一种测定酸性糖可溶性盐重均分子量和含量的方法

技术领域

本发明属于天然药物化学以及其质量控制领域，具体地涉及酸性糖类物质的重均分子量和含量的测定和质量控制方法。

背景技术

多糖是天然来源的主要的生物活性化合物，可来自植物、真菌等。多糖的分子量大，结构复杂，因此，多糖的分子量的准确测定是一个挑战。

目前，中国药典中，高效液相凝胶渗透色谱法（Gel Permeation Chromatography, GPC）是测定分子量的常规做法，其是按照排阻色谱的原理，不同分子量的多糖按照其大小顺序先后流出色谱柱，通过一系列不同分子量标准多糖与保留时间的相关性测得的校正曲线并计算相应的待测多糖的相对分子量。但该常规方法必须要有相应的多糖标准品而有一定的局限性。

此外，多糖和寡糖含量测定的常用方法为硫酸咔唑法，该方法首先以浓度及单糖标准品的显色做标准曲线，再在标准曲线上读出待测样品的含量。但是酸性糖的单糖甘露糖醛酸并没有标准品出售，若以葡萄糖醛酸为标准品，其与酸性糖的结构及显色效率存在差异，不能对酸性糖进行精确定量。

近年来出现的尺寸排阻色谱联用多角度激光散射（Size-Exclusion Chromatography/ Multi-Angle Laser Light Scattering，SEC-MALS）测定

样品绝对重均分子量、分子量分布和含量在业界引起了广泛的关注。本领域中有研究人员将MALS和尺寸排阻色谱（SEC）联用，不必依赖泵的流速、校正曲线及其他错误的假设，即可直接求得分子量及分子量分布等数据。MALS利用色谱柱分离出的样品在不同角度的光散射量，由示差折光（RI）检测器得到洗脱液浓度及dn/dc值计算得到质量，综合两者即可计算出各个切片的分子量。该方法不需标准品校准，克服了样品与标准品的化学组成、分子结构及大小不同带来的相对分子量测定的误差。已有研究者采用这一方法测定了壳聚糖、透明质酸的平均分子量（Monica Fee, Neil Errington, Kornelia Jumel, *et al.* Correlation of SEC/MALLS with ultracentrifμge and viscometric data for chitosans. *Eur Biophys J* (2003) 32: 457~464; Sanya Hokputsa, Kornelia Jumel, Catherine Alexander, *et al.* Comparison of molecular mass determination of Hyaluronic acid using SEC/MALLS and sedimentation equilibrium. *Eur Biophys J* (2003) 32: 450~456），还有研究者采用该方法对天然中性多糖进行定量，（Kit-Leong Cheong, Ding tao Wu, Jing Zhao, *et al.* A rapid and accurate method for the quantitative estimation of natural polysaccharides and their fractions using high performance size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering and refractive index detector. *Journal of Chromatography A* (2015) 1400: 98~106）。目前欧洲药典已经采用此方法作为羟乙基淀粉重均分子量及分子量分布的测定方法（European pharmacopoeia 8.0, p3307-3308, starches hydroxyethyl）。

综上，SEC-MALS可以测定中性多糖重均分子量及含量。

发明内容

但是，本发明的发明人发现，用SEC-MALS方法测定酸性糖类时常

常无法准确获得的测定结果。为此，本发明的一个方面提供了一种准确且高效的酸性糖类重均分子量和含量的测定方法，包含以下步骤：

(1)使用SEC-MALS测定酸性糖可溶性盐样品中酸性糖的重均分子量和含量；

(2)测定酸性糖可溶性盐中成盐的金属离子的含量，由此对步骤(1)酸性糖的重均分子量和含量测定结果进行校正，即步骤(1)测得的重均分子量和含量分别除以酸性糖可溶性盐中糖链部分所占的质量分数，进而分别得到酸性糖可溶性盐的重均分子量和含量。

