

使用 TSKgel Amide-80 高效正相分配色谱填料 分离糖类¹

目录

1. 简介	1
2. 糖类的洗脱行为	1
3. 方法开发	4
4. 应用	5
5. 操作条件注意事项	6
6. 结论	8



TOSOH BIOSCIENCE

TOSOH

1. 简介

糖类是一类基本物质，可表达各种生物活性，并可能独立存在或者与蛋白质或脂质形成复合物。对复合碳水化合物中的糖类和糖链进行分析可以为医疗、科研、食品等行业提供有价值的信息。在过去，糖类分析使用了各种方法，包括不同的高效液相色谱 (HPLC) 模式。

根据聚合和缩合程度，糖类可分为单糖、双糖、寡糖和多糖。单糖和双糖的分离方法包括阴离子交换色谱法（在存在硼酸条件下形成阴离子糖类硼酸复合物）¹、正相色谱法²⁻⁶、配位体交换色谱法⁷以及强碱性 pH 值条件下的阴离子交换色谱法⁸。

可选择的寡糖分离方法包括凝胶过滤色谱法⁹、正相分配色谱法^{2,5,6,10}和反相分配色谱法^{11,12}，而多糖最常用的分离方法为凝胶过滤色谱法。

理解这些分离模式的特点并为目标样本选择最佳分离模式，这一点很重要。

在这些 HPLC 模式中，正相色谱（通常也被称为亲水作用色谱 (HILIC)）可选择性地保留多元醇（例如糖类），而大部分低极性物质和一元醇物质则不保留，或接近不保留化合物的洗脱体积。正相色谱配以示差折光检测器，长期用于糖类分析，因为其提供了良好的选择性，并且分析时间相对较短。

糖类分离的传统填料通常包括离子交换树脂^{2,10}和氨基键合硅胶^{3,4,6}。这些填料在物理和化学稳定性方面不尽人意。TSKgel Amide-80 填料的固定相含有非离子氨基酰胺基，并与硅胶颗粒进行化学键合。相较于所谓的氨基键合固定，非离子固定相赋予了 TSKgel Amide-80 优异的化学稳定性。固定相 -NH 基团的 H 原子可以和羟基或羰基的氧原子形成氢键，具有强大的锁水性能。这在水溶性有机溶剂和水的混合溶液中形成了一个富水的分配相，使得采取正相分配模式进行分离成为可能。相较于非离子型二醇键合硅胶，其可以优先保留糖类和其他多元醇，并且可以在更实用的洗脱条件下使用。

本报告介绍了 TSKgel Amide-80 的基本属性以及在中性单糖、糖醇和寡糖分离中的某些应用。

2. 糖类的洗脱行为

2-1 分离机制和温度的影响

TSKgel Amide-80 可在有机/水溶剂系统（例如乙腈/水）中保留极性化合物（例如糖和多元醇）。为了说明这一点，图 1 中的色谱图显示了各种糖醇的分离。基本上，化合物的羟基越多，其极性就越大，在 TSKgel Amide-80 柱上保留的时间就越长。此外，对甘露醇和肌醇（各有 6 个羟基）的保留情况的比较表明，由于肌醇为环状结构并且在流动相（乙腈/水系统）的溶解度较低，其保留时间更长。通常，溶质的保留受流动相极性的影响很大，随着流动相中含水量的减少，其呈现出更强的保留倾向。图 2 说明了这一点。这种趋势并不仅限于糖醇。在单糖、双糖和寡糖中亦可见到。

此外，单糖按照碳原子数增加的顺序进行洗脱。例如，戊糖先于己糖洗脱。在特定类别中，例如己糖，选择性会随着分子结构中的轻微差异而变化，类似的己糖亦是如此，这使得该类别的单个成员得以分离。

分析寡糖时，需要将含水量增加 20% 至 30%，因为使用适合单糖分离的流动相时，其保留时间会太长。此外，据了解，还原糖分子结构包括 α 或 β 型结构，吡喃或呋喃结构等，它们并不是仅作为一种单一的结构呈现，而是一般都能够转换为另一种结构，直至达到平衡。此转换过程被称为变旋，其速率常数在室温中性条件下通常相当缓慢。

