

高效阴离子交换色谱-脉冲安培法检测 小鼠尿液中的甘露醇、单糖和乳果糖

周利¹, 刘菊², 郑婷², 丁卉², 施超欧^{2*}

(1. 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237 ;

2. 华东理工大学分析测试中心, 上海 200237)

摘要 :采用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法(HPAEC-PAD)建立了小鼠尿液中甘露醇、单糖(包括半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖)和乳果糖的分析方法。样品经离心沉淀除去蛋白并过分子膜,以CarboPac™ PA1阴离子交换柱为分离柱,采用NaOH梯度淋洗,脉冲安培四电位检测。结果表明,甘露醇、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、果糖和乳果糖在0.1~5.0 mg/L内线性良好,线性相关系数 r^2 为0.988~0.999,样品加标回收率为95.5%~104.2%,检出限为0.0013~0.0048 mg/L。此法准确、快速、简便,能同时对6种糖类化合物进行分析,可以跟踪检测整个糖类代谢过程中甘露醇、单糖和乳果糖之间的代谢关系。

关键词 :高效阴离子交换色谱 ;脉冲安培检测法 ;乳果糖 ;甘露醇 ;单糖

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)10-0984-05

Determination of mannitol, monosaccharides and lactulose in mouse urine by high performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection

ZHOU Li¹, LIU Ju², ZHENG Ting², DING Hui², SHI Chaou^{2*}

(1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Analysis and Research Center, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract : A method of high performance anion exchange chromatography (HPAEC) coupled with pulsed amperometric detection (PAD) was established for the determination of mannitol, monosaccharides (galactose, glucose, mannose and fructose) and lactulose in mouse urine. The samples were first centrifuged, and then filtered through molecular film to eliminate the proteins. The analysis was performed on a CarboPac™ PA1 column using gradient elution with water and 250 mmol/L sodium hydroxide as the mobile phase. All of the six carbohydrates had good linear relationships ($0.988 \leq r^2 \leq 0.999$) in the range of 0.1 - 5.0 mg/L. The recoveries were between 95.5% and 104.2% and the limits of detection were between 0.0013 and 0.0048 mg/L. The method is accurate, fast and simple. It can be used to analyse six carbohydrates simultaneously and track the metabolic relationships among mannitol, monosaccharides and lactulose during the metabolism of the carbohydrates.

Key words : high performance anion exchange chromatography ; pulsed amperometric detection ; lactulose ; mannitol ; monosaccharide

乳果糖是双糖,甘露醇是糖醇,在体内不被人体代谢,主要经尿液以原型排出体外。医学上用乳果

糖排泄率/甘露醇排泄率比值作为评估由于肠炎、术后、消化不良等疾病引起的肠黏膜通透性的指

* 通讯联系人 施超欧,高级工程师,主要研究方向为离子色谱及液相色谱的应用研究. Tel : (021)64252812, E-mail : hplc@ecust.edu.cn.

收稿日期 2010-06-22

标^[1,2],是一种无创的诊断肠黏膜屏障功能的方法,因为其简单、安全、可靠,所以在临床上广为应用。目前报道的有关甘露醇和乳果糖的检测方法,最为常用的是高效液相色谱法(HPLC),由于紫外吸收弱,检测这两种糖类只能用示差折光^[3,4]和蒸发光散射^[5,6]等检测器,灵敏度和重复性比较差;另外还有气相色谱法^[7,8]、液相色谱-质谱(LC-MS)法^[9]、LC-MS/MS法^[10]等,近年来又有了高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法(HPAEC-PAD)^[11,12],都各具特色。目前国内尚未见同时测定甘露醇、单糖(半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖)和乳果糖这6种糖含量的方法报道。

本文采用 ICS-3000 离子色谱仪,以 CarboPac™ PA1 阴离子交换柱为分离柱,强碱性 NaOH 溶液为淋洗液,同时检测甘露醇、单糖(半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖)和乳果糖。该方法样品处理简单方便,结果准确可靠,不仅能作为肠黏膜通透性指标的研究,而且可以跟踪整个糖类代谢过程中甘露醇、单糖和乳果糖之间可能的代谢关系。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国戴安公司 ICS-3000 双系统离子色谱仪(包括 SP 单泵和 DP 四元梯度泵,DC 控制单元,EG 淋洗液发生单元,AS 自动进样器)。Chromleon 6.8 色谱工作站。MILLI-Q Advantage A10 超纯水机(美国密理博公司),TG16-WS 离心机(湖南赛特湘仪离心机有限公司),Lab Dancer 试管振荡器(德国 IKA 公司),BRANSON 2510 超声波清洗器(法国必能信公司),BRAND 移液枪(0.5~10 μL,10~100 μL,100~1 000 μL)(德国普兰德公司)。

