

羧甲基牛膝多糖的制备、结构及生物活性研究

邓乐华 田庚元*

(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 在 NaOH 水溶液中,以 ClCH_2COOH 为羧甲基化试剂,对牛膝多糖 (AbPS) 进行了羧甲基化,粗产物经 DEAE-Cellulose 及 Sephadex G25 两次柱层析纯化,得到羧甲基牛膝多糖 (CM-AbPS) 纯品,经高效液相法 (HPLC) 及毛细管电泳法 (CE) 检测表明具有较好的均一性. 并通过样品甲基化和 GC-MS 分析,对羧甲基牛膝多糖糖链中羧甲基的分布进行了研究,结果表明羧甲基牛膝多糖中羧甲基主要取代在糖链中呋喃果糖的 4-位上. 该产物具有抗肿瘤活性.

关键词 羧甲基牛膝多糖,羧甲基化,GC-MS 分析,结构分析,抗肿瘤

Studies on the Preparation, Structure and Bioactivity of CM-AbPS

DENG, Le-Hua TIAN, Geng-Yuan*

(State Key Laboratory of Bio-organic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract *Achyranthes bidentata* Polysaccharides (AbPS) was carboxymethylated by ClCH_2COOH in aqueous NaOH and the crude product was purified by successive DEAE-Cellulose and Sephadex G25 column chromatography to yield homogeneous carboxymethylated product (CM-AbPS), which was detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE). By the methylation method and GC-MS analysis, we studied the distribution of carboxymethyl groups in the sugar backbone of CM-AbPS and conclude that the carboxymethyl groups mainly substitute on 4-position of the fructofuranose of the sugar backbone. The product has anti-tumor activity.

Key words CM-AbPS, carboxymethylation, GC-MS analysis, structural analysis, anti-tumor

近 20 年来,多糖免疫调节剂因其独特的功能,已经在抗肿瘤药、抗病毒药及延缓衰老药方面得到了开发和利用^[1]. 我们从中药牛膝 (*Achyranthes bidentata* Blume) 中提取出一种水溶性小分子多糖——牛膝多糖 (*Achyranthes bidentata* Polysaccharides, AbPS)^[2],药理实验表明其对机体具有显著的增强免疫活性^[3~6]. 根据以前的分析^[7],牛膝多糖为小分子量果聚糖,平均聚合度为 9,数均分子量为 1400,分子末端为一个 α -D-吡喃葡萄糖,后面接 2-6 连接或 2-1 连接的 α -D-呋喃果糖,其结构如图 1 所示.

多糖分子中的取代基对多糖的活性影响很大^[8,9]. 因而对多糖进行结构改造有望得到活性更强、应用范围更广的多糖衍生物. 在多糖的结构改造方法中,羧甲基方法因具有制备过程简单、试剂成本低及生成物无毒性等优点,已成为一种较常用的衍生化方法^[10,11]. 为研究多糖结构与功能的关系,扩大牛膝多糖的应用范围,我们对其进行了羧甲基化,测定了其产物羧甲基牛膝多糖的取代度^[12],本文对羧甲基牛膝多糖的制备、结构及生物活性进行了研究.

* E-mail: tiangy @pub. sioc. ac. cn

Received April 29, 2002; accepted July 20, 2002.

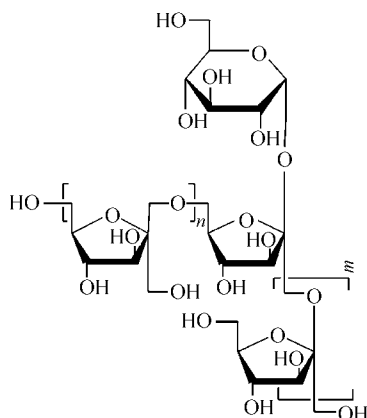


图1 牛膝多糖(AbPS) 的结构

Figure 1 The structure of AbPS

$$m, n = 0 \sim 19, m + n = 2 \sim 19$$

1 实验部分

1.1 原料、试剂及仪器

精制牛膝多糖(纯度 > 98 %),从中药牛膝多糖中提取、分离、纯化而得; ClCH_2COOH , NaOH , 丙酮, 均为化学纯.

