

羟丙基壳聚糖在水溶液中的聚集行为研究

王雪 程晓敏*

(安徽大学化学化工学院, 合肥 230039)

摘 要 在乙酸-水-甲醇体系中, 通过改变乙酸酐用量, 对壳聚糖进行乙酰化反应, 再以异丙醇为溶剂, 环氧丙烷与碱化后的 *N*-乙酰化壳聚糖反应制备了不同脱乙酰度(DD 98% ~ 55%) 的羟丙基壳聚糖(HPCS)。核磁和红外光谱结果表明, 羟丙基化的取代过程主要发生在 C3-OH 和 C6-OH 上。采用带有光散射检测器的凝胶渗透色谱(GPC-MALS)、动态光散射(DLS)、荧光光谱法和原子力显微镜(AFM) 研究了 HPCS 在水溶液中的聚集行为。结果表明, 在水溶液中, HPCS 主要以单链分子和聚集体形式存在。HPCS 中乙酰基的相对含量影响临界聚集浓度(CAC), DLS 测得 DD 为 98% 和 75% HPCS 的 CAC 值分别为 1.09 和 1.67 mg/mL, 与荧光探针法基本一致。水溶液中, HPCS 聚集体存在两种分布, 一种为成膜堆砌高度低于 13 nm, 轮廓长度约为 70 ~ 200 nm 的小尺寸聚集体, 占大多数; 另一种成膜堆砌高度约为 13 ~ 31.4 nm, 轮廓长度约 200 ~ 610 nm 的大尺寸聚集体, 约占 20%。

关键词 羟丙基壳聚糖; 光散射; 聚集行为

1 引 言

壳聚糖是甲壳素脱乙酰化后形成的功能化多糖, 具有良好的生物相容性、生物降解性及无毒性, 并被广泛应用于医药、化妆品、食品添加剂等领域^[1-3]。由于壳聚糖在应用时很多情况下须溶解在弱酸溶液中, 壳聚糖产品的性能与其分子结构和溶液性质有重要的关系, 壳聚糖在溶液中聚集行为的研究受到了广泛关注。壳聚糖具有交联聚集的特性, 在分析化学领域也常用作吸附剂^[4]。Wu 等^[5]采用动态光散射法研究了壳聚糖水溶液中扩散系数与分子量的关系, 具有伸展链构象的壳聚糖倾向形成聚集体, 甚至在低分子量电解质的存在下仍可以发生聚集。Yanagisawa 等^[6]采用尺寸排除色谱-多角度光散射法研究了不同分子量和不同脱乙酰度壳聚糖的溶液性质。壳聚糖溶液中残余微量的乙酰基团(低至 2%) 就能够引起聚集体的产生, 导致溶液的非均一性, 且无法避免或去除。

由于壳聚糖不溶于水和许多有机溶剂, 在很大程度上限制了它的应用。人们通过烷基化、羧甲基化和季氨化等多种化学改性反应得到水溶性的壳聚糖衍生物^[7-9]。羟丙基壳聚糖(HPCS) 是一种重要的壳聚糖衍生物, 具有良好的水溶性、抗菌和抗凝等特点, 广泛应用于药物、皮肤修复和组织工程等领域^[10-13]。目前, HPCS 的相关研究多集中在制备方法^[10, 14-16]和应用^[11-13]等方面, 而在中性水溶液中聚集行为的研究尚未报道。为了更好地拓展 HPCS 在生物领域, 特别是药物传输方面的应用, 研究其聚集行为是至关重要的^[17-19]。

本实验制备了不同脱乙酰度的 HPCS, 用红外光谱及核磁共振探究了其微观结构; 采用带有光散射检测器的凝胶渗透色谱(GPC-MALS)、动态光散射(DLS)、荧光光谱法和原子力显微镜(AFM) 研究了 HPCS 在水溶液中的聚集行为, 为 HPCS 在医药领域的应用提供依据。

2 实验部分

2.1 试剂

壳聚糖(生化试剂, 成都市科龙化工试剂厂); 1, 2-环氧丙烷、异丙醇、甲醇、乙醇、丙酮、氨水、乙醚、冰醋酸等(分析纯, 国药化学试剂有限公司); NaCl(色谱纯, 天津光复科技发展公司); 苾(95% , 萨恩化

