

液相色谱在糖类分析中的应用研究进展

戴 军

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)



戴 军: 江南大学食品科学与技术国家重点实验室研究员; 无锡轻工大学化学学士、食品科学硕士, 江南大学食品科学博士; 中国色谱学会理事,《色谱》杂志编委。在国内外学术期刊上发表论文 70 余篇, 主编专著 1 部; 主持或主要参加完成国家自然科学基金及省部级科研项目 8 项, 获省部级科技进步奖 4 项, 参加制定国家标准及轻工业行业标准 7 项, 授权发明专利 2 项。主要研究方向为食品功能因子及生物活性成分的分离分析与构效关系研究。

1 石墨化碳柱色谱-质谱用于果聚糖异构体的表征及果糖基转移酶合成产物的分析

来源于植物或酶法合成的果聚糖是一类非消化性的水溶性膳食纤维, 具有增殖双歧杆菌、调节肠道菌群与功能、降低血脂、提高免疫力、促进钙吸收等重要的生理功能。这些功能性质都与其结构即单糖组成、糖苷键和聚合度有关。已有的糖苷键分析方法十分繁琐耗时: 将目标寡糖或多糖纯化后分别进行单糖组成检测、甲基化-气相色谱/质谱(GC/MS)分析及核磁共振(NMR)分析, 再综合解析。新西兰奥克兰大学的 Harrison 研究组^[1]利用石墨化碳柱色谱(GCC)分离-线性离子阱质谱联用检测的手段探索研究了以¹³C 标记的蔗糖和蔗果三糖(1-kestose)为底物, 分别用重组果糖基转移酶 6G-FFT (fructan: fructan 6G-fructosyltransferase) 和 6-SFT (sucrose: fructan 6-fructosyltransferase) 催化合成的 $\beta(2 \rightarrow 1)$ (inulins) 和 $\beta(2 \rightarrow 6)$ (levans) 果聚糖的二级与三级质谱碎裂模式, 建立了分离和鉴定果聚糖异构体的液相色谱-质谱(LC-MSⁿ)方法。他们研究发现, inulins 和 levans 两类果聚糖的 MS² 谱图有显著的差异。在电喷雾电离(ESI)负离子扫描下, 每个聚合度(DP_n)的 levans 的 MS² 谱图上除了有糖苷键裂解的特征产物外, 还显示一系列区别于 inulins 的特征离子(一系列相应较低 DP 值寡糖的羟乙醛衍生物负离子 $[M(DP_{(n-1)} \sim DP_1) - H + 42]^-$)。他们在应用建立的 LC-MSⁿ 方法研究来源于 *L. perenn* 的重组果糖基转移酶 6G-FFT 的酶转化产物中发现, 该酶还具有显著的 1-SST (sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase) 的酶活性。以上工作对于其他含有不同糖苷键的同多糖或寡糖的结构分析、构效关系研究及寡糖转化酶的菌种筛选检测具有一定的借鉴意义。

2 亲水作用色谱-蒸发光散射检测-串联质谱分离鉴定植物细胞壁酶解产物酸性杂寡糖

作为可利用的再生生物资源的植物细胞壁的主要成分为果胶、纤维素及半纤维素。果胶及其酶解产物酸性杂寡糖的组成及结构分析对评价其提取和酶解技术的有效性与产品的应用性能及开发果胶类功能性食品配料具有重要的意义。目前已有的对其复杂的酶解产物酸性杂寡糖混合物的分析方法均有较大的局限性。最近, 荷兰瓦特宁根大学的 Schols 研究组^[2]通过流动相的组成、pH 值、梯度洗脱程序和柱温等色谱条件的优化及甲酯化和乙酰化基团、聚合度、电荷数和果胶裂解的消除反应产生的不饱和结构对保留时间的影响与相关性的考察, 使用亲水作用色谱(HILIC, 用 UPLC BEH amide 柱)研究建立了能同时成功分离测定甜菜果胶、黄蓍胶及甜菜渣等植物细胞壁提取物的酶解产物中不同聚合度、部分甲酯化或同时乙酰化的各种中性和酸性杂寡糖混合组分并表征其组成结构的超高效液相色谱-蒸发光散射检测-质谱(UPLC-ELSD-MSⁿ)分析方法。该方法相对于已有方法的突出优点是: ①可很好地分离电荷数相同但聚合度不同的酸性寡糖。毛细管电泳-激光诱导荧光检测-质谱法(CE-LIF-MS)虽可分离鉴定该类寡糖, 但其衍生化方法一般不适用

