

# PMP – HPLC – MS 分析扇贝内脏多糖的组成

黄璐, 王洪旭, 殷廷, 曹九零, 温成荣, 宋爽\*

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

**摘要:**本研究以虾夷扇贝加工副产物内脏为原料制备多糖, 采用化学方法测定虾夷扇贝内脏多糖(SVP)中蛋白质含量为4.09%, 中性糖含量为75.37%, 硫酸根含量为0.63%, 硫酸多糖含量为8.77%, 红外光谱显示了多糖特征吸收峰。采用PMP-HPLC-PDA-MS分析扇贝内脏多糖酸降解产物, 确定主要组成单糖是Xyl, Gal, Man, Rha, Fuc, Ara, 另外还含有少量的GlcN, GalN, GalA和Glc; 并由二糖片段推测扇贝内脏中存在硫酸软骨素或其类似物, 以及三种结构中存在糖醛酸与己糖重复二糖片段的多糖。本研究提供了扇贝内脏多糖的信息, 有助于这一加工副产物的开发利用。

**关键词:**扇贝, 内脏, 多糖, PMP-HPLC-MS

## Composition analysis of polysaccharides from viscus of *Patinopecten yessoensis* by PMP-HPLC-MS

HUANG Lu, WANG Hong-xu, YIN Ting, CAO Jiu-ling, WEN Cheng-rong, SONG Shuang\*

(School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University,  
National Engineering Research Center of Seafood, Dalian 116034, China)

**Abstract:** Polysaccharides were prepared from viscus of *Patinopecten yessoensis*, and the contents of neutral sugar, protein, sulfate, sulfated polysaccharides were determined as 75.37%, 4.09%, 0.63% and 8.77%, respectively, by chemical methods. IR spectrum showed characteristic absorption of polysaccharides. Acid hydrolysates of the polysaccharides from *Patinopecten yessoensis* viscus were analyzed by PMP-HPLC-PDA-MS. The results indicated that Xyl, Gal, Man, Rha, Fuc and Ara were the main components, whereas others, e.g. GlcN, GalN, GalA and Glc, were in a minor content. In addition, chondroitin sulfate or its analogue as well as three polysaccharides composed of a hexose and a hexuronic acid were found by analyzing the resulting disaccharides. This research provided information of polysaccharides in the scallop viscus, and helped to exploit and re-utilize this processing by-product.

**Key words:** *Patinopecten yessoensis*; viscus; polysaccharide; PMP-HPLC-MS

中图分类号: TS254.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)07-0113-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.07.015

虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 是贝类水产品的重要品种, 可加工贝柱和柱连籽产品, 而内脏是加工的副产物, 作为低值饲料使用甚至被丢弃。殷红玲等<sup>[1]</sup>对虾夷扇贝内脏多糖的酶解提取方法进行了优化, 并证实提取出的虾夷扇贝内脏多糖具有羟基自由基清除活性。闫雪等<sup>[2]</sup>从虾夷扇贝内脏中提取纯化得到的多糖组分 SVP-12, 并测定了它的硫酸根含量, 氨基己糖含量, 分子质量, 气相色谱法分析了单糖组成。李广靖等<sup>[3]</sup>从虾夷扇贝软体部下脚料中提取出糖胺聚糖, 并证实它具有一定的抗氧化活性

和低弱的抗凝血活性。本研究将借助化学和仪器方法, 分析虾夷扇贝内脏中多糖的种类和结构特征, 为开发利用这一生物资源提供线索和依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 由大连獐子岛渔业集团股份有限公司提供。将新鲜虾夷扇贝内脏取出, 冷冻干燥, 粉碎, 过 20 目筛, 得扇贝内脏粉, 储藏于 -20℃ 冰箱中备用。胰蛋白酶 (250N.F.U/mg)、木瓜蛋白酶 (3500U/mg)、肝素、透明质酸 购自生工生物

