

茶多糖 TGC 的结构表征*

周 鹏¹⁾ 谢明勇^{**} 聂少平

(南昌大学食品科学教育部重点实验室, 南昌 330047)

王小如

(厦门大学现代分析科学教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要 采用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)分析均一茶多糖 TGC 的单糖组成, 并与 NMR, 圆二色谱、紫外扫描等其他分析方法结合, 对茶多糖 TGC 的一级结构及其在溶液中的构象加以探讨. 结果表明: 茶多糖 TGC 是由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖等 6 种单糖组成, 它在水溶液中应以有序的螺旋构象存在, 其一级结构为: 主链的骨架结构由鼠李糖、葡萄糖和半乳糖构成, 这 3 种单糖都有可能连接支链, 不接支链时其连接方式为 $\beta 1 \rightarrow 3$, 支链主要由阿拉伯糖构成, 其连接方式可为 $\beta 1 \rightarrow 2$, $\beta 1 \rightarrow 3$, $\beta 2 \rightarrow 3$ 三种, 木糖以 $\beta 1$ 存在于主链和支链的末端.

关键词 GC-MS NMR 茶多糖 一级结构 构象

多糖是来自于自然界的天然大分子物质, 现已证明其具备诸多的生物活性. 虽然对于糖类的研究较核酸及蛋白质而言还处于落后状态^[1], 但是近年来仍然取得了巨大的进展, 主要表现在多糖的结构及构效关系的研究方面. 生物大分子的空间构象最终决定其生物活性, 因此多糖空间构象的研究对于解析其在生命过程中的作用具有极为重要的意义. 随着现代生物学手段及现代分析仪器在糖类研究中的应用, 以精确三维结构知识为基础揭示重要生命活动的规律已达到前所未有的广度和深度^[2]. 原子力显

微镜(AFM)^[3,4]、投射电子显微镜(TEM)、圆二色谱(CD)、X 射线衍射^[5-7]等手段目前已成功应用于多糖的构象研究.

利用酶的专一性和高效性, 酶学方法已成为糖链结构分析中的一种重要手段. 试剂阵列分析方法(reagent array analysis method, RAAM)^[8]的发展, 使酶解方法的操作简化, 结合计算机技术可直接得到多糖的结构信息. 气相色谱(GC)^[9-11]、液相色谱(LC)^[12,13]及毛细管电泳方法目前广泛用于分析单糖及其衍生物的分离、鉴定和糖类纯度的检测. 气质联

2003-07-23 收稿, 2003-11-18 收修改稿

* 教育部高等学校骨干教师资助计划项目及江西省主要学科学术和技术带头人培养计划项目资助

** 联系人, E-mail: myxie@ncu.edu.cn

1) 现在单位: 诺维信(中国)投资有限公司, 北京 100085

用(GC-MS)技术可以同时提供保留时间和荷质比信息^[11],在分析多糖的全甲基化产物、Smith 降解产物中具有独特的优势.高效液相色谱-电喷雾电离质谱(HPLC-ESI-MS)联用技术已被用于多糖分子量的测定.基质辅助激光解析电离质谱(MALDI-MS)具有极高的质量上限,能将极大的生物分子电离,又不使分子破裂分解^[14,15],Garozzo 等人^[16]对 MALDI-MS 与分子排阻色谱的联用进行了尝试.核磁共振(NMR)技术已被用于探讨多糖结构中糖苷键的构型以及重复结构中单糖的数目,二维 NMR 技术也可用于鉴定多糖的纯度,计算机专用程序 CASPER(computer assisted spectrum evaluation of regular)可以对采集的 NMR 数据进行分析处理,并可根据得到的信号进行搜索进而模拟出多糖结构^[17,18].平板电泳技术可用于糖链的纯度和结构分析,又可对糖的酶解产物进行定性定量分析.荧光基团标记的糖的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGEFS)技术^[19]通过对糖类分子的还原端羰基进行荧光基团衍生化标记后进行电泳分析,可把电泳凝胶上的糖蛋白定量地转移到聚偏氟乙烯薄膜上,直接进行酸水解后进一步分析其氨基酸和糖基组成.

多糖结构和生物活性的研究是糖生物学的主要内容之一.通观茶多糖的文献报道,其研究还基本停留在提取、纯化、分子量及单糖组成等的研究阶段,茶多糖的一级结构及其在水溶液中的构象研究尚未见报道.从茶叶中提取的多糖 TGC 为含有 14% 蛋白质的均一糖蛋白,研究表明其具有多种生物活性^[20,21].本文采用多种仪器分析手段,结合化学方法对茶多糖 TGC 的单糖组成、一级结构及其在水溶液中的构象加以系统研究.由于茶多糖的一级结构、构象与其生物活性密切相关,因此,本研究结果可用以指导茶多糖功能食品的开发,从而可创造良好的经济价值和社会效益,同时还可对茶多糖的生物学和医药学研究奠定相关的理论基础.

