

锌试剂与壳聚糖的结合反应机理的研究*

高贵珍^{a,b}, 焦庆才^{a,**}, 丁一磊^a, 陈雷^a, 丁黎华^a

(a. 南京大学生命科学学院, 药物生物技术国家重点实验室, 南京 210093 ;

b. 宿州师范专科学校化生系, 宿州 234000)

摘要: 为从分子水平认识多糖分子与小分子之间相互作用的机理, 应用光谱法研究了壳聚糖(CTS)与锌试剂(ZCN)的相互作用机理, 测得 ZCN-CTS 复合物吸收光谱出现新的吸收峰所需的临界 ZCN/CTS 摩尔比为 2.67×10^3 , CTS 对 ZCN 的最大结合数为 6.93×10^3 , 实验值与理论值相吻合, 证明了多糖与生物探针相互作用理论模型的可靠性, 探讨了 ZCN 与 CTS 相互作用产生变色反应的机理, 认为其是在 ZCN 与 CTS 大分子间发生静电相互作用的基础上, 主要由 ZCN 与 CTS 大分子间的疏水相互作用所引起。

关键词: 壳聚糖; 锌试剂; 光谱法; 最大结合数

中图分类号: Q539 文献标识码: A

A Study on the Mechanism of the Interaction between Chitosan and Zincon*

Gao Guizhen^{a,b}, Jiao Qingcai^{a,**}, Ding Yilei^a, Chen Lei^a, Ding Lihua^a

(a. *Pharmaceutic Biotechnology Key Laboratory, College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093 ;*

b. *Department of Biochemistry, Suzhou Teachers College, Suzhou 234000*)

Abstract In order to know the mechanism of the interaction between polysaccharides and small molecules at the molecular level, the interaction of Chitosan (CTS) and Zincon (ZCN) was studied by absorption spectra. The influence of the molar ratio of ZCN/CTS on the spectra was investigated. The critical molar ratio (2.67×10^3) necessary for the new absorption peak of the absorption spectra of ZCN-CTS complex and the maximum binding number (6.93×10^3) were obtained by spectrometry. The maximum binding number is consistent with the theoretical value. And it has proved that the theoretical model and the mechanism of the interaction between polysaccharides and biological probes are reliable. The mechanism of the color changes of ZCN and Chitosan reaction system has been discussed. We draw the conclusion that the color changes result mainly from the hydrophobic interaction between ZCN and Chitosan on the basis of the electrostatic interaction between ZCN and Chitosan.

Key words Chitosan, Zincon, Spectrometry, Maximum binding number

1 引言

壳聚糖(简称 CTS)是自然界中唯一的碱性多糖,是由线性聚合物甲壳质脱乙酰后的产物,化学结

构如图 1 所示^[1]. 壳聚糖及其衍生物是重要的生物活性物质,具有抗肿瘤、抗凝血、抗血栓、降血脂和增强免疫力等功能^[1-5]. 近几年来,各国对壳聚糖及其衍生物的研究越来越关注,尤其是壳聚糖的生物活

* 国家科技攻关基金资助项目(2002EB020962). ** 通讯联系人, Tel: 025-3594376, E-mail: jiaoqc@jlonline.com

收稿日期: 2003-03-01; 修回日期: 2003-05-06.

