

## 糖类衍生物在毛细管区带电泳下的分离研究

盛筱<sup>2</sup> 丁晨旭<sup>1</sup> 刘凌君<sup>2</sup> 索有瑞<sup>1</sup> 孙志伟<sup>2</sup> 尤进茂<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001) <sup>2</sup>(曲阜师范大学化学科学学院, 曲阜 273165)

**摘要** 以新合成的 1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (NMP) 为柱前衍生试剂, 采用毛细管区带电泳模式考察并优化了糖类衍生物的分离条件。实验采用 58.5 cm × 50 μm i.d. 毛细管 (有效柱长 50 cm), 55 mmol/L 硼酸盐缓冲溶液 (pH 9.46), 柱温 20 °C, 分离电压 22 kV, 进样 10 s, 在不加任何添加剂的情况下, 高效、快速地实现了 9 种糖的基线分离, 并在最优化条件下进行了唐古特白刺实际样品的分离分析, 结果令人满意。

**关键词** 糖类, 毛细管区带电泳, 1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮

### 1 引言

糖是自然界和生物体中广泛存在的物质。长期以来, 人们认为糖的主要功能是提供能量, 而新兴的糖生物化学研究发现, 糖类物质除了提供能量外还有其它多方面的生物活性与功能, 诸如抗癌、抗菌、抗病毒、控制细胞分裂, 调节细胞生长和人体免疫功能等作用<sup>[1]</sup>。多糖及其衍生物还被用作分离对映异构体的手性选择剂<sup>[2,3]</sup>, 所以糖类的研究受到人们越来越多的关注。但多糖的结构复杂, 具有很高的微观不均一性。因此, 对其分离分析相当困难。毛细管电泳以快速、高效和灵敏度高、所需样品少等优点被广泛应用于各个领域。用毛细管电泳分析糖类物质在 20 世纪 90 年代发展迅速, 目前毛细管电泳对糖的分析主要集中在单糖和寡糖的分离检测方面, 对多糖的分离分析还不多见。Suzuki 等<sup>[4]</sup>提出了一种不同于还原氨化类型的新的衍生方法, 以 1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (NMP) 作衍生试剂, 利用活泼碳 (C-4) 和还原糖的还原端之间的一种新的缩合反应。在温和条件下缩合反应快速定量, 不需要酸催化剂。赵燕等<sup>[5]</sup>以 NMP 作为衍生试剂分离了 8 种单糖, 并将该方法用于中药大黄多糖 (RTP) 的单糖组成及其摩尔比率的测定。本研究采用新合成的衍生试剂 1-萘基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (NMP) 对糖类进行柱前衍生, 在毛细管区带电泳模式下实现了 9 种糖类的快速基线分离, 并用于唐古特白刺实际样品的分离分析, 效果令人满意。

### 2 实验部分

#### 2.1 仪器与试剂

HP-3D 毛细管电泳仪 (美国 Agilent 公司); 毛细管 (河北省永年锐沅色谱器件有限公司), 总长度 58.5 cm, 有效柱长为 50 cm, 内径为 50 μm。单糖 (美国 Sigma 公司); 硼砂 (分析纯, 徐州试剂二厂); 水为 Milli-Q 超纯水。其它试剂均为分析纯。

#### 2.2 实验方法

以不同浓度的硼酸盐缓冲溶液, 在不同 pH、电压和温度下, 采用 254 nm 二极管阵列检测 (DAD), 分别对糖类衍生物进行分离。实验前对缓冲溶液进行超声脱气 5 min, 每次进样之前, 分别用 0.1 mol/L NaOH 溶液、超纯水、硼酸盐缓冲液冲洗毛细管柱 5 min, 更换缓冲液时, 需要分别冲洗 10 min。

#### 2.3 样品的合成和衍生化

**2.3.1 萘胺的制备** 将 19.45 g 萘胺盐酸盐悬浮在 500 mL 水中, 迅速加热至沸, 趁热过滤除去杂质后小心地用 100 mL 5.0% (w/w) NaOH 溶液中和。滤液放置 4 h 后过滤, 所得晶体在氮气环境下用 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 干燥后用于合成。

