

戴安 (DIONEX) 园地

配备脉冲安培检测器的高效阴离子 交换色谱 (HPAE-PAD) 流动相的配制

在检测碳水化合物领域中, HPAE-PAD 是一项广泛应用的技术. 这一技术不仅仅局限于分析单糖、双糖、寡糖、小分子多糖、硅酸和其它糖酸, 还包括糖醇、磷酸糖和核苷糖. HPAE-PAD 已经代替了其它许多碳水化合物的分析技术, 对小分子碳水化合物(如单糖)和大分子碳水化合物(如寡糖)HPAE-PAD 都能实现高效分离.

Dionex 在二十多年前就实现了 HPAE-PAD 的商品化. 相继推出了五款新的 Carbopac 色谱柱, 同时通过提高 PAD 的重现性和耐用性, 提高了不同种类碳水化合物的分离度. 在多年的研究中, Dionex 发现, 使用这项技术获得分析成功的最大障碍是正确配制和使用 HPAE-PAD 的淋洗液.

本文详细描述了水、氢氧化钠和乙酸钠三种淋洗液的纯度标准, 淋洗液的正确配制、储存和使用、污染的淋洗液的判定以及使用污染了的淋洗液所产生的结果.

1 HPAE-PAD 淋洗液用水

配制 HPAE-PAD 淋洗液的理想用水应是高电阻率($18\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 或更好)的溶有尽可能少的二氧化碳的高质量去离子水, 这种水应没有生化(如细菌或霉菌)和微小粒子的污染, 不含硼酸盐. 这些污染物和以下要讨论的其它污染物可能未必影响其它技术如 HPLC 和离子色谱, 但已发现会影响 HPAE-PAD 的结果.

1.1 碳酸盐污染

溶于水中的二氧化碳在 $\text{pH} \geq 12$ 时会变成碳酸盐, 通常用阴离子系统分析单糖时, 所有 HPAE-PAD 的淋洗液大多都在这个范围内, 二价碳酸根离子是比氢氧根更强的洗脱剂, 因此, HPAE-PAD 淋洗液中过多的碳酸盐会减小糖的保留从而降低分离度. 除去水中所有的碳酸盐是不切合实际的, 但应尽量减少之. 在 HPAE-PAD 系统之前使用的水, 或者用来配制淋洗液的水都需要超声 15 min 脱气. 或者购买连接真空泵的装置, 于真空度小于 500mmHg 下真空脱气. 脱气后立即将水装入 HPAE-PAD 系统, 并以 5—8psi 的氮气覆盖表层.

新制备的去离子水再蒸馏的水可能比较热, 这样会增加水中二氧化碳的含量, 在脱气和加入系统以前应使其冷却到室温.

1.2 硼酸盐污染

当去离子水设备的离子交换柱出现故障时, 硼酸盐将首先穿过柱子, 这是最明显的柱子损耗. 硼酸盐能与碳酸盐附近的氢氧根结合成对, 这将导致由于碳酸盐引起的峰的拖尾. 在受硼酸盐污染影响的碳水化合物中, 甘露糖最为常见. 图 1 最高的色谱峰表明由硼酸盐污染的淋洗液造成的甘露糖拖尾(峰不对称性增加). 含 $10\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 硼酸盐的淋洗液造成的甘露糖峰的不对称因子为 1.53. 为防止这种拖尾可以将一根 BorateTrap™ 柱置于泵和进样阀之间, 安装了这种硼酸盐捕获柱之后甘露糖的峰不对称性因子降为 1.11 (如图 1B 所示). 在分析其它样品前可监测甘露糖的不对称性来确定和纠正这种问题. 甘露糖峰不对称性的增加意味着需要更换离子柱和或硼酸盐捕获柱, 这一问题不会被其它液相技术所注意; 虽然去离子水的系统问题会被其它技术注意到, 比如离子交换柱的损耗或反渗透系统的失效, 但这些却会导致 HPAE-PAD 出现故障.

