

浒苔多糖的分级纯化及保湿活性研究

石学连^{1,2}, 张晶晶^{1,2}, 宋厚芳^{1,2}, 王晶^{1,2}, 张忠山^{1,2}, 张全斌¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 用 DEAE-Sepharose FF 离子交换凝胶层析柱对浒苔 (*Enteromorpha*) 多糖进行分级纯化, 利用 HPLC 色谱分析了单糖组成, 并以甘油和透明质酸为对照, 研究其吸湿和保湿活性。结果表明, 浒苔多糖主要为葡萄糖醛酸-鼠李糖-木糖-甘露糖聚合物; 浒苔多糖主要由两种组分组成, 其一组分木糖和鼠李糖含量摩尔比为 1.11 : 1, 另一组分木糖和鼠李糖含量比为 1:3.28; 浒苔多糖具有与透明质酸相似的吸湿和保湿能力。

关键词: 浒苔 (*Enteromorpha*); 多糖; 保湿

中图分类号: R282.77

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)07-0081-05

浒苔 (*Enteromorpha*) 属绿藻门, 石莼目, 石莼科。文献记载^[1], 浒苔含有多种人体必需氨基酸、脂防酸、维生素和无机盐, 其中铁的含量尤为丰富。自古以来浒苔就是我国沿海居民食用和药用藻类, 有清热消炎之功效。《本草纲目》中记载浒苔“烧未吹鼻止衄血, 汤漫捣敷手背肿痛”, 另外《随息居饮食谱》记载了浒苔“消胆、消瘰疬瘦瘤、泄胀、化痰、治水土不服”。

浒苔中含有大量水溶性硫酸多糖, 研究发现^[2,3], 浒苔多糖具有提高超氧化物歧化酶(SOD)活力、降低脂质过氧化物(LPO)含量、促进 T、B 淋巴细胞的增殖反应、抑制皮肤癌等生理功能。由于多糖分子结构中存在大量羟基或羧基等极性基团, 能与水分子形成氢键且相互交联呈网状结构, 表现出良好的吸湿和保湿性能^[4]。本实验研究了浒苔多糖的提取、化学组成及其吸湿和保湿活性, 为更好地开发利用浒苔提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

浒苔于 2008 年 6 月份采自青岛汇泉湾, 由中国科学院海洋研究所丁兰平博士鉴定为缘管浒苔 (*Enteromorpha linza*)。褐藻多糖硫酸酯 FPS 及其衍生物样品均为本实验室自制, 分别为 FPS、乙酰化 FPS、低分子质量 FPS、2.0 低分子质量 FPS 和乙酰化低分子质量 FPS, 其中 2.0 低分子质量 FPS 为通过 DEAE-Sepharose FF 凝胶柱, 用 2 mol/L NaCl 溶液洗脱。

1.2 仪器

SHIMADZU-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); YMC-Pack ODS-AQ 色谱柱(250 × 4.6 mm, 5 μm); FA1004 电子天平(上海天平仪器厂); 722 型分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司); R-114 型旋转蒸发器(瑞士 BÜCHI); EYELA FD-5N 型真空冷冻干燥机(东京理化器械株式会社)。

2 方法

水分测定采用烘干法; 灰分测定采用马弗炉法; 粗脂肪测定采用索氏提取法; 总糖测定采用苯酚-硫酸法; 碘测定采用亚硝酸-尿素法。

2.1 浒苔多糖的提取

取浒苔干品 180 g, 加入 40 倍水, 于 115 ℃ 下提取 3 h, 筛绢分离藻渣, 硅藻土作为助滤剂过滤提取液, 浓缩后加入到 3.75 倍 95%乙醇中, 得白色絮状沉淀, 将沉淀分离后溶于水, 装入分子质量截留值为 3 500 u 的透析袋中透析, 浓缩至小体积后冷冻干燥, 得白色絮状多糖样品(14.69 g, 得率 8.16%), 命名为 6-EP。

2.2 浒苔多糖的分级

多糖溶于水后, 用 DEAE-Sepharose FF 凝胶柱

收稿日期: 2009-06-23; 修回日期: 2009-10-16

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2008BAC49B04)

作者简介: 石学连 (1984-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事海洋天然产物研究, 电话: 0532-82898708, E-mail: shijie1021@163.com; 张全斌, 通信作者, E-mail: qbzhang@qdio.ac.cn

