

低聚甘露糖醛二酸的制备方法

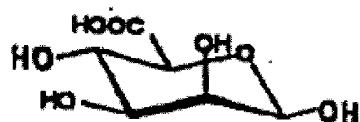
技术领域

本发明涉及一种重要的生物活性物质低聚甘露糖醛二酸的新制
5 备方法，该方法使用 M-段中间体作为起始原料，通过酸降解、活性
次溴酸氧化步骤得到目标物质。

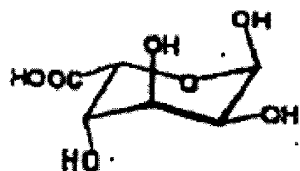
背景技术

低聚甘露糖醛二酸由于其潜在的药用价值已经受到广泛的重视。
10 低聚甘露糖醛二酸通常以海藻酸为原料经过多步骤制得。

在原料海藻酸的多糖分子中，有由甘露糖醛酸(D-mannuronic acid)
通过 β -1,4-糖苷键连接形成的 M 段、古罗糖醛酸(L-guluronic acid)
通过 α -1,4-糖苷键连接形成的 G 段，以及由这两种糖杂合形成的 MG
段。它们的结构式如下所示：

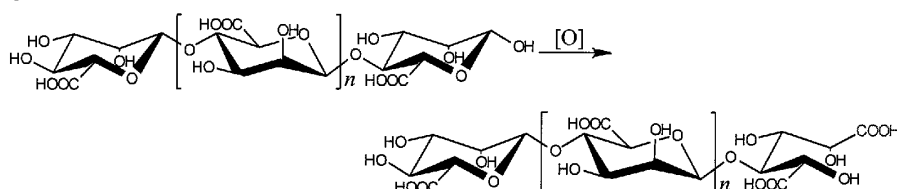


15

(M; β -D-甘露糖醛酸)(G; α -L-古罗糖醛酸)。

M 段和 G 段可以从原料海藻酸中分离。通常的方法可以简单描
述为：将海藻酸初步降解后可得到聚甘露糖醛酸和聚古罗糖醛酸的混
20 合多糖，混合多糖再经酸法沉淀后，可以除去其中的聚古罗糖醛酸，
进一步精制可以得到纯度在 90%以上的均聚甘露糖醛酸(下文中也称
“M 段中间体”)。例如，可参见中国专利申请 No.98806637.8 以及
CN02823707.2 所披露的方法。

耿美玉等人的中国专利申请 200580009396.5 及美国专利 US 8835403B2 披露了低聚甘露糖醛的衍生物——甘露糖醛二酸具有重要药用价值，该甘露糖醛二酸的反应过程可通过如下反应方程式 (I) 表示，即低聚甘露糖醛酸多糖还原端的甘露糖醛酸 C1-位醛基氧化成羧基。



在上述氧化转化过程中，常用的氧化剂有碱性硫酸铜溶液，即菲林试剂，美国专利 US8835403 即采用了该氧化方法，具体为：在碱性条件下，将反应底物低聚甘露糖醛酸加入硫酸铜溶液中，在沸水浴中反应 15 分钟至 2 小时。该法是以 Cu^{2+} 离子为氧化剂氧化醛基，反应中产生砖红色的氧化亚铜沉淀，这个反应常用于鉴定还原性糖。

葡萄糖氧化生成葡萄糖酸的反应与之类似，这类反应可以分成三类。第一类为生物发酵或者酶催化氧化：发酵法例如中国专利 96119169.4 采用黑曲霉发酵；美国专利 5,962,286、5,017,485 和 5,190,869 均采用微生物发酵法生产葡萄糖酸；葡萄糖氧化酶法例如美国专利 6,942,997、5,897,995 和 3,935,071。第二类为重金属催化氧化：美国专利 5,132,452 和 4,843,173 均采用钨催化氧化制备葡萄糖酸。第三类为化学试剂：双氧水氧化葡萄糖制备葡萄糖酸，中国专利号 2011103384029。

以上的这些方法都存在不足：生物发酵和酶催化生产周期长，成本高；重金属催化剂容易失活，且容易引入重金属残留；氢氧化铜或双氧水反应均需 100°C 左右的高温，副反应较多，产率低 ($<50\%$)。

发明内容

本发明人发现，通过使用特定的氧化剂，大大地提高了反应收率，并且使得生成低聚甘露糖醛二酸的反应速度快，副反应少，反应以后的产物可以通过加入足量的甲醇或乙醇使反应终止并得到油状沉淀，

