

## 硫酸皮肤素寡糖的分离与制备

于广利<sup>1</sup> 管华诗<sup>1</sup> Robert J. Linhardt<sup>2</sup> Wang Qun<sup>2</sup>  
Hyun OK Yang<sup>2</sup> Toshihiko Toida<sup>3</sup>

(1 青岛海洋大学海洋药物与食品研究所, 青岛, 266003)

(2 美国爱荷华大学药物与天然产物化学系, IA 52246, 美国)

(3 日本千叶大学药物科学学院, 千叶 263, 日本)

**摘要** 利用软骨素酶ABC (Chondroitinase ABC, EC4. 2. 2. 4)对硫酸皮肤素(Dermatan Sulfate, DS)进行控制降解。对得到的混合寡糖首先采用低压凝胶渗透色谱(LPGPC)进行分级,然后对每一组分再利用强阴离子交换高压液相色谱(SAX-HPLC)进行分离,最终制备出聚合度为2,4,6,8,10,12的寡糖纯品。寡糖纯度采用SAX-HPLC,毛细管电泳(CE)以及聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)进行检验,结构采用电喷雾离子化质谱(ESI-MS)以及核磁共振波谱(NMR)技术确定。

**关键词** 硫酸皮肤素;软骨素酶ABC;寡糖;SAX-HPLC

**中图分类号** R284

**文章编号** 1001-1862(2001)06-849-06

硫酸皮肤素(Dermatan Sulfate, DS)是一种线形糖氨聚糖,在动物组织中广泛存在,它由N-乙酰氨基-D-半乳糖(D-GalNAc),L-艾杜糖醛酸(L-IdoA)和葡糖醛酸(D-GlcA)组成。通常在D-GalNAc的4位氧上有硫酸基(约95%以上),但在D-GalNAc的6位和L-IdoA的2位氧上也含有少量硫酸基。DS和未分级的肝素相比,虽然同样具有抗凝和抗血栓活性但出血作用很小<sup>[1~3]</sup>。由于受低分子肝素大量的临床研究与应用的启示,开发利用低分子量的DS并作为临床应用的抗凝、抗栓剂已成为近年来研究的热点<sup>[4]</sup>。DS寡糖具有多种研究应用价值,可以从事该寡糖和某些具有重要生物作用的蛋白质之间的相互作用研究<sup>[5,6]</sup>,如DS可能和多肽进行特异结合<sup>[7]</sup>。此外,也可以研究该寡糖和酶形成结晶时的晶体结构<sup>[8]</sup>。

采用控制酶解技术,对寡糖混合物进行各种分离纯化,最终得到不同聚合度(DP2,4,6,8,10,12)的硫酸皮肤素寡糖并确定了它们的结构。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 软骨素酶ABC (EC 4. 2. 2. 4, Sigma);硫酸皮肤素(来源于猪肠黏膜, Celus Laboratories); BioGel P2、P6 填料 (BioRad 公司);SAX-HPLC 柱(Spherisorb, 5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  250 mm 和 20 mm  $\times$  250 mm) (Waters 公司); TSKGel-2000SW 柱(10  $\mu$ m, 7.5 mm  $\times$  300 mm) (Phenomenx 公司)。高压液相色谱仪(Shimadzu 公司)(配有LC-10Ai 双泵系统和

• 本论文在 Robert J. Linhardt 教授实验室完成并得到美国 NIH(GM38060)和 HL52622(R. J. L.)课题资助  
收稿日期:2000-10-23;修改日期:2001-02-21  
于广利,男,1964年12月出生,副教授。

SPD-10Ai 检测器,数据用 Class-VP 4.03 软件采集和处理);毛细管电泳仪(美国 Dionex 公司);紫外可见分光光度仪(JASCO 公司);核磁共振仪(Varian 500 MHz,配有 SUN SPARC 工作站);部分收集器(BioRad 2110 型)。

## 1.2 方法

1.2.1 硫酸皮肤素的酶解 称取 DS 10 g,用 50 mmol/L Tris-HCl/NaAC (pH8.0) 配成 20 mg/mL 溶液,在 37℃ 下用硫酸软骨素酶 ABC(20U)连续降解,每隔一定时间取样分析其紫外吸收( $\lambda_{232\text{nm}}$ )度增加情况,当酶解完成后,将酶解液于 100℃ 加热 3 min,然后于 35℃ 旋转蒸发浓缩到 100 mL,浓缩液于 0℃ 贮存备用。

