

Определение нейтральных олиго- и полисахаридов (инулинов и фруктанов), выделенных из растений

ВВЕДЕНИЕ

С тех пор, как было впервые показано, что высокоэффективная жидкостная анионообменная хроматография (high-performance anion-exchange chromatography, HPAE) совместно с импульсным амперометрическим детектированием (pulse amperometric detection, PAD) может быть использована для разделения и определения углеводов с высокой эффективностью¹, HPAE-PAD нашла широкое применение для различных образцов². Для разделения углеводов использовалась колонка CarboPac™ PA1, являющаяся сильным анионообменником и специально разработанная для анализа моно- и полисахаридов. В 1989 году Koizumi *et al* показал, что метод HPAE-PAD может быть использован для определения линейных полимеров глюкозы со степенью полимеризации (degree of polymerization, DP) равной 50³. Новый метод по эффективности значительно превзошел существующие методики на основе гель-фильтрации (предел обнаружения DP12) и обращенно-фазовой хроматографии (предел обнаружения DP30, связанный с плохой растворимостью больших полимеров в элюентах для обращенно-фазовой хроматографии). Недавно было показано, что с помощью HPAE-PAD возможно разделять полимеры глюкозы со степенью полимеризации более 80⁴.

Высокая разрешающая способность HPAE и возможность определения полимеров

с высокой степенью полимеризации позволили Koizumi *et al*, используя HPAE-PAD, установить распределение α 1,4-связанной глюкозы в шести естественных источниках⁵. Возможность получения подобного распределения вместе с высокой чувствительностью импульсной амперометрии сделали возможным определение примесей сахарной свёклы в апельсиновом соке⁶, а также позволили установить географическое происхождение мёда по профилю распределения олигосахаридов, входящих в его состав⁷.

Начиная с 1989 года появилось огромное количество работ, посвященных HPAE-PAD анализу олиго- и полисахаридов, включая амилопектины³⁻⁵, арабинаны⁸, арабиноксиланы⁸, фруктоолигосахариды⁹, фруктаны¹⁰, галактаны¹¹, глюкоарабиноксиланы¹², маннаны¹³, ксиланы¹⁴ и ксилоглюканы¹⁵. Эти углеводные компоненты были выделены из множества источников. В одной из работ авторы определили содержание фруктоолигосахаридов в более чем 80 видах фруктов, овощей и зерновых⁹.

Данный документ содержит указания для разработки метода HPAE-PAD для разделения нейтральных олиго- и полисахаридов растительного происхождения. Разделения амилопектинов и фруктанов иллюстрируют выбор колонок, элюентов и форм градиента для создания надёжных HPAE-POD методов анализа олиго- и полисахаридов.

ОБОРУДОВАНИЕ

Хроматографическая система Dionex BioLC[®], состоящая из:

- градиентного насоса GP50 с функцией вакуумного дегазирования
- электрохимического детектора ED50
- органайзера элюентов E01
- автосамплера с термостатом AS50

Программное обеспечение Dionex Chromeleon[®] 6

РЕАГЕНТЫ И СТАНДАРТЫ

Деионизованная вода, сопротивление 17.8 МОм·см или выше (используется для приготовления всех элюентов и разведения стандартов)

Натрия гидроксид, 50% (w/w) (Fisher Scientific)

Натрия ацетат, безводный (Fluka, Microselect)

Инулин, корень цикория (Sigma Chemical)

Инулин, клубни георгина (Sigma Chemical)

Мальтрин MO40 (Grain Processing Corporation)

ДРУГИЕ РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Фильтрующие насадки на шприц (0.47 мкм, PVDF) (Acrodisc LC, Gelman Sciences)

Нейлоновые фильтрующие диски (0.2 мкм, 47 мм) (P/N 66602, Gelman Sciences)

Виалы для автосамплера

УСЛОВИЯ

Колонка CarboPac PA1 или PA-100 Analytical, (4 × 250 mm, P/N 035391 и 043055, соответственно)

Предколонка CarboPac PA1 или PA-100 (4 × 50 mm, P/N 043096 и 043054, соответственно)

Рабочее давление 17.2 МПа (2500 psi)

Дегазация 30 сек. каждые 10 мин.

Объем инъекции 10 мкл

Объем петли 25 мкл

Элюенты А: 100 mM или 150 mM NaOH
Б: 100 mM или 150 mM NaOH / 0.5 M или 1.0 M ацетата натрия

Скорость потока 1.0 мл/мин

Детектирование Импульсная амперометрия, золотой рабочий электрод, Ag/AgCl электрод сравнения

Форма электрохимического потенциала¹⁶ (waveform)

Время, сек	Потенциал, В	Интегрирование
0.00	+0.1	
0.20	+0.1	Начало
0.40	+0.1	Конец
0.41	-2.0	
0.42	-2.0	
0.43	+0.6	
0.44	-0.1	
0.50	-0.1	

Примечание: данная форма электрохимического потенциала должна быть использована только с новым золотым рабочим электродом, либо с золотым рабочим электродом, для которого использовалась ранее эта форма импульса.

Частота сбора данных 2 Гц

Ожидаемый фон 20-37 nC

Температура 30°C

Параметры автосамплера

Высота иглы 2 мм

Мертвый объем 4 мкл

Объем для промывки 100 мкл

Примеры градиентов* :

Элюент А: 100 мМ гидроксида натрия

Элюент В: 100 мМ гидроксида натрия / 1.0 М ацетата натрия

Скорость потока: 1 мл/мин

Разделение M040:

Время, мин	%А	%В	Форма градиента
0.0	95	5	6
60.0	55	45	6
61.0	95	5	6

Время анализа: 75 минут

Разделение Инулина:

Время, мин	%А	%В	Форма градиента
0.0	85	15	6
60.0	55	45	6
61.0	85	5	6

Время анализа: 75 минут

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ И РЕАГЕНТОВ

Приготовление образцов

Maltrin M040

Взвесить 25 мг M040 и добавить воды для получения раствора 5 мг/мл. Все работы, описанные в данном документе, были выполнены с раствором 5.2 мг/мл M040.

Инулины

Взвесить 25 мг инулина и добавить 100 мМ гидроксида натрия для получения раствора 5 мг/мл. Все работы, описанные в данном документе, были выполнены с растворами 5.0 мг/мл инулина из корней цикория и 5.5 мг/мл инулина из клубней георгина.

Общие рекомендации по приготовлению образцов, содержащих олигосахариды, для HPAE-PAD

Образцы можно растворять в воде или в 100 мМ гидроксиде натрия (непосредственно перед анализом). Возможно использование более высоких концентраций гидроксида натрия, но влияние их на результат хроматографии для данного образца, данной концентрации образца, объема инъекции должно быть оценено дополнительно.

Мутные образцы следует профильтровать через фильтр 0.45 мкм. Если образцы остаются мутными после фильтрации, они при выполнении инъекции могут повредить колонку и засорить инжектор, инжекторный клапан, инжекторную петлю или капилляр до предколонки. Дополнительную информацию по пробоподготовке для колонок CarboPac можно найти в руководстве пользователя к колонкам CarboPac (Документ №031824-02).

Приготовление элюента

100 и 150 мМ гидроксид натрия

Необходимо использовать высококачественную деионизованную воду высокого сопротивления (17.8 МОм·см и

* Остальные градиенты в данном документе показаны на рисунках или описаны в тексте

более), содержащую наименьшее количество диоксида углерода. Биологические загрязнения должны полностью отсутствовать. Элюент должен быть приготовлен из концентрированного раствора 50% гидроксида натрия. Не используйте гранулированный гидроксид натрия. Для приготовления 2 л 100 мМ NaOH возьмите градуированную пластиковую пипетку и добавьте 10.4 мл 50% гидроксида натрия к 1 л воды, затем доведите объем водой до 2 л. Перемешивайте раствор 1-2 минуты. Длительное перемешивание ведет к увеличению содержания карбонат-иона в растворе, который захватывается из воздуха. После приготовления, храните раствор в закрытой ёмкости под гелием при давлении 34-55 кПа (5-8 psi) все время. При хранении под гелием, элюент можно использовать в течение примерно 1 недели. Для приготовления 2 л 150 мМ раствора NaOH, разведите 50% (w/w) раствор гидроксида натрия, как описано выше для 100 мМ гидроксида натрия.

100 и 150 мМ гидроксид натрия с 0.5 или 1.0 М ацетата натрия

Отмерьте примерно 800 мл воды в мерный цилиндр объемом 1 л. Опустите магнитную мешалку и начните перемешивание. Взвесьте 41 г (0.5 М) или 82 г (1.0 М) безводного кристаллического ацетата натрия. Непрерывно добавляйте соль, энергично перемешивая воду. После того, как соль растворится, удалите магнитную мешалку, и используйте 10 мл градуированную пластиковую пипетку для добавления 5.2 мл (для приготовления 100 мМ гидроксида натрия) или 7.8 мл (для приготовления 150 мМ гидроксида натрия) 50% (w/w) раствора гидроксида натрия к раствору ацетата натрия. Доведите объем водой до 1 л и быстро взболтайте цилиндр, для того, чтобы перемешать его содержимое. Профильтруйте раствор под вакуумом через нейлоновый фильтр 0.2 мкм. Этот шаг может занять некоторое время, так как фильтр может

забиться нерастворимыми примесями, которые содержатся в ацетате натрия. После приготовления храните элюент в закрытой ёмкости под гелием при давлении 34-55 кПа (5-8 psi) все время. При хранении под гелием, элюент можно использовать в течение примерно 1 недели.

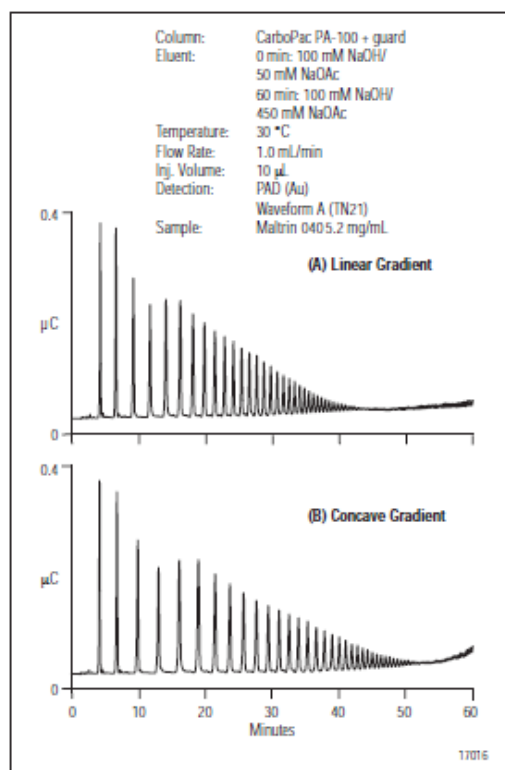


Рис. 1. Сравнение линейного и изогнутого градиента при разделении полисахаридов.

