

TN41 HPAE 分析唾液酸

引言

高效阴离子交换色谱与脉冲安培检测法是一种无需衍生的测定 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 和 N-羟乙酰神经氨酸 (Neu5Gc) 的有效方法[1-6]。很多 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的衍生物在碱性条件下不稳定, 所以不能用常规的 HPAE-PAD 法进行检测。这些取代的衍生物可以在中性条件下分离, 而后柱后加碱, 最后用 PAD 检测[1]。本注解评价了 HPAE-PAD 分析 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的线性、检测限、重复性和准确度。TN41 包括用 CarboPacPA10 柱分离 Neu5Ac、Neu5Gc 和 KDN (内标) 的一系列方法和从糖蛋白中释放唾液酸的方法。对于想用 HPAE-APD 分析唾液酸的研究人员有很大的帮助。

装置

Dionex DX-500 色谱系统, 包括: LC30 柱温箱; GP40 梯度泵; ED40 电化学检测器 (金电极和安培池); AS3500 自动进样器 (不锈钢进样针); Peaknet 色谱工作站

试剂和标准

醋酸钠、50% (w/w) 氢氧化钠、Neu5Ac、Neu5Gc、6N 盐酸、3-脱氧-D-丙三醇-D-乳-2-nonnulosonic acid (KDN)、牛胎球蛋白、牛铁传递蛋白 (脱辅基)、人铁传递蛋白 (部分铁)、Arthrobacter ureafaciens 唾液酸苷酶、自动进样器瓶、盖和隔垫。

条件

柱子: CarboPac PA10 分析柱 (4×250mm, P/N 46110) 带保护柱

流速: 1mL/min; 进样体积: 25µL; 检测器: ED40 电化学检测器 (金电极, 新)

ED40 检测波形:

时间 (毫秒)	电位 (伏特)
400	+0.05
200	+0.75
200	-0.15

淋洗液: A: 100mM NaOH; B: 100mM NaOH/1M NaAc

方法:

时间 (分钟)	A (%)	B (%)
初始	93	7
0.0	93	7
10.0	70	30

11.0	70	30
12.0	93	7

样品和溶液的准备

淋洗液

100mM NaOH 和 100mM NaOH/1M NaAc 淋洗液的配制请参考 TN20。

标准

将 Neu5Ac 和 Neu5Gc 放在干燥器中干燥 24 小时。分别称取 149.8mg 和 41.0mg 的 Neu5Ac 和 Neu5Gc 溶于 50mL 水中配制成 9.68mM 和 2.52mM 的溶液。称取 4.8mg 的 KDN 溶于 5mL 水中配制成 3.58mM 溶液。然后配制 0.4mM 的上述三种溶液的混合标准溶液。如表 1 所示配制各级稀释溶液。

表 1 线性分析的稀释方法

Pmol/25 μ L	0.4mM 混标的体积 (μ L)	水的体积 (μ L)
5000	200	200
2000	80	320
1000	40	360
500	20	380
250	30	1170
Pmol/25 μ L	250 pmol/25 μ L 混标的体积 (μ L)	水的体积 (μ L)
100	160	240
50	80	320
25	40	360
10	16	384
5	16	784
Pmol/25 μ L	5 pmol/25 μ L 混标的体积 (μ L)	水的体积 (μ L)
2	100	150
1	50	200
0.5	25	225

样品

自动进样器测试

分析前, 应该对自动进样器进行测试。安装 100 μ L 定量环, 以 10 μ M 葡萄糖分别进样 5、10、15、25、75 μ L, 每个进样四次。用 100mM NaOH 作淋洗液, 流速为 1.5mL/min。以进样体积对峰面积作图, 线性相关系数的平方应在 0.99 以上, 每次平行进样峰面积的相对标准偏差应小于 1%。如果大于 2% 说明应该对自动进样器进行维护。

