

用 ^{13}C -NMR 分析几种中国麒麟菜卡拉胶*

史升耀 刘万庆 李智恩

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

提要 用 ^{13}C -核磁共振波谱法测定了琼枝、耳突麒麟菜和珍珠麒麟菜经碱处理后再用水提取的卡拉胶和直接用水提取的卡拉胶的组成结构。直接用水提取的琼枝卡拉胶由 β -、 κ -、 ι -、 γ -、 μ -和 ν -卡拉胶组成,以 β -和 κ -卡拉胶为主。碱处理后的琼枝卡拉胶包含 β -和 κ -卡拉胶,以 β -卡拉胶为主。

耳突和珍珠麒麟菜不论是否经碱处理,所得的卡拉胶几乎完全由 κ -卡拉胶构成。

卡拉胶是某些红藻类的细胞壁多糖,是由半乳糖及半乳糖的衍生物构成的半乳糖硫酸酯。其基本结构为 α -1 \rightarrow 3-D-半乳糖和 β -1 \rightarrow 4-D-半乳糖二者交替连接成的线型高分子多糖。其中4-连接的残基有的被3,6-内醚-半乳糖残基所替换,有的在不同位置上连接有硫酸基。Rees^[12], Percival^[11]根据这些分子的组成和结构将卡拉胶分成: κ , ι , λ ,

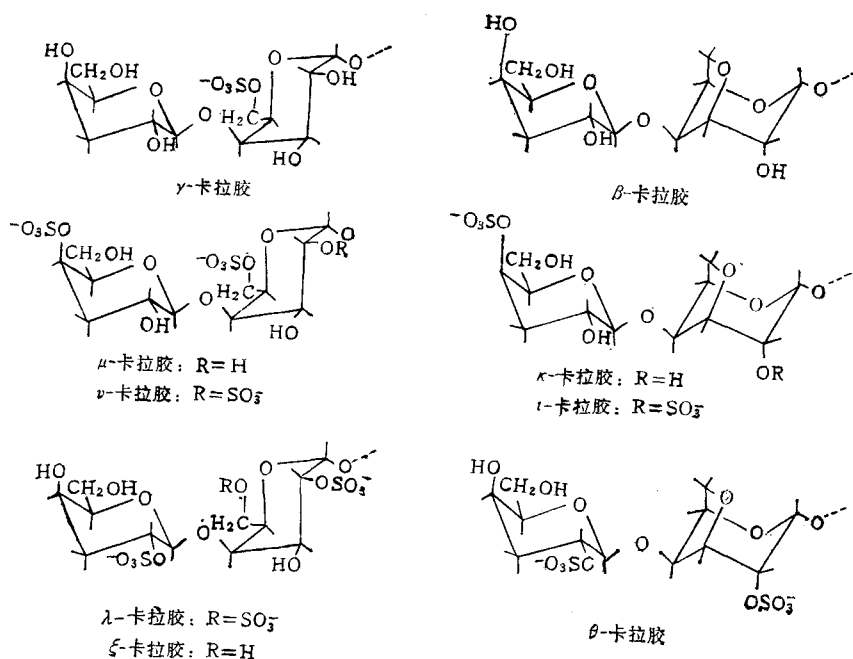


图1 卡拉胶的重复二糖结构

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第1308号。
收稿日期: 1986年3月10日。

μ , ν , ξ 和 θ 7 种。1980 年, Usov 等^[14]提出了脱硫酸基的 κ -卡拉胶和 λ -卡拉胶。最近, Greer 和 Yaphe^[9]将脱硫酸基的 κ -卡拉胶命名为 β -卡拉胶, 并将其前身命名为 γ -卡拉胶。 β -卡拉胶由 3 连- β -D-吡喃半乳糖和 4 连-3,6-内醚- α -D-吡喃半乳糖构成; γ -卡拉胶由 3 连- β -D-吡喃半乳糖和 4 连- α -D-吡喃半乳糖-6-硫酸基构成。 β -卡拉胶与 κ -卡拉胶在结构上的差别是前者的 3-连接的 D-吡喃半乳糖残基上不带有硫酸基。这些二糖的重复二糖的结构见图 1。这些结构都是非常理想的, 实际上从任何一种海藻中提取出来的多糖, 常常是两种或两种以上结构的混合物。

