

文章编号: 1000-6281(2013)01-0054-08

# 两种方法提取的麦冬多糖结构 及聚集行为的比较研究

王小梅<sup>1</sup>, 孙润广<sup>1\*</sup>, 张 静<sup>2</sup>, 郝长春<sup>1</sup>, 张力妮<sup>1</sup>

( 陕西师范大学 1. 物理学与信息技术学院 2. 食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710062)

**摘 要:** 本文利用热水提取法与超声提取法提取麦冬多糖, 并利用傅里叶变换红外光谱法、原子力显微镜(AFM)及扫描电子显微镜(SEM)对两种方法提取的麦冬多糖的官能团及表面形貌进行了比较研究。结果表明, 热水提取的麦冬多糖(WPOJ-DS)与超声提取的麦冬多糖(UPOJ-DS)的官能团存在明显差别, 在WPOJ-DS中检测到 $\beta$ -葡萄糖吡喃糖, 而UPOJ-DS中没有。两种多糖的AFM观测结果表明, 相对于WPOJ-DS, UPOJ-DS的分散性更好, 能观察到多糖单分子链形态以及明显的螺旋结构, 说明超声处理可能对麦冬多糖的分子间及分子内氢键产生影响。SEM结果表明, UPOJ-DS相对于WPOJ-DS大片状结构减少, 且出现很多棒状及小球状颗粒, 说明超声处理使麦冬多糖产生了降解。因此, 超声提取法会对麦冬多糖的分子结构及聚集行为产生影响。

**关键词:** 麦冬多糖; 超声; 原子力显微镜; 扫描电子显微镜

**中图分类号:** S567.23<sup>+</sup>2; TG115.21<sup>+</sup>5.3; TG115.21<sup>+</sup>5.7 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.1000-6281.2013.01.010

麦冬多糖作为麦冬的主要有效成分之一, 近年来研究表明其具有多种生物活性, 主要表现在免疫活性、抗过敏性、降血糖和抗心肌缺血等方面<sup>[1-3]</sup>。已有文献<sup>[4]</sup>报道超声提取法可明显提高麦冬多糖的提取率, 但目前对于超声提取的麦冬多糖结构与溶液构象的研究相对较少。

由于多糖分子量、结构复杂, 而且很难形成晶体, 对其二级结构的研究比较困难。原子力显微镜的出现使得多糖表面形貌的研究成为可能<sup>[5-8]</sup>。与其他物理化学方法相比, 原子力显微镜分辨率高, 可以直观地观察到样品纳米结构的信息。而多糖链庞大而复杂, 原子力显微镜仅限于局部区域的观察, 对于多糖样品大范围的整体性, 需要用扫描电子显微镜进行观察<sup>[9,10]</sup>。为了准确测定水提麦冬多糖(WPOJ-DS)与超声提取麦冬多糖(UPOJ-DS)的区别, 本文首先利用红外光谱法对其官能团分布进行了检测, 并利用原子力显微镜对其不同浓度的多糖进行观测, 获得了两种多糖在水溶液中的分子构象信息。最后利用云母片试样与粉末试样两种方法分别对WPOJ-DS与UPOJ-DS进行扫描电镜观测, 比较研究了两种多糖的聚集行为。为进一步研究超声对麦冬多糖结构及功能的影响提供一定的实验

依据。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

麦冬, 湖北产, 购于西安市万寿路中药材市场。DEAE-cellulose52 (Whatman), Sephacryl S-300 (Pharmacia), 苯酚, 浓硫酸, 95%乙醇, 氯化钠, 氢氧化钠均为分析纯。

SPM-9500J3型原子力显微镜(日本岛津公司)、TU-4810紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)、傅里叶变换红外光谱仪(Avatar360E, S. P. FTIR, 尼高力)、磁力搅拌器、RE-52AA型旋转蒸发器、FD-1A真空冷冻干燥机、Quanta 200型环境扫描电子显微镜(FEI公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 麦冬多糖的提取及纯化

将麦冬块根60℃烘干后并粉碎, 加入4倍体积的95%乙醇脱脂3次, 烘干, 利用两种方法提取麦冬多糖。方法1: 取80g脱脂后的块根粉末, 按料液比1:10加蒸馏水, 80℃恒温水浴提取2h, 提取两次; 方法2: 取80g脱脂后的块根粉末, 按料液比1:10加蒸馏水, 搅拌使其充分溶解, 于超声波细胞粉

收稿日期: 2012-08-04; 修订日期: 2012-11-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 10874108); 教育部科学技术研究重点资助项目(No. SJ08A16)。

