

乙酰化苦豆子多糖的制备及溶液构象

张岩¹, 陈冠¹, 赵振宇², 张桂贤¹, 傅予¹, 刘庆焕¹, 陶遵威^{*}

(1. 天津市医药科学研究所, 天津 300020; 2. 天津市中医药研究院附属医院, 天津 300120)

[摘要] 目的:制备乙酰化苦豆子多糖,并对修饰后的乙酰化苦豆子多糖溶液的构象特征进行研究。方法:对苦豆子多糖进行乙酰化修饰,采用取代度测定、红外光谱分析手段对修饰结果进行验证,采用碘-碘化钾反应和刚果红试验研究乙酰化苦豆子多糖的构象特征,采用圆二色谱法(CD)对不同因素影响下乙酰化苦豆子多糖的溶液行为进行研究。结果:乙酰化苦豆子多糖修饰成功,取代度为 0.84,其溶液行为显示乙酰化苦豆子多糖具有多股螺旋结构以及较长的侧链和较多的分支,并且溶液构象受浓度、温度以及添加金属离子的影响而变化。结论:成功修饰获得乙酰化苦豆子多糖,并对其溶液构象进行了全面研究,为其进一步研究提供了参考。

[关键词] 苦豆子多糖; 乙酰化; 构象; 圆二色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)12-0079-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016120079

Preparation and Solution Conformation of Acetylated *Sophora alopecuroides* Polysaccharide

ZHANG Yan¹, CHEN Guan¹, ZHAO Zhen-yu², ZHANG Gui-xian¹,
FU Yu¹, LIU Qing-huan¹, TAO Zun-wei^{*}

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

2. Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Tianjin 300120, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare the acetylated *Sophora alopecuroides* polysaccharide (AC-SAP), and study the conformation characteristics of the modified acetylated *S. alopecuroides* polysaccharide solution. **Method:** *S. alopecuroides* polysaccharide was modified by acetylation, and the modification results were verified by means of the substitution determination method and infrared spectroscopy analysis. The conformation characteristics of acetylated *S. alopecuroides* polysaccharide was studied by I₂-KI reaction and Congo red test. Solution behavior of acetylated *S. alopecuroides* polysaccharide under different conditions were studied by circular dichroism (CD) spectrum. **Result:** Acetylated *S. alopecuroides* polysaccharide was successfully modified and its substitution degree was 0.84. Its solution behavior indicated multiple helixes structure with long side chains and many branches in solution. In addition, its solution conformation could be affected by the concentration, temperature and metalions. **Conclusion:** Comprehensive research on the solution conformation of successfully modified acetylated *S. alopecuroides* polysaccharide can provide reference for further research.

[Key words] *Sophora alopecuroides* polysaccharide; acetylation; conformation; circular dichroism spectrum

[收稿日期] 20150603(001)

[基金项目] 天津市抗癌重大科技专项(12ZCDZSY19200)

[第一作者] 张岩, 硕士, 研究实习员, 从事中药学研究, Tel:022-27236182, E-mail:yanyan0911110@126.com

[通讯作者] * 陶遵威, 研究员, 从事天然产物的提取分离、天然产物单体的结构改造、新药及制剂的研发工作, Tel:022-27236182, E-mail:taozunweitj@163.com

苦豆子 (*Sophora alopecuroides*) 为豆科槐属植物, 药用根、茎、全草及种子, 广泛分布于我国新疆、西藏、甘肃、内蒙古等地区^[1], 具有清热燥湿、消炎止痛等药用价值^[2] 和生态功能^[3], 苦豆子资源的合理利用与开发越来越引起人们的重视。多糖类成分是苦豆子的重要组成部分, 苦豆子经热水提取得到苦豆子多糖^[4], 经研究发现苦豆子多糖对小鼠移植瘤 S180, H22 和 EAC 具有一定的抑制作用^[5] 并具有一定的抗氧化活性^[6]。然而, 由于苦豆子多糖相对分子质量大^[7], 黏度高, 溶解性能差, 限制了其活性的发挥和应用的范围, 为了提高苦豆子多糖的活性及应用价值, 对苦豆子多糖进行修饰是相当必要的。

