

条斑紫菜中一种琼胶多糖的分离纯化及鉴定

张伟云 陈 颢 汪水娟 谭仁详

(南京大学生物科学与技术系 南京 210093)

费修绠

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 的热水提取物, 经 DE-23 和 Sephadex G-200 柱层析纯化, 得到一种含微量硫酸基的琼胶精品 (PY1)。此多糖经 Sepharose 6B 柱层析鉴定为单一组分, 分子量为 220 kD。紫外光谱显示它不含蛋白质、多肽及核酸。红外光谱揭示它含 3,6-内醚-半乳糖的特征吸收以及微量的硫酸基。该多糖的水解产物经气相色谱分析, 主要由半乳糖及其衍生物组成, 有少量岩藻糖存在。通过高碘酸氧化和 Smith 除解以及 ^{13}C -NMR 谱的分析, 该多糖主要由琼胶二糖结构单元和它的生物前体组成, 以琼胶二糖为主。

关键词 条斑紫菜, 多糖, 分离纯化, ^{13}C -NMR

The Isolation, Purification and Identification of a Kind of Agar Polysaccharide from *Porphyra yezoensis*

ZHANG Wei-Yun CHEN Hao WANG Shui-Juan TAN Ren-Xiang

(Department of Biological Science and Technology, Nanjing University, Nanjing 210093)

FEI Xiu-Geng

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract The crude polysaccharide was extracted from *Porphyra yezoensis* with hot water and was then purified by DE-23 and Sephadex G-200 column chromatography. A purified polysaccharides (PY1) was obtained, which contains little sulfate. Its homogeneity was identified with Sepharose 6B column chromatography. The average molecular weight was estimated to be 220 kD. The ultraviolet spectrum showed there is no proteins and nucleic acids in PY1. And the infrared spectrum indicated that there are special absorption of 3,6-anhydro-galactose and very little sulfated absorbance peaks. Galactose and its derivatives were the main constituents by gas chromatography. Through periodate oxidation, Smith degradation and ^{13}C -NMR analysis, PY1 is mainly composed of agarobiose, and a little of its precursor exists as well.

Key words *Porphyra yezoensis*, Polysaccharide, Isolation and purification, ^{13}C -NMR

紫菜是一种营养价值较高的海藻, 它作为人类食用及药用已有上千年历史。我国民间早就利用紫菜来泻火降血压, 并治疗一些淋巴结核病症等。近年来的研究发现, 紫菜的各种功效大多数是由紫菜中多糖成分起作用的, 而进一步搞清楚紫菜中多糖的组成、结构及在体内的合成途径等, 对于更好地利用紫菜这一丰富资源具有一定的参考价值。

<https://www.sciencegate.com/doi/10.3724/CBB-199-077>

① 作者简介 张伟云, 女, 1989 年硕士毕业, 现为南京大学生物科学与技术系博士研究生。

收稿日期: 1999-07-12 接受日期: 1999-09-22 责任编辑 姜联合

紫菜属藻类在我国沿岸皆有分布,我国常见种类有 10 多种以上。不少学者已对紫菜属藻类多糖作了大量研究,尤其是高洪峰等(1992;1994),对坛紫菜多糖作了许多研究。条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)是中国北方紫菜中的主要种类。周慧萍和陈琼华(1989a, 1989b, 1990)曾就条斑紫菜多糖的生物活性方面作了一些研究,发现紫菜多糖具有抗辐射抗肿瘤、降血脂和抗衰老等作用。但对于条斑紫菜多糖的分离纯化及结构特征的研究尚未有详尽的报道。

我们对条斑紫菜的热水提取物进行了分离纯化,从其中共获得 4 种不同结构组成及分子量的多糖。本文仅就其中的一种弱酸性多糖作了初步的化学研究,利用红外光谱、核磁共振等手段对其结构特征作了初步鉴定,为今后进一步研究紫菜多糖结构与功能的关系以及确定其生物合成途径提供一定的实验数据。

紫菜多糖一般分为紫菜胶(porphyrin)和琼胶(agar)两类(Brasch 等, 1981;史升耀, 1991)。其主要区别在于琼胶中硫酸基含量比紫菜胶中的少,而 3,6-内醚-半乳糖含量比后者高。本文所报道的多糖(PY1)即是一种琼胶,它是一种硫酸基含量很低的多糖。