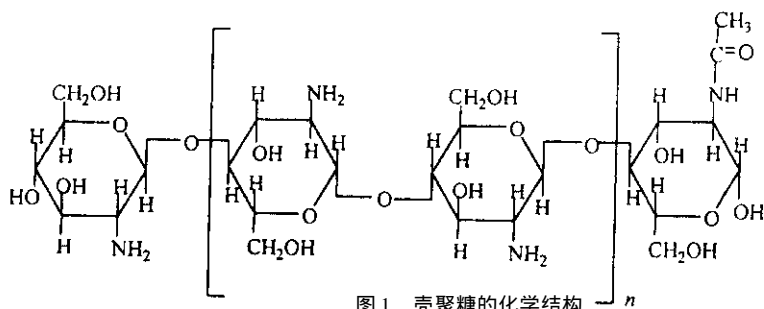


图1 壳聚糖的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of Chitosan

性及其在生物体内的作用机理是研究的热点. 本实验室已报道了酸性多糖透明质酸、硫酸软骨素与天青 A、亚甲蓝等光谱探针的作用机理^[6-9], 并建立了多糖与生物探针相互作用模型. 在此基础上, 我们又对壳聚糖与光谱探针作用机理进行研究. 锌试剂 (ZCN) 是一种阴离子染料, 化学结构如图 2 所示, 已应用于无机离子分析和蛋白质作用机理研究^[10], 作为光谱探针与多糖作用机理的研究尚未见报道. 本工作运用光谱分析法研究了 ZCN 和 CTS 的相互作用机理, 并通过相应的理论模型预测了 ZCN 和 CTS 的最大结合数 N_c . 通过实验获得了 ZCN 和 CTS 的最大结合数实验值 N_E , 研究结果表明, 理论预测值 N_c 与实验值 N_E 相吻合, 证明了多糖与生物探针相互作用机理及理论模型的可靠性.

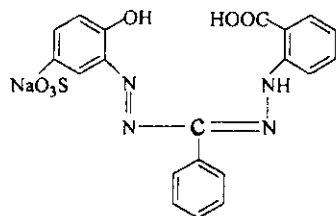


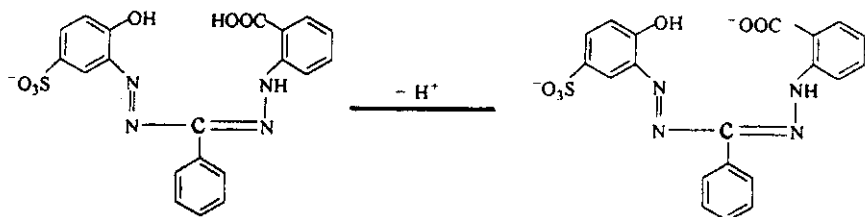
图2 锌试剂的化学结构

Fig. 2 Chemical structure of zincin

2 实验

2.1 仪器和主要试剂

U-3000 分光光度计(日本 Hitachi 公司); UV-860 分光光度计(瑞士); PHS-P 型酸度计(上海大中分析仪器厂).



壳聚糖(CTS)购自浙江玉环海洋生物化工厂, 纯度 95%, 分子量按 5×10^5 计, 脱乙酰度 80%. CTS 贮液(2.0 $\mu\text{mol/L}$): 称取 CTS 0.1 g 溶于 100 mL 1% HAc 水溶液中. 操作液(0.02、0.1 $\mu\text{mol/L}$): 分别吸取贮液 1、5 mL 到 100 mL 的容量瓶中, 稀释至刻度. 锌试剂(ZCN)购自上海试剂三厂, 二级. 贮液(5 mmol/L): 称取 0.2312 g ZCN 溶于 100 mL 蒸馏水. 操作液(0.5 mmol/L): 取 10 mL 贮液定容至 100 mL, 由于锌试剂长时间放置易沉淀, 使用前要摇匀. 反应体系的 pH 由 0.2 mol/L 的 NaAc-HAc 缓冲液控制, 其他试剂均为分析纯或优级纯.

2.2 实验方法

在一系列 12×100 mm 试管中, 按先后顺序分别加入锌试剂、NaAc-HAc 缓冲液、壳聚糖和其它试剂, 以蒸馏水定容, 摇匀. 由于 CTS-ZCN 复合物容易聚集沉淀, 测定前须震荡摇匀, 以蒸馏水为参比扫描 380 ~ 680 nm 的吸收光谱, 或在给定波长下测量吸光值, 实验操作均在室温下进行.

3 结果与讨论

3.1 吸收光谱的特征及变色反应机理

ZCN 在水溶液中三级离解常数分别为: $\text{p}K_1 = 4.5$, $\text{p}K_2 = 8.3$, $\text{p}K_3 > 14$. 在 $\text{pH} = 3.8 \sim 5.8$ 的 NaAc-HAc 缓冲液中, ZCN 仅在 465 nm 处有一个吸收峰, 固定 ZCN 的浓度, 随着 pH 的升高, 465 nm 处的吸收峰逐渐增高, 并在 520 nm 处形成一个等色点, 如图 3 所示. 此时 ZCN 在溶液中的平衡如下:

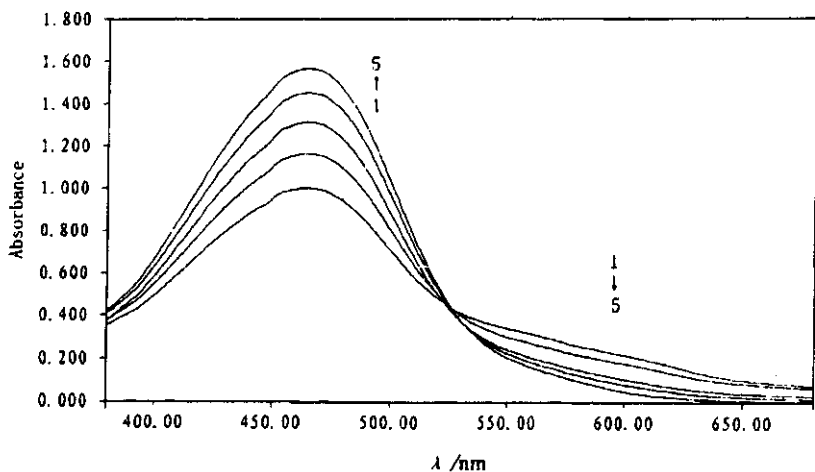
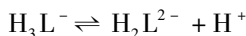


图 3 不同 pH 下锌试剂的吸收光谱 (ZCN : 83.3 μmol/L)
pH 按 465 nm 吸光值 1→5 为 : 3.8 ; 4.2 ; 4.6 ; 5.0 ; 5.8

Fig. 3 Absorption spectra of ZCN in different pH (ZCN : 83.3 μmol/L)
In order of the absorption peak at 465 nm 1→5 , pH : 3.8 ; 4.2 ; 4.6 ; 5.0 ; 5.8

为简便计 , 上述的离解平衡可写作 :



固定 ZCN 的浓度和 pH = 5.0 , 向该体系中加入不同浓度的 CTS. 由图 4 可见 , 当 CTS 浓度在 2.000×10^{-8} mol/L 以下时 , 反应体系仅在 465 nm 有吸收峰 ; 当 CTS 浓度达到 2.000×10^{-8} mol/L 时 , 随着 CTS 浓度增大 , 465 nm 吸收峰不断下降 , 在 600 nm 处产生了新的吸收峰并不断升高 , 这表明 ZCN 与 CTS 之间存在着相互作用. CTS 大分子链上分布着

许多羟基、氨基 , 还有一些 N-乙酰氨基 , 在水溶液中它们会形成各种分子内和分子间的氢键 , 正因为这些氢键存在 , CTS 分子链形成了疏水微区 , 聚集成 CTS 大分子的双螺旋结构^[1]. 在 pH = 5.0 的酸度条件下 , CTS 分子链上含有大量带正电荷的氨基 , 可通过静电作用吸引带负电荷的 ZCN 分子. 但 CTS 浓度低于 2.000×10^{-8} mol/L 时 , 由于其在反应体系中浓度较低 , 相互之间还不足以引发聚集 , 不能产生疏水微区 , CTS 分子链以扩张型线性分子存在 , 反应体

