

四种鱼类内脏中含糖醛酸多糖的结构分析

刘海曼¹, 艾春青^{1,2,3}, 刘斌¹, 马娜¹, 李艳玲¹, 宋爽^{1,2,3}

(1. 大连工业大学食品学院, 辽宁大连 116034) (2. 国家海洋食品工程技术研究中心, 辽宁大连 116034)

(3. 海洋活性多糖开发应用技术国家地方联合工程实验室, 辽宁大连 116034)

摘要: 内脏是鱼类加工的主要副产物之一, 为充分开发利用这一生物资源, 本研究对草鱼、鲤鱼、大黄花鱼和带鱼内脏中的多糖组分进行了分析。本研究采用胰蛋白酶和木瓜蛋白酶双酶酶解法对原料中的多糖进行提取, 将所得多糖于 1.3 mol/L 的三氟乙酸中 105 °C 下水解 3 h 后, 采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生化-HPLC-MS/MS 法对水解产物中的二糖衍生物片段进行分析。通过与标准品的保留时间对比及质谱数据解析, 确定不同样品中含糖醛酸多糖(Uronic acid-containing polysaccharides, UACPs)的种类。实验结果表明, 草鱼内脏样品中含有透明质酸(HA)、硫酸软骨素(CS)、肝素(HP)以及一种由糖醛酸与己糖组成的重复二糖单元构成的未知 UACPs; 鲤鱼样品中含有 CS 和 HP 以及少量 HA; 而大黄花鱼和带鱼内脏样品中的 UACPs 以 CS 为主。本研究揭示了四种鱼类内脏中的多糖资源, 为这一加工副产物的开发与利用提供重要的科学依据。

关键词: 鱼内脏; 多糖; 含糖醛酸多糖; 质谱; 酸水解

文章编号: 1673-9078(2017)1-33-38

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.1.006

Structure Analysis of Uronic Acid-containing Polysaccharides in Viscera of Four Types of Fish

LIU Hai-man¹, AI Chun-qing^{1,2,3}, LIU Bin¹, MA Na¹, LI Yan-ling¹, SONG Shuang^{1,2,3}

(1.School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China) (2.National Engineering

Research Center of Seafood, Dalian 116034, China) (3.National & Local Joint Engineering Laboratory for Marine

Bioactive Polysaccharide Development and Application, Dalian 116034, China)

Abstract: Viscus is one of the major by-products of fish processing. To fully utilize this biological resource, polysaccharides from the viscera of *Ctenopharyngodon idellus*, *Cyprinus carpio*, *Larimichthys crocea*, and *Trichiurus lepturus* were analyzed. Polysaccharides were isolated by double enzyme hydrolysis (trypsin and papain), followed by hydrolyzing with 1.3 M trifluoroacetic acid at 105 °C for 3 h. Disaccharides from acid hydrolysates were analyzed using HPLC-MS/MS after 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) derivatization. By comparing the retention times and mass spectra of the resultant polysaccharides with those of the references, the uronic acid-containing polysaccharides (UACPs) in the fish viscera were identified. The results showed that hyaluronic acid (HA), chondroitin sulfate (CS), heparin (HP), and an unknown UACP-containing repeated disaccharide with hexuronic acid linked to hexose were present in the viscera of *C. idellus*. CS, HP, and small quantities of HA were detected in the viscera of *C. carpio*. CS was found to be the major UACP in the viscera of *L. crocea* and *T. lepturus*. The results revealed the UACPs in the viscera of four types of fish and provided a scientific basis for exploring and utilizing these resources.

