文章编号:1000 6281(2009) 03 0260 07

酸性柴胡多糖 WBP011的热特性及其聚集体特性的研究

李 岱,张 静*,孙润广,郭树琴

(陕西师范大学物理学与信息技术学院生物物理与生物医学工程研究室,陕西西安710062)

摘 要:本文报道了酸性柴胡多糖(WBP₀₁₁)在各种环境中的聚集态行为。利用热分析系统改变酸性柴胡多糖 (WBP₀₁₁)的环境温度,跟踪检测到该多糖的聚集态特性的变化,表明在不同温度环境下,该多糖有多种聚集形态。 利用原子力显微镜观察云母片表面WBP₀₁₁分子的形貌,研究不同溶剂对该多糖分子及聚集体行为的影响。通过观 察发现,水溶液中WBP₀₁₁分子呈旋绕态的柔性链;盐离子的浓度在一定程度上控制着多糖分子构象的变化;碱溶液 中由于分子间负电荷数目的增加强化了静电排斥作用,使WBP₀₁₁分子呈刚性排列,与在水溶液中的排列有明显不 同。以上结果表明WBP₀₁₁分子构象的变化依赖于WBP₀₁₁/云母片界面及WBP₀₁₁分子/WBP₀₁₁分子间的相互作用。 关键词:酸性柴胡多糖(WBP₀₁₁);热分析系统;原子力显微镜

中图分类号: R285; Q336; TG115. 21* 5.7 文献标识码: A

柴胡,别名地熏、茈胡、茄草等,为伞形科多年生 草本植物,其性味苦凉,有疏散退热疏肝解闷,升阳 举气之功效,常用于治疗寒热往来、胸满肋痛、口苦 耳聋、头痛目眩等,是药物价值极高的一种传统中草 药。柴胡多糖是柴胡中主要的活性成分之一。从 1989 年至今近20 年的研究表明,柴胡多糖具有多种 生物活性功能,例如,柴胡多糖-柴 III 5311 的抗辐 射功能,柴胡果胶多糖 2 II b 对巨噬细胞 Fc 受体表 达的调节作用及抗溃疡作用,防治急性呼吸窘迫综 合症的作用及对实验性胃粘膜损伤的保护作用^[1]。 但目前对其微观形貌、分子链构象的研究尚无报道。

原子力显微镜的出现,为人们直接观察高分子 的微观形貌提供了有利手段,目前已广泛应用于多 糖等大分子构象的分析研究中^[2-4]。长期以来由于 云母片表面电荷与阴性多糖分子之间静电排斥作用 使阴性多糖分子很难吸附在云母片表面,因而利用 AFM 观察的手段也很难获得阴性多糖分子的结构 信息。近年来,人们总结了对 DNA 的观察经 验^[5-7],发现通过添加无机盐来屏蔽这种静电排斥 效应,就可以使阴性多糖分子有效地沉积在云母片 表面上,同时金属盐离子及其它离子(溶剂性质、离 子浓度、酸碱度)的引入改变了阴性多糖的介电性 质,从而改变大分子间的缔合能力,使得阴性多糖微 观结构形貌的多样化。

本项研究首先对陕西商洛地区产的柴胡进行热

水浸提、醇沉,得到了水提柴胡粗多糖 WBP01;然后 对其进行分离纯化,获得酸性组分-酸性柴胡多糖 WBP01;在此基础上,借助热分析系统跟踪检测了酸 性柴胡多糖 WBP01在27 ℃(室温)~800 ℃范围的 热学特性;利用原子力显微镜对该多糖分子进行直 接观测,获得了该多糖在不同溶液中的分子链构象、 聚集体形貌特征的信息,为进一步研究多糖的构效 关系提供了实验依据。

1 材料和仪器

材料:柴胡产于陕西商洛,购于西安万寿路中药 材市场;DEAE-纤维素 52 阴离子交换剂(Whatman); Sephadex G-150 Medium(Pharacia);NaCl 和 NaOH 均 为分析纯。

主要仪器:LXF II B型低速大容量离心机(上海 安亭科学仪器厂)、78-1 磁力加热搅拌器(上海浦东 物理光学仪器厂)、SPM9500 J3 型原子力显微镜(日 本岛津公司)、Q1000DSC+ LNCS+ FACS Q600SDT 的 热分析系统、系列层析柱 2.5×60 cm(上海琪特分析 仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 柴胡多糖 WBP 11的制备和纯化

称取一定量的柴胡粉碎物, 脱脂^[8] 得脱脂柴胡

作者简介:李岱(1981-),女(汉族),山西运城人,硕士.