卡拉胶的性质差别很大^[1], 有的具有良好的凝固性, 而粘度很低, 如 κ -卡拉胶, 其凝固性是所有类型卡拉胶中最好的; 有的粘度很高而不能凝固, 如 λ -卡拉胶。因此, 研究卡拉胶的物理性与其化学组成和结构之间的相互关系, 受到学者们的重视。

最近, 为了进一步搞清红藻多糖的化学组成与结构, Usov^[13,14]和 Bhattacharjee^[7]等将 ^{13}C -核磁共振波谱引用到测定红藻多糖结构方面来, 取得了良好结果。于是, 我们用这一方法测定了江蓠琼胶的组成结构^[3], 证明 ^{13}C -NMR 在研究红藻多糖的结构方面确实是一有力的工具。为了了解我国海南岛麒麟菜属海藻的卡拉胶产率及其物化性质, 1982 年我们曾用一般的方法进行了测定^[2], 本文用 ^{13}C -NMR 法进一步研究这些麒麟菜碱处理前后所得卡拉胶的组成结构。

一、材料和方法

1. 材料

耳突麒麟菜 (*E. cottonii*) 采自海南岛琼海, 晒干。

珍珠麒麟菜 (*E. okamurai*) 采自海南岛琼海, 晒干。

琼枝 (*E. gelatinae*) 采自海南岛文昌, 晒干。

2. 方法

直接水提取卡拉胶: 海藻样品 10.00 g, 放烧杯中, 洗净, 加入 500 ml 水, 置沸水浴中, 加热搅拌提取 3 小时, 先用筛绢粗滤, 再加助滤剂 Celite 545 用滤纸抽滤, 滤液放冷, 切条, 放入约 -15°C 低温冰箱中冷冻, 取出加 750 ml 95% 酒精融化脱水, 再用 85% 酒精洗, 干燥。

碱处理后提取卡拉胶: 海藻样品 10.00g, 置烧杯中, 加入 32% NaOH 150 ml 处理, 水洗至近中性, 然后加水提取, 步骤同上。

卡拉胶的纯化: 称取上述卡拉胶粗制品 0.625 g, 加水 50ml, 加热溶化, 用砂芯漏斗加 Celite 545 过滤, 滤液装透析袋中, 用蒸馏水透析数日, 取出, 低温冷冻, 再用酒精融化脱水, 干燥。

凝胶强度的测定: 样品用 0.2% KCl 溶液加热配成含有 1.0% 卡拉胶(干重计)的溶液, 放冷凝固后用凝胶强度测定器在 30°C 测定。

凝固点的测定: 用上述同样溶液按文献[4]的方法测定。

硫酸基和 3, 6-内醚-半乳糖的测定: 同文献[4]。

^{13}C -NMR 分析: ^{13}C -NMR 波谱用 Jeol-FX-60 Q 测定。用噪声去偶测定了在 15.00 MHz 的 ^{13}C -NMR 波谱。样品浓度为 30—100 mg/2.5 ml D_2O , 置直径 10 mm NMR 管中,

加一点 H_2O , 用 DMSO 作内标。样品先在沸水浴中加热至全溶, 然后放入仪器中, 在 80°C 测定。记录条件如下: 谱宽 5000 Hz; 脉冲宽度 $6\ \mu\text{s}$; 间隔 0.3 s; 累加次数 16000—20000。化学位移 δ 值 (ppm) 按 $\delta\text{TMS} = \delta\text{DMSO} + 39.45$ 换算成对四甲基硅烷 (TMS) 的相对值。

二、结果和讨论

琼枝、耳突麒麟菜和珍珠麒麟菜三份样品分别直接用水提取以及经碱处理后再用水提取所得卡拉胶的产率、物理性质和化学组成的结果见表 1。

表 1 卡拉胶的产率与物化性质

海藻名称	方 法	产率 (%)	凝胶强度 (g/cm^2)	凝固点 ($^\circ\text{C}$)	SO_4 (%)	3,6-AG (%)
琼 枝	直接水提取	74.6	57	39.3	14.7	22.4
	碱处理后水提取	43.7	346	48.9	11.4	29.5
耳突麒麟菜	直接水提取	49.4	22	34.1	22.8	21.6
	碱处理后水提取	29.6	521	32.1	13.2	33.6
珍珠麒麟菜	直接水提取	49.0	30	34.9	19.4	22.9
	碱处理后水提取	31.4	520	32.3	13.7	33.9