Key words: fish viscera; polysaccharide; uronic acid-containing polysaccharide; mass spectroscopy; acid hydrolysis

2014 年我国鱼类年产量为 3770 万 t, 其中草鱼、

收稿日期: 2016-01-03

基金项目: 国家青年科学基金项目 (31301431); 辽宁省农业领域青年科技创新人才培养计划 (2014002); 辽宁省教育厅一般项目 (L2014222); 国家高技术发展计划 (863 计划) 课题 (2014AA093602)

作者简介: 刘海曼 (1991-), 女, 硕士在读, 研究方向: 食品资源与综合利用

通讯作者: 宋爽 (1981-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 海洋天然产物研究

鲤鱼、大黄花鱼和带鱼的产量分别为 538 万 t、317 万 t、22 万 t 和 108 万 t。内脏是鱼类加工的主要副产物之一, 占鱼体总重量的 7% 左右^[1], 是一种亟待开发的生物资源。目前, 对鱼内脏中脂肪和蛋白质组分的研究已形成初步的研究成果^[1,2], 但对多糖组分的研究目前尚未见报道。

糖胺聚糖是动物体内含量最多的一类杂多糖, 通常由氨基己糖和糖醛酸组成的重复单元构成。根据二糖单元及糖苷键的连接方式, 可将糖胺聚糖分为以下

四类：硫酸软骨素/硫酸皮肤素(CS/DS)、透明质酸(HA)、肝素/硫酸乙酰肝素(HP/HS)和硫酸角质素(KS)^[3]。除硫酸角质素外，糖胺聚糖的重复二糖片段中均含有糖醛酸，因而可将其归为含糖醛酸多糖(Uronic acid-containing polysaccharides, UACPs)。除糖胺聚糖外，在水产动物中还发现了一些由己糖与糖醛酸组成的重复二糖片段构成的 UACPs^[4]。研究表明 UACPs 具有治疗骨关节炎、固化软骨组织、抗凝血、抗血栓及抗氧化等多种功效^[5-9]，在医药和保健食品等诸多领域都具有潜在的应用价值。

UACPs 分子量大，结构复杂，难以直接分析，只有经降解处理后，通过色谱检测才能获得准确有效的分析结果。糖胺聚糖通常采用酶法或硝酸脱氨降解法获得二糖片段后，采用高效液相色谱或者高效液相色谱-质谱联用技术进行检测分析，间接实现对糖胺聚糖的定性和定量^[15-18]。对于由糖醛酸-己糖重复二糖单元构成的新型酸性多糖，目前还未找到相应的降解酶，而其结构也不适用脱氨降解法。实验室前期采用弱酸降解 UACPs 生成二糖片段，结合高效液相色谱-离子阱质谱联用技术，建立了酸性多糖的分析方法，能够同时对糖胺聚糖和糖醛酸-己糖型 UACPs 的检测分析^[10,19]。

为进一步提高方法的灵敏度和准确性，本研究采用三重四极杆质谱替代前期使用的离子阱质谱，对大黄花鱼(*Larimichthys crocea*)、带鱼(*Trichiurus lepturus*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)和草鱼(*Ctenopharygodon idellus*)四种鱼内脏中的 UACPs 进行分析，为开发利用鱼内脏资源提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 原料

大黄花鱼、带鱼、鲤鱼和草鱼购自大连市兴工街长兴市场。

1.2 试剂

硫酸软骨素，Sigma 公司；透明质酸钠，肝素钠，木瓜蛋白酶，胰蛋白酶，生工生物工程股份有限公司；鲍鱼性腺多糖 AGSP，实验室提取并鉴定^[4]。

1.3 仪器设备

高效液相色谱仪，日本 SHIMADZU 公司；4000QTRAP 三重四极杆串联线性离子阱质谱仪，美国 AB SCIEX 公司；电热鼓风干燥箱，巩义市予华仪器责任有限公司；电热真空干燥器，上海赛凡科技仪器有限公司；高速冷冻离心机，日本日立公司。

1.4 试验方法

1.4.1 多糖提取

将四种鱼类内脏洗净匀浆后，各称取 10 g 置于 80 mL 离心管中，分别加入 8 mL 半胱氨酸-EDTA 二钠(0.05 mol/L)溶液和 32 mL K₂HPO₄ (0.05 mol/L、pH=8) 溶液，震荡混匀；加入 0.5% (m/m) 的胰蛋白酶，37 °C 水浴震荡酶解 4 h 后，再加入 0.5% (m/m) 的木瓜蛋白酶，65 °C 水浴震荡酶解 3 h；100 °C 灭酶 5 min，10000 r/min 离心 20 min，分离上清。上清液中加入 1.5 倍体积的乙醇，醇沉过夜后，5000 r/min 离心 10 min，分离沉淀；待乙醇挥发完全后，加去离子水复溶，冷冻干燥得多糖样品。

