

不同脱乙酰度壳聚糖 Mark-Houwink 方程的订定*

王 伟 薄淑琴 秦 汶

(中国科学院长春应用化学研究所高分子物理开放实验室, 长春 130022)

摘 要

通过多步脱乙酰基反应和溶液超声波降解制备了脱乙酰度 $D.D$ 在 49—100% (wt), 重均分子量 $\bar{M}_w$ 在 $1.94—25.1 \times 10^5$ 的系列壳聚糖样品。在 0.1mol/L $\text{CH}_3\text{COONa} + 0.2\text{mol/L}$ CH_3COOH 溶剂中和 30℃ 下, 用光散射法首次订定出了不同 $D.D$ 壳聚糖的 M-H 方程常数 K 和 α 值, 结果如下:

$D.D(\text{wt}\%)$	$K \times 10^3(\text{ml} \cdot \text{g}^{-1})$	α
69	0.104	1.12
84	1.424	0.96
91	6.589	0.88
100	16.800	0.81

导致 K 和 α 值差别的主要原因是由于壳聚糖大分子链上的胺基($-\text{NH}_2$)被酸质子化后, 失去了形成分子内氢键的能力, 减弱了内旋转受阻程度。同时, 质子化后形成的阳离子聚电解质分子链链段间以及链段与溶剂之间的相互作用增强, 有效电荷密度的增加使得聚电解质溶液粘度增大。

关键词: 壳聚糖, 脱乙酰度, 特性粘数, 光散射, Mark-Houwink 方程

壳聚糖是一种贮量丰富, 具有许多特殊用途的直链多糖^[1,2], 其主要来源是蟹、虾壳中的甲壳素经脱乙酰基反应而得。这种用途广泛, 可再生的天然资源已受到世界性的重视。目前, 许多国家对壳聚糖的制取、性质以及各种应用给予了越来越强烈的关注^[3,4]。

粘度法是快速而简单地测定高分子化合物分子量的方法。此方法的理论根据是著名的 Mark-Houwink 方程, 即

$$[\eta] = K \cdot M^\alpha \quad (1)$$

对于一定的高分子、溶剂和温度体系, K 和 α 值是常数。壳聚糖的 M-H 方程的订定工作虽然已有文献报道过^[5-9], 但是作者都忽略了脱乙酰度不同对 K , α 值的影响以及影响程度如何。这不仅在理论上造成了混乱, 而且也给应用带来不便。因此, 随着壳聚糖研究的深入, 订

本文 1989 年 9 月 19 日收到, 1990 年 5 月 12 日收到修改稿。

* 国家自然科学基金资助项目。

定出不同 *D.D* 壳聚糖的 *M-H* 方程, 不仅迫切, 而且在理论上和实际中都具有重要的意义和价值。

一、实验部分

1. 样品制备

(1) 甲壳素的提取 将螃蟹壳洗净、凉干后, 经过氢氧化钠和盐酸溶液处理, 除去蛋白质、碳酸盐等物质, 再经水洗, 最后得到中性的纯净甲壳素。

(2) 壳聚糖的制取^[10] 将甲壳素浸入 47% (wt) NaOH 溶液中, 在氮气流下进行非均相脱乙酰基反应, 按反应程度不同取出样品, 并用温水洗至中性, 得到不同 *D.D* 的壳聚糖样品。

(3) 壳聚糖溶液的超声波降解^[11] 将 1% 的壳聚糖乙酸水溶液用 CSF-1A 型超声波发生器(上海超声波仪器厂)进行超声波降解反应。按不同的降解时间取样, 用 1N NaOH 溶液将壳聚糖沉淀出, 过滤并用温水洗至中性, 再用甲醇浸泡 24h 重复 2—3 次, 最后经真空干燥。

2. *D.D* 值分析^[12]

用聚乙烯硫酸钾 (PVSK) 做滴定剂, 甲苯胺蓝 (T. B) 为指示剂, 用胶体滴定法测壳聚糖的脱乙酰基程度(*D.D*)。本文 *D.D* 值的含意是指壳聚糖中脱乙酰基链节的重量百分数。

