第 25 卷,第 6 期　　光 谱 实 验 室　　Vol. 25, No. 6
2008 年 11 月　　Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory　　November, 2008

壳聚糖与甲基橙探针试剂的相互作用①

邹建军[b]　赵弟海[b]　曾延波[a]　李 蕾②[a,b]
a(嘉兴学院生物与化学工程学院　浙江省嘉兴市越秀南路 56 号　314001)
b(江西理工大学化学与材料学院　江西省赣州市　341000)

摘　要　以吸收光谱法研究了在pH= 2.0, 壳聚糖(CTS) 与甲基橙(MO) 的相互作用机理。结果表明, CTS 与光谱探针MO 主要是通过静电作用形成CTS-MO 复合物, 考察了MO/CTS 摩尔比对反应体系的影响, 实验测得CTS 与MO 的最大结合数N_E 为6.17×10³, 理论模型预测最大结合数N_C 为6.13×10³, 实验值与理论值一致, 验证了壳聚糖与光谱探针试剂相互作用的理论模型的合理性。

关键词　壳聚糖, 甲基橙, 紫外可见光光谱, 相互作用。
中图分类号: O657.32　　文献标识码: A　　文章编号: 1004-8138(2008)06-1199-05

1　引言

生物活性大分子、多糖等与有机小分子探针试剂的相互作用及其机理是近年来化学、临床医学及生命科学中研究的热点之一。壳聚糖(CTS) 是自然界中惟一的碱性多糖, 安全无毒, 分子中含有丰富的亲水性氨基和羟基, 具有良好的生物活性、生物相容性、易成膜性和配位性等, 近年来已在许多领域得到了广泛应用。采用有机小分子与生物多糖之间的相互作用, 建立了多糖与光谱探针相互作用的理论模型[1—4]; 高贵珍等采用茜素红S 荧光猝灭法[5]、锌试剂光度法[6] 测定了壳聚糖含量, 并研究了茜素红与壳聚糖的相互作用机理[7]; 谭学才等[8]应用电化学方法研究了茜素红与壳聚糖的相互作用; 张海容等[9] 采用光谱法研究了硫酸酯化壳聚糖与DNA 的相互作用机理。

甲基橙主要应用于酸碱指示剂和生物染色, 但作为多糖分析的探针试剂研究尚未见报道。本文应用紫外可见光谱法研究了壳聚糖与甲基橙相互作用的机理, 有助于深入研究多糖分子与光谱探针相互作用的化学本质。

2　实验部分

2.1　主要仪器和试剂

UV-2550 紫外可见光谱仪(日本岛津公司); DELTA320pH 型酸度计[梅特勒-托利多仪器(上海) 有限公司]。

壳聚糖(CTS, 平均分子量为46000, 浙江玉环海洋生物研究所), 1.00×10^{-4} mol·L^{-1}: 准确称量壳聚糖0.4600g, 溶于1% 的醋酸溶液转移至100mL 的容量瓶中, 稀释至刻度摇匀。

① 浙江省科技厅重点项目(No: 2007C23071) 资助
② 联系人, E-mail: lileichem@yahoo.com.cn
作者简介: 邹建军(1984—), 男, 江西省瑞金市人, 硕士研究生, 主要从事食品安全分析工作。
收稿日期: 2008-08-28; 接受日期: 2008-09-19
© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.c

