

微波场中 KCl 浓度对几丁质脱乙酰反应的影响

仰振球, 宋宝珍, 欧阳藩

(中国科学院过程工程研究所, 北京 100080)

摘要:研究了 KCl 浓度对几丁质在微波场中脱乙酰反应的影响. 结果表明, 引入盐离子促进了反应的进行. 随着反应时间的延长, 几丁聚糖的脱乙酰度上升, 但上升速度逐渐变慢, 呈一级反应特征; 分子量随时间延长而降低. 脱乙酰度随 KCl 浓度上升而减小, 但在实验范围内, 均高于对照组. 当 $[KCl]=0.05 \text{ mol/L}$ 时脱乙酰度达到 79.26%, 与对照组相比(脱乙酰度=69.84%)提高了 13.5%. 随 KCl 浓度的上升, 分子量开始减小, 当 KCl 浓度上升到 0.2 mol/L 附近时, 分子量又呈上升趋势. 这是由于 KCl 浓度影响体系介电损耗角正切值, 在较高 KCl 浓度时降低了体系对微波的吸收能力.
关键词: 几丁质; 几丁聚糖; 微波; 脱乙酰反应

中图分类号: TQ039 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2003)01-0037-06

1 前言

几丁质(Chitin), 又名甲壳素、甲壳质、壳多糖, 自然界中每年的生物合成量达 100 亿吨, 仅次于结构类似的纤维素, 在自然界的碳氮循环中起着重要的作用. 几丁质经脱乙酰化处理后得到的产物称为几丁聚糖(Chitosan), 又称壳聚糖. 几丁质和几丁聚糖及其衍生物不仅具有许多独特的物化特性, 而且具有良好的生物相容性和生物可降解性, 广泛应用于食品、化妆品、轻工、印染、环保和生物医药等领域^[1-5]

以甲壳类动物壳(虾、蟹)为原料, 先用盐酸脱钙, 再用碱进行脱蛋白、脱乙酰反应, 通过控制反应温度和反应时间, 可以得到一定脱乙酰度的几丁聚糖. 尽管这种工艺简单、操作方便, 但是存在着反应时间长(十几个小时左右)、污染比较严重、生产成本高等许多缺点. 因此许多新的制备方法及其工艺过程正在研究开发.

微波可以促进化学反应的进行. 据报道^[6], 在微波场中, 用 4-氰基苯氧离子与氰苄的 SN_2 亲核取代反应可以使反应速率提高 1240 倍, 并且提高了产率. 微波对反应的作用除了与反应的类型有关外, 还与微波的强度、频率、调制方式以及体系的环境有关^[7]. 在微波场中介质的加热机理有两种, 即离子传导(ionic conduction)和偶极子转动(dipole rotation). 影响离子传导的因素是离子浓度、离子迁移率和溶液的温度. 随离子浓度的增大, 介质的损耗因子增大. 温度不仅影响离子溶液中介质耗散因子, 对离子迁移率和浓度场均有影响^[8].

微波场能加快几丁质脱乙酰反应^[9,10]. 本工作重点考察了在固定微波频率(2.45 GHz)、固定调制方式条件下, 体系环境的重要因素—KCl 浓度的变化对微波场中几丁质脱乙酰反应的影响.

2 实验

2.1 原料与实验装置

几丁质以虾壳为原料按照文献^[11]方法实验室自制, 并粉碎至 60 目(约 $250 \mu\text{m}$); NaOH, 化学

纯；盐酸及其它化学试剂均为分析纯。实验装置为家用微波炉(Glanz 型，750 W)。

2.2 实验方法

2.2.1 几丁聚糖的制备

配制一定浓度的 NaOH 溶液，用烧杯取 200 ml，加入不同质量的 KCl，配制成不同 KCl 浓度的 NaOH 溶液，预热到 70°C。称取几丁质 10 g，加入到碱溶液中，快速搅拌均匀，置于微波炉中反应。每隔 2 min 用玻棒搅拌 1 次，每 10 min 记录 1 次体系温度。反应结束后，立即进行水洗至 pH 中性，过滤后经真空干燥烘干，置于干燥器中保存备用。

