

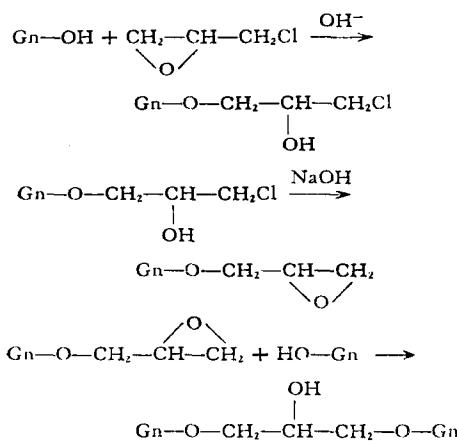


珠状交联葡聚糖凝胶 G-10 的制备

中国科学院上海生物化学研究所东风生物化学试剂厂 G-10 生产小组

一、引言

交联葡聚糖凝胶是一种人工合成的高分子化合物，由葡聚糖（以下简称 Gn）和含双功能基团的交联剂环氧氯丙烷（以下简称 ECH）交联聚合而成^[1]。其反应式如下：



在交联葡聚糖凝胶中，整个分子由稳定的

醚桥键形成三度空间的网状结构，使它具有分子筛的作用。早期的商品凝胶颗粒是无定形的，装柱后流速甚慢，后来试制成功了珠状凝胶^[2]，用它来装柱，大大加快了流速，提高了分离提纯的能力。珠状凝胶的制备采用二相悬浮反应的原理，先把葡聚糖均匀分散在第一相碱溶液里，然后在快速搅拌下，使葡聚糖碱相呈小珠状态悬浮在第二相透平油中，最后和 ECH 起交联反应得到珠状交联葡聚糖凝胶。

交联葡聚糖凝胶，国外商品名为 Sephadex，从 G-10 到 G-200 共有八种型号^[3]，型号数目表示凝胶分子中 Gn 和 ECH 的交联程度，也就是分子中网络空隙的大小，一般用床体积（1 克干胶吸水溶胀后的最大体积）和吸水量（1 克干胶能吸收水的最大重量）来表示。从表 1^[4] 可见 G-10 分子中网络空隙最小，G-200 分子中网络空隙最大。因此，只要按照分离对象分子量的大小，选择适当型号的凝胶，就可达到分离的要求。

表

1

交联葡聚糖凝胶型号	颗粒大小(目)	床体积(毫升/每克干胶)	吸水量(克/每克干胶)
G-10	100—275	2—3	1.0±0.1
G-15	"	2.5—3.5	1.5±0.2
G-25	"	5	2.5±0.2
G-50	"	10	5.0±0.3
G-75	"	12—15	7.5±0.5
G-100	"	15—20	10.0±1.0
G-150	"	20—30	15.0±1.5
G-200	"	30—40	20.0±2.0

目前，交联葡聚糖凝胶已被广泛应用在科学的研究和生产上，特别是珠状凝胶，由于具有洗脱流速快，分离提纯效果好，时间省和回收方便等特点，已取代了无定形凝胶。各种型号的生产中，G-10、G-15 的生产至今未见有详细的报

道，而分子量在 700 以下的化合物的分离，如一些小肽，寡核苷酸等的分离、提纯、脱盐和一些顺、反式异构体的拆分，往往需要用 G-10 来进行。

遵照伟大领袖毛主席自力更生，奋发图强

的教导，为了满足科研上和生产上的需要，发展我国自己的生化试剂，我们进行了 G-10 的试制工作。

从 G-10 分子的结构来看，它的交联结构最为紧密，其基团的空间障碍和基团的斥力就比其他型号大得多，尤其是在珠状凝胶的制备中，采用二相悬浮聚合反应，Gn 的碱相成珠粒分散在油相中，当加入交联剂 ECH 后，很快就发生交联反应，首先在珠粒表层形成一个网络屏障，阻碍了 ECH 分子进一步钻入珠粒内部，和里面的 Gn 分子交联，结果往往导致交联度达不到 G-10 标准和所获得的凝胶交联度不均一。因此，只有掌握好 ECH 的用量、碱相中 Gn 的浓度、反应温度和搅拌速度等，求出其最适反应条件，才能成功地制得合格的 G-10 产品。

