

甲壳低聚糖的酸水解

刘 晓^{1,2}, 石 瑛¹, 白雪芳¹, 杜昱光¹

(1. 中国科学院 大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023;

2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘 要:不同浓度(2、3、4、6 mol/L) HCl 对壳聚糖、低聚氨基葡萄糖、氨基葡萄糖单糖的降解实验表明,在 100 ℃并有氩气保护的条件下, HCl 在水解氨基葡萄糖聚糖的同时对所生成单糖的分子结构有较强的破坏作用, 2、3、4、6 mol/L 的 HCl 所破坏的氨基葡萄糖分子数 N 与 HCl 浓度 C_{HCl} 和水解时间 t 之间的关系遵循方程: $N = 0.0854 C_{\text{HCl}} t$ 。氨基葡萄糖的回收率 y 对 HCl 浓度及分解时间的方程为: $y = -0.0854 C_{\text{HCl}} t + 100$ 。HCl 降解聚氨基葡萄糖的动力学反应受 HCl 浓度和底物聚合度的影响,生成单糖的产率随水解时间延长、HCl 浓度增大而增加,但在相同 HCl 浓度和水解时间条件下,聚合度低则降解进程快。6 mol/L HCl 于 100 ℃水解 3 h 对氨基葡萄糖分子结构没有显著的破坏作用,回收率为 99.4%,但对低聚氨基葡萄糖、壳聚糖的水解产率均很低,分别为 33.6%、32.2%。本研究结果证明,壳聚糖较好的分解条件为 HCl 浓度 4 mol/L、水解 72 h,此时单糖水解产率可达 89.6%。

关键词:水解;盐酸;壳聚糖;低聚糖;氨基葡萄糖

中图分类号: Q53 **文献标识码:** A

文章编号: 1005-8737(2003)01-069-04

糖作为生物系统的重要结构成分和调节分子受到了越来越多的关注^[1]。氨基葡萄糖是真菌细胞壁、节肢动物外骨骼的重要组成成分,而且也是糖蛋白的重要组分,此外,多聚氨基葡萄糖(壳聚糖)和多聚乙酰氨基葡萄糖(几丁质)及其衍生物在医学、农业、药剂学、化工、食品、化妆品等行业有广泛的用途^[2]。氨基葡萄糖通常以聚糖和复合物的形式存在于生物体内,需将氨基葡萄糖的聚糖水解成为单糖后才能对其含量进行精确的测定。壳聚糖和几丁质可通过酸水解、氧化降解、酶水解、微波、超声、辐射等方法被降解成为低聚糖与单糖,可用于低聚糖的制备^[3-5]。在酸水解法中,盐酸、酸-亚硝酸盐、过醋酸、浓硫酸、氢氟酸等均被用于降解壳聚糖和几丁质,同时不同浓度的 HCl 对几丁质的降解作用已有较为详细的报道^[6],但 HCl 对壳聚糖的降解作用还缺乏系统的研究。本研究用不同浓度的 HCl 水解壳聚糖、低聚氨基葡萄糖和氨基葡萄糖单糖,研究酸对

聚氨基葡萄糖的降解过程和对氨基葡萄糖分子的破坏作用,旨在获得高收率的水解条件。

1 材料与方法

1.1 试剂

1.1.1 氨基葡萄糖单糖 购自日本和光试剂公司,用蒸馏水配制成 5 mg/mL 的母液备用。

1.1.2 高脱乙酰度壳聚糖 由大连鑫蝶甲壳素公司提供,经凝胶滴定法测定知脱乙酰度 $\geq 98\%$,分子量约 35×10^4 。壳聚糖在 60 ℃烘至恒重后用 1.0% 的醋酸配制成 5 mg/mL 的母液备用。

1.1.3 低聚氨基葡萄糖 由中国科学院大连化学物理研究所通过酶法降解与膜分离耦合技术制备^[7],并经过时间飞行质谱检测^[8]知其主要成分为聚合度 $DP = 3 \sim 23$ 的低聚脱乙酰氨基葡萄糖,低聚糖冻干粉在 60 ℃烘至恒重后配制成 5 mg/mL 的母液备用。

其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验设计

在水解管中准确称取不同聚合度的氨基葡萄糖母液 1.00 g,分别加入不同浓度的 HCl 使反应体系的 HCl 浓度分别为 2、3、4、6 mol/L,并使反应物总体积为 4 mL,充入高纯度氩气后密封水解管,在水解