2.2.2 壳聚糖脱乙酰度的测定

脱乙酰度(degree of deacetylation, DD)指的是几丁聚糖大分子中胺基葡萄糖单体占总单体(胺基葡萄糖和乙酰胺基葡萄糖)的摩尔分数，它是影响几丁质、几丁聚糖及其衍生物物化特性和生物活性功能的重要参数。本工作采用酸碱滴定法测定几丁聚糖脱乙酰度^[12]，每个样品至少重复 3 次，同时也采用 ¹³C NMR 法进行了对照比较。脱乙酰度计算公式如下^[13]：

$$[\text{NH}_2] = \{0.016(C_1V_1 - C_2V_2) / [W(1 - C_{\text{H}_2\text{O}})]\} \times 100\%, \quad (1)$$

$$\text{DD} = 203[\text{NH}_2] / \{42[\text{NH}_2] + 16\} \times 100\%, \quad (2)$$

式中 C_1 , C_2 为盐酸和 NaOH 标准溶液浓度(mol/L), V_1 , V_2 为加入的盐酸和 NaOH 标准溶液体积(ml), 0.016 为 1 ml 盐酸溶液(1 mol/L)相当的胺量(g), W 为样品的质量(g), $C_{\text{H}_2\text{O}}$ 为样品水份含量。

2.2.3 几丁聚糖分子量的测定

几丁聚糖是一种线性大分子聚合物，其分子量测定方法有粘度法、光散射法、端基分析法、渗透压法、蒸汽压法、高压液相色谱法、凝胶色谱法和超过滤法等^[13]。本工作采用粘度法，根据经验公式 Mark-Houwink 方程计算：

$$[\eta] = KM^\alpha, \quad (3)$$

式中， $[\eta]$ 为特性粘度； K , α 为常数，对几丁聚糖溶液体系，与几丁聚糖的脱乙酰度有关，根据文献^[14]进行修正； M 为粘均分子量。

称取 50 mg 几丁聚糖，溶于 20 ml 缓冲溶液(0.2 mol/L 醋酸+0.1 mol/L 醋酸钠缓冲溶液)，采用乌氏粘度计测量几丁聚糖溶液的粘度。体系温度由恒温水浴保持在(30±0.1)°C。

2.2.4 几丁聚糖结构的 ¹³C CP/MAS NMR 表征

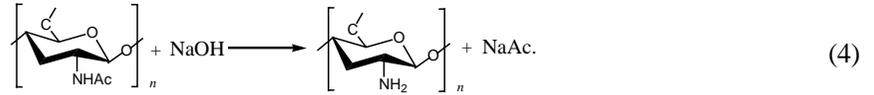
对于难溶性样品，固体核磁技术可以避免样品溶解而测定其波谱特征信息。本文用 ¹³C CP/MAS(cross-polarization and magic-angle spinning, 交叉极化魔角旋转) NMR(Bruker MSL400, Germany)对样品进行表征，检测频率为 100.63 Hz，转速为 6 kHz，驰豫延迟为 1 s，CP 接触时间为 1 ms，累加次数为 700~1000。化学位移以固体金刚烷的 ¹³C 化学位移(29.5 ppm)为第 2 参考。

3 结果和讨论

3.1 反应时间对几丁聚糖脱乙酰度和分子量的影响

几丁聚糖脱乙酰度与反应时间的关系如图 1 所示。从图可以看出，固液比为 1:20，NaOH 浓度为 45%，在微波场中进行脱乙酰反应，连续反应 4 min，脱乙酰度可以达到 65.4%。持续 20 min 左右，脱乙酰度即可达到 80%以上。开始脱乙酰度随反应时间的延长增大较快，但是反应 12 min 后，

