

6-O-羧甲基氨基葡萄糖的制备及其结构分析

常菁, 刘万顺, 韩宝芹, 王常红

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 采用酶降解和酸降解相结合的工艺, 将大分子量的 6-O-羧甲基甲壳素降解成单分子的 6-O-羧甲基氨基葡萄糖, 经 906 型弱碱性阴离子交换树脂柱吸附层析分离, 制得羧甲基化氨基糖。对该单糖进行了 HPLC、高效薄层、比旋光度、熔点和红外光谱等方面的分析研究。结果表明, 该单糖在 C₆ 连有羧基, C₂ 连有氨基, 具有特定的比旋光度和熔点特征, 与报道的结果相一致。

关键词: 壳聚糖酶; 溶菌酶; 6-O-羧甲基氨基葡萄糖; 酸水解

中图分类号: Q532⁺.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)02-0063-06

甲壳素是由 D-乙酰基氨基葡萄糖结构单元组成的线性多糖, 是地球上丰富存在的天然高分子化合物, 主要存在于节肢动物如虾、蟹、昆虫外壳及真菌细胞壁和某些低等植物中。甲壳素本身具有强烈的氢键作用, 化学性质不活泼, 不能直接溶解于水、稀酸、稀碱和一般有机溶剂中, 因而限制了它在许多方面的应用^[1]。甲壳素在低温碱性条件下与一氯乙酸反应可制得水溶性的 6-O-羧甲基甲壳素(6-O-CM-chitin), 具有优良的保温性、成膜性、药物缓释^[2]等特性, 在日用化工、食品、药物等领域有广泛应用前景。由羧甲基甲壳素水解制得的羧甲基壳寡糖(CM-co₅)具有良好的抗菌、促进 Ca 的吸收、提高巨噬细胞的吞噬能力、抑制肿瘤细胞的生长等诸多生物活性^[3-5]。作为氨基葡萄糖的衍生物 6-O-羧甲基氨基葡萄糖具有兼性离子的特性, 本试验目的是通过研究 6-O-羧甲基氨基葡萄糖的制备方法, 并将其分离纯化成单一组分, 为今后进一步研究其生理活性和构象关系奠定基础。

1 材料与实验方法

1.1 材料和试剂

国产 906 弱碱性阴离子交换树脂(上海华震科技有限公司); 聚丙烯酰胺凝胶 P4(AT Biochem); 高效硅胶板(MERCK 公司); 壳聚糖酶(按本实验室方法制备纯化, 酶活力为 5 000 U/mg); 溶菌酶(北京鼎国生物技术发展中心产品, 酶活力为 20 000 U/mg); 大茴香醛、无水甲醇、无水乙醇、乙酸、氨水、盐酸、氢氧化钠、醋酸钠、冰醋酸均为国产商品试剂, 分析纯。

1.2 主要仪器

1525 型液相色谱仪(美国 Waters 公司); Avatar

360 型红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet); WXG-4 型旋光仪(上海大庆光学仪器厂); TU-1800S 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); RS-20 III 型高速冷冻离心机(湘西仪器仪表总厂机械仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 羧甲基甲壳素的制备

称取 50 g 甲壳素加入过量的 50% NaOH 溶液中, 室温搅拌均匀, 冰冻过夜。融化抽滤固形物, 加入 4 倍体积的异丙醇溶液。室温搅拌下加入氯乙酸(甲壳素单糖残基与氯乙酸摩尔比为 1:1.5), 搅拌反应 10 h。抽滤, 固液分离, 固形物用蒸馏水溶解, 稀 HAC 中和至 pH=8, 95% 乙醇沉淀, 70% 乙醇溶液洗涤脱盐, 乙醇脱水, 真空干燥, 得 6-O-CM-chitin 产品。

1.3.2 羧甲基甲壳素的乙酰化度和羧化度分析

采用电位滴定法测脱乙酰化度^[6]和羧化度^[7]: 取 0.3 g 烘干至恒质量的羧甲基甲壳素, 加入 30 mL 0.100 0 mol/L HCl 溶液中, 搅拌至完全溶解, 用标准的 0.100 0 mol/L NaOH 溶液在搅拌下滴定, 用数字酸度计测定溶液 pH 值, 直到 pH>11 时终止滴定, 绘制 pH 值-NaOH 溶液体积曲线, 分别以下列公式计算脱乙酰度和羧化度:

$$\text{脱乙酰度} = \frac{(V_3 - V_2) \times c(\text{NaOH}) \times 10^{-3}}{m / 241}$$

$$\text{羧化度} = \frac{0.203(V_2 - V_1) \times c(\text{NaOH})}{m - m_1 + m_2}$$

收稿日期: 2006-02-26; 修回日期: 2006-06-10

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2003AA625050)

