

GC-MS 联合二维核磁对文蛤多糖 Fr.2A 组分结构的解析

何永峰, 钱建瑛, 李 恒, 陆震鸣, 许正宏, 史劲松

(糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 采用 GC-MS 联合二维核磁的方法, 对文蛤均多糖结构进行解析。运用双酶辅助水提的方法, 提取文蛤粗多糖(MMPX), 分离纯化得到文蛤均多糖, 并通过气质联用技术(GC-MS)和核磁共振波谱(1D, 2D NMR), 对文蛤均多糖的结构进行了分析。结果表明, 从文蛤中提取得到文蛤粗多糖(MMPX), 经分离纯化得到高纯度文蛤均多糖 Fr.2A, 其单糖组成为葡萄糖(Glc)。GC-MS 分析发现, Fr.2A 存在三种残基单元 1, 4-Glcp、T-Glcp 和 1, 4, 6-Glcp, 摩尔比为 5.58 : 1.26 : 1.0; 核磁共振波谱分析表明, Fr.2A 是以 α -(1 \rightarrow 4) 与少量 α -(1 \rightarrow 6) 连接为主链, 并存在少量的 α -(1 \rightarrow 6) 和 β -(1 \rightarrow 4) 支链的新型水溶性 D 型吡喃葡聚糖。

关键词: GC-MS; 核磁共振; 多糖; 结构解析

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)10-0050-08

DOI: 10.11759/hyxx20170320003

多糖参与多种生物生理活动, 如细胞间的识别及信息传递、生物体的生长发育和机体能量代谢等。现代研究已证明, 多糖具有多种生物活性, 如降血糖、抗凝血、抗肿瘤及免疫调节功能等^[1-4], 在医药开发领域具有广泛的应用前景。多糖的功能与其结构密切相关, 多样性和特异性的结构是其生物功能的基础^[5-7]。通过对多糖结构的分析, 能够找到其生物功能的依据, 也是深入了解多糖作用机制的前提。由于多糖在糖基组成、连接方式、构型和支化度上具有多样性^[8], 采用经典方法解析结构复杂的多糖仍具有较高难度^[9]。随着核磁共振技术的不断发展, 尤其是高分辨率核磁图谱及二维核磁分析方法的普遍应用, 为多糖结构的精细解析提供了强有力的技术支持^[10]。

文蛤(*Meretrix meretrix* L.)是我国沿海潮间带常见的蛤类, 不仅肉质鲜美, 而且还具有很高的药用价值, 具有清肺化痰, 软坚散结, 利水消肿, 制酸止痛, 敛疮收湿和抗疲劳之功效^[11]。文蛤的组织提取液对艾氏瘤型、肝癌腹水型和肝癌实体型有较高的抑制率^[12]。已有较多研究认为^[12-15], 文蛤多糖是文蛤中具有抑制肿瘤和免疫活性的一个重要成分。研究文蛤多糖的方向主要集中在提取方法和药理活性评价, 而结构方面相对较少。本实验在进行文蛤多糖提取分离时, 发现不同提取方法所得的多糖组分的分子质量和糖基的组成差异较大。为寻找更具活性价值的多糖组分, 需要对获得的分离组分进行较为精细的结构分析。本文以气质联用(GC-MS)结合二维核磁

为主要手段, 对文蛤均多糖组分 Fr.2A 的结构进行鉴定, 以期为多糖类化合物的结构表征及构效关系研究提供参考。

1 材料与实验方法

1.1 材料

文蛤软体, 购于南通昌华水产食品有限公司, -20°C 下储存备用。

1.2 试剂

胰蛋白酶(2 500 U/mg), 木瓜蛋白酶(6 000 U/mg) 购自国药集团化学试剂有限公司; 右旋糖酐标准品购自 sigma 公司; 其他化学试剂均为国药试剂公司的分析纯。

1.3 仪器

SpectraMax 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司); 冷冻干燥机 2.5 L Traid(美国 LABCONCO 公司); AKTA purifier

收稿日期: 2017-03-20; 修回日期: 2017-07-18

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项经费项目(201305007); 江苏省重大科技成果转化项目(BA2015006)

[Foundation: National Marine public welfare industry research foundation of China, No.201305007; The transformation project for major scientific and technological achievements in Jiangsu Province, No.BA2015006]

作者简介: 何永峰(1989-), 男, 湖南道县人, 硕士研究生, 主要从事海洋活性多糖相关的研究, E-mail.15061888901@163.com; 史劲松, 通信作者, 男, 教授, 主要从事酶工程及天然活性物质开发研究, E-mail.shijs@163.com

