

壳聚糖铜(II)配位与氧化控制降解寡糖的 GFC 色谱研究

陈祎平¹, 郝红元¹, 张 岐^{1, 2*}, 葛庆凯¹, 王平红¹

1. 海南大学海南省精细化工重点实验室, 海南海口 570228

2. 兰州大学功能有机国家重点实验室, 甘肃 兰州 730030

摘要 在壳聚糖溶液中加入铜离子使形成壳聚糖铜配合物, 通过 IR, UV, 元素分析及热重分析等对壳聚糖铜配合物进行表征。用 H₂O₂ 对形成的壳聚糖 Cu(II) 配合物进行氧化降解, 测定了降解产物寡糖的平均数均分子量和分子量分布。结果表明壳聚糖铜配合物在升高温度时, 在过氧化氢的存在下降解迅速, 降解从大分子量范围开始, 降解寡糖分子量分布在温度和降解时间相同条件下大大窄于目前常用的盐酸和纯过氧化氢氧化降解方法。分子量分布指数与降解寡糖的平均数均分子量有关, 当高于 10 个寡聚糖数(DP)时, DP 越小, 分子量分布指数越小。

主题词 壳聚糖; 壳聚糖铜配合物; 配位催化氧化; 降解

中图分类号: O657.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2005)06-0992-04

引言

甲壳素, 化学名称为 2-脱氧-2-乙酰氨基-β-(1→4) 葡聚糖。是迄今发现的唯一天然碱性高分子多糖。甲壳素广泛分布于自然界甲壳纲动物虾、蟹和昆虫的外壳及菌类和低等植物的细胞壁中。其年生物产量高达 100 亿吨, 仅次于纤维素。浓碱处理所得壳聚糖(脱乙酰基甲壳素)分子结构中的游离 OH, NH₂ 具有良好的配位能力, 可与过渡及稀土金属离子形成配合物。壳聚糖金属配合物的 X 射线衍射图与热分析结果表明: 壳聚糖金属配合物的分子结构存在优势构象, 有利于壳聚糖高分子链的断裂^[1, 2]。结合壳聚糖配合物的上述性质和壳聚糖降解研究进展^[3-8], 本课题组于 1999 年提出了壳聚糖金属配位氧化控制降解制备窄分子量分布寡糖的方法。其原理是: 向壳聚糖的醋酸稀溶液中加入适量金属盐溶液, 通过控制壳聚糖与金属离子摩尔数的比例控制配位点的个数, 使配位结点在壳聚糖高分子链中均匀分布, 以保证配位结点之间未配位糖苷链中糖数的均一性。采用氧化剂对配合物进行氧化, 断链在壳聚糖中的葡糖胺配位结点或优势构象处, 柱吸附除去金属离子, 得到窄分子量分布的低聚壳聚糖。本文探讨了过渡金属盐 Cu(AcO)₂ · H₂O 对壳聚糖配位控制降解反应情况, 并应用 GFC 色谱测定了降解寡糖的分子量分布。

1 实验

1.1 仪器与试剂

壳聚糖(简称: CTS, 湛江遂溪南星甲壳素有限公司, 脱乙酰度 75%, 未进一步处理), 醋酸铜(北京化学试剂二厂, 分析纯), 冰醋酸(广州化学试剂厂, 优级纯)。其他试剂均为分析纯。

1.2 壳聚糖的降解及表征

称取 0.5 g 壳聚糖, 加入 40 mL 0.5% HAc, 溶解后加入一定数量的 Cu(AcO)₂ · H₂O, 磁力搅拌溶解。用 1% Na₂CO₃ 溶液调节 pH 值至 5~6, 浓缩析出固体, 吸滤, 用蒸馏水洗涤 3 次, 脱除游离金属离子。干燥后对所得配合物进行 IR, UV, 元素分析, 热重分析及金属含量检测, 证明此 pH 值条件下确实形成了配合物。

1.3 分子量分布的测定

称取 0.5 g 壳聚糖, 重复上述操作, 调节 pH 值后直接加入 30% H₂O₂, 升高温度降解, 去除金属离子后, 测量产物的分子量分布, 具体数据见表 1。

