

Ag⁺ 在照相明胶不同分子量组分中的分布*

董永平, 黄碧霞**, 岳 军

(中国科学技术大学化学与材料科学学院, 合肥 230026)

摘 要: 利用凝胶排阻层析-火焰原子吸收光谱法研究了 Ag⁺ 在照相明胶中分子量的分布情况. 研究表明, 利用葡聚糖凝胶 G-75 可有效的将明胶中的 γ 、 β 、 α 及小分子蛋白 L 组分分开. 发现 Ag⁺ 完全分布于分子量较小的 α 大分子蛋白组分. γ 组分、 β 组分中均不存在 Ag⁺.

关键词: 明胶; Ag⁺

中图分类号: O634, TQ330 文献标识码: A

The Distribution of Ag⁺ in Gelatin with Respect to Molecular Weight*

Dong Yongping, Huang Bixia**, Yue Jun

(School of Chemistry and Material Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract The distribution of Ag⁺ in gelatin with respect to molecular weight was studied using gel exclusion chromatography — flame atomic absorption spectroscopy. Firstly, several gels used for isolating gelatin protein components were studied and the result indicated that dextran G-75 was favourable for the present study. The γ , β , α and other lower molecular weight components of gelatin could be isolated from each other by means of gel G-75. The results demonstrated that the Ag⁺ in gelatin was combined only with the α protein component and not with the γ or the β components.

Key words Gelatin, Ag⁺

1 引 言

在卤化银乳剂中明胶作为卤化银晶体粒子的保护性载体, 对乳剂的制备和它的感光性能有着重要的影响^[1,2]. 在乳剂制备过程中明胶的存在防止了卤化银核的聚集, 控制了卤化银颗粒的生长速度, 颗粒的形状以及颗粒的大小和均一性^[3-5]. 因而明胶与卤化银的相互作用, 明胶与 Ag⁺ 的相互作用深受人们的关注^[6-10]. 研究表明, 明胶的保护作用与卤化银对明胶的吸附有关, 明胶无序地以螺旋状形式的单分子层被卤化银晶粒所吸附, 未被吸附的部分伸向四周环境, 吸附链的厚度随链的长度增加而增加, 并且发现这种吸附作用的本质可能与明胶蛋白

分子中某些氨基酸残基与 Ag⁺ 的化学作用有关. 明胶由动物结缔组织加工而得, 不仅成分复杂, 而且具有很宽的分子量分布(几千至几十万或更高). 明胶分子量的分布影响着明胶的性能和乳剂特性^[11]. 为了全面深入地了解 Ag⁺ 与明胶的相互作用, 仅仅了解明胶与 Ag⁺ 的结合特性显然是不够的, 还有必要研究 Ag⁺ 在明胶不同分子量组分中的分布情况.

2 实 验

本实验中使用的化学试剂 NaNO₃ 和 AgNO₃ 为分析纯, 其溶液均用去离子水配制. 使用的骨明胶是碱法生产的去离子惰胶, 鱼明胶样品由美国 Norland 公司提供. 明胶中的不同分子量的组分利用葡聚糖

* 美国 Norland Products Inc. 资助项目. ** 通讯联系人, E-mail: yuej@ustc.edu.cn

收稿日期: 2002-03-27; 修回日期: 2002-06-05.

凝胶排阻层析法进行分离,而后对各级分溶液进行蛋白检测和 Ag^+ 浓度的检测. 根据凝胶排阻层析分离的原理,洗脱液体积数越大的级分,其分子量较小. 这样根据被研究组分所在的级分溶液对应的洗脱液体积数的大小,便可知其分子量的分布.

2. 1 样品溶液的配制

明胶样品溶液:称 0.125 g 明胶,加 0.01 mol/L 的 NaNO_3 溶液至 25 mL,在室温下溶胀 30 min,置于 50°C 恒温水浴中保温 1 h 并搅拌,冷却至室温待用,溶液的 pH 为 5.5.

明胶加银样品溶液:称 0.125 g 明胶样品,用 15 mL 0.01 mol/L NaNO_3 溶液室温下溶胀 30 min,然后加入 5 mL 5.18 g/L 的 AgNO_3 溶液并补加 0.01 mol/L 的 NaNO_3 至 25 mL,于 50°C 恒温水浴中保温 1 h 并搅拌,冷却至室温待用,溶液的 pH 为 5.5. 该溶液中明胶与 Ag^+ 的重量比为 7.6:1.