作者简介: 常菁(1980), 女, 山东青岛人, 在读博士, 从事海洋活性物质和医用生物材料研究, 电话: 15963209745, E-mail: Jingch1980@yahoo.com.cn

式中 $m_1 = (V_2 - V_1) \times c(\text{NaOH}) \times 0.080 - (V_3 - V_0) \times c(\text{NaOH}) \times 0.022$, g; $m_2 = (V_3 - V_2) \times c(\text{NaOH}) \times 0.042$, g; m 为样品的恒质量, g; V_0 为相同体积标准 HCl 溶液空白滴定所需 NaOH 溶液的体积, mL; V_1 、 V_2 、 V_3 为三个突跃点所对应的 NaOH 体积, mL。

1.3.3 低分子质量羧甲基甲壳素的制备

1.3.3.1 酶解条件优化实验

首先分别以 pH 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0 的酶底物反应液测定酶的最适 pH 值; 然后分别以 30, 35, 40, 45, 50 °C 测定酶的最适温度; 最后分别以 72, 96, 120, 144 h 测定底物水解的程度, 确定其最适的酶水解条件。

1.3.3.2 制备方法

称取 20 g 羧甲基甲壳素, 用 0.1 mol/L HAC-NaAc 缓冲液, pH 5.6, 配成 4% 底物溶液, 最适条件下酶水解, 酶水解后样品用乙酰丙酮法^[8]测定数均分子质量。

1.3.4 羧甲基甲壳寡糖的制备

经壳聚糖酶水解制得的低分子质量羧甲基甲壳素样品用 0.05 mol/L HAC-NaAc 溶液 (pH = 6.0) 配成 5% 的溶液, 加入 2 g 溶菌酶, 45 °C 酶水解 96 h, 乙酰丙酮法测定其数均分子质量。

1.3.5 酶水解产物除蛋白质

酶水解产物溶液中加入少量的 10% 三氯乙酸, 溶液调 pH 值 4.5~5.0, 4 °C 下放置过夜, 沉淀酶蛋白, 以 6 000 r/min 离心 30 min, 取其上清液, 滤纸抽滤, 用乙醇沉淀, 真空干燥, 得羧甲基甲壳寡糖。

1.3.6 羧甲基氨基葡萄糖的制备

将酶水解后的样品溶于 2 mol/L 的盐酸溶液中, 于 100 °C 回流水解 5.5 h, 液体旋转蒸发至干, 加入少量三蒸水复溶, 无水乙醇沉淀, 抽滤, 真空干燥, 乙酰丙酮法测定其数均分子质量。

1.3.7 离子交换层析

选用国产 906 弱碱型阴离子交换树脂柱 ($\Phi 5$ cm \times 25 cm), 用前酸碱处理转为 Cl 型, 样品配成质量分数为 5% 的溶液, pH 8.5, 上样流速为 0.75 mL/min, 蒸馏水洗脱, 以 4 mol/L 的 HAC 溶液洗脱, 分别收集样品洗脱峰, 50 °C 减压浓缩, 冷冻干燥。

1.3.8 凝胶分离纯化

选用 Biogel P4 凝胶柱 ($\Phi 2$ cm \times 120 cm), 用三蒸水配成质量分数 10% 的溶液, 每次上样量 1 mL, 三蒸水为流动相, 用 0.2 mL/min 的流速上样洗脱, 收集洗脱峰, 冷冻干燥。

1.3.9 产物指标分析

1.3.9.1 HPLC 法

色谱柱: SUGAR-KS-801 柱; 柱温: 40 °C; 进样量: 20 μ L; 流动相: 三蒸水; 流速: 0.2 mL/min。

1.3.9.2 高效硅胶板薄层法^[9]

用乙酸乙酯: 甲醇: 水: 氨水 = 5: 9: 1: 1.5 (体积比) 混合液作为硅胶薄板展开剂; 大茴香醛乙醇溶液 (25.0 mL 大茴香醛, 450 mL 乙醇, 25.0 mL 浓硫酸, 5.0 mL 乙酸混合) 作为显色剂。操作: 吸取 1% 的氨基葡萄糖盐酸盐 (对照) 溶液和样品溶液各 1 μ L 点于高效硅胶板上 (12 cm \times 3 cm), 距底端距离为 1.0 cm。置于预饱和好的层析缸中, 上行法展开。取出, 用热风吹干, 喷雾法显色, 糖所在点呈棕黄色。

