

# 壳聚糖氧化降解制备壳寡糖的研究

郑必胜<sup>1,2</sup>, 周萌<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 广州现代产业技术研究院 广东广州 510640)

**摘要:** 本文将脱乙酰度为 96.7% 的壳聚糖 (COS) 通过过氧化氢氧化降解制取壳寡糖, 通过单因素变量的研究以及正交实验得出最优反应条件为: 反应温度 60 °C, 反应时间 6 h, 过氧化氢质量分数 4.0%, 乙酸质量分数 4.0%, 且四个因素对降解程度的影响为反应温度 > 过氧化氢质量分数 > 乙酸质量分数 > 反应时间。通过凝胶渗透色谱 (GPC) 对原料壳聚糖及最优条件下得到的降解产物的分子量分布进行检测, 结果表明壳聚糖已完全降解且相对分子量达 2000 以下, 降解产物经电喷雾质谱 (ESI-MS) 检测分析得聚合度为 10 以下, 在控制降解的范围内, 达到制备目的。

**关键词:** 壳聚糖; 降解; 过氧化氢; 壳寡糖

文章编号: 1673-9078(2012)8-959-963

## Oxidation Degradation of Chitosan for Preparation of Oligochitosan

ZHENG Bi-sheng<sup>1,2</sup>, ZHOU Meng<sup>1</sup>

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Modern Industrial Technology Research Institute, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Chitosan (COS) with 96.7% deacetylation degree was degraded oxidatively by hydrogen peroxide in order to prepare oligochitosan with polymerization. The optimal reaction conditions were discussed by means of some single factor experiments and orthogonal experiments. COS was dissolved in 4.0% acetic acid with 4.0% hydrogen peroxide at 60 °C shaking for 6 hour. The distribution of COS and the degraded COS under optimal conditions were analyzed by gel permeation chromatography (GPC). The results showed COS had been completely degraded with the molecular weight being below 2000. The polymerization degree of degraded COS was below 10 after been detected and analysed by electro-spray ionization mass spectrometry (ESI-MS), which was in the control range of degradation.

**Key words:** chitosan; degradation; hydrogen peroxide; oligochitosan

壳聚糖是天然糖中唯一大量存在的碱性氨基多糖<sup>[1]</sup>, 壳寡糖是其降解产物, 它由氨基葡萄糖单体以  $\beta$ -(1,4)-氨基糖苷键缩合而成, 作为一种性能优良的可生物降解的高分子材料, 壳寡糖具有抗消化性溃疡、降血糖血脂、抗辐射、诱导干扰素产生、促进血功能恢复, 以及促进蛋白质和核酸的生物合成等方面的生物活性, 应用十分广泛<sup>[2]</sup>; 且聚合度 2~3 的壳寡糖具有非常爽口的甜味, 又由于其降血糖的生理功能, 安全性能高, 可作为糖尿病人的可食甜味剂, 聚合度 4~7 的壳寡糖具有抑制癌细胞生长和转移的效果, 作为肿瘤放疗的辅助性药物, 能有效提高人体抗肿瘤免疫功能, 对细胞分裂具有调节作用<sup>[3]</sup>。正是由于壳寡糖在医药<sup>[4]</sup>、保健食品<sup>[5]</sup>、农业<sup>[6]</sup>和化妆品<sup>[7]</sup>方面显示其特异功能, 越来越被人们所重视, 对其制备方法的研究也越来越多。

收稿日期: 2012-05-18

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目 (2008B090500190)

