

低聚壳聚糖降解制备、分离、纯化、鉴别的研究进展

冯小强¹, 杨 声^{2*}, 苏中兴¹, 李会学², 赵海红²

(1. 兰州大学 化学化工学院, 兰州 730000; 2. 天水师范学院生命与化学学院, 天水 741001)

摘要: 查阅了近十年来国内外有关壳聚糖降解的最新文献, 系统地综述了壳聚糖降解制备、分离、纯化、鉴别的研究进展。

关键词: 壳聚糖; 降解; 制备; 分离; 纯化; 鉴别

甲壳素(Chitin), 壳聚糖(Chitosan)由于具有良好的生物相容性和可降解性^[1], 因而具有广泛的用途。但由于其分子量大、水溶性差、在人体内不易被吸收而使其应用受到限制^[2]。随着研究的深入, 人们发现壳聚糖经水解生成的低聚合度的葡胺糖具有较高的溶解度、易被吸收利用, 更显示其独特的生理活性和功能性质, 具有更有魅力的新用途。同壳聚糖大分子相比, 低聚壳聚糖具有: (1)水溶性: 当壳聚糖降解时, 其相对分子质量降低, 壳聚糖分子中的氢键作用随之减弱, 使壳聚糖分子在溶液中具有更大的扩展趋势, 从而引起壳聚糖分子构象发生一定的变化。而链长度和分子构象的变化使得壳聚糖在水溶液中的无序程度增加, 从而使其水溶性大为改善; (2)吸湿保湿性: 低聚壳聚糖分子中大量的—NH₂ 和—OH 强极性基团的存在, 不仅使低聚壳聚糖的水溶性大为改善, 也使其具有良好的吸湿保湿功能; (3)抗菌抑菌功能: 有试验证明壳聚糖的抑菌作用是随着壳聚糖相对分子质量的降低而逐渐增强的, 尤以相对分子质量为 1500 左右的低聚壳聚糖的抗菌效果最好^[3]。特别是相对分子质量低于一万的低聚壳聚糖更展现出独特的优良生理活性和功能性质, 即在人体肠道内活化增殖双歧杆菌, 提高巨噬细胞的吞噬能力, 促进脾脏抗体生长, 抑制肿瘤细胞生长; 降低血压、血糖、血脂、吸附胆固醇。在微环境中具有较强抑菌作用和显著的保温吸湿能力等; 特别是较高聚合度低聚壳聚糖具有阻碍病原菌生长和繁殖的功能, 能促进蛋白质合成; 活化植物细胞, 从而促进植物快速生长等^[4]。

1 低聚壳聚糖降解制备方法

目前, 低聚水溶性壳聚糖的降解方法主要有酶降解法, 化学降解及物理降解三种。另外, 最近还发展了联合降解法。

1.1 酶降解

在壳聚糖降解工艺中, 酶法降解与物理、化学降解方法相比具有许多优点^[5]。酶法降解过程和降解产物的相对分子质量更容易被控制, 而且, 酶法降解在较温和条件下进行, 可选择性地切断 β -1, 4 糖苷键, 反应过程中不需要大量的反应试剂, 对环境污染较小等。目前, 已发现有三十多种专一或非专一性酶可用于壳聚糖的降解, 从而生成各种相对分子质量的低聚壳聚糖。这些酶包括专一性降解酶如壳聚糖酶, 非专一性酶如脂肪酶、溶菌酶、蛋白酶、元酶和聚糖酶等^[6]。壳聚糖酶是壳聚糖的专一性水解酶, 主要来源于真菌。壳聚糖酶催化壳聚糖降解得到甲壳低聚糖, 其最适宜的 pH 值为 4.0~6.8, 产物是聚合度为 2~8 的低聚糖。Miyake 利用芽孢杆菌属产生的脱乙酰壳聚糖酶在 50 °C 下降解 10h, 得到了聚合度为 8 的甲壳低聚糖。自然界中的壳聚糖绝大部分由壳聚糖酶催化水解成小分子, 但是商品壳聚糖酶的价格昂贵, 不易得到。近年来研究发现许多种酶如蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、葡萄糖酶和胰酶等对壳聚糖具有非

基金项目: 天水师范学院科学研究基金资助项目(X3-01);

作者简介: 冯小强(1980—), 男, 现为兰州大学化学化工学院在读硕士研究生, 主要研究方向为电分析化学;

* 通讯联系人, 杨声(1964—), 男, 教授, 主要从事电分析化学研究工作, E-mail: ysh@mail.tsnc.edu.cn.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

