



УДК 582.272-119.2.2:577.114.083

© 1994 А. И. Усов, А. В. Кирьянов

ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ
47'. ВЫДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИЙ ФУКОИДАНА ИЗ БУРОЙ ВОДОРΟΣЛИ
Laminaria cichorioides Miyabe

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва

Ключевые слова: бурые водоросли, *Laminaria cichorioides*, фукоидан.

В процессе фракционной экстракции из бурой водоросли *Laminaria cichorioides* получены D-маннит (выход 8,7% от сухой биомассы), ламинаран (10,4%), альгинат натрия (11,2%) и три фракции фукоидана (11,1, 5,3 и 2,7% соответственно). С помощью ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе показана гетерогенность выделенных фракций фукоидана. Очищенный препарат фукоидана с высоким содержанием фукозы и сульфата и незначительным содержанием других нейтральных сахаров и уроновых кислот, предназначенный для структурного анализа и изучения биологической активности, выделен по упрощенной схеме, включающей экстракцию водоросли разбавленной соляной кислотой, осаждение цетавлоном и хроматографию на DEAE-сефадексе.

Laminaria cichorioides — широко распространенный и легко доступный вид бурых водорослей Японского моря. Как и в других бурых водорослях, в ней содержатся три типа полисахаридов: ламинаран, альгиновая кислота и сложные сульфатированные гетерогликаны, в составе которых преобладает фукоза, — «фукоиданы» [2]. Эта водоросль неоднократно использовалась для лабораторного получения ламинарана [3, 4] и альгиновой кислоты [5]; строение обоих полисахаридов охарактеризовано в упомянутых работах достаточно подробно. Сульфатированные компоненты *L. cichorioides* изучены гораздо меньше [6], однако они представляют существенный интерес в свете обнаружения у фукоиданов из других бурых водорослей разнообразной биологической активности: противоопухолевой [7—9], противовирусной [10], антикоагулянтной [8, 11—16] и др. Хотя проявление биологической активности фукоиданов принято связывать в первую очередь с высокой степенью сульфатирования этих полисахаридов [13, 16, 17], не вызывает сомнения влияние других параметров, таких, как молекулярная масса [18] и особенности строения молекул [13—15]. В частности, близкие по составу фукоиданы, полученные из разных видов водорослей, могут сильно различаться по антикоагулянтной активности [19, 20].

В наших предварительных опытах было установлено, что суммарная фракция сульфатированных полисахаридов из *L. cichorioides* обладает антикоагулянтным

* Сообщение 46 см. [1]. Адрес А. В. Кирьянова в настоящее время — Л/О «Биотехнология», Москва.

Адрес для переписки: 117913 Москва, ГСП-1, Ленинский проспект, 47, Институт органической химии. Усов А. И.

действием, сравнимым с действием гепарина [20, 21], а также довольно высокой антилипемической активностью [22]. Данная работа посвящена выделению из водоросли и характеристике отдельных фракций фукоидана, необходимых для более подробного исследования структуры и биологических свойств.

Для извлечения полисахаридов из водоросли мы воспользовались схемой последовательных экстракций, которая позволяет уже на этой стадии провести разделение главных углеводных компонентов биомассы (стр. [23]). Воздушно-сухую водоросль вначале обрабатывали смесью метанола, хлороформа и воды [24] для удаления низкомолекулярных веществ и из экстракта получали фракцию липидов и *D*-маннит, охарактеризованный в виде гексаацетата. Дополнительное количество *D*-маннита было выделено при последующей экстракции водоросли этанолом; общий выход *D*-маннита составил 8,7% от воздушно-сухой биомассы. Затем водоросль обрабатывали 2% водным раствором хлорида кальция, к экстракту прибавляли бромид цетилтриметиламмония (цетавлон), осадок цетавлоновых солей кислых полисахаридов переводили в Са-соли и получали фракцию фукоидана I. Раствор после осаждения цетавлоновых солей диализовали и осадением этанолом выделяли ламинаран. Остаток водоросли экстрагировали 0,1 М соляной кислотой и из экстракта с помощью осаждения цетавлоном, как описано выше, получали фукоидан II. Далее водоросль обрабатывали 3% водным раствором соды, из экстракта после диализа с помощью осаждения хлоридом кальция выделяли альгинат кальция, который переводили в Na-соль; из маточного раствора осаждением цетавлоном выделяли фукоидан III. Остаток водоросли представлял собой нерастворимый и трудногидролизуемый материал клеточных стенок.