作者简介: 郑必胜 (1966-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 糖类物质及其药物制备

目前国内外研究壳聚糖降解的方法主要有: 化学法、物理法、酶解法以及三种降解法派生出的复合降解法。李艾华等<sup>[8]</sup>自制酸性蛋白酶粗酶液降解壳聚糖, 研究了降解过程中温度、pH 值、反应时间、酶用量及壳聚糖脱乙酰度 (D.D) 对酶降解能力的影响; 邓倩莹<sup>[9]</sup>等以溶菌酶和过氧化氢为催化剂研究了壳聚糖降解速率的变化, 得到利用溶菌酶可以大大提高壳聚糖的降解速率; 何日安<sup>[10]</sup>等人则采用臭氧降解法制备壳低聚糖; 罗平<sup>[11]</sup>通过混合氧化剂  $H_2O_2$ -NaClO 来氧化降解壳聚糖在  $H_2O_2$  1%~4%, NaClO 1%~3%, 反应温度 40~90 °C, 反应时间 1~4 h, 得到产品收率和外观质量都比较好; 曾虹燕<sup>[12]</sup>等人采用化学助剂协同  $\gamma$  射线辐照制备低分子量壳聚糖, 研究了在  $H_2O_2$ 、硼氢化钠、L- $\alpha$ -丙氨酸液中辐照剂量对壳聚糖降解的影响。壳聚糖降解方法较为成熟, 但对于表征降解产物的降解程度, 大多单纯采用粘度法测粘均分子量、端基法测数均分子量, 本文以过氧化氢氧化降解壳聚糖为分子量低于 2000 的壳寡糖为制备目的, 采用相对粘度和端基法测数均分子量表征降解的程度, 对降解的最佳条件

进行优化, 进而用 GPC、ESI-MS 对最优条件下所得的降解产物进行分子量分布及其结构单元的分析, 建立较为全面的表征降解产物的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

樟壳聚糖(脱乙酰度>90%)、D-氨基葡萄糖 浙江澳兴生物科技有限公司; 食品级壳寡糖(分子量3000以下)大连物理化学研究所 1808组; 葡聚糖系列标样: Mw=505、1200、3650、5300、2500000 美国标准聚合物公司 (APSC) Mw=6000、10000、21700、48800、113000、210000、366000、805000 Shodex 普鲁兰 P-82 系列; 冰乙酸、醋酸钠为色谱纯; 其它试剂均为分析纯。

乌式粘度计(毛细管内径 0.4~0.5 mm), 上海良晶玻璃仪器厂; UV-2102 PC 型紫外可见分光光度计, 上海尤尼柯仪器有限公司; 1260 型高效液相色谱(配示差折光检测器), 美国安捷伦公司; 电喷雾质谱 (ESI-MS), 德国 Bruker 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 壳聚糖脱乙酰度的测定

按文献<sup>[11]</sup>的方法。准确称取经过干燥恒重的壳聚糖溶于 30 mL 0.1 mol/L HCl 中, 以甲基橙作指示剂, 用 0.1 mol/L NaOH (准确标定) 滴定过量 HCl, 则脱乙酰度 (D.D) 的计算如下:

$$NH_2\% = \frac{(c_1V_1 - c_2V_2) \times 0.016}{m}$$

$$D.D = \frac{203 \times (NH_2\%)}{16 + 42 \times (NH_2\%)}$$

式中:  $c_1$ 、 $V_1$  和  $c_2$ 、 $V_2$  分别为 HCl 和 NaOH 的浓度(mol/L)、体积(L);  $m$  为恒重后样品的质量(kg)。

#### 1.2.2 降解方法

壳聚糖用乙酸溶解后, 加入过氧化氢, 降解体系中壳聚糖的质量分数为 3.5%。恒温摇床水浴中降解, 调节 pH 至中性后旋蒸浓缩, 用三倍体积的无水乙醇沉, 静置过夜。沉淀经真空干燥后研成粉末待用。

#### 1.2.3 粘度表征与数均分子量测定

分相对粘度: 选用 0.1 mol/L 乙酸-0.2mol/L 氯化钠作为溶剂, 将待测的壳寡糖配成浓度为 20 g/L 溶液, 用乌式粘度计在  $25 \pm 0.1$  °C 恒温下测量, 记下溶液通过粘度计毛细管的时间  $t$ 。用相对粘度<sup>[13]</sup>, 即  $\eta_r =$  壳寡糖溶液流经毛细管的时间/溶剂流经毛细管的时间来表征降解趋势。

测数均分子量采用铁氰化钾显色法<sup>[14]</sup>, 紫外检测的最佳扫描波长 420 nm。以 D-氨基葡萄糖为标样做标准曲线。待测样品通过与显色剂氧化还原反应后, 测其吸光度, 在标准曲线上得出对应还原性端基数目, 进而得知其平均聚合度, 计算其数均分子量。