收稿日期: 2008 10 19;修订日期: 2009 01-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 20772077),教育部科学技术研究重点资助项目(No. 104167).

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(No. 20772077).

[·] 通讯作者:张静, 女(汉族),副教授, 硕士研究生导师. E mail: zhangjin@snnu.edu.en. © 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

粉末, 按实验所获得的柴胡多糖最佳提取工艺^[9]提 取水提柴胡粗多糖 WBP₀。0.01 mol/L NaCl 作为洗 脱液, 利用 DEAE 纤维素 52 阴离子交换层析法从粗 多糖 WBP₀ 中分离出酸性柴胡多糖 WBP₀₁^[10], 进一 步采用 Sephadex G-150 凝胶过滤层析分级分离,获 得分子量不同的两组分 WBP₀₁ (白色) 和 WBP₀₁₂ (浅 黄色), 本实验的研究对象是 WBP₀₁。

2.2 柴胡多糖 WBPon 纯度的鉴定

利用 Sephadex G 150 凝胶过滤法对柴胡多糖 WBP011的纯度进行鉴定。

2.3 WBP011热分析

利用型号为 Q1000DSC+ LNCS+ FACS Q600SDT 的热分析系统跟踪检测柴胡多糖 WBPa1在27 ℃(室 温)~800 ℃范围的热学特性(20 ℃/min)。

2.4 WBP₀₁原子力显微镜的观察及 AFM 样品的制备^[11,12]

采用日本岛津公司的 SPM 9500J3 型原子力显 微镜,室温下大气环境中对柴胡多糖 WBPon 的分子 形态进行扫描观测。探针为 Si₃N₄ (微悬臂长: 200 µm,弹性系数 0.12 N/m),原子力显微镜图像的形态 学特征均系原子力显微镜附带的软件进行分析(数 据均为 50 次测量取平均值)。

用蒸馏水溶解已制备好的柴胡多糖WBPa1,磁 力搅拌器持续搅3h,配成1mg/mLWBPa1储备液。 将所得多糖储备液分别用双蒸水、氯化钠、氢氧化钠 母液稀释成100 μg/mLWBPa11多糖水溶液,100 μg/ mLWBPa1(0.005 mol/L氯化钠、0.01 mol/L氯化钠、 0.5 mol/L氯化钠、0.005 mol/LNaOH)不同浓度的多 糖盐溶液和碱溶液,取确定浓度的溶液2μL,滴在新 剥离的云母表面上,室温空气中干燥30 min,60 ℃ 烘箱干燥24h。原子力显微镜观测(氯化钠溶液稀 释的样品滴在云母片上干燥后蒸馏水冲洗,无水乙 醇固定,室温空气中干燥,原子力显微镜观测)。

3 结果与讨论

3.1 WBPon 纯度的鉴定

选用 Sephadex G-150 柱(2.5×60 cm) 层析法对 柴胡多糖 WBP011 的均一性进行测定,柴胡多糖 WBP011显示一个单峰如图 1,结果证明柴胡多糖 WBP011为组分均一的多糖。





