

## 毛细管区带电泳法分离发酵液中的木糖和木糖醇

陈冠华<sup>1</sup>, 张利平<sup>2</sup>, 田益玲<sup>1</sup>, 王秀敏<sup>1</sup>

(1. 河北农业大学生命科学院, 河北 保定 071001; 2. 河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002)

**摘要** 建立了利用毛细管区带电泳分离发酵液中木糖和木糖醇的新方法。研究表明:采用硼砂缓冲溶液时,木糖和木糖醇的分离度随硼砂浓度的增高而加大,在室温下硼砂最高浓度为 130 mmol/L,分离度还与溶液的 pH 有关,在 pH 9.55 处分离度有最大值。缓冲液中十六烷基三甲基溴化铵的浓度为  $4 \times 10^{-6}$  mmol/L  $\sim 8 \times 10^{-4}$  mmol/L 时对分离度无显著影响,在优化的分离条件下,木糖和木糖醇可在 6 min 内基线分离。测定了发酵过程中样品各组分的含量和加标回收率,5 次测定木糖的相对标准偏差(RSD)为 1.42%  $\sim$  3.11%,回收率为 96.0%  $\sim$  108.0%。5 次测定木糖醇的 RSD 为 0.62%  $\sim$  1.32%,回收率为 94.0%  $\sim$  109.0%。

**关键词** 毛细管区带电泳;木糖;木糖醇;发酵液

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2001)06-0549-03

### 1 前言

木糖醇是一种重要的食品和医药工业原料。由于它的甜度与蔗糖相等,并且在进入血液后不需要胰岛素的作用就可以透过细胞膜而被细胞所利用,故作为糖尿病人的替代糖源是它的一个重要应用方面<sup>[1]</sup>。利用木糖作为原料,采用微生物发酵的工艺可以生产木糖醇。因此,准确而有效地分离测定木糖和木糖醇在科研与生产当中有着重要的意义。糖类分离一般采用液相色谱的方法<sup>[2,3]</sup>,采用毛细管电泳分离的方法也有一些报道<sup>[4-8]</sup>。木糖和木糖醇的分子结构中都含有 5 个碳原子,二者只差 1 个氢原子。由于它们是多羟基化合物,可以和硼酸盐形成络阴离子,并且在 195 nm 处有较强的紫外吸收,因而若以硼酸盐缓冲液作为运行缓冲液,利用毛细管区带电泳的方法可以将二者分离。络阴离子在正向电压条件下分离时间可能较长,在硼酸盐缓冲液中加入适量的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)对毛细管壁进行动态改性后,可以采用反向电压以较快的速度进行分离。据此原理,我们建立了以鼠李糖为内标、以毛细管区带电泳为分离方式测定木糖和木糖醇的新方法。该方法可使木糖和木糖醇在 6 min 内达到基线分离,已成功地用于发酵液中二者的分离与测定。

### 2 实验部分

#### 2.1 仪器与试剂

**仪器** BioFocus 3000 型毛细管电泳仪(BioRad Inc., USA);石英毛细管 50  $\mu$ m i.d.  $\times$  50 cm,有效

长度 45.4 cm(河北永年光导纤维厂)。

**试剂** 木糖、木糖醇和鼠李糖为生化试剂;硼砂、氢氧化钠、盐酸和 CTAB 为分析纯试剂;水为高纯水(电阻率为 150 k $\Omega$ ·m)。

#### 2.2 标准品和样品制备

**标准溶液制备** 将适量木糖和木糖醇纯品溶解于 pH 为 9.55、浓度为 130 mmol/L 的硼砂缓冲溶液中即可得到标准贮备液。再将贮备液用同样的缓冲液稀释到不同的浓度并加入适量的鼠李糖内标,制得标准系列溶液。

**样品溶液制备** 吸取适量发酵过程中的发酵液作为样品溶液,加入与标准系列相同量的鼠李糖内标,然后将温度高于室温、浓度高于 130 mmol/L 的硼砂溶液稀释到与标准溶液系列相同的体积,并使样品溶液中的硼砂浓度为 130 mmol/L。

#### 2.3 电泳条件

运行缓冲液为 CTAB  $5 \times 10^{-5}$  mmol/L、硼砂 130 mmol/L 的水溶液(pH 9.55)。分离电压 -12 kV;压力进样 68.9 kPa·s;195 nm 检测;分离柱的柱温 25  $^{\circ}$ C。每次进样前按水、6 mol/L 盐酸、水、1 mol/L 氢氧化钠、水的顺序清洗毛细管各 1 min,然后再用运行缓冲液冲洗 2 min。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 硼砂浓度对分离度的影响

