

海藻中 3-(6-脱氧-6-磷酸基- α -D-吡喃型葡萄糖苷基)-sn-酰基甘油酯含量测定方法^{*}

李宪瑾¹ 范 晓¹ 牛荣丽¹ 韩丽君¹ 王丽君²

(¹ 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(² 山东华新海大海洋生物股份有限公司 威海 264200)

摘要 介绍了一种快速、准确地测定 3-(6-脱氧-6-磷酸基- α -D-吡喃型葡萄糖苷基)-sn-酰基甘油酯的方法。测定方法是基于苯酚和糖类能在浓硫酸快速加热下形成一种有色复合物。经过实验和统计学分析,结果表明酰基链对测定结果没有影响。该测定方法有较高的灵敏度和准确度,而且可以直接测定从薄层层析板获得的样品。

关键词 3-(6-脱氧-6-磷酸基- α -D-吡喃型葡萄糖苷基)-sn-酰基甘油酯, 定量分析

中图分类号 Q545⁺.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)06-0055-04

3-(6-脱氧-6-磷酸基- α -D-吡喃型葡萄糖苷基)-sn-酰基甘油酯(SQG)广泛分布在植物体内,其中海藻比陆生植物更富含 SQG^[1]。近年来科学家们发现 SQG 具有抗 HIV 活性^[2,3]、抑制 DNA 聚合酶活性^[4]、抗肿瘤活性^[5]等生物活性,引起人们的广泛兴趣。但是准确测定生物体内 SQG 含量尚未得到很好地解决。目前测定 SQG 含量的方法主要有两种:(1)通过测定纯化后样品中的脂肪酸含量,间接地测定 SQG 含量^[6,7];(2)通过比色测定纯化后样品中的硫酸根定量地测定 SQG^[8]。其中脂肪酸测定法是建立在经验公式的基础上;比色测定硫酸根的方法手续比较繁琐,需要特殊的玻璃仪器以及消除阳离子的干扰,更重要的是两种方法的灵敏度和准确性都不高,所以这些方法应用在大量海藻中 SQG 的分析方面具有局限性。因此需要建立一种新的测定 SQG 方法。

1 材料与方 法

1.1 材料

实验所用的新鲜海藻石莼采自青岛汇泉湾。样品先用干净海水洗去表面杂质和附着物,并将其在沸水中烫洗 1 min,使石莼中的脂酶失活。

1.2 试剂与溶剂

溶剂:氯仿,甲醇(分析纯);试剂: α -D-半乳糖(Sigma),SQG 标准,苯酚,浓硫酸(分析纯);仪器:721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

2 实验方法

2.1 SQG 的分离制备与鉴定

2.1.1 SQG 的分离制备 将石莼切碎,用氯仿:甲醇(1:1)浸泡 24 h,浸取 3 次,合并、浓缩提取液,加适量蒸馏水,使氯仿:甲醇:水的比例为 1:1:0.9,静置分层,除去水层和中间絮状物;将氯仿层减压蒸干,并加少量氯仿-甲醇混合溶剂,然后上 O'Brien^[9]的方法处理过的乙酸型 DEAE 离子交换柱,最后用 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 混合溶剂(12:8:1.5, V/V)将结合在交换柱上的 SQG 洗脱下来,得到 SQG 粗品。除盐后,再溶于少量甲醇中过硅胶层析柱,用冷丙酮将 SQG 洗脱下来。

^{*} 中国科学院知识创新工程领域前沿项目。

第一作者:李宪瑾,出生于 1968 年,博士,研究方向:海洋天然产物。E-mail:lixiancui@sina.com

收稿日期:2002-04-12;修回日期:2002-08-20

2.1.2 SQG 的鉴定 将高效硅胶薄层层析板在 110 ℃ 活化 0.5 h, 将样品点于薄层板上, 在展开剂氯仿-甲醇-乙酸-水 (110:20:15:5, V/V/V/V) 中展层。吹干溶剂后在碘蒸气中显色, 测定比移值 R_f 。

将展层后的薄层板吹干后, 喷 (1) 蒽酮试剂^[10]; (2) 天青 A 试剂^[11] 分别显色。

2.2 硫酸-苯酚定糖法标准曲线的制定

α -D-半乳糖标准溶液的配制: 先取一定量的 α -D-半乳糖, 在 105 ℃ 下烘干至恒重, 准确称取 10.0 mg, 用蒸馏水溶解后, 定容至 100 mL。

采用硫酸-苯酚比色法^[13,14] 测定半乳糖的含量。准确移取 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mL 标准半乳糖于玻璃试管中, 并加入蒸馏水至总体积 1 mL, 加入 0.050 mL 80% 的苯酚, 混合均匀后快速加入 4 mL 浓硫酸。冷却至室温后, 在 485 nm 波长处测定吸光度值。

