

## 神经节苷脂的红外、紫外光谱分析及其多聚体结构的原子力显微镜观测

王海龙<sup>1</sup>, 孙润广<sup>1\*</sup>, 张静<sup>2</sup>, 郝长春<sup>1</sup>

1. 陕西师范大学物理学与信息技术学院, 陕西 西安 710062

2. 陕西师范大学食品工程系, 陕西 西安 710062

**摘要** 神经节苷脂(gangliosides, Gls)是一类含有唾液酸的酸性鞘糖脂,是神经细胞膜的重要组成成分,在生物膜中起着非常重要的生理作用。文章用红外光谱(IR)、紫外光谱(UV)、原子力显微镜(AFM)分别对以牛脑为原料,采用 Folch 萃取法、硅胶吸附柱层析和 DEAE-SephadexA-25 离子交换柱层析得到的神经节苷脂的分子官能团和多聚体结构进行了研究。实验结果表明,从 100 g 湿组织中获得产品为 55.2 mg,纯度达 62.84%,其紫外光谱吸收在 195 nm 处。通过红外光谱研究证明在提纯的产品结构中含有唾液酸分子的结构片段。利用原子力显微镜对其在水中的聚集体微观形貌进行了观察研究,发现神经节苷脂在水中呈清晰的纳米级球状或椭球状结构,经测定:神经节苷脂多聚体的大小在 55~380 nm 之间,平均大小为(148.9±66.7) nm;高度在 1.0~5.0 nm 之间,平均高度为(3.25±1.01) nm。该实验结果为神经节苷脂的生物活性研究以及作为神经类药物的开发利用提供了理论和实验依据。

**关键词** 神经节苷脂; 红外光谱; 紫外光谱; 原子力显微镜

**中图分类号:** O561.1, Q25 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)04-1045-05

### 引言

神经节苷脂(gangliosides, Gls)是一类含有唾液酸的酸性鞘糖脂,主要由单唾液酸神经节苷脂(GM<sub>1</sub>和 GM<sub>3</sub>)、双唾液酸神经节苷脂(GD<sub>1a</sub>和 GD<sub>1b</sub>)及三唾液酸神经节苷脂 GT<sub>1b</sub>等组成,是神经细胞膜的重要组成成分,在生物膜中起着非常重要的作用<sup>[1]</sup>。Gls 分子由亲水的寡糖链和亲脂的神经酰胺两部分组成。神经酰胺插入膜脂双层中,构成膜组分的一部分,亲水的寡糖链(包括唾液酸)则连在神经酰胺中丝氨酸上,并与丝氨酸一起构成极性“头”,伸展在细胞表面的外环境中<sup>[2]</sup>。从而神经节苷脂具有感知、传递细胞内外信息的功能。

近年来,随着对细胞膜表面糖类生理功能研究的日益重视,Gls 的研究也日趋受到科学界的关注,特别是它们与细胞信号传导有着密切的关系,这已被我国的“攀登计划”列为重点研究项目<sup>[2]</sup>。临床资料报道,Gls 在糖尿病神经病变<sup>[3]</sup>,外周神经的脊椎损伤<sup>[4]</sup>中能很好的促进受损神经的再生和

功能恢复;还可促进后期神经功能恢复<sup>[5]</sup>,对脑缺血早期也有明显的保护作用,另外 Gls 对老年性痴呆的治疗有较好的前景<sup>[6]</sup>。

随着神经生物化学和神经药理学的发展,对 Gls 的代谢及其生物学作用研究已经成为神经科学的重要课题。Gls 在国内大多数依赖进口,虽然国内外已报道了多种分离纯化的方法,但绝大多数都有操作步骤繁琐、溶剂用量大、周期长等不足之处。目前国内外的研究主要集中于 Gls 与生物膜其他有效成分之间的相互作用<sup>[7-12]</sup>,而对 Gls 多聚体的形貌及结构未给予详细的报道。本文以牛脑为原料,以国产硅胶代替进口的 Iatrobeads 大颗粒硅胶,利用萃取、凝胶层析的方法,从牛脑中提取了较高纯度的 Gls,用紫外和红外光谱对其结构进行了分析,用原子力显微镜观察了其多聚体的表面形貌和结构,对其大小进行了分析研究,为 Gls 的开发利用,更好地发挥其药性和生物活性提供了理论依据。