2015-05-20 收稿; 2015-08-10 接受

本文系安徽省绿色高分子重点实验室和教育部创新团队培育计划资助项目

* E-mail: xmcheng@adu.edu.cn

学技术有限公司); 实验用水均为超纯水。

2.2 不同脱乙酰度羟丙基壳聚糖的制备

参照文献 [20] 通过改变乙酸酐和壳聚糖的摩尔比(约为 0 ~ 0.6), 制备脱乙酰度为 98%, 88%, 75%, 67% 和 55% 的壳聚糖, 编号为 CS-R (R = 1 ~ 5)。产物置于 40℃ 真空烘箱中干燥 24 h。

不同脱乙酰度羟丙基壳聚糖的合成路线见图 1。在三颈瓶中加入 2 g CS, 5 mL 40% (w/V) NaOH 和 20 mL 异丙醇, 室温下搅拌碱化 1 h, 然后加入 5 mL 9% (V/V) 的四甲基氢氧化铵和 20 mL 环氧丙烷, 室温下搅拌 30 min 后升温至 60℃, 搅拌反应 6 h, 反应结束后用 15% (V/V) HCl 溶液中和至中性, 用丙酮沉淀出产物, 并多次洗涤沉淀物。最后, 真空干燥至恒重。即可得到不同脱乙酰度的羟丙基壳聚糖 HPCS-R (R = 1 ~ 5)。

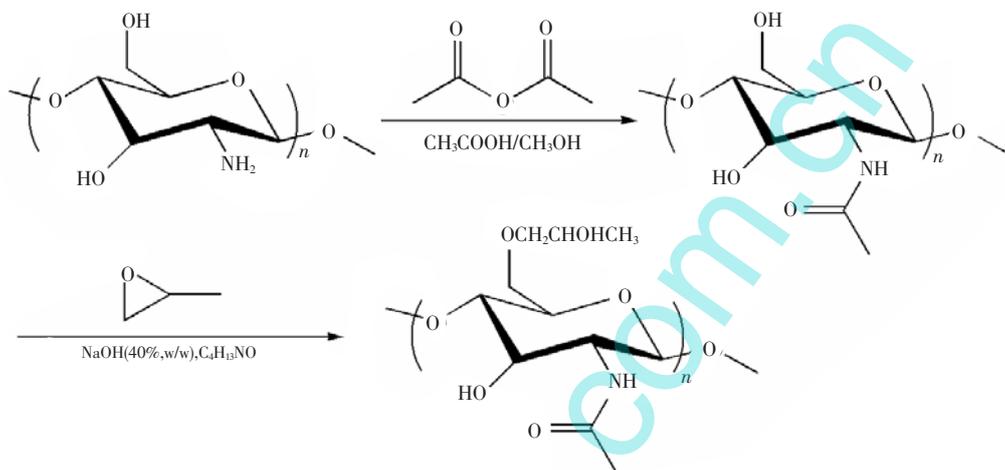


图 1 不同脱乙酰度羟丙基壳聚糖的合成路线

Fig. 1 Synthesis procedure of hydroxypropyl chitosans (HPCS) with different degrees of deacetylation (DD) values

2.3 HPCS 结构表征

NEXUS-870 型傅里叶变换红外仪(美国尼高利公司): KBr 压片法, 波长扫描范围在 4000 ~ 500 cm^{-1} , 分辨率 4 cm^{-1} 。Bruker 400 MHz 型核磁共振仪(NMR, 瑞士布鲁克公司): 以重水(D_2O)为溶剂, 四甲基硅烷(TMS)为内标。

2.4 HPCS 聚集行为研究

GPC-MALS-RI 体系(美国 Wyatt 公司), 主要包括凝胶渗透色谱柱(GPC)、DAWN HELEOS-II 多角激光光散射检测器(MALLS)和 Optilab Rex 型示差检测器(RI), 采用 AstraV 软件处理数据。样品浓度为 2 mg/mL (w/V), 进样量 50.0 μL , 激发波长 658 nm, 以 0.1 mol/L NaCl 溶液为流动相, 流速 0.5 mL/min, 测试温度 25℃。

