

二维核磁共振谱在多糖结构研究中的应用

李 波^{1,2*}, 陈海华², 许时婴²

(1 河南科技学院食品学院, 新乡 453003; 2 江南大学食品学院, 无锡 214036)

摘 要: 二维核磁共振谱(2D NMR)是获取多糖结构信息, 尤其是在多糖序列分析方面的有力工具。本文重点介绍了在多糖结构解析中常用的几种 2D NMR 谱以及 2D NMR 解析多糖结构的方法。

关键词: 核磁共振; 二维核磁共振; 多糖; 结构

中图分类号: O65

Application of Two Dimension Nuclear Magnetic Resonance in the Structural Determination of Polysaccharide

LI Bo^{1,2*}, CHEN Hai-hua², XU Shi-ying²

(1. Food School, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China;

2. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract Two dimension nuclear magnetic resonance (2D NMR) is a powerful tool acquiring structural information of polysaccharide, especially in the sequence analysis of polysaccharide. Several 2D NMR spectra often used in polysaccharide structural analysis and the method for studying polysaccharide structure using 2D NMR are introduced in this paper.

Key words: nuclear magnetic resonance; 2D NMR; polysaccharide; structure

近年来, 多糖类化合物由于具有多方面的功能性质, 因而成为研究领域的一个热点, 多糖的结构及其构效关系也越来越引起人们的重视。

经典的分析方法如高碘酸氧化、Smith 降解和甲基化分析等, 对简单多糖的结构还能解析, 但对复杂的多糖则有些力不从心。尤其是对于糖基之间的连接序列, 往往只能依靠推测, 缺乏确凿的证据。核磁共振(NMR)方法引入多糖结构的研究后, 大大推动了这一领域的发展。早期 NMR 主要解决多糖结构中糖苷键的构型以及重复结构中单糖的数目, 随着 NMR 技术的发展, 尤其是二维核磁共振(2D NMR)的出现和发展, NMR 逐渐成为获得多糖结构信息最有力的工具。NMR 具有不破坏样品的优点, 因而在获取多糖的结构信息后, 所用的样品可以通过除去溶剂而回收。

目前, 国内有关 2D NMR 研究多糖结构的文献很少^[1,2], 相关介绍 2D NMR 的书籍又缺乏对多糖的

针对性^[3-6]。面对种类繁多的 2D NMR, 初学者往往感到无从下手, 而且限于条件, 也不可能每种 2D NMR 都去做一做。事实上, 不同的 2D NMR 谱, 它所提供的信息是不同的。对于多糖, 一般只需测定其中的几种 2D NMR 谱, 就能获得必要的结构信息。下面介绍 2D NMR 在多糖结构中的应用。

1 NMR 的准备工作

1.1 单糖组成和甲基化分析

对于结构复杂的多糖, 尤其是结构未知的多糖, 直接采用 NMR 分析结构难度很大, 也不可取, 因而在 NMR 分析之前最好做一些基础性的工作, 主要是单糖组成的测定和甲基化分析。而且, 这些前期的分析结果越准确越有助于对 NMR 结果的解析。

1.2 样品的制备

通常, 多糖的分子量越大, NMR 谱图中峰的重叠越严重, 也就越难解析, 如果多糖的分子量超过 2 万, 则有可能得不到十分清晰的图谱。当然, 这也与多糖结构的复杂程度有关, 不能一概而论。因此, 对

收稿日期: 2004-04-06 接受日期: 2004-05-12

*通讯作者 Tel: 86-373-3040977; E-mail: libowuxi@yahoo.com.cn

©1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

于分子量很大而结构又比较复杂的多糖,最好将多糖进行部分酸水解后再进行 NMR 分析。

多糖的分子量大,样品浓度最好超过 30 mg/mL,而且浓度越大,越有利于测定^[7]。但是,样品溶解后的粘度不能太大,要有一定的流动性,以使各部分的磁场均匀。样品管底部少量的沉淀不影响分析,关键是磁场扫描范围内的溶液要均匀一致。