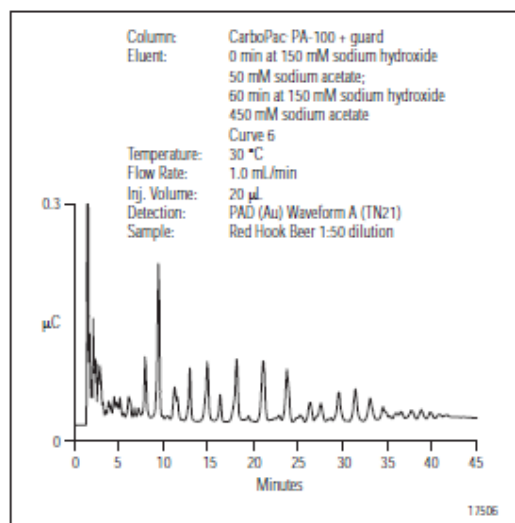


Рис. 2. HPAE-PAD анализ янтарного пива Red Hook.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор градиента

Незаряженные олиго- и полисахариды (линейные или с небольшим ветвлением), обычно разделяют на колонках CarboPac PA1 или PA-100 с использованием градиента ацетата натрия в элюенте, содержащем либо 100, либо 150 мМ гидроксида натрия. Гидроксид натрия необходим для ионизации гидроксильных групп сахара до оксианионов. Таким образом модифицированный сахарид удерживается как анион на сорбенте CarboPac, сильном анионообменнике. Ацетат-ион является более сильным элюентом, чем гидроксид-ион и используется для элюирования связанного сахара. На рисунке 1 (панель А) приведено разделение Мальтрин М040 на колонке CarboPac PA-100 с использованием градиента от 50 до 450 мМ ацетата натрия в 100 мМ гидроксиде натрия. Мальтрин М040 представляет собой препарат мальтодекстринов, выделенный из кукурузного крахмала. Мальтодекстрины представляют собой несладкие питательные полимеры глюкозы. Мальтодекстрины могут быть также отнесены к классу амилопектинов, глюкозных полимеров, в которых мономеры глюкозы образуют полимер по связям α 1,4 со случайными ветвлениями по связям α 1,6. Замена линейного градиента (кривая 5) на рисунке 1А на слегка вогнутый (кривая 6) приводит к разделению, показанному на рисунке 1В. Хотя данная замена формы градиента не позволяет получить новых пиков, она позволяет увеличить расстояние между существующими пиками. Данный тип градиента может повысить воспроизводимость интегрирования, а также облегчить сбор индивидуальных пиков для очистки или дополнительного анализа. Мы обнаружили, что слегка вогнутая форма градиента улучшает разделение углеводных полимеров, в которых элюируемые пики хуже разрешаются с ростом

полимера. На рисунке 2 показан результат анализа пива, в котором, как известно, содержатся амилопектины.

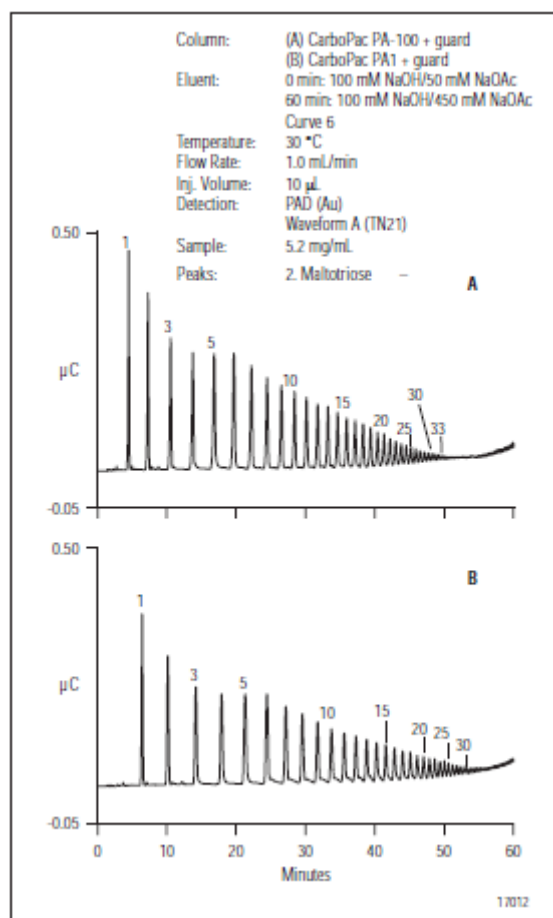


Рис. 3. Сравнение колонок CarboPac PA1 и PA-100 при разделении полисахаридов.

Выбор колонки

На рисунке 3 приведено сравнительное разделение Мальтрина М040 на колонках CarboPac PA-100 (А) и CarboPac PA1 (В). Рисунок демонстрирует различия свойств сорбентов. PA-100 содержит частицы сорбента меньшего диаметра с большей степенью сшивки по сравнению с PA1. Эти различия приводят к увеличению эффективности разделения и уменьшению на 10% ёмкости сорбента (90 мэкв по сравнению с 100 мэкв). Повышенная эффективность показана численно путём сравнения эффективности пиков от двух разделений (см. табл. 1).

Номер пика	CarboPac PA-100	CarboPac PA1
4	17087	9378
8	39445	24417
12	66978	45667

Табл. 1. Сравнение эффективностей пиков

Благодаря повышенной эффективности удалось детектировать три дополнительных пика на колонке PA-100. Меньшие времена удерживания пиков на панели А (по сравнению с В) демонстрируют меньшую ёмкость колонки PA-100. Уменьшение ёмкости приводит к тому, что более объёмные углеводные молекулы элюируются при меньшей концентрации ацетата натрия. Замена градиента с 50-450 мМ на 80-480 мМ (для того, чтобы учесть повышенную ёмкость PA1) не привела к появлению дополнительных пиков на колонке PA1.

100 мМ гидроксида натрия или 150 мМ гидроксида натрия?

Во многих работах по НРАЕ-РАD разделению олиго- и полисахаридов авторы используют 100 мМ или 150 мМ гидроксида натрия. Мы сравнили разделение Мальтрина М040 при данных концентрациях гидроксида натрия. Хотя концентрация ионов элюента выше в случае 150 мМ гидроксида натрия,

только первый пик элюируется раньше, чем в аналогичном разделении при элюции 100 мМ гидроксида натрия. Мы полагаем, что большие времена удерживания в случае 150 мМ гидроксида натрия объясняются большей степенью ионизации гидроксильных групп образца, что, в свою очередь, ведёт к более сильному взаимодействию с колонкой CarboPac. Этот результат был впервые получен при разделении разветвлённых олигосахаридов млекопитающих¹⁷. При использовании в качестве элюента 150 мМ гидроксида натрия не удалось обнаружить дополнительных пиков в препарате Мальтрина М040, по сравнению со 100 мМ гидроксида натрия. Использование 150 мМ гидроксида натрия может быть оправдано при анализе образцов, содержащих объёмные углеводы, которые лучше растворяются при повышенных концентрациях гидроксида натрия.

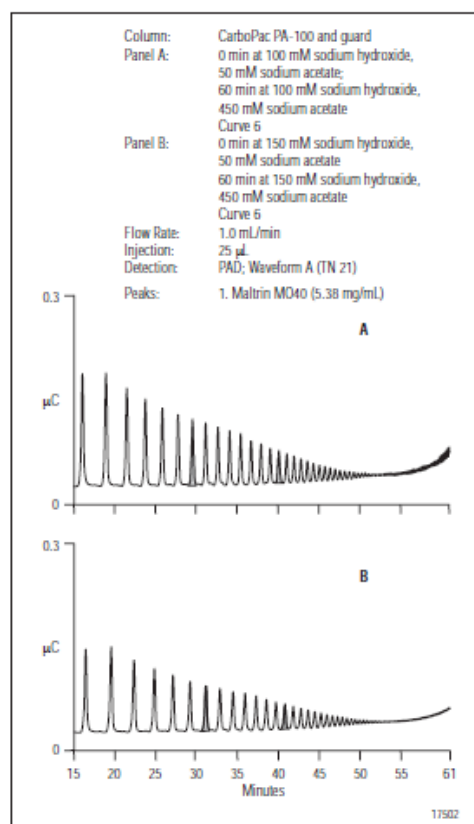


Рис. 4. Разделение мальтодекстринов с 100 мМ и 150 мМ NaOH.

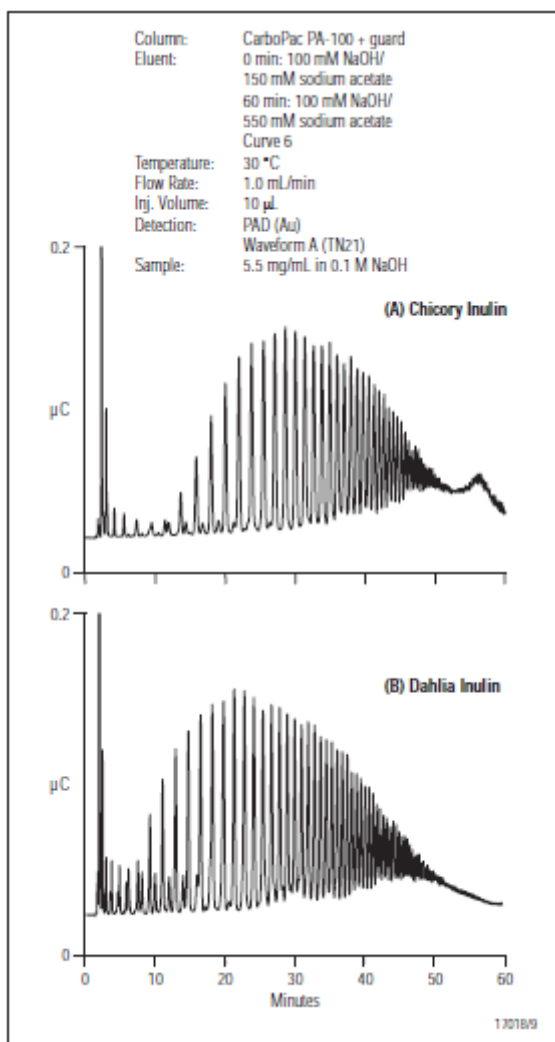


Рис. 5. Сравнительный НРАЕ-РАD анализ инулинов из корня цикория (А) и из клубней георгина (В).

Анализ инулинов

Для разработки методов анализа инулинов мы использовали результаты, полученные при разделении амилопектинов. Инулины относятся к классу фруктанов и представляют собой линейные β 2-1 полимеры фруктозы длиной порядка DP60, содержащие на конце остаток глюкозы. На рисунке 5 показаны разделения инулинов из корня цикория (А) и из клубней георгина (В). Разделение было выполнено на колонке CarboPac PA-100 с использованием элюента 100 мМ гидроксида натрия и криволинейного градиента (кривая 6) 150-550 мМ ацетата натрия. Рисунок 5 демонстрирует возможность метода НРАЕ-РАD по

профилированию как, например инулины, имеют различное распределение полимеров. Метод НРАЕ-РАD может быть также использован для сравнения разных экстракций или партий олиго- или полисахаридов, полученных из одного источника.

