $Q_B$  在一次反相层析中的  $R_f$  值。然后,将所得  $\Delta R_f$  值代入(2)式就可求得未知样品的侧链碳原子数( $Q_x$ )。

### 一、计算举例

现以小孢酵母 (*Saccharomyces exiguus*) UQ 抽提物的定性为例,用更换过已知样品的两张层析图谱(图 A, B)的数据来说明该计算方法。

图谱 A: 已知样品:  $R_f Q_8 = 0.30$ ,  $R_f Q_{10} = 0.19$ ; 未知样品:  $R_{f, \text{未知}} = 0.40$ 。将以上数据代入(3)式得:

$$\Delta R_f = \frac{0.30 - 0.19}{10 - 8} = \frac{0.11}{2} = 0.055$$

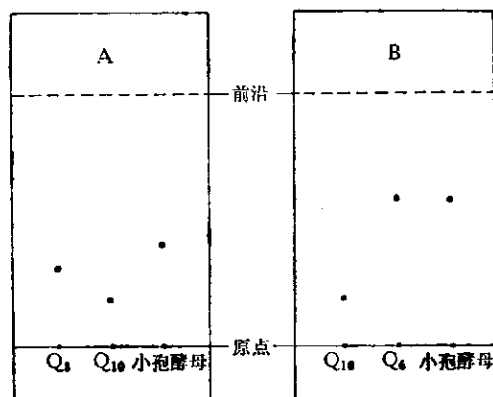


图 1 小孢酵母的反相层析图谱(按原层析图谱缩小一倍)  
展层系统: 丙酮:水:石蜡油=95:5:0.5 (体积比)  
展层时间: 1.5 小时  
点样量: 20-40 微升  
溶剂前沿: A = 13.2 厘米; B = 13.1 厘米

再将  $\Delta R_f$  值代入(2)式求得小孢酵母所含 UQ 的侧链碳原子数。

当用已知样品  $Q_{10}$  的数据 ( $Q_k = 50$ ) 代入(2)式时得:

$$\begin{aligned} Q_x &= 50 - \left[ \left( \frac{0.40 - 0.19}{0.055} \right) \times 5 \right] \\ &= 50 - 19.2 \approx 30 \end{aligned}$$

当用已知样品  $Q_8$  的数据 ( $Q_k = 40$ ) 代入(2)式时得:

$$\begin{aligned} Q_x &= 40 - \left[ \left( \frac{0.40 - 0.30}{0.055} \right) \times 5 \right] \\ &= 40 - 9.9 \approx 30 \end{aligned}$$

∴ 小孢酵母所含泛醌类型为  $UQ_{30}$ 。

图谱 B: 已知样品:  $R_f Q_6 = 0.588$ ,  $R_f Q_{10} = 0.191$ ; 未知样品:  $R_{f, \text{未知}} = 0.588$ 。将以上数据代入(3)式得:

$$\begin{aligned} \Delta R_f &= \frac{0.588 - 0.191}{10 - 6} \\ &= \frac{0.397}{4} = 0.099 \end{aligned}$$

再将  $\Delta R_f$  值代入(2)式求得小孢酵母所含 UQ 的侧链碳原子数。

当用已知样品  $Q_{10}$  的数据 ( $Q_k = 50$ ) 代入

\* 级差: 如  $Q_{10} - Q_9 = 1$ ,  $Q_9 - Q_8 = 1$ ,  $Q_8 - Q_7 = 2$ ,  $Q_7 - Q_6 = 2$ ,  $Q_{10} - Q_7 = 3$ ,  $Q_9 - Q_6 = 3$ ..... 如此类推。

