

# 龙须菜和扁江蓐多糖的组成及其 抗肿瘤效果\*

邓志峰 纪明侯

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

**摘要** 于1985—1987年期间用冷水和热水对采集于青岛的龙须菜(1986年7月)和扁江蓐(1985年12月)的琼胶型多糖进行提取。两海藻的热水提取多糖都通过DEAE-Sephadex A50色谱柱用热水和不同浓度NaCl溶液前后进行洗脱分级。龙须菜和扁江蓐多糖的主要级分分别为0.5mol/L和1.0mol/L NaCl洗脱级分。对各级分做化学分析及IR和<sup>13</sup>C-NMR光谱分析。结果表明,龙须菜多糖由琼二糖、琼胶糖前体和6-OCH<sub>3</sub>-琼二糖组成;扁江蓐多糖则由琼二糖、6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-琼二糖和6-OCH<sub>3</sub>-琼二糖组成。对两海藻的提取多糖及个别级分的抗肿瘤(S180)效果试验结果表明,龙须菜的冷水提取多糖和扁江蓐的热水提取多糖的初筛抑瘤率分别为45%和60%。

**关键词** 龙须菜 扁江蓐 <sup>13</sup>C-NMR 光谱分析 分级 抗肿瘤效果

江蓐属各种中所含主要多糖都属于琼胶类型,即由(1→3)-β-D-半乳糖与(1→4)-3,6-内醚-α-L-半乳糖交替地相连接的琼二糖(agarobiose)构成的线形聚合物(纪明侯等,1986)。不同种类的江蓐存在着进化上的差异,所含琼胶多糖中含有不同数量的硫酸基和甲氧基,连接于D-或L-半乳糖单位的不同位置羟基上;或部分L-半乳糖未被3,6-内醚化,从而给整个多糖的性质如凝固能力、凝固温度等带来不同影响。

本工作使用NaCl分级方法研究龙须菜和扁江蓐所含不同电荷多糖的分布,并且以IR和<sup>13</sup>C-NMR光谱法确定各级分的组成。同时还试验两种海藻多糖和某些级分对小鼠的抗肿瘤(S180)效果,为利用红藻含硫多糖在医药方面的应用提供必要的科学依据。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 材料

龙须菜(*Gracilaria sjeostedtii* Kylin)于1986年7月采自青岛莱阳路海边;扁江蓐[*G. textorii* (Sur.) De-Toni]于1985年12月采自青岛中港。

### 1.2 方法

**1.2.1 龙须菜和扁江蓐多糖的热水提取** 取20.0g剪细的干藻小块,加1200ml蒸馏水,在压力锅中加热至1kg/cm<sup>2</sup>提取1h。以尼龙布过滤,藻渣再加800ml水,同样提取1h。合并两次滤液,加入适量Celite 545,以双层滤纸抽滤。滤液经减压浓缩后注入透析袋中透析至无Cl<sup>-</sup>反应,注入压力过滤器(Pharmacia产品)依次通过1.2,0.65和0.45μm

\* 硕士学位论文。邓志峰,男,出生于1963年3月,硕士。

收稿日期:1993年10月25日,接受日期:1994年7月10日。

滤膜压滤,滤液冻干。

**1.2.2 龙须菜多糖的冷水提取** 取 20.0g 干藻小块,加入 1 200ml 水,搅拌提取 24h,同上过滤。藻渣再加 800ml 水,同样提取 24h,以后步骤同上,冻干。

**1.2.3 DEAE-Sephadex A50 (Cl<sup>-</sup>) 色谱柱分级** 参照 Duckworth 等(1971)方法,称取 1.0g 龙须菜或扁江蓐的热水提取物,加 200ml 水,加热使溶解。趁热徐徐注入 DEAE-Sephadex A50 色谱柱上,柱温保持 70℃。然后以蒸馏水,0.5,1.0 和 2.5 mol/L NaCl 溶液依次洗脱。各洗脱液经浓缩后冻干。从各洗脱液中取样测定总糖含量。

