



## 太湖蓝藻素—从太湖蓝藻水华中分离得到的天然胰蛋白酶抑制剂<sup>△</sup>

敖宗华<sup>1</sup>,陶文沂<sup>1</sup>,许正宏<sup>1</sup>,孙徽<sup>1</sup>,吴厚铭<sup>2</sup>

(1. 江南大学 生物工程学院生物制药研究室,无锡 214036;

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

**摘要:**通过各种层析方法,从太湖蓝藻水华中分离得到多种胰蛋白酶抑制剂。用质谱和核磁共振测定了其含量最多组分——太湖蓝藻素的结构,确定与 acruginosin 98-A 同质。这是首次发现该物质在太湖蓝藻水华中存在。

**关键词:**太湖蓝藻素;天然胰蛋白酶抑制剂

**中图分类号:**R931.711 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-3461(2001)06-0004-05

### Taihunosin, A Natural Trypsin Inhibitor from the Water Bloom in Taihu Lake

AO Zong-hua, TAO Wen-yi, XU Zheng-hong, *et al.*

(Laboratory of Biopharmacy, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

**Abstract:** By chromatography, a few trypsin inhibitors have been separated from the water bloom in Taihu Lake. The structure of Taihunosin (the compound that has the highest content) has been determined by MS and NMR. Taihunosin has the same structure as acruginosin 98-A. It is the first time found that such compound is in the water bloom from the Taihu Lake.

**Key words:** Taihunosin; natural trypsin inhibitor

太湖蓝藻水华是微囊藻属蓝藻爆发形成的。近 10 年来,从微囊藻属蓝藻水华和实验室培养样品中分离得到多种酶抑制剂。日本、德国、美国对该属蓝藻开展了广泛的研究,日本国立环境研究所(NIES)对其研究较系统,建立了多种微囊藻属蓝藻株系并筛选得到多种结构新颖、活性较高的多肽类酶抑制剂<sup>[1]</sup>,国内尚未见相关报道。

本研究希望从太湖蓝藻水华中寻找可用作新型药物的先导化合物,为新药的研究与开发打下理论基础,如开发新药成功,可提高蓝藻水华的经济价值,为大规模收集蓝藻水

华或利用富营养化污水培养蓝藻提供了可能,对治理淡水污染具有较高的环保价值。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 样品与试剂

太湖蓝藻水华为 1998 年 8 月采集,通过抽滤去除水分。

乙醇、氯仿为工业级,其它试剂为分析纯;ODS 反相硅胶(Merck,45 $\mu$ m)。

分离纯化所得各组分的活性测定所用胰蛋白酶(1:250,336u/mg,华美生物工程公司),底物为 TAME(Na-Toluene-P-Sulpho-

nyl-L-arginine methyl ester hydrochloride, L-Na-对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯盐酸盐·上海丽珠东风生物技术有限公司)。

### 1.2 太湖蓝藻水华粗品的制备

样品:乙醇 1:1(v/v)浸提 2 次,每次 24h,合并浸提液,过滤得清液→真空减压浓缩,氯仿:浓缩相 1:1(v/v)萃取 2 次,再以正丁醇:萃余相 1:1(v/v)萃取 3 次,减压浓缩得正丁醇相,浓缩、干燥得粗品。

### 1.3 分离纯化

正丁醇粗品水溶解,ODS 反相硅胶吸附→分别用 10%~40%CH<sub>3</sub>CN+0.1%TFA 和甲醇洗脱→各梯度洗脱组分分别测定胰蛋白酶抑制活性→选取活性最强组分进行 HPLC 制备分离。

制备所用 HPLC 仪器为 Waters<sup>TM</sup>650E, Advanced Protein Purification System (Waters)。柱为 μBONAPAK<sup>TM</sup>C<sub>18</sub>, 1cm×30cm (Waters)。流速为 5mL·min<sup>-1</sup>,紫外检测波长为 220nm。采用梯度洗脱,A 液为 10% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, B 液为 40% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, 0~40min, 0%~35%B; 40~65min, 35%~65%B; 65~75min, 65%B; 75~85min, 65%~100%B。

### 1.4 胰蛋白酶抑制活性测定

参照 Worthington 法<sup>[2]</sup>作了改进。

### 1.5 结构测定

结构测定采用质谱仪器为 QUATRO, 电离方式为 ESI, 红外光谱(IR); 美国 Amalacet-RFX-65 型红外仪; 核磁共振仪器为 Unity INOVA-600。

## 2 结果与讨论

### 2.1 太湖蓝藻素的分离纯化

ODS 层析结合胰蛋白酶抑制活性追踪, 得到一活性最强组分 bc2, 其 HPLC 分离纯化如图 1 所示。

通过对图中各组分分别进行的胰蛋白酶抑制活性测定, 发现其中多种成分有胰蛋白

酶抑制活性。其中第六种成分 bc26 具有很强的胰蛋白酶抑制活性, 其 IC<sub>50</sub> 为 0.05mg·L<sup>-1</sup>, 将其命名为太湖蓝藻素。由以上的分离纯化流程可以看出, 太湖蓝藻水华含有多种胰蛋白酶抑制剂。

### 2.2 太湖蓝藻素的结构确定

太湖蓝藻素为白色粉末, 相对分子质量为 689 (EI-MS)。IR 谱在 1500cm<sup>-1</sup>, 1450cm<sup>-1</sup>, 有强吸收, 这是由芳香化合物平面骨架振动引起的。在 1670cm<sup>-1</sup>处有强吸收, 说明分子中含有 δ-内酰胺。在 1204cm<sup>-1</sup>有强吸收, 这是由 S→O 伸缩振动引起的, 在 800~600cm<sup>-1</sup>处有较强吸收, 这是由 C→Cl 伸缩振动引起的。

