

# 硫酸酯化对测定多糖分子量的干扰性研究

陈海秀<sup>1</sup>, 吴永沛<sup>1, 2, 3</sup>, 刘翼翔<sup>1, 2, 3</sup>, 蔡慧农<sup>1, 2, 3</sup>, 刘萌<sup>1</sup>, 凌绍梅<sup>1</sup>, 李斌<sup>1</sup>

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建厦门 361021) (2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室福建厦门 361021) (3. 厦门市食品与生物工程技术研究中心, 福建厦门 361021)

**摘要:** 硫酸酯化赋予了多糖独特的抗病毒、抗凝血等生物活性, 但其活性严格受控于分子量大小。然而, 用于检测硫酸多糖分子量的方法仍然采用葡聚糖为标准品, 必然出现对活性硫酸多糖分子量的误判。本文通过对比标准葡聚糖和葡聚糖硫酸酯的特征粘性参数, 观察两种多糖的流变力学差异性; 并采用改良 Mark-Houwink-Sakurada(MHS)模型和常规柱层析技术探讨硫酸酯化对多糖分子量测定的干扰性。结果发现: 葡聚糖与葡聚糖硫酸酯表现出不同的流体力学性质, 葡聚糖浓度与比浓粘度关系式斜率为正, 而葡聚糖硫酸酯浓度与其比浓粘度关系式斜率为负; 改良 MHS 模型发现, 两种多糖的 DB 方程式特性常数出现明显差异; 凝胶柱层析分析发现, 如果采用葡聚糖为标准品, 葡聚糖硫酸酯的分子量会远大于其真实值。以上结果说明, 硫酸酯化会对多糖的流变特性产生影响, 是造成常规检测方法误判硫酸多糖分子量的根本原因。

**关键词:** 硫酸酯化; 多糖; 分子量; 特性粘度

文章编号: 1673-9078(2015)9-284-288

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.046

## Interference of Sulfate Esterification in the Detection of Polysaccharide Molecular Weight

CHEN Hai-xiu<sup>1</sup>, WU Yong-pei<sup>1,2,3</sup>, LIU Yi-xiang<sup>1,2,3</sup>, CAI Hui-nong<sup>1,2,3</sup>, LIU Meng<sup>1</sup>, LING Shao-mei<sup>1</sup>, LI bin<sup>1</sup>

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

(2. Key Laboratory of Food Microorganism and Enzyme Engineering of Fujian Province, Xiamen 361021, China)

(3. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** Sulfate esterification facilitates a number of biological activities, such as antiviral and anticoagulant effects, that are unique to polysaccharides. Its activity is strictly controlled by molecular weight. However, dextran is widely used as the standard substance in the determination of the molecular weights of sulfated polysaccharides and its use inevitably leads to the misjudgment of active sulfated polysaccharide molecular weight. The rheological mechanic differences between standard dextran and dextran sulfate were observed by comparing the characteristic viscous parameters of the two substances. An improved Mark-Houwink-Sakurada (MHS) model and conventional column chromatography were used to analyze the interference of sulfate esterification in the detection of polysaccharide molecular weight. The results showed that dextran and dextran sulfate have different fluid mechanics. The gradient of the correlation equation for dextran concentration and its reduced viscosity was positive, whereas that for dextran sulfate was negative. Improved MHS model also demonstrated significant differences in the specific coefficients in the DB equations of the two polysaccharides. The results of column chromatography showed that the molecular weight detected with dextran sulfate was far greater than the true value if dextran was used as the standard substance. In summary, sulfate esterification may change the rheological behavior of polysaccharides and is thus a fundamental cause for the misjudgment of polysaccharide molecular weight measured using normal detection methods.