900 蛋白纯化系统(美国 GE 集团); DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱和 Superdex G 75 葡聚糖凝胶柱(美国 GE 集团); 高效凝胶渗透色谱仪 HLC-8320GPC EcoSEC(美国怀雅特技术公司); 三重四级杆气质联用仪 GC-MS TSQ8000(美国赛默飞世尔科技有限公司); 核磁共振波谱仪 NMR 600M(德国布鲁克 AXS 公司)。

1.4 文蛤多糖的提取及纯化

采用双酶法(胰蛋白酶和木瓜蛋白酶)辅助提取文蛤粗多糖^[13]; 对文蛤粗多糖进行全波长扫描, 确定最适检测波长; 采用两步层析策略, 多糖进行分离纯化, 分别为弱离子交换层析(DEAE-FF)和分子筛阻层析(葡聚糖凝胶柱 G75), 得到了组分 Fr.2A。

1.5 单糖组成分析

采用离子色谱仪(ICS-5000 型), 色谱柱为 CarboPA20, 脉冲安培检测器; 流动相分别采用水、250 nmol/L NaOH 溶液、1 mol/L NaAc 溶液, 流速 0.5 mL/min。

1.6 分子质量及纯度检测

高效凝胶渗透色谱法(HPGPC), 色谱仪为 HLC-8320 GPC EcoSEC, 色谱柱为 Ultrahydroge Linear (300 mm×7.8 mm ID×2), 采用 2410 示差折光检测器。流动相为 0.1 mol/L NaNO₃, 流速为 0.8 mL/min; 采用 Epower 色谱工作站和 GPC 软件对多糖样品平均分子质量进行计算, 以右旋糖酐标准品进行曲线校正。

1.7 红外光谱分析

取 2 mg Fr.2A 与 KBr 混合、研细、压片, 在 4 000~500 cm⁻¹ 范围内进行扫描。

1.8 GC-MS 分析

1.8.1 样品预处理

采用改良的 Hakomori 法对样品甲基化^[16]: 先称取经 P₂O₅ 干燥的样品 50 mg, 加入 10 mL 无水二甲亚砜, 搅拌使多糖充分溶解; 再加入 200 mg 干燥的 NaOH 粉末, 搅拌使之溶解, 反应 1 h; 然而加入 6 mL 碘甲烷, 搅拌反应 1 h, 最后加入 2 mL 水终止反应。反应全程通入氮气进行保护。将反应液减压蒸干去除有机试剂, 再使用去离子水透析 24 h。将透析液浓缩、冻干。重复上述步骤 3 次。样品采用红外光谱检测, 当其 3 400 cm⁻¹ 波长附近的羟基峰完全消失, 表示甲基化完成。

酸水解: 取 5 mg 甲基化样品加入 2 mL 体积分数 90% 甲酸, 100℃ 水解 6 h, 减压蒸干, 加入 3 mL 甲醇再减压蒸干, 重复 3 次。溶解于 2 mL 水中, 加入 25 mg 硼氢化钠室温反应 2 h, 滴加乙酸至溶液 pH 呈酸性, 减压浓缩蒸干, 加 3 mL 甲醇和少量乙酸减压蒸干, 重复此步骤 4 次, 最后一次不加乙酸。

乙酰化: 干燥后样品加 2 mL 乙酸酐, 100℃ 衍生化 1 h, 减压蒸干, 反复加甲苯(3 mL)减压蒸干, 重复 3 次; 再溶于氯仿中, 加 3 mL 水洗涂 3 次, 最后收集氯仿层用无水硫酸钠干燥, 浓缩至 0.3 mL, 得到了部分甲基化糖醇乙酸酯衍生物。

1.8.2 GC-MS 检测

采用毛细管色谱柱(HP-5, 0.25 mm×30 m); MSD 检测器; 色谱条件: 柱温从 140℃ 升至 250℃, 2℃/min; 进口温度: 250℃; 载气: 氦气; 载气流速: 1.0 mL/min; 上样量: 1 μL。

1.9 核磁共振分析

称取干燥样品 80 mg, 用 D₂O(99.96%) 溶解样品, 冻干, 重复 3 次, 使样品中的氢完全被氘氢置换; 再用 500 μL D₂O 溶解, 转移至核磁管中进行检测, 在室温下记录一维 NMR(¹H-NMR、¹³C-NMR)和二维 NMR(¹H-¹H COSY、HSQC、HMBC)图谱^[17-20]。

2 结果与讨论

2.1 文蛤多糖的提取、分离纯化及理化性质分析

胰蛋白酶和木瓜蛋白酶双酶法联合水解文蛤软体, 提取文蛤多糖^[13], 得到文蛤粗多糖 MMPX; 经全波长扫描发现, MMPX 在 215 nm 处有吸收, 并经苯酚硫酸法验证为多糖组分, 因而采用该波长作为检测波长。经阴离子交换(DEAE-FF)柱初步分离, 并以 0~0.4 mol/L 浓度的 NaCl 溶液进行样品洗脱, 得到了分离度良好的五个组分(图 1, Fr.1-5), 进一步对 Fr.2 组分进行凝胶色谱(Superdex G75)纯化, 得到峰形对称性较好的多糖组分 Fr.2A(图 1, Fr.2A)。