Hitachi F-7000 型荧光光谱仪(日本 Hitachi 公司): 1 cm 石英池, 激发狭缝和发射狭缝带宽均为 5 nm, 激发波长 337 nm, 发射光波范围 360 ~ 440 nm, 扫描速度 300 nm/min。芘在水中的最终浓度 6.0×10^{-7} mol/L。

CSPM500 型原子力显微(AFM)(中国纳米本原): 测试膜尺寸为 10 mm \times 10 mm。采用轻敲模式在大气环境、室温下进行成像观察。

3 结果与讨论

3.1 不同脱乙酰度羟丙基壳聚糖的微观结构

3.1.1 红外图谱分析 由不同脱乙酰度壳聚糖的 FT-IR 光谱图(图 2a)可见, 壳聚糖乙酰化后, 保持在 3450 cm^{-1} 处的 O—H 与 N—H 的伸缩振动重叠而成的宽峰。2920 cm^{-1} 附近甲基或次甲基的 C—H 伸缩振动吸收峰增强, 1655 和 1310 cm^{-1} 处出现了较为明显的酰胺(I)和酰胺(III)特征峰, 1550 cm^{-1}

出现了新的酰胺(II)特征峰。说明壳聚糖发生了乙酰化反应。此外,随着乙酰度的增加,1600 cm^{-1} 处的 $-\text{NH}_2$ 吸收峰强度逐渐减弱,说明壳聚糖的乙酰化主要发生在 $-\text{NH}_2$ 上。图 2b 为羟丙基壳聚糖 (HPCS-5) 的 FT-IR 光谱图。对比 CS-5, HPCS-5 在 2973 和 1376 cm^{-1} 处出现新峰,分别属于 $-\text{CH}_3$ 中的 C—H 伸缩振动吸收峰和弯曲振动峰,表明 CS 与环氧丙烷反应后,CS 分子链上引入了 $-\text{CH}_3$ 。另外,1030 和 1160 cm^{-1} (分别归属于 CS 上 3-OH 和 6-OH 的 C—O 振动吸收峰) 消失,表明羟丙基化取代过程主要发生在 $\text{C}_3\text{—OH}$ 和 $\text{C}_6\text{—OH}$ 上。

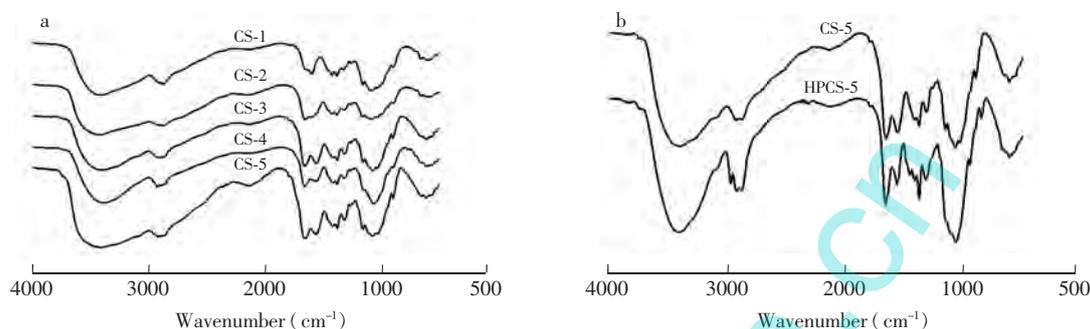


图 2 (a) 不同脱乙酰度壳聚糖和 (b) 羟丙基壳聚糖的红外谱图

Fig. 2 FTIR spectra of (a) chitosan (CS) with different DD values and (b) HPCS

3.1.2 核磁氢谱分析 由 HPCS 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图(图 3)可知 $\delta = 1.1$ 附近出现了明显的 $-\text{CH}_3$ 质子峰,证明在壳聚糖分子链上引入了羟丙基^[8]; $\delta = 2.02$ 处是甲壳素脱乙酰化不完全残留的乙酰基 $-(\text{OCCH}_3)$ 的甲基质子峰 $\delta = 2.56 \sim 2.81$ 是 C_2 上 H 的振动吸收峰; $\delta = 3.57 \sim 3.9$ 归属于 $\text{C}_3\text{—C}_8$ 上 H 的振动吸收峰。

