

京尼平对丝素蛋白交联的染色作用*

李令锦¹ 李俊嵩¹ 王东¹ 段晓琼¹ 丁克毅² 杜林方^{1**}

(¹四川大学生命科学院 成都 610064)

(²西南民族大学化学与环保工程学院 成都 610041)

摘要 京尼平是一种环烯醚萜类化合物,能够与氨基酸反应生成蓝色素。制备的无色丝素蛋白溶液与京尼平溶液混合后,溶液显蓝紫色。利用紫外可见光光谱和荧光光谱,分析了整个反应过程,考察了温度、酸碱度等影响因素,并对颜色产物对光照的稳定性进行了分析,初步探讨了京尼平对丝素蛋白交联染色作用的机制。结果显示:生成的颜色产物在590 nm处具有特征光吸收,高温和碱性条件有利于反应的进行;交联产物的颜色与反应时pH相关,酸性条件下偏蓝色,碱性条件下偏紫色;生成的颜色产物具有较高的稳定性,于自然光强下放置一个月或5 000 lx光强照射6 h,590 nm吸收值减小不显著。丝素蛋白的内源荧光显著降低,表明反应导致丝素蛋白构象的剧烈变化。京尼平可能与丝素蛋白中某些氨基酸侧链基团反应形成稳定的颜色产物。研究结果对环烯醚萜类化合物用于蚕丝染色具有一定的指导意义。图5 表1 参18

关键词 京尼平; 环烯醚萜; 丝素蛋白; 蚕丝; 交联; 稳定性

CLC Q599:Q946.8

Cross-linking Staining of Fibroin by Genipin in Solution*

LI Lingjin¹, LI Junsong¹, WANG Dong¹, DUAN Xiaoqiong¹, DING Keyi² & DU Linfang^{1**}

(¹College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

(²College of Chemistry and Environment Protection Engineering, Southwest University for Nationality, Chengdu 610041, China)

Abstract Genipin, a natural iridoid compound, was transformed to blue pigment by the reaction with amino acids. Amethyst solution was formed when colorless fibroin abstracted from natural silk was mixed with genipin. The effects of temperature and acidity or alkalinity on genipin-fibroin reaction and the product stability against light were studied with UV-vis spectra analysis. The mechanism of the reaction was primarily investigated through fluorescence spectra. The results indicated that the reaction products had a characteristic absorbance at 590 nm, while high temperature and pH accelerated the color reaction and the color of the reaction products was correlated with pH changing, tending to be blue at acidic pH and purple at alkaline pH. The reaction products possessed a good stability against light because only a small decrease of $A_{590\text{ nm}}$ value was observed under natural light for one month or illumination at 5 000 lx for 6 h. The fluorescence intensity of fibroin was obviously decreased after the reaction, suggesting that a drastic change of fibroin conformation happened. The results showed that genipin was cross-linked with some amino acid side chains of fibroin and produced a product with stable color. This study would be helpful for staining silk with natural iridoid compound. Fig 5, Tab 1, Ref 18

Keywords genipin; iridoid; fibroin; natural silk; cross-link; stability

CLC Q599:Q946.8

梔子(*Gardenia jasmonoides* L.)属于茜草科植物,作为传统中草药在我国应用于疾病治疗已经有1 600多年的历史。梔子果实中梔子苷的主要化学成分为京尼平苷(Geniposide),京尼平苷经 β -葡萄糖苷酶水解得到京尼平(Genipin),二者在生物医学材料和材料工程^[1, 2]、食品和色素添加剂^[3]、中药保肝利胆^[4, 5]、抗癌和抗炎^[6, 7]、生物检测^[8, 9]以及农业生产增产^[10, 11]等方面有着广泛的应用。

我国是养蚕大国,2007年全国桑园面积为 $9.607 \times 10^7 \text{ m}^2$,蚕茧产量 $7.927 \times 10^8 \text{ kg}$ ^[12]。我国现有蚕丝出口可以占到世界蚕丝出口总量的70%,但在独立开发应用上只占0.5%,如何增强对蚕丝的深加工、提高蚕丝的综合利用价值,成为困扰我

