

摘 要

海藻酸钠作为天然生物大分子,由于其立体结构的特殊性,表现出特殊的物理化学性质,具有可生物降解、良好的生物相容性、和生物黏附性等特性,从而广泛地应用于医药和生物技术等领域。本文用热力学、光谱学等方法对海藻酸钠凝胶机理进行了分析。并对海藻酸钠的结构组成和特种海藻酸钠品种的制备进行了探讨。

用等温滴定量热法研究了钙锌离子与海藻酸钠相互作用的热力学过程。量热滴定拟合结果表明, Ca^{2+} 与海藻酸钠相互作用时有两种结合位点, 分别对应 $K_1=1.21\text{E}7(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$, $\Delta S_1=141.84(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$, $\Delta H_1=1.89(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$; $K_2=2.90\text{E}4(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$, $\Delta S_2=79.08(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$, $\Delta H_2=-1.84(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$ 。锌与海藻酸钠相互作用时只有一种结合位点, 结合常数 $K=9472(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$, 熵变 $\Delta S=128.95(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$, 焓变 $\Delta H=15.8(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$ 。钙与海藻酸钠的相互作用比锌与海藻酸钠的相互作用强。扫描电镜照片表明, 海藻酸锌凝胶比海藻酸钙凝胶交联点多, 空腔比较小, 腔与腔之间的隔膜比较多。

用圆二色谱对海藻酸钠与钙锌离子相互作用的稳态溶液-凝胶过程进行了研究, 结果表明该过程分前后两个阶段, 在临界点之前第一阶段内, 海藻酸钠与阳离子生成的凝胶配合物结构在线性变化范围内是相同的, 同时速度和机理也是一样的。对海藻酸钠与钙锌离子的选择识别和相互作用研究表明, 钙离子与海藻酸钠的 G、M 单元相互作用差别很大, 锌离子与 G、M 单元相互作用差别比较小。锌离子对 G、M 单元的识别作用不如钙离子。通过四个不同组成的海藻酸钠样品圆二色 CD 信号随温度变化的谱图, 结合 X-射线衍射、 ^{13}C -NMR 技术证明海藻酸钠中存在双螺旋结构的功能微区。G 段形成的双螺旋功能微区结构, 随温度发生有序-无序可逆转变。

海藻酸钠与二价阳离子凝胶时会发生膨胀收缩现象。对 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 离子来说, 膨胀收缩程度的大小, 与离子大小, 成键电子轨道等离子性质有关。且膨胀和收缩是可逆的。

在海藻酸钠与钙离子结合过程中, 量热反应的第一类结合位点, 对应于离子量对圆二色谱影响的第一阶段线性部分, 钙镶嵌于已存在的螺旋蛋盒空腔中, 类似于分子内交联, 使粘度有稍微下降的趋势。半蛋盒结构以及二聚体聚集体形成过程, 对应于量热反应的第二类结合位点, 在圆二色 CD 谱图上, 对应于第二阶段的斜率比值比第一阶段小。在这一过程中, 以分子间交联为主, 体系粘度急剧上升。 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 与海藻酸钠相互作用时, 体系的焓变、熵变符合等动力学关系, 说明三种离子与海藻酸钠的相互作用都是静电离子相互作用。

古罗糖醛酸裂解酶 (G-lyase) 降解 poly-G-blocks 所得七种寡糖的产率分别为 39.5%、22.1%、21.3%、2.2%、2.4%、8.3% 与 1.2%。结构鉴定结果说明, 产物中含有一种二聚糖 ΔG (39.5%); 二种三聚糖 (ΔGG , 22.1%; ΔMG , 21.3%); 产物中不含 $+\Delta M$, ΔMM 或者 ΔGM ; 产物中甘露糖醛酸的含量从 9% 增加到 10.68%, M 含量增加了 18.7%。根据以上实验结果推测裂解位点位于两个古罗糖醛酸之间 ($-G-G-$), 使得一个古罗糖醛酸变成不饱和糖醛酸位于产物的非还原末端, 而另一个古罗糖醛酸位于产物的还原末端。这些结果验证了 G-lyase 是古罗糖醛酸专一裂解酶。此外从产物含量可知, 五聚糖只占 3%, 六聚糖几乎没有检测到, 说明 G-lyase 酶所能识别的最长链段为五聚糖。用 $^{13}\text{C-NMR}$ 结合马尔可夫 (贝努利) 统计理论对海藻酸钠 LVCR 的结构进行分析, 结果表明 LVCR 中 G 单元含量为 39.77%。

关键词: 等温滴定量热, 圆二色谱, 海藻酸钠, $^{13}\text{C-NMR}$, 双螺旋, 功能微区, 古罗糖醛酸裂解酶

Abstract

Sodium alginate, a natural biomolecule, shows special physicochemical properties due to steric structure characterity. Being biodegradable, biocompliance and bioadhesive, alginate has being widely used in the biological and pharmaceutical fields. For better application of alginate, it is necessary that we study its sol-gel mechanism with thermodynamic and spectral methods from the physicochemical properties. Simultaneously, alginate composition showed be determined and preparation of its special samples be studied.

Thermodynamics of the interaction of calcium and zinc ions with sodium alginate has been studied by isothermal titration Calorimetry. The results showed that there are two sites when calcium ion complexates with alginate, with $K_1=1.21E7(L\cdot mol^{-1})$, $\Delta S_1=141.84(J\cdot mol^{-1}\cdot K^{-1})$, $\Delta H_1=1.89(kJ\cdot mol^{-1})$; $K_2=2.90E4(L\cdot mol^{-1})$, $\Delta S_2=79.08(J\cdot mol^{-1}\cdot K^{-1})$, $\Delta H_2=-1.84(kJ\cdot mol^{-1})$. There is only one site when zinc ion interacts with alginate, with the binding affinity $K=9472(L\cdot mol^{-1})$, entropy $\Delta S=128.95(J\cdot mol^{-1}\cdot K^{-1})$, enthalpy $\Delta H=15.8(kJ\cdot mol^{-1})$. The binding affinity of calcium ion complexating with alginate are greater than zinc ion. The scanning electron microscopy (SEM) micrograph showed that there are more linking points, smaller cavities, and more septa between the cavities in Zn-alginate gel than in Ca-alginate gel.

The steadystate interaction research of calcium and zinc ions with alginate during the sol-gel thransition by circular dichroism, show this process includes the former and latter two phases. During the first linear change scale, the structure of the gel-conjugate of alginate-metal ions is homological before the critical point. The rate and mechanism have the similar change. The research of selectivity, recognition and interactions of calcium and zinc ions with alginate, shows that the interactions of calcium ion with guluronic and mannuronic units are more different than that of zinc ion. The selectivity and recogonition of zinc ion for guluronic and mannuronic units are less than calcium ion. The circular dichroism spectra with temperature of four different composition alginate, combined with X-ray diffraction and ^{13}C -NMR spectra technology, showed that there are functional microdomains in alginate. The functional microdomains formed by guluronate units (G), show order-disorder transitions with temperature.

Swelling and shrinking, when alginate gels with divalent cations. For

cupric,calcium and zinc ions,the swelling and shrinking degree are related to the cationic properties,such as the ionic radius and bond orbits.Furthermore,swelling and shrinking are reversible.

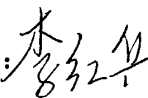
The primary ITC binding sites for alginate interaction with calcium ion correspond to the first linear scale in the CD spectra of intensity variation with calcium-ion concentration.The calcium ions inlay in the “egg-box”cavities,similar with the intramolecular linkage,leading a little decrease for the viscosity.The formation process of the half-egg-box structure and dihelix aggrations ,correspond to the second ITC binding sites.The slope ratio for the second phase are smaller than the first.During this process,the intermolecular linkage are dominating,and the relative viscosity hoiks.Calcium,zinc,cupric ions interact with alginate,their enthalpies and ehtropies show isokinetic relationship,confirming that their interaction mechanisms are the same.

Seven oligosaccharides were gained from poly-G-blocks hydrolyzed by guluronate lyase,with yields of 39.5%,22.1%,21.3%,2.2%,2.4%,8.3% and 1.2%,respectively.Structural elucidation showed that only one disaccharide(Δ G,39.5%) and two trisaccharides(Δ GG,22.1%; Δ MG,21.3%) were separated from the mixture.Based on the fact that no Δ M, Δ MM or Δ GM fractions were separated,we postulated that the hydrolysis mainly occurred between two guluronic acids(-G-G-) making one guluronic acid(G) residue on the reducing end and an unsaturated guluronic acid(Δ) in the nonreducing end.These results proved that the G-lyase was a guluronic acid specific lyase.Furthermore,a very low yield of pentasaccharide(3%) and no trace amount of hexasaccharide indicated that the minimal recognition oligosaccharides of G-lyase should be pentasaccharide.The structure composition of sodium alginate LVCR was analyzed by ^{13}C -NMR with Markov(Bernoullian) statistics,the result showed that the amount of G units in alginate LVCR is 39.77%.

Key words: isothermal titration calorimetry,circular dichroism,sodium alginate, ^{13}C -NMR,double helix ,functional microdomain,guluronate lyase

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作和取得的研究成果，除了文中特别加以标注和致谢之处外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 天津大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

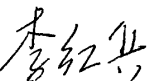
学位论文作者签名：

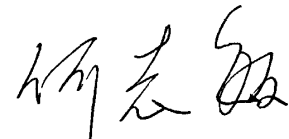
签字日期：2006 年 3 月 21 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 天津大学 有关保留、使用学位论文的规定。特授权 天津大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，并采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编以供查阅和借阅。同意学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘。

（保密的学位论文在解密后适用本授权说明）

学位论文作者签名：

导师签名：

签字日期：2006 年 3 月 21 日

签字日期：2006 年 3 月 21 日

前 言

海藻酸钠由海藻等藻类深加工而成。海藻是生长在海水里的藻类植物,是海洋生物资源的一大家族,有250属,1500余种,有经济价值的种类就有100多种。在我国漫长的海岸线上,北至黄海的辽河、鸭绿江口,南至北部湾的白兰河口及西沙群岛、中沙群岛和南沙群岛等辽阔的海域中都有海藻的踪迹,二十一世纪世界人工栽培海藻已非常普及,栽培总面积约20万公顷(300万亩),海藻总产量约为635万t(鲜重);其中,海带310万t,裙带菜220万t,紫菜75万t,江篱10万t,腓鳞菜10万t,其他10万t。总产值约30亿美元以上。我国海带和紫菜干品产量分别达到了30万t和3万t,占世界的第一位和第三位^[14]。在我国,国家很重视海藻的深加工技术,把海藻深加工技术列入海洋领域的863研究和开发计划。

海藻酸钠具有抗肿瘤、调节免疫能力、消除自由基和抗氧化、抗高血脂、降低血糖、抵抗放射起到防护效果等作用,在体内有抗凝血作用可用来治疗心血管疾病;在体外具有止血作用,可用来开发外用医疗敷料。研究人员用海藻酸系列原材料可开发抗肿瘤、抗病毒、抗放射、抗衰老、抗心脑血管疾病的海洋药物,同时针对各种人群的特殊需要,研制海洋生物工程制品。

海藻酸钠是一种线性天然生物大分子,在单元糖环上具有羧基和羟基等功能基团,作为食品乳化剂、稳定剂、增稠剂广泛地用于农业、食品加工、药品和工业产品中。海藻酸钠带有羧基,是一种阴离子聚电解质,由于其本身立体结构的特殊性,表现出特殊的物理化学性质,其在温和条件下可与二价阳离子(如 Ca^{2+} 、 Zn^{2+}) 形成凝胶。由于海藻酸可生物降解、生物相容良好和具生物黏附性,从而广泛地应用于药学和生物技术等领域。钙锌为生物元素中的必需元素,按酸碱理论, Ca^{2+} 属于硬酸, Zn^{2+} 属于软酸,可代表两大类金属与配体的相互作用。 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 对生命活动有重要意义,海藻酸钠与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 形成的凝胶,可以使一些药物实现缓释,正引起极大关注。

目前,国内外对海藻酸钠凝胶的研究,主要通过与其它物质复配、交联、覆膜等来改变药物溶出速度。如通过调节海藻酸钠、氯化钙浓度与聚赖氨酸用量来控制粒径大小和分布,可得到微球(μm 级)和纳粒(nm 级)。通过控制 pH、NaCl 浓度等制备条件来得到一定性能要求的凝胶颗粒,从而控制释放速率。此外,还可通过覆膜和使用交联剂来调控释药速率。以上方法主要通过实验现象观测控释效果,但不能从机理上阐述和预测实验结果。要选择适宜的制备方法,得到工艺制备简便可控,微球(或微囊)机械性能良好、符合医药指标的载药率、有良好的贮存稳定性和符合医药指标的释放速率,需要从海藻酸钠理化性质着手,用物理化学、热力学方法对海藻酸钠的凝胶机理进行研究。

近几年,国际上结构化学、理论化学、分子动态学的研究取得了重要进展,我国在这方面具有较高研究水平,将物理化学、材料科学、生命科学、药物释放科学相融合。如用化学热力学(热化学、溶液化学)的方法来研究海藻酸钠的溶液-凝胶结构、凝胶动态结构和凝胶动力学;用分子识别和生物分子相互作用对海藻酸钠和无机离子之间的聚集状态进行研究;用热力学观点解释海藻酸聚集体对药物的缓释行为。理论化学、分子动态学、超分子化学领域中的等温滴定量热(ITC)、圆二色谱(CD)、纳秒光谱仪、分子探针、荧光光谱仪等方法技术可用于海藻酸钠研究,本课题选用了等温滴定量热、圆二色谱技术等研究方法。

由于 M、G 糖单元的构象不同,不同 M、G 含量的海藻酸钠性能不同,不同分子量的海藻酸钠应用领域不一样,海藻酸钠在高科技领域有广阔的发展空间,纯 M 段、纯 G 段、标准品海藻酸钠、寡聚海藻酸钠糖、特种组成的海藻酸钠样品都属于海藻酸钠特种品,应该对这些样品的制备进行研究;包括海藻酸不同级分的制备、提纯分离和结构组成鉴定,以及海藻酸钠的降解技术。

综上所述,在前人研究的基础上,本文具体研究内容包括:

- 1、用等温滴定量热仪(ITC)对钙锌与海藻酸钠相互作用动力学过程进行研究;研究了魔芋葡甘聚糖与海藻酸钠形成复杂聚集体的机理和结构,以及魔芋葡甘聚糖对海藻酸凝胶体系药物释放性能的影响;
- 2、通过水解,结合核磁测定海藻酸钠组成结构,用圆二色色谱(CD)设计一种快速简便准确测定海藻酸结构的方法;用圆二色色谱找到海藻酸的特征吸收峰。在特征峰处研究海藻酸钠的性质及与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 的相互作用;
- 3、用重量增加法研究海藻酸钠凝胶过程中的膨胀收缩性能,将宏观现象与微观机理结合起来,从宏观现象对所得微观机理进行验证;
- 4、将等温滴定量热仪(ITC)、圆二色谱(CD)、粘度测试、膨胀收缩几种研究结果对比分析,对海藻酸钠凝胶机理进一步探讨,分析了其对药物缓释的影响;
- 5、对海藻酸钠进行分级和结构鉴定,研究 G-lyase 酶对 poly-G-blocks 的降解;并对海藻酸钠样品 LVCR 的结构进行分析。

第一章 文献综述

1.1 海藻酸钠的应用研究状况

1.1.1 海藻酸的结构

海藻酸胶是海藻细胞壁和细胞间质的主要成分，海藻酸胶分子是由 β -D-1,4-甘露糖醛酸和 α -L-1,4-古罗糖醛酸两种单体组成的嵌段线性聚合物。在一个分子中，可能只含有其中一种糖醛酸构成的连续链段，也可能由两种糖醛酸链节构成嵌段共聚物^[1-5]。两种糖醛酸在分子中的比例变化，以及其所在的位置不同，都会直接导致海藻酸的性质差异，如粘性、胶凝性、离子选择性等^[6-13]。海藻酸的化学结构见图：

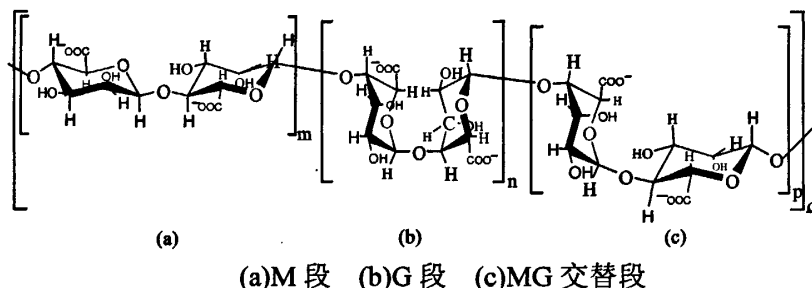


图 1-1 海藻酸分子链的化学组成结构

Fig.1-1 Chain Chemical Component Structure of Sodium 海藻酸钠

1.1.2 用海藻酸钠开发海洋活性药物

海藻酸胶具有良好的生物活性，在“蓝色医药产业”正在兴起的今日^[14-22]，将海藻酸系列开发成药品保健品具有重要意义。用海藻酸系列原材料可开发抗肿瘤、抗病毒、抗放射、抗衰老、抗心脑血管疾病的海洋药物^[23-42]，海洋药物独特的疗效、低毒性已引起人们的高度重视。以活性物质构效关系的理论研究为基础研制开发防治疑难病、多发病为主的海洋多糖类药物，同时针对各种人群的特殊需要，研制海洋生物工程制品。

海洋生物开发技术的发展诞生了中国第一个海洋药物——藻酸双酯钠(PSS)，就是用海藻酸胶为原料开发的，开创了中国海洋药物的先河。我国的科研者后来又以海藻酸胶为原料开发出了抗乙肝病毒新药“海力特”、降脂抗栓新药“甘糖酯”、降糖药物“降糖宁散”等药。多种海洋药物的开发和生产，掀起了海洋药物产业化的高潮。

1.1.2.1 心脑血管药物藻酸双酯钠 (PSS) 和甘糖酯 (PGMS)

PSS^[41]是从海带等海藻中分离提取的海藻酸，经化学修饰组成的 1 种半合成

的多糖硫酸酯。它具有明显的抗凝血、降低血粘度、降低血脂、抑制红细胞和血小板聚集,以及改善微循环的作用。PSS 治疗缺血性心脑血管疾病总有效率达 91%~98%,而 PSS 除了在心脑血管病中的应用外,还被广泛用于治疗眼睑黄色瘤^[43, 44]、突发性耳聋、系统性红斑狼疮、糖尿病性周围神经病变、不安腿综合症、新生儿硬化症及银屑病、积聚性痤疮、变态性血管炎、系统性硬皮病、静脉炎、结节性红斑、硬红斑、扁平苔癣^[45]等。

而甘糖酯^[42] (propylene glycol mannurate sulfate, PGMS) 是在 PSS 基础上研制的一种相对低相对分子质量的类肝素海洋药物,是 PSS 的换代产品,其疗效更高,副作用小。

1.1.2.2 治疗肾衰药物肾海康 (FPS)

以褐藻酸糖胶为原料开发的肾海康 (FPS) ^[41,42,46-49],治疗慢性肾衰,对中早期肾衰效果好,无毒副作用,特别对改善肾功能,提高肾脏对肌酐清除率效果尤为显著,现已按国家二类新药获准进入临床研究,有的学者通过将海藻酸胶进行酸水解得到的相对低分子质量片段与海藻酸胶进行抗氧化能力的对比,从而得出相对分子质量以及分子组成对抗氧化能力的影响。

1.1.2.3 开发降胆固醇、降血脂药物

另外,海藻酸还能降低人体内的胆固醇。首先,海藻酸进入消化系统后,其胶质会包裹部分胆固醇,使这部分胆固醇无法被吸收。其次,人消化吸收脂肪是靠自身分泌的胆汁酸,胆汁酸越多吸收的脂肪越多。一些胆汁酸分解脂肪后会被肠壁再吸收和利用,而海藻酸的胶质弥漫在肠壁上,可以阻碍胆汁酸的再吸收,使消化道内胆汁酸数量减少。这时,人体会自动合成新的胆汁酸来补充,而合成胆汁酸的原料正是肝脏内的胆固醇。这就是说,为了合成胆汁酸,肝脏内的胆固醇将被大量消耗,而血液中的胆固醇含量也随之被降低。通过上述阻碍胆固醇的吸收和促进肝脏内胆固醇消耗,海藻酸起到了良好的降血脂作用。因此,海藻酸胶可用于开发降胆固醇、降血脂的药物。

1.1.2.4 特种海藻酸胶活性药物——海藻酸钾

低分子海藻酸及海藻酸盐是生产各种治疗心血管疾病的主要原料,其中低分子海藻酸钾被誉为生命活化因子,可有效的净化血液环境,养护血管,阻止血黏度增高,不能形成血栓,使血管保持年轻状态,防止糖尿病、动脉硬化、高血压、冠心病、呼吸系统疾病及肝脏病的发生^[50]。

导致人血压升高的一个重要因素是人体中的微量元素钠和钾失去平衡。因为吃盐的缘故,人每天都要吃进一些钠,但不一定能补充进足够的钾。因此,许多人特别是高血压患者经常处于钾低钠高的状态。能够给人体补充钾而减少钠,显

然是防治高血压的一种有益方法。

海藻中的海藻酸实际上是包裹着钾、钙、镁等金属离子的混合物。海藻酸有一特性在酸性环境里,会与钾、钙、镁等金属离子分离,在碱性环境中,又与金属离子结合。那么海藻进入人的胃以后,在胃酸作用下,海藻酸释放了所含的钾等金属离子。但由于海藻酸不能被胃消化吸收,所以它要继续在人体内旅行。海藻酸进入肠道后,由于肠道是碱性的,它又要寻找金属离子结合,由于人每天都吃盐,肠道里钠离子最多,于是海藻酸就大量地与钠离子结合,并将其牢牢包裹直到排出体外。由此看来,吃海藻正好可以补充钾和清除多余的钠。

以海藻为原料提取低聚海藻酸盐,研制、开发、生产纯天然、无任何毒副作用的药品、保健品、功能性食品添加剂,用于治疗高血压病、高血脂症、糖尿病,经过国家专利局检索中心的检索证实低分子海藻酸钾可降低原发性高血压患者的血浆醛固酮水平,是国际首创。新发现低聚海藻酸钾可以减少精子的畸变,提高精子的成熟率,间接证实低聚海藻酸钾可提高有氧代谢水平,改善微循环。雅威特公司开发小分子海藻酸钾注射液治疗冠心病、高粘度血症新药的技术已得到国家科技部资助。

利用海藻酸钾可开发降压、降脂新药,开发低分子“海藻酸钾”静脉注射液。低聚海藻酸钙——在降压的同时补钙;含锌低聚海藻酸钾食品——降压、补锌、益智;含铬海藻酸钾——对高血压并伴有糖尿病的患者在降压的同时降血糖。

中国现有高血压患者 1.4 亿,其中 10% 的患者(1400 万人)长期服用降压药,按每人每月平均费用为 82 元计算,一年每人平均支付 1000 元/人,总额 140 亿元,低聚海藻酸盐系列产品占有 10% 的市场份额就是年销售收入 14 亿元。

1.1.2.5 配制复方海藻酸糖合剂

黑龙江商学院中药系药物研究所的季宇彬教授等科研工作者用昆布多糖、海藻酸多糖、羊栖菜多糖、海蒿多糖、人参多糖、黄蔑多糖、辽宁葱木多糖和刺五加,按顺序比例为 2:2:4:2:0.5:1.5:2:6 制成的复方海藻酸糖合剂^[51]。具有良好的生物学活性。

1.1.2.6 化学改性海藻酸胶的生物学活性

近年来,国外学者对海藻中所提取的海藻酸胶进行了化学改性的研究工作。David^[52]等学者将分子量较高的藻胶(几十万—几百万的分子量)用酸进行反应,把其降解成较低分子量(1万—5万),在反应过程中控制酸的浓度、温度和时间可获得不同分子量大小的降解产物。通过改变其结构,从而提高其生物活性或降低其毒副作用。

在国内,中国海洋大学的管华诗、胡晓柯^[17]等科研者用酶法水解海藻酸胶,得到纯度很高不同组成的低分子海藻酸糖片断,具有不同的药理学活性。例如,

高M段可用来开发心脑血管药物，高G段可用来止血。

Nishimura^[53]和Takano^[54]等学者对海藻酸胶进行硫酸酯化的研究，使之具抗病毒、抗凝血等活性。他们通过化学手段对海藻酸胶化合物分子进行结构改性，以获得更多结构类型的海藻酸胶衍生物的方法。这些研究引起世人的高度重视。

1.1.2.7 其他

海藻酸钠胶可用做安全有效的止血药；低聚糖海藻酸钠可用做代血浆，是维持血容量的良好的扩容剂，海藻酸钾还可用作人工牙模材；低聚海藻酸保健胶囊可适用于肾功能不全的高血压患者。要对量大的低活性物质海藻酸及其衍生物进行人工修饰，使之变为高活性物质。从而为海藻酸胶的进一步开发提供理论和实例依据。

1.1.3 海藻酸作为药物转运载体的开发

聚合物的生物相容性或对生物组织的免疫原性是决定其能否作为药物释放载体与组织工程材料的主要因素之一，海藻酸具有良好的生物粘着性。药剂学中利用海藻酸钠的溶解度特性、凝胶和聚电解质作为缓释制剂的载体、包埋剂或生物粘附剂，利用其水溶胀性，作为片剂崩解剂，利用其成膜性，制备微囊，利用其与二价离子的结合性，曾作为软膏基质或混悬剂的增粘剂，其中作为缓释制剂的骨架和包埋和微囊材料等尤为重要^[55]。近年来超纯的（通过0.22 μm 微孔滤膜）交联海藻酸钠作为包埋材料的植入剂已有商品出售并见有各方面文献报道^[55]。最近国内外科研者将海藻酸开发为新型药物转运载体很活跃^[56-60]。

1.1.3.1 海藻酸用作缓释包衣材料

一些研究者尝试将交联海藻酸盐用作缓释包衣^[61]，海藻酸钠为水溶性聚合物，常用于片剂制备作粘合剂和崩解剂，但其与钙盐作用，与钙离子发生交链形成的钙盐不溶于水，它形成的衣膜具控制药物释放速率的能力。例如：在流化床中进行包衣，以1%海藻酸钠水溶液与1.7%氯化钙水溶液同时或交替喷至吡啶美锌和对乙酰氨基酚小丸上，带负电的海藻酸钠通过静电作用与钙离子发生交联，在小丸表面形成不溶性膜，膜厚100 μm 的小丸释药可持续8小时。所成之膜光滑均匀，包衣过程中小丸不发生粘连，改变交联剂用量或膜厚可调节释药速率，处方简单，不象水分散体要加多种稳定剂。但包衣液中含大量水，故包衣过程较长

1.1.3.2 海藻酸钠与果胶在结肠给药上的应用

结肠内有大量的细菌，某些细菌可产生 β -葡萄糖苷酶、纤维素酶、硝基还原酶、偶氮还原酶等酶系，许多高分子材料在结肠被这些酶所降解^[62,63]，而这些高

分子材料作为药物载体在胃、小肠由于相应酶的缺乏不能降解,这就保证药物在胃和小肠不释放^[64]。同时应考虑到消化道内胃的 PH 为 0.9—1.5,小肠为 6.0-6.8。在结肠为 6.5-7.5,海藻酸,果胶都是酸性多糖,在胃内低 PH 环境中不溶解,在肠道碱性环境下溶解,同时可被结肠酶系降解,而且由于果胶钙,海藻酸钙可吸收体内的铅、镉等重金属的积累。对高血压、便秘等慢性病有一定疗效,并可降低血糖、血脂、减少胆固醇,具有防癌、抗癌等作用。因此,海藻酸钙,果胶钙、海藻酸—果胶—钙被用来开发作为结肠定位给药系统^[65, 66]。

1.1.3.3 海藻酸钠被用来制作微球,微囊及用作血管栓塞剂

海藻酸钠与钙等二价金属离子“交联”形成的物质以较稳定的凝胶形式存在,具有很好的生物相容性和生物粘连性,制备方法温和,同时,海藻酸钠作为囊材具有如下优点:

①性质稳定;②有合宜的释药速率;③无毒、无刺激性;④能与药物配伍,不影响药物的药理作用及含量测定;⑤有一定的强度及可塑性,能完全包封囊心物,或药物与附加剂能比较完全地进入球的骨架内;⑥具有符合要求的粘度、渗透性、亲水性、溶解性等特性。

因此,海藻酸钠作为微囊材料是一个很有发展前景的领域^[67-73],海藻酸与聚赖氨酸、海藻酸与乙酸壳多糖、海藻酸与白蛋白等合用作复合囊材,因海藻酸钙不溶于水,故海藻酸钠可用 CaCl_2 固化成囊^[74]。

最近,国内有公司(北京圣医耀)正在推广海藻酸钠微球血管栓塞剂^[1],并受到国家科技创新基金的资助。用微球或微囊进行化疗栓塞可以使肿瘤缩小,也可减少手术后的复发或转移,改善症状,提高疗效,减少毒副反应,延长病人生存期。因此对海藻酸微囊进行深入细致的研究,具有重要意义^[75]。

1.1.3.4 海藻酸钠在纳米生物上的应用

Sinjan De, Robinson 等用壳聚糖—海藻酸,赖氨酸—海藻酸复合材料来做纳米微球^[76],实验室已做出来,应进行理化性质深入研究,收集对中试有指导意义的参数。利用海藻酸钠线性长链上富含羧基和羟基,将药物通过价键接枝到高分子链上,然后通过分子自组装技术进行纳米微粒的制备,可扩大海藻酸钠作为药物转运载体的范围和应用性能。用 ITC 可研究海藻酸钠与其它生物高分子、药物、靶向位点之间的相互作用、构象变化,为药物载体的设计和开发提供基础性构效关系理论^[77]。

1.1.3.5 作为基因治疗的转运载体

为基因治疗提供新型的给药转运载体系统正引起越来越多科研者的兴趣和关注。反义技术的药理学基础是在 mRNA 分子水平上降低致病蛋白基因的表达。

这一原理意味着能设计出合理的具有特定序列的核酸药物,这些核酸药物通过沃森-克里克(Watson-Crick)氢键作用寻找特定的 mRNA 并阻止其表达。反义寡核苷酸是阴离子生物大分子,拥有 10-25 个核苷酸单位,分子量 3~8KDa。它们是亲水性的($\log D_{(\text{octanol/water})} \approx -3.5$),不能穿过生物膜;再加上降解、核酸酶的新陈代谢,和在一些生物器官表面的粘附。这样就降低了核酸药物到达靶向器官的量,以至于细胞吞噬剂量的降低。寡核苷酸转运载体的优化需要提高非胃肠道吸收,正确的靶向(时间和空间上),提高细胞的吞噬量和充分的细胞内转运。非病毒基因载体包括阳离子脂质体,树枝状聚合物和其它阳离子高分子。

海藻酸钠具有粘液吸附,生物降解和生物相容,作为寡核苷酸载体具有诱人的前景^[59]。海藻酸钠和低分子量的聚赖氨酸(poly-L-lysine)所形成的微胶囊,可以保护内分泌器官移植后的免疫排斥作用,而且 Bowersock 和 Lemoine 已经证明口服和鼻腔给药的可行性。最近报道,在小牛血管中,海藻酸钠可使所转运的寡核苷酸避免降解,这样可改善药物静脉注射后的生物分布。用海藻酸钠制备的载寡核苷酸微囊,为反义基因治疗的口服给药途径提供了极具潜力的发展空间。

海藻酸钠与阳离子和阳离子高分子 poly-L-lysine 形成凝胶的多样化,使得在水性环境温和条件下可得到从纳米级到微米级范围的不同尺度大小的粒子。作为反义寡核苷酸载体,既是口服给药系统的良好载体,又是非口服给药系统的优良载体。

1.1.3.6 海藻酸在外科修复材料上的应用

海藻酸是从海藻植物中提炼的多糖物质。当海藻酸钙海绵用于伤口接触层时,即与创口渗出液及血液中的钠离子与钙离子进行交换,释放出钙离子,并在创口表面形成一凝胶薄层^[60]。由于钙离子释放,加速了毛细血管末端中血块的形成,从而达到迅速止血。由于表面凝胶层是亲水性的,可使氧气通过而细菌不能通过,并促进新组织的生长,从而对创面起到一定的保护作用,并使创面保持一定的湿度,温度,为创面的愈合创造一个良好的微环境,促使创口及早愈合。另外 Young 和 Sung 用明胶与海藻酸的复合物作人造皮肤,效果良好^[78]。

1.1.3.7 海藻酸在经皮给药系统上的应用

由于水凝胶型透皮制剂在透气性、控缓释、透皮吸收及生物利用度上都有很佳性能,所以,近年来成为世界各国的研制发展方向。

海藻酸钠与离子形成凝胶^[55],符合工艺要求,并且生物功能优良,可使多种药物实现缓控释,在水凝胶型缓控释制剂上有良好的发展空间^[79]。

1.1.4 海藻酸钠作为功能食品的开发

海藻酸及海藻酸盐系列可开发纯天然海洋生物药品,同时该产品还可以作为

保健品的原料、功能食品添加剂和营养强化剂,对保障和促进人体健康有显著功效。该食品添加剂可添加到任何食品/饮料中(如牛奶、咖啡等),营养效果显著,海洋生物提取、纯天然、无任何毒副作用,指标均可量化^[50]。

海藻酸钾、钙、锌、镁等海藻酸盐作为新型低分子化功能性食品添加剂,可制备(1)降脂饮料;(2)降压牛奶、奶伴侣;(3)降压茶、降脂茶;(4)降压、降脂咖啡;(5)降脂糕点;(6)补锌、钾、钙面粉。

利用海藻酸盐凝胶性能、生产各种仿生、仿真食品^[80]。它克服了现有同类技术中的许多缺陷,可以将海藻酸盐及其它全部原、辅料混匀灌入模具中,无须外加条件,静置后脱模即制成为色、香、味、型、结构俱佳的各种仿生、仿真食品,其各种营养成分及其它添加物的配比,是可随意调整的、成品体积、重量不受限制、方法安全、高效,产品属新型功能性保健食品^[13]。

海藻酸钠在食品领域有着极其巨大的推广、发展空间,具体包括: 1.一般食品生产中,用来提高质量或大幅降低生产成本; 2.生产千变万化的仿生、仿真替代食品; 3.研制生产新、奇、特食品或流行、时尚健康快餐; 4.开发功能性食品,指生产瘦身、减肥及其它系列保健食品; 5.做为新型食品工业的基础进行二次开发、向更宽、更深、更广的领域发展。

1.1.5 海藻酸钠的特种品种

我国生产的海藻酸系列产品,多为食品级,没有专门的药品级生产单位,更没有专门的符合药典级别的行业标准,因此,在深加工和开发高档产品,以及制定与国际接轨的药用级别行业标准上具有很好的发展空间。

我国对海藻酸糖药理实验的研究中所用的实验材料多是粗制品,缺乏纯化和组成鉴定技术,一种粗多糖经分级可以提出多种粗多糖。今后应加强海藻酸糖各组分的分离纯化技术。随着近代药理和临床的深入研究和仪器分析的发展,应对海藻酸多糖的化学结构、生物活性、应用及其在医学和药用价值等方面的研究深入下去。

大多数生产厂家的海藻酸糖胶产品纯度低,规格不齐全,缺乏与国际接轨的质量标准,没有符合医药标准的高档产品,缺少高科技领域的应用开发,与国外公司相比,产品价格相差7~10倍,因此,我国的海藻酸糖胶具有很好的发展空间和竞争力。

美国国际特品公司“ISP”看到了中国海藻酸市场的巨大,正在中国寻址建厂,准备生产高科技含量的海藻酸胶产品,可见中国市场的巨大。国内的科研者应与企业结合起来,一方面占领国际市场,同时更要兼顾国内的市场,以防长期利益受损。

21世纪是海洋世纪,海洋技术是当代七大尖端科学技术之一,海藻酸糖胶作

为重要的海洋生物资源,应该受到更多的关注。国内价格虽然偏低,作为重要的海洋生物原材料,象石油、钢铁一样,按照经济运行发展的规律,在不久的将来肯定会迎来价格大幅提升的一天。

综上所述,海藻酸钠胶在高科技领域有广阔的发展空间,纯 M 段、纯 G 段、标准品海藻酸钠、寡聚海藻酸钠糖、特种组成的海藻酸钠样品都属于海藻酸钠特种品,应该进行深入细致的研究。

由于甘露糖醛酸 M、古洛糖醛酸 G 分子构象的不同,而造成 M 段、G 段和 MG 交替段各种性质的差异,如:在医学上, M 段具有抗凝血性,可用来制备抗凝血和心脑血管药物;而 G 段具有止血、凝血功能,可用来制作止血粉、止血剂或织成止血纱布等。M 段在低 pH 酸性介质中可溶,而 G 段在低 pH 值酸性介质中难溶。M 段是分子链伸展型而 G 段分子链是卷曲螺旋型的。“MG”交替型性能介于两者之间。

M 段含量高的海藻酸胶,酯化速度较快,酯化度可达 90%以上,乳化稳定性最好。开发新的海藻酸衍生物时,如将海藻酸与十八碳环氧化物(如 0,i-环氧硬脂酸或 9,10-环氧十八醇)反应,应该选用适当 M/G 组成和分布的海藻酸,以得到所需性能的产品。在海藻酸与各种脂肪酸如丁酸、癸酸、油酸、椰子油、豆油、亚麻油、鱼肝油等的氯化物反应进行酰化时,也应选用合适组成的海藻酸,并先部分水解后再反应。

另外,海藻酸形成凝胶的能力以及所成凝胶的各种性能也与海藻酸的 M/G 含量有关。因此,对海藻酸进行分级提纯,制备纯 M 段、纯 G 段海藻酸产品就显得非常重要。由于天然海藻酸组分的复杂多样性,以纯 G 段、纯 M 段为标准参考物,对某一海藻酸产品进行组分鉴定就显得非常有意义。而要用纯 G 段、纯 M 段作为参考物,就要对他们的结构和性能进行鉴定分析。

海藻酸不同级分的制备,提纯分离和结构组成鉴定,纯 M 段纯 G 段标准物的制备,这些属于海藻酸钠特种品种范围,都要涉及到海藻酸胶的降解,在未来十分有前景的海藻酸胶寡糖的制备中,更离不开海藻酸胶的降解反应。

1.2 海藻酸钠的理化性质研究

海藻酸胶象许多天然生物大分子一样,在单元糖环上具有羧基和羟基等功能基团。海藻酸钠胶带有羧基,是一种阴离子聚电解质,由于古洛糖醛酸和甘露糖醛酸两种糖单元立体构象的不同,使它们的各种物理化学性能也不同,两种糖醛酸在分子中的比例和序列顺序变化,都会直接导致海藻酸的性质差异,如粘性、胶凝性、离子选择性等^[6-13]。由于本身立体结构的特殊性,表现出特殊的物理化学性质,其中在温和条件下与二价阳离子(Ca^{2+} 、 Zn^{2+})等形成凝胶并保持包埋

物生物活性等独特的性质^[82], 再加上海藻酸胶又是生物降解、生物相容、和具生物黏附性^[76], 从而广泛地应用于药学和生物技术等领域^[3,81]。钙锌为生物元素中的必需元素, 钙锌对生命活动有重要意义^[83-85], 海藻酸钠与钙锌离子形成凝胶, 可以使一些药物实现缓释^[71], 引起科研者的极大关注。

不同离子与海藻酸钠的凝胶机理不一样, 形成的凝胶结构和性能也不一样, 决定了它们的应用也不一样。在药物缓控释方面, 不同离子与海藻酸钠形成的凝胶对药物的缓控释也不一样, 如 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 离子相比, 锌离子释放的要慢, 为了更好地应用海藻酸胶, 作为理化性质的一部分, 有必要研究不同离子与海藻酸钠形成凝胶的机理和所成凝胶的性能^[71]。按酸碱理论, 钙离子属于硬酸, 锌离子属于软酸, 可代表两大类金属与配体的相互作用^[86]。

理论化学、分子动态学、超分子化学领域中的等温滴定量热 (ITC)、圆二色谱 (CD)、纳秒光谱仪、分子探针、荧光光谱仪等方法技术可用于海藻酸钠研究, 本论文主要应用了等温滴定量热、圆二色谱技术。

1.2.1 等温滴定量热

人们在自然界中所观察到的任何现象, 例如物理变化、化学变化、生物代谢等过程均有热效应的发生。人们对于这种热效应的认识首先来自触觉。随着人们认识的不断深入和科学技术的发展, 为了定量地研究这类现象和它的规律, 因而产生了量热学。Bell 和 Cowell 在 1913 年首次进行了量热的不连续滴定, 但是直到上世界 60 年代中叶, 这项技术才被意识到可作为一种常规、方便的工具同时测定反应平衡常数、吉布斯自由能变化以及焓变。Linde 等于 1953 年报道了使用电热调节器的量热滴定法, Wasilewski 等于 1964 年将直接注射法引入到量热学中, Ruzicka 和 Hansen 普及推广了流动注射的分析技术, 加上诸如峰焓量热、高灵敏流动量热、酶量热等等相关的技术和仪器共同确立了今天高灵敏度、小体积的量热技术。

化学和物理过程都含有能量变化。量热学的特殊之处就是直接计算这些能量变化的值。状态变化和化学反应的能量变化就构成了热力学学科的内容。因此, 量热法不仅测量最普通的一切反应的性质、能量变化, 而且也提供了解释化学历程的方法。此外, 量热计的测量在整个反应的过程、开始和结束、速率以及平衡中等于任何其他分析方法。

用量热计定量的测量在反应过程中所放出和吸收的热变, 并可根据量热计提供的数据计算像络合物的形成和电荷转移络合的形成平衡反应时的。

等温滴定量热 (ITC) 是测定任何由加入结合组分而引起化学变化的热力学技术, 已经变成表征生物大分子相互作用的首选方法。当物质相互结合时, 总会放出热量或吸收热量, 对这种反应热进行测量可以很精确地测定接合常数

(K)、化学反应计量比 (n), 焓变 (ΔH) 和熵变 (ΔS)。这样, 在一个简单实验中对生物大分子的相互作用进行了全面的热动力学描述。

Sinjan De^[76]等用等温滴定量热 (ITC) 对钙离子与海藻酸钠的相互作用、结合位点、动态过程进行了研究, 同时对聚赖氨酸 (PLL)、壳聚糖与海藻酸的相互作用, 以及二者存在下对钙与海藻酸钠形成凝胶的影响进行了研究, 取得了一定的成果, 考察了上述影响因素下对药物从海藻酸基载体中释放的缓释行为。但没有对凝胶形成的本质进行深入系统研究。仅仅研究了钙离子与海藻酸钠的相互作用, 没有对不同离子 (钙、锌离子) 进行比较。

用等温滴定量热技术测量海藻酸钠等生物大分子与小分子和离子识别中的稳定常数的测定, 比较这些生物大分子体系对金属离子、无机以及有机小分子的识别能力时, 常以其溶液中配位反应的热力学函数 (稳定常数、热焓、熵、吉布斯自由能) 和动力学数据作为量度的基础, 这方面的数据积累对于非共价键的结合, 即弱作用力的研究至关重要, 对于推动这些生物大分子在药物缓控释方面配方的优化设计和工艺改进起着直接重要的作用。

用等温滴定量热仪 (ITC) 来对上述各种离子与海藻酸上的羧基相互作用进行研究。通过反应的热量变化, 求出反应亲合能、热力学基本常数和反应活化能, 并对凝胶动力学过程进行研究。从而从本质上揭示各种离子与海藻酸的羧基之间的相互作用。

1.2.2 圆二色谱

圆二色谱 (circular dichroism, 简称 CD) 是用光学方法研究分子三维空间结构和不对称性的有效方法^[3,93,94], 可方便地对溶液中生物大分子进行研究。CD 谱有许多有利的方面。首先它的峰或负峰的位置与吸收峰的位置基本重叠, 因此每一个谱峰的贡献者是谁可以利用吸收光谱的知识来寻找。用圆二色谱研究海藻酸钠与钙锌离子的相互作用时, 所得数据信息只反映生物大分子的构象变化, 研究对象单一, 数据处理简单可靠, 样品需要量少、操作简单、快捷。是一种很好的研究海藻酸钠等生物大分子的方法。可用圆二色谱对海藻酸钠与钙锌离子相互作用的稳态溶液-凝胶过程、海藻酸钠对钙锌离子的选择识别、相互作用进行研究。

用核磁、等温滴定量热、圆二色对海藻酸钠的结构、与无机离子的动态凝胶过程和对药物释放的研究, 从过去的总体性质测量和关联, 转向在分子、原子和电子轨道尺度上的现象观察、测量和模拟, 从单一领域的研究走向多学科的综合与集成研究。

用宏观微观研究相结合、动态与静态相结合的方法, 更多倾向于微观和动态, 并进一步深入到化学反应控制的研究, 使认识和实践的结合更加紧密, 对药物缓释设计提供理论参考。

Thom^[91]用圆二色(CD)对海藻酸钠的构象进行了研究,对凝胶动力学、结构进行了初步探讨;Rees^[92]用圆二色上的停留装置对离子对黄原胶、卡拉胶的凝胶动力学和机理进行了研究,得到了生物大分子间的三维结合结构和凝胶动力学反应级数。所得信息清晰明了,数据容易分析和理解。随着测试仪器的功能改进和数据处理手段提高,越来越好的性能被开发出来,促进了科研的发展^[3]。国内外缺乏用圆二色谱对海藻酸钠进行深入系统的研究。

1.2.3 其它方法

Zheng 等^[81, 87, 88]用粘度计研究了钙锌离子与海藻酸钠的溶液-凝胶转变,Chan^[71]等观测了钙锌离子与海藻酸钠所成凝胶的外观形貌和对药物缓释性能的不同。Jang^[6]用原子吸收光谱对金属离子在海藻酸钠凝胶形成时表观扩散系数进行了研究,用 Langmuir 模型对静态吸附过程进行描述,Xu^[89]、Pillay^[66]等用扫描电镜(SEM)、Zimmermann 等^[73]用光聚焦显微镜、原子力显微镜观察了凝胶的形貌。

到现在为止,国内外对海藻酸钠凝胶的研究,在医药领域停留在配方研制的水平上,主要通过与其它物质复配、交联、覆膜等来改变药物溶出速度。有些研究者通过调节海藻酸钠、CaCl₂浓度与聚赖氨酸用量来控制粒径大小和分布^[76],分别得到微球(μm 级)和纳粒(nm级)。通过控制制备条件(pH,NaCl浓度)来优化制备条件和控制释放速率。有些科研者通过覆膜和使用交联剂来调控释药速率。这些方法对极少数药物可能有实际效果,但不能从根本上解决问题。要想使制备条件温和、稳定、工艺简便可控,所得微球(或微囊)机械性能良好、符合医药指标载药率、有良好贮存稳定性和符合医药指标的释放速率,需要从海藻酸钠理化性质着手,用物理化学、热力学方法对海藻酸钠的凝胶机理进行研究^[90]。

1.3 本论文主要研究内容

结合生命材料、生物无机化学、医药与物理化学等领域,加强化学理论研究和实验方法和测试技术相配合,将结构化学、理论化学、分子动态学等学科取得的具有前沿性的新方法、新成果应用到海藻酸基凝胶缓控释体系,从原子、分子聚集体开展多层次多尺度的研究,获得海藻酸钠与魔芋葡甘聚糖形成复杂聚集体的机理和结构;钙锌钠等生物无机离子与海藻酸凝胶的识别机理和反应动力学;从而为海藻酸基凝胶的结构性能研究提供依据,并可将凝胶动力学反应过程应用到缓控释药物的制备当中,从而获得更加优良的工艺和配方。通过研究,获得海藻酸钠结构快速简便的测试方法,可为海藻酸开发为医药原材料和制定医药用海藻酸国家标准提供基础研究数据。