1 实验部分

1.1 仪器、试剂和实验材料

(1) 仪器及工作条件:气相色谱仪为 Varian 公司的 3400 型,联接 Finnigan 离子阱质谱检测器(GC-MS),

采用尺寸为 30 m×0.32 mm×0.25 μm 的石英毛细管柱;其工作条件为:()以 30 /min 的升温速率将温度从 50 升至 140 ,然后以 5 /min 的升温速率再将温度从 140 升至 190 ;()所用载气为氦气;()注射器温度维持在 250 ;()气-质谱联接通道温度为 250 ;()离子化模式采用电子冲击;()电子倍增器电压为 1850 V;()电子能量为 70 ev.

J-180 圆二色谱仪(CD)为日本 Jasco 公司生产,检测温度为室温,狭缝宽度为 1 nm,扫描速度为 100 nm/min,扫描范围为 180~400 nm. UNTY⁺500 核磁共振仪(NMR)为 Varian 公司生产. DU 7400 紫外可见分光光度仪为 Beckman 公司生产. HP-1100 液相色谱仪为惠普公司生产,联接 G 1315B DAD 二极管阵列检测器. ZK-82A 型烘箱为上海实验仪器厂生产. THZ-8 恒温水浴振荡器为嘉兴电热仪器厂生产. Milli-Q⁵⁰ 超纯水仪为 Milli-Q 公司生产.

(2) 试剂及实验材料:盐酸羟胺、乙酸酐、吡啶、硫酸、碳酸钡、高碘酸钠、乙酸、乙二醇、氢氧化钠、硼氢化钾、刚果红、丙三醇、丁四醇等试剂药品为国产分析纯;葡萄糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖标准品等生化试剂均由上海试剂公司提供.超纯水用 Milli-Q⁵⁰ 超纯水仪制得.

茶多糖 TGC 用江西婺源粗老绿茶自制,经凝胶层析及 HPLC 鉴定其为均一组分.

1.2 试验方法

(1) GC-MS 分析单糖组成:茶多糖 TGC 的水解及挥发性衍生物按文献^[22]制备,进行 GC-MS 分离分析.

(2) 高碘酸氧化和 Smith 降解反应:TGC 的高碘酸氧化和 Smith 降解参照文献^[23,24]进行.采用盐酸羟胺-乙酸酐将 Smith 降解产物、单糖标样和丙三醇、丁四醇标样衍生成具有挥发性的物质,进行 GC-MS 分离分析.

(3) 部分酸水解:部分酸水解方法参照文献^[25,26]进行.经水解后得到沉淀和上清液,上清液浓缩干燥备用.沉淀继续完全水解,干燥备用.上清固体和沉淀水解固体样经衍生采用 GC-MS 分析.

(4) NMR 分析:用重水溶解 TGC,浓度为 2

mg/mL, 然后采用核磁共振仪分析.

(5) CD 色谱分析: 取 10 mL TGC 水溶液, 定容于 50 mL 的容量瓶中; 另取 10 mL TGC 水溶液, 加 4 mL 0.2 mmol/L 的刚果红溶液, 再加 25 mL 0.1 mol/L 的 NaOH, 定容于 50 mL 的容量瓶中. 采用 CD 色谱分析.

(6) 紫外光谱分析: 将刚果红和浓度为 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液加入 TGC 溶液, 用 Beckman DU 7400 紫外可见分光光度计自动扫描, 扫描范围为 200~800 nm.

2 结果与讨论

2.1 茶多糖 TGC 的单糖组成

混合标准单糖衍生物和 TGC 水解产物衍生物的 GC-MS 分析的总离子流谱图见图 1, 各色谱峰的保留时间及荷质比列于表 1.

从图 1 及表 1 实验数据可以看出, 图 1(b) 中样品峰的保留时间及质谱信号与对应的标准品的测试结果完全吻合, 证明茶多糖 TGC 是由鼠李糖、阿拉伯

糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖 6 种单糖构成, 因此, 茶多糖蛋白复合物 TGC 的多糖部分系杂多糖.

2.2 高碘酸氧化-Smith 降解反应结果

高碘酸氧化反应每间隔 24 h 取样, 通过 DAD 检测器检测 223 nm 处的吸收强度(以峰面积表示), 说明反应进行的程度, 结果显示, 高碘酸氧化在第 7 天完成. 反应完成后在体系中加入乙二醇分解过量的高碘酸, 取反应液, 超纯水稀释, 并以 0.1 mol/L 的 NaOH 滴定, 平行 3 次测定, 反应液消耗的碱量与空白一致. 结果表明, 高碘酸氧化完成后, 体系的含酸量并没有增加, 说明没有甲酸的释放, 由此证明 TGC 中不具备连三羟基的结构, 即在糖链中没有 1-6 连接方式.