专一性水解作用,也可用来催化水解壳聚糖得到低相对分子质量产品^[7]。因此,寻求经济,高效的壳聚糖非专一性水解酶就成了近年来研究的热点。陈江燕等^[8]研究了纤维素酶对壳聚糖的降解作用并初步探讨了壳聚糖水解反应的动力学,得到的水解产物有氨基葡萄糖和它的二糖、三糖和四糖,说明纤维素酶能有效地催化壳聚糖降解。陈云,胡健等^[9]采用粘度测定法和还原糖测定法,研究了温度、pH 值、反应时间、底物浓度、金属离子及壳聚糖的脱乙酰度对胃蛋白酶降解活性的影响,研究了胃蛋白酶催化降解壳聚糖的特性。华南理工大学张立彦等^[10]选用溶菌酶作为壳聚糖的水解用酶,研究了壳聚糖的脱乙酰度、温度、pH、酶解时间、底物浓度、酶浓度及摇床速率等对酶水解反应的影响,并对以上影响因素进行优化,得出了制备低聚壳聚糖的最佳生产工艺。武汉大学李艾华,杜予民等^[11]还做了曲霉 AH625 降解制备低聚壳聚糖的研究,他们从特定土壤中分离出一株能分泌胞外甲壳酶的高产菌株曲霉 AH625,在以甲壳素为唯一碳、氮源的平板上生长,将菌株在生长培养基中振荡培养 72h,再转移至诱导培养基中培养 24h,酶活力可达 0.512 μ/mL。研究了菌株的最佳产酶条件,该条件下使产酶量提高 2~3 倍。能得到 M_w 为 1127, M_w/M_n 为 1.53 的低聚壳聚糖。

有关其它壳聚糖降解酶,浙江大学戴芸,朱旭芬^[12]做了详细的综述,根据其底物特异性和断裂键的专一性将其分为 I、II、III 三类。并根据已测序壳聚糖酶的氨基酸序列相似性,壳聚糖酶分别属于糖苷水解酶 46 号、75 号和 80 号。目前,只有 2 种壳聚糖酶的 3 级结构被测定。

1.2 化学降解

1.2.1 酸降解 由于糖苷键对酸是不稳定的,所以可以利用酸(包括无机酸和有机酸)使甲壳素和壳聚糖发生水解以制备低聚糖和单糖。

早在上世纪 50 年代 Horowitz 等用酸和碱纯化后加入浓盐酸溶液进行降解反应,得到聚合度小于 10 的低聚壳聚糖。90 年代又发展了浓硫酸法和氢氟酸法。浓硫酸法是在稀盐酸中加入 65 %浓硫酸对壳聚糖进行降解反应,反应后用丙酮和硫酸的混合液处理得到甲壳低聚糖。氢氟酸法是将壳聚糖溶于稀盐酸中加入 HF 溶液进行降解反应,反应 15h 以后以碳酸钙中和掉,过滤,滤液冷冻干燥,可制得低聚壳聚糖。化学法是非特异性降解,过程难以控制,产物的相对分子质量范围较宽,但其简便易行,适于工业化生产^[13]。

传统的化学降解方法是 NaNO₂ 法,降解产物的相对分子质量可以通过改变 NaNO₂ 的加入量和反应时间来控制,国内常用此法降解壳聚糖并提取产物中的单糖组分。其方法如下:

将壳聚糖溶解于质量分数为 10 %乙酸溶液中,在搅拌下缓慢滴入一定量的 NaNO₂ 溶液,于 4 °C 下静置一段时间,使 -NH₂ 发生重氮化反应,脱去一分子 N₂,引起分子内重排使大分子链断裂,再用 NaBH₄ 还原端基,完成降解反应。该法得到相对分子质量位于 2000~3000,分布相对狭窄且为水溶性的低聚壳聚糖。反应历程如图 1 所示:

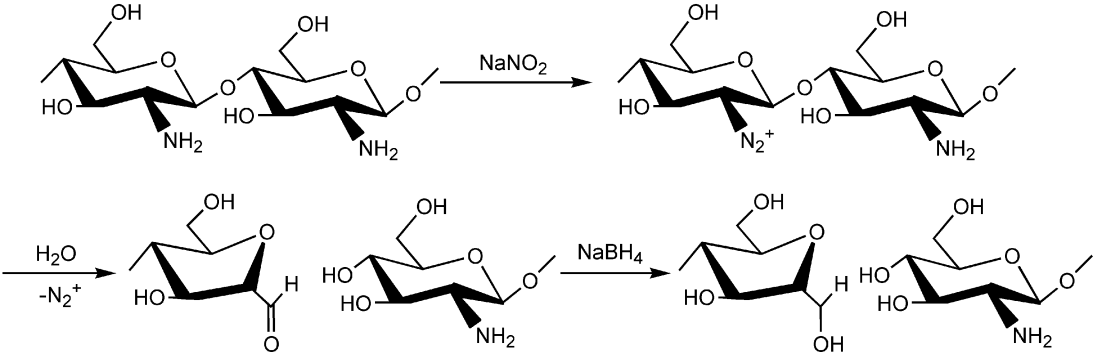


图 1 NaNO₂ 降解反应历程

Figure 1 Process of degradation by NaNO₂

该法的主要缺陷在于:(1)产品的相对分子质量分布太宽,均一性差;(2)降解过程中破坏了氨基,理论上加入 1 mol NaNO₂ 就要消耗 1 mol 氨基,而壳聚糖良好的生物相容性主要由氨基提供,同时分子链上存在足够数量的氨基也是壳聚糖进行进一步改性的重要前提,氨基数量的减少将会使壳聚糖的应用受到

