

壳低聚糖 Cr(III) 离子配合物的制备及其结构表征

许牡丹, 王晓燕

(陕西科技大学生命学院, 陕西 西安 710021)

摘要: 本试验用壳低聚糖与铬(III)离子配合生成壳低聚糖铬(III)离子配合物, 研究 pH 值、温度、底物浓度、时间对结合率的影响。并对其结构进行了初步研究。红外、紫外-可见光谱分析结果表明壳低聚糖与铬(III)能形成稳定的配合物, 其配位的基团是-NH₂基。铬离子的结合率高达 25.04%。

关键词: 壳低聚糖; 配合物; 铬

中图分类号: TS245.9; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)12-0015-05

Preparation and Structure Characterization of Oligo-chitosan Cr(III) Complex

XU Mu-dan, WANG Xiao-Yan

(College of Life Sciences and Engineering, Shanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: A chitooligosaccharide Cr(III) complex was prepared using water soluble chitooligosaccharide and Cr(III) ion as substrates and the effects of four factors, including pH value, temperature, substrate concentration and reaction time, on the forming of the complex were investigated. Structure analysis of the complex with IR and UV-Vis spectrophotometric methods showed that the chitooligosaccharide Cr(III) complex had high stability and formed via the -NH₂ group. The mass percent of Cr reached 25.04%.

Key words: Oligo-chitosan; complex; Cr

壳低聚糖是壳聚糖经水解后产生的一类低聚合度(n一般在2~20)可溶于水的氨基糖类化合物, 其化学结构是由N-乙酰-D-氨基葡萄糖(GlcNAc)和D-氨基葡萄糖(GlcN)通过 β -1,4糖苷键连接起来的均聚或杂聚低聚糖, 不仅具有壳聚糖一些相似的性质, 而且一些生理活性或功能性质更加显著, 这些性质包括壳低聚糖良好的水溶性、保湿增湿性、抑菌抗菌作用、抗肿瘤和促进免疫作用等, 而且它可以依靠氢键或盐键形成具有类似网状结构的笼形分子, 非常容易和金属离子发生配位作用, 且由于其配合物具有独特的物理、化学性质及生物活性而越来越引起了人们的兴趣^[1-3]。三价铬作为葡萄糖耐量因子(Glucose Tolerate Factor)的活性成分, 通过增强胰岛素的功能而起作用。铬与糖尿病关系密切, 缺铬严重的地区糖尿病发病率高。通过壳低聚糖与微量元素的配合而达到补充体内所缺的元素, 目前成为许多人关注的焦点^[4], 但还没有具体研究表明壳低聚糖与铬可以发生配合反应, 本试验详细讨论了影响壳低聚糖与Cr(III)离子配合的各种因素, 并对其进行综合正交试验, 得到

了配合反应的最佳工艺, 即反应的pH为8.5、反应时间为3.5h、反应温度为45℃、底物浓度比为5:1时, 反应条件为最佳, 在此条件下壳低聚糖与Cr(III)离子结合率达25.04%。

1 材料与试剂

壳低聚糖(潍坊盈德甲壳素有限公司); 氯化铬(天津福辰化学试剂厂); 722型分光光度计(上海第三分析仪器厂); PHS-3C型pH计(上海精密科学仪器有限公司); RQUINOX55红外光谱仪(德国布鲁克公司), KBr压片, 754PC紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司); 循环水式多用真空泵(郑州杜甫仪器厂); 电热恒温水浴锅(北京化玻联联医疗器械有限公司)。

2 实验方法

2.1 Cr(III)离子含量的测定方法

本试验采用酸性高锰酸钾法检测配合物中Cr(III)离子含量。

高锰酸钾氧化法测定铬的原理是: 通过硫酸、磷酸消解, 使铬化合物变成可溶性, 并以磷酸掩蔽铁经

收稿日期: 2007-09-04

作者简介: 许牡丹(1961-), 女, 教授, 研究方向: 食品生物技术与分析检测

过离心或过滤分离后,用高锰酸钾溶液将三价(Cr^{3+})氧化成六价铬(Cr^{6+})。用叠氮化钠分解除去溶液中过剩的高锰酸钾。在酸性条件下,铬与二苯碳酰二肼反应生成紫红色化合物,于波长 540 nm 处测定吸光度,计算其含量。公式为: $\text{Cr}^{6+}(\text{mg/L})=m/V$