为了对 Smith 降解产物进行定性分析, 实验将丙三醇、丁四醇和 6 种单糖标准混合物同时衍生, 产物经 GC-MS 分析, 结果如图 2(a). TGC 经 Smith 降解后, GC-MS 分析出现 6 个信号峰(图 2(b)), 图 3 给出了图中各峰对应的质谱分析结果.

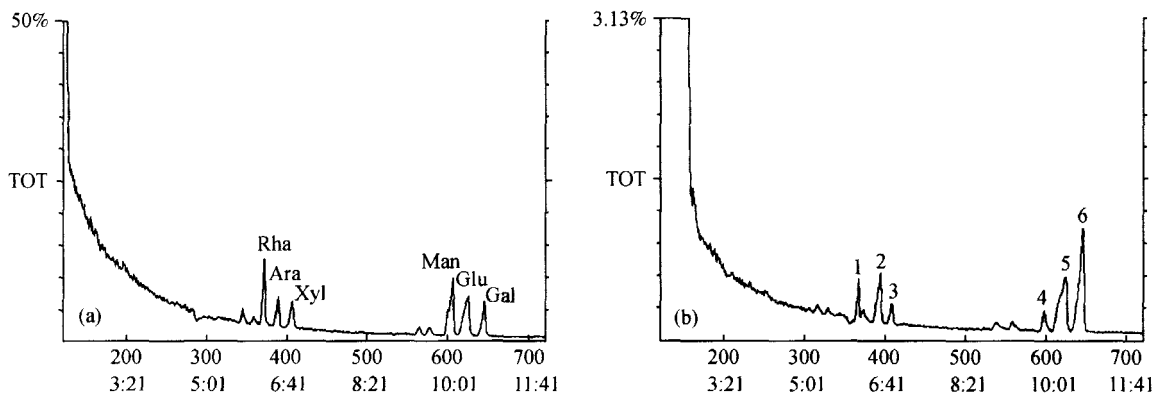


图 1 单糖标样及 TGC 水解产物 GC-MS 分析结果

(a) 单糖标准混合物的 GC-MS 分析; (b) 茶多糖 TGC 完全水解产物的 GC-MS 分析. 纵坐标 TOT 示总离子流, 下同

表 1 图 1 中各峰的保留时间及质谱信号

图 1(a)标准品峰	鼠李糖(Rha)	阿拉伯糖(Ara)	木糖(Xyl)	甘露糖(Man)	葡萄糖(Glu)	半乳糖(Gal)
T/min	6.13	6.32	6.49	10.06	10.26	10.48
m/z	270	256	256	328	328	328
图 1(b)样品峰序号	1	2	3	4	5	6
T/min	6.10	6.36	6.50	10.01	10.26	10.48
m/z	270	256	256	328	328	328

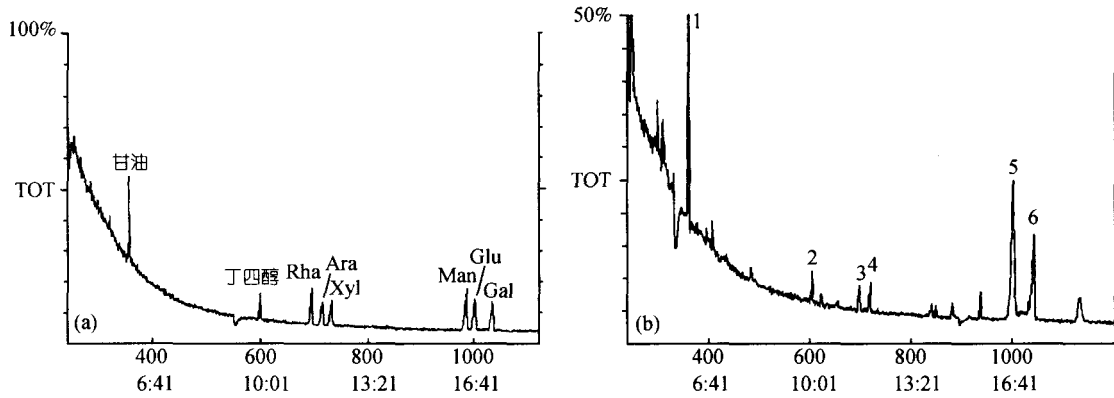


图 2 TGC 经 Smith 降解其产物的 GC-MS 分析结果及与标准品的对照
 (a) 混合样(单糖及醇)的 GC-MS 分析; (b) 茶多糖 Smith 降解产物的 GC-MS 分析