#### 1.2.4 渗透凝胶色谱与电喷雾质谱检测条件

将萃取物定容, 色谱柱 TSKgel G4000PWXL; 色谱检测条件<sup>[15]</sup>: 流动相为 0.1 mol/L CH<sub>3</sub>COOH -0.05 mol/L CH<sub>3</sub>COONa 溶液, 流速 0.5 mL/min, 柱温 30 °C, 示差折光检测器温度 35 °C。待测样品浓度为 1 mg/mL。

分子量在凝胶柱上的洗脱提及  $V_e$ 、分配系数  $K_{av}$  存在如下关系:

$$V_e = a - b \cdot \log Mw$$

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

$$K_{av} = K_1 - K_2 \cdot \log Mw$$

式中,  $V_e$  为标准品的洗脱体积,  $V_0$  及  $V_t$  分别表示空柱体积及柱的总体积<sup>[16,17]</sup>, 考虑到色谱柱用葡聚糖测得的排阻体积为 1000~700000, 故取葡聚糖标样中  $Mw=505$  及  $Mw=2500000$  的洗脱体积分别表示  $V_0$  及  $V_t$ , 利用葡聚糖系列标样完成  $K_{av}-\log Mw$  标准曲线的绘制, 然后对待测的降解产物进行相对分子量的检测。

电喷雾质谱检测条件: ESI 离子源, 正离子模式, 质荷比扫描范围: 100~3000 m/z。

## 2 结果与分析

### 2.1 脱乙酰度值

三次滴定所用 NaOH 体积的数据求平均值, 计算得预降解的壳聚糖样品脱乙酰度为 96.7%。

### 2.2 单因素变量研究

分别研究反应温度、时间、过氧化氢及乙酸的质量分数四个因素<sup>[17]</sup>对降解反应的影响。用相对粘度与端基法测得的数均分子量对得到的产物进行表征。

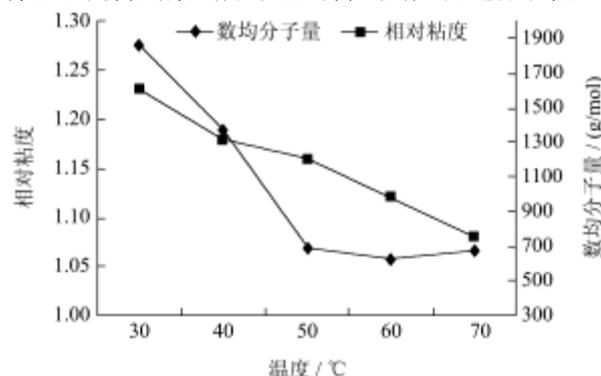


图 1 反应温度对降解的影响

Fig.1 Effects of reaction temperature on degradation

注: 其他条件: 3h, CTS 3.5%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, HAc 1%。

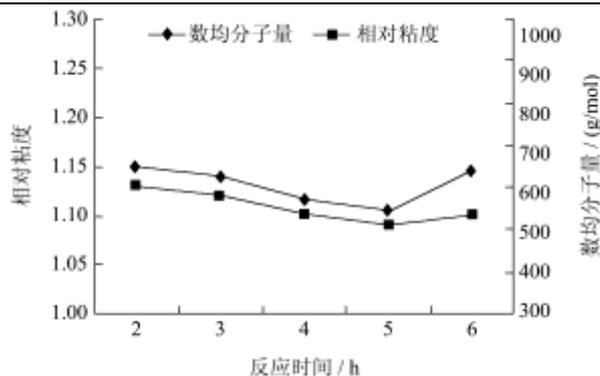


图2 反应时间对降解的影响

Fig.2 Effects of reaction time on degradation

注：其他条件：60℃，CTS3.5%，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>3%，HAc1%。

图1中，相对粘度以及数均分子量随温度的影响波动明显，可以得出温度是影响降解程度的主要因素之一，且数均分子量下降的趋势在50℃处变得缓和，降解液的颜色随着温度的升高变深，考虑到可能会发生副反应，故反应温度不宜过高；图2中，随着降解时间的延长，相对粘度及数均分子量减小，到5h处则趋于缓和，继续反应到6h其数均分子量有增大的趋势，理论上，反应时间长，降解产物仅可能有增无减，最终趋于平稳，而图中数均分子量增大，推断为：降解反应开始，壳聚糖大分子长链断裂成聚合度不等的分子链，反应初期由于过氧化氢过量，体系中聚合度低的壳聚糖分子占主导地位，而数均分子量主要由数量较多分子的分子量表征，因此数均分子量呈下降趋势，随着反应进行，过氧化氢量减少以致反应平缓，壳聚糖大分子降解程度下降，此时产物的聚合度较反应初期偏高，若聚合度偏高的降解产物数量占主导，则求得的数均分子量反而增大。图2中，从曲线的整个变化趋势看可知，时间对降解程度的影响小，没有温度的影响明显。