因此，在这种条件下，即使是单糖亦可能被分离和检测到两个或两个以上的峰。图 3 显示了 D-葡萄糖在 TSKgel Amide-80 柱上分离时温度对其色谱图的影响。很明显，在 60°C 或更低时，色谱图中显示了多个峰，每个峰代表了一种不同的分子结构。

对于 D-葡萄糖，当柱温升至 70°C 或更高时，则仅检测到单峰，如图 3 所示。虽然检测到单峰时的温度随还原糖类型的变化而不同，但大多数糖可以在 80°C 或更高时检测到单峰。

图 4 显示了温度对分离的影响。一般来说，当除温度之外的洗脱条件保持不变时，温度越高，洗脱时间越短。

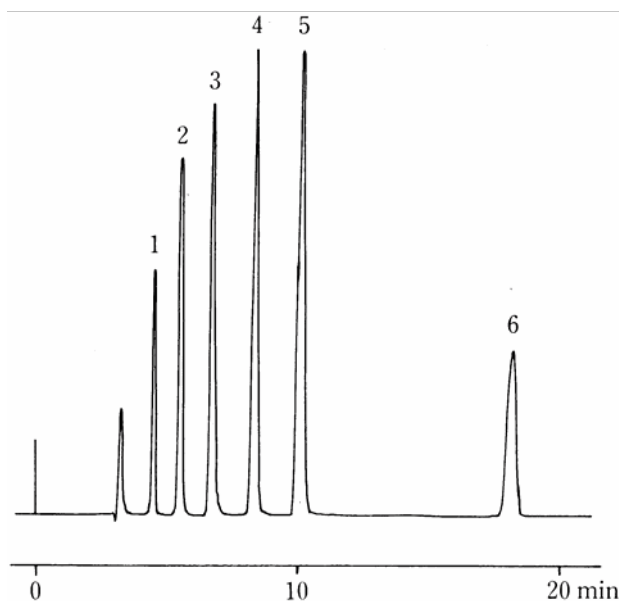


图 1 多元醇的分离

色谱柱: TSKgel Amide-80
4.6mm ID x 25cm
洗脱液: 乙腈/水 = 75/25
流速: 1.0mL/min
温度: 25℃
检测: RI
样品: 1. 乙二醇 2. 甘油 3. 赤藓糖醇
4. 木糖醇 5. 甘露醇 6. 肌醇

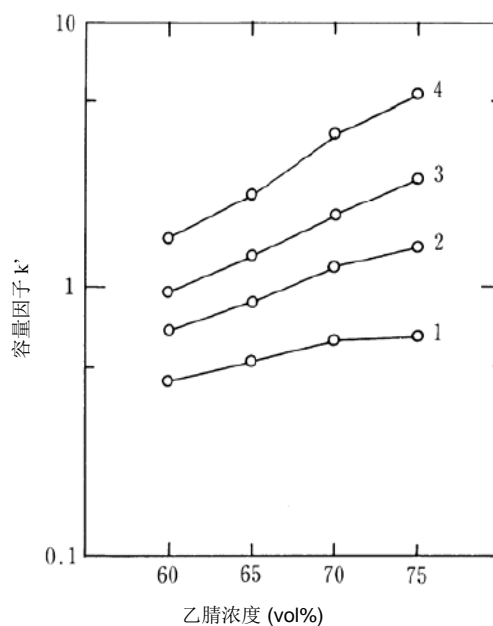


图 2 洗脱液乙腈浓度对多元醇保留的影响

色谱柱: TSKgel Amide-80
4.6mm ID x 25cm
洗脱液: 乙腈/水
流速: 1.0mL/min
温度: 25℃
检测: RI
样品: 1. 乙二醇 2. 木糖醇
3. 甘露醇 4. 肌醇