本论文的主要研究内容包括：

- a. 用等温滴定量热仪（ITC）对钙锌与海藻酸钠相互作用的本质和凝胶动力学进行研究，
- b. 用圆二色色谱找到海藻酸的特征吸收峰。用圆二色色谱（CD）设计一种快速简便准确测定海藻酸结构的方法；在特征峰处研究海藻酸钠的性质及与钙锌离子的相互作用；
- c. 用重量增加法研究海藻酸钠凝胶过程中的膨胀收缩性能，将宏观现象与微观机理结合起来，从宏观现象对所得微观机理进行验证；
- d. 将等温滴定量热仪（ITC）、圆二色谱（CD）、粘度测试、膨胀收缩几种方法相结合，从原子、分子聚集体开展多层次多尺度的研究，采用微观与宏观相结合，静态与动态相结合，对海藻酸钠凝胶药物缓释体系进行研究。
- e. 对海藻酸胶进行分级和结构鉴定，研究 G-lyase 酶对 poly-G-blocks 的降解；并对海藻酸钠样品 LVCR 的结构进行了分析。

第二章 用 ITC 研究海藻酸钠溶胶-凝胶转变过程热力学

海藻酸钠是可与二价金属离子络合形成水凝胶(Mg^{2+} 除外)。由于具有生物相容性良好与凝胶过程温和等特点,使海藻酸盐在生物工程、组织工程及医药等方面得到了广泛的应用^[2, 3, 95]。钙锌为生物元素中的必需元素,对生命活动有重要意义^[83, 84, 85]。海藻酸钠与钙锌离子形成凝胶,可使一些药物实现缓释^[71],引起科研者的极大关注。

不同离子与海藻酸钠的凝胶机理不一样,形成的凝胶结构和性能也不一样,决定了它们的应用也不一样。在药物缓控释方面,不同离子与海藻酸钠形成的凝胶对药物的缓控释也不一样,如 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 离子相比,锌离子释放的要慢,为了更好地应用海藻酸胶,作为理化性质的一部分,有必要研究不同离子与海藻酸钠形成凝胶的机理。

当物质相互结合时,总会放出热量或吸收热量,用量热计定量的测量在反应过程中所放出和吸收的热变,并可根据量热计提供的数据计算像络合物的形成和电荷转移络合的形成平衡反应时的焓变值^[96]。反应的自由能(ΔG)和熵变(ΔS)通过公式(2-1)和公式(2-2)计算得到。

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (2-1)$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T \quad (2-2)$$

等温滴定量热法(ITC)是近年发展起来的一种原位、在线和无损伤地研究生物大分子与其它物质相互作用时的热力学与动力学的重要方法^[97, 98]。ITC是一种溶液测试方法,与其它方法相比,ITC不需要固载化或修饰化,也不需要分子量有任何限制,因为结合热是自然产生的现象,ITC通常被用来研究任何形式的配位接合反应,ITC非常快而且提供丰富的信息^[90, 99, 100]。一个典型的ITC实验只需要30~60分钟。用ITC方法,在一个简单的实验中,两种甚至更多不同类型的结合位点都能被完全同时分析出来,甚至能够分析混浊溶液或颗粒混悬液。

用等温滴定量热仪(ITC)对钙锌离子与海藻酸钠上的羧基相互作用进行研究。通过反应的热量变化,求出反应亲合能 K 、焓变 ΔH 和熵变 ΔS 等热力学基本常数;与红外、SEM 照片、药物溶出相结合,对凝胶动力学过程进行研究,从热力学上揭示各种离子与海藻酸钠之间的相互作用。

2.1 实验部分

2.1.1 试剂和仪器

海藻酸钠(型号LVCR, 药品级, 美国特品公司ISP, 粘均分子量为 2.11×10^5);

卵清蛋白 (ovalbumin), Sigma公司, 直接使用; 魔芋葡甘聚糖 (KGM), 食品级, 湖北武汉清江魔芋食品有限公司; 其余试剂均为分析纯。

D-800LS 型智能药物溶出仪 (天津大学无线电厂); 752 型紫外分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司); 等温滴定量热仪 (美国 MicroCal Incorporated 公司); 扫描电镜 (PHILIPS XL 30 ESEM, Japan)。

2.1.2 钙锌离子与海藻酸钠相互作用的等温滴定量热实验

钙锌离子与海藻酸钠LVCR相互作用时中间态热力学性质的测定在美国 MicroCal公司生产的VP-ITC型等温滴定量热仪上进行。滴定实验中, 将125 μ l的 CaCl_2 (9mM)或 ZnSO_4 (10.54mM)水溶液装入250 μ l的滴定注射器中, 1.4ml的LVCR水溶液 (1.25mM) 放入样品池中, 每间隔一定时间 (Ca^{2+} 为240s, Zn^{2+} 为200s) 加入5 μ l离子溶液到海藻酸钠溶液中, 共滴25次。参比池中加入去离子水作为样品池的热平衡参照。须另做一空白实验以扣除离子 (CaCl_2 或 ZnSO_4) 稀释热的影响, 即在样品池中加入去离子水, 用离子溶液 (CaCl_2 或 ZnSO_4 水溶液) 滴定, 可得离子的稀释热。所有的溶液都在相应温度条件下真空脱气处理以减小信号噪音, 积分每个峰面积并扣除稀释热后得到结合反应热, 对离子 (Ca^{2+} 或 Zn^{2+}) 与海藻酸钠LVCR的摩尔比作图得到反应等温线。以MicroCal公司提供的Origin软件 (版本5.0) 中的相应模型 (Zn^{2+} 用一个位点拟合程序, Ca^{2+} 用两个位点拟合程序) 进行非线性最小方差拟合, 可计算出钙锌离子与海藻酸钠相互作用的热力学参数。

在魔芋葡甘聚糖对钙锌离子sol-gel过程的影响中, 连续滴加5 μ l CaCl_2 溶液 (9.0mM) 或 ZnSO_4 溶液 (10.54mM) 到海藻酸钠LVCR (1.25mM) 与魔芋葡甘聚糖混合溶液中进行量热滴定实验, 其余同上。

2.1.3 海藻酸凝胶颗粒与载蛋白质海藻酸凝胶颗粒的制备

将1 mL2% (w) 的海藻酸钠溶液 (或海藻酸钠与魔芋葡甘聚糖的混合溶液, 海藻酸钠浓度2% (w/v), 魔芋葡甘聚糖浓度1% (w/v)), 滴加入20 mL 0.20 mol / L的氯化钙、硫酸锌水溶液中, 凝胶4 h后(凝胶过程达到饱和)过滤, 用水冲洗干燥。湿态凝胶颗粒粒径3 mm左右。

将卵清蛋白与海藻酸钠溶液 (或海藻酸钠魔芋葡甘聚糖混合溶液) 混合均匀, 海藻酸钠溶液的质量百分比浓度为2%, 蛋白质质量浓度20mg / mL。将1 mL混有蛋白质的海藻酸钠溶液滴加入20 mL 0.20 mol / L的氯化钙、硫酸锌水溶液中, 为防止蛋白质在凝胶液中释放, 凝胶液中加入与凝胶中等浓的蛋白质。凝胶4 h后(凝胶过程达到饱和)过滤, 用水冲洗干燥。湿态凝胶颗粒粒径3 mm左右。

2.1.4 海藻酸凝胶颗粒的SEM照片

将凝胶30 min的湿态海藻酸钙、海藻酸锌凝胶颗粒冷冻干燥，用扫描电镜观察凝胶颗粒断面结构。

2.1.5 蛋白质的释放

在智能药物溶出仪中，恒温37℃，转速180 r/min，将含有蛋白质的凝胶颗粒放入20 mL水溶液中，定时取样用紫外分光光度计在280 nm下测定释放液中的蛋白质含量

2.2 结果与讨论

2.2.1 钙锌离子与海藻酸钠相互作用的热力学过程研究及其对药物释放的影响

图 2-1 是 CaCl_2 水溶液 (9.0mM) 滴定海藻酸钠 LVCR 的量热曲线，图 2-2 是 ZnSO_4 (10.54mM) 滴定海藻酸钠 LVCR 的量热曲线。由实验得到的钙锌离子与海藻酸钠相互作用的热力学参数列于表 2-1。由图 2-1 可知，钙与海藻酸钠相互

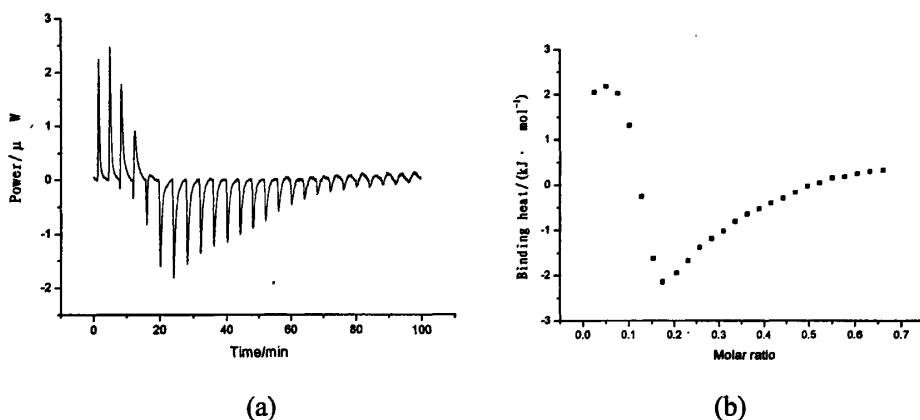


图 1-1 海藻酸钠 LVCR 与 CaCl_2 在双蒸水中的滴定曲线

(a) 连续滴加 5 μl CaCl_2 溶液 (9.0mM) 到海藻酸钠 LVCR 溶液 (1.25mM) 中的滴定曲线；(b) 相应于滴定曲线积分得到的反应热变化曲线

Fig.1-1 Calorimetric titration of alginate LVCR with CaCl_2 in double distilled water at 25°C (a) Raw data for sequential injection of 5 μl CaCl_2 solution (9.0mM) into alginate LVCR solution (1.25mM); (b) Heats of reaction as obtained from the integration of the calorimetric traces

作用时分前后两段，对应于两个结合位点。第一阶段是吸热反应，结合常数 $K_1=1.21\text{E}7(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$ ，熵变 $\Delta S_1=141.84(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$ ，焓变 $\Delta H_1=1.89(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$ ；第

二阶段是放热反应, 结合常数 $K_2=2.90E4(L\cdot mol^{-1})$, 熵变 $\Delta S_2=79.08(J\cdot mol^{-1}\cdot K^{-1})$, 焓变 $\Delta H_2=-1.84(kJ\cdot mol^{-1})$. 第一阶段是熵驱动的, 第二阶段是熵焓共同驱动的. 由图 2-2 可知, 锌与海藻酸钠相互作用时只有一个结合位点, 结合常数 $K=9472(L\cdot mol^{-1})$, 熵变 $\Delta S=128.95(J\cdot mol^{-1}\cdot K^{-1})$, 焓变 $\Delta H=15.8(kJ\cdot mol^{-1})$, 焓变比钙与海藻酸钠相互作用时大许多, 可能是锌离子比钙离子的生成热大许多造成的; 比钙与海藻酸钠相互作用时第一阶段的熵变值小, 比第二阶段的熵变值大. 锌与海藻酸钠相互作用时是吸热反应, 凝胶过程是熵驱动的.

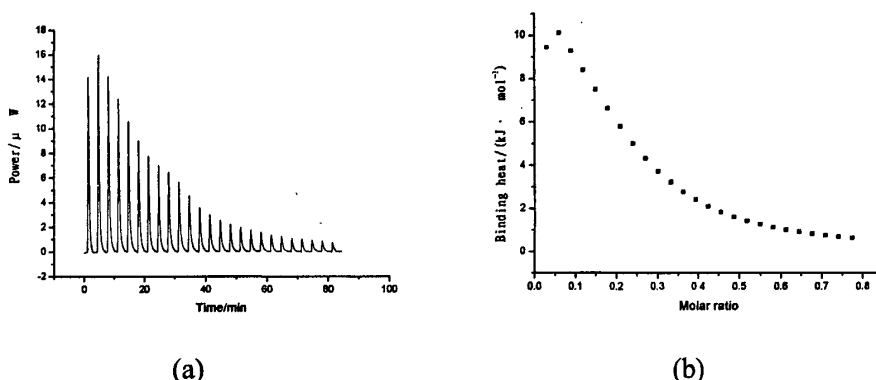


图 2-2 海藻酸钠 LVCR 与 $ZnSO_4$ 在双蒸水中的滴定曲线

(a) 连续滴加 $5\mu l$ $ZnSO_4$ 溶液 ($10.54mM$) 到海藻酸钠 LVCR 溶液 ($1.25mM$) 中的滴定曲线; (b) 相应于滴定曲线积分得到的反应热变化曲线

Fig.2-2 Calorimetric titration of alginate LVCR with $ZnSO_4$ in double distilled water at $25^\circ C$ (a) Raw data for sequential injection of $5\mu l$ $ZnSO_4$ solution($10.54mM$) into alginate LVCR solution($1.25mM$);(b)Heats of reaction as obtained from the integration of the calorimetric traces

图 2-3 (a) (b) 分别是 2%海藻酸锌、海藻酸钙冷冻干燥颗粒断面的扫描电镜 (SEM) 照片, 从照片可知海藻酸钙内部交联点比较少, 空腔很大; 而在海藻酸锌内交联点很多, 空腔比较小, 腔与腔之间的隔膜比较多, 可阻碍物质扩散^[71].

图 2-4 是卵清蛋白 (ovalbumin) 从海藻酸钙海藻酸锌凝胶颗粒中随时间的扩散释放曲线。由图可知海藻酸锌凝胶颗粒中, 卵清蛋白的释放速度比海藻酸钙凝胶颗粒中的慢 2~3 倍, 24 小时后, 海藻酸钙中的释放率可达到 81.3%, 而海藻酸锌中的释放率只有 29.1%, 二者释放情况明显不同, 海藻酸锌凝胶比海藻酸钙凝胶对卵清蛋白扩散阻滞作用强。正如 SEM 照片所示, 这是由于海藻酸锌凝胶内交联点比海藻酸钙内多造成的。

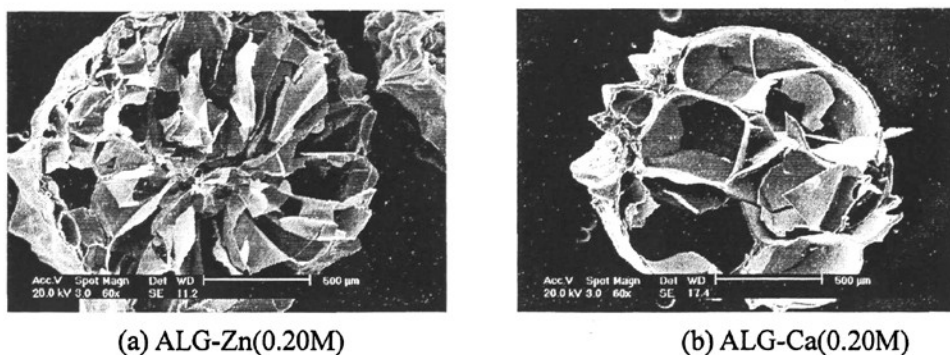


图 2-3 海藻酸凝胶颗粒的扫描电镜照片

Fig.2-3 Scanning electron micro graphs of the alginate(ALG) gel beads:(a)ALG-Zn beads,concentration of zinc is 0.20M;(b)ALG-Ca beads,concentration of calcium is 0.20M.Bar=500μm

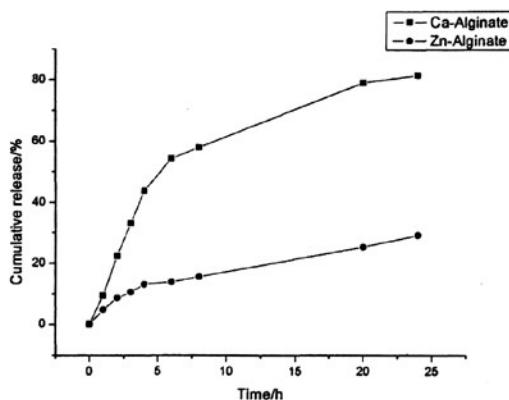


图 2-4 卵清蛋白从海藻酸锌海藻酸钙颗粒中的释放曲线

Fig.2-4 Ovalbumin release curve from Zn-alginate and Ca-alginate beads

生物大分子与金属离子的配位结合倾向经常受软硬酸碱理论的制约。软意味着体积大且易被极化，而“硬”意味着体积小且不易被极化^[86]。金属离子可以认为是 Lewis 酸；生物大分子上与金属离子配位的基团可以认为是 Lewis 碱。软硬酸碱匹配和尺寸匹配关系决定了主体与离子间的配位作用强度^[101]。

表 2-1 是钙锌离子与海藻酸钠相互作用的热力学参数，表 2-2 是钙锌离子的特征参数。按酸碱理论，钙属于硬酸，锌属于中等程度的酸，海藻酸钠糖醛酸上的羧基氧以及羟基氧属于硬碱，所以钙与海藻酸钠的相互作用比锌与海藻酸钠的相互作用强。 $K < K_2 < K_1$ 验证了这一理论。

从熵上考虑，未配位前溶液中的 Ca(II) 阳离子以及糖醛酸上的羧基是溶剂化的， Ca(II) 与古洛糖醛酸上的羧基配位后。二者所缔合的溶剂分子将被脱掉而导

致熵增^[102]。这种脱溶剂化效应补偿了配体构型变化所引起的熵损失，使键合过程表现出正的熵变。

表 2-1 钙锌离子与海藻酸钠相互作用的热力学参数

Table2-1 Thermodynamic parameters for complexation of calcium and zinc ions with alginate LVCR

	K/(L·mol ⁻¹)	ΔS/(J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	ΔH(kJ·mol ⁻¹)
Zn-Alginate	K=9472	ΔS=129.0	ΔH=15.80
Ca-Alginate	K ₁ =1.210E7	ΔS ₁ =141.8	ΔH ₁ =1.890
	K ₂ =2.900E4	ΔS ₂ =79.08	ΔH ₂ =-1.840

表 2-2 钙锌离子的特征参数

Table2-2 Characteristic parameters of calcium and zinc ions

离子 种类	酸碱 理论	原子 半径 (10 ⁻¹⁰ m)	离子 半径 (10 ⁻¹⁰ m)	共价 半径 (10 ⁻¹⁰ m)	原子 电子 排布	离子 电子 排布
Ca ²⁺	Rigid	1.97	0.99	1.74	3s ² 3p ⁶ 4s ²	3s ² 3p ⁶
Zn ²⁺	Middle	1.33	0.74	1.25	3s ² 3p ⁶ 3d ¹⁰ 4s ²	3s ² 3p ⁶ 3d ¹⁰

由古洛糖醛酸单元之间形成的空隙与 Ca²⁺离子大小相适应，Ca²⁺离子嵌入空隙中^[76, 92]，与糖环上的羧基、氧原子等基团的距离适度，相互作用强。由于相互作用比较强，带动高分子链的构象发生很大变化，使高分子链向已存在的交联点聚集^[103]，形成很大的空腔。

第二阶段是 M 单元上的羧基以及糖环上的其它氧原子与钙发生反应，相互作用力比较低，距离也比较远，因此脱溶剂化程度较低。Ca(II)离子与相应基团间属于离子-偶极相互作用，属于放热反应，同时构象变化也比较低，所以是熵焓共同驱动的反应。

锌离子由于半径比较小，与古洛糖醛酸之间的空腔匹配时有更多的空隙，同时又是中等强度的酸，与羧基氧之间是不太强的相互作用，因此，与 M 单元 G 单元之间的相互作用区分不太明显。但相互作用力又不是太弱，使得缔合的溶剂水分子被脱掉后，与氧原子相互作用，同时伴有一定程度的构象变化，即由于高分子链段在锌离子与氧原子相互作用力牵引下，向已有交联点聚集^[103]，从而形成比较密集交联点和细长孔状的空腔。ΔS₂ < ΔS < ΔS₁ 可看出钙锌离子引起海藻酸钠构象变化程度的强弱。

由于钙锌离子电子云密度和离子半径大小的不同(表 2-2), 使得他们与海藻酸钠相互作用时的热力学不同, 驱动力不同, 与海藻酸钠 LVCR 结合能力大小相差很大, 形成的凝胶结构也不一样, 对卵清蛋白的释放也不一样。

2.2.2 魔芋葡甘聚糖对海藻酸钠与钙锌离子 sol-gel 过程的影响

表 2-3 是钙锌离子滴定海藻酸钠与魔芋葡甘聚糖混合液的热力学参数。与表 2-1 相比, 相应参数变小。焓变值减小, 熵变值减小, 说明魔芋葡甘聚糖阻止了钙锌离子与海藻酸钠的相互作用。但粘度测试表明, 加入魔芋葡甘聚糖添加剂后, 在相转变点附近, 海藻酸钙凝胶相对粘度明显增加, 产生明显的协同增效作用。

表 2-3 魔芋葡甘聚糖存在下钙锌离子与海藻酸钠相互作用的热力学参数
Table2-3 Thermodynamic parameters for complexation of calcium and zinc ions with alginate LVCR

	$K/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$	$\Delta H(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
Zn-KGM-Alginate	$K=1493$	$\Delta S=103.2$	$\Delta H=12.64$
Ca-KGM-Alginate	$K_1=4.600\text{E}5$	$\Delta S_1=113.5$	$\Delta H_1=1.512$
	$K_2=2.200\text{E}3$	$\Delta S_2=59.31$	$\Delta H_2=-1.380$

这些实验说明, 魔芋葡甘聚糖与海藻酸钙凝胶混合体系, 由于强烈的分子间交联, 高分子间相互聚集, 所形成的大分子团簇, 与双螺旋结构有点相似, 魔芋葡甘聚糖没有分支链的部分与海藻酸高分子聚集体以次级键形式相互结合形成三维网状结构, 从而产生强烈的协同增效作用。KGM 将会缠绕在海藻酸高分子链周围, 从而影响了钙离子与海藻酸的结合。

对于锌离子凝胶系统, 魔芋葡甘聚糖加入会使得体系的相应热力学参数变小, 相对粘度略有下降。这可能是由于锌离子与海藻酸的结合能力较弱, 无法克服魔芋葡甘聚糖对溶胶-凝胶过程的阻碍作用。由此也表明魔芋葡甘聚糖的加入对海藻酸的凝胶过程有两个相反的作用。一是由于魔芋葡甘聚糖对金属离子与海藻酸结合位点的遮蔽作用, 二是若金属离子与海藻酸的结合能力较强, 克服了魔芋葡甘聚糖对溶胶-凝胶过程的阻碍作用, 魔芋葡甘聚糖将会与部分交联的海藻酸凝胶进一步结合, 产生明显的协同增效作用。

从海藻酸-魔芋葡甘聚糖凝胶颗粒红外吸收曲线(图 2-7)可发现, 由于海藻酸与魔芋葡甘聚糖间的相互作用, 一些吸收峰减弱或消失了。海藻酸中 2950cm^{-1} 处-CH 伸展峰与魔芋葡甘聚糖中 2920 、 2885cm^{-1} 处-CH 伸展峰消失了。魔芋葡

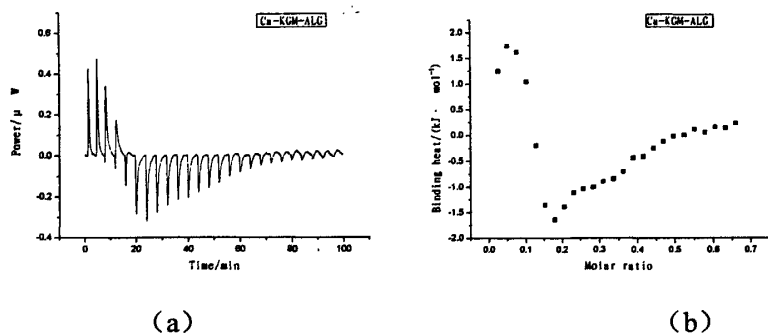


图 2-5 海藻酸钠 LVCR 魔芋葡甘聚糖混合溶液与 CaCl_2 在双蒸水中的滴定曲线
 (a) 连续滴加 $5\mu\text{l}$ CaCl_2 溶液 (9.0mM) 到海藻酸钠 LVCR (1.25mM) 与魔芋葡甘聚糖混合溶液中的滴定曲线; (b) 相应于滴定曲线积分得到的反应热变化曲线
 Fig.2-5 Calorimetric titration of alginate LVCR and KGM mixture solution with CaCl_2 in double distilled water at 25°C . (a) Raw data for sequential injection of $5\mu\text{l}$ CaCl_2 solution (9.0mM) into alginate LVCR (1.25mM) and KGM mixture solution; (b) Heats of reaction as obtained from the integration of the calorimetric traces

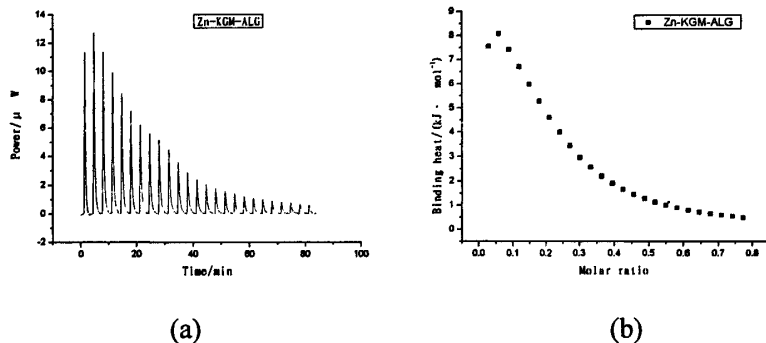


图 2-6 海藻酸钠 LVCR 魔芋葡甘聚糖混合溶液与 ZnSO_4 在双蒸水中的滴定曲线
 (a) 连续滴加 $5\mu\text{l}$ ZnSO_4 溶液 (10.54mM) 到海藻酸钠 LVCR (1.25mM) 与魔芋葡甘聚糖混合溶液中的滴定曲线; (b) 相应于滴定曲线积分得到的反应热变化曲线

Fig.2-6 Calorimetric titration of alginate LVCR and KGM mixture solution with ZnSO_4 in double distilled water at 25°C . (a) Raw data for sequential injection of $5\mu\text{l}$ ZnSO_4 solution (10.54mM) into alginate LVCR (1.25mM) and KGM mixture solution; (b) Heats of reaction as obtained from the integration of the calorimetric traces

甘聚糖中 1730cm^{-1} 处乙酰基特征吸收峰也看不到了。可能由于海藻酸 1620cm^{-1} 处的 COO^- 与魔芋葡甘聚糖 1640cm^{-1} 处的分子间氢键相互作用, 从而在 1630cm^{-1} 处出现了一个新的吸收峰。同时由于混合体系中 COO^- 浓度相对较低, 1620cm^{-1} 处的吸收峰变得相对较弱。同理 1438cm^{-1} 处震动峰几乎消失。此外海藻酸 1040cm^{-1} 处的 C-O-C 与魔芋葡甘聚糖相互作用在 1070cm^{-1} 处出现了一个较为伸展大峰。以上试验结果表明, 在凝胶过程中魔芋葡甘聚糖被保留在凝胶颗粒内, 且其与海藻酸凝胶间存在微弱的氢键与静电相互作用。从而影响了钙锌离子与海藻酸钠的相互作用, 产生阻滞或协同增效作用。

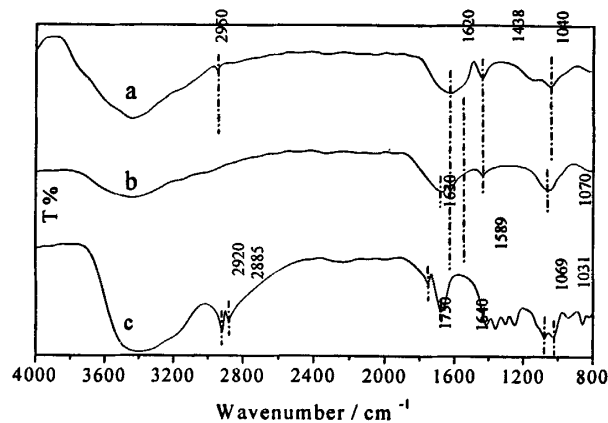


图 2-7 凝胶颗粒的红外谱图

Fig.2-7 IR spectra of the beads. a, ALG(2%) beads; b, ALG(2%)-KGM(0.5%) beads; c KGM beads

2.2.3 魔芋葡甘聚糖对蛋白质释放的影响

图 2-8 给出了魔芋葡甘聚糖对蛋白质从海藻酸钙凝胶中释放的影响, 由图可知, 对于加入魔芋葡甘聚糖的海藻酸钙凝胶颗粒, 蛋白质的释放速率较快, 这可能是魔芋葡甘聚糖较为分散地分布在凝胶中, 在释放过程中的泄漏比较明显, 从而形成较为均匀的小孔, 作用相当于制孔剂, 使得 BSA 的释放速率增加。

图 2-9 给出了不同凝胶离子浓度对 BSA 在含有魔芋葡甘聚糖凝胶颗粒中释放的影响。由图可见凝胶离子浓度对 BSA 在 ALG-KGM 颗粒中的释放没有显著影响,

比较释放率随离子浓度的变化, BSA 在加入魔芋葡甘聚糖颗粒中的释放率随离子浓度变化不大, 这是由于魔芋葡甘聚糖的存在会降低凝胶离子与海藻酸的结合速度及在凝胶中的扩散速度, 使得凝胶浓度与 BSA 在颗粒内的分布受离子浓度的影响较小, 从而释放速率的变化不大。

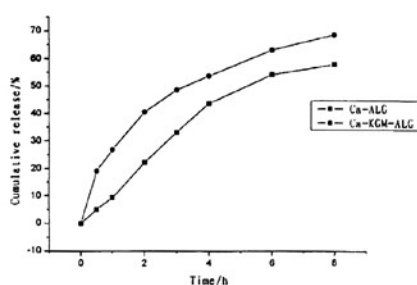


图 2-8 KGM 对蛋白质从海藻酸钙凝胶中释放的影响

Fig.2-8 Influence of KGM on release of Protein from calcium alginate gel

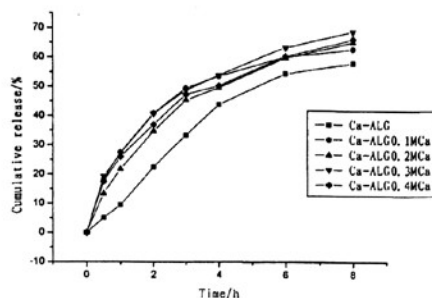
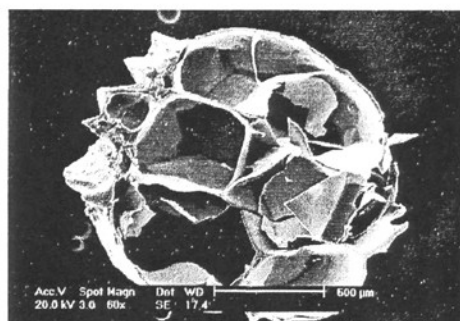


图 2-9 钙离子浓度对蛋白质从海藻酸钙-魔芋葡甘聚糖颗粒中释放的影响

Fig.2-9 Influence of calcium concentration on release of porotein from calcium alginate-KGM gel beads

在凝胶颗粒内部,海藻酸钙凝胶是较为均匀的蜂窝状园孔,而在海藻酸-魔芋葡甘聚糖凝胶颗粒内,是体积比较小,交联点比较多,分布比较均匀的狭长孔。



(a) Ca-ALG



(b) Ca-KGM-ALG

图 2-10 海藻酸魔芋葡甘聚糖凝胶颗粒的扫描电镜照片

Fig.2-10 Scanning electron micro graphs of the alginate(ALG)-KGM gel beads:(a) Ca-ALG beads;(b) Ca-KGM-ALG beads,KGM concentration is 1% (w/v). Bar=500μm.

加入魔芋葡甘聚糖将会使凝胶内部的浓度分布较为均一,这可能是由于魔芋葡甘聚糖的存在,使得海藻酸与钙离子的结合受到影响,凝胶的强度与凝胶速度都较低,使得体系的均一程度较高。由于结合强度低,使得蛋白质等大分子容易透过,与前面释放试验结果相同。

另外添加魔芋葡甘聚糖的凝胶颗粒,随凝胶离子浓度的增大粒径变化不大,这可能是由于魔芋葡甘聚糖分子量与粘度较大,使体系的刚性较强,从而凝胶的

收缩性较小。另外魔芋葡甘聚糖阻滞了凝胶离子与海藻酸钠的结合。体现在熵上,熵变减小,焓变减小,结合常数减小,但协同作用增加。从而凝胶离子浓度对含有魔芋葡甘聚糖添加剂的海藻酸钙凝胶释放性能影响不大。

2.2.4 热力学机理研究

海藻酸钠与钙锌离子在键和过程中,糖醛酸会发生一定的构象变化,即原来自由的链段参与了阳离子的配位而导致了整个分子链的构象固定化,这种构象固定化必然会带来一定的熵损失。另一方面,未配位前溶液中的阳离子是溶剂化的,参与配位后,阳离子所缔合的溶剂分子将被脱掉而导致熵增。这种脱溶剂化效应补偿了配体构型变化所引起的熵损失,使键合过程表现出正的熵变。

熵的因素对决定离子-配体稳定性也起着重要的作用^[101],因为一方面配体要经历构型的变化以适应与阳离子的配位,包括最大限度地适应离子-配体相互作用和尽量避免因配位而导致的配体变形应力;另一方面,原来被溶剂化的阳离子和配体分子必须脱除溶剂分子以便进行配位。这样,配体的构型变化和阳离子的脱溶剂就成为通过熵的变化而影响离子-配体相互作用的关键概念。

单独从熵的观点来看,海藻酸钠与二价阳离子的配位过程,伴随着海藻酸钠糖醛酸构象的变化和与阳离子的缔合,是个熵减的过程,但熵的损失可以通过释放与海藻酸钠以及阳离子结合的水分子来补偿。据 Sinjan De 等人^[76,92]研究证明,海藻酸钠大分子中的 G 单元形成的空腔与钙离子大小相适配,使得钙离子与海藻酸钠的结合最稳定,从 G 单元空腔中释放的水分子最多,因此,熵增最大。而水分子从海藻酸钠 G 单元空腔脱去以及从钙离子上脱去都是放热过程,因此焓变值相对变小。表 2-5 是钙锌铜离子与海藻酸钠相互作用的热力学参数,同理可解释锌铜离子与海藻酸钠相互作用时的熵变相对减小和焓变相对增大现象。以上分析也说明能量是电荷/偶极、距离的函数。

在钙锌铜离子与海藻酸钠相互作用中, $\Delta H > 0, \Delta S > 0$,都是熵稳定的配合物并伴随着大或小的不利的正的焓变。从图 2-11 可知,将钙锌铜离子与海藻酸钠反应时的相应 $T\Delta S$ 对 ΔH 作图,三点接近于线性关系^[104]。1955 年 Leffler 首先提出了一个叫做“等动力学关系”(Isokinetic Relationship)^[105]的热力学概念。认为 ΔS 和 ΔH 的变化是相互补偿的,即

$$\Delta H^* = \beta \Delta S^* \quad (2-3)$$

这里的 β 是一个被叫做“等动力学温度”(Isokinetic Temperature)的系数。 ΔS 和 ΔH 之间的线性关系(式 2-3)意味着 $T\Delta S$ 的变化与 ΔH 的变化是呈比例的,即有表达式(2-4)的关系,对等式(2-4)积分得到公式(2-5)。该等式中的 α 和 $T\Delta S_0$ 分别代表图 2-11 中的斜率和截距。等式(2-5)表明熵的变化包括两部分:一部分是按比例的焓变,另一部分是不变的熵值。将式(2-4)插入公式(2

—6) 的微分形成式 (2-7) 中就可以得到式(2-8)。这样, 焓熵补偿效应反过来又与焓控制的配位稳定性是同义的。

$$T\delta(\Delta S) = \delta(\Delta H) \quad (2-4)$$

$$T\Delta S = \alpha\Delta H + T\Delta S_0 \quad (2-5)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2-6)$$

$$\delta(\Delta G) = \delta(\Delta H) - T\delta(\Delta S) \quad (2-7)$$

$$\delta(\Delta G) = (1-\alpha)\delta(\Delta H) \quad (2-8)$$

图 2-11 中的斜率 (α) 为 -1.586, 截距 ($T\Delta S_0$) 为 $65.34\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 线性相关性为 0.997. $\Delta H > 0$ 表明脱溶剂化作用增加的熵变贡献于配合物的形成. α 和 $T\Delta S_0$ 值可以用来定量度量配合物形成过程中的构型变化和脱溶剂效应. α 的值为 -1.586 表明构型变化特别大, $T\Delta S_0$ 的值为 $65.34\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 表明钙锌铜离子在与海藻酸钠配位时发生了大的脱溶剂效应^[106], 与前面所得结论相同。

图 2-11 用最小二乘法拟合给出了很好的相关系数值 ($R=0.997$), 说明焓熵补偿理论的有效性. 由于斜率为 -1.586, 也就是说由于离子半径的减小所导致的钙锌铜离子与海藻酸钠配位结合的减弱, 使得脱溶剂化引起的焓变增加, 再加上构象变化和脱溶剂化减弱引起的熵增减少, 从而使得净配位稳定性的减弱 (ΔG) 远远大于单个的 ΔH 和 $T\Delta S$ 的贡献. 另外斜率的绝对值为 1.586, 说明焓的增加将导致 158.6% 的熵减少。

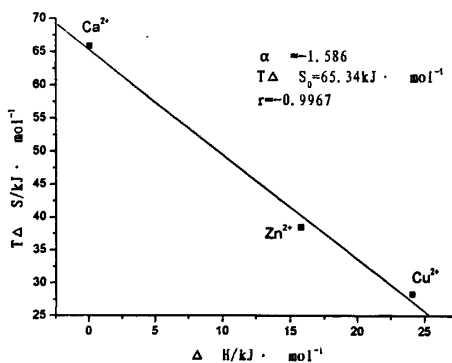


图 2-11 海藻酸钠与二价阳离子配合时的焓熵补偿关系曲线

Fig.2-11 Enthalpy-entropy complexation plot for the complexation of sodium alginate with divalent cationic ions

在配位过程中的溶剂化扮演了另外一个重要的作用^[106]. 在络合过程中, 首先溶剂化的阳离子及配体的构象要发生大的变化. 离子与配体的络合过程伴随着

配体上的供电子原子要部分地取代被阳离子缔合的溶剂分子,脱溶剂化的程度与离子的大小和电子云形状密度有关.正的截距说明即使缺乏焓增($\Delta H=0$),配位反应可以依靠正的熵的贡献($T\Delta S_0>0$)而进行,这时由脱溶剂化效应而获得正的熵增就成为配位反应的主要驱动力.此时不管焓变是零还是正值,络合物的配位稳定性都毫无例外地由于正的熵变而增加.

从前面的讨论中我们可以知道,正的 $T\Delta S_0$ 被认为是络合过程中内在的熵增,这与配体的构象有关,主要来自于阳离子络合过程中的脱溶剂化效应.这种内在的熵增代表了有多少溶剂化的阳离子被配体的供电子原子代替、以及络合过程中被释放的溶剂分子的近似比例.最后可以得出结论,即可以用由 $T\Delta S-\Delta H$ 曲线图得到的 α 值和 $T\Delta S_0$ 值来描述通过静电相互作用结合的离子-海藻酸钠配合物的配位行为。

表 2-4 钙锌铜离子的特征参数

Table2-4 Characteristic parameters of calcium, zinc and cupric ions						
阳离子 种类	酸碱理 论软硬 度	原子半径 (10^{-10}m)	离子半径 (10^{-10}m)	共价半径 (10^{-10}m)	原子电子排 布	离子电子 排布
Ca^{2+}	硬	1.97	0.99	1.74	$3s^23p^64s^2$	$3s^23p^6$
Zn^{2+}	中	1.33	0.74	1.25	$3s^23p^63d^{10}4s^2$	$3s^23p^63d^{10}$
Cu^{2+}	中	1.28	0.72	1.17	$3s^23p^63d^94s^2$	$3s^23p^63d^9$

表 2-5 钙锌铜离子与海藻酸钠相互作用的热力学参数

Table2-5 Thermodynamic parameters for complexation of calcium, zinc and cupric ions with alginate LVCR

	$K/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$	$\Delta H(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
Ca-Alginate	$K=3.385\text{E}11$	$\Delta S=220.9$	$\Delta H=0.050$
Zn-Alginate	$K=9472$	$\Delta S=128.9$	$\Delta H=15.80$
Cu-Alginate	$K=9.024\text{E}4$	$\Delta S=94.87$	$\Delta H=24.09$

由于配位反应的熵变和焓变显示出良好的线性相关性,说明二价阳离子与海藻酸钠为静电型的相互作用.尺寸适合的概念适用于解释二价阳离子与海藻酸钠配位过程热力学量的总趋势,可以说明或预期尺寸最匹配的主-客体化合物间可以给出最高的配合物稳定性^[107].

铜离子比钙离子小,在 G 单元形成的空腔中留有一定间隙,可容纳一定量的

水分子,使得脱溶剂化的水分子相对减少,铜的 $T\Delta S_0$ 值相对最小,证明了这一点。

钙锌铜离子半径依次在减小,与海藻酸钠相互作用时的焓变在增加,熵变在减少,说明这些变化和离子的半径大小和电子云形状及密度有非常密切的关系。软硬酸碱匹配和尺寸匹配关系决定了主体与离子间的配位作用强度^[10]。

需要进一步指出,用于焓熵补偿关系的二价阳离子与海藻酸钠配位过程的热力学数据比较少,因此目前所得出的结论在扩展应用范围时还应有所保留。今后应加强这方面的研究。

2.3 结论

通过以上实验研究,结果表明:

(1) Ca^{2+} 与海藻酸钠相互作用时有两个结合位点,分别对应 $K_1=1.21\text{E}7(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$, $\Delta S_1=141.84(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$, $\Delta H_1=1.89(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$; $K_2=2.90\text{E}4(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$, $\Delta S_2=79.08(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$, $\Delta H_2=-1.84(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$ 。锌与海藻酸钠相互作用时只有一个结合位点,结合常数 $K=9472(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$,熵变 $\Delta S=128.95(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$,焓变 $\Delta H=15.8(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$;海藻酸锌凝胶比海藻酸钙凝胶对卵清蛋白扩散阻滞作用强。

(2) BSA 释放试验表明,在 ALG-KGM 凝胶中,BSA 释放速度较快,这与魔芋葡甘聚糖泄漏,形成较大释放孔径有关;随离子浓度增加,释放速率没有明显变化,这与魔芋葡甘聚糖粘度较大,使得钙离子凝胶与扩散速度降低有关。从溶胀凝胶 SEM 照片可知,添加有魔芋葡甘聚糖的海藻酸钙凝胶中,是体积比较小,交联点比较多,分布比较均匀的狭长孔。这将有助于增加凝胶的稳定性和缓释性能。

(3) 将钙锌铜离子与海藻酸钠反应时的相应 $T\Delta S$ 对 ΔH 作图,三点接近于线性关系。符合等动力学理论,说明二价阳离子是通过静电相互作用与海藻酸钠配位的。可用等动力学理论来解释它们的凝胶机理

第三章 用圆二色谱对海藻酸钠构象进行研究

组成海藻酸钠 (ALG) 的古洛糖醛酸和甘露糖醛酸两种糖单元立体构象的不同, 使它们的各种物理化学性能也不同, 这些特定的构象是它们表达生物功能的结构基础。测定海藻酸胶生物大分子的这种结构并联系功能研究它们的变化, 是近年来海藻酸胶研究领域中最吸引人的问题。

圆二色性 (circular dichroism, 简称 CD) 是用光学方法研究分子结构不对称性的有效方法, 可用来检测生物大分子样品在溶液状态下的构象, 检测样品需要量少, 操作简单、快捷, 是一种简便准确测定溶液中生物高分子构象的方法。随着精密分析仪器的不断发展, 越来越好的性能被开发出来, 促进了科研的发展。科研工作者用圆二色的停留装置研究过 K^+ 对黄原胶、角叉菜胶的凝胶动力学, 取得了良好的结果, 证明用圆二色对生物活性配合物的有序无序螺旋结构研究, 所得信息清晰明了, 数据容易分析和理解。用圆二色谱研究海藻酸钠时, 所得数据信息只反映生物大分子的构象变化, 研究对象单一, 数据处理简单可靠。本章将用圆二色对海藻酸胶的结构、溶液性质、溶胶-凝胶性能、温度对结构微区的影响进行详细深入细致的研究。

3.1 材料与方法

3.1.1 试剂和仪器

$CaCl_2$ (AR), 天津市科威试剂公司; $ZnSO_4$ (AR), 天津市科威试剂公司; 海藻酸钠胶: LVCR50(中 G 中 M), LF98(高 G), LN100(中 G), HD52(低分子量高 M 样品), LF148(高分子量高 G 样品), HD113(较高分子量高 M 样品), HD440(特高分子量高 M 样品), 均购于美国特品公司(ISP)。

圆二色 (CD) 谱 JASCO-810, 大连华洋科学仪器有限公司; X-射线衍射仪 X'Pert PRO, 荷兰 PANalytical 公司; 核磁共振波谱仪 AV400MHz, Bruker 公司。

3.1.2 实验方法

3.1.2.1 圆二色 CD 信号与海藻酸钠浓度的关系

取四种海藻酸钠胶样品 LVCR、LN150、LF98、HD113 溶于去离子纯水中, 分别得到浓度为 0.05%LVCR 水溶液, 浓度为 0.05%LN150 水溶液, 浓度为 0.0125%、0.025%、0.05%、0.10%、0.20%、0.40%LF98 水溶液, 浓度为 0.0125%、0.025%、0.05%、0.10%、0.20%、0.40%HD113 水溶液。用圆二色性谱仪 JASCO J-810 (附有 Model JWJTC-484 Temperature Control Program 温度控制单元) 进

行测量, 样品池光径 1cm, 扫描 3 次。CD 测试条件: 灵敏度, 标准(100mdeg); 开始波长, 250nm; 结束波长, 180nm; 数据精度, 0.2nm; 扫描速度, 50nm/min; 响应时间, 1sec; 裂缝宽度, 2nm; 累积扫描次数, 1 次。

3.1.2.2 在 0.1MNaCl 水溶液中圆二色 CD 信号与海藻酸钠浓度的关系

取三种海藻酸钠胶样品 LVCR、HD52、LF98 溶于 0.1MNaCl 水溶液中, 分别得到浓度为 0.025%、0.05%、0.10%、0.20%溶于 0.1MNaCl 水溶液中的 LVCR 溶液, 浓度为 0.00625%、0.0125%、0.025%、0.05%、0.10%、0.20%、0.40%、0.80%溶于 0.1MNaCl 水溶液中的 LF98 水溶液, 浓度为 0.00625%、0.0125%、0.025%、0.05%、0.10%、0.20%溶于 0.1MNaCl 水溶液中的 HD52 溶液。用圆二色性谱仪 JASCO J-810 进行测量。

3.1.2.3 离子强度对海藻酸钠的影响。

配制 0.1%的 Alginate 水溶液 (0.005M 的 Alginate 水溶液), 配 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0mM NaCl 水溶液。将 0.1%Alginate 水溶液与等体积的不同氯化钠水溶液混合, 得到 0.05%Alginate 的 f (f 为加入盐的阳离子与 Alginate 上的羧基的摩尔比) 分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0 的氯化钠水溶液。用圆二色性谱仪 JASCO J-810 (附有 Model JWJTC-484 Temperature Control Program 温度控制单元) 进行测量。

3.1.2.4 自由盐浓度对海藻酸钠构象的影响

配制 0.05%Alginate 0 M NaCl、0.00625 M NaCl、0.0125 M NaCl、0.025 M NaCl、0.05 M NaCl、0.1 M NaCl、0.2 M NaCl、0.4 M NaCl、0.8M NaCl 水溶液。用圆二色性谱仪 JASCO J-810 (附有 Model JWJTC-484 Temperature Control Program 温度控制单元) 进行测量。

3.1.2.5 钙锌离子对海藻酸钠构象的影响

配制 0.1%的 Alginate 水溶液 (0.005M 的 Alginate 水溶液), 配 0.002M CaCl_2 溶液和 ZnSO_4 溶液, 取 10ml0.1%的 Alginate 水溶液, 加入 5.0ml0.002M CaCl_2 (或 ZnSO_4) 水溶液, 再加入 5.0ml 水, 得 $f=0.20$ (f 为二价阳离子与 Alginate 上的羧基的摩尔比) 的凝胶液, 依次配制可得 $f=0.00$ 、 $f=0.05$ 、 $f=0.10$ 、 $f=0.15$ 、 $f=0.20$ 、 $f=0.25$ 、 $f=0.30$ 、 $f=0.35$ 、 $f=0.40$ 的 Alginate 凝胶液。将凝胶液在室温下放置 12 小时后达到平衡。用圆二色性谱仪 JASCO J-810 进行测量, 样品池光径 1cm, 扫描 3 次。

配制 0.0025M 的 ZnSO_4 水溶液, 取 9ml0.0025M 的 ZnSO_4 水溶液加入 1ml 水, 倒入 10ml 0.1%的 Alginate 水溶液中得 $f=0.45$ 的 Zn-Alginate 凝胶液, 取 10ml0.0025M 的 ZnSO_4 水溶液, 倒入 10ml0.1%的 Alginate 水溶液中得 $f=0.50$ 的

Zn-Alginate 凝胶液。将凝胶液在室温下放置 12 小时后达到平衡。用圆二色性谱仪 JASCO J-810 (附有 Model JWJTC-484 Temperature Control Program 温度控制单元) 进行测量。

3.1.2.6 温度对海藻酸钠功能结构微区的影响

变温实验: 检测波长, 212nm; 开始温度, 5℃; 结束温度, 85℃; 变温速率, 1℃/min; 数据精度, 0.1℃; 延迟时间, 10sec; 灵敏度, 标准(100mdeg); 裂缝宽度, 2nm; 响应时间, 1sec.

