

用薄层层析法分析海藻糖

毛忠贵 朱利丹 邓绍荣

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 从制备薄层的各种硅胶、调浆剂着手制备硅胶薄板, 然后选择展开剂, 解决海藻糖不易与其他双糖分开的难题, 建立了一种理想的海藻糖薄层层析定性分析方法。用本方法可检出 $2\ \mu\text{g}$ 海藻糖, 简单, 快速, 灵敏。

关键词 海藻糖; 薄层层析; 展开剂

中图分类号 TS201.23

0 前言

海藻糖^[1]是自然界广泛分布的一种非还原性双糖。其分子结构独特, 化学性质稳定。研究表明: 某些物种对外界恶劣环境所表现出来的抗逆耐受能力与它们体内的海藻糖有直接关系; 外源性的海藻糖同样对生物大分子具有保护作用。海藻糖这些奇妙的生物学特性, 使其在医药、食品、化妆品、农业等方面具有广阔的应用前景。海藻糖的开发已成为国际范围的研究热点。目前海藻糖的定性定量分析, 主要借助于高效液相色谱(HPLC)。在国内 HPLC 仪还不普遍的情况下, 这一方法的应用往往受到实验室条件的限制, 并且对于菌种筛选、培养及提取过程中大量的海藻糖快速定性定量测定工作, 完全依赖于 HPLC 并不是一个高效经济的方法, 而用薄层层析法则十分便利的。然而, 海藻糖和蔗糖、麦芽糖等双糖结构相似, 某些性质接近, 是薄层层析法分析中的一个难题, 文献中也很少报道。作者就薄层的制备、展开剂的选择等方面进行了广泛的研究, 确立了一种较理想的分离海藻糖、麦芽糖、蔗糖、葡萄糖的薄层层析方法。

1 材料和方法

1.1 材料

标准海藻糖为 SIGMA 级; 标准麦芽糖、蔗糖、葡萄糖均为 AR 级。硅胶分别为: 浙江产硅胶 H; 青岛产硅胶 G; 上海产硅胶 H。

1.2 方法

1.2.1 硅胶板的制备 采用湿法制板。调浆剂和硅胶(硅胶和调浆剂)在研钵中混合研磨后, 均匀涂布于干净的玻璃板(10 cm × 20 cm)上, 自然晾干, 使用前105℃活化30 min。

1.2.2 点样 将各标准糖配成1%的溶液, 点样量 $2\ \mu\text{l}$, 点样点距离板底1.5 cm, 点样斑点

直径控制在3~5 mm, 样品间距1.5 cm.

1.2.3 展开 于各种展开体系中, 室温展开. 待展开剂前沿走至距板顶2 cm 时, 取出, 自然晾干.

1.2.4 显色 用喉头喷雾器将20% 的硫酸-甲醇溶液均匀喷至板上, 置于105 烤箱内加热10 min, 使显色.

2 结果与讨论

2.1 不同硅胶薄板的分离效果

2.1.1 实验 实验中采用浙江产硅胶 H, 青岛产硅胶 G, 上海产硅胶 H. 用同一种调浆剂(0.05%的羧甲基纤维素钠 CMC-Na 溶液)调浆制板, 于同一展开体系中展开, 海藻糖和麦芽糖的 R_f 值见表1.

表1 硅胶对展开时间和糖分离效果的影响

硅胶种类	R_f		展开时间 /h
	海藻糖	麦芽糖	
浙江产硅胶 H	0.275	0.343	2
青岛产硅胶 G	0.224	0.310	3
上海产硅胶 H	0.272	0.328	2

注: 展开剂为 正丁醇-异丙醇-乙酸-水(3:20:3:2)

由表1可以看出, 青岛产硅胶 G 对海藻糖麦芽糖的分离效果最佳. 故以后实验均选用青岛产硅胶 G 作为吸附剂, 简称硅胶 G.

2.1.2 湿法制板调浆剂的选择 盐溶液代替水制备薄层, 能增加糖在固定相中的溶解度, 提高薄层的负荷量, 且能使糖的斑点集中, 改善分离效果. 表2为用不同盐溶液作调浆剂制成的薄板在同一展开体系中对糖分离效果的影响.

