

阴离子交换分离-脉冲安培检测 分析糖类化合物的进展*

牟世芬 李宗利

(中国科学院生态环境研究中心 北京 100085)

提要 简述了糖的主要生物学作用及测定糖的主要方法,重点讨论了近年来建立起来的高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测(HPAEC-PAD)技术,对此技术的基本理论、应用现状及优缺点进行了较为详细的叙述。

关键词 高效阴离子交换色谱法,脉冲安培检测,糖类化合物

1 前言

糖是生物界中分布极广、含量较多的一类有机物质,几乎所有的动物、植物、微生物体内都含有它。糖类物质的主要生物学作用是通过氧化而放出能量,以满足生命活动的需要。它还是非光合生物的最终能源和碳源,而且它们在结构上也起着重要作用^[1]。近年来,随着分析手段的不断发展完善,糖化学有了长足的进展。糖蛋白中有关糖链的结构知识已经和正在以指数的速度不断增长,它们的结构与功能的关系以及在生命活动中的作用从分子水平和细胞水平上逐步为人们所揭示和认识。细胞间的相互识别和作用^[2]、癌转移^[3]、溶菌酶的胞内迁移^[4]、细胞自身的代谢和对脂质的调控、受精与细胞的凝集、细胞的病变、激素与受体以及抗原与抗体间的结合和相互作用等现象,无一不与体内的复合糖密切相关^[5,6]。还有一些糖类化合物具有润滑剂、血型决定簇、细胞抗冻等不同的功能^[7]。糖链还有能保护蛋白质不易变性和避免受酶的水解等功能。这些发现证明糖是生物体内的重要信息物质,在生命过程中发挥着重要的生理功能,使长期被忽视的糖蛋白一跃成为生命科学研究的中心^[5]。用来阐明一些自然来源的糖类的生物反应性的结构基础的研究常常需要分离寡糖(通常来自糖蛋白)或糖脂的复杂混合物。要解释抗体^[8,9]、外源凝聚素^[10,11]以及糖基转移酶^[12,13]的专一性还需要分离仅仅一个连接位置不同的寡糖。

对糖的分析方法可以分为两类:一类是以色谱

技术为基础,另一类则利用其它的不同方法。在非色谱技术中,主要是酶学方法。尽管酶学方法非常灵敏和具有高的特异性,但受到样品中污染物引起的干扰的限制,而且酶的来源和纯化也是一个至关重要的问题,因此相比较而言,色谱技术可能更为有用。

用来分析糖类化合物的色谱技术有很多种,包括非常廉价的纸色谱、各种不同的薄层色谱(TLC)、高效薄层色谱(HPTLC)、气相色谱(GC)、超临界流体色谱(SFC)、开柱液相色谱和高压液相色谱(HPLC)等。近年来,高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测(HPAEC-PAD)技术的发展和不断完善给糖类分析提供了一个非常有力的工具。本文主要就此领域的基本理论、应用现状及前景作一简单的概括。

2 基本理论

中性糖类为pKa在12~14之间的弱酸(表1),在高pH值的淋洗液中,例如10~200mmol/L NaOH中,它们会部分或全部以阴离子形式存在,可以在阴离子交换柱上被保留并得到分离。阴离子交换分离是在碱性条件下完成的,检测方法必须与此相匹配——金电极的脉冲安培检测器适合这个条件。在碱性条件下,贵金属电极例如金电极的表面可为糖的电化学氧化反应提供一个反应途径。图1表示脉冲安培检测中葡萄糖在金电极上的氧化作用。有关糖的这两个方面的特性已经被用来发展了一种全新的色谱分析方法——高效阴离子交换分离-脉冲安培检测(HPAEC-PAD)技术^[14]。