收稿日期: 2014-11-05

作者简介: 黄璐 (1989-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 海洋食品生理活性物质。

\*通讯作者: 宋爽 (1981-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 海洋天然产物研究。

基金项目: 国家自然科学基金 (31301431); 辽宁省教育厅一般项目 (L2014222); 辽宁省农业领域青年科技创新人才培养计划 (2014002); 国家火炬计划 (2012GH560223); 国家高技术发展计划 (863 计划) 课题 (2014AA093602)。

工程(上海)股份有限公司;木糖、D-葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、硫酸软骨素、D(+)-氨基半乳糖盐酸盐、D-核糖 购自 Sigma;岩藻糖、D-氨基葡萄糖盐酸盐、鼠李糖 购自 Fluka;D-半乳糖 购自 BIO BASIC INC;PMP(1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮) 购自国药集团有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

UV-2100 型紫外可见分光光度计 尤尼柯上海仪器有限公司;液相色谱线性离子阱质谱仪 德国赛默飞世尔科技公司;傅里叶变换红外光谱仪 美国铂金埃尔默仪器有限公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 SVP 的制备 虾夷扇贝内脏粉加入 25 倍水,用 6mol/L 的 NaOH 调 pH 至 8.0,温度 37℃,加入 2.0% 的胰蛋白酶,水解 4h 后,升温至 50℃,再加入 2.0% 木瓜蛋白酶,水解 4h 后,升温至 100℃ 灭酶 10min,冷却至室温后,调至中性,离心 10min (4000r/min),取上清液加 3 倍体积 95% 乙醇,醇沉 12h,离心 10min (4000r/min),取沉淀,冷冻干燥得扇贝内脏粗多糖。将扇贝内脏粗多糖配成质量分数为 5% 的水溶液,用 NaOH 调节至 pH 为 9,然后加七分之一体积的 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,在 60℃ 水浴条件下加热 2h,取出冷却至室温,加 3 倍体积无水乙醇,醇沉 12h,离心,取沉淀,冷冻干燥后得到 SVP,得率 1.11%。

1.2.2 SVP 的组成分析 蛋白质含量采用福林酚法测定<sup>[4]</sup>,中性糖含量采用苯酚硫酸法测定<sup>[5]</sup>,硫酸根含量采用明胶-比浊法测定<sup>[6]</sup>,硫酸多糖含量以硫酸软骨素为对照品采用 1,9 二甲基亚甲蓝光度法测定<sup>[7]</sup>。

1.2.3 红外光谱分析 将样品分别与 KBr 以 1:100 (W/W) 比例混合研细后,以 KBr 为本底,在 4000~400cm<sup>-1</sup> 波数范围内扫描红外吸收。

1.2.4 PMP 柱前衍生化法分析 SVP 的组成

1.2.4.1 糖样的制备 称取 SVP 4mg,分别溶于 1mL 2mol/L 的三氟乙酸中,充 N<sub>2</sub> 密封,在 121℃ 的条件下水解 2h,冷却后旋转蒸发去除三氟乙酸,加水溶解继续旋蒸直至无酸味,得扇贝内脏多糖的单糖水解物。

称取扇贝内脏多糖(SVP)、肝素(HP)、硫酸软骨素(CS)、透明质酸(HA)、鲍鱼性腺硫酸多糖(AGSP)各 4mg,分别溶于 1mL 1mol/L 的三氟乙酸(TFA)中,充 N<sub>2</sub> 密封,在 110℃ 的条件下水解 3h,冷却后旋转蒸发去除三氟乙酸,加水溶解继续旋蒸直至无酸味,得到含二糖片断的水解物。

