

• 制剂与质量 •

新月菱形藻胞外多糖的成分及其硫酸酯的制备

郑维发¹, 陈才法¹, 鲍康德², 王义琴³, 储成才³

(1. 徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116; 2. 安徽师范大学 生物系, 安徽 芜湖 241000; 3. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要:目的 阐明新月菱形藻胞外多糖(exopolysaccharides of *Nitzschia closterium*, EPN)的成分、单糖组成及其硫酸酯化条件。方法 新月菱形藻胞外多糖以醇沉法从该藻的培养液中制备;DEAE-Sephadex 25 柱分离,HPLC 法测定其质量分数,HPLC 测定其相对分子质量;以氯磺酸-吡啶法探索新月菱形藻硫酸酯化反应条件。结果 新月菱形藻向胞外分泌3种多糖,相对分子质量分别为EPN1: 1.886×10^5 ,EPN2: 1.41×10^5 ,EPN3: 1.134×10^5 。3种多糖的单糖组成均为甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖和岩藻糖。甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖和岩藻糖的摩尔比在EPN1为4.3:1:5.1:8.9:5.6,EPN2为4.2:7.3:3.7:12.8:3.4,EPN3为3.5:2.1:4.3:4.9:4.7。3种多糖的硫酸酯化条件基本一致,提高氯磺酸比例和延长反应时间均有利于增加酯化产物的硫酸根、提高取代度和酸酯化反应的产率。结论 新月菱形藻胞外多糖为酸性多糖,其硫酸酯化产物多糖硫酸酯可能具有潜在的药理活性。

关键词:新月菱形藻胞外多糖;胞外多糖硫酸酯;单糖组成**中图分类号:**R284.1;R284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)12-1790-04

Components of exopolysaccharides of *Nitzschia closterium* and preparation of their sulfated products

ZHENG Wei-fa¹, CHEN Cai-fa¹, BAO Kang-de², WANG Yi-qin³, CHU Cheng-cai³

(1. Key Laboratory for Biotechnology on Medicinal Plants of Jiangsu Province, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China; 2. Department of Biology, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China; 3. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China)

Abstract: **Objective** To elucidate the components of exopolysaccharides of *Nitzschia closterium* (EPN), the components of monosaccharide in each EPN, and the conditions for preparing their sulfated products. **Methods** The EPNs were prepared from the nutrient solution by ethanol precipitation and separated by DEAE-Sephadex 25 column. The purity and the relative molecular weight of each EPN were determined by HPLC. The chlorosulfuric acid-pyridine method was used for investigating conditions of EPN sulfation. **Results** The EPNs were constituted by three polysaccharides with their molecular weight 1.886×10^5 (EPN1), 1.41×10^5 (EPN2), and 1.134×10^5 (EPN3), respectively. The monosaccharides in three EPNs all comprised mannose (Man), rhamnose (Rha), glucuronic acid (GluA), glucose (Glu), and fucose (Fuc), whose ratio was 4.3:1:5.1:8.9:5.6 in EPN1, 4.2:7.3:3.7:12.8:3.4 in EPN2, and 3.5:2.1:4.3:4.9:4.7 in EPN3. The conditions for sulfation of EPNs were nearly identical, namely, increasing the ratio of chlorosulfuric acid and elongation of reaction time favored in obtaining higher content of sulfate, degree of sulfation in EPN molecular, and percent of sulfated products. **Conclusion** The EPNs are acidic polysaccharides. Their sulfated products — sulfated polysaccharides may be of potential pharmacological activities.

Key words: exopolysaccharides of *Nitzschia closterium* (Ehr.) W. Smith (EPN); sulfated exopolysaccharides of *N. closterium*; composition of monosaccharide

现代药理学研究表明,海洋藻类来源的酸性多糖具有显著的免疫调节活性,用于治疗或预防某些

病毒性疾病^[1~3]。多糖的硫酸酯对HIV病毒具有显著的抑制作用^[4]。因此,以多糖为主要成分的硅藻胞

收稿日期:2005-02-24

基金项目:国家科技部863高新技术项目(2004AA628080);江苏省高新技术产业化项目(02KJ360008)

