

参 考 文 献

- [1] Meselson, M. et al.: *Nature*, 217, 1110, 1968.
[2] Danna, K. et al.: *J. Mol. Biol.*, 78, 363, 1973.
[3] 余曙华等: «生物化学与生物物理学报», 4, 546, 1984.
[4] Koike, K. et al.: *Gene*, 2, 299, 1977.
[5] Rosenvold, E. C. et al.: *Gene*, 2, 273, 1977.
[6] Moore, S. K. et al.: *Gene*, 5, 159, 1979.
[7] 吴详甫等: «遗传学报», 5, 329, 1983.
[8] Prakash, R. K. et al.: *Plasmid*, 7, 271, 1982.
[9] Ojala, D. et al.: *Plasmid*, 1, 78, 1977.
[10] Conrad, B. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 10, 31, 1982.

[本文于 1984 年 7 月 20 日收到]

用日立 835-50 型氨基酸分析仪分析还原糖

鄢家林 林进龙

(四川抗菌素工业研究所,成都)

氨基酸分析仪在结构上与糖分析仪相似,本文仅讨论利用日立 835-50 型氨基酸分析仪分析还原糖。

一、原 理

在硼酸缓冲液洗脱条件下,糖的混合物能够在强碱性阴离子交换树脂柱上得到分离。经分离的单一糖组分在 98℃ 温度下,与 2,2'-双金鸡纳酸盐试剂作用,生成蓝紫色的络合物^[1,2]。该络合物在波长 562nm 处有最大吸收,因此可用氨基酸分析仪检测器的 570nm 通道进行检测。检出信号经数据处理机处理,电传打字机打印出色谱图和分析实验报告。

二、材料与试剂

阴离子交换树脂 Aminex A-28 (美国 Bio-RAD 实验室); 2,2'-双金鸡纳酸钠 (美国 Sigma 公司); 聚四氟乙烯塑料管, 内径 0.3mm, 长 50m (四川富顺晨光化工研究院); 糖标样为国产或进口试剂, 纯度在分析纯以上; 其它均为国产分析纯试剂。

1. 显色剂的配制:

溶液 A 1.3 克 2,2'-双金鸡纳酸钠, 62.3 克无水碳酸钠, 加 300 毫升无离子水溶解, 最后稀释至一升, 备用。

溶液 B 3.7 克天门冬氨酸, 5.0 克无水碳酸钠, 加 100 毫升水溶解; 另外, 1.0 克硫酸铜溶

于 50 毫升无离子水中。以上两种溶液混合, 备用。

将 23 份溶液 A 和 1 份溶液 B 混合, 即得显色剂。显色剂及溶液 A、B 均放冰箱保存。

2. 硼酸缓冲液的配制:

缓冲液 No. 1: 0.35 M H_3BO_3 溶液, 用 NaOH 调 pH 至 8.2。

缓冲液 No. 2: 0.5 M H_3BO_3 溶液, 用 NaOH 调 pH 至 8.6。

三、定性定量分析

实验采用非腐蚀性显色剂^[2], 该试剂能与 50 多种还原糖及其类似物作用产生蓝紫色。例如普通的己糖, 戊糖, 氨基糖及部分低聚糖等。至于非还原糖如蔗糖、棉子糖等则不显色, 故不能用本法检出。

硼酸络合物阴离子交换色谱法是一个比较成熟的分离糖的方法; 只要选择适当的树脂、柱温、硼酸浓度及 pH 值等, 总能找到一个分离糖混合物的最适条件^[3,4]。

表 1、表 2 分别为九种糖组分的色谱分离条件和分析程序。图 1 为色谱图。

由于分析报告不能打印出糖组分名称, 我们指令数据处理机打印出保留时间和相对保留时间作定性的依据。定量方法与氨基酸分析相同, 输入糖标样的毫微克分子浓度参数后, 数据处理机自动打印出检品的毫微克分子浓度。数

表 1 九种糖组分的色谱分离条件

色谱柱	Aminex A-28 阴离子交换树脂内径 2.6mm, 长 250mm
洗脱方式	分段梯度洗脱(见表 2, 分析程序)
洗脱液流速	0.275ml/min
洗脱液泵压	40-50kg/cm ²
显色剂溶液流速	0.3ml/min
显色剂溶液泵压	5-10kg/cm ²
检测器	570nm 波长检出
色谱柱温度	50℃
反应浴温度	98℃
反应圈	内径 0.3mm, 长 50m
样品分析周期	100min
进样体积	50μl

表 2 分析程序

步骤	存储数码	工作数码	时间数码
1	1	1	0
2	2	11	0
3	3	50	0
4	4	1	1
5	1	2	32
6	1	1	65
7	4	2	85
8	6	1	100

据处理机衰减参数设定为 6, 纸速参数为 6, 分析时间参数为 7500。

四、灵敏度、重现性及线性

分析灵敏度与显色反应时间成正比。本实验以 50 米长的反应圈更换原仪器 20 米长的反应圈, 提高了灵敏度。测定各糖组分标准浓度范围为 2—40nmole/50μl, 最小检出量为 10⁻¹⁰ 克分子。

用九种糖混合标样连续测定 10 次, 各组分峰面积, 保留时间重现性见表 3。

表 3 九种糖混合标样峰面积及保留时间的重现性

糖组分	纤维二糖	乳糖	鼠李糖	核糖	甘露糖	果糖	半乳糖	木糖	葡萄糖
CV%	S	3.0	1.0	2.4	2.6	2.2	2.2	3.5	3.1
n = 10	t _R	1.1	1.0	0.9	0.9	0.9	0.4	0.5	0.5