由分液漏斗将油状物分离出来，干燥，即得。如需精制以除去单糖、盐和有机酸杂质，可以进一步通过透析或者柱层析的方法实现，操作简单。

本发明具体涉及一种氧化制备低聚甘露糖醛二酸的方法，通过采用 M-段中间体作为原料，首先将 M-段中间体进一步降解，形成 M 段寡糖（本文中也称为“低聚甘露糖醛酸”），然后以该 M 段寡糖为原料，溴水或活性次溴酸盐等能够通过次溴酸起作用的含溴物质为本发明中使用的氧化剂，反应生成低聚甘露糖醛二酸。

本发明第一个方面提供一种低聚甘露糖醛二酸的制备方法，包括使低聚甘露糖醛酸与含溴氧化剂接触的氧化反应步骤。特别地，可用于本发明的含溴氧化剂选自溴水、液溴、次溴酸、次溴酸盐、溴离子源与次氯酸盐的组合、或者溴与次氯酸盐的组合。这些氧化剂通过溴离子或次溴酸根离子起作用。在本发明的一个实施方案中，以次溴酸计的含溴氧化剂和/或次氯酸盐的摩尔用量为反应原料低聚甘露糖醛酸的 1.0-2.0 倍。

本发明的另一个方面提供了通过溴离子或次溴酸根离子（ BrO^- ）起作用的氧化剂在用于氧化还原性寡糖或者多糖中的用途。

本发明的低聚甘露糖醛二酸的制备方法可以采用温和的反应条件实现，副反应少，不需要进一步纯化，收率可达 90% 以上，甚至达 95% 以上。本发明的氧化反应速度快产率高，室温下即可反应，适合用在线连续反应装置生产，反应过程易于实现自动化控制。所选氧化剂价格便宜，操作简单，适合大规模制备。

附图说明

- 图 1 是本发明的原料 M 段中间体的核磁共振氢谱（ $^1\text{H-NMR}$ ）。
图 2 是溴水氧化得到低聚甘露糖醛二酸的 SEC-HPLC 图。
图 3 是液溴氧化得到低聚甘露糖醛二酸的 SEC-HPLC 图。
图 4 是 NaBrO 氧化得到低聚甘露糖醛二酸的 SEC-HPLC 图。
图 5 是溴化钠催化-次氯酸钠氧化得到低聚甘露糖醛二酸的

SEC-HPLC 图。

图 6 是溴-次氯酸钠氧化得到低聚甘露糖醛二酸的 SEC-HPLC 图。

图 7A 和 7B 分别是甘露糖醛酸六糖组份氧化前后的 LC-MS 图(被溴水-次氯酸钠氧化)。

5

具体实施方式

本文中使用的术语“约”是指在所修饰数值的 $\pm 5\%$ 范围内，在优选实施方案中，是指在所修饰数值的 $\pm 3\%$ 范围内，在更优选的实施方案中，是指在所修饰数值的 $\pm 1\%$ 范围内。

10

M 段中间体的制备

本发明中采用的原料 M 段中间体可以通过现有技术中已知的方法制备。例如中国专利申请 No.98806637.8 以及 CN02823707.2 所披露的方法。这些方法可以简单描述为：将海藻酸初步降解后得到聚甘露糖醛酸和聚古罗糖醛酸的混合多糖，混合多糖再经酸法沉淀后除去其中的聚古罗糖醛酸，进一步精制可以得到纯度在 90%以上的均聚甘露糖醛酸。

15

根据该方法制备的 M-段中间体具有约 10 KDa 左右的分子量，结构经核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)确证，见图 1。在一个具体的方案中，核磁共振氢谱中化学位移值 4.5ppm 附近只有一个端基质子信号，归属为甘露糖醛酸 C1-位的 ^1H ，3.5ppm~3.9ppm 之间，有 4 个氢信号，归属为 C2-C5 四个 ^1H 信号。由此获得的 M 段中间体可以直接用于下一步反应。

20

在一个优选的实施方案中，适合用于发明的 M 段中间体的纯度为 60%以上，优选 70%以上，更优选 80%以上。分子量范围为 1-15 KDa，优选 2-12 KDa，更优选 4-10 KDa。

25

M 段寡糖的制备

采用 M 段中间体作为原料, 将其进行酸降解, 可以获得待氧化的 M 段寡糖。将 M 段中间体溶于水中, 配制成浓度为 15% (w/v) 以上的浓溶液, 然而进行酸降解。优选地, 配制的溶液浓度为 20% (w/v) 以上, 更优选 25% (w/v) 以上。