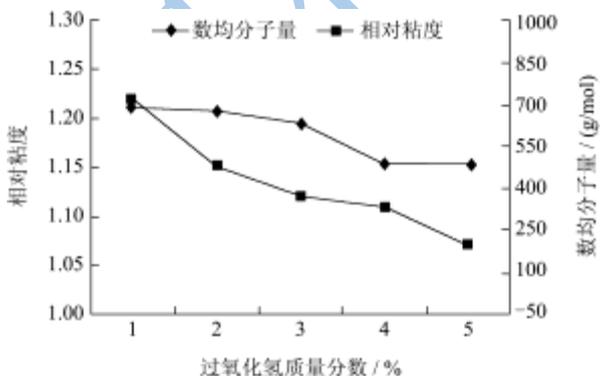


图3 过氧化氢质量分数对降解的影响

Fig.3 Effects of hydrogen peroxide quality score on degradation

注：其他条件：3h，CTS3.5%，60℃，HAc1%。

图3中，随着过氧化氢含量的增大，相对粘度一直都处于下降趋势，数均分子量在4%处趋于缓和，

因此将过氧化氢的质量分数控制在4%左右为佳；图4中，相对粘度随乙酸浓度的增大呈现的趋势为先增后减，3%是转折点，数均分子量则是先减后增，但波动的范围小。

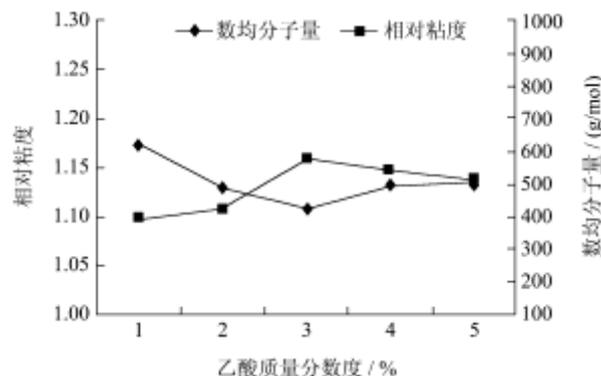


图4 乙酸质量分数对降解的影响

Fig.4 Effects of acetic acid quality score on degradation

注：其他条件：3h，CTS3.5%，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>3%，60℃。

### 2.3 优化降解条件的确定

表1 正交实验结果

Table 1 Results of orthogonal experiment

| 序号 | 温度 / °C | 时间 / h  | 乙酸质量分数 / % | 过氧化氢质量分数 / % | 数均分子量 / (g/mol) |
|----|---------|---------|------------|--------------|-----------------|
| 1  | 50      | 4       | 2          | 3            | 440.87          |
| 2  | 50      | 5       | 3          | 4            | 433.55          |
| 3  | 50      | 6       | 4          | 5            | 402.84          |
| 4  | 60      | 4       | 3          | 5            | 420.03          |
| 5  | 60      | 5       | 4          | 3            | 436.85          |
| 6  | 60      | 6       | 2          | 4            | 402.32          |
| 7  | 70      | 4       | 4          | 4            | 453.28          |
| 8  | 70      | 5       | 2          | 5            | 468.11          |
| 9  | 70      | 3       | 3          | 3            | 505.43          |
| T1 | 1277.26 | 1314.18 | 1311.30    | 1383.16      |                 |
| T2 | 1259.20 | 1338.51 | 1359.00    | 1289.15      |                 |
| T3 | 1426.82 | 1310.59 | 1292.98    | 1290.98      |                 |
| k1 | 425.75  | 438.06  | 437.10     | 461.05       |                 |
| k2 | 419.73  | 446.17  | 453.00     | 429.72       |                 |
| k3 | 475.61  | 436.86  | 430.99     | 430.33       |                 |
| R  | 55.87   | 9.31    | 22.01      | 31.34        |                 |