数均分子量及分子量分布用 TSK-GEL G6000 PWXL 和 TSK-GEL G4000 PWXL 双柱(WATERS), RI K-2301 示差检测器(KMAUER), 在 P3000 高效液相色谱仪上测定。标准样品为已知分子量的右葡聚糖(Sigma Co.), 流动相为 HAc/NH₄Ac(pH 4.5)缓冲液, 流速为 0.3 mL · min⁻¹, 数据处理采用南京千谱软件有限公司的工作站。

收稿日期: 2004-09-16, 修订日期: 2004-12-18

基金项目: 国家自然科学基金(20361003), 国家高技术研究发展专项(2002AA629130)及海南省教育厅基金资助项目

作者简介: 陈祎平, 1958 年生, 海南大学化工系副教授 * 通讯联系人

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖铜络合物的表征

元素分析(计算值):

CTS: C% 45.68(45.59), H% 5.65(5.64), N% 8.47(8.58), Cu% 0(0); CTS-Cu: C% 32.20(32.11), H% 5.11(5.04), N% 3.64(3.67), Cu% 16.83(16.79)。

IR 数据:

壳聚糖原料在 3431 cm^{-1} 的振动吸收峰可归属为 N—H 的伸缩振动, 1596 和 606 cm^{-1} 为弯曲振动。形成配合物后分别变为 3423 , 1609 和 622 cm^{-1} , 而 C—N 的伸缩振动从 1324 紫移到 1339 cm^{-1} , 这些变化说明壳聚糖结构中—NH₂ 参与了与铜的配位(见图 1)。从远红外的谱图部分还可清楚看到形成配合物后在 446 cm^{-1} 处出现了一个新的吸收峰, 可归纳为金属氮键的伸缩振动, 这个中强度的吸收峰在壳聚糖原料的谱图中并不存在。氧化降解除去金属离子后的红外谱图各特征吸收峰位置与原料相比几乎未变, 只是随壳聚糖相对分子质量的降低各峰强度有所变化, 这说明催化氧化降解反应是以开裂壳聚糖的(1,4)糖苷键的方式降解的。

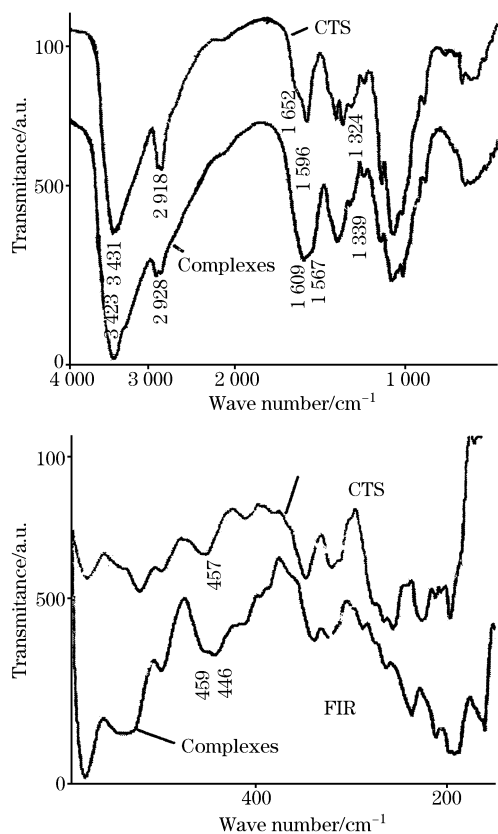


Fig. 1 IR and FIR spectra of sitosan (CTS) and its Cu(II) complex

UV 数据:

壳聚糖在配位后紫外吸收峰的位置从 212.7 nm 略向低波长移动, 且在 215.1 nm 出现了新的吸收峰。

热重分析数据:

通过对比壳聚糖与壳聚糖铜配合物的热分析数据可知, 配合物各失重温度均较壳聚糖的低, 说明配位键的形成降低了壳聚糖部分分子内或分子间的键能。

以上分析结果表明: 壳聚糖与醋酸铜作用, 生成了壳聚糖铜配合物, 随后参与了氧化降解。

2.2 分子量分布情况

分子量测定分别以 2500 , 7100 , 21400 , 41100 , 84400 和 133800 窄分布标准分子量样品的 GFC 曲线(见图 2), 其平均保留时间列于表 2, 由平均保留时间得到标准曲线(见图 3)。

