

痕量氨基糖和中性单糖的高效毛细管电泳及液相色谱分析

林启山 张任恩 刘国谏

(中国科学院化学研究所 北京 100080)

提要 由于糖缀合物具有较弱的紫外吸收,采用了一种与单糖有高反应活性的新型紫外、荧光衍生试剂茚甲氧羰基胍(FMOC-Hydrazine)和茚甲氧羰基氯(FMOC-Cl)对单糖进行衍生。利用高效毛细管电泳(HPCE)和液相色谱技术对衍生产物进行了分析。结果表明:以上衍生试剂可用于fmol级单糖的测定。对单糖的HPCE分离因素进行了详细讨论。

关键词 高效毛细管电泳,高效液相色谱,氨基糖,单糖,柱前衍生,痕量分析

1 前言

糖缀合物,尤其糖蛋白中的寡糖链在生命过程中参与蛋白的靶向、细胞识别及抗体-抗原相互作用等重要生理过程^[1],对其结构和功能的研究成了继DNA和蛋白之后又一重要课题而倍受人们的重视。因从生物体中可获得用于结构研究的寡糖量甚微,故寻求高效分离和高灵敏度检测手段成为必然。

糖缀合物本身的紫外吸收很弱,对痕量糖的分析多采用衍生方法,使其有较强的紫外或荧光吸收以利于检测。有关测定微量糖的高效液相色谱(HPLC)衍生方法,近年陆续有报道^[2-7],其中在提高衍生反应转化率、缩短反应时间、降低衍生反应温度以利于保持寡糖结构的完整性等方面,都还有待于进一步改进和提高。HPCE是近年发展起来的一种新型的分离分析技术。由于它具有快速分离、高效、所需样品量少等优点,已广泛用于多肽、蛋白、核酸等生命科学领域研究。近年应用HPCE进行糖的分析也有报道^[8,9]。本文采用一种与单糖有高反应活性的新型紫外、荧光衍生试剂茚甲氧羰基胍(FMOC-Hydrazine)和茚甲氧羰基氯(FMOC-Cl)对包括葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、岩藻糖(Fuc)、木糖(Xyl)、乙酰氨基半乳糖(GalNAc)、氨基葡萄糖(GlcN)和氨基半乳糖(GalN)的单糖进行衍生,利用HPCE和HPLC技术,研究了它们的分离条件、线性定量关系和单糖衍生物的检测极限,并将此方法用于糖蛋白中糖的组分测定。

2 实验部分

2.1 仪器

Spectra Phoresis 1000™毛细管电泳仪(SP公司产品),ALTEX Model 100A Solvent Metering System,日立635-10LC荧光检测仪。

2.2 试剂

标准单糖,胎球蛋白,转铁蛋白,均为Sigma公司产品。

2.3 缓冲液的配制

称一定量的硼酸,用NaOH将pH调至对应值。

2.4 FMOC-胍的合成

参照文献[7],将约100mg茚甲氧基氯溶于30mL乙腈中。在快速搅拌条件下,将上述溶液缓慢滴加到1mL水合胍中,待反应30min后,将反应液在低于40℃条件下真空旋转蒸发除去未反应的胍和溶剂,得白色固体物。此粗产品纯度可达98%。产物可直接用于制备衍生物试剂,亦可经乙醇或乙腈重结晶,得白色片状晶体。

2.5 中性单糖衍生反应

取10μL含1~20nmol糖的乙醇溶液,加入100μL含0.1%乙酸的乙醇溶液。混合后加入100μL含20~400nmol茚甲氧羰基胍的乙腈溶液。将带有螺旋帽的聚四氟乙烯反应瓶拧紧,在65℃水浴中反应6h,衍生反应产物可直接进行色谱分析。

2.6 氨基单糖衍生反应

取10μL含1~5nmol氨基糖的水溶液,加入100μL 0.2mol/L pH 7.0的硼酸钠和100μL含有10~50nmol FMOC-Cl的乙腈溶液,摇荡后在室温下反应4min,衍生反应液直接进行分析。

