
* 技术与方法 *

薄层层析法测定海藻糖

周 坚 吴大鹏 程 萍 戴秀玉

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 用适宜浓度的硫酸溶液, 在使糖样品炭化的同时保持硅胶底板的反差度, 解决了海藻糖不易显色的问题, 从而建立了用硅胶板薄层层析法测定微量海藻糖的方法。此法可分离和测定 $1\mu\text{g}$ 量的海藻糖, 灵敏度高且简单易行, 可作为海藻糖分析测定的常规手段。

关键词 海藻糖, 薄层层析

海藻糖(trehalose, α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside)是由两个葡萄糖分子 α - α , 1 $\rightarrow$ 1键接的非还原性双糖, 结构稳定, 化学惰性。海藻糖具有稳定细胞膜和蛋白质结构的功能^[1]。海藻糖是极好的保鲜剂和耐储剂, 它对果品蔬菜、食品、化妆品、医药、保健品、酶, 特别是对疫苗等生物制品的保存效果令人瞩目^[2], 因而海藻糖的生产、应用技术以及遗传工程已成为当前国际上研究和开发的活跃领域^[3]。由于目前用于糖分析的一般显色剂都不能使海藻糖显色或显色极弱^[4], 海藻糖的测定主要借助于高效液相色谱(HPLC)或气相色谱(GC), 而这些方法的推广不仅受实验室设备条件的限制, 而且因对样品的纯度要求高, 无法对提取过程中的中间试样进行测定, 给研究工作带来一定困难。浓硫酸可以使碳水化合物炭化并留下印迹, 我们对硫酸浓度与样品显示、底板颜色深浅和稳定性等关系作了比较试验。在最适显示条件的基础上, 建立了点样量、展开系统、显色剂浓度和加热时间等一套分析方法, 测定了此法对海藻糖分析的灵敏度, 并与当前使用的显色方法作了比较。

1 材料与方法

1.1 材料

标准海藻糖、葡萄糖、蔗糖均为 AR 级, 硅胶板(GF254, 100 $\times$ 100), 青岛海洋化工厂生产。

1.2 方法

1.2.1 硅胶板活化: 硅胶板用前在 105 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱内烤 2h, 然后置干燥器中冷却备用。

1.2.2 点样: 点样线距板底 1.5cm, 样品间距 1.5cm。

1.2.3 展开: 经过对多种展开剂及不同配比的对比试验, 最后选择了展开效果好的、特别是能将几种双糖相互分开的展开系统, 即: 正丁醇:乙醇:水=2:1:1, 置层析缸内在室温下展开, 待展开剂前沿走至距板上端 1cm 处取出烘干。

1.2.4 显色: 经层析展开的硅胶板浸入不同浓度的硫酸液, 即刻取出置 100 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱加热, 使之显色。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度硫酸的显色效果

把海藻糖、葡萄糖和蔗糖的标准样品以及本实验室发酵法自制的海藻糖结晶样品分别配成 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度, 点样 5 μl 。展开并干燥后, 分别浸入不同浓度的硫酸液, 即刻取出至 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热, 待所有糖样带均显现, 取出并记录加热时间, 置室温 10min, 待显色稳定后观察样点的清晰程度(表 1)。

从表 1 结果可看出, 10% ~ 15% 的硫酸

中国科学院院长基金, “九五”攻关项目

1996-05-05 收稿

表1 不同浓度硫酸的显色效果

硫酸 (%)	样点全部显现的 加热时间(min)	室温 10min 后的清晰度
30	9	底色发黑无法分辨
25	9	底色很深, 样点轮廓不清
20	11	底色较深, 不够清晰
15	13	底色较浅, 清晰
10	13	底色浅, 清晰
5	16	底色很浅, 样点稍浅
2	19	底色很浅, 样点很浅

对糖样的稳定显现效果最好, 过浓底色深, 过稀则加热时间长达近 20min 才显现, 且样品点颜色偏浅。

2.2 对海藻糖测定的灵敏程度

将海藻糖的点样量从 0.1 μ g 至 25 μ g, 共做 14 个不同样量处理, 展开后用 10% 硫酸显示, 其清晰程度如表 2 所示。

表2 不同点样量的显色效果

点样量(μ g)	层析带的清晰度
25	++++
20	++++
15	++++
10	+++
5	+++
4	+++
3	++
2	++
1	++
0.8	+
0.6	+
0.4	+
0.2	-
0.1	-

