

左利民, 徐士婕, 赵婷, 等. 高效液相色谱联用高分辨质谱和电喷雾检测器定性和定量检测水苏糖提取物中寡糖成分[J]. 环境化学, 2023, 42(3): 1053-1056.

ZUO Limin, XU Shijie, ZHAO Ting, et al. Qualitative and quantitative analysis of oligosaccharides in stachyose extract by high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry and charged aerosol detector[J]. Environmental Chemistry, 2023, 42(3): 1053-1056.

高效液相色谱联用高分辨质谱和电喷雾检测器定性和定量检测水苏糖提取物中寡糖成分*

左利民¹ 徐士婕¹ 赵 婷¹ 刘伊彤¹ 姜艺菲¹
金 燕³ 刘彦飞^{2**} 山广志^{1**}

(1. 中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京, 100050; 2. 中国医学科学院药物研究所, 北京, 100050;
3. 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 上海, 201206)

摘 要 本文建立了高效液相色谱联用电喷雾检测器(HPLC-CAD)检测水苏糖中寡糖成分的方法. 利用高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱高分辨质谱(HPLC-LTQ/Orbitrap-MS)鉴定了水苏糖中包括蔗糖、棉子糖、甘露三糖和毛蕊花糖等多种寡糖成分. 方法采用 XBridge BEH Amide 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm), 乙腈-水(70:30)为流动相进行测定. 结果表明, 蔗糖、棉子糖、甘露三糖质量浓度与峰面积分别在 2.763—110.5 μg·mL⁻¹、9.906—396.2 μg·mL⁻¹ 和 12.24—489.5 μg·mL⁻¹ 范围内呈现良好线性关系($r > 0.999$), 平均回收率($n=9$)为 100.1%—103.4%, RSD 为 1.09%—2.49%. 该方法灵敏度高, 准确性好, 操作简便, 可用作水苏糖提取物质量控制的有效方法.

关键词 高效液相色谱, 电喷雾检测器, 水苏糖, 高分辨质谱, 寡糖, 质量控制.

Qualitative and quantitative analysis of oligosaccharides in stachyose extract by high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry and charged aerosol detector

ZUO Limin¹ XU Shijie¹ ZHAO Ting¹ LIU Yitong¹ JIANG Yifei¹
JIN Yan³ LIU Yanfei^{2**} SHAN Guangzhi^{1**}

(1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, 100050, China; 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, 100050, China; 3. Thermo Fisher Scientific (China) Co., Ltd, Shanghai, 201206, China)

Abstract A method for the determination of oligosaccharides in stachyose by high performance liquid chromatography with charged aerosol detector (HPLC-CAD) was established. High performance liquid chromatography linear ion trap/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry (HPLC-LTQ/Orbitrap MS) was used to identify a variety of oligosaccharides in stachyose, including sucrose, raffinose, mannotriose and verbascose. The method Used XBridge BEH amide chromatographic column (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm), acetonitrile and water (70:30) as the mobile phase for quantitative determination. The results showed that sucrose, raffinose and mannose have a good linear relationship ($r > 0.999$) within 2.763—110.5 μg·mL⁻¹, 9.906—396.2 μg·mL⁻¹ and 12.24—489.5 μg·mL⁻¹. The average recoveries ($n=9$) were 100.1%—103.4%. The RSD

* 北京市自然科学基金(7214285)资助.

** 通信联系人 Corresponding author, Tel: 010-67011961, E-mail: catalpol@imm.ac.cn; shanguanzghi@imb.pumc.edu.cn

were 1.09%—2.49%. The method has high sensitivity, good accuracy and simple. It can be used as an effective method for the quality control of stachyose extract.

Keywords high-performance liquid chromatography, charged aerosol detector, stachyose, high resolution mass spectrometry, oligosaccharides, control of drug quality.