1.2.2 DS 的低压柱(LPGPC)分离及分级物的脱盐 寡糖的 LPGPC 分离在 BioGel P6 (4.8 cm×100 cm) 柱上进行。用 0.1 mol/L NaCl 洗脱,流速 1.5 mL/min,每管收集 10 mL,分别于 232 nm 测定吸收度,根据洗脱体积对吸收度作图。根据 PAGE<sup>[9]</sup> 分析结果合并分子量均匀的寡糖。脱盐后冻干保存。

1.2.3 寡糖的高效离子交换色谱(SAX-HPLC)分离和分析 少量样品(1~100  $\mu\text{g}$ )在分析柱(Spherisorb SAX, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm×250 mm)上进行,采用 1.0 mL/min 流速和 0~1.2 mol/L NaCl pH3.5 (120 min.) 梯度洗脱;大量样品(50~100 mg)的分离在制备柱(Spherisorb SAX, 5  $\mu\text{m}$ , 20 mm×250 mm)上进行,洗脱条件采用 0~2 mol/L NaCl pH3.5 (150 min) 梯度,4.0 mL/min 流速洗脱。

1.2.4 寡糖的毛细管电泳(CE)分析<sup>[10]</sup> 电泳在 Dionex 毛细管系统上进行,该系统带有 UV-Vis 检测器,数据采集和分析用微机控制。毛细管规格(i. d. 74  $\mu\text{m}$ ×375 o. d., 78 cm) 洗脱液用 20 mmol/L pH3.5 的磷酸盐缓冲溶液。

1.2.5 寡糖的高效凝胶色谱(HPGPC)分析 用 TSKGel 2000SW (10  $\mu\text{m}$ , 7.8 mm×300 mm) 凝胶色谱柱分析,洗脱液用 0.2 mol/L NaCl(pH3.5),流速为 0.5 mL/min, 232 nm 波长检测。

1.2.6 寡糖的电喷雾质谱(ESI-MS)分析<sup>[11]</sup> 采用负离子光谱方式对寡糖进行质谱分析。以氮气为雾化气体,流速为 12 L/h,电喷雾离子源温度为 80℃,喷雾针电压为 7.7 kV。乙腈中加入碘化四丁基铵作为校正剂。样品溶于 1:1 的水/乙腈(含有 0.05%  $\text{NH}_4\text{OH}$ )流动相中,每次注射 20  $\mu\text{L}$ ,多次注射,利用 OPUS 软件扫描 30~40 次得到所需图谱。

1.2.7 寡糖的核磁共振波谱(NMR)分析 将寡糖样品(0.1~0.5 mmol/L)溶于 99.6%  $\text{D}_2\text{O}$  中,0.22  $\mu\text{m}$  膜过滤,冻干,再重复 2 次,然后溶于 0.7 mL 99.6%  $\text{D}_2\text{O}$  中。1D NMR 和 2D NMR(COSY, NOESY, TOCSY) 实验均在 Varian VXR-500 光谱仪上进行,操作温度为 298K。

## 2 结果与讨论

作者用猪肠来源的硫酸皮肤素为原料是基于它的结构比较简单,其中 95% 以上的二糖重复单位是 [ $\alpha$ -L-艾杜糖醛酸(IdoA) (1→3)- $\beta$ -D-4-硫酸-N-乙酰氨基半乳糖(GalNAc4S)] 组成。通过采用软骨素酶 ABC 对该多糖进行控制降解,得到寡糖混合物。为了确定酶的活力,首先采用小规模实验,据此结果进行扩大实验。研究表明,水解率达 50% 左右时可以得到高聚合度的寡糖。酶解完成后,混合物的 SAX-HPLC 和 CE 分析结果见图 1a, 1b。此混合物首先采用