二、实 验

葡聚糖，平均分子量 4×10^4 ，上海长征制药厂出品。

环氧氯丙烷，分析纯，上海试剂总厂出品。

46 号透平油，上海炼油厂出品。

ECH 用量和凝胶吸水量的关系

30 克 Gn 和含 0.5 克硼氢化钾的 30 毫升 6N 氢氧化钠溶液混和，搅拌成均匀的糊状物，加入 500 毫升透平油，继续搅拌使葡聚糖碱相均匀分散在油相中，搅拌速度视所需珠粒大小而定。在 40℃ 时加入不同量的 ECH（从 11 毫升到 17 毫升），半小时后升温到 70℃，继续保温 5 小时。停止搅拌，将反应物过滤，尽量将油抽干，70℃ 干燥一天。取出，用 120 号汽油洗涤三次，无水乙醇洗二次，干燥后，用无离子水洗至中性，无水乙醇脱水，80℃ 干燥，过筛，即得白色珠状交联葡聚糖凝胶，它们的吸水量测定结果如图 1 所示。从图 1 可知随着 ECH 用量的增加，所得凝胶的交联度也增加，但当 ECH 用量超过一定量时，交联度反而下降，即存在一个最适 ECH 用量，本系统中最适用量为 12 毫升，此时所得凝胶吸水量为 1.4 克/每克干胶。

碱相中 Gn 的浓度和吸水量的关系

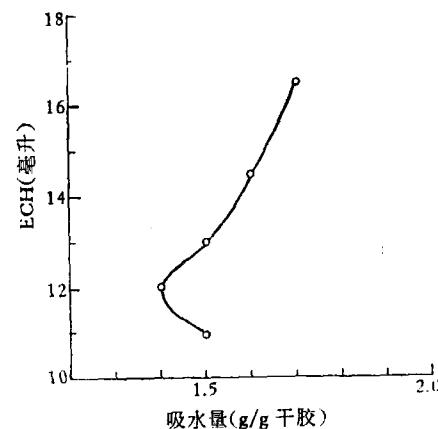


图 1 ECH 用量与吸水量的关系

30 克 Gn 与含 0.5 克硼氢化钾和 8 克氢氧化钠的不同量的水混合（从 25 毫升到 35 毫升），充分搅拌均匀，成不同浓度的 Gn 碱相，然后分别均匀分散在 500 毫升透平油中，在 40℃ 时加入 12 毫升 ECH，进行反应，以下步骤同上。得到结果如图 2 所示。可知，Gn 浓度的增加有利于交联度的提高，当 Gn 在碱相中的浓度为 55% (w/w) 时，得到凝胶吸水量为 1.3 克/每克干胶。但是这时碱相已非常粘稠，搅拌费力，要从继续提高碱相中 Gn 的浓度来达到 G-10 标准是困难的。

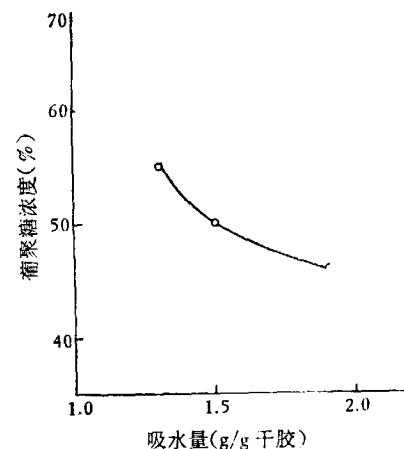


图 2 Gn 浓度与吸水量的关系

温度和吸水量的关系

30 克 Gn 与含 0.5 克硼氢化钾的 30 毫升 6N 氢氧化钠搅拌均匀，然后均匀分散在 500 毫升透平油中，分别在不同温度时（从 30℃ 到 57℃）

加入 12 毫升 ECH，进行反应，以下步骤同上。结果如图 3 所示。显然温度是一个重要因素，由于适当提高了反应温度，使交联剂 ECH 分子有比较大的能量穿过珠粒外层骨架屏障，进入内部反应，从而提高了交联度与均一性。实验表明，在 50℃ 时反应，生成凝胶的吸水量显著下降，为 1.1 克/每克干胶，符合 G-10 的标准。