国丝绸工业和广大蚕农的一个重大问题。此外,由于知识的普及和安全意识的增强,人们越来越意识到化学合成染料对人体造成的伤害和对环境造成的污染,这在一定程度上也限制了丝绸产业的发展。京尼平具有低的细胞毒性^[13],对胶原、明胶等具有交联作用,可应用于生物医学材料和药品包装等方面^[2],目前关于京尼平与蛋白质交联反应的机理还没有统一的认识。现有研究表明,在一定条件下,京尼平与氨基酸能够进行呈色反应生成梔子蓝色素^[14]。因此,本文以蚕丝和制备的丝素蛋白为材料,对京尼平的染色作用和影响因素进行了探讨,对交联反应颜色产物的稳定性进行了分析,并通过紫外可见光和荧光光谱测定的方法,初步考察了京尼平与丝素蛋白交联颜色反应的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

蚕丝购于成都市场,京尼平购自上海沪云医药科技公司

收稿日期:2008-11-10 接受日期:2008-12-04

*四川省科技厅项目(No. 2008SG0025)资助 Supported by the Project of the Science and Technology Department of Sichuan Province, China (No. 2008SG0025)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: dulinfang@yahoo.com)

(相对分子质量226, 纯度 $\geq 98\%$), 配制缓冲液试剂及其他相关试剂均为国产分析纯。

称取蚕丝(除去蚕茧等杂质) 1 g置于20 mL 0.05 mol/L NaHCO_3 溶液中, 在沸水浴中煮3~4 min, 重复2~3次以完全去除丝胶, 清水洗净后烘干。再于80 °C水浴条件下于500 g/L CaCl_2 中溶解, 自然冷却后透析过夜, AgNO_3 检测合格后, 用Bradford法测定丝素蛋白溶液浓度。

1.2 实验方法

剪成小段的蚕丝, 放入4支试管中, 分别加入2 mL 浓度分别为1、2 mg/mL的京尼平水溶液(pH 5.5) 和1、2 mg/mL京尼平的PBS (pH 8.0)溶液, 密闭后于80 °C水浴条件下浸泡反应2 h, 待清水冲洗后, 晾干, 拍照。

3 mL丝素蛋白水溶液(1 mg/mL)中, 加入450 μL 的0.1%京尼平溶液, 于35 °C水浴放置, 反应不同时间后, 以相同浓度的丝素蛋白溶液为参比, 对反应溶液进行吸收光谱扫描200~800 nm, 找出最大特征光吸收值。

1.3 温度、酸碱度等因素对反应的影响

分别取1 mg/mL丝素蛋白水溶液3 mL置于两支试管(试管标号: 1、3)中和PBS (pH 8.0)溶液3 mL置于两支试管(试管标号: 2、4)中, 加入450 μL 的1 mg/mL京尼平溶液后, 将1、2试管置于80 °C水浴中2 h, 3、4于35 °C水浴中反应48 h, 测定吸收光谱, 并进行拍照。考查酸碱度的影响时, 采用不同的缓冲溶液, pH 3 (硼砂与硼酸)、pH 5 (乙酸盐)、pH 7和8 (磷酸盐)、pH 10和11 (碳酸氢钠与氢氧化钠)、pH 12 (磷酸盐与氢氧化钠), 分别配制的3 mL丝素蛋白溶液, 加入450 μL 的1 mg/mL京尼平溶液, 80 °C条件下反应2 h后测定 $A_{590\text{ nm}}$ 值, 并以1 mg/mL丝素蛋白溶液为参比, 进行紫外与可见光吸收光谱(200~800 nm)扫描。

1.4 荧光光谱测定

向两试管中加入1 mg/mL的丝素蛋白PBS (pH 8.0)溶液3 mL, 然后分别加入PBS (pH 8.0)和1 mg/mL的京尼平溶液450 μL , 在35 °C条件下反应, 取2 min、0.5、3、6、24、48 h的反应产物, 用PBS (pH 8.0)稀释4倍后在35 °C条件下进行荧光光谱测定, 测定采用Hitachi Fluorescence Spectrophotometer F-4500记录300~700 nm的荧光发射光谱, 激发光波长为280 nm^[15], 数据导出后利用Origin 7.5作图分析。