作者简介:郑维发(1962-),男,安徽南陵人,教授,博士,主要从事天然产物成分化学及药理学研究。

Tel/Fax: (0516) 3403179 E-mail: yyzw@xznu.edu.cn

外多聚物具有潜在的药学价值,已引起海洋学家的重视^[5]。

新月菱形藻 *Nitzschia closterium* (Ehr.) W. Smith 是海洋微藻中富含多不饱和脂肪酸浮游种类之一。在系统分类学上属于硅藻门羽纹藻纲,是海洋生态系统初级生产力的常见种类,也是许多珍贵水产动物的饵料生物重要种类。笔者在培养新月菱形藻时发现该藻在生长的过程中分泌大量的胞外多聚物,高达 1.5 g/L 以上。初步分析表明,新月菱形藻胞外多聚物只含多糖,不含蛋白质和硫化物^[6]。本文报道新月菱形藻胞外多糖的分离、单糖组成以及多糖硫酸酯的制备。

1 材料与仪器

无水吡啶、无水甲酰胺、浓硫酸(上海化学试剂站中心化工厂);氯磺酸、无水乙醇、硫酸钾、氯化钡、明胶、三氟乙酸、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)、萘酚(北京, Biodee 生物技术有限公司)。单糖对照品:葡萄糖(上海化学试剂公司),甘露糖和半乳糖(Sigma 公司)、鼠李糖、葡萄糖醛酸和木糖(上海化学试剂二厂产品)(以上试剂均为分析纯)。色谱纯乙腈(Fisher 公司),三蒸水(自制)。DEAE Sephadex 25 半透膜(Pharmacia 公司);新月菱形藻采自连云港海滨,分离后作为江苏省药用植物生物技术重点实验室保存藻种,编号为 JKL B003。

722S 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);Waters 600 高效液相色谱系统,2487 紫外检测器,Waters Empower 色谱工作站,空气压缩机(南京塞格)。

2 新月菱形藻的培养及胞外总多糖的制备

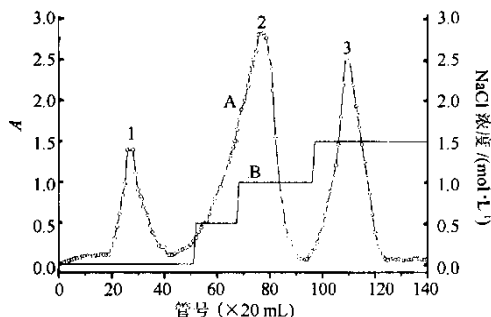
新月菱形藻以 ZBNC 专用培养基^[6]通气培养,环境温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度为 $81.04 \mu\text{Em}^2/\text{s}$,光暗周期为 10 h/14 h。取细胞浓度为 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 的新月菱形藻藻种,按 1:5 的比例接种于 60 L 培养缸中(工作体积 40 L)。以空气压缩机通气搅拌,压缩空气以 400 mL/min 的速度通过气体分散沙芯向培养基供气。10 d 后,将培养液温度提高至 30°C ,保持 1 h,调 pH 值为 8.4,使藻细胞自然沉降,收集上清液,60 $^\circ\text{C}$ 真空浓缩后,以半透膜对蒸馏水透析 24 h。透析液经真空浓缩后,加入 3 倍体积乙醇沉淀。沉淀物冻干后得 75.96 g 新月菱形藻胞外多糖。

3 新月菱形藻胞外多糖的分离、质量分数及其相对分子质量的测定

取 5 g 新月菱形藻胞外多糖溶解于蒸馏水中,

上 DEAE Sephadex 25 色谱柱(100 cm $\times$ 8 cm)。 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ NaCl 溶液梯度洗脱,体积流量 1 mL/min。洗脱梯度分别为 0.0、0.5、1.0、1.5 mol/L。每 20 mL 收集一次于试管中。硫酸-萘酚比色法检测^[7](对于吸光度值大于 1 的洗脱物稀释后测定)。采用 HPLC 法检测多糖质量分数^[8]。样品配称 2% 浓度,进样 10 μL 于 $\mu\text{Bondgel}$ Linear 柱,流动相为 0.02 mol/L 醋酸钠水溶液,体积流量 0.5 mL/min,柱温 25°C 。记录出峰的保留时间。

DEAE Sephadex 25 色谱柱将新月菱形藻胞外多糖分成 3 个组分,即 EPN1、EPN2 和 EPN3。其中,EPN1 的洗脱体积为 800 mL,峰收集体积为 400 mL 蒸馏水;EPN2 洗脱体积为 1 840 mL,峰收集体积 840 mL (0.5 mol/L NaCl 400 mL, 1 mol/L NaCl 440 mL);EPN3 的洗脱体积为 2 460 mL,峰收集体积 640 mL (1 mol/L NaCl 80 mL, 1.5 mol/L NaCl 560 mL)。3 个 EPN 组分洗脱物经真空浓缩、蒸馏水透析和冷冻干燥,分别得到 EPN1 250.45 mg (12.5%),EPN2 1 088.29 mg (55.1%) 和 EPN3 647.93 mg (32.39%),见图 1。EPN1、EPN2 和 EPN3 经 HPLC 分析,HPLC 色谱中出现单一的对峰,说明这 3 个多糖质量分数较高。