直接水提取的产率都比碱处理后再用水提取的高很多。琼枝的卡拉胶产率, 不论是水直接提取的, 还是经过碱处理的, 都比耳突和珍珠麒麟菜的高。耳突和珍珠麒麟菜的产率很相近。水直接提取卡拉胶的凝胶强度都很低。经 32% 碱处理后, 凝胶强度大幅度提高: 耳突麒麟菜的卡拉胶由 $22\ \text{g}/\text{cm}^2$ 提高到 $521\ \text{g}/\text{cm}^2$, 珍珠麒麟菜的卡拉胶由 $30\ \text{g}/\text{cm}^2$ 提高到 $520\ \text{g}/\text{cm}^2$; 琼枝则提高较少。用水直接提取的耳突和珍珠麒麟菜卡拉胶的凝固点比碱处理的稍高, 而琼枝则反之。碱处理使三种样品的硫酸基含量减少, 而使 3,6-内醚-半乳糖 (3,6-AG) 含量增加。耳突和珍珠麒麟菜经浓碱处理后, 其卡拉胶中硫酸基减少的幅度和 3,6-AG 增加的幅度比琼枝卡拉胶的大。直接水提取的琼枝卡拉胶的硫酸基含量比耳突和珍珠麒麟菜的少, 是一种低硫酸基的卡拉胶。

直接水提取和碱处理后再用水提取的三种麒麟菜卡拉胶的 ^{13}C -NMR 波谱图见图 2—4。为了便于比较, 将前人测的部分数据列于表 2。

在琼枝卡拉胶的 ^{13}C -NMR 波谱图上出现的化学位移信号较多。其中用水直接提取的尤其复杂, 出现的信号除了有 κ -卡拉胶的 12 个信号外, 在 101.9 ppm (3-连- β -D-吡喃半乳糖的 C1), 92.2 ppm (4-连-3,6-内醚- α -D-吡喃半乳糖的 C1) 和 71.8 ppm (3-连- β -D-吡喃半乳糖的 C4) 三处的化学位移表明有一些 ι -卡拉胶存在; 在 94.6, 80.3 和 66.3 ppm 处的化学位移信号相当强, 这些信号与 Usov 等^[14]提出的脱硫酸基的 κ -卡拉胶和 Greer 等^[9]提出的 β -卡拉胶的 4-连-3,6-内醚- α -D-吡喃半乳糖的 C1 的化学位移 94.6 ppm, 3-连- β -D-吡喃半乳糖的 C3 的化学位移 80.4 ppm 和 3-连- β -D-吡喃半乳糖的 C4 的化学位移 66.3 ppm (Usov 等的结果), 66.5 ppm (Greer 等的结果) 一致, 证明直接水提取的琼

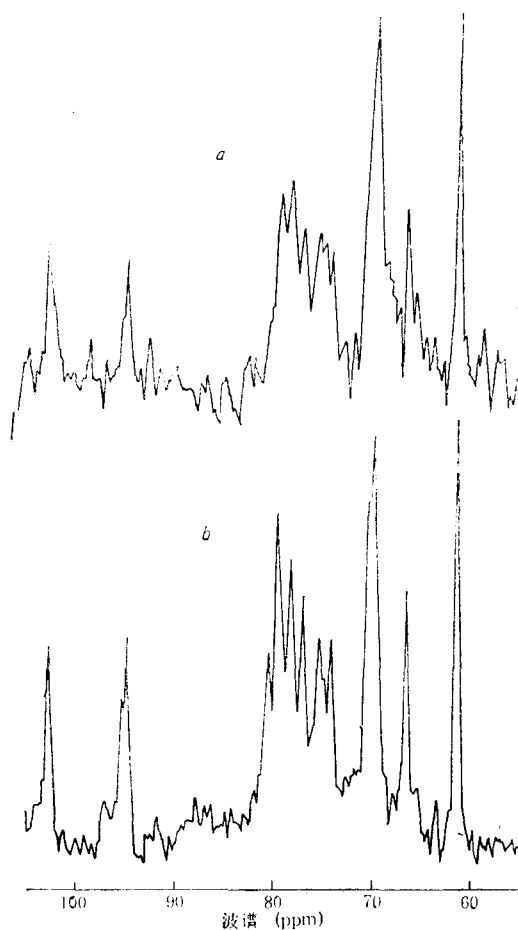
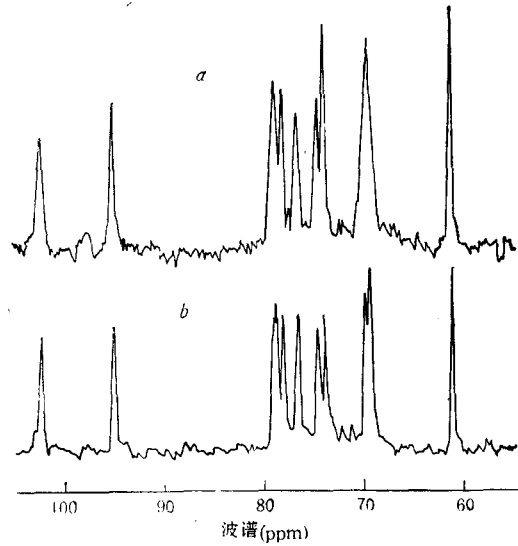
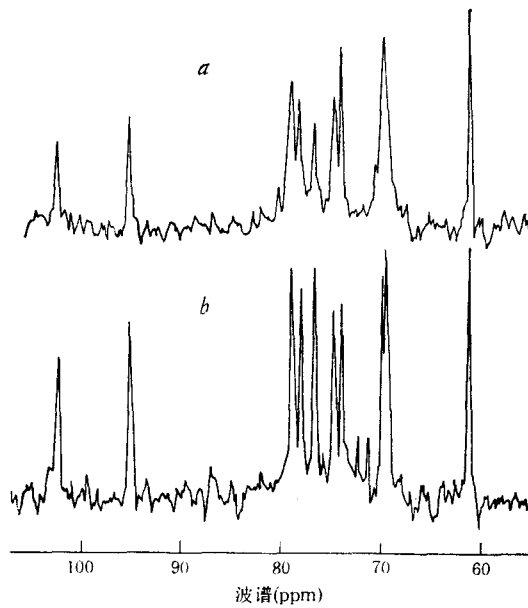


