

过氧化氢制备壳寡糖的工艺

舒德海, 钱俊青, 吴薇

(浙江工业大学药学院, 浙江 杭州, 310014)

摘要 为了简便高效的制备出壳寡糖, 采用过氧化氢(质量分数 1.0%)来降解稀醋酸溶液(质量分数 1.0%)中含量为 3.5% 的壳聚糖, 60℃ 下摇床反应 4.5 h 后得到壳寡糖水溶液, 检测溶液中还原性端基数并估算降解物平均聚合度来表征降解程度。降解液浓缩到 25%, 调 pH 7.0, 用体积分数 95% 乙醇分级沉淀分离壳寡糖可以除掉部分单糖, 总的回收率达 93.0%。通过电喷雾电离质谱(ESI-MS)分析, 3 倍醇沉出的产物为 2-4 糖为主的壳寡糖产品。实验说明过氧化氢氧化降解壳聚糖可制取聚合度为 2-4 的壳寡糖。

关键词 壳寡糖, 过氧化氢, 降解, 醇沉

壳寡糖是壳聚糖降解产物, 由氨基葡萄糖单体以 β -(1,4)-氨基糖苷键缩合而成。壳寡糖具有抗消化性溃疡、降血糖、降血脂、抗血栓、抗辐射、抗毒物损伤、抗晕、祛痰镇咳、诱导干扰素产生、促进免疫功能恢复, 以及促进蛋白质和核酸的生物合成等方面的生物活性, 应用广泛^[1-2]。

壳寡糖的制备可以分四大类: 物理降解法、化学降解法、生物酶降解法和联合降解法^[3-4]。物理法产品分子量分布太广; 化学法过于剧烈, 不易控制; 酶法降解过程容易控制, 降解周期较长; 联合降解法则是结合了物理法、化学法及酶法各自的优点, 前景无限^[5-7]。其中过氧化氢氧化降解法由于降解速度快、成本低、无残毒、后处理方便, 易于实现工业化, 是一种无污染的环保型生产工艺, 很受人们的重视。过氧化氢降解可在酸性、碱性和中性条件下进行。在碱性和中性介质中, 降解是非均相反应, 反应慢且不均匀; 而在酸性介质中, 反应是均相的^[8]。对于 $\text{HAc}/\text{H}_2\text{O}_2$ 均相降解体系, 由于过程影响因素较多, 缺乏相应的质量控制方法。

本文采用化学法来制备功能性壳寡糖。食品级的壳聚糖经低浓度的过氧化氢氧化降解成水溶性壳寡糖, 然后用乙醇分级沉淀去除单糖, 真空干燥即得到壳寡糖产品, 乙醇经旋转蒸发回收利用, 整个流程适合于工业化放大实现。

1 实验材料和方法

1.1 材料与设备

第一作者: 硕士研究生(钱俊青教授为通讯作者)。

收稿日期: 2009-03-09, 改回日期: 2009-04-22

1.1.1 实验材料

壳聚糖, 分子质量(M_v)50 万 u, 脱乙酰度(DD)86.3%, 浙江玉环县海洋生物化学有限公司; 过氧化氢, 温州市化学用料厂; 斐林试剂, GB5009.7-1985; D-氨基葡萄糖标样, Sigama 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.1.2 试验设备

水浴恒温振荡器(THZ-82A), 金坛市杰瑞尔电器有限公司; HP1100 LC-API4000 TQ Mass Spectrometer, 美国 Applied Bio-systems 公司; 旋转蒸发器(EYE-LA), Tokyorikakikaico. ltd。

1.2 试验方法

1.2.1 壳聚糖过氧化氢的降解

首先研究醋酸浓度、温度、过氧化氢浓度、壳聚糖脱乙酰度、反应时间、摇床转速和壳聚糖浓度对降解的影响, 然后用正交试验优化单因素条件。采用斐林滴定法检测降解后壳聚糖溶液中还原端基数含量表征降解程度^[9-10], 均换算成 1 g 壳聚糖对应的还原端基数(mmol/g)。

