

• 综 述 •

多糖化学结构修饰方法的研究进展

申林卉^{1,2}, 刘丽侠^{1,2}, 陈冠^{1,2}, 陶遵威^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300073

2. 天津市医药科学研究所, 天津 300020

摘 要: 多糖是一类重要的生物大分子物质, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、免疫活性调节等生物活性。多糖的生物活性与其结构有直接关系, 因而对多糖结构通过适当的方法进行修饰是目前多糖领域研究的重要方向之一。简要地阐述多糖的化学修饰方法(包括硫酸化、羧甲基化、乙酰化和磷酸化等)研究进展, 以及修饰后对生物活性的影响, 以期为新药发现提供依据。

关键词: 多糖; 多糖硫酸化; 多糖羧甲基化; 多糖乙酰化; 多糖磷酸化; 化学修饰; 生物活性

中图分类号: R284.3 R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2013)06-0465-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.06.016

Research progress in structural modification of polysaccharide

SHEN Lin-hui^{1,2}, LIU Li-xia^{1,2}, CHEN Guan^{1,2}, TAO Zun-wei²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300073, China

2. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

Abstract: Polysaccharide is an important class of biological macromolecules. It has a variety of biological activity, such as antitumor, antiviral, anti-oxidation, immune activity regulation, and so on. The biological activity of polysaccharide has a direct relationship with its structure. Thus the structural modification of polysaccharide by an appropriate method is one of the important directions of research in the field of polysaccharides. This article systematically elaborated the structural modification methods and research progress on the polysaccharide including chemical, biological, and physical methods, as well as the impact on the biological activity.

Key words: polysaccharide; polysaccharide sulfation; polysaccharide carboxymethylation; polysaccharide acetylation; polysaccharide phosphorylation; chemical modification; biological activities

多糖(polysaccharides)是存在于多种有机体内的一类生物大分子物质, 具有抗肿瘤、增强免疫、抗氧化、抗风湿和预防艾滋病等作用^[1]。多糖生物活性的发挥与其结构有关, 因而对多糖结构进行适当修饰是多糖领域研究的重点方向之一。多糖的结构修饰是指通过物理、化学等手段对其分子结构进行适当的修饰, 从而获得理化性质改变甚至产生新的生物活性的多糖衍生物^[2]。本文主要阐述近年来对多糖结构修饰化学方法的研究进展, 并简要分析修饰前后其生物活性的变化, 以期为今后在生物和医药领域应用多糖提供一定的理论依据。

目前对多糖进行化学修饰的常见方法有硫酸

化、羧甲基化、乙酰化、烷基化、磷酸化等。其中硫酸化和羧甲基化在生产中应用得最广泛, 即通过将所取代基团连接到原有多糖糖残基上的羟基、羧基、氨基等位置, 对多糖进行分子结构表面修饰。

1 多糖的硫酸化修饰

多糖硫酸化修饰是将多糖溶液与相应的硫酸化试剂在一定条件下反应, 使得硫酸基团取代多糖部分残基上的羟基。硫酸化修饰是多糖支链修饰中最广泛应用的方法之一, 硫酸化多糖最突出的特点就是其具有很好的抗病毒活性, 目前也已大量投入生产, 这也是把它作为研究和应用最多的一类多糖衍生物的主要原因之一。天然硫酸多糖具有明显的

收稿日期: 2013-07-03

作者简介: 申林卉(1989—), 女, 河北石家庄人, 在读硕士研究生, 主要从事药物化学研究。Tel: 15222863112 E-mail: 1010324159@qq.com

*通信作者 陶遵威 Tel: (022)27236182 E-mail: taozunwei@yahoo.com.cn

抗病毒活性,包括抗艾滋病毒、流感病毒等,因此得到了人们的广泛关注^[3-5]。通过硫酸化修饰后的香菇多糖,不仅增强了原有的抗肿瘤、抗凝血和免疫调节等活性,并且还产生了抗艾滋病毒的新功效^[6]。

