

第三章 實驗

3.1 儀器裝置

使用的分析儀器為美商 Beckman 公司所生產的毛細管電泳儀 (P/ACE 5500 型)，此儀器主要設備有高壓電源供應器、毛細管裝填盒 (capillary cartridge) 及紫外-可見光偵測器。可多波長偵測，掃瞄範圍從 190 nm 至 600 nm。數據以電腦接收，結果由 System Gold 軟體分析。毛細管分離管柱為內徑 50 μm 、外徑 358 μm 的毛細管柱，材質是外層塗佈聚醯亞胺 (polyimide) 的熔融態二氧化矽毛細管 (fused-silica capillary, polymicro Technologies, Inc., Phoenix, AZ, USA)，總長度為 37 公分，入口端到偵測點為 30 公分。分離電壓為 -400 V/cm。樣品注入以壓力 (0.5 psi) 方式導入毛細管。偵測波長設於 254 nm。基質輔助雷射脫附游離質譜儀為陳月枝老師實驗室所提供協助。

3.2 藥品

methacryloxypropyltrimethoxysilane (MPTMOS) 購自 ACROS 公司，丙烯醯胺 (acrylamide)、過硫酸胺 (ammonium persulfate) 購自 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)，N,N,N,N-tetramethylethylenediamine (TEMED) 購自 MD Bio, Inc.，3-aminonaphthalene-2,7-disulfonic acid (3-ANDA) 購自 TCI (Tokyo, Japan)，木聚醣 (xylan, Beechwood, 大於 90% xylan residues)、糊精 (dextrin)、Sodium cyanoborohydride (NaBH_3CN)、4-aminobenzoic acid methyl ester、Sodium citrate dehydrate 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)，冰醋酸 (glacial acetic acid) 購自 Fluka (Buchs, Switzerland)，鹽酸 (hydrochlorid acid) 單水檸檬酸 (citric acid monohydrate) 購自 Merck (Darmstadt, Germany)，實驗中用水為經 Milli-Q 純水系統 (Millipore, Bedford, MA, USA) 純化處理過之去離子水，電阻值為 18.2 $\text{m}\Omega$ 。

幾丁寡醣粉末為李耀坤教授實驗室所提供。

3.3 塗佈線性聚丙醯烯胺之管柱製作

實驗所使用的分離毛細管其內壁須塗佈上一層線性的聚丙醯烯胺，此管柱應用於凝膠電泳分離可以減少膠體吸附於管壁上、穩定電泳狀態、延長毛細管柱使用壽命[88]。本實驗所進行的管柱塗佈可分為兩個部分：首先，是在毛細管壁上接上一層高分子單體 MPTMOS，第二部分則是藉由 MPTMOS 外側所裸露出來的雙鍵接上聚丙醯烯胺，以穩定具有聚丙醯烯胺的緩衝溶液所進行的凝膠電泳。

首先，取一段長 37 公分，內徑 50 μm 的毛細管，將氮氣以 20 psi 加壓的方式注入液體來潤洗。為了增加毛細管內壁的矽醇基的數量，先以 0.1 N 氫氧化鈉水溶液潤洗 60 分鐘，隨即以水清洗約 15 分鐘至管柱環境達到 pH 7.0，之後再以甲醇潤洗 15 分鐘，如此達到活化管柱的目的。另取高分子溶液 MPTMOS 100 μL 溶入 0.02 M 醋酸-二氯甲烷中，此時高分子單體在酸催化下，其 $-\text{OCH}_3$ 官能基會水解成 $-\text{OH}$ ，接著以 20 psi 氣壓持續注入毛細管內約 120 分鐘，之後高分子單體上的 $-\text{OH}$ 官能基可以與管壁上的矽醇基產生縮合反應，形成 Si-O-Si 的鍵結，此時在管柱內已壁覆蓋上一層高分子，並且暴露出具有活性的雙鍵於管柱內壁。最後再以甲醇和清水各潤洗 15 分鐘，完成第一階段塗佈管柱。

第二部分是將丙醯烯胺溶入緩衝溶液中，配製成重量百分比 2% 的單體溶液，並加入活化劑 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ TEMED 與催化劑 1 mg/mL 過硫酸胺來幫助丙醯烯胺聚合成線性高分子。配製完成 60 分鐘後以氣壓注入管柱達 120 分鐘，此時利用高分子尾端所露出來的碳碳雙鍵與線性分子結合，使管柱內壁塗佈上第二層線性高分子，最後以水潤洗 15 分鐘，再以氮氣將塗佈管柱吹乾即可完成管柱製作。

每次使用前後均用清水潤洗 10 分鐘，實驗間隔亦是用水沖洗 3

分鐘，沖洗去管柱內舊有的凝膠緩衝溶液，再注入新鮮的線性凝膠緩衝溶液進行分離。此種以兩階段塗佈方式所得的凝膠塗佈毛細管使用壽命可長達 3 個禮拜，其間管柱不會堵塞，而且擁有相當好的再現性。管柱製作流程如圖(3-1)所示。

3.4 木糖寡糖衍生反應：

3.4.1 木聚糖之酸水解反應條件

將 0.5 g 的木糖聚糖裝入螺旋帽之玻璃樣品瓶中，加入 2 ml 的 0.3 M 的鹽酸，使得所加入的 0.5 g 木糖聚糖均沾濕成稠狀液，再置入沸水中隔水加熱，進行加熱酸水解，分別於加熱水解 10、20、30、40、50、60 分鐘後，直接取出經酸水解反應後所得的木糖寡糖溶液，與 3-ANDA 進行衍生反應，此酸水解反應後的產物完全不做其他前處理步驟。



3.4.2 木糖寡糖與 3-ANDA 之衍生條件：

本實驗所採用的衍生試劑為 3-ANDA，為胺萘磺酸鹽類，是 UV 吸收的衍生試劑，其分子的主體為雙苯環(萘)結構，在位置 2、7 上各有一個極易解離而帶上負電荷的磺酸基，而反應官能基-胺基則在 3 的位置上。整個衍生反應機構如圖(3-2)所示。在醋酸的催化下，3-ANDA 的胺基與木糖寡糖開環處醛基反應，生成一較不穩定之中間產物，統稱為 Schiff base。最後經由還原試劑 NaBH_3CN 將二級氮與碳間的雙鍵還原成為穩定的二級胺。衍生步驟如下：

將 0.2 M 之 3-ANDA 溶於以重量百分比 30%(w/w)冰醋酸水溶液，盛於具螺旋帽的微量離心管中，加入 0.1 ml 經加熱酸水解反應後之木糖寡糖水溶液，再添加 1.0 M 之 NaBH_3CN (溶於 DMSO) 50 μL 於 90°C 烘箱內加熱 2 小時。反應後所得之 3-ANDA-木糖寡糖溶液衍生

產物直接以去離子水稀釋，進行電泳分析。

經由衍生反應所得的產物可知：原為中性不帶電且不具發光團的木糖寡糖經由與 3-ANDA 衍生反應後，變成帶有二價負電且具有光學性質的分子。

3.5 幾丁寡糖之衍生反應

本實驗使用之幾丁寡糖為將幾丁聚糖利用酵素水解而成，聚合度 1~8 不等的寡糖粉末。衍生之前，取 0.1 g 幾丁寡糖粉末溶於 1.0 ml 去離子水中震盪溶解。將 0.2 M 之 4-aminobenzoic acid methyl ester 溶於以重量百分比 20%(w/w)冰醋酸水溶液，盛於具螺旋帽的微量離心管中，加入取 0.1 ml 經溶解後之幾丁寡糖水溶液，再添加 1.0 M 之 NaBH_3CN (溶於 DMSO) 50 μL ，於 90°C 烘箱內加熱 2 小時。反應後所得之 4-aminobenzoic acid methyl ester-幾丁寡糖溶液衍生產物直接以去離子水稀釋，進行凝膠電泳分析。此衍生試劑為苯胺類，是 UV 吸收的衍生試劑，其分子的主體為苯環結構，以反應官能基-胺基進行衍生反應，與木糖衍生反應皆屬於 Reductive amination 類型。

3.6 製作凝膠緩衝溶液

本實驗所使用的緩衝溶液為檸檬酸/檸檬酸鈉水溶液，將所使用的緩衝溶液添加 2%(w/w)重量百分比之聚丙烯醯胺，加入起始劑 1 mg/mL 過硫酸胺、及催化劑 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ TEMED 後，充分混合均勻，然後靜置一小時候即成為線性凝膠緩衝溶液，以進行實驗。

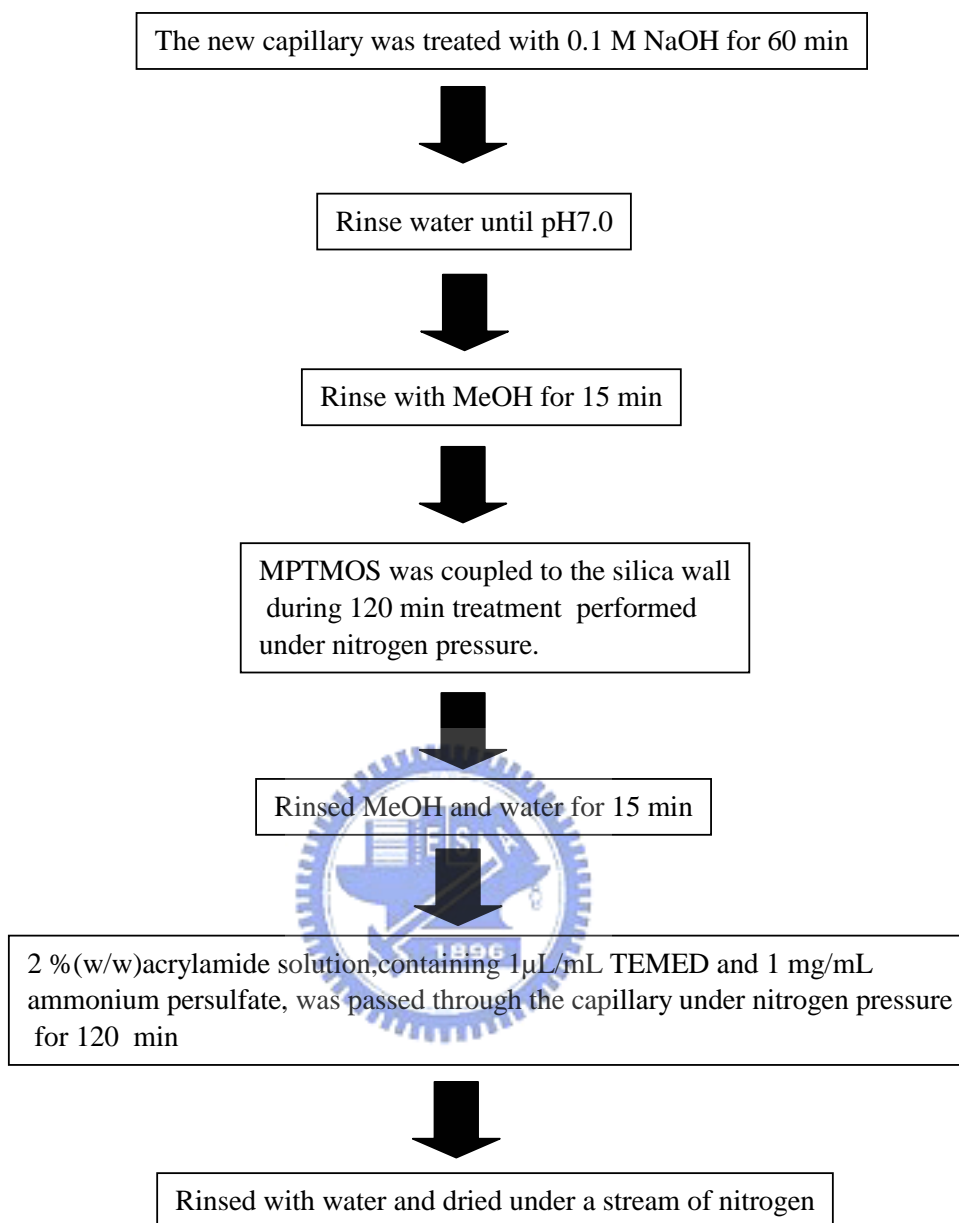


Figure 3-1 The process of producing capillary coated with a layer of linear polyacrylamide.

