第12卷 无锡轻工业学院学报 Vol.12
第3期 JOURNAL OF THE WUXI INSTITUTE OF LIGHT INDUSTRY 1993 No.3

综 述

甲壳素脱乙酰度的测定方法

陈 洁 杨方琪

(食品科学与工程系)

近年来,从甲壳素制取壳聚糖的生产以及对其理论和应用的研究,已越来越广泛和深入。

甲壳素是由N-乙酰基-D-氨基葡萄糖通过β-(1-4)甙键联结起来的直链多糖,大量存在于甲壳动物、昆虫和细菌中,由于其在自然界中具有丰富的资源及广阔的应用前景而日益受重视。但甲壳素由于分子内外氢键的作用,形成了有序结构,溶解性很差,所以应用受到一定限制。

甲壳素经脱乙酰基处理转变成壳聚糖,其溶解性能大大提高,应用范围同时大大扩展。

甲壳素及其衍生物有着广泛的用途。在医药工业上,由于其可被生物降解,无毒性,具有生物相容性,是一种理想的高分子材料,可用作外科手术线,人造皮肤,药物缓释剂,抗凝血剂等等。在环境保护方面,由于其可与许多重金属离子形成稳定的络合物,可用来有效捕集重金属离子进行废水净化。作为天然的阳离子聚电解质,对活性污泥、蛋白质等有很强的凝集能力,壳聚糖作为絮凝剂在工业上已获广泛应用。在食品方面,由于其具有抗菌性,保湿性,缓释性,可用于食品防腐,香料、营养素的缓慢释放,半干半湿食品的制作等。在化妆品方面,其特有的保湿、抗静电、成膜性能,使洗发护发用品具有使头发易于梳理,发色光亮,头发飘洒的功效。另外还可用于纺织,印染,造纸等方面。

由于壳聚糖溶解性能好,一般工业应用和制备各种衍生物大都以壳聚糖为起始原料。

壳聚糖中的胺基含量即甲壳素脱乙酰度,直接影响它的物化性能,如溶解度,粘度,离子交换能力,絮凝能力等等,它是鉴定壳聚糖产品质量的一个重要指标。因此,测定甲壳素的脱乙酰度或壳聚糖的胺基含量对研究和生产壳聚糖是必不可少的工作。

本文主要介绍了国内外研究工作者在甲壳素脱乙酰度测定方法上的探索。

1 碱量法

壳聚糖上的胺基呈游离状态,属伯胺,具阳离子性质,可与酸定量反应生成盐。根据此性

收稿日期:1993-01-09

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

质可测定盐中酸的含量来计算脱乙酰度(D.D).D.D定义为甲壳素分子中脱除乙酰基的链节数占总链节数的百分数,碱量法可分成一些具体的方法。

1.1 电位滴定法[1]

准确称取壳聚糖溶于0.1mol/L盐酸中(约1%),用0.1mol/LNaOH溶液回滴过量HCl,作pH-V(NaOH)曲线,用三切线法确定终点,按下式计算D.D.

游离胺基含量

$$-NH_2\% = \frac{(C_1V_1 - C_2V_2) \times 16}{m} \times 100\%$$

$$D.D = \frac{203 \times (-NH_2\%)}{16 + 42(-NH_2\%)} \times 100\%$$

式中

C_1——HCl标准液浓度(mol/L)　　V_1——HCl标准液体积(ml)

C_2——NaOH标准液浓度(mol/L)　　V_2——NaOH标准液体积(ml)

m——扣除水分后样品质量(g)

1.2 酸碱滴定法[1,2]

将一定量壳聚糖溶于0.1mol/LHCl中(约1%),以甲基橙为指示剂,用0.1mol/LNaOH滴定过量的HCl,计算同上。

1.3 氢溴酸盐法[1]

称0.5g壳聚糖,溶于100ml0.2mol/LHBr水溶液中,再加入9mol/LHBr溶液50g,生成的沉淀经离心分离,沉淀粉(壳聚糖氢溴酸盐)经甲醇浸泡后离心分离,再用甲醇浸泡,再分离,反复数次至pH值不再变化,最后用乙醚洗涤,常温真空干燥5～7d,储存于$CaCl_2$干燥器中待用。称一定量上述盐,溶解于100ml去离子水中,用0.1mol/LNaOH滴定,酚酞作指示剂,按下式计算D.D.

$$D.D = \frac{1}{\frac{4.93m}{CV} - 0.192} \times 100\%$$

式中

C——NaOH标准液浓度(mol/L)

V——NaOH标准液体积(ml)

m——样品质量(g)