配制 0.1%LF148、0.1%HD、0.1%LVCR、0.1%LN 水溶液, 用圆二色性谱仪 JASCO J-810 (附有 Model JWJTC-484 Temperature Control Program 温度控制单元) 进行测量。

以上实验中, 根据得到的 TXT 文件用“origin”作图, 图中纵坐标表示是平均残基椭圆度, 单位 mdeg ([θ]单位为 $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$), 横坐标为波长。

3.1.2.7 海藻酸钠样品的 XRD 测试

将四个海藻酸钠样品配制成 0.1% 的溶液, 脱气后于聚苯乙烯陪替氏培养皿中 25℃ 成膜。用 X-射线衍射仪测量, 扫描角度范围 $2\theta=5\sim75^\circ$, 电压 40keV, 电流 40mA, 步长 0.02° , 步长时间 0.5s。

3.1.2.8 海藻酸钠 LVCR 变温 ^{13}C -NMR 谱图测试

将海藻酸钠 LVCR 溶于 0.1MNaCl 水溶液中, 制成 2%(w/v) 溶液, 分别于 20℃、55℃ 在 Bruker 公司的 AV400MHz 核磁共振仪上进行 ^{13}C -NMR 的谱图测试。

3.2 结果与讨论

3.2.1 确定海藻酸钠圆二色谱特征吸收峰

从三个样品(不同组成)的 CD 谱图 (图 3-1) 上可知, 不同 M/G 组成的海藻酸钠样品在 210nm 左右有一波谷, 在 200nm 左右有一波峰, 在 190nm 左右有一波谷。纪明侯^[108]、Morris^[109]等科研者报道, 通过测定海藻酸钠胶的圆二色性 (circular dichroism) 谱图, 可从 212nm 与 200nm 处的谷 (B) 与峰 (A) 的高度相对比较, 如图 3-2 所示, 求出 M/G 比值。

LF98 是高 G 含量的海藻酸钠, HD52、HD113 是高 M 含量的海藻酸钠, LVCR 是中 M 中 G 含量的海藻酸钠。从不同浓度 ($\leq 0.40\%$) LF98 在水溶液中的 CD 谱图 (图 3-3) 可知, 在稀浓度范围内, 200nm 左右处的波峰, 190nm 左右处的波谷随浓度增加变得不突出, 当浓度大于 0.1% 时, 两者变得越来越弱, 直至消失; 而 210nm 左右的波谷变得越来越明显, 信号强度随浓度增加而增强, 这说明 210nm 左右的负峰对高 G 含量的海藻酸钠来说是特征峰。

随海藻酸钠胶浓度的增加, 由不同浓度 ($\leq 0.40\%$) HD113 在水溶液中的 CD 谱图 (图 3-4, 图 3-5) 可知, 当浓度由 0.0125% 增加到 0.05% 时, 200nm 左右处的波峰, 190nm 左右处的波谷, 不是随浓度增加而呈比例变化, 当浓度由 0.025%

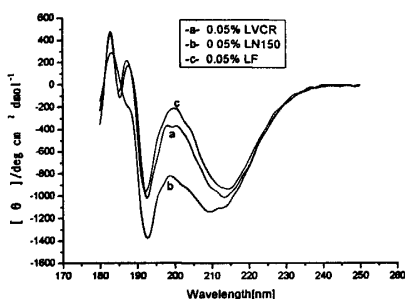


图 3-1 三个原材料样品的 CD 谱图
Fig.3-1 CD spectra of three raw samples

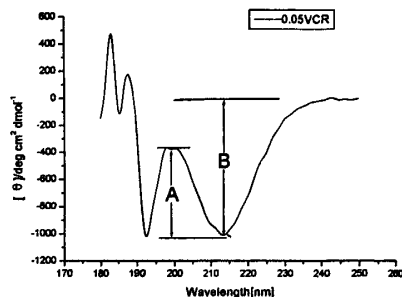


图 3-2 文献中用于计算海藻酸钠组成的 CD 谱图
Fig.3-2 CD spectra for the calculation of alginate composition in reference

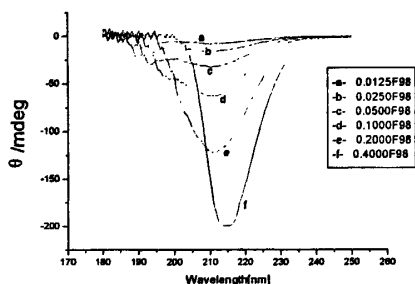


图 3-3 不同浓度 ($\leq 0.40\%$) LF98 在水溶液中的 CD 谱图
Fig.3-3 CD spectra of sodium alginate LF98 of different concentration ($\leq 0.4\%$ w/v) in water

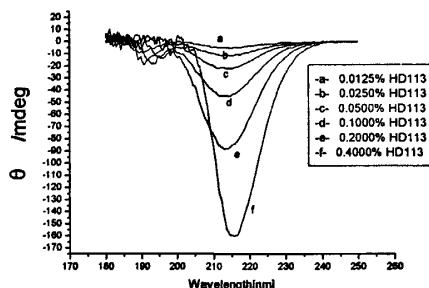


图 3-4 不同浓度 ($\leq 0.40\%$) HD113 在水溶液中的 CD 谱图
Fig.3-4 CD spectra of sodium alginate HD113 of different concentration ($\leq 0.4\%$ w/v) in water solution

增加到 0.05% 时, 200nm 左右处的波峰, 190nm 左右处的波谷, 出现了平移和衰减, 当浓度由 0.05% 增加到 0.10% 时, 衰减得很明显。在浓度从 0.0125% 到 0.040% 的范围内, 甚至低到 0.00625% 的浓度, 210nm 左右的波谷变得越来越明显, 信号强度随浓度增加而增强, 这说明 210nm 左右的负峰对高 M 含量的海藻酸钠来

说是特征峰。

由不同浓度 ($\geq 0.05\%$) LF98 在 0.1MNaCl 水溶液中的 CD 谱图 (图 3-6) 可知, 在 210nm 左右的特征峰处, 当浓度达到 0.4% 时, 虽然检测信号仍随浓度增加而增加, 但已经超出了仪器的量程; 虽然在某些波长下, 浓度高达 0.80% 时, θ 值仍和浓度成比例增加, 所以海藻酸钠当用 CD 谱仪来检测时, 浓度最好不要超过 0.40% 。这样即节省样品, 又便于操作和处理。

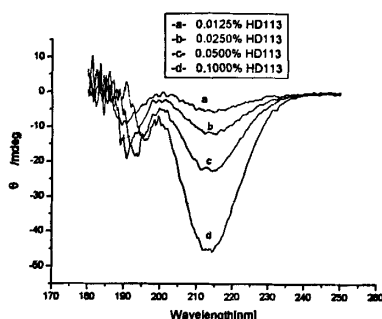


图 3-5 不同浓度 ($\leq 0.20\%$) HD113 在水溶液中的 CD 谱图
Fig.3-5 CD spectra of sodium alginate HD113 of different concentration ($\leq 0.2\%w/v$) in water solution

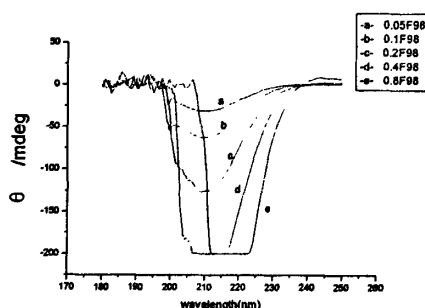


图 3-6 不同浓度 ($\geq 0.05\%$) LF98 在 0.1MNaCl 水溶液中的 CD 谱图
Fig.3-6 CD spectra of sodium alginate LF98 of different concentration ($\geq 0.05\%w/v$) in 0.1MNaCl water solution

由不同浓度 ($\leq 0.20\%$) LF98 在 0.1MNaCl 水溶液中的 CD 谱图 (图 3-7) 可知, 当浓度低至 0.00625% 时, 200nm 左右处的波峰, 190nm 左右处的波谷, 已经不存在; 当浓度由 0.00625% 增加到 0.4% 大范围内, 在 210nm 左右的特征峰处, CD 信号 θ 值随浓度增加而增加, 200nm 左右处的波峰, 190nm 左右处的波谷, 仍没出现。也就是说对高 G 含量的海藻酸钠, 200nm 左右处的波峰, 190nm 左右处的波谷, 不能代表它的特征峰, 而 210nm 左右的峰, 可能是它的特征吸收峰。由不同浓度 ($\leq 0.20\%$) LVCR 在 0.1MNaCl 水溶液中的 CD 谱图 (图 3-8) 可知, 对中 G 中 M 含量的海藻酸钠, 200nm 左右处的波峰, 190nm 左右处的波谷, 不能代表它的特征峰, 而 210nm 左右的峰, 可能是它的特征吸收峰。由不同浓度 ($\leq 0.20\%$) HD52 在 0.1MNaCl 水溶液中的 CD 谱图 (图 3-9) 可知, 对高 M 含量的海藻酸钠, 200nm 左右处的波峰, 190nm 左右处的波谷, 不能代表它的特征峰, 而 210nm 左右的峰, 可能是它的特征吸收峰。

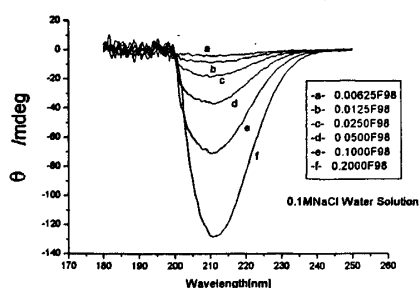


图 3-7 不同浓度 ($\leq 0.20\%$) LF98 在 0.1MNaCl 水溶液中的 CD 谱图
Fig.3-7 CDspectra of sodium alginate LF98 of different concentration ($\leq 0.2\%w/v$) in 0.1MNaCl water solution

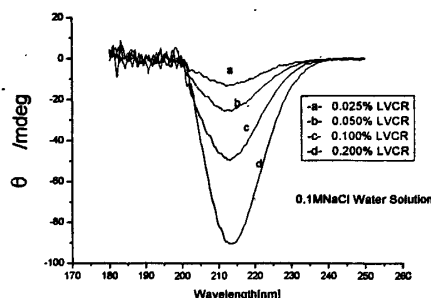


图 3-8 不同浓度 ($\leq 0.20\%$) LVCR 在 0.1MNaCl 水溶液中的 CD 谱图
Fig.3-8 CDspectra of sodium alginate LVCR of different concentration ($\leq 0.2\%w/v$) in 0.1MNaCl water solution

由 LF98 在不同水溶液中的 CD 谱图 (图 3-10) 可知, 由于溶液环境的不同, 在无盐的情况下, 0.05% 的 LF98 的 CD 谱图, 除了 210nm 处的特征吸收峰外, 194nm 处的波谷和 200nm 处的波峰都显示出来; 而在 0.1MNaCl 水溶液中, 即使在 0.025% 的低浓度下, 200nm 左右处的波峰, 190nm 左右处的波谷, 都没有出现, 而 210nm 左右 (200nm-230nm) 的特征吸收峰却非常明显, 进一步证明 200nm

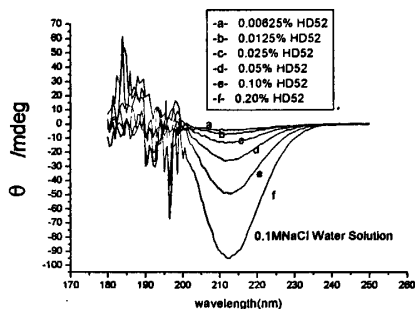


图 3-9 不同浓度 ($\leq 0.20\%$) HD52 在 0.1MNaCl 水溶液中的 CD 谱图
Fig.3-9 CDspectra of sodium alginate HD52 of different concentration ($\leq 0.20\%w/v$) in 0.1MNaCl water solution

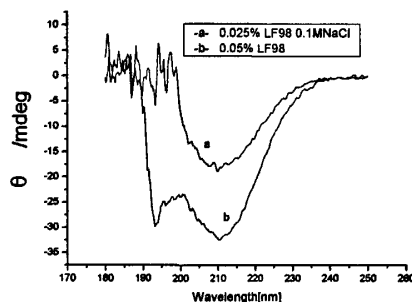


图 3-10 LF98 在不同水溶液中的 CD 谱图
Fig.3-10 CD spectra of sodium alginate LF98 in different water solution

左右处的波峰, 190nm 左右处的波谷, 不应用来计算海藻酸钠的 M/G 组成, 而 210nm 左右的特征峰, 不管海藻酸钠的 M/G 组成, 无论有无氯化钠盐 (0.1M), 在低到 0.00625% 浓度, 高到 0.40% 的浓度范围内, CD 信号 θ 值随浓度增加而增

加,这一切说明 210nm 左右(200nm-230nm)的谱带是海藻酸钠的特征吸收峰,测定 M/G 组成的计算方法应该在这一谱带范围内进行。

CD 光谱突出的优点之一是,它的峰或负峰的位置与吸收峰的位置基本重叠,因此每一个谱峰的贡献者是谁可以利用吸收光谱的知识来寻找。羧基(-COOH)的吸收峰在普通 CD 谱仪上只能检测到 210nm 左右的 $n-\pi^*$; 用真空 CD 谱仪,在远紫外区 175nm 左右能观测到另一吸收峰^[110, 111]。

当电子由一个能级跃迁到另一能级时,同时伴随许多不同振动能级和转动能级跃迁,因此,所得吸收光谱不是简单的谱线,而是连续的吸收谱带^[112]。

根据吸收光谱知识和光学原理,210nm 处的谱带归属于分子中原子外层电子跃迁。当分子吸收光能后,受到激发,由基态跃迁到激发态而产生吸收谱线。分子吸收光能,具有量子化的特性。即两能级之差的能量为:

$$\Delta E = E_1 - E_2 = h\nu = (hc)/\lambda \quad (\text{普朗克常数 } h = 6.626068 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ Kg/s})$$

$$\Delta E_{210\text{nm}} = 9.466 \times 10^{-19} \text{ J/mol} \approx 5.91 \text{ 电子伏特}$$

电子能级之间的能量差一般为 1~20 电子伏特(eV),振动能级间的能量差约 0.05~1eV,转动能级间的能量差小于 0.05 eV。5.91eV 属于电子能级,是由价电子的跃迁而产生的。电子能级变化时,不可避免地伴随着分子振动和转动能级的变化。因此,当电子由一个能级跃迁到另一能级时,同时伴随许多不同振动能级和转动能级跃迁,所得吸收光谱不是简单的谱线,而是连续的吸收谱带^[112]。所以,分子的电子光谱是带状光谱,比原子的线状光谱要复杂得多。

在海藻酸钠胶中,由于 M、G 单元立体构象的不同,造成不对称环境,虽然羰基发色团是对称的,但不对称环境诱导了电子分布的不对称,在这个条件下,观察到一个康顿效应。大量的天然出现的羰基化合物,它们有一个刚性的已知结构,同时在一般光谱范围内的吸收强度的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁一般归属于羰基。

3.2.2 用二元线性圆二色谱方法对海藻酸钠构象组成进行测定

在海藻酸钠生物大分子链中,无论 M 单元、G 单元采用什么样的顺序连接,核磁测试结果证明 M 单元采用 ${}^4\text{C}_1$ 椅式构象 $\text{C}_{1\beta}$ 键合、G 单元采用 ${}^1\text{C}_4$ 椅式构象 $\text{C}_{4\alpha}$ 键合^[114, 115],通过(1→4)糖苷键连接。不会影响 M 单元、G 单元的立体构象。Fischer, Drumond, Hirst 等通过实验证明碱提取,酸催化,100℃下长时间加热都不能引起甘露糖醛酸和古洛糖醛酸之间的相互转化^[116],即不会影响海藻酸钠的 CD 谱图测试^[5, 113]。

关于海藻酸钠中 M、G 单元含量的测定,现在普遍使用的方法有化学法、 ${}^1\text{H-NMR}$ 和 ${}^{13}\text{C-NMR}$ 法,操作复杂、费时、费用比较高,而且化学法和 ${}^1\text{H-NMR}$ 法结果不是很精确。开发快速简便定量的海藻酸 M、G 段组成测定方法具有重要的意义。Ivan Donati^[3]等科研者用 $[\theta]_{\text{GG}}(\lambda)$ 、 $[\theta]_{\text{MM}}(\lambda)$ 、 $[\theta]_{\text{MG+GM}}(\lambda)$ 三参数法来

求任意海藻酸钠样品的组成即 M/G 值，取得了很好的结果，但该方法需要 $[\theta]_{GG}(\lambda)$ 、 $[\theta]_{MM}(\lambda)$ 、 $[\theta]_{MG+GM}(\lambda)$ 三个参数，而且准确的 $[\theta]_{MG+GM}(\lambda)$ 数值很难求得。本章对自由盐离子对 CD 信号的影响和对特征峰的影响进行了详细讨论。在很多情况下海藻酸钠产品中是有杂离子的，有时是生产厂商故意加入作为稳定剂使用的。 ^{13}C -NMR 可获得丰富的信息，但制样比较费时而且条件苛刻。圆二色需要样品量少，可回收，简单、快捷。而且可以获得许多生物活性信息，是一种值得深入研究和推广的方法。

表 3-1 212nm 处不同浓度 HD52 海藻酸钠的 CD 值 (0.1MNaCl 水溶液中)
Table3-1 CD value of HD52 alginate of different concentration at wavelength 212nm (in 0.1MNaCl water solution)

浓度 (w%)	0.00625%	0.0125%	0.025%	0.05%	0.10%	0.20%	0.40%
θ/mdeg							
(0.1MNaCl)	-4.090	-6.910	-12.93	-25.40	-48.40	-94.80	
$[\theta](0.1\text{M NaCl})$	-1309	-1106	-1034	-1016	-967.0	-948.0	

表 3-2 212nm 处不同浓度海带 (HD113) 海藻酸钠的 CD 值
Table3-2 CD value of HAIDAI113 alginate of different concentration at wavelength 212nm

浓度 (w%)	0.0125	0.0250	0.050	0.100	0.200	0.400
θ/mdeg						
(水溶液)	-5.400	-11.81	-21.90	-45.35	-86.86	-128.9
$[\theta](\text{水溶液})$	-864.3	-945.0	-875.9	-907.0	-868.6	-644.4

从图 3-12 可知，当浓度达到 0.40%时，已经超出了 Lambert-Beer 定律，浓度与 CD 检测信号 θ 不再成线性关系，浓度为 0.20%时仍符合 Lambert-Beer 定律。浓度低到 0.00625%时线性关系仍然很好，考虑到实验操作的方便和减少引入误差的机会，建议实验时浓度不小于 0.0125%。从 HD 和 LF98 在纯水和 0.1MNaCl 水溶液中的 $\theta \sim C$ 比较，由于盐的存在使 θ 值变得有一些小 (10%左右)；同时使 $[\theta]$ 变得也有些小，说明测试时应尽量消除盐的影响。但是在 M / G 组成结构的测试中，和其它方法相比，误差不算大，同时简便、快速、样品需要量少，可

以得到许多生物活性信息。经过改进,可以使误差减少,精确度提高。Ivan Donati^[3]等科研者用 $[\theta]_{GG}(\lambda)$ 、 $[\theta]_{MM}(\lambda)$ 、 $[\theta]_{MG+GM}(\lambda)$ 三参数法来求任意海藻酸钠样品的组成即 M/G 值,取得了很好的结果,但该方法需要 $[\theta]_{GG}(\lambda)$ 、 $[\theta]_{MM}(\lambda)$ 、 $[\theta]_{MG+GM}(\lambda)$ 三个参数,而且准确的 $[\theta]_{MG+GM}(\lambda)$ 数值很难求得。本章将探讨使用两参数法 $[\theta]_M(\lambda)$ 、 $[\theta]_G(\lambda)$ 来求任一海藻酸钠样品的 M/G 值。该方法认为任意组成海藻酸钠品种,都由 M、G 两单元组成并且样品的 CD 读数在 200~230nm 波长范围内与 M 单元 G 单元的 CD 读数符合线性加和规则。两参数法比较方便快捷,而且各种参数容易得到。

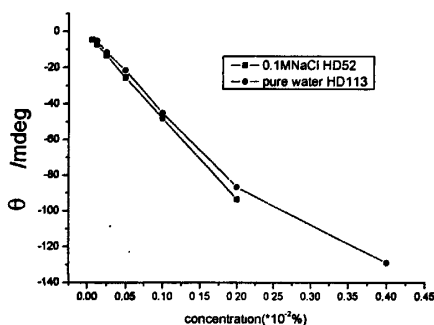


图 3-12 212nm 处海带 (HD113) 海藻酸钠 CD 值随浓度的变化

Fig.3-12 CD value of HAIDA113 alginate of different concentration at wavelength 212nm

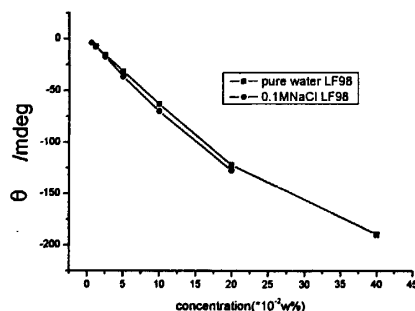


图 3-13 212nm 处 LF98 海藻酸钠 CD 值随浓度的变化

Fig.3-13 CD value of LF alginate of different concentration at wavelength 212nm

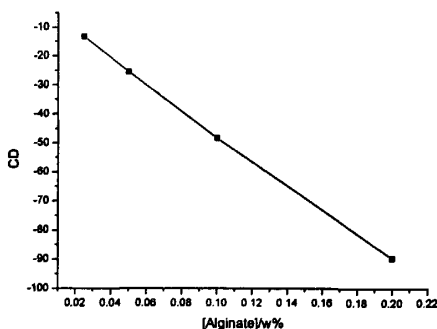


图 3-14 212nm 处 LF 海藻酸钠 CD 值随浓度的变化

Fig.3-14 CD value of LF alginate of different concentration at wavelength 212nm

表 3-3 212nm 处不同浓度 LF98 海藻酸钠的 CD 值 (0.1MNaCl 水溶液中)

Table3-3 CD value of LF alginate of different concentration at wavelength 212nm (in 0.1MNaCl water solution)

浓度 (w%)	0.00625%	0.0125%	0.025%	0.05%	0.10%	0.20%	0.40%
θ/mdeg							
(0.1MNaCl)	-4.100	-7.680	-17.22	-36.39	-69.80	-127.3	
θ/mdeg							
(水溶液中)		-7.410	-15.62	-31.35	-62.77	-122.1	-189.7
$[\theta]$ 水溶液		-1186	-1250	-1254	-1255	-1221	-948.7
$[\theta]$ 0.1MNaCl	-1313	-1229	-1377	-1456	-1396	-1273	

表 3-4 212nm 处不同浓度 LVCR 海藻酸钠的 CD 值 (0.1MNaCl 水溶液中)

Table3-4 CD value of LVCR alginate of different concentration at wavelength 212nm (in 0.1MNaCl water solution)

浓度 (w%)	0.0250	0.050	0.100	0.200
θ/mdeg				
(0.1MNaCl)	-13.26	-25.44	-48.40	-89.63
$[\theta]$				
(0.1MNaCl)	-1061	-1018	-968.1	-896.3

图 3-15 是 HD113 和 LF98 的 CD 谱图以及它们按一定比例混合后的 CD 谱图, 图 3-16 是混合物的实测谱图和理论计算模拟谱图, 从图上可知在 195nm~250nm 的范围内, 实测谱图与理论模拟谱图很接近, 在 200nm~230nm 的范围内误差不超过 8%。高 M 含量样品 HD113 与高 G 含量样品 LF98 混合物 CD 谱值与理论模拟值很接近, 即该理论在这种情况下是适用的。

图 3-17 是 LVCR 和 LF98 的 CD 谱图以及它们按一定比例混合后的 CD 谱图, 图 3-18 是混合物的实测谱图和理论计算模拟谱图, 从图上可知在 190nm~250nm 的范围内, 实测谱图与理论模拟谱图很接近, 在 200nm~230nm 的范围内误差不超过 7%。中 M 中 G 含量样品 LVCR 与高 G 含量样品 LF98 混合物 CD 谱值与理论模拟值很接近, 即该理论在这种情况下是适用的。

图 3-19 是 HD113 和 LF98 的 CD 谱图以及它们按一定比例混合后的 CD 谱图, 图 3-20 是混合物的实测谱图和理论计算模拟谱图, 从图上可知在 195nm~250nm 的范围内, 实测谱图与理论模拟谱图很接近, 在 200nm~230nm 的范围内

误差不超过 7.64%。高 M 含量样品 HD113 与中 M 中 G 含量样品 LVCR 混合物 CD 谱值与理论模拟值很接近，即该理论在这种情况下是适用的。

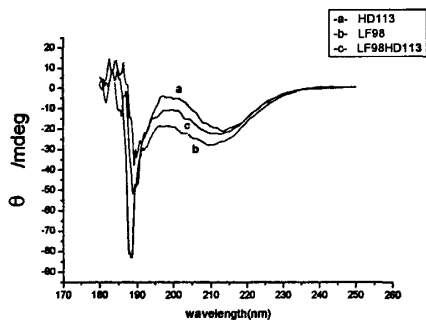


图 3-15 HD113 和 LF98 及它们混合物的 CD 谱图

Fig.3-15 CD spectroscopy of HD113, LF98 and their mixtures

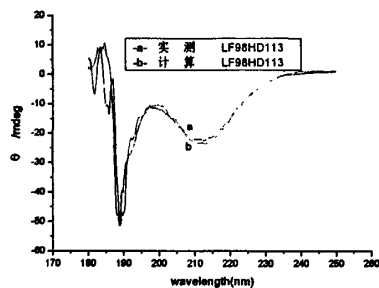


图 3-16 HD113 和 LF98 的实测 CD 谱图及其理论计算模拟谱图

Fig.3-16 CD spectroscopy of HD113 and LF98 and its simulation

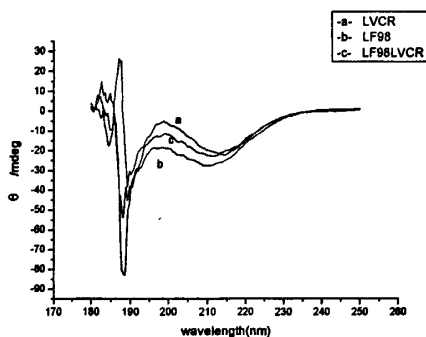


图 3-17 LVCR 和 LF98 及它们混合物的 CD 谱图

Fig.3-17 CD spectroscopy of LVCR, LF98 and their mixtures

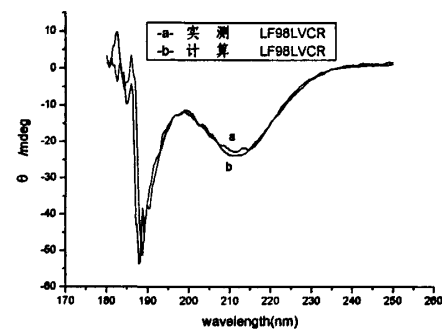


图 3-18 LVCR 和 LF98 的实测 CD 谱图及其理论计算模拟谱图

Fig.3-18 CD spectroscopy of LVCR and LF98 and its simulation

通过以上实验和论述，证明该两参数方法对不同 M / G 组成的样品，包括高 G、高 M、中 G 中 M 样品都适用，误差不超过 8%，可应用于快速简便的海藻酸钠中 M、G 段含量的测定。海藻酸作为医药原材料，在国内没有国家标准，该方法可为制定医药海藻酸标准提供基础性研究数据。更可推动中国的海藻产业步入国际市场作贡献。

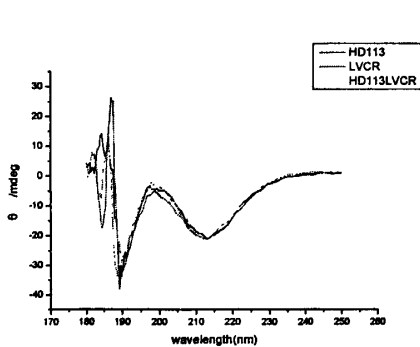


图3-19 HD113 和 LVCR 及它们混合物的 CD 谱图
Fig.3-19 CD spectroscopy of HD113, LVCR and their mixtures

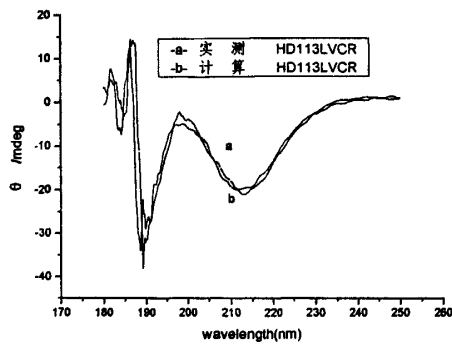


图 3-20 HD113 和 LVCR 的实测 CD 谱图及其理论计算模拟谱图
Fig.3-20 CD spectroscopy of HD113 and LVCR and its simulation

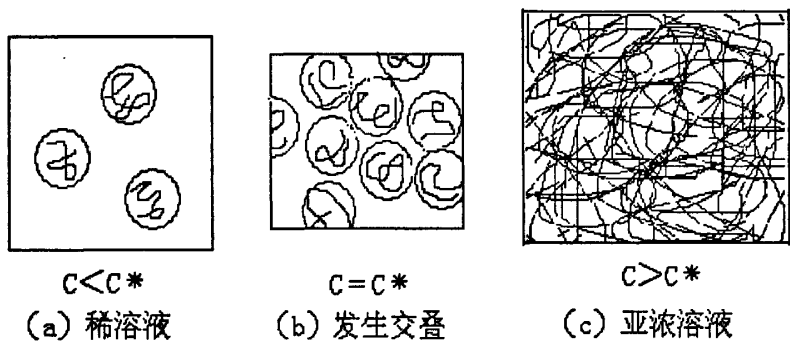


图 3-21 稀溶液向亚浓溶液过渡
Fig.3-21 Transition from dilute to sub-concentrated solution

P.G.de Gennes 指出,在稀溶液中,高分子线团是互相分离的,如图 3-21 (a) 所示;当浓度增大到某种程度后,高分子线团互相穿插交叠,甚至许多链段开始形成聚集,这种溶液称为亚浓溶液;在这两种溶液之间,若溶液浓度从稀向浓逐渐增大,孤立的高分子线团则开始靠近,靠近到开始成为线团密堆积时的浓度,称为临界交叠浓度,用 C^* 表示, C^* 又称为接触浓度,如图 3-21 (b) 所示。在亚浓溶液状态,溶液的各种性质和分子尺寸都会发生改变^[117],这就是高浓度下 CD 读数不再成线性的原因。

3.2.3 离子强度和自由盐浓度对海藻酸钠构象的影响

浓度为 c 的氯化钠溶液的离子强度

$$I=(1/2)*(\sum b_{BZB}^2)=0.5*[c*(+1^2+c*(-1)^2)]=c$$

c 为氯化钠浓度

即氯化钠溶液的离子强度在数值上等于氯化钠的浓度。

从高 M 段含量样品 HD113 在氯化钠离子强度从 0 到 2.5mM 的范围内圆二色谱图可知，氯化钠对高 M 段含量海藻酸钠的影响不是很大，从 210nm 处不同 NaCl 浓度（稀浓度）水溶液中 0.05%（w/v）HD113 的 CD（圆二色）读数也可验证这一结果。

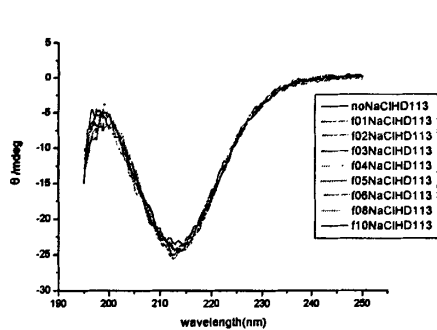


图 3-23 海藻酸钠 HD113（0.05%）在不同浓度 NaCl（≤2.5mM）水溶液中的 CD 谱图
Fig.3-23 CD spectra of sodium alginate HD113(0.05%w/v) in NaCl water solution of different concentration(≤ 2.5mM)

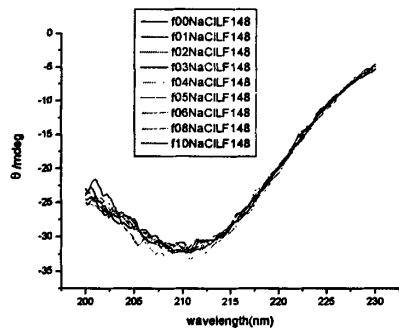


图 3-24 海藻酸钠 LF148（0.05%）在不同浓度 NaCl（≤2.5mM）水溶液中的 CD 谱图
Fig.3-24 CD spectra of sodium alginate LF148(0.05%w/v) in NaCl water solution of different concentration(≤2.5mM)

表 3-6 210nm 处不同 NaCl 浓度（稀浓度）水溶液中 0.05%（w/v）HD113CD 读数
Table3-6 CD value of HD113 alginate(0.05%) in NaCl water solution of different concentration(≤2.5mM) at wavelength 210nm

f	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0
θ/mdeg	-22.3	-22.1	-22.6	-21.3	-22.1	-22.9	-22.8	-23.0	-22.9

表 3-7 210nm 处不同 NaCl 浓度(稀浓度)水溶液中 0.05% (w/v) LF148 CD 读数
Table3-7 CD value of LF148 alginate(0.05%) in NaCl water solution of different concentration($\leq 2.5\text{mM}$) at wavelength 210nm

f	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0
θ/mdeg	-30.85	-31.83	-31.91	-32.13	-33.09	-32.04	-31.97	-31.52	-32.16

从高 G 段含量样品 LF148 在氯化钠离子强度从 0 到 2.5mM 的范围内圆二色谱图可知,氯化钠对高 G 段含量海藻酸钠的影响不是很大,从 210nm 处不同 NaCl 浓度 (稀浓度) 水溶液中 0.05% (w/v) LF148 的 CD (圆二色) 读数也可验证这一结果。

这样可知,在氯化钠离子强度不大于 2.5mM ($f=1.0$) 的范围内,对高 M 段海藻酸钠的 CD 谱图测试影响不大,可以忽略;对高 G 段含量海藻酸钠的 CD 谱图测试影响不大,可以忽略。也就是说,稀浓度的氯化钠 (不大于 2.5mM) 对任意组成的海藻酸钠样品的圆二色谱 CD 测试影响不大,分析谱图时可以忽略。

从图 3-26 和表 3-8 中的数据可知,对高 M 段含量的 HD440 海藻酸钠,当氯化钠浓度小于 25mM 时,CD 读数在-22.7 到-23.5 之间振荡,也就是说维持在这一数值范围内保持不变,当氯化钠浓度继续升高时,CD 值开始下降,直到氯化钠浓度达到 0.4M 时 CD 值开始成一稳定值-24.3 左右。200nm~202nm 范围内,在低于 0.2M (含 0.2M) NaCl 水溶液中,各种氯化钠浓度下 0.05% 的 Alginate 的 CD 谱图比较接近,而 0.4M、0.8M 的氯化钠却使 Alginate 的 CD 谱图出现了大的偏离,可能是氯化钠浓度太高,使无规线团收缩的过于紧密,或者海藻酸钠开始从水溶液中析出。CD 值随氯化钠浓度的变化趋势与 Huggins 常数 k' 随氯化钠浓度的变化趋势相一致 (表 3-9),说明氯化钠改变了 Alginate 与水溶液的相互作用,进而使海藻酸钠大分子在水溶液中的形状发生改变,即由无规线团变得比较紧密,甚至析出 (析出有待验证)。

表 3-8 211nm 处不同 NaCl 浓度下 HD440 的 CD 读数
Table3-8 CD value of HD440 alginate in different concentration($\leq 0.8\text{M}$) NaCl water solution at wavelength 211nm

[NaCl]	0M	6.25mM	12.5mM	25mM	50mM	0.1M	0.2M	0.4M	0.8M
θ/mdeg	-22.8	-23.3	-23.0	-23.4	-23.6	-23.5	-23.6	-24.2	-24.3

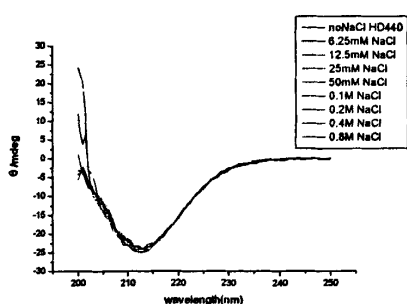


图 3-25 海藻酸钠 HD400 (0.05%) 在不同浓度 NaCl ($\leq 0.8M$) 水溶液中的 CD 谱图
Fig.3-25 CD spectra of sodium alginate HD400(0.05%w/v)in NaCl water sodium of different concentration($\leq 0.8M$)

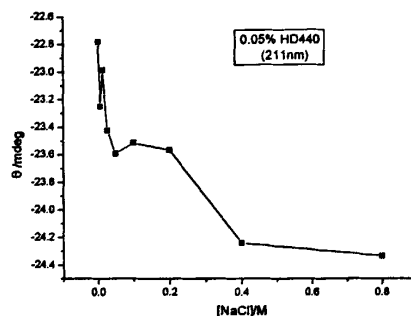


图 3-26 211nm 处不同 NaCl 浓度下 HD440 的 CD 读数
Fig.3-26 CD value of HD440 alginate in different concentration($\leq 0.8M$) NaCl water solution at wavelength 211nm

$$\eta_{sp}=[\eta]+k'[\eta]^2 \quad (\text{Huggins equation})$$

$$[\ln(\eta/\eta_s)]/c=[\eta]+k''[\eta]^2 \quad (\text{Kraemer equation})$$

Kraemer 常数 k'' 的物理意义尚不太清楚^[118]。理论研究指出 k'' 包含流体力学项和热力学项两部分。Huggins 参数 k' 反映高分子与溶剂、高分子与高分子之间的相互作用，可表现出不同的溶剂环境对给定大分子的相对作用；Huggins 参数 k' 对线形高分子来说，与分子量无关^[81, 119]。对 Alginate 来说，Huggins 参数 k' 与样品的组成、序列分布以及溶液中的离子强度有关^[81]。

表 3-9 海藻酸钠水溶液的特性粘度、Huggins 参数 k' 、Kraemer 常数 k'' 与 NaCl 浓度的关系

Table3-9 viscosity($[\eta]$), Huggins constant(k') and Kraemer constant(k'') of alginate solution at different NaCl concentrations

[NaCl]/M	0.01	0.02	0.05	0.10	0.20	0.50	∞
$[\eta]/(\text{ml} \cdot \text{g}^{-1})$	166	142	123	116	112	104	94.6
Huggins							
constant(k')	0.31	0.37	0.45	0.42	0.43	0.45	-
Kraemer							
Constant($-k''$)	0.10	0.14	0.10	0.11	0.12	0.12	-

从图 3-28 和表 3-10 中的数据可知, 对高 G 段含量的海藻酸钠 LF148, 当氯化钠浓度小于 25mM 时, CD 读数在-29.5 到-30.8 之间振荡, 也就是说维持在这一数值范围内保持不变, 当氯化钠浓度继续升高时, CD 值开始下降, 直到氯化钠浓度达到 0.4M 时 CD 值开始成一稳定值-31.8 左右。200nm~202nm 范围内, 在低于 0.2M (含 0.2M) NaCl 水溶液中, 各种氯化钠浓度下 0.05% 的 Alginate 的 CD 谱图比较接近, 而 0.4M、0.8M 的氯化钠却使 Alginate 的 CD 谱图出现了大的偏离, 可能是氯化钠浓度太高, 使无规线团收缩的过于紧密, 或者海藻酸钠开始从水溶液中析出。

表 3-10 210nm 处不同 NaCl 浓度下 LF148 的 CD 读数

Table3-10 CD value of LF148 alginate in different concentration($\leq 0.8M$) NaCl water solution at wavelength 210nm

[NaCl]	0M	6.25mM	12.5mM	25mM	50mM	0.1M	0.2M	0.4M	0.8M
θ/mdeg	-29.5	-30.1	-29.2	-30.8	-31.1	-29.6	-31.7	-32.1	-31.8

从图 3-30 和表 3-11 中的数据可知, 对于中 G 中 M 含量的海藻酸钠 LN150, 当氯化钠浓度小于 25mM 时, CD 读数在-22.7 到-23.5 之间振荡, 也就是说维持在这一数值范围内保持不变, 当氯化钠浓度继续升高时, CD 值开始下降, 直到氯化钠浓度达到 0.4M 时 CD 值开始成一稳定值-24.3 左右。200nm~202nm 范围内, 在低于 0.2M (含 0.2M) NaCl 水溶液中, 各种氯化钠浓度下 0.05% 的 Alginate 的 CD 谱图比较接近, 而 0.4M、0.8M 的氯化钠却使 Alginate 的 CD 谱图出现了大的偏离, 可能是氯化钠浓度太高, 使无规线团收缩的过于紧密, 或者海藻酸钠开始从水溶液中析出。

表 3-11 210nm 处不同 NaCl 浓度下 LN150 的 CD 读数

Table3-11 CD value of LN150 alginate in different concentration($\leq 0.8M$) NaCl water solution at wavelength 210nm

[NaCl]	0M	6.25mM	12.5mM	25mM	50mM	0.1M	0.2M	0.4M	0.8M
θ/mdeg	23.3	23.7	23.4	25.8	24.5	24.6	25.8	26.3	25.5

从图 3-32 和表 3-12 中数据可知, 对于中 G 中 M 含量的海藻酸钠 LVCR, 当氯化钠浓度小于 25mM 时, CD 读数在-22.7 到-23.5 之间振荡, 也就是说维持在这一数值范围内保持不变, 当氯化钠浓度继续升高时, CD 值开始下降, 直到氯化钠浓度达到 0.4M 时 CD 值开始成一稳定值-24.3 左右。200nm~202nm 范围内,

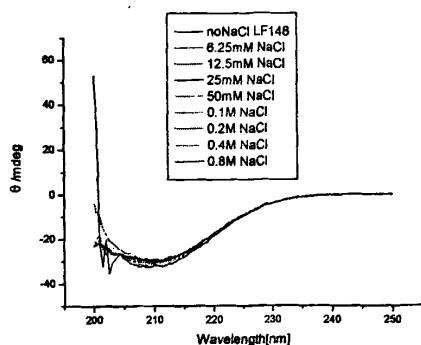


图 3-27 海藻酸钠 LF148 (0.05%) 在不同浓度 NaCl ($\leq 0.8M$) 水溶液中的 CD 谱图
Fig.3-27 CD spectra of sodium alginate LF148(0.05%w/v) in NaCl water solution of different concentration($\leq 0.8M$)

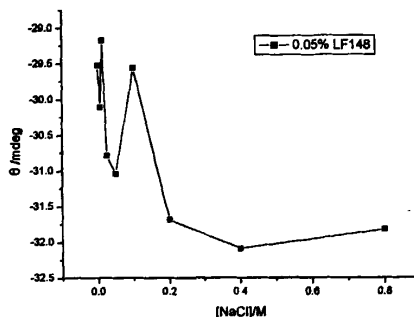


图 3-28 210nm 处不同 NaCl 浓度下 LF148 的 CD 读数
Fig.3-28 CD value of LF148 alginate in different concentration($\leq 0.8M$) NaCl water solution at wavelength 210nm

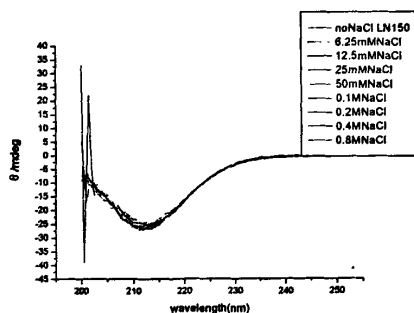


图 3-29 海藻酸钠 LN150 (0.05%) 在不同浓度 NaCl ($\leq 0.8M$) 水溶液中的 CD 谱图
Fig.3-29 CD spectra of sodium alginate LN150 (0.05%w/v) in NaCl water solution of different concentration($\leq 0.8M$)

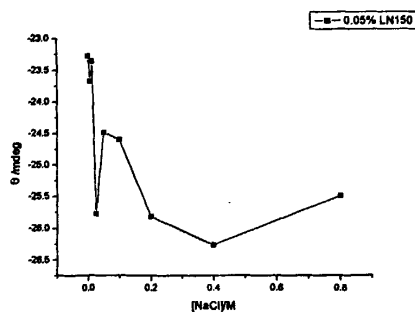


图 3-30 210nm 处不同 NaCl 浓度下 LN150 的 CD 读数
Fig.3-30 CD value of LN150 alginate in different concentration($\leq 0.8M$) NaCl water solution at wavelength 210nm