同时, 还可用 PE-580B 红外光谱仪测乙酰基含量。

3. 特性粘数和光散射的测定

选择 0.1mol/L CH_3COONa + 0.2mol/L CH_3COOH 为溶剂, 于 $30 \pm 0.05^\circ\text{C}$, 用乌氏粘度计按五点法测各样品的特性粘数 $[\eta]$ 。

用上述同样的溶剂通过日本岛津 PG-21 型广角光散射光度计测重均分子量 $\bar{M}_w$ 。入射光波长为 436nm。测前, 溶剂和溶液须经 G5 玻璃漏斗和 $0.1\mu\text{m}$ — $0.8\mu\text{m}$ 的微孔膜压滤。

折光指数增量 dn/dc 用岛津 DR-1 型示差折光计在 436nm 和 $25 \pm 0.05^\circ\text{C}$ 下测得。

二、结果和讨论

1. 不同 *D.D* 的系列壳聚糖样品

实验表明, 通过降低反应温度, 缩短反应时间, 增加反应次数的多步脱乙酰基反应方法, 可以获得高分子量的不同 *D.D* 值的产品。虽然如此, 也不可避免地会发生分子链的断裂, 这是由于多糖的甙键在浓碱中水解造成的, 同时脱乙酰基后使得链节单元的分子量降低, 因而 *D.D* 值增加, 壳聚糖的分子量下降。表 1 是不同反应程度的壳聚糖的 *D.D*, $[\eta]$ 和 $\bar{M}_w$ 值。

由于获得完全脱乙酰基的壳聚糖很困难, 因此, 将 *D.D* 值为 91% 的样品进行溶解后抽丝处理^[10]最后得到的产品经胶体滴定分析, *D.D* 值近似为 100%。用红外光谱仪检测, 表示乙酰基的特征峰 (1660cm^{-1}) 消失^[13](图 1)。

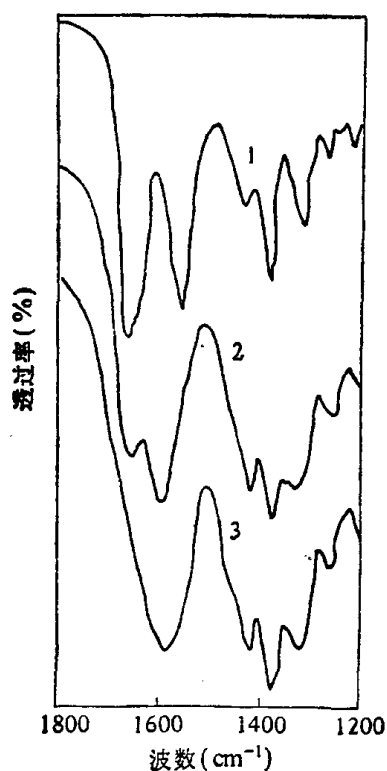
将各壳聚糖样品分别制成溶液并进行超声波降解。结果表明, 溶液超声波降解使壳聚糖的分子量迅速下降, 而 *D.D* 值不受影响^[11]。这样便制得了相同 *D.D* 值的系列分子量的壳聚糖。

