

研究工作

硫酸软骨素 A 与 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 的结合度的测定

邵子厚

(南京大学化学系)

吴铁军

(南京大学生物系)

袁玉荪

(南京生化制药研究所)*

硫酸软骨素 (Chondroitin Sulfate ChS) 是一种酸性粘多糖, 广泛存在于哺乳动物和人体的结缔组织、软骨组织和皮肤之中, 它参与细胞中离子和水分的调节作用以及软骨的钙化, 它们在体内的含量随年龄而变化, 故与衰老现象密切相关^[1]。

硫酸软骨素是没有支链的线状阴离子多聚电解质, 在非常低的离子强度下, 由于分子内静电排斥作用而使分子富于弹性; 随着离子强度的增大, 由于离子对的形成可使分子成为螺旋状或无规线团^[2]。硫酸软骨素的基本结构单位为葡糖醛酸与半乳糖胺通过 β -1, 3 糖苷链连接而成的二糖单位。因分子中硫酸根的位置不同, 它有二种异构体 ChSA 和 ChSC。

目前, 世界各国已普遍应用硫酸软骨素 A 防治冠心病^[3]。此外, 硫酸软骨素 A 与 Cu^{2+} 所形成的化合物还具有治疗皮肤病的功能^[4]。因而, 研究硫酸软骨素 A 与不同金属离子的结合能力的大小, 对于阐明它的不同的生理功用是颇有意义的。我们用 pH 滴定法^[5]和离子选择电极法^[6]测定并比较了 ChS- H_2 与 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 离子的结合度。

结果和讨论

一、ChSA 的提纯和鉴定

以镇江生化制药厂生产的硫酸软骨素粗品 (ChSA 和 ChSC 的混合物, 蛋白质含量约 4.6%) 为原料, 参照王世中等所报道的方法^[7]进行纯

化。但考虑到在处理过程中, 一些较剧烈的条件可能会引起硫酸软骨素的部分降解, 为除去因此而产生的小分子量的降解产物及盐类, 进一步采用透析的方法以得到纯净的硫酸软骨素 A 的钠盐 (ChSA- Na_2)。

将所得 ChSA- Na_2 制品进行氨基己糖的滤纸电泳^[8], 证明其中不含其它酸性粘多糖。醋酸纤维薄膜电泳^[9]的结果亦表明 ChSA- Na_2 为单纯物质。并用微量克氏定氮法测定总氮^[10], 用改进的卞巴唑反应测定醛酸^[11], 用改进的方法测定氨基己糖^[12]和硫酸^[13]。现将所得结果汇于表 1。

表 1 硫酸软骨素 A 钠盐 ($\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_{14}\text{NSNa}_2$) 的化学分析

ChSA- Na_2	总 氮	醛 酸	氨基己糖	硫 酸
实验值%	2.74	38.10	34.99	18.74
理论值%	2.78	38.56	35.58	19.08

从表中数据可见, 若以理论值为准, ChSA- Na_2 的纯度为 98.5%。

同时还测定了 ChSA- Na_2 制品的红外光谱和 ^{13}C -核磁共振谱。从所测得的谱图可见, 它在 928, 852 和 725 cm^{-1} 处具有特异吸收峰^[14], 它的 ^{13}C -核磁共振谱亦与文献报道的一致^[15]。

