

气质联用定量分析放线菌全细胞单糖方法的研究*

陈文峰** 蒋凌月 徐丽华*** 姜成林

(云南大学微生物研究所 昆明 650091)

摘要: 采用气相色谱-质谱联用仪分析了近百株放线菌的全细胞水解液单糖。放线菌全细胞糖经酸水解、氢化还原和乙酰化生成糖醇乙酸酯衍生物通过气相色谱-质谱仪定性、定量分析。鼠李糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、马杜拉糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖的糖醇乙酸酯衍生物在这种条件下得到了良好地分离。计算各糖的峰面积之比确定它们的相对百分含量。

关键词: 气相色谱-质谱联用, 定量分析, 放线菌全细胞单糖

中图分类号: Q93.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)06-0416-05

STUDIES ON QUANTITATIVE ANALYSIS OF WHOLE-CELL SUGARS IN ACTINOMYCETES BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTRUM

CHEN Wen-Feng** JIANG Ling-Yue XU Li-Hua*** JIANG Cheng-Lin

(Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091)

Abstract: Rapidly and accurately quantitative analysis of whole-cell sugars in some strains of actinomycetes by GC-MS was performed in this paper. After the polysaccharides were hydrolyzed, deoxidized and esterified, the alditol acetate derivatives were analyzed by GC-MS. The derivatives of rhamnose, ribose, arabinose, xylose, madurose, mannose, glucose, galactose were separated commendably under this condition. The ratio of the peak area was calculated to get the relative percentage of the various sugars.

Key words: GC-MS, Quantitative analysis, Whole-cell sugars of actinomycetes

在现行的放线菌化学分类中, 纸层析^[1]、薄板层析^[1]、高效液相色谱^[2]和气相色谱^[3]等化学分析手段均被用于分类指标(如细胞壁氨基酸、全细胞糖等)的定性研究。但越来越多的研究表明, 定性分析存在着许多问题。Wellington等^[4]分析了9个属的放线菌的DAP(二氨基庚

二酸)组分, 结果表明每个属几乎都同时含有 meso-DAP和 L-DAP, 只是两种DAP的比例不

* 云南省科委国际合作项目

** 现在中国农业大学生物学院攻读博士

*** 通讯联络人

收稿日期: 1999-07-19, 修回日期: 1999-11-01

同而已。Yumiko Nakagaito 等^[5]用 HPLC 研究 *Streptomyces* 属(十株)的全细胞糖发现有 7 株含有马杜拉糖,而以前却认为该属不含特征性糖^[6],并且他根据是否含有马杜拉糖而将所研究的 *Streptomyces* 属分为两大类。我们^[7]在研究高温链霉菌和高温放线菌全细胞糖时,也发现多含半乳糖。由于微生物本身的复杂性,而现行的分析方法都是定性的测定,缺乏定量标准,因此难以解释以上分类学上的许多实验现象。放线菌全细胞水解液单糖类型是放线菌化学分类的重要特征之一。目前已有报道用高效液相色谱^[8]、气相色谱^[9]等来定量分析放线菌的全细胞糖。但由于高效液相色谱分析糖需要进行柱后衍生,用酶来降解甘露糖(因为它的保留时间与马杜拉糖的相同),而且总的保留时间长(约 45min),不利于大批量分析。用气相色谱分析时又由于不易找到合适的糖衍生物,且使用极性柱时柱温过高,柱流失严重,故而也不适用。因此,本文建立了 GC-MS 联用(装以弱极性毛细管柱)来快速、准确定量分析糖醇乙酸酯衍生物,为放线菌全细胞糖的定量化学分析和放线菌定量化学分类提供了一项可行的分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:所用 71 株标准菌株分别来自 CCRC, JCM, CGMCC, ATCC, NRRL 等菌种保藏中心,这些菌株的胞壁化学类型为 I-IV 型;糖类型为 A-E 五型。41 株待鉴定菌株分离自云南、新疆等地的高温、高盐、酸、碱等极端环境之中。