**1.2.4 化学组成分析** 对各级分分别用 Dubois 等(1956)和 Yaphe 等(1965)法测定总糖含量和 3,6-内醚半乳糖含量;用 Perkin-Elmer 240C 型元素分析仪测定 S 含量,以此换算为 SO<sub>4</sub> 含量;用 Shimadzu IR-440 光谱仪和压片法测定 IR 谱图;用 JNM-FX 100 NMR 光谱仪和纪明侯等(1986)操作法测定 <sup>13</sup>C-NMR 谱图。

**1.2.5 抗肿瘤效果试验** 由青岛海洋药物研究所协助完成。试验用小鼠平均体重为 20g,雌雄各半。移植瘤株为肉瘤 Sarcoma-180 (S180),配成浓度为 450 万 cell/ml 生理盐水溶液。在每只小鼠左腋皮下接种。然后分两组:一组注射多糖溶液,浓度为 4mg/ml;另一组为对照组,注射生理盐水。注射 1 周后杀鼠取瘤,称重。两组比较,算出抑瘤率(%)。

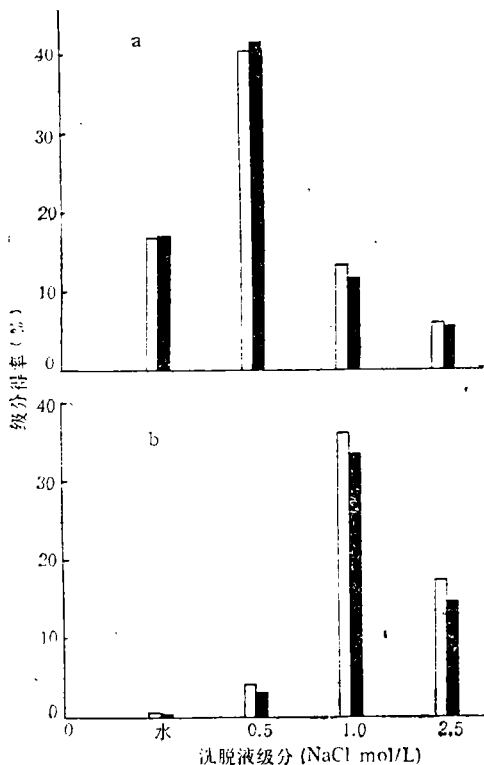


图 1 龙须菜(a)和扁江蓐(b)多糖经 DEAE-Sephadex A50 色谱柱洗脱下来的各级分得率

Fig. 1 The yields of fractions of *G. sjostedtii* and *G. textorii* polysaccharides eluted from DEAE-Sephadex A50 column

□ 实际干重得率; ■ 苯酚-硫酸比色分析得率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 两海藻多糖及其级分的化学组成

DEAE-Sephadex A50 色谱柱经洗脱、分离,所得各级分得率(干重量和比色分析量)如图 1 所示。龙须菜多糖以 0.5 mol/L NaCl 溶液洗脱级分得率为最高,达 41.3%;其次为水级分,17.4%;总级分得率为 76.0%。而扁江蓐多糖以 1.0 mol/L NaCl 级分的得率为最高,为加入多糖的 33.6%;其次为 2.5mol/L NaCl 级分,15.0%;水级分仅为 0.5%;总级分得率为加入多糖的 53.0%。还有约一半尚未洗脱下来,需用其他方法如尿素、加压、热水提取等法 (Ji et al., 1988),还能再溶出一部分。比色法所得得率低约 1%,因为干重还包括样品中原有的金属离子和少量杂质含氮物质。

龙须菜和扁江蓐多糖的各级分中 3,6 内醚-半乳糖 (3,6-AG) 和硫酸基 (SO<sub>4</sub>) 含量的分布见图 2。龙须菜热水提取多糖的水级分中 SO<sub>4</sub> 含量为 2.1%,比原热水提取多糖中含量(6.4%)减低,

