

高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法定量测定 低聚木糖样品中的低聚木糖

范 丽, 徐 勇*, 连之娜, 勇 强, 余世袁

(南京林业大学林木遗传与生物技术教育部重点实验室, 江苏 南京 210037)

摘要: 建立了低聚木糖样品中的木二糖至木六糖等低聚木糖的高效阴离子交换色谱定量测定方法, 并根据低聚木糖的聚合度与色谱保留时间的线性关系, 对木七糖和木八糖的保留时间进行预测。采用 CarboPac™ PA200 阴离子交换柱 (3 mm × 250 mm), 以醋酸钠和氢氧化钠为淋洗液进行二元梯度洗脱, 脉冲安培法进行检测。结果表明, 木二糖至木六糖在 0.804~8.607 mg/L 质量浓度范围内的线性关系良好, 检出限为 0.064~0.111 mg/L, 定量限为 0.214~0.371 mg/L。将该方法用于低聚木糖产品的检测, 3 个添加水平的加标回收率为 84.29%~118.19%, 相对标准偏差 (n=3) 为 0.44%~14.87%。结果表明该方法适用于低聚木糖产品中有效成分的快速、高效分离和定量测定。

关键词: 高效阴离子交换色谱; 脉冲安培检测; 低聚木糖

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2011)01-0075-04

Quantitative determination of xylo-oligosaccharides in xylo-oligosaccharide products with high performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection

FAN Li, XU Yong*, LIAN Zhina, YONG Qiang, YU Shiyuan

(Key Laboratory of Forest Genetics & Biotechnology, Ministry of Education,
Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract A method for the analysis of xylo-oligosaccharides (XOS) in xylo-oligosaccharide products including xylobiose, xylotriose, xylotetraose, xylopentose and xylohexaose was developed using high performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). The retention times of xyloheptaose and xylooctaose were calculated according to the linear relationship between the retention time and the polymerization degree. The separation was performed on a CarboPac™ PA200 column (250 mm × 3 mm) with a gradient elution of NaOH-NaOAc as the mobile phase. The calibration curves showed good linearity for the xylo-oligosaccharides in the range of 0.804–8.607 mg/L. The detection limits (LODs) and the quantification limits (LOQs) were 0.064–0.111 mg/L and 0.214–0.371 mg/L, respectively. Under the optimized conditions, the recoveries of xylo-oligosaccharides at three different spiked levels ranged from 84.29%–118.19%, with the relative standard deviations (RSDs, n=3) of 0.44%–14.87%. This method is fast and accurate for the quantitative analysis of the xylo-oligosaccharide products.

Key words high performance anion-exchange chromatography (HPAEC); pulsed amperometric detection (PAD); xylo-oligosaccharides

* 通讯联系人: 徐 勇, 博士, 副教授, 研究方向为生物工程. E-mail: xuyong@njfu.com.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 31070514)、江苏省高校自然科学重大基础科研项目 (No. 08KJA220002) 和江苏省自然科学基金项目 (No. BK2009690).

收稿日期: 2010-09-21

低聚木糖 (xylo-oligosaccharide, XOS) 是由 2 ~ 8 个木糖分子以 β -1, 4 木糖苷键连接而成的功能性低聚糖, 具有独特的免疫增强和保健促生功效, 是目前性价比最高的双歧因子之一。现已成功地应用于食品和饲料添加剂行业, 成为当前研发的热点, 市场发展空间巨大^[1]。

