

钝顶螺旋藻糖缀合物 SPPA-1 的糖链化学结构研究

王仲孚^{1,2}, 彭雪梅², 黄琳娟², 彭志英¹, 田庚元^{2*}

(1. 华南理工大学生物科学与工程研究中心, 广东 广州 510640;

2. 中国科学院上海有机化学研究所生命有机化学国家重点实验室, 上海 200032)

摘要: 目的 研究从钝顶螺旋藻中分离纯化得到的糖缀合物 SPPA-1 的糖链结构。方法 应用了气相色谱、甲基化分析和¹H, ¹³C NMR及 2D NMR 技术研究糖链结构。结果 SPPA-1 的糖链是由单一葡萄糖组成, 其重复单元是由 1→4 连接的葡萄糖糖残基组成的主链且具有分支。结论 SPPA-1 的糖链部分为一新的葡聚糖。

关键词: 螺旋藻; 多糖; 结构

中图分类号: Q949.2; Q539

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2001)05 - 0356 - 04

螺旋藻多糖(*Spirulina platensis* Polysaccharide, SPP)是从螺旋藻中提取得到的水溶性多糖,是螺旋藻中抗肿瘤和抗辐射的重要生物活性物质^[1]。此外,还有抗衰老^[2]、抗病毒^[3]、修复 DNA 损伤^[4]等作用。因此,螺旋藻多糖药物的开发是国内外研究的热点。SPP 结构复杂,分离纯化难度较大,不同提取条件下得到的多糖其结构也不相同。作者采用新的分离工艺,用丙酮分部沉淀和 TCA 去蛋白,粗多糖 SPPA 经纯化后得到一种抗氧化的糖缀合物 SPPA-1,本文主要报道 SPPA-1 的理化性质及糖链化学结构。

材 料 和 方 法

仪器与试剂 722, UV-754 分光光度计为上海第三分析仪器厂产品, Bio Rad FTS 185 型红外光谱仪, Varian Vista 6000 型气相色谱仪, Water Quanta 4000E 毛细管电泳仪, Shimadzu LC-10AD 型液相色谱仪, Shimadzu Qp5000 GC/MS 仪。Carioerba 元素自动分析仪, Varian 600 MHz 核磁共振仪。

Sephadex G-75, CM Sephadex G-50 为 Pharmacia 产品;标准葡聚糖分子量为 Fluka 产品;吡啶和二甲基亚砷,分析纯,经氯化钙回流后重蒸,加入分子筛备用;醋酸酐重蒸后加入分子筛备用;其余未经注明

试剂均为分析纯试剂。

螺旋藻干粉为广东产品。

SPPA-1 的纯度鉴定 ① 高效液相色谱法:分析柱为 Biosep sec-S4000, 样品溶于双蒸水中, 示差检测。② 毛细管电泳法:缓冲液为 100 mmol·L⁻¹ H₃BO₃-KOH (pH 10), 样品溶于双蒸水, 紫外检测波长为 254 nm。

SPPA-1 的糖组成分析 糖样品 2 mg, 加 1 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 2 mL, 充氮气, 100℃下水解 4 h, 用 BaCO₃ 中和, 离心, 上清液过滤。完全酸水解后的样品加入 NaBH₄ 和浓氨水使呈碱性, 室温搅拌 3 h, 用醋酸中和至无气泡, 减压抽干。再用甲醇溶解并旋转蒸发, 重复 6 次, 以充分除去硼酸, 80℃油浴减压干燥后, 加入吡啶和乙酸酐, 密封搅拌过夜。抽干溶剂, 再用氯仿溶解后过滤, 除去不溶盐类, 浓缩后作气相色谱分析。

甲基化分析 样品 6 mg 80℃油浴减压抽干, 加二甲基亚砷(DMSO) 2 mL, 超声, 充氮气搅拌 10 min, 使充分溶于 DMSO, 加入 NaOH 粉末 100 mg, 充氮气搅拌 15 min, 冰浴下缓慢加入碘甲烷, 反应 2 h, 透析至无 DMSO, 冻干, 以上操作重复 3 次。将全甲基化的样品分别用 88% 甲酸和 0.125 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 水解, 再经还原和乙酰化, 得到部分甲基化和部分乙酰化衍生物, 利用 GC/MS 和 GC 对此衍生物进行定性和定量分析^[5]。

核磁共振(NMR)分析 样品用重水交换 3 次, 每次交换后冷冻干燥抽干。NMR 实验在 30℃条件下, Unity Inova 600 MHz 谱仪上完成。采集了 1D ¹H, ¹³C, 2D TOCSY, 2D NOESY, 2D DOF-COSY,

收稿日期: 2000-08-21.