1.3.9.3 单糖中的羧基鉴定

采用硫酸吡啶法^[10]: 羧基化单糖与浓硫酸脱水形成糖醛或其衍生物, 可与吡啶缩合产生颜色物质, 反应后溶液呈红色, 在 530 nm 处有最大吸光值。以氨基葡萄糖做空白, 葡萄糖醛酸做对照, 各糖质量浓度均为 100 mg/L, 能对产物的羧基存在作定性分析。

1.3.9.4 比旋光度测定

按药典方法精确称取干燥至恒质量的样品 0.5 g, 蒸馏水溶解, 定容至 50 mL。放置 24 h 后, 用旋光仪测定。按下式计算:

$$\alpha_{D,t} = \frac{\alpha}{l \cdot c} \times 100$$

$\alpha_{D,t}$ 为比旋光度; D 为钠光谱的 D 线; t 为测定时的温度; l 为测定管长度 (dm); α 为测得的旋光度; c 为样品的质量浓度 (g/100 mL)。

1.3.9.5 熔点测定

采用毛细管法测熔点, 样品干燥后, 研成细粉末, 装入毛细管内至夯实, 管外样品擦净。用橡皮圈将毛细管缚在温度计旁, 并使装样部分和温度计水银球处在同一水平位置, 同时要使温度计水银球处于 b 形管两侧管中心部位。缓慢升温, 当看到第一滴熔化的液体时, 记下此时的温度, 到所有固体完全消失呈液体时再记下这时的温度, 这两个温度即为该样品的熔点范围。

1.3.9.6 红外光谱分析

取 50~100 mg 无水溴化钾和 0.5~1 g 样品与玛瑙钵体中, 研碎成细末并充分混匀, 压片机中压片, 将压好的溴化钾盘片放入 Avatar360 型红外光谱仪中扫描测试。

2 结果与讨论

2.1 6-O-CM-chitin 的制备条件

甲壳素是由 N-乙酰氨基葡萄糖以 β -1,4 糖苷键缩合而成的多糖,因而在羧化反应中, C_2 , C_3 , C_6 位上的羟基都有可能发生醚化反应。根据化学反应中亲核反应原理,糖环的 C_6 位的羟基应该是最易发生反应,所以反应中控制反应的温度、碱浓度和氯乙酸的滴加速度和用量以控制此多糖的羧甲基化尽可能在 C_6 位上进行,由此确定甲壳素单糖残基与 NaOH 的摩尔比为 1:3,甲壳素单糖残基与氯乙酸的摩尔比为 1:1.5 最宜,温度控制在 30 °C 以下的范围,缓慢滴加氯乙酸,可制得羧甲基绝大多数在 C_6 位反应的羧甲基甲壳素。

2.2 6-O-CM-chitin 脱乙酰度和羧化度测定结果

用标准的 0.100 0 mol/L NaOH 溶液滴定,以消耗的 NaOH 溶液的体积为横坐标, pH 值为纵坐标绘制滴定曲线(图 1)。根据不同基团的酸性强弱比较可知曲线中第一拐点为过剩盐酸的滴定终点,第二拐点为羧基的滴定终点,第三拐点为氨基的滴定终点。利用二次微商法找出三个拐点,根据各滴定终点所用的 NaOH 溶液的体积,用脱乙酰度和羧基化度公式计算,求得脱乙酰度为 84.5%,羧化度为 90.6%。

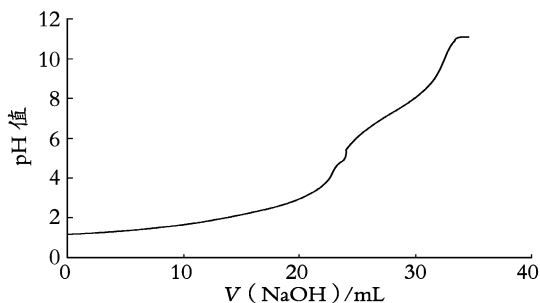


图 1 CM-chitin 的电位滴定曲线

Fig. 1 Potentiometric titration curve of CM-chitin

2.3 壳聚糖酶最适酶解条件的确定

根据壳聚糖酶在不同 pH 值、不同温度和不同

时间酶降解底物程度的变化,分别制得 pH 值-酶活力、温度-酶活力和酶水解时间-产物变化 3 条曲线(图 2、图 3、图 4),由曲线峰值确定壳聚糖酶解最佳条件为 pH 为 5.6, 40 °C, 水解时间为 120 h。

