

硫酸海胆内容物多糖化学结构的质谱法研究

白日霞^{a, b} 王长海^a

^a(大连理工大学环境科学与生命学院 辽宁省大连市 116024)

^b(大连民族学院生命科学学院 辽宁省大连市开发区辽河西路 18 号 116600)

摘 要 将海胆内容物硫酸多糖 XB-3 进行脱硫得到多糖 XB-3D, 分别对 XB-3 和 XB-3D 进行甲基化, 对脱硫前后的部分甲基化糖进行气相色谱-质谱测定, 通过质谱分析法得出 XB-3 和 XB-3D 的结构信息, 包括其主链和支链的构成、连接方式、硫酸基取代位置和结构模型。

关键词 海胆; 硫酸多糖; 结构; 质谱法

中图分类号: O 636 1; O 657. 63

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2010)02-0665-04

1 引言

海胆是海洋中的一种棘皮动物, 其内容物具有止痛、软坚散结、化瘀消肿、清热消炎、健脾强肾、舒筋活血等药用功效, 海胆卵有滋阴补肾, 养颜护肤的作用, 具有很高的营养价值, 用海胆卵制成的食品具有提高机体免疫力, 安神补血和促进性功能。近年来, 日本、法国、美国、德国和港澳的消费者, 都把海胆视为高档名贵的高级保健食品。

研究表明, 棘皮动物中含有硫酸多糖, 硫酸多糖具有抗凝血, 降血脂, 抗肿瘤, 抗病毒, 增强机体免疫机能等多种生物学活性。硫酸基团往往有单取代或双取代, 硫酸基的含量和位置对硫酸多糖的生物活性有重要影响^[1], 有的自身无抗病毒活性的多糖经硫酸酯化后, 表现出抗病毒活性, 有抗病毒活性的硫酸酯多糖脱去硫酸基团后, 失去了抗病毒活性。硫酸基一方面提供了在其抗病毒活性中起重要作用的负电荷, 另一方面可使多糖的立体结构发生变化。

硫酸多糖的结构随着来源的不同有较大的差异, 采用红外光谱来判断硫酸基的位置是比较常用的方法^[2], 本文通过海胆内容物硫酸多糖为研究载体, 采用质谱法对硫酸多糖的一级结构进行了研究。

2 实验部分

2.1 材料和仪器

新鲜马粪海胆于 2007 年秋季采自大连金石滩海域, 将海胆壳和内容物分离, 分别水洗、晾干; 取干燥的海胆内容物经脱脂、热水煮沸、浓缩、去蛋白、去核酸、脱色、醇分级和柱层析等一系列步骤, 得到硫酸海胆内容物多糖 XB-3; 利用高效液相色谱证明了多糖 XB-3 的组分均一性, XB-3 经水解、衍生化和气相色谱分析, 确定 XB-3 由半乳糖、葡萄糖和硫酸基组成。

GCM S-Q P2010 型气-质联用仪(日本岛津公司); Nicolet A V A T A R 370 D T G S 红外光谱仪(美

联系人, 电话: (0411)87656046; 手机: (0)13332211266; E-mail: brx@dlu.edu.cn 或 chwang2001@sina.com

作者简介: 白日霞(1964—), 女(蒙古族), 黑龙江省杜蒙自治县人, 教授, 主要从事多糖和寡糖化学的研究工作。

收稿日期: 2010-02-01; 接受日期: 2010-02-19

国 Thermo 公司);OV-225 毛细管色谱柱(30.0m × 0.33mm × 0.25mm, 中国科学院兰州化学物理研究所色谱技术研究开发中心),DZ-1A 型真空干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);三氟乙酸、二甲基亚砜、无水吡啶、乙醇、碘甲烷、氯仿、甲酸、甲醇、乙醚、硼氢化钠为国产分析纯试剂;盐酸、草酸、三氧化锑、氯化钡、玫瑰酸钠、NaOH、NaHCO₃ 为国产化学纯试剂。实验用水为蒸馏水。

