

使用 TSKgel Amide-80 高效正相分配色谱填料 分离糖类 (2)*

* 请参阅本系列 055 号分离报告的第 1 部分。

目录

1. 简介	1
2. 与三种不同的氨基键合硅胶填料比较	1
3. 流动相中有机溶剂的效应	2
4. 添加氨类到流动相	4
5. 高灵敏度分析	6
6. 结论	7

1. 简介

糖类在工业应用中是非常重要的物质，可作为食品、造纸、纸浆、纤维、酿造或发酵产品以及医疗产品的原料。近年来发现复合碳水化合物中的糖类和糖链结构域对生物机能发挥作用，因此它们作为重要生化物质受到越来越多的关注。因此，工程、农业、科学、药学、医学等领域需要采取有效的方法对糖类或糖链进行分析。

有很多种采用高效液相色谱 (HPLC) 分离糖类的方法^{1,2}，包括硼酸络合阴离子交换色谱法、反相色谱法、正相色谱法、离子排斥色谱法、离子色谱法、凝胶过滤色谱法、配位体交换色谱法、亲和色谱法以及强碱性条件下的阴离子交换色谱法。

在这些方法中，正相色谱法基于亲水性差异对糖类进行分离。糖类的亲水性由其羟基的数量和方向决定。由于寡糖分子量可以通过保留或容量因子推断出来，糖类分离也被称为体积分离色谱³。

传统上，氨基键合硅胶⁴⁻⁶常被用作糖类正相色谱法的填料。然而，这些填料表现出较差的化学稳定性，且还原糖的回收率较低。为了克服这些缺点，我们研发了一种采用氨基酰基代替氨基丙基来键合硅胶的填料 (TSKgel Amide-80)，并使其商品化。这种新型的键合相旨在分析不饱和二糖⁷、糖苷⁸以及衍生寡糖⁹⁻¹⁵等糖类。

这种填料的基本性质及若干应用（使用乙腈/水为流动相并通过示差折射仪检测）在 055 号分离报告“使用 TSKgel Amide-80 高效正相分配色谱填料分离糖类¹”中有所详述。

本报告对 TSKgel Amide-80 和其他硅型填料进行了比较，并考察了流动相中有机溶剂和胺类的作用。

2. 与三种不同的氨基键合硅胶填料比较

2-1 化学稳定性

海藻糖（一种非还原性糖）在 TSKgel Amide-80 柱和三种氨基键合硅胶填料的容量因子 (k') 如图 1 所示。此研究是在等度流动相条件下进行，使用 75% 乙腈/25% 水作为洗脱液。TSKgel Amide-80 柱的分析在 80°C 下进行，以抑制还原糖形成（和分离出）异构体。

经过 200 小时连续洗脱后，海藻糖的容量因子 (k') 在三种氨基键合硅胶填料中大幅下降。相对初始测量值，柱 A 的容量因子下降 34%，柱 C 下降 32.7%，柱 D 下降 21.5%。对于 TSKgel Amide-80 柱 (B)，容量因子仅轻微下降 3.8%，这表明酰胺固定相具备优越的化学稳定性。

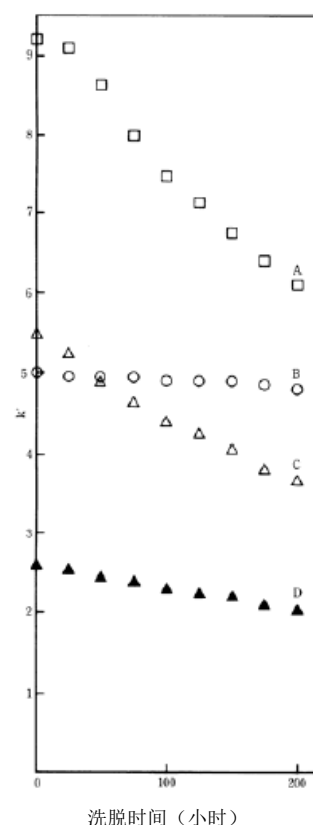


图 1

色谱柱:

化学稳定性

- A: 厂商 A 的氨基键合硅胶柱 (4.6mm ID x 25cm)
- B: TSKgel Amide-80 (4.6mm ID x 25cm)
- C: 厂商 B 的氨基键合硅胶柱 (4.6mm ID x 25cm)
- D: 厂商 C 的氨基键合硅胶柱 (4.6mm ID x 25cm)