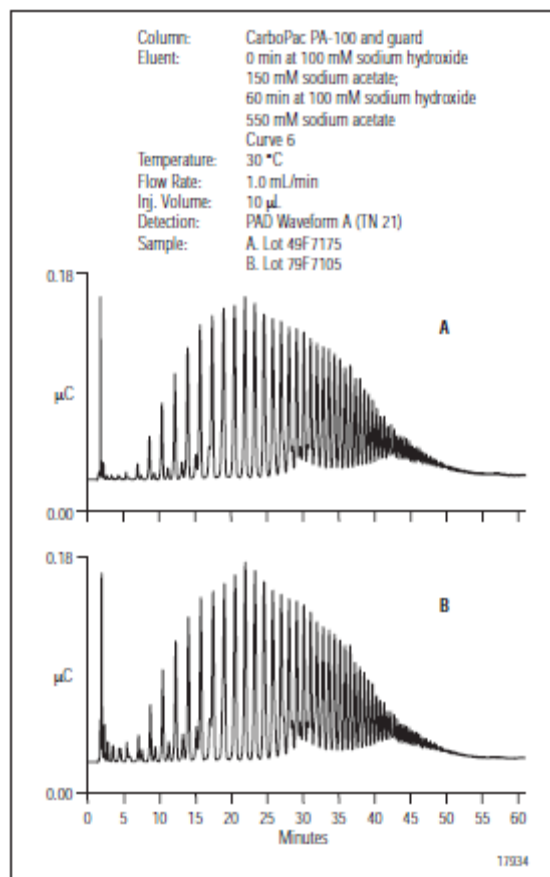


Рис. 6. Сравнение двух партий инулинов, выделенных из корней цикория.

Номер пика	Отношение высоты пиков (старая партия/новая партия)
3	0.76
6	0.89
10	0.97
12	0.93
14	0.92
18	0.96
23	0.99
27	1.00
31	1.08
35	1.13

Табл. 2. Сравнение двух партий инулинов из корня цикория.

На рисунке 6 приведено сравнение двух партий инулинов из корня цикория, приобретенных с разницей в 10 лет.

Анализ площадей пиков показывает (табл. 2), что старая партия имеет больший процент объемных полимеров.

Разработка надёжных методов анализа олиго- и полисахаридов.

Для разработки надёжных методов НРАЕ-PAD, следует оптимизировать процесс уравнивания колонки, температуру, учитывать природу образца, количество наносимого образца, выбор формы электрохимического потенциала, режим ввода проб автосамплером.

Для хорошей воспроизводимости времен удерживания пиков колонка должна быть уравновешена стартовым буфером до начала каждого анализа, и период уравнивания между инъекциями должен строго контролироваться. Во всех разделах, приведенных в данном документе, колонка была уравновешена между инъекциями в течение 15 минут (15 мл), при этом в течение первой минуты происходил переход от конечных значений градиента к начальным перед каждой новой инъекцией. Мы контролировали время уравнивания колонки установкой длительности цикла промывки автосамплера до инъекции 15 минут (скорость потока при этом составляла 1 мл/мин) после каждого разделения по достижении финальной точки градиента. Контроль за температурой колонки, помещенной в термостат, также повышает воспроизводимость результатов.

Многие образцы олиго- и полисахаридов образуются путём кислотного или ферментативного гидролиза более длинных полимеров. К примеру, амилоза и амилопектины получаются при гидролизе крахмала. Образцы, приготовленные подобным образом, могут содержать остатки высокомолекулярного материала, который не будет элюироваться с колонки во время стандартного метода. После нескольких инъекций снижение ёмкости колонки (вследствие наличия данных высокомолекулярных веществ) приведет к уменьшению времён удерживания основных пиков. Мы сделали 32 последовательные инъекции Мальтрина M040, используя метод, показанный на рисунке 1А.

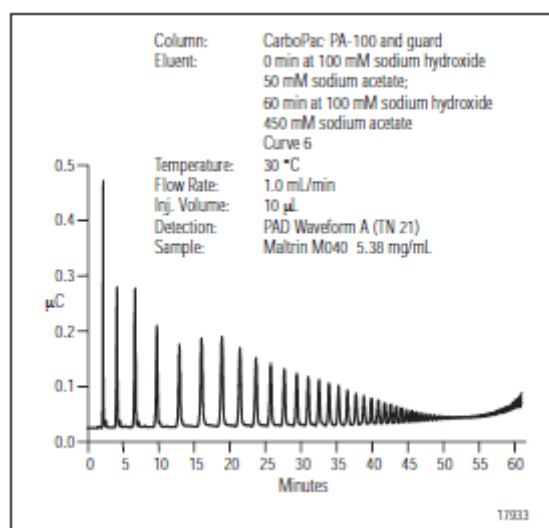


Рис. 7. Сравнительный анализ разделений 1 и 32 мальтодекстринов.

На рисунке 7 приведено наложение хроматограмм первой и последней инъекции. Времена удерживания совпадают для первых 18-ти пиков, и уменьшаются (в случае 32-ой инъекции) для всех пиков после 18-го. Рисунок 8 показывает, что эффект является результатом сорбции сильно удерживаемого, не элюирующегося при этих условиях хроматографирования материала. Нижняя хроматограмма на рисунке 8 соответствует холостому заколу (10 мкл воды), сделанному до

32-х инъекций Мальтрина М040, а верхняя хроматограмма – чистый закол, сделанный сразу после 32-ой инъекции М040. Метод, использованный для этого сравнения, идентичен методу для разделения препарата Мальтрина М040, за исключением того, что колонка промывалась в течение 10 минут раствором 100 мМ гидроксида натрия / 1 М ацетата натрия после финальной точки градиента.

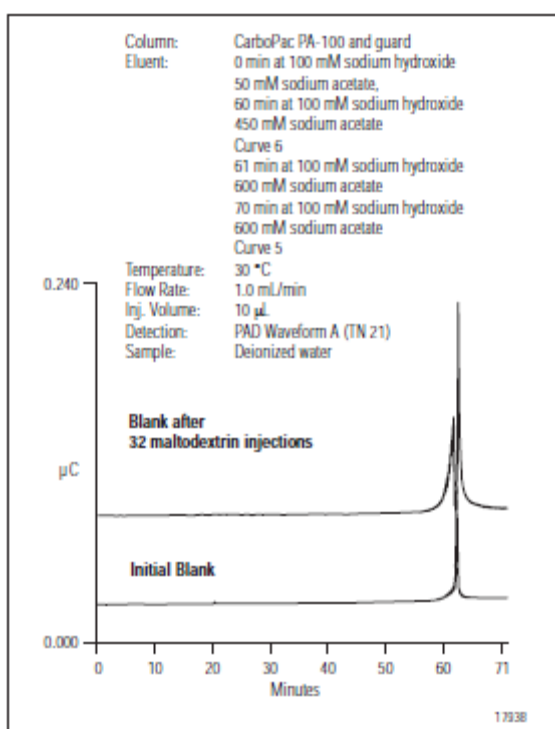


Рис. 8. Ввод холостой пробы (с промывкой) до и после 32 инъекций мальтодекстрина.

Это сравнение показывает наличие компонентов образца, которые не элюируются с колонки на протяжении 32 инъекций. Мы можем решить данную проблему промывкой колонки после каждой инъекции, но для этого потребуется увеличить время анализа. Продолжительность промывки может быть определена исходя из требований, которые предъявляются к методу – сколько пиков в разделении нас интересуют (например, если нам интересен любой из или все первые 18 пиков данного разделения, то промывки необходимо проводить каждые 32 инъекции).

Если же первые 20 пиков – уменьшить объем инъекции. Для того, чтобы определить, нуждается ли колонка CarboPac в тщательной отмывке, можно использовать образец с известным распределением компонентов, например инулин из корня цикория (рис. 5А). Для этого небольшие количества стандарта (инулина) расфасовываются по маленьким виалам и замораживаются и при необходимости используются для проверки пригодности хроматографической системы, времен удерживания, отклика и общей производительности системы.

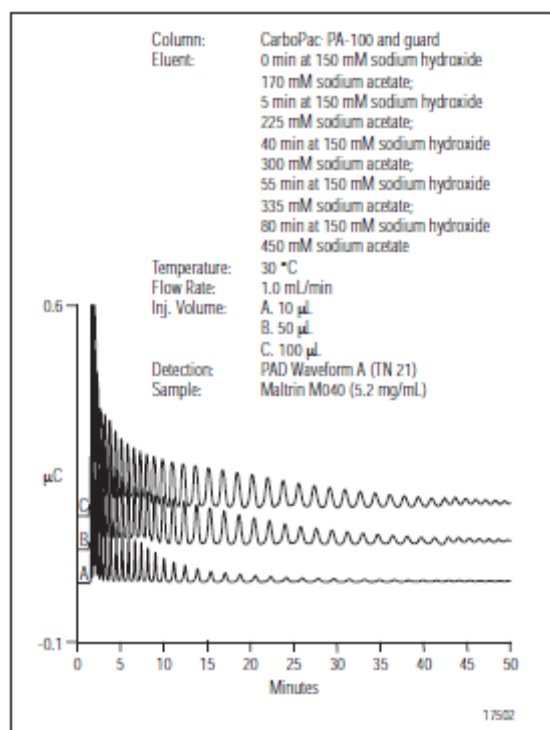


Рис. 9. Эффект перегрузки колонки при разделении олигосахаридов.

Другая возможная причина уменьшенных времен удерживания пиков, особенно сильно удерживаемых – это нанесение слишком большого количества образца. На рисунке 9 показан эффект увеличивающегося количества Мальтрина М040 на колонку CarboPac PA-100. Обратите внимание на сглаженные формы пиков и уменьшенные времена удерживания более поздних пиков разделения. Иногда колонку при нанесении образца намеренно

перегружают для того, чтобы собрать достаточные количества конкретного пика или пиков для отдельного анализа. Колонка CarboPac PA-100 доступна в формате 9 x 250 мм, а также существует альтернативная упаковка в формате 22 x 250 мм. При сборе фракций с колонки 4 x 250 мм CarboPac возможно использование углеводного мембранного обессоливателя (Carbohydrate Membrane Desalter, CMD) для превращения гидроксида натрия и ацетата натрия, входящих в состав элюента, в разбавленную уксусную кислоту, которая может быть удалена позднее вакуумным выпариванием¹⁸. CMD может убирать до 350 мМ Na⁺ при скорости потока 1 мл/мин. Фракции, собранные с больших колонок CarboPac можно нейтрализовать уксусной кислотой и диализовать против воды с использованием диализной трубки с пределом отсечения 1000 Да.