式中: m -从标准曲线上查得的 Cr^{6+} 量(μg); V -水样的体积(mL)。

2.2 单因素实验

2.2.1 pH 对壳低聚糖 Cr(III)配合反应的影响

取 Cr(III)的浓度为 0.2 mol/L 的溶液 50 mL,加入壳低聚糖 3 g,以 NaOH 调节 pH 分别为 6、7、8、9、10、11、12,置于 40 °C 恒温水浴锅中反应 3 h,反应结束加入等体积的无水乙醇静置 12 h,然后用布什漏斗进行抽滤,烘干后取一定质量的配合物进行测定,计算 Cr(III)离子的结合率。

2.2.2 温度对壳低聚糖 Cr(III)配合反应的影响

取 50 mL Cr(III)浓度为 0.2 mol/L 的溶液,加入壳低聚糖 3 g,以 NaOH 调节至最佳 pH,分别置于 35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C 恒温水浴锅中搅拌反应 3 h,反应结束加入等体积的无水乙醇静置 12 h,然后用布什漏斗进行抽滤,烘干后取一定质量的配合物进行测定,计算 Cr(III)离子的结合率。

2.2.3 底物浓度对壳低聚糖 Cr(III)配合反应的影响

取 50 mL Cr(III)的浓度为 0.2 mol/L 的溶液,以 NaOH 调节至最佳 pH,向反应液中加入不同质量的壳低聚糖调节反应物底物浓度分别为 2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%,置于最佳温度恒温水浴锅中反应 3 h,反应结束加入等体积的无水乙醇静置 12 h,然后用布什漏斗进行抽滤,烘干后取一定质量的配合物进行测定,计算 Cr(III)离子的结合率。

2.2.4 反应时间对壳低聚糖 Cr(III)配合反应的影响

取 50 mL Cr(III)浓度为 0.2 mol/L 的溶液,以 NaOH 调节至最佳 pH,向反应液中加入一定质量的壳低聚糖使其达到最适底物浓度,将反应液置入最适温度的恒温水浴锅中反应,调节反应时间分别为 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h。反应结束加入等体积的无水乙醇静置 12 h,然后用布什漏斗进行抽滤,烘干后取一定质量配合物进行测定,计算 Cr(III)离子结合率。

2.3 正交试验

经过单因素试验确定了各单因素对壳低聚糖 Cr(III)配合物反应的影响。但他们的综合影响并不一定是各自最佳条件的简单叠加,因此,本次试验拟通过正交试验来确定最佳工艺参数。

2.4 结构分析

取 50 mL Cr(III)的浓度为 0.2 mol/L 的溶液,在正交试验确定的最适条件下让其反应,反应结束加入等体积的无水乙醇静置 12 h,然后用布什漏斗进行抽滤,烘干后取一定质量的配合物进行红外、紫外光谱分析,分析其结构及参与发生配位反应的基团。

3 结果与讨论

3.1 铬标准曲线的制备

3.1.1 0.01 mg Cr/mL $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 标准溶液的配制:精称 0.1414 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶解于小烧杯中转移到 500 mL 容量瓶中。吸取此溶液 10 mL,稀释定容到 100 mL 容量瓶中。

3.1.2 氧化:分别移取 0 mL、1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL 0.01 mg Cr/mL 的标准溶液,分别加 50 mL 蒸馏水。加 1:1 硫酸 0.5 mL (10 滴) 加 1:1 磷酸 0.5 mL (10 滴) 加热煮沸,加 2 滴 4% 高锰酸钾煮沸 3 min 不褪色,如紫色消退,则继续滴加高锰酸钾溶液至保持紫红色。取下冷却。

3.1.3 褪色:冷却后,加入 1 mL 20% 的尿素溶液,摇匀。用滴管加 2% 亚硝酸钠溶液,每加一滴充分摇匀,至紫色刚好消失。

3.1.4 显色:转移到 100 mL 容量瓶中,移取 5 mL 二苯碳酰二肼溶液,边加边摇,并定容摇匀,10 min 后测。

3.1.5 比色测 OD 值:于波长 540 nm 处测定吸光度,计算其含量。曲线方程为: $y=0.0496x+0.002$, $R=0.9996$

3.2 单因素实验

3.2.1 pH 值对结合率的影响

取 Cr(III)的浓度为 0.2 mol/L 的溶液 50 mL,加入壳低聚糖 3 g,调节 pH 值分别为 6、7、8、9、10、11、12,得到壳低聚糖 Cr(III)配合物的结合率分别为 0%、2.57%、18.20%、10.96%、8.91%、7.30%、5.60%。其线性关系图见图 1。