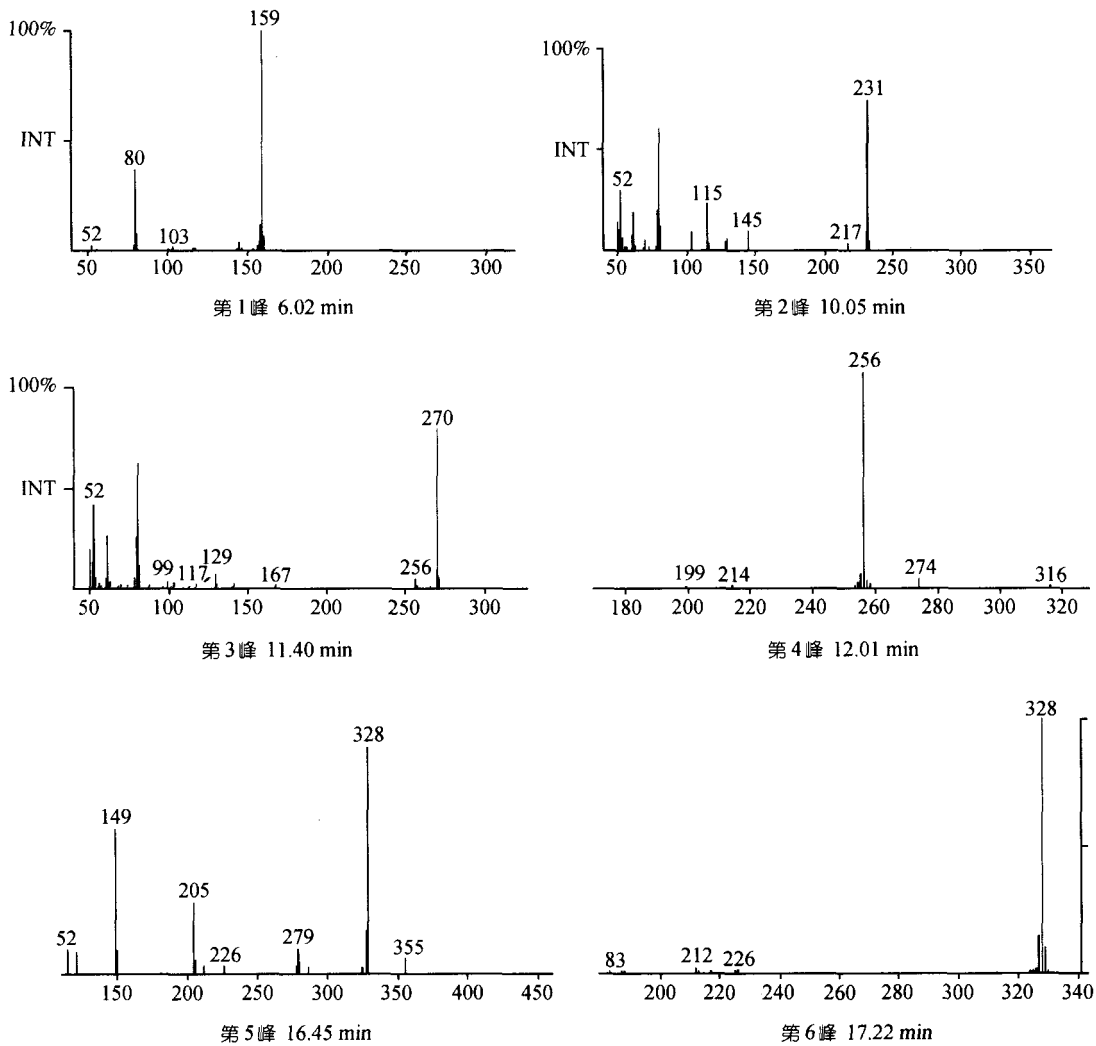


图 3 图 2(b)中各峰的保留时间及质谱信号
 纵坐标 INT 示离子碎片强度

TGC 经过高碘酸氧化-Smith 降解之后, 可以检测到丙三醇、丁四醇及鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖. 鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖的检出, 说明在糖链中这 4 种糖苷以没有连羟基的形式存在. 木糖及甘露糖没有被检测到, 说明这两种糖苷上存在连二羟基. 综合上述分析结果, 进一步推断 TGC 中糖苷的可能连接方式如表 2 所示.

表 2 茶多糖 TGC 中各单糖苷可能的连接方式

糖苷	可能的连接方式
鼠李糖	1 3 或支链的连接位置
阿拉伯糖	1 2, 1 3, 2 3
木糖	1, 1 5
甘露糖	1 2, 1 4
葡萄糖	1 3 或支链的连接位置
半乳糖	1 3 或支链的连接位置

2.3 部分酸水解反应结果

对多糖进行部分水解可以把大分子裂解成较小的片段. 适当控制实验条件, 可以使多糖的骨架结构基本保持不变, 而使支链上或链末端的糖基水解下来, 因此进行部分(弱条件)水解, 可用于推断多糖的骨架结构及分支结构. TGC 经部分水解, 醇沉, 得上清液和沉淀, 沉淀继续完全水解. 图 4 和 5 给出了上清液和沉淀水解样的 GC-MS 分析结果.