* 欣闻今年为卢佩章先生七十华诞,藉此文发表之际向卢老表示祝贺
本文收稿日期:1995年5月26日

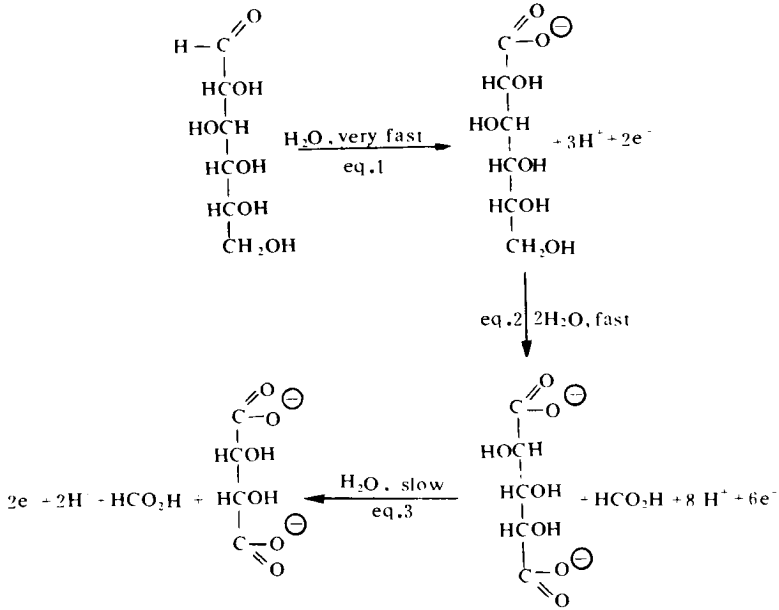


图1 脉冲安培检测中葡萄糖在金电极上的氧化作用

摘自 Johnson D C, LaCourse W R. Anal Chem. 1990;62:589A~597A.

表1 一些常见糖的高解常数(在25℃水中)

糖类	pKa
果糖	12.03
甘露糖	12.08
木糖	12.15
葡萄糖	12.28
半乳糖	12.39
半乳糖醇	13.43
山梨醇	13.60
α -甲基葡萄糖苷	13.71

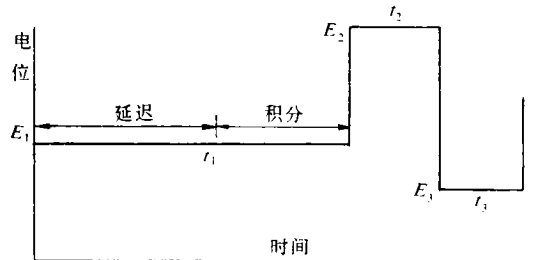


图2 脉冲安培检测中的三电位序列

普通的安培检测器不能用于糖的检测,主要原因是氧化产物对电极的不可逆污染。脉冲安培检测使用重复的三个施加电位: E_1 , E_2 及 E_3 。这三个电位施加在三个特定的时间段上: t_1 , t_2 及 t_3 。电位的选择可以通过电化学实验来确定,最常用的是循环伏安法。如图2所示, E_1 是工作电位,在该电位测量糖的氧化电流; E_2 为较 E_1 高的清洗电位,用于完全氧化电极表面,使糖的氧化物脱离电极;继而将施加电位降到较 E_1 负得多的电位 E_3 ,使金电极表面还原到金本身。然后电位再回到 E_1 , E_2 和 E_3 ,依次自动循环。实际上,只有 t_1 时间段的电流才被测量,在此时间段中加到池子上的电位为 E_1 ,由脉冲电位产生的总电流是几个电流之和,其中最重要的电流为糖氧化电流。除此之外,还有电极表面的充电电流及金电极本身的氧化所产生的电流。在 t_1 时间开始后延迟几十

到几百个毫秒再测量电流可改善糖氧化电流对其它电流的比率,从而得到较高的信噪比。

3 应用现状

自从 Rocklin 和 Pohl^[14]首先提出用阴离子交换分离-脉冲安培检测分析糖类化合物以来,一方面出现了许多用此法进行糖类化合物分析的例子,另一方面仪器的发展和不断完善也为分析工作者提供了更为有力的手段,使应用的范围更广,检测限更低。

从仪器的发展情况看,Dionex 公司在此领域可谓独领风骚。继最初的 Dionex HPIC-AS6柱之后,又先后开发了专门用于糖分析的三种分离柱:CarboPac PA1, CarboPac MA1和 CarboPac PA100。PA1柱主要用于分离还原性的单糖、直链的寡糖和多糖;MA1柱主要用来分离一些在 PA1柱上弱保留

的单糖和双糖类,例如糖醇;而PA100柱则主要用来分离复杂的具有支链结构的寡糖。这些柱子的填料均为薄壳型阴离子交换树脂。树脂基核为粒度较大(8~13 μm)的苯乙烯/二乙烯基苯共聚物,流动特性好,反压小。具有离子交换功能基的胶乳小珠附聚于基核表面,因而极易接近溶质分子,传质速度快。胶乳和基核都具有明显的疏水性。分离机理结合了阴离子交换和疏水的相互作用,因而可有效地用于单糖和低聚糖的分离。PAD检测器也从最初的形式经过PED-1发展到最新的ED-40,其灵敏度从最初的50nmol提高到现在的1pmol。