2. 壳聚糖的 *M-H* 方程

将制得的样品分别进行特性粘数 $[\eta]$ 和分子量 $\bar{M}_w$ 的测定。结果表明, 在 0.1mol/L

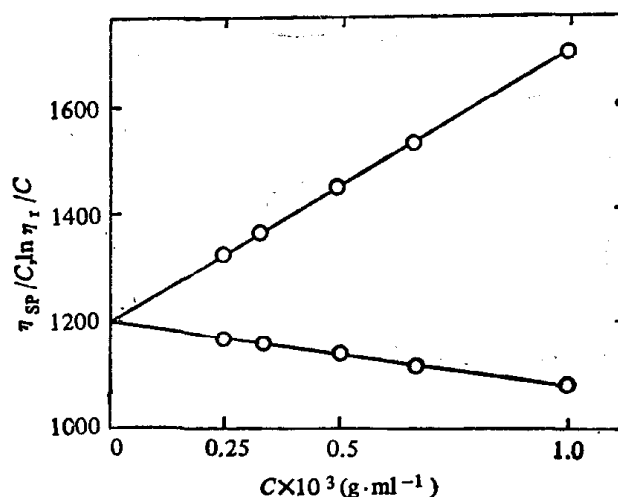
表 1 不同反应程度壳聚糖的 D,D , $[\eta]$ 和 $\bar{M}_w$ 值

样号	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	次序	累加时间 (h)	D,D (wt%)	$[\eta]$ ($\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}$)	$\bar{M}_w \times 10^{-3}$
C-1	62 ± 2	1	2	49	—	—
C-2	62 ± 2	2	4	69	1706	25.1
C-3	62 ± 2	3	6	84	1530	18.5
C-4	62 ± 2	4	8	91	1460	12.6
C-5	90 ± 2	5	9.5	98	—	—
C-6	90 ± 2	6	11	100	1200	9.37

图 1 甲壳素和壳聚糖的红外光谱图
(1——甲壳素, 2——91% D,D 壳聚糖,
3——100% D,D 壳聚糖)

$\text{CH}_3\text{COONa} + 0.2\text{mol/L CH}_3\text{COOH}$ 中,壳聚糖具有很好的粘度曲线和较好的光散射的 Zimm 图,图 2 和图 3 分别是表 1 中 C-6 样品的粘度曲线和光散射 Zimm 图。

表 2 中列出了所有样品的 $[\eta]$ 和 $\bar{M}_w$ 测量

图 2 壳聚糖 ($D,D = 100\%$) 在 $0.1\text{mol/L CH}_3\text{COONa} + 0.2\text{mol/L CH}_3\text{COOH}$ 溶剂中,
30 $^{\circ}\text{C}$ 时的粘度曲线表 2 不同 D,D 系列壳聚糖样品的 $[\eta]$ ($\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}$)和 $\bar{M}_w \times 10^{-3}$ 值

	69		84		91		100	
	$\bar{M}_w$	$[\eta]$	$\bar{M}_w$	$[\eta]$	$\bar{M}_w$	$[\eta]$	$\bar{M}_w$	$[\eta]$
1	25.1	1706	18.5	1530	12.6	1460	9.37	1200
2	18.2	1231	15.7	1270	10.8	1159	5.51	883
3	14.3	710	11.3	903	5.86	780	4.46	691
4	7.17	424	9.26	773	3.76	500	2.69	480
5	4.77	252	5.36	460	2.11	290	1.94	330

结果。

将表 2 中的 4 个系列数据按 $[\eta]$ 对 $\bar{M}_w$ 作双对数图,得到 4 条不同的直线(图 4),对以

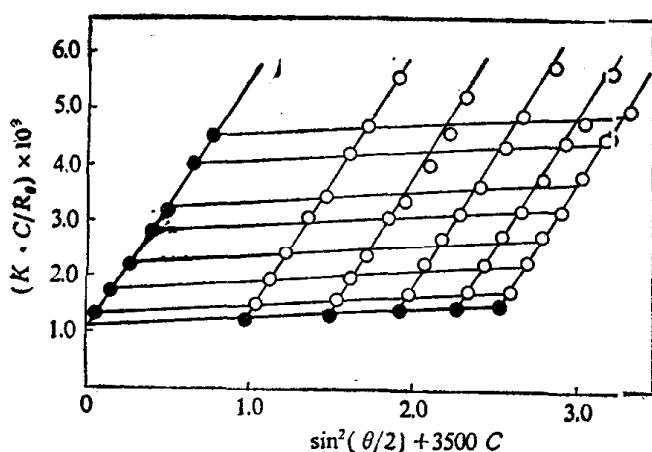


图 3 壳聚糖($D.D = 100\%$) 在 $0.1\text{mol/L CH}_3\text{COONa} + 0.2\text{mol/L CH}_3\text{COOH}$ 溶剂中, 光散射 Zimm 图 (室温)