Для получения высокой воспроизводимости электрохимических откликов, используйте форму входного импульса (Waveform) A¹⁶ (которая приведена в данном документе), контролируйте температуру электрохимической ячейки, используйте автосамплер и выбирайте режим автосамплера исходя из баланса между желаемой воспроизводимостью и количеством образца, которое вы планируете потратить (высокая воспроизжимость требует больше образца). Форма входного импульса A обеспечивает более длительную долгосрочную воспроизжимость результатов, чем ранее рекомендованные формы входных импульсов¹⁶ с элюентами, содержащими ацетат натрия¹⁹. Для контроля за температурой электрохимическая ячейка может быть установлена вместе с колонкой внутри модуля AS50 TC.

Точность инъекций автосамплера AS50, и соответственно воспроизжимость площади пиков, зависит от выбранного режима автосамплера. Наиболее точные результаты

получаются в режиме инъекции с полным заполнением петли (full-loop). В этом режиме автосамплер забирает образец из виалы, объемом в четыре раза превышающим объем петли инжектора. Петля полностью заполняется образцом, а излишки уходят в линию слива. Затем содержимое петли поступает на колонку. Более детальную информацию по режимам инжектора можно найти в инструкции к автосамплеру AS50.

DP	Количество гидроксильных групп (НСОН)	Относительный отклик ^a	Относительный отклик ^b	Относительный отклик / НСОН ^b	Относительный отклик / НСОН ^a	Отклик / мкмоль ^c	Отклик / мкг ^c
2	8	1.00	-	-	1.00	17.8	51.9
3	11	1.39	-	-	1.01	22.3	44.2
4	14	1.72	-	-	0.98	29.0	43.6
5	17	2.06	-	-	0.97	29.8	35.9
6	20	2.33	0.74	1.08	0.93	34.5	34.8
7	23	2.59	0.82	1.03	0.90	35.7	31.0
8	26	-	0.89	0.99	-	-	-
9	29	-	1.00	1.00	-	-	-
10	32	-	1.10	1.00	-	-	-
11	35	-	1.20	1.00	-	-	-
12*	38	-	1.31	1.00	-	38.8	20.6
13*	41	-	1.38	0.99	-	40.0	19.6
14*	44	-	1.46	0.97	-	50.9	21.5
15	47	-	1.55	0.96	-	-	-
16*	50	-	1.59	0.92	-	46.0	18.8
17*	53	-	1.65	0.90	-	52.2	18.3
18-19	-	-	-	-	-	44.6	14.8
19-21	-	-	-	-	-	44.3	13.6
20-22	-	-	-	-	-	54.4	15.9

Табл. 3. Электрохимический отклик амилозных олигосахаридов.

a. Koizumi, K. *et al.*, Journal of Chromatography. 1989, 464: 365–373

b. Koizumi, K. *et al.*, Journal of Chromatography. 1991, 585: 233–238

c. Ammeraal, R. N. *et al.*, Carbo. Res. 1991, 215: 179–192

* см. 11-12, 12-13, 14-15, 14-16, и 17-18 соответственно.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ОТКЛИК ОЛИГО- И ПОЛИСАХАРИДОВ

Хотя в данной работе мы не изучали вопросы, касающиеся электрохимического отклика олиго- и полисахаридов, эти данные описаны в литературе^{3,5,20,21}. Работы посвящены изучению зависимости изменения электрохимического потенциала от степени полимеризации (DP). Koizumi *et al.*^{3,5} показал, что отклик возрастает с ростом DP. Отклик, нормированный на количество гидроксильных групп, также возрастает (см. табл. 3). В соответствии с данными наблюдениями, Ammeraal *et al.*²⁰ показал, что с ростом DP возрастает линейный прирост в отклике в расчете на микромоль нанесенного вещества, и уменьшается отклик в расчете на микрограмм вещества. Недавняя работа²¹ подтверждает эти результаты.

ДРУГИЕ ФАКТОРЫ, КОТОРЫЕ НЕОБХОДИМО УЧИТЫВАТЬ

Для экономии элюента и образования меньшего количества сливных вод существуют колонки CarboPac в формате 2 x 250 мм. Использование вместо ацетата натрия нитрата натрия рекомендовано для разделений амилопектинов²². Авторы показали, что нитрат, являющийся более сильным элюентом, чем ацетат, лучше подходит для разделения линейных и разветвлённых углеводов. Использование нитратных элюентов позволило разделять полимеры с большей степенью (DP66 против DP58 в случае ацетатных элюентов). Однако у компании Dionex нет данных, касающихся долгосрочных эффектов при использовании элюентов на основе нитрата натрия для метода HPAE-PAD.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И РЕКОМЕНДАЦИИ

Для получения наилучших результатов заменяйте Ag/AgCl электрод сравнения на новый каждые 3-6 месяцев.

ДОПОЛНЕНИЕ

Поскольку сравнение двух градиентных разделений с использованием теоретических тарелок (эффективностей) не совсем корректно, в этом разделе мы приводим метод расчёта ёмкостей пиков, описанный Giddings *et al*, и использованный для сравнения разделений мальтодекстринов на колонках CarboPac PA1 и PA-100²³.

Для расчёта ёмкости пика разделения с градиентным профилем элюирования, используйте формулу:

$$\text{Ёмкость пика} = 1.5 \times \text{Время анализа} \times \\ (1/\text{Средняя ширина пика})$$

1.5 – это фактор разрешения пиков до базовой линии.

Используя данную формулу, мы получили значение 191 для колонки PA1 и значение 209 для PA-100. Этот 10% прирост соответствует количеству пиков, идентифицированных программным обеспечением при интегрировании (30 пиков для PA1 и 33 пика для PA-100).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Rocklin, R. D.; Pohl, C. A. J. *Liq. Chromatogr.* 1983, 6, 1577-1590.
2. Lee, Y. C. J. *Chromatogr. A* 1996, 720, 137-149.
3. Koizumi, K.; Kubota, Y.; Tanimoto, T.; Okada, Y. J. *of Chromatogr.* 1989, 464, 365-373.
4. Hanashiro, I.; Abe, J.; Hizukuri, S. *Carbo. Res.* 1996, 283, 151-159.
5. Koizumi, K.; Fukuda, M.; and Hizukuri, S. J. *of Chromatogr.* 1991, 585, 233-238.
6. Dionex Corporation. Application Note 82; Sunnyvale, CA.
7. Swallow, K.W.; Low, N.H. J. *Agric. Food Chem.* 1990, 38, 828-832.

8. van der Hoeven, R. A. M.; Niessen, W. M. A.; Schols, H. A.; Bruggink, C.; Voragen, A. G. J.; van der Greef, J. J. *Chromatogr.* 1992, 627, 63-73.
9. Campbell, J. M.; Bauer, L.L.; Fahey, G.C., Jr.; Hogarth, A. J. C. L.; Wolf, B.W.; Hunter, D. E. J. *Agric. Food Chem.* 1997, 45, 3076-3082.
10. Chatterton, N. J.; Harrison, P. A. *New Phytol.* 1997, 136, 3-10.
11. Schols, H. A.; Lucas-Lokhorst, G.; Voragen, A. G. J.; Niessen, W. M. A. *Carbohydrates in the Netherlands* 1993, 9, 11-13.
12. Verbruggen, M. A.; Spronk, B. A.; Schols, H. A.; Beldman, G.; Voragen, A. G. J.; Thomas, J. R.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F. G. *Carbo. Res.* 1998, 306, 265-274.
13. Torto, N.; Buttler, T.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; Stalbrand, H.; Tjerneld, F. *Anal. Chim. Acta* 1995, 313, 15-24.
14. Mou, S.; Sun, Q.; Lu, D. J. *Chromatogr.* 1991, 546, 289-295.
15. McDougall, G. J.; Fry, S. C. *Carbo. Res.* 1991, 219, 123-132.
16. Dionex Corporation. Technical Note 21; Sunnyvale, CA.
17. Cooper, G. A.; Rohrer, J. S. *Anal. Biochem.* 1995, 226, 182-184.
18. Thayer, J.; Rohrer, J. S.; Avdalovic, N.; Gearing, R. P. *Anal. Biochem.* 1998, 256, 207-216.
19. Rocklin, R. D.; Clarke, A. P.; Weitzhandler, M. *Anal. Chem.* 1998, 70, 1496-1501.
20. Ammeraal, R. N.; Delgado, G. A.; Tenbarger, F. L.; Friedman, R. B. *Carbo. Res.* 1991, 215, 179-192.
21. Koch, K.; Andersson, R.; Aman, P. J. *of Chromatogr. A* 1998, 800, 199-206.
22. Wong, K. S.; Jane, J. J. *Liq. Chromatogr.* 1995, 18, 63-80.
23. Giddings, J. C. *United Separation Science*; John Wiley and Sons: New York, 1991, p 105.

СПИСОК ПОСТАВЩИКОВ

Fisher Scientific, 2000 Park Lane, Pittsburgh, Pennsylvania, 15275-1126 USA, 1-800-766-7000, www.fishersci.com.
Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178 USA, 1-800-325-3010, www.sigma-aldrich.com.
Fluka Chemika-BioChemika, Fluka Chemie AG,

Industriestrasse 25, CH-9471, Buchs, Switzerland,
+81 755 25 11.
Gelman Sciences, 600 S. Wagner Road, Ann Arbor,
MI,
48106-1448 USA, 1-800-521-1520,
www.pall.com/gelma

Determination of Plant-Derived Neutral Oligo- and Polysaccharides

INTRODUCTION

Since it was first reported that high-performance anion-exchange chromatography (HPAE) could be combined with pulsed amperometric detection (PAD) to separate and detect carbohydrates with high sensitivity and without derivatization,¹ HPAE-PAD has been applied to the determination of many types of carbohydrates in a large variety of samples.² Carbohydrates were separated with the CarboPac™ PA1, a strong anion-exchange column specifically designed to separate mono- and oligosaccharides. In 1989, Koizumi et al. reported that HPAE-PAD could be used to separate linear glucose polymers with degrees of polymerization (DP) as high as 50.³ This method was a significant improvement over size-exclusion chromatography, which could not resolve polymers greater than DP12, and reversed-phase chromatography, which could not determine polymers greater than DP30 (due to the poor solubility of the large carbohydrates in reversed-phase eluents). More recently, Hanashiro et al. reported an HPAE-PAD separation of glucose polymers greater than DP80.⁴

The high-resolving power of HPAE and its ability to determine higher DPs than other techniques, allowed Koizumi et al. to use HPAE-PAD to “fingerprint” the distribution of α 1,4-linked glucose polymers from six natural sources.⁵ This fingerprinting capability, combined with the sensitivity of PAD, allowed the determination of beet sugar adulteration of orange juice⁶ and the determination of the geographical origin of honey from its oligosaccharide profile.⁷

Since 1989, numerous publications have featured HPAE-PAD analysis of oligo- and polysaccharides, including amylopectins,³⁻⁵ arabinans,⁸ arabinoxylans,⁸ fructooligosaccharides,⁹ fructans,¹⁰ galactans,¹¹ glucoarabinoxylans,¹² mannans,¹³ xylans,¹⁴ and xyloglucans.¹⁵ These carbohydrate polymers were isolated from a variety of sources. In one study, the authors determined the fructooligosaccharide content of over 80 fruits, vegetables, and grains.⁹

This application note describes how to develop an HPAE-PAD method for separating plant-derived neutral oligo- and polysaccharides. Amylopectin and fructan separations demonstrate column, eluent, and gradient choices for developing rugged HPAE-PAD methods for neutral oligo- and polysaccharides.

