

多糖的化学修饰研究进展

刘占峰, 孙汉文

(河北大学 化学与环境科学学院 河北省分析科学与技术重点实验室 河北 保定 071002)

摘要 引用 41 篇文献介绍了多糖的化学修饰技术, 综述了硫酸化多糖、硒硫酸酯多糖和硒化多糖的制备、纯化与分析研究进展。

关键词 硫酸化多糖 硒化多糖 硒硫酸酯多糖 化学修饰

中图分类号 O 629.12 **文献标识码** A **文章编号** 1000-156X(2005)01-0104-05

多糖类是生物体内除蛋白质和核酸外又一类重要的生物大分子, 具有抗感染、免疫促进、肿瘤防治、病毒性肝炎、类风湿症、艾滋病等免疫损伤或免疫缺损症和抗氧化等多方面功能和生物活性。具有生物学功能的多糖又被称为“生物应答效应物”(biological response modifier, BRM)或活性多糖。影响多糖生物学活性的结构因素包括多糖的主链性质、支链性质和多糖分子的高级结构, 其中多糖主链的糖单元组成、糖苷键类型均直接决定多糖的活性, 多糖支链的类型、聚合度、支链在多糖链上的分布及其取代度决定了多糖的活性大小, 多糖分子的高级结构如链的柔韧性和空间构像与多糖的活性紧密相关^[1]。为提高多糖的生物活性, 多糖的分子修饰和结构改造具有重要意义。近年来, 有关多糖的分子修饰研究已大有进展。利用糖残基上的羟基、羧基、氨基等基团运用化学方法进行修饰, 有可能提高多糖的活性。修饰的方法很多, 有硫酸化、羧甲基化、硒化、甲基化、氧化、部分水解、磷酸酯化、双基团衍生化等^[2-4]。

1 硫酸化多糖

硫酸化多糖也称多糖硫酸酯或硫酸酯多糖, 是指糖羟基上带有硫酸根的多糖, 是抗病毒多糖中研究最多的一类天然或化学修饰多糖, 包括从动、植物中提取的各种硫酸多糖、肝素、天然中性多糖的硫酸衍生物及人工合成、半合成的各种硫酸多糖, 如硫酸葡聚糖、硫酸戊聚糖、硫酸木聚糖、硫酸香菇多糖、岩藻依聚糖、卡拉胶硫酸软骨素等。硫酸多糖因具有广泛的生物学性质, 包括抗病毒、抗肿瘤、抗艾滋病、对免疫系统作用和抗凝活性, 而受到极大关注^[5-10]。方积年曾评述了硫酸酯化多糖的研究进展^[11]。常用的多糖硫酸酯化方法有浓硫酸法、三氧化硫-吡啶法和氯磺酸-吡啶法。氯磺酸-吡啶法产物回收方便, 收率较高。

鲨鱼软骨多糖(SCAMP)属氨基多糖, 是类硫酸软骨素 D 类物质, 在许多动物和人体的生理和病理过程中起重要作用。近 10 年来发现, 多糖经硫酸酯化后, 本身富含 SO_4^{2-} , 易与蛋白质的特定结构域结合, 由此改变其构像并影响其功能。李东霞等采用氯磺酸-吡啶法对多糖进行化学修饰^[12]。取 10 mL 吡啶置于烧杯中, 冰盐浴, 在搅拌条件下缓慢加入 10 mL 氯磺酸, 控制滴加速度使温度保持在室温以下, 得白色粘稠物质磺化试剂。取 0.5 g SCAMP-F2, 置于 20 mL 无水甲酰胺中, 室温搅拌 0.5 h, 加 10 mL 磺化试剂, 沸水浴 1 h, 中间不停搅拌, 冷却后加水 20 mL, 2~5 mol/L NaOH 中和脱氨。脱氨至中性后, 将溶液移入透析袋, 双蒸水透析 3 d, 充分清除小分子物质, 3 倍无水乙醇沉淀, 得纯化 SCAMP 硫酸酯化多糖衍生物^[13]。

