

讲 座

高效液相色谱在生物医药研究中的应用

第四讲 高效液相色谱法在糖类研究中的应用

方积年 魏远安

(中国科学院上海药物研究所, 200031)

随着科学技术的迅速发展和人们对单糖、双糖、寡糖、尤其是多糖的功能的不断深入了解, 糖的研究已成为当今化学家和生物学家研究“热点”。例如肿瘤的发生与细胞表面的糖类的变化有着密切的关系; 人类血型的不同主要由于红细胞中糖基的不同; 以及最近发现的糖链在分子生物学中具有决定性的作用⁽¹⁾。所有这些发现和发明均有赖于糖类方法学的突飞猛进。高效液相色谱(HPLC)就是糖类研究方法学中的重要组成部分。在糖类的分离和分析中, HPLC具有快速、方便、分辨率高、分离效果好、重现性好和不破坏样品等优点, 并且特别适用于某些热敏糖类的测定。现就这方面的应用按单糖, 寡糖和多糖分述之。

§ 4-1 单 糖

采用 HPLC 分离或分析单糖混合物, 常用二种类型的柱即离子交换型柱, 和吸附(分配)型柱。离子交换型柱中最常用的固定相为季铵硼酸型阴离子交换树脂。当单糖与硼酸络合后, 单糖由中性转变成酸性, 因此可进行离子交换⁽²⁾。流动相通常为硼砂缓冲液。其分辨率与流动相的浓度, 温度和 pH 值有关。离子交换型柱的最大优点是柱不需要每次再生。分配型柱的固定相有许多类型, 如氨基阴离子交换树脂, H⁺型阳离子交换树脂⁽³⁾及粒径为 5—10 μm 衍生化硅胶, 这种衍生化硅胶较为理想的是烷胺基或长链烷基与硅胶之羟基以硅醚键结合而成的硅胶衍生物⁽⁴⁾。流动相常是不同比例的乙腈水溶液。其峰之保留时间随流动相含水量的增加而缩短⁽⁵⁾。由于许多还原糖能与固定相中胺基形成共价键, 导致柱的分辨率下降, 以及这种硅胶支持的固定

相能溶于流动相中而产生空隙, 使分辨率下降, 这些问题可以通过控制 pH, 低流速的流动相及减少进样而得到克服。单糖衍生化后, 还可用正相或反相的硅胶柱。为了延缓柱的退化, 流动相必须先经过孔径小于 0.5 μm 过滤器过滤, 并去除溶解之气体, 去除气泡的方法有加热, 减压或高强度的振荡波处理。以水溶液作流动相时, 加入 0.01%(W/V)叠氮钠作防腐剂是可取的。通常在柱前装置一短小保护柱以延长柱的使用期。糖类在 HPLC 上直接检测比较困难。因为糖类在正常的紫外区域和可见光范围没有吸收, 也无荧光。但单糖在远紫外 188nm 有最大吸收值。通常小于 190nm 处噪音很大, 所以常用检测波长为 192—200nm。示差折射检测常用于糖的直接检测上, 但它的灵敏度较远紫外为差, 并易受温度及溶液浓度变化的影响, 不能应用于梯度洗脱中。为了解决单糖的检测问题, 发展了柱前⁽⁶⁾, 柱后⁽⁷⁾衍生化的方法, 就是说样品在柱前或柱后制备成各种衍生物, 而这些衍生物或对紫外敏感, 或具荧光。当然这时的层析性质已经改变了。如单糖与氨基吡啶反应生成具荧光的衍生物, 然后于 C₁₈ 反相柱上层析, 以乙腈柠檬酸缓冲液作流动相, 洗脱液即可用荧光检测⁽⁸⁾, 敏感度较示差折射检测提高二倍。异氰酸苯酯与各种单糖反应生成具紫外吸收的衍生物, 然后在 C₁₈ 反相柱上用乙腈磷酸缓冲液展层, 其敏感度也较非衍生物提高了三倍⁽⁹⁾。柱后衍生化检测法可能是更值得推荐的方法, 原因是适合于各种单糖, 灵敏度高, 操作较简单, 可直接根据峰面积进行定量计算。如流出液与硫酸铜试剂反应⁽¹⁰⁾, 立即可用紫外于 285 或 310nm 检测。表 1 推荐了几种单糖常用

