

文章编号: 1000-0615(2004)04-0473-04

·研究简报·

羊栖菜和裙带菜中抗凝血活性物质的初步筛选

刘承初, 周 颖, 邬英睿, 甘建红, 周培根
(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

关键词: 羊栖菜; 裙带菜; 抗凝血活性; 硫酸多糖; 岩藻糖
中图分类号: Q946 文献标识码: A

Screening of the components with blood-anticoagulant activity from marine algae *Sargassum fusiforme* and *Undaria pinnatifida*

LIU Cheng-chu, ZHOU Ying, WU Ying-rui, GAN Jian-hong, ZHOU Pei-gen
(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Components with blood-anticoagulant activity were fractionated from marine algae *Sargassum fusiforme* and *Undaria pinnatifida* and the activity of the components was investigated by using the method of bioassay. It was found that the 80% ethanol soluble fraction of *Sargassum fusiforme* exhibited no blood-anticoagulant activity, while the components obtained from the 80% ethanol insoluble fraction (hot water extract) gave obvious blood-anticoagulant activity. A further study suggests that the principal component in the hot water extract from *Sargassum fusiforme* with high blood-anticoagulant activity should be sulfated polysaccharides, in which the activity was positively correlated with the content of total sugar and fucose in sulfated polysaccharides. As for *Undaria pinnatifida*, the n-butanol extract fractionated from the 80% ethanol soluble fraction had blood anticoagulant activity, while the petroleum ether, ether, ethyl acetate, or water extract showed no blood-anticoagulant activity.

Key words: *Sargassum fusiforme*; *Undaria pinnatifida*; blood-anticoagulant activity; sulfated polysaccharides; fucose

广阔海洋占地球总面积的 71%, 其中蕴涵着丰富的生物资源。海藻系生长于海洋中的低等隐花植物, 曾被大量用作工业原料、肥料和饲料。而近年来, 其保健作用和药用价值越来越受到人们的关注^[1]。中国古代《神农本草经》和《本草纲目》等书中曾记载, 海藻具有软坚散结、清热解毒、利水消肿、补肾养心、破血祛瘀和消食驱虫等功效。近代研究表明, 海藻中含有多种药理活性很强的成分, 如硫酸多糖、海藻氨酸、软骨藻酸、海藻多糖衍生物及生物碱类等, 具有抗病毒、抗肿瘤、抗凝血、抗辐射、抗心血管疾病及增强免疫力等药理功能^[2]。

就海藻的抗凝血功效而言, 国内外学者对许多海藻如海带^[3]、马尾藻^[4]、铜藻^[5]等已进行过深入的研究, 对

盛产于中国沿海的褐藻羊栖菜、裙带菜等海藻的抗凝血活性研究却为空白。本文以浙江省洞头县的特产羊栖菜和上海市售裙带菜为研究对象, 采用系统分离和活性追踪的方法对其抗凝血活性成分进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

羊栖菜(*Sargassum fusiforme*): 由浙江省洞头县华隆经贸有限公司海藻加工厂提供。

裙带菜(*Undaria pinnatifida*): 浙江产, 购于上海市杨浦区图门路农贸市场。

收稿日期: 2002-12-13

资助项目: 上海水产大学校长专项基金项目(SFU200103)

作者简介: 刘承初(1965-), 女, 四川威远人, 博士, 副教授, 主要从事海洋生物资源利用、营养与食品安全方面的研究。Tel: 021-65710033, Fax: 021-65710222, E-mail: ccliu@shfu.edu.cn

小白鼠:昆明种系,购于上海第二医科大学实验动物房。

肝素钠注射液:6250U·mL⁻¹,中国苏州、常州千红生化制药有限公司,4℃贮存。

1.2 方法

1.2.1 裙带菜和羊栖菜不同组分的系统分离 将海藻原料在80%乙醇溶液中搅拌浸提24h,浸提两次,分别得到乙醇提取物和残渣。将乙醇提取物中的化学组分按照极

性由小到大的顺序,分别采用石油醚、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇和水等溶剂进行萃取,将所得各层溶液通过旋转蒸发除去有机溶剂、再进行真空干燥,得到各层的样品。同时,将经过乙醇提取后的残渣,热水浸提,与0.1% HCl溶液,用约1:10的比例混合,在90℃水浴中浸提6h;用200目纱布,将浸提后的溶液过滤,再经真空浓缩、干燥,得到残渣水提物。残渣水提物经30%乙醇处理,除去杂质,所得滤液再经60%乙醇处理,得到海藻多糖粗提物。按以上步骤重复处理,海藻多糖的纯度得以提高(图1)。

