

# 莫氏马尾藻多糖的分离及理化性质评价

侯宁宁<sup>1,2</sup>, 王 晶<sup>1</sup>, 张全斌<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 以莫氏马尾藻(*Sargassum maclurei*)为原料, 分别采用热水和稀酸两种提取方式提取莫氏马尾藻多糖, 通过 DEAE-Sephrose FF 柱层析进行分级纯化, 利用化学分析方法并结合高效液相色谱法(HPLC)、红外谱图、核磁共振谱图对分离到的莫氏马尾藻多糖及其分级组分的理化性质及基本结构进行分析, 并对其主要组分的抗氧化与抗凝血活性进行研究。研究结果表明: 莫氏马尾藻多糖是以岩藻糖为主, 且含有少量硫酸根和糖醛酸的酸性多糖; 莫氏马尾藻多糖清除自由基能力较强, 具有良好的抗氧化活性; 同时, 该多糖可以通过抑制内源性凝血途径起到抗凝血作用, 具有一定的开发前景。

**关键词:** 莫氏马尾藻多糖; 岩藻糖; 抗氧化; 抗凝血

中图分类号: 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)09-0102-08

DOI: 10.11759/hyxx20170218001

莫氏马尾藻(*Sargassum maclurei*), 隶属于褐藻门、圆子纲、墨角藻目、马尾藻科、马尾藻属。藻体高达 1.5 m, 黄褐色。莫氏马尾藻主要分布于香港、广东、海南和广西沿海等海域, 生长于低潮带或潮下带岩石上<sup>[1]</sup>。莫氏马尾藻具有生长快和生物量大的特点, 是在海洋环境生态修复上具有显著优势的一种大型海藻。截止目前, 国内外对莫氏马尾藻的研究还仅限于对其繁殖生物学及其多酚成分的抗氧化和抗肿瘤细胞增殖作用等方面<sup>[2-3]</sup>。对于莫氏马尾藻中多糖等其他活性成分的分离、理化性质及活性评价尚未见报道。

研究表明, 马尾藻属藻类含有丰富的膳食纤维、褐藻淀粉、矿物质和维生素以及优质的高度不饱和脂肪酸和合理的必需氨基酸组成, 脂肪含量较低, 可作为保健食品和药物的优质原料<sup>[4]</sup>。

马尾藻属藻类含以岩藻糖为主要组成单糖的硫酸化多糖, 但是不同藻类中多糖的理化特性和生物活性有很大差别。目前已有南海亨氏马尾藻(*Sargassum henslowianum*)、半叶马尾藻(*Sargassum hemiphyllum*)等多糖抗肿瘤活性的研究, 表明亨氏马尾藻多糖对小鼠艾氏腹水瘤和腹水型肉瘤 180 有较明显的抑制作用<sup>[5]</sup>。

本文以莫氏马尾藻为研究材料, 对其多糖的分离、理化性质和抗氧化、抗凝血活性进行评价, 以期对莫氏马尾藻多糖的研究和应用提供一定依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

莫氏马尾藻(*Sargassum maclurei* Setch)采集自中国广东碓洲岛, 由广东海洋大学谢恩义教授鉴定并提供。原料经自来水洗涤, 除去泥沙, 干燥, 然后粉碎成藻粉保存备用。

单糖标准品: D-甘露糖(Man), L-鼠李糖(Rha), D-葡萄糖醛酸(GlcA), D-葡萄糖(Glc), D-半乳糖(Gal), D-木糖(Xyl), L-岩藻糖(Fuc), 2-脱氧核糖均购自 Sigma 公司。Folin 酚试剂购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。不同分子量右旋糖酐(dextran)购自中国药品生物制品检定所。活化部分凝血活酶时间(APTT)测定试剂盒, 凝血酶原时间(PT)测定试剂盒, 凝血酶时间(TT)测定试剂盒均购自南京建成有限公司。其余试剂均为国产分析纯。

BXM-30R 立式压力蒸汽灭菌器(上海东亚压力

收稿日期: 2017-02-18; 修回日期: 2017-04-25

基金项目: 山东省重点研发计划(海洋医用食品)(2016YYSP002); 国家海洋公益性行业科研专项(201405040)

[Foundation: The Key Research and Development Project of Shandong province, No.2016YYSP002; Marine Scientific Research in the Public Interest, No.201405040]

作者简介: 侯宁宁(1991-), 女, 山东寿光人, 研究方向: 海藻化学及海洋药物, 电话: 0532-82898708, Email: houningning14@mails.ucas.ac.cn; 张全斌, 通信作者, 博士生导师, 研究员, 研究方向: 海藻化学与海洋药物, 电话: 0532-82898708, Email: qbzhang@qdio.ac.cn

容器制造有限公司); L2S 可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司); 高效液相色谱仪(日本岛津 LC-20AT); 恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司); 旋转蒸发仪(无锡市星海王生化设备有限公司); SHZ-D(III)循环水多用真空泵(郑州英峪领科仪器设备有限公司); 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); BSA124S 电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); L-550 台式低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 莫氏马尾藻多糖的提取