**2.3.2 1-(2-萘基)-3-甲基-5-吡咯烷酮 (NMP) 的合成** 圆底烧瓶中分别加 10 g 萘胺, 50 mL 无水乙

2007-06-18 收稿; 2007-10-13 接受

本文系国家自然科学基金资助项目 (No. 20075016)

\* E-mail: jnyou6304@163.com

醇,混合后加热至 60 °C,在 1.5 h 内小心地滴加 30 mL 乙酰乙酸乙酯,并于 60 °C 保温搅拌 7 h。反应完全后旋转蒸出大部分溶剂,常温放置 24 h 后,过滤所得沉淀于室温干燥 24 h。粗产物用 100 mL 甲醇重结晶 3 次,得白色晶体 NMP 10 g (产率 68%)。熔点 (m. p.) 195.1 ~ 197.5 °C。元素分析 (测定值): C 75.2, H 5.40, N 12.47; 计算值, C 75.0, H 5.36, N 12.5。红外光谱  $\bar{\nu}$  (KB $\bar{\nu}$ ): 3121.4 (—C—H); 3055.20 (—C—H); 1722.1 (—C=O); 1562.1 (pH—H); 1511.6 (pH—H); 1469.44 (C—H); 1390.7, 1363.8 (C—H); 1027.3, 895.2, 858.6, 748.3。质谱 (ESI/MS):  $m/z$  225 [M + H]<sup>+</sup>。

**2.3.3 糖的衍生化** 依次将 30  $\mu$ L 糖溶液,200  $\mu$ L NMP 溶液 (0.05 mol/L) 和 20  $\mu$ L 氨水加入安培瓶中,密闭后于 70 °C 保温 30 min。氮气吹干加 500  $\mu$ L 乙腈溶解。衍生化过程见图 1。

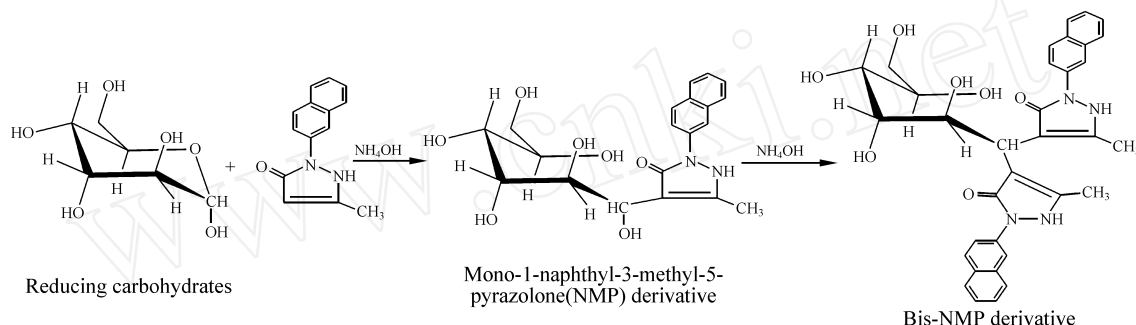


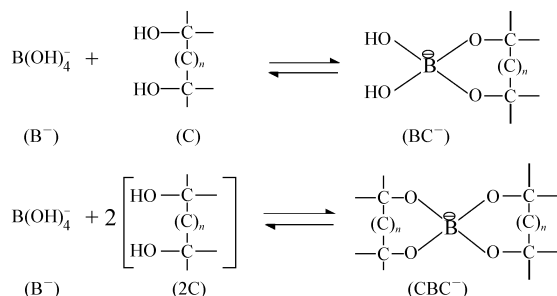
图 1 糖类的衍生化过程

Fig 1 Scheme of carbohydrate derivatization

### 3 结果与讨论

#### 3.1 缓冲溶液的选择

分离体系缓冲溶液的选择对于减小溶质与管壁的相互作用,克服峰型畸变,提高分离度都是十分重要的。对于糖类来说,由于其分子中具有较多的疏水基团,因此克服溶质与管壁的吸附尤为重要。在利用光学检测器时应用最多的缓冲溶液是硼酸盐体系,pH 值一般在 8 ~ 10,实际起作用的是  $B(OH)_4^-$ ,它能与糖形成带电络合物,其反应如下<sup>[6]</sup>:



缓冲溶液中常用的除硼酸盐外还有磷酸盐,它们可以单独使用,也可联合使用。本研究在比较了硼酸盐缓冲体系和磷酸盐缓冲体系之后,发现在硼酸盐缓冲体系下糖类衍生物分离效果更佳,因此实验选择硼酸盐缓冲体系。

**3.1.1 硼酸盐浓度对分离的影响** 缓冲溶液浓度的变化会造成电导的变化,从而引起峰型的前伸和拖尾,所以选择合适的硼酸盐浓度对提高分离效果具有十分重要的作用。实验在固定其它条件的前提下,考察了硼酸盐浓度在 40 ~ 65 mmol/L 范围内对糖类衍生物分离的影响,如图 2(a, b, c) 所示。由图 2 可以看出,硼酸盐浓度为 55 mmol/L 时分离效率较高,迁移时间较短。虽然随着浓度的改变分离度的变化趋势不很明显,但对于分离度最小的葡萄糖而言,硼酸盐浓度为 55 mmol/L 时,其分离度达到最高。因此实验选择硼酸盐浓度为 55 mmol/L。

**3.1.2 pH 值对分离的影响** 溶液 pH 值的调节对于溶质的分离具有较大的影响,pH 的高低会引起溶质所带电荷的改变<sup>[7]</sup>,从而影响溶质的迁移行为。此外,pH 的改变还伴随着电渗流的变化,引起分离

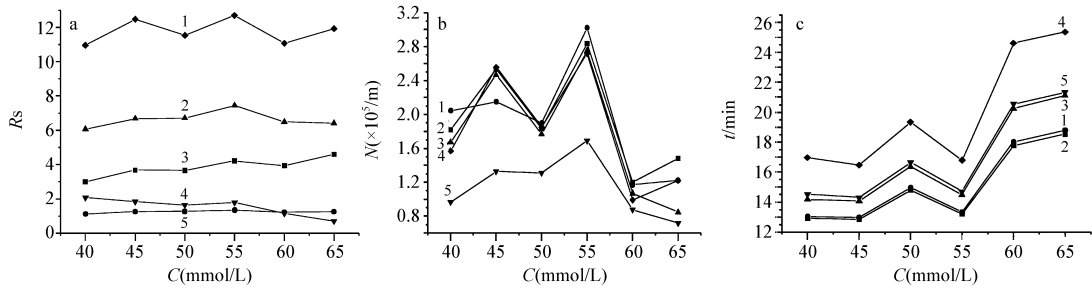


图 2 硼酸盐浓度对分离度 (a)、理论塔板数 (b) 和迁移时间 (c) 的影响

Fig 2 Effect of borate concentration on resolution (a), theory plates (b) and migration time (c)

1. 半乳糖 (galactose, Gal) 葡萄糖醛酸 (glucuronic acid, GlcUA); 2. 鼠李糖 (rhamnose, Rha) 甘露糖 (mannose, Man);  
3. 木糖 (xylose, Xyl) 阿拉伯糖 (arabinose, Ara); 4. 甘露糖 (Man) 岩藻糖 (fucose, Fuc); 5. 阿拉伯糖 (Ara) 葡萄糖 (glucose, Glc)。条件 (conditions): pH=9.46, 温度 (temperature) 20 , 电压 (voltage) 22 kV。

情况的变化, 所以 pH 值的优化对于分离的影响很大。实验考察了不同 pH 值的缓冲溶液对分离的影响, 从而确定了最佳的 pH 值。图 3(a, b, c) 分别为 pH 值对分离度、理论塔板数、迁移时间的影响, 由图 3 可以看出, pH 9.46 时分离效率最高, 分离时间最短, 分离度较高, 综合这 3 方面因素, 实验选择 pH=9.46。