表 3-12 211nm 处不同 NaCl 浓度下 LVCR 的 CD 读数

Table3-12 CD value of LVCR alginate in different concentration($\leq 0.8M$) NaCl water solution at wavelength 211nm

[NaCl]	0mM	6.25mM	12.5mM	25mM	50mM	0.1M	0.2M	0.4M	0.8M
$\theta/mdeg$	-24.80	-22.78	-24.64	-22.51	-26.00	-25.60	-27.11	-27.63	-28.07

在低于 0.2M (含 0.2M) NaCl 水溶液中, 各种氯化钠浓度下 0.05% 的 Alginate 的 CD 谱图比较接近, 而 0.4M、0.8M 的氯化钠却使 Alginate 的 CD 谱图出现了大的偏离, 可能是氯化钠浓度太高, 使无规线团收缩的过于紧密, 或者海藻酸钠开始从水溶液中析出。

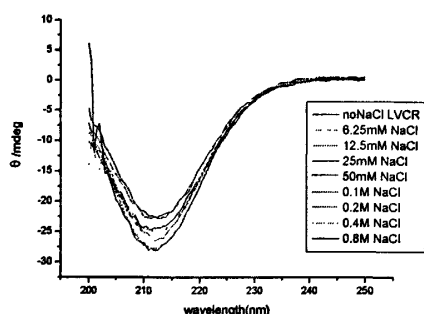


图 3-31 海藻酸钠 LVCR (0.05%) 在不同浓度 NaCl ($\leq 0.8M$) 水溶液中的 CD 谱图
Fig.3-31 CD spectra of sodium alginate LVCR (0.05%w/v) in NaCl water solution of different concentration($\leq 0.8M$)

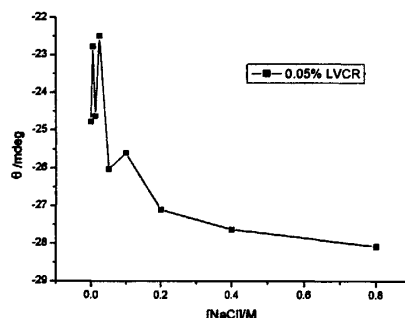


图 3-32 210nm 处不同 NaCl 浓度下 LVCR 的 CD 读数
Fig.3-32 CD value of LVCR alginate in different concentration($\leq 0.8M$) NaCl water solution at wavelength 210nm

聚电解质的溶液性质与所用溶剂关系很大, 溶液中的聚电解质和中性聚合物一样, 呈无规线团状, 离解作用所产生的抗衡离子分布在高分子离子的周围。在离子化溶剂中, 它不仅和普通高分子的溶液性质不同, 而且表现出在低分子电解质中也看不到的特殊行为。随着溶液浓度和抗衡离子浓度的不同, 高分子离子的尺寸要发生变化。

当氯化钠浓度很稀时, 由于许多钠阳离子远离高分子链, 高分子链上的阴离子互相产生排斥作用, 以致链的构象比中性高分子更为舒展, 尺寸较大; 当氯化钠浓度较大时 (如大于 25mM, 小于 0.2M 时), 钠阳离子浓度增加, 在聚阴离子链的外部与内部进行扩散, 使部分阴离子静电场得到平衡, 以致其排斥作用减弱, 链发生蜷曲, 尺寸缩小; 当氯化钠浓度足够大时, 一部分抗衡离子渗入高分子离子中而遮蔽了有效电荷, 由阴离子间的排斥引起的链的扩展作用减弱, 强化了蜷曲作用, 使尺寸更为缩小。结合圆二色来说, 使 CD 读数发生了变化。对不同组成的海藻酸钠样品来说, 由氯化钠浓度改变所引起的 CD 读数变化趋势是相同的, 在低于 25mM 的浓度下, 对海藻酸钠生物大分子形状的影响很小, 可以忽略。大于 25mM 浓度时, 就要考虑诸如氯化钠等小分子电解质的影响。通过

Huggins 参数 k' ，用溶剂与高分子之间相互作用的观点可以从热力学解释这一现象，用现代检测手段 ITC（等温滴定量热）可以很好地检测并观测到这一现象。这是以后本课题所要进行的研究工作。

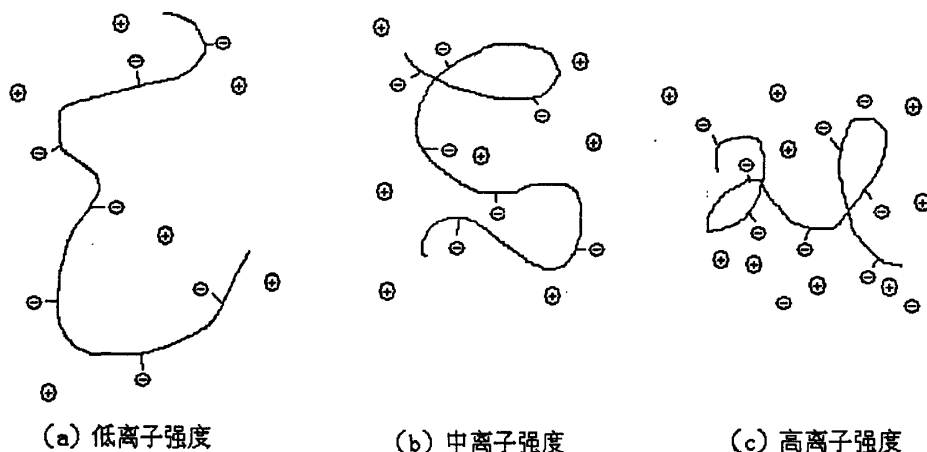


图 3-33 聚电解质大分子在不同离子强度下的分子链构象示意图

Fig.3-33 Scheme of polyelectrolyte conformation at different ionic strength

3.2.4 钙锌和不同海藻酸钠样品的相互作用

3.2.4.1 钙锌离子与海藻酸钠相互作用的圆二色谱图

从图 3-34 可知随阳离子用量的增加，体系的圆二色谱图 CD 值在增加，为了便于研究，由原始谱图经过处理可得增量谱图，如 $f=0.30$ 的 LF-Ca 原始谱图减去相应 $f=0.00$ (即纯净海藻酸钠) 的 LF 原始谱图，得到 $f=0.30$ 的 LF-Ca 增量谱图。类似可得其它增量谱图，如图 3-35 所示。图 3-35 中 (a) (b) (c) 是 LF、LVCR、LN 与钙离子相互作用的增量谱图，(d) (e) (f) 是 LF、LVCR、LN 与锌离子相互作用的增量谱图；从下到上依次为 0.05% 的纯净海藻酸钠水溶液， $f=0.05$ 、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50 相应海藻酸-金属配合物的谱图。

从三个样品与钙相互作用 CD 增量谱图 (图 3-35a、b、c) 可知，不论样品的组成如何，波谱都落在 195nm~230nm 范围内，峰的形状都是类高斯分布。三个样品的最大变化波长都在 204.5nm~209nm 范围内，这些都说明三个样品与钙离子的相互作用相似，都是由于相同的功能区域或片段与钙离子凝胶引起的。三个海藻酸钠样品与锌离子相互作用时，每条谱线上有多个小峰，随锌离子用量的

增加, 峰位向低波长移动 (位于 198nm 至 193nm 范围内), 说明钙锌离子与海藻酸钠相互作用有许多不同, 锌离子的 CD 增量谱图 (图 3-35d、e、f) 峰位明显地偏向低波长, 显示出与钙离子明显地不同。因此分析时, 选择海藻酸-钙配合物的特征波长为 205nm, 选择海藻酸-锌配合物的特征波长为 195nm; 不同波长的光学信号是无法比较的, 考虑到海藻酸钠与钙锌离子相互作用的对比, 选择 200nm 作为对比时的参考波长。

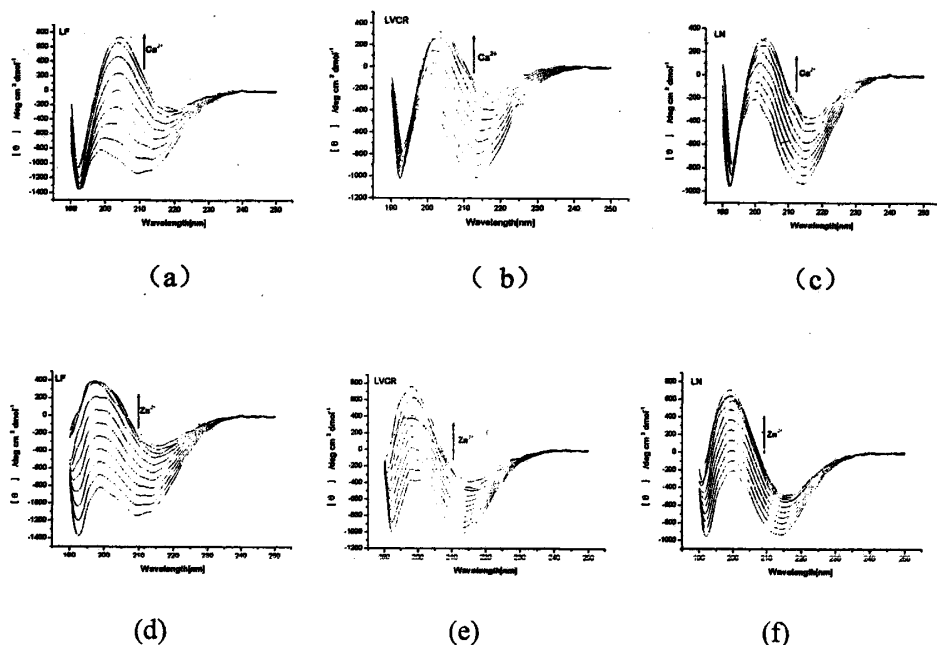


图 3-34 钙锌离子用量对三个海藻酸钠样品圆二色 CD 原始谱图的影响

(a) (b) (c) 是 LF、LVCR、LN 与钙离子相互作用的谱图, (d) (e) (f) 是 LF、LVCR、LN 与锌离子相互作用谱图; 从下到上依次为 0.05% 纯净海藻酸钠水溶液, $f=0.05$ 、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50 相应海藻酸-金属配合物的谱图。

Fig.3-34 C.D.spectra of three sodium alginate samples in the presence of various levels of calcium and zinc ions. Panel (a),(b) and (c) are the circular dichroism behaviours of sodium alginate LF, LVCR and LN binding with calcium ion, panel (d),(e) and (f) are the circular dichroism of LF,LVCR and LN binding with zinc ion; From the bottom up, are c.d.spectra of pure sodium alginate solution(0.05%w/v) in water and of conjugate of alginate-metal ions of $f=0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50$ respectively.

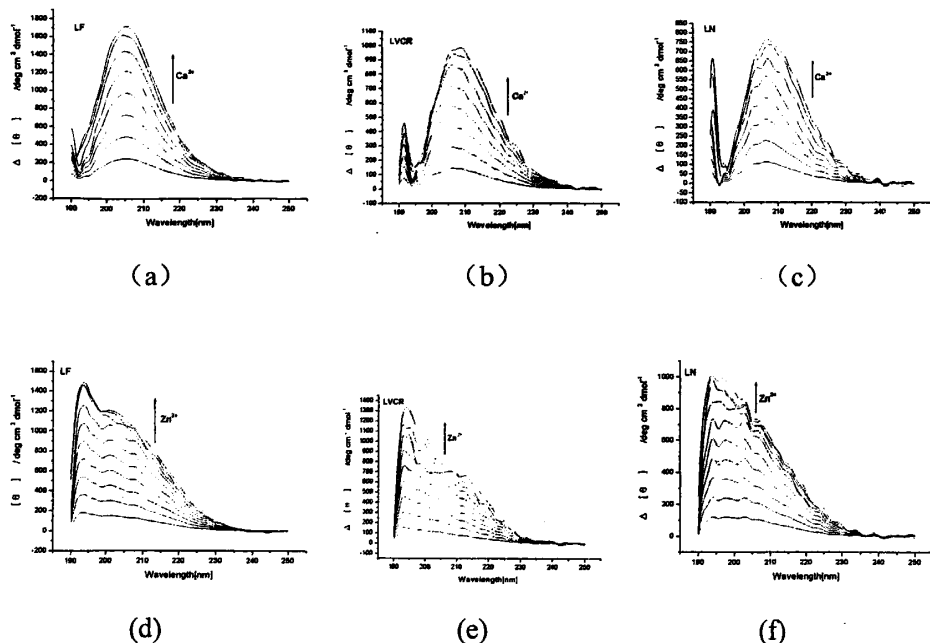


图 3-35 钙锌离子与三个海藻酸钠样品相互作用的 CD 增量谱图

Fig.3-35 C.D.change (final-gel c.d. minus initial-solution c.d.) for gelation of three sodium alginate samples binding with various levels of calcium and zinc ions.

3.2.4.2 用超分子配合物理论对二价阳离子与海藻酸钠配合物进行解释

图 3-36 为 205nm 处海藻酸-钙配合物圆二色 CD 增量随 Ca^{2+} 用量(用 f 表示)的变化。图 3-37 为 195nm 处海藻酸-锌配合物圆二色 CD 增量随 Zn^{2+} 用量(用 f 表示)的变化。图 3-38 是在参考波长 200nm 处所得数据做的图。从图可知, 无论海藻酸钠样品的组成如何, 与钙或锌离子相互作用时圆二色 CD 增量的变化都分成两个阶段, 第一阶段是线性增加部分, 而且变化比率比第二阶段快, 第二阶段随二价阳离子的增加, 配合物的摩尔椭圆值缓慢增加, 有趋于某一稳定值的趋势。从第一阶段向第二阶段过渡的转折点对应于体系从溶胶向凝胶转变的临界点。对钙离子与海藻酸钠的相互作用, 反应分前后两段, 等温滴定量热 (ITC) 实验表明^[76], 是由于驱动力不同造成的, 在第一阶段, 钙可能和 G 单元作用形成所谓的 "蛋盒" 结构^[8]。对于锌离子与海藻酸钠的相互作用, 第二阶段无论是饱和还是另一种机理, 为了讨论上的方便, 都看作是另一种反应机理, 对结果影响不大。

海藻酸钠与阳离子的相互作用属于超分子配合物体系范畴, 根据超分子配合物理论^[120], 如果超分子配合物各组分间以式 (3-1) 达成平衡:



固定 H 初始浓度为 C_0 ，则在 G 初始浓度为 0 时，平衡后体系中主体 H、客体 G 和配合物 HGn 的浓度分别为： C_0 、0、0；客体 G 初始浓度为 C_G 时，平衡后体系中主体 H、客体 G 和配合物 HGn 的浓度分别为： $C_0 - C_e$ 、 $C_G - nC_e$ 、 C_e 。

在波长 λ 处，体系相应的圆二色谱读数 θ_0^λ 和 θ_e^λ 分别为：

$$\theta_0^\lambda = [\theta]_1^\lambda * C_0 * l \quad (3-2)$$

$$\theta_e^\lambda = ([\theta]_1^\lambda * (C_0 - C_e) + [\theta]_2^\lambda * (C_G - nC_e) + [\theta]_3^\lambda * C_e) * l \quad (3-3)$$

其中 $[\theta]_1^\lambda$ 、 $[\theta]_2^\lambda$ 和 $[\theta]_3^\lambda$ 分别为 H、G 和配合物 HGn 在波长 λ 下的摩尔椭圆值。

由于一般测量中使用的比色池光路长度为 1cm，并且 G 在检测波长范围内无吸收，即 $[\theta]_2^\lambda = 0$ ，式 (3-2) ~ 式 (3-3) 可简化为：

$$\theta_0^\lambda = [\theta]_1^\lambda * C_0 \quad (3-4)$$

$$\theta_e^\lambda = [\theta]_1^\lambda * (C_0 - C_e) + [\theta]_3^\lambda * C_e \quad (3-5)$$

式 (3-5) 减去式 (3-4) 可得

$$\theta_e^\lambda - \theta_0^\lambda = ([\theta]_3^\lambda - [\theta]_1^\lambda) * C_e \quad (3-6)$$

体系中海藻酸钠和配合物很难分开，但糖醛酸单元总浓度为 C_0 ，定义 $(\theta_e^\lambda - \theta_0^\lambda) / C_0$ 为表观摩尔椭圆值 $\Delta[\theta]_{\text{表观}}$ ，实验数据很好处理，则式 (3-6) 转变为

$$(\theta_e^\lambda - \theta_0^\lambda) / C_0 = ([\theta]_3^\lambda - [\theta]_1^\lambda) * (C_e / C_0)$$

$$\Delta[\theta]_{\text{表观}} = ([\theta]_3^\lambda - [\theta]_1^\lambda) * (C_e / C_0)$$

对于海藻酸钠与二价阳离子之间的相互作用，由于第一阶段反应常数 $K^{[76]}$ 的数量级为 10^6 ，当 f (二价阳离子与海藻酸钠上羧基的比例) 小于 0.5 时，可近似认为

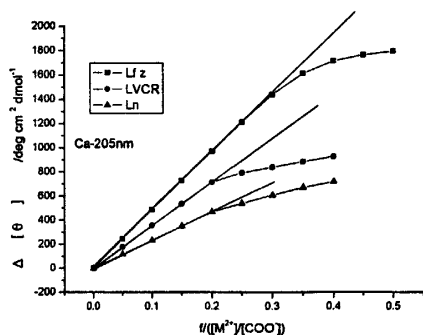


图 3-36 三个海藻酸钠样品摩尔椭圆值(205nm)增量随钙离子用量的变化
Fig.3-36 Variation in c.d. spectral intensity at 205nm of three sodium alginate with calcium-ion concentration(expressed as ratio f)

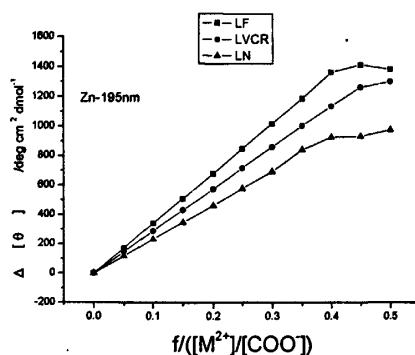


图 3-37 三个海藻酸钠样品摩尔椭圆值(195nm)增量随锌离子用量的变化
Fig.3-37 Variation in c.d. spectral intensity at 195nm of three sodium alginate with zinc-ion concentration(expressed as ratio f)

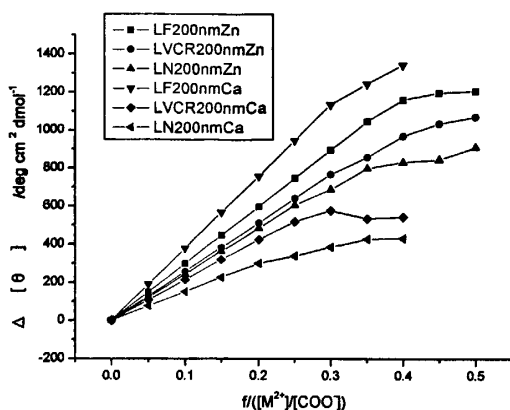


图 3-38 三个海藻酸钠样品摩尔椭圆值(200nm)增量随钙锌离子用量的变化
Fig.3-38 Variation in c.d. spectral intensity at 200nm of three sodium alginate with calcium zinc ion concentration(expressed as ratio f)

反应完全, (3-1) 式变为



由上式可知所生成的配合物是消耗二价阳离子的两倍。即 $(\text{Ce}/\text{C}_0) = 2f$, 式(3-6)变为:

$$\Delta[\theta]_{\text{表观}} = 2([\theta]_3^\lambda - [\theta]_1^\lambda) * f \quad (3-8)$$

由式(3-8)可知, 表观摩尔椭圆值 $\Delta[\theta]_{\text{表观}}$ 与 f 成线性关系, 对应图 3-36 图 3-37 图 3-38 中第一阶段的线性部分。表观摩尔椭圆值 $\Delta[\theta]_{\text{表观}}$ 随 f 变化时所得直线斜率为 $2([\theta]_3^\lambda - [\theta]_1^\lambda)$, 是和配合物的结构参数 $[\theta]_3^\lambda$ 有关的量, 具有重要意义。从直线斜率可看出海藻酸钠构象受金属离子的影响程度大小, 也可看出两者的相互作用强弱。在图 3-36 图 3-37 图 3-38 中第一阶段线性范围内, 直线斜率 $2([\theta]_3^\lambda - [\theta]_1^\lambda)$ 是定值, 因为 $[\theta]_1^\lambda$ 为定值, 所以 $[\theta]_3^\lambda$ 是定值, 说明生成了结构均匀的新的物质。该新物质为金属离子与海藻酸钠形成的新的配合物, 从图上还可看出, 在转折点之前, 随着离子用量的增加, 斜率不变, 即 $[\theta]_3^\lambda$ 不变, 没有新结构物质生成, 那么在线性范围内, 海藻酸-金属离子配合物随离子量的增加, 仅仅是量在增加, 并没有质的变化。由式(8)可算出 200nm、205nm 处的海藻酸-钙配合物摩尔椭圆值 $[\theta]_{\text{Ca}}^{\text{ALG}}$ (表 3-13) 和 195nm、200nm 处的海藻酸-锌配合物摩尔椭圆值 $[\theta]_{\text{Zn}}^{\text{ALG}}$ (表 13), 为进一步研究海藻酸钠与二价阳离子的相互作用和更好地应用海藻酸金属配合物凝胶提供了基础数据。

表 3-13 海藻酸-钙配合物和海藻酸-锌配合物的摩尔椭圆值 $[\theta]_{M^{2+}}^{Alginat}$ (M^{2+} 代表钙锌离子)

Table3-13 Mole ellipticity $[\theta]_{M^{2+}}^{Alginat}$ of alginate-calcium conjugate and alginate-zinc conjugate (M^{2+} represents calcium or zinc ion)

	$[\theta]_{Zn^{2+}}^{Alginat}(195nm)$	$[\theta]_{Zn^{2+}}^{Alginat}(200nm)$	$[\theta]_{Ca^{2+}}^{Alginat}(200nm)$	$[\theta]_{Ca^{2+}}^{Alginat}(205nm)$
LF	2749.59	2333.46	2733.41	3429.73
LVCr	2128.50	1651.14	1437.19	2408.45
LN	1690.26	1419.08	962.610	1627.97

注: $[\theta]$ 的单位为 $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$.

Noting: The unit of $[\theta]$ is $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$.

由图 3-36 可知, 第一阶段与第二阶段变化斜率的不同, 说明两个阶段的机理和所形成配合物的结构是不同的。由于海藻酸钠样品组成的不同, 在第一阶段摩尔椭圆值的变化比率不一样, LF 为 4862.4、LVCr 为 3579.6、LN 为 2343.6。三种样品中 G 含量从大到小为 $LF > LVCr > LN$, 说明在与钙离子形成凝胶的过程中, G 单元起决定作用, 与 ^{13}C -NMR 研究结果相同^[113]。第一阶段为线性变化, 说明所形成的配合物的结构是均一的, 即只要海藻酸钠的样品组成确定, 它与钙离子所成凝胶的结构在线性变化范围内所成配合物的结构是相同的, 同时速度和机理也是一样的, 这为海藻酸钠在生物工程的应用提供了便利。在线性变化范围内, 可对凝胶工艺进行优化和控制。从图 3-36 可知, 第一阶段向第二阶段的过渡, LF 发生在 $f = 0.33$ 左右, LVCr 发生在 $f = 0.22$ 左右, LN 发生在 $f = 0.21$ 左右, 样品的组成不一样, 发生转变时的临界点也不一样。从图 3-37 可知, 锌离子与海藻酸钠相互作用时遵循同样的规律, 只是斜率和临界点的具体数值大小不同而已。我们可以得到启示, 只要知道了组成, 临界点是可以测出的, 从而可以在临界点之前线性变化范围内, 通过控制 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 离子的浓度、添加顺序、比例来对凝胶工艺进行控制, 得到符合要求的海藻酸凝胶体系。在药物缓释领域, 可以选择适当组成的海藻酸钠, 调整钙锌离子的比例, 控制添加顺序可得到符合释药速率的海藻酸钙锌配合物凝胶^[71]。有关海藻酸钠与二价离子的凝胶机理和反应过程的控制, 有待于与其他现代方法相结合进行进一步的研究。

3.2.4.3 不同组成海藻酸钠样品对钙锌离子的选择识别

从斜率变化可看出二价阳离子对海藻酸钠构象变化的影响, 也可看出二价阳离子与海藻酸钠相互作用的大小。从增量谱图可知, 钙的最大 CD 增量变化位于 205nm 左右; 锌的最大 CD 增量变化位于 194nm 左右; 在 200nm 左右二者变化差别不是很大。在 205nm 左右 (图 3-36), 钙与 LF、LVCr、LN 三个样品相互

作用时 CD 变化斜率分别为 $4862.4 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ 、 $3579.6 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ 、 $2343.6 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ，大小顺序与 G 单元含量顺序一致，说明构象变化主要由 G 单元引起，所成凝胶结构也主要和 G 单元功能区域有关。

在 195nm 处，锌离子与 LF、LVCR、LN 相互作用时，CD 增量变化斜率（图 3-37）分别为 $3484.1 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ 、 $2862.5 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ 、 $2304.4 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ，比相应 205nm 处 Ca 与三个样品的变化斜率小，说明与钙离子相比，锌与海藻酸相互作用比钙小，由于斜率反映构象变化的剧烈程度，与所成凝胶结构密切相关，在 200nm 处，斜率从大到小顺序为：LF-Ca(3777.1) > LF-Zn(2977.2) > LVCR-Zn(2552.6) > LN-Zn(2414.84) > LVCR-Ca(2124.7) > LN-Ca(1501.9)。锌与三个不同样品作用时 CD 增量变化斜率数值大小非常接近，位于 LF-Ca 斜率与 LVCR-Ca 斜率之间，三个样品斜率之间相差不象 Ca 与三个样品那样大，说明海藻酸组成对锌的影响没有对钙的影响大。说明二价阳离子与 G 单元功能区域优先接合的前提下，Zn 与 M 单元(或含有 M 单元的其它功能区域)的相互作用比与钙的相互作用强^[71]，这一点从 CD 增量的最大变化值上也可反映出来。 $\Delta[\theta]_{\text{最大}}(\text{LF-Ca}, 1718.85) > \Delta[\theta]_{\text{最大}}(\text{LF-Zn}, 1384.68) > \Delta[\theta]_{\text{最大}}(\text{LVCR-Zn}, 1301.44) > \Delta[\theta]_{\text{最大}}(\text{LN-Zn}, 975.42) > \Delta[\theta]_{\text{最大}}(\text{LVCR-Ca}, 930.96) > \Delta[\theta]_{\text{最大}}(\text{LN-Ca}, 721.19)$ 。

钙与三个样品相互作用时，在 205nm 波长下转折点分别位于 $f=0.33(\text{LF-Ca})$ 、 $f=0.22(\text{LVCR-Ca})$ 、 $f=0.21(\text{LN-Ca})$ ；在 200nm 下转折点分别位于 $f=0.30(\text{LF-Ca})$ 、 $f=0.27(\text{LVCR-Ca})$ 、 $f=0.26(\text{LN-Ca})$ 。两个波长处转折点 f 值大小接近，可取 200 nm 处 $f=0.30(\text{LF-Ca})$ 、 $f=0.27(\text{LVCR-Ca})$ 、 $f=0.26(\text{LN-Ca})$ 作为三个样品的转折点，转折点大小顺序与 G 单元含量顺序相同，说明与组成有关。

锌与三个样品相互作用时，在 195 nm 处，转折点分别位于 $f=0.43(\text{LF-Zn})$ 、 $f=0.42(\text{LVCR-Zn})$ 、 $f=0.37(\text{LN-Zn})$ ；在 200nm 处，转折点分别位于 $f=0.42(\text{LF-Zn})$ 、 $f=0.40(\text{LVCR-Zn})$ 、 $f=0.35(\text{LN-Zn})$ 。两个波长处转折点 f 值大小接近，可取 200nm 处 $f=0.42(\text{LF-Zn})$ 、 $f=0.40(\text{LVCR-Zn})$ 、 $f=0.35(\text{LN-Zn})$ 作为三个样品与锌相互作用时的转折点，转折点大小顺序与 G 单元含量顺序相同，说明与组成有关，同时说明优先与 G 单元相互作用。但三个转折点处 f 值与钙离子的相比比较接近，不象三个海藻酸钠样品与钙离子相互作用时那样相差很大，说明锌离子对 G、M 单元相互作用时差别变小^[71]，即锌离子对 G、M 单元识别作用不如钙离子。这一点也可从锌离子与三个样品相互作用的转折点比钙离子与相应三个样品相互作用的转折点大许多反映出来，这一结论与 Aslani 和 Kennedy 用黏度法推测出的结论相同^[121]。同时，这些实验数据也说明锌离子与海藻酸钠形成凝胶时，交联点比钙离子的多。

表 3-14 钙锌离子与海藻酸钠相互作用时的溶胶-凝胶转折点 $f_{M^{2+}}^{Alginat}$ (M^{2+} 代表钙或锌离子)

Table3-14 The sol-gel critical point $f_{M^{2+}}^{Alginat}$ when sodium alginate interacted with calcium and zinc ions (M^{2+} represents calcium or zinc ion)

	$f_{Zn^{2+}}^{Alginat}(195nm)$	$f_{Zn^{2+}}^{Alginat}(200nm)$	$f_{Ca^{2+}}^{Alginat}(200nm)$	$f_{Ca^{2+}}^{Alginat}(205nm)$
LF	0.43	0.42	0.30	0.33
LVCR	0.42	0.40	0.27	0.22
LN	0.37	0.35	0.26	0.21

从以上分析可知，不同组成海藻酸钠对 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 的选择识别不一样。但在临界点之前都是线性变化，可以按要求设计符合要求的凝胶过程和产品，以及对工艺进行控制。可以控制 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 离子的浓度、添加顺序、比例来得到符合要求的海藻酸钙锌凝胶体系。

3.2.5 温度对海藻酸钠功能结构微区的影响

3.2.5.1 海藻酸钠中的功能结构微区

由图 3-39 可知，在 205nm 处，琼脂糖凝胶圆二色 CD 信号随温度的升高而降低，随温度的降低而升高，并且升降温曲线不重合，形成了滞后环。Rees 和 Liang 等人^[7, 92, 123]经过大量实验证明在琼脂糖大分子链中，存在许多按严格顺序

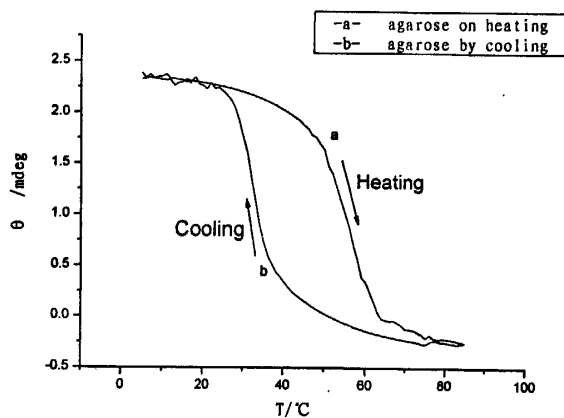


图 3-39 琼脂糖圆二色谱图随温度的变化

Fig.3-39 Circular Dichroism spectra with temperature for a solution(0.1%w/v) of agarose (Wavelength:205nm)

连接在一起构型相同的糖单元, 这些糖单元可形成双螺旋结构, 并有部分形成双螺旋聚集体。随温度升高这些双螺旋功能结构片段解聚, 使圆二色 CD 信号随温度的升高而降低; 随温度的降低双螺旋结构又重新形成, 伴随着圆二色信号的升高。升降温曲线不能重合而形成滞后圈, 双螺旋聚集得越厉害滞后越严重。David A.Rees, E.Jane Welsh.^[7]通过研究发现黄原胶、葡聚糖、半乳甘露聚糖^[122]、透明质酸、粘多糖、软骨素、角质素、皮肤素、氨基葡萄糖、肝磷脂^[7, 124]等生物大分子中旋光、黏度、核磁检测信号随温度变化有相似的现象, 他们通过实验证明这也是由功能结构链段之间缔合形成双螺旋结构造成的。

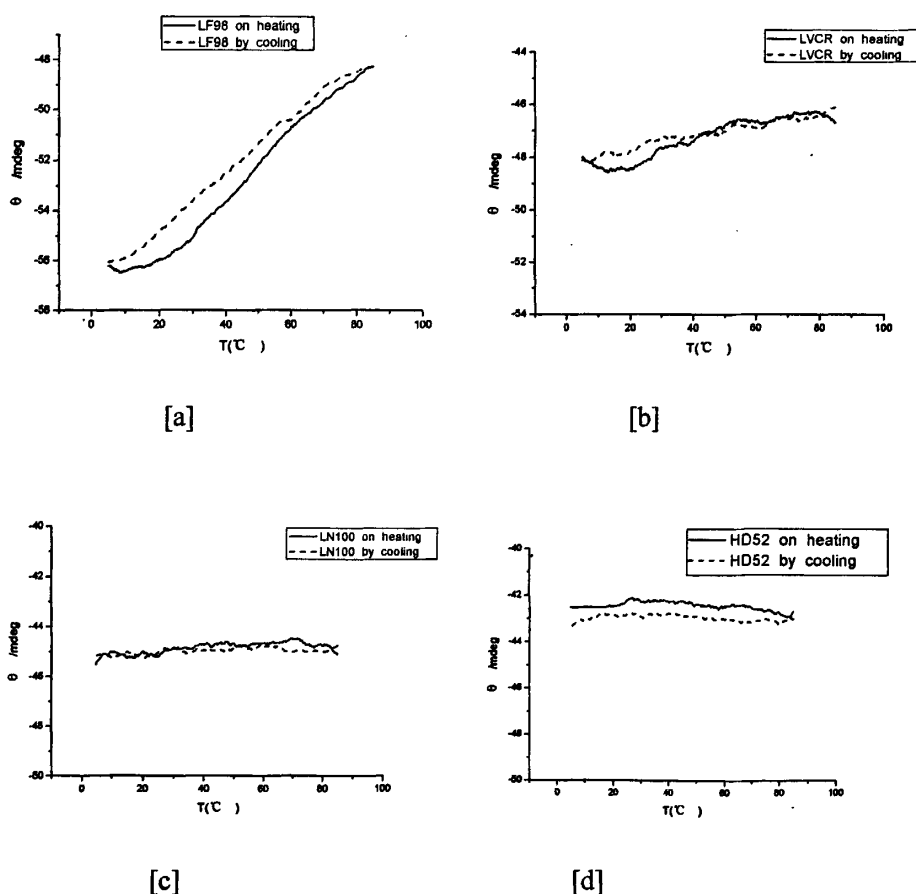


图 3-40 四种海藻酸钠圆二色谱图随温度的变化

检测波长为 210nm, 海藻酸钠为 0.1% 的水溶液, 其中[a]LF98; [b]LVCR; [c]LN100; [d]HD52。

Fig.3-40 Circular Dichroism spectra with temperature for a solution(0.1%w/v) of four sodium alginate of different composition.(Wavelength:210nm, Spectra are shown for alginate of [a]LF98; [b]LVCR; [c]LN100; [d]HD52)

图 3-40[a]~[d]是四个海藻酸钠随温度变化的圆二色谱图。从图 3-40[a]可知,当温度由 5℃升到 85℃时, LF98 的圆二色 CD 信号椭圆度随升温曲线由 -56.14mdeg 升高到 -48.28mdeg, 降温时又沿降温曲线回到起点, 降温曲线与升温曲线不重合, 形成一个滞后圈。但是, LF98 的圆二色信号随温度升高而升高, 与琼脂糖的相反, 这是由于二者糖单元的构型不同造成的, 其余如滞后圈和变化幅度等非常相似, 说明 LF98 分子链中存在明显的双螺旋结构功能结构片断。这些双螺旋功能结构微区随温度升高而解聚, 导致圆二色信号升高, 随温度降低通过缔合重新生成双螺旋结构; 部分双螺旋形成聚集体, 使升温降温曲线不能重合, 导致滞后圈的形成。

3.2.5.2 海藻酸钠中糖单元组成与功能结构微区的关系

从图 3-40[a]~[d]可知, 在 5℃~85℃范围内, LF98 圆二色 CD 信号的变化幅度为 7.85mdeg; LVCR 圆二色 CD 信号在此温度范围内, 变化幅度为 2.01mdeg; LN100 的变化幅度为 1.03mdeg; HD52 的变化幅度为 0.71mdeg。四个样品圆二色 CD 信号受温度影响变化程度从大到小顺序为 LF98>LVCR>LN100>HD52。

图 3-41 是四个样品的 XRD 谱图, 从图可知, 样品 LF98 峰的信号最强, 峰面积最大; LVCR 的 XRD 峰较小, LN100 的衍射峰已经很平坦, HD52 几乎没有峰, 说明四个样品中规整结构区域含量^[89, 125, 126, 127, 128]从大到小为 LF98>LVCR>LN100>HD52。与四个样品圆二色检测值(椭圆度 mdeg)受温度影响的变化程度大小顺序相同, 说明规整结构微区的存在是圆二色 CD 信号随温度变化的关键因素。另外四个样品中规整结构区域的多少, CD 信号受温度影响的程度大小, 与四个样品中 G 单元含量顺序一致, 说明在海藻酸钠中 G 单元在功能结构微区的形成中发挥主要作用。

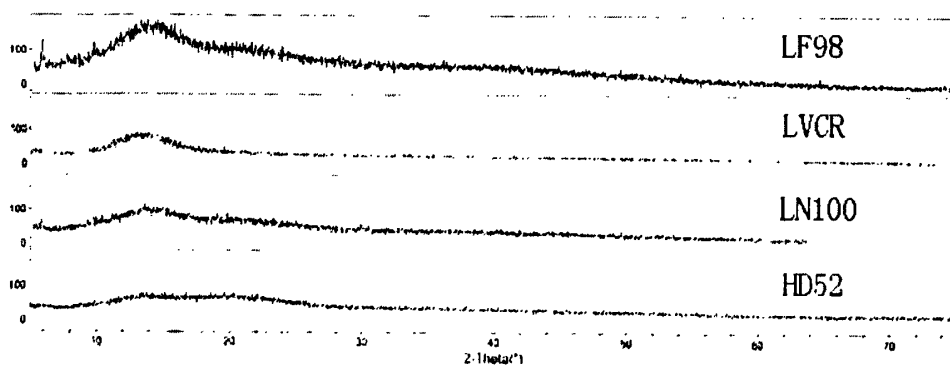


图 3-41 四种海藻酸钠的 X-射线衍射图

Fig.3-41 X-ray diffractograms of four alginate of different composition

四个样品由于结构组成不同，圆二色信号随温度变化有很大差异，说明 G 段、M 段随温度的变化差异很大，是以后研究的重点。

3.2.5.3 温度对功能结构微区的影响。

图 3-42 是海藻酸钠 LVCR 在 20℃ 和 55℃ 对应的 ^{13}C -NMR 谱图，与 T.A.Bryce 等人^[7, 129] 用高分辨 ^{13}C -NMR 对角叉菜胶的研究相似，20℃ 时海藻酸钠 LVCR 的 ^{13}C -NMR 谱图上峰很小，55℃ 时 ^{13}C -NMR 谱图上有明显的峰，这是在 20℃ 时由于链段之间的缔合形成功能微区，使糖醛酸单元上碳核的运动被限制的如此严重，以致于碳核的弛豫时间降低，导致高分辨 ^{13}C -NMR 谱图上的峰很小；55℃ 时由于分子链运动剧烈使功能微区消失，碳核的运动限制被取消， ^{13}C -NMR 谱图上出现明显的峰。结合圆二色信号随温度的变化，这说明在海藻酸钠中相同构型的糖单元通过链段之间缔合形成的功能结构微区，随温度升降可发生可逆的有序-无序转变。象晶体的形成和融化，是一个平衡转化过程。与四个样品圆二色谱随温度的升降发生可逆变化的现象相一致。

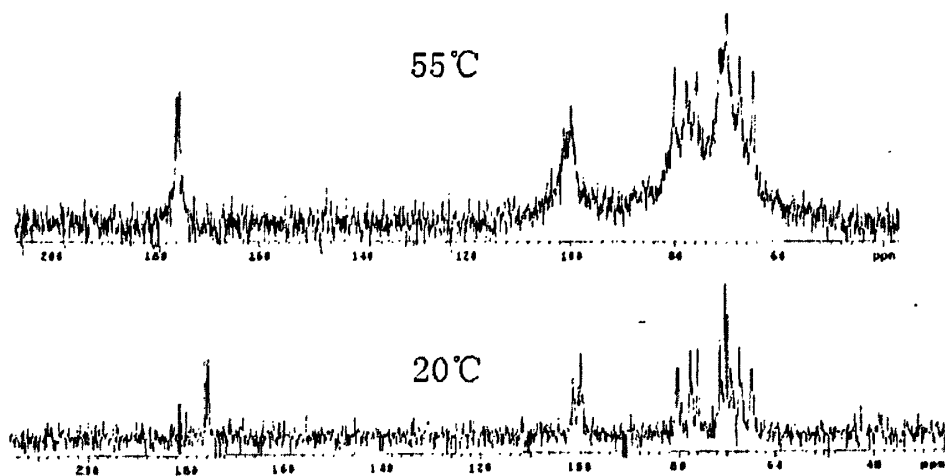


图 3-42 海藻酸钠 LVCR 55℃ 与 20℃ 时 ^{13}C -NMR 谱图对比 (2% (w/v) 的海藻酸钠溶于 0.1M 氯化钠水溶液中)

Fig.3-42 Comparison of ^{13}C -NMR spectra for alginate LVCR segments at 55℃(upper spectrum) and 20℃(lower spectrum).The concentration was 2%(w/v) in 0.1M sodium chloride.