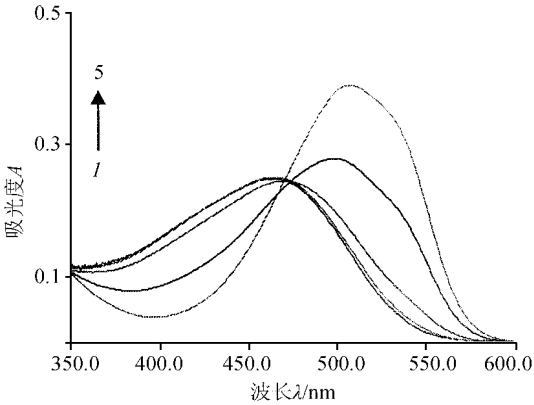

图 1 不同pH 下MO-CTS 复合物的吸收光谱

C(MO) 1.00×10^{-5}mol·L^{-1}; C(CTS) 1.00×10^{-8}mol·L^{-1}

1→*5*: pH 7.13、5.25、4.32、3.18、2.04。

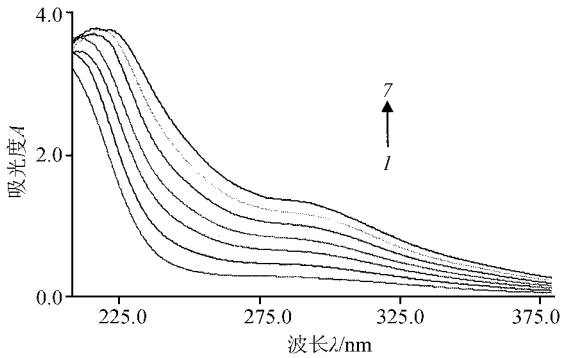

图 2 不同 CTS 浓度下MO-CTS 复合物的吸收光谱

C(MO) 1.00×10^{-5}mol·L^{-1}; pH= 2.04。

1→*7*: C(CTS)/(10^{-6}mol·L^{-1})

1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、7.00。

甲基橙(MO, 上海试剂三厂), 1.00×10^{-2}mol·L^{-1}: 称取甲基橙0.3274g, 用超纯水溶解, 定容至100mL。

Britton Robinson 缓冲溶液(B.R.), 0.40mol·L^{-1}: 称量硼酸19.8g 用少量超纯水溶解, 量取浓磷酸(15mol·L^{-1}, 85%)21.4mL 和冰醋酸(17.4mol·L^{-1}, 99.5%)18.4mL 倒入硼酸溶液中充分混合, 加水定容至800mL, 摇匀。

其余试剂均为分析纯或优级纯, 实验用水为超纯水。

2.2 实验方法

在10mL 比色管中, 按依次加入B.R.缓冲溶液、甲基橙、壳聚糖溶液以超纯水定容摇匀。以超纯水为参比, 利用可见光谱仪, 在200—800nm 波长范围内扫描其吸收光谱。

3 结果与讨论

3.1 缓冲体系的pH 选择

壳聚糖不溶于水, 但溶于醋酸溶液, 选择能够溶解壳聚糖的弱酸性B.R.为缓冲溶液。在一系列不同pH 值的B.R.缓冲溶液中反应, 以超纯水为参比, 在紫外可见光谱仪上测定其吸光度, 光谱图如图1, 结果表明在pH= 2.04 时反应体系在507.41nm 处有最大吸收峰, 故选择反应体系的最佳pH 为2.04。

3.2 甲基橙与不同浓度的壳聚糖的结合反应

取甲基橙的浓度为1.00×10^{-5}mol·L^{-1}和pH= 2.04。向体系中加入不同浓度的壳聚糖溶液, 由图2 可见, 随着壳聚糖浓度的增大, 在276.48nm 处吸收峰不断升高。这表明甲基橙与壳聚糖之间存在相互作用, 壳聚糖大分子链上分布

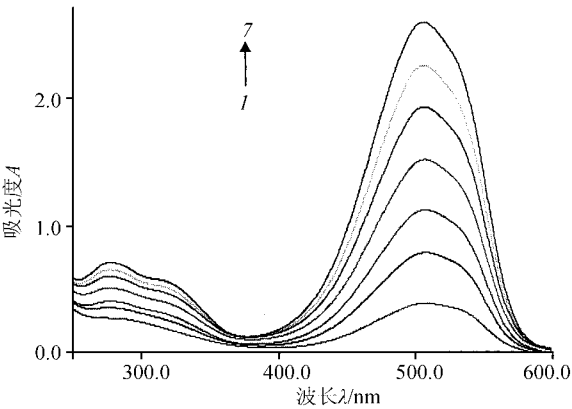

图 3 不同MO 浓度下MO-CTS 复合物的吸收光谱

C(CTS) 1.00×10^{-5}mol·L^{-1}; pH= 2.04。

1→*7*: C(MO)/(10^{-5}mol·L^{-1})

1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、7.00。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.c

着许多羟基、氨基, 还有一些 N-乙酰氨基, 在水溶液中它们会形成各种分子内和分子间的氢键, 正因为这些氢键的存在, 壳聚糖分子链形成了疏水区, 聚集成为壳聚糖大分子的双螺旋结构, 在 pH = 2.04 的酸度条件下, 壳聚糖分子链上含有大量正电荷的氨基, 可通过静电作用吸引带负电荷的甲基橙分子; 同时, 随着反映体系中壳聚糖浓度的增大, 壳聚糖分子链聚集程度增大, 所形成的紫红色复合物在276.48nm 处产生了新的吸收峰并且不断升高, 导致颜色越来越深。

