

壳聚糖超声可控降解及降解动力学研究*

李 瑾¹ 杜予民^{1**} 姚评佳² 魏远安²

(¹ 武汉大学资源与环境科学学院 武汉 430079) (² 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室 南宁 530005)

摘 要 通过正交实验法考察了壳聚糖溶液浓度、反应温度、超声强度以及醋酸溶液浓度对超声降解反应的影响,确定了最佳反应条件,制备了一系列不同分子量的壳聚糖.研究了壳聚糖溶液浓度、反应温度以及壳聚糖原料分子参数与降解速率常数的关系.通过红外光谱、X-射线衍射和凝胶渗透色谱对降解产物进行了表征.结果表明,超声降解壳聚糖的最佳条件为 10℃,壳聚糖溶液浓度 2.5 g/L.降解速率常数随壳聚糖溶液浓度和反应温度的降低而增大.高分子量和低脱乙酰度的壳聚糖原料有较高的降解速率和降解速率常数,壳聚糖原料的分子量对降解速率和降解速率常数的影响大于脱乙酰度对其的影响.超声波导致了壳聚糖分子量的降低和产物晶体结构的破坏,但没有改变产物的脱乙酰度和糖残基结构.

关键词 壳聚糖, 超声波, 降解, 分子量

低分子量(重均分子量小于 5×10^4)壳聚糖不仅具有一些与壳聚糖相似的性质,而且还具有其独特的生物生理活性,使其在农药、医药及化妆品等领域有着比高分子量壳聚糖更广泛的应用^[1~5],受到了普遍的关注.如用重均分子量为 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 的低分子量壳聚糖作载体的基因输送系统在动物模型中有着良好的表达和生物效应,显示了比聚 L-赖氨酸更高的转染效率^[6].分子量为 2×10^4 的低分子量壳聚糖显示了比分子量为 1.4×10^5 的壳聚糖更好的与粘多糖的亲合力,从而有效地改善了糖尿病的治疗效果^[7].目前,主要采用降解法制备低分子量壳聚糖,包括化学降解法、物理降解法和生物降解法.其中超声降解法因降解过程无其它反应试剂参加,无副反应发生,后处理过程简单而使其降解产物在医药和食品领域方面的应用受到重视^[8,9].但超声降解条件对降解速率及降解速率常数的影响、超声波降解产物的结构鲜见系统报道.本文揭示了壳聚糖原料脱乙酰度及分子量对超声降解速率及降解速率常数的影响.探讨了超声波作用于壳聚糖分子链的方式,对壳聚糖的超声降解产物进行了表征,为制备特定分子结构的低分子量壳聚糖提供了科学依据.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

壳聚糖(浙江玉环海洋生物化学有限公司产

品)的分子参数列于表 3 中,除特别指明,实验所用壳聚糖均为 CS4.其它试剂均为分析纯.

Thermo Nicolet FT-IR 5700 红外光谱仪(美国, Nicolet 公司);XRD-6000 型 X-射线衍射仪(日本, Shimadzu 公司);TSP 高效液相色谱仪(美国, Thermoquest 公司);JY 92-IID 型超声波细胞粉碎机(中国,宁波新芝科器研究所);DELTA-320-S 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司).

1.2 最佳降解条件的确定

采用正交设计实验研究了反应条件对产物分子量的影响.壳聚糖的醋酸溶液置于超声场中,间歇式超声 30 min(仅计超声时间).反应结束后,降解产物过滤,用凝胶渗透色谱(GPC)测定其重均分子量(M_w)及分子量分布(M_w/M_n).