1 材料和方法

1.1 实验材料及多糖的提取

新鲜的条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)来自江苏赣榆,由中国科学院海洋研究所费修绶教授提供并鉴定。首先将紫菜剪碎,加入 95% 乙醇,加热回流 3 h,以去油脂。然后重复 3 次用水煮沸紫菜 3 h,收集水提液。合并各次提取液,浓缩,冷冻干燥,得粗提品。

1.2 脱蛋白

粗提品中含有大量蛋白质,在多糖类物质纯化前必须除去。用 Sevag 法(Staub, 1965),将提取液与有机溶剂(氯仿与正丁醇体积比 5:1)混合,比例为 5:1,剧烈振荡 20 min,离心,去除沉淀。重复此过程若干次,直至上清液中无蛋白质被测出。浓缩至小体积,冷冻干燥得粗多糖。

1.3 多糖的纯化

1.3.1 离子交换柱层析

将 100 mg 粗多糖溶解在 5 ml 蒸馏水中,然后加到 DE-23(Whatman 产品)层析柱(2.6 cm × 20 cm)上,流速为 20 ml/h,用 150 ml(约 1.5 倍柱体积)的蒸馏水(pH 6.0)洗脱,以部分收集器收集。从各管取样,用苯酚-硫酸法显色后在 490 nm 测吸光值的方法来检测多糖(张惟杰, 1987)。收集含有多糖的各管样品,冷冻干燥,该水洗组简称 Da。再用 0~4 mol/L NaCl 对该柱进行梯度洗脱,还可得到另一组分(在本文中不作讨论)。

1.3.2 凝胶柱层析

将 50 mg 的 Da 组分溶于 2 ml 0.02 mol/L NaCl 溶液中,加样于 Sephadex G-200(Pharmacia 产品)层析柱(2.6 cm × 60 cm)上,以 0.02 mol/L NaCl 溶液洗脱,流速为 15 ml/h。同样用部分收集器收集,苯酚-硫酸法检测得到两个多糖组分(PY1 和 PY2),分别收集,透析脱盐并冷冻干燥。

<https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-199-077>

1.3.3 纯度鉴定

将上述 PY1 约 5 mg 溶解在少量 0.05 mol/L NaCl 溶液中,在 1.6 cm × 50 cm 的 Separose

6B 层析柱上以 0.05 mol/L NaCl 溶液洗脱,流速为 6.6 ml/h,每 20 min 收集 1 管,用苯酚-硫酸法检测,只出现单一对称峰。

1.4 紫外检测

将少量多糖溶解于蒸馏水中,用 U-3000 型分光光度计检测 190 ~ 400 nm 范围内的吸收峰。

1.5 红外光谱测定

取少量多糖(1 ~ 2 mg),与溴化钾研磨混匀后压片,用傅立叶变换红外分光光度计(170SX FT-IR)记录红外吸收光谱。

1.6 分子量测定

一般来说,多糖分子量分布呈分散性的特点,其分子量大小表现为连续的变化,所以多糖的分子量大小一般是指它的平均分子量。本研究以凝胶柱层析法,通过与标样比较,测定该琼胶的平均分子量。

分别称取 Pharmacia 公司出品的蓝色葡聚糖 2000 和标准葡聚糖(分子量分别为 11.5 kD、41 kD、71 kD、267 kD 和 580 kD)各 2 mg,分别溶解于 0.1 mol/L NaCl 溶液中,各自在 1.1 cm × 85 cm 的 Sepharose 6B 层析柱上以 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱,洗脱液流速为 5 ml/h,用苯酚-硫酸法检测,测得外水体积(V_0)和各标准品的洗脱体积(V_e),作标准曲线。然后以 2 mg 样品上柱,同样洗脱,得洗脱体积,对照标准曲线得出样品的分子量。

1.7 气相色谱

取 10 mg 样品,在 3 ml 2mol/L 三氯乙酸(TFA)溶液中 100 °C 水解 10 h,水解产物经乙酸酐-吡啶乙酰化,再以气相色谱仪 HP6890(HP-5 柱)进行组成分析。选取葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、木糖、岩藻糖、甘露糖、阿拉伯糖和核糖作为标准品。气相色谱的条件为进样口和检测器温度分别为 280 °C 和 300 °C。汽化温度为 170 °C(1 °C/min)→185 °C(5 °C/min)→210 °C(20 °C/min)→250 °C(3 min)。