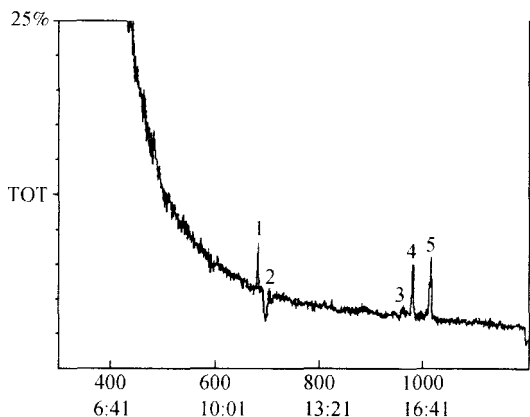


图 4 沉淀完全水解后产物的 GC-MS 分析

1 示 Rha; 2 示 Ara; 3 示 Man; 4 示 Glu; 5 示 Gal

从图 4 和 5 可以看出, TGC 经部分酸水解后, 沉淀部分主要含有鼠李糖、葡萄糖和半乳糖, 另外存在微量的阿拉伯糖和甘露糖, 木糖没有检测到. 上清液中的主要成分是阿拉伯糖, 另外检测到了少量的鼠李糖, 由此推断 TGC 糖链的骨架结构由葡萄糖、半

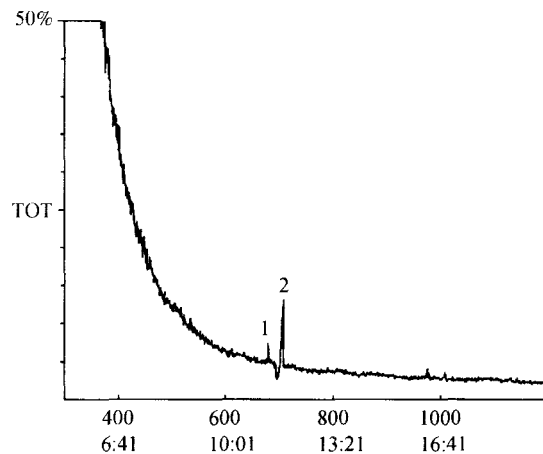


图 5 上清液中单糖的 GC-MS 分析

1 示 Rha; 2 示 Ara

乳糖和鼠李糖组成, 大部分的阿拉伯糖位于侧链或支链, 少量的鼠李糖在侧链上也存在. 进一步推断 TGC 可能的糖链结构如图 6 所示.

主链中少量的 Glycoside₁ 为阿拉伯糖和甘露糖, 阿拉伯糖的连接方式可能有 1 2, 1 3, 2 3 三种, 甘露糖的连接方式有 1 2, 1 4 两种, 主链中由鼠李糖、葡萄糖、半乳糖构成的单元应为其骨架结构(基本结构), 这 3 种单糖都有可能连接支链, 不接支链时它们的连接方式为 1 3. 支链主要由阿拉伯糖构成, 连接方式可能同样有 1 2, 1 3, 2 3 三种, 其中少量的 Glycoside₂ 为鼠李糖, 它的连接方式应该是 1 3. 木糖以 1 存在于主链和支链的末端.

2.4 ¹H NMR

¹H NMR 可用于探讨多糖结构中糖苷键构型. 通常 α 型糖苷 C1 质子的 δ 会超过 5×10^{-6} , 而 β 型则小于 5×10^{-6} . 图 7 为茶多糖 TGC 经重水交换后的 ¹H NMR 谱图.

图中最左边的一簇峰是 TGC 的异头碳(C1)信号, 它们的化学位移 δ 小于 5×10^{-6} , 说明 TGC 中的糖苷是以 β 型存在, C2~C6 的信号出现在 $4 \times 10^{-6} \sim 3 \times 10^{-6}$ 位置, 互相交叉重叠.