1.1 硫酸化修饰方法

多糖硫酸化修饰常用的方法有氯磺酸-吡啶法、浓硫酸法、氨基磺酸-甲酰胺法及三氧化硫-二甲基甲酰胺法等,前3种应用较多。

1.1.1 氯磺酸-吡啶法 氯磺酸-吡啶法是吡喃型多糖常用的硫酸化修饰法。将一定量的氯磺酸加入到装有吡啶的三颈烧瓶中,置于盐水-冰浴中搅拌;然后加入原料糖,于沸水浴中恒温搅拌1 h左右;反应液进行中和,透析,浓缩,醇沉,沉淀物经冷冻干燥后得终产物,此法反应较为彻底,产物回收率较高^[7]。沈赞等^[8]采用氯磺酸-吡啶法对螺旋藻中性多糖进行硫酸化修饰,并通过玫瑰酸钠法测定了修饰前后硫酸根的量分别为0.17%、20%;硫酸根取代度为0.429。王文侠等^[9]以豆渣为原料,采用氯磺酸-吡啶法制备硫酸酯化豆渣多糖,产物的取代度为2.15;采用比色法研究硫酸化豆渣多糖对羟基自由基及DPPH·自由基的清除作用,结果该多糖对自由基的清除作用比未酯化前豆渣多糖有明显的提高。

1.1.2 浓硫酸法 颜邦干等^[10]用该法制得香菇多糖,分别量取一定量的浓硫酸、正丁醇,置于连接干燥管和搅拌装置的三颈烧瓶中,再加入适量浓硫酸搅拌反应,冰浴至0℃,然后加入多糖粉末继续搅拌反应30 min;反应液用NaOH中和,自来水流水透析24 h,蒸馏水透析24 h。透析液浓缩,醇沉,离心,沉淀经冷冻干燥后即得硫酸化多糖。

1.1.3 氨基磺酸-甲酰胺法 赵永安等^[11]采用氨基磺酸-甲酰胺体系对苦豆子多糖硫酸化工艺进行研究,利用四因素三水平正交试验得到最佳修饰条件,所得产物的硫酸根取代度达到1.3。取一定量的多糖粉末于圆底烧瓶中,分别加入一定量的硫酸化试剂氨基磺酸和溶剂甲酰胺,在适当温度下油浴搅拌反应3~5 h,反应液经NaOH中和,透析,浓缩,醇沉,沉淀经冷冻干燥后即得硫酸化多糖。

1.2 硫酸化多糖的结构解析与含量测定

1.2.1 红外光谱分析 王顺春等^[12]解析了香菇多糖的结构,硫酸化多糖经KBr压片,在红外光谱下进行分析测定,其中1 210 cm⁻¹左右的吸收峰为S=O的伸缩振动,810 cm⁻¹左右的吸收峰为C-O-S的拉伸振动,这两个明显的特征吸收峰表明硫酸基

团已连接到多糖残基上。

1.2.2 硫酸根含量的测定 赵永安等^[11]采用氯化钡-明胶法对多糖硫酸根取代度进行测定。分别配制不同浓度的硫酸钾溶液,加入一定量的三氯乙酸及氯化钡-明胶溶液,于360 nm处测其吸光度,以有无氯化钡存在溶液的吸光度差值为横坐标,硫酸根质量为纵坐标绘制标准曲线。配制一定浓度的多糖样品溶液,根据以上操作和回归方程得到样品中硫酸根的含量,并根据取代度公式计算出多糖中硫酸根取代度。硫酸化修饰多糖后,其生物活性具有显著的提高,但其具体的构效关系还有待进一步研究。

2 多糖羧甲基化修饰

用适当方法向多糖支链上引入羧甲基可很好地实现其羧甲基修饰。羧甲基化多糖可提高多糖的溶解性和电负性,并对其抗肿瘤活性有很大的提高,且能增强甚至产生新的生物活性,因此羧甲基化修饰也作为多糖结构常用的修饰方法之一,被广泛研究和应用。近2年关于多糖的羧甲基化报道也逐年增多,Wang等^[13]从茯苓菌中提取的β-葡聚糖在水中的溶解性很低,通过适当方法对其进行羧甲基化等修饰后,得到了几种水溶性很强的衍生物,研究发现经羧甲基化修饰后的茯苓多糖产生了新的显著的抗S180肿瘤细胞和胃癌细胞活性。