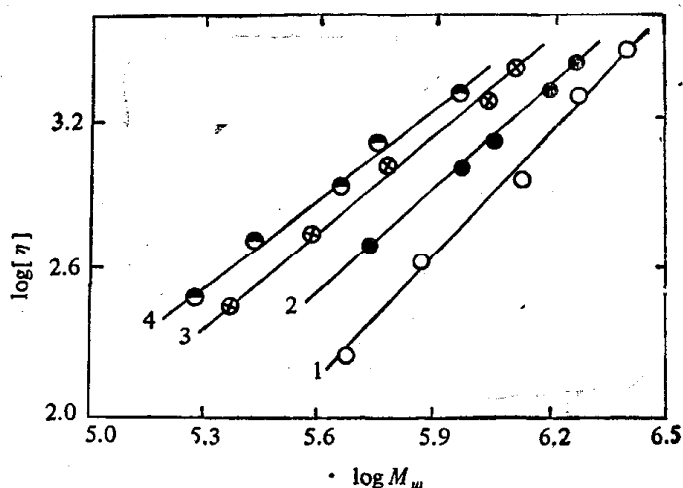


图 4 不同 $D.D$ 壳聚糖的 $[\eta]$ 和 $\bar{M}_w$ 的双对数图 (1—69%, 2—84%, 3—91%, 4—100%)

上各系列数据作最小二乘法线性回归处理, 得到如下 4 个方程:

$D.D(\%)$	M-H 方程	线性相关系数 r	
69	$[\eta] = 0.104 \times 10^{-3} M_w^{1.12} \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$	$r = 0.991$,	(2)
84	$[\eta] = 1.424 \times 10^{-3} M_w^{0.96} \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$	$r = 0.999$,	(3)
91	$[\eta] = 6.589 \times 10^{-3} M_w^{0.88} \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$	$r = 0.997$,	(4)
100	$[\eta] = 16.800 \times 10^{-3} M_w^{0.81} \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$	$r = 0.993$,	(5)

从以上结果看出, $D.D$ 值不同, K 和 α 值相差较大, 且呈现出规律性的变化。较大的 α 值表明, 壳聚糖大分子在溶剂中呈伸展的构象。由于甲壳素分子链可以形成很强的分子内氢键^[14], 在图 5 中表示出了甲壳素两种分子内氢键(I)和(II)的结构。

这样的两个分子内氢键严重地限制了乙酰胺基 ($-\text{NHCOCH}_3$)、羟甲基 ($-\text{CH}_2\text{OH}$) 和 β -(1, 4) 甙键的内旋转, 使甲壳素分子的刚性非常强。如果甲壳素部分或全部脱去乙酰基 ($-\text{COCH}_3$) 转变成壳聚糖后, 由于胺基