3.3　不同浓度的甲基橙与壳聚糖结合反应

图 3 为固定壳聚糖浓度 1.00×10^{-5} mol·L^{-1} 和 pH = 2.04, 逐渐增加甲基橙的浓度, 测得 MO-CTS 复合物的吸收光谱, 随着甲基橙的浓度增大, 在276.48nm 和 506.88nm 处吸收峰也增大, 当甲基橙浓度低于 1.00×10^{-5} mol·L^{-1}时, 只在 276.48nm 处有吸收峰, 当浓度到达 2.00×10^{-5} mol·L^{-1}时, 在 506.88nm 处开始有吸收峰, 并随着甲基橙的浓度增大而升高, 从甲基橙和壳聚糖结构上看, 二者之间可以通过静电引力结合, 但当甲基橙处于低浓度时, 506.88nm 处没有吸收峰, 说明 506.88nm 处的吸收峰不完全由甲基橙与壳聚糖之间的静电作用而产生的, 同时还与甲基橙和壳聚糖分子形成的结合态浓度有关。

3.4　MO/CTS 摩尔比对吸收光谱的影响和最大结合数 N_E

为了更清楚地阐明壳聚糖与甲基橙相互作用的机理, 本文对 MO/CTS 摩尔比对 MO-CTS 复合物结构的影响进行了研究。

令 MO 与 CTS 的最大结合数为 N, C_D 代表 MO 浓度, C_P 代表 CTS 的浓度。

MO/CTS 摩尔比 $m = C_D/C_P$。

A_{276}——溶液在 276nm 处的吸光度, A_{507}——溶液在 507nm 处的吸光度。

ΔA_{276}——在 276nm 处两个相邻峰的吸光度差值, ΔA_{507}——在 507nm 处两个相邻峰的吸光度差值。

$n = \Delta A_{507}/\Delta A_{276}$, n 值的大小可以反映结合态分子间作用的强弱, n 越大, 说明这种相互作用越强。

表 1　MO-CTS 复合物 n 值结果

C_D/(mol·L^{-1})(×10^{-4})	m(×10^3)	ΔA_{507}	ΔA_{276}	n
1.00×10^{-5}	1.0	0.385	0.243	1.58
2.00×10^{-5}	2.0	0.394	0.079	4.99
3.00×10^{-5}	3.0	0.332	0.005	6.64
4.00×10^{-5}	4.0	0.394	0.102	3.86
5.00×10^{-5}	5.0	0.406	0.092	4.41
6.00×10^{-5}	6.0	0.319	0.052	6.14
7.00×10^{-5}	7.0	0.340	0.056	6.07

表 1 是在 C_P 为 1.00×10^{-7} mol·L^{-1} 和 pH = 2.04 的条件下, C_D 浓度为 1.00—7.00×10^{-4} mol·L^{-1}, m 值从1 变到7, ΔA_{507}的值从0.319 到0.401, ΔA_{276}为0.005—0.102。当 m 为 1.0×10^3 时, n 有最小值为 1.584, 当 m 为 3.0×10^3 时, n 有最大值为 6.64。

m 与 n 的关系如图 4 所示, 从图 4 中可看出, m 值增加, n 值开始显著增加, 在 $m = 3$ 时形成一个波峰, m 值继续增加 n 逐渐减小, 在 $m = 4$ 时形成一个波谷, 之后, n 值又随 m 值增加而增加, 至 $m = 6.0\times10^3$ 时形成第二个峰, 随后 n 随 m 值增大而减小。

产生这种现象的原因是甲基橙分子结构比较大, 与壳聚糖结合的空间位阻大。甲基橙分子首先通过静电作用结合在壳聚糖分子的表面, 结合速度不断增大, 随着 m 值的增加壳聚糖分子表面的结合点逐渐减少, 甲基橙分子能够结合在壳聚糖分子表面的速度变化也越小, 当 $m = 3.0\times10^3$ 时结合

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.c

的作用达到最大, 此时n= 6.64 为最大。随m 值继续增加n 开始减小, 当m= 4.0×10^3 时壳聚糖分子表面几乎所有位点都已经结合此时n 值达到最小为3.86。当m 继续增加时, 甲基橙分子开始与壳聚糖分子内点结合, 至m= 6.17×10^3 时, 同理又形成第二个峰, 此时 n 值为6.14。壳聚糖分子表面和内部所有位点都已结合完全, 达到了最大结合数N。