温度:

A, C, D: 25°C, B: 80°C

洗脱液:

乙腈/水 = 75/25

流速:

1.0mL/min

检测:

RI

样品:

海藻糖 (1g/L), 20 μ L

2-2 单糖的定量回收

图 2 显示了三种糖类的载样量和峰面积之间的关系。对于 TSKgel Amide-80 柱，一种非还原糖（甘露醇）和两种还原糖（葡萄糖和木糖）在 1.25 μg 至 10 μg 范围内的载样量呈线性关系。相反，对于三种不同的氨基键合硅胶填料，葡萄糖低于 1.25 μg 和木糖低于 10 μg 时未观察到线性，这表明其样本回收率较差。此处仅提供了厂商 A 的色谱柱数据。据认为，回收率下降是由填料的氨丙基与还原糖之间生成糖胺键造成的。由于 TSKgel Amide-80 采用氨甲酰基代替氨丙基，故不会形成糖胺键。因此，TSKgel Amide-80 可对微量还原糖进行定量回收。

正如所见，相对于传统的氨基键合硅胶填料，TSKgel Amide-80 的化学稳定性和回收率更胜一筹，这使其成为连续分析和微量分析的理想选择。

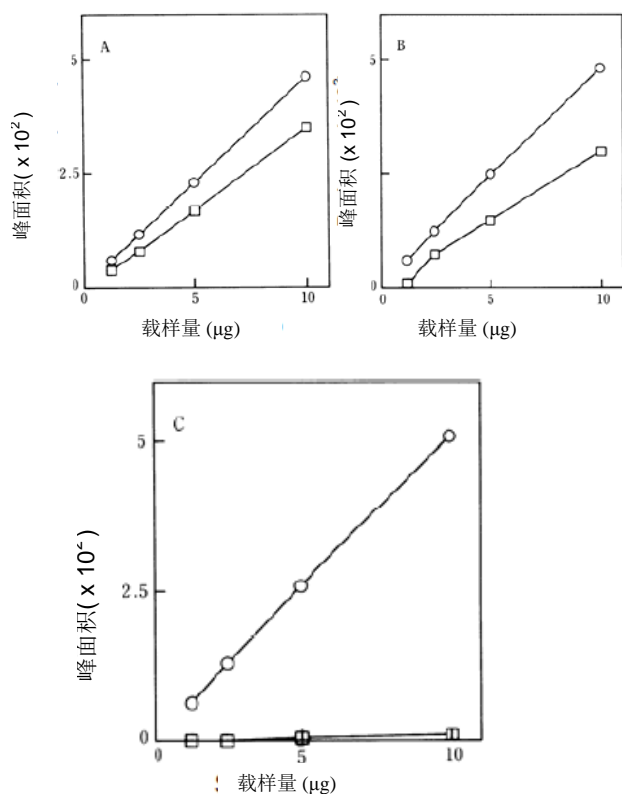


图 2 单糖的定量回收
 色谱柱: ○ TSKgel Amide-80 (4.6mm ID x 25cm)
 □ 厂商 A 的氨基键合硅胶柱 (4.6mm ID x 25cm)
 洗脱液: 乙腈/水 = 75/25
 流速: 1.0mL/min
 检测: RI
 温度: ○: 80 $^{\circ}\text{C}$ □: 25 $^{\circ}\text{C}$
 样品: A: 甘露醇 B: 葡萄糖 C: 木糖

3. 流动相中有机溶剂的效应

3-1 保留

含有各种有机溶剂的流动相中 TSKgel Amide-80 对糖醇的保留体积如图 3 所示。乙醇的保留体积很小，因此不能用于单糖的分离，除非其浓度提高到 95%。在这些溶剂中，乙腈和丙酮被视为最佳溶剂。