2. 2 凝胶分离

将 1 mL 样品溶液注入装有 G-75 葡聚糖凝胶的分离柱中,柱长 100 cm,内径 1 cm. 以 0.01 mol/L 的 NaNO_3 溶液淋洗,流速为 6 mL/h. 洗脱液用分部收集器收集,随后检测各级分溶液的蛋白含量和 Ag^+ 含量,每份级分溶液的体积均为 2 mL,共计收集 160 mL.

在进行加入 Ag^+ 的明胶样品分离时,由于葡聚糖带有的少量电荷会吸附 Ag^+ ,虽然吸附量可能极少,但多次,长期使用分离柱后,残留在柱中的 Ag^+ 会逐渐还原成黑色的 Ag 而沉积下来,最终影响分离效果. 为了避免该现象的发生,在分离柱的外围需用黑色的纸或塑料布包裹.

2. 3 级分溶液蛋白含量的检测条件

使用 UV-1900 紫外可见分光光度计检测. 因为,明胶在 NaNO_3 溶液中的最大紫外吸收波长为 236 nm,故本工作测定波长选定为 236 nm.

2. 4 级分溶液 Ag^+ 含量的检测条件

使用 WFX-120 火焰原子吸收光谱仪测定. 灯电流 1.4 mA,波长 328.1 nm,狭缝宽度 0.2 nm,氧化剂为空气,燃料为乙炔.

2. 5 Ag^+ 在明胶中分子量分布曲线的绘制

用各级分溶液所对应的洗脱液的体积作横坐标,用紫外吸收的吸光度作纵坐标,绘制蛋白组分的分子量分布曲线. 同样地,以各级分溶液所对应的洗脱液为横坐标,以其 Ag^+ 的含量为纵坐标绘制 Ag^+ 的分子量分布曲线.

3 结果与讨论

3. 1 级分分离条件的选择

通常,人们采用电泳法或高压液相色谱法分离明胶,以研究其蛋白组分的分子量分布. 在研究金属离子或其他组分的分子量分布时,考虑到用这些方法分离后,各组分的数量太少,或者各组分存在的状况不宜于后续的分析检测,因此,又研究了用凝胶排阻层析法分离明胶中分子量不同的组分,并且取得了可喜的研究成果^[12-16]. 商品凝胶有许多品种,它们具有不同的物理特性和分离性能,为了充分揭示 Ag^+ 在明胶中分子量分布的特征,我们对凝胶进行了比较、选择. 选择凝胶的条件实验结果示于图 1 a ~ c.

比较图 1a ~ d 中使用不同凝胶分离的效果,我们发现当使用 G-100 凝胶时,可将明胶组分清楚地分为大,中,小三个不同分子量的组分,但其中 α 和 β 组分不能很好的分开. 使用 G-75 凝胶时不仅可将明胶的 α 组分, β 组分和其他组分分开,而且 α 组分与 β 组分彼此之间也完全分开. 使用 Sepharose 4B 或 Sephacryl-400 凝胶时,在分子量分布曲线上虽然可以辨认出明胶中 α 、 β 和 γ 等不同分子量组分,但各组分之间严重重叠. 为了获得良好的分离效果,本工作采用 G-75 作为分离用的凝胶. 图 2 是用 HPLC 获得的分子量分布曲线,显示了与使用 Sepharose 4B 或 Sephacryl-400 凝胶类似的分离效果.

