

文章编号: 1000-0615(2001)06-0582-03

• 研究简报 •

琼胶寡糖的制备及其¹³C-NMR 研究

Preparation and NMR investigation of agarose oligosaccharides

毛文君, 林 洪, 管华诗

(青岛海洋大学海洋药物与食品研究所, 山东 青岛 266003)

MAO Wen-jun, LIN Hong, GUAN Hua-shi

(Marine Drug & Food Institute, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

关键词: 琼胶糖; 制备; 核磁共振碳谱

Key words: agarose; preparation; ¹³C-NMR

中图分类号: S917; Q132.1 文献标识码: A

天然多糖酶降解是制备寡聚糖的一个重要途径。酶降解由于具有特异性, 可选择性地酶解切断特定链, 从而制得特定的寡聚糖, 并且反应条件温和, 降解过程易于控制, 在多糖降解中运用日益增多。在对多种微生物筛选研究基础上, 从一种海洋微生物中分离获得了对琼胶具有较高降解活性的琼胶酶, 并将此琼胶酶应用于琼胶糖降解修饰研究。本文研究了琼胶寡糖的制备, 并运用波谱分析对琼胶寡糖的结构进行研究, 为琼胶的构效关系研究提供基础实验资料。

1 材料与amp;方法

1.1 琼胶糖的酶解

取 5g 琼胶糖, 加入 250mL 蒸馏水并加热至 100℃ 摇动使其溶解, 冷至 37℃ 加入适量微生物发酵液, 于 37℃ 水浴中保温 24h, 水解结束后, 将酶解液于 100℃ 加热 5min 以终止酶解反应, 将酶解产物于 35℃ 减压浓缩至 100mL, 加入 3 倍量乙醇, 使其产生沉淀, 离心(7000r·min⁻¹, 15min), 上清液经浓缩, 冷冻干燥得寡糖混合物。

1.2 寡糖的分离纯化

取 0.5g 寡糖混合物, 加 1mL 水溶解后注入 Superdex 30 色谱柱(150cm × 1.5cm), 室温以蒸馏水进行洗脱(20mL·h⁻¹), 以部分收集器收集洗脱液, 每管收集 10mL, 分别于 490nm 测定吸收^[1], 根据洗脱体积对吸收度作图, 得到寡糖的分离图谱。根据 PC 分析结果合并分子量均匀的寡糖, 减压浓缩, 冻干。

1.3 离子色谱分析

参考文献[2, 3]的方法。DIONEX 公司 DX-500 离子色谱仪(GP40 四元梯度泵), ED 40 型脉冲安培检测器, DIONEX CarboPac PAI(4mm × 250mm) 阴离子分离柱, CarboPac™ Guard(3mm × 25mm) 前置柱。样品用重蒸水溶解, 进样量为 25μL, 以醋酸钠和氢氧化钠洗脱, 泵流速控制在 1.0mL·min⁻¹。

1.4 质谱分析

英国 Micromass 质谱公司 Quattro 串联质谱仪。纯化样品加入超滤的光谱纯甲醇内含 0.1% 的醋酸经蠕动泵(Harvardmodel)直接向 ESI 电离源进样, 进样速度 3μL·min⁻¹。

收稿日期: 2001-12-26

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(1999-2001)。

第一作者: 毛文君(1962-), 女, 山东青岛人, 博士, 副教授, 主要从事海洋药物的研究。Tel: 0532-2032065, E-mail: maowenju@263.net

1.5 核磁共振碳谱分析

Bruker DRX-300MHz 核磁共振仪。样品溶于重水, 混合时间 80ms, 测试温度 40℃。

2 结果与讨论

2.1 寡糖的制备

琼胶糖是由 1,3 连接的 β -D-吡喃半乳糖与 1,4 连接的 3,6-内醚 α -L-吡喃半乳糖反复交替连接而成的^[4]。通过采用微生物琼胶酶对该多糖进行控制降解, 得到系列寡糖混合物。实验表明, 当水解 24h 可以得到聚合度高的寡糖, 当水解达到要求后升高温度(100℃, 5min)使酶失活。此琼胶酶解产物通过 Superdex 30 凝胶层析柱进行分子量分级(图 1), 合并分子量相同的级分, 得到 6 种琼胶寡糖。经 PC 层析分析, 各寡糖在酸性和碱性两种展开系统中, 均显示为一个斑点。而且离子色谱图也显示, 各寡糖均呈单一对称色谱峰, 表明其纯度较高。