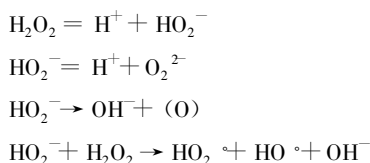
限制; (3)生产的三废污染严重^[7]。另外, 反应在低温下进行(5℃以下), 温度的变化对实验的直接影响较大。

另外, 盐酸降解也是比较常用的方法之一。中国科学院大连化学物理研究所刘晓、石瑛等^[14]研究了不同浓度 HCl 对壳聚糖、低聚氨基葡萄糖、氨基葡萄糖单糖的降解实验, 实验得到了很好的效果并找到了最佳条件。

除此之外, 还有抗坏血酸降解法^[15]、H₂SO₄-HCl 降解法^[16]等方法被用来制备低相对分子质量的水溶性壳聚糖。

1.2.2 氧化降解 过氧化氢是一种氧化能力很强的氧化剂, 用它对壳聚糖氧化降解具有无毒、无副产物的优点, 并在酸、碱和中性条件下进行都可得到低相对分子质量壳聚糖。但反应工艺条件复杂, 稳定性和重复性较差^[7]。其方法为: 将 1% 壳聚糖溶液中, 在催化剂存在条件下, 加入适量 H₂O₂ 溶液, 调节 pH 值 3~5 进行反应; 也可以将壳聚糖溶液 pH 调节到 11.5, 控制 70℃ 左右, 分批加入一定量 35% 的 H₂O₂ 溶液进行反应, 采用 H₂O₂ 氧化法可得到相对分子质量为 2000 左右的低聚壳聚糖。

过氧化氢氧化法是通过 H₂O₂ 离解产生的高活性羟基自由基攻击壳聚糖的 β-(1-4)糖苷键使壳聚糖降解, 其降解机理为: H₂O₂ 性质极不稳定, 很容易发生分解。在水溶液中, 它可按式电离



游离基 HO₂·、HO· 和新生 O, 特别是高活性的 HO· 以及新生氧 O 对壳聚糖具有强的氧化降解作用。

但 H₂O₂ 单独使用时电离产生羟基自由基的过程较慢, 氧化效果不好^[18]。为了克服这一缺点, 最近又发展了一些新的过氧化氢降解技术。例如, 福建师范大学黄群增、王世铭等^[9]探讨了在紫外光照射下 H₂O₂ 氧化降解壳聚糖的情况, 制得了相对分子质量为 2.8 万左右的水溶性壳聚糖; 金鑫荣、柴平海等^[6]在 H₂O₂ 中加入催化剂制备了相对分子质量为 2600 的低聚水溶性壳聚糖; 张文清、柴平海等^[20]研究了 NaOCl/H₂O₂ 协同氧化制备低聚壳聚糖的适宜工艺条件, 制得了相对分子质量为 930 的低聚壳聚糖。另外, 还有用 H₂O₂-NaClO₂、H₂O₂-HCl、NaBO₃·Cl₂ 等氧化降解法等^[21], 其中用 H₂O₂-NaClO₂ 氧化降解法则相对分子质量可达 600。

过氧化氢氧化法是目前最常用的方法, 也是目前研究最多的一种降解方法^[9]。特别是在日本, 每年都有这方面的研究成果见诸报道。作者对过氧化氢降解壳聚糖进行了系统研究, 通过控制反应条件, 将相对分子质量为 80 万的壳聚糖在 11 h 后降解到了 3 万左右, 同时也得出如下结论: (1) 产品的产率和颜色受反应时间的影响最大。一般以 6 h 为宜, 此时产品为乳白色, 且能得到 100% 水溶性的壳聚糖。超过 6 h 开始慢慢变成褐色甚至变黑, 甚至得不到任何产品(非水溶性和水溶性), 原因正在探讨之中; (2) 产品黏度受氧化剂与 CTS 的比例影响较大; (3) 降解温度也会对产品的颜色造成很大的影响, 温度太高(80℃ 以上)将会有部分壳聚糖炭化; (4) 降解结束后, 一定要调 pH 值为 9~10, 否则将影响产率; (5) 过滤掉非水溶性壳聚糖后的溶液浓缩后要加入 2~3 倍量的无水乙醇且放置过夜才能得到水溶性的、低相对分子质量的壳聚糖。

氧化降解存在的最大问题是在降解过程中引入了各种反应试剂, 从而增加了控制降解副反应及降解产物分离纯化的难度。目前对氧化降解过程中有色副产物的产生机理及副产物的分离鉴定尚有待进一步的研究。

1.3 物理降解

物理降解法速度快、无副产物、无环境污染, 是较理想的高聚物降解方法^[22]。其中主要方法有以下几种:

1.3.1 超声波降解^[7] 超声波对壳聚糖的降解作用是十分明显的。选用适当频率和功率的超声波照射壳聚糖, 能有效地将大分子链打断。日本的景世兵等用 28 kHz 的超声波对溶解于稀盐酸之中的壳聚糖