半乳糖、葡萄糖、甘露糖、果糖(分析纯,上海试剂二厂);甘露醇、乳果糖(分析纯,北京希凯创新科技有限公司);NaOH(优级纯,美国 Fisher 公司);叠氮化钠(分析纯,北京化工试剂公司);超纯水(18.2 MΩ·cm(25℃),自制)。

1.2 样品制备

1.2.1 样品的收集

将实验用小鼠分为3组:一是高脂饮食组,12只小鼠(A1~A12);二是高脂饮食组+益生菌,13只小鼠(B1~B13);三是对照组,3只小鼠(分别标记为D-A,D-B1,D-B2)。取2 mL 乳果糖与甘露醇的混合溶液(含乳果糖100 mg、甘露醇50 mg),用灌胃器插入小鼠食管上端缓慢灌注。收集6 h 尿液,记总量,将5 mL 尿样放入离心管中置于-80℃

保存,待测。

1.2.2 样品的预处理

将冰冻贮存的小鼠尿液样品解冻、摇匀,离心(10 000 r/min)10 min,以去除尿液中的沉淀物。取上清液加入5%醋酸水溶液2~3滴,加热煮沸3~5 min,冷却后再离心(10 000 r/min)10 min,以去除尿液中的蛋白。先用0.45 μm 膜过滤,再用带离心管的滤膜(1 000 Da)过滤。然后用40 mg/L 叠氮化钠水溶液将样品稀释100倍,待测。

1.3 色谱条件

色谱柱:Dionex CarboPac™ PA1 分析柱(4 mm×250 mm),CarboPac™ PA1 保护柱(4 mm×50 mm);检测器:脉冲安培检测器,金工作电极,Ag/AgCl 参比电极,四电位波形;流速:1.0 mL/min;检测温度30℃;进样体积25 μL;淋洗液梯度程序见表1。

表1 淋洗液的梯度程序

Table 1 Gradient of eluent

Time/min	$\varphi(\text{H}_2\text{O})/\%$	$\varphi(250 \text{ mmol/L NaOH})/\%$
0.00	96.4	3.6
5.00	96.4	3.6
20.00	85.0	15.0
20.05	70.0	30.0
25.00	40.0	60.0
25.05	96.4	3.6
37.00	96.4	3.6

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择

本文比较了可用于单糖分析的戴安 CarboPac™ 系列的 PA1、PA10、PA20 3 种色谱柱的分离效果,其中 PA1 和 PA10 均可用于6种糖及糖醇的分离,相比之下 PA1 效果更佳,因此,最终选择 CarboPac™ PA1 作为分离柱。

2.2 NaOH 淋洗梯度程序的选择

虽然采用等度洗脱方式,PA1 柱也可以分析甘露醇和乳果糖,但无法同时分离其他4种单糖,必须采用梯度洗脱的方式。通过不断调整梯度程序,最终选择表1所列的梯度程序,在此条件下能同时分离6种单糖和糖醇。

2.3 脉冲安培检测器电位波形的选择

一般采用三电位和四电位的方式检测糖,另外戴安公司仪器说明资料中还有适用于 PA1 柱的标准电位(不同电位的波形见表2)。通过对这3种不同电位检测方式的比较(见图1),结果表明四电位得到的谱图基线更平稳,因此采用四电位检测方式。

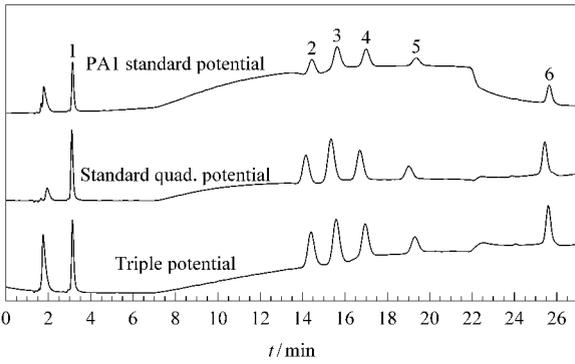


图 1 采用 PA1 柱在 3 种检测电位下 6 种糖标样的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of 6 mixed standard carbohydrates in three different waveforms

Peak identifications : 1. mannitol ; 2. galactose ; 3. glucose ; 4. mannose ; 5. fructose ; 6. lactulose.

