

海带和马尾藻中褐藻胶的糖醛酸组成与序列结构的研究*

郑乃余 张燕霞 范晓

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 从中国产海带和3种马尾藻中提取褐藻胶,用IR谱分析其褐藻胶的结构特征,用高分辨¹H-NMR(400MHz)测定无损褐藻酸钠的单体组成和序列结构。IR谱表明了这4种褐藻胶单体组成的差异性。NMR谱的结果表明:海带、海蒿子、海黍子和鼠尾藻中褐藻胶的G组分摩尔分数 F_G 依次为0.35,0.40,0.45和0.44,而相应的GG二聚重复单元摩尔分数 F_{GG} 分别为0.21,0.37,0.36和0.34,即海带的 F_{GG} 明显小于三种马尾藻。文中引入一嵌段分布参数 $\eta = F_{MG}/(F_M \cdot F_G)$,相应的 η 值依次为0.62,0.13,0.36和0.41,这表明了序列分布的差异性。

关键词 组成 序列结构 褐藻胶 海带 马尾藻

关于褐藻胶组成和序列结构的研究,已有不少报道^[5-16]。但对我国产褐藻中褐藻胶的化学结构报道甚少^[2,13,14],至于糖醛酸序列结构的研究至今未见报道。本文采用IR谱分析了我国产4种褐藻的褐藻胶的结构特征,用高分辨¹H-NMR(400MHz)系统研究了无损褐藻酸钠的糖醛酸组成和序列结构。

一、实验材料和方法

1. 实验材料

- (1) 海带(*Laminaria japonica*),1988年长岛人工养殖海带。
- (2) 海蒿子(*Sargassum pallidum*),1988年采于海南岛。
- (3) 海黍子(*S.kjellmanianum*),1988年6月25日采于青岛太平角。
- (4) 鼠尾藻(*S.thunbergii*);1988年6月25日采于青岛太平角。

2. 实验方法

(1) 褐藻酸钠的提取 海带褐藻酸钠由褐藻胶生产车间的酸化池中取出褐藻胶絮状凝胶,用4%NaOH溶液中和溶解后,再用酒精脱水三遍,过滤后置于五氧化二磷干燥器中干燥制得。马尾藻(海蒿子、海黍子和鼠尾藻)褐藻酸钠系取自然晒干后的整棵藻体,剪碎至约1cm长碎片,水洗两次后,参照纪明侯等^[1]的方法制备。

(2) 褐藻酸的制备 用上述提取得到的海带和3种马尾藻的褐藻酸钠,参照高桥

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第1754号。

在本文的NMR谱和IR谱分析中,承蒙中国科学院上海药物研究所贺湘同志和本所中心室陈群梯同志的大力协助,特此志谢。

接受日期:1990年5月19日。

武雄等^[4]的酸化法制备。

(3) 红外光谱分析 取 1—2mg 干燥褐藻酸样品, 磨碎后加入约 20mg 烘干的 KBr 粉末混合, 仔细研磨, 压成的薄片用 Shimadzu IR-440 型红外光谱仪记录红外吸收光谱。

(4) 高分辨 ¹H-NMR 谱分析 参照 Grasdalen 等^[7]的方法进行。为降低粘度, 褐藻酸钠样品需经稀酸温和水解处理 (30min, 100°C, pH = 3)。取水解处理后干燥褐藻酸钠样品 3—5mg, 在中性 pD 下溶于 D₂O 中, 加入 0.3mg EDTA, 在 Bruker AM-400 型超导 Fourier 变换核磁共振谱仪上测定, 谱图在室温记录。D₂O 残存的氢峰 (HDO) 对谱线有干扰, 可用计算机程序压制水峰。记录各谱峰的强度 I。

