

柱前衍生化高效液相色谱法测定 2-去氧葡萄糖的含量[△]

洪碧红^{1,2}, 黄文文¹, 尤小云¹, 谢全灵¹, 刘俊朋¹, 易瑞炆^{1*}

(1. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学材料学院, 福建 厦门 361005)

摘要:目的 建立柱前衍生化高效液相色谱法测定2-去氧葡萄糖(2-DG)含量的方法。方法采用1-苯基-3-甲基-5-吡唑酮(PMP)为柱前衍生化试剂,将2-DG在碱性条件下衍生化后直接进样测定。分离柱为Hypersil ODS2色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为100 mmol·L⁻¹醋酸铵缓冲液(pH 5.5)-乙腈(78:22),流速1.0 mL·min⁻¹,波长249 nm。结果2-DG在19.68~393.6 μg·mL⁻¹浓度范围内与峰面积具有良好的线性关系($r=0.9997$);其定量限(S/N=10)和最低检出限(S/N=3)分别为7.8和3.1 ng;平均回收率为101.21%,RSD 0.63%。结论 该方法简便实用、检测灵敏度高、测定结果准确,适用于2-DG的质量控制。

关键词:2-去氧葡萄糖;柱前衍生化;高效液相色谱法

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1002-3461(2011)05-0044-05

Determination of 2-deoxyglucose by high performance liquid chromatography with precolumn derivatization

HONG Bi-hong^{1,2}, HUANG Wen-wen¹, YOU Xiao-yun¹, XIE Quan-ling¹,
LIU Jun-peng¹, YI Rui-zao^{1*}

(1. The Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China;

2. College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Objective An effective precolumn derivatization HPLC method was developed to determine 2-deoxyglucose (2-DG). **Methods** The 2-DG after being derived with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) in alkaline medium was injected directly for determination. The determination of 2-DG was performed on a Hypersil ODS2 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of 100 mmol·L⁻¹ ammonium acetate buffer (pH 5.5) to acetonitrile (v/v=78:22). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 249 nm. **Results** A good linearity was observed in the concentration range from 19.68-393.6 μg·mL⁻¹, and the correlation coefficient was 0.9997. The lowest detection and quantitative limits were 3.1 and 7.8 ng, respectively. The average recovery was 101.21%, RSD 0.63%. **Conclusion** This method has good accuracy and repeatability and it can be used for the quality control of 2-DG.

Key words: 2-deoxyglucose; precolumn derivatization; HPLC

①△ 基金项目: 海洋公益性行业科研专项经费资助(No. 201005020); 福建省科技重大专项经费资助(No. 2010NZ0001-2); 厦门市海洋与渔业局科技计划项目经费资助(厦海渔合[2009]9号)

作者简介: 洪碧红, 女, 高级工程师, 博士研究生

* 通讯作者: 易瑞炆, 男, 研究员 E-mail: yirui-zao@163.com

2-去氧葡萄糖(2-DG)是海洋生物糖类活性衍生物,具有抗肿瘤、抗病毒等生物活性^[2],在医药、保健品等行业发展前景良好。

文献报道的 2-去氧葡萄糖的测定方法主要有离子色谱法^[3]和以对氨基苯甲酸乙酯(ABEE)为衍生化试剂的柱前衍生化高效液相紫外色谱法^[4]。离子色谱法具有方法简单、灵敏度高等优点。柱前衍生化高效液相紫外色谱法具有适用性广,灵敏高等特点。以 1-苯基-3-甲基-5-吡唑酮(PMP)为糖类物质衍生化试剂具有衍生化产物单一,测定结果准确等优点^[5,9]。用 PMP 柱前衍生化高效液相紫外色谱法测定 2-DG 的含量尚未见报道,本实验在参考相关文献的基础上,以 PMP 为衍生化试剂,经衍生化方法和衍生化条件的优化,建立了柱前衍生化高效液相紫外色谱法测定 2-DG 含量的方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Dionex 液相色谱仪(P680,德国);Waters alliance 液相色谱仪(2695/2996,美国);Waters 高效液相质谱仪(LC/MS, 2545/3100,美国)。

