

海藻中糖脂的研究进展

STUDIES ON GLYCOLIPIDS OF MARINE ALGAE

杨汇芹

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

海洋藻类是极为多样性的一类生物,其多样性反映在化学成份上,因而亦就成为生产种类繁多的药品及精细化工产品的潜在资源。目前已商业化生产或正在开发的产品有:类胡萝卜素、藻胆素、脂肪酸、多糖类、维生素类、甾醇类等用于人类或动物保健的生物活性物质。海藻中的极性脂可以分为三类:糖脂、磷脂和既不含有糖也不含有磷的一类脂。糖脂在许多藻种

中普遍存在。糖脂(Glycolipid)是一类由一个或多个单糖残基与脂类部分、单脂酰或二脂酰甘油以糖苷键相连所形成的化合物。长期以来,人们对海藻中的脂组份很感兴趣,尤其是糖脂,因为虽然它的含量很少,但在许多生物学和病理学过程中起着重要作用,已引起

收稿日期:1997-04-23

世人的广泛关注。本文试图对海藻中糖脂的生物合成、提取、分离、鉴定以及应用等方面作一概述。

1 海藻中糖脂的生物合成

叶绿体是海藻细胞中一个特有的非常重要的细胞器。因为它是光合作用的重要场所,它能吸收光能合成碳水化合物,同时产生分子氧。叶绿体是由叶绿体膜、类囊体和基质三部分构成的。叶绿体膜和类囊体膜一样,都含有糖脂[MGDG (Monogalactosyldiglyceride)、DGDG (Digalactosyldiglyceride)、SQDG (Sulfoquinovosyldiglycerol)]和磷脂。分离出来的叶绿体膜可以使尿苷二磷酸葡萄糖(UDG)和二甘油脂生成半乳糖脂,而基质和类囊体都不具备这一能力,这说明半乳糖基转移酶只存在于叶绿体膜之中。

普遍认为海藻糖脂中的脂肪酸在组成和位置分配上不同,部分地是因为二乙酰基甘油(DAG)前体从不同的生物细胞器中合成。若脂中 C_{16} 酸位于甘油2-位置上,表明脂的一部分是来源于在叶绿体中合成的二乙酰基甘油前体。若在甘油2-位置上主要是 C_{18} 酸,这说明该脂主要来源于在细胞质中合成的二乙酰基甘油(DAG)前体。原核生物的特征是在甘油2-位置上存在 C_{16} 酸,含有这种构型的糖脂合成方式称为原核路线。若在脂中甘油2-位置上存在 C_{18} 酸,如在内质网上合成的脂,则含有这种构型的脂合成方式称为真核路线。这些脂肪酸的不同分配是由酰基转移酶所决定的, Kiet, P. Q. (1993)认为,这种酶选择性地地在甘油1-位置或2-位置上酯化 C_{16} 酸或 C_{18} 酸。糖脂的生物合成虽然由内部因素所决定,但外部环境对它的合成也有一定的影响。David提出SQDG的合成与叶绿体中存在的硫酸盐有关。他研究了硫酸盐浓度对SQDG生物合成的影响,结果表明硫酸盐浓度低于10 mmol/L时,大部分合成的是SQDG,但当硫酸盐浓度增加时,其他含硫的脂增加了。这些脂比SQDG极性小,在弱酸或弱碱中不易水解。此外,他还发现当硫酸盐浓度为1 mmol/L时,叶绿体内存在的三磷酸腺苷(ATP)和磷酸(P_i)能显著地抑制了其他含硫脂的形成,但并不影响SQDG生成。如果在缺乏ATP和 P_i 的情况下,SQDG的生成随着硫酸盐浓度的增加而增加,但是其他含硫脂增加得更快。如果硫酸盐浓度在50 mmol/L或更低,ATP和 P_i 的存在对SQDG生成没有作用。在100 mmol/L时,SQDG浓度增加很慢,在250 mmol/L时,SQDG浓度反而减小。说明ATP和

P_i 存在于低浓度硫酸盐时能显著地抑制其他含硫脂生成。这可能是因为低硫酸盐浓度下,进入叶绿体进行脂合成的硫酸盐主要是直接进行SQDG合成,而在过量硫酸盐情况下,则有利于其他脂的生成。所以叶绿体是能够吸收硫酸盐,并将它用于SQDG合成中。尽管ATP对该反应显示一点促进作用,这反应总体上是独立的,不需要别的协助因子。但是,SQDG中的硫酸根离子在任何水溶性条件下都不会释放出来的,除非在强的氧化剂作用下或者是自身生理氧化下才能释放出一点。