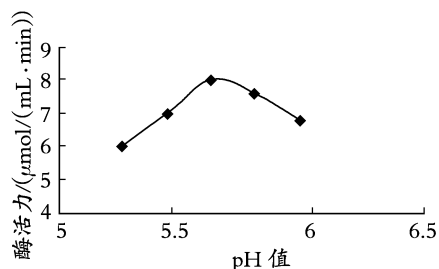


图 2 pH 对壳聚糖酶活性的影响

Fig. 2 Effect of pH on chitosanase activity

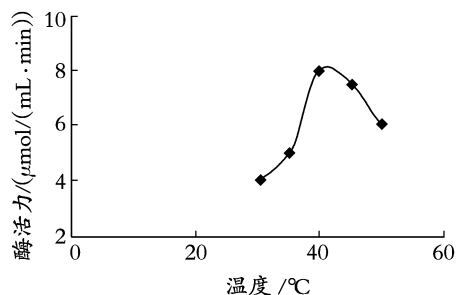


图 3 温度对壳聚糖酶活性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on chitosanase activity

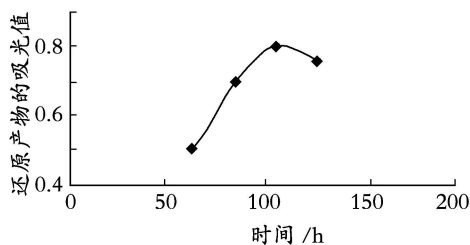


图 4 不同时间壳聚糖酶对底物水解程度的影响

Fig. 4 Effects of chitosanases at different times on the hydrolysis of bottom matters

2.4 Biogel P4 凝胶分离纯化图谱

水解终产物经阴离子交换树脂吸附分离,再经 Biogel P4 凝胶柱纯化结果见图 5。由图 5 可以看出,产品由 4 个组分组成。峰 1 为主要组分,且分子质量为最低,将其收集进行纯度分析和结构鉴定。

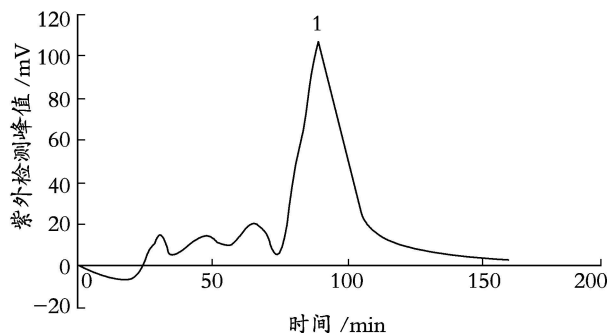


图5 Biogel P4 凝胶过滤层析

Fig. 5 Gel filtration of the product on Biogel P4 column

2.5 6-O-CM-chitin 各降解步骤的产物收率及数均分子质量

各降解步骤的产物收率和分子质量见表1,由表1可以看出在不同酶作用及酸水解后,产物分子质量有明显变化,尤其是经HCl水解后分子质量已达到单糖水平。收率水平较高,损失量少,离子交换和凝胶层析的收率也均达到75%以上,说明降解工艺比较合理。

表1 产物收率和分子质量

Tab. 1 The yield and MW of product

降解步骤	质量 (g)	收率 (%)	数均分子质量
壳聚糖酶降解后	17.2	86	2 383.79
溶菌酶降解后	15.4	77	890.47
HCl水解后	16.8	84	229.83
离子交换后	15.3	76.5	231.76
Biogel P4 凝胶层析后	13.9	69.5	223.13

2.6 产物纯度分析

2.6.1 产物的HPLC分析结果

凝胶分离纯化终产物经KS-801柱分析图谱见图6,用Waters Breeze分析软件分析峰面积结果表明,产物主峰面积占整个峰面积的99.2%,表明经纯化后得到的产物制品达到了较高的纯度。

表2 产物硫酸卡唑吸光值

Tab. 2 The sulfate carbazole colorimetry of the product

参数	空白(氨基葡萄糖) (100 mg/L)			对照(葡萄糖醛酸) (100 mg/L)			样品(C ₆ -CM- glucosamine) (100 mg/L)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
吸光值	0	0	0	0.805	0.810	0.803	0.791	0.788	0.798
平均值		0			0.806			0.792	