结果与讨论

唾液酸的分离

从图 1 可以看出, Neu5Ac、KDN 和 Neu5Gc 用本方法可以很好的分离。KDN 在 Neu5Ac 和 Neu5Gc 之间被淋洗, 有比较合适的保留时间, 可以用作这些唾液酸分析的内标。因为这几类糖酸可以很好的分离, 所以在分离这些化合物时可以采用很多的条件, 见附录。在这里描述的方法分离时间短, 进样间隔只有 27min, 而且 Neu5Ac 的峰 (保留时间为 5.8min) 可以与死体积的峰很好的分开。如果是分析生物体液中的唾液酸或者是在非离子洗洁剂的存在下分离唾液酸, 增加 Neu5Ac 的保留时间会有好处。

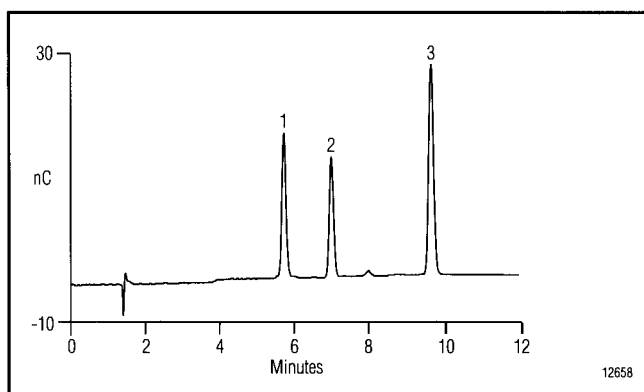


图 1 HPAE/PAD 分离 Neu5Ac (5.8min)、KDN (7.1min)、Neu5Gc (9.8min)

用 HPAE-PAD 分析唾液酸的线性

为了确定 Neu5Ac、KDN 和 Neu5Gc 的线性和最低检测限, 对 0.4mM 的混标和一系列标准稀释溶液 (见表 1) 各 25 μ L 每个进样 5 次。由图 2 可以看出, Neu5Ac、KDN 和 Neu5Gc 在 2-500pmol 进样有很好的线性相关, r^2 分别为 0.9985, 0.9995, 0.9972。由图 3 可以看出, KDN 的线性范围要比 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的线性范围宽。因为 KDN 的电化学响应在 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的线性范围内也呈现线性, 所以是一种合适的内标化合物。

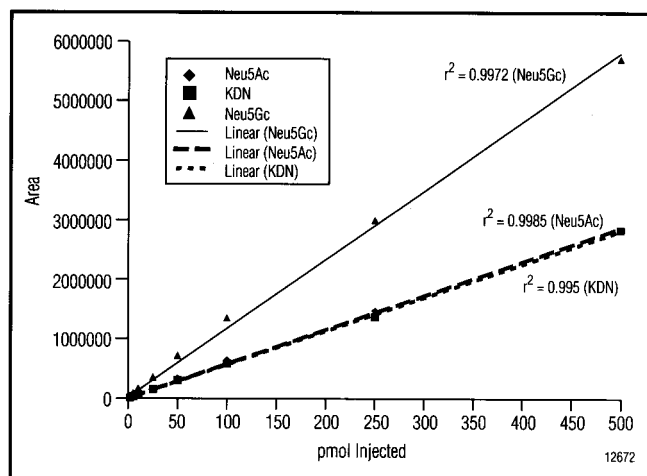


图 2 唾液酸的线性分析 (2-500pmol)