1.1.2 试剂:糖衍生试剂:硼氢化钠购于 E. MERCK; 1-甲基咪唑购于 Sigma 公司;氢氧化铵、冰乙酸、乙酸酐、二氯甲烷等试剂均为国产或进口分析纯。

标准糖试剂: α -L-鼠李糖和 D-核糖购于 Sigma 公司; D-木糖购于 E. MERCK; L-(+)-阿拉伯糖、D-(+)-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖等均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 菌体多糖的水解:取 100mg 冻干菌体用 1mL 0.5mol/L HCl 在 121℃ 水解 30min, 过滤。

1.2.2 单糖的还原^[3]:水解液中加入 0.3mL 17mol/L 氢氧化铵和过量的 10% 硼氢化钠(3mol/L 氢氧化铵), 4℃ 保存 2h。逐滴加入冰乙酸至不再冒出气泡为止。

1.2.3 糖醇乙酸酯的制备^[3]:取 0.2mL 还原糖溶液, 加入 0.25mL 1-甲基咪唑和过量的乙酸酐, 55℃ 振荡反应 3h。冷却后加入 5mL 蒸馏水及 1mL 二氯甲烷。离心分相。吸出下层有机相, 减压蒸干。再用 100 μ L 二氯甲烷溶解即可进行气-质分析。

称取标准单糖各 0.5mg, 混合后用 1mL 蒸馏水溶解, 滴入 2 滴 17mol/L 氢氧化铵使溶液呈微碱性。余下的还原、酯化按上述方法进行。

1.2.4 气-质联用分析糖醇乙酸酯:色谱条件: HP6890 气相色谱-质谱联用仪。色谱柱: HP-5MS 苯甲基硅烷石英毛细管弹性柱, 30.0m \times 0.25mm 弱极性毛细管柱。注射器和质谱检测器温度均为 250℃。进样量 0.2 μ L。分流比为 50:1。载气(He)流速为 1mL/min。柱升温程序为: 180℃ 维持 3min; 以 10℃/min 升到 183℃ 并维持 2min; 最后以 8℃/min 升到 197℃ 并维持 5min。

质谱条件: 电子轰击(EI); 电子能量 70eV; 扫描范围 50~550; 扫描速度 2.51/s。

1.2.5 数据处理及分析:糖的定性分析: 采用保留时间和质谱分析同时进行定性。即根据 GC-MS 系统分析得到的质谱图, 有 WELEY 计算机质谱库检索, 鉴定各组分。

糖的定量分析: 采用微机自动积分仪计算各糖的峰面积, 然后求出各峰面积之间的比例即为各糖的相对百分比含量。

2 结果与讨论

2.1 糖的衍生化

采用 GC 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, 因此必须在 GC 分析之前预先转化成易挥发、对热较稳定的衍

生物。又由于糖的异构化,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。本方法是将衍生成糖醇乙酸酯这种易挥发且对热稳定的衍生物,同时它避免了糖异构体的产生,因此在分析时每种糖可得到单峰。

2.1.1 多糖的水解:生物体内的大多数糖类都是以多糖和低聚糖的形式存在,所以在分析之前必须先将菌体多糖水解成单糖。多糖的水解常用无机酸在适当条件下进行。水解后多糖可定量地转变成它所组成的单糖,然后再进行分离和分析。由于多糖中糖甙键的酸水解难易存在差别,需要选用不同的水解条件。目前常用的方法有盐酸、硫酸和三氟乙酸(TFA)等水解法。一般应尽可能地选择较温和的条件和较低的酸浓度以避免水解后生成的单糖受酸和热的作用进一步发生分解反应和复合反应。由于 H_2SO_4 和TFA的作用剧烈,不易控制,可发生复合反应生成低聚糖或发生分解反应生成非糖物质;且TFA的毒性较大,不宜在实验室中使用。因此我们选用盐酸来水解菌体多糖。