3.2 WBP 11 热特性分析

柴胡多糖 WBPon在27 °C(室温)~800 °C逐渐加 热的过程中,失重率,与失重速率结果如图 2 所示, 在温度升高的过程中,干燥的 WBPon 有 3 次大的质 量损失,其中,在27 °C(室温)~100 °C的过程中,失 重率为6.328%;在100~187 °C,失重率为7.476%; 在187~400 °C,失重率为 38.22%,失重速率最大, 其后直至800 °C的加热过程中,WBPon的质量一直在 减小,但失重的速率也较之前减小,减小的速率也基 本处于稳定。多糖质量在加热过程中的这种变化与 多糖的组成,含水量、分子间的相互作用以及聚集态 的行为有关。因此,柴胡多糖 WBPa1的这种如下图 所示的热变化特性,说明在温度变化的过程中,多糖 聚集态的结构发生相应变化^[12]。

3.3 水溶液中 WBP01分子的形貌特征

图 3 显示的是 100 ^{µg} mL WBP₀₁ 的 AFM 图像, 可见云母片表面有 WBP₀₁ 分子聚集体的存在, 聚集 体之间由延伸出来的分子单链相互缠绕联结在一 起, 形成如图 3A 所示的网状结构。这种局域性的 分布结果是由于云母片表面和聚集体分子之间微弱 的相互作用导致样品分子链在云母片表面发生移 动^[3] 在分子聚集体周围可观察到分子的重叠、搭



图 2 WBP₀₁₁的热分析图。 Fig. 2 Thermal analysis of WBP₀₁₁.



图 3 100^μg mL WBP₀₁₁ AFM 图像(溶剂:蒸馏水)。 a:大范围图像(Bar=2^μm); b: a 中白色箭头所指处的放大图像(Bar= 500 nm)。 Fig. 3 AFM images of 100^μg mL WBP₀₁₁ (solvent: distilled water).

链、相互缠绕的现象, 从图 3b 可看到多数分子链呈 柔性旋绕的状态, 实验测得其高度为 1.672 ±0.75 nm(≥ 个葡萄糖单元的高度(0.3 nm 左右)), 这可 能是因为浓度过高部分条件恰当的糖链在晾干的过 程中发生了局部的聚集, 单分子链由旋绕转变成螺 旋的状态, 也可能相应地增加了单链之间的链接, 因 此可能形成高度较高的分子双链或数链并行紧密缠 绕的 WBPon 多糖分子股^[3]。

3.4 NaCl 盐溶液中 WBP011分子的形貌特征

图 4~ 图 6 显示 WBPon 在钠盐中的结构信息, 将水溶性的 WBPon 溶解在钠盐中制成 WBPon 钠盐溶 液, 然后将此溶液沉积在云母片表面上制成 AFM 观 察的样片。

图 4 为 WBP01 在 0.005mol/L NaCl 溶液中的 AFM 图像,可看到 WBP01 单分子链在微量钠盐引起 的屏蔽效应下通过,WBP01 分子/云母片,WBP01 WBP₀₁分子间, 分子内的相互作用开始缔合成多股 分子的胶束, 其临近胶束多糖分子链上羟基间的紧 密接触有利于分子间形成氢键, 促成了胶束网状结 构或高分子聚集体的形成, 如图 4a 中的棒状或颗粒 状高分子聚集体(平均高度 17.597 nm)。图 4c 中在 棒状或颗粒状聚集体周围分布着分子胶态的网状结 构, 其中红色箭头所示的一刚性分子, 高度为 0.48 nm(一个葡萄糖单元的高度为 0.3 nm 左右), 可视其 一 WBP₀₁ 分子单链; 绿色箭头所示的分子高度为 1.11 nm, 可能为 3 条单分子链铰链成的分子股。可 看出在 Na⁺存在的情况下, WBP₀₁分子已经由水溶 液中的无序柔性分子转变成盐溶液中的刚性分子, 对比水溶液中 WBP₀₁ 单分子链高度, 多糖在 0.005 mol/L NaCl 溶液中的单分子链的高度有所减小, 与 其它文献[3, 13] 的报道不同, 但这个结果并不与分

的屏敝。2216 唐辺,WBPau分方/云母后,WBPau/publis子在不同溶剂中从无序到有序这种构象转变的现象



图 4 100 µg mL WBP₀₁₁ (溶剂: 0.005 mol L NaCl) 的 AFM 图像。

a: 大范围图像(Bar= 20 μm); b: a 中所指区域棒状聚集体及其周边的大分辨率图像(Bar= 2 μm); c: b 中白色箭头所指部位的高分辨率图像(Bar= 689.01 mm); d: c 中红绿箭头所示位置分子链的高度图。 Fig. 4 AFM images of 100 μg/mL WBP₀₁₁(solvent: 0.005 mol/L NaCl).

