

离子色谱法检测食品中壳寡糖含量的研究

刘玉峰^{1*}, 徐佳佳¹, 王宗继², 李进国², 崔亚娟¹, 李全霞¹, 李东¹

(1. 北京市营养源研究所, 北京市系统营养工程技术研究中心, 北京 100069;

2. 山东卫康生物医药科技有限公司, 临沂 276017)

摘要: **目的** 建立一种食品中壳寡糖含量的离子色谱检测方法。**方法** 样品经盐酸溶液水解后, 氢氧化钠溶液中和至中性, 过反相固相萃取柱净化。采用水(A)、200 mmol/L 氢氧化钠(B)和 150 mmol/L 氢氧化钠-500 mmol/L 乙酸钠(C)作为流动相进行梯度洗脱, 脉冲安培检测器定量测定。**结果** 确定壳寡糖水解脱最佳条件为水解温度为 110 °C, 盐酸溶液浓度为 8mol/L, 水解时间为 4 h, 回收率在 87.72%~103.37%, 平均回收率为 95.58%, 相对标准偏差为 5.80%, 方法定量限为 0.1 g/100 g。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适用于食品中壳寡糖含量的测定。

关键词: 壳寡糖; 氨基葡萄糖; 离子色谱法

Determination of chitosan oligosaccharide in foods by ion chromatography

LIU Yu-Feng^{1*}, XU Jia-Jia¹, WANG Zong-Ji², LI Jin-Guo², CUI Ya-Juan¹, LI Quan-Xia¹, LI Dong¹

(1. Beijing Institute of Nutrition Resources, Beijing System Nutrition Engineering and Technology Research Center, Beijing 100069, China; 2. Shandong Weikang Bio-medical Technologies Co., Ltd., Linyi 276017, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of chitosan oligosaccharide in foods by ion chromatography. **Methods** Samples were hydrolyzed with muriatic acid and neutralized with sodium hydroxide solution, then purified with reversed phase solid phase extraction column. The water(A), 200 mmol/L sodium hydroxide solution (B) and 150 mmol/L sodium hydroxide solution-500 mmol/L sodium acetate solution (C) were used as mobile phases for gradient elution, and pulsed amperometric detector was used for quantitative determination. **Results** The best conditions of hydrolyzing chitosan oligosaccharide were as follows: hydrolysis temperature was 110 °C, muriatic acid was 8 mol/L, and hydrolysis time was 4 h. The recoveries were ranged from 87.72% to 103.37%, the average recovery was 95.58%. The relative standard deviation (RSD) was 5.80%, and the limit of quantitation (LOQ) was 0.1 g/100 g. **Conclusion** This method is fast, accurate and sensitive, which is suitable for the determination of chitosan oligosaccharide in food samples.

KEY WORDS: chitosan oligosaccharide; glucosamine; ion chromatography

1 引言

壳寡糖, 又称寡聚氨基葡萄糖、甲壳低聚糖, 是指 2~10 个氨基葡萄糖以 β -1,4-糖苷键连接而成的低聚壳聚糖。壳寡糖是甲壳素、壳聚糖系列产品的高级产品, 具备水溶性

好、生物活性高、功能作用大、应用领域广、易被人体吸收等突出特点, 在国外素有“人体第六大生命要素”、“软黄金”之美誉^[1-3]。科学研究证明, 壳寡糖具有抑制病毒、细菌、真菌的作用, 能降血脂、降血糖、降血压, 调节免疫、pH 值和内分泌, 能够抑制癌细胞生长和转移, 增强肝脏机能

*通讯作者: 刘玉峰, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为食品营养成分的分析检测。E-mail: liuyf_29@163.com

*Corresponding author: LIU Yu-Feng, Master, Associate Professor, Beijing Institute of Nutrition Resources, Beijing System Nutrition Engineering and Technology Research Center, Beijing 100069, China. E-mail: liuyf_29@163.com

