

海带褐藻多糖硫酸酯的降解与岩藻寡糖的制备

耿丽华^{1,2,3}, 金维华¹, 王晶^{1,3}, 张全斌^{1,3}

(1. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室, 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋生物学与生物技术功能实验室, 青岛 266071)

摘要 采用稀酸水解的方法降解粗褐藻多糖硫酸酯(FPS)制备了硫酸化岩藻寡糖. 通过考察降解及沉降条件研究了FPS的水解及沉降规律. 通过理化性质分析发现, 沉降所得上层清液为杂合硫酸化岩藻寡糖[岩藻糖(Fuc)含量>55%]. 进一步采用Bio-Gel P4 低压凝胶渗透色谱分离纯化, 得到4种以岩藻糖为主的低聚合度硫酸化寡糖. 单糖组成分析和电喷雾质谱(ESI-MS)分析结果表明, 各组分主要为系列低聚合度硫酸化岩藻寡糖或硫酸化岩藻糖, 包括 $\text{Fuc}_{1-3}\text{S}_{1-3}$, $\text{Fuc}_{1-2}\text{S}_{1-2}$, $\text{Fuc}_{1-2}\text{S}_1$ 及 FucGlcAS .

关键词 褐藻多糖硫酸酯; 岩藻寡糖; 酸水解

中图分类号 O629 **文献标志码** A

褐藻多糖硫酸酯是一种主链为 α -L-Fuc残基的硫酸化岩藻聚糖^[1,2], 主要单糖组成为岩藻糖, 其次为半乳糖, 还含有一定量或相当量的甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖及木糖等. 近年来, 褐藻多糖硫酸酯因其抗凝血^[3-5]、抗病毒^[6,7]、抗肿瘤^[8-10]和神经保护^[11,12]等广泛的生物活性, 而成为研究热点之一. 构效关系研究表明, 其生物活性与岩藻糖含量、硫酸基取代度及相对分子量等密切相关^[13-15]. 但褐藻多糖硫酸酯存在分子量大、难以通过血脑屏障及吸收率低等缺点, 并且其组成复杂, 结构表征和质量控制有一定的难度, 因而其应用受到了一定限制.

通过对褐藻多糖硫酸酯的降解方法进行研究, 制备具有不同硫酸酯化程度的岩藻寡糖, 对于开展构效关系研究, 提高褐藻多糖硫酸酯的吸收利用效率, 开拓其新活性和应用范围具有重要意义. 随着各种软电离质谱技术的发展, 电喷雾质谱(ESI-MS)已被广泛应用于糖类结构的表征^[16-18]. 利用ESI-MS可以快速获得寡糖的结构组成, 使寡糖结构研究更方便、快捷. 徐祖洪等^[19]提出的水提碱凝法可从海带褐藻中提取褐藻多糖硫酸酯, 已用于大规模生产并已商品化投入市场. 本文以海带褐藻多糖硫酸酯粗多糖为原料, 探索了稀酸水解和分离规律, 并结合渗透色谱法获得了一系列低聚合度的硫酸化岩藻寡糖片段, 为岩藻寡糖的制备和应用开辟了新思路.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Bio-Gel P4 凝胶(Extra Fine)购自美国Bio-Rad公司; 右旋糖酐系列标准品(分子量分别为180, 2500, 4600, 7100, 10000, 21400, 41100, 84400和133800)购自中国药品生物制品检定所; D-甘露糖(Man)、L-鼠李糖(Rha)、D-葡萄糖醛酸内酯(GlcA)、D-葡萄糖(Glc)、D-半乳糖(Gal)、D-木糖(Xyl)、L-岩藻糖(Fuc)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)和硫酸钾(优级纯)均购自Sigma公司; 甲醇和乙腈均为色谱纯, 购自德国Merck公司; 硫酸钠、碳酸氢铵、正丁醇、甲酸、乙酸和三氟乙酸均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司.

L2S型紫外-可见分光光度计(上海棱光技术有限公司); RE-520型旋转蒸发器(上海青浦沪西仪

收稿日期: 2017-04-13. 网络出版日期: 2017-11-20.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 41506165)、山东省重点研发计划项目(海洋医用食品)(批准号: 2016YYSP002)、山东省自然科学基金(批准号: ZR2014DQ024)和青岛市应用基础研究计划-青年专项(批准号: 15-9-1-74-jch)资助.

