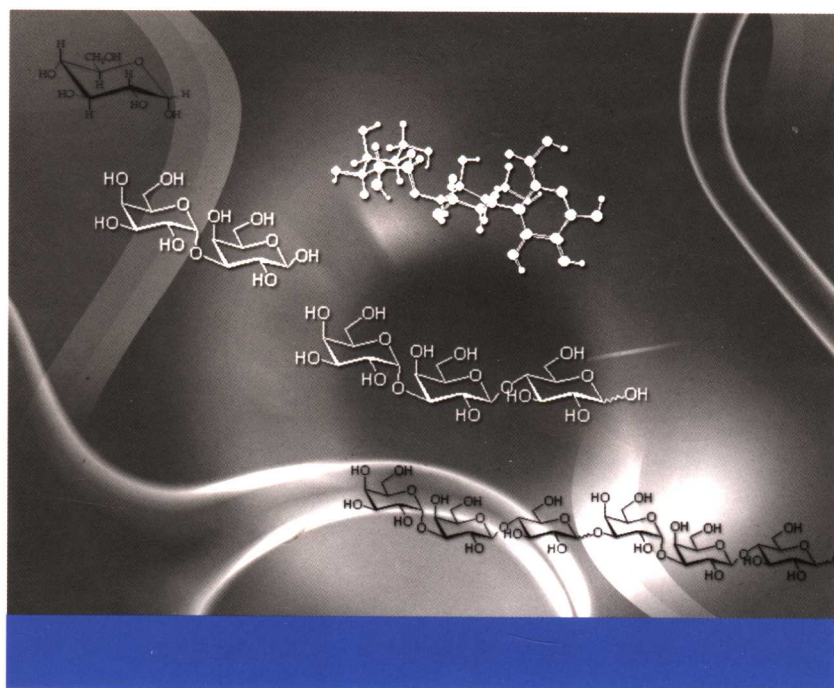


郭振楚 编著

糖类化学



Chemical Industry Press



化学工业出版社
化学与应用化学出版中心

湖南省教育委员会重点学科资助出版

糖类化学

郭振楚 编著



化学工业出版社
化学与应用化学出版中心

· 北 京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目(CIP)数据

糖类化学/郭振楚编著. —北京:化学工业出版社,
2005.5

ISBN 7-5025-7149-3

I. 糖… II. 郭… III. 碳水化合物 IV. O629.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 051645 号

糖 类 化 学

郭振楚 编著

责任编辑:梁虹 李晓红

责任校对:顾淑云 边涛

封面设计:郑小红

*

化 学 工 业 出 版 社
出版发行
化学与应用化学出版中心

(北京市朝阳区惠新里3号 邮政编码 100029)

购书咨询:(010) 64982530

(010) 64918013

购书传真:(010) 64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京永鑫印刷有限责任公司印刷

三河市延风装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 18½ 字数 494 千字

2005 年 8 月第 1 版 2005 年 8 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-7149-3

定 价: 36.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者,本社发行部负责退换

编者的话

糖是除核酸和蛋白质之外的另一类重要的生命物质,糖生物学被称之为“生物化学最后的巨大前沿之一”,这是人类了解糖一个多世纪后的今天才认识到的。人们对糖的认识远远落后于对核酸和蛋白质的认识,其中一个主要原因是糖的化学较核酸和蛋白质复杂。核酸和蛋白质是分别通过磷酸二酯键和酰胺键相连的线性分子;而糖是通过糖苷键相连,且有 α 、 β 两种立体异构;组成糖基的种类、连接位置与顺序又各不相同,往往都有分支,因此糖的分离、结构分析及化学合成都相当困难;同时,糖在生物体中的合成也远比核酸和蛋白质复杂。自20世纪80年代以来,由于现代分离、分析技术及生物技术的发展,才使人们对体内糖链结构惊人的复杂性与多样性有了根本认识,知道糖作为信息分子参与着生命体内的各种识别过程。越来越多的资料证明,糖及其复合物在生命过程中的重要性,如同蛋白质和核酸一样具有同等的地位。

近20余年来,糖的合成化学有了前所未有的发展,由经典的逐步定向合成发展到现代的一锅法合成和组合合成;酶促合成和固相合成等多种方法。糖科学也已发展成为今天涵盖糖生物学、糖化学、糖工程学、化学糖生物学、糖药理学、糖组学的多学科。然而,要揭示糖的生物学的全部意义,探索糖类物质在人体生命活动中的全部奥秘,需要包括有生物学、化学、医学、物理学等多学科的专门人才有效地协同配合与努力。遗憾的是有关糖学科方面的专著太少。20世纪80年代出版的《糖类的生物化学》一书,是目前惟一的反映糖类的教学用书,其内容主要为生物化学方面。有关糖化学方面的片段内容,也曾出现在《天然产物化学》以及《天然药物化学》等著作的部分章节中,但其内容与篇幅尚不能满足广大糖化学工作者的需求,也不可能反映近年的糖化学研究成果。在多年的教学与科学研究中,我们常感到迫切需要有一本糖化学方面的专门论著。基于这一想法,作者综合了国内外的糖化学研究成果,结合自己20多年来的研究工作,以及收集到的有关文献资料,加以汇编、整理,编著了这本书。

全书共分9章。第1章论述了糖的生物学意义,糖化学研究的主要内容,并介绍了新的学科分支——化学糖生物学;第2章详细讨论了糖及其复合物类型,扩展了糖的研究对象,首次将“糖配合物”列为糖类物质中;第3章、第4章叙述糖的提取、分离、性质与化学修饰,糖类的降解;第5、第6章详细讨论了糖类化合物的现代分析,引进了糖的现代光谱分析技术的内容和实例,列出了大量的糖类物质,包括不少新糖类化合物的波谱学数据;第7章系统介绍了糖苷和寡糖的合成方法与合成的新动向;第8章介绍了多糖及糖复合物的合成;第9章为糖的药物化学。各章内容自成体系,力求反映糖类化学的基础理论、新概念、新方法以及国内外糖类研究的最新成果,并适当注意前后知识的衔接与渐进。

全书共收集参考文献658篇,化合物930个,列出了大量的实验数据与图表,便于查阅。尽可能地举出许多实例与操作方法。

该书可作为硕士研究生、博士生的教学用书,也是相关专业的科研人员、教师和大学生的参考书。编写此书只是抛砖引玉。由于糖类化学研究发展迅速,加之本人水平和时间等条件所限,可能遗漏了许多重要文献、资料,书中难免存在不足与错误,敬请学界同仁指正。