1.3 生物污染

对于保养及时和正常运转的去离子水系统, 生物污染不会产生. 多数去离子水系统都配有一个紫外灯和一个过滤器, 能够除去微生物和会损伤泵出口阀和柱塞杆的微小粒子. 去离子水系统的正确维护包括一年一次的过氧化氢处理, 以减少微生物污染. 如果未能采取这样的措施, 在使用真空过滤器(大于 500mmHg 的真空度)过滤时必须使用 $0.2\mu\text{m}$ 的滤膜(如 P/N66602, Pall Corporation). 这个操作可以使用玻璃过滤器或者不锈钢过滤器(P/N164-0020, Nalge Nunc International)来实现. 所用的玻璃必须是洁净且没有表面活性剂残留的. 为了获得最佳的重现性, 最好是给 HPAE-PAD 的淋洗液配备一套专用的玻璃过滤器. 使用尼龙滤膜很重要, 因为那些使用碳水化合物制成的滤膜或者其它对 PAD 敏感的物质会污染 HPAE PAD 淋洗液.

当用被微生物污染的水来配制氢氧化钠和氢氧化钠/乙酸钠, 以及使用泵来混合氢氧化钠淋洗液分析单糖时将会有较高的背景电导. 当使用推荐的四波电位以 $10\text{—}20\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的氢氧化钠进行 HPAE-PAD 分析时, 正常的背景电导不超过 20nS 纳西, 当使用乙酸钠含 $100\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的氢氧化钠淋洗液时背景电导不超过 30nS . 当使用乙酸钠梯度时背景电导可能稍有提高. 微生物污染的水可能只会使背景电导加倍, 这种现象不易被觉察. 通常污染愈严重背景电导愈高, 从而使所测物质的峰面积响应值降低, 这往往会被认为是灵敏度降低, 实际上正常的响应值被背景电导掩盖.

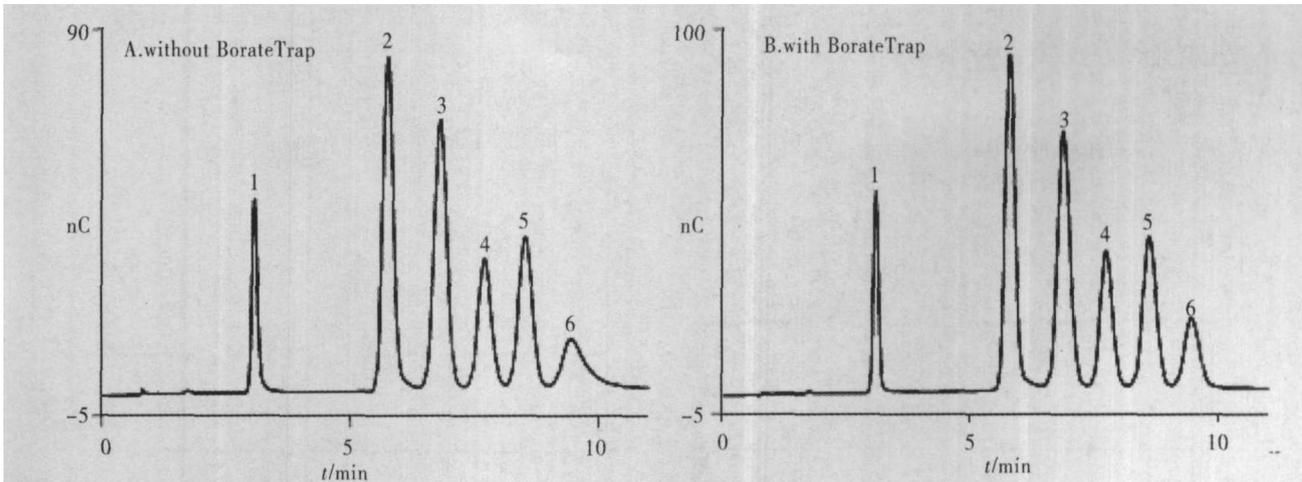


图 1 硼酸盐污染的淋洗液造成的甘露糖的拖尾

色谱柱: CarboPac PA10, 淋洗液: $18\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}\text{NaOH}$, $10\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 硼酸盐, 流速: $1.5\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测器: 脉冲电流分析法, Ed40 金电极. 色谱峰: 1. 岩藻糖, 2. 半乳糖胺, 3. 葡(萄)糖胺, 4. 半乳糖, 5. 葡萄糖, 6. 甘露糖

值得注意的是: 增高的背景可能是一次性使用金电极损毁的指征. 在分析可能存在污染的项目时, 应当将一次性电极换下. 不管分析什么样品, 当系统正常运行时都应记录背景电导, 这样将来就有了可供比较的水准. 如果愿意你可以去掉软件程序中的自动归零命令, 使背景电导一直处于可控状态下.

