

文章编号:0253-9950(2010)04-0247-05

化学助剂协同 γ 射线 辐照制备低分子量壳聚糖

曾虹燕¹, 夏葵¹, 廖凯波¹, 吴国忠², 高文成¹

1. 湘潭大学 化工学院 生物技术研究所, 湖南 湘潭 411105;

2. 中国科学院 上海应用物理研究所 辐射技术应用中心, 上海 201800

摘要: 用 γ 射线辐照降解制备了低分子量壳聚糖。研究了在 H_2O_2 、硼氢化钠、L- α -丙氨酸液中辐照剂量对壳聚糖降解的影响, 并对辐照前后壳聚糖的结构进行了表征。结果表明, 在 H_2O_2 中的壳聚糖降解速率最快, 主要是 H_2O_2 能够提高 $\cdot OH$ 自由基浓度, 对壳聚糖的降解有促进作用; 在硼氢化钠和 L- α -丙氨酸水溶液中所降解壳聚糖的白度最佳。样品的 UV、FTIR 分析表明, 辐照后除壳聚糖分子生成羰基外, 壳聚糖主链结构未见变化, 脱乙酰度也没有显著改变, 显示出辐照降解是一种有效的控制壳聚糖分子量的方法。

关键词: 壳聚糖; 辐照降解; 脱乙酰度; 白度

中图分类号: O631.1 文献标志码: A

Preparation of Chitosan With Low Molecular Weight by γ -Ray Irradiation in Different Solutions

ZENG Hong-yan¹, XIA Kui¹, LIAO Kai-bo¹, WU Guo-zhong², GAO Wen-cheng¹

1. College of Chemical Engineering, Biotechnology Institute, Xiangtan University, Xiangtan 411105, China

2. Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

Abstract: The chitosan with low molecular weight was prepared by γ -ray degradation method. The influence of irradiation dose on the radiation degradation of chitosan was studied in heterogeneously aqueous solutions of H_2O_2 , $NaBH_4$ and L- α -alanine. The degradation products were characterized by FTIR and UV-VIS. The degradation of chitosan is the most quickly in the H_2O_2 , because of the concentrations of OH radicals increased. The white degree of irradiation degraded chitosan is the highest in $NaBH_4$ or L- α -alanine solution. UV and FTIR analyses manifest that no obvious differences in the main chain structure and deacetylation degree between irradiated and un-irradiated chitosans, but the carbonyl group forms in the molecules of the irradiated chitosan. The results show that γ -ray can be expected as an effective way to control the molecular weight of chitosan.

Key words: chitosan; radiation degradation; degree of deacetylation; white degree

收稿日期: 2008-11-26; 修订日期: 2009-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20573130; 20673137)

作者简介: 曾虹燕(1965—), 女, 河南洛阳人, 博士, 教授, 生物化工专业

壳聚糖是一种天然生物高分子材料,具有无毒、抗菌保健、良好的生物相容性和可降解等性能,在化工、医药、印染等领域有着广泛的应用^[1]。近年来,低分子量壳聚糖的制备得到了许多学者的重视,对壳聚糖的不同降解法得到了深入的研究^[2]。由于相对分子质量对壳聚糖的性质有很大影响,因此将壳聚糖降解到需要的相对分子质量是其应用的前提。目前主要使用化学降解法^[3],化学试剂双氧水由于其降解成本低、产品无残毒等优点得到广泛应用,但反应时间长,易发生副反应。硼氢化钠易于与壳聚糖中乙酰氨基发生亲和取代反应,生成具有氨基的壳聚糖,但硼氢化钠易产生硼污染。L- α -丙氨酸液中的氨基能提高壳聚糖的氨基含量,改善活性,但降解效果不明显。因此,选择合适的降解方法具有重要意义。

γ 射线辐照方法降解壳聚糖工艺,具有操作简单、无污染、易控制、技术附加值高并可在常温下进行等优点,国内外学者已展开了广泛研究^[4-6]。本工作拟以化学试剂双氧水、硼氢化钠和 L- α -丙氨酸为溶液,采用 γ 射线辐照新技术,降解制备一系列低相对分子质量的壳聚糖,研究 γ 射线剂量对不同溶液中壳聚糖的降解、脱乙酰度和白度的影响。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