对上述四个单因素控制变量进行 L<sub>9</sub>(3)<sup>4</sup> 正交实验，选择适宜的单因素控制条件，以端基法测得数均分子量作为响应值，结果见表1。

从正交实验结果分析可知，反应温度因素的极差最大，即反应温度对降解反应的影响最大。各因素对降解速率的影响大小为：反应温度>过氧化氢质量分数>乙酸质量分数>反应时间。同时得到，各因素的最优水平，即过氧化氢降解壳聚糖的最优条件为：反应

温度 60 °C，反应时间 6 h，过氧化氢质量分数 4%，乙酸质量分数 4%。

### 2.4 壳寡糖分子量分布的检测

以葡聚糖系列(Mw=505、1200、3650、5300、6000、10000、21700、48800、113000、210000、366000、805000、2500000)为标准，采用分配系数Kav对葡聚糖标准的logMw值进行回归处理，得标准曲线Kav=1.996-0.3142 logMw，r=0.9815，如图5所示。对未降解的壳聚糖、食品级壳寡糖及在正交实验最优条件下得到的降解产物进行分析，其液相色谱图依次见图6~8所示。图6与图8对比可知，壳聚糖降解前后变化明显，由对应的保留时间求出壳聚糖的分子量，具体数值见表2。

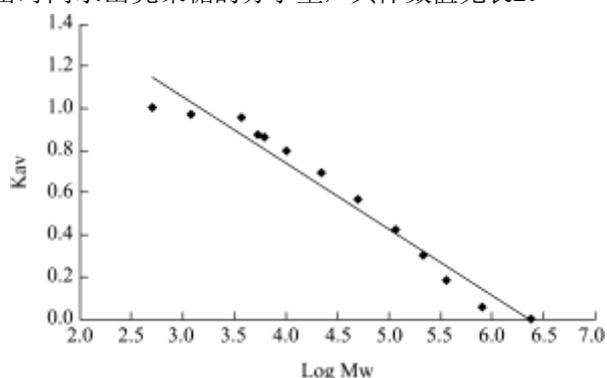


图5 葡聚糖 Kav-logMw 标准曲线

Fig.5 The calibration curve of dextran standards

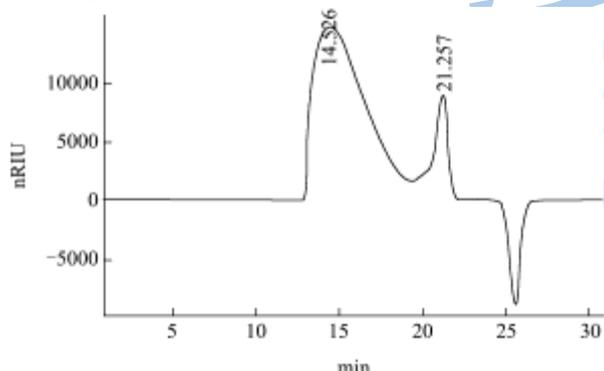


图6 壳聚糖液相色谱图

Fig.6 HPLC chromatogram of COS

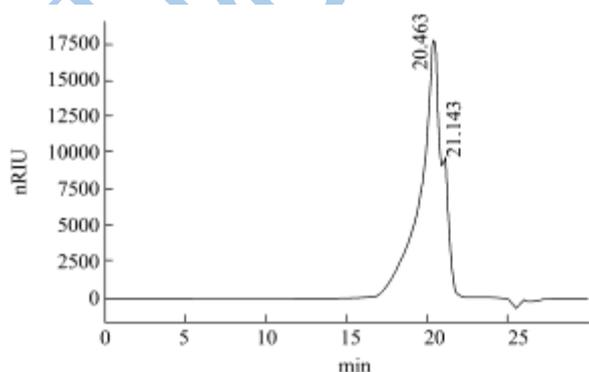


图7 食品级壳寡糖液相色谱图

Fig.7 HPLC chromatogram of food grade COS

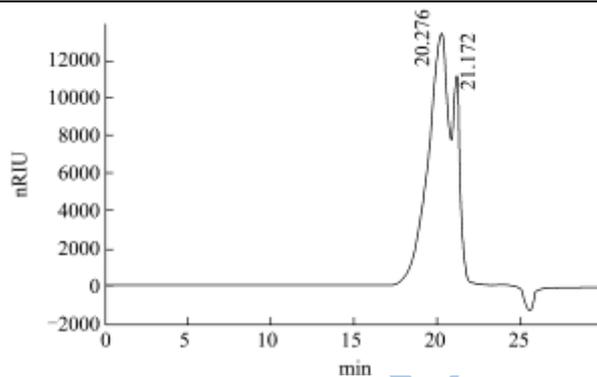


图8 最优条件下降解产物液相色谱图

Fig.8 HPLC chromatogram of degraded COS under the optimal conditions

表2 检测样品的相对分子质量

Table 1 The relative molecular weight of the tested samples

