

葡萄糖及其衍生物的直接紫外检测毛细管区带电泳研究

许 峰, 祝文君, 毛秀丽, 戴忠鹏, 张 青,
杜昱光, 梁鑫淼, 林炳承

(中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要 :发展了在 195 nm 波长下直接检测葡萄糖及其衍生物的毛细管区带电泳方法。在未涂渍石英毛细管中,以 50 mmol/L Na_2HPO_4 -50 mmol/L NaH_2PO_4 为缓冲液体系(接近生理条件 pH 7.4),分离了葡萄糖及其衍生物(葡萄糖胺、*N*-乙酰葡萄糖胺和葡萄糖酸钠)。在各自相应的浓度范围内,峰面积与样品浓度之间呈现良好的线性关系。方法简单、快速、重复性好,为研究葡萄糖及其衍生物与凝集素的相互作用奠定了分离检测的基础。

关键词 :毛细管区带电泳;直接紫外检测;葡萄糖;衍生物

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-871X(2002)02-0156-03

Direct UV Detection of Glucose and Its Derivatives in Capillary Zone Electrophoresis

XU Feng, ZHU Wen-jun, MAO Xiu-li, DAI Zhong-peng, ZHANG Qing,
DU Yu-guang, LIANG Xin-miao, LIN Bing-cheng

(Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract : UV labeling detection has been commonly used to determine the association constants between lectins and saccharides, but the interaction is always between the labeled carbohydrates, rather than the truly underivatized carbohydrates, and lectins. In order to directly detect saccharides during the study on the interaction of glucose and its derivatives with lectins (e. g., concanavalin A), a capillary zone electrophoretic method with detection at a wavelength of 195 nm has been developed. The influences of various separation conditions including buffer concentration, pH and voltage were investigated. By using an uncoated silica capillary (50 μm i. d., 375 μm o. d., 48.5 cm of total length, and 44.0 cm to the detector) and 50 mmol/L Na_2HPO_4 -50 mmol/L NaH_2PO_4 solution (near to the physiological pH of 7.4) as buffer, the underivatized sugars, including glucosamine, *N*-acetylglucosamine, glucose, and sodium gluconate, were sufficiently separated within 11 min at an applied voltage of 10 kV. On-column UV monitoring allowed the detection of these compounds at less than 4 mmol/L level, and quantification by the peak area method allowed reproducible determination of them at least at their respective concentration ranges. The method is characterized by its simplicity, rapidity, and reproducibility, and should be useful for the analysis of the interaction of glucose and its derivatives with lectins.

Key words : capillary zone electrophoresis; direct UV detection; glucose; derivative

糖是生物体内普遍存在的、对生物体结构和生命活动起重要作用的一类物质。凝集素是非免疫来源的、不具有酶活性的糖结合蛋白,具有多种生物功能,如细胞识别和受体功能等。糖的重要性体现在它与其它生命物质(主要是凝集素)之间的相互作用方面^[1]。20世纪90年代以来,毛细管电泳因具有

分离快速、所需样品量少和自动化程度高的特点,已被用于分子间相互作用的研究^[2]。葡萄糖及其衍生物是研究糖与凝集素(如:伴刀豆球蛋白(Con A))相互作用的一类模型化合物。通常将不同浓度的一种反应物(如 Con A)加入运行缓冲液(又称载体)中,通过检测另一反应物(如糖)的迁移时间或游

收稿日期 2001-07-13

作者简介 许 峰,男,1964年生,副研究员,博士,E-mail: fengxu@dicp.ac.cn.

通讯联系人 林炳承,男,研究员,博士,电话/传真(0411)4379065,E-mail: bclin@dicp.ac.cn.

基金项目:中国科学院创新基金(KSCX 2-3-02-02)和国家自然科学基金重点基金(20035010)

离浓度变化,来测定衡量相互作用大小的结合常数^[3,4]。因此需要测定游离的糖浓度。毛细管电泳分析糖类化合物一般存在两个问题:一是大多数糖离解程度低,荷电性差,亲水性强,致使利用样品淌度差异进行分离的毛细管区带电泳法(CZE)和利用疏水性差异进行分离的胶束电动色谱法(MEKC)较难分离它;二是多数糖类不具备强的紫外或荧光发色基团,使检测有一定的难度。通常的解决方法有三种:第一,采用柱前衍生法来改变糖的性质,并引入强紫外或荧光发色团。如使用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮^[5,6]、8-氨基萘-1,3,6-三磷酸盐^[7]、2-氨基吡啶^[8]、对氨基苯甲酸乙酯^[9]等,但衍生法存在操作步骤多、易造成糖链的解离等问题。更主要的是衍生法测定的是糖的衍生物,而非真正的糖与糖蛋白的相互作用。第二种方法是用硼酸盐缓冲液作载体,利用糖基上相邻的 2 个羟基与硼酸根生成糖-硼酸根络合物,以增加糖的淌度差别和检测灵敏度^[10],但结果反映的往往是络合物与其他待研究溶质的相互作用。因此硼酸盐也不适合作为研究糖与糖蛋白相互作用的缓冲液。第三种方法是采用间接紫外测定法^[11],即在缓冲液中加入淌度适当的、具有一定紫外吸收的离子作为载体,载体与糖吸收值之差作为响应信号检出,但选择这种不影响相互作用研究的载体并非易事。因此目前常用的电泳方法^[12~14]尤其是前两种方法并不适合糖与糖蛋白的相互作用研究,因此有必要发展能直接定量测定溶液中糖的方法,以消除外界因素(如衍生、络合)对糖与凝集素相互作用研究结果的影响。

