

高脱乙酰度低分子量壳聚糖的制备与鉴定

张刘珍 许玉杰 刘敏 翁婉雯 丁文秀 杨占山

(苏州大学医学部放射医学与公共卫生学院 苏州 215123)

摘要 本工作先用强碱洗脱法提高原料壳聚糖的脱乙酰度,再通过 ^{60}Co γ 辐射降解降低壳聚糖的分子量,并用线性电位滴定法测定经强碱洗脱法处理过的壳聚糖脱乙酰度的变化,用乌氏粘度计法测定经 ^{60}Co γ 辐射降解后的壳聚糖分子量的改变,并用傅立叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectrometer, FT-IR)对产物进行了表征分析。结果表明,强碱洗脱法能有效提高壳聚糖的脱乙酰度, ^{60}Co γ 辐射降解法能迅速降低壳聚糖的分子量,获得的产物能够满足研制体内污染放射性核素的纳米型促排剂的要求。

关键词 壳聚糖,脱乙酰度,分子量,红外光谱

中图分类号 O636.9, O644.29

甲壳素(Chitin, CT)是由N-乙酰-2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖以 β -1, 4糖苷键连接而形成的天然多糖,而壳聚糖(Chitosan, CTS)是甲壳素经脱乙酰化处理后即N-脱乙酰化的产物,是自然界中唯一的碱性多糖^[1]。壳聚糖中的氨基含量即脱乙酰度决定其物理化学特性和应用,壳聚糖脱乙酰度的高低直接关系到它在稀酸中的黏度、溶解度、螯合金属离子的性能以及与氨基有关的化学反应能力^[2]。降解的低聚壳聚糖在食品、医药等领域具有广泛的用途,已被欧美各国誉为除蛋白质、脂肪、糖类、纤维素和矿物质之外人体所需的第六大生命要素^[3]。研究表明,壳聚糖具有抗菌、抗肿瘤、降血脂、降胆固醇、增强免疫功能等多种生物活性功能,而且具有亲水性、生物相容性、生物可降解性等特性,但是不同分子量壳聚糖的性质差异很大,有时甚至表现出截然相反的特性,而生物应用壳聚糖的独特功能只有在其分子量降低到一定程度时才表现出来^[4]。壳聚糖分子内所含有的氨基,可以螯合金属离子,氨基越多,螯合金属离子的能力越强。因此,通过必要的手段和方法增加壳聚糖的脱乙酰度,提高游离氨基的含量,是利用壳聚糖研制金属离子促排剂的关键问题。同时,壳聚糖的分子量通常在几十万到几百万,分子结构紧密,其水溶性不佳,影响使用;并且由于分子量大,不能通过各种生物膜和生物屏障,无法直接用于体内金属离子的促排,特别无法将已经进入细胞内的放射性核素螯合并排

出体外。将低分子量壳聚糖的N-酰化反应产物通过特定的方法形成纳米粒之后,应用于体内有望利用纳米粒的纳米生物效应透过生物屏障和细胞膜,促进体内甚至细胞内的放射性核素的排出,切实解决军事及工业中的放射性核素体内污染问题;而且低分子量壳聚糖本身比高分子量壳聚糖有更明显的抗自由基的优势^[5],可以在促排的同时产生抗辐射的作用。采用辐射降解法制备低分子量壳聚糖节省能源、无环境污染、生产可控性好,经辐射降解后可得到均一性较好的产品,且生物相容性不受影响,比传统方法更具优势^[4]。