收稿日期:2001-12-12.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39980012)。

作者简介:刘 晓(1965-),女,理学博士,研究员,主要从事海洋生物技术研究。E-mail: Liuxiao@ms.qdio.ac.cn

仪上于 100 ℃ 处理 3~84 h。水解反应完成后,将水解产物全部转移到蒸发皿中,在 70 ℃ 水浴上将液体蒸干,在蒸发皿中加入蒸馏水后再蒸干,用蒸馏水溶解蒸发皿中的固体并定容到 25 mL,该液体用于测定氨基葡萄糖的含量。每反应至少 3 次重复。

1.3 氨基葡萄糖含量测定

参见文献 9,以未经水解处理的氨基葡萄糖单糖作标准曲线。

2 结果

2.1 不同浓度 HCl 对氨基葡萄糖单糖分子的水解作用

结果见图 1。由图 1 可见,在相同浓度的 HCl 条件下,氨基葡萄糖的回收率在 100 ℃ 随水解时间的延长有线性下降的趋势,表明 HCl 对氨基葡萄糖的分子结构有破坏作用,被破坏的氨基葡萄糖分子数随 HCl 作用时间延长呈线性增加;而在相同的水解时间下,氨基葡萄糖的回收率有随 HCl 浓度增加而下降的趋势,表明随 HCl 浓度的升高,在相同的时间内被破坏的氨基葡萄糖分子数增多。

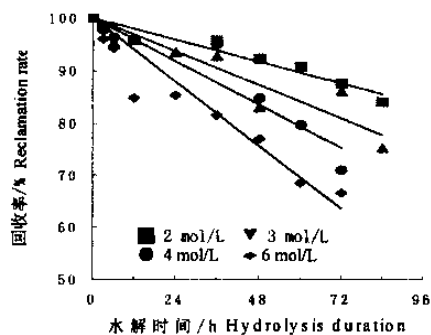


图 1 不同浓度 HCl 水解氨基葡萄糖单糖的反应动力学曲线

Fig. 1 Effects of hydrochloric acid concentration on hydrolyzing kinetic reaction of glucosamine

将不同浓度 HCl 水解反应后氨基葡萄糖的回收率(y)对水解时间(t)拟合直线方程,可分别得到以下方程:

$$y = kt + 100 \quad (A)$$

$$2 \text{ mol/L HCl: } y_2 = -0.1729t + 100 \quad R^2 = 0.9372 \quad (1)$$

$$3 \text{ mol/L HCl: } y_3 = -0.2647t + 100 \quad R^2 = 0.8701 \quad (2)$$

$$4 \text{ mol/L HCl: } y_4 = -0.3428t + 100 \quad R^2 = 0.8921 \quad (3)$$

$$6 \text{ mol/L HCl: } y_6 = -0.5062t + 100 \quad R^2 = 0.9194 \quad (4)$$

可见,方程的斜率(k)随 HCl 浓度增大而下降,表明随 HCl 浓度增大,氨基葡萄糖的回收率下降。将方程 1~4 中的 k 对 HCl 浓度(C_{HCl})作图,得到图 2 和方程:

$$k = -0.0854C_{\text{HCl}} \quad R^2 = 0.9981 \quad (5)$$

可见氨基葡萄糖水解反应动力学方程的 k 与 HCl 浓度 C_{HCl} 成比例关系,其比例常数为 -0.0854 , $R^2 = 0.9981$ 。

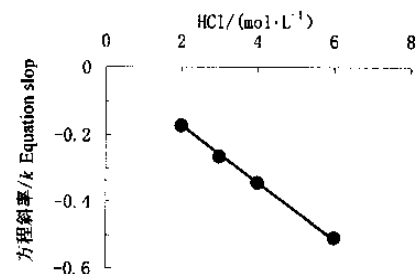


图 2 氨基葡萄糖水解反应动力学方程斜率与 HCl 浓度的关系

Fig. 2 Effects of hydrochloric acid concentration on slope of glucosamine hydrolyzing dynamical equation

将方程(5)代入方程(A),得到回收率 y' 和 HCl 浓度及水解时间的方程 B:

$$y' = -0.0854C_{\text{HCl}}t + 100 \quad (B)$$

而 2~6 mol/L 的 HCl 在 100 ℃ 条件下破坏的氨基葡萄糖分子数 N 与水解时间 t 和 HCl 浓度 C_{HCl} 之间的关系可由方程 C 描述:

$$N = 0.0854C_{\text{HCl}}t \quad (C)$$

2.2 不同浓度 HCl 对壳聚糖的降解作用

结果见图 3。由图 3 可知,在 6 mol/L 的 HCl 水解处理中,壳聚糖降解生成氨基葡萄糖的产率在水解反应最初的 12 h 内随水解时间延长迅速增加,在 12 h 已经达到最高值(76.4%),此后随水解时间延长呈下降的变化趋势;在 4 mol/L 的 HCl 水解处理中,氨基葡萄糖的产率有随水解时间延长而增加的趋势,至 72 h 时达到最大值 89.6%,在 84 h 后开始下降;而在 2~3 mol/L 的 HCl 处理中,氨基葡萄糖的产率随水解反应时间的延长一直呈增加的趋势,在实验测定的时间内还没有出现最大值,在达到最大值之前,氨基葡萄糖的产率随水解时间延长有线性