- 5 随后, 将溶液的 pH 调节至酸性, 优选 5 以下, 更优选 4 以下, 最优选 3.5 以下, 于高温高压下进行降解, 自然冷却至室温。

酸降解在高温高压条件下进行。温度为 95-150°C, 优选 100-130°C, 更优选 105-120°C。压力为 0.10-0.50MPa, 优选 0.10-0.28MPa, 更优选 0.15-0.20MPa。

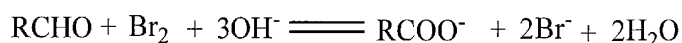
- 10 降解后的溶液进行浓缩, 蒸发和干燥, 以获得干燥的固体。

M 段寡糖包含二糖至十三糖的混合物。其中, 基于二糖至十三糖的混合物的重量计, 二-四聚糖为约 40-60%, 优选约 50%, 五至十聚糖为约 30-50%, 优选 40%, 十一至十三聚糖为约 5-15%, 优选约 10%。

15 活性次溴酸盐氧化步骤

- 将由前述步骤制得的干燥的 M 段寡糖氧化, 制成本发明的低聚甘露糖醛二酸。此步骤中所用的氧化剂为含溴氧化剂。特别地, 这些含溴氧化剂选自溴水、液溴、次溴酸、次溴酸盐、溴离子源与次氯酸盐的组合、或者溴与次氯酸盐的组合。由于次溴酸盐或次溴酸根离子不稳定, 本发明的方法中所采用的次溴酸盐可以在反应体系中原位生成, 或者在加入反应液之前现场制备。
- 20

- 在本发明的一个实施方案中, 使用溴水或液溴作为氧化剂。溴水作为市售产品, 可以由供应商处获得, 通常市售的溴水浓度为 3%。
- 25



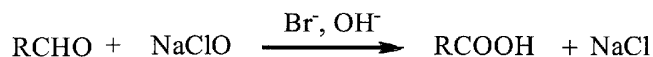
在本发明的一个实施方案中, 使用次溴酸盐作为氧化剂。次溴酸盐可以是次溴酸钠和/或次溴酸钾。次溴酸盐通过在反应介质中加入液

溴和碱原位制备。例如，采用液溴与 NaOH 或 KOH 的混合物制备。

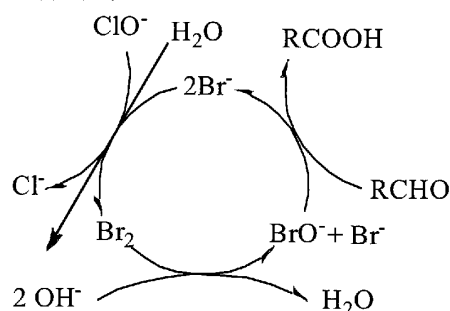
以次溴酸钠为例，如此进行的氧化反应化学方程式如下：



- 5 在本发明的另一个实施方案中，次溴酸盐可以通过金属溴化物与次氯酸钠或次氯酸钾随反应的进行原位制备。反应过程中，反应溶液先褪色，之后逐渐出现红棕色（表明有 Br_2 生成），随着反应的进行，颜色褪去。以次氯酸钠为例，所进行的氧化反应化学方程式如下：

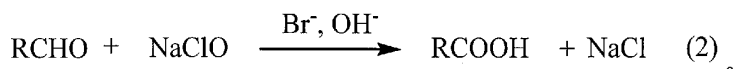
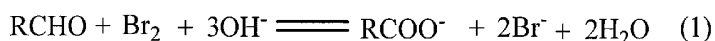


Reaction Mechanism



10

或者，在另一个实施方案中，可以使用溴水与次氯酸钠或次氯酸钾反应，原位生成次溴酸盐。同样以次氯酸钠为例，反应式如下：



- 该方案中，加入的溴氧化了部分的反应原料低聚甘露糖醛酸，并且产生溴离子；溴离子又可以继续催化次氯酸钠与未反应的原料继续反应，直到反应完成。
- 15

本发明的氧化步骤进行的 pH 值为 6-10，优选 6.5-9.6，更优选 7.5-9.5。本发明的氧化步骤进行的温度优选为 0-70°C，更优选 10-45°C。

由此制备的低聚甘露糖醛二酸可以进行纯化。例如,可以使用醇,诸如乙醇、甲醇等进行沉淀,然后将沉淀复溶,二次醇沉,分液漏斗分离油状沉淀,将该油状沉淀物干燥,获得期望的低聚甘露糖醛二酸。如需精制以进一步除去产品中残留的单糖、有机酸杂质和无机盐,可以通过透析膜透析或者柱层析的方法实现。这些操作是本领域技术人员所已知的,实例可参见本发明说明书下文中给出的实施例。