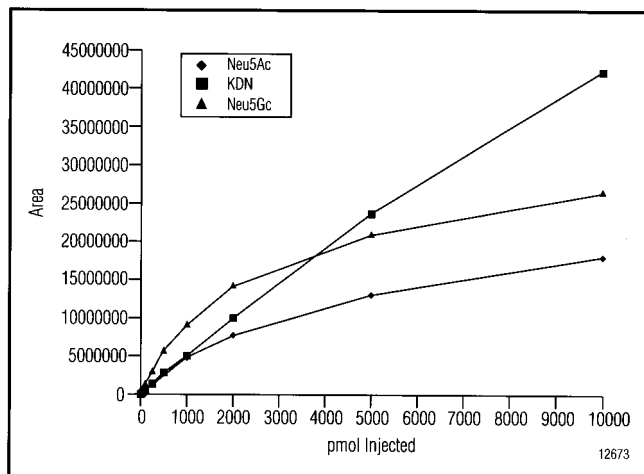


图 3 唾液酸的线性分析 (2-10000pmol)

最低检测限

图 4 是 Neu5Ac、KDN 和 Neu5Gc 各 1pmol 进样的色谱图。Neu5Ac 和 Neu5Gc 的峰高是 4-5min 间基线噪音的三倍以上。KDN 的峰高略低于三倍的基线噪音。500fmol 的 Neu5Gc 的峰高是基线噪音的三倍以上。

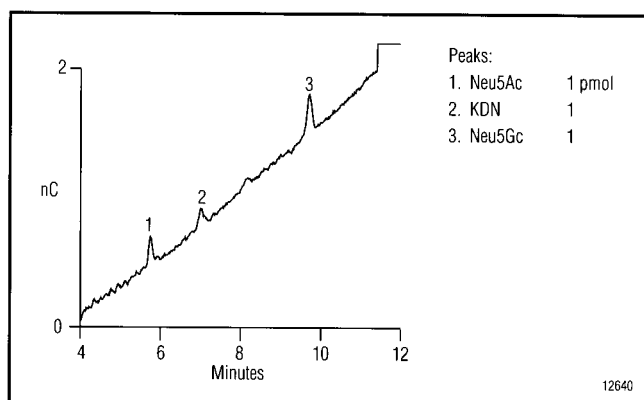


图 4 HPAE / PAD 分离 Neu5Ac、KDN 和 Neu5Gc (各 1pmol)

重复性

为了验证方法的重复性，用 200pmol 的混标 20 μ L 在 48 小时内进样 107 次。六个小瓶中每个装有 500 μ L 混标溶液。其中五个小瓶每个进样 20 次，另外一个小瓶进样 7 次。图 5 是 Neu5Ac、KDN 和 Neu5Gc 连续 107 次进样的结果。三者的相对标准偏差分别为 2.4%、2.2%和 2.8%。在有些情况下，要先进样 5-7 次直到出现稳定的响应值，如图 7 所示。当 Neu5Ac 和 Neu5Gc 用内标校正后，其相对标准偏差分别为 1.3%和 1.1%，如图 6 所示。

这些实验的统计结果见表 2。此外，我们发现温度对这些化合物的电化学响应也有一定的影响。因此，可以通过控制电化学检测池恒定的温度从而得到更好的响应重复性。第二套系统的 Neu5Ac、KDN 和 Neu5Gc 的相对标准偏差分别为 4.0%、2.9%和 1.7%。用内标校正后 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的相对标准偏差分别为 2.6%和 1.9%。此时，KDN 不能改善 Neu5Gc

的相对标准偏差。总体说来,我们发现 KDN 是一种更加适合 Neu5Ac 的内标化合物。Neu5Ac、KDN 和 Neu5Gc 的平均保留时间分别为 5.78min、7.06min 和 9.77min。保留时间的相对标准偏差分别为 0.5%、0.4% 和 0.3%。第二套系统的三者的平均保留时间分别为 5.75min、7.05min 和 9.79min。保留时间的相对标准偏差均为 0.7%。