以轻度微生物污染的水配制淋洗液, 从 HPAE-PAD 系统中未必能观察到, 但是使用被污染的水处理样品或者进行梯度分析时, 可以从 HPAE-PAD 的图谱上看到多出来的峰. 例如, 酸水解测单糖时用污染的水溶解样品, 可以看到一个巨大的葡萄糖峰; 另一种情况下, 用乙酸钠梯度分析寡糖时, 由于使用微生物污染的塑料管从去离子水系统的蒸馏室转移蒸馏水而造成多了一组色谱峰.

1.4 过氧化氢处理引起的污染

去离子水系统一年一次的过氧化氢处理可能带来 HPAE-PAD 淋洗液的短期问题: 如果去离子水系统在经过过氧化氢处理后未能充分冲洗, 残留的过氧化氢会造成高背景电导. 这种由于过氧化氢引起的污染可以通过多数液相检测器, 但不能通过 PAD. 图 2 显示了经过过氧化氢处理的去离子水系统生产的水配制的流动相造成的背景. 注意高背景产生后更换不同来源的去离子水配制淋洗液, 当新的淋洗液到达检测器时, 背景回复到正常值. 如果实验室坐落的区域不允许使用大量的水冲洗去离子水系统, 应于过氧化氢处理前在洁净容器中储备足够的水以保证连续的色谱行为, 以备当观察到不正常的背景水平时能提供一个解决故障的手段.

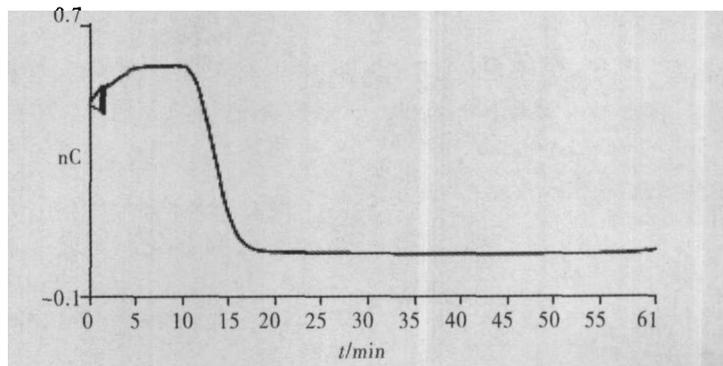


图 2 残余过氧化氢对 HPAE-PAD 响应值的影响

1.5 甘露糖污染

甘露糖是去离子水系统的又一种污染, 并且这种污染可以传递至其它的液相部件. 比如在 Dionex 实验室中我们发现当更换纯化水的滤膜时, 水可能会被甘露糖短期污染. 同样的事情发生了两次后我们购买了不含甘露糖的滤膜. 这是否是一个普遍存在的问题, 我们现在还未知. 生产者生产滤膜时使用了甘露糖或其它电化学污染物如表面活性剂, 用这种滤膜过滤水, 水再用来配制氢氧化钠淋洗液或含氢氧化钠的淋洗液都可见高背景电导. 图 3 是两个分析单糖的水空白色谱图: 图(A)使用甘露糖污染的水, 图(B)使用洁净水, 图 3(B)的背景比图 3(A)低; 同样在清洗柱子时图 3(A)图存在一巨大色谱峰和由于死体积引起的巨大倒峰, 而巨大的倒峰通常是淋洗液被污染时高背景的指征. 如同过氧化氢的残留一样, 这种污染将最终伴随去离子水系统的使用而消退.

