
* 研究简报 *

用 ^{13}C -NMR 光谱法研究几种红藻 含硫半乳聚糖的结构特征*

纪明侯 高洪峰 曹文达 范 晓

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 于1989年8月对采自青岛地区的5种红藻用冷水和热水分步提取或直接加热提取方法制备含硫半乳聚糖。对其多糖进行的 ^{13}C -光谱分析结果表明, 扁江蓼多糖主要由琼胶糖和6-硫酸基-琼胶糖组分构成; 海萝和多管藻多糖主要由6-硫酸基-琼胶糖组成, 并含微量琼胶糖前体、6- OCH_3 -琼胶糖组分; 此两种藻的热水提取物中还含有微量2- OCH_3 -琼胶糖; 三叉仙菜的热热水提取多糖主要由琼胶糖前体组成; 从海膜多糖谱图的信号首次确定其主要为琼胶糖前体和1-卡拉胶组分杂交的中间多糖。

关键词 琼胶糖前体 6-硫酸基-琼胶糖 红藻 含硫半乳聚糖 ^{13}C -NMR 谱图

红藻多糖中由D-和L-半乳糖单位交替连接成线型半乳聚糖者均为琼胶型。多糖中的糖单位上的羟基, 不同程度地被硫酸基和甲氧基所取代(纪明侯等, 1986, 1988), 其取代位置和数量不同, 会给多糖的性质带来不同的影响。本工作用 ^{13}C -NMR光谱法比较研究了用冷水和热水分步提取或直接加热提取方法从海萝、多管藻、扁江蓼、三叉仙菜和海膜5种红藻制备的含硫半乳聚糖的结构特点, 以阐述这些海藻之间的生化差异。

1 实验材料与方法

1.1 材料

海萝(*Gloiopeltis furcata*), 1989年4月采于青岛团岛; 多管藻(*Polysiphonia urceolata*), 1988年3月采于青岛二中后; 扁江蓼(*Gracilaria textorii*), 1988年1月采于青岛中港, 三叉仙菜(*Ceramium kondoi*), 1989年4月采于青岛太平角; 海膜(*Halymenia sinensis*), 1988年5月采于青岛团岛。

1.2 方法

根据海藻质地不同, 采用了冷水和热水分步提取(对海萝和多管藻)和直接加热提取(对扁江蓼、三叉仙菜和海膜)两种提取方法。

1.2.1 冷水和热水分步提取 取20.0g经磨碎机切细至约20目的藻末, 加700ml水, 室温搅拌提取22h。先用尼龙布过滤, 后经脱脂棉减压抽滤。滤液经减压浓缩后以1.2至0.8 μm 滤膜依次用压滤筒压滤。压滤液注入3倍量95%乙醇中(事先加入少许电解质)搅拌使多糖沉淀出来, 乙醇洗涤, 真空干燥。滤后的藻渣加800ml水, 于90 $^{\circ}\text{C}$ 搅

* 国家自然科学基金资助课题, 3870137号。纪明侯, 男, 出生于1925年10月, 研究员。

收稿日期: 1992年11月11日, 接受日期: 1996年1月22日。

拌提取 1.5h, 尼龙布过滤。两次滤液合并, 离心(5000r/min)。上清液减压浓缩后, 乙醇脱水, 洗涤, 干燥。

1.2.2 直接加热提取 取 20.0g 藻末加 1000ml 水, 压力锅中于 1kg/cm² 加热提取 1.5h, 尼龙布过滤。藻渣加 100ml 水, 同压力提取 1h, 同上法过滤。滤液合并, 离心, 上清液经浓缩后用压滤筒压滤, 乙醇脱水, 洗涤, 干燥。

1.2.3 ¹³C-NMR 光谱分析 称取 80mg 干多糖样品, 加 2ml D₂O, 于热水浴中加热使其溶解。用 JEOL JNM-G×400SCM NMR 光谱仪于 100.535MHz 和 70℃ 描绘质子去偶 ¹³C-NMR 谱图, 以 TMS(四甲基硅)作外标记录碳原子的化学位移(δ, ppm)。