| 样品名称       | 保留时间/min | Kav   | Mw     |
|------------|----------|-------|--------|
| 壳聚糖        | 14.526   | 0.370 | 149222 |
|            | 21.257   | 1.054 | 999    |
| 食品级壳寡糖     | 20.463   | 0.973 | 1802   |
|            | 21.143   | 1.042 | 1086   |
| 最优条件下的降解产物 | 20.276   | 0.954 | 2072   |
|            | 21.172   | 1.045 | 1064   |

表2是由标准曲线对照计算得出的检测样品的相对分子质量，结合GPC谱图，可知壳聚糖的分子量大都集中在15万左右，也有少量集中在1000左右的分子；而通过正交实验降解得到的产物，分子量集中在2000~1000，降解完全且降解强度大，与大连物化所提供的食品级壳寡糖降解程度相当，说明用过氧化氢在优化条件下降解的方法能达到预期效果。

考虑到色谱柱的葡聚糖分子排阻范围为1000~700000 Da，当分子量小于1000时，凝胶渗透色谱已无法对其进行准确检测，故要完成对降解产物更全面的检测，且为进一步对降解产物的结构进行分析，采用电喷雾质谱对食品级壳寡糖及在最优条件下降解的产物进行检测，扫描范围100~3000 m/z 所得的结果如图9~10。

壳聚糖的分子结构单元形式为： $H-(GlcN)_x-(GlcNAc)_y-OH$ ，GlcN指相对分子量为161的氨基葡萄糖结构单元，GlcNAc指相对分子量为203的乙酰氨基葡萄糖结构单元，则其质荷比 $m/z=18+161x+203y$   $M^+$ ， $M^+$ 是与壳寡糖结合的离子<sup>[10]</sup> ( $H^+1$ 、 $H_3O^+19$ 、 $Na^+23$ 、 $K^+39$ )。由检测结果可知：图10所示的壳聚糖降解所得产物出峰集中在2000以下，主峰间隔为161结构单元，即GlcN，表明产物已经降解为聚合度10个氨基葡萄糖结构单元以下；其中， $m/z=985.8$ 为6个161结构单元加上一份子 $H_3O^+$ ，其他主峰的分布

