

海藻糖分析方法的研究

缪 静*

(烟台师范学院生命科学学院 烟台 264025)

摘要: 对目前研究中应用的海藻糖的定性定量分析方法作了较为全面的介绍, 并对各种方法的特点及适用性作了比较。

关键词: 海藻糖, 分析方法

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0096-05

Research for Determination of Trehalose

MIAO Jing*

(School of Life Science, Yantai Normal University, Yantai 264025)

Abstract: The different methods used in trehalose determination are introduced in the review. Comparisons on the characteristics and the applicational property of the methods are also discussed.

Key words: Trehalose, Analytical method

海藻糖 (Trehalose), 又名草糖, 是由两个葡萄糖分子以 α, α - (1 \rightarrow 1) 键结合而成的非还原性双糖。该糖广泛存在于多种生物体内^[1], 如细菌、酵母、蕈菌、昆虫、无脊椎动物和某些低高等植物中。经研究发现: 海藻糖是一种应激代谢物, 它赋予生物体抵抗干燥、干旱、寒冷、高温以及氧自由基等恶劣环境的能力, 此外外源的海藻糖同样对生物大分子具有保护作用。海藻糖这些独特的生物学特性使其在医药、食品、化妆品、农业等方面具有广阔的应用前景^[2]。而且随着对其研究的不断深入, 发现海藻糖的功能还远不止这些^[1]。因此自上世纪 90 年代以来, 越来越多的学者开始关注这一奇妙的双糖。而海藻糖分析方法的建立必然是海藻糖生产及应用研究的关键。不同的研究方向, 其方法也不尽相同。目前海藻糖的分析方法主要有纸层析、薄层层析 (TLC)、高压液相色谱 (HPLC)、气相色谱、蒽酮比色、酶分析等方法。为了特殊的目的, 还可几种方法联用, 并辅助于其它设备, 形成一系列新的方法。

1 纸层析法

纸层析法是一种古老的分析手段, 因其操作简单、费用低, 所以仍被广泛应用。建立纸层析法的关键是选择合适的展开剂和显色剂。用于海藻糖分析的展开系统有: 正丁醇: 醋酸: 水 = 4:1:2 (v/v/v 下同); 正丁醇: 乙醇: 丙酮: 水 = 5:4:3:2; 乙酸乙酯: 甲酸: 水 = 30:7.5:5; 正丁醇: 醋酸: 水 = 5:1:2; 正丁醇: 甲酸: 水 = 75:15:10; 酚水的上层饱和液等。王 兰等^[3]人找到了如下组成的展开系统: 正丁醇: 丙酮: 水: 醋酸 = 10:3:6:2。其显色系统由两部分组成: A 液为 AgNO₃ 的水-丙酮饱和溶液, 水: 丙酮 = 1:

* 联系人 Tel: 0535-6681263, E-mail: miaojing426@263.net

收稿日期: 2004-01-11, 修回日期: 2004-06-10

200; B液是将NaOH晶体溶于100g乙醇水溶液中,乙醇:水=1:1。他们为了解决纸层析法进行定量测定时误差大、重现性差等问题,在洗脱剂的选择上做了比较,最终选择了0.1 mol/L的HCl作为洗脱剂,洗脱时间为16 h。点样量40~100 μg 时,吸光度与海藻糖含量有一定的线性关系。用该方法进行回收和重复性试验,发现回收率在93%以上,变异系数只有0.4659%,说明精密度高,重现性好。因此可作为海藻糖的定性、定量测定的常规方法。曾国驱等^[4]人在海藻糖产生菌的筛选及其发酵条件研究中也使用纸层析法测定海藻糖,作为海藻糖产生菌初筛的常规手段,他们使用的展开剂为:乙酸乙酯:吡啶:水=13:5:4。显色剂:依次为1.12 mol/L的 AgNO_3 溶液:丙酮=1:9,0.25 mol/L的NaOH乙醇溶液,6 mol/L的 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 。

2 薄层层析法(TLC)

薄层层析法主要用来定性分析糖类。其基本原理与纸层析法相同,但采用的固定相材料不同。与纸层析法相似,建立TLC法的关键也是要寻找合适的展开和显色系统。

周坚等^[5]建立了以正丁醇:乙醇:水=2:1:1为展开剂,10%~15%硫酸溶液为显色剂的海藻糖测定方法。刘传斌等^[2]采用硅胶GF254(200×50)板,选用正丁醇:吡啶:水=15:3:2(v/v)为展开剂,同样能很好的将海藻糖与葡萄糖、蔗糖等小分子糖分开。把1 g酚及5 mL的98%浓硫酸溶于100 mL 95%乙醇中,配得显色剂。将展开后的薄层板烘干后,均匀喷上显色剂,于110℃烘箱中加热10~15 min,即可呈现棕色斑点。