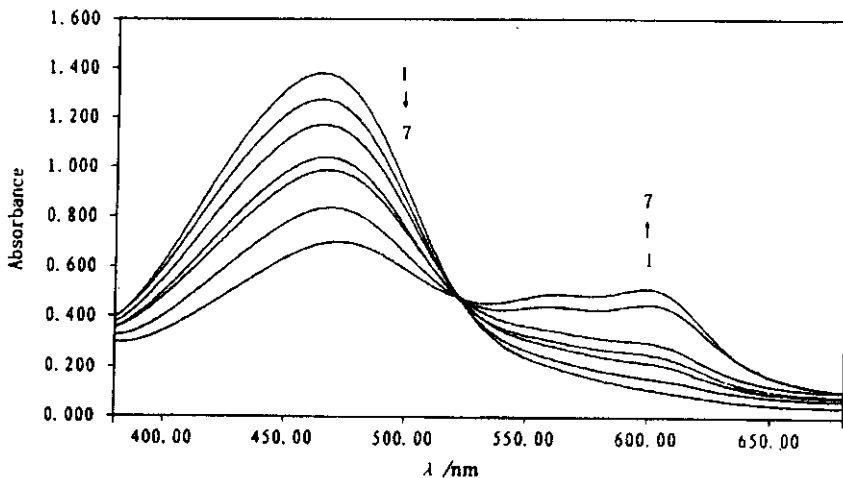


图 4 不同壳聚糖浓度下的锌试剂-壳聚糖复合物的吸收光谱
ZCN : 83.3 μmol/L ; pH = 5.0 ; CTS : 0.01 μmol/L 按 465 nm 吸光值
1→7 : 0.000 ; 0.667 ; 2.000 ; 3.340 ; 4.667 ; 6.000 ; 7.340

Fig. 4 Absorption spectra of ZCN-CTS complex in different CTS concentrations
ZCN : 83.3 μmol/L ; pH = 5.0 ; CTS : 0.01 μmol/L ; In order of the absorption peak at 465 nm
1→7 : 0.000 ; 0.667 ; 2.000 ; 3.340 ; 4.667 ; 6.000 ; 7.340

系未产生颜色变化,没有出现新的吸收峰.当 CTS 浓度高于 2.000×10^{-8} mol/L 时,CTS 分子链聚集程度增大,形成疏水微区,主要以双螺旋状态存在,并随着反应体系中 CTS 浓度增大,所形成疏水微区的数目也逐渐增加^[41],ZCN 分子的芳香族基团通过疏水相互作用不断结合在 CTS 分子疏水微区内,形成 ZCN-CTS 紫红色复合物,产生了 600 nm 新的吸收峰并不断升高,导致反应体系由黄色变为紫红色并逐渐加深.由此可见,ZCN 与 CTS 相互作用形成 ZCN-CTS 紫红色复合物产生变色反应的机理是在 ZCN 与 CTS 大分子间发生静电相互作用的基础上,主要由 ZCN 与 CTS 大分子间的疏水相互作用所引起.同时,CTS 分子链的聚集程度是影响 ZCN 与 CTS 分子间产生疏水相互作用的重要因素.

图 5 为固定 CTS 浓度,渐增 ZCN 的浓度测得 ZCN-CTS 复合物吸收光谱,随着 ZCN 浓度增加 A_{65}

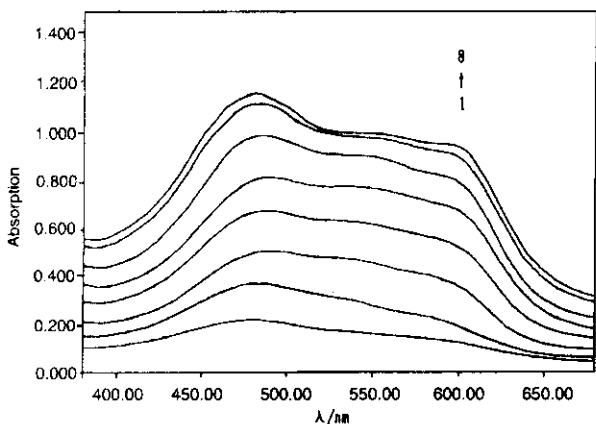


图 5 不同锌试剂浓度下锌试剂-壳聚糖复合物吸收光谱

CTS $0.033 \mu\text{mol/L}$ pH=5.0 ;ZCN :0.1 mmol/L ;
按 465 nm 吸光值 1→8 :0.333 ;0.667 ;1.000 ;
1.333 ;1.666 ;2.000 ;2.333 ;2.500

Fig.5 Absorption spectra of ZCN-CTS complex in different ZCN concentrations

CTS $0.033 \mu\text{mol/L}$ pH=5.0 ;ZCN :0.1 mmol/L ;
The absorption peak at 465 nm 1→8 :0.333 ;0.667 ;
1.000 ;1.333 ;1.666 ;2.000 ;2.333 ;2.500

和 600 nm 处的吸光值也同时增加.当 ZCN 浓度低于 0.667×10^{-4} mol/L 时,600 nm 处没有出现吸收峰,只有 465 nm 处一个吸收峰.当 ZCN 浓度达到 0.667×10^{-4} mol/L,600 nm 处吸收峰开始出现,并随 ZCN 浓度的增大而升高.从 ZCN 和 CTS 结构上看,二者之间可以通过静电引力结合,但 ZCN 处于低浓度时,600 nm 处没有出现吸收峰,说明 600 nm

处吸收峰不完全是由 ZCN 与 CTS 之间静电作用产生的,同时还与 ZCN 在 CTS 分子上形成的结合态 ZCN 浓度有关.