多糖作为继蛋白质、核酸之后的又一类信息分子, 由于其结构的不均一性, 如相对分子质量的不均一性,

组成、极性、末端结构的不均一性,因而对其进行纯化及纯度鉴定非常困难。总的说来其纯化方法有有机溶剂沉淀、季铵盐沉淀、离子交换及亲和层析等,而离子交换是最常用的一种方法。多糖的纯度检测方法有旋光测定法、凝胶过滤法、高压电泳法及冻融离心法等。选用 Sepharose-4B 分离纯化 SCAMP,得到 2 个组分 SCAMP-F1 和 SCAMP-F2,用凝胶层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳、冻融离心对 SCAMP-F2 进行纯度鉴定,认为 SCAMP-F2 为单一组分。然后用吡啶-氯磺酸磺化试剂制备 SCAMP-F2 的硫酸酯化多糖,得到 SO_4^{2-} 质量分数为 19.6 % 的硫酸酯化多糖,比未硫酸酯化前增加 6.1 %。红外光谱和核磁共振碳谱分析结果表明,硫酸基取代在 C-6 位上。

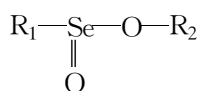
鉴别多糖硫酸酯包括 2 个方面:1)肯定多糖分子上存在硫酸基,可用 BaCl_2 -明胶比浊法确定 SO_4^{2-} 的含量,或者用 IR 检查是否有硫酸基团的特征光吸收;2)确定硫酸酯化多糖衍生物上的硫酸基取代位置,可以采用甲基化分析和核磁共振方法。一般认为在甲基化过程中,强碱试剂容易造成硫酸基的脱落,该法不适合于硫酸基取代位置的确定。而 ^{13}C -NMR 化学位移范围较 ^1H -NMR 为广,其化学位移可达 200,所以共振讯号分得开,不但能确定各种碳的位置,而且还能区别分子的构型和构象,可以说是鉴别多糖硫酸基位置的一种较好的方法。

2 硒化多糖

多糖和硒对许多疾病都有防治作用,近年来对多糖和硒活性的研究已经较为深入,但将多糖与硒有机结合成为硒多糖,国内外的研究尚处于起步阶段。硒多糖的化学结构有别于普通多糖,形成了特殊的硒氧键,硒多糖具有多种生理活性,可通过提高相关酶的活性来拮抗重金属中毒和抗活性氧损伤的能力,可使癌细胞 DNA 合成受阻而抑制癌细胞生长等。崔乔等综述了硒多糖的研究进展^[14]。硒元素是生命活动的必需元素,其存在形式有无机硒和有机硒 2 种,常见的无机硒有亚硒酸钠和硒酸钠,有机硒主要是硒蛋白和硒多糖。硒能构成若干氧化酶的活性中心,可增强机体的抗氧化能力和对相关疾病的抵抗能力,这说明了硒与人体健康的直接关系。多糖具有多种生理功能,与抗衰老、防治癌症等密切相关。无机硒具有蓄积性毒性和致突变作用,使用时剂量难以控制,而有机硒的毒性低、副作用小,不但能够更好地发挥硒的作用,而且在激发免疫反应上比无机硒显著,因此,将无机硒与多糖有机结合使之转化为有机硒化合物——硒多糖,将会使硒和多糖的生理和药理功能得到优化。

天然硒多糖分布于许多动植物和微生物体内,尤其是在植物体内存在硒多糖已经得到证实。但是天然硒多糖在生物体内的含量甚微,这使得硒多糖的研究受到了一定限制。近年来,人们通过人工方法获取硒多糖,即在适宜培养条件下将无机硒添加到真菌、藻类等的培养基中,通过真菌、藻类等的生长代谢,对硒进行富集和生物转化来获得硒多糖^[14-17]。