碱量法要求被测样品有较高的脱乙酰度,因为溶于酸溶液后才能测定。

酸碱滴定法以甲基橙作指示剂,方法简单,但由于终点判断易于产生误差,尤其是在样品的摩尔质量较大的情况下,从而导致实验重复性差。

氢溴酸盐法如在测定过程中准确度高,使游离胺基和HBr充分成盐,结果的可靠性较高,但由于壳聚糖氢溴酸盐在较高的温度下易于分解,样品只能在常温下干燥,测定时间较长,影响它被普遍采用。

电位滴定法操作简单,分析速度快,终点判断清楚,精确度较高。因此,对于具有较高脱乙酰度的样品,电位滴定法是一个较可供选择的方法。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2　红外光谱法[3~5]

红外光谱法测定脱乙酰度,是利用酰胺的三个吸收峰,即酰胺Ⅰ 1665cm^{-1},酰胺Ⅱ 1550cm^{-1}和酰胺Ⅲ 1310cm^{-1}.脱乙酰度定量分析中通常选用的内标峰有3450cm^{-1},2867cm^{-1},1420cm^{-1},1378cm^{-1},由于酰胺Ⅲ 1310cm^{-1}和$-CH_2$是摇摆吸收峰相重叠,酰胺Ⅰ 1655cm^{-1}峰受样品含水量影响很大,而1550cm^{-1}峰的峰形比较陡,扩散小,故一般采用1550cm^{-1}峰来测定脱乙酰度,研究A1550/A2867,A1550/A1420,A1550/A1378对脱乙酰度的线性关系,发现:A1550/A1420的线性关系最好。

红外光谱法具有操作简单,速度快,样品用量少等优点,但具准确度不高,若作为一个快速测定法,在对精确度要求不太高的情况下,还是可取的。

3　折光指数法[6]

壳聚糖与甲壳素N上乙酰基含量的不同,造成了结构上的差异,类似于合成二元共聚物中主链上两种单体单元的比例发生了变化,两个不同的链节分别是β-(1,4)-2-乙酰胺基-2-脱氧-D-葡萄糖单元和β-(1,4)-2-胺基-2-脱氧-D-葡萄糖单元,由于结构不同,其稀溶液性质也有所不同。

研究不同胺基含量的壳聚糖样品其D.D和溶液折光指数增量(dn/dc)的关系发现:不同D.D壳聚糖的dn/dc不同,而且两者间符合二元无规则共聚物的dn/dc与其化学组成间的一般线性关系,因此,可以利用折光指数测壳聚糖的脱乙酰度。

按逐渐加浓法测不同浓度壳聚糖溶液的绿移Δd,按式$\frac{\Delta d}{\Delta n}=2f\cdot \mathrm{tg}(\frac{A}{2})$,其中$A$为折射池顶角,$f$为成像焦距。换算成溶液与溶剂的折光指数差$\Delta n$,用$n$对各个浓度$C$做图得直线,其斜率即折光指数$\gamma$值(ml/g),将不同脱乙酰度壳聚糖的$\gamma$对D.D作图,可得线性关系较好的直线。

由于高分子溶液的γ值在一定的分子量范围内一般(10^4以上)与分子量无关,在指定的温度、溶剂和入射光波长下,在稀溶液范围内γ是常数,因此折光指数法测定脱乙酰度有一定限制,脱乙酰度不能太低,否则溶解度太差,同时样品分子量亦要求要有一定范围,要大于10^4.

4　胶体滴定法[7]

由于壳聚糖上的胺基在酸中可质子化,形成铵离子,因此表现为一种阳离子聚电解质的性质。

聚电解质本身在水溶液中是稳定的,但如果遇到带有相反电荷的聚电解质时,彼此之间就会按一定的化学计算关系发生电荷中和反应,形成中性缔合物,最终形成沉淀。

胶体滴定法测乙酰度就是利用化学结构,分子量和浓度已知的阴离子聚电解质PVSK,滴定壳聚糖,以T、B为指示剂,测定壳聚糖中的$-NH_2$含量,然后换算成D.D,用PVSK滴定时,终点变色很灵敏。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

该方法简单、迅速、准确，不需任何复杂设备，所有分析试剂常温下稳定，可长期放置，因此胶体滴定法应用方便，是一种较为理想的分析方法。同样，胶体滴定法因为需要一定的溶解度，要求样品脱乙酰度不能太低。

5 热分析法[8]

甲壳素和壳聚糖有特征的降解温度，热分析法是通过建立在特征温度下降解质量损失与脱乙酰度的关系来测 D. D.