При гидролизе ламинарана были получены глюкоза и маннит в соотношении 25 : 1. По данным гель-хроматографии, молекулярная масса полисахарида составляла 4500 ± 500 . Спектр ^{13}C -ЯМР ламинарана оказался идентичным описанному в литературе [4] и соответствовал глюкану, содержащему около 90% $1 \rightarrow 3$ - и около 10% $1 \rightarrow 6$ -связей между остатками β -*D*-глюкопиранозы.

Выделенный альгинат натрия не давал при гидролизе нейтральных моносахаридов и имел типичный для этого класса полисахаридов спектр ^{13}C -ЯМР [25]. Соотношение *D*-маннуруновой и *L*-гулуруновой кислот, рассчитанное из спектра, составило величину 1,54, близкую к приведенной в литературе [2].

Фукоиданы I—III содержали в качестве главных компонентов фукозу и сульфат, а в качестве минорных — галактозу, ксилозу, маннозу, глюкозу и уроновые кислоты. Гель-хроматография показала, что эти препараты неоднородны по молекулярной массе. В результате препаративной хроматографии на DEAE-сефадексе А-25 каждый из фукоиданов I—III был разделен на 4 фракции, условия элюции, относительные выходы и состав которых приведены в таблице. Несмотря на довольно пестрый качественный состав, с количественной точки зрения некоторые из полученных таким способом фракций приближаются к фукансульфату, т. е. состоят преимущественно только из остатков фукозы и серной кислоты. Это в первую очередь относится к фракциям Ib и Iv, в меньшей степени — к Ig и Iv. Фракции Ia, IIa и IIIa обогащены уроновыми кислотами, вероятно, за счет примеси альгината. Прочие фракции характеризуются более низким содержанием сульфата, а в случае фукоидана III также значительным количеством неуглеводных примесей. Таким образом, по данным ионообменной хроматографии, сульфатированные полисахариды I—III представляют собой весьма гетерогенный набор молекул, однако фукоидан I и в меньшей степени фукоидан II могут служить источником фукансульфата, с которым, как следует из литературных данных [13], связана в первую очередь антикоагулянтная активность полисахаридных препаратов из водорослей. Удобным способом выделения фукансульфата служит ионообменная хроматография на DEAE-сефадексе в градиенте NaCl.

Результаты фракционирования позволили предложить упрощенную методику выделения высокосульфатированного фукоидана из биомассы водоросли. Согласно этой методике, водоросль после измельчения и обезжиривания обрабатывали

Характеристика фракций фукоиданов, полученных при хроматографии на DEAE-сефадексе А-25 в градиенте концентрации NaCl

Исходный препарат	Фракция	[NaCl], М	Выход, %		Содержание, %							
			от исходного препарата	от суммы фракций	SO ₃ Na	Fuc	уроновые кислоты	Gal	Xyl	Man	Glc	
Фукоидан I	а	1,25		19,0	28,0	44,2	10,2	5,1	0,7	1,5	2,1	
	б	1,5		31,0	40,0	52,2	1,6	3,0	0,2	0,4	0,4	
	в	1,75		35,5	40,8	50,7	1,6	5,6	0,6	0,5	0,2	
	г	3,0		14,5	33,8	40,6	4,8	10,3	—	0,4	0,5	
Фукоидан II	а	1,25		52,3	15,2	37,0	25,6	2,2	0,3	0,7	0,6	
	б	1,5		25,0	26,3	39,4	5,0	7,6	0,4	0,7	0,4	
	в	1,75		18,5	30,8	41,5	3,0	4,4	0,3	0,5	4,3	
	г	3,0		4,2	19,2	24,4	7,0	1,5	0,3	0,5	0,4	
Фукоидан III	а	1,25		47,8	5,7	11,5	26,4	3,6	0,6	0,8	1,2	
	б	1,5		30,5	16,6	20,9	4,8	1,4	0,3	0,3	0,3	
	в	1,75		13,8	13,1	19,4	3,6	1,4	0,6	0,6	0,9	
	г	3,0		7,9	3,8	5,5	3,6	0,2	0,1	0,4	0,1	
Фукоидан F ₂	IV	1,5 + 1,75	55,5		40,2	52,0	3,7	2,2	0,3	0,2	0,2	
Фракция IV	а	1,5	26,2		24,5	47,0	4,1	1,7	0,3	0,3	0,2	
	б	1,75	68,2		44,0	43,8	3,0	2,6	0,3	0,3	0,3	