目前,成功获得的人工合成的硒多糖和天然硒多糖有灵芝硒多糖、香菇硒多糖、螺旋藻硒多糖、箬叶硒多糖和大蒜硒多糖等。此外,还可利用多糖硒化、化学合成等方法获取硒多糖。唐家骏等已经用硒粉和角叉菜胶合成了一种新的有机硒多糖——硒化角叉菜胶。龚晓钟等^[18]从黄芪根中提取出的黄芪多糖 II,为 D-葡聚糖,其结构单一,平均相对分子质量为 12 300。黄芪多糖又比黄芪具有更显著的生物活性,是黄芪促蛋白质更新的有效成分。对黄芪多糖 II 进行硒化反应后,得到硒与黄芪多糖 II 药疗营养作用合二为一的硒化黄芪多糖 II,使有毒的硒元素成为对人体有营养作用的有机硒。为进一步确证硒化黄芪多糖 II 的结构及药疗营养作用,用 D-葡聚糖进行硒化反应,得到含硒量为 $6\,037\,\mu\text{g/g}$ 的硒化葡聚糖。通过紫外光谱、红外光和 ^{13}C -NMR 的分析,得到与测定硒化黄芪多糖 II 基本一致的结果,确定了硒多糖的结构就是形成五员环的亚硒酸酯(1.2 和 6.6 位),并用硒化葡聚糖在小鼠上进行药效实验,发现其具有广泛免疫作用。龚晓钟^[19]从黄芪中提取出结构单一且具有生物活性的黄芪多糖 II 后,利用具有酰氯结构的硒试剂(SeOCl_2)分别与自制黄芪多糖 II 和 D-葡聚糖进行硒化反应,制备出高含硒量的硒化黄芪多糖与硒化葡聚糖。硒多糖的结构特征为:硒作为硒



多糖的特征性部分,在多糖中的存在式可能有一SeH和

2 种^[13]。实验表明,一种灵芝硒多

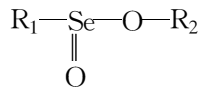
糖是以 α -糖苷键合成的吡喃多糖,由 Glu(葡萄糖)、Man(甘露糖)、Xyl(木糖)和 Rha(鼠李糖)组成,其中硒的存在方式可能是 $O=Se=O$ ^[20]。

硒化多糖的分离纯化与一般多糖的分离纯化方法相似,通常用水或碱提取,经乙醇沉淀后得到粗硒多糖^[17]。硒多糖再进行脱蛋白和脱色处理。脱蛋白可以采用 Sevag 法或蛋白酶法^[21],目前通常将两法交替使用。除蛋白的效果比较理想。硒多糖脱色一般采用传统的活性炭法和过氧化氢脱色法,如果色素是结合在硒多糖上的,用活性炭处理会大量吸附硒多糖,使硒多糖严重损失,此时应采用过氧化氢脱色法,即采用质量分数为 10% 的过氧化氢在 40℃ 脱色 5 h,用盐酸和氨水调整 pH 值。脱色脱蛋白后的硒多糖呈白色或淡黄色,易溶于热水或热碱,该硒多糖经过 DEAE-cellulose 52, Sephadex 或 Sepharose 柱色谱^[20]即可得到较纯的硒多糖。硒多糖的纯度分析可采用高效液相色谱(HPLC)、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)等方法^[22],但为了保证测定结果的准确性,尽量减小误差,需要有 2 种以上方法的测定结果方可确认其纯度。

硒多糖的含糖量可用苯酚-硫酸法测定^[23],相对分子质量可用排阻色谱、SDS-PAGE 等方法测定^[24-25],单糖组成可用酸水解、纸色谱、HPLC 等方法分析^[24-26],吡喃环或呋喃环形式可用红外光谱分析^[27],用糖苷酶水解、核磁共振、激光拉曼光谱等方法分析硒多糖的 α -、 β -异构^[28-29],硒多糖中羟基的被取代情况可用甲基化反应、Smith 降解等方法分析,分析硒多糖中糖链-肽链结合方式可以采用单糖与氨基酸组成分析和稀碱水解、胍解反应等方法^[30]。