作用 30h, 得到了相对分子质量很低的产品(聚合度 3 ~ 12)。升高温度和延长照射时间有利于降低产物的分子量。另有研究表明, 延长超声波的作用时间可以使降解产物的相对分子质量分布明显变窄, 从而得到较为均一的、低相对分子质量的壳聚糖, 同时降解过程中氨基的含量不变。

与化学降解相比, 超声波降解的用酸量明显减少, 后处理过程大为简化, 对环境的污染也大大降低, 所以很多科研工作者都用此法研制低聚壳聚糖。超声降解法是目前试用较多的物理降解方法之一, 但是该法突出的缺点是收率太低, 导致生产成本过高, 要实现工业化还有待于进一步的研究。

1.3.2 γ 射线辐照技术 壳聚糖在 γ 射线的照射下可发生降解反应。红外光谱分析表明, 在 γ 射线的照射下, 壳聚糖主链上的 $\beta(1, 4)$ 糖苷键发生断裂, 导致相对分子质量下降, 辐射降解过程中没有产生羰基, 也没有使壳聚糖发生交联、形成支链或网状结构^[21]。

江苏省农业农科院原子能利用研究所张卫东、李正魁等^[23] 研究了壳聚糖辐射降解后产物分子量、粘度、微量元素与辐照剂量之间的关系。结果表明, 10 ~ 450 kGy 的辐照剂量可以使壳聚糖的相对分子质量由 82×10^5 降至 10×10^3 左右, 降解效果明显, 最适辐照降解剂量为 47.75 kGy; 经 10 ~ 450 kGy 剂量辐照, 壳聚糖粘度减小, 相对分子质量和粘度均随辐照剂量的增大而降低。天津大学李治、刘晓非等^[24] 用 γ 射线照射壳聚糖使之发生辐射降解, 研究了降解反应的动力学、辐射对壳聚糖脱乙酰化度的影响以及大分子链的断链机理。结果表明: 壳聚糖在 γ 射线照射下发生的辐射降解遵循无规降解动力学规律; 降解过程中壳聚糖的脱乙酰化度略有升高; 降解反应主要由壳聚糖分子链上的 C_1-O-C_4 键断裂引起, 在降解过程中生成了 δ 内酯结构的端基。随辐射剂量的增加, 壳聚糖的相对分子质量明显降低, 当辐射剂量达到 250kGy 时, 大气环境下壳聚糖的相对分子质量从 27.4 万下降到 2.4 万, 而真空环境下则下降到 2.0 万。胡健、赵国骏等^[25] 采用 γ 射线辐照相对分子质量为 450 kd 的天然壳聚糖溶液, 分析了辐照强度及辐照时间与降解产物相对分子质量、还原糖相对分子质量及相对分子质量均一性之间的关系, 并通过分级得到了若干相对分子质量(580 ~ 2800)的低聚壳聚糖。

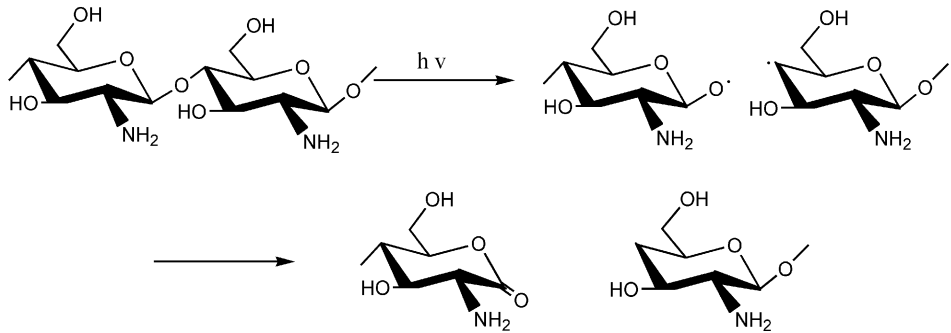


图 2 γ 射线辐照技术降解机理

Figure 2 Mechanism of degradation by gamma ray

辐射降解是不需要添加物的固相反应, 成本低, 反应易控制, 无污染, 产品品质高, 降解后壳聚糖的生物相容性不受影响, 具有广阔的发展前景。

1.3.3 微波场降解 微波降解法降解壳聚糖可使甲壳素脱乙酰化反应与壳聚糖降解反应同时进行, 降低了甲壳素脱乙酰化过程得碱用量, 缩短了反应时间, 可有效地降低成本^[26], 而且可通过改进工艺技术实现对环境无污染绿色生产^[4]。

1.4 联合降解法

所谓联合降解即以上各降解方法的组合使用, 目前是一个较新的研究领域, 所以在此方面的研究还不是太多。

张峰、殷佳敏等^[27] 进行了在超声波条件下用 H_2O_2 降解壳聚糖的研究, 研究表明, 在超声波条件下, H_2O_2 降解壳聚糖的反应能在较低温度进行, 降解反应速度提高近 3 倍, 且产物白度令人满意。

