

离子色谱分离保留因子计算定性分析低聚壳寡糖的研究*

陈梅兰, 林智威, 卢珩俊, 邵波

(浙江树人大学生物与环境工程学院, 杭州 310015)

摘要 目的: 建立阴离子交换色谱分离, 并用保留因子计算法定性分析低聚壳寡糖。方法: 首先利用高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培检测法(HPAEC-IPAD)对5种壳寡糖(聚合度 DP=2~6)标准样品进行分离; 分离条件: 采用 DIONEX CarboPac® PA10(4.0 mm×50 mm)保护柱和 DIONEX CarboPac® PA10(4.0 mm×250 mm)分析柱, 淋洗液采用氢氧化钠溶液, 积分脉冲安培法检测。然后用建立的分离方法对壳寡糖样品进行分离并定性。再根据所得样品色谱峰的保留时间分别计算保留因子, 建立壳寡糖聚合度(DP)与其保留因子(k')的相关关系, 根据建立的相关关系对未知的壳寡糖进行定性, 并用质谱方法对未知壳寡糖样品进行验证。结果: 壳寡糖聚合度的对数值与其保留因子的对数值具有线性关系, 回归系数 $R^2 \geq 0.9987$, 利用建立的线性回归方程对样品中的4种未知壳寡糖样品的定性结果为壳七糖、壳八糖、壳九糖和壳十糖, 误差 $\leq 5.66\%$ 。质谱方法对未知壳寡糖样品进行了验证, 验证结果为样品中存在壳二糖、壳三糖、壳四糖、壳五糖、壳六糖、壳七糖和壳八糖。结论: 对于壳寡糖样品, 利用离子色谱分离, 保留因子计算来定性壳寡糖聚合度的方法是可行的。

关键词: 低聚壳寡糖; 壳聚糖; 壳二糖; 壳三糖; 壳四糖; 壳五糖; 壳六糖; 聚合度; 保留因子; 离子色谱(IC); 积分脉冲安培

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)01-0043-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.01.06

Application of ion chromatography separation and retention factor calculation in the qualitative analysis of chitosan oligosaccharide of low degree of polymerization*

CHEN Mei-lan, LIN Zhi-wei, LU Heng-jun, SHAO Bo

(College of Biology and Environmental Engineering, Zhejiang Shuren University, Hangzhou 310015, China)

Abstract Objective: To develop a method for qualitative analysis of chitosan oligosaccharides using an anion exchange chromatography and retention factor calculation. **Methods:** Five kinds of chitosan oligosaccharides [degree of polymerization (DP)=2-6] were separated by high performance anion exchange chromatography with integrated pulsed ampere detection (HPAEC-IPAD). A DIONEX CarboPac® PA10 guard column (4.0 mm×50 mm) and a DIONEX CarboPac® PA10 (4.0 mm×250 mm) separation column were used for the chitosan

* 浙江省自然科学基金(编号: Z14B070001); 浙江省分析测试基金(编号: 2015C37039)

第一作者 Tel: (0571) 88297023; E-mail: rain-lake@163.com

oligosaccharides separation. The mobile phase was sodium hydroxide. An integrated pulsed ampere detection was utilized for detection. Then, the chitooligosaccharide samples were separated and characterized by the established separation method. The retention factors of sample were calculated in accordance with their retention time and linear correlation between the DP of chitosan oligosaccharides and retention factors. Finally, unknown chitosan oligosaccharides were qualitatively determined according to the above relationship. **Results:** There was a good linear correlation ($R^2 \geq 0.9987$) between $\log k'$ (retention factor) value of chitosan oligosaccharide and corresponding $\log DP$ value. The DP of the unknown chitosan oligosaccharides in the sample were calculated and 4 chitosan oligosaccharides (chitoheptaose, chitooctaose, chitononaose, chitodecaose) were qualitatively determined by established linear equation. The error was below 5.66%. Result of mass spectrometry test also showed 8 chitosan oligosaccharides (DP=2-8) existed in the real sample. **Conclusion:** The established method can be used as a qualitative method for chitosan oligosaccharide homogeneous when there is a lack of reference substance.