1.2.4 硫酸基分析 按照 Verma (1977) 的比浊法进行。

2 结果与讨论

2.1 含硫半乳聚糖的提取得率和硫酸基含量

由表 1 可见, 海萝多糖的冷水和热水提取多糖的总得率为 37.6%, 其中热水提取率较高; 多管藻的冷、热水提取多糖总得率为 27.6%, 冷水提取率较高。海膜的直接热水提取率为最高, 达 42.1%; 扁江莼次之, 为 36.6%; 三叉仙菜最低。硫酸基含量以海膜多糖为最高, 18.8%, 海萝冷水提取物为 16.0%, 其他几种提取物均在 10% 以下。

表 1 5种红藻含硫多糖的提取得率(对干重, %)及其硫酸基含量(对多糖, %)

Tab.1 The yield (%. on dry weed) of sulfated polysaccharides extracted from five species of red seaweeds and their sulfate contents (%. on polysaccharide)

海藻种类	冷水提取		热水提取		直接加热提取	
	多糖得率	SO ₄ 含量	多糖得率	SO ₄ 含量	多糖得率	SO ₄ 含量
海 萝	8.8	16.0	28.8	9.7		
多管藻	21.4	— ^{d)}	6.2	7.9		
扁江莼					36.6	7.8
三叉仙菜					23.9	9.3
海 膜					42.1	18.8

d) 因样品作别用, 未测。

2.2 ¹³C-NMR 谱图分析

2.2.1 海萝的冷水和热水提取多糖 海萝的冷水提取物谱图表示, 有清晰的 6-硫酸基-琼胶糖的信号 G⁺4, G⁺5 和 G⁺6 及琼二糖其他信号 G1—G3, A1—A6 (Usov et al., 1983), 说明该多糖主要由 6-硫酸基-琼胶糖组成。还可看到琼胶糖前体(precursor to agarose) 的信号 G⁻1 和 A⁻1, 以及 6-OCH₃-琼胶糖的微弱信号 G⁻5, G⁻6 和 OCH₃。谱图中的 57.8ppm 信号的来源尚不清。海萝的热水提取物的谱图(图 1b)与冷水谱图近似, 有清晰的 G⁺4, G⁺5 和 G⁺6 信号, 说明此多糖也主要由 6-硫酸基-琼胶糖构成。同时还出现微弱的 6-OCH₃-琼胶糖信号和 2-OCH₃-琼胶糖信号(G⁻1, A⁻1, A⁻3) (Ji et al., 1988)。后者的出现, 表明海萝经冷水提取后, 于热水提取物中才显示出被杂质掩盖的微量组分的信号。1987年, 纪明侯等用 ¹³C-NMR 光谱法曾确定海萝多糖的 1.0mol/L NaCl 洗脱级分全部由 6-硫酸基-琼胶糖级组成, 并含有微量 6-OCH₃-琼胶糖和 2-OCH₃-琼胶糖组分。本文中提及的各种琼胶糖、琼二糖和琼胶糖