3.3 结论

(1) 海藻酸钠的原二色谱表明 210nm 左右(200nm-230nm)的谱带是海藻酸钠的特征吸收峰，两参数方法对不同 M/G 组成的样品，可快速简便地检测海藻

酸钠中 M、G 段含量。

(2) 用圆二色谱对海藻酸钠与钙锌离子相互作用的稳态溶液-凝胶过程研究表明：钙锌离子与海藻酸钠反应时，分前后两个阶段；在临界点之前构象的变化与二价阳离子用量成线性关系。说明所形成的配合物的结构是均一的，同时速度和机理也是一样的；

(3) 锌离子临界点处 f 值比相应钙离子大，说明锌离子与海藻酸钠形成凝胶时，交联点比钙离子的多。

(4) 海藻酸钠中存在规整结构的双螺旋功能结构微区，规整微区的含量与 G 段含量有关；规整排列的 G 段是形成双螺旋功能结构微区的物质基础，受温度影响比较大；双螺旋功能微区随温度而发生的有序-无序可逆转变，与晶体随温度“融化”和“成核”过程很相似。

第四章 海藻酸钠的膨胀收缩性能研究

溶胀广泛存在于高分子凝胶中^[130, 131]。海藻酸钠与阳离子形成凝胶时,伴随着构象的变化、溶剂与高分子链的相互作用、阳离子与海藻酸钠的相互作用,这些作用使海藻酸钠凝胶产生膨胀收缩现象。在回收贵金属时海藻酸凝胶小球的体积会膨胀许多^[6],影响到工艺和回收效率;由海藻酸-阳离子形成的微胶囊,会发生膨胀,从而影响药物的释放^[132]。研究海藻胶的膨胀收缩性能,除有理论价值外,对食品工业,有关的化学工业以及其它方面也是需要的。

4.1 材料与方法

4.1.1 试剂与仪器

海藻酸钠 LVCR50(中 G 中 M),美国特品公司(ISP);其余试剂皆为分析纯,购于天津市科威化学试剂有限公司;TG328A 型光电分析天平,上海天平仪器厂。

4.1.2 实验方法

4.1.2.1 凝胶膜的制备和膨胀程度的表征

将 1cm×4cm 净重 0.03~0.05g 的海藻酸钠膜放入 30ml 浓度分别为 0.02M、0.05M、0.1M、0.2M 的二价阳离子 (Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+}) 凝胶液中,在一定时间,用纯净水冲洗后,擦去浮水后称重。

凝胶过程中的膨胀程度可用质量吸收倍数 (mass uptake) 来度量,即指一定凝胶所吸收的液体量。若膨胀前后凝胶的重量分别为 m_1 与 m_2 ,则质量吸收倍数 (即膨胀度)

$$\text{Mass uptake} = (m_2 - m_1) / m_1$$

4.1.2.2 凝胶小球的制备和小球在钠离子中的溶胀性

取 1ml 2%海藻酸钠溶液滴入 20 ml 0.2M 的氯化钙或硫酸锌凝胶液中,静置 24 小时后得到海藻酸钙或海藻酸锌凝胶小球,测定小球直径计算得体积 V_0 。将凝胶小球放入含有 0.9%的钠离子及不同浓度钙或锌离子的水溶液中,在 25℃达到平衡后,取出凝胶小球,测定小球溶胀半径,计算得溶胀小球体积 V ,体积溶胀比 Δ 定义为:

$$\text{体积溶胀比: } \Delta = V / V_0$$

用体积溶胀比 Δ 表征凝胶小球在钠离子溶液中的溶胀性。

4.2 结果与讨论

将 Na-ALG 膜放入不同浓度的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 溶液中进行凝胶, 所成凝胶的膨胀收缩度随时间变化的情况如图 4-1、图 4-2、图 4-3 所示。由图可知, 离子浓度越低, 膨胀度越大; 离子浓度较低时, 凝胶膜是先膨胀后收缩; 较高离子浓度时, 凝胶速度太快, 只能检测到膨胀度随时间减小, 即凝胶膜收缩的过程; 随着时间的延长, 凝胶的重量趋于稳定值。根据胶体化学理论^[130, 131], 海藻酸钠与水接触后, 马上产生溶剂化作用, 由于没有交联或者交联太少, 海藻酸钠开始溶解并膨胀, 随着水分子扩散和海藻酸钠的溶剂化, 二价阳离子也扩散进入海藻酸钠水凝胶层, 二价阳离子开始与海藻酸钠形成交联。由于交联点的形成, 海藻酸钠水凝胶的无限溶胀作用被限制, 凝胶的体积膨胀速度变慢。由于海藻酸与钙锌铜离子形成的配合物不溶于水, 这样在海藻酸钠与水接触的界面上形成一凝胶膜, 该凝胶膜具有半透膜的作用, 凝胶膜内没有与二价阳离子结合的海藻酸钠大

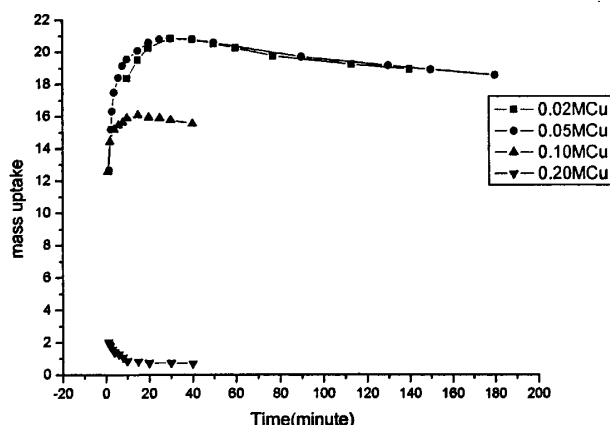


图 4-1 海藻酸钠膜在不同浓度 Cu^{2+} 凝胶液中膨胀度时间曲线

Fig.4-1 Swelling Degree of Sodium Alginate Membrane in Copper Ionic Gelling Solution as a Function of Time

分子不能扩散出来, 水分子与阳离子可以扩散进入凝胶内部。当二价阳离子浓度较低时, 凝胶的水化膨胀速度比凝胶膜的形成速度快, 所以海藻酸钠与水结合迅速膨胀。除了在表面形成凝胶膜外, 二价阳离子还扩散进入凝胶内部, 部分海藻酸钠与之结合, 分子链的运动自由度降低, 扩散速度减慢; 由于体积膨胀, 凝胶内海藻酸钠浓度降低, 产生的渗透压推动力降低。随着时间的进行, 凝胶膜变厚并完全包裹住凝胶, 这些作用综合起来, 使凝胶的膨胀作用变慢。当凝胶膜的强度与渗透压的推动力相等时, 凝胶不再膨胀^[67, 133, 134], 二价阳离子由于浓度梯

度的存在，继续扩散入凝胶内，并与游离的海藻酸钠上的羧基结合，这样造成凝

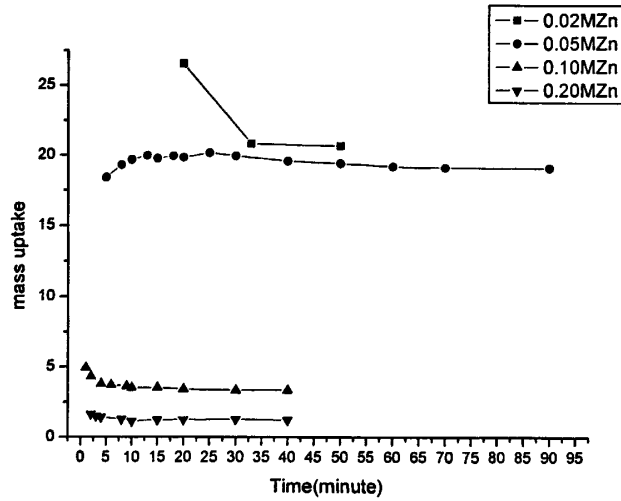


图 4-2 海藻酸钠膜在不同浓度 Zn^{2+} 凝胶液中膨胀度时间曲线

Fig.4-2 Swelling Degree of Sodium Alginate Membrane in Zinc Ionic Gelling Solution as a Function of Time

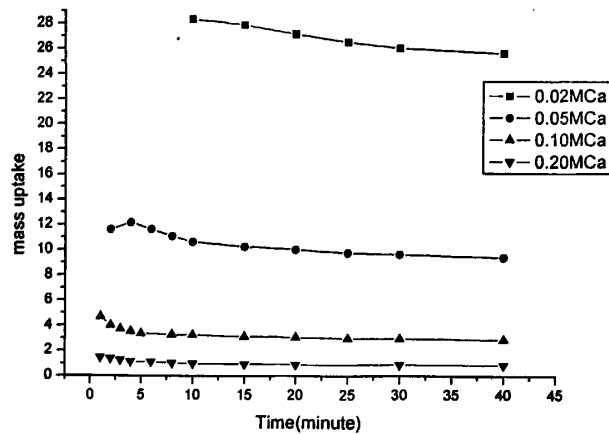


图 4-3 海藻酸钠膜在不同浓度 Ca^{2+} 凝胶液中膨胀度时间曲线

Fig.4-3 Swelling Degree of Sodium Alginate Membrane in Calciumr Ionic Gelling Solution as a Function of Time

胶膜内能产生渗透压的海藻酸钠浓度降低,使膜内的渗透压推动力减少。凝胶膜内游离羧基的减少,使得自由水含量增多;膜外二价阳离子浓度比膜内高,按照唐南平衡原理,水分开始向外扩散,阳离子继续向膜内扩散,总体表现为水的减少和重量的降低。随着时间的延长,最终得到平衡,凝胶的重量趋于稳定值。

对于 0.02M 的钙锌离子,由于刚开始形成的凝胶膜太软,无法称重,海藻酸钙只能得到 10 分钟以后的数据,海藻酸锌只能得到 20 分钟以后的数据。

随着凝胶液中二价阳离子浓度的增大,开始形成凝胶膜的速度、强度也增大,同时由于膜外阳离子浓度的增大,使膜内外的唐南效应形成的渗透压减小,这些多种作用使得凝胶的膨胀速度和增重倍数降低。并且使达到平衡的时间缩短。

当阳离子浓度高达 0.1M 时,由于双电层的压缩,海藻酸钠很难与水发生溶剂化反应,同时凝胶膜形成的也非常快,这样使凝胶很快越过膨胀阶段,进入收缩重量减少过程。膜外离子浓度很大,由于唐南渗透压力膜外大于膜内,使得快速膨胀阶段吸收的少量水分,有一部分被重新释放到膜外的凝胶离子液中。如图 4-1、图 4-2、图 4-3 所示,在 0.1M 的钙锌铜离子凝胶液中,海藻酸钠膜 3 分钟时已经开始收缩,20 分钟左右以后达到平衡稳定状态。

图 4-4 是海藻酸钠膜放入 0.02M 的 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 离子凝胶液中,膨胀度随时间变化情况,铜离子表现出完整的膨胀收缩曲线。三个二价阳离子与海藻酸钠结合的能力从大到小为 $\text{Cu}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$, 由于铜的结合能力很强^[135],在

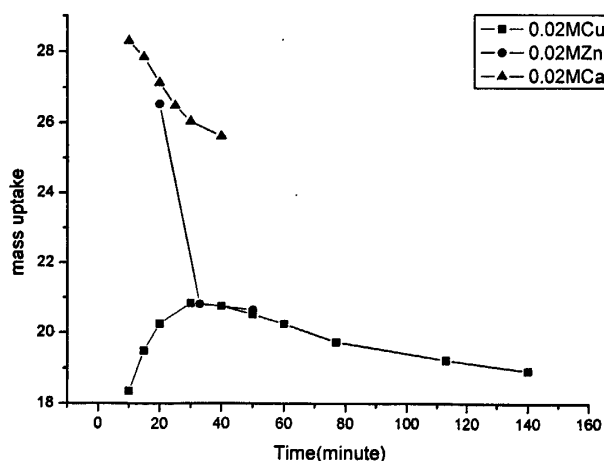


图 4-4 海藻酸钠膜在 0.02M 的二价阳离子凝胶液中膨胀度时间曲线

Fig.4-4 Swelling Degree of Sodium Alginate Membrane in 0.02M Divalent Cation Ionic Gelling Solution as a Function of Time

0.02M 的低浓度下,也能和海藻酸钠很快地反应形成渗透膜,维持凝胶的形状和膜两边的渗透平衡。在 0.02M 与 0.05M 铜离子中海藻酸钠凝胶时的膨胀收缩很接近,说明在一定低的浓度范围内,铜离子对凝胶的影响不是很大。钙锌与海藻酸钠的相互作用较弱,只有凝胶快速膨胀到很大程度才形成比较稳定的膜,由于强度低,只可勉强维持凝胶的形状。

图 4-5 是海藻酸钠膜放入 0.05M 的 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 离子凝胶液中,膨胀度随时间变化情况,三个离子都表现出完整的膨胀收缩曲线。海藻酸铜由于强度远远高于其它二者,能够抵抗一定的唐南渗透压力,使它的增重倍数最大。海藻酸锌比海藻酸钙的亲水性好^[136],锌离子与海藻酸钠的结合没有钙离子强,使得海藻酸锌中的游离羧基比海藻酸钙中的高,即海藻酸锌中的渗透压比海藻酸钙中的高,所以在 0.05M 的离子溶液中,海藻酸锌凝胶比海藻酸钙凝胶的增重倍数大。

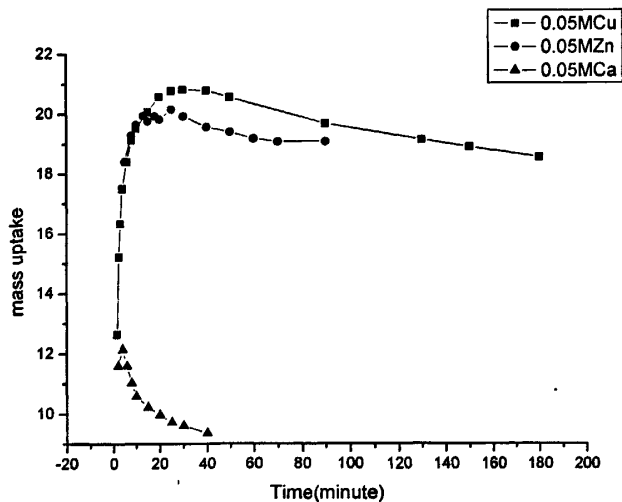


图 4-5 海藻酸钠膜在 0.05M 的二价阳离子凝胶液中膨胀度时间曲线

Fig.4-5 Swelling Degree of Sodium Alginate Membrane in 0.05M Divalent Cation Ionic Gelling Solution as a Function of Time

铜离子与海藻酸钠结合时,由于相互作用力太强,使海藻酸钠的构象发生很大变化,在 0.1M 的离子浓度下,双电层的作用没有构象变化的影响大,如图 4-6 所示,海藻酸铜凝胶发生膨胀增重现象。对钙锌离子来说,机理如前所述,检测不到膨胀过程,只能测定收缩过程,而且增重倍数比较低。

图 4-7 是海藻酸钠膜在 0.2M 的 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 离子凝胶液中膨胀收缩示意图。由于离子浓度很高,使凝胶速度太快,海藻酸钠膜还没来得及膨胀,表面

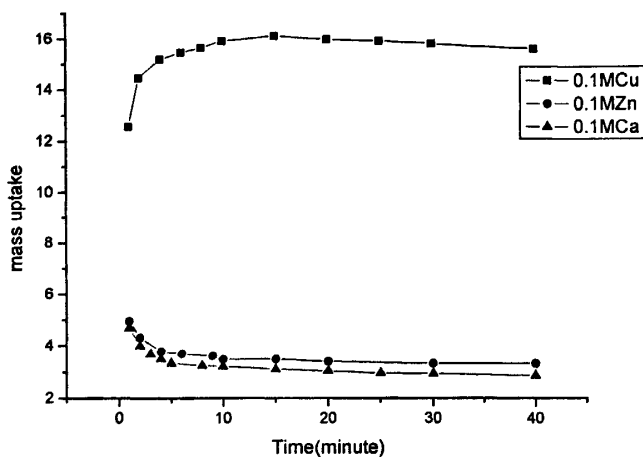


图 4-6 海藻酸钠膜在 0.1M 的二价阳离子凝胶液中膨胀度时间曲线
Fig.4-6 Swelling Degree of Sodium Alginate Membrane in 0.1M Divalent Cation Ionic Gelling Solution as a Function of Time

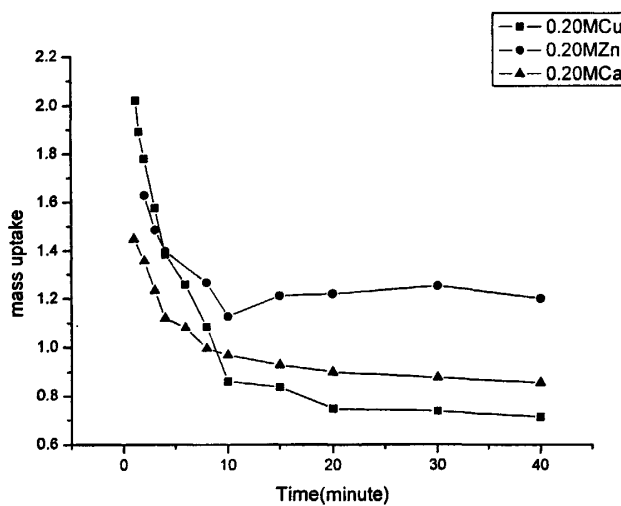


图 4-7 海藻酸钠膜在 0.2M 的二价阳离子凝胶液中膨胀度时间曲线
Fig.4-7 Swelling Degree of Sodium Alginate Membrane in 0.2M Divalent Cation Ionic Gelling Solution as a Function of Time

就已形成完整的凝胶膜。 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 离子与海藻酸钠结合强度依次递减，使得相应海藻酸胶上的游离羧基依序增多，对水的亲和力依次增加，这样，相应凝胶中的唐南渗透压依次增高，使得平衡后，海藻酸铜凝胶的增重倍数最低，海藻酸锌凝胶的增重倍数最大，与图 4-7 所示试验结果相符。

凝胶后的海藻酸凝胶真空 100℃干燥 24 小时后，测量并计算表面积 A，与凝胶前的表面积 A_0 的比值 δ 定为凝胶前后的面积比，即 $\delta=A/A_0$ 。

表 4-1 将 $A_0=1\times4\text{cm}^2$ 的 Na-ALG 干燥膜片放入不同浓度的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 水溶液中，凝胶前后的面积比。

Table4-1 Dry membrane of sodium alginate, imerged into different concentration solution of cupric, zinc, calcium ions. The area ratio δ after and before being gelled

离子浓度 面积比 离子种类				
	0.02M	0.05M	0.10M	0.20M
Cu^{2+}	0.51	0.49	0.54	0.60
Zn^{2+}	1.79	1.42	1.04	0.70
Ca^{2+}	0.90	0.83	0.74	0.58

图 4-8 是离子浓度对凝胶前后面积比 δ 的影响，从图可知，在低浓度时，海藻酸锌凝胶的面积比大于 1，浓度大于 0.1M 时，面积比才低于 1，即开始收缩；随着凝胶离子浓度的增加，面积比在降低。对钙离子来说，面积比是低于 1 的，随着凝胶离子浓度的增加，面积比在降低，幅度比锌离子的小许多。铜离子的面积比在 0.55 左右。随凝胶离子浓度的增加，稍微有点升高。高浓度的凝胶离子使面积收缩，铜离子由于和海藻酸钠的强烈作用，使得构象变得紧凑，引起面积收缩。钙离子可能由于使海藻酸钠规整排列，分子链变得紧密，才使得面积比低于 1。海藻酸钠与锌离子的相互作用比较小，同时海藻酸锌与水的亲和性比较大，使得分子链比较舒展，造成面积比大于 1，导致海藻酸锌膜的表面积扩张。

图 4-9 是海藻酸锌、海藻酸钙凝胶小球在不同钠离子溶液中的溶胀体积比。在纯水溶液中海藻酸锌小球的体积发生膨胀，说明锌离子与海藻酸钠结合作用相对较弱，海藻酸锌凝胶亲水性比较大。在钠离子溶液中海藻酸锌海藻酸钙凝胶小球都发生溶胀，这是由于钠离子与二价阳离子竞争海藻酸凝胶上的结合位点，使部分二价阳离子从结合位点上释放出来，凝胶的交联点变少造成的。同样条件下，海藻酸锌的膨胀体积总比海藻酸钙的大，近一步证明与海藻酸钠相互作用时，锌没有钙结合的牢固。

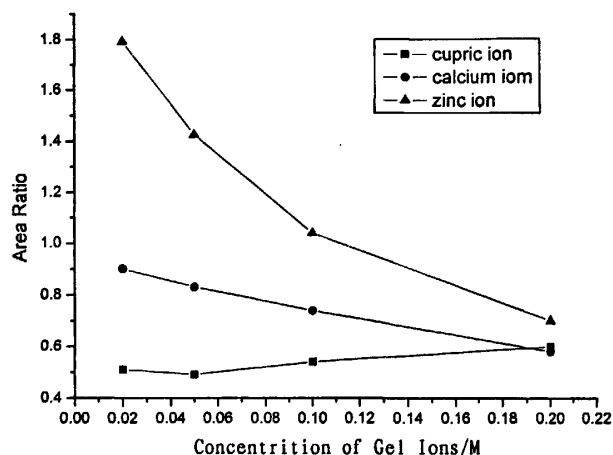
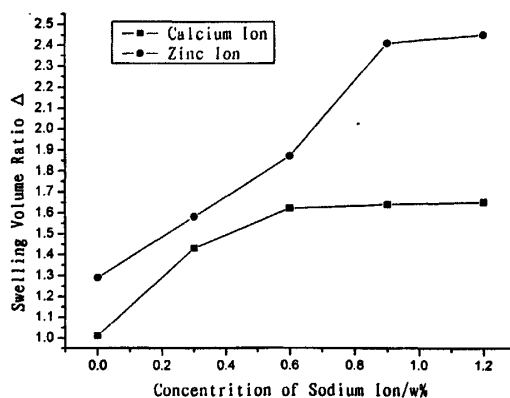
图 4-8 凝胶离子浓度对面积比 δ 的影响Fig.4-8 Influence of gelling cationic ions concentration on area ratio δ 

图 4-9 溶液中钠离子浓度对海藻酸锌与海藻酸钙溶胀体积的影响

Fig.4-9 Effect of Na^+ concentration in solution on swelling of Ca-ALG and Zn-ALG

将 0.2M 氯化钙溶液中形成的凝胶小球放入水中，体积基本不变，放入 0.9%NaCl 水溶液中，体积膨胀到 1.4 倍，当 0.9%NaCl 中含有 0.001M 的 Ca^{2+} 时膨胀体积由 1.64 倍降低到 1.43 倍，重新放回 0.2M 的 Ca^{2+} 凝胶液中，小球体积收缩为初始体积的 0.96 倍，基本上恢复到原来状态，这说明随外界离子条件的改变，凝胶小球的溶胀收缩是可逆的。对海藻酸锌来说，变化趋势是一样的，只

是变化的幅度大小不一样，各个状态下的凝胶强度不一样。在使用海藻酸钠时，应尽量利用这些特性，如缓释药物在制备时要考虑到生理条件下不同离子对释放的影响；同时要避免这些特性造成的缺陷，如药物在生理条件下的暴释，酶固定化过程中的泄漏等。

表 4-2 在不同溶液中的钙锌凝胶小球溶胀体积比 Δ

Table4-2 Swelling Volume Ratio Δ of Calcium and Zinc alginate gel beads in different solutions

	纯水	0.9%NaCl	0.9%NaCl 0.001M M^{2+}	0.2M M^{2+}
Ca^{2+}	1.01	1.64	1.43	0.96
Zn^{2+}	1.29	2.41	1.94	0.98

4.3 小结

通过以上实验可得出如下结论：

(1) 海藻酸钠与二价阳离子凝胶时会发生膨胀收缩现象，随阳离子种类和浓度的不同，膨胀收缩的程度和速度是不一样的，对 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 离子来说，膨胀收缩程度的大小，与三个离子的性质有关，如离子大小，成键电子轨道等。

(2) 当外界条件不同时，如在不同的氯化钠和凝胶离子溶液中，膨胀和收缩是可逆的。这些宏观的膨胀收缩现象，是微观离子结合和竞争解离的结果。

第五章 海藻酸钠凝胶机制分析

这几年,国际上物理化学、量热学、分子动态学的研究取得了重要进展,我国在这方面具有较高研究水平。将物理化学、量热学、分子动态学等领域取得的新知识、新理论、新方法应用于生命、材料、药物释放等高新技术领域。结合粘度、膨胀收缩等宏观方法,从热力学中间态、分子构象、分子聚集体开展多种研究方法相结合,用热力学圆二色谱、超分子化学方法和理论对海藻酸钠和无机离子之间的聚集状态进行研究,将各种方法的测量进行对比和关联,从单一方法的研究走向多学科的综合与集成。用宏观微观研究相结合、动态与静态相结合的方法,更多倾向于微观和动态,并进一步深入到化学反应的本质研究,使微观本质和宏观现象结合更加紧密,期望对药物缓释设计等应用提供理论参考。

5.1 材料与方法

5.1.1 实验材料

5.1.1.1 主要试剂

海藻酸钠样品 LF98、LVCR、LN100、HD52 购于美国特品公司 (ISP), G 单元含量分别为: LF98, 87%; LVCR, 39.9%; LN100, 35.8%; HD52, 10%。 CaCl_2 、 ZnSO_4 、 CuSO_4 为分析纯, 购于天津市科威化学试剂有限公司。

5.1.1.2 主要仪器设备

等温滴定量热仪 (美国 MicroCal Incorporated 公司); 圆二色谱仪 JASCO J-810, 大连华洋科学仪器有限公司; 红外光谱仪 (HITACHI270-30, Japan); Ostwald 粘度计, 上海玻璃一厂生产; 平氏粘度计, 上海玻璃一厂生产; CS501 型超级恒温水浴, 南通科学仪器厂; TG328A 型光电分析天平, 上海天平仪器厂。

5.1.2 实验方法

5.1.2.1 ITC 对海藻酸钠凝胶过程的研究

同第二章 1.2

5.1.2.2 圆二色 CD 对海藻酸钠凝胶的研究

同第三章 1.2.5

5.1.2.3 海藻酸凝胶粘度的测定

将海藻酸钠配制成不同浓度的水溶液 (质量分数为 0.2%、0.35%、0.5% 和 0.75%), 静置 24 小时使之充分溶胀; 取 1ml 不同浓度的 CaCl_2 与 ZnSO_4 水溶液,

边搅边加入 10 ml 不同浓度的海藻酸钠溶液中,再继续搅拌至体系均匀透明,静置 24 小时。以 1ml 水与 10 ml 不同浓度的海藻酸钠的均匀混合液为标准,在 $30\pm 0.02^{\circ}\text{C}$ 条件下,用 Ostwald 粘度剂测定各体系粘度;以同浓度海藻酸钠溶液的含盐溶液与无盐溶液的流出时间之比 (t/t_0),定义为样品液的相对粘度 ($\eta_{\text{rel}}=\eta/\eta_0\approx t/t_0$),描述体系的凝胶化程度,粘度最小样品流出时间不小于 100 秒。在研究 Na^+ 离子对海藻酸 sol-gel 影响的过程中,将 CaCl_2 与 ZnSO_4 水溶液中加入不同浓度的钠离子,并以 1ml 相应浓度氯化钠水溶液与 10 ml 不同浓度的海藻酸钠的均匀混合液为标准。

5.1.2.4 海藻酸凝胶流出时间的测定

分别配制 0.025%、0.05%、0.075%、0.10%、0.15% 的海藻酸钠、海藻酸钙、海藻酸锌水溶液,于 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 用平氏粘度计测定这些溶液的流出时间,取三次平均值。

5.1.2.5 海藻酸凝胶的红外光谱测试

将 1% 海藻酸钠溶液滴入 0.2M 的氯化钙、硫酸锌水溶液中,形成海藻酸钙、海藻酸锌凝胶颗粒,室温干燥,研成细粉,采用 KBr 压片法制成样品后用红外光谱仪 (HITACHI270-30, Japan) 进行测量。

5.1.2.6 海藻酸钠的膨胀收缩性能

同第四章 4.1.2

5.2 结果与讨论

5.2.1 ITC 与 CD、粘度法相结合对海藻酸钙凝胶的解释

量热研究表明 (图 5-1), 在带负电的海藻酸与带正电的钙离子间存在两种类型的结合位点。第一个结合位点有高的亲合常数 $k_1=1.21\text{E}7\text{ M}^{-1}$, 伴随着不利的吸热反应 ($1.89\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$); 第二个结合位点的亲合常数比较低 $k_2=2.90\text{E}4\text{ M}^{-1}$, 伴随着有利的放热反应 ($-1.84\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)。因此, 古洛糖醛酸与甘露糖醛酸上的两种结合位点对钙离子来说有不同的结合常数 k_a 。由 Gibb's 方程

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$$\Delta G = -RT\ln k$$

由量热仪自带的软件, 对 ITC 数据处理, 可得相关的热力学参数。结果表明二价钙离子和海藻酸钠之间存在两种结合位点, 可计算得第一和第二结合位点的熵增 $T\Delta S$ 分别为 $T\Delta S_1=42.29\text{kJ}$, $T\Delta S_2=23.58\text{kJ}$ 。结合位点的焓变和熵变表明第

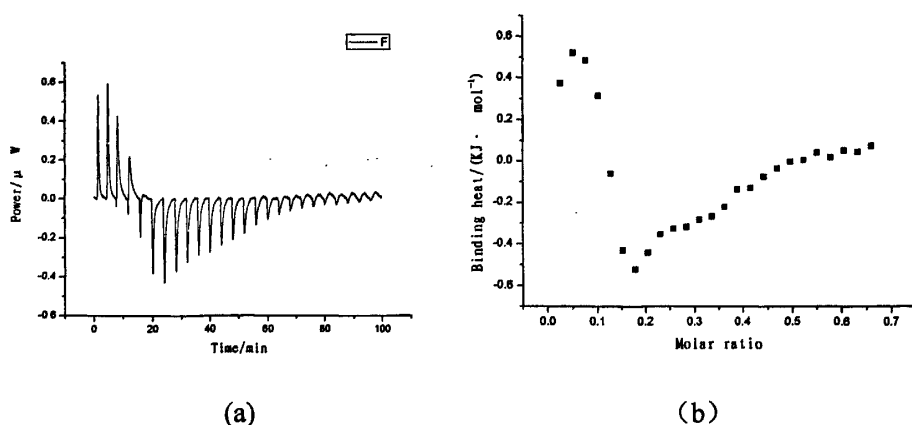


图 5-1 海藻酸钠 LVCR 与 CaCl_2 在双蒸水中的滴定曲线

(a) 连续滴加 $5\mu\text{l}$ CaCl_2 溶液 (9.0mM) 到海藻酸钠 LVCR 溶液 (1.25mM) 中的滴定曲线; (b) 相应于滴定曲线积分得到的反应热变化曲线

Fig.5-1 Calorimetric titration of alginate LVCR with CaCl_2 in double distilled water at 25°C . (a)Raw data for sequential injection of $5\mu\text{l}$ CaCl_2 solution(9.0mM) into alginate LVCR solution(1.25mM);(b)Heats of reaction as obtained from the integration of the calorimetric traces.

一结合位点是熵驱动的, 第二结合位点是焓变和熵变共同驱动的。在不同 NaCl 浓度下 (从 0 到 100mM) ,用 ITC 测定结合常数 (表 5-1), 结果表明, 二价钙离子与海藻酸钠的第一位点结合常数与 NaCl 浓度按自然对数成线性关系(图 5-2)。即

$$\ln k_1 = a \ln [\text{NaCl}] + b$$

表明, 二价钙离子与海藻酸钠的相互作用是静电的离子相互作用, 可以被钠离子竞争和阻止。从机理上说明了二价钙离子和海藻酸钠结合形成凝胶的机理和动力学过程。

从圆二色 CD 谱图 (图 5-3) 上可知, 钙离子与海藻酸钠相互作用分前后两个阶段, 由于圆二色测定的是海藻酸钠大分子构象的变化, 明显反映出凝胶过程中糖醛酸构象与钙离子用量的关系。在第一阶段线性变化范围内, 第一阶段摩尔椭圆值的变化比率不一样, LF 为 4862.4、LVCR 为 3579.6、LN 为 2343.6, 变化比率大小反映了三个样品构象变化幅度大小。从三个不同 G 单元含量样品的构象变化大小程度可知, G 单元含量越高, 在相同钙离子用量下, 构象变化幅度越大。说明第一阶段线性变化范围内, 钙离子主要与 G 单元相互作用。大量的事实证明, 钙与 M 糖醛酸单元的相互作用非常弱。

表 5-1 不同氯化钠浓度下海藻酸钠与氯化钙相互作用的结合常数

Table5-1 Binding parameters between sodium alginate and calcium chloride at different sodium chloride concentration

Sample/[NaCl]Mm	0mM	10mM	25mM	50mM	100mM
$K_1(\text{per mole})$	1.330E+06	7.710E+05	5.010E+05	4.010E+05	3.090E+05
$\Delta H_1(\text{cal/mole CaCl}_2)$	945.0	348.0	301.0	19.00	-1.020
$K_2(\text{per mole})$	1.030E+04	1.270E+04	1.010E+04	3.130E+03	4710
$\Delta H_2(\text{cal/mole CaCl}_2)$	-1.510E+03	-3.840E+03	-1.890E+03	-2.670E+04	-1560
ΔG_1	-8.350E+03	-8.030E+03	-7.770E+03	-7.640E+03	-7485
$T\Delta S_{(1)}(\text{cal})$	9.300E+03	8.380E+03	8.070E+03	7.660E+03	7484
ΔG_2	-5.470E+03	-5.600E+03	-5.460E+03	-4.770E+03	-5008
$T\Delta S_2(\text{cal})$	3.960E+03	1.765E+03	3.570E+03	-2.190E+04	3448

Subscripts 1 and 2 refer to first and second binding sites;K, affinity of binding ; ΔH ,change in enthalpy of binding; ΔG ,change in Gibb's free energy; $T\Delta S$,entropic contribution for the binding

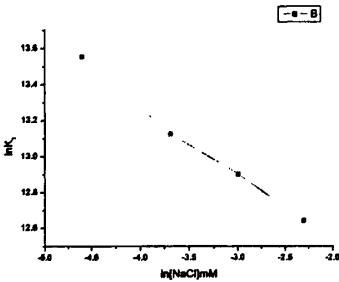


图 5-2 海藻酸钠与钙离子相互作用时的结合常数与氯化钠浓度的关系
Fig.5-2 A linear relationship for the decrease in the natural logarithm of binding affinity between alginate and calcium with increasing NaCl concentration

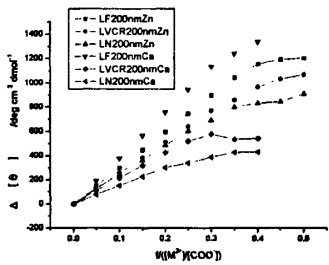


图 5-3 三个海藻酸钠样品摩尔椭圆值 (200nm)增量随钙锌离子用量的变化
Fig.5-3 Variation in c.d. spectral intensity at 200nm of three sodium alginate with calcium zinc ion concentration (expressed as ratio f)

图 5-4 是体系相对粘度随离子摩尔比 f 变化的趋势图，对钙离子，当摩尔比 f 比较小时，相对粘度没有增加，甚至显示出有些下降的趋势，这是因为伴随着离子强度的增加，主要发生了分子内的交联，分子间的交联特别少。当离子摩尔比 f 达到比较高的浓度时，随着 f 的增加海藻酸钠溶液的粘度迅速增加，提示我

们在这一范围内分子间交联形成聚集体占主导地位。

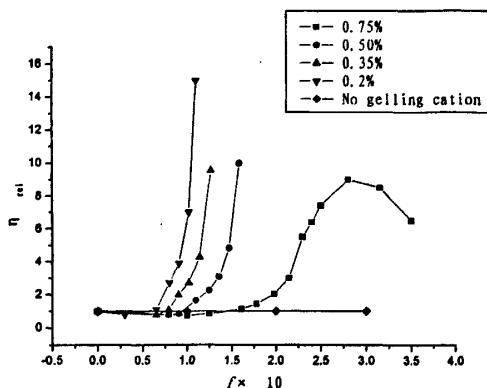


图 5-4 海藻酸钠溶液的相对粘度随钙离子摩尔分数的变化情况

Fig.5-4 Variations of relative viscosity (η_{rel}) vs fraction of calcium ions (f) at 30°C and under various alginate concentrations. Various symbols refer to ALG concentration (w/v) as: ▼ 0.75% ▲ 0.50% ● 0.35% ■ 0.2%

在稀释过程中,由分子间交联形成的链段聚集体可以被消除,而分子内交联却存在,分子内交联和分子间交联在化学上是等价的。在低离子浓度下,特性粘度随离子摩尔分数的增加出现轻微下降的趋势,可以推论分子链构象变得比较紧密。在体系中分子链的紧密构象和分子间交联形成的聚集体同时发生,特性粘度在低的离子摩尔分数 f 时增长的并不明显,说明分子内交联占主导地位,在高的摩尔分数 f 范围内,特性粘度的急剧上升,说明分子间交联占主导地位。海藻酸钠聚集体中分子内交联使分子链构象收缩变得紧密,导致溶液粘度降低。

在海藻酸钠中,分子链由 G 段、M 段、MG 交替段构成。G 单元达到一定程度后,主要以双螺旋结构存在,如图 5-5 所示。G 段当中的古罗糖醛酸表现出一个负电性空腔的规则排列,形成所谓的蛋盒结构,当钙离子与海藻酸钠相互作用时,优先与形成蛋盒结构的 G 单元相互作用,形成蛋盒结构配合物(图 5-6,图 5-7(a))。在这一过程中,对应于量热反应的第一类结合位点,对应于离子量对圆二色谱影响的第一阶段线性部分。钙离子优先与 G 单元形成的蛋盒空腔作用,通过 2_1 链段对称二聚体形成链段之间的缔合,如图 5-7(a)所示。由于钙镶嵌于已存在的螺旋蛋盒空腔中,相似于分子内交联,对粘度贡献不大,同时释放出钠离子,起到少量电解质的作用,使粘度有稍微下降的趋势。在这一过程中,由于链段与链段之间的相互作用和缔合导致构象运动的损失,使得 c.d.信号增强。从熵上考虑,

未配位前溶液中的 $\text{Ca}(\text{II})$ 阳离子以及糖醛酸上的羧基是溶剂化的, $\text{Ca}(\text{II})$ 与古洛糖醛酸上的羧基配位后。二者所缔合的溶剂分子将被脱掉而导致熵增^[102]。这种脱溶剂化效应补偿了配体构型变化所引起的熵损失, 使键合过程表现出正的熵变。由古洛糖醛酸单元之间形成的空隙与 Ca^{2+} 离子大小相适应, Ca^{2+} 离子嵌入空隙中^[76, 92], 与糖环上的羧基、氧原子等基团的距离适度, 相互作用强。由于相互作用比较强, 带动高分子链的构象发生很大变化。

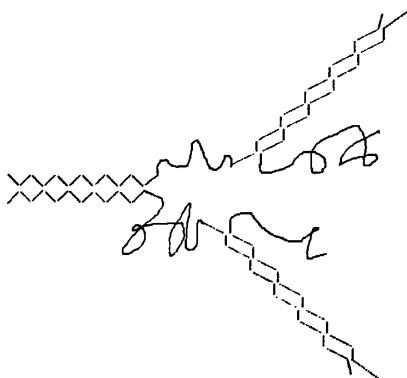


图 5-5 交联状态下的双螺旋聚集结构

Fig.5-5 Scheme of cross-linking of dimer helix

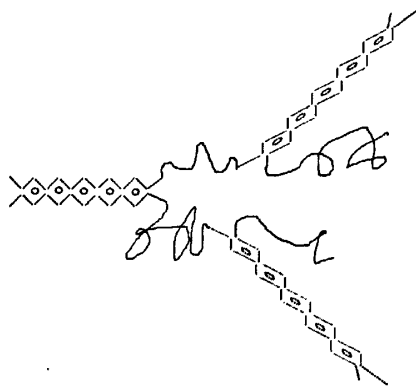


图 5-6 螯合钙离子的双螺旋结构

Fig.5-6 Scheme of cross-linking of dimer helix chelated with calcium ion

由于钙离子与 M 糖醛酸单元的相互作用非常弱, 当钙离子用量进一步增加时, 会形成所谓的半蛋盒结构和二聚体聚集体, 如图 5-8、图 5-9(b)、图 5-9(c) 所示, 当另一个链段加到已存在的二聚体上时, 进一步的结合能不足以补偿熵变和溶剂化程度改变的影响。刚开始聚集的结合能一定比后面的聚集结合能高。对于进一

步的聚集体来说，没螯合金属离子的糖醛酸链与缔合二价阳离子的二聚体之间，由于聚电解质电荷密度差异而产生的对结合能的贡献，随着凝胶程度的加深，将会极大地减弱。这样，二聚体是介于单个链段与充分聚集链段之间的最稳定中间态。聚集不会导致分子链构象的显著改变，二聚体间钙结合位点的几何形状和二聚体内一样。在水溶液状态下，钙离子是唯一或主要反离子时，这样的二聚体能够不需结构重排而进一步聚集。当钙离子用量与螯合上去的离子用量一样时会导致相似的二聚体。

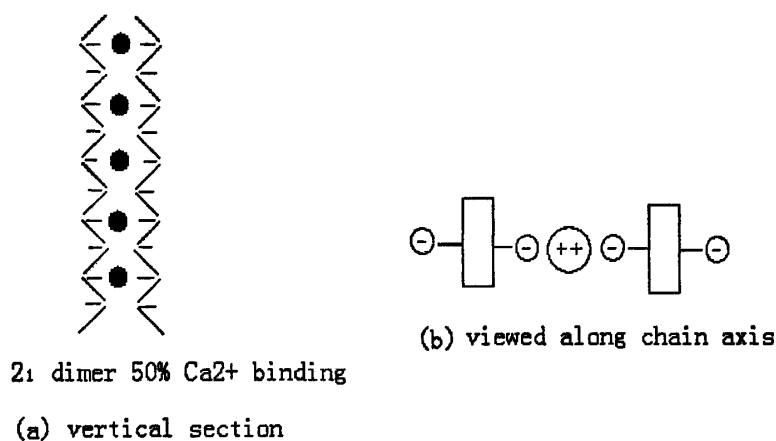


图 5-7 螯合钙离子的双螺旋结构示意图

Fig.5-7 Scheme of the dimer helix chelated with calcium ion

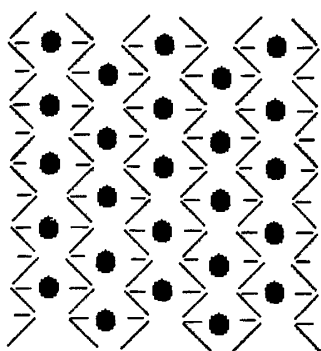


图 5-8 螯合钙离子的双螺旋聚集体

Fig.5-8 The aggregation of dimer helix chelated with calcium ion

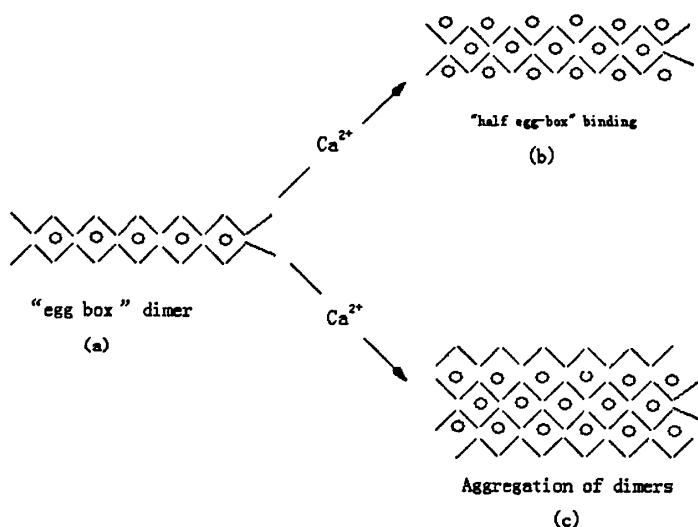


图 5-9 钙离子与古洛糖醛酸螯合示意图

Fig.5-9 Schematic representation of calcium-ion chelation to poly-L-gulonate sequences

在半蛋盒结构以及二聚体聚集体形成过程中,钙离子与糖单元相互作用时作用力不大,主要是脱溶剂化程度很低,二聚体结构不需要重排就可进一步聚集,分子链的构象改变不显著。这样导致焓变为放热反应,同时构象变化也比较低。在圆二色 CD 谱图上,对应于第二阶段的斜率比值比第一阶段小。在量热实验上第二阶段的热力学参数为结合常数 $K_2=2.90E4(L \cdot mol^{-1})$, 焓变 $\Delta S_2=79.08(J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1})$, 焓变 $\Delta H_2=-1.84(kJ \cdot mol^{-1})$, 比第一阶段的热力学参数(结合常数 $K_1=1.21E7(L \cdot mol^{-1})$, 焓变 $\Delta S_1=141.84(J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1})$, 焓变 $\Delta H_1=1.89(kJ \cdot mol^{-1})$)小;第二阶段是放热反应,第一阶段是吸热反应,原因可能是离子的生成热太大造成的。

对钙离子来说,以四种状态存在,自由游离离子、包含在蛋盒中的离子、半蛋盒中的单取代钙离子、交联螯合状态的钙离子。离子浓度的增加使高分子电解质溶液的离子强度增加,也会使粘度降低。随着摩尔离子比 f 的增加,参与交联的离子数量急剧增大,体系粘度快速升高,说明参与交联的离子是溶液性质的决定因素。

钙与海藻酸钠相互作用的过程可描述为:首先发生分子内的交联,这些分子链经过扩散与碰撞结合成二聚体、三聚体,在离子交联作用下通过分子间交联形

成聚集体,随着离子的加入,最终形成多个较大的聚集体,当聚集体充满整个溶液体积即达到亚浓点时,体系最终会跨越到临界生长点,通过连通性转变,形成凝胶网络。在半稀释状态,被固定压缩的聚集体可视为巨大的“单体”,其与相邻单体自由无规结合,形成凝胶。

5.2.2 钠离子对海藻酸钠与二价阳离子相互作用的影响

图 5-10 是海藻酸钠与钙相互作用时粘度随氯化钠用量的变化。由图可知,不同氯化钠浓度下,钙-海藻酸钠溶液的粘度随交联分数 f 变化的趋势不同。在低交联分数 f 下,相对粘度随交联分数增加趋势比没有氯化钠的海藻酸钙体系要

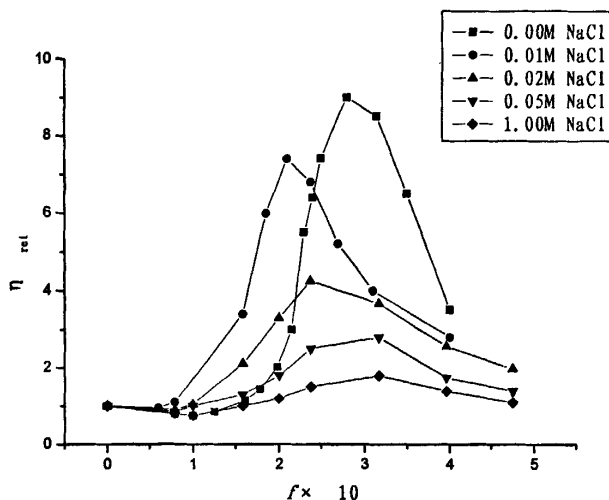


图 5-10 不同钠离子浓度对 0.2%ALG-Ca 体系 sol-gel 过程的影响

Fig.5-10 Variations of relative viscosity(η_{rel}) of alginate solutions versus molar fraction of calcium cation, f , in the presence of various amount of NaCl added. Various symbols refer to NaCl concentration ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$): ■0.00; ●0.01 ▲0.02; ▼0.05; ◆1.00

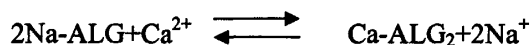
明显。这些结果说明在有外加盐情况下,分子间的交联要容易。当氯化钠浓度达到一定程度后,粘度随摩尔离子比 f 的变化将不明显,氯化钠浓度进一步增加会产生盐析。在不同氯化钠盐浓度下,随摩尔离子比 f 的增加,粘度先增加达到一极大值后,继续增加钙离子浓度会产生沉降。钠离子的存在会影响体系粘度,妨碍钙离子与海藻酸钠的结合。

聚电解质高分子在无盐溶液中由于强的静电斥力会非常伸展。外加盐的作用

使高分子链上的静电得到屏蔽,从而影响到高分子链的柔顺性,以及单体间复合结构的形成。在结合钙离子与游离钙离子间存在交换平衡。对极稀的海藻酸钠溶液,在低交联摩尔离子比 f 范围内,无外加盐存在情况下,可以认为由于分子链充分伸展,并且海藻酸钠分子链上非常强的静电能,使得交联特别是分子内的交联几乎不可能发生。

当氯化钠浓度有轻微地增加时,海藻酸钠大分子链上的电荷在一定程度上得到屏蔽。非常柔顺的高分子链在一定程度上得到伸展。少量氯化钠电解质的存在会有利于海藻酸钠分子链间复合物的形成。

氯化钠的加入,在钙离子与海藻酸钠相互作用时,有两个作用,一是作为电解质,影响聚电解质海藻酸钠生物大分子在溶液中的行为,二是离子交换平衡,置换与海藻酸钠缔合的钙离子。



在反应平衡时,凝胶与溶液中的钙、钠离子达到平衡。当体系加入一定量钠离子时,则需要增加与海藻酸钙凝胶平衡的钙离子浓度。当体系钠离子浓度较高时,则会出现明显的盐析现象,使体系粘度下降。

郑洪河^[137]等认为加入少量钠离子,将形成十分有韧性及更加伸展的高分子链,使分子间交联有更多的基团可以利用,导致粘度增加。然而随钠离子浓度的增加,最终会形成中性高分子,此时从热力学与动力学上讲都难以形成分子间交联,因此相对粘度随交联分数的增加而增加是很弱的。

从表 5-1 可知,随氯化钠浓度的增加,第一结合位点的熵变 $T\Delta S$,逐渐变小,说明是钙离子与 G 单元通过价键作用造成的。而对于第二结合位点,从前面分析可知,是钙离子与已结合钙离子的蛋盒结构结合形成半蛋盒结构,或者是缔合钙的二聚体在钙离子作用下形成聚集体。当少量氯化钠电解质存在时,高分子链伸展,有利于形成分子间交联,链段被固定,熵相比无氯化钠时减少。当氯化钠浓度继续增加时,开始置换缔合的钙离子,使交换程度降低,链段自由度变大,表现出熵增。进一步增加盐浓度,海藻酸钠分子链蜷曲有沉析的趋势,又表现出熵减。因此,氯化钠浓度对海藻酸钠大分子链的构象影响是复杂的,表现在钙与海藻酸钠相互作用时第二结合位点的熵变随氯化钠用量而出现复杂的变化趋势。

5.2.3 ITC 与 CD、粘度法相结合对海藻酸锌凝胶的解释

从流出时间的变化可以看出海藻酸钠与钙锌离子的交联程度,流出时间降低的越厉害,交联程度越大。如图 5-11 可知海藻酸钙锌溶液的流出时间比海藻酸钠水溶液的要低许多,说明海藻酸钠与钙锌离子发生了很大程度的交联。海藻酸锌凝胶液的流出时间比相应海藻酸钙凝胶液的小,说明海藻酸锌中的交联程度比海藻酸钙中的多。

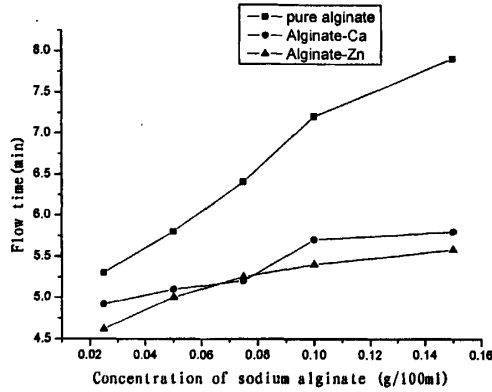


图 5-11 海藻酸钠浓度对海藻酸钠溶液、海藻酸钙锌凝胶流出时间的影响

Fig.5-11 Influence of increasing concentration of sodium alginate,sodium alginate and calcium salt(constant ratio),sodium alginate and zinc salt(constant ratio)on the flow time of the solutions

从图 5-12 可知,海藻酸钠与锌离子相互作用时,随锌离子用量的增加,流出时间下降的非常快,直到 $8 \times 10^{-5} \text{M}$ 才达到一个平稳值,说明锌离子与钙离子相比,锌离子与海藻酸钠的结合程度比钙离子大,可推测锌离子与海藻酸钠有更多的结合位点或不同的结合位点。从图上可知钙离子与海藻酸钠相互作用分两个阶段,与量热等方法所得结果相同,说明这种方法的可靠性很大。

图 5-13 是 ZnSO_4 (10.54mM) 滴定海藻酸钠 LVCR 的量热曲线,从图 5-13 (a) 可知,反应是吸热反应,焓变 $\Delta H = 15.8 \text{ (kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$,比钙与海藻酸钠相互作用时大许多,从图 5-13 (b) 可看出,在离子摩尔比 0.3 左右有一个小突起,可能是锌离子与 G 单元优先作用后,再与 M 单元相互作用时,中间过渡引起的。说明锌与 M、G 单元相互作用是有差别的,但用量热仪自带的软件拟合时,用一个位点拟合程序处理时,数据在误差范围之内,即相互作用差别不大。推测主要以不严密的“egg-box dimer”形式和大量的二聚体交联聚集体形式存在,半蛋盒结构形式比较少。由于锌离子与 M、G 单元都可相互作用,所以海藻酸锌的交联点比海藻酸钙的交联点多。结合 CD 测试结果,由于锌与 G 优先结合,与 M、G 单元相互作用差别不大。因此,不同组成的三个海藻酸钠样品与锌相互作用时,斜率比率比较接近,并且第一阶段线性变化的范围也比较大。这样,圆二色、粘度测试、量热测试对海藻酸钠与锌离子相互作用的解释在不同层次,不同尺度上得到了统一

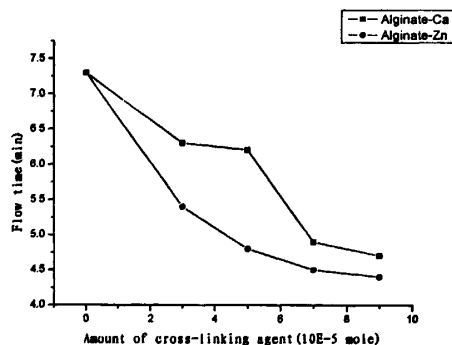


图 5-12 不同钙锌离子用量对 0.05%海藻酸钠溶液粘度的影响

Fig.5-12 viscosity changes of 0.05%/100ml alginate solution with different amounts of calcium and zinc salts.

