

海洋硫酸多糖几种脱硫方法的比较研究

刘 鑫^{1,2}, 王玉峰^{1,2}, 曾洋洋^{1,2}, 王培培^{1,2}, 韩章润^{1,2}, 吴建东^{1,2}, 于广利^{1,2}

(1. 海洋药物教育部重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 山东省糖科学与糖工程重点实验室, 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 以 κ -卡拉胶(硫酸基含量 25.1%, 分子质量 83.1 kD)为原料, 研究了二甲基亚砷-甲醇法(DMSO 法)、三甲基氯硅烷法(CTMS 法)以及苯并四甲酸-三氧化二锡法(PMA 法)对其脱硫后多糖样品的得率、硫酸基含量及分子质量的影响。结果表明, κ -卡拉胶经三种方法脱硫后, 样品得率分别为 45.3%、50.6% 和 62.0%, 脱硫率分别为 42.2%、48.6% 和 82.8%, 分子质量分别为 15.7、22.3 和 4.75 kD。通过红外光谱和硫酸基含量分析表明, PMA 法脱硫效果优于 DMSO 和 CTMS 法。PMA 法不仅对 κ -卡拉胶有效, 而且适合于 ι -卡拉胶、 λ -卡拉胶和岩藻聚糖硫酸酯的脱硫。

关键词: 海洋硫酸多糖; 卡拉胶; 脱硫; 苯并四甲酸; 红外光谱

中图分类号: Q946.3; O621.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2012)12-0050-06

海洋动植物中存在着种类繁多、结构独特的硫酸多糖^[1-3], 而各种硫酸多糖具有广泛的生物活性^[4-5]。为了确定多糖结构, 探讨多糖活性与其硫酸基含量之间关系, 对其进行脱硫处理变得十分重要。

常用的多糖脱硫方法, 目前主要有二甲基亚砷-甲醇法(下称 DMSO 法)^[6-7]、三甲基氯硅烷法(下称 CTMS 法)^[8]以及苯并四甲酸-Sb₂O₃法(下称 PMA 法)^[9]。其中 DMSO 法操作简单, 但脱硫酸基效率不高; CTMS 法是一种非选择性的脱硫方法, 由于所用试剂容易爆炸, 实验具有一定危险性; PMA 法操作虽较复杂, 但用时短、安全性好。虽然国外学者对上述方法分别进行了脱硫效果研究, 但缺乏对它们在同一样品的得率、脱硫率以及脱硫前后分子质量变化的综合评价。

卡拉胶(carrageenan)是某些红藻中广泛存在的硫酸多糖。根据其单糖种类以及硫酸酯基取代位置的不同, 卡拉胶有十几种(如 α 、 β 、 κ 、 ι 、 λ 、 ν 、 π 、 θ 、 ω 、 ζ 、 γ 等), 其中 κ -卡拉胶在食品中应用最多, 它是由(1→3)-4-硫酸- β -D-半乳糖和(1→4)-3,6-内醚- α -D-半乳糖交替连接而成, 因其具有显著的免疫调节^[10]和抗病毒^[11]活性而受到广泛关注。作为硫酸半乳糖的 κ -卡拉胶, 分子中不仅含有酸不稳定的 3,6-内醚半乳糖, 且其硫酸酯基处于难脱除的半乳糖 C4 位, 是研究脱硫方法的良好原料。本文以 κ -卡拉胶为研究对象, 首次比较了三种脱硫方法的优缺点, 并

利用建立的方法评价了其他海洋来源硫酸多糖的脱硫效果, 为各种硫酸多糖的脱硫, 尤其是硫酸多糖的结构分析提供了有用参考。

1 材料和方法

1.1 试剂及仪器

材料: κ -卡拉胶(*K. Striatum*), 烟台市润隆海洋生物制品有限公司, 精制后使用; λ -卡拉胶、 ι -卡拉胶, sigma 公司。岩藻聚糖硫酸酯, 实验室自制。