A-EPN B-NaCl gradient 1-EPN1 2-EPN2 3-EPN3
图1 新月菱形藻胞外多糖的 DEAE Sephadex 25 柱色谱洗脱色谱

Fig. 1 Chromatogram of EPN by DEAE Sephadex 25 column chromatography

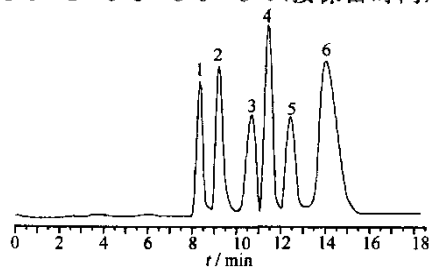
采用 HPLC 法测定多糖质量分数时的液相条件分别将 Dextran T-2000、T-110、T-80、T-40、T-20 进样,记录各标准多糖的保留时间。标准多糖的相对分子质量(M_r)对保留时间(t)作工作曲线,根据 ORIGIN 软件求出相对分子质量对保留时间的一元线性回归曲线。根据标准曲线,求出相对分子质量对应保留时间的一元线性回归方程: $M_r = 232.27 - 7.11 t$, $r = 0.9992$,在 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ 呈线性关系。求出 3 个 EPN 的相对分子质量分别为 EPN1:

1.886×10^5 , EPN2: 1.41×10^5 , EPN3: 1.134×10^5 。

4 新月菱形藻胞外多糖的单糖组成

采用 HPLC 柱前衍生法检测单糖组成^[9]。将待测样品置于 1 mL 试管中, 室温减压真空干燥; 向干燥好的试管中依次加入 20 μ L 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液和 20 μ L 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液, 混匀后置于 70 $^{\circ}$ C 水浴中加热反应 30 min, 取出室温放置 10 min; 再加入 25 μ L 0.3 mol/L 盐酸溶液中和, 混匀后用 0.5 mL 乙酸异戊酯萃取, 涡旋 3 min, 离心 15 min, 小心弃去有机层, 再萃取 1 次, 得到下层, 加水 150 μ L 混匀并离心 15 min, 用于 HPLC 分析。色谱条件: Inertsil ODS (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 体积流量 1.0 mL/min; 流动相为溶剂 A [15% 乙腈 + 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.9)], 溶剂 B [40% 乙腈 + 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.9)]。梯度模式: 时间梯度为 0 min $\rightarrow$ 9 min $\rightarrow$ 25 min, 相应梯度为 0% B $\rightarrow$ 10% B $\rightarrow$ 55% B。检测波长 250 nm, 进样体积 20 μ L。

6 个单糖对照品 PMP 衍生物的 HPLC 图谱显示 6 个基线分离的色谱峰, 按保留时间先后的顺序分别为甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、岩藻糖和木糖, 见图 2。3 个 EPN 水解产物 PMP 衍生后, 在与单糖对照品相同的色谱条件下经 HPLC 检测, 出现 5 个峰。与单糖对照品的 HPLC 色谱峰比较, 确定这 5 个峰分别为甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、岩藻糖。其中, EPN1 主要由甘露糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖和岩藻糖组成, 鼠李糖仅占很小的比例。根据 HPLC 色谱的峰面积算出 5 种单糖的摩尔比为 4.3 : 1 : 5.1 : 8.9 : 5.6 (按保留时间顺序);

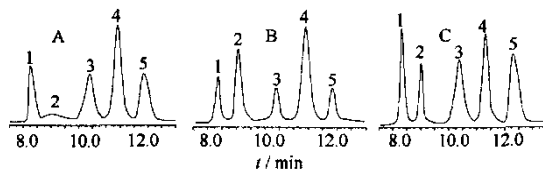


1-甘露糖 2-鼠李糖 3-葡萄糖醛酸
4-葡萄糖 5-岩藻糖 6-木糖
1-mannose 2-rhamnose 3-glucuronic acid
4-glucose 5-fucose 6-xylose

图2 单糖对照品 PMP 衍生物的 HPLC 色谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP)-labeled monosaccharide reference substances

EPN2 的 5 种单糖中以葡萄糖的量最高, 其次为鼠李糖, 各单糖的摩尔比为 4.2 : 7.3 : 3.7 : 12.8 : 3.4 (按保留时间顺序)。EPN3 含有较高比例的葡萄糖醛酸, 各单糖的摩尔比为 3.5 : 2.1 : 4.3 : 4.9 : 4.7 (按保留时间顺序), 见图 3。



