

鲍鱼多糖 HalB 的乙酰解研究^{*}

胡谷平, 刘丽红, 余志刚, 林永成
(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 对鲍鱼中分离得到的硫酸脂多糖 HalB 进行了乙酰解的研究。硅胶柱层析分离得到两个组分, 核磁共振和串联质谱的研究表明: 这两个组分分别是全乙酰化的半乳糖和全乙酰化的寡糖混合物。

关键词: 杂色鲍; 糖; 串联质谱; 乙酰解

中图分类号: O629.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 06-0128-03

长期以来, 糖类只被看作是能量和结构物质, 然而随着对糖在生物体内功能的不断研究和认识, 以及多糖药物的临床应用, 多糖的研究已成为热门的研究课题^[1]。尤其是发现硫酸脂多糖具有的独特药理作用, 如抗凝血作用、抗病毒作用^[2]、抗癌及抗艾滋病作用^[3]等, 硫酸脂多糖成为多糖研究的又一个热点。与核酸和蛋白质相比, 人们对多糖的认识滞后外, 多糖的方法学研究还有待突破, 尤其结构复杂的多糖更是如此。最近我们从杂色鲍中分离提取了一种具有增加免疫功能和抗癌作用^[4]的硫酸脂多糖 -HalB 并通过甲醇解, 酸水解, 核磁共振等方法进行了结构研究^[5]。本文中用乙酰解的方法对 Hal-B 做了进一步研究, 并用核磁共振和串联质谱研究了乙酰解的产物。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 鲍鱼多糖由作者等从杂色鲍中提取分离得到。试剂均为市售分析纯试剂。杂色鲍来自汕尾市鲍鱼养殖场, 由中山大学生命科学院吕军仪教授鉴定。所用仪器为美国 Varian 公司 Mercury 300M 核磁共振仪, Finnigan 公司 LCQ DECA XP 液相色谱质谱联用仪。

1.2 实验方法 100 mL 烧瓶中加入 20 mL 醋酸和 20 mL 醋酐, 置于冰水浴中, 在搅拌的情况下缓慢滴入 2 mL 浓硫酸。真空干燥的多糖样品 HalB 500 mg 分批加入上述醋酸 醋酐 浓硫酸的混合溶液中。温度升至 55 °C 恒温搅拌 3 h, 溶液颜色渐变成深黄色, 30 min 后多糖全部溶解。然后降温至 35 °C 恒温搅拌 36 h, 反应液倒入 30 mL 碎冰中, 用冰的醋酸钠溶液中和至 pH 3~4, 用 3×20 mL 氯仿萃取, 萃取液分别用 20 mL 水、20 mL 饱和碳酸氢钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤后蒸干氯仿, 得到黄

色浆状混合物约 500 mg。

混合物用少量氯仿溶解, 硅胶 (300 目) 伴样上柱, 乙酸乙酯 石油醚洗脱。乙酸乙酯 石油醚 (体积比为 1:1) 时洗脱得到 Ac1, 纯乙酸乙酯洗脱得到 Ac2。

质谱检测条件: 离子泵喷射电压 5 V, 毛细管温度 200 °C, 毛细管电压 35 V, 壳气: 氮气, 流速: 15 个单位, 碰撞气: 氦气。

2 结果与讨论

2.1 第一个洗脱得到的组分 Ac1 Ac1, θ_{mp} 为 144~146 °C。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 6.379 (s, 1H, H-1), 5.506 (d, 1.2 Hz, 1H, H-4), 5.342 (d, 1.2 Hz, 2H, H-3, H-2), 4.351 (d, 6.6 Hz, 1H, H-5), 4.118 (d, 2.1 Hz, 1H, H-6a), 4.095 (d, 2.1 Hz, 1H, H-6b), 证明是五乙酰化的半乳糖。这个结果也与之前的研究结果相符^[5], 也与文献 [6] 数据一致。

2.2 第二个洗脱得到的组分 Ac2 Ac2 的核磁共振谱峰位置和 Ac1 的呈一一对应, 但峰形是一些宽峰。因此我们初步判断 Ac2 应是由乙酰化的寡糖所组成的混合物。因寡糖中的各个糖残基空间折叠位置的不同, 造成核磁谱峰的微小位移, 因此出现了一系列的宽峰。串联质谱的分析结果也证实了这一点。

图 1(a) 是 Ac2 的正离子模式下的电喷雾质谱图。对各个质谱峰还进行了多级串联质谱分析, 图 1(b) - (f) 是 $[M+Na]^+ = 1955$ 的五级串联质谱图 (其他的串联质谱图未列出)。在各个次级质谱图中都明显出现了去乙酰基的离子峰 $[M-60]^+$ 。

多糖乙酰化过程中除了普通的全乙酰化产物外

^{*} 收稿日期: 2006-02-20

基金项目: 国家海洋 863 基金资助项目 (819-04-03)

作者简介: 胡谷平 (1974 年生), 男, 博士研究生; 通讯联系人: 余志刚, E-mail: ceshhezhi@mail.sysu.edu.cn.