经高效凝胶过滤色谱法分析, Fr.2A 平均分子质量为 882 kDa, 纯度达到 100%; 离子色谱法对其单糖组成分析表明, 主要由葡萄糖组成。因此, 可对 Fr.2A 进行结构分析。

2.2 Fr.2A 的 FT-IR 分析

Fr.2A 在 3406.43 cm⁻¹ 处吸收为 -OH 伸缩振动;

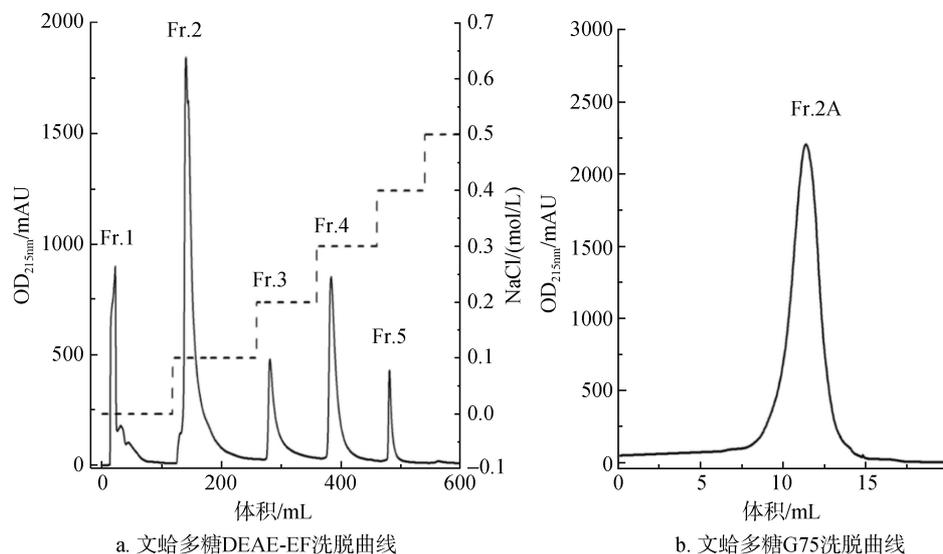


图 1 文蛤多糖(Fr.2A)纯化洗脱曲线

Fig.1 Eluted curves of purified polysaccharide Fr.2A

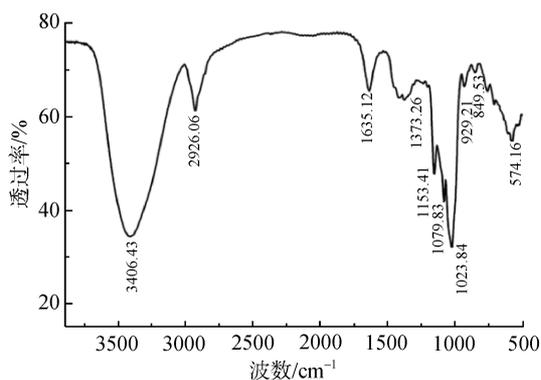


图 2 Fr.2A 的 FT-IR 谱图

Fig.2 FT-IR spectrum of Fr.2A

1 153.41、1 079.83、1 023.84 cm^{-1} 处吸收是糖环 C—O—C 的特征骨架振动; 在 2 926.06 cm^{-1} 和 1 373.26 cm^{-1} 的吸收是 C—H 的伸缩振动和变角振动; 在 929.21 cm^{-1} 处有吸收, 为 D 型吡喃环的伸缩振动; 849.53 cm^{-1} 处吸收, 是 α 异头端基的特征吸收。根据红外光谱的上

述特征吸收, 可以初步推测 Fr.2A 是主要由 α -D-吡喃糖组成的多糖。

2.3 Fr.2A 的 GC-MS 分析

多糖经甲基化、酸水解、乙酰化后, 可以得到甲基化的糖醇乙酸酯衍生物, 再利用 GC-MS 分析, 可以获得有关单糖残基的类型、糖环形式以及羟基的取代情况等多种结构信息。Fr.2A 经上述衍生化, 其碎片离子峰经由化学质谱库中检索和分析, 可确定其由三种残基组成: 1, 4-Glc、1, 4, 6-Glc 和 1-Glc, 三者的摩尔比约为 5.58 : 1 : 1.26, 且都是吡喃型糖 (表 1)。1, 4-Glcp 含有 2 个连接点, 其相对百分含量高, 是糖链的主体, 而 1, 4, 6-Glcp 也是位于主链结构上的糖基, 且其 6 位存在支化连接; T-Glcp 包含了主链的末端糖基, 也包含了大量与主链 6 位连接的侧位糖基。由此可以大致推测出 Fr.2A 是一条由 1, 4 糖苷键连接的线性多糖, 其主链存在 6 位修饰的葡萄糖, 但也并不能完全排除其他支链修饰的可能。