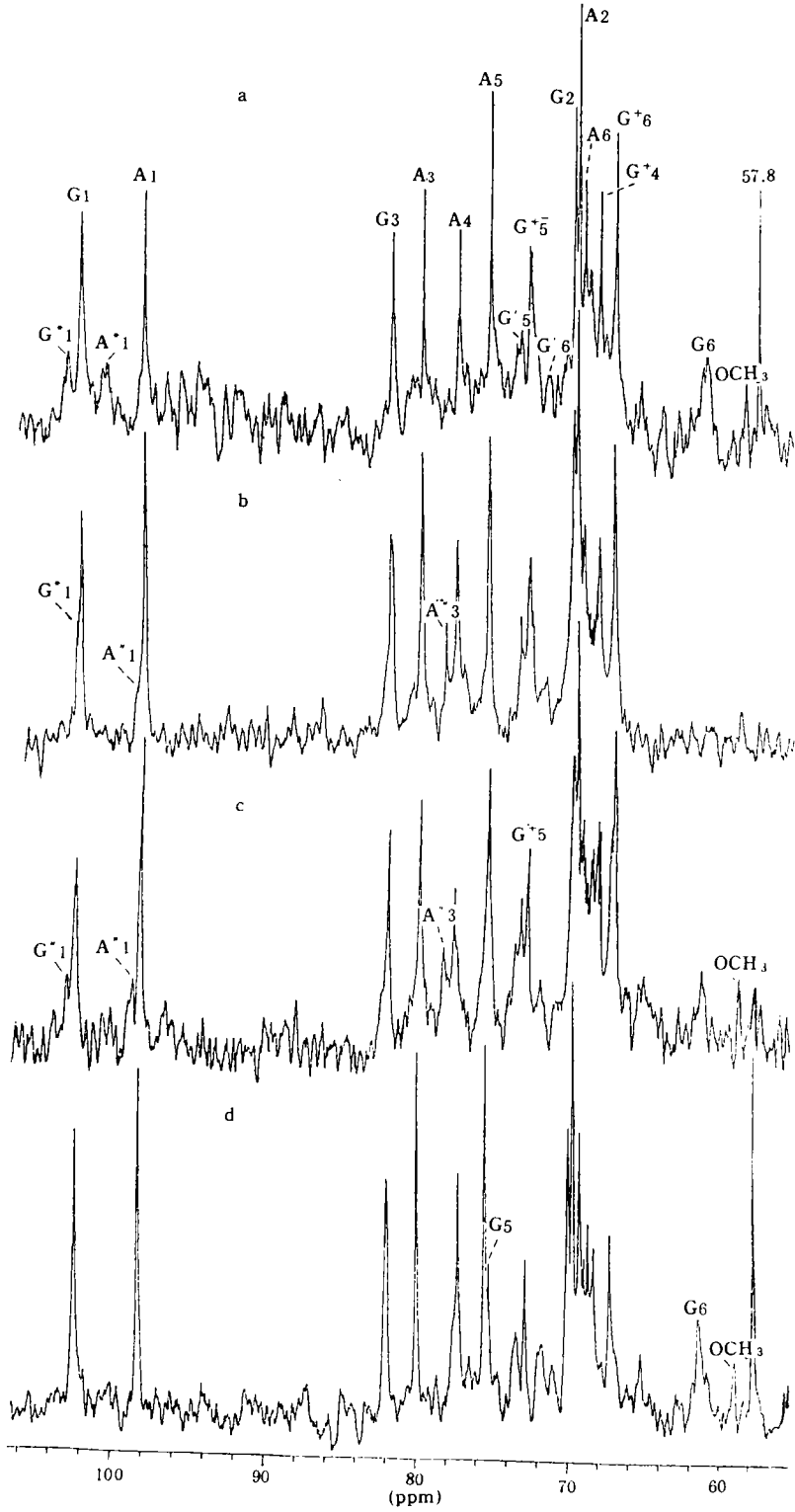


图1 海萝的冷水(a)和热水(b)提取多糖, 多管藻的热水(c)和扁江蓼的直接热水(d)提取多糖的¹³-NMR谱图

Fig.1 ¹³-NMR spectra of cold water (a) and hot water (b) extracts from *Gloiopeltis furcata*, hot water extract (c) from *Polysiphonia urceolata* and hot water extract (d) from *Gracilaria textorii*.

