

自养小球藻中多糖 PCA1 的化学结构研究

刘四光,李文权*,邓永智,郑 啸,梁燕茹

(厦门大学海洋学系,亚热带海洋研究所,福建 厦门 361005)

摘要: 选取自养小球藻(*Chlorella autotrophica*)为研究对象,从中分离纯化得到 3 个组分,对其中的组分 PCA1 进行研究.电泳及高效凝胶过滤色谱法(HPGFC)鉴定其为均一多糖组分,熔点为 226.9.相对分子量为 1.3×10^5 ,气相色谱法及红外光谱显示其主要由 α -D-吡喃葡萄糖组成,并含有一定量硫酸基.甲基化及 ^{13}C -NMR 结果表明 PCA1 是一种以 1,4-的 α -D-吡喃葡萄糖构成的均一多糖.

关键词: 自养小球藻;多糖;甲基化;气相色谱-质谱分析

中图分类号: Q 946.3

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2007)05-0679-05

多糖是除蛋白、核酸外的第三类大分子,主要以糖蛋白、糖脂和蛋白聚糖形式存在^[1].多糖类化合物在自然界中分布广泛,是生命物质的重要组成成分,并广泛地参与到生命过程的许多方面中去,其中包括激素分子与细胞表面受体的相互作用,精子与卵子的识别,病原体对寄主的侵入等^[2].过去对多糖的研究主要集中在对陆源有机体,以及大型的褐藻、红藻等藻类的研究,而对海洋微藻类多糖的关注较少^[3].

自养小球藻(*Chlorella autotrophica*)属于绿藻门(Chlorophyta)绿球藻目(Chlorococcales)卵囊藻科(Oocysteeae)小球藻属(*Chlorella*).1999 年 Fabregas J 等人发现从自养小球藻中的提取物对 VHSV 及 ASFV 两种病毒的复制具有明显的抑制作用,并推测可能是由于其胞内硫酸多糖产生的作用^[4].本研究选取自养小球藻为研究对象,提取其胞内硫酸多糖组分 PCA1,对其化学结构进行研究.

1 材料与方法

1.1 实验材料

自养小球藻取自厦门大学生命科学院.厦门白城海滨海水(pH=8.53, S=25.00),经过膜滤灭菌后,加 f/2 培养基自然光条件下培养.于指数生长期末收集,离心,干燥,得到的藻粉经研磨后立即提取.

1.2 仪器及试剂

超声细胞破碎仪(VCX600 型,美国 S&M Inc 公

司);WRR 熔点仪(上海精密科学仪器有限公司);傅立叶变换红外光谱仪(470FT-IR,美国 Thermo Nicolet 公司);高效液相色谱仪(Waters 600 型,配 2410 示差折光检测器和 M32 工作站);气相色谱仪(Agilent 6890N,美国 Agilent 公司);气相色谱-质谱联用仪(Varian SA TURN 2100,美国 Varian 公司);电泳仪(EC320,美国 Thermo 公司);核磁共振仪(美国 Varian 公司).

10 种单糖标准及内标肌醇购自美国 Fluka 公司;二乙氨基乙基交联葡萄糖高流速离子交换剂购自瑞典 Pharmacia 公司;Dextran T 系列分子量校正标准品均为美国 Sigma 公司出品;浓硫酸、盐酸、氢氧化钠均为优级纯,上海化学试剂公司出品;丙酮、二氯甲烷为色谱纯,上海化学试剂公司出品;无水乙醇、三氯乙酸、萘酮等其他试剂均为国产分析纯.

1.3 实验方法

(1) 自养小球藻多糖的提取方法

采用超声破碎协同热水浸提法提取自养小球藻中多糖.提取介质采用 NaOH(4%),物料比 1:25(小球藻/提取介质, g/mL).超声破碎 10 min,超声功率 300 W,频率 20 kHz,超声脉冲持续时间 9.9 s,等待时间 3.3 s.相同条件下超声破碎两次,中间用冰浴冷却,然后在 80 水浴中加热 1 h,立即离心取上清液,此上清液为多糖粗提液.本实验中采用 3 倍体积无水乙醇沉淀所得多糖粗提液,静置过夜,离心取沉淀,沉淀中加入 3%的 TCA,充分搅拌,至沉淀不再溶解,离心取上清液,再次用无水乙醇沉淀上清液,离心得沉淀,反复用无水乙醇及丙酮洗涤沉淀以除去 TCA 后,经真空干燥 5 h 即得白色粉末状的粗多糖.