图 2 琼枝卡拉胶的 ^{13}C -NMR 波谱

a. 直接水提取的; b. 经过碱处理的。(图 3,4 图注相同)

枝卡拉胶有 Usov 等所提出的脱硫酸基的 κ -卡拉胶, 也即 Greer 等所命名的 β -卡拉胶存在。此外, 在 96.3, 68.3 和 65.6 ppm 处, 有 Greer 等所提出的 γ -卡拉胶的三个信号, 前一个很微弱, 后两个较强; 在 104.5 和 98.1 ppm 处, 有 Bellion 等^[6]提出的 μ -卡拉胶或 ν -卡拉胶的微弱信号。因此, 用水直接提取的琼枝卡拉胶是 β -卡拉胶、 κ -卡拉胶和 ι -卡拉胶, 及其前身 γ -卡拉胶、 μ -卡拉胶和 ν -卡拉胶六者的混合物, 以 β -卡拉胶和 κ -卡拉胶为主。

琼枝经碱处理后再用水提取, 所得卡拉胶的 ^{13}C -NMR 波谱图在 94.6 和 66.5 ppm 处的信号很强, 表明碱处理后的产品中以 β -卡拉胶占多数, 同时还有一些 κ -卡拉胶。碱处理后, 101.9, 92.2 和 71.8 ppm 这三个 ι -卡拉胶的信号, 104.5 和 98.1 ppm 这两个 μ -卡拉胶和 ν -卡拉胶的信号以及 96.3, 68.3 和 65.6 ppm 这三个 γ -卡拉胶的信号消失。这表示琼枝经碱处理后 ι -卡拉胶的含量降低到 10% 以下^[8], γ -卡拉胶转变成 β -卡拉胶, 而 μ -卡拉胶则转变成 κ -卡拉胶。因此, 经碱处理后的琼枝卡拉胶以 β -卡拉胶为主, κ -卡

图 3 耳突麒麟菜卡拉胶的 ^{13}C -NMR 波谱图 4 珍珠麒麟菜卡拉胶的 ^{13}C -NMR波谱

拉胶退居到第二位。

水直接提取的耳突麒麟菜卡拉胶的 ^{13}C -NMR 波谱出现典型的 κ -卡拉胶的全部化学位移信号, 证明这一卡拉胶是 κ -卡拉胶。碱处理后的耳突麒麟菜卡拉胶在 72.4 和 71.4 ppm 处出现两个比较弱的信号, 这是碱处理前所没有的。

水直接提取的珍珠麒麟菜卡拉胶的 ^{13}C -NMR 波谱显示 κ -卡拉胶的 12 个信号, 此外

表 2 卡拉胶中各碳原子的¹³C-NMR 化学位移 (ppm)