测定多糖的溶剂一般是重水(D₂O)。国外有报道^[8,9]先用 D₂O 将样品冷冻干燥 3 次(或减压蒸发 3 次),以充分替换出样品中原有的 H₂O,再进行 NMR 测试。但若将固体样品直接溶于 D₂O 后进行 NMR 测试,一般也能得到比较满意的结果。内标通常用 TMS 和 DSS,也可以用甲醇、丙酮等来定标,但要注意所加入的溶剂不能破坏多糖的溶解性。

2 1D NMR 在多糖结构分析中的应用

2.1 ¹H NMR

¹H NMR 主要解决多糖结构中糖苷键构型的问题。通常 α 型糖苷的异头质子超过 $\delta 5.0$, β 型一般小于 $\delta 5.0$ 。此外,耦合常数 $^3J_{1,2}$ 对解析异头质子的构型也有帮助。如果异头质子同时满足化学位移小于 5.0 且 $^3J_{1,2}$ 大于 6,则认为是 β 型。反之,若化学位移大于 5.0 且 $^3J_{1,2}$ 小于 4,则认为是 α 型。 $^3J_{1,2}$ 的计算方法是谱峰的分裂间距(ppm)乘以仪器的工作频率。

此外,异头质子(H1)和 6 位脱氧糖的甲基(H6)信号的线宽和积分可用于区别糖单元的类型及其相对含量。

2.2 ¹³C NMR

¹³C NMR 的化学位移范围较宽,而且通常采用全去耦法,每一种化学等价的碳原子只有一条谱线,因而谱图的分辨率好,谱线很少重叠。

¹³C NMR 在多糖结构研究中的作用如下:1)确定糖残基的数目和相对含量。异头碳的共振信号出现在 $\delta 90 \sim 110$,由于所有异头碳的共振是非等价的且很少重叠,因而可根据这一范围内峰的个数来确定糖残基的数目,还可根据峰的相对高度来估算糖残基的相对比例。2)确定糖链的连接位置。糖环上某个位置的碳如发生取代,则其化学位移向低场移动 6~7 ppm。如 α -Glc 的 C4 的化学位移是 $\delta 70.6$,C4 被取代后化学位移变为 $\delta 78.1$ 。因此,如果糖残基的各个碳都得以归属,就可以通过与已知单糖的碳的化学位移进行比较^[7,10],确定糖链的连接位置。

3)确定硫酸基的取代位置^[11]。硫酸酯多糖中硫酸基的取代位置对多糖的生理功能有重要影响,若用红外光谱法来判定硫酸基的位置并不可靠^[12],¹³C NMR 可有效地解决这一问题。糖环上某一位置的碳若发生硫酸基的取代,则其化学位移向低场移动 6~9 ppm。因此,通过比较硫酸酯多糖脱硫前后的 ¹³C NMR 谱,就可以确定硫酸基在糖环上的取代位置。4)确定某些糖类。例如, $\delta 170 \sim 176$ 范围内的低场信号表明存在己糖醛酸的羧基或乙酰氨基, $\delta 16 \sim 18$ 范围内的高场信号表明有 6 位脱氧糖的甲基存在。5)确定异头碳的构型。多数 β 型异头碳的化学位移高于 α 型约 2~3 ppm,因而可对 H 谱的分析结果进一步确证。但此规律不适用于甘露糖和鼠李糖,因为它们的 α 与 β 化学位移几乎在同一位置。

3 2D NMR 在多糖结构分析中的应用

以上 ¹³C NMR 的应用大多建立在对多糖 ¹³C NMR 谱的全归属基础之上,而 2D NMR 对于多糖 ¹³C NMR 谱的全归属起着至关重要的作用。下面重点介绍几种在多糖结构研究中比较常用的 2D NMR 谱。

3.1 同核位移相关谱

3.1.1 COSY(化学位移相关谱, ¹H, ¹H Chemical Shift Correlation Spectroscopy)

COSY 能够提供糖环中相邻氢核之间的耦合关系。COSY 谱中,每个交叉峰反映了相邻氢核之间的耦合关系。交叉峰的强度与其有关的 3J 值密切相关, 3J 值大,交叉峰的强度就大,反之亦然。

由于异头质子易于确认,所以一般从异头质子的对角线峰出发,首先找到 H1/H2 的交叉峰,通过划线即可找出 H2 的对角线峰。再由 H2 的对角线峰出发,依次找出 H3~H6 的对角线峰和化学位移。