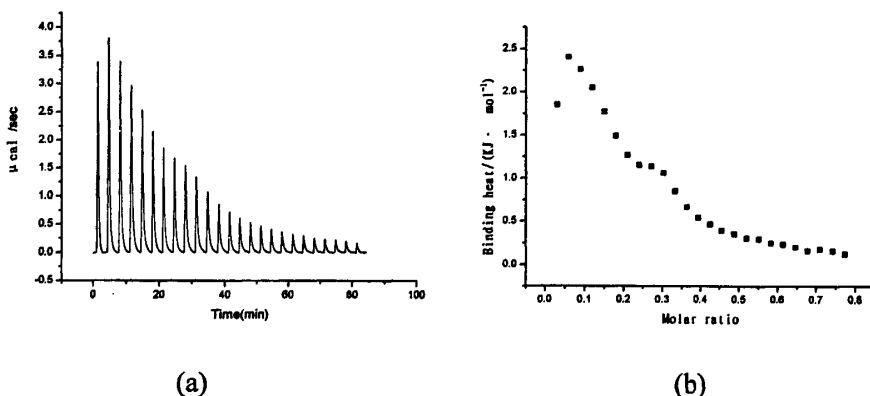


图 5-13 海藻酸钠 LVCR 与 ZnSO_4 在双蒸水中的滴定曲线

(a) 连续滴加 $5\mu\text{l}$ ZnSO_4 溶液 (10.54mM) 到海藻酸钠 LVCR 溶液 (1.25mM) 中的滴定曲线; (b) 相应于滴定曲线积分得到的反应热变化曲线

Fig.5-13 Calorimetric titration of alginate LVCR with ZnSO_4 in double distilled water at 25°C . (a) Raw data for sequential injection of $5\mu\text{l}$ ZnSO_4 solution(10.54mM) into alginate LVCR solution(1.25mM);(b)Heats of reaction as obtained from the integration of the calorimetric traces

锌离子与海藻酸钠相互作用时, 无论从粘度测试还是等温滴定量热上, 没有钙离子那样复杂, 只有一种结合位点。但从 CD 谱图上可知优先与 G 单元结合, 由于离子半径、电子云形状和密度的原因, 与钙离子与海藻酸钠的结合不同。

分子内交联和分子间交联在化学意义上是等价的, 但在物理意义上, 普遍认

为分子内交联对分子链构象有压缩作用，使溶液粘度降低，而分子间交联产生三维网状结构，是形成凝胶的主要因素。

如图 5-14 所示，不同浓度海藻酸钠溶液相对粘度随锌离子用量 f 的变化趋势与钙离子相似，说明二者有许多相似之处。

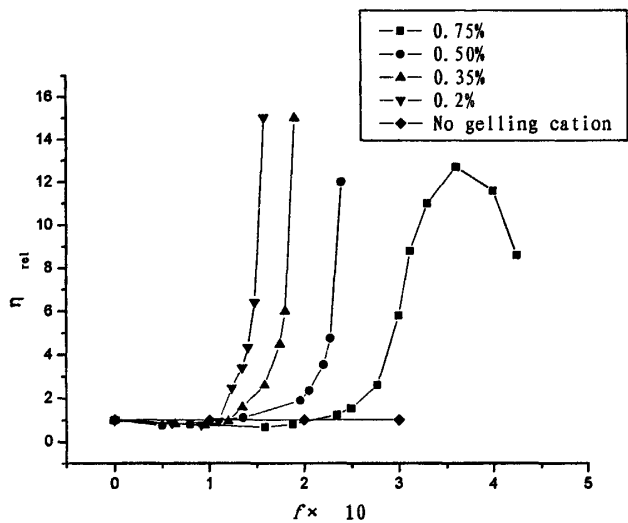


图 5-14 海藻酸钠溶液的相对粘度随锌离子摩尔分数的变化情况

Fig.5-14 Variations of relative viscosity (η_{rel}) vs fraction of zinc ions (f) at 30°C and under various alginate concentrations. Various symbols refer to ALG concentration (w/v) as: ▼0.75% ▲0.5% ●0.35% ■0.2%

图 5-15 给出了不同钠离子浓度对 0.2%ALG-Zn 体系 sol-gel 过程的影响。由图可见，体系钠离子浓度不同，相对粘度随交联分数增加的变化趋势不同。在钠离子浓度较低时，当 f 较低时 η_{rel} 相比不加钠离子的体系增加较为明显，表明加入一定量的钠离子使海藻酸分子间交联更容易。当钠离子浓度大于 0.05M 时，在 f 较低时 η_{rel} 随 f 的增加而增加的趋势明显下降，继续增加钠离子浓度，则 η_{rel} 随 f 的增加变化已较小，体系发生明显的沉淀，表明较高的盐浓度是不利于分子间交联形成凝胶的。图中曲线总的趋势为随着 f 的增加 η_{rel} 可达到 $\eta_{rel,max}$ ，且其是钠离子浓度的函数。再增加 f 值，则相对粘度显著下降，最终形成沉淀。以上结果与 Smidsrod^[137]及 Honghe Zheng（政洪河）^[81]的试验结果一致。

考虑到盐对钙锌导致的海藻酸钠溶液缔合促进作用，粘度测试表明非常柔顺的分子链有利于钙锌离子引起的分子间交联。它比分子内交联使溶液粘度升高的

更明显。推理认为在稀溶液状态下,当盐的浓度很低时,很难发生分子内交联,少量盐的作用使分子链充分伸展,反而使分子间交联优先进行。

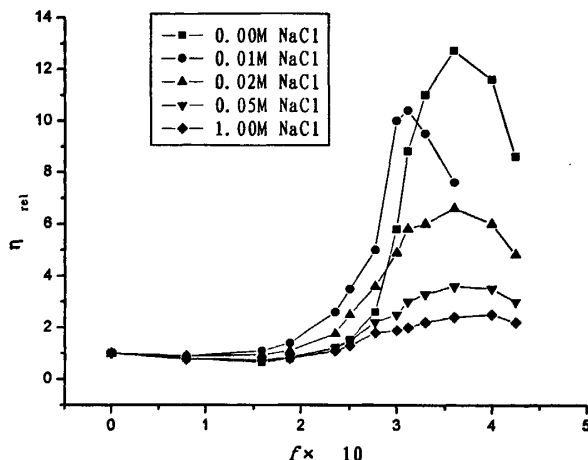


图 5-15 不同钠离子浓度对 0.2%ALG-Zn 体系 sol-gel 过程的影响

Fig.5-15 Variations of relative viscosity(η_{rel}) of alginate solutions versus molar fraction of zinc cation, f , in the presence of various amount of NaCl added. Various symbols refer to NaCl concentration ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$): ■0.00; ●0.01 ▲0.02; ▼0.05; ◆1.00

随着氯化钠浓度的增加,聚电解质高分子链的柔顺性也在增加,并最终象一个中性大分子处于 θ 溶剂中一样。在极稀溶液中,柔顺的链段毫无疑问最大可能进行分子内交联,而分子间交联热力学与动力学都非常困难,因此,随锌离子浓度的增加,溶液粘度反而降低。

锌离子与海藻酸钠相互作用时,存在着钠离子与锌离子的交换,当锌离子浓度较低时,海藻酸钠水溶液性质与氯化钠浓度的关系,与普通聚电解质溶液的性质很相似。当交联离子用量 f 达到一定值后,可以看到随氯化钠浓度的增加,溶液粘度先上升而后下降,中间出现一个极大值。这说明,海藻酸钠在水溶液中与锌离子相互作用时的构象,即不可认为是一个无外加电解质条件下的普通聚电解质高分子链,也不可认为是良溶剂下的中性大分子。

如图 5-16 所示,钙、锌、铜离子与海藻酸钠相互作用时,体系的焓变、熵变成线性关系,符合等动力学过程要求,说明三种离子与海藻酸钠的相互作用都是静电的离子相互作用。粘度测试说明,钙锌离子与海藻酸钠的相互作用,以及氯化钠对钙锌离子与海藻酸钠溶胶凝胶过程的影响都很相似,说明二价离子与海藻酸钠相互作用时有许多相同的本质,值得进一步深入研究。

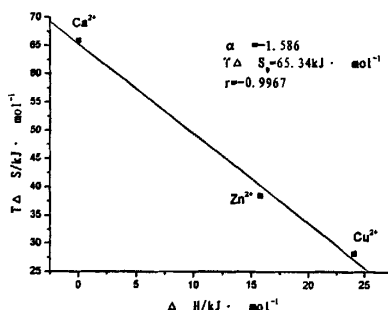


图 5-16 海藻酸钠与二价阳离子相互作用的等动力学关系图

Fig.5-16 Isokinetic relationship for sodium alginate reaction with divalent cationic ions

5.2.4 钙锌与海藻酸钠相互作用的红外谱图

如图 5-17 给出了海藻酸钠、海藻酸钙与海藻酸锌的红外谱图。海藻酸中的 M 段与 G 段的红外吸收位于指纹区，分别在 808cm^{-1} 与 787cm^{-1} 有特殊吸收。海藻酸钠中 787cm^{-1} 吸收峰相对 808cm^{-1} 吸收峰相对较强，表明海藻酸中 G 段含量较高，前者对后者的峰面积比值可估算 G/M 的值，计算得 G/M 约为 2:1。同样的在海藻酸钙中 787cm^{-1} 处的吸收峰相对 808cm^{-1} 吸收峰也相对较强，但峰面积比值约为 3:1，这表明钙离子与海藻酸的 G 段相结合，这与核磁测试结果一致。而在海藻酸锌中 808cm^{-1} 吸收峰明显增大，表明锌离子除与 G 段结合还可与海藻酸的 M 段相互作用。此外海藻酸钠中 3450cm^{-1} 处有一较为宽大的峰出现，其表示海藻酸中的 -OH，而在海藻酸钙与海藻酸锌中，其在 3550cm^{-1} 分裂出一小峰，且在海藻酸锌中 3550cm^{-1} 峰相对较强，表明金属离子与单体 -OH 中的 O 相互作用，同时锌离子与其作用较强。海藻酸钠中的 2950 、 1620 、 1438 与 1020cm^{-1} 分别表示 -CH、COO-、-CH 与 C-O-C^[138]。对应于海藻酸钙与海藻酸锌中，-CH、COO-峰位置没有明显改变，但在海藻酸锌中， 1610cm^{-1} 处明显分裂出一个小峰，表明二价离子与 COO-中的 O 相互作用，同时由于锌离子与 G 段 M 段都结合，使得海藻酸中 COO-的行为不同。C-O-C 对应于海藻酸钙与海藻酸锌中，峰位置分别移动至 1445cm^{-1} 与 1450cm^{-1} ，表明二价离子与环间 O 相互作用。

总结以上结果，金属离子与海藻酸 OH 中的 O 与环间的 O 及 COO-中两个 O 配位，这与文献结果一致，钙离子只与 G 段结合，锌离子除与 G 段结合还可与海藻酸的 M 段相互作用，由于钙、锌离子与海藻酸的结合机制不同，使得海藻酸钙与海藻酸锌的物理性质不同，同时由于单体中基团性质不同，可能使得海藻

酸钙与海藻酸锌在同一介质中的性质不同，如与钠离子或酸碱性的影响等。

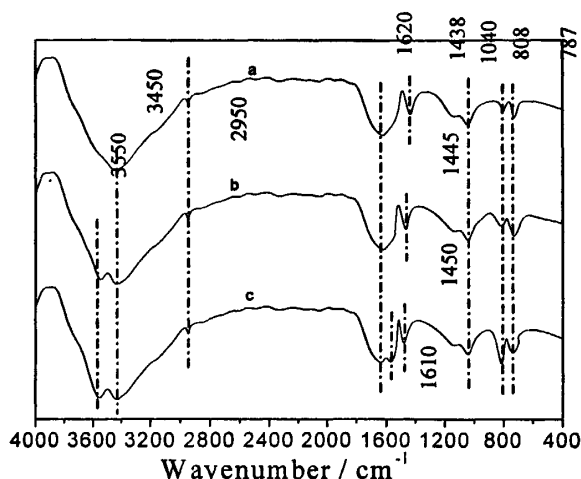


图 5-17 凝胶颗粒的红外谱图

Fig.5-17 IR spectra of the beads. a, ALG-Na ; b, ALG-Ca; c, ALG-Zn

5.2.5 ITC 对海藻酸钠膨胀收缩现象的解释

凝胶后的海藻酸凝胶真空 100℃干燥 24 小时后，测量并计算表面积 A ，与凝胶前的表面积 A_0 的比值 δ 定为凝胶前后的面积比，即 $\delta = A/A_0$ 。

由图可知，无论二价离子浓度大小，在相同离子浓度下海藻酸锌凝胶膜片的面积总比海藻酸钙凝胶膜片的面积大。钙离子的半径是 0.99Å，锌的离子半径为 0.74Å。钙离子的第一结合位点是钙离子镶嵌入 G 单元形成的蛋盒空腔中，对分子间交联、对粘度影响不大，那么对海藻酸钠膜片的膨胀收缩性能影响也不大。第二结合位点与海藻酸钠分子链的聚集有关，是凝胶形成的关键，与膜片的膨胀收缩密切相关。锌离子由于离子半径比较小，镶嵌于 G 单元形成的蛋盒结构中，与分子链间起交联作用的锌离子，作用差别不是很大，再加上锌离子与 G、M 单元相互作用差别不是很大，因此可以认为不管以何种方式结合，锌离子对海藻酸钠膨胀收缩性能的影响是相同的。钙离子与海藻酸钠相互作用时第二结合位点的熵变为 $79.08 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ，锌离子与海藻酸钠相互作用时熵变为 $128.95 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ，海藻酸锌凝胶膜片的面积总比海藻酸钙的大，可能是反应过程中熵变比海藻酸钙的大造成的。这可能与钙锌离子的离子半径大小、电子云形状以及密度紧密相关。

表 5-2 将 $A_0=1\times4\text{cm}^2$ 的 Na-ALG 干燥膜片放入不同浓度的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 水溶液中，凝胶前后的面积比。

Table5-2 Dry membrane of sodium alginate, imerged into different concentration solution of cupric, zinc, calcium ions. The area ratio δ after and before being gelled

离子种类	离子浓度			
	面积比			
	0.02M	0.05M	0.10M	0.20M
Cu^{2+}	0.51	0.49	0.54	0.60
Zn^{2+}	1.79	1.42	1.04	0.70
Ca^{2+}	0.90	0.83	0.74	0.58

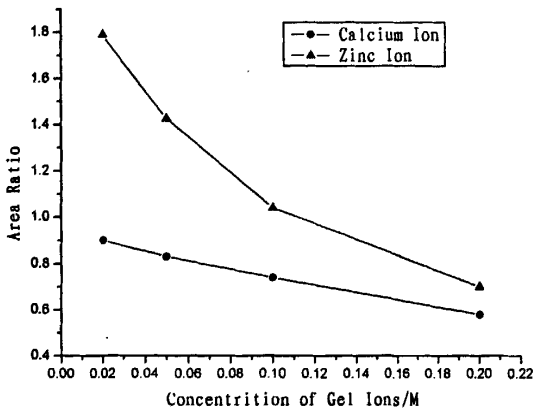


图 5-18 凝胶离子浓度对面积比 δ 的影响

Fig.5-18 Influence of gelling cationic ions concentration on area ratio δ

表 5-3 钙锌离子与海藻酸钠相互作用的热力学参数

Table5-3 Thermodynamic parameters for complexation of calcium and zinc ions with alginate LVCR

	$K/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$	$\Delta H(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
Zn-Alginate	$K=9472$	$\Delta S=129.0$	$\Delta H=15.80$
Ca-Alginate	$K_1=1.210\text{E}7$	$\Delta S_1=141.8$	$\Delta H_1=1.890$
	$K_2=2.900\text{E}4$	$\Delta S_2=79.08$	$\Delta H_2=-1.840$

5.2.6 CD 对海藻酸钠膨胀收缩现象的解释

如图 5-19 所示,在相同条件下,海藻酸锌比海藻酸钙的构象变化幅度比较大,在 0.3 左右海藻酸钙构象变化不再随离子用量的增加而增加,而海藻酸锌的构象变化继续随锌离子用量的增加而增加。结合前面的解释,对海藻酸钙凝胶膜片来说,粒子用量在 0.3 以后才开始对面积有影响,而海藻酸锌凝胶膜片的在任何锌离子用量下都有影响,因此,不难理解海藻酸锌凝胶膜片的面积相对比海藻酸钙凝胶膜片的大。由 CD 谱图上可知,海藻酸锌的 CD 信号比海藻酸钙的大,与凝胶后的表面积变化趋势相同,因此可认为海藻酸锌的表面积比较大,是由于海藻酸锌的构象变化比海藻酸钙的大所导致。

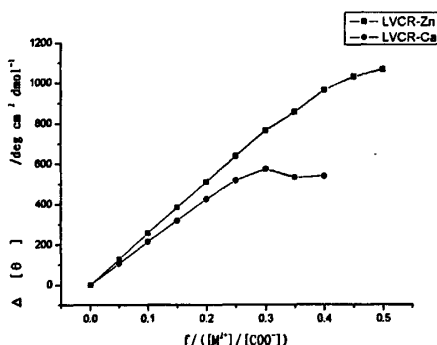


图 5-19 海藻酸钠 LVCR 摩尔椭圆值(200nm)增量随钙锌离子用量的变化

Fig.5-19 Variation in c.d. spectral intensity at 200nm of sodium alginate with calcium and zinc ion concentration(expressed as ratio f)

5.3 小结

(1) 在海藻酸钠与钙离子结合过程中,量热反应的第一类结合位点,对应于离子量对圆二色谱影响的第一阶段线性部分,钙离子优先与 G 单元形成的蛋盒空腔作用,由于钙镶嵌于已存在的螺旋蛋盒空腔中,相似于分子内交联,对粘度贡献不大,同时释放出钠离子,起到少量电解质的作用,使粘度有稍微下降的趋势。在半蛋盒结构以及二聚体聚集体形成过程中,钙离子与糖单元相互作用时作用力不大,主要是脱溶剂化程度很低,二聚体结构不需要重排就可进一步聚集,分子链的构象改变不显著。这样导致焓变为放热反应,同时构象变化也比较低。在圆二色 CD 谱图上,对应于第二阶段的斜率比值比第一阶段小。在这一过程中,以分子间交联为主,体系粘度急剧上升。

(2) 量热实验证明,锌与海藻酸钠相互作用是吸热反应,比钙与海藻酸钠

相互作用时焓变大许多。由于锌离子与 M、G 单元都可相互作用，所以海藻酸锌的交联点比海藻酸钙的交联点多。结合 CD 测试结果，锌与 G 优先结合，与 M、G 单元相互作用差别不大。

(3) 由 CD 谱图上可知，海藻酸锌的 CD 信号比海藻酸钙的大，与凝胶后的表面积变化趋势相同，因此可认为海藻酸锌的表面积比较大，是由于海藻酸锌的构象变化比海藻酸钙的大所导致。

第六章 海藻酸钠的纯化和降解及其结构测定

由于不同 M、G 含量的海藻酸钠性能不同,不同分子量的海藻酸钠应用领域不一样,海藻酸钠在高科技领域有广阔的发展空间,纯 M 段、纯 G 段、标准品海藻酸钠、寡聚海藻酸钠糖、特种组成的海藻酸钠样品都属于海藻酸钠特种品,应该对这些样品的制备进行研究;包括海藻酸不同级分的制备、提纯分离和结构组成鉴定,以及海藻酸钠的降解技术。

本章研究了海藻酸胶的分级和结构鉴定,以及 G-lyase 酶(从微生物菌株中提取)对 poly-G-blocks 的降解;并测定了海藻酸钠 LVCR 的结构。

6.1 材料与方法

6.1.1 试剂和仪器

马尾藻海藻酸钠胶,海带海藻酸钠,山东青岛明月海藻有限公司;LVCR50(中 G 中 M),LF98(高 G),LN100(中 G),HD52(高 M),美国特品公司(ISP);盐酸(AR),氢氧化钠(AR),无水乙醇(AR),天津科威化学试剂公司;Dextran 标准品(重均分子量为 2500,4600,7100,10000,24400,41100),中国药品与生物制品检验所。

玻璃层析柱: 1700×16IDmm,600×10IDmm,200×16IDmm. 高校层析柱: 100×4.6mm,(10μm),美国 PE 公司; S5SAX250×2(5μm),美国 Waters 公司; 填料: Bio-Gel P-4(Extra Fine,45μm)美国 Bio-Rad 公司; Sephadex G-10, 瑞典 Pharmacia Biotech 公司。

旋转蒸发器: SENCO R502B 型,上海申生科技有限公司; SF-2120 分部收集器,美国 PE 公司; FPLC 全自动液相色谱仪,瑞典 Pharmacia Biotech 公司。UV-2102 紫外可见分光光度计,日本尤尼柯(上海)公司; 核磁共振波谱仪 AV400MHz, Bruker 公司。圆二色谱仪 Jasco-810, 大连华洋科学仪器有限公司; 高效液相色谱仪: (包括 515 型液相色谱仪,2410 示差折光检测器,GPC 软件), 美国 Waters 公司; ESI-MS, Finnegan Company。

510 菌株,从海藻中筛选出的野生菌株; 菌株 Vibrio510 所产的海藻酸裂解酶粗酶,中国海洋大学张真庆博士提供; Vibrio510 海藻胶古罗糖醛酸裂解酶专一精制酶(记为 G-lyase,从海藻细菌 Vibrio sp.510 分泌溶液提取粗酶中多次提取分离纯化而得), 中国海洋大学张真庆博士提供; 高纯度(G)_n 样品 (poly-G-BLOCKS, M/G=0.099), 中国海洋大学张真庆博士提供或用 LF 藻自制

6.1.2 实验方法

6.1.2.1 海藻酸钠的分级

将海藻酸钠用 1mol/L 草酸于 100℃ 进行水解,大约 30%溶解,离心分离出的不溶部分为聚合度 20~30 的寡糖。将其溶解,于 PH=2.85 使产生沉淀,分离,可溶部分中含 80~90%甘露糖醛酸单位,不溶部分含 80~90%古罗糖醛酸单位。

用部分酸水解法对我国产马尾藻类和海带所含海藻胶进行了水解和分级,分别得到 $(MG)_n$ 、 $(G)_n$ 、 $(M)_n$ 的寡糖,通过多次纯水溶解稀释乙醇浓缩,除去杂质并冷冻干燥。称重可得相对含量和比例。所用分级步骤如图 6-1 所示。

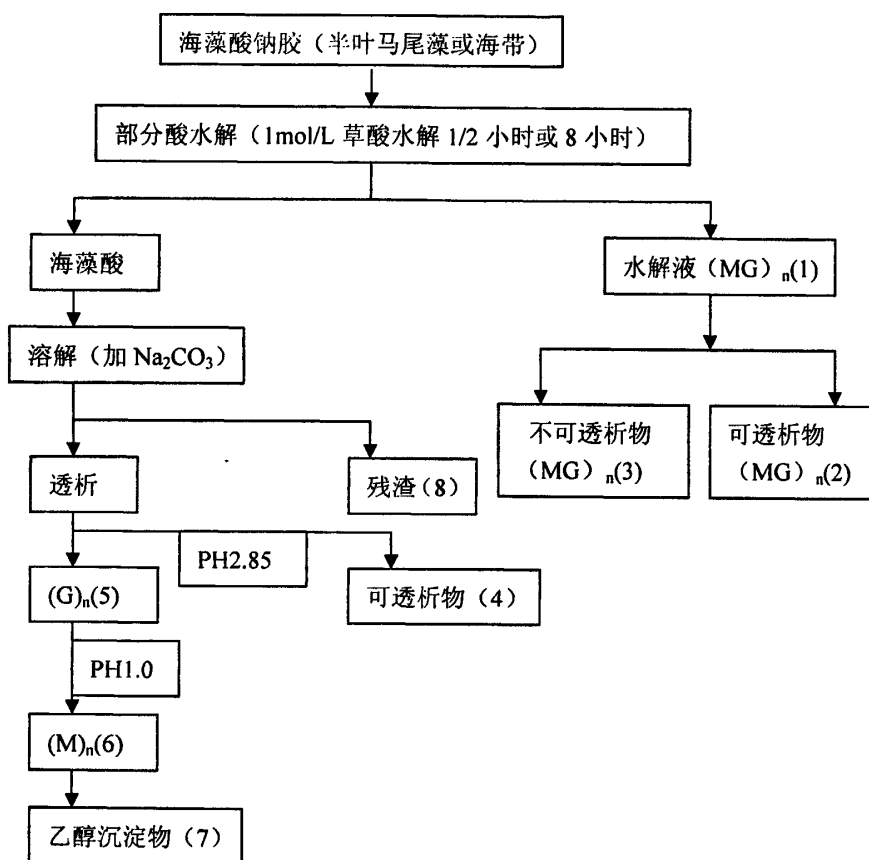


图 6-1 海藻酸钠胶的分级步骤

Fig.6-1 Preparation procedure of the sodium alginate fraction

由于立体结构的影响, M 段比 G 段容易降解, 因此 M 段比 G 段聚合度低。用碱降解或甘露糖裂合酶处理古罗糖醛酸含量高的海藻酸钠胶样品, 可得纯度特别好聚合度比较高的古罗糖醛酸海藻酸钠胶标准品。通常不管 M 段含量高的海藻酸钠胶样品, 还是 M 段含量高的经过分级方法得到的 $(M)_n$ 级分, 分子量比较低而且含有 G 单元连接, 为了得到分子量比较高并且比较纯的甘露糖醛酸低

聚糖，需要对聚合度高且 M 段含量高的样品中 G 单元连接的糖苷键进行专一性降解研究。用提取到的古罗糖醛酸裂合酶对高 G 含量的海藻酸钠样品进行了酶解研究，并对水解产物进行了分离提纯和结构鉴定。

6.1.2.2 凝胶渗透色谱法 (HPGPC) [5][6]

色谱柱：日本 TOSOH 公司 TSKgel G3000PW_{XL} (300mm×7.8mm)，分子量排阻范围为 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ ；流动相：2.84%NaSO₄ 水溶液；流速：0.5mL/min；柱温：40℃；进样量 20μL。标准曲线的制作：以标准葡聚糖为分子量标准品，加流动相溶解制成 $5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液，以 0.45μm 纤维素滤膜滤过，分别进样 20μL，GPC 软件根据 6 个不同分子量标样的出峰时间不同，绘制标准曲线。样品的测定：加流动相溶解制成 $5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液，以 0.45μm 纤维素滤膜滤过，进样 20μL ($5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)，用 GPC 软件根据出峰时间对应标准曲线计算样品的峰位分子量 (Mp)，及每个峰的相对百分含量。

6.1.2.3 海藻酸钠醛糖酸的结构鉴定

电离子喷雾质谱 (ESI-MS)：离子源用电喷雾电离 (ESI)；毛细管温度：250℃；水：甲醇=1:1；进样方式：syringe pump 5μL/min；数据采集方式：Full scan, M/Z=100-1100，正负离子同时采集，(二级质谱)子离子扫描、母离子扫描。核磁共振 (400MHz)：重水交换溶解后加入核磁管，在 25℃ 下积分 2-12 小时。

6.1.2.4 古罗糖醛酸裂解酶对 poly-G-blocks 的降解

1.2.4.1 古罗糖醛酸裂解酶的制备

对 510 菌种产生的粗酶制剂，经过 Phenyl Sepharose CL-4B 疏水色谱、Q-sepharose Fast Flow 阴离子交换色谱、BioCAD 700E 灌注色谱分离纯化，收集对 poly-G-blocks 有专一裂解作用部分，制得古罗糖醛酸裂解酶(记为 G-lyase)。本实验主要由中国海洋大学张真庆博士完成。

1.2.4.2 G-lyase 的最适作用条件、稳定性及金属离子对酶活性的影响。

(1) 酶活力的测定

原理：海藻胶裂合酶作用于海藻胶，产生一系列寡糖，并在寡糖的非还原末端产生 C₄, 5 不饱和双键，在 230~240nm 有强吸收，未反应的海藻胶和最终的单糖产物都没有吸收。

测定方法：用 0.005 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液，pH7.5 配制 0.2% 的海藻酸钠底物溶液，含有 2% 的 NaCl，取 2.8ml 底物溶液，加 0.2ml 酶液，在室温下用紫外分光光度计每隔 6s 记录 230nm OD 值，测定 3min 内 OD 值的变化，以底物溶液调零。

酶活力：上述条件下，每 min 使吸光度增加 0.1 所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{酶活力 } U/ml = \Delta OD / T / 0.2 / 0.1 \times n$$

式中符号说明:

ΔOD : 230nm 吸光值的变化;

T : 反应时间 (min);

0.2 : 加入的酶液量 (ml);

0.1 : 每 min 使吸光度增加 0.1 相当于 1 个酶活力单位;

n : 酶液的稀释倍数。

(2) pH 对酶活力的影响

将 G-lyase 用缓冲液溶解至适当的浓度供测定用。用不同的缓冲液体系 (不同 pH 范围) 代替酶活力测定方法 (1) 中的 Tris-HCl(0.05mol/L, pH7.5), 其余部分相同, 测定酶活力。所用的缓冲液体系为: 磷酸缓冲液 (pH2~6), Tris-HCl(pH7~8), 甘氨酸缓冲液 (pH9~11), NaOH-KCl 缓冲液 (pH12)。

(3) 温度对酶活力的影响

改变不同的测定温度 (24~60℃), 其余同酶活力测定方法 (1)。

(4) pH 稳定性:

将浓度较高的酶液用不同 pH 的缓冲液稀释 10 倍, 在 4℃ 放置 24h 后, 取样按酶活力测定方法 (1) 测定残余的酶活力。所用缓冲液体系同上。

(5) 温度稳定性:

用 Tris-HCl(0.05mol/L, pH7.5) 配置酶液, 在不同的温度下保温 20min, 按酶活力测定方法 (1) 测定残余的酶活力。

(6) 金属离子的影响;

将 1ml 酶液 (Tris-HCl 缓冲液 0.05mol/L, pH7.5) 与 1ml 0.02mol/L 浓度的金属离子盐 (氯化物) 溶液混匀, 于室温下按酶活力测定方法 (1) 测定酶活力。

由于 NaCl 对酶活力的影响比较大, 分别测定 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.8%, 1%, 2%, 3% 浓度的 NaCl 对酶活力的影响。

1.2.4.3 圆二色谱 (circular dichroism CD 谱) 测定酶的二级结构

将 G-lyase 用 J-圆二色谱仪测定二级结构, 波长范围 185~300nm, 速度 100nm/min, 以 H₂O 为空白。按照 YANG 公式计算各二级结构的含量。

6.1.2.5 G-lyase 裂解 poly-G-blocks 制备寡糖及机理。

1.2.5.1 酶解反应

5g poly-G-blocks 溶于 1L 0.05M Tris-HCl 缓冲液 (PH=7.5), 加入 50 单位的 G-lyase, 28℃ 下反应 4 小时, 沸水浴 100℃ 加热 10 分钟停止酶解反应。加入乙醇到 50% (v/v) 含量, 离心去除沉淀, 收集上清液, 0.45μm 的纤维素膜过滤, 旋转蒸发掉乙醇和大量的水, 冷冻干燥后保存在 -20℃。

1.2.5.2 海藻酸寡糖的分离纯化

(1) 凝胶色谱法

填料: Bio-Gel-P-4 Extra Fine; 柱规格: 1700×16IDmm; 固定相: 聚丙烯酰胺凝胶; 流动相: 0.2% NH_4HCO_3 ; 流速: 1.5ml/min; 柱温: 常温; 检测: 235nm 紫外在线检测。

填料: Sephadex G-10; 柱规格: 600×10IDmm; 固定相: 葡聚糖凝胶; 流动相: 双蒸水; 流速: 1.5ml/min; 柱温: 常温; 检测: 235nm 紫外检测。

用低压凝胶渗透色谱法, 按分子量大小对古洛糖醛酸寡糖进行分离分析。将寡糖混合物 (100—150mg/2mL) 上 BioGel P4 经济柱 (16×1700mm, Extra-fine, 45 μm , BioRad, USA), 用 0.2mol/L NH_4HCO_3 溶液梯度洗脱, 洗脱液流速 1.5mL/min, 分步收集洗脱液, 235nm 紫外分光光度计在线检测。

(2) 强阴离子交换色谱法

填料: Q-Sepharose Fast Flow; S5SAX(5 μm); 柱规格: 100×4.6mm, 2×250IDmm(预装柱); 固定相: 阴离子交换树脂; 流动相: 0-0.4mol/L NaCl 梯度洗脱; 流速: 2ml/min; 柱温: 常温; 检测: 235nm 紫外在线检测。

从 BioGel P4 柱上分离得到的均一组分, 上 SAX-FPLC(Spherisorb S5SAX(20×250mm)柱)强阴离子色谱柱进行二次纯化, 用 0~0.4mol/L NaCl 溶液梯度洗脱, 洗脱液流速 2mL/min. 分步收集洗脱液, 235nm 紫外分光光度计在线检测。

(3) 脱盐

每一组分浓缩, 上 SephadexG-10 柱 (10×1000mm) 脱盐, 双蒸水洗脱。

1.2.5.3 结构鉴定

用 ESIMS、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、H-HCOSY、HMQC 和 HMBC 测寡糖结构。

6.1.2.6 海藻酸钠 LVCR 的结构检测。

将海藻酸钠 LVCR 在一定条件下水解后, 多次用纯水稀释乙醇沉淀后, 冷冻干燥, 称重。用 ^{13}C -NMR 测定结构和序列组成。

6.2 结果与讨论

6.2.1 海藻酸钠的分级

6.2.1.1 高 G 段高 M 段样品的制备

由表 6-1 和表 6-2 结果看, 半叶马尾藻和海带海藻酸胶经草酸部分水解 1/2 和 8 个小时, 酸水解液中糖醛酸 (MG)_n 大致分别为 24% 和 37%, 虽相当于 (MG)_n, 但甘露糖醛酸含量仍较高 (M/G=1.7-1.8), 有一部分低聚物被透析损失, 其量

分别为 7%和 32%。未水解的半叶马尾藻海藻酸经溶解后，调 PH 至 2.85，生成的沉淀即为古罗糖醛酸嵌段(G)_n，产率为 45%（1/2 小时）和 34%（8 小时），它们的 M/G 比值分别降至 0.47 和 0.14（G 含量达 87%）。经调 PH 至 1.0 时，又出现的沉淀即为(M)_n。水解 8 小时者，(M)_n的 M/G 比值高达 13.2(M 含量达 93%)，这样，所得 (G)_n和(M)_n是纯度比较高的嵌段。海带海藻胶的 (G)_n产率比马尾藻者低，只有 10%左右；(M)_n产率较高，但纯度不如马尾藻者高，8 小时水解

表 6-1 半叶马尾藻海藻酸胶酸水解分级产物的产率和 M/G 比值

Table 6-1 Yields and M/G ratios of alginate from *Sargassum hemiphyllum*

级分编号	酸水解 1/2 小时		酸水解 8 小时	
	产率 (%)	M/G 比值	产率 (%)	M/G 比值
1.水解液，(MG) _n	24.4		36.4	1.80
2.可透析物，(MG) _n	6.90		31.9	
3.不可透析物，(MG) _n	15.0	1.59	2.30	1.38
4.可透析物	4.90		6.40	
5.(G) _n	45.4	0.47	34.4	0.14
6.(M) _n	15.9	2.46	11.3	13.2
7.乙醇沉淀物	3.00		2.10	

表 6-2 海带 (*Laminaria sp.*) 海藻酸胶酸水解分级产物的产率和 M/G 比值

Table 6-2 Yields and M/G ratios of hydrolysates of alginate from *Laminaria sp.*

级分编号	酸水解 1/2 小时		酸水解 8 小时	
	产率 (%)	M/G 比值	产率 (%)	M/G 比值
1.水解液，(MG) _n	24.1		37.4	1.70
2.可透析物，(MG) _n			31.3	
3.不可透析物，(MG) _n	11.3	2.08	2.60	2.38
4.可透析物	1.40		3.30	
5.(G) _n	13.4	0.68	10.7	0.27
6.(M) _n	39.2	4.64	26.8	5.63
7.乙醇沉淀物	4.70		4.70	
8.残渣	1.40		3.40	

的 (M)_n其 M 含量 85%，如需要 (G)_n和 (M)_n含量高产品，可分别用半叶马尾藻和海带作原料分级制备。半叶马尾藻 (G)_n含量高，因为它是多年生植物；海带 (M)_n含量高，因是一年生植物。

由上可知,制备 $(MG)_n$ 纯度高的样品有一定难度,应通过其它方式或途径解决。将制得的高 G 含量海藻酸钠胶经过碱水解或甘露糖醛酸裂合酶处理,经过分离提纯可得 G 段含量高纯度高的样品。

通常不管 M 段含量高的海藻酸钠胶样品,还是 M 段含量高的经过分级方法得到的 $(M)_n$ 级分,分子量比较低而且含有 G 单元连接,为了得到分子量比较高并且比较纯的甘露糖醛酸低聚糖,需要对聚合度高且 M 段含量高的样品中 G 单元连接的糖苷键进行专一性降解研究。应此用提取的古罗糖醛酸裂合酶对高 G 含量海藻酸钠样品进行了酶解研究,并对水解产物进行了分离提纯和结构鉴定。

6.2.1.2 高 G 段高 M 段样品的分析表征

从 GPC 谱图上可知, M 段级分有两个峰,含量分别为 68.04%、31.96%,分子量分别为 4939、1112。平均分子量为 3715.90,平均聚合度为 18.86。G 段级分由一个主含量的大峰和一个含量很小的小峰组成,分子量为 4644,平均聚合度为 23.6。从一个侧面证明 M 段比 G 段容易降解,纯度高的 G 段比纯度高的 M 段容易获得。从 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 可方便地对各个化学位移峰进行识别,说明样品可近似作为纯 M 段、纯 G 段标准品使用。

表 6-3 M 段 G 段海藻酸钠的 $^1\text{H-NMR}$ 化学位移(ppm, 相对于丙酮)

Table6-3 $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of poly-mannuronate and -guluronate blocks(ppm; Acetone was used as the external standard. $\delta\text{H}=2.10\text{ppm}$).

糖种类	质子				
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5
M-blocks	4.6221	3.6638	3.8689	3.9654	4.0191
G-blocks	5.0277	3.9099	4.0808	3.9905	4.4495

表 6-4 M 段 G 段海藻酸钠的碳原子化学位移 (ppm, 相对于丙酮)

Table6-4 $^{13}\text{C-NMR}$ chemical shifts of poly-mannuronate and -guluronate blocks(ppm; Acetone was used as the external standard. $\delta\text{C}=31.45\text{ppm}$ δ).

糖种类	碳原子				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
M-blocks	100.04	69.980	70.830	77.860	75.660
G-blocks	100.84	64.960	69.030	80.050	67.100

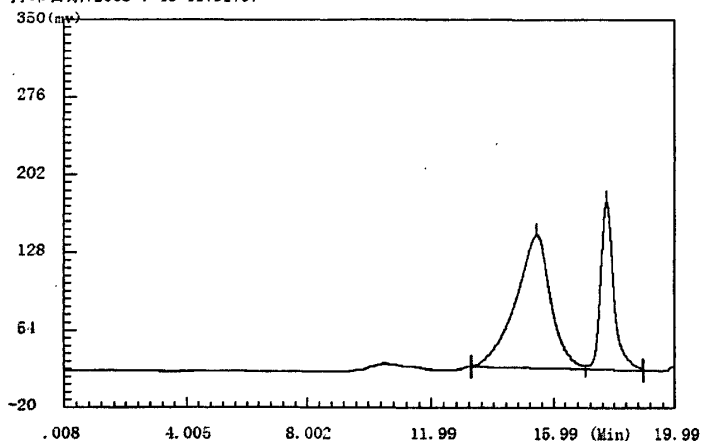
M 段 G 段的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图为不知组成的海藻酸钠样品的结构测定提供了参考依据。也为水解产物的结构鉴定提供了参考对照。知道了水解产物结构可以推测水解机理。

GPC分析报告

文件名 : C:\Program Files\Gpcw32\wy717-18. dA1
 样品名 : M FRACTION

测试日期: 2004-07-17 □ / 19

流动相: 2.84%Na2SO4 温度: 35
 流速: 0.5ml/min 注射器: 25μl
 检测器: ri 检测器参数: RI=1
 校正曲线: 基线修正值: 0
 Mark-Hov K: 1 Mark-Hov a: 1
 实验条件说明: G3000PWL
 接收时间(分): 从 0.1 到 20.2
 基线区间(分): 从 13.268 到 18.977
 计算区间(分): 从 13.31 到 18.935
 打印日期: 2003-7-18 11:31:07



重均分子量(Mw) = 4377 粘均分子量(Mv) = 4377
 数均分子量(Mn) = 2277 Z均分子量(Mz) = 6525
 M10分子量(M10) = 8417 M90分子量(M90) = 1020
 分布系数(MWD) = 1.92 特性粘度(Vis) = 4376.77

峰检索 — 2 个峰, 阈值 2 %

序号	峰位(Min)	峰高(mv)	峰面积	含量%	峰位分子量
1	15.427	128.635	177.55	68.04	4939
2	17.735	161.813	83.4	31.96	1112

图 6-2 高 M 段样品的 GPC 色谱图

Fig.6-2 GPC of sample with a high mannuronic units content

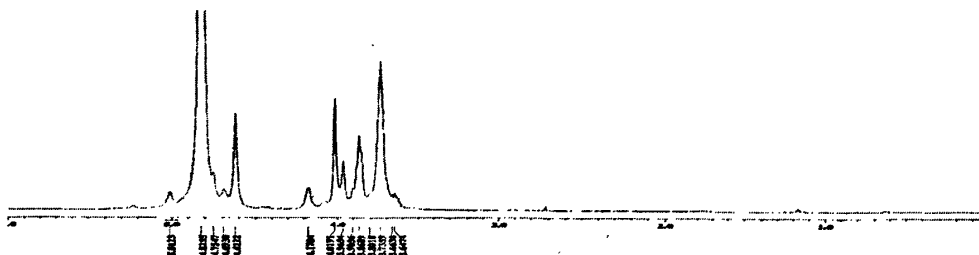
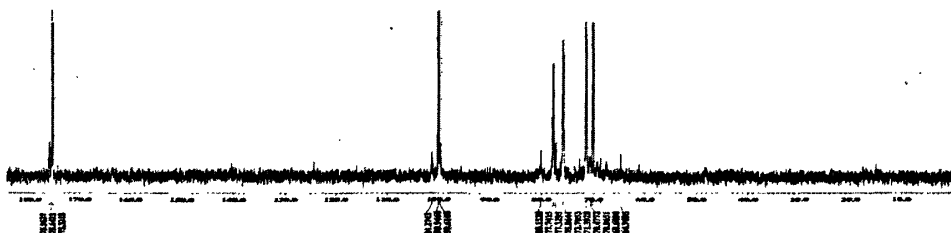


图 6-3 高 M 段样品的 ^1H -NMR 谱图

Fig.6-3 ^1H -NMR of poly-mannuronic acid

图 6-4 高 M 段样品的 ^{13}C -NMR 谱图Fig.6-4 ^{13}C -NMR of poly-mannuronic acid

GPC分析报告

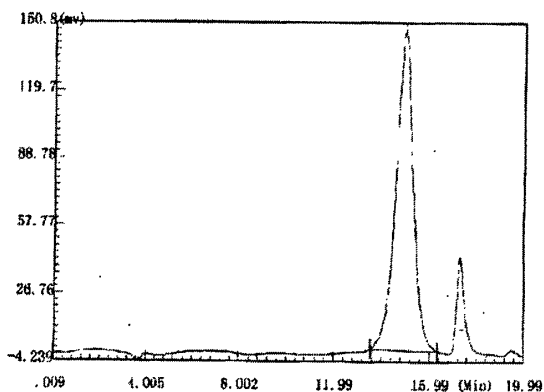
文件名: C:\Program Files\Gpcw32\hinz-11.Dx
样品名: G FRACTION

测试日期: 2004-08-08 / 13

流动相: 0.7%Na2SO4 温度: 35
流速: 0.5ml/min 注射量: 20
检测器: RI 检测器参数: RI=1
校正曲线: C:\Program Files\Gpcw32\ZXB.cur

Mark flow K: 1 基线修正值: 0
实验条件说明: G3000PWXL Mark flow a: 1

接收时间(分): 从 0 到 20
基线区间(分): 从 13.514 到 16.381
计算区间(分): 从 13.561 到 16.334



重均分子量(Mw) = 4854 黏均分子量(Mv) = 4864
数均分子量(Mn) = 4419 Z均分子量(Mz) = 5328
M10分子量(M10) = 6802 M90分子量(M90) = 3204
分布系数(D) = 1.1 特性粘度(η) = 4854.39

峰检索	峰位(Min)	峰高(mv)	峰面积	含量%	峰位分子量
1	14.911	145.513	123.01	100	4644

图 6-5 高 G 段样品的 GPC 色谱图

Fig.6-5 GPC of sample with high guluronic units content

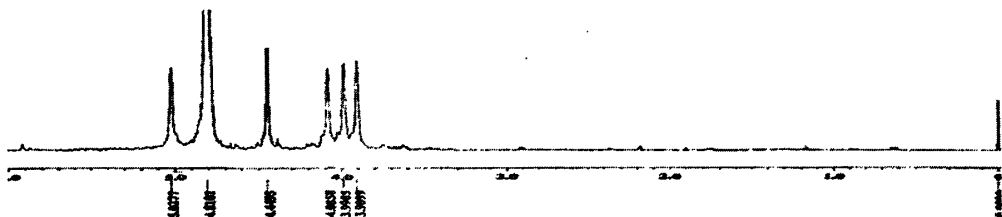


图 6-6 高 G 段样品的 ¹H-NMR 谱图

Fig.6-6 ¹H-NMR of poly-guluronic acid

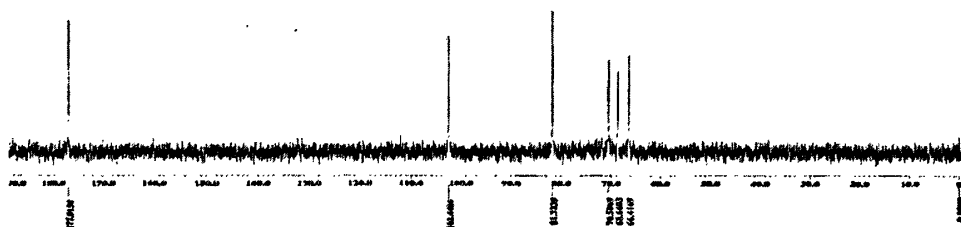


图 6-7 高 M 段样品的 ¹³C-NMR 谱图

Fig.6-7 ¹³C-NMR of poly-guluronic acid

由以上讨论可知，为了制备分子量高纯度好的 M 段样品，研究古罗糖醛酸裂解酶对 poly-G-blocks 的降解显得很有意义。

6.2.2 古罗糖醛酸裂解酶（G-lyase）对 poly-G-blocks 的降解

6.2.2.1 酶的最适反应条件.