1.3 壳聚糖分子量(M_w)及分子量分布(M_w/M_n)的测定

在 TSP 高效液相色谱仪(TSP P100 泵,示差折光检测器 RI150)上,用 TSK G5000PWXL 作为色谱分离柱,进行分子量及分子量分布测定,用江申色谱工作站(大连江申色谱软件公司生产)进行数据采集和分析.标准样品为已知分子量的水溶性普鲁兰,以 0.2 mol/L CH_3COOH /0.1 mol/L CH_3COONa 缓冲溶液为流动相,流速为 1.0 mL/min,柱温 30℃.用普适校正得 GPC 校正方程式:

$$\lg M_w = 9.7668 - 0.6500 V_e$$

* 2006-03-01 收稿,2006-04-06 修稿.国家自然科学基金(基金号 29977014)、广西亚热带生物资源保护利用重点实验室开放基金(基金号 SB0404)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: duiyumin@whu.edu.cn

按平均分子量定义法求重均分子量 (M_w) 和分子量分布 (M_w/M_n) .

1.4 脱乙酰度(DD)的测定

DD 的测定参见文献[10] .

1.5 降解速率(R)及降解速率常数(k)的测定

在超声降解过程中,一定超声时间内壳聚糖分子量的降低百分率定义为降解速率 $R_{i,j}$,可由下式确定:

$$R_{i,j} = [1 - (M_j/M_i)] \times 100\% / t$$

式中 M_i 和 M_j 分别为壳聚糖经过超声处理 i 和 j ($j > i$) 分钟后的重均分子量; t 为超声降解时间(min), $t = j - i$.

在降解初期,壳聚糖的超声降解反应遵循一级反应动力学,降解速率常数 $k_{i,j}$ 可以由下式确定:

$$1/M_j = 1/M_i + k_{i,j}t/m = 1/M_i + k'_{i,j}t$$

式中 $k_{i,j}$ 为 $j - i$ 超声时间内壳聚糖分子量的降解速率常数(min^{-1}); m 为壳聚糖单糖的分子量, $m = 161 + 42(1 - \text{DD})$.

1.6 低分子量壳聚糖样品的制备

0.375 g 壳聚糖溶解于 150 mL 0.175 mol/L 醋酸溶液中,壳聚糖溶液于 10℃ 间歇式超声处理 10,90,240 及 480 min (仅计超声时间) 后,降解产物在 45℃ 减压浓缩,用 1 mol/L KOH 溶液调节溶液的 pH 值为 9,收集沉淀,用蒸馏水反复洗涤至中性,然后用无水乙醇洗涤,真空干燥,获得低分子量壳聚糖 LMWC1,LMWC2,LMWC3 和 LMWC4.

2 结果与讨论

2.1 超声降解制备低分子量壳聚糖的最佳反应条件

以壳聚糖 CS4 (M_w 为 2.86×10^5) 溶液的浓度、反应温度、超声强度和醋酸溶液浓度为影响因子,以降解产物分子量作为主要的评价指标,利用 $L_9(3^4)$ 正交设计表设计正交实验(见表 1),实验安排、实验结果以及数据处理结果如表 2 所示.表 2 中正交实验的结果表明,在实验范围内,最佳反应条件为壳聚糖溶液浓度 2.5 g/L,反应温度 10℃,醋酸溶液浓度 0.175 mol/L,超声强度 9.0 $\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$.壳聚糖溶液浓度和反应温度对降解产物分子量影响最大,其次为醋酸溶液的浓度,超声强度对反应的影响最小.

Table 1 The variables investigated for preparation low molecular weight chitosan by ultrasound and their levels

Variables investigated	Levels of each variable		
	1	2	3
A Chitosan concentration (g/L)	2.5	5.0	10.0
B Reaction temperature (℃)	10	30	50
C Sonic intensity ($\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$)	3.0	6.0	9.0
D HAc concentration (mol/L)	0.175	0.525	0.875

Table 2 Conditions of ultrasound treatment and the results of orthogonal test for preparation low molecular weight chitosan