### 1 实验部分

#### 1.1 试剂与仪器

收稿日期: 2007-11-18, 修订日期: 2008-02-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(20772077)和教育部科学技术研究重点项目(104167)资助

作者简介: 王海龙, 1981年生, 陕西师范大学物理学与信息技术学院研究生 e-mail: hailong\_16@163.com

\* 通讯联系人 e-mail: sunranguang@snnu.edu.cn

新鲜牛脑,市售;DEAE-Sephadex A-25 购自 Pharmacia 公司;柱层层析硅胶(200~300 目)购自青岛麦克硅胶干燥剂有限公司;95%唾液酸购自 Sigma 公司;间苯二酚购自天津市科密欧化学试剂开发中心;氯仿、甲醇及其他试剂,均为国产分析纯。DS-1 高速组织捣碎机(上海标本模型厂)、DY89-1 电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、HANGPING JA2003 电子天平(上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂)、PHS-4CT 酸度计(上海康仪仪器有限公司)、CF16RX 型高速离心机(日本日立)、柱层析仪(上海沪西分析仪器厂有限公司)、TU-1810 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器)、RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、Alphal-4 真空冷冻干燥机(德国 Christ 公司)、傅里叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司)、WET-SPM-9500J3 原子力显微镜(日本岛津公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 Gls 的粗提方法

采用潘颖等<sup>[1]</sup>的方法称取 350 g 新鲜牛脑,以 10 倍体积的氯仿:甲醇混合液(1:1,  $\varphi$ ),在电动匀浆机匀浆,在 4 °C 下搅拌提取过夜。过滤或离心(7 500 r·min<sup>-1</sup>, 15 min)取上清液。沉淀物用上述混合液再次匀浆,反复提取 3 次,合并各次上清液。40 °C 旋转蒸发浓缩至原体积的 1/4,置-20 °C 冰箱过夜。将以上过夜后的浓缩液过滤,按滤液 1/5 体积加入 5% NaCl:甲醇(1:1,  $\varphi$ )混合液进行 Folch<sup>[13]</sup>分配,使 Gls 转入水相,收集上层液,下层多次进行分配,合并上层液。置 40 °C 旋转蒸发浓缩去处甲醇,浓缩液 4 °C 蒸馏水透析至无 Cl<sup>-</sup> 为止,冷冻干燥得粗提 Gls。

### 1.2.2 Gls 的纯化方法

(1)硅胶吸附柱层析,称取 50 g 已活化好的柱层析用硅胶(200~300 目),加入适量氯仿浸泡过夜。用玻璃棒搅拌硅胶使之悬浮于氯仿中,成为糊状浆料。然后将浆料沿着层析柱壁慢慢地倒入层析柱中(1 cm×40 cm),边加边搅拌,一次加完,同时将层析柱下面的旋塞打开,以便于硅胶沉降。此时应注意不要有气泡产生,倾倒在离柱顶 5 cm 处时,停止加料,并关掉旋塞,静置一夜,让硅胶完全沉降。翌日,打开旋塞,用 2~3 倍柱体积的氯仿液流过层析柱以保证平衡,调整好滴速。当氯仿液面恰好到达硅胶床层顶面时,立即关上旋塞。用一支注射器沿柱壁将样品溶液慢慢铺在床层顶面上,以减少对床层的扰动。然后,再打开旋塞,慢慢排出下部流出液,使样品进入顶面,再用氯仿小心地洗涤上部柱壁,直到柱层上面有(1~2 cm)的溶液。首先用 10 倍柱体积的氯仿洗去磷脂以及脂类,而后用 15 倍柱体积的氯仿:甲醇:双蒸水(30:60:20,  $\varphi$ )洗出组织鞘糖脂,收集第二段,加入少许异丁醇减压蒸干<sup>[14]</sup>。

(2)DEAE-Sephadex A-25 离子交换柱层析,醋酸型树脂的制备参照了 Yu 等的方法<sup>[15]</sup>: DEAE-Sephadex-A25 混悬于 10 倍量的 C/M/0.8 mol·L<sup>-1</sup> NaAc(30:60:8,  $\varphi$ )混合液中,搅拌 30 min 以上,过滤。如上重复 3 次,末次让树脂在混合液中 4 °C 过夜。再混悬于 10 倍量 C/M/W(60:30:8,  $\varphi$ )混合液中,搅拌 30 min 以上过滤。如上重复 3 次,以除去过剩的 Ac<sup>-</sup> 离子。醋酸型 DEAE-Sephadex A-25 混悬于 C/