1.2.4.2 PMP 衍生物的制备 各种水解物溶于 2mL 氨水中,混合标准单糖溶于 5mL 氨水中,分别取混合标准单糖和 10 种标准单糖溶液 100μL 与 100μL 的 PMP/甲醇溶液(0.3mol/L)混合,分别取 SVP 水解物 200μL 与 200μL 的 PMP/甲醇溶液(0.3mol/L)混合,将所有混合液均放置在 70℃ 下反应 30min。取出后冷却至室温,加入 1.5mL 纯水,旋转蒸发去除氨水,重复 2 次。干燥后的物质用 1mL 纯水及 1mL 氯仿溶解,充分振荡后除去有机相,重复 3 次,静置,取上清液过 0.22μm 水相膜,用于 HPLC-PAD-MS 分析。

标准单糖甘露糖(Man)、葡萄糖(Glc)、半乳糖

(Gal)、鼠李糖(Rha)、木糖(Xyl)、岩藻糖(Fuc)、葡萄糖醛酸(GlcA)、半乳糖醛酸(GalA)、氨基葡萄糖(GlcN)、氨基半乳糖(GalN)、核糖(Rib)、阿拉伯糖(Ara)(各 10mg),也按照上述操作进行衍生化,作为对照品使用。按照摩尔比为 0.1mmol 准确称取各单糖(不含 Ara)作为单糖混合对照品,按照上述操作进行衍生化。

1.2.4.3 HPLC-PAD-MS 分析 仪器:配备电喷雾离子源(ESI)和光电二极管阵列检测器(PDA)的 LXQ 线性离子阱质谱仪,XCalibur 软件操作系统。

色谱条件:Silgreen ODS C<sub>18</sub>(250×4.6mm,5μm) 色谱柱;柱温 30℃;流动相 20mmol 乙酸铵-乙腈(78:22,V/V);流速 1mL/min。

质谱条件:离子源 ESI 源;喷雾电压 4.5kV;毛细管温度为 275℃;毛细管电压为 37V;鞘气:40AU;辅助气:10AU;正离子模式检测;扫描方式为全扫描(Full Scan);扫描范围为 100~2000(m/z)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SVP 组分分析结果

SVP 蛋白质含量为 4.09%,表明已经基本去除了蛋白质。中性糖含量较高,为 75.37%。硫酸根含量为 0.63%,硫酸多糖含量为 8.77%。

### 2.2 SVP 红外光谱分析结果

SVP 的红外光谱如图 1 所示,显示了多糖的吸收特征。在 3422cm<sup>-1</sup> 处有强且宽的吸收峰,系多糖上的 O-H 的伸缩振动;2935cm<sup>-1</sup> 附近的肩峰为饱和 C-H 伸缩振动的信号;1655cm<sup>-1</sup> 处较强吸收,可能是 C=O 键的伸缩振动,或是酰胺键中 N-H 键的变角振动;1040cm<sup>-1</sup> 处强吸收为 C-O 伸缩振动;1413cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰为硫酸基的特征吸收;而 1250cm<sup>-1</sup> 吸收峰可归属为 -OSO<sub>3</sub> 基团的 S=O 伸缩振动。

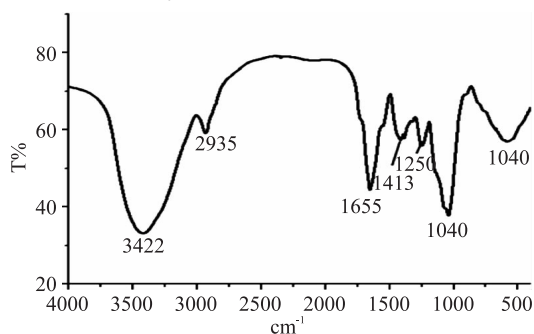


图 1 SVP 红外光谱

Fig.1 IR spectrum of SVP

### 2.3 SVP 单糖组成测定结果

与薄层色谱法和气相色谱法相比,PMP 柱前衍生化液相色谱法分析复杂多糖单糖组成更为有效<sup>[8]</sup>。但是,使用 HPLC-UV 分析时,常常会发生不同单糖 PMP 衍生物保留时间近似而难以区分现象,另外,杂质峰也会干扰指认。本研究以 HPLC-PAD-MS 对单糖的 PMP 衍生物进行检测,利用 PAD 和 MS 的定性作用,对色谱峰进行定性辨别。在质谱中,由于不同类型单糖的分子量不同,生成的 PMP 衍生物的准分子离子峰质荷比不同。氨基己糖(如 GlcN 和