作者简介: 王小梅(1983-), 女(汉族), 陕西户县人, 博士。E-mail: wxm19830427@163.com

\* 通讯作者: 孙润广, 男(汉族), 教授, 博士研究生导师。E-mail: sunrun Guang@snnu.edu.cn

碎机下提取, 提取条件: 超声时间 15 s, 间隙时间 15 s, 超声次数 90 次, 超声功率为 400 W, 提取两次。两种方法提取得到的提取液分别经减压浓缩, 用 4 倍量 95% 乙醇醇沉、离心、透析和真空干燥后得水提麦冬粗多糖 WPOJ 及超声提取麦冬粗多糖 UPOJ。经紫外 - 可见分光光度计检测, WPOJ 及 UPOJ 在 260 ~ 280 nm 无特征吸收峰, 证明此粗多糖中不含蛋白质和核酸。

将所得粗多糖经 DEAE-cellulose52 纤维素柱层析, 洗脱液均为双蒸水, 流速为 6 s/滴, 15 min/管, 全自动部分收集器收集洗脱液, 苯酚 - 硫酸法在 490 nm 波长下比色检测糖含量。以试管数目为横坐标, 吸光度值为纵坐标作 DEAE-cellulose52 色谱柱洗脱曲线图。均得到一个组分, 分别命名为 WPOJ-D 及 UPOJ-D。将 WPOJ-D 及 UPOJ-D 经 Sephaeryl S-300 凝胶柱层析, 洗脱液为蒸馏水, 流速为 5 s/滴, 15 min 收集一管, 苯酚 - 硫酸法检测, 收集, 冷冻干燥, 均得到一种组分, 分别命名为 WPOJ-DS 及 UPOJ-DS。

### 1.2.2 麦冬多糖的红外光谱扫描

分别称取 1 mg 多糖样品 WPOJ-DS 与 UPOJ-DS, 加入 100 mg KBr 充分研磨, 压片, 利用傅里叶红外光谱仪在 4 000 ~ 400  $\text{cm}^{-1}$  波长范围内进行扫描。

### 1.2.3 原子力显微镜制样及观测

分别精确称取 1 mg 麦冬多糖 WPOJ-DS 与 UPOJ-DS, 用蒸馏水将其配置成 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的多糖溶液, 在磁力搅拌器上搅拌 4 h, 使其充分溶解, 用蒸馏水分别稀释成 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的多糖溶液, 分别吸取 5  $\mu\text{L}$  滴在新剥离的云母表面上, 室温下、大气环境中采用日本岛津公司的 SPM 9500J3 型原子力显微镜对麦冬多糖的分子形态进

行扫描观测。图像均在 contact 模式下进行, 探针为  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , 微悬臂长: 200  $\mu\text{m}$ , 弹性系数 0.12 N/m。AFM 图像的形态学特征(如高度、宽度等)均采用 AFM 附带的软件进行分析。

### 1.2.4 扫描电镜制样方法

(1) 分别配置浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的麦冬多糖 WPOJ-DS 与 UPOJ-DS, 滴在新解离的 1 cm  $\times$  1 cm 云母表面, 静置, 自然风干, 真空喷金, 电子枪加速电压 20 kV, 进行 SEM 观察。

(2) 取适量麦冬多糖样品 WPOJ-DS 与 UPOJ-DS 粉末, 分别粘于实验台的导电胶上, 用洗耳球吹去浮样, 真空喷金, 进行 SEM 观察。

## 2 结果与讨论

### 2.1 麦冬多糖的红外光谱扫描结果

图 1 为麦冬多糖 WPOJ-DS 及 UPOJ-DS 的红外光谱扫描图, 由图可见, 两种多糖均具有多糖的特征吸收峰。两种多糖分别在 3 361  $\text{cm}^{-1}$  和 3 334  $\text{cm}^{-1}$  出现的峰是 O—H 伸缩振动峰, 表明两种多糖均存在分子间和分子内氢键; 2 936  $\text{cm}^{-1}$  和 2 935  $\text{cm}^{-1}$  处为多糖— $\text{CH}_2$ —的 C—H 伸缩振动引起的; 1 649  $\text{cm}^{-1}$  和 1 658  $\text{cm}^{-1}$  处为多糖中结晶水或氨基 N—H 变角振动引起的; 1 200 ~ 1 400  $\text{cm}^{-1}$  处为多糖 C—H 键的变角振动引起的; 1 000 ~ 1 200  $\text{cm}^{-1}$  处为多糖 C—O 伸缩振动引起的; 934  $\text{cm}^{-1}$  和 935  $\text{cm}^{-1}$  处为呋喃环的对称伸缩振动引起的; 820  $\text{cm}^{-1}$  和 822  $\text{cm}^{-1}$  处说明两种糖都存在  $\alpha$ -构型; 400 ~ 600  $\text{cm}^{-1}$  处为吡喃环的特征吸收峰。两种多糖的区别在于 WPOJ-DS 在 872  $\text{cm}^{-1}$  处有吸收峰, 而 UPOJ-DS 没有, 表明 WPOJ-DS 存在  $\beta$ -葡萄糖吡喃糖<sup>[11]</sup>, 经过超声作用后, 此结构受到影响。