目前低聚木糖的分析和检测主要采用高效液相色谱法 (HPLC)^[2-4]。由于低聚木糖产品均为聚合度相近的各种低聚糖组分的混合物, 采用普通的 HPLC 尚不能高效分离这些糖组分^[2], 因而难以对低聚木糖进行准确的定量测定, 从而制约了低聚木糖产品的质量、品质评定及工艺技术优化。高效阴离子交换色谱-脉冲安培法 (HPAEC-PAD) 利用糖类物质在强碱性介质中可以发生酸性解离的原理, 采用高效阴离子交换色谱柱分离糖类, 利用糖分子结构中的羟基在金电极表面发生氧化还原反应时产生的电流实现检测^[5]。与普通的 HPLC 相比, HPAEC 可利用不同相对分子质量的低聚糖之间羟基解离度的细微差异实现它们的精确分离, 具有操作方便、针对性强、灵敏高和应用范围广等优点, 适用于低聚糖的定性分析和定量检测^[6], 并已成功用于菊糖等低聚糖的分析^[7-9]。尽管 Swennen 等^[10]采用 CarboPacTM PA100 阴离子交换柱实现了对低聚木糖组分以及阿拉伯糖基低聚木糖组分的分离, 但未对分离条件做进一步的优化, 且未建立定量分析方法。本文在该工作的基础上, 采用分离效果更好的 CarboPacTM PA200 阴离子交换柱, 利用 HPAEC-PAD 装置, 实现了低聚木糖产品中各组分的高效、快速分离, 并建立了相应的定量测定方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

ICS-3000 离子交换色谱系统, 配备电化学检测器、AS40 自动进样器、柱温箱、安培检测器 (Au 工作电极, pH-Ag/AgCl 复合参比电极) 和 Chromleon 6.7 色谱工作站 (美国 Dionex 公司); 超纯水设备 (法国 ELGA LabWater 公司); 离心机 (美国 ThermoFisher 公司); CarboPacTM PA200 分析柱 (250 mm \times 3 mm); CarboPacTM PA200 保护柱 (50 mm \times 3 mm) (美国 Dionex 公司)。

木二糖、木三糖、木四糖、木五糖和木六糖标准样品 (纯度 > 95%, 色谱纯) 购于爱尔兰 Megazyme 公司, 木糖标准样品 (色谱纯) 购于上海国药公司, 无水醋酸钠 (NaOAc) 购于美国 Sigma 公司, 50% (质量分数) 氢氧化钠 (NaOH) 溶液购自美国 Fluka

公司。低聚木糖产品由玉米芯木聚糖经定向酶水解制备而成, 主要成分为葡萄糖、木糖和低聚合度的水溶性木聚糖^[11]。实验用水均采用电阻率不低于 18.2 M Ω \cdot cm 的超纯水。

1.2 溶液的制备

1.2.1 标准溶液

用超纯水将木糖至木六糖的标准低聚木糖分别配成一定浓度的母液, 取适量母液配制成不同浓度的标准溶液, 分装后于 -20 $^{\circ}$ C 下冷冻保存。使用前取出化冻, 取等量同浓度级别的标准溶液混合后作为工作标准溶液。

1.2.2 淋洗液

0.1 mol/L NaOH 溶液: 取 50% NaOH 溶液 5.2 mL, 用水稀释至 1 L 并定容, 混匀后立即通氮气 (41.3 ~ 55.1 kPa (6 ~ 8 psi)) 保护。

0.5 mol/L NaOAc 溶液: 称取 41.0 g 固体无水醋酸钠, 用水溶解, 经 0.22 μ m 醋酸纤维膜过滤后转至 1 L 容量瓶中, 加入 50% NaOH 溶液 5.2 mL 后用水定容, 混匀后立即通氮气 (41.3 ~ 55.1 kPa (6 ~ 8 psi)) 保护。

1.2.3 样品溶液

用水稀释低聚木糖样品至检测浓度范围, 在 10 000 r/min 条件下离心 5 min, 取上清液并经过 0.22 μ m 滤膜过滤至样品瓶, 转入 AS40 自动进样器进行色谱检测和分析。

1.3 色谱条件

以 0.1 mol/L NaOH (A)、0.5 mol/L NaOAc (B) 为淋洗液进行二元梯度洗脱, 淋洗程序: 0 ~ 40.0 min B 相浓度从 0 mmol/L 线性升至 120 mmol/L; 40.1 ~ 60.0 min 以 100% A 冲洗系统; 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样体积: 10 μ L; 检测方式: 四电位脉冲安培检测。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