2 海藻中糖脂的提取、分离和鉴定

糖脂中的SQDG首次由Benson等在1959年从光合作用的微生物和高等植物分离出来。Benson用氯仿和甲醇的混合物将藻类(*Chlorella*)中的脂抽提出来,然后在Whatman No. 1滤纸上双向展开,根据比移值 R_f 值确定了SQDG。从它的水解结果看,只有一种脂肪酸,即油酸(Oleic acid)存在。他还确定了油酸在甘油的3-位置上。从Benson所研究的工作来看,分子中只存在一种脂肪酸,表明半乳糖基是单甘油酯衍生物。为了进一步论证SQDG在自然界中广泛存在,Benson于1960年又开始分离提取紫苜蓿*Alfalfa*树叶中的SQDG。将叶子用95%乙醇提取,然后真空浓缩,再溶于氯仿。最后加入KOH的甲醇溶液,在37℃加热90 min。他使用了阳离子交换树脂代替纸色谱,并用氯仿和石油醚冲洗以除去脂肪酸和非皂化物质。离子交换树脂的分离原理是根据离子特性的差异,如糖脂中甘油和脂肪酸的取向、类型及数量差异,用不同离子强度的盐溶液洗脱而分离。离子交换柱法相对于其他许多分离方法的优点在于上柱前不必洗脱,色谱柱本身从溶液中吸附糖脂,从而起到浓缩作用。用自动分布收集器来收集组份,通过适当的检测装置,记录了线性曲线,确定了含量。

到了70年代,许多科学家纷纷利用薄层色谱TLC来分离鉴定糖脂。薄层色谱的原理是当作为流动相的液体从由固体组成的固定相的间隙中通过时,由于试样中的各组份在固定相和流动相之间的分配系数不同,因而随着流动相的移动各组份彼此相互分离开。薄层色谱TLC的特点是装置简单,操作方便,在一般化学实验室中都可以方便地进行;展开所需时间短;薄层色谱对样品的负荷量比纸色谱要大得多,一张薄板上可以加上多到50 mg的样品。由于它具有上述的这些优点,因此得到广泛的应用。英格兰的

Jamieson, G. R. 利用一维 TLC 分析了 22 种绿藻, 发现糖脂中主要糖是半乳糖 (Galactose), 葡萄糖 (Glucose) 仅作为一小部分而存在。一维 TLC 就是在硅胶薄板上点上样品之后, 在一个方向上使用一种溶剂展开系统。

80 年代以来, 由于一维 TLC 对于糖脂并不能提供良好的分离效果, 更多的人使用了二维 TLC。二维 TLC 是在用硫酸铵处理过的硅胶板上, 在两个方向上使用两种不同的溶剂展开系统。由于是在两个方向上, 两种不同的展开体系中, 样品中的各组份就可以更加充分地、完全地得以分开。使用硫酸铵的目的是避免糖脂在色谱分析中分解。德国脂研究联邦中心 Radwan, S. S. 研究了 *Trigonella* 的叶子, 他用硫酸铵处理过的硅胶板进行二维 TLC 分析, 发现糖脂 MGDG 和 DGDG 中, 亚油酸 (Linoleic acid) 是主要的; 而在 SQDG 中, 主要是棕榈酸 (Palmitic acid) 和亚油酸, 并且棕榈酸占大多数。

80 年代末, 挪威的 Ollsen, R. E. 和 Henderson, R. J. 又发展了高效薄层色谱 TLC。这种技术的特点是在同一色谱上, 在同一方向上, 连续使用不同的溶剂展开系统。HPTLC (10 cm × 10 cm) 最大的优点是只需极少量样品, 一般 0.5 μg 就可以了, 这点对研究样品中低脂含量如浮游生物的海洋化学家很重要。

首先, 由于缺乏对脂类化合物有效的检测器, 高效液相色谱 (HPLC) 在分离分析脂类时并未有很大的作用。1985 年, 苏格兰的 William 对检测器作了改进, 成功地用 HPLC 对脂类进行分离和定量。他从老鼠肝脏中分离出糖脂、磷脂等 14 种脂。在这一过程中, 他加入了 BHT (2, 6-Di-tert-butyl-p-cresol) 作为抗氧化剂, BHT 在检测器中可以挥发, 并不影响测试效果。高效液相色谱法是近年来迅速发展起来的一项高效、快速的分离分析技术。在技术上采用了高压泵、高效固定相和高灵敏度检测器, 实现了分析速度快、分离效率高和操作自动化^[1]。高效液相色谱 (HPLC) 的特点是高压、高速、高效和高灵敏度, 与微机相连, 可输入程序并设定条件, 直接进行数据处理。但是, 整个操作所需的样品量较大, 约 0.2~0.4 mg, 操作所用的时间也比较长。相比之下, HPTLC 系统仅用硅胶薄板和简单的溶剂混合物就可以分离多种脂。

90 年代以来, 对糖脂的分析进入了分子水平。人们普遍采用气相色谱来研究糖脂中的脂肪酸组成。当载气携带被测物质进入色谱柱, 和均匀涂敷在柱上的固定液接触时, 气相中的被测组份就溶解到固定液中去。载气连续流经色谱柱, 溶解在固定液中的被测组