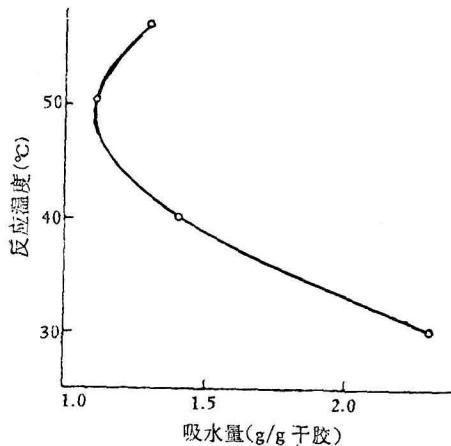


图 3 反应温度与吸水量的关系

综合上面几个方面实验条件，我们优选了下面条件，再求最适 ECH 用量。

30 克 Gn 与 25 毫升含 0.5 克硼氢化钾的 32% 氢氧化钠溶液搅拌均匀，然后均匀分散在 500 毫升透平油中，在 46℃ 时加入不同量的 ECH (从 12 毫升到 20 毫升) 进行反应，以下步骤同上。结果如图 4 所示，可知，本系统中加入 18 毫升的 ECH 反应所得凝胶吸水量最小，为

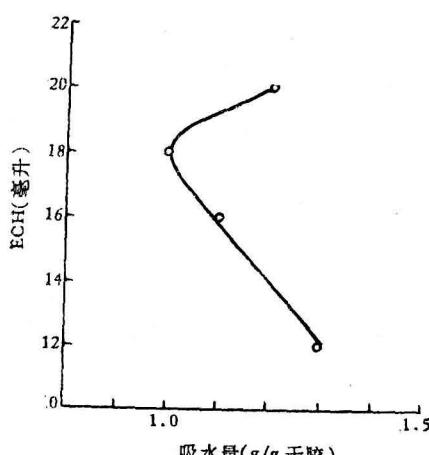


图 4 ECH 用量与吸水量的关系

1.0 克/每克干胶。因此，18 毫升为最适 ECH 用量。产品见图 5。

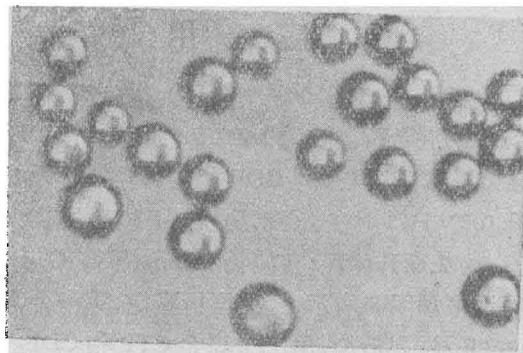


图 5 珠状凝胶的显微镜观察

三、生产条件

交联反应

取一只圆底不锈钢反应锅，容积 30 立升。外面装上水浴装置，上面装有搅拌器，反应锅中装有锚式不锈钢搅棒。称取 600 克 Gn 于 1 立升烧杯中，加入含 3 克硼氢化钾的 32% 氢氧化钠溶液 500 毫升，初步搅和后，转移入 30 立升反应锅内，水浴加热到 40℃，在保温下，以 1000 转/分速度搅拌 45 分钟，使 Gn 与碱充分混和。加入 10 立升 46 号透平油，搅拌 15 分钟，使碱相均匀悬浮在油相中。水浴升至 50℃，待反应物温度也升至 50℃ 达平衡时，加入 370 毫升 ECH，将搅拌速度加快至 1400 转/分，维持 50℃ 半小时，升温至 70℃ 反应 5 小时止。停止搅拌，将产物吸入一只 10 立升瓶中，凝胶很快沉入底部，上层油轻轻倒去，下层凝胶和油混合物用 2 号砂芯漏斗过滤，压干，凝胶置 80℃ 干燥 2 天。

洗涤

将烘干凝胶倒入烧杯中，在搅拌下，每次用 1500 毫升 120 号汽油洗涤，去除透平油，共洗四次，滤干，再用无水乙醇洗二次，每次约 1000 毫升，滤干，80℃ 干燥。