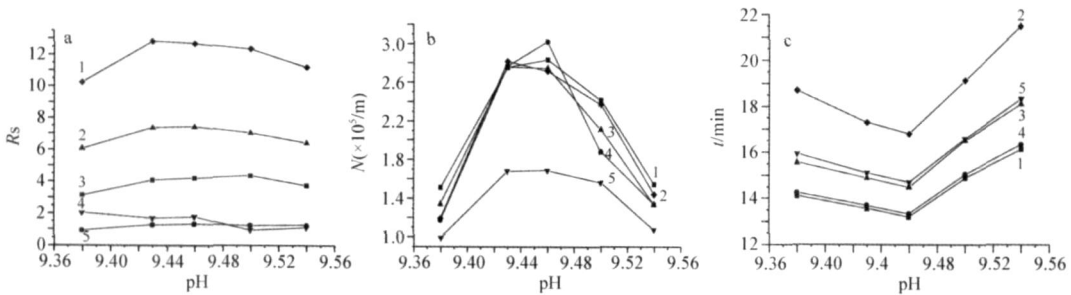


图 3 pH 值对分离度 (a)、理论塔板数 (b) 和迁移时间 (c) 的影响

Fig 3 Effect of buffer pH on resolution (a), theory plates (b) and migration time (c)

a-1. 半乳糖 (Gal) 葡萄糖醛酸 (GlcUA); a-2. 鼠李糖 (Rha) 甘露糖 (Man); a-3. 木糖 (Xyl) 阿拉伯糖 (Ara); a-4. 甘露糖 (Man) 岩藻糖 (Fuc); a-5. 阿拉伯糖 (Ara) 葡萄糖 (Glc)。b, c-1. 阿拉伯糖 (Ara); b, c-2. 葡萄糖醛酸 (GlcUA); b, c-3. 甘露糖 (Man); b, c-4. 葡萄糖 (Glc); b, c-5. 岩藻糖 (Fuc)。条件 (conditions): 55 mmol/L 硼酸盐 (borate), 温度 (temperature) 20 , 电压 (voltage) 22 kV。

### 3.2 温度和电压对分离的影响

毛细管电泳分离过程中维持恒定毛细管温度, 对于散逸分离过程中产生的焦耳热及改善分离都有一定的作用。在 10 ~ 30 之间, 比较了不同温度下糖类的分离情况。结果发现, 温度的变化对实验中糖类分离影响不大。为防止温度过高产生较大的焦耳热而影响分离效果, 实验选择 20 作为毛细管的分离温度。分离电压对迁移时间和分离度也有一定的影响。但升高电压, 由于受焦耳热的限制, 对分离度的贡献相对有限。当电压过高时, 电流增大, 产生较大的焦耳热, 导致毛细管的温度梯度和溶质局部粘度的改变, 从而引起区带变形。尽管缩短了分析时间, 但各组间的分离度相应变差。从整体分离情况看, 实验选用分离电压 22 kV, 9 种糖类衍生物均在 18 min 内出峰完毕, 分析简单快速。

### 3.3 添加剂对分离的影响

在电泳过程中, 在缓冲溶液中加入有机溶剂可以影响介质粘度、介电常数及双电层结构等, 进而影响电渗流及迁移行为, 达到调节选择性、改善分离度的目的<sup>[8]</sup>。实验中考察了异丙醇、乙腈、甲醇 3 种有机添加剂对糖类衍生物分离的影响, 结果发现, 异丙醇、乙腈、甲醇的加入均不能明显改善分离度, 所以在实际分离过程中未加入任何有机添加剂。

### 3.4 糖类的分离

按照上述优化条件,50 kPa压力进样,进样 10 s,硼酸盐浓度 55 mmol/L, pH = 9.46, 柱温 20 ,分离电压 22 kV,对 9种糖类 NMP衍生物进行了分离,并在此最佳条件下对唐古特白刺实际样品进行了分离分析,结果见图 4和表 1。