M/W(60:30:8,  $\varphi$ )混合液(A 液)中,装玻璃层析柱(柱床先有少许 A 液)。

平衡、上样、洗脱及收集,待溶剂全部流出后用 A 液平衡柱床。将硅胶层析出的鞘糖脂用 A 液超声溶解(0.5 mol·g<sup>-1</sup>),直接滴加上柱,速度 0.5 mL·min<sup>-1</sup>。待样品液面流至与柱床表面在同一平面时,任其放置过夜。翌日,先用 10 倍体积的 A 液洗脱,再用 20 倍体积的 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸钾甲醇溶液洗脱,洗脱速度为 0.5 mL·min<sup>-1</sup>,第一次洗脱为中性糖鞘脂,第二次洗脱为神经节苷脂。收集第二段洗脱液,对蒸馏水透析 48 h,4~6 h 换水一次,加入少许正丁醇恒温 40 °C 减压蒸干,得纯化的 Gls<sup>[14]</sup>。

### 1.2.3 紫外-可见吸收光谱法与红外光谱法定性分析

称取 1 mg 纯化后的 Gls,定容至 10 mL,稀释至 0.01 mg·mL<sup>-1</sup>。从中吸取 4 mL 测量其吸收光谱,波长范围为 190~400 nm。采用 KBr 固体压片法,在 400~4 000 cm<sup>-1</sup> 区间内对神经节苷脂进行红外光谱扫描<sup>[16]</sup>。

### 1.2.4 脂结合唾液酸含量(LBSA)的测定

利用 Svennerholm<sup>[17]</sup>以唾液酸(含量为 95%)为标准品,配置系列标准溶液,其唾液酸含量为 5, 10, 15, 20, 25, 30 和 35  $\mu$ g。按照以下方法进行:各管用双蒸水补足至 2 mL 后,各加显色剂 2 mL,100 °C 煮沸 15 min,流水冷却,加正戊醇 5 mL,强烈震荡,置水浴 15 min。取出蓝色上清液,用紫外可见分光光度计测定系列标准液在 580 nm 的吸收值,作浓度-吸收值标准曲线。被测样品配成一定浓度的溶液。将被测液的吸收值,通过标准曲线计算出被测样品中脂结合唾液酸含量,并换算成 Gls 含量。

### 1.2.5 原子力显微镜的观测方法

采用旋转涂层方法,配置 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> Gls 水溶液,在云母片上制备 Gls 膜。为了得到薄的吸附层,多余材料用水洗方法移去。样品置于日本岛津 SPM-9500J3 原子力显微镜上测量。测量在室温进行,湿度为 50%~60%。探针为 Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>,最大扫描范围为 125  $\mu$ m×125  $\mu$ m,探针微悬臂长 200 nm,悬臂弹性系数为 0.06 N·m<sup>-1</sup>,对 Gls 膜的作用力控制在 10<sup>-8</sup> 以内,所有图像数据在恒力模式下获得。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Folch 分配次数与上层水相中 Gls 含量的关系

进行 Folch 分配时多次提取是必要的,但是并不是次数越多越好,据文献报道<sup>[18]</sup>在用兔、猪、狗肝提取 Gls 时,要进行至少五次 Folch 分配。本实验中,共进行了四次 Folch 分配,用间苯二酚法测定其脂结合唾液酸含量,结果见表 1。由表 1 可以看出,分离 Gls 时,进行 3 次 Folch 分配就可达到较好的萃取效果。

### 2.2 Gls 含量及纯度测定结果

#### 2.2.1 唾液酸标准曲线

图 1 以标准唾液酸浓度为横坐标,以 A<sub>580</sub> 值(ABS)为纵坐标,绘制标准曲线。在 15~105  $\mu$ g 的 Gls 测量范围中,吸光值(ABS)与脂结合唾液酸含量的变化呈良好的线性关系( $r=99.94$ )。