3.1.2 COSY-45(β -COSY)

COSY 的脉冲序列由两个 90° 的脉冲组成。如果减小第二个脉冲的宽度,使其倾角减小,则会对交叉峰及对角线峰的精细结构产生影响。在 COSY-45 中,第二个脉冲角度是 45°。与 COSY 相比, COSY-45 减少了平行跃迁间的磁化转移强度,限制了多重峰的间接跃迁,对角线峰则因自身的自相关峰消失而简化。因此, COSY-45 谱中的对角线峰沿对角线变窄,减少了对邻近的交叉峰的干扰,有利于复杂分子的密集峰群的解析。另外,从 COSY-45 还可判别耦合常数的符号。对于多糖,推荐采用 COSY-45 谱。

3.1.3 DQF-COSY(双量子滤波 COSY, Double Quantum Filtered COSY)

就自旋体系的识别而言, DQF-COSY 所能提供的信息与 COSY 毫无二致。DQF-COSY 的优点在于它抑制了强峰和溶剂峰, 而且由于对角线峰和交叉峰均为吸收型, 所以分辨率较高。然而, DQF-COSY 的灵敏度比同等条件下的 COSY 低。

3.1.4 TQF-COSY(三量子滤波 COSY)

TQF-COSY 只能显示至少三个以上两两耦合的自旋之间的交叉峰。对于糖环而言, 满足这一条件的质子一般只有 H5 和 H6(6 位通常有两个质子), 而在 COSY 谱中出现的其它谱峰均被“洗白”。因此, TQF-COSY 可以作为 COSY 谱的一个补充, 用于识别 H5 和 H6。

在很多情况下, 单靠 COSY 并不能完成多糖中各个糖环质子的识别。这种不完全的识别往往是由于缺乏质子间的交叉峰连接^[4]。交叉峰的缺失可能是由于以下原因造成的: 1) 也是最常见的原因, 是两个化学位移很接近而相互间的耦合又较强的两个质子的交叉峰很容易掩埋在对角线峰中; 2) 两个质子间的耦合太弱, 因而所形成的交叉峰强度太小, 难于观测; 3) 由于谱峰相互重叠, 有的交叉峰可能根本无法识别。总之, 还有必要做其它的一些实验作为补充才能完成谱峰的识别。

3.1.5 TOCSY(全相关谱, Total Correlation Spectroscopy)

COSY 给出的是相邻氢核间的相关峰, 而 TOCSY 给出的是同一自旋体系中所有氢核间的相关峰, 包括长程耦合和短程耦合。从任一谱峰出发, 可以找到好几个相关峰, 它们与该氢核处于同一自旋体系, 如 H1/H2, H1/H3, H1/H4 等, 因而可能克服一些 COSY 谱中由于谱峰重叠造成的困难。TOCSY 可以作为 COSY 谱的补充和验证。

3.1.6 NOESY(Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

NOESY 的外观与 COSY 相似, 其差别在于交叉峰表示的不是耦合关系, 而是 NOE 关系。通常间距小于 5 Å 的两个质子, 在谱上会出现交叉峰, 且空间距离越近, NOE 作用越强。对于多糖, NOESY 可作为 COSY 的补充来识别谱峰, 也可用来确定糖残基间的连接方式。

3.2 碳氢相关谱

3.2.1 HSQC(异核单量子相干, Heteronuclear Single-quantum Coherence)

HSQC 反映的是直接相连的 ^1H 、 ^{13}C 核之间的耦

合关系($^1J_{\text{CH}}$), 它的作用相应于 H, C-COSY。在用 H, H COSY 等将糖单元的氢核的化学位移进行归属后, 通过 HSQC, 就可将碳核的化学位移进行归属。此外, 如果某些氢核的谱峰由于重叠无法识别, 可以根据已识别的 ^1H 由 HSQC 推出相应的 ^{13}C , 然后再根据 ^{13}C NMR 谱的峰形和峰高, 结合甲基化分析的结果, 对未知的 ^1H 进行反推。