G, G*, G'', G' and G+ 分别代表琼二糖的 D- 半乳糖, 琼胶糖前体的 D- 半乳糖, 2-OCH₃-L- 半乳糖的 D- 半乳糖, 6-OCH₃-D- 半乳糖和 6- 硫酸基-D- 半乳糖的各碳原子; A, A* 和 A'' 分别代表 3, 6- 内醚-L- 半乳糖, 6- 硫酸基-L- 半乳糖和 2-OCH₃-L- 半乳糖的碳原子。

前体的结构式参见纪明侯等(1986), Ji等(1988)。

2.2.2 多管藻的热水提取多糖 多管藻的热水提取多糖(冷水与热水提取物的谱图相似, 这里省略)的谱图(图1c)与海萝热水提取多糖相似, 也有明显的 G^+4 , G^+5 和 G^+6 信号, 表明, 该多糖也几乎全由6-硫酸基-琼胶糖组分构成, 此外, 尚有表示琼胶糖前体、6- OCH_3 -琼胶糖和2- OCH_3 -琼胶糖组分存在的微弱信号。Usov等(1987)对内枝多管藻(*Polysiphonia morrowii*)多糖的酶解后的抗酶解部分用 ^{13}C -NMR法证实主要由6-硫酸基-琼胶糖组成。还确认有微量6- OCH_3 -琼胶糖和2- OCH_3 -琼胶糖