莫氏马尾藻采用乙醇加热回流方法脱脂, 去除色素和小分子脂溶性物质, 固形物干燥后分别采用热水提取和稀酸提取两种方式提取莫氏马尾藻多糖。

(1) 热水提取: 料液比 1 : 30, 加压提取, 温度 120°C, 提取时间 4 h, 提取液进行硅藻土过滤、浓缩, 浓缩液中加入 CaCl<sub>2</sub> 溶液至浓度为 0.2 mol/L, 离心去除褐藻胶沉淀, 上清液透析, 醇沉, 得到粗多糖 SMP。

(2) 稀酸提取: 采用 0.1 mol/L 的稀盐酸进行搅拌提取, 料液比 1 : 15, 提取时间 2 h, 提取液用氢氧化钠中和至 pH5~7, 后续处理过程同热水提取, 得到酸提粗多糖 SMP-A。

### 1.2.2 多糖分级纯化

粗多糖 SMP 和 SMP-A 分别通过 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱层析进行分级纯化, 采用 0~2 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱方式对获取的粗多糖进行分级纯化, 苯酚-硫酸法检测多糖浓度, 绘制浓度曲线, 收集分级组分, 减压浓缩后透析, 冷冻干燥, 得到纯化多糖组分。

### 1.2.3 低分子质量多糖样品制备及分级纯化

将粗多糖样品 SMP 采取自由基方式降解, 采用过氧化氢与抗坏血酸降解, 并对获取的降解组分采用 DEAE-Sepharose Fast Flow 弱阴离子柱层析进行分级。

### 1.2.4 理化性质分析

可溶性总糖: 苯酚-硫酸法<sup>[6]</sup>; 岩藻糖含量: 半胱氨酸盐酸盐法<sup>[7]</sup>; 硫酸根含量: 明胶-氯化钡法<sup>[8]</sup>; 糖醛酸含量: 吡啶比色法<sup>[9]</sup>; 多酚含量: 没食子酸-福林酚法<sup>[10]</sup>; 单糖组成分析: 1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP)柱前衍生高效液相色谱法<sup>[11]</sup>; 分子质量分布分析: 高效凝胶色谱法, 色谱条件: 流动相为 0.1 mol/L 的 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液, 色谱柱为 TSK Gel G3000 PWxl 柱, RI 检测器。红外光谱测定: 采用溴化钾压

片法, 在 Nicolet iS10 傅立叶变换红外光谱仪上进行测定。核磁分析: 将多糖(50 mg)与氘代水混合, 冷冻, 重复上述步骤两次, 再以氘代水溶解样品, 进行核磁共振波谱分析。

### 1.2.5 抗氧化活性研究

#### 1.2.5.1 超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)清除能力采用邻苯三酚比色法<sup>[12]</sup>

于 10 mL 比色管中依次加入 4.5 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH=8.2), 不同浓度的待测多糖溶液 1 mL, 蒸馏水 2.4 mL, 混匀, 25°C 下保温 10 min 后加入 0.1 mL 6 mmol/L 邻苯三酚, 计时, 摇匀, 准确反应 3 min 后, 加入 10 mol/L HCl 溶液 0.1 mL, 终止反应, 以双蒸水为对照, 在 325 nm 下测定吸光值 A。

清除率计算公式为

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100$$

其中, A<sub>0</sub> 为用水代替多糖时测得的吸光值; A<sub>i</sub> 为不同多糖浓度下测得的吸光值; A<sub>j</sub> 为用水代替邻苯三酚时不同多糖浓度下测得的本底吸光值。

#### 1.2.5.2 羟基自由基清除能力(OH)采用硫酸亚铁-水杨酸法<sup>[12]</sup>

在 10 mL 的试管中依次加入 6 mmol/L 的 FeSO<sub>4</sub> 溶液 1 mL、不同浓度的多糖溶液 1 mL 和 6 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 1 mL, 摇匀, 静置 10 min, 再加入 6 mmol/L 的水杨酸溶液 1 mL, 摇匀, 静置 30 min 后, 以双蒸水为对照, 于 510 nm 处测其吸光值。清除率计算公式为

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100$$

其中, A<sub>0</sub> 为用水代替多糖时测得的吸光值; A<sub>i</sub> 为不同多糖浓度下测得的吸光值; A<sub>j</sub> 为用水代替水杨酸时不同多糖浓度下测得的本底吸光值。

#### 1.2.5.3 DPPH 采用 DPPH 标准品-乙醇法测定

1 mL 0.1 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液加入到不同浓度的样品溶液中(3 mL, 样品用 50%乙醇溶解), 剧烈摇动, 室温放置 20 min, 最后在 517 nm 测定。对照组, 采用 50%乙醇替代样品液。

$$\text{清除率}(\%) = (1 - A_{\text{样}} / A_{\text{对照}}) \times 100$$

#### 1.2.5.4 还原力的测定采用铁氰化钾-三氯化铁法

1.25 mL 铁氰化钾(1%)加入到不同浓度的样品溶液中(1 mL), 然后 50°C 水浴 20 min, 加入三氯化铁(2.5 mL)停止反应, 最后加入三氯化铁(1.5 mL), 振匀, 于 700 nm 测定吸光度。