用HCl水解时,不同的作用时间对水解会产生影响,我们曾研究了1mL 0.5mol/L HCl在121℃水解不同的时间(15min、20min、30min、1h),结果表明,15min和20min的水解时间作用不彻底,得率很低。而1h和30min的水解处理效果基本上没多大差别。因此我们选择100mg干细胞用1mL 0.5mol/L HCl于封口的安瓿管中在121℃水解0.5h的实验方案并开展下一步的工作。

2.1.2 单糖的氢化还原:硼氢化钠与糖反应的摩尔比为1:4,为保证糖完全被还原,所加硼氢化钠的量应过量。氢化不彻底时,糖仍保持其环状的结构,经酯化反应后所得到的糖醇乙酸酯缺少一个乙酰基,因此影响糖的定量。pH偏低或反应温度过高(室温或37℃)时,硼氢化钠主要与水反应,故溶液的pH应调节至碱性,并使反应在低温(如4℃左右)下进行。氢化的时间也影响糖的还原。通过与Saddler^[3]和Takahashi^[9]的实验方法相比,前者的反应温度在37℃,时间为

1h;后者的反应在室温进行,需4h;我们改用4℃反应3h,糖可被完全氢化。

2.1.3 糖醇的乙酸酯化:本方法是将糖衍生成糖醇乙酸酯衍生物,和其它的衍生物(如糖的三甲基硅醚衍生物)相比,这一衍生化过程可以避免衍生物异构体的产生,因此在色谱分析时每种糖形成单一峰。糖的乙酸酯是在催化剂的存在下由糖与乙酸酐反应生成。所用催化剂为1-甲基咪唑,它比另一种常用催化剂吡啶的催化效果更佳。因为咪唑环上氮的孤对电子更易对乙酸酐的羰基碳进行攻击,使之与糖醇的羟基发生成酯反应。

反应液中含有水时,乙酸酐先与水发生反应,再与糖醇反应。因此应加入过量的乙酸酐以保证所有的糖醇羟基彻底酯化。另外,提高温度也有利于酯化反应的进行。

2.2 GC-MS联用定量分析糖醇乙酸酯

分析糖醇乙酸酯衍生物多用SP-2380、SP-2100等极性柱,另有用非极性的SF-96毛细管柱来分离还原糖的三甲基硅衍生物。极性柱分析糖的衍生物,所需的保留时间长。Takahashi^[9]用SP-2380分析了9种标准单糖(鼠李糖、果糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、马杜拉糖、半乳糖、葡萄糖和肌醇)的衍生物,所需的保留时间约为45min。保留时间的延长对于大批量分析菌体糖衍生物是不利的。

除了保留时间长外,使用极性柱还存在柱子固定液流失的问题,而且使用极性柱时一般要求较高的柱温(250℃~270℃,维持5~20min),这样会造成柱子的使用寿命缩短。因此我们尝试用非极性或弱极性毛细管柱代替极性毛细管柱来分析糖醇乙酸酯衍生物。本方法采用苯甲基硅烷为固定液的弱极性毛细管柱HP-5分析糖醇乙酸酯衍生物。我们调整了柱温,初温由极性柱的250℃降至180℃,5min后出来第一个峰,然后采用程序升温,最后在197℃维持5min,7种单糖总的保留时间不到15min,大大地提高了分析速度。图1为7种标准单糖(鼠李糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖)的糖醇乙酸酯混合物的GC