和肠道有益菌^[4-7],还具有排除多余有害胆固醇和氯离子、重金属有害离子、体内毒素和多余脂肪的功能^[8,9]。壳寡糖作为新世纪前瞻性生物技术产品,在医药、功能性食品、日化、农业等领域具备广泛的应用前景。

近年来,壳寡糖的功能研究取得了长足的进步,同时也对壳寡糖含量的分析测定提出了挑战。目前对于食品中壳寡糖的含量测定还没有国家标准检测方法,查阅国内外文献,用于壳寡糖含量测定的方法主要有离子色谱法^[10,11]、高效液相色谱法^[12]、毛细管电泳紫外检测法^[13]、比色法、分光光度法、薄层色谱法、高效液相色谱-质谱联用法^[14,15]。离子色谱法是报道的检测糖类最好的方法^[16],具有快速、精密度高、重复性好的特点。本研究结合传统的酸水解法和现代高灵敏度仪器测定含量法,拟通过酸水解法降解壳寡糖为氨基葡萄糖,采用高效离子色谱法测定氨基葡萄糖浓度,折算成壳寡糖的含量,以期对监管政策的落实和实施提供必要的技术支持和有力保障。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

ICS-3000 离子色谱仪(美国 Thermofiner 公司); DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司); ME235s 电子天平(精度 0.1 mg, 德国赛多利斯公司)。

盐酸氨基葡萄糖对照品(纯度 99.0%, 中国食品药品检定研究院); 50%氢氧化钠溶液、乙酸钠(色谱纯, 美国 Sigma 公司); 盐酸(分析纯, 国药集团试剂有限公司); 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); ON GUARD IIRP 柱(3cc, 美国 Thermofiner 公司); 0.45 μm 水系滤膜(天津津滕公司); 实验室用水为 Aquaplore 2C 超纯水。

样品来源: 山东卫康生物医药科技有限公司提供。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

氨基葡萄糖标准溶液配制: 准确称取 25 mg 的盐酸氨基葡萄糖对照品到 25 mL 的容量瓶中, 用超纯水配成浓度约为 1000 mg/L 标准贮备液, 4 °C 保存。

6 mol/L 盐酸溶液: 取盐酸(12 mol/L)40 mL, 缓慢注入蒸馏水中, 稀释至 80 mL, 混匀。

8 mol/L 盐酸溶液: 取盐酸(12 mol/L)40 mL, 缓慢注入蒸馏水中, 稀释至 60 mL, 混匀。

9.6 mol/L 盐酸溶液: 取盐酸(12 mol/L)40 mL, 缓慢注入蒸馏水中, 稀释至 50 mL, 混匀。

9 mol/L 硫酸溶液: 取硫酸(18 mol/L)40 mL, 缓慢注入蒸馏水中, 稀释至 80 mL, 混匀。

2.2.2 样品处理

①采样和试样制备

抽取有代表性的样品, 用四分法缩减取 200 g, 粉碎

后过 0.4 mm 孔径的分析筛, 混匀, 装入自封袋中, 备用。

②提取

称取 0.1~1.0 g(精确至 0.01 g)粉碎的样品于 50 mL 具塞比色管中, 准确加入不同浓度的盐酸溶液 分别在 100、110、120 °C、高温水解后用氢氧化钠溶液中和至中性, 过滤后得上清液, 备用。

③净化

ON GUARD IIRP 柱依次用 10 mL 甲醇和 15 mL 水活化。取上清液依次通过 0.45 μm 水相滤膜和净化柱, 弃去前面 3 倍柱体积洗脱液, 收集后面的洗脱液待测。

2.2.3 实验方法

(1) 单因素实验

选取水解时间、水解温度、酸浓度这 3 个因素进行了优化。水解时间选取 2、3、4、5、24 h 进行比较。水解温度选取 100、110、120 °C 进行比较。酸浓度选取 6、8、9.6 mol/L 进行比较。