разбавленной соляной кислотой и из полученного экстракта кислые полисахариды осаждали цетавлоном (ср. [26]). Очевидно, что получаемая при этом фракция кислых полисахаридов по составу приблизительно соответствует смеси фукоиданов I и II, описанных выше. Именно эта фракция (в виде Са-солей), обозначенная как F₂, использовалась в предварительных исследованиях биологической активности фукоидана из *L. cichorioides* [20—22]. Ее дальнейшая очистка была проведена в две стадии. Вначале препарат хроматографировали на DEAE-сефадексе, как описано выше, и в интервале концентраций элюента 1,25—1,75 М NaCl получали фракцию IV, близкую по составу к фукоиданам Ib и Iv. При повторном хроматографировании эту фракцию удалось дополнительно разделить на две подфракции IVa и IVб, различающиеся степенью сульфатирования. Препарат IVб, который характеризуется наиболее высоким соотношением сульфата и фукозы, а также незначительным содержанием прочих компонентов (таблица), будет использован далее для структурных исследований и более детального изучения биологической активности.

Экспериментальная часть

Полный гидролиз полисахаридов для анализа моносахаридного состава проводили нагреванием в 2 н. H₂SO₄ при 100° С в течение 6 ч с последующей нейтрализацией BaCO₃. Перевод моносахаридов в ацетаты полиолов и количественный анализ методом ГЖХ с мио-инозитом в качестве внутреннего стандарта проводили по методике [27]. ГЖХ выполняли на хроматографе Hewlett-Packard 5890А (США) с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой HP Ultra-1 и интегратором HP 3393А в режиме программирования температуры от 175 до 290° С со скоростью 10°/мин.

Содержание сульфата в полисахаридах определяли турбидиметрическим методом после гидролиза 1 н. HCl [28], урановых кислот — спектрофотометрически по реакции с *m*-гидроксидифенилом [29], фукозы — спектрофотометрически по реакции с *L*-цистеином [30]. Спектрофотометрические измерения проводили на приборе СФ-4А.

Спектры ¹³С-ЯМР получали на спектрометре Bruker WM-250 (62,86 МГц) для 2% растворов полисахаридов в D₂O при 30° С (для ламинарана) или 80° С (для альгината); внутренним стандартом служил диметилсульфоксид (39,5 м. д.).

Аналитическую гель-хроматографию проводили на колонках (2,6×90 см) с Тоуорегл HW-50S и HW-65S (Тоуо-Сода, Япония) в 0,1 М NaCl; содержание сахаров в элюате определяли по реакции с фенолом и серной кислотой [31]; условия ионообменной хроматографии фукоиданов описаны ниже.

Оптическую активность измеряли на поляриметре Jasco DIP-360 (Япония).

Водоросль *L. cichorioides* собрали в сентябре 1986 г. в бухте Троица залива Посьета Японского моря, высушивали на воздухе и измельчали до размера частиц, не превышающего 0,25 мм.