3.2 CPC-MALS-RI 信号分析

由不同脱乙酰度 HPCS 样品的激光光散射 (LS) 和示差指数 (RI) 信号(图 4)可见,RI 信号为单峰,而 LS 信号中则含有两个峰。HPCS-1 的 LS 信号中,高淋洗体积(约为 7.2 mL)处的峰代表 HPCS 的单链分子。低淋洗体积(约为 5.5 mL)处的小肩峰对应的 RI 示差信号峰很小,这种 LS 和 RI 信号之间不匹配的关系意味着其溶液体系具有不均一性。与之类似,HPCS-2~5 样品的 LS 和 RI 信号也呈现了类似现象,说明 HPCS-2~5 水溶液同样具有不均一性,存在聚集体。随着 HPCS 分子中乙酰基含量的增加 (HPCS-2→HPCS-5) 聚集体的峰面积增大,分子量范围为 $3.16 \times 10^5 \sim 8.35 \times 10^5$ g/mol; 而单链分子的峰面积减小,分子量范围为 $1.13 \times 10^5 \sim 1.75 \times 10^5$ g/mol,但 RI 信号峰面积基本没有变化。说明聚集体的存在与 HPCS 中乙酰基的含量有关。乙酰基含量越高,聚集体数目越多。

3.3 光散射强度分析

当溶液中高分子链发生聚集时,随着聚集体数不断增加,光散射强度会不断增强。因此利用散射光强度-溶液浓度曲线中的突变点可以确定临界聚集浓度。HPCS 光散射强度随浓度变化的关系见图 5。

利用曲线中的突变点得到 HPCS-1 和 HPCS-3 的 CAC 分别为 1.09 和 1.67 mg/mL。由此可见,HPCS 的 CAC 值随乙酰基团量的增加而增大。结果表明,疏水基团 *N*-乙酰基团含量增加,促进了 HPCS 的聚集。可能是因为 HPCS 分子链上羟丙基、氨基及羟基的存在,使分子间形成较强的氢键,同时疏水