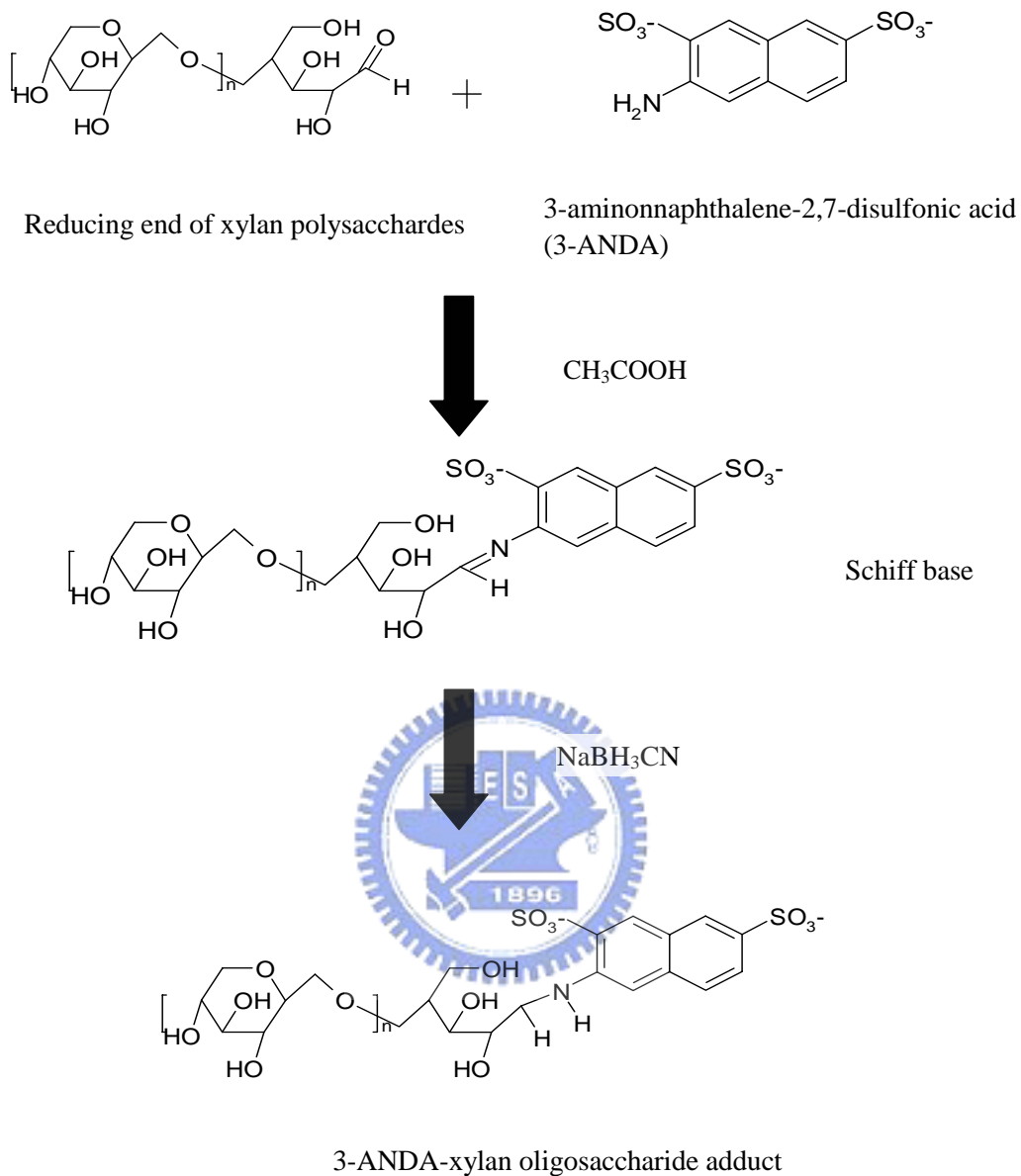


Figure 3-2 Reaction scheme of the derivatization of xylan oligosaccharides with 3-ANDA followed by reductive amination.

第四章 結果討論

4.1 以毛細管區帶電泳(CZE)確認木醣寡醣水解衍生成功

木醣為聚合物，由木聚醣單醣(xylose)所組成。而分解醣類聚合物分子通常有兩種水解方式：其一為低溫酵素水解；另一種則是高溫加酸水解。一般而言，高溫加酸水解醣類聚合物較不具特異性；而酵素水解端視所選擇的酵素而定，具有相當程度的特異性，如此切割出來的短鏈醣分子會固定為某些聚合度的寡醣產物。而本實驗中採用加酸加熱方式進行水解，再與 3-ANDA 試劑進行衍生。為了確認木醣水解反應、衍生狀態是否成功，將此樣品以毛細管區帶電泳方式偵測，依文獻所述[98]，利用 250 mM 磷酸與 2% 三乙基胺組成 pH 2.5 之緩衝溶液，並施予一反向電壓。層析圖如圖(4-1)所示：可以觀察到於單醣至十醣，可證實水解、衍生反應成功。利用衍生試劑本身所帶有的負電荷往正極的偵測端移動，分子量較小的衍生單醣分子較早出現，隨著分子量的上升，速度愈慢，愈晚出現。低聚合度能清楚分離，較高聚合度部分則解析度有所降低。主要原因是在反向電泳中，分離機制為質荷比的差異，隨著聚合度上升，質量亦大幅上升，但所帶電荷仍為兩個負電荷，因此質荷比的差異逐步縮小，特別在聚合度較高的寡醣，差異極小，因此造成解析度不佳的狀態。故希望藉由凝膠電泳分離技術來提升醣類聚合物的解析度。

4.2 以凝膠電泳分離單醣雙醣

一般而言，單醣、雙醣的溶解度佳、反應時立體障礙較小且衍生效能較高，我們預期所出現的層析圖譜相對比較簡單明瞭，以便更加清楚地瞭解凝膠電泳的特性，故先以凝膠電泳分析單醣、雙醣，以測試其分析特性。

挑選三種雙醣：麥芽糖 (Maltose)、乳糖 (Lactose)、蔗糖

(Saccharose)，與三種單糖：海藻糖(Fucose)、鼠李糖(Rhamnose)、半乳糖(Galactose)，因為這些糖類皆屬於醛糖，故可直接利用 3-ANDA 衍生試劑進行 reductive amination 的衍生反應。分離條件為於 pH 5.0 的凝膠緩衝溶液下進行反向電泳的分離，結果發現：帶有 2 價負電荷的衍生試劑最快抵達正極的偵測端，而成功衍生於糖類的衍生試劑因為質量增加、體積增大，所以出現時間較衍生試劑晚一些，且能成功的分離，如圖(4-2)所示。其中部分雙糖(乳糖與麥芽糖)溶於水中後，因加入醋酸進行 90°C 的衍生反應，推測部分發生斷裂為單糖的情形，而乳糖由半乳糖與葡萄糖結合而成，麥芽糖由兩個葡萄糖組成，於是在衍生試劑與雙糖波峰中間出現較小的波峰，即是部分解離而衍生成成功的單糖分子。乳糖圖譜的一小波峰與半乳糖標準品於滯留時間 6.7 分鐘出現，此小波峰推測為解離後的半乳糖。於遷移時間 6.2 分鐘時乳糖與麥芽糖皆出現的小波峰，推測為相同組成物的葡萄糖。由雙糖圖譜發現此凝膠分離機制可以在無電滲流的情形下，以衍生試劑上的負電荷來推動分析物，透過質荷比與大小篩分的差異造成分離的效果。

由上述的實驗結果，利用凝膠電泳能分離帶有負電荷、體積大小與葡萄糖相仿的糖類分子，對於是五碳糖構成的木糖聚合物，應該可應用凝膠電泳來分離木糖寡糖。

4.3 以凝膠電泳分離不同水解時間之木糖寡糖

依據不同加酸加熱時間可能水解出不同聚合度的木糖寡糖，故針對不同水解時間的木糖寡糖衍生產物進行反相凝膠電泳分離。木糖加酸進行隔水加熱的時間自 10 分鐘起每隔 10 分鐘取一次，至 60 分鐘為止。結果如圖(4-3)所示，發現水解 10 分鐘的木糖寡糖衍生產物以凝膠電泳分離，在 pH 5.8 / 50 mM 的檸檬酸/檸檬酸鈉緩衝溶液下，在衍生試劑出現之後依序出現單糖、二糖、、、至十四糖，可以清楚

發現隨著分析物的體積逐漸增大，分析物的滯留時間呈現規律的延長，原因在於其分離機制除了荷質比的差異外，也表現大小篩分的分離效果，在聚合度較大的部分，大小篩分之影響更是明顯，而在九醣與十醣的解析度高達 6.07，相較於毛細管區帶電泳系統中九醣之後已無法準確辨識單一聚合度的波峰而言，此凝膠電泳法的分離效果顯得相當優異。觀察不同時間出現的寡醣情形，發現木醣在水浴進行 10 分鐘水解後可產生最多種聚合度的寡醣(DP=14)，而隨著水浴時間的增加，高聚合度的醣類數目逐次遞減，而低聚合度的寡醣數目則大幅提昇，至水浴時間 60 分鐘為止，僅可以見到 1-10 之聚合度，這是因為每一個多醣裂解為成多個的單醣寡醣，所以單醣至三醣吸收峰大幅增加。

此外，由於碳水化合物的結構多樣化，木聚醣也會有異質多醣體(heteropolysaccharides)的存在，單元糖上羥基的氫以許多不同的取代基所修飾，如：乙醯基、阿拉伯呔喃醣、葡萄糖酸及甲基葡萄糖酸等等，而形成支鏈[98]。所以在圖(4-3)中可以觀察到隨著水解時間的增加，單醣、二醣、三醣的波峰與波峰之間所出現的吸收峰群強度明顯地逐漸增強，而藉由毛細管凝膠電泳的高解析度可以觀察到出現的波峰甚多，推測原因為木聚醣的異質多醣體的出現。

儘管毛細管電泳的進樣量很小，但餾分(fraction)的收集也是有其必要性。雖然一般只有 10^{-12} g 量級的物質被收集到，但卻已足夠進行一些更進一步的分析，如應用不同的緩衝溶液或其它毛細管分離方式再次進樣、序列分析、質譜或黴法鑑定[100]。此高解析度的實驗技術可應用於分離樣品，對於醣類結構的多變性，可以藉此作進一步的結構鑑定。

4.4 凝膠電泳中緩衝溶液 pH 值的影響

實驗中採 pH 4.2、pH 5.0、和 pH 5.8 三種不同酸鹼值的檸檬酸/

檸檬酸鈉緩衝溶液於相同的離子強度下探討 pH 值對分離的影響。由圖(4-4)可以觀察發現在此 pH 範圍內之酸性緩衝溶液下可以將 3-ANDA-木糖寡糖依序分離。因為在此凝膠電泳的系統下並沒有電滲流，所以帶有 2 價負電荷的衍生試劑均於同一時間出現，而 3-ANDA-木糖寡糖分析物則因為木糖上帶有羥基，於不同酸鹼值下的解離程度不同，整個分子所帶電荷也不同。於較為酸性的情形下(pH 4.2)，木糖帶有較多的正電，中和了部分衍生試劑的負電荷，因此分析物出現的時間較為延後。隨 pH 值的上升，可以發現 3-ANDA-木糖寡糖分析時間往前移動，表示木糖上所中和負電荷的效應減弱，pH 5.8 與 pH 5.0 的差異也小於 pH 4.2 與 pH 5.0 之間的差異，由圖(4-4)可以觀察出來在 pH 5.8 的狀態下，無法達到基線分離(baseline separation)的能力，於是採用 pH 5.0 為較佳的條件。

4.5 凝膠電泳中緩衝溶液離子強度的影響

利用不同離子強度的檸檬酸/檸檬酸鈉緩衝溶液來配製成凝膠緩衝溶液，觀察離子強度對分離效果的影響。實驗中配製 75 mM、50 mM、25 mM 的凝膠緩衝溶液濃度進行 3-ANDA-木糖寡糖分離，結果如圖(4-5)所示，可以觀察發現：在離子強度為 75 mM 的狀態下，對於電泳的速率並無影響，而在吸收度方面有明顯的降低，離子強度的增強對於吸收強度的結果影響甚大。推測因為是當離子強度增加時，會減弱分子間的靜電排斥力，使得線性丙醯烯胺的迴旋半徑(radius of gyration)縮小[101]，再由公式(1-7)瞭解：較小的迴旋半徑會形成比較小的篩孔，而最終形成的篩孔大小與聚合物分析的圖譜息息相關。高離子強度所造成的篩孔較小，所以有部分分析物完全陷在沒有電滲流推動的凝膠篩孔中，無法順利抵達偵測端，於是吸收度明顯下降。所幸此凝膠為流動式凝膠，每進行一回實驗後，即以去離子水沖洗去管柱內凝膠後，再注入新鮮凝膠緩衝溶液，因此不會因為管柱阻塞或污

染造成壽命短暫的問題。隨著離子強度的降低，篩孔逐漸放大，能夠全部進行篩分而抵達偵測端的分子數量增多，訊號也跟著增加，至 25 mM 離子強度時，可以觀察到最多數目的木糖寡糖數，也可以比較明顯觀察到二糖、三糖、四糖中出現雙峰的波峰，推測是觀察到結構異構物(structure isomer)的存在，因此視為最佳的離子濃度條件。

