

孔石莼热水提取多糖的研究*

吴志军 徐祖洪 李智恩

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 分析了孔石莼 (*Ulva pertusa* Kjellm) 热水提取得到的多糖的理化性质, 并利用核磁共振碳谱解析其结构单元, 推定其多糖主要由 β -D 葡萄糖醛酸-(1 \rightarrow 4)-3- 硫酸基- α -L 鼠李糖和 α -L 艾杜糖醛酸-(1 \rightarrow 4)-3- 硫酸基 α -L 鼠李糖结构单元组成。

关键词 绿藻, 孔石莼, 多糖, 理化性质, 结构

中图分类号 Q538 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)02-0005-03

孔石莼 (*Ulva pertusa* Kjellm) 是一种广泛分布于太平洋沿岸的大型野生绿藻, 在我国主要分布于辽宁、河北、山东、江苏等省沿海, 生长在中潮带、低潮带和大干潮线的岩石或石沼中, 一般在海湾中生长较繁茂。《中国海洋药物辞典》记述, 其具有软坚散结, 利水消肿之功效, 为我国一种传统海洋药物, 用于治疗甲状腺肿大、水肿、高血压等症。关于孔石莼多糖的研究, 1961年, 日本学者三田喜代就已开始对其热水提取多糖进行过研究, 利用乙醇沉淀和酸水解多糖后, 经纸色谱分析, 检测到含有 D-葡萄糖、L-鼠李糖、D-木糖和 D-葡萄糖醛酸。1976年, Yama mo 等人进一步研究了孔石莼多糖, 经乙醇反复沉淀纯化, 得到中性多糖和硫酸多糖, 利用化学方法及气相色谱分析, 证明了硫酸多糖主要由鼠李糖和木糖组成, 此外还含有少量葡萄糖、甘露糖和半乳糖。对孔石莼多糖的研究, 以往只注重于它的组成, 而对其结构的研究则较少。主要原因是孔石莼多糖组成较复杂, 用一般的化学方法难以准确地确定各单糖的连接顺序。要正确的确定它的结构, 必须依靠现代分析仪器 (NMR, MS, IR, GC-MS 等) 并结合化学方法才能完成。

作者做的药理实验已证明, 孔石莼热水提取多糖对高脂血症小鼠具有非常显著的调节血脂的作用, 但对其多糖的性质和结构还未了解。为了能把孔石莼开发成为新的海洋药物, 提供坚实的理论基础, 作者分析了孔石莼热水提取多糖的理化性质并利用核磁共振碳谱解析其结构。本文报道这方面的研究结果。

1 材料与方法

1.1 孔石莼样品的采集及多糖的提取与纯化

孔石莼于 1999 年 3 月采自青岛太平角, 自来水清洗, 除去泥砂和其他杂草, 样品自然阴干, 塑料袋封口室温下保存。取孔石莼 100 g, 粉碎, 用 30 倍的蒸馏水于 100 $^{\circ}$ C 提取 1 h, 过滤, 滤渣重复提取两次, 合并 3 次滤液, 滤液用透析袋 (孔径为 12 000 u) 先在自来水中透析 1 d, 然后在蒸馏水中透析两次, 用硅藻土作助滤剂过滤透析液, 滤液经减压浓缩至小体积, 加入 95% 乙醇至浓度为 75%, 所得沉淀经干燥后得到提纯的多糖样品, 重 15 g, 得率为 15%。

1.2 仪器及分析方法

水分和灰分含量的测定按 1995 年版中华人民共和国药典附录所述方法进行; 以 K_2SO_4 为标准, 制作标准工作曲线, 采用明胶-氯化钡分光光度法测定样品中水解硫酸根的含量; 以半乳糖为标准, 制作标准工作曲线, 采用苯酚-硫酸法测定样品中总糖的含量; 多糖样品 C, H, O 和 N 元素的测定采用 PE240C

* 山东省科技专项项目“孔石莼多糖的提取”2001-2003
第一作者: 吴志军, 出生于 1966 年, 博士, 副研究员, 研究方向: 海洋药理学。E-mail: wulizhijun@263.net

收稿日期: 2001-03-27; 修回日期: 2001-10-20

型元素分析仪;氨基酸含量的测定采用日立 835 型氨基酸自动分析仪; ^{13}C 核磁共振谱的测定在 Bruker DPX400 M型超导核磁共振谱仪上进行,以 D_2O 为溶剂, TMS 为内标,温度 35°C 下进行。

2 结果与讨论

2.1 理化性质

孔石莼热水提取的多糖溶液,经透析袋透析,乙醇沉淀等步骤处理,所得多糖样品经测定各项理化性质列入表 1、表 2 和表 3。

表 1 孔石莼热水提取多糖样品的理化指标

Tab.1 The physical and chemical property index of the polysaccharide from *Ulva pertusa*

项目指标	水份	灰份	硫酸基	总糖
含量(%)	7.5	25.5	20.7	56.4

表 2 孔石莼热水提取多糖样品中的 C、H、O、N 元素含量的测定

Tab.2 C, H, O and N element content of the polysaccharide from *Ulva pertusa*

元素	C	H	O	N
含量(%)	27.51	4.57	42.93	0.70

从表 1 可以看出,该多糖含有较高的硫酸基,总糖含量也较高,灰份中主要成分为含硫酸根成分的无机盐。

从表 2 看出,多糖样品中 C、H、O 元素含量都较高,而 N 元素含量则较低,按公式 $C_N \times 6.25\%$ 计算得到的粗蛋白含量只有 4.38%。