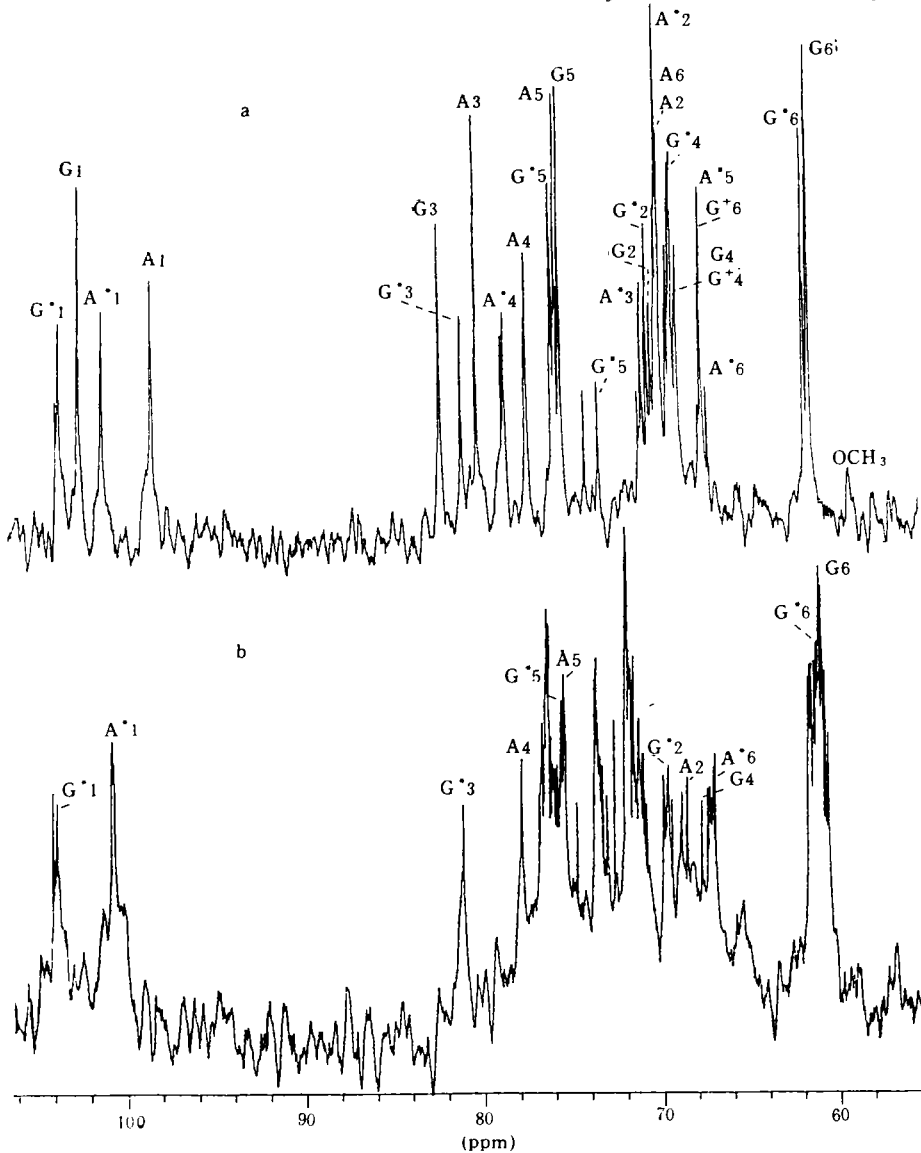


图2 三叉仙菜(a)和海膜(b)的直接热水提取多糖的 ^{13}C -NMR谱图

(图中各符号的说明与图1相同)

Fig.2 ^{13}C -NMR spectra of hot water extracts from *Ceramium kondoi* (a) and *Halymenia sinensis* (b)

组分的存在。

2.2.3 扁江离的直接热水提取多糖 如图 1d 所示, 既有显示琼二糖的各碳原子信号(包括 G5 和 G6)、尚有明显的 6- 硫酸基- 琼胶糖各信号(包括 G⁺5 和 G⁺6)。这表明, 江离琼胶主要由琼胶糖和 6- 硫酸基- 琼胶糖两组分构成。此外, 谱图还有表示 6-OCH₃- 琼胶糖的微量信号。但没有琼胶糖前体的信号。Ji 等(1988)对扁江离的冷水提取级分所测定的主要组分与本文的热水提取组分相似。

2.2.4 三叉仙菜的直接热水提取多糖 如图 2a 的 ¹³C-NMR 谱图所示, 三叉仙菜的热水提取多糖主要由琼胶糖(G1—G6, A1—A6 信号很明显)和琼胶糖前体(G*1—G*6 和 A*1—A*6 信号也较明显)组分构成。另外, 尚含有一定量的 6- 硫酸基- 琼胶糖(G⁺4, G⁺5 和 G⁺6 信号)。从各琼胶糖的碳原子 G6, G*6, 和 G⁺6 的信号强度, 可以估算琼胶糖前体的相对含量, 即 $G^*6 / (G6 + G^*6 + G^+6) \times 100\% = 32.6\%$ 。琼胶糖前体在活的藻体内可部分地经脱硫酸酶的作用脱去其中 L- 半乳糖 C6 上的硫酸基, 同时发生 3,6- 内醚化而生成琼胶糖(Rees et al., 1961)。三叉仙菜的热水提取多糖中的琼胶糖前体含量与其在龙须菜的冷水提取多糖中的含量 33.2%(Ji et al., 1988)大体一致, 但比坛紫菜的热水提取多糖中的 60%(纪明侯等, 1986)要低得多。这样, 红藻中的琼胶糖前体含量在紫菜类中为最高, 龙须菜和三叉仙菜居中, 而石花菜类中则极低, 或不含有。这种含量差异, 反映红藻中不同种类的进化特点。

2.2.5 海膜的直接热水提取多糖 海膜属于蜈蚣藻科的红藻。此科所属数种类如叉叉蜈蚣藻(*Grateloupia divaricata*)、肉质厚膜藻(*Pachymenia carnova*)、角质叶膜藻(*Phyllymenia cornea*)等所含含硫多糖已证实为琼胶- 卡拉胶中间多糖(Усов и др., 1978; Parolis et al., 1978; Nunn et al., 1969)。但至今未见有关海膜多糖结构的报道。在本工作中得知, 海膜提取多糖的硫酸基含量较高, 达 18.8, 其 ¹³C-NMR 谱图(图 2b)中, 信号高而复杂, 除有较明显的琼胶糖前体的信号 G*1:104.1, G*2:70.4, G*3:81.3, G*5:75.8, G*6:61.7; A*1:100.8, A*6:67.2ppm 等之外, 还有相当于 l- 卡拉胶的 lA3:77.9, lG3:76.5, lG4:72.1, lG6:61.3, lA6:69.8ppm 等信号, 但无明显的 lA1 信号。在 62—67, 72—75, 76—77ppm 之间出现的若干信号尚不易判别。由此, 可以推断, 海膜多糖主要是琼胶糖前体嵌段与 l- 卡拉胶嵌段相杂交在一起的中间多糖。这有待进一步进行分离和水解以确定其详细结构。