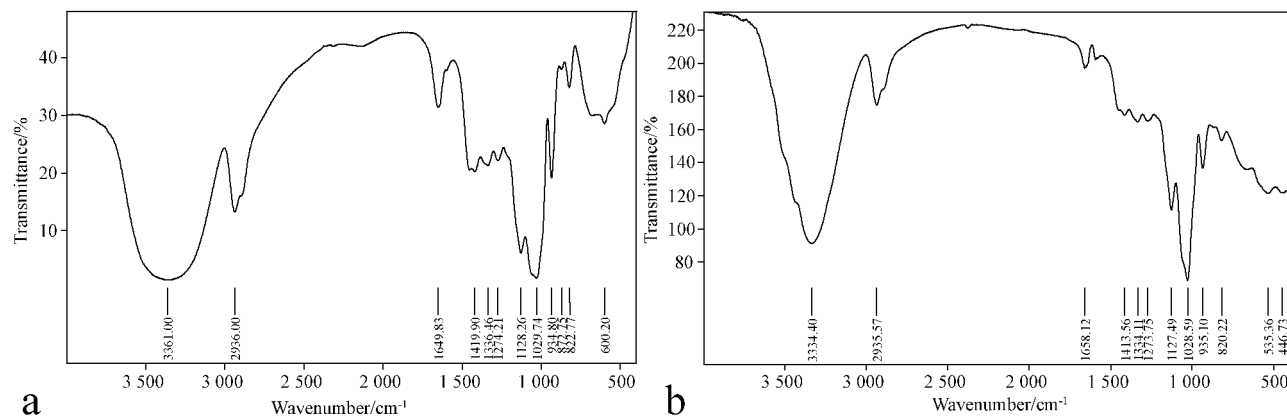


图 1 a: WPOJ-DS 的红外光谱图; b: UPOJ-DS 的红外光谱图。

Fig. 1 IR spectrum of WPOJ-DS (a) and UPOJ-DS (b).

## 2.2 麦冬多糖的原子力显微镜观测结果

将不同浓度的 WPOJ-DS 与 UPOJ-DS 样品分别用 AFM 成像,得到了不同形貌多糖分子聚集行为的图像。实验表明,溶液浓度及超声提取法均会对麦冬多糖的聚集行为产生一定的影响。图 2 为两种多糖 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时的 AFM 图像,结果表明,WPOJ-DS 表现为多分枝的分型结构,链宽 30 ~ 70 nm,链高 8 ~ 20 nm;而 UPOJ-DS 除有较大的聚集状态出现外,还

出现了细丝状结构,丝状的宽度为 90 nm 左右,高度不到 1 nm,一般多糖单链的直径为 1 nm 左右,说明 UPOJ-DS 为很多单链相互作用平铺在云母表面。因此,超声提取法使得麦冬多糖的高级结构发生了变化,出现了分散性较好的丝状结构,而且从高度上分析是单分子链,说明超声处理使得麦冬多糖的分子间氢键减弱。