Sephadex G25, Pharmacia 公司产. DEAE-Cellulose (Diethylaminoethyl-Cellulose, 二乙基氨基乙基纤维素), Sigma 公司产. DMSO: 分析纯, 加入粉状 CaH_2 在 65 °C 下反应 2 h, 然后 N_2 下蒸馏, 加入分子筛干燥, 保存在干燥器备用. 碘甲烷: 试剂纯, 经重蒸馏, 于冰箱中避光保存. 吡啶: 分析纯, 加入粉状 CaH_2 回流 2 h 后重蒸馏, 加入分子筛干燥, 保存在干燥器备用. 醋酸酐: 分析纯, 重蒸后加入分子筛干燥, 保存在干燥器备用. 三氟乙酸: 分析纯. 硼氢化钠, Merck 公司产品. 其余未经注明试剂均为分析纯.

722 型分光光度计, 上海第三分析仪器厂生产. 红外光谱仪为 Bio-Rad FTS 185. 液相色谱仪为 Shimadzu LC-10AD 公司产品. 毛细管电泳仪为 Waters Quanta 4000E. 核磁共振仪: Bruker-DRX-400. GC/MS: a. HP 6890, OV-17 柱 (30 m \times 0.32 mm); b. MD 800, HP-1 柱 (25 m \times 0.28 mm). 超声波: CQ50, 上海超声波仪器仪表厂; 透析膜, 截留分子量为 1000.

1.2 实验方法

1.2.1 羧甲基牛膝多糖的制备及纯度鉴定

(a) 羧甲基化

参照文献[11], 牛膝多糖, ClCH_2COOH 及 NaOH 水溶液在 95 °C 下反应 3 h, 然后将反应溶液中和至

pH 7, 经丙酮沉淀、离心、透析、真空冷冻干燥, 得到产物羧甲基牛膝多糖 (CM-AbPS) 粗品. 将粗品上 DEAE-Cellulose 柱层析 (HCO_3^- 型), 0.5 mol/L NaHCO_3 洗脱, 苯酚-硫酸法^[13] 隔管检测 A_{490} , 经透析, 冷冻干燥后, 所得样品再上 Sephadex G25 柱层析, 0.1 mol/L NaCl 洗脱, 苯酚-硫酸法每管检测 A_{490} , 经透析, 冷冻干燥, 所得样品为 CM-AbPS 精品.

(b) 纯度鉴定

高压液相色谱法 (HPLC) 分析柱: TSK 2000SW, 洗脱液: 双蒸水, 流速: 1 mL/min, 示差检测 (RI).

毛细管电泳法 (CE) 电泳液为 0.1 mol/L H_3BO_3 -KOH (pH 10), 紫外检测波长 214 nm.

1.2.2 羧甲基牛膝多糖的甲基化分析

(a) 甲基化反应^[14]

称取经二次纯化样品 7 mg 于蛋形瓶中, 80 °C 下真空干燥 30 min, 加入 2 mL 无水 DMSO, 超声 2 min, 使样品充分溶解, 然后加入 100 mg 粉状 NaOH , 充入 N_2 , 超声 2 min, 搅拌至大部分 NaOH 溶解, 冰浴下缓慢加入 0.8 mL CH_3I , 室温搅拌 3 h 后, 加 2 mL 水淬灭反应, 旋转蒸发除去多余 CH_3I (浴温低于 40 °C). 反应溶液用氯仿萃取 (3 \times 2 mL), 合并氯仿层, 用水洗至中性 (3 \times 3 mL), 加入无水 MgSO_4 干燥. 然后过滤, 滤液经旋转蒸发除去氯仿即得甲基化产物.

(b) 甲基化产物的水解^[15]

向甲基化产物中加入 3 mL 2 mol/L CF_3COOH , 浴温 60 °C 反应 30 min, 然后减压下抽去水和 CF_3COOH 至干, 再加入 1 mL 水使产物溶解.

(c) 甲基化水解产物的还原及乙酰化

在水解样品水溶液中加入 1 滴浓氨水, 加入 20 mg NaBH_4 , 室温搅拌反应 3 h, 用 2 mol/L 醋酸中和至无气泡, 减压抽干. 再用甲醇溶解并旋转蒸发, 重复 6 次, 以充分带走硼酸. 将样品 80 °C 真空干燥 1 h 后, 加入 2 mL 无水吡啶, 2 mL 乙酸酐, 密封后搅拌过夜, 第二天油泵抽干溶剂, 再用氯仿溶解后过滤, 除去不溶性的盐类, 即得到 GC-MS 分析样品.