(2) 粗多糖的分离纯化

收稿日期:2006-12-11

基金项目:国家自然科学基金(39870565),厦门大学科研基金(20005003)资助

*通讯作者:wql@xmu.edu.cn

采用二乙氨基乙基交联葡萄糖高流速离子交换凝胶柱(250 mm × 16 mm)对所得的粗多糖组分进行分离. 50 mg 粗多糖样品溶于 10 mL 缓冲液离心、过滤后进样,洗脱液分 0、0.5、1 mol/L NaCl 3 个浓度阶梯进行洗脱,流速 2 mL/min,每 5 mL 收集 1 份,以蒽酮-硫酸法检测. 合并收集含有多糖的组分,透析,乙醇沉淀得到各分级组分.

(3) PCA1 组分的纯度、分子量、硫酸基含量及熔点检测

采用琼脂糖电泳法^[5]及高效凝胶过滤色谱法(High Performance Gel Filtration Chromatogram, HPGFC)^[6]对 PCA1 纯度进行检测. 并以高效凝胶过滤色谱(HPGFC)标准曲线法测定 PCA1 分子量,采用两根 Ultrahydrogel 凝胶色谱柱(300 mm × 7.8 mm)串联,流动相:0.1 mol/L 硝酸钠,流速:0.9 mL/min,柱温:45℃,样品溶解于流动相中,用微孔过滤膜过滤后进样. 分子量校正曲线所用标准品采用 Dextran T 系列标准品,配置浓度为 2 mg/mL. 硫酸基含量测定采用硫酸钡比浊度法^[7]. PCA1 的熔点测定采用毛细管法^[8].

(4) PCA1 的单糖组分检测

本文选择糖醇乙酸酯衍生法^[9],进行气相色谱分析. 气相色谱条件为:HP-5 石英毛细管柱(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm),恒流模式,流量为 1 mL/min;程序升温为:120℃升到 210℃,升温速率为 3℃/min,然后在 210℃保持 4 min. 进样口采用分流模式,分流比 1:30,进样口温度 250℃,载气为氮气. FID 检测器温度为 300℃.

(5) PCA1 的红外光谱

红外光谱采用 KBr 压片法测定^[10].

(6) PCA1 的甲基化分析

甲基化分析是确定糖苷键的连接位置的重要手段. 其原理是将糖的全部自由羟基通过甲基化反应转变成成为稳定性很强的甲醚,然后酸水解得到部分甲基化的单糖,将它们转变为相应的糖醇乙酸酯,用气质联用方法确定各种单糖残基的种类和相对含量,进而可以推断糖的连接及分支情况,还可以了解重复单元中含糖残基的数目及种类.

本实验采用 Needs 法操作^[11],2 mg PCA1 样品溶于 1 mL DMSO 后在该方法下反复进行 3 次后,以红外光谱确定无羟基吸收,水解,还原,乙酰化后进行 GC-MS 分析. GC-MS 条件为:VF-5MS 毛细管色谱柱(30 m × 0.25 mm,美国 Varian 公司);进样口温度 280℃;柱箱起始温度 120℃,3℃/min 至 210℃,保持 4 min;载气为高纯氮气,流速 1.0 mL/min;离子化模