3.5 最大结合数的理论值N_c

Jiao Q C 等[1] 在研究光谱探针试剂与壳聚糖相互作用机理时, 运用了最大结合数的理论公式:

$$\Delta A = \Delta\epsilon(1+KD_T)K - \Delta\epsilon N\ (DT\Delta\epsilon/\Delta A - 1)\ C_P$$

其中: $\Delta A = A - \epsilon_F D_T$, $\Delta\epsilon = \epsilon_B - \epsilon_F$; D_T——游离态甲基橙在溶液中在总浓度; ϵ_B——游离态甲基橙的摩尔吸光系数; ϵ_F——结合态甲基橙的摩尔吸光系数; C_P——壳聚糖浓度; K——结合常数; N——最大结合数。

表 2 不同CTS浓度下MO-CTS相互作用的光谱数据

C_P/(10^{-6}mol·L^{-1})	ΔA	$(D_T\Delta\epsilon/\Delta A-1)\ C_P$
1.00	0.191	9.41×10^{-6}
2.00	0.203	8.79×10^{-7}
3.00	0.217	8.21×10^{-7}
4.00	0.228	7.69×10^{-7}
5.00	0.240	7.18×10^{-7}
6.00	0.251	6.71×10^{-7}
7.00	0.263	6.27×10^{-7}

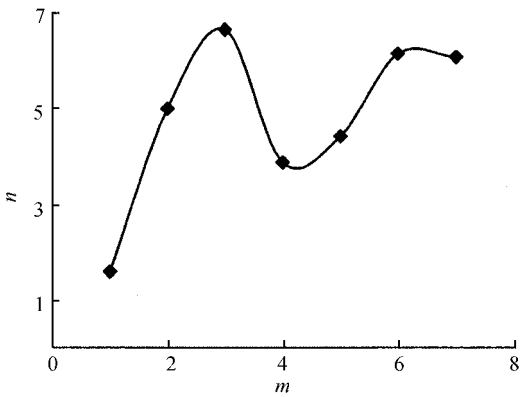

图 4 $m\times10^3$ 和n 的关系

从表2 数据可以得到ΔA —$(D_T\Delta\epsilon/\Delta A-1)\ C_P$ 的线性方程为:

$$\Delta A = 0.4049 - 2.29\times10^8(D_T\Delta\epsilon/\Delta A-1)C_P,$$

线性关系r= − 0.9992。

从该方程的斜率和截距计算出: $K = 2.83\times10^5$, $N_C = 6.13\times10^3$。

3.6 反应的稳定性和重现性

在pH= 2.04 的B.R 缓冲溶液中, 室温下考察反应时间对MO-CTS 复合物的稳定性的影响, 结果表明, 该体系反应速度快, 向甲基橙溶液中加壳聚糖溶液后颜色由橙黄色很快变为紫红色, 考察在2h 内, 1.0min 后反应趋于稳定, 并且重现性好。

3.7 干扰因素

为考察实验干扰因素对测定结果的影响, 在甲基橙和壳聚糖的混合液中添加不同试剂, 观察对甲基橙与壳聚糖复合物吸光度的影响。

表 3 不同因素对MO-CTS复合物吸光度的影响

试剂	浓度(mol·L^{-1})	吸光度A(506.41nm)	
		空白(甲基橙)	甲基橙-壳聚糖
蒸馏水	–	0.660	0.468
蔗糖	1.50×10^{-3}	0.661	0.471
氯化钠	0.20	0.660	0.645

pH= 2.04 C(MO) 1.00×10^{-5}mol·L^{-1} C(CTS) 1.00×10^{-6}mol·L^{-1}

由表3数据可知, 蔗糖基本没有影响, 氯化钠对反应影响较大, 表明较高浓度的无机离子对甲基橙与壳聚糖的相互作用有较大的影响, 这可能是反应体系离子强度增大, 离子电荷的屏蔽作用使MO 与CTS 的静电作用减弱。

4 结论

通过采用光谱法研究了MO 与CTS 相互作用的机理, MO-CTS 复合物主要是通过静电作用所形成离子强度是影响MO-CTS 反应体系的主要因素。通过考察MO/CTS 摩尔比对相互作用的影响和测得MO-CTS 最大结合数, 验证了先前研究者建立的多糖与光谱探针相互作用的理论模型的

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.c

适应性, 对于研究此类光谱探针反应机理有很好的指导作用。

参考文献

[1] Jiao Q C, Liu Q, Sun C *et al*. Investigation on the Binding Site in Heparin by Spectrophotometry[J]. *Talanta*, 1999, **48**(5): 1095—1101.

