

# 离子色谱法检测糖

刘庆生 张 萍 范志影

(中国农科院饲料研究所中心分析室 北京 100081)

**摘 要** 现有一种改进的色谱方法,用高效的阴离子交换柱分离糖,用脉冲积分安培检测器进行检测。它可以直接进行检测低浓度糖的定量分析,而无需衍生和样品的前处理。离子色谱的优点在于高 pH 条件下,糖能够很好的在阴离子交换柱上分离。以下将详细介绍此项技术。

**关键词** 离子色谱;单糖;寡糖;多糖

中图分类号 0657.7\*5

## Analysis of Carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD)

Liu Qingsheng, Zhang Ping, Fan Zhiying

(Central Laboratory, Feed Research Institute of CAAS, Beijing 100081, China)

**Abstract** An improved chromatographic technique known as high performance anion exchange (HPAE) was developed to separate carbohydrates. Coupled with pulsed amperometric detection (PAD), it permitted direct quantification of nonderivatized carbohydrates at low picomole levels with minimal sample preparation and clean-up. HPAE chromatography took advantage of carbohydrates to give highly selective separations at high pH using a strong anion exchange stationary phase. These papers should be consulted for more specific details.

**Key words** HPAEC; monosaccharide; oligosaccharides; Polysaccharides

## 1 引 述

糖、脂类、蛋白质和核酸是构成有机生物体的四大类化合物。其中糖是一类主要由 C、H、O 元素组成的化合物,又称碳水化合物(carbohydrates)。在自然界中分布最广,含量最丰富,参与各种生理活动,有着广谱的化合结构和生理功能。从 70 年代以来,在糖类的分离和结构分析等方面取得的突破使得人们对糖类的研究有了快速的发展。经过多年来对有机体中寡糖链的研究,目前已发现有机体中寡糖链具有:1) 结构功能,稳定功能和保护功能;2) 毒素受体功能;3) 开关和调节功能;4) 库存功能;5) 细胞内向导功能;6) 介导细胞间识别;7) 调控其它蛋白的活性等功能。新近完成的人类基因组的测序的完成标志着“后基因组学时代”的到来。著名的生物学家 Ajit Varki 指出:“在即将到来的‘后基因组学时代’中,当人们越来越多地将注意力集中到完整器官或生物体的发育和生理学的分子机制,糖链生物学功能将会更加显而易见”。因为基因对细胞的生命活动的调控是由基因所编码的。

## 2 糖的分析方法

对糖的分析方法大致可以分为两类:一类是色谱

法,另一类是酶学方法<sup>[9]</sup>。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,因此色谱法是现在主要的分离检测糖的方法。

用色谱方法检测糖主要有以下几个方法<sup>[4-5]</sup>:

### 2.1 气相色谱法(GC)

该方法主要通过化学修饰(如甲基化、乙酰化、硅烷化等)将寡糖链的单糖组分转化为易挥发的衍生物进行测定,其准确性的提高关键在于改进化学修饰及柱后检测法,以提高糖肽链定量裂解的转化率和检测灵敏度。

### 2.2 液相色谱法(HPLC)

糖类化合物的传统液相色谱法检测方法采用柱后衍生和可见光检测器检测,近年来常用灵敏度较低的示差折光检测器直接测定,样品毋需衍生化。为了提高分析灵敏度,可采用衍生化的方法将样品组分制备成具有紫外吸收或能发出荧光的衍生物,用紫外检测器、二极管阵列检测器或荧光检测器,虽然样品制备操作繁杂,但分析灵敏度可大大提高。

### 2.3 亲和色谱与高效液相色谱

人们利用凝集素可专一、可逆地与游离糖及复合糖类中的单糖或寡糖结合这一特性,将亲和色谱用于

收稿日期:2004-12

作者简介:刘庆生(1973-),男,研究生,主要从事动物和饲料原料、以及饲料中的营养因子的检测技术研究。

现代科学仪器 2005 1

75

糖蛋白的分离纯化和序列测定。科学家利用固定化凝集技术将 ConA 固定于琼脂糖凝胶和硅胶柱上，用于亲和色谱和 HPLC 分析<sup>[10-11]</sup>。

2.4 毛细管电泳(CE)