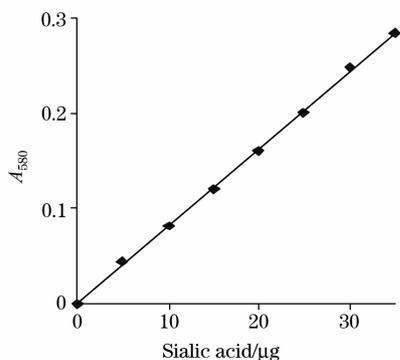


Fig. 1 Criterion curve of sialic acid

### 2.2.2 Gls 含量

Gls 的提取按照 Yu 的方法<sup>[15]</sup>稍加改进, 在实验中增加了一20 °C 冷藏过夜, 此步骤的目的是除去中性脂类, 有利于节省后续步骤中的溶剂用量和提取时间, 并提高 Glc 的含量<sup>[1]</sup>。本实验投入原料为 350 g 新鲜牛脑, 所得提取物 Glc 为 1.083 2 g。经测定脂结合唾液酸含量为 11.38%, 这与潘颖等<sup>[1]</sup>的实验结果一致, 而未经冷藏过夜处理的 Glc, 只能达到 8%~10%。利用柱色谱技术对粗提 Glc 进行了纯化, 得到 0.193 3 g 纯品。每 100 g 新鲜牛脑组织中可提取物 Glc 0.055 2 g。经检测 LBSA = 20.95%, 相当于 Glc 含量为 62.85%, 实验结果表明此方法能有效地提取纯度较高的 Glc。

### 2.3 纯化 Glc 的紫外光吸收曲线

图 2 显示 Glc 的最高吸收峰位于 195 nm 附近, 本法分离所得 Glc 的紫外光吸收曲线与文献报道<sup>[19]</sup>的吸收曲线的吸收峰相同, 所以本方法分离纯化 Glc 取得了较满意的效果。

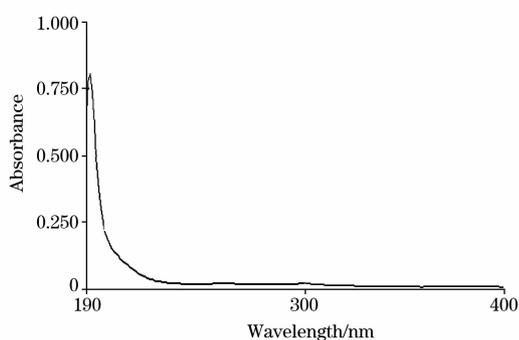


Fig. 2 Curve of ultraviolet absorption

### 2.4 纯化 Glc 的红外吸收光谱

Glc 是一类含有唾液酸的酸性鞘糖脂。因此为了验证从牛脑里提纯出来的产品是否含有唾液酸, 本研究对纯化的 Glc 与标准唾液酸的红外光谱进行了比较。实验采用 KBr 压片的方法进行红外光谱测量。实验测定的标准唾液酸特征官能团的吸收峰位与纯化的 Glc 的吸收峰位的红外光谱, 如图 3 所示: 峰位 1 处(3 342.60  $\text{cm}^{-1}$ )出现了一宽峰, 是 O—H 的伸缩振动, 峰位 2 处(1 725.09  $\text{cm}^{-1}$ )和峰位 5 处

(1 434.39  $\text{cm}^{-1}$ )为 C=O 的伸缩振动, 峰位 3 处(1 654.62  $\text{cm}^{-1}$ )为酰胺键 C=O 伸缩振动, 峰位 4 处(1 531.38  $\text{cm}^{-1}$ )为酰胺键 N—H 弯曲振动峰, 峰位 6 处(1 265.22  $\text{cm}^{-1}$ )为酰胺键 III 级伸缩振动峰。从红外光谱分析比较可知, 标准唾液酸分子中特征官能团红外吸收峰, 在纯化 Glc 中均能找到, 且峰位和峰形一致, 故纯化 Glc 中含有标准唾液酸, 与唾液酸含量测定实验结果相匹配。