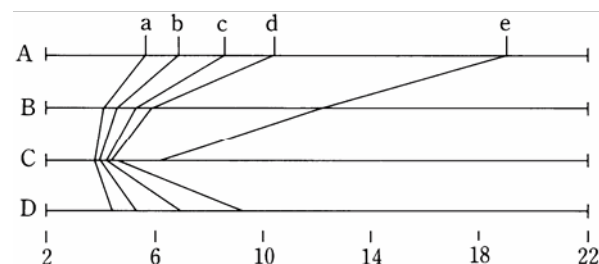


图 3 TSKgel Amide-80 柱洗脱液组分和多元醇保留体积的变化

色谱柱: TSKgel Amide-80 (4.6mm ID x 25cm)
 洗脱液: A: 乙腈/水 = 75/25
 B: 丙酮/水 = 75/25
 C: 1,4-二恶烷/水 = 75/25
 D: 乙醇/水 = 95/5
 流速: 0.3mL/min
 温度: 25 $^{\circ}\text{C}$
 检测: RI
 样品: a. 甘油 b. 赤藓糖醇 c. 木糖醇 d. 甘露醇 e. 肌醇

3-2 选择性

表 1 显示了使用 TSKgel Amide-80 分析异构体时流动相组成对于分离因子 (α) 的影响。此外，图 4 显示了使用乙腈或丙酮作为洗脱液在 TSKgel Amide-80 柱上分离 β -环糊精水解产物的结果。在丙酮溶剂系统中使用 TSKgel Amide-80 柱对三种环糊精的分离和糖类混合物的分离分别如图 5 和图 6 所示。根据这些数据可以得出，丙酮溶剂系统增强了异构体的分离能力 (表 1 和图 4)，乙腈溶剂系统提供了更好的 α -和 β -环糊精分离能力 (图 5)，丙酮溶剂系统中麦芽糖和乳糖的分离能力更佳 (图 6)。显然，在分析时间几乎相同的情况下，乙腈和丙酮溶剂系统的选择性存在差异。因此，建议根据分析目标来选择溶剂。此外，由于丙酮溶剂系统毒性较低，故其更适合用于必须清除成品的溶剂残留的情况，例如在纯化食物组分时。

表 1 流动相组成对异构体选择性因子 (α) 的影响

流动相	分离因子 (α)			
	葡萄糖	木糖	麦芽糖	乳糖
乙腈/水				
80/20	1.07	1.15	1.09	1.05
75/25	1.05	1.11	1.07	1.03
70/30	1.03	1.10	1.04	—
60/40	—	1.05	—	—
丙酮/水				
85/15	1.09	1.20	1.14	1.11
75/25	1.03	1.11	1.08	1.04

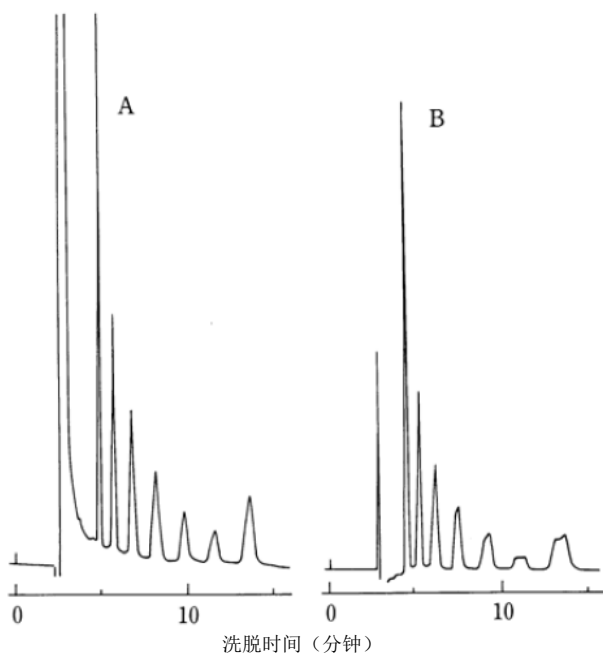


图 4 β -环糊精水解产物的分离

色谱柱: TSKgel Amide-80 (4.6mm ID x 25cm)
 洗脱液: A: 乙腈/水 = 60/40
 B: 丙酮/水 = 65/35
 流速: 1.0mL/min
 温度: 25°C
 检测: RI
 样品: β -环糊精水解产物