1 实验设备材料

1.1 仪器

温度指示控制仪(WMZK-01 上海医用仪表厂)、电压调整器(TDGC2/0.5 苏州电压调整器厂)、电子天平(FA 1004 上海天平仪器厂)、恒温磁力搅拌器(DF-II 金坛市医疗仪器厂)、低速大容量离心机(RJ-LD-IIB 德国)、真空冷冻干燥机(美国Labconco公司)、磁力搅拌子、圆底烧瓶、硅油浴缸、球型冷凝管、数字式酸度计(PHS-3TC 上海天达仪器有限公司)、红外快速干燥箱(WS70-1 巩义市英峪予华仪器厂)、恒温磁力搅拌器(DF-II 金坛市医疗仪器厂)、磁力搅拌子、碱式滴定管、 ^{60}Co 辐射源、砂芯漏斗(4#)、抽滤瓶、乌氏粘度计及恒

国防科研基础研究项目(A3820060138)资助

第一作者:张刘珍,女,1982年3月出生,2006年毕业于苏州大学医学部放射医学与公共卫生学院放射医学系,现为放射医学专业在读硕士研究生

通讯联系人:许玉杰

收稿日期:初稿 2008-10-28, 修回 2008-12-08

温水浴缸（上海博鑫科技有限公司）、微型超声波清洗机（上海杰恩普超声设备有限公司）、温度计、秒表、砂芯漏斗（4#）、抽滤瓶、循环水式真空泵（SHZ-DA 巩义市英峪予华仪器厂）。

1.2 试剂

壳聚糖（ $M_w=185$ 万 $DD=64.79\%$ 青岛海普生物技术有限公司）、盐酸（AR）、氢氧化钠（AR）、冰乙酸（AR）、醋酸钠（AR）、氢氧化氨（ $NH_3 \cdot H_2O$ AR）均购自国药集团化学试剂有限公司。

2 实验方法

2.1 高脱乙酰度壳聚糖的制备

采用高温强碱洗脱的方法提高壳聚糖的脱乙酰度^[6]，将 20 g CTS 混匀于浓度为 200 mL 40 % NaOH 溶液中，在 120 °C 搅拌反应 60 min 之后先以 3000 r/min，离心 5 min，再用去离子水洗涤，并抽滤至滤液为中性；重复上述步骤两次，然后真空冷冻干燥。

2.2 壳聚糖脱乙酰度的鉴定

采用线性电位滴定法测定壳聚糖的脱乙酰度^[7,8]，将线性电位滴定法测得的 V-pH 数值代入公式（1）

$$f(v)=(V_0+V)/([H^+]-[OH^-])/N_B \quad (1)$$

式中， V 为滴定液的体积（mL）； V_0 为被滴定液的体积（mL）； N_B 为滴定液的当量浓度； $[H^+]$ 为 H^+ 的浓度； $[OH^-]$ 为 OH^- 的浓度。以 $f(v)$ 为纵坐标， V 为横坐标作图，直线外推与横坐标交点即为滴定终点时所需滴定液的体积 V_2 ，代入公式（2）

$$NH_2\%=[(C_1V_1-C_2V_2) \times 0.016/G] \times 100\% \quad (2)$$

式中， C_1 ：盐酸标准溶液的浓度(mol/L)； C_2 ：氢氧化钠标准溶液的浓度(mol/L)； V_1 ：盐酸标准溶液的体积(mL)； V_2 ：氢氧化钠标准溶液的体积（mL）； G ：样品的恒量(g)；0.016：与 1 mL 1mol/L 盐酸溶液相当的氨基量(g)，求出 $NH_2\%$ ；再将 $NH_2\%$ 代入公式（3）

$$DD=NH_2\%/9.94\% \quad (3)$$

9.94 %：脱乙酰度为 100 % 的壳聚糖的理论氨基含量，求出壳聚糖的脱乙酰度 DD 。

2.3 低分子量壳聚糖的制备

文献[9]报道，采用辐射降解的方法降低壳聚糖的分子量，将壳聚糖溶解于 2%醋酸溶液中，以 ^{60}Co γ 射线照射，剂量率为 30 Gy/min，总剂量分别为 50 kGy、100 kGy、150 kGy、200 kGy 辐照之后，产物经真空冷冻干燥，再作进一步的鉴定。