表 1

HPLC 在单糖分析上的应用

柱 型	流动相	温度 ℃	流 速 ml/min	可应用的现成柱 (i.d. × L(cm))	检 测	参 考 文 献
阴离子 交换剂 (季胺, 硼酸盐型)	硼酸 缓冲液	65	1.0	Hitachi No.2633 (0.8 × 8)	柱后衍生荧光	[11—13]
				Durrum DA-X8-11 (0.3 × 25)	柱后衍生荧光	
				Bio-Rad Aminex A-14 (0.9 × 99)	UV199nm	
				Bio-Rad Aminex A-25 (0.9 × 25)	柱后衍生荧光	
阴离子 交换剂 (氨基, OH ⁻ 型)	乙腈/ 水	25	2.5	Waters μ Bondapak Carbohydrate (0.4 × 30)	RI	[14,15]
				Whatman Particil 10-PAC (0.4 × 25)	柱前衍生 UV	
				Varian MicroPak NH ₂ (0.4 × 30)	RI	
				Merck Lichrosorb NH ₂ (0.4 × 25)	RI	
				Supelco Supercosil LC-NH ₂ (0.46 × 25)	RI	
阳离子 交换剂 (Ca ⁺⁺ 型)	水	85	0.6	Bio-Rad Aminex Q-15S (0.9 × 50)	RI	[16,17]
				Bio-Rad Aminex HPX-87C (0.78 × 30)	RI	
				Waters Sugar-PaK1 (0.4 × 30)	柱后衍生 UV	
硅 胶 (正 相)	乙腈/ 水	25	1.0	Whatman Partisil 0 (0.46 × 25)	柱前衍生 UV	[18,19]
				Merck (Lichrosorb Si 60) (0.4 × 25)	RI	
				Waters μ Porosil (0.4 × 30)	RI	
硅 胶 (反 相)	乙腈/ 水	28	1.0	Waters μ Bondapak (C ₁₈) (0.39 × 30)	RI	[18]

的柱型及操作条件。

§ 4-2 寡 糖

虽然 HPLC 的吸附色谱或正相色谱在中性寡糖中用得不多,但它适合于低聚合的寡糖衍生物的分析。如 White 等^[20],将寡糖苯二甲基硅醚化后进行吸附色谱,固定相为硅胶,流动相为正己烷-乙酸乙酯(193:1),取得了满意结果。反相色谱的载体常是骨架表面键合不同链长的烷基,如 C₁₈ 的甲硅烷基硅胶和 C₈ 的甲硅烷基硅胶。流动相常为水溶液或中等极性的溶剂^[21]。上述二种色谱法在寡糖中一般用得不多。最常用的当推化学键合相色谱,其重要的二种柱型是氨基丙基键合相^[22-25]和氰基及氨基衍生物的混合键合相^[26],它们可以分辨出相差一个糖残基的寡糖以及连接位置不同的匀寡糖的异构体^[24,27]。如采用化学键合相的 Spherisorb S5NH₂ 柱,流动相

为含水 35—40% 的乙腈溶液,可在 20 分钟内分离聚合度 10 以下的各种寡糖。如流动相中水的含量增加到 45%,则可分离聚合度为 15 以下的各种寡糖。用二胺或多胺代替胺基,键合于硅胶上,在流动相中加入 0.01%(V/V)的二胺或多胺如 1,4-二氨基丁烷的乙腈水溶液,可使硅胶支持体的表面的胺基键合与流动相达到动态平衡,其分离寡糖的聚合度可增加至 25。寡糖的极性很大,中性条件下又不容易离子化,所以过去离子交换色谱应用不多,Mark 等^[28]根据在碱性条件下(pH=13)糖类也能电离,应用高效阴离子交换色谱分离寡糖,其分辨率取决于两个因素,一是糖环上羟基的相对酸性大小,环上不同位置的羟基酸性强弱的顺序是:1-OH > 2-OH >> 6-OH > 3-OH > 4-OH。二是寡糖的烷氧基负离子与固定相的官能团的相互作用的大小。结果证

