

神经节苷脂的高效液相色谱-化学衍生方法进展

徐桂芸 常理文

(中国科学院化学研究所 北京 100080)

1 前言

神经节苷脂(Ganglioside)是一类含有唾液酸(Sialic acid)的酸性鞘氨醇糖脂,由鞘氨醇(Sphingosine)、脂肪酸、寡糖链三部分组成。它采用 Svennerholm^[1]的通俗命名法,例如 GM₁, GD_{1a}, GT_{1b} 和 GQ_{1b} 等。其中, G 代表神经节苷脂;大写 M, D, T, Q 和 P 分别表示所含的 1~5 个唾液酸基团;阿拉伯数字 1~4 分别代表除唾液酸外从 4 个糖残基到 1 个糖残基的糖链;小写字母 a, b 等表示唾液酸连接不同的位置。

神经节苷脂广泛分布于动物的各种组织细胞膜上,有着多种生物学功能,其中包括表面受体作用^[2,3]、细胞识别与粘合作用^[4~7]、细胞生长及分化的调节作用^[8,9],并且也是与肿瘤相关的糖脂抗原^[10~13]。因此有关神经节苷脂的各种研究一直很活跃。自然,对于它的分离纯化、结构和定量分析的方法学也得到迅速发展。应用薄层色谱(TLC)法分析神经节苷脂是比较成熟的技术^[14~19]。常用含石膏的硅胶色谱板,使用氯仿-甲醇-水体系作为展开剂,显色剂为间苯二酚-盐酸混合液,在 580nm 处经光密度薄层扫描仪进行定量^[20,21]。由于各条谱带显色反应完全程度的不同以及板与板之间质量上的差异,

使定量的误差较大。而且分离效率和检测灵敏度远远满足不了低含量和复杂体系生物样品的分析要求。为了提高检测的灵敏度和改善分离效率,高效液相色谱(HPLC)技术已被应用到神经节苷脂的分析上。本文就这方面作一简介。

2 神经节苷脂的高效液相色谱分离

(1)HPLC 对高沸点、不挥发性化合物是一个非常有效的分离和检测手段。成功的分离神经节苷脂首先是在硅胶的正相色谱上进行的^[22~29]。通常用氯仿-甲醇-水或者异丙醇-正己烷-水体系作流动相,神经节苷脂按其含糖残基的数目完全分开。其流出顺序是随着糖残基的增加而保留时间增长。图 1 是神经节苷脂的对溴苯甲酰甲基酯在硅胶柱上的分离谱图^[32]。从图 1 可以看到在含有相同数目唾液酸残基的 GM_{1a}, GM₃, GM₂ 和 GM₁ 中,糖链最短的 GM_{1a} 先被洗脱下来,最后流出的是糖链最长的 GM₁。GD_{1a} 和 GM₁ 含有相同数目(4 个)糖的残基。而在 GD_{1a} 的分子中所含两个唾液酸的羧基被酯化,使它带上两个疏水的苯环,从而它的极性变得比 GM₁ 的衍生物要弱,所以它在 GM₁ 的前面流出。

(2)由于神经节苷脂的一端是亲水的糖链,另一端是疏水的脂肪链,所以反相色谱技术更适合于对

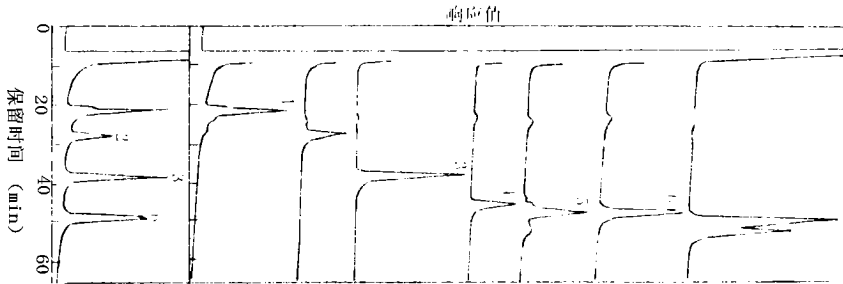


图 1 神经节苷脂的对溴苯甲酰甲基酯的 HPLC 谱图

色谱柱: Zorbax SIL 5~6 μ m(25cm \times 4.6mm i. d.); 流动相: 异丙醇-正己烷-水。1. GM_{1a}, 2. GM₃, 3. GM₂, 4. N-acetylneuraminosylacto- N -neutetraosyl ceramide, 5. GD_{1a}, 6. GM₁, 7. Fucosyl GM₁。