感谢曹晨忠教授给我的支持与帮助。特别要感谢我的妻子杨祁,她不仅给我生活上与精神上长期的关怀与照顾,还负责了整部书稿的打印、整理及部分核对工作。感谢邓湘林为该书做了大量资料收集工作。此外,参与校对和其它工作的有李帮良教授,赵立刚副教授,青年教师袁春桃、王瑞兰和我的四位研究生韩亮、胡博、熊兴泉、欧阳文竹,在此一并表示衷心的感谢。

谢。我还要感谢大连化物所杜昱光教授和谭玉成博士为该书的出版提出了许多宝贵意见和支持。感谢化学工业出版社为本书的编辑出版所付出的努力。感谢一切直接或间接为我的工作提供方便的人们。感谢湖南省教育厅有机化学重点学科建设项目资金的支持。

编 者

2005年1月13日于湘潭

缩写词(按英文字母排序)

Ac	acetyl	乙酰基
Am	amyl	戊基
Aq	aqueous	水
Ar	aryl	芳基
Ara	arabinose	阿拉伯糖
Asn	asparagines	天冬酰胺
Bn	benzyl	苄基
Bu	butyl	丁基
Bz	benzoyl	苯甲酰基
CSA	camphorsulfonic acid	樟脑磺酸
CS	chondroitin Sulfate	硫酸软骨素
DBS	dibromide-succinic acid	二溴丁二酸
DBU	1,8-diazo-bicyclo[5.4.0] undecene-7	1,8-重氮-双环[5.4.0]-7-十一碳烯
DMAP	4-dimethylaminopyridine	4- <i>N,N</i> -二甲基氨基吡啶
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide	<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DMTr	di- <i>p</i> -methoxytrityl	二对甲氧基三苯甲基
DTBMP	di-tertbutyl-4-methyl-pyridine	二叔丁基-4-甲基吡啶
ESI	electrospray ionization	电喷雾离子化
Et	ethyl	乙基
FAB	fast atom bombardment	快原子轰击
GAG	glycosaminoglycan	糖胺聚糖,黏多糖
Gal	galactose	半乳糖
Glu(or Glc)	glucose	葡萄糖
HA	hyaluronic acid	透明质酸
HEP	heparin	肝素
HLB	hydrophilic-lipophilic balance	亲水亲油平衡值
Man	manose	甘露糖
Me	methyl	甲基
MMA	methyl methacrylate	甲基丙烯酸甲酯
MW	molecular weight	分子量
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide	<i>N</i> -溴代丁二酰亚胺
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide	<i>N</i> -碘琥珀酰亚胺
PG	proteoglycan	蛋白聚糖
Ph	phenyl	苯基
Pr	propyl	丙基
Py	pyridine	吡啶
Rha	rhamnose	鼠李糖
Ser	triethyl amine	三乙胺
TBDMSCI	<i>tert</i> -butyl-dimethylchloro-silicane	叔丁基二甲基氯硅烷
TCPO	tricetylphosphine oxide	氧化三-十六烷基膦
Thr	threonine	苏氨酸
TMSOTf	trimethylsilyl triflate	三氟甲磺酸三甲基硅酯
Ts	<i>p</i> -toluenesulfone	对甲基磺酰基
Xyl	xyllose	木糖

内 容 提 要

糖是除蛋白质和核酸外的又一类非常重要的生命物质，糖化学在生命科学、药物研究中占有很重要的地位和广泛的用途。

本书以糖类化合物为主线，系统全面地介绍了糖化学的各个方面：分类、命名、结构、性质，以及化学修饰，合成及分离提纯，并提出糖类化合物的一些新概念、新理论、新方法。其中汇集了国内外糖类研究方面最新研究成果，突出了糖的合成与结构鉴定两大核心问题，具体详尽地讲述了实验方法和技术。本书侧重于化学方面，可操作性强，每章尽可能地举出许多实例和操作方法，收集整理出有关的实验数据和图表。

本书不仅可作为有机化学、天然产物化学、糖化学、药物化学专业的研究生教科书，而且也可作为有关专业本科生的参考用书，还有助于有关人员了解糖化学、糖生物学方面的科学知识。

目 录

第1章 绪论	1	第6章 糖链结构研究与实例分析	160
1.1 糖的生物学意义	1	6.1 糖链结构研究的一般程序	160
1.2 糖化学	4	6.2 糖链结构研究的分析实例	169
1.3 化学糖生物学	12	参考文献	180
1.4 结束语	17	第7章 糖苷和寡糖的合成	182
参考文献	18	7.1 引言	182
第2章 糖及糖复合物类型	20	7.2 保护与去保护	183
2.1 单糖及其重要衍生物	20	7.3 立体选择性、反应活性及条件	188
2.2 寡糖	33	7.4 逐步缩合的定向合成	194
2.3 多糖	40	7.5 氨基葡萄糖糖苷控制选择性合成	199
2.4 蛋白聚糖	45	7.6 硫代糖苷法在糖苷化及寡糖合成中的 应用	207
2.5 糖蛋白的聚糖	47	7.7 合成实例	211
2.6 糖鞘脂(鞘糖脂)	48	7.8 固相合成	218
2.7 糖苷	50	7.9 酶促合成	222
2.8 糖配合物	53	7.10 组合合成	227
参考文献	57	7.11 可程序化一锅法合成	229
第3章 糖类的提取、分离、性质与 化学修饰	59	7.12 其它合成方法	237
3.1 糖类的提取与分离	59	参考文献	240
3.2 糖类的性质	67	第8章 多糖及糖复合物的合成	245
3.3 糖类的化学修饰	72	8.1 多糖的合成	245
参考文献	88	8.2 糖肽的合成	248
第4章 糖链的降解	90	8.3 拟糖蛋白的合成	253
4.1 引言	90	8.4 糖脂的合成	255
4.2 酸催化降解	90	8.5 其它糖复合物的合成	261
4.3 氧化降解	99	参考文献	266
4.4 氨基糖的脱氨降解	102	第9章 糖类的药物化学	269
4.5 酶催化降解	103	9.1 糖类药物的功能	269
参考文献	105	9.2 糖类药物作用的靶点	272
第5章 糖类化合物的光谱分析	106	9.3 单糖及寡糖类药物	273
5.1 红外光谱	106	9.4 多糖类药物举例	276
5.2 质谱	119	9.5 用于药物转运的糖类	278
5.3 核磁共振氢谱	133	9.6 基于药物及与肿瘤相关的糖复合物	282
5.4 核磁共振碳谱	148	9.7 被糖修饰的其它药物	284
参考文献	158	参考文献	286