2.5 波谱扫描实验

在碱性溶液中, 刚果红与具有螺旋构象的多糖可以形成络合物, 络合物的最大吸收波长较刚果红

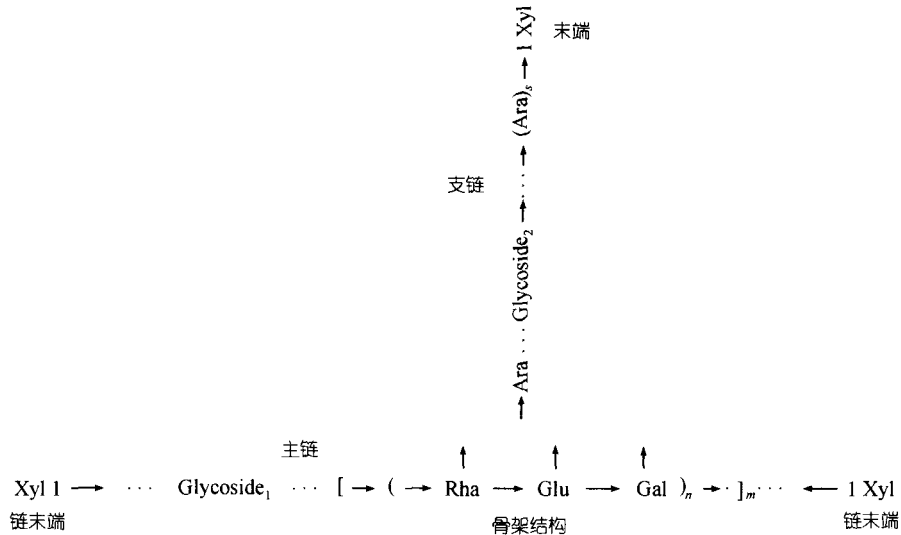


图 6 茶多糖 TGC 的一级结构

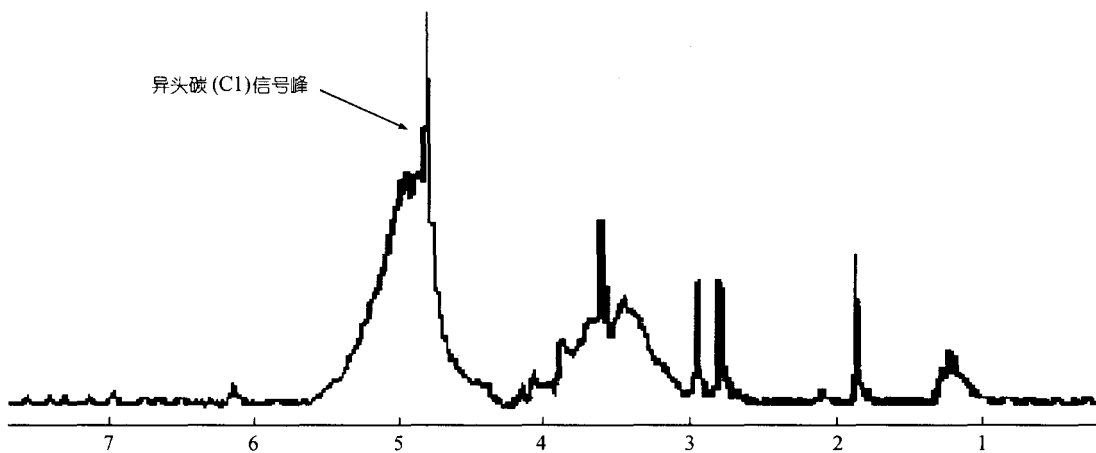


图 7 茶多糖 TGC 的氢谱

移向长波^[27]. 对刚果红空白(含 0.1 mol/L 的 NaOH)及 TGC 和刚果红的混合物(含 0.1 mol/L 的 NaOH)分别进行紫外-可见光谱扫描, 扫描范围: 200~800 nm, 结果如图 8 所示.

结果表明, 刚果红的最大吸收出现在 230 nm 附近, 当加入 TGC 后, 混合体系的最大吸收波长出现在 490 nm 附近, 说明刚果红与茶多糖 TGC 发生了络合反应, 暗示 TGC 在溶液中呈现螺旋构象.

2.6 圆二色谱(CD)分析

圆二色谱(circular dichroism, CD)可以提供分子的绝对构型、构象等信息, 是研究有机化合物分子(包括生物大分子)三维结构的有效方法. 多糖, 特别是中性多糖因缺乏在一般紫外区的光谱活性, 难以直接测定得到由 CD 分析提供的结构信息. 通常先将多糖进行分子修饰或将多糖与刚果红络合后测定 CD 谱