毛忠贵等^[6]以较难分离的海藻糖、麦芽糖、蔗糖和葡萄糖为分离目标,建立了一套有效的分离系统。实验选用青岛产硅胶G,用0.1 mol/L的磷酸二氢钠调浆制板。展开系统是:正丁醇:吡啶:水=6:4:1。显色剂为“万能显色剂”即20%的硫酸-甲醇溶液。用该法能够检出2 μg 以上的海藻糖。荣绍丰等^[7]人对该法进行改进,采用两种显色剂分别对样品进行显色。显色剂1仍为“万能显色剂”,而显色剂2为丙二酸-苯胺显色剂,是一种选择显色剂。它对海藻糖不显色,而对麦芽糖、异麦芽糖等显色。通过对比可初步确定反应体系中是否存在海藻糖。

Hansen^[8]报道了一种方法进行单糖和低聚糖类的分离,可以得到良好的效果。该方法所使用的展开系统为:异丙醇:丙酮:0.1 mol/L乳酸=4:4:2,显色系统由4 mL苯胺,4 g二苯胺,200 mL丙酮,30 mL的80%磷酸组成,喷浸样品糖斑点后在105℃烘箱中烘30 min,不同糖会以不同颜色显现。海藻糖为蓝色, R_f 值为0.31。由于该方法在展开系统中使用乳酸,并且预涂层板预先经过 NaH_2PO_4 溶液浸渍,乳酸带着糖移动,限定了糖的斑点不扩散到板的边沿,即不出现边沿效应。

王绍校等^[9]在进行海藻糖微生物酶法合成机制的研究中,采用的展开剂为正丁醇:冰醋酸:水=2:1:1,上行展开2次。显色剂为4 g二苯胺和4 mL苯胺溶于200 mL丙酮和20 mL 85%磷酸的混合液。

纸层析和TLC都具有设备简单、操作易行的特点,且易于菌种初筛和中间试样的测定,但由于纸层析 R_f 值重现性好,故更适用于海藻糖的定量分析。一般,定量时采用TLC的目的主要是分离,根据海藻糖的 R_f 值确定其位置,将海藻糖位置的硅胶刮下,然后用其它定糖的方法,如苯酚硫酸法^[10]进行定量。

3 高压液相色谱 (HPLC)

高压液相色谱是较理想的高效、快速进行海藻糖定性定量分析的手段。同其它色谱一样,高压液相色谱也是溶质在固定相和流动相之间进行的一种连续多次的交换过程,它借溶质在两相间分配系数、亲和力、吸附能力、离子交换或分子大小不同而造成的排阻作用的差别,使不同溶质进行分离。样品在柱内保留或滞留的能力可以用保留值来描述。从进样开始到柱后出现样品浓度极大值所需的时间为保留时间,用TR表示。在相同色谱条件下,不同的物质有不同的保留时间,这是定性的依据;溶质的量与峰面积在一定的范围之内有着线性的正比关系,这是定量的依据。

影响分离效果的因素主要有:固定相、流动相(包括种类、浓度、流速)、柱长、温度和进样量等。常用来分离糖的色谱柱有氨基柱和 C_{18} 柱。选什么样的柱子,应视具体情况而定。笔者曾参与过以淀粉为底物酶法生产海藻糖的研究工作。因为我们的分析样品中可能存在麦芽糖、异麦芽糖等结构极为类似的同分异构体。而 C_{18} 柱对同分异构体的分离效果不如氨基柱,所以我们选择了氨基柱。氨基柱的分离原理是键合相氨基能和糖类分子中的羟基间有选择性的相互作用,因而当选用合适的有机溶剂做流动相时可以分离单、双糖和多糖。我们尝试了两家公司的氨基柱,一是惠普公司的 Hyperersil-APS, 一是 Waters 公司的 SpherisorbNH₂。实验中发现 Waters 公司的柱子对旋光异构体分离效果很好,这样一来使图谱中出现的峰特别多,实际上对我们定量分析起到干扰的作用。而惠普公司的柱子不能将糖的旋光异构体分开,但条件适宜时却能将所试标样中的几种糖很好的分开。因此,最终选用了 Hyperersil-APS。