结构和溶解性是多糖起效的基础, 多糖糖链构象直接影响多糖溶解性, 多糖的生物活性又直接依赖糖链的结构和构象。多糖通过修饰可以改变其在水中的链构象, 并通过链构象的变化改善多糖的溶解性, 产生多种不同的生物活性^[8]。如金顶侧耳多糖经硫酸酯化后, 在水中由无规线团构象变为了螺旋结构, 提高了抗病毒 CB5 活性^[8]。白及多糖经过硫酸酯化修饰后, 糖链的空间构象变得舒展, 暴露羟基较多, 增加了溶解度并降低了黏度, 提高了生物活性^[9]。

根据报道多糖经乙酰化修饰后, 由于其羟基暴露在外, 增加了多糖在水中的溶解度, 更利于生物活性的发挥^[10], 改善抗凝血活性^[11] 和抗氧化活性^[12] 等。因此本文为改善苦豆子多糖溶解性、提高其生物活性, 选择对苦豆子多糖进行乙酰化修饰, 将水不溶性苦豆子多糖制成了溶于水的乙酰化苦豆子多糖, 明显降低了黏度, 大大提高了苦豆子多糖的溶解性和应用价值, 为改善其生物活性提供了新的思路。此外, 本文对乙酰化苦豆子多糖的溶液构象进行了全面分析, 为与苦豆子多糖生物学活性的区别研究提供了基础, 也为与苦豆子多糖溶液构象^[13] 进行比较分析, 确定影响其生物活性的构象以及构效关系研究提供了参考。

1 材料

Nicolet 6700 型 FT-IR 傅立叶红外光谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司), Specord 210 Plus 型紫外-可见分光光度计 (德国耶拿分析仪器股份公司), J-715 型圆二色谱仪 (日本 Jasco 公司)。

苦豆子多糖经本实验室提取纯化而得 (纯度 > 95%); β -D-五乙酰葡萄糖对照品 (经 HPLC-ELSD 面积归一法检测纯度 > 99.5%), 杭州临安天鸿生

物科技有限公司 (惠赠)。其他试剂均为分析纯, 购自天津试剂开发公司。

2 方法与结果

2.1 乙酰化苦豆子多糖 (AC-SAP) 的制备^[14] 称取苦豆子多糖 2 g 置于三口瓶中, 加入甲酰胺 80 mL, 恒温搅拌 30 min, 滴加乙酸酐 4 mL [含 1% *N*-溴代琥珀酰亚胺 (NBS), 提前溶于乙酸酐中], 80 °C 恒温搅拌反应 4 h, 反应结束后, 透析, 浓缩, 无水乙醇沉淀, 离心, 取沉淀, 冷冻干燥。反应式见图 1。

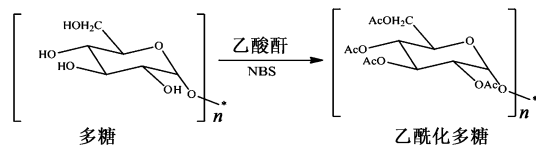


图 1 乙酰化苦豆子多糖的制备

Fig. 1 Preparation of AC-SAP

2.2 盐酸羟胺比色法测定 AC-SAP 的取代度^[15]

2.2.1 β -D-五乙酰葡萄糖对照品溶液的配制 精密称取一定量 β -D-五乙酰葡萄糖 (其中乙酰基占此对照品含量的 55.14%), 于 50 mL 量瓶中, 加乙醇 10 mL 于 60 °C 水浴条件下加热溶解, 冷却至室温, 加水稀释至刻度, 摇匀, 配成乙酰基质量分数为 2 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.2 标准曲线制备 准确吸取 β -D-五乙酰葡萄糖对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 溶解, 加水稀释至刻度, 各吸取 5 mL 分别置于 50 mL 量瓶中, 各加入 0.1 mol·L⁻¹ 的盐酸羟胺溶液 5 mL, 加入 1.5 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 5 mL, 充分混匀, 静置 20 min, 各加入 2 mol·L⁻¹ 盐酸 3.5 mL 混匀, 静置 20 min, 分别继续加入 0.40 mol·L⁻¹ 的三氯化铁溶液 10 mL, 混匀, 定容至刻度, 静置 10 min。采用紫外分光光度计, 以溶剂为空白对照, 在 490 nm 处测定吸光度 *A*。以乙酰基的浓度 (*C*, mg·L⁻¹) 为横坐标, *A* 为纵坐标绘制曲线, 得回归方程 $A = 0.0258C - 0.0022$ ($r = 0.9999$)。

