

## 海湾扇贝边中氨基多糖的研究

王长云 管华诗

(青岛海洋大学水产学院, 266003)

**摘要** 本文对海湾扇贝边中氨基多糖进行了研究。海湾扇贝边经胃蛋白酶和胰匀浆水解去蛋白, 继用乙醇沉淀得粗多糖。粗多糖用吸附法和透析法纯化, 并经乙醇和CTAB进一步分级提纯, 最终获得氨基多糖精制品。该品含有氨基己糖、己糖醛酸、硫酸基以及5种中性单糖。其琼脂糖凝胶电泳、高效液相色谱和红外光谱类于肝素表明, 所得多糖为肝素样氨基多糖。

**关键词** 海湾扇贝, 扇贝裙边, 氨基多糖

氨基多糖(Glycosaminoglycans, GAG), 或称酸性粘多糖(Acid/Acidic Mucopolysaccharide), 广泛存在于动物体内, 是蛋白多糖的糖链部分, 在许多生物学、生理学和病理学过程中起着重要作用, 诸如抗凝血、降血脂、抗肿瘤、抗炎、抗病毒等<sup>[1]</sup>, 已引起世界医药界的高度重视。近十年来, 国内外对海洋动物中氨基多糖的研究日益高涨, 研究者从鲨鱼软骨、鲸软骨以及大量无脊椎动物(包括软体动物)中提取分离出各种氨基多糖, 并对其性质、结构和生物活性等方面作了深入研究, 显示了作为药用氨基多糖的广阔前景。

近年来, 我国的扇贝养殖业发展迅速, 年产已达18万吨(1992年)。而扇贝在加工贝柱后所得大量下脚料——扇贝边(亦称扇贝裙边)尚未被充分利用, 目前除部分作为饲料外, 有相当一大部分被丢弃, 造成极大浪费。大量的扇贝边资源亟待开发利用。本文对目前主要贝类养殖品种之一——海湾扇贝中的生物活性物质, 即氨基多糖, 进行了初步研究, 在氨基多糖的提取、纯化、分离、鉴定等方面做了一些探索性工作, 试图为扇贝边的综合利用开辟一条新路。

## 材料与方 法

### (一)主要材料和试剂

1. 海湾扇贝 Bay scallop (*Argopecten irradians*)\*, 青岛海洋大学太平角养殖场提供。采集时间1993年3月。

2. 酶制剂 胃蛋白酶: 酶活力1: 3000, 最适作用pH值2.0~2.5, 最适作用温度

收稿日期: 1994-03-15。

\* 青岛海洋大学水产学院王如才教授对海湾扇贝品种进行了鉴定。

50℃。

胰匀浆:将新鲜猪胰脏剔净脂肪异物,切碎后按每克胰脏加入 1 毫克胰蛋白酶,加入等量蒸馏水,于组织捣碎机中制成匀浆,冷藏备用<sup>[1,2]</sup>。

**3. 氨基多糖标准品** 透明质酸(Hyaluronic acid):N 含量 4.0%,葡萄糖醛酸 36.4%,氨基葡萄糖 40.0%,中国科学院上海生物化学研究所制品。

6-硫酸软骨素(Chondroitin 6-sulphate):分子量为 10,000 左右,鲨鱼软骨中制备,山东省海洋药物研究所陈淑梅教授提供。

肝素(Heparin):分子量 6,000~20,000,效价 140IU/mg,总氮量 1.3~2.5%,上海化学试剂站分装厂制品。

**4. 单糖标准品** D-葡萄糖(D-Glucose)、D-半乳糖(D-Galactose)、L-阿拉伯糖(L-Arabinose)、L-鼠李糖(L-Rhamnose)、D-木糖(D-Xylose)、D-甘露糖(D-Mannose);均为 A. R.。

D-岩藻糖( $\alpha$ -D-Fucose)、盐酸氨基葡萄糖(D-Glucosamine Hydrochloride)、盐酸氨基半乳糖(D-Galactosamine Hydrochloride)、D-半乳糖醛酸(D-Galacturonic acid);均购自 SIGMA CHEMICAL COMPANY, USA。