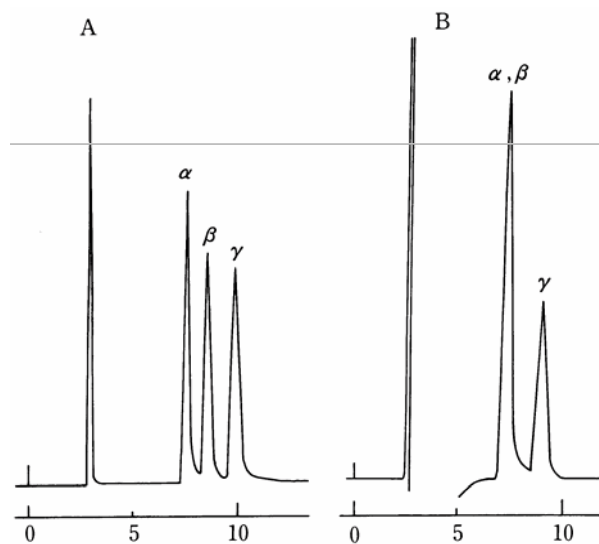


图 5: α , β , γ -环糊精的分离

色谱柱: TSKgel Amide-80 (4.6mm ID x 25cm)
 A: 乙腈/水 = 60/40
 B: 丙酮/水 = 65/35
 流速: 1.0mL/min
 温度: 25°C
 检测: RI
 样品: α , β , γ -环糊精

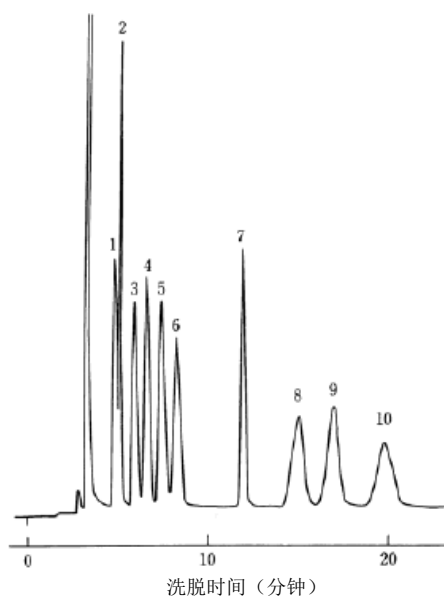


图 6 糖类混合物的分离

色谱柱: TSKgel Amide-80 (4.6mm ID x 25cm)
 洗脱液: 丙酮/水 = 82/18
 流速: 1.0mL/min
 温度: 80°C
 检测: RI
 样品: 10mmol/L 单糖, 5mmol/L 双糖, 20 μ L
 1. 鼠李糖 2. 核糖
 3. 木糖 4. 果糖
 5. 甘露糖 6. 葡萄糖
 7. 蔗糖 8. 麦芽糖
 9. 乳糖 10. 异麦芽糖

4. 流动相中的含胺添加剂

4-1 对理论塔板高度 (HETP) 的影响

55 号分离报告介绍了在 80°C 条件下使用乙腈/蒸馏水流动相时, 流速范围为 0.5 至 1.5mL/min 时, 非还原糖的效率最高; 0.25mL/min 或更低时, 还原糖的效率最高。据认为, 相对于非还原糖, 还原糖的最佳流速较低, 这是因为其异构体转化率比色谱柱中流动相和固定相之间溶质分布的速度更慢。

表 2 总结了当五种浓度为 20mmol/L 的不同有机胺添加到乙腈/水 (75/25) 流动相时, 四种糖类在 TSKgel Amide-80 柱上的 HETP 值。均衡考虑对 HETP 的改善程度与商业试剂的纯度时, 三乙胺和二乙氨基乙醇是最可行的胺修饰基团。

图 7 显示了流动相中添加不同浓度的三乙胺时对 HETP 的影响。如图所示, 随着添加到流动相中的三乙胺浓度的增加, 糖类的 HETP 明显降低。HETP 的降低是由于添加有机胺后, 还原糖中异头物的转化率加快。

图 8 显示了含 100mmol/L 三乙胺的流动相中十种糖类的分离。虽然分析是在 25°C 条件下进行, 但并未观察到还原糖异构体的分离。因此, 在存在胺类添加剂的情况下, 还原糖的分离可以在室温下进行, 作为在 80°C 条件下分离的替代方案。

