

文章编号:1005-8737(2000)02-0059-05

硒化岩藻聚糖的理化性质和分子结构

缪锦来, 李光友

(国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘要:运用多种方法和仪器对本实验室制备的硒化岩藻聚糖的理化性质进行了测定, 结果表明: 硒化岩藻聚糖可溶于水, 溶解度随温度升高而增加, 但在有机溶剂中基本不溶; 室温干燥放置1年, 硒含量保持稳定; 硒化岩藻聚糖的平均分子量为 1.75×10^4 ; 特性粘度为 16; 在 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 时的旋光度为 -50.16° 。通过紫外光谱、红外光谱、氢谱($^1\text{H-NMR}$)和碳谱($^{13}\text{C-NMR}$)的测定分析确定, 亚硒酸根取代了岩藻聚糖分子中 C_2 位或 C_3 位的硫酸根而连接在 C_2 位或 C_3 位。

关键词:岩藻聚糖; 硒化岩藻聚糖; 理化性质; 分子结构

中图分类号:O636.1

文献标识码:A

岩藻聚糖作为治疗肾衰和血管病的药品已进入临床阶段, 据报道^[1], 其在临床治疗尿毒症, 心血管疾病方面有显著疗效。岩藻聚糖是高度不均一多糖, 因为纯粹由岩藻糖和硫酸根组成的岩藻聚糖很少, 从不同藻类中得到的岩藻聚糖的成分有很大差别, 有的几乎由等量的岩藻糖和硫酸酯组成, 有的还含有糖醛酸、半乳糖、木糖和岩藻糖, 有的甚至含更多的单糖成分。

无机硒具有显著的抗肿瘤和治疗心血管疾病的作用, 将硒和岩藻聚糖结合, 以期使两者的优势互补, 得到高效无毒的化合物。硒化岩藻聚糖是本实验室研究制备的硒多糖中的一种新化合物, 国内外尚未见有关报道, 本文报道了其理化性质和分子结构的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

岩藻聚糖和硒化岩藻聚糖: 均由本实验室制备。

1.2 测定方法

收稿日期: 1999-11-12

作者简介: 缪锦来(1968-), 男, 江西全南人, 国家海洋局第一海洋研究所副研究员, 海洋生物学博士, 从事海洋生物活性物质研究。

1.2.1 硒化岩藻聚糖的分子量^[2] 用高效液相色谱凝胶层析法(HPGPC)测定硒化岩藻聚糖的分子量。BIO-CAD 高效液相色谱仪, 配备 Shodex RI8E-51 型示差折光检测器, BIO-Gel TSK-40 和 TSK-50 两根不锈钢柱串联使用, 每根柱为 $300\text{ mm} \times 7.5\text{ mm}$ (日本制造)。将7个标准T系列葡聚糖(Pharmacia, Uppsala, Sweden 产品)和葡萄糖以及硒化岩藻聚糖和岩藻聚糖2个测试样品溶于 0.2 mol/L 磷酸缓冲液($\text{pH } 6.0$, 用水泵经 G-5 玻璃漏斗抽滤, 并脱气)中, 制成质量浓度为 0.2% , $16\ 000\text{ r/min}$ 离心 3 min 。标准T系列葡聚糖和葡萄糖的上清液用于作标准曲线, 硒化岩藻聚糖和岩藻聚糖2个样品的上清液用于测定分子量, 每次进样 $20\ \mu\text{l}$, 流速 0.5 ml/min , 测定温度 $23\sim 25^\circ\text{C}$ 。

1.2.2 硒化岩藻聚糖的粘度^[3] 取硒化岩藻聚糖配成 1% 的蒸馏水溶液, 用3号垂熔玻璃漏斗过滤。弃去初滤液(约 1 ml), 取滤液(不少于 7 ml)注入垂直固定于恒温水浴($25 \pm 1^\circ\text{C}$)的乌氏粘度计中, 使硒化岩藻聚糖溶液在管内自然下落, 用秒表准确记录液体在2个刻度之间的流经时间, 重复测定2次, 测定值相差不超过 0.1 s , 取2次的平均值为硒化岩藻聚糖溶液的流出时间(T)。用 1% 岩藻聚糖溶液和溶剂代替硒化岩藻聚糖溶液时, 用同样操作步骤