3. 2 Ag^+ 在明胶中的分子量分布

从图 3 和图 4 中 Ag^+ 在鱼明胶和骨明胶中的分子量分布曲线上可清楚看到,无论是在鱼明胶或是在骨明胶中 Ag^+ 均分布于分子量较小的 α 蛋白组分. 在分子量较大的 β 组分和 γ 组分均未发现有 Ag^+ . 即使在 α 组分中 Ag^+ 似乎更倾向于分布在分子量较小的部分. 从图 4 可见,骨明胶中除了大分子蛋白的 α 、 β 和 γ 组分外,还有少量的小分子蛋白组分(L 组分). 在该组分中也未发现有 Ag^+ . 为了进一步探明在 α 胶原蛋白的级分溶液中是否还有游离 Ag^+ 的存在,我们试图确定游离 Ag^+ 的洗脱体积. 我们首先将纯 AgNO_3 溶液注入凝胶柱,在相同的实验条件下进行洗脱,此时, Ag^+ 峰出现在洗脱体积为 90 ~ 100 mL 的级分,小于明胶 α 蛋白组分的洗脱体积. 显然用纯 AgNO_3 水溶液进行试验无法确定明胶中游离 Ag^+ 级分的洗脱体积. 因为明胶溶液与纯 AgNO_3 水溶液化学成分不相同,致使其粘度等物理

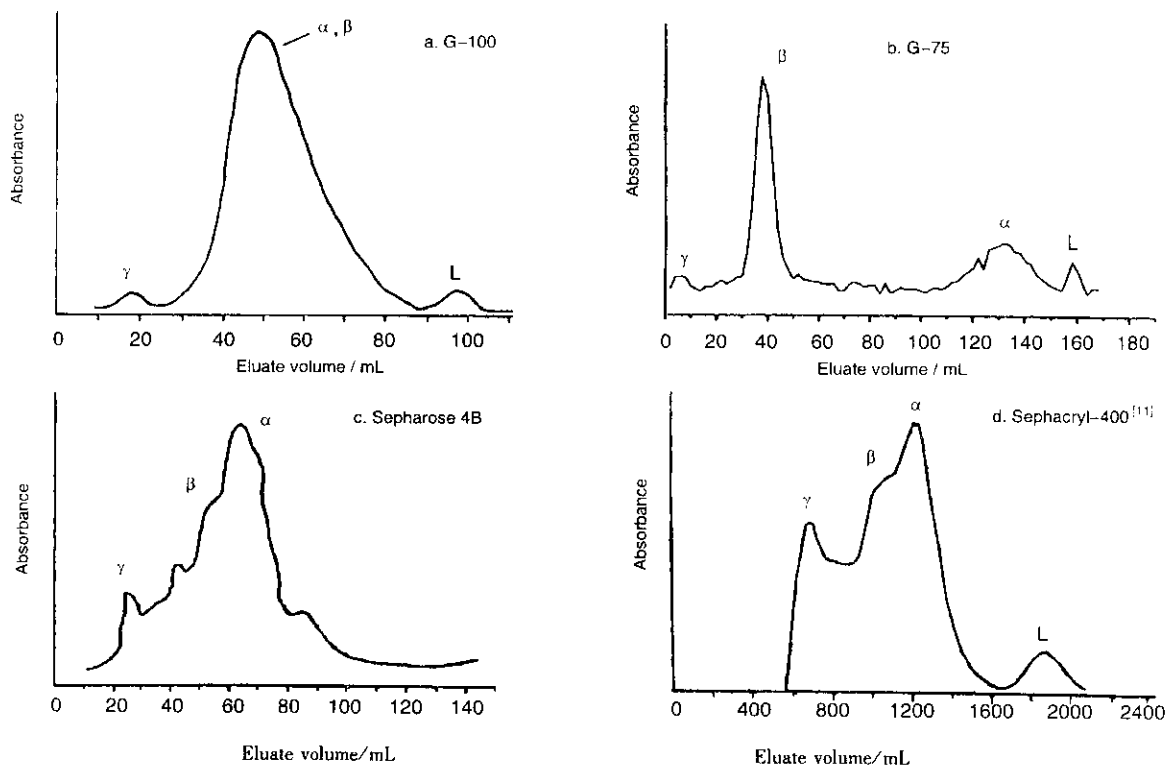


图 1 使用不同凝胶时,骨明胶的分子量分布曲线

Fig. 1 The curve of the distribution of bovine gelatin with respect to molecular weight by means of gel