4.6 測試不同凝膠緩衝溶液濃度

實驗的分離機制與凝膠所形成網狀結構的孔隙大小有很大的關係，而孔隙的大小則與凝膠濃度有關[104]。隨著凝膠濃度的上升，所形成的孔隙會越小，而濃度大小的選擇則賴於分析物的大小而定。實驗中以 pH 5.0、25 mM 的檸檬酸/檸檬酸鈉為緩衝溶液，添加凝膠濃度 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 等以進行分離，固定起始劑過硫酸胺為 1 mg/mL、催化劑 TEMED 為 1 μ L/mL。結果如圖(4-6)所示，可以觀察到隨著凝膠濃度的上升，凝膠對分析物的作用力漸強，體積越大的分析物需要越長的滯留時間。當濃度較低時，分離效果較差，且擴散現象亦比較嚴重，至較高濃度後，可以因體積分篩區隔出單一分析物，2.0%相較於 2.5%濃度同樣都能達到理想的分離效果，不過前者滯留時間較短，因此選擇 2%凝膠濃度為較佳的條件。

4.7 測試不同起始劑濃度

凝膠電泳聚合物溶液所形成的孔隙大小對分離的影響甚大，因此聚合物的鏈長及分子量對分離是相當重要的因素[104]。實驗中所使用的線性聚丙烯醯胺為自行合成的聚合物，合成之條件、環境對聚合出來的產物都有影響。本實驗採用的聚合反應是由氧化還原的電子轉移產生自由基，以自由基作為起始反應劑，當自由基打到碳碳雙鍵上而引發一連串聚合反應，因不需照光或加熱，故在低溫進行此聚合反應，較為方便，而此法可得較大分子量的聚合產物。研究所使用的起

始劑為過硫酸胺，並以 TEMED 作為活化劑，加速反應。起始劑的含量會影響到聚合反應速率及聚合物分子的鏈長與分子量：當起始劑的含量越高時，反應進行越快，而所得到的聚合產物鏈長較短而且分子量較小；相反的，當起始劑含量下降，反應時間就需要長一點，而聚合產物鏈長會較長且分子量較大[104]。

在此固定線性聚丙烯醯胺濃度為 2.0%，分別加入不同濃度的起始劑，分別是：0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL。但於此實驗範圍的起始劑濃度下所製成的凝膠緩衝溶液，分析物遷移時間差異並沒有很大，推測原因是所測試的起始劑濃度範圍過小，其結果如圖(4-7)所示，所以選擇 1.0 mg/mL 作為起始劑濃度。

4.8 文獻中分析木糖寡糖所得結果比較

4.8.1 分析木糖寡糖文獻

Dahlman *et al.*[99]利用中性的 6-AQ 作為木糖寡糖之衍生試劑。使用聚合度 1-6 的木糖寡糖之標準品，衍生反應於 40°C 下進行 2 小時。聚合度 1-6 之 6-AQ 木糖寡糖可於 6 分鐘內完成分離。所使用的水解條件為：經過前處理之木聚糖 5 mg 加入 1 mL 三氟乙酸於 100°C 下加熱 4 小時，酸水解後產物溶液需再經冷凍乾燥處理。

本實驗室王金玉之研究[98]，於施加反向電壓下，12 分鐘內分析聚合度 1-17 之木糖寡糖，其寡糖來源為商業化產品之木聚糖進行酸水解所得，而水解產物不需在經任何樣品處理，直接進行衍生，在帶有負電荷的 3-ANDA 為衍生試劑，於緩衝溶液為 pH 2.6 磷酸/三乙基胺的條件下分離。

4.8.2 凝膠電泳分離木糖寡糖最適化分離條件

圖(4-8)顯示在最適化的條件下所分離的 3-ANDA-木糖寡糖凝膠

電泳分離結果，在緩衝溶液 pH 5.0 的檸檬酸/檸檬酸鈉 25 mM 下，添加 2%(w/w)線性凝膠於緩衝溶液中，1 mg/mL 的起始劑過硫酸胺濃度與 1 μ L/mL 的催化劑 TEMED 濃度。以內壁塗佈線性凝膠的毛細管柱進行分離的動作，反向電壓為 400 V/cm，可解析出木糖寡糖聚合度共約 20 的寡糖分子。寡糖出現的時間隨著聚合度的增加，其滯留時間呈現線性的增加，線性相關係數為 0.9946，如圖(4-9)所示，這樣的曲線即表示：在凝膠電泳中，分離隨聚合物之聚合度越高，遷移時間會規律增加，並顯示可以使高聚合度的分析物成功分離[102]。

在分析結構為直鏈形、同質(homologues)糖類分子時，有效電泳速率(effective mobility)會與聚合度成拋物線的關係，並且根據公式(1-5)可得知解析度與相鄰兩分析物的有效電泳速率差異成正相關，同時比較此分析物於毛細管區帶電泳中的有效電泳速率的差異，如圖(4-10)所示，於凝膠電泳系統中，分析物之有效電泳速率散佈範圍大於區帶電泳中的有效電泳速率範圍，因此，相鄰兩聚合度之分析物也就擁有較大的淌度差異，合理推得凝膠系統擁有較高的解析度。

由圖(4-9)及圖(4-10)顯示，在凝膠系統中以最適化條件下分離 3-ANDA-木糖寡糖可分離到聚合度至 20 糖，且解析度極佳。

表二所列出的是木糖在最適化的凝膠電泳條件下的平均遷移時間、遷移時間相對標準偏差值、波峰面積相對標準偏差值。遷移時間的相對標準偏差在 1.81%，波峰面積的相對標準偏差則在 4.53 %，在此條件下可得到之儀器偵測極限值為 15.7 pmol (S/N=3)。本實驗發展的凝膠電泳技術克服傳統凝膠電泳的缺點，管柱製備較為簡便、再現性佳，穩定性好及壽命長，且為具有高解析力。

4.9 凝膠電泳系統測試其它糖類

4.9.1 幾丁寡糖測試

在成功利用電泳凝膠系統分離木糖寡糖之際，更進一步推廣到

分離其他種類的醣類。由於可以觀察到凝膠電泳系統可以針對單一種類的寡醣進行分離，對於其它同樣是醣類聚合物，推論亦可利用大小篩分的能力加以分離。醣類分析物單體是以五碳醣、六碳醣為主，因此，凝膠所形成的篩分能力可以分離醣類一般體積，而凝膠緩衝溶液所形成的環境是會造成吸收峰強度的變化與解析能力的優劣，當分離條件調整適當後，即可展現出凝膠電泳的高解析能力以及於高聚合度的分離不致因荷質比差異過小而推疊在一起，並且適用於所有醣類聚合物的分析。

在此選擇幾丁寡醣作為下一分析目標。實驗之初，在選擇衍生試劑時，同時嘗試了幾種 UV 衍生試劑中的胺基磺酸類衍生試劑如：8-aminonaphthalene-1,5-disulfonic acid、3-aminonaphthalene-2,7-disulfonic acid、7-aminonaphthalene-1,3-disulfonic acid、4-aminonaphthalene-1-sulfonic acid，其結果由於反應效果不佳或是衍生試劑水溶性較差，因而不適用於幾丁寡醣的衍生反應中，最終選擇 UV 衍生試劑苯胺類的 4-aminobenzoic acid methyl ester，其擁有較佳的衍生能力，而後進入凝膠系統分離。

衍生試劑的 pka 值為 2.47，所以在 pH 5.0 的環境中帶有負電荷，藉由負電荷的推動，在無電滲流的情形下，讓分析物經由大小篩分的機制依序出現衍生試劑峰、單醣、二醣至五醣，如圖(4-11)所示，觀察圖譜可以發現，幾丁寡醣於凝膠電泳系統下分離，可得 1~5 醣的分離。然而，所得到的吸收峰強度並不強，推測原因有是所利用的 UV 衍生試劑對於幾丁寡醣的衍生能力比木醣寡糖與 3-ANDA 為弱，造成衍生反應的效果不如預期。

而幾丁寡醣的測試成功，代表凝膠系統分離技術確實可以應用於不同種類的醣，藉由相同的分離機制，依據大小篩分與質荷比的差異，依序分離出一至五醣，於 8 分鐘以內完成分離。

4.9.2 糊精與玻璃質酸測試

在木糖寡糖、幾丁寡糖成功衍生後經由凝膠電泳獲得高解析度的分離之後，下一步驟將目標放在結構較為複雜、分子量更為巨大的糊精(dextrin)與玻璃質酸(haluronic acid, HA)，期待藉由具有高解析力的此凝膠電泳分離技術，能分離更大量聚合度的寡糖。

然而，在糊精的部分，將 0.1 g 的聚糖藉由超音波震盪儀溶在 1.0 ml 的去離子水中，溶解過程中逐漸形成果凍狀，即使在加酸加熱之後，其形體並沒有改變，也就是說，糊精難溶於水中，利用加酸加熱仍未能增加其溶解度。仍取水解 2 小時之瓶內溶液部分進行衍生反應，所使用的 UV 衍生試劑包括：7-aminonaphthalene-1,3-disulfonic acid、3-aminonaphthalene-2,7-disulfonic acid、2-aminonaphthalene-1-sulfonic acid、4-aminonaphthalene-1-sulfonic acid、4-aminobenzoic acid methyl ester、4-aminobenzoic acid methyl ester 等，其中，前二者為參考文獻中所提及與碳水化合物具衍生效果[96, 98]，其餘為取得方便且具有胺基的苯胺類與胺萘磺酸鹽類的 UV 衍生試劑，於是用來嘗試進行 reductive amination。參考表一資料，本實驗進行的衍生條件如表三所示。然而，在 pH 5.0 的凝膠緩衝溶液下除衍生試劑峰僅獲得 2 根波峰，如圖(4-12)所示，在 pH 8.5 的凝膠緩衝溶液下，僅剩衍生試劑峰，推測分離效果不如預期的原因有：

1. 由相關文獻得知目前將糊精與玻璃質酸切成聚合度不等的寡糖皆是進行酵素水解，聚糖在酵素尚未水解成為單一種聚合度寡糖時，即取出置於沸水，停止酵素反應而得聚合度不等的寡糖溶液，然後進行衍生反應，最後進入區帶電泳分離。本實驗採用較為便宜的化學水解方式進行切割，並利用凝膠電泳進行偵測。但實驗證實化學水解方式未能有效將糊精切割成多種聚合度，僅少數末端短鏈的寡糖斷裂。

2. 由於每種糖類的構造皆不盡相同，衍生試劑種類亦多，因此

雖然都是進行 reductive amination 型式的衍生反應，衍生效果都有很大的差異。

因此，雖然以增加水解時間、增加水解時的鹽酸強度來彌補第一點可能性，以多樣化衍生試劑加強第二點可能性，在不同酸鹼度下(pH 5.0, pH 8.5)進行實驗，仍無法得到期待的圖譜。

在 HA 部分，HA 為線性聚醣，以帶有負電荷的雙醣為單體連結成高聚合度的聚醣，在經由化學水解後進行上述多種衍生試劑進行衍生反應，之後再進入凝膠系統進行分離。然而，圖譜上僅出現衍生試劑峰，並無出現其它訊號如圖(4-13)所示。推論原因可能是化學水解方式無法順利將 HA 切成寡醣，因此無法成功地進行衍生反應，或是偵測極限不比文獻上所使用的螢光衍生試劑靈敏，故並無寡醣訊號出現。

針對分離技術推廣到其它醣類所遇到的瓶頸，於實驗改善的重點有：首先應確定水解的效能，有效的水解才能保證分析物的存在，而醣類結構多變，聚醣分子量不一，所需水解強度由實驗觀察得知有很大的差異，是實驗首要克服的問題；另外分析物的訊號強度不夠，影響來源是衍生反應的效率與偵測器的選擇，若能在醣類分子選擇衍生效率高，發光效率佳的衍生方法，且利用靈敏度較高的偵測法，所能偵測的範圍就更加寬廣。若能克服以上的問題，此分離技術可以將醣類寡醣的圖譜提升其聚合度、增高其解析力，在分離技術與結構鑑定的領域有長足的進展與助益。

4.10 餾分收集與質譜鑑定

由於凝膠系統的優異解析力，多半可以藉由商用儀器的協助，來進行分段的收集產物，所收集到微量產物藉由質譜儀進一步鑑定。

實驗首先利用木醣單醣、二醣的混合物進行衍生反應，所得樣品進入凝膠電泳系統，發現除了衍生試劑外，分別出現單醣、二醣的波峰，如圖(4-14)所示。目前所使用的 P/ACE5500 系統無法設置出口端

於不同緩衝溶液瓶子中，於是利用有效分離管長來推斷分析物的速度，推算得跑較快的單醣已離開毛細管，而二醣尚在毛細管中之際，即停止供給電壓，終止分離狀態，在出口端置於不同瓶子中，收集以氣壓推出毛細管中之二醣。並重複收集此樣品 50 次。