2.2.3 样品溶液配制及测定 精密称取 AC-SAP 30 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加入水 5 mL, 于 60 °C 水浴中加热溶解, 冷却至室温, 加水定容至刻度。按照标准曲线制备方法测定样品的吸光度, 计算乙酰基的含量 *w*。

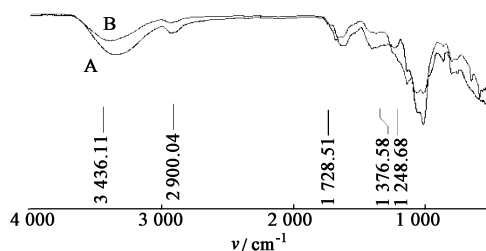
2.2.4 乙酰基取代度计算 乙酰基取代度是指平均每个失水糖单元上被乙酰基取代的羟基数目, 具体数值按以下公式得出:

$$DS = \frac{162 \times w}{4300 - 42w}$$

式中 DS 为取代度, w 为乙酰基的含量。

计算结果表明,乙酰基取代度为 0.84,说明对苦豆子多糖进行乙酰化修饰较为成功。

2.3 红外光谱分析 取完全干燥,研磨均匀的乙酰化苦豆子多糖和苦豆子多糖样品各 5 mg,与一定量的溴化钾(KBr)混合压片,在 $4\ 000 \sim 500\ \text{cm}^{-1}$ 进行红外光谱扫描,观察谱峰情况,结果见图 2。



A. 修饰前; B. 修饰后

图 2 AC-SAP 的红外谱

Fig. 2 IR Spectrum of AC-SAP

分析图谱可知,苦豆子多糖与 AC-SAP 的红外吸收谱图轮廓大致相同,表明经过乙酰化后的苦豆子多糖仍具有苦豆子多糖基本母体结构,均具有多糖类物质的红外特征吸收峰, $3\ 400\ \text{cm}^{-1}$ 左右为羟基(O-H)的伸缩振动吸收峰, $2\ 900\ \text{cm}^{-1}$ 左右为次甲基(C-H)的伸缩振动吸收峰。AC-SAP 在 $1\ 728\ \text{cm}^{-1}$ 处出现了明显的羰基特征吸收峰,为羧基中 $\text{C}=\text{O}$ 的非对称振动吸收峰,在 $1\ 248\ \text{cm}^{-1}$ 出现了酯基的 C-O 伸缩振动峰, $1\ 376\ \text{cm}^{-1}$ 为 $-\text{CH}_3$ 的变形峰,表明乙酰基团已成功地被引入,实现了苦豆子多糖的乙酰化修饰。

2.4 乙酰化苦豆子多糖溶液行为研究 通过碘-碘化钾反应考察 AC-SAP 糖链的分枝情况,刚果红试剂考察 AC-SAP 的溶液构象特征。

2.4.1 碘-碘化钾反应^[16] 精确称取一定量 AC-SAP 样品,配制质量浓度为 $1.0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AC-SAP 溶液,准确量取样品溶液 2.0 mL,加入碘试剂(含 I_2 溶液 0.02%,含 KI 溶液 0.2%)1.2 mL,混合均匀,于紫外分光光度计 200 ~ 700 nm 处扫描测定紫外吸收,观察紫外最大吸收的范围。见图 3。

如果多糖具有较多的支链,会影响其与碘结合所需的螺旋结构的形成,结果会使最大吸收峰主要分布在 300 ~ 500 nm^[17]。由图 3 可以看出,AC-SAP 与 I_2 -KI 试剂反应物最大吸收峰在 300 ~ 400 nm 而非 565 nm。说明该多糖有较长的侧链和较多的分枝。