层析, 上样后先以蒸馏水平衡。然后以 0~2 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱, 洗脱流速为 0.92 mL/min, 自动收集器收集洗脱液, 每 10 min 收集一管, 苯酚-硫酸法

检测是否有多糖洗脱出, 洗脱曲线如图 1 所示, 收集对应洗脱峰洗脱液透析后冷冻干燥, 命名为分级多糖 (FP1,FP2); 最后再以 2 mol/L NaCl 溶液洗脱。

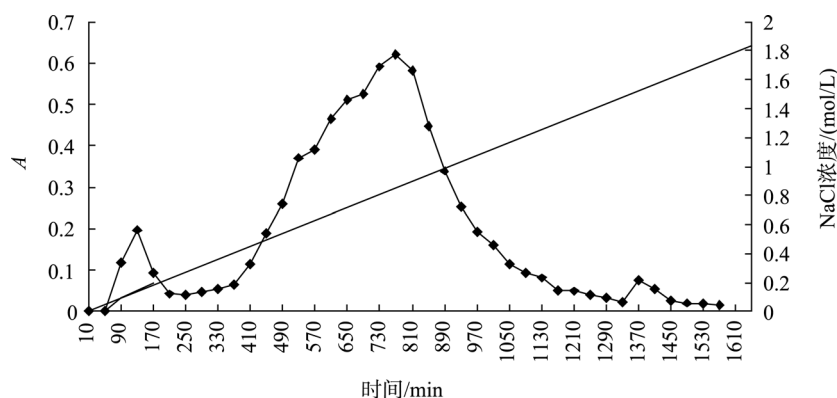


图 1 6-EP 经 DEAE-Sepharose FF 离子交换凝胶柱纯化图

Fig. 1 Purification of 6-EP by anion exchange chromatography on DEAE-Sepharose FF column

2.3 化学分析

总糖含量采用苯酚-硫酸法测定, 以鼠李糖为标准; 硫酸根含量采用明胶-氯化钡分光光度法测定, 以硫酸钾为标准; 糖醛酸含量采用硫酸-咔唑法测定, 以葡萄糖醛酸为标准; 分子质量采用高效液相色谱法测定; 溴化钾压片, 红外光谱分析。多糖样品使用 D₂O 溶解后冻干, 多次交换。称取 40 mg 多糖样品溶解于 0.5 mL D₂O 中, 于 AVANCE 600 型超导超屏蔽傅立叶变换核磁共振波谱仪上测定 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR, 测定温度 25 。

2.4 单糖分析^[5]

采用 SHIMADZU-20A 高效液相色谱仪, 检测方法为 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生, C₁₈ 烷基键合柱分离, 紫外检测器于 245 nm 处检测, 内标为褐藻糖。

2.4.1 样品水解

约 50 mg 样品经 2 mol/L 三氟乙酸水解 4 h, 过滤后用 NaOH 溶液中和后定容至 25 mL 待用。

2.4.2 衍生化处理

取样品水解溶液 4 mL 与 1 mL 20 mmol/L 核糖溶液混匀, 从中取 100 μL 置于离心管中, 分别加入 100 μL 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液和 0.3 mol/L NaOH 溶液, 混匀后于 70 °C 水浴中反应 30 min, 取出后在 4 °C 下冷却 10 min, 以 100 μL 0.3 mol/L HCl 溶液中和, 摇匀后用 1 mL 氯仿萃取, 充分震荡后 5 000 r/min 离心 10 min, 弃去有机层, 萃取 3 次后待用。

2.4.3 色谱条件

柱温为 25 °C, 流速为 1 mL/min, 流动相 A, 0.4% 三乙胺溶液(20 mmol/L 乙酸铵, 乙酸调节 pH 至 6.90): 乙腈=1 : 9; 溶剂 B, 0.4%三乙胺溶液(20 mmol/L 乙酸铵, 乙酸调节 pH 至 6.90): 乙腈=4 : 6。时间梯度为 0~9 min~30 min~35 min~40 min, 相应溶剂 B 梯度为 10%~14%~64%~14%~10%, 进样量 20 μL。

2.5 样品的吸湿、保湿活性研究

2.5.1 样品的吸湿活性^[6]