(2) 方法的线性回归方程及定量限

逐级稀释标准工作液, 按照所建立的方法测定其响应值, 以目标物质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到线性回归方程(见图 1)。

以信噪比为 10(S/N=10)计算定量限为 0.1 g/100 g。

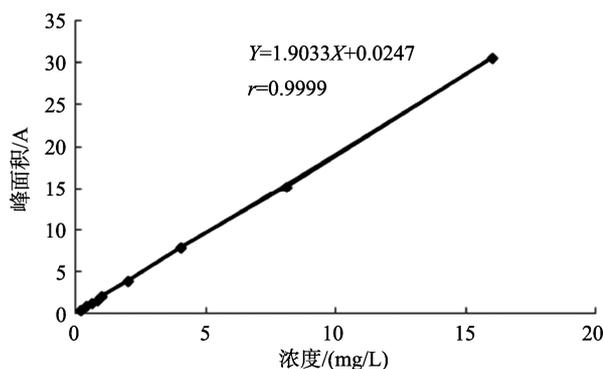


图 1 线性回归方程

Fig.1 Equation of linear regression

(3) 精密性及回收率实验

精密性实验: 称取一定量的样品, 按照前处理方法进行提取并上机测定。

回收率实验: 精密称取适量阴性样品, 分别加入不同量的壳寡糖, 按照样品前处理方法进行提取并上机测定。

2.2.4 离子色谱条件

赛默飞 DIONEX CarboPac™ PA1 色谱柱(4.0 mm×250 mm, 10 μm), 流动相: A 为去离子水、B 为 200 mmol/L 氢氧化钠溶液、C 为 150 mmol/L 氢氧化钠和 500 mmol/L 乙酸钠混合溶液; 梯度洗脱条件: 0~1 5min, A:B:C=90:10:0; 15.1~25 min, A:B:C=0:0:100; 25.1~35 min, A:B:C=0:100:0; 35.1~45 min, A:B:C=90:10:0; 流速:1.0 mL/min, 进样体积:

25 μ L, 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

3 结果与分析

3.1 不同酸水解比较研究

本研究选用盐酸和硫酸作为酸水解溶液, 从而确定一种适合水解壳寡糖的酸。实验前期采用 9 mol/L 硫酸溶液和 8 mol/L 盐酸进行水解, 在加硫酸的过程以及水解后的中和过程一定要在冰水浴中, 否则放出的大量热量会使硫酸破坏糖的结构或是造成糖的焦化, 对后面的测定造成干扰。本研究试图选择一种较为缓和的水解环境, 因此确定选择盐酸作为水解溶液。

3.1.1 盐酸水解条件的研究

盐酸水解壳寡糖的过程主要受到 3 个因素的影响: 水解时间、水解温度、酸浓度, 本研究对这 3 个因素进行了优化。

3.1.2 水解时间的影响

盐酸溶液为 6 mol/L, 水解温度分别为 100、110、120 $^{\circ}$ C 比较水解时间的影响, 结果如下:

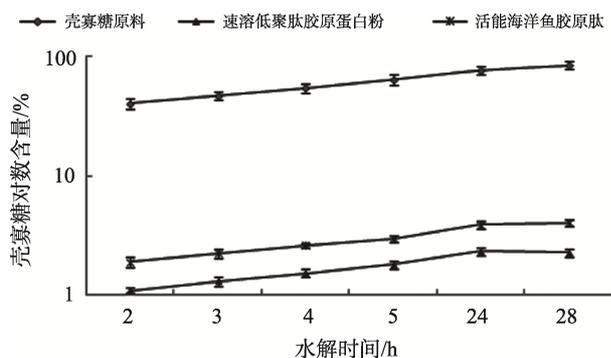


图 2 100 $^{\circ}$ C 时不同水解时间壳寡糖含量 ($n=3$)

Fig.2 The contents of chitosan oligosaccharide at 100 $^{\circ}$ C under different hydrolysis time ($n=3$)