增加的趋势,而且在相同的水解时间内,氨基葡萄糖的产率与 HCl 浓度呈正相关关系。

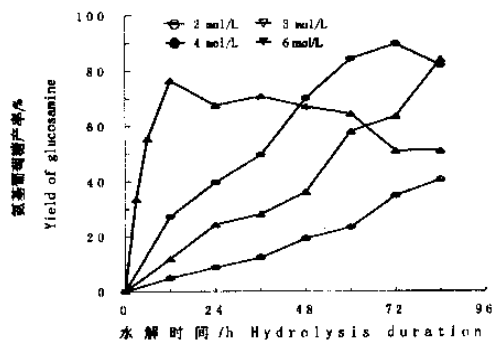


图3 不同浓度 HCl 降解壳聚糖的反应动力学曲线

Fig. 3 Effects of hydrochloric acid concentration on hydrolyzing kinetic reaction of chitosan

2.3 不同浓度 HCl 对低聚氨基葡萄糖的降解作用

100 °C 条件下,不同浓度 HCl 对氨基葡萄糖低聚糖的水解反应动力学曲线见图 4。图 4 的曲线走势总体与图 3 类似,在相同的测定条件下,未经水解的低聚氨基葡萄糖检测得到的氨基葡萄糖浓度相当于底物理论浓度的 2.13%;在 3 mol/L HCl 的水解条件下,氨基葡萄糖的产率随水解时间延长而增加,在水解 48 h 已达到 76.4%,在实验所用的 48 h 内没有出现最大值;在 6 mol/L HCl 的水解条件下,氨基葡萄糖产率在水解反应的初期(3~6 h)即迅速升高,在 24 h 左右达到最大值,在 48 h 则开始下降。

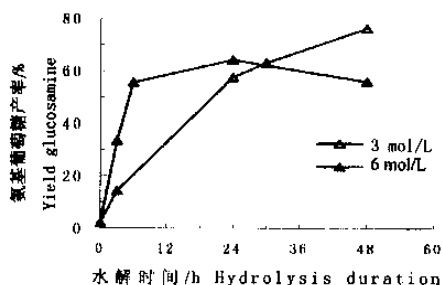


图4 不同浓度 HCl 降解氨基葡萄糖低聚糖的反应动力学曲线

Fig. 4 Effects of hydrochloric acid concentration on hydrolyzing kinetic reaction of oligoglucosamine

2.4 6 mol/L HCl 水解 3 h 对不同聚合度氨基葡萄糖的水解作用

壳聚糖、低聚氨基葡萄糖、氨基葡萄糖单糖在 6 mol/L 的 HCl 中于 100 °C 水解 3 h^[9],检测水解产物中的氨基葡萄糖浓度并由此计算水解产率或回收率,结果见表 1。氨基葡萄糖单糖在 6 mol/L 的 HCl 中水解 3 h,氨基葡萄糖的回收率为 99.4%,低聚氨基葡萄糖和壳聚糖的水解产率分别为 33.6%、32.2%。结果表明,在氩气保护的条件下,6 mol/L 的 HCl 在 100 °C 水解 3 h 对氨基葡萄糖分子没有显著的破坏作用,但聚氨基葡萄糖的水解产率较低。

表 1 6 mol/L HCl 水解 3 h 对不同聚合度氨基葡萄糖的水解作用

Table 1 Glucosamine yield of chitosan and oligoglucosamine hydrolyzed by 6 mol/L HCl for 3 h

反应底物 Substrate	氨基葡萄糖产率/% Yield of glucosamine	回收率/% Reclamation rate
氨基葡萄糖单糖 Glucosamine		99.4
低聚氨基葡萄糖 Oligoglucosamine	33.6	
壳聚糖 Chitosan	32.2	

3 讨论

氨基糖的聚糖与酸共热将被水解而释放出单糖,后者经碱性乙酰化处理后可与对-二甲氨基苯甲醛呈色而进行定量测定,因此氨基葡萄糖聚糖定量测定的精确度依赖于水解生成游离态氨基葡萄糖的产率。氨基糖在酸水解时其分子结构会被破坏而影响显色反应,导致测定数值偏低,在封管中真空或充惰性气体的条件下进行水解可对氨基糖的分子结构进行较好的保护。