3.2.2 HMBC(异核多键相关, Heteronuclear Multiple-bond Correlation)

HMBC 把 ^1H 核与长程耦合的 ^{13}C 核关联起来, 其作用相应于长程 H, C-COSY, 它能提供分子骨架的结构信息。对于多糖, HMBC 可作为一种序列分析的工具给出糖单元间的连接次序。例如, 一种多糖由 A、B、C 三种糖单元组成, 在 HMBC 谱中, 出现 A-H1/B-C2、B-H1/C-C3、C-H1/A-C4 的相关峰, 则可以推定多糖有如下的结构单元: $-4\text{A}1-2\text{B}1-3\text{C}1-4\text{A}1-$ 。由此可见, HMBC 在多糖结构研究中是一个非常有用的工具, 它解决了糖残基连接序列的问题, 这是以前的分析手段(包括 1D NMR)难以做到的, 这也正是 2D NMR 的魅力所在。

3.3 2D NMR 的解析思路

对于多糖的结构分析, 必做的 2D NMR 谱为 COSY-45(或 DQF-COSY)、HSQC 和 HMBC。若条件允许, TQF-COSY、TOCSY 和 NOESY 也可做一做, 以帮助识别氢核。用 2D NMR 分析多糖结构的思路如下: 1) 首先由碳谱确定异头碳的数目。因为碳谱是全去耦谱, 一般一条谱线对应一种化学等价的碳原子, 而氢谱有耦合峰, 异头质子的数目不易确定, 且有些异头质子峰还可能被溶剂峰所掩盖; 2) 由异头碳的位移, 在 HSQC 谱中找出异头质子; 3) 从异头质子出发, 在 COSY-45(或 DQF-COSY)谱中, 找出其它氢核的化学位移。若不能完成识别, 可结合 TQF-COSY、TOCSY、NOESY 等帮助识别; 4) 由氢核的位移, 在 HSQC 谱中找出碳的位移。对于个别无法识别的碳, 可借助甲基化分析的结果进行推测; 5) 完成了氢和碳的归属后, 在 HMBC 谱中找出与某一个糖单元的异头质子和异头碳相关的另一个糖单元的碳和氢, 从而推出糖单元的连接次序; 6) 在得到多糖的初步结构后, 最好与甲基化分析的结果进行对照, 看是否有大的出入, 这样可以避免 2D NMR 谱中一些噪音峰和杂质峰所带来的干扰。