1.5 溶液反应产物的稳定性分析

京尼平与丝素蛋白溶液(京尼平与丝素蛋白质量比为15%)在80 °C水浴条件下反应达到稳定后, 于室温条件下密闭放置1 mo后测定 $A_{590\text{ nm}}$ 值; 自然光强条件下放置, 每隔1 h测定一次至6 h; 或进行光照处理, 处理时光照条件(光源: 1 000 W卤化物灯, 光强: 5 000 lx), 持续照射6 h, 每隔1 h测定一次 $A_{590\text{ nm}}$ 值, 求出 A/A_0 (A 表示测定时光吸收值, A_0 为最初光吸收值)值, 利用Origin 7.5作图分析。

2 结果与分析

2.1 蚕丝在京尼平溶液中浸泡染色

蚕丝浸泡于无色的0.1%京尼平溶液中, 于80 °C条件下2 h蚕丝会染成蓝色, 晾干后呈蓝黑色(图1)。实验过程中发现, 蚕丝染上颜色的快慢与京尼平溶液的浓度及pH相关, 在0.2%京尼平溶液中快于0.1%京尼平溶液中, 在PBS (pH 8.0)溶



图1 蚕丝在京尼平溶液中的染色

Fig. 1 Natural silk stained in genipin solution

0为未染色的蚕丝; 1和2为京尼平水溶液(1、2 mg/mL); 3和4为京尼平的PBS (pH 8.0)溶液(1、2 mg/mL)

0: Natural silk; 1 and 2: Genipin in aqueous solution (1, 2 mg/mL); 3 and 4: Genipin in PBS at pH 8.0 (1, 2 mg/mL)

液中快于水溶液(pH 5.5)中。晾干染色蚕丝的深浅也显示与京尼平溶液的浓度及pH相关, 使用水溶液的显紫黑色, 使用PBS (pH 8.0)溶液的显青黑色。

2.2 京尼平与丝素蛋白溶液的颜色反应

以蚕丝为原料, 制备丝素蛋白溶液, 进一步在液体状态下, 分析京尼平对无色的丝素蛋白的染色过程与影响因素。采用两种温度(35 °C和80 °C)与两种pH (pH 5.5和pH 8.0)条件, 发现其他条件相同时, 温度对京尼平染色丝素蛋白有显著影响, 35 °C时反应48 h的溶液颜色较浅, 而80 °C时反应2 h的溶液颜色较深, 这存在典型的温度效应, 表明发生了化学反应(图2)。反应体系的pH影响生成产物的颜色, pH 5.5时为蓝色而pH 8.0时为蓝紫色。此结果表明不同温度和pH条件下, 反应进行程度和反应产物的颜色不同。

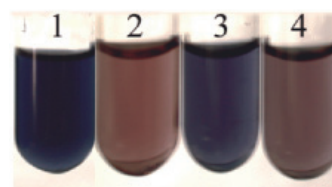


图2 不同温度和pH条件下京尼平与丝素蛋白溶液的反应

Fig. 2 Reaction of genipin with fibroin at different temperatures and pH values 1, 2: 80 °C; 3, 4: 35 °C; 1, 3: 水溶液(pH约5.5); 2, 4: PBS (pH 8.0)溶液

1, 2: 80 °C; 3, 4: 35 °C; 1, 3: In aqueous solution at pH 5.5; 2, 4: In PBS at pH 8.0