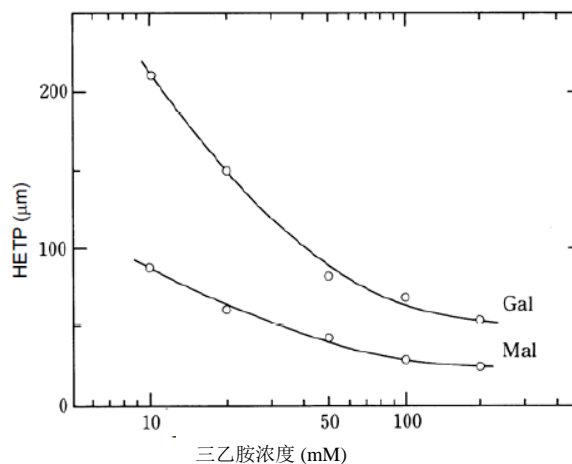


图 7 添加到流动相中的三乙胺浓度对 HETP 的影响

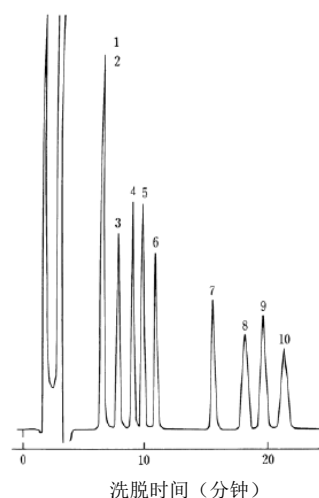


图 8 糖类的分离
洗脱液: 乙腈/水 = 75/25, 含 100mmol/L 的三乙胺
温度: 25°C
其他条件: 同图 6。

表 2 添加胺对 TSKgel Amide-80 中糖类分离的影响

胺 (20mmol/L)	25°C 时的 HETP (μm)			
	葡萄糖	半乳糖	麦芽糖	乳糖
Tris*	88	532	142	无数据 **
乙醇胺	无数据 **	无数据 **	42	27
三乙胺	无数据 **	150	59	28
三正丁胺	69	252	103	39
二乙氨基乙醇	51	283	72	41

*: 三羧甲基氨基甲烷

** : 由于形成肩峰而无法计算

5. 高灵敏度分析

5-1 预标记高灵敏度分析

痕量组分分析需要高灵敏度。例如，采用吡啶标记衍生物的方法具有以下优点：

- (1) 高灵敏度
- (2) 由于吡啶衍生物在化学反应中相对稳定，故可以进行各种处理
- (3) 可以采用反相色谱分离

图 9 显示了在葡聚糖水解产物与 2-氨基吡啶反应后对吡啶标记糖类进行分离的一个例子。从 5 聚体到 25 聚体，糖类水解产物几乎是在基线处分离，与分子量的增加成函数关系。