用 CTAB 浓度为  $5.0 \times 10^{-5}$  mmol/L, pH 为 9.55 硼砂浓度不同的缓冲液分离标准溶液,可以看出木糖和木糖醇的分离度  $R$  随着硼砂浓度的变化而变化(见图 1)。从图 1 中我们可以看到,分离度

随硼砂浓度的升高而逐渐变大,当硼砂浓度超过 130 mmol/L 时,在室温下溶液已出现过饱和现象,故取硼砂浓度为 130 mmol/L。

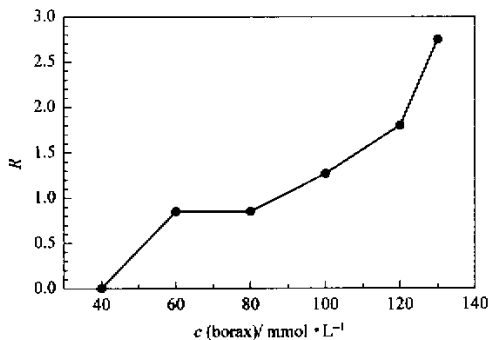


图 1 硼砂浓度对分离度的影响

Fig.1 Effect of borax concentration on resolution

### 3.2 pH 对分离度的影响

用硼砂浓度为 130 mmol/L,CTAB 浓度为  $5 \times 10^{-5}$  mmol/L,pH 不同的缓冲液分离标准溶液,可看出木糖和木糖醇的分离度  $R$  随着 pH 值的变化而变化(图 2)。从图 2 中可知, $R$  在 pH 9.55 处有一个最大值,故缓冲液的 pH 取 9.55。

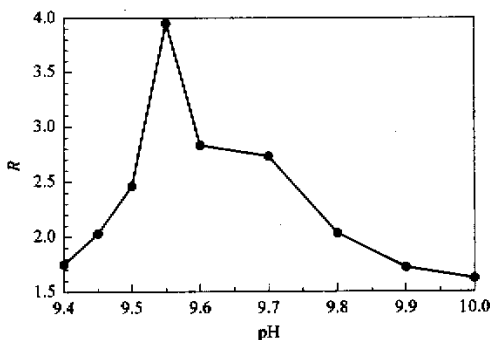


图 2 pH 对分离度的影响

Fig.2 Effect of pH on resolution

### 3.3 CTAB 浓度对分离度的影响

用硼砂浓度为 100 mmol/L,pH 为 9.50,CTAB 浓度不同的缓冲液分离标准溶液,结果表明:CTAB 浓度为  $4 \times 10^{-6}$  mmol/L~ $8 \times 10^{-4}$  mmol/L 时对分离度无显著影响,木糖和木糖醇都可达到基线分离;浓度再升高,两峰会有部分重叠。我们选择 CTAB 浓度为  $5 \times 10^{-5}$  mmol/L。

### 3.4 样品测定结果

以“2.3”节所述电泳条件分离标准品和样品溶液,结果如图 3 所示。从图 3 中可以看出,木糖和木糖醇在 6 min 内可达基线分离。与 Soga 等<sup>[8]</sup>所报道的方法相比,本方法在分析速度方面具有明显优势,特别适合于只需分离木糖和木糖醇的样品。通

过测定标准系列溶液,可得工作曲线为: $A_1' = 3.19 + 0.15C_1$ , $r_1 = 0.9991$ ; $A_2' = 8.16 + 0.36C_2$ , $r_2 = 0.9999$ ;其中  $A'$  的物理意义为被测组分的相对峰面积(实际峰面积/迁移时间)与内标鼠李糖的相对峰面积的比值, $C$ (g/L)为被测组分的质量浓度,下标 1 和 2 分别代表木糖和木糖醇。

对发酵过程中不同时刻所取实际样品进行测定,并进行加标回收率试验,其中每个时刻取 5 个平行样品测定,结果见表 1。从表 1 所示数据可看出,方法的精密度较好,被测组分回收完全。木糖和木糖醇的变化情况体现了随着发酵时间的增加,木糖的质量浓度逐渐下降,木糖醇的质量浓度逐渐上升的实际规律。

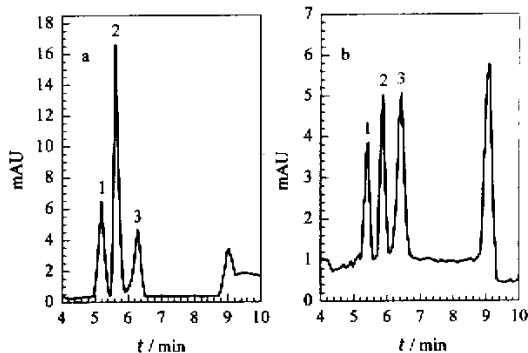


图 3 标准品(a)和样品(b)的电泳图

Fig.3 Electropherograms of the standard(a) and the sample(b)  
1. xylose; 2. xylitol; 3. rhamnose( internal standard).

