

甲壳素类液晶高分子研究 ——低分子量壳聚糖溶致液晶性及分子量对液晶临界浓度的影响*

董炎明^{1**} 黄训亭¹ 赵雅青¹ 杨柳林¹ 毛微¹ 毕丹霞¹ 赵连军²

(¹ 厦门大学材料科学与工程系 厦门 361005) (² 济南海得贝海洋生物制品有限公司 济南 250022)

摘要 研究了两种用酶降解法得到的低分子量壳聚糖样品(CS1和CS2)的溶致液晶性.用GPC并辅以质谱法确定了两样品的数均相对分子质量为622和2311 g/mol.在相对分子质量低至622的低分子量壳聚糖(相当于四糖)水溶液中仍发现了溶致液晶现象,并确定出相对分子质量为622和2311的低分子量壳聚糖液晶临界浓度为73%和36%(W/W%),这些结果与已报道的中、高分子量壳聚糖液晶临界浓度随分子量升高而降低的基本规律是一致的.实验结果与经典的KS理论预测值不符,因为低分子量壳聚糖的相对分子质量超过了KS理论对高分子临界浓度的预测范围.

关键词 低分子量壳聚糖, 溶致液晶, 液晶临界浓度

甲壳素是地球上含量仅次于纤维素的天然高分子.它是除蛋白质外数量最大的含氮天然有机化合物,广泛存在于甲壳纲动物虾、蟹的甲壳,昆虫的甲壳,真菌(酵母、霉菌)的细胞壁中^[1].壳聚糖是甲壳素的脱乙酰产物.壳聚糖经过降解得到聚合度小于20的低分子量壳聚糖,又称壳低聚糖或壳寡糖.近来,壳低聚糖越来越受到研究者的关注.因为它具有良好的水溶性、吸湿保湿性和抗菌抑菌作用,而且还有很好的生物活性.据报道聚合度6左右的壳低聚糖,更有许多独特的生理活性,于人体肠道内活化双歧杆菌,抑制大肠杆菌^[2];促进脾脏抗体生长,抑制肿瘤细胞^[3];强化肝脏功能,降低血压,吸附胆固醇;在微酸环境中具有较强的抗菌作用和显著的吸湿保湿力^[4];活化植物细胞,促进植物快速生长^[5]等.

1982年Ogura^[6]等最先发现壳聚糖/10%乙酸溶液在浓度高于40%时有溶致液晶性,此后,大量甲壳素类衍生物的液晶行为被相继报道^[7-16].目前已报道的壳聚糖的液晶性及其分子量影响的研究,涉及的分子量范围都在中高区域^[17-19],而本文所用的壳低聚糖样品的聚合度均小于20(相对分子质量小于3220 g/mol),属严格意义上的壳低聚糖,这一相对分子质量区域的壳聚糖的液晶性很少报道过.人们已知壳聚糖的单糖,即氨基葡萄糖,是没有液晶性的.因而壳低聚糖是否有形成

液晶的能力吸引了我们的研究兴趣.

1 实验部分

1.1 原料与仪器

壳低聚糖为济南海得贝海洋生物工程有限公司提供,以壳聚糖(原料来自阿拉斯加深海雪蟹)经酶法降解得到.两个样品分别以CS1和CS2表示,脱乙酰度分别为83%和88%(核磁共振法).

偏光显微镜为日本Olympus BH2型;液相色谱-离子阱质谱联用仪为美国Esquire 3000 Plus型;阿贝折光仪为日本ATAGO 1T型;核磁共振仪为美国Varian UNITY 500 Hz型;凝胶色谱仪为美国Agilent 1100型;

1.2 实验方法

1.2.1 凝胶色谱法(GPC)测定分子量及分子量分布 用凝胶色谱法测分子量,水相分离柱用Ultra hydrogel™250,温度为30℃,淋洗液为0.2 mol/L HAc-0.1 mol/L NaAc,流速为0.8 mL/min.标样为D-氨基葡萄糖($M = 179$)、壳聚糖三聚体($M = 501$)和普鲁兰($M = 5900, 11800, 22800$).

