

N ,O-羧甲基壳聚糖的合成和性质研究*

吴 刚^a, 沈玉华^{a,b,**}, 谢安建^{a,b}, 林宏云^a, 郭文豪^a

(a. 安徽大学化学化工学院, 合肥 230039; b. 南京大学配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

摘 要: 采用多段升温法将壳聚糖改性, 合成了取代度为 1.84、平均分子量为 3.08×10^5 、等电点为 7.28 的 N ,O-羧甲基壳聚糖 (CMC), 分别用紫外光谱、红外光谱、荧光光谱对其结构进行了表征, 并对其水溶液的 Zeta 电位、电导率、表面张力以及水分散体系中羧甲基壳聚糖微粒的粒径分布进行了研究. 结果表明, N ,O-羧甲基壳聚糖具有表面活性, 介质的 pH 值和浓度对羧甲基壳聚糖溶液的稳定性有很大的影响.

关键词: N ,O-羧甲基壳聚糖 (CMC); 聚集; 表面张力; 电导率; Zeta 电位

中图分类号: O631.4, O647.2, O648.16 文献标识码: A

Synthesis and Studies on Properties of N ,O-Carboxymethylchitosan*

Wu Gang^a, Shen Yuhua^{a,b,**}, Xie Anjian^{a,b}, Lin Hongyun^a, Guo Wenhao^a

(a. College of Chemistry & Chemical Engineering, Anhui University, Hefei 230039;

b. State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract N ,O-Carboxymethylchitosan (CMC) beginning with chitosan and chloroacetic acid by stepwisely increasing temperature method was synthesized. Carboxymethylation substitutive degree is 1.84, average molecular weight is 3.08×10^5 and intrinsic viscosity (25 ± 0.5)°C is 180 L/g. It was characterized by ultraviolet spectrum, infrared spectrum, fluorescence spectrum. Its ultraviolet characteristic absorption peak is at 206 nm arising from $n \rightarrow \pi$ electron transition. However, the ultraviolet characteristic absorption peak of chitosan is at 195 nm. One of stretching vibration absorption peak of CMC infrared spectrum is at 1635 cm^{-1} which results from stretching vibration of $-C=O(-COOH)$ bond. But at 1635 cm^{-1} there is no stretching vibration peak of $C=O$ in the chitosan infrared spectrum. In fluorescence spectrum, the excitation wavelength of CMC is 330 nm and its emission wavelength is 407 nm. The excitation wavelength of Chitosan is 320 nm and its emission wavelength is 391 nm. Synthesized CMC is soluble in the aqueous solution. It is a macromolecular surface-active agent. CMC surface tension linearly decreases with the increasing of CMC concentration in aqueous solution. But its conductivity linearly increases with the increasing of CMC concentration in the aqueous solution. The CMC aggregate behaviors in CMC aqueous solution is also studied, which shows that there is a some degree aggregation in the aqueous solution of synthesized carboxymethylchitosan. Meanwhile, the Zeta potential of CMC aqueous solution is studied. It demonstrates that Zeta potential value decreases with the decreasing of the concentration of CMC. The study indicates CMC is an amphoteric macromolecular electrolyte and its isoelectric point is 7.28. Therefore, the pH value and concentration of CMC have great influence on the stability of CMC aqueous solution.

Key words N ,O-Carboxymethylchitosan (CMC), Aggregation, Surface tension, Conductivity, Zeta potential

* The Project Supported by NNSFC (20031010, 29971001), KPME00180 and NSFAHP (0045115).

** Corresponding author, E-mail: s_yuhua@163.com Received 30 October 2002; in final form 22 April 2003.

1 引 言

毒理学研究表明,羧甲基壳聚糖无任何毒副作用^[1].在医药上可作为免疫辅助剂,具有抗癌作用而不损伤正常细胞^[2];具有促细胞生长、抗心律失常等生物活性^[3];对金属离子如 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 等有配位作用,是制备微量元素补剂的理想配体^[4].N,N-二羧甲基壳聚糖磷酸钙可用于促进损伤骨头的修复、再生^[5];N,O-羧甲基壳聚糖可以防止心脏手术后心包黏连^[6],对玉米氮代谢、蛋白质合成与积累具有明显的生理调节作用^[7].