[2] Liu Q, Jiao Q C, Liu Z L *et al*. Study on the Interaction Between Methylene Blue and Compound of Mickle Anions[J]. *Spectrosc. Lett.*, 2001, **34**(1): 25—34.

[3] Zhou S G, Jiao Q C, Chen L *et al*. Comparative Study on the Interaction Between Two Spectroscopic Probes and Acidic Polysaccharides by Absorption Spectra[J]. *Spectrosc. Lett.*, 2002, **35**(1): 21—29.

[4] 万晖, 欧阳纬, 焦庆才等. 多糖与生物探针相互作用机理的研究[J]. 化学学报, 2001, **59**(12): 2181—2185.

[5] 高贵珍, 焦庆才, 丁一磊, 陈雷. 茜素红S荧光猝灭法测定壳聚糖含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2003, **23**(5): 895—898.

[6] 高贵珍, 焦庆才, 丁一磊等. 锌试剂分光光度法测定壳聚糖含量[J]. 分析化学, 2003, **31**(12): 1479—1481.

[7] 高贵珍, 焦庆才, 刘茜, 丁一磊, 陈雷. 茜素红与壳聚糖的相互作用机理研究[J]. 化学学报, 2003, **61**(8): 1294—1298.

[8] 谭学才, 麦智彬, 邹小勇等. 壳聚糖与茜素红相互作用的电化学研究[J]. 高等学校化学学报, 2005, **26**(6): 1055—1057.

[9] 张海容, 郭祀远, 李琳, 蔡妙颜, 郑必胜. 光谱法研究硫酸酯化壳聚糖与DNA的作用机理[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, **27**(11): 2294—2298.

Interaction between Chitosan and Probe Reagents of Methyl Orange

ZOU Jian-Jun[b]　ZHAO Di-Hai[b]　ZENG Yan-Bo[a]　LI Lei[a,b]

a(*School of Biological and Chemical Engineering, Jiaxing University, Jiaxing, Zhejiang* 314001, *P. R. China*)

b(*Faculty of Material and Chemical Engineering, Jiangxi University of Science and Technology, Ganzhou, Jiangxi* 341000, *P. R. China*)

Abstract　The mechanism of chitosan (CTS) and methyl orange (MO) at pH= 2.0 was studied by absorption spectra. The result showed there were formed MO-CTS complex by the hydrophobic interaction between MO and CTS. The influence of the molar ratio of MO/CTS was investigated. The maximum binding numbers ($N_E = 6.17\times10^3$, $N_C = 6.13\times10^3$) were obtained by spectroscopic experiment and theoretical model, respectively. There were validated rationality of theoretical model of the interaction between chitosan and probe reagents.

Key words　Chitosan, Methyl Orange, UV-Vis Spectrum, Interaction.

欢迎订阅《邮票上的杰出科学家》等论著

1. 《邮票上的光谱学和化学史》, 周开亿等编, 《科学出版社》1991年出版, 16开, 158页, 附有67个国家和地区的彩色邮票(复印件, 下同) 176枚, 每册10元。
2. 《邮票上的化学、光学和光谱学史》, 周开亿主编, 《光谱实验室》2006年第1期彩色抽印本(收藏本), 16开, 64页, 附有77个国家和地区的彩色邮票314枚, 每册30元。买3送1。
3. 《邮票上的科学家——佼佼者之路》, 周开亿主编, 《光谱实验室》2007年第1期彩色抽印本(珍藏本), 16开, 196页, 附有91个国家和地区的彩色邮票533枚, 每册70元。买3送1。
4. 《邮票上的杰出科学家》, 周开亿主编, 《光谱实验室》2008年第1期彩色抽印本(珍藏本), 16开, 240页, 附有104个国家和地区的彩色邮票515枚, 每册90元。买5送1。

以上各书售价中均含普通印刷品邮费。

联系地址: 北京市81信箱66分箱《光谱实验室》编辑部联络处 刘建林, 邮编: 100095。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.c