**Key words:** sulfate esterification; polysaccharide; molecular weight; characteristic viscosity

收稿日期: 2014-11-27

基金项目: 国家海洋公益项目 (201205022-6); 厦门市科技计划项目 (3502Z20143019)

作者简介: 陈海秀 (1990-), 女, 硕士生, 研究方向: 海洋生物活性物质利用与开发

通讯作者: 刘翼翔 (1982-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 海洋生物活性物质利用与开发

多糖是一类由单糖基通过糖苷键聚合而形成的天然高分子化合物, 在生物体内普遍存在。多糖作为一种重要的生物活性物质, 具有抗病毒、免疫调节、抗凝血、抗氧化、降血糖血脂等<sup>[1-5]</sup>活性, 且活性强弱与其分子量密切相关。有研究表明, 低分子量岩藻聚糖 (<10 ku) 比高分子量岩藻聚糖 (>10000 ku) 具有更有效的生物活性; 硫酸葡聚糖的抗 HIV-1 活性随分

子量增加到一定程度后会呈下降趋势,且对于不同的病毒,最佳分子量略有不同。例如,硫酸葡聚糖抑制 HIV-1 的最佳分子量为 10000 Da,而抑制甲型流感病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 II 的最佳分子量为 40000 Da,但对于单纯疱疹病毒 I,硫酸葡聚糖的分子量上升到 5000 Da 以后活性才趋于稳定<sup>[6]</sup>。

由此可见,分子量的大小可以显著影响多糖的生物活性,是决定多糖生物活性的关键特征参数,在多糖的应用中往往需要在它的分子量大小方面做选择,测定分子量就成为了研究和制备活性多糖的一项关键性工作。目前,多糖分子量测定方法主要有渗透压法、超过滤法、 $\gamma$  角激光光散射法、还原末端法、聚合度法、高效凝胶渗透色谱法等,其中,高效凝胶渗透色谱法应用较为普遍。在色谱法中,常采用葡聚糖作为标准物质制定校正曲线,从而计算出多糖分子量。但是,由于多糖链上常含有修饰基团,如氨基、磷酸基、硫酸基、乙酰基等,不仅会对多糖分子链构象产生一定影响,也会对分子量的测定产生严重干扰。因此,本文研究对比了标准葡聚糖和葡聚糖硫酸酯的特征粘性参数及流变力学特征,并对硫酸酯化对多糖分子量测定的干扰性进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Sephadex G-100 (分离范围  $M_w$  2~120 ku), 购于北京索莱宝公司。葡聚糖 ( $M_w$  10 ku、40 ku、70 ku、500 ku)、葡聚糖硫酸酯 ( $M_w$  5 ku、6.5~10 ku、9~20 ku、40 ku) 购于北京索莱宝公司。

### 1.2 主要仪器设备

0.7~0.8 mm 乌氏黏度计 (上海申玻仪器公司); DKB-2006 低温恒温水浴槽 (上海精宏实验设备公司); BS224S 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); V-755B 紫外可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司); PC396 秒表 (深圳市惠波工贸有限公司); Biologig LP 蛋白纯化系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 特性粘度 $[\eta]$ 的测定

将葡聚糖标准品 ( $M_w$  为 10 ku、40 ku、70 ku、500 ku)、葡聚糖硫酸酯 ( $M_w$  5 ku、6.5~10 ku、9~20 ku、40 ku) 稀释成四种浓度,在  $20 \pm 0.1$  °C 水浴条件下用同一乌氏粘度计测定其流出时间  $t_1$ , 重复 3 次取平均值,以蒸馏水流经时间为对照  $t_0$ , 通过公式: 相对粘

度 ( $\eta_r$ ):  $\eta_r = t_1/t_0$ ; 增比粘度 ( $\eta_{sp}$ ):  $\eta_{sp} = \eta_r - 1$  计算, 且以浓度 (C) 为横坐标, 比浓粘度 ( $\eta_{sp}/C$ ) 为纵坐标, 作图, 并外推至  $C=0$  时求得截距, 即为特性粘度 $[\eta]$ 。