2-去氧葡萄糖(自制);PMP(CP, 国药集团化学试剂公司);醋酸铵(AR, 汕头西陇化工厂);甲醇(色谱纯, Merck 公司);超纯水电阻率 ≥ 18.2 M Ω ·cm(自制)。

2.2 色谱条件

2.2.1 HPLC 条件

色谱柱为 Hypersil ODS2 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m);流动相为 100 mmol \cdot L⁻¹ 醋酸铵缓冲液(pH 5.5)-乙腈(78:22);流速为 1 mL \cdot min⁻¹;进样量为 10 μ L;柱温为室温;UV 检测波长为 249 nm。

2.2.2 MS 条件

电喷雾离子源(ESI),电离电压(毛细管电压)3.5 KV,一级锥孔电压 35 V,二级锥孔电压 3.0 V,六级杆透镜电压 0.1 V,源温度(source temperature)120 $^{\circ}$ C,脱溶剂温度 350 $^{\circ}$ C,脱溶剂氮气流速 500 L \cdot h⁻¹,锥孔氮气流速 50 L \cdot h⁻¹,高、低质量数分辨率分别为 15,离子能量 0.5,选择离子扫描(SIM)采集模式。

2.3 样品配制

取 2-DG 约 0.05 g,精密称定,加入 5.0 mL NaOH 溶液(0.27 mol \cdot L⁻¹),溶解并混匀,吸取 1.0 mL,加至 1.0 mL 的 PMP/甲醇溶液(0.42 mol \cdot L⁻¹)中,于 70 $^{\circ}$ C 水浴中反应 40 min,取出放冷至室温,加入 1.0 mL HCl 溶液(0.27 mol \cdot L⁻¹),用超纯水定容至 50 mL,溶液经 0.45 μ m 滤膜过滤后即可进样,进样量 10 μ L。

3 结果与讨论

3.1 衍生化方法的优化

参考文献报道^[5,9],PMP 衍生化 2-DG 的反应式如下:

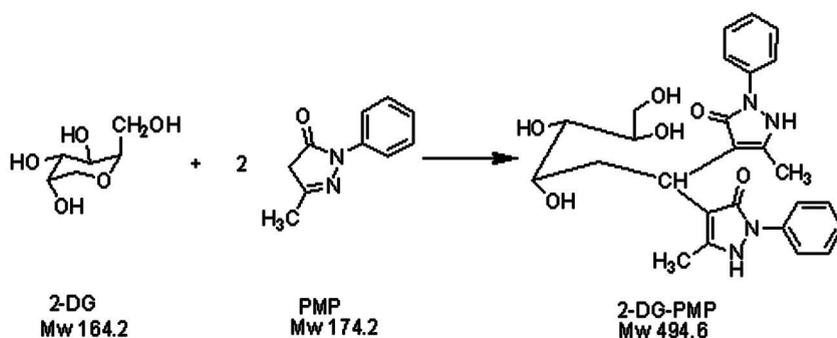


图 1 PMP 衍生 2-DG 化学反应式

Fig. 1 Chemical reaction of PMP derivatives with 2-DG

Susumu Honda 等人^[5]报道的衍生化方法:取一定量的糖类物质,加入 NaOH 溶液和 PMP/甲醇溶液,于 70 $^{\circ}$ C 下反应 2 h,冷至室温,加入稀 HCl 溶液中和后真空干燥至干,加入水溶解,然后