毛细管电泳技术用于糖蛋白结构测定是近年来蓬勃发展起来的分析技术，具有快速、高效，高灵敏度和所需样品少等特点，它克服了液相色谱中水解氨基酸和肽键对分析有干扰这一缺点，但是由于糖类缺乏极性紫外或荧光发射基团，一般仍采用衍生化的方法进行寡糖结构分析以提高灵敏度。衍生化法虽然灵敏度高，但由于过程烦琐，应用有一定的自身局限性。

以上各种色谱分析法具有不同的优点。然而，它们又有各自的缺陷。气相色谱分析中较烦琐的样品处理过程；液相色谱通过柱前衍生然后用紫外和荧光检测这一方法虽然敏感，但是在定量检测时常出现异常现象干扰测定；亲和色谱中某些糖蛋白寡糖链由于高亲和性而难于洗脱；毛细管电泳快速、灵敏，但缺乏直接的 UV 检测信号。本文下面主要介绍的是另一种测定糖的色谱方法 - 离子色谱法。

3 基本原理

3.1 分离原理<sup>[8]</sup>

糖类分子具有电化学活泼性及在强碱溶液中呈离子化状态。中性糖类为 pKa 在 12-14 之间的弱酸。在高 pH 值的淋洗液中，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。

阴离子交换分离其流动相通常采用 NaOH 或 KOH 和乙酸钠溶液进行淋洗。NaOH 或 KOH 提供的 OH<sup>-</sup> 具有两种功能，一是提供流动相的高 pH 值，使糖部分或全部离解；二是流动相中 OH<sup>-</sup> 浓度的改变可以改变糖的保留时间，增加选择性。乙酸钠所提供的 AC<sup>-</sup> 与固定相的亲合力大于 OH<sup>-</sup>，用乙酸钠溶液和 NaOH 或 KOH 进行梯度淋洗可以进一步的增加固定相的选择分离性。由于糖具有很复杂的空间结构，对于一些如差向异构体形成共洗脱，根据不同的离解行为，通过梯度淋洗改变流动相的 pH 值到这些糖化合物的 pK 值的方法从而达到有效的分离。

3.2 检测原理

离子色谱法检测糖主要使用金电极的脉冲安培检测器。因为当施加一个电位在金电极上，糖易在金电极表面发生氧化反应。在碱性条件下，用金电极检测糖非常灵敏，可检测 pmol/L 的糖，而且不需衍生反应和复杂的样品纯化处理。另外，直流安培检测器不能用于糖的检测，主要是因为糖氧化产物对电极产生不可逆的污染。

脉冲安培检测糖的波形主要有两种。(见表 1)

| 表1 波形A(四电位波形) |       |    | 波形B(三电位波形) |       |    |
|---------------|-------|----|------------|-------|----|
| 时间            | 电位(V) | 积分 | 时间         | 电位(V) | 积分 |
| 0.00          | +0.1  |    | 0.00       | +0.05 |    |
| 0.20          | +0.1  | 开始 | 0.20       | +0.05 | 开始 |
| 0.40          | +0.1  | 结束 | 0.40       | +0.05 | 结束 |
| 0.41          | -2.0  |    | 0.41       | +0.75 |    |
| 0.42          | -2.0  |    | 0.60       | +0.75 |    |
| 0.43          | +0.6  |    | 0.61       | -0.15 |    |
| 0.44          | -0.1  |    | 1.00       | -0.15 |    |
| 0.50          | -0.1  |    |            |       |    |

这两种波形是戴安公司所推荐用于糖分析。波形 A 具有很好的重现性，但是它对淋洗液中的溶解氧非常敏感，而且它的背景噪声比较高(16-22nC)。波形 B 是从 1993 年戴安公司推出 ED40 以后被推荐使用的。波形 B 与波形 A 的最大区别就是波形 B 用正电位作为清洗电位，而波形 A 是用负电位作为清洗电位。它能够提高灵敏度，减小淋洗液中溶解氧的影响，并且可以降低在分离低聚糖用乙酸钠进行梯度淋洗而造成的基线漂移。用正电位可以更好的清洗电极上糖的氧化产物，减小电极磨损。