收集之樣品利用基質輔助雷射脫附游離(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI)質譜儀來進行分析物結構鑑定。發現得圖譜甚為乾淨，如圖(4-15)所示，所得到的質譜峰出現 3 根主要波峰，分別是 614.1 Da、541.9 Da、466.1 Da。由於計算出生成試劑為 301.2 Da，開環的單醣為 119 Da，衍生後單醣為 419.1 Da，推論 466.1 Da 則是衍生後單醣再加上 2 個鈉離子帶有一正電質子，而 541.9 Da 為衍生後單醣加上 2 個鈉離子與 2 個鉀離子所構成，並帶有一正電質子。衍生後二醣因為多加上 O-Link 的部分，而且在第二個五碳醣的四號碳上會帶有羥基，因此衍生後二醣比一醣多加 148 Da，為 567.3 Da。亦表示雙醣結構多添加了 267 Da。推測 614.1 Da 為所收集到的衍生後二醣再加上 2 個鈉離子，且帶有一個正電質子。其中，生成試劑帶有 2 個負電荷，因此容易吸引 2 個正離子的出現；而大於 2 個正離子的出現則是推論正離子取代了羥基上的氫所造成。由凝膠電泳所收集到的是不含單醣的分析物，而由相對強度觀察得到的單醣強度卻是很高，推論在游離過程中，雙醣間 O-Link 部分容易發生斷裂，因此多數的二醣已經是斷裂為單醣的情況。

由質譜圖所呈現的結果得知，經過凝膠電泳分離所收集到的二醣應該算是純化後的樣品，相較於分離前樣品，原本欲經MALDI MASS作比對工作，然而，樣品過於濃稠，組成成分過於複雜，經稀釋後所得的圖譜雜訊相當多，干擾嚴重，造成偵測的困難。而所收集的分析物因為純度較高，所得到的雜訊甚少，偵測過程也較為順利。其中，614.1 Da為最大的分子量，可視為母離子峰，成功確認所收集到的是二醣衍生後的分子。

4.11 結論

本實驗利用塗佈有線性聚丙烯醯胺的毛細管柱，並於緩衝溶液添加線性聚丙烯醯胺的凝膠後，可以利用凝膠系統中之大小篩分的能力來幫助木糖寡糖聚合物的分離，並且能有效率的提升所分離的寡糖聚合度。換言之，同一份經水解衍生後的樣品，在利用凝膠系統分離所出現的寡糖聚合度為 20，足足較 CZE 所呈現的 10 糖聚合度多出了一倍，由此可見其分離效率的大幅提昇。樣品製備是採用加酸加熱水解後，利用 3-ANDA 的衍生試劑進行胺化還原反應，在木糖寡糖獲得良好的衍生效果；然而進行其它糖類測試方面，惟幾丁寡糖獲得成功推展，糊精與玻璃質酸可能因水解效果不佳、分析物的訊號強度不夠而無法成功分離。此外，藉由凝膠系統的優異解析度，滯留時間隨著寡糖聚合度的增加而成線性增加，即高聚合度寡糖依然能如同低聚合度一般獲的高解析度，為餾分收集的動作製造有利的環境；實驗中，並利用此優勢收集樣品，再以 MALDI/MASS 鑑定其結構，並成功地鑑定所收集的木糖二糖。



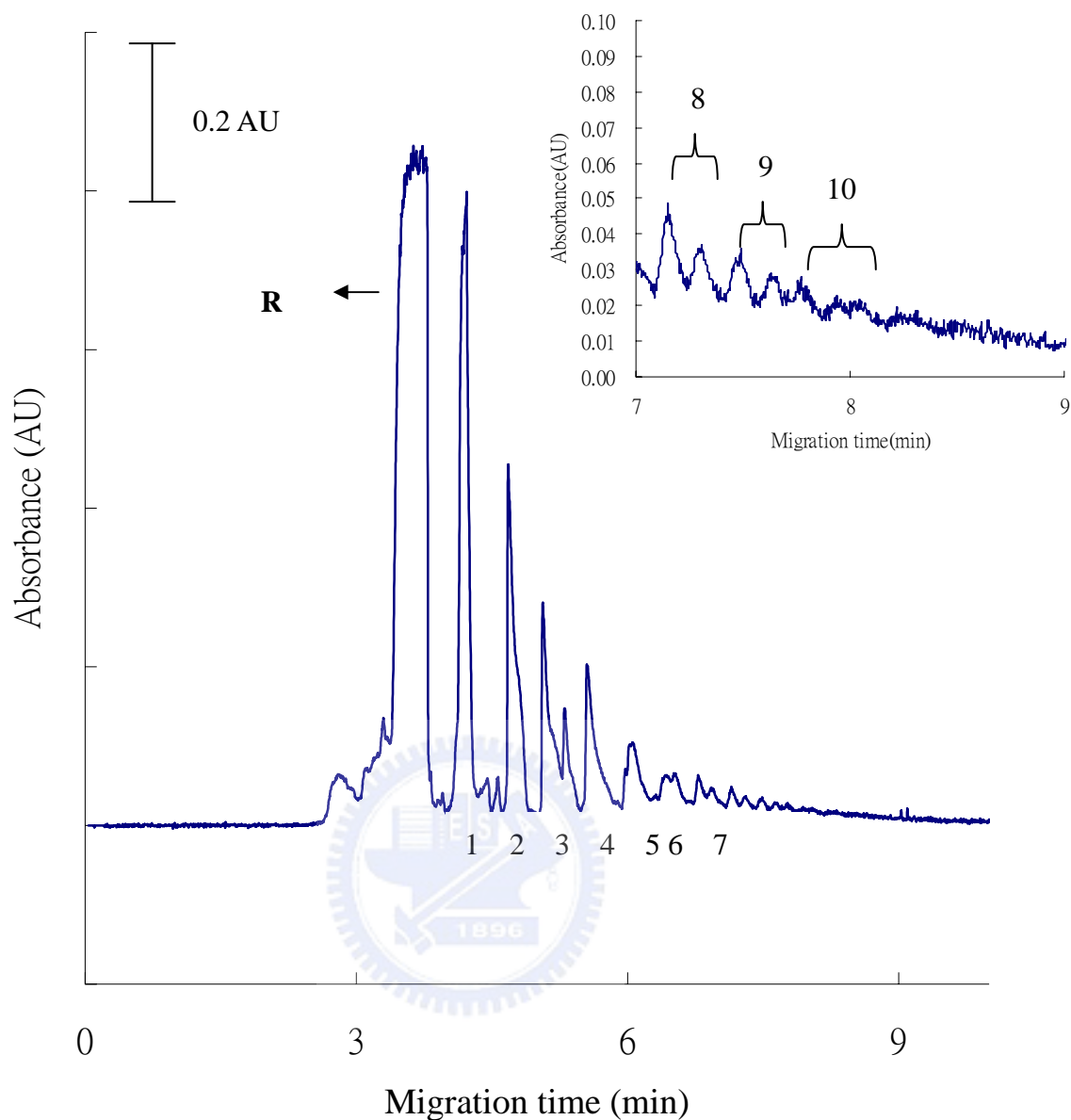


Figure 4-1 Electropherogram of 3-ANDA-derivatized xylan oligosaccharides. The optimized CZE conditions : electrolyte: 250 mM phosphate/2.0 % triethylamine, pH 2.6 ; Voltage:-15 kV ; Injection time:12 sec ; UV absorption wavelength : 254 nm. The inset in the upper corner corresponds to a detail of the electropherogram. R: means the peak of the derivate. The number indicate the degree of polymerization.

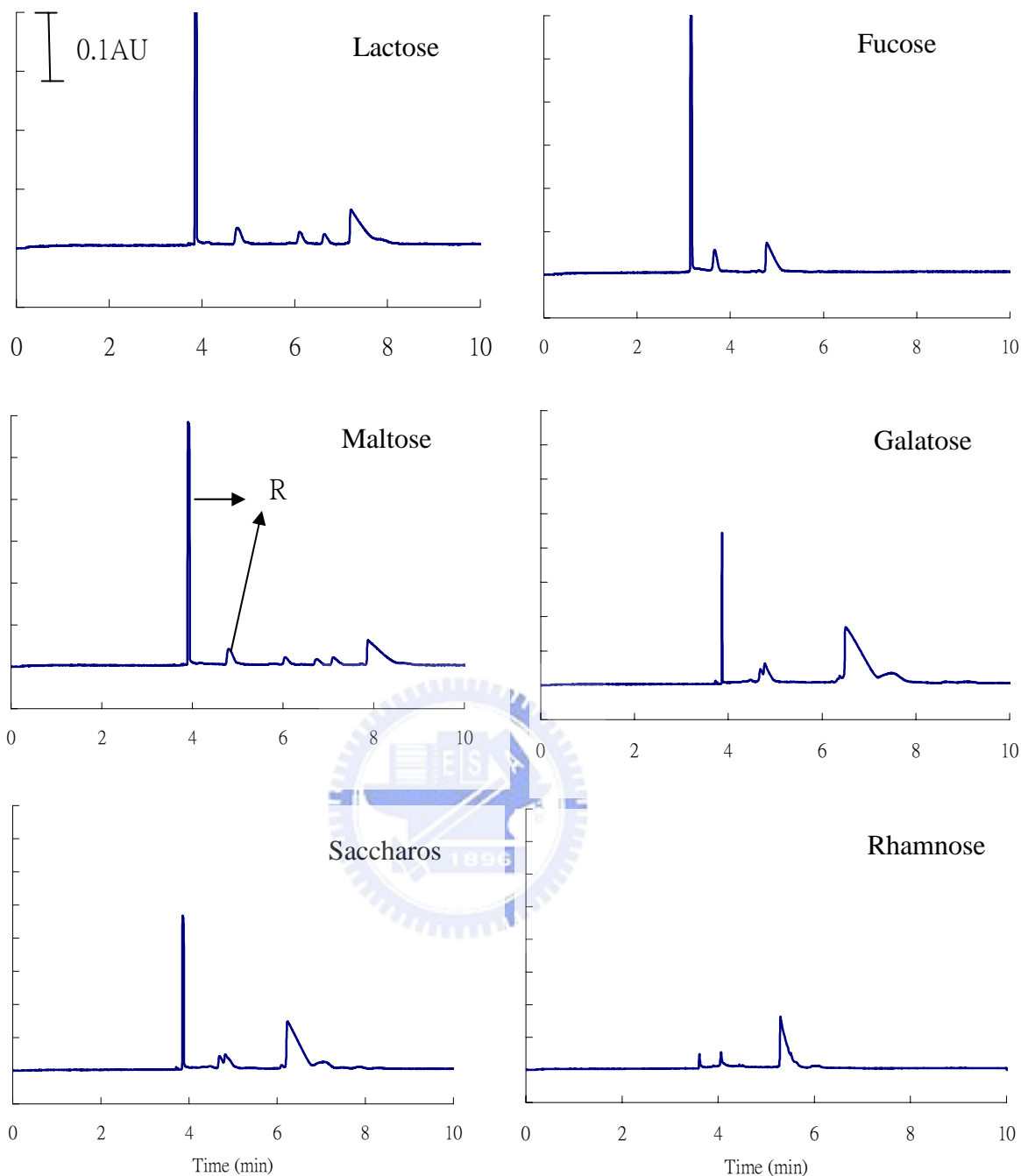


Figure 4-2 Electropherograms of monosaccharides and disaccharides in an entangled polymer solution. Conditions : electrolyte : 25 mM citric acid-sodium citrate, pH 5.0 ; gel conc. : 2%LPAA ; The effective length of the separation capillary : 30 cm ; applied voltage : -18.5 kV .R: means the peak of the derivate.