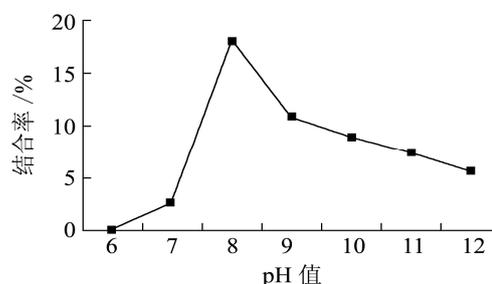


图 1 pH 值对结合率的影响

由图 1 可看出,随着 pH 值的变化,壳低聚糖与 Cr(III)离子结合率发生了显著的变化,当 pH 为 6 时,结合率趋近于 0,当 pH 值向中性方向偏移时,壳低聚糖才与 Cr(III)离子发生了配合反应,当 pH 为 8 时壳

低聚糖与 Cr(III)离子配合物结合率最大, 为 18.20%, 但是继续调节 pH 值至碱性, 结合率反而降低。

3.2.2 温度

取 Cr(III)的浓度为 0.2 mol/L 的溶液 50 mL, 加入壳低聚糖 3 g, 以 NaOH 调节 pH 值为 8, 置于温度分别为 35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C 的恒温水浴锅中反应 3 h。得到壳低聚糖与 Cr(III)离子的结合率分别为 2.82%、18.20%、19.37%、20.56%、12.10%、9.12%、8.87%。其线性关系图见图 2。

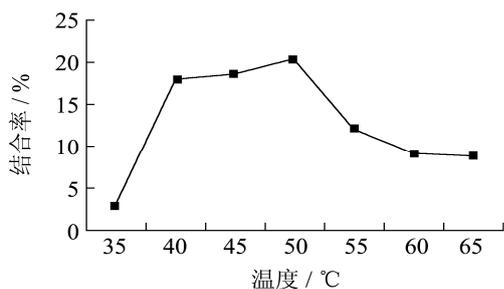


图2 温度对结合率的影响

由图 2 可以看出, 当温度为 35 °C 时, 壳低聚糖与 Cr(III)离子结合率很低, 而当温度上升至 40 °C 时, 壳低聚糖与 Cr(III)离子结合率上升至 18.20%, 温度从 40 °C 上升至 50 °C 时, 壳低聚糖与 Cr(III)离子结合率变化得较为平缓, 当温度为 50 °C 时壳低聚糖与 Cr(III)离子配合物结合率最大, 为 20.56%, 而当温度继续上升时, 壳低聚糖与 Cr(III)离子的结合率则开始下降, 至 65 °C 时再度趋于平缓。

3.2.3 底物浓度

取 Cr(III)的浓度为 0.2 mol/L 的溶液 50 mL, 向反应液中加入不同质量的壳低聚糖调节反应物底物浓度分别为 2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%, 以 NaOH 调节 pH 值为 8, 置于 50 °C 恒温水浴锅中反应 3 h, 得到壳低聚糖与 Cr(III)离子结合率分别为 8.78%、18.18%、22.55%、20.56%、18.33%、14.23%、5.74%, 其线性关系图见图 3。

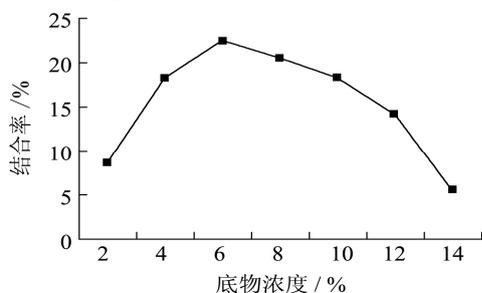


图3 底物浓度对结合率的影响

由图 3 可以看出, 开始时随着底物浓度增大, 壳低聚糖与 Cr(III)离子结合率升高当底物浓度为 6% 时壳低聚糖与 Cr(III)离子配合物结合率最大, 为 22.55%,