二、结果与讨论

1. 褐藻酸的红外光谱分析

海带、海蒿子、海黍子和鼠尾藻提取的褐藻酸的红外光谱如图 1 的 I—IV 所示。

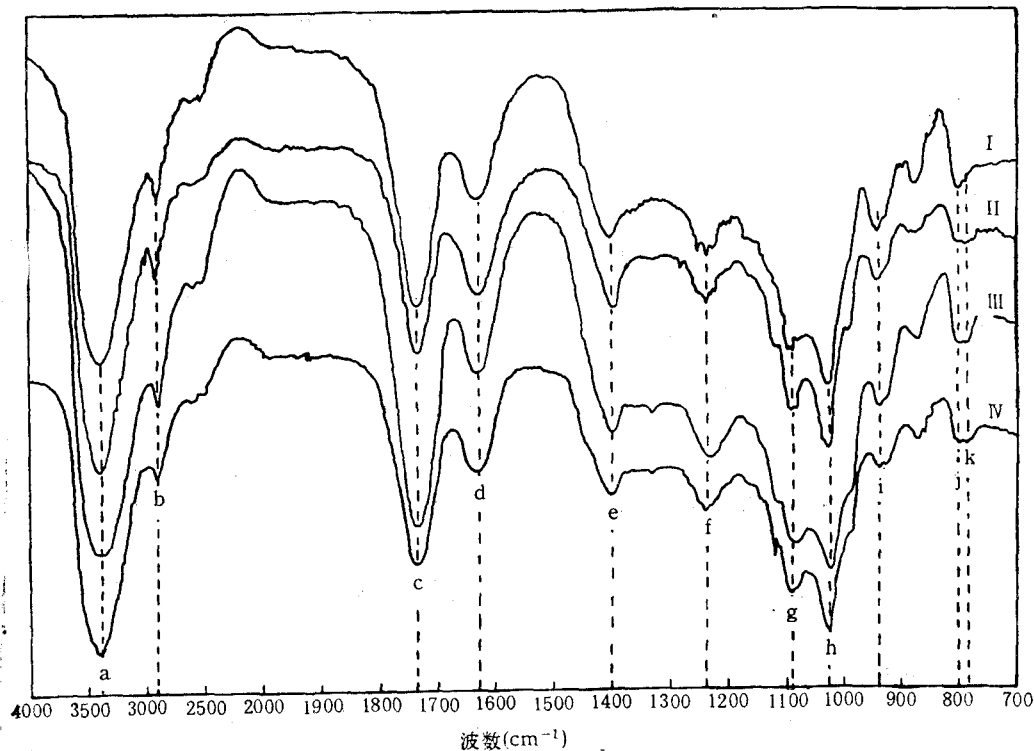


图 1 4 种褐藻中褐藻酸的红外光谱

Fig.1 The infrared spectra of alginic acids from four species of brown algae
I. 海带; II. 海蒿子; III. 海黍子; IV. 鼠尾藻。

图 1 的结果表明, 这 4 种褐藻酸的红外光谱非常相似, 都具有以下特征吸收峰^[3,15]:

- a. 3370cm^{-1} , O—H 的伸缩振动, 存在分子间氢键;
- b. 2920cm^{-1} , —CH—基团的伸缩振动;
- c. 1730cm^{-1} , 羧基—COOH 上 C=O 的伸缩振动;

- d. 1630cm^{-1} , 羧基 $-\text{COO}^-$ 上的非对称伸缩振动;
 e. 1400cm^{-1} , { 羧基 $-\text{COOH}$ 上的 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动;
 羧基 $-\text{COO}^-$ 的对称伸缩振动;
 f. 1230cm^{-1} , { 羧基 $-\text{COOH}$ 上 $\text{O}-\text{H}$ 的变角振动;
 $\text{C}-\text{H}$ 的变角振动;
 g. 1090cm^{-1} , 环内醚 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 的伸缩振动;
 h. 1020cm^{-1} , $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ 中 $\text{C}-\text{O}$ 的伸缩振动;
 i. 930cm^{-1} , 非对称环伸缩振动;
 j. 808cm^{-1} , 甘露糖醛酸特征吸收峰;
 k. 787cm^{-1} , 古罗糖醛酸特征吸收峰。

由于褐藻酸具有位于 1730cm^{-1} 的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动吸收峰(c), 而褐藻酸盐具有位于 1630cm^{-1} 的 $-\text{COO}^-$ 非对称伸缩振动峰(d), 因此, 很容易区分褐藻酸和褐藻酸盐。从图 1 看出, 4种褐藻酸都出现 d 吸收峰, 说明酸化后, 部分羧基仍以 $-\text{COO}^-$ 的形式存在。另外, 位于 930cm^{-1} 的非对称环伸缩振动峰(见 i), 是吡喃环的特征吸收峰, 当吡喃环上取代基的性质发生变化时, 其吸收峰也将发生变化^[3], 据此可以判断分子链之间是否有交联发生。图 1 表明, 4种褐藻酸的非对称环伸缩振动峰大致相同(见 i)。

