

进展评述

壳聚糖在稀溶液中的分子构象及其影响因素

高群 王国建 李文涛[#](同济大学材料科学与工程学院 上海 200092 [#]复旦大学附属肿瘤医院 上海 200032)

摘 要 结合国内外对壳聚糖在溶液性质方面的研究进展,从壳聚糖的分子量、乙酰度和溶液的离子强度 3 个方面,探讨了它们对壳聚糖在稀溶液中的分子构象所产生的影响,并从分子间和分子内相互作用力(主要是范德华力、氢键、疏水作用和静电作用)的角度对这种构象转变进行了理论解释。

关键词 壳聚糖 分子构象 分子间作用力

Study on Molecular Conformation of Chitosan in Dilute Solution

Gao Qun, Wang Guojian, Li Wentao[#](School of Materials Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092; [#]Cancer Hospital, Fudan University, Shanghai 200032)

Abstract Progress on the molecular conformation transition of chitosan in dilute solution is reviewed. The effects of molecular weight, degree of acetylation and ionic strength on conformation transition of chitosan in dilute aqueous solution are discussed based on intra/inter molecular interactions, i.e. hydrogen bonding, hydrophobic interaction and electrostatic interaction.

Keywords Chitosan, Molecular conformation, Inter/intra molecular interactions

聚合物的构象指的是由于单键内旋转而导致的聚合物分子链上的原子和基团在空间的排列。溶液中聚合物的分子构象与分子链的柔顺性、溶剂的性质和溶质的浓度等因素有关。

研究壳聚糖溶液性质的重要性在于:一方面,壳聚糖的玻璃化转变温度高于它的热分解温度,要制备各种壳聚糖材料如膜、纤维、凝胶等必须首先将壳聚糖配制成溶液^[1];另一方面,壳聚糖的生物活性、絮凝和吸附等特性都是在水溶液中得以体现,因此对溶液中壳聚糖分子与金属离子、蛋白质、细胞和细菌之间的相互作用机理的研究具有重要的意义^[2]。

壳聚糖的溶液性质已经进行了广泛的研究。壳聚糖在溶液中的构象一般分为球形、无规线团和刚性棒状,主要受两类因素的影响:结构参数,如分子量和乙酰度;溶液性质,如溶液离子强度、溶剂、溶液的温度和 pH 等^[1]。其中分子量和乙酰度是决定壳聚糖物理化学性质和生物活性的关键因素。分子量能够诱导构象转变,低分子量壳聚糖的分子构象相对于高分子量壳聚糖更加伸展和刚性。增加溶液的离子强度可使分子更加收缩和卷曲^[3]。Chen 等^[4]的研究发现溶液温度对构象转变没有影响。对于乙酰度(DA)对壳聚糖分子构象的影响,存在很多相互矛盾的研究结果:一些研究表明随着增加 DA,壳聚糖分子更加伸展和刚性^[5~7];另外一些研究则显示分子链刚性参数 L_p (分子链持续长度)和 $[\eta]-M_w$ 或 R_G-M_w 的相互关系都对 DA 没有依赖性,说明 DA 对分子构象没有影响^[8,9]。

经常用于表征溶液中壳聚糖分子构象的参数主要包括 Mark-Houwink 指数 a, b, ϵ 和 ν 以及 L_p 、均方回转半径 R_G 和第二维利系数 A_2 ^[10]。这些参数是通过特性粘度、沉降系数、扩散系数和回转半径的对数

高 群 男, 40 岁, 博士, 从事多糖化学修饰研究。E-mail: wityygao@mail.tongji.edu.cn
国家自然科学基金项目(30670596)、中国博士后基金项目、上海市博士后基金项目资助
2008-06-23 收稿, 2008-12-03 接受

