

自养小球藻硫酸多糖的红外光谱分析

梁燕茹, 李文权, 刘四光

(厦门大学 海洋系, 亚热带海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 利用二乙胺基乙基琼脂糖凝胶柱层析纯化自养小球藻 (*Chlorella autotropica*) 粗多糖, 得到 3 个硫酸多糖组分 (A, B, C); 利用高效液相色谱仪和熔点仪测定了 3 个多糖的分子质量和熔点; 利用 BaCl₂ 浊度法测定了硫酸多糖中硫酸根的质量分数; 利用傅立叶变换红外光谱分析了海水自养小球藻 3 个硫酸多糖组分的环状结构、半缩醛羟基构型及取代基类型。结果显示, 3 个硫酸多糖组分的硫酸根的质量分数分别为 0.77%, 8.46%, 2.69%, 3 个组分均含有硫酸基、酰氨基, 葡萄糖是 3 个硫酸多糖组分的主要组成单糖; 3 个硫酸多糖组分组成单糖的环构型均是吡喃环, 成苷的半缩醛羟基构型有一定差异, A 是 α 构型, B、C 是 α 、 β 两种半缩醛羟基构型并存。为深入研究自养小球藻硫酸多糖的结构及抗癌活性提供基础。

关键词: 自养小球藻 (*Chlorella autotropica*); 硫酸多糖; 红外光谱

中图分类号: P745 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2007)11-0001-04

自 1981 年美国发现第一例艾滋病 (AIDS) 患者, 向 WHO 报告的临床病例现已超过几十万例, 据 Piot 1998 年统计疾病患者平均每天以 16 000 人数增加。艾滋病严重危害了人类健康。而传统治疗艾滋病的药物以叠氮胸苷 (AZT) 为代表都存在明显的副作用, 硫酸酯化多糖在临床实验中发现其用量少且副作用小。而且硫酸多糖和叠氮胸苷联合使用可大大降低叠氮胸苷的毒性, 因此极有望成为此类药物的代表, 有着很好的市场潜力。然而由于多糖结构复杂, 使得对其构效关系的研究困难重重。海藻多糖是天然硫酸多糖的重要来源, 而且作为食物链中的初级环节, 具有生物多样性的特点, 因此研究海藻多糖是获得抗癌新药的有效途径^[1]。

近年来人们陆续发现从海洋微藻提取的多糖具有特殊化学结构, 具有多种生物活性, 如增强机体免疫、抗病毒作用、抗恶性肿瘤、抗炎症、抗类风湿性关节炎。其中硫酸多糖因其独特的药理特性引起人们越来越大的兴趣^[2]。目前对海洋微藻多糖的研究远不及陆地植物和大型藻类多, 国内此类研究报道极少。作者以海水小球藻作者利用傅立叶变换红外光谱分析了海水自养小球藻 3 个硫酸多糖组分的单糖组成、

环状结构、半缩醛羟基构型及取代基类型, 为进一步研究 3 个硫酸多糖的结构及生物活性提供基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

自养小球藻 (*Chlorella autotropica*) 引自厦门大学生命科学学院。按 F/2 配方配制营养盐, 在消毒的膜滤海水中培养。

葡萄糖标准品: Dextran T-2000, T-580, T-190, T-70, T-10, T-3 (MW 分别为 2000000, 580000, 188000, 70000, 10000, 2500, 美国 Sigma 公司); 二乙胺基乙基琼脂糖凝胶柱 (20 cm \times 1.6 cm, 美国 Pharmacia 公司); 氢氧化钠、Tris、氯化钠、乙醇、蒽酮、浓硫酸、硝酸钠、溴化钾等均为国产分析纯。

超声波细胞破碎仪 (VCX600, 美国 S&M Inc 公

收稿日期: 2006-12-07; 修回日期: 2007-05-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870565)

作者简介: 梁燕茹 (1980-), 女, 河南驻马店人, 博士研究生, 主要从事海洋有机化学的研究, 电话: 13779944970, E-mail: liangyanru2003@126.com



司)、傅立叶变换红外光谱仪(470FT IR 型, 美国 Thermo Nicolet 公司)、可见分光光度计(722 型, 上海光谱仪器有限公司)、高效液相色谱仪(600 型, 美国 Waters 公司)。