由电喷雾质谱 (electrospray ionization mass ESI-MS) 谱图看出, 这些寡糖的 ESI-MS 谱图非常清晰, 而且只出现 $[M+Na]^+$ 加成离子, 因此, 能准确判断出化合物的分子量。琼胶糖经微生物琼胶酶降解得到 6 种寡糖的分子量分别为 324、630、936、1242、1548 和 1854。为进一步确定其结构, 对这些寡糖进行了核磁共振碳谱(¹³carbon nuclear magnetic resonance ¹³C- NMR)波谱分析。

2.2 ¹³C- NMR 解析

¹³C- NMR 图谱分析中 G 和 A 分别代表 D-半乳糖和 3,6-内醚半乳糖; Gr β 和 Gr α 代表还原末端单位的 β 和 α 异头碳, Gnr 为非还原末端单位的异头碳, G 和 A 为寡糖中内重复二糖的 D-半乳糖和 3,6-内醚半乳糖, Ar β 和 Ar α 为还原末端单位的 β 和 α 异头碳。

从图 2 可见, 寡糖 1¹³C- NMR 谱具有清晰的 18 个信号, 对应于每个单位 (Gr α , Gr β , Anr) 的信号是清晰的, 每个糖碳原子的信号强度不同, 各碳原子的信号不重叠, 而且其谱图的吸收峰数目、位置和峰形与前人报道的新琼二糖相似^[5,6], 结合 ESI-MS 谱图解析结果, 证实寡糖 1 为新琼二糖, 寡糖 1 各碳原子的共振信号解析结果见表 1。另外, 从图 2 也可见, 寡糖 1 Gr 单位的 α/β 比值为 40/60; 而且, 异头羟基的取向对碳原子的化学位移有一定影响, 如 Anr C-4 信号偏移约 0.3×10^{-6} 。

从图 3 可见, 寡糖 2 的¹³C- NMR 含有 30 个信号, 其中有 5 个清晰的异头碳原子信号, 其为典型的四糖碳谱特征。结合 ESI-MS 分析结果, 证实寡糖 2 为新琼四糖。与寡糖 1 相比, 寡糖 2 还原端 Gr α/β 信号稳定不变, 而且其化学位移与寡糖 1 相同, 但其强度减弱; 由于异头羟基的影响, Ar 的 α/β C-1、C-2 和 C-4 碳原子化学位移发生微小变化; 而且, 由

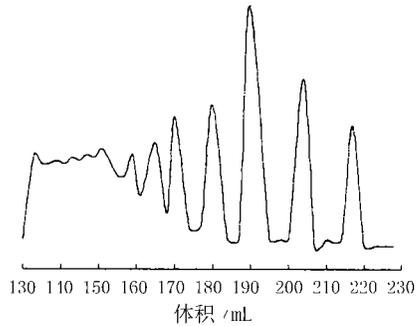


图 1 琼胶寡糖在 Superdex 30 凝胶色谱上的层析结果
Fig. 1 Chromatography of agarose oligomers on Superdex 30

表 1 寡糖-1 的¹³C- NMR 化学位移

Tab. 1 ¹³ C- NMR chemical shift of oligosaccharide- 1 $\times 10^{-6}$						
单位	C- 1	C- 2	C- 3	C- 4	C- 5	C- 6
Gr β	99.21	73.99	84.96	71.29	77.64	63.84
Gr α	95.20	70.47	81.78	71.93	73.07	64.02
Anr(β)	100.64	72.13	83.42	72.23	79.84	71.54
Anr(α)	100.64	72.13	83.42	72.53	79.84	71.54

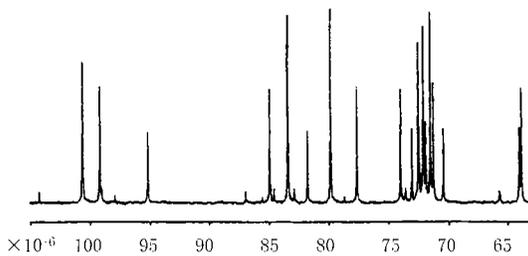


图 2 寡糖 1 的¹³C- NMR 谱图

Fig. 2 ¹³C- NMR spectrum of oligosaccharide- 1

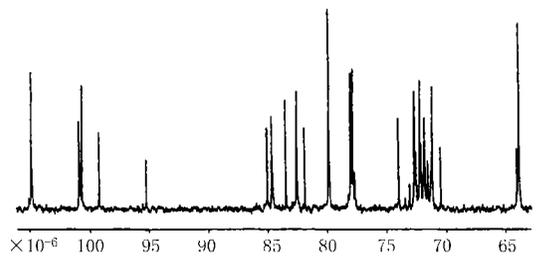


图 3 寡糖 2 的¹³C- NMR 谱图

Fig. 3 ¹³C- NMR spectrum of oligosaccharide- 2

于 β -D-1 \rightarrow 4键的存在,Ar上C-3、C-4和C-5的碳原子化学位移不同于Anr,两者的C-3、C-4和C-5碳原子化学位移分别相差 0.93×10^{-6} 、 8.37×10^{-6} 和 1.87×10^{-6} ;Gnr上C-1和C-2碳原子化学位移与G β 不同,而其它碳原子化学位移基本相同。寡糖1和寡糖2碳谱结果揭示,本实验获得的琼胶酶为 β -琼胶酶,即在琼胶糖的 β -D-半乳糖和 α -3,6-L-内醚半乳糖之间的 β -(1 \rightarrow 4)糖苷键断裂,因而形成不同聚合度的偶数新琼寡糖。