从图 3 可见,当多糖浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,WPOJ-

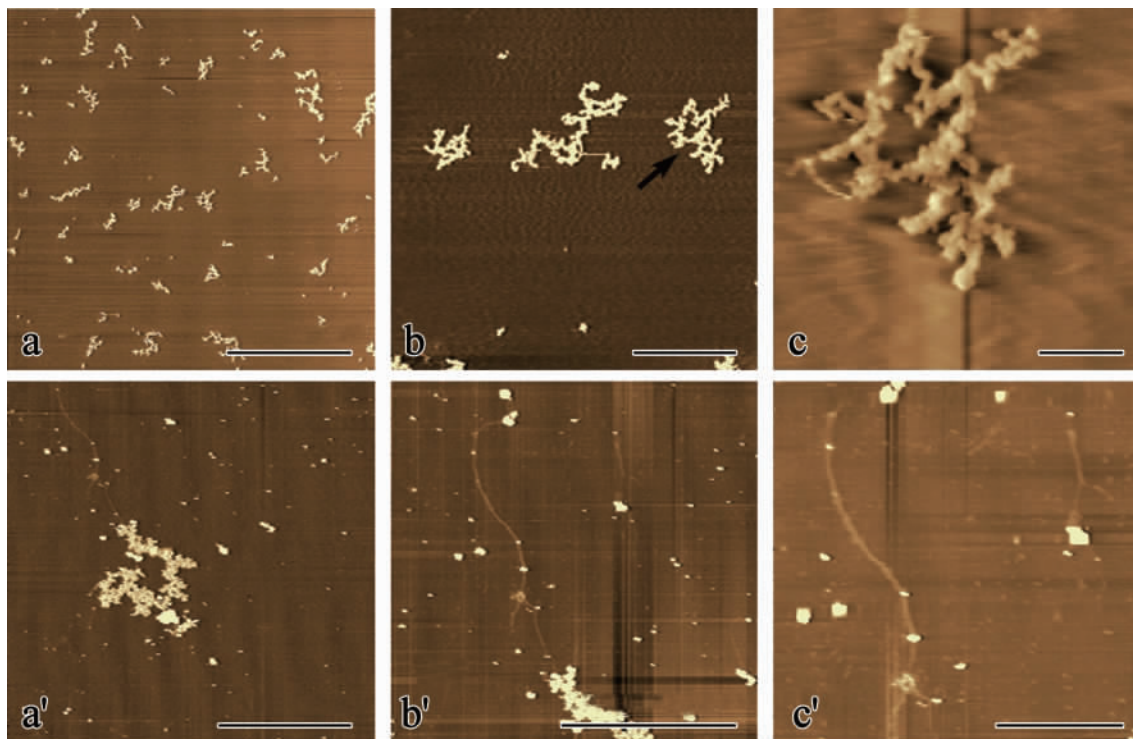


图 2 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  WPOJ-DS(a ~ c) 和 UPOJ-DS(a' ~ c') 的 AFM 图像。

a ~ c: Bar = 5  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$ , 200 nm; a' ~ c': Bar = 5  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 200 nm

Fig. 2 AFM images of WPOJ-DS(a - c) and UPOJ-DS(a' - c') on the concentration of 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

DS 呈现出聚集状,每个聚集物在高分辨率下可以看出其分子链状及片状粘连接构,实验测得其分子链的高度在 1.3 nm 左右,宽度在几十 ~ 几百 nm 不等。UPOJ-DS 分子较为分散,呈现出螺旋棒状,其宽度为 80 nm 左右,高度 10 nm 左右。因此,超声提取的麦冬多糖与水提的比较,片状粘连接构消失,出现小棒状结构,且高分辨率下观察其具有螺旋结构,溶液的分散性更好。

图 4 为 5  $\mu\text{g}/\text{m}$  麦冬多糖 WPOJ-DS 与 UPOJ-DS 的 AFM 图像,由图可见,WPOJ-DS 呈现出细丝状,有分枝,链宽 50 nm,链高 1 nm 左右,链长几 mm,由于分子链间相互作用力及与云母表面的相互作用力,麦冬多糖以单链高度平铺在云母表面。UPOJ-DS 呈现出小螺旋棒状,宽度 50 nm 左右,高度几 nm,长度较短,150 nm 左右。因此,超声提取的麦冬

多糖相对水提的麦冬多糖分子聚集行为发生了明显变化。经过超声作用,多糖链明显变短,多糖链与云母片之间的作用力减弱,使其高级结构出现缠绕及螺旋结构。结合红外分析结果可知,这可能是由于超声处理对麦冬多糖  $\beta$ -葡萄吡喃糖产生影响,使得多糖分子内氢键增强,而分子间氢键减弱而引起其高级结构发生显著地变化。

比较图 2 ~ 4 的 AFM 图,可看出,随着多糖浓度的减小,麦冬多糖的聚集性明显减小,从聚集链状、片状粘连接构变为单链态。

## 2.3 麦冬多糖的扫描电镜观测结果

图 5a、5b 分别是麦冬多糖 WPOJ-DS 云母片试样不同放大倍数的扫描电镜图像,从图中可看出 WPOJ-DS 呈聚集状,聚集成片状分层结构,紧密堆积在一起;图 5a'、5b' 是麦冬多糖 UPOJ-DS 云母片