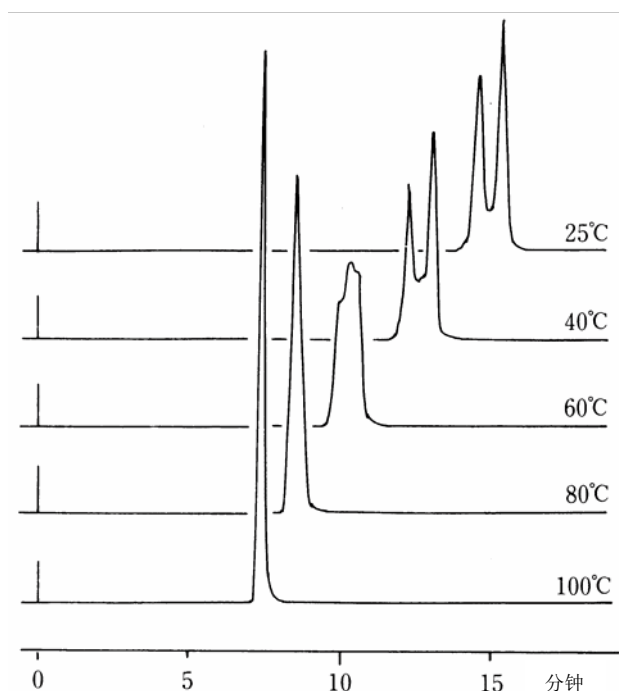


图 3 柱温对 D-葡萄糖色谱的影响

色谱柱: TSKgel Amide-80
4.6mm ID x 25cm
洗脱液: 乙腈/水 = 80/20
流速: 1.0mL/min
检测: RI
样品: D-葡萄糖

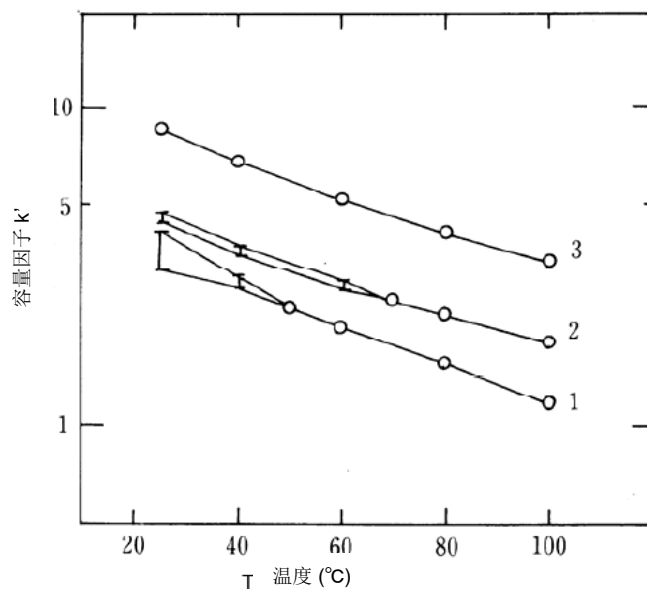


图 4 柱温对保留的影响

色谱柱: TSKgel Amide-80
4.6mm ID x 25cm
洗脱液: 乙腈/水 = 80/20
流速: 1.0mL/min
检测: RI
样品: 1. 果糖 2. 葡萄糖 3. 蔗糖

2-2 理论塔板高度 (HETP)

理论塔板高度 HETP 通常缩写为 H，用于表示在特定操作条件下某溶质的色谱柱效率。H 是柱长与理论塔板数之比 ($H=L/N$)。H 随流速不同而异，如图 5 所示。H 的值越低，柱效就越高，所得到的峰就越好。

在室温 (25°C) 下注射甘露醇，当流速为 0.15mL/min 至 0.3mL/min 之间时，N 的计算值大约为每米 80000 理论塔板。从实用的观点来看，流速在 0.5 至 1.0mL/min 范围内是分离效率和分析时间之间的一个很好折中点。

在 80°C (见图 6) 时还原糖 (例如 D-葡萄糖) 效率最佳 (最低的 H 值) 的流速为 0.25mL/min，这是在此温度下检测的最低流速。我们推测还原糖的最佳效率实际上在流速低于 0.25mL/min 时取得。