LPGPC 技术进行分子量分级,合并分子量相同的级分,经旋转蒸发、脱盐后用 PAGE 检验纯度。结果表明 DP $\geq$ 4 以上的寡糖,单纯采用 LPGPC 分离效果欠佳,相互间有重叠现象,须采用制备型 SAX-HPLC 进一步分离纯化。经分子量为 600 膜截留后,混合寡糖的制备柱分离图谱见图 1c。各分子量均匀的寡糖分别经多次色谱分离后,合并相同峰后用 BioGel P2 脱盐,冻干后采用分析型 SAX-HPLC 和 CE 进行检验纯度,如果纯度不高,必须采用优化的梯度洗脱程序,进行二次分离纯化。从图 1(a~c)的图谱中可以看出,对于 2,4,6 及 8 糖的分离和制备比较容易,10 和 12 以上的寡糖分离纯化比较困难,分子量越大,分子之间的微不均一性越高,获得结构均一的寡糖就相对困难。所得各种寡糖分子量采用 HPGPC 进行分析。分子量标准采用肝素 2,4,8,10,12 和 14 寡糖为标准(由 Dr. Linhardt 实验室提供),以  $[(V_e - V_0)/(V_r - V_0)]$  为  $x$  轴,  $\text{Log}(M_r)$  为  $y$  轴作图,得到标准回归方程为  $Y = 5.39 - 3.79X$ ,  $r^2 = 0.988$ 。所得到的 2,4,6,8,10,12 寡糖在混合物中的比例,寡糖纯度,分子量等数据见表 1。从表 1 可以看出,HPGPC 得到分子量比理论计算值偏低,这是因为采用分子量标准是肝素寡糖所致。

表 1 DS 寡糖含量、纯度及其分子量

Table 1 The content, purity and molecular weight of DS oligosaccharides

寡糖聚合度 (DP)	寡糖在混合物中所占比例 mol% in mixture	纯度 Purity (%) HPLC/CE	分子量 (HPGPC) $M_r$	分子量 (计算值) $M_r$
2	54.5	99/99	459	459
4	14.8	99/96	918	918
6	10.9	99/90	1 377	1 377
8	1.8	95/80	1 836	1 836
10	0.7	87/80	1 886	2 295
12	0.3	95/90	2 465	2 754

经纯化得到的 6 种寡糖,采用 ESIMS 进行质量分析,各种 DP 寡糖的选择离子及其质量数据见表 2。十二糖的 ESIMS 图谱如图 2 所示。图 2 中共有 6 组峰,每组峰虽含有相同的负电荷数,但  $M/Z$  值不同。各组峰的  $M/Z$  值可表示为  $[M - xH + yNa]^n$ , 其中:  $x$  代表丢失的质子数,数值从 1~12;  $y$  代表增加的钠原子数,数值从 0~9;  $n$  代表负电荷数,数值从 -7 到 -2。根据各寡糖的质谱数据,应用上述公式,可以解析其碎片离子,根据其母离子的质核比可以容易获得寡糖的质量数据。如十二糖  $[M - 8H + 6Na]^{2-} = 1 442$ ,  $[M - 12H + 9Na]^{3-} = 983$  及  $[M - 6H]^{6-} = 458$  等,据此可以推算其分子量为 2 754,其它寡糖的分子量计算方法如此相同。

各种寡糖的结构还需要进一步用 1D 和 2D  $^1H$ -NMR 技术进行确证,对于各种寡糖的  $^1H$ -NMR 数据本文没有逐个列出,只列出 12 寡糖 2D  $^1H$ -NMR TOCSY 图谱(图 3)和其化学位移数据(表 3)。所得 TOCSY 图谱中各交叉峰的归属如下: 1,  $\Delta$ UA H1/H4; 2,  $\Delta$ UA H3/H4; 3,  $\Delta$ UA H2/H4; 4,  $\alpha$ -GalNAc H1/H2; 5,  $\alpha$ -GalNAc H1/H3, H6; 6,  $\Delta$ UA H1/H3; 7,  $\Delta$ UA H1/H3; 8, IdoA H1/H4; 9, IdoA H1/H3; 10, IdoA H1/H2; 11,  $\beta$ -GalNAc H1/H2, H3。

表2 DS 十二糖ESI-MS数据  
Table 2 ESI-MS data of DS dodecasaccharide

DP	2	4	6	8	10	12
Parent Ion	$[M-H]^{1-}$	$[M-3H]^{3-}$	$[M-4H]^{4-}$	$[M-4H]^{4-}$	$[M-6H]^{6-}$	$[M-6H]^{6-}$
M/Z	458	305	343	458	382	458
Mass	459	918	1 377	1 836	2 295	2 754

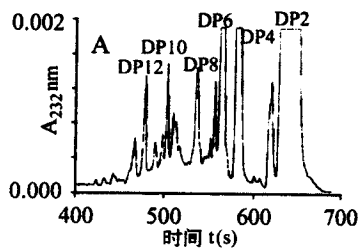


图1a 寡糖的毛细管电泳分离图谱  
Fig. 1a Separation of DS oligosaccharides on CE

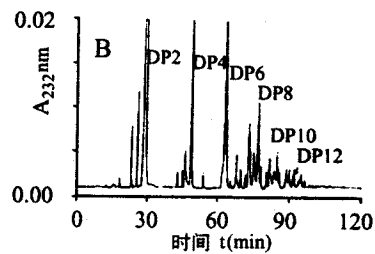


图1b 寡糖的阴离子交换高效液相色谱  
Fig. 1b Separation of DS oligosaccharides on analytical SAX-HPLC