表 2 不同检测电位的波形

Table 2 Different waveforms of potential

Standard quad. potential		Triple potential		PA1 standard potential	
Time/s	Voltage/V	Time/s	Voltage/V	Time/s	Voltage/V
0.00	0.1	0.00	0.05	0.00	0.1
0.20	0.1	0.20	0.05	0.10	0.1
0.40	0.1	0.40	0.05	0.20	0.1
0.41	-2	0.41	0.75	0.21	-2
0.42	-2	0.60	0.75	0.22	-2
0.43	0.6	0.61	-0.15	0.23	0.6
0.44	-0.1	1.00	-0.15	0.24	-0.1
0.50	-0.1			0.27	-0.1

2.4 线性关系和检出限

分别称取半乳糖、葡萄糖、甘露糖、果糖、乳果糖和甘露醇 50.0 mg 于 100 mL 容量瓶中,配制成 500 mg/L 的标准溶液,然后逐级稀释配制成各糖含量为 0.100、0.500、1.00、2.00 和 5.00 mg/L 的系列标准溶液,按 1.3 节条件进行测定。以各糖峰面积 ($y, \mu S \cdot \min$) 对其质量浓度 ($x, \text{mg/L}$) 进行线性回归,根据信噪比 (S/N) 为 3 计算检出限 (LOD), 结果见表 3。

2.5 仪器、样品的稳定性及加标回收率

选择 1.00 mg/L 标准溶液,连续进样 5 次,考察仪器稳定性。选择某一样品每隔 2 h 进样一次,进样 5 次考察样品中各糖的稳定性。标样及样品峰

表 3 6 种糖类化合物的线性关系和检出限

Table 3 Linearity and detection limits (LODs) of 6 carbohydrates

Compound	Linear equation	Linear range/ (mg/L)	r^2	LOD/ (mg/L)
Mannitol	$y = 2.3196x + 0.5810$	0.1 - 5.0	0.9877	0.0030
Galactose	$y = 3.2283x + 0.1292$	0.1 - 5.0	0.9998	0.0020
Glucose	$y = 4.7379x - 0.1843$	0.1 - 5.0	0.9997	0.0019
Mannose	$y = 3.3533x + 0.4742$	0.1 - 5.0	0.9993	0.0013
Fructose	$y = 1.8893x - 0.0262$	0.1 - 5.0	0.9998	0.0048
Lactulose	$y = 2.6447x - 0.0700$	0.1 - 5.0	0.9999	0.0031

y : peak area; x : mass concentration, mg/L.

面积的相对标准偏差 (RSD) 见表 4。在样品中加入 1.00 mg/L 的标准溶液,其加标回收率为 95.5% ~ 104.2% (见表 4)。

2.6 样品测定

按照实验预计, A 组小鼠尿液中的乳果糖和甘露醇含量应最高;因益生菌对肠道黏膜屏障有保护作用, B 组小鼠尿液中这两种物质的含量其次;对照组含量应最低。实验结果基本符合以上规律: A 组乳果糖和甘露醇两者的含量加起来最高,范围为 3.726 ~ 12.477 mg/L; B 组乳果糖和甘露醇含量之和为第二位,范围为 1.078 ~ 3.562 mg/L; 对照组乳果糖和甘露醇含量之和最低,为 0.046 ~ 1.070 mg/L。样品的分离图谱见图 2, 实际样品中 6 种糖的含量测定结果见表 5。

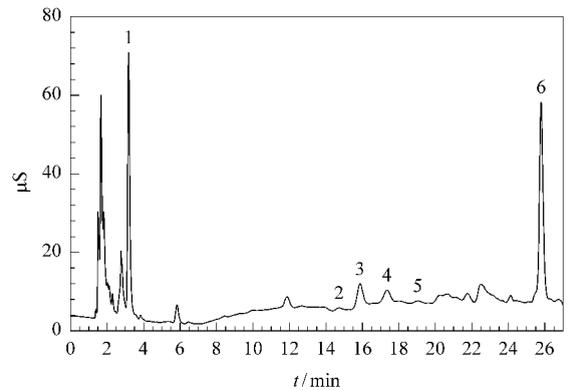


图 2 实际样品的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of a real sample

Peak identifications : 1. mannitol ; 2. galactose ; 3. glucose ; 4. mannose ; 5. fructose ; 6. lactulose.