### 1.2.6 抗凝血能力测定

活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)的测定严格按照试剂盒的说明

书进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 理化性质分析

#### 2.1.1 莫氏马尾藻粗多糖

通过热水提取及稀酸提取, 分别获取粗多糖

SMP 与 SMP-A。水提及酸提粗多糖的差别主要在岩藻糖及硫酸根的含量上, 酸提多糖岩藻糖和硫酸根含量明显高于水提多糖, 从单糖组成分析, 二者单糖种类一样, 但是各单糖的含量则有所差异。水提多糖和酸提多糖的多酚含量均低于 1%(分别为 0.93% 和 0.66%), 见表 1。

表 1 莫氏马尾藻粗多糖及分级组分的化学组分分析

Tab. 1 Chemical composition (% , dry weight) of polysaccharides from *Sargassum maclurei* and their fractions

组别	总糖 (%)	糖醛酸 (%)	岩藻糖 (%)	硫酸根 (%)	单糖组成(摩尔比)					
					Man	Rha	GlcA	Gal	Xyl	Fuc
SMP	75.12	13.53	21.36	13.93	0.16	0.19	0.11	0.34	0.36	1.00
SMP-A	75.15	14.23	26.01	17.68	0.27	0.33	0.04	0.56	0.29	1.00
SMP-W	56.86	11.31	9.39	12.99	0.21	-	-	0.68	0.33	1.00
SMP-0.5mol/L	73.13	12.54	23.93	15.41	0.23	0.26	0.17	0.31	0.44	1.00
SMP-1.2mol/L	44.99	6.41	17.67	19.09	0.08	0.11	0.05	0.40	0.12	1.00
SMP-A-W	20.14	1.33	1.01	-	-	-	-	0.24	-	1.00
SMP-A-0.5 mol/L	76.14	16.59	28.15	8.32	0.11	0.41	0.31	0.57	0.43	1.00
SMP-A-1.2mol/L	33.02	2.51	27.79	25.86	0.05	0.08	-	0.63	0.08	1.00

注: -表示未检出

#### 2.1.2 粗多糖的分级纯化

通过 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱, 采用 0~2 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱方式对获取的粗多糖进行分级纯化, 水洗后的洗脱曲线图 1 所示。除上样后的水洗部分分别得到水洗组分(分别为 SMP-W、SMP-A-W)外, 从图中可以看出, 二者的洗脱曲线类似, 均呈现一个主要的洗脱峰, 对应洗脱浓度为 0.5 mol/L

(分别为 SMP-0.5 mol/L、SMP-A-0.5 mol/L), 对主洗脱峰后的洗脱液收集后得到 1.2 mol/L 洗脱组分(分别为 SMP-1.2 mol/L、SMP-A-1.2 mol/L), 对每一组分进行透析除盐、冷冻干燥, 最后样品分级的总回收率在 70%左右; 其中 0.5 mol/L 洗脱组分含量最多, 为主要组分, 也是后期活性测定的主要组分。并对各分级组分进行相应的组成成分分析, 结果见表 1。

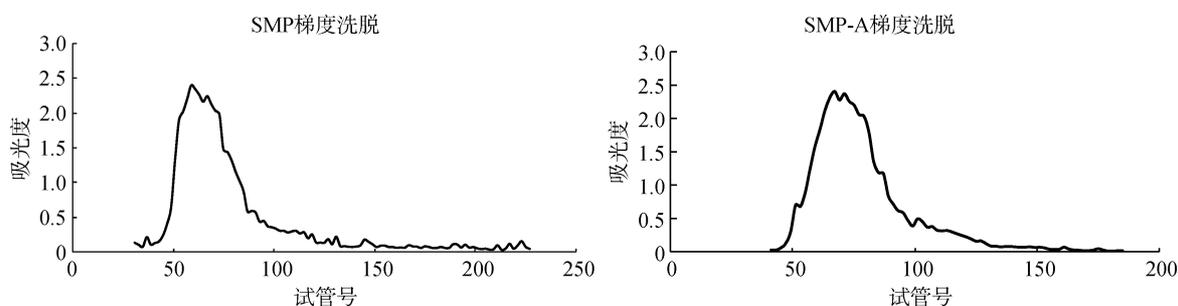


图 1 SMP 与 SMP-A 洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of SMP and SMP-A

根据所得数据分析可知, 0.5 mol/L 洗脱组分是以岩藻糖为主, 单糖组成较复杂的硫酸化杂多糖, 含有少量的硫酸根。其中, SMP-A-0.5 mol/L 的岩藻糖含量及半乳糖含量要高于 SMP-0.5 mol/L, 这与其粗多糖的分析结果一致。SMP-A-W 硫酸根和糖醛酸含量都很低, 基本为有岩藻糖和半乳糖组成的中性