第1章 绪 论

1.1 糖的生物学意义

糖类的研究已有百余年的历史,在经历了一个相对寂静时期之后,近年又开始活跃起来了。近30多年,特别是近10年的研究,彻底改变了人们对糖的原有认识。长期以来,人们一直认为糖只是一种能量物质(如葡萄糖、动物体内的糖原、植物体内的淀粉等)或结构物质(如纤维素、几丁质、果胶等)。20世纪50年代后,随着对糖和糖复合物(如糖脂、糖蛋白、蛋白聚糖等)的分离、纯化以及结构鉴定技术的进步^[1],人们才开始认识到糖的结构要比核酸和蛋白质的结构复杂得多。糖生物学研究所积累的可喜的研究证据已经表明:糖是除核酸和蛋白质之外另一类重要的生命物质,多糖、寡糖以及它们与蛋白质、酯类等结合形成的糖复合物涉及到细胞,特别是多细胞的生命的全部时间和空间过程,首先它们作为信息分子参与细胞的各种识别过程:传递生物信息、参与机体的免疫调节与细胞分化、受精、胚胎发育、血液系统、感染、衰老等多方面功能密切相关^[2]。其次,糖的结构也影响到与其相连的蛋白质的功能,如影响蛋白质的折叠、溶解度、半衰期、抗原性及生物活性等。20世纪90年代诞生的糖生物学被称之为“生物化学最后的巨大前沿之一”。“糖与核酸、蛋白质并列为生命体中最重要的3种大分子”的概念已经被越来越多的人所接受。

1.1.1 糖在细胞间的生物信号传递

细胞间的生物信号传递首先发生在细胞的最外层,而称之为糖萼或细胞外被,在日文中将其形象地描述为细胞的颜面,它们是由细胞质膜与糖脂或糖蛋白结合而成的。构成糖复合物(如糖脂、糖蛋白、蛋白聚糖等)的糖链结构通常是由几十个甚至上百个糖残基构成,可以是同种的,如葡聚糖、甘露聚糖,也可以是不同种的,如所谓的杂寡糖、杂多糖。由于形成糖苷时的连接方式,例如,1,2-糖苷,1,3-糖苷,1,4-糖苷;或是出现糖链的分支;或是糖的异构现象,其中包括 α -构型、 β -构型,以及糖的光学异构体的存在;糖链结构的排列顺序及其长短等,便构成了极为复杂的糖链结构变化,这种结构上的千差万别的糖链成为一个细胞传递给另一个细胞的巨大生物信息资源,而使糖类化合物成为最有魅力的信息载体,它们在多细胞生物中发挥着重要的生理调节作用。

糖复合物是怎样在细胞间传递生物信息而引起它们的生理效应呢?当某一细胞质膜受到其它细胞上糖脂或糖蛋白等糖的复合物作用时,会在细胞内产生一系列的生物化学变化,从而将其生物信号逐级传递,并形成细胞内的生物信号传递网络。

机体的免疫细胞-单核巨噬细胞受细菌脂多糖激活的过程是糖复合物信号传递过程的典型代表。当细菌与单核巨噬细胞接触时,细菌表面的脂多糖在血浆中脂多糖结合蛋白介导下,结合于单核巨噬细胞表面的特异性受体,CD14使细胞膜内侧的蛋白质酪氨酸蛋白激酶活化,并引起级联放大效应,使细胞内一系列蛋白质级联磷酸化,产生巨大的生理效应。或者将细胞外信号传递到细胞核,活化核内转录因子,最终作用于相关的基因,使基因活化转录,引起细胞的生理效应^[3,4]。

1.1.2 糖复合物的生理效应

具有不同组成和结构的糖蛋白、糖脂和蛋白聚糖等糖复合物宛如天线,在细胞间传递着生物信号,它们与身体的多方面重要功能密切相关。

1.1.2.1 免疫功能^[5]

最近研究表明,糖复合物表面糖链结构的变化将导致免疫细胞的免疫调节功能的改变,这将与疾病的发生与治疗相关。1975年, Milstein 等创建的单克隆抗体技术,被广泛地应用于糖链的检测和鉴定,以及相关疾病的诊断。1985年, Feisi 运用单克隆抗体技术,确认了糖蛋白和糖脂的糖链是癌发育抗原。他首先提出了“糖分化抗原”的概念,即发育过程中细胞糖蛋白和糖脂所携带的糖类抗原的改变,是通过有序地逐个增加或减少糖残基而完成的。目前,已知 $2\rightarrow 3$ SiaLe^x 主要是消化系统胰腺、肝脏、胃和大肠等肿瘤的标记性糖链抗原; $2\rightarrow 3$ SiaLe^x 主要是肺癌和卵巢癌等肿瘤的标记性糖链抗原。免疫球蛋白 G(IgG) 的糖链和类风湿性疾病的关系是糖复合物与疾病关系研究得较为透彻的一个例子。IgG 占免疫球蛋白的 80%, 其含糖量略大于 3%。1985年, 木幡阳发现类风湿病人中 IgG 糖链中的 Gal(半乳糖) 低于正常人,从而提出了一个新的学科分支——糖病理学,即研究糖链改变与疾病关系的学科。他与英国著名的糖生物学家 Dwek 合作研究,证实了引发类风湿病是由缺乏 Gal 的 IgG 发生了构象变化,而产生了相应的抗体的缘故。同时,外源性糖复合物常常将影响到免疫细胞的功能,例如:人们熟知的灵芝多糖、香菇多糖、茯苓多糖、苦孢牛肝多糖等能激活各种吞噬细胞。这些作用与糖链分支程度、糖基类型以及糖的构象有关。多糖激活吞噬细胞作用还与其表面负电荷有关^[6]。多糖还具有能调节 T、B 淋巴细胞和 NK 细胞的功能。如灵芝多糖可通过间接激活淋巴细胞中的 DNA 多聚酶而促进 DNA 合成及 T 细胞增殖,促进白介素-2 产生,从而影响 T 细胞亚群的数量与功能,云芝多糖肽则可促进经外源凝集素(PHA)诱导的末梢淋巴细胞增殖,使 CD4⁺ 细胞增加^[7,8]。