用 DTA，DTG 和 TG 测甲壳素，发现其最大降解率为 320℃，随样品脱乙酰度的上升，320℃降解峰变小，而 280℃的峰变大，而且脱乙酰度与两个温度下的质量损失都存在着线性关系，但在 280℃，样品 D. D>80%时，线性关系将失去拟合性。

热分析法简单、快速、准确度比较高，而且对整个 N-乙酰度范围样品都适用。

6 气相色谱法[4]

脱乙酰度的测定可采用气相色谱法，甲壳素或壳聚糖以甲醇为洗涤液，其保留时间与脱乙酰度存在线性关系，因此可用保留时间来测定脱乙酰度。

此法快速、准确。

7 元素分析法[5]

元素分析法测定乙酰化度的原理是假设乙酰化度为 x，则壳聚糖乙酰化后，其平均每个葡胺糖单位中碳原子数由原来的 6 个增加为 $6+2x$ 个，而氮原子数是不变的，测出 N/C 比后即可求出乙酰化度。

$$R=\frac{N}{C}=\frac{14.008}{12.011\times 6+12.011\times 2x}$$

$$x=\frac{0.58314}{R}-3$$

此法由于甲壳素吸湿性比较大，称量时有误差，所以测出的乙酰化度有数个百分点的误差。

8 紫外光谱-阶导数法[9]

壳聚糖用超声波降解后，测其吸光度，发现葡胺糖和 N-乙酰葡胺糖在 197，193nm 分别有最大值，在 199nm 时，N-乙酰葡胺糖的摩尔吸光系数是葡胺糖的 130 倍，乙酸的存在会干扰两种化合物的测定。研究发现，所有的乙酰光谱在 202nm 处有共同的零交点，此点靠近 N-乙酰化葡胺糖的最大吸收波长，因此在 199nm 处测定可使 N-乙酰葡胺糖与乙酸无关。测定 N-乙酰葡胺糖 0.005～0.040mg/ml 在 0.01mol/L 乙酸中的溶液紫外光谱，峰高与 N-乙酰葡胺糖的浓度成正比，脱乙酰度的测定就是利用壳聚糖降解后，测其中的 N-乙酰

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

葡胺糖的含量来计算的。

此法测定脱乙酰度快速，准确，不破坏样品结构，测定时不需精确知道乙酸浓度，可用普通的光谱仪测定。

9　苦味酸法[10]

苦味酸法利用液相色谱柱，将干燥样品放入色谱柱中，然后引入苦味酸-甲醇液，使 苦味酸与壳聚糖的$-NH_2$反应，充分反应后用甲醇洗去未反应的苦味酸，键合的苦味酸则用甲醇-DIPEA(diisopropylethylamine)转移下来，测量其稀释液的吸光度，在 DIPEA 苦味酸盐-甲醇溶液中 0～15μmol/L 浓度范围内的校正曲线是线性的。

此法可以测定不溶性样品的胺基含量，在整个 N-乙酰度范围内结果都能复现。此法相对而言比较快速简便，另外样品的用量较少，准确度较高，对于脱乙酰度较差的样品较为合适。

10　结　　论

测定壳聚糖的胺基含量或脱乙酰度方法很多，各有其应用范围。比较而言，对于溶解度较好的样品即脱乙酰度较高的样品，可采用电位滴定法，紫外光谱-阶导数法等，对于脱乙酰度较差的样品，可以采用苦味酸法，气相色谱法，热分析法，元素分析法等。从另外一个角度看，比如工业上，可采用酸碱滴定，电位滴定，胶体滴定，苦味酸法等一些对试剂、仪器要求不高，但同时又相对较简便准确的方法。而科研上，则可以采用红外元素分析，热分析紫外光谱-阶导数等方法。另外测定时，可以采用几个方法相互印证，比如红外与元素分析法并用，相互参考印证，这样结果就更为可靠。

参　考　文　献

1　林瑞询，蒋苏浜，张慕珊. 化学通报，1992；3：39～42

2　汪志君. 化学世界，1986；1：22～23

3　Sannan，T.，Kurita，K. etal Polymer，1978；Vol. 19

4　Muzzarelli，R. A. A.，Tanfani，F. etal Journal of Biochemical and Biophysical Methods，2(1980)；299～306

5　安东忠直，吉野正纪. 大坂工业技术试验所季报，1979；30(1)：75～79

6　王伟，蒋淑琴，秦汶. 应用化学，1991；8(2)：56～59

7　王伟，李索清，秦汶. 日用化学工业，1989；85：36～38

8　Alonso，G.，Peniche-Covas，C. etal Journal of Thermal Analysis Vol. 28(1983)189～193

9　Muzzarelli，R. A. A.，Rocchetti，R. Carbohydrate Polymers，5(1985)：461～472

10　Neugebaner，Z.，Brzezinski，R. Carbohydrate Research，189(1989)：363～367

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net