试剂: 苯并四甲酸(pyromellitic acid, PMA), sigma 公司; 三甲基氯硅烷(chlorotrimethylsilane, CTMS), Acros organics 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

仪器: Shodex OHpak SB-806M HQ 凝胶色谱柱(8.0 mm ID × 300 mm, 13 μ m), 日本昭和电工; 732#阳离子交换树脂小柱(18mm ID × 50mm), 国药集团化学试剂有限公司; 红外光谱仪(Nicolet Nexus 470 型), Thermo Electron 公司; 高效液相色谱仪(Agilent 1260, 配柱温箱, 自动进样器, 示差检测器), 美国安捷伦

收稿日期: 2011-11-02; 修回日期: 2012-03-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070724); 国家海洋局公益性行业科研专项项目(201005024); 长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0944)

作者简介: 刘鑫(1987-), 男, 山东滨州人, 博士研究生, 研究方向: 海洋药物化学, 电话: 0532 - 82031790 E-mail: liuxinouc@163.com; 于广利, 通信作者, E-mail: glyu@ouc.edu.cn

公司; 紫外可见分光光度计(UV-2102 PCS), 尤尼柯上海公司; 十八角度激光散射仪 (DAWN HELEOSTM Light Scattering Instrument), 美国 Wyatt Technology 公司; 透析袋(MWCO 3.5kD), Spectrum Laboratories 公司。

1.2 方法

1.2.1 κ -卡拉胶吡啶盐制备^[8]

将精制后的 50 mg κ -卡拉胶样品溶于 5 mL 去离子水中, 过 732# 阳离子交换树脂小柱, 用 10 mL 去离子水洗脱, 收集水洗组分。用吡啶调节 pH 至 9, 旋转蒸发浓缩至 1~2 mL, 冷冻干燥, 得到 κ -卡拉胶吡啶盐(κ Py)。

1.2.2 DMSO 脱磺法^[6-7]

将 60 mg κ Py(约 50 mg κ -卡拉胶)加到 10 mL 干燥具塞玻璃瓶中, 加入 4.5 mL 无水 DMSO 和 0.5 mL 无水甲醇, 超声溶解后, 于 80 °C 沙浴反应 10 h 后, 冷却至室温, 加入 5 mL 蒸馏水终止反应。产物经透析袋透析去除有机溶剂、盐等杂质, 内液离心后过 0.22 μ m 膜, 旋蒸、冻干。

1.2.3 CTMS 法^[8]

取 60 mg κ Py(约 50 mg κ -卡拉胶), 加到 10 mL 干燥具塞玻璃瓶中, 用 5 mL 无水吡啶溶解后, 加入 CTMS 0.67 mL, N₂ 保护下 100 °C 油浴反应 8 h 后, 缓慢加入 5 mL 蒸馏水终止反应。其他步骤同上。

1.2.4 PMA 法^[9]

取 60 mg κ Py(约 50 mg κ -卡拉胶), 加到 100 mL 干燥圆底烧瓶中, 加入 9 mL 无水 DMSO 和 1 mL 无水吡啶, 磁力搅拌溶解后, 分别加入 65 mg PMA 和 60 mg Sb₂O₃, 再加入 1 mL 吡啶, 在 N₂ 保护下, 在 120 °C 磁力搅拌油浴中搅拌反应 3 h 后, 冷却至室温, 向反应体系中加入 3 % 碳酸氢钠水溶液 5 mL, 终止反应。其他处理步骤同上。

1.2.5 硫酸基含量分析^[12]

采用硫酸钡比浊法测定。

1.2.6 红外光谱分析

取各多糖样品以及脱磺后样品适量, 用 P₂O₅ 干燥 48 h, 取 1~2 mg 经 KBr 压片后进行红外光谱分析, 扫描范围为 400~4 000 cm⁻¹。