为此,我们采用多段升温法将壳聚糖改性,制备了取代度较高的 N,O-羧甲基壳聚糖(CMC),以提高其水溶性,扩展其用途.羧甲基壳聚糖是否具有表面活性,在水溶液中是否容易聚集,水溶液的稳定性如何,所有这些肯定会对羧甲基壳聚糖在食品、医药、水处理等方面的应用产生影响,而这方面的研究尚未见报道.故本工作应用多种现代分析测试手段,对新制备的 N,O-羧甲基壳聚糖(CMC)的水溶液诸性质进行了分析,得到了一些有意义的结果.

2 实 验

2.1 试 剂

壳聚糖(从虾壳中提取,自制,脱乙酰度:90.24%,分子量: 5×10^5);氯乙酸,上海金山化工厂,分析纯.无水乙醇,上海振兴化工一厂,分析纯.无水甲醇,上海振兴化工一厂,分析纯.氢氧化钠,上海东懿化学试剂公司,分析纯.盐酸,上海振兴化工二厂,分析纯.异丙醇,南京化学试剂厂,分析纯.

2.2 仪器和样品的测试方法

紫外分光光度计:Shimadzu UV-3100 spectrometer,扫描范围 190~400 nm;Malvern 3000Hs 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪,英国,测羧甲基壳聚糖水溶液中粒径分布、Zeta 电位、电导率、自动电位滴定;荧光光谱仪:Aminco Bowman Series 2 spectrofluorimeter,激发光栅和发射光栅狭缝均为 10 nm,扫描速度为 1500 nm/min,扫描范围为 360~550 nm;表面张力仪:Drop Shape Analysis System DSA 10 MKZ, KRÜSS GmbH Germany; Nicolet670 傅立叶变换红外光谱仪, KBr 压片,扫描范围为 4000~400 cm^{-1} ,扫描次数为 32 次,分辨率为 4 cm^{-1} .在紫外光谱、荧光光谱、Zeta 电位、电导率、纳米粒度和表面张力测试分析中,用 N,O-羧甲基壳聚糖水溶液,除特别说

明外,水溶液的 pH 值均为 3.8.

2.3 羧甲基壳聚糖的合成

称取 5 g 壳聚糖,加入盛有 75 mL 异丙醇的三颈瓶中,在搅拌下缓慢加入 40% 的 NaOH 溶液 125 mL,于 44℃ 下搅拌碱化 4 h 后,滴入溶有 30 g 氯乙酸的异丙醇溶液 100 mL,1.5 h 内滴加完,于 54℃ 下反应 4 h 后,升温至 64℃,反应 10 h,分出水层粘状物,加入 300 mL 去离子水,充分搅拌,再加入 10% HCl 调节 pH,过滤,弃去不溶物,滤液中加入无水甲醇,有白色胶状物沉淀,静置,过滤,滤物用无水乙醇洗涤至无氯离子,真空干燥,得白色固体物.

3 结果与讨论

3.1 CMC 的表征

3.1.1 特性粘度和粘均分子量:准确称量已干燥的羧甲基壳聚糖,用 0.1 mol/L 的 NaCl 为溶剂,配成不同浓度的溶液,过滤,于 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 下用乌式粘度计测定,平行测三次,外推法求出特性粘度 $[\eta]$ 为 180 mL/g.根据 Roberts 和 Domszy 方程^[8] $[\eta] = 3.04 \times 10^{-5} \text{Mr}^{1.26}$,算出羧甲基壳聚糖的粘均相对分子质量为 3.08×10^5 .

