

· 药物分析和鉴定 ·

高效液相色谱法在体液成分糖质分析中的应用

解放军总后医学专科学校 张 惠

提要: 本文介绍了近年来用高效液相色谱法分析体液成分中糖质的离子交换法, 分配色谱法, 凝胶过滤色谱法, 高效亲和色谱法等。

糖质中除单糖、寡糖、多糖等单由糖分子(单纯糖质)所组成成分外, 尚有糖分子与各种甙元所组成的甙。以及糖与蛋白质或脂质的结合体, 所谓糖蛋白质和糖脂质的复合糖质。在自然界和体内分布很广泛。糖质在化学结构上有很多类似, 又有很多的异构体, 并且在体内或自然界常以几种糖共同存在。所以在糖质分析中有很多的干扰。使用基质特异性高的酶, 作为目的的糖成分可以进行特异分析, 但这样方法有一定限制, 所以近年来报道甚少。因此, 在定量前需要分离, 其分离技术就要利用各种色谱法。

1982年以来在美国化学文摘(CA)中收录的糖质分析文献, 用DIALOG检索, 高效液相色谱法(HPLC)文献约为120篇, 为其他色谱法篇数的总和。本文搜集了1982年以来的HPLC法分析糖质文献, 必要时也参照了以前的文献, 现分类评述如下。

一、离子交换树脂法及柱后标记技术

50年代就有人用离子交换树脂进行糖质分析, 由于当时离子交换树脂性能差, 柱后标记试剂反应慢且有干扰的副产物产生。以后经过多次的改进, 在分离效率等方面有很大提高(当时为常压柱色谱法)。Honda等使用交联度低的球形季铵型阳离子交换树脂(日立2633), 以二段梯度洗脱, 天然存在的全部醛糖约60min即可分离成功, 并分离了糖醇, 糖醛酸, 唾液酸等。又用磺酸型阳离子交换树脂(日立2677); 将糖衍生为硼

酸络合物, 分离了氨基糖。作为硼酸络合物, 利用糖的羟基配位的不同, 所以对异构体的分离也很适合。

还原糖由2-氨基乙酰胺柱后标记, 利用紫外吸收(260nm), 荧光(激发波长283nm, 荧光波长331nm⁵)检测。另外, 标记物在石墨炭电极上由电解电流(附加电压350mV VS AgCl)也可检测⁽⁷⁾。

紫外吸收, 荧光及电化学的检出下限分别为 10^{-9} mol, 10^{-10} mol, 10^{-11} mol。用乙二胺代替2-氨基乙酰胺在高温下标记, 进行电化学检测, 检出下限还可降低。此法在现在糖分析中可算得是最灵敏的方法。

糖的柱后标记法除上述外, 尚有吸光法的2-2-二辛可宁酸法, 四唑鎓盐法, 对氨基安息香酸肼⁽¹¹⁾等。另外, 荧光检测法有用乙醇胺法, 乙二胺法, 牛磺酸法, 精氨酸法, 苯甲酰胺法, β -氨基丙基乙腈法。电化学检测用的标记法除2-氨基乙酰胺和乙二胺外, 尚有二氮杂菲-Ca(I)络合法, 其灵敏度与乙二胺法几乎相等。

二、分配色谱法和柱前标记法

分配色谱法是分析糖的另一个重要分支, 它的保留时间比阳离子交换树脂色谱法短。将硅胶上所有的硅羟基用烷基或氨基烷基取代作为固定相。分配色谱法成功的分离了寡糖, 用肼或硼氢化物在碱性条件下, 将糖从糖蛋白质中释放出来, 在1h内分离。但这种方法事先要用凝胶渗透色谱, 或电泳以

及纸色谱纯化寡糖,所以不适用于常规分析。近年来因离子交换树脂有很大改进,本田等用分配型再上典型的离子交换型树脂,确定了在糖蛋白质中醛糖,氨基糖,唾液酸等的分析条件,柱填充以质子型磺化苯乙烯-二乙烯苯聚合物,检测在280nm,以后用2-氰基乙酰胺柱后标记。另外,此多孔结构树脂也可起到分子筛的作用,用于分离分子量大小不同的寡糖。

将硅胶烷基化或氨基烷基化,用含水乙腈作流动相,用差示折光检测器检测,此系统主要以中性糖为对象,利用分配型进行分离。此分离型本来是根据样品极性差异,适合于碳原子数不同的单糖间,脱氧糖和N-酰化氨基糖和醛糖以及酮糖间,以及聚合度不同的糖种间等分离。但对立体异构体和位置异构体的分离效果不佳。Blanken等用烷基氨基化硅胶柱研究了65种单糖及寡糖的洗脱时间与糖结构间的关系。小泉等的关于寡糖分离报告引起人们的注视,他们对具有各种结合样式的同族系列寡糖的分离进行了讨论,同系列聚合度在20~30的寡糖分离获得成功。氨基烷基化系统的缺点是洗脱液的酸碱性柱效率易发生变化,再现性不佳。特别是对体液样品连续分析时此倾向性更强,柱老化快。用烷基化硅胶柱一般比氨基烷基化硅胶柱更易老化,但在洗脱液中脂肪族胺作为改性剂,可使分离效率改进。