2.4.2 刚果红试验^[11] 精确称取乙酰化苦豆子多

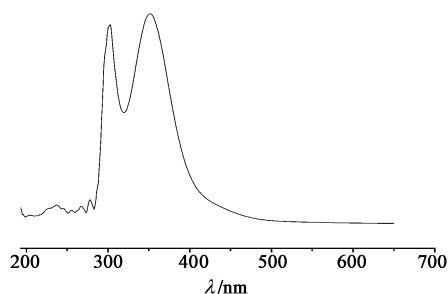


图 3 AC-SAP 与碘试剂反应后的紫外-可见吸收光谱

Fig. 3 UV spectrum of AC-SAP after reaction with I_2 -KI

糖样品配成质量浓度为 $2\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样品溶液,配制刚果红溶液浓度为 $80\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,依次配制浓度为 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液并用邻苯二甲酸氢钾标定。准确量取样品溶液 5 mL,刚果红溶液 5 mL,NaOH 溶液 10 mL,配制成样品溶液,刚果红溶液,NaOH 溶液体积比为 1:1:2 的混合溶液,混合均匀,静置 10 min,用紫外-分光光度计在 400 ~ 600 nm 扫描,依次测定混合溶液在不同浓度 NaOH 条件下最大吸收波长的变化,进而观察 AC-SAP 的构象变化。

刚果红是一种酸性染料可与具有多股螺旋构象的多糖形成络合物,试验中可以看出刚果红与 AC-SAP 络合后变成紫红色,见图 4,其络合物的最大吸收波长在 NaOH 浓度小于 $0.25\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,呈现亚稳状态,表明在中性和弱碱性范围内 AC-SAP 的氢键稳定,在此状态下呈现有序的螺旋结构;随着 NaOH 浓度继续增大,多糖的氢键被碱性条件破坏,溶液颜色变浅,螺旋结构解体,变成无规则的线团形式,不再与刚果红形成络合物,从而使最大吸收波长急剧下降^[18]。结果表明 AC-SAP 在中性和弱碱性范围内呈现多股螺旋结构,溶液中结构易受碱性影响而改变。

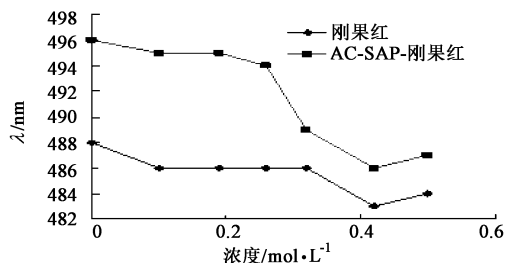


图 4 AC-SAP-刚果红络合物的最大吸收波长变化

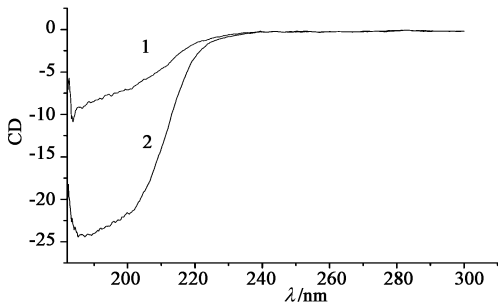
Fig. 4 Change of maximum absorption wavelength of AC-SAP-Congo red complex

2.4.3 不同因素对乙酰化苦豆子多糖溶液构象的影响 通过改变不同因素,浓度、温度、以及添加金

属离子观察乙酰化苦豆子多糖的圆二色谱(CD 谱)的变化(扫描波长范围 180 ~ 300 nm),进而观察不同因素、不同条件对乙酰化苦豆子多糖溶液构象的影响。

2.4.3.1 浓度对乙酰化苦豆子多糖构象的影响

分别配制质量浓度为 1.0, 0.5 g·L⁻¹ 的 AC-SAP 溶液,于 180 ~ 300 nm 处测定其 CD 谱,观察乙酰化苦豆子多糖在不同浓度下溶液构象的改变,AC-SAP 在 185 nm 处有负峰,这可能是由于乙酰基的存在所产生^[19],多糖浓度由 1.0 g·L⁻¹ 降低至 0.5 g·L⁻¹ 后,AC-SAP 在 190 ~ 200 nm 附近的负峰峰值减弱,说明浓度变化对 SAP 分子的不对称性有所改变,不对称性减小使得峰值减小。见图 5。