D-葡萄糖醛酸(D-Glucuronic acid);Made in Switzerland, Fluka AG. Buchs SG。

**5. 其它主要试剂** 琼脂糖(Agarose);电泳用;十六烷基三甲溴化铵(Cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)、巴比妥(Barbitone/barbital)、咪唑(Carbazole)、吡啶(Pyridine)、甲醇(Methylalcohol)、六甲基二硅胺烷(Hexamethyldisilan, HMDS)、三甲基氯硅烷(Chlorotrimethylsilan, TMCS);均为 A. R.。阿尔辛蓝(Alcian blue);8GX, CHROMA, 进口分装;甲苯胺蓝(Toluidine blue);E. Merck, 进口分装。

## (二)方法

**1. 氨基多糖的提取** 按照扇贝柱加工方法,用刀具将鲜活扇贝剖开,分离出扇贝边。摘除扇贝边中消化腺,沥干汁液。加入 1:1 水,用高速组织捣碎机匀浆,加入 0.1%(W/V)苯甲酸钠防腐,于 50℃下不停搅拌,先后在胃蛋白酶和胰匀浆作用下酶解。酶解条件同文献[1]和[3]。酶解结束后,加热酶解液,趁热过滤得清液。清液在不停搅拌下进行醇沉操作,操作条件同文献[3]。离心收集沉淀,冷冻干燥,得氨基多糖粗制品(F1)。

**2. 氨基多糖的纯化与分离** 将粗制品溶于蒸馏水,加入活性炭,同文献[3]脱色 30 分钟。硅藻土助滤,去除活性炭及其吸附的蛋白质、色素等杂质,得清液。将清液注入透析袋,于 30 倍蒸馏水中 10℃下透析 48 小时。收集透析液,加入 80%(V/V)乙醇-5%(W/V)乙酸钠,同上法进行醇沉回收多糖,得制品 F2。

为进一步纯化和分离,将上述制品配成 1%(W/V)糖液,依次用 20%、40%、60%(V/V)醇量同上法进行分级醇沉并回收多糖。取 60%(V/V)醇沉级分(F3-3)配成 1%(W/V)糖液,滴加 5%(W/V)CTAB 溶液,出现絮状沉淀。用 3 体积水洗净游离 CTAB 后,先后以 0.3、1.0、2.0mol/L NaCl 溶液分级解离。其中 2.0mol/L 解离液用硅藻土助滤,同上法醇沉回收多糖,冷冻干燥,得最终纯品 F3-3-3。

**3. 分析鉴定方法** 氨基己糖的测定,用 Rondle 法<sup>[7]</sup>;己糖醛酸的测定,用 Dische 法<sup>[6]</sup>;含硫量测定,用氧瓶燃烧法<sup>[9]</sup>;中性单糖的测定,采用气相色谱法<sup>[4,10]</sup>。样品 10mg,

经盐酸—甲醇醇解后,用吡啶中和,以 1.5ml HMDS : TMCS = 2 : 1 硅醚化,用 HP5890 I 型气相色谱仪测定。测定条件:HP5 毛细管色谱柱(25m × 0.32mm),柱温 240℃(恒温),检测器温度 280℃。

琼脂糖凝胶电泳,参照 Carl 法<sup>[11]</sup>。缓冲系统为巴比妥缓冲液(0.06mol/L, pH8.6),琼脂糖 1%,琼脂板 5.3 × 10.5 × 0.2cm。样品浓度 6μg/μl,点样量 1μl。染色液为 0.1%(W/V)甲苯胺蓝(用乙酸:乙醇:水=0.1:5:5 配成)。电泳条件:DYY-Ⅱ8 型电泳仪,80V(35mA),10℃,60min。

高效液相色谱,参照 Karamanos<sup>[12]</sup>和 Engfeldt<sup>[13]</sup>,用 HITACHI-655 高效液相色谱仪测定。测定条件:ET11 色谱柱,4mm × 250mm;平衡液 0.01mol/L, pH7.0 磷酸盐缓冲液;样品浓度 6μg/μl,进样量 10μl;氯化钠—磷酸盐缓冲液 0.01~1.90mol/L 梯度洗脱,流速 1ml/min;检测 UV215nm。