同样也是在 80°C 时，非还原糖 (例如甘露醇和蔗糖) 的最小 H 值在流速为 0.5 至 1.5mL/min 时取得。

据推测，导致这一现象的原因是糖类的变旋异构体之间的转化速率比色谱柱流动相和固定相之间溶质的分配速率更低，从而导致谱带增宽。

注意，由于 TSKgel Amide-80 是一种基于硅胶的填料，当色谱柱在乙腈/水溶剂系统中进行高温操作时，其寿命将受到不利影响。

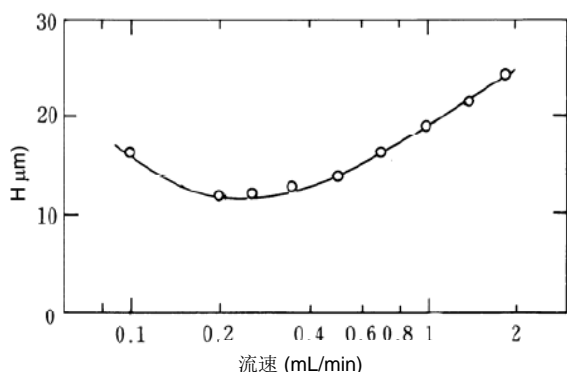


图 5 25 °C 时流速对 H 的影响

色谱柱: TSKgel Amide-80
4.6mm ID x 25cm
洗脱液: 乙腈/水 = 75/25
温度: 25°C
检测: RI
样品: 甘露醇

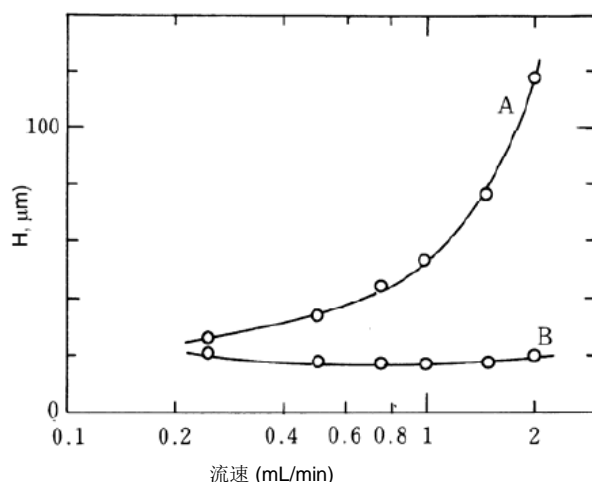


图 6 80°C 时流速对 H 的影响

色谱柱: TSKgel Amide-80
4.6mm ID x 25cm
洗脱液: 乙腈/水 = 80/20
温度: 80°C
检测: RI
样品: A. D-葡萄糖
B. 甘露醇

2-3 载样量

图 7 显示了流动相对最大载样量^{*}的影响。例如，对于单糖和双糖的分析，在图中所列流动相条件下每个组分进样量为 20 µg 或更少为适当，而对于寡糖，在所列条件下，每个组分注入量为 200µg 或更少为适当。此外，据认为，50µL 或更少的进样量可以防止色谱柱超载。图 7 还显示，通过提高流动相中水的比例，可在在色谱柱超载之前注入更多的样本。

- 最大载样量指的是在不减少峰宽的情况下可以添加到色谱柱的样品量。虽然可以为色谱柱添加更高的进样量，但这不可避免地会导致柱效损失。

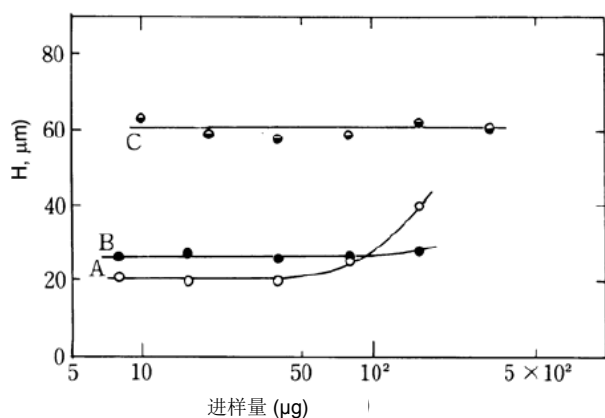


图 7 载样量

色谱柱: TSKgel Amide-80
4.6mm ID x 25cm
洗脱液: A: 乙腈/水 = 75/25
B: 乙腈/水 = 65/35
C: 乙腈/水 = 55/45
流速: 1.0mL/min
温度: 25°C
检测: RI
样品: A,B: 甘露醇
C: 麦芽五糖