表 4 仪器、样品的稳定性及加标回收率

Table 4 Relative standard deviations (RSDs) of peak areas of standards and samples, recoveries of spiked standards

Compound	RSD of standard/% (n = 5)	RSD of sample/% (n = 5)	Background/ (mg/L)	Added/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Recovery/% (n = 3)
Mannitol	0.83	0.94	1.63	1.00	2.53	96.2
Galactose	0.36	0.42	0.04	1.00	1.00	95.9
Glucose	0.31	0.90	1.08	1.00	1.99	95.7
Mannose	0.87	0.83	0.34	1.00	1.28	95.5
Fructose	0.54	0.26	0.09	1.00	1.14	104.2
Lactulose	0.76	0.53	1.28	1.00	2.18	95.6

表 5 实际样品中 6 种糖的含量测定结果
Table 5 Contents of 6 carbohydrates in real samples

Sample code	Mannitol/ (mg/L)	Galactose/ (mg/L)	Glucose/ (mg/L)	Mannose/ (mg/L)	Fructose/ (mg/L)	Lactulose/ (mg/L)	Lactulose + Mannitol/ (mg/L)	Lactulose/ Mannitol	Group of sample *
D-A	0.085	-	-	-	-	0.014	0.099	0.164	D
A1	2.677	0.007	0.119	0.019	0.009	1.763	4.440	0.659	A
A2	2.720	0.047	1.408	0.560	1.170	1.355	4.074	0.498	A
A3	2.584	0.047	0.757	0.421	0.511	1.142	3.726	0.442	A
A4	3.308	0.031	0.353	0.396	-	1.583	4.891	0.479	A
A5	2.632	0.081	0.740	0.603	0.327	1.427	4.059	0.542	A
A6	3.082	0.053	0.822	0.403	0.222	1.798	4.880	0.584	A
A7	2.722	0.068	1.283	0.420	1.105	1.413	4.135	0.519	A
A8	2.907	0.080	1.472	0.768	0.056	1.839	4.746	0.633	A
A9	4.897	0.276	0.296	1.091	0.127	7.581	12.48	1.548	A
A10	3.080	0.059	0.413	0.304	0.074	4.772	7.851	1.550	A
A11	2.590	-	-	-	-	3.801	6.391	1.467	A
A12	2.698	0.016	0.096	0.166	0.053	3.398	6.096	1.260	A
B1	0.055	0.006	0.062	-	0.030	1.561	1.616	28.17	B
B2	0.811	0.048	0.048	0.027	-	2.018	2.829	2.488	B
B3	0.081	0.013	0.010	-	-	3.480	3.562	42.81	B
B4	0.957	0.028	0.034	0.086	-	1.522	2.479	1.590	B
D-B1	0.006	-	0.010	0.017	-	1.064	1.070	174.3	D
B5	0.279	-	0.027	0.051	-	2.502	2.782	8.960	B
D-B2	0.016	-	0.015	-	0.072	0.030	0.046	1.841	D
B6	0.659	0.030	0.041	0.072	0.147	1.484	2.143	2.250	B
B7	0.797	0.020	0.116	0.104	-	2.141	2.937	2.687	B
B8	0.058	0.005	0.014	-	-	1.020	1.078	17.59	B
B9	0.106	0.018	0.012	0.041	-	2.297	2.403	21.61	B
B10	1.002	0.029	0.076	0.090	-	1.580	2.582	1.577	B
B11	0.325	0.017	0.012	0.058	-	1.405	1.730	4.327	B
B12	1.286	-	0.355	0.229	-	1.265	2.551	0.984	B
B13	0.145	0.012	0.011	-	-	1.915	2.059	13.22	B

* A : high-fat diet group ; B : high-fat and probiotics diet group ; D : normal group. - : not detected.