红外光谱,参照平野茂博等<sup>[5]</sup>。样品用 KBr 压片,以 10DX-FTIR 型红外光谱仪测定,光谱扫描范围 4800~400cm<sup>-1</sup>。

## 结 果 与 讨 论

由海湾扇贝边制得的氨基多糖制品 F3-3-3 得率为  $2.12 \times 10^{-4}$ (相对于鲜扇贝边)。制品呈白色粉末状,无臭无味,易潮解,易溶于水。用 Edward 法<sup>[14]</sup>试验,该品具有阿尔辛蓝反应。F3-3-3 的重要组分和基团的分析结果见表 1。

表 1 F3-3-3 分析结果(%)

Table 1 The result of analysis of F3-3-3(%)

样品 Sample	项目 Items	氨基己糖 HexNH <sub>2</sub>	己糖醛酸 HexUA	含硫量 S	含氮量 N
F3-3-3		22.60	23.20	6.66	1.68
Heparin		23.58	25.86	13.79	1.32

氨基己糖和己糖醛酸为分子中的主要单糖,即碱性单糖和酸性单糖,含量分别为 22.60%和 23.20%,其分子比接近 1:1。硫来源于糖环上的硫酸基。用氧瓶燃烧法测得的含硫量为 6.66%。氮来源于两部分,一是与多糖分子相连的氨基酸残基以及肽等;二是多糖分子中的氨基、N-乙酰基或磺酰氨基。F3-3-3 含氮量为 1.68%。与肝素相比,除含硫量为肝素的一半外,其它与肝素接近。

标准单糖和 F3-3-3 的气相色谱图见图 1。

对照标准单糖和 F3-3-3 的气相色谱图发现,F3-3-3 含有 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖、D-岩藻糖、L-鼠李糖等中性单糖,未见 L-阿拉伯糖和 D-甘露糖。

琼脂糖凝胶电泳结果见图 2 和表 2。

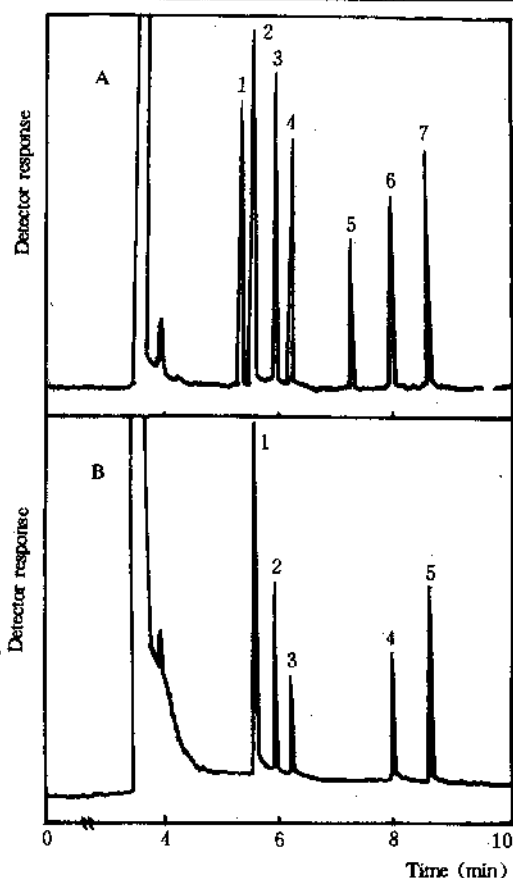


图 1 标准单糖和 F3-3-3 气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatography of standard monosaccharides and fraction F3-3-3

The gas chromatograph was HP5890 I. The column used was HP5, 25 × 0.32mm, with a constant temperature of 240°C. The detector temperature was 280°C. A, Standard monosaccharides, 1, Arabinose; 2, Rhamnose; 3, Fucose; 4, Xylose; 5, Mannose; 6, Galactose; 7, Glucose. B, F3-3-3, 1, Rhamnose; 2, Fucose; 3, Xylose; 4, Galactose; 5, Glucose.

