

苦豆子多糖溶液构象的研究

陈冠^{1,2}, 张岩¹, 冯文茹¹, 王文彤¹, 陶遵威^{1*}

1. 天津市医药科学研究所, 天津 300020

2. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: **目的** 研究苦豆子多糖溶液的构象特征以及在不同因素影响下的溶液行为。**方法** 采用碘-碘化钾反应观察苦豆子多糖链的分支情况和刚果红试验研究构象特征; 采用圆二色谱(CD)法研究在不同浓度、温度和添加钙离子等条件下苦豆子多糖构象的变化。**结果** 碘-碘化钾反应结果显示苦豆子多糖有较长的侧链和较多的分支; 刚果红试验中苦豆子多糖具有多股螺旋结构; 浓度、温度以及添加金属离子使苦豆子多糖溶液构象发生变化。**结论** 通过碘-碘化钾反应、刚果红试验和圆二色谱法的结合可更加全面地了解苦豆子多糖溶液的构象。

关键词: 苦豆子; 多糖; 构象; 圆二色谱

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2015)03-0237-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.03.002

Conformation of *Sophora alopecuroides* polysaccharide solution

CHEN Guan^{1,2}, ZHANG Yan¹, FENG Wen-ru¹, WANG Wen-tong¹, TAO Zun-wei¹

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

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the conformation of *Sophora alopecuroides* polysaccharide (SAP) solution and its change under the condition of various factors. **Methods** Branch of SAP chain was observed by I₂-KI reaction. And the conformation of SAP in solution was studied by Congo red experiment. The conformations of SAP in different conditions were analyzed by circular dichroism (CD) spectrum. **Results** I₂-KI reaction showed that SAP had long chains and many branches. Congo red experiment showed that SAP was a multiple helical polysaccharide. The conformation of SAP solution can be affected by the changes of the concentration, temperature and metal ions. **Conclusion** The conformation of SAP solution can be studied more by methods of I₂-KI reaction, Congo red experiment and CD spectrum.

Key words: *Sophora alopecuroides*; polysaccharide; conformation; circular dichroism spectrum

苦豆子多糖是由豆科槐属植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 的种子中提取得到的多糖, 其主要成分为半乳甘露聚糖, 可作为增稠剂、稳定剂和生物材料而广泛应用于食品、医药、造纸等行业^[1-3]。目前, 苦豆子多糖的提取分离以及纯化工艺已经有了系统的研究, 并得到质量稳定的苦豆子多糖^[4-8]。在此基础上, 为了增强该多糖的活性, 进行了硫酸化、磷酸化以及羧甲基化等一系列的衍生化, 并研究各个衍生物的抗氧化活性^[9-11]。目前, 有关苦豆子多糖的研究尚未涉及到溶液行为及构象, 而多糖

的立体构象对于多糖的生产和活性研究有着重要意义^[12-13]。为了进一步开发利用苦豆子多糖, 本研究研究了不同浓度、温度和金属离子等对其溶液构象的影响, 为其临床应用和开发研究奠定基础。

1 材料

Specord 210 Plus 紫外可见分光光度计(德国耶拿分析仪器股份公司); Jasco J-715 圆二色谱仪(日本 Jasco 公司)。

苦豆子多糖经本实验室提取纯化冷冻干燥而得(质量分数为 98.9%); 刚果红、氢氧化钠、氯化钙

收稿日期: 2014-09-19

基金项目: 天津市卫生局科技基金资助项目(2012KY30)

作者简介: 陈冠, 女, 助理研究员, 主要从事天然产物研究与开发工作。Tel: 13672009387 E-mail: guanchenren@yahoo.com

*通信作者 陶遵威, 男, 研究员, 主要从事化学药物的合成工作。Tel: (022)27236182 E-mail: taozunwei@126.com

均为分析纯, 均购自天津试剂开发公司。

2 方法与结果

2.1 苦豆子多糖链的分支情况

配制质量浓度为 1.0 mg/mL 的苦豆子多糖溶液 2.0 mL, 加入 1.2 mL 碘试剂(含 0.02 % I_2 的 0.2% KI 溶液), 混匀后测定紫外吸收, 观察紫外最大吸收的范围, 见图 1。苦豆子多糖与碘试剂反应物的最大吸收峰在 300~500 nm, 而非 565 nm, 说明该多糖有较长的侧链和较多的分支^[14]。