它的分离。一些实验室^[30~35]使用十八烷基或辛基键合硅胶柱,甲醇-水作为流动相,神经节苷脂按其含唾液酸基数目的差异得以分离。图 2 是人脑中混合神经节苷脂的对硝基苄基胍在十八烷基键合相柱上的分离谱图^[30]。首先流出的是样品中含唾液酸基最多的 GT_{1b}(3 个),其次是含两个唾液酸基的 GD_{1b}, GD_{1a}, 最后被洗脱下来的是含 1 个唾液酸基的 GM₁。GD_{1a} 和 GD_{1b} 是含相同数目的唾液酸基和相同数目的糖残基(4 个)。它们的差异只是唾液酸在糖链上连接位置的不同。图中的峰 3' 和 4' 分别为 GD_{1a} 和 GM₁ 的异构体(原文作者没有指出为何种异构体)。反相柱不但可以分辨出相差一个糖残基的神经节苷脂,而且对于唾液酸在糖残基连接位置不同的神经节苷脂以及其它异构体也有高的分辨率。

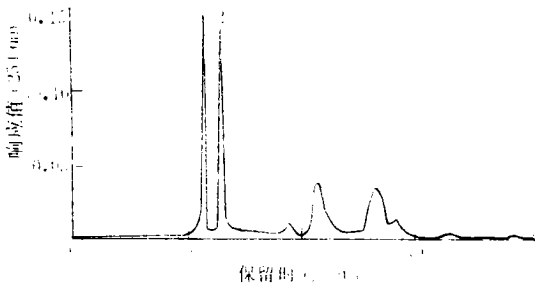


图 2 神经节苷脂的对硝基苄基胍在反相柱上的分离图
色谱柱: μ Bondopak C₁₈, 10 μ m (30cm \times 2mm i. d.); 流动相: 甲醇-水; 峰: 1. GT_{1b}, 2. GD_{1b}, 3 和 3'. GD_{1a}, 4 和 4'. GM₁。

(3) 神经节苷脂的结构特点是在它的寡糖链上结合一个或几个唾液酸基团。沿袭了它的柱色谱法, HPLC 的离子色谱技术被应用在神经节苷脂的分离上。首先是 Watanabe^[36] 和 Mansson^[37] 使用离子交换树脂柱(DEAE-CPG 和 Mono Q), 用含盐的流动相体系, 以浓度梯度洗脱, 神经节苷脂按其含唾液酸残基的数目分开。氨基键合相一般是作为极性固定相在正相洗脱下使用。但是由于氨基的碱性, 在酸性水溶液中可作为一种弱离子交换剂。另外氨基与糖分子中的羟基也可发生反应。所以对于神经节苷脂来说, 在氨基键合柱上的保留机理是基于唾液酸上的羧基和糖链上的羟基与氨基作用的结果。当然流动相中盐的浓度和 pH 是影响分离效率的主要因素。图 3 给出了在氨基键合相的 Lichrosorb-NH₂ 柱上对于 9 种未衍生的神经节苷脂的分离结果。从图 3 中可以看到分离极为成功。

3 神经节苷脂的化学衍生方法

细颗粒填料的高效液相色谱柱和多元梯度洗脱

装置的发展, 使 HPLC 成为分离神经节苷脂的混合物和异构体的有效技术。Jiaden^[22] 的实验室首先应用 HPLC 分离未进行衍生化的神经节苷脂。检测是在移动丝火焰离子化检测器上进行的。但这种检测器与 HPLC 匹配不是十分适宜的, 尚未能普遍采用。有一些实验室在硅胶柱或离子交换柱上直接分离神经节苷脂, 定量是在薄层板上经光密度扫描来完成的^[24~26, 28, 36]。HPLC 常用的检测器是紫外和荧光检测器, 它们具有选择性好, 灵敏度高的特点。神经节苷脂有微弱的紫外吸收, 直接在 195~215nm 处测定, 其紫外吸收峰灵敏度较低^[31, 34, 38~41], 一般为 nmol 甚至 mmol 级水平。为了解决检测问题, 发展了柱前化学衍生化方法, 就是说在柱前将样品制备成各种衍生物, 而这些衍生物或者有荧光或者对紫外敏感, 以达到痕量检测的目的。