壳聚糖,自制,相对分子质量 2.6×10^5 ,脱乙酰度 80.5%,白度 69%;其余试剂均为分析纯。⁶⁰Co 辐射源,中国科学院上海应用物理研究所;Specrum Qne B 型傅立叶变换红外光谱仪,美国 PE 公司;U-2001 紫外-可见分光光度仪,日本 HITACHI 公司;YQ-Z-48A 型白度仪,上海三准仪器设备有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 γ 射线辐照制备低分子量壳聚糖 准确称取壳聚糖样品若干,分别分散于蒸馏水、 $w = 0.5\%$ 硼氢化钠水溶液、 $w = 0.5\%$ L- α -丙氨酸水溶液和 $w = 1.0\%$ 双氧水溶液中,配成 10% 的壳聚糖悬浊液,超声波除去悬浊液空气,通入氮气,进行不同剂量的 ⁶⁰Co (0、25、50、100、150、200 kGy) 辐照,抽滤。浓缩滤液,无水乙醇检验壳聚糖的水溶性。同时真空干燥滤出物,得低分子量壳聚糖,称重,备用。

1.2.2 相对分子质量(M_r) 测定 乌氏粘度计测

试壳聚糖的特性粘度 η ,根据 Mark-Houwink 公式计算相对分子质量。按照文献^[7]测定($n=3$)。

1.2.3 脱乙酰度(D. D)的测定 电导滴定法参考文献^[8]测定。

1.2.4 白度测定 参见 GB 12097—89 测定。

2 结果和讨论

2.1 辐照剂量对不同溶液中壳聚糖的降解

γ 射线在大气和真空环境下对壳聚糖的照射都使壳聚糖发生明显的降解反应,如图 1(a)所示。壳聚糖相对分子质量随辐照剂量的增加而呈下降趋势,辐照降解效果明显。

$w = 1.0\%$ H_2O_2 液中,壳聚糖降解速度最快,100 kGy 辐照剂量时,样品相对分子质量减小至 2.5×10^4 ;200 kGy 时,降至 1.8×10^4 。在水中辐照剂量分别为 100 kGy 和 200 kGy 时,样品相对分子质量由 2.6×10^5 降至 5.3×10^4 和 2.8×10^4 。在 $w = 0.5\%$ $NaBH_4$ 和 $w = 0.5\%$ L- α -丙氨酸液中,小于 25 kGy 时,壳聚糖相对分子质量降解缓慢;25~100 kGy 辐照范围,相对分子质量降解速度加大;100~200 kGy 范围,样品相对分子质量均略有减少。100~200 kGy 范围, $w = 0.5\%$ $NaBH_4$ 和 $w = 0.5\%$ L- α -丙氨酸液中的壳聚糖相对分子质量下降速度与水的几无差异。由图 1(a)可知,分散在双氧水中的壳聚糖相对分子质量降解最为剧烈,样品相对分子质量也最低。

0~100 kGy 辐照范围,所有样品随辐照剂量的增加,其相对分子质量急剧下降。当辐照剂量继续增大,样品的相对分子质量下降明显减缓,基本上保持在 $1.8 \times 10^4 \sim 2.8 \times 10^4$ 范围内,降解效果不明显。其它多糖经过辐照后也得到类似的结果,比如琼脂、海藻酸盐,尤其是卡拉胶溶液。 γ 射线辐照可以诱导壳聚糖多聚物 $\beta(1-4)$ 糖苷键的断裂,从而使聚合物的相对分子质量降低;因此对壳聚糖进行一定剂量的辐照可以使得壳聚糖的粘度迅速降低^[9]。 γ 射线辐照对在 H_2O_2 中的壳聚糖相对分子质量降解速率最快,能力最强,可能 H_2O_2 经辐照分解出的 $\cdot OH$ 对壳聚糖的降解有至关重要的作用, $\cdot OH$ 引发了壳聚糖的自由基降解,同时, $\cdot OH$ 的强氧化作用又引发其氧化降解,两种作用综合结果,使壳聚糖的降解速度大大增加^[10]。