表 2 琼脂糖凝胶电泳结果

Table 2 The results of agarose gel electrophoresis

项目 Items	样品 Samples	F3-3-3	Hep.	CS6	HA
$R_f$		1.50	1.50	1.42	1.29
$R_{fHep.}$		1.00	1.00	0.95	0.86

Hep., Heparin; CS6, Chondroitin 6-sulphate; HA, Hyaluronic acid.

由结果可知, F3-3-3 具有甲苯胺蓝反应。由图表可见, 与肝素、透明质酸和 6-硫酸软骨素相比, F3-3-3 的电泳行为类于肝素, 其相对迁移率(以肝素为 1)与肝素一致。高效液相色谱分析结果见图 3。

从高效液相色谱图可以看出, F3-3-3 峰 3 与标准样肝素保留时间(梯度洗脱浓度)相一致, 表明 F3-3-3 主要为肝素养物质, 占 93.04%。峰 1 和峰 2 保留时间位于透明质酸和 6-硫酸软骨素之间, 表明 F3-3-3 中仍含有少量其它多糖, 很可能为透明质酸和

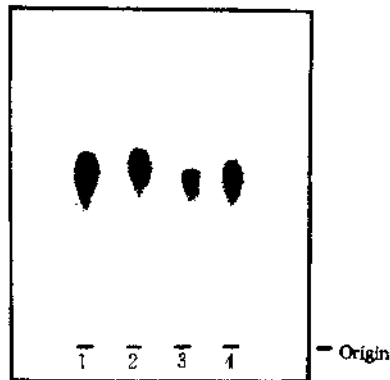


图2 F3-3-3和氨基多糖标准样肝素、透明质酸及6-硫酸软骨素琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of fraction F3-3-3 and GAG standard samples of Hep., CS6 and HA

Agarose gel slide (5.3×10.5cm, 0.2cm thick) was prepared with 1% agarose in 0.06mol/L barbital buffer (pH 8.6). Samples (μl) containing 6μg of GAG were applied. The agarose slide was subjected to electrophoresis for 60min at 80V in a chamber prepared with the same buffer at 10°C. The GAG were then stained, as described under "Materials and Methods".

1, F3-3-3; 2, Heparin; 3, Hyaluronic acid; 4, Chondroitin 6-Sulphate.

硫酸软骨素, 因含量甚微, 又因洗脱浓度的关系, 未能完全分开。Kennedy<sup>[6]</sup>指出, 尽管分离方法很多, 有些方法已很先进, 但尚难将各种氨基多糖彼此完全分开。这是因为有许多限制因素, 例如, 分子量的分散性、硫酸化程度的不一致性、显微结构的不均匀性、残基数量的多变性等等, 所有这些因素使氨基多糖出现显著的化学上重叠, 而氨基多糖的结构也只能通过假设确定。

F3-3-3 经红外光谱分析, 并与标准氨基多糖肝素作对照, 结果见图4。

参照文献[5]可知, F3-3-3 具有典型的氨基多糖红外吸收光谱, 其图谱(波形、波数、峰宽、峰强)与肝素接近。这一结果与高效液相色谱法、琼脂糖凝胶电泳法以及其它方法所得结果一致。

由 F3-3-3 红外图谱可知, 分子中除含有 -OH(3434cm<sup>-1</sup>)、C-O-C(1034cm<sup>-1</sup>) 外, 还含有 -NH(3434cm<sup>-1</sup>、1655cm<sup>-1</sup>、1560cm<sup>-1</sup>)、-COO<sup>-</sup>(1655cm<sup>-1</sup>、1414cm<sup>-1</sup>)、OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>(1234cm<sup>-1</sup>、850cm<sup>-1</sup>、820cm<sup>-1</sup>)。这些基团均为氨基多糖特征基团<sup>[5]</sup>。

综合上述分析结果, F3-3-3 含有氨基己糖、己糖醛酸、硫酸基及 5 种中性单糖, 其琼脂糖凝胶电泳和高效液相色谱与肝素一致, 红外光谱类于肝素。因此, 可以得出结论, F3-3-3 为肝素样氨基多糖。