2.2 红外光谱分析

采用 KBr 压片法,在 4000—400cm⁻¹ 区间分析。

2.3 脱硫酸基

称取多糖 100mg,加入二甲基亚砜 9mL,120℃ 加热 15min,使多糖全部溶解,冷却,加入 500μL 吡啶,150mg 草酸,200mg 三氧化锑,最后补充 1mL 吡啶,120℃ 反应 3h,待反应液冷却后加入 5mL NaHCO₃ 溶液(6%,w/v),摇匀后透析 72h,经冷冻干燥获得脱硫酸多糖 65mg。XB-3 脱硫后的产物命名为 XB-3D。

2.4 浊度法测定硫酸基含量

准确吸取 0.01,0.02,0.03,0.04,0.05mL 硫酸基标准溶液于试管中,加水至 0.5mL,依次加 2mL 乙醇,1mL 氯化钡,摇匀后加 1.5mL 玫瑰酸钠液,静置 10min 后于 510nm 处测定吸光度,以 0 管做对照,以浓度对吸光度绝对值绘制校准曲线。称取样品 1mg 共 2 份,置于带有聚四氟乙烯衬垫的玻璃管中,分别加入 0.04mol/L 盐酸溶解,100℃ 加热 1h,冷却后 65℃ 减压抽干,加少量水,重新减压抽干去残留酸,残留物加 4mL 水溶解,吸取两种处理液各 0.1mL,分别以水补加至 0.5mL,余下的操作如校准曲线制备,测定吸光度。由校准曲线计算硫酸基含量。

2.5 甲基化分析

分别称取彻底干燥的 XB-3 和 XB-3D 各 20mg,溶于 6mL 二甲亚砜(DMSO)中,DMSO 以 4A 分子筛脱水;充 N₂ 封管后,40℃ 磁力搅拌,至糖样充分溶解为止。将 240mg 80 目过筛的 NaOH (70℃ 真空干燥)与 6mL DMSO 混合,充 N₂ 密封,25℃ 磁力搅拌,使其成为均匀的混悬液,并将 NaOH-DMSO 混悬液加入溶解的糖样中,充 N₂ 磁力搅拌,加入 3.6mL 碘甲烷,密封,磁力搅拌,反应 7min,然后加入 6mL 蒸馏水中止反应,产物分别用流水和蒸馏水透析各 24h。

将上述反应液浓缩至 10mL 左右,加入等体积氯仿,充分振荡 30min 萃取甲基化多糖,重复至少 3 次,将萃取液合并。再用蒸馏水反复洗萃取液至少 3 次,然后加无水 Na₂SO₄ 干燥 24h,过滤,蒸除氯仿至 1mL 左右。

采用红外光谱检查在 3400cm⁻¹ 处无吸收峰,即无羟基吸收峰,则证明多糖甲基化完全。否则,重复甲基化,至多糖甲基化完全为止。

完全甲基化的多糖真空干燥后,加 85% 甲酸 1mL,充 N₂ 封管,100℃ 水解 4h,然后加甲醇蒸除甲酸,至 pH 为 6—7,真空干燥,再加入 2mol/L 三氟乙酸 2mL,100℃ 水解 6h,然后用无水乙醇赶除三氟乙酸至中性,再用蒸馏水赶除乙醇。加入 NaBH₄ 60mg 还原 24h,室温磁力搅拌;然后加入半匙阳离子交换树脂,磁力搅拌 2h,过滤,向滤液中加入甲醇蒸除硼酸,真空干燥。加乙醚、无水吡啶各 0.5mL,封管,100℃ 乙酰化 2h,然后移入蒸发皿,再反复加无水乙醇赶除乙醚,然后真空干燥。

2.6 质谱法测定

样品分析产物干燥后,用少许氯仿溶解,进行 GC 及 GC-MS 测定。程序升温起始温度为 170℃,保持 2min,再以 2℃/min 升至 230℃,氦气为载气,流速 1mL/min,离子源 200eV。根据色谱的各峰面积计算各种连接方式的摩尔比,根据各峰的保留时间和质谱碎片峰,分析确定多糖的化