1.2 方法

1.2.1 硫酸多糖的提取、分离及纯化^[2-7]

自养小球藻加入 4% 氢氧化钠溶液, 细胞超声破碎 2 次, 80 °C 水浴提取 1 h, 离心, 取上清液, 3 倍体积无水乙醇沉淀 5 h, 3% 的三氯乙酸除去蛋白和色素, 离心, 取上清液, 加入 3 倍无水乙醇沉淀, 丙酮洗涤沉淀 1 次, 无水乙醇洗 3 次, 真空干燥即得碱提粗多糖。粗多糖采用亲水性阴离子交换层析柱纯化。洗脱液是 Tris-HCl 缓冲液和 NaCl (1 mol/L) 溶液, 阶段性浓度梯度洗脱, 首先加入 100 mL Tris-HCl 缓冲液洗脱, 再加入 100 mL 0.5 mol/L NaCl 洗脱, 最后加入 100 mL 1 mol/L NaCl 洗脱, 每 5 mL 收集 1 份样, 采用蒽酮-硫酸比色法测定吸光值^[3]。

1.2.2 硫酸多糖的分子质量及熔点测定

研究表明, 多糖的生物活性与其分子质量有密切关系^[1, 8]。因此测定其分子质量对多糖活性的研究有着重大的意义。本研究采用高效凝胶过滤色谱法 (HPGFC)^[9] 测定 3 个硫酸多糖组分的分子质量, 高效液相色谱仪配有示差折光检测器 (2410 型) 和 2 个串联的色谱柱 (300 mm × 7.8 mm), 流动相是 0.1 mol/L 硝酸钠, 流速为 0.9 mL/min, 柱温是 45 °C。将样品溶解于流动相中, 用微孔过滤膜过滤后进样。3 个硫酸多糖组分的熔点测定, 见文献^[10]。

1.2.3 硫酸多糖的硫酸根质量分数测定

本实验采用较为常用的经典的 BaCl₂ 浊度法^[3], 测定硫酸多糖的硫酸根质量分数。研究发现^[9], 硫酸根在硫酸多糖的抗病毒活性中起着重要作用。

1.2.4 硫酸多糖的红外光谱测定

采用溴化钾压片法测定自养小球藻 3 个硫酸多糖组分的红外光谱。取 0.1~0.5 mg 干燥的多糖组分, 与 10~50 mg 干燥的溴化钾粉末混合, 在红外灯照下, 置于玛瑙钵, 均匀研磨, 经压片机压成薄片后即进行傅立叶红外光谱测定^[2, 3]。

2 结果

2.1 自养小球藻碱提粗多糖的分离纯化

采用二乙胺基乙基琼脂糖凝胶柱进行柱层析, 根据粗多糖中各个多糖组分与离子交换剂的结合力

不同, 而将各组分进行分离纯化 (如图 1)。由图可知得到的 3 个组分峰形对称, 表明分离较彻底。分别依次收集 1 mol/L HCl, 0.5 mol/L NaCl 和 1 mol/L NaCl 的洗脱峰得到 3 个多糖组分 A, B, C, 3 倍乙醇沉淀, 离心, 并真空干燥, 即得 3 个硫酸多糖组分 A, B, C。根据总糖标准曲线计算总的硫酸多糖质量分数, 得到硫酸多糖质量分数是 75.14%。

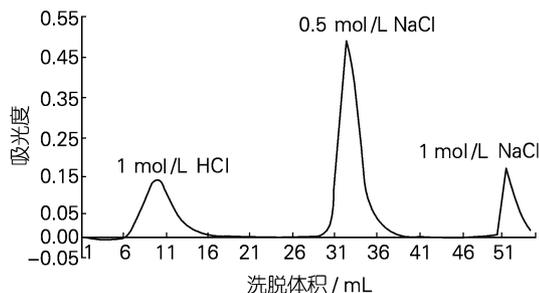


图 1 碱提粗多糖的洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of gross polysaccharides in basic extract