但此时底物浓度继续增大, 壳低聚糖与 Cr(III)离子结合率反而开始下降, 因此选定壳低聚糖与 Cr(III)离子配合反应的最适底物浓度为 6%。

3.2.4 反应时间

取 Cr(III)的浓度为 0.2 mol/L 的溶液 50 mL, 加入壳低聚糖 3 g, 以 NaOH 调节 pH 值为 8, 置于 50 °C 恒温水浴锅中反应, 调节反应时间分别为 0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h 时, 得到壳低聚糖与 Cr(III)离子结合率分别为 12.32%、17.88%、21.90%、22.55%、22.14%、19.27%、17.70%, 其线性关系图见下图 4。

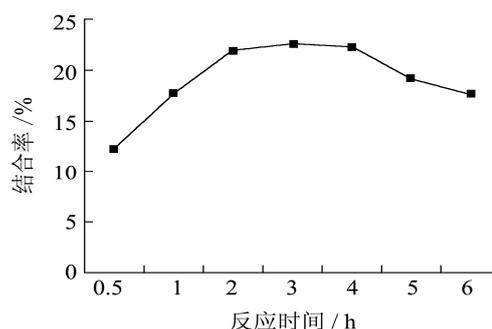


图4 时间对结合率的影响

由图 4 可以看出, 反应开始时, 随着时间的增加, 壳低聚糖与 Cr(III)离子结合率上升明显, 但当反应时间从 2 h 继续增加时, 壳低聚糖与 Cr(III)离子结合率上升缓慢, 当反应时间为 3 h 时壳低聚糖与 Cr(III)离子配合物结合率最大, 为 22.55%, 而当反应时间从 3 h 增加至 4 h 时, 结合率基本不变, 继续增加反应时间, 壳低聚糖与 Cr(III)离子结合率反而下降, 由此得出反应最佳时间为 3 h。

表 1 正交试验结果

实验号	操作者	pH	温度/°C	底物浓度		结合率	
				/%	时间/h	/%	/%
1	-	7.5	45	4	2.5	21.49	
2	-	7.5	50	6	3	16.69	
3	-	7.5	55	8	3.5	25.04	
4	-	8	45	6	3.5	22.82	
5	-	8	50	8	2.5	15.47	
6	-	8	55	4	3	13.73	
7	-	8.5	45	8	3	22.71	
8	-	8.5	50	4	3.5	24.66	
9	-	8.5	55	6	2.5	20.83	
K ₁		21.07	22.34	19.96		19.26	
K ₂		17.04	18.94	20.11		18.71	
K ₃		22.93	19.86	21.07		23.67	
R		5.89	3.4	1.11		4.96	
优水平	A3	B1	C3	D3			

3.3 正交试验确定壳低聚糖 Cr(III)离子配合反应的最佳工艺条件

从表 1 可知：各因素极差之大小 $R_A > R_D > R_B > R_C$ ，四种因素影响甲壳低聚糖 Cr(III)配合物配合的次序顺序为 A→D→B→C。即主要因素是：反应 pH、反应时间和反应温度；次要因素是底物浓度。各因素的最优水平组是：A₃B₁C₃D₃，即反应的 pH 为 8.5、反应时间为 3.5 h、反应温度为 45 ℃、底物浓度为 8%，在此水平下，壳低聚糖与 Cr(III)离子配合物结合率达到 25.04%。