测定,测出溶剂的流出时间为(T_0),按式 $\ln \eta_r/c$ 计算特性粘度(η),式中, η_r 为 T/T_0 ; c 为试液的质量浓度(g/ml)。

1.2.3 硒化岩藻聚糖的稳定性 以 XYG-110 型多功能原子荧光仪测定。取适量硒化岩藻聚糖溶于适量水中,经透析袋透析 72 h,以除去硒化岩藻聚糖中的无机硒,用酒精沉淀透析袋内的硒化岩藻聚糖,抽滤、洗涤、干燥,测定硒化岩藻聚糖中的硒含量。另在常温下于干燥器中将硒化岩藻聚糖放置 1 年,按上述同样方法处理后进行测定,比较两者硒含量的变化,以评价硒化岩藻聚糖的稳定性。

1.2.4 硒化岩藻聚糖的溶解性 在设计温度(表 2)下将硒化岩藻聚糖分别放入水、乙醇、丙酮、氯仿、二甲基甲酰胺等不同溶剂中,搅拌直到饱和为止,测定硒化岩藻聚糖在各种溶剂中的含量,比较硒化岩藻聚糖在不同溶剂中的溶解性。

1.2.5 硒化岩藻聚糖的旋光度^[4] 室温(25 ± 1)℃,用 WZZ-1 自动指示旋光仪测定样品溶液旋光度。每个样品读取 3 次,取平均值。按下式计算比旋度: $[\alpha]_D^{25} = 100\alpha/Lc$, 式中, $[\alpha]$ 为比旋度; D 为钠光谱的 D 线; t 为测定时温度; α 为测得的旋光度; c 为每 100 ml 溶液中含有硒化岩藻聚糖的质量(g,按干品或无水物计算); L 为测定管长度(cm)。

1.2.6 硒化岩藻聚糖的分子结构 以 UV-3210 型紫外光谱仪和 IMPACT 400 红外光谱仪分别测定硒化岩藻聚糖的紫外光谱、红外光谱;以 INOVA 300 核磁共振波谱仪测定硒化岩藻聚糖的氢谱(^1H -NMR)和碳谱(^{13}C -NMR)。以此 4 项测定结果推断其分子结构。

2 结果和讨论

2.1 硒化岩藻聚糖的分子量

Dreher 等^[2]发现多糖的分子量 M 与分配系数 K_{av} 存在如下关系:

$$K_{av} = k_1 - k_2 \ln M \quad (1)$$

式中, K_{av} 为分配系数; k_1 和 k_2 为常数; M 为分子量(Dalton)。保持洗脱液流速恒定,则分配系数 K_{av} 与洗脱时间 T 成正比:

$$K_{av} = (T - T_0)/(T_1 - T_0) \quad (2)$$

式中, T_1 - 标准样品 1 的洗脱时间, T_0 - 标准样品 8 的洗脱时间。

根据以上原理,在本实验室条件下测得各标准样品的洗脱时间(T)见表 1,根据其中样品 2~7 的

数据,作 $\ln M - K_{av}$ 线性回归,得到下列方程(相关系数 $r = -0.990$):

$$K_{av} = 1.853 - 0.184 \ln M \quad (3)$$

表 1 各标准样品的保留时间及参数

Table 1 Retention time and data of each standard sample

项目 Item	样品 Sample							
	1	2	3	4	5	6	7	8
M	180	505	1200	3600	5700	11700	25500	40000
T/min	10.90	9.75	8.95	8.05	7.62	6.91	6.75	6.59
K_{av}		0.73	0.54	0.34	0.24	0.07	0.04	
$\ln M$		6.22	7.09	8.19	8.65	9.37	10.20	