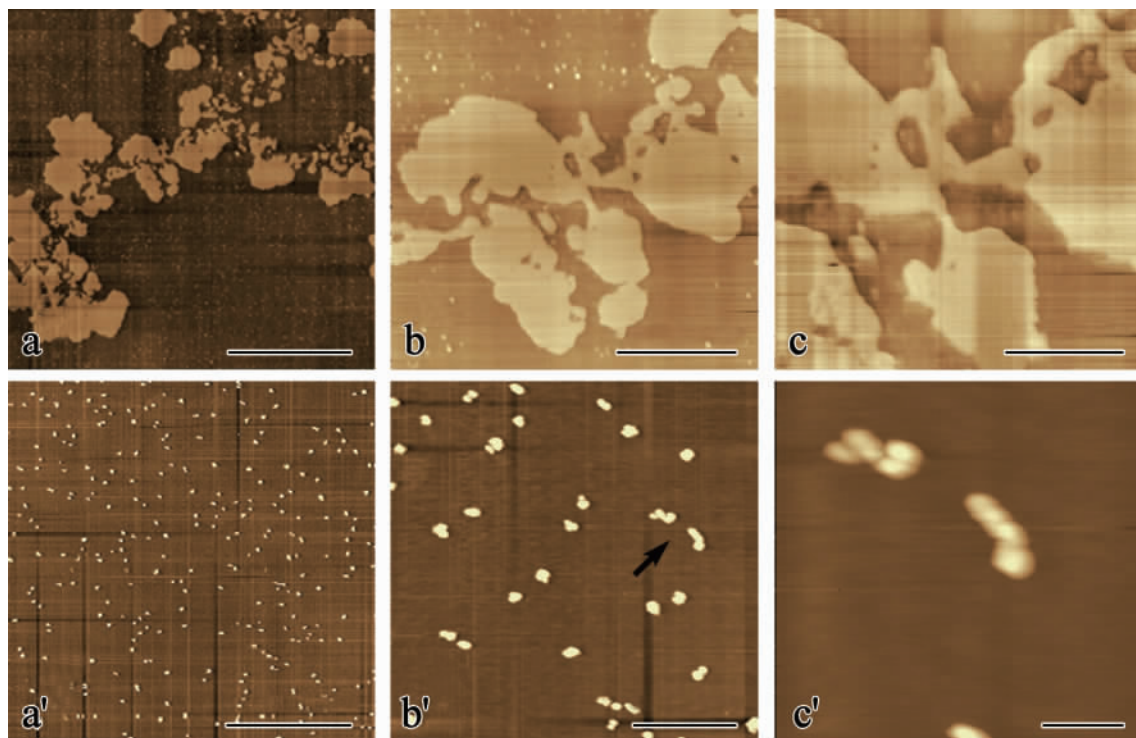


图 3 10  $\mu\text{g/mL}$  WPOJ-DS( a ~ c) 和 UPOJ-DS( a' ~ c') 的 AFM 图像。

a ~ c: Bar = 5  $\mu\text{m}$  , 1  $\mu\text{m}$  , 500 nm; a' ~ c': Bar = 5  $\mu\text{m}$  , 1  $\mu\text{m}$  , 200 nm

Fig. 3 AFM images of WPOJ-DS( a - c) and UPOJ-DS( a' - c') on the concentration of 10  $\mu\text{g/mL}$ .

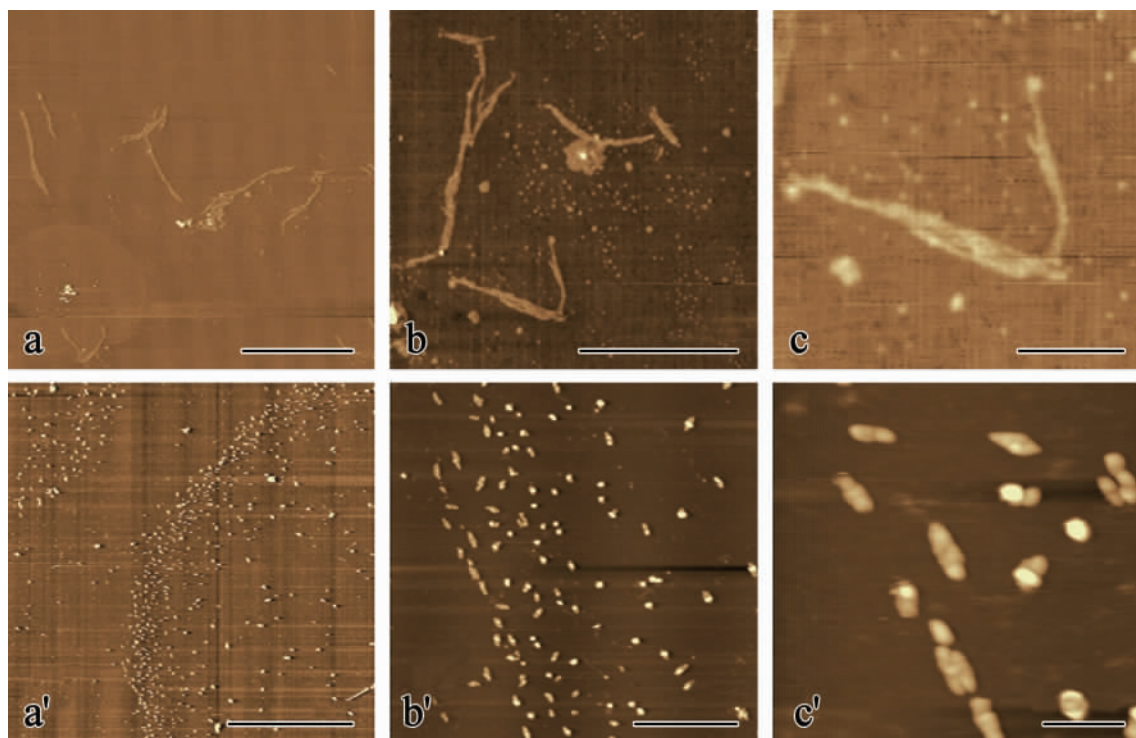


图 4 5  $\mu\text{g/mL}$  WPOJ-DS( a ~ c) 和 UPOJ-DS( a' ~ c') 的 AFM 图像。

a ~ c: Bar = 5  $\mu\text{m}$  , 2  $\mu\text{m}$  , 500 nm; a' ~ c': Bar = 5  $\mu\text{m}$  , 1  $\mu\text{m}$  , 200 nm

Fig. 4 AFM images of WPOJ-DS( a - c) and UPOJ-DS( a' - c') on the concentration of 5  $\mu\text{g/mL}$ .

