

二色桌片参的化学成分研究

Ⅱ 二色桌片参多糖-1, 一种新的岩藻聚糖[△]

吴萍茹 方金瑞 黄维真 郑志辉* 黄耀坚* 苏文金*

(福建海洋研究所, 厦门 361012)

摘要 利用乙醇沉淀分级技术从二色桌片参双酶水解液里分离到一种纯的活性多糖, 定名 PMI-1。用高效薄层层析法鉴定其组成的单糖, 发现 PMI-1 只含有 L-岩藻糖。根据其分析结果和理化特性, PMI-1 应是由岩藻糖基和岩藻糖-4 硫酸酯基组成的均多糖。研究 PMI-1 的核磁共振谱, 可认定它是一种具有直链的和 α_1 - α 联接的均多糖。因此它是一种新的岩藻聚糖。

关键词 二色桌片参多糖, 均多糖, 岩藻聚糖

STUDIES ON THE CHEMICAL CONSTITUENT FROM SEA CUCUMBER *MENSAMARIA INTERCEDENS* Ⅱ. PMI-1, A NOVEL FUCOSAN

Wu Pingru, Fang jinrui, Huang Weizhen, *et al.*

(Fujian Institute of Oceanology, Xiamen 361012)

ABSTRACT Using double enzymes digestion and fractionations by precipitation with alcohol, a pure active polysaccharide PMI-1 was obtained from the dried body wall of *Mensamaria intercedens*. Monosaccharide composition was identified by thin-layer chromatography, the results indicate that PMI-1 only consists of L-fucose. According to analytical and chemico-physical data, PMI-1 seemed to be homosaccharide consisted of fucose and fucose-4-sulfate with the molar ratio of 1:1.

Studied on the ¹H NMR and ¹³C NMR data of PMI-1 showed that PMI-1 had a straight saccharide chain and α_1 - α linkage.

KEY WORD polysaccharide of *Mensamaria intercedens*, Homosaccharide, Fucosan.

二色桌片参 *Mensamaria intercedens* (Lampert) 含有丰富的活性多糖^[1], 其酶水解液又呈显著的抗癌作用^[2]。二色桌片参中多糖的研究, 国内外均未见报道。本文主要报道二色桌片参多糖-1 (PMI-1) 的提取、分离、纯化及特性的研究。有关抗癌作用的研究正在进行中。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 二色桌片参干品 购自福建省诏安县市场, 并经种类鉴定。

1.1.2 二色桌片参多糖-1 (PMI-1) 的提取、分离和纯化 取二色桌片参干品 1000g, 以温水浸泡约 24h, 其间多次更换新的温水, 尽可能除去干品在加工过程中加上的盐和其他杂质。浸泡好后, 再以绞肉机绞切, 尽可能绞

[△] 福建省重中之重大项目资助

* 厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室, 厦门 361005

碎、绞细。绞细的海参兑水调至适当的稠度,以 20% 盐酸调整 pH 至 2,加入 40g 胃蛋白酶,在 37℃ 震荡搅拌 6~8h。随后以 10%~20% 氢氧化钠调整 pH 至 9,加入 50~60g 胰匀浆,再置 37℃ 震荡搅拌 6~8h。此时双酶水解后的水解液呈褐色,虽有腥味但应无臭味,仍会有一些不被酶水解的白色片状物。离心除去不被酶水解的物质,合并上清液,以稀盐酸调整 pH 至 7,在搅拌下缓缓加入无水乙醇,至最终乙醇浓度为 60%,置冰箱过夜^[3]。第 2d,离心收集沉淀物,分别以等体积的无水乙醇和丙酮各洗 2 次。经洗涤的沉淀物溶于 300ml 的蒸馏水,透析除盐,再经 2 次 Sevag 法除去少量的残留蛋白,在搅拌下缓缓加入无水乙醇,至最终乙醇浓度为 40%,置冰箱过夜,第 2d 离心收集沉淀物,分别以等体积的无水乙醇和丙酮各洗涤 3 次,在五氧化二磷的干燥器里,以真空泵抽干,则得二色桌片参多糖-1(近 0.6g)。母液再加入无水乙醇,至最终乙醇浓度为 60%。经同样处理,可得二色桌片多糖混合物(近 7g)。