只要测出硒化岩藻聚糖和岩藻聚糖的洗脱时间,通过(3)式就可以求得它们的分子量。硒化岩藻聚糖和岩藻聚糖的洗脱时间分别是 6.83 min 和 6.71 min,计算出它们的分子量分别是 1.75×10^4 和 2.03×10^4 。比较说明,硒化后硒化岩藻聚糖的分子量比岩藻聚糖小,说明硒化反应使岩藻聚糖分子发生降解。

2.2 硒化岩藻聚糖的粘度

在(25 ± 1)℃ 室温条件下得到的硒化岩藻聚糖和岩藻聚糖特性粘度 $[\eta]$ 分别是 16 和 39。可以看出,硒化岩藻聚糖的特性粘度小于岩藻聚糖。原因为:①岩藻聚糖分子中的硫酸根被亚硒酸根所取代;②岩藻聚糖在硒化反应的过程中,由于分子发生降解,生成的硒化岩藻聚糖的分子量小于岩藻聚糖。

2.3 硒化岩藻聚糖的稳定性

新合成时和放置 1 年后除去无机硒的硒化岩藻聚糖的硒含量分别是 6.5 和 6.2 mg/g,变化不大,表明硒化岩藻聚糖性质是相当稳定的。

2.4 硒化岩藻聚糖的溶解度

从表 2 的有关数据可以看出,硒化岩藻聚糖在水中的溶解度远远小于岩藻聚糖,这可能是岩藻聚糖分子中的硫酸根被亚硒酸根取代,分子的亲水性大大降低。硒化岩藻聚糖和岩藻聚糖几乎都不溶于有机溶剂。

2.5 硒化岩藻聚糖的旋光度

在(20 ± 1)℃ 室温下测得的硒化岩藻聚糖和岩藻聚糖旋光度,分别是 -50.16° 和 -70.35° 。比较说明,前者旋光度变小,主要原因是:岩藻聚糖硒化后分子中的硫酸根被亚硒酸根取代,分子结构发生变化;岩藻聚糖在硒化反应过程中发生分子断裂,分子量变小。

表 2 溶解性测定结果(室温 25℃)

Table 2 Solubility of seleno-fucan and fucan

溶剂 Solvent	硒化岩藻聚糖 Seleno-fucan	岩藻聚糖 Fucan
水 Water	约 2%	约 15%
水(50℃) Water	约 5%	约 24%
水(80℃) Water	约 8.6%	约 36%
酒精 Alcohol	几乎不溶 Hardly soluble	几乎不溶 Hardly soluble
丙酮 Acetone	几乎不溶 Hardly soluble	几乎不溶 Hardly soluble
氯仿 Chloroform	不溶 Insoluble	不溶 Insoluble
二甲基甲酰胺 Dimethylformamide	几乎不溶 Hardly soluble	几乎不溶 Hardly soluble

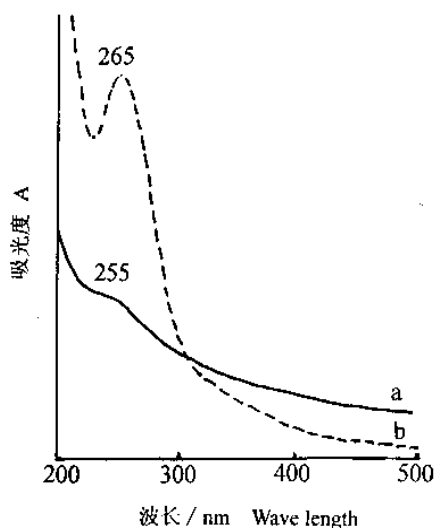


图 1 硒化岩藻聚糖(a)和岩藻聚糖(b)紫外光谱
Fig.1 UV spectrums of seleno-fucan(a) and fucan(b)