学键连接方式。

3 结果和讨论

3.1 海胆多糖的硫酸含量分析

通过浊度法制作校准曲线和样品硫酸基测定, 结果见表 1。结果表明, 多糖 XB-3 含有硫酸基 66.0%, 摩尔比占 2/3 左右, XB-3D 含有硫酸基 2.7%, 基本得到脱除。

表 1 XB-3 和 XB-3D 的硫酸基含量

多糖样品	SO ₄ ²⁻ 含量(μg/mL)	SO ₄ ²⁻ 含量(%)
XB-3	16.4	66.0
XB-3D	0.67	2.7

3.2 甲基化糖的气相色谱-质谱分析

多糖经甲基化, 甲酸水解, NaBH₄ 还原, 乙酰-吡啶乙酰化后获得各种甲基化单糖的衍生物, 用于气相色谱-质谱测定, XB-3 和 XB-3D 甲基化糖的气相色谱-质谱测定, 分析结果见表 2。

表 2 XB-3 和 XB-3D 甲基化糖的气相色谱-质谱测定结果

甲基化糖	连接方式	脱硫前摩尔比		质谱峰 (<i>m/z</i>)
		XB-3(mol%)	XB-3D(mol%)	
2, 3, 4, 6-Me ₄ -Glc	1	28.6	28.6	43, 45, 59, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205
2, 3, 4-Me ₃ -Gal	1, 6	-	42.8	43, 87, 99, 101, 117, 129, 161, 189
3, 4-Me ₂ -Gal	1, 2, 6	57	28.6	43, 87, 99, 129, 189
3-Me-Gal	1, 2, 4, 6	14.3	-	43, 189, 261

从表 2 中可以看出多糖 XB-3 和 XB-3D 的甲基化糖的取代位置, 由此可以判断出糖苷键的连接方式。在多糖 XB-3D 中, 检出了表示(1-6)-半乳糖和(1-2,6)-半乳糖的两种连接方式, 在多糖 XB-3 中, 检出了表示(1-2,6)-半乳糖和(1-2,4,6)-半乳糖的两种连接方式, 半乳糖均不存在端基(1-)连接。在 2 种多糖中, 葡萄糖只检出 2, 3, 4, 6-四甲氧基-葡萄糖存在方式, 无其他取代方式, 无取代也就无硫酸基取代, 且表明葡萄糖只存在端基连接, 而含有如此多的端基葡萄糖, 说明 XB-3 中存在大量的葡萄糖残基支链。

通过比较脱硫前后的甲基化产物, 可以推知硫酸基在单糖残基中所处的位置和多糖化学结构的连接方式^[3]。脱硫前后的半乳糖含量比例明显变化, 说明半乳糖残基被硫酸基取代; 脱硫后, (1-6)连接的 2, 3, 4-Me₃-半乳糖的含量由无升高, 说明 XB-3D 中半乳糖残基以是(1-6)连接为主, (1-6)-半乳糖聚合构成 XB-3D 的主链, 脱硫后, XB-3 的连接方式由(1-2,4,6)连接部分转变为(1-2,6)键型, 说明硫酸基取代在 C-4 位置上, 未脱硫的部分是连有支链的 C-2 位; 同理, 脱硫后连接方式由(1-2,6)转变为(1-6)键型, 说明 C-2 位上也连有硫酸基, 说明多糖 XB-3 有双取代硫酸基。

3.3 甲基化产物质谱峰值解析

甲基化衍生物受到电子流轰击时, 分子裂分的规律一般为: 被甲基化、乙酰化的单糖分子中, 带有甲氧基的碳原子容易与相邻碳原子间发生断键形成正离子, 各种单糖甲基化衍生物的基峰都是 43(CH₃CO⁺)。如图 1, 1, 5-二乙酰基-2, 3, 4, 6-四甲氧基半乳糖的断裂方式, 初级碎片(*m/z*)为: 43, 45, 117, 161, 205。其中部分初级碎片发生进一步裂解, 形成更加稳定的次级碎片。如 *m/z* 161 初级碎片脱去乙酸(HOAc)后形成 *m/z* 101 碎片离子峰, 或脱去甲醇(MeOH)后形成 *m/z* 129 的碎片离子峰, 而且 *m/z* 101 碎片离子峰还可脱去甲醛(HCOH)进一步形成 *m/z* 71 的碎片离子峰, *m/z* 129 可脱去次乙基(CH₂C=)形成 *m/z* 87 碎片; *m/z* 205 初级碎片脱去乙酸(HOAc)形成 *m/z* 145