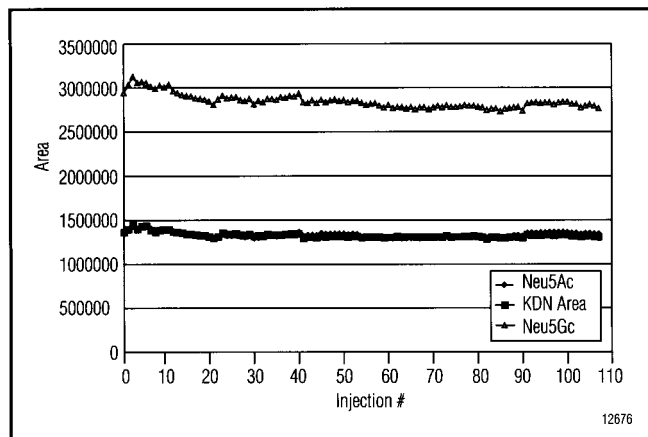


图 5 唾液酸 48 小时进样的重复性

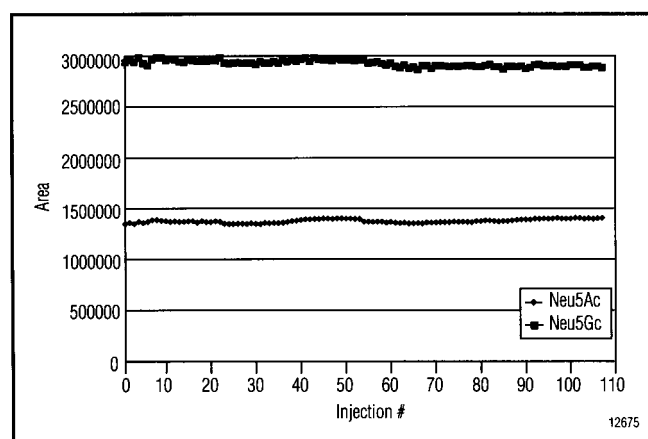


图 6 内标校正

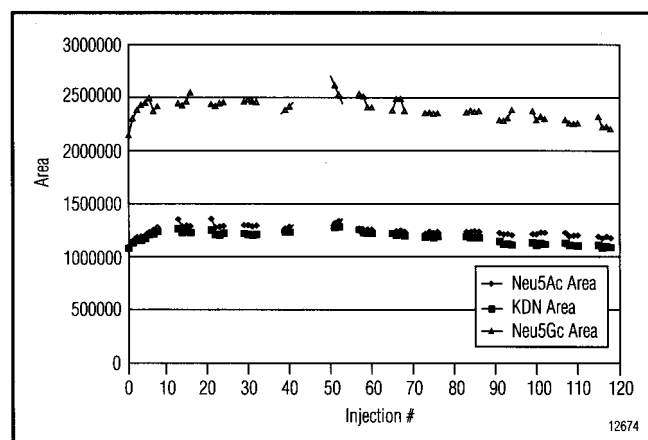


图 7 散布样品的 48 小时唾液酸分析

表 2 唾液酸分析的重复性结果和数据统计

	标准的 48 小时分析	散布样品的标准 48 小时分析
Neu5Ac 的平均面积 (1 单位=0.1pC/s)	1337469	1242470
KDN 的平均面积 (1 单位=0.1pC/s)	1330581	1182139
Neu5Gc 的平均面积 (1 单位=0.1pC/s)	2846095	2384343
Neu5Ac 面积的 RSD (%)	2.4	4.1
KDN 面积的 RSD (%)	2.3	4.5
Neu5Gc 面积的 RSD (%)	2.8	4.0
内标校正后 Neu5Ac 面积的 RSD (%)	1.3	2.5
内标校正后 Neu5Gc 面积的 RSD (%)	1.1	2.3