表 1 Fr.2A 的甲基化分析结果

Tab.1 Result of Fr.2A methylation

残基类型	相对比例(%)	质荷比(m/z)
T-Glcp	13.66	71, 87, 101, 113, 117, 129, 145, 161, 205
1, 4-Glcp	60.52	71, 87, 99, 101, 113, 117, 129, 131, 161, 173, 233
1, 4, 6-Glcp	10.87	71, 85, 87, 101, 111, 117, 127, 159, 201, 261

2.4 Fr.2A 的核磁分析

由于 FT-IR 谱图在提供糖构型解析上还不够精

确, 因此不能完全排除其他糖构型的存在, 同时上述衍生化分析时, 可能存在衍生不完全、碎片结构单元丢失等问题, 因此, 要精确推测 Fr.2A 的结构,

还需要借助核磁共振波谱进一步确认, 具体是确认糖的 α 与 β 构型。

2.4.1 糖基的构型确定

在 $^1\text{H-NMR}$ 谱中, 大部分氢信号集中在 $3.0 \times 10^{-6} \sim 4.0 \times 10^{-6}$ 之间, 在此区域的谱峰重叠, 不易进行归属; 但异头氢所在区域能够获得较好的分离度, 可作为糖构型的重要判据。在 Fr.2A 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱(图 3)

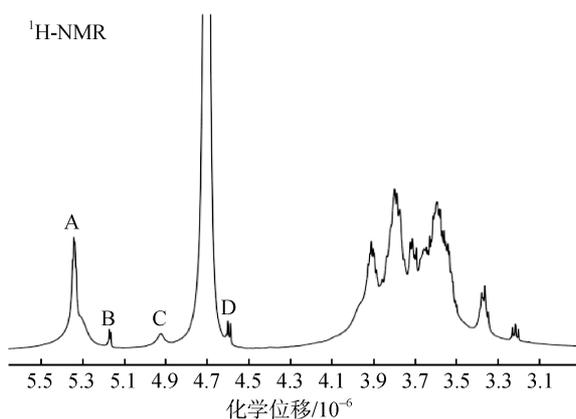


图 3 Fr.2A 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图
Fig.3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Fr.2A

中可以看到 4 个端基氢信号, 化学位移依次为 δ 5.35(A)、5.17(B)、4.92(C)和 4.60(D), 其中 A 和 B 端基氢的化学位移 $> 5.0 \times 10^{-6}$, 可以确定其是来自 α -构型的异头氢, 而 C、D 端基氢的化学位移 $< 5.0 \times 10^{-6}$, 通常属于 β -构型; 但在多糖等复杂构型的化合物中, 也有可能是 α -端基氢的高频偏移, 需要通过二维核磁的近程相关谱(HSQC)耦合常数 $^3J_{\text{C,H}}$ 进一步判断, 其判定依据为: α 构型 $^3J_{\text{C,H}}$ 在 170 Hz, 而 β 构型 $^3J_{\text{C,H}}$ 在 160 Hz 左右。

HSQC 反映的是异核单量子近程相关, 可以确定的是同一位点的 H 与 C 的耦合关系, 根据从 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY 谱中已经识别的氢的化学位移, 在 HSQC 谱找到与氢相连碳的化学位移。根据 Fr.2A 的 HSQC 谱图(图 4)从已经确定氢的化学位移推测出相连碳的化学位移, 对 A(H1, C1)、B(H1, C1)、C(H1, C1)、D(H1, C1)、...、D(H6, C6)进行归属。通过 HSQC 图谱中异头碳与对应异头氢的化学位移计算 $^3J_{\text{C,H}}$ 耦合常数, 其中 C 的 $^3J_{\text{C,H}}=170$ Hz, D 的 $^3J_{\text{C,H}}=160$ Hz, 表明 C 为 α 构型, D 为 β 构型。