2-4 定量

众所周知，还原糖可与氨基羟基固定相反应形成席夫碱。这导致固定相发生不可逆变化，从而使氨基柱不适宜进行进一步的分析。另一方面，还原糖不与 TSKgel Amide-80 柱反应，即使注射微量样本量亦可进行良好的定量。图 8 显示了在使用示差折射仪研究进样量与峰面积之间的关系时呈现的出色线性。

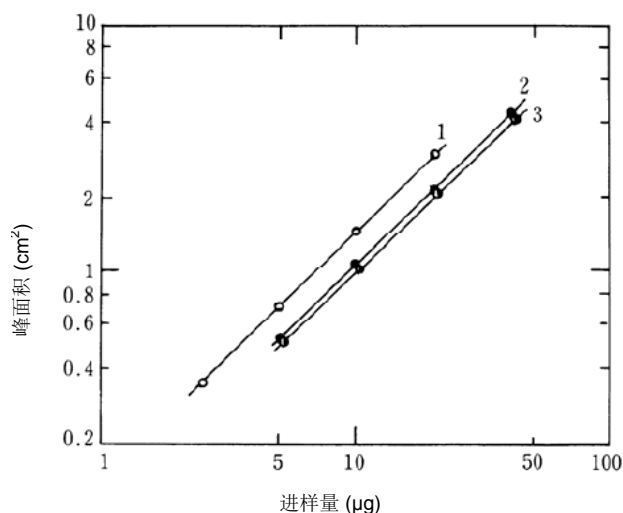


图 8 进样量与峰面积之间的关系

色谱柱: TSKgel Amide-80
4.6mm ID x 25cm
洗脱液: 乙腈/水 = 80/20
流速: 1.0mL/min
温度: 80°C
检测: RI
样品: 1. 赤藓糖醇
2. 葡萄糖
3. 木糖

3. 方法开发

如前一节所述，有必要对各种流动相条件进行研究，以优化保留和选择性。以下给出了使用 TSKgel Amide-80 柱进行方法开发时的一些指南。

3-1 影响保留和洗脱顺序的因素

(1) 流动相中有机溶剂和水之比

基本概念见第 2-1 节。请参见图 2 以及图 9 和 10 的应用。

(2) 流动相中的有机溶剂

乙腈和丙酮已成功地作为 TSKgel Amide-80 柱的流动相成分。低级醇亦可用于寡糖的分离。

(3) 流动相的 pH 值和盐浓度

洗脱碱性样本时，pH 值需要降低至约 3.0。此外，所需盐浓度约 10 至 20mM。

(4) 柱温

基本概念见第 2-1 节。图 3 和 4 显示了柱效和保留随柱温的不同而异。

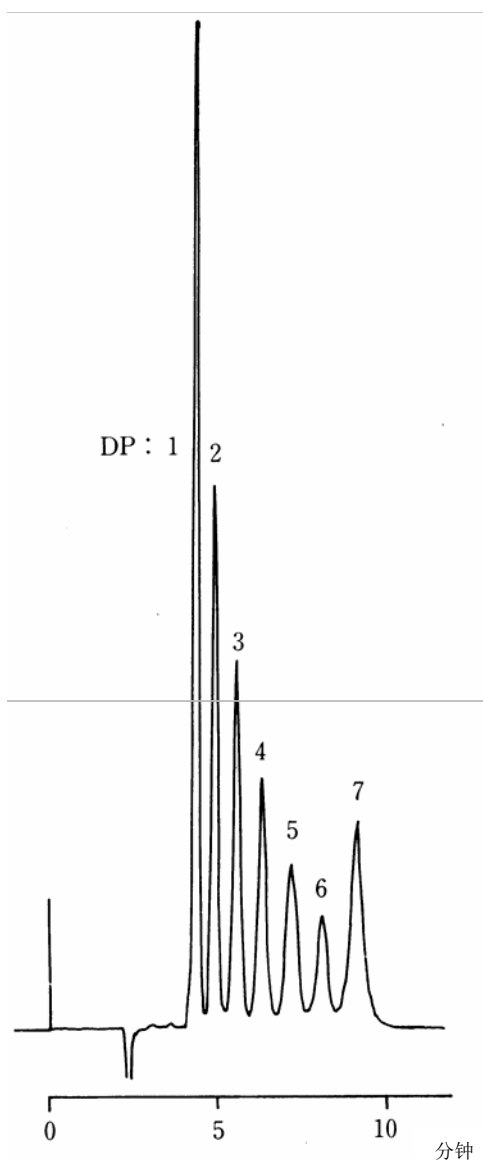


图 9 β -环糊精酸水解产物的分离

色谱柱: TSKgel Amide-80
4.6mm ID x 25cm
洗脱液: 乙腈/水 = 55/45
流速: 1.0mL/min
温度: 25°C
检测: RI