选择适当的溶剂要比固定相更为重要,它更能影响分离的成败。经过大量试验,最终确定 78% 的乙腈水溶液为流动相,在柱长 20 cm,柱温 25℃,流速 1 mL/min,进样量 5 μ L 的条件下,能将海藻糖、葡萄糖、麦芽糖、异麦芽糖、麦芽三糖、潘糖组成的混合液很好的分开。但值得注意的是使用氨基柱时,如果时间长、次数多了,不可避免地存在氨基基团从硅胶表面缓慢地漂移等问题,所以,遇到这种情况时,需通过调整溶剂成分而得到纠正。即我们可通过增加乙腈含量,以保证保留时间的稳定。也可往流动相中加入某些胺作为改善剂,动态修饰硅胶柱。由于柱上吸附的有机胺不断得到更新,分析柱可以长时间保持稳定。

糖本身在通常的紫外区无吸收,采用低波长紫外检测干扰较大,对糖的直接检测往往利用示差折光检测器(RID)来进行。但RID的灵敏度较低且不能用于梯度洗脱。衍生化法可很大程度的提高糖的检测灵敏度,但衍生化操作繁琐且不可避免的会引入误差。针对这一问题,魏 泱等^[11]人在用HPLC法测定海藻糖纯度时,改用蒸发光散射检测器(ELSD)作为检测系统取得良好的效果。他们采用的色谱条件为:色谱柱:Zorbax SB-C18 (4.6 mm i.d. \times 25 cm, 5 μ m),流动相:甲醇:水 = 80:20 (v/v),流速:0.8 mL/min,柱温:25℃,进样量:20 μ L; ELSD 参数:漂移管温度:75℃,氮气流速为 1.75 L/min。在此条件下,当海藻糖浓度为 30 ~ 100 mg/L 范围内,浓度的对数与 ELSD 测得的峰面积具有良好的线性关系,且 ELSD 检测过程中,无溶剂峰干扰,基线稳定。

目前有关海藻糖分析的 HPLC 检测条件很多,可参阅文献 [2]、[7]、[9]、[12]、[13]。

此外由美国的 Dionex 公司开发的高效阴离子交换-脉冲安培法 (HPAE-PAD) 为高压液相色谱的一种, 在海藻糖的定量分析中的应用也有报道^[14]。它具有灵敏度高, 可达 pmol 水平; 分析时间短, 只需 15~30 min; 无需进行衍生化和严格的样品处理; 可以使用梯度洗脱; 色谱柱的选择性及分辨率高; 柱及检测器的使用寿命长等优点。其基本原理及应用可参阅文献[14]。

HPLC 显示了良好的线性和校正。研究发现海藻糖测定的线性相关系数为 0.9998~0.9999, 回收率在 98% 以上。且精确度高, 变异系数仅为 0.67%~1.00%^[13]。

4 气相色谱法

气相色谱也可以用于糖组分的分离与检测上, 因为糖是不挥发性物质, 因此必需制成相应的挥发性衍生物^[14]。用气相色谱来分析糖类时。用得最多的挥发性化合物是 TMS (三甲基硅烷基) 衍生物。Glaever 等用气相色谱对海藻糖进行了测定。测定条件及步骤如下: He 气为载气, 注射器和检测器温度分别为 250℃ 和 300℃, 柱温在 190℃ 保持 2 min, 紧接着以 30℃/min 的速率升至 250℃, 再在此温度下保持 10 min, 海藻糖样品 (先经过冷冻干燥) 溶解于 20 μL 的二甲基酰胺中, 然后再加 20 μL 的二 (三甲基硅烷基)-三氟乙酰胺 (含 1% 三甲基氯硅烷) 进行三甲基硅烷化。

与 HPLC 比较, 气相色谱操作烦琐, 干扰大, 准确度和重现性都不如 HPLC, 因此, 在海藻糖分析中并不常见。

5 蒽酮比色法

蒽酮比色法是目前常用的定糖方法, 其原理是糖类 (包括多糖) 在硫酸作用下, 脱水生成糠醛或羟甲基糠醛, 然后蒽酮与糠醛或羟甲基糠醛经脱水缩合, 产生蓝绿色糠醛衍生物, 颜色的深浅即可作为定量的依据。

但这种方法是非特异性的, 受到其它可与蒽酮试剂反应的物质的干扰。比如在酵母细胞中, 就有至少 3 种多糖如糖原、甘露聚糖和不溶性的葡聚糖会与蒽酮试剂发生反应。但根据纸色谱鉴定及离子交换色谱发现, 海藻糖是用冷三氯乙酸萃取的物质。因此选择合适的提取方法, 可以得到比较单一的含海藻糖的组分, 从而可以进一步用蒽酮比色。尽管蒽酮方法测得的值偏大, 但在常规筛选步骤中, 因为它很便宜, 所以常用于海藻糖的常规检测。