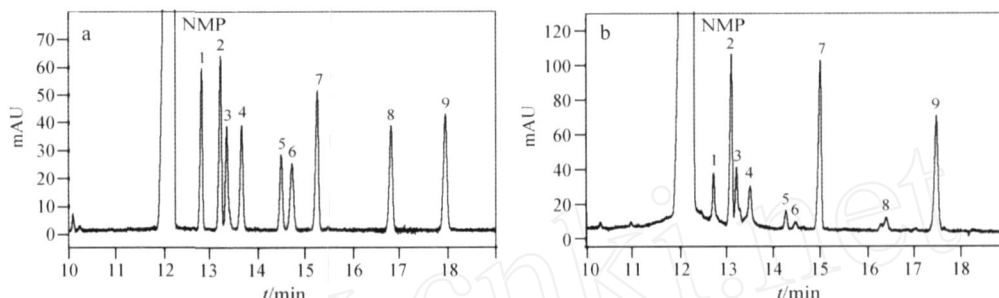


图 4 9种糖类衍生物 (a)和唐古特白刺实际样品 (b)的毛细管区带电泳分离图

Fig 4 Chromatograms of nine derivatized carbohydrates (a) and Tangufican Nitratia sample (b) by capillary zone electrophoresis

1. 木糖 (Xyl); 2. 阿拉伯糖 (Ara); 3. 葡萄糖 (Glc); 4. 鼠李糖 (Rha); 5. 甘露糖 (Man); 6. 岩藻糖 (Fuc);
7. 半乳糖 (Gal); 8. 葡萄糖醛酸 (GlcUA); 9. 半乳糖醛酸 (GalUA)。

表 1 单糖标准品衍生物的分离参数

Table 1 Separation parameters of carbohydrate derivatives

单糖 Carbohydrates	迁移时间 $t$ (min) Migration time	理论塔板数 $N$ Theory plates	分离度 $R_s$ Resolution	选择性 Selectivity
木糖 Xyl	12.8	$3.24 \times 10^5$	3.02	1.05
阿拉伯糖 Ara	13.2	$2.84 \times 10^5$	4.22	1.03
葡萄糖 Glc	13.3	$3.02 \times 10^5$	1.34	1.01
鼠李糖 Rha	13.6	$2.32 \times 10^5$	2.96	1.02
甘露糖 Man	14.5	$2.75 \times 10^5$	7.44	1.06
岩藻糖 Fuc	14.7	$1.69 \times 10^5$	1.79	1.02
半乳糖 Gal	15.2	$2.76 \times 10^5$	4.13	1.04
葡萄糖醛酸 GlcUA	16.8	$2.72 \times 10^5$	12.7	1.10
半乳糖醛酸 GalUA	17.9	$2.57 \times 10^5$	8.94	1.07

条件 (conditions): 55 mmol/L 硼酸盐 (borate), pH = 9.46, 温度 (temperature) 20 , 电压 (voltage) 22 kV, 进样 (injection) 10 s, 毛细管长 (capillary length) 58.5 cm, 内径 (interior diameter) 50  $\mu$ m, 有效长度 (effective length) 50 cm, 波长 (wavelength) 254 nm。

结果发现,唐古特白刺实际样品中 9种糖类物质均含有。其中阿拉伯糖 (Ara)、半乳糖 (Gal)、半乳糖醛酸 (GalUA) 3种单糖含量较高;木糖 (Xyl)、葡萄糖 (Glc)、鼠李糖 (Rha)含量居中;甘露糖 (Man)、岩藻糖 (Fuc)、葡萄糖醛酸 (GlcUA)含量相对较低。

### References

- 1 Ding Kan (丁侃), Fang Ji-Nian (方积年). *Chinese Journal of Chromatography (色谱)*, **1999**, 17(4): 346 ~ 349
- 2 Nishi H, Kuwahara Y. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2002**, 27(3/4): 577 ~ 585
- 3 Chankvetadze B, Burjanadze N, Blaschke G. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2002**, 27(1/2): 153 ~ 159
- 4 Suzuki S, Tanaka R, Takada K. *J. Chromatogr A*, **2001**, 910(2): 319 ~ 329
- 5 Zhao Yan (赵燕), Liu Li (刘莉), Yang Xing-Bin (杨兴斌), Li Xiao-Ye (李晓晔), Liu Wen-Min (柳文敏), Zhang Sheng-Yong (张生勇). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, **2006**, 34(2): 255 ~ 258
- 6 Zhang Li (张利), Chen Zhen-Zhen (陈蓁蓁), Wang Yan (王燕), Tang Bo (唐波). *Chemical Research and Application (化学研究与应用)*. **2003**, 15(10): 5
- 7 Yuan Wei (袁炜), Lü Jian-De (吕建德), Fu Xiao-Yun (傅小芸). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, **2000**, 28(6): 749 ~ 752