1.2.2 壳寡糖的醇沉分离实验

经过过氧化氢降解所得的水溶性壳寡糖用体积分数 95% 乙醇来分级沉淀, 研究了固形物浓度、醇水比、沉淀时间、降解液 pH 值和离心条件对醇沉分离的影响, 然后用正交试验优化单因素条件, 用回收率表征结果的优劣。分离后经真空干燥即得到寡糖产品。

1.3 检测方法

1.3.1 降解程度的表征

本文主要采用端基分析法表征壳聚糖降解程度^[11]。将一定量的壳聚糖与 12 mol/L HCl 混合, 在

120℃, 2.02×10^5 Pa 下反应 1 h。取出用氢氧化钠中和 pH 值至 7.0, 然后斐林滴定测还原端基数。3 次平均值 $A_0 = 3.5445$ mmol/g。每次实验中壳聚糖降解之后检测得的还原端基数值为 A_1 , 则壳聚糖的平均聚合度(DP)可以这么估算: $DP = A_0/A_1$ 。

1.3.2 ESI-MS 检测壳寡糖分布

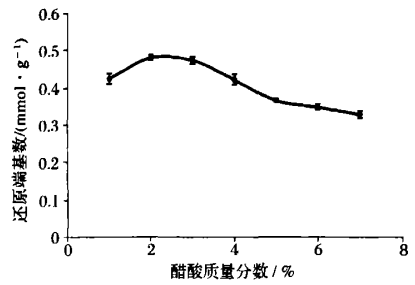
壳寡糖样品分散于甲醇溶液进行 ESI-MS 分析^[12-14]。重要参数设置: 氮气的温度 300℃, 流速 480 L/h, 喷雾压 10.5×10^5 Pa, 微管电压 4 000 V, 扫描电压 60 V, 电子能量 70 eV, 质荷比设置为 0 - 2 000 m/z。

2 实验结果与讨论

2.1 壳聚糖过氧化氢降解实验

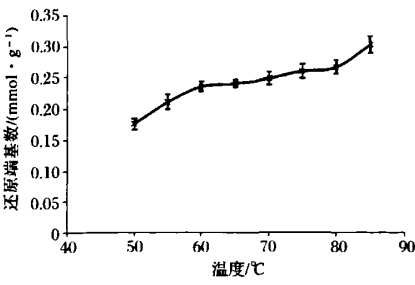
2.1.1 壳聚糖过氧化氢降解单因素的确定

为了研究均相下各因素对过氧化氢降解壳聚糖的影响, 分别进行了醋酸浓度、温度、过氧化氢浓度、壳聚糖脱乙酰度、反应时间、摇床转速和壳聚糖浓度 7 个单因素条件实验, 结果如图 1 - 图 7 所示。



(H_2O_2 0.6%, CTS1.0%, 80℃, 200 r/min, 3 h)

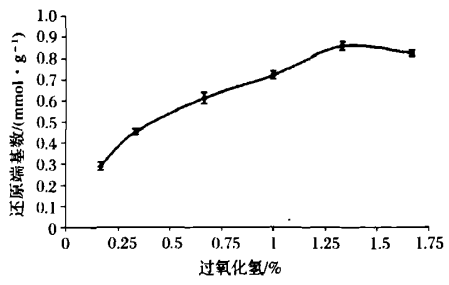
图 1 醋酸质量分数对降解的影响



(H_2O_2 0.6%, CTS1.0%, HAc 1.0%, 200 r/min, 3 h)

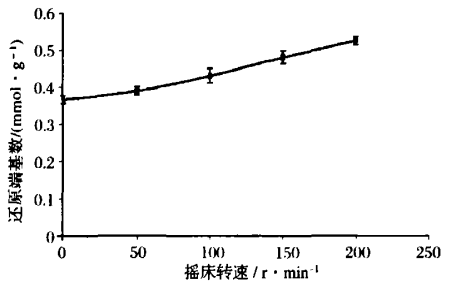
图 2 反应温度对降解的影响

图 1 显示, 醋酸浓度对反应影响不大, 从成本和后处理角度选取质量分数为 1.0%。图 2 显示, 较高的反应温度有利于制备水溶性低聚糖, 但是随着反应温度的升高, 水溶性壳聚糖的颜色逐渐变深, 所以降