硒多糖中硒含量的测定可用荧光分光光度法、ICP 法和原子吸收光谱法^[31-33]等。

通过对硒多糖的分析发现,硒多糖的单糖组成一般分为 2 类:1)单一聚糖;2)由 Gal(半乳糖)、Glu(葡萄糖)、Rha(鼠李糖)、Xyl(木糖)、Fuc(岩藻糖)和 Man(甘露糖)等多种单糖中的几种组成的杂聚糖。各种单糖一般以 D2 构型存在,它们在硒多糖分子中的比例也不尽相同。多数硒多糖为 β 2 构型, α 2 构型的硒多糖也有发现。硒多糖的主链一般是由 1→3 糖苷键键合而成,支链形式多样,如以 D2 葡萄糖残基、 β 2 D2 葡萄糖醛酸残基、 β (1→6)-D-葡萄糖残基、 β (1→2)-D-木糖残基等作为支链。其他键合方式,如 1→2 糖苷键、1→4



糖苷键较为少见。硒作为硒多糖的特征性部分,在硒多糖中的存在形式可能有一SeH 和 $O=Se=O$ 2 种^[34]。实验表明,一种灵芝硒多糖是以 α -糖苷键合成的吡喃多糖,由 Glu、Man、Xyl、Gal 和 Rha 组成,其中硒的存在方式可能是 $O=Se=O$ ^[20]。大蒜硒多糖的平均相对分子质量为 15 000,其水解产物经 HPLC 和纸色谱分析,证明大蒜硒多糖含硒量约为 12 μ g/g,其中硒可能以硒酸酯形式存在^[35]。箬叶硒多糖是一种硒酸酯多糖^[34]。螺旋藻硒多糖相对分子质量为 12 590,由 D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖和 D2 葡萄糖醛酸组成。目前,已有几种硒多糖作为商品上市,其中一种海藻硒化低聚多糖的结构已有了明确的模型。

大量实验证明,硒参与多种酶的组成与代谢过程,具有防癌抗癌、延缓衰老、增强机体免疫力等生理功能。多糖具有复杂的生物活性,是一种广谱的免疫促进剂,具有免疫调节功能,而且有抗感染、抗放射、抗凝血、调节细胞生长与衰老、控制细胞分裂与分化、促进核酸与蛋白质的生物合成等作用^[36]。硒多糖作为一种有机硒化合物,兼有多糖与硒二者的活性,是生物体将无机硒转化成有机硒的有效形式之一。研究证明,硒多糖的生物活性普遍高于多糖和硒,更易于为机体吸收和利用^[34-37]。

总之,通过近年来对硒多糖的研究分析,人们已逐步了解了硒多糖的一些功能,但是硒多糖的全部功能和生化特性尚未完全清楚,尤其是在硒多糖的分子生物学研究、构效关系以及作用机制等方面的直接证据和实验更是不足,因此对硒多糖的深入研究是非常必要和非常重要的,硒多糖类药品和保健品的开发研制也具有良好的社会效益和经济效益。

3 硒硫酸酯多糖

硒硫酸酯多糖是利用天然硫酸酯多糖将其中部分硫用硒取代而半合成的有机硒化合物,由我国首次合成。研究发现,它可提高血液谷胱甘肽过氧化物酶的活力、血红蛋白的含量、红细胞对 H_2O_2 的稳定性及抗自由

基的能力^[38],还发现它能增强机体的免疫功能^[39].有关硒的抗癌、防癌作用的研究也已有报道^[40-41].