作者简介: 王仲孚, 男, 博士研究生;

田庚元, 男, 研究员, 博士生导师。

* 通讯作者 Tel: (021) 64163300 - 1307, Fax: (021) 64166128,

E-mail: tiangy @pub. sioc. ac. cn

2D HMQC, 2D HMBC. 2D 实验采集时的数据为 $2K \times 512$. 在数据处理时充零至 $2K \times 2K$. 1H 的化学位移以水的信号为参考, 以 DMSO 为外标. 同核 2D 相关实验均采用相敏模式.

结果与讨论

1 螺旋藻多糖 SPPA-1 的分离和纯化

螺旋藻干粉加水浸泡 48 h (pH 8.5), 离心, 上清液依次加 1, 1 和 2 倍丙酮分部沉淀, TCA 去蛋白, 透析, 冷冻干燥得到 3 个粗多糖组分 SPPA, SPPB 和 SPPC. SPPA 经 Sephadex G-75 柱色谱, 洗脱液为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$. 5 mL/份, 隔管检测 A_{280} 和 A_{490} (硫酸-苯酚法), 得到 1 个主要的多糖组分, 此组分再经 CM-Sephadex C-50 柱色谱得到 SPPA-1.

2 物理化学性质

SPPA-1 经高压液相色谱和毛细管电泳分析得到单一对称峰, 表明其具有均一性. 经元素分析, 各元素的质量分数 (%) 为: C 41.70, H 6.55, N 0.91, S 1.32. 凝胶过滤法测得 SPPA-1 的分子量为 $69.00 \times 10^4 \text{ u}$. 糖醇乙酸酯衍生化气相色谱表明 SPPA-1 只含有 Glc.

3 红外光谱测定

SPPA-1 的红外光谱图具有多糖特征吸收峰, 其中 3371 cm^{-1} 为 O-H 伸缩振动区, 红外光谱在 849 cm^{-1} 有吸收峰, 在 890 cm^{-1} 附近无吸收峰, 表明多糖以 α -糖苷键连接.

4 甲基化分析

将 SPPA-1 进行全甲基化, 经红外光谱分析羟基峰已不存在, 表明甲基化已完全. 将完全甲基化的 SPPA-1 水解, 还原和乙酰化处理后进行气质连用分析 (图 1).

结合标准图谱^[6]对其依次归属如下 (表 1).

从表 1 可知, SPPA-1 的糖链是由 Glc(1-, -4)

Tab 1 GC and GC-MS results of methylation analysis of SPPA-1

Fragment	Linkage mode	MS (m/z)	Molar ratio
2, 3, 4, 6- Me4- Glc	Glc(1 →	87, 101, 117, 129, 145, 161, 205	1
2, 3, 6- Me3- Glc	→ 4) Glc(1 →	71, 87, 99, 101, 113, 117, 129, 131, 161, 173, 233	10
2, 3- Me2- Glc	→ 4, 6) Glc(1 →	85, 87, 99, 101, 117, 127, 142, 159, 161, 201, 261	1

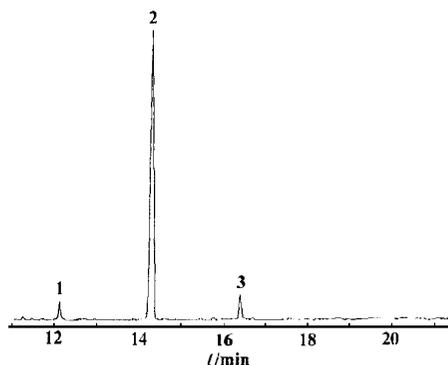


Fig 1 GC measurement of the partially methylated alditol acetates of SPPA-1 on OV-17 capillary ($30 \text{ m} \times 0.2 \text{ mm}$), temperature: $150 \text{ }^\circ\text{C}$ (3 min) - $260 \text{ }^\circ\text{C}$ ($5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$)

Glc(1-和-4, 6) Glc(1-葡萄糖残基组成. 其中分支糖-4, 6) Glc(1-所占的比例较少. Glc(1-, -4) Glc(1-和-4, 6) Glc1 均为吡喃环(p).