北京联合大学生物化学工程学院林强、马可立^[28] 利用纤维素酶- H_2O_2 降解法制备了低分子量壳聚糖, 分别研究了 pH 值、温度、酶浓度、 H_2O_2 加入量及反应时间等因素对产品收率及平均分子量的影响, 在

最佳反应条件 pH 为 5.6、酶/糖为 0.1、反应温度 54 °C、反应时间 6 h, 在反应结束前 0.5 h 加入一定量 H₂O₂ 进行氧化降解得到了相对分子质量为 1500 的低聚壳聚糖, 而且由于 H₂O₂ 的作用产物颜色较浅。

郝红元等^[29] 采用醋酸锰 Mn(AcO)₂·4H₂O 对壳聚糖配位控制降解的研究及降解寡糖的相对分子质量分布, 得到了较低相对分子质量的壳聚糖。

2 分离纯化方法

低聚壳聚糖的制备方法不同、制备目的不同, 相应的分离纯化方法也不同。但通常都包括调节体系的 pH 值、过滤(或离心)、真空(或冷冻)干燥等操作, 必要时可进行脱色和重结晶。例如, 由酸法水解甲壳素得到的甲壳低聚糖经活性炭-硅藻土色谱柱吸附后, 用乙醇梯度洗脱可得到不同聚合度(通常为 1~7)的寡聚糖, 然后在甲醇中结晶, 可精制得高纯度的产物。但活性炭, 硅藻土只吸附低聚糖, 而不吸附单糖, 并且吸附能力低, 需大量乙醇, 速度慢, 不适于工业化。采用凝胶过滤法处理要比活性炭-硅藻土法快速, 可获得大量的产物。有专利报道, 用离子交换膜法代替活性炭-硅藻土法, 即以离子交换膜将剩余的盐酸去除, 这样可高效回收生成的甲壳素低聚糖和单糖, 从而使得工业化成为可能。壳聚糖酸法水解所得的低聚糖混合物经阳离子交换树脂吸附, 用盐酸梯度洗脱可得到不同聚合度的寡聚糖。此法可分离自由氨基葡萄糖, 分离较有效, 可进行大规模色谱分离。高压液相色谱(HPLC)法也是分离和纯化甲壳低聚糖的有效方法。此外, 也有采用膜法、TLC/FID 法进行甲壳低聚糖的分离分析的^[30] 报道。

Christophe 等^[31] 的纯化方法为: 将壳聚糖溶于 1 % 的 0.1 M 乙酸中, 用孔隙度从 3~0.22 μm 依次减小的膜(Millipore)过滤, 后用稀释的氨水再次沉淀, 用大量的去离子水冲洗至中性, 然后冻干即可。

杜昱光、张铭俊等^[32] 设计了降解反应与膜分离技术相耦合方法(已申请专利), 耦合技术的引进实现了反应与分离一体化和过程的连续操作, 提高了酶的利用率, 有利于工业化生产。选择不同孔径及不同的膜操作参数, 可以控制不同的反应程度, 调控并获得所需聚合度的壳寡糖。

3 降解产物分析与表征方法

3.1 凝胶渗透色谱(GPC)测定壳聚糖分子量及分子量分布^[33]

重均分子量(M_w), 数均分子量(M_n)和相对分子质量分布(M_w/M_n)用 TSKG5000-PW 和 TSKG3000-PW 联柱, RI 150 示差检测器, 在 TSPP100 高效液相色谱仪上测定。标准样品为已知分子量的 TOSHPulluan, 流动相为 0.2 M CH₃COOH/0.1 M NaCOOCH₃ 缓冲液, 流速为 1.0 mL/min, 数据处理采用江申工作站。

3.2 高压液相色谱(HPLC)鉴定产物及纯度分析

陈江燕、邬国铭^[34] 用高压液相色谱(HPLC)来鉴定产物, 色谱柱为: LichoCART(R) 250-4HPLC-Cartridge; LichospHer(R)100NH₂(5 μm), 流动相采用乙腈-水(70:30), 流速为 0.5 mL/min。在保留时间 6.424、6.811、7.830、8.625min 四处都出现了峰值, 以 log K(停留时间)对 DP(聚合度)值作图, 可得到线性关系(由于杂质峰的影响使二糖的值有些偏离), 这与蒋挺大的报道一致。分析结果说明在保留时间 6.424、6.811、7.830、8.625min 四处出现的峰分别是氨基葡萄糖的单糖、二糖、三糖和四糖。