氨基多糖按其组成为 8 种<sup>[6]</sup>, 包括肝素、透明质酸、4-硫酸软骨素、6-硫酸软骨素等。Cassaro<sup>[15]</sup>研究发现, 贝类中的团蛤(*Perna perna*)含有硫酸软骨素和硫酸乙酰肝素, 斧蛤(*Mesodesma donacium*)和畸心蛤(*Anomalocardia brasiliense*)主要含有肝素。Ovodov<sup>[16]</sup>对日本海几种无脊椎动物的多糖进行了研究, 从一种扇贝(*Chlamys swifti*)中分离出两个组分的多糖, 但未确定多糖种类。本文从海湾扇贝边中提取分离出一种氨基多糖, 与氨基多糖的主要代表种类肝素、透明质酸和 6-硫酸软骨素进行的比较分析表明, 该多糖为肝素样氨基多糖。初步的生物活性试验显示了显著的抗凝活性, 有可能成为一种新型海洋药

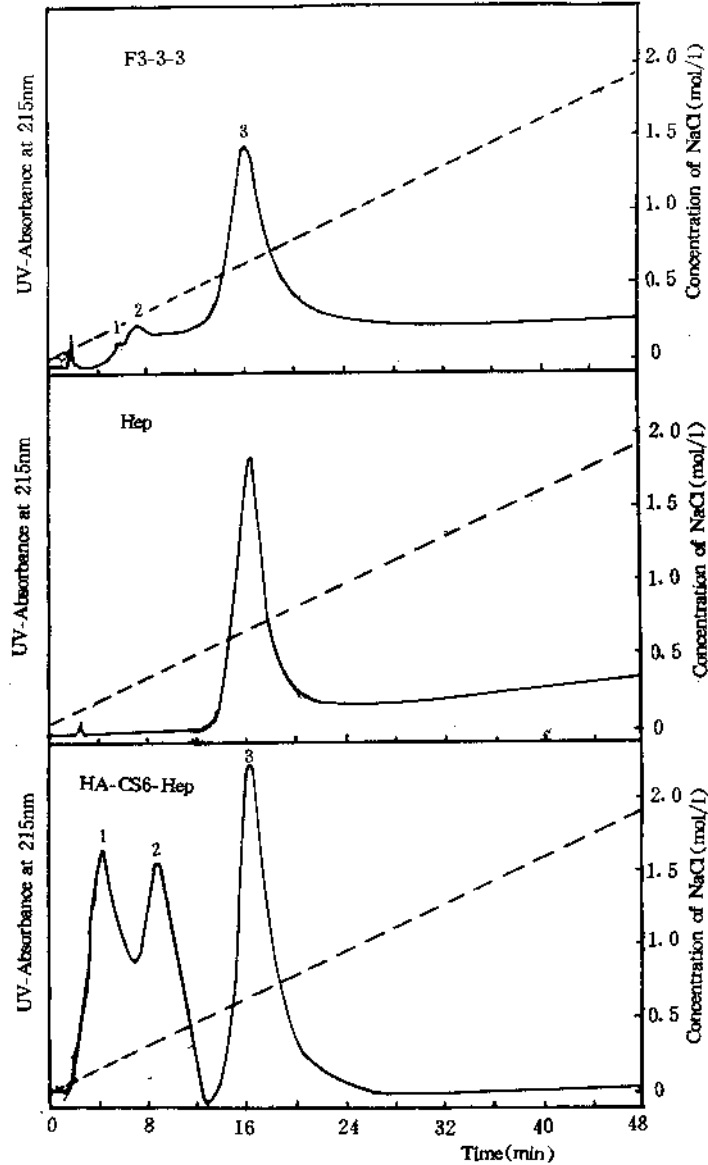


图 3 高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC of fraction F3-3-3, Heparin and mixture of HA, CS6 and Hep.