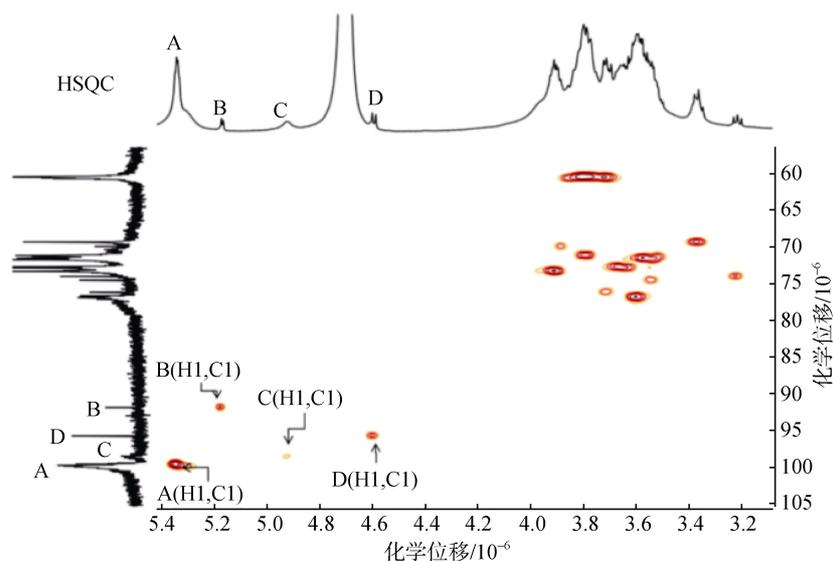


图 4 Fr.2A 的 HSQC 谱图
Fig.4 HSQC spectrum of Fr.2A

多糖分子的一维碳谱($^{13}\text{C-NMR}$)中, 异头碳的化学位移集中在 $90.00 \times 10^{-6} \sim 112.00 \times 10^{-6}$, 其中 $80.00 \times 10^{-6} \sim 90.00 \times 10^{-6}$ 区间为呋喃型糖环信号, $80.00 \times 10^{-6} \sim 55.00 \times 10^{-6}$ 为 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 的信号区, 一般情况下通过异头碳信号数目来确定糖残基数目, 异头碳区域出现的信号为对应

的 α 或 β 构型。在 Fr.2A 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 图谱(图 5)中, 同样存在 4 个异头碳信号, 化学位移依次为 99.59×10^{-6} 、 98.61×10^{-6} 、 95.74×10^{-6} 和 91.83×10^{-6} , 与一维氢谱中 4 个异头氢相符, 说明存在 4 种糖残基, 且都为吡喃型糖环(化学位移), 这与 FT-IR 和 GC-MS 结果相符。

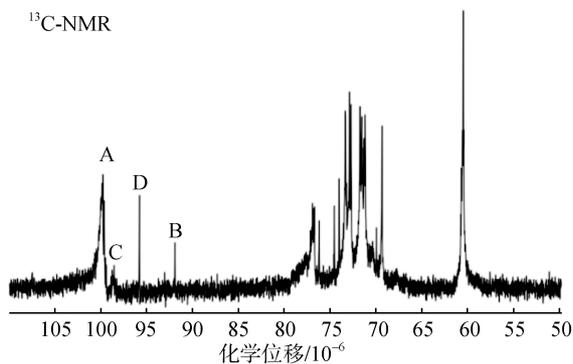


图5 Fr.2A 的一维碳谱图
Fig.5 1D and 2D NMR spectrum of Fr.2A

2.4.2 连接方式确定

GC-MS 的结果初步给出了 Fr.2A 的连接方式, 主要包括 1, 4 糖苷键连接和 1, 6 糖苷键两种方式。如果能够通过核磁共振谱获得主要糖基 C、H 的化学位

移, 就可以较为准确地推测出连接方式。

由异头氢的化学位移出发, 在二维氢-氢相关谱 (^1H - ^1H COSY) 中找到与异头氢交叉的信号峰和相邻氢的耦合关系, 确定相邻氢的化学位移, 依次可以找到其余的氢的化学位移; 根据已经确定的氢的化学位移, 可以在 HSQC 中找到与相应氢化学位移交叉的信号峰, 确定与氢对应碳的化学位移。因此可对所有的碳和氢的化学位移进行归属(图 6、表 2)。

HMBC 反映的是异核远程相关信息, 可以确定糖环之间的连接方式。根据 Fr.2A 的 HMBC 谱(图 7), 并结合氢与碳化学位移归属表(表 2), 发现 A-H1 与 A-C4, A-H1 与 C-C4, A-H1 与 C-H6, B-H1 与 C-H6, A-H4 与 A-C1, C-H4 与 A-C1, D-H1 与 C-C4, C-H4 与 D-C1 具有相关耦合关系, 确定 A 与 A 之间通过 1→4 连接, A 与 C 之间通过 1→4, 1→6 连接, D 与 C 之间通过 1→4 连接, B 与 C 之间通过 1→6 连接。