EQUIPMENT

Dionex BioLC[®] chromatography system consisting of:
GP50 Gradient Pump with vacuum degas option
ED50 Electrochemical Detector
E01 Eluent Organizer
AS50 Autosampler with Thermal Compartment
Dionex Chromeleon[®] 6 Chromatography Workstation

REAGENTS AND STANDARDS

Deionized water, 17.8 MΩ-cm resistivity or better (used for all eluent and standard preparations)
Sodium hydroxide, 50% (w/w) (Fisher Scientific)
Sodium acetate, anhydrous (Fluka, Microselect)
Inulin, chicory root (Sigma Chemical)
Inulin, dahlia tuber (Sigma Chemical)
Maltrin[®] MO40 (Grain Processing Corporation)

OTHER CONSUMABLES

Syringe filters (0.45-μM PVDF) (Acrodisc LC, Gelman Sciences)
Nylon filter disks (0.2-μM, 47 mm) (P/N 66602, Gelman Sciences)
Autosampler vials

CONDITIONS

Column: CarboPac PA1 or PA-100 Analytical, (4 × 250 mm, P/N 35391 and 43055, respectively)
CarboPac PA1 or PA-100 Guard (4 × 50 mm, P/N 43096 and 43054, respectively)

Expected Operating

Pressure: 17.2 MPa (2500 psi)

Degas: 30 s every 10 min

Injection Volume: 10 μL

Injection Loop: 25 μL

Eluents: A: 100 mM or 150 mM NaOH
B: 100 mM or 150 mM NaOH/500 mM or 1 M sodium acetate

Flow Rate: 1.0 mL/min

Detection: Pulsed amperometry, gold working electrode, Ag/AgCl reference

Waveform¹⁶

Time (sec)	Potential (V)	Integration
0.00	+0.1	
0.20	+0.1	Begin
0.40	+0.1	End
0.41	-2.0	
0.42	-2.0	
0.43	+0.6	
0.44	-0.1	
0.50	-0.1	

Note: This waveform should only be used with a new gold working electrode or gold working electrode that has only been previously used with this waveform.

Collection Rate: 2 Hz
Expected 20–37 nC
Background:
Temperature: 30 °C
Needle height: 2 mm
Cut segment
Volume: 4 μL
Flush volume: 100 μL

Example* Gradients:

Eluent A: 100 mM sodium hydroxide

Eluent B: 100 mM sodium hydroxide/1.0M sodium acetate

Flow Rate 1.0 mL/min

M040 Separation

Time (min)	%A	%B	Curve
0.0	95	5	6
60.0	55	45	6
61.0	95	5	6

Autosampler Cycle Time: 75 min

Inulin Separation

Time (min)	%A	%B	Curve
0.0	85	15	6
60.0	55	55	6
61.0	85	15	6

Autosampler Cycle Time: 75 min

* Other gradients in this application note are shown in the figures or described in the text.

PREPARATION OF SOLUTIONS AND REAGENTS

Sample Preparation

Maltrin M040

Weigh out 25 mg of M040 and add water to prepare a 5.0-mg/mL solution. All work presented in this application note was performed with 5.2-mg/mL M040 solutions.

Inulins

Weigh out 25 mg of inulin and add 100 mM sodium hydroxide, prepared in the same manner as the eluent, to prepare a 5.0-mg/mL solution. All work presented in this application note was performed with 5.0-mg/mL chicory root inulin and 5.5-mg/mL dahlia tuber inulin solutions.

General Advice on Preparing Samples Containing Oligosaccharides for HPAE-PAD

Samples can be dissolved in water or 100 mM sodium hydroxide (reconstitute just prior to analysis). Higher concentrations of sodium hydroxide may be used, but the effect on the chromatography for a given sample, sample concentration, and injection volume must be evaluated. Cloudy samples should be filtered using a 0.45 μ M syringe filter. If samples that are cloudy, even after filtration, are injected, they will damage the guard column and clog the injector, injection valve, injection loop, or tubing leading to the guard column. For additional advice on sample considerations for CarboPac columns, see the CarboPac column manual (Document #031824-02).

Eluent Preparation

100 and 150 mM Sodium Hydroxide

It is essential to use high-quality water of high resistivity (17.8 M Ω -cm or better) that contains as little dissolved carbon dioxide as possible. Biological

contamination should be absent. Sodium hydroxide eluent should be prepared with 50% (w/w) sodium hydroxide. Sodium hydroxide pellets are covered with a thin layer of sodium carbonate and should not be used under any circumstances. To prepare 2 L of 100 mM NaOH, use a 10-mL graduated plastic pipet to deliver 10.4-mL 50% (w/w) sodium hydroxide into 1 L of water and then add water to reach 2 L. Stir this solution only 1–2 min. Excessive mixing will increase the carbonate ion in the solution by trapping carbon dioxide from the air. After preparation, keep the eluent blanketed under helium at 34–55 kPa (5–8 psi) at all times. If maintained under helium, the eluent is viable for approximately one week. To prepare 2 L of 150 mM NaOH, dilute 15.6-mL 50% (w/w) sodium hydroxide using the same procedure described for the 100 mM eluent.

100 or 150 mM Sodium Hydroxide with 0.5 or 1.0 M Sodium Acetate

Measure approximately 800 mL of water into a 1-L graduated cylinder. Add a stir bar and begin stirring. Weigh out 41.0 g (0.5 M) or 82.0 g (1 M) of anhydrous crystalline sodium acetate. Steadily add the sodium acetate while briskly stirring the water. After the salt dissolves, remove the stir bar with a magnetic retriever and use a 10-mL graduated plastic pipet to add 5.2 mL (100 mM sodium hydroxide) or 7.8 mL (150 mM sodium hydroxide) 50% (w/w) sodium hydroxide to the sodium acetate solution. Add water to the solution to reach a final volume of 1 L, replace the stir bar, and stir briefly to mix. Vacuum filter this solution through a 0.2 μ M nylon filter. This step may proceed slowly if the filter clogs with insoluble impurities from the sodium acetate. After preparation, keep the eluent blanketed under helium at 34–55 kPa (5–8 psi) at all times. If maintained under helium, this eluent is viable for approximately one week.

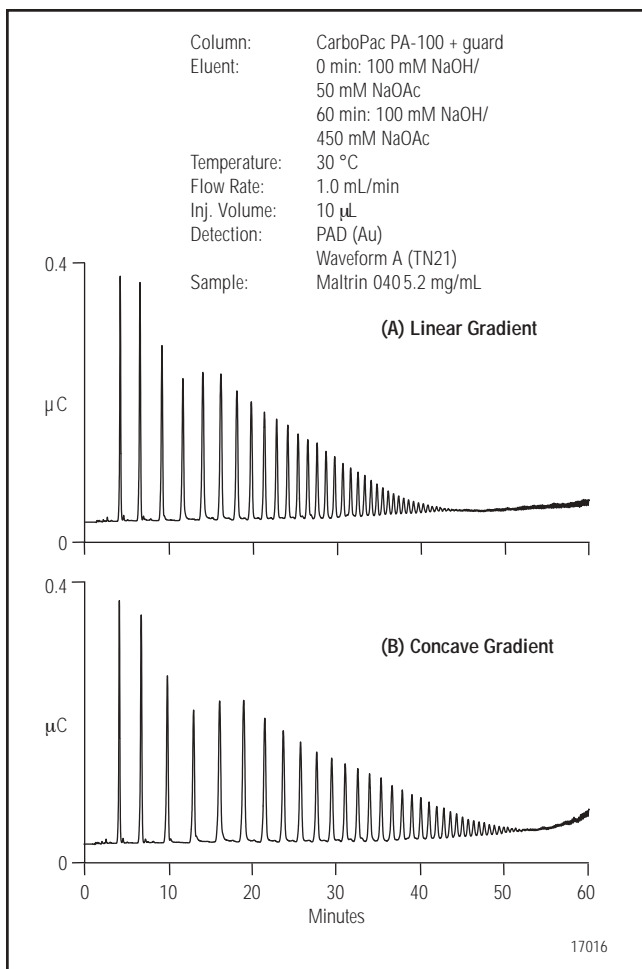


Figure 1. Comparison of a linear and curved gradient for a polysaccharide separation.

RESULTS AND DISCUSSION

Gradient Choice

Uncharged oligo- and polysaccharides with little or no branching are generally separated on either a CarboPac PA1 or PA-100 column set using a sodium acetate gradient in an eluent containing either 100 or 150 mM sodium hydroxide. The sodium hydroxide is present to ionize the saccharide hydroxyl groups to oxyanions so that the saccharide binds to the CarboPac column, a strong anion exchanger. The acetate ion is a stronger eluent than the hydroxide ion and is used to elute the

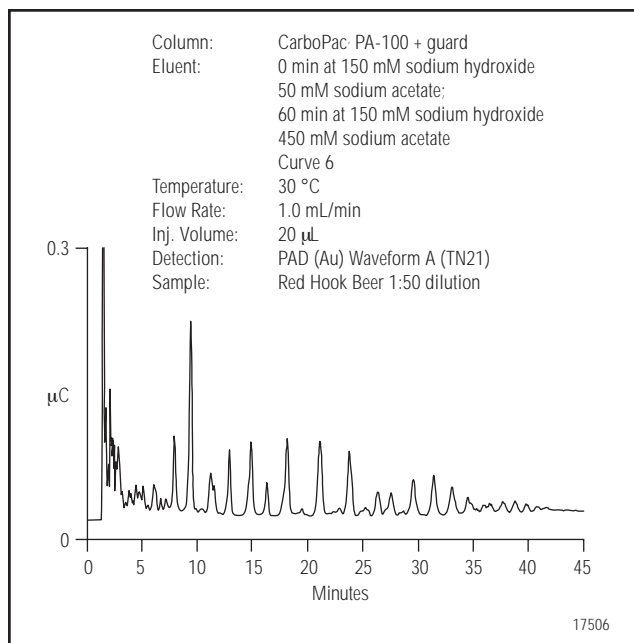


Figure 2. HPAE-PAD analysis of Red Hook amber beer.

bound saccharide. Figure 1, Panel A shows the separation of Maltrin M040 on a CarboPac PA-100 column using a gradient of 50 to 450 mM sodium acetate in 100 mM sodium hydroxide. Maltrin M040 is a maltodextrin sample prepared from cornstarch. Maltodextrins are nonsweet nutritive polymers of glucose. Maltodextrins can also be classified as amylopectins, glucose polymers in which the glucoses are joined by α 1,4 linkages with occasional branches of α 1,6 linked glucose. Changing the linear gradient (curve 5) in Figure 1, Panel A to a slightly concave gradient (curve 6), yields the separation in Figure 1, Panel B. Although no additional peaks are identified, the spacing between the later-eluting peaks is improved. This gradient may improve the reproducibility of integration and will make it easier to collect individual peaks for purification or additional analyses. We have found that a slightly concave gradient improves separations of carbohydrate polymers in which the later-eluting peaks are less resolved as the polymer gets larger. Figure 2 shows this method applied to the analysis of beer, which is known to contain amylopectins.