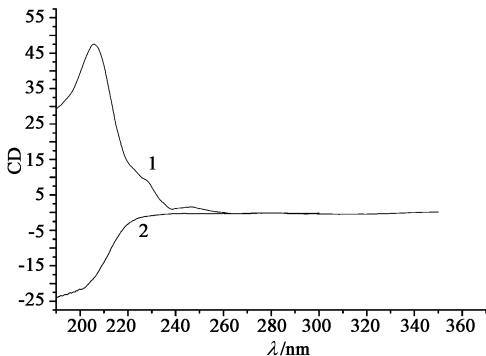
1. 1.0 g·L⁻¹; 2. 0.5 g·L⁻¹

图 5 不同浓度的 AC-SAP 圆二色谱

Fig.5 Effects of concentration on CD spectrum of AC-SAP

2.4.3.2 温度对乙酰化苦豆子多糖构象的影响

测定 20, 70 °C 下 1.0 g·L⁻¹ 乙酰化苦豆子多糖溶液的 CD 谱,观察不同温度下溶液构象的转变,见图 5。温度由 25 °C 升到 70 °C,AC-SAP 在 190 ~ 200 nm 附近的负峰变为正峰,说明温度升高导致 AC-SAP 的聚集结构发生明显的改变,手性中心发生变化。



1. 70 °C; 2. 25 °C

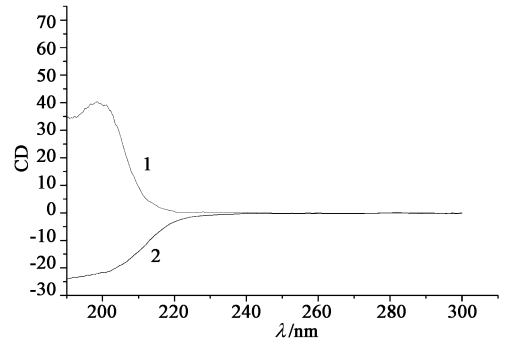
图 6 不同温度处理的 AC-SAP 的圆二色谱

Fig.6 Effects of temperature on CD of AC-SAP

2.4.3.3 Ca²⁺ 对乙酰化苦豆子多糖构象的影响

通过在 1.0 g·L⁻¹ 乙酰化苦豆子多糖溶液中添

加 CaCl₂, 观察乙酰化苦豆子多糖溶液的 CD 谱变化,见图 7。加入钙离子后,AC-SAP 吸光度略有增加,AC-SAP 190 ~ 200 nm 附近的负峰变为正,与没加 Ca²⁺ 之前比较,呈对称状,手性在加入 Ca²⁺ 前后近似为镜像关系,说明加入 Ca²⁺ 使 AC-SAP 结构发生明显变化,可能是因为 Ca²⁺ 与糖链上的羟基结合,引起糖链之间的聚合,形成了“蛋箱”结构而相互靠近,使手性中心发生变化^[20]。



1. AC-SAP; 2. CaCl₂-AC-SAP

图 7 Ca²⁺ 处理的 AC-SAP 的圆二色谱

Fig.7 Effect Ca²⁺ of temperature on CD of AC-SAP

通过上述浓度、温度和金属离子因素变化考察对乙酰化苦豆子多糖溶液的空间构象的影响,结果表明,浓度对 AC-SAP 及其衍生物的构象不大,浓度降低最大吸收位置基本不变只是吸收强度减弱。温度升高和加入 Ca²⁺ 均能增强 AC-SAP 的不对称性立体结构,使多糖聚集结构发生明显的改变,手性中心发生变化。