2.3 硫酸-苯酚法测定溶液中 SQG 含量

SQG 溶液的配制: 称取约 60 mg SQG, 用氯仿-甲醇混合溶剂 (1:1, V/V) 定容至 10 mL。

溶液中 SQG 浓度的测定:

方法 1: 准确移取 0.02 mL SQG 溶液于试管中, 用吸耳球将溶剂吹干, 然后按照 2.1 步骤操作, 测定吸光度值;

方法 2: 准确移取 0.02 mL SQG 溶液于试管中, 用吸耳球将溶剂吹干, 然后加入 1 mL 1mol/L H_2SO_4 沸水浴水解 1 h, 冷却后, 用正己烷萃取 3 次, 除去游离脂肪酸。然后加入蒸馏水至 1 mL, 再按 2.1 步骤操作, 测定吸光度值。

3 结果

3.1 SQG 鉴定结果

在高效薄层层析板上 R_f 为 0.24 处有一棕色点, 并且该点的化合物遇到蒽酮试剂显粉红色, 遇天青 A 染成深蓝色, 表明分子中含有糖基和磺酸基, 即可断定该物质为 SQG。

3.2 硫酸-苯酚定糖法标准曲线的制定

从图 1 和表 1 可以看到硫酸-苯酚定糖法, 在含糖量 0~70 μ g 范围内, 半乳糖的量与吸光度值之间具有很好的线性关系。测定微量糖的方法很多, 但是相比之下, 硫酸-苯酚法是更快速、更灵敏的测定糖的方法, 检测限较低。

3.3 样品溶液中 SQG 含量的测定结果

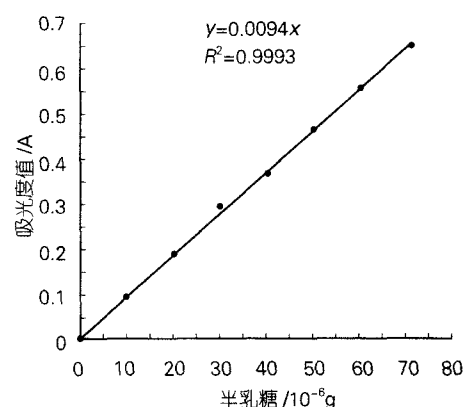


图 1 硫酸-苯酚定糖法工作曲线

Fig. 1 Standard curve of galactose determined by Phenol-Sulfuric Acid Reagent

表 1 硫酸-苯酚法中不同含量半乳糖的吸光度值

Tab. 1 Absorption data for galactose determined by Phenol-Sulfuric Acid Reagent

编号	空白	1	2	3	4	5	6	7
半乳糖 (10 ⁻⁶ g)	0	10	20	30	40	50	60	70
吸光度值 A	0.000	0.095	0.190	0.295	0.370	0.470	0.560	0.650

表 2 SQG 溶液硫酸-苯酚比色法测定结果

Tab. 2 Absorption data for SQG determined by Phenol-Sulfuric Acid Reagent

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	平均值
吸光度 A	0.300	0.285	0.300	0.310	0.290	0.310	0.290	0.310	0.2994

以半乳糖为标准, 溶液中 SQG 含量为:

$$\frac{A}{0.0094} \times \frac{1}{M} \times \frac{1}{1000} \times \frac{1}{V} = 8.837 \times 10^{-3} \text{ mmol/mL}$$

A:吸光度值; M:半乳糖的分子量; V:样品溶液体积(mL)

表3 SQG脱酰基后产物的硫酸-苯酚比色法测定结果

Tab.3 Absorption data for the deacylated SQG determined by Phenol-Sulfuric Acid Reagent

编号	1	2	3	平均值
吸光度 A	0.310	0.295	0.305	0.303

4 讨论

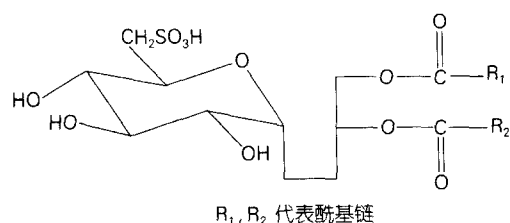


图2 SQG的结构式

Fig.2 The structure of SQG

对SQG的分子结构式(图2)分析可以看到,酰基链的存在有可能影响SQG测定结果。因此我们对SQG的酰基对测定结果的影响进行了探讨:

F检验:主要通过比较两组数据的方差 S^2 ,以确定表2和表3两组数据的精密度是否有显著性差异。

样本方差 S^2 :

$$S^2 = \frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}$$

$$n_1 = 8 \quad S_1^2 = 0.000103$$

$$n_2 = 3 \quad S_2^2 = 0.0000585$$

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} = 1.76$$

当 $f_1 = 7, f_2 = 2$ 查表^[14], $F' = 19.36, F < F'$, 因此确定表2和表3两组数据的精密度之间不存在显著差异。作出此种判断的置信度为90%。

t检验法:对于同一样品由于采用不同分析方法,因而得到的平均值不相等,现在要判断这两组数据之间是否存在系统误差,即确定表2和表3两组数据的平均值之间是否有显著差异:

$$n_1 = 8 \quad \bar{X}_1 = 0.2994$$

$$n_2 = 3 \quad \bar{X}_2 = 0.303$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_1 - \bar{X}_1)^2 + \sum (X_2 - \bar{X}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}} = 0.009655$$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{S} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} = 0.5508$$