1.2 分析方法

1.2.1 PMI-1 的纯度鉴定 采用:(1)进口预铺的纤维素薄层(Eastman Chromogram Sheet, Kodak 厂产品)层析,以溶剂系统 a. 乙酸乙酯:乙酸:水=4:1:1 v/v; b. 乙酸乙酯:吡啶:水=4:1:1 v/v; c. 乙酸乙酯:六氢吡啶:水=4:1:1 v/v; d. 氯仿:甲醇=60:40 v/v; e. 甲醇:水=1:1 v/v; 展开, I₂ 显迹。(2)进口聚葡糖凝胶 Sephadex G-200 柱层析鉴定。

1.2.2 PMI-1 单糖组分分析 采用两种酸

表 1 PMI-1 硫酸水解产物与若干单糖标准品的硅胶薄层层析行为比较

单糖	溶剂系统 a		b		c		d		e	
	R _f	显色	R _f	显色	R _f	显色	R _f	显色	R _f	显色
PMI-1 硫酸水解产物	0.71	灰蓝	0.97	蓝	0.57	蓝	0.55	蓝	0.56	蓝
葡萄糖	0.59	褐	0.64	褐	0.32	褐	0.32	褐	0.27	褐
果糖	0.46	褐	0.57	褐	0.29	褐	0.34	褐	0.27	褐
L-岩藻糖	0.71	灰蓝	0.97	蓝	0.57	蓝	0.55	蓝	0.56	蓝
阿拉伯糖	0.55	褐	0.61	褐	0.46	褐	0.46	褐	0.33	灰

水解方法,即常规的 1N 硫酸回流水解,氢氧化钡中和,浓缩得硫酸水解产物,和以 1N 盐酸回流水解,树脂中和除酸,浓缩得盐酸水解产物。水解产物以进口预铺的硅胶薄层(Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck 厂产品)层析,以溶剂系统 a. 异丙醇:水=4:1v/v; b. 异丙醇:吡啶:水=3:1:1 v/v; c. 乙酸乙酯:异丙醇:水:吡啶=26:14:7:2v/v; d. 氯仿:甲醇=60:40v/v 和正丁醇:乙酸:水=4:1:2 展开,以苯胺-二苯胺-磷酸试剂显色。

1.2.3 波谱测定 PMI-1 的紫外吸收光谱采用岛津紫外分光光度计 UV2201 (Shimadzu, Japan)测定,以 H₂O 溶解。其红外吸收光谱采用 FTS-7 红外分光光度计 A164 (Bio-Rad, USA)测定,以 KBr 压片。其¹H NMR 和¹³C NMR 的测定用 300MHz 的 Varian 核磁共振谱仪测定。

2 结果

2.1 PMI-1 纯度的鉴定

以进口预铺的纤维素薄层层析,使用 1.2.1 所列举的溶剂系统展开,PMI-1 均为单一的斑点,而 PMI 混合物则能分离出多至 3 个斑点(其中包括相当于 PMI-1 的斑点)。因此 PMI-1 是均一的纯品。Sephadex G-200 柱层析提示 PMI-1 完全被凝胶排阻,其分子量至少应大于 20 万。

PMI-1 为白色粉末,易吸潮,吸潮后转变为浅褐色。该多糖易溶于水而不溶于一般的有机溶剂。

2.2 PMI-1 的组成单糖的分析

分析结果列于表 1。

从表 1 可见,无论从薄层层析的移行或从苯胺-二苯胺-磷酸试剂的显色颜色来看,PMI-1 硫酸水解产物与岩藻糖都完全一致。唯一差别是在溶剂系统 e 里,从 PMI-1 硫酸水解产物中还可以分离出显色颜色为蓝色, R_f 值为 0.45 的新斑点。若取用 PMI-1 盐酸水解产物,则无此斑点,因此这个新斑点很可能是岩藻糖的硫酸酯。从 PMI-1 盐酸水解产物中可检出较高的硫酸根也证明了这一点。

2.3 PMI-1 的特征颜色反应

PMI-1 的茚三酮反应和 Elson-Margan 反应均为阴性,硫酸半胱氨酸反应为阳性。PMI-1 的盐酸水解物里有较高含量的硫酸根(钡试剂检查)。上述表明,PMI-1 不含氨基糖或其他氨基化合物,但的确含有岩藻糖。