1.2.7 分子质量测定

将样品用 0.1 mol/L Na₂SO₄ 配成 5 g/L 溶液, 经 Shodex OHpak SB-806 HQ 色谱柱分离, 采用示差和十八角激光散射仪联用技术分析测定各样品分子量。进样量 100 μ L, 柱温 35 °C, 流速 0.5 mL/min。

2 结果与讨论

2.1 样品得率和硫酸基含量

样品经三种方法脱磺后, 分别冻干、称重, 计算产率, 结果如表 1 所示。由表 1 可知, PMA 法(62.0 %)及 CTMS 法(50.6 %)产率相对较高, 而 DMSO 法(45.3 %)产率较低。产率的高低主要与以下因素有关, 一是原料起始为钠型, 使用阳离子交换树脂将其转变为氢型, 与吡啶反应生成吡啶盐, 以增加其溶解度, 然后脱除硫酸基, 最终原料二糖单位分子质量降低(图 1), 导致产率降低; 另一个原因是由于脱磺过程中造成了多糖的降解, 形成降解产物, 在后续透析过程中造成损失, 从而降低得率。

本实验 κ -卡拉胶钠盐二糖重复单元的分子质量为 408.3 D, 当转变为吡啶盐后, 二糖单元分子质量变为 464.4 D。如果 κ -卡拉胶全部脱磺, 则得到 β -卡拉胶, 其二糖重复单元的分子质量为 306.3 D。由 κ -卡拉胶变为 β -卡拉胶的理论得率为 75.0 % (306.3/408.3)(图 1)。由于三种方法脱磺所用的温度、试剂等均不同, 产物颜色也不同, 如 DMSO 法产物为白色, 其余两个产物均为浅褐色, 但所用产物均为无定型粉末。

从表 1 可看出, 不同方法脱磺效果不同, CTMS 法及 DMSO 法对于 κ -卡拉胶脱磺效果不如 PMA 法, PMA 法的脱磺率为 82.8 %, 是一种较理想的脱磺方法。

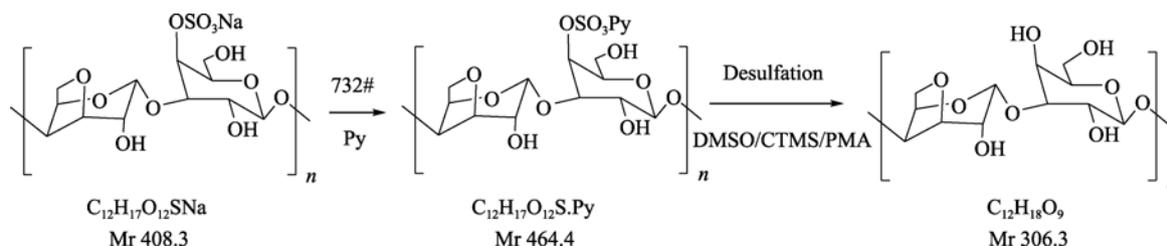


图 1 脱磺前后卡拉胶二糖重复单元结构

Fig. 1 Repeating disaccharide structure of κ -carrageenan before and after desulfation

表 1 κ -卡拉胶脱硫前后得率、硫酸基含量及分子质量分析

Tab. 1 The yield, sulfate content and molecular mass analysis of κ -carrageenan before and after desulfation

脱硫方法	得率(%)	硫酸基 (%)		脱硫率(%)	分子质量(kD)	
		脱硫前	脱硫后		脱硫前	脱硫后
PMA	62.0		4.30	82.8		4.75
CTMS	50.6	25.1	12.9	48.6	83.1	22.3
DMSO	45.3		14.5	42.2		15.7

注:脱硫率=[1- (脱硫后硫酸根含量/脱硫前硫酸根含量)] × 100 %

2.2 样品分子质量分析

脱硫反应均会造成多糖不同程度的降解,其降解程度与样品结构、反应体系温度、含水量及溶剂种类等因素有关。本文将样品转化为吡啶盐,有利于提高样品在体系中的溶解度。 κ -卡拉胶在采用 PMA 法、CTMS 法和 DMSO 法脱硫后,峰型不同,出峰时间延长,表明分子质量均降低,结果见图 2 和表 1。