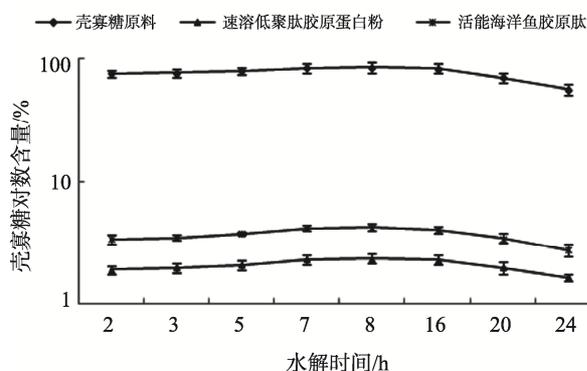


图 3 110 $^{\circ}$ C 时不同水解时间壳寡糖含量 ($n=3$)

Fig.3 The contents of chitosan oligosaccharide at 110 $^{\circ}$ C under different hydrolysis time ($n=3$)

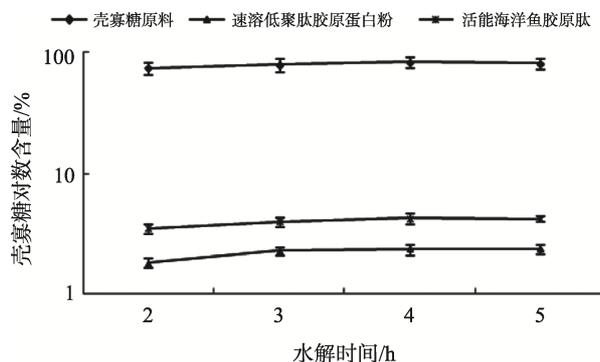


图 4 120 $^{\circ}$ C 时不同水解时间壳寡糖含量 ($n=3$)

Fig.4 The contents of chitosan oligosaccharide at 120 $^{\circ}$ C under different hydrolysis time ($n=3$)

从图 2~4 可以看出, 6 mol/L 的盐酸溶液在 100 $^{\circ}$ C 水解壳寡糖, 在 28 h 内其含量一直处于增加趋势。在 110 $^{\circ}$ C 水解壳寡糖, 在 3~7 h 内其含量一直处于增加趋势, 7~16 h 内基本保持不变, 16 h 之后开始出现下降趋势。在 120 $^{\circ}$ C 水解壳寡糖, 在 2~4 h 内其含量一直处于增加趋势, 4 h 之后开始出现下降趋势。

综上所述, 实验表明, 壳寡糖会随着水解时间的增加而增大, 但是当水解时间太长也会造成单糖的破坏, 使得含量降低。

3.1.3 水解温度的影响

实验选用了 3 个样品, 采用 6 mol/L 盐酸溶液对壳寡糖分别水解 3、4、5 h 不同水解温度结果如下:

由表 1 可知, 温度从 100 $^{\circ}$ C 到 120 $^{\circ}$ C, 随着温度的升高, 样品收率一直在提高。要达到较为完全的水解, 需要较长的时间, 考虑日常检测工作的时效性, 我们试图提高盐酸溶液浓度以减少水解时间, 提高工作效率。

3.1.4 盐酸浓度的影响

实验选用了 3 个样品, 分别采用 4、6、8、9.6 mol/L 的盐酸溶液在 100 $^{\circ}$ C 下对壳寡糖进行水解 4 h, 结果如图 5 所示。

从上图可以看出, 在 100 $^{\circ}$ C 水解壳寡糖时, 盐酸浓度为 8 mol/L 时, 样品含量最高, 当盐酸浓度达到 9.6 mol/L 时, 回收率开始降低, 说明盐酸浓度太高会破坏单糖。