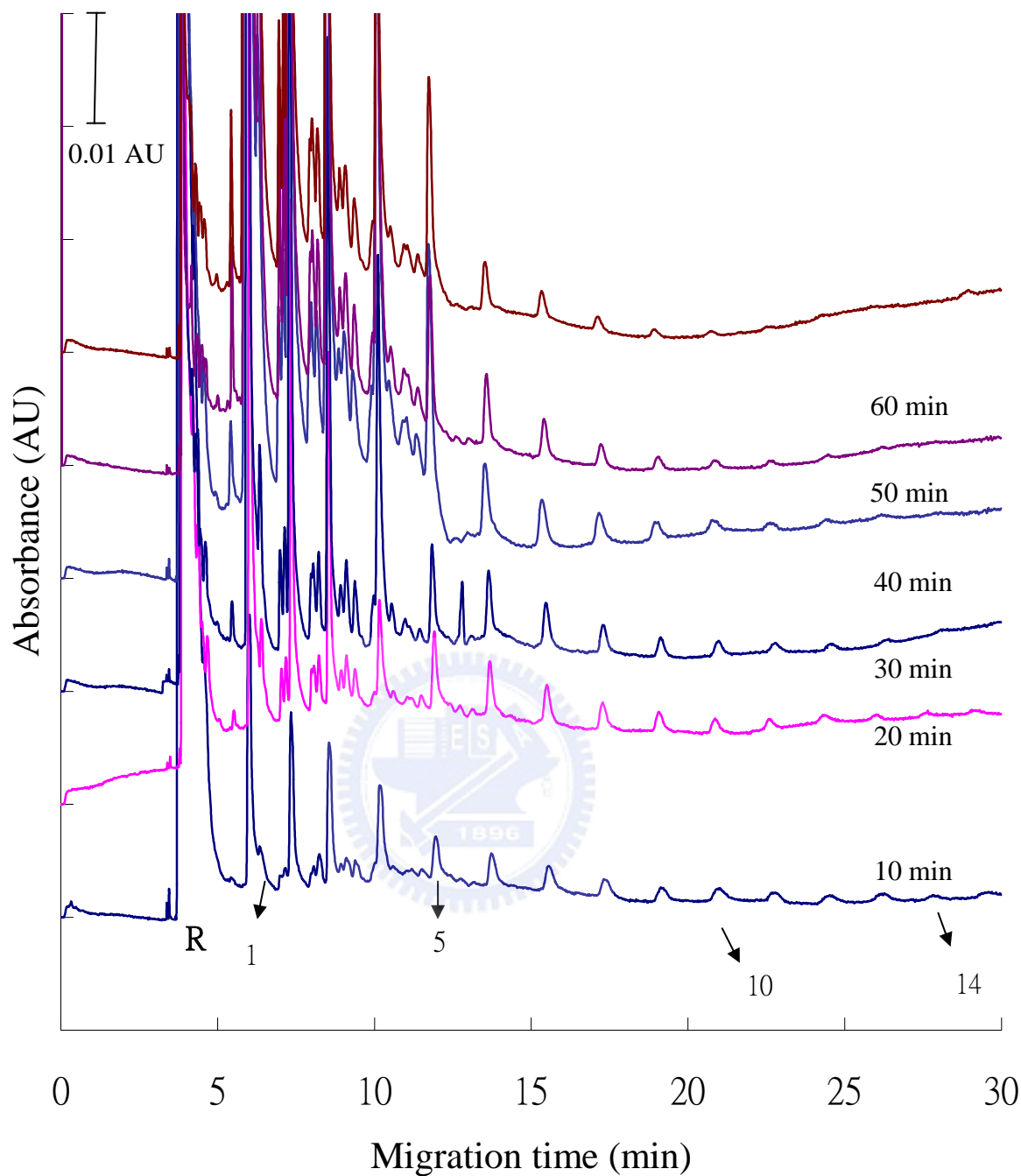


Figure 4-3 CE profiles for the hydrolysis of xylan. Xylan fragments after chemical hydrolysis for 10-,20-,30-,40-,50-,and 60-min periods,respectively was separated in entangled solution. Conditions : electrolyte : 50 mM citric acid-sodium citrate , pH 5.8 ; gel conc. : 2%LPAA ; the effective length of the separation capillary : 30 cm ; appllied voltage : -18.5 kV. R: means the peak of the derivate. The number indicate the degree of polymerization.

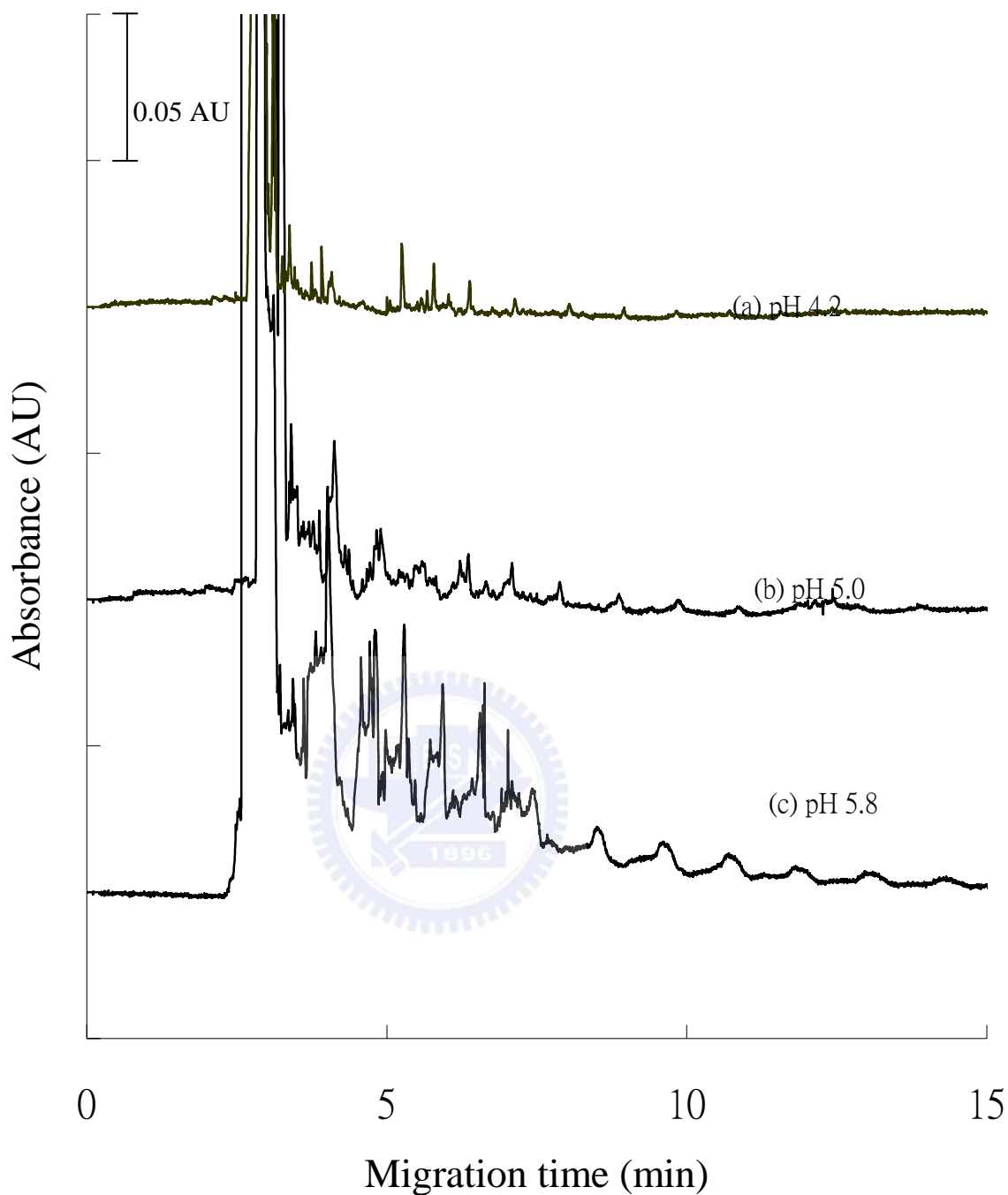


Figure 4-4 Separation of 3-ANANDA-derivatized xylan oligosaccharides using (a) pH 4.2, (b) pH 5.0 (c) pH 5.8 citric acid-sodium acetate buffer. Conditions : UV absorption wavelength : 254 nm ; applied voltage : -400V/cm ; Injection time:12 sec ; gel conc. : 2% LPAA ; the effective length of the separation capillary : 30 cm.

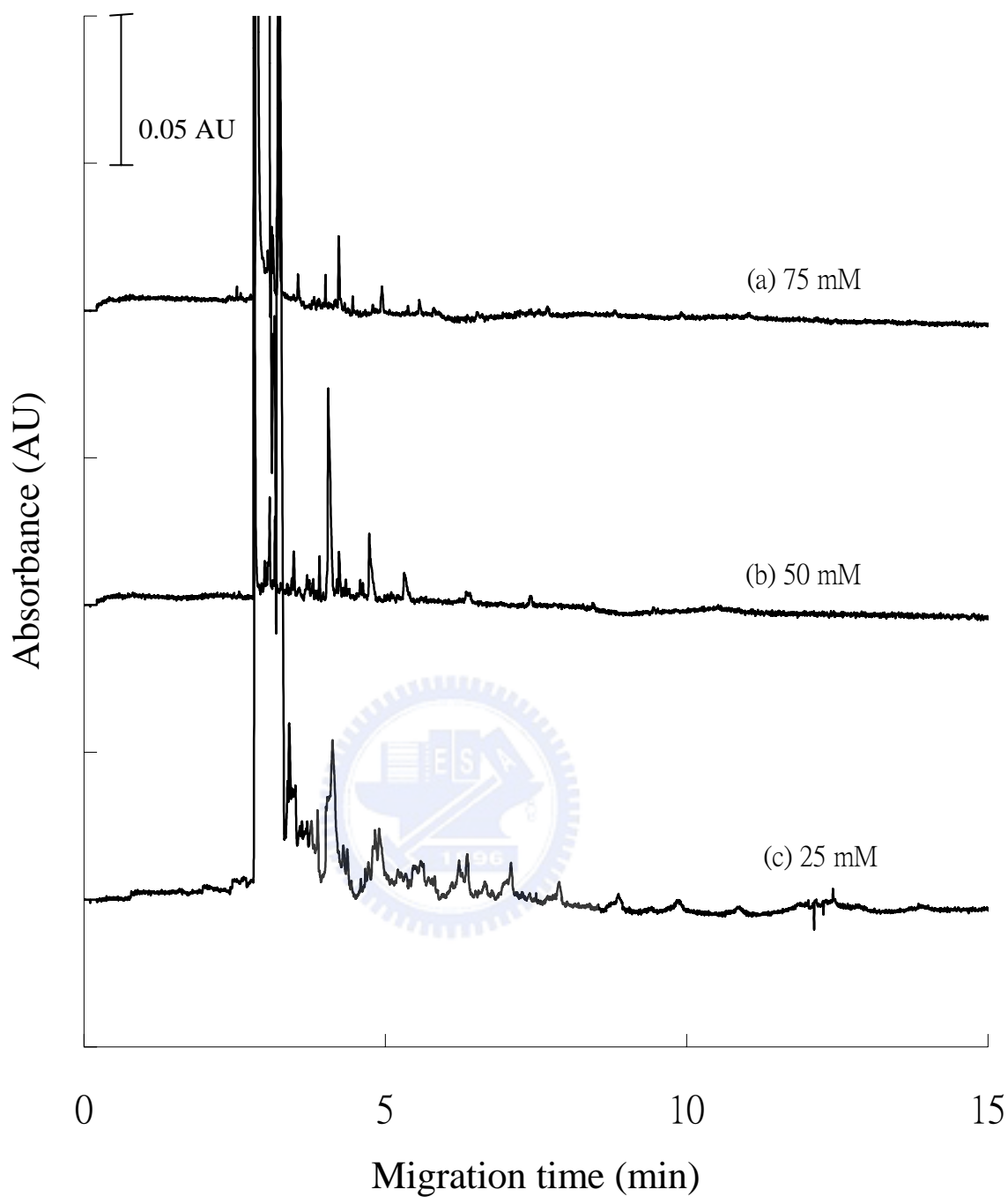


Figure 4-5 Effect of ionic strength on peak performance for the 3-ANANDA-derivatized xylan oligosaccharides. Electrolyte: citric acid-acetic acetate buffer at pH 5.0 (a)75mM (b)50mM (c)25mM. Other conditions are the same as those in Figure 4-4.