表 1 PMP 衍生化的二糖片段的质谱分析条件

Table 1 Parameters for MRM analysis of PMP-labeled disaccharides

No.	Q ₁ Mass/u	Q ₃ Mass/u	Time (msec)	CE(volts)	DP(volts)	EP(volts)	CXP(volts)
1	686.30	510.12	150	40	80	10	12
2	686.30	492.10	150	40	100	10	12
3	687.30	511.20	150	40	100	10	12
4	686.30	525.20	150	30	90	10	12
5	687.30	373.00	150	50	100	10	12
6	687.30	187.00	150	70	90	10	12
7	686.30	175.00	150	70	100	10	12
8	686.30	187.00	150	70	100	10	12
9	687.30	175.00	150	70	90	10	12
10	686.30	374.00	150	50	100	10	12

注：CE 表示碰撞能量；DP 表示去簇电压；EP 表示入口电压；CXP 表示碰撞室出口电压。

1.4.2 酸水解

分别取四种多糖样品 10 mg 置于水解管中, 加入 0.5 mL TFA (1.3 mol/L) 溶液, 105 °C 水解 3 h; 再向酸水解液中加入 0.5 mL 去离子水, 真空干燥除去 TFA, 重复 3 次, 完全去除 TFA。

1.4.3 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生化

干燥样品中依次加入 400 μ L 氨水和 400 μ L PMP (0.3 mol/L) 甲醇溶液, 70 °C 水浴 30 min 后, 再加入 3 mL 甲醇, 真空干燥除去溶剂; 依次加入 2 mL 去离子水和 2 mL 氯仿, 震荡混匀, 待液体分层后除去氯仿, 重复三次; 取水相过 0.22 μ m 微孔滤膜后进行 HPLC-MS/MS 分析。

1.4.4 HPLC-MS/MS 分析

色谱条件: Phenomenex Synergi Fusion-RP 4 μ (80A, 50 \times 2.0 mm) 色谱柱; 柱温 30 °C; 流速 0.5 mL/min; 流动相为 20 mmol 乙酸铵水溶液(A):乙腈(B)=82:18 等度洗脱。质谱条件: 离子源 ESI 源; 喷雾电压 5.5 kV; 正离子模式; 辅助加热气温度 600 °C; 选择多重反应监测(MRM); MRM-IDA(信息依赖采集)-EPI(增强离子扫描)方式获得二级质谱图。其它参数如表 1 所示。

2 结果与讨论

2.1 检测方案的设计

生物样品中多糖的鉴定通常需要经过繁琐的分离纯化过程后, 再采用化学、光谱学等方法进行结构解

析^[11,12]。高效液相色谱-质谱联用技术是一种鉴定小分子化合物的常规方法, 由于多糖分子量大, 离子化困难, 其并不能直接应用于多糖的检测。本实验基于糖醛酸的糖苷键在酸性条件下较难断裂这一化学特性^[4,13], 将 UACPs 酸水解获得二糖片段, 并通过 PMP 衍生化反应提高质谱检测的灵敏度, 最终采用高效液相色谱-质谱联用分析二糖衍生物, 从而鉴定出 UACPs。该方法的优点在于能够检测以糖醛酸为重复二糖单元组成的多糖, 且对样品纯度要求低。由于二糖 PMP 衍生物在衍生反应产物中含量较低, 必须使用质谱进行检测^[14]。在先前的研究中, 以离子阱质谱为检测手段对多种海洋贝类进行分析, 发现其中含有硫酸软骨素、肝素以及几种含有糖醛酸-己糖重复二糖片段的多糖^[10]。相比离子阱质谱, 本实验中使用的三重四极杆-线性离子阱串联质谱仪具有更多优势, 其可同时对多个离子的两级离子选择监测, 特异性强, 灵敏度高, 能够获得更高质量的色谱图; 此外, 它提供的二级质谱图进一步保证鉴定的准确性。