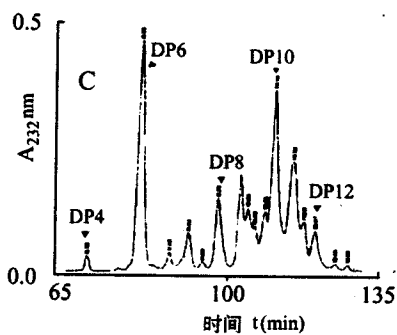


图1c 寡糖(DP ≥ 4)在制备柱上的分离图谱  
Fig. 1c Separation of DS (DP ≥ 4) on preparative SAX-HPLC

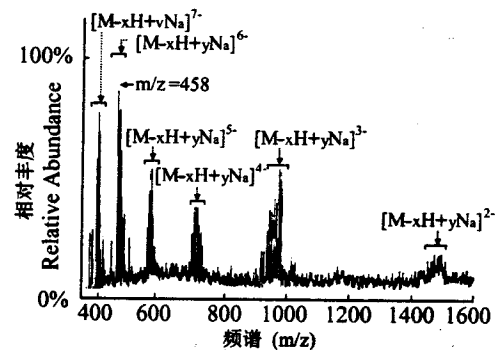


图2 硫酸皮肤素十二糖的电喷雾离子化质谱  
Fig. 2 ESI-MS graph of DS dodecasaccharide

### 3 结论

本文通过采用软骨素酶ABC对硫酸皮肤素进行控制酶解,采用LPGPC, SAX-HPLC, CE和聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)等技术得到高纯度寡糖,该寡糖分子量采用HPGPC和ESI-MS得到确证,分子结构采用NMR技术进一步得到证实。这些结构确定的寡糖为进一步从事“寡糖-蛋白质”相互作用研究,以及从事糖肽、糖脂,不同寡糖之间的分子合成研究提供了有用信息。

表3 DS 十二糖的  $^1\text{H-NMR}$  化学位移值  
Table 3 Chemical shifts of DS dodecasaccharide

糖残基 Residue		1		2	3	4	5	6
		( $\alpha$ )	( $\beta$ )					
4-硫酸-N-乙酰半乳糖 (GalNAc4S)	H-1	5.184	4.72*	4.66	4.68*	4.68*	4.68*	4.68*
	H-2	4.321	4.02	4.03	4.03	4.03	4.03	4.06
	H-3	4.141	4.02	4.03	4.14	4.14	4.14	4.14
	H-4	4.68*	4.68*	4.68*	4.642	4.642	4.642	4.596
	H-5	4.256	3.84	3.84	3.84	3.84	3.84	3.84
	H-6a	3.76	3.76	3.76	3.76	3.76	3.76	3.76
	H-6b	3.76	3.76	3.76	3.76	3.76	3.76	3.76
艾杜糖醛酸 IdoA( $\Delta$ UA)	N-Ac	2.027	2.027	2.047	2.047	2.047	2.047	2.091
	H-1	4.889	4.84*	4.839	4.839*	4.839*	4.839*	5.242
	H-2	3.502	3.502	3.509	3.509	3.509	3.509	3.82
	H-3	3.84	3.84	3.89	3.89	3.89	3.89	3.910
	H-4	4.03	4.03	4.08	4.08	4.08	4.08	5.940
	H-5	4.71	4.71	4.71	4.71	4.71*	4.71*	-

注: \* 45°C测定值

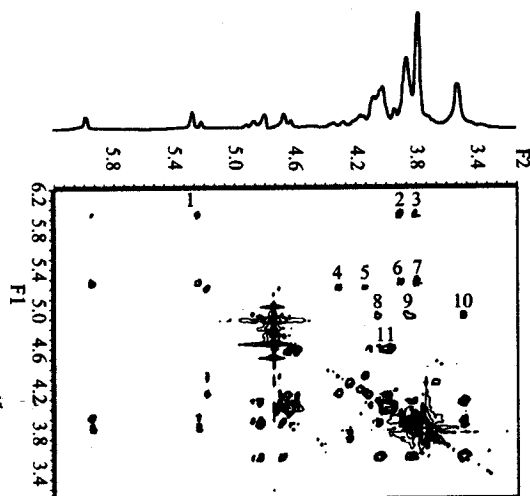


图3 硫酸皮肤素十二糖的  $^1\text{H-NMR}$  TOCSY 谱图  
Fig. 3 Two dimensional  $^1\text{H-NMR}$  TOCSY spectrum of DS dodecasaccharide