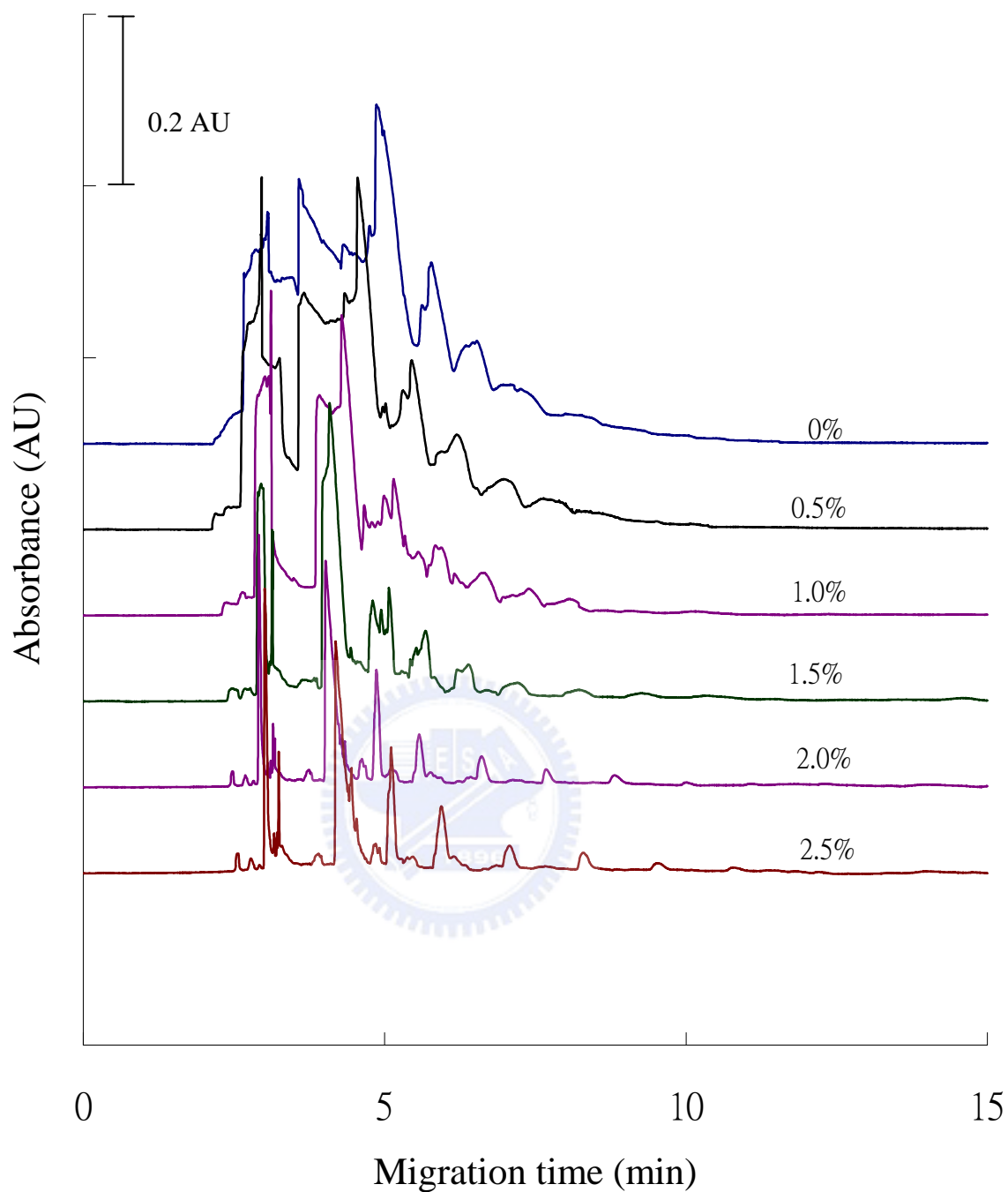


Figure 4-6 Effect of polyacrylamide concentration on peak performance for the 3-ANDA-derivatized xylan oligosaccharides. Other conditions are the same as those in Figure 4-4.

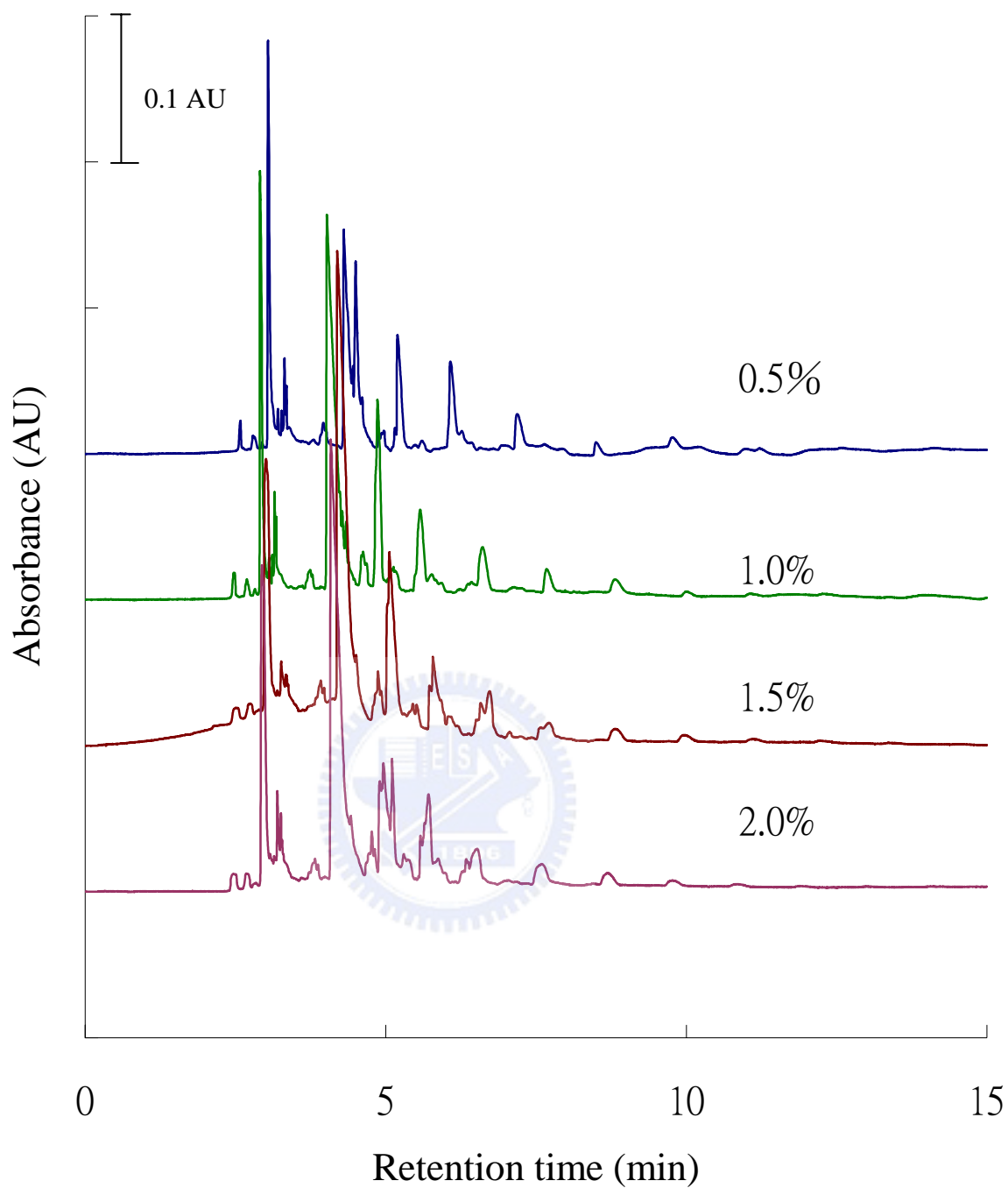


Figure 4-7 Effect of initiate reagent concentration on peak performance for the 3-ANDA-derivatized xylan oligosaccharides. Other conditions are the same as those in Figure 4-4.

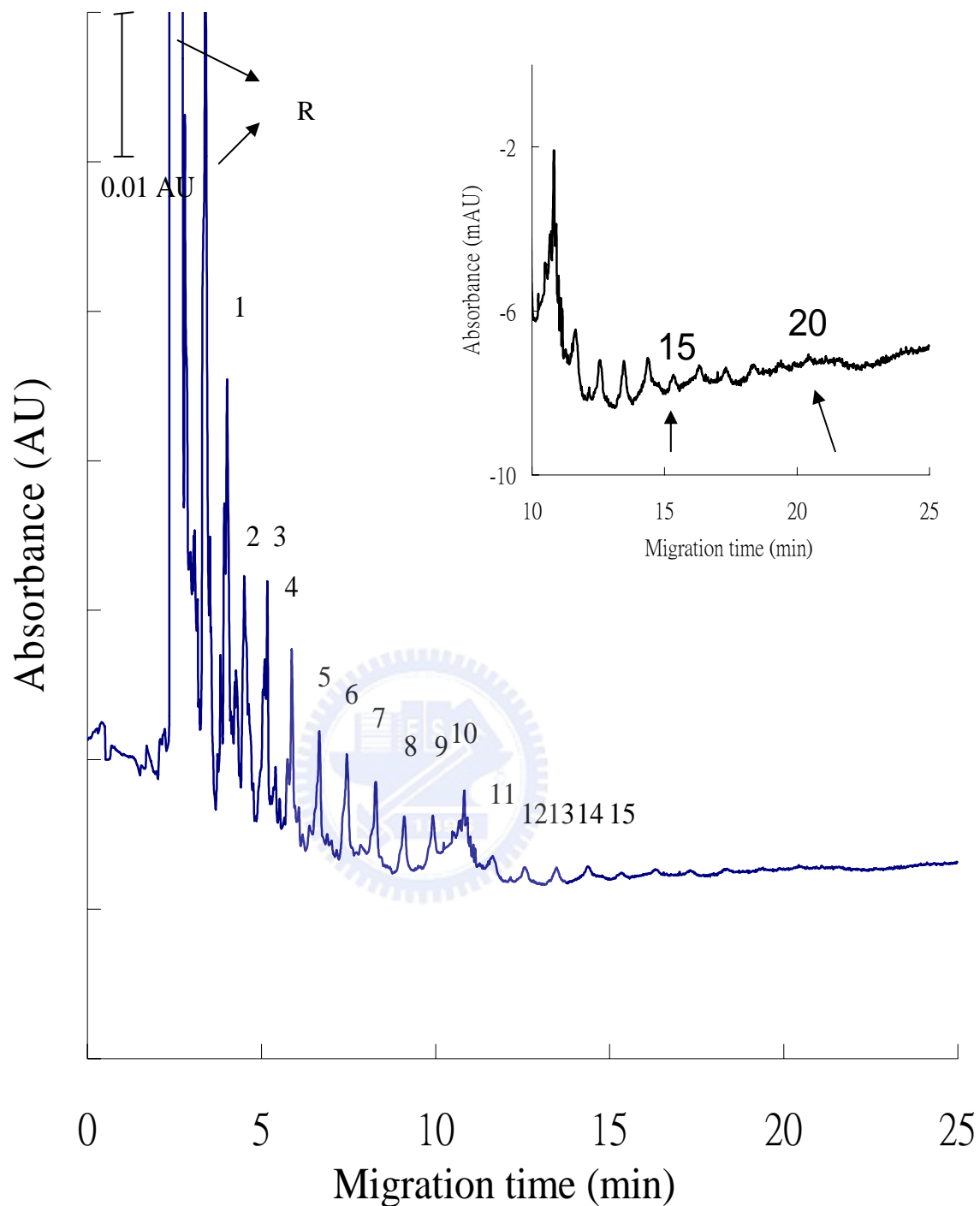


Figure 4-8 Electropherogram of xylan in an entangled polymer solution. The optimized conditions: electrolyte : 25 mM citric acid-sodium citrate , pH 5.0 ; gel conc. : 2%LPAA. ; applied voltage : -15 kV ; The effective length of the separation capillary : 30 cm. The inset in the upper corner corresponds to a detail of the electropherogram. The number indicate the degree of polymerization. R: means the peak

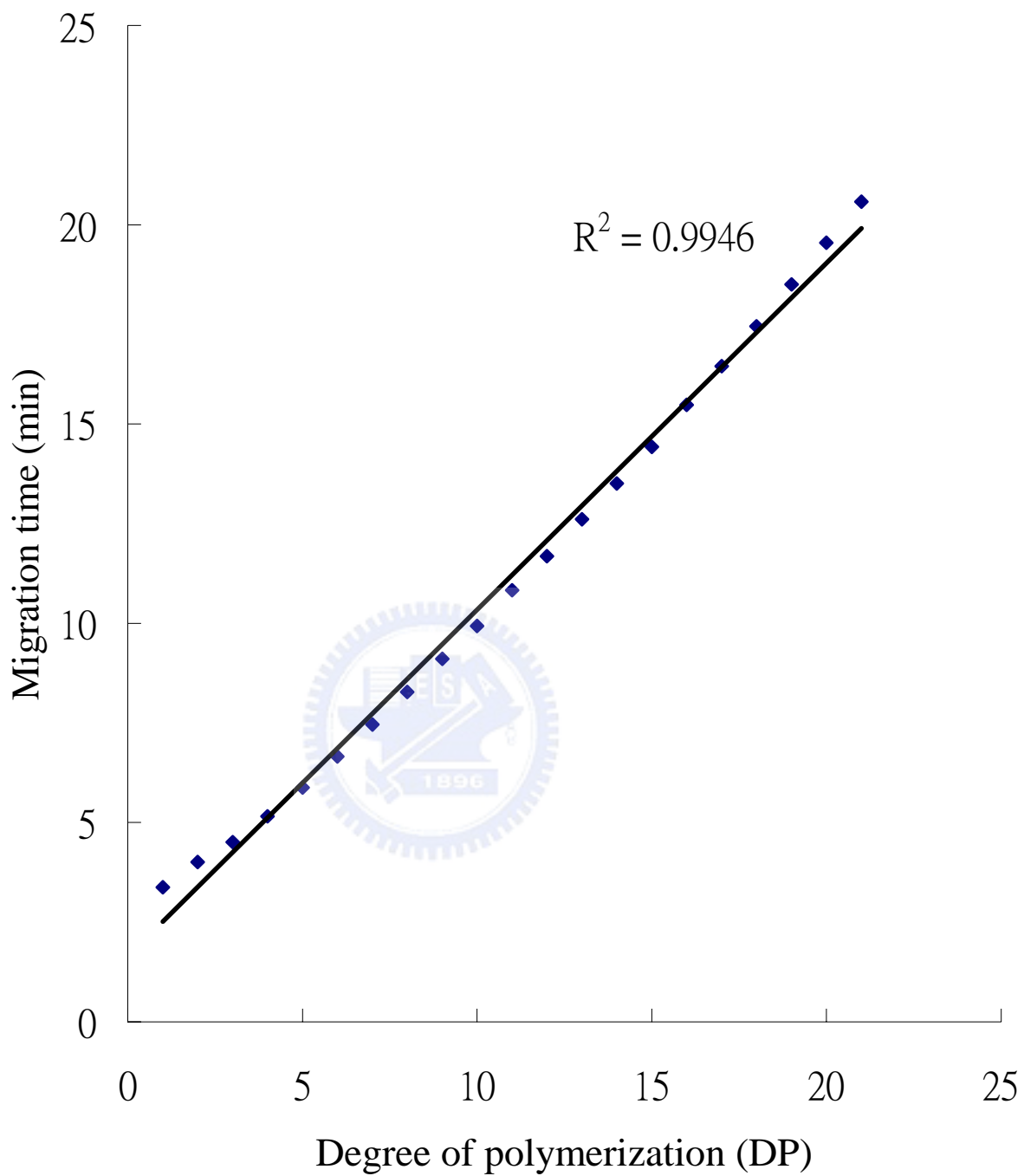


Figure 4-9 Correlation of migration time with degree of polymerization. (data were extracted form Figure 4-8)