测定吸湿性需在恒温恒湿环境下进行, 可以采用密闭容器中放置某种饱和盐溶液, 在规定温度下使之保持一定的相对湿度。本实验选用饱和硫酸铵和乙酸钾溶液置于小干燥器中, 环境温度为 20 °C。选用甘油和透明质酸(HA)为对照, 测定了浒苔多糖(6-EP)、FPS 及其衍生物样品的吸湿率。将样品干燥至恒质量后称其质量, 分别置于相对湿度为 80%和 44%的干燥器中, 放置 4、24、48 h 称其质量变化。吸湿率计算公式:

$$\text{吸湿率}(\%) = (M_2 - M_1) / M_1 \times 100\%$$

其中, M_2 为放置前样品质量(g); M_1 为放置后样品质量(g)。

2.5.2 样品的保湿活性^[6,7]

测定保湿性同样在恒温恒湿环境下进行, 本实验采用硅胶干燥器, 环境温度为 20 °C。对照选用甘油和透明质酸, 样品干燥至恒质量后称其质量, 加入 3 倍量的蒸馏水充分混匀, 置于干燥器中, 测定水

分经时减少量, 保湿率计算公式:

$$\text{保湿率}(\%) = M_2 / M_1 \times 100\%$$

式中, M_2 为放置后水分质量(g); M_1 为放置前水分质量(g)。

3 结果与分析

3.1 化学分析

经 DEAE-Sephrose FF 离子交换柱分离纯化后, 得到 2 个组分。其化学组成分析结果如表 1 所示。从 HPLC 色谱单糖分析结果可知, 浒苔多糖由甘露

糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖和木糖组成, 其中鼠李糖、木糖和甘露糖含量最多。分级组分 FP1 单糖组成比较特殊, 其木糖含量比较高, 鼠李糖和糖醛酸含量相比较低, 但该组分所占比重比较小。图 2 为各个标准单糖的 HPLC 色谱图, 各峰分别对应甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖和内标褐藻糖, 各单糖分离效果良好。随着洗脱液浓度提高, 酸性多糖被洗脱出, 所以 FP1 和 FP2 的硫酸根含量高于 6-EP 含量。

表 1 各组分化学组成

Tab. 1 Chemical composition of fractions

样品	得率 (%)	糖醛酸 (%)	硫酸根 (%)	总糖 (%)	分子质量 ($\times 10^4$ u)	单糖(摩尔分数, %)				
						甘露糖	鼠李糖	葡萄糖	半乳糖	木糖
6-EP	-	12.10	16.70	48.86	23.2	6.74	65.56	5.54	2.83	19.33
FP1	5.06	9.08	20.07	45.12	23.6	8.40	40.22	3.43	3.26	44.69
FP2	27.18	16.60	20.18	57.57	22.6	7.34	66.08	3.91	2.55	20.12

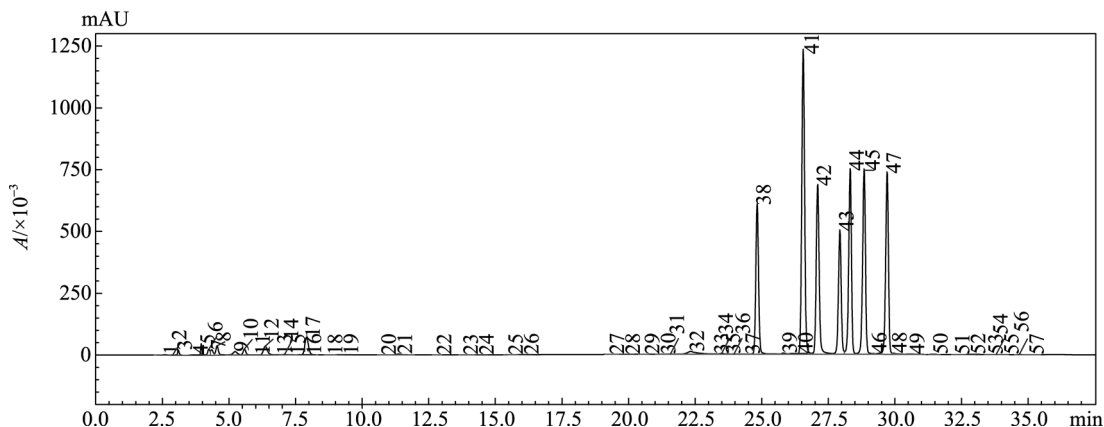


图 2 PMP 衍生化标准单糖的高效液相色谱

Fig. 2 High performance liquid chromatographic (HPLC) separation of PMP-labeled monosaccharide standards