当 HPAE-PAD 系统存在预期的背景时, 就应使用瓶装 HPLC 级水来配制淋洗液(包括更换系统瓶子中的水和配制

氢氧化物体系的水)。瓶装 HPLC 级水的电阻率不是 18 兆欧。但当去离子水系统存在问题时,使用未开瓶的 HPLC 级水来配制新鲜的淋洗液是一种暂时的解决方案。

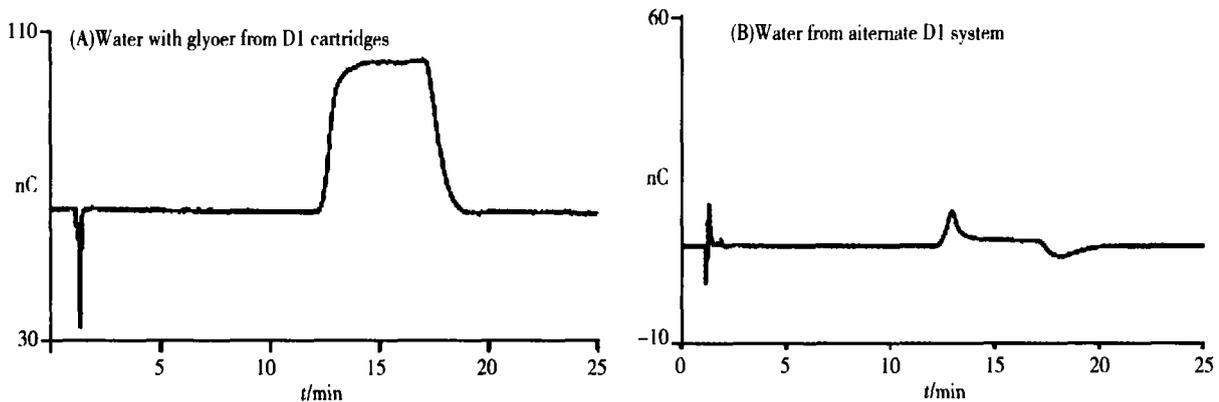


图3 洗脱液中丙三醇对 HPAE-PAD 响应值的影响

色谱柱: CarboPac PA1 + 防护; 淋洗液: 0—12min, $150\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 氢氧化钠, $150\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 醋酸钠; 12—17min, $150\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 氢氧化钠; $500\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 醋酸钠; 17—25min, $150\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 氢氧化钠, $150\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 醋酸钠; 流速: $1.0\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$; 进样体积: $25\mu\text{l}$, 温度: 30°C ; 检测器: PAD 波形 B (TN21); 样品: 水

2 配制氢氧化物淋洗液

在分析单糖时,使用淋洗液发生器产生高品质的氢氧化物淋洗液是最可靠的方法。因为这种淋洗液是由电解产生的,碳酸盐不会从氢氧化钠溶液或溶液混合时由空气中混入。Dionex 技术详细给出了使用和评价淋洗液发生器进行哺乳动物糖蛋白中单糖分析时的 40 个要目。氢氧化物淋洗液的污染主要来自配制淋洗液的水和碳酸盐。如上所述,在人工配制 HPAE-PAD 淋洗液时,碳酸盐不能彻底除去,但应尽可能减小。如在碳酸盐污染中所述,为获得最佳结果配制氢氧化钠淋洗液的水必须脱气且达到纯度要求,一般使用 50% 氢氧化钠 (W/W) 溶液作为氢氧化钠的来源。绝不能使用氢氧化钠片状颗粒来配制氢氧化钠淋洗液,因其表面覆盖了一层碳酸钠。同样市售的 $0.5\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的氢氧化钠也不宜使用,因其中的碳酸钠的浓度很高。

制备 $1\text{L} \cdot 200\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的氢氧化钠时,可以吸取 10.4ml 或称取 16.0g 的 50% 的氢氧化钠,将其置于装有约 800ml 脱气水的 1L 塑料瓶中,吸取时请使用 5ml 或 10ml 分刻度为 0.1ml 的无菌吸管。轻轻搅动此溶液 ($10\text{—}15\text{s}$),然后稀释至刻度。迅速将此溶液转入 HPAE-PAD 系统的淋洗液瓶中,并覆盖 $34\text{—}55\text{kPa}$ ($5\text{—}8\text{psi}$) 的氮气。轻轻转动淋洗液瓶直至充分混匀。配制含有氢氧化钠的淋洗液必须使用塑料容器,氢氧化钠会溶解玻璃中的硼硅酸盐。淋洗液必须每周新鲜配制,氮气未覆盖超过 15min 时也要新鲜配制。淋洗液搅拌要轻,过多搅拌特别是未加气保护时,会在淋洗液中掺入大量碳酸盐。