#### 1.3.2 粘度法测定多糖分子量

根据 Dondos 和 Benoit 提出的下列半经验式, 用于测定多糖分子量范围 (分子量低于 300 ku)<sup>[7-8]</sup>:

$$[\eta]^{-1} = -A_2 + A_1 M^{-1/2} \quad (1)$$

式中  $A_1$  是聚合物的特性常数;  $A_2$  是聚合物—溶剂间的特性常数。

#### 1.3.3 凝胶柱层析法测定多糖分子量

采用 Sephadex G-100 凝胶色谱柱 (75 cm x 1 cm) 测定多糖分子量。用蒸馏水平衡凝胶柱, 后用 4 mg/mL 标准葡聚糖 1 mL 分别上柱, 流速 0.2 mL/min, 每 8 min 收集一管。收集液用蒽酮-硫酸比色法测定糖含量, 分别求得洗脱体积, 根据洗脱体积与分子量对数关系得到标准曲线。葡聚糖硫酸酯采用以上同样的凝胶柱层析条件, 获得洗脱体积, 然后根据洗脱体积和标准曲线, 计算得到葡聚糖硫酸酯的分子量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 葡聚糖及葡聚糖硫酸酯的流变特性比较

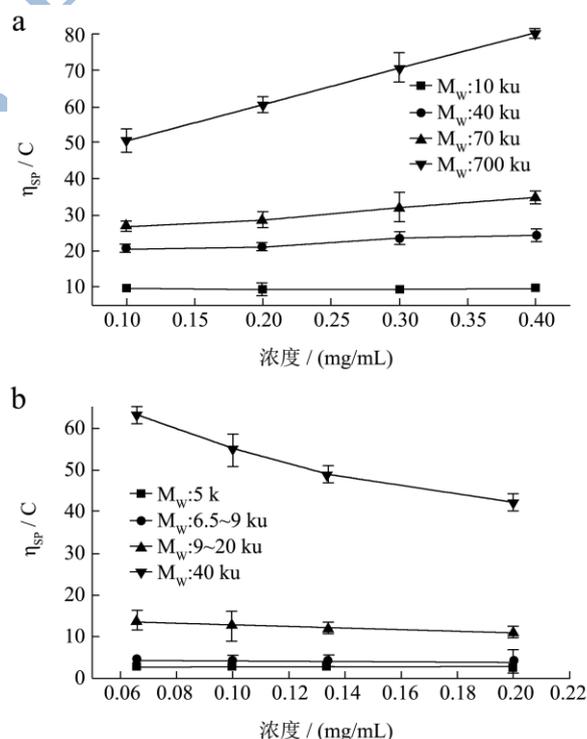


图 1 葡聚糖与葡聚糖硫酸酯的粘性参数对比

Fig.1 Comparison of viscous parameters of dextran (a) and dextran sulfate (b)

注: a: 葡聚糖; b: 葡聚糖硫酸酯。

流变特性是体系的一种宏观动力特性,是体系结构的表征。根据不同浓度下测定的多糖粘度值  $\eta_{sp}$  及对应浓度  $C$ , 以  $\eta_{sp}/C$  对  $C$  作图, 并外推至  $C=0$ , 得到多糖的 $[\eta]$ 值, 结果如图 1 及表 1 所示。从实验结果可看出, 葡聚糖与葡聚糖硫酸酯表现出不同的流体力学性质, 葡聚糖浓度与比浓粘度关系式斜率为正, 而葡聚糖硫酸酯浓度与其比浓粘度关系式斜率为负。原因可能在于, 葡聚糖硫酸酯属硫酸化阴离子多糖, 含硫约 17%, 相当于每个葡萄糖残基中含有 2.3 个硫酸基团, 在低离子强度的溶液中硫酸基团所带负电荷产生的排斥力使其完全展开, 影响了结构的刚性。有文献报道, 香菇多糖的三螺旋结构具有刚性, 而将硫酸基团引入到香菇多糖的侧链后, 其刚性要明显弱于天然香菇多糖<sup>[9]</sup>。由此推测, 正是由于硫酸基团的这种作用使得葡聚糖与葡聚糖硫酸酯表现出不同的流体力学性质。同时, 比较表 1 中葡聚糖和葡聚糖硫酸酯的 $[\eta]$ 值可以发现, 在分子量较小时两个样品的 $[\eta]$ 值差异较小, 但随分子量的增大, 葡聚糖硫酸酯的 $[\eta]$ 值比葡聚糖增加更快, 差异越来越大。例如, 分子量为 40 ku 的葡聚糖的 $[\eta]$ 值为  $19.27 \text{ cm}^3/\text{g}$ , 而葡聚糖硫酸酯达到了  $71.23 \text{ cm}^3/\text{g}$ , 葡聚糖硫酸酯的 $[\eta]$ 值是葡聚糖的 3.7 倍。