联系人简介: 张全斌, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事海藻化学与海洋药物研究. E-mail: qbzhang@qdio.ac.cn

器公司); SBS-100 型自动部分收集器(上海沪西分析仪器有限公司); Shimadzu LC-20A 型高效液相色谱仪(HPLC, 日本岛津公司); TSK G3000 PWxl 型凝胶色谱柱(日本 TOSOH 公司); YMC-Pack ODS-AQ 型色谱柱(ϕ 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m, 日本 YMC 公司); Silica Gel 60 型硅胶层析板(德国 Merck 公司); SUGAR KS-802 型色谱柱(ϕ 8.0 mm \times 300 mm, 6 μ m)和 SUGAR KS-804 型色谱柱(ϕ 8.0 mm \times 300 mm, 7 μ m, 日本 Shodex 公司); Micromass Q-TOF Ultima 型电喷雾质谱(ESI-MS, 英国 Waters 公司).

1.2 实验过程

参照文献[19]方法,从海带中制备褐藻多糖硫酸酯(FPS),总糖含量(质量分数)为 55.96%,硫酸根含量为 20.22%,糖醛酸含量为 12.61%,岩藻糖含量为 21.32%,平均重均分子量为 100000.

1.2.1 寡糖的制备及酸水解条件的优化 将 10 g FPS 溶于 300 mL H_2SO_4 (0.2 mol/L)溶液中,于 80 $^{\circ}C$ 搅拌不同时间水解后,中和离心,将所得上层清液用不同浓度的几种溶剂沉降,静置过夜后离心,取上层清液,旋蒸浓缩后冷冻干燥,即为酸解得到的寡糖,标记为 SPF1;离心所得沉淀经冷冻干燥,即为降解后的杂多糖,标记为 SPF2.稀酸水解和沉降条件列于表 1,分别考察了水解时间、沉降试剂和沉降终浓度 3 个条件,每个条件考察 3 个水平,共计有 27 种不同处理方式.

Table 1 Condition setting of degradation of crude fucoidan from seaweed

Condition	Level		
	1	2	3
Hydrolysis time/h	3	5	7
Precipitation reagent	EtOH	AcN	$(CH_3)_2CO$
Concentration(%)	50	70	90

SPF1 和 SPF2 各有 27 种不同处理方式,分别用 X-Y-Z 表示(其中, X=1, 2, 3 分别指水解时间 3, 5 和 7 h; Y=1, 2, 3 分别指所用沉降剂为乙醇、乙腈和丙酮; Z=1, 2, 3 分别指沉降终浓度为 50%, 70%和 90%).例如:处理方式 1-1-1 即为水解 3 h 后,用乙醇沉降至终浓度为 50%.

1.2.2 寡糖的分离纯化 将 1 g 降解后的寡糖溶于 4 mL 碳酸氢铵(0.5 mol/L)溶液中,用 Bio-Gel P4 (<45 μ mol/L, 2.6 cm \times 100 cm)低压凝胶渗透色谱(LPGPC)分离,流动相为碳酸氢铵(0.5 mol/L),流速为 0.15 mL/min,采用苯酚-硫酸法快速测定总糖含量并绘制洗脱曲线.根据洗脱曲线的出峰情况分别收集相应的组分,经旋转蒸发浓缩、脱盐及干燥,得到硫酸化寡糖.采用薄层层析(TLC)检测分离纯化情况及分析聚合度^[20],展开剂 V(正丁醇):V(甲酸):V(水)=4:5:1,展开 2 次后用苯胺-二苯胺磷酸缓冲液显色.

1.2.3 化学组成分析 分析了 FPS 及所得 27 种 SPF1 的化学组成.以岩藻糖为标准,采用半胱氨酸盐酸盐法^[21]测定岩藻糖含量;以 K_2SO_4 为标准,采用 $BaCl_2$ -明胶比浊法^[22]测定硫酸根含量;以苯酚硫酸法^[23]测定总糖含量;以葡萄糖醛酸为标准,采用吡啶比色法^[24]测定糖醛酸含量;采用 PMP 柱前衍生-HPLC 法^[25]测定单糖组成;采用凝胶色谱法^[26]测定相对分子量分布,色谱条件:TSK G3000 PWxl/SUGAR KS-802/KS-804 色谱柱,流动相为 Na_2SO_4 (0.05 mol/L),流速为 0.5 mL/min,柱温为 40 $^{\circ}C$,示差检测器,以不同分子量的右旋多糖酐作为参照.