在本发明的一个实施方案中，酸性糖可溶性盐的重均分子量和含量应在其SEC-MALS结果的基础上按如下公式1、公式2进行校正：

$$\text{重均分子量 } M_w\text{（Da）}=\frac{Mw1}{(1-A)}\text{……公式（1）}$$

以上公式（1）中：M_{w1} 为 SEC-MALS 法直接得到酸性糖重均分子量（Da）；A 为酸性糖可溶性盐中金属离子的含量；

$$\text{含量}(\%)-\frac{X}{Y(1-A)}\times 100\%\text{……公式（2）}$$

以上公式（2）中：X 为图谱处理软件计算得到的质量（μg）；Y 为进样的质量（μg）；A 为酸性糖可溶性盐中金属离子的含量。

利用本发明提供的测定方法，可以精确测定酸性糖可溶性盐的重均分子量和含量，成功解决了糖化学领域中酸性糖可溶性盐重均分子量测定偏差大、含量定量不准的问题。

附图说明

图 1 所示为溶剂（A）和甘露寡糖二酸钠盐（B）的 SEC-ICP-MS 谱图和甘露寡糖二酸钠盐的 SEC-MALS 示差谱图（C）。

图 2 所示为氢型肝素（Heparin H，2A）肝素钠（Heparin sodium，

2B）、依诺肝素钠（Enoxaparin solium，2C）和那屈肝素钙（Nadroparin calcium，2D）的示差图（RI，虚线）、Na 离子 SEC-ICP-MS 图（Na，实线）和 Ca 离子 SEC-ICP-MS 图（Ca，实线）。

图 3 所示为甘露寡糖二酸五糖钠的总离子流图（A）、质谱图（B）和甘露寡糖二酸五糖 H 型理论质量数列表（C）。

具体实施方式

定义

除非另外说明，否则所有的百分数、比例、比率或份数按重量计。

除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练技术人员所熟知的熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

如本文所用，术语“**dn/dc**”指折光指数增量，可使用本领域常用的方法进行测定（刘莉莉等.医用透明质酸钠凝胶的绝对分子量及其分布的测定方法[J] 药物分析杂志 2013，33(8)，1435-1438)；也可从本领域公开的相关技术文献中查询获得。

如本文所用，术语“SEC-MALS”指尺寸排阻色谱联用多角度激光散射 (Size-Exclusion Chromatography/ Multi-Angle Laser Light Scattering)，近年来被广泛应用于测定样品绝对重均分子量、分子量分布和含量，具体测定方法可采用本领域公知的方法（Monica Fee, Neil Errington, Kornelia Jumel, *et al*. Correlation of SEC/MALLS with ultracentrifuge and viscometric data for chitosans. *Eur Biophys J* (2003) 32: 457~464; Sanya Hokputsa, Kornelia Jumel, Catherine Alexander, *et al*. Comparison of

molecular mass determination of Hyaluronic acid using SEC/MALLS and sedimentation equilibrium. *Eur Biophys J* (2003) 32: 450~456; Kit-Leong Cheong, Ding tao Wu, Jing Zhao, *et al.* A rapid and accurate method for the quantitative estimation of natural polysaccharides and their fractions using high performance size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering and refractive index detector. *Journal of Chromatography A* (2015) 1400: 98~106）。

如本文所用，术语“ICP-MS”指电感耦合等离子体质谱法（Inductively coupled plasma mass spectrometry ）是当代元素组成测定技术中的重大发展，具有高灵敏度，干扰少、超痕量检测限、多元素同时分析等诸多优点，具体测定方法可采用本领域公知的方法，例如冯先进，屈太原. 电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)最新应用进展.中国无机化学分析.(2011) 1:46~52 所记载的方法。

如本文所用，术语“ICP-OES”指电感耦合等离子体发射光谱法（Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer），是本领域用于测定金属离子含量的常用方法，具体测定方法可采用本领域公知的方法。

技术问题的发现

本申请的发明人发现，现有技术 SEC-MALS 在测定甘露寡糖二酸类样品时，计算得到纯度不合理，且样品后有未知峰，且 MALS 在此含量基础上得到的重均分子量存在偏差。另外，不仅是甘露寡糖二酸类，还发现在其他多种糖中也存在这个问题，例如聚甘露糖醛酸、聚古罗糖醛酸、藻酸双酯钠、聚甘露糖醛酸硫酸酯、聚古罗糖醛酸硫酸酯、肝素等。申请人发现，这些糖均为含有酸性基团的糖，也即在糖结构中包含