水苏糖(stachyose)是天然存在的四糖,结构由一分子棉子糖中的半乳糖基以 α -1,6 糖苷键与另一分子半乳糖相连接构成,是唇形科水苏属植物中天然存在的能显著促进人体肠道有益菌群增殖的功能性低聚糖,被誉为“天然超强双歧因子”^[1-2],被美国 FAD 认定为 GRAS(一般安全无毒食品)的低聚糖产品.目前文献主要针对水苏糖含量测定进行方法研究,主要有比色法^[3]、离子色谱联用脉冲安培检测器法^[4]、高效液相色谱法^[5-7]等,但鲜有关注水苏糖提取物中其他寡糖成分的定性和定量研究报道.

电喷雾检测器(charged aerosol detector, CAD)是近年来在药物分析领域运用较多的通用型检测器,已被成功应用于寡糖类化学物的分析检测^[8].本文采用高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱高分辨质谱(HPLC-LTQ/Orbitrap-MS)鉴定了水苏糖中多种寡糖成分,建立了 HPLC-CAD 方法,对水苏糖提取物中蔗糖、棉子糖、甘露三糖、毛蕊花糖以及两种未知组分开展了定量方法研究,对加强水苏糖提取过程中的质量控制、保证水苏糖相关产品安全性及有效性提供研究手段和方法依据.

1 实验部分(Experimental section)

1.1 仪器、试剂与材料

Ultimate 3000 高效液相色谱仪, Corona Ultra RS 电喷雾检测器, LTQ Orbitrap XL 高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司); XP205 电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司), IQ7000 超纯水机(美国 Millipore 公司), 超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); 色谱柱: XBridge BEH Amide(4.6mm×250mm, 5 μ m, 美国 Waters 公司).

乙腈(色谱纯, 瑞典 OCEANPAK 公司), 蔗糖对照品(纯度 100%, 中国食品药品检定研究院)、水苏糖(纯度 90.5%, 中国食品药品检定研究院)、棉子糖(纯度 98%, 百灵威公司)及甘露三糖(纯度 98%, 北京中科华检生物公司); 实验用水均为 Milli-Q 超纯水. 水苏糖样品 3 批(批号: 201810131、201810132、201810133), 均由中国医学科学院药物研究所提供.

1.2 分析条件

色谱条件: 流动相乙腈-水(70:30, V/V), 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 35℃; 进样量 10 μ L; 电喷雾检测器氮气压力为 0.24 MPa, 采集频率 10 Hz, 蒸发器温度 35℃, 滤波 1 s.

质谱条件: 电喷雾离子(ESI)源, 正离子模式, 高分辨数据采集, 毛细管温度 350℃, 离子源电压 4.5 kV, 毛细管电压 35 V, Tube lens 110 V, 鞘气 30 arb, 辅助气 10 arb, 二级离子采用碰撞诱导解离(CID)数据采集, CID 归一化能量 35%.

1.3 溶液配制

对照品溶液: 精密称取蔗糖、棉子糖及甘露三糖对照品各适量, 分别置 10 mL 量瓶中, 加水 2mL 超声溶解后用乙腈稀释至刻度, 摇匀. 制备每 1 mL 约含蔗糖 0.04 mg、棉子糖 0.15 mg、甘露三糖 0.2 mg 的混合溶液.

供试品溶液: 水苏糖样品适量精密称定, 加水适量超声溶解, 放冷, 用乙腈定量稀释制成每 1mL 约含 20 mg 溶液.

对照溶液 精密量取供试品溶液适量, 用流动相定量稀释制成每 1mL 约含 200 μ g 的溶液.

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 色谱柱及流动相的选择

结合水苏糖及其他成分的结构性质, 选用氨基柱进行方法建立及分析. 通过比较月旭公司的 Xtimate XB NH₂ 柱、Waters 公司的 Spherisorb NH₂ 柱及 XBridge BEH Amide 柱对水苏糖提取物的分离效果, 最终选用酰胺基色谱柱(XBridge BEH Amide, 4.6 mm×250 mm, 5 μ m). 在初步建立的水苏糖分离方法中, 对流动相组成及比例进行考察, 分别尝试乙腈:水=70:30、65:35、75:25 等比例, 结果显示, 在乙腈:水=70:30 条件下, 水苏糖及其他成分分离度更佳.