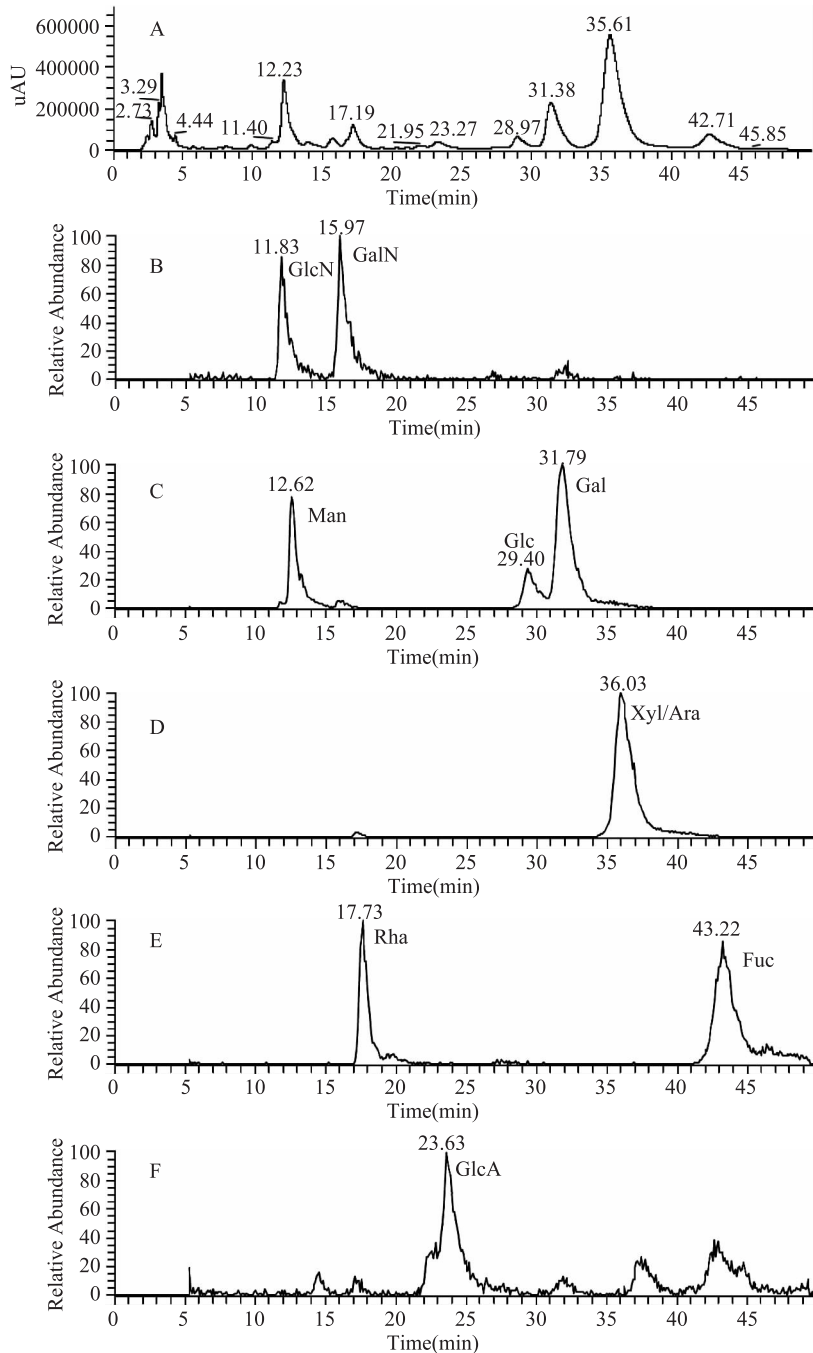


图2 SVP单糖PMP衍生物液相色谱图。

Fig.2 Chromatograms of PMP-labeled monosaccharides in SVP.