5 核磁共振(NMR)谱图分析

图 2, 3 为 SPPA-1 的 1H , ^{13}C NMR 谱. 在 1H 谱中 δ 5.4 - 5.0 间有 3 种异头碳的氢位移, 依次为 δ : 5.44 (d, $^3J_{HH} = 3.6 \text{ Hz}$), 5.28 (d, $^3J_{HH} = 3.6 \text{ Hz}$), 5.02 (d, $^3J_{HH} = 3.0 \text{ Hz}$), 表明这些葡萄糖残基均为 α 构型. 他们在 HMQC 谱 (图 4) 中分别与 δ : 101.21, 93.51 和 97.41 碳信号相关, 表明分子中含有 3 种类型的糖残基^[7].

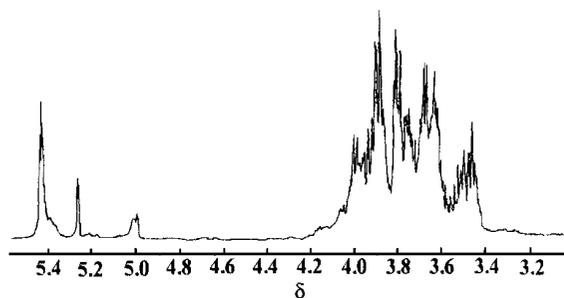


Fig 2 Expanded 1H NMR spectrum of SPPA-1

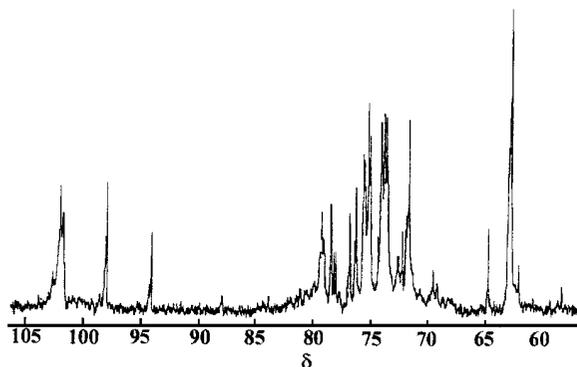


Fig 3 Expanded ^{13}C NMR spectrum of SPPA-1

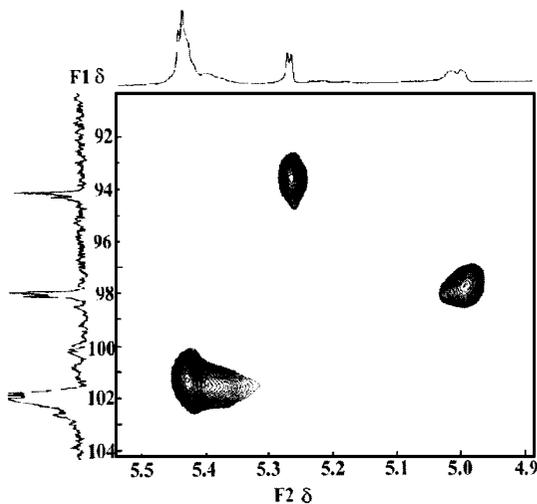
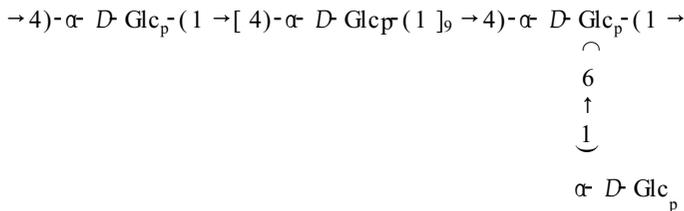