表2 调浆剂对糖分离效果的影响

薄层种类	展开时间 /h	R_f			
		海藻糖	麦芽糖	蔗糖	葡萄糖
硅胶 G+ 0.02 mol/L 乙酸钠	2	0.336	0.328	0.353	0.414
硅胶 G+ 0.07 mol/L 硼酸	2	0.536	0.564	0.618	0.645
硅胶 G+ 0.1 mol/L 磷酸二氢钠	2	0.196	0.256	0.343	0.480
硅胶 G+ 0.05%CMC-Na+ 0.02 mol/L 乙酸钠	3	0.200	0.224	0.224	0.320
硅胶 G+ 0.05%CMC-Na+ 0.07 mol/L 硼酸	3	0.237	0.271	0.322	0.441
硅胶 G+ 0.05%CMC-Na+ 0.1 mol/L 磷酸二氢钠	3	0.150	0.150	0.208	0.208

注: 展开剂为 正丁醇-异丙醇-乙酸-水(3:20:3:2)

由表3可看出, 制板时不加粘合剂 CMC-Na, 用0.1 mol/L 的磷酸二氢钠调浆制板, 对4种糖的分离效果最好.

2.2 不同展开体系对糖的分离效果的影响

选择展开剂是薄层色谱分离成败的关键. 对于海藻糖、麦芽糖、蔗糖、葡萄糖等难于分离的物质, 我们选用多元展开剂. 根据展开剂的选择原则^[2], 选择了10种展开体系, 各糖的 R_f 值见表3.

表3 展开体系对糖分离效果的影响

展开体系	R_f				展开体系	R_f			
	葡萄糖	海藻糖	蔗糖	麦芽糖		葡萄糖	海藻糖	蔗糖	麦芽糖
1	0	0	0	0	6	0	0	0	0
2	0.552	0.336	0.416	0.368	7	0.409	0.218	0.364	0.309
3	0.217	0.150	0.208	0.150	8	0.476	0.252	0.467	0.473
4	0.167	0.139	0.167	0.139	9	0.498	0.108	0.486	0.433
5	0.274	0.164	0.222	0.119	10	0.571	0.240	0.463	0.456

- 展开体系1: 二甲苯-乙酸乙酯-乙醇-水(10·3·3·2)
 展开体系2: 正丁醇-乙酸乙酯-异丙醇-乙酸-水(7·20·12·7·6)
 展开体系3: 正丁醇-乙酸乙酯-异丙醇-乙酸-水(5·20·20·5·5)
 展开体系4: 正丁醇-乙酸乙酯-异丙醇-乙酸-水(15·5·5·3·3)
 展开体系5: 正丁醇-乙酸乙酯-异丙醇-乙酸-水(5·10·20·3·3)
 展开体系6: 正丁醇-异丙醇-乙酸-水(3·20·3·2)
 展开体系7: 正丁醇-吡叮-水(15·5·2)
 展开体系8: 正丁醇-吡叮-水(6·4·1)
 展开体系9: 正丁醇-吡叮-三乙醇胺-水(6·4·5·1)
 展开体系10: 正丁醇-吡叮-2%的脲水溶液(6·4·2)

由表3可看出, 展开体系8, 9, 10能够十分清晰地将海藻糖与其他几种糖分开。尽管葡萄糖、蔗糖、麦芽糖之间的分离效果不佳, 但并不影响对海藻糖的分析。

2.3 对海藻糖测定的灵敏度

在以硅 G-磷酸二氢钠(0.1 mol/L) 制备的薄板上点样。海藻糖的点样量从0.6~30 μg , 共10个不同的点样量处理, 于正丁醇·吡叮·水(6·4·1) 中展开, 显色后其糖的斑点清晰度见表4。

表4 本文薄层层析条件下对海藻糖测定的灵敏度

点样量/ μg	0.6	0.8	1	2	4	8	10	15	20	30
斑点颜色	—	—	—	+	+	++	++	+++	+++	+++

注: - 无斑点; + 斑点色浅, 但能检出; ++ 斑点色较深; +++ 斑点色深

3 结 论

根据以上实验结果, 建立了一种定性分析海藻糖的薄层层析方法——薄层: 青岛产硅胶 G-磷酸二氢钠; 展开体系: 正丁醇-吡叮-水(6·4·1); 显色剂: 20%的硫酸-甲醇溶液。用本方法能够灵敏地检测出上述几种混合糖溶液中含2 μg 以上(包括2 μg) 的海藻糖。

参 考 资 料

- 1 Elbein A D, Adv., Carbohydr. Chem. Biochem., 1974, 30
- 2 周同惠等. 纸色谱和薄层色谱. 北京: 科学出版社, 1989. 163~167

On Assayed Trehalose by TLC

Mao Zhonggui Zhu Lidan Deng Shaorong

(School of Biotechnology, Wu Xi University Of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract To resolve the defficulty of isolation trehalose from other disaccharides, an TLC (thin-layer chromatography) assay method of trehalose was established during the study of the thin-layer and solvent system. The minimal amount of trehalose which could be assayed by this method was 2 μg , and it was fast, simple and sensitive.

Key-words trehalose; thin-layer; solvent system