位于 808cm^{-1} (j)的甘露糖醛酸(M)和位于 787cm^{-1} (k)的古罗糖醛酸(G)特征吸收峰的大小与 M/G 比值的大小有关, 据此可以半定量测定 M/G 比值^[13]。由图 1 可见, j 和 k 两峰几乎重叠, 海带(见图 1: I)的 j 峰比 k 大, 表明 M/G 较大; 而三种马尾藻(见图 1: II, III 和 IV)的 j 和 k 峰比较接近, 表明 M/G 比值都比海带小, 此结果与纪明侯等^[14]的结果相吻合。由于本红外光谱仪的灵敏度和分辨率所限, 难以测定 M/G 比值的大小。

2. 高分辨 $^1\text{H-NMR}$ 谱的分析

褐藻酸钠是由 D-甘露糖醛酸和 L-古罗糖醛酸的单体以嵌段形式排列而成的线型二元共聚物(如图 2 所示)。

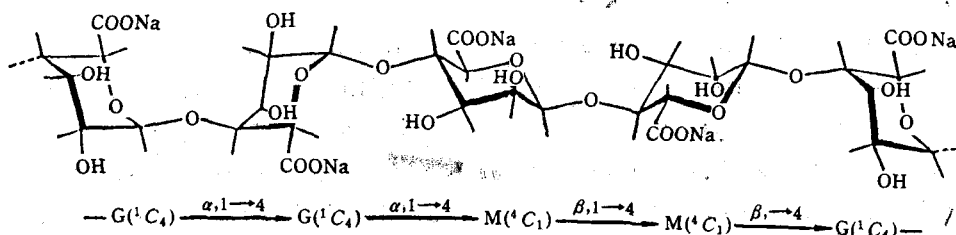


图 2 褐藻酸钠的嵌段结构

Fig.2 The block-structure of sodium alginate

A. G-1(5.02ppm); B. GM-5(4.67ppm); C. M-1(4.62ppm); D. GG-5(4.44ppm)

采用高分辨 $^1\text{H-NMR}$ 谱可以表征褐藻酸盐中糖醛酸的组成和序列结构^[6,7]。图 3 为海蒿子褐藻酸钠的高分辨 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz) 谱图, 图中以 $^1\text{C}_4$ 构象连接的单体 G 异头碳上质子 H-1 的谱峰为 G-1(5.02ppm); 以 $^1\text{C}_1$ 构象连接的单体 M 异头碳上质子 H-1 的谱峰为 M-1(4.62ppm)。单体 G 的第 5 个碳上的质子 H-5, 当与相邻的单体 M 连接时, 化

学位移为 GM-5(4.67ppm);当与相邻的G连接时,化学位移为 GG-5(4.44ppm)。高场区的 4.09ppm 和 4.16ppm 两组峰,根据 Grasdalen 等^[7]的数据,可能是 G-3(三重峰)和 G-4(二重峰)的谱峰。在更高场区域的谱线由于受到溶液中残留的乙醇以及 EDTA 等谱峰的影响而不易分辨。