NaOH 溶液中所含有的 OH⁻ 离子可以促进低聚糖中羟基的酸性解离, 从而增强它们在阴离子交换色谱柱上的保留。在作为淋洗剂的同时, NaOH 溶液也提高了 PAD 对糖类检测的灵敏度。增加 NaOH 溶液的浓度, 其淋洗能力有一定的增强, 但是对于强保留的聚合度较高的低聚糖组分, 必须采用具有更强淋洗能力的醋酸钠溶液进行洗脱才能实现良好的分离效果^[5, 12]。以 HPAEC 系统分离低聚木糖标准品时发现: 增加 NaOAc 溶液浓度、加快流速或提高柱温可以加快洗脱强保留的糖组分, 缩短各

低聚木糖组分的保留时间, 但会对糖组分间的分离效果及色谱系统的柱压产生影响。因此, 优化色谱操作条件对提高低聚木糖组分之间的分离度、提高检测效率和保护色谱系统是必要的^[13]。

采用上述 PA200 阴离子交换色谱柱, 以 NaOH 溶液-NaOAc 溶液为二元洗脱溶液, 在不同流速和

梯度洗脱方式下分离木二糖至木六糖标准样品。5 种低聚糖标准品的色谱分离效果以柱效和保留时间作为表征参数列于表 1 中。综合考虑各低聚木糖组分的柱效、组分间的分离度、峰不对称性和色谱柱压(数据未公布)等因素^[14], 最终选取 1.3 节中的色谱条件分离低聚木糖。

表 1 洗脱条件对低聚木糖色谱分离效果的影响

Table 1 Effect of elution conditions on xylo-oligosaccharide separation

Xylo-oligosaccharide	Elution flow rate ¹⁾ / (mL/min)						Concentration of NaOAc ²⁾ / (mmol/L)					
	0.2		0.3		0.4		0-90		0-120		0-150	
	t/min	N/m ⁻¹	t/min	N/m ⁻¹	t/min	N/m ⁻¹	t/min	N/m ⁻¹	t/min	N/m ⁻¹	t/min	N/m ⁻¹
Xylobiose	9.98	25516	6.67	24415	5.08	17975	6.47	22314	6.67	24415	6.67	23624
Xylotriose	14.50	67147	9.93	41027	7.55	29896	9.67	33797	9.93	41027	9.82	48123
Xylotetraose	17.18	102047	12.68	74667	9.97	55540	12.92	60056	12.68	74667	12.07	77692
Xylopentaose	19.52	117412	15.00	93079	12.12	72637	15.72	79834	15.00	93079	13.93	90761
Xylohexaose	21.60	144026	17.10	117947	14.08	95283	18.27	103913	17.10	117947	15.65	110290

1) the different elution flow rate under the same gradient elution of NaOAc from 0 mmol/L to 120 mmol/L within 40 min 2) the different gradient elution of NaOAc within 40 min at the same elution flow-rate of 0.3 mL/min

2.2 方法的检出限和线性关系

在优化的色谱条件下, 采用积分脉冲安培法检测, 色谱峰面积对低聚木糖的质量浓度进行线性回归, 得到木二糖至木六糖的标准曲线方程。结果如表 2 所示, 在 0.804~8.607 mg/L 范围内, 木二糖至木六糖标准曲线的线性相关系数均在 0.9986 以

上。将低浓度的混合标准样品进行稀释, 以 3 倍的空白标准偏差为检出限 (LOD)^[15], 得到低聚木糖的 LOD 为 0.064~0.111 mg/L; 以 10 倍的空白标准偏差为定量限 (LOQ), 得到低聚木糖的 LOQ 为 0.214~0.371 mg/L, 表明采用本文建立的方法可以实现木二糖至木六糖组分的高灵敏度定量测定。

表 2 5 种低聚木糖的线性范围、相关系数、方法的检出限和定量限

Table 2 Linear ranges, correlation coefficients (r^2), detection limits (LOD) and quantification limits (LOQ) for xylo-oligosaccharides