通过对水解温度、水解时间和盐酸浓度的研究表明, 水解时间太长、盐酸浓度太高都会造成单糖的破坏, 导致含量测定值得降低, 水解温度仅考察了 100、110、120 $^{\circ}$ C 3 个温度, 在 6 mol/L 盐酸溶液环境下水解, 还没有出现下降趋势, 考虑到实验安全因素, 没有继续考察高温对水解的影响。但是, 在实验过程中, 我们观察到当水解温度达到 120 $^{\circ}$ C 时, 使用普通具塞试管会出现盐酸挥发的情况, 应该使用密封性很好的水管, 考虑到实验的安全性, 本研究初步确定采用水解温度 100 $^{\circ}$ C 和 110 $^{\circ}$ C, 提高盐酸浓度, 考察水解效率。

表1 不同水解温度壳寡糖含量
Table 1 The contents of chitosan oligosaccharide under different hydrolysis temperatures 单位: %

样品	3 h			4 h			5 h		
	100 °C	110 °C	120 °C	100 °C	110 °C	120 °C	100 °C	110 °C	120 °C
壳寡糖原料	47.3	76.3	79.4	54.8	77.9	84.1	64.9	80.7	81.6
速溶低聚肽胶原蛋白粉	1.29	1.88	2.25	1.52	1.96	2.34	1.79	2.06	2.34
活能海洋鱼胶原蛋白肽	2.22	3.37	3.95	2.61	3.47	4.17	2.97	3.72	4.15

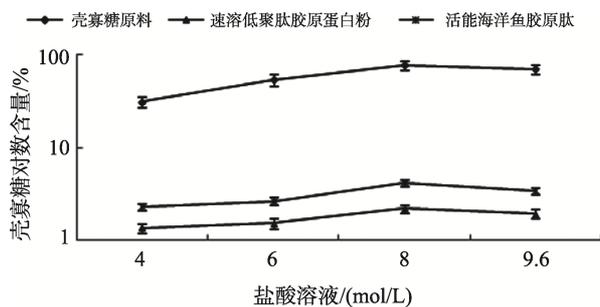


图5 不同盐酸浓度壳寡糖含量(n=3)

Fig.5 The contents of chitosan oligosaccharide under different concentrations of muriatic acid (n=3)

研究表明, 100 °C时 8 mol/L 盐酸溶液水解效率最高, 本实验考察了在此前提下, 不同水解时间对回收率的趋势, 实验结果如下:

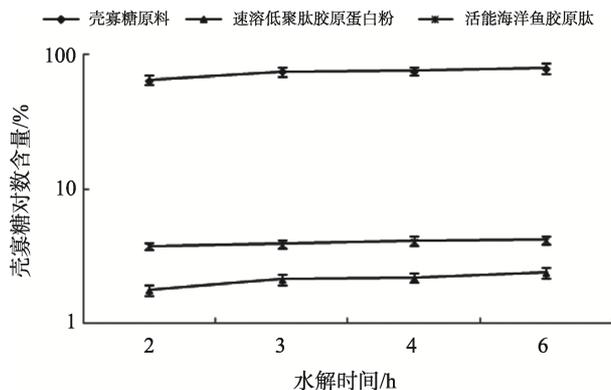


图6 8 mol/L 盐酸溶液 100 °C水解结果(n=3)

Fig.6 The contents of chitosan oligosaccharide at 100 °C with 8 mol/L muriatic acid (n=3)

从图6可以看出, 8 mol/L 盐酸溶液 100 °C水解壳寡糖样品, 水解时间达到 6 h 时, 水解效率达到最高值, 本实验试图通过提高水解温度以减少水解时间, 提高工作效率。

实验选用了 3 个样品, 采用 8 mol/L 的盐酸溶液对壳寡糖进行水解, 水解温度为 110 °C, 结果如下:

从图7可以看出, 采用 8 mol/L 盐酸溶液 110 °C水解壳寡糖时, 4 h 达到最大水解效率, 能够满足实验室常规检测, 且回收率也在可接受范围内。因此本研究最终确定水解条件为 8 mol/L 盐酸溶液 110 °C水解 4 h。