2.1 羧甲基化修饰方法

目前常用的多糖羧甲基化法是将原料糖充分溶于碱液中,然后加入一定量的溶有氯乙酸的异丙醇溶液,在一定温度下反应数小时,再用冰醋酸调至中性后进行透析,溶液浓缩,醇沉,真空干燥即得多糖的羧甲基衍生物。陈春霞等^[14]对茯苓多糖进行羧甲基化修饰,结果修饰后的茯苓多糖较之前溶解度有很大的提高,且增加了其抗肿瘤活性。对于纤维素等难溶物的羧甲基化反应,选择合适的溶剂非常重要。Ramos等^[15]用DMSO和TBAF的混合物作为溶剂,可使聚合度高达650的纤维素很快溶解,比二甲基乙酰胺-氯化锂更有效。

2.2 羧甲基化多糖的结构解析^[16]

2.2.1 红外光谱分析 经IR分析,羧甲基化多糖特征吸收峰主要出现在1 640~1 600 cm⁻¹和1 430~1 400 cm⁻¹处。其中,1 640~1 600 cm⁻¹处为羧基中C=O的伸缩振动吸收峰,1 430~1 400 cm⁻¹处为与羧基相连的C-H变角振动吸收峰。

2.2.2 核磁共振技术 将一定量的羧甲基化多糖样品溶于重水,加入DSS内标进行测定。通过修饰前

后羧甲基化多糖的碳核磁共振图谱进行比较, 羧甲基化修饰后使得糖链上带有羧甲基的碳原子信号发生化学位移, 且常向高磁场移动, α -H 的共振向低场位移。NMR 谱图-COOH 在 m/z 178 处有吸收峰。

3 多糖的乙酰化修饰

乙酰化修饰也是多糖结构修饰中重要的支链修饰方法之一。多糖经乙酰化修饰后, 由于其羟基暴露在外, 从而增加了多糖在水中的溶解度, 因此更利于活性的发挥^[17]。乙酰化多糖乙酰基的数量和取代位置与多糖的活性也存在一定的构效关系。其中 O-3 位被乙酰基取代时, 多糖的抗肿瘤活性明显增强; O-5 位被乙酰基取代时, 其抗肿瘤活性显著减弱; O 位全部被乙酰基取代时, 则多糖的活性完全消失。其原因可能是乙酰基的引入通过改变了多糖糖链分子的空间排布, 从而使之活性也相应发生改变^[18]。因此, 如何采取适当的方法在特定的位置引入乙酰基, 从而发挥所需功效是以后需要深入研究的方向之一。

3.1 乙酰化修饰方法

多糖的乙酰化试剂主要为乙酸酐。将多糖充分溶解于吡啶、甲醇、甲酰胺等有机溶剂中, 然后与一定量的乙酰化试剂进行化学反应, 乙酰基取代的部位可以发生在羟基氧和氨基氮上^[19]。郭晓强^[20]等在氢氧化钠水溶液中以乙酸酐制备乙酰化银耳多糖, 并以羟胺比色法测定其取代度, 结果获得了低取代度的乙酰化银耳多糖 (取代度 0.214)。Wang 等^[21]用乙酸酐作为酰化试剂, NBS 代替传统方法常用的吡啶作催化剂对海带褐藻多糖硫酸酯进行乙酰化, 并研究其体外抗氧化活性。结果表明乙酰化褐藻多糖硫酸酯清除 DPPH 自由基和还原能力增强, 表现出了比原料褐藻多糖硫酸酯更强的抗氧化活性。

3.2 乙酰化多糖的含量测定

取代度是乙酰化多糖结构和性能表征的重要参数, 多糖类物质通过不同程度的乙酰化修饰, 其理化性质和生物活性都会受到很大影响^[22]。测定多糖乙酰化取代度的常用方法是皂化法和羟胺比色法。皂化法是在过量的强碱性条件下将样品中的乙酸酯完全水解 (约 72 h), 然后用标准酸逐滴滴定剩余的碱, 通过取代度公式即可计算出乙酰基的取代度^[23]。该法优点操作简便, 易行, 缺点为所需样品量大, 反应时间长, 对取代度较低的多糖测定值误差较大。羟胺比色法最初用于医学检验上血液中乙酰胆碱等的测定, 方法为将多糖充分溶于强碱性溶液中, 使取