表 1 样品测定结果和回收率(  $n = 5$  )

Table 1 Results of sample determination and recovery(  $n = 5$  )

Sample No.	Xylose			Xylitol		
	mass conc. (g/L)	RSD (%)	recovery (%)	mass conc. (g/L)	RSD (%)	recovery (%)
1	56.5	1.42	108.0	9.25	0.98	109.0
2	48.0	1.80	97.3	30.8	0.75	101.0
3	17.8	3.11	96.0	38.2	1.32	94.0
4	3.75	2.18	102.0	50.8	0.62	99.4

### 参考文献:

[1] LIU Zhi-nie. Food nutriology. Beijing :Chinese Light Industry Press ,1994. 65  
刘志泉. 食品营养学. 北京:中国轻工业出版社, 1994.65

[2] LI Jing-ci. Journal of Hebei University( Natural Science Edition ),1997 ,17(4) :87-92  
李敬慈. 河北大学学报(自然科学版), 1997 ,17(4): 87-92

[3] DU Yu-min ,WANG Xiao-yan ,LIU Wei-li , et al. Chi-

- nese Journal of Chromatography, 1998, 16(2):172-175
- 杜予民, 王晓燕, 柳卫莉, 等. 色谱, 1998, 16(2): 172-175
- [4] LUO Guo-an, WANG Yi-ming, WANG Ru-ji, et al. Chinese Journal of Chromatography, 1998, 16(1):39-43  
罗国安, 王义明, 王如骥, 等. 色谱, 1998, 16(1):39-43
- [5] Ye J N, Baldwin R P. J Chromatogr, 1994, 687:141-146
- [6] Jin L J, Li S F Y. Electrophoresis, 1999, 20(17):3450-3454
- [7] Corradini C, Cavazza A, Canali G, et al. Ital J Food Sci, 1998, 10(3):195-206
- [8] Soga T, Heiger D N. Anal Biochem, 1998, 261:73-78

## Separation of Xylose and Xylitol in Fermentation Liquid by Capillary Zone Electrophoresis

CHEN Guan-hua<sup>1</sup>, ZHANG Li-ping<sup>2</sup>, TIAN Yi-ling<sup>1</sup>, WANG Xiu-min<sup>1</sup>  
(1. College of Life Science, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China;  
2. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

**Abstract:** Xylitol may be produced with microbial fermentation technology when xylose is used as the raw material. It is important in scientific research and production fields concerned with xylose and xylitol to develop the method of separation and detection. The anionic complexes with strong UV absorption at 195 nm will form by dissolving xylose and xylitol in borax solution. They may be separated with borax buffer by use of capillary zone electrophoresis. It was shown that the resolution between xylose and xylitol gradually increased with the increase of borax concentration, but its maximum concentration was 130 mmol/L at room temperature. The resolution depended on the pH of running buffer with a maximum at pH 9.55. The resolution was independent of cetyltrimethylammonium bromide when its concentration was between  $4 \times 10^{-6}$  mmol/L- $8 \times 10^{-4}$  mmol/L. So the optimum conditions were as follows: borax concentration of 130 mmol/L, pH 9.55 and cetyltrimethylammonium bromide concentration of  $5 \times 10^{-5}$  mmol/L in running buffer; separating voltage of -12 kV; column temperature of 25 °C. Xylose and xylitol could be separated on base line in 6 min under these conditions. Samples from fermentation process and the recoveries of spiked samples were determined. The relative standard deviations of the results were between 1.42%-3.11% for xylose, and 0.62%-1.32% for xylitol. The recoveries were between 96.0%-108.0% for xylose and 94.0%-109.0% for xylitol.

**Key words:** capillary zone electrophoresis; xylose; xylitol; fermentation liquid

### 欢迎购买《分析化学手册第五分册气相色谱分析》

应化学工业出版社邀请,由中国科学院大连化学物理研究所国家色谱研究分析中心李浩春教授主编,许国旺教授、叶芬副教授、修振佳副教授、洪群发副教授及罗春荣、杨黎等同志参加撰写的《分析化学手册第五分册气相色谱分析》(第2版)已于1999年3月出版。全书共200万字,内容系统、全面、新颖、实用,既是色谱工作者必需的工具书,也是有关人士学习、提高色谱技能的必备参考书。全国各地新华书店有售。需要者也可与化学工业出版社(电话 010-64918013)或作者许国旺教授联系(电话 0411-3693403),书价128元,包装费、邮费17元,共计145元。