2.6 硒化岩藻聚糖的光谱

2.6.1 紫外光谱测定结果 岩藻聚糖(b)的紫外光谱图与有关的文献报道^[5,6]基本相同。从硒化岩藻聚糖(a)和岩藻聚糖(b)的紫外光谱图可见(图1), 硒化岩藻聚糖只在 255 nm 左右有很弱的吸收峰, 而岩藻聚糖在 265 nm 左右有较强的吸收峰。因此, 紫外光谱的这种明显的变化, 结合岩藻聚糖所经历的化学反应机理, 可以初步判定岩藻聚糖分子中的部分硫酸根已被亚硒酸根所取代。

2.6.2 红外光谱 见图2, 其中岩藻聚糖的红外光谱图与文献报道基本相同^[7,8]。岩藻聚糖的结构比较复杂, 一般来说, 在 $1\ 100\sim 1\ 010\text{ cm}^{-1}$ 区间的吸收峰表明含有呋喃糖苷键; 在 $1\ 250\sim 1\ 260\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰为 S=O 伸缩振动峰; $810\sim 850\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰是 C-O-S 伸缩振动峰, 它的位置与硫酸根在糖上的连接位置有关, 连接在岩藻聚糖的 C₄ 位处于直立键位置的硫酸根, 在 850 cm^{-1} 有吸收, 连接在岩藻聚糖的 C₂ 或 C₃ 位处于平伏键位置的硫酸根, 它的吸收峰在 820 cm^{-1} 左右。

从本文得到的红外光谱看, 岩藻聚糖在 $1\ 255\sim 1\ 260\text{ cm}^{-1}$ 有 S=O 伸缩振动峰, 说明含有硫酸根, 而且在 820 cm^{-1} 处有吸收, 表明硫酸根连在 C₂ 或 C₃ 的位置上。

硒化岩藻聚糖与岩藻聚糖的红外光谱基本相同, 但是硒化岩藻聚糖在 $1\ 255\sim 1\ 260\text{ cm}^{-1}$ 处的 S=O 伸缩振动峰已变得非常弱, 这表明, 硫酸根大部分已被亚硒酸根所取代; 此外, 硒化岩藻聚糖在 820 cm^{-1} 处的 C-O-S 伸缩振动峰强明显变弱, 也可证实硫酸根被亚硒酸根所取代。

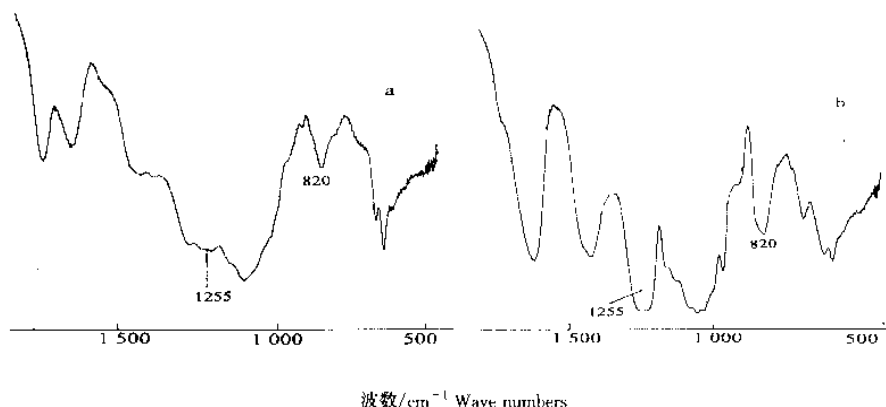


图 2 硒化岩藻聚糖(a)和岩藻聚糖(b)红外光谱
Fig.2 IR spectrums of seleno-fucan(a) and fucan(b)

2.6.3 硒化岩藻聚糖和岩藻聚糖的 ^1H -NMR 测定结果 硒化岩藻聚糖和岩藻聚糖的氢谱^[9]基本相同(图3), 所以两者的骨架结构和基本构型相同。但是, 硒化岩藻聚糖(a)的氢谱上出现岩藻聚糖(b)