Sample	A	B	C	D	$M_w (\times 10^5)$	M_w/M_n
1	1	1	1	1	1.33	3.12
2	1	2	2	2	1.55	3.29
3	1	3	3	3	1.38	3.12
4	2	1	2	3	1.64	3.41
5	2	2	3	1	1.71	3.65
6	2	3	1	2	1.81	3.35
7	3	1	3	2	1.72	3.48
8	3	2	1	3	1.91	3.98
9	3	3	2	1	1.66	3.42
k_1^a	42.6	46.9	50.5	47.0		
k_2	51.6	51.7	48.5	50.8		
k_3	52.9	48.5	48.1	49.3		
Variance	10.3	4.8	2.4	3.8		

^a k_i : sum of level i

2.2 超声降解过程中分子量的变化

图 1 为壳聚糖 CS4 及其降解产物的 GPC 图.从图中可以看出,随着反应时间的延长,降解产物的流出峰向高淋洗体积方向移动,说明超声波可以有效降低壳聚糖的分子量,分子量分布也随之减小.图中 LMWC1 的 GPC 图谱显示了双峰现象,这说明超声波水解壳聚糖的最初阶段会产生两种主要分子量的产物,与文献报道相符[11] .

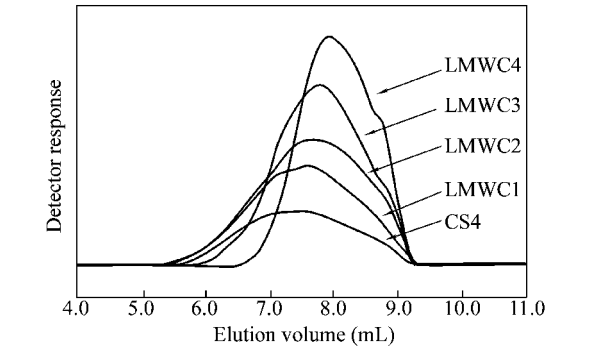


Fig. 1 GPC profiles of products of CS4 prepared by ultrasonication at different reaction periods
Ultrasonic treatment condition :concentration of CS4 2.5 g/L, reaction temperature 50℃,concentration of HAc 0.175 mol/L and sonic intensity 9.0 $\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$

图 2 为不同分子参数的壳聚糖原料在超声波降解的不同时间分子量的变化情况。如图所示,壳聚糖的分子量均在超声波处理前期下降很快,随着反应的进行,分子量的变化逐渐减慢,呈渐近线变化,直至达到最终降解分子量。这种分子量的变化趋势是超声波降解聚合物的特点,与超声波处理葡聚糖的结果一致^[12]。最终降解分子量的存在,不是因为当降解产物的分子量达到这一值时,超声波不能再作用于壳聚糖的糖苷键,而是因为降解的深入、分子链的断裂,使得溶液中总的分子数目增加。所以,如果在可以被超声波作用的分子链数目保持不变的同时,而需要被超声波作用的分子链数目增加,就会导致超声降解能力的下降。因此,分子量大的壳聚糖原料的最终降解分子量较分子量小的壳聚糖原料大。实验结果表明,分子量为 2.86×10^5 , 脱乙酰度为 91.7% 的壳聚糖原料 CS4 在超声处理 480 min 后达到其最终降解分子量 2.2×10^4 。

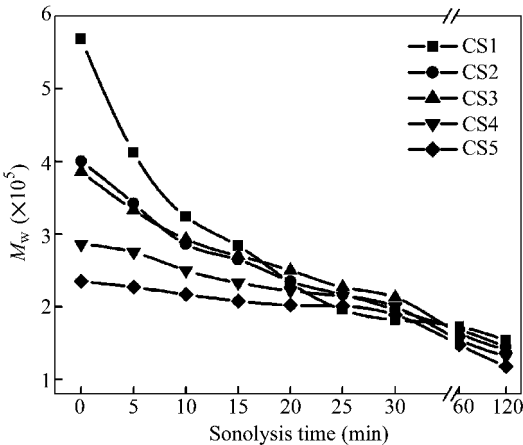


Fig. 2 Relationship between the molecular weight and sonolysis time of five kind of initial chitosan