示差和十八角激光散射仪联用技术是一种不需标准品,可以直接测定样品分子质量的分析技术,

示差信号显示样品组成,激光信号测定分子质量。选取激光信号与示差信号重合部分进行计算,获得样品分子质量数据。从表 1 可知,产物的峰位分子质量由 83.1 kD 分别降为 4.75、22.3 和 15.7 kD,与脱硫前相比,分子质量均明显降低。DMSO 法得率较低,是由于产生大量寡糖(dp 4-20),在透析过程中损失所致,这一点经 Toshi^[13]研究组用 DMSO 法制备脱硫的硫酸软骨素寡糖证实;而 PMA 法虽然产物分子质量降低,但不会降解产生寡糖^[9],因此在透析过程中损失较少,产率相对较高。

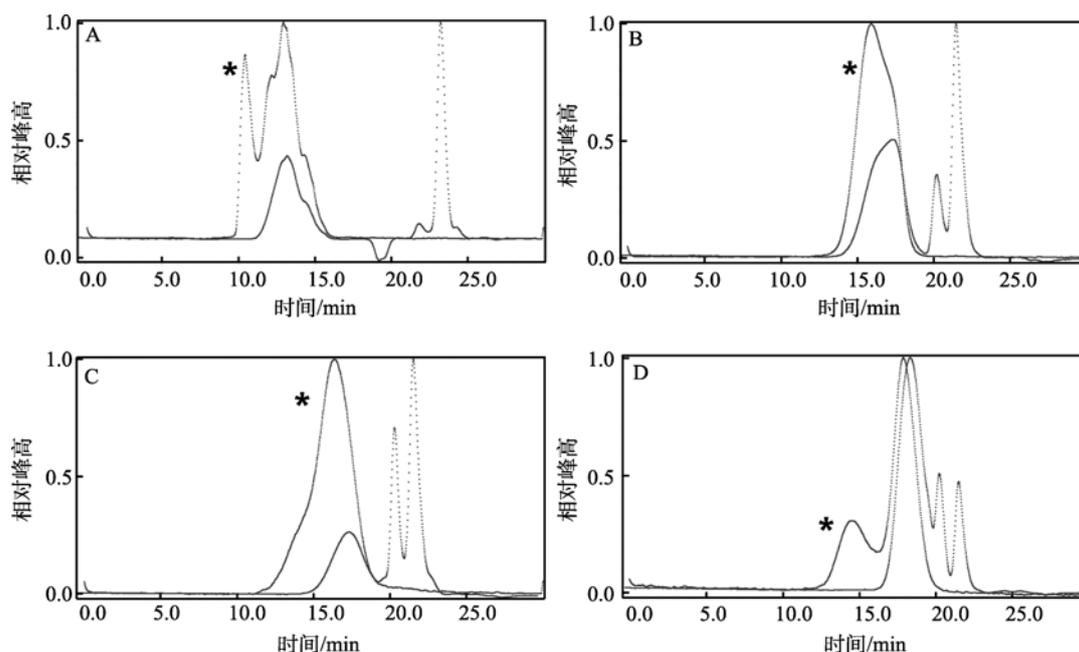


图 2 不同脱硫方法多糖样品 HPGPC-RI-MALLS 图谱

Fig. 2 HPGPC-RI-MALLS chromatographs of polysaccharides before and after desulfation by different methods

A. κ -卡拉胶; B. CTMS 法脱硫产物; C. DMSO 法脱硫产物; D. PMA 法脱硫产物; *. 十八角激光散射信号

A. κ -carrageenan; B. desulfated product by CTMS method; C. desulfated product by DMSO method; D. desulfated product by PMA method; signals of eighteen angles light scatterer