3 讨论

多糖是一类大分子聚合物,影响其生物活性的因素很多,除了基本结构、相对分子质量以外,其理化性质如黏度、溶解度等也在一定程度上决定着多糖活性。因此,为了增强多糖的活性对多糖结构进行修饰,改变或引入新的基团,是提高多糖实际利用价值的重要途径之一。多糖经过修饰可以增加溶解度,提高生物利用率,改善生物活性,其中引入乙酰基,能使多糖的伸展发生变化,导致多糖羟基暴露,增加多糖在水中的溶解度,同时还可以改变多糖分子的定向性和横向次序,从而改变糖链的空间排布,是对多糖进行修饰的有效途径。

多糖的生物活性发挥与其溶解性及其在溶液中的性质也是密切相关的,多糖的活性不仅建立在一级结构的基础上,还与其高级结构有关,而高级结构中,其溶液行为及链构象比一级结构在活性方面作用更大的,直接影响其活性的表达,因此在考察多糖

结构以及活性时,对其溶液行为及构象的研究也是不容忽视的。

因此,多糖的研究应该在寻找新的活性成分的同时,综合多种分析手段进行佐证分析,多方评价,有效提高多糖的利用率和实际应用价值。

[参考文献]

[1] 祁燕蓉,何生虎,史光亮. 苦豆子的研究进展[J]. 甘肃畜牧兽医,2008(6):36-38.

[2] 廖春燕,梁健,杨燕,等. 苦豆子的药理及应用概述[J]. 中国民族民间医药,2009(3):6-8.

[3] 李珂璟,王小龙. 苦豆子及其应用[J]. 甘肃农业科技,2010(2):46-47.

[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] 冯文茹,赵秀梅,郑夺,等. 苦豆子多糖的体内抗肿瘤作用的初步观察[C]. 天津:2011 医学科学前沿论坛暨第 12 届全国肿瘤药理与化疗学术会,2011:60.

[6] 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.

[7] 陈香荣,曹楠楠,吴艳,等. 苦豆子多糖的分离纯化及初步结构[J]. 天然产物研究与开发,2014,26(8):1244-1247.

[8] 王强,刘红芝,钟葵. 多糖分子链构象变化与生物活性关系研究进展[J]. 生物技术进展,2011,1(5):318-326.

[9] 闫亚美,林武,刘兰英,等. 硫酸酯化多糖生物活性及其构效关系研究进展[J]. 安徽农业科学,2009,37(24):11374-11375.

[10] 宋道,张丽华,赵鹏,等. 响应面法优选款冬花多糖的乙酰化工艺研究[J]. 中成药,2013,35(9):30-33.

[11] 梁进,张剑韵,崔莹莹,等. 茶叶多糖的化学修饰及

体外抗凝血作用研究[J]. 茶业科学,2008,28(3):166-171.

[12] 王晶,张全斌,张忠山,等. 乙酰化海带褐藻多糖硫酸酯的制备及其抗氧化活性研究[J]. 中国海洋药物杂志,2008,27(1):50-54.

[13] 陈冠,张岩,冯文茹,等. 苦豆子多糖溶液构象的研究[J]. 现代药物与临床,2015,30(3):237-240.

[14] Zhang Z S, Wang X M, Yu S C, et al. Synthesized oversulfated and acetylated derivatives of polysaccharide extracted from *Enteromorpha linza* and their potential antioxidant activity[J]. *Int J Biol Macromol*, 2011, 49(5):1012-1014.

[15] 殷殷,张燕,彭芳,等. 紫外分光光度法测定魔芋多糖中乙酰取代度[J]. 药物分析杂志,2010,30(5):919-921.

[16] 王艳丽,张静. 白术多糖的溶液构象及其变化[J]. 陕西师范大学学报:自然科学版,2012,40(3):98-103.

[17] 石磊,陈靠山,董群,等. 柘树根多糖的分离纯化及结构表征[J]. 高等学校化学学报,2007,28(6):1088-1091.

[18] 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.

[19] 张丽萍,张翼伸. 金顶侧耳多糖及其化学修饰产物的圆二色谱测定[J]. 中国生物化学与分子生物学报,1994,110(3):633-635.

[20] Zhang Z S, Zhang Q B, Wang J, et al. Regioselective syntheses of sulfated porphyrans from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant and anticoagulant activities *in vitro* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79(4):1124-1129.

[责任编辑 顾雪竹]