3.2 CTS 脱乙酰度对 ZCN-CTS 吸收光谱的影响

从图 6 可以看出,随着 CTS 脱乙酰度的降低,465 nm 处的吸光值逐渐下降,反应体系的紫红色逐渐加深.这是由于随着 CTS 脱乙酰度的降低,CTS 分子链上乙酰基含量逐渐增加,减少了阳离子氨基的密度及相互之间排斥作用,分子内和分子间氢键作用增强,使 CTS 双螺旋和疏水微区增加,ZCN 与 CTS 疏水相互作用不断增加,结合能力逐渐增强.表明疏水相互作用在形成 ZCN-CTS 紫红色复合物产生变色反应的过程中起着重要的作用.

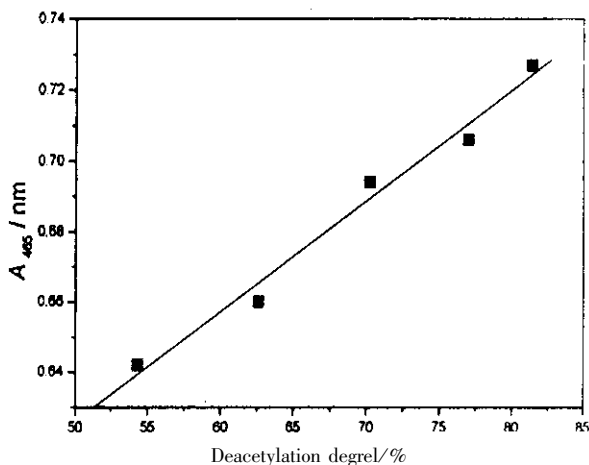


图 6 壳聚糖脱乙酰度对锌试剂-壳聚糖复合物吸收光谱的影响

Fig.6 Effect of different deacetylation degrees of CTS on the absorbance of ZCN-CTS complex
ZCN :83.3 $\mu\text{mol/L}$;pH 5.0 ;CTS :0.013 $\mu\text{mol/L}$.

3.3 ZCN/CTS 摩尔比对吸收光谱的影响和最大结合数 N_E

为更清楚地阐明 CTS 与 ZCN 相互作用的机理,本工作又对 ZCN/CTS 摩尔比对吸收光谱的影响进行了研究并测得 ZCN 与 CTS 的最大结合数 N_E . ZCN/CTS 摩尔比 m 定义为:

$$m = C_D/C_P \quad (1)$$

C_D 为 ZCN 浓度; C_P 为 CTS 浓度; $A_{465\text{nm}}$ 为待测溶液在 465 nm 处的吸光值,而 $A_{600\text{nm}}$ 为待测溶液在 600 nm 处的吸光值. $\Delta A_{465\text{nm}}$ 由两个相邻的 465 nm 处的吸光值相减得到,同法得到 $\Delta A_{600\text{nm}}$.

$$\text{令} \quad \beta = \Delta A_{600\text{nm}}/\Delta A_{465\text{nm}} \quad (2)$$

β 为 600 nm 处的吸收峰值增幅与 465 nm 处的吸收峰值增幅之比, β 值的大小可以反映出结合态 ZCN 分子间相互作用的强弱, β 值越大, 说明这种相互作用越强. 按式(1)、(2)处理图 5 数据, 结果列于表 1. m 和 β 的关系如图 7 所示, 从图 7 中可以看出, 当 m 值增加到 2.67×10^3 (图 7 中的 a 点) 时, 由于 $\Delta A_{600\text{nm}}$ 的急剧增大和 $\Delta A_{465\text{nm}}$ 的减小, β 值开始显著增加并在 m 值增加到 4.45×10^3 (图 7 中所示的 b 点) 时形成一个波峰, 之后, 随着 m 值的增加 β 值随之减小, 至 m 为 6.93×10^3 (图 7 中的 c 点) 时到达一个最低值.