注:图A为紫外检测器(245nm)色谱图,图B、C、D、E、F分别为提取  $m/z$  510.23, 511.21, 481.20, 495.22, 525.19 离子的色谱图。

GalN)、己糖(如 Man、Glc 和 Gal)、戊糖(如 Ara, Rib 和 Xyl)、甲基戊糖(如 Rha 和 Fuc)、己糖醛酸(如 GlcA 和 GalA) PMP 衍生物准分子离子峰的理论质荷比分别为 510.23、511.21、481.20、495.22 和 525.19。

本实验是通过与标准单糖保留时间、紫外光谱、质谱信息进行对比,指认各色谱峰。如图2所示,采用选择离子方式,可以依据分子量差别分别显示各类型单糖。但需要说明的是,该方法仍不能区分保留时间相同的同分异构体, Ara 和 Xyl, 而据文献报道它们均大量存在于虾夷扇贝内脏多糖中<sup>[2,9]</sup>。最终,判断 SVP 中的主要组成单糖是 Xyl, Gal, Man, Rha, Fuc, Ara, 另外还含有少量的 GlcN, GalN, GalA 和

Glc。其中, GlcN, GalN, GalA 由于含量较少,在紫外色谱图中难以分辨(图2A),而质谱技术提高了灵敏度(图B和F)实现了检出。这三种单糖常见于糖胺聚糖中,它们的存在提示扇贝内脏可能存在糖胺聚糖,而糖胺聚糖的种类还需下步实验分析。

## 2.4 SVP 种类的分析结果

在酸水解中,糖醛酸的糖苷键是最难断裂的,因此,在较弱的酸水解条件下,可以产生非还原端为糖醛酸的二糖片段。本研究是通过鉴定多糖水解产生的二糖片段,间接推断含糖醛酸多糖的种类。该方法未见文献报道。通过对 SVP 水解物的 PMP-HPLC-PAD-MS 分析,发现了四种二糖片段,它们的 PMP

衍生物分子离子峰质荷比有两种,  $m/z$  686 和  $m/z$  687。

由分子离子峰  $m/z$  686 推测该二糖为糖醛酸与氨基己糖连接而成。而广泛存在于扇贝组织中的糖胺聚糖<sup>[10-12]</sup>就是由糖醛酸与氨基己糖组成,包括肝素(HP),硫酸软骨素(CS)和透明质酸(HA)等。经过酸水解,肝素将生成 IdoA-(1→4)-GlcN,硫酸软骨素将生成 GlcA-(1→3)-GalN,透明质酸将生成 GlcA-(1→3)-GlcN,它们 PMP 衍生物的分子离子峰理论均为  $m/z$  686.3。如图 3 所示,选择离子  $m/z$  686.3 得到的色谱图中,SVP 的二糖 PMP 衍生物的保留时间与硫酸软骨素的一致,说明扇贝内脏中可能存在硫酸软骨素或其它可水解得该二糖片段的多糖。该二糖及其 PMP 衍生物结构如图 4 所示。