以 L-纯岩藻糖作标准,按 Dische 法测定^[4],PMI-1 含 L-岩藻糖 65.1%。

以纯硫酸钾作为标准,按 Dodgsan 法测定^[5],PMI-1 含硫酸基 20.5%。

因此,在 PMI-1 的组成里,L-岩藻糖与硫酸酯基的分子比例为 2:1。

2.4 PMI-1 的紫外吸收光谱

PMI-1 水溶液的紫外吸收光谱呈末端吸收。特别是当浓度高达 0.1% 时,在 260nm 和 280nm 处仍未见到蛋白质和核酸的特征吸收峰,因此可确认 PMI-1 是一种纯的多糖,而不是蛋白多糖。结合其茚三酮显色阴性,证明纯度是高的。

2.5 PMI-1 的红外吸收光谱

在 $4000\text{cm}^{-1}\sim 500\text{cm}^{-1}$ 区间,PMI-1 的红外吸收光谱显示典型的硫酸多糖的吸收特征(图 1),即主要吸收峰为 3514cm^{-1} 和 3402cm^{-1} (多糖的羧基), 2983cm^{-1} 和 2935cm^{-1} (糖的甲基), 1643cm^{-1} , 1633cm^{-1} , 1426cm^{-1} , 1258cm^{-1} (强, -C-O-S-键吸收), 1030cm^{-1} (强, 环状 C-OH 吸收), 843cm^{-1} (强, 多糖 $\text{C}_1\text{-H}$ 弯曲振动和 -C-O-S-键吸收), 670cm^{-1} , 582cm^{-1} 。由于 1610cm^{-1} 和 1410cm^{-1} 处无特征吸收。所以 PMI-1 分子里

应不存在离子型羧基。又因为 900cm^{-1} 处无吸收,而 843cm^{-1} 处有强吸收,提示分子里具有 α -构型的糖苷键。

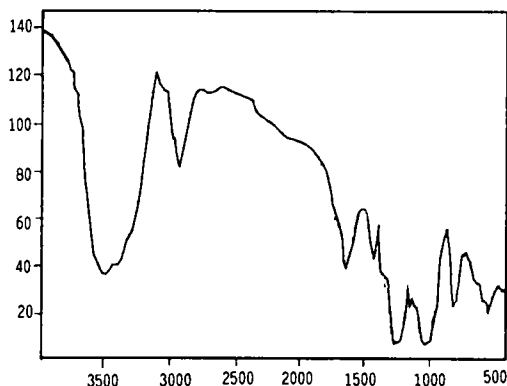


图 1 PMI-1 红外吸收光谱图

2.6 质子磁共振谱

PMI-1 的质子磁共振谱(图 2)显示在 $\delta 5.452$ 和 5.322 (单位 ppm, 下同) 处有二个端基质子(也称为 C_1 质子)的吸收信号,提示分子里糖苷键的构型为 α 型。岩藻糖甲基的吸收峰出现在 $\delta 1.419$ 和 1.315 (扭曲的双重峰), H_2 的吸收峰出现在 $\delta 3.623$ 和 3.645 (畸形的双重峰), H_3 的吸收峰出现在 $\delta 3.670$ 和 3.962 (畸形的双重峰), H_4 和 H_5 的吸收峰分别出现在 $\delta 4.331$ 和 $\delta 3.926$ 处。

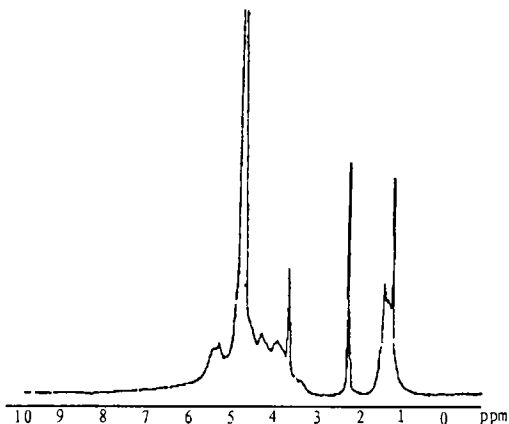


图 2. PMI-1 ^1H 核磁共振图

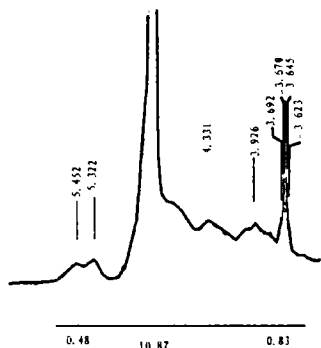


图 2. PMI-1 ¹H 核磁共振图(局部放大)