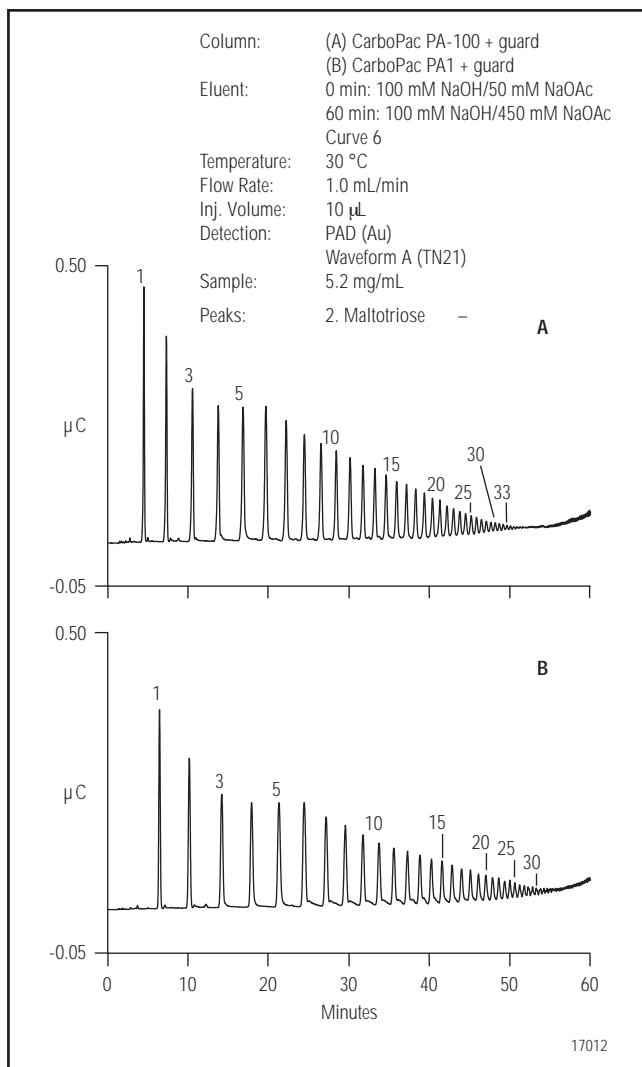


Figure 3. Comparison of the CarboPac PA1 and PA-100 columns for a polysaccharide separation.

Column Choice

Figure 3 compares the Maltrin M040 separation on a CarboPac PA-100 column set (Panel A) with the same separation on a CarboPac PA1 column set (Panel B). This figure highlights the resin differences between the CarboPac PA1 and PA-100 columns that lead to improved oligo- and polysaccharide separations on the PA-100. The PA-100 has a smaller latex particle size and increased latex cross-linking compared to the PA1.

Table 1. Comparison of Peak Efficiencies

Peak #	CarboPac PA-100	CarboPac PA1
4	17087	9378
8	39445	24417
12	66978	45667

These differences yield more efficient chromatography and 10% less column capacity (90 meq vs 100 meq). The improved efficiency is shown numerically by comparing the efficiency of peaks from both separations (Table 1). This improved efficiency leads to the identification (same detection parameters used for both chromatograms) of three more peaks on the PA-100 column. The shorter retention times in Panel A compared to Panel B demonstrate the lower capacity of the PA-100. This reduced capacity causes larger carbohydrate polymers to elute with less sodium acetate. A change in the sodium acetate gradient of 50 to 450 mM to a gradient of 80 to 480 mM, to account for the higher capacity of the PA1 column, did not identify a greater number of peaks (chromatogram not shown).

100 mM Sodium Hydroxide or 150 mM Sodium Hydroxide

In the many HPAE-PAD publications of oligo- and polysaccharide separations, the authors have used either 100 mM sodium hydroxide or 150 mM sodium hydroxide. We compared the Maltrin M040 separation with 100 mM sodium hydroxide (Figure 4, Panel A) with the same separation using 150 mM sodium hydroxide (Figure 4, Panel B). Although the concentration of eluent anions is greater at all points in the separation with the 150 mM sodium hydroxide eluent, only the first peak (not shown) elutes earlier in the 150 mM sodium hydroxide separation. We believe longer retention with the 150 mM sodium hydroxide eluent is due to the greater ionization of sample hydroxyl groups that leads to tighter binding to the CarboPac column.

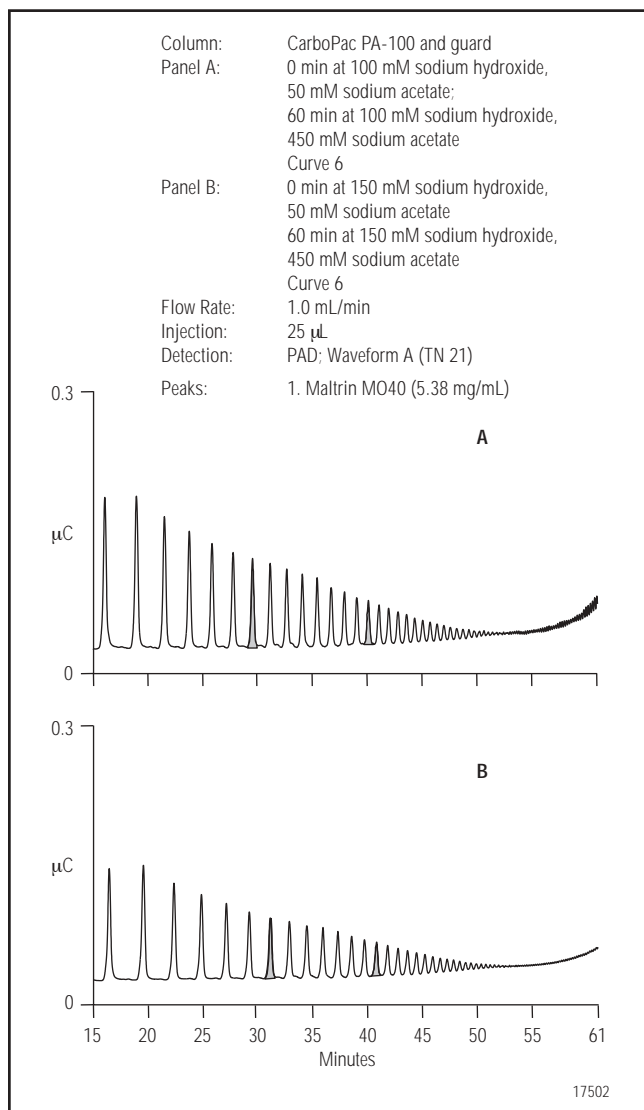


Figure 4. Maltodextrin separation with 100 mM and 150 mM NaOH.

This result has been previously observed for separations of branched mammalian oligosaccharides.¹⁷ The 150 mM sodium hydroxide eluent did not identify any more peaks in the Maltrin M040 sample compared to the 100 mM eluent. Using 150 mM rather than 100 mM, sodium hydroxide may be beneficial for the separation of some samples due to improved solubility of some larger carbohydrate polymers.

Inulin Analysis

We used what we learned developing amylopectin separation to develop inulin separations. Inulins are fructans that are linear β 2-1 linked polymers of fructose as large as DP60 with a terminal glucose. Figure 5 shows a comparison of inulin from chicory root

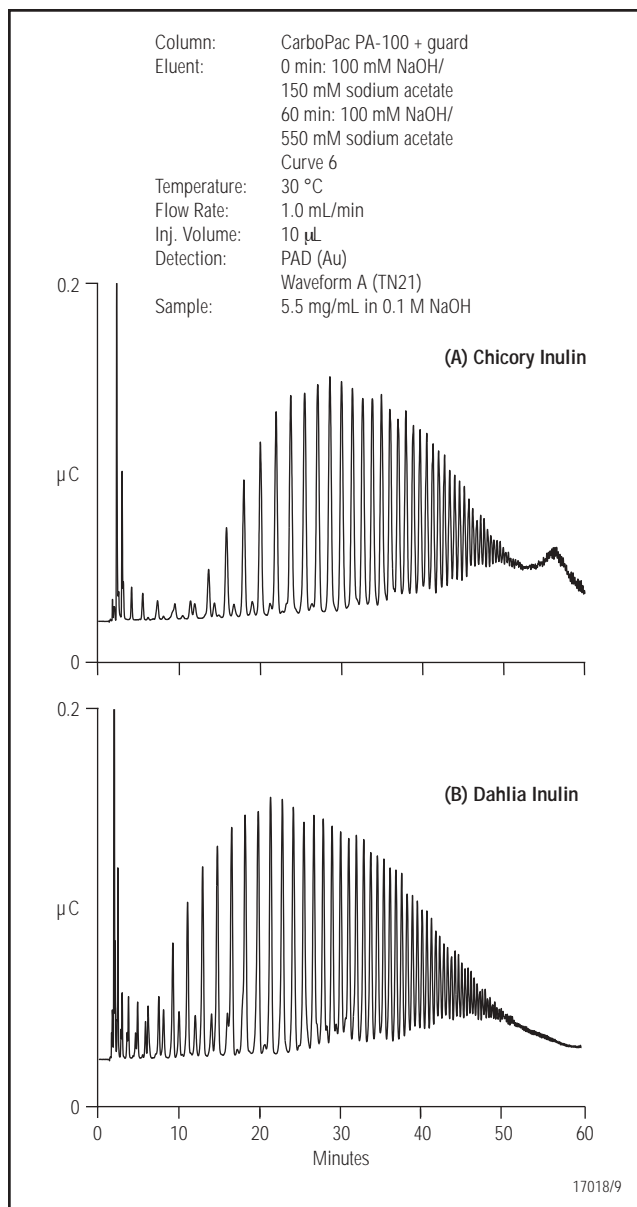


Figure 5. HPAE-PAD comparison of chicory and dahlia inulins.

(Panel A) and dahlia tuber (Panel B). The inulins are separated on a CarboPac PA-100 column using a 100 mM sodium hydroxide eluent and a curved gradient (Curve 6) of 150 to 550 mM sodium acetate. Figure 5 demonstrates the “fingerprinting” ability of the HPAE-PAD technique, as the inulins isolated from different sources have different polymer distributions. HPAE-PAD can also be used to compare different isolations or lots of an oligo- or polysaccharide isolated from the same source. Figure 6 shows a comparison of two lots of chicory root inulin purchased over ten years apart. Comparison of the peak areas (Table 2) reveals that the older lot has a greater percentage of larger polymers.