1.2.2 偏光显微镜观察液晶临界浓度 在1 mL的塑料离心管中配置以间隔1%递增的一系列不同质量百分比浓度的样品/水溶液,搅拌使其溶解均匀,密闭静置1天.观察时取少量溶液于两载玻片间,制成液晶盒,以20℃下偏光显微镜恰

* 2004-07-27 收稿, 2004-12-27 修稿;国家自然科学基金(基金号 20374041),福建省自然科学基金(基金号 E0310002)和福建省重点科技项目(项目号 2004J006)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: ymdong@jingxian.xmu.edu.cn

能观察到双折射的浓度为临界浓度 c^* 。

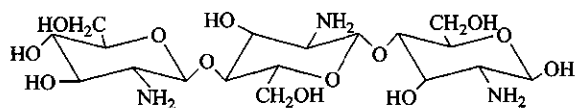
1.2.3 平均折射率法观察临界浓度 按文献[20]方法进行,以钠光灯为光源,在阿贝折射仪的目镜上装一可旋转的偏振片,预先在棱镜的毛玻璃上用丙酮浸湿棉球沿长轴方向摩擦取向.丙酮干后均匀涂上一薄层待测溶液,按文献[21]方法平行测定4次,取平均折射率,以溶液的平均折射率对浓度作图,曲线的拐点处即为临界浓度。

2 结果与讨论

2.1 壳低聚糖分子量的确定

壳低聚糖的分子量不是单一的,仍存在着分布,因而利用 GPC 法以及能扩展到 6000 的离子阱质谱法共同确定样品分子量,以便保证准确性。

作为 GPC 标样之一的壳聚糖三聚体的结构式为:



由计算可知其分子量为 501.其质谱图如图 1.

由质谱图中可以看出,虽然在小于 502.1 的范围外还有一些小峰存在,但仍然只有 502.1 处的峰最强烈,为分子离子峰 $[M + H]^+$,而其他峰应该是碎片所造成的峰,峰小得多.因此在质谱中若把最强的峰视为分子离子峰,忽略其他小的碎片峰,可作为壳低聚糖的绝对分子量测定方法。

CS1 的 GPC 谱图和质谱图如图 2;CS2 的 GPC 谱图和质谱图如图 3.

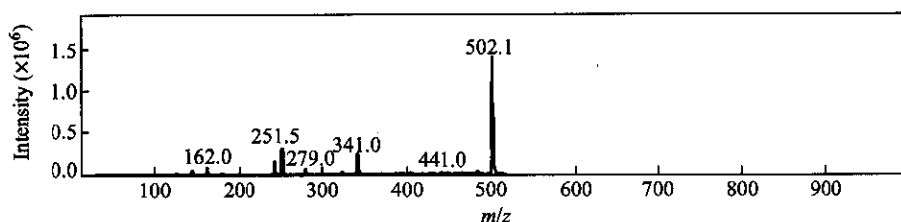


Fig. 1 Mass spectra of trisaccharides

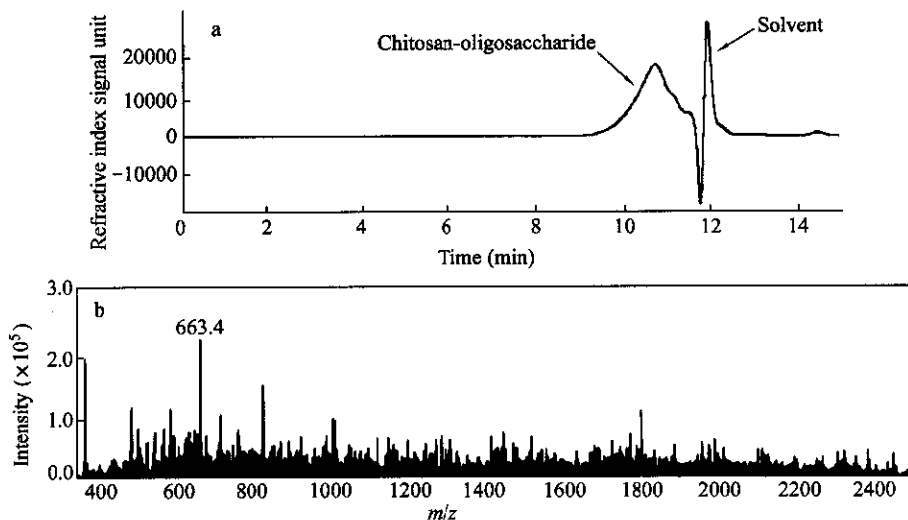


Fig. 2 GPC trace(a) and mass spectra(b) of CS1

从 CS1 的 GPC 谱图(聚合物流出时间的峰值在 10.751 min,而 11.940 min 处为流动相出峰)可得到 $\overline{M}_n = 622$ g/mol, $\overline{M}_w = 946$ g/mol.虽然分布不宽,但两种统计值仍有较大差别,而通过质谱法可以得到最强峰 $[M + H]^+ = 663$,即最可几的绝对分子量应为 662 g/mol,这个结果与 GPC 的结果是一致