本文在未涂渍石英毛细管中,经考察缓冲液浓度、pH 值、运行电压等条件对糖分离的影响,发展了在 195 nm 下直接分析检测葡萄糖及其衍生物的毛细管电泳方法。

1 实验部分

1.1 材料和试剂

葡萄糖胺和 *N*-乙酰葡萄糖胺(和光纯药工业株式会社,日本大阪)、葡萄糖(沈阳化学试剂厂)、葡萄糖酸钠(湖州生物化学厂)、伴刀豆球蛋白(中科院上海生化所东风生化技术有限公司)标准品的纯度均在 99% 以上。其余试剂为分析纯。所用水为二次重蒸水。

1.2 仪器

Bio-Rad 公司 BioFocusTM3000 型全自动毛细管电泳仪。未涂渍石英毛细管柱(375 μm o.d., 50 μm i.d. \times 48.5 cm,有效长度 44.0 cm)购自河北永年光纤厂。

1.3 方法

将 50 mmol/L Na_2HPO_4 溶液和 50 mmol/L NaH_2PO_4 溶液按一定比例混合,即得到一定 pH 值的缓冲液。糖用缓冲液配制,进行 CZE 分析。电泳条件为:压力进样 27.6 kPa (\cdot s) (4 psi \times sec),正向运行电压 10 kV,恒压操作模式,柱温和盘温均为 20 $^\circ\text{C}$,195 nm 下检测。每次进样分析之间,用数倍柱体积的 1 mol/L 的 NaOH 和水分别淋洗毛细管柱,再用正极端缓冲液淋洗毛细管,以保证较好的迁移时间和峰面积的重现性。

2 结果与讨论

2.1 CZE 分离谱图

所分离的 4 种糖化合物的紫外吸收弱,只在 185 nm 附近有最大吸收,但在此波长下,要求缓冲液中的杂质含量低,否则会造成基线波动,故本文采用 195 nm,此波长既可保证有足够的灵敏度,又能使基线稳定。图 1 为 4 种糖化合物混合标样的毛细管区带电泳图。在 50 mmol/L Na_2HPO_4 -50 mmol/L NaH_2PO_4 缓冲液(pH 7.4)中,4 种化合物在比较短的时间(11 min)内获得分离。其理论塔板数分别是 55 000,62 000,64 000 和 66 000。

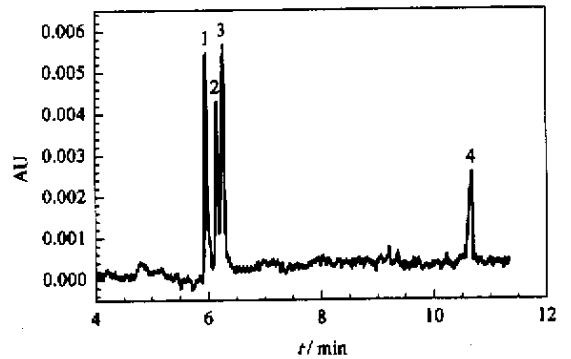


图 1 葡萄糖及其衍生物混和标样的毛细管区带电泳图
Fig.1 Electropherogram of a standard mixture of glucose and its derivatives by capillary zone electrophoresis

Capillary: 44.0 cm (effective length) \times 50 μm i. d., uncoated; buffer: 50 mmol/L Na_2HPO_4 -50 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 7.4); field strength: 206 V/cm; detection: UV absorption at 195 nm; temperature: 20 $^\circ\text{C}$; injection: 27.6 kPa (\cdot s) (4 psi \times sec) of mixture at the anode end.

Peaks: 1. glucosamine; 2. *N*-acetylglucosamine; 3. glucose; 4. sodium gluconate.