2.2 UACPs 对照品的分析

本实验中使用了四种 UACPs 对照品, 包括三种糖胺聚糖(透明质酸、硫酸软骨素和肝素)和一种非糖胺聚糖(鲍鱼性腺多糖 AGSP), 其酸水解后产生的特征性二糖片段, 如表 2 所示。经 PMP 衍生化后, 不同样品的二糖片段衍生物的色谱保留时间和质谱裂解信号具有明显的差异性。

表 2 PMP 衍生化的二糖片段的离子对及保留时间

Table 2 Pseudomolecular ion and retention time (tR) of reference PMP-disaccharides

多糖对照品	二糖片段	二糖衍生物分子离子峰/(m/z)	二糖衍生物的保留时间/min
透明质酸	GlcA-(1 \rightarrow 3)-GlcN	686.3	1.68
硫酸软骨素	GlcA-(1 \rightarrow 3)-GalN	686.3	2.69
肝素	IdoA-(1 \rightarrow 4)-GlcN	686.3	4.55
鲍鱼性腺多糖 AGSP	GlcA-(1 \rightarrow 2)-Man	687.3	4.17

2.3 鱼内脏多糖的分析

四种鱼的内脏多糖经 TFA 酸水解后, 再进行 PMP 柱前衍生化, 然后采用 HPLC-MS/MS 的多反应监测(MRM)模式对其中含有糖醛酸的二糖片段的 PMP 衍生物进行分析, 如图 1 所示。通过与标准多糖二糖衍生物的质谱信息和保留时间(表 2)对比, 确定草鱼内脏样品中存在 HA、CS 和 HP 的二糖衍生物, 另外在 t_R=3.36 min 处, 还存在一个与 AGSP 二糖衍生物相同

的质谱信号(原多糖命名为 UP1), 表明草鱼内脏中的 UACPs 种类最为复杂; 鲤鱼样品中存在 CS 和 HP 以及少量 HA 二糖衍生物; 而在大黄花鱼和带鱼这两种海鱼衍生化的样品中检测到的成分较为单一, 主要为 CS 二糖衍生物。目前, 对鱼内脏中 UACPs 的研究少有报道。Arima 等^[20]采用硫酸软骨素酶酶解后液相色谱分析的方法检测了太平洋蓝鳍金枪鱼(*Thunnus orientalis*)的胃、肠和心房中的硫酸软骨素, 但由于方法所限, 并未分析其它 UACPs。