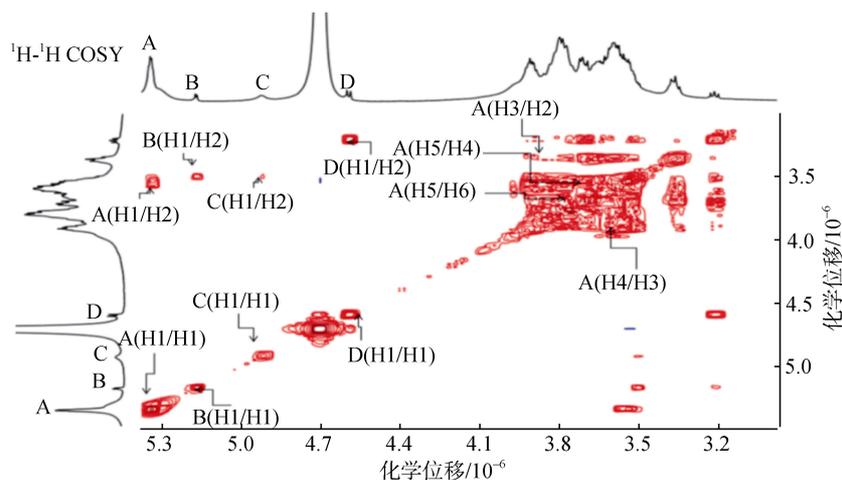


图6 Fr.2A 的 ^1H - ^1H COSY 谱图
Fig.6 ^1H - ^1H COSY spectrum of Fr.2A

表 2 Fr.2A 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 化学位移信号归属
Tab.2 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR chemical shifts in Fr.2A

残基	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6	残基单元
A	5.35/99.59	3.62/76.80	3.93/73.24	3.59/71.29	3.67/72.69	3.77/60.41	→4)- α -D-Glc(1→
B	5.17/91.83	3.52/71.56	3.89/69.88	3.57/71.45	3.68/72.76	3.78/60.46	α -D-Glc(1→
C	4.91/98.44	3.51/71.83	3.78/76.12	3.61/76.78	3.68/72.69	3.89/69.87	→4, 6)- α -D-Glc(1→
D	4.60/95.74	3.22/73.95	3.90/73.22	3.35/69.28	3.55/71.45	3.81/60.44	β -D-Glc(1→

糖残基异头氢信号峰面积大小, 反映的是该残基在多糖中含量的多少。对残基异头氢峰面积进行积分, 得到 A : (B+D) : C=5.54 : 1.21 : 1.0, 这与 GC-MS 分析残基比例相吻合, 其中 B 与 D 的峰面积比为 1 : 1。因此, 可

以进一步确定残基 A 为 1, 4)- α -D-Glc, 残基 B 为 1)- α -D-Glc, 残基 C 为 1, 4, 6)- α -D-Glc, 残基 D 为 1)- β -D-Glc, 并可推断出残基 A, B, C, D 的最简摩尔比为 11 : 1 : 2 : 1。因此, 多糖 Fr.2A 可能的结构单元如图 8 所示。

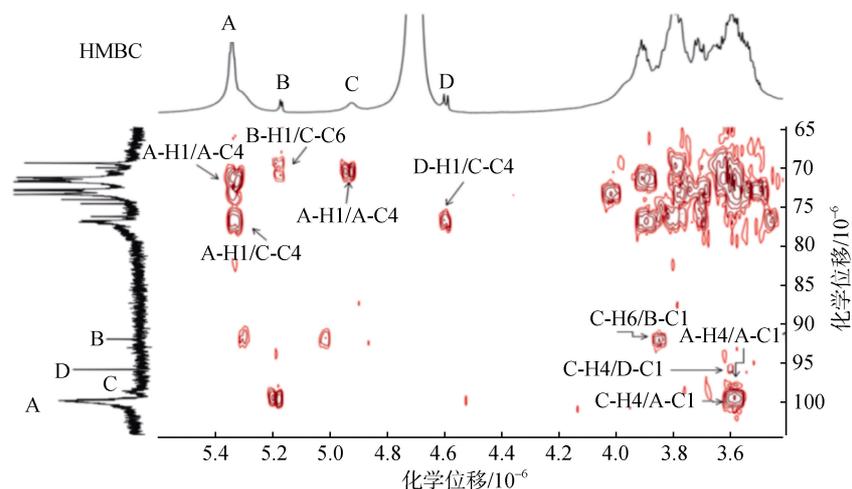


图7 Fr.2A 的 HMBC 谱
Fig.7 HMBC spectrum of Fr.2A

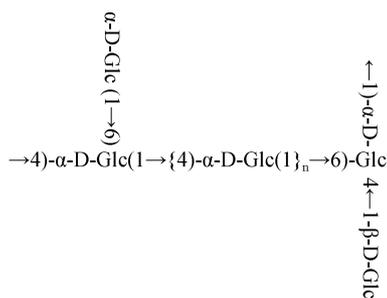


图8 Fr.2A 的结构单元
Fig.8 Structure of the repeating unit in Fr.2A

3 结论

本实验采用 GC-MS 联合二维核磁共振波谱 (^1H - ^1H COSY、HSQC、HMBC) 的方法, 对文蛤多糖 Fr.2A 结构进行解析, 发现 Fr.2A 是一种以 α -(1 \rightarrow 4), 以及少量 α -(1 \rightarrow 6) 连接为主链, 并伴随着少量 α -(1 \rightarrow 6) 和 β -(1 \rightarrow 4) 支链的新型水溶性 D 型吡喃葡聚糖。