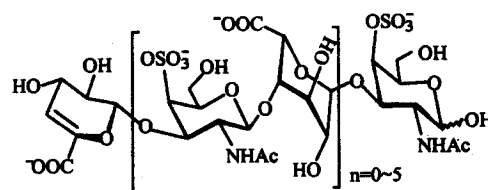


图4 硫酸皮肤素寡糖结构  
( $n=0\sim 5$ , DP=2~12)

Fig. 4 The structure of DS oligosaccharides

### 参考文献

- Linhardt R J, AL-Hakim A, Liu J, et al. Structural features of dermatan sulfates and their relationship to anticoagulant and antithrombotic activities. [J] *Biochem Pharmacol*, 1991, 42: 1609~1619
- Linhardt R J, Desai UR, Liu J, et al. Low molecular weight dermatan sulfate as an antithrombotic agents: structure-activity relationship studies. [J] *Biochem Pharmacol*, 1994, 47: 1241~1252

- 3 Linhardt R J, Hileman R E. Dermatan sulfate as a therapeutic agent. [J] *General pharmacol.* 1995, 26: 443~451
- 4 Miglioli M, Pironi E, Ruggeri E, et al. Bioavailability of desmin, a low molecular weight dermatan sulfate, after subcutaneous administration to healthy volunteers. [J] *Int J Clin Lab Res.* 1997, 27: 195~202
- 5 Templeton D M, Wang A. Conserved change of glomerular and mesangial cell proteoglycans; possible role of amino acid-derived sulfate. [J] *Can J Physiol Pharmacol.* 1992, 70(6): 843~850
- 6 Hileman R E, Smith A E, Toida T, et al. Glycosaminoglycan binding proteins. [J] *Bioassays.* 1998, 20: 156~167
- 7 Lyon M, Deakin J, Rahmoune H, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor binds with high affinity to dermatan sulfate. [J] *J Biol Chem* 1998, 273(1): 271~278
- 8 Huang W, Matte A, Li Y, et al. Crystal structure of chondroitinase B from *Flavobacterium heparinum* and its complex with a disaccharide product at 1.7 Å resolution. [J] *J Of Molecular Biology.* 1999, 294: 1 257
- 9 Pervin A, Gallo C, Jandick K A, et al. Preparation and structural characterization of large heparin-derived oligosaccharides. [J] *Glycobiology.* 1995, 5(1): 83~95
- 10 Pervin A, AL-Hakim A, Linhardt R J. Separation of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides by capillary electrophoresis using reversed polarity. [J] *Anal Biochem.* 1994, 221: 182~188
- 11 Kim Y S, Ahn M Y, Wu S J, et al. Determination of the structure of oligosaccharides prepared from anchran sulfate. [J] *Glycobiology.* 1998, 8(9): 869~977

## Isolation and Preparation of Dermatan Sulfate Oligosaccharides

Yu Guangli<sup>1</sup> Guan Huashi<sup>1</sup> Robert J Linhardt<sup>2</sup>  
Wang Qun<sup>2</sup> Hyun OK Yang<sup>2</sup> Toshihiko Toida<sup>3</sup>

(1 *Institute of Marine Drug and Food,*

*Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)*

(2 *MNPC, University of Iowa, IA 52242, USA)*

(3 *School of Pharmaceutical Science, Chiba University, Chiba 263, Japan)*

**Abstract** In this paper, the dermatan sulfate (DS) was control-hydrolyzed by chondroitinase ABC. The oligosaccharides mixture was firstly fractionated by low-pressure gel permeation chromatography (LPGPC), and then the size uniform mixture was separated by strong anion exchange high performance chromatography (SAX-HPLC). Six pure DS oligosaccharides (disaccharide, tetrasaccharide, hexasaccharide, octasaccharide, decasaccharide and dodecasaccharide) were obtained, The purity of each sample was confirmed on capillary electrophoresis (CE), polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and analytical SAX-HPLC and the structure was elucidated by using electro-spray ionization mass spectrometry (ESI-MS), and high field magnetic resonance (NMR) spectrometry.

**Key words** dermatan sulfate; chondroitinase ABC; oligosaccharides; SAX-HPLC