对聚合物的分子量作图而求得, 对应的分子构象的表征方法是毛细管粘度法、超速离心分析法、动态和静态光散射法。

壳聚糖分子在溶液中存在着 4 种相互作用力: 范德华力、氢键、疏水作用和静电作用, 它们对分子构象都有不同的影响。壳聚糖一般只能溶解于稀酸溶液中, 是一个阳离子多糖。在酸性溶液中, 壳聚糖上的伯氨基团(NH_2)质子化为 NH_3^+ , 因此分子内和分子间存在着较强的静电相互作用, 很明显, 溶液的离子强度和 pH 对这种相互作用有影响。当增加溶液的离子强度, 反离子将屏蔽质子化氨基, 使分子构象收缩卷曲(图 1 中的球形)。由于壳聚糖分子上含有大量的羟基和乙酰氨基, 因此会形成较强的分子内氢键; 脲能够破坏分子内氢键使分子构象变得伸展(图 1 中的棒形)^[3]。另外, 壳聚糖上的疏水基团如乙酰基团和糖环对于壳聚糖分子的聚集行为具有重要的影响^[11,12]。总结已有的研究表明, 壳聚糖分子在溶液中构象的转变归因于分子内和分子间作用力的变化^[13], 可以从作用力的角度去分析壳聚糖的分子构象及其转变。

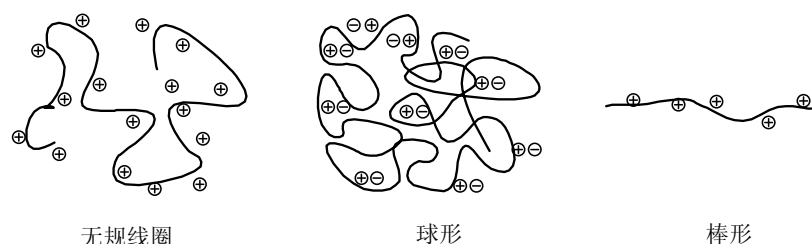


图 1 壳聚糖在稀溶液中的 3 种分子构象

Fig.1 Three molecular conformation of chitosan in dilute solution

1 壳聚糖分子量的影响

研究壳聚糖分子量对分子构象的影响, 首先要制备分子量不同而乙酰度相同的壳聚糖。壳聚糖是一种天然的高分子材料, 分子量可达百万。壳聚糖的降解方法很多, 有酸降解、酶降解、氧化降解等方法, 超声降解是目前常用的不改变壳聚糖化学结构的一种降解方法^[14]。Tsaih 等^[3]采用光散射和粘度法研究稀溶液中壳聚糖分子量对分子构象的影响时发现, 当壳聚糖的分子量大于或等于 223kDa, 壳聚糖的分子构象是无规线圈, 分子量低于或等于 148kDa 分子呈现刚性的棒状构象。分子量诱导的构象发生转变可归因于分子内氢键的不同或大分子和小分子上电荷分布的不同。对于不同分子量的壳聚糖溶液, 高分子量壳聚糖分子比低分子量分子更易缠结, 高分子量壳聚糖分子间会形成更多的氢键相互作用。

然而, Tsaih 等的研究所使用的合成样品具有较宽的分子量分布($\text{IP} > 2.5$)且乙酰度 DA 与分子量的范围较窄, 导致研究结果有较大的局限性, 不能得出普遍性的规律。Domard 等^[13]为了全面的了解壳聚糖在溶液中的构象和行为, 最大限度地扩展了研究范围(乙酰度 DA 0~70%, 聚合度 DP_w 650~2600), 通过粘度法和静态光散射测定了 DP_w 和 DA 对特性粘度 $[\eta]$ 、 R_G 和 A_2 的影响, 通过 Mark-Houwink 指数 α 和 ν 的变化来判断分子构象的转变。他们的研究表明, 在所研究的分子量范围内, 存在一个临界聚合度 DP_{wc} , 低于 DP_{wc} 时分子链的柔顺性主要受近程相互作用影响, 而高于 DP_{wc} 则远程相互作用起主要作用。临界聚合度受乙酰度的影响(DA 0~70%)而在 DP_w 1800~1300 的范围内变化。具体说: (1)在低于临界聚合度时, 若乙酰度 $\text{DA} < 25\%$, 由于分子链上临近质子化氨基的静电作用使分子链呈伸展的刚性状态; 随乙酰度的增加, 静电作用减弱, 乙酰基团的疏水作用和空间位阻影响增强, 分子链的柔顺性增加; (2)在高于临界分子量时, 排除体积效应是构象变化的主要因素, 随着聚合度增大, 分子链的柔顺性增加; 在低乙酰度($\text{DA} < 25\%$)时是高斯线圈, 乙酰度增加, 受空间位阻的影响, 分子链的刚性增加。