2.3 京尼平与丝素蛋白溶液反应产物的吸收光谱与荧光光谱分析

利用紫外可见光光谱扫描, 检测京尼平与丝素蛋白溶液反应过程中体系吸收光谱变化。未反应前, 京尼平水溶液只在242 nm处具有最大特征光吸收值, 而丝素蛋白水溶液在230 nm处具有肽键的吸收峰, 280 nm处具有典型的蛋白质吸收峰, 可见光区均无吸收。京尼平水溶液与丝素蛋白水溶液混合后在35 °C条件下反应。反应初期, 290 nm及380 nm处出现了新的吸收峰, 推测可能是反应的中间产物, 随后原来各自的紫外吸收峰降低, 而在590 nm附近出现一个新的特征光吸收峰, 这与溶液呈现为蓝紫色相吻合(图3)。并且随着反应时间的延长, 590 nm吸收峰不断增高, $A_{590\text{ nm}}$ 值不断增大, 说明所生成的颜色产物的最大特征光吸收值在590 nm附近。文献曾报道, 京尼平与氨基酸反应后生成的栀子蓝色素的特征光吸收峰也在590 nm附近^[16]。

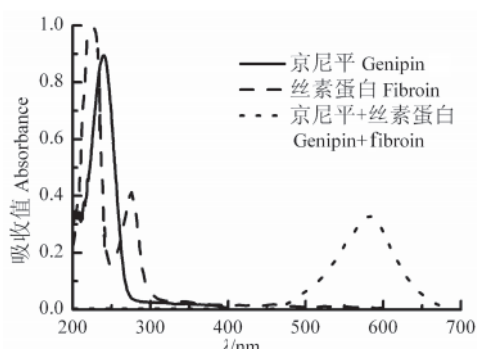


图3 京尼平与丝素蛋白溶液反应前后的紫外可见光吸收光谱
Fig. 3 UV-vis absorbance spectra of genipin, fibroin and fibroin reacted with genipin

以280 nm波长光激发时,蛋白质溶液具有内源荧光,因此可以检测反应混合物荧光发射峰的变化.未反应的丝素蛋白具有350 nm荧光发射峰,表明主要来自丝素蛋白的酪氨酸残基,且处于相对亲水环境中.35℃条件下放置不同时间,丝素蛋白溶液荧光发射峰的位置仍在350 nm处,峰强度仅有10%的减少.与京尼平反应时,丝素蛋白的荧光强度明显降低,并随反应时间延长而逐渐降低,并且荧光峰的位置由350 nm蓝移到325 nm处(图4),说明丝素蛋白与京尼平的反应剧烈,明显改变了丝素蛋白的结构和溶液中的构象,导致酪氨酸残基微环境的改变.

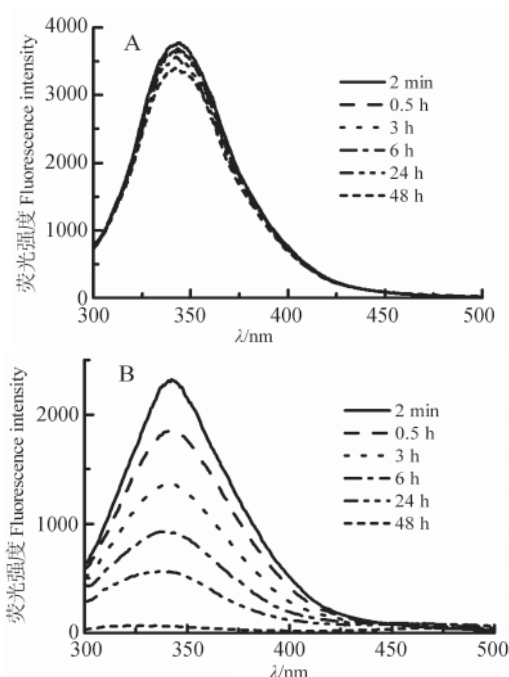


图4 丝素蛋白与京尼平反应前后的荧光发射光谱
Fig. 4 Fluorescence emission spectra of fibroin and its reaction with genipin (A) 丝素蛋白溶液; (B) 丝素蛋白与京尼平混合溶液. 二者均在35℃进行测定 (A) Fibroin solution; (B) Genipin-fibroin reaction solution. Both were measured at 35℃

2.4 酸碱度对京尼平与丝素蛋白反应的影响

进一步在80℃条件下反应2 h,测定生成物特征光吸收值,考察酸碱度对丝素蛋白与京尼平反应的影响.表1结果显

示,溶液最大吸收峰的位置和峰的强度与溶液酸碱度密切相关. pH 8.0、10.0、11.0时终溶液呈现为蓝紫色和浅紫色,具有较大的 $A_{590\text{ nm}}$ 值,表明反应完全. pH 5.0和pH 7.0条件下,反应终溶液的最大吸收峰在594 nm和595 nm处, $A_{590\text{ nm}}$ 值较小,分别为0.3和1.4,表明反应没有进行完全. 过酸(pH 3.0)或过碱(pH 12.0)条件下,溶液仍为无色,没有颜色变化.