Xylo-oligosaccharide	Linear range/(mg/L)	r^2	Slope of calibration curve	LOD [*] /(mg/L)	LOQ [*] /(mg/L)
Xylobiose	0.804-7.911	0.9998	3.08	0.072	0.239
Xylotriose	0.827-8.311	0.9999	1.52	0.111	0.371
Xylo-tetraose	0.828-8.274	0.9997	1.72	0.070	0.235
Xylo-pentaose	0.818-8.607	0.9986	1.37	0.064	0.214
Xylo-hexaose	0.831-8.435	0.9998	1.10	0.096	0.324

* LOD=3SD/b, LOQ=10SD/b, where the SD is the standard deviation calculated on twenty measurements, and b as the slope of the calibration curve for each standard

采用上述色谱条件分离低聚木糖标准样品和实际样品的色谱图如图 1 所示。低聚木糖产品中常见的干扰组分葡萄糖和木糖均在低聚木糖组分之前出

峰。因此, 在上述色谱条件下, 葡萄糖和木糖对低聚木糖的测定无干扰, 木二糖至木六糖各组分都可以在 20 min 内被完全洗脱, 且分离度均在 1.5 以上,

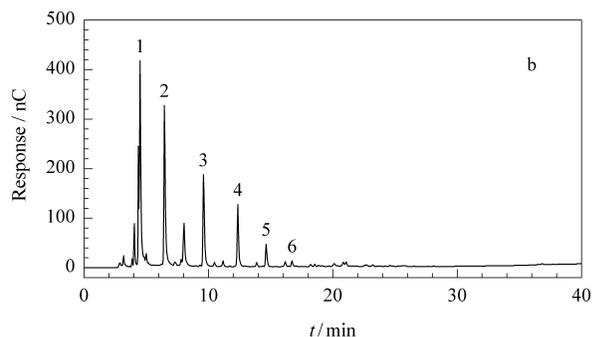
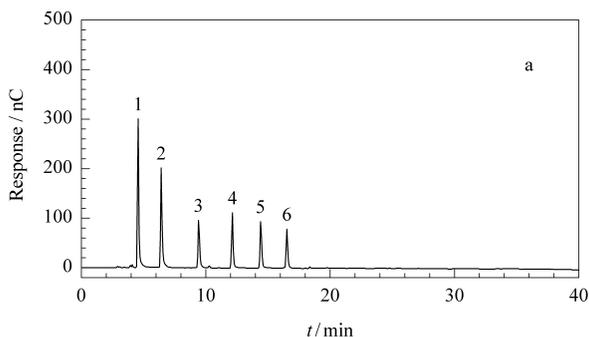


图 1 (a) 低聚木糖标准品和 (b) 实际样品的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of (a) XOS standard and (b) a XOS product

Peak identifications 1 xylobiose 2 xylotriose 3 xylo-tetraose 4 xylo-pentaose 5 xylo-hexaose

可实现高效、快速的分离。但基于色谱系统的清洗要求,为了保证充分淋洗出样品中的强保留组分,防止不同样品间的干扰和污染,延长分析柱的使用寿命,在实际测定时需要延长洗脱时间至 40 min。

2.3 重复性和准确度

在适宜的浓度范围内配制未知浓度的木二糖至

木六糖的标准样品混合液,连续进样 6 次,测定结果的相对标准偏差 (RSD)均在 0.68% ~ 1.67% 之间。

以玉米芯定向酶解制备得到的低聚木糖样品作为实验样本,平行取样 3 次,进行 3 个水平的加标回收实验,得到加标回收率在 84.29% ~ 118.19% 之间 (见表 3)。

表 3 低聚木糖样品中低聚木糖的加标回收率 (n = 3)

Table 3 Recoveries of xylo-oligosaccharides spiked in a xylo-oligosaccharile product (n = 3)

Xylo-oligosaccharide	Background/(mg/L)	Spiked/(mg/L)	Found/(mg/L)	Recovery/%	RSD/%
Xylobiose	2.37	0.79	3.17	101.83	0.89
	2.37	2.05	4.80	118.19	11.11
	2.37	3.96	6.87	113.69	9.12
Xylobiose	4.09	0.82	4.85	92.70	4.38
	4.09	2.08	6.10	97.05	11.13
	4.09	4.16	8.35	102.45	3.37
Xybtetraose	2.88	0.82	3.57	84.29	11.28
	2.88	2.07	4.86	95.56	14.87
	2.88	4.14	6.78	94.31	2.81
Xybpentaose	2.02	0.84	2.84	97.71	0.44
	2.02	2.10	4.05	96.80	1.84
	2.02	4.30	6.39	101.52	0.84
Xylohexaose	1.45	0.83	2.28	99.58	2.01
	1.45	2.08	3.48	97.56	2.94
	1.45	4.22	5.71	101.13	0.66