加入有机溶剂萃取除去剩余衍生剂,水相过滤后进样检测。

衍生化反应过程中干燥、萃取步骤的主要目的是除去剩余 PMP 试剂及杂质,减少 PMP 对分

离分析过程的干扰,但同时也会造成 PMP 衍生化方法操作复杂及衍生化产物的损失。通过 LG-MS 联用分析发现 2-DG 与 PMP 按 1:2 形成衍生化产物, PMP 试剂峰在单糖衍生化产物峰前流出,

且杂质峰与衍生化产物峰分离良好,不会干扰主成分的分离分析(见图 2 分离谱图)。因此,衍生化反应完成后,无需进行干燥、萃取等操作步骤,可加酸中和后直接进样检测。

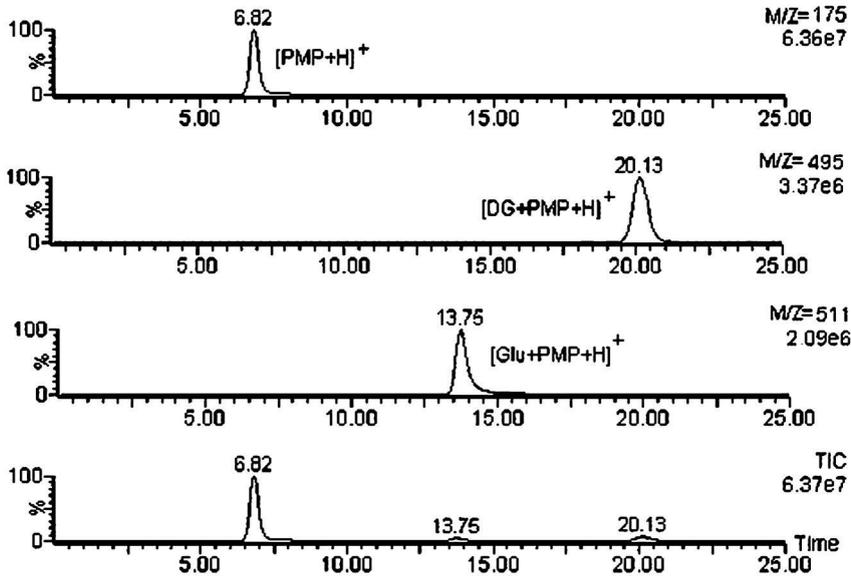


图 2 PMP、DG-PMP 及主要杂质(Glu-PMP)的 LG-MS 分离图谱

Fig. 2 Separation chromatogram of PMP, DG-PMP and impurity (Glu-PMP) by LG-MS

注:保留时间 6.82 min 为 PMP 峰,保留时间 13.75 min 为杂质峰(葡萄糖衍生化产物 Glu-PMP 峰),保留时间 20.13 min 为 DG-PMP 峰。

3.2 衍生化条件的优化

在确定衍生化方法后,进一步考察了衍生化条件如 PMP、NaOH 的用量,衍生化反应时间及反应温度等对衍生化产物产率的影响。

3.2.1 NaOH 用量的影响

取 2-DG 适量,使 2-DG 与 NaOH 的摩尔比为 1:3,1:4,1:4.5,1:5,1:6,保持 PMP 的摩尔用量为 2-DG 的 5 倍,恒温 70 °C 下反应 2 h。随着 NaOH 用量的增加,衍生化产物的量增加,在摩尔比为 1:4.5 时产量最大,高于这个比值时,产量有所降低,可能是碱性过大,引起副反应的发生。因此,选取 2-DG 与 NaOH 的摩尔比为 1:4.5。

3.2.2 PMP 用量的影响

取 2-DG 适量,使 2-DG 与 PMP 的摩尔比为 1:3,1:4,1:5,1:6,1:7,1:8,1:9,1:10,保持 NaOH 的摩尔用量为 2-DG 的 4.5 倍,恒温 70 °C 下反应 2 h。随着 PMP 用量的增加,衍生化产物的量显著增加,在摩尔比为 1:7 时产量最高,高于 1:8 时,产量缓慢降低。因此,选取 2-

