

# 海蒿子多糖 DEI、DEII 组分的分离纯化及单糖组成分析

赵 宇, 李俊卿, 张立新, 陈 悦, 李志萍, 陆懋荪, 尹佩玉

(青岛大学 化工学院, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 海蒿子(*Sargassum confusum* Agardh)经热水抽提、乙醇沉淀、DEAE-Sephadex A-25 柱层析分离, 得到多糖 DEI、DEII, 糖质量分数分别为 52.40%, 38.80%。经酸降解、薄层层析、气相色谱-质谱分析, 证明其单糖组成均为岩藻糖、木糖、半乳糖、果糖、甘露糖、葡萄糖。其中岩藻糖质量分数最高(DEI: 39.3%; DEII: 35.2%)。

**关键词:** 海蒿子(*Sargassum confusum* Agardh); 多糖; 分离; 纯化; 单糖组成

**中图分类号:** R284.1   **文献标识码:** A   **文章编号:** 1000-3096(2006)09-0006-03

海蒿子(*Sargassum confusum* Agardh)属于褐藻门(Rhacophyta), 马尾藻科(Sargassaceae), 马尾藻属(*Sargassum*), 为多年生海藻, 褐色藻体。《中药大辞典》<sup>[1]</sup>记载, 海蒿子性“苦、咸、寒”, 入“肺、脾、肾”经, 具有“软坚、消痰、利水、泻热”之功效, 可用于治疗“瘰疬、癭瘤、积聚、水肿、脚气、睾丸肿痛”等症。1970年, Ovodov 等<sup>[2]</sup>从海蒿子中提取出硫酸蛋白结合多糖, 经凝胶过滤, 离子交换法纯化, 电泳法证明为均一多糖。1973年, Krasikova<sup>[3]</sup>等用气-液色谱对海蒿子多糖的结构进行了鉴定。1985年, Usov<sup>[4]</sup>通过对海蒿子多糖进行酸降解及片断分离, 证明其是由岩藻糖、葡萄糖、D-甘露糖及葡萄糖醛酸组成。1998年, 芦金清等<sup>[5]</sup>用水煎法从海蒿子中提取出水溶性多糖, 用乙醇沉淀法对其纯化, 并用电泳法证明其为均一多糖, 并用纸层析及红外光法鉴定其结构。目前, 对于海蒿子多糖的分离纯化及结构分析和抗癌活性研究工作尚欠深入。作者首次采用 DEAE-Sephadex A-25 葡聚糖凝胶层析柱成功地将海蒿子粗多糖纯化分离出两种组分 DEI 和 DEII, 并用薄层色谱法, 气相色谱-质谱法鉴定其单糖组成。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 仪器和试剂

海蒿子采集于烟台长岛, 阴干、粉碎; DEAE-Sephadex A-25 (北京经科试剂公司分装); 薄

层层析硅胶 G-60 型(青岛海洋化工厂产品); D-葡萄糖、D-半乳糖、D-岩藻糖、D-果糖、D-木糖、D-甘露糖标准品均为分析纯(上海试剂二厂产品); 其余试剂均为国产(CP 或 A.R.); 721 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司产品); 气相色谱-质谱: 美国瓦里安 Varian GC-3800。

### 1.2 多糖的提取、分离和纯化

称取海蒿子干粉 10 g, 甲醛浸泡过夜, 热水抽提, 过滤、透析、浓缩, 乙醇沉淀, 沉淀干燥后, 去离子水溶解, 加乙醇、MgCl<sub>2</sub> 沉淀, 离心取上清液, 浓缩, 35℃ 烘干得多糖粗品。将多糖粗品溶于少量蒸馏水中, 离心, 上清液加入 DEAE-Sephadex A-25 层析柱, NaCl 溶液梯度洗脱, 分步收集, 苯酚-硫酸法跟踪检测, 确定多糖所在的管数, 收集, 透析、减压浓缩, 得多糖 DEI、DEII。

### 1.3 海蒿子多糖 DEI、DEII 的纯度鉴定

醋酸纤维薄膜电泳法测其纯度,  $\sigma$ -岩藻聚糖为标准糖, 次甲基蓝溶液显色。

收稿日期: 2004-11-17; 修回日期: 2005-06-23

基金项目: 青岛市科技局资助项目(02-1-kchhh-42-2)