Экстракция низкомолекулярных веществ. 100 г воздушно-сухой биомассы перемешивали с 0,5 л смеси метанол—хлороформ—вода (4 : 2 : 1) в течение 8 ч при комнатной температуре, экстракт отделяли центрифугированием, а остаток водоросли обрабатывали той же смесью растворителей еще 4 раза. К объединенному экстракту прибавляли 1 л хлороформа и 1 л воды, встряхивали в делительной воронке, органический слой упаривали, остаток высушивали в вакууме, получали фракцию липидов (выход 3,04 г). Водно-метанольный слой концентрировали в вакууме и лиофилизовали, получали фракцию полярных веществ (выход 25,81 г), содержащую главным образом неорганические соли и маннит. Выход маннита, по данным ГЖХ его ацетата, составил 8,57% от веса водоросли. Для идентификации маннита 1,5 г фракции полярных веществ обрабатывали 4 мл пиридина и 2 мл уксусного ангидрида в течение 1 ч при 100° С, упаривали с добавлением толуола, остаток растворяли в хлороформе и хроматографировали на колонке

(2×15 см) с силикагелем L 40—100 мкм (Сhemapol, ЧСФР) при промывании хлороформом. Фракции, содержащие гексаацетат маннита (по данным ГЖХ), объединяли, упаривали и остаток кристаллизовали несколько раз из этанола, получали гексаацетат D-маннита. Выход 241 мг, т. пл. 122° С, $[\alpha]_D^{28} +24,8^\circ$ (с 1; CHCl_3); [32]: т. пл. 122° С, $[\alpha]_D^{20} +25,0^\circ$ (CHCl_3).

Остаток водоросли перемешивали с 0,5 л этанола в течение 8 ч при комнатной температуре, центрифугировали, обрабатывали в тех же условиях 0,5 л 80% водного этанола, а затем проводили еще одну экстракцию 80% этанолом при 70° С. Объединенные экстракты концентрировали до небольшого объема и лиофилизировали. Остаток (выход 1,45 г), по данным ГЖХ, содержал 0,14 г маннита.

Экстракция полисахаридов. Остаток водоросли, полученный после извлечения низкомолекулярных веществ, перемешивали 8 ч с 1 л 2% водного раствора CaCl_2 при комнатной температуре. Экстракт отделяли центрифугированием, остаток повторно обрабатывали в тех же условиях, а затем проводили еще две экстракции при 70° С. К объединенным экстрактам приливали при перемешивании 333 мл 10% водного раствора бромидоцетилтриметиламмония (цетавлона), выпавший осадок цетавлоновых солей отделяли центрифугированием, промывали водой, растворяли в 660 мл 3 М CaCl_2 при 60° С и из полученного раствора осаждали Са-соль фукоидана прибавлением 2 л этанола. Осадок промывали этанолом, ацетоном, эфиром и сушили в вакууме над P_2O_5 , получали фукоидан I (выход 11,12 г). Маточный раствор после отделения цетавлоновых солей диализовали относительно проточной воды, затем, против дистиллированной воды, концентрировали до объема 0,2 л и приливали 1,2 л этанола. Осадок высушивали сменой растворителей, как описано выше, получали ламинаран (выход 10,4 г).

Остаток водоросли трижды перемешивали с порциями по 1 л 0,1 н. HCl при 70° С в течение 8 ч, экстракты отделяли центрифугированием, объединяли, прибавляли NaHCO_3 до рН 5, приливали при перемешивании 333 мл 10% цетавлона и после обработки осадка по описанной выше методике получали фукоидан II (Са-соль). Выход 5,31 г.

Остаток водоросли трижды перемешивали с порциями по 1 л 3% водного раствора Na_2CO_3 при 50° С в течение 8 ч. Экстракты отделяли центрифугированием, объединяли, диализовали, концентрировали до объема 1 л и прибавляли 50 мл 4 М CaCl_2 . Осадок альгината кальция промывали 100 мл 2% раствора CaCl_2 и перемешивали 2 ч с 2,5 л 0,1 н. HCl . Суспензию центрифугировали, осадок промывали 100 мл 0,1 н. HCl и растворяли в 300 мл 3% Na_2CO_3 . Раствор диализовали, концентрировали и лиофилизировали, получали альгинат натрия (выход 11,2 г).