笔者^[15]采用最大气泡压力法研究不同分子量壳聚糖在稀溶液中的表面张力变化的结果显示, 表面张力的变化分成两个阶段: 在浓度低于 $0.01 \times 10^{-2} \text{ kg/L}$ 的极稀浓度时, 高分子量壳聚糖的表面张力随着浓

度增加先降低后增加,低分子量壳聚糖的表面张力则呈现先增加后平缓的趋势。在溶液浓度较高($>0.1 \times 10^{-2} \text{ kg/L}$)时,表面张力随浓度逐渐增加,并且高分子量壳聚糖表面张力的增加幅度明显大于低分子量壳聚糖。

按照 Fowkes^[16]提出的表面张力构成理论,壳聚糖在稀溶液的表面张力主要由氢键、疏水作用和静电作用所决定。壳聚糖分子链上存在的大量 OH 和 NH_2 基团使其分子在水溶液中存在强的氢键和静电相互作用。对于相同乙酰度的壳聚糖,当溶液的离子强度和 pH 相同时,其 NH_2 的质子化程度就相同,氢键便成为影响分子构象的主要作用力。对于某一特定分子量的壳聚糖,随着增加溶液的浓度,更多的分子相互接近和缠结,分子间形成更多的氢键作用,导致壳聚糖分子的内聚能增加,因此表现为表面张力随着溶液浓度的增加而增加。在极稀浓度溶液时,壳聚糖分子间距离较远,分子间的相互作用力很弱,壳聚糖分子的溶液行为与中性多糖(如 ficoll 和葡聚糖)类似,即随着溶液浓度的增加,表面张力适度减小。对于低分子量壳聚糖,由于它们的体积较小,能够更加接近水-汽界面,而高分子量壳聚糖分子距离界面要远一些。这些结果同 Docoslis 等^[17]关于中性多糖表面张力的研究结果相吻合。

对高分子量壳聚糖,在稀溶液中其分子构象是伸展的蠕虫状链。当壳聚糖的浓度超过 $0.01 \times 10^{-2} \text{ kg/L}$,溶液中的分子链开始相互缠结或聚集,分子间产生较强的氢键和疏水相互作用,导致溶液表面张力的增加。低分子量壳聚糖的分子构象呈现刚性的伸展的棒状,其分子的溶液行为更接近于单糖分子,邻近的分子间产生氢键作用,同时当单糖分子相互靠近时产生强烈的静电斥力。在此浓度范围内,当氢键引力和静电斥力达到平衡时表面张力就会维持不变。浓度大于此范围,分子间的相互缠结使得氢键作用增强,导致表面张力增加。据此,笔者认为,对应于表面张力转变的溶液浓度($0.01 \times 10^{-2} \text{ kg/L}$)就是壳聚糖的临界聚集浓度(CAC)。很多研究者已经采用多种方法,如荧光光谱法^[12]、静态光散射^[18, 19]、动态光散射^[20]等对溶液中壳聚糖的聚集行为进行了研究,结果表明壳聚糖在稀溶液中的聚集行为具有浓度依赖性,其临界聚集浓度(CAC)大约是 $0.1 \times 10^{-2} \text{ kg/L}$ 。笔者认为此临界聚集浓度的差别是由于分子量的不同引起的,高分子量的壳聚糖更容易在较低的溶液浓度下发生缠绕和聚集,因此临界聚集浓度(CAC)较低。

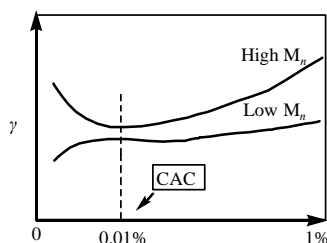


图 2 不同分子量壳聚糖的表面张力随浓度变化^[19]

Fig. 2 Surface tension (γ) versus concentration for different molecular weight chitosans in HOAC solution^[19]

2 壳聚糖乙酰度的影响

壳聚糖分子链由氨基葡萄糖结构单元和乙酰氨基葡萄糖结构单元构成,壳聚糖的物化性质、生物活性和溶液中的分子构象与两种结构单元的比例即乙酰度密切相关。乙酰度的大小导致分子构象转变的主要原因是:(1)改变了壳聚糖分子链上的电荷密度;(2)乙酰基团具有较大的空间位阻效应和疏水性。