1992 年张澄波等^[9]报道采用腹腔注射及灌胃两种途径给试验小鼠水溶性脱乙酰几丁聚糖,测定其体内巨噬细胞的吞噬功能和巨噬细胞精氨酸酶活性,结果显示几丁聚糖对小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能、精氨酸酶活性及酸性磷酸酶活性均有明显的促进作用。巨噬细胞激活后,除本身的吞噬杀菌、杀肿瘤细胞等功能增强外,又能分泌多种免疫因子,调节其它细胞免疫与体液免疫。

1996 年,有人用几丁聚糖(甲壳素)在 C57 近交系小鼠上做对巨噬细胞功能试验,结果几丁聚糖处理组小鼠的巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬率为 $(57.8 \pm 4.7)\%$, 对照组为 $(39.6 \pm 4.5)\%$, 差异显著,表明几丁聚糖有显著增强巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬功能。

梅学文等^[10]研究证实了脱乙酰几丁聚糖具有促进 NK 细胞活性的作用,因此能提高机体非特异性免疫功能,这是几丁聚糖具有抗肿瘤和抗感染作用原理之一。

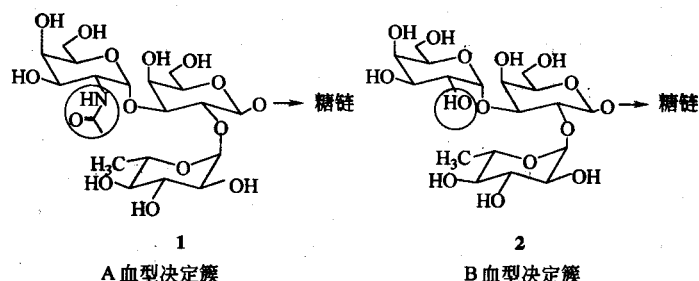
1.1.2.2 细胞的分化与恶变

肿瘤细胞的表面会发生糖复合物结构的改变,从而使其失去分化能力。肿瘤恶性的行为常伴随着糖复合物分子(例如岩藻糖糖肽)相对大分子糖肽的出现和增加,这种相对大分子的糖肽比正常的相对小分子糖肽有更多的分支结构和构象的变化,同时,肿瘤细胞表面的糖链的改变还与末端唾液酸含量的变化有关^[11]。

1.1.2.3 血型与凝血

1900 年 Landsteiner 发现了人类的主要血型 ABO。血型的发现在输血,组织及器官移植,法医鉴定等方面发挥作用,因而 1930 年 Landsteiner 获得了生理和医学诺贝尔奖。经 Landsteiner 与 Watkins 以及众多的从事免疫学、医学的科学家半个多世纪的艰苦卓绝的努力,终

于在 1960 年确定了 ABO (H) 的抗原决定簇是糖类, Watkins 等人的工作, 证实了这一结论, 并测定了这些糖类的结构。现已证明: H 抗原的前体的结构基础正是其糖蛋白和糖脂中糖链非还原末端的二糖-半乳糖-N-乙酰氨基葡萄糖。由于糖基的连接方式不同, 例如 $\beta(1\rightarrow3)$ 或 $\beta(1\rightarrow4)$ 连接, 又有不同血型。末端糖基的不同导致了不同血型, 如末端糖基为 2-N-乙酰氨基半乳糖者 (1), 为 A 型血; 末端糖基为半乳糖者 (2), 为 B 型血; 末端糖基为 2-N-乙酰氨基半乳糖和半乳糖的混合型, 则为 AB 型血; O 型血则两种糖基都不存在。可见, H 抗原, A 抗原或 B 抗原是由于末端不同糖基的种类及其连接顺序和方式所造成的, 仅仅一个糖基的差异就改变了血型。如在 H 抗原及其前体二糖的 N-GlcNAc 上再接有 $\alpha(1\rightarrow4)$ 岩藻糖 (Fuc), 就会产生另一类型的血型, 即 Lewis 血型。在不同的抗原接上不同的苷键 [例如 $\alpha(1\rightarrow4)$, 或 $\alpha(1\rightarrow3)$] 的 Fuc 就会形成不同新的抗原, 例如 Le^a 抗原、 Le^x 抗原和 Le^y 抗原。这样便构成了以糖链残基结构为基础的相当大的抗原系统。



凝血作用也与多糖有关, 一些酸性多糖具有抗凝血的作用。肝素是目前应用最广泛的抗凝血多糖, 它是在 1918 年从肝组织中分离出来, 后来被鉴定为一种带有高度负电荷的糖胺聚糖, 其中 D-葡萄糖醛酸较多, 而硫酸酯基较少 (见 2.3.2.3 节)。肝素的优点是具有较高的抗凝血效力, 而且注射给人与动物后无任何毒性, 它是通过抑制凝血酶的活性而在血液凝固过程中产生重要影响, 能促进抗凝血酶 III (AT-III) 很快中和凝血酶的活性^[12]。目前, 已知的具有抗凝血作用的多糖还有: 木聚糖、葡聚糖、岩藻聚糖以及许多杂多糖, 例如, 含半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘露糖、葡萄糖醛酸及其 4-甲酯的杂多糖, 它们均有着高的分子量和强负电荷性。

几丁聚糖 (壳聚糖) 有着与肝素相似的糖链结构, 而且易于发生与肝素同类型的化学修饰。几丁聚糖的硫酸衍生物具有抗凝血作用, 其活性随着其含硫酸的增加而迅速增加^[13]。几丁聚糖的抗凝活性还与导入糖醛酸羧基有关, 与其衍生物的相对分子量及构型有关。与肝素相似的是, 几丁聚糖衍生物也是通过对血浆抗凝血酶 III 作用来加速凝血酶失活, 而抑制凝血过程。

1.1.2.4 细胞发育

糖类对机体细胞的生长有激活与促进或抑制作用。而细胞与细胞间的相互作用、变化也将导致细胞表面糖类结构的变化。现有的研究证明, 几丁聚糖及其衍生物对机体细胞有激活、促进、抑制及黏附作用。在细胞培养实验中可以观察到含几丁聚糖及其衍生物的培养基可使肌细胞和上皮细胞的活性有所增加, 可促进人表皮角化细胞的生长, 促进内皮细胞生长, 同时还具有促进血管内皮细胞生长和抑制血管平滑肌细胞增殖的双重作用。几丁聚糖也有抑制成纤维细胞的生长作用。