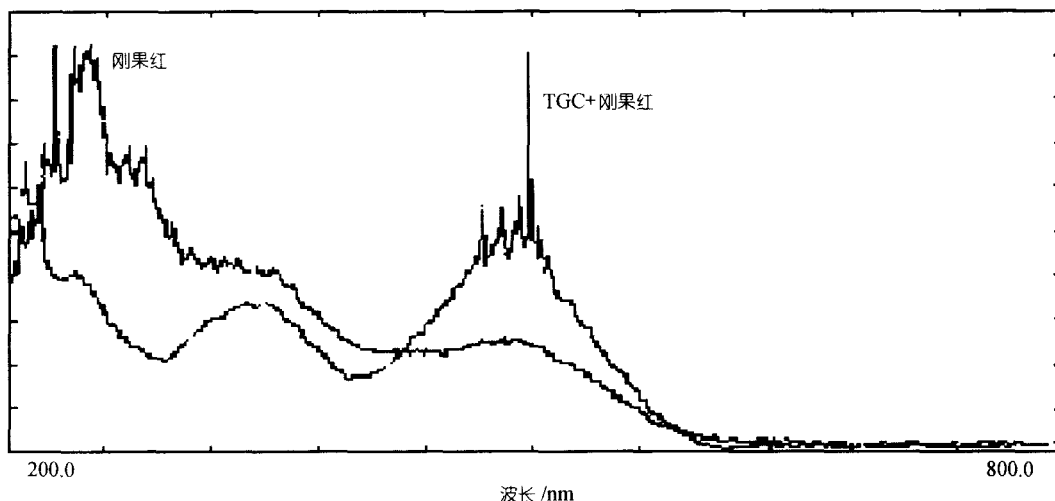


图 8 刚果红及 TGC 与刚果红混合物的紫外扫描波谱的比较

来推测多糖的构象^[28,29]. 图 9 和 10 分别给出了 TGC 和 TGC 与刚果红络合物的 CD 谱图.

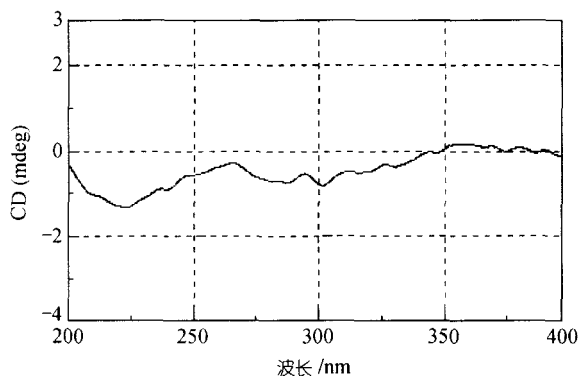


图 9 TGC 水溶液的圆二色谱

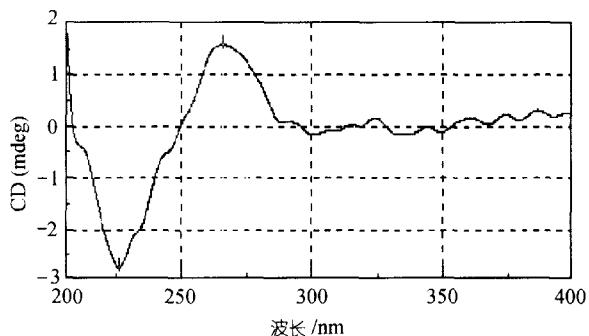


图 10 TGC 在刚果红溶液中的圆二色谱

分析图 9 和 10 的结果表明, TGC 中的糖醛酸含量很低(3%), 仍属于中性多糖, 其 CD 谱中缺乏明显的 CD 信号(图 9). 当 TGC 与刚果红络合后, 此络合物的 CD 谱(图 10)在 270 nm 附近有正 Cotton 效应, 说明 TGC 确以有序的结构与刚果红形成络合物; 在 226 nm 处有负的 Cotton 效应, 结合第 2.5 小节的实验结果, 进一步证实^[30]TGC 在水溶液中以有序的螺旋结构存在.

3 结论

本文采用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)分析了均一茶多糖 TGC 的单糖组成, 并与 NMR, 圆二色谱, 紫外扫描等其他现代分析技术相结合, 对茶多糖 TGC 的一级结构及其在溶液中的构象加以探讨. 经上述实验及结果分析可得出如下结论: () 均一组分茶多糖 TGC 是一种由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖组成的杂多糖. () TGC 的一级结构为: 主链中由鼠李糖、葡萄糖、半乳糖构成的单元应为其骨架结构(基本结构), 这 3 种单糖都有可能连接支链, 不接支链时它们的连接方式为 $\beta 1-3$. 支链主要由阿拉伯糖构成, 连接方式可能有 $\beta 1-2$, $\beta 1-3$, $\beta 2-3$ 三种. 木糖以 $\beta 1$ 的连接方式存在于主链和支链的末端. () 茶多糖 TGC 在水溶液中以有序的螺旋构象存在.