壳聚糖的乙酰度对静电作用、疏水作用、氢键和空间位阻效应有不同程度的影响。一方面,大体积的乙酰基团的增加引发的空间位阻作用会增加分子链的刚性,并且倾向于形成更多的氢键和疏水相互作用。另一方面,降低乙酰度意味着分子链上形成更多质子化氨基,分子内的静电斥力的增加会导致分子链更加伸展。这个影响在低浓度时非常明显,在高离子强度时这种静电斥力大部分被反离子的静电屏蔽作用所抑制,分子链又变得卷曲,因此静电作用对链刚性的影响减弱^[21]。

人们对壳聚糖的乙酰度对分子构象的影响已经进行了大量的研究,但众多相互矛盾的研究结果使其仍然存在着争议。Anthonson 等^[6]发现,随着 DA 增加,壳聚糖分子链变得更加伸展和刚性。同样,Wang 等^[5]和 Terbojevich^[7]的研究显示,由于分子链段间氢键的存在使分子链的刚性随 DA 的减小而减小。然而,Errington 等^[22]的研究结果与此相反,他们采用粘度法、超速离心分析技术和动态光散射测定了两种 DA 的壳聚糖的溶液构象,发现 DA=11% 的呈现刚性棒状构象,而 DA=58% 的则呈现柔性的无规线团构象。Rinaudo 等^[8]指出,反映链刚性的相 L_p 以及 $[\eta]$ 、 R_G 对其测定范围内的 DA (2%、11.5% 和 21%) 没有依赖性。Berth 等^[9]的研究也表明当 DA<60% 时,其对分子链的构象没有产生可测量的影响。

为什么会产生这些相互矛盾的结果?笔者认为主要原因是他们研究的壳聚糖的 DA 范围窄,没有全面考虑分子量及分子量分布等因素的以下影响:(1)壳聚糖的乙酰化制备方法对溶液性质的影响:在合成不同 DA 的壳聚糖时,均相或非均相介质中进行的脱乙酰过程和乙酰化过程导致氨基和乙酰基团在分子链上的无规或嵌段分布,这些不同结构的分子链对研究壳聚糖的溶液行为规律和计算 L_p 都有影响。Brugnerotto 等^[23]的研究证实,当壳聚糖分子链上的氨基和乙酰基团分别呈现嵌段、交替和无规分布时, L_p 与 DA 具有 3 种不同的变化规律,例如被反粒子屏蔽的多个氨基链段能增加分子链的柔顺性。因此可以解释有些人制备了相同 DA 的壳聚糖,但由于制备方法的不同,导致壳聚糖溶液性质的测定结果不同的现象;(2)提高分离效果、消除壳聚糖溶液中的聚集对溶液性质测定产生了不利的影响。由于溶液中聚集现象的产生,偏离了实验所采用的稀溶液体系和模型,会导致例如 Zimm 曲线弯曲或 A_2 呈负值,或者 R_G 突然增加,因此,所测定的参数不能代表分子链的真实状态,分子链的刚性被过高估计了。

Sorlier 等^[24]通过均相的乙酰化过程制备了具有近似分子量分布的不同 DA 的壳聚糖,系统研究了 DA 对壳聚糖溶液性质的影响。他们提出了壳聚糖的溶液行为与 DA 关系的一般规律。这个研究结果进一步被 Schatz^[11]、Lamarque^[13]和 Boucard^[25]等的研究所证实。具体是,DA 可以分成 3 个明显的区间对应不同的溶液行为:(1)DA<25%,显示聚电介质行为,分子链具有较高的柔顺性;(2)25%<DA<50%是亲水和疏水作用平衡的过渡区域,分子链的刚性逐渐增强;(3)DA>50%,空间位阻导致的排斥体积效应增加,使分子链的刚性增强,并且疏水作用增强导致有聚集现象产生。同时在每一个区域内,要考虑壳聚糖的分子量的影响。壳聚糖溶液中分子构象可以看作是 DA 和分子量(聚合度 DP_w)的函数,分子构象都可以用近程相互作用和排斥体积效应进行描述^[13]。

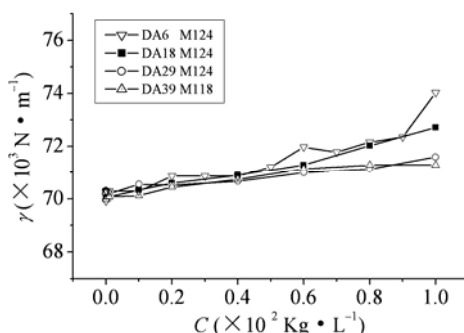


图 3 不同乙酰度的壳聚糖溶液表面张力随浓度的变化^[15]