在生物体的发育过程中, 细胞表面糖类结构也发生变化。例如, 胎儿时期的红细胞表面的聚乳糖胺为直链型, 当出生后在向成人发育时, 红细胞表面的聚乳糖胺内直链向多分支的支链变化。又如, 正常早期胚胎多潜能细胞表面具有不寻常的大分子糖肽存在, 当细胞发育分化

后, 大分子的糖肽逐渐消失。

1.2 糖 化 学

1.2.1 糖结构的复杂性与多样性

从 19 世纪初期至中期, 有机化学成为一门学科以来, 糖化学的研究便已经开始了, 它起源于 18 世纪末 Emil Fischer 对所有六碳糖结构的确定。被誉为“糖化学之父”的 Fischer 以及 Haworth 于 20 世纪 30 年代确定了葡萄糖等许多单糖的构型。随后, 许多氨基糖相继在 50 年代后被发现, 并弄清楚了人类血型决定簇与含有 β -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 3) 的寡糖片段有关。随着现代分离、分析技术的发展, 如核磁共振 (NMR) 技术、高效液相色谱 (HPLC)、质谱 (MS) 技术, 尤其是联用技术以及高场核磁共振与软电离技术 (如 ESI 和 MALDI) 的出现, 使得糖链结构的测定快速而准确; 此外利用生物技术 (各种糖基水解酶、转移酶、抗体等) 使人们开始从深层次结构上了解糖链的结构。

研究糖的结构, 比研究核酸和蛋白质的结构复杂。首先要搞清楚组成糖链的单糖种类和分子比例, 确定单糖之间的连接位置; 糖链是直链, 还是支链; 糖链中糖基的排列顺序; 糖的苷键构型是 α -苷, 还是 β -苷。与只看相互连接的核苷酸和氨基酸不同, 单糖可在多个羟基 (或其它活泼 H 的基团) 上以两种可能的构型相连成寡糖和多糖。例如, 4 种不同的单糖, 理论上可形成 35560 种四糖, 而 4 种不同的核苷酸或 4 种不同的氨基酸连接只能形成 24 种不同的四核苷酸或四肽。糖链上结构的修饰, 如甲基化、乙酰化和硫酸化、磷酸化使得寡糖的结构比多肽和寡聚核酸复杂得多。糖还可以共价键和肽链相结合成为复合物, 即所谓的糖蛋白、蛋白聚糖和肽聚糖; 糖与脂类以共价键结合而成为复合物的糖脂和脂多糖, 包括多糖在内它们统称为糖复合物 (glycoconjugates)。这种糖链结构的多样性与复杂性使得对糖的研究远远落后于核酸和蛋白质的研究。就研究技术而言, 首先要得到纯化糖链的样品, 这比得到纯化肽链样品要困难得多。用同一种生物材料分别提取、分离、纯化出同一种糖复合物时, 不同实验室却报道出不同的糖链结构。在人们以为是已经纯化了的糖链样品, 而实际上它并非是一种分子结构, 而表现出糖链结构上的“微观不均一性”, 即一个糖蛋白中肽链顺序是一定的, 糖基化位点也是一定的, 但上述糖链结构却是不均一的, 即有着不同构型的结构分布 (称为糖型)。要得到单一糖型的糖复合物却是非常困难的。即使得到纯化了的糖链样品, 还需通过甲基化、化学降解或酶解, 以及核磁共振和质谱等现代物理技术, 把多方面的结构信息拼凑、分析和整理, 才能得到该糖链序列的初步结论。而分析肽链或蛋白质序列的结构, 可以用早已问世的氨基酸自动分析仪, 结合一些比较成熟的方法, 只需少量纯化的肽链样品, 便可得到该肽链的氨基酸序列, 所得结构的信息准确, 又方便得多, 省时得多。

1.2.2 糖结构的现代分析技术^[14]

1.2.2.1 核磁共振技术

自 20 世纪 70 年代将核磁共振 (NMR) 引入糖化学研究中以来, 它在结构分析中起了决定性的作用。核磁共振技术是研究糖及糖复合物结构最常用、最有力的手段之一, 它可以测定多糖的一级结构、化学组成、糖残基排列顺序及糖苷键的键合位置、糖的构型和构象, 也可测定寡糖的二级结构^[15]。¹H NMR 主要解决多糖结构中糖苷键的构型问题, 而¹³C NMR 的化学位移较¹H NMR 为广, 分辨率好, 不仅能确定各种碳的位置, 而且可区别糖分子的构型和构象, 能够确定糖的立体结构。此外不损耗样品也是 NMR 技术在糖结构分析中的优点, 但其灵

灵敏度不适合痕量成分的分析,不过最近发展起来的低温超导探头,它能提高 NMR 灵敏度 3.5~4 倍,同时,由于 NMR 信号是通过序列信号平均得到的,因此,测量中平均化的次数可以减少到 1/10~1/16。并且,极微量体积(微升、纳升)的探头也已经设计出来^[16],使用这些低温超导微体积新探头,对于提高在多糖分析中的灵敏度与分辨率以及在分子水平上研究糖复合物是极为有利的。目前,更高磁场强度的 NMR 已经出现,它可以进一步提高灵敏度和分辨率。全世界已有 50 台以上 800MHz 的 NMR 被安装起来,900MHz 的 NMR 不久以前已商业化。Scripps 研究所的 Peter Wright 曾预言^[17]:“高磁场的 NMR 可用于解决生物分子领域的所有问题”。Wright 的预言今天已逐步地开始被证实。例如发展起来的核磁共振与液相色谱联用(LC/NMR)技术可以免除 LC 分析样品繁琐的回收操作,从而防止样品的污染与损失。直接利用 LC/NMR 谱仪的特殊探头进行结构分析,不仅可以完成过去难以完成的微量多糖等生物活性物质的分析,而且工作周期短、效率高。由组合化学合成得到的几百个乃至上千个混合物的组合化学库不必一个个地装样,就能快速扫描分析每一个样品。LC/NMR 技术可以用质子化溶剂, NMR 不再需要氘代溶剂。随着 NMR 的计算机处理、数字化和精密制造的革命,使得测定程序自动化程度空前提高,其中梯度场调线形使 NMR 测定变得快速而简便。