于非还原性糖。②分析过程中甲酯化和乙酰化基团等重要的结构信息仍能保留,而高效阴离子交换色谱(HPAEC)的强碱性流动相会使这些基团受到破坏。③果胶类酶解产物低聚半乳糖醛酸的聚合度、不同取代基、电荷数等结构元素对保留时间的影响有显著的特征和可预见性。因而将各酸性寡糖组分的保留行为与其质谱数据相结合,可对其复杂的混合物样品进行有效的寡糖组成和序列结构分析。

3 中性寡糖产品中不同聚合度糖组分及其异构体的分离分析

作为功能性食品配料被广泛应用的中性寡糖产品一般均为组成复杂、具有不同聚合度且同一聚合度又含多个不同糖苷键异构体的寡糖混合物样品。为了产品开发和质量监控及作用机制的探索,针对目前市场上各种寡糖混合物产品中各种糖组分的多种色谱分离模式进行比较,对定性定量检测的方法学进行系统的研究具有重要的实用价值。为此,Sanz 研究组^[9]分别应用 HPAEC、反相色谱(RP)、GCC 和 HILIC 4 种不同色谱模式对不同分子质量大小($DP_3 \sim DP_7$)的寡糖标准品及分子质量相同的 7 种四糖异构体和 4 种五糖异构体标准品在不同的流动相条件下的保留特性和分离度进行定量比较和色谱条件的优化,并将优化的色谱条件应用于龙胆寡糖(CEOS)、果寡糖(FOS)和葡聚糖蔗糖酶的纤维二糖受体产物(DSRCel)等商业性寡糖混合物产品与由尺寸排阻色谱法(SEC)分离得到的这些混合寡糖产品的各个不同聚合度($DP_2 \sim DP_6$)级分中的寡糖组分及其异构体的分离和定量测定。研究结果表明:GCC 和 HILIC 的分离效果优于 RP 和 HPAEC;HILIC 对于不同聚合度寡糖的分离效果最佳,而 GCC 对于各种寡糖的同分异构体显示出最好的分离度。但对于实际寡糖产品而言,因一般均含有多个不同聚合度的寡糖成分,故在用 GCC 分离时,不同聚合度的多个同分异构体的色谱峰会发生部分交叉重叠。因此,对于这样的寡糖混合物样品的定量分析还是采用对异构体分离效果稍差而对不同聚合度寡糖的分离效果最佳的 HILIC 分离模式较为适宜。

此外,Sanz 研究组^[9]还应用 HILIC- MS^n 对益生低聚半乳糖产品的分离分析方法进行了深入研究。他们分别用 3 种不同的 HILIC 固定相(磺烷基甜菜碱两性离子、聚羟乙基天冬酰胺及 BEH amide)在不同的流动相条件下做 LC- MS 分析,对 18 种含半乳糖的寡糖标准品和 12 种麦芽寡糖及其异构体标准品的保留值、分离度及峰对称性进行全面

定量的比较和评价,并选用分离效果较好的 BEH amide 柱考察了流动相组成和洗脱梯度等因素对分离效果的影响,得到能使大多数寡糖及糖苷键异构体均能较好分离的最佳色谱条件。在此色谱条件下,应用 LC- MS^n (ESI-线性离子阱质谱)对各种糖苷键及单糖组成的二糖标准品的 MS^2 中性丢失碎片离子特征及相对丰度进行了系统的考察;据此,对照同样分析条件下得到的 3 个低聚半乳糖产品(GOS-1、GOS-2、GOS-3)的二糖、三糖及四糖的各个异构体色谱峰的 MS^2 与 MS^3 的中性丢失离子特征及相对丰度,推测了 3 个 GOS 产品的各个异构体的糖苷键构成。此外,应用 LC-ESI- MS 以外标法测定了上述 3 个 GOS 产品中各个聚合度寡糖的含量及其各个异构体的相对比例。该研究发现:3 个 GOS 产品均含有 DP 值为 2~5 的寡糖,GOS-1 和 GOS-3 含微量的六糖;GOS-1 和 GOS-3 有相似的聚合度分布和糖苷键构成,而 GOS-2 却有较大的差异;二糖是 3 个 GOS 样品中相对含量最高的寡糖;GOS 中主要糖苷键为(1→4)和(1→6),也含少量的(1→2)和(1→3)。