6 酶法分析

海藻糖的酶法测定是近年发展起来的一种测定方法^[15], 它的基本原理是通过海藻糖酶对海藻糖的特异性水解, 产生的葡萄糖再用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶系统进行检测。该方法特异性高。但分析成本也很高, 另外, 海藻糖酶制备方法不同, 所制备的海藻糖酶种类不同, 活力不同, 都可能会对结果产生一定影响。王 兰等^[16]人, 在此基础上, 开发出酶-DNS 比色法, 用 DNS 法对经海藻糖酶催化产生的葡萄糖进行检测。其结果相对于实际含量的误差为 -0.78%。且用 DNS 法测定葡萄糖含量时不受海藻糖及培养基成分的影响。

目前在所有分析方法中, HPLC 法是最理想的方法。它能快速、准确测定样品中的海藻糖。但是存在设备昂贵等缺点。相比之下纸层析和 TLC 法所需设备简单、操作易

行,已成为海藻糖定性分析的常规方法。因此在不具备 HPLC 设备的实验室,笔者建议使用上述两种方法。实践证明,如果严格按照实验步骤操作的话,完全可以达到分析目的。另外,纸层析由于其准确度和重现性都是很好,所以还可对海藻糖进行定量分析。气相色谱由于操作步骤烦琐,准确度和重现性较 HPLC 差,故很少应用。蒽酮比色法容易受杂质干扰,但它便宜。如果排除干扰使用这种方法也是不错的。酶法虽比蒽酮法精确,但由于在操作中使用酶类,所以成本较高,影响因素较多,不易控制。为解决该问题,可以对上述方法进行改进。例如,采用论文中介绍的酶-DNS 比色法。实际研究中最终选用那种方法,视具体情况而定。为了得到更准确的结论,一些研究者还采用几种方法联合使用的方式。例如,荣绍丰等^[7]在进行海藻糖生产菌株筛选过程中产物鉴定的研究中,先用 TLC 对照法对所试菌株胞内酶反应产物进行研究,排除未知糖分子链中存在 α -1, 4 键和 α -1, 6 键连接的可能,然后采用高效液相电喷雾质谱联用 (HPLC/ESI-MS) 对酶反应底物进行分析获得未知糖分子量,然后用核磁共振分析确证产物的连接键,从而完成产物的鉴定。当然这种方法需要昂贵的设备做保障。笔者认为如果只是以初筛为目的,那么采用纸层析或 TLC 法即可。

参考文献

- [1] Elbein A D, Pan Y T, Pastuszak I, *et al.* *Glycobiology*, 2003, **13** (4): 17~27.
- [2] 刘传斌, 云战友, 鲁齐鲁, 等. 食品与发酵工业, 1998, **24** (5): 40~42.
- [3] 王 兰, 肖冬光. 生物技术, 2002, **12** (3): 27~29.
- [4] 曾国驱, 黄晓兰, 蔡小伟, 等. 生物技术, 2002, **12** (3): 22~23.
- [5] 周 坚, 吴大鹏, 程 萍, 等. 微生物学学报, 1997, **24** (2): 125~127.
- [6] 毛忠贵, 朱利丹, 邓绍荣, 等. 无锡轻工大学学报, 1997, **36** (4): 42~44.
- [7] 荣绍丰, 张海平, 杨 静, 等. 微生物学报, 2003, **43** (1): 104~110.
- [8] Hansen S A. *Journal of Chromatography*, 1975, **107**: 224~227.
- [9] 王绍校, 吴 襟, 高春霄, 等. 微生物学通报, 2003, **30** (2): 36~40.
- [10] 赖承兴, 葛 宇, 袁勤生. 微生物药物与生化药物, 2003, **34** (9): 433~425.
- [11] 魏 决, 丁明玉. 分析实验室, 2001, **20** (1): 5~7.
- [12] 荣绍丰, 张海平, 段作营, 等. 色谱, 2002, **20** (3): 197~201.
- [13] 甘宾宾. 化工技术与开发, 2003, **32** (1): 22~23.
- [14] John E H, Naresh M. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62** (7): 2435~2437.
- [15] Julio C F, Vanis M F F, Anita D P, *et al.* *Food Chemistry*, 1997, **60** (2): 251~254.
- [16] 王 兰, 肖冬光, 张 正. 工业微生物, 2002, **23** (2): 18~21.