

毛细管离子色谱质谱联用测定蓝藻发酵液中的糖

潘广文

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

离子色谱；质谱；发酵液；糖

Keywords:

ion chromatography, mass spectrometry, carbohydrate, blue-green algae fermentation

引言

蓝藻，又名蓝绿藻或蓝细菌。一般认为，蓝藻是地球上最早进行光合放氧的生物。蓝藻可以进行光合作用，与高等植物叶绿素具有一定程度上的同源性，加上其研究体系简单，长期以来一直是研究光合作用的模式生物。除此之外，蓝藻还可以进行固氮作用，将大气中的氮气经固氮作用转化为可以利用的氮源，用于提高土壤的肥力。随着人们对于光合作用认识的加深，以及对自身生活环境状况的重视，加上蓝藻遗传体系简单、生长速度快、培养方便等，相关方面的研究已经引起越来越多的重视，蓝藻已经成为一种重要的生理生化应用研究模式生物。由于蓝藻具有高光效、生长速度快、遗传操作体系相对成熟，适用大通量的基因工程改造等一系列传统优势，因此，如果可以通过代谢工程改造蓝细菌生产蔗糖并提供给大肠杆菌等微生物发酵生产生物燃料，必将加速整个生物燃料的产业化进程，具有显著的意义。我们通过此种方法测定蓝藻发酵液中的一些成分，如蔗糖、乳糖、葡萄糖、海藻糖、葡萄糖甘油酯、甘露糖、果糖等，有利于了解其基因改造效果，对于充分利用蓝藻意义重大。

本实验采用离子色谱质谱联法分离测定7种糖，分离度好，灵敏度高，操作简便，建立了一种有效检测蓝藻发酵液中游离糖的方法。

测试条件

仪器：ICS-4000色谱仪（ThermoFisher公司），配四元梯度泵，AS-AP自动进样器，MSQ单四极质谱（ESI源）

色谱柱：CarboPac PA 20 保护柱 $6.5\text{ }\mu\text{m}$,
 $35 \times 0.4\text{ mm}$, (P/N: 072073)
 CarboPac PA 20 分离柱 $6.5\text{ }\mu\text{m}$,
 $150 \times 0.4\text{ mm}$, (P/N: 072072)

柱温： 30°C ；

淋洗液：KOH等度淋洗



流速： $10\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ ；

定量环： $0.4\text{ }\mu\text{L}$ ；

检测方式：质谱检测（正离子模式加钠峰）

质谱条件：柱后加液NaAC(1 mmol/L):乙腈(50:50),
 流速 $20\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$

样品前处理

取发酵液样品，于离心机中离心20分钟(3000 rpm)，上清液稀释适当倍数后，过RP柱和 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 尼龙滤膜过滤，取续滤液直接上机分析。

结果和讨论

色谱柱的选择及淋洗液梯度条件优化

在常规离子色谱上CarboPac PA 20的糖柱上采用NaOH/NaOAc梯度淋洗的方式，能够将上述7种糖完全分离，且色谱行为良好，在ICS 4000单泵条件下，也可利用KOH梯度将上述几种糖分离，但其分析和平衡时间较长。在质谱条件下可利用分子量的不同，选择不同的离子

通道对7种糖进行定性和定量。为了保证色谱峰的分离度和保留时间的合理性，我们选择CarboPac PA 20的糖柱和KOH等度淋洗的方式。在上述色谱条件下7种糖的色谱图如下图（图1. 总离子流图，图2. SIM图）。