6-EP、FP1 和 FP2 的红外吸收光谱很相似, 如图 3 所示, 其中 3421 cm^{-1} 对应的是羟基吸收峰; 1633 cm^{-1} 为糖醛酸残基中羧基的吸收峰; 1228 cm^{-1} 的强峰为硫酸基的 S=O 对称伸缩振动吸收峰; $1052 \sim 1170\text{ cm}^{-1}$ 的强宽吸收峰为糖苷键 C-O-C 的振动吸收峰, FP1 和 FP2 的该峰峰型与 6-EP 的稍有不同, 可能是由于单糖组成不同造成糖苷键连接的差异造成的; 920 cm^{-1} 附近的弱峰对应 β -型吡喃糖环振动峰; 849 cm^{-1} 附近的峰为糖 α -端基差向异构的 C-H 变角振动吸收峰^[8], 也可能是硫酸基的 C-O-S 伸缩振动吸收峰, Lloyd^[9]研究发现该峰出现表示硫酸基位于轴向配位, 但由于端基 C-H 在此处也有吸收, 不能

凭此判断硫酸基连接位置。

图 4 和图 5 为 6-EP 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图和 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图。利用 ChemNMR 软件模拟 NMR 谱图与实际谱图对比^[10], 在 $^1\text{H-NMR}$ 谱图中化学位移 1.2 处峰对应鼠李糖 H6 信号, 2.85 处为鼠李糖和木糖的 H4 信号峰, 3.3 处为 (1 \rightarrow 2,4)-连接鼠李糖的 H2 或者端基鼠李糖的 H4 吸收峰, 3.79 处为 (1 \rightarrow 4)-3-S 连接鼠李糖的 H2 信号, 鼠李糖 H1 信号峰在 5.03 处, 说明多糖主要为 α 构型。在 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图中 18 处为鼠李糖 C6 吸收峰, 64.5 处为木糖 C5 峰, 68 处为鼠李糖 C5 峰, 69.3 处为 (1 \rightarrow 2,4)-连接鼠李糖的 C3 信号峰, 75 处为 (1 \rightarrow 2,4)-3-S 连接鼠李糖的 C2 峰, 102 和 104 处分别对应鼠李糖 C1 和木糖 C1 信号。