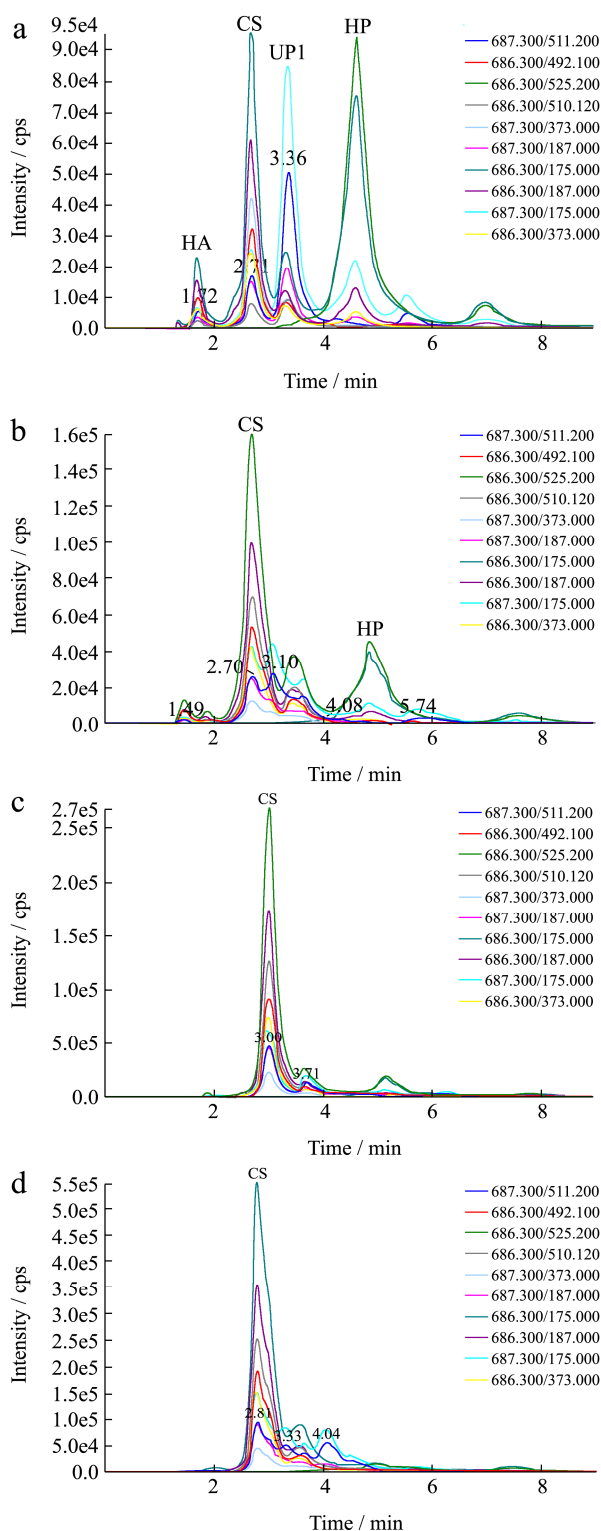


图1 鱼类内脏中UACPs二糖PMP衍生物的MRM色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of PMP-disaccharides derived from the viscera

注: a, 草鱼、b, 鲤鱼、c, 大黄花鱼、d, 带鱼。

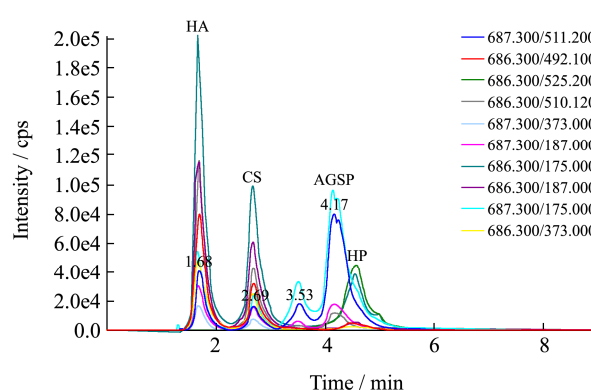
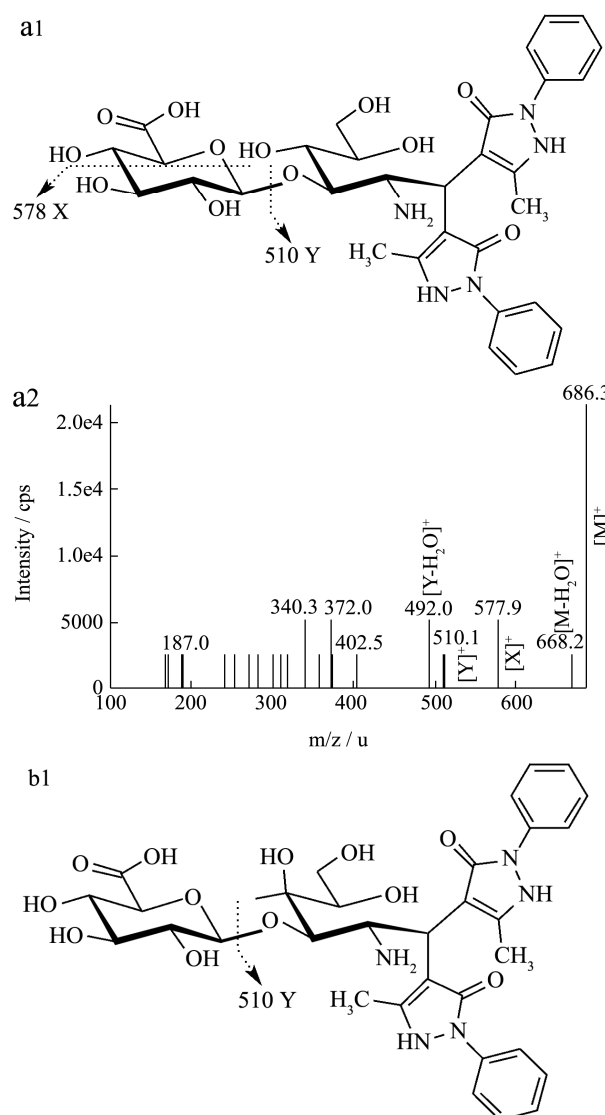