上述针对几种有代表性的商业性中性寡糖产品的分离分析方法研究的数据和结果对于国内未来功能性寡糖食品配料及其终端产品中功能因子的检测方法及质量标准的研究和提升具有重要的参考价值。

4 基于多孔石墨化碳芯片分离和干血斑采样技术的糖蛋白 N-连接聚糖的轮廓分析

近年来,一些基于 HPLC 和 CE 分离及荧光标记检测或质谱鉴定的血浆样品糖蛋白 N-连接聚糖(N-glycan)谱(轮廓)分析方法的开发使得糖组学成功地应用于多种疾病的潜在生物标志物的研究。在癌症(例如乳房癌、卵巢癌、胰腺癌及肺癌等)、慢性间质性肝炎和纤维症等多种疾病的血样检测中已发现其糖蛋白 N-连接聚糖轮廓的特异性改变。此外,大规模的流行病学调查研究也证实了性活动、吸烟行为和其他环境因素对血样糖蛋白的糖基化的影响。最近,美国加州大学戴维斯分校化学系的 Lebrilla 教授等^[9]采用健康志愿者的干血斑(DBS)样本建立了一种新的安全、简便的 N-连接聚糖轮廓分析程序。该程序改变了以往静脉抽血取样的方法,采用手指针刺滤纸滴血取样的方法得到干血斑样本,再依次进行缓冲液溶解血样、二硫苏糖醇(DTT)蛋白变性、微波辅助快速酶解释放糖链、冰冷乙醇沉淀已脱糖基的蛋白质,然后使用固相萃取多孔石墨化碳柱(PGC)纯化酶解释放的寡糖样液,

并使用纳流高效液相色谱-芯片-飞行时间质谱 (nano HPLC-chip-TOF-MS) 分析鉴定(其芯片含有用 PGC 装填的一根富集柱和一根分析柱, 两者自动切换, 分析柱分离采用乙腈-水-0. 1% 甲酸为流动相梯度洗脱) , 同时根据 nano HPLC-chip-Q-TOF-MS/MS 得到的寡糖碎片信息进一步确证了由 TOF-MS 据精确相对分子质量得到的定性结果。此项实验从健康志愿者干血斑样本中鉴定出 150 个不同化学结构(包括同分异构体) 的糖蛋白 *N*-连接聚糖化合物。分析结果显示, 采样滤纸基质对定性结果和各化合物的相对丰度均无明显干扰; 相对丰度的定量结果重复性较好, 其日内平均相对标准偏差(RSD) 为 18. 8% ($n=3$) , 日间 RSD 为 20. 8% ($n=3$) ; DBS 样本在室温和 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存一个月, 其 *N*-连接聚糖谱没有明显的变化。

由于 *N*-连接聚糖的组成和结构较复杂, 而 GCC

相对其他色谱模式对 *N*-连接聚糖的立体异构体和糖苷键异构体具有较好的分离能力, 故将 PGC 芯片分离-梯度洗脱和质谱检测相结合被认为是目前为止含有信息较全面的 *N*-聚糖谱的微量分析方法。将 DBS 这种微量、安全、简便的采样技术应用于该方法, 更加有利于进行儿童、老人和大量人群以及幼小哺乳动物血样的 *N*-连接聚糖生物学的研究。

参考文献:

- [1] Harrison S, Xue H, Lane G, et al. Anal Chem, 2012, 84: 1540
- [2] Leijdekkers A G M, Sanders M G, Schols HA, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218: 9227
- [3] Brokl M, Hernández-Hernández O, Soria A C, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218: 7697
- [4] Hernández-Hernández O, Calvillo I, Lebrón-Aguilar R, et al. J Chromatogr A, 2012, 1220: 57
- [5] Ruhaak L R, Miyamoto S, Kelly K, et al. Anal Chem, 2012, 84: 396