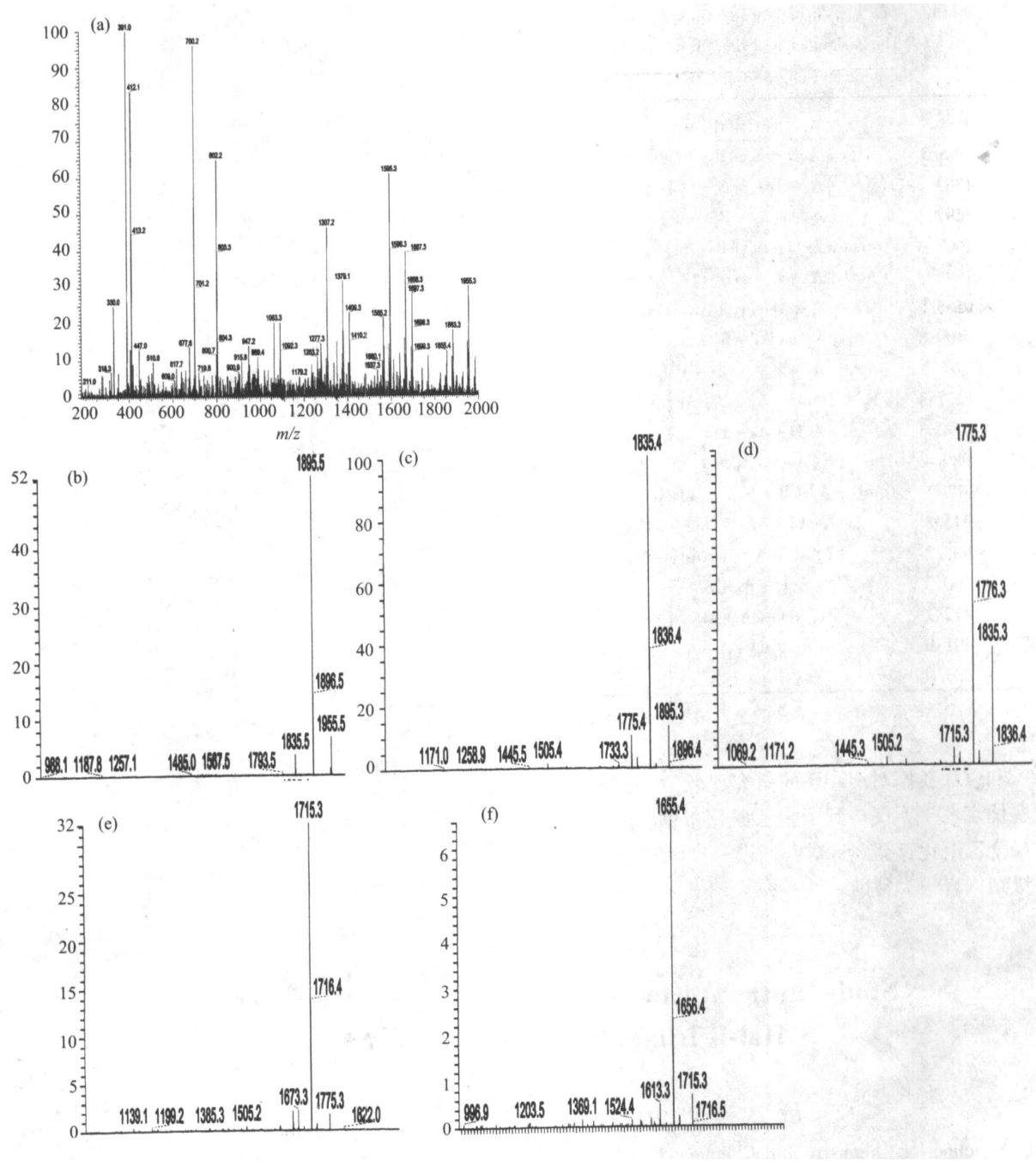


图 1 Ac2的多级串质谱分析图

Fig. 1 Mass spectrum of Ac2 (positive ion)

(a) Full scan spectrum of Ac2 (b) MS¹ of m/z 1955 (c) MS² of m/z 1955
(d) MS³ of m/z 1955 (e) MS⁴ of m/z 1955 (f) MS⁵ of m/z 1955

还会生成开环结构^[7]。乙酰化糖的两种可能的结构单元列于图 2 根据各种结构单元的组合分析, 各个质谱峰都得到了归属(表 1)。此外, 从表 1 还可看出: 乙酰化寡糖的质谱峰均为 [M + Na]⁺, 表明乙酰化寡糖与 Na 也有很强的亲合势^[8]。