2.3 红外光谱分析

从分子质量分析可知,多糖脱硫前后发生不同程度降解,降解后多糖骨架是否破坏是重要的评价指标。脱硫前后 κ -卡拉胶的红外光谱分析如图 3 所示。1 250 cm^{-1} 左右为硫酸酯基中 S=O 伸缩振动峰,

其强弱可以初步判定硫酸基的多少,通过比较其与 1069 cm^{-1} 处 C-O 伸缩振动峰(表征糖总量),可以考察脱硫效果。 κ -卡拉胶中 C4 位硫酸基的红外特征吸收峰在 845 cm^{-1} 处,比较此处吸收,可表征硫酸基脱除效果;930 cm^{-1} 为 3,6 内醚特征吸收峰。

由图 3 可知, DMSO 法脱硫产物在 $1\ 250\ \text{cm}^{-1}$ 处吸收峰峰值仍很高, 脱硫效果不理想; CTMS 法与 DMSO 法比较, $1\ 250\ \text{cm}^{-1}$ 处峰值有所降低, 但总体仍较高, 而且 $850\ \text{cm}^{-1}$ (C4 位硫酸基) 有较明显吸收峰,

说明脱硫效果不理想; PMA 法在 $1\ 250\ \text{cm}^{-1}$ 吸收峰小, $850\ \text{cm}^{-1}$ 没有明显吸收峰, 说明脱硫效果显著, 且脱硫后多糖特征吸收没有明显改变, 说明没有破坏 κ -卡拉胶主链结构。