Keywords: chitosan oligosaccharide; chitosan; chitobiose; chitotriose; chitotetraose; chitopentaose; chitohexaose; degree of polymerization; retention factor; ion chromatography (IC); integrated pulse ampere

壳寡糖是以壳聚糖为原料,经酶法降解成具有一定聚合度和一定结构的系列低聚合度寡糖。壳聚糖具有广泛的生物学作用,特别是具有提高机体免疫功能,抗肿瘤,抗感染等作用^[1-3],有文献报道抗肿瘤效果最好的是低聚合度寡糖,特别是壳寡糖^[4-5]。目前壳寡糖产品质量控制的关键是聚合度分析,从而获得高活性壳寡糖^[6]。壳寡糖的分析有采用薄层色谱法,但该方法准确度不好;还有高效液相色谱法^[7]、毛细管电泳法^[8-9]、分光光度法^[10]及费时的衍生荧光法。离子色谱积分脉冲安培检测法是报道的检测糖类最好的方法^[11],但此方法需要使用标准物质进行验证,壳寡糖的标准物质不但价格昂贵,且供应商极少因而较难购全,这给壳寡糖的聚合度的验证带来很大的困难。

根据气相色谱保留值规律可知,同系物的调整保留时间或保留因子(k')的对数与碳数的 n 值存在线性关系,即 $\ln k' = A_1 n + B_1$,式中 A_1 为碳数规律常数, $A_1 = \ln \left(\frac{k'_{n+2}}{k'_n} \right)$,许多化合物如烷、烯、醛、酮、醇、酯、硝基化合物,脂肪胺、吡啶同系物、芳烃等均符合这一规律^[12-13]。已知柱子的 A_1 值,可以对符合碳数规律的化合物进行定性。然而,气相色谱仅适用于分析蒸汽压低,沸点低的样品,而不适用于分析高沸点有机物、高分子和热稳定性差的化合物,以及生物活性物质,壳寡糖样品不适用于气相色谱分析。气相色谱中保留因子碳数增量规律是建立在同位数每增量1个碳数的基础上,基于这个原理,直链低聚合度寡糖由糖单

体缩合而成的寡糖,把糖单体看成一个增量,则寡糖的保留因子与它的聚合度也符合聚合度增量规律,这一规律在文献^[14-15]中也有提及,但没有进一步的验证。

文章建立壳寡糖的保留因子与聚合度的关系,利用该相关关系对未知的壳寡糖进行定性,并用质谱进行验证,结论是可靠的。可克服目前壳寡糖利用薄层色谱法、高效液相色谱法、气相色谱法等需要使用标准物质进行验证的困难。也可利用该保留因子规律进行定性并指导实际生产,是非常有意义的工作。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 戴安 ICS5000 离子色谱仪,配电化学检测器;分析柱系统: DIONEX CarboPac® PA10 (4.0 mm × 250 mm),其填料为苯乙烯与二乙烯基苯单体共聚而合成的高分子聚合物骨架团聚季胺盐离子;保护柱: DIONEX CarboPac® PA10 (4.0 mm × 50 mm),填料与分析柱相同。氢氧化钠、无水乙酸钠(纯度 > 99%)为优级纯,壳二糖、壳三糖、壳四糖、壳五糖、壳六糖标准物质(大连中科格莱克生物科技有限公司,含量 90%~98% 不等)。实验用水为超纯水由 Milli-Q 纯水仪纯化(电阻率 18.2 MΩ · cm)。壳寡糖试样,浙江省金壳生物科技有限公司提供。

1.2 溶液制备 分别称取壳二糖、壳三糖、壳四糖、壳五糖、壳六糖的标准物质各 10.00 mg,用超纯水分别溶解于 10 mL 量瓶中定容,配成质量浓度为 1.00 g · L⁻¹ 的标准储备液;将储备液分别用超纯水稀释至 10 mg · L⁻¹,即得壳寡糖标准混合液;称取壳寡糖样品 1.0 g,用超纯水溶解后定容至 10 mL,用 0.45 μm 水性

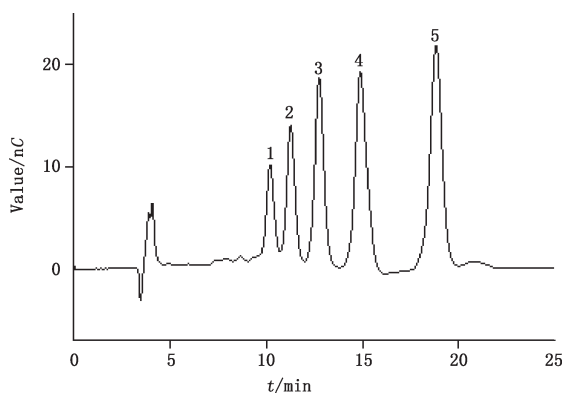
滤膜过滤,滤液作为储备液备用,使用时用超纯水稀释至 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 色谱条件 色谱柱系统: DIONEX CarboPac® PA10 保护柱 ($4.0 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$) + DIONEX CarboPac® PA10 分析柱 ($4.0 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$)。淋洗液 1: $32.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 - 超纯水 (30:70), 等度洗脱; 淋洗液 2: $32.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 - 超纯水 (20:80), 等度洗脱; 淋洗液 3: $32.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 - 超纯水 (40:60), 等度洗脱。流速: $0.40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 色谱柱温度: $35 \text{ }^\circ\text{C}$; 检测池温度 $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样量 $25 \text{ } \mu\text{L}$; ED40A 电化学检测器配 Au 工作电极及 Ag-AgCl 参比电极, 积分脉冲安培法检测。