的,它相当于 GPC 的峰值处分子量(注:理论上, $\overline{M}_n$ 要比峰值分子量略低).对于低聚糖可见采用 $\overline{M}_n$ 比 $\overline{M}_w$ 更合理,更接近于绝对分子量数值.类似地,从 CS2 的 GPC 谱图得到 $\overline{M}_n = 2311$ g/mol, $\overline{M}_w = 6570$ g/mol,可以看出 CS2 的 GPC 曲线要比 CS1 的 GPC 曲线宽得多.从质谱图上

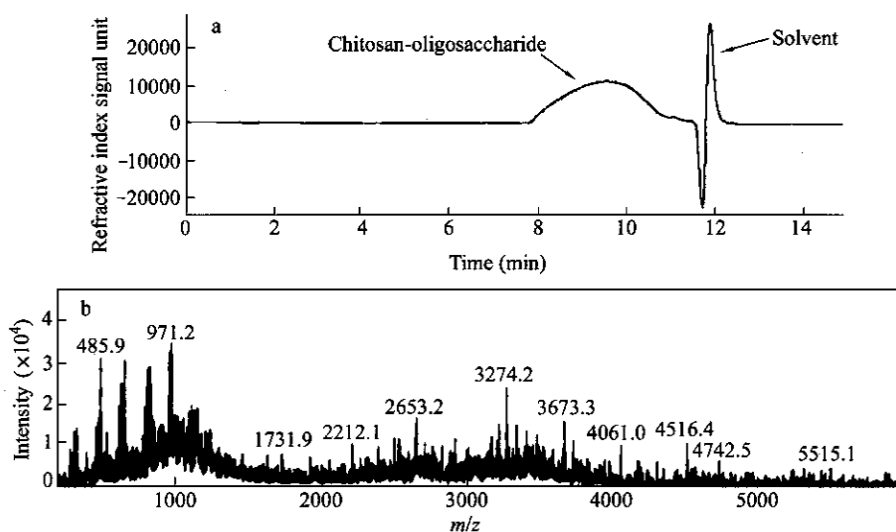


Fig. 3 GPC trace(a) and mass spectra(b) of CS2

明显得到双峰分布,分子量在 970 左右有一个分布,在 3270 左右还有一个分布,但总的范围与 GPC 得到的 $\overline{M}_n$ 比较接近.综合两种方法的结果,为了讨论方便,本文对于 CS1 和 CS2 均采用 GPC 的 $\overline{M}_n$ 的数值(表 1).

Table 1 The molecular masses of CS1 and CS2

Sample	GPC $\overline{M}_n$ (g/mol)	GPC $\overline{M}_w$ (g/mol)	d	MS (g/mol)	Values adapted	Degree of polymerization
CS1	622	946	1.52	662	622	~ 4
CS2	2311	6570	2.84	971, 3274	2311	~ 14

2.2 壳低聚糖的液晶临界浓度

尽管壳聚糖的单糖没有液晶性,但本文发现相对分子质量低至 622 的寡糖(实际上主要是四糖)在水溶液中仍有明显的液晶性.由于其特别好的水溶性,甚至在浓度高达 90% 的水溶液中仍可观察到典型的胆甾相结构.图 4 是 CS1 在 90% 水溶液中出现的平面织构的液晶.与此同时,聚合度稍大的壳低聚糖也有溶致液晶性,图 5 为 CS2 的 60% 水溶液中出现的平面织构液晶.高于临界浓度的其他浓度也观察到相似结构.