随着洗脱液 NaCl 浓度增高,其级分中 SO<sub>4</sub> 含量也逐渐增加,至 2.5mol/L NaCl 级分达 11.6%; 3,6-AG 含量与 SO<sub>4</sub> 含量成反比关系。扁江蓐热水提取多糖也呈同样趋势(水级分因量少,未做分析)。这与 Duckworth 等(1971)对其他多种江蓐多糖用同法分级,级分中 3,6-AG 与 SO<sub>4</sub> 含量成相反的分布趋势是相似的。即低电荷密度的琼胶在低浓度 NaCl 洗脱液中先溶出,高密度电荷的半乳聚糖在较高浓度 NaCl 洗脱液中才溶出。

**2.2 IR 光谱分析** 两海藻提取多糖及其级分的 IR 谱图(图 3)中都有 1 250cm<sup>-1</sup> 和 930cm<sup>-1</sup> 吸收峰,分别表示总硫酸和 3,6-AG 的存在(Lloyd et al., 1961)。龙须菜的冷水提取多糖 (a) 和

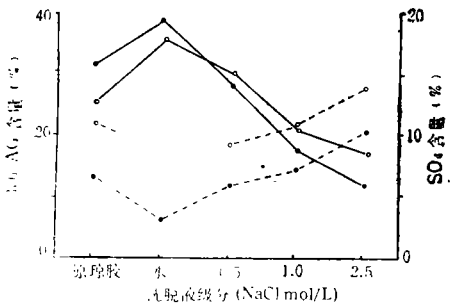


图 2 龙须菜和扁江蓐多糖经 DEAE-Sephadex A50 色谱柱洗脱下来的各级分中 3,6-AG 和 SO<sub>4</sub> 含量分布  
Fig. 2 The distribution of contents of 3,6-AG and SO<sub>4</sub> in the fractions of *G. sjostedtii* and *G. textorii* polysaccharides eluted from DEAE-Sephadex A50 column

龙须菜: —○— 3,6-AG; ●---● SO<sub>4</sub>。  
扁江蓐: ○—○ 3,6-AG; ○---○ SO<sub>4</sub>。

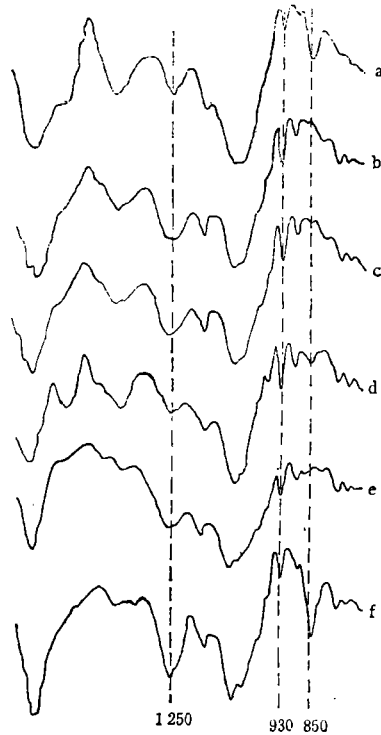


图 3 龙须菜和扁江蓐提取多糖与各级分的红外光谱图

Fig. 3 The infrared spectra of polysaccharides and fractions from *G. sjostedtii* and *G. textorii*

龙须菜: a. 冷水提取多糖; b. 热水提取多糖的 0.5mol/L NaCl 级分。扁江蓐: c. 热水提取多糖; d. c 的 0.5mol/L NaCl 级分; e. c 的 1.0mol/L NaCl 级分; f. c 的 2.5mol/L NaCl 级分。