表 1 不同锌试剂浓度下锌试剂-壳聚糖相互作用的光谱数据*

Table 1 Data from ZCN-CTS assay in different ZCN concentrations*

$C_D / (\text{mol/L})$	C_D / C_P^*	$\Delta A_{600\text{nm}}$	$\Delta A_{465\text{nm}}$	β
3.333×10^{-5}	1×10^3	0.046	0.034	1.353
6.667×10^{-5}	2×10^3	0.067	0.153	0.438
1.000×10^{-4}	3×10^3	0.057	0.163	0.350
1.333×10^{-4}	4×10^3	0.282	0.145	1.945
1.667×10^{-4}	5×10^3	0.274	0.134	2.045
2.000×10^{-4}	6×10^3	0.155	0.166	0.934
2.333×10^{-4}	7×10^3	0.093	0.141	0.660
2.500×10^{-4}	7.5×10^3	0.037	0.054	0.685

* $C_P = 3.333 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$.

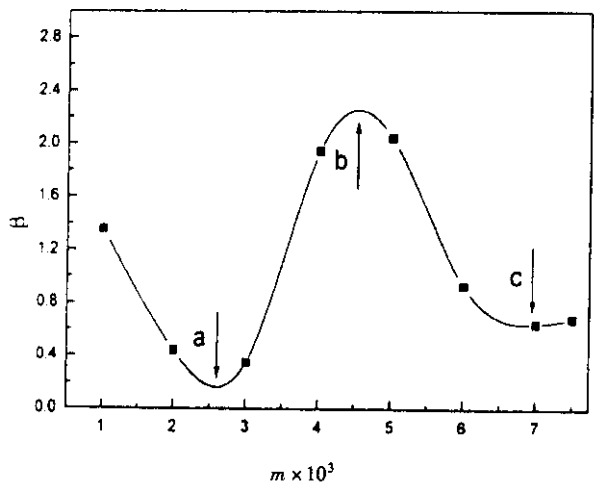


图 7 m 和 β 的关系

Fig. 7 Relationship between m and β

当 m 值小于 2.67×10^3 (a 点) 时, 由于染料浓度比较低, 在 600 nm 处尚不能形成新的吸收峰, 因而随 m 值增大, 600 nm 处的吸光值的增幅小于

465 nm 处吸光值增幅, β 值下降; 当 m 值达到 2.67×10^3 (a 点) 时, ZCN-CTS 复合物足以在 600 nm 处产生新的吸收峰, 此时的 m 值即为复合物开始产生新的吸收峰所需要达到的临界 ZCN/CTS 摩尔比. 当 m 值继续增加时, CTS 分子上结合的 ZCN 分子密度越来越高, 相互作用相应增强, 因而 600 nm 处的吸收峰增加的幅度大于 465 nm 处吸收峰增加的幅度, β 值逐渐增大. 当 m 值继续增加, 达到 4.45×10^3 (b 点) 时, 由于 CTS 分子上的可结合位点逐渐减少, 只有少数的 ZCN 分子能够与 CTS 结合, 600 nm 处的吸收峰的增幅又小于 465 nm 处吸收峰增幅, 所以 β 值开始降低, 至 m 值 6.93×10^3 (c 点) 时, CTS 分子上所有位点都被 ZCN 结合, 新的 ZCN-CTS 复合物不再产生, β 值达到一个波谷, 此时的 m 值就等于 CTS 对 ZCN 的最大结合数 N_E .

3.4 最大结合数的理论值 N_C

焦庆才等在研究多糖与生物探针相互作用机理时^[6] 提出了最大结合数的理论计算公式:

$$\Delta A = \frac{\Delta \epsilon (1 + K D_T)}{K} - \Delta \epsilon N \left(\frac{D_T \Delta \epsilon}{\Delta A} - 1 \right) C_P \quad (3)$$

其中, $\Delta A = A - \epsilon_F D_T$, $\Delta \epsilon = \epsilon_B - \epsilon_F$, D_T 为染料在溶液中的总浓度; ϵ_F 为游离态染料的摩尔吸光系数; ϵ_B 为结合态染料的摩尔吸光系数; C_P 为多糖浓度; K 为结合常数; N 为最大结合数. 表 2 为固定 ZCN 浓度改变 CTS 加入量时, 在 465 nm 波长下测得的一组光谱数据.