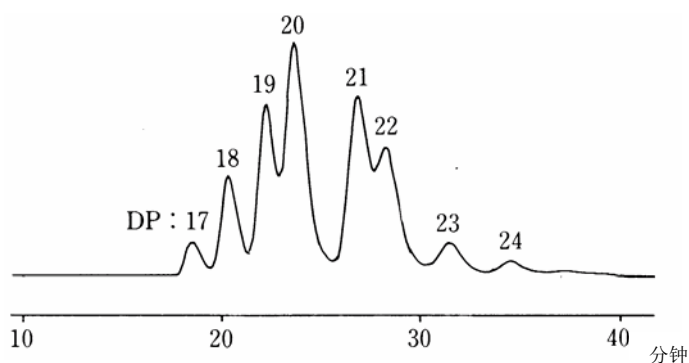


图 10 环糊聚糖的分离

色谱柱: TSKgel Amide-80
4.6mm ID x 25cm
洗脱液: 乙腈 / 水 = 57/43
流速: 1.0mL/min
温度: 25°C
检测: RI

3-2 影响谱带增宽的因素

(1) 流速

第 2-2 节中描述了流量对理论塔板高度的影响。请参见图 3、图 5 和图 6。

(2) 柱温

第 2-1 节和第 2-2 节描述了温度对保留、峰形和柱效的影响。请参见图 3、图 5 和图 6。

(3) 粒径

常规的 TSKgel Amide-80 柱使用了 5 μ m 颗粒。最近推出了效率更高的 3 μ m 柱。

(4) 样本溶液

请参见第 5-1 节。

(5) 载样量和进样量

请参见第 2-3 节和图 7。

4. 应用

4-1 寡糖的分离

(β -环糊精酸水解产物)

如图 9 所示, 分析开放形式的 β -环糊精时, 葡萄糖和所有低聚物 (包括七聚体) 在 10 分钟内都得到完全分离。在这些条件下, 可能存在的任何完整 β -环糊精在四聚体的位置洗脱。

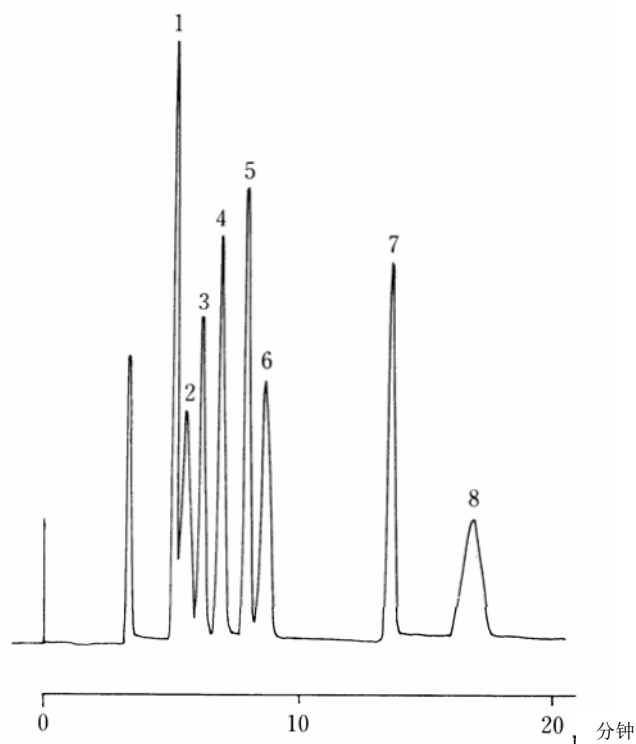


图 11 单糖和双糖的分离

色谱柱: TSKgel Amide-80
4.6mm ID x 25cm
洗脱液: 乙腈/水 = 80/20
流速: 1.0mL/min
温度: 80°C
检测: RI
样品: 1.鼠李糖
2. 岩藻糖
3. 木糖
4. 果糖
5. 甘露糖
6. 葡萄糖
7. 蔗糖
8. 麦芽糖