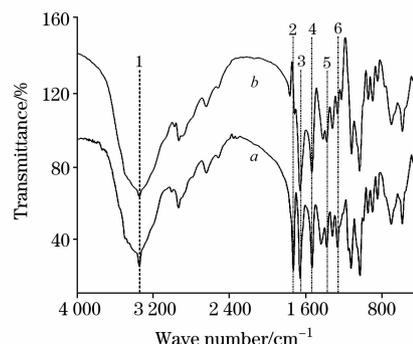


Fig. 3 IR spectra of sample

a: Sialic acid; b: Product

### 2.5 Glc 的原子力显微镜分析

AFM 的探针在 Glc 的吸附层扫描时, 探针与表面的相互作用力应该非常小, 这样得到的图像最具有代表性<sup>[20, 21]</sup>。对于生物样品, 施加力应该在  $10^{-10}$ ~ $10^{-8}$  N。当施加力大于  $10^{-8}$  N 时, 样品表面可能出现大的损伤。当施加力在此之间时, 将获得理想的 Glc 微观形貌图<sup>[22]</sup>。当探针在样品表面扫描时, 样品表面形状以形貌图被记录下来。形貌图不仅显示样品形状特征, 而且也受到样品柔软性的影响<sup>[23]</sup>。我们将这一技术应用到 Glc, 在纳米范围得到 Glc 真实结构图像。

原子力显微镜对 Glc 的扫描过程可以概述为: 当 Glc 被吸附在云母片膜上时, 分子间通过 van der Waals 力、离子静电作用以及亲水/疏水相互作用形成多聚体, 这些聚集体呈球形或扁椭圆形<sup>[24]</sup>。当 AFM 的探针开始在吸附 Glc 层的表面扫描时, 探针遇见 Glc 的聚集体时, 开始相互作用。当探针与 Glc 的聚集体相互作用力达到某临界值时, 探针跳过 Glc 多聚体。随后, 上述过程重新开始, 探针又跳过第二个 Glc 多聚体。我们观测到, 在探针力的作用下, 扫描范围内发现了一些大小不同的球形或椭球形颗粒, 这意味着在 Glc 分子多聚体中, 这些球形或椭球形颗粒可能与吸附在云母表面上的多聚体有关。

#### 2.5.1 粗提 Glc 与纯化 Glc 的 AFM 影像比较分析

Glc 的吸附膜被放在 AFM 的探针下, 用接触模式扫描后, 在扫描范围内观察到一些大大小小的球形或扁椭圆形, 它们可能是一些大小和形状不同的 Glc 多聚体。本研究分别对粗提 Glc 和纯化 Glc 进行了原子力显微镜观测。从图 4(a)中可以看出, 粗提 Glc 表面比较杂乱, 分布很不均匀, 存在大大小小的混合微团, 而且可见一些链状物。除此之外, 我们还看到很多杂乱无章的物质。这些杂乱无章的物质可能是硫脂类和磷脂类杂质。链状物可能是 Glc 本身或神经节苷脂之间形成的混合微团。图 4(b)是对图 4(a)中链状物(箭头

所示)的高分辨率放大图像。图 5 中可见纯化 Gls 以较均匀的形式存在,较图 4 有明显不同,未出现杂乱无章的物质,图 5(b)是图 5(a)中所选区域的高分辨率放大图像,可见在水溶液中 Gls 形成具有高度规律性的椭球形(长箭头所示)或者球形(短箭头所示)聚集体,这与文献报道基本一致<sup>[24]</sup>,说明纯化效果较好。

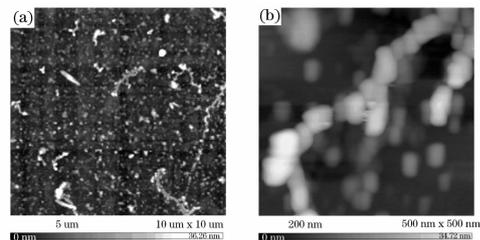


Fig. 4 AFM images of crude gangliosides

(a):  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ ; (b):  $500\ \text{nm} \times 500\ \text{nm}$

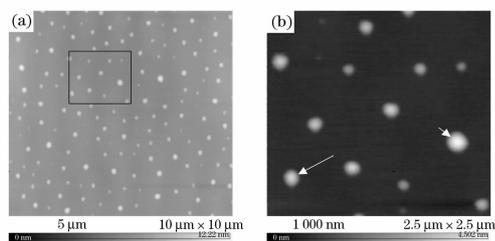


Fig. 5 AFM images of pure gangliosides

(a):  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ ; (b):  $2.5\ \mu\text{m} \times 2.5\ \mu\text{m}$