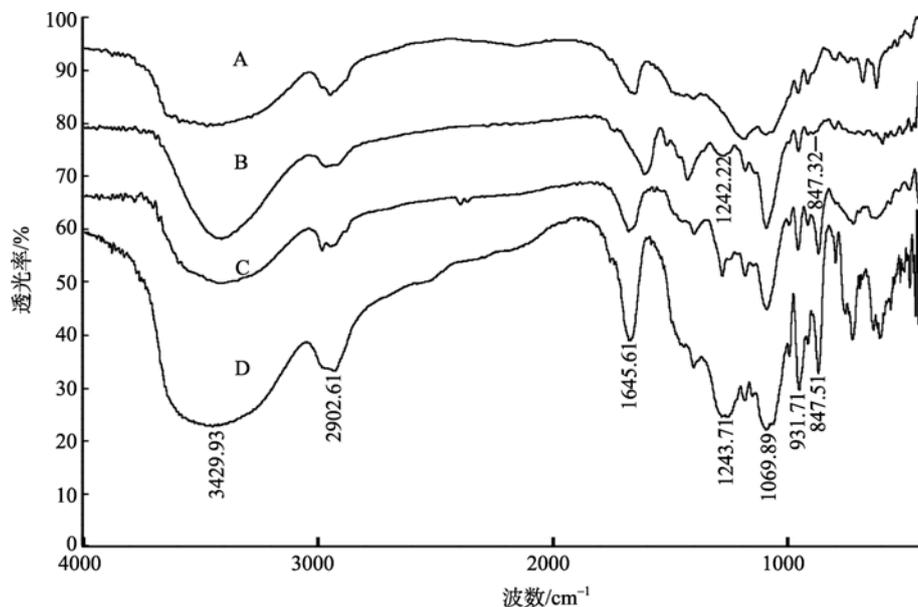


图 3 κ -卡拉胶及脱硫样品的 FTIR 图谱

Fig. 3 FTIR spectra of κ -car and different samples of desulfation

A.DMSO 法; B.PMA 法; C.CTMS 法; D. κ -卡拉胶原料

A.DMSO method; B.PMA method; C.CTMS method; D. κ -carrageenan material

2.4 PMA 法在其他硫酸多糖脱硫中应用

为了验证 PMA 法的有效性, 本文进一步对其他硫酸多糖进行脱硫分析。

选择 λ -卡拉胶、 ι -卡拉胶为实验对象, 应用 PMA 法进行脱硫, 产物进行红外光谱分析, 其结果如图 4 和图 5。

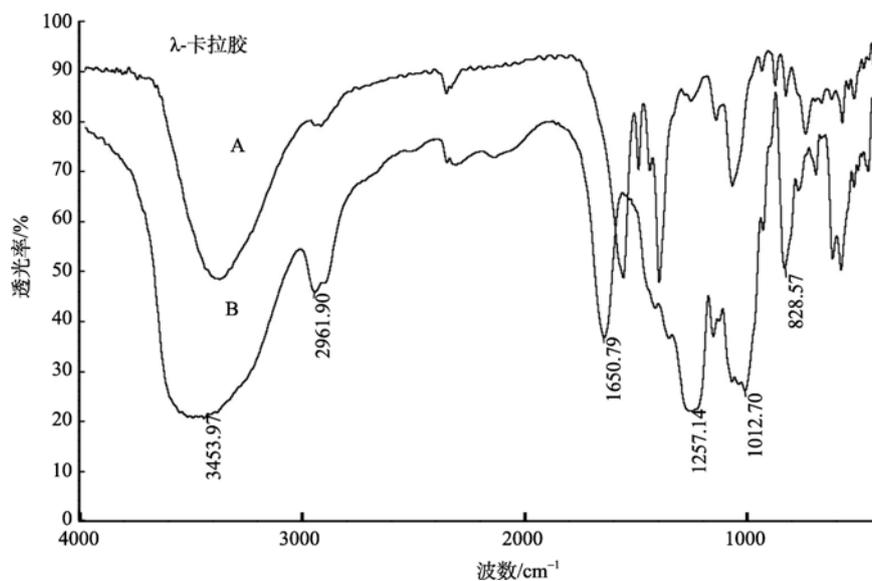


图 4 λ -卡拉胶脱硫前后样品 FTIR 图谱

Fig. 4 FTIR analysis of λ -carrageenan before and after desulfation

A. 脱硫 λ -卡拉胶; B. λ -卡拉胶

A. desulfated λ -carrageenan; B. λ -carrageenan

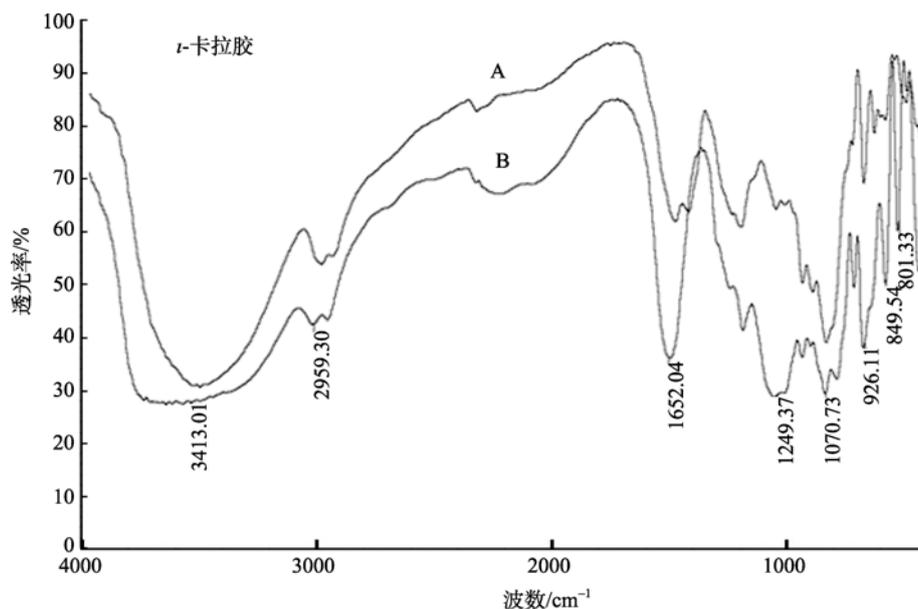


图 5 ι -卡拉胶脱硫前后样品红外光谱分析

Fig. 5 FTIR analysis of ι -carrageenan before and after desulfation

A. 脱硫 ι -卡拉胶; B. ι -卡拉胶

A. desulfated ι -carrageenan; B. ι -carrageenan