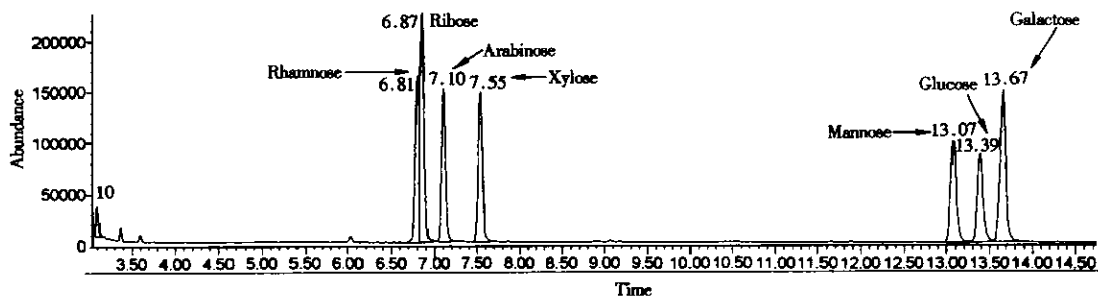


图1 混合标准单糖的糖醇乙酸酯衍生物的GC图谱

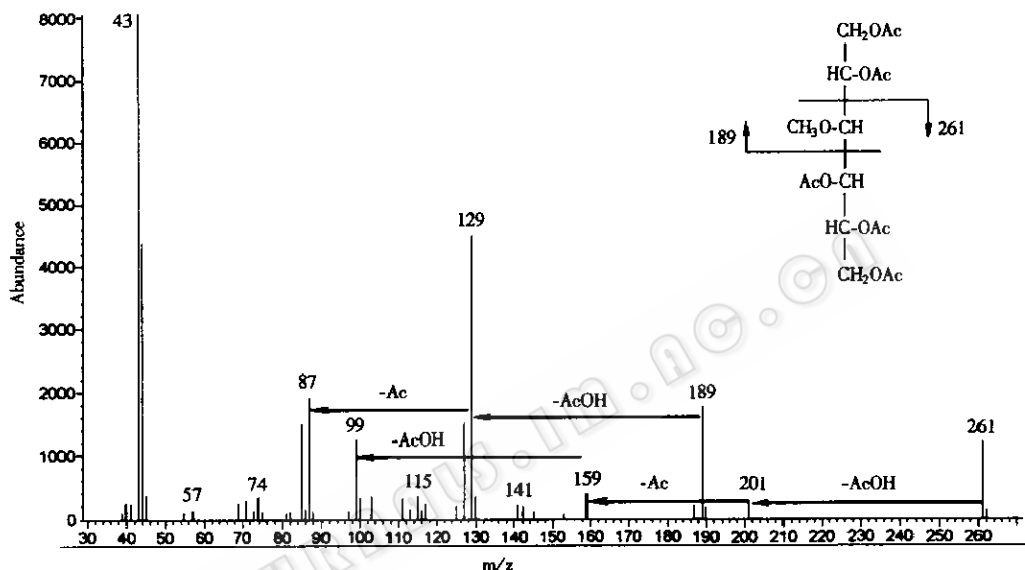


图2 马杜拉糖的糖醇乙酸酯衍生物的质谱图

图谱。

对马杜拉糖的鉴定, 由于我们没有获得其标准品, 所以主要参考文献 [3, 9] 上的资料并结合其质谱图进行分析。先挑选含有马杜拉糖的已知菌 *Microbispora rosea subsp. rosea* JCM 14044, 对之进行全细胞糖的衍生后, GC-MS 分析, 结果见图 2。图 2 为已知含有马杜拉糖菌 JCM 14044 中的一个色谱峰的质谱图, 从图中可以看出, 它的主要片段在 m/z 85、87、99、127、129、159、189、201、261, 特征性片段峰为 m/z 129、189 和 261, 与文献 [3] 中报道的完全一致。基峰为 m/z 43。一级片段 m/z 189 和 261 通过部分裂解产生乙酸根 ($-AcOH$, -60) 后成为次级片段。这一结果同时还说明此糖为六元糖, 且在 C-3 位上存在 $-OCH_3$ 。由此我们断定该糖为马杜拉糖。