К маточному раствору после отделения альгината кальция прибавляли 333 мл 10% цетавлона. Выпавший осадок обрабатывали, как при получении фукоиданов I и II, получали фукоидан III (выход 2,74 г). Остаток водоросли высушивали сменой растворителей (выход 9,45 г).

Ионообменная хроматография фукоиданов. Раствор 0,9 г фукоидана в 100 мл 0,01 н. HCl наносили на колонку (4×100 см) с DEAE-сефадексом А-25 (СГ-форма), которую промывали последовательно 1,25, 1,5, 1,75 и 3 М растворами NaCl в 0,01 н. HCl (по 2 л каждого раствора). Полученные фракции нейтрализовали Na_2CO_3 , диализовали, концентрировали в вакууме и лиофилизировали. Выходы и характеристика фракций фукоиданов приведены в таблице.

Упрощенная методика экстракции фукоидана. Измельченную водоросль исчерпывающе экстрагировали в аппарате Сокслета вначале хлороформом, затем метанолом, ацетоном и высушивали в вакууме. 15 г обезжиренной биомассы перемешивали с тремя порциями по 150 мл 0,1 н. HCl в течение 3 ч при 80° С, экстракты охлаждали, нейтрализовали NaHCO_3 , объединяли, диализовали, фильтровали и упаривали в вакууме до объема 100 мл. К полученному раствору приливали при перемешивании 10% водный раствор цетавлона (около 30 мл) до полного осаждения кислых полисахаридов. Осадок отделяли центрифугиро-

ванием, промывали водой и растворяли при перемешивании и осторожном нагревании до 60—70° С в 100 мл 4 М CaCl₂. Небольшой осадок отделяли центрифугированием, а к супернатанту приливали 4 объема этанола. Выпавший осадок отделяли, промывали этанолом, суспендировали в 100 мл дистиллированной воды и диализовали. По окончании диализа раствор фильтровали, концентрировали в вакууме и лиофилизовали, получали фукоидан F₂ (ср. [20—22]) в виде Са-соли (выход 0,86 г, 5,7%).