动物体内的以 α -(1 \rightarrow 4) 连接为主的多糖大多由糖原衍生而来, 其修饰方式通常 α -(1 \rightarrow 6) 葡聚糖的侧链修饰, Fr.2A 也属这种类型, 但本文通过二维核磁共振谱的精确分析, 发现在侧链糖基上还存在少量的 β -(1 \rightarrow 4) 葡聚糖进一步修饰, 使其结构更为复杂。关于 β -(1 \rightarrow 4)-D-Glcp 支链结构的存在, 在海蛭、河蚌等来源的多糖中也有报道^[20-21], 但之前研究并没有明确。

参考文献:

[1] 代荣, 刘如明, 肖建辉. 菌类中药多糖降血糖效应机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 174-179.

Dai Rong, Liu Ruming, Xiao Jianhui. Research progress on hypoglycemic effect and its mechanism of action of medicinal fungal polysaccharides[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(2): 174-179.

[2] 刘潇潇, 刘丽丽, 赵小亮, 等. 沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)硫酸多糖的结构表征及抗凝血活性研究[J]. 中国海洋药物, 2016, 35(6): 1-6.

Liu Xiaoxiao, Liu Lili, Zhao Xiaoliang, et al. Structure characterization and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide from *Perinereis aibuhitensis*[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2016, 35(6): 1-6.

[3] 王凯, 慕慧敏, 李玉磊, 等. 孔石莼多糖及其硫酸酯化衍生物抗肿瘤活性的体外实验研究[J]. 中国海洋药物, 2014, 33(2): 19-23.

Wang Kai, Qi Huiming, Li Yulei, et al. The study of *Ulva* and its derivative on anti-Tumor activity in vitro[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2014, 33(2): 19-23.

[4] 王竹清, 张凯, 侯虎, 等. 皱纹盘鲍性腺多糖的提取及其体内免疫调节活性研究[J]. 中国海洋药物, 2015, 34(2): 34-38.

Wang Zhuqing, Zhang Kai, Hou Hu, et al. Extraction of polysaccharides from *Haliotis discus hannai* ino gonad and immunomodulating activity in vivo of polysaccharides[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2015, 34(2): 34-38.

[5] 牛庆凤, 王斌, 李涛, 等. 一种新型乌贼墨糖胺聚糖的分离纯化、理化性质及其抗氧化活性研究[J]. 中国海洋药物, 2015, 34(3): 59-64.

Niu Qingfeng, Wang Bin, Li Tao, et al. Separation, purification and analyses on physicochemistry properties, antioxidative activity of a novel glycosaminoglycans from *Sepia esculenta*[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2015, 34(3): 59-64.