图2 相同质量的HA、CS、AGSP和HP产生的二糖PMP衍生物的MRM色谱图

Fig.2 MRM chromatogram of PMP-disaccharides derived from equal amounts of HA, CS, AGSP and HP



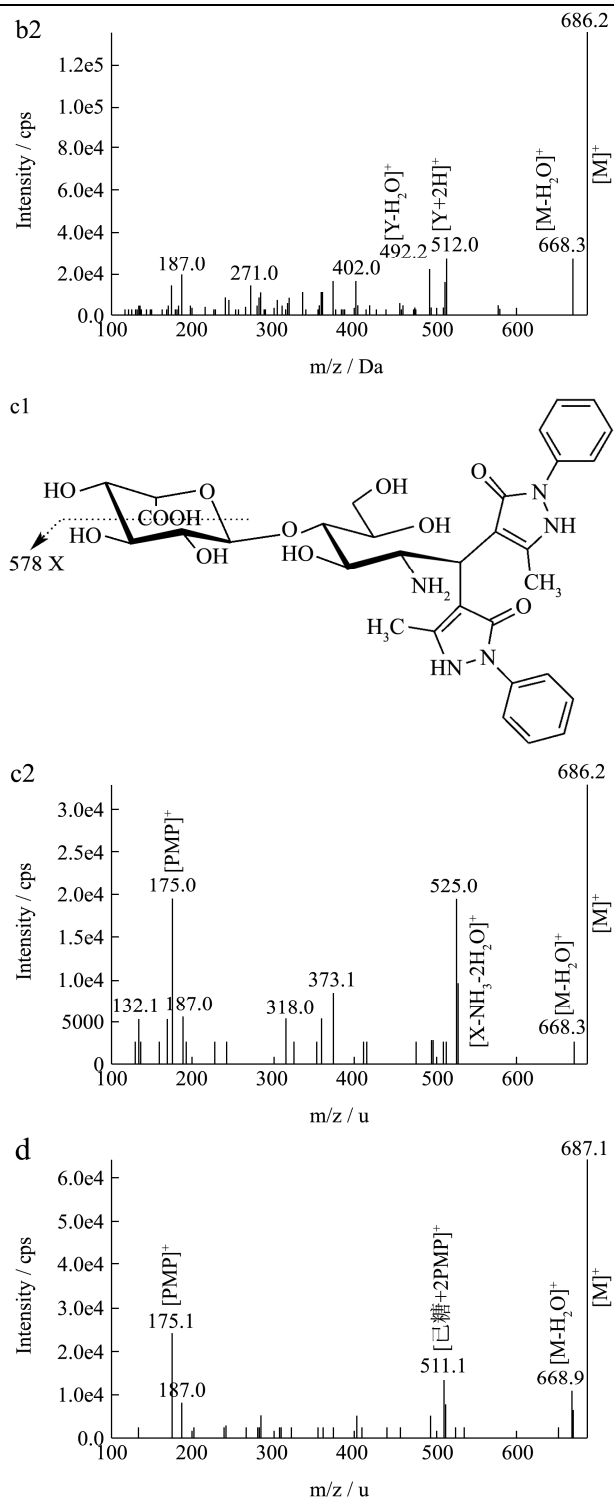


图3 鱼内脏中 HA (a)、CS (b)、HP (c) 及 UP1 (d) 产生的二糖 PMP 衍生物的质谱图

Fig.3 Mass spectra of PMP-labeled disaccharides derived from fish viscera. HA (A), CS (B), HP (C), and UP1 (D)