8 Ming Yong-Fei(明永飞), Sun Yu-Xi(孙玉希), You Jin-Mao(尤进茂). *Chemical Research* (化学研究), 2003, 14(3): 9~12

## Separation of Derivatized Carbohydrates by Capillary Zone Electrophoresis

Sheng Xiao<sup>2</sup>, Ding Chen-Xu<sup>1</sup>, Liu Ling-Jun<sup>2</sup>, Suo You-Rui<sup>1</sup>, Sun Zhi-Wei<sup>2</sup>, You Jin-Mao<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup> (Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001)

<sup>2</sup> (College of Chemistry Science, Qufu Normal University, Qufu 273165)

**Abstract** A simple and rapid method was developed for the separation of derivatized carbohydrates using 1-naphthyl-3-methyl-5-pyrazolone (NMP) as derivatization reagent by capillary zone electrophoresis. The detection was performed with diode array at 254 nm. A 58.5 cm × 50 μm i.d. (50 cm effective length) untreated fused-silica capillary was used. To optimize the conditions, the background electrolyte concentration, buffer pH, column temperature, voltage and other factors were studied. It was found that the buffer concentration and pH value have a greater impact on the separation, but the influences of temperature, voltage and additives on resolution were not obvious. On the basis of the optimization, the optimum conditions are as follows: 55 mmol/L borate buffer (pH 9.46), voltage 22 kV, column temperature at 20 °C and detection at 254 nm. The samples were atmospherically introduced with an injection time of 10 s. The results indicate that 9 NMP-derivatized carbohydrates achieve baseline resolution within 18 min under the proposed conditions. The Tangufican Nitratia sample was also analyzed under the optimum conditions.

**Keywords** Carbohydrates, capillary zone electrophoresis, 1-naphthyl-3-methyl-5-pyrazolone

(Received 18 June 2007; accepted 13 October 2007)

## 2008 年全国化学与光谱分析会议 (第一轮通知)

2008 年全国化学与光谱分析会议由中国机械工程学会理化检验分会主办,西北师范大学、湖南大学、上海材料研究所共同承办,定于 2008 年 7 月下旬在兰州召开。竭诚欢迎全国高等院校、科研机构和产业部门从事化学与光谱分析研究和应用开发的朋友们参加,会议期间将举行仪器的展示活动,欢迎广大的相关企业踊跃参加。

### 1 征文范围

各种材料,以及涉及生命科学、生物工程、环境保护、食品卫生等专业领域分析化学的新技术、新方法、应用成果以及相应学科发展前沿与进展。应征论文应尚未在期刊上发表或其它会议宣读,被征用的论文将收录在《理化检验—化学分册》2008 年增刊上。

应征论文涵盖:(1)化学与光谱分析的理论研究;(2)原子光谱及其应用;(3)分子光谱及其应用;(4)激光光谱、光谱成像技术等;(5)表面等离子共振 (SPR)技术;(6)表面增强光谱 (红外、拉曼、荧光光谱);(7)近红外光谱、红外光谱、二维相关光谱等;(8)化学及光谱分析在材料科学、生命科学、生物工程、环境保护、食品卫生等领域的应用;(9)化学分析实验室建设与管理。

### 2 征文要求

应征论文格式按《理化检验—化学分册》杂志征稿简则,限制在 4000 字以内,提供中英文摘要,并接受英文稿件。应征论文请用 E-mail 投至 mjtiao@ptcai.org 信箱,投稿时必须注明“2008 年全国化学与光谱分析会议投稿”字样。

论文截稿日期为 2008 年 3 月 31 日。

联系人:中国机械工程学会理化检验分会秘书处 陶美娟、金永祥、梅坛

地址:上海市邯郸路 99 号,上海材料研究所检测中心 邮编:200437,电话:021-55541226,13916102205

传真:021-65539089, E-mail: mjtiao@ptcai.org; mjtiao@sct.org.cn