图 4 是分析单糖的色谱图。图 4(B) 样品正确配置了氢氧化钠淋洗液,图 4(A) 样品配制淋洗液时搅拌 30min ,与图 4(B) 相比保留时间缩短,单糖分度显著下降。这是一个碳酸盐污染的典型例子,低含量碳酸盐污染将使保留时间的缩短减少,从而使分离度的下降减少。

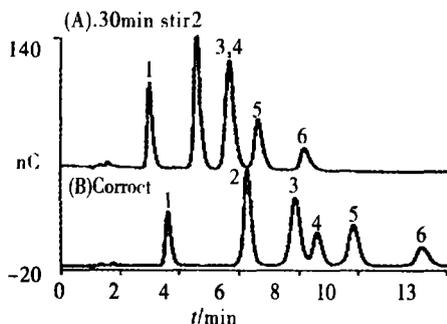


图4 碳酸盐的污染对 HPAE-PAD 分析单糖的影响

色谱柱: CarboPac PA20 + Armino Trap™,
淋洗液: $10\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH, 流速: $0.5\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$,
进样体积: $10\mu\text{l}$, 检测器: PAD(Au) 可配置波形的 A(TN21),
温度: 30°C ,
样品: 6 种标准的混合物 ($50\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$),
峰 (500pmol): 1. 岩藻糖, 2. 半乳糖胺, 3. 葡(萄)糖胺, 4. 半乳糖, 5. 葡萄糖, 6. 甘露糖

即使正确配制淋洗液仍不可避免有碳酸盐,或者样品在柱上富集,将会使柱容量下降。这种情况会得到与上图相似的谱图。为减少样品富集,每次进样后,可使用 $200\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的氢氧化钠冲洗柱子。

正确处置 50% 氢氧化钠溶液同样重要。这种溶液会从空气中捕获二氧化碳,在瓶底形成碳酸钠。同时在使用前不能摇动 50% 氢氧化钠的瓶子,而只是从瓶子的中部取用氢氧化钠,不能使用瓶底三分之一部分的溶液。瓶中剩余部分可在实验室中作其它用途。对 HPAE-PAD 系统来说,使用专门的瓶子盛装 50% 的氢氧化钠将有助于减少人员操作误差或易疏忽的其它化学污染。不按上述操作将会导致淋洗液中产生过多的碳酸盐。

污染的氢氧化钠淋洗液有较高的背景、噪音和倒峰。这通常是由污染了的水造成的;被碳酸盐污染的氢氧化钠将

会缩短保留时间而形成较差的色谱保留行为。图 4 就是一个碳酸盐极度污染的例子。

3 乙酸钠/氢氧化钠淋洗液的配制

当分析中性条件下带电的碳水化合物(如唾液酸)或大分子的寡糖(如糖蛋白、麦芽糊精中含有天冬酰胺分枝的寡糖)时,需要比氢氧化钠更强的淋洗液。乙酸钠就是这样的淋洗液。因检测器需要强碱性环境,这种分离仍然需要使用氢氧化钠。多数寡糖需 $100\text{--}150\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 的等度氢氧化钠和梯度乙酸钠条件下分离(见 Dionex Application Note 67 中 100 和 $150\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氢氧化钠对麦芽糊精分离情况的比较)。

这种分离需要调整两种淋洗液的比例来实现,一种淋洗液有适合的氢氧化钠浓度,另一种淋洗液含有乙酸钠和与第一种淋洗液相同浓度的氢氧化钠。最常见的乙酸钠浓度为 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$,更弱一些的梯度只要 $500\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 的乙酸钠。