2.4 壳聚糖分子量的测定

采用乌氏粘度计法测定分子量^[10]，以 0.2 mol/L CH_3COOH 和 0.1 mol/L CH_3COONa 为溶剂，在 (30 ± 0.5) °C 的恒温水浴中测定壳聚糖的分子量，通过下面公式计算出特性黏度 η 。

$$\eta=(\eta_{sp}+3l n \eta_r)/4c$$

式中，相对黏度 $\eta_r=t/t_0$ ，增比黏度 $\eta_{sp}=\eta_r-1$ ， c 为壳聚糖溶液浓度，再根据 Mark-Houwink 方程 $\eta=KM^\alpha$ 推算出壳聚糖的黏均分子量 M ，其中 $K=1.64 \times 10^{-30} \times DD^{14}$ ， $\alpha=-1.02 \times 10^{-2} \times DD+1.82$ ^[11]。

2.5 壳聚糖红外光谱分析

傅立叶红外光谱仪，固体样品干燥后，与 KBr 粉末混合研磨、压片，纯 KBr 片作参比，1 cm^{-1} 分辨率，16 次扫描累积。

3 实验结果与讨论

3.1 壳聚糖脱乙酰度的鉴定

采用线性电位滴定法分别测定市售原料壳聚糖（CTS0）、经第一次提高脱乙酰度壳聚糖（CTS1）与经第二次提高脱乙酰度壳聚糖（CTS2）的脱乙酰度，结果如表 1 所示：

Table 1 Determining chitosan's degree of deacetylation (DD) by linear potentiometric titration

Samples	DD / %
CTS0	64.79
CTS1	81.09
CTS2	96.65

从表 1 中可见，经过两次高温强碱洗脱法，成功地将市售原料壳聚糖（CTS0）的脱乙酰度由 64.79 % 最终提高到 96.65 %。采用间歇的强碱洗脱法可以更有效地提高壳聚糖的脱乙酰度，因为在反应过程中，生成副产物 CH_3COONa ，间歇洗脱相当于分次去除生成的副产物，使反应更快地向生成目

的产物的方向进行, 最终得到高脱乙酰度壳聚糖。本实验用线性电位滴定法测定壳聚糖的脱乙酰度, 在测定过程中, 虽然增加盐酸用量可以加快壳聚糖的溶解速度, 但并非加入得越多越好。因为壳聚糖在酸性溶液中会发生降解而消耗一定的盐酸, 最终使氢氧化钠滴定体积减少, 计算结果因其测定方法偏高。

3.2 提高壳聚糖脱乙酰度的前后的红外光谱分析

将脱乙酰前后的壳聚糖进行红外光谱扫描, 结果如图1所示。壳聚糖脱乙酰前后的红外光谱表明, 壳聚糖骨架的峰型不变, 3430 cm^{-1} 左右为壳聚糖上 $-\text{OH}$ 和 $-\text{NH}_2$ 的特征吸收峰, 2878 cm^{-1} 左右的吸收峰是由 $-\text{CH}_2-$ 的伸缩振动所引起, 1154 cm^{-1} 为 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 伸缩振动吸收峰, 897 cm^{-1} 左右的吸收峰是由呋喃糖环振动引起的^[12], 这些吸收峰位置和强度均未见明显变化。原料壳聚糖 CTS0 上有明显的酰胺键特征吸收峰 1645 cm^{-1} , 说明脱乙酰度不够高, 从线性电位滴定法所测得的结果看, 只有 64.79 %; 经第一次提高脱乙酰度之后, 红外图谱上出现了游离伯氨基的特征峰 1591 cm^{-1} , 但仍有部分酰胺键的吸收峰 1623 cm^{-1} , 说明仍有相当部分乙酰基未被脱掉, 从线性电位滴定法所测得的结果看, 脱乙酰度已提高到 81.09 %; 再次提高脱乙酰度后, 红外图谱上出现了典型的游离伯氨基的特征峰 1599 cm^{-1} , 已看不到酰胺键的吸收峰, 从线性电位滴定法所测得的结果看, 脱乙酰度已提高到 96.65 %, 说明获得的产物是高脱乙酰度的壳聚糖。