Chromatography was performed on a  $4 \times 250$ mm ECTEOLA-Cellulose (Whatman ET11) column in a HITACHI HPLC system using a linear gradient from 0.01mol/L to 1.90mol/L NaCl (pH 7.0, 0.01mol/L phosphate buffer system) over a 48-min period at a flow rate of 1.0ml/min at room temperature. Samples dissolved in 0.01 mol/L phosphate buffer (pH 7.0) were injected. Eluates were monitored by UV absorbance at 215nm. The elution position are as follows. F3-3-3, 1, 5.47min, 0.56%; 2, 7.55min, 5.50%; 3, 16.31min, 93.04%. Hep., 16.39min, 99.91%. HA-CS6-Hep.: 1, Hyaluronic acid (HA), 4.59min, 21.36%; 2, Chondroitin 6-sulphate (CS6), 8.97min, 20.09%; 3, Heparin (Hep.), 16.44min, 58.52%.

物。

近十年来,国内在利用海洋水产资源进行生化制药的研究方面进行了积极尝试。研究

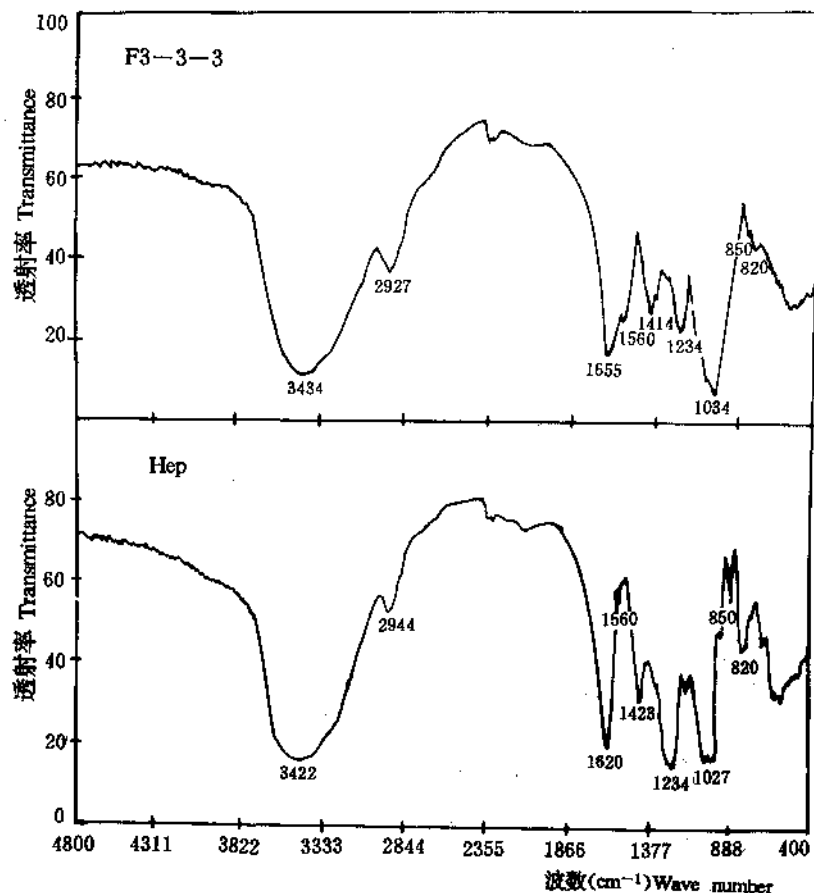


图4 F3-3-3和肝素红外光谱图

Fig. 4 Infrared spectrometry of fraction F3-3-3 and Heparin

Samples were pelleted with potassium bromide (KBr). Infrared spectrometries were performed in a 10DX-FTIR infrared spectrometer system scanning from 4800 to 400 wave number.

者从鲨鱼(软骨)<sup>[17]</sup>、海星<sup>[18]</sup>和刺参(体壁及内脏)<sup>[1,2]</sup>等海洋动物中提取出各种多糖,并对所得多糖的抗凝血、抗肿瘤、降血脂以及提高机体免疫功能等方面进行了广泛研究。由于刺参等水产资源有限而且价值昂贵,对其活性物质的药用开发受到限制。而扇贝边资源量很大(已达5万吨/年),并且价值低廉,扇贝氨基多糖的药用前景极为广阔。此外,在提取多糖的同时,还可大量回收蛋白质(或氨基酸),这为扇贝边的综合利用提供了一条新途径。