多糖, 而水提多糖 SMP 的水洗组分 SMP-W 组成更为复杂。1.2 mol/L 洗脱组分均具有更高的硫酸根含量, 这也符合阴离子交换洗脱的规律。

#### 2.1.3 水提粗多糖的降解

由于 SMP 分子质量超过 800 kD, 为了评价分子质量大小对多糖 SMP 抗凝血活性的影响, 本研究采

用自由基降解方法对 SMP 进行降解, 制备了重均分子质量为 10 kD 的水提多糖降解产物 SMP-D, 并采用同样的阴离子交换方式进行分级处理, 获取其主

要的分级组分 SMP-D-0.5 mol/L, 二者的化学组分分析结果如表 2 所示。降解后多糖的分子质量明显降低, 其他单糖组成等指标没有明显变化。

表 2 SMP 降解产物及其分级组分离理化性质分析

Tab. 2 Chemical composition (% dry weight) of degraded SMP and its fraction

组别	总糖 (%)	糖醛酸 (%)	岩藻糖 (%)	Mw/Da	中性单糖				
					Man	GlcA	Gal	Xyl	Fuc
SMP-D	74.19	13.60	19.40	10449.00	0.22	0.29	0.45	0.27	1.00
SMP-D-0.5 mol/L	78.79	17.88	21.56	8 465.00	0.24	0.22	0.44	0.42	1.00

## 2.2 红外和核磁共振波谱分析

对获取的莫氏马尾藻多糖及其主要分级组分 (0.5 mol/L 洗脱组分) 以及低分子量莫氏马尾藻多糖进行 FT-IR 分析, 红外谱图如图 2 所示。由红外谱图可知, 莫氏马尾藻粗多糖及其 0.5 mol/L 分级组分具有相似的官能团吸收峰; 其中 SMP-0.5 mol/L 与 SMP-D-0.5 mol/L 的 IR 谱图基本一致, 表明氧化降

解没有破坏多糖的结构骨架。对谱峰分析结果为: 821  $\text{cm}^{-1}$  为 C-2 位硫酸根取代峰; 1 200  $\text{cm}^{-1}$  左右处为 O=S=O; 1 417 和 1 602  $\text{cm}^{-1}$  为糖醛酸中 C=O 伸缩振动; 3 352  $\text{cm}^{-1}$  为糖残基中 O-H 的伸缩振动; 1 027  $\text{cm}^{-1}$  是糖苷键的 C-O-C 伸缩振动。表明其为典型的硫酸化多糖。

由于粗多糖结构复杂, 其核磁共振谱图难以辨析, 因此需要对多糖进行一定处理方可进行相关谱图分析。作为莫氏马尾藻多糖的主要分级组分, 多糖 SMP-D-0.5 mol/L 分子质量相对较低、且多糖理化指标具有一定的代表性, 因此以组分 SMP-D-0.5 mol/L 为基础, 对多糖的结构进行初步研究。图 3 所示为 SMP-D-0.5 mol/L 的  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱图。由于 SMP-D-0.5 mol/L 为多种单糖组成的杂多糖, 无论是  $90 \times 10^{-6} \sim 105 \times 10^{-6}$  的异头碳区域, 还是  $60 \times 10^{-6} \sim 90 \times 10^{-6}$  的 C2-C5 信号区域, 都非常复杂, 单凭一维碳谱难以辨识每个信号归属。176  $\times 10^{-6}$  区域的信号说明该多糖含有一定的糖醛酸, 而  $15 \times 10^{-6} \sim 17 \times 10^{-6}$  的岩藻糖 C-6 甲基信号非常明显。结合红外谱图及核磁共振谱图, 并参考相应的理化数据可知, 莫氏马尾藻多糖是以岩藻糖为主, 硫酸根主要在 C2 的含有少量糖醛酸的结构复杂的多糖。