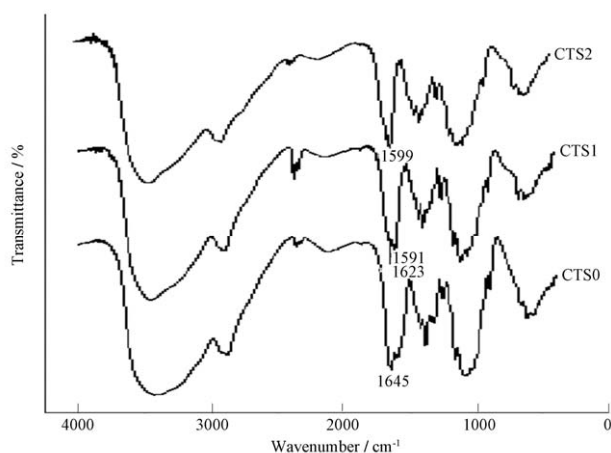


Fig.1 IR of chitosan with different DD
CTS0: DD=64.79 %; CTS1: DD=81.09 %; CTS2: DD=96.65 %

3.3 壳聚糖分子量的鉴定

将提高脱乙酰度后的壳聚糖采用不同剂量 ^{60}Co γ 辐射降解之后, 用乌氏粘度计测定其分子量的变

化, 作出分子量变化情况与辐射剂量之间的关系图, 结果如图2所示。

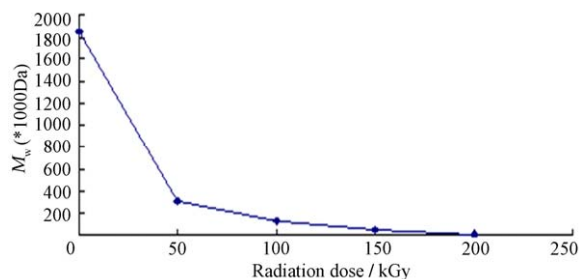


Fig.2 Molecular weights (M_w) of chitosan samples irradiated with different doses

从图2中可以看到, 随着辐射剂量的提高, 壳聚糖的分子量明显下降。这与文献[13]的报道相一致。在本实验中, 50 kGy 就能显著地降低分子量, 由原来的 1850kDa 降至 300 kDa, 再提高剂量分子量降低的趋势较为平缓, 剂量从 100 kGy 提高到 150 kGy 再到 200 kGy, 分子量从 120 kDa 降低至 48 kDa, 最终降至 2.5 kDa, 获得的产物能够满足进一步实验的需要。目前, 壳聚糖降解的主要传统方法包括: 化学降解法、酶降解法、氧化降解法和物理降解法。其中, 化学降解法存在着成本高、产量低、酸残留液需处理等诸多缺点; 酶降解法也有诸如降解过程缓慢, 无法大批量工业化生产等问题; 氧化降解法条件复杂多变, 反应的稳定性和重复性较差; γ 辐射降解法是当前新型的、经济可行的物理降解法之一, 用其制备低聚壳聚糖无环境污染且生产可控性好, 因此比传统方法更有优势^[14]。由于壳聚糖在溶液中的辐射降解速度远大于在固体状态下降解的速度^[15], 故而先将壳聚糖用 2 % 醋酸溶解之后再行辐照。采用 ^{60}Co γ 射线辐射处理壳聚糖, 能有效控制壳聚糖的降解程度, 而且无外加试剂污染。固体辐照壳聚糖降解速率比溶液体系辐照降解慢的原因是溶液体系辐照时有直接和间接两种作用, 而固体辐照仅有直接作用。在固态下辐照, 由于壳聚糖的分子链没有充分地打开, 不利于射线对其分子链的轰击, 需要非常高的剂量才能得到较低分子量的壳聚糖, 而在 2% 醋酸水溶液中, 由于水的存在, 产生了大量的羟基自由基, 进攻壳聚糖的糖苷键, 提高了分子的降解速率^[12]; 同时也由于壳聚糖分子链膨胀并伸展, 使降解加速, 在较低剂量下即可得到低分子量的壳聚糖。