2.2.1.1 酶的最适作用 pH

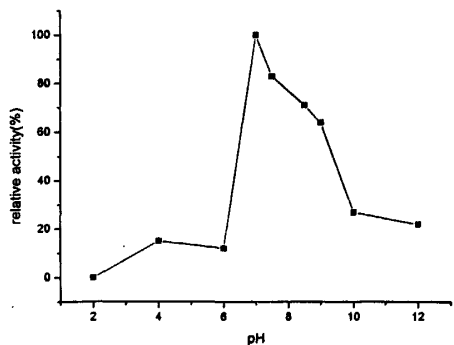


图 6-8 酶的最适 pH 曲线

Fig.6-8 Plot of enzymic activity with pH

以 poly-G-blocks 为底物，在室温及不同的缓冲液体系中测定了 G-lyase 的活力，结果如图 6-8 所示。

结果表明：酶的最佳作用 pH 在 7 附近。而该酶在较宽的 pH 范围 (pH7~9) 均具有较高的活力。即使在 pH12 的极端 pH 条件下，仍具有较高的酶活力 (25%)。

2.2.1.2 酶的最适作用温度

以 poly-G-blocks 为底物，在最适 pH 下，温度对 G-lyase 活力的影响示于图 6-9 中。结果显示：酶的最适温度在 28℃ 左右，在 24~40℃ 之间，酶活力均维持在较高水平，高于 45℃ 酶活力迅速下降。

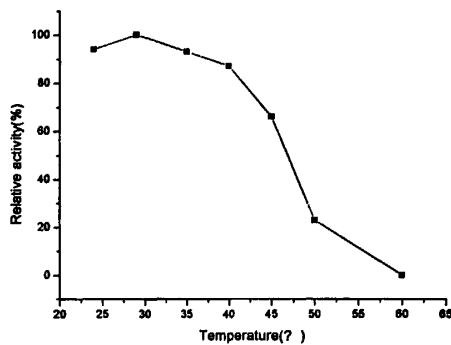


图 6-9 酶的最适温度曲线

Fig.6-9 Plot of enzymic activity with temperature

2.2.1.3 酶的 pH 稳定性

图 6-10 是不同 pH 缓冲液体系下酶液 4℃ 下放置 24h 后的残余酶活力，如图

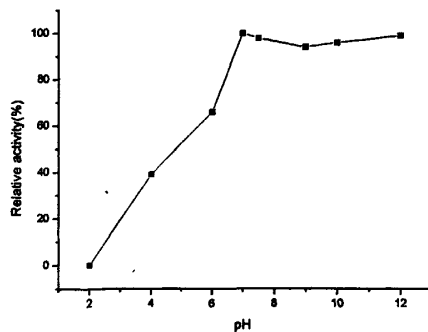


图 6-10 酶的 pH 稳定曲线

Fig.6-10 Plot of enzymic stability with pH

结果表明：该酶在碱性环境 (pH7.0~12 范围) 稳定性很好，残余酶活力在

95%以上，在 pH 2.0 的酸性环境保存 24h 酶活力伤失，但在 pH4.0 的酸性环境中保持 24h 酶活力仍能保留在 40%以上，说明该酶有一个较宽的 pH 稳定性范围

2.2.1.4 酶的温度稳定性

将酶液(0.05mol/L,pH7.5Tris-HCl 缓冲液)在不同温度下保温 30min,其残余酶活见图 6-11. 结果表明: 在 40℃以下保温 30min 酶活力几乎无损失, 但高于 45℃时，酶活力迅速下降，当温度升至 50℃时，酶活力损失 95%以上。

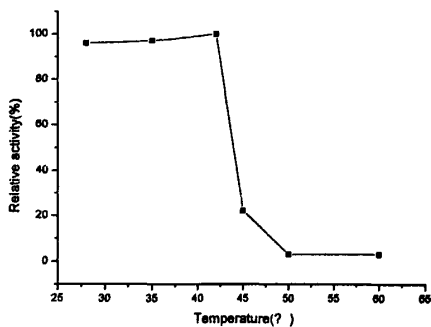


图 6-11 酶的温度稳定曲线

Fig.6-11 Plot of enzymic stability with temperature

2.2.1.5 不同金属离子对酶活力的影响

酶液与各种无机离子（或金属螯合物）在 28℃保温 30min，残余酶活力见表 6-5~6-6。

表 6-5 金属离子对酶活力的影响

Table6-5 Influence of metal ions on enzymic activity

金属离子 (氯化物)	相对酶活力% (底物含 2%NaCl)
对照	100.00
K ⁺	110.70
Li ⁺	104.20
Ba ²⁺	98.460
Ca ²⁺	130.08
Co ²⁺	101.11
Cu ²⁺	62.200
Cu ⁺	70.400
Hg ²⁺	/

Mg ²⁺	92.670
Mn ²⁺	108.35
Ni ²⁺	111.03
Pb ²⁺	43.080
Sn ²⁺	14.180
Al ³⁺	93.040
Fe ³⁺	133.10
Fe ²⁺	246.58
EDTA	/

表 6-6 金属离子对酶活力的影响

Table6-6 Influence of metal ions on enzymic activity

金属离子 (氯化物)	相对酶活力% (底物不含 NaCl)
对照 (不含 NaCl)	100.00
K ⁺	81.680
Li ⁺	81.770
Ba ²⁺	74.110
Ca ²⁺	169.26
Co ²⁺	72.030
Cu ²⁺	97.360
Cu ⁺	59.930
Hg ²⁺	/
Mg	106.90
Mn	134.43
Ni	92.780
Pb	53.590
Sn	37.700
Al	41.330
Fe	559.41
Fe	239.10
EDTA	/

结果表明 Fe²⁺, Fe³⁺, Ca²⁺, Mn²⁺在含有 NaCl 的底物和不含有 NaCl 的底物

中对酶活都有促进作用, Al^{3+} , Sn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} 对酶有抑制作用, EDTA 和 Hg^{2+} 使酶完全失活。

2.2.1.6 NaCl 浓度对酶活力的影响

NaCl 对酶有激活作用, 因此测定了底物中不同浓度的 NaCl 对酶活力的影响, 见图 6-12

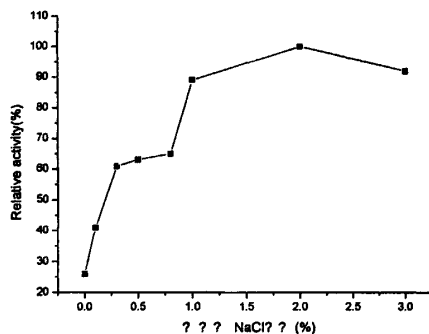


图 6-12 不同 NaCl 浓度对酶活力的影响

Fig.6-12 Influence of NaCl concentrations on enzymic activity

结果显示: NaCl 浓度在 2%时酶活力最高, NaCl 浓度 1%和 3%时相对酶活力在 90%以上。这也许与产酶菌株生长的海洋环境有关。

2.2.1.7 圆二色谱 (CD 谱) 测定酶的二级结构结果

将 G-lyase 用 CD 谱测定其二级结构, α -螺旋占 59.6%, β -折叠占 1.7%, β -转角占 17.5%, 自由绕曲占 21.2%。 β -折叠比较少, 可能是对 poly-G-blocks 专一性酶解的主要原因。酶的结构和专一性之间的关系是以后所应研究的方向。

6.2.2.2 酶解古洛糖醛酸寡糖的分离纯化

G-lyase 对 poly-G-blocks 降解反应混合物, 用乙醇沉淀去除杂质物质, 上清液含有古罗糖醛酸寡糖 (产率为 96.5%); 旋转蒸发后上 BioGel P4 柱分离。图 6-13 是所得古罗糖醛酸寡糖的低压凝胶渗透色谱分离纯化图 (235nm 紫外分光光度计在线检测)。从图 6-13 可知, 基线基本上可以得到分离, 所得分析结果是可靠的。谱图显示寡糖混合物含有四个主要级分, 记为 Fr I, Fr II, FrIII, FrIV; 对应的产率分别为 39.5%, 43.4%, 14.1%, 3%。电喷雾电离质谱 (Electrospray-ionization mass spectrometry) 测得的相应分子量分别为 352.5, 528.5, 704.8 和 881.2, 说明各级分分别为 2 糖, 3 糖, 4 糖和 5 糖。

凝胶色谱方法根据样品中各组分的聚合度(分子量)不同, 出峰时间不同以达到分离的目的。ESIMS 测定结果证实了凝胶色谱分离方法的结果, 但要得到纯品化合物还要进行二次纯化。本文对 Fr I, Fr II, FrIII级分利用强阴离子交换色

谱进行二次分离纯化. FrIV级分由于样品量太少没有进一步分离纯化, 鉴定结构.

嵌图 A、B、C 是在最佳条件下对级分 Fr I, Fr II, FrIII的分离效果图. 从图上可以看到基本实现基线分离, 说明结果是可靠的. 最佳条件是经过对不同流动相、不同流速、不同上样量和不同的分布梯度的分离结果对比得到的.

离子交换色谱分离的原理是以样品的电荷密度不同, 以梯度离子强度的缓冲液洗脱以达到分离的目的. 在本文中因为海藻酸寡糖的电荷密度基本相同, 但在离子交换色谱法分离过程中依然得到了较好的效果, 说明了在以离子交换色谱法分离的过程中根据每个组分的总电荷强度不同也同样可以达到良好的分离效果.

从 Fr I, Fr II, FrIII在强阴离子交换色谱中良好的分离效果, 说明聚合度较小的糖醛酸寡糖在离子交换色谱中出峰时间较聚合度大的糖醛酸寡糖为早.

从简单乙醇沉淀取上清液就可得到产率为 27%的混合海藻酸醛糖酸寡糖, 说

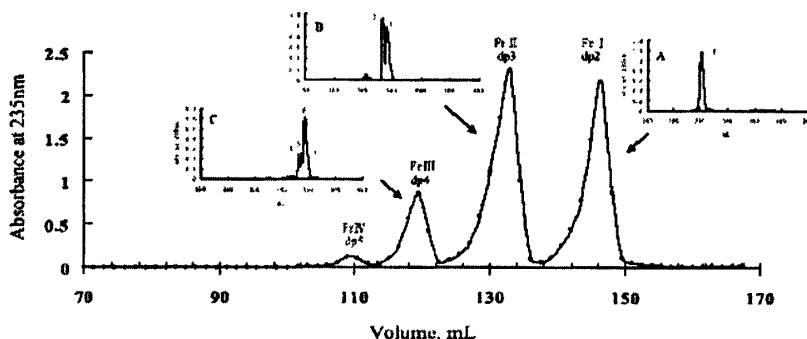


图 6-13 海藻酸胶寡糖的分离纯化谱图

Fig.6-13 The separation graph of alginate oligoccharides on a BioGel P4 column($V_0=72\text{mL}$, $V_1=178\text{mL}$).Eluted with $0.2\text{mol/L NH}_4\text{HCO}_3$ at a flow rate of 1.5mL/h with detection at 235nm .Panel A,B and C was the purification graph of Fr I,Fr IIand FrIII,respectively,on SAX-FPLC.The gradient was $0\text{-}0.4\text{mol/L NaCl}(\text{pH}=3.5)$ at 3mL/min for 2.5h .Numbers1-7 correspond to compounds 1-7,respectively.

表 6-7 酶解古洛糖醛酸寡糖特征 ESIMS 数据

Table6-7 Characteristic ESIMS data of guluronic oligosaccharide with enzymic degradation

	Fr I (dp2)	Fr II (dp3)	FrIII(dp4)	FrIV(dp5)
母离子	$[\text{M-H}]^{1-}$	$[\text{M-H}]^{1-}$	$[\text{M-2H}]^{2-}$	$[\text{M-2H}]^{2-}$
m/z	351.4	528.3	352.3	440.5
Mr(tested)	352.5	528.5	704.8	881.2
Mr(caled)	352.2	528.4	704.5	880.6

表 6-8 酶解古洛糖醛酸寡糖的组成和含量
Table6-8 Composition and content of the guluronic
oligosaccharide with enzymic degradation

级分	所含化合物	含量 (%)	合计	所含单元 糖数目
Fr I	ΔG 化合物 1	39.5%	39.5%	2 糖
Fr II	ΔGG 化合物 2	22.1%	43.4%	3 糖
	ΔMG 化合物 3	21.3%		
FrIII	ΔGGG 化合物 4	2.2%	14.1%	4 糖
	ΔMGG 化合物 5	2.4%		
	ΔGMG 化合物 6	8.3%		
	ΔMMM 化合物 7	1.2%		
FrIV	量少没分离鉴定	3.0%	3.0%	5 糖

注：M 单元占水解寡糖的 10.18%

明酶的高效性和作为工业生产的可行性。从单一降解产物能够分离而且产率可精确计算，说明工艺放大批量生产有可能。

从凝胶渗透色谱可知，Fr I，Fr II，FrIII，FrIV都是单一聚合度的寡糖，电喷雾电离质谱也证明了这一点。Fr I 的强阴离子交换色谱峰是单一对称峰，是一种化合物；Fr II 和 FrIII分别由 2 个和 4 个峰组成，说明 Fr II 由两种化合物组成，FrIII由四种化合物组成。用半制备强阴离子交换色谱可得到 7 种化合物的样品，用二维核磁共振可得到这些化合物的精确结构。

FrIV（五糖化合物）量很少说明 G-lyase 对 poly-G-blocks 的链段专一识别不会超过 5 个糖单元，同时由不同聚合度寡糖（Fr I，Fr II，FrIII，FrIV）的比例可知 G-lyase 在裂解 poly-G-blocks 只认识某一个片断或某几个片断。由 Fr II、FrIII 同一聚合度中不同构象组成的寡糖百分含量不同，说明 G-lyase 切割 poly-G-blocks 只优先选择某一种或某几种糖苷键连接方式。今后，要寻找对海藻胶寡糖有更高分辨率的方法对其进行分离纯化，并使用更好的结构鉴定方法对寡糖结构进行鉴定，以便分析海藻胶裂合酶的降解行为，为酶解海藻胶的工艺作进一步的指导。

6.2.2.3 水解产物的结构鉴定

在 ¹H NMR 低场，δ5.92ppm 为不饱和氢的化学位移，可定为非还原末端 4 位上的氢，记为 H-4^{II}（II 表示非还原末端糖单元，4 表示糖环上的位置）。在 ¹³C-NMR 谱图上可发现 δ110.96ppm 属于 C-4^{II}。δ5.21ppm、δ4.87ppm、δ96.04ppm

分别归属于非还原末端 H-1^{II}(α), 还原末端 H-1^I(β) 和古罗糖醛酸还原末端异头碳 C-1^I。可确立化合物 1 是 4-脱氧- α -L-赤式- $\Delta^{4,5}$ -吡喃糖醛酸-(1-4)- α -L-古罗糖醛酸(Δ G)。表 6-9 是化合物 1 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据。

从级分 Fr II 中分得化合物 2 和化合物 3, 比例接近 1:1, 表 6-10 是他们的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据。对于化合物 2, 从 ^1H NMR 上可知 $\delta 5.69\text{ppm}$ 是非还原末端的氢, 归属于 H-4^{III} (III 表示非还原末端, 4 表示糖环上的位置)。 $\delta 5.02\text{ppm}$, $\delta 4.85\text{ppm}$, $\delta 4.72\text{ppm}$ 分别归属于均聚古罗糖醛酸 H-1^{III}, H-1^{II}, H-1^I 的特征吸收峰。再根据 HMQC 谱图上的碳-质子峰信号可推出化合物 2 的结构为 4-脱氧- α -L-赤式- $\Delta^{4,5}$ -吡喃糖醛酸-(1-4)- α -L-古罗糖醛酸-(1-4)- α -L-古罗糖醛酸(Δ GG)。

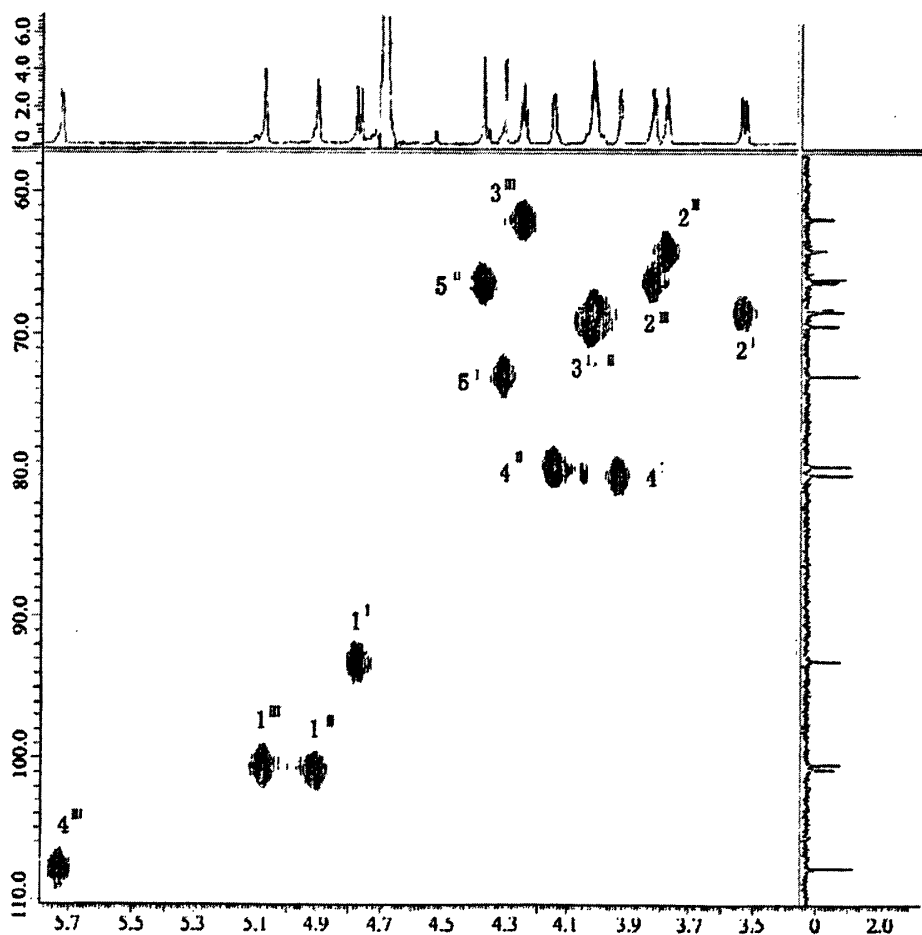


图 6-14 三聚糖化合物 2 的 HMQC 谱图

Fig.6-14 HMQC of trisaccharide 2. I :reducing end; II :middle residues;III:nonreducing end;and the numbers are the positions in pyranosyluronic acids.

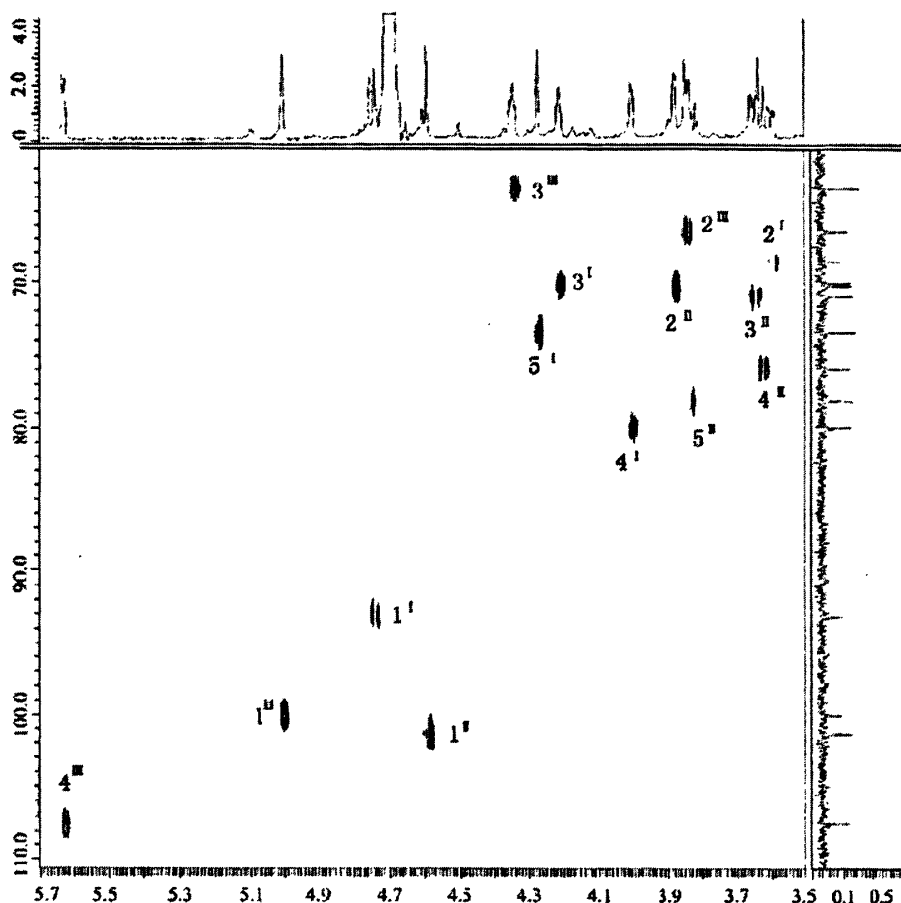


图 6-15 三聚糖化合物 3 的 HMQC 谱图

Fig.6-15 HMQC of trisaccharide 3. I :reducing end; II :middle residues;III:nonreducing end;and the numbers are the positions in pyranosyluronic acids.

对于化合物 3, 综合分析谱图, 84.68ppm 归属于 H-1G β , 84.94ppm 归属于不饱和糖环上的 H-1, 84.54ppm 归属于甘露糖醛酸上的 H-1, 再结合 HMQC 谱图, 可得到化合物 3 为 4-脱氧- α -L-赤式- $\Delta^{4,5}$ -吡喃糖醛酸-(1-4)- β -D-甘露糖醛酸-(1-4)- α -L-古罗糖醛酸(Δ MG)。二次纯化级分 FrIII 可得四种化合物(4, 5, 6, 7), 其中化合物 6 占主要含量。ESIMS 检测结果证明级分 FrIII 是四糖化合物的混合物。从化合物 4 的 ^1H - ^1H COSY、HMBC 谱图, 并参照 Δ G、 Δ GG 的相关谱图, 化合物 4 可认为是古罗糖醛酸的低聚物, 结构为 4-脱氧- α -L-赤式- $\Delta^{4,5}$ -吡喃糖醛酸-(1-4)- α -L-古罗糖醛酸-(1-4)- α -L-古罗糖醛酸-(1-4)- α -L-古罗糖醛酸(Δ GGG)。在 Δ GGG 的 HMBC 谱图中, (H-1^{IV}, C-4^{III}), (H-1^{III}, C-4^{II}), (H-1^I, C-4^I), (H-1^I,

C-4^I), (H-1^I, C-4^I), (H-1^I, C-4^{II}) 的相关峰, 结合 ¹H-¹H COSY 谱图, 证明化合物 4 的谱峰归属是正确的。

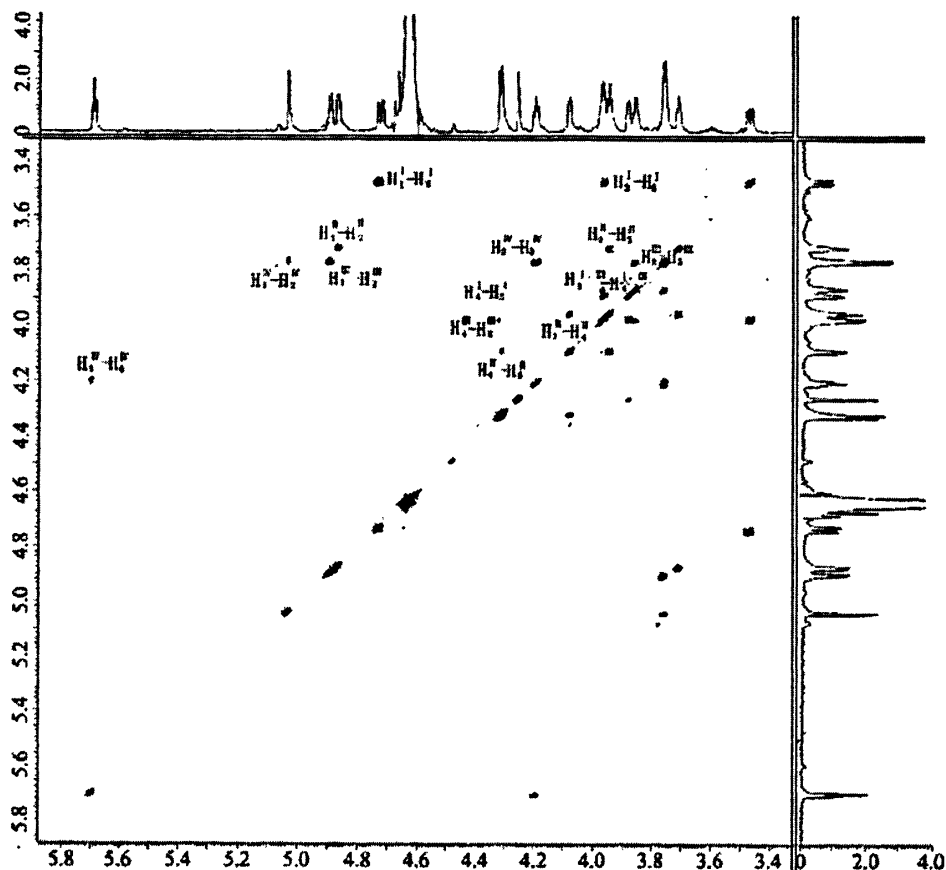


图 6-16 四聚糖化合物 4 的 ¹H-¹H COSY 谱图

Fig.6-16 ¹H-¹H COSY of tetrasaccharide 4. IV:nonreducing end; III:middle residues near to nonreducing end; II:middle residues near to reducing end; I :reducing end, The numbers are the positions in pyranosyluronic acids.

从化合物 5 的 ¹H-¹H COSY, HMBC 谱图, 参照 ΔMG 的结构和谱图, 化合物 5 的结构被鉴定为 4-脱氧-α-L-赤式-Δ^{4,5}-吡喃糖醛酸-(1-4)-β-D-甘露糖醛酸-(1-4)-α-L-古罗糖醛酸-(1-4)-α-L-古罗糖醛酸(ΔMGG)。正如谱图所示, 高场的 δ4.52ppm 应归属于 H-1^{III}, 并说明糖残基 III 是甘露糖醛酸。化合物 5 的 HMBC 谱图说明, 在 H-1^{IV} (4.92ppm) 和 C-4^{III} (78.28ppm), H-1^{III} 和 C-3^{II}, H-1^{II} 和 C-4^I, C-1^I 和 H-2^I, C-1^I 和 H-3^I, C-1^I 和 H-5^I, C-1^I 和 H-1^{II}, H-4^{II} 和 C-1^{III}, H-4^I 和 C-1^{II} 之间的相关峰, 说明各基团的相互作用的重要性, 并说明所推论的化合

物 5 结构 (Δ MGG) 糖链顺序是正确的。通过解析化合物 6 的 NMR 谱图可得出它的结构是 4-脱氧- α -L-赤式- $\Delta^{4,5}$ -吡喃糖醛酸 (1-4)- α -L-古罗糖醛酸-(1-4)- β -D-甘露糖醛酸--(1-4)- α -L-古罗糖醛酸(Δ GMG)。同样方法可以得到化合物 7 的结构为 4-脱氧- α -L-赤式- $\Delta^{4,5}$ -吡喃糖醛酸 -(1-4)- β -D-甘露糖醛酸-(1-4)- β -D-甘露糖醛酸-(1-4)- β -D-甘露糖醛酸(Δ MMM)。

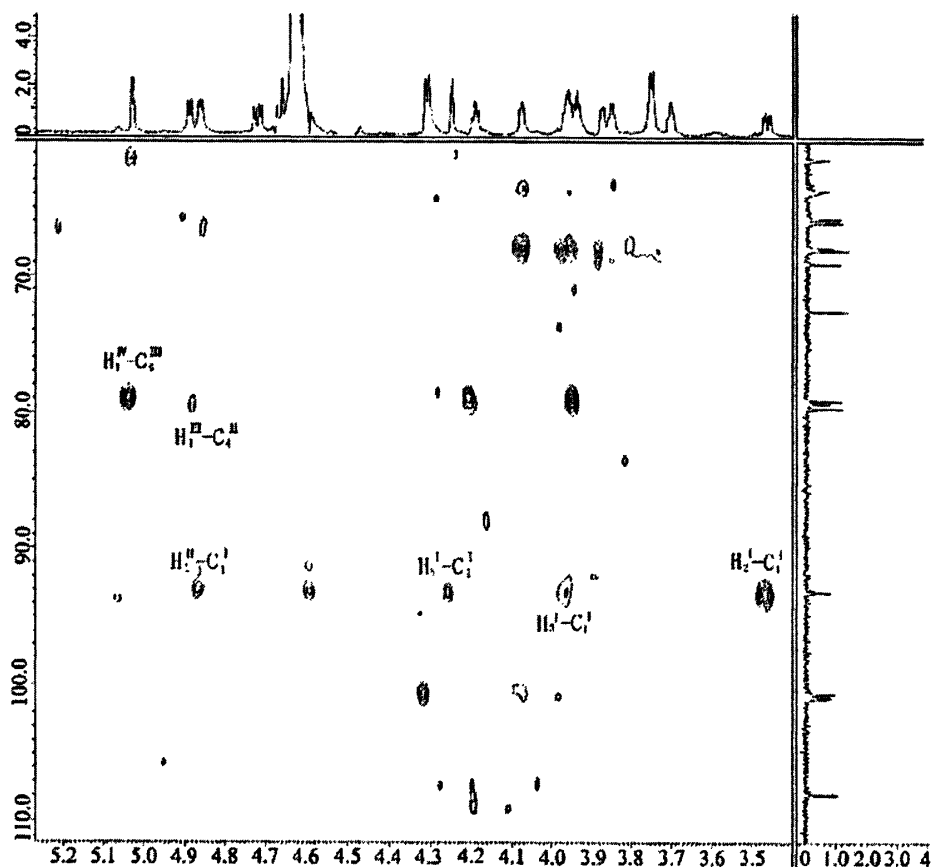


图 6-17 四聚糖化合物 4 的 HMBC 谱图

Fig.6-17 HMBC(B) of tetrasaccharide 4. IV :nonreducing end; III:middle residues near to nonreducing end; II :middle residues near to reducing end; I :reducing end, The numbers are the positions in pyranosyluronic acids.

本节中，从酶解海藻酸胶寡糖混合物中分离纯化得到七种寡糖，化合物 1-7 的相应产率分别为 39.5%，22.1%，21.3%，2.2%，2.4%，8.3%，1.2%。结构鉴定结果说明，从产物混合物中分离得一种二聚糖 Δ G(39.5%)，二种三聚糖(Δ GG，22.1%； Δ MG，21.3%)。从产物混合物中没有分离到 Δ M， Δ MM 或者 Δ GM。而且产物中甘露糖醛酸的含量从 9%增加到 10.68%，M 含量增加了 18.7%。我们推

测裂解位点位于两个古罗糖醛酸之间 (-G-G-), 使得一个古罗糖醛酸变成不饱和糖醛酸位于产物的非还原末端, 而另一个古罗糖醛酸位于产物的还原末端。这些结果验证了 G-lyase 是古罗糖醛酸专一裂解酶。从产物含量可知, 二聚糖、三聚糖、四聚糖共占产物 97%, 五聚糖只占 3%, 六聚糖几乎没有检测到, 这些结果说明 G-lyase 酶所能识别的最长链段为五聚糖: -G-G-G-G-G-, -G-G-G-M-G-, -M-G-G-M-G-或者-G-G-M-G-G-。G-lyase 酶的裂解机理如图 6-22 所示, 这些机理与张真庆^[139], Y.Matsubara^[140], J.Boyd^[141]三个作者所报道的古罗糖醛酸裂解酶机理相似。

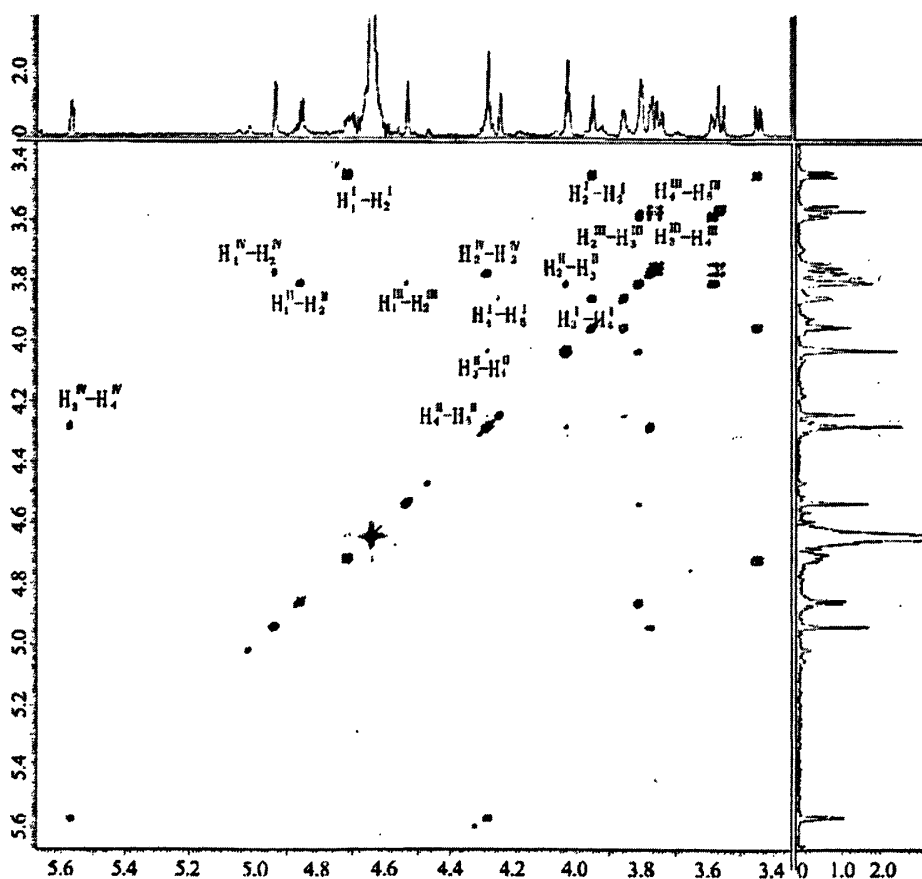


图 6-18 四聚糖化合物 5 的 ^1H - ^1H COSY 谱图

Fig.6-18 ^1H - ^1H COSY(A) tetrasaccharide 5. IV:nonreducing end; III:middle residues near to nonreducing end; II :middle residues near to reducing end; I :reducing end. The numbers are the positions in pyranosyluronic acids.

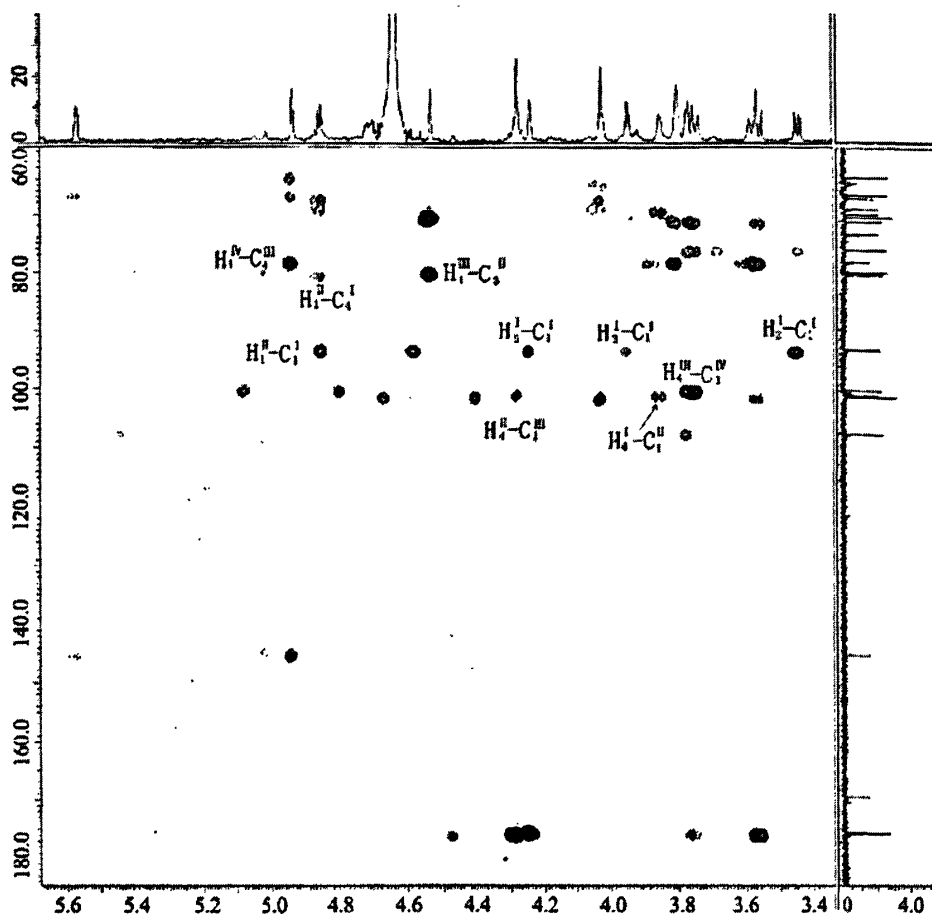


图 6-19 四聚糖化合物 5 的 HMBC 谱图

Fig.6-19 HMBC(B) of tetrasaccharide 5. IV:nonreducing end; III:middle residues near to nonreducing end; II :middle residues near to reducing end; I :reducing end.The numbers are the positions in pyranosyluronic acids.

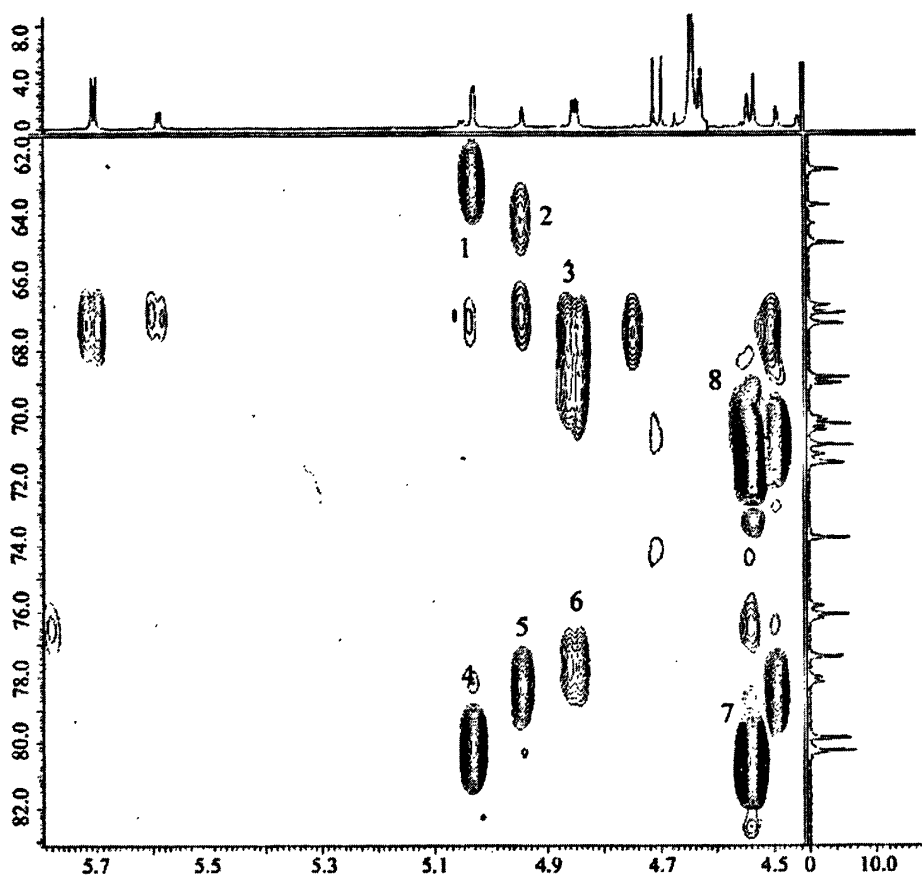


图 6-20 四聚糖化合物 6 的 HMBC 谱图

Fig.6-20 HMBC spectra of tetrasaccharide 6. The crosspeaks of 6 are assigned as :1, $H_1^{IV}-C_3^{IV}$;2, $H_1^{IV}-C_3^{IV}$;3, $H_1^{III}-C_5^{III}$;4, $H_1^{IV}-C_4^{III}$;5, $H_1^{IV}-C_4^{III}$;6, $H_1^{III}-C_4^{II}$;7, $H_1^{II}-C_4^I$;8, $H_1^{II}-C_2^{II}$; I:reducing end; II:middle residues near to reducing end; III:middle residues near to nonreducing end;IV:nonreducing end. Square brackets stand for contaminates signals of Δ MMM in 6.

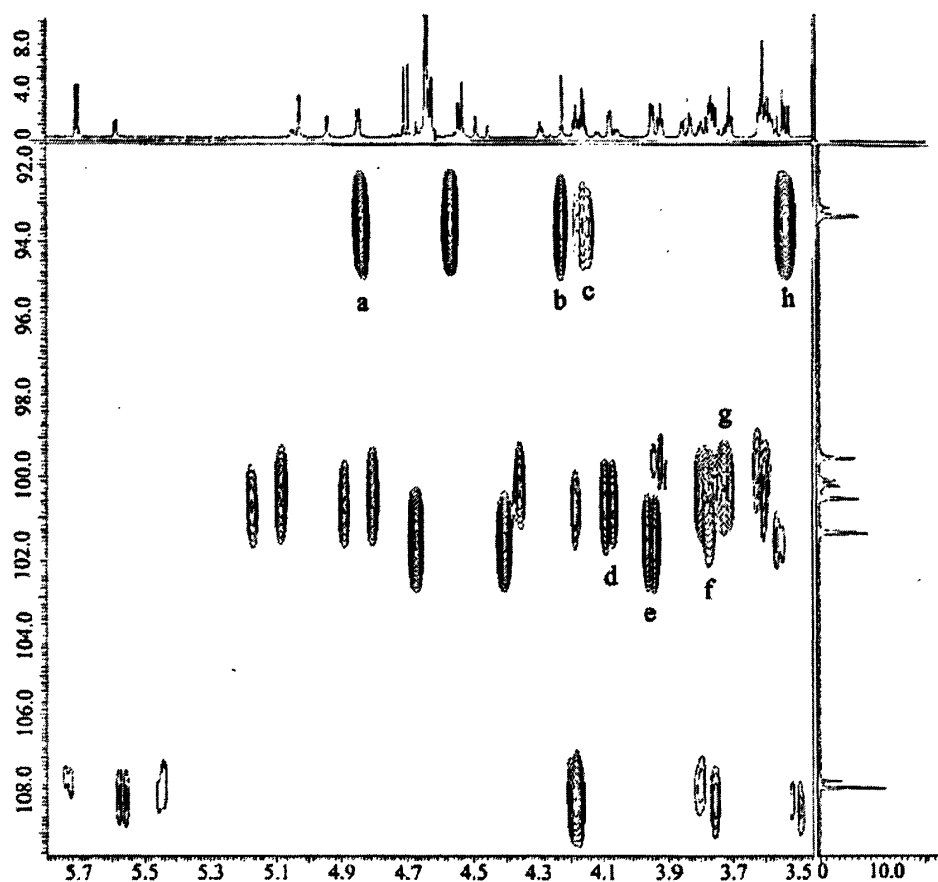


图 6-21 四聚糖化合物 7 的 HMBC 谱图

Fig.6-21 HMBC spectra of tetrasaccharide 7. The crosspeaks of 6 are assigned as :a, $\text{H}_1^{\text{III}}-\text{C}_1^{\text{II}}$;b, $\text{H}_5^{\text{I}}-\text{C}_1^{\text{I}}$;c, $\text{H}_3^{\text{I}}-\text{C}_1^{\text{I}}$;d, $\text{H}_4^{\text{III}}-\text{C}_1^{\text{IV}}$;e, $\text{H}_4^{\text{I}}-\text{C}_1^{\text{II}}$;f, $\text{H}_4^{\text{I}}-\text{C}_1^{\text{III}}$;g, $\text{H}_4^{\text{III}}-\text{C}_1^{\text{IV}}$;h, $\text{H}_2^{\text{I}}-\text{C}_1^{\text{I}}$; I:reducing end; II:middle residues near to reducing end; III:middle residues near to nonreducing end;IV:nonreducing end.

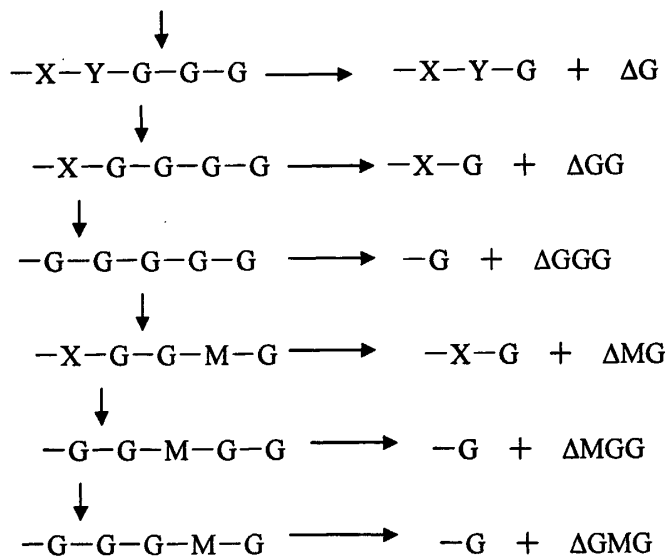


图 6-22 古罗糖裂解酶对 G 段的裂解机理

Fig.6-22 Possible modes for poly-G-blocks hydrolysis with G-lyase. X=M or G; Y=G or M; G: guluronic acid; M:mannu-
-ronic acid; ↓ : hydrolysis sites.