4-2 寡糖的分离

(环槐聚糖: 环 β -1, 2-葡聚糖)

环槐聚糖的分析如图 10 所示, 17 聚体至 24 聚体程度的环槐聚糖得到分离。

4-3 单糖和双糖混合物的分离

此分离请参见图 11。在该色谱图条件下, 建议在 80 °C 的柱温下对含有还原糖的糖类进行分离。

4-4 糖苷的分离 (粗甜菊糖)

图 12 显示了极性杂质的测量, 这些杂质在反相色谱中通常难以测量。此类型的分离使用正相 TSKgel Amide-80 柱就变得简单多了。

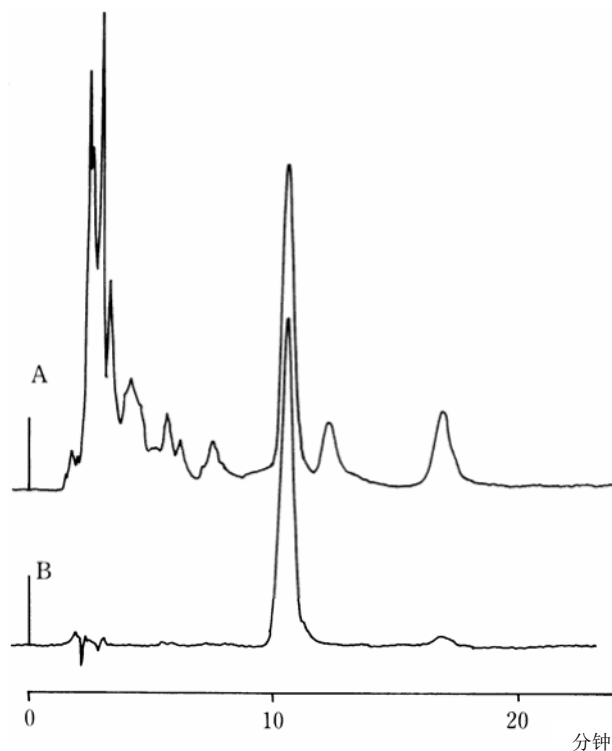


图 12 粗甜菊糖和纯化甜菊糖色谱图

色谱柱: TSKgel Amide-80
4.6mm ID x 25cm
洗脱液: 乙腈/水 = 80/20
流速: 1.0mL/min
温度: 25°C
检测: UV @ 210nm

5. 操作条件注意事项

5-1 样品溶液中的溶剂

一般来说, 在正相分配色谱中, 样品溶剂的极性对谱带增宽有显著影响。表 1 显示了一个此类实验的结果。结果表明, 当样品溶剂的极性高于流动相的极性时, 谱带增宽加大。因此, 建议尽可能使用流动相溶解样本, 或者为已在水中溶解的样本添加有机溶剂以获得与流动相近似的组分。如果样本溶液中的溶剂组分与流动相的不同, 则任何可能产生的负面影响将随着注入量的增大而放大。

5-2 洗脱液组成和压降

与任何 HPLC 色谱柱一样, 色谱柱的压降取决于洗脱液的组分、流速和温度。在正相条件下操作时, 色谱柱的压降将随着流动相中含水量的增加而增加。使用乙腈/水系统时, 通常建议含水量不超过 60%。当含水量较高时, 建议使用较低的流速操作 TSKgel Amide-80 柱。

5-3 柱温箱和进样阀

使用 TSKgel Amide-80 分析还原糖时，柱温箱需要设置在 80°C 左右。通常在这些条件下，样本中含有沸点为 100°C 或更低的有机溶剂。如果使用配有内置进样阀的柱温箱，定量可能会受到溶剂膨胀或汽化的阻碍。因此，建议将进样阀安装在室温下操作的仪器部位，并使用 0.2mm ID 的不锈钢管连接进样阀和色谱柱。