羧基、硫酸酯基、磷酸酯基等阴离子。本申请中将这样的糖称为酸性糖。

针对上述现象，通常认为是样品在柱子上发生吸附造成含量降低，但是发明人发现，这种情况在使用柱子多次分离后也未得到解决。为探索该问题，发明人对 SEC-MALS 测定酸性糖时的未知峰进行解析，结果发现该未知峰对于得到酸性糖可溶盐准确重均分子量和含量至关重要，从而获得一种高效、简单、稳定的检测酸性糖的重均分子量、含量的方法。

本发明的发明人发现，未知峰归属于酸性糖结构中的金属离子，因此，在将酸性糖转化成钠盐之后，通过测定方法调节由于钠盐所带来的分子量改变，由此调整所获得的糖的重均分子量，获得更加准确的测定值。

酸性糖

在本发明的一些实施方案中，所述的酸性糖可溶性盐选自结构中具有羧基、硫酸酯基或磷酸酯基一种或一种以上结构特征的。

在本发明的一些实施方案中，所述酸性糖可溶性盐选自具有以下糖链结构的：甘露寡糖二酸、聚甘露糖醛酸、聚古罗糖醛酸、藻酸双酯钠、聚甘露糖醛酸硫酸酯、聚古罗糖醛酸硫酸酯、肝素、低分子量肝素、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、透明质酸、PI88、或岩藻糖硫酸酯、卡拉胶、右旋糖酐硫酸酯。但可适用本发明方法的酸性糖包括但不限于上述的种类。

在本发明的一些实施方案中，所述酸性糖可溶性盐包括但不限于具有以下糖链结构的糖：甘露寡糖二酸、肝素或低分子量肝素。

金属离子含量的测定

在本发明的实施方案中，所述酸性糖可溶性盐中金属离子含量的测定方法选自：ICP-MS、ICP-OES、原子吸收或离子色谱法。优选ICP-MS、离子色谱法，更优选离子色谱法。这些测定方法如前文所描述。

电感耦合等离子体质谱法（Inductively coupled plasma mass spectrometry，ICP-MS）是当代元素组成测定技术中的重大发展，具有高灵敏度，干扰少、超痕量检测限、多元素同时分析等诸多优点（冯先进，屈太原. 电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)最新应用进展.中国，无机化学分析.(2011) 1:46~52）。发明人首次尝试将 SEC 与 ICP-MS 联用，成功确认了 SEC-MALS 测定酸性糖可溶性盐样品峰后的未知峰为金属离子，同时能够获得金属离子的种类及含量的相关数据。

在此基础上，通过测定离子的种类及其含量来以期对SEC-MALS法测定的重均分子量和含量进行校正：通过将测得的重均分子量和含量分别除以酸性糖可溶性盐中糖链部分所占的质量分数，进而分别得到酸性糖可溶性盐的重均分子量和含量。

SEC-MALS 方法测定分子量和含量

在本发明中， SEC-MALS方法用于测定酸性糖类的分子量和含量。在采用SEC-MALS方法进行解析时，酸性糖类的可溶性盐样品进入SEC柱分析时发生解离（可参见实施例1），由此可知，SEC-MALS方法得到的是解离后不含金属离子的酸性糖的重均分子量和含量，因此酸性糖可溶性盐的重均分子量和含量还应考虑金属离子含量的影响，目前的SEC-MALS方法中，还没有关于这方面的报道。

在本发明采用的 SEC-MALS 方法中，可以使用醇+盐的溶液作为流

动相；其流速可能为 0.1-0.5 mL/min；其中，所述流动相中醇的含量为 0-20%。所述醇可为甲醇、乙醇、丙醇、环己醇或其混合物，所述盐选自 NH_4Ac、NaAc、NaCl、$NaNO_3$ 或 Na_2SO_4，盐溶液的浓度为 0.02-0.5mol/L。