2.2 辐照降解对不同溶液中壳聚糖脱乙酰度的影响

辐照剂量对不同溶剂中壳聚糖脱乙酰度的影

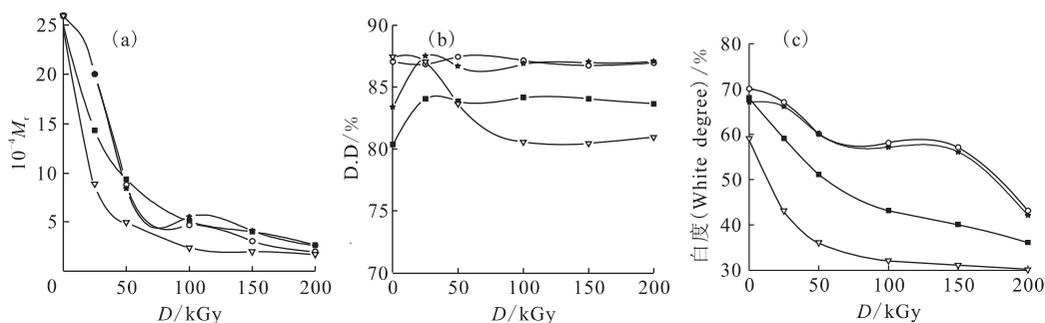


图 1 辐照剂量对壳聚糖相对分子质量(a)、脱乙酰度(b)和白度(c)的影响

Fig. 1 Effect of radiation dose on average-molecular weight(a), chitosan deacetylation(b) and the white degree(c) of chitosan

■— H_2O , ○— NaBH_4 , ★—丙氨酸(Alanine), ▽— H_2O_2

响示于图 1(b)。从图 1(b)可知,在未辐照条件下,分散在水中的样品的脱乙酰度保持不变,为 80.4%;25 kGy 辐照时脱乙酰度略有提高,为 84.1%,但并不随辐照剂量继续增大而改变。辐射电离 H_2O 中的 OH^- 离子与乙酰基发生反应,可能取决于两种作用,即酰氨的水解阻力和小分子扩散阻力。反应后期由于分子胶团阻力,使得 OH^- 离子难以扩散进入壳聚糖,而使反应难以进行。这使甲壳素脱乙酰化反应很难达到高脱乙酰度^[11]。

分散在硼氢化钠溶液中未辐照壳聚糖的脱乙酰度升高到 87.1%,但辐照剂量对分散在硼氢化钠溶液中的壳聚糖几无影响。这主要是由于壳聚糖脱乙酰化反应属于亲和取代反应,硼氢化钠溶液呈碱性, BH_4^- 首先通过扩散进入壳聚糖,与乙酰氨基发生亲和取代反应,脱去乙酰基,生成具有氨基的壳聚糖,所以未辐照时壳聚糖脱乙酰度有所提高;但辐照没有提高 BH_4^- 活性,故辐照剂量对脱乙酰度影响不明显。

分散在 L- α -丙氨酸液中的壳聚糖未辐照时,其脱乙酰度提高到 83.4%,25 kGy 辐照样品脱乙酰度稍有提高,为 87.5%,进一步增大辐照剂量对壳聚糖脱乙酰度几无影响。可能 L- α -丙氨酸液中本身已含有氨基整合到壳聚糖的分子中,故未辐照时样品脱乙酰度有所提高。增大辐照剂量为 25 kGy,辐射部分氨基酸开链,使得氨基基团进一步整合到壳聚糖的分子中,使得壳聚糖分子中的氨基略微增多。未辐照的 H_2O_2 中壳聚糖脱乙酰度也升高到 87.5%;与 25 kGy 辐照强度下的相差无几(87.1%);50 kGy 辐照剂量下其脱乙酰度则迅速降至 83.7%;100~200 kGy 剂量时,其脱

乙酰度稳定在 80.4%左右。可能当辐照强度大于 25 kGy 时,增大辐照强度能产生更多的强氧化性基团与部分氨基反应,降低了氨基的含量,使得脱乙酰度降低。

综上所述,所有样品的脱乙酰度几乎均处于 80.4%~87.5%的范围内,辐照剂量对壳聚糖脱乙酰度无显著影响,从 FTIR 分析可知,辐照没有改变壳聚糖的酰胺结构,其酰胺结构保持不变(图 2),这与张志亮等^[12]报道相符。综合图 1(a)、(b)结果,在一定溶剂环境和辐照剂量下,壳聚糖降解产物的脱乙酰度与其分子量不相关,无章可循。