我们用 GC-MS 定量分析了全细胞糖型为 A 型的 11 个属 17 株标准放线菌的单糖组成。分析结果见表 1。

表 1 中这 17 株放线菌的特征性糖应为阿拉伯糖和半乳糖, GC-MS 检出率为 100%, 阿拉伯糖的相对百分含量在 12%~61% 之间, 半乳糖的含量为 11%~57%, 与文献报道一致。但有 14 株 (占 80%) 含有木糖, 含量在 1%~12% 之间, 这与现行的分类标准不符。很明显, 由于应用 GC-MS 分析全细胞的单糖含量, 原来用薄板层析检测不到的糖, 现在确定无疑的被检测出来, 分类理论和分类方法也要随之改进。这将在另文结合其他化学分类研究的结果进行讨论。

采用上述方法, 每天可分析 25~30 株放线菌的全细胞单糖, 大大提高了糖定量化学分析

表1 GC-MS定量分析A型放线菌的全细胞糖组成的结果

菌名	各单糖的相对百分含量(%)							
	Rha	Rib	Ara	Xyl	Mad	Man	Glu	Gal
<i>Actinokineospora riparia</i>	4	9	12	5	6	0	33	30
<i>Amycolatopsis orientalis</i>		5*	43	2	0	0	4	44
<i>A. mediterranei</i>		6*	34	0	0	0	3	57
<i>Actinobispora yunnanensis</i>	12	0	26	4	0	9	15	32
<i>A. xinjiangensis</i>	0	7	17	3	0	14	25	33
<i>A. alaninophila</i>	0	5	37	1	0	2	7	48
<i>Pseudonocardia autotrophica</i>	0	2	33	0	0	7	31	24
<i>Saccharomonospora viridis</i>	5	0	61	8	0	0	0	26
<i>S. xinjiangensis</i>		13*	25	6	2	0	6	48
<i>Saccharopolyspora hirsuta</i>		5*	44	4	1	0	12	35
<i>Gordona terrae</i>	0	5	45	0	0	3	34	12
<i>Rhodococcus rubropertinctus</i>		4*	22	3	0	2	26	44
<i>Tsukamurella paurometebola</i>	0	6	47	5	t	15	13	15
<i>Nocardia asteroides</i>	0	3	38	2	0	12	31	14
<i>N. mexicana</i>	9	9	15	3	0	6	32	24
<i>N. otitiscaviarum</i>		4*	33	3	1	11	36	13
<i>Corynebacterium xerosis</i>		7*	49	12	0	12	3	11

注: Rha=鼠李糖, Rib=核糖, Ara=阿拉伯糖, Xyl=木糖, Mad=马杜拉糖, Man=甘露糖, Glu=葡萄糖, Gal=半乳糖, t=微量, * R和R两种单糖相对百分含量的总和

的速度。而且灵敏度大大提高(10^{-9} g)。这一快速、高效、高灵敏度的定量分析放线菌全细胞单糖的方法为放线菌的定量化学分类提供了一项有力的研究手段。

参 考 文 献

- [1] 阮继生, 刘志恒, 梁丽糯等. 放线菌研究及应用. 北京: 科学出版社, 1990.
- [2] 日本放线菌学会编. 放线菌的鉴定实验法-HPLCによる菌体成分の定性・定量分析. 平成元年 10 月 30 日.
- [3] Saddler G S, Tavecchia P, Lociuoro S *et al.* J Microbiol Methods, 1991, 14:185~191.
- [4] Willington E, Stackebrandt E, Sanders D *et al.* Int J Syst Bacteriol, 1992, 42:156~160.
- [5] Nakagaito Y, Nishii T, Yokota A *et al.* IFO Res Commun, 1993, 16:102~108.
- [6] Lechevalier M P, Lechevalier H A. Int J Syst Bacteriol, 1970, 20:435~443.
- [7] 姜成林, 徐丽华, 许宗雄. 放线菌分类学. 昆明: 云南大学出版社, 1995.
- [8] Takeuchi M, Nishii T, Yokota A. Actinomycetol, 1992, 6:79~90.
- [9] Takahashi Y, Egusa H, Deng B *et al.* Actinomycetol, 1992, 6:69~78.