扁江蓐的 1.0(e) 和 2.5(f)mol/L NaCl 级分中 930cm<sup>-1</sup> 吸收峰较低,表明 3,6-AG 含量比其他级分(b,c,d)较少,而 1 250cm<sup>-1</sup> 吸收峰比较高宽,即 SO<sub>4</sub> 含量较多。这与图 2 各级分的化学分析结果相吻合。两藻中 850cm<sup>-1</sup> 吸收峰表示半乳糖的 C6 上 SO<sub>4</sub> 的存在,但龙须菜的 850cm<sup>-1</sup> 表示 L-半乳糖的 C6-SO<sub>4</sub>, 0.5mol/L NaCl 级分中其含量较少,吸收峰不明显。此 C6-SO<sub>4</sub> 当用碱处理时很易被除去,而扁江蓐的 850 cm<sup>-1</sup> 吸收峰则是由于 D-半乳糖中 C6-SO<sub>4</sub> 的存在 (Ji et al., 1988)。这从 <sup>13</sup>C-NMR 谱图中的化学位移(图 4)也可判断出。

**2.3 <sup>13</sup>C-NMR 光谱分析** 两海藻的谱图(图 4)都显示出清晰的琼二糖碳原子信号 (G,A),说明多糖分子以琼胶糖为主要组分。龙须菜冷水提取多糖尚有琼胶糖前体的信

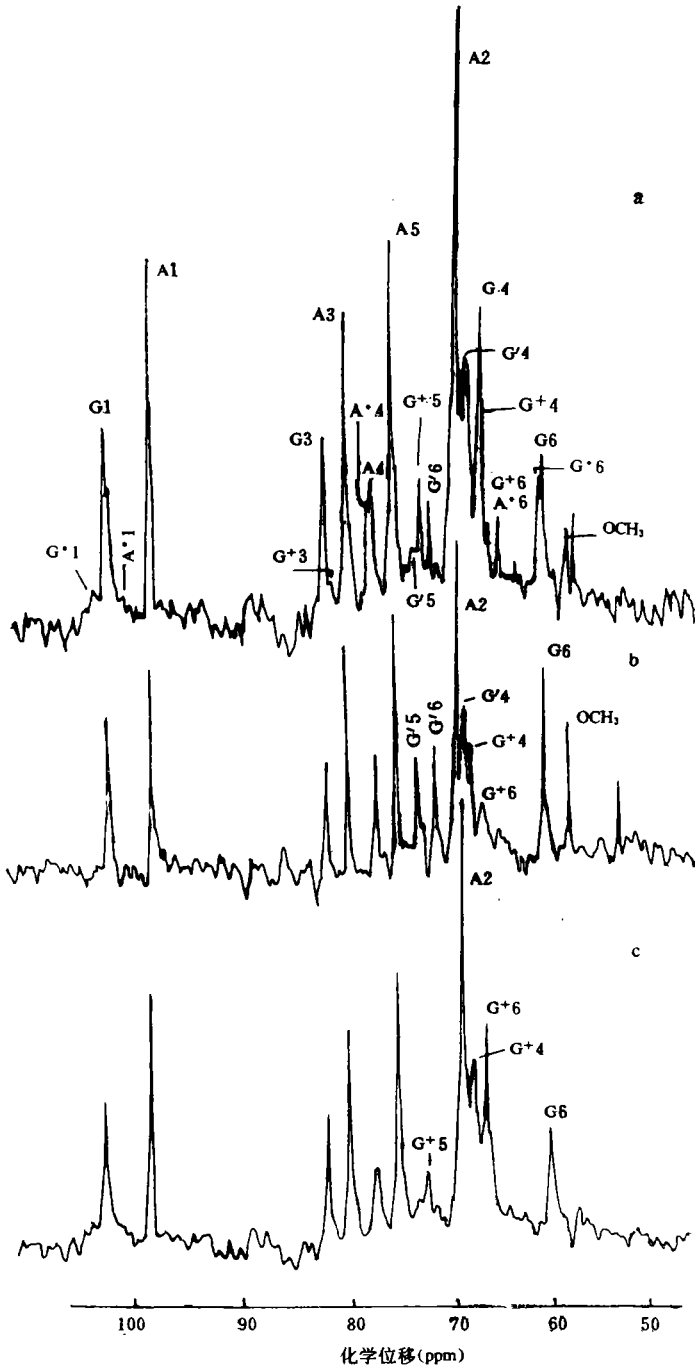


图4 龙须菜提取多糖(a)和扁江离提取多糖两个级分(b,c)的  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱图