试样不同放大倍数的扫描电镜图像,其呈较分散的小片状或颗粒状结构。比较 WPOJ-DS 与 UPOJ-DS 云母片试样扫描电镜图像,结果表明,超声提取的麦

冬多糖 UPOJ-DS 相对于水提的麦冬多糖 WPOJ-DS 减少了密集紧实的聚集行为,较为分散。

图6(a~d)分别是麦冬多糖 WPOJ-DS 粉末试

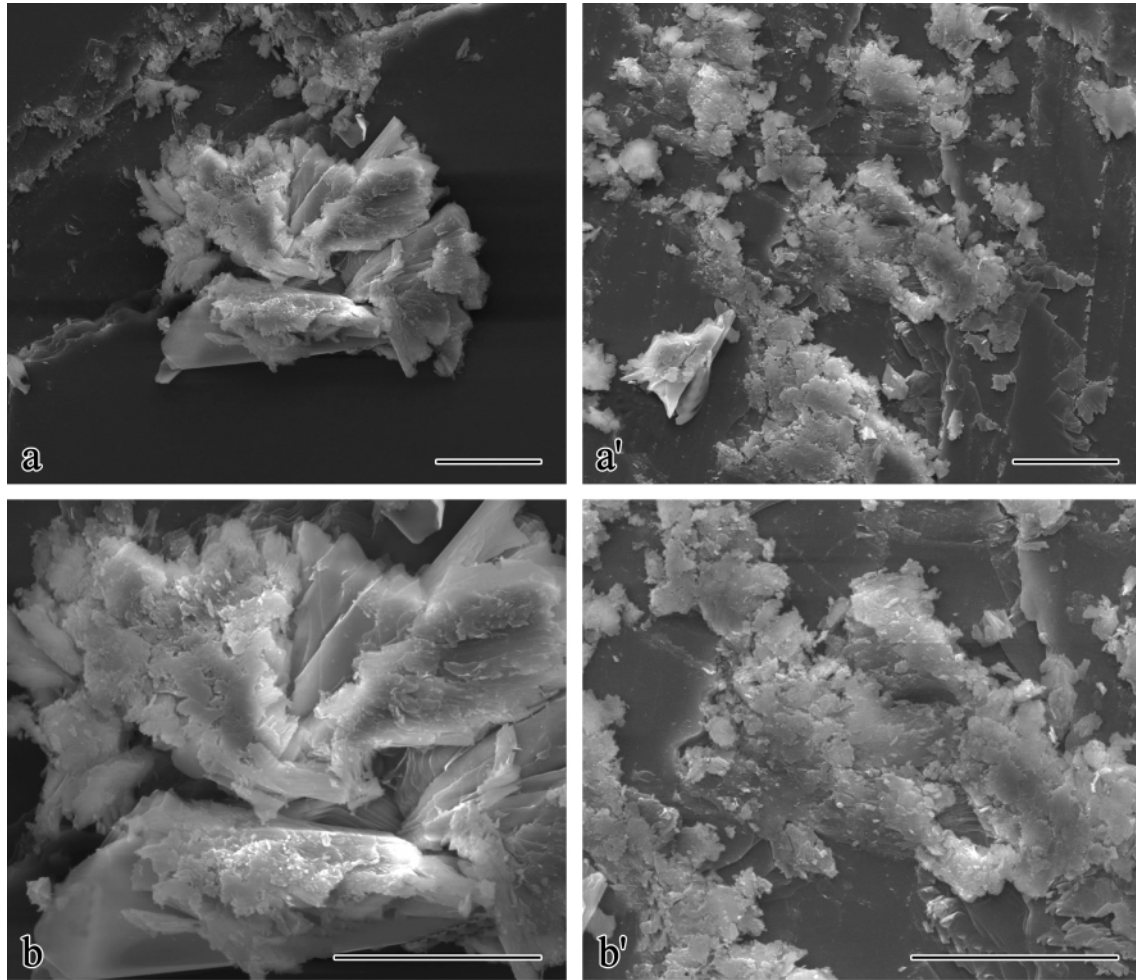


图5 WPOJ-DS(a,b)和UPOJ-DS(a',b')的云母片试样SEM像。a,b,a',b': Bar=20 $\mu$ m

Fig.5 SEM images of mica samples of WPOJ-DS (a,b) and UPOJ-DS (a',b').