2.2 供试品浓度考察

水苏糖 LOQ 为 0.1054 μ g·mL⁻¹, 供试品浓度 20 mg·mL⁻¹ 时, 相当于水苏糖含量 0.0005% 的杂质可被准确定量.

2.3 杂质的分离与鉴定

本研究中采用建立的 HPLC-CAD 法对水苏糖提取物中的微量成分进行分析(图 1). 根据水苏糖提取物不同组分含量情况(相对水苏糖峰面积>0.3%), 采用保留时间、高分辨质量数、二级碎片信息、质量数偏差值等信息, 结合对照品色谱定位及相关文献报道对色谱峰对应的化合物进行鉴定, 鉴定结果见表 1.

2.4 定量方法的选择

考虑定量方法准确性及对对照品获取情况, 蔗糖、棉子糖及甘露三糖采用外标法定量. 毛蕊花糖通过计算确定其校正因子为 1.23. 根据中国药典分析检测技术指南要求, 当校正因子超出 0.9—1.1 范围时, 可采用加校正因子的主成分自身对照法进行定量. 杂质 4、6 与毛蕊花糖分子量相同, 在无法获得对照品情况下, 亦采用加校正因子的自身对照法进行定量分析.

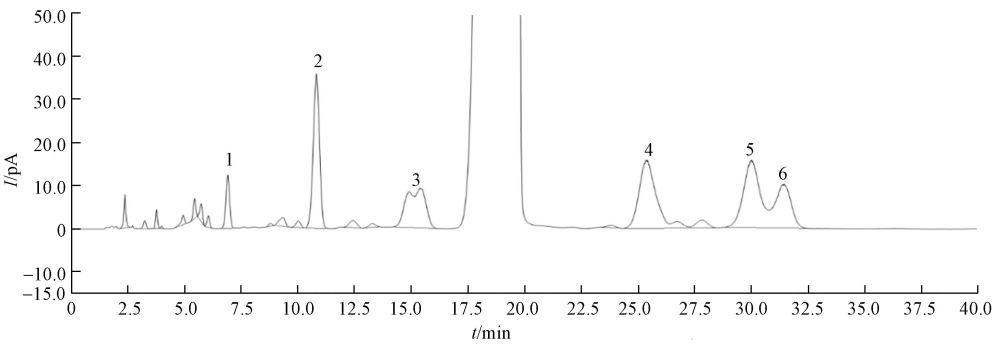


图 1 水苏糖提取物 HPLC-CAD 分析色谱图
(图中 1—6 见表 1)

Fig.1 Chromatogram of HPLC-CAD of Stachyose

表 1 水苏糖原料中主要成份信息

Table 1 Main compounds in Stachyose

No.	理论分子量 [M+Na] ⁺	实测分子量[M+Na] ⁺	可能元素组成	偏差值	二级碎片MS ²	推测成份
1	365.10543	365.10477	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ Na	-1.404	203.00/184.99	蔗糖
2	527.15826	527.15765	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆ Na	-1.377	365.18	棉子糖
3	527.15826	527.15778	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆ Na	-1.035	365.23/467.17	甘露三糖
4	851.26390	851.26257	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆ Na	-0.485	689.32/527.28	—
5	851.26390	851.26331	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆ Na	-0.625	689.31	毛蕊花糖
6	851.26390	851.26306	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆ Na	-1.060	527.25	—

2.5 方法学研究

2.5.1 专属性试验

精密称取样品约 200 mg, 在建立的方法条件下, 空白溶液不干扰检测, 各杂质峰与蔗糖、棉子糖、甘露三糖和毛蕊花糖色谱分离良好. 在酸、碱、氧化、高温及光照强制降解条件下, 各杂质峰分离度良好. 水苏糖主成分在强酸强碱 (2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液和 2 mol·L⁻¹ 盐酸溶液) 条件下降解较为明显, 提示样品在存储及保存过程中应避免与强酸及强碱接触.