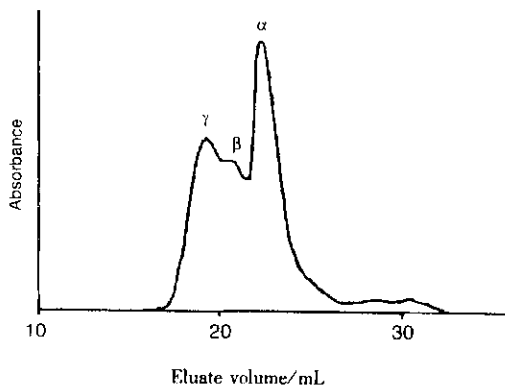


图 2 采用 HPLC 分离明胶时的分子量分布曲线^[11]

Fig. 2 The curve of the distribution of gelatin with respect to molecular weight according to HPLC^[11]

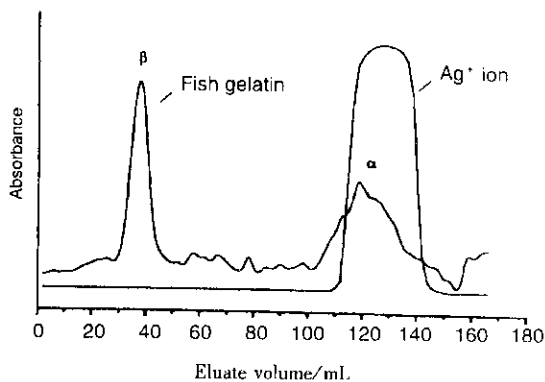


图 3 Ag⁺ 在鱼明胶中的分子量分布曲线 1

Fig. 3 The curve of the distribution of Ag⁺ in fish gelatin with respect to molecular weight No. 1

性质差别很大,影响了洗脱过程.之后,我们仍然采用明胶加 Ag⁺ 的溶液进行实验,但在此明胶溶液中加入了更多的 Ag⁺,明胶与 Ag⁺ 重量比为 3:1. 该溶液的淋洗曲线示于图 5. 图中出现了二个明显分离的 Ag⁺ 峰. 其中一个 Ag⁺ 峰与 α 蛋白组分峰重合,另一个 Ag⁺ 峰的洗脱体积大于 α 蛋白组分峰的洗脱体积. 显然后面的 Ag⁺ 峰与游离 Ag⁺ 或与小分子量组分结合的 Ag⁺ 有关. 比较图 3 和图 5 的 Ag⁺ 的

分布,说明了当明胶溶液中明胶与 Ag⁺ 的重量比值较大时,Ag⁺ 可完全与 α 蛋白组分结合,然而当该比值减小时,有一部分 Ag⁺ 就可能呈游离态或与分子量更小的其他组分结合.

我们曾通过红外光谱研究发现 Ag⁺ 主要是通过 N 原子或 S 原子与明胶键合(结果待发表). Declercq 和他的同事们通过稳定常数的测定^[8,9],认为在 pH=3 时,明胶主要是通过蛋氨酸残基与 Ag⁺ 键合,

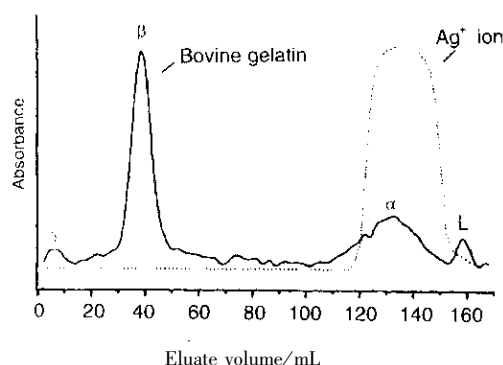


图4 Ag^+ 在骨明胶中的分子量分布曲线

Fig. 4 The curve of the distribution of Ag^+ in bovine gelatin with respect to molecular weight

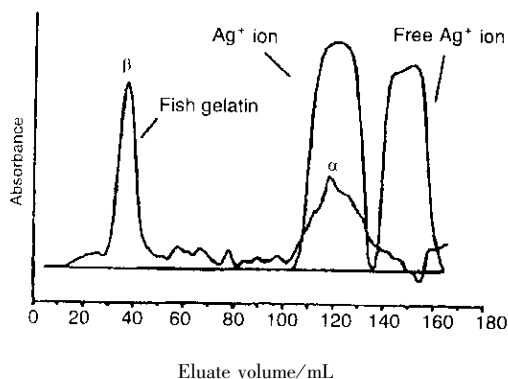


图5 Ag^+ 在鱼明胶中的分子量分布曲线2

Fig. 5 The curve of the distribution of Ag^+ in fish gelatin with respect to molecular weight No. 2