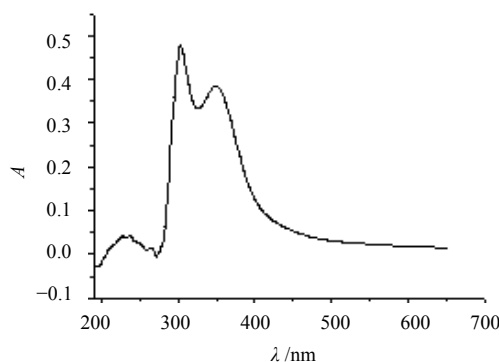


图1 苦豆子多糖与碘试剂反应后的紫外可见吸收光谱图

Fig. 1 UV spectrum of SAP after reaction with I_2 -KI

2.2 苦豆子多糖溶液构象的特征^[14]

刚果红是一种染料, 可以与具有三股螺旋链的多糖形成络合物, 络合物的最大吸收波长会发生红移, 在一定的 NaOH 浓度范围内, 表现为最大吸收波长的特征变化, 当 NaOH 浓度大于某个浓度后, 最大吸收波长急剧下降。

苦豆子多糖溶液质量浓度为 1 mg/mL, 刚果红溶液浓度为 80 μ mol/L, NaOH 依次配成不同浓度 (0.05~1.0 mol/L 用邻苯二甲酸氢钾标定), 将苦豆子多糖溶液、刚果红溶液、NaOH 溶液按体积比 1 : 1 : 2 混合并摇匀, 25 $^{\circ}$ C 下静置 10 min 后用紫外分光光度计 400~600 nm 进行扫描, 依次测定混合液在不同浓度 NaOH 下最大吸收波长的变化。

苦豆子多糖水溶液与刚果红形成的络合物在 NaOH 浓度 0~0.5 mol/L 最大吸收波长的变化见图 2。随着 NaOH 浓度的增大, 刚果红被苦豆子多糖络合后变成紫红色, 其络合物的最大吸收波长红移, 在一定 NaOH 浓度范围内, 络合物出现亚稳区, 表明多糖分子存在多股螺旋构象, 当 NaOH 浓度达到 0.3 mol/L 时, 其最大吸收波长开始下降, 当浓度达到 0.4 mol/L 时急剧下降到与对照相同, 这种特征变

化与张安强等^[16]观察到的硫酸酯化猴头菌多糖的情况类似, 这表明在中性、弱碱性范围内, 苦豆子多糖是有序的三股螺旋结构, 当碱的浓度达到 0.4 mol/L 时, 解体为单股结构, 不能与刚果红形成络合物, 变成无规则的线团形式, 从而使最大吸收波长骤降。

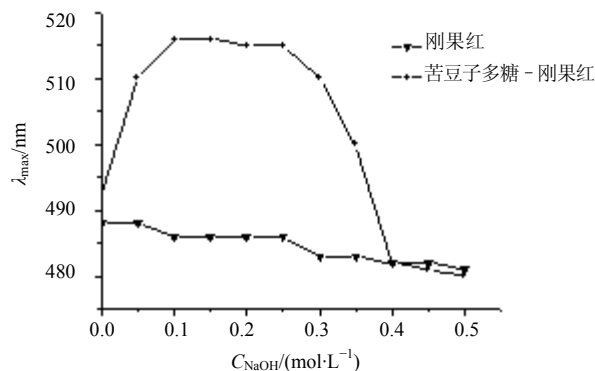


图2 苦豆子多糖-刚果红络合物的最大吸收波长变化

Fig. 2 Change of maximum absorption wavelength of SPA-Congo red complex

2.3 苦豆子多糖溶液构象的影响因素^[16-18]

将苦豆子多糖配制成 1.0 mg/mL 的溶液, 波长范围 190~300 nm, 通过改变浓度、温度和添加 Ca^{2+} (3% $CaCl_2$ 溶液) 等因素观察苦豆子多糖溶液的圆二色谱 (CD) 变化, 进而分析其构象的变化。

2.3.1 浓度的影响 分别配制质量浓度为 1.0、0.5 mg/mL 苦豆子多糖水溶液, 测定其圆二色谱, 观察苦豆子多糖在不同浓度下溶液构象的转变, 见图 3。由图 3-A 可看出, 苦豆子多糖在 195 nm 处有较大的正峰, 质量浓度由 1.0 mg/mL 降低至 0.5 mg/mL 后, 苦豆子多糖随着质量浓度降低, 195 nm 处吸收减弱, 最大吸收位置没有改变; 从图 3-B 可看出, 苦豆子多糖在 230、270 nm 处有正 Cotton 效应, 且随着质量浓度的降低而减弱, 这是由于苦豆子多糖具有有序的三股螺旋结构, 随着质量浓度降低, 氢键的作用减少, 疏水作用增强, 有序的状态减弱, 多糖分子趋于聚解, 手性减弱, 空间构象发生了改变。