此外, 还用乌氏粘度计测定了 ChSA- Na_2 的

* 参加实验工作的有沈毅、沈勤、华建民、李燕敏。

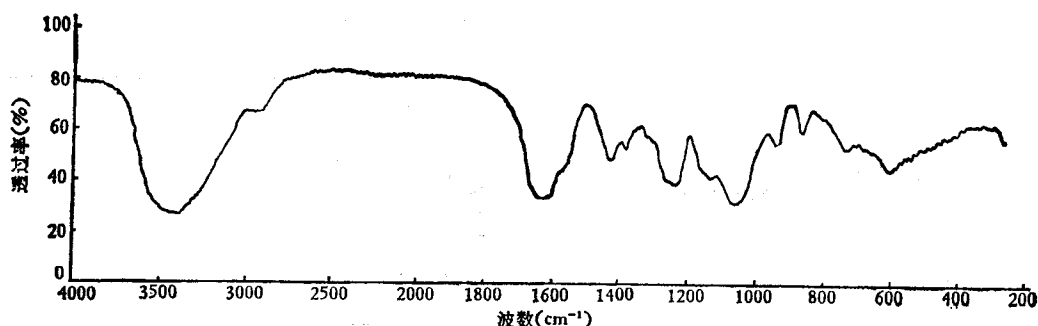


图1 在 Perkin-Elmer 577 型光栅型红外光谱仪上测得的 ChSA-Na₂ 谱图

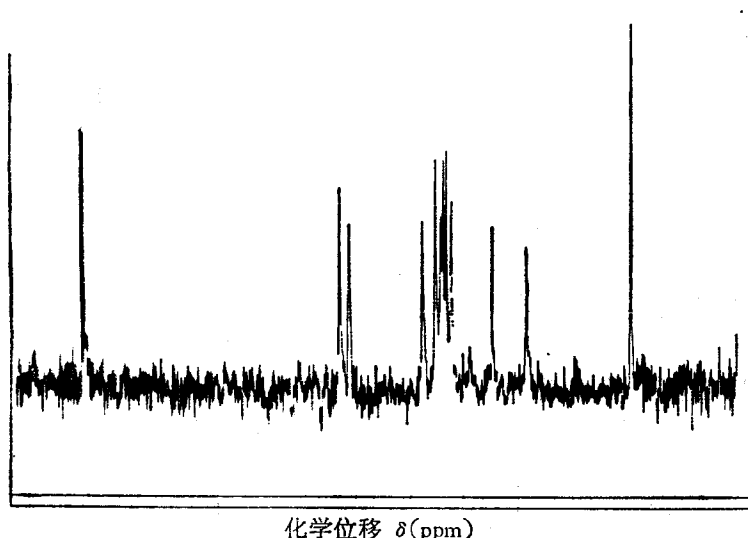


图2 FT-80A 核磁共振仪测得的 ChSA-Na₂ ¹³C-NMR 谱(D₂O中, 80°C)

粘均分子量^[16], 以粘度方程 $[\eta] = 3.1 \times 10^{-4} \bar{M}_{\text{粘}}^{0.74}$ 所计算得到的 $\bar{M}_{\text{粘}} \approx 75,000$ 。

二、ChSA-H₂ 的制备和 pH 滴定

将 732 型阳离子交换树脂, 放入 6N 盐酸中搅拌处理二小时, 再用蒸馏水洗至中性, 使其转为氢型。

称取 ChS-Na₂ 1.0 克, 溶于 150 毫升去离子水中, 通过 732 型氢型交换树脂(柱床 4×60 厘米, 流速 1 毫升/分)流出液即为氢型 ChSA (ChSA-H₂)。

吸取 20 毫升 ChSA-H₂ 置于带有恒温夹套的烧杯中, 边搅拌边用标准 NaOH 溶液 ($C_{\text{NaOH}} = 0.1227N$) 滴定。以 231 型玻璃电极为指示电极, 802 型甘汞电极为参比电极, 在 37°C 下, 测定 pH 的变化, 可得一类似于强碱滴定弱酸的 pH 滴定曲线, 呈 S 形。在等当点处 NaOH

的用量为 3.95 毫升, 计算得 ChSA-H₂ 的浓度 $C_{\text{ChSAH}_2} = 0.0121M$ 。

三、ChSA-H₂ 与 Ca²⁺、Cu²⁺ 离子结合过程中的 pH 变化

硫酸软骨素 A 作为一种酸性粘多糖, 可解离的硫酸根和羧基受到所选择的相反离子成键的影响, 当电解质加入 ChSA-H₂ 时, 它与金属离子的结合过程即是金属离子与 ChSA-H₂ 的质子交换的过程, $M^{2+} + \text{ChSA-H}_2 \rightleftharpoons \text{ChS-M} + 2\text{H}^+$ 。因而, 随着反应的进行, 释放出来的质子使溶液 pH 值下降。

用 231 型玻璃电极为指示电极, 801 型双液接甘汞电极为参比电极(外盐桥为 0.1M LiAc 溶液), 在 37°C 下, 于恒温夹套烧杯中分别放入 20 毫升 $10^{-2}M$ 的 Ca²⁺, Cu²⁺ 溶液, 将 ChSA-H₂ 溶液滴入其中, 在搅拌下测定反应过程的溶