2.4 木七糖和木八糖的色谱定性检测

HPAEC对糖类的分离主要是基于样品和色谱填料之间的阴离子交换和疏水相互作用^[5]。本实验中,在 NaOAc溶液-NaOH 溶液二元线性梯度淋洗条件下,各低聚木糖组分的保留时间与其含有的羟基数目、碱性条件下的解离度和碳骨架结构等因素有关,最终表现为木糖至木六糖的聚合度 (N_{DP}) 与色谱保留时间 (t) 之间的线性关系,回归后得到二者之间的线性方程 $t = 2.578 N_{DP} + 1.9726$ ($r^2 = 0.9952$)。由该线性关系式可以推算出木七糖和木八糖的色谱保留时间分别为 20.02 min 和 22.60 min。由于目前木七糖和木八糖等高聚合度低聚木糖标准样品难以获取,因此无法对其进行定量分析。但根据预测的保留时间,可以实现对低聚木糖样品中木七糖和木八糖组分的定性分析。

3 结语

采用 CarboPac™ PA200 色谱柱建立了木二糖至木六糖的 HPAEC-PAD 定量测定方法,并推算出木七糖和木八糖的色谱保留时间。经重复性和加标回收等实验验证,该方法准确可靠,可实现对低聚木糖产品的高效、快速分离检测,并为其他类型的功能性低聚糖的定性和定量检测提供借鉴。

参考文献:

[1] Moure A, Gulbón P, Domínguez H, et al. *Process Biochem*,

2006, 41: 1913
 [2] Moura P, Cabanas S, Lourenco P, et al. *IWT-Food Sci Technol* 2008, 41(10): 1952
 [3] Wang J, Sun B G, Cao Y P, et al. *Carbohydr Polym* 2010, 82: 419
 [4] Teng C, Yan Q J, Jiang Z Q, et al. *Bioresour Technol* 2010, 101: 7679
 [5] Mou S F, Yu H, Cai Y Q. *Chinese Journal of Chromatography* (牟世芬, 于泓, 蔡亚岐. 色谱), 2009, 27(5): 667
 [6] Yu H, Mou S F. *Chemistry* (于泓, 牟世芬. 化学通报), 2007(7): 483
 [7] Corradini C, Bianchi F, Matteuzzi D, et al. *J Chromatogr A* 2004, 1054: 165
 [8] Ronkart S N, Blecker C S, Foumanoir H, et al. *Anal Chim Acta* 2007, 604: 81
 [9] Fukunizo T, Hayashi K, Tanoi M, et al. *Arch Biochem Biophys* 2008, 478: 187
 [10] Swennen K, Courtin C M, Van der Bruggen B, et al. *Carbohydr Polym* 2005, 62: 283
 [11] Xu Y, Jiang H, Yong Q, et al. *Food Science* (徐勇, 江华, 勇强, 等. 食品科学), 2001, 22(7): 15
 [12] Ding Y S, Mou S F. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (丁永胜, 牟世芬. 分析化学), 2005, 33(4): 557
 [13] Shan Y C, Zhang W B, Seidelmorgenstem A, et al. *Science in China Series B: Chemistry* (单亦初, 张维冰, Seidelmorgenstem A, 等. 中国科学 B 辑: 化学), 2006, 36(2): 130
 [14] Yu S L. *Methods and Application of High Performance Liquid Chromatography*. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press (于世林. 高效液相色谱方法及应用. 2版. 北京: 化学工业出版社), 2005: 195
 [15] Borromei C, Cavazza A, Merusi C, et al. *J Sep Sci* 2009, 32: 3635