与图 9 显示的食品级壳寡糖相当, 因含少量醋酸钠故杂质峰干扰较多, 但不影响正常测定。

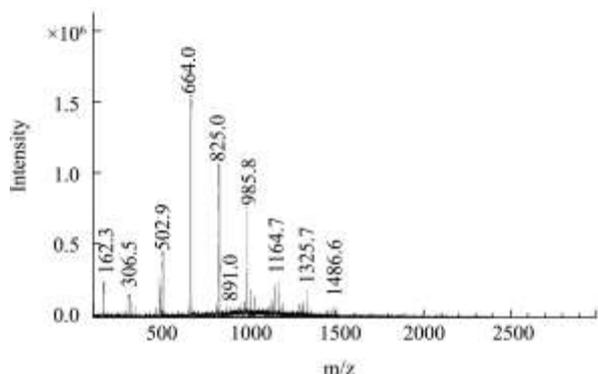


图 9 食品级壳寡糖 ESI-MS 谱图

Fig.9 ESI-MS diagram of food grade COS

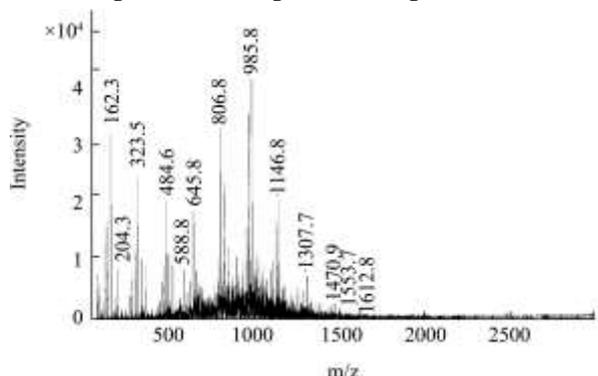


图 10 最优条件所得降解产物 ESI-MS 谱图

Fig.10 ESI-MS diagram of degraded COS under the optimal conditions

### 3 结论

对壳聚糖(脱乙酰度为 96.7%)过氧化氢氧化降解过程进行单因素研究及正交实验优化, 得到降解过程的最优条件为: 反应温度 60℃, 反应时间 6 h, 过氧化氢质量分数 4%, 乙酸质量分数 4%。壳聚糖在最优条件下完全降解, 产物的平均相对分子量在 2000 以下, 通过电喷雾质谱检测, 其结构单元相对分子质量为 161, 即氨基葡萄糖的结构单元, 且分子量主要分布在 100~1500, 即聚合度在 10 以下。

### 参考文献

[1] 蒋挺大.壳聚糖[M].北京:化学工业出版社,2007  
 [2] Bernkop-Schnurch A, Kast C. Chemically Modified Chitosans as Enzyme Inhibitors [J]. Advance Drug Deliv Rev, 2001, 52 (2): 127-137  
 [3] Suzuki K, Tokoro A, Okawa Y, et al. Effect of N-acetylchito-

oligosaccharides on Activation of Phagocytes [J]. Microbiol and Immunology, 1986, 30(8): 777-787  
 [4] Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: Aunique Polysaccharide for Drug Delivery [J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1998, 24(11): 979-993  
 [5] Shahidi F, Synowiecki J. Isolation and Characterization of Nutrients and Value-added Products from Snow Crab (*Chionoecetes opilio*) and Shrimp (*Pandalus borealis*) Processing Discards [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991,39(8): 1527-1532  
 [6] Yamada A, Shibuya N, Komada O, et al. Induction of Phytoalexin Formation in Suspension-cultured Rice Cells by N-acetylchitooligosaccharides [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1993,57(3): 405-409  
 [7] Majeti N, Kumar R. A review of chitin and chitosan [J]. Reactive and Functional Polymers, 2000,46(1): 1-27  
 [8] 李艾华,杜予民.聚合度 3-6 甲壳寡糖的制备与 TOF-MS 分析[J].分析科学学报,2004,20(3):233-236  
 [9] 邓倩莹,李立华.溶菌酶、过氧化氢对壳聚糖降解性能的影响[J].化学世界,2005,6:338-340  
 [10] 何日安,岳武.臭氧降解法制备壳低聚糖及其结构表征[J].广州化学,2008,33(4):31-36,41  
 [11] 罗平,何波兵.水溶性低分子壳聚糖的制备[J].化学研究与应用,2000,12(6):677-679  
 [12] 曾虹燕,夏葵.化学助剂协同  $\gamma$  射线辐照制备低分子量壳聚糖[J].核化学与放射化学,2010,32(4):247-251  
 [13] 葛华才,袁高,彭程.物理化学[M].北京,高等教育出版社, 2008  
 [14] 孟显丽,陈国华.关于端基分析法测定壳低聚糖的相对数均分子量问题的探讨[J].中国海洋化学学报,2005,35(1): 142-144  
 [15] 盛以虞,仲惠娟.高效凝胶渗透色谱法测定壳聚糖的分子量 [J].中国药科大学学报,1994,25(4):242-244  
 [16] 成跃祖.凝胶渗透色谱法的进展及其应用[M].北京,中国石化出版社出版,1993  
 [17] Silvio Aime, Eliana Gianolio, Fulvio Uggeri, et al. New paramagnetic supramolecular adducts for MRI applications based on non-covalent interactions between Gd(III)-complexes and b- or c-cyclodextrin units anchored to chitosan [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2006, 100(5): 931-938  
 [18] 舒德海,钱俊青,吴薇.过氧化氢制备壳寡糖工艺[J].食品与发酵工业,2009,35(6):121-124