散布样品的重复性

在有些情况下, 样品中大量蛋白质的存在会使电极表面中毒, 从而减小 PAD 的响应值。内标的加入通常可以补偿这种效应。为了验证 KDN 内标对是否足够补偿这些化合物的响应值的降低, 我们先用 200pmol 的混标溶液进样 8 次 (每次 20 μ L), 然后换成样品 (酸消化或唾液酸苷酶消化) 进样 4 次, 接着再换成标准进样 4 次, 共进样 48 小时 (108 次进样)。样品是 0.1N 盐酸或唾液酸苷酶消化的牛胎球蛋白 (2 μ g, 20 μ L)、牛铁传递蛋白 (3.5 μ g, 20 μ L) 和人铁传递蛋白 (3.3 μ g, 20 μ L)。在实验过程中我们也对 0.1N 盐酸或唾液酸苷酶消化的空白 2 次进样, 每次 20 μ L。图 7 是散布样品的进样的重复性。这个实验的有些统计结果列在了表 2 中。与图 5 不同, 这个实验要求 7 次进样以得到持续的响应。峰面积的相对标准偏差分别为 4.1%、4.5% 和 4.0%。用内标校正后 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的相对标准偏差分别为 2.5% 和 2.3%。第二套系统峰面积的相对标准偏差分别为 5.2%、5.3% 和 6.2%。用内标校正后 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的相对标准偏差分别为 2.3% 和 1.8%。虽然这些实验的相对标准偏差比不加样品的要高, 但是这种高与样品无关, 因为用另外一个旧工作电极 (用了一年之后没有打磨) 的四次 48 小时重复性实验 (两次有标准两次没有标准) 结果表明面积的相对标准偏差小于 3%。Neu5Ac、KDN 和 Neu5Gc 的平均保留时间分别为 5.77min、7.04min 和 9.77min。保留时间的相对标准偏差分别为 0.3%、0.2% 和 0.2%。

糖蛋白中的唾液酸分析

表 3 是散布样品的 48 小时实验中发现的 3 个糖蛋白中 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的含量。牛胎球蛋白、牛铁传递蛋白和人铁传递蛋白的摩尔质量分别为 48、78 和 80KDa。每个糖蛋白

样品中唾液酸的含量与已知值一致[8-11]。图 8 是牛铁传递蛋白分别用 0.1N 盐酸 (A) 和唾液酸苷酶 (B) 消化的谱图。每个谱图都是 3.5 μ g 牛铁传递蛋白和样品消化干燥后 200pmol KDN 加标进样。酸消化样品中 KDN 的响应值略低于唾液酸苷酶消化样品。唾液酸苷酶消化样品中 KDN 的响应值与标准中的响应值一致。因此，酸消化样品中 KDN 的响应值降低了，可能的原因在于酸消化后残留的氯离子抑制了 KDN 的信号。

我们发现，当糖蛋白用 2N 醋酸在 80 $^{\circ}$ C 加热 3 小时而后分析唾液酸的含量时，KDN 的响应没有受到抑制。我们推荐使用唾液酸苷酶消化样品。

表 3 糖蛋白中唾液酸的测定

样品	Neu5Ac 的 Mole/蛋白质 M	Neu5Gc 的 Mole/蛋白质 M
牛胎球蛋白/HCl	17 \pm <1	0.54 \pm 0.05
牛胎球蛋白/唾液酸苷酶	17 \pm <1	0.59 \pm 0.04
牛铁传递蛋白/HCl	1.1 \pm 0.1	1.9 \pm <0.1
牛铁传递蛋白/唾液酸苷酶	1.2 \pm <0.1	2.2 \pm <0.1
人铁传递蛋白/HCl	3.8 \pm <0.1	未检出
人铁传递蛋白/唾液酸苷酶	3.7 \pm <0.1	未检出