1.2.4 电喷雾质谱分析 参照文献[27]方法,取少量分离纯化后的硫酸化寡糖用 ESI-MS 质谱仪进行分析.测定条件:样品用 V(乙腈):V(水)=1:1 溶液溶解,流速 5 μ L/min,离子源温度 80 $^{\circ}C$,溶剂挥发温度 150 $^{\circ}C$,毛细管电压 3 kV,数据采集方式为 Full scan,扫描范围 m/z 120~2000,负离子模式.

2 结果与讨论

2.1 酸水解规律及寡糖的制备

糖苷键水解的难易程度与其类型、连接方式、单糖种类及取代基的取代情况相关.通常,酸水解情况下支链糖苷键比主链糖苷键更易水解,呋喃糖苷比吡喃糖苷易水解,酮糖比醛糖易水解,非还原端的中性糖易水解,而与糖醛酸相连的糖苷键则较难水解.本文采用稀硫酸水解法降解褐藻多糖硫酸酯制备岩藻寡糖.通过设置不同降解时间来研究酸解对制备岩藻寡糖的影响;同时,结合沉降原理,即糖类在水和其它溶剂中的溶解度不同,设置不同沉降试剂和沉降浓度来研究降解产物的结构和组成,总结多糖酸解和沉降规律,为硫酸化岩藻聚糖的结构表征提供信息.

实验中 SPF1 共得到 27 种不同方式的处理,平均重均分子量均为 2000,产率 25%~60%.结果表

明,不同的降解时间(3~7 h)和沉降剂对产率几乎无影响,而沉降浓度影响则较大且呈负相关,符合沉降原理.由理化性质分析数据可知,各处理硫酸基含量亦相差不大[(Mean±SD)=(12.82±2.45)%].水解后,硫酸基保留在 SPF1 中,说明硫酸基主要存在于易水解的糖链上,且岩藻糖的质量分数比水解前显著提高(RSD=0.29%).由此推测硫酸基取代主要在非还原端的岩藻糖上,故通过酸解结合沉降的方式可以有效得到硫酸化寡糖.与糖醛酸相连的糖苷键难以水解,故水解时间越长,水解越剧烈,SPF1 中糖醛酸含量越高;而沉降终浓度越大,SPF1 中糖醛酸含量越低,对中性单糖的组成分析也印证了此结果.SPFF2 的理化性质变化规律与 SPF1 相对应,且 SPF2 的平均重均分子量>20000,因此不在本文讨论范围内.

图 1 给出了 PMP 柱前衍生高效液相色谱法测得的 SPF1 所有处理的单糖组成情况.可见,27 种处理方式所得 SPF1 均主要由岩藻糖(Fuc)组成(质量分数>55%),且随着沉降浓度的增大,Fuc 含量升高,其它杂糖含量均减少,当沉降浓度为 90%时,Fuc 含量可达 86.21%.水解时间对 SPF1 中 Fuc 和甘露糖(Man)、鼠李糖(Rha)、半乳糖(Gal)和木糖(Xyl)的含量基本无影响,而葡萄糖(Glc)含量随着水解时间的延长而升高.水解时间和沉降终浓度的相互作用可以影响 SPF1 中葡萄糖醛酸(Glc A)的含量,水解 3 h,终浓度为 90%时,可有效去除 SPF1 中的 Glc A.沉降试剂对单糖组成的影响较小,但用乙腈和丙酮处理所得 SPF1 比乙醇处理后的 Fuc 含量略有升高.而相应的 SPF2 中,单糖组成更加复杂多样,平均重均分子量为 20~35000,证实为杂多糖.