The parameters of investigated chitosan were listed in Table 1, concentration of chitosan solution 2.5 g/L, reaction temperature 10℃, concentration of HAc 0.175 mol/L and sonic intensity $9.0 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$

由上述讨论可知,在超声波作用于壳聚糖溶液的同时使用超滤等方法从反应体系中及时除去小分子量的降解产物,可以有效提高超声波降解壳聚糖的效率,从而有望进一步降低壳聚糖的最终降解分子量。

2.3 降解速率常数

2.3.1 反应温度对降解速率常数的影响 当壳聚糖溶液浓度为 2.5 g/L 时,不同反应温度下降解产物的分子量倒数与反应时间的关系曲线如图

3 所示。显然,在超声降解的最初阶段,反应温度低时具有较高的降解速率常数。因为超声对壳聚糖降解的促进作用必须在溶液中存在气泡的条件下才会发生,温度升高,样品溶液内部的气体流失,从而空化泡无法发生,抑制了超声波对壳聚糖的降解作用,降解速率常数低。所以,空化作用是壳聚糖在超声波作用下发生降解的主要原因。

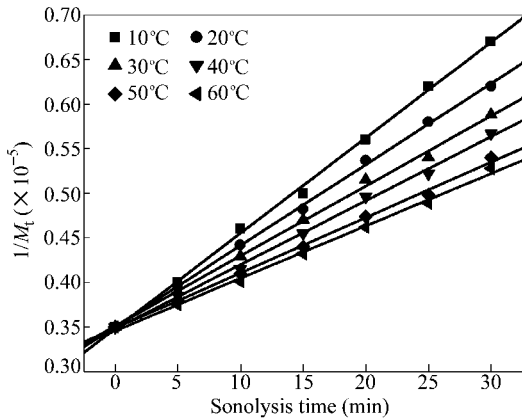


Fig. 3 Plot of the reciprocal of molecular weight of degraded chitosan during ultrasonic treatment using 2.5 g/L chitosan concentration at different reaction temperature against sonolysis time.

Ultrasonic treatment condition : concentration of HAc 0.175 mol/L and sonic intensity $9.0 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$

2.3.2 壳聚糖溶液浓度对降解速率常数的影响

超声功率一定、超声降解温度为 10℃ 时,不同壳聚糖溶液浓度下降解产物的分子量倒数与反应时间的关系曲线如图 4 所示。壳聚糖溶液浓度较大时,在相同的超声功率下,分子链所接受的切

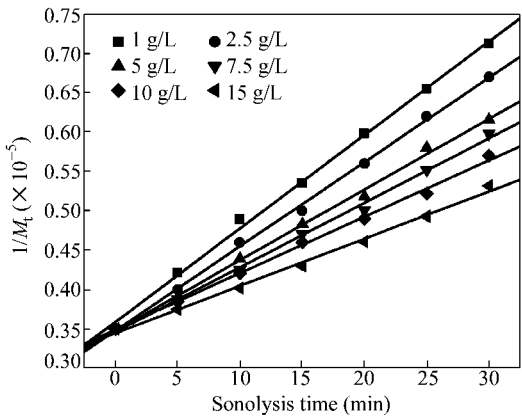


Fig. 4 Plot of the reciprocal of molecular weight of degraded chitosan during ultrasonic treatment using different chitosan concentration at 10℃ against sonolysis time

Ultrasonic treatment condition : concentration of HAc 0.175 mol/L and sonic intensity $9.0 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$

点少,分子量变化幅度小,而浓度低时,分子链所接受的切点多,分子量下降幅度大,壳聚糖降解速度快.同时,壳聚糖浓度低时,溶液粘度也低,有利于空化泡的发生,从而使降解反应容易进行.