Fig. 4 The  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of the polysaccharides (a) from *G. sjeostedtii* and fractions (b,c) from *G. texorii*

a. 龙须菜的冷水提取多糖; b. 扁江离的热水提取多糖的 0.5 mol/L NaCl 级分; c. b 的 2.5 mol/L NaCl 级分。G. D-半乳糖; G\*. D-半乳糖(琼胶糖前体); G'. 6-OCH<sub>3</sub>-D-半乳糖; G+. 6-OSO<sub>3</sub>-半乳糖单位中的碳原子; A. 3,6-内醚-L-半乳糖; A\*. 6-OSO<sub>3</sub>-L-半乳糖单位中的碳原子 (Ji et al., 1988)。

号(G\*) (图 4a), 表明分子中杂交有(1→3)- $\beta$ -D-半乳糖与(1→4)-6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>- $\alpha$ -L-半乳糖相连接的重复二糖单位。这是龙须菜多糖中较明显的组分。此外, 还有表示 6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-琼二糖(即 6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-D-半乳糖与 3,6-内醚-L-半乳糖连接的琼二糖)存在的弱信号(G<sup>+</sup>)和 6-OCH<sub>3</sub>-琼二糖的信号(G' 和 OCH<sub>3</sub>) (Ji et al., 1988)。

扁江蒿多糖的 0.5mol/L NaCl 级分图谱(图 4b)中, 除明显的琼二糖信号外, 还有表征 6-OCH<sub>3</sub>-琼胶糖的强信号(G' 和 OCH<sub>3</sub>) 和 6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-琼二糖的信号(G<sup>+</sup>)。其 2.5mol/L NaCl 级分(图 4c) 都以琼二糖和 6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-琼胶糖的碳信号明显, 但 OCH<sub>3</sub> 信号未出现。

总之, 龙须菜多糖以琼二糖和琼胶糖前体为主要组分, 扁江蒿多糖则以琼二糖、6-OCH<sub>3</sub>-琼二糖和 6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-琼二糖为主要组分。

**2.4 抗肿瘤效果** 龙须菜和扁江蒿的多糖及其个别级分对小白鼠肉瘤 Sarcoma180 的抑制效果如表 1 所示。龙须菜的冷水提取多糖的抑瘤率为 45%, 其 0.5mol/L NaCl 级分为 28.5%; 扁江蒿的热水提取多糖的抑瘤率为 60%, 其 1.0mol/L NaCl 级分为 33%, 都接近或超过 30%, 说明有抗肿瘤效果。其中, 以扁江蒿热水提取多糖的抗肿瘤效果较为突出, 是有希望作进一步探索和开发的海藻药物资源。

**表 1 龙须菜与扁江蒿多糖及其级分对小白鼠肉瘤 S180 的抗肿瘤效果**

Tab. 1 The antitumor effect of the polysaccharides and their fractions from *G. sjostedtii* and *G. textorii* against Sarcoma 180 in rats

给 药 名 称		给药剂量 [mg/(只·d)]	给药次数 (腹注)	抑瘤率 (%)	P
龙须菜	冷水提取多糖	2	7 次	45	<0.01
	热水提取多糖的 0.5mol/L NaCl 级分	2	7 次	28.5	
扁江蒿	热水提取多糖 <sup>1)</sup>	1.02	间日一次	60	<0.05
	热水提取多糖的 1.0mol/L NaCl 级分	2	7 次	33	<0.05

1) 此样品有毒性, 故给药次数仅 3 次, 且剂量小。

龙须菜的冷水提取多糖和扁江蒿的热水提取多糖, 都含有较多硫酸基。前者以琼胶糖前体为主组分, 后者以 6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-琼胶糖为主组分, 都是高分子量的含硫酸基多糖。同时两多糖都还含有一定量的含氮物质, 因此, 其抑瘤效果是否有综合性因素尚不清楚。而分级产物, 如龙须菜多糖的 0.5mol/L NaCl 级分和扁江蒿多糖的 1.0mol/L NaCl 级分的抑瘤率反而低于含杂质较多的原琼胶多糖。