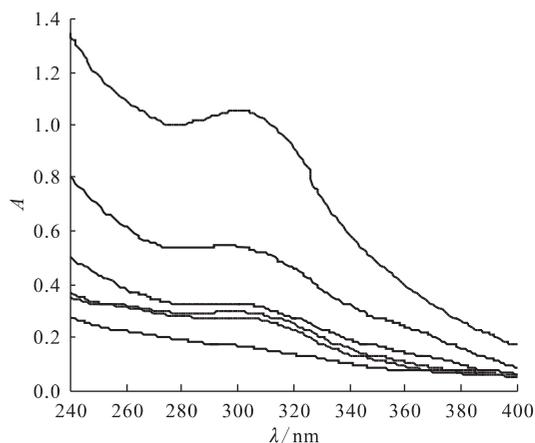


图 2 不同溶液、不同辐照剂量下的壳聚糖的 UV 图谱

Fig. 2 UV-VIS spectra of the chitosan under different irradiation

自下而上(From bottom to top):0 kGy, H_2O ;

100 kGy, NaBH_4 ; 100 kGy, 丙氨酸(Alanine); 0 kGy, H_2O_2 ;
25 kGy, H_2O_2 ; 100 kGy, H_2O_2

2.3 辐照对不同溶液中壳聚糖白度的影响

辐照剂量对壳聚糖白度的影响示于图 1(c)。

从图 1(c)可知,随着辐照剂量的增加,样品的白度均呈现下降趋势,分散在 H_2O_2 溶液中样品的白度下降最大,其次为 H_2O ,分散在 $L\text{-}\alpha\text{-丙氨酸}$ 和硼氢化钠溶液中样品的白度下降幅度相近,最为缓慢。 H_2O_2 中的样品未经辐照,其白度已从 69% 降至 59%; 在 25~200 kGy 辐照剂量下,随辐照剂量增大样品白度急剧下降至 30%。未经辐照其白度已下降,可能由于 H_2O_2 强氧化引发壳聚糖产生有色基团副产物,即碳氧双键 $C=O$ ^[13],从而使其白度降低。当 γ 射线辐照时, γ 射线又加大 $C=O$ 生成,使壳聚糖的白度大大降低。 H_2O 、 $L\text{-}\alpha\text{-丙氨酸}$ 和硼氢化钠样品未经辐照时,其白度几无变化,均约为 68%。25~150 kGy 辐照剂量下,在 H_2O 中随辐照剂量增大样品白度降低,从 68% 降至 40%; 而在 $L\text{-}\alpha\text{-丙氨酸}$ 和硼氢化钠液中,随辐照剂量增大样品白度下降明显减缓,从约 67% 降至约 56%。 $NaBH_4$ 是一种强还原剂,它能选择性与壳聚糖中可能形成的 $C=O$ 结合,使其为无色基团。而 $L\text{-}\alpha\text{-丙氨酸}$ 可直接与 γ 射线辐照所产生的激活基团结合,从而降低了 $C=O$ 生成。所以, $NaBH_4$ 和 $L\text{-}\alpha\text{-丙氨酸}$ 可提高壳聚糖抗 γ 射线辐照能力。

2.4 辐照剂量对不同溶液中水溶性壳聚糖的形成

低于 25 kGy 辐照剂量,所有降解样品的水溶性壳聚糖均无检出。在 50~200 kGy 辐照剂量下,随着辐照剂量的增加,水溶性壳聚糖含量均有所增加。在相同辐照剂量下, H_2O_2 中的水溶性壳聚糖含量最高,水、 $NaBH_4$ 和 $L\text{-}\alpha\text{-丙氨酸}$ 液中的水溶性壳聚糖的含量几无差异。在 200 kGy 辐照剂量下, H_2O_2 中的水溶性壳聚糖含量为 6%; 其余三者为 4%。

γ 射线辐照 H_2O_2 中壳聚糖生成的水溶性壳聚糖含量最高,主要是因为 γ 射线辐照对 H_2O_2 中的壳聚糖分子量降解能力最强,使得其产生低分子水溶性的壳聚糖的概率较之其它溶液的大,故产生较多的水溶性壳聚糖。但在本文现有的实验条件下,较难得到高含量水溶性壳聚糖,而低分子量壳聚糖居多。