3.3 分离柱

几种常用的分离柱见表 2。

| 表2 几种常用的分离柱 |                             |                                     |                                     |                                            |
|-------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------|
| 性质          | CarboPacMA1                 | CarboPacPA1                         | CarboPacPA10                        | CarboPacPA100                              |
| 树脂组成        | 7.5 μm 直径的氯化乙烯基苯 - 二乙烯基苯大孔基 | 薄壳 10 μm 直径聚苯乙烯 - 二乙烯基苯基球, 附聚 580nm | 薄壳 10 μm 直径聚苯乙烯 - 二乙烯基苯基球, 附聚 460nm | 薄壳 8.5 μm 直径乙烷基苯乙烯 - 二乙烯基苯基球附聚 275nm 季铵功能基 |
| 基球交联度       | 15%                         | 2%                                  | 55%                                 | 55%                                        |
| 乳胶交联度       | 无乳胶                         | 5%                                  | 5%                                  | 6%                                         |
| 阴离子交换容量     | 1450                        | 100                                 | 100                                 | 90                                         |
| 换容量         | 4 × 250mm 柱                 | 4 × 250mm 柱                         | 4 × 250mm 柱                         | 4 × 250mm 柱                                |
| 可用溶剂量       | 0                           | 0 - 2                               | 0 - 90                              | 0 - 90                                     |
| PH 稳定性      | pH 0 - 14                   | pH 0 - 14                           | pH 0 - 14                           | pH 0 - 14                                  |
| 最大压力        | 2000psi                     | 4000psi                             | 3500psi                             | 4000psi                                    |
| 流速          | 0.2 - 0.5ml/min             | 1 - 1.5 ml/min                      | 1 - 1.5 ml/min                      | 1 - 2 ml/min                               |
| 温度          | 4 - 50                      | 4 - 55                              | 4 - 55                              | 4 - 55                                     |

四种离子交换柱各自具有不同的特点。CarboPacMA1 的柱容量很大，保留性很强，它最适合于弱电离的糖醇化合物的分析。它的缺点就是溶剂消耗比较大，并且寡糖和多糖不能洗脱，污染柱子。CarboPacPA1 的柱效比 CarboPacMA1 高，它主要适合于单糖、二糖和寡糖的分析，但在低 OH<sup>-</sup> 浓度进行单糖和二糖检测时由于淋洗液中溶解氧的干扰使得它的检测灵敏度不高。CarboPacPA10 和 CarboPacPA100 为薄壳型阴离子交换树脂，它们在不同浓度的 OH<sup>-</sup> 中都具有很好的灵敏度。CarboPacPA10 主要是用于单糖、

二糖和寡糖的分析。CarboPacPA100 主要是用于寡糖和多糖的分析，它比 CarboPacPA1 具有更好的分离效率，但用它不适合检测单糖或二糖因为对于有的差向异构体如：葡萄糖和半乳糖 CarboPacPA100 就无法分离。

### 3.4 不同类型的糖所适用的不同离子交换柱

#### 3.4.1 单糖

对于还原性单糖应使用 CarboPacPA10，而对于中性糖醇或从己糖中分离 N - 乙酰胺基糖则使用 CarboPacMA1。

#### 3.4.2 中性寡糖

CarboPacPA100 最适合分析像从蛋白聚糖水解得到的低聚糖混合物。虽然有时用 CarboPacPA1 分离的图谱看起来峰形更尖锐，分离度更好，但还是应该用 CarboPacPA100。经  $\beta$  - 消去从蛋白聚糖剪切下来的低聚糖具有一个或几个氨基酸的剪切末端，它使得低聚糖更容易淋洗下来。剪切下来的二糖、三糖在 CarboPacPA 类型柱子上保留时间很短，而在 CarboPacMA1 中很容易分离。

#### 3.4.3 电荷寡糖

电荷寡糖通常含有唾液酸、磷酸、硫酸或羧基团，它们的分离与它们的组成、结构和外层所带负电荷的水平有关。我们可以在 pH4.6 - 13 条件下进行分离。在低 pH 条件下，分离主要依靠低聚寡糖所携带的负电荷的量以及它的结构进行分离。例如寡聚唾液酸随着 pH 的变化而形成不同的氧化产物，其选择性也不同。虽然以前有一些研究人员用 CarboPacPA1 成功的分离了一些寡聚唾液酸，但最好还是用 CarboPacPA100 进行分离<sup>[3]</sup>。