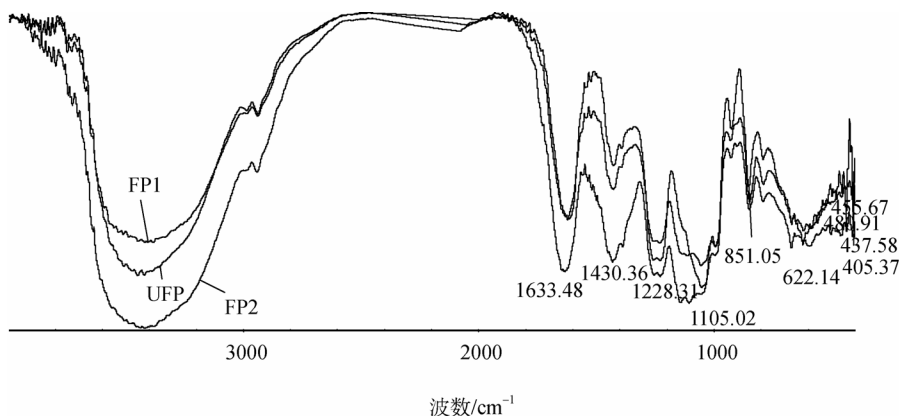


图 3 6-EP 和 FP2 的红外谱图
Fig. 3 Infrared spectra of 6-EP and FP2

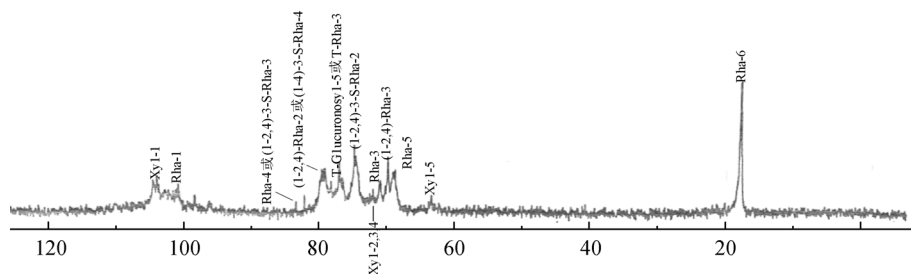


图 4 6-EP 的 ¹H-NMR 谱图
Fig. 4 ¹H-NMR spectrum of 6-EP

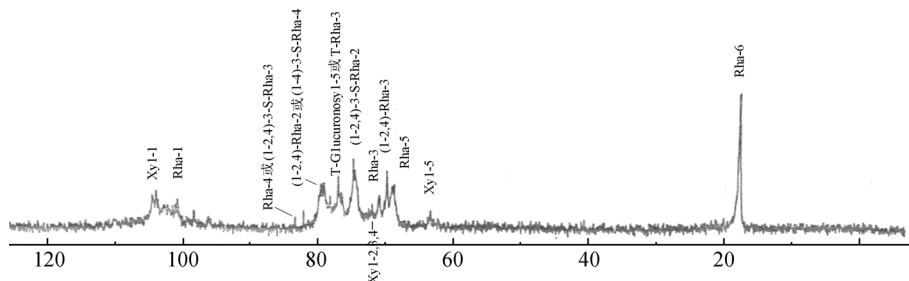


图 5 6-EP 的 ¹³C-NMR 谱图
Fig. 5 ¹³C-NMR spectrum of 6-EP

3.2 保湿活性

3.2.1 吸湿性

吸湿性实验结果如图 6 所示。各样品的吸湿率均随时间逐渐增长。在相对湿度为 80% 时, 最初的 24 h 内增长较快, 24 h 后各样品的吸湿率基本饱和, 甘油则继续增加, 不过速率也有所减缓; 在相对湿度为 44% 时, 各个样品在 24 h 也已基本饱和。甘油的吸湿能力弱于 6-EP、低分子质量 FPS、2.0 低分子质量 FPS 和 HA 的吸湿能力, 其中 2.0 低分子质量 FPS 的吸湿能力最强。对照高低两相对湿度环境下吸收率曲线, 各个样品在高相对湿度时的吸湿率均要

高于低相对湿度的吸湿率。优良的保湿剂其吸湿能力应该受环境湿度和温度影响较小, HA 无论是在高湿度还是低湿度环境下, 都具有较强的吸湿能力, 是很好的保湿剂。本实验中 6-EP、低分子质量 FPS 和 2.0 低分子质量 FPS 的吸湿能力与 HA 相似, 同样受环境湿度影响较小。

3.2.2 保湿性研究

保湿性实验结果如图 7 所示, 各样品保湿率随时间逐渐减小。在 24 h 时保湿率顺序为甘油 > 2.0 低分子质量 FPS > HA > 6-EP > FPS; 6-EP 和 2.0 低分子质量 FPS 同 HA 具有相同的保湿率变化趋势。

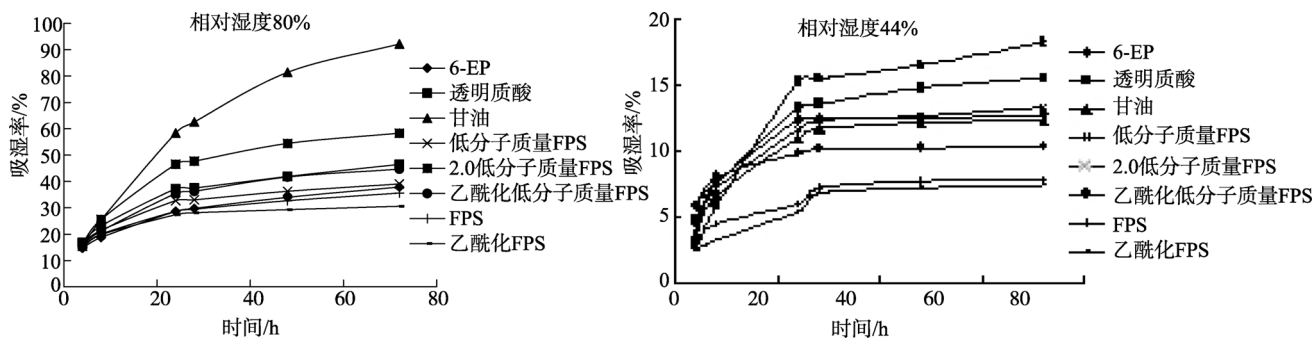


图 6 相对湿度为 80%和 44%时 6-EP、甘油和透明质酸的吸湿率

Fig. 6 Moisture absorption by 6-EP, Glycerol and HA (Hyaluronic acid) at RH = 80% or 44%