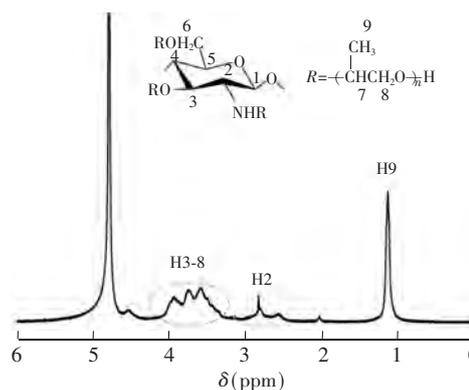


图 3 羟丙基壳聚糖的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图

Fig. 3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of HPCS

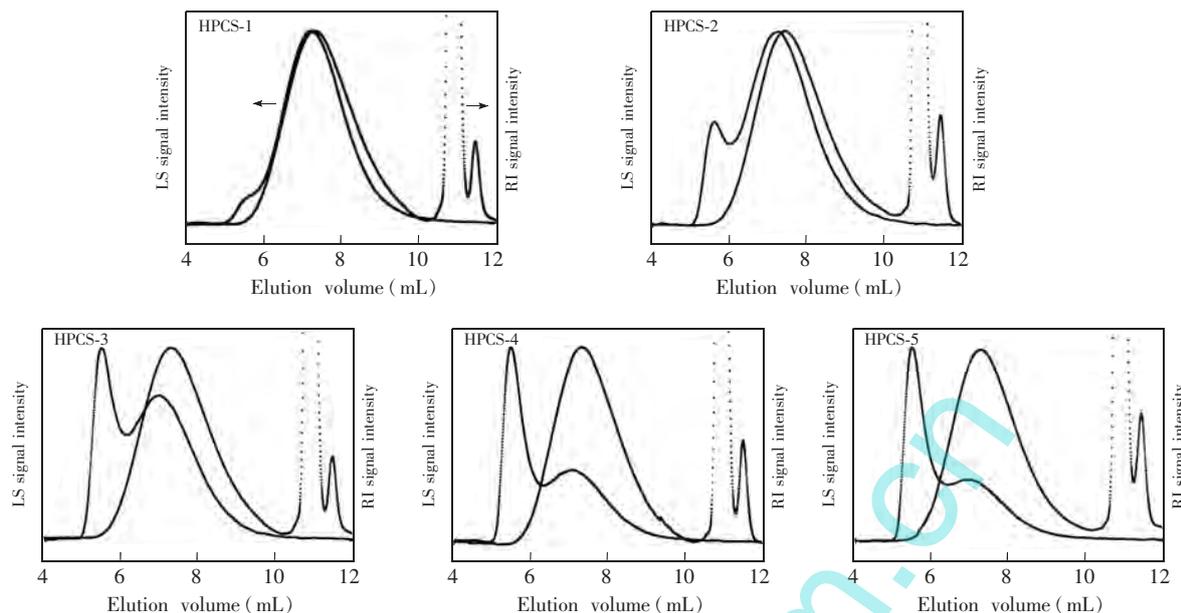


图 4 不同脱乙酰度 HPCS 光散射 (LS) 和相对示差 (RI) 检测器的 GPC 图

Fig. 4 Gel permeation chromatogram (GPC) of HPCS samples with various DD values from light scattering (LS) and refractive index (RI) detectors

基团例如乙酰基和糖苷环之间的相互作用导致 HPCS 聚集。

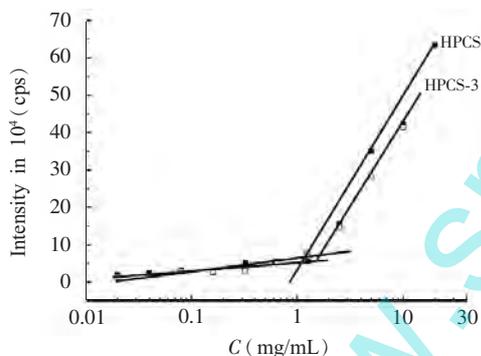


图 5 HPCS 光散射强度随浓度变化图

Fig. 5 Light scattering intensity as a function of HPCS concentration

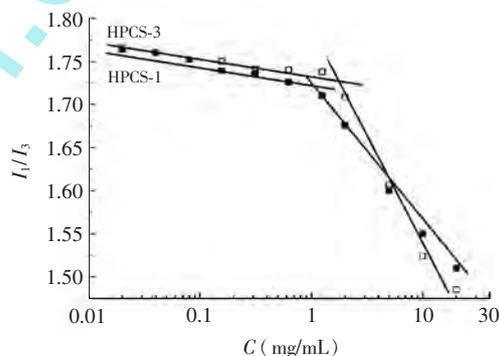


图 6 HPCS 水溶液中 I_1/I_3 值随羟丙基壳聚糖浓度变化图

Fig. 6 Variation of I_1/I_3 with HPCS concentration in aqueous solution

3.4 荧光光谱分析

芘荧光探针法是普遍采用的测定高分子在水溶液中临界聚集浓度的方法。图 6 为芘荧光光谱中羟丙基壳聚糖样品的 I_1/I_3 随浓度变化的曲线。根据芘荧光光谱中的 I_1/I_3 强度比值的水平部分与急剧下降部分的曲线转折点可作为壳聚糖的 CAC^[21], 得到 HPCS-1 和 HPCS-3 的 CAC 分别为 1.05 和 1.73 mg/mL。

综上所述, 动态光散射法可以方便地测定高分子在水溶液中的临界聚集浓度, 且测定结果与芘荧光探针法基本一致。

3.5 AFM 形貌分析

采用 AFM 观测到羟丙基壳聚糖(图 7) 尺寸分布不均匀的聚集体。羟丙基壳聚糖溶液中的聚集体存在两种分布, 一种为高度低于 13 nm, 轮廓长度约为 70 ~ 200 nm 的小尺寸聚集体, 占大多数; 另一种