值得注意的是,不同 UACPs 生成 PMP 二糖衍生物的产率并不相同,且不同物质的离子化效率也存在较大差异。为校正这一偏差,通过采用标准品的峰面积进行折算,以获知样品中各 UACPs 组分的相对含量。图 2 为相同质量的四种 UACPs 标准品产生的

PMP 二糖衍生物的 MRM 色谱图,每种衍生物最强响应离子的峰面积之比 HA:CS:AGSP:HP≈1:0.7:1:0.5。由此可知草鱼内脏中 HA、CS 和 HP 的含量比约为 0.1:1:2.5,其中 UP1 的比例暂无法确定。鲤鱼内脏中 CS:HP 的含量比约为 1:0.8,HA 含量很少。大黄花鱼和带鱼中 CS 均为最主要的 UACPs。

因二糖 PMP 衍生物多为同分异构体,其准分子离子质荷比的特异性较差。为更加准确的鉴别样品中的 UACPs,除了保留时间以外,本实验还将 MRM-IDA-EPI 获得的质谱图作为另一鉴定依据。不同标品的二糖 PMP 衍生物的质谱图和主要裂解碎片的归属如图 3 所示。HA 的二糖 PMP 衍生物的质谱图(图 3a)中的 m/z 668 离子是由分子离子脱去一分子水得到的,糖醛酸环的裂解得到 m/z 578 的 $[X]^+$ 碎片离子,糖苷键处断裂产生 m/z 510 的 $[Y]^+$ 碎片离子,而 m/z 492 离子是由 $[Y]^+$ 脱去一分子水产生。CS 二糖 PMP 衍生物的质谱图(图 3b)与 HA 相似,也存在 m/z 668, m/z 510(图中未标出), m/z 492 等离子,但几乎没有 m/z 578 离子;此外,它还产生了 m/z 512 的特征性离子,推测其可能是由于糖苷键断裂产生的碎片 Y 未成环或未脱质子形成双键,因而结构中多了两个氢质子。HP 的二糖 PMP 衍生物的质谱中(图 3c), m/z 525 的离子可能是由糖醛酸环裂解产生的碎片 X 脱去一分子氨(NH_3)和两分子水后形成;另一丰度较高离子 m/z 175 推测为 PMP 离子。虽然 HA、CS 和 HP 的二糖 PMP 衍生物分子离子峰均相同,但它们的质谱差别明显,因此可通过质谱图区分这些二糖 PMP 衍生物。

在草鱼内脏中发现的未知多糖 UP1 的二糖 PMP 衍生物(图 3d)准分子离子的质荷比为 687,与 AGSP 的 PMP 衍生物相同。 m/z 511 的离子为 $[己糖+2PMP]^+$,说明该未知多糖结构中重复二糖片段为糖醛酸与己糖连接而成。

3 结论

本文采用 TFA 酸水解结合 PMP 柱前衍生化-HPLC-MS/MS 的方法将草鱼、鲤鱼、大黄花鱼和带鱼内脏中含糖醛酸的二糖片段衍生物与标准品对照,根据保留时间和二级质谱数据,对四种鱼类内脏多糖中含有糖醛酸的二糖片段进行指认,确定所含 UACPs 的种类。该检测方法的优势在于无需对多糖进行分离纯化,快速准确。实验结果表明,两种淡水鱼内脏中 UACPs 组成相对复杂,草鱼内脏含有 HA、CS、HP 及一种由糖醛酸与己糖连接的重复二糖单元构成的未知 UACPs;鲤鱼样品中存在 CS、HP 以及少量 HA;而大黄花鱼和带鱼这两种海鱼内脏中的 UACPs 成分