2 实验结果与讨论

2.1 壳寡糖的分离和保留因子的计算 直链壳寡糖是一类均一性寡糖, 一般由 2~10 个氨基葡萄糖单体通过 1,4-糖苷键缩合而成, 离子色谱的检测中发现, 壳寡糖洗脱规律与一般寡糖不一致。一般寡糖在离子色谱上的洗脱规律大多是从低聚糖到高聚糖, 但壳寡糖由于氨基的存在, 从而使它从高聚糖到低聚糖进行洗脱^[9]。

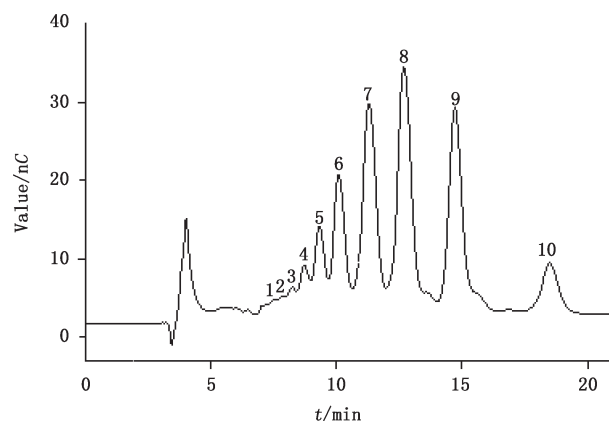
分别取各壳寡糖质量浓度均为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准混合液及质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的壳寡糖样品溶液, 进样分析, 用淋洗液 1 进行淋洗, 得到如图 1 及图 2 的色谱图。其中, 图 1 所示 1~5 号峰分别为壳六糖、壳五糖、壳四糖、壳三糖和壳二糖标准物质所对应的色谱峰; 图 2 所示 6~10 号峰已使用标准物质进行定性确证, 分别为壳六糖、壳五糖、壳四糖、壳三糖和壳二糖。计算保留指数时以图 2 数据为基准计算各相关参数, 图 2 中 6~10 号峰的相关参数见表 1。



1. 壳六糖 (chitohexaose) 2. 壳五糖 (chitopentaose) 3. 壳四糖 (chitotetraose)
4. 壳三糖 (chitotriose) 5. 壳二糖 (chitobiose)

图 1 用淋洗液 1 淋洗的 5 种壳寡糖标准物质色谱图

Fig. 1 Chromatogram of 5 kinds of chitosan oligosaccharide standard solution using elution 1



1. 未知峰 (unknown peak) 2. 未知峰 (unknown peak) 3. 未知峰 (unknown peak)
4. 未知峰 (unknown peak) 5. 未知峰 (unknown peak) 6. 壳六糖 (chitohexaose)
7. 壳五糖 (chitopentaose) 8. 壳四糖 (chitotetraose) 9. 壳三糖 (chitotriose)
10. 壳二糖 (chitobiose)

图 2 用淋洗液 1 淋洗的壳寡糖样品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of chitosan oligosaccharide sample using elution 1

2.2 聚合度与保留因子相关关系及未知峰聚合度的计算 通过对壳寡糖聚合度 DP 与保留因子 k' 相关关系进行回归, 发现聚合度与保留因子对数 $\log k'$ 具有指数相关关系, 根据此关系对壳寡糖产品的未知峰组成进行判断, 再根据回归方程计算出壳寡糖聚合度。为了使壳寡糖定性公式推导过程的简单明了, 公式推导过程采用线性方程计算, 即分别由壳寡糖聚合度的对数值 ($\log \text{DP}$) 与对应壳寡糖的 $\log k'$ 建立回归方程进行推导计算。计算过程如表 2, 先由表 1 的数据建立由聚合度为 2~6 的壳寡糖样品 (图 2 中 6~10 号峰) 的 $\log \text{DP}$ 与 $\log k'$ 相关关系, 再将图 2 中 5 号未知峰 (经推算为壳七糖) 的 $\log k'$ 值数据代入上述方程, 计算其“ $\log \text{DP}$ ”值, 并由此“ $\log \text{DP}$ ”值计算其“DP”值及误差值。完成对该未知峰的定性后, 再以该未知峰为最低聚合度, 顺序向下再取 5 个聚合度的壳寡糖数据 (本例中为 5~9 聚合度) 建立新的回归方程, 按以上方法对下一个未知峰 (本例为图 2 中 4 号未知峰) 进行定性计算, 直至完成所有未知峰的定性, 这样可减少定性的误差。