#### 3.4.4 糖胺聚糖<sup>[1]</sup>(GAG)

Shibata S., Midura R.J. and Hascall V.C., J. 已经成功的在 CarboPacPA1 上分离了从糖胺聚糖中得到的低聚寡糖（非硫酸化软骨素二糖<sup>[2]</sup>）。硫酸软骨素二糖也可以在 CarboPacPA1 或 CarboPacPA100 上进行检测。

#### 3.4.5 线性多糖

线性多糖的分离可以按照其长度的不同，在不同的 CarboPacPA 柱子进行分离。CarboPacPA1 在分离线性多糖的峰形要比 CarboPacPA100 好，是分析线性多糖的首选柱子。但如果要想收集某一组分的多糖则最好使用 CarboPacPA100 柱子，因为它可以在更低的乙酸钠浓度条件下进行分离。

## 4 离子色谱在糖分析中的应用

### 4.1 单糖二糖

色谱图见图 1

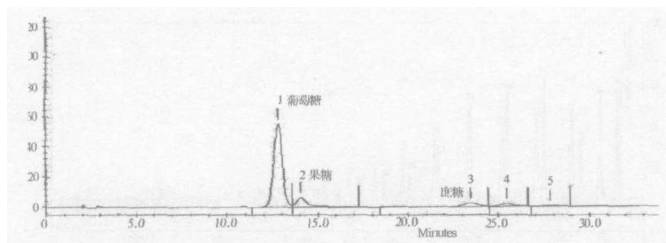


图 1 胡萝卜素稀释 1000 倍后色谱图

分离柱：CarboPacPA10(4 × 250mm)；淋洗液：60mmol/L KOH；检测器：脉冲安培，金电极

色谱峰：1、葡萄糖 2、果糖 3、蔗糖。

### 4.2 寡糖

色谱图见图 2 和图 3

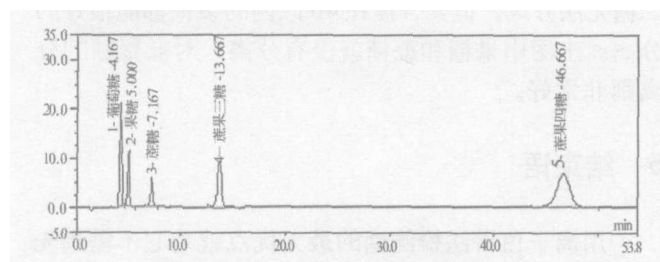


图 2 酶法合成寡糖稀释 5000 倍后色谱图

分离柱：CarboPacPA100 (4 × 250mm)；检测器：脉冲安培，金电极；淋洗液：100mmol/L NaOH 和 50mmol/L NaAC 梯度淋洗；流速：1.0ml/min

色谱峰：1、葡萄糖 2、果糖 3、蔗糖 4、蔗糖三糖 5、蔗糖四糖。

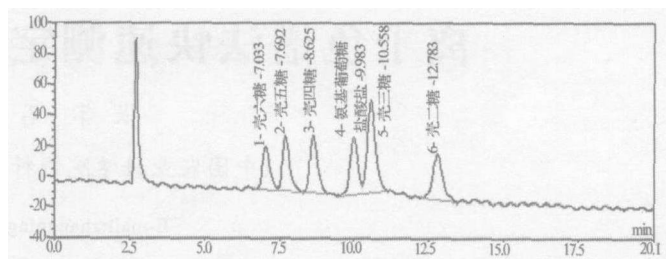


图 3 壳寡糖稀释 5000 倍后色谱图

分离柱：CarboPacPA100 (4 × 250mm)；检测器：脉冲安培，金电极；淋洗液：10mmol/L NaOH 和 30mmol/L NaAC 梯度淋洗；流速：0.5ml/min；

色谱峰：1、壳聚六糖 2、壳聚五糖 3、壳聚四糖 4、氨基葡萄糖盐酸盐 5、壳聚三糖 6、壳聚二糖。

多糖在离子色谱上的分离大多是从低聚糖到高聚糖，但是由于有的糖所带电荷，以及功能团的影响造成洗脱顺序上的变化。壳寡糖可能由于氨基的存在从而使它从高聚糖到低聚糖进行洗脱。