较早时期的工作主要偏重于不同来源的单糖及寡糖的分析。Edwards等^[15]使用Dionex HPIC-AS6柱,以氢氧化物和醋酸盐为淋洗液,分析了木材及木材纸浆中的单糖。Hardy等^[16]使用同样的柱子,以22mmol/L NaOH为淋洗液,分析了来自几种糖蛋白、糖脂和寡糖水解产物中的单糖,其定量极限低于100pmol($S/N = 184:1$)。牟世芬等^[17]利用AE-PAD分析了木糖的寡聚物和一些单糖,木糖的寡聚物的测定限为0.08~0.01nmol。Lampio等^[18]用高压液相色谱(Waters Dextro-Pak 塑性柱)分离,水为淋洗液,柱后加入100mmol/L NaOH, PAD检测分析了糖蛋白及糖脂中的单糖。

近期的工作主要集中在各种复合糖,尤其是糖蛋白中寡糖链的组成、结构等方面的分析^[19]。Townsend等^[20]使用PA1柱来分离各种中性的、唾液酸基化的和磷酸化的寡糖,并比较了它们在PAD

检测器上的响应系数。Hardy和Townsend^[21]用高效阴离子交换色谱会同PAD检测了寡糖和糖肽的位置异构体。四糖和含有十一糖的糖肽的1-3和1-4位置异构体在HPAEC上的分辨率优于以前的反相和胺联的固定相的分离。他们还比较了来自牛胎球蛋白的两种具有三级分支结构的糖肽的不同定量方法,即PAD和¹HNMR。Rohrer等^[22]用反相高效液相柱分离了牛胎球蛋白的胰蛋白酶消解产物,再分别以PA1和PA100柱配合脉冲安培检测器分析了其中的单糖和寡糖,以帮助鉴定其中的糖肽。这个方法不需样品衍生就能鉴定4种天冬酰胺连结(N-连)的糖肽和至少7种丝氨酸或苏氨酸连结(O-连)的糖肽。Vessels和Radding^[23]使用高效阴离子交换色谱对在真菌葡聚糖合酶反应中形成的多糖进行比较定量分析,发现使用该法对1,3- β -糖苷键连结和1,4- α 连结的葡萄糖的多聚体能够容易地加以区分。Weitzhandler等^[24]用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离糖蛋白并将其电迁移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,将在PVDF膜上染色的蛋白质进行酸性水解之后,再用HPAEC/PAD分析全部的单糖组成,据此可以明确地确定一个蛋白是否连有糖基。同时,利用一些特定的糖苷内切酶进行消解,用HPAEC/PAD分析释放出的寡糖,可以得到更多的结构信息。