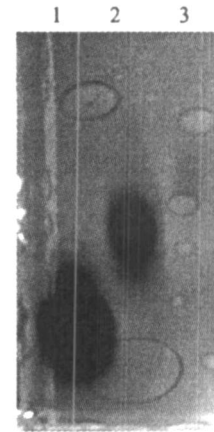


图 1 多糖 PCA1 的电泳

1. 肝素标准;2. PCA1;3. 溴芬兰指示剂

Fig. 1 Electrophoresis of PCA1

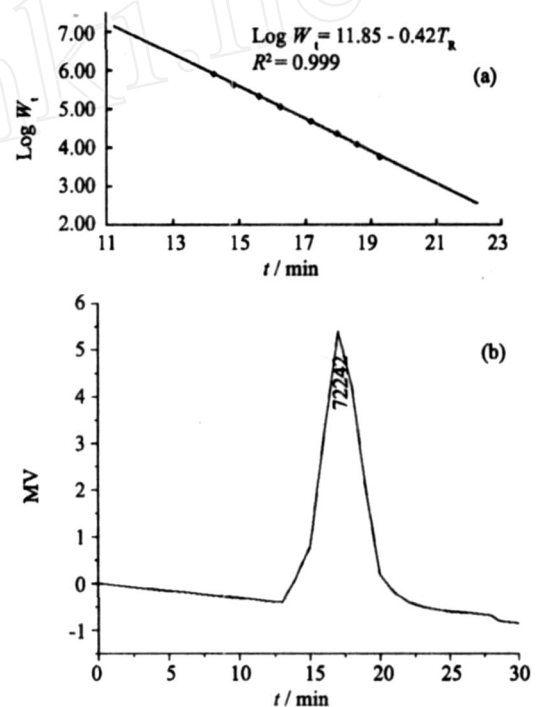


图 2 (a) 高效凝胶过滤色谱法(HPGFC)测定多糖分子量校正曲线;(b)多糖 PCA1 的高效凝胶过滤色谱法(HPGFC)鉴定

Fig. 2 (a) Calibration of polysaccharide molecular weight by HPGFC;(b) Identification of PCA1 by HPGFC

式为 EFAuto,离子化能量 70 eV;离子阱温度 180℃;接口温度 280℃;质量扫描范围 40~550 u.

(7) ¹³C-NMR 的测定

以 D₂O 为溶剂,样品浓度为 20 mg/mL,在 45℃下测定 PCA1 样品的¹³C-NMR 谱图.

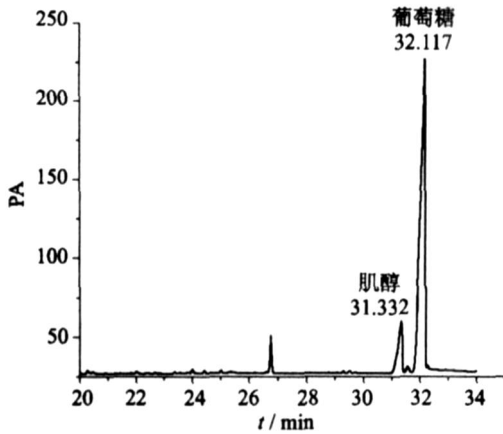


图 3 PCA1 样品水解衍生单糖气相色谱图
Fig. 3 GC spectrum of monosaccharide derived from hydrolyzed PCA1

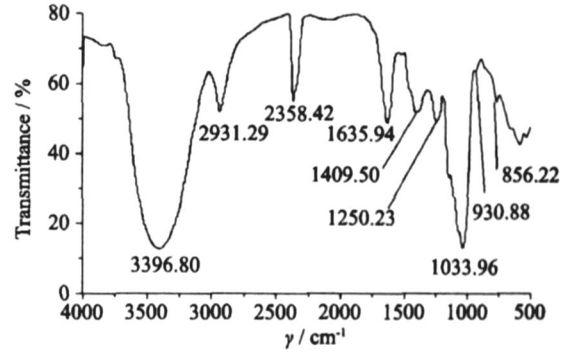


图 4 多糖 PCA1 的红外光谱
Fig. 4 FT-IR spectrum of PCA1

2 结果与讨论

2.1 分离及纯化

在 3 种 NaCl 浓度梯度下共有 PCA1, PCA2, PCA3 3 个多糖组分. 其中我们选择第一个峰为本实验研究的 PCA1 组分. 从电泳结果来看, PCA1 只显示出单一的斑点, 见图 1. 而在高效凝胶过滤色谱法 (HPGFC) 中, PCA1 为单一的对称峰, 见图 2(b). 该组分 10 mg/mL 浓度下在紫外 190 ~ 400 nm 扫描无吸收, 说明该组分不含蛋白及核酸等杂质. 因此, 从以上两种方法的结果可以得出 PCA1 为均一多糖组分. 根据标准曲线法, 测定其分子量为 1.3×10^5 . 其熔点为 226.9. 硫酸钡比浊法测得 SO_4^{2-} 含量为 0.77 %.