份会从固定液中挥发到气相中去。这样反复多次溶解、挥发, 经过一定时间后, 各组份就依次分离。G. Mahajan 等利用气相色谱研究了糖脂的组成^[2]。

从上可以看出, 糖脂的提取和分离经历了从纸色谱、柱色谱、一维薄层色谱、二维薄层色谱、高效薄层色谱、高效液相色谱到气相色谱等分离手段的进步, 随着分离技术的不断完善, 对糖脂的研究也越来越深入。

在 TLC 薄板上点上样品, 放在溶剂中展开。展开完毕, 取出薄层板。如果化合物本身有颜色, 就可以直接观察它的斑点; 如本身无色, 可先在紫外线下观察有无荧光斑点, 用小针在薄层上划出斑点的位置, 也可用显色剂喷雾显色。以前, 人们曾用过对二苯胺茴香胺、二羟基甲苯、苯胺氢酞酸盐等作为糖脂的显色剂, 但颜色很模糊, 不容易鉴别。后来, Vargent, C. M. 发现选用 1% (w/v) 蒽酮的苯溶液作显色剂可以给出很好的效果。现在, 人们就广泛采用蒽酮作为糖脂的显色剂。

3 海藻中糖脂的应用研究

随着对糖脂研究的深入, 人们已发现其许多医疗价值。目前, 最引人注目的是硫代-6-脱氧葡萄糖苷基二酰基甘油 (SQDG)。近几十年来, 医药科学虽然取得了长足的发展, 但对人类形成巨大挑战的 AIDS 病尚缺乏有效的治疗方法。Gustafson (1989) 从人工培养的鞘丝藻 *Lyngbya laterheimii* 细胞提取物中分离出含磺酸的糖脂, 这种糖脂抑制 HIV 的复制, 是一种新型的抗 HIV 药物。为了认定和比较新一代抗 AIDS 的治疗价值, 美国国家癌症研究所已经选择了该种脂作为进一步治疗 AIDS 的主要药物。科学家们还发现从蓝绿藻 *Phormidium tenue* 中分离的糖脂具有抑制 Epstein-Barr 病毒的效果^[3]。人们发现螺旋藻能防治高脂血症, 因为螺旋藻中糖脂能有效地抑制血浆和肝脏中胆固醇的水平。螺旋藻对大肠溃疡和糖尿病, 肥胖以及精神高度紧张都有一定的疗效, 也可能是与糖脂中的 SQDG 所起的作用有关^[4]。除此之外, 人们还已经发现糖脂中有高度不饱和脂肪酸, 例如, 绿藻 *Chlamydomonas* sp. 的糖脂 MGDG 中, 90% 脂肪酸是亚油酸和其他 ω-3 酸组成的^[5]。而某些多不饱和脂肪酸是必需脂肪酸 EFA, 又称维生素 F。这些不饱和脂肪酸不能在动物机体内合成, 必须从植物中摄取。自从 1964 年发现 EFA 是生物合成前列腺素 PGE 的前体以来, EFA 的研究有了迅速的发展, 吴保杰 (1992)

已经了解到 EFA 具有多种药理作用。它可以治疗炎症和糖尿病并发症,防止免疫系统失调,对精神紊乱和头痛也有一定缓解作用。Horrobin(1992)报道不饱和脂肪酸对心血管疾病具有防治作用,它能改善脂质代谢,降低血压,抗血小板聚集等。由于糖脂在藻类中含量很少,不能满足大量研究和临床试验的需要。美国的科学家 Danu, M. G. 和 Samud, J. D. (1992)已经开始用有机化学的方法人工合成糖脂,这是解决糖脂来源有限的一条有希望的途径。从上所述一系列研究表明,糖脂在临床和药学等方面越来越引起世人注目。

总之,自 Benson 首次发现糖脂中的 SQDG 以来,在糖脂的提取、分离、纯化、鉴定及至应用等方面均取得了一些结果。特别是近年来,有关糖脂对人体的作用和疾病治疗的探索,取得了具有实际意义的结果。可以预言,糖脂在分子生物学、生物化学以及药物开

发等方面必将有更突出的发展。

我国有丰富的海藻资源,但目前国内对海藻中糖脂的研究并不多,因此开发我国海藻中的糖脂,不仅具有理论价值,而且有重要现实意义。

主要参考文献

- 1 朱明华. 仪器分析. 北京: 高等教育出版社, 1993. 1~
- 2 G. Mahajan and M. Kamat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, 43: 466~ 469
- 3 Takashi Morimoto *et al.*. *Phytochemistry*, 1995, 40(5): 1 433~ 1 437
- 4 Amha, B. *et al.*. *Journal of Applied Phycology*, 1995, 5 : 235~ 241
- 5 Kidetaka Tatsuzawa *et al.*. *J. Phycol.*, 1996, 32: 598~ 601