4 方法的优缺点

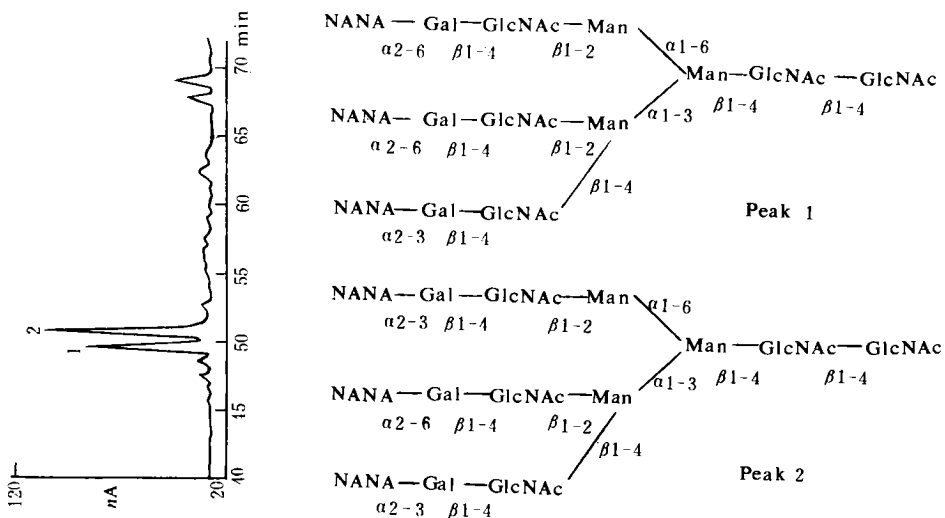


图3 仅一个连接位置不同的三唾液酸基化寡糖的分离

HPAEC/PAD 的一大优点就是它不需预先衍生就能分析几乎所有的单糖和大部分的寡糖及低聚糖,这不仅节约了大量的时间和金钱,而且避免了一些有毒的衍生试剂的使用,减少了环境污染。此外,现有的商品分离柱及设备的高分辨率使得轮廓(profileing)分析,即对特定糖蛋白中寡糖的类型和含量进行分析成为可能。在组成、结构、大小上非常相近的单糖及寡糖也可得到很好的分离。图3表示仅有一个连接位置不同(1号峰为 α 2-6连接,2号峰为 α 2-3连接)的两个寡糖可在PA100柱上得到很好的基线分离。条件:分离柱为CarboPac PA-100,淋洗液为100mmol/L NaOH溶液,在110 min内NaOAc的浓度从0增到250mmol/L,流速为1mL/min,检测器为PAD(金电极)。图4表示用HPAEC/PAD分析流体动力学体积相近的寡糖的谱图。条件:分离柱为CarboPac PA-100+保护柱,淋洗液为250mmol/L NaOH溶液,在20min内NaOAc的浓度从0增到80mmol/L,流速为1mL/min,进样量为25 μ L(0.5 μ g),检测器为PAD(金电极)。从图4中可以看出这种分离柱的巨大分离能力。

强碱性的淋洗液至少有下列好处:1)快速的端头异构平衡,2)增加了某些寡糖及多糖的溶解性。使用强碱性的淋洗液可能遇到的问题包括还原糖会发生醛糖-酮糖的转化,即Lobry de Bruyn-Van Ekenstein转化,胺基化糖的水解以及3位氧结合的糖化物的 β 消除(β -elimination)。但是,相对于色谱分离的时间来说,这些反应都很慢,不至于影响到糖的色谱分离^[7,23]。由于PAD检测器的灵敏度与pH密切相关,在pH 13时检测最为灵敏,所以当使用较低pH的淋洗液进行分离时,就需要在柱后加入一个较浓的碱液以便获得合适的灵敏度。在梯度淋洗中也常用柱后加入来保证一个平稳的基线。尽管一些样品在碱性溶液中有较好的溶解性,但其原样品却由于差向异构的问题而不能保存在碱性溶液中。NaOH淋洗液在空气中易吸CO₂而产生Na₂CO₃,使用50%的浓碱液可部分地解决这个问题。对于强保留的糖,还需在NaOH淋洗液中加入“推动”离子OAc⁻。碱性淋洗液的腐蚀也给操作带来了麻烦,Dionex公司的BioLc系统可耐受pH~14的淋洗液而不会产生腐蚀的问题。

PAD检测器的一个最大优点就是它的高灵敏度。低至pmol级的糖类也可得到很好的检测,结果见图5。条件:分离柱为CarboPac PA1,淋洗液为100mmol/L NaOH,流速为1.0mL/min,进样量为

25 μ L,检测器为ED-40,金电极。此外,它的无区别与不统一的检测特性可以很容易地进行非还原糖的测定^[26]。但是,也正是这两个特性造成了此检测方法的一些缺陷。不仅是糖类,还有氨基酸、肽类或有机酸均能产生正的响应值,这就需要对真正的糖类或含糖物质的峰加以确定。由于PAD不能对不同的寡糖产生统一的摩尔响应值,这样为了定量就必须得到每个寡糖的实际摩尔响应值。

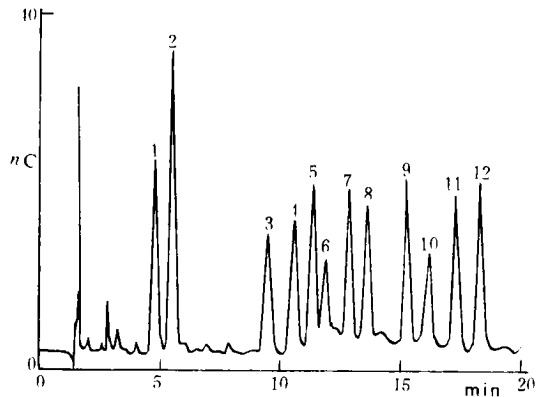


图4 流体动力学体积相近的寡糖的HPAEC/PAD分析
峰号: 1. Fucosylated Man₃GlcNAc₂ (GP17), 2. Man₃GlcNAc₂ (GP18), 3. Asialo agalacto bi, core fuc (GP15), 4. Asialo agalacto bi (GP16), 5. Man₃GlcNAc₂ (GP11), 6. Asialo agalacto tri (GP14), 7. Asialo bi, core fuc (GP07), 8. Asialo bi (P101), 9. Asialo tri (FT02), 10. Bisected hybrid (GP12), 11. Asialo tetra (GP05), 12. Man₃GlcNAc₂ (GP10)。