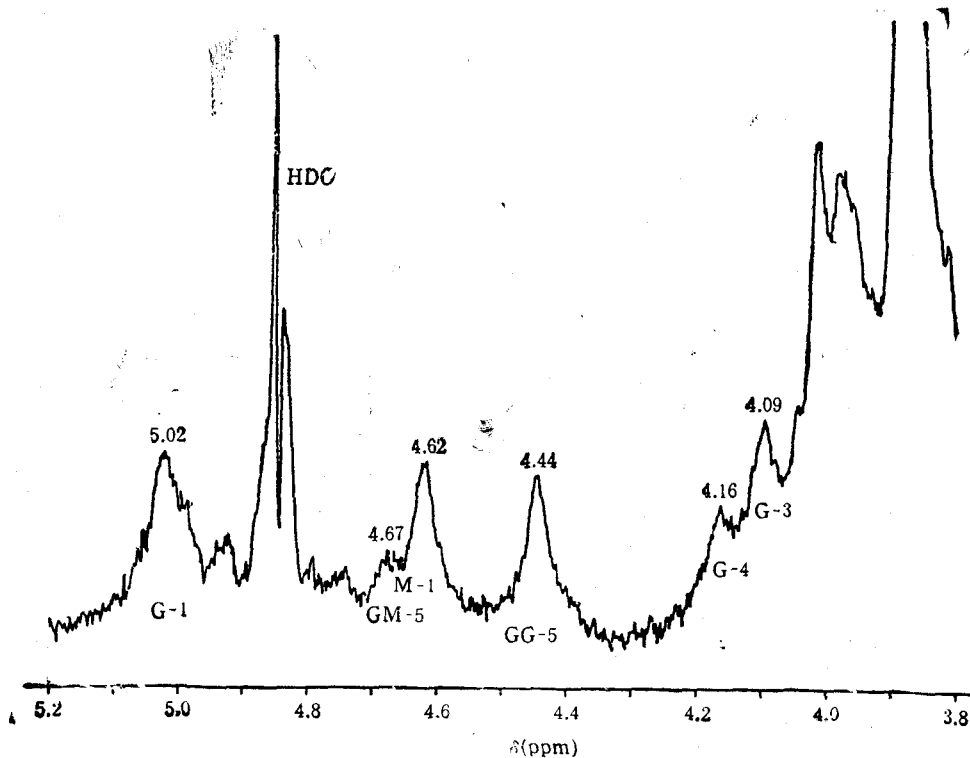


图3 海蒿子褐藻酸钠的 400MHz FT-¹H-NMR 谱图(室温记录, pD = 6)

Fig.3 The 400 MHz FT-¹H-NMR spectra of sodium alginate of *Sargassum pallidum*

中国产 4 种经济褐藻中无损褐藻酸钠的 400MHz FT-¹H-NMR 谱如图 4 所示。

图 4 表明,4 种褐藻酸钠都出现 A,B,C 和 D 4 组峰。从图 4a 看出,海带褐藻酸钠的谱线存在着一个优势的 C 峰,这同它本身具有高含量的 M 是一致的^[1]。

本实验采用室温记录,在 400MHz 谱上,GM-5 和 M-1 仅出现 B 和 C 两组单峰;采用 90℃记录时^[6],GM-5 和 M-1 都出现双峰。Grasdalen 等^[7]测定 996MHz 谱图,其 B 和 C 是重叠的;而本实验是部分重叠。根据 A,B,C 和 D 4 组峰的归属,对 Grasdalen 等^[7]的 F_G 及 F_{GG} 计算公式作了相应调整,由 A,B,C 和 D 4 组峰的强度 I_A, I_B, I_C 和 I_D , 可得 G 组分和 GG 二聚重复单元的摩尔数 F_G 和 F_{GG} :