2.3 改变淋洗条件对保留因子规律的影响 改用淋洗液 2 对壳寡糖标准混合液及壳寡糖样品液进行等度洗脱, 由于淋洗液中氢氧化钠浓度降低, 样品分离出 9 个峰, 图谱见图 3。分离后的各项参数见表 3 和表 4。从表 3 和表 4 可知, 改变淋洗条件对规律没有影响。

表 1 淋洗液 1 淋洗后计算的壳寡糖样品聚合度 (DP) 与保留因子 (k') 数据

Tab. 1 Data calculation of degree of polymerization (DP) and retention factor (k') for chitosan oligosaccharide sample using elution 1

峰号 (peak number)	分析物 (analyte)	DP	log DP	t_m	t_R	t'_R	k'	$\log k'$
10	壳六糖 (chitohexaose)	6	0.778	3.45	10.284	6.834	1.981	0.297
9	壳五糖 (chitopentaose)	5	0.699	3.45	11.300	7.850	2.275	0.357
8	壳四糖 (chitotetraose)	4	0.602	3.45	12.701	9.250	2.681	0.428
7	壳三糖 (chitotriose)	3	0.477	3.45	14.717	11.267	3.266	0.514
6	壳二糖 (chitobiose)	2	0.301	3.45	18.484	15.034	4.358	0.639
5	未知物 (unknown compound)			3.45	9.517	6.067	1.759	0.245
4	未知物 (unknown compound)			3.45	8.917	5.467	1.585	0.200
3	未知物 (unknown compound)			3.45	8.434	4.984	1.445	0.160
2	未知物 (unknown compound)			3.45	8.067	4.617	1.338	0.127
1	未知物 (unknown compound)			3.45	7.7840	4.334	1.256	0.099

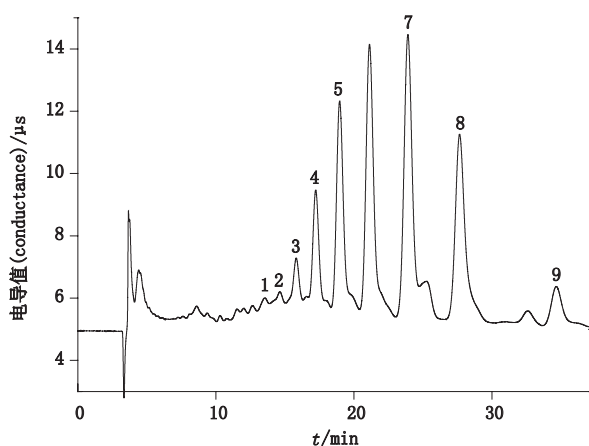
注 (note): t_m 为死时间 (以水负峰出峰时间), t_R 为各壳寡糖的保留时间, t'_R 为各壳寡糖的调整保留时间, $k' = t'_R / t_m$ (t_m was death retention time, t_R was retention time of each chitosan oligosaccharide, t'_R was adjusted retention time of each chitosan oligosaccharide, $k' = t'_R / t_m$)

表 2 用淋洗液 1 淋洗计算的壳寡糖样品聚合度 (DP) 与误差

Tab. 2 Calculation of degree of polymerization (DP) and deviation for chitosan oligosaccharide sample with elution 1

聚合度 (DP)	线性方程 (linear equation)	R^2	未知峰的 $\log k'$ 值 ($\log k'$ value of unknown peaks)	log DP	“DP”	DP	$\Delta / \%$
5~9	$\log k' = -0.6211 \log DP + 1.1034$	0.9992	0.565	0.867	7.3621	7	5.1724
4~8	$\log k' = -0.6159 \log DP + 1.1013$	0.9998	0.520	0.944	8.7902	9	-2.3308
3~7	$\log k' = -0.6164 \log DP + 1.1013$	0.9998	0.477	1.013	10.3039	10	3.0386
2~6	$\log k' = -0.6152 \log DP + 1.0998$	1.0000	0.429	1.090	12.3027	12	2.5224

注 (note): $\Delta = (\text{“DP”} - \text{DP}) / \text{DP} \times 100\%$; “DP”: 根据线性方程计算 (calculated according to the linear equation)



- 1. 未知峰 (unknown peak) 2. 未知峰 (unknown peak) 3. 未知峰 (unknown peak)
- 4. 未知峰 (unknown peak) 5. 壳六糖 (chitohexaose) 6. 壳五糖 (chitopentaose)
- 7. 壳四糖 (chitotetraose) 8. 壳三糖 (chitotriose) 9. 壳二糖 (chitobiose)

图 3 用淋洗液 2 淋洗的壳寡糖样品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of chitosan oligosaccharide sample using elution 2