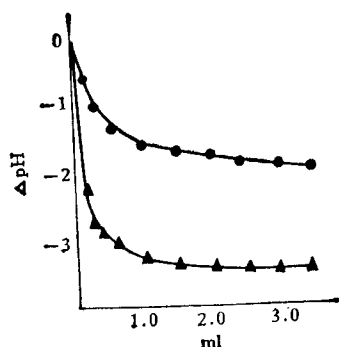


图3 ChSA-H₂ 与 Ca²⁺(●) Cu²⁺(▲)
离子结合过程中 ΔpH-V 曲线

液 pH 变化,结果如图 3 所示。

四、离子选择电极法测定 ChSA-H₂ 与 Ca²⁺、Cu²⁺ 离子的结合度

中垣正幸^[5]等用膜平衡法, 柘植英哉^[7]和米势政胜^[1]等用测定偏克分子体积和渗透压系数的方法研究了硫酸软骨素与金属离子的结合能力的大小。

我们参照中垣正幸等所提出的结合度的概念来加以衡量。在本实验的条件下, 结合度的意义是在溶液电位值平衡时, 每摩尔硫酸软骨素 A 的结合的金属离子的摩尔数。由于加入的是 ChSA-H₂ 溶液, 必须考虑稀释效应, 则结合度 X 表示为:

$$X = \frac{C_0 V_0 - C'(V_0 + V)}{CV}$$

C₀——金属离子 M²⁺ 溶液的初始浓度

V₀——金属离子 M²⁺ 溶液的初始体积

C'——电位平衡时, 溶液中游离的金属离子的浓度

C——所加入的 ChSA-H₂ 溶液的浓度

V——所加入的 ChSA-H₂ 溶液的体积

1. ChSA-H₂ 与 Ca²⁺ 的结合 以 402 型钙离子选择电极为指示电极, 801 型双液接甘汞电极为参比电极 (0.1M LiAc 为外盐桥), 电位测定用 PXD-12 型数字式离子计、钙电极经活化后, 用去离子水洗至空白电位后, 由稀至浓测定标准溶液电位值, 绘制标准曲线。

取 10⁻³M CaCl₂ 溶液 20 毫升, 用 0.0121M ChSA-H₂ 滴定, 测量滴定过程中电位的变化, 结

果如图 4 所示。

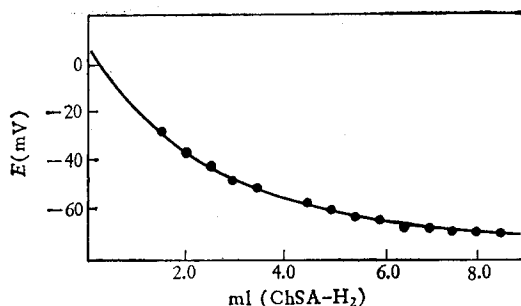


图4 ChSA-H₂ 与 Ca²⁺ 结合过程中的电位改变
(t = 37°C)

2. ChSA-H₂ 与 Cu²⁺ 的结合 以 306 型铜离子选择电极为指示电极, 801 型双液接甘汞电极为参比电极 (0.1M KNO₃ 为外盐桥), 电位测定用 PXD-12 型数字式离子计。铜电极经活化后, 用去离子水洗至空白电位后, 由稀至浓测定标准溶液电位值, 绘制标准曲线。

取 10⁻³M CuSO₄ 溶液 20 毫升, 用 0.0121M ChSA-H₂ 滴定, 测量滴定过程中电位的变化, 结果如图 5 所示。

从图 4 的结果通过标准曲线可求得溶液中游离的 Ca²⁺ 离子浓度, 从图 5 的结果通过标准曲线可求得溶液中游离的 Cu²⁺ 离子浓度。根据结合度公式计算可得: $X_{\text{ChSA}-\text{Ca}} = 0.207$, $X_{\text{ChSA}-\text{Cu}} = 0.488$, 故 $X_{\text{ChSA}-\text{Cu}} > X_{\text{ChSA}-\text{Ca}}$ 。

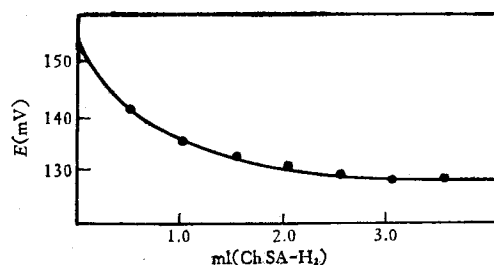


图5 ChSA-H₂ 与 Cu²⁺ 结合过程中的电位改变
(t = 37°C)