脱乙酰反应开始变慢. 传统方法中, 几丁质脱乙酰反应的条件为: NaOH 浓度为 40%~50%, 反应温度 60~140°C 左右, 持续反应 1~20 h, 得到的几丁聚糖的脱乙酰度为 75%~97%^[13]. 事实上, 几丁质脱乙酰反应是一种酰胺的碱性水解反应, 如下式所示:



因为在整个反应体系中 NaOH 远远过量, 所以可以假定反应速率只与乙酰胺基浓度有关, 这种情况下, 脱乙酰反应又可看作一个拟一级反应^[15]. 按照一级反应的特点, 要想完全脱除乙酰基要花很长时间. 这一点从图 1 中也可以看出, 随着反应时间的延长, 脱乙酰度的增加越来越慢. 另一方面, 几丁质粉末在浓 NaOH 溶液中不溶而形成悬浮液, 脱乙酰反应可以看作一缩核反应. 几丁质颗粒的外层很快参与反应, 但随着反应的进行, 传质阻力影响了反应的进行, 从而导致了反应速率下降.

随着反应的进行, 几丁聚糖的分子量也随之减小. 这是因为, 在利用强碱进行脱乙酰反应的同时, 会发生几丁质、几丁聚糖分子链的断裂降解, 从而导致粘度下降、分子量降低. 结果如图 2 所示. 从图中可以看出, 刚开始时, 分子量下降趋势较慢, 随着反应时间的延长, 反应温度的升高, 加速了分子链的断裂降解, 造成了分子量减小的速度趋快.

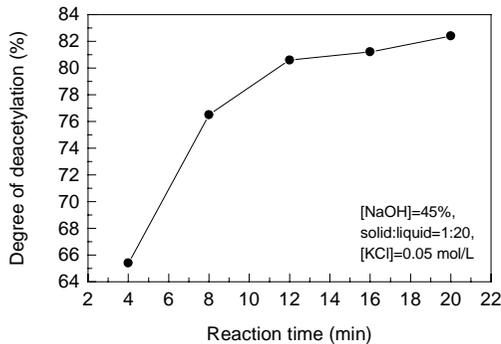


图 1 反应时间对几丁聚糖脱乙酰度的影响

Fig.1 Effect of reaction time on DD of chitosan

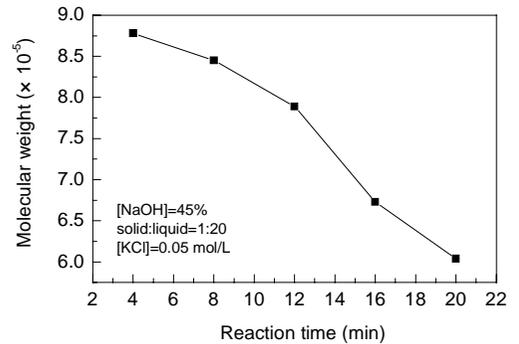


图 2 反应时间对几丁聚糖分子量的影响

Fig.2 Effect of reaction time on MW of chitosan

3.2 KCl 浓度对几丁聚糖脱乙酰度的影响

从图 3 可以看出, 反应体系的温升要低于对照组([KCl]=0); 随着 KCl 浓度的上升, 温升随之下降, 脱乙酰度也呈下降趋势, 见图 4. 但在实验范围内, 脱乙酰度均大于对照组.

KCl 浓度增加会增加体系的损耗角正切值($\text{tg}\delta$), 导致对微波的吸收增加, 但是随着 $\text{tg}\delta$ 上升, 微波的穿透深度下降, 受到微波作用的体积也就变小; 另外, $\text{tg}\delta$ 随着温度的上升而下降^[7]. 综合这些因素的影响, 整个体系对微波能的吸收减少, 从而导致了整个体系的温度下降. 但在微波场中, 离子的快速极化作用会促进、强化能量的传递, 而导致反应物分子间碰撞机率增加, 促进了脱乙酰反应. 在较低离子浓度下([KCl]=0.05 mol/L), 脱乙酰度达到 79.26%, 与对照组相比(DD=69.84%), 提高了 13.5%. 但是, 随着离子浓度的上升, 温升的影响越来越大, 所以脱乙酰度呈现出下降趋势. 离子类型对几丁质脱乙酰反应的影响这里没有考虑.

