

# 壳寡糖的制备及组分分析

纪莹<sup>1</sup>, 赵轶<sup>2</sup>周翔<sup>1</sup>, 翁登坡<sup>1</sup>, 赵鲁杭<sup>1</sup> (1. 浙江大学医学院生化教研室, 浙江 杭州 310006; 2. 浙江大学医学院附属妇产科医院, 浙江 杭州 310006)

**摘要:**目的 研究以壳六糖为主的壳寡糖制备工艺并对制备物组分进行分析。方法 用酶解法水解壳聚糖, 有机溶剂法提取壳寡糖, 色谱法分离纯化壳六糖, HPLC 法分析检测壳寡糖组分。结果 壳寡糖粗提物中的主要成分为 6-7 聚壳寡糖, 色谱分离得到较纯的壳六糖。结论 该制备工艺可以得到以 6-7 聚壳寡糖为主的壳寡糖制备物。

**关键词:**壳寡糖; 制备; 检测

中图分类号: R917.7; R931.7

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2003)03-0195-02

## The preparation of chitosan oligomer and the components analysis

Ji Ying<sup>1</sup>, Zhao Yi<sup>2</sup>, Zhou Xiang<sup>1</sup>, Weng Dengpo<sup>1</sup>, Zhao Lurhang<sup>1</sup> (1. Biochemistry Department of Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the preparation technology of chitohexose that is the main component, and to analyze the component of the preparing product. **METHOD** Chitosan was hydrolyzed with enzyme, then the chitosan oligomer was extracted with organic solvent, following by purifying the chitohexose by chromatograph method and detecting the chitosan oligomer component by HPLC. **RESULTS** The main component of the crude chitosan oligomer extract was 6-7 oligomer, the chitohexose could be separated by chromatograph. **CONCLUSION** The chitosan oligomer in which the main component was 6-7 oligomer could be produced by preparation technology.

**KEY WORDS:** chitosan oligomer; preparation; detection

几丁质又称甲壳素,是由乙酰氨基葡萄糖经  $\beta$ -1,4-糖苷键连接而成的聚合物,其不完全脱乙酰基后的产物为壳聚糖。几丁质或壳聚糖具有广泛的生物学作用,特别是具有提高机体免疫功能,抗肿瘤,抗感染等作用<sup>[1-3]</sup>。但由于它们不溶于水,其开发利用受到了很大程度的限制。壳寡糖为壳聚糖的降解物,具有良好的水溶性,并同时具有调节机体免疫功能和抗肿瘤等作用。Suzuki 等报道抗肿瘤效果最好的壳寡糖为壳六糖<sup>[4,5]</sup>。我们利用生物酶解工艺制备以六糖为主的壳寡糖,并利用色谱法进行壳寡糖的分离纯化,得到了较纯的壳六糖。壳寡糖的组成成分分析及质量标准控制是壳寡糖开发利用过程中需要解决的问题。我们利用 HPLC 法对制备和纯化的壳寡糖进行组分分析,建立了壳寡糖组分的 HPLC 分析方法。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验材料

壳寡糖(脱乙酰度 85% 以上), HCl, NaOH, 无水乙醇(分析纯), 甲醇, 乙腈(HPLC 级), 复合纤维素酶(浙江省微生物研究所邱晓力高级工程师提供), 色谱柱: TSK-Gel Amide-80 (Bio-Rad 公司), 层析树脂: Bio-Gel 6P。

#### 1.2 实验仪器

HPLC, 折光检测器(Waters 公司), 色谱收集系统

(Pharmacia 公司), 冷冻高速离心机(HITACHI), 冰冻干燥机(SAVANT 公司), 恒温水浴。

#### 1.3 壳寡糖的制备工艺

将 9g 壳聚糖溶于 300 mL HCl 溶液中, 调 pH 至 5.0, 加复合纤维素酶 1.5g, 50℃ 水浴酶解 48h, 用 NaOH 调 pH 至中性, 8000r/min 离心 10min, 去沉淀; 上清液加二倍体积的无水乙醇, 8000r/min 离心 10min, 取沉淀, 溶于适量去离子水中。冰冻干燥即为壳寡糖的粗提物。

#### 1.4 柱色谱分离纯化

取 Bio-Gel 6P 装柱, 柱长 160cm, 内径 1.5cm。取 300mg 壳寡糖粗提物, 溶于 1 mL 水中, 上样, 流速 5 mL/h, 每管 20min 分步收集。将收集液冰冻干燥, 进行 HPLC 分析。

#### 1.5 HPLC 分析

用 TSK-Gel Amide-80 柱进行 HPLC 分析, 视差检测器检测, 流动相为乙腈: 水 = 37: 63, pH 4.0, 柱温 25℃, 上样量 1  $\mu$ L。

#### 1.6 壳寡糖抗肿瘤作用

无菌取 S<sub>180</sub> 肉瘤, 制成 2 × 10<sup>7</sup> 细胞/mL 的细胞悬液, 皮下注射 S<sub>180</sub> 细胞悬液于 ICR 种小鼠(0.2 mL/只), 次日分组进行实验, 每组 10 只 ICR 种小鼠。实验组尾静脉注射 100 mg/kg 的壳寡糖, 对照组注射生理盐水, 停药次日处死