相矛盾,因为在盐存在的前提下,本文的研究不仅仅 是因为探针和云母片间的排斥力减弱,而且探针与 聚合物间的相互作用也同时改变的缘故而变得更加 复杂^[3],在纳米范围尤其很难校准。

图 5 是 WBP011 在 0. 01 mol/L NaCl 溶液中的 AFM 图像, 可看到在相同的视场有更大片的高分子网状 结构, 分子链的方向性变得更加模糊。说明样品在 干燥过程中, 分子发生了较图 4 更大的移动, 形成了 如图这种不规则的分布形态, 这种移动发生的动力 同样来自较大的屏蔽效应下分子间及分子内有效的 氢键作用和分子间的 van der Waals 相互作用, 同时 这种动力的增强也使得 WBP011 分子间及分子内的交 联作用增强, 造成多糖分子相互缠绕, 形成了如图 5 示的网状结构。

图 6 是 WBP₀₁₁ 在 0.5 mol/L NaCl 溶液中的 AFM 图像, 通过对样品多区域的扫描, 获得如图 6a 所示 的 WBP₀₁₁ 分子在云母片表面分布有序且长短不一的 棒状形态。进一步观察图 6b 可看到图 6a中所示的 棒状分子实为梯子一样的支架结构。实验测得此环 境下的 WBP₀₁₁ 分子的平均高度为 19.303 nm, 宽度为 0.516 ±0.17 μm。WBP₀₁₁分子在 0.5 mol/L NaCl 溶液 中, 形成这种如图 6 所示的高分子聚集体并有序地 分布在云母片的表面, 可能是因为随着离子浓度的



图 5 100 µg' mL WBP₀₁₁ (溶剂: 0.01 mol'L NaCl) 的 AFM 图像。Bar= 20 µm Fig. 5 AFM image of 100 µg/ mL WBP₀₁₁ (solvent: 0.01 mol/L NaCl).

增加,由于屏蔽效应,云母片表面对阴性多糖分子的 吸附增加,但是适当的排斥仍然存在,同时由于补偿 离子的缩合效应,分子间和分子内氢键形成的竞争 机制下,前者处于优势,因此多糖分子在强大的分子 间的氢键(O—H—O 氢键为直线时最强)和 van der Waals相互作用下发生缔合,形成如图所示多股紧 密并行排列的梯形胶束分子形态。

3.5 NaOH 碱性环境中 WBPu1分子的形貌特征

本实验采用文献[14]的制样方法,利用原子力 显微镜扫描得到 100 ^µg/mL WBP₀₁(0.005 mol/L NaOH)的AFM 图像,由图 7a 可见太小不一的柴胡多



图 6 100^μg mL WBP₀₁ (溶剂: 0.5 mol/L NaCl)的 AFM 图像。 a:低分辨率图(Bar= 5^μm); b:白色箭头所示棒状分子的高分辨率图像(Bar= 500 nm)。 Fig. 6 AFM images of 100^μg mL WBP₀₁ (solvent: 0.5 mol/L NaCl).



图 7 100 µg mL(溶剂:0.005 mol/L NaOH) AFM 图像。a: Bar= 2µm; b: Bar= 200 µm Fig. 7 AFM images of 100 µg/mL WBP₀₁₁(solvent:0.005 mol/L NaOH).