以上 5 种海藻多糖的 1.5% 热水溶液冷却后都无凝固力。

3 结论

所试验的 5 种红藻代表着 4 种不同类型硫酸基含量高(7.8%—18.8%)的琼胶型和琼胶- 卡拉胶型中间多糖。第 1 种类型是扁江离类多糖, 是以琼胶糖与 6- 硫酸基- 琼胶糖为主要组分, 微量组分为 6-OCH₃- 琼胶糖; 第 2 种类型是海萝和多管藻类多糖, 主要组分为 6- 硫酸基- 琼胶糖, 微量组分为琼胶糖前体、6-OCH₃- 琼胶糖和 2-OCH₃- 琼胶糖; 第 3 种类型为三叉仙菜类多糖, 主要由琼胶糖和琼胶糖前体组分组成; 第 4 种类型是海膜多糖, 其主要组分为琼胶糖前体和 l- 卡拉胶组分杂交形成的琼胶- 卡拉胶型的中间多糖。

参 考 文 献

- 纪明侯等, 1986. 海洋与湖沼, **17**(3): 185—195.
- 纪明侯, 顾柯楠, 1987. 海洋科学, **2**: 50—52.
- 纪明侯等, 1988. 海洋与湖沼, **19**(3): 249—261.
- Ji Minghou et al., 1988. *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, **6**(2): 87—103.
- Nunn, J. R. et al., 1969. *Carbohydr. Res.*, **9**: 265—276.
- Parolis, H. et al., 1978. *Carbohydr. Res.*, **62**(2): 313—320.
- Rees, D. A. et al., 1961. *Biochem. J.*, **81**(2): 347—352.
- Usov, A. I. et al., 1983. *Bot. Mar.*, **26**: 285—294.
- Usov, A. I. et al., 1987. *Bot. Mar.*, **30**(5): 365—370.
- Verma, B. C., 1977. *Talanta*, **24**: 49—50.
- Усов, А. И. и др., 1978. *Биоорг. Хим.*, **4**(11): 1507—1512.

STUDIES ON THE STRUCTURAL FEATURE OF SULPHATED GALACTAN POLYSACCHARIDES FROM SOME RED SEAWEEDS USING ^{13}C -NMR SPECTROSCOPY

Ji Minghou, Gao Hongfeng, Cao Wenda, Fan Xiao

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract The sulphated galactan polysaccharides were prepared by cold water and hot water extraction sequentially from *Gloiopeltis furcata* and *Polysiphonia urceolata*, and by direct hot water extraction from *Gracilaria textorii*, *Ceramium kondoi* and *Halymenia sinensis*, which were collected on the coast of Qingdao in Aug. 1989.

The ^{13}C -NMR spectroscopic analysis of these polysaccharides showed that the polysaccharides extracted from *G. furcata*, *P. urceolata* and *G. textorii* either by cold water or hot water consist of 6-OSO₃⁻-agarose as the main component and 6-OCH₃-agarose and 2-OCH₃-agarose are the minor components, while that from *C. kondoi* consists of agarose and precursor to agarose. The spectrum of the direct hot water extract from *H. sinensis*, however, indicated that many signals in it remain unknown except some signals assigned to be attributed to the precursor to agarose and 1-carrageenan.

Key word Precursor to agarose 6-OSO₃⁻-agarose Red seaweeds Sulphated galactan polysaccharides ^{13}C -NMR spectroscopy