1.8 高碘酸氧化和 Smith 降解

将多糖 PY1 溶于 15 mmol/L NaIO₄ 溶液中,4 °C 避光放置,间或振摇。定时取样,用分光光度法(Dixon,1954)测定 NaIO₄ 的消耗量。

在上述完全氧化的多糖溶液中,加入乙二醇终止反应,透析 48 h,透析液中加入 NaBH₄,避光搅拌 18 h,加乙酸调节 pH 值至 5.5。再透析 48 h,冻干得多糖醇。多糖醇经三氯乙酸水解并乙酰化,用 HP6890 气相色谱仪分析。用甘油、赤藓醇及半乳糖等物质作为标准品。

1.9 ¹³C-NMR 光谱

称取 20 mg 左右的样品,加热溶于 D₂O 中,室温下用 Bruker ACF-300 型核磁共振仪记录¹³C-NMR 谱图。

2 结果

2.1 多糖的纯度鉴定

DE-23 纤维素层析柱上用蒸馏水洗脱只得一个组分即 Da,此样品为淡黄色粉末。Da 经凝胶柱层析再次分离后,产生 2 个组分(图 1),冻干后 PY1 为白色絮状物,经 Sepharose

6B 柱层析只出现单一峰,表明它已是纯的单一组分。它的紫外可见光谱除 190 nm 附近有吸收峰外,无其它吸收峰存在,表明该多糖已不含蛋白质、核酸等杂质。

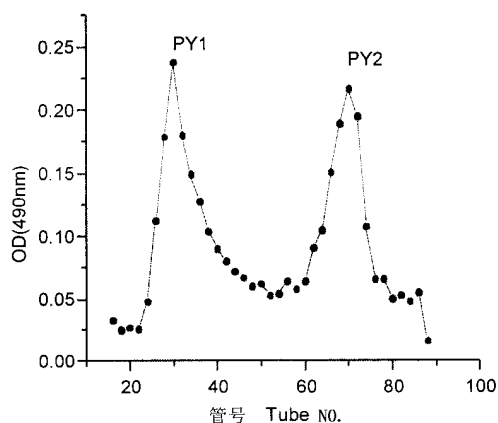


图1 组分 Da 在 Sephadex G-200 层析柱上的洗脱曲线
Fig.1 Elution diagram of Da on Sephadex G-200

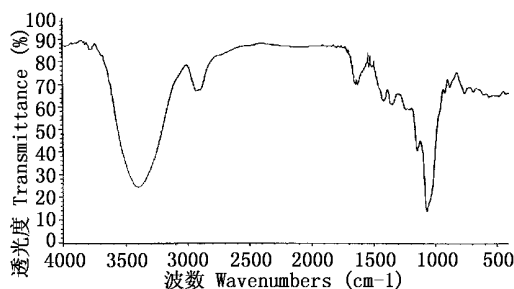


图2 多糖 PY1 的红外吸收光谱
Fig.2 The infrared spectrum of polysaccharide PY1

2.2 多糖的红外光谱

从琼胶 PY1 的红外光谱谱图(图 2)可以看出,在 $3\ 600 \sim 3\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 、 $3\ 000 \sim 2\ 800\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 400 \sim 1\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 200 \sim 1\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 处有多糖特征性的吸收峰存在。此外, PY1 的 IR 谱图上还有一些特殊基团吸收峰。 $1\ 250\ \text{cm}^{-1}$ 附近有一微弱的吸收峰,这是由于 $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ 不对称伸展运动所引起,表明有少量硫酸基存在。 $1\ 070\ \text{cm}^{-1}$ 和 $930\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰提示 3,6-内醚桥的存在(高洪峰等,1992; Sekkal 等,1993),表明此多糖中含有 3,6-内醚-半乳糖。

2.3 分子量的确定

几种葡聚糖标准品用柱层析法测得的洗脱体积分别为 $74.6\ \text{ml}$ (11.5 kD)、 $62.5\ \text{ml}$ (41 kD)、 $56.0\ \text{ml}$ (71 kD)、 $43.5\ \text{ml}$ (267 kD) 和 $38.9\ \text{ml}$ (580 kD),外水体积 V_0 为 $32.1\ \text{ml}$ 。其 V_e/V_0 分别为 2.324, 1.947, 1.745, 1.355 和 1.212,由此得出标准曲线的方程式为 $Y = 5.01704 - 0.6677 \times X$, X 代表分子量的对数, Y 代表 V_e/V_0 。由于 PY1 的洗脱体积为 $46.5\ \text{ml}$,故由标准曲线计算出其分子量约 220 kD。

2.4 气相色谱分析

从气相色谱分析得知, PY1 主要由半乳糖及其衍生物组成,可能含 D-半乳糖、L-半乳糖及 3,6-内醚半乳糖,另有少量岩藻糖被测出(1.5%)。由于半乳糖衍生物在酸性条件下水解及衍生物化过程中会转变为半乳糖,故只能测出它们的总量。

2.5 高碘酸氧化和 Smith 降解

从高碘酸氧化结果得知,每单位己糖残基消耗 $0.13\ \text{mol}$ 的 NaIO_4 。Smith 降解的降解产物经气相色谱分析,绝大多数为半乳糖,有少量赤藓糖和甘油,其摩尔比为 70:1:4。这说明多糖 PY1 的骨架主要是以 $1 \rightarrow 3$ 位连接的半乳糖,或 $1 \rightarrow 4$ 位连接的 3,6-内醚-半乳糖组成,有少量 $1 \rightarrow 4$ 位连接的半乳糖。甘油可能由侧链末端产生。

2.6 多糖的¹³C-NMR 光谱分析

PY1 的¹³C-NMR 光谱见图 3。在该 NMR 谱图上有两个较强的异头碳化学位移(104.5 ppm,100.6 ppm),对应于琼胶二糖 3-O-β-D-半乳糖-4-O-α-L-3,6-内醚-半乳糖的 C1。另外,在 105.7 ppm、103.4 ppm 处的两个吸收峰对应于琼胶二糖前体 3-O-β-D-半乳糖-4-O-α-L-6-SO₄-半乳糖的两个异头碳(高洪峰等,1992,Brasch 等,1981)。根据异头碳的核磁共振峰信号的强弱,可以推断出在此多糖中琼胶二糖的含量较高,而其前体含量较低。

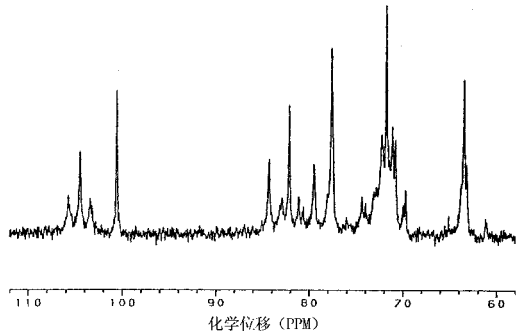


图 3 多糖 PY1 的核磁共振谱图
Fig.3 ¹³C NMR spectrum of PY3 from *P. yezoensis*

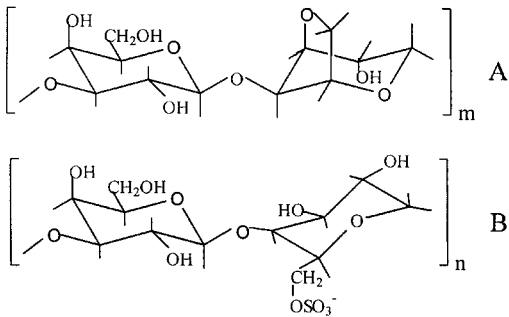


图 4 紫菜多糖 PY1 的二糖重复单元
A. 琼胶二糖 B. 琼胶二糖前体
Fig.1 Disaccharide repeating units in PY1 from *P. yezoensis*
A. Agarobiose B. Precursor

参考文献(Brasch 等,1981),PY1 中各碳原子核磁共振信号与化合物的大致对应关系见表 1。

表 1 琼胶 PY1 的¹³C-NMR 光谱的化学位移分布
Table 1 Chemical shift assignments for the ¹³C-NMR spectrum

重复单位	连接方式	化学位移					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6
琼胶二糖	→3)β-D-半乳糖	104.5	72.3	84.3	70.9	77.7	63.5
	→4)α-L-3,6-内醚-半乳糖	100.6	71.9	82.2	79.5	77.7	71.9
二糖前体	→3)β-D-半乳糖	105.7	72.3	84.3	70.9	78.1	63.3
	→4)α-L-6-SO ₄ -半乳糖	103.4	71.9	72.1	81.1	70.2	69.7