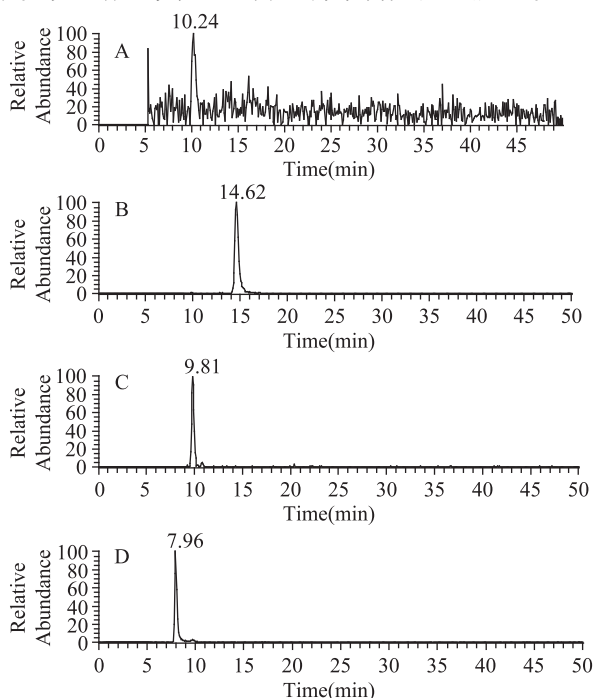


图3 SVP(A),HP(B),CS(C)以及HA(D)降解物中二糖 PMP 衍生物的选择离子  $m/z$  686.3 色谱图

Fig.3 Chromatograms of PMP-labeled disaccharides in SVP(A),HP(B),CS(C)and HA(D) with extracted ion at  $m/z$  686.3

由分子离子峰  $m/z$  687 推测该二糖为糖醛酸与己糖连接而成。如图 5A 所示,选择离子  $m/z$  687.3 获得的色谱图中可见三个色谱峰,说明扇贝内脏中存在三种由糖醛酸与己糖重复二糖片段构成的多糖。目前,对这种类型多糖的研究开发还较少,缺少商品化的标准品。本课题组前期从鲍鱼性腺中分离得到的多糖(AGSP)主链结构由 GlcA-Man 重复二糖片段构成,酸水解可产生 GlcA-(1→2)-Man,该二糖及其 PMP 衍生物结构如图 6 所示<sup>[13]</sup>。如图 5B 所示,AGSP 的二糖 PMP 衍生物的色谱峰对比,推测扇贝内脏中存在 AGSP 或其它可水解得该二糖片段的多糖。

### 3 结论

SVP 中蛋白质含量为 4.09%,中性糖含量为 75.37%,硫酸根含量为 0.63%,硫酸多糖含量为

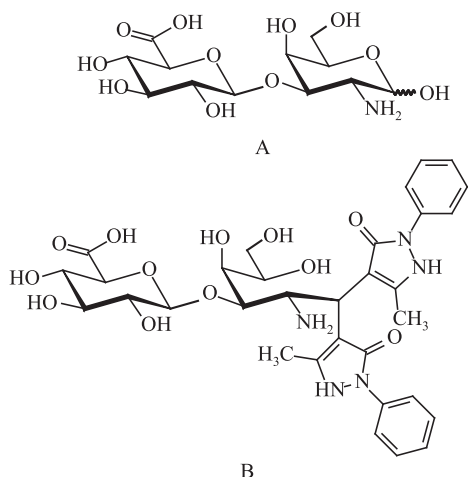


图4 GlcA-(1→3)-GalN 及其 PMP 衍生物的结构  
Fig.4 Structures of GlcA-(1→3)-GalN and its PMP derivative

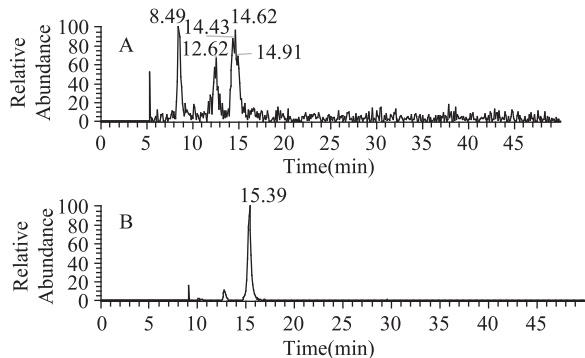


图5 SVP(A)和AGSP(B)二糖衍生物选择离子色谱图。其中,提取的离子质荷比为 687.3

Fig.5 Chromatograms of PMP-labeled oligosaccharides with extracted ions at  $m/z$  687.3 in SVP(A) and AGSP(B)