2.2 PCA1 的化学结构

从气相色谱图 3 结果得出, PCA1 是主要由葡萄糖组成的均多糖. 而从红外光谱图 4 可以看出, 在 $3400, 2931 \text{ cm}^{-1}$ 附近分别为糖类的 -OH 及 C-H 吸收峰, 1250 cm^{-1} 附近为硫酸基的吸收峰, $1150 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 为 C-O-C 环内醚 C-O 伸缩振动和 C-O-H 变角振动所引起的吸收, 856 cm^{-1} 附近的吸收为 -D-吡喃葡萄糖的特征吸收^[12].

采用 Needs 法对多糖 PCA1 进行甲基化后, 谱图见图 5 所示. 我们尝试对谱图进行分析, 谱库检索结果显示其为 2,3,6-三氧甲基三醋酸酯葡萄糖醇, 其分子式为 $C_{15}H_{26}O_9$, 分子量为 350. 其离子化途径为 (图 6): 失去乙酰基 (43, m/z), 或者失去乙酰基形成 $M = 291 (m/z)$ 的碎片, 接着在 C2 和 C3 之间断裂形成 $M = 233 (m/z)$ 的碎片, 然后在 C4 到 C5 之间断裂形成 $M = 117 (m/z)$ 的两个相同的碎片. 其特征碎片 m/z 分别为: 43、117、233、291.

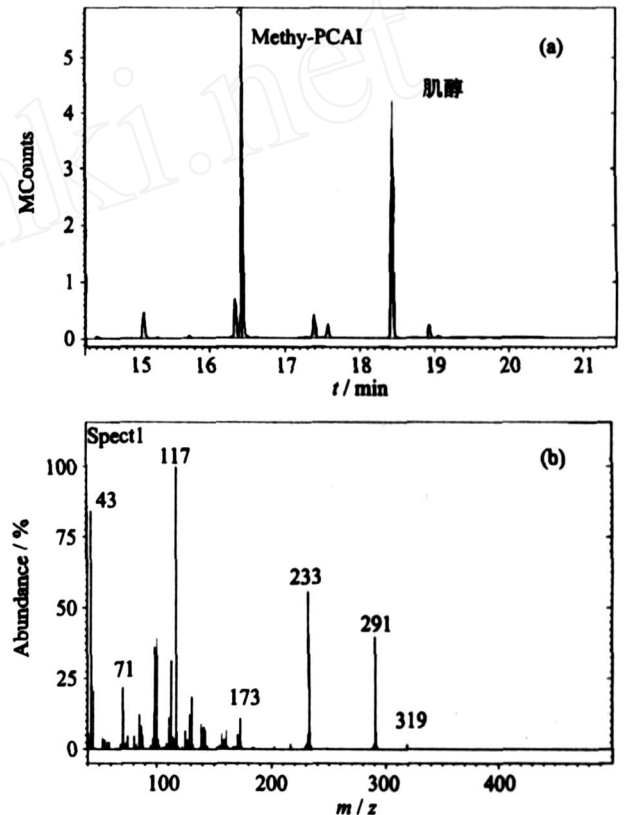


图 5 (a) 甲基化的多糖 PCA1 的总离子流图; (b) 甲基化的多糖 PCA1 的质谱图
Fig. 5 (a) Total ion chromatogram of methylated PCA1; (b) GC-MS spectrum of methylated PCA1

表 1 PCA1 ¹³C-NMR 的归属
Tab. 1 Adscription of PCA1 ¹³C-NMR

峰号	化学位移	归属
1	99.95	C ₁
2	71.83	C ₂
3	73.58	C ₃
4	77.32	C ₄
5	71.53	C ₅
6	60.81	C ₆