1-甘露糖 2-鼠李糖 3-葡萄糖醛酸 4-葡萄糖 5-岩藻糖
1-mannose 2-rhamnose 3-glucuronic acid
4-glucose 5-fucose

图3 EPN1 (A)、EPN2 (B)和 EPN3 (C)的 PMP 衍生物 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatograms of PMP for EPN1 (A), EPN2 (B), and EPN3 (C)

5 新月菱形藻胞外多糖的硫酸酯化

EPN 硫酸酯化反应采用氯磺酸-吡啶法^[10,11]。

5.1 酯化试剂的制备: 将带有冷凝管和搅拌装置的三颈瓶置冰浴中, 将吡啶与氯磺酸按 1 : 1 和 2 : 1 的比例加入, 反应温度控制在 4 $^{\circ}$ C。反应产物冷却后置低温冰箱备用。

5.2 EPN 硫酸酯化多糖的制备: 将 EPN 54 mg 加入 4.5 mL 甲酰胺中搅拌 30 min, 于室温下分别加入吡啶与氯磺酸两种配比的酯化试剂, 分别反应 1 h 和 2 h。反应结束用 0.1 mol/L NaOH 溶液中和, 再加入等体积无水乙醇析出沉淀, 将沉淀溶于水后透析 72 h, 冷冻干燥后得新月菱形藻胞外多糖硫酸酯。

5.3 硫酸根的测定: 采用 BaSO₄ 浊度法^[10]。精确称量硫酸酯化后的 EPN 3 mg, 放入盛有 3 mL 1 mol/L HCl 的试管中溶解, 密封后于 100 $^{\circ}$ C 水浴中水解 6 h。冷却后开启试管, 内容物低温减压干燥, 1 mL 蒸馏水溶解并做 2 个平行样 A、B (各 0.4 mL)。向 A 样中加蒸馏水至 1.6 mL, 再加入 8% 三氟乙酸水溶液 1.4 mL 和 5 mg/mL 氯化钡-明胶溶液 1.0 mL, 混合后静置 20 min, 在 360 nm 处测定吸光度值。B 样中以 5 mg/mL 明胶溶液 1.0 mL 代替氯化钡-明胶溶液, 加入后同法处理。求 A、B 两样品吸光度之差值。将蒸馏水空白对照和含 2.3、4.6、9.2、18.4、36.8、73.7 μ mol/L 硫酸钾标准品溶液重复上述操作, 以测得空白组吸光度和各对照样品组的吸光度差值对硫酸根浓度作标准曲线, 根据 ORIGIN 软件求出硫酸根浓度 (X) 对吸光度 (Y) 的一元线性回归

方程,即 $Y=0.86+22.9 X$, $r=0.9997$,线性范围: 2.31~73.63 mmol/L。进而求出样品中硫酸根的量。多糖分子中硫酸根的取代度(degree of sulfate, DS)以公式 $DS=[(1.62 \times S\%)/(32-1.02 \times S\%)] \times 100\%$ 计算,式中 $S\%$ 为硫酸根的质量分数。

5.4 不同条件下 EPN 硫酸酯化反应比较:结果表明,同等反应条件下,3 种 EPN 硫酸酯中硫酸根量无显著差异。氯磺酸与吡啶等摩尔条件下,延长反应

时间可稍稍提高硫酸根的量、取代度和反应产物的得率。如反应时间由 1 h 延长为 2 h 时,硫酸根量可提高 0.6% 左右,得率可提高 15% 左右。增加氯磺酸比例和延长反应时间可提高硫酸根量,并显著提高反应产物产率。从表 1 可以看出,条件 3 比条件 1 的硫酸根量高出 0.4% 左右,产率高出 8% 左右。条件 4 比条件 3 硫酸根量高出 0.5%,产率高出 12%。4 种反应条件中硫酸根的取代度则没有显著变化。

表 1 不同条件下硫酸根的质量分数和 EPN 的硫酸酯化的产率

Table 1 Content of sulfate radical and yield of sulfated EPN under different conditions