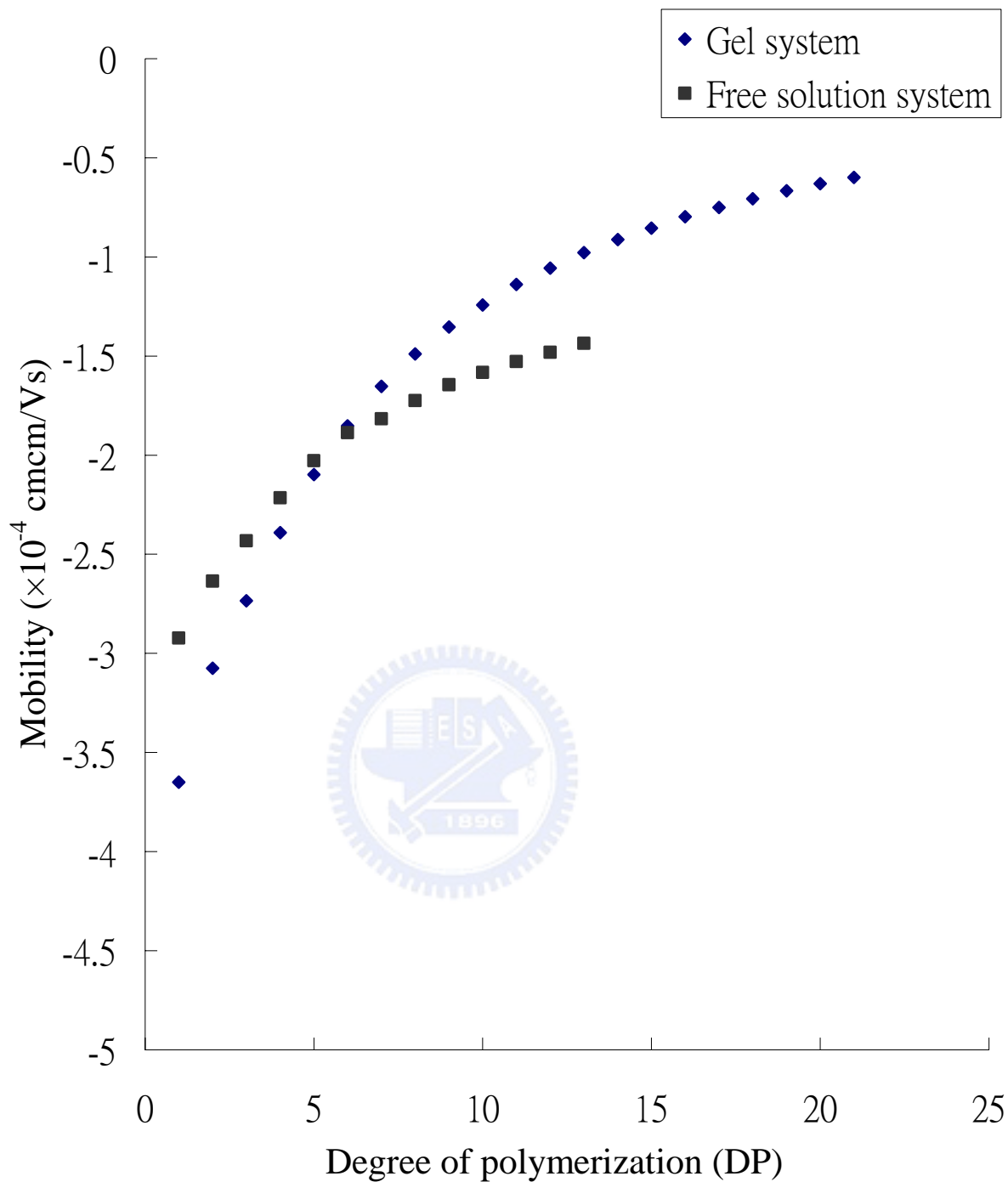


Figure 4-10 Mobility versus molecular size (number of monosaccharide units), poltted from data in figure4-1 、 4-8.

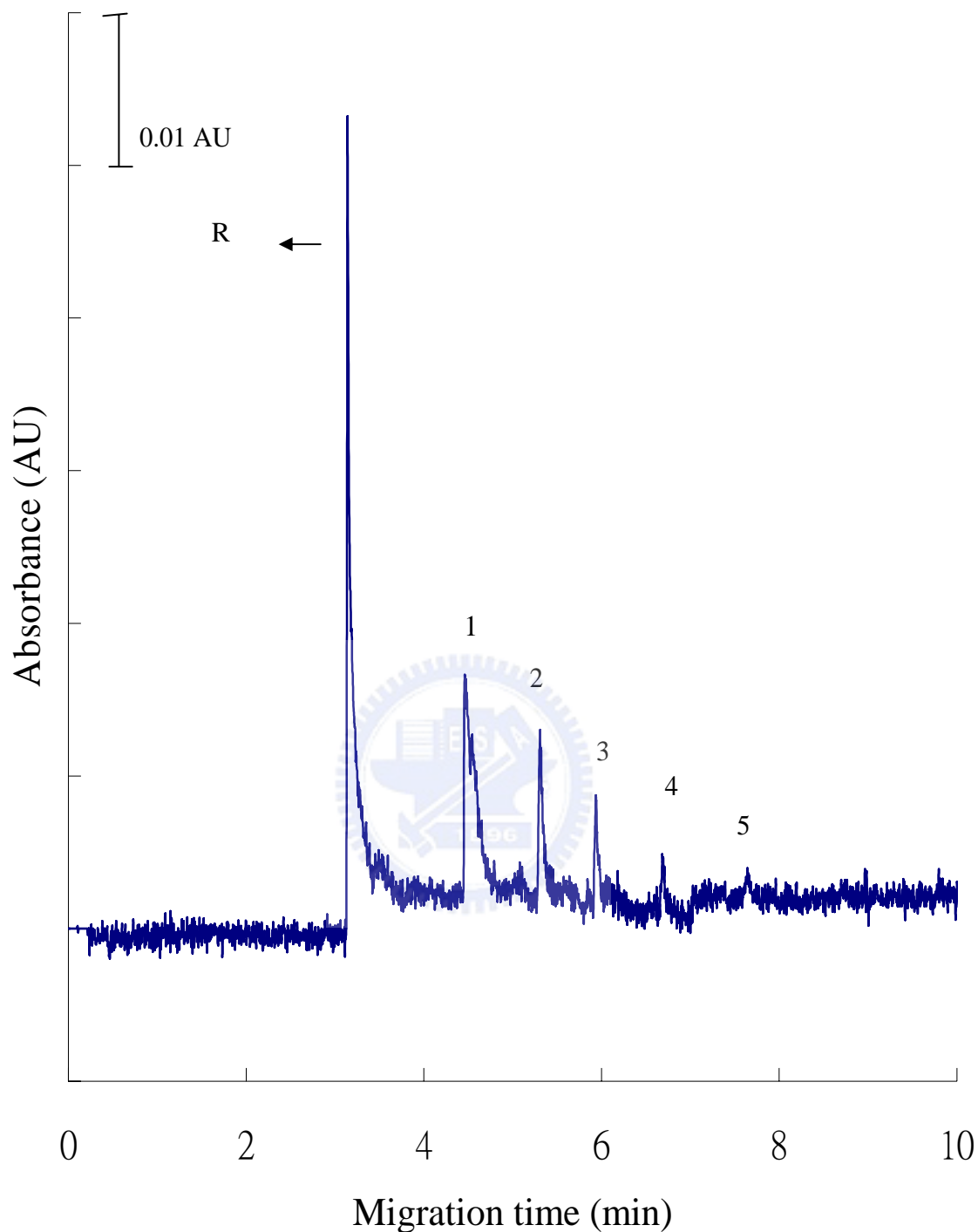


Figure 4-11 Electropherogram of chitosan in entangled polymer solution .
 Condition : applied voltage : -18.5 kV ; electrolyte : 50 mM citric acid-sodium citrate , pH5.0 ; gel conc. : 2%LPAA. The effective length of the separation capillary : 30 cm.UV absorption wavelength : 254 nm. The number indicate the degree of polymerization. R: means the peak of the derivate.

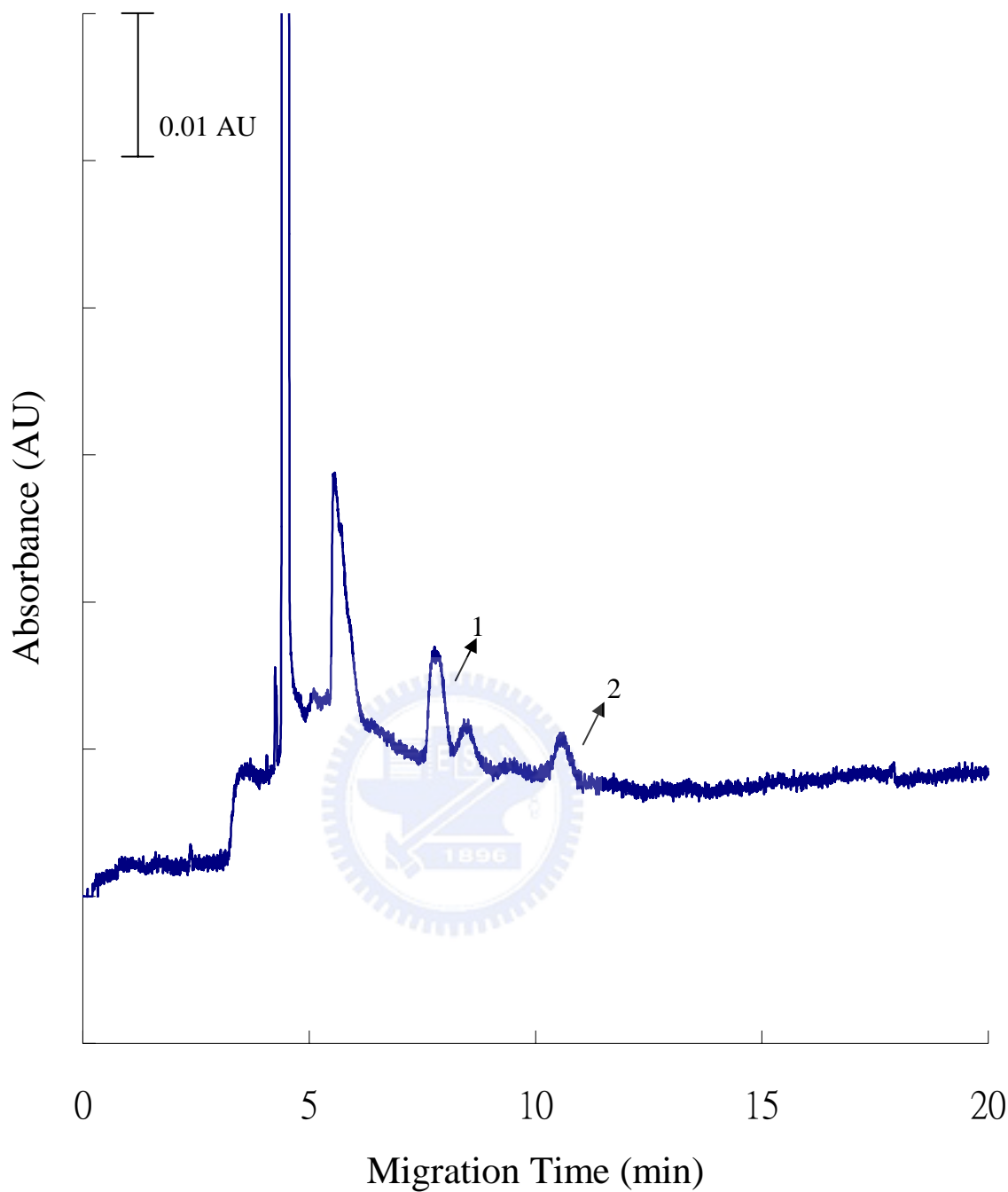


Figure 4-12 Electropherogram of 3-ANDA-dextrin in entangled solution. Conditions : electrolyte : 50 mM citric acid-sodium citrate, pH 5.0 ; Other conditions are the same as those in Figure 4-4. The number indicate the degree of polymerization. R: means the peak of the derivate.