2.3.3 壳聚糖原料分子参数对降解速率常数的影响 脱乙酰度和分子量是壳聚糖的两个重要的分子参数,二者均会影响壳聚糖分子链的构象及链的柔顺性,从而影响到壳聚糖超声降解速率

和降解速率常数.如表 3 所示,具有低脱乙酰度和高分子量的壳聚糖在超声降解初期具有较高的降解速率和降解速率常数.因为壳聚糖的这两个重要的分子参数均会影响到超声降解速率常数,所以将 k 除以 M_w 获得 k^+ 来确定脱乙酰度对降解速率常数的影响.对于不同脱乙酰度的壳聚糖, k^+ 变化不明显,说明分子量对壳聚糖超声降解速率常数的影响要大于脱乙酰度对其的影响.

Table 3 The molecular parameter of initial chitosan

Initial chitosan	DD (%)	M_w ($\times 10^5$)	$k_{i,j}(\times 10^5)(\text{min}^{-1})$				$k^+_{0,30}$ (min^{-1})	$R_{i,j}(\%/ \text{min})$		
			$k_{0,10}$	$k_{10,20}$	$k_{20,30}$	$k_{0,30}$		$R_{0,10}$	$R_{10,20}$	$R_{20,30}$
CS 1	67.2	5.68	2.32	2.11	2.10	2.19	0.39	4.30	2.81	2.19
CS 2	75.9	4.00	1.71	1.30	0.95	1.43	0.36	2.85	1.78	1.15
CS 3	81.2	3.86	1.39	1.13	1.04	1.21	0.31	2.41	1.64	1.31
CS 4	91.7	2.86	0.83	0.83	0.83	0.82	0.29	1.26	1.12	0.99
CS 5	95.3	2.35	0.58	0.56	0.55	0.55	0.23	0.77	0.69	0.64

Ultrasonic treatment condition : concentration of chitosans 2.5 g/L, reaction temperature 10℃, concentration of HAc 0.175 mol/L and sonic intensity 9.0 W·cm⁻²

随着反应时间的延长,相同时间间隔的壳聚糖超声降解速率和降解速率常数均减小.分子量大的壳聚糖随反应时间的延长,降解速率和降解速率常数降低较快.分子量小的壳聚糖具有较低的降解速率和降解速率常数,但其随时间变化不明显.这也表明,在相同的超声时间内,可以被超声波切断的分子键的数目是一定的,但是随着超声降解时间的延长,分子量大的壳聚糖在超声降解过程中产生的分子链片段比低分子量壳聚糖多,使得在相同的超声条件下,超声效率受到了限制,降解速率和降解速率常数都减小.

2.4 超声降解产物结构表征

2.4.1 降解产物的脱乙酰度 如表 4 所示,超声处理壳聚糖降低了壳聚糖的分子量及分子量分布,但是没有改变产物的脱乙酰度.这表明,超声波降解壳聚糖与酶降解壳聚糖不同^[13],超声波作用于壳聚糖时,对壳聚糖分子内存在的四种不同的糖苷键(GlcN-GlcN, GlcN-GlcNAc, GlcNAc-GlcN, GlcNAc-GlcNAc)不存在特异性识别能力,所以不会选择性地切断壳聚糖分子的糖苷键,使得降解产物的脱乙酰度与壳聚糖原料相比没有改变.

2.4.2 红外光谱分析 图 5 为壳聚糖原料及其超声降解产物 LMWC4 的红外光谱图.壳聚糖在 1655.1,1600.7 和 1324.2 cm⁻¹ 处的吸收峰分别为酰胺Ⅰ带,—NH₂ 的 δ (N—H) 和酰胺Ⅲ带^[14].超声降解产物 LMWC4 的红外谱图与壳聚糖原料

的极为相似.超声降解产物的酰胺Ⅲ带与壳聚糖原料相比没有改变,也说明超声降解没有改变壳聚糖的脱乙酰度,这与电位滴定测定脱乙酰度的结果吻合.壳聚糖及其降解产物的红外谱图说明超声处理没有改变降解产物的糖残基结构.