基金项目: 本项目由浙江省海洋局(9812102)和浙江省大仪办(01084)资助

小鼠,剥离实体瘤称重,计算抑瘤率(%)。

1.7 色谱分离纯化的样品用质谱进行相对分子质量分析。

## 2 结果

### 2.1 壳寡糖粗提物的 HPLC 分析

以四、五、六聚壳寡糖标准品为参照,制备的壳寡糖粗提物以六、七糖为主,见图 1、图 2。壳寡糖粗提品的得率为 30%左右。

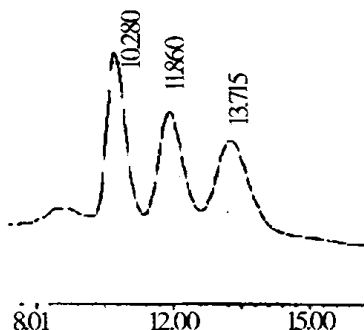


图 1 四、五、六聚壳寡糖标准品的 HPLC 图谱

$t_R$  分别为 10.28, 11.86, 13.715 min。

Fig 1 HPLC analysis of standard chitotetraose, chitopentaose and chitohexaose sample, the retention time was 10.28, 11.86, 13.715 min, respectively

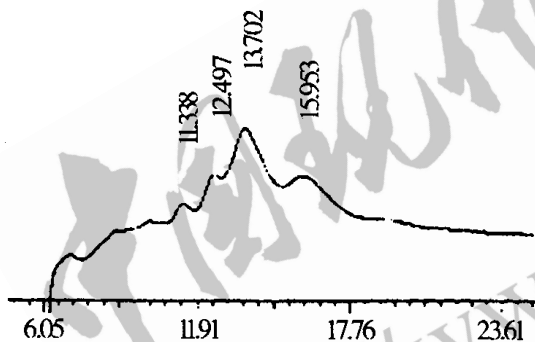


图 2 壳寡糖粗制品的 HPLC 图谱壳六糖  $t_R = 13.702$  min。

Fig 2 HPLC analysis of crude oligochitosan sample chito-hexaose  $t_R = 13.702$  min

2.2 用 TSK-Gel Amide-80 柱分离纯化壳寡糖粗提物,可以得到壳六糖占 95%以上的制备物,见图 3。

2.3 抑瘤实验结果:实验组和对照组瘤重的方差分析结果分别为  $1.266 \pm 0.354$  和  $2.130 \pm 0.235$ ,统计学处理实验组与对照组之间具有显著性差异( $t = 6.42, P < 0.001$ ),抑瘤率大于 30%。

2.4 质谱分析的结果表明:图 3 样本的主要成分的相对分子质量为 985.4217,表明是壳六糖。

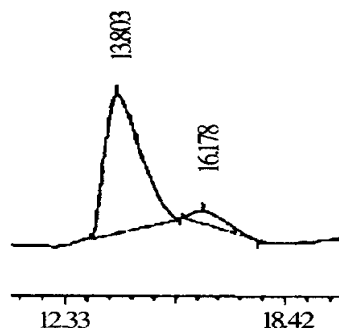


图 3 壳寡糖精制品的 HPLC 图谱

壳六糖  $t_R = 13.803$  min。

Fig 3 HPLC analysis of purified oligochitosan sample chito-hexaose  $t_R = 13.803$  min

## 3 讨论

壳寡糖一般是指聚合度小于 10 的(乙酰)氨基葡萄糖的聚合物,不同的聚合度的壳寡糖的抗肿瘤作用是不同的<sup>[4,5]</sup>,以壳六糖为最佳。我们利用生物酶解技术制备以 6-7 糖为主的壳寡糖,其制备工艺简单,产物纯度较高,壳寡糖粗提物的得率为 30%左右。但由于壳聚糖的脱乙酰度为 90%左右,而且分布并不均匀,故每个不同聚合度的壳寡糖可能含有一个、两个或不含有乙酰基,这可能是导致图 2 中不同糖之间未达到基线分离的原因,制备物经进一步处理后,可以得到以壳六糖为主的产品(大于 95%)。壳寡糖制备物对小鼠  $S_{180}$  肿瘤的抑瘤率大于 30%,说明壳寡糖具有较好地抑制肿瘤细胞生长的作用。

## 参考文献

- [1] Shibata Y, Foster LA, Metzger WJ, *et al.* Alveolar macrophage priming by intravenous administration of chitin particles, polymers of N-acetyl-D-glucosamine, in mice [J]. *Infect Immun* 1997; 65 (5): 1734.
- [2] Shibata Y, Foster LA, Bradfield JF, *et al.* Oral administration of chitin down-regulates serum IgE levels and lung eosinophilia in the allergic mouse [J]. *J Immunol* 2000; 164(3): 1314.
- [3] Shibata Y, Honda I, Justice JP, *et al.* The adjuvant N-acetyl-D-glucosamine polymer up-regulates Th1 immunity but down-regulates Th2 immunity against a mycobacterial protein (MPB-59) in interleukin-10-knockout and wild-type mice [J]. *Infect Immun* 2001; 69(10): 6123.
- [4] Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, *et al.* Antitumor effect of hexa-N-acetylchito-hexaose and chito-hexaose [J]. *Carbohydr Res* 1986; 151: 403.
- [5] Tsukada K, Matsumoto T, Aizawa K, *et al.* Antimetastatic and growth-inhibitory effects of N-acetylchito-hexaose in mice bearing Lewis lung carcinoma [J]. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81(3): 259.

收稿日期: 2002-08-28