2.5 UV-VIS 分析

随着辐照剂量的增加,降解产物的颜色不断加深,原因是降解过程中生成了碳氧双键^[13]。图 2 为壳聚糖溶液辐照降解前后的 UV 吸收谱图。壳聚糖本身没有生色团,只有残留乙酰氨基中 $C=O$ 的很弱的吸收(图 2; 0 kGy, H_2O),因而壳

聚糖不是紫外吸收剂。

在 H_2O_2 中样品随着辐照剂量增加,300 nm 的紫外吸收变得明显,强度逐渐增强。该峰为羰基 $C=O$ 吸收峰,是壳聚糖辐照降解时生成的。样品紫外吸收在 100 kGy 时比在 25 kGy 时强得多,也比同等辐照强度下 $NaBH_4$ 和 $L\text{-}\alpha\text{-丙氨酸}$ 液中强得多。

样品在 $L\text{-}\alpha\text{-丙氨酸}$ 和 $NaBH_4$ 液中经 100 kGy 辐照后的 300 nm 处的峰强与在 H_2O_2 中辐照前的几无差异,说明它们生成了等量的 $C=O$ 结构,故它们的白度基本相似,这与辐照对壳聚糖颜色影响结果一致(图 1(c)),也与红外分析的结论(图 3)一致,表明 H_2O_2 中的样品在 100 kGy 辐照降解有更多的 $C=O$ 结构形成,其白度最低。可能由于 H_2O_2 辐解产生的 $\cdot OH$ 自由基进攻壳聚糖分子,引发壳聚糖主链上 $\beta\text{-}(1\rightarrow4)$ 醚键的断裂,并形成羰基。而 $L\text{-}\alpha\text{-丙氨酸}$ 和 $NaBH_4$ 液中在 100 kGy 时产生的 $C=O$ 结构较少,所以它们的白度较高。另外,UV 分析表明壳聚糖主链结构未见变化,这与红外分析的结论(图 3)一致。

2.6 FTIR 分析

壳聚糖辐照降解过程主要是糖苷键的随机断裂^[14]。为研究降解壳聚糖结构的变化,对不同溶液、不同辐照剂量下的壳聚糖降解产物进行了 FTIR 分析,结果示于图 3。由图 3 可见,辐照降解前后所得不同相对分子质量壳聚糖在 3 440($\nu O-H$, νNH_2)、2 919、2 880($\nu C-H$)、1 420(δCH_2)、1 151($\nu C-O-C$)、1 093($\nu-CHOH-$)、1 052 cm^{-1} ($\nu-CH_2OH$) 均有明显红外吸收,这些吸收峰都来自壳聚糖主链环状结构; 897 cm^{-1} 处的红外吸收是壳聚糖环状结构的振动吸收。辐照降解前后这些吸收峰的位置和强度没有明显变化,表明辐照降解时壳聚糖的化学结构没有变化,从而可断定经过辐照后材料没有新的化学键形成。辐照前后在 1 650 cm^{-1} ($\nu C=O$) 和 1 596 cm^{-1} ($\delta N-H$) 的酰胺特征吸收峰的位置和强度也没有显著变化,说明降解时壳聚糖酰胺结构基本保持不变,脱乙酰度没有显著改变。但 H_2O_2 溶液中的样品在 1 650 cm^{-1} 处随辐照剂量的加大其强度增强,此处为 $C=O$ 吸收峰,可能 H_2O_2 的样品在降解过程中,部分羟基被氧化成了羰基缘故。样品在 $L\text{-}\alpha\text{-丙氨酸}$ 和 $NaBH_4$ 溶液中 100 kGy 辐照后在 1 650 cm^{-1} 的峰强与在 H_2O_2 溶液中辐

照前的几无差异,这与紫外吸收分析结果(图2)一致。FTIR分析结果说明,在降解过程中确有C=O结构生成。同时 1700 cm^{-1} 左右也未出现吸收峰,说明降解时样品的—OH没有氧化成羧基。