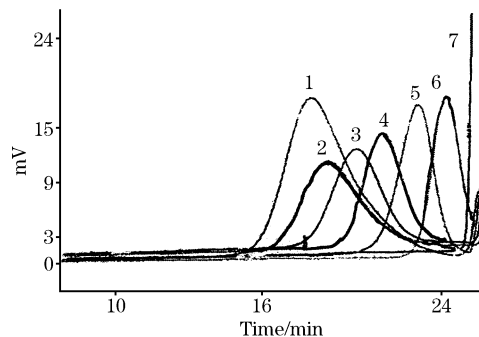


Fig. 2 Average retention time of standards samples

- 1, Dextran standard 133800 from leuconost;
- 2, Dextran standard 84400 from leuconost;
- 3, Dextran standard 41100 from leuconost;
- 4, Dextran standard 21400 from leuconost;
- 5, Dextran standard 7100 from leuconost;
- 6, Dextran standard 2500 from leuconost;
- 7, D(+)-Glucosamine Hydrochloride

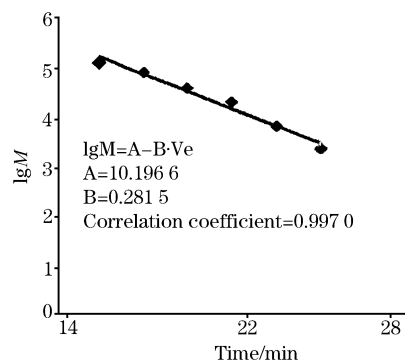


Fig. 3 Standard graph and correlation coefficient

原料及采用不同降解条件所得的寡糖的分子量分布曲线见图 4。降解条件列于表 1。所有的数据收集及曲线绘制工作均由计算机自动处理。从图 4 可以看出: 原料的分子量分布十分宽, 数均分子量为 2600 到 800000 。将其按表 1 所列条件降解, 得到不同分子量及分子量分布的寡糖。当高于 10 个寡聚糖数(DP)时, DP(degraded product)越小, 分子量分布指数越小。当数均分子量为 2498 时, $DP \approx 14$, 分布指数为 1.09 , $70\% \sim 80\%$ 的产物在这个区间内。

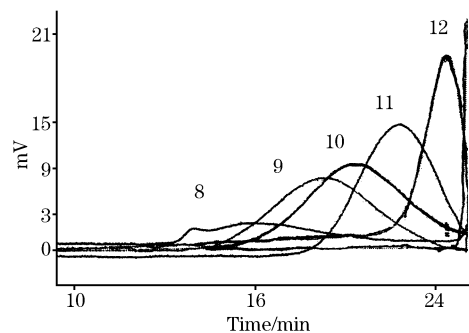
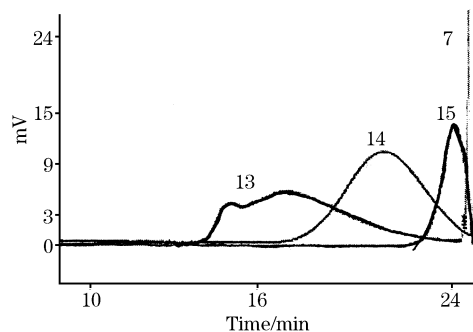
Table 1 Different degradation conditions and their results

No	CTS add. (g)	Cupric acetate add. (g)	H ₂ O ₂ (30%) add. (μ L)	Terminal vol. (mL), using mobile phase add. to	Reaction time (min)	Reaction temp. ($^{\circ}$ C)	Average retention time (min)	Average Molecular weight	DP	Molecular weight distribution index
8	0.5	—	—	40.0	—	—	—	—	—	—
9	0.5	0.020	14.0	40.0	60	60	20.054	855.6	48	3.25
10	0.5	0.060	41.0	40.0	60	60	22.208	534.7	30	1.72
11	0.5	0.050	250.0	40.0	60	60	24.196	286.9	16	1.18
12	0.5	0.050	500.0	40.0	60	60	24.478	249.8	14	1.09

Table 2 Average retention time of Standards samples

Molecular weight of standard samples	Average of Ve ^a
133 800	17.896
84 400	18.643
41 100	19.878
21 400	21.107
7 100	22.652
2 500	23.910

a. repeated 3 times

**Fig. 4** Molecular weight distribution of oligosaccharides with different degradation conditions**Fig. 5** Molecular weight distribution of oligosaccharides with different degradation methods