表1 pH对京尼平与丝素蛋白溶液反应的影响

Table 1 Effect of pH on genipin-fibroin reaction

溶液pH Solution pH value	产物最大光吸收值 Maximum absorbance value (λ/nm)	$A_{590\text{ nm}}$	产物颜色 Product color
pH 3.0	Not detected	0	无色 Colorless
5.0	594	0.30	浅蓝色 Light blue
7.0	595	1.40	蓝紫色 Amethyst
8.0	593.5	1.68	紫色 Purple
10.0	591.5	1.69	深紫色 Dark violet
11.0	593	1.71	黄紫色 Yellow purple
12.0	Not detected	0	黄色 Yellow

2.5 反应产物稳定性分析

一般带色的物质对光有敏感性,容易受光照的影响,反应生成物容易发生光降解.染色后的蚕丝于强光下暴晒1 wk,颜色没有发生任何改变,再于水中浸泡2 d后,也没有发生退色现象,说明京尼平与蚕丝反应所生成带颜色的产物具有良好的稳定性.

进一步考察溶液状态下京尼平与丝素蛋白反应生成的颜色产物的稳定性.在室温条件下密闭放置1 mo后,染色的丝素蛋白溶液颜色几乎没有发生变化, A/A_0 为97.3%,说明京尼平与丝素蛋白反应产物是稳定的.自然光(实验测定为650 lx)照射下,短时间条件下反应产物不发生变化,而5 000 lx光强照射6 h后,最大吸收值有5%的减少(图5).以上研究结果表明,京尼平与丝素蛋白溶液反应的颜色产物具有光照稳定性.

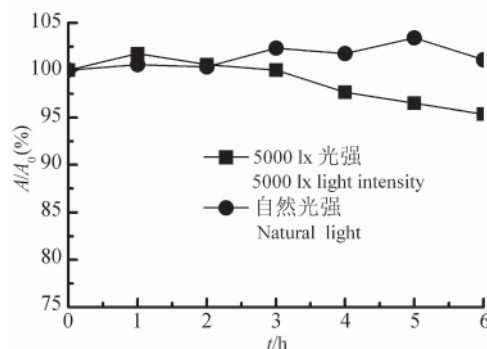


图5 京尼平与丝素蛋白反应产物在不同光照条件下的稳定性
Fig. 5 Stability of genipin-fibroin reaction products under different light irradiances

3 讨论

京尼平是一种环烯醚萜化合物,含有一 COOH 、一 OH 等多个活性基团,能够与含氮化合物发生反应^[17].我们在研究中发现京尼平能使蚕丝染上一定的颜色.利用丝素蛋白与京尼平在溶液状态下反应,紫外可见光光谱分析显示反应产物在590 nm附近处具有最大特征吸收峰,这与京尼平同氨基酸

反应生成的栀子蓝色素的最大吸收峰相似^[16]。丝素蛋白与京尼平反应前后的荧光发射光谱分析表明,京尼平与丝素蛋白是通过与蛋白质肽链中某些氨基酸侧链发生了反应,至于哪些氨基酸,以及如何进行反应,还有待进一步研究。

实验结果显示,酸碱度(pH值)对京尼平与丝素蛋白间的反应具有很大的影响。已有的研究证明,在弱碱性条件下,溶液中的OH⁻可作为一个亲核基团,首先攻击京尼平C₃原子,形成活性的醛基后,然后才能与蛋白质发生反应^[18],因此溶液OH⁻浓度的高低可能决定了反应产物的生成速度和反应进行的程度,同时也决定了产物的最终颜色,因此反应体系pH值是一个关键因素。