表 1 葡聚糖与葡聚糖硫酸酯的 $[\eta]$ 值

Table 1 $[\eta]$ values of dextran and dextran sulfate		
样品	分子量/ku	$[\eta]/(\text{m}^3/\text{g})$
Dextran	10.00	9.65
	40.00	19.27
	70.00	23.94
	500.00	40.73
Dextran sulfate	5.00	3.08
	8.25	4.64
	14.50	14.92
	40.00	71.23

## 2.2 硫酸酯化对粘度法测定多糖分子量的影响

经 Dondos 和 Benoit 对 Mark-Houwink-Sakurada (MHS)模型进行改良, 得到多糖粘度与分子量的关系  $[\eta]^{-1} = -A_2 + A_1 M^{-1/2}$ , 对该公式进行直线最小二乘法拟合, 并进行线性回归处理(如图 2 所示), 求得葡聚糖和葡聚糖硫酸酯的 DB 方程。如下所示:

$$[\eta]^{-1} = 8.57 \times 10^{-3} + 9.24 M^{-1/2} \quad (2)$$

$$[\eta]^{-1} = -0.1882 + 35.81 M^{-1/2} \quad (3)$$

(2) 和 (3) 分别是葡聚糖和葡聚糖硫酸酯的

DB 方程式。比较公式 (2) 与 (3) 发现, 两式中参数  $A_2$  和  $A_1$  差别很大, 那么在 $[\eta]$ 取值相同的情况下所计算出来的多糖分子量也将差别很大, 间接说明了硫酸酯化可通过影响多糖的粘度影响多糖分子量的测定。

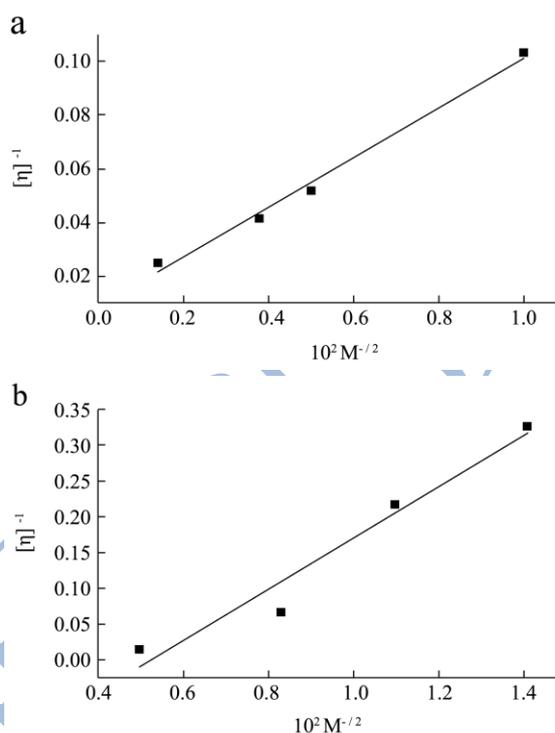


图 2  $[\eta]^{-1}$ 与  $M^{-1/2}$ 的关系图

Fig.2 Relationship of  $[\eta]^{-1}$  and  $M^{-1/2}$

注: a: 葡聚糖; b: 葡聚糖硫酸酯。

## 2.3 硫酸酯化对凝胶柱层析法测定多糖分子量的影响

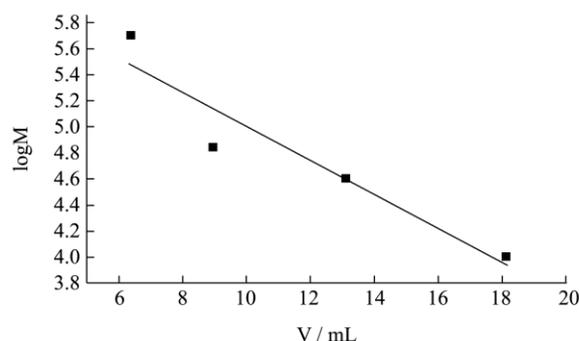


图 3 葡聚糖分子量与洗脱体积的线性曲线

Fig.3 Linear curve of dextran molecular weight and elution volume

以 10 ku、40 ku、70 ku、500 ku 标准葡聚糖分别上凝胶柱层析分离, 各分子量对应的洗脱体积分别为 18.13、13.11、8.97、6.38 mL, 以分子量对数 ( $\log M$ ) 对洗脱体积作图, 得到葡聚糖分子量与洗脱体积的线