糖大分子的聚集体,实验测量其高度为 47.219 nm 左右。当放低视场高度,就可看见这些大小不一的 聚集体之间由平均高度为 0.708 ±0.40 nm 多糖刚 性分子相互链接在一起,形成以聚集体为亮点的网 状布局。比较 WBP 和在水溶液中分布的 AFM 图像, 可认为这一方面是由于沉积在云母片表面上的多糖 大分子在干燥过程中发生了移动,另一方面是由于 微弱的碱性环境使得 WBP011的 COO 发生解离, 与带 负电的云母片基底产生更大的互斥作用,使得阴性 柴胡多糖大分子形成较大的聚集体,为数不多的多 糖单分子链从聚集体中延伸出来,延伸出来的有些 单分子链或其支链上相邻羟基的紧密接触使得至少 有两个单分子链在氢键及 van der Waals 相互作用下 缔合成多糖分子股^[12]。图 7b 显示柴胡多糖 WBP01 分子在 0.005 mol/L NaOH 溶液中 为高度 0.914 nm 左右的刚性分子,与文献[13]中测得的一致,由于扫 描环境空气湿度的影响. 云母片表面保留了一层薄 ·薄的水层,大约有一个大分子的直径(0.25~1 nm) 厚.因此对比单链分子的垂直高度可推测其可能为

股。这与文献中报道的在 5 mmol/L 的 NaOH 环境不 会破坏多糖的胶束结构一致^[14],由于碱性环境中阴 性多糖 WBPan分子裸露的 COO 离子的增多使得分 子内静电排斥作用较其在水溶液中有增无减,因此 难以形成如水溶液中所示的任意旋绕的柔性连,而 形成如图 7b 所示的刚性直连。

综上所述, WBPon 在钠盐溶液中不再像其在水 溶液中形貌特征(图3), 而是在无机盐离子的屏蔽 作用下单分子链之间通过氢键, van der Waals 相互 作用缔合成胶态分子股, 随着无机盐离子浓度的增 大, WBPon 分子/云母片, WBPon 分子间, 分子 内的相互作用也随之改变, WBPon 分子间, 分子 内的相互作用也随之改变, WBPon 分子间, 分子 内的相互作用也随之改变, WBPon 分子间, 分子 内的相互作用也随之改变, WBPon 分子影 流电水溶液中相互缩给的胶态网状结构, 随着 NaCl 浓 度的进一步增大(0.5 mol/L NaCl), WBPon 分子聚集 成长短不一的梯形结构的棒状形态, 有序地分布在 云母片表面。

4 结论

两条的弟分子链相互作用缩合成的多糖刚性分子。实验表明,柴胡多糖 WBPa1的分子构象会因环。

境(温度、溶剂性质、离子浓度)的变化而变化。热分 析结果表明:在加热过程中,多糖的三次质量损失, 提示柴胡多糖 WBPout 的组成、分子量及分子间的相 互作用因环境温度的变化而变化,从而影响到多糖 分子的微观形貌和聚集体行为的变化。观察不同溶 液中WBPan分子的 AFM 图片,水溶液中阴性柴胡多 糖WBPm由干静电效应,分子呈旋绕状柔性链杂乱 地分布在云母片的表面。在NaCl存在的环境中,由 于静电屏蔽效应, WBPon 分子间及分子内, 支链临近 羟基形成的氢键, van der Waals 相互作用下形成分 子胶态网状结构。随着离子浓度的增大,当离子浓 度增大到 0.5 mol/L 时, 胶态分子网状结构变成了梯 形结构有序地分布在云母片的表面。在金属离子浓 度的影响下,WBPm分子构象的这种跨越式变化,可 认为是金属离子浓度变化引起的 WBPm/云母片表 面,WBPou/WBPou之间的相互作用互相竞争的结果, 但它们之间的牵制机制尚不清楚。在 0.005 mol/L NaOH 溶液中,由于促进了糖基上 COO 的解离,裸露 的COO-相应地增大了WBP01/云母片表面,WBP01/ WBP011之间的静电排斥效应,在氢键和 van der Waals 相互作用下形成较高的分子聚集体、单分子链呈刚 性无盘绕 螺旋态由聚集体中延伸出来分布在云母 片的表面。结果表明,通过调节多糖的环境参数,可 以控制其构象行为,因此未来有待进一步研究为这 种控制机制建立数学模型,为获得最佳的功能多糖 提供理论和科学依据。

参考文献:

- [1] 李岱,张静,孙润广.柴胡多糖的研究现状和进展.生物医学物理学[M].北京:科学出版社,2008.
- [2] Camesano T A, Wilkinson K J. Single molecule study of xanthan. conformation using atomic force microscopy [J]. Biomacromolecules, 2001, 2: 1184-1191.