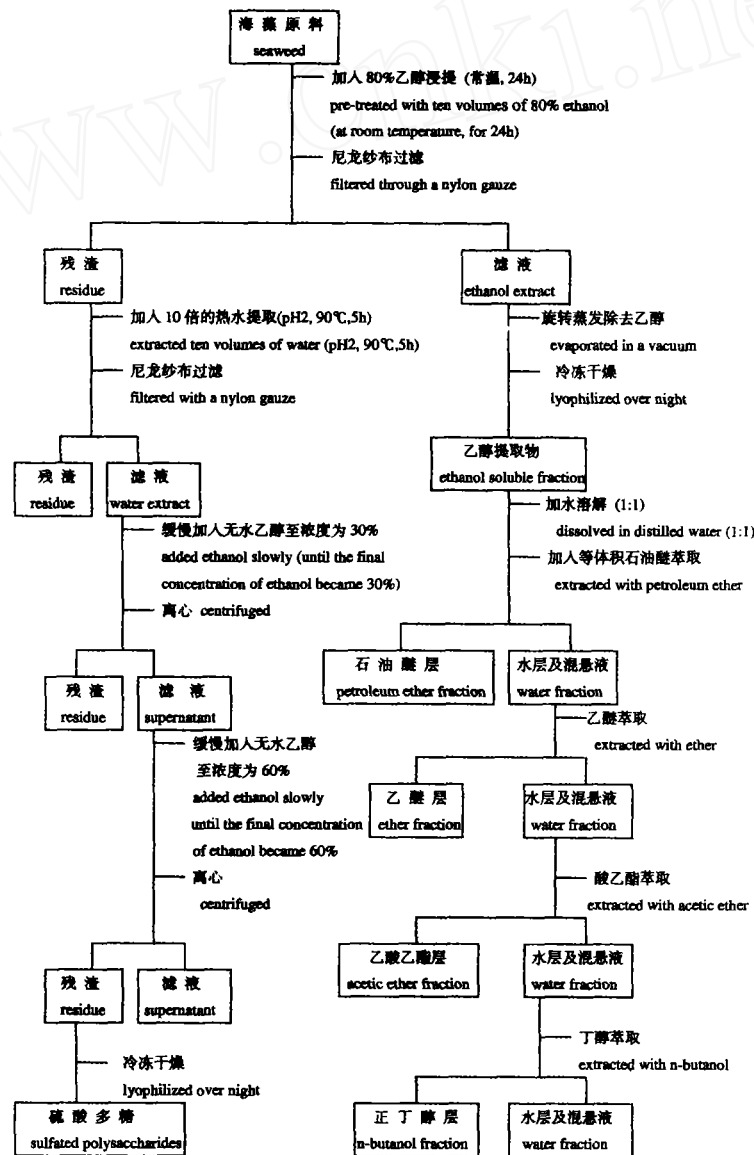


图1 海藻原料不同组分的分离

Fig.1 Separation of different components from marine seaweeds

1.2.2 小鼠体内抗凝血实验方法 采用小鼠体内抗凝血实验方法^[6]对裙带菜和羊栖菜不同组分的抗凝血功效进

行测定,即首先通过尾部静脉注射将样品注入小鼠体内,待样品在体内循环30min后,摘除小鼠眼球采血,迅速滴

在载玻片的两端,每隔 30s 以干燥的大头针挑动血液一次,至针头能挑起血丝为止,记录开始凝血时间。

同时采用生理盐水和肝素($25\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)作为对比。样品的注入浓度为 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,注入体积为 $0.1\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 小鼠体重。

1.2.3 总糖的测定 样品中的总糖采用苯酚硫酸法进行测定,采用葡萄糖作为标准^[7]。

1.2.4 褐藻糖的测定 样品中褐藻糖采用半胱氨酸盐酸盐法^[8]进行测定,采用 L-岩藻糖绘制标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 裙带菜、羊栖菜中抗凝血成分的初步筛选