本发明的另一个方面提供了通过溴离子或次溴酸根离子 (BrO^-) 起作用的氧化剂在用于氧化还原性寡糖或者多糖中的用途,其中所述氧化剂选自溴水、液溴、原位生成次溴酸盐的混合物、金属溴化物与次氯酸盐的组合、以及溴-次氯酸钠的组合。

在一个实施方案中,其中所述还原性寡糖或者多糖的还原端糖环上的 C1-位醛基或者半缩醛被氧化成羧基,生成相应的糖酸或者糖二酸。在一个实施方案中,其中所述还原性寡糖或者多糖选自聚甘露糖醛酸或聚古罗糖醛酸,优选聚甘露糖醛酸。

本发明的优点在以下非限制性的实施例中进一步进行说明。但实施例中采用的具体材料及其用量,以及其他实验条件并不应理解为对本发明的限制。除非特别指明,本发明中份数、比例、百分比等均以质量计。

实施例

实施例 1:

步骤 1): M 段寡糖的制备

称取 1500g M-段中间体,加蒸馏水溶解后,配成 7500ml 体积的溶液,用浓盐酸调 pH 至 3.5,分成若干份,放入高压灭菌锅内加热 110°C ,保持 3.5hr,冷却,取出,旋转蒸发仪中浓缩, 60°C 真空干燥箱烘干,即得 M-段寡糖 1515g。

采用高效液相色谱-质谱联用仪 (HPLC-MS) 对 M-段寡糖进行定

性分析。HPLC 条件：色谱柱 Waters ACQUITY UPLC BEH125 SEC 1.7 μ m, 4.6 $\times$ 300mm；流动相：50mM NH₄Ac 溶于 20%甲醇-水，流速 0.1ml/min；样品浓度：1mg/ml；进样体积：8 μ l；柱温箱温度：30℃；检测器：DAD 检测器，210nm。质谱条件：Agilent 6540 QTOF；离子源：ESI 碎裂电压 120V；负离子模式。

酸降解得到的 M-段寡糖产物均为低聚甘露糖醛酸，以二糖到十三糖为主。二糖到十三糖的质谱分析见下表 1 的左半部分。

步骤 2)：低聚糖醛二酸的制备

取 100g 上述干燥的 M-段寡糖，放入 5L 的玻璃烧杯中，加 1L 蒸馏水溶解，加入 1M Na₂HPO₄ 1L，用浓盐酸调 pH 至 8.0。室温（20℃）搅拌下，缓慢加入 3%浓度的商品化溴水 3.3L。10 分钟内加入完以后，继续搅拌 2 小时即反应完全。

将反应后的溶液倾入装有 4L 95%乙醇的塑料桶中，稍微搅拌后静置 1hr。静置分层后，倾出上清，下层加入适量 95%乙醇脱水，收集下层黄褐色油状物，真空干燥箱减压干燥（60℃）12 小时，即得干燥后的氧化产物——低聚甘露糖醛二酸 125g。取出少量干燥的低聚甘露糖醛二酸，准确称量为 5.0g，加水溶解，配成 10%的溶液后，用截留分子量为 1000Da 的透析袋透析脱盐，同时除去单糖。脱盐后浓缩干燥，称得 3.8g。从氧化反应的原料 100g M-段寡糖开始计算，脱盐干燥后的低聚甘露糖二酸的得率为 95.0%。

采用高效液相色谱-质谱联用仪（HPLC-MS）对上述脱盐干燥后的产物进行定性分析。HPLC 条件：色谱柱 Waters ACQUITY UPLC BEH125 SEC 1.7 μ m, 4.6 $\times$ 300mm；流动相：50mM NH₄Ac 溶于 20%甲醇-水，流速 0.1ml/min；样品浓度：1mg/ml；进样体积：8 μ l；柱温箱温度：30℃；检测器：DAD 检测器，210nm。质谱条件：Agilent 6540 QTOF；离子源：ESI 碎裂电压 120V；负离子模式。氧化反应完成度大于 95%，且无其他副反应发生。脱盐操作除去了大部分的一糖和少