### 参 考 文 献

- [1] 樊绘曾等,1980.刺参酸性粘多糖的分离及其理化性质.药学报,5:263-269.
- [2] 樊绘曾等,1983.刺参内脏酸性粘多糖研究.海洋药物.3:134-137.
- [3] 王长云、管华诗,1992.扇贝边中酸性粘多糖的提取.青岛海洋大学学报,海洋药物专辑,71-77.
- [4] 李铁林等,1981.糖和糖醇的气相色谱分析1,单糖三甲基硅醚衍生物.分析化学,9(3):295-298.
- [5] 平野茂博等,1972.ムコ多糖,化学の领域,增刊(96):1-26.

- [6] Kennedy J. F. ,1979. Proteoglycans, Elsevier, Amsterdam,1—72.
- [7] Rondle C. J. M. , Morgan W. T. J. , 1955. The Determination of Glucosamine and Galactosamine, Biochem. , 61, 586.
- [8] Dische Z. *et al.* , 1948. A Specific Reaction of Methylpentoses for their Determination, J. Biol. Chem. ,175:595—603.
- [9] McGillivray R. *et al.* , 1966. The Application of the Oxygen—Flask Combustion Technique to the Determination of Trace Amounts of Chlorine and Sulphur in Organic Compounds, Analyst. , 91:611—620.
- [10] Sweeley C. C. *et al.* , 1963. Gas—Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances, J. Amer. Chem. Soc. , 85:2497.
- [11] Carl P. D. *et al.* , 1977. Identification of Acidic Mucopolysaccharides by Agrose Gei Electrophoresis, J. Chromatography, 130:299—304.
- [12] Karamanos NK. *et al.* , 1991. Isolation and High—Performance Liquid Chromatographic Analysis of Ray (*Raja Clavata*) Skin Glycosaminoglycans, Comp. Biochem. Physiol. , B,100B(4),827—832.
- [13] Engfeldt B. *et al.* , 1982. Morphological and Biochemical Analysis of Biopsy Specimens in Disorders of Sceletical Developments, Acta Paediat Scand, 71:353—363.
- [14] Edward W. G. , 1979. A Simple Spectrophotometric Method of Estimating Glycosaminoglycan Concentrations, Analytical Biochem. , 99:183—188.
- [15] Cassaro C. M. F. , Dietrich C. P. , 1977. Distribution of Sulphated Mucopolysaccharides in Invertebrates, J. Biol. Chem. , 252:2254.
- [16] Ovodov Y. S. *et al.* , 1969. Polysaccharides of Some Japan Sea Invertebrates, Comp. Biochem. Physiol. , 29:1093—1098.
- [17] Li J—H, Wang Y—S. , *et al.* , 1986. Isolation and Characterization of Chondroitin 6—Sulfated from the Cartilages of Rhincodon Typus, J. Mar. Drugs, 5(2):7—10.
- [18] Shen W—M. *et al.* , 1986. Physical and Chemical Properties Studies of Acidic Mucopolysaccharide from Solaster Dawsoni, J. Mar. Drugs, 5(2):1—6.

## STUDIES ON GLYCOSAMINOGLYCANS FROM LEFTOVER BITS OF BAY SCALLOP

Wang Changyun Guan Huashi

(Fishery College of Ocean University of Qingdao, 266003)

**ABSTRACT** Glycosaminoglycans (GAG) from the leftover bits of Bay scallop (*Argopecten irradians*) was studied. The semifinished product of GAG was isolated from leftover bits by hydrolization of protein with pepsin and pancreas homogenate and precipitation with alcohol. The final fraction of GAG was gained from the semifinished product through adsorption with activated charcoal, dialysis with dialyzer, and separation with alcohol and CTAB successively. The GAG of the final fraction contains hexosamine, hexosuronic acid and sulphate. The results of agarose gel electrophoresis, high performance liquid chromatography and infrared sepectrometry of the fraction were similar to that of heparin. It indicated that the GAG of the fraction is heparin—like.

**KEYWORDS** Bay scallop, Leftover bits of scallop , Glycosaminoglycans