2 实验结果

2.1 羧甲基化牛膝多糖的制备

牛膝多糖 (AbPS) 经羧甲基化、丙酮沉淀、离心、透析、冷冻干燥可得白色羧甲基化牛膝多糖 (CM-AbPS) 粗产物. 粗产物需进一步进行纯化. CM-AbPS 先经 DEAE-Cellulose 柱层析 (HCO_3^- 型), 柱用 0.5

mol/L NaHCO_3 平衡,然后用 0.5 mol/L NaHCO_3 进行洗脱,苯酚-硫酸法隔管检测 A_{490} ,其洗脱图如图 2,收集 26~40 管,经透析,冷冻干燥,得到经 DEAE-Cellulose 柱层析纯化 CM-AbPS 产物.再将该产物进行 Sephadex G25 柱层析,苯酚-硫酸法隔管检测 A_{490} ,其洗脱图如图 3,收集 8~14 管,对水透析,冷冻干燥,得到经二次纯化的白色蓬松的 CM-AbPS 纯品.

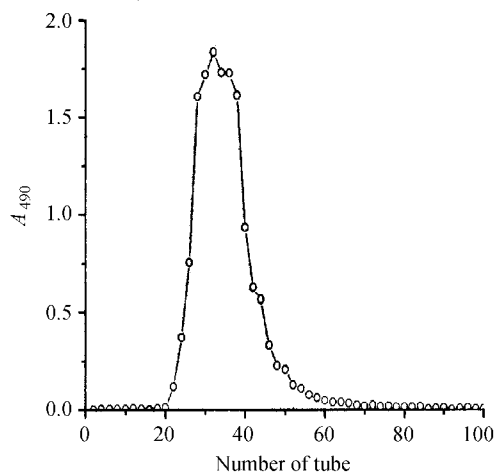


图 2 DEAE-Cellulose 柱层析 (3.0 cm × 20 cm)

洗脱液: 0.5 mol/L NaHCO_3 ; 流速: 0.8 mL/min, 5 min/tube

Figure 2 DEAE-Cellulose column chromatography (3.0 cm × 20 cm)

Eluent: 0.5 mol/L NaHCO_3 ; rate: 0.8 mL/min, 5 min/tube

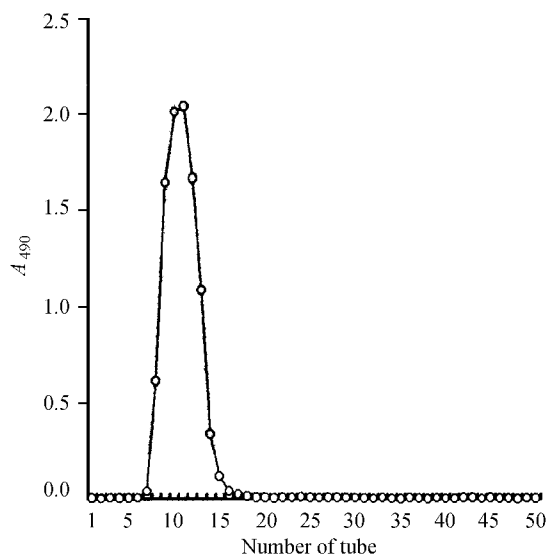


图 3 Sephadex G25 柱层析 (1.2 cm × 60 cm)

洗脱液: 0.1 mol/L NaCl ; 流速: 0.33 mL/min, 6 min/tube

Figure 3 Sephadex G25 column chromatography (1.2 cm × 60 cm)

Eluent: 0.1 mol/L NaCl ; rate: 0.33 mL/min, 6 min/tube

2.2 羧甲基牛膝多糖的纯度鉴定

2.2.1 高压液相色谱法 (HPLC)

CM-AbPS 纯品经 HPLC 分析得到单一对称性峰 (如图 4), 表明其具有均一性, 分析柱为 TSK-2000SW, 其分子量适用范围为 500~20000.

2.2.2 毛细管电泳法 (CE)

CM-AbPS 经 CE 分析得到单一对称的峰, 亦表明其具有均一性 (如图 5).