明高效阴离子交换色谱其分辨率较反相色谱及氨基键合相色谱大大提高。其所用之柱为 Dionex CarboPac PA-1 薄膜阴离子交换柱(4.6 × 250mm), 流动相为 A. 0.1mol/L 之 NaOH, B. 含 0.15mol/L NaAc 之 0.1mol/L 的 NaOH, 梯度淋洗, 检测器为电化学检测(三重脉冲安培计⁽²⁹⁾)。在 HPLC 中寡糖的检测确实是一个难题。由于它的洗脱常是梯度洗脱, 所以示差折射不能使用。寡糖在低波长的紫外区 (<210nm)虽敏感, 但噪声大, 并且需要超纯度的溶剂, 这样也限制了它的应用。目前常用的为柱前衍生化方法。用生色基团⁽³⁰⁾ 荧光基团⁽³¹⁾ 和放射性同位素标记⁽³²⁾ 使寡糖衍生化, 然后分别用紫外, 荧光和放射检测。如采用氨基键合相柱, 则制备成具紫外吸收的 O-苄基和 O-(4-硝基苄基)衍生物⁽³³⁾ 或具荧光的 2-吡啶衍生物⁽³⁴⁾。前已述及, 采用电化学检测即三重脉冲安培计是寡糖检测的新发展⁽²⁸⁾, 它的分辨率较前几种方法为高, 可检测 10⁻⁹mol/L 的未衍生化的寡糖。Chapman 还采用质谱检测即所谓超敏感 HPLC 检测器⁽³⁵⁾。近年来寡糖的制备性 HPLC 有较快发展。如麦芽寡聚糖是 α-1, 4 葡萄糖寡聚糖, 用通常的纯化方法很难得到纯品, 采用制备性 HPLC 方法分离麦芽寡聚糖混合物, 它具有快速, 高效, 低价, 分离量大(可达克级)等优点⁽³⁶⁾。常用的制备性柱(30 × 20cm)的载体有四种: (I)H⁺型阳离子交换树脂。(II)Ag⁺型阳离子交换树脂。(III)氨基硅胶。(IV)十八烷硅胶。制备性 HPLC 的流速(Fp)2—12ml/min。Fp 可按下列方程式计算:

$$Fp = Fa[IDp / IDa]^2 Lp / La$$

其中 Fa 为分析型柱之流速, IDp 及 IDa 分别为制备型柱和分析型柱之内径, Lp 及 La 分别为制备型柱及分析型柱之高度。

以阳离子交换树脂为载体的 HPLC 分离寡糖, 它主要根据分子大小排阻和配合基交换机理⁽³⁷⁾ 常用 4% 或 8% 交联度的树脂。Ag⁺型分辨率高于 H⁺型树脂, 其分离样品量每次可达 1g。反相十八烷硅胶每次样品分离量仅 1mg, 但纯度很高。

§ 4-3 多 糖

多糖的研究, 首要问题是分离纯化及其纯度的检测和分子量测定。过去常用的检测和测定方法有超速离心法, 高压电泳法, 渗透压法, 粘度法和光散射法等⁽³⁸⁾。这些方法测定比较麻烦且误差很大。七十年代以后, 由于耐高压合成凝胶的出现, HPLC 已应用于测定多糖的纯度和分子量以及制备性的分离多糖。多糖中所用的 HPLC 多是高效体积排阻色谱(HPSEC)或称高效凝胶渗透色谱(HPGPC)。它具有快速, 高分辨和重现性好的优点。这种方法, 样品分子与固定相表面之间无相互作用, 完全是按分子筛原理分离, 目前最常用的商品柱是 μBondagel 柱系和 TSK 柱系, 如表 2 所示。常用水^(39,40), 缓冲液^(41,42) 和含水的有机溶剂⁽⁴³⁾, 如二甲亚砜作流动相。如单糖与寡糖中所述一样, 流动相也必须经过过滤和去气体。样品如含较多盐类或蛋白质则必须首先除去。

表 2 μBondagel 商品柱(Waters Assoc.)