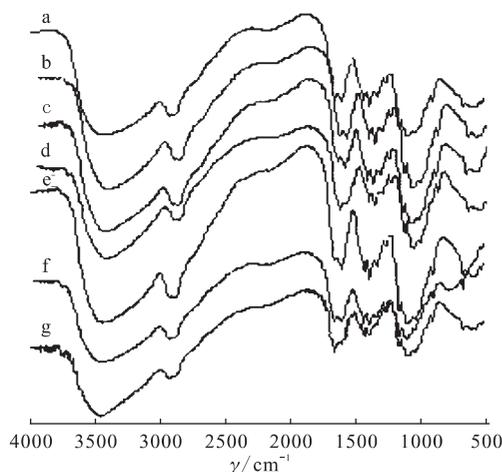


图3 不同溶液、不同辐照剂量下壳聚糖的 FTIR 图谱

Fig. 3 FTIR spectra of the irradiated chitosan samples

a—0 kGy, H_2O ; b—100 kGy, H_2O ;

c—0 kGy, H_2O_2 ; d—25 kGy, H_2O_2 ;

e—100 kGy, H_2O_2 ; f—100 kGy,

丙氨酸(Alanine); g—100 kGy, NaBH_4

3 结论

用 γ 辐照降解法成功制备了一低相对分子质量的壳聚糖,研究了 γ 射线剂量对不同溶液中壳聚糖的降解、脱乙酰度和白度的影响。在小于100 kGy辐照范围内,随辐照剂量的增加,所有样品的相对分子质量急剧下降。当辐照剂量继续增大($>100\text{ kGy}$),壳聚糖降解效果不明显。辐照降解时壳聚糖酰胺结构基本保持不变,脱乙酰度无显著变化。在低辐照($<150\text{ kGy}$)条件下, NaBH_4 或L- α -丙氨酸溶液对壳聚糖的白度有一

定的保持效果。

参考文献:

- [1] 徐鑫,王静. 甲壳质和壳聚糖的开发及应用[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2002, 34(1): 95-100.
- [2] 朱孔营, 渠荣遴, 李方. 低分子量壳聚糖制备与应用研究进展[J]. 高分子通报, 2006, (2): 41-45.
- [3] 陈巍, 罗志刚, 李忠彦, 等. 物理方法在壳聚糖降解中应用[J]. 酿酒, 2006, 33(2): 57-60.
- [4] 赵军旗, 邓钢桥, 邹朝晖. 辐射加工技术在壳聚糖降解中的应用研究[J]. 湖南农业科学, 2007, (1): 103-105.
- [5] 张卫东, 李正魁, 朱佳廷, 等. 壳聚糖电离辐射降解的研究[J]. 核农学报, 2005, 19(1): 55-57.
- [6] 杨波, 赵榆林, 杨万明, 等. γ 射线辐照降解壳聚糖的工艺和机理研究[J]. 化学世界, 2006, 47(11): 660-662.
- [7] 杨国臣. 黏度法测定壳聚糖的相对分子质量的研究[J]. 雁北师范学院学报, 2006, 22(2): 45-46.
- [8] 贾之慎, 李秀玲. 酸碱电导滴定法测定壳聚糖脱乙酰度[J]. 分析化学, 2002, 30(7): 846-848.
- [9] Choi W S, Ahn K J, Lee D W, et al. Preparation of Chitosan Oligomers by Irradiation[J]. Polym Degrad Stab, 2002, 78(3): 533-538.
- [10] 康斌, 戚志强, 伍亚军, 等. γ 辐射降解法制备小分子水溶性壳聚糖[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2006, 24(2): 83-86.
- [11] 张子涛, 陈东辉, 陈亮, 等. 甲壳素脱乙酰化及其动力学[J]. 青岛大学学报(工程技术版), 2000, 15(4): 23-26.
- [12] 张志亮, 彭静, 黄凌, 等. 壳聚糖在水溶液中的辐射降解反应[J]. 高分子学报, 2006, 7: 841-847.
- [13] Qin C Q, Du Y M, Xiao L. Effect of Hydrogen Peroxide Treatment on the Molecular Weight and Structure of Chitosan[J]. Polym Degrad Stab, 2002, 76(2): 211-218.
- [14] 李治, 刘晓非, 徐怀玉, 等. 壳聚糖的 γ 射线辐射降解研究[J]. 应用化学, 2001, (2): 104-107.