2.7 ¹³CNMR 谱

PMI-1 的 ¹³C 核磁共振谱如图 3, 虽还只采用 300MHz 的仪器, 但谱图已相当清晰, 根据文献^[9,10], 可对各碳原子的 δ 值(化学位移值)指认如表 2。

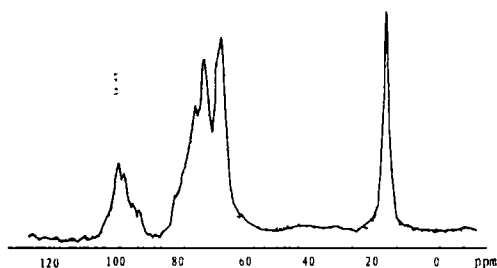


图 3 PMI-1 ¹³C 核磁共振谱

表 2 PMI-1 的 ¹³CNMR 数据

δ(化学位移)值 ppm	归属于
99.4	3 位取代 L-岩藻糖基的端基碳
97.8	可能为 3 位取代 L-岩藻糖-4-硫酸酯基的端基碳
95.1	末端 L-岩藻糖基的端基碳
77.1	L-岩藻糖基的 C ₄
73.1	L-岩藻糖基的 C ₅
67.9	L-岩藻糖基的 C ₂ 和 C ₃
15.6	L-岩藻糖基的 C ₅ -CH ₃

因为端基碳共振信号落在 δ90~100ppm 之间, 揭示多糖应具有 α-糖苷键的结构。又因为在 δ80~90ppm 区间无任何共振信号, 所以多糖无分枝结构, 是一种直链多糖。

综上波谱数据, 表明二色桌片参多糖 PMI-1 是一种由 L-岩藻糖基和 L-岩藻糖-4-

硫酸酯基构成的直链均多糖, 这是迄今都没有报道过的来自海参的一种活性多糖。

3 讨论

迄今国内外仍无有关从二色桌片参分离多糖的研究报道。但对海参纲动物进行粘多糖组分分析的报道还不少。已报道的各种海参多糖(诸如产自日本瓜参、赛瓜参、灰海参、刺参^[3]、花刺参^[6]、白肛海地瓜^[7]、玉足海参的多糖), 都是杂多糖(hetero-saccharide), 即都是由不同品种的单糖组成的聚糖。玉足海参多糖 HL-S 虽主要组成为岩藻糖基(占 51%), 但仍含显著量的氨基半乳糖(占 2.7%)。花刺参酸性粘多糖 SVII 虽主要组成为岩藻糖基(占 47.9%), 但仍含有少量的氨基半乳糖(占 1.6%), 且岩藻糖基和硫酸基组成的分子比值为 1:1, 这些都与二色桌片参多糖 PMI-1 有显著的区别。

PMI-1 的硫酸水解产物里含有几乎等量的 L-岩藻糖和 L-岩藻糖的硫酸酯, 盐酸水解物里岩藻糖基和硫酸基的分子比值接近 2:1。它对碱颇为稳定, 并有明显的抗过碘酸氧化作用, 这些表明: PMI-1 可能是由岩藻糖基和岩藻糖-4-硫酸酯基以 1:1 的分子比例组成的, 糖基之间是以 α₁-α 连接的。虽然还没有完成全结构的确定, 但从现有的理化特性, 特别是波谱特性已足够说明它是一种新的均多糖(homo-saccharide)。其与来自褐藻的 Fucoidine 可能有结构的相似。文献报道 Fucoidine 具有降血脂和抗肿瘤作用^[11], 因此深入研究 PMI-1 的全化学结构和药理活性将是很有意义的。

核磁共振技术是分析糖苷键和研究多糖结构的一种很有效的谱学方法。但由于高纯高的多糖样品不易获得, 且多糖的分子量太大, 所以获得的 ¹H 或 ¹³C 的信号往往会由于本身的重叠或受杂质的干扰而使图谱解析变得十分困难。我们虽采用的是 300MHz 的仪器, 分辨率不很高, (下转第 10 页)

0.93nA(图 3 为其中的 1 例)。

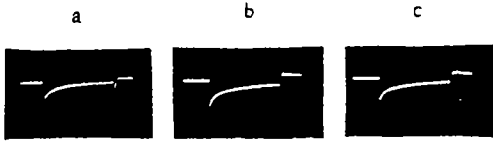


图 3 QT 减小 I_{Ca} 作用的可复性

保持电位 -30mV, 指令电位 0mV, a: 给药前 b: $1\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ QT 作用 3min c: 冲洗后 5min.