将上述产品用无离子水反复洗涤至中性，并将细颗粒彻底漂洗干净，滤干，用 95% 乙醇、无水乙醇脱水，80℃ 干燥。最后约得 520 克珠状交联葡聚糖凝胶 G-10，其中 100 目到 250 目

占 70%，吸水量为 1.0 ± 0.1 克/每克干胶，床体积为 2.8 毫升/每克干胶。

四、应 用

我们用 G-10 (100—250 目) 来分离 CTP 和 CDP 的混合物。柱为 1.2×7.5 厘米, 约 50 毫克含 55% CTP, 其余为 CDP 和盐的样品溶于 2 毫升 $0.5N$ HCl 上柱, 用水洗脱, 每 10 分钟收集一管, 约 2 毫升体积, 在波长 $260m\mu$ 下测 O. D. 所得结果如图 6 所示, 经纸层析鉴定, 第一个峰为 CTP, 纸层析纯, 第二个峰为 CTP 和 CDP。

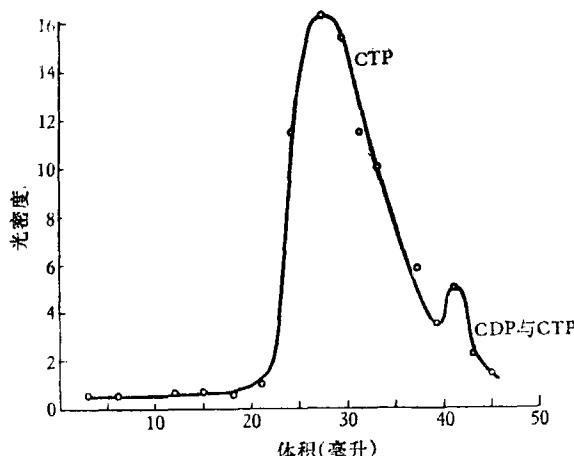


图 6 CTP 与 CDP 混合物的分离

上海生化所酶室应用我们生产的 G-10 (100—250 目) 来去除 ATP 钠盐中的无机磷。将 G-10 在 $5mM$ Tris-HCl pH7.4 的缓冲液中膨胀后装柱 (1×150 厘米), 121mg ATP 钠盐 (含无机磷 20%) 溶于 1 毫升缓冲液中上柱, 并用此缓冲液洗脱, 分管收集, 分别测定波长 $260m\mu$ 下的 O. D.、无机磷和酸不稳定磷, 结果见图 7, 有效地去除了 ATP 钠盐中的无机磷。

上海生化所蛋白室应用我们生产的 G-10 (100—250 目) 来分离多肽混合物。将含五肽 (Val, Glu- γ OMe, Ala, Leu, Tyr-OH) 2 毫克, AC-Tyr-Et 1 毫克和氯化钠 1 毫克的样品溶于 1 毫升, $1M$ 醋酸中上柱 (1×100 厘米), 用 $1M$ 醋酸洗脱, 流速为 3.1 毫升/5 分钟, 分管收集,