3.4 以红外光谱及紫外光谱进行结构分析结果

3.4.1 红外光谱分析

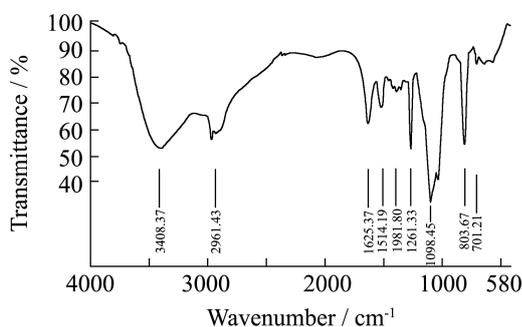


图 5 壳低聚糖标准样品的红外光谱图

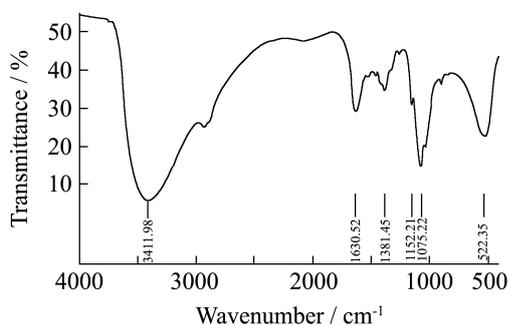


图 6 壳低聚糖 Cr(III)配合物红外光谱图

取 Cr(III)的浓度为 0.2 mol/L 的溶液 50 mL，加入壳低聚糖 4 g，以 NaOH 调节 pH 值为 8.5，置于 45 ℃ 恒温水浴锅中反应 3.5 h，反应结束加入等体积的无水乙醇静置 12 h，然后用布什漏斗进行抽滤，烘干后取一定质量的配合物进行红外光谱检测，同时取一定质量的壳低聚糖标准样品进行红外光谱检测，对比两个谱图，结果如下。

由图 5、6 可以看出，配合物在 3000~3500 cm^{-1} 之间的宽峰变窄，且在 3000~3200 cm^{-1} 的缔合峰消失，在 1615 cm^{-1} 处 δNH 弯曲振动减弱，1150 cm^{-1} 的 C-N 收缩峰强度减弱，1410 cm^{-1} 处的 C-N 峰也消失，说明 NH_2 基中的原子参加了配位作用，形成较强的氮-金属 (N-M) 键。在 1050 cm^{-1} 处的 C-OH 峰强度和位置无明显变化，说明羟基的配位作用不强。

3.4.2 紫外光谱分析

取 Cr(III)的浓度为 0.2 mol/L 的溶液 50mL，加入壳低聚糖 4 g，以 NaOH 调节 pH 值为 8.5，置于 45 ℃ 恒温水浴锅中反应 3.5 h，反应结束加入等体积的无水乙醇静置 12 h，然后用布什漏斗进行抽滤，烘干后取一定质量的配合物按酸性高锰酸钾法进行试验，显色后对其进行紫外光谱分析，对样品为铬标准溶液。紫外-可见光谱扫描图如下：

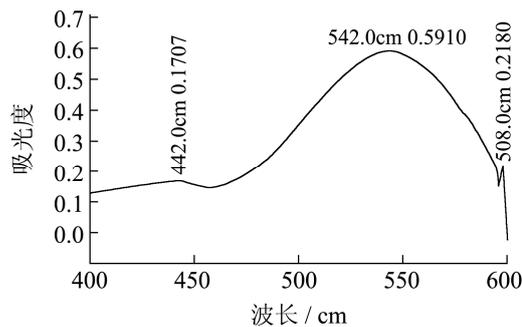


图 7 铬标准溶液紫外光谱扫描图

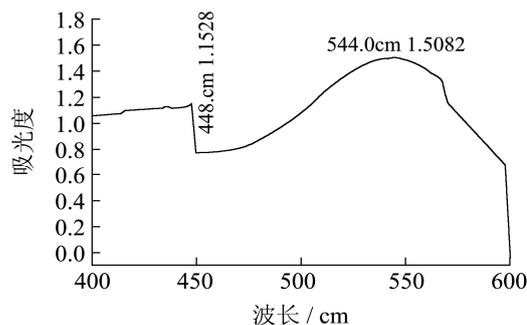


图 8 配合物消化后紫外光谱扫描图

由图可知配合物中铬的紫外-可见图谱在 544.0 nm 处有一较强的吸收峰，吸收峰发生明显变化的紫移 (542.0 nm~544.0 nm)。这是由于配合物中分子内电子跃迁所需能量较高，表明了配位作用的发生，说明铬离子与壳低聚糖发生了配合反应。

4 结论

4.1 试验表明：壳低聚糖可与 Cr(III)离子发生配合反应并形成稳定的配合物，影响壳低聚糖 Cr(III)配合物的因素依次为：反应的 pH 值 > 反应时间 > 反应温度 > 底物浓度。

4.2 通过单因素试验和正交试验，确定出了壳低聚糖 Cr(III)离子配合反应最佳工艺条件为：pH 为 8.5、反应时间为 3.5 h、反应温度为 45 ℃、底物浓度为 5，壳低聚糖 Cr(III)配合物结合率最大，为 25.04%。

4.3 通过红外及紫外-可见光谱分析，可验证壳低聚糖与 Cr(III)离子确实发生了配位反应，且主要为 NH_2

(下转第 22 页)