量的二糖。氧化产物低聚甘露糖醛二酸的二糖至十三糖的质谱解析见下表 1 右部。

表 1 低聚甘露糖醛酸及其氧化产物的质谱解析

低聚糖醛酸	m/z	信号归属	低聚糖醛二酸	m/z	信号归属
二糖	739.14	$[2M-H]^-$	二糖	771.14	$[2M-H]^-$
	369.07	$[M-H]^-$		385.07	$[M-H]^-$
三糖	545.10	$[M-H]^-$	三糖	561.10	$[M-H]^-$
				280.05	$[M-2H]^{2-}$
四糖	721.13	$[M-H]^-$	四糖	737.12	$[M-H]^-$
	360.06	$[M-2H]^{2-}$		368.06	$[M-2H]^{2-}$
五糖	897.17	$[M-H]^-$	五糖	913.15	$[M-H]^-$
	448.08	$[M-2H]^{2-}$		456.07	$[M-2H]^{2-}$
六糖	1073.20	$[M-H]^-$	六糖	1089.21	$[M-H]^-$
	536.09	$[M-2H]^{2-}$		544.10	$[M-2H]^{2-}$
七糖	1249.23	$[M-H]^-$	七糖	1265.21	$[M-H]^-$
	624.11	$[M-2H]^{2-}$		632.10	$[M-2H]^{2-}$
八糖	712.13	$[M-2H]^{2-}$	八糖	1441.28	$[M-H]^-$
				720.14	$[M-2H]^{2-}$
九糖	1601.97	$[M-H]^-$	九糖	1617.30	$[M-H]^-$
	800.14	$[M-2H]^{2-}$		808.15	$[M-2H]^{2-}$
十糖	888.16	$[M-2H]^{2-}$	十糖	538.43	$[M-3H]^{3-}$
				896.17	$[M-2H]^{2-}$
十一糖	976.17	$[M-2H]^{2-}$	十一糖	597.11	$[M-3H]^{3-}$
	650.45	$[M-3H]^{3-}$		984.19	$[M-2H]^{2-}$
十二糖	1064.69	$[M-2H]^{2-}$	十二糖	655.79	$[M-3H]^{3-}$
	709.13	$[M-3H]^{3-}$		1072.20	$[M-2H]^{2-}$
十三糖	1152.70	$[M-2H]^{2-}$	十三糖	714.47	$[M-3H]^{3-}$
	768.14	$[M-3H]^{3-}$		535.60	$[M-4H]^{4-}$
				1160.72	$[M-2H]^{2-}$
				773.15	$[M-3H]^{3-}$
				579.61	$[M-4H]^{4-}$

5 实施例 2:

取 100g 实施例 1 中制备的 M-段寡糖, 放入 5L 的玻璃烧杯中, 加 1L 蒸馏水溶解, 加入 1M Na_2HPO_4 1L, 用浓盐酸调 pH 至 6.5。水浴锅加热至 40℃, 搅拌, 缓慢加入 3%浓度的商品化溴水 1.7L。10 分钟内加入完以后, 继续搅拌 3 小时后, 加 2 倍体积的 95%乙醇中止

反应，并使产物沉淀。沉淀用适量水溶解后，重复一次醇沉操作。沉淀最后在真空干燥箱中干燥，得褐色块状固体 96g，得率约为 96%。HPLC-MS 分析该固体物质的组成，实验条件同实施例 1，SEC-HPLC 分析结果见图 2A。

5

实施例 3:

取 100g 实施例 1 中制备的 M-段寡糖，放入 5L 的玻璃烧杯中，加 1L 蒸馏水溶解，加入 1M Na_2HPO_4 1L，用浓盐酸调 pH 至 9.5。在水浴锅中加适量冰块冷却至 10℃，搅拌，缓慢加入 3%浓度的商品化溴水 4.7L。10 分钟内加入完以后，继续搅拌 1 小时后，加 2 倍体积的 95%乙醇中止反应，并使产物沉淀。沉淀用适量水溶解后，重复一次醇沉操作。沉淀最后在真空干燥箱中干燥，得褐色块状固体 94g，得率约为 94%。HPLC-MS 分析该固体物质的组成，实验条件同实施例 1，SEC-HPLC 分析结果见图 2B。

15

实施例 4:

将实施例 1 中制备的 M-段寡糖取出 100g，溶于 500ml 1M Na_2HPO_4 缓冲液中，加盐酸调 pH 至 8.0，在冰水浴中搅拌使冷却，然后缓慢滴入 100g（约 35ml）液溴（市售，含量>99%）。在滴入液溴的同时，补加 6M NaOH 适量，用 pH 试纸检测，控制反应液的 pH 在 7-9 之间。待液溴滴加完以后，移除冰水浴，室温（23℃）搅拌 1.5hr 后，加 2 倍体积的 95%乙醇中止反应，并使产物沉淀。沉淀用适量水溶解后，重复一次醇沉操作。沉淀最后在真空干燥箱中干燥，得褐色块状固体 97g，得率约为 97%。HPLC-MS 分析该固体物质的组成，实验条件同实施例 1，SEC-HPLC 分析结果见图 3A。