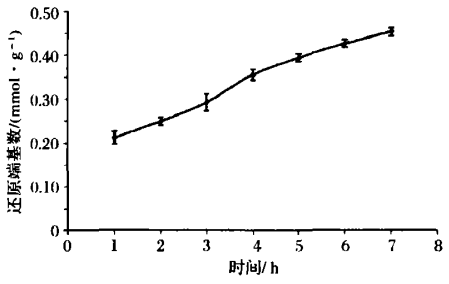
(H_2O_2 1.0%, 60℃, HAc 1.0%, 200 r/min, 3 h)

图 3 过氧化氢质量分数对降解的影响



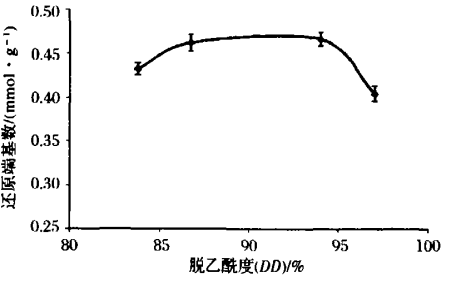
(H_2O_2 1.0%, CTS1.0%, 60℃, HAc 1.0%, 3 h)

图 4 摇床转速对降解的影响



(H_2O_2 1.0%, CTS1.0%, 60℃, HAc 1.0%, 150 r/min)

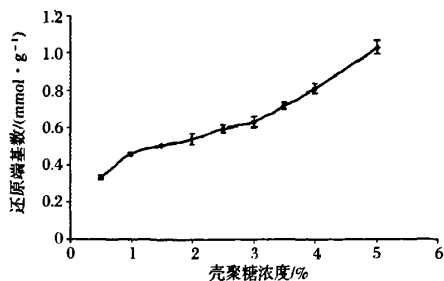
图 5 反应时间对降解的影响



(H_2O_2 1.0%, CTS1.0%, 60℃, HAc 1.0%, 150 r/min, 4 h)

图 6 脱乙酰度对降解的影响

解反应的温度选择 60℃ 为宜。图 3 显示, H_2O_2 的浓度是影响降解反应程度的主要因素之一, 在考虑到氧化强度, H_2O_2 用量为 1.0% 具有较好的效果。图 4 显示, 加大摇床转速有利于反应, 在权衡下选取 150



(H_2O_2 1.0%, 60℃, HAc 1.0%, 150 r/min, 4h)

图7 壳聚糖浓度对降解的影响

r/min。图5显示,随着反应时间的延长,还原性端基量逐渐上升,反应时间在4 h之内时,水溶性壳聚糖的还原性端基量增加很快,当反应时间超过4 h以后,还原性端基量增加缓慢。因此,制备低分子量水溶性壳聚糖,反应时间控制在4 h比较适宜。图6显示,脱乙酰度并不是越高越有利于氧化降解。图7显示,壳聚糖浓度越高响应值越高,但考虑到均相条件,选取3.0%较佳。

2.1.2 优化壳聚糖过氧化氢降解条件确定

从单因素实验中选出影响较大的4个因素:温度、时间、过氧化氢含量和壳聚糖浓度进行 $L_9(3)^4$ 正交实验,以斐林滴定还原性端基量为响应值,实验结果见表1。

表1 正交实验结果及分析

因素	温度	过氧化氢	时间	壳聚糖	还原性端基量
实验	/℃	质量分数/%	/h	质量分数/%	/(mmol · g ⁻¹)
实验1	55	0.75	3.5	2.5	0.314
实验2	55	1.0	4	3	0.415
实验3	55	1.25	4.5	3.5	0.424
实验4	60	1.0	3.5	3.5	0.751
实验5	60	1.25	4	2.5	0.840
实验6	60	0.75	4.5	3	0.560
实验7	65	1.25	3.5	3	0.614
实验8	65	0.75	4	3.5	0.585
实验9	65	1.0	4.5	2.5	0.475
均值1	0.384	0.560	0.486	0.543	
均值2	0.717	0.613	0.547	0.530	
均值3	0.558	0.486	0.626	0.587	
极差	0.333	0.127	0.140	0.057	