由图4可见,寡糖3的 ^{13}C -NMR谱异头碳特征不明显,与寡糖2相比,两者相应的碳原子化学位移相同,但强度不同;而且与寡糖2相似,寡糖3Gr单位的 α/β 比值也为40/60。结合ESI-MS分析结果,证实寡糖3为新琼六糖。

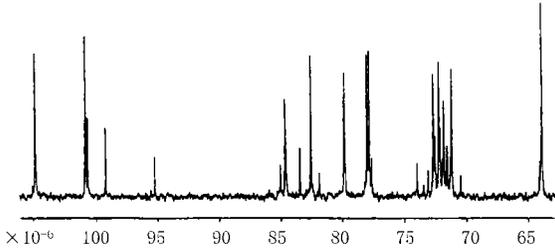


图4 寡糖3的 ^{13}C -NMR谱图

Fig. 4 ^{13}C -NMR spectrum of oligosaccharide-3

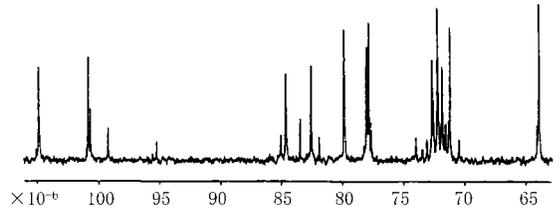


图5 寡糖4的 ^{13}C -NMR谱图

Fig. 5 ^{13}C -NMR spectrum of oligosaccharide-4

寡糖4、寡糖5、寡糖6的 ^{13}C -NMR谱相似,各糖相应的碳原子化学位移相同,所不同的只是峰的强度,这些寡糖由于糖链中多了一些A和G重复单位,它们不象寡糖1和寡糖2碳谱那样表现出典型的寡糖特征,而具有多糖的碳谱特征。如寡糖5的碳谱,碳原子的信号相互重叠,异头碳特征不明显,因此,为判断该寡糖必须借助质谱,由寡糖5质谱可证实该寡糖为新琼十糖。同理,可证实寡糖4为新琼八糖、寡糖6为新琼十二糖。各寡糖碳原子的共振信号归属见表2。

表2 寡糖-2至寡糖-6的 ^{13}C -NMR化学位移

Tab. 2 ^{13}C -NMR chemical shifts of oligosaccharide-2 to oligosaccharide-6 $\times 10^{-6}$

单位	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Gnr	104.82	72.68	84.57	71.18	77.83	63.84
G	104.82	72.68	84.64	71.18	77.83	63.84
G β	99.21	73.97	85.03	71.29	77.65	63.84
G α	95.21	70.45	81.86	71.92	73.08	64.02
Anr	100.65	72.11	83.43	69.85	79.86	71.55
A	100.83	72.22	82.50	78.22	77.99	71.83
Ar(β)	100.83	72.22	82.50	78.22	77.99	71.83
Ar(α)	100.87	72.23	82.50	78.24	77.99	71.83

参考文献:

[1] 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(9): 550-553.

[2] Thomas J. Paskach, Heinz-Peter Lieker, Peter J. Reilly, et al. High-performance anion-exchange chromatography of sugars and sugar alcohols on quaternary ammonium resins under alkaline conditions[J]. Carbohydrate Res, 1991, 215: 1-14.

[3] Kevi B. Hicks, Arland T. Hotchkiss. High-performance liquid chromatography of plant-derived oligosaccharides on a new cation-exchange resin stationary phase: HPX-22H[J]. J Chromatography, 1988, 441: 382-386.

[4] Karen K H, Heinrich H, Hans S. The analysis of agarose by the reductive cleavage method[J]. Carbohydrate Res, 1993, 248: 267-275.

[5] Kunihiko I. Structural analysis of agar-type polysaccharides by NMR spectroscopy[J]. Bioch Bioph Acta, 1973, 320: 311-317.

[6] Rochas C, Lahaye M, Yaphe W. ^{13}C -NMR spectroscopic investigation of agarose oligomers[J]. Carbohydrate Res, 1986a, 148: 199-207.