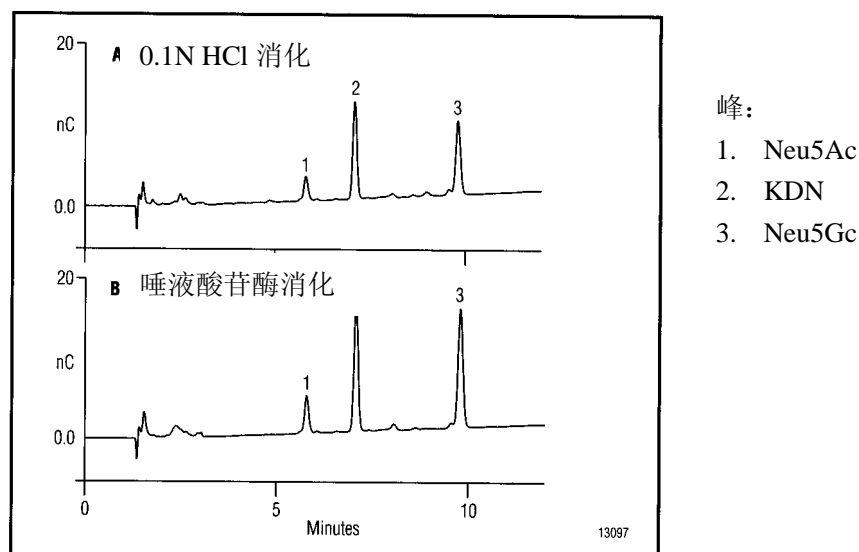


图 8 牛铁传递蛋白中的唾液酸分析

建议和故障维修

系统关机

实验完成后，先关掉电化学池，用 100mM NaOH 以 0.1mL/min 的流速淋洗池子。在另外两个淋洗液的位置分别装入水和 200mM NaOH 并调节比例至 50/50。关掉电化学池，减小工作电极的磨损。

自动进样器

自动进样器的性能不好会直接影响到重复性。当进样重复性差时，首先检查冲洗管路、样品注射器和样品瓶中是否有气泡。如果有气泡，可能是转子密封圈已经损坏。操作手册上推荐每六个月更换一次转子密封圈。如果进样体积小，则可能是进样针已经堵塞。如果不能对进样针清洗，则应更换。操作手册上推荐每六个月更换一次进样针。如果从样品瓶中的第一次进样小于应进样体积，则说明转子密封圈应该更换。其他的故障维修请参考 AS3500 操作手册。

工作电极和电化学检测器响应

唾液酸在工作电极上的响应与电极的工作状态有关。工作电极使用的时间越长，灵敏度越低。由表 2 可以看出两次实验之间唾液酸响应的降低。散布样品的实验是在第一次实验两周之后进行的。我们发现，新的刚刚打磨过的工作电极对唾液酸的响应值是用过一年的电极的响应值的两倍。旧的工作电极在极端的条件下的最低检测限（3 倍基线噪音）对 Neu5Ac、KDN 和 Neu5Gc 分别是 2、5 和 2pmol。旧电极的线性范围是 10-2000pmol，而新电极的线性范围是 2-500pmol。新旧电极在 48 小时的重复性没有差别。先用新电极后用旧电极并选择 KDN 作内标分析糖蛋白所得结果也是一致的。工作电极应按照 ED40 操作手册上的指导进行打磨，并且在初次使用前用不含硫的铅笔擦擦抹。如果打磨后不“擦抹”，对唾液酸的响应在 48 小时内会逐步升高。“擦抹”后，进样 10 次后就可以达到响应平衡。应用本方法的条件实验 500 小时后，工作电极的表面仍然与打磨保证的效果一样。而且这个结论已经通过显微镜观察得到了验证。

内标

本方法强调了应用内标化合物的重要性。KDO 也是 HPAE-PAD 方法分析唾液酸时常用的内标化合物[6]。在本实验的条件下，KDN 和 KDO 不能有效分离。选择 KDN 是因为它在结构上和 Neu5Ac 和 Neu5Gc 相似。葡萄糖醛酸在 Neu5Ac 和 Neu5Gc 之间洗脱，但是它的响应与 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的响应不一致，而且用它作内标会导致 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的峰面积的相对标准偏差增大。N-乙酰-胞壁酸也是一种有效的内标化合物，但是在 Neu5Gc 之后洗脱，会延长分析时间。在选择内标前至少应先分析一个样品，保证样品中不含有 KDN 或其他未知峰干扰定量。