改用淋洗液 3 对壳寡糖标准混合液及壳寡糖样品液进行等度洗脱, 由于淋洗液中氢氧化钠浓度增加, 样品分离出 9 个峰, 图谱见图 4。分离后的各项参数见表 5 和表 6。从表 5 和表 6 可知, 改变淋洗条件对规律没有影响。

2.4 改变柱温对保留因子规律的影响 将色谱柱温度改为 30 ℃, 用淋洗液 1 淋洗, 流速 0.4 mL · min⁻¹, 对壳寡糖标准混合液及壳寡糖样品液进行等度洗脱, 分离后的各项参数见表 7 和表 8。从表 7 和表 8 可知, 改变柱温对规律没有影响。

2.5 改变流速对保留因子规律的影响 淋洗液 1, 柱温为 35 ℃, 将流速改为 0.6 mL · min⁻¹ 对壳寡糖标准混合液及壳寡糖样品溶液进行等度洗脱, 分离后的各项参数见表 9 和表 10, 改变流速对规律也没有影响。

表 3 用淋洗液 2 淋洗计算的壳寡糖样品聚合度 (DP) 与保留因子 (k')

Tab. 3 Data calculation of degree of polymerization (DP) and retention factor (k') for chitosan oligosaccharide sample using elution 2

峰号 (peak number)	分析物 (analyte)	DP	log DP	t_m	t_R	t'_R	k'	$\log k'$
9	壳六糖 (chitohexaose)	6	0.778	3.343	18.970	15.627	4.675	0.670
8	壳五糖 (chitopentaose)	5	0.699	3.343	21.130	17.787	5.321	0.726
7	壳四糖 (chitotetraose)	4	0.602	3.343	23.925	20.582	6.157	0.789
6	壳三糖 (chitotriose)	3	0.477	3.343	27.660	24.317	7.274	0.862
5	壳二糖 (chitobiose)	2	0.301	3.343	34.661	31.318	9.368	0.972
4	未知物 (unknown compound)			3.343	17.235	13.892	4.156	0.619
3	未知物 (unknown compound)			3.343	15.819	12.476	3.732	0.572
2	未知物 (unknown compound)			3.343	14.613	11.270	3.371	0.528
1	未知物 (unknown compound)			3.343	13.567	10.224	3.058	0.485

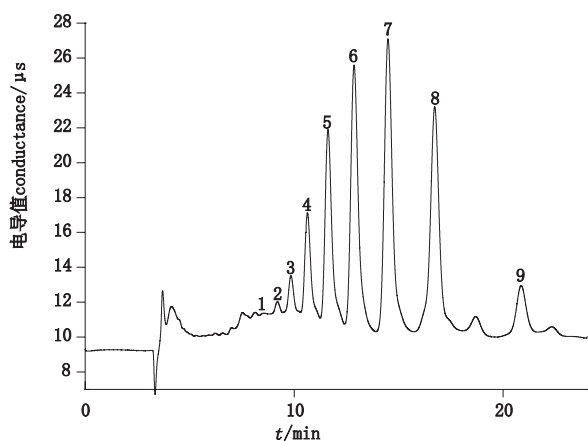
注 (note): t_m 为死时间 (以水负峰出峰时间), t_R 为各壳寡糖的保留时间, t'_R 为各壳寡糖的调整保留时间, $k' = t'_R / t_m$ (t_m was death retention time, t_R was retention time of each chitosan oligosaccharide, t'_R was adjusted retention time of each chitosan oligosaccharide, $k' = t'_R / t_m$)

表 4 用淋洗液 2 淋洗计算的壳寡糖样品聚合度 (DP) 及其误差

Tab. 4 Calculation of degree of polymerization (DP) and deviation for chitosan oligosaccharide sample using elution 2

聚合度 (DP)	线性方程 (linear equation)	R^2	未知峰的 $\log k'$ 值 ($\log k'$ value of unknown peaks)	log DP	"DP"	DP	$\Delta / \%$
5~9	$\log k' = -0.6266 \log DP + 1.1617$	0.9991	0.619	0.866	7.3451	7	4.9300
4~8	$\log k' = -0.6227 \log DP + 1.1602$	0.9996	0.572	0.945	8.8105	9	-2.3688
3~7	$\log k' = -0.6227 \log DP + 1.1601$	0.9998	0.528	1.015	10.3514	10	3.5140
2~5	$\log k' = -0.6217 \log DP + 1.1585$	1.0000	0.485	1.083	12.1060	12	0.8833

注 (note): $\Delta = ("DP" - DP) / DP \times 100\%$; "DP": 根据线性方程计算 (calculated according to the linear equation)



1. 未知峰 (unknown peak) 2. 未知峰 (unknown peak) 3. 未知峰 (unknown peak) 4. 未知峰 (unknown peak) 5. 壳六糖 (chitohexaose) 6. 壳五糖 (chitopentaose) 7. 壳四糖 (chitotetraose) 8. 壳三糖 (chitotriose) 9. 壳二糖 (chitobiose)