表 6-9 二聚糖（化合物 1）的 NMR 数据

Table 6-9 The NMR data of disaccharide 1

化 合 物	端基位置	¹³ C NMR				
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
1ΔG	I	96.04 (93.42)	71.61 (69.00)	72.66 (70.03)	82.39 (79.77)	75.92 (73.55)
	II	103.20 (100.39)	69.73 (67.07)	65.21 (62.39)	110.96 (107.99)	146.99(144.61)
¹ H NMR						
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5
	I (α)	5.19	3.87	3.63	-	-
	I (β)	4.87(4.85)	3.55(3.53)	4.20(4.14)	4.16(4.11)	4.44(4.39)
	II	5.21(5.18)	3.92(3.91)	4.32(4.29)	5.92(5.88)	-

表 6-10 三聚糖化合物 2 与化合物 3 的 NMR 数据

Table6-10 The NMR data of trisaccharides 2 and 3

化 合 物	端基 位置	¹³ C-NMR				
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
2ΔGG	I	93.290(94.520)	69.130(70.410)	70.090(71.250)	80.350(81.500)	73.450(74.670)
	II	100.49(101.99)	64.850(65.970)	68.930(70.110)	79.720(80.900)	67.120(68.320)
	III	100.83(101.63)	66.91(68.05)	62.72(63.82)	107.77(108.86)	44.71(145.90)
3ΔMG	I	93.250	68.830	70.290	80.150	73.680
	II	101.37	70.510	71.210	76.090	78.260
	III	100.13	66.690	63.670	107.52	145.18
		¹ H-NMR				
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5
2ΔGG	I	4.72(4.78)	3.45(3.50)	3.96(4.00)	3.86(3.91)	4.24(4.30)
	II	4.85(4.90)	3.70(3.76)	3.94(4.00)	4.08(4.13)	4.31(4.36)
	III	5.02(5.08)	3.75(3.81)	4.24(4.23)	5.69(5.75)	-
3ΔMG	I	4.68	3.53	4.15	3.94	4.21
	II	4.54	3.81	3.59	3.75	3.55
	III	4.94	3.77	4.28	5.57	-

注：I 为还原末端，II 为非还原末端。括号内的化学位移摘自参考文献 10。

表 6-11 四聚糖化合物 4, 5, 6, 7 的 NMR 数据

Table6-11 The NMR data of tetrasaccharides 4,5,6 and 7

化合物	端基 位置	¹³ C NMR				
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
4ΔGGG	I	93.310	69.150	70.110	80.350	73.450
	II	100.69	64.890	68.950	80.020	67.160
	III	100.86	65.010	69.150	79.790	67.160
	IV	100.56	66.920	62.710	107.75	144.75
5ΔMGG	I	93.300	69.160	70.090	80.400	73.470
	II	100.93	64.790	69.160	67.340	63.680

	III	101.28	70.500	71.250	78.280	76.100
	IV	100.17	64.790	67.340	107.55	145.19
6ΔGMG	I	93.300	68.880	70.290	80.220	73.750
	II	101.34	70.930	71.460	77.370	76.080
	III	99.470	64.820	69.060	79.840	67.250
	IV	100.49	71.220	62.560	107.80	144.73
7ΔMMM	I	93.090	66.700	71.460	77.370	76.210
	II	100.17	70.180	71.220	78.160	76.210
	III	101.34	71.220	71.460	78.010	76.210
	IV	100.03	66.930	63.660	107.63	145.22
¹ H NMR						
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5
4ΔGGG	I	4.71	3.46	3.96	3.87	4.24
	II	4.86	3.70	3.93	4.07	4.30
	III	4.88	3.75	3.84	3.96	4.31
	IV	5.02	3.74	4.19	5.68	-
5ΔMGG	I	4.69	3.43	3.94	3.85	4.23
	II	4.84	3.79	4.02	4.27	4.23
	III	4.52	3.79	3.56	3.73	3.54
	IV	4.92	3.76	4.28	5.55	-
6ΔGMG	I	4.68	3.53	4.14	3.93	4.21
	II	4.52	3.76	3.59	3.82	3.57
	III	4.83	3.69	3.91	4.06	4.61
	IV	5.02	3.74	4.17	5.69	-
7ΔMMM	I	5.04	3.81	3.58	3.70	3.55
	II	4.48	3.84	3.59	3.73	3.55
	III	4.53	3.81	3.59	3.79	3.60
	IV	4.93	3.78	4.28	5.57	-

6.2.3 海藻酸钠 LVCR 的结构组成测定.

在糖链结构的研究中,核磁共振技术的重要性是毋庸置疑的。核磁共振分析样品用量少且无破坏性,傅立叶技术的应用促进了碳谱的常规化,使其可以与氢谱相媲美,这两种核磁谱相互补充在结构测定方面相得益彰。近年来随着超导核磁的普及,种类繁多的二维谱技术得到广泛应用。在糖链的结构分析中,综合运用这些技术可以获得组成单糖的种类、异头构型、糖苷键位置、非糖取代基位置、单糖连接顺序等一级结构的丰富信息。如果将其与经典的甲基化分析、部分降解等方法联合应用,可以大大加快糖链结构研究的进程。图 6-23 是海藻酸钠 LVCR 的 ^{13}C -NMR 谱图.

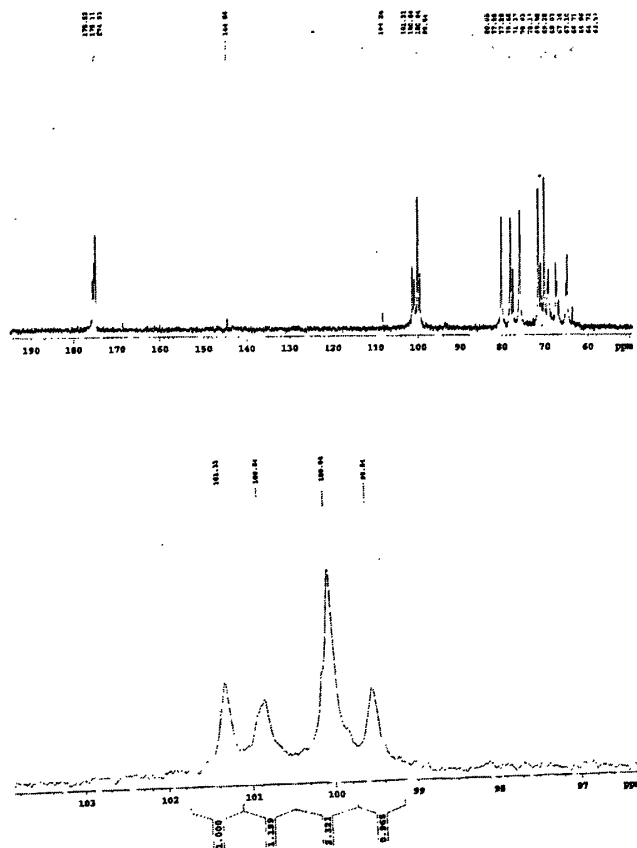


图 6-23 海藻酸钠 LVCR 的 ^{13}C -NMR 谱图

Fig.6-23 ^{13}C -NMR of sodium alginate LVCR

下面是 99~102ppm 之间的图谱分析:

101~102ppm 之间为异头碳 (anomeric carbon) C-1 苷原子的相应谱图数据,

表 6-12 海藻酸钠样品 ^{13}C -NMR 谱图相应谱峰归属

Table 6-12 Assignments of peaks in the ^{13}C -NMR spectrum of alginate

Sequence	Carbon atom					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
MMM	100.04	69.980	70.830	77.860	75.660	174.93
MMG	101.31	70.370		78.130	75.660	
GMM	100.04	69.980		77.280	75.660	
GMG	101.31	70.370	71.370	77.280	75.660	175.52
GGG	100.84	64.960	69.030	80.050	67.100	175.11
GGM	99.540	64.720		80.050	67.380	
MGG	100.84	64.960		80.050	67.100	
MGM	99.540	64.720	69.280	80.050	67.380	175.33

注: p.p.m.66.71 的峰没有进行归属。

下面利用贝努利和马尔可夫统计理论, 结合核磁谱图数据对海藻酸钠 LVCR 进行结构分析测定:

$$A_{\text{MMG}} + A_{\text{GMG}} = A_{\text{MG}} = 1.00$$

$$A_{\text{MGG}} + A_{\text{GGG}} = A_{\text{GG}} = 1.20$$

$$A_{\text{MMM}} + A_{\text{GMM}} = A_{\text{MM}} = 2.32$$

$$A_{\text{GGM}} + A_{\text{MGM}} = A_{\text{GM}} = 0.97$$

$$A_0 = A_{\text{MG}} + A_{\text{GG}} + A_{\text{MM}} + A_{\text{GM}} = 1.000 + 1.199 + 2.321 + 0.965 = 5.49$$

$$F_{\text{MG}} = A_{\text{MG}} / A_0 = 1.000 / 5.485 = 0.18$$

$$F_{\text{GG}} = A_{\text{GG}} / A_0 = 1.199 / 5.485 = 0.22$$

$$F_{\text{MM}} = A_{\text{MM}} / A_0 = 2.321 / 5.485 = 0.42$$

$$F_{\text{GM}} = A_{\text{GM}} / A_0 = 0.965 / 5.485 = 0.18$$

$$F_{\text{M}} = 1 - F_{\text{G}}$$

$$F_{\text{MG+GM}} = 2 (F_{\text{G}} - F_{\text{GG}})$$

$$F_{\text{MM}} = 1 - F_{\text{GG}} - 2 (F_{\text{G}} - F_{\text{GG}}) = 1 + F_{\text{GG}} - 2F_{\text{G}}$$

$$\text{得 } F_{\text{G}} = 0.40$$

$$F_{\text{M}} = 0.60$$

$$N_M = F_M / F_{MG} = 0.6023 / 0.1823 = 3.30$$

$$N_G = F_G / F_{GM} = 0.3977 / 0.1759 = 2.26$$

$$F_{MMM} = (F_{MM})^2 / F_M = 0.30$$

$$F_{GMM} = F_{MMG} = (F_{MM} * F_{MG}) / F_M = 0.13$$

$$F_{GMG} = (F_{GM} * F_{MG}) / F_M = 0.05$$

$$F_{GGG} = (F_{GG})^2 / F_G = 0.12$$

$$F_{MGG} = F_{GGM} = (F_{GG} * F_{GM}) / F_G = 0.10$$

$$F_{MGM} = (F_{MG} * F_{GM}) / F_G = 0.08$$

$$N_M(>1) = (F_M - F_{GMG}) / F_{MMG} = 4.29$$

$$N_G(>1) = (F_G - F_{MGM}) / F_{GGM} = 3.28$$

$$\text{计算 } F_{MM} = (F_M)^2 = 0.36$$

$$\text{计算 } F_{MG} = \text{计算 } F_{GM} = F_M * F_G = 0.24$$

$$\text{计算 } F_{GG} = (F_G)^2 = 0.16$$

从测得的 M 单元、G 单元含量 F_M 、 F_G 按统计学原理计算得^{计算} F_{MM} ^{计算} F_{MG} ^{计算} F_{GM} ^{计算} F_{GG} , MM 段含量最高占 36%, MG、GM 交替段次之占 24%, GG 段最低占 16%。实际测得的 MM 段最高占 42%, 交替段 MG 占 18.23%, GM 段占 17.59%, GG 段占 21.86%。总体趋势是一样的说明测试方法和数据处理方法可靠。从计算结果可知, M 段含量高于 G 段含量, $M/G=3/2=1.5$, M 段的平均聚合度为 3.3, G 段的平均聚合度为 2.26, 纯 M 段(单元数>1)的平均聚合度为 4.29, 约占 42.32%, 纯 G 段(单元数>1)的平均聚合度为 3.28, 约占 21.86%, 交替段(MG+GM)约占 35.82%。测试结果表明被测样品主链是单元数为 4 的纯 M 片段, 被大量的交替段给隔开, 链段上镶嵌着不是很多的单元数为 3 的纯 G 片段。

文献报道 Alginate 分子链长经稀酸水解后平均聚合度 $DP>20$, 对还原末端基的校正可忽略, 因此, $F_{MG}=F_{GM}$, 从而, 可以计算 M/G 比值和二聚糖频率。引入参数 η 代表嵌段的分布特征, 即

$$\eta = F_{MG+GM} / (F_M * F_G)$$

η 的大小表明:

(a) $0 \leq \eta < 1$ 为嵌段形式分布; (b) $\eta = 1$ 为完全无规线团形式分布; (c) $1 < \eta \leq 2$ 为交替嵌段形式分布。

样品实测 $F_{MG}=0.1823$, $F_{GM}=0.18$, $F_{MG} \approx F_{GM}$, 符合条件, 可以用该参数来表征 $F_M * F_G = 0.6023 * 0.3977 = 0.24$

$$F_{MG+GM}=F_{MG}+F_{GM}=0.1823+0.1759=0.36$$

$$\eta=F_{MG+GM}/(F_M \cdot F_G)=1.50$$

$1 < \eta \leq 2$ 为交替嵌段形式分布,与前面描述相同。证明方法可靠。

表 6-13 海藻酸钠样品和分级产物中二聚糖频率分布以及相应平均链段长度

Table6-13 Distribution of diad frequency in alginate and alginate fractions, and the corresponding number-average block-lengths

Sample	F_M	F_G	F_{MM}	F_{MG}	F_{GM}	F_{GG}	N_M	N_G	M/G	M_n	η	$[\eta] \text{ (dl} \cdot \text{g}^{-1})$
LVCr	0.6	0.4	0.4	0.1	0.1	0.2	3.3	2.2	1.51	2.11	1.5	4.21
	0	0	2	8	8	2	0	6		E5	0	

Values given in parenthesis are calculated according to (Bernouillian statistics

表 6-14 海藻酸钠样品和分级产物中三聚糖频率分布以及相应平均链段长度

Table6-14 Distribution of triad frequency in alginate and alginate fractions, and the corresponding number-average block-lengths

Sample	F_M	F_G	F_{MMM}	F_{MMG}	F_{GMM}	F_{GMG}	F_{GGG}	F_{GGM}	F_{MGG}	F_{MGM}	$N_M(>1)$	$N_G(>1)$
LVCr	0.6	0.4	0.3	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0	4.29	3.28
	0	0	0	3	3	5	2	0	0	8		

Values given in parenthesis are calculated according to [] first-order Markovian statistics

6.3 小结

(1) 对海藻酸钠进行分级,得到了高 M 段高 G 段样品,并得到了相应的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图,为不知组成的海藻酸钠样品的结构测定提供了参考依据。也为水解产物的结构鉴定提供了参考对照。

(2) 对古罗糖醛酸裂解酶(G-lyase)降解 poly-G-blocks 的产物进行分离纯化和结构鉴定,并分析了酶解机理。结果表明:酶的最佳作用 pH 在 7 附近,最适温度在 28°C 左右, Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} 在含有 NaCl 的底物和不含有 NaCl 的底物中对酶活都有促进作用, Al^{3+} , Sn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} 对酶有抑制作用, EDTA 和 Hg^{2+} 使酶完全失活。NaCl 浓度在 2% 时酶活力最高,

(3) 从酶解海藻酸胶寡糖混合物中分离纯化得到七种寡糖,化合物 1-7 的相应产率分别为 39.5%, 22.1%, 21.3%, 2.2%, 2.4%, 8.3%, 1.2%。结构鉴定结果说明,从产物混合物中分离得一种二聚糖 ΔG (39.5%), 二种三聚糖 (ΔGG ,

22.1%; Δ MG, 21.3%)。从产物混合物中没有分离到 Δ M, Δ MM 或者 Δ GM。而且产物中甘露糖醛酸的含量从 9% 增加到 10.68%, M 含量增加了 18.7%。推测裂解位点位于两个古罗糖醛酸之间 (-G-G-), 使得一个古罗糖醛酸变成不饱和糖醛酸位于产物的非还原末端, 而另一个古罗糖醛酸位于产物的还原末端。这些结果验证了 G-lyase 是古罗糖醛酸专一裂解酶。从产物含量可知, 二聚糖、三聚糖、四聚糖共占产物 97%, 五聚糖只占 3%, 六聚糖几乎没有检测到, 这些结果说明 G-lyase 酶所能识别的最长链段为五聚糖。

(4) 用 ^{13}C -NMR 结合马尔可夫 (贝努利) 统计理论对海藻酸钠样品 LVCR 结构进行分析, 结果表明 LVCR 中 G 单元含量为 39.77%;

第七章 结论与展望

7.1 结论

本文利用等温滴定量热、圆二色谱对海藻酸钠理化性质研究,结合粘度测试、膨胀收缩对海藻酸钠凝胶进行多角度的研究,以及对海藻酸钠结构的测定和特种品种制备的研究,得出以下结论:

(1) Ca^{2+} 与海藻酸钠相互作用时有两个结合位点. 分别对应 $K_1=1.21\text{E}7(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$, $\Delta S_1=141.84(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$, $\Delta H_1=1.89(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$; $K_2=2.90\text{E}4(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$, $\Delta S_2=79.08(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$, $\Delta H_2=-1.84(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$ 。锌与海藻酸钠相互作用时只有一个结合位点, 结合常数 $K=9472(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$, 熵变 $\Delta S=128.95(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$, 焓变 $\Delta H=15.8(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$ 。海藻酸锌凝胶比海藻酸钙凝胶内的交联点多, 海藻酸锌凝胶比海藻酸钙凝胶对卵清蛋白扩散阻滞作用强。

(2) 将钙锌铜离子与海藻酸钠反应时的相应 $T\Delta S$ 对 ΔH 作图, 三点接近于线性关系, 符合等动力学关系理论。说明钙锌离子与海藻酸钠之间是静电相互作用。

(3) 210nm 左右(200nm-230nm)的谱带是海藻酸钠的特征吸收峰。在这一谱带范围内, 利用两参数法对多种组成海藻酸钠品种进行结构测定, 误差不超过 8%, 可应用于快速简便的海藻酸钠中 M、G 段含量的测定。

(4) 圆二色谱研究表明: 钙锌离子与海藻酸钠反应时, 分前后两个阶段; 临界点前构象的变化与二价阳离子用量成线性关系, 说明所形成的配合物的结构是均一的。钙锌离子优先与 G 单元相互作用, 锌离子对 G、M 单元相互作用时差别没有钙离子大, 即锌离子对 G、M 单元识别作用不如钙离子。锌离子临界点 f 值比相应钙离子大, 说明锌离子与海藻酸钠形成凝胶时, 交联点比钙离子的多。

(5) 海藻酸钠中存在规整结构的双螺旋功能微区, 规整微区的含量与 G 段含量有关; 规整排列的 G 段是形成双螺旋功能微区的物质基础, 受温度影响比较大; 双螺旋功能微区随温度而发生的有序-无序可逆转变, 与晶体随温度“融化”和“成核”过程很相似。

(6) 海藻酸钠与二价阳离子凝胶时会发生膨胀收缩现象, 对 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 离子来说, 膨胀收缩程度的大小, 与三个离子的性质有关, 如离子大小, 成键电子轨道等。当外界条件不同时, 如在不同的氯化钠和凝胶离子溶液中, 膨胀和收缩是可逆的。这些宏观的膨胀收缩现象, 是微观离子结合和竞争解离的结果。

(7) 在海藻酸钠与钙离子结合过程中, 量热反应的第一类结合位点, 对应于离子量对圆二色谱影响的第一阶段线性部分, 钙离子优先与 G 单元形成的蛋盒空腔作用, 由于钙镶嵌于已存在的螺旋蛋盒空腔中, 相似于分子内交联, 对粘度

贡献不大,同时释放出钠离子,起到少量电解质的作用,使粘度有稍微下降的趋势。在半蛋盒结构以及二聚体聚集体形成过程中,钙离子与糖单元相互作用时作用力不大,主要是脱溶剂化程度很低,二聚体结构不需要重排就可进一步聚集,分子链的构象改变不显著。这样导致焓变为放热反应,同时构象变化也比较低。在圆二色 CD 谱图上,对应于第二阶段的斜率比值比第一阶段小。在这一过程中,以分子间交联为主,体系粘度急剧上升。

(8) 对海藻酸钠进行分级,得到了高 M 段高 G 段样品,并得到了相应的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图,为不知组成的海藻酸钠样品的结构测定提供了参考依据。也为水解产物的结构鉴定提供了参考对照。

(9) 对古罗糖醛酸裂解酶(G-lyase)降解 poly-G-blocks 的产物分离纯化得到七种寡糖,化合物 1-7 的相应产率结合结构鉴定结果说明,裂解位点位于两个古罗糖醛酸之间(-G-G-),结果验证了 G-lyase 是古罗糖醛酸专一裂解酶。从产物含量可说明 G-lyase 酶所能识别的最长链段为五聚糖。

(10) 用 $^{13}\text{C-NMR}$ 结合马尔可夫(贝努利)统计理论对海藻酸钠样品 LVCR 的结构进行了分析,结果表明 LVCR 中 G 单元含量为 39.77%。

7.2 展望

作者通过用等温滴定量热、圆二色谱对海藻酸钠的理化性质研究和海藻酸钠特种品种的制备,有了一定的研究基础,结合当前国内外学科前沿发展方向,对海藻酸钠的研究提出以下建议:

(1) 用等温滴定量热(ITC)、圆二色谱(CD)、分子探针、纳秒荧光仪(激光荧光寿命法)、荧光光谱仪测定研究生物大分子海藻酸钠与小分子间(离子、表面活性剂等)相互作用与识别及引起的结构动态变化,用时间分辨技术研究分子聚集体形成过程和聚集体的结构性能关系;

(2) 用分子探针(芘)、荧光光谱仪、纳秒荧光仪(激光荧光寿命法)研究海藻酸钠与不同表面活性剂形成疏水微区的最佳配比、微区的形成机理和极性;

(3) 今后应加强海藻酸糖各组分的分离纯化技术和药理学研究,进一步研究各类多糖的结构和生物活性的关系,确定多糖活性决定部位,为新药和保健食品的开发奠定基础,扩大海藻酸作为药物载体在医药领域的应用范围;

(4) 将海藻酸钠生物大分子链用特殊基团修饰后,结合现代测试方法(如核磁滴定等)和超分子化学理论对海藻酸钠自组装性能、与二价阳离子结合配位性能和聚集体特征进行精确详细的研究和解释;

(5) 将海藻酸钠理化性质研究和特种品种制备技术,拓展为一个包括海藻酸钠、果胶、螺旋藻和其他多糖在内的生物多糖研究平台。

参 考 文 献

- [1] A. Martinsen, I. Storrø, G. Skjåk-Bræk. Alginate as Immobilization Material: III. Diffusional Properties. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, 39: 186~194
- [2] G. Skjåk-Bræk. Alginate:biosyntheses and some structure-function relationships relevant to biomedical and biotechnological applications. *Biochemistry of Plant Polysaccharides*, 1992, 20: 27~33
- [3] I. Donati, A. Gamini, G. Skjåk-Bræk etc.. Determination of the diadic composition of alginate by means of circular dichroism: a fast and accurate improved method. *Carbohydrate Research*, 2003, 338: 1139 ~ 1142
- [4] H. Grasdalen, B. Larsen, O. Smidsrød. ^{13}C -NMR studies of monomeric composition and sequence in alginate. *Carbohydr. Res.*, 1981, 89: 179~191
- [5] H. Grasdalen. High-field ^1H -n.m.r. spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformation. *Carbohydr. Res.*, 1983, 118: 255~260
- [6] L. K. Jang, D. Nguyen, G. G. Geesey. Selectivity of Alginate Gel for Cu vs Co. *Water Res.*, 1995, 29: 307~313
- [7] A. David Rees, E. Jane Welsh. Secondary and Tertiary Structure of Polysaccharides in Solutions and Gels. *Angew.Chem. Int. Ed. Engl.*, 1977, 16: 214~224
- [8] R. Kohn. Ion binding on polyuronates-alginate and pectin. *Pure Appl. Chem.*, 1975, 42: 371~397
- [9] H. Arne. Ion Exchange Properties of Alginate Fractions. *Acta Chem. Scand.*, 1959, 13(6): 1250~1251
- [10] A. Haug, B. Larsen. Quantitative Determination of the Uronic Acid Composition of Alginates. *Acta Chem. Scand.* 1962, 16(8): 1908~1918
- [11] S. Cohen, E. Lobel, A. Trevigoda. A novel in situ-forming ophthalmic drug delivery system from alginates undergoing gelation in the eye. *Journal of Controlled Release*, 1997, 44: 201~208
- [12] 马萍, 孙淑英, 刘东春等. 海藻酸钠理化参数的测定. *中国海洋药物*, 2000, 19(3): 54~56
- [13] 黄来发, 洪文生, 黄恺. 食品增稠剂, 北京: 中国轻工业出版社, 2000, p.11~45
- [14] 黄知清, 严兴洪. 海藻研究开发的发展概述. *海洋技术*, 2002, 21(3): 22~25
- [15] 李来好, 陈培基, 李利东等. 海带膳食纤维的提取与功能性试验. *青岛海洋大学学报*, 2003, 33(5): 687~694
- [16] 王丽丽, 唐学玺, 王蒙等. 褐藻酸降解菌在海带绿烂病发生中的作用. *青岛海洋大学学报*, 2003, 33(2): 245~248

- [17] 江晓路, 刘岩, 胡晓珂等. *Vibrio* sp. 510 产褐藻胶裂合酶的底物专一性分析. 中国海洋大学学报, 2004, 34(1): 55~59
- [18] D. Mahaveer Kurkuri, G. Sangamesh Kumbar, M. Tejrj Aminabhavi. Synthesis and Characterization of Polyacrylamide-Grafted Sodium Alginate Copolymeric Membranes and Their Use in Prevaporation Separation of Water and Tetrahydrofuran Mixtures. *Journal of Applied Polymer Science*, 2002, 86: 272~281
- [19] 杨宇峰, 费修绶. 大型海藻对富营养化海水养殖区生物修复的研究与展望. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(1): 053~057
- [20] 姚勇, 雷富. 海洋高新技术产业化进程中产品标准的作用. 海洋技术, 2003, 22(4): 92~95
- [21] 秦嗣仁. 计量认证在海洋事业发展中的作用. 海洋技术, 2003, 22(4): 89~91, 96
- [22] 齐连明, 徐伟, 王连队. 加速海洋技术产业化探讨. 海洋技术, 2003, 22(1): 87~89
- [23] 姜山. 近几年海洋药物的临床应用与研究. 中国海洋药物, 2001, 20(1): 42
- [24] 施志仪. 海带褐藻糖胶的药理活性. 上海水产大学学报, 2000, 9(3): 268
- [25] 廖建民. 海带多糖中不同组分降血脂及抗肿瘤作用的研究. 中国药科大学学报, 2002, 33(1): 55
- [26] 詹林盛. 海带多糖的免疫调节作用. 中国生化药物杂志, 2001, 22(3): 116
- [27] Zvyagintseva, N. Tatiana. Inhibition of complement activation by water-soluble polysaccharides of some fareastern brown seaweeds. *Comp Biochem. Physiol, Part C: Toxicol Pharmacol*, 2000, 126(3): 209
- [28] X. J. Yan. Fucoxanthin as the Major Antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a commen Edible Seaweed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1999, 63(3): 605
- [29] 田晓华, 丛建波. 褐藻硫酸多糖清除活性氧自由基作用及动力学的ESR研究. 营养学报, 1997, 19(1): 32
- [30] 朱海波. 硫酸多糖抗血管平滑肌细胞增殖作用机理的研究进展. 中国海洋药物, 2001, 20(5): 35
- [31] 朱海波. 海洋硫酸多糖 DPS 对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响. 中国海洋药物, 2000, 19(2): 18
- [32] Muto, Shigeaki. Polysaccharides from marine algae and antiviral drugs containing the same as active ingredient. *Eur. Pat. Appl.* EP295956, 21 Dec 1988
- [33] 李凡. 褐藻糖胶体外抗病毒作用研究. 白求恩医科大学学报, 1995, 21(3): 255.
- [34] 李德远. 海带岩藻糖胶对小鼠的高胆固醇血症防治作用. 食品科学, 1999, 20(1): 45
- [35] 李福川. 三种海带多糖的降糖作用. 中国海洋药物, 2000, 19(5): 12
- [36] 纪明侯. 海藻化学, 北京: 科学出版社, 1997: p.208, p.296
- [37] 邓槐春. 海带多糖的药理作用. 中草药, 1987, 18(2): 15

- [38] 邓槐春. 海带多糖的放射防护和毒理效果. 中华放射医学与防护杂志, 1987, 7(1): 49
- [39] 彭波. 褐藻多糖硫酸酯的抗凝和纤溶活性. 中草药, 2001, 32(11): 1015
- [40] 刘志峰. 五种海藻多糖体外抗血小板聚集作用的观察. 中国海洋药物, 2001, 20(2): 36
- [41] 关美君, 林文翰, 丁源. 海洋药物-二十一世纪中国药学研究的热点. 中国海洋药物, 2001, 20(1): 1
- [42] H. Itoh, H. Noda. Antitumor activity and immunological properties of marine algae polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of phaeophyceae. *Anticancer Res.*, 1993, 13: 2045
- [43] 吴金华. 褐藻及褐藻胶的研究现状和进展. 盐城工学院学报, 1999, 12(4): 52
- [44] 杨为中. 藻酸双酯钠对眼睑黄色瘤的疗效评价. 临床眼科杂志, 1995, 3(3): 157
- [45] 刘莉. 藻酸双酯钠的临床新用途. 天津医学, 1996, 8(4): 27
- [46] J. H. Choi. Effects of sea tangle (*Laminaria japonica*) and fucoidan components on the attacks of oxygen radicals in kidney. *Journal of the Korean Fisheries Society*, 1999, 32(6): 758
- [47] J. H. Choi. Effects of sea tangle (*Laminaria japonica*) extract and fucoidan drinks on oxygen radicals and their scavenger enzymes in stressed mouse. *Journal of the Korean Fisheries Society*, 1999, 32(6): 764
- [48] C. H. Xue. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology*, 2001, 13: 67
- [49] 李兆杰. 低分子量海带岩藻聚糖硫酸酯的清除活性氧自由基和体内抗氧化作用. 水产学报, 2001, 25(1): 64.
- [50] 大连雅威特生物工程有限公司, 抗高血压低聚海藻酸盐技术, 国际专利, PCT/CN99/00202, 2004-07-14
- [51] 季宇彬, 李文举, 谷春山. 复方海藻多糖剂抗癌作用的实验研究. 中国海洋药物, 1994, 13(3): 20~24
- [52] M. E. David, Stancioff, Dirnithi et al.. Effect of acid hydrolysis on the molecular weight of kappa carrageenan by GPC-LS. *Carbohydr. Polym.* 1996, 31(1/2): 83
- [53] S. I. Nishimura, H. Kai, K. Shibada et al.. Regioselective syntheses of sulfated polysaccharides: specific anti-HIV-1 activity of novel chitin sulfates. *Carbohydrate Research*, 1998, 306: 427
- [54] R. Takano, S. Yoshikawa et al.. Sulfation of polysaccharides using monomethyl sulfate. *J Carbohydrate Chem.*, 1996, 15(14): 449
- [55] 郑俊民. 药用高分子材料学, 北京: 中国医药科技出版社, 2000, p.132
- [56] S. M. Morgan, A. Aymen, Shamkhani et al. Alginates to therapeutic agents containing primary amine groups. *International Journal of Pharmaceutics* 1995, 122: 121~128

- [57] D. E. Chickering III, J.S. Jacob, T.A. Desai. Bioadhesive microspheres: III, An in vivo transit and bioavailability study of drug-loaded alginate and poly(fumaric-co-sebacic anhydride) microspheres. *Journal of Controlled Release*, 1997, 48: 35~46
- [58] L. W. Chan, W. Paul, S. Heng. Effects of aldehydes and methods of cross-linking on properties of calcium alginate microspheres prepared by emulsification. *Biomaterials* 2002, 23: 1319~1326
- [59] M. Gonzalez, Ferreiro, L. Tillman et al.. Characterization of alginate/poly-L-lysine particles as antisense oligonucleotide carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 239: 47~59
- [60] T. Gilchrist, A. Martin. Wound treatment with Sorbsan®-an alginate wound dressing. *Biomaterials* 1994; 15: 317~320
- [61] 陆彬. 药物新剂型与新技术, 北京: 人民卫生出版社, 2002: p.260
- [62] V. R. Sinha, R. Kumria. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 224: 19~38
- [63] L. Yang, J. S. Chu, J. A. Fix. Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 235: 1~15
- [64] 张正全, 陆彬. 口服结肠定位给药系统. *中国药物杂志*, 2000, 35(1): 221~223
- [65] V. Pillay, R. Fassihi. In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract, I. Comparison of pH-responsive drug release and associated kinetics. *Journal of Controlled Release*, 1999, 59: 229~242
- [66] V. Pillay, R. Fassihi. In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract, II. Physicochemical characterization of calcium-alginate, calcium-pectinate and calcium-alginate-pectinate pellets. *Journal of Controlled Release*, 1999, 59: 243~256
- [67] A. Martinsen. Alginate as Immobilization Material: III. Diffusional Properties. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, 39: 186~194
- [68] B. Thu, P. Bruheim, T. Espevik et al.. Alginate polycation microcapsules, I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials*, 1996, 17(10): 1031~1040
- [69] F. Edwards-Lévy, M. C. Lévy. Serum albumin-alginate coated beads: mechanical properties and stability. *Biomaterials* 1999, 20: 2069~2084
- [70] L.W. Chan, H.Y. Lee, P.W.S. Heng. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 242: 274~282
- [71] L.W. Chan, Y.Lin, P.W.S. Heng. Cross-linking mechanisms of calcium and zinc in production of alginate microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 242: 255~258

- [72] M. Carin, D. Barthes-Biesel, F. Edwards-Lévy. Compression of Biocompatible Liquid-Filled HAS-Alginate Capsules: Determination of the Membrane Mechanical Properties. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 82(2): 207~212
- [73] H. Zimmermann, M. Hillgärtner, B. Manz. Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-, CLSM- and AFM-imaging. *Biomaterials* 2003, 24: 2083~2096
- [74] 陆彬. 药物新剂型与新技术, 北京: 人民卫生出版社, 2002, p.171
- [75] 陆彬. 药物新剂型与新技术, 北京: 人民卫生出版社, 2002, p.514
- [76] S. De, D. Robinson. Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-l-lysine-alginate nanospheres. *Journal of Controlled Release*, 2003, 89: 101~112
- [77] A. Schön, M. M. Ingaramo, E. Fretre. The Binding of HIV-1 protease inhibitors to human serum proteins. *Biophysical Chemistry*, 2003, 105: 221~230
- [78] Y. S. Choi, S. R. Hong, Y. M. Lee. Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge. *Biomaterials*, 1999, 20: 409~417
- [79] D. Thacharodi, K. P. Rao. Rate-controlling biopolymer membranes as transdermal delivery systems for nifedipine: development and in vitro evaluations. *Biomaterials*, 1996, 17: 1307~1311
- [80] 于传兴. 低分子量藻酸盐及其制备方法和用途, 中国专利, 99114615.8., 2003-11-30
- [81] H. Zheng, H. Zhang, Q. Zhang. Salt effects on the cross-linking mechanism of cupric-induced sol-gel transition in alginate solutions. *Carbohydrate Polymers*, 1998, 35: 215~221
- [82] I. S. Braccini, R. P. Grasso, S. Perez. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. *Carbohydrate Research*, 1999, 317: 119~130
- [83] 柴之芳, 祝汉民. 微量元素化学概论, 北京, 原子能出版社, 1994, 275
- [84] S.J.Lippard, J.M.Berg, 席振峰. 生物无机化学原理, 北京: 北京大学出版社, 2000: p.1
- [85] H.A.Schroeder; 陈荣三, 张祖喧译著. 微量元素与人. 科学出版社, 北京, 1979, p.42
- [86] S.J.Lippard, J.M.Berg, 席振峰. 生物无机化学原理, 北京: 北京大学出版社, 2000: p.14
- [87] H. Zheng, Q. Zhang. Critical behavior of viscosity for alginate solutions near the gelation threshold induced by cupric ions. *J.Chem.Phys.*, 1996, 105(17): 7746~7752
- [88] H. Zheng, K. Jiang. Solvent effects on sol-gel transition of alginate solutions by addition of cupric ions. *Chemical Physics*, 1996, 211: 507~513

- [89] J.B.Xu, J.P.Bartley. Preparation and characterization of alginate-carrageenan hydrogel films crosslinked using a water-soluble carbodiimide(WSC). *Journal of Membrane Science*, 2003, 218: 131~146
- [90] C. Hammann, A. Cooper, M. David et al.. Thermodynamics of Ion-Induced RNA Folding in the Hammerhead Ribozyme; An Isothermal Titration Calorimetric Study. *Biochemistry*, 2001, 40: 1423~1429
- [91] D. Thom, H. Gregor, T. Grant etc.. Characterisation of Cation Binding and Gelation of Poly-Uronates by Circular Dichroism. *Carbohydrate Research*, 1982, 100: 29~42
- [92] D. A. Rees. Polysaccharide Shapes and Their Interactions-Some Recent Advances. *Pure & Appl. Chem.*, Vol.53, 1~14
- [93] 鲁子贤, 催涛, 施庆洛. 圆二色性和旋光色散在分子生物学中的应用, 北京: 科学出版社, 1987, 2
- [94] 刘海洋, 应晓, 胡希明等. 苯丙氨酸桥联金属双卟啉的诱导圆二色光谱研究. *光谱学与光谱分析*, 2000, 20(4): 495~497
- [95] 张汉威, 蔡晴, 贝建中等. 包埋于 PLGA 膜中的 BSA 海藻酸钙微球的制备及其释放行为. *高分子学报*, 2004, 3: 454~457
- [96] 刘育, 尤长城, 张衡益. 超分子化学—合成受体的分子识别与组装. 天津: 南开大学出版社, 2003, p.598~603
- [97] 项瑾, 梁毅, 陈楠. 等温滴定量热法和荧光滴定法研究十二烷基硫酸钠与纤维素酶的结合. *化学学报*, 2003, 61(12): 1949~1954
- [98] 焦铭, 梁毅, 李洪涛等. 脲和盐酸胍诱导过氧化氢酶去折叠的研究. *化学学报*, 2003, 61(9): 1362~1368
- [99] 赖兵, 李颖, 来鲁华. 古细菌 RNase H II 与金属离子结合的热力学研究. *物理化学学报*, 2001, 17(10): 865~867
- [100] J. E. Ladbury, B. Z. Chowdhry. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. *Chemistry&Biology*, 1996, 3: 791~801
- [101] 刘育, 尤长城, 张衡益. 超分子化学—合成受体的分子识别与组装. 天津: 南开大学出版社, 2003, p.501
- [102] 张强, 李莉, 刘育. 新型臂式氮杂冠醚的合成及其多价螯合的热力学特征. *化学学报*, 2004, 62(5): 514~517
- [103] B. Amsden. Diffusion characteristics of calcium alginate gels. *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, 65: 605-610
- [104] K.S. Hairou, W. M. Gethami, R.M.Hassan. Kinetics and mechanism of sol-gel transformation between sodium alginate polyelectrolyte and some heavy divalent metal ions with formation of capillary structure polymembranes ionotropic gels. *Journal of Membrane Science*, 2002, 209: 445~456
- [105] J.E.Leffler. Kinetics of ion exchange on resin exchangers. *J.Org.Chem.*, 1955, 20: 1202

- [106] 刘育, 尤长城, 张衡益. 超分子化学—合成受体的分子识别与组装. 天津: 南开大学出版社, 2003, p.506
- [107] 刘育, 尤长城, 张衡益. 超分子化学—合成受体的分子识别与组装. 天津: 南开大学出版社, 2003, p.564
- [108] 纪明侯. 海藻化学, 北京: 科学出版社, 2004, p.264~265
- [109] E. R. Morris, D. A. Rees, D. Thom. Characterization of Polysaccharide Structure and Interactions by Circular Dichroism: Order-Disorder Transition in the Calcium Alginate System. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communication*, 1973, (7): 245~6
- [110] 鲁子贤, 催涛, 施庆洛. 圆二色性和旋光色散在分子生物学中的应用. 北京: 科学出版社, 1987, p.17
- [111] J.N.Liang, E.S.Stevens. Spectroscopic Origin of Conformation-Sensitive Contributions to Polysaccharide Optical Activity: Vacuum-Ultraviolet Circular Dichroism of Agarose. *Biopolymers*, 1979, 18: 327~333
- [112] 朱盈权, 李俊义. 实用分析化学, 成都: 四川人民出版社, 1981, p.289
- [113] Z. Wang, Q. Zhang, M. Konno et al.. Sol-gel Transition of Alginate Solution by the Addition of Various Divalent Cations: ^{13}C -NMR Spectroscopic Study. *Biopolymers*, 1993, 33: 703~711
- [114] 纪明侯. 海藻化学, 北京: 科学出版社, 2004, p.241~242
- [115] 纪明侯. 海藻化学, 北京: 科学出版社, 2004, p.261
- [116] 纪明侯. 海藻化学, 北京: 科学出版社, 2004, p.250
- [117] 何曼君, 陈维孝. 高分子物理, 上海: 复旦大学出版社, 1990, p.129~132
- [118] 何曼君, 陈维孝. 高分子物理, 上海: 复旦大学出版社, 1990, p.178~179
- [119] 何曼君, 陈维孝. 高分子物理, 上海: 复旦大学出版社, 1990, p.123
- [120] 刘育, 尤长城, 张衡益. 超分子化学—合成受体的分子识别与组装. 天津: 南开大学出版社, 2003, p.615~616
- [121] P.Aslani, R.A.Kennedy. Effect of gelation condition and dissolution media on the release of paracetamol from alginate gel beads. *Int.J.Pharm.*, 1996, 79: 11-19
- [122] I.C.M. Dea, A. Morrisom. The interaction of some polysaccharides. *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.*, 1975, 31: 241
- [123] J.N.Liang, E.S.Stevens. Spectroscopic origin of conformation-sensitive contributions to polysaccharide optical activity: Vacuum-ultraviolet circular dichroism of agarose. *Biopolymers*, 1979, 18: 327~333
- [124] U.Lin, M.T.Pillay. *International Review of Science, Organic Chemistry Series 2*, Vol.7, Carbohydrates, London: Butterworths, 1976: 283
- [125] S.Arnott, W.E.Scott, D.A.Rees. Characterization of sodium alginate and poly(vinyl alcohol) blend membranes. *J.Mol.Biol.*, 1974, 90: 253~267
- [126] H. C. Wu, A.Sarko. Stoichiometric evidence of a specific dimerisation process in alginate gelation. *Carbohydr. Res.*, 1978, 61: 27~40

- [127] E.D.T. Atkins, I.A. Nieduszynski. ^{13}C -NMR Spectroscopic study of alginate solution. *Biopolymers*, 1973, 12: 1865~1879
- [128] W. Mackie. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. *Biochem. J.*, 1978, 125: 89
- [129] T.A. Bryce, A.A. McKinnon, E.R. Morris. Chain conformations in the sol-gel transitions for polysaccharide systems, and their characterization by spectroscopic methods. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 1974, 57: 221
- [130] 周祖康, 顾惕人, 马季铭. 胶体化学基础, 北京: 北京大学出版社, 1996, p.318~329
- [131] 宋世谟, 王正烈, 李文斌. 物理化学(下册), 北京: 高等教育出版社, 1995, p.449~454
- [132] B. Thu, P. Bruheim, T. Espevik. Alginate polycation microcapsules. *Biomaterials*, 1996, 17(11): 1069~1079
- [133] J.D. Sherwood, F. Risso. Rates of transport through a capsule membrane to attain Donnan equilibrium. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, 263, 202~212
- [134] J.D. Sherwood, B. Craster. Transport of Water and Ions Through a Clay Membrane. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2000, 230, 349~358
- [135] L.K. Jang, G.G. Geesey. Sorption Equilibrium of Copper by Partially-Coagulated Calcium Alginate Gel. *Chem. Eng. Comm.*, 1990, 94, 63~77
- [136] K. Nakamura, T. Hatakeyama. Formation of the Glassy State and Mesophase in the Water-Sodium Alginate System. *Polymer Journal*, 1991, 23(4): 253~258
- [137] O. Smidesrod, A. Haug. The effect of divalent metal on the properties of alginate solution I calcium ion. 1965, 19: 329~340
- [138] C. Xiao, S. Gao, L. Zhang. Blend films from konjac glucomannan and sodium alginate solutions and their preservative effect. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2000, 77: 617~626
- [139] Z. Zhang, G. Yu, H. Guan et al.. Preparation and structure elucidation of alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase from *Vibrio* sp. 510. *Carbohydrate Research*, 2004, 339, 1475~1481
- [140] Y. Matsubara, K. Iwasaki, T. Muramatsu. Action of poly(α -L-gulonate)lyase from *Corynebacterium* sp. ALY-1 strain on saturated oligogulonates. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1998, 62, 1055~1060
- [141] J. Boyd, J. R. Turvey. Structure Studies of Alginic Acid, Using a Bacterial Poly- α -L-gulonate Lyase. *Carbohydrate Research*, 1978, 66, 187~194

发表论文和参加科研情况

发表论文情况:

- 1、海藻酸作为活性药物和新型药物转载体的开发，海洋技术，印刷中

附录 主要符号说明

普朗克常数 $h = 6.626068 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg} / \text{s}$

1ev=1 电子伏特 $= 1.60217646 \times 10^{-19} \text{ 焦耳}$

ITC: 等温滴定量热 (isothermal titration calorimetry)

CD: 圆二色谱 (circular dichroism)

M: 甘露糖醛酸单元

G: 古洛糖醛酸单元

COSY: 相关二维核磁共振谱

HMBC: 异核多量子相关谱

HSQC: 异核单量子相关谱

θ : 圆二色 CD 中的椭圆值

$[\theta]$: 摩尔椭圆值, 单位是 $\text{度} \cdot \text{厘米}^2 \cdot \text{分摩尔}^{-1}$

f ; 离子与海藻酸钠上羧基的摩尔比

致 谢

感谢导师何志敏教授给了我这次接受博士教育的机会。导师对科学前沿的准确把握,用简洁语言、宽容作风对学生高标准的科研要求,以前总体体会不到,随着自己科研能力的提高,才明白导师早已把成功经验告诉了自己,只是自己没领会。阅读完导师主编的《2001年天津青年科技论坛集萃》,受益匪浅,感到应向导师学习的地方很多。导师举重若轻、切中要害的科研管理方法,更是作者一生当中应该学习的榜样。当自己在科研上走弯路时,导师总是留给作者充足的时间去改正,并引导作者重新走上正确的科研思路。在此谨向导师致以崇高的敬意与衷心的感谢。导师的言传身教将使作者受益终生。导师倾全力对年青人才的培养和不拘一格、大胆创新的教育方式更让作者佩服,使作者受到了熏陶并提高了自身整体素质。

南开大学刘育教授在百忙中对作者的指导和思维启发,使我受益匪浅,刘老师对科学的勤奋钻研和勇攀高峰的精神使作者钦佩。

感谢何明霞老师对作者课题上的关心和帮助。感谢课题组齐崴老师、王康老师在实验上的帮助。

感谢南开大学化学系李晓云博士在量热实验上的帮助和有益讨论;中国海洋大学张真庆博士对作者海藻酸钠水解实验和结构表征给予了密切合作,使得实验能够在外地顺利实施,在此表示感谢。

感谢范江洋、周泽乾、苏荣欣、刘瑞、贾辰熙、杨皓明等同学给予了作者多方面的支持;南开大学的南晶老师,天津大学的丁春生老师、靳风民、贲宇恒、乔斌对作者实验给予了很多帮助,在此一并表示感谢。感谢北京生物物理所周淑华老师在核磁实验上的帮助。

李红兵

2005年12月于北洋园