2.5.2 精密度试验

取混合对照品溶液, 按 1.2 节的液相色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积. 蔗糖、棉子糖、甘露三糖峰面积的 RSD 分别为 0.89%、0.58% 及 1.65%. 取 6 份供试品溶液进行重复性实验, 结果显示蔗糖含量 RSD=0.87%, 棉子糖含量 RSD=0.75%, 甘露三糖含量 RSD=0.98%, 毛蕊花糖含量 RSD=0.96%, 最大单杂含量 RSD=0.80%, 总杂含量 RSD=0.94%.

2.5.3 线性范围、检出限和定量限

采用建立的 HPLC-CAD 方法对对照品系列浓度溶液进行测定. 各分析物的峰面积 (Y) 和对应的质量浓度 (X, μg·mL⁻¹) 呈现线性相关, 结果表明, 各组分在对应的浓度范围内线性关系良好, 相关系数 (r) 均大于 0.999. 以色谱峰 S/N≥3 和 10 时目标物的浓度作为方法的检出限和定量限 (见表 2).

表 2 水苏糖提取物中各成分线性及灵敏度考察

Table 2 Investigation on linearity and sensitivity of components in stachyose

组分	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	线性方程	r	LOD/(μg·mL ⁻¹)	LOQ/(μg·mL ⁻¹)
蔗糖	2.763—110.5	Y=0.0747X-0.1416	0.9998	0.1105	0.2210
棉子糖	9.906—396.2	Y=0.0624X-0.2635	0.9998	0.2476	0.4953
甘露三糖	12.24—489.5	Y=0.0368X-0.4150	0.9997	0.7649	1.530
水苏糖	46.44—495.3	Y=0.1351X-0.4363	0.9997	0.0527	0.1054

2.5.4 稳定性试验

取各溶液适量分别在室温条件下放置 0、2、4、6、8、10、12 h, 蔗糖峰面积 RSD=0.66%; 棉子糖峰面积 RSD=0.30%; 甘露三糖峰面积 RSD=0.46%; 毛蕊花糖含量 RSD=0.82%; 最大单杂含量 RSD=0.37%; 杂质总量 RSD=0.35%. 供试品溶液中各组分在室温条件下 12 h 内稳定性良好.

2.5.5 回收率试验

精密称取各成分对照品适量,按 1.3 节方法制备 3 浓度 9 份供试品加标溶液,连续进样检测,记录峰面积.在限度浓度的 80%—120% 范围内,蔗糖平均回收率为 100.1%, RSD=2.09%(*n*=9); 棉子糖平均回收率为 103.4%, RSD=1.09%(*n*=9); 甘露三糖平均回收率为 100.4%, RSD=2.49%(*n*=9).

2.5.6 耐用性考察

当流速、柱温及不同批次的色谱柱等条件微小变化时,蔗糖含量变化 RSD=1.39%, 棉子糖含量变化 RSD=0.67%, 甘露三糖含量变化 RSD=1.1%, 毛蕊花糖含量变化 RSD=6.41%, 最大单杂含量变化 RSD=4.44% 及杂质总量变化 RSD=2.67%.

2.6 样品检测

采用建立的方法对 3 批水苏糖提取物进行检测,分别精密称取样品粉末 200 mg,测定蔗糖、棉子糖、甘露三糖、毛蕊花糖及未知杂质的含量(见表 3).结果表明,样品中蔗糖、棉子糖、甘露三糖和毛蕊花糖含量分别为 0.07%—0.08%、0.51%—0.56%、0.35%—0.37% 和 0.43%—0.47%,最大单杂在 0.45%—0.46%,各杂质成分在不同批次间较为一致.