(1) 全苯甲酰化反应是用苯甲酰氯与神经节苷脂在密封的微型反应器中进行。在 37 C 下保温 12~24 小时, 各种神经节苷脂都能完全衍生化^[27]。糖链上所有的羟基和氨基全部被苯甲酰化。由于这种衍生物含有多个苯甲酰基, 故在紫外检测器上有高的响应值, 其检测灵敏度可达 pmol 水平。McCluer 等人^[42] 首先采用这种衍生技术分析中性糖鞘脂。Lee^[27] 和 Ullman^[43] 应用这种方法, 将样品中的中性和酸性糖鞘脂同时进行苯甲酰化, 然后用 HPLC 进行分离和定量分析。值得注意的是在反应前, 必须将样品、苯甲酰氯、吡啶介质以及所用的玻璃器皿进行充分干燥。

(2) 羰基容易和含氮亲核试剂进行加成反应。常用来作为标记羰基的紫外或荧光试剂有 2, 4-二硝基苯肼、对硝基苄基胍和丹磺酰肼等。神经节苷脂的分子中没有可以进行直接标记的羰基, 需在标记反应之前进行一次预反应, 使其转为带有羰基的化合物, 如长链碱上 3 位碳上的羟基可被 2, 3-二氯-4, 5-二氧基苯醌氧化成羰基^[44], 也可以用半乳糖氧化酶将寡糖链末端的半乳糖或 N-乙酰半乳糖的 6 位碳的羟基氧化成醛基^[45]。烯烃与臭氧在低温时极易反应生成臭氧化合物, 经进一步处理分解为醛或酮。Traylor^[30] 报道神经节苷脂与臭氧反应, 经三苯磷处理, 长链碱上的 C=C 双键被氧化成醛基。然后在甲醇介质中与对硝基苄基胍在 45 C 下反应 15 分钟, 将神经节苷脂转化为紫外敏感的衍生物。为了除去过量的反应试剂和杂质, 反应的混合物需经 DEAE-Sephadex-A-25 柱色谱预先处理, 继而应用 C₁₈ 键合柱分离, 254nm 紫外检测。又如神经节苷脂

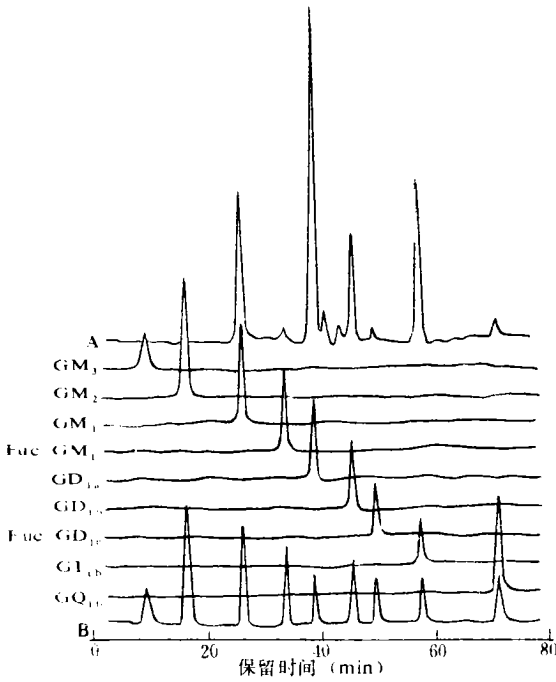


图3 混合神经节苷脂在氨基键合柱上的分离

色谱柱: Lichrosorb-NH₂, 7μm(25cm×2mm i. d.); 流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液(5~20mmol/L)。A为牛脑中神经节苷脂, B为标准神经节苷脂。

糖链末端的唾液酸可在温和的高碘酸氧化作用下失去8位和9位碳, 而7位碳上羟基被氧化成醛基。Spiegel等人^[46,47]应用这种方法得到唾液酸上含醛基的神经节苷脂, 然后用含氮的荧光染料进行标记。生成的衍生物具有强荧光, 不仅能用于细胞表面糖脂的荧光探针, 也可用于液相色谱分析。