乳果糖排泄率/甘露醇排泄率比值可以作为肠黏膜通透性指标。由表 5 可以看出 ,B 组的该数据明显比 A 组高 ,因此我们可以得出在肠道中加入益生菌有利于保护肠道、肠道通透率比较高的结论。

此外 ,从表 5 的 4 个单糖的含量与甘露醇和乳果糖之间的含量关系看 ,甘露醇与甘露糖似有一定的关联 ,A 组甘露醇的含量高 ,B 组甘露醇的含量低 ,对应的甘露糖也是 A 组的含量高 ,B 组的含量低。而甘露糖不应该由人体本身合成 ,推测其来自体内糖的代谢 ,来自甘露醇的氧化 ,而这与理论上甘露醇不被代谢有矛盾。果糖在 A 组和 B 组的差别比较明显 ,显示了益生菌的作用 ,初步判断加入益生菌后产生的果糖整体少多了。葡萄糖作为体内代谢必然存在的组分 ,虽然从理论上与乳果糖/甘露糖之间的关联性不大 ,但从实际的结果看 ,B 组含量比 A 组要低。所以益生菌的加入不仅仅提高乳果糖排泄率/甘露醇排泄率比值 ,也可能跟一些单糖的含量变化有关。

当然 ,单单凭这些结果 ,还无法对他们之间的关

系作出结论 ,但是测定甘露醇与乳果糖以及代谢相关的一些单糖 ,为研究乳果糖排泄率/甘露醇排泄率比值的规律以及可能存在的糖代谢关系提供了可靠的实验数据。

3 结论

采用 HPAEC-PAD 检测 ,优化了 NaOH 梯度淋洗程序、采用四电位和 CarboPac™ PA1 分离柱对小鼠尿液中甘露醇、单糖和乳果糖进行了测定 ,方法灵敏度高 ,稳定性好。该方法不仅可以很好地分离甘露醇和乳果糖 ,对其进行准确的定性定量分析 ;同时也能分离半乳糖、葡萄糖、甘露糖和果糖 ,为研究甘露醇和乳果糖代谢过程提供了可靠的检测方法。

参考文献 :

- [1] Sun M , Liu Y W , Liu W , et al. Chinese Journal of Surgery (孙梅 ,刘跃武 ,刘卫 ,等. 中华外科杂志) , 1999 , 37(5) : 298
- [2] Qin H M , Wu C M , Li H T , et al. Central China Medical Journal (覃慧敏 ,吴春明 ,李洪涛 ,等. 华中医杂志) ,

- 2008, 32(2):113
- [3] Pan F, Wang Y J, Sun W, et al. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae (潘峰, 王一健, 孙玮, 等. 第三军医大学学报), 1998, 20(6):550
- [4] Zhao R B, Liu M J, Ge W, et al. Food Science (赵仁邦, 刘孟军, 葛微, 等. 食品科学), 2004, 25(8):138
- [5] Liu Z L, Chao Z M, Li L F, et al. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (刘振丽, 巢志茂, 李林福, 等. 中国实验方剂学杂志), 2008, 14(5):6
- [6] Chen D, Jiang C Y, Ma C. Infection Inflammation Repair (陈丹, 姜春燕, 马辰. 感染、炎症、修复), 2007, 8(2):79
- [7] Liu X Y, Xie Y. Analysis and Testing Technology and Instruments (刘晓宇, 谢勇. 分析测试技术与仪器), 2001, 7(2):91
- [8] Farhadi A, Keshavarzian A, Fields J Z, et al. J Chromatogr B, 2006, 836(1):63
- [9] Liu H X, Chen X L, Cao S X, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (刘红霞, 陈晓岚, 曹书霞, 等. 分析实验室), 2003, 22(Suppl):40
- [10] Hu Q, Xu H B, Li S J, et al. China Journal of Modern Medicine (胡强, 徐红兵, 李水军, 等. 中国现代医学杂志), 2008, 18(13):1810
- [11] Pan Y Y, Liang L N, Cai Y Q, et al. Chinese Journal of Chromatography (潘媛媛, 梁立娜, 蔡亚岐, 等. 色谱), 2008, 26(5):626
- [12] Hou Y Z, Yuan X M, Jiang M W, et al. Food and Fermentation Industries (侯玉柱, 元晓梅, 蒋明蔚, 等. 食品与发酵工业), 2009, 35(2):134