3 讨论

本实验所提取并纯化的这种多糖,其硫酸基含量相当低,是一种接近中性的多糖。由文献所知(高洪峰等,1992 ;1994),硫酸基主要存在于琼胶二糖前体的 α-L-半乳糖的 6 倍 C 上。紫菜幼体主要先合成含硫酸基的半乳聚糖,随着藻体生长,6 位 C 上的硫酸基与 3 位 C 上的羟基缩合成内醚,除仍含有部分琼胶糖的生物前体外,藻体合成了相当数量的 3,6-内醚-半乳糖,而硫酸基的数量大大减少。由此可见,本文所得到的 PY1 多糖基本上是成熟的紫菜多糖。

因此我们推断, PY1 主要由琼胶二糖 $[(1 \rightarrow 3)-\beta\text{-D-半乳糖}-(1 \rightarrow 4)-3,6\text{-内醚-}\alpha\text{-L-半乳糖}]$ 组成, 同时尚存在极少量的含硫酸基的前体 $[(1 \rightarrow 3)-\beta\text{-D-半乳糖}-(1 \rightarrow 4)-6\text{-OSO}_3\text{-}\alpha\text{-L-半乳糖}]$, 其组成结构式见图 6。此外, 由气相色谱分析可知, 还有微量的岩藻糖存在于侧链。

由于此多糖的分子量较大, 用 Sepadex-200 层析柱洗脱时发现其洗脱体积接近外水体积, 故考虑在纯度鉴定和分子量测定时选用 Sepharose 6B 层析柱来进行。

参 考 文 献

- 史升耀, 1991. 紫菜胶与紫菜琼胶的化学. 中国海洋药物, 10(1): 21 ~ 26
- 周慧萍, 陈琼华, 1989a. 紫菜多糖抗衰老作用的实验研究. 中国药科大学学报, 20(4): 231 ~ 234
- 周慧萍, 陈琼华, 1989b. 紫菜多糖对机体细胞的保护作用. 中国药科大学学报, 20(6): 340 ~ 343
- 周慧萍, 陈琼华, 1990. 紫菜多糖的抗凝血和降血脂作用. 中国药科大学学报, 21(6): 358 ~ 360
- 张惟杰主编, 1987. 复合多糖生化研究技术, 上海: 上海科学技术出版社, 6 ~ 7
- 高洪峰, 纪明侯, 曹文达, 1992. 南、北方坛紫菜多糖结构特征的比较研究. 海洋与湖沼, 25(5): 541 ~ 549
- 高洪峰, 纪明侯, 曹文达, 1994. 不同生长期坛紫菜多糖中组分含量的变化. 海洋与湖沼, 25(5): 505 ~ 509
- Brasch D J, Chuah C T, Melton L D, 1981. A ^{13}C NMR study of some agar-related polysaccharide from New Zealand seaweeds. Aust J Chem, 34: 1095 ~ 1105
- Dixon J S, Lipkin D, 1954. Spectrophotometric determination of vicinal glycols. Anal Chem, 26: 1092 ~ 1098
- Sekkal M, Huvenne J P, Legrand P, Sombret B, Mollet J, Mouradi-Givernaud A, Verdus M, 1993. Direct structural identification of polysaccharides from red algae by FTIR microspectrometry I: Localization of agar in Gracilaria verrucosa sections. Mikrochim Acta, 121: 1 ~ 10
- Staub A M, 1965. Removal of proteins. Sevag method. Methods Carbohydr Chem, 5: 5 ~ 6

《贵州环保科技》杂志 2001 年征订启事

《贵州环保科技》系贵州省环保系统唯一一家环境保护专业性科技期刊, 国内统一刊号: CN52-1101/R。

本刊主要登载 环境科研、环境监测、环境管理、环境工程、环境经济、环境医学、环境分析化学及生态环境等方面的科研、技术报告及学术论文, 可供从事环境科研、监测、工程技术和管理人员参考, 对从事相关专业教学及学习的高等院校师生, 亦有一定的参考价值。

《贵州环保科技》为季刊, 季末月下旬以前出刊, 每期定价 4.00 元, 全年定价 16.00 元, 单位或个人可随时订阅。

(1) 银行信汇 户名 贵州省环境保护科学研究所

开户银行 贵阳市工商行南明支行 帐号 4888058-21

信汇凭证请写明《贵州环保科技》订书

(2) 邮汇直接寄《贵州环保科技》编辑部收

(3) 本刊编辑部通讯地址: 贵阳市新华路 70 号 (旧号 148) 贵州省环保所内, 邮编 550002, 电话: (0851) 5509362

(4) 也可到邮局订阅, 邮发代号 66-59。

<https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-199-077>