5-4 样品组分吸附和清洗方法

(1) 去除极性物质（中性多糖等）

使用 TSKgel Amide-80 时，很少会吸附不带电荷的疏水性物质。某些多糖可非常紧密地吸附于

TSKgel Amide-80 填料上。要去除此类紧密保留的物质，通常在 0.5mL/min 流速下运行乙腈/水系统 (45/55, v/v) 约 3 小时即可从色谱柱上洗脱这些污染物。此外，在使用含水量比用于测量的流动相高 5% 的溶剂清洁色谱柱不久后，基线通常即可趋于稳定。

(2) 去除阳离子物质

由于 TSKgel Amide-80 采用硅胶为基料，在非缓冲流动相下，填料表面具有带负电荷的残留未键合硅醇基团，会与阳离子物质结合。在流动相中添加微量的盐，即可洗脱和去除这些阳离子物质。例如，在大多数情况下，使用 pH 值为 6.0 的乙腈 /50mM 磷酸盐缓冲液 (50/50) 作为清洁溶剂，以 0.5mL/min 的流速运行约 3 小时，即可去除阳离子物质。

表 1：样品溶剂组成的影响

样品溶剂 乙腈/水 (v/v)	洗脱体积 (mL)	甘露醇 理论塔板数 (TP/柱)	洗脱体积 (mL)	蔗糖 理论塔板数 (TP/柱)
75/2	10.3	14,80	15.0	13,85
60/4	10.3	12,19	14.9	11,73
45/5	10.2	5,51	14.8	5,33
0/10	10.22 *	—	14.86 *	—

* 该峰出现了多个肩峰。峰的最高点作为洗脱体积。

分离条件

色谱柱： TSKgel Amide-80
4.6mm ID x 25cm
洗脱液： 乙腈/水 = 75/25 (v/v)
流速： 1.0mL/min
检测： RI
温度： 25°C
样品： 甘露醇、蔗糖，2.0mg/mL，每种 20 µL

6. 结论

TSKgel Amide-80 是一种高效正相分配色谱柱，被开发用于简化及加快多元醇（例如糖类）的分析。它克服了传统正相分配色谱填料的弱点，取得了较高的精密度和良好的可重复性。

除了 TSKgel Amide-80 柱之外，东曹还提供了其他几种色谱柱用于糖类分析。TSKgel Sugar AX 系列（使用糖类硼酸复合物的阴离子交换法），TSKgel SCX（H⁺型），TSKgel PW 型水凝胶过滤色谱（包括用于寡糖/多糖分离的 PW_{xL} 系列）以及正相分配色谱 TSKgel NH₂ 系列（含有氨基化学键合型硅胶），这些亦可用于糖类分析。

文献

- 1) R. B. Kesler, *Anal. Chem.*, **39**, 1416 (1976)
- 2) E. Martinsson and O. Samuelson, *J. Chromatogr.*, **50**, 429 (1970)
- 3) M. T. Yang, L.P. Milligan and G. W. Mathison, *ibid*, **209**, 316 (1981)
- 4) R. E. A. Escott and A. F. Tayler, *J. HRC&CC*, **8**, 290 (1985)
- 5) M. Abbou and A. M. Siouffi, *J. Liquid Chromatogr.*, **10** (1), 95 (1987)
- 6) Y. Kurihara, T. Sato, M. Umino, *Toyo Soda Research Report*, **24** (2), 35 (1980)
- 7) G. Bonn, *J. Chromatogr.*, **322**, 411 (1985)
- 8) R. D. Rocklin and C. A. Pohl, *J. Liquid Chromatogr.*, **6** (9), 1577 (1983)
- 9) K. Tanaka, T. Kitamura, T. Matsuda, H. Yamasaki and H. Sasaki, *Toyo Soda Kenkyu Houkoku*, **25** (2), 21 (1981)
- 10) J. Havlicek and O. Samuelson, *Anal. Chem.*, **47**, 1954 (1975)
- 11) N. W. H. Chee tham, P. Sirimanne and W. R. Day, *J. Chromatogr.*, **207**, 439 (1981)
- 12) B. Porsch, *J. Chromatogr.*, **320**, 408 (1985)

致谢

图 10 由日本三重大学农业科学系久松博士惠赠。