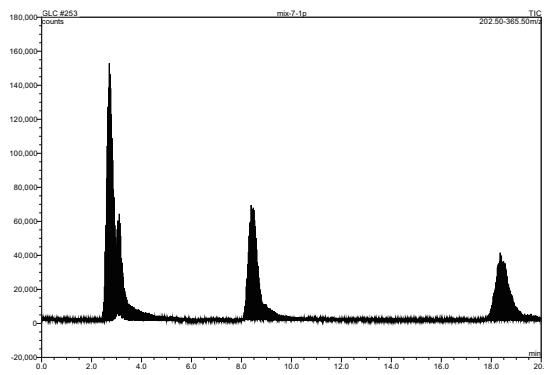


图1. 总离子流图

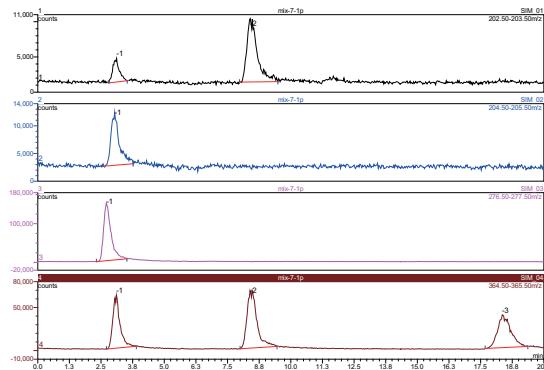


图2. 三个通道SIM图

Figure 2 Chromatogram of standard solution (1.0 mg/L)
质荷比203通道1-葡萄糖(glucose)、2-甘露糖(mannose)、
质荷比253通道1-甘露醇(mannitol)
质荷比277 通道1-葡萄糖甘油酯 (glucose glyceride)
质荷比365 通道1-海藻糖(trehalose)、2-蔗糖(sucrose)、3 -乳糖(lactose)

线性和灵敏度

将标准品定量混合，并将标准品溶液稀释得到一浓度系列，对上述系列浓度各测定，以峰面积为纵坐标，标准液质量浓度为横坐标建立标准工作曲线，以葡萄糖甘油酯为例，其在0.02 mg/L 10 mg/L范围内线性良好，其回归方程、相关系数如表1所示。

表1. 葡萄糖甘油酯的线性

Table 1 Aggression equation of the ions determined

Peak Name	Cal. Type	#Points	Coeff. Det.	Offset	Slope
Glucose glyceride	LOff	7	99.7829	-13.9054	844.3748

实际样品分析

取发酵液样品，离心稀释后经过过RP柱和0.22 μm滤膜过滤，按选定的色谱条件进行测定，外标法定量，其谱图见图3。

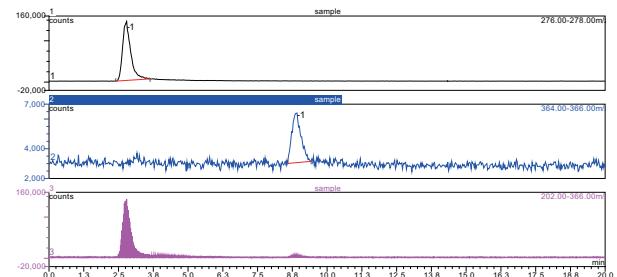


图3. 样品溶液的色谱图

质荷比277通道1.葡萄糖甘油酯(glucose glyceride)
质荷比365通道 1. 蔗糖(sucrose)

结论

离子色谱分离脉冲安培检测器测定糖分离度好灵敏度高，在糖类物质的研究中应用非常广泛。毛细管离子色谱常用色谱柱直径为0.4 mm，流速为10 μL/min，其进样体积通常为0.4 μL，与常规分析型离子色谱相比，其灵敏度是常规离子色谱的近百倍，且。毛细管离子色谱的流速是10 μL/min，符合质谱对低流速的需求；且经过抑制器后，淋洗液中的钾离子被交换到废液中，进入质谱的流动相基本为水，与质谱具有很好的兼容性，在需要进行定性研究时可连接质谱。并且在进入质谱前，可以通过一个三通引入部分乙腈以增加质谱的雾化效率，增加仪器的稳定性。本方法在柱后乙腈溶液中添加了少量乙酸钠，以提高糖在质谱中的重现性。毛细管离子色谱质谱联用测定糖方法操作简便，重复性好，线性范围内相关性好，准确度高，进一步拓展了毛细管离子色谱的应用范围，具有较高的实用价值。

参考文献

- [1] Mou S F, Liu K N, Ding X J. Ion Chromatographic Method and Its Application. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press (牟世芬, 刘克纳, 丁晓静. 离子色谱方法及应用, 第2版.北京: 化学工业出版社), 2005: 76, 140, 154
- [2] González-Noriega A, Michalak C, Antonio Sosa Melgarejo J. Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res., 2005, 1745(1): 7
- [3] 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
- [4] Fan L, Xu Y, Lian Z N, et al. Chinese Journal of chromatography (范丽, 徐勇, 连之娜等. 色谱), 2011, 29(1): 75

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

**免费服务热线: 800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)**

ThermoFisher
SCIENTIFIC