高度约为 13 ~ 31.4 nm 轮廓长度约 200 ~ 610 nm 的大尺寸聚集体, 约占 20%。Winnik 等^[22] 在研究壳聚糖溶液性质时发现, 壳聚糖存在少量的聚集, 且不同壳聚糖分子很可能通过片段之间的侧向连接发生聚集。羟丙基基团引入壳聚糖分子链并没有改变壳聚糖本身的结构, 所以羟丙基壳聚糖分子间的聚集也是通过片段之间的侧向连接而发生的。

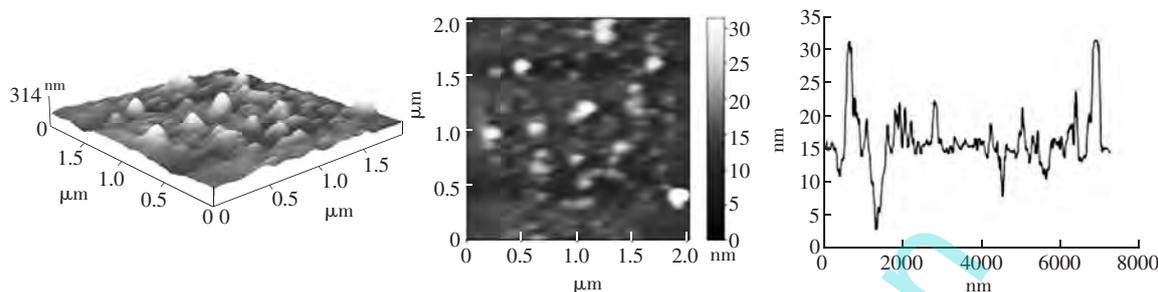


图 7 HPCS 聚集体的 AFM 图

Fig. 7 AFM images of HPCS aggregates

4 结 论

通过改变乙酸酐与壳聚糖的摩尔比, 制备了脱乙酰度为 98% ~ 55% 的 HPCS。GPC-MALS 结果表明, HPCS 在水溶液中可以发生聚集, 且聚集体的存在与 HPCS 所含乙酰基的量有关。通过光散射和稳态荧光光谱法确定了 HPCS 聚集体的 CAC, 两种测量的结果接近, CAC 数值随着 HPCS 中乙酰基含量的增加而增大。在 HPCS 水溶液中, 存在两种不同尺寸的聚集体, 尺寸范围分别为 200 ~ 610 nm 和 70 ~ 200 nm, 其中大尺寸的聚集体, 约占 20%。

References

- 1 Sarvaiya J, Agrawal Y K. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2015**, 72: 454 - 465
- 2 CUI Hong-Min, CHEN Ji, YANG Hua-Ling, WANG Wei, LIU Yu, DENG Yue-Feng, ZHANG Dong-Li. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2014**, 42 (3): 446 - 451
崔红敏, 陈继, 杨华玲, 王威, 刘郁, 邓岳峰, 张冬丽. *分析化学*, **2014**, 42 (3): 446 - 451
- 3 Friedman M, Juneja V K. *J. Food Protect*, **2010**, 73(9): 1737 - 1761
- 4 HUANG Zhong-Hua, SUN Xiu-Yun, LI Yan, GE Wei, WANG Jun-De. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **2005**, 25(5): 698 - 700
黄中华, 孙秀云, 李燕, 葛玮, 王俊德. *光谱学与光谱分析*, **2005**, 25(5): 698 - 700
- 5 Wu C, Zhou S Q, Wang W. *Biopolymers*, **1995**, 35(4): 385 - 392
- 6 Yanagisawa M, Kato Y, Yoshida Y, Isoogai A. *Carbohydr. Polym.*, **2006**, 66(2): 192 - 198
- 7 Sajomsang W, Tantayanon S, Tangpasuthadol V, Daly W H. *Carbohydr. Polym.*, **2008**, 72(4): 740 - 750
- 8 Faizuloev E, Marova A, Nikonova A, Volkova I, Gorshkova M, Izumrudov V. *Carbohydr. Polym.*, **2012**, 89(4): 1088 - 1094
- 9 Fernanda R D A, Sérgio P C F. *Carbohydr. Polym.*, **2009**, 75(2): 214 - 221
- 10 Peng Y F, Han B Q, Liu W S, Xu I X J. *Carbohydr. Res.*, **2005**, 340(11): 1846 - 1851
- 11 Wang Z H, Yan Y B, Jiang Y Y, Li W, Hu X C, Fu B Q, Xia C F, Qin C Q. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2014**, 64: 25 - 29
- 12 Yiang Y, Liu W S, Han B Q, Yang C Z, Ma Q, Song F L, Bi Q Q. *Colloid Surface B*, **2011**, 82(1): 1 - 7
- 13 Wang S L, Liu W S, Han B Q, Yang L L. *Appl. Surf. Sci.*, **2009**, 255(20): 8701 - 8705
- 14 Wan Y, Creber K A M, Peppley B, Bui V T. *J. Polym. Sci. Phys. B*, **2004**, 42(8): 1379 - 1397
- 15 Zhang C, Ping Q N, Ding Y. *J. Appl. Polym. Sci.*, **2005**, 97(5): 2161 - 2167
- 16 Fan L H, Li M J, Gong Y G, Peng K, Xie W G. *J. Appl. Polym. Sci.*, **2012**, 125(2): 829 - 835
- 17 Shi M, Shoichet M S. *J. Biomat Sci-Polym. E*, **2008**, 19(9): 1143 - 1157