2.7 糖蛋白的水解

将样品溶解于20μL水中,加入等体积4mol/L

三氟乙酸。将带有螺旋帽的聚四氟乙烯反应瓶拧紧,在沸水中反应 6h 后,冷却并将反应液以 N_2 吹干,用于上述的衍生反应。

3 结果与讨论

3.1 衍生反应

FMOC 肼与单糖的衍生反应如图 6 所示。FMOC 与单糖的最佳衍生反应条件已有详尽讨论^[2]。FMOC 肼同目前最常用的伯氨基衍生试剂相比,前者衍生条件温和(65℃, 4~6h),反应产物 FMOC 糖脎稳定,后者衍生反应温度高(80~90℃),生成不稳定产物席夫碱(Schiffbase),需经长达 8h(90℃)的还原反应才可生成稳定的可用于分析的叔氮衍生物,其结果会使糖链结构的完整性遭受破坏,因而也就影响了随后的结构研究。糖蛋白寡糖链中常见的 GalNAc 和乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)在蛋白质水解过程中均定量转化为相应的氨基糖。采用 FMOC-Cl 作为衍生试剂,可快速(4min)在室温下完成氨基糖的定量衍生。上述两种衍生方法均可使被衍生糖带有相同的 FMOC 荧光基团,用相同的色谱分离条件和相同的荧光检测条件即可测定,并且过剩的荧光衍生试剂及水解产物在反相色谱中均在糖衍生物之后流出,不影响分离。在 HPCE 中,它们均在电渗流处出峰。如有必要,也可将衍生反应液用氮气吹干后,加少量水溶解,用戊烷萃取 2~3 次以除去反应中过剩的衍生试剂,而在水相中的糖衍生物损失极少(低于 1%)。

3.2 电泳条件的选择

单糖衍生物在水中不带电荷,需与硼酸络合形成糖-硼酸根阴离子才可用于电泳分离。在电泳过程中,对分离有重要影响因素为缓冲液的浓度、pH 值以及电泳过程中的温度。以常见五种单糖考察上述因素对分离的影响,其结果如图 1~3 所示。从图 1 中可以看出,随着硼酸缓冲液浓度的增大,所有糖衍生物的迁移时间也随之增大。其中乙酰氨基半乳糖、氨基半乳糖衍生物的相对迁移时间值基本保持恒定不变;而岩藻糖、葡萄糖和半乳糖衍生物的相对迁移时间值则随之相应增加,从而有利于改善分离。由图 2 可知,随 pH 值的增大,所测糖衍生物的迁移时间值也有所增长,且相邻组分的相对迁移时间值也随之增大,从而有利于改进分离。但在 pH 10~11 范围内,所测糖衍生物的迁移时间值的顺序有所颠倒。尽管如此,高 pH 条件对葡萄糖、岩藻糖、半乳糖和氨基半乳糖衍生物分离还是有利的。图 3 表明在

电泳过程中的温度对分离的影响不像 pH 值和缓冲液浓度那样显著,且对不同糖衍生物的影响也不尽相同,但温度升高,有利于缩短分离时间。

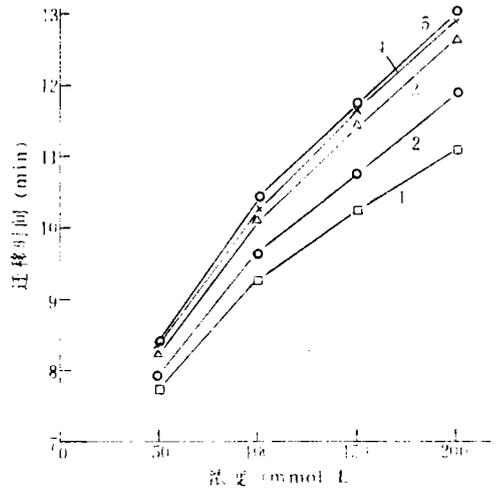


图 1 缓冲液浓度对迁移时间的影响

1. 葡萄糖, 2. 岩藻糖, 3. 半乳糖, 4. 氨基半乳糖, 5. 乙酰氨基半乳糖。色谱条件: 毛细管长 70cm×50 μ m, 20℃, pH10.0, 20kV, 进样时间 6s。

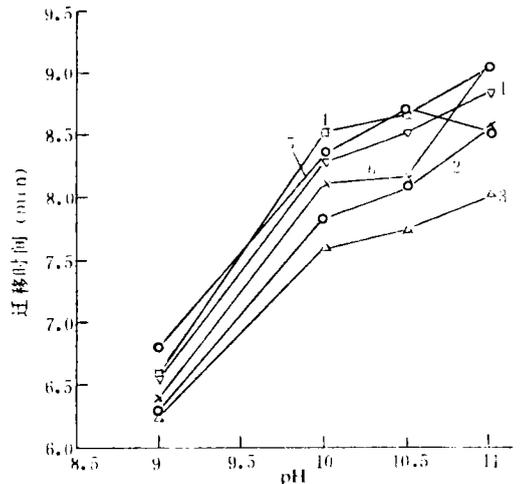


图 2 缓冲液 pH 值对迁移时间的影响

1. 葡萄糖, 2. 岩藻糖, 3. 半乳糖, 4. 氨基半乳糖, 5. 乙酰氨基半乳糖, 6. 氨基葡萄糖。色谱条件: 毛细管长 70cm×50 μ m, 20℃, 20kV, 100mmol/L 硼砂, 进样时间 6s。