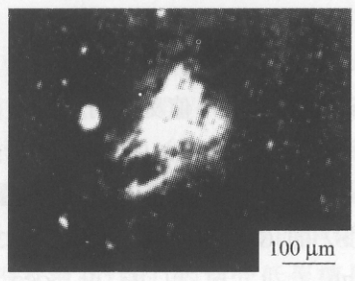


Fig. 4 Photomicrograph of the planar texture observed in the 90 wt% CS1 aqueous solution

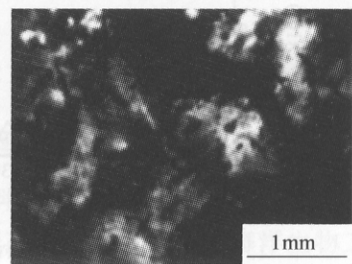


Fig. 5 Photomicrograph of the planar texture observed in the 60 wt% CS2 aqueous solution

我们将偏光显微镜恰能观察到双折射的浓度定为临界浓度,则确定出两个样品的临界浓度分别为 $CS1 = 73 \text{ wt} \%$, $CS2 = 36 \text{ wt} \%$.

临界浓度值进一步用折射率法验证,结果如图 6 所示.可以看到,折射率值随浓度的变化出现拐点,若以该点浓度为液晶临界浓度,则 $CS1 = 72 \%$; $CS2 = 36 \%$.这一结果与显微镜法相符.

2.3 相对分子质量对壳低聚糖临界浓度的影响

对于不同相对分子质量天然高分子的临界浓度的预测,多是采用 Khokhlov 和 Semenov 建立的处理蠕虫链的理论——KS 理论^[22,23].根据 KS 理论,蠕虫状分子出现液晶相时的临界体积分数:

$$V'_2 = \frac{d}{2q} \left[\frac{3.34 + 11.94(L/2q) + 6.34(L/2q)^2}{(L/2q)[1 + 0.586(L/2q)]} \right] \quad (1)$$

式中 $L = L_0 M/M_0$, d 为链直径, L 为链长(轮廓长度), q 为链构象持续长度(对于壳聚糖其 $q = 22 \text{ nm}^{[17]}$).链直径 d 由下式计算:

$$d = \left(\frac{M_0}{\rho \cdot N_A \cdot L_0} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

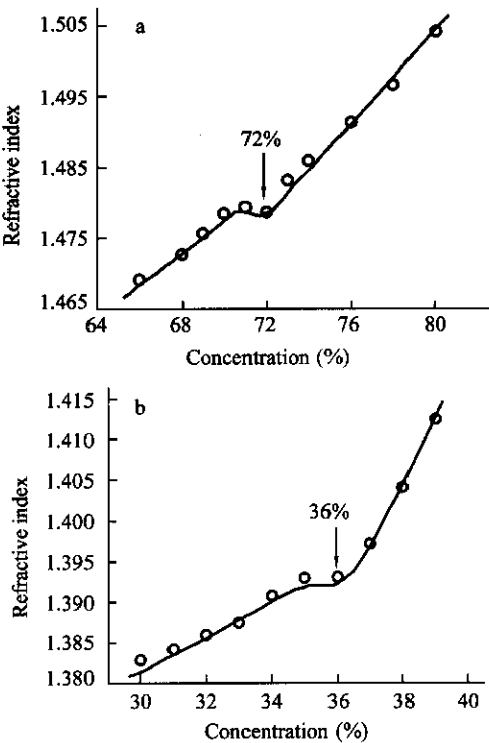


Fig. 6 Measurements of c^* by refractometry for a CS1/water solution (a) and a CS2/water solution (b)

式中 M_0 为重复单元分子量(壳聚糖为 161), ρ 为聚合物密度(壳聚糖为 1.5 g/cm^3), N_A 为 Avogadro 常数, L_0 为重复单元沿链轴方向投影的长度(取壳聚糖晶胞常数 $b = 1.030\text{ nm}^{[24]}$ 的一半). 我们将 KS 理论预测值列于表 2.

Table 2 The calculated data for critical concentration of chitosan and chitosan-oligosaccharides in water according to KS theory

M	$L(\text{nm})$	$L/2q$	$V_2(\%)$	$c^*(\%)$
622(CS1)	1.9896	0.0452	112.2	—
708	2.2647	0.0515	100.0	100.0
1000	3.199	0.0727	74.8	81.7
2000	6.398	0.1454	44.2	54.3
2311(CS2)	7.3923	0.1680	40.00	50.0
2500	7.997	0.1817	38.0	47.9
3000	9.596	0.2181	34.0	43.6
4000	12.795	0.2908	28.88	37.9
5000	15.994	0.3635	25.8	34.3
8000	25.59	0.5816	21.3	28.9
1×10^4	31.988	0.727	19.8	27.0
5×10^4	159.938	3.635	15.3	21.3
10×10^4	319.876	7.27	14.9	20.8
20×10^4	639.752	14.54	14.7	20.5

CS1 和 CS2 的实测值分别比表 2 的理论预测值低了很多,对于相对分子质量低至 622 的壳低聚糖而言,预测值已经超过了 100%,这在实验中是不可操作的.因此,KS 理论已经不适用于壳低聚糖临界浓度的预测.当然,从这两个数据发现,壳低聚糖的临界浓度仍然符合随相对分子质量降低而升高的基本规律.