3 讨论

充血性心力衰竭是一种多原因导致的心血管系统疾病, 严重地威胁着患者的生命, 其血流动力学表现为心脏不能射出足量血液以满足全身组织的需要。充血性心力衰竭时, 心肌收缩力减弱, 心输出量不足是导致心衰的重要因素。Ca²⁺ 在心肌兴奋-收缩耦联中的作用至关重要^[4]。临床试用的结果发现 QT 具有明显的强心作用, 可缓解充血性心衰的临床症状。本研究结果证明了 QT 能增加心

肌细胞的 Ca²⁺ 内流, 使细胞内 Ca²⁺ 增加, 加强心肌细胞的兴奋-收缩耦联, 使心肌收缩力加强, 改善心衰时的血流动力学状态; 另外, 研究中还发现, QT 尚能抑制心肌细胞的 K⁺ 外流, 故认为 QT 治疗心衰的作用可能与多种机制有关, 而 QT 的其他作用及作用机制还有待进一步研究。

QT 是天然的生物高分子物质, 对人体无毒、无害, 来源丰富, 价格低廉, 故在临床应用上有着广泛的前景。

参考文献

- 1 马克炯. 甲壳胺人工皮在烧伤创面的作用. 云南医药, 1991, 12(5): 279
- 2 刘良明. 甲壳素在创伤愈合中的应用前景. 国外医学(军事医学分册) 1991, 2: 29
- 3 Lijima T, Irisawa H and Kameyama M. Membrane currents and their modification by acetylcholine in isolated single atrial cells of the guinea pigs. *J physiol(Lond)*, 1985, 359: 485
- 4 张万年. 心力衰竭(见金惠铭主编). 病理生理学, 第四版, 北京: 人民卫生出版社, 1996: 160—176

(收稿时间: 99-11-15)

(上接第 8 页) 但测得的 PMI-1 的氢谱和碳谱都却还比较清晰, 图谱也能较好地解析。这从另一方面表明了 PMI-1 的纯度已达相当高了。

多糖的分子量测定至今仍是一个较难的问题, 还没有一种准确的测定方法。这是因为多糖与其他一般化合物不同, 它的分子量只代表相似链长的平均配布, 而不是确切的分子大小。正因为这样往往用不同方法会测得不同分子量。估计 PMI-1 的分子量会大于数十万道尔顿, 没有合适的标准多糖样品作对照, 所以尚无法测出其近似分子量。

初步的研究表明: PMI-1 体外能增加脾淋巴细胞增殖指数, 并明显增加 IL-2 的产量, 体内能显著增加胸腺指数, 促进迟发型过敏反应, 即对机体细胞免疫系统有增强作用, 数据将另文报道。

参考文献

- 1 吴萍茹, 方金瑞, 陈正明, 苏文金. 二色桌片参的化学成分研究 I. 二色桌片参的化学成分分析, 中国海洋药物,

2000, 19(1): 17

- 2 陈正明, 陈清西, 郑文竹, 等. 海洋通报, 1988, 7(1): 34
- 3 樊绘曾, 陈菊娣, 林克忠. 刺参酸性粘多糖的分离和理化性质. 药学报, 1980, 15(5): 265
- 4 Dische Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J Biol Chem*, 1947, 167: 189
- 5 Dodgson KS. Determination of the ester sulfate content of sulfated polysaccharides. *J Bio Chem*, 1948, 175: 595
- 6 陈菊娣, 樊绘曾, 荆蕊凝, 等. 花刺参酸性粘多糖的分离研究. 中国海洋药物, 1994, 1: 24
- 7 樊绘曾, 陈菊娣, 荆蕊凝, 等. 白虹海地瓜酸性多糖研究. 海洋药物, 1982, 3: 10
- 8 樊绘曾, 陈菊娣, 吕培宏, 等. 玉足海参酸性多糖研究. 药学报, 1983, 18(3): 203
- 9 Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 1992, 32(10): 3307
- 10 Tipson RS. and Hortans D. Carbon-13-nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides. *Adv Carbohydr Chem Brachem*, 1984, 42: 193-201
- 11 Stoloff L, Springe GF (ed). *Polysaccharides in Biology*. Madison Printing Company, Madison, 1959: 283

(收稿时间: 99-09-04)