### 2.5.2 Gls 多聚体的 AFM 观测

用原子力显微镜观察到 Gls 多聚体,图 6 为  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  范围内 Gls 多聚体大小的原子力显微镜观测结果。图 6 (a)是  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  扫描范围内选定的 126 个 Gls 多聚体。从图中可以看出,我们选中了扫描范围内大部分的 Gls 多聚体。图 6(b)是 126 个 Gls 多聚体的大小分布图。从中可见,Gls 多聚体的大小多数在  $100\sim 180\ \text{nm}$  范围内,有极少数的多聚体大小在  $300\sim 350\ \text{nm}$  之间,大小在  $30\sim 100\ \text{nm}$  以及  $180\sim 300\ \text{nm}$  也有适当的分布。应用 SPSS10.0 版统计软件

分析可知,Gls 多聚体的平均大小为  $(148.9 \pm 66.7)\ \text{nm}$ 。在  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$  扫描范围内选定 60 个 Gls 多聚体对其进行高度测量,应用 SPSS10.0 版统计软件分析可知,Gls 多聚体的平均高度为  $(3.25 \pm 1.01)\ \text{nm}$ 。

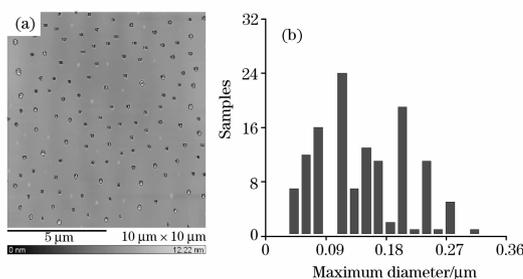


Fig. 6 Polymeric aggregates of gangliosides observed by AFM in the area of  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$

(a): 126 aggregates of gangliosides selected in the area of  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ ; (b): Diameter distribution histogram of 126 aggregates of gangliosides

## 3 结 论

从牛脑中用 Folch 萃取法获得 Gls,用硅胶柱层析和 DEAE-SephadexA-25 离子交换柱层析对 Gls 进行分离纯化,实验测得  $100\ \text{g}$  湿组织中获得产品为  $55.2\ \text{mg}$ ,纯度达  $62.84\%$ ,其紫外光谱吸收在  $195\ \text{nm}$  处。通过红外光谱研究证明在提纯的 Gls 中含有唾液酸分子的结构片段。

用原子力显微镜对粗提 Gls 和纯化后 Gls 聚集体表面形貌进行了观察研究,实验发现 Gls 多聚体在水中呈清晰的纳米级球状或椭球状结构,其大小分布在  $55\sim 380\ \text{nm}$  之间,平均大小为  $(148.9 \pm 66.7)\ \text{nm}$ ;高度在  $1.0\sim 5.0\ \text{nm}$  之间,平均高度为  $(3.25 \pm 1.01)\ \text{nm}$ 。

通过使用柱层析技术对 Gls 进行提取,得到了一定量的且纯度较高的 Gls,通过紫外光谱和红外光谱对其结构进行分析,用 AFM 对 Gls 多聚体的形貌进行观测,在纳米范围内得到了较为清晰的表面形貌图,这对探索生物膜的结构和功能具有一定的作用和意义。

## 参 考 文 献

- [1] HUANG Ru-bin, PAN Ying, WANG Ze-sheng, et al(黄如彬,潘颖,王泽生,等). Progress of Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展), 1994, 21(5): 444.
- [2] TANG Xiang-dong(唐向东). Chemistry of Life(生命的化学), 1995, 15(2): 32.
- [3] Crepaldi G, Fedele D, Tiengo A, et al. Acta Diabetol Lat, 1983, 20: 265.
- [4] Geisler F H, Dorsey F C, Coleman W P. New England Journal of Medicine, 1991, 324: 1829.
- [5] Argentino C, Sacchetti M L, Toni D. Stroke, 1989, 20(9): 1143.
- [6] Angeleri F, Scarpino O, Martinazzo C, et al. Cerebrovascular Disease, 1992, 2(3): 163.
- [7] Takeda Y, Horito S. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005, 41: 111.
- [8] Yokoyama S, Ohta Y, Sakai H, et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2004, 34: 65.
- [9] Ohta Y, Yokoyama S, Sakai H, et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2004, 33: 191.
- [10] Ohta Y, Yokoyama S, Sakai H, et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2004, 34: 147.
- [11] Yuan C B, Johnston L J. Biophysical Journal, 2001, 81: 1059.
- [12] Yuan C B, Furlong J, Burgos P, et al. Biophysical Journal, 2002, 82: 2526.