由图 4 和图 5 可知, 脱硫产物在 1250cm^{-1} 处吸收峰明显降低, 而且 λ -卡拉胶在 830cm^{-1} 、 806cm^{-1} (C2 位硫酸基吸收) 及 820cm^{-1} (C6 位硫酸基吸收) 处吸收峰降低, ι -卡拉胶在 806cm^{-1} (C2 位硫酸基吸收)、 845cm^{-1} (C4 位硫酸基吸收) 处吸收峰降低, 说明 PMA 法对 C2、C4、C6 位硫酸基均有较好的脱除效果。

海蒿子 (*Sargassum pallidum*) 水提取物用强阴离

子交换色谱 (Q Sepharose FF, 1mol/L NaCl) 分离获得一种岩藻聚糖硫酸酯, 用 PMA 法脱硫, 将脱硫前 (A) 与脱硫后 (B) 样品进行了红外光谱分析, 其结果如图 6 所示。脱硫前该组分在 1250cm^{-1} 处峰值很高, 脱硫产物 (B) 在 1250cm^{-1} 处吸收峰几乎消失, 说明 PMA 法对此多糖的脱硫效果较理想, 其硫酸基含量由脱硫前的 20% 降低到 4% 左右。

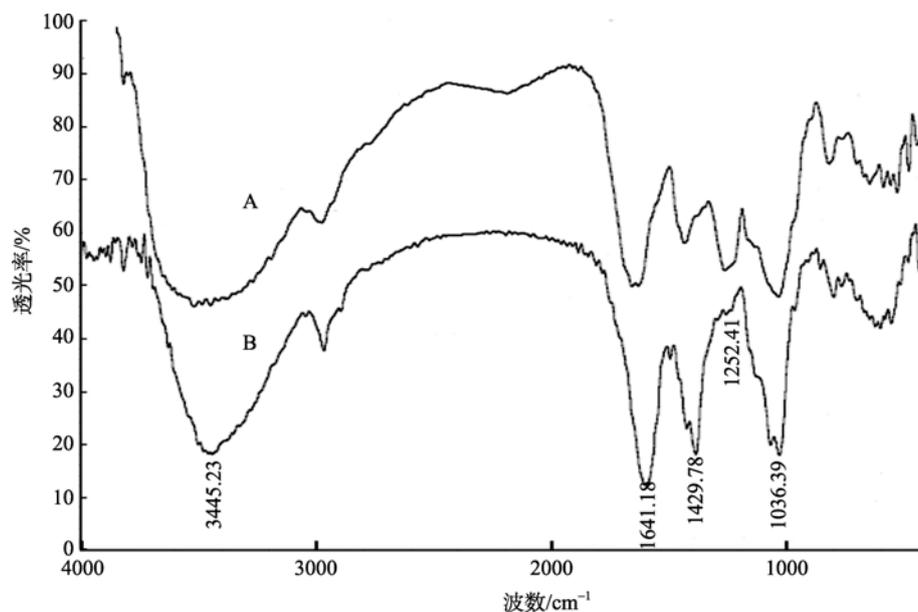


图 6 海蒿子岩藻聚糖硫酸酯脱硫前 (A) 和脱硫后 (B) 红外光谱图

Fig. 6 FTIR spectra of polysaccharides from *Sargassum Pallidum* after (A) and before (B) desulfation

A. 岩藻聚糖硫酸酯; B. 岩藻聚糖硫酸酯脱硫产物

A. Fucoidan; B. Desulfated fucoidan

3 结论

本文以 κ -卡拉胶为研究对象,考察了 PMA 法、CTMS 法、DMSO 法对其脱硫的效果,从产率、硫酸基含量、红外光谱、分子量等方面考察,表明 PMA 法是一种较理想的多糖脱硫方法,该法脱硫效率高,用时短,优于 CTMS 法、DMSO 法。利用 PMA 法对其他海洋硫酸多糖样品进行脱硫实验,同样得到了较理想的效果。本方法为从事糖类构效关系研究,以及海洋糖类药物开发提供了基础。