上述实验表明,较高 pH 值和硼酸浓度更有利于糖基上相邻羟基与硼酸根离子的络合反应,分别形成取向和分子量不同的配合体,从而达到完全分离的目的。综上所述,采用较高 pH 值的硼酸介质体系,单糖衍生物可获得较好分离。从分离效率、分离速度和仪器分离状态三方面考虑,选择的分离条

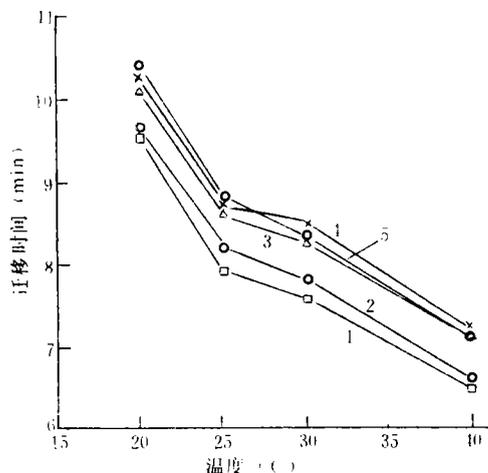


图3 分离温度对迁移时间的影响

1. 葡萄糖, 2. 岩藻糖, 3. 半乳糖, 4. 氨基半乳糖, 5. 乙酰氨基半乳糖。色谱条件: 毛细管长 70cm×50μm, pH10.0, 20kV, 100mmol/L 硼砂, 进样时间 6s。

件为: 120mmol/L 硼酸, pH 10.2, 温度 22°C, 电压 20kV。若缓冲液浓度、pH 值和温度过高, 必然会造成较大的电泳电流, 焦耳热加大, 检测器噪音增高, 降低了检测极限且不利于分离。图 4 示出了 FMOC-糖胺在选定电泳条件下的色谱分离结果。由图 4 可以看出, Glc, Fuc, Man, GlcN, GalNAc, GalN 和 Xyl 于 14min 内在 HPCE 上便可获得完全分离, 且 GalN 和 GlcN 可得到完全分离。

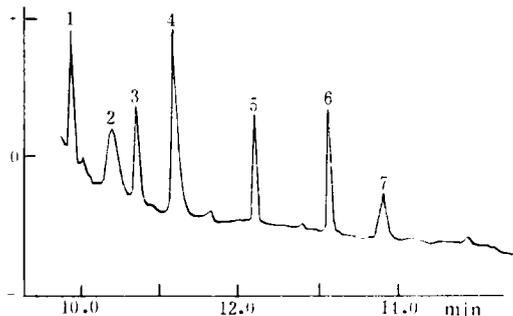


图4 单糖衍生物物 FMOC-糖胺的 HPCE 分离

1. 葡萄糖, 2. 岩藻糖, 3. 甘露糖, 4. 氨基葡萄糖, 5. 乙酰氨基半乳糖, 6. 氨基半乳糖, 7. 木糖。色谱条件: 毛细管长 70cm×50μm, 22°C, pH 10.2, 20kV, 120mmol/L 硼砂, 进样时间 3s。

3.3 色谱条件的选择

用 Cosmosil C₁₈ 柱进行了 FMOC-糖胺分离实验, 使用恒定组分流动相考察不同 pH 及不同流动相组成对糖衍生物分离的影响, 其结果表明: 最佳流动相组成为 30% 乙腈, pH 6~7。图 5 给出了 FMOC-糖胺的 HPLC 分离结果, 在 15min 内, 用 C₁₈

柱仅可将单糖衍生物部分分离且异构体 GalN 和 GlcN 在此条件下不能分离。

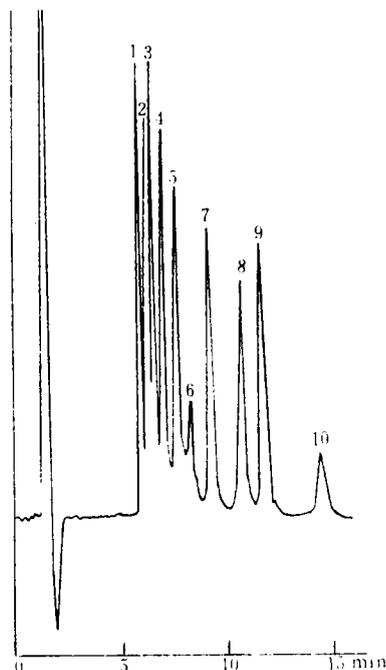


图5 单糖衍生物物 FMOC-糖胺的 HPLC 分离

1. 乙酰氨基半乳糖, 2. 乙酰氨基葡萄糖, 3. 甘露糖, 4. 半乳糖, 5. 葡萄糖, 6. 山梨糖, 7. 果糖, 8. 核糖, 9. 木糖, 10. 岩藻糖。色谱条件: Cosmosil 5 C₁₈ 柱 4.6×150mm, 30% 乙腈, 流速 1.0mL/min, 荧光检测: Ex 270nm, Em 320nm。