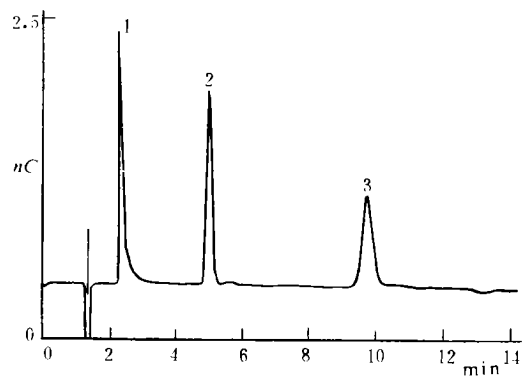


图5 三种糖的HPAEC/PAD分析

峰号: 1. Sorbitol 10pmol, 2. Glucose 10pmol, 3. Sucrose 10pmol。

另外,HPAEC的分辨率高但柱容量较低,这给柱后收集各组份进行更深入的分析带来了一些操作

上的困难。现在已经出现了半制备性的柱子,例如 Dionex CarboPac PA1(9×250mm),可有效地解决这一问题。

尽管存在各种不足,但 HPAEC/PAD 方法正在不断发展完善,尤其是与特定的内、外切酶配合,辅以别的分析方法,将会在复合糖的研究中显示出迷人的魅力。

参 考 文 献

- 1 沈 同,王镜岩.生物化学(上册).北京:高等教育出版社,1990:10
- 2 Riopelle R J, Dow K E. In: Gorczynski R M ed. Receptors in cellular recognition and developmental processes, San Diego, CA: Academic, 1987:215
- 3 Dennis J W, Laferte. *Cancer Res*, 1985;45:6034
- 4 Sahagian G G. In: Olden K, Parent J B eds. Vertebrate lectins, New York: Van Nostrand Reinhold, 1987:46
- 5 惠永正,陈耀全.化学与生命科学.北京:化学工业出版社,1991:128
- 6 Gahmberg C G, Karhi K K. In: Corczynski R M ed. Receptors in cellular recognition and developmental processes, San Diego, CA: Academic, 1987:251
- 7 Olechno J D, Carter S R, Edwards W T *et al.* *American Biotechnology Lab*, 1987;Sept/Oct:38
- 8 Wood E, Lecomte J, Childs R A *et al.* *Mol Immunol*. 1979;16:813
- 9 Abe K, McKibbin J M, Hakamiri S-i. *J Bio Chem*, 1983;258:11793
- 10 Hindsgaul O, Khare D P, Bach M *et al.* *Can J Chem*, 1984;63:2653
- 11 Townsend R R, Hardy M R, Wong T C *et al.* *Biochemistry*, 1986;25:5716
- 12 Paulson J C, Weinstein J, Souza-E-Silva U. *Eur J Biochem*, 1984;140:523
- 13 Blanken W M, Hooghwinkel G J M, van den Eijnden D. *Eur J Biochem*, 1982;127:547
- 14 Rocklin R D, Pohl C A. *J Liq Chromatogr*, 1983;6:1577
- 15 Edwards W T, Pohl C A, Rubin R. *Tappi Journal*, 1987;70(6):138
- 16 Hardy M R, Townsend R R, Lee Y C. *Anal Biochem*, 1988;170:54
- 17 Mou Shifen, Sun Qun, Lu Depei. *J Chromatogr*, 1991;546:289
- 18 Lampio A, Finne J. *Anal Chem*, 1991;197:132
- 19 Townsend R R, Hardy M R. *Glycobiology*, 1991;1(2):139
- 20 Townsend R R, Hardy M R, Hindsgaul O *et al.* *Anal Biochem*. 1988;174:459
- 21 Hardy M R, Townsend R R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988;85:3289
- 22 Rohrer J S, Cooper G A, Townsend R R. *Anal Biochem*. 1993;212:7
- 23 Vessels J M, Radding J A. *Anal Biochem*, 1993;215:150
- 24 Weitzhandler M, Kadlecck D, Avdalovic N *et al.* *J Bio Chem*, 1993;268:5121
- 25 Dionex Corporation. *Technical Note 20*, Sunnyvale, CA, USA, 1987
- 26 Lee Y C. *Anal Biochem*, 1990;189:151

The Progress of Carbohydrates Determination by Anion Exchange Separation with Pulsed Amperometric Detection

Mou Shifen and Li Zongli

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, the Chinese Academy Sciences, Beijing, 100085)

This paper described biological importance of carbohydrates and major procedures for the determination of carbohydrates briefly. The emphasis of the article was laid upon the discussion of newly developed high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) technique for the determination of carbohydrates. The basic principle, current application situation, advantages and drawbacks of this technique were recounted in greater detail.

Key words high performance anion exchange chromatography, carbohydrates, pulsed amperometric detection