型 号	分离范围(分子量)
μPorasil GPC 6 × 10 ⁻³ μm	100—10,000
μBondagel E-125	2,000—50,000
μBondagel E-500	5,000—500,000
μBondagel E-1000	50,000—2,000,000
μBondagel E-Linear	2,000—2,000,000
μBondagel E-high A	15,000—7,000,000

表 3 TSK 商品柱(Bio-Rad)

型 号	分离范围(分子量)
Bio-Gel TSK-30	—100,000
Bio-Gel TSK-40	1,000—700,000
Bio-Gel TSK-50	10,000—2,000,000
Bio-Gel TSK-60	100,000—20,000,000

多糖检测不像单糖和寡糖采用柱前, 柱后衍生法, 大多采用直接检测, 常用示差折射仪(RI)。RI 具中等灵敏度, 其线性关系的最低敏感量为 20μg, 也就是说如果进样 20μl, 则样品浓度必须大于 0.1%, RI 的最大敏感量为 400μg, 如果是酸性多糖还可用紫外检测, 但多数是紫外检

测与示差折射检测联用。Yu等^[45]采用小角激光散射检测多糖分子量,分子量配布和多糖分枝度,它可以直接从图上得到每一点的绝对分子量,而不需要像RI预先用已知多糖制作标准曲线。

Superose 6和Superose 12(Pharmacia)是交联氯甲代环氧丙烷的琼脂糖,具有一定孔径,耐压和较高理论塔板数的新型凝胶。分离分子量范围为5000—1000000。Praznik^[46]采用Superose 6柱(300×10 I.D.),进样量50 μ l的水解淀粉,水作流动相,RI检测,流速0.6ml/min,得到满意结果。必须指出,多糖在HPLC上的表现,易受其本身结构影响。操作时最好用相似结构的已知多糖校正柱子。Firoz等^[47]认为高温时HPLC可以提高分离速度,增加效率,虽然在高温时会发生一级柱上不可逆反应,但因分离速度很快,不利反应可以忽略不计。为了获得较好的分辨率,流动相的离子强度一般维持在0—0.6mol/L, pH为3—7。但如采用亲水基团丙三基丙基甲基硅烷与多孔球型硅胶共价,商品为SynChropak柱,用较高离子强度(0.7mol/L, PH3.7)缓冲液作流动相,发现使用了较高离子强度的缓冲液不但可以减少离子基团在大分子链上的化学不均一性,而且可以大大减少进样溶液的粘度,从而减少了层析粘度效应^[48]。下面以HPGPC测定多糖分子量着重说明之:

多糖的分子量与其在柱上的洗脱体积 V_e ,分配系数 K_{av} 存在如下关系^[49]:

$$K_{av} = k_1 - k_2 \log M \quad (1)$$

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0) \quad (2)$$

其中 k_1 和 k_2 为常数, V_0 为柱的空体积,即不能透过所有凝胶孔的大分子的洗脱体积。 V_t 为柱的总体积,即能透过所有凝胶孔的小分子的洗脱体积。对于分子量 M 小于1000000的样品,通常以兰色葡萄糖($M > 2000000$)和葡萄糖的流出体积作为 V_0 和 V_t ,先以已知分子量的标准多糖测得 V_e 及 K_{av} ,以 K_{av} 对 $\log M$ 进行线性回归,求得 k_1 和 k_2 及回归系数,然后测定样品之 V_t ,按式(2)求得 K_{av} ,再按式(1)得到样品的分子量。HPGPC方法在多糖上的应用也有一些引

起误差的因素,如标准品与样品结构之差异,凝胶柱对多糖大分子可能产生的吸附作用,大分子在柱上扩散,标准多糖与样品之间浓度,粘度,温度的微小差异等, K_{av} 的引入就是为了尽量减少这些因素引起的误差。