1.2.2.2 质谱技术

最早利用质谱技术对糖类进行分析始于 20 世纪 50 年代末,由于早期的质谱计主要局限于电子解离法(EL-MS),不能直接测定热不稳定的、不易挥发的和强极性的生物大分子。早期对于低分子量的单糖或寡糖,可采用乙酰化、甲基化等方法使之转变为可挥发性的衍生物,从而研究这些衍生物形成碎片离子的规律或机理。随后,人们利用毛细管色谱/质谱法可以测定寡糖的糖残基组成及分支情况,该方法因灵敏度高,已成为实验室分析糖的常规手段。20 世纪 80 年代以来,随着快离子轰击电离质谱计(FAB-MS)的问世,质谱技术在生物大分子领域中的应用有了很大发展^[15]。测定寡糖时灵敏度为 1nmol/1 μ L 基质,比核磁共振所需的样品量少 100 倍以上,可以获得未知寡糖的分子量、糖基排列序列及其它结构信息。例如蒋可^[18]等人采用液态二次离子质谱测定了从免疫球蛋白中分离得到的糖链,又测定了从人体乙型肝炎表面抗原(HBsAg)中分离出来的糖链,分别测定单糖的组成及大致的分支结构;H. Egge 等应用 FAB/MS 技术测定了许多天然的神经营鞘糖脂(glycosphingolipid, GSL)的全甲基化合物,取得满意结果。M. N. Fukuda^[19]测定了从人体粒性白细胞中分离出来的糖脂。

近年,各种“软”电离技术,如电喷雾电离质谱 ESI-MS 和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 MALDI-TOF-MS 以及高性能串联质谱的发展使得质谱在分析类似于糖类生物大分子中有了用武之地, FAB-MS 以及 LSI-MS 伴随着高磁场多级串联质谱仪器的出现,已经能够迅速地测定痕量的多达 30 个糖基组成的糖链的分子量、糖残基种类、序列、组成及联接位点等结构信息。与各种色谱的在线联用,如 GC/MS, LC/MS, CEZ/MS 等以及自身联用 MS/MS,并在高分辨核磁共振谱的配合下,在未来糖复合物结构分析中,在揭示生命奥秘的艰难进程中将发挥积极作用。

1.2.2.3 其它仪器分析

傅里叶紫外分光光度计、傅里叶红外光谱仪是实验室中最常用的光谱仪器,它们对于鉴定糖及其复合物中的发色团,各种官能团以及糖的构型,仍是不可缺少的,在糖结构分析中,可作为核磁和质谱中的辅助手段。此外,发展中的激光诱导的荧光光谱已在生命科学与环境科学等领域中受到重视,当它与色谱、毛细管电泳和流动注射分析联用时,使其兼具有色谱、毛细管电泳分离的高选择性、流动注射分析的高速度和激光诱导荧光光谱的高灵敏度,从而在寡糖及糖蛋白的定性、定量分析中广泛使用。毛细管区带电泳,由于采用了与荧光光谱的联用技术,有可能来研究糖蛋白的微观不均一性问题。同时,由于糖蛋白与有关物质(如某些信号载

体等)结合后,电泳谱图的图貌、峰数均会发生变化,可用于研究糖蛋白的生物学功能、反应的动力学等问题。

1.2.2.4 生物分析方法

与生物大分子的特异性结合的分析方法就是生物分析方法,其中免疫分析是主要内容。自然界中的糖类(单糖、寡糖及其衍生物、多糖)是没有抗原性的,但如果用某种化学方法,将其附着在一种载体(如牛血清蛋白、麻仁球蛋白)上而成为一种偶联物,尔后用其对选择的动物进行免疫,即可产生抗血清(可称这些糖类物质为半抗原)。该抗血清与相应的半抗原具有特异的亲和力,而与其相应的半抗原的衍生物只有不同程度的亲和力。可以测定半抗原对特异的抗血清与偶联物结合的抑制常数来确定未知糖类的部分结构。目前已发展了一系列免疫分析方法。值得一提的是,用于生物分析的表面等离子共振技术可能在分析生物大分子方面大显身手。物理分析(如上述的各种仪器分析)、化学分析、生物分析方法在解决糖复合物结构或是了解生物活性信息的实际问题时,常常是相互配合、相互补充的。物理方法,如 NMR、MS 不能提供有着生物活性的信息,而采用生物组织或活体的生物试验,却有独到之处,因为它可以揭示生物活性物质的靶点。但生物试验却无法提供在分子水平上的信息。目前,人们试图研究生物(例如细胞中的)物质的分析方法,不仅探讨受体的结合,还能搞清楚包含在信息传导和信号通路中的已知的分子过程,以阐明在分子水平上被分析物质与细胞机制的选择性,这无疑对于探索糖复合物的生理功能和新药的研制与开发等将起到重要作用。

由于糖类结构的多样性、复杂性,如何快速、准确地确定糖链的组成、序列、连接方式、分支、修饰、构型与构象以及提供生物活性靶点仍是一个巨大的难点,尽管 ESI-MS, MTOF-MS 已经应用于糖类研究,但糖类研究的方法学仍有待突破。

1.2.3 糖的合成化学

1.2.3.1 糖与现代有机合成

自 1861 年 Бутлеров 首次合成了糖,随后费歇尔·因(E. Fischer)在糖等的合成方面荣获诺贝尔化学奖后,至今已有一百多年的历史了,它相对于其它生物大分子(如多肽、蛋白质和核酸)的合成都要缓慢得多。因为在结构复杂的糖合成中要解决区域选择性和立体选择性问题,合成中复杂的基团保护与去保护策略,糖端基碳的活化方式及产物的立体选择性控制是十分关键的问题,而目前又没有一个通用的合成方法。同时,繁琐的多步反应所带来的分离纯化技术也更困难,产率往往偏低。近十多年以来,虽然合成一个双糖或三糖并不视为一个杰出的工作,但一个不太复杂的寡糖(例如六碳糖)的合成与分离在国际上也只有为数不多的实验室才能完成^[19]。