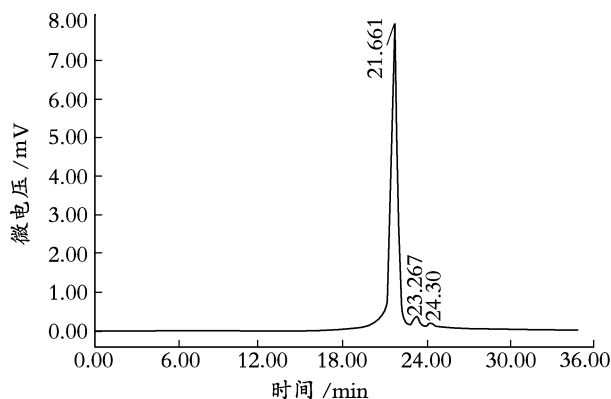


图6 产物HPLC分析图谱

Fig. 6 The HPLC analysis of the product using KS-801

2.6.2 产物的薄层分析

按1.3.9.2方法上行展开,喷雾法显色,显色点为棕黄色(图7),左点为GluNH₂·HCl点, R_f值为0.571,右点为C₆-CM- glucosamine点, R_f值为0.786。两糖在实验所选定的展层系统中有很好的展层效果:无拖尾,显色点均呈圆形。产物的上行速度更快一些,可能与其羧基的存在有关。

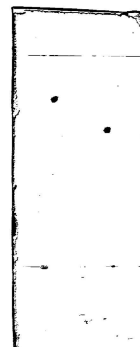


图7 产物和GluNH₂·HCl TLC分析比较图谱

Fig. 7 The TLC analysis of the product and GluNH₂·HCl

左:产物 右:氨基葡萄糖盐酸盐

left: the product right: GluNH₂·HCl

2.7 硫酸卡唑实验结果

以氨基葡萄糖为空白,葡萄糖醛酸为对照,测得产物的吸光值见表2,可见对照和样品吸光值非常接近,进行定性比较分析可知产物的羧化程度较完全。

2.8 产物理化性质及结构表征

2.8.1 比旋光度

将 20℃ 下测得的旋光度、管长以及样品浓度按公式计算得比旋光度 α_{20} 为 + 62.0~ + 67.0。

2.8.2 熔点

加热至 136℃ 时样品开始熔化, 所有样品完全呈液体时, 温度为 139℃, 所以该样品的熔点为 136~139℃, 与相关报道的 138~140℃ 一致^[11]。

2.8.3 产物红外光谱鉴定

从图 8 的产物红外光谱分析可知, 1 588 cm^{-1} 和 3 242 cm^{-1} 处的吸收峰分别归属于氨基的变形振动和伸缩振动, 1 409 cm^{-1} 处和 1 669 cm^{-1} 处的吸收峰归属于羧基的变形振动和伸缩振动, 1 303 和 3 413 cm^{-1} 处的吸收峰分别归属于羟基的变形振动和伸缩振动, 2 832 cm^{-1} 处的吸收峰是残糖基上的甲基或次甲基的 C-H 伸缩振动吸收峰, 1 071 cm^{-1} 处的吸收峰是 C₆-OH 一级羟基和 C₃-OH 二级羟基特征吸收峰叠加而成。