$$F_G = \frac{I_A}{I_B + I_C + I_D}$$

$$F_{GG} = \frac{I_D}{I_B + I_C + I_D}$$

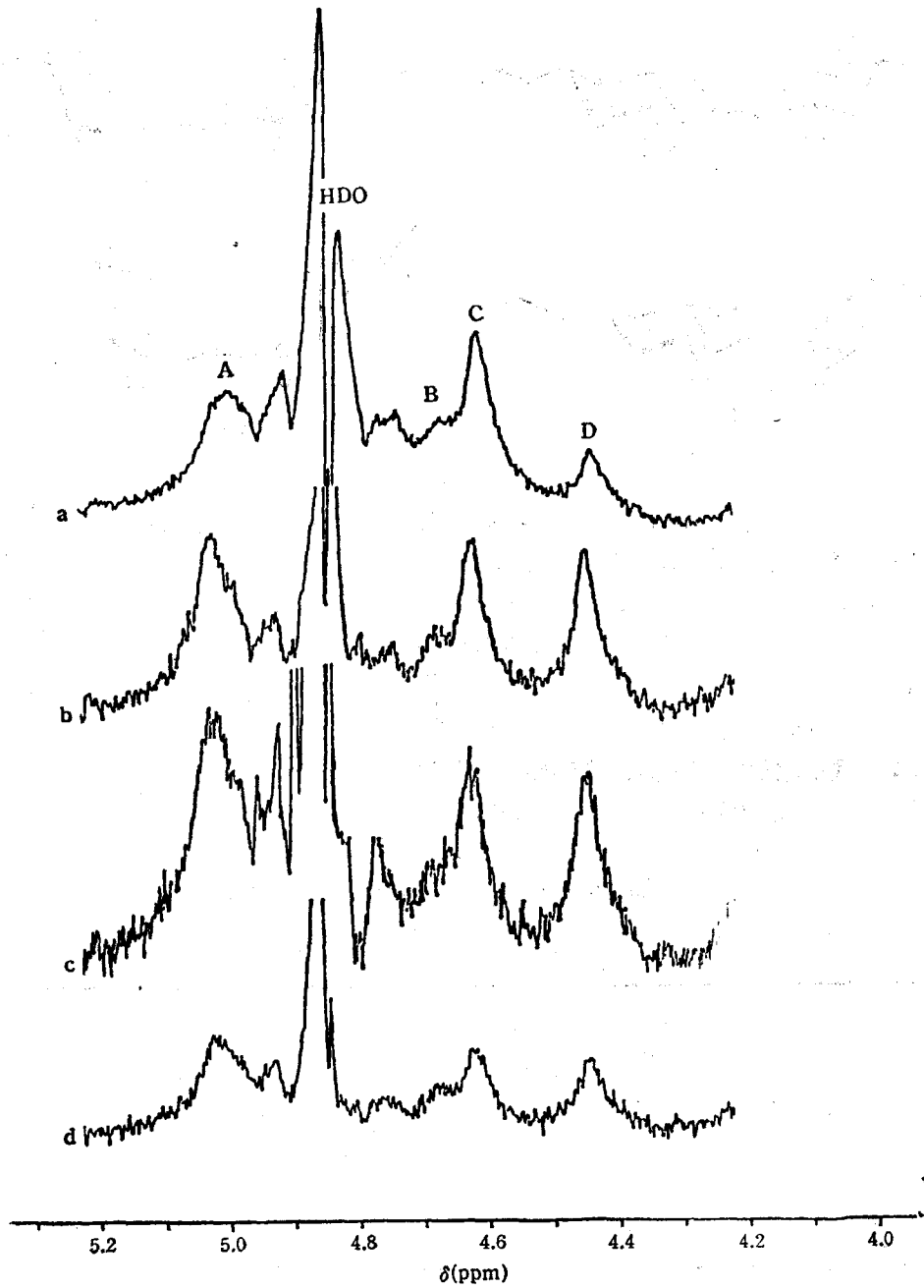


图4 4种褐藻中褐藻酸钠的400MHz FT-¹H-NMR谱图

Fig.4 The 400 MHz-FT-¹H-NMR spectra of sodium alginates from four different species of brown algae

a.海带; b.海蒿子; c.海黍子; d.鼠尾藻。

根据 Grasdalen 的其他计算公式, 即可得到 F_M , F_G (M和G的摩尔分数) 和 MM, MG, GM, GG 等4种二聚重复单元(见图5)的摩尔分数 F_{MM} , F_{MG} , F_{GM} 和 F_{GG} 。