从正交实验结果分析可知,温度因素的极差最大,即温度对降解反应的影响最大。各因素对降解速率影响大小为:温度>时间>过氧化氢>壳聚糖浓度。同时得到,各因素的最优水平,即过氧化氢降解壳聚糖的最优条件为,即温度60℃,时间4.5 h,过氧化氢含量1.0%,壳聚糖质量分数3.5%。

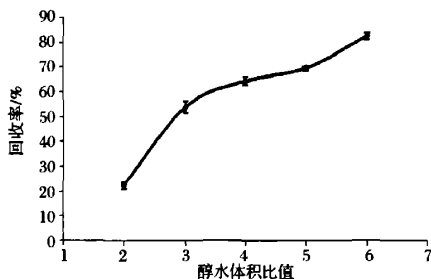
为验证该反应条件的最适性,进行了最适反应条

件验证实验。在最适反应条件下,对壳聚糖进行降解反应。3次降解反应后还原性端基量平均值为0.821 mmol/g,平均聚合度 $DP = A_0/A_1 = 3.5445/0.821 = 4.32$ 。水溶性壳聚糖溶液颜色为淡黄色。

2.2 壳聚糖的醇沉分离

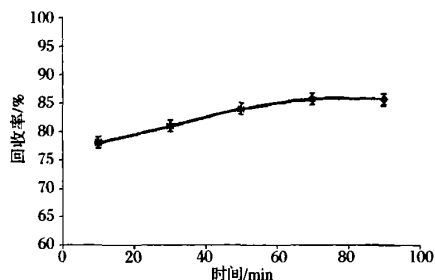
2.2.1 壳聚糖的醇沉分离条件选择

研究了醇水比、固形物浓度、沉淀时间、降解液pH值和离心条件对醇沉分离的影响,结果如图8-图12所示。图8显示,醇水体积比3:1时逐级沉淀出的寡糖量较多;图9显示,醇沉50 mins就能达到沉淀完全;图10显示,壳聚糖质量分数在20%即可达到很好的醇沉分离;图11显示,壳聚糖溶液pH值在6.0即可达到很好的醇沉分离;图12显示,选择4 500 r/min离心10 min可以达到很好的分离。



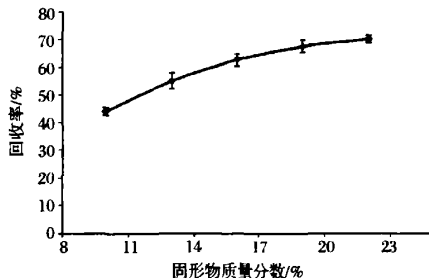
(10%, pH 6.0, 10 mins)

图8 醇水体积比对醇沉的影响



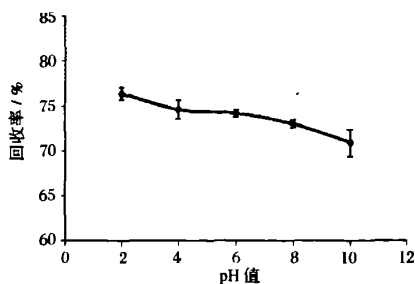
(10%, pH 6.0, 醇水体积比3:1)

图9 时间对醇沉的影响



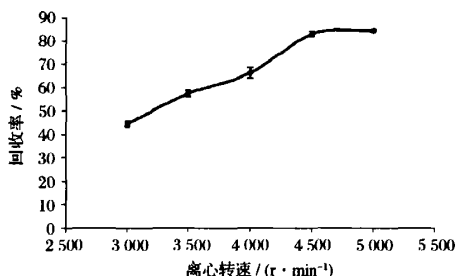
(50 mins, pH 6.0, 醇水体积比3:1)

图10 固形物质量分数对醇沉的影响



(50 mins, 20%, 醇水体积比 3 : 1)

图 11 降解液 pH 值对醇沉的影响



(50 mins, 20%, 醇水体积比 3 : 1, pH 7.0)