2.2.1 羊栖菜不同组分的抗凝血功效 羊栖菜通过 80% 乙醇浸提后得到乙醇抽提液和乙醇不溶部分(残渣)。将乙醇抽提液进行旋转蒸发回收乙醇,并经真空干燥,得乙醇可溶组分;而残渣部分则通过 pH2 的沸水(0.01N HCl 溶液)处理,得残渣水提混合物。羊栖菜的乙醇可溶组分和残渣水提混合物对小鼠凝血时间的影响结果见图 2。

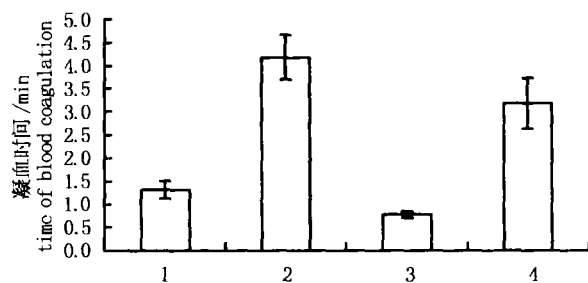


图 2 羊栖菜乙醇可溶组分和残渣水提混合物的抗凝血效果

Fig.2 The time of rat blood coagulation of varied fractions from *Sargassum fusiforme*

1.生理盐水;2.肝素;3.乙醇可溶组分;4.残渣水提混合物
1. physiological saline; 2. heparin; 3. ethanol soluble components; 4. water extract from the residue

由图 2 可知,羊栖菜乙醇不溶组分(残渣水提物)具有明显延长小鼠凝血时间的功效,其抗凝血达到肝素($25\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 76%,宜作进一步处理。而羊栖菜的乙醇可溶组分不具抗凝血活性故弃之。

由于残渣水提液中主要含有硫酸多糖、水溶性蛋白质、无机盐及褐藻酸等成分,推测其起抗凝血功效的主要成分为硫酸多糖(SPS),故将羊栖菜原料的水溶性成分直接采用热水提取出来(pH2,沸水浴 5h),再通过 30% 乙醇沉淀除去褐藻酸等杂质,并采用 60% 乙醇将硫酸多糖沉降出来。结果表明:羊栖菜 SPS 的总糖和岩藻糖的含量随提纯次数的增加而增高(表 1)。同时,其抗凝血功效也随之增强(图 3 和图 4)。由此推断,羊栖菜水提液中具有抗凝血活性的有效成分可能为硫酸多糖,其抗凝血功效大小与其总糖和岩藻糖的含量有关。

表 1 提纯次数对羊栖菜 SPS 总糖和岩藻糖含量的影响

total sugar and fucose in SPS		%		
糖含量	未提纯	提纯次数 purification times		
sugar content	none purification	1 次 once	2 次 twice	3 次 third
总糖 total sugar	5.4	33.3	43.1	62.5
岩藻糖 fucose	2.4	8.23	27.4	53.6

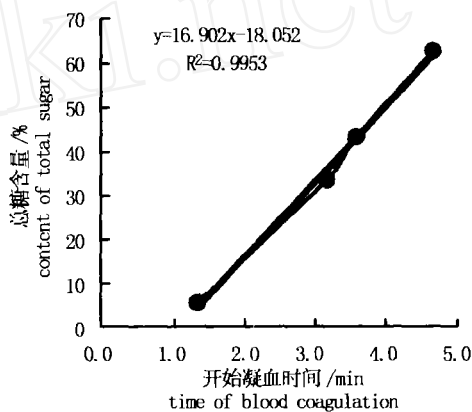


图 3 SPS 的抗凝血效果同总糖含量的关系

Fig.3 Correlation between the content of total sugar in SPS and the time of rat blood coagulation

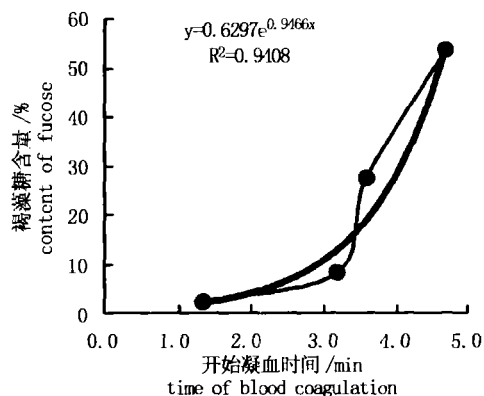


图 4 SPS 的抗凝血效果同岩藻糖含量的关系

Fig.4 Correlation between the content of fucose in SPS and the time of rat blood coagulation