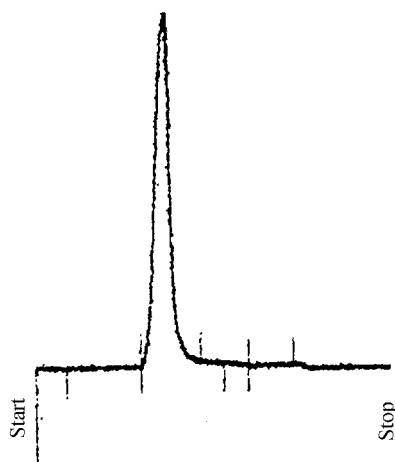


图 4 HPLC 图

分析柱: TSK-2000SW; 洗脱液: 双蒸水, 1 mL/min, RI 检测

Figure 4 HPLC spectrum

Column: TSK-2000SW; eluent: double distilled H_2O , 1 mL/min, RI detection

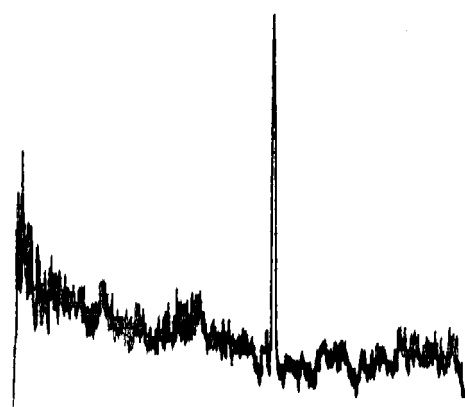


图 5 CE 图

检测波长: 214 nm; 洗脱液: 0.1 mol/L H_3BO_3 -KOH (pH 10)

Figure 5 CE spectrum

Detected wave length: 214 nm; eluent: 0.1 mol/L H_3BO_3 -KOH (pH 10)

2.3 羧甲基牛膝多糖的结构研究

采用 Ciucanu 和 Kerek 发展的用 NaOH 粉末作碱, DMSO 为溶剂的甲基化方法^[14]. 样品 CM-AbPS

经甲基化之后,红外图谱如图 6,其中 3000 ~ 3500 cm^{-1} 的羟基峰已消失,说明甲基化已经完全. 因牛膝多糖是呋喃果聚糖,水解过程中其糖环容易被破坏^[14,15],所以对于水解时酸的浓度、反应温度和时间必须严格控制. 我们尝试了各种不同酸性条件,最后发现样品在 60 条件下于 2 mol/L 三氟乙酸中反应 30 min,可以得到比较好的结果^[15].

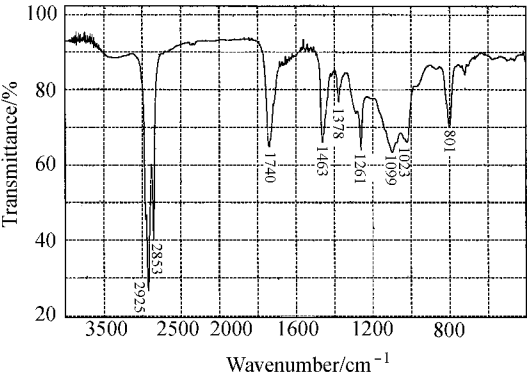


图 6 完全甲基化 CM-AbPS 的红外图谱

Figure 6 IR spectrum of completely methylated CM-AbPS

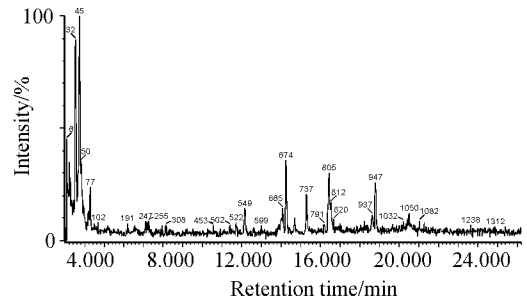


图 7 CM-AbPS 的甲基化碎片 GC 色谱图

Figure 7 GC spectrum of CM-AbPS methylated fragments

将水解后的样品经还原、乙酰化处理后进行 GC-MS 分析. 图 7 为甲基化碎片 GC 色谱图,从中可以发现它远比 AbPS 的 GC 图复杂,其主要原因可能是由于 AbPS 经羧甲基衍生化之后糖环结构的多样性引起的.