在本发明的另一优选实施方案中，SEC-MALS 测定采用 20%甲醇 +80% 80mmol/L NH_4Ac 作为流动相；其流速为 0.1 mL/ min。

在本发明的另一优选实施方案中，所述的测定方法还包括测定酸性糖类的折光指数增量（**dn/dc**）的步骤。

在本发明的另一优选实施方案中，所述的酸性糖类的折光指数增量（**dn/dc**）的测定包含以下步骤:

（1）使用与 SEC-MALS 测定相同的流动相溶解酸性糖类样品，并将样品稀释，得到 0.1mg/ml-2mg/ml 浓度区间内的 5-6 个浓度点的系列溶液;

（2）用示差折光检测器（例如 Wyatt，Optilab T-rEX(WTREX-08）分别依次进样流动相、步骤 2 中制备的样品溶液，并采集信号;

（3）由 Astra 软件计算得到 dn/dc。

在本发明的一个实施方案中，酸性糖类物质的重均分子量和含量应按如下方法进行测定:

步骤 1：ICP-MS、ICP-OES、原子吸收或离子色谱法测定酸性糖类中金属离子的重量百分含量 A。

步骤 2：测定酸性糖类的 dn/dc:

（1）称定恒重的样品，加入流动相溶解，配置成 0.1-5 mg/ml，优选 0.2-2 mg/ml 的系列溶液，该系列溶液的浓度可以

是例如 0.2mg/ml、0.4mg/ml、0.8mg/ml、1.2mg/ml、1.8mg/ml、2mg/ml；使用醇+盐的溶液作为流动相；其中，所述流动相中醇的含量为 0-20%。所述醇可为甲醇、乙醇、丙醇、环己醇或其混合物，所述盐选自 NH_4Ac、NaAc、NaCl、$NaNO_3$ 或 Na_2SO_4，盐溶液的浓度为 0.02-0.5mol/L。

（2）用示差折光检测器（例如 Wyatt，Optilab T-rEX(WTREX-08）分别依次进样流动相、步骤（1）配制的系列溶液，并采集信号，

（3）由 Astra 软件计算得到 dn/dc。

步骤 3: SEC-MALS 测定酸性糖类分子量和含量

（1）根据预估待测酸性糖分子量的范围，选择适合的色谱柱；

（2）配制待测酸性糖样品的梯度溶液，其浓度范围为 2-500mg/ml，分 3-10 个梯度；例如约为 2、10、50、100、300mg/ml（浓度=重量/体积）的溶液。

（3） 使用醇+盐的溶液作为流动相；其流速可能为 0.1-0.5 mL/min；其中，所述流动相中醇的含量为 0-20%。所述醇可为甲醇、乙醇、丙醇、环己醇或其混合物，所述盐选自 NH_4Ac、NaAc、NaCl、$NaNO_3$ 或 Na_2SO_4，盐溶液的浓度为 0.02-0.5mol/L，检测器采用十八角激光检测器和示差折光检测器；

（4）使用 SEC-MALS 法直接得到的酸性糖类重均分子量 M_{w1}；

（5）使用图谱处理软件计算得到的样品中酸性糖类的质

量 X;

（6）使用以下公式进行计算，分别得到酸性糖类的重均分子量和含量:

$$\text{重均分子量 } M_w\text{（Da）}=\frac{Mw1}{(1-A)}\text{.....公式（1）}$$

以上公式（1）中：M_{w1} 为 SEC-MALS 法直接得到酸性糖类的重均分子量（Da）；A 为酸性糖类中金属离子的含量;

$$\text{含量}(\%)-\frac{X}{Y(1-A)}\times 100\%\text{.....公式（2）}$$

以上公式（2）中：X 为图谱处理软件计算得到的质量；Y 为进样的质量；A 为酸性糖类中金属离子的含量。

SEC-MALS法测定重均分子量和含量的具体操作条件可以根据常规的实验方案进行。

本发明与现有技术相比具有以下优点:

（1）对酸性糖可溶性盐样品 SEC-MALS 分析中的未知峰进行解释。

（2）可以精确测定酸性糖可溶性盐重均分子量和含量，重复性好。

（3）重均分子量和含量可在一次分析中得到，操作简单。

（4）提高了测量酸性糖可溶性盐的准确性，有助于更准确地研究多糖的分子结构。

实施例

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体

条件的实验方法，通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。

实施例部分所使用的仪器包括:

LC: Agilent 1260 液相色谱仪

18 角度激光检测器: Wyatt DAWN HELEOS II

示差折光检测器: Wyatt Optilab T-rEX

ICP-MS: Agilent 7900 ICP-MS

离子色谱: 瑞士万通

ICP-OES: 美国 Perkin-Elmer 公司 Optima7000DV 电感耦合等离子发射光谱仪

火焰原子吸收: 北京瑞利 WFX-120B 型火焰原子吸收光谱仪

实施例 1 SEC 与 ICP-MS 揭示酸性糖在尺寸排阻色谱的分离机理

（1）测试的样品为甘露寡糖二酸钠盐，将样品溶于水中，浓度 2mg/ml，进样 0.1ul。通过 SEC 色谱柱 Waters ACQUITY UPLC@BEH125 ÅSEC 1.7um 4.6×300mm 柱（购自 Waters），流动相为 20 mmol/L NH_4Ac，流速 0.1 mL/ min; 将 SEC 与 ICP-MS 联用，采集 ^{23}Na 的信号。同时，使用溶剂水作为对照。

（2）将 SEC 与 MALS 联用，样品甘露寡糖二酸钠盐溶于流动相中，浓度 10mg/ml，进样 20ul。

附图 1 示出了溶剂水（图 1A）和甘露寡糖二酸钠盐（图 1B）的 SEC-ICP-MS 谱图，以及甘露寡糖二酸钠盐的 SEC-MALS 示差谱图（图 1C）。结果显示，在 SEC-ICP-MS 谱图中，相比于阴性对照，甘露寡糖二酸钠盐在 a 处有明显 Na 盐峰，比较图 1B 和图 1C 可知，甘露寡糖二酸钠盐在 SEC-ICP-MS 谱图 a 处的 Na 盐峰与示差谱图 b 处的峰出峰位置一致，说明示差谱图 b 处的未知峰为钠盐峰，这意味着甘露寡糖二酸

进入 SEC 柱分析时发生解离，SEC-MALS 方法得到是解离后不含金属离子的甘露寡糖二酸的重均分子量和含量，提示为了准确计算出酸性糖可溶性盐的重均分子量和含量，采用 SEC-MALS 方法时，必须考虑酸性糖可溶性盐中的金属离子进行校正，具体计算见公式 1、公式 2。

$$\text{校正后重均分子量 } M_w\text{（Da）}=\frac{Mw1}{(1-A)}\text{……公式（1）}$$

以上公式（1）中：M_{w1} 为 SEC-MALS 法直接得到酸性糖重均分子量（Da）；A 为金属离子的含量。

$$\text{校正后含量}(\%)=\frac{X}{Y(1-A)}\times 100\%\text{……公式（2）}$$

以上公式（2）中：X 为图谱处理软件计算得到的质量（μg）；Y 为进样的质量（μg）；A 为金属离子的含量。

实施例 2　SEC-MALS 用于测定肝素、低分子量肝素的重均分子量和含量

样品：肝素钠（Heparin sodium）、依诺肝素钠（Enoxaparin solium）、那屈肝素钙（Nadroparin calcium）和氢型肝素（Heparin H），将样品配制成溶液。

步骤 1：SEC-ICP-MS 测定金属离子的含量

（1）使用色谱柱 Waters ACQUITY UPLC@BEH200 Å SEC 1.7um 4.6×150mm 柱，80mmol/L NH_4Ac 为流动相，流速 0.1 mL/ min。

（2）将 SEC 与 ICP-MS 联用：将样品溶于水中，浓度 0.02mg/ml，进样 20ul，采集 ^{23}Na, ^{43}Ca, ^{44}Ca 的信号。将信号与分别配置的浓度为 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1.0 ppm, 5.0 ppm 和 10.0 ppm 的 Na 和 Ca 离子标准溶液，并以外标法计算样品中金属离子的重量含量（A 值）。