表 2 不同壳聚糖浓度下锌试剂-壳聚糖相互作用的光谱数据*

Table 2 Data from ZCN-CTS assay in different CTS concentrations*

$C_P / (\text{mol/L})$	ΔA	$(D_T \Delta \epsilon / \Delta A - 1) C_P$
0.269×10^{-8}	0.153	1.325
0.400×10^{-8}	0.217	1.272
0.534×10^{-8}	0.276	1.221
0.667×10^{-8}	0.327	1.183
0.768×10^{-8}	0.373	1.100
0.901×10^{-8}	0.416	1.063
1.034×10^{-8}	0.453	1.036
1.168×10^{-8}	0.490	0.994
1.301×10^{-8}	0.523	0.955

* pH = 5.0; $D_T = 0.667 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 465 nm, $\Delta \epsilon = 1.360 \times 10^4$, $\Delta A_{\text{max}} = 0.907$.

从表 2 数据可以得到 $\Delta A \sim \left(\frac{D_T \Delta \varepsilon}{\Delta A} - 1 \right) C_p$ 的线

性回归方程:

$$\Delta A = 1.458 - 0.974 \times 10^8 \left(\frac{D_T \Delta \varepsilon}{\Delta A} - 1 \right) C_p$$

$$R = -0.996$$

从该方程的截距和斜率计算出 $K = 2.47 \times 10^4$, $N_C = 7.16 \times 10^3$, 与实验值 N_E 吻合.

4 结 论

本工作研究了 ZCN 与 CTS 相互作用的机理, 实验中发现静电作用是 ZCN-CTS 复合物产生的必需条件, CTS 脱乙酰度对 ZCN-CTS 复合物变色反应影响很大, 因此, 我们认为 ZCN-CTS 复合物变色反应机理是在 ZCN 与 CTS 大分子间发生静电相互作用的基础上, 主要由 ZCN 与 CTS 大分子间的疏水相互作用所引起的, 而 CTS 分子链的聚集程度是影响 ZCN 与 CTS 分子间产生疏水相互作用的重要因素. 同时我们考察了 ZCN/CTS 摩尔比对相互作用的影响, 通过实验方法测得了 ZCN 对 CTS 复合物形成 600 nm 新的吸收峰所需的临界 ZCN/CTS 摩尔比和 CTS 对 ZCN 的最大结合数, 通过实验获得的最大结合数与理论计算值一致. 这表明我们建立的相互作用理论模型^[6-9]具有一定的应用价值, 对多糖与光谱探针相互作用机理的深入研究具有指导意义.

参 考 文 献

- [1] Jiang Tingda (蒋挺大). Chitonsan (壳聚糖), Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2001 : 8
- [2] Zhang Weijie (张惟杰). Biochemical Research Technology of Complex Carbohydrates (Second Edition) (糖复合物生化研究技术, 第二版), Zhejiang (浙江): Press of Zhejiang University (浙江大学出版社), 1994. 23
- [3] Wang Xiaohong (王小红), Ma Jianbiao (马健标), He Binglin (何炳林). *J. Functional Polymers* (功能高分子学报), 1999 , 12 : 197
- [4] Du Yuming (杜予民). *Journal of Wuhan University (Natural Science)* (武汉大学学报, 自然科学版), 2000 , 46 : 181
- [5] Zhang Tianhong (张天鸿). *China Food Additives* (中国食品添加剂), 2000 , 2 : 37
- [6] Jiao Q C , Liu Q , Sun C , et al. *TALANTA* , 1999 , 48 : 1095
- [7] Jiao Q C , Liu Q . *Spectrochimica Acta Part A* , 1999 , 55 : 1667
- [8] Liu Q , Jiao Q C , Liu Z L , et al. *Spectroscopy Letters* , 2001 , 34 : 25
- [9] Zhou S G , Jiao Q C , Chen L , et al. *Spectroscopy Letters* , 2002 , 35 : 21
- [10] Chi Yanhua (迟燕华), Li Na (李娜), Zhuang Jia (庄稼), et al. *Chem. J. Chin. Univ.* (高等学校化学学报), 1998 , 20 : 1697