图 7 中的各峰,其中糖峰的 EI 质谱图分别如图 8(a) ~ (d) 所示,结合标准图谱^[16]进行归属,结果发现图 8 中(a)是末端葡萄糖单元甲基化碎片,而(b), (c)则是 2-6 连接和 2-1 连接的呋喃果糖单元甲基化碎片,对于图 8(d),图谱中出现了 115, 147, 187, 217, 221, 259 等质量数的碎片,我们断定为 4-O-羧甲基呋喃果糖单元甲基化碎片,其理由如下: 因为 CM-AbPS 的羧基是以钠盐形式存在的,所以

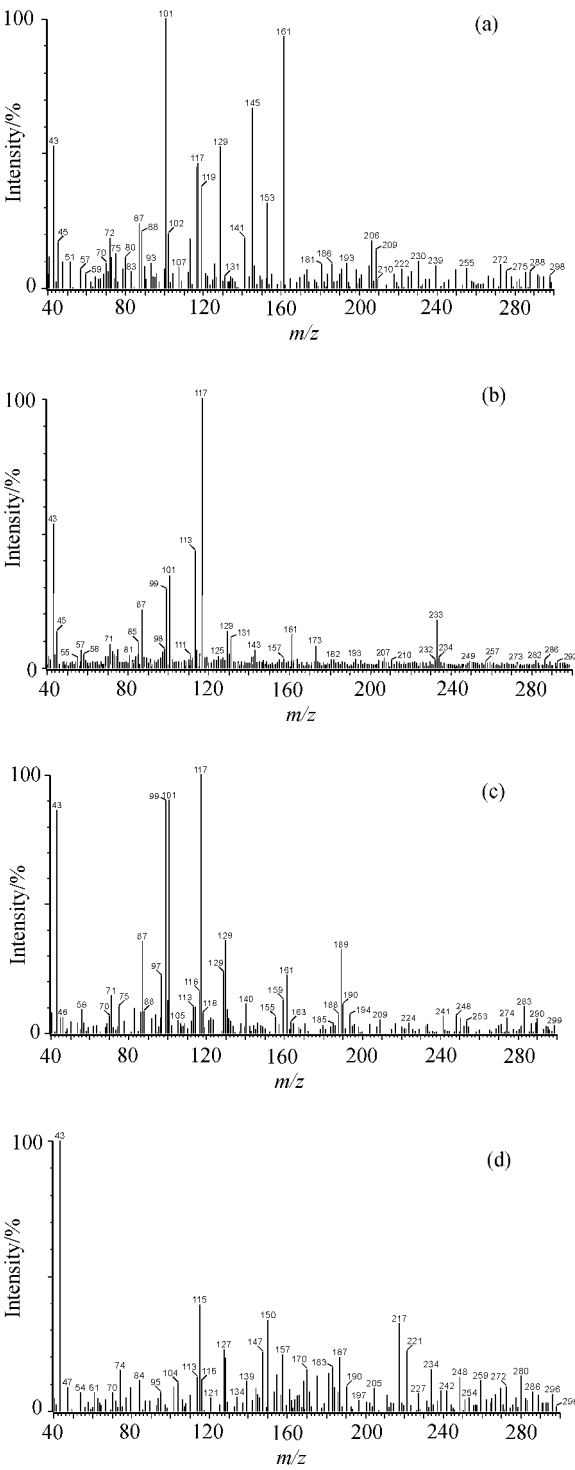


图 8 EI 质谱图

Figure 8 EI/MS spectrum

(a) 末端葡萄糖单元甲基化碎片; (b) 2-6 连接的呋喃果糖单元甲基化碎片; (c) 2-1 连接的呋喃果糖单元甲基化碎片; (d) 4-O-羧甲基呋喃果糖单元甲基化碎片

在甲基化过程中会生成甲基酯,这可从其完全甲基化样品的 IR 图谱中 ~ 1600 cm^{-1} 峰 (COO^- 吸收峰) 消失和新生成 ~ 1740 cm^{-1} 峰 (酯吸收峰) 得以证实.