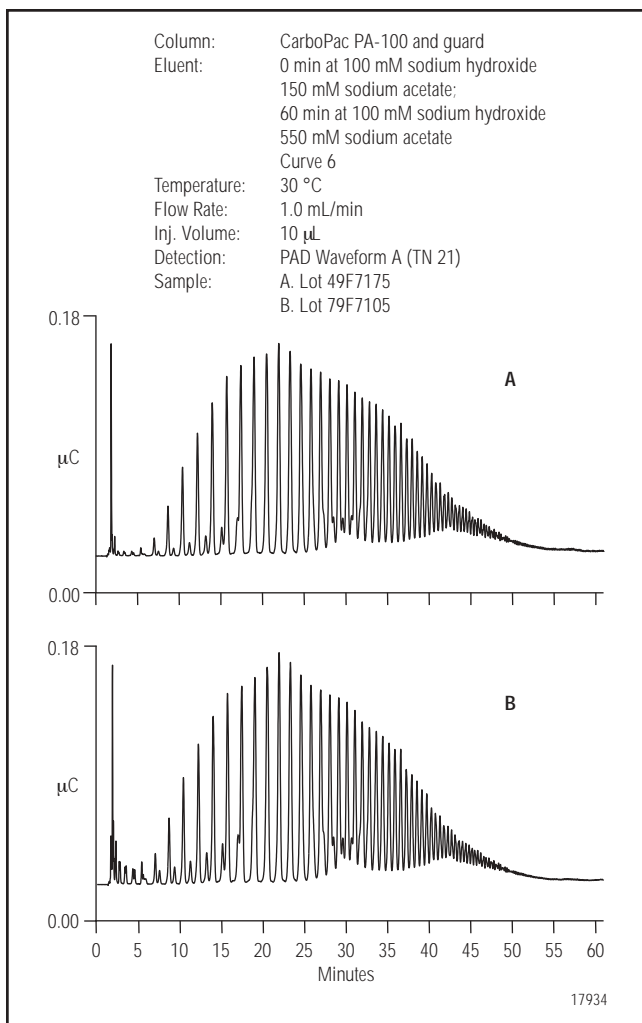


Figure 6. Comparison of two lots of chicory inulin.

Table 2. Comparison of Two Lots of Chicory Inulin

Peak Number	Peak Height Ratio (old lot/new lot)
3	0.76
6	0.89
10	0.97
12	0.93
14	0.92
18	0.96
23	0.99
27	1.00
31	1.08
35	1.13

DEVELOPING RUGGED ASSAYS OF OLIGO- AND POLYSACCHARIDES

To develop rugged HPAE-PAD assays of oligo- and polysaccharides, the analyst should optimize the column reequilibration, temperature, nature of the sample, amount of sample injected, choice of electrochemical waveform, and autosampler injection mode.

For good retention time reproducibility, the column must be equilibrated to the starting gradient conditions prior to each injection, and the reequilibration period should be tightly controlled. In all separations shown in this application note, the column set was reequilibrated at initial conditions for 15 min (15 mL), with the first minute used to return from the final gradient condition to the starting condition, prior to the next injection. We controlled the reequilibration time by setting the AS50 Autosampler cycle time to 15 min (flow rate was 1 mL/min) after the separation's final gradient time point. Controlling the column temperature by placing the column set in the AS50 Autosampler Thermal Compartment (TC) also increases retention time reproducibility.

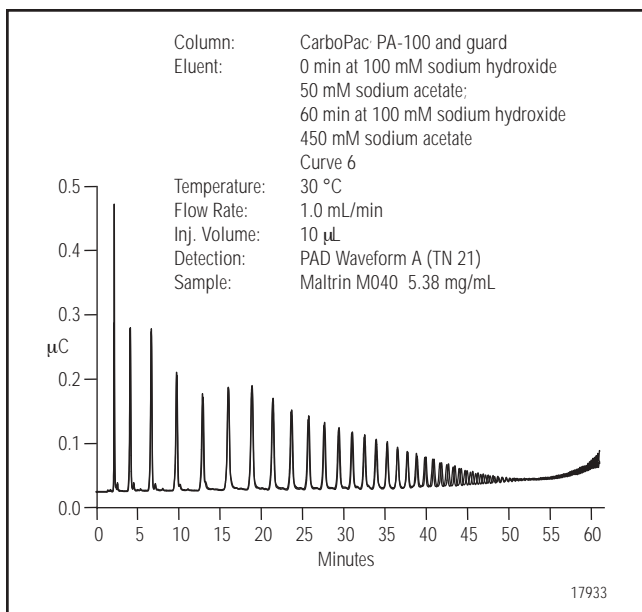


Figure 7. Comparison of maltodextrin separations 1 and 32.

The nature of the sample(s) must also be considered. Many oligo- and polysaccharide samples are prepared by the acid or enzymatic hydrolysis of a larger polymer. For example, amylose and amylopectins are prepared by hydrolyzing starch. Samples prepared in this manner can still contain small amounts of very high-molecular-weight material that will not elute from the column during a method designed to elute all the major peaks. After multiple injections, the loss of column capacity due to these large polymers will cause the retention times of later-eluting peaks to shorten. To demonstrate this retention time loss, we made 32 consecutive separations of Maltrin M040 using the method in Figure 1A. Figure 7 compares the first injection to the last injection. The retention times are the same for the first 18 peaks, but are shorter for all the later-eluting peaks in the 32nd injection. Figure 8 shows that this effect is a result of tightly bound sample that is not eluted by the separation method. The lower chromatogram is a blank injection (10 μ L water) made prior to the 32 Maltrin M040 injections, and the upper chromatogram is a blank injection made immediately after the 32 Maltrin M040 injections. The separation method used for this comparison was the same as that used for the 32 Maltrin M040 injections, except that the column was washed for 10 min with 100 mM sodium

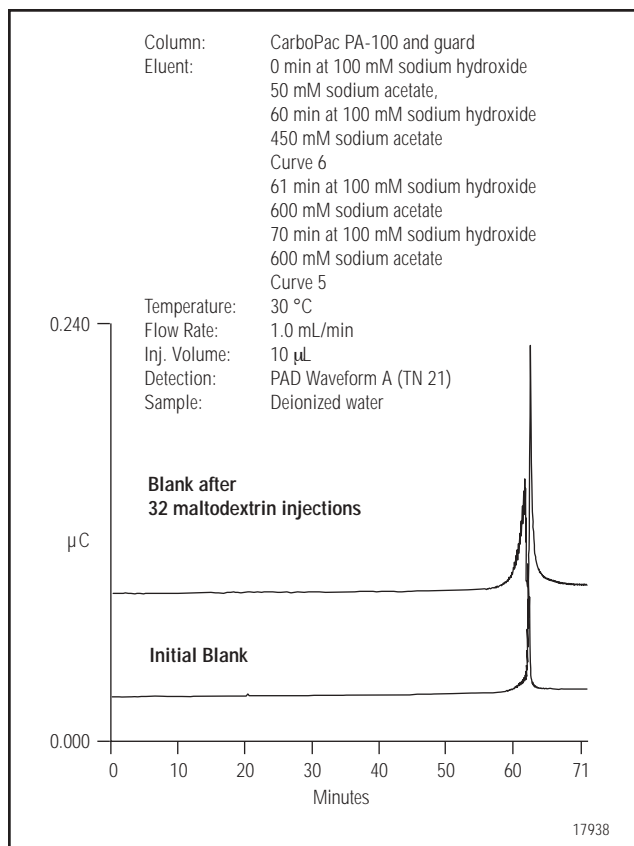


Figure 8. Blank injections (with wash) before and after 32 maltodextrin separations.

hydroxide 1 M sodium acetate after the final gradient point. This comparison shows that there were sample components that did not elute from the column during the 32 injections. Although we could eliminate this problem by washing the column after each injection, extra analysis time would be required. The amount of time between column cleanings can be determined based on which peaks one is interested in measuring (i.e., if one wished to quantify any or all of the first 18 peaks of this separation, a column cleaning would only be needed every 32 injections). If, in this separation, only the first 20 peaks are of interest, the injection amount could be reduced, which would further increase the times between column cleanings. To determine if the CarboPac column needs to be cleaned, inject a known sample, such as the chicory root inulin shown in Figure 5, Panel A. A standard of chicory root inulin aliquoted into a number of small vials and stored in a freezer could be used as a system suitability standard to judge retention, response, and overall performance of the chromatography system.

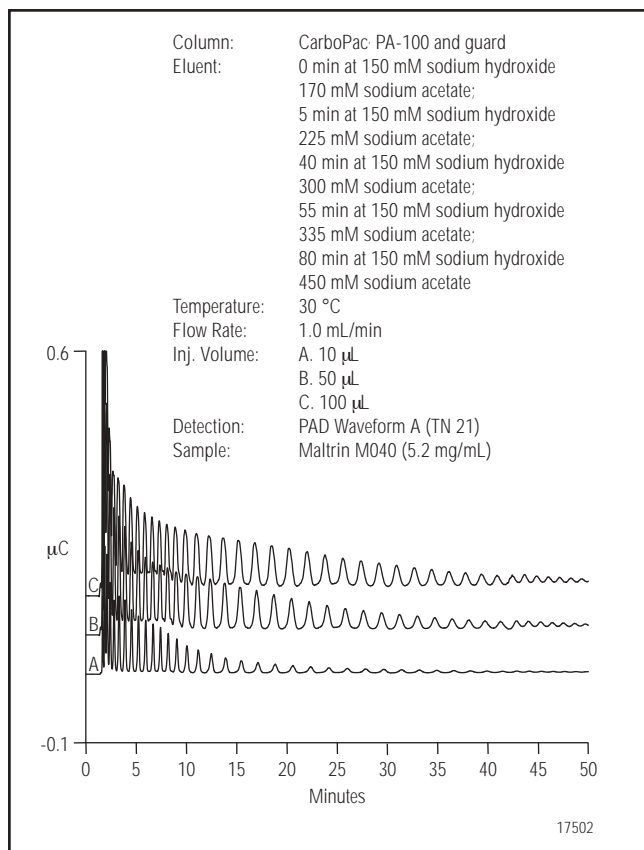


Figure 9. Effect of sample overload on oligosaccharide chromatography.