参 考 文 献

- 1 焦克芳, 陈望忠, 曲 红. 糖类与生命科学研究进展. 大学化学, 1999, 14(1): 28 ~ 31
- 2 王大成. 结构生物学研究的一些进展. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(5): 396 ~ 403
- 3 Rief M, Oesterhelt F, Heymann B, et al. Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy. Science, 1997, 275: 1295 ~ 1297
- 4 Morris V J, Guning A P, Kirby A R, et al. Atomic force microscopy of plant cell wall polysaccharides and gels. International Journal of Biological Macromolecules, 1997, 21: 61 ~ 66
- 5 王顺春, 方积年. X-射线纤维衍射在多糖分析中应用的研究进展. 天然产物研究与开发, 1997, 12(2): 75 ~ 79
- 6 Waigh T A, Donald A W, Hesdelbach F, et al. Analysis of the native structure of starch granules with small angle X-ray microfocus scattering. Biopolymers, 1999, 49: 91 ~ 105
- 7 Lebaih B, Bizot H, Ollivon M, et al. Monitor the crystallization of amylase-lipid complexes during maize starch melting by synchrotron X-ray diffraction. Biopolymer, 1995, 50: 99 ~ 110
- 8 Edge C J, Radmemacher T M, Wirmald M R, et al. Fast sequencing of oligosaccharide: the reagent-array analysis method. Natural Academic Science, 1992, 89(4): 6338 ~ 6342
- 9 Osborn H M I, Lochey F, Mosley L, et al. Analysis of polysaccharides and monosaccharides in the root mucilage of maize (*Zea mays* L.) by gas chromatography. Journal of Chromatography A, 1999, 831: 267 ~ 276
- 10 Ahrazem O, Leal J A, Prieto A. Chemical structure of a polysaccharide isolated from the cell wall of *Arachniotus verruculosus* and *A. rubes*. Carbohydrate Research, 2001, 36: 325 ~ 328
- 11 周 鹏, 沈金灿, 谢明勇, 等. GC-MS 法分析茶叶多糖 TGC 单糖组成及机理探讨. 厦门大学学报(自然科学版), 2003, 42(2): 211 ~ 217
- 12 Reinhold V N, Reinhold B B, Costello C E. Carbohydrate molecular weight profiling: Sequence, linkage, and branching data: ESI-MS. Analytical Chemistry, 1995, 67(1): 1772 ~ 1784
- 13 Bao X F, Liu C P, Fang J N, et al. Structural and immunologically studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lueidum* (Fr.). Carbohydrate Research, 2001, 332: 67 ~ 74
- 14 Mock K K, Davey M, Cottrell J S. The analysis of underivatized oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. Biochemical and Biophysical Research Comment, 1991, 177(2): 644 ~ 651
- 15 Venkataraman G, Shriver Z, Raman R, et al. Sequencing complex polysaccharides. Science, 1999, 286: 537 ~ 542
- 16 Garozzo D, Spire E, Cozzolino R, et al. Studies on the primary structure of short polysaccharides using SEC MALDI mass spectrometry. Carbohydrate Research, 2000, 323: 139 ~ 146
- 17 Leeflang B P, Faber E I, Erbel P, et al. Structural elucidation of glycoprotein glycans and of polysaccharides by NMR spectroscopy. Journal of Biotechnology, 2000, 77: 115 ~ 122
- 18 Stenvtz R, Jansson P E, Widmalm G. Computer-assisted structural analysis of oligo- and polysaccharides: An extension of CASPER to multibranching structure. Carbohydrate Research, 1998, 306: 11 ~ 17
- 19 Weitzhandler M, Kadlerek D, Avdanovic N. Mono- and oligosaccharide analysis of proteins transferred to polyvinylidene fluoride membranes after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(7): 5121 ~ 5130
- 20 严鸿德, 汪东风, 王泽农, 等. 茶叶深加工技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1998
- 21 傅博强, 谢明勇, 周 鹏. 茶叶多糖的提取纯化、组成及药理作用研究进展. 南昌大学学报(理科版), 2001, 25(4): 358 ~ 364
- 22 张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1999
- 23 Kocharova N A, Kmirel Y A, Janson P E, et al. Structure of the O-specific polysaccharide of *Uibrio cholerae* O9 containing 2-acetamido-2-deoxy-D-galaturonic acid. Carbohydrate Research, 2001, 332: 279 ~ 284
- 24 Linker A, Evans L R, Impallomeni G. The structure of a polysaccharide from infectious strains of *Burkholderie cepacis*. Carbohydrate Research, 2001, 335: 45 ~ 54
- 25 Falshaw R, Furneaux R H. The structural analysis of disaccharides from red algal galactans by methylation and reductive partial-hydrolysis. Carbohydrate Research, 1995, 269: 183 ~ 189
- 26 Renard M G C, Lahaye M, Mutter M, et al. Isolation and structural characterization of rhamnagalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. Carbohydrate Research, 1998, 305: 271 ~ 280
- 27 周义发, 张丽萍, 杨庆尧, 等. 裂褶菌多糖的构象研究. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22(1): 53 ~ 55
- 28 张丽萍, 张翼伸, 孙 非, 等. 硫酸化对金顶侧耳多糖构象及其生物活性的影响. 生物化学与生物物理学报, 1994, 26(4): 417 ~ 421
- 29 梁忠岩, 苗春艳, 张翼伸, 等. 树舌多糖结构修饰前后 CD 谱比较研究. 生物化学杂志, 1995, 11(4): 434 ~ 436
- 30 梁忠岩, 张翼伸, 苗春艳, 等. 树舌多糖 CF2a 溶液中构象行为的研究. 生物化学与生物物理学报, 1994, 26(4): 411 ~ 416