朱晓兰、夏文水^[35] 采用甲壳素水解生成氨基葡聚糖, 再用氯甲酸苄甲酯(FMOG-Cl)进行衍生, 利用液相色谱技术对衍生产物进行分析。其色谱柱条件为: ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 柱, 4.6 mm×150 mm、粒径 5 μm; 柱温 25 °C; 流动相: 乙腈-水, 起始时为 30:70(体积比), 12min 内梯度变化至 100:0(体积比), 保持 2 min; 流速 1.0 mL/min, 紫外检测波长 254 nm, 并提出了甲壳素纯度的计算公式:

$$X = \frac{m_{GAH} m_{OS} (203 - 42d)}{203 m_{OGAH} m_S} \times 100\%$$

式中: m_{GAH} 为甲壳素样品水解后的 GAH 质量(mg), m_{OGAH} 为甲壳素标样水解后的 GAH 质量(mg), m_S 为甲壳素/壳聚糖样品质量(mg), m_{OS} 为甲壳素标准样品质量(mg), d 为甲壳素样品的脱乙酰度, 203、42 分别表示甲壳素分子中乙酰氨基葡萄糖单元和脱去乙酰基的相对分子质量。

3.3 红外吸收光谱

将高相对分子质量壳聚糖和低相对分子质量壳聚糖 KBr 压片, 400 ~ 4000 cm^{-1} 区间扫描, 相对分子质量不同的壳聚糖红外光谱结构表征基本一致。几个特征峰如 3450 cm^{-1} 的 O—H 伸缩吸收峰, 2867 cm^{-1} 的 C—H 伸缩吸收峰, 1665 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} 的酰胺峰都存在。低相对分子质量壳聚糖由于羟基的增多, 3450 cm^{-1} 处出现较强的 O—H 吸收峰^[36]。在壳聚糖降解前后 3400 cm^{-1} 左右的 N—H 伸缩振动、1600 cm^{-1} 左右的 N—H 弯曲振动等主要峰的位置都无变化, 只是随壳聚糖相对分子质量的降低各峰峰强有所变化, 进一步证实了该协同反应是以开裂壳聚糖的 $\beta(1, 4)$ 糖苷键来进行^[20], 说明降解前后壳聚糖糖环结构没有改变。作者运用 HAc-H₂O 均相体系对壳聚糖进行降解, 制备出了一系列不同相对分子质量的低聚壳聚糖, 1600 cm^{-1} 左右的 N—H 弯曲振动仍然存在, 其红外吸收谱图与文献^[20, 36] 所述相同。

3.4 电毛细管电泳测定降解后的壳聚糖的聚合度^[37]

高效毛细管电泳具有高分辨率、高灵敏度及快速分离的特点, 广泛用于寡糖的结构测定。将低相对分子质量的水溶性壳聚糖 50 mg 加 150 μL 0.2 M 8-氨基奈-1, 3, 6-三磺酸盐 (ANTS, 溶于 HAc-H₂O 中) 衍生物, 并于 200 μL 1 M NaBH₃CN 络合 (40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 15 h), 使糖链带负电荷, 且具有发色团和荧光特性。由于大小不一的寡糖形成络合物时, 每个络合物只带一个电荷, 这样各种寡糖可根据分子大小在电泳中得到分离, 并很快通过激光诱导荧光检测, 然后从出峰时间判断寡糖的聚合度。通过峰面积计算各种聚合度的寡糖占总水解产物的百分比。

3.5 游离氨基含量(或脱乙酰度)测定^[38]

准确称取壳聚糖溶于 30 mL 0.1 mol/L HCl 中, 以甲基橙为指示剂, 用 0.1 mol/L NaOH 滴定过量的 HCl, 按下式计算脱乙酰度:

$$\text{NH}_2\% = \frac{(C_1 V_1 - C_2 V_2) \times 0.016}{m}; D, D = \frac{203 \times (\text{NH}_2\%)}{16 + 42(\text{NH}_2\%)}$$

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); 0.016 为 $-\text{NH}_2$ 基团的化学式量 (Kg/mol); m 为扣除水分后样品的质量 (Kg)。

3.6 分子量的测定^[39]

用乌氏粘度计采用稀释法, 以 0.1 mol/L 乙酸、0.2 mol/L 氯化钠溶液为溶剂, 壳聚糖初始浓度为 1.0 g/L, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下测定。求出特性粘度 η , 按下式计算粘均分子量: $\overline{M}_\eta: [\eta] = 1.81 \times 10^{-3} \overline{M}_\eta^{0.93}$ 。

3.7 低聚壳聚糖的薄层色谱分析^[40]

采用乙酸乙脂: 甲醇: 水: 氨水 = 5: 9: 1: 1.5 混合液作为硅胶薄板展开剂时, 可将不同聚合度的壳聚糖寡糖很好地分开, 且层析重现性高, 糖残基数目和 R_f 值具有很好的线性关系。具体方法为:

准确吸取浓度为 1% 的 DP(聚合度) = 1~6 混合壳聚糖寡糖标准品 1 μL 点于高效硅胶板上 (15 cm $\times$ 3 cm), 距底端距离为 1.0 cm。置于预饱和好的层析缸中, 上行法展开。展开时间 30 min, 展距 10 cm。取出, 用吹风机吹干, 喷雾法显色。壳聚糖寡糖点呈棕黄色。实验表明: 含有 1~6 糖单位的壳聚糖寡糖在实验所选定的展层系统中分离效果很好: 无拖尾, 标准品中的 6 个糖都分离得很清楚, 分离点都呈圆形。可以得到很好的糖单位数目和 R_f 值的线性对应关系。与高效液相色谱法 (HPLC) 结合是一种可靠的壳聚糖寡糖分析方法。