在较高的 pH 例如 $\text{pH} = 5$ 时,则主要是通过组氨酸残基与 Ag^+ 键合. 从这些研究不难看出明胶与 Ag^+ 之间肯定存在化学结合. 金属离子与蛋白的结合,既取决于蛋白的氨基酸成分,又与蛋白的分子量大小和空间结构有关. Steckert 和 Shinya Takahashi 分别研究过明胶各组分蛋白的氨基酸的成分^[12,13],他们得到基本相同的结果,即 α 、 β 和 γ 大分子组分中各氨基酸成分的相对含量基本相同,但分子量更低的小分子蛋白中则有较多的胱氨酸,并且其他某些成分的氨基酸含量也有明显的差别. 明胶小分子蛋白组分与大分子蛋白在氨基酸成份上的差异可能是 Ag^+ 不分布于小分子蛋白上的重要原因. 但 Ag^+ 只分布于大分子蛋白的 α 组分,而不是分布在分子量更大的 β 组分和 γ 组分,这可能是由于在这三者中, α 组分的分子量较小,其较小的空间位阻效应和较大的迁移速度为明胶与 Ag^+ 的结合提供了大得多的可能性.

4 结论

在我们所研究的二类明胶中,无论是鱼明胶或是骨明胶, Ag^+ 均分布在 α 大分子蛋白组分. 但当明胶与 Ag^+ 的重量比较小时, Ag^+ 可以游离态存在或与小分子量组分结合.

参考文献

- [1] Borginon H. *The Journal of Photographic Science*, 1967, **15**:207
- [2] Maternaghan T J, Bangham O B, Ottewill R H. *The Journal of Photographic Science*, 1980, **28**:1
- [3] Joe E. Maskasky. *Journal of Imaging Science*, 1989, **33**:13
- [4] Antoniadis M G, We J S. *Journal of Imaging Science and Technology*, 1992, **36**:517
- [5] Huang Bixia (黄碧霞), Song Lei (宋磊), Yue Jun (岳军), Zheng Zhixia (郑志侠). *Chin. J. Chem. Phys.* (化学物理学报), 2001, **14**:479
- [6] Hiroshi Saijo, Toshiyuki Isshiki, Makoto Shiojiri. *Journal of Imaging Science and Technology*, 1993, **37**:314
- [7] De Clerq M, Rolin D. *The Journal of Photographic Science*, 1994, **42**:117
- [8] De Clerq M, Rolin D. *The Journal of Photographic Science*, 1995, **43**:197
- [9] De Clerq M, Legat J C, Rolin D. *The Journal of Photographic Science*, 1995, **43**:154
- [10] Shen Dejun (申德君), Zhang Chaoping (张朝平). *Chin. J. Chem. Phys.* (化学物理学报), 2001, **14**:100
- [11] Ohno T, Kobayashi H, Mizusawa S, Fuma A, Ogawa A, Ohtsuki H. *J. Photogr. Sci.*, 1985, **33**:207
- [12] Steckert J J, Kramer D L, Brand J S. *The Journal of Photographic Science*, 1992, **40**:134
- [13] Shinya Takahashi, Tetsuya Ishikawa, Yusuke Okawa, Hiroyuki Kobayashi, Noriichi Itoh and Takashi Ohno. *The Journal of Photographic Science*, 1996, **44**:136
- [14] Jun Yue, Bixia Huang, Fang Xiong, Jingyuan Ai, Aibing Yue. *The Journal of Photographic Science*, 1991, **39**:130
- [15] Huang Bixia (黄碧霞), Yin Yimen (尹屹梅), Xu Luo (徐洛), Yue Jun (岳军). *Chin. J. Chem. Phys.* (化学物理学报), 1999, **12**:339
- [16] Huang Bixia (黄碧霞), Zhou Tao (周涛), Chang Li (常丽), Yin Yimei (尹屹梅), Yue Jun (岳军). *Journal of China University of Science and Technology* (中国科学技术大学学报), 1998, **28**:33