3.4 降低壳聚糖分子量前后的红外光谱鉴定

将经各剂量辐射降解之后的壳聚糖进行红外光谱分析, 结果如图3所示。

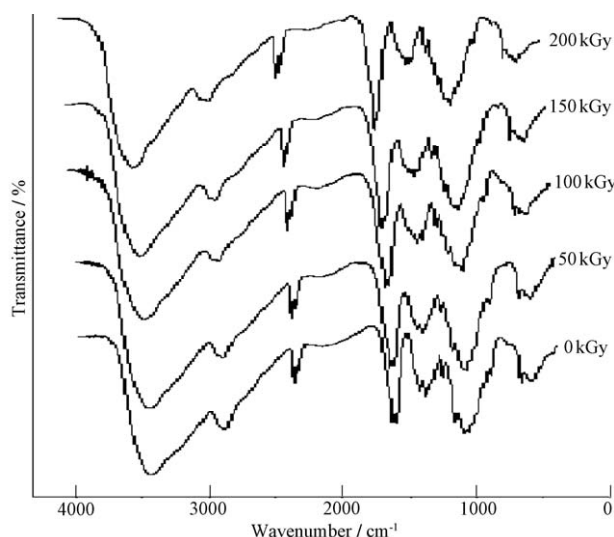


Fig.3 IR of chitosan samples irradiated under different doses

从图3中可以看出,辐射降解前后所得不同分子量壳聚糖在 3375 cm^{-1} 、 2875 cm^{-1} 、 1595 cm^{-1} 、 1419 cm^{-1} 、 1382 cm^{-1} 、 1321 cm^{-1} 、 1154 cm^{-1} 、 1076 cm^{-1} 、 1032 cm^{-1} 都能看到明显的红外吸收峰, 3375 cm^{-1} 为O-H伸缩振动,N-H伸缩振动, 2875 cm^{-1} 为C-H伸缩振动, 1595 cm^{-1} 为N-H变形谱带(酰胺II谱带), 1419 cm^{-1} 为 CH_2 弯曲振动, CH_3 变形振动, 1380 cm^{-1} 为 CH_3 对称变形振动,CH弯曲振动, 1319 cm^{-1} 为C-N伸缩振动(酰胺III谱带), CH_2 摇摆振动, 1154 cm^{-1} 为C-O-C不对称氧桥伸缩振动, 1078 cm^{-1} 为C-O二级醇羟基吸收峰, 897 cm^{-1} 为环状结构振动吸收峰,这些吸收峰均来自壳聚糖主链环状结构^[16]。在辐射降解前后,这些吸收峰的位置与强度均没有明显变化。此外,在辐射降解前后都可在 897 cm^{-1} 处发现稳定的红外吸收峰,这是壳聚糖环状结构的振动吸收特征峰^[16]。由此表明,辐射降解前后,壳聚糖的化学结构变化不大,壳聚糖主链仍为环状结构。这一结论与文献[17]中的报道一致。

4 结论

本实验用高温强碱洗脱法将壳聚糖的脱乙酰度由64.79%提高到96.65%,再用 ^{60}Co γ 辐射降解法将壳聚糖的分子量由1850 kDa降至2.5 kDa,而且通过红外光谱分析证实经辐射降解后壳聚糖的结构没有明显变化,成功制备了高脱乙酰度、低分子量的壳聚糖,为进一步研制新型体内污染放射性核素促排药物提供了条件。