代上的乙酰基游离出来, 然后与一定量羟胺反应生成乙酰肟羟酸, 最后与 Fe^{3+} 生成可溶性红色络合物羟肟酸铁, 利用紫外分光光度计测定不同浓度下多糖溶液的吸光度, 通过取代度公式计算出乙酰基取代度; 此法操作简便快捷, 且灵敏度高, 目前多糖的乙酰化取代度测定常用此法。

4 多糖的磷酸化修饰

作为常用的化学修饰方法之一, 多糖的磷酸化修饰也是一种对分子支链的共价修饰。经磷酸化修饰后的多糖衍生物其抗肿瘤、抗凝血和免疫调节等生物活性得到明显提高^[24]。Chen 等^[25]制备的磷酸酯化的牛膝多糖具有明显的抗 S180 肉瘤和小鼠 Lewis 肺癌的作用。目前有关多糖磷酸化的研究报告相对较少, 磷酸基团是如何在多糖残基上发挥作用的机理尚不明确, 所以还有待进一步的研究。

常用的磷酸化试剂有磷酰氯、磷酸酐、磷酸或其盐。磷酸及磷酸酐或两者的混合物作为磷酸化试剂操作简便易行, 但对于一些对酸不稳定的多糖极易降解, 从而影响了产物的收率和磷酸化取代度。磷酸盐作为磷酸化试剂的优势是其价格低廉, 且一般不会引起多糖分子的降解。常用的磷酸盐包括磷酸氢钠、磷酸二氢钠、偏磷酸钠或它们的混合盐。常用的磷酸化试剂是三氯氧磷 (POCl_3)。Yuan 等^[19]用以吡啶为溶剂, POCl_3 为磷酸化试剂制备出了取代度较高的磷酸化多糖。影响多糖磷酸化取代度的因素包括反应温度、反应时间、pH 值等。如对吡喃葡聚糖进行磷酸化修饰时, 随着反应温度升高、反应时间加长, 磷酸根的含量也随之增加^[26]。对多糖分子进行磷酸化修饰时, 酸碱环境对反应有很大的影响, 应尽量避免在强酸、强碱溶液中进行, 否则极易造成多糖苷键的断裂及构象改变^[27]。目前关于多糖磷酸化修饰的实验报道相对较少, 其具体作用机制和磷酸化修饰后的构效关系尚待深入研究。

除了上述几种修饰方法, 多糖的化学修饰法还有烷基化、硬脂酰化、氨化、碘化等^[28]。这些方法都可在一定程度上对多糖的生物活性有不同程度的提高。

5 结语

多糖作为一种重要的高分子化学物质, 因其具有的广泛性、安全性、高效性和丰富的生物活性等优势, 已作为当代新药发展的方向标, 深受相关科研工作者的重视。多糖丰富的生物活性与其结构存在着一定的关系, 采取适当的方法对多糖结构进行

修饰, 探寻其构效关系, 是目前研究多糖类药物研究的重点之一。经化学修饰后的多糖可以增强其生物活性, 或产生新的生物活性, 有利于多糖类药物的开发与利用。其中硫酸化和磷酸化修饰作为目前应用最广, 效果最突出的化学修饰方法已大量投入生产, 为发现新型药物提供了充足的理论基础和方法。乙酰化和烷基化等方法还需进一步进行化学方法的改造和摸索, 为新药的研发和生产做准备。

目前有关多糖衍生物的抗肿瘤、抗凝血、抗氧化等活性的相关报道越来越多, 且因其基本无细胞毒性, 已作为抗肿瘤、抗病毒、降血糖药物应用于临床, 显示出很好的应用前景。继续开展多糖结构修饰或其他修饰手段的研究和完善, 对已修饰的结构机制继续深入探究, 进一步阐明其结构与功效的关系, 从而研发出更有效的新型多糖类药品, 造福于社会。