下面举一个例子。笔者在对羊栖菜褐藻糖胶的

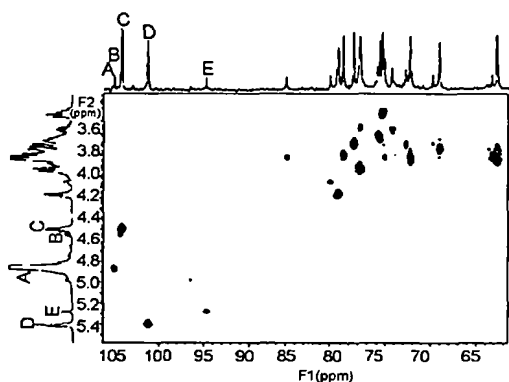


图1 羊栖菜褐藻糖胶 DSJL 的 HSQC 谱

Fig. 1 HSQC spectrum of DSJL

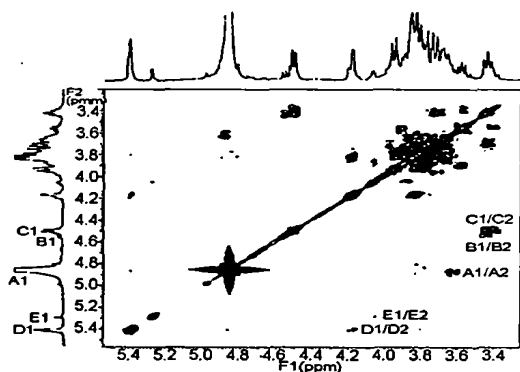


图2 羊栖菜褐藻糖胶 DSJL 的 COSY45 谱

Fig. 2 COSY45 spectrum of DSJL

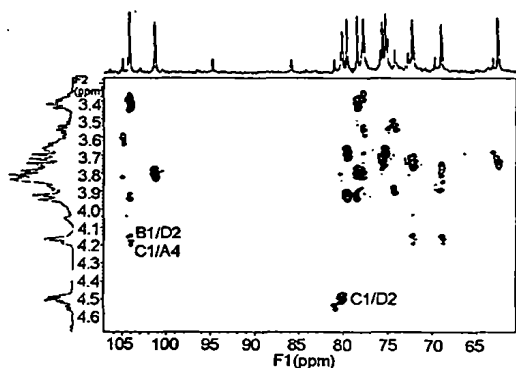


图3 羊栖菜褐藻糖胶 DSJL 的 HMBC 谱

Fig. 3 HMBC spectrum of DSJL

结构进行研究时,由于褐藻糖胶的分子量较大且组成复杂,因此将其部分酸水解后再用 2D NMR 进行分析。部分酸水解产物称为 DSJL,其分子量约为 1 万,主要由甘露糖、葡萄糖醛酸和葡萄糖组成,NMR 仪的工作频率为 400 MHz。首先由碳谱确定异头碳 A、B、C、D、E,再从 HSQC 谱(图 1)中找出异头质子。

从异头质子出发,在 COSY-45 谱(图 2)中,可找出其它氢核的化学位移。氢和碳的归属完成后,在 HMBC 谱(图 3)中可找到 B1/D2、C1/A4、C1/D2 和 D1/C4(在 HMBC 谱的其它区域,图 3 未显示)的相关峰,由此就能推出糖单元 A、B、C、D、E 之间的连接次序。

综上所述,2D NMR 在多糖结构研究中可以发挥重要的作用。虽然目前一些结构复杂、分子量大的多糖用 2D NMR 还不能完全解决问题,但相信随着 NMR 技术的不断发展,更多的多糖结构将会被解开。

参考文献

- 1 Yang JH(杨建红), Du YM(杜予民), Feng HQ(冯汉桥), *et al.* Studies on structural characterization of Chinese Lacquer polysaccharides by NMR. *J Changzhou Teachers Coll Tech* (常州技术师范学院学报), 1997, (12): 29-35
- 2 Wang Z(王展), Fang JN(方积年). Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy in the structural determination of polysaccharide. *Chinese J Anal Chem* (分析化学), 2000, 28: 240-247
- 3 Ning YC(宁永成). Structural Determination of Organic Compound and Organic Spectroscopy (有机化合物结构鉴定与有机波谱学), 2nd ed. Beijing: Science Publishing House, 2000
- 4 Xia YL(夏佑林), Wu JH(吴季辉), Liu Q(刘琴), *et al.* Multidimension NMR of Biomacromolecule (生物大分子多维核磁共振). Hefei: China Science and Technology University Publishing House, 1999
- 5 Ma LD(马礼敦). Higher Structural Analysis (高等结构分析). Shanghai: Fudan University Publishing House, 2002
- 6 Yang L(杨立). Concise Principle and Spectrum Analysis of two-dimension NMR (二维核磁共振简明原理及图谱解析). Lanzhou: Lanzhou University Publishing House, 1996
- 7 Zhang WJ(张惟杰). Biotechnology of Glycoconjugates (糖复合物生化研究技术) 2nd edition. Hangzhou: Zhejiang University Publishing House, 1999
- 8 Bilan IB, Grachev AA, Ustuzhanina NE, *et al.* Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus exanexens* C. Ag. *Carbohydrate Res*, 2002, 337: 719-730
- 9 Chizhov AO, Dell A, Morris HR, *et al.* A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydrate Res*, 1999, 320: 108-119
- 10 Yu DQ(于德泉), Yang JS(杨峻山). Analytical Chemistry Handbook, 7th Fascicule (分析化学手册, 第一分册-核磁共振波谱解析), 2nd ed. Beijing: Chemistry Industry Publishing House, 1999
- 11 Ribeiro A, Vieira RP, Mourao PA, *et al.* A sulfated α -L-fucan from sea cucumber. *Carbohydrate Res*, 1994, 255: 225-240
- 12 Lloyd AG, Dodgson KS, Price RG, *et al.* Infrared studies on sulphate esters. *Biochim Biophys Acta*, 1961, 46: 108-115