作者简介: 赵宇(1979-), 女, 山东泰安人, 硕士, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: yu-zhao@163.com; 张立新, 通讯作者, E-mail: zhanglixin01@sina.com



## 1.4 总糖含量测定

以岩藻糖为标样,用苯酚硫酸法测定总糖含量。

## 1.5 单糖组成分析

### 1.5.1 多糖酸降解

称取多糖 DEI、DEII 各 20 mg,以 2 mL 1mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶解,封管,于 100℃ 下降解 12 h,冷却, BaCO<sub>3</sub> 粉末中和,离心取上清液,干燥后放入盛有 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的干燥器中干燥 24 h。

### 1.5.2 薄层层析

水解浓缩样点硅胶板,展开剂为正丁醇:吡啶:0.03 mol/L 硼酸水溶液(体积比)为 9:6:4.5,丙二酸-苯胺试剂显色。

### 1.5.3 气相色谱-质谱分析

#### 1.5.3.1 衍生物制备

称取 10 mg 多糖 DEI、DEII 于带盖的小试管中,各加入 1 mL 吡啶摇动使其溶解后,再加入 0.4 mL 六甲基二硅氮烷和 0.2 mL 三甲基氯硅烷,密塞,震荡后在室温下反应 5 min,反应物可直接进行气相色谱-质谱分析。

#### 1.5.3.2 测定条件

CP-Sil8 柱;进样口温度:200℃;离子阱温度:150℃;分流比为 20:1;流速:1.0 mL/min;程序升温条件:165℃(保持 8 min),以 5℃/min 升温至 210℃(保持 20 min);气化温度 250℃;进样量:0.3 μL;。质量扫描范围为 40~600。

## 2 结果

### 2.1 多糖的纯度检测

海蒿子经水提、脱蛋白、DEAE-Sephadex A-25 层析分离,收集 0.7 和 1 mol/L NaCl 的洗脱峰分别得多糖 DEI、DEII,结果为单一对称峰(图 1)。经纯度检测,两种多糖均呈现单一色带,表明它们是均一性多糖,结果见图 2。

### 2.2 海蒿子多糖 DEI、DEII 的总糖含量测定

采用苯酚硫酸法以岩藻糖为标准测定多糖中的总糖含量,测定结果 DEI 总糖质量分数为 52.4%,DEII 总糖质量分数为 38.8%。

### 2.3 单糖组成分析

#### 2.3.1 薄层层析

海蒿子多糖 DEI、DEII 降解液经薄层层析检出其单糖组成为岩藻糖、半乳糖、果糖、葡萄糖(图 3)。

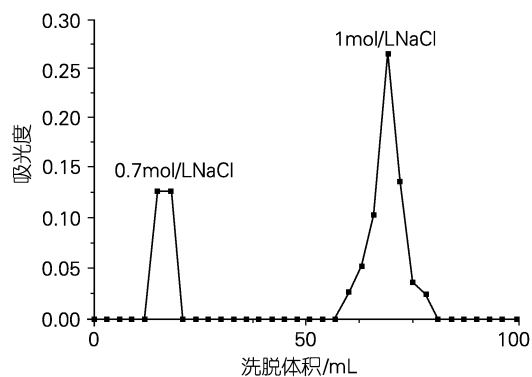


图 1 多糖洗脱曲线

Fig.1 The elution of polysaccharide

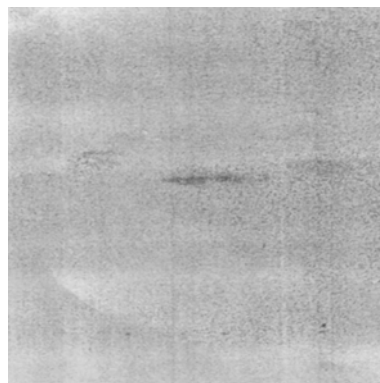


图 2 多糖 DEI、DEII 电泳图

Fig.2 Electrophoresis of polysaccharide DEI, DEII

### 2.3.2 气相色谱-质谱分析

降解后的多糖 DEI、DEII 硅烷化后直接进行气相色谱-质谱分析,与标准单糖硅烷化后各衍生物的保留时间和质谱库检索结果对照,多糖 DEI、DEII 衍生物的单糖组成均为:木糖 1,岩藻糖 2,半乳糖 3,果糖 4,甘露糖 5,葡萄糖 6(按出峰顺序排列)。在 DEI 中,岩藻糖的质量分数为 39.3%,而 DEII 中岩藻糖质量分数为 35.2%。另外 5 种糖的质量分数在 DEI 中分别为半乳糖 27.1%,木糖 17.0%,葡萄糖 7.4%,甘露糖 6.6%,果糖 2.6%,在 DEII 中分别为半乳糖 19.4%,葡萄糖 17.0%,甘露糖 14.7%,木糖 10.4%,果糖 1.4%。可见两个多糖组分虽然组成种类相同,但具体组成多糖的单糖含量有较大的差别。另外,气-质联用分析