从表 2 还可以看到,当相对分子质量低至 700 左右 KS 理论算出的预测临界浓度就已经大于 100%,此时就 KS 理论公式其本身就不具有预测的意义了.这一现象应该与其所采用的模型有关. KS 理论所用的模型是 Kratky-Porod 的蠕虫链模型,推导过程中采用了第二维里近似,而这只有在相对分子质量足够大时才正确.壳低聚糖的相对分子质量很低,链也不长,因此不适合用这种模型来描述.

小分子液晶理论只处理清亮点 T_{N-1} , 可以从化学结构预测清亮点,但从文献上和专著^[25,26]上均未查到有小分子溶致液晶临界浓度的理论,可能因为实用的小分子液晶基本上都是热致液晶,溶致液晶只有两亲分子. Onsager 理论、Flory 理论或 KS 理论是从高分子链出发讨论的,因而符合高分子,不符合小分子是正常的.但我们之前的工作^[27]表明,分子量低至 4304 的低聚壳聚糖的临界浓度为 31 wt% ~ 32 wt%,与 KS 理论的预计值 32.1%相符.一般按分子量 1×10^4 为界划分高分子与低分子,也就是说 KS 理论可以用到约 4300 的低聚物范围.因而我们所感兴趣的是 KS 理论还能用到多低分子量的低聚物.本文所研究的 14 糖(分子量约为 2311)的临界浓度值与 KS 理论值已有相当大的偏离,而对于 4 糖(分子量约为 622)则 KS 理论完全不可用.这意味着 KS 理论不仅适用于高分子量壳聚糖临界浓度的预测,还能推广到壳低聚糖的部分范围(已有的实验表明可达到分子量约 4000),分子量再低就可能会出现较大偏差.

这样,本文不仅观察到低分子量壳聚糖有溶致液晶性,而且测定了经典理论不能预测的临界浓度值,为其他天然高分子低聚物液晶行为的评价提供了参考.