值得一提的是, 由于升温对核磁共振仪的保养不利, 本实验未能采用高温记录。根据

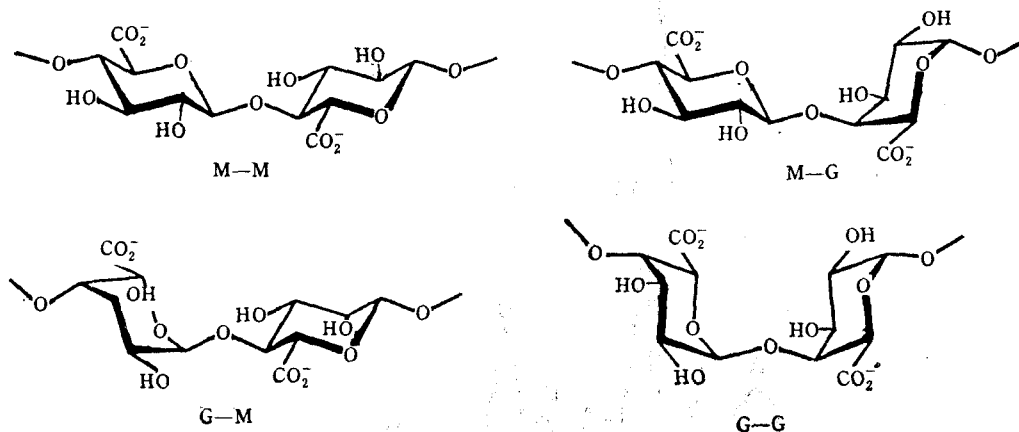


图5 分子链上4种可能的二聚重复单元

Fig.5 The four possible doublet along the copolymer chain

Grasdalen 等^[6,7]的结果,采用 90℃记录,将使 HDO 峰移向高场,对褐藻胶的谱峰无干扰。高温时,样品的流动性好,因而分辨率也有显著提高。采用 90℃记录的 400MHz ¹H-NMR 谱可测定与 G 相邻的 GGG, MGM 和 MGG 等三聚重复单元所占的比例^[6]。 F_{GGG} , F_{MGM} 和 F_{MGG} 关于 ¹H-NMR 分析的误差,与化学分级法及 ¹³C-NMR 相比,其误差大多数在 ±0.05 的范围内^[7]。

3.4 种褐藻酸盐的糖醛酸组成和序列结构的比较

从 4 种褐藻提取的褐藻酸钠的 F_G , F_M 及二聚重复单元的摩尔分数 F_{MM} , F_{MG} , F_{GM} 和 F_{GG} 如表 1 所示。

表 1 4 种褐藻酸盐共聚物的组成与二聚重复单元摩尔数

Tab. 1 The compositions and the doublet frequencies of alginates from four different species of brown algae

材 料	组 成		二聚重复单元摩尔数			
	F_M	F_G	F_{MM}	F_{MG}	F_{GM}	F_{GG}
海 带	0.65	0.35	0.51	0.14	0.14	0.21
海蒿子	0.60	0.40	0.57	0.03	0.03	0.37
海黍子	0.55	0.45	0.46	0.09	0.09	0.36
鼠尾藻	0.56	0.44	0.46	0.10	0.10	0.34

从表 1 中可以看出,3 种马尾藻褐藻胶的 F_G 组分比较接近($F_G = 0.40-0.45$),但都比海带($F_G = 0.35$)大。3 种马尾藻褐藻胶的 GG 二聚重复单元的摩尔分数为 $F_{GG} = 0.34-0.37$,而海带的 F_{GG} 仅为 0.21。可见,3 种马尾藻的褐藻酸盐共聚物中 G 组分及 GG-序列的比例均比海带大。根据蛋箱模型^[8],褐藻酸钙凝胶的形成是由 Ca^{2+} 离子诱导聚-L-古罗糖醛酸分子链之间的二聚化所决定的。G-嵌段的比例越大,分子链之间的连接点越多,凝胶的网状结构越稳定,即凝胶的强度越大,因而越不易脱水。由于 3 种马尾藻褐藻胶的 G 及 GG 含量都比海带高,因而褐藻酸钙凝胶的稳定性比海带高,脱水性比

海带差。这预示着马尾藻褐藻胶是一种优良的凝胶剂, 在食品工业及固定化材料方面具有更广泛的用途。然而, 由于褐藻酸钙泌水性差, 马尾藻褐藻酸钙凝胶不易脱水, 因此, 不宜用钙化法工艺生产马尾藻的褐藻胶。

由于褐藻酸盐是以 M 和 G 两种单体组成的嵌段共聚物, 仅用二聚重复单元的摩尔分数难以全面表征分子链中 M 和 G 的嵌段分布, 为此, 我们引用一个嵌段参数 η 来统计地加以说明^[7], 即

$$\eta = \frac{F_{MG}}{F_M \times F_G}$$

η 值的大小具有以下意义:

$0 \leq \eta < 1$, 表示 M, G 排列以均聚嵌段序列为主;

$\eta = 1$, 表示 M, G 排列为无规序列;