表 硅胶 G 反相薄层层析对酵母类 UQ 的定性结果

层析板 编号	样 品 名 称	$R_f$		$\Delta R_f$	溶剂前沿 (厘米)	UQ 类型	
	未 知 样 品	已知样品	未知样品				已知样品
1	薛氏酵母 (2.131) <i>Saccharomyces chevalieri</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.540	0.540 0.203	0.084	14.8	$Q_8$
2	薛氏酵母 (2.131) <i>Saccharomyces chevalieri</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.670	0.440 0.230	0.105	13.0	$Q_8$
3	粘红酵母 (2.013) <i>Rhodotorula glutinis</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.514	0.514 0.179	0.083	13.4	$Q_8$
4	粘红酵母 (2.013) <i>Rhodotorula glutinis</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.371	0.371 0.099	0.068	13.2	$Q_8$
5	胶红酵母 (2.21) <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.176	0.401 0.176	0.056	14.5	$Q_{10}$
6	胶红酵母 (2.21) <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.166	0.302 0.166	0.068	14.0	$Q_{10}$
7	胶红酵母 (2.22) <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.185	0.520 0.184	0.084	13.6	$Q_{10}$
8	胶红酵母 (2.22) <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.172	0.346 0.172	0.087	14.2	$Q_{10}$
9	酵母属 (2.1164) <i>Saccharomyces</i> sp.	$Q_8$ $Q_{10}$	0.390	0.290 0.190	0.050	12.8	$Q_8$
10	酵母属 (2.1164) <i>Saccharomyces</i> sp.	$Q_8$ $Q_{10}$	0.338	0.338 0.070	0.067	14.2	$Q_8$
11	膜醭毕赤氏酵母 (2.1039) <i>Pichia membranaefaciens</i> 酵母属 (2.1164) <i>Saccharomyces</i> sp.	$Q_8$ $Q_{10}$	0.275 0.384	0.384 0.094	0.073	13.8	$Q_8$ $Q_8$
12	膜醭毕赤氏酵母 (2.1039) <i>Pichia membranaefaciens</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.351	0.526 0.162	0.091	15.4	$Q_8$
13	啤酒酵母 (2.588) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 白球拟酵母(2.270) <i>Torulopsis candida</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.535 0.245	0.381 0.174	0.104	15.5	$Q_8$ $Q_8$
14	啤酒酵母 (2.588) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 白球拟酵母 (2.270) <i>Torulopsis candida</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.513 0.265	0.359 0.171	0.094	11.7	$Q_8$ $Q_8$
15	平常球拟酵母 (2.75) <i>Torulopsis inconspicua</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.390	0.276 0.163	0.052	12.3	$Q_8$
16	平常球拟酵母 (2.75) <i>Torulopsis inconspicua</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.392	0.267 0.163	0.086	12.0	$Q_8$
17	小孢酵母 <i>Saccharomyces exiguus</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.400	0.300 0.190	0.055	13.2	$Q_8$
18	小孢酵母 <i>Saccharomyces exiguus</i> 土星汉逊氏酵母 (2.300) <i>Hansenula saturnus</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.588 0.435	0.588 0.191	0.099	13.1	$Q_8$ $Q_8$
19	土星汉逊氏酵母 (2.300) <i>Hansenula saturnus</i>	$Q_8$ $Q_{10}$	0.254	0.408 0.085	0.078	14.2	$Q_8$

[注]: 表中括号 ( ) 中的数字系中国科学院微生物研究所的菌种编号。

(2)式时得:

$$Q_s = 50 - \left[ \left( \frac{0.588 - 0.191}{0.099} \right) \times 5 \right]$$
$$= 50 - 20 = 30$$

当用已知样品  $Q_k$  的数据 ( $Q_k = 30$ ) 代入(2)式时得:

$$Q_s = 30 - \left[ \left( \frac{0.588 - 0.588}{0.099} \right) \times 5 \right]$$
$$= 30 - 0 = 30$$

∴ 小孢酵母所含泛醌类型为  $UQ_{10}$ 。

## 二、定性结果

我们用上述同样的方法对酵母类 9 个种 (12 个菌株) 的正己烷 (或石油醚) 抽提物作了鉴定。为了验证结果的可靠性, 每个未知样品都通过改变或不改变其中一个已知标准样品的方法作了重复。表中列出了一部分结果。

### 小 结

1. 本文所报告的计算方法只需要使用二个已知  $UQ$  标准品就能准确地确定任一未知样品中  $UQ$  类型。

2. 这个方法是以  $UQ$  类在硅胶 G 反相薄层层析中的  $R_f$  值是一个相对值, 其  $\Delta R_f$  值随不同的层析板变化; 而在一次层析中,  $\Delta R_f$  值则是恒定的 (即两相邻  $UQ$  类的  $R_f$  值之差是一个常

数) 事实为依据的。在以丙酮: 水: 石蜡油 = 95: 5: 0.5 (体积比) 展层时, 如果溶剂前沿在 12—15 厘米的范围内,  $\Delta R_f$  值在不同的层析板上的变化范围大约在 0.05—0.10 之间 (见表)。

3. 用该法对酵母类 9 个种 (12 个菌株) 的正己烷 (或石油醚) 抽提物的定性结果表明, 该法所得结果与文献报道的结果一致, 而且迅速简便; 避免了在  $UQ$  类的反相薄层层析定性中使用众多的  $UQ$  标准品。

### 参 考 文 献

- [1] Crane, F. L. and R. Barr: Determination of Ubiquinones, *Meth. in Enzymol.* Vol. 18(C) (ed. by Donald, B. et al.), Academic Press, New York, 1971, p. 157.
- [2] Karner, W. F.: "Ubichinone", "Ferment, Hormone, Vitamine, 3 Auflage III/I, Vitamine", (ed. by Ammon, K. et al.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974, p. 569.
- [3] Crane, F. L. and R. A. Dilley: Determination of Coenzyme Q, *Meth. of Biochem. Anal.* Vol. 11 (ed. by Glick, D.), John Wiley & Sons, New York, 1963, p. 302.
- [4] Crane, F. L. and R. Barr: Determination of Ubiquinones, *Meth. in Enzymol.* Vol. 18(C) (ed. by Donald, B. et al.), Academic Press, New York, 1971, p. 143.
- [5] 近藤圭二: 特許公報, 昭 48—8836, 1973.
- [6] Crane, F. L. and R. Barr: Determination of Ubiquinones, *Meth. in Enzymol.* Vol. 18(C) (ed. by Donald, B. et al.), Academic Press, New York, 1971, p. 147—148.