另外, 还有纸层析、紫外吸收光谱、核磁共振元素分析^[41, 42]、基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI TOF MS)^[43]、High-Performance Size Exclusion Chromatography (HP-SEC)^[31] 等分析表征手段。

4 展望

作为一种性能优良的可生物降解的高分子材料, 低聚壳聚糖有着广阔的应用前景, 尤其是在医药^[44~48]、保健食品^[49~51]、农业^[47, 52] 和化妆品^[4, 47] 方面显示其特异功能。我国海岸线长, 甲壳资源丰富, 加强对及其衍生物的研究开发将会产生巨大的经济效益和社会效益。

如何使壳聚糖降解的成本低、工艺简单、产品均一、无污染是壳聚糖降解方法的发展方向。未来的研究不会拘泥于某一单一的降解方法, 很可能是几种降解方法的联合运用, 人们可以通过控制某一环节得

到不同相对分子质量的壳聚糖,以达到不同的使用目的。另外,关于降解机理和降解效率还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Ning F, Vincent C, etc. *Biomacromolecules*, 2001, 2, 1161 ~ 1168.
- [2] Keisuke K, Hiroyuki I, Yuya Y. *Biomacromolecules*, 2002, 1(3): 1 ~ 4.
- [3] 裘迪红, 张芝芬, 等. *食品与机械*, 2000, 3, 29 ~ 30.
- [4] 孙长华, 王静. *粮食与油脂*, 2004, 1: 44 ~ 46
- [5] Pantaleone D, Yapani M. *Carbohydr Res*, 1992, 237: 325 ~ 332
- [6] 金鑫荣, 柴平海, 张文清. *化工进展*, 1998, 2: 17 ~ 21
- [7] 李治, 刘晓非, 杨冬芝, 等. *化工进展*, 2000, 6: 20 ~ 24.
- [8] 陈江燕, 邬国铭. *广东医学院学报*, 2003, 21(2): 105 ~ 107.
- [9] 陈云, 胡健, 等. *扬州大学学报(自然科学版)*, 2000, 3(3): 31 ~ 34.
- [10] 张立彦, 曾庆孝, 李作为. *功能高分子学报*, 2004, 17(3): 391 ~ 394.
- [11] 李艾华, 杜予民, 等. *环境科学与技术*, 2004, 27(2): 5 ~ 6
- [12] 戴芸, 朱旭芬. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2004, 2(30): 229 ~ 236
- [13] 魏衍超, 杨连生. *武汉工业学院学报*, 2000, 1: 16 ~ 17.
- [14] 刘晓, 石瑛, 白雪芳, 等. *中国水产科学*, 2003, 10(1): 69 ~ 72
- [15] Grandmontagne B. *FR2, 701, 030*, 1994 年.
- [16] 赵文伟, 等. *化学通报*, 1994, 4, 31 ~ 34.
- [17] 杨冬芝, 刘晓非, 管云林. *精细与专用化学品*, 1999, 9, 17 ~ 19
- [18] 覃彩芹, 杜予民, 刘义, 等. *孝感学院学报*, 2001, 16(2): 9 ~ 13.
- [19] 黄群增, 王世铭, 等. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2004, 20(4): 63 ~ 67.
- [20] 张文清, 柴平海, 等. *华东理工大学学报*, 2000, 26(4): 425 ~ 428.
- [21] 郑连英. *材料科学与工程*, 1999, 17(1): 97 ~ 100.
- [22] 邹超贤. *广西化纤通讯*, 2003, 1, 37 ~ 39.
- [23] 张卫东, 李正魁, 等. *核农学报*, 2005, 1(19): 55 ~ 57
- [24] 李治, 刘晓非, 徐怀玉, 等. *应用化学*, 2001, 18(2): 104 ~ 107.
- [25] 胡健, 赵国骏, 等. *扬州大学学报, 自然科学版*, 1999, 2(2): 51 ~ 54
- [26] 郭国瑞, 钟海山. *天然产物研究与开发*, 1994, 6(4): 103 ~ 106
- [27] 张峰, 殷佳敏, 丁丽娟. *高分子材料科学与工程*, 2004, 20(1): 221 ~ 223.
- [28] 林强, 马可立. *实验与技术*, 2003, 27(6): 7 ~ 10
- [29] 郝红元, 张岐, 葛庆凯. *无机化学学报*, 2004, 20(9): 1085 ~ 1088.
- [30] 范金石, 陈国华, 徐桂云. *日用化学工业*, 2002, 32(2): 69 ~ 72
- [31] Christophe S, Christophe V, Thierry D, et al. *Biomacromolecules*, 2003, 4, 641 ~ 648
- [32] 杜昱光, 张铭俊, 等. *中国微生态学杂志*, 2001, 13(1): 5 ~ 7.
- [33] 覃彩芹, 杜予民, 刘义, 等. *孝感学院学报*, 2001, 21(6): 9 ~ 13.
- [34] 陈江燕, 邬国铭. *广东医学院学报*, 2003, 21(2): 105 ~ 107.
- [35] 朱晓兰, 夏文水. *分析测试学报*, 2003, 22(4): 9 ~ 12.
- [36] 林瑞海, 蒋苏洪, 张幕珊. *化学通报*, 1992, (3): 39 ~ 42.
- [37] 李邦良, 高仕瑛, 乔新惠, 等. *中国生化药物杂志*, 1999, 20(6): 292 ~ 294
- [38] 罗平, 何波兵, 藺显俊, 等. *化学研究与应用*, 2000, 12(6): 677 ~ 679
- [39] 曹宗顺, 卢凤琦. *中国医药工业杂志*, 1996, 27(1): 14.
- [40] 房子, 刘万顺, 位晓娟, 韩宝芹. *中国海洋大学学报*, 2005, 35(1): 113 ~ 115.
- [41] 郝红元, 张岐, 葛庆凯. *无机化学学报*, 2004, 20(9): 1085 ~ 1088.
- [42] 范国枝. *应用化工*, 2004, 33(5): 29 ~ 30.
- [43] 李艾华, 杜予民, 李瑾, 等. *分析科学学报*, 2004, 20(3): 233 ~ 236
- [44] Ning F, Vincent C, Hai Q M, Kam W L. *Biomacromolecules*, 2001, 2, 1161 ~ 1168
- [45] 尹承慧, 侯春林, 蒋丽霞, 等. *第二军医大学学报*, 2002, 23(5): 536 ~ 539.
- [46] 章莹等. *中华实验外科杂志*, 2000, 17(2): 132
- [47] 高忠良, 王海青, 等. *食品添加剂*, 2003, 9.