不管吡啶标记糖类衍生物的量 1pmol 或更少，荧光检测的灵敏度都很高。可以合理地预计，糖类分析的应用范围可扩展到高灵敏度痕量分析。

对糖蛋白的糖骨干的结构研究如后所示。此应用通常被称为二维映射或糖链映射⁹⁻¹⁵，用于确定未知寡糖的糖链结构。

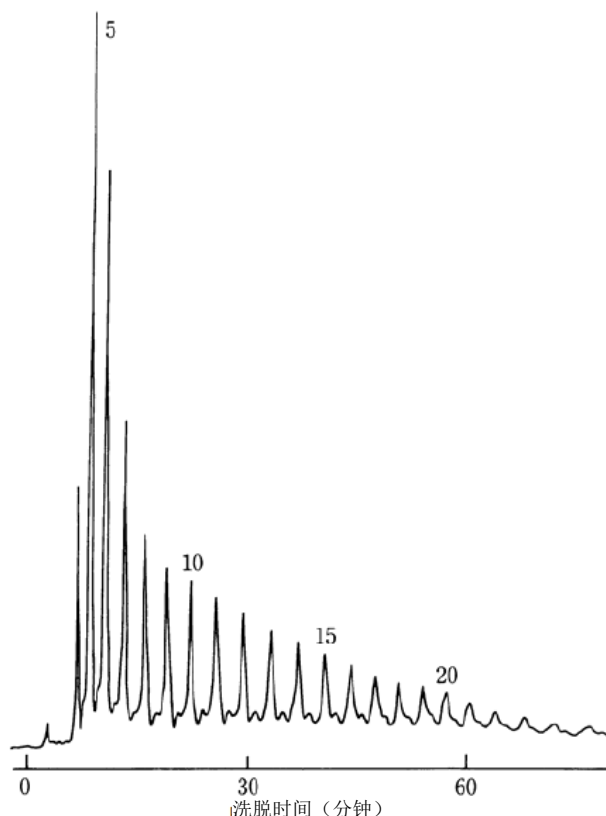


图 9 葡聚糖水解产物吡啶标记衍生物的分离

在这种方法中，在使用如图 9 所示的反相和正相色谱法进行分析前，对葡聚糖水解产物标准样品采取了吡啶 (PA) 标记。然后，对一个已知寡糖进行吡啶标记，用于比较其洗脱位置和标准样品的洗脱位置，并估计葡萄糖低聚物单位的数量。通过在二维图上绘制所估计的葡萄糖低聚物单位的数量 (洗脱位置)，可以获得各个样本的特定点。对未知样本进行吡啶标记，然后比较反相色谱法和正相色谱法与二维图，从而确定未知样本的结构。

色谱柱: TSKgel Amide-80 (4.6mm ID x 25cm)
洗脱液: A: 3% 醋酸-三乙胺 (pH7.3)/
乙腈 = 35/65
B: 3% 醋酸-三乙胺 (pH7.3)/
乙腈 = 50/50
A→B (50 分钟线性梯度)
流速: 1.0mL/min
温度: 40°C
检测: FS (Ex.320nm, Em.400nm)
样品: 葡聚糖水解产物吡啶标记衍生物
0.5g/1.1μL

如此处所述，二维映射是一个很有价值的方法，其使得采用吡啶标记寡糖对糖链大小和结构进行高灵敏度分析成为可能。据认为，这种方法在微量糖链的结构分析中很有用。此外，在使用高效液相色谱分析技术后还可以使用结构分析方法 (如核磁共振) 来确定糖链的确切结构。

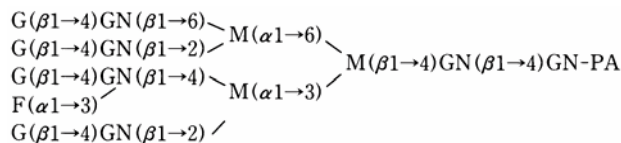


图 10 显示了使用反相和正相色谱法分离吡啶标记寡糖的应用。此外，表 3 显示了根据洗脱位置估计 6 种吡啶标记寡糖的葡萄糖低聚物单位。

吡啶标记寡糖的结构

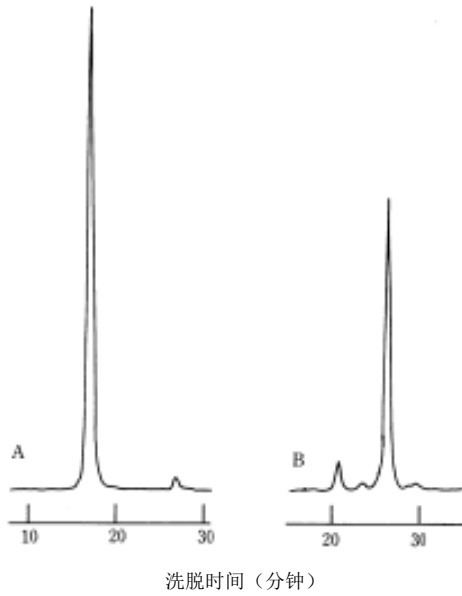


图 10 使用 TSKgel ODS-80T_M 和 TSKgel Amide-80 分析寡糖的吡啶标记衍生物

色谱柱: A: TSKgel ODS-80T_M (4.6mm ID x 15cm)
 B: TSKgel Amide-80 (4.6mm ID x 25cm)
 洗脱液: A: a: 10mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH3.8)
 b: a + 0.5% n-丁醇
 a/b (80/20) → (40/60) 线性梯度 (80 分钟)
 B: 条件同图 9
 流速: 1.0mL/min
 温度: A: 55°C, B: 40°C
 检测: FS (Ex.320nm, Em.400nm)
 样品: 吡啶标记的寡糖