不同供应商的乙酸钠质量不同,这可能是客户问题的来源之一。在戴安我们使用 Fluka 的无水乙酸钠未见任何意外问题。Dionex 销售电化学级别的无水乙酸钠,这种乙酸钠是通过检测氨基酸用来测试 AAA-Dionex 阴离子交换—脉冲安培检测器检测氨基酸的。这种乙酸钠可用于 HPAE-PAD 系统,有助于解决可能由乙酸钠淋洗液不纯产生的问题。

配制 $1\text{L } 100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 的氢氧化钠(按配制 $1\text{L } 200\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 氢氧化钠的方法)时,可以吸取 5.2ml 或称取 8.0g 50% 的氢氧化钠。配制 $1\text{L } 100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 的氢氧化钠和 $1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 的乙酸钠时,先于 800ml 去离子水中溶解 82.04g 高纯无水乙酸钠,用 $0.2\mu\text{m}$ 滤膜真空抽滤除去可能影响泵体的粒子。这种过滤通常比较慢,不溶的乙酸钠会慢慢堵住滤器。关掉真空泵之前将真空泵和溶液之间的连接断开,防止溶液倒吸。过滤后将溶液转入 1L 的瓶子,再加入 5.2ml 或 8.0g 50% 的氢氧化钠(浓度为 $100\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 时),加水至刻度。迅速将溶液转移到 HPAE-PAD 系统的塑料瓶中,且覆盖 $34\text{--}55\text{kPa}$ 的氦气。轻轻旋动瓶子使溶液混合均匀。小心操作,避免旋动时溶液与外接气体的管子接触。

也可在过滤前,先加入氢氧化钠和水到刻度,这样可使氢氧化钠加入后的搅动降到最低。无论选择哪种方式,最重要的是按实验室的标准操作要求进行操作。淋洗液每周新鲜配制,或者氦气未覆盖超过 15min 时淋洗液也要重配。

有人可能先配制水氢氧化钠、和乙酸钠三种流动相,然后在分离单糖时用泵产生梯度。Dionex 强烈建议不使用这种方式。这样做短期可获得成功,但却会造成系统污染。不含氢氧化钠的乙酸钠溶液是绝好的霉菌和微生物培养基。一种淋洗液有微生物污染会造成整个系统的污染。

为清除系统污染,需要更换管子,包括淋洗液连线,且用 $2\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 的氢氧化钠冲洗系统。在实验室中使用不含氢氧化钠的乙酸钠淋洗液,天气温暖时很容易遇到问题。但微生物污染在一年中的任何时间都会遇到。如果需要在中性条件下使用乙酸钠,而氢氧化钠是在柱后为 PAD 加入的话,应尽可能在无菌条件下配制乙酸钠,且不要使用旧的乙酸钠淋洗液。

污染了的乙酸钠淋洗液会产生大于 40nC 的背景,且可能在梯度分析过程中掩盖其它峰。高度污染的淋洗液会产生百 nC 的背景,并产生巨大倒峰。如果水是洁净的,乙酸盐就是罪魁祸首。

三元淋洗液按比例混合产生的基线不会象二元淋洗液混合产生的基线那样高低不平。然而从长远来看,或者当淋洗液从一种系统转换成另一种系统时,设计二元系统比三元系统要好。Dionex 建议,如果可能,起始的淋洗液中应包含少量的乙酸钠。当从非乙酸盐体系转变成乙酸盐体系时,氢氧根系统的柱子换成乙酸盐系统的柱子,基线总可见一小尖峰,起始溶液中 $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 的乙酸盐将避免这一尖峰。分离寡糖时,淋洗液中不含 $10\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 的乙酸盐不会影响分离。而同一个样品中的单糖和寡糖之间的分离会受影响。在这种情况下,可以将样品分成两针进样用两个时间较短的方法分析,一针用于单糖分析,一针用于寡糖或带电糖的分析。

如果遇到流路中出现 Dionex 不能分析的含金属的组分,色谱柱和工作电极将会被金属污染。当使用被污染的乙酸盐时这个问题就更为突出。通常被金属污染的色谱柱和工作电极需要更换。当遇到金属污染了泵头时,请与 Dionex 的技术支持团队联络获得帮助,从泵头和污染的管路中除去金属污染。