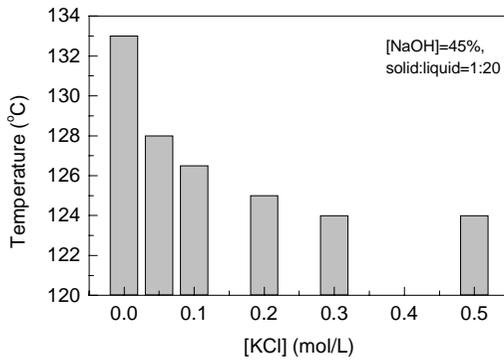


图 3 KCl 浓度对体系温度的影响
Fig.3 Temperature vs. concentration of KCl

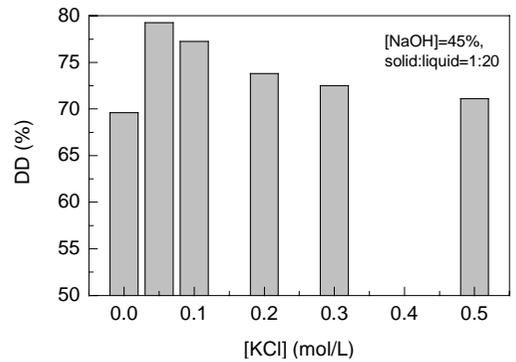


图 4 KCl 浓度对几丁聚糖脱乙酰度的影响
Fig.4 DD vs. concentration of KCl

3.3 KCl 浓度对几丁聚糖分子量的影响

从图 5 可以看出,随着 KCl 浓度的上升(反应时间为 10 min,下同),几丁聚糖分子量开始呈现下降趋势,当 KCl 浓度达到 0.2 mol/L 附近时,几丁聚糖分子量却开始呈现上升的趋势.这种现象与体系对微波的吸收相关.因为随着 KCl 浓度的增加,加大了几丁聚糖分子热运动以及大分子之间碰撞几率,从而加快了几丁聚糖大分子链的降解.但是当 KCl 浓度达到 0.2 mol/L 附近时,由 KCl 浓度增加而产生的对微波的吸收减少成为了主要影响因素,温度相应降低,分子的运动也相应减弱,所以分子链受到破坏的几率也就减少,分子量因而随之逐渐增大.

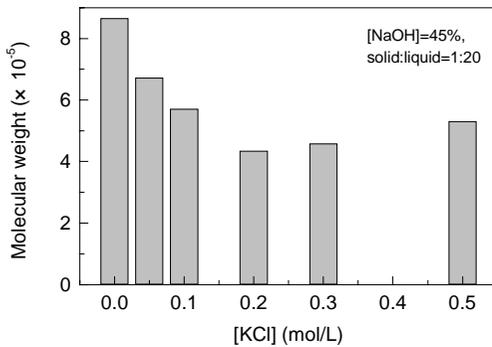


图 5 KCl 浓度对几丁聚糖分子量的影响
Fig.5 Effect of ionic strength on chitosan's molecular weight