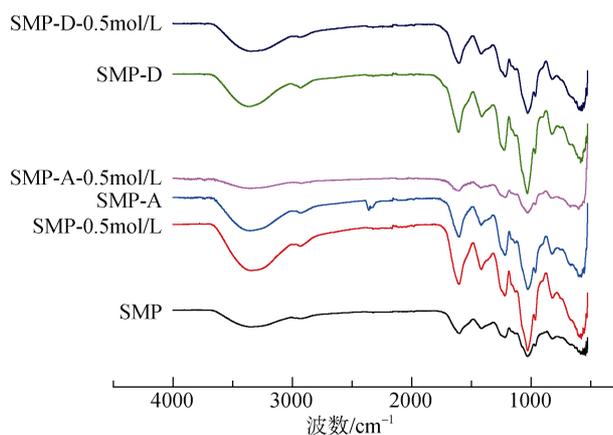


图 2 莫氏马尾藻多糖的红外谱图

Fig. 2 IR spectra of polysaccharides from *Sargassum maclurei*

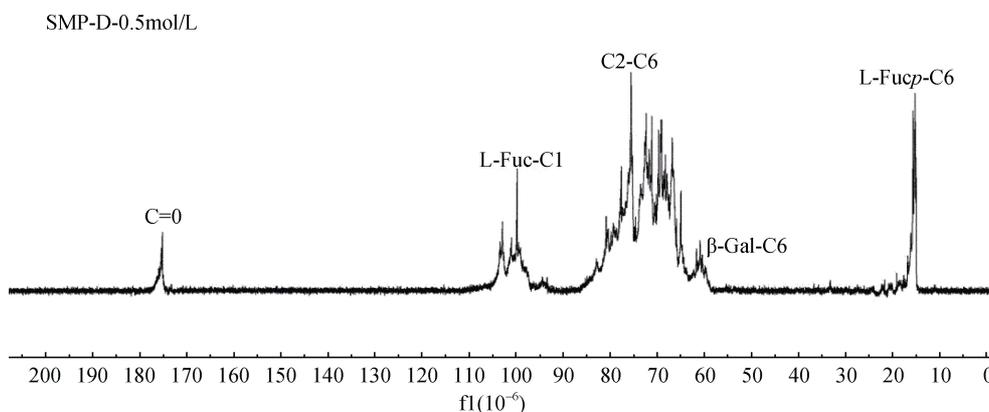


图 3 SMP-D-0.5 mol/L 碳核磁共振谱图

Fig. 3  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of SMP-D-0.5mol/L

### 2.3 活性测定

通过理化性质分析,粗多糖 SMP、SMP-A 及其 0.5 mol/L 分级组分(即 SMP-0.5 mol/L、SMP-A-0.5 mol/L)的总糖含量较高,而两种粗多糖对应的水洗组分及 1.2 mol/L 组分总糖含量较低,且回收得率较高,因此在活性测定方面选取总糖含量及得率相对较高粗多糖 SMP、SMP-A 及其 0.5 mol/L 分级组分(SMP-0.5 mol/L、SMP-A-0.5 mol/L)进行相关活性测定。

#### 2.3.1 抗氧化活性

以抗坏血酸 Vc 作为阳性对照,分别测定样品 SMP、SMP-A、SMP-0.5 mol/L 及 SMP-A-0.5 mol/L 的抗氧化能力。莫氏马尾藻多糖清除超氧阴离子自由基的结果见图 4,可以看出,莫氏马尾藻多糖清除超氧阴离子自由基的能力较 Vc 弱,但是随着浓度增加,其清除能力逐渐增强,在浓度达到 0.4 g/L 时趋于稳定,且清除率均达到 50%以上;且在相同浓度下,其清除能力大小为 Vc>SMP-A-0.5 mol/L>SMP-0.5 mol/L>SMP>SMP-A。

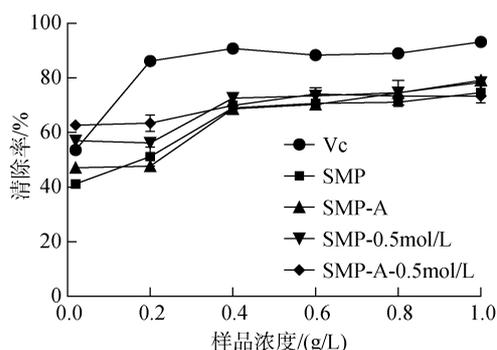


图 4 莫氏马尾藻多糖对超氧阴离子自由基的清除作用  
Fig. 4 Scavenging effects of polysaccharides from *Sargassum maclurei* on superoxide radicals

莫氏马尾藻多糖对羟基自由基的清除作用见图 5。由图 5 可知,水提粗多糖 SMP 及其分级组分 SMP-0.5 mol/L 对羟基自由基的清除能力较 Vc 强,而酸提粗多糖 SMP-A 及其分级组分 SMP-A-0.5 mol/L 的清除能力则较 Vc 要弱;但是都具有浓度依赖性。且在一浓度下,其清除能力大小为 SMP>SMP-0.5 mol/L>Vc>SMP-A>SMP-A-0.5 mol/L。

莫氏马尾藻多糖组分对 DPPH 的清除作用见图 6(数据 SD 值小于 0.01,无法在图中显示)。四种多糖对 DPPH 自由基的清除能力均弱于 Vc,且在浓度达到 5 g/L 时,四种多糖的清除能力仍小于 50%。但是,对于 DPPH 自由基的清除能力均有浓度依赖性。且

在相同浓度下,其清除能力大小为 Vc>SMP>SMP-0.5 mol/L>SMP-A>SMP-A-0.5 mol/L。

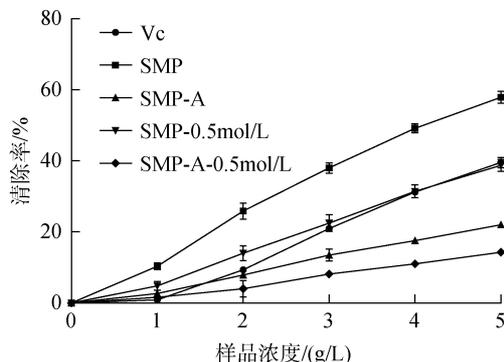


图 5 莫氏马尾藻多糖对羟基自由基的清除作用  
Fig. 5 Scavenging effects of polysaccharides from *Sargassum maclurei* on hydroxyl radicals