步骤 2：测定 dn/dc

（1）称定恒重的样品 20mg 至 10ml 容量瓶中，加入步骤 3 中的流动相溶解，振摇，即得母液。分别取母液 0.2、0.4、0.8、1.2、1.8ml，用流动相稀释至 2ml，得 0.2mg/ml、0.4mg/ml、0.8mg/ml、1.2mg/ml、1.8mg/ml、2mg/ml 的一系列溶液。

（2）用示差折光检测器（Wyatt，Optilab T-rEX(WTREX-08）分别依次手动进样所述流动相、所述 0.2mg/ml、0.4mg/ml、0.8mg/ml、1.2mg/ml、1.8mg/ml、2mg/ml 样品溶液，并采集信号，dn/dc 由 Astra 软件计算得到，如下表所示。

样品	dn/dc（mL/g）
肝素钠	0.1311
依诺肝素钠	0.1341
那屈肝素钙	0.1382
肝素 H	0.1310

步骤 3： SEC-MALS 测定重均分子量和含量

（1）使用色谱柱 Waters ACQUITY UPLC@BEH200 Å SEC 1.7um 4.6×150mm 柱，80mmol/L NaCl 为流动相，流速 0.1 mL/ min。

（2）将 SEC 与 MALS 联用，样品溶于流动相中，浓度为 10mg/ml，进样量 20ul，即公式中 Y 值为 200ug。

实施例 2 结果见表 1 和图 2。

表 1：肝素和低分子量肝素金属离子含量及校正前后的重均分子量和含量

样品	Mw1（kDa）	X 值(ug)	X/Y%	A 值	校正*后 Mw（kDa）	校正*后含量%
肝素钠	15.9	182.0	91.0	10.6[a]	17.8	101.8
依诺肝素钠	4.3	179.1	89.5	10.56[a]	4.8	100.1
那屈肝素钙	4.5	178.3	89.2	10.67[b]	5	99.8

肝素 H	15.6	197.1	98.5	0.87[a]	15.7	99.4

Y 值为 200ug;

*: 采用实施例 1 中的公式校正;

a 为 Na%; b 为 Ca%。

实施例 2 的结果见图 2 和表 1。比较 2A 和 2B(氢型肝素和肝素钠),发现两者示差图一致,但在示差的倒峰处(因流动性和样品溶剂的影响,在盐峰位置示差图可呈现正峰、倒峰),氢型肝素无 Na 信号,而肝素钠有 Na 信号、且 2C 和 2D(依诺肝素钠和那屈肝素钙)也均有 Na 或 Ca 信号,说明氢型肝素不含 Na,而肝素钠、依诺肝素钠和那屈肝素钙这三种酸性糖金属盐在 SEC 柱上发生解离,金属离子延后出峰。从表 1 可知,肝素钠和肝素 H 的 Mw1 相近,说明 SEC-MALS 法直接测得为糖部分的重均分子量;通过 ICP 测定金属离子含量得到 A 值后,采用实施例 1 中的公式校正,发现二者的差异明显增加;肝素 H 的 X/Y%接近 100%,而肝素钠校正后含量近于 100%,表明 SEC-MALS 法直接测得为糖部分的含量;同法计算依诺肝素钠和那屈肝素钙的重均分子量和含量。综上,经过校正后,SEC-MALS 可以准确计算出肝素盐和低分子量肝素盐的重均分子量和含量。

实施例 3 SEC-MALS 方法和质谱方法互证

样品: 甘露寡糖二酸五糖(Na 型)

(1)色谱柱 Waters ACQUITY UPLC@BEH125 Å SEC 1.7um 4.6×300mm 柱,20%甲醇+80%80mmol/L NH_4Ac 为流动相,流速 0.1 mL/min。