图 4 用淋洗液 3 淋洗的壳寡糖样品色谱图

Fig. 4 Chromatogram of chitosan oligosaccharide sample using elution 3

2.6 壳寡糖样品的质谱对照分析

为进一步验证该规律的可靠性,对上述样品进行质谱数据的验证。实验采用 Thermo-Finnigan 离子阱电喷雾质谱仪,采用正离子模式,扫描范围为 m/z 200~1 500,喷雾电压 -4.5 kV,壳气为氮气,辅助气体为氦气,离子传输管温度为 250 °C,电压为 +55 V;样品配成 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,以 $300 \mu\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ 引进离子源室。结果见图 5。

如图 5 所示,壳二糖、壳三糖、壳四糖、壳五糖、壳六糖、壳七糖、壳八糖的相对分子质量分别是 340、501、662、823、984、1 145、1 306,其氯离子加合物 $[M+\text{Cl}]^-$ 的相对分子质量分别是 375、536、697、858、1 019、1 180、1 341,其他以此类推。图中相对分子质量出现大约 0.5 的偏差可能与分析所用的三维离子阱质谱有关。

表 5 用淋洗液 3 淋洗计算壳寡糖样品聚合度 (DP) 与保留因子 (k') 数据
Tab. 5 Data calculation of degree of polymerization (DP) and retention factor (k')

for chitosan oligosaccharide sample using elution 3

峰号 (peak number)	分析物 (analyte)	DP	log DP	t_m	t_R	t'_R	k'	$\log k'$
9	壳六糖 (chitohexaose)	6	0.778	3.345	11.620	8.275	2.474	0.393
8	壳五糖 (chitopentaose)	5	0.699	3.345	12.867	9.522	2.847	0.454
7	壳四糖 (chitotetraose)	4	0.602	3.345	14.490	11.145	3.332	0.523
6	壳三糖 (chitotriose)	3	0.477	3.345	16.724	13.379	4.000	0.602
5	壳二糖 (chitobiose)	2	0.301	3.345	20.861	17.516	5.236	0.719
4	未知物 (unknown compound)			3.345	10.635	7.290	2.179	0.338
3	未知物 (unknown compound)			3.345	9.847	6.502	1.944	0.289
2	未知物 (unknown compound)			3.345	9.200	5.855	1.750	0.243
1	未知物 (unknown compound)			3.345	8.527	5.182	1.549	0.190

注 (note): t_m 为死时间 (以水负峰出峰时间), t_R 为各壳寡糖的保留时间, t'_R 为各壳寡糖的调整保留时间, $k' = t'_R / t_m$ (t_m was death retention time, t_R was retention time of each chitosan oligosaccharide, t'_R was adjusted retention time of each chitosan oligosaccharide, $k' = t'_R / t_m$)

表 6 用淋洗液 3 淋洗计算的聚合度确定及其误差

Tab. 6 Calculation of degree of polymerization (DP) and deviation for chitosan oligosaccharide sample using elution 3

聚合度 (DP)	线性方程 (linear equation)	R^2	未知峰的 $\log k'$ 值 ($\log k'$ value of unknown peaks)	log DP	“DP”	DP	$\Delta / \%$
5-9	$\log k' = -0.676 5 \log DP + 0.924 9$	0.999 0	0.338	0.868	7.379 0	7	5.414 9
4-8	$\log k' = -0.670 3 \log DP + 0.922 3$	0.999 7	0.289	0.945	8.810 5	9	-2.105 7
3-7	$\log k' = -0.670 7 \log DP + 0.922 4$	0.999 8	0.243	1.013	10.303 9	10	3.038 6
2-5	$\log k' = -0.669 4 \log DP + 0.920 7$	1.000 0	0.190	1.092	12.359 5	12	2.995 6

注 (note): $\Delta = (\text{“DP”} - \text{DP}) / \text{DP} \times 100\%$; “DP”: 根据线性方程计算 (calculated according to the linear equation)

表 7 柱温为 30 °C 壳寡糖样品聚合度 (DP) 与保留因子 (k') 数据计算

Tab. 7 Data calculation of degree of polymerization (DP) and retention factor (k') for chitosan oligosaccharide sample with 30 °C column temperature