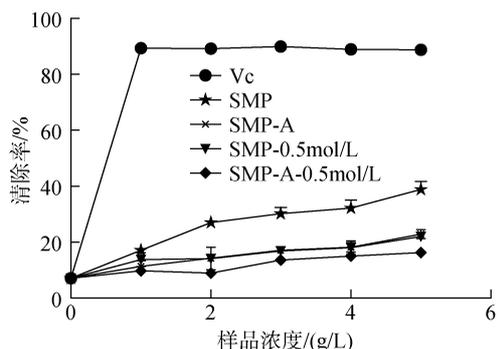


图 6 莫氏马尾藻多糖的对 DPPH 自由基的清除作用  
Fig. 6 Scavenging effects of polysaccharides from *Sargassum maclurei* on DPPH free radicals

还原能力实验主要用于测定样品对三价铁和铁氰化物的还原能力,作为抗氧化能力的一个重要指标;且在 700 nm 的吸光度越大,代表还原能力越强。由图 7 可知,四种多糖的还原能力均随着浓度增大

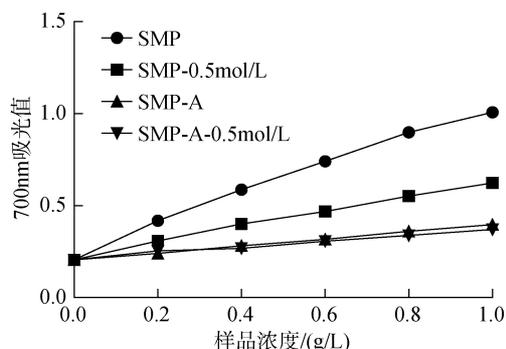


图 7 莫氏马尾藻多糖的还原能力  
Fig. 7 Scavenging effects of polysaccharides from *Sargassum maclurei* on power reduction

而逐渐增强,但是却弱于维生素 C(在该浓度范围下, Vc 的吸光度已超出范围; 且数据 SD 值小于 0.01, 无法在图中显示)。在相同浓度下, 其清除能力大小为 SMP>SMP-0.5 mol/L>SMP-A>SMP-A-0.5 mol/L。

通过对四种多糖在清除自由基能力方面的测定发现, 四种多糖均具有一定的抗氧化能力, 且随着浓度增加逐渐增强, 这与王晶、金维华等<sup>[13-15]</sup>对于海藻多糖抗氧化能力的研究结果一致。从结果中可以发现, 水提莫氏马尾藻多糖及其分级组分的清除自由基及还原能力较酸提多糖及其分级组分要强。

### 2.3.2 抗凝血活性

以生理盐水为阴性对照, 肝素钠(HP)为阳性对照, 测定了几种多糖及降解后的低分子量多糖的抗凝血活性。同时, 对其他褐藻多糖的研究表明分子量对多糖抗凝血活性有一定影响, 因此为评价分子量大小对多糖 SMP 抗凝血活性的影响, 利用氧化降解方法制备粗多糖 SMP 的降解物 SMP-D, 并对其抗凝血活性进行测定。

通过实验发现, 各种多糖的 APTT 及 TT 测试中与浓度呈现一定的正相关(谱图较多, 未放入), 但是 PT 实验中凝血时间长短与浓度则没有相关性。故对每一种多糖选取了 0.5 g/L 的浓度进行比较其抗凝血能力强弱。结果如图 8-10 所示。

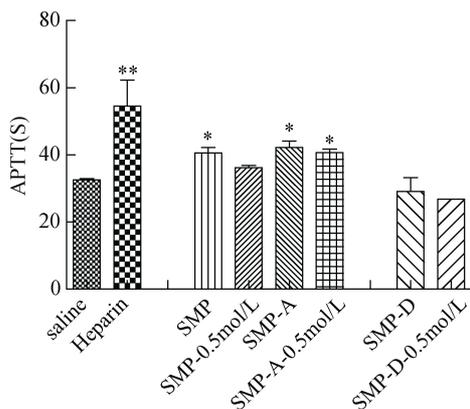


图 8 不同莫氏马尾藻多糖的活化部分凝血酶时间(\*\*.  $P < 0.01$ , \*.  $P < 0.05$ )  
Fig. 8 Activated partial thrombin time of different polysaccharides from *Sargassum maclurei*(\*\*.  $P < 0.01$ , \*.  $P < 0.05$ )

由图 8 可知, 在样品浓度为 0.15g/L 时, 样品的凝血时间均短于肝素钠, 即抗凝效果要弱于肝素钠。但是与生理盐水组相比较, 除了低分子量多糖及其分级组分外, 其余四种多糖的凝血时间均大于生理盐水组, 其中 SMP、SMP-A 及 SMP-A-0.5 mol/L 与