$1 < \eta \leq 2$, 表示 M, G 排列以交替嵌段序列为主。

通过比较 η 值的大小, 即可得到褐藻酸盐中 M, G 单体排列的结构特征信息。

另外, 由于测定的是长链分子 ($\overline{dP}_n = 20-30$)^[7], 可近似地认为: M-嵌段的比例等于 F_{MM} , G-嵌段的比例等于 F_{GG} , MG-嵌段的比例等于 $F_{MG} + F_{GM}$ 。

据此, 即可得不同原料褐藻酸盐中的 η 值和嵌段分布(见表 2)。由表 2 可见, η 值与 F_G 的大小没有明显相关性, G 的含量仅能表示褐藻酸盐中单体的组成, 并不能表征褐藻酸盐的嵌段分布。由于这 4 种褐藻酸盐的 $\eta = 0.13-0.62$ (即 $0 \leq \eta < 1$), 因此, M, G 单体的排列都属于均聚嵌段序列型, 交替嵌段序列占少数。从 η 值看, 海蒿子的 η 值最小, 尽管其 F_G 仅次于海带, 也可以预料它可能具有某些特殊的性质。海黍子和鼠尾藻的 F_G 和 η 值都比较接近, 说明这两种褐藻酸盐的结构特征比较相似, 应该具有某些相似的性质。

表 2 褐藻酸盐的嵌段分布(%)与特征参数(η)

Tab. 2 The block distributions (%) and the block characters(η) of alginates from four different species of brown algae

材 料	M-嵌段	G-嵌段	MG-嵌段	η
海 带	51	21	28	0.62
海蒿子	57	37	6	0.13
海黍子	46	36	18	0.36
鼠尾藻	46	34	20	0.41

三、结 语

本文以中国产海带和 3 种马尾藻为材料, 分别提取褐藻胶, 用红外光谱分析这 4 种褐藻胶的结构特征, 用高分辨 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz) 直接测定无损褐藻酸钠的组成和序列结构。这不仅对于工业利用这 4 种褐藻胶提供了可靠的依据, 而且对于开展褐藻胶结构与功能关系的研究及探索褐藻的生理生化作用也具有重要的指导意义。本文的主要研究结

论如下:

1. IR 谱的 808cm^{-1} 和 787cm^{-1} 两个特征吸收峰的大小表明了 M, G 组成的差异性。
 2. 古罗糖醛酸组分的摩尔分数 F_G 的大小依次为: 海带(0.35) < 海蒿子(0.40) < 鼠尾藻(0.44) < 海黍子(0.45); GG 二聚重复单元的摩尔数 F_{GG} 依次为: 海带(0.21) < 鼠尾藻(0.34) < 海黍子(0.36) < 海蒿子(0.37)。即 3 种马尾藻褐藻胶的 F_G 及 F_{GG} 都明显地大于海带, 因此, 马尾藻褐藻胶的凝胶性能比海带好, 但不宜用钙化法生产马尾藻的褐藻胶。

3. 文中引入一嵌段分布参数 $\eta = \frac{F_{MG}}{F_M \times F_G}$, 4 种褐藻酸盐的 η 值依次为: 海带(0.62) > 鼠尾藻(0.41) > 海黍子(0.36) > 海蒿子(0.13)。该结果表明这 4 种褐藻胶都属于均聚嵌段型共聚物。由 η 值的大小, 可见海黍子($\eta = 0.36$) 和鼠尾藻($\eta = 0.41$) 的结构特征相近, 而海蒿子(η 值最小) 与海带(η 值最大) 有较大的差异, 由此可预料这 4 种褐藻胶性质的差异性。