氢谱上所没有的2个新峰, 即 3.906 mg/L 和 3.929 mg/L。这2个峰可能是连在 C_2 或 C_3 位上的亚硒酸根的氢产生的吸收峰, 或者是 C_2 或 C_3 上的氢产生的吸收峰。

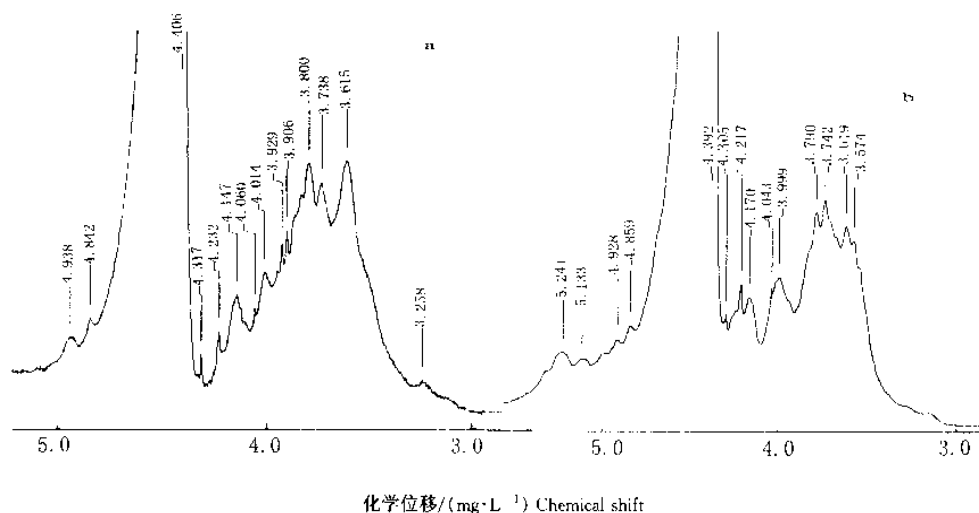


图3 硒化岩藻聚糖(a)和岩藻聚糖(b)的氢谱

Fig.3 ^1H -NMR spectrums of seleno-fucan(a) and fucan(b)

2.6.4 硒化岩藻聚糖和岩藻聚糖的 ^{13}C -NMR 测定结果 硒化岩藻聚糖和岩藻聚糖的碳谱^[9]见图4, 二者对比可以清楚地看出, 岩藻聚糖在 77.383 和 77.076

mg/L 处有明显的吸收峰, 而硒化岩藻聚糖在此位移处的吸收峰很弱, 但在 75 和 76 mg/L 附近出现2个岩藻聚糖碳谱中没有的新峰。

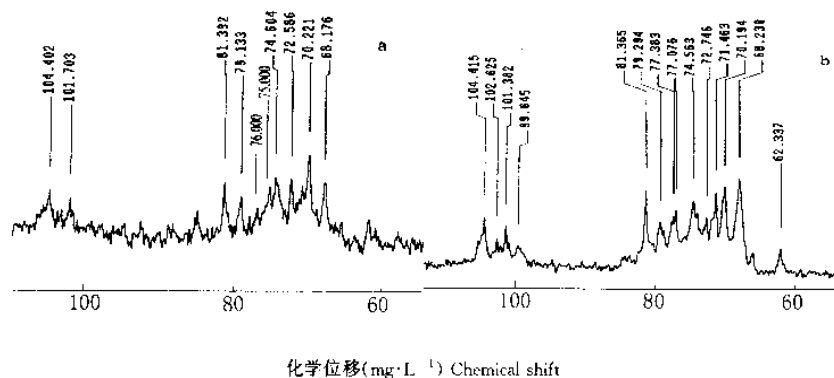


图4 硒化岩藻聚糖(a)和岩藻聚糖(b)的碳谱

Fig.4 ^{13}C -NMR spectrums of seleno-fucan(a) and fucan(b)