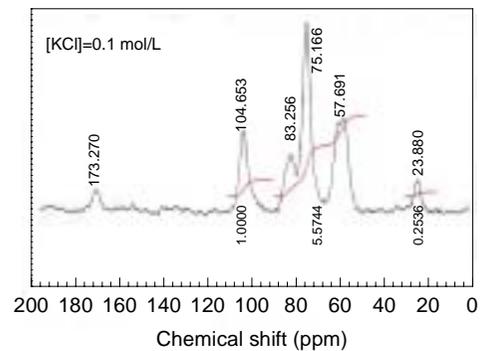


图 6 几丁聚糖的 ^{13}C CP/MAS NMR 谱图
Fig.6 ^{13}C CP/MAS NMR spectra of chitosan

3.4 ^{13}C CP/MAS NMR 方法测定几丁聚糖脱乙酰度与酸碱滴定法的比较

几丁聚糖在较低脱乙酰度时,很难溶于普通的溶剂;另一方面,即使几丁聚糖溶于稀酸溶液,但是要使几丁聚糖大分子链完全展开比较困难,这样就会带来一定的系统误差. ^{13}C CP/MAS NMR 对局部有序结构的变化是非常敏感的,另外还可以在固态下直接对样品的性质进行测定,所以采用该方法测定脱乙酰度是比较可靠的.脱乙酰度可从甲基和 C 环的 C 原子积分比值来计算^[16-18][式 (5)],结果见图 6 和表 1.

$$DD = \left(1 - \frac{I_{\text{CH}_3}}{I_{\text{C}_1+\text{C}_2+\text{C}_3+\text{C}_4+\text{C}_5+\text{C}_6}/6} \right) \times 100\% . \quad (5)$$

表 1 ^{13}C CP/MAS NMR 法和滴定法测定的几丁聚糖脱乙酰度Table 1 Degree of deacetylation determined by ^{13}C CP/MAS NMR and titration

Sample	[KCl] (mol/L)	Integral of CH_3 (A)	Integrals of $\text{C}_1+\text{C}_2+\text{C}_3+\text{C}_4+\text{C}_5+\text{C}_6$ (B)	Deacetylation (1-A/B/6) (%)	Deacetylation determined by titration (%)	Deviation (%)
1	0.0	0.2896	5.7611	69.84	71.10	1.8
2	0.1	0.2536	6.5744	76.86	78.22	1.7
3	0.5	0.2997	6.1860	71.94	72.28	0.5

Note: $[\text{NaOH}]=45\%$, solid:liquid=1:20.

从表中结果可以看出,采用酸碱滴定法测定的脱乙酰度结果偏高约 2%左右,这可能是在几丁聚糖酸性溶液中,由于几丁聚糖分子上的氨基质子化后,存在着式(6)所示的解离平衡,影响了溶液中 H^+ 的浓度^[9];另一方面,指示剂(甲基橙)在几丁聚糖溶液中变色不灵敏,很难用肉眼准确判断.对于酸碱滴定的结果,按照 ^{13}C CP/MAS NMR 得出的结果进行修正.



4 结论

(1) 在微波场中进行几丁质脱乙酰反应,几丁聚糖脱乙酰度随着反应时间的延长而增加,分子量随时间的延长而降低.与传统方法相比,脱乙酰反应速率大大加快.对于相同的脱乙酰度,反应时间可以从 8~16 h 缩短到 20 min 以内,反应呈一级反应特征.

(2) 脱乙酰度随 KCl 浓度的上升而减小,但在实验范围内,均高于对照组.当 $[\text{KCl}]=0.05$ mol/L 时脱乙酰度达到 79.26%.与对照组相比(DD=69.84%),提高了 13.5%.分子量开始随 KCl 浓度的上升而减小,当 KCl 浓度上升到 0.2 mol/L 附近时分子量又呈上升趋势.这是因为在较高 KCl 浓度时,体系对微波的吸收能力降低的缘故.