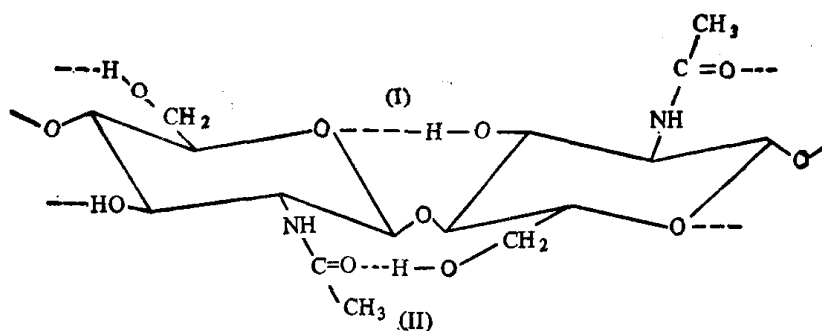


图 5 甲壳素的分子内氢键

($-\text{NH}_2$) 与氢质子 (H^+) 质子化成铵离子 ($-\text{NH}_3^+$) 后, 氮原子随之也失去了与 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 形成氢键的能力, 使氢键 (II) 部分或全部消失。这样 $-\text{NH}_3^+$ 和 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 以及甙键的内旋转阻碍减弱, 相应分子链的刚性降低, 而柔性相对增强, 因此当 $D.D$ 值从 69% 上升到 100% 时, α 值从 1.12 降到 0.81。另一方面, 由于 $D.D$ 值的增加, 在酸溶液中壳聚糖分子链上电荷密度增加, 同性电荷的静电排斥效应使分子链扩张, 尽管有外加小分子电解质的作用, 但还不能完全屏蔽静电效应。同时, 大分子链上带电基团的增加, 从而导致大分子运动阻碍增加, 因

此,在同样离子强度的溶剂中,同样聚合度(N)的壳聚糖随着 $D.D$ 值增加,其特性粘数增加。表 3 是相同聚合度(N)时,不同 $D.D$ 值的壳聚糖按所得方程(2)–(5)计算得到的 $[\eta]$ 值。实际上,在相同的分子量下, $D.D$ 值从 69% 上升到 100%。聚合度将增加,即分子链长增加,从而更加导致了 $[\eta]$ 的增加。因此在 M-H 方程上, K 值逐渐显著增大。

表 3 相同聚合物(N)时,不同 $D.D$ 壳聚糖的 $\bar{M}_w$ 和 $[\eta]$

$D.D\%$	$N = 2000$		$N = 5000$	
	$\bar{M}_w \times 10^{-5}$	$[\eta](\text{ml/g})$	$\bar{M}_w \times 10^{-5}$	$[\eta](\text{ml/g})$
69	3.445	165	8.612	460
84	3.334	286	8.34	688
91	3.284	485	8.21	1047
100	3.220	552	8.05	1170

另一方面, K 值还和样品的多分散性有关。在订定 M-H 方程时,一般是把样品先分级,制得窄分布的样品,但是对聚电解质来说,分级是困难的。壳聚糖的分级至今还未有成功的方法,见矢腾等人用 GPC 和 LALLS 连用测得了不同脱乙酰基程度的壳聚糖样品的分布宽度 $D(\bar{M}_w/\bar{M}_n)$ 在 1.55–2.08 之间,表明在脱乙酰基反应过程中,尽管分布逐渐变宽,但不很严重。

本工作在制备不同 $D.D$ 壳聚糖时,基本上借用了见矢腾等人的方法。并且随后采用了溶液超声波降解。而溶液超声波降解的结果将使分子量分布宽度 D 减小并趋近单分散^[15–17]。因此,本工作制得的壳聚糖样品的分布宽度至少不高于见矢腾等人的测定结果,即分子量分布不是很宽。各样品的 D 值相差不大。

表 4 本文与文献结果的比较

序号	溶 剂	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	$D.D^*$ (%)	K (ml/g)	α	订定** 方法	降解 方法	分子量范围 ($M \times 10^{-5}$)	文献
1	0.2mol/L CH_3COOH + 0.1mol/L NaCl + 4mol/L Uren	—	—	8.93×10^{-2}	0.71	S.D	剪切	—	[5]
2	0.167mol/L CH_3COOH + 0.47mol/L NaCl	25	90–100	111.5	0.147	S.D	浓碱	1.5–0.16	[6]
3	0.1mol/L CH_3COOH + 0.2mol/L NaCl	25	—	1.81×10^{-3}	0.93	端基 分析***	乙酸	6.3–0.48	[7]
4	2% CH_3COOH + 0.2mol/L CH_3COONa	25	85 $\pm$ 3	1.38×10^{-2}	0.85	S.D	乙酸	1.5–0.61	[8]
5	0.2mol/L CH_3COOH + 0.1mol/L CH_3COONa	30	78–99	—	—	LALLS	浓碱	8.5–4.9	[9]
6	0.2mol/L CH_3COOH + 0.1mol/L CH_3COONa	30	69 84 91 100	0.104×10^{-3} 1.424×10^{-3} 6.589×10^{-3} 16.800×10^{-3}	1.12 0.96 0.88 0.81	L.S	溶液超 声波降 解方法	25.1–1.94	本文