参 考 文 献:

- [1] 王兆梅,李琳,郭祀远,等.活性多糖构效关系研究评述[J].现代化工,2002,22(8):18-21.
- [2] 吴立根,毛文君.衍生化多糖的生物活性研究进展[J].海洋科学,2002,26(5):23-25.
- [3] DACE R. Comparison of the anticoagulant action of sulfated and phosphorylated polysaccharides[J]. Thrombosis Research, 1997, 87(1):113-121.
- [4] 邓成华,杨祥良,王雁,等.硫酸酯化及羧甲基化虎奶多糖的抗病毒作用[J].中国地方病学杂志,2000,19(4):251-253.
- [5] 王长云,管华诗.多糖抗病毒作用研究进展 II——硫酸多糖抗病毒作用[J].生物工程进展,2000,20(2):3-8.
- [6] GARIC G. Biological and chemical characterization of the fraction with antiherpetic activity from *Achyrocline flaccida*[J]. Planta Medica, 1999, 65:343-346.
- [7] HATTORI K. Synthesis of sulfonated aminopolysaccharides having anti-HIV and anticoagulant activities[J]. Carbohydr Res, 1998, 312:1-8.
- [8] KATSURAYA K. Synthesis of sulfonated oligosaccharide glycosides having anti-HIV activity and the relationship between activity and chemical structure[J]. Carbohydr Res, 1999, 315:234-242.
- [9] CARO A D. Fraction of chemically over sulphated galactosaminoglycan sulphates in inhibit three enveloped virus: human immunodeficiency virus type 1, herpes simplex virus type 1 and human cytomegalovirus[J]. Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 1999, 10:33-38.
- [10] 魏经建,邵树军,王天元.硫酸酯化多糖化学及临床应用研究进展[J].中国生化药物杂志,1999,20(5):260-262.
- [11] 方积年.硫酸酯化多糖的研究进展[J].中国药学杂志,1993,28(7):393-395.
- [12] 李东霞,张双全,刘平. SCAMP 硫酸酯化多糖的制备及其光谱鉴定[J].光谱学与光谱分析,2002,22(1):59-62.
- [13] 王顺春,方积年.香菇多糖硫酸化衍生物的制备及其结构分析[J].生物化学与生物物理学报,1999,31(5):594-597.
- [14] 崔乔,尚德静,邹霞.硒多糖的研究进展[J].中国生化药物杂志,2003,24(3):155-157.
- [15] MIERSCH J, TSCHIMEDBALSHIR M, BARLOCHER F, et al. Heavy metals and thiol compounds in *Mucor racemosus* and *Articulospora tetracladia*[J]. Mycol Res, 2001, 105(7):883-889.
- [16] 张新宇,王雷,李光友,等.绿色巴夫藻硒多糖的提取分离与纯化[J].海洋与湖沼,2000,31(6):643-646.
- [17] STAAF M, YANG Z N, HUTTUNEN E, et al. Structural elucidation of the viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* Lb16[J]. Carbohydrate Research, 2000, 326:113-119.
- [18] 龚晓钟,欧阳政,蔡端仁.富硒茶叶和富硒大蒜中硒的有机形态[J].天然产物研究与开发,1996,8(1):59-62.
- [19] 龚晓钟.硒化黄芪多糖与硒化葡聚糖的研究——硒化条件选择[J].深圳大学学报,1997,14(14):68-75.
- [20] 尚德静,崔乔,高林.灵芝硒多糖 SeGLP-1 抑制小鼠肝腹水癌作用的研究[J].食用菌学报,2001,3:34-38.
- [21] SATTO K, NISHIJIMA M, MIYAZAKI T. Structural analysis of an acidic polysaccharide from *Ganoderma lucidum* (Studies on Fungi Polysaccharide XXXV)[J]. Chem Pharm Bull, 1989, 37(11):31-34.
- [22] SCHAFFER C, MULLER N, CHRISTIAN R, et al. Complete glycan structure of the S-layer glycoprotein of *Aneurinibacillus thermoaerophilus* GS4-9[J]. Glycobiology, 1999, 9(4):407-414.
- [23] YAMAMOTO Y, MUROSAKI S, YAMAUCHI R, et al. Structural study on an exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* TY1-2[J]. Carbohydrate Research, 1994, 261:67-78.
- [24] VINCENT S J F, FABER E J, NEESER J R, et al. Structure and properties of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus macedonicus* Sc136[J]. Glycobiology, 2001, 11(2):131-139.
- [25] MARSHALL M V, DUNN H, ELVIN M, et al. Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* EU20[J]. Carbohydrate Research, 2001, 331:413-422.
- [26] YANG Z, STAAF M, HUTTUNEN E, et al. Structure of a viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* K16[J]. Carbohydrate Research, 2000, 329:465-469.
- [27] GUERARDEL Y, MORELLE W, PLANCKE Y, et al. Structural analysis of three sulfated oligosaccharides isolated from human milk[J]. Carbohydrate Research, 1999, 320:230-238.
- [28] DAS M T, RAO P C, KOLEHMAINEN E. Interaction of metal ions with N-glycosylamines: isolation and characterization of the