25

实施例 5:

将实施例 1 中制备的 M-段寡糖取出 100g，溶于 500ml 1M Na_2HPO_4 缓冲液中，加盐酸调 pH 至 6.5，在冰水浴中搅拌使冷却，然

后缓慢滴入 60g (约 20ml) 液溴 (市售, 含量>99%)。在滴入液溴的同时, 补加 6M NaOH 适量, 用 pH 试纸检测, 控制反应液的 pH 在 7-9 之间。待液溴滴加完以后, 移除冰水浴, 水浴锅加热至 40℃, 搅拌 3hr 后, 加 2 倍体积的 95%乙醇中止反应, 并使产物沉淀。沉淀用
5 适量水溶解后, 重复一次醇沉操作。沉淀最后在真空干燥箱中干燥, 得褐色块状固体 94g, 得率约为 94%。HPLC-MS 分析该固体物质的组成, 实验条件同实施例 1, SEC-HPLC 分析结果见图 3B。

实施例 6:

10 将实施例 1 中制备的 M-段寡糖取出 100g, 溶于 500ml 1M Na₂HPO₄ 缓冲液中, 加盐酸调 pH 至 9.5, 在冰水浴中搅拌使冷却, 然后缓慢滴入 150g (约 50ml) 液溴 (市售, 含量>99%)。在滴入液溴的同时, 补加 6M NaOH 适量, 用 pH 试纸检测, 控制反应液的 pH 在 7-9 之间。待液溴滴加完以后, 移除冰水浴, 在水浴锅中加入适量冰
15 块使之溶解后温度达到 10℃, 并随时补充冰块, 使温度控制在 10℃, 搅拌 1hr 后, 加 2 倍体积的 95%乙醇中止反应, 并使产物沉淀。沉淀用适量水溶解后, 重复一次醇沉操作。沉淀最后在真空干燥箱中干燥, 得褐色块状固体 93g, 得率约为 93%。HPLC-MS 分析该固体物质的组成, 实验条件同实施例 1, SEC-HPLC 分析结果见图 3C。

20

实施例 7:

将实施例 1 中制备的 M-段寡糖取出 100g, 溶于 500ml 1M Na₂HPO₄ 缓冲液中, 加盐酸调 pH 至 8.0, 获得 M 段寡糖溶液。配置 6M NaOH 溶液 100ml, 在冰水浴中冷却。液溴也在冰水浴中预冷。反
25 应时, 先把 NaOH 溶液和液溴预先反应生成次溴酸钠, 次溴酸钠再与 M-段寡糖反应。

因次溴酸钠不稳定, 需要临时制备, 立即使用, 故采用在线连续反应装置: 该反应装置包含带有冷却部件的混合反应器 A 和混合反应器 B, 体积分别为 50ml 和 100ml, 并预先充满蒸馏水; NaOH 溶液和

液溴分别通过塑料针筒手动匀速、持续泵入，流速分别为 5ml/min 和 1ml/min，同时在反应器 A 的冷凝管中通入-10℃的冷却液；NaOH 溶液和液溴在混合反应器 A 中反应一段时间后，生成的 NaBrO 离开反应器 A 进入反应器 B 中，在反应器 B 中与泵入的 M-段寡糖溶液（流速为 10ml/min）反应，反应在室温下进行。产物低聚甘露糖醛二酸从混合反应器 B 中的流出流速为 16ml/min。流出液收集在装有 800ml 95% 乙醇的烧杯中。

反应完成后，将烧杯中下层黄褐色油状沉淀收集，加适量水溶解后，重复一次醇沉操作，真空干燥箱中减压干燥（60℃，12hr），得 90g 褐色固体，得率约为 90%。干燥产品取少量用 HPLC-MS 分析，SEC-HPLC 分析结果见图 4A。

实施例 8:

将实施例 1 中制备的 M-段寡糖取出 100g，溶于 500ml 1M Na₂HPO₄ 缓冲液中，加盐酸调 pH 至 6.5。配置 6M NaOH 溶液 100ml，在冰水浴中冷却。液溴也在冰水浴中预冷。反应时，先把 NaOH 溶液和液溴预先反应生成次溴酸钠，次溴酸钠再与 M-段寡糖反应。