参考文献:

- [1] 胡艳南, 于广利, 吴建东. 珊瑚藻硫酸多糖的提取分离及其结构表征[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(10): 90-94.
- [2] 于广利, 嵇国利, 冯以明. 刺松藻水溶性多糖的提取分离及其理化性质研究[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(11): 90-94.
- [3] 文松松, 赵峡, 于广利. 海洋动物多糖研究进展[J]. 中国海洋药物, 2009, 28(4): 46-51.
- [4] Stephanie B, Eric D, Sophie F M, et al. Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions[J]. Carbohydr Poly, 2010, 81(2): 448-460.
- [5] Chen Shiguo, Xue Changhu, Yin Li'ang, et al. Comparison of structures and anticoagulant activities of fucosylated chondroitin sulfates from different sea cucumbers[J]. Carbohydr Poly, 2011, 83: 688-696.
- [6] Ciucanu I, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates[J]. Carbohydrate Research, 1984, 131(2), 209-217.
- [7] Patankar M S, Oehninger S, Barnett T. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities[J]. The Journal of biological chemistry, 1993, 268(29): 21770-21776.
- [8] Adriana A. Kolender, Maria C. Matulewicz. Desulfation of sulfated galactans with chlorotrimethylsilane. Characterization of b-carrageenan by ¹H-NMR spectroscopy[J]. Carbohydrate Research, 2004, 339: 1619-1629.
- [9] Miller I J, Blunt J W. Desulfation of algal galactans [J]. Carbohydrate Research 309(1998): 39-43.
- [10] 周革非, 李树福, 王长海. κ -卡拉胶硫酸多糖的免疫调节活性初步研究[J]. 海洋科学, 2010, 8: 56-59.
- [11] 郭丹, 栾晖, 孙黎玮. 低分子量卡拉胶及其衍生物的生物学活性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 5: 2581-2583.
- [12] 丛建波, 王长振, 李妍. 褐藻硫酸多糖硫酸基含量测定 - 硫酸钡比浊法研究[J]. 解放军药学学报, 2003, 19(3): 181-183.
- [13] Toida T, Sato K, Sakamoto N. Solvolytic depolymerization of chondroitin and dermatan sulfates[J]. Carbohydrate Research, 2009, 344: 888-893.

Comparison of several desulfation methods of marine sulfated polysaccharide

LIU Xin^{1,2}, WANG Yu-feng^{1,2}, ZENG Yang-yang^{1,2}, WANG Pei-pei^{1,2}, HAN Zhang-run^{1,2}, WU Jian-dong^{1,2}, YU Guang-li^{1,2}

(1. Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, Qingdao 266003, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Glycoscience and Glycotechnology, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Nov., 2, 2011

Key words: Marine polysaccharide; carrageenan; desulfation; pyromellitic acid; IR

Abstract: κ -carrageenan (sulfate content 25.1 %, molecular mass 83.1kD) was selected as studying material. The yields, sulfate contents and molecular masses of desulfated products of the methods of DMSO-MeOH (DMSO), trimethylchlorosilane (CTMS) and pyromellitic acid-Sb₂O₃ (PMA) were compared. The results showed that the yields of the desulfated κ -carrageenan were 45.3 %, 50.6 % and 62.0 %, the desulfation rates were 42.2 %, 48.6 % and 82.8 %, the molecular masses were 15.7 kD, 22.3 kD and 4.75 kD, respectively. According to the IR spectrum and sulfate content analysis, PMA method was better than the DMSO and CTMS method. PMA method was not only effective for κ -carrageenan, but also suitable for the desulfation of ι -carrageenan, λ -carrageenan and fucoidan polysaccharide.

(本文编辑: 康亦兼)