Table 4 Properties of degraded chitosan

Sample	$M_w(\times 10^5)$	M_w/M_n	DD (%)	Yield (%)
CS4	2.86	5.40	91.7	—
LMWC1	1.61	4.87	91.6	97.3
LMWC2	1.05	4.10	91.5	95.9
LMWC3	0.58	3.08	92.1	93.8
LMWC4	0.22	1.97	92.8	89.7

Ultrasonic treatment condition : concentration of CS4 2.5 g/L, reaction temperatur 10℃, concentrationof HAc 0.175 mol/L and sonic intensity 9.0 W·cm⁻²; LMWC1-4 were prepared from CS4 by ultrasound treatment for 10, 90, 240 and 480 min, respectively.

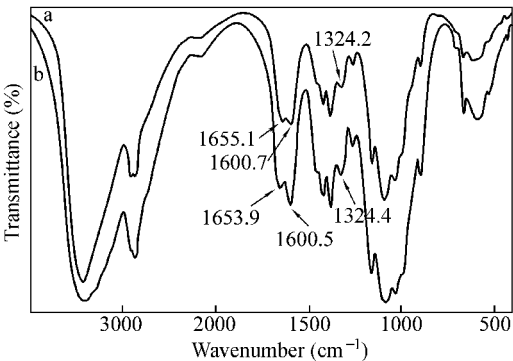


Fig. 5 FT-IR spectra of chitosan (a) and degraded chitosan LMWC4 (b)

2.4.3 X-射线衍射分析 图 6 为壳聚糖及其降解产物的 X-射线衍射图谱.壳聚糖原料在 $2\theta = 10.4^{\circ}$ 和 19.8° 处有两个特征吸收峰.而 LMWC1 和 LMWC3 的 X-射线衍射图谱与壳聚糖原料的相比, $2\theta = 10.4^{\circ}$ 处的衍射峰消失了,这表明晶面间隔增大,说明超声降解导致壳聚糖晶体完整性的破坏.用“剪纸称重”法^[15]测得壳聚糖及其降解产物结晶度的大小顺序为 $CS2 < LMWC1 > LMWC3$, 结晶度值分别为 19.1%, 35.9% 和 23.4%. LMWC4 显示一个宽峰而转变为无定型态^[16].说明超声波降解壳聚糖首先发生在壳聚糖的非结晶区,然后由结晶区的表面逐渐向里面进行.非晶区部分的优先降解使得壳聚糖的降解产物 LMWC1 的结晶度有所增加,随着分子量的降低,壳聚糖的结晶区逐渐被破坏,结晶度下降,最终成为无定形态.

综上所述,超声降解壳聚糖溶液是制备低分子量壳聚糖的一种有效方法.超声制备低分子量壳聚糖的最佳反应条件为 10°C ,壳聚糖浓度 2.5 g/L.低壳聚糖浓度和低反应温度时具有较高的降解速率和降解速率常数.高分子量和低脱乙酰度

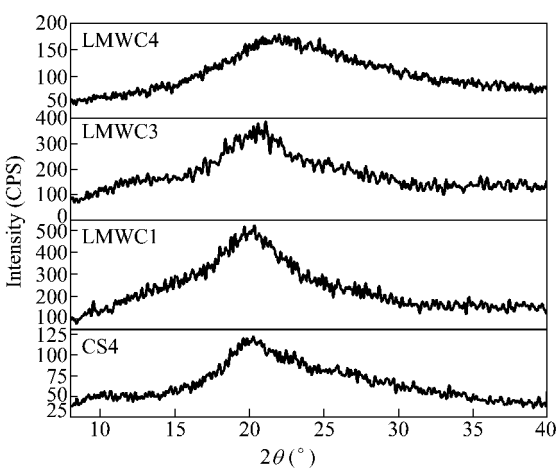


Fig. 6 X-ray diffraction patterns of initial chitosan and degraded chitosans

的壳聚糖有较高的降解速率和降解速率常数.超声波处理壳聚糖在降低分子量的同时改变了产物的晶体结构,但是没有改变产物脱乙酰度和糖残基结构.由超声波降解壳聚糖制备低分子量壳聚糖是一种安全有效的方法,降解产物更适合应用于食品和医药领域.