Fig. 3 Surface tension (γ) versus concentration for chitosans with different DAs in HOAC solution^[15]

笔者^[15]对壳聚糖溶液表面张力的研究表明,虽然 DA 的增加将降低结构电荷密度,静电斥力的减小导致分子链的刚性减小,但这种趋势被乙酰基团的空间位阻作用导致的刚性增加所平衡;而且分子链上乙酰基团的增加有利于形成氢键和疏水相互作用^[11],而这两种作用力对表面张力的影响是相反的,因此,总的作用效果是在浓度低于 $0.6 \times 10^{-2} \text{ kg/L}$ 时壳聚糖的 DA 对表面张力没有明显的影响作用。如果高于此浓度,相对柔顺性高的分子容易相互缠结形成更多的分子间氢键,致使其表面张力比高 DA 分子

有了明显的增加。因此 $DA = 20\%$ 附近是溶液行为的一个分界线, 这个结果与 Schatz 等^[19]的研究结果相吻合。

3 溶液离子强度的影响

研究大分子电解质的溶液行为, 离子强度是一个关键的影响因素。通过加入盐改变溶液的离子强度, 反离子屏蔽分子链上的离子点, 减小了分子链上的静电排斥作用, 使分子链的构象发生变化。根据 Manning 的反离子凝聚理论^[26], 在高离子强度溶液中, 聚电解质分子链上的质子化点大部分被反离子所屏蔽, 导致表观电荷密度减少, 这意味着在高离子强度溶液中, 壳聚糖分子链可以近似看做是中性聚合物分子链, 构象的变化也符合中性聚合物的相关理论。

人们对离子强度对壳聚糖溶液性质和构象的影响进行了深入的研究。Tsaih 等^[3]对稀溶液中离子强度对壳聚糖分子构象影响的研究发现, 随着离子强度的增加, 壳聚糖的分子构象从伸展变得卷曲。在低离子强度时, 第三电粘(the third electroviscous)的影响起主要作用, 使壳聚糖呈现伸展的分子构象。在高离子强度时, 反离子对质子化氨基的屏蔽作用使分子卷曲。当离子强度增加到无穷大, 所有的质子化氨基都被反离子中和, 分子内的静电斥力消失, 所有的壳聚糖分子无论分子量大小都变成紧缩的球形, 当用脲将分子内的氢键消除, 壳聚糖分子又变得伸展。

笔者^[15]采用表面张力研究了离子强度对壳聚糖溶液性质的影响, 结果显示: 对于低 DA 的壳聚糖溶液, 它们具有较高的结构电荷密度, 静电相互作用较强, 呈现典型的聚电介质行为^[19]。在低离子强度溶液中, 第三电粘作用下壳聚糖分子呈现伸展的分子构象, 而高离子强度溶液中, 由于反离子的静电屏蔽作用使分子构象卷曲。伸展的蠕虫状链构象相对于收缩的卷曲构象其分子间更易于相互缠结, 形成更多的分子间氢键, 导致其表面张力明显增加。

酸性溶剂对壳聚糖溶液分子构象的影响也可以归结为离子强度的影响。例如盐酸比醋酸在水溶液中能够电离出更多的质子 H^+ 和反离子 Cl^- , 反离子的屏蔽作用使壳聚糖在盐酸溶液中的分子构象相对的收缩卷曲, 并且壳聚糖分子量较大时溶剂的影响要显著一些, 分子量低的受溶剂的影响小一些。Boucard 等^[25]最近采用小角同步 X 射线散射技术证实了反离子影响壳聚糖分子链的本质, 壳聚糖的盐酸盐比醋酸盐有更强的憎溶剂性。这与前面讨论的分子量和离子强度的影响是相符的。

4 结语

壳聚糖是唯一的一种多功能的天然阳离子聚电解质, 除了在农业、食品工业、造纸和水处理等方面获得广泛的工业化应用外, 它作为一种具有良好生物活性的可降解材料, 目前在生物医学、组织工程、药物缓释、细胞及酶的固定化等方面已经进行了广泛的研究和探索。壳聚糖的溶液性质研究特别是溶液构象的研究对于深入的了解壳聚糖与 DNA 药物、细胞和蛋白质等阴离子大分子电解质的相互作用机制具有重要的作用。