峰号 (peak number)	分析物 (analyte)	DP	log DP	t_m	t_R	t'_R	k'	$\log k'$
9	壳六糖 (chitohexaose)	6	0.778	3.345	11.62	8.275	2.474	0.393
8	壳五糖 (chitopentaose)	5	0.699	3.345	12.867	9.522	2.847	0.454
7	壳四糖 (chitotetraose)	4	0.602	3.345	14.49	11.145	3.332	0.523
6	壳三糖 (chitotriose)	3	0.477	3.345	16.724	13.379	4.000	0.602
5	壳二糖 (chitobiose)	2	0.301	3.345	20.861	17.516	5.236	0.719
4	未知物 (unknown compound)			3.345	10.635	7.290	2.179	0.338
3	未知物 (unknown compound)			3.345	9.847	6.502	1.944	0.289
2	未知物 (unknown compound)			3.345	9.200	5.855	1.750	0.243
1	未知物 (unknown compound)			3.345	8.527	5.182	1.549	0.19

注 (note): t_m 为死时间 (以水负峰出峰时间), t_R 为各壳寡糖的保留时间, t'_R 为各壳寡糖的调整保留时间, $k' = t'_R / t_m$ (t_m was death retention time, t_R was retention time of each chitosan oligosaccharide, t'_R was adjusted retention time of each chitosan oligosaccharide, $k' = t'_R / t_m$)

表 8 聚合度确定及其误差计算

Tab. 8 Calculation of degree of polymerization (DP) and deviation for chitosan oligosaccharide sample with 30 °C column temperature

聚合度 (DP)	线性方程 (linear equation)	R^2	未知峰的 $\log k'$ 值 ($\log k'$ value of unknown peaks)	log DP	“DP”	DP	$\Delta / \%$
5~9	$\log k' = -0.676 5 \log DP + 0.924 9$	0.999 0	0.338	0.868	7.379 00	7	5.414 9
4~8	$\log k' = -0.670 3 \log DP + 0.922 3$	0.999 7	0.289	0.945	8.810 50	9	-2.105 7
3~7	$\log k' = -0.670 7 \log DP + 0.922 4$	0.999 8	0.243	1.013	10.303 9	10	3.038 6
2~5	$\log k' = -0.669 4 \log DP + 0.920 7$	1.000 0	0.190	1.092	12.359 5	12	2.995 6

注 (note): $\Delta = (\text{“DP”} - \text{DP}) / \text{DP} \times 100\%$; “DP”: 根据线性方程计算 (calculated according to the linear equation)

表 9 流速为 0.6 mL · min⁻¹ 壳寡糖样品聚合度 (DP) 与保留因子 (k') 数据计算

Tab. 9 Data calculation of degree of polymerization (DP) and retention factor (k') for chitosan oligosaccharide sample with 0.6 mL · min⁻¹ flow rate

峰号 (peak number)	分析物 (analyte)	DP	log DP	t_m	t_R	t'_R	k'	$\log k'$
9	壳六糖 (chitohexaose)	6	0.778	2.243	7.818	5.575	2.486	0.395
8	壳五糖 (chitopentaose)	5	0.699	2.243	8.711	6.468	2.884	0.460
7	壳四糖 (chitotetraose)	4	0.602	2.243	9.888	7.645	3.408	0.533
6	壳三糖 (chitotriose)	3	0.477	2.243	11.524	9.281	4.138	0.617
5	壳二糖 (chitobiose)	2	0.301	2.243	14.485	12.242	5.458	0.737
4	未知物 (unknown compound)			2.243	7.118	4.875	2.173	0.337
3	未知物 (unknown compound)			2.243	6.563	4.320	1.926	0.285
2	未知物 (unknown compound)			2.243	6.115	3.872	1.726	0.237
1	未知物 (unknown compound)			2.243	5.714	3.471	1.547	0.190

注 (note): t_m 为死时间 (以水负峰出峰时间), t_R 为各壳寡糖的保留时间, t'_R 为各壳寡糖的调整保留时间, $k' = t'_R / t_m$ (t_m was death retention time, t_R was retention time of each chitosan oligosaccharide, t'_R was adjusted retention time of each chitosan oligosaccharide, $k' = t'_R / t_m$)

表 10 流速为 0.6 mL · min⁻¹ 壳寡糖样品聚合度 (DP) 确定及其误差计算

Tab. 10 Calculation of degree of polymerization (DP) and deviation for chitosan oligosaccharide sample with 0.6 mL · min⁻¹ flow rate

聚合度 (DP)	线性方程 (linear equation)	R^2	未知峰的 $\log k'$ 值 ($\log k'$ value of unknown peaks)	log DP	“DP”	DP	$\Delta / \%$
5~9	$\log k' = -0.710 5 \log DP + 0.954 3$	0.998 7	0.337	0.869	7.396 10	7	5.658 6
4~8	$\log k' = -0.703 9 \log DP + 0.951 7$	0.999 6	0.285	0.947	8.851 20	9	1.653 3
3~7	$\log k' = -0.704 4 \log DP + 0.951 9$	0.999 7	0.237	1.015	10.351 4	10	3.514 0
2~5	$\log k' = -0.702 9 \log DP + 0.949 9$	0.999 9	0.190	1.081	12.050 4	12	0.420 0