查表^[14], 当 $P = 0.99, f = 9$ 时, $t_{0.01,9} = 3.25$,

$t < t_{0.01,9}$ 因此脱酰基与直接测定SQG两种分析方法之间不存在显著性差异。

综合F检验和t检验的结果来看,脱酰基和直接测定两种方法不存在显著差异性即不存在由于方法不同而产生系统误差。因此酰基的存在对硫酸-苯酚法测定SQG结果的影响可以忽略。

5 结语

SQG分子中的酰基对硫酸-苯酚法测定海藻中SQG含量的影响可以忽略。由于硫酸-苯酚法具有快速、准确的特点,因此可以通过薄层色谱分离SQG,直接测定海藻中SQG的含量。

参考文献

- Heinz E. Recent investigations on the biosynthesis of the plant sulfolipid. In: De Kok L J. Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants. Den Haag, Netherlands: SPB Acad, 1993. 163-178
- Gustafson KR, Cardellina J H, Fuller RW, et al. AIDS-antiviral sulfolipids from Cyanobacteria blue-green algae. J Natl Cancer Inst, 1989, 81: 1254-1258
- Loya S, Reshef V, Mizrahi E, et al. The inhibition of the reverse transcriptase of HIV-1 by the natural sulfolipids from Cyanobacteria: contribution of different moieties to their high potency. J Nat Prod, 1998, 61: 891-895
- Mizushima Y, Watanabe I, Ohta K, et al. Studies on inhibitors of mammalian DNA polymerase α and β . sulfolipids from a pteridophyte. Athyrium niponicum. Biochemical Pharmacology, 1998, 55: 537-541
- Shirahashi H, Murakami N, Watanabe M, et al. Isolation and identification of anti-tumor-promoting principles from the fresh-water Cyanobacterium Phormidium tenue. Chem Pharm Bull, 1993, 41: 1664-1666

- 6 Radwan S S. Coupling of two-dimensional thin-layer chromatography with gas chromatography for the quantitative analysis of lipid classes and their constituent fatty acids. *J Chromatogr Sci*, 1978, 16: 538-542
- 7 Demibitsky V M, Rozentsvet O A, Pechenkina E E. Glycolipids, phospholipids and fatty acids of brown algae species. *Phytochemistry*, 1990, 29: 3 417-3 421
- 8 Bertolacini R J, Barneya J E. Colorimetric determination of sulfate with barium chloranilate. *Analy Chem*, 1957, 29: 281-283
- 9 O'Brien J S, Benson A A. Isolation and fatty acid composition of the plant sulfolipid and galactolipids. *J Lipid Research*, 1964, 432-436
- 10 Khotimchenko S V, Klochova N G, Vaskovsky V E. Polar lipids of marine macrophytic algae as chemotaxonomic markers. *Biochem System Ecol*, 1990, 18: 93-101
- 11 Murakami M K, Nakamura K, Ishizuka I, et al. Visualization method for sulfolipids and its application to the determination of nanomole quantities of lipid sulfur. *Analy Biochem*, 1985, 149: 480-483
- 12 Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analy Chem*, 1956, 28(3): 350-356
- 13 Rao P, Pattabiraman T N, Reevaluation of the phenol-sulfuric acid reaction for the estimation of hexoses and pentoses. *Analy Chem*, 1989, 181: 18-22
- 14 武汉大学 主编. 分析化学. 北京: 高等教育出版社, 1987. 126-130

A METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF 3- α -DEOXY- 6-SULFO- α -D-GLUCOPYRANOSYL)-sn-ACYL-GLYCEROL FROM MACROALGAE

LI Xian-Cui¹ FAN Xiao¹ NIU Rong-Li¹ HAN Li-Jun¹ WANG Li-Jun²

(¹*Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

(²*Shandong Huaxin Haida Marine Biological Co., Ltd., Weihai, 264200*)

Received: Apr., 12, 2002

Key Words: 3-(6-deoxy-6-sulfo- α -D-glucopyranosyl)-sn-acylglycerol, Quantitative analysis

Abstract

A rapid, sensitive spectrophotometric method for quantitative determination of 3-(6-deoxy-6-sulfo- α -D-glucopyranosyl)-sn-acylglycerol is described. The assay method is based upon the formation of a colored complex between phenol and saccharide heating with concentrated sulfuric acid. The experimental result and statistic analysis indicated that the acyl chain can not affect the result of determination.

The method is more sensitive than most methods currently used and has a high degree of precision. In addition, the method can be applied to samples obtained from thin-layer plates.

(本文编辑:张培新)