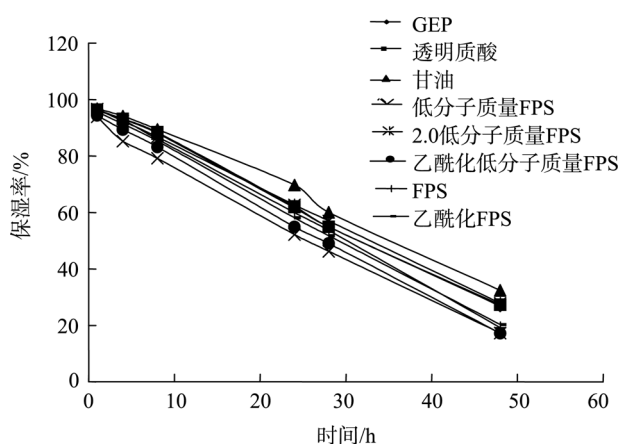


图 7 6-EP、甘油和透明质酸的保湿率

Fig. 7 Moisture retention by 6-EP, Glycerol and HA (Hyaluronic acid)

4 结论

实验表明浒苔多糖为硫酸杂多糖，主要有两种组分，且均为葡萄糖醛酸-鼠李糖-木糖-甘露糖聚合物。FP2 为主要分级组分；FP1 量相对较少，其木糖含量较高，葡萄糖醛酸和鼠李糖含量相对低。透明质酸是一种酸性多聚黏多糖，是目前自然界中发现的保湿性能最好的物质，被国际化妆品行业公认为最理想的天然保湿因子，但由于透明质酸的来源比较特别^[11]，使其无法满足需求，迫切需要合适的替代品来解决这一问题。本实验通过吸湿性和保湿性研究表明，浒苔多糖、褐藻多糖硫酸酯及其衍生物与透明质酸有相似的保湿性质，环境湿度对其吸湿率影响较小。由于浒苔多糖制备方法简便，且原料易得，可以作为透明质酸的替代品开发为优良天然保湿剂。

致谢：本实验得到徐祖洪研究员和李智恩研究员的

悉心指导，谨在此表示感谢。感谢山东福瑞达生物化工有限公司提供透明质酸样品。

参考文献：

- [1] Aguilera-Morales M, Casas-Valdez M, Carrillo-Domínguez S, *et al.* Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha spp.* As a potential food source [J]. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2005, 18: 79-88.
- [2] 周慧萍, 蒋巡天, 陈琼华, 等. 浒苔多糖的降血脂及其对 SOD 活力和 LPO 含量的影响[J]. *生物化学杂志*, 1995, 11: 161-165.
- [3] Choo K S, Snoeijs P, Pedersén M. Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlnieriana* [J]. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 2004, 298: 111-123.
- [4] Khor E, Lim L Y. Implantable applications of chitin and chitosan [J]. **Biomaterials**, 2003, 24(13): 2 339-2 349.
- [5] Zhang Jingjing, Zhang Quanbin, Wang Jing *et al.* Analysis of monosaccharide compositions in fucoidan by precolumn derivation HPLC [J]. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, 2009, 27(3): 1-5.
- [6] 杜小豪, 徐卫, 杜雪洁. 护肤产品的保湿功能评价[J]. *日用化学工业*, 2000, 3: 47-52.
- [7] 秦允荣, 王昌涛, 何聪芬, 等. 单一保湿剂体外保湿功能的评价[J]. *日用化学工业*, 2006, 36(3): 199-201.
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 第二版. 杭州: 浙江大学出版社. 1999. 193-198.
- [9] Lloyd A G, Dodgson K S, Price R G, *et al.* Infrared studies on sulphate esters. Polysaccharide sulphates [J]. **Biochim Biophys Acta**, 1961, 46: 108-115.
- [10] Jens Duus, Carlotte H Gotfredsen, Klaus Bock. Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: modern methods and limitations [J]. **Chemical Reviews**, 2000, 100: 4 589-4 614.
- [11] 吴明霞, 邓静, 吴华昌, 等. 透明质酸制备的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2008, 2: 68-72.

(下转第 99 页)