DG 与 PMP 的摩尔比为 1:7。

3.2.3 反应时间的影响

取 2-DG 适量,使 2-DG 与 PMP 的摩尔比为 1:7,与 NaOH 的摩尔为 1:4.5,恒温 70 °C 下反应 10,20,30,40,60,120,180,240 min。随着反应时间的延长,衍生化产物的量缓慢增加,40 min 时产量达到最大值,随着反应时间的延长,产量开始下降。可能在碱性条件下,PMP 衍生单糖的速度较快,反应时间的延长反而会导致副产物的产生。因此,最佳反应时间为 40 min。

3.2.3 反应温度的影响

取 2-DG 适量,使 2-DG 与 PMP 的摩尔比为 1:7,与 NaOH 的摩尔为 1:4.5,反应时间 40 min,温度选取 50,60,70,80,90 °C 下反应。随着反应温度的升高,衍生化产物的量增加,70 °C 时达到最大值,然后衍生化产量开始下降,可能由于反应温度升高会导致产物的分解。因此,最佳反应温度选取 70 °C,见图 3。

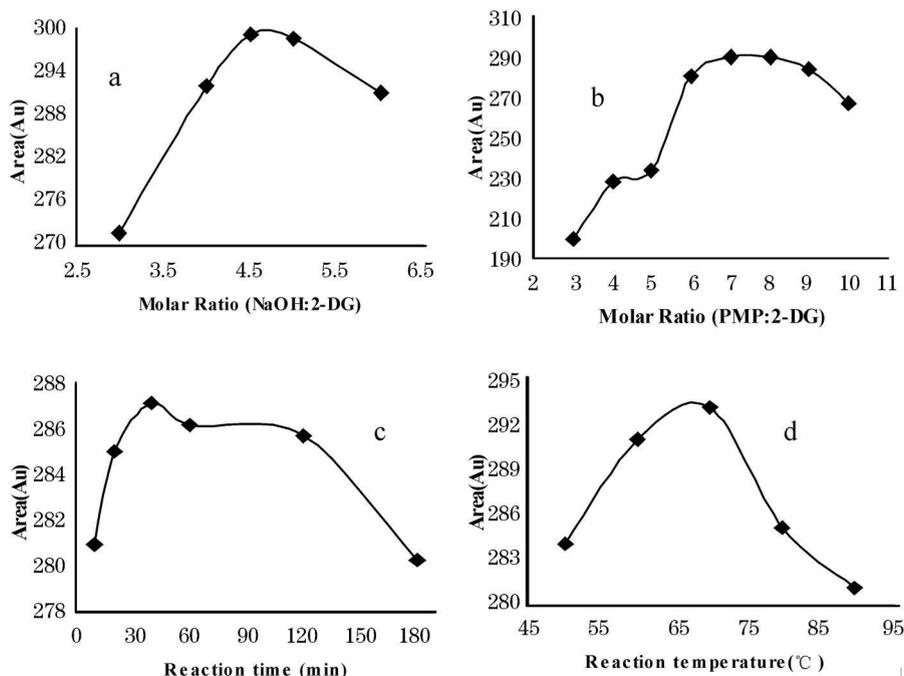


图3 2-DG 柱前衍生化条件优化

a) 氢氧化钠用量的影响; b) PMP 用量的影响; c) 反应时间的影响; d) 反应温度的影响

Fig. 3 Optimizations of the conditions for pre-column derivatization

a) Effect of molar ratio of NaOH to 2-DG; b) Effect of molar ratio of PMP to 2-DG; c) Effect of reaction time; d) Effect of reaction temperature