这些系统在检测方面,都专用差示折光,检测灵敏度都不高,检出下限为 10^{-9} ~ 10^{-10} mol。

因此,这些系统适合于食品,衣料品,药品中单糖或寡糖,对糖可分析的种类较少,样品用量较多。不适用于常规分析,仅适用于试验研究用。

柱前标记法因难于自动化,衍生化技术需由操作者自己动手处理,大量常规分析就显得花费时间。但标记的衍生物比原样品的疏水性增强,所以也适用于在硅胶上正相

分配方式。为此也开发了一些方法。苯二甲基硅烷化是用正相分配紫外检测系统,丹酰肼化,还原的吡啶氨基化等得到好评。此二者是用反相分配荧光检测系统。一般伴随衍生化后,还原糖的端基异构体的互变消失,各还原糖出现复峰,所以对含有多种糖成分的样品分析很困难。丹酰肼化不是端基异构体的消失,而是有正/反异构体的问题。上述方法中只有还原的吡啶氨基化法有一个峰,使分析单纯化,但环结构消失分子刚性(rigidity)减少,单糖的相互分离不容易。

三. 凝胶过滤色谱法

将磺化苯乙烯-二乙烯苯聚合物的树脂细孔大小加以调节,可利用为凝胶过滤色谱。使用H型,有分析聚合度1~7麦芽寡糖的例子。又有使用这些树脂的Ca型和pb型,在这些金属配位的水分子和糖分子的羟基之间发生配位交换,所以可以分离糖,此型为糖分析所特有,用水就可洗脱所以很方便。但是,端基异构体和异构体间的分离只有某种程度的可能性,可分离糖的种类并不太多。磺化苯乙烯-二乙烯苯基聚合物因具有磺酰基,可以将氨基糖等碱性糖,直接用阳离子交换型分离,用含酸的洗脱液洗脱时,因离子筛析效果可以分离酸性糖。

本型因均可将水或比较稀的缓冲液作为流动相,容易采用各种柱后标记法。用水或含水乙腈的流动相均可使用差示折光检测,如果样品用量不受限制时可采用本法。但用磺化苯乙烯-二乙烯苯聚合物进行分析,不论那种类型可以分离糖的种类均受到限制。

四、高效亲和色谱法

高效亲和色谱法是有希望分析临床样品的糖蛋白质,现在用空心柱,Waltes和Borchert等采用了高效亲和色谱法用于临床分析糖样品。典型的亲和色谱法以琼脂糖主要作为不溶性载体,然而硅胶经化学修饰也可使用。

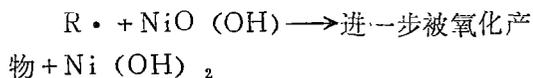
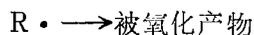
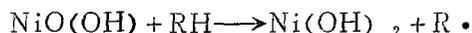
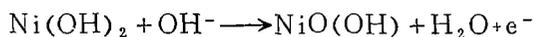
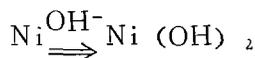
Borrepaok等作了研究报道,他们将亲和色谱法结合以筛析色谱法,用多孔硅胶(10 μ m)作亲和色谱的固定相,连接到T-SKG-3000SW柱,作为筛析色谱用此复合柱,于2小时内完成了血浆(6 μ l)中5种糖蛋白质的分离。

五、其他方法

阴离子交换树脂/碱性溶液—电化学检出。Rocklon等^{3,6)}将金电极浸于糖的碱性溶液,产生正电位,使糖被氧化,用3个电位交互附加脉冲,一面电极表面不断净化,一面进行电解电流的模拟(Simulation),可以显现将糖以高灵敏度检出。由阴离子交换树脂与强碱性的阴离子交换型(此时糖变为酸而分离)分离糖,适用于此检出法的装置已有市售,但分离糖的种类仍受限制。此外,一般的阴离子交换树脂长期与强碱性溶液相接触则发生分解,分解产物对糖的检出有干扰,所以必需用耐腐蚀性树脂。用此系统检测方法选择性低,对糖以外的物质也有检出的可能性,不仅还原糖连糖醇等非还原糖也可检出,此方法的检出下限为 $10^{-11} \sim 10^{-12}$

mol。

上述用金电极脉冲电流滴定而代之利用以镍电极上的氧化检出法也被人重视。其机理如下,但电极的耐久性等的研究尚有待探讨。



七、结 语

糖的种类和各种异构体众多,所以精细分析是很必要的。目前,在糖分析及与蛋白质和核酸的有关化合物的分析,不能说近于完成。关于用气相色谱法,电泳法,薄层法来分析糖质仍有一些好的方法,因篇幅所限将另行介绍。因与糖质有关的领域非常广泛,很多疾病也与糖及其代谢产物有关,期待更好的新方法问世。

(参考文献共39篇略)

用快速比色法测定复方新诺明小儿片溶出度和含量均匀度

朝晖药厂
第二军医大学
药学院

郑棣君 蒋雪涛
柳正良 宓鸣鹤

复方新诺明制剂中SMZ和TMP的测定,已有多种方法报道:如永停滴定法⁽¹⁾,紫外光谱法⁽²⁾,气相色谱法⁽³⁾,液相色谱法^(4,5),比色法⁽⁶⁾和示波极谱法⁽⁷⁾等。为了考察复方新诺明小儿片的溶出度和均匀度,我们对各种测定方法进行了比较,综合考虑了快速,简便,不需昂贵仪器设备又有足够的灵敏度和精密密度等因素,参照Sanyal AK.和Iaha D.⁽⁶⁾的快速直接比色法,对其中的某些操作条件进行了考察,较满意地完成了

小儿用复方新诺明片剂的溶出度和均匀度的测定。

实验部分

一、仪器与试药

721分光光度计(上海分析仪器厂),80—1型药物释放度测定仪(江苏武进精密仪器厂),旋涡混合器,(上海第一医学院XW-80型);溴酚蓝试液(0.3%W/V的枸橼酸—磷酸盐缓冲液,pH3.2,37.7ml 0.1M枸橼酸与12.3ml 0.2M磷酸氢二钠混