参 考 文 献

- (1) 方积年, 药学学报, 21, 944 (1986) .
- (2) V.R. Villanueva et al., J. Chromatogr., 393,115(1987).
- (3) S. Honda et al., Anal. Biochem., 142, 167(1984).
- (4) K.B.Hicks et al., Carbohydr. Res., 168,33(1987).
- (5) C.A.Chang, Anal. Chem., 55,971(1983).
- (6) J.Golik et al., Carbohydr. Res. 113,291(1983).
- (7) S.Honda et al., J. Chromatogr., 291,31(1984).
- (8) H. Takemoto et al., Anal. Biochem., 145,245(1985).
- (9) J.M.Dethy et al., Anal. Biochem., 143,119(1984).
- (10) G.K.Grimble et al., Anal. Biochem., 128,442(1983).
- (11) M.F.Chaplin, Carbohydr. Anal., New York. p15,1986.
- (12) L.A.T.Verhaar et al., Carbohydr., 62,19(1978).
- (13) S.Honda et al., Anal. Biochem., 113,130(1981).
- (14) W.Blaschek, J. Chromatogr., 256, 157(1983).
- (15) B.Porsch, J. Chromatogr., 253, 49(1982).
- (16) A.Lenherr et al., J. Chromatogr., 388, 455(1987).
- (17) K.B.Hicks et al., J. Chromatogr., 319, 159(1985).
- (18) K.Kainunia et al., J. Chromatogr., 212,126(1981).

- (19) A.Heyrand et al., J. liq. Chromatogr. 3,721(1980).
- (20) C.A.White et al., J. Chromatogr., 264,99(1983).
- (21) D.Noel et al., J. Liq. Chromatogr., 2, 1325(1980).
- (22) R.Schwarzenbach, J. Chromatogr., 117,205(1976).
- (23) N.Tomiya et al., Anal. Biochem., 163,489(1987).
- (24) W.Blanken et al., Anal. Biochem., 145,322(1985).
- (25) V.K.Dua et al., J. Chromatogr., 126,731(1976).
- (26) F.M.Rabel et al., J. Chromatogr., 126,731(1976).
- (27) E.F.Hounsell et al., J. Liq. Chromatogr., 7, 661(1984).
- (28) R.Mark et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85,3291(1988).
- (29) R.D.Rocklin et al., J. Liq. Chromatogr. 6,1577(1983).
- (30) W.T.Wang et al., Anal. Biochem., 141,366(1984).
- (31) N.Tomiya et al., Anal. Biochem., 163,489(1987).
- (32) S.Takasaki et al., Methods Enzymol., 83,263(1981).
- (33) C.C.Chen et al., J.Chromatogr., 122,322(1981).
- (34) E.Coles et al., J. Chromatogr., 139,1(1985).
- (35) J.R.Chapman, Inst. Food Sci. Technol. Proc., 18,59(1985).
- (36) B.H.Kevin et al., J. Chromatogr., 389,183(1987).
- (37) R.W.Goulding, J. Chromatogr., 103, 229(1975).
- (38) 方积年, 药学报, 19,46(1984).
- (39) R.W.Klingler, Starch, 37,111(1985).
- (40) W.Praznik et al., J. Chromatogr., 387,467(1987).
- (41) Ji-nian Fang et al., Phytochem., 24,2619(1985).
- (42) 魏远安等, 药学报, 24, 532 (1989)
- (43) K.Kyoko et al., J. Chromatogr., 321,145(1985).
- (44) K.Shoichi et al., J. Chromatogr. 319,205(1985).
- (45) L.Yu et al., J. Appl. Polymer Sci., 33,1909(1987).
- (46) W.Praznik, Starch, 38,292(1985).
- (47) D.Firoz et al., J. Chromatogr., 435,1(1988).
- (48) N.B.Beaty et al., J. Chromatogr., 418,203(1987).
- (49) R.M.Alosp et al., J. Chromatogr., 246,227(1982).

(收稿日期: 1989年6月15日)

(上接 121 页)

(1968).

- (3) S.F.A.E公司产品介绍, 1987.
- (4) 四川化工研究院, 化工自动化及仪表, (5),20 (1957).
- (5) E.R.Fisher and J.Mccarty, Jr., Anal.Chem. 37. 1207(1965).

(收稿日期: 1989年12月28日)

Chunrong, Lian Jiyo, Lin Bingcheng and Zhang Yukui, Dalian Institute of Chemical Physics, Academia Sinica, 116012.

The composition and specifications of a home-made argon discharge detector has been examined. It has been proved that this detector is suitable for the estimatin of impurities in argon: H₂, O₂, CH₄ and CO. The detectivity is 10 ppb (based on CH₄). The noise-signal ratio is 10⁻¹³g/s (based on CH₄ or H₂).