(2)将 SEC 与 MALS 联用,样品溶于流动相中,浓度 10mg/ml,

进样 20ul。

（3）将 SEC 与质谱联用，样品溶于水中，浓度 10mg/ml，进样 10ul。

（4）离子色谱测定酸性糖中金属离子的含量。

Na 离子标准溶液配置为 25、10、12.5、6.25、3.125ppm。样品浓度为 2mg/ml。离子色谱条件：预柱：Metrosep C4 Guard/4.0；分离柱：Metrosep C5-150/4.0; 流动相: 5mM 硝酸的超纯水溶液; 流速: 0.9ml/min; 进样量 20ul。以外标法进行金属离子含量的测定。

按实施例 1 进行甘露寡糖二酸五糖（Na 型）金属离子含量（A）的测定。

实施例 3 的结果见图 3 和表 2。

图 3 中，质谱图 B 为总离子流图中出峰位置 a 段的累积质谱图，从图 B 和表 C 可知，质谱测得的甘露寡糖二酸五糖的质量数同理论质量数一致，即甘露寡糖二酸五糖（H 型）分子量为 854-914Da。

表 2 甘露寡糖二酸五糖（Na 型）的 SEC-MALS 结果

	Mw1（Da）	X 值	X/Y（%）	A 值（%）	校正*后 Mw（Da）	校正*后含量（%）
1	907	168.8	84.4	12.4	1035.4	96.3
2	914	171.6	85.8	11.9	1037.5	97.4
3	902	173.6	86.8	12.7	1033.2	99.4
平均值	908	171.3	85.7	12.3	1035.4	97.7
RSD%	0.66%	1.41%	1.41%	3.28%	0.20%	1.60%

Y 为 200ug，*：指采用实施例 1 中的公式校正

由表 2 甘露寡糖二酸五糖钠的 SEC-MALS 结果可知，SEC-MALS 测定的重均分子量为 908Da；液质联用结果详见图 3（A 为甘露寡糖二酸五糖钠总离子流图、B 为质谱图、C 为理论质量数列表），质谱结果显示，分子量为 854-914Da，经过归属发现其为甘露寡糖二酸五糖 H 型

的分子量，与 SEC-MALS 测定的结果一致，进一步说明 SEC-MALS 的计算结果是不含金属离子的氢型甘露寡糖二酸五糖的重均分子量和含量，与实施例 1 的结论一致。经校正，甘露寡糖二酸五糖（Na 型）的重均分子量为 1035Da，含量为 97.7%。

实施例 4　SEC-MALS 用于测定 PI88 的重均分子量和含量

PI88 为一种含有磷酸根和硫酸根的酸性糖。其制备方法可参见 Guangli Yu, Nur Sibel Gunay , Robert J. Linhardt, et al. Preparation and anticoagulant activity of the phosphosulfomannan PI-88[J]. European Journal of Medicinal Chemistry 37 (2002) 783-791。

步骤 1：ICP-OES 测定金属离子含量:

采集 Na 589nm 的分析谱线，配制 1mg/L、5mg/L、10mg/L 的 Na 标准溶液；样品溶液浓度配制为 20mg/L。采用 ICP-OES 测定金属离子含量。

步骤 2：测定 PI88 的 dn/dc

方法同实施例 2 步骤 2。

步骤 3：SEC-MALS 测定重均分子量和含量

方法同实施例 2 步骤 3。

实施例 4 的结果见表 3。

表 3：　PI88 金属离子含量、dn/dc 及校正前后的重均分子量和含量

样品	A 值（%）	dn/dc	Mw1（Da）	X（ug）	X/Y（%）	校正*后 Mw（Da）	校正*后含量（%）
PI88	14.3	0.1421	2100	167.6	83.8%	2450	97.8%

Y 为 200ug，*:采用实施例 1 中的公式校正

从表 3 可以看出，经过校正，SEC-MALS 可以准确计算出含有磷酸

根和硫酸根的寡糖 PI88 的重均分子量和含量：重均分子量为 2450Da，含量为 97.8%。

实施例 5　SEC-MALS 用于测定硫酸软骨素钠的重均分子量和含量

步骤 1：火焰原子吸收法测定金属离子含量：

采集 Na 330.2nm 的谱线，配制 1mg/L、10mg/L、50mg/L、75mg/L 和 100mg/L 的 Na 标准溶液；外标法计算样品中金属离子的浓度（即 A 值），样品溶液浓度配制为 200mg/L。