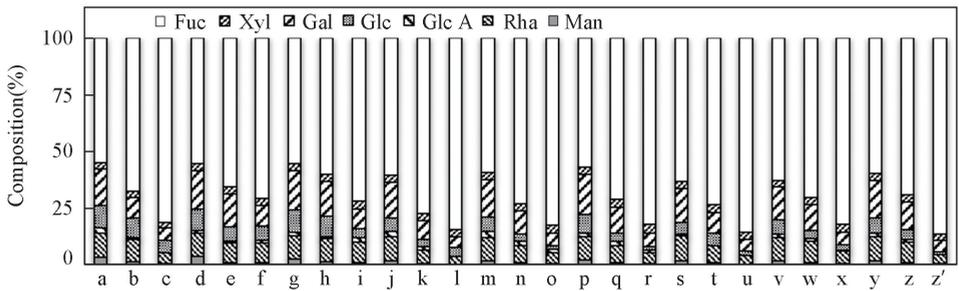


Fig.1 Monosaccharides composition of SPF1 (mass ratio)

a. 1-1-1; b. 1-2-1; c. 1-3-1; d. 2-1-1; e. 2-2-1; f. 2-3-1; g. 3-1-1; h. 3-2-1; i. 3-3-1; j. 1-1-2; k. 1-2-2; l. 1-3-2; m. 2-1-2; n. 2-2-2; o. 2-3-2; p. 3-1-2; q. 3-2-2; r. 3-3-2; s. 1-1-3; t. 1-2-3; u. 1-3-3; v. 2-1-3; w. 2-2-3; x. 2-3-3; y. 3-1-3; z. 3-2-3; z'. 3-3-3.

2.2 寡糖的分离纯化

SPF1 的理化性质分析结果表明,使用乙腈或丙酮在沉降浓度为 90%时的所有产物均以岩藻糖为主,其它杂糖含量则很少,故选取其中 3-3-2 方式为研究对象.3-3-2 方式处理所得 SPF1 的 GPC 结果(图 S1,见本文支持信息)表明,其平均分子量约为 2400,单糖组成谱图(图 S2,见本文支持信息)印证了其单糖组成以岩藻糖为主,其它中性糖含量较少.该产物经 LPGPC 分离纯化得到 4 个组分 FP1,FP2,FP3 和 FP4,分别收集脱盐后,用 TLC 检测其纯度及组成情况如图 2 所示.根据 TLC 原理,聚合度越小,其迁移速度越快, R_f 越大.从分析结果看,FP1~FP4 的组成由复杂到简单,且显色情况表明,

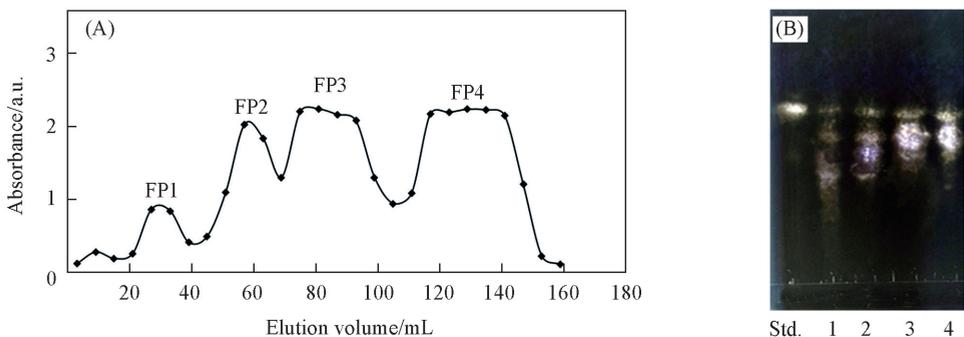


Fig.2 Separation graph(A) and TLC analysis for fractions FP1—FP4(B) of SPF1 by LPGPC

(B) Std.: standard of fucose; lanes 1—4: FP1—FP4.