3.3 定量限和检测限

按照样品配制方法配制溶液, 信噪比(S/N) 为 3 时测得其最低检测限为 3.1 ng; 信噪比(S/N) 为 10 时测得其最低定量限为 7.8 ng。

3.4 线性关系和精密度考察

分别配制浓度为 0.120 0、0.096 0、0.072 0、0.060 0、0.036 0、0.012 0、0.009 6、0.006 0 mol·L⁻¹ 的去氧葡萄糖溶液, 各取出 1.0 mL, 按照样品配制方法进行配制, 所得最终进样浓度分别为 0.002 40、0.001 92、0.001 44、0.001 2、0.000 72、0.000 24、0.000 192、0.000 12 mol·L⁻¹, 过滤后进样。结果表明该方法在样品进样浓度为 0.000 12~0.002 40 mol·L⁻¹ 范围内与峰面积具有良好的线性关系($r=0.9997$)。采用样品进样浓度为 0.001 20 mol·L⁻¹ 的样品连续进样 6 针, 考察其精密度。实验结果 RSD 为 0.10, 表明该方法精密度良好。

3.5 稳定性考察

按照样品配制方法配制溶液, 考察其在 0、2、4、6、8、10、12 h 的稳定性, 测定每个时间点的样品纯度, 记录主峰峰面积, 实验结果主峰峰面积的

RSD 为 1.99%, 小于 2.0%, 说明溶液在 12 h 内基本稳定。

3.6 回收率考察

分别配制 157.6、196.8、236.0 μg·mL⁻¹ 的去氧葡萄糖溶液各 3 份, 进行回收率考察实验。结果 2-DG 平均回收率为 101.21%, RSD 为 0.63%, 表明该方法回收率良好。

3.7 中间精密度考察

按照样品配制方法配制溶液, 利用 Waters alliance 液相色谱仪, 浓度为 0.120 mol·L⁻¹ 的去氧葡萄糖连续进样 6 针。实验结果主峰峰面积的 RSD 为 0.44, 表明该方法的中间精密度良好。

4 小结

建立了以 PMP 柱前衍生化高效液相色谱法测定 2-DG 含量的方法, 该方法衍生化产物单一, 衍生化后无需处理即可直接测定, 操作简单, 灵敏度高, 测定结果准确, 适用于 2-DG 的质量控制。

参考文献

- [1] Kang H T, Hwang E S. 2-Deoxyglucose: An anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic[J]. *Life Sciences*, 2006, 78: 1392.
- [2] Pistollato F, Abbadi S, Rampazzo E, et al. Hypoxia and succinate antagonize 2-deoxyglucose effects on glioblastoma [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 80: 1517.
- [3] 洪碧红, 易瑞灶, 方华, 等. 2-去氧-D-葡萄糖的离子色谱法分析[J]. 厦门大学学报, 2010, 49(6): 886.
- [4] Yasuno S, Takeomi M, Kokubo K, et al. Two-mode analysis by high-performance liquid chromatography of p-aminobenzoic ethyl-derivatized monosaccharides[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1997, 61(11): 1944.
- [5] Honda S, Akao E, Suzuki S, et al. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolon derivatives [J]. *Analytical Biochemistry*, 1989, 180: 351.
- [6] Honda S, Suzuki S, Taga A. Analysis of carbohydrates as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolon derivatives by capillary/microchip electrophoresis and capillary electrochromatography [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, 30: 1689.
- [7] 徐瑾, 张凌怡, 张庆合, 等. 单糖的柱前衍生化高效液相色谱及胶束电动毛细管色谱分析的对比研究[J]. 色谱, 2003, 21(4): 363.
- [8] Kakehi K, Suzuki S, Honda S, et al. Precolumn labeling of reducing carbohydrates with 1-(p-methoxy) phenyl-3-methyl-5-pyrazolon: Analysis of neutral and sialic acid-containing oligosaccharides found in glycoproteins [J]. *Analytical Biochemistry*, 1991, 199: 256.
- [9] Shen X D, Perreault H. Characterization of carbohydrates using a combination of derivatization, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 811: 47.

(收稿日期: 2011-03-28)

热爱海洋, 利用海洋, 开发海洋!