注 (note): $\Delta = (\text{“DP”} - \text{DP}) / \text{DP} \times 100\%$; “DP”: 根据线性方程计算 (calculated according to the linear equation)

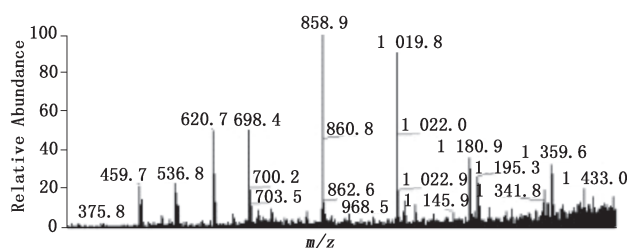


图5 壳寡糖样品的质谱图

Fig. 5 Mass spectrum of chitosan oligosaccharide sample

经比对认为,图5中459和620的质量数应为杂质,从质谱可看出样品中存在壳二糖、壳三糖、壳四糖、壳五糖、壳六糖、壳七糖、壳八糖、壳九糖。聚合度大于8的寡糖含量相对较少。由以上结果可知,本法结果与质谱数据能够较好地吻合。

3 结论

本文建立了低聚壳寡糖的聚合度与它们的保留因子关系,即:保留因子的对数与聚合度的对数具有线性关系($\log k' = a \log DP + b$),且相关关系都在0.999以上。根据建立的关系对壳寡糖样品进行聚合度的定性,误差不大于5.66%。可见该法只需少数几种标准物质即可完成对系列化合物定性,可广泛应用于食品安全、生物医药等产业中壳寡糖产品的质量评价,也可应用于生产优质寡糖过程控制。

参考文献

- [1] KIM SK, RAJAPAKS EN. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): a review [J]. *Carbohydr Res*, 2005, 62(4): 357
- [2] NAM KS, CHOR YR, SHON YH. Evaluation of the antimutagenic potential of chitosan oligosaccharide: Rec, Ames and Umu tests [J]. *Biotechnol Lett*, 2001, 23(12): 971
- [3] NO HK, PARK NY, LEE SH, *et al.* Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights [J]. *Int J Food Microbiol*, 2002, 74(1-2): 65
- [4] SUZUKI K, MIKAMI T, OKAWA Y, *et al.* Antitumor effect of hexa-

N-acetylchitohexaose and chitohexaose [J]. *Carbohydr Res*, 1986, 151: 403

- [5] TOKORO A, TATEWAKI N, SUZUKI K, *et al.* Growth-inhibitory effect of hexa-*N*-acetylchitohexaose and chitohexaose against meth-A solid tumor [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(2): 784
- [6] JEON YJ, KIM SK. Bioactivities of chitosan oligosaccharides and their derivatives [J]. *Adv Chitin Sci*, 1998, 3(3): 28
- [7] KROKEIDE IM, SYNSTAD B, GASEIDNES S, *et al.* Natural substrate assay for chitinases using high-performance liquid chromatography: a comparison with existing assays [J]. *Anal Biochem*, 2007, 363: 128
- [8] EL RASSI Z. Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of carbohydrate species [J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(15-16): 3134
- [9] LEE KB, KIM YS, LINHARDT RJ. Capillary zone electrophoresis for the quantitation of oligosaccharides formed through the action of chitinase [J]. *Electrophoresis*, 1991, 12(9): 636
- [10] 陈伶俐, 宗莉, 庞瑞. 分光光度计测定壳聚糖含量 [J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(5): 526
- [11] CHEN LL, ZONG L, PANG R. Determination of chitosan content by spectrophotometer [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2005, 25(5): 526
- [11] 牟世芬, 于泓, 蔡亚岐. 糖的高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法分析 [J]. *色谱*, 2009, 27(5): 667
- [12] MOU SF, YU H, CAI YQ. Analysis of sugar by high performance anion exchange chromatography with pulsed ampere detection [J]. *Chin J Chromatogr*, 2009, 27(5): 667
- [12] KOVATS E. Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. teil 1: retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone [J]. *Helv Chim Acta*, 1958, 41(7): 1915
- [13] 许国旺. 现代实用气相色谱法 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004
- [13] XU GW. *Modern Practical Gas Chromatography* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004
- [14] BERTHOD A, CHANG SC, KULLMAN JP, *et al.* Practice and mechanism of HPLC oligosaccharide separation with a cyclodextrin bonded phase [J]. *Talanta*, 1998, 47(4): 1001
- [15] LI K, LIU S, XING R. High-resolution separation of homogeneous chitoooligomers series from 2-mers to 7-mers by ion-exchange chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(7): 1275

(本文于2016年1月8日收到)