人类进入 21 世纪以来,社会的可持续发展及其所涉及到的生态、环境、资源、人口、经济等方面的问题已成为国际社会关注的焦点,日益严格的环境保护法规的陆续出台,促使合成化学工业朝着减少或杜绝环境污染的方向发展。绿色化学、洁净技术和环境友好过程是当代合成化学的新目标和方向。此外,还有合成的有效性、经济性以及合成速度,都是现代有机合成的新概念和要解决的新问题。这种合成中的新概念已由美国斯坦福大学 Wender 教授在《Chemical Review》杂志 1996 年《有机合成的前沿》前言中,给出了完整的定义^[15]:一种理想的(最终是实现的)合成指的是“用简单的、安全的、环境友好的、资源有效的操作;快速、定量地把价廉、易得的起始原料转化为天然或设计的目标分子”。这一新概念的提出,不仅只是指出了绿色合成的主要途径,也指出了有机合成化学的某些发展趋势,当然也是糖合成的发展趋势。

随着生命科学与材料科学的发展,尤其是后基因组时代的到来,需要提供多种具有特定生理活性或生物材料功能的有机分子,传统的有机合成概念已适应不了这一发展要求,近年来组合化学与高通量筛选就是因新概念的导入而发展的新领域和新技术,同时带动了有机合成方法的革命。近 20 年来,有机合成的方法研究在以下几方面得到了快速发展:

- (1) 高选择性试剂的合成与设计;
- (2) 新型物理手段存在下的合成反应;
- (3) 新型介质中的有机合成:如水相、离子液体、超临界液体等;
- (4) 新型生物催化剂及有机溶剂中的生物催化反应;
- (5) 组合化学在有机合成方法学发展中的应用;
- (6) 有机合成反应的选择性调控;
- (7) 立体可控的自由基反应;
- (8) 新型催化剂包括手性催化剂的合成与设计。

有机合成方法上的更新,以及 20 世纪后由柯里 (E. J. Corey) 总结和提出的“逆合成分析法”,导致了許多重要的复杂天然产物合成,而这一时期由 Kishi 小组的最复杂分子海葵毒素 (Palytoxin, 见图 1-1) 的合成被当时称为是珠穆朗玛峰的攀登。

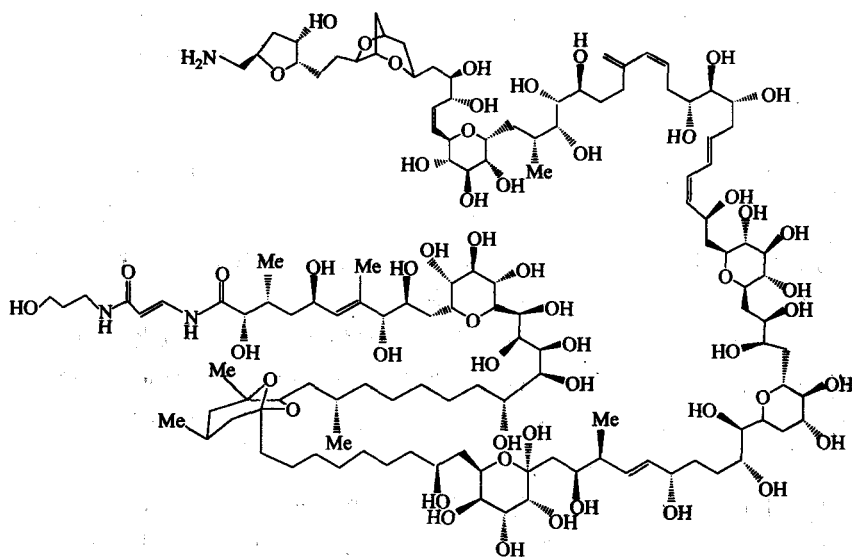


图 1-1 海葵毒素

现代有机合成的全新面貌给糖的合成带来了机遇与发展。

1. 2. 3. 2 立体选择合成新方法不断出现

经典的糖苷与寡糖的合成始于 1901 年的 Koenigs-Knorr 法,近年出现的氟代糖法^[20]是对 Koenigs-Knorr 法的改良与发展,所用的催化剂不仅限于重金属盐,还可以是 $\text{SiF}_4/\text{TMSOTf}$ 、 DAST/THF 等,同时,氟代糖的热稳定性相对溴代糖、氯代糖好,可用常规方法进行分离与纯化;目前常用的糖基化反应是三氯乙酰亚胺酯法 (Schmidt 法)^[21],它具有收率高,立体选择性好,反应条件温和,应用范围广等特点, Schmidt 的糖基神经鞘脂的合成^[22]便是典型一例。2001 年, Seiichi Inamura^[23]等报道了以三氯乙酰亚胺酯为离去基团,合成了细菌胞壁的肽聚糖片段,分别是包含有二肽的壳四糖和壳八糖,其中在合成含壳二糖片段时的产率高达 98%。第三种是卤代乙酸酯法, Koayashi 等人首先报道了使用糖基三氟乙酸酯与羧酸的反应,

蔡孟深等在碳苷^[24]、氧苷^[25]、硫苷^[26,27]、核苷^[28]的合成中应用此法取得满意结果,其最大优点是能获得高立体选择性产物,且反应快,条件温和,产率高。例如应用三氯乙酸酯法还可获得稳定的糖基三氯乙酸酯给体。此外,还出现糖基硅烷醚法,即使用三甲基硅烷醚或叔丁基二甲基硅烷醚基作为端基碳上糖基给体的离去基团进行糖基化反应^[29],产物的立体选择性由邻基参与和端基效应控制。

1.2.3.3 寡糖的固相合成

由 Merrifield 创立和发展的固相合成法在多肽和寡核苷酸合成中得到成功应用以来,糖化学家们也试图将这一方法应用于寡糖的合成。Frechet 和 Schuerch 于 1971 年首次报道了寡糖的固相合成^[30],该法最大优点是一旦寡糖链与完全不溶载体相键合,那么每步的反应只通过过滤和洗涤便可有效达到纯化的目的。但由于寡糖合成的复杂性,在 20 世纪 80 年代停滞了一段时期后,90 年代才有了突破,其中 Danishefsky^[31]所领导的研究小组摆脱传统的固相合成途径,采取了与其相反的策略,成功地在固相载体上得到立体选择性非常高而且几乎没有缺序的寡糖链,给分离纯化工作带来极大的便利。不足之处,产率不够高,且一般只能合成 β -糖苷^[32]。90 年代后, Van Boom 等采用自动 DNA 合成仪,将固相合成 DNA 的方法应用于多糖的合成^[33]。2001 年,Seeberger 等人^[34]首先报道了寡糖的自动固相合成技术,从而使固相合成糖的研究有力地向前推进了一步。然而由于形成糖苷键所进行的长时间又极为复杂的反应而阻碍固相合成的自动化。糖合成中的立体控制,产率以及检测手段的提高还需要糖化学家做许多工作。