参 考 文 献

- [1] 纪明侯等, 1982, 褐藻酸钠对放射性铯的阻吸作用研究, 水产学报, 6(4): 331—327。
- [2] 纪明侯等, 1981, 褐藻酸中糖醛酸组成的测定, 海洋与湖沼, 12(3): 240—247。
- [3] 张惟杰主编, 1987, 复合多糖生化研究技术, 上海科学技术出版社, 121—128。
- [4] 高桥武雄, 江村悟, 1958, アルギン酸をイオン交換体とする金属イオンの分離定量, 分析化学, 7: 568—571。
- [5] Grant, G.T. et al., 1973, Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg box model, *FEBS Letters*, 32(1): 195—198。
- [6] Grasdalen, H., 1983, High-field, $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations, *Carbohydr. Res.*, 118: 255—260。
- [7] Grasdalen, H. et al., 1979, A P.M.R. study of the composition and sequence of uronate residues in alginates, *Carbohydr. Res.*, 68: 23—31。
- [8] Haug, A. & B. Larsen, 1971, Biosynthesis of alginate. Part II: polymannuronic acid 1,5-epimerase from *Azotobacter vinelandii* (Lipman), *Carbohydr. Res.*, 17: 297—308。
- [9] Haug, A. et al., 1974, Uronic acid sequence in alginate from different sources, *Carbohydr. Res.*, 32: 217—225。
- [10] Haug, A. et al., 1967, Correlation between chemical structure and physical properties, *Acta Chem. Scand.*, 21: 768—778。
- [11] Indergaard, M. & Skjåk-Braek, G., 1987, Characteristics of alginate from *Laminaria digitata* cultivated in a high-phosphate environment, *Hydrobiologia*, 151/152: 541—549。
- [12] Ishikawa, M. & Nisizawa, K., 1981, Some enzymatic properties of polymannuronic acid 5-epimerase in brown algae, *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 10: 419—424。
- [13] Ji Minghou et al., 1983, Chemical components of alginic acid in some Chinese brown seaweeds, *Proc. Joint China-U. S. Phycology Symp.*, Science Press, Beijing, China, pp. 393—399。
- [14] Ji Minghou et al., 1984, Studies on the M: G ratios in alginate, *Hydrobiologia*, 116/117: 554—556。
- [15] Mackie, W., 1971, Semi-quantitative estimation of the composition of alginates by infrared spectroscopy, *Carbohydr. Res.*, 20: 413—415。
- [16] Penman, A. & Sanderson, G. R., 1972, A method for the determination of uronic acid sequence in alginates, *Carbohydr. Res.*, 25: 273—282。
- [17] Smidsrød, O. & Haug, A., 1972, Dependence upon the gel-sol state of the ion-exchange properties of alginates, *Acta Chem. Scand.*, 26: 2063—2074。
- [18] Smidsrød, O. et al., 1972, The molecular basis for some physical properties of polyuronides, *Acta Chem. Scand.*, 26: 2563—2564。

STUDIES ON THE COMPOSITIONS AND SEQUENTIAL STRUCTURES OF URONATE RESIDUES IN ALGINATES FROM CHINESE BROWN ALGAE *LAMINARIA* AND *SARGASSUM**

Zheng Naiyu, Zhang Yanxia and Fan Xiao

(Institute of oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071)

ABSTRACT

Sodium alginates and alginic acids were extracted from four Chinese brown algae. The alginic acids were characterized by infrared spectra. The compositions and sequential structures of uronate residues in the intact sodium alginates were determined by high-resolution $^1\text{H-NMR}$ spectra (400 MHz). Results obtained may be summarized as follows:

The infrared spectra of alginic acids at 808cm^{-1} and 787cm^{-1} show the difference in monomeric compositions of alginates.

The order of the F_G values (the molar fraction of guluronic acid) is: *L. japonica* (0.35) < *S. pallidum* (0.40) < *S. thunbergii* (0.44) < *S. kjellmanianum* (0.45), and the order of the F_{GG} values (the diad frequencies of GC) is: *L. japonica* (0.21) < *S. thunbergii* (0.34) < *S. kjellmanianum* (0.36) < *S. pallidum* (0.37). This may indicate that one of the three species of *Sargassum* has a higher G content and more GG-sequences in alginates than *Laminaria*. Consequently *Sargassum* mentioned above would be good raw materials for the preparation of high gel strength alginates.

The sequence distributions of uronate residues in alginates may be illustrative to use a parameter defined by $\eta = F_{MG}/(F_M \cdot F_G)$. The order of η values is: *L. japonica* (0.62) > *S. thunbergii* (0.41) > *S. kjellmanianum* (0.36) > *S. pallidum* (0.13). This probably means that there is a marked difference in compositions and sequences of uronate residues in the alginates between *Laminaria* and *Sargassum*.

Key words Composition, Sequential structure, Alginate, *Laminaria*, *Sargassum*.

* Contribution No. 1754 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.