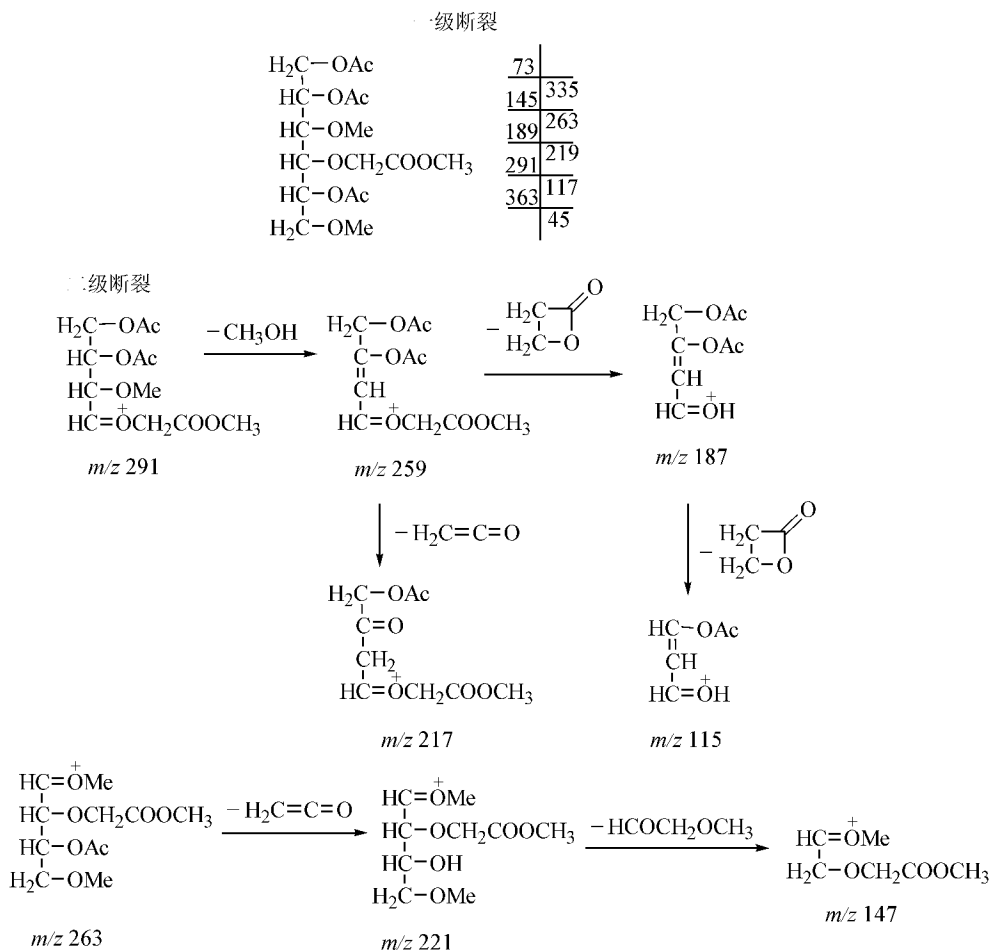


表 2 羧甲基牛膝多糖对小鼠 S-180 肉瘤(皮下接种)的试验结果

Table 2 Effects of CMF-Abps on the inhibition of sarcoma 180 growth in mice

样品	剂量/(mg·kg ⁻¹)	给药方案	动物数		动物体重		瘤重 ($\bar{X} \pm SD$)	抑制率/%
			始	终	始	终		
CMF-Abps	50	iv ×7qd	10	10	19.8	25.1	1.13 ±0.25	47.19 ^a
对照组	—	iv ×7qd	10	10	19.9	25.3	2.14 ±0.34	—

^a $p < 0.01$.

表 3 羧甲基牛膝多糖对荷 Lewis 肺癌小鼠 NK 活性的影响

Table 3 Effects of CMF-Abps on NK activities in Lewis pulmonary carcinoma mice

样品	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	给药方案	动物数 只/组	OD 值 ($\bar{X} \pm SD$)	NK 活性/%	与对照组相比 NK 活性提高 %
CMF-Abps	50	iv ×7qd	6	0.385 ±0.006 ^a	47.12	22.69
对照组	—	iv ×7qd	6	0.498 ±0.008 ^b	31.59	—

^a实验组 OD 均值/效应对照组 OD 均值, $p < 0.01$; ^b靶细胞 OD 均值.

3 讨论

我们采用 NaOH 水溶液为碱,以 ClCH₂COOH 为羧甲基化试剂,对牛膝多糖(Abps)进行了羧甲基化,粗产物经 DEAE-Cellulose 及 Sephadex G-25 两次柱层析纯化,得到羧甲基牛膝多糖(CMF-Abps)纯品,经高效液相法(HPLC)及毛细管电泳法(CE)检测表明具有较好的均一性.

运用甲基化分析方法,对羧甲基牛膝多糖的结构进行了分析.结果表明,产物中的羧甲基主要分布在糖链中的呋喃果糖的 4-位上,其原因可能是由位阻效应引起的.

(1) 对于 2-6 连接,因为其 3-位与 6-位处于 *cis* 位,而 4-位与 6-位处于 *trans* 位,所以 4-位的位阻应该比 3-位小^[17].

(2) 2-1 连接为主链 9-聚果聚糖经计算机分子结构模拟,其最低能量的分子构象呈螺旋状,其中呋喃果糖的 3-位羟基朝向相邻的两个果糖基的中间,而 4-位羟基则朝向正相差一个螺距的两个果糖基的中间,因此 4-位的位阻比 3-位小,因此反应时 4-位比 3-位更容易^[7c].