图 12 离心转速对醇沉分离的影响

2.2.2 正交实验优化壳寡糖的醇沉条件选择

从单因素实验中选出 4 个因素:醇水体积比、醇沉时间、固形物浓度和降解液 pH 值进行 $L_9(3)^4$ 正交实验,以醇沉出的壳寡糖量的回收率为响应值,实验结果见表 2。

表 2 正交实验结果及分析

因素	固形物浓度 / %	醇水体积比	醇沉时间 / mins	降解液 pH 值	实验结果回收率 / %
实验 1	15	2 : 1	40	5	55.1
实验 2	15	3 : 1	50	6	81.6
实验 3	15	4 : 1	60	7	66.3
实验 4	20	2 : 1	50	7	70.4
实验 5	20	3 : 1	60	5	63.3
实验 6	20	4 : 1	40	6	65.3
实验 7	25	2 : 1	60	6	66.3
实验 8	25	3 : 1	40	7	82.6
实验 9	25	4 : 1	50	5	91.8
均值 1	67.667	63.933	67.667	70.067	
均值 2	66.333	75.833	81.267	71.067	
均值 3	80.233	74.467	65.300	73.100	
极差	13.900	11.900	15.967	3.033	

从正交实验结果分析可知,醇沉时间的极差最大,即醇沉时间对醇沉的影响最大。各因素对醇沉速率影响大小为:醇沉时间 > 固形物浓度 > 醇水比 > 降解液 pH 值。同时得到,各因素的最优水平,即乙醇沉淀分离壳寡糖的最优条件为,醇沉时间 50 mins,固形

物质量分数 25%,醇水体积比 3 : 1,降解液 pH 值 7.0。

为验证该反应条件的最适性,进行了最适反应条件验证实验。在最适反应条件下,对壳寡糖进行醇沉。3 次醇沉后壳寡糖回收率的平均值为 93%。水溶性壳寡糖溶液颜色为金黄色。对醇沉后的母液滴定检测,平均聚合度为 1.24。同时对逐级醇沉出的产品进行了硅胶薄层分析^[15],发现逐级醇沉出的产品薄层显色相似,没有单糖;而母液薄层显色分析单糖很多。说明醇沉可以去除单糖。

2.3 ESI-MS 检测壳寡糖的分布

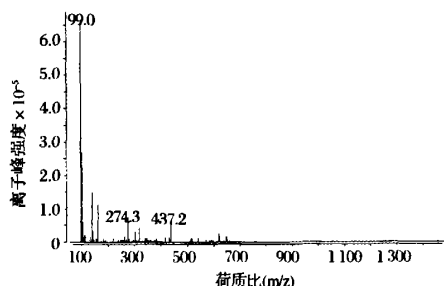


图 13 壳寡糖 ESI-MS 图谱

将醇水体积比为 3 : 1 醇沉出的壳寡糖样品进行 ESI-MS 分析。从图 13 可以看出,壳寡糖分布比较集中, m/z 在 99.0 - 670。ESI-MS 电离过程中,分子离子很容易带多价电荷,一般不会超过 6 价。其中 m/z 为 99.0 对应着最强的分子离子峰,结合薄层色谱分析结果, $m/z = 99.0$ 其聚合度应为 4 - 12;整个产品中 $m/z = 99.0$ 含量占主导,说明醇沉出的主要产物为寡糖。

3 结论

(1)通过氧化降解壳聚糖的单因素条件实验及正交实验,得到氧化降解的最优条件:醋酸质量分数 1.0%,温度 60℃,过氧化氢用量 1.0%,壳聚糖质量分数 3.5%,摇床转速 150 r/min,反应时间 4.5 h,壳聚糖脱乙酰度 85% 左右较有利于氧化降解。验证实验中 3 次降解反应后还原端基量平均值为 0.821 mmol/g,平均聚合度 $DP = 4.32$ 。

(2)乙醇沉淀分离壳寡糖,可以得到去除了部分单糖的壳寡糖产品,研究发现固形物浓度 25%、醇水体积比 3 : 1、醇沉 50 时间和降解液 pH 7.0 条件较佳。经 ESI-MS 分析,3 倍醇沉出的壳寡糖产品,发现主要是 2 - 4 糖。若想得到很纯的产品仍需要进一步提纯。