0,9 г F₂ хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом, как описано выше. Фракции, вымываемые 1,5 и 1,75 М NaCl, объединяли, получали фукоидан IV. Выход 0,5 г (55,5% от F₂). При хроматографировании этого препарата в тех же условиях получали фракцию IVa (элюция 1,5 М NaCl) с выходом 131 мг и IVб с выходом 341 мг (элюция 1,75 М NaCl), состав которых приведен в таблице.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Усов А. И., Иванова Е. Г. // Биоорг. химия. 1992. Т. 18. № 8. С. 1108—1116.
2. Усов А. И., Кошелева Е. А., Яковлев А. П. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 830—836.
3. Elyakova L. A., Zvyagintseva T. N. // Carbohydr. Res. 1974. V. 34. № 2. P. 241—248.
4. Shevchenko N. M., Zvyagintseva T. N., Elyakova L. A. // Carbohydr. Res. 1986. V. 148. № 1. P. 57—62.
5. Фаворов В. В. Исследование альгинов из моллюска *Littorina* sp. Дис. ... канд. хим. наук. Владивосток: ТИБОХ ДВНЦ АН СССР, 1974.
6. Оводов Ю. С., Хоменко В. А. // Химия природ. соед. 1969. № 2. С. 73—76.
7. Iizima-Mizui N., Fujihara M., Himeno J., Komiyama K., Umezawa I., Nagumo T. // Kitasato Arch. Exp. Med. 1985. V. 58. № 3. P. 15—27.
8. Maruyama H., Nakajima J., Yamamoto I. // Kitasato Arch. Exp. Med. 1987. V. 60. № 3. P. 105—121.
9. Nagumo T., Iizima-Mizui N., Fujihara M., Himeno J., Komiyama K., Umezawa I. // Kitasato Arch. Exp. Med. 1988. V. 61. № 1. P. 59—67.
10. Baba M., Nakajima M., Schols D., Pauwels R., Balzarini J., De Clercq E. // Antiviral Res. 1988. V. 9. № 6. P. 335—343.
11. Church F. C., Meade J. B., Treanor R. E., Whinna H. C. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 6. P. 3618—3623.
12. Dobashi K., Nishino T., Fujihara M., Nagumo T. // Carbohydr. Res. 1989. V. 194. P. 315—320.
13. Nishino T., Yokoyama G., Dobashi K., Fujihara M., Nagumo T. // Carbohydr. Res. 1989. V. 186. № 1. P. 119—129.
14. Nishino T., Kiyohara H., Yamada H., Nagumo T. // Phytochemistry. 1991. № 2. P. 535—539.
15. Nishino T., Nagumo T., Kiyohara H., Yamada H. // Carbohydr. Res. 1991. V. 211. № 1. P. 77—90.
16. Kitamura K., Matsuo M., Yasui T. // Agric. Biol. Chem. 1991. V. 55. № 2. P. 615—616.
17. Yamamoto I., Takahashi M., Suzuki T., Seino H., Mori H. // Jap. J. Exp. Med. 1984. V. 54. № 4. P. 143—151.
18. Nishino T., Aizu Y., Nagumo T. // Agric. Biol. Chem. 1991. V. 55. № 3. P. 791—796.
19. Nishino T., Nagumo T. // Nippon Nogeikagaku Kaishi. 1987. V. 61. № 3. P. 361—363.
20. Розкин М. Я., Левина М. Н., Ефимов В. С., Усов А. И. // Фармакол. и токсикол. 1988. Т. 51. № 4. С. 63—68.
21. Розкин М. Я., Левина М. Н., Каменева Н. С., Усов А. И., Ефимов В. С. // Фармакол. и токсикол. 1989. Т. 52. № 3. С. 48—51.
22. Розкин М. Я., Левина М. Н., Ефимов В. С., Усов А. И. // Фармакол. и токсикол. 1991. Т. 54. № 5. С. 40—42.
23. Mian A. J., Percival E. // Carbohydr. Res. 1973. V. 26. № 1. P. 133—146.
24. Whyte J. N. C., Southcott B. A. // Phytochemistry. 1970. V. 9. № 5. P. 1159—1161.
25. Grasdalen H., Larsen B., Smidsrod O. // Carbohydr. Res. 1981. V. 89. № 2. P. 179—191.
26. Anno K., Terahata H., Hayashi Y., Seno N. // Agric. Biol. Chem. 1966. V. 30. № 5. P. 495—499.
27. Слопекер Дж. Методы исследования углеводов / Пер. с англ. под ред. Хорлина А. Я. М.: Мир, 1975. С. 22—25.
28. Dodgson K. S., Price R. G. // Biochem. J. 1962. V. 84. № 1. P. 106—110.
29. Blumenkranz N., Asboe-Hansen G. // Anal. Biochem. 1973. V. 54. № 2. P. 484—489.
30. Peplow P. V., Somers P. J. // Carbohydr. Res. 1969. V. 9. № 1. P. 33—40.
31. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 3. P. 350—356.
32. Pacsu E., Rich F. V. // J. Amer. Chem. Soc. 1933. V. 55. № 7. P. 3018—3024.

Поступила в редакцию
25.XI.1993

A. I. Usov,* A. V. Kir'yanov

POLYSACCHARIDES OF ALGAE. 47. ISOLATION OF FUCOIDAN
FRACTIONS FROM THE BROWN SEAWEED
Laminaria cichorioides MIYABE

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 117913*

Key words: brown seaweed, *Laminaria cichorioides*, fucoidan.

D-Mannitol (yield 8.7% of dry biomass), laminaran (10.4%), sodium alginate (11.2%), and three fractions of fucoidan (11.2, 5.3, and 2.7%) were isolated by fractional extraction of the brown seaweed *Laminaria cichorioides*. The heterogeneity of the fucoidan preparations was demonstrated by ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex. A purified fucoidan with high fucose and sulfate content and low levels of other neutral monosaccharides and uronic acids was isolated by a simplified procedure using extraction of the seaweed with diluted hydrochloric acid followed by precipitation with Cetavlon and chromatography on DEAE-Sephadex.

* Author for correspondence.