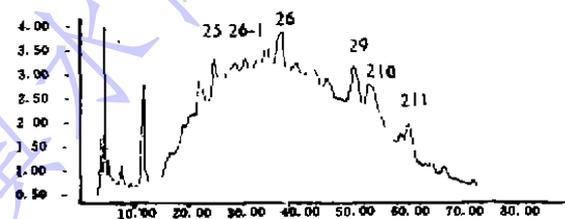


图 1 bc2 的 HPLC 分离纯化图谱  
Fig. 1 The HPLC chromatography of bc2

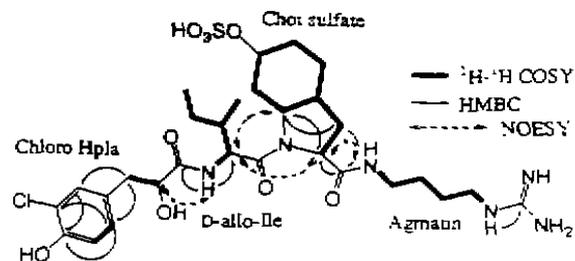


图 2 太湖蓝藻素的<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC 和 NOESY 关系

Fig. 2 The relationship of <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC and NOESY in Taihuosin

对照 HMQC 谱和<sup>1</sup>H 谱中的积分值, 发现 δ7.774 和 δ7.420 的氢信号为酰胺质子, 然后用<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 将两-NH-基团及其间的 4 个-CH<sub>2</sub>-基团连接起来。同理, allo-Ile 和 Choi Sulfate 的结构也可以照此推导出来, 具

体结果在图 2 中用粗线条标出。依据 HMBC 谱,可以找到 Chloro-Hpla 的各碳原子之间的连接。此外,allo-Ile 的-NH-所连接的-CO-,Choi Sulfate 的-NH-所连接的-CO-也可以找到。从 NOESY 谱中可以看出 Chloro Hpla 的 2 号碳原子( $\delta 71.659$ )上的质子

( $\delta 1.092$ )与 allo-Ile 的酰胺质子( $\delta 7.32$ )有相关信号,说明二者的空间位置相邻。同理可将各残基连接起来。以上的图谱解析总结于图 2 中。

太湖蓝藻素的  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ )数据与 aeruginosin 98-A 比较如表 1。

表 1 太湖蓝藻素与 aeruginosin 98-A 的  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ )数据比较

基团	碳编号	aeruginosin 98-A	Taihunasin	基团	碳编号	aeruginosin 98-A	Taihunasin
Chloro Hpla	1	172.3	172.322	Choi Sulfate	1	171.5	171.516
	2	71.7	71.659		2	59.9	59.850
	3	38.7	38.213		3	30.6	30.576
	4	129.6	129.627		3a	35.9	35.837
	5	130.7	130.645		4	19.3	19.319
	6	118.9	118.879		5	23.4	23.378
	7	151.4	151.293		6	71.0	70.782
	8	116.1	116.079		7	31.6	31.552
	9	129.2	129.189		7a	54.0	53.981
Allo-Ile	1	168.7	169.012	Agmatin	1	37.9	37.817
	2	52.5	52.610		2	25.9	25.811
	3	37.5	37.379		3	26.2	26.164
	4	25.8	25.754		4	40.3	40.391
	5	11.8	11.768		C=N	156.6	156.539
	6	13.7	13.733				

从以上数据可以确定,太湖蓝藻素与 aeruginosin 98-A 同质。现将 aeruginosin 98-A 的结构表示于图 3。

外产生的蓝藻水华中筛选多种酶抑制剂或将产生水华的蓝藻进行引种驯化,人工培养,可望开辟一新药先导化合物来源的崭新领域。

致谢:本课题无锡林洲喷雾干燥机厂在喷雾干燥,中科院上海有机所红外光谱组和生命有机国家重点实验室核磁共振组和质谱组进行了相关谱图的测定,在此一并致谢。

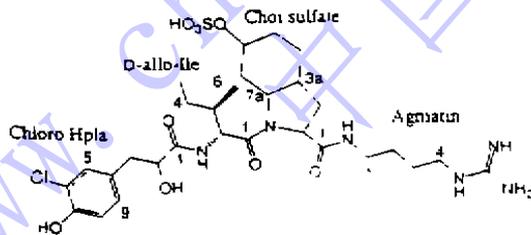


图 3 aeruginosin 98-A 的结构<sup>[1]</sup>

Fig. 3 The structure of Aeruginosin 98-A

aeruginosin 98-A 首先是日本国立环境研究所用保存的铜锈微囊藻株系通过实验室室内培养得到的<sup>[3]</sup>。本研究是首次在太湖蓝藻水华中首次发现该化合物。

我国地域辽阔,各地的生态环境存在较大的差异。同时,形成水华的蓝藻会有不同的株系,甚至可能为不同的种。因此,从我国野

## 参考文献

- [1] 敖宗华,陶文沂,许正平,等.微囊藻属多肽类酶抑制剂研究进展[J].天然产物研究与开发,2000,12(4):79.
- [2] B.施特尔马赫著,钱嘉渊译.酶的测定方法[M].北京:轻工业出版社,1992.
- [3] Murakami M,Ishida K,Okino T,et al. Aeruginosins 98-A and B, Trypsin Inhibitors from the Blue-Green Alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-98)[J]. *Tetrahedron Letters*, 1995,36(16):2785.