2.2 自养小球藻 3 个硫酸多糖组分的分子质量及熔点测定

经测定, 自养小球藻 3 个硫酸多糖组分的分子质量及熔点见表 1。

表 1 3 个硫酸多糖的分子质量及熔点

Tab.1 Molecular weights and melting points of three sulfate polysaccharides

组分	分子质量 (u)	熔点 (°C)
A	134 690	226.9
B	220 073	243.3
C	165 925	230.8

2.3 自养小球藻 3 个硫酸多糖组分的硫酸根质量分数测定

BaCl₂ 浊度法测定柱层析所得 3 个多糖组分的硫酸根质量分数。A, B, C 的硫酸根质量分数分别为 0.77%, 8.46%, 2.69%。

2.4 自养小球藻 3 个硫酸多糖组分的红外光谱分析

海水自养小球藻 3 个硫酸多糖组分的红外光谱 (如图 2, 3, 4), 分析结果^[2, 11-15]示于表 2。

3 结论

海水自养小球藻粗多糖经柱层析得到 3 个硫酸多糖组分，通过傅立叶红外光谱分析，3 个硫酸多糖组分的主要组成单糖均是葡萄糖；3 个硫酸多糖组分均含有酰氨基、硫酸基、羟基等，组成单糖的环构型均为吡喃环，成苷的半缩醛羟基构型有一定差异，A 是 α 构型，B、C 均是 α 、 β 两种糖苷半缩醛羟基构型并存。综上所述，为进一步研究 3 个组分中硫酸多糖的结构及其生物活性提供了初步参考。

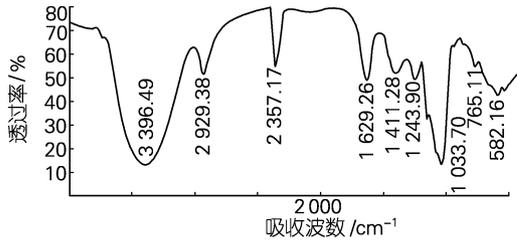


图2 组分 A 的红外光谱图
Fig.2 Infrared spectrometry of A

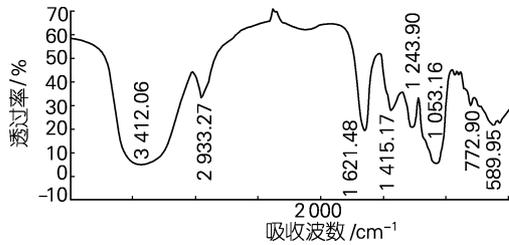


图3 组分 B 的红外光谱图
Fig.3 Infrared spectrometry of B

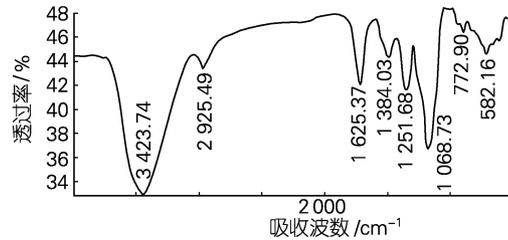


图4 组分 C 的红外光谱图
Fig.4 Infrared spectrometry of C

表 2 3 个硫酸多糖组分的红外光谱

Tab.2 Infrared spectrometries of three sulfate polysaccharides

吸收波数(cm^{-1})			振动方式或官能团
A	B	C	
3396.49	3412.06	3423.74	-OH 伸缩振动
2929.38	2933.27	2925.49	糖类 C-H 不对称伸缩振动
2357.17			R-N=C=O
1629.26	1621.48	1625.37	N-H 弯曲振动
1411.28	1415.17	1384.03	糖类 C-H 弯曲振动
1243.90	1243.90	1251.68	-O-SO ₃ -H
1032.66	1053.16	1068.73	C-OH
940.97			D-吡喃葡萄糖环的振动
	894.27	901.35	β -糖苷键
863.14	867.06		α -糖苷键
765.11	772.90	772.90	α -吡喃环的对称伸缩振动

参考文献:

[1] 张赛金, 李文权, 蔡明刚. 海藻硫酸多糖及其抗 HIV-1 活性[J]. 海洋科学, 2003, 27 (8): 16-19.
[2] 张赛金, 李文权, 邓永智, 等. 海洋微藻多糖的红外光谱