2.2 缓冲液浓度和 pH 对糖分离的影响

在 10 mmol/L ~ 100 mmol/L 的磷酸盐缓冲液浓度范围内,糖的迁移时间和分辨率随着磷酸盐浓度的增加而增加,但幅度较小。表明缓冲液浓度的影响不大。考虑到缓冲液浓度过高,则离子强度大,会使电流增大,柱效降低,本实验取磷酸盐浓度为

50 mmol/L。

pH 在 6.0 ~ 8.5 时 4 种糖化合物的迁移时间随缓冲液 pH 值的增大而略有增大,但幅度不大。pH 值在 7.0 ~ 8.5 时 4 种糖化合物分离最好。考虑到相互作用研究常在动植物的生理 pH 值(7.4)附近进行,本文选择 pH 值为 7.4。

2.3 运行电压对糖分离的影响

在 5 kV ~ 30 kV 时,提高运行电压可使分离时间缩短,但同时也会使电流增加,焦耳热影响增大。

本文选择运行电压为 10 kV,此时电流稳定在 36 μ A 左右。

2.4 定量校正曲线的绘制

取 6 种不同浓度的糖溶液(每种糖的浓度均在 0.6 mmol/L 到 150 mmol/L 之间)进行电泳实验,每个样品重复进样 4 ~ 6 次。以峰面积(Y),对浓度(X, mmol/L)作图。各化合物的线性关系见表 1。由表 1 可以看出,它们的线性关系良好。最低检测限(以 $S/N = 3$ 计)为 0.2 mmol/L ~ 4.0 mmol/L。

表 1 方法的线性关系和检测限

Table 1 Linearity and detection limit of the proposed method

Glucose and its derivative	Regression equation *	r	Linear range (mmol/L)	Detection limit (mmol/L)
Glucosamine	$Y = 3.421 \times 10^4 X + 1.12 \times 10^3$	0.995	5 - 30	0.92
N-Acetylglucosamine	$Y = 1.590 \times 10^5 X + 1.82 \times 10^3$	0.993	0.6 - 20	0.20
Glucose	$Y = 7.433 \times 10^3 X + 3.15 \times 10^3$	0.991	15 - 150	4.0
Sodium gluconate	$Y = 3.739 \times 10^4 X + 3.41 \times 10^3$	0.994	5 - 30	0.80

* Y :peak area ; X :saccharide concentration in mmol/L.

以标样连续进样结果计算迁移时间和峰面积的相对标准偏差(RSD),得迁移时间的 RSD 小于 0.4%,峰面积的 RSD 小于 2.6%(n = 6)表现出较好的重现性。又由于本方法能将 4 种糖化合物分离,因此有可能对研究 Con A 与多个单糖的交互作用(协同与拮抗作用)提供条件,使通常只能对单个糖与糖蛋白的相互作用的电泳研究扩展到对糖混合物与糖蛋白的研究。

3 结论

在 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4),温度 20 $^{\circ}$ C、电压 10 kV 的电泳条件下,未经紫外衍生的葡萄糖及其衍生物在 11 min 内获得了较好的分离。为研究单个糖类化合物与凝集素(如 Con A)的相互作用以及多个糖类化合物与 Con A 的协同或拮抗作用提供了一种新的途径。有关相互作用的研究将另文报道。

参考文献:

[1] Yin L H, Xu X, Xue J, *et al.* In: Lin B C, Li S F Y, Ma Y F, eds. Second Asia-Pacific International Symposium on Capillary Electrophoresis and Related Microscale Techniques. Dalian [s. n.], 1998. 57

[2] Honda S, Taga A, Suzuki K, *et al.* J Chromatogr, 1992, 597-377

[3] Mammen M, Gomez F A, Whitesides G M. Anal Chem, 1995, 67:3-526

[4] Penn S G, Bergstrom E T, Knights I, *et al.* J Phys Chem, 1995, 99:3-875

[5] Honda S, Akao E, Suzuki S, *et al.* Anal Biochem, 1989, 180:351

[6] Honda S, Ueno T, Kakehi K. J Chromatogr, 1992, 608:289

[7] Chiesa C, Horvath C. J Chromatogr, 1993, 645:337

[8] Nashabeh W, Rassi Z E. J Chromatogr, 1992, 600:279

[9] Vorndran A E, Grill E, Huber C, *et al.* Chromatographia, 1992, 34:109

[10] Hoffstetter-Kuhn S, Paulus A, Gassmann E, *et al.* Anal Chem, 1991, 63:1541

[11] Oefner P J, Vorndran A E, Grill E, *et al.* Chromatographia, 1992, 34:308

[12] Taga A, Mochizuki M, Itoh H, *et al.* J Chromatogr A, 1999, 839:157

[13] Taga A, Uegaki K, Yabusako Y, *et al.* J Chromatogr A, 1999, 837:221

[14] Honda S, Makino A, Suzuki S, *et al.* Anal Biochem, 1990, 191:228