碎片离子。所以,实际所得碎片为: 43、45、71、87、101、117、129、145、161、205。其余甲基化衍生物也可分析出其可能的碎片^[4]。

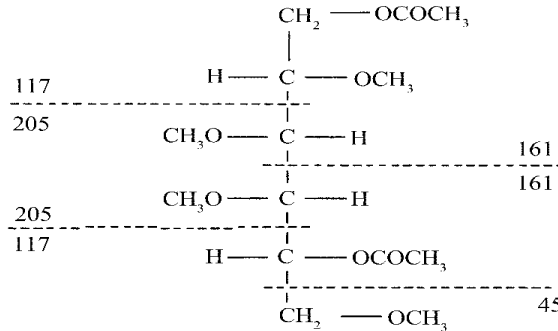


图 1 1,5-二乙酰基-2,3,4,6-四甲氧基半乳糖的断裂方式

通过脱硫前后的甲基化反应、GC-MS 分析和质谱裂解机理,推断硫酸海胆内容物多糖 XB-3 的结构模型如图 2: XB-3D 的化学结构为: 主链(1→6)-半乳糖(Gal), C-2 位上连有支链葡萄糖(Glc), 由此可知, XB-3 主链由(1→6)-半乳糖构成, 半乳糖的 C-2 位上连有支链葡萄糖, C-4、C-2 位上均连有硫酸基, 硫酸基大部分连在 C-2 位上。

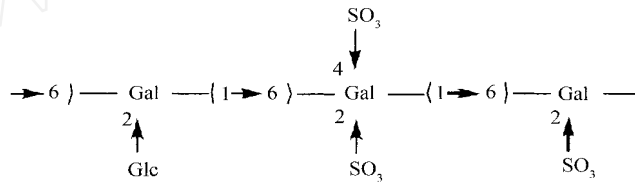


图 2 硫酸海胆内容物多糖 XB-3 的结构模型

参考文献

- [1] Pereira M, S, Mulby B, Mourao P A. Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Fucans Comparison Between the Regular, Repetitive, and Linear Fucans from Echinoderm with the More Heterogeneous and Branched Polymers from Brown Algae[J]. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274(12): 7656—7667.
- [2] 李波, 顾小红, 许时婴. 硫酸酯多糖结构中硫酸基位置的判断[J]. *分析科学学报*, 2004, 20(5): 498—500.
- [3] 徐杰, 李八方, 薛长湖等. 羊栖菜岩藻聚糖硫酸酯的甲基化分析[J]. *中国海洋大学学报*, 2004, 34(6): 959—963.
- [4] 白日霞. 质谱法测定多糖结构的机理研究[J]. *光谱实验室*, 2001, 18(2): 165—167.

Structure Analysis of Sulfated Polysaccharide from Sea Urchin *Hemicentrotus Pulcherrimus* by Mass Spectrometry

BAIRIXIA^{a,b} WANG Chang-Hai^a

^a(School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, P. R. China)

^b(College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600, P. R. China)

Abstract The sea urchin contents sulfated polysaccharide XB-3 was desulfurized to be XB-3D. XB-3 and XB-3D for methylation, right before and after desulfurization carried out partially methylated sugars by gas chromatography-mass spectrometry, and XB-3 and XB-3D structural information was obtained, including its main chain and branched-chain composition, connection, sulfuric acid-substituted position and structure model

Key words Sea Urchin; Sulfated-Polysaccharide; Structure; Mass Spectrometry