将图 4 和图 5 进行比较时, 对于同样量的 Ca²⁺ 和 Cu²⁺, 当电位值达到平衡时, 滴定前者所用去的 ChSA-H₂ 的量要比后者多, 而溶液中游离离子的浓度则是前者比后者低。从表面上看, 似乎是 Ca²⁺ 被 ChSA 结合得多。然而, 本文所指的金属离子的结合度是对溶液中每摩

尔硫酸软骨素A所结合的金属离子的摩尔数而言的,滴定 Cu^{2+} 离子所用的 ChSA-H_2 的量少,可能是因为 Cu^{2+} 与 ChSA-H_2 结合的动力学过程快,易于达到平衡;而 Ca^{2+} 则相反,它达到平衡较慢,故需较多量的 ChSA-H_2 。同样,在用 pH 法测定 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 与 ChSA-H_2 的结合时,亦有类似的情况。如图 3 所示,由于 CaCl_2 溶液的初始 pH 值大于 CuSO_4 溶液的初始 pH 值,在 $\Delta\text{pH-V}_{\text{ChSA-H}_2}$ 的曲线中是前者低于后者。但在加入 0.5 毫升 ChSA-H_2 后, Ca^{2+} 的滴定曲线较平坦而 Cu^{2+} 的滴定曲线较陡直。

玉木国夫等^[18]曾研究过高分子多聚电解质与相反离子的互相作用,认为在分子多聚电解质中存在的羧基和硫酸根对于碱金属阳离子的结合能力差异颇大。硫酸软骨素A中所含有的羧基和硫酸根,在本实验条件下,究竟是如何与 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 离子成键的? 这仍是一个尚待研究的课题。

参 考 文 献

[1] 米勢政勝等: 日化, 1, 108, 1978。

- [2] M. Nakagake et al.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **41**, 555, 1968.
 [3] 成都制药三厂: 《新医学通讯》, **5**, 53, 1977。
 [4] 南京生化制药研究所, 内部资料。
 [5] 中垣正幸等: 《藥学雜誌》, **99**, 618, 1979。
 [6] D. R. Williams Ed.: *An Introduction to Bioinorganic Chemistry*, Charles C Thomas, U. S. A. (1976) Chap 12.
 [7] 王世中等: 《药学报》, **15**, 163, 1980。
 [8] T. S. Foster et al.: *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **39**, 1771, 1961.
 [9] D. Freifelder: *Physical Biochemistry*, W. H. Freeman & Company, p. 211, 1976.
 [10] 南京大学生化教研室: 《生物化学实验》, 人民教育出版社, P. 39, 1979。
 [11] T. Bitter et al.: *Anal. Biochem.*, **4**, 330, 1962.
 [12] F. A. Balazs et al.: *Anal. Biochem.*, **12**, 559, 1965.
 [13] K. S. Dodgson: *Biochem.*, **J.** **78**, 312, 1961.
 [14] M. B. Mathews et al.: *Nature*, **181**, 421, 1958.
 [15] S. Honda et al.: *J. Biochem.*, **76**, 209, 1974.
 [16] M. B. Mathews: *Arch. Biochem. Biophys.*, **61**, 367, 1956.
 [17] 拓植英哉等: 日化, **4**, 609, 1978。
 [18] 玉木國夫等: 日化, **7**, 711, 1971。

[本文于 1982 年 12 月 1 日收到]

“嘌呤霉素反应”在研究蛋白质合成抑制剂作用机制中的应用

方福德 吴冠芸 左瑾

(中国医学科学院基础医学研究所)

蛋白质合成抑制剂在生化研究及医学应用中具有重要的作用。原核细胞和真核细胞中蛋白质合成是一个复杂的过程, 对于一个蛋白质合成抑制剂, 只有搞清其作用机制, 才能有目的地加以利用或改造。为了阐明一个蛋白质合成抑制剂的作用机制, 应从不同的角度设计实验方案, 以期彼此印证。在这些实验方案中, “嘌呤霉素反应”对于确定转肽作用抑制剂是一个简便而可靠的方法。

嘌呤霉素是氨酰 tRNA 的 3' 末端 AMP 残基的类似物:

