

文章编号:1009-038X(2004)02-0086-04

羊栖菜褐藻糖胶的分级纯化和结构分析

李波, 许时婴

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 从浙江洞头产羊栖菜中提取得到的褐藻糖胶, 经 DEAE Sepharose CL-6B 柱层析得 F1、F2 和 F3 3 个组分, F3 又经 Sepharose CL-6B 柱层析得 F31、F32 和 F33 3 个级分。经凝胶过滤色谱检测, F31、F32 和 F33 为均一组分。化学组成分析表明, 这 5 个级分均为岩藻糖、半乳糖和甘露糖等糖基组成的杂多糖, 并含有硫酸酯、糖醛酸以及少量的蛋白质, 相对分子质量范围为 $2.5 \times 10^4 \sim 9.5 \times 10^5$ 。F33 中氮的质量分数为 2%, 氨基酸分析和紫外扫描表明氮大部分可能来自核酸。F32 的硫酸酯对碱基本稳定, 表明大部分硫酸酯位于单糖残基的垂直位置。

关键词: 羊栖菜; 褐藻糖胶; 分级; 结构

中图分类号: P 74

文献标识码: A

Fractionation and Structure of Fucoidan from *Sargassum fusiform*

LI Bo, XU Shi-ying

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

Abstract: Fucoidan, separated from *Sargassum fusiform* (grown in Dongtou, Zhejiang Province), was graded into three fractions: F1, F2 and F3 by chromatography on a DEAE Sepharose CL-6B column. F3 was further graded into three fractions: F31, F32 and F33 by chromatography on a Sepharose CL-6B column, which were shown to be homogeneous by gel filtration chromatography. The five fractions all contained fucose, mannose and galactose predominantly, and also contained sulphate groups, uronic acid and little protein. Their M_w ranged from 25000 to 950000. F33 contained 2% N, most of which probably came from nucleic acid based on amino acid analysis and UV detection. Ester sulphate in F32 was stable to alkali, which suggested most of sulphates were on the axial position of the sugars.

Key words: *Sargassum fusiform*; fucoidan; fractionation; structure

羊栖菜(*Sargassum fusiform*)属褐藻门马尾藻科, 主要生长在北太平洋西部的暖温带水域, 在我国分布很广。羊栖菜具有较高的食用和药用价值, 我国药典早有记载。褐藻糖胶(fucoidan)是褐藻细胞产生的粘性物质, 是一系列组成相似的杂多糖

混合物, 分级纯化比较困难。现代研究表明, 褐藻糖胶具有抗凝血、抗肿瘤、抗病毒、降血糖、调节免疫等多种生理功能^[1,3]。羊栖菜是我国的特色海藻, 资源十分丰富, 但我国目前对其主要活性成分褐藻糖胶的研究却较少。作者对羊栖菜中的褐藻糖胶进行

收稿日期: 2003-07-08; 修回日期: 2003-11-03.

作者简介: 李波(1973-), 男, 河南新乡人, 讲师, 食品科学与工程博士研究生。

万方数据

了分级,并对化学组成和结构进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

羊栖菜采自浙江洞头县,干燥粉碎成藻粉备用。DEAE Sepharose CL-6B 与 Sepharose CL-6B 为 Pharmacia 公司产品;标准 Pullulan 为日本 SHOWA DENKO K. K 公司产品;标准单糖为 Sigma 公司产品;其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 羊栖菜褐藻糖胶的分级纯化

1)提取:羊栖菜粉用体积分数为 90% 的乙醇溶液回流处理,除去脂类、色素及甘露醇等物质,然后用 70 °C 热水提取 3 次,每次 2 h;离心,上清液加乙醇至体积分数为 75%,过滤,沉淀依次用乙醇、丙酮和乙醚洗涤,40 °C 干燥,得粗多糖;粗多糖配成质量分数为 2.5% 的水溶液,加 3 mol/L CaCl_2 溶液进行纯化,过滤;滤液加乙醇至体积分数为 75%,过滤,沉淀依次用乙醇和丙酮洗涤,40 °C 干燥,得褐藻糖胶。

2)分级:褐藻糖胶先经 DEAE Sepharose CL-6B 柱(D 3.5 cm $\times$ 30 cm)层析,用去离子水洗脱出第一个组分 F1 后,换成 0.3~1.5 mol/L NaCl 溶液线性梯度洗脱,得到另外两个组分 F2 和 F3。洗脱体积流量为 2 mL/min,每管收集 4 mL,以硫酸-苯酚法检测多糖,紫外 280 nm 检测蛋白质。