参考文献:

- [1] Li Q, Dunn E T, Grandmaison E W, et al. Applications and Properties of Chitosan [A]. Goosen M F A. Applications of Chitin and Chitosan [C]. Lancaster: Technomic Co. Inc., 1997. 2-21.
- [2] Cui Z R, Mumper R J. Chitosan-based Nanoparticles for Topical Genetic Immunization [J]. Journal of Controlled Release, 2001, 75: 409-419.
- [3] Erbacher P, Zou S, Bettinger T, et al. Chitosan-based Vector/DNA Complexes for Gene Delivery: Biophysical Characteristics and Transfection Ability [J]. Pharmaceutical Research, 1998, 15(9): 1332-1339.
- [4] Singh M, Briones M, Ott G, et al. Cationic Microparticles: A Potent Delivery System for DNA Vaccines [A]. Proceeding of Nation Academy of Sciences of USA [C]. San Diego: Academic Press, 2000. 811-816.
- [5] Sato T, Ishii T, Okahata Y. In Vitro Gene Delivery Mediated by Chitosan: Effect of pH, Serum, and Molecular Mass of Chitosan on the Transfection Efficiency [J]. Biomaterials, 2001, (22): 2075-2080.
- [6] Gedye R, Smith F, Westaway K, et al. The Use of Microwave Ovens for Rapid Organic Synthesis [J]. Tetrahedron Letters, 1986, 27(3): 279-282.
- [7] 金钦汉. 微波化学 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 30-32, 151-154.
- [8] 潘学军. 微波辅助萃取药用植物活性成份及微波脱水纯化青霉素 G 亚砷的研究 [D]. 北京: 中国科学院过程工程研究所, 2001. 1-14.
- [9] Quintin P. Process for Activating Chitin by Microwave Treatment [P]. U.S. Pat.: 4159932, 1979-09-16.
- [10] 严伯奋, 童瑞璜, 宦银根, 等. 微波辐射对制备几丁聚糖的影响及其特性 [J]. 食品与发酵工业, 1997, (2): 39-41.
- [11] 谢雅明. 可溶性甲壳质的制造和用途 [J]. 化学世界, 1983, (4): 118-121.
- [12] 汪志君. 碱量法测定壳聚糖的胺基 [J]. 化学世界, 1986, (1): 20-22.
- [13] 蒋挺大. 甲壳素 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1999. 30-45, 46, 99-109, 117-118.

- [14] 王伟, 薄淑琴, 秦汶. 不同脱乙酰度壳聚糖 Mark-Houwink 方程的订定 [J]. 中国科学 B 辑, 1990, (11): 1126-1129.
- [15] 蔡中丽, 马晓红, 李细峰. 低碱度甲壳素脱乙酰工艺及动力学研究 [J]. 化学世界, 1998, (7): 352-356
- [16] Harish Prashanth K V, Kittur F S, Tharanathan R N. Solid State Structure of Chitosan Prepared under Different N-deacetylating Conditions [J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 50: 27-33.
- [17] Duarte M L, Ferreira M C, Marvao M R, et al. Determination of the Degree of Acetylation of Chitin Materials by Spectroscopy [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2001, 28: 359-363.
- [18] Heux L, Brugnerotto J, Desbrieres J, et al. Solid State NMR for Determination of Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan [J]. Biomacromolecules, 2000, (1): 746-751.
- [19] 李蕾, 刘小明, 钟永思. 线性滴定法同时测定壳聚糖的脱乙酰度及其胺基的表现离解常数 [J]. 分析试验室, 1996, 15(2): 21-25.

Influence of KCl Concentration on Chitin Deacetylation in Microwave Field

YANG Zhen-qiu, SONG Bao-zhen, OUYANG Fan

(Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: This paper presents the effect of KCl concentration on chitin deacetylation in the microwave field. The experimental result shows that the reaction was enhanced when salts were introduced into the reaction system. The degree of deacetylation (DD) of chitosan increases with time, but the rate of increase slows down gradually, revealing the characteristics of first order reaction. The molecular weight (MW) of chitosan decreases with time. The DD of chitosan decreases with the increase of the concentration of KCl, but it is higher than that of the control in the concentration range of KCl investigated. When KCl concentration equals 0.05 mol/L, the DD is 79.3%, as compared with that of the control (69.6%). Along with the increase of KCl concentration, the MW of chitosan decreased, but it increased when the concentration was greater than 0.2 mol/L.

Key words: chitin; chitosan; deacetylation; microwave