同时我们可以看出：用这种方法，降解首先从大分子量的壳聚糖开始，且随着反应条件的加剧，寡糖产物的峰向右移动（保留时间增长，并逐渐变尖）。降解未得到窄分布的高分子量降解产物，可能与原料有关，因为原料的分子量分布很宽，并且有约 1/3~1/4 的单糖化合物。

表 3 和图 5 列出了采用盐酸及纯 H₂O₂ 的降解条件及结果。比较 3 种方法，金属铜离子配位氧化降解壳聚糖的方法能迅速降解壳聚糖。降解可能包含芬顿(Fenton)反应及金属铜催化分解过氧化氢产生羟基自由基，随后羟基自由基切断多糖链的过程。

Table 3 Different degradation methods and their results

No	CTS add. (g)	Material added	Terminal vol. (mL)	Reaction time (min)	Reaction temp. ($^{\circ}$ C)	Retent time (min)	Average Molecular weight	DP	Distribution index
13	0.5	4.0 mL 36% HCl, 36.0 mL H ₂ O	40.0	60	70	—	Almost no change	—	—
14	0.5	1.0 mL 30% H ₂ O ₂ , 39 mL H ₂ O	40.0	60	60	15.076	14 219	76	4.33
15	0.5	0.05 Cupric acetate, 500.0 μ L 30% H ₂ O ₂	40.0	60	60	24.478	2 498	14	1.09

参 考 文 献

- [1] Okuyama K, Moguchi K, Kanenari M, et al. Carbohydrate Polymers. , 2000; 41, 237.
- [2] WANG Ai-qin, ZHANG Yu-ping, YU Xian-da(王爱勤, 张余平, 俞贤达). Chemistry Bulletin(化学通报), 1999, (8): 32.
- [3] ZHANG Wen-qing, CHAI Ping-hai, XIA Wei, et al(张文清, 柴平海, 夏 玮, 等). Journal of East China University of Science and Technology(华东理工大学学报), 2000; 26(4): 435.
- [4] Alain D, Noel C. Int. J. Biol. Macromol. , 1989; 11(10): 297.
- [5] YIN Xue-qiong, ZHANG Qi, YU Wen-xia, et al(尹学琼, 张 岐, 于文霞, 等). Journal of Inorganic Chemistry(无机化学学报), 2002; 18(1): 87.
- [6] Shinichiro T, Yoshihisa M, Takao I, et al. Biosic Biotech Biochem. , 1996, 60(12): 2001.
- [7] Lee M Y, Figen V, Yoshitsue S Y, et al. Process Biochemistry, 1999, 34: 493.
- [8] MA Xiao-li, YAO Zi-hua(马晓莉, 姚子华). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(3): 456.

Formation of Cu(II) with Chitosan and the Study of GFC Spectra Study on the Molecular Weight Distribution of Oligosaccharides by Oxidizing Degradation

CHEN Yi-ping¹, HAO Hong-yuan¹, ZHANG Qi^{1, 2*}, GE Qing-kai¹, WANG Ping-hong¹

1. Hainan Provincial Key Lab of Fine Chemicals, Hainan University, Hainan 570228, China

2. State Key Lab of Applied Organic Chemistry Lanzhou University, Lanzhou 730030, China

Abstract Complexes of chitosan with Cu(II) were prepared by adding $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ to chitosan solution. IR, UV, elemental analysis, and thermal weight analysis were used to characterize the complex. The results showed that there were coordinate bands formed. H_2O_2 was used to degrade chitosan-Cu(II) complex, and the molecular distribution of degraded products was investigated. The result suggested that the chitosan could be degraded rapidly, the degradation started from higher molecular weight range, and the molecular weight distribution of oligosaccharides was much more narrow than that of degraded products with usual methods, such as hydrolysis acidic and oxidizing conditions. The index of molecular weight distribution changed with the average degradability. When exceeding 10 oligosaccharides, the smaller the DP, the smaller the index.

Keywords Chitosan; Chitosan-Cu(II) complex; Coordination; Controlled degradation

(Received Sep. 16, 2004; accepted Dec. 18, 2004)

* Corresponding author