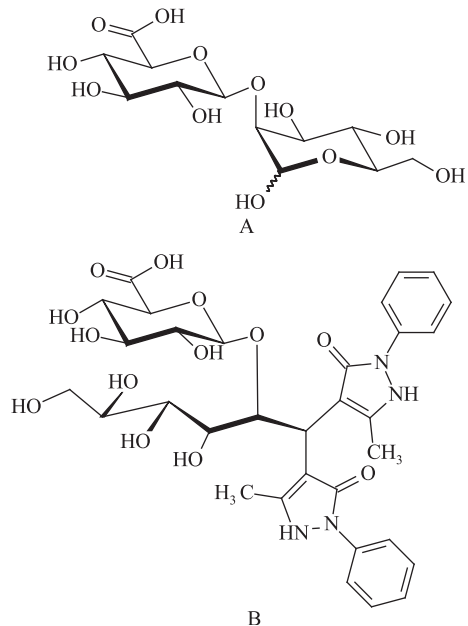


图6 GlcA-(1→2)-Man 及其 PMP 衍生物的结构  
Fig.6 Structures of GlcA-(1→2)-Man and its PMP derivative



8.77%, 红外光谱中具有多糖特征吸收峰。采用 PMP-HPLC-PDA-MS 分析 SVP 的单糖组成, SVP 中的主要组成单糖是 Xyl, Gal, Man, Rha, Fuc, Ara, 另外还含有少量的 GlcN, GalN, GalA 和 Glc。通过 HPLC-PDA-MS 对酸降解产物中二糖的分析, 推测扇贝内脏中存在硫酸软骨素或其类似物、AGSP 或其类似物以及另外两种结构中存在糖醛酸与己糖重复二糖片段的多糖, 首次实现了对虾夷扇贝内脏中多糖种类的鉴定。该方法是通过鉴定多糖酸水解产生的二糖片段来推断含糖醛酸多糖的种类, 避免了繁琐的分离纯化过程, 使用样品量较少, 可在较短时间内可获得结果。这种鉴别多糖的方法未见文献报道。本研究较为全面深入的提供了扇贝内脏中多糖的信息, 为开发利用扇贝内脏提供了基础的研究数据。

### 参考文献

- [1] 殷红玲, 马媛, 王璐, 等. 虾夷扇贝内脏多糖的提取及清除羟基自由基作用的研究[J]. 水产科学, 2007, 26(5): 255-258.
- [2] 闫雪, 杨静峰, 周大勇, 等. 虾夷扇贝内脏多糖 SVP-12 的分离纯化及性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 172-175.
- [3] 李广靖, 崔青曼, 袁春营. 虾夷扇贝下脚料糖胺聚糖的化学组成与生物学功能研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(24): 134-139.
- [4] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 265-275.

(上接第 108 页)

- development in aqueous glucose systems at high temperatures [J]. Journal of Food Engineering, 2000, 44: 181-189.
- [14] Kurata T, Sakurai Y. Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of non-enzymatic browning reaction part [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1967, 31: 170-176.
  - [15] 张玉玉, 宋戈, 李全宏. 食品中糠醛和 5-羟甲基糠醛的产

(上接第 112 页)