### 3 结 语

**3.1** 用热水和冷水从龙须菜和扁江蒿分别提取琼胶型多糖。对热水提取多糖通过 DEAE-Sephadex A50 色谱柱进行分级。两藻各级分中 3,6-AG 含量随 NaCl 浓度增加而降低; SO<sub>4</sub> 含量则成相反趋势。

**3.2** <sup>13</sup>C-NMR 谱分析表明, 龙须菜和扁江蒿所含多糖除都含有琼胶糖组分外, 前者主要还含琼胶糖前体, 后者主要还含 6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-琼胶糖和 6-OCH<sub>3</sub>-琼胶糖组分。

**3.3** 龙须菜冷水提取多糖和扁江蒿热水提取多糖对小鼠的抗肿瘤(S180)试验表明, 两者的抑瘤率分别为 45% 和 60%。

## 参 考 文 献

- 纪明侯, Lahaye, M., Yaphe, W., 1986, 中国江蓠属红藻所含琼胶的结构特征, *海洋与湖沼*, **17**(1): 72—83。
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton J. K. et al., 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**: 350—356.
- Duckworth, M. and Yaphe, W., 1971, The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, **16**: 189—197.
- Ji Minghou, Lahaye, M. and Yaphe, W., 1988, Structural studies on agar fractions extracted sequentially from Chinese red seaweeds: *Gracilaria sjostedtii*, *G. textorii* and *G. salicornia* using <sup>13</sup>C-NMR and IR spectroscopy, *Chin. J. Oceanol. Liminol.*, **6**(2): 87—103.
- Lloyd, A. G., Dodgson, K. S., Price, R. G. et al., 1961, Infrared studies on sulfate esters I. Polysaccharide sulfates, *Biochim. Biophys. Acta*, **46**: 108—115.
- Yaphe, W. and Arsenault, G. P., 1965, Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and 3, 6-anhydro-galactose in polysaccharides, *Anal. Biochem.*, **3**: 143—148.

COMPOSITION OF POLYSACCHARIDES OF *GRACILARIA*  
*SJEOSTEDTII* KYLIN AND *G. TEXTORII* (SUR.)  
De-Toni (RHODOPHYTA) AND THEIR  
ANTITUMOR EFFECT

Deng Zhifeng, Ji Minghou

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071)

ABSTRACT

Two agar type polysaccharides were extracted with hot water and cold water from *Gracilaria sjeostedtii* Kylin and *G. textorii* (Sur.) De-Toni (Rhodophyta) collected on the seashore of Qingdao [from 1985 to 1987, and fractionated separately on DEAE-Sephadex A50 chromatographic column by elution with water and various concentration of NaCl solutions. The results showed that the main fraction from *G. sjeostedtii* polysaccharide was 0.5 mol/L NaCl fraction, yielding 41.3% of the total fraction, and that from *G. textorii* polysaccharide was 1.0 mol/L NaCl fraction, yielding 33.6% of the total fraction. The eluted fractions were analyzed by chemical methods and by IR and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopic methods. It was clarified that the main component of the 0.5 mol/L NaCl fraction from *G. sjeostedtii* was a mixture of agarose and precursor to agarose, while that of the 1.0 mol/L fraction from *G. textorii* was a mixture of agarose, 6-OCH<sub>3</sub>-agarose and 6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-agarose. The polysaccharides and some fractions from both species were tested for their antitumor effect against Sarcoma 180 in rats. The results indicated that the antitumor efficiencies of the polysaccharide extracted by cold water from *G. sjeostedtii* and of that extracted by hot water from *G. textorii* were 45% and 60%, respectively. These polysaccharides would be promising antitumor substances after further study through animal and clinical tests.

**Key words** *Gracilaria sjeostedtii* *G. textorii*  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopic analysis Fraction Antitumor effect