- products of 4 β -O-Benzylidene-N-(O-carboxyphenyl)- β -D glucopyranosylamine with different metal ions[J]. Carbohydrate Research, 2001, 335: 151–158.
- [29] 盛家荣, 曾令辉, 翟春, 等. 多糖的提取分离及结构分析[J]. 广西师院学报(自然科学版), 1999, 16(4): 49–54.
- [30] YAMAMOTO Y, NANOME T, YAMAUCHI R, et al. Structure of an exocellular polysaccharide of *Lactobacillus helveticus* TY-4, a spontaneous mutant strain of *Lactobacillus helveticus* TY1-2[J]. Carbohydrate Research, 1995, 275: 319–322.
- [31] 彭琨, 吴珩. 原子荧光法测定食品中砷和硒[J]. 理化检验—化学分册, 2000, 36(12): 557–558.
- [32] 傅明, 陈新焕, 杨万彪, 等. 微波消解 ICP–AES 法测定茶叶中铅、砷、铜、铁、锌、硒等 12 种元素的含量[J]. 食品科学, 2001, 22(11): 76–78.
- [33] 周林爱, 曹民杰, 汤楠. 石墨炉原子吸收法测定灵芝孢子粉中的痕量硒与锗[J]. 分析试验室, 2001, 20(4): 87–89.
- [34] 黄峙, 郑文杰, 郭宝江, 等. 含硒生物大分子化合物研究进展[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2001, 19(2): 169–175.
- [35] 徐辉碧, 黄开勋, 高中洪. 硒蛋白与硒多糖[J]. 科学, 1997, 49(5): 22–25.
- [36] 周鹏, 谢明勇, 傅博强. 多糖的结构研究[J]. 南昌大学学报(理科版), 2001, 25(2): 197–204.
- [37] 唐福, 周静, 谷连坤, 等. 富硒大蒜对体内外人胃癌细胞生长的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23(6): 461–464.
- [38] 唐家骏, 芮海风. 硒化角叉菜胶的制备及其理化性质和生化活性研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1988, 20(3): 259–267.
- [39] 戴伟娟, 索金良, 林志彬. 4—(代)硒硫酸酯多糖体外给药的免疫药理学研究[J]. 北京医科大学学报, 1994, 26(2): 83–86.
- [40] MAR JORY S STEWART, JULLAN E SPALLHOLZ, KENNETH NELDNER, et al. Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis[J]. Free Radical Biology & Medicine, 1999, 26(1/2): 42–48.
- [41] ALAEJOS M SANZ, DIAZ ROMERO F J, ROMERO C DIAZ. Selenium and cancer: some nutritional aspects[J]. Nutrition, 2000, 16: 376–383.

Progress of the Research on Chemically Modifications of Polysaccharide

LIU Zhan-feng, SUN Han-wen

(Key Laboratory of Analytical Science and Technology of Hebei Province,
College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract The progress of research on chemically modifications of polysaccharide was reviewed. The preparation, purification and structural analysis of sulfated polysaccharides, selenopolysaccharides and sulfated polysaccharides containing selenium were described.

Key words : sulfated polysaccharides; selenopolysaccharides; sulfated polysaccharides containing selenium; chemically modifications

(责任编辑 赵藏赏)