较为单一,主要为CS。本研究系统揭示了四种鱼类内脏中的多糖资源,为这一加工副产物的再利用提供了科学依据。

参考文献

- [1] Rubio-Rodríguez N, Diego S M D, Beltrán S, et al. Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods [J]. Journal of Food Engineering, 2011, 109(2): 238-248
- [2] 陈耕,刘忠义. 鳙鱼内脏蛋白质和脂肪的分析[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(5): 112-114
CHEN Geng, LIU Zhong-yi. Analysis of protein and fat from big head carp (*Aristichthys nobilis*) guts [J]. Food Research and Development, 2009, 30(5): 112-114
- [3] Hicham N, Nancy L, Joseph Z. Screening for anticoagulant heparan sulfate octasaccharides and fine structure characterization using tandem mass spectrometry [J]. Biochemistry, 2010, 49(17): 3743-3752
- [4] Wang H X, Zhao J, Li D M, et al. Structural investigation of a uronic acid-containing polysaccharide from abalone by graded acid hydrolysis followed by PMP-HPLC-MSn and NMR analysis [J]. Carbohydrate Research, 2015, 402: 95-101
- [5] Bottegoni C, Muzzarelli R A A, Giovannini F, et al. Oral chondroprotection with nutraceuticals made of chondroitin sulphate plus glucosamine sulphate in osteoarthritis [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 109(9): 126-138
- [6] Levett P A, Melchels F P W, Karsten S, et al. A biomimetic extracellular matrix for cartilage tissue engineering centered on photocurable gelatin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate [J]. Acta Biomaterialia, 2014, 10(1): 214-223
- [7] Wu M, Wen D, Gao N, et al. Anticoagulant and antithrombotic evaluation of native fucosylated chondroitin sulfates and their derivatives as selective inhibitors of intrinsic factor xase [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015, 92: 257-269
- [8] Ke C, Sun L, Qiao D, et al. Antioxidant activity of low molecular weight hyaluronic acid [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(10): 2670-2675
- [9] Yang J A, Kong W H, Dong K S, et al. Hyaluronic acid-tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand conjugate for targeted treatment of liver fibrosis [J]. Acta Biomaterialia, 2015, 12(1): 174-182
- [10] Cao J, Wen C, Lu J, et al. Characterization of acidic polysaccharides from the mollusks through acid hydrolysis [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 130: 268-274
- [11] Anastuyk S D, Barabanova A O, Correc G, et al. Analysis of structural heterogeneity of κ/β -carrageenan oligosaccharides from *Tichocarpus crinitus* by negative-ion ESI and tandem MALDI mass spectrometry [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(86): 546-554
- [12] Nicola V, Francesca M. Structural characterization and antithrombin activity of dermatan sulfate purified from marine clam *Scapharca inaequivalvis* [J]. Glycobiology, 2009, 19(4): 356-367(12)
- [13] De K K, Timell T E. The acid hydrolysis of glycosides IV. hydrolysis of aldobiouronic acids [J]. Carbohydrate Research, 1967, 4(2): 177-181
- [14] Wang H X, Zhao J, Li D M, et al. Comparison of polysaccharides of *Haliotis discus hannai* and *Volutharpa ampullacea perryi* by PMP-HPLC-MS(n) analysis upon acid hydrolysis [J]. Carbohydrate Research, 2015, 415: 48-53
- [15] Zhang F, Yang B, Ly M, et al. Structural characterization of heparins from different commercial sources [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 401(9): 2793-2803
- [16] Mourier P, Anger P, Martinez C, et al. Quantitative compositional analysis of heparin using exhaustive heparinase digestion and strong anion exchange chromatography [J]. Analytical Chemistry Research, 2015, 3: 46-53
- [17] Osago H, Shibata T, Hara N, et al. Quantitative analysis of glycosaminoglycans, chondroitin/dermatan sulfate, hyaluronic acid, heparan sulfate, and keratan sulfate by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. Analytical Biochemistry, 2014, 467: 62-74
- [18] Gill V L, Aich U, Rao S, et al. Disaccharide analysis of glycosaminoglycans using hydrophilic interaction chromatography and mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(2): 1138-1145
- [19] 宋爽,王洪旭,宋亮,等.一种鉴定生物组织中含糖醛酸多糖的方法:中国,201510031426.8[P].2015-1-22
SONG Shuang, WANG Hong-xu, SONG Liang, et al. A method for identifying the uronic acid-containing polysaccharides in biological tissues. CN, 201510031426.8 [P]. 2015-1-22
- [20] Arima K, Fujita H, Toita R, et al. Amounts and compositional analysis of glycosaminoglycans in the tissue of fish [J]. Carbohydrate Research, 2013, 366(4): 25-32