[48] 杜昱光, 白雪芳, 虞星炬, 等. 中国生化药物杂志, 1997, 18(5): 268—271
 [49] 柴平海, 张文清, 金鑫荣. 大学化学, 1999, 14(2): 36~39.
 [50] Agullo E, Ramos V, Varilas M A. Anales de La Association Química Argentina, 1998, 86(1—2): 1.
 [51] 夏文水, 张帆, 何新益. 无锡轻工大学学报, 1998, 17(4): 0—14.
 [52] 李瑞国. 邢台学院学报, 2004, 19(2): 77~79.

Study Progress of the Low Molecular Weight Chitosan on Preparation Separation Purification and Distinguishing

FENG Xiao-qiang¹, YANG Sheng², SU Zhong-xing¹, LI Hui-xue², ZHAO Hai-hong²
 (College of Chemistry and Chemical Engineering , Lanzhou University, Lanzhou 73000, China ;
 (School of Life Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China)

Abstract: This paper contained the newest literatures on the degradation of chitosan at home and abroad in recent decade years, and gave an systematic summary on the low molecular weight chitosan on preparation, separation, purification and distinguishing.

Key words: Chitosan; Degradation; Preparation; Separation; Purification; Distinguishing

(上接第 51 页)

[12] Bao C Y, Jin M, Lu R, et al. Mater Chem Phys, 2003, 82: 812~817.
 [13] 李国平, 罗运军, 徐厚才. 无机化学学报, 2004, 20(1): 61~64.
 [14] 李国平, 罗运军, 谭惠民. 化学学报, 2004, 62(12): 1158~1162.
 [15] Mo Z L, Sun Y X, Chen H, et al. Polymers, 2005, 46: 12670~12676.
 [16] Mo Z L, Wang K J, Chen H, et al. Rare Earth, 2004, 22: 63~66.
 [17] 陆玉, 林德, 魏焕郁, 等. 高分子学报, 2000, 4: 411~414.

Preparation and Functionization of Hyperbranched Poly(amine-ester) of Different Generations

MO Zun-li^{1,2*}, NIU Gui-ping, LI He-jun², LIU Yan-zhi¹, CHEN Hong¹
 (1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China;
 2. College of Material science and Engineering, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract: The synthesis of a series of polydisperse hyperbranched poly(amine-ester)s based upon pentaerythritol (as a core molecule) and *N,N*-diethylol-3-amine methylpropionate is described, proceeding in pseudo-one-step manner. The molecular composition of HPAE was characterized by GPC, FT-IR, ¹H NMR and TGA. The the moset of hyperbranched poly(amine-ester) synthesized in this study becomes better as the generation increases. So, those materials may be modified to meet particular application. Then highly uniform and monodisperse Nd nanoparticles, protected by hyperbranched poly(amine-ester), were prepared in aqueous solution. Transmission electron microscopy (TEM) has been used to study the structure and characterization of the nanocomposites. From which it showed that Nd nanoparticles were formed inside HPAE and the size distribution fits a lognormal distribution as the generation increases. Those excellent dispersivity and good results allow for a complete prepare of nanoparticles by simple procedure.

Key words: Hyperbranched poly(amine-ester); Nanoparticles; Preparation; Functionalization