F3 透析脱盐浓缩后,用 Sevag 法脱去蛋白质,再经 Sepharose CL-6B(D 1.6 cm $\times$ 100 cm)柱层析,得到 F31、F32 和 F33 共 3 个级分。洗脱液为 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液,体积流量 15 mL/h,每管收集 20 min。

1.2.2 F31、F32、F33 的纯度鉴定 分别取 10 mg F31、F32、F33,上 Sepharose CL-6B 柱(D 1.6 cm $\times$ 100 cm),0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱。

1.2.3 相对分子质量测定 Sepharose CL-6B 柱(D 1.6 cm $\times$ 100 cm)层析方法,用已知相对分子质量的标准 Pullulan 制作标准曲线,0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱。

1.2.4 化学组成分析

1)单糖组成分析:10 mg 多糖样品,用 2 mol/L H_2SO_4 溶液 100 °C 水解 10 h,糖腈乙酸酯衍生化^[4]。Agilent 6890 气相色谱仪,HP-1 毛细管柱(30 m $\times$ 320 μm $\times$ 0.25 μm),程序升温为 150 °C,1 min $\rightarrow$ 10 °C/min $\rightarrow$ 82 °C,2 min $\rightarrow$ 1 °C/min 至 188 °C

$\rightarrow$ 8 °C/min 至 240 °C,1 min。

2)岩藻糖质量分数测定:Gibbons 法^[5]。

3)糖醛酸质量分数测定:咭法,以葡萄糖醛酸^[6]。

4)硫酸基质量分数测定:浊度法,以 SO_4 计^[4]。

5)蛋白质质量分数测定:Lowry 法^[7]。

6)氨基酸组成分析:F33 经 6 mol/L 的盐酸在 110 °C 水解 24 h,用 Agilent 1100 液相色谱仪测定。

7)元素分析:用 CHN-O-RAPID 元素分析仪(德国 Element 公司产品)测定 C、H、N 组成。

8)总糖质量分数测定:采用苯酚硫酸法。根据气相色谱测定的各组分的单糖组成配制混合单糖,制作标准曲线,在 486 nm 进行检测(混合单糖经苯酚硫酸法显色后,波长扫描显示在 486 nm 有最大吸收)。

1.2.5 红外光谱和紫外光谱分析 红外光谱仪为 Nicolet 公司产 5DXB FT-IR 型,采用 KBr 压片法。紫外分光光度计为北京瑞利公司产 UV-1100 型,1.3 mg 样品溶于 10 mL 水,190~330 nm 进行紫外扫描。

1.2.6 硫酸基对碱稳定性测定 F32 的水溶液与 NaBH_4 反应过夜,再与 NaOH 80 °C 反应 2 h^[8]。

1.2.7 旋光测定 国产 WZZ-T 自动旋光仪(钠灯光源),2 dm 管,室温条件下测定。

2 结果与讨论

2.1 褐藻糖胶的分级纯化

羊栖菜褐藻糖胶经 DEAE Sepharose CL-6B 柱层析分级,得到 3 个级分 F1、F2 和 F3(图 1)。F3 又经 Sepharose CL-6B 柱层析分级,得到 F31、F32 和 F33 共 3 个级分(见图 2)。经 Sepharose CL-6B 柱层析检测,F31、F32 和 F33 均呈单一对称峰(见图 3~5)。

2.2 不同级分的糖苷键类型的确定

5 个级分均易溶于水,水溶液呈弱酸性,pH 值为 4.8 左右。红外光谱(见图 6)显示,833 cm^{-1} 处(F31 在 836 cm^{-1})有一强吸收峰,这一位置既是 α -糖苷键的特征吸收,也是 C—O—S 振动的特征吸收。F31 和 F32 在 906 cm^{-1} 有一小的峰,此为 β -糖苷键的特征吸收,而 F33 在此位置的吸收不明显。红外光谱分析表明,F31、F32 和 F33 的糖苷键类型以 α 型为主,并有少量的 β -糖苷键。F32 的 $[\alpha] = -157.5^\circ$,较强的负旋光意味着 F32 的糖苷键主要是 α -L 型,这与红外光谱的分析结果一致。

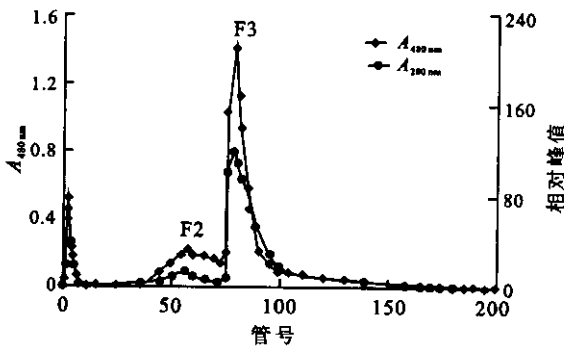


图 1 褐藻糖胶的 DEAE Sepharose CL-6B 柱层析

Fig. 1 Chromatogram of fucoidan on a DEAE Sepharose CL-6B column

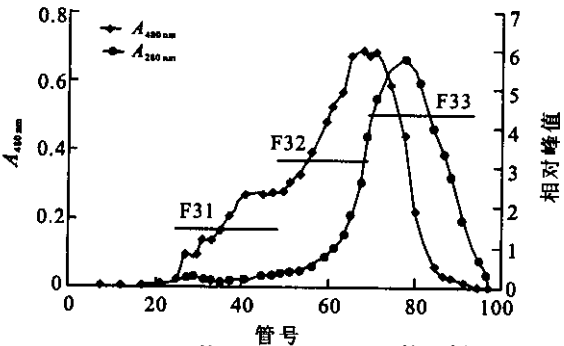


图 2 F3 的 Sepharose CL-6B 柱层析

Fig. 2 Chromatogram of F3 on a Sepharose CL-6B column

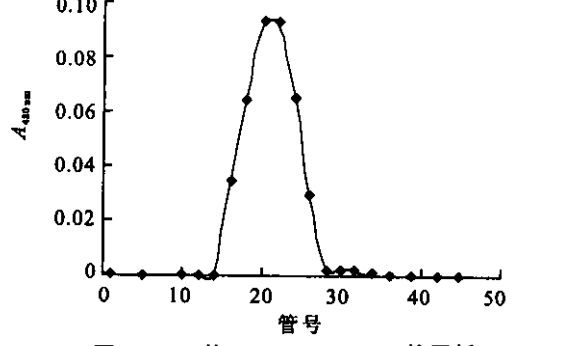


图 3 F31 的 Sepharose CL-6B 柱层析

Fig. 3 Chromatogram of F31 on a Sepharose CL-6B column

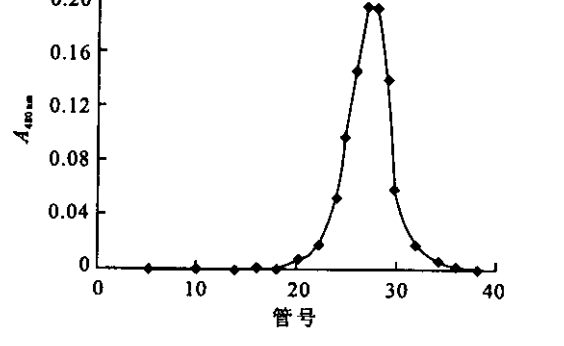


图 4 F32 的 Sepharose CL-6B 柱层析

Fig. 4 Chromatogram of F32 on a Sepharose CL-6B column

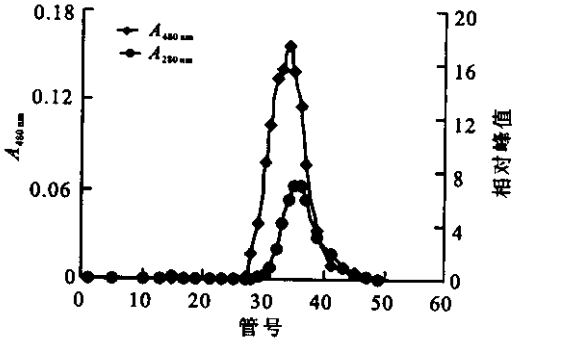


图 5 F33 的 Sepharose CL-6B 柱层析

Fig. 5 Chromatogram of F33 on a DEAE Sepharose CL-6B column

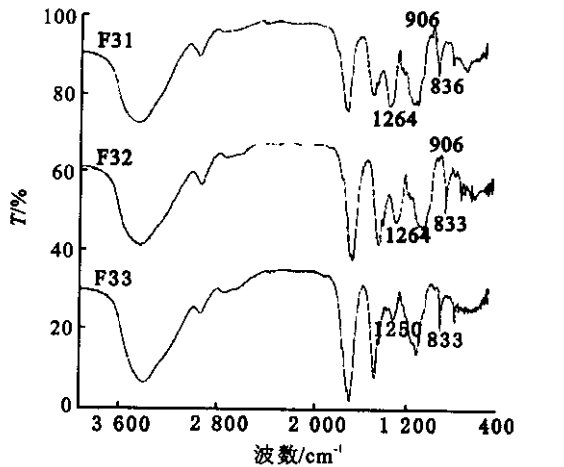


图 6 F31、F32 和 F33 的红外光谱

Fig. 6 IR spectrum of F31, F32 and F33

2.3 不同级分的化学组成和相对分子质量

羊栖菜褐藻糖胶的 5 种级分的化学组成、相对分子质量和单糖组成见表 1 和表 2。

表 1 5 种级分的化学组成和相对分子质量

Tab. 1 Chemical components and Mw of five fractions

样品	岩藻糖 质量 分数/%	糖醛酸 质量 分数/%	硫酸基 质量 分数/%	蛋白质 质量 分数/%	总糖 质量 分数/%	相对 分子 质量
F31	31.2	13.4	23.9	1.7	46.3	775 532
F32	32.8	21.8	23.4	1.2	57.4	92 704
F33	18.8	32.4	3.3	1.4	61.0	25 918
F2	20.1	29.3	11.6	1.8*	51.1	507 107
F1	22.1	17.4	19.3	2.4*	51.8	959 069