亚硒酸根与硫酸根相比, 电子云更多地偏向氧原子, 因而相比较而言, 与亚硒酸根相连的碳原子的化学位移在高场, 与硫酸根相连的碳原子的化学位移在低场。据此, 根据岩藻聚糖和硒化岩藻聚糖的 C_2 位或 C_3 位移变化(表3)可以证实, 岩藻聚糖的 C_2

位或 C_3 位的硫酸根被亚硒酸根所取代。

3 结论

(1)通过硒化反应可得到硒多糖中的一种新化合物—硒化岩藻聚糖, 用原子荧光光谱法证实了其

有较高的硒含量。

表 3 硒化岩藻聚糖和岩藻聚糖的碳谱比较与分析

Table 3 Contrast and analysis of seleno-fucan and fucan

样 品 Sample	化学位移/(mg·L ⁻¹) ¹⁾ Chemical shift					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
岩藻聚糖 Fucan	104.41	577.383	79.294	81.365	74.563	17.225
硒化岩藻聚糖 Seleno-fucan	104.402	77.000 ²⁾	79.133 ³⁾	81.392	74.604	17.200
△δ	0.013	0.383	0.161	-0.027	-0.041	0.025

1) 化学位移是以二甲基亚砜为对照。N,N-Dimethylformamide is the control for chemical shift. 2) 有新峰在 76 mg/L。A new peak at 76 mg/L. 3) 75 mg/L 处出现新峰。A new peak at 75 mg/L.

(2) 硒化岩藻聚糖与岩藻聚糖的理化性质有差异, 其中分子结构的改变是其理化性质不同的主要原因。

(3) 紫外光谱和红外光谱证实, 硒化岩藻聚糖中确实含有机硒; 结合氢谱和碳谱基本确定亚硒酸根

取代了岩藻聚糖 C₂ 或 C₃ 位的硫酸根而连接在岩藻聚糖的 C₂ 位或 C₃ 位。

参考文献:

- [1] 徐祖洪. 中国专利[P], 公开号 CN 1129109A.
- [2] 魏远安. 高效凝胶渗透色潜法测定多糖纯度及分子量[J]. 药学学报, 1989, 24(7): 532-536.
- [3] 崔月梨. 粘度测定法[A]. 中国药典[M]. 附录: 19. 北京: 化学工业出版社, 人民卫生出版社, 1990.
- [4] 崔月梨. 旋光度测定法[A]. 中国药典[M]. 附录: 17. 北京: 化学工业出版社, 人民卫生出版社, 1990.
- [5] 刘晓惠. 海带中褐藻糖胶的分级纯化与结构研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24(4): 297.
- [6] 张全斌. 褐藻多糖硫酸酯化学研究进展[J]. 中国海洋药物, 1996, 4: 38.
- [7] 张全斌. 几种褐藻中褐藻多糖硫酸酯的分离及分析[J]. 海洋科学, 1997, 3: 55.
- [8] 纪明候. 海带褐藻糖胶的研究[J]. 水产学报, 1980, 4(1): 9.
- [9] 于德泉. 核磁共振波谱分析[A]. 分析化学手册第五分册[M]. 第一版, 北京: 化学工业出版社, 1989. 309-388.

Physical and chemical properties and molecular structure of seleno-fucan

MIAO Jin-lai, LI Guang-you

(The First Institute of Oceanography, State Ocean Administration of China, Qingdao 266061, China)

Abstract: The seleno-fucan was prepared in this research. The results show that the average molecular weight of seleno-fucan is 1.75×10^4 ; its specific viscosity is 16; it's properties can be stable in dry atmosphere under room temperature after a year's storing; The seleno-fucan is soluble in water with an increasing - with - temperature solubility but hardly soluble in organic solvents, and its optical rotation degree is -50.16° under a room temperature of $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$. In addition, the structure analysis of seleno-fucan proved that SO_4^{2-} on the C₂ or C₃ of fucan was substituted by SeO_3^{2-} according to the results of UV, IR, ^1H -NMR, and ^{13}C -NMR.

Key words: fucan; seleno-fucan; physical and chemical properties; molecular structure