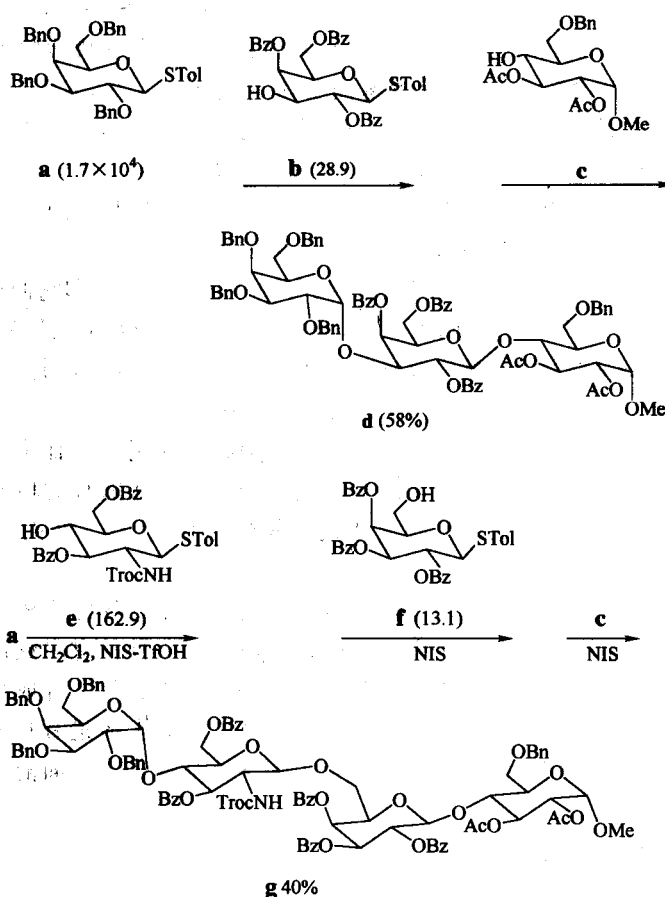
1.2.3.4 糖的组合合成

利用平行合成的原理,在短时间以及有效的合成步骤内,快速地合成大量易于表征的化合物或混合物,形成所谓化合物库,并通过高效的分离、鉴定、筛选技术,即通过高通量筛选方法,筛选出生物活性化合物。这一研究方法极大地缩短了活性化合物发现的时间,是在有机合成和药物化学研究领域中所发生的一场重大革命。

糖的组合合成相对小分子与其它生物高分子领域的组合合成要缓慢得多。Kanie 等^[35]首先用保护的单糖或二糖作为糖基受体进行随机糖基化反应以构建二糖或三糖库。Hui 等^[36]利用双随机化方法制得了一个含有 16 个组分的皂角苷库。该法的缺点是糖基化水平不易控制和产物分离以及识别困难。

在组合合成糖中具有卓越成效的工作属 Wong 领导的研究小组^[37],他们于 1999 年运用计算机设计“一锅合成法”来组装寡糖库。“一锅法合成”其原理是将其原料(具有活性差异)按一定的顺序加入反应釜中,待前一步结束反应后,再加入新的原料,与前一步反应所得产物进行后一步反应,如此重复,最终把所要的产物分离出来。该法不需要对中间产物分离、纯化,从而大大提高了产率。然而大多数的“一锅法合成”缺乏定量设计,而 Ley 和 Wong 工作组的策略则以其定量性著称^[38]。Ley 等人^[39]首先用 ^1H NMR 技术测定了一些作为构建模块的糖基给体和给体-受体的相对反应活性值,运用该值可以预测一锅法合成的反应产物,以及为合成特定目标寡糖而选择适宜的构建模块,由于所测的给体糖核类型较少,而限制了它的运用。

Wong^[37]工作组在此基础上运用高效液相色谱法(HPLC)对构建板块的相对反应活性(RRV)进行了定量测定,1999 年建立了 50 个构建板块的相对反应活性值(RRV)数据库,2000 年又进一步扩充到 98 个(RRV),并运用 RRV 值设计了一套用于指导寡糖合成的计算机程序 OptiMer。这一策略,使得线性或支链寡糖的可程序化设计与快速合成成为可能,并且实现了一个三糖和四糖的自动合成,如下式:



这是迄今为止国际上第一个可程序化的运用一锅法来合成寡糖的实例。随后, Xin-Shan and Chi-Huey Wong 等人又用该法合成了 33 个部分或全部解除了保护的二糖或三糖^[40]。这一研究成果, 在国际学术界产生极大反响, 美国的《科学》(*Science*, 1999, 283, 911) 和《化学与工程新闻》(*C & EN*, March 22, 1999, 30) 等杂志开辟专栏进行了评述。可程序化一锅法合成寡糖使糖的合成技术朝着最终完全突破机器化和计算机化的目标迈进了一大步。

1996 年, Kahne 等^[41]用异头碳亚砷化物作为糖基给体, 用混合裂分方法在树脂珠上制备了一个含 1300 个二糖和三糖的寡糖库, 这方法被称之为寡糖库的固相组合合成: 即通过一定的连接基团将被保护的单糖分子连接到某种载体上, 然后以其作为糖基给体 (或糖基受体), 再与液相中的糖基受体 (或糖基给体) 反应。这一方法的难点在于除考虑糖基的保护与去保护策略外, 还要考虑载体与连接基团以及糖基化反应是否兼容。K. C. Nicolaou^[42]、G. J. Boons^[43]、P. H. Seeberger^[44]等在这方面做了很多工作, 其中 Seeberger 研究小组将一台多肽合成仪改装成寡糖自动合成仪, 运用固相合成技术仅 12 个小时就合成了一个由 12 个单糖组成的寡糖, 而按常规方法得花上几个月的时间。虽然它还只能对于一级醇的糖基化, 即得到 β -(1 $\rightarrow$ 6) 连接产物, 但合成仪的出现毕竟使寡糖的自动化合成迈开了第一步。

1. 2. 3. 5 糖的酶促合成

酶催化合成是现代有机合成中不可缺的生物催化方法, 酶催化的反应可对不加保护的高官能团底物进行条件温和, 环境友好地转化, 得到具有高度的区域选择和立体选择产物。其优点是: 简化合成路线, 反应产物不复杂, 易于分离、纯化; 可避免使用重金属和有机溶剂, 能源消耗低; 著名