虽然对于壳聚糖的分子量、乙酰度和离子强度对其溶液行为的影响已经进行了广泛的研究, 但目前要构建一幅精确的壳聚糖溶液的分子构象图是困难的。壳聚糖的溶液行为(如聚集和构象转变)同分子间或分子内作用力的相互关系还不是很明确; 这些相互作用力难以测定和区分, 需要采用新技术新方法进行进一步的研究; 大分子聚电解质的已有的理论和模型能否应用于壳聚糖溶液还有待于实验的验证。在壳聚糖稀溶液体系中, 由于存在的氢键相互作用、疏水作用和静电作用等各种作用力相互制约, 处于此消彼长的平衡状态。外界条件的各种变化也必然对这种平衡产生一定的影响, 都会引发分子构象的转变。除了上述讨论的乙酰度、分子量和离子强度外, 对壳聚糖分子构象的影响因素还有溶液的浓度、温度和 pH。通过溶液中分子构象和相互作用力的研究, 能够增加我们对分子构象与分子作用力的认识, 也有助于我们对壳聚糖生物活性和作用机理的理解。

参考文献

- [1] P Sorlier, C Viton, A Domard. *Biomacromolecules*, 2002, 3 (6): 1336~1342.
- [2] F J Pavinatto, A Pavinatto, L Caseli et al. *Biomacromolecules*, 2007, 8 (5): 1633~1640.
- [3] M L Tsaih, R H Chen. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1997, 20 (3): 233~240.
- [4] R H Chen, M L Tsaih. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1998, 23 (2): 135~141.
- [5] W Wang, S Q Bo, S Q Li et al. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1991, 13 (5): 281~285.
- [6] M W Anthonsen, K M Vårum, O Smidsrød. *Carbohydr. Polym.*, 1993, 22 (3): 193~201.
- [7] M Terbojevich, G Cosani, G Conio et al. *Carbohydr. Res.*, 1991, 209: 251~260.
- [8] M Rinaudo, M Milas, P L Dung. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1993, 15 (5): 281~285.
- [9] G Berth, H Dautzenberg. *Carbohydr. Polym.*, 2002, 47 (1): 39~51.
- [10] H Cölfen, G Berth, H Dautzenberg. *Carbohydr. Polym.*, 2001, 45 (4): 373~383.
- [11] C Schatz, C Viton, A. Domard et al. *Biomacromolecules*, 2003, 4 (3): 641~648.
- [12] M M Amiji. *Carbohydr. Polym.*, 1995, 26 (3): 211~213.
- [13] G Lamarque, J-M Lucas, A Domard et al. *Biomacromolecules*, 2005, 6, 131~142.
- [14] G Qun, W Ajun. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2007, 104 (4): 2720~2728.
- [15] Q Gao, A Wan. *Carbohydr. Polym.*, 2006, 64 (1): 29~36.
- [16] C J Van Oss, M K Chaudhury, R J Good. *Chem. Rev.*, 1988, 88 (6): 927~941.
- [17] A Docoslis, R F Giese, C J van Oss. *Colloid. Surface. B*, 2000, 19 (2): 147~162.
- [18] M W Anthonsen, K M Vårum, A M Hermansson et al. *Carbohydr. Polym.*, 1994, 25 (1): 13~23.
- [19] C Schatz, C Pichot, A. Domard et al. *Langmuir*, 2003, 19 (23): 9896~9903.
- [20] E Buhler, M Rinaudo. *Macromolecules*, 2000, 33 (6): 2098~2106.
- [21] G Berth, H Dautzenberg, M G Peter. *Carbohydr. Polym.*, 1998, 36 (3): 205~216.
- [22] N Errington, S E Harding, K M Vårum et al. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1993, 15 (2): 113~117.
- [23] J Brugnerotto, J Desbrieres, M Rinaudo et al. *Polymer*, 2001, 42, 9921~9927.
- [24] P Sorlier, A Denuziere, A. Domard et al. *Biomacromolecules*, 2001, 2 (3): 765~772.
- [25] N Boucard, L David, A Domard et al. *Biomacromolecules*, 2007, 8 (4): 1209~1217.
- [26] G S Manning. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1972, 23: 117~140.