* 本工作 $D.D$ 值为重量百分数。

** S.D——超速离心沉降, L.S——光散射, LALLS——激光小角光散射。

*** 用端基分析测 $\bar{M}_n$, 后按无规降解处理。

按理论分析^[18], 对于分布宽度相差不大的一组分布宽度较小的试样, 用重均分子量方法订定 M-H 方程参数 K 和 α 值。其结果与单分散的方程 α 值一致, 而 K 值略有一定程度的减少。

进一步将本工作的结果与文献值进行了比较, 见表 4。

从表 4 可以看出, 见矢腾等人^[9]用 $D.D$ 值为 78—99% 的壳聚糖订定方程, 最终无法得到 K 和 α 值。Berkovich^[6] 虽然得到了 K , α 值, 但结果异乎寻常, 不可应用。将 Lee^[5] 的结果与其它一些 β -(1,4) 甙键多糖相比, 表现出过高的 K 值和过低的 α 值。实际上, 在订定方程过程中, 只用了 3 个样品, 也未提到脱乙酰度, 因此这个最早的关于壳聚糖的 M-H 方程一出现就引起了人们很大的异议。George^[7] 和 Gamgagade^[8] 的 2 个结果与本工作的结果相近, 尽管所用溶剂不完全相同, 但仍然具有可比性^[3]。

再与其它一些具有类似化学结构的 β -(1,4) 甙键多糖相比^[19,20], 我们认为, 本工作的结果是合理的, 可信的。由此得出结论, 不同脱乙酰度的壳聚糖有不同的 Mark-Houwink 方程, $D.D$ 值不同, K , α 值有着明显的差别, 随着 $D.D$ 值增加, α 值逐渐减小, K 值逐渐增大。

参 考 文 献

- [1] 严俊, 化学通报, 1984, 11: 26—31.
- [2] 黄汉生, 国外科技消息, 4(1990), 6—8.
- [3] Domard, A. & Rinaudo, *Int. J. Biol. Macromol.*, 4(1983), 49—52.
- [4] Riccardo, A. A. et al., *Carbohydrate Research*, 164(1987), 433—442.
- [5] Lee, V. F., *Diss. Abstr. Int. B*, 35(1975), 7: 3275.
- [6] Berkovich, L. A. et al., *Vysokomol. Soedin. Ser. A*, 22(1980), 1834—1841.
- [7] George, A. F. & Julian, G. D. *Int. J. Biol. Macromol.*, 4(1982), 374—377.
- [8] Gamgagade, A. I. et al., *Acta. Polym.*, 36(1985), 8: 420—424.
- [9] 见矢腾等, 高分子论文集, 43(1986), 2: 83—89.
- [10] Mima, S. & Miya, M. et al., *J. Appl. Poly. Sci.*, 28(1983), 1909—1917.
- [11] 王伟、秦汶, 化学通报, 1989, 9: 41, 44.
- [12] 王伟、李素清、秦汶, 日用化学工业, 2(1989), 36—38.
- [13] 见矢腾等, 高分子论文集, 42(1985), 181—189.
- [14] Minke, R. & Bloackwell, J., *J. Mol. Biol.*, 120(1978), 167—181.
- [15] Ovenall, D. W. et al., *J. Polym. Sci.*, 33(1958), 207—224.
- [16] 朱善农、钱人元, 化学学报, 29(1963), 1: 19—26.
- [17] Bapambonm, H. K., 高分子化合物物化, 江晓兰等译, 化学工业出版社, 1982.
- [18] 钱人元、应琦琮, *Scientia Sinica*, 5(1962), 1: 66—75.
- [19] Kishiko, K. et al., *Euro. Polym. J.*, 17(1981), 623—630.
- [20] Kurata, M. et al., *Polymer Handbook*, New York, 1975, IV-1—IV-33.