REFERENCES

- 1 Jiang Tingda(蒋挺大). Chitin(甲壳素). Beijing(北京): Chinese Chemistry Industry Press(化学工业出版社), 2003. 1 ~ 21
- 2 Kjell M V, Marit W A, Hans G. Carbohydr Res, 1991, 211: 17 ~ 23
- 3 Du Yuguang(杜昱光), Zhang Mingjun(张铭俊), Zhang Hu(张虎). Chinese Journal of microbiology(中国微生物学杂志), 2001, 13(1): 5 ~ 7
- 4 Xia Wenshui(夏文水), Wu Yannan(吴炎楠). Journal of Wuxi Light Industry University(无锡轻工大学学报), 1996, 15(4): 297 ~ 302
- 5 Yan Qin(严钦), Shen Yuxin(沈月新), Wang Zao(王慥). Food Research and Development(食品研究与开发), 2003, 24(2): 26 ~ 29
- 6 Ogura K, Kanamoto T, Sannan T, Tanaka K, Iwakura Y. In: Hirano S, Tokura S, eds. Chitin Chitosan Proceeding International Conference 2nd. Tottori: Jpn Soc Chitin Chitosan, 1982. 39 ~ 44
- 7 Rout D K, Pulapura S K, Gross R A. Macromolecules, 1993, 26: 5999 ~ 6006
- 8 Dong Yanming(董炎明), Li Zhiqiang(李志强), Guo Rong(郭榕). Chem J Chin Univ(高等学校化学学报), 1998, 19(1): 161 ~ 163
- 9 Dong Yanming(董炎明), Li Zhiqiang(李志强). Chemistry(化学通报), 1998, (6): 39 ~ 42
- 10 Dong Yanming(董炎明), Li Zhiqiang(李志强). Chem J Chin Univ(高等学校化学学报), 1998, 19(8): 1343 ~ 1345
- 11 Dong Y M, Yuan Q, Wu Y S, Wang M. J Appl Polym Sci, 2000, 76: 2057 ~ 2061
- 12 Dong Y M, Wu Y S, Wang J W, Wang M. Euro Polym J, 2001, 37: 1713 ~ 1720
- 13 Wu Y S, Dong Y M, Chen L, Huang J Y. Macromol Biosci, 2002, 2: 131 ~ 134
- 14 Wu Y S, Dong Y M, Zhou H, Ruan Y H, Wang H W, Zhao Y Q. J Appl Polym Sci, 2003, 90: 583 ~ 586
- 15 Dong Yanming(董炎明), Wu Yusong(吴玉松), Ruan Yonghong(阮永红), Wang Huiwu(王惠武), Zhao Yaqing(赵雅青). Acta polymerica Sinica(高分子学报), 2003, (4): 509 ~ 512
- 16 Dong Yanming(董炎明), Wu Yusong(吴玉松), Ruan Yonghong(阮永红), Zhao Yaqing(赵雅青), Wang Huiwu(王惠武), Zhou Hua(周花). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2003, (5): 685 ~ 687
- 17 Terbojevich M, Cosani A, Conio G, Marsano E, Bianchi E. Carbohydr Res, 1991, 209: 251 ~ 260
- 18 Hu Zhongming(胡钟鸣), Li Ruixia(李瑞霞), Wu Dacheng(吴大诚), Liu Hongbin(刘洪斌), Sun Yushan(孙玉山), Wu Liheng(吴立衡). Acta polymerica Sinica(高分子学报), 2000, (1): 46 ~ 49
- 19 Dong Y M, Qiu W B, Ruan Y H, Wu Y S, Wang M, Xu C Y. Polym J, 2001, 33: 387 ~ 389
- 20 Tseng S L, Valente A, Gray D G. Macromolecules, 1981, 14: 715 ~ 719
- 21 Huang Yong(黄勇), Chen Mingcai(陈鸣才), Li Lisheng(李历生). Chemistry Communication(化学通讯), 1986, (4): 1 ~ 5
- 22 Khokhlov A R, Semonov A N. Physica, 1981, 108A(2/3): 546 ~ 556
- 23 Khokhlov A R, Semonov A N. Physica, 1982, 112A(3): 605 ~ 614
- 24 Sakurai K, Takahashi T, Kimura K, Takahashi T, Sen-I Gakkashi, 1982, 41(9): T-361 ~ T-368
- 25 Wang Liangyu(王良御), Liao Songsheng(廖松生). Liquid Crystalline Chemistry(液晶化学). Beijing(北京): Chinese Science Press(科学出版社), 1988. 132 ~ 178
- 26 Xie Yuzhang(谢毓章). Liquid Crystalline Physics(液晶物理学). Beijing(北京): Chinese Science Press(科学出版社), 1988. 9 ~ 14
- 27 Dong Y M, Wang H W, Zheng W Y, Zhao Y Q, Bi D X. Carbohydrate Polymers, 2004, 57: 235 ~ 240

STUDIES ON CHITIN-BASED LIQUID CRYSTALLINE POLYMERS

——THE LYOTROPIC LIQUID CRYSTALLINITY OF LOW MOLECULAR WEIGHT CHITOSAN AND
THE INFLUENCE OF MOLECULAR MASS ON CRITICAL CONCENTRATION

DONG Yanming¹, HUANG Xunting¹, ZHAO Yaqing¹, YANG Liulin¹, MAO Wei¹, BI Danxia¹, ZHAO Lianjun²

(¹ Department of Materials Science and Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

(² Haidebei Marine Biological Product Co. Ltd., Jinan 250022)

Abstract The lyotropic liquid crystallinity of two low molecular weight chitosan samples prepared by enzymic decomposition was investigated. The number average molecular masses of those two samples CS1 and CS2 were 622 and 2311 g/mol, measured by means of GPC and MS. The lyotropic liquid crystalline behavior was found for these samples even when the molecular mass was as low as 622 g/mol (~ tetramer). The critical concentration of CS1 and CS2 to form liquid crystalline phase was determined to be 73 wt% and 36 wt% respectively. The results agree with the principle rule deduced from chitosans with high and medium molecular mass, which states that the critical concentration increases with the decrease of molecular mass. However the results were not accordant with those predicted by the traditional Khokhlov-Semenov(KS) theory, because the molecular mass of the samples is out of the region in which KS theory can be used.

Key words Low molecular weight chitosan, Lyotropic liquid crystals, Critical concentration