Fig 4 Expanded part of HMQC spectrum of SPPA-1

从上述异头质子信号出发,在 TOCSY 谱中可找出各糖基的质子自旋偶合系统的亚谱,配合 DOF-COSY, HMBC, NOESY 对各种残基的糖环质



SPPA-1 的糖链化学结构与报道的一些具有 $\alpha\text{-(1}\rightarrow 4)$ 为主链的葡聚糖类似,但理化性质不同, SPPA-1 为白色疏松状固体,其水溶液粘度大,具乳光,分子量较大。应用 ESR 技术研究 SPPA-1 对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的清除效果,结果表明,加入 SPPA-1 后的 ESR 谱信号明显减弱,表明 SPPA-1 对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 有消除作用。当 SPPA-1 浓度分别为 0.18, 0.90 和 1.80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,其消除率分别为 15.0%, 42.3% 和 75.6%,呈量效关系^[8]。可确定 SPPA-1 的糖链为新的葡聚糖。

REFERENCES:

[1] Pang QS, Guo BJ, Ruan JH. Purification and characterization of a radioprotective polysaccharide from *Spirulina plaensis* [J]. *Acta Biochim Biophys Sin* (in Chinese), 1989, **21**(5):445 - 449.

[2] Liu YL, Mu XS, Yan M, et al. Anti-aging effects of polysaccharide of *Spirulina plaensis* [J]. *Chin Pharmacol Bull* (in Chinese), 1998, **14**(4):362 - 364.

子信号进行归属(表 2)。

Tab 2 ¹H and ¹³CNMR chemical shifts of the SPPA 1

δ		2,3,4,6- Me4- Glc	2,3,6- Me3- Glc	2,3- Me2- Glc
1	H	5.28	5.44	5.02
	C	93.51	101.21	97.41
2	H	3.60	3.62	3.61
	C	73.25	73.25	73.25
3	H	4.00	3.99	4.04
	C	74.99	74.94	74.94
4	H	3.74	3.67	3.65
	C	74.51	78.79	76.34
5	H	3.43	3.45	3.96
	C	71.13	70.96	71.66
6	H	3.59,3.69	3.88,3.79	3.78,4.01
	C	64.19	62.27	67.66

综上所述,SPPA-1 的糖链化学结构是以 $\rightarrow 4)$ - $\alpha\text{-D-Glc}_p\text{-(1}\rightarrow$ 残基形成主链,平均每 11 个葡萄糖残基中含有 1 个分支。其重复单元可表示如下:

[3] Hayashi T, Hayashi K. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis* [J]. *J Nat Prod*, 1996, **59**(1):83 - 87.

[4] Pang QS, Guo BJ, Ruan JH. Enhance ment of endonuclease activity and repair DNA synthesis by polysaccharide of *Spirulina platensis* [J]. *Acta Genet Sin* (in Chinese), 1988, **15**(5):374 - 381.

[5] Huang LJ, Tian GY, Ji GZ. Structure elucidation of glycoconjugate Lbgp3 isolated from the fruit of *Lycium barbarum* [J]. *JANPR*, 1999, **1**:259 - 267.

[6] Jansson PE, Kenne L, Liedgren H, et al. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates [A]. *Chemical Communication* [M]. Stockholm: Univ. Stockholm, Vol.8, 1976.1 - 74.

[7] Agrawal PK. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharide and glycosides [J]. *Phytochemistry*, 1992, **31**(10):3307 - 3330.

[8] Wang ZF, Peng ZY, Huang LJ, et al. Physico-chemical properties and biological activities of a glycoconjugate SPPA-1 from *Spirulina platensis* [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 2001, **36**(2):112 - 115.

STRUCTURE ELUCIDATION OF GLYCAN OF A GLYCOCONJUGATE SPPA1 ISOLATED FROM *SPIRULINA PLATENSIS*

WANG Zhong-fu^{1,2}, PENG Xue-mei², HUANG Lir-juan², PENG Zhi-ying¹, TIAN Geng-yuan²

(1. Center of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China; 2. State Key Laboratory of Bio-organic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT: AIM To elucidate the structure of the glycan of SPPA1, a glycoconjugate isolated from *Spirulina platensis*. **METHODS** Methylation analysis, GC/MS, and 1D, 2DNMR techniques were used to determine the structures of the glycoconjugate (SPPA1). **RESULTS** SPPA1 was only composed of α -D-glucose and shown to be a (1 \rightarrow 4) linked α -D-glucan to which a few glucosyl side chains are attached at O-6 of the glucosyl residues of the main chain. **CONCLUSION** The glycan of SPPA1 is a new glucan.

KEY WORDS: *Spirulina platensis*; polysaccharide; structure