组成中 R_f 大的峰颜色加重, 即低聚合度成分越来越多, 高聚合度成分越来越少, FP1~FP4 呈现有规律的聚合度变化。

图 S3(见本文支持信息)为 SPF1 分离纯化后的 4 种寡糖组分的 ESI-MS 谱图, 结合单糖组成分析, 其聚合度及结构解析结果列于表 2。由表 2 可知, 经 Bio-Gel P4 凝胶色谱分离纯化后, 所得产物主要为一系列低聚合度的硫酸化岩藻寡糖或硫酸化岩藻糖。其中, FP4 为硫酸化岩藻糖(FucS) ($[M-H]^- = 243.0$, $[2M-H]^- = 487.0$), 其余各组分可以用系列硫酸化岩藻寡糖的形式^[28]表示, FP1 为 $Fuc_{1-3}S_{1-3}$ 及 FucGlcAS, 即主要为聚合度为 1~3 的单硫酸化、二硫酸化及三硫酸化的岩藻糖或岩藻寡糖, 还有少量的单硫酸化岩藻葡萄糖醛酸二糖; FP2 为 $Fuc_{1-2}S_{1-2}$, 即单硫酸化以及二硫酸化的岩藻糖和岩藻二糖; FP3 为 $Fuc_{1-2}S_1$, 即单硫酸化的岩藻糖和岩藻二糖。可见, 酸解制备的寡糖 SPF1 经凝胶色谱分离纯化后, 可得系列低聚合度硫酸化岩藻寡糖或硫酸化岩藻糖, 包括 $Fuc_{1-3}S_{1-3}$, $Fuc_{1-2}S_{1-2}$, $Fuc_{1-2}S_1$ 及 FucGlcAS。

综上所述, 采用稀酸水解的方式降解海带褐藻多糖硫酸酯, 结合沉降原理, 通过理化性质分析, 探究了所得寡糖的化学成分分布规律。通过凝胶渗透色谱法分离纯化, 得到系列低聚合度硫酸化岩藻寡糖及硫酸化岩藻糖。本文方法可用于硫酸化岩藻寡糖和硫酸化岩藻糖的制备, 对进一步开展构效关系研究有重要指导意义。

支持信息见: <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20170232>。

参 考 文 献

- [1] Nishino T., Nagumo T., Kiyohara H., Yamada H., *Carbohydr. Res.*, **1991**, 211(1), 77—90
- [2] Chizhov A. O., Dell A., Morris H. R., Haslam S. M., McDowell R. A., Shashkov A. S., Nifant'ev N. E., Khatuntseva E. A., Usov A. I., *Carbohydr. Res.*, **1999**, 320(1/2), 108—119
- [3] Jin W. H., Zhang Q. B., Wang J., Zhang W. J., *Carbohydr. Polym.*, **2013**, 91(1), 1—6
- [4] Jin W. H., Zhang Q. B., Zhang Z. S., Hou Y., Zhang H., *Chinese J. Oceanol. Limn.*, **2011**, 29(3), 679—685
- [5] Dore C. M. P. G., Alves M. G. D. C. F., Will L. S. E. P., Costa T. G., Sabry D. A., Rego L. A. R. S., Accardo C. M., Rocha H. A. O., Filgueira L. G. A., Leite E. L., *Carbohydr. Polym.*, **2013**, 91(1), 467—475
- [6] Karmakar P., Pujol C. A., Damonte E. B., Ghosh T., Ray B., *Carbohydr. Polym.*, **2010**, 80(2), 513—520
- [7] Hemmingson J. A., Falshaw R., Furneaux R. H., Thompson K., *J. Applied Phy.*, **2006**, 18(2), 185—193
- [8] Synytsya A., *Carbohydr. Polym.*, **2010**, 81(1), 41—48
- [9] Moghadamtousi S. Z., Karimian H., Khanabdali R., Razavi M., Firoozinia M., Zandi K., Kadir H. A., *Sci. World J.*, **2014**, 2014(2014), 768323
- [10] Lowenthal R. M., Fitton J. H., *J. Appl. Phycol.*, **2015**, 27(5), 2075—2077
- [11] Luo D. Z., Zhang Q. B., Wang H. M., Cui Y. Q., Sun Z. L., Yang J., Zheng Y., Jia J., Yu F., Wang X., Wang X. M., *Eur. J. Pharmacol.*, **2009**, 617(1—3), 33—40
- [12] Gao Y., Dong C., Yin J., Shen J., Tian J., Li C., *Cell Mol. Neurobiol.*, **2012**, 32(4), 523—529
- [13] Bouhedja F. H., Ellouali M., Sinquin C., Vidal C. B., *Thromb. Res.*, **2000**, 100(5), 453—459
- [14] Koyanagi S., Tanigawa N., Nakagawa H., Soeda S., Shimeno H., *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, 65(2), 173—179
- [15] Wang J., Liu H. D., Jin W. H., Zhang H., Zhang Q. B., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2016**, 82, 878—883
- [16] Chen H. H., Zhao X., Luan X. H., Yu G. L., *Chem. J. Chinese Universities*, **2015**, 36(1), 1—8(陈欢欢, 赵峡, 栾晓红, 于广利. 高