反应条件			硫酸根/%			取代度/%			产率/%		
条 件	氯磺酸 和吡啶 的摩尔比	反应 时间/h	EPN1	EPN2	EPN3	EPN1	EPN2	EPN3	EPN1	EPN2	EPN3
1	1:1	1	2.6±0.3	2.7±0.3	2.8±0.3	15.1±0.9	15.4±0.7	15.5±1.4	45.6±2.1	43.4±2.9	39.9±1.1
2	1:1	2	3.3±0.1	3.2±0.1	3.4±0.3	18.6±0.5	18.4±1.0	19.2±1.6	60.3±3.5	61.3±4.1	63.7±3.6
3	2:1	1	2.9±0.5	3.1±0.2	3.2±0.2	16.1±1.2	17.9±1.3	18.0±1.2	53.9±2.3	52.2±4.4	56.1±2.7
4	2:1	2	3.8±0.1	3.6±0.4	3.9±0.1	20.6±0.8	20.7±1.1	22.4±1.3	75.8±3.1	73.9±5.8	78.4±3.9

6 讨论

新月菱形藻为海洋硅藻中的浮游种类,是水产养殖中重要的饵料生物种类之一。该藻在 ZBNC 培养基中生长速度极快,8 d 即可达到指数生长后期,生物量可达 1.9 g/L,同时产生大量的由多糖组成的胞外多聚物^[8]。研究结果显示,新月菱形藻胞外多聚物中含有 3 种多糖,分别是 EPN1,相对分子质量为 1.886×10^5 ,占总多糖的 12.5%;EPN2,相对分子质量为 1.41×10^5 ,占总多糖的 55.1%;EPN3,相对分子质量为 1.134×10^5 ,占总多糖的 32.39%。3 种多糖的单糖组成一致,都是由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖和岩藻糖组成,但各单糖在每种多糖中的摩尔比不同。3 种多糖都含有较高摩尔比的葡萄糖、岩藻糖、甘露糖和葡萄糖醛酸。由于新月菱形藻胞外多聚物中不含硫化物,因此胞外多糖也不含硫酸根。为了增加 EPN 的药理活性潜力,实验采用 4 种条件对 3 种 EPN 进行了硫酸酯化反应。结果表明,氯磺酸比例越大,反应时间越长,越有利于提高硫酸根在多糖中的比例和取代度,并且越有利于提高目标产物的产率。

多糖的硫酸酯化对于提高多糖的抗病毒和抗肿瘤等方面的药理活性具有重要作用,有时甚至起决定作用^[4]。但多糖的药理活性更多的还是取决于糖苷键的连接方式和空间构型等^[12]。有关新月菱形藻多糖的药理活性、糖苷键的连接方式将作进一步研究。

References:

[1] Damonte E B, Matulewicz M C. Sulfated xylogalactans from marine algae useful as anti HSV-1 agents [J]. *Antivir Res*,

1995, 26 (3): A306.

[2] Schaeffer D J, Krylov V S. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and *Cyanobacteria* [J]. *Ecotoxic Environ*, 2000, 45 (3): 208-227.

[3] Ermak I M, Khotimcheno Y S. Physical and chemical properties, applications, and biological activities of carrageenan, a polysaccharide of red algae [J]. *Oceanogr Litara Rev*, 1998, 45 (9): 1710.

[4] Wu L G, Mao W J. The research status of activities of modified polysaccharides [J]. *Sci Scope* (科学视野), 2002, 26 (5): 23-25.

[5] Wang D Z, Huang S Y, Cheng Z D. Influences of light/dark cycle on species [J]. *J Xiamen Univ: Nat Sci* (厦门大学学报:自然科学版) 2004, 43: 244-248.

[6] Zheng W F, Bao K D. A specific medium for culturing *Nitzschia closterium* (Ehr.) W. Smith and its mass culture [P]. CN: 200410047285.7, 2005-05-05.

[7] Winder B, Staats N, Stal L J, et al. Carbohydrate secretion by phototrophic communities in tidal sediments [J]. *J Sea Res*, 1999, 42: 131-146.

[8] Wei Y A, Fang J N. Purity and molecular of polysaccharides determination by high performance gel osmotic chromatography [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1989, 24 (7): 532-536.

[9] Mao D Y, Cheng J, Li P, et al. Analysis of monosaccharide compositions in polysaccharides by precolumn derivatization high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2002, 30 (6): 702-705.

[10] Wang S C, Fang J N. Preparation and structural analysis of sulfated derivatives of lentinan [J]. *Acta Biochem Biophys Sin* (生物化学与生物物理学报), 1999, 31 (5): 594-597.

[11] Tian Y G, Li S T, Song M L, et al. Synthesis of sulfated derivatives of polysaccharides from *Achyranthes bidentata* and their antiviral activity [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1995, 30 (2): 107-111.

[12] Wei J J, Shao S J, Wang T Y. Progress of study on chemistry and clinical application of sulfated polysaccharides [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 1999, 20 (5): 260-262.