3.1.2 取代度:称取一定量的羧甲基壳聚糖,用二次水溶解后,用 10.4 mmol/L 的 NaOH 溶液滴定,用笔式 pH 计检查 pH 值的变化,用一阶导法求出终点时的碱的用量,其取代度 D 用下式计算^[9]:

$$D = 161A / (1 - 58A)$$

$$A = V(\text{NaOH}) \times C(\text{NaOH}) / m$$

m 为羧甲基壳聚糖的质量.计算出制得的羧甲基壳聚糖的取代度是 1.84.理论上,6 位的羟基、2 位的氨基均可发生亲核取代反应,但由于 6 位上羟基空间位阻较小,其活性要比 2 位的氨基活泼,氧的电负性又比氮大,因此,6 位上的羟基亲核性要比氨基强,6 位氧取代速度应比 2 位的氮取代速度快.但从热力学角度分析,2-N 取代的产物比 6-O 取代产物的生成热和总能量均低 15.55 kJ/mol.因此,前者比后者稳定^[10].综合取代度、动力学和热力学的分析,推测合成的产物主要是 CMC.

3.1.3 红外光谱:图 1a 是 CMC 的红外光谱图,与图 1b 相比,其 1062 cm^{-1} 一级羟基峰消失($\text{C}_6\text{-OH}$),说明在此位置发生了羧甲基化反应.图谱中明显有 1635 cm^{-1} 的羧基团的 $\nu(\text{C}=\text{O})$ 的特征吸收峰,说明羧甲基化反应后在壳聚糖分子中引入了羧基.CMC、壳聚糖红外光谱在约 3446 cm^{-1} 处存在一

较宽峰 ,可能是由于 O - H 和 N - H 基团形成了氢键而宽化 ,两振动峰相互重叠所造成的. 壳聚糖红外

光谱中 1590 cm^{-1} 是酰胺的吸收峰 ,是由 $\delta(\text{NH})$ 和 $\nu(\text{C} - \text{N})$ 偶合产生的峰.

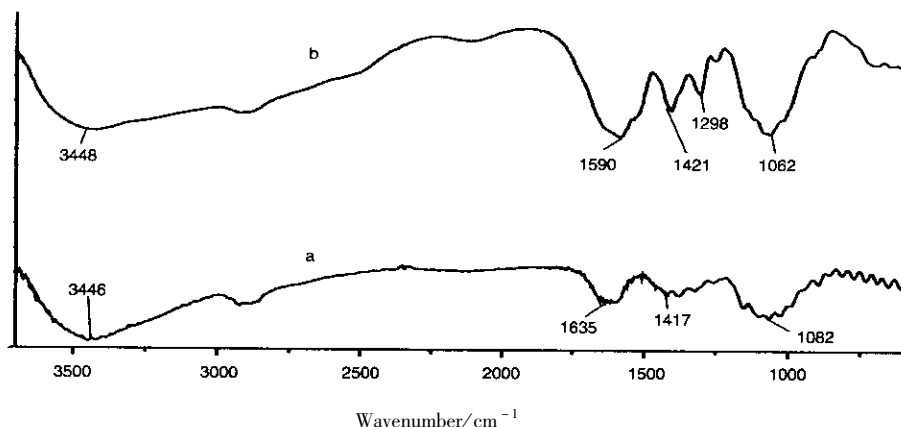


图 1 羧甲基壳聚糖 (a) 和壳聚糖 (b) 的红外光谱
Fig.1 IR spectra of CMC (a) and chitosan (b)

3.1.4 紫外光谱和荧光光谱 : 图 2、图 3 分别是 CMC 的紫外和荧光光谱图 ,其紫外光谱在 206 nm 处有最大吸收 ,主要是羧基发生 $n-\pi^*$ 跃迁所致 ,由于羧基羰基与氧原子上的未成对电子共轭 ,使 $n-\pi^*$ 跃迁能量增大而蓝移 ,壳聚糖紫外光谱在 195 nm 处有最大吸收. CMC 荧光激发波长为 330 nm ,荧光最大发射波长为 407 nm ,壳聚糖荧光激发波长为 320 nm ,荧光最大发射波长为 391 nm.