1.生理盐水;2.肝素;3.石油醚层组分;4.乙醚层组分;5.乙酸乙酯层组分;6.正丁醇层组分;7.水层组分;8.残渣水提混合物;9.硫酸多糖(粗)

1. physiological saline; 2. heparin; 3. petroleum ether fraction; 4. aether fraction; 5. ethyl acetate fraction; 6. n-butanol fraction; 7. water fraction; 8. water extract from the residue; 9. crude sulfated polysaccharides

2.2.2 裙带菜不同组分的抗凝血功效 按上述处理羊栖菜的方法对裙带菜进行处理,得到裙带菜的乙醇可溶组分和乙醇不溶组分。在预备实验中,发现该两部分组分对小鼠的开始凝血时间均无明显影响。为了进一步考察裙带菜中是否存在具有抗凝血活性的成分,采用如系统分离分别将乙醇可溶组分得到的石油醚层、乙醚层、乙酸乙酯层、正丁醇层、水层提取样品以及残渣水提物样品,采用体内抗凝血实验方法分别考察以上各组分对小鼠凝血时间的影响(图5)。

由图5可知,裙带菜的石油醚层、乙醚层、乙酸乙酯层、水层组分以及残渣水提混合物和裙带菜多糖的开始凝血时间小于生理盐水,表明这些组分不具抗凝血功效,而正丁醇层样品则表现出一定的抗凝血功效,此结果在以往的参考文献中未见报道。裙带菜正丁醇层组分中的抗凝血活性成分为何物有待进一步研究。

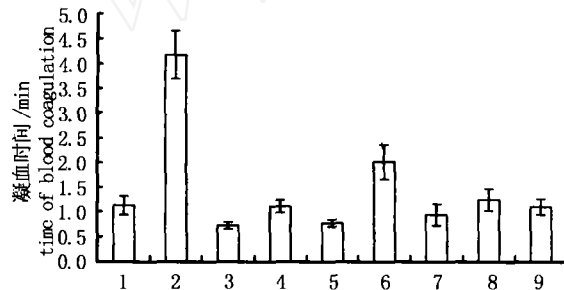


图5 裙带菜不同组分对小鼠凝血时间的影响

Fig.5 Effect of varied fractions from *Undaria pinnatifida* on the time of rat blood coagulation

本研究得到本校研究生部主任施志仪教授、复旦大学药学院潘家祐教授和常建杰同学以及浙江省洞头县华隆经贸有限公司海藻加工厂林志强先生的热情帮助和大力支持,在此一并致谢。

参考文献:

- [1] Jin J, Lin M J. Utilization and processing of seaweeds[M]. Beijing: Science Press, 1993. 126-135. [金峻,林美娇.海藻利用与加工[M].北京:科学出版社,1993.126-135.]
- [2] Ji M H. Algae chemistry[M]. Beijing: Science Press, 1997. 318-339. [纪明侯.海藻化学[M].北京:科学出版社,1997.318-339.]
- [3] Liu X H, Zhang Y S. Fractionation, purification and determination of the structure of fucoidin in *Laminaria japonica* Aresch[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1992, (4): 297-302. [刘晓惠,张翼伸.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,(4):297-302.]
- [4] Lu R C, Liu W Q. Studies on enzyme extraction of sargassan from *Sargassum henslowianum* [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 1997, (2): 10-13. [卢睿春,刘婉乔.酶法提取马尾藻硫酸多糖的研究[J].中国海洋药物,1997,(2):10-13.]
- [5] Wang Z Y, Zhao X W. Extraction and isolation of alginic acid, laminaran and fucoidan from *Sargassum horneri* [J]. J Fish China, 1985, (1), 71-77. [王作芸,赵学武.铜藻的褐藻糖胶、褐藻淀粉和褐藻胶的分离及提纯[J].水产学报,1985,(1),71-77.]
- [6] Zhang Y P. Pharmacology experiments[M]. Beijing: People's Medical Press, 1996. 95-96. [章元沛.药理学实验(第二版)[M].北京:人民卫生出版社,1996.95-96.]
- [7] Fan X. Chemical analysis methods of seaweeds[M]. Beijing: Xueyuan Press, 1996. 330-337. [范晓.海藻化学分析方法[M].北京:学苑出版社,1996.330-337.]
- [8] Dische Z, Shettles L B. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination[J]. Biol Chem, 1948, 175: 595-603.