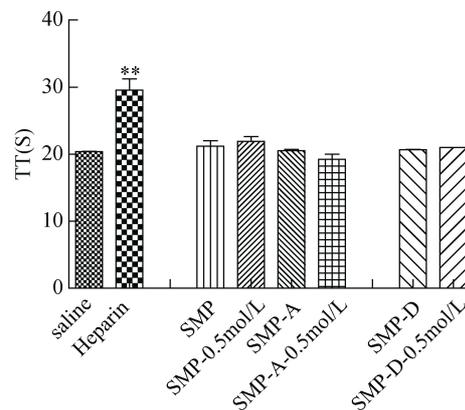


图 9 不同莫氏马尾藻多糖的凝血酶时间(\*\*.  $P < 0.01$ , \*.  $P < 0.05$ )  
Fig. 9 Thrombin time of different polysaccharides from *Sargassum maclurei* (\*\*.  $P < 0.01$ , \*.  $P < 0.05$ )

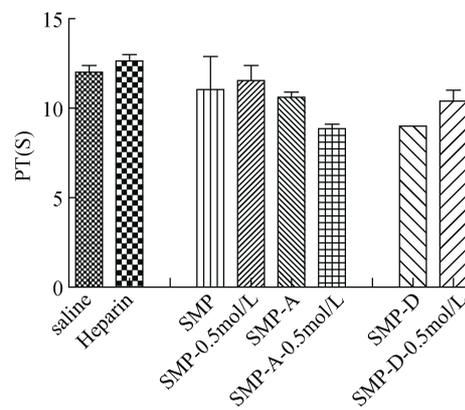


图 10 不同莫氏马尾藻多糖的凝血酶原时间(\*\*.  $P < 0.01$ , \*.  $P < 0.05$ )  
Fig. 10 Prothrombin time of different polysaccharides from *Sargassum maclurei* (\*\*.  $P < 0.01$ , \*.  $P < 0.05$ )

生理盐水对照组相比差异性显著, 说明未降解的四种多糖组分具有一定的延长活化部分凝血酶时间的作用。由图 9 可知, 与生理盐水相比, 六种多糖组分在凝血酶时间的测定时, 未显现出明显差别, 只有细微的区别。由图 10 可知, 六种多糖组分在凝血酶原时间的测定时, 与生理盐水组相比, 没有较明显差别, 即对于延长凝血酶原时间无效。

通过上述实验数据分析可知, 大分子质量的莫氏马尾藻多糖对于延长活化部分凝血酶时间(APTT)具有良好的作用, 但是对于凝血酶原时间(PT)则无效。而低分子量多糖及其分级组分在三种实验中均没有表现出效果, 说明抗凝血作用与分子量大小相关, 分子量太小, 影响抗凝血活性, 这与于广利等的研究结果一致<sup>[16-18]</sup>。

APTT 时间的延长说明样品抑制了内源性凝血

系统, TT 时间的延长说明样品抑制了凝血酶活性或纤维蛋白的聚合作用, 而 PT 时间延长则说明样品抑制外源性凝血系统。在本实验中, 样品可显著延长 APTT, 但是对于 PT 则没有效果, 说明莫氏马尾藻多糖的抗凝血作用主要是通过抑制内源性凝血系统起作用的, 这与刘雪莲等对于海藻多糖的抗凝血活性研究结果一致<sup>[19-21]</sup>。

### 3 结论

通过热水提取和稀酸提取获得的莫氏马尾藻粗多糖, 并对其进行分级纯化。结果表明, 莫氏马尾藻多糖是以岩藻糖为主, 含有糖醛酸及多种单糖的结构较复杂的硫酸化多糖。

莫氏马尾藻多糖具有良好的抗氧化和抗凝血活性。其抗氧化能力与浓度呈现正相关, 且水提多糖的抗氧化能力要强于酸提多糖。抗凝血主要是通过抑制内源性凝血途径起抗凝血作用的, 并且与分子量呈正相关。本文研究结果表明莫氏马尾藻多糖可以作为良好的抗氧化和抗凝血剂, 具有较好的药用开发前景。

#### 参考文献:

[1] 曾呈奎, 陆保仁. 中国海藻志: 第三卷, 第二册-褐藻门, 墨角藻目[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 75-77.  
Zeng Chengkui, Lu Baoren. Chinese seaweed: the third volume, the second volume-brown algae, Mexican algae order[M]. Beijing: Science Press, 2000: 75-77.

[2] 贾桢, 杨彬, 谢恩义. 莫氏马尾藻繁殖生物学初步研究[J]. 水产科学, 2012, 31(10): 616-619.  
Jia Cheng, Yang Bin, Xie Yien. Reproductive Biology of Seaweed *Sargassum moclurei*[J]. Fisheries Science, 2012, 31(10): 616-619.

[3] 卢虹玉, 刘义, 邵海艳, 等. 莫氏马尾藻(*Sargassum moclurei*) 褐藻多酚的抗氧化和抗肿瘤细胞增殖作用[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 104-105.  
Lu Hongyu, Liu Yi, Shao Haiyan, et al. Antioxidant and antiproliferative effects of phlorotannins from *Sargassum moclurei*[J]. Food Science, 2012, 33(23): 104-105.

[4] 李来好, 杨贤庆, 吴燕燕, 等. 马尾藻的营养成分分析和营养学评价[J]. 青岛海洋大学学报: 自然科学版, 1997, 27(3): 319-325.  
Li Laihao, Yang Xianqing, Wu Yanyan, et al. Analysis of nutritive composition in *Sargassum* and its evaluation in nutriology[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1997, 27(3): 319-325.