分析初探[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2005, 44 (增刊): 212-214.
[3] 刘四光, 李文权, 郑啸, 等. 自养小球藻 (*Chlorella autotropica*) 多糖提取纯化方法研究[J]. 海洋科学进展,



- 2005, **23** (增刊): 41-46.
- [4] 赵宇, 李俊卿, 张立新, 等. 海藻子多糖 DEI、DEII 组分的分离纯化及单糖组成分析[J]. 海洋科学, 2006, **30** (9): 6-8.
- [5] 牛建峰, 王广策, 曾呈奎, 等. 带形蜈蚣藻多糖和可溶性蛋白含量测定及藻红蛋白分析鉴定[J]. 海洋科学, 2006, **30** (8): 50-53.
- [6] 薛志欣, 杨桂朋, 王广策. 龙须菜琼胶的提取方法研究[J]. 海洋科学, 2006, **30** (8): 71-77.
- [7] 朱劲华, 张威, 王敏. 极大螺旋藻胞内多糖对体外肿瘤细胞抑制作用的实验研究[J]. 海洋科学, 2007, **31** (1): 1-5.
- [8] Fabregas J, Garcia D, Fernandez-Alonso M, *et al.* *In vitro* inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae[J]. *Antiviral Research*, 1999, 44: 67-73.
- [9] 商澎, 梅其炳, 曹之宪, 等. 当归多糖组分的高效液相色谱分析[J]. 中国药学杂志, 2000, **35** (5): 332-335.
- [10] 张景文, 杨乃峰. 有机化学实验[M]. 长春: 吉林大学出版社, 1992. 38-41.
- [11] 张俐娜, 张平义, 李翔, 等. 香菇多糖的成分及其分子量研究[J]. 高等学校化学学报, 1998, **19** (9): 1 513-1 517.
- [12] Zbhanov R G. Vibrational spectra and structure of mono and polysaccharides [J]. *Journal of Molecular Structure*, 1992, **27**(2): 565-584.
- [13] Kacurakova M, Capek P, Sasinkova N, *et al.* FT-IR study of plant cell model compounds: pectic polysaccharides and hemicellulose[J]. *Carbohydrate polymers*, 2000, **43**(1): 195-203.
- [14] 陈向东, 刘晓雯, 吴梧桐. 低分子量灰树花多糖的分离、纯化和抗肿瘤活性[J]. 中国天然药物, 2006, **4** (1): 77-80.
- [15] 慕慧敏, 赵婷婷, 张全斌, 等. 超微粉碎在孔石莼多糖提取中的应用[J]. 海洋科学, 2005, **29** (12): 56-59.

Infrared spectrometry of sulfate polysaccharides of *Chlorella autotropica*

LIANG Yan-ru, LI Wen-quan, LIU Si-guang

(Department of Oceanography, Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received : Dec., 7, 2006

Key words: *Chlorella autotropica*; sulfate polysaccharide; FT-IR spectroscopy

Abstract: In order to research the structure and anti-HIV activity of sulfate polysaccharides, three white refined sulfate polysaccharides (A, B, C) were gained with the DEAE sepharose column chromatographic analysis; molecular weights and melting points of three sulfate polysaccharides were got with the HPLC technology and melting point apparatus; determination of sulphate content was made by barium chloride gravimetric method; the chemical compositions and configuration of marine *Chlorella autotropica* polysaccharides basically extracted from marine *Chlorella autotropica* were studied by FT-IR spectroscopy. The results show that sulphate contents of three sulfate polysaccharides were 0.77%, 8.46%, 2.69% respectively, all the three marine *Chlorella autotropica* polysaccharides have acylamino radical and sulfate radical. Glucose is always a dominant monosaccharide in the three sulfate polysaccharides. Pyranose is the major component of the sulfate polysaccharide in the A, with one glycoside configuration, α -hemiacetal hydroxyl. Pyranose is also the major component of the sulfate polysaccharide in the B and C, with two glycoside configurations, α -hemiacetal hydroxyl and β -hemiacetal hydroxyl coexisted.

(本文编辑: 刘珊珊)