反应装置同实施例 7。NaOH 溶液和液溴进入反应器 A 的流速分别为 3ml/min 和 0.6ml/min；反应器 B 中的 M-段寡糖溶液流速为 10ml/min，该反应由水浴锅控制温度为 40℃。产物低聚甘露糖醛二酸从混合反应器 B 中的流出流速为 14ml/min。流出液收集在装有 800ml 95%乙醇的烧杯中。反应完成后，将烧杯中下层黄褐色油状沉淀收集，加适量水溶解后，重复一次醇沉操作，沉淀最后在真空干燥箱中减压干燥（60℃，12hr），得 93g 褐色固体，得率约为 93%。干燥产品取少量用 HPLC-MS 分析，SEC-HPLC 分析结果见图 4B。

实施例 9:

将实施例 1 中制备的 M-段寡糖取出 100g，溶于 500ml 1M Na₂HPO₄ 缓冲液中，加盐酸调 pH 至 9.5，得到 M-段寡糖液。配置 6M

NaOH 溶液 100ml, 在冰水浴中冷却。液溴也在冰水浴中预冷。反应时, 先使 NaOH 溶液和液溴预先反应生成次溴酸钠, 次溴酸钠再与 M-段寡糖反应。

反应装置同实施例 7。反应器 A 中 NaOH 溶液和液溴流速分别为
5 7.5ml/min 和 1.5ml/min; 反应器 B 中 M-段寡糖溶液流速为 10ml/min, 该反应在 10℃控温下进行。产物低聚甘露糖醛二酸从混合反应器 B 中的流出流速为 19ml/min。流出液收集在装有 800ml 95%乙醇的烧杯中。反应完成后, 将烧杯中下层黄褐色油状沉淀收集, 加适量水溶解后, 重复一次醇沉操作, 沉淀最后在真空干燥箱中减压干燥 (60℃,
10 12hr), 得 94g 褐色固体, 得率约为 94%。干燥产品取少量用 HPLC-MS 分析, SEC-HPLC 分析结果见图 4C。

实施例 10:

将实施例 1 中制备的 M-段寡糖取出 100g, 溶于 500ml 1M
15 Na_2HPO_4 缓冲液中, 加盐酸调 pH 至 7.5, 加入溴化钠 20g, 搅拌溶解后, 在室温 (18℃) 下, 滴加次氯酸钠 (市售 13%溶液) 50ml。反应液先褪色, 逐渐出现红棕色, 反应一段时间后, 颜色褪去。反应 3 小时以后, 颜色变橙黄色。

将反应液倒入装有 600ml 95%乙醇的烧杯中, 混匀, 静置分层。
20 下层液加适量水溶解后, 用 2 倍体积的 95%乙醇重复沉淀一次, 60℃真空干燥箱中减压干燥 12hr。干燥后得褐色固体 97g, 得率约为 97%。取少量用 HPLC-MS 分析, SEC-HPLC 分析结果见图 5A。

实施例 11:

25 将实施例 1 中制备的 M-段寡糖取出 100g, 溶于 500ml 1M Na_2HPO_4 缓冲液中, 加盐酸调 pH 至 6.5, 加入溴化钠 20g, 搅拌溶解后, 在 40℃下, 滴加次氯酸钠 (市售 13%溶液) 25ml。反应液先褪色, 逐渐出现红棕色, 反应一段时间后, 颜色褪去。反应 3 小时以后, 颜色变橙黄色。将反应液倒入装有 600ml 95%乙醇的烧杯中, 混匀,

静置分层。下层液加适量水溶解后，用 2 倍体积的 95%乙醇重复沉淀一次，60℃真空干燥箱中减压干燥 12hr。干燥后得褐色固体 90g，得率约为 90%。取少量用 HPLC-MS 分析，SEC-HPLC 分析结果见图 5B。

5 实施例 12:

将实施例 1 中制备的 M-段寡糖取出 100g，溶于 500ml 1M Na_2HPO_4 缓冲液中，加盐酸调 pH 至 9.5，加入溴化钠 20g，搅拌溶解后，在 40℃下，滴加次氯酸钠（市售 13%溶液）75ml。反应液先褪色，逐渐出现红棕色，反应一段时间后，颜色褪去。反应 1 小时以后，
10 颜色变橙黄色。将反应液倒入装有 600ml 95%乙醇的烧杯中，混匀，静置分层。下层液加适量水溶解后，用 2 倍体积的 95%乙醇重复沉淀一次，60℃真空干燥箱中减压干燥 12hr。干燥后得褐色固体 96g，得率约为 96%。取少量用 HPLC-MS 分析，SEC-HPLC 分析结果见图 5C。