2.3.2 温度的影响 测定 20、70 $^{\circ}$ C 下苦豆子多糖溶液的圆二色谱, 观察苦豆子多糖在不同温度下溶液构象的转变, 见图 4。195 nm 处吸收强度随着温度升高而稍有增强和红移, 提示温度升高到 70 $^{\circ}$ C 后苦豆子多糖的手性略有增强。

2.3.3 钙离子的影响 苦豆子多糖在 Ca^{2+} 水溶液中圆二色谱见图 5, 结果表明其吸收峰增强和红移,

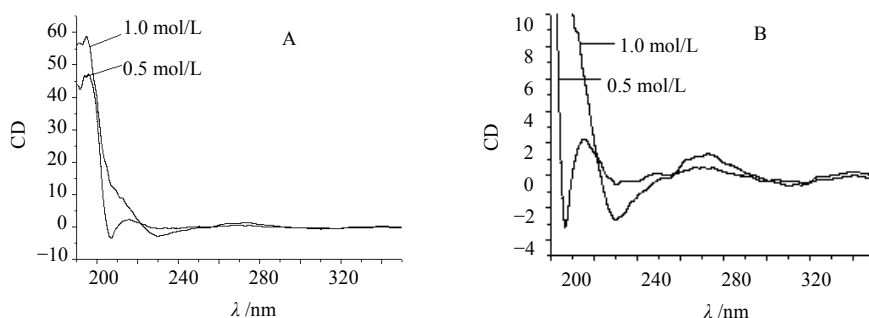


图3 不同浓度的苦豆子多糖圆二色谱图(A)和部分放大图(B)

Fig. 3 Effects of concentration on the CD spectrum (A) and local amplification (B) of SAP

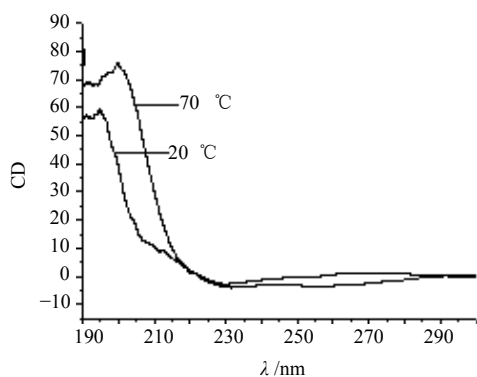


图4 不同温度处理的苦豆子多糖的圆二色谱图

Fig. 4 Effects of temperature on the CD of SAP

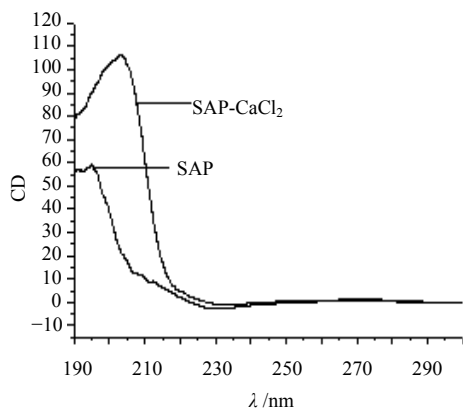


图5 Ca^{2+} 处理的苦豆子多糖的圆二色谱

Fig. 5 Effect Ca^{2+} of temperature on the CD of SAP

推断苦豆子多糖分子间与 Ca^{2+} 桥接或络合, 发生胶化的过程中, 形成“蛋箱”结构, 导致分子的不对称性增强^[18]。说明钙离子参与了苦豆子多糖的胶化过程, 但作用较弱。