Another possible cause of reduced retention times, especially for later-eluting peaks, is an injection of too much sample. Figure 9 shows the effect of injecting increasing amounts of Maltrin M040 on the CarboPac PA-100 column set. Note the flattened peak shapes and reduced retention times of the later-eluting peaks. Sometimes, sample is intentionally overloaded to collect larger amounts of a given peak or peaks for a separate analysis. Alternatively, the CarboPac PA-100 is available in a 9 × 250 mm format or custom packed in a 22 × 250 mm column body. When collecting fractions from a 4 × 250 mm CarboPac column, the Carbohydrate Membrane Desalter (CMD) can be used to convert the sodium hydroxide and sodium acetate eluent into dilute acetic acid that can be removed by vacuum drying.¹⁸ The CMD can remove up to 350 mM Na⁺ at 1.0 mL/min. Fractions collected from larger CarboPac columns can be neutralized with acetic acid and dialyzed against water using 1000-dalton mw-cutoff dialysis tubing.

To obtain the best reproducibility of electrochemical response, use Waveform A¹⁶ (the same as used here), control the temperature of the electrochemical cell, use a properly functioning autosampler, and choose an autosampler injection mode that balances the reproducibility desired with the amount of sample you wish to expend (the best reproducibility requires using more sample). Waveform A provides better long-term reproducibility than the previously recommended waveforms¹⁶ with sodium acetate-containing eluents.¹⁹ To control temperature, the electrochemical cell can be installed inside the AS50 TC, along with the column set.

The precision and accuracy of AS50 injections, and therefore peak area reproducibility, depends on the mode of injection. The most accurate and precise injections are made in full-loop injection mode using a calibrated sample loop. In this mode, the AS50 draws four times the loop volume from the sample vial and delivers it to the injection valve. The middle portion of the sample is positioned in the loop and injected. For loop sizes less than 17 μ L, 2.5 times the loop volume plus 25 μ L is delivered to the valve. Peak area precision for full-loop injections of 25 μ L is typically 0.3% RSD. To conserve sample, use either the partial-loop or the partial-loop, limited-sample (Partial LS) injection mode. In the partial-loop mode, the AS50 draws the volume to be injected from the sample vial, plus two times the cut segment volume. (The cut segment volume is a portion of the sample discarded from each end of the aspirated sample to improve accuracy.) The middle portion of the sample is positioned in the loop and injected. For best precision and accuracy when using one of the partial-loop injection modes, install a sample loop that is at least two times the injected volume. Peak area precision for partial-loop injections of 10 μ L is typically 1% RSD. A 10- μ L partial-loop injection with a cut volume of 10 μ L uses 30 μ L of sample. The AS50 in Partial LS mode wastes no sample and usually provides precision of 1–2% RSD. See the AS50 reference manual for a complete discussion of the different injection modes.

Table 3. Electrochemical Response of Amylose Oligosaccharides

DP	# HCOH	Relative Response ^a	Relative Response ^b	Relative Response per HCOH ^b	Relative Response per HCOH ^a	Response per μmole^c	Response per μg^c
2	8	1.00	–	–	1.00	17.8	51.9
3	11	1.39	–	–	1.01	22.3	44.2
4	14	1.72	–	–	0.98	29.0	43.6
5	17	2.06	–	–	0.97	29.8	35.9
6	20	2.33	0.74	1.08	0.93	34.5	34.8
7	23	2.59	0.82	1.03	0.90	35.7	31.0
8	26	–	0.89	0.99	–	–	–
9	29	–	1.00	1.00	–	–	–
10	32	–	1.10	1.00	–	–	–
11	35	–	1.20	1.00	–	–	–
12*	38	–	1.31	1.00	–	38.8	20.6
13*	41	–	1.38	0.99	–	40.0	19.6
14*	44	–	1.46	0.97	–	50.9	21.5
15	47	–	1.55	0.96	–	–	–
16*	50	–	1.59	0.92	–	46.0	18.8
17*	53	–	1.65	0.90	–	52.2	18.3
18–19	–	–	–	–	–	44.6	14.8
19–21	–	–	–	–	–	44.3	13.6
20–22	–	–	–	–	–	54.4	15.9

a Koizumi, K. et al., *Journal of Chromatography*. 1989, 464: 365–373.

b Koizumi, K. et al., *Journal of Chromatography*. 1991, 585: 233–238.

c Ammeraal, R. N. et al., *Carbo. Res.* 1991, 215: 179–192.

* For ref. c, 11–12, 12–13, 14–15, 14–16, and 17–18, respectively

ELECTROCHEMICAL RESPONSE OF OLIGO- AND POLYSACCHARIDES

Although not investigated in this application note, a few publications have studied the relative electrochemical responses of oligo- and polysaccharides.^{3,5,20,21} These publications investigated the change in electrochemical response as amylose and amylopectin DP increased. Koizumi et al.^{3,5} showed that response increased with DP. This change could be normalized to an increase per hydroxyl group (Table 3). Consistent with those observations, Ammeraal, et al.²⁰ showed that as DP increased, there was a linear increase in response per micromole injected, and the response per microgram injected decreased. A more recent publication confirmed these observations.²¹

OTHER CONSIDERATIONS

For analysts who wish to consume less eluent and produce less waste per injection, the CarboPac columns are available in 2 × 250 mm formats. The use of sodium nitrate in place of sodium acetate has been reported for amylopectin separations.²² The authors reported that nitrate, a stronger eluent than acetate, affected better separations between linear and branched, and was able to distinguish a higher DP for amylopectin (DP58 for acetate and DP66 for nitrate). Dionex has not evaluated the long-term effects of using sodium nitrate eluents for HPAE-PAD.

PRECAUTIONS AND RECOMMENDATIONS

For best results, the Ag/AgCl reference electrode should be replaced every three to six months.

APPENDIX

Because it is not entirely accurate to compare two gradient separations by using theoretical plates (efficiencies), in this appendix we use the peak capacity method reported by Giddings to compare the maltodextrin separations on the CarboPac PA1 and PA-100 columns.²³

To calculate the peak capacity of a gradient separation, the following formula is used:

$$\text{Peak Capacity} = 1.5 \times \text{Run Time} \times (1/\text{Average Peak Width})$$

The 1.5 is the resolution factor for baseline resolution. Using this formula, we calculated a value of 191 for the PA1 and 209 for the PA-100. This 10% increase matches that seen for the number of peaks identified using the same integration parameters in the software (30 peaks for PA1 and 33 for the PA-100).

REFERENCES

1. Rocklin, R. D.; Pohl, C. A. *J. Liq. Chromatogr.* **1983**, *6*, 1577-1590.
2. Lee, Y. C. *J. Chromatogr. A* **1996**, *720*, 137-149.
3. Koizumi, K.; Kubota, Y.; Tanimoto, T.; Okada, Y. *J. of Chromatogr.* **1989**, *464*, 365-373.
4. Hanashiro, I.; Abe, J.; Hizukuri, S. *Carbo. Res.* **1996**, *283*, 151-159.
5. Koizumi, K.; Fukuda, M.; and Hizukuri, S. *J. of Chromatogr.* **1991**, *585*, 233-238.
6. Dionex Corporation. Application Note 82; Sunnyvale, CA.
7. Swallow, K.W.; Low, N.H. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 828-832.
8. van der Hoeven, R. A. M.; Niessen, W. M. A.; Schols, H. A.; Bruggink, C.; Voragen, A. G. J.; van der Greef, J. *J. Chromatogr.* **1992**, *627*, 63-73.
9. Campbell, J. M.; Bauer, L.L.; Fahey, G.C., Jr.; Hogarth, A. J. C. L.; Wolf, B.W.; Hunter, D. E. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3076-3082.
10. Chatterton, N. J.; Harrison, P. A. *New Phytol.* **1997**, *136*, 3-10.
11. Schols, H. A.; Lucas-Lokhorst, G.; Voragen, A. G. J.; Niessen, W. M. A. *Carbohydrates in the Netherlands* **1993**, *9*, 11-13.
12. Verbruggen, M. A.; Spronk, B. A.; Schols, H. A.; Beldman, G.; Voragen, A. G. J.; Thomas, J. R.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F. G. *Carbo. Res.* **1998**, *306*, 265-274.
13. Torto, N.; Buttler, T.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; Stalbrand, H.; Tjerneld, F. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *313*, 15-24.
14. Mou, S.; Sun, Q.; Lu, D. *J. Chromatogr.* **1991**, *546*, 289-295.
15. McDougall, G. J.; Fry, S. C. *Carbo. Res.* **1991**, *219*, 123-132.
16. Dionex Corporation. Technical Note 21; Sunnyvale, CA.
17. Cooper, G. A.; Rohrer, J. S. *Anal. Biochem.* **1995**, *226*, 182-184.
18. Thayer, J.; Rohrer, J. S.; Avdalovic, N.; Gearing, R. P. *Anal. Biochem.* **1998**, *256*, 207-216.
19. Rocklin, R. D.; Clarke, A. P.; Weitzhandler, M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1496-1501.
20. Ammeraal, R. N.; Delgado, G. A.; Tenbarger, F. L.; Friedman, R. B. *Carbo. Res.* **1991**, *215*, 179-192.
21. Koch, K.; Andersson, R.; Aman, P. *J. of Chromatogr. A* **1998**, *800*, 199-206.
22. Wong, K. S.; Jane, J. *J. Liq. Chromatogr.* **1995**, *18*, 63-80.
23. Giddings, J. C. *United Separation Science*; John Wiley and Sons: New York, 1991, p 105.

LIST OF SUPPLIERS

- Fisher Scientific, 2000 Park Lane, Pittsburgh, Pennsylvania, 15275-1126 USA, 1-800-766-7000, www.fishersci.com.
- Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178 USA, 1-800-325-3010, www.sigma-aldrich.com.
- Fluka Chemika-BioChemika, Fluka Chemie AG, Industriestrasse 25, CH-9471, Buchs, Switzerland, +81 755 25 11.
- Gelman Sciences, 600 S. Wagner Road, Ann Arbor, MI, 48106-1448 USA, 1-800-521-1520, www.pall.com/gelman/



Maltrin is a registered trademark of the Grain Processing Corporation.
 BioLC and Chromeleon are registered trademarks, and
 CarboPac is trademark of the Dionex Corporation.

Printed on recycled and recyclable paper.

Dionex Corporation
 1228 Titan Way
 P.O. Box 3603
 Sunnyvale, CA
 94088-3603
 (408) 737-0700

Dionex Corporation
 Salt Lake City Technical Center
 1515 West 2200 South, Suite A
 Salt Lake City, UT
 84119-1484
 (801) 972-9292

Dionex U.S. Regional Offices
 Sunnyvale, CA (408) 737-8522
 Westmont, IL (630) 789-3660
 Houston, TX (281) 847-5652
 Atlanta, GA (770) 432-8100
 Marlton, NJ (856) 596-06009

Dionex International Subsidiaries
 Austria (01) 616 51 25 Belgium (03) 353 42 94 Canada (905) 844-9650 China (852) 2428 3282 Denmark 36 36 90 90
 France 01 39 30 01 10 Germany 06126-991-0 Italy (06) 66 51 50 52 Japan (06) 6885-1213 The Netherlands (0161) 43 43 03
 Switzerland (062) 205 99 66 United Kingdom (01276) 691722
 * Designed, developed, and manufactured under an NSAI registered ISO 9001 Quality System.