表 1 的实验结果表明,6 mol/L HCl 在 100 °C 水解 3 h 对氨基葡萄糖分子结构没有显著的破坏作用,但对低聚氨基葡萄糖和壳聚糖的水解产率均很低。本研究提供的壳聚糖降解的较好条件是 4 mol/L HCl、72 h,该条件下游离氨基葡萄糖产率可达 89.6%。但在低浓度 HCl(2~3 mol/L)水解壳聚糖和低聚糖的过程中,在实验所用的最长时间范围内还未出现氨基葡萄糖产率的最大值,因此有关最佳水解条件的研究还需在增加 HCl 的低浓度设置、延长水解时间等方面进行进一步实验。

从图 1 可知,HCl 对氨基葡萄糖单糖分子的破坏作用随水解时间延长,HCl 浓度增大而增强,2~6

mol/L 的 HCl 破坏的氨基葡萄糖分子数随水解时间 t 和 HCl 浓度 C_{HCl} 变化的关系可通过方程 $N = 0.0854 C_{\text{HCl}} t$ 描述。该方程为确定聚糖水解产率的补偿系数提供了参考。

由于水解过程中氨基葡萄糖聚糖的水解及 HCl 对所产生的单糖分子的破坏作用同时发生,所以,在图 3、4 中每个时刻的氨基葡萄糖产率是到该时刻止的水解时段内氨基葡萄糖聚糖水解产生的单糖分子数减去该时段内被 HCl 破坏的单糖分子数后表现的结果。2.1 给出了 2~6 mol/L 的 HCl 对氨基葡萄糖单糖分子破坏作用的动力学方程(C): $N = 0.0854 C_{\text{HCl}} t$, 结合方程(C)与相应水解条件下 HCl 对氨基葡萄糖聚糖的水解反应动力学曲线,可以对 HCl 水解氨基葡萄糖聚糖产生单糖的降解过程进行定量分析。

致谢:本文成文过程中得到中国科学院海洋研究所李鹏程研究员的指导,谨此致谢。

参考文献:

- [1] 王克夷. 灰姑娘的马车已经来了[J]. 生命的化学, 2001, 21(3): 257-258.
- [2] 李鹏程, 宋金明. 甲壳质/壳聚糖及其衍生物的应用化学[A]. 海洋化工与海水利用技术[M]. 北京: 海洋出版社, 2001. 56-63.
- [3] 金鑫荣, 柴平海, 张文清. 低聚水溶性壳聚糖的制备方法及研究进展[J]. 化工进展, 1998, (2): 17-21.
- [4] 邵健, 杨宇民. 低聚氨基葡萄糖的研制[J]. 中国医药工业杂志, 1999, 30(11): 481.
- [5] 张虎, 杜昱光, 虞星炬. 几丁寡糖与壳寡糖的制备和功能[J]. 中国生化药物杂志, 1999, 20(2): 99-101.
- [6] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1999. 166-176.
- [7] Zhang H, Du Y, Yu X, et al. Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme[J]. Carbohydr Res, 1999, 320: 257-260.
- [8] 刘晓, 杜昱光, 白雪芳. 壳寡糖诱导小麦种胚细胞抗脱氧雪腐镰刀菌烯醇抑制的效应[J]. 植物学报, 2001, 43(4): 370-374.
- [9] 樊绘普. 氨基己糖的比色测定[A]. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994. 23-25.

Hydrolysis effects of hydrochloric acid on oligoglucosamine and chitosan

LIU Xiao, SHI Ying, BAI Xue-fang, DU Yu-guang

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Using HCl solution at 2, 3, 4 and 6 mol/L and temperature 100 °C to hydrolyze chitosan and oligoglucosamine in an argon atmosphere, the results show that the relationship among glucosamine molecule number (N , destroyed by HCl), HCl concentration (C_{HCl}) and hydrolyzing duration (t) can be described as $N = 0.0854 C_{\text{HCl}} t$; and the hydrolysis of polyglucosamine is affected by both HCl concentration and substrate polymerizing degree that with the extension of hydrolysis and the increase of HCl concentration the yield of monosaccharide from polyglucosamine increases, but under the same HCl concentration and hydrolysis duration, the degradation rate is higher for the glucosamine of low polymerization degree. When HCl concentration is at 6 mol/L, the temperature at 100 °C and hydrolysis duration 3 h, the molecular structure of oligoglucosamine can not be destroyed and the yield rate is 99.4%, but for the glucosamine with low polymerization degree, the yield rate is also low (33.6% and 32.2%). The optimum hydrolysis condition is HCl concentration 4 mol/L, hydrolysis duration 72 h and 100 °C when the yield rate is 89.65%.

Key words: hydrolysis; hydrochloric acid; chitosan; glucosamine; oligoglucosamine