性曲线,如图3所示。然后采用凝胶柱层析法获得葡聚糖硫酸酯洗脱体积,根据葡聚糖分子量的标准曲线,求出葡聚糖硫酸酯的分子量,结果如表2所示。

表2 凝胶柱层析法测定葡聚糖硫酸酯分子量与真实值的比较

Table 2 Molecular weight of dextran sulfate detected using gel column chromatography compared with true values

葡聚糖硫酸酯标准品	真实值/Da*	测定值/Da
T5	5000	174461
T6.5-10	8250#	281838
T40	40000	355074

注:“\*”表示从sigma公司购买时产品标注的分子量;“#”表示取平均分子量。

从表2可看出,由凝胶柱层析法所测得的葡聚糖硫酸酯的分子量比产品标注的分子量大得多。例如,分子量为5 ku和40 ku的葡聚糖硫酸酯,如果采用葡聚糖为标准品制备的标准曲线,检测得到的分子量分别达到174 ku和355 ku。凝胶柱层析法是利用一定大小孔隙的具有网状结构的凝胶作层析介质,根据被分离物质的分子大小、形状不同,扩散到凝胶孔隙中的速度不同而达到分离的一种层析方法。葡聚糖硫酸酯中硫酸基团的空间位阻和静电排斥效应改变了多糖的空间立体结构。这种空间立体结构的改变导致分子体积发生变化,进而改变了分子在凝胶柱中的运动路程,最终影响了分子量的测定。例如,从灵芝子实体中提取到的一种水不溶性线性葡聚糖,在DMSO溶液中为紧缩的球形链构象,而硫酸酯化后不但溶解性增加,同时在NaCl溶液中呈现较为柔软的柔性链构象<sup>[10]</sup>。由此可见,采用标准葡聚糖检测硫酸多糖会导致检测结果远远大于真实值,从而造成对活性硫酸多糖分子量的误判。

### 3 结论

3.1 研究表明,分子量是决定硫酸多糖生物活性与物化性质的关键特征参数,是开发高活性硫酸多糖药源关键质量指标。据报道,分子量相近时,硫酸酯含量低的岩藻聚糖清除自由基的能力越强<sup>[11]</sup>。在对岩藻聚糖清除超氧离子的研究过程中,Hou等<sup>[12]</sup>发现分子量800 Da~4400 Da、硫酸根含量为30.8%的岩藻聚糖在0.045 mg/mL时对 $O_2^{\cdot-}$ 的抑制率约70% (分子量是通过高效液相色谱测得,采用葡聚糖作为标准),而董平等<sup>[13]</sup>却发现分子量164 Da~5000 Da、硫酸根含量为14.05%的岩藻聚糖在0.2 mg/mL时对 $O_2^{\cdot-}$ 的抑制率才约60% (分子量是通过高效液相色谱测得,采用分子量164.2 Da的岩藻糖和分子量5000 Da的硫酸葡聚糖作为标准)。这种差别进一步说明了硫酸酯化会对多糖

分子量的测定产生严重的干扰影响。

3.2 许多多糖已经作为特效药应用于临床,因此,准确检测多糖分子量是至关重要的。例如,我国香菇多糖原料药的国家标准中对香菇多糖分子量的规定为:重均分子量 $4 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$  Da,分子量大于 $2 \times 10^4$  Da的组分 $\geq 90\%$ <sup>[14]</sup>。分子量大于 $2 \times 10^6$  Da的香菇多糖在被注射进入人体血管后容易造成血栓的产生,而分子量小于 $2 \times 10^4$  Da的香菇多糖一般被认为是无效组分。可见,适度分子量的多糖可以发挥很好的药理作用,而分子量的过大或过小不仅作用效果不明显,甚至可能导致疾病的发生。因此,多糖分子量的准确测定对于分子量的选择是十分关键的。对于硫酸多糖,由于单糖组成、硫酸基团含量等结构差异较大,目前市场上还没有特定分子量的硫酸多糖标准品,通过其他一些方法获得几种特定分子量的硫酸多糖作为标准物质或者建立一种准确快速测定硫酸多糖分子量的检测方法是今后一个重要的研究方向。