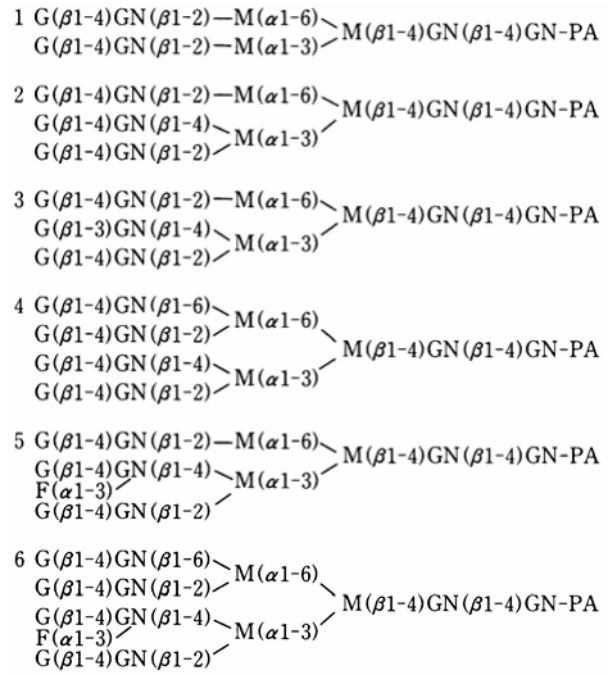


表 3 TSKgel Amide-80 和 TSKgel ODS-80T_M 中吡啶标记寡糖的保留时间

糖链	TSKgel Amide-80			TSKgel ODS-80T _M	
	保留时间 (mL) ¹⁾	测量的葡萄糖单位 ²⁾	文献值 ³⁾	保留时间 (mL) ¹⁾	测量的葡萄糖单位 ²⁾
1	13.7	6.9	7.0	15.3	9.6
2	17.9	8.3	8.3	25.8	12.3
3	17.5	8.2	8.2	26.7	12.6
4	23.5	9.9	9.9	17.7	10.3
5	20.6	9.1	9.0	24.4	11.9
6	26.2	10.6	10.5	16.9	10.1

1) 洗脱体积
 2) 葡萄糖单位计算值
 3) 葡萄糖单位文献报告值⁹⁾

6. 结论

TSKgel Amide-80 是一种正相分配色谱柱，它克服了传统氨基键合硅胶柱的弱点。TSKgel Amide-80 具有优秀的单、双和寡糖分离性能。

除了 TSKgel Amide-80 柱之外，还有许多其他 TSKgel HPLC 产品可用于糖类分析，例如 TSKgel SugarAX 系列（使用硼酸作为反离子的离子交换法）、TSKgel SCX（H⁺ 型）（离子排阻色谱法）、TSKgel PW 和 PW_{XL} 系列（凝胶过滤法）以及 TSKgel NH₂-100（氨基键合正相分配色谱法）。关于这些色谱柱的更多详情，请参阅东曹生命科学色谱产品目录。

文献

- 1) S. C. Churms, *J. Chromatogr.*, 500, 555 (1990)
- 2) S. Honda, *Anal. Biochem.*, 140, 1 (1984)
- 3) S. Hase, S. Koyama, H. Daiyasu, H. Takemoto, S. Hara, Y. Kobayashi, Y. Kyogoku and T. Ikenaka, *J. Biochem. (Tokyo)*, 100, 1 (1986)
- 4) M. T. Yang, L. P. Milligan and G. W. Mathison, *J. Chromatogr.*, 209, 316 (1981)
- 5) R. E. A. Escott and A. F. Tayler, *J. HRC & CC.*, 8, 290 (1985)
- 6) Y. Kurihara, T. Sato, M. Umino, Toyo Soda Research Report, 24 (2), 35 (1980)
- 7) Y. Nomura, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 3313 (1989)
- 8) Y. Fujii et al., *J. Chromatogr.*, 508, 241 (1990)
- 9) N. Tomiya et al., *Anal. Biochem.*, 171, 73 (1988)
- 10) H. Oku et al., *Anal. Biochem.*, 185, 331 (1990)
- 11) H. Higashi et al., *Anal. Biochem.*, 186, 355 (1990)
- 12) R. Jefferis et al., *Biochem. J.*, 268, 529 (1990)
- 13) M. Hayashi et al., *Eur. J. Biochem.*, 191, 287 (1990)
- 14) N. Takahashi et al., *J. Biol. Chem.*, 265, 7793 (1990)
- 15) N. Tomiya et al., *Anal. Biochem.*, 193, 90 (1991)