淋洗液的配制

当配制含氢氧化钠的淋洗液时，50% (w/w) 氢氧化钠溶液底部的几厘米舍弃不用。因为这部分溶液含有大量的碳酸盐离子，会导致色谱图上 4-5.5min 间基线的紊乱。

结论

我们用 HPAE-PAD 研究了分析唾液酸的最小检测限、响应线性和重复性。本研究表明，KDN 是一种有效的内标化合物，可以用于样品的准确定量。这些结果对于 HPAE-PAD 分析唾液酸有很大的帮助。

附录 表 4 CarboPac PA10 柱分析唾液酸的分离条件和保留时间

分离方式	梯度时间	[NaOH]	初 始 [NaOAc]	最 终 [NaOAc]	Neu5Ac 保留时间	KDN 保 留时间	Neu5Gc 保留时间
梯度	20min	100mM	20mM	180mM	11.5min	14.3min	20.8min
梯度	20min	100mM	50mM	180mM	8.8min	11.8min	19.2min
梯度	15min	100mM	50mM	180mM	8.3min	10.8min	16.8min
梯度	10min	100mM	50mM	180mM	7.8min	9.7min	14.4min
梯度	15min	100mM	70mM	200mM	7.0min	9.0min	14.8min
梯度	15min	100mM	70mM	250mM	6.8min	8.7min	13.0min
梯度	15min	100mM	70mM	300mM	6.2min	8.1min	11.7min
梯度	15min	100mM	70mM	350mM	6.1min	7.8min	10.8min
梯度	10min	100mM	70mM	300mM	5.9min	7.3min	10.0min
梯度	15min	100mM	100mM	200mM	5.5min	7.2min	13.0min
梯度	15min	100mM	100mM	250mM	5.2min	7.1min	11.5min
等度	-	50mM	150mM	150mM	3.7min	4.7min	8.6min
等度	-	100mM	100mM	100mM	5.8min	8.5min	22.2min
等度	-	100mM	120mM	120mM	4.8min	6.8min	15.7min
等度	-	100mM	150mM	150mM	3.7min	5.1min	10.1min
等度	-	100mM	200mM	200mM	3.0min	3.7min	6.1min

参考文献

1. Manzi AE, Diaz S, Varki A, *Anal. Biochem.*, **1990**, 188, 20-32.
2. Seppala R, Tietze F, Krasnewich D, Weiss P, Ashwell G, Barsh G, Thomas GH, Packman S, Gahl WA. *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 7456-7461.
3. Rohrer JS, Cooper GA, Townsend RR. *Anal. Biochem.*, **1993**, 212, 7-16.
4. Grollman EF, Saji M, Shimura Y, Lau JY, Ashwell G. *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 3604-3609.
5. Protein Glycosylation: Cellular, Biotechnological, and Analytical Aspects. Hermentin P, Seidat J, Conradt HS, Eds. GBF Monographs Vol. 15; VCH Publishers: Cambridge, **1991**, pp. 185-188.
6. Jorge P, Abdul-Wajid A, *Glycobiology*, **1995**, 5, 759-764.
7. Fan JQ, Namiki Y, Matsuoka K, Lee YC, *Anal. Biochem.*, **1994**, 219, 375-378.
8. Spiro RG, Bhoyroo VD. *J. Biol. Chem.*, **1974**, 249, 5704-5717.
9. Townsend RR, Hardy MR, Cumming DA, Carver JP, Bendiak B. *Anal. Biochem.*, **1989**, 182, 1-8.
10. Richardson NE, Buttress N, Feinstein A, Stratil A, Spooner RL. *Biochem. J.* **1973**, 135, 87-92.
11. Spik G, Bayard B, Fournet B, Strecker G, Bouquelet S, Montreuil J. *FEBS Letter*, **1975**, 50, 296-299.