++++ 色很深、清楚; +++ 色深、清楚; ++ 色较深、清楚; + 色浅、尚清楚; - 不显

从表 2 结果看, 点样量在 1 μ g (包括 1 μ g) 以上, 都能清楚显色, 1 μ g 以下至 0.4 μ g 以上, 能证明其存在。

2.3 与二苯胺显色法比较

硫酸炭化显色法对几种糖的显色结果见图 1。

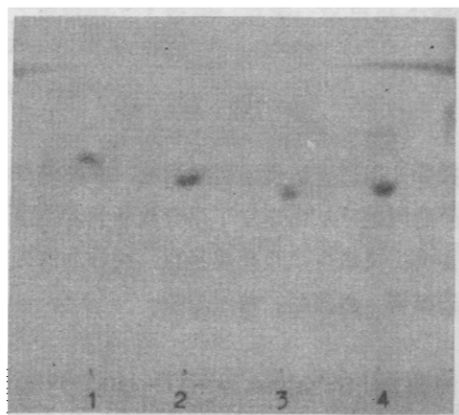


图1 硫酸炭化显色法薄层层析照片

1. 标准葡萄糖, 2. 标准蔗糖, 3. 发酵法自制的海藻糖结晶, 4. 标准海藻糖 (点样量均为 2 μ g)

本方法与二苯胺显色法相比, 灵敏度要高很多, 图 2 是点样 10 μ g, 用相同展开系统及条件展开之后用二苯胺显色的照片。葡萄糖、蔗糖显色很深, 而两个海藻糖样品则基本不显色, 其点样量是图 1 的 5 倍。

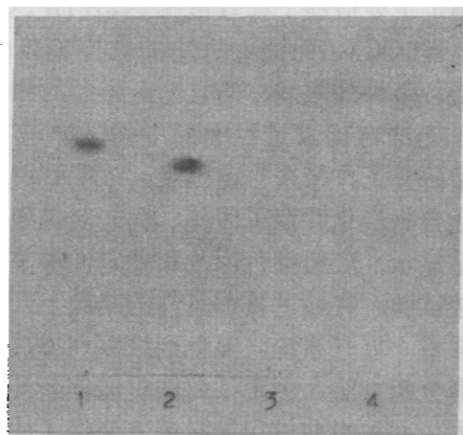


图2 二苯胺法显色层析照片

1. 标准葡萄糖, 2. 标准蔗糖, 3. 发酵法自制的海藻糖结晶, 4. 标准海藻糖 (点样量均为 10 μ g)

2.4 对混合样的分离效果

这种薄层层析法对混合样的分离效果也很

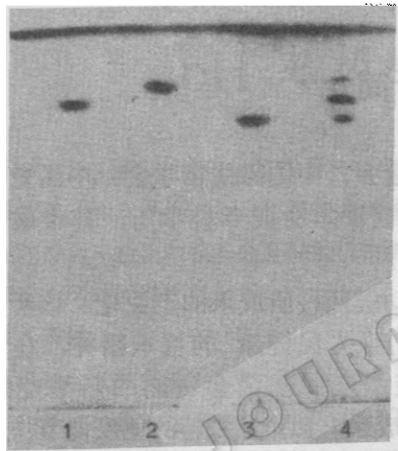


图3 混合点样层析照片

1. 标准蔗糖, 2. 标准葡萄糖, 3. 标准海藻糖,
4. 标准葡萄糖、蔗糖、海藻糖
(1, 2, 3, 点样量均为 $4\mu\text{g}$, 4 为各种糖 $1\mu\text{g}$ 的混合样)

好, 能把同是双糖的蔗糖与海藻糖分离开并清楚地显现, 结果见图3照片。

以上结果说明配合适当的展开系统和实验方法, 用 10% ~ 15% 硫酸溶液作为糖的显示剂, 可以用简单方便的薄层层析法分析测定微量的海藻糖。

参 考 文 献

- [1] Crowe J H, Crowe L M, Chapman D. Science, 1984, 223: 701 ~ 703.
- [2] Roser B, Colace C. New Scientist, 1993, 138: 24 ~ 28.
- [3] 戴秀玉 程 萍 周 坚等. 微生物学通报, 1995, 22(2): 102 ~ 103.
- [4] 张维杰主编, 复合糖生化研究技术, 上海: 上海科技出版社 1987, 10 ~ 21.