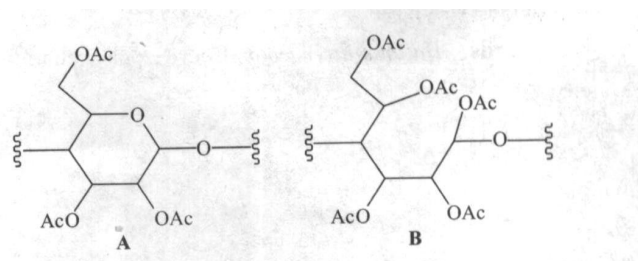


图 2 乙酰化糖的的结构单元

Fig. 2 The unit structure of Ac2

表 1 质谱峰的归属

Tab. 1 The assignments of the MS peaks of the peracetyl oligose from A c2

编号	质量数	结构 ¹⁾
1	955. 3	(A cO+A ₅ +B+A c)+N a
2	1883. 3	(A cO+A ₅ +B+A c) -(CH ₂ OAc)+N a
3	1697. 3	(A cO+A ₃ +B ₂ +A c)+N a
4	1667. 3	(A cO+A ₄ +B+A c)+N a
5	1595. 3	(A cO+A ₄ +B+A c) -(CH ₂ OAc)+N a
6	1565. 2	(A cO+A ₅ +A c)+N a
7	1409. 3	(A cO+A ₂ +B ₂ +A c)+N a
8	307. 2	(A cO+A ₃ +B+A c) -(CH ₂ OAc)+N a
9	1277. 3	(A cO+A ₃ +B+A c)+N a
10	1092. 3	(A cO+A ₂ +B+A c)+N a
11	989. 4	(A cO+A ₃ +A c)+N a
12	47. 2	(A cO+A ₂ +B+A c) -2(CH ₂ OAc)+N a
13	915. 8	(A cO+A ₃ +A c)+N a-(CH ₂ OAc)
14	802. 2	(A cO+A+B+A c)+N a
15	700. 2	(A cO+A ₂ +A c)+N a
16	412. 1	(A cO+A+A c)+N a
17	391. 0	A cO+A+A c
18	330. 0	A+A c

1) A cO+A_n+A c是含有 n 个单糖的全乙酰化寡糖的简单表示

和以往我们对 H a1 B 的研究比较^[5], 乙酰解的主要优点在于不仅得到了全乙酰化单糖, 还得到了大量全乙酰化寡糖。这对我们进一步研究 H a1 B 的二级结构有很大帮助。

参考文献:

[1] HURTLEY S, SERVICE R, SZUROMI P. Carbohydrates and glycobioogy cinderella's coach is ready[J]. Science, 2001, 291: 2337.

[2] 岑颖洲, 王凌云, 马夏军, 等. 羊栖菜多糖体外抗病毒作用研究[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(5): 765 - 768

[3] EZEKOWITZ R A, KUHIMAN M, GROOIMAN M, et al. A human serum mannose binding protein inhibits *in vitro* — infection by the human immunodeficiency virus [J]. J Exp Med, 1989, 169: 185 - 196

[4] 王兵, 蒋建敏, 许东晖, 等. 鲍鱼多糖对荷人鼻咽癌裸鼠抗癌作用的研究[J]. 中草药, 2000, 31: 597.

[5] 吴耀文, 余志刚, 胡谷平, 等. 鲍鱼多糖 H a1 B 的组成研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2002, 41(2): 119 - 120

[6] DENIS W. Adrenaline profiling of lipases and esterases with 1, 2 diol and carbohydrate acetates[J]. Tetrahedron, 2004, 60(3): 703

[7] JOZEF K, MAGDA B, HARRIL, et al. Sulfuric acid catalyzed acetolysis of anomeric ethyl 2, 3, 4, 6 tetra O-acetyl glucopyranosides: kinetics and mechanism [J]. Carbohydrate Res, 1995, 279: 107.

[8] 郭明全, 宋凤瑞, 陈貌连, 等. 刺五加寡糖的电喷雾多级串联质谱研究[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(9): 1577.

Study on the Acetolysis of the Sulphated Polysaccharide
H a1 B from *Halotis diversicolor* Reeve

HU Gu-ping, LIU Li-hong, SHE Zhi-gang, LIN Yong-deng

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract It was studied that the acetolysis of sulfated heterosaccharide H a1 B which isolated from *Halotis diversicolor* Reeve. Two components (A c1, A c2) were isolated from the product by gel column chromatography. The result of NMR and electrospray ionization tandem mass spectrometry indicated A c1 was peracetyl galactose and A c2 was peracetyl oligose.

Key words *Halotis diversicolor* Reeve; polysaccharide; acetolysis; electrospray ionization tandem mass spectrometry