从表 3 测定结果可以看出,多糖样品中氨基酸含量较低,主要原因是纯化采用透析法,把大部分无机盐、氨基酸以及分子量较小的蛋白质、糖类等物质透析掉,可以得到分子量较均一的大分子多糖。与元素分析结果相比较,用氨基酸自动分析测定仪所得结果总蛋白质含量偏低,是由于仪器测定方法不同而造成的偏差。

2.2 结构解析

孔石莼多糖的 ^{13}C NMR 图谱上出现 4 组峰,处于高场信号的一个单峰,其化学位移在 16.8δ ,为鼠李糖 C6 的甲基峰;第 2 组化学位移位于 $67.7 \sim 78.7\delta$

表 3 孔石莼热水提取多糖样品中氨基酸含量的测定

Tab.3 Amino acids content of the polysaccharide from *Ulva pertusa*

氨基酸名称	缩写英文符号	含量 ($\times 10^{-2}\text{mg/mg}$)
天门冬氨酸	Asp	0.44
苏氨酸	Thr	0.13
丝氨酸	Ser	0.25
谷氨酸	Glu	0.43
甘氨酸	Gly	0.51
丙氨酸	Ala	0.26
胱氨酸	Cys	0.07
缬氨酸	Val	0.22
蛋氨酸	Met	0.04
异亮氨酸	Ile	0.04
亮氨酸	Leu	0.09
酪氨酸	Tyr	0.12
苯丙氨酸	Phe	0.06
赖氨酸	Lys	0.10
氨	NH_3	0.44
组氨酸	His	0.05
精氨酸	Arg	0.07
脯氨酸	Pro	0.06
总和		3.38

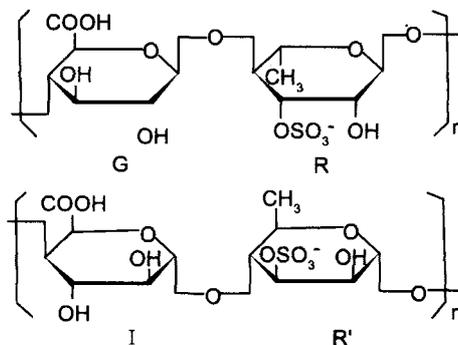


图 1 孔石莼多糖结构单位

Fig.1 The polysaccharide structural units of *Ulva pertusa*

之间的共振峰,其信号呈现典型的单糖特征;第 3 组信号出现在 $99.7 \sim 103.0\delta$ 之间,其化学位移为多糖端基 G1 的信号;处于低场 $174.5 \sim 175.0\delta$ 之间的信号,为多糖糖醛酸的化学位移。经与 Lahaye 等人^[1]研究硬石莼 (*Ulva nigida*) 所得多糖的 ^{13}C NMR 图谱数据

相比较,结果相一致。因此,推定孔石莼热水提取多糖主要由 $[\beta\text{-D-GlcP}\alpha(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3S}]_m$ 和 $[\alpha\text{-L-Idop}\alpha(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3S}]_n$ 结构单位组成(图1)。孔石莼多糖的 ^{13}C NMR 化学位移指定见表4。

表4 孔石莼多糖结构单位的化学位移(δ)

Tab.4 ^{13}C -NMR chemical shifts (δ) of structural units of polysaccharide from *Ulva pertusa*

糖残基	1	2	3	4	5	6
G	103.0	73.8	73.8	78.7	76.0	175.0
R	99.7	68.9	78.1	78.1	67.7	16.8
I	103.0	71.3	72.2	78.7	71.3	174.5
R'	101.0	68.9	78.1	78.1	68.0	16.8

G: 葡萄糖醛酸; I: 艾杜糖醛酸; R: 鼠李糖

孔石莼热水提取的多糖,经化学降解、乙酰化制成衍生物进行GC分析并结合纸色谱等化学方法分析,结果证明其多糖主要由葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸、鼠李糖组成,此外还含有少量的木糖、甘露糖、阿拉伯糖和葡萄糖。作者用 ^{13}C NMR谱也证明了孔石莼多糖主要由葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸和鼠李糖组成,结果与GC等方法分析结果相一致。本文的研究结果为把孔石

莼开发成为新的海洋药物,提供了理论依据。

参考文献

- 1 Lahaye M, Gimadevilla E A C, Ruhlennamp R, et al. Chemical composition and ^{13}C NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (Uvales, Chlorophyta). Journal of Applied Phycology, 1999(11) 1 - 7

STUDIES ON THE WATER-SOLUBLE POLYSACCHARIDE OF *Ulva Pertusa*

WU Zhi-Jun XU Zu-Hong LI Zhi-En

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

Received: Mar., 27, 2001

Key Words: Green algae, *Ulva pertusa*, Polysaccharide, Structure

Abstract

The physical and chemical property of the watersoluble polysaccharide from *Ulva pertusa* was analyzed. ^{13}C NMR spectrum was used to determine the chemical structure of the polysaccharide, and it revealed that the polysaccharide was mainly composed of major repeatedly structural units: $[\beta\text{-D-GlcP}\alpha(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3S}]_m$ and $[\alpha\text{-L-Idop}\alpha(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3S}]_n$.

(本文编辑:张培新)