(3)除羟基和羰基之外, 神经节苷脂分子中唾液酸的羧基可作为直接引进紫外或荧光基团的结合部位, 羧基很容易与酰甲基溴反应生成酯。使用较多的有萘甲酰甲基溴、对硝基苯甲酰甲基溴和对甲氧基苯甲酰甲基溴等, 都可生成类似的紫外吸收衍生物。首先研究神经节苷脂上羧基标记反应的是日本东京大学的Nakabayashi等人^[32], 他们在温和条件下, 成功地将对溴苯甲酰甲基标记到唾液酸的羧基上。反应前后不需作任何处理步骤, 衍生的混合物可直接在正相的硅胶柱或反相的键合柱上分离并进行紫外检测。4-溴甲基-7-甲氧基香豆素是专一标记羧基的强荧光试剂。作者在实验中使用二甲基甲酰胺作为介质, 60℃反应1小时, 可定量地将神经节苷脂转化为荧光衍生物^[48](GM₁的转化率为94%)。将衍生后的混合物直接进行TLC或HPLC的荧光分析。比

较所述的几种标记反应方法, 唾液酸羧基上的标记反应可能是更值得推荐的方法, 原因是这种反应具有专一性强和操作手续简便的优点。

4 小结

综上所述, 由于神经节苷脂既含亲水的糖链, 又含疏水的脂肪链, 加之唾液酸上羧基的性质, 故它在正相的硅胶柱、反相的键合柱以及离子交换柱均获得满意的分离。此外人们又发展了各种化学衍生化方法, 将它接上有强紫外吸收或具有荧光的有机基团, 提高了检测的灵敏度, 使HPLC成为分析神经节苷脂的有效技术。可根据样品来源、含量种类来选择色谱柱和衍生化方法。

关键词 高效液相色谱, 神经节苷脂, 柱前衍生

参考文献

- 1 Svennerholm L. *J Neurochem*, 1963;10:613
- 2 Holmgren J. *Nature (London)*, 1981;292:413
- 3 Haywood A M. *J Mol Biol*, 1974;83:427
- 4 Hakomori S. *Annu Rev Biochem*, 1981;50:733
- 5 Rahmann H. *Neurochem Int*, 1983;5:539
- 6 Svennerholm L. *Neurochem Int*, 1983;5:549
- 7 Burlingame A L, Meckley J A. *Biological Mass Spectrometry*, B V Amsterdam; Elsevier Science, 1990;363
- 8 Bremer E G, Hakomori S, Bower-Pope D F *et al.* *J Biol Chem*, 1984;259:6818
- 9 Srinivas L, Grindhart T D, Colburn N H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982;79:4988
- 10 Dawson G, Kravis E B. *Adv Exp Med Biol*, 1984;174:341
- 11 Hakomori S. *Can Res*, 1970;30:2930
- 12 Tockman M S, Gupta P K *et al.* *J Clin Oncol*, 1988;6:1685
- 13 Hakomori S. *Adv Cancer Res*, 1989;52:257
- 14 Svennerholm L. *Biochim Biophys Acta*, 1957;24:604
- 15 Eberlein K, Gerchen G. *J Chromatogr*, 1975;106:425
- 16 Zanetta J P, Breckenridge W C, Vincendon G. *J Chromatogr*, 1972;69:291
- 17 Harth S E, Dreyfus H, Urban P F *et al.* *Anal Biochem*, 1978;86:543
- 18 Klenk E, Gielen W. *Hoppe-Seyler's Z, Physiol Chem*, 1961;323:126
- 19 Zanetta J P, Vitiello F, Vincendon G. *Lipids*, 1980;15:1055
- 20 Ando S, Chang N C, Yu R K. *Anal Biochem*, 1978;89:437
- 21 Ledeen R W, Yu R K. In: Marks N, Rodnight K, eds. *Research methods in neurochemistry*, Vol N, New York: Plenum Press, 1978:373
- 22 Jiaden U R, Krol J H, van Hoeven R P *et al.* *J Chromatogr*, 1977;136:233