总之,由于呋喃果糖 4-位的空间位阻比 3-位小,在产物羧甲基牛膝多糖中羧甲基主要在糖链中呋喃果糖的 4-位上.但并不排除其他位置发生羧甲基化的可能性.

生物活性试验结果表明该衍生物具有较好的抗肿瘤活性.

References

1 Tian, G.-Y.; Feng, Y.-C.; Lin, Y. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* **1996**, 20, 441 (in Chinese).
(田庚元, 冯宇澄, 林颖, 中国中药杂志, **1996**, 20, 441.)

2 Tian, G.-Y. *Chinese Patent*, 93 112 588 ·X, **1992**.

3 Xiang, D.-B.; Li, X.-Y. *Acta Pharmacol. Sinica* **1993**, 14, 332.

4 Xiang, D.-B.; Li, X.-Y. *Acta Pharmacol. Sinica* **1993**, 14, 556.

5 Xiang, D.-B.; Jiang, C.; Li, X.-Y. *Chin. J. Pharmacol. Toxicol.* **1994**, 8, 209 (in Chinese).
(向道斌, 蒋超, 李晓玉, 中国药理学与毒理学杂志, **1994**, 8, 209.)

6 Li, Z.-K.; Li, D.-D. *Yaoxue Xuebao* **1997**, 32, 881 (in Chinese).
(李宗锴, 李电东, 药学学报, **1997**, 32, 881.)

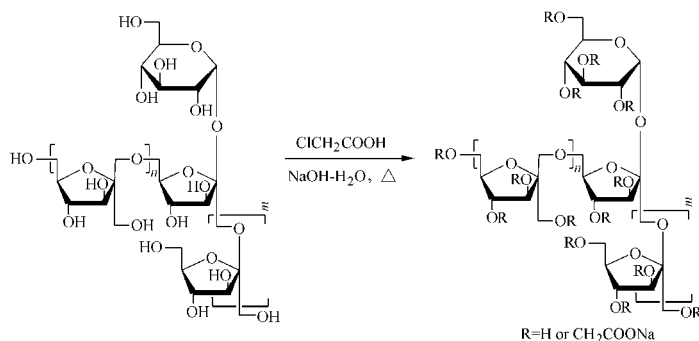
7 (a) Yu, B. M. S. *Thesis*, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Shanghai, **1992** (in Chinese).
(俞飏, 硕士论文, 中国科学院上海有机化学研究所, 上海, **1992**.)
(b) Yu, B.; Tian, G.-Y.; Hui, Y.-Z. *Chin. J. Chem.* **1995**, 13, 539.
(c) Xu, Y.-J. M. S. *Thesis*, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Shanghai, **1997** (in Chinese).
(徐愿坚, 硕士论文, 中国科学院上海有机化学研究所, 上海, **1997**.)

8 Nishikawa, W. *Chem. Pharm. Bull.* **1969**, 17, 1910.

- 9 Tian, G.-Y. ; Li, S.-T. ; Song, M.-L. ; Zheng, M.-S. ; Li, W. *Yaoxue Xuebao* **1995**, 30, 107 (in Chinese).
(田庚元, 李寿桐, 宋麦丽, 郑民实, 李文, 药学报, **1995**, 30, 107.)
- 10 Hamuro, J. ; Yamashita, Y. ; Ohsaka, Y. ; Maeda, Y. Y. ; Chihara, G. *Nature* **1971**, 233, 486.
- 11 Verraest, D. L. ; Peters, J. A. ; Batelaan, J. G. ; Van Bakkum, H. *Carbohydr. Res.* **1995**, 271, 101.
- 12 Deng, L.-H. ; Feng, Z.-R. ; Tian, G.-Y. *Lihua Jianyan* **2001**, 37 (Supplement), 137 (in Chinese).
(邓乐华, 冯祖儒, 田庚元, 理化检验, **2001**, 37 (增刊), 137.)
- 13 Zhan, W.-J. *Technologies in Research of Glycoconjugates Biochemistry*, 2nd Edn., Zhejiang University Press, Hangzhou, **1994**, p. 16 (in Chinese).
(张惟杰, 糖复合物生化研究技术(第二版), 浙江大学出版社, 杭州, **1994**, p. 16.)
- 14 Ciucanu, I. ; Kerek, F. *Carbohydr. Res.* **1984**, 131, 209.
- 15 Pollock, C. J. ; Hall, M. A. ; Roberts, D. P. *J. Chromatogr.* **1979**, 171, 411.
- 16 Jansson, P. E. ; Kenne, L. ; Liedgren, H. ; Lindberg, B. ; Lonngren, J. *Chem. Commun., Univ. Stockholm* **1976**, (8), 1.
- 17 Verraest, D. L. ; Peters, J. A. ; Kuzee, H. C. ; Raaijmakers, H. C. ; Van Bakkum, H. *Carbohydr. Res.* **1997**, 302, 203.