比薄层层析多检出木糖和甘露糖,可能是两者的检出限不同所致。

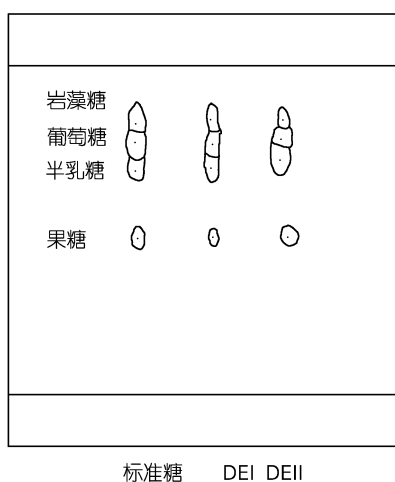


图3 多糖 DEI, DEII 薄层层析

Fig.3 TLC of polysaccharide DEI,DEII

### 3 讨论

利用DEAE-SephadexA-25凝胶层析柱从海蒿子中分离出多糖DEI、DEII纯品为淡黄色粉末,易溶于水且呈粘稠状,不溶于乙醇、丙酮等有机溶剂。苯酚硫酸、蒽酮硫酸反应、次甲基蓝颜色反应为阳性。在醋酸纤维薄膜电泳中均显示单一色带,薄层层析与气相色谱-质谱法加以对照,表明两种多糖其单糖组成

均为木糖、岩藻糖、半乳糖、果糖、甘露糖和葡萄糖,其中岩藻糖的含量在两种多糖组分中均为最高,质量分数分别为39.3%和35.2%。本实验中所得到的数据为进一步的对两种多糖组分进行药理活性研究奠定了化学基础。

#### 参考文献:

- [1] 江苏新医学院编. 中药大辞典[M]. 第一版. 上海: 上海科学技术出版, 1985.1 933-1 934.
- [2] Ovodov Y S, Khomenko V A, Guseva T F. Polysaccharides of brown algae. II .*Sargassum* from *Sargassum pallidum* [J]. **Inst Biol Akt Veshchestv Vladivostok USSR Khim Prir Soedin**,1970, **6**(3): 285-294.
- [3] Krasikova I N, Solov'eva T F, Khomenko V A. Polysaccharides of brown algae. VI .*Sargassum* and its fragments studied by gas-liquid chromatography [J]. **Inst Biol Akt Veshchestv Vladivostok USSR Khim Prir Soedin**, 1973, **9**(3): 253-259.
- [4] Usov A I, Kosheleva E A, Yakovlev APND. Polysaccharides of algae. Polysaccharide composition of several brown algae of the Sea of Japan [J]. **Org Chem Moscow USSR Bioorg Khim**, 1985,**11**(6): 830-836
- [5] 芦金清, 邓可众. 中药海藻多糖的提取与分析 [J]. 中成药, 1998, **20**(6): 9-12.

## The studies on the isolation, purification, and chemical composition analysis of polysaccharides DEI and DEII from *Sargassum confusum*

ZHAO Yu, LI Jun-qing, ZHANG Li-xin, CHEN Yue, LI Zhi-ping, LU Mao-sun, YIN Pei-yu

(College of Chemistry Engineering, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

Received: Nov., 17, 2004

**Key words:** *Sargassum confusum*; polysaccharide; isolation; purification; chemical composition

**Abstract:** The characteristics of the polysaccharide DEI and polysaccharide DEII isolated from *Sargassum pallidum* through water extraction, ethanol precipitation and DEAE-Sephadex A-25 column chromatography sequentially were analyzed by TLC, gel electrophoresis and GC-MS. It was found that these polysaccharides were composed of fucose, xylose, galactose, fructose, mannose and glucose, among them fucose being the primary component (39.3% in DEI and 35.2% in DEII). (本文编辑: 张培新)