- 23 Bremer E G, Gross S K, McCluer H. *J Lipid Res*, 1979;20:1028
- 24 Watanabe K, Arao Y. *J Lipid Res*, 1981;22:1020
- 25 Kannagi R, Nudelman E, Levery S B *et al.* *J Biol Chem*, 1982;257:14885
- 26 Kundu S K, Scott D D. *J Chromatogr*, 1982;232:19
- 27 Lee W M F, Westrick M A, Macher B A. *Biochimica Biophysica Acta*, 1982;712:498
- 28 Hakomori S, Nudelman E, Levery S B *et al.* *Biochim Biophys Res Commun*, 1983;113:791
- 29 Miyazaki K, Okamura N, Kishimoto Y *et al.* *Biochem J*, 1986;235:755
- 30 Traylor T D, Koontz D A, Hogan E L. *J Chromatogr*, 1983;272:9
- 31 Kadowaki H, Evans J E, McCluer R H. *J Lipid Res*, 1984;25:1132
- 32 Nakabayashi H, Iwamori M, Nagai Y. *J Biochem*, 1984;96:977
- 33 Gazzotti G, Sonnino S, Ghidoni R *et al.* *J Neurosci Res*, 1984;12:179
- 34 Sonnino S, Ghidoni R, Gazzotti G *et al.* *J Lipid Res*, 1984;25:620
- 35 徐桂芸,常理文. 第七届全国色谱学术讨论会文集,北京,1989:483
- 36 Watanabe K, Tomono Y. *Anal Biochem*, 1984;139:367
- 37 Mansson J E, Rosengren B, Svennerholm L. *J Chromatogr*, 1985;322:465
- 38 Gazzotti G, Sonnino S, Ghidoni R. *J Chromatogr*, 1985;348:371
- 39 Ando S, Waki H, Kou K. *J Chromatogr*, 1987;408:285
- 40 Previti M, Dotta F, Pontieri G M *et al.* *J Chromatogr*, 1992;605:221
- 41 Handa S, Kushi Y. *Adv Exp Med Biol*, 1982;152:23
- 42 McCluer R H, Evans J E. *J Lipid Res*, 1973;14:611
- 43 Ulliman M D, McCluer R H. *J Lipid Res*, 1985;26:501
- 44 Ghidoni R, Sonnino S, Masserini M *et al.* *J Lipid Res*, 1981;22:1286
- 45 Gahmberg C G. *J Biol Chem*, 1973;249:4311
- 46 Spiegel S. *Methods in Enzymology*, 1987;138:313
- 47 Spiegel S, Yamada K M, Hom B E *et al.* *J Cell Biol*, 1985;100:721
- 48 Xu G Y, Chang L W. In: Chen Z ed. *Proceedings of the First Changchun International Symposium on Analytical Chemistry*, Changchun, 1990, Jilin University Press, 1990:63

中科院三联气体技术中心大连化物所分部

为用户提供国内领先的气体净化及微量气体分析测试技术

● 色谱载气、仪器仪表零点气体系列净化管

1. 高效变色脱氧管:净化深度 $O_2 < 0.01$ (气体浓度单位均为 $10^{-6} V/V$), $H_2O < 0.1$, $CO_2 < 0.1$ 。
2. 高效变色脱水管(发明专利 93110031):净化深度 $H_2O < 0.1$ ($-90^\circ C$), $CO_2 < 0.1$ 。
3. 变色脱氢管:净化深度 $H_2 < 0.01$ 。
4. 一氧化碳、氢气净气管:净化深度均 < 0.1 。
5. 甲烷净化管:净化深度 $CH_4 < 0.1$ 。

● 气体小型净化器

净化 N_2, H_2 , 空气等气体中的 $H_2, O_2, N_2, H_2O, CH_4, CO, CO_2$, 净化深度 < 0.1 。

● 高纯气体分析测试、仪器改装技术服务

经国家技术监督局计量认证合格,我们的微量气体分析测试具有公证性;有丰富的实践经验为您的仪器提高分析灵敏度、准确度。

● 常量氧(0.1%~100%)、微量氧(0.1~2000)分析仪

联系人:王武明 王瑞升

电话:(0411)3631841—322

地址:大连市中山路 161 号

邮编:116012