(A0204291 CHENG, B.)

Studies on the Preparation, Structure and Bioactivity of CM-AbPS

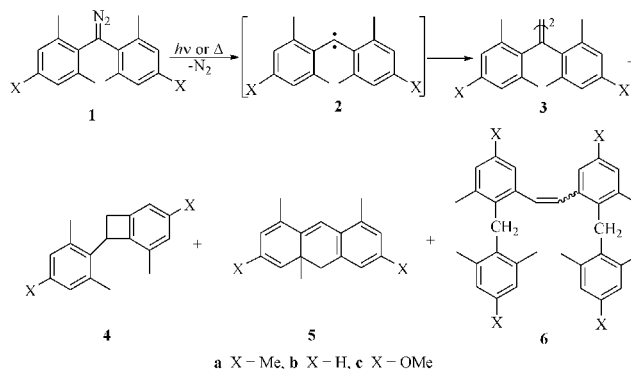


AbPS was carboxymethylated by ClCH_2COOH in aqueous NaOH and the gross products were purified by successive DEAE-Cellulose and Sephadex G25 column chromatography to yield homogeneous carboxymethylated products (CM-AbPS), which were detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE). By the methylation method and GC-MS analysis, the distribution of carboxymethyl groups in the sugar backbone of CM-AbPS was studied, and it is concluded that the carboxymethyl groups mainly distributed in the 4-position of the fructofuranose of sugar backbone. The product has anti-tumor activity.

DENG, Le-Hua; TIAN, Geng-Yuan

Acta Chimica Sinica **2002**, 60(11), 2049

Generation and Reaction of Triplet Bis(2,6-dimethyl-4-methoxyphenyl) carbene



Bis(2,6-dimethyl-4-methoxyphenyl) carbene (**2c**) shows rather high reactivity and unstability than **2a** and **2b** owing to the strongly electron donating methoxy group at the para position, and it decays besides dimerization to form tetra(aryl) ethylene (**3c**) or attacks at an σ -methyl group to afford 1,2-dihydrobenzocyclobutenes (**4c**) like **2a** and **2b**, and also generates 3,6-dimethoxy-1,4a,8-trimethyl-4a,10-dihydroanthracene (**5c**) and 2,2-di(2,6-dimethyl-4-methoxybenzyl)-3,3-dimethyl-5,5-dimethoxystilbene (**6c**) by attacking on the σ -methyl group in solution.

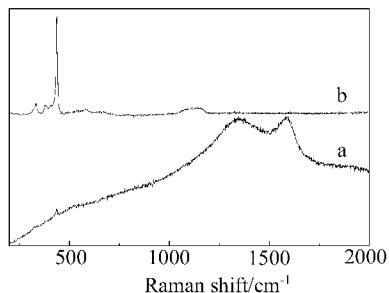
HU, Ying-Mo; HIRAI, Katsuyuki; TOMIOKA, Hideo

Acta Chimica Sinica **2002**, 60(11), 2056

Electrochemical Synthesis of Zinc Complexes and Preparation of Nano-sized ZnO

ZHOU, Xing-Fu; HAN, Ai-Jie; CHU, Dao-Bao; GU, Jia-Shan; LIN, Chang-Jian; TIAN, Zhong-Qun

Acta Chimica Sinica **2002**, 60(11), 2064



Zinc complexes of $\text{Zn}(\text{OEt})_2$, $\text{Zn}(\text{OBu})_2$, $\text{Zn}(\text{acac})_2$, $\text{Zn}(\text{OEt})_2\text{-(acac)}_2$ and $\text{Zn}(\text{OBu})_2\text{-(acac)}_2$ were directly synthesized by using zinc metal as sacrificing anode in non-aqueous media. Nano-sized ZnO (5–10 nm) was prepared by direct hydrolysis of the electrolyte solution containing $\text{Zn}(\text{OEt})_2\text{-(acac)}_2$ precursor.