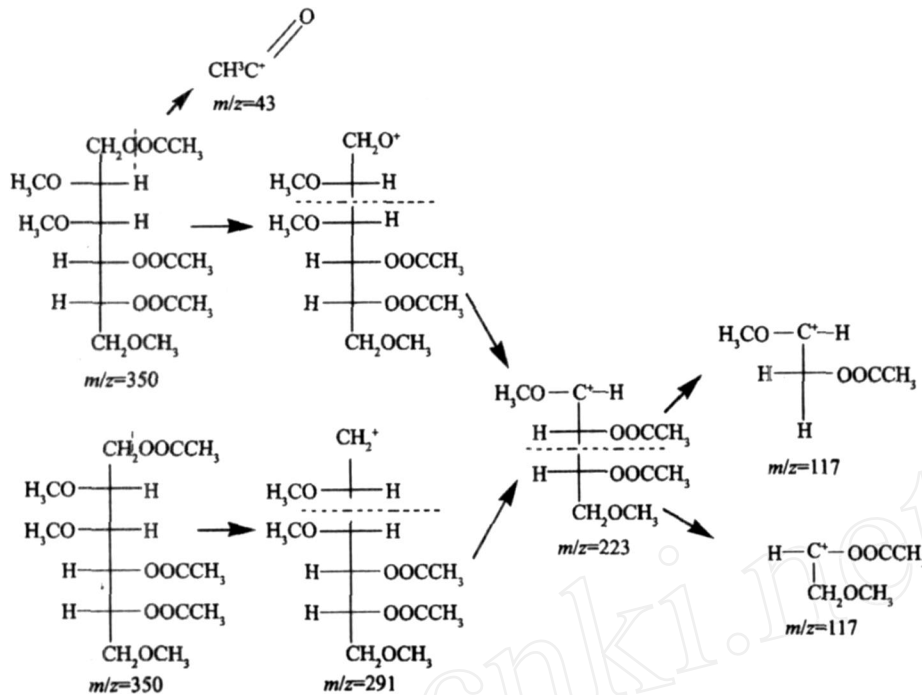


图 6 甲基化的多糖 PCA1 质谱图解析

Fig. 6 Analysis of GC-MS spectrum of methylated PCA1

从图 7¹³C-NMR 可以看出,只有 6 个碳信号表明其为直链多糖^[13]. 99.95 为 C₁ 发生取代的化学位移信号,未发生取代的糖环的 C₂,C₃,C₄ 的化学位移一般在 70~77 之间,77.32 是 C₄ 位碳完全苷化而产生的化学位移,这也印证了甲基化分析所得到的结论.与张维杰所述结果对比可知,其构型应为,这与红外光谱所得出的结果一致.

3 小结

从甲基化分析结果来看,GC-MS 谱图中只有一个 2,3,6-三氧甲基三醋酸酯葡萄糖醇峰,由此可以判断 PCA1 组分中 -D-吡喃葡萄糖是 1,4 连接的.此外,在¹³C-NMR 只有 6 个碳信号,说明 PCA1 不具有分支结构,与文献中未发生取代的 -D-吡喃葡萄糖¹³C-NMR 谱图比较可以看出 PCA1 中的 C₁、C₄ 都发生了化学位移,这是 1,4 位碳苷化的结果.以上两方面结果可以证明,自养小球藻中分离出的 PCA1 组分是一种以 1,4-连接的 -D-吡喃葡萄糖构成的均一多糖,其熔点为 226.9,分子量为 1.3 × 10⁵,硫酸基含量为 0.77%.限于藻类培养实验条件,我们较难获得大量的 PCA1 样品,因此导致核磁共振结果信噪比较低.另外,有关硫酸基取代位置的确定将在以后另作报道.