- 18 Kwon G S , Forrest M L. *Drug Develop. Res.* ,**2006** ,67(1) : 15 – 22
- 19 LIN Bao-Feng , LI Yan-Ming , ZHOU Yu-Lian , DU Yu-Min. *Acta Polymerica Sinica* ,**2011** ,3(3) : 267 – 273
林宝凤, 黎演明, 周好莲, 杜予民. *高分子学报* ,**2011** ,3(3) : 267 – 273
- 20 Schatz C , Viton C , Delair T , Pichot C , Domard A. *Biomacromolecules* ,**2003** ,4(3) : 641 – 648
- 21 Fee M , Errington N , Jumel K , Illum L , Smith A , Harding S E. *Eur. Biophys. J.* ,**2003** ,32(5) : 457 – 464
- 22 Winnik F M , Winnik M A , Tazuke S. *J. Phys. Chem.* ,**1987** ,91(3) : 594 – 597
- 23 Philippova O E , Volkov E V , Sitnikova N L , Khokhlov A R , Desbrieres J , Rinaudo M. Evgenii V V , Natalia L S , Alexei R K. *Biomacromolecules* ,**2001** ,2(2) : 483 – 490

Study on Aggregation Behavior of Hydroxypropyl Chitosan in Aqueous Solution

WANG Xue , CHENG Xiao-Min*

(College of Chemistry and Chemical Engineering , Anhui University , Hefei 230039 , China)

Abstract Hydroxypropyl chitosan (HPCS) with various degrees of deacetylation (DD 98% – 55%) was successfully prepared by the reaction of pre-basified *N*-acetylchitosan and propylene epoxide with isopropanol as solvent. The acetylations of chitosan at *N*-position were carried out by changing the dosage of acetic anhydride in acetic acid-water-methanol solution. The hydroxypropyl substitution mainly occurred at both C3-OH and C6-OH groups , which was approved by FTIR and ¹H-NMR. The aggregation behavior of HPCS samples was carefully investigated by gel permeation chromatography with multi-angle light scattering (GPC-MALS) , dynamic light scattering (DLS) , fluorescence spectrometry and atomic force microscope (AFM) . The results indicated that HPCS single chains and aggregates were coexistence in aqueous solution. With the increasing content of *N*-acetyl of HPCS , the apparent aggregation number increased. The critical aggregation concentration (CAC) from DLS were 1.09 mg/mL for HPCS with DD 98% and 1.67 mg/mL for HPCS with DD 75% , which were consistent with the results of pyrene probe fluoresce spectrometry. The content of *N*-acetyl groups had an effect on the CAC values. Two types of HPCS (DD 55%) aggregates occurred in aqueous solution. The majority was smaller aggregates with lower than 13 nm in height after film pilling and 70 – 200 nm in length , while the minority (about 20%) was comparatively larger aggregates with about 13 – 31.4 nm in height after film pilling and 200 – 610 nm in length.

Keywords Hydroxypropyl chitosan; Light scattering; Aggregation behavior

(Received 20 May 2015; accepted 10 August 2015)