一般染料多通过本身颜色的覆盖进行染色,也可以通过反应而生成有色物质。常见的蛋白质染色试剂,与蛋白质的结合力较弱,主要靠分子间的作用力,因此,很容易褪色。而蛋白质纤维更难染色。京尼平通过与蛋白质的交联反应形成最终的颜色产物,因此具有较好的稳定性。京尼平是天然的栀子提取物京尼平苷的水解产物,与丝素蛋白反应具有产物颜色稳定、细胞毒性小、环境污染少等优点,可以考虑用于蚕丝的直接染色。

References

- 1 Ofner CM, Bubnis WA. Chemical and swelling evaluation of amino group crosslinking in gelatin and modified gelatin matrices. *Pharm Res*, 1996, **13** (12): 1821~1826
- 2 Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterial*, 2002, **23**: 4827~4836
- 3 Koga K, Fujikawa S, Fukui Y. Natural blue dye composition and colorant using the same prepared by reacting taurine and genipin. US, US4878, 921, 1987
- 4 Zhang LM (张立明), He KZ (何开泽), Ren ZJ (任治军), Pu Q (蒲蔷). Biochemical mechanism of hepatic protective effect of geniposide on liver-injured mice induced by CCl₄. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2005, **11** (6): 669~672
- 5 Ren ZJ (任治军), He KZ (何开泽), Zhang LM (张立明). Producing technologies of the main components and the recent advances of pharmacological research of *Gardenia*. *Nat Prod R & D* (天然产物研究与开发), 2005, **17** (6): 1~7
- 6 Wang SW, Lai CY, Wang CJ. Inhibitory effect of geniposide on aflatoxin B₁-induced DNA repair synthesis in primary cultured rat hepatocytes. *Cancer Lett*, 1992, **65** (2): 133~137
- 7 Koo HJ, Lim KH, Jung HJ, Park EH. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract. geniposide and genipin. *J Ethnopharmacol*, 2006, **103**: 496~500
- 8 Lee SW, Lim JM. Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*. *Anal Chim Acta*, 2003, **480**: 267~274
- 9 Almog J, Cohen Y, Azoury M, Hahn TR. Genipin. a novel fingerprint reagent with colorimetric and fluorogenic activity. *J Forensic Sci*, 2004, **49**: 255~262
- 10 Bi ZY, Yu ZW, Li JS. Study on improving cheat yield for geniposide. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 1997, **25**: 102~105
- 11 Zhang BX (张伯熙), Zhan XH (詹选怀), Shan YN (单永年). A study on the effect of geniposide and it's compound on increasing the yield of cucumber. *Acta Agric Univ Jiangxi* (江西农业大学学报), 1999, **11** (2): 1~5
- 12 Qian D (钱婵), Zhao DW (赵德万). The observation of the modern sericulture development. *North Sericult* (北方蚕业), 2008, **29** (2): 1~5
- 13 Chen YS, Cheng JY. An *in vivo* evaluation of a biodegradable genipin-crosslinked gelatin peripheral nerve guide conduit material. *Biomaterials*, 2005, **26**: 3911~3918
- 14 Fujikawa S, Fukui Y, Koga K, Kumada JI. Brilliant skyblue pigment formation from *Gardenia* fruits. *J Ferment Technol*, 1987, **65**: 419~424
- 15 Mi FL. Synthesis and characterization of a novel chitosan-gelatin bioconjugate with fluorescence emission. *Biomacromolecules*, 2005, **6** (2): 975~987
- 16 Park JE, Lee JY. Isolation and characterization of water-soluble intermediates of blue pigments transformed from geniposide of *Gardenia jasminoides*. *J Agric Food Chem*, 2002, **50** (22): 6511~6518
- 17 Nickerson MT, Patel J, Heyd DV. Kinetic and mechanistic considerations in the gelation of genipin-crosslinked gelatin. *Int J Biol Macromol*, 2006, **39**: 298~302
- 18 Liang HC, Chang WH. Crosslinking structure of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water-soluble carbodiimide. *J Appl Poly Sci*, 2004, **91** (4): 4017~4026