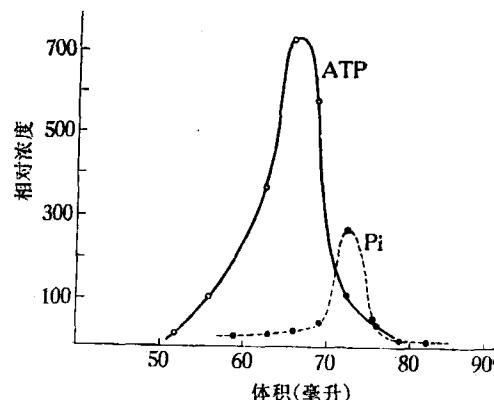


图 7 ATP 与无机磷的分离

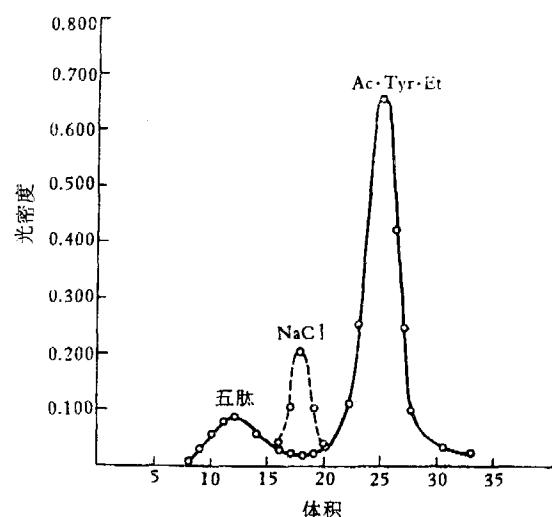


图 8 多肽混合物的分离

在 280 毫微米下测 O. D., 结果见图 8。五肽首先洗脱下来, 其次是氯化钠 (用硝酸银测定其 Cl^-), 而 AC-Tyr-Et 比盐后洗脱下来, 可能是因为它和凝胶有一定的吸附作用的缘故。国外, 应用相同类型的产品进行分离提纯等工作, 取得很好的效果, 例如:

S. F. Contractor^[5] 等应用 G-10 去除鼠和人尿中的无机盐和尿素, 从而得到回收率很高, 约 $>80\%$ 的 5-羟色氨酸和 5-羟色胺, 较之原来用尿酶处理去除尿素和电泳层析去盐的方法回收率要高得多。

H. E. Oberleander^[6] 等用 G-10 脱盐提纯 Fulsvic acid, 去除其中的盐和杂质如有机铁、 $P_2O_7^{4-}$ 、氯化钠等。

Kundun^[7] 等用 G-10 来拆分顺、反式丁烯二酸及丁烯酸和异丁烯酸等异构体。

Megzasoma^[8] 等用 G-10 来分离多种核苷酸的碱基、核苷和核苷酸，其分离效果很好。

参 考 资 料

- [1] Flodin, P.: "Dextran gels and their applications in gel filtration". Pharmacia Uppsala. Sweden. 1962.
- [2] 戎积折：“珠状交联葡聚糖凝胶 G-25 的生产”中国科学院生化研究所东风生化试剂厂资料。
- [3] Pharmacia Fine Chemicals "Sephadex: Gel filtration in theory and practice", Sweden. 1962.
- [4] Dawson, R. M. C., Daphne. Elliott, W. H. Elliott, K. M. Jones: "Data for Biochemical Research", Oxford. 1969.
- [5] Contractor, S. F. and Patricia Jomain: "The use of Sephadex G-10 in the removal of inorganic salts and urea from rat and human urine prior to chromatography of 5-hydroxyindole metabolites", *Clin. Chim. Acta* 14(4), 535, 1966.
- [6] Oberleander, H. E. Stadler, I. and Roth, K.: "Desalting of fulvic acid solution by gel filtration", *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 234(2), 124, 1968.
- [7] Kundun, N. Maenza, F.: "Simple method for the separation of suitable cis-trans isomers. Gel filtration with Sephadex", *Natur wissenschaften*, 57(11), 544, 1970.
- [8] Megzasoma, I. & Farina, B.: "Separation of bases, nucleosides, and nucleotides on dextran (Sephadex G-10) Columns", *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 42(20), 1449, 1966.

简 讯

无公害农药——氨基酸和脂肪酸

已发现 N-月桂酰·L-异戊氨酸可防治稻瘟病。这为研究无公害农药开辟了一个新方向。氨基酸和脂肪酸作农药，有下列优点：容易为微生物分解，无残毒，不污染环境；因为它们都是构成生物体的物质，因此无急性毒害。又因为这类物质是土壤微生物的营养物，所以，有可能改良土壤。

免疫荧光技术在兽医诊断上的应用

将已知抗体（或抗某种传染病的血清），用荧光色素处理，使它们相互结合。然后用与荧光色素结合的抗体，对未知抗原（或病原物）进行染色。如果抗原和抗体之间存在特异性，在紫外线显微镜下可观察到特殊的荧光，从而鉴别出未知抗原。

这种技术可以广泛地应用于兽医工作中，诊断由病毒、原虫和寄生虫引起的疾病。它的优点是准确、迅速、设备简单、操作不复杂，适合于大批样品的检查。