3 讨论

多糖的活性与其构象有关, 本研究中, 刚果红

实验结果表明苦豆子多糖具有三股螺旋结构, 而三股螺旋结构具有较强的生物活性, 其药理活性有待进一步研究。

通过观察几种不同因素(浓度、温度和钙离子)对苦豆子多糖溶液圆二色性的影响, 研究苦豆子多糖在溶液中构象的变化, 从其溶液行为的微观入手, 为探讨构象转变和宏观性能的相关性提供参考。浓度、温度和钙离子因素对苦豆子多糖溶液的空间构象均有不同程度的影响, 主要表现在吸收强度的变化。金属阳离子通过配位作用会对多糖的结构造成显著影响, 常见的如 Ca^{2+} 与海藻胶^[19]、桔皮果胶形成“蛋箱”结构^[20], 因此, 通过在水多糖溶液中添加金属离子, 检测其 CD 谱的变化, 可以为多糖的结构提供更多信息。苦豆子多糖分子与 Ca^{2+} 能形成“蛋箱”结构, 导致分子的不对称性增强。研究苦豆子多糖在不同环境因素下的构象的变化, 为苦豆子多糖的优势构象和构效关系研究提供理论依据, 同时也为进一步临床应用和奠定理论基础。

多糖的空间构象研究较蛋白复杂, 不能以简单的 α -螺旋或 β -折叠来描述, 从糖类化合物 CD 的形状和强度, 仍可以了解到寡糖(或多糖)的一级结构和空间构象等方面的结构信息, 甚至可以作为糖类化合物结构变化的一种检测手段。另一方面, CD 谱只能作为判断多糖溶液行为的一个论据, 要得到更多的信息还需要结合其他技术手段, 如 NMR、X 射线以及分子模拟等手段共同论证。

参考文献

- [1] 叶文斌, 樊亮. 苦豆子多糖复合涂膜对成县樱桃贮藏品质的影响 [J]. 甘肃农业大学学报, 2013, 48(3): 62-67.
- [2] Buritia F C A, Freitasc S C, Egitoa A S, *et al.* Effects of

- tropical fruit pulps and partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds on the dietary fibre content, probiotic viability, texture and sensory features of goat dairy beverages [J]. *LWT-Food Sci Tech*, 2014, 59(1): 196-203.
- [3] 叶文斌, 樊亮, 王都留, 等. 苦豆子半乳甘露聚糖与中草药复合膜的包装性能研究 [J]. 包装与食品机械, 2012, 30(6): 10-14.
- [4] 艾连中. 响应面分析法优化苦豆子多糖提取工艺 [J]. 食品科学, 2010, 31(12): 141-143.
- [5] 陶遵威, 张岩, 王文彤. 大孔吸附树脂对苦豆子多糖纯化工艺研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 515-518.
- [6] 张岩, 马丽娜, 王鹏, 等. 苦豆子多糖脱蛋白工艺比较 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(8): 85-89.
- [7] 郑夺, 张岩, 王文彤, 等. 响应面分析法优化苦豆子多糖的醇沉工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 27-29.
- [8] 王文彤, 张岩, 陶遵威. 正交试验优化苦豆子多糖的双氧水脱色工艺研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(11): 1234-1237.
- [9] 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.
- [10] 赵永安, 陈冠, 陶遵威. 苦豆子多糖及其衍生物的体外抗氧化活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 213-216.
- [11] 申林卉, 刘丽侠, 陈冠, 等. 苦豆子多糖羧甲基化修饰及其抗氧化活性的研究 [J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(3): 157-160.
- [12] Gilbert H J, Knox J P, Boraston A B. Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2013, 23(5): 669-677.
- [13] 田华, 张义明. 多糖的结构测定及应用 [J]. 中国食品添加剂, 2012(2): 177-181.
- [14] 李志孝, 刘方明, 孟延发. 鬼臼葡聚糖的化学结构 [J]. 化学学报, 1996, 54(10): 1037-1040.
- [15] Yang W J, Pei F, Shi Y, et al. Purification, characterization and anti-proliferation activity of polysaccharides from *Flammulina velutipes* [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 88(2): 474-480.
- [16] 张安强, 马新, 何荣军, 等. 硫酸酯化猴头菌多糖的结构与构象分析 [J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(3): 64-67.
- [17] 简文杰. 魔芋葡甘聚糖螺旋微观构象及性质研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2011.
- [18] 陈小强, 张志发, 王川丕, 等. 热处理对高温煎煮和低温酶法提制绿茶多糖的影响 [J]. 应用化学, 2011, 28(4): 454-457.
- [19] 韩铨. 茶树花多糖的提取、纯化、结构鉴定及生物活性的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [20] Poojari R, Srivastava R. Composite alginate microspheres the next-generation egg-box carriers for biomacromolecules delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2013, 10(8): 1061-1076.
- [21] 郭秀君, 黄雪松. 不同工艺条件对桔皮果胶钙产量的影响 [J]. 食品科技工业, 2013, 16(34): 258-261.