参考文献

- [1] 何智健, 陈建伟, 李 祥. 多糖的硫酸酯化研究述要 [J]. 中医药学刊, 2003, 21(12): 2087-2088.
- [2] Prashanth K V H, Tharanathan R N. Chitin/Chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2007, 18(3): 1172-1311.
- [3] 多尹学琼, 林 强, 译. 糖酯化反应 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008. 1-3.
- [4] Huheihel M, Ishanu V, Tal J, *et al.* Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Biochem Biophys Meth*, 2002, 50(2/3): 189-200.
- [5] Talarico L B, Zibetti R G, Faria P C, *et al.* Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenellata* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2004, 34(1/2): 63-71.
- [6] 赖 萍, 林跃鑫. 天然多糖分子修饰研究进展 [J]. 生命的化学, 2003, 23(3): 183-187.
- [7] 刘颖华, 何开泽, 杨 敏, 等. 川牛膝多糖硫酸酯的体外抗单纯疱疹病毒2型活性 [J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(1): 46-50.
- [8] 沈 赞, 尹鸿萍, 王 旻, 等. 螺旋藻中性多糖硫酸化及性质研究 [J]. 药物生物技术, 2005, 12(1): 22-25.
- [9] 王文侠, 王龙燕, 宋春丽, 等. 豆渣多糖硫酸酯化工艺条件优化及其抗氧化活性 [J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(1): 103-107.
- [10] 颜邦干, 李卫旗, 吴学谦. 香菇多糖的分子结构及其硫酸化改性的研究 [J]. 中国食品学报, 2006, 6(5): 11-16.
- [11] 赵永安, 郑晓辉, 张 岩, 等. 苦豆子多糖硫酸化修饰工艺的研究 [J]. 中南药学, 2012, 10(8): 580-583.
- [12] 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.
- [13] Wang Y F, Zhang L N, Li Y Q, *et al.* Correlation of structure to antitumor activities of five derivatives of β -glucan from *Peoria cocoas sclerotium* [J]. *Carbohydrates*, 2004, 339(15): 2567-2574.
- [14] 陈春霞, 赵大明, 张秀军, 等. 羧甲基茯苓多糖的抗肿瘤实验 [J]. 福建中医药, 2002, 33(3): 38-40.
- [15] Ramos L A, Frollini E, Heinze T H. Carboxymethylation of cellulose in the new solvent dimethyl sulfoxide/tetrabutylammonium fluoride [J]. *Carbohydr Polym*, 2005, 60(2): 259-267.
- [16] 葛 青, 张安强, 孙培龙. 真菌多糖结构修饰及鉴定研究进展 [J]. 中国食用菌, 2008, 27(1): 5-8.
- [17] Frazier C E, Wendler S L. Long chain branched celluloses by mild transglyco sedation [J]. *Carbohydr Polym*, 1996, 31(1): 11218.
- [18] 赵晓燕, 王长云. 分子修饰在多糖构效关系研究中的应用 [J]. 海洋湖沼通报, 2000(3): 10-14.
- [19] Yuan H M, Zhang W W, Li X G, *et al.* Preparation and *in vitro* antioxidant activity of κ -carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives [J]. *Carbohydr Res*, 2005, 340(4): 685-692.
- [20] 郭晓强, 何 钢, 姚 倩, 等. 乙酰化银耳多糖的制备及其取代度测定 [J]. 食品工业科技, 2013, 12: 255-257.
- [21] Wang J, Liu L, Zhang Q B, *et al.* Synthesized oversulphated, acetylated and benzoyleated derivatives of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* and their potential antioxidant activity *in vitro* [J]. *Food Chem*, 2009, 114: 1285-1290.
- [22] 严瑞煊. 水溶性高分子. 北京: 化学工业出版社, 1998. 400.
- [23] 光善仪, 宫晓梅, 高晓燕, 等. 乙酸酐对魔芋葡甘聚糖的改性 [J]. 精细化工, 2004, 21(7): 529-531.
- [24] Blennow A, Nielsen T H, Baunsgaard L, *et al.* Starch phosphorylation: a new front line in starch research [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(10): 445-450.
- [25] Chen X M, Zhang J, Tian G Y. Studies on synthesis and antitumor activity of phosphorylated *Achyranthes bidentata* polysaccharide (P-AbPS) [J]. *Chin J Chem*, 2002, 20(11): 1406-1410.
- [26] Muhammad K, Hussin F, Man Y C, *et al.* Effect of pH on phosphorylation of sago starch [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2000, 42(1): 85-90.
- [27] 罗 伟, 李 东. 香菇多糖的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 26(4): 63-67.
- [28] 崔胜云, 池善女, 刘立春, 等. 碘化壳聚糖的制备及其抗菌活性的研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2005, 26(3): 138-140.