参考文献

- 1 Jac-Young Je, Se-Kwon Kim. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2006, **14**(17): 5989-5994
- 2 陈振宁, 郭慎满. 化学通报, 1990, (10): 42-43
CHEN Zhenning, GUO Shenman. *Chemistry*, 1990, (10): 42-43
- 3 翟茂林, 林琳, 李久强, 等. 高分子通报, 2001, (4): 45-50
ZHAI Maolin, LIN Lin, LI Jiuqiang, *et al.* *Polymer Bulletin*, 2001, (4): 45-50
- 4 吴孝怀, 朱南康. 中国血液流变学杂志, 2007, **17**(1): 163-166
WU Xiaohuan, ZHU Nankang. *China Haemorheology Journal*, 2007, **17**(1): 163-166
- 5 Rong Xing, Song Liu, Zhanyong Guo, *et al.* *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2005, **13**(5): 1573-1577
- 6 王宏昌, 孙晓飞. 中国海洋药物杂志, 2007, **1**(26): 16-19
WANG Hongchang, SUN Xiaofei. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2007, **1**(26): 16-19
- 7 范金石, 陈国华, 孙明昆, 等. 青岛海洋大学学报, 2002, **32**(2): 296-300
FAN Jinshi, CHEN Guohua, SUN Mingkun, *et al.* *Qingdao Mar Univ Proc*, 2002, **32**(2): 296-300
- 8 柯火仲, 陈庆绸. 化学通报, 1990, (10): 44-46
KE Huozhong, CHEN Qingchou. *Chem*, 1990, **10**: 44-46
- 9 Won-Seok Choi, Kil-Jin Ahn, Dong-Wook Lee, *et al.* *Polymer Degradation and Stability*, 2002, **78**(3): 533-538
- 10 Ismail Zainol, Hazizan Md Akil, Azreena Mastor. *Materials Science and Engineering C*. 2009, **29**(1): 292-297
- 11 Chen R H, Hwa H D. *Carbohydrate Polymers*, 1996, **29**(4): 353-358
- 12 Bin Kang, Yao-dong Dai, Hai-qian Zhang, *et al.* *Polymer Degradation and Stability*, 2007, **92**(3): 359-362
- 13 Tao Feng, Yumin Du, Jin Li, *et al.* *Carbohydrate Polymers*, 2008, **73**(1): 126-132
- 14 Choi W S, Ahn K J, Lee D W, *et al.* *Polymer Degradation and Stability*, 2002, **78**(3): 533-538
- 15 Naotsugu Nagasawa, Hiroshi Mitomo, Fumio Yoshii, *et al.*

- Polymer Degradation and Stability, 2000, **69**(3): 279-285
- 16 蒋挺大. 壳聚糖. 北京: 化学工业出版社, 2007. 21-29
- JIANG Tingda. Chitosan. Beijing: Chemistry and Chemical Engineering Publishing Company, 2007. 21-29
- 17 Tolaimatea A, Desbrieresb J, Rhazia M, *et al.* Polymer, 2003, **44**(26): 7939-7952

Preparation and characterization of chitosan with low molecular weight and high degree of deacetylation

ZHANG Liuzhen XU Yujie LIU Min WENG Wanwen DING Wenxiu YANG Zhanshan

(School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT The elution with sodium hydroxide was used to increase deacetylation (DD) degree of chitosan and ^{60}Co γ -irradiation was applied to decrease its molecular weight. The change of chitosan's degree of deacetylation (DD) was determined by linear potentiometric titration, and the change of molecular weight was measured by Ubbelohde Viscometer. Fourier transform infrared spectrometer was utilized to characterize and analyze the products. The result indicates that sodium hydroxide elution could increase deacetylation (DD) degree of chitosan efficiently and ^{60}Co γ -rays irradiation could decrease its molecular weight remarkably. The products may be satisfied with the preparation of new nano-chelating agents.

KEYWORDS Chitosan, Degree of deacetylation (DD), Molecular weight, IR

CLC O636.9, O644.29