注: (1) S 为峰面积; t_R 为保留时间

$$(2) \quad CV\% = \sqrt{\frac{\sum(X_n - \bar{X})^2}{n-1}} \times 100\%$$

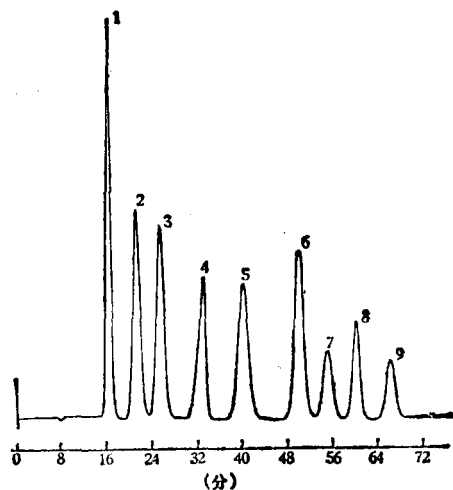


图 1 九种糖组分的色谱分析图

1. 纤维二糖; 2. 乳糖; 3. 鼠李糖; 4. 核糖; 5. 甘露糖; 6. 果糖; 7. 半乳糖; 8. 木糖; 9. 葡萄糖 (每种糖组分 1.6μg)。

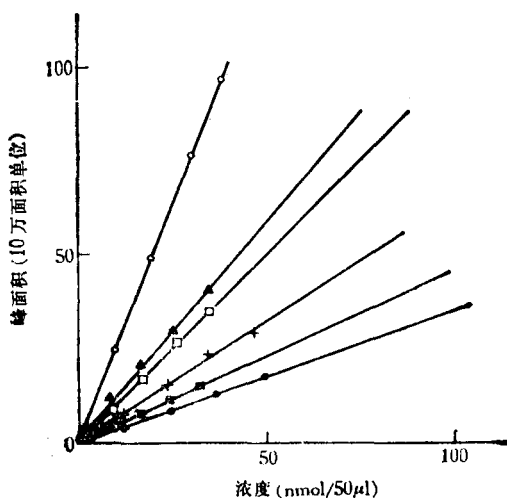


图 2 糖组分标准曲线

鼠李糖(○), 果糖(▲), 甘露糖(□), 核糖(×), 半乳糖(■), 葡萄糖(●)

配制不同浓度的混合标样,测定峰面积,以峰面积对浓度作各糖组分的标准曲线(图2)。由图可知,各标准准曲线均过原点,线性良好。

五、应 用

糖的测定在各领域有广泛的用途。图3、4、5均为实用例子。

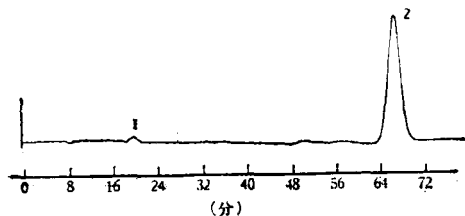


图3 淀粉酸水解产物中的糖组分分析
1. 麦芽糖; 2. 葡萄糖

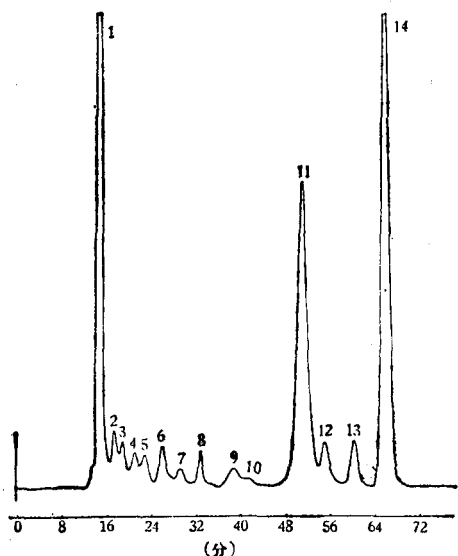


图4 糖尿病人尿中的糖组分分析
1、3、7、10. 未知组分; 2. 纤维二糖; 4. 麦芽糖; 5. 乳糖; 6. 鼠李糖; 8. 核糖; 9. 甘露糖; 11. 阿拉伯糖; 12. 半乳糖; 13. 木糖; 14. 葡萄糖

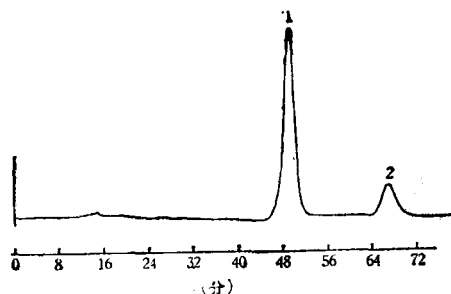


图5 广柑汁中糖组分分析
1. 果糖; 2. 葡萄糖

六、结 语

1. 本法灵敏度高,最小检出量达 10^{-10} 克分子/ $50\mu\text{l}$ 。定量测定峰面积重现性 $CV\%$ 值不大于 3.5%,保留时间重现性不大于 1.1%。在测定浓度范围内线性良好。

2. 用日立 835-50 型氨基酸分析仪分析还原糖,是“一机多用”的初步尝试;既可提高大型仪器使用率,又可提供一种新的高灵敏度分析糖的手段,是有意义的。

参 考 文 献

- [1] Mopper, K. et al.: *Anal. Biochem.*, 56, 440, 1973.
- [2] Sinner, M. et al.: *J. Chromatogr.*, 156, 197, 1978.
- [3] Jandera, P. et al.: *J. Chromatogr.*, 98, 55, 1974.
- [4] Mopper, K. et al.: *Anal. Chem.*, 52, 2018, 1980.

[本文于 1984 年 9 月 18 日收到]