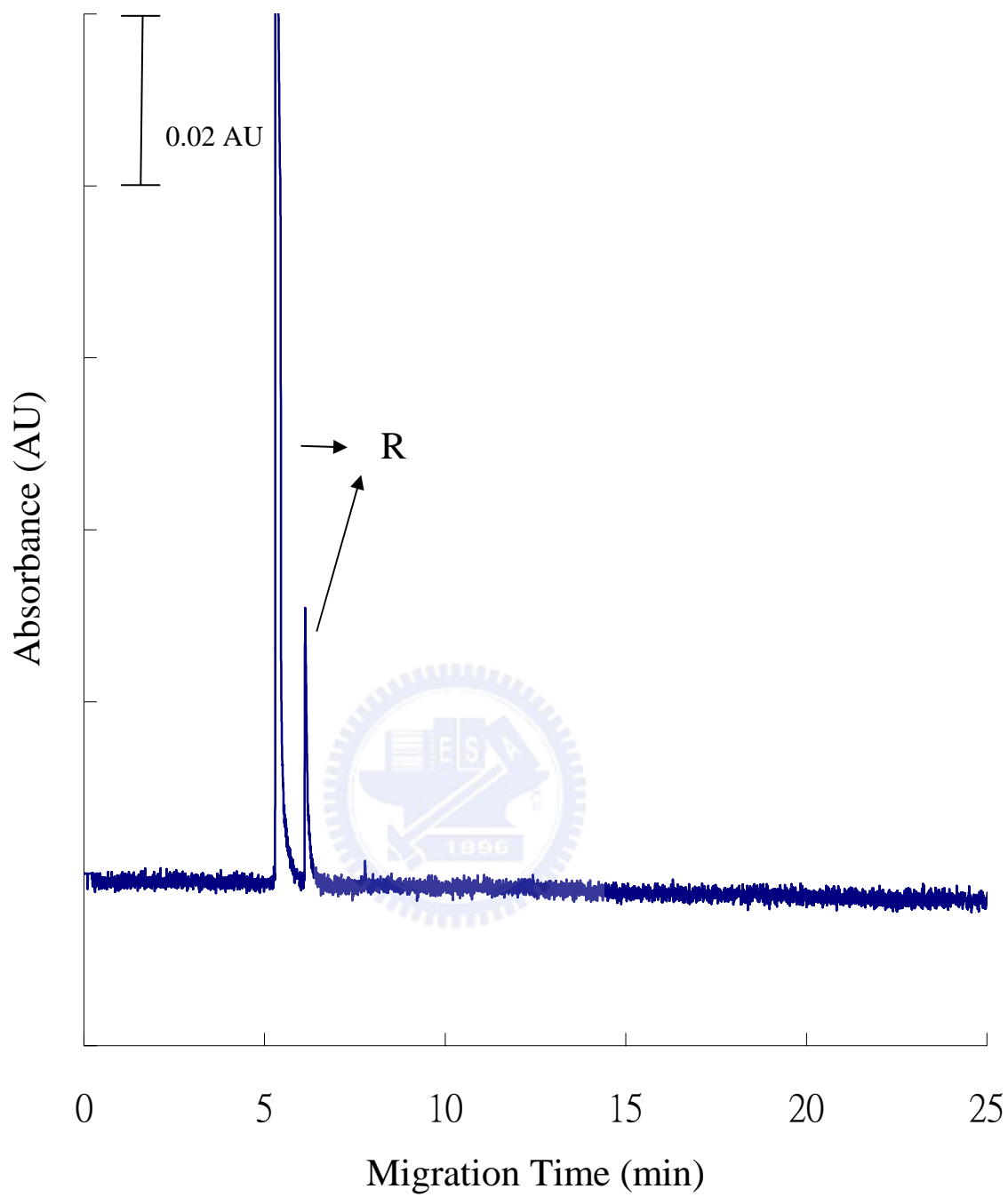


Figure 4-13 Electropherogram of 7-ANDS-HA in entangled polymer solution.

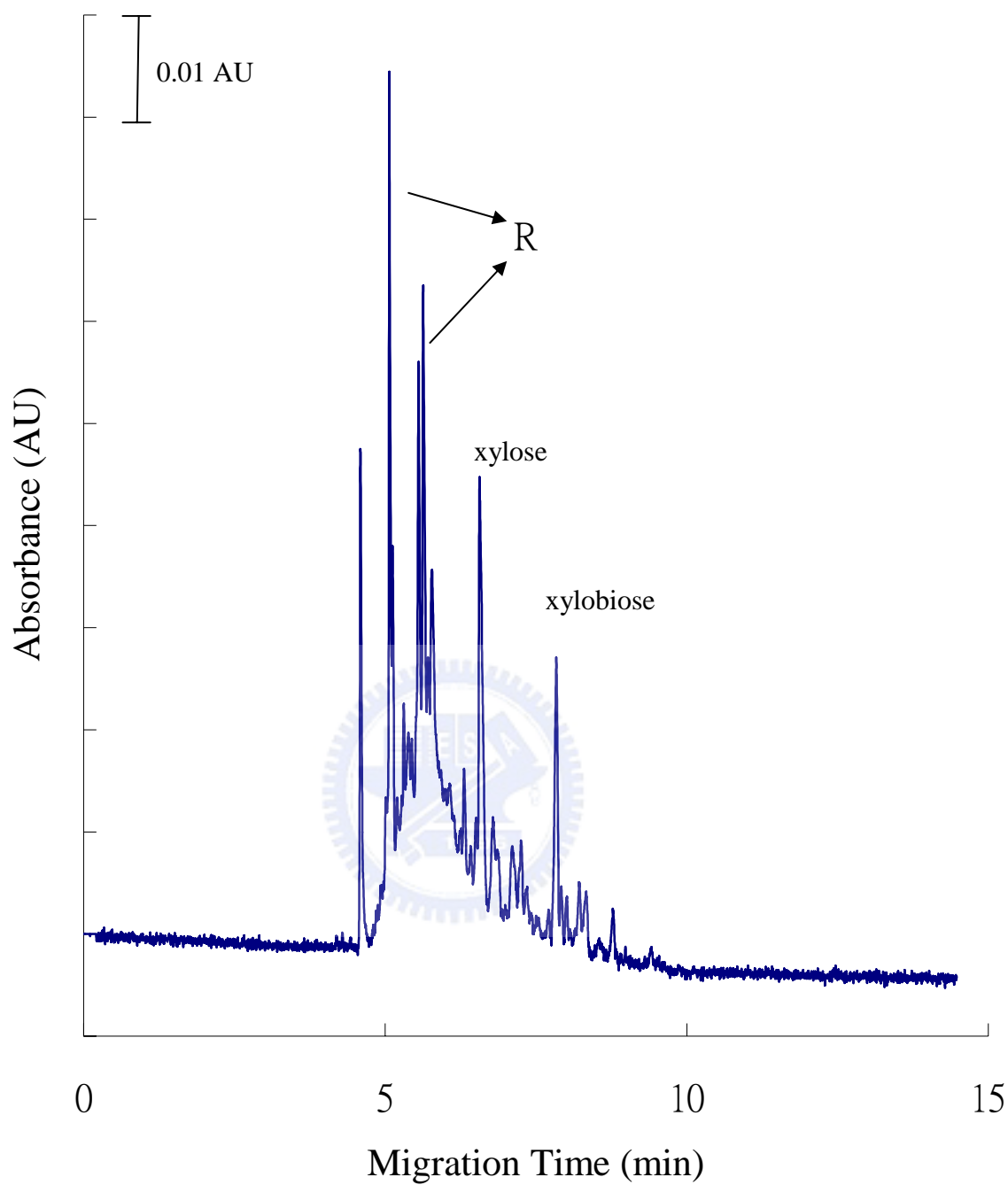


Figure 4-14 Electropherogram of xylose and xylobiose in an entangled polymer solution. Conditions : applied voltage : -10 kV ; Other conditions are the same as those in Figure 4-8. R: means the peak of the derivate.

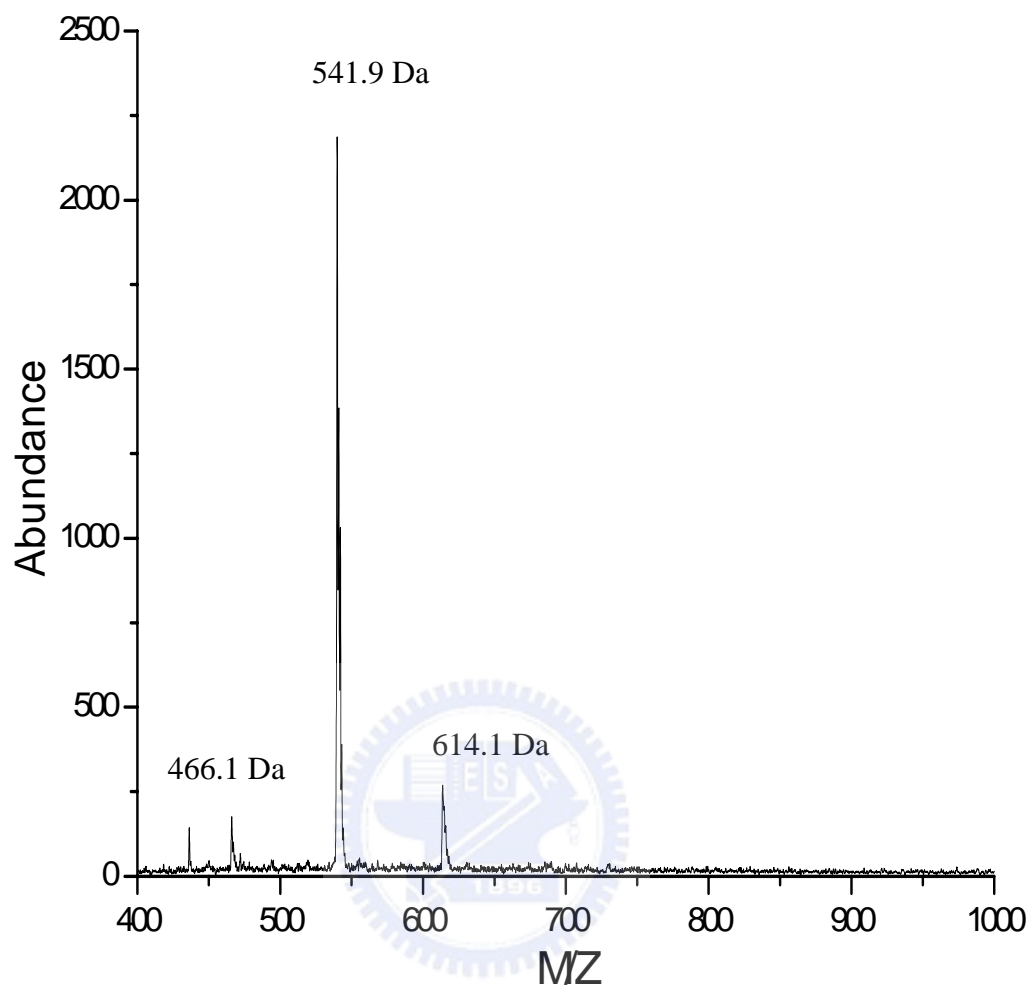


Figure 4-15 The MALDI spectrum of the xylobiose.

Table 4-1

The average migration time, reproducibility of migration time and peak area, and the instrumental detection limit of 3-ANDA-xylose.

	Migration time (min)	migration time (RSD,%) ^a	peak area (RSD,%) ^b	LOD (Pmol) ^c
xylose	4.185	1.81	4.53	15.7

a,b = 3

c = injection volume 19.24 nl

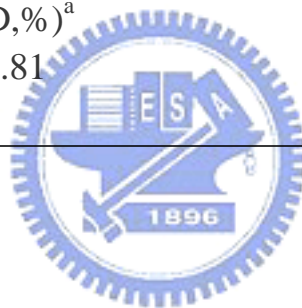


Table 4-2

The trial derivative condition.

Derivative reagent	Time (hr)	Temp. (°C)	Conc. of acetic acid (%)	Conc. of derivative reagent (M)	analyte	Conc. of analyte
Condition (1)	2	90	20	0.2	dextrin/HA	500 mg/ml
Condition (2)	3	80	20	0.2	dextrin/HA	500 mg/ml
Condition (3)	6	45	20	0.2	dextrin/HA	500 mg/ml