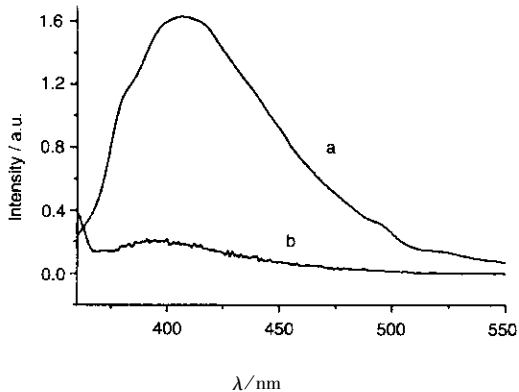


图 3 羧甲基壳聚糖 (a) 和壳聚糖 (b) 荧光光谱
Fig.3 Fluorescence spectrum of (a) CMC and (b) Chitosan

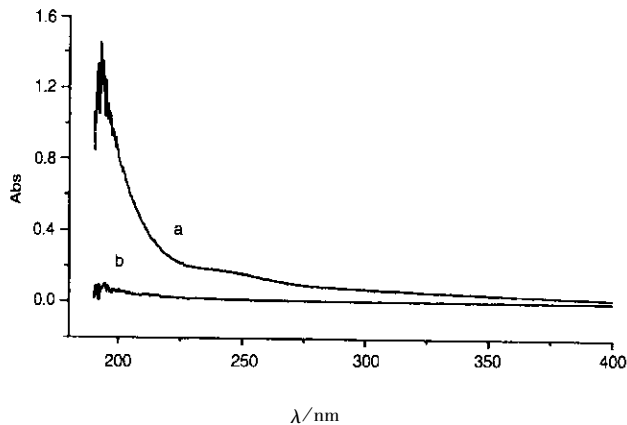


图 2 羧甲基壳聚糖 (a) 和壳聚糖 (b) 紫外光谱
Fig.2 UV - Vis spectrum of (a) CMC and (b) Chitosan

3.2 CMC 水溶液的性质

3.2.1 表面张力和电导率 : 图 4 为 CMC 水溶液表面张力与浓度的关系图 ,由图 4 可见 ,在所研究浓度范围内 ,CMC 的表面张力和浓度成线性关系 ,随着浓度的增加而降低 ,但降低的程度没有一般的低分子表面活性剂那样大 ,这符合高分子表面活性剂

的基本特征 : 表面张力、界面张力降低能力小 ,多数情况下不形成胶束^[11]. 图 5 为 CMC 水溶液电导率与浓度关系图 ,由图 5 可见 ,电导率随浓度的增加而增加 ,并且成线性关系.

3.2.2 Zeta 电位和 pH 的关系 : 图 6 为 CMC 水溶液 (2 g/L) Zeta 电位 ~ pH 关系图 ,由图可见 ,其等电点约是 7.28 ,它是两性聚电解质. 总体上说 ,在此浓度下 CMC 水溶液的 Zeta 电位绝对值小于 30 mV ,因此 ,其水溶液是不稳定的. 但相对而言 ,在酸性条件下 ,pH 值愈小 ,Zeta 电位值愈大 ,其水溶液趋于稳定 ,这是由于 pH 值愈小 ,分子上的氨基可结合更多的氢离子而带更多正电荷. 在碱性条件下 ,pH 值由 7.28 升至 10.00 时 ,Zeta 电位的绝对值也是增加的 ,即稳定性也是增加的 ,这是由于 pH 值增加 ,使羧基电离程度增加而带更多的负电荷所致. 但 pH