[6] 郭浩杰, 杨严格, 安乐, 等. 中药多糖的分子修饰及

- 其药理活性研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(7): 1074-1080.
- Guo Haojie, Yang Yange, An Le, et al. Research progress in molecular modification and pharmacological activity of Chinese materia medica polysaccharides[J]. Chinese Traditional and Herbal Drug, 2015, 46(7): 1074-1080.
- [7] 孟思彤, 徐艳芝, 王振月. 多糖的化学修饰对其生物活性影响研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2014(11): 1901-1905.
- Meng Sitong, Xu Yanzhi, Wang Zhenyue. Research progress on chemical modification of polysaccharide and their biological activities[J]. Natural Product Research and Development, 2014(11): 1901-1905.
- [8] 李绍平, 吴定涛, 赵静. 糖谱及其在中药多糖质量控制中的应用[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3505-3513.
- Li Shaoping, Wu Dingtao, Zhao Jing. Saccharide mapping and its application in quality control of polysaccharides from Chinese medicines[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(17): 3505-3513.
- [9] 徐航, 朱锐, 刘玮, 等. 多糖高级结构解析方法的研究进展[J]. 药学进展, 2015(5): 364-369.
- Xu Hang, Zhu Rui, Liu Wei, et al. Research progress in analytical methods for Advanced structures of polysaccharides[J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2015(5): 364-369.
- [10] 郭涛, 李洁, 郭甜甜, 等. 盐碱地植物内生真菌 SXH-69 胞外多糖的分离、化学组成和结构特征[J]. 中国海洋药物, 2015(6): 23-27.
- Guo Tao, Li Jie, Guo Tiantian, et al. Isolation, chemical components and structural characterization of extracellular polysaccharides produced by the saline-alkali plant endophytic fungus SXH-69[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2015(6): 23-27.
- [11] 严晓丹, 钱建瑛, 许泓瑜, 等. 文蛤不同极性提取物对糖尿病小鼠降血糖作用的研究[J]. 中国海洋药物, 2015, 34(5): 71-76.
- Yan Xiaodan, Qian Jianying, Xu Hongyu, et al. Hypoglycemic effect of different extracts from *Meretrix meretrix* in diabetic mice[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2015, 34(5): 71-76.
- [12] 袁强, 袁弘. 文蛤多糖对小鼠调节血糖和抗应激功能的影响[J]. 中国现代应用药学, 2007, 24(2): 113-114.
- Yuan Qiang, Yuan Hong. Effect of *Meretrix* polysaccharides on blood sugar regulation and stress response in the experimental diabetic rats[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2007, 24(2): 113-114.
- [13] Li Li, Li Heng, Qian Jianying, et al. Structural and Immunological Activity Characterization of a Polysaccharide Isolated from *Meretrix meretrix* Linnaeus[J]. Marine drugs, 2015, 14(1): 6.
- [14] Lin Song, Chen Xiaolin, Liu Xiaodong, et al. Characterization and comparison of the structural features, immune-modulatory and anti-avian influenza virus activities conferred by three algal sulfated polysaccharides[J]. Marine Drugs, 2015, 14(1): 4.
- [15] Du Zhengcai, Hou Xiaotao, Huang Qing, et al. Progress of Chemical Composition and Pharmacological Effects of *Meretrix meretrix* Linnaeus[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2014, 6(5): 287-290.
- [16] 刘丽丽. 酸性多糖甲基化分析方法的改进[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- Liu Lili. Improvement of methods for Methylation Analysis of Acidic polysaccharides[D]. Qingdao: Chinese Marine University, 2014.
- [17] 王林强. 核磁共振在多糖结构解析中的应用[D]. 上海: 华东师范大学, 2013.
- Wang Linqiang. Application of the NMR Techniques in Structural Analysis of Polysaccharides[D]. Shanghai: East China normal University, 2013.
- [18] 何宇愿, 谢璐为, 杜冠峰, 等. 狗肝菜多糖 P1A 的结构解析[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(8): 1489-1492.
- He Yuyuan, Xie Luwei, Du Guanfeng, et al. Studies on structure characteristic of polysaccharide P1A from *Dicliptera chinensis*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(8): 1489-1492.
- [19] 殷秀红. 紫贻贝(*Mytilus edulis* Linnaeus)多糖的提取分离及结构研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- Yin Xiuhong. Extraction, Isolation and Structural Characterization of Polysaccharides from *Mytilus edulis* Linnaeus[D]. Qingdao: Chinese Marine University, 2011.
- [20] Yuan, Qingxia, et al. Structural Characterization and Immunostimulatory Activity of a Homogeneous Polysaccharide from *Sinonovacula constricta*[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry 63.36(2015): 7986-7994.
- [21] 栾晓红. 两种海蛭多糖的提取、分离和结构分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- Luan Xiaohong. Extraction, separation and structural characterization of polysaccharides from two species of *Solenidae*[D]. Qingdao: Chinese Marine University, 2015.
- [22] 林双喜. 河蚌多糖的生物学活性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2007.
- Lin Shuangxi. Studies on biological properties of polysaccharides from *Anodonta*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2007.

The structure of *Meretrix meretrix* Linnaeus polysaccharide Fr.2A characterized by GC-MS and 2D NMR

HE Yong-feng, QIAN Jian-ying, LI Heng, LU Zhen-ming, XU Zheng-hong, SHI Jin-song
(Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, ministry of Education; School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Received: Mar. 20, 2017

Key words: GC-MS; 2D NMR; polysaccharide; structural characterization

Abstract: In this study, the structure of a polysaccharide is analyzed using GC-MS combined with two-dimensional NMR. A polysaccharide from the clam *Meretrix meretrix* Linnaeus (MMPX) was prepared using double enzyme-assisted water extraction, and its purity was analyzed and characterized using GC-MS and 1D and 2D NMR. The result showed that Fr.2A, extracted and purified from *M. meretrix* Linnaeus, is a type of highly purified polysaccharide. The GC-MS analysis demonstrated that Fr.2A had three types of residue: 1, 4-Glc, T-Glc, and (1, 4, 6-Glc, and that the molar ratio of these residues was 5.58 : 1.26 : 1.0. The NMR spectrum results demonstrated that the main chain in Fr.2A was α -(1→4) with a small amount of α -(1→6) included, and that the branch was linked with less α -(1→6) and β -(1→4), which is a novel water-soluble D-glucan.

(本文编辑: 康亦兼)