- [3] Balnois E, Stoll S, Wilkinson K J, Buffle J. Conformations of succinoglycan as observed by atomic force microscopy [J]. Macromolecules, 2000, 33: 7440-7447.
- [4] Decho A W. Imaging an alginate polymer gel matrix using atomic force microscopy[J]. Carbohydr Res, 1999, 315: 330
 333.
- [5] Lyubchenko Y L, Shlyakhtenko L S. Visulization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(2): 496–501.
- [6] Hansma H G, Laney D E, Bezanilla M, Sinsheime R L, Hansma P K. Applications for atomic force microscopy of DNA[J]. Biophys J, 1995, 68(5): 1672.
- [7] Helen G H, Daniel E L. DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy [J]. Biophy J, 1996, 70: 1933–1939.
- [8] 孙润广,张静. 甘草多糖螺旋结构的原子力显微镜研 究[J]. 化学学报,2006,64(24):2467-2672.
- [9] 李岱,张静,孙润广.超声波处理对柴胡多糖提取率、 微观形貌特征及生物活性的影响[J].生物加工过 程,2009,7(2):29-34.
- [10] 耿俊贤,陈仕儒.柴胡多糖的分离与鉴定[J].中国中 药杂志,1989,14(1):37-40.
- [11] 王博,孙润广,张静. 羧甲基茯苓多糖结构的红外光 谱表征与原子力显微镜观测[A].2007 中国生物医学 工程联合学术年会论文集[C],中国生物医学工程进 展,2007.
- [12] 倪德江,陈玉琼,谢笔钧,等. 乌龙茶多糖 OTPS2-1 三
 维光谱特性、形貌特征及热特性研究[J]. 高等学校
 化学学报,2004,25(12):2263-2268.
- [13] Decho Alan W. Imaging an alginate polymer gel matrix using atomic force microscopy[J]. Carbohydrate Research, 1999, 315: 330-333.
- [14] Yang Jin, Zhang Hongbin, Yin Yimei, et al. Comparison of curdlan and its carboxymethylated derivative by means of Rheology, DSC, and AFM [J]. Carbohydrate Research, 2006, 341: 90-99.

Thermal properties and aggregation behaviors of acidic bulpeurum polysaccharide WBP₀₁₁

LI Dai, ZHANG Jing*, SUN Rurr guang, GUO Shur qin

(Laboratory of Biophysics and Biomedical Technology, College of Physics and Information Technology, ShanxiNormal University, Xi' an Shanxi 710062, China)

Abstract: Aggregation behavior of acidic Bulpeurum Polysaccharide (WBP_{011}) in a variety of environments was investigated. Using thermal analysis to trace the behavior of aggregation of polysaccharide with temperature rising, it was discovered that the change of the configuration of acidic Bulpeurum Polysaccharide (WBP_{011}) in different temperature. The effect of different solvents on aggregation behavior of acidic Bulpeurum Polysaccharides was investigated using atomic force microscope observing WBP_{011} molecular morphology on the surface of mica in Atmospheric environment. The concentration of ions controlled conformation changes of acidic Bulpeurum Polysaccharide (WBP_{011}) in a certain extent. In alkali solution, the increasing of negative charge strengthened the role of the electrostatic repulsion, consequently WBP_{011} molecules exhibited rigid structures. The above results showed that conformation of WBP_{011} molecular changed dependently on the interfacial change between WBP_{011} and mica, as well as interaction among WBP_{011} moleculars.

Keywords: Bulpeurum polysaccharide(WBP011); thermal an alysis system; atomic force microscope

^{*} Corresponding author © 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net