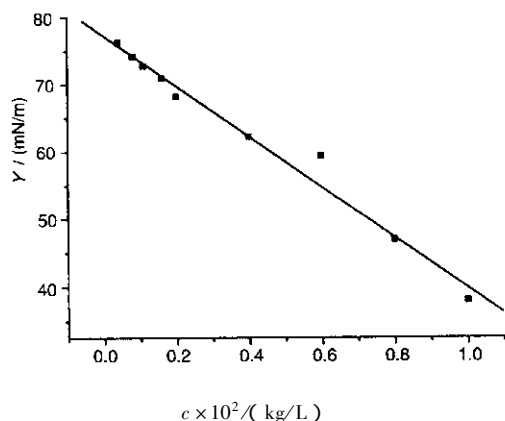


图4 表面张力与 CMC 水溶液浓度的关系

Fig. 4 Relation of surface tension to concentration of CMC aqueous solution

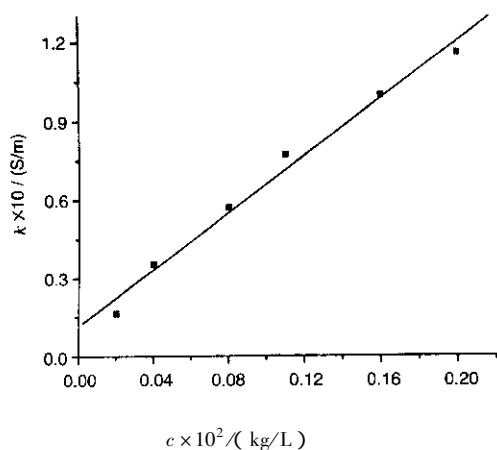


图5 电导率与 CMC 水溶液浓度的关系

Fig. 5 Relation of conductivity to concentration of CMC aqueous solution

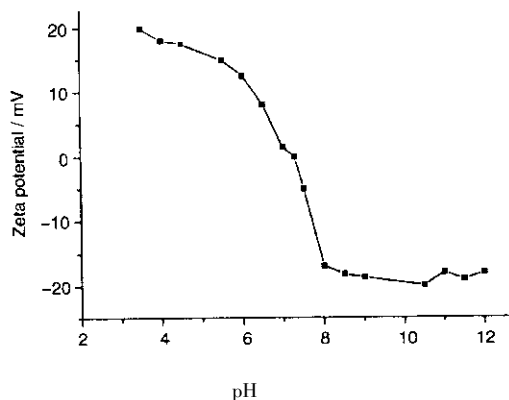


图6 Zeta 电位和 pH 的关系

Fig. 6 Relation of Zeta potential to pH of CMC aqueous solution

超过 10 以后,随着 pH 值的增加,其 Zeta 电位绝对值降低,这可能是在强碱性条件下,羧酸全部形成了羧基阴离子,同一分子中或不同分子中羧基阴离子和氨基或羟基形成氢键的能力增强,从而使分子链更易发生卷曲和聚集,疏水微区增加^[12],导致疏水性增加,吸附离子能力降低,同时,由于离子强度的增加,使 CMC 的溶剂化层和双电层变薄,两者共同影响,使得 Zeta 电位绝对值降低。

3.2.3 浓度对粒径、Zeta 电位的影响: 图 7 是 CMC 水溶液中羧甲基壳聚糖的粒径与浓度关系图,图 7 显示,随 CMC 的浓度的变化表现出两种变化规律.当浓度在 0.8 ~ 10 g/L 时,随着浓度的减小,CMC 粒子的粒径愈来愈小,说明 CMC 分子之间存在聚集,但随着浓度的降低,分子间的聚集程度降低,导致粒径降低;在 0.02 ~ 0.8 g/L 时,CMC 的粒径则随浓度的减小而呈现增大趋势.可能是因为在在此条件下,CMC 浓度已经很低,使得分子可以比较自由地伸展,因而占据较大的空间,粒径反而增大。

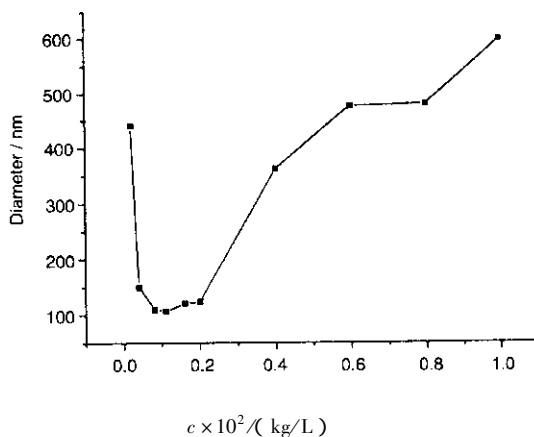


图7 CMC 粒径和水溶液关系图

Fig. 7 Relation of CMC particle diameter to concentration of CMC aqueous solution