[5] 傅明辉, 余纲哲. 亨氏马尾藻多糖的分离、纯化和鉴定[J]. 中国生化药物杂志, 2000, 21(2): 66-68.

Fu Minghui, She Gangzhe. Isolation, purification and identification of polysaccharides from *Sargassum henslowianum*[J]. Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceuticals, 2000, 21(2): 66-68.

[6] Smith F, Gilles M A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugar related substances[J]. Anal Chem, 1956, 28(3): 350-356.

[7] Gibbons M N. The determination of methylpentoses[J]. Analyst, 1955, 80(949): 268-276.

[8] Kawai Y, Seno N, Anno K. A modified method for chondrosulfatase assay[J]. Analytical Biochemistry, 1969, 32(2): 314-321.

[9] Bitter T, Muir H M. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. Analytical Biochemistry, 1962, 4(4): 330-334.

[10] Li X, Lin J, Gao Y, et al. Antioxidant activity and mechanism of Rhizoma Cimicifugae[J]. Chemistry Central Journal, 2012, 6(1): 140-141.

[11] Zhang J, Zhang Q, Wang J, et al. Analysis of the monosaccharide composition of fucoidan by precolumn derivation HPLC[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2009, 27: 578-582.

[12] 王雪艳, 陈发河, 吴光斌, 等. 龙眼多糖清除自由基活性的研究[J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2010, 15(2): 109-114.  
Wang Xueyan, Chen Fahe, Wu Guangbin, et al. Study on free-radical scavenging activities of polysaccharide extracts from Longan[J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2010, 15(2): 109-114.

[13] 张胜帮, 麻卫锋, 于萍. 羊栖菜多糖提取分离及其清除自由基的活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 192-195.  
Zhang Shengbang, Ma Weifeng, Yu Ping. Extraction, purification and hydroxyl radical scavenging activity of polysaccharides from *Sargassum fusiforme*[J]. Food Science, 2009, 30(18): 192-195.

[14] Wang J, Zhang Q, Zhang Z, et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 42(2): 127-132.

[15] Jin W, Zhang W, Wang J, et al. The neuroprotective activities and antioxidant activities of the polysaccharides from *Saccharina japonica*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 58: 240-244.

[16] Wu J, Zhang M, Zhang Y, et al. Anticoagulant and FGF/FGFR signal activating activities of the heparinoid propylene glycol alginate sodium sulfate and its oligosaccharides[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 641-648.

[17] 张喆迺, 刘雪莲, 杨靖亚, 等. 羊栖菜硫酸多糖的抗凝血活性研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(18): 7505-

7508.  
Zhang Zheer, Liu Xuilian, Yang Jingya, et al. Study on anticoagulant activity of sulfated Polysaccharides from *Hizikia fusiformis*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(18): 7505-7508.
- [18] Ustyuzhanina N E, Bilan M I, Gerbst A G, et al. Anticoagulant and antithrombotic activities of modified xylofucan sulfate from the brown alga *Punctaria plantaginea*[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 826-833.
- [19] Jin W, Zhang Q, Wang J, et al. A comparative study of the anticoagulant activities of eleven fucoidans[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 91(1): 1-6.
- [20] 王静凤, 张学成, 姜国良, 等. 枝管藻多糖的提取及其抗凝血活性的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报: 自然科学版, 2003, 33(1): 75-79.  
Wang Jingfeng, Zhang Xuecheng, Jiang Guoliang, et al. Preliminary studies on the extraction of polysaccharide from *Cladosiphon okamuranusa* and its anti-coagulation activity[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2003, 33(1): 75-79.
- [21] Li Q, Zeng Y, Wang L, et al. The heparin-like activities of negatively charged derivatives of low-molecular-weight polymannuronate and polyguluronate[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 155: 313-320.

## Isolation and Characterization of polysaccharides from *Sargassum maclurei*

HOU Ning-ning<sup>1, 2</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, ZHANG Quan-bin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Received:** Feb. 18, 2017

**Key words:** *Sargassum maclurei*; polysaccharides; fucose; antioxidant activity; anticoagulant activity

**Abstract:** Polysaccharides were extracted from *Sargassum maclurei* by hot water and diluted acid. Subsequently, they were fractionated by an anion exchange column chromatography. The physicochemical properties and structural features of the polysaccharides were elucidated based on HPLC, FT-IR, NMR, and other chemical analyses. Moreover, the antioxidant and anticoagulation activities were examined in vitro. The results showed that the polysaccharides from *S. maclurei* were a type of sulfated polysaccharides, composed mainly of fucose, with some uronic acid. The in vitro antioxidation experiment indicated that the *S. maclurei* polysaccharides had good antioxidant activity and a strong ability to scavenge free radicals. Additionally, the anticoagulant assay indicated that the polysaccharides could inhibit the intrinsic pathways. The results that are presented in this study demonstrate the potential use of polysaccharides as antioxidants and anticoagulants.

(本文编辑: 康亦兼)