注：* 表示用 Sevag 法脱去游离蛋白质后测定所得数据。

分析结果显示,羊栖菜褐藻糖胶的化学组成十分复杂,其单糖主要由岩藻糖、甘露糖和半乳糖组成,并有少量的木糖、葡萄糖、鼠李糖和阿拉伯糖。羊栖菜褐藻糖胶含有硫酸酯,其中 F31 和 F32 的硫酸基质量分数较高,F33 的硫酸基质量分数较低。

红外光谱(见图 6)显示,F31 和 F32 在 $1\,264\text{ cm}^{-1}$ 有一较强的峰,F33 在 $1\,250\text{ cm}^{-1}$ 有一较弱的峰,这一位置是 $\text{S}=\text{O}$ 伸缩振动的特征吸收^[9],这与化学分析的结果相符.5 种级分都含有糖醛酸,并结合有少量的蛋白质,且相对分子质量分布范围很宽($2.5\times 10^4\sim 9.5\times 10^5$).

表 2 5 种级分的单糖组成

Tab. 2 Sugar composition in five fractions

样品	岩藻糖	甘露糖	半乳糖	木糖	葡萄糖	鼠李糖	阿拉伯糖
F31	44.5	17.3	33.0	3.1	1.0	1.1	无
F32	41.7	24.4	20.6	6.1	2.0	3.6	1.5
F33	37.6	27.0	22.4	5.3	4.5	2.0	1.2
F2	38.2	30.3	18.2	7.6	3.5	1.4	0.8
F1	29.6	29.3	22.7	7.9	8.8	0.9	0.8

2.4 F32 和 F33 级分的元素分析和氨基酸组成

F32 和 F33 的 C,H,N 组成见表 3,F33 的氨基酸组成见表 4.

表 3 F32 和 F33 的 C,H,N 组成

Tab. 3 C,H,N composition of F32 and F33

样品	N	C	H
F32	0.16	28.01	5.91
F33	2.01	28.79	5.49

分析结果显示,F33 的 N 质量分数较高,质量分数达 2.01%,若这些 N 都来自蛋白质,则蛋白质质量分数的计算值应为 12%左右,这与 Lowry 法测定的结果(质量分数 1.4%)有很大差异.因此,对 F33 的氨基酸组成进行了分析.

经计算,F33 的氨基酸总质量分数为 1.14%,与 Lowry 法测定的结果比较接近,但与元素分析的结果有很大出入,这表明大部分 N 可能来自蛋白质以外的物质.紫外扫描(见图 7)显示,F33 在 258 nm 有较强的吸收,而这一位置通常是核酸的特征吸

收.经测定,亮聚糖(含氨基葡萄糖残基)在 258 nm 附近无吸收,说明 F33 可能不含氨基糖.由此推测 F33 含有的 N 大部分可能来自核酸.

表 4 F33 的氨基酸组成

Tab. 4 Amino acid composition in F33

氨基酸	质量分数/%	氨基酸	质量分数/%
Asp	0.150	Val	0.062
Glu	0.160	Met	0.020
Ser	0.085	Phe	0.028
His	0.030	Ile	0.035
Gly	0.170	Leu	0.041
Thr	0.130	Lys	0.013
Ala	0.120	Pro	0.042
Arg	0.024	Cys	0.010
Tyr	0.018		

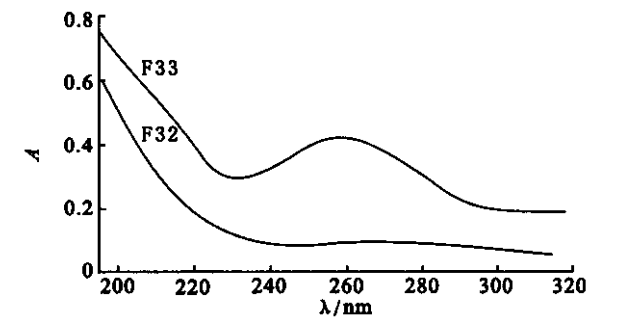


图 7 F32 和 F33 的紫外扫描图

Fig. 7 UV spectrum of F32 and F33

2.5 硫酸基对碱的稳定性

F32 经碱处理后硫酸基质量分数基本未变(23.4%降至 22.6%),表明 F32 中硫酸酯对碱基本稳定,由此可以推断大部分硫酸酯位于单糖残基的垂直位置^[8].

3 结 论

研究表明,羊栖菜褐藻糖胶是由多种单糖组成的杂多糖,并含有硫酸酯和糖醛酸,单糖残基主要以 α -糖苷键连接,而且相对分子质量分布较宽,这些特点使得它具有比较广泛的生物活性.

参考文献:

[1] Yasuji Okai. Possible immunomodulating activities in an extract of edible brown algae, *Hizikia fusiforme*[J]. J Sci Food Agric,1998, 76(1) :56—62.

[2] Yasuji Okai. Identification of antimutagenic activities in the extract of an edible brown algae, *Hizikia fusiforme* (Hiji-ki) by umu gene expression system in *Salmonella typhimurium* (TA1535/psk1002)[J]. J Sci Food Agric,1994, 66(1): 103—109.

萃取、酯化等样品预处理环节比较完全,内标法定量检测结果比较正确.

定性检出 6 种烷氧基甘油化合物,对研究该类功能性有效成分具有较大的参考价值.

3 结 论

- 1)对鲨鱼肝油进行样品预处理后,经 GC/MS
- 2)通过气相色谱内标法对烷氧基甘油各种成分进行定量分析,初步建立了一种简便的检测方法.

参考文献:

[1] 张野平,赵润洲,赵笑梅. 姥鲨鱼肝油乳免疫作用的研究[J]. 沈阳药学院学报,1989,6(3):186—188.

[2] 张豁中,宋修俭,李玉山. 鲨鱼肝油研究概况[J]. 中国海洋药物,1991,10(1):30—31.

[3] 张豁中,金向群,宋修俭. 国产姥鲨鱼肝油中脂肪酸和角鲨烯的成分分析及含量测定[J]. 中国海洋药物,1991,10(3):7—9.

[4] 宋修俭,顾茂书,陈少龙. 国产阔口真鲨鱼肝油中脂肪酸和角鲨烯的成分分析及含量测定[J]. 中国海洋药物,1994,13(4):26—28.

[5] Ohta Y, Haliniewski D E, John Hansen. Isolation of transporter associated with antigen processing genes, TAP1 and TAP2, from the horned shark *Heterodontus francisci*[J]. **Immunogenetics**, 1999, 49:981—986.

[6] Diaz M, Stanfield R L, Greenberg A S. Structural analysis, selection, and ontogeny of the shark new antigen receptor (IgNAR): identification of a new locus preferentially expressed in early development[J]. **Immunogenetics**, 2002, 54:501—512.

(责任编辑:朱 明)

(上接第 89 页)

[3] Kenji Dobashi. Isolation and preliminary characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides with blood-anticoagulant activity from seaweed *Hizikia fusiforme*[J]. **Carbohydrate Res**,1989,194: 315—320.

[4] 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.

[5] Gibbons M N. The determination of methylpentoses[J]. **Analyst**,1955,80:267—276.

[6] Bitter T. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. **Analytical Biochemistry**,1962,(4):330—334.

[7] 张龙翔. 生物实验方法和技术[M]. 北京:人民教育出版社,1981.

[8] Rees D A. Estimation of the relative amounts of isomeric sulphate esters in some sulphated polysaccharides[J]. **J Chem Soc**, 1961:5168—5171.

[9] Lloyd A G. Infrared studies on sulphate esters[J]. **Biochim Biophys Acta**, 1961,46:108—115.

(责任编辑:朱 明)