参 考 文 献

- [1] Qiao Ying, Bai Xuefang, Du Yuguang. Research advance of chitosan oligosaccharides on keeping healthy[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2008, 29(3): 210-213.
- [2] Tzu-Wen Liang, Yu-Jen Chen, Yue-Horng Yen. The anti-tumor activity of the hydrolysates of chitinous materials hydrolyzed by crude enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* V656[J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42: 527-534.
- [3] 刘幸海, 李正名, 王宝雷. 壳寡糖的制备工艺最新研究进展[J]. *天津化工*, 2006, 20(1): 1-6.
- [4] Se-Kwon Kim, Niranjan Rajapakse. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 62: 357-368.
- [5] Chen Xiaoe, Fang Xubo, Xia Wenshui. Preparation of chitosan oligosaccharides by enzymic hydrolysis[J]. *Journal of Functional Polymers*, 2007, 19-20(2): 204-208.
- [6] Sun Tao, Zhou Dongxiang, Xie Junlin, et al. Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity[J]. *Euro Food Res Technology*, 2007, 225: 451-456.
- [7] Lee DongXia, Xia WenShui, Zhang Jiali. Enzymatic preparation of chito-oligosaccharides by commercial lipase[J]. *Food Chemistry*, 2008, 111: 291-295.
- [8] 刘羿君, 楼陈钰, 侯智谋, 等. 过氧化氢在乙酸均相体系中对壳聚糖的降解[J]. *功能高分子学报*, 2007, 19-22(4): 426-430.
- [9] Aslak Einbu, Hans Grasdalen, Kjell M. Varum. Kinetics of hydrolysis of chitin/chitosan oligomers in concentrated hydrochloric acid[J]. *Carbohydrate Research*, 2007, 342: 1055-1062.
- [10] Cabrera, Juan Carlos, Van Cutsem, Pierre. Preparation of chitosan oligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2005, 25(2): 165-172.
- [11] Jarle Horn, Svein, Eijsink, Vincent GH. A reliable reducing end assay for chito-oligosaccharides[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2004, 56(1): 35-39.
- [12] Nicole Dennharta, Tamo Fukamizob, Ryszard Brzezinski. Oligosaccharide hydrolysis by chitosanase enzymes monitored by real-time electrospray ionization-mass spectrometry[J]. *Journal of Biotechnology*, 2008, 134: 253-260.
- [13] 袁湘林, 邹汉法, 汪海林, 等. 基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱用于寡糖的分析[J]. *分析化学*, 1997, 27(7): 786-789.
- [14] Ste'pHane Trombotto, Catherine Ladavière, Fre'de'ric Delolme, et al. Chemical preparation and structural characterization of a homogeneous series of chitin/chitosan Oligomers[J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 1731-1738.
- [15] 刘靖, 夏文水. 纤维素酶中双功能酶水解壳聚糖作用方式的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2006, 32(5): 31-35.

The Oxidation Method to Prepare Chitosan Oligosaccharide

Shu Dehai, Qian Junqing, Wu Wei

(College of pharmaceutical science, Zhejiang University of technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT Low molecule weight chitosan oligosaccharide (COS) was prepared by degraded 3.5% chitosan in 1.0% acetic acid with 1.0% hydrogen peroxide at 60℃ shaking for 4.5 hours. Concentration was then adjusted to 25%, pH 7.0. The solution finally was precipitated by 95% alcohol and COS was obtained without monosaccharide at the yield of 93.0%. The molecular weight was estimated by Fehling oxidation-reduction titration which was detecting the average value of the reducing ends. The distribution of COS was analyzed by electro-spray ionization mass spectrometry (ESI-MS). The COS comprised mainly of 2 to 4 chitosan oligosaccharides was precipitated by three volume of alcohol. The conclusion was that COS could be efficiently prepared by the hydrogen peroxide oxidation of chitosan.

Key words chitosan oligosaccharide, hydrogen peroxide, degradation, alcohol precipitation