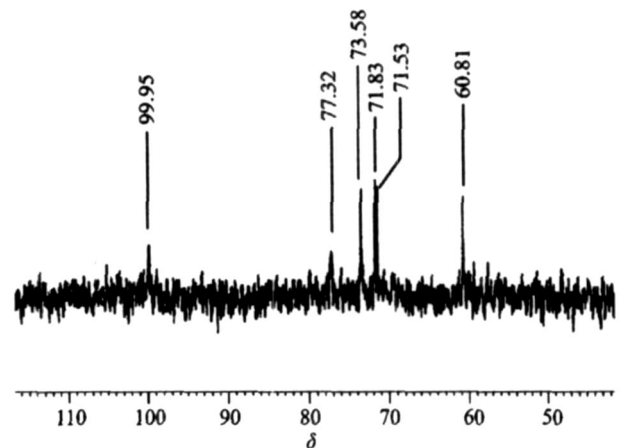


图 7 PCA1 的¹³C 核磁共振图

Fig. 7 ¹³C-NMR spectrum of PCA1

参考文献:

- [1] 王亚飞,孟庆勇.藻类多糖的免疫调节作用及机制研究进展[J].中国海洋药物杂志,2006,25(3):50-54.
- [2] 张维杰.糖复合物生化技术[M].2版.杭州:浙江大学出版社,1997.
- [3] Yang X B, Gao X D, Han F, et al. Purification, characterization and enzymatic degradation of YCP, a polysaccharide from marine filamentous fungus Phoma herbarum YS4108[J]. Biochimie, 2005, 87: 747-754.
- [4] Fabregas J, Garcia D, Fernandes-Alonso M, et al. In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae[J]. Antiviral Research,

- 1999,44:67 - 73.
- [5] 郑震寰,尹鸿萍,张芳,等.螺旋藻多糖的琼脂糖凝胶电泳鉴别[J].中国生化药物杂志,2003,24(1):34 - 36.
- [6] Shi Ying,Sheng Jianchun, Yang Fangmei, et al. Purification and identification of polysaccharide derived from *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Food Chemistry,2006,103(1):101 - 105.
- [7] 从建波,王长振,李妍,等.褐藻硫酸多糖硫酸基含量测定-硫酸钡比浊度法研究[J].解放军药学报,2003,19(3):181 - 183.
- [8] 张景文,杨乃峰.有机化学实验[M].长春:吉林大学出版社,1992:38 - 41.
- [9] 陈清花,李文权,张赛金,等.海洋微藻多糖组成的气相色谱分析[J].厦门大学学报:自然科学版,2003,42(4):495 - 498.
- [10] 张赛金,李文权,邓永智,等.海洋微藻多糖的红外光谱分析初探[J].厦门大学学报:自然科学版,2005,44(sup.):212 - 214.
- [11] Needs P W,Selvendran R R. Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/ methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide[J]. Carbohydrate Research,1993,245:1 - 10.
- [12] Melo M R S,Feitosa J P A, Freitas A L P, et al. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*[J]. Carbohydrate Polymers,2002,49:491 - 498.
- [13] 王顺春,方积年.徐长卿多糖的分离纯化与化学结果研究 I[J].中药及天然药物,1999,34(10):656 - 658.

Chemical Structure Study of Polysaccharide PCA1 Derived from *Chlorella autotrophica*

LIU Si-guang, LI Wen-quan*, DENG Yong-zhi, ZHENG Xiao, LIANG Yan-ru

(Department of Oceanography, Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract : Studies on algae have attracted more attention in these years due to the potential biological active materials. Recently, purified seaweed polysaccharides were found to have biological activities, such as antitumor, antiviral, antihyperlipidemia and anticoagulant. *Chlorella autotrophica* is a widely distributing alga that contains different polysaccharides in cell. Previous study on extract of *Chlorella autotrophica* shows that it has antiviral ability to VHSV and ASFV. In order to test their bioactivities, three fractions of polysaccharide were isolated from *Chlorella autotrophica* and one of them, PCA1, was studied in this paper. Purity of PCA1 was determined with methods of electrophoresis and HPGFC, and the melting point is 226.9. The molecule weight of PCA1 is 134690, GC and FT-IR results show that it is mainly made of α -D-glucopyranoside and also functional group of sulfate radical. Both results of methylation and ^{13}C -NMR suggest that PCA1 is most likely a α -(1 \rightarrow 4) bonded glucopyranoside.

Key words : *Chlorella autotrophica*; polysaccharide; methylation; GC-MS