步骤 2：SEC-MALS 测定重均分子量和含量

（1）色谱柱 TSK G3000PWXL 7.8×300mm 柱，0.3mol/L Na_2SO_4 为流动相，流速 0.5 mL/ min，柱温 35℃。

（2）将 SEC 与 MALS 联用，样品溶液流动相中，浓度为 10mg/ml，进样量 25ul。

实施例 5 的结果见表 4。

表 4 硫酸软骨素钠金属离子含量、dn/dc 及校正前后的重均分子量和含量

样品	A 值%	dn/dc	Mw1（Da）	X（ug）	X/Y（%）	校正*后 Mw（Da）	校正*后含量（%）
硫酸软骨素钠	9	0.1427	17k	181.4	90.7%	18.7k	99.7%

Y 为 200ug，*:采用实施例 1 中的公式校正

表 4 中 dn/dc 来自于文献（宋玉娟,任丽萍,范慧红。硫酸软骨素钠分子质量及其分布的测定[J].中国新药杂志，2011 年，20（18），1795-1797）报道，经过校正，SEC-MALS 可以准确计算出含有硫酸根和羧酸根的多糖硫酸软骨素钠的重均分子量和含量：重均分子量为 18.7kDa，含量为

99.7%。

实施例 6 SEC-MALS 用于测定几种多糖可溶性盐的重均分子量和含量

聚甘露糖醛酸钠和聚古罗糖醛酸钠含有羧基；聚甘露糖醛酸硫酸酯钠盐、聚古罗糖醛酸硫酸酯钠盐和藻酸双酯钠含有羧基和硫酸酯基；硫酸角质素和岩藻聚糖硫酸酯含有硫酸酯基。

步骤 1： ICP-MS 测定金属离子的含量

经文献查证，以上样品中的多糖均为 Na 盐，故采集 ^{23}Na 的信号。样品溶于水中，浓度 0.02mg/ml; 配制 Na 标准溶液，浓度为 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1.0 ppm, 5.0 ppm and 10.0 ppm。

步骤 2: 测定 dn/dc

方法同实施例 2 步骤 2。

步骤 3: SEC-MALS 测定重均分子量和含量

（1）色谱柱：具体见表 5。

（2）将 SEC 与 MALS 联用，样品溶液流动相中，浓度为 10mg/ml，进样量 20ul。

实施例 6 的结果见表 5。

表 5: 几种多糖的金属离子含量、dn/dc、所用柱子、校正前后的重均分子量和含量

	A 值（%）	dn/dc	柱子	Mw1（Da）	X（ug）	X/Y（%）	校正*后 Mw（Da）	校正*后含量（%）
聚甘露糖醛酸钠	11	0.1370	xBrige waters	6.1k	178.6	89.3	6.9 k	100.3

聚甘露糖醛酸硫酸酯钠盐	15.7	0.1401	beh sec 200 Å 3.5um 7.8×300mm	5.3k	166	83	6.3 k	98.4
聚古罗糖醛酸硫酸酯钠盐	15.1	0.1104		8.9k	168.2	84.1	10.5 k	99.1
聚古罗糖醛酸钠	10.8	0.1272	TSK G3000PWXL 7.8×300mm	14.7k	176	88	16.5 k	98.6
藻酸双酯钠	16	0.1411		15.4k	165.8	82.9	18.3 k	98.7
硫酸角质素	5.6	0.1423		20.3k	183.6	91.8	21.5 k	97.2
岩藻聚糖硫酸酯	8.3	0.1302	Shodex OHpak SB-803 HQ 7.8×300mm	30.0k	177	88.5	32.7 k	96.5

Y 为 200ug，*:采用实施例 1 中的公式校正

从表 5 可以看出，经过校正，SEC-MALS 可以准确计算出酸性多糖可溶性盐的重均分子量，且含量在 96-101%之间。