- [5] R Bou, J A Navas, A Tres, et al. Quality assessment of frying fats and fried snacks during continuous deep-fat frying at different large-scale producers [J]. Food Control, 2012, (27): 254-267.
- [6] 郭文川, 郭康权, 朱新华. 介电特性在番茄和苹果品种识别中的应用[J]. 农业机械学报, 2006, 37(8): 131-133.
- [7] 郭文川, 朱新华, 郭康权, 等. 桃的介电特性及新鲜度识别[J]. 农业机械学报, 2007, 38(1): 131-133.
- [8] Kent M, Peymann A, Gabriel C, et al. Determination of added water in pork products using microwave dielectric spectroscopy [J]. Food Control, 2002, 13(3): 143-149.
- [9] 何天宝, 程裕东. 温度和频率对鱼糜介电特性的影响[J]. 水产学报, 2005, 29(2): 252-257.
- [10] Zhang L, Lyng J G, Brunton N P. The effect of fat, water and salt on the thermal and dielectric properties of meat batter and its temperature following microwave or radio frequency heating [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 80(1): 142-151.

- [5] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999, 11.
- [6] Ghosh P, Adhikari U, Ghosal P K, et al. *In vitro* anti-herpetic activity of sulphated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa* [J]. Phytochemistry, 2004, 65, 3151-3157.
- [7] Farndale R W, Buttl D J, Barrett A J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1986, 883: 173-177.
- [8] 宋叶涵, 李冬梅, 杨静峰, 等. 三种色谱法分析鲍鱼生殖腺多糖的单糖组成[J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 44-47.
- [9] 于运海, 周大勇, 孙黎明, 等. 虾夷扇贝脏器硫酸酯多糖的制备及性质研究[J]. 食品科学, 2009, 30(6): 68-71.
- [10] 王长云, 管华诗. 海湾扇贝边中氨基多糖的研究[J]. 中国水产科学, 1994, 1(2): 32-39.
- [11] 李珊, 刘赛. 扇贝裙边中糖胺聚糖的气相色谱定性定量分析及红外光谱分析[J]. 中国海洋药物杂志, 2004, 23(6): 8-11.
- [12] Saravanan R, Shanmugam A. Is isolation and characterization of heparan sulfate from marine scallop *Amussium pleuronectes* (Linne.) an alternative source of heparin? [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86: 1082-1084.
- [13] Wang H X, Jun Z, Li D M, et al. Structural investigation of an uronic acid-containing polysaccharide from abalone by graded acid hydrolysis followed by PMP-HPLC-MS<sup>n</sup> and NMR analysis [J]. Carbohydrate Research, 2015, 402: 95-101.

- 生机理、含量检测及安全性评价研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(5): 275-280.
- [16] 曹少谦, 陈伟. 利用模拟体系研究水蜜桃汁的非酶褐变[J]. 浙江万里学院学报, 2011, 24(2): 73-77.
- [17] 黎婕, 陈中, 林伟锋, 等. 分光光度法分析柚子果肉汁的非酶褐变[J]. 食品工业科技, 2012(21): 33: 90-95.
- [11] 陈慰宗. 用介电常数检测油在使用过程中的质量变化[J]. 食品工业科技, 1999, 20(3): 62-63.
- [12] 冯宝萍. 介电常数与食用油质量[J]. 新乡教育学院学报, 2003, 16(1): 52-63.
- [13] 李剑, 党剑亮, 杨丽萍, 等. 三种植物绝缘油的理化与电气性能比较[J]. 重庆大学学报: 自然科学版, 2007, 30(9): 42-45.
- [14] Hu Li zhi, K Toyoda, I Ihara. Dielectric properties of edible oils and fatty acids as a function of frequency, temperature, moisture and composition [J]. Journal of Food Engineering, 2008 (88): 151-158.
- [15] 张俐, 马晓愚, 雷得天, 等. 基于食用植物油介电特性的试验研究[J]. 东北农业大学工程学院, 2008, 39(10): 108-111.
- [16] 陈慰宗, 宋应谦, 忽满利, 等. 食用油介电常数随加热时间和温度变化的实验[J]. 西北大学学报, 2000, 30(4): 300-301.
- [17] 郭文川, 吕俊峰, 谷洪超. 微波频率和温度对食用植物油介电特性的影响[J]. 农业机械学报, 2009, 40(8): 124-130.