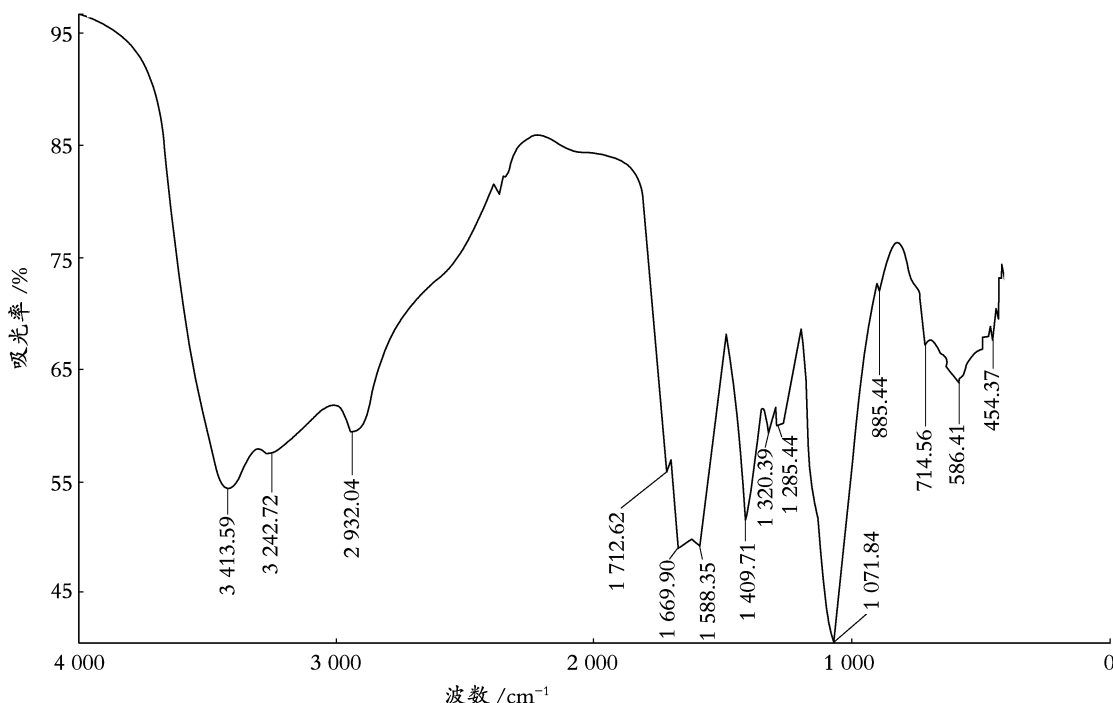


图 8 产物红外图谱

Fig. 8 The IR imagery of the product

3 小结

本实验利用酶水解和酸水解相结合的工艺, 从制备 6-O-CM-chitin 开始, 通过两种酶逐级降解成寡糖, 再经稀盐酸水解制得, 并对水解产物进行阴离子交换树脂吸附分离和 Biogel4 凝胶分离纯化, 6-O-CM-chitin 收率达 69.5%, 是一条可行的制备 C₆-CM-glucosamine 的路线, 得到的产物技术指标的测定也与相关报道一致。制备出的这种带兼性离子的氨基葡萄糖的衍生物, 为在分子细胞水平及动物整体水平上开展糖的结构和功能的研究提供了基础。

参考文献:

[1] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京: 环境科学出版社, 1996. 1-5.

[2] Hiroshi S. Processing and utilization of chitin and chitosan[J]. *Seni Gakkaishi*, 1990, 46(12): 564-578.

[3] 邢荣娥, 刘松. 甲壳寡糖的研究与应用[J]. *海洋科学*, 2002, 24(5): 26-28.

[4] 路大年. 壳聚糖降解探索[J]. *化学工程师*, 2000, 31(5): 65.

[5] 杜显光, 白雪芳. 壳寡糖抑制肿瘤作用的研究[J]. *中国海洋药物*, 2000, 19(2): 18.

[6] 陈世清. 甲壳素制备工艺及其对壳聚糖质量的影响[J]. *化学世界*, 1993, 10: 489-491.

[7] 刘长霞, 陈国华, 晋治涛, 等. N, O-羧甲基壳聚糖羧化度计算式的修正[J]. *北京化工大学学报*, 2004, 2: 14-16.

[8] 韩宝芹, 位晓娟, 房子, 等. 乙酰丙酮法测定甲壳胺寡糖数均分子量[J]. *中国海洋药物*, 2004, 23(6): 12-17.

[9] 孟显丽, 陈国华, 孙明昆, 等. 薄层色谱法分析壳寡糖

- [J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(4): 641-644.
- [10] Bitter T, Galambos J T. The reaction of carbazole with carbohydrates. I. Effect of borate and sulfamate on the carbazole colour of sugars[J]. *Anal Biochem*, 1962, 4: 330-332.
- [11] Seiichi T, Yoshihiro I, Shir ichiro N, *et al*. The thesis of a polyamide containing a glucose unit in the chitin chain[J]. *Int J Biol Macromol*, 1983, 5(8): 249-250.

Preparation and structural analysis of C₆-CM-glucosamine

CHANG Jing, LIU Wan shun, HAN Bao-qin, WANG Chang-hong

(College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Feb., 26, 2006

Key words: chitosanase; lysozyme; 6-O-CM-glucosamine; acid hydrolysis

Abstract: By use of both enzymolysis and acid hydrolysis, the 6-O-CM-chitin with high MW could be degraded to 6-O-CM-glucosamine, which is a monosaccharide. Then we studied its HPLC, HTLC, optical rotation, melting point, IR imagery and so on. The result shows that this monosaccharide has a carboxyl group on C₆, an amino group on C₂ and also has its own optical rotation and melting point, which are just in accordance with the results reported.

(本文编辑: 张培新)