### 参考文献

- [1] Kozarski M, Klaus A, Niksic M, et al. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *agaricus bisporus*, *agaricus brasiliensis*, *ganoderma lucidum* and *phellinus linteus* [J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1667-1675
- [2] Kim W J, Koo Y K, Jung M K, et al. Anticoagulating activities of low-molecular weight fuco-oligosaccharides prepared by enzymatic digestion of fucoidan from the sporophyll of Korean *undaria pinnatifida* [J]. Archives of Pharmacal Research, 2010, 33(1): 125-131.
- [3] Li B, Liu S, Xing R, et al. Degradation of sulfated polysaccharides from *enteromorpha prolifera* and their antioxidant activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(2): 1991-1996
- [4] 王莹,赵志浩,高蒙初,等.岩藻聚糖硫酸酯及其酶解产物对D-半乳糖氧化损伤小鼠的抗氧化作用[J].现代食品科技, 2013,10: 2378-2382  
WANG Ying, ZHAO Zhi-hao, GAO Meng-chu, et al. Antioxidant effects of fucoidan and its hydrolysates on oxidative damage mice induced by D-galactose [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 10: 2378-2382
- [5] Zha X Q, Xiao J J, Zhang H N, et al. Polysaccharides in *laminaria japonica* (LP): extraction, physicochemical properties and their hypolipidemic activities in diet-induced mouse model of atherosclerosis [J]. Food Chemistry, 2012, 134(1): 244-252

- [6] Witvrouw M, Schols D, Andrei G, et al. Antiviral activity of Low- $M_w$  dextran sulphate (derived from dextran  $M_w$  1000) compared to dextran sulfate samples of higher  $M_w$  [J]. Antiviral Chemistry Chemotherapy, 1991, 2: 171-179
- [7] Dondos A, Benoit H. A new representation of viscosity data as a function of molecular weight [J]. Polymer, 1977, 18(11): 1161-1162
- [8] Dondos A, Benoit H. Linear representation of viscosity data as a function of molecular weight [J]. Polymer, 1978, 19(5): 523-525
- [9] Wang X, Zhang L. Physicochemical properties and antitumor activities for sulfated derivatives of lentinan [J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(16): 2209-2216
- [10] 王建国. 灵芝多糖的结构及生物活性研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2010  
WANG Jian-guo. Structure and bioactivities of polysaccharides from ganoderma lucidum [D]. Wuhan: Wuhan University, 2010
- [11] 薛长湖, 陈磊. 岩藻聚糖硫酸酯体外抗氧化特性的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(4): 583-588  
XUE Chang-hu, Chen Lei. Antioxidative activities of low molecular sulfated fucan fractions *in vitro* [J]. Journal of Ocean University of QingDao, 2000, 30(4): 583-588
- [12] Hou Y, Wang J, Jin W, et al. Degradation of laminaria japonica fucoidan by hydrogen peroxide and antioxidant activities of the degradation products of different molecular weights [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(1): 153-159
- [13] 董平, 薛长湖, 李兆杰, 等. 岩藻聚糖硫酸酯低聚糖的制备及其抗氧化活性研究[J]. 中国海洋大学学报: 2006, 36(B05): 59-62  
DONG Ping, XUE Chang-hu, Li Zhao-jie, et al. Preparation and antioxidative activity of low molecular weight fucoidan [J]. Journal of Ocean University of China, 2006, 36(B05): 59-62
- [14] 金幸, 陈林祥, 朱益锋. 一种香菇多糖冻干粉针剂及其制备方法: 中国, 200910056460.5 [P]  
JIN Xing, CHEN Ling-xiang, ZHU Yi-feng. A new method for preparation of lentinan injection: China, 200910056460.5 [P]