冬多糖 UPOJ-DS 粉末试样不同放大倍数的扫描电镜图像,从图中可看出,样品 UPOJ-DS 中的片状明显变少、变小,而且出现大量的棒状、小球状形貌。比较 WPOJ-DS 与 UPOJ-DS 扫描电镜图像,说明两种多糖形貌有明显区别,经超声作用得到的麦冬多糖相对与水提的麦冬多糖颗粒明显变小。

比较图5与图6,结果表明,云母片试样和粉末试样存在明显区别,云母片试样表面粗糙,多糖分子聚集较薄,而粉末试样多糖分子聚集体表面光滑,分布较厚。这可能是由于云母试样多糖溶液在二维云母表面析出生长的结构,而粉末试样是多糖粉末在三维空间生长的结构。但是,云母片试样与粉末试

样都表明超声提取的麦冬多糖 UPOJ-DS 相对于水提麦冬多糖 WPOJ-DS 分子聚集程度明显减少,说明超声的巨大能量可能使麦冬多糖产生了降解。结合两种多糖红外光谱的区别,表明超声对麦冬多糖  $\beta$ -葡萄吡喃糖的结构产生影响,使得分子间作用力减小,分子交联程度减小,进而导致其麦冬多糖聚集体的形态发生变化。

### 3 结论

以上结果说明超声提取法会对麦冬多糖的结构及分子聚集行为产生明显的影响,超声波的作用也会对麦冬多糖中  $\beta$ -葡萄吡喃糖的结构产生影响。同时,原子力显微镜及扫描电子显微镜结果表明,超声提取的麦冬多糖相对于水提的麦冬多糖其分子聚集性明显减少。同时,原子力显微镜下观察到了明

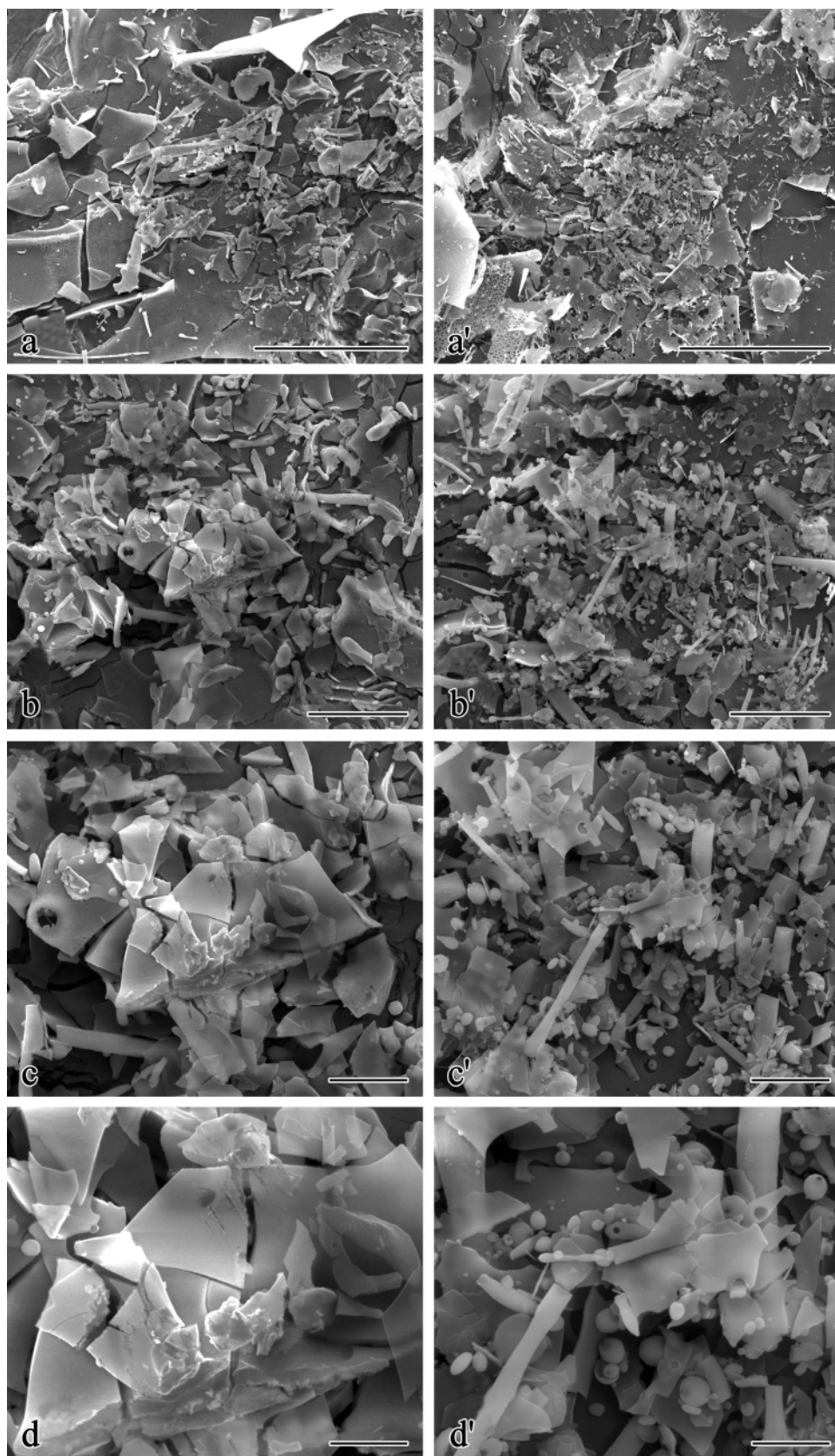


图 6 WPOJ-DS( a ~ d) 和 UPOJ-DS( a' ~ d') 的粉末试样 SEM 像。

a ~ d: Bar = 200 , 50 , 20 , 10 μm; a' ~ d': Bar = 200 , 50 , 20 , 10 μm

Fig. 6 SEM images of powder samples of WPOJ-DS ( a - d) and UPOJ-DS ( a' - d' ) .