卡拉胶类型	3-连接的残基						4-连接的残基						文献
	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	
κ -卡拉胶	102.5	69.9	78.8	74.0	74.8	61.3	95.1	69.7	78.3	79.1	76.8	69.4	[14]
κ -卡拉胶	102.2	69.3	78.5	73.7	74.4	61.0	94.9	69.5	78.9	78.0	76.5	69.2	[13]
ι -卡拉胶	102.3	70.0	78.8	72.0	74.8	61.3	92.1	75.4	77.9	79.1	76.8	69.5	[14]
ι -卡拉胶	101.9	69.1	76.6	71.9	74.5	61.0	91.9	74.7	77.6	78.0	76.8	69.5	[13]
脱硫酸基的 κ -卡拉胶	102.5	70.2	80.4	66.3	75.3	61.3	94.6	69.9	78.1	79.3	76.8	69.5	[14]
β -卡拉胶	102.5			66.5		61.3	94.6						[9]
γ -卡拉胶	104.8			65.8			96.3					68.3	[9]

还在 80.3 和 70.3 ppm 处出现化学位移。珍珠麒麟菜经碱处理后,这两处的信号消失,而在 72.4 和 71.4 ppm 处与耳突麒麟菜一样,多出两个比较弱的信号。

以上¹³C-NMR 分析的结果表明,琼枝藻体中含有的卡拉胶种类很复杂。直接水提取的卡拉胶中包括有 β -、 κ -、 ι -、 γ -、 μ -或 ν -卡拉胶。该样品用一般的化学方法测定的硫酸基含量很低,比过去已知的 7 种卡拉胶中硫酸基含量最少的 κ -卡拉胶还低,这是比较特殊的。Peats^[10]分析的琼枝卡拉胶,其硫酸基含量偏低,本文也得到与之相同的结果。经过 Greer 等^[9]的研究,证明琼枝卡拉胶中存在着 β -卡拉胶,从而找到了琼枝卡拉胶硫酸基含量偏低的原因,解决了一般的化学分析法不能解决的问题。本文用¹³C-NMR 进行的测定,同样可以说明这个问题。

耳突麒麟菜卡拉胶的¹³C-NMR 波谱出现典型 κ -卡拉胶的 12 个化学位移,证明这一卡拉胶是 κ -卡拉胶。Anderson 等^[5]曾证明由耳突麒麟菜提取出来的卡拉胶,其化学结构最接近理想的 κ -卡拉胶。本文用¹³C-NMR 方法所得的结果和他们的一致。

三、结 语

用¹³C-NMR 波谱法测定了琼枝、耳突麒麟菜和珍珠麒麟菜直接水提取和碱处理后再用水提取所得卡拉胶的组成结构。

直接水提取的琼枝卡拉胶由 β -卡拉胶 (O- β -D-吡喃半乳糖 (1 \rightarrow 4)-O-3, 6-内醚- α -D-吡喃半乳糖 (1 \rightarrow 3)), κ -卡拉胶 (O- β -D-吡喃半乳糖-4-硫酸基 (1 \rightarrow 4)-O-3, 6-内醚- α -D-吡喃半乳糖 (1 \rightarrow 3)), ι -卡拉胶 (O- β -D-吡喃半乳糖-4-硫酸基 (1 \rightarrow 4)-O-3, 6-内醚- α -D-吡喃半乳糖-2-硫酸基 (1 \rightarrow 3)), γ -卡拉胶 (O- β -D-吡喃半乳糖 (1 \rightarrow 4)-O- α -D-吡喃半乳糖-6-硫酸基 (1 \rightarrow 3)), μ -卡拉胶 (O- β -D-吡喃半乳糖-4-硫酸基 (1 \rightarrow 4)-O- α -D-吡喃半乳糖-6-硫酸基 (1 \rightarrow 3)) 和 ν -卡拉胶 (O- β -D-吡喃半乳糖-4-硫酸基 (1 \rightarrow 4)-O- α -D-吡喃半乳糖-2,6-二硫酸基 (1 \rightarrow 3)) 组成。以 β -卡拉胶和 κ -卡拉胶为主。碱处理后的琼枝卡拉胶以 β -卡拉胶为主。