### 4.3 多糖

色谱图见图 4

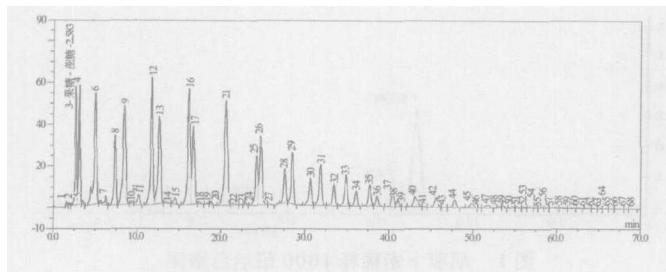


图4 菊粉多糖水解后产物稀释5000倍色谱图

分离柱: CarboPacPA100 (4 × 250mm); 检测器: 脉冲安培, 金电极; 淋洗液: 100mmol/L NaOH 和 400mmol/L NaAC 梯度淋洗; 流速: 0.5ml/min。

用 CarboPacPA100 柱子分析多糖时, 有些单糖和二糖无法分离, 但聚合度在 40 以内的多糖都能很好的分离。上图中果糖和蔗糖就没有分离, 对低聚糖的分离则非常好。

## 5 结束语

用离子色谱法检测糖的最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。PAD 检测器具有非常高的灵敏度。低至 pmol 级的糖类也可得

到很好的检测。但是用 PAD 检测不仅是糖类, 还有氨基酸、肽类或有机酸均能产生正的响应值, 还需要对糖的峰进行鉴别<sup>[6]</sup>。由于糖的种类、结构多样性, 现在很难用一种分析手段对一种糖进行定性和定量分析。但离子色谱法对糖的分离和定量分析中起到很重要的作用。随着离子色谱分析技术的发展, 尤其在寡糖和多糖方面出色的分离能力, 使得它在人们对糖的研究过程起到更重要的用途。

## 参考文献

- [1] Varki, A. Essentials of Glycobiology 1999
- [2] Shibata S., Midura R.J. and Hascall V.C., J. Biol. Chem., 267, 1992, 6548-6555
- [3] Rohrer, J., Glycobiology, 1995, 5, 359-360.
- [4] 陈伟才等. 糖蛋白寡糖及单糖色谱分析的研究进展, 天津药学, 2000, 11;(4)
- [5] 王静, 王晴, 向文胜. 色谱法在糖类化合物分析中的应用, 分析化学 2001, 29 (2)
- [6] 于泓, 丁永胜, 牟世芬. 阴离子交换色谱积分脉冲安培检测法分离测定氨基酸注射液中的氨基酸和葡萄糖, 色谱, 2002 20(5)
- [8] 牟世芬, 刘克纳. 离子色谱方法及应用, 2000
- [9] 牟世芬, 李宗利. 阴离子交换分离—脉冲安培检测分析糖类化合物的进展, 色谱, 1995
- [10] Ziad EL Rassl. Yunghuoy Truei. Yih-Fen Maa, and Csaba Horvath. Anal. Biochem 1988. 169: 172
- [11] R D Cummings. Methods Enzymol. 1994. 230: 66

# 离子色谱法快速测定鱼预混饲料中的肌醇

张萍 石波 梁平

(中国农业科学院饲料研究所 北京 100081)

E-mail: zhangping@mail.caas.net.cn

**摘要** 采用离子色谱技术快速测定鱼预混饲料中肌醇的含量。该方法具有试样制备简单, 分析干扰少, 速度快, 结果准确等特点。

**关键词** 离子色谱; 肌醇; 鱼预混饲料

中图分类号 0657.7<sup>+</sup>5

## Rapid Determination of Inositol in Fish Premix by Ion Chromatography

Zhang Ping, Shi Bo, Liang Ping

(Feed Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract** The inositol in preblend fish feed was detected by ion chromatography, and the method was simple, rapid and precision.

**Key words** Ion chromatography; inositol; fish premix

收稿日期: 2004-12

作者简介: 张萍 (1956 - ), 女, 研究员, 中国农业科学院饲料研究所研究员, 饲料检测技术研究室主任, 一直从事土壤、饲草等生物产品检测技术的研究。