表 3 不同批次水苏糖提取物中各成分含量测定

Table 3 Determination of each component in different batches of stachyose extract

样品批号	蔗糖/%	棉子糖/%	甘露三糖/%	毛蕊花糖/%	最大单杂/%	杂质总量/%
201810131	0.07	0.51	0.37	0.43	0.45	0.72
201810132	0.08	0.56	0.36	0.47	0.46	0.75
201810133	0.08	0.55	0.35	0.47	0.46	0.75

3 结论(Conclusion)

本文利用高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱高分辨质谱(HPLC-LTQ/Orbitrap-MS)结合 HPLC-CAD 鉴定了水苏糖提取物中含量相对较高(>0.3%)的 6 种寡糖成分,确定了水苏糖提取物中包括蔗糖、棉子糖、甘露三糖、毛蕊花糖及其两种异构体等微量组分.采用酰胺柱建立了水苏糖提取物中微量组分分离的 HPLC 分析方法,并应用 CAD 检测器对 4 种已知寡糖组分和两种未知四糖组分进行定量检测.方法建立过程显示 CAD 检测器在微量寡糖组分检测中,质量浓度和响应信号之间呈现线性相关,能够较为简单完成微量组分定量.

目前高效液相色谱法广泛用于糖类物质的检测.由于糖类成分没有发色官能团,紫外吸收较弱或几乎没有吸收,示差折光检测器(RID)在糖类研究中应用较多,但检测结果受流动相比例、温度、流速等方面影响较大,且不能采用梯度洗脱,存在一定局限性.蒸发光散射检测器(ELSD)可以进行梯度洗脱,但由于其检测原理特点,方法灵敏度较低,耐用性和稳定性不佳. CAD 检测器作为一种新型质量型检测器,其响应值不依赖于分析物的结构,灵敏度更高,已逐步被用于糖类物质分析.在本文方法中, CAD 检测器呈现出较为灵敏的响应,在 0.1105—0.7649 μg·mL⁻¹ 内的微量组分可被有效检出.方法学验证显示,该方法线性范围宽,灵敏度高,准确度高.建立的方法可用于水苏糖提取过程中的质量控制,为水苏糖质量研究提供方法依据.

参考文献 (References)

[1] ZHANG J, SONG G S, MEI Y J, et al. Present status on removal of raffinose family oligosaccharides-a Review [J]. *Czech Journal of Food Sciences*, 2019, 37(3): 141-154.

[2] ARCHER S, MENG S, WU J, et al. Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through two distinct pathways[J]*Surgery*, 1998, 124(2): 248-253.

[3] DuBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J] *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3): 350-356.

[4] GIANNOCARO E, WANG Y, CHEN P. Comparison of two HPLC systems and an enzymatic method for quantification of soybean sugars [J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(1): 324-330.

[5] 郭楠, 李稳宏, 赵鹏, 等. 不同炮制地黄中水苏糖含量研究 [J]. *中成药*, 2008, 30 (12): 1812-1814.

GUO N, LI W H, ZHAO P, et al. Study on stachyose content in *Rehmannia glutinosa* processed by different methods[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2008, 30 (12): 1812-1814(in Chinese).

[6] KIM T B, KIM S H, SUNG S H. Quantitation of α-galactosides in *Rehmannia glutinosa* by hydrophilic interaction chromatography-evaporative light scattering detector [J]. *Phytochemical Analysis*, 2012, 23(6): 607-612.

[7] 陈蓉, 马冬阳, 郭彬, 等. HPLC-CAD 法结合化学计量学同时测定甘草中多种糖类 [J]. *中国药师*, 2021, 24 (10): 1932-1937.

CHEN R, MA D Y, GUO B, et al. Simultaneous quantification of saccharides in *glycyrrhizae radix et rhizoma* by HPLC- CAD Combined with chemometrics[J]. *China Pharmacist*, 2021, 24 (10): 1932-1937(in Chinese).

[8] LI J, HU D J, ZONG W R, et al. Determination of inulin-type fructooligosaccharides in edible plants by high-performance liquid chromatography with charged aerosol detector [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(31): 7707-7713.