15 实施例 13:

将实施例 1 中制备的 M-段寡糖取出 100g，溶于 500ml 1M Na_2HPO_4 缓冲液中，加盐酸调 pH 至 8.5，在室温搅拌下滴入 10ml 液溴，待滴加完成以后，继续滴加 35ml 次氯酸钠溶液（市售，13%浓度），反应 1hr。反应完成后，加 2 倍体积的 95%乙醇中止反应，静置
20 分层，下层黄褐色油状沉淀加适量水溶解后，重复一次醇沉操作，沉淀最后在真空干燥箱中减压干燥得 91g，得率约为 91%。取少量样品用 HPLC-MS 分析，SEC-HPLC 分析结果见图 6A。

实施例 14:

25 将实施例 1 中制备的 M-段寡糖取出 100g，溶于 500ml 1M Na_2HPO_4 缓冲液中，加盐酸调 pH 至 6.5，水浴锅加热至 40℃，搅拌下滴入 8ml 液溴，待滴加完成以后，继续滴加 20ml 次氯酸钠溶液（市售，13%浓度），反应 3hr。反应过程如实施例 13 中的式（V）所示。加入的溴氧化了部分的反应原料低聚甘露糖醛酸，并且产生溴离子；

溴离子又可以继续催化次氯酸钠与未反应的原料继续反应，直到反应完成。反应完成后，加 2 倍体积的 95%乙醇中止反应，静置分层，下层黄褐色油状沉淀加适量水溶解后，重复一次醇沉操作，沉淀最后在真空干燥箱中减压干燥得 96g，得率约为 96%。取少量样品用
5 HPLC-MS 分析，SEC-HPLC 分析结果见图 6B。

实施例 15:

将实施例 1 中制备的 M-段寡糖取出 100g，溶于 500ml 1M Na_2HPO_4 缓冲液中，加盐酸调 pH 至 9.5，水浴锅中加入冰块控制温度为 10℃，搅拌下滴入 15ml 液溴，待滴加完成以后，继续滴加 50ml
10 次氯酸钠溶液（市售，13%浓度），反应 0.5hr。反应过程如实施例 13 中的式(V)所示。加入的溴氧化了部分的反应原料低聚甘露糖醛酸，并且产生溴离子；溴离子又可以继续催化次氯酸钠与未反应的原料继续反应，直到反应完成。反应完成后，加 2 倍体积的 95%乙醇中止反
15 应，静置分层，下层黄褐色油状沉淀加适量水溶解后，重复一次醇沉操作，沉淀最后在真空干燥箱中减压干燥得 94g，得率约为 94%。取少量样品用 HPLC-MS 分析，SEC-HPLC 分析结果见图 6C。

实施例 16:

20 将实施例 1 中制备的 M-段寡糖取出 10g，溶于水中，配成 0.1g/ml，采用 Bio-Gel P6 凝胶色谱柱分离，0.02M 的 NaCl 洗脱，紫外 210nm 检测，自动收集器收集，合并相同组份，Bio-Gel P10 凝胶色谱柱脱盐，干燥，得到 10 个寡糖组份。将其中的一个寡糖组份标记为 HexaM。HexaM 经 HPLC-MS 分析显示其中以寡聚甘露糖醛酸六糖为主，还含
25 有少量五糖和七糖，具体见附图 7A。

称取上述 HexaM 0.5g，溶于 5ml 水并转移至 50ml 圆底烧瓶中，加 1M Na_2HPO_4 5ml，用 6M HCl 调 pH 至 7.9，室温 20℃，磁力搅拌器搅拌，滴加 1.0ml 市售 3%浓度的溴水，搅拌 30min 后，滴入 0.5ml 次氯酸钠（市售 13%浓度），继续搅拌 1hr 后，加入 10ml 95%乙醇，

终止反应，并生成沉淀，加 10ml 水复溶后，加乙醇二次沉淀，吸管
移除上清，取出沉淀，真空干燥箱中 60℃干燥，得 0.48g 固体。取该
固体适量，采用 HPLC-MS 分析，分析方法同实施例 1，分析结果显
示，反应原料中的主成分甘露糖醛酸六糖已经被氧化成甘露糖醛二酸
5 六糖，反应完成度>98%。LC-MS 分析结果见图 7B。