显的螺旋结构,这与多糖分子链的氢键缔合有关。此结果也与红外检测结果相对应,由于超声对麦冬多糖中 $\beta$ -葡萄糖吡喃糖的结构产生影响,使麦冬多糖的分子内或分子间氢键发生变化,进而使其高级结构产生较明显的影响。云母片试样和粉末试样的扫描电镜图像可较宏观地观察到麦冬多糖的聚集行为,而原子力显微镜成像则在高分辨率下清晰地观察到麦冬多糖分子结构的显微变化。两者相互印证,更准确地分析和证实了超声提取法会对麦冬多糖微观结构、高级结构及宏观结构产生影响。为进一步研究超声对麦冬多糖结构及功能的影响提供有力的实验依据。

#### 参考文献:

- [1] Li Y N, Zhu D N, Qi J, et al. Characterization of homoisoflavonoids in different cultivation regions of *Ophiopogon japonicus* and related antioxidant activity [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 52(5): 757 - 762.
- [2] Xiong Shuangli, Li Anlin, Huang Ni, et al. Antioxidant and immunoregulatory activity of different polysaccharide fractions from tuber of *Ophiopogon japonicus* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 86(3): 1273 - 1280.
- [3] Chen X M, Jin J, Tang J, et al. Extraction, purification, characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the root of *Ophiopogon japonicus* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83(2): 749 - 754.
- [4] Ying Zhi, Han Xiaoxiang, Li Jianrong. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127: 1273 - 1279.
- [5] 蔡林涛,李萍,陆祖宏. 原子力显微镜观察虫草多糖分子的结构形貌 [J]. *电子显微学报*, 1999, 18(1): 103 - 105.
- [6] 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 - 2472.
- [7] Camesano T A, Wilkinson K J. Single molecule study of xanthan. conformation using atomic force microscopy [J]. *Biomacromolecules*, 2001, 2: 1184 - 1191.
- [8] Ding Xiang, Feng Su, Cao Mei, et al. Structure characterization of polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Tricholoma matsutake* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 81: 942 - 947.
- [9] 王得润,于宪潮,赵大健,等. 黄原胶分子形貌的电镜研究 [J]. *高分子学报*, 1990, (1): 60 - 66.
- [10] 张忠玲,朱波,张翠,等. 海胆肠多糖致 Bel7402 人肝癌细胞凋亡的扫描电镜观察 [J]. *电子显微学报*, 2003, 6: 467.
- [11] Ding Xiang, Tang Jie, Cao Mei, et al. Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide isolated from *Tricholoma matsutake* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 47(2): 271 - 275.

# Comparative study on the structure and aggregation behavior of ophiopogon japonicus polysaccharides extracted by two methods

WANG Xiao-mei<sup>1</sup>, SUN Run-guang<sup>1\*</sup>, ZHANG Jing<sup>2</sup>, HAO Chang-chun<sup>1</sup>, ZHANG Li-ni<sup>1</sup>

(1. College of Physics and Information Technology, 2. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an Shaanxi 710062, China)

**Abstract:** In this paper, different extraction methods including hot water and ultrasound were used to extract polysaccharides in ophiopogon japonicus. The functional group distribution and surface morphology of polysaccharides extracted by the two methods were studied by FT-IR spectroscopy, atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM). The results showed that the difference of functional group between ophiopogon japonicus polysaccharides extracted by hot water (WPOJ-DS) and ultrasound (UPOJ-DS) was obvious.  $\beta$ -glucopyranoside was detected in WPOJ-DS using infrared spectroscopy, but not in UPOJ-DS. The results of AFM showed that the dispersion of UPOJ-DS was significantly higher than that of WPOJ-DS. Single molecule chain and helical structure were observed in UPOJ-DS by AFM, indicating that intermolecular and intramolecular hydrogen bonds of polysaccharides were affected by ultrasound. The results of SEM showed that less of bigger schistose structures were observed in UPOJ-DS compared to WPOJ-DS, and a lot of rod-shaped and small globular aggregates were observed in UPOJ-DS, indicating that supersonic treatment created degradation on ophiopogon japonicus polysaccharides. Therefore, ultrasonic extraction has an effect on molecular structure and aggregation behavior of ophiopogon japonicus polysaccharides.

**Keywords:** ophiopogon japonicus polysaccharides; ultrasound; atomic force microscope (AFM); scanning electron microscope (SEM)

\* Corresponding author