- [13] Folch J, Lees M, Sloane S. *Journal of Bio. Chem.*, 1957, 226: 497.
- [14] FAN Guang-sheng, MO Han-qing, SUN Ce, et al(范广胜, 莫汉庆, 孙册, 等). *Acta Biochemica et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报), 1991, 23(5): 443.
- [15] Yu R K, Ledeen R W. *J. Lipid Res.*, 1972, 13: 680.
- [16] ZHAO De-zhang, LIU Gang, SONG Ding-shan, et al(赵德璋, 刘刚, 宋鼎珊, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2006, 26(8): 1445.
- [17] Svennerholm L. *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 24: 604.
- [18] CUI Zhao-chun, ZHANG Xin-bo, ZHU Zheng-mei(崔肇春, 张新波, 朱正美). *Progress of Biochemistry and Biophysics*(生物化学与生物物理进展), 1990, 17(3): 206.
- [19] XU Xiong-xin, SHEN Xia, ZHAO Shan-zheng(徐雄心, 沈霞, 赵善政). *Shanghai Journal of Medical Laboratory Science*(上海医学检验杂志), 1991, 6(4): 198.
- [20] Person B N J. *Chem. Phys. Lett.*, 1987, 54: 366.
- [21] Abraham F F, Barra I P S. *Surface Sci.*, 1989, 209: 125.
- [22] SUN Run-guang, ZHANG Jing(孙润广, 张静). *Journal of Atomic and Molecular Physics*(原子与分子物理学报), 2003, 20(1): 85.
- [23] SUN Run-guang, QI Hao, ZHANG Jing(孙润广, 齐浩, 张静). *Acta Phys. Sin.*(物理学报), 2002, 51(6): 1203.
- [24] Liu Y B, Jessechan K F. *Electrophoresis*, 1991, 12(6): 402.

## IR/UV Spectroscopic Analysis of Gangliosides and Their Microstructures of Polymeric Aggregates Observed by AFM Technique

WANG Hai-long<sup>1</sup>, SUN Run-guang<sup>1\*</sup>, ZHANG Jing<sup>2</sup>, HAO Chang-chun<sup>1</sup>

1. College of Physics and Information Technology, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

2. Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

**Abstract** Gangliosides, a kind of acid glycosphingolipid containing sialic acid, plays a very important physiological role in biomembrane as one of the important components of neurocyte membrane. They were extracted from bovine brain by the Folch method and purified by silica gel and DEAE-Sephadex A-25 column chromatograph. Their molecular functional groups and microstructures of polymeric aggregates were studied by infrared spectrum(IR), ultraviolet spectrum(UV) and atomic force microscope(AFM). The experimental results indicate that: 55.2 mg of Gls from 100 g of wet bovine brain had a certain purity, 62.84%. And their UV absorption spectra appeared at 195 nm, near to the results reported by other peoples. Compared with the IR spectra of sialic acid, the experimental results showed that the structures of the products had the units of sialic acid. In order to investigate the aggregate structures of ganglioside, AFM technique was applied in water, and the results showed that gangliosides can form spherical or ellipsoidal structures in water. It was determined that the size of polymeric aggregates of gangliosides varies between 55 and 380 nm, the average size is  $(148.9 \pm 66.7)$  nm; the height is between 1.0 and 5.0 nm, and the average height is  $(3.25 \pm 1.01)$  nm. The experimental results provide a theoretical and experimental basis for investigating biological activity and the exploitation and utilization of neural drugs.

**Keywords** Gangliosides(Gls); Infrared spectrum(IR); Ultraviolet spectrum(UV); Atomic force microscope(AFM)

(Received Nov. 18, 2007; accepted Feb. 22, 2008)

\* Corresponding author