REFERENCES

1 Inui H,Tsujikubo M,Hirano S. Biosci,Biotechnol,Biochem,1995,59 2111 ~ 2114
2 Kumar M N V R. React Funct Polym,2000,46 1 ~ 27
3 Dodane V,Vilivalam V D. Pharm Sci Technol Today,1998,1 246 ~ 253
4 Qin C Q,Du Y M,Xiao L,Li Z,Gao X H. Int J Biol Macromol,2002,31 111 ~ 117
5 Wang Yinsong(王银松),Li Yingxia(李英霞),Song Ni(宋妮). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2004,(3) 378 ~ 382
6 Lee M,Nah J,Kwon Y,Koh J J,Ko K S,Kim S W. Pharm Res,2001,18 427 ~ 431
7 Kondo Y,Nakatani A,Hayashi K,Ito M. Biol Pharm Bull,2000,23(12) 1458 ~ 1464
8 Mason T J,Cordemans E D. Chem Eng Res Des,1996,74 511 ~ 516
9 Baxter S,Zivanovic S,Weiss J. Food Hydrocolloids,2005,19 821 ~ 830
10 Tolaimate A,Desbrieres J,Rhazi M,Alagui A,Vincendon M,Vottero P. Polymer,2000,41 2463 ~ 2469
11 Trzcinski S,Staszewska D U. Carbohydr Polym,2004,56 489 ~ 498
12 Lorimer J P,Mason T J,Cuthbert T C,Brookfield E A. Ultrason Sonochem,1995,2 555 ~ 557
13 Li J,Du Y M,Yang J H,Feng T,Li A H,Chen P. Polym Degrad Stab,2005,87 441 ~ 448
14 Dong Y M,Xu Z Y,Wang J W. Science in China, Series B 2Chem,2000,31 153 ~ 160
15 Klug H P,Alexander L E. X-ray Diffraction Procedures for Poly-crystalline and Amorphous Material. New York 2Wiley-interscience,1974. 109 ~ 110
16 Kurita K,Sannan T,Iwakura Y. Makromol Chem,1977,178 3197 ~ 3202

PREDICTION AND CONTROL OF DEPOLYMERIZATION OF CHITOSAN BY SONOLYSIS AND DEGRADATION KINETICS

LI Jin¹, DU Yumin¹, YAO Pingjia², WEI Yuan'an²

(¹ College of Resource and Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430079)

(² Key Laboratory of Guangxi Subtropical Bioresource Protection and Utilization, Nanning 530005)

Abstract Optimal conditions for preparation of low molecular weight chitosan with sonolysis were described. The influence of sonolysis conditions and the molecular parameters of initial chitosan on the degradation rate and degradation rate constant was investigated in detail. Weight-average molecular weight (M_w) and molecular weight distribution (M_w/M_n) of samples were measured by gel permeation chromatography. The structure of degraded chitosan was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray diffraction. For a given sonolysis time, the decrease in molecular weight has been found to be the greatest at the lowest reaction temperature and lowest chitosan concentration. Molecular weight of samples decreased exponentially with increasing sonication time at early stages. The action mode of ultrasound on the splitting of molecular chains of chitosan was discussed. The degree of deacetylation of the main hydrolysis products almost unchanged compared with the initial chitosan. The decrease of molecular weight led to transformation of crystal structure, but the chemical structures of residues were not modified. Ultrasonic treatment on chitosan is an alternative, safe method to prepare different molecular weight chitosan which is more suitable for biomedical and food applications.

Key words Chitosan, Ultrasound, Degradation, Molecular weight