等学校化学学报, **2015**, 36(1), 1—8)

- [17] Anastyuk S. D., Shevchenko N. M., Nazarenko E. L., Imbs T. I., Gorbach V. I., Dmitrenok P. S., Zvyagintseva T. N., *Carbohydr. Res.*, **2010**, 345(15), 2206—2212
- [18] He Y. F., Liu W. L., Su R., Xiu Y., Pei J., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2017**, 33(2), 172—178
- [19] Xu Z. H., Li Z. E., Zhang X. J., Guo Y. C., *Drug and Preparation Method for Renal Failure and Cerebrovascular Disease as Fucoidan*, CN 1129109A, 1996-08-21(徐祖洪, 李智恩, 张星君, 郭玉彩. 褐藻多糖硫酸酯作为治肾衰和血管病的药品及其制备方法, CN 1129109A, 1996-08-21)
- [20] Nie Y., Zhang W. Q., Shi B., Jiu Z. W., Su D. H., Cheng Y. Q., *Food Nutr. China*, **2012**, 18(8), 29—33(聂莹, 张文倩, 石波, 韭泽悟, 苏东海, 程永强. 中国食物与营养, **2012**, 18(8), 29—33)
- [21] Gibbons M. N., *Analyst*, **1955**, 80(949), 267—276
- [22] Dogson K. S., Price R. G., *Biochem. J.*, **1962**, 84(1), 106—110
- [23] Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., *Anal. Chem.*, **1956**, 28(3), 350—356
- [24] Bitter T., Muir H. M., *Anal. Chem.*, **1962**, 4(4), 330—334
- [25] Zhang J. J., Zhang Q. B., Wang J., Shi X. L., Zhang Z. S., *Chinese J. Oceanol. Limn.*, **2009**, 27(3), 578—582
- [26] Lv Z. H., Yu G. L., Zhao X., *Chinese J. New Drugs*, **2002**, 11(3), 220—221(吕志华, 于广利, 赵峡. 中国新药杂志, **2002**, 11(3), 220—221)
- [27] Jin W., Zhang W., Wang J., Ren S., Song N., Zhang Q., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2013**, 62(11), 697—704
- [28] Wu J. D., Lv Y. J., Liu X. X., Zhao X. L., Jiao G. L., Tai W. J., Wang P. P., Zhao X., Cai C., Yu G. L., *J. Carbohydr. Chem.*, **2015**, 34(5), 303—317

Fucoidan Degradation and Preparation of Fuco-oligosaccharides from *Saccharina japonica*[†]

GENG Lihua^{1,2,3}, JIN Weihua¹, WANG Jing^{1,2}, ZHANG Quanbin^{1,3*}

- (1. *Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;*
2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;*
3. *Lab for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Lab for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China)*

Abstract The sulfated fuco-oligosaccharides were prepared *via* acid hydrolysis degradation of crude fucoidan extracted from *Saccharina japonica*. Through the optimization of degradation and precipitation conditions, the hydrolysis and sedimentation law of fucoidan were studied. Physicochemical analysis showed that the supernatant was heterozygous sulfated fuco-oligosaccharide (fucose > 55%). Four fractions of fucose based low polymerization degree of oligosaccharides were purified by Bio-Gel P4 low-pressure permeation chromatography, and the fucose content of the fractions was up to 90% according to monosaccharide composition analysis and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analysis. Thus, the fractions were series of low-polymerized sulfated fuco-oligosaccharide/fucose, and the major fractions could be expressed with the formula of Fuc₁₋₃S₁₋₃, Fuc₁₋₂S₁₋₂, Fuc₁₋₂S, and FucGlcAS.

Keywords Fucoidan; Fuco-oligosaccharide; Acid hydrolysis

(Ed.: P, H, W, K)

[†] Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.41506165), the Focus on Research and Development Plan in Shandong Province (Marine Medical Food), China (No.2016YYSP002), the Shandong Provincial Natural Science Foundation of China (No.ZR2014DQ024) and the Science and Technology Program of Applied Basic Research Projects of Qingdao Municipal, China (No.15-9-1-74-jch).