耳突麒麟菜和珍珠麒麟菜不论是水直接提取的还是碱处理后的几乎完全由 κ -卡拉胶构成。

参 考 文 献

- [1] 史升耀, 1981. 一种用途广泛的海藻多糖——卡拉胶. 海洋科学 2: 47—53.
- [2] 史升耀、刘万庆、李智恩等, 1986. 中国海南岛麒麟菜属卡拉胶的制备与性质. 水产学报 10(1): 1—9.
- [3] 史升耀、李智恩、刘万庆, 1984. 用 ^{13}C -NMR 研究几种中国江蓠琼胶. 海洋药物 3(4): 20—24.
- [4] 史升耀、张燕霞、刘万庆等, 1983. 江蓠琼胶产率、物理性质和化学组成的季节变化. 海洋与湖沼 14(3): 272—278.
- [5] Anderson, N. S., T. C. S. Dolan and D. A. Rees, 1973. Carrageenans. Part VII. Polysaccharides from *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottonii*. The co-valent structure of t-carrageenan. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 2173—2176.
- [6] Bellion, C., G. Brigand, J. C. Prome, D. Welti et al., 1983. Identification et caracterisation des précurseurs biologiques des carraghenanes par spectroscopie de R. M. N. ^{13}C . *Carbohydr. Res.* 119: 31—48.
- [7] Bhattacharjee, S. S., W. Yaphe and G. K. Hamer, 1978. ^{13}C -n.m.r. spectroscopic analysis of agar, k-carrageenan and t-carrageenan. *Carbohydr. Res.* 60: C1—C3.
- [8] Bodeau-Bellion, C. 1983. Analysis of carrageenan structure. *Physiol. Veg.* 21(4): 785—793.
- [9] Greer, C. W. and W. Yaphe, 1984. Characterization of hybrid (beta-kappa-gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatinac* J. Agardh (Rhodophyta, Solieriaceae) using carrageenases, infrared and ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Bot. Mar.* 27(10): 473—478.
- [10] Peats, S., 1981. Infrared spectra of carrageenans extracted from various algae. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 10: 495—502.
- [11] Percival, E., 1978. Sulfated polysaccharides of the Rhodophyceae -a review. In: Carbohydrate Sulfates. R. G. Schweiger, ed. ACS, Washington, D. C., pp. 213—224.
- [12] Rees, D. A., 1969. Structure, conformation and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Adv. Carbohydr. Biochem.* 24: 267—332.
- [13] Usov, A. I., 1984. NMR spectroscopy of red seaweed polysaccharides: Agars, carrageenans and xylans. *Bot. Mar.* 27(5): 189—202.
- [14] Usov, A. I., S. V. Yarotsky and A. S. Shashkov, 1980. ^{13}C -NMR Spectroscopy of red algal galactans. *Biopolymers* 19: 977—990.

¹³C-NMR SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF CARRAGEENANS FROM CHINESE *EUCHEUMA* SPECIES*

Shi Shengyao, Liu Wanqing and Li Zhien

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

ABSTRACT

Carrageenans isolated from *E. gelatinae*, *E. cottonii* and *E. okamurai* were analysed using ¹³C-NMR spectroscopy. Each *Eucheuma* sample was extracted by two methods, one treated with 32% NaOH and then extracted with water, and the other without alkaline treatment extracted directly with water.

Carrageenan extracted directly with water from *E. gelatinae* was composed of β-carrageenan (O-β-D-galactopyranosyl (1→4)-O-3,6-anhydro-α-D-galactopyranosyl (1→3)), κ-carrageenan (O-β-D-galactopyranosyl-4-sulfate (1→4)-O-3,6-anhydro-α-D-galactopyranosyl (1→3)), λ-carrageenan (O-β-D-galactopyranosyl-4-sulfate (1→4)-O-3,6-anhydro-α-D-galactopyranosyl-2-sulfate (1→3)), γ-carrageenan (O-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-O-α-D-galactopyranosyl-6-sulfate (1→3)), μ-carrageenan (O-β-D-galactopyranosyl-4-sulfate (1→4)-O-α-D-galactopyranosyl-6-sulfate (1→3)) and ν-carrageenan (O-β-D-galactopyranosyl-4-sulfate-(1→4)-O-α-D-galactopyranosyl-2,6-disulfate (1→3)), with β-carrageenan and κ-carrageenan as the main components. The carrageenan obtained from alkali treated *E. gelatinae* was composed predominantly of β-carrageenan.

Carrageenans isolated from *E. cottonii* and *E. okamurai* with and without alkaline treatment were almost completely composed of κ-carrageenan.

* Contribution No. 1308 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.