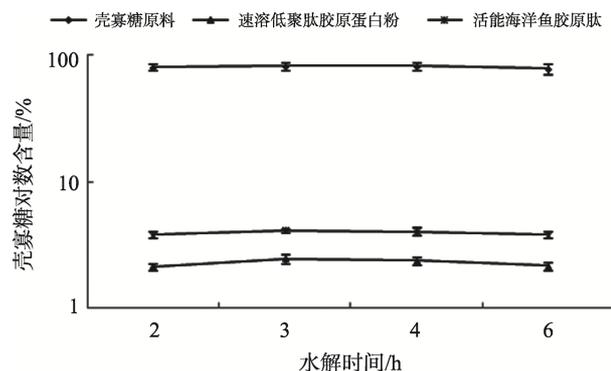


图7 8 mol/L 盐酸溶液 110 °C水解结果(n=3)

Fig.7 The contents of chitosan oligosaccharide at 110 °C with 8 mol/L muriatic acid (n=3)

3.2 精密度及回收率实验

3.2.1 精密度实验

样品中氨基葡萄糖含量分别为 2.45%、2.39%、2.52%、2.49%、2.44%、2.56%, 相对标准偏差为 2.46%, 可见方法精密度较好。

3.2.2 回收率实验

精密称取适量阴性样品, 分别加入不同量的壳寡糖, 按照样品前处理方法进行提取并上机测定, 结果见表2。

表2 回收率实验结果
Table 2 The result of recovery

称样量 /g	加标量 /mg	测定值 /mg	回收率 /%	平均回收率/%	RSD /%
0.4845	0.8080	0.8352	103.37		
0.4751	0.8080	0.8266	102.30		
0.5037	0.8080	0.8133	100.66		
0.4888	1.6160	1.5475	95.76		
0.4251	1.6160	1.5532	96.11	95.58	5.80
0.5231	1.6160	1.4876	92.05		
0.4875	2.4240	2.2142	91.34		
0.5012	2.4240	2.2033	90.90		
0.4889	2.4240	2.1264	87.72		

3 水平加标氨基葡萄糖的回收率在 87.72%~103.37%, 平均加标回收率为 95.58%, RSD 为 5.80%。可见方法的准确度较好。

4 结 论

随着各种分析技术在壳寡糖的分析测定中的应用以及各种检测技术的不断进步, 进一步提高分析的准确性和灵敏度仍是重要的研究课题。本研究采用 110 °C 8mol/L 盐酸溶液水解壳寡糖时, 4 h 达到最大水解效率, 能够满足实验室常规检测, 且回收率也在可接受范围内。因此本研究最终确定水解条件为 110 °C 8 mol/L 盐酸溶液水解 4 h。且该方法快速、准确、灵敏, 适合测定食品中壳寡糖的含量。

参考文献

- [1] 汤怀武, 王红春, 史爱民. 农业领域对壳寡糖改性的专利技术发展概述[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 444.
Tang HW, Wang HC, Shi AM. Overview of patent technology development of chitosan oligosaccharide modification in agriculture [J]. Jiangsu Agric Sci, 2015, 43(8): 444.
- [2] 严钦, 沈月新. 壳寡糖制备研究进展[J]. 上海水产大学学报, 2004, 11(4): 383-387.
Yan Q, Chen YX. The development of study preparation of chito-oligosaccharides [J]. J Shanghai Fish Univ, 2004, 11(4): 383-387.
- [3] 李苏亮, 闫冰雪, 郑素霞. 壳寡糖的理化特性及制备方法[J]. 添加剂世界, 2016, (7): 27-29.
Li SL, Yan BX, Zheng SX. The physiochemical properties and preparation methods of chito-oligosaccharides [J]. Addit World, 2016, (7): 27-29.
- [4] 曹维强, 王静, 余永新, 等. 壳寡糖对肠道致病菌抑制作用的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 114-116.
Cao WQ, Wang J, She YX, et al. Study on inhibitive effect of chito-oligosaccharides on intestinal causative microorganism [J]. Food Sci, 2008, 29(4): 114-116.
- [5] Muanprasa C, Wongkrasant P, Satitsri S, et al. Activation of AMPK by chitosan oligosaccharide in intestinal epithelial cells: Mechanism of action and potential applications in intestinal disorders [J]. Biochem Pharmacol, 2015, 96(3): 225-236.
- [6] 王鲁霞, 吴延立, 马文平. 壳寡糖的制备方法及其在食品中的应用现状[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(32): 11485-11487.
Wang LX, Wu YL, Ma WP. The Preparation method and application status of chito-oligosaccharide in food [J]. J Anhui Agric Sci, 2014, 42(32): 11485-11487.
- [7] Kang YR, Choi HY. Effect of supplementation of lowmolecular-weight chitosan oligosaccharide, GO2KA1, on postprandial blood glucose levels in healthy individuals following bread consumption [J]. Food Sci Biotechnol, 2016, 25(3): 911-914.
- [8] 邓丽莉, 黄艳, 周玉翔, 等. 壳寡糖处理对柑桔果实贮藏品质的影响[J]. 食品工业科技, 2009, 30(7): 287-290.