图 8 为 Zeta 电位 ~ 浓度关系图,由图可见,随着浓度的降低,Zeta 电位值增加,因此,CMC 水溶液的稳定性的增加.当浓度低于 0.2 g/L 时,从 Zeta 电位数值看,其水溶液已相当稳定.这是由于 CMC 分子发生聚集或者自身卷曲^[13],都会生成疏水微区^[12],而浓度的降低,使聚集或者卷曲程度降低,疏水微区减少,使其分子的更多的极性部分和水作用,吸附更多的离子,使 Zeta 电位值增加。

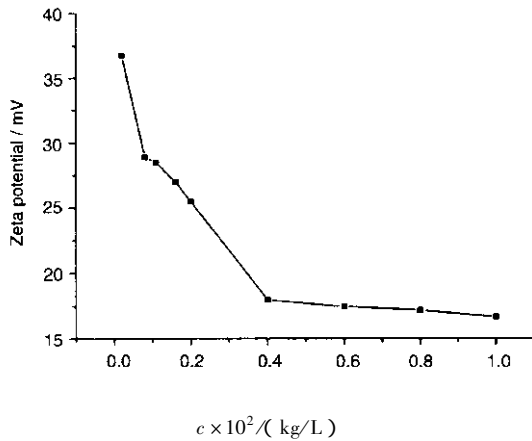


图8 Zeta 电位 ~ 浓度关系图

Fig. 8 Relation of Zeta potential to concentration of CMC aqueous solution

参 考 文 献

- [1] Liu Wanshun (刘万顺), Chen Xiguang (陈西广). *Chinese Journal of Marine Drug* (中国海洋药物), 1997 , (3) : 17
- [2] Wu Kunxian (伍焜贤), Li Minyi (李敏谊). *Chinese Chemistry Bulletin* (化学通报), 1999 , (9) : 54
- [3] Zhang Shenli (张沈丽), Wang Lijuan (王丽娟), *et al.* *Chinese Journal of Marine Drug* (中国海洋药物), 2000 , (1) : 11
- [4] Lin Youwen (林友文), Luo Hongbin (罗红斌), *et al.* *Chinese Journal of Marine Drug* (中国海洋药物), 2001 , (4) : 11
- [5] Riccardo A A Muzzarelli , Viviana Ramos , Vesna Stanic , Bruno Dubini , *et al.* *Carbohydrate Polymers* , 1998 , **36** : 267
- [6] Krause TJ , Zazanis G , Malatesta P , Solina A. *Journal of Investigative Surgery* , 2001 , **14**(2) : 93
- [7] Shi Suyun (师素云), Xue Qihan (薛启汉), *et al.* *Acta Phytobiologica Sinica* (植物生理学报), 1999 , **25** : 187
- [8] Roberts G A F , Domszy J G. *Int. J. Biol. Macromol.* , 1982 , **4** : 374
- [9] Han Xiao (韩笑), Tan Tianwei (谭天伟). *Journal of Beijing University of Chemical Technology* (北京化工大学学报), 2000 , **27**(3) : 2
- [10] Xia Shuwei (夏树伟), Sui Weiping (隋卫平), *et al.* *Acta Phys.-Chim. Sin.* (物理化学学报), 2002 , **18** : 249
- [11] Li Zongshi (李宗石), Xu Mingxin (徐明新). *Synthesis & Technics of Surfactant* (表面活性剂合成与工艺), Beijing (北京) : Light Industry Press (轻工业出版社), 1999. 276
- [12] Chen Tian (陈天), Zhang Xiaohong (张晓红), Guo Rong (郭荣). *Acta Phys.-Chim. Sin.* (物理化学学报), 2000 , **16** : 1041
- [13] Duan Yufeng (段玉丰), Zhang Qiang (张强), Yang Jun (杨俊). *Chin. J. Chem. Phys.* (化学物理学报), 2001 , **14** : 511