3.4 灵敏度及线性关系

FMOC 胺激发和发射波长分别为 270 和 320nm, 其最大紫外吸收为 263nm。当 HPCE 进样量为 3nL, 在 263nm 处紫外检测及 HPLC 以 270nm 激发, 320nm 荧光检测时, 七种单糖的最小检测量(信噪比 1:3 时)如表 1 所示。从表 1 可以看出, HPCE-UV 检测极限为几个到二十几个 fmol, 其最小检出量优于 HPLC-荧光测出极限, 这主要得益于 HPCE 的低进样量和高分辨率。线性关系实验结果表明, 上述单糖在 10⁻⁶~10⁻⁴mol/L 浓度范围线性关系良好, 而在 HPLC 上, 线性范围为 10~100pmol。

表1 FMOC-糖胺荧光、紫外检测限量

糖	HPLC-荧光	HPCE-紫外检
	检测极限(fmol)	测极限(fmol)
GalNAc	200	18
GlcNAc	200	/
Man	50	12
Gal	70	7
Glc	100	8
Xyl	100	24
Fuc	200	17

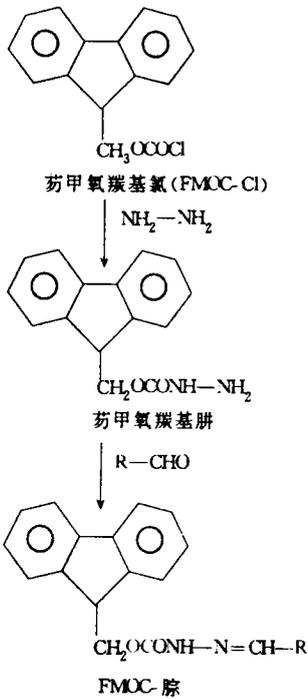


图 6 FMOC 脲的合成及其与单糖的反应

3.5 糖蛋白寡糖链的单糖组成分析

应用上述 HPLC 法测定了胎球蛋白和转铁蛋白中糖的组成,其结果如表 2 所示,所得结果与文献 [10] 相近。HPCE 用于实际样品糖蛋白中单糖含量测定仍在进行之中。

表 2 糖蛋白中的单糖组成

糖蛋白	单糖含量 (文献值)		2mol/L TFA 中水解 100 C/6h
	转铁蛋白	Gal 1	1*
	Man 1.26	1.33*	1.48
	GlcNAc 1.70	/	1.67
胎球蛋白	Gal 1		1
	Man 0.82		0.88

* 由 GLC 方法测定。

参考文献

- 1 Paulso J C. Trends Biochem Sci, 1989;14:272
- 2 Aplenfels W F. Anal Biochem, 1981;114:153
- 3 Handa S, Akao E, Suzuki S *et al.* Anal Biochem, 1989;180:351
- 4 Ullman M D, McCluer R H. Methods Enzymol, 1987; 138:117
- 5 Wong W T *et al.* Anal Biochem, 1984;141:366
- 6 Lin J K, Wu S S. Anal Chem, 1987;59:1320
- 7 Zhang R, Cao Y, Heam M W. Anal Biochem, 1991; 195:161
- 8 Liu J P, Osamu Shirota, Milos Novotny, Proc Natl Acad Sci USA, 1991;88:2302
- 9 Susumu Honda, Shigefumi Iwase, Akiko Makino *et al.* Anal Biochem, 1989;176:72
- 10 Takemoto H, Hase S, Ikenaka T. Anal Biochem, 1985;145:245

Trace-Analysis of Amino Sugars and Neutral Saccharides by High Performance Capillary Electrophoresis (HPCE) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Lin Qishan, Zhang Ren'en and Liu Guoquan

(Institute of Chemistry, the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080)

Because of the low UV absorbance of carbohydrates, the active fluorescence and ultraviolet labelling reagents, 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) hydrazine and 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride, have been utilized as derivatization reagents for monosaccharides in the present work. HPCE and HPLC coupled with ultraviolet and fluorescence detector was studied as a means of separation and determination of sugars. The results show that monosaccharides derivatized with Fmoc-hydrazine and Fmoc-Cl can be determined with high sensitivity at fmol level. The HPCE separation conditions of monosaccharides were studied in details.

Key words high performance capillary electrophoresis, high performance liquid chromatography, amino sugars, monosaccharides, pre-column derivatization, trace analysis