- Deng LL, Huang Y, Zhou YX, et al. Effect of chito-oligosaccharide treatment on storage quality of citrus fruit [J]. Food Ind Technol, 2009, 30(7): 287-290.
- [9] 许翔, 李吕木, 张民扬. 壳寡糖的生物学功能及其在畜禽营养中的应用[J]. 饲料博览, 2015, (6): 31-36.
Xu X, Li LM, Zhang MY. Research progress on biological function of chitosan oligosaccharide and application in livestock nutrition [J]. Feed Rev, 2015, (6): 31-36.
- [10] 邵波, 陈梅兰, 金月珠. 离子色谱快速检测壳寡糖的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(11): 1973-1977.
Shao B, Chen ML, Jin YZ. Determination of chito-oligosaccharide quickly [J]. J Pharm Anal, 2017, 37(11): 1973-1977.
- [11] 李娟, 朱捷, 李春红, 等. 氨基寡糖素的高效阴离子交换-脉冲安培检测法[J]. 食品科学, 2015, (21): 295-298.
Li J, Zhu J, Li CH, et al. Determination of amino oligosaccharins by ion chromatography and pulsed amperometric detection [J]. Food Sci, 2015, (21): 295-298.
- [12] 蒋慧, 李恒, 张澜, 等. 高效液相色谱法测定壳寡糖的含量[J]. 发酵科技通讯, 2016, 45(4): 232-236.
Jiang H, Li H, Zhang L, et al. Determination of chitosan oligosaccharide by high performance liquid chromatography [J]. Ferment Technol Commun, 2016, 45(4): 232-236.
- [13] 薛芝敏, 付凤富. 毛细管电泳紫外检测法同时分析樟芝多糖水解液中 8 种单糖[J]. 分析科学学报, 2012, 28(5): 657-660.
Xue ZM, Fu FF. Determination of eight monosaccharides in the hydrolysate of antrodia camphorata's polysaccharide by using capillary electrophoresis-UV detection [J]. J Anal Sci, 2012, 28(5): 657-660.
- [14] 李克成, 李鹏程, 邢荣娥, 等. 壳寡糖含量的测定方法比较[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(8): 1530.
Li KC, Li PC, Xing RE, et al. Comparison of methods in determination of chito-oligosaccharide [J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(8): 1530.
- [15] Centi S, Tatini F, Ratto F, et al. In vitro assessment of antibody: Conjugated gold nanorods for systemic injections [J]. J Nan Biotechnol, 2014, 12(1): 1.
- [16] 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(1): 667.
Mou SF, Yu H, Cai YQ. Analysis of sugars by high performance anion-exchange chromatography with pulse damperometric detection [J]. Chin J Chromatogr, 2009, 27(1): 667.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



刘玉峰, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为食品营养成分的分析检测。
E-mail: liuyf_29@163.com