

壳聚糖制备方法比较及其性能研究

纪蕾^{1,2}, 刘天红^{1,2}, 王颖^{1,2*}, 唐欢欢¹, 李晓^{1,2}, 李红艳¹, 姜晓东¹,
孙元芹¹, 杨青^{3,4}

(1. 山东省海洋生物研究院, 青岛 266104; 2. 青岛市水产生物品质评价与利用工程研究中心, 青岛 266104;
3. 海洋功能食品国家地方联合工程实验室, 威海 264309; 4. 荣成泰祥食品股份有限公司, 威海 264309)

摘要: **目的** 研究壳聚糖的制备方法。**方法** 以甲壳素为原料, 分别采用微波法和间歇碱液法制备壳聚糖, 分析不同方法制备壳聚糖的粘均分子量、黏度、抗氧化性、吸湿保湿性能及表面形态的差异。**结果** 微波法制备壳聚糖的最佳工艺条件为: 氢氧化钠浓度为55%, 料液比为1:15 (g/mL), 微波功率为400 W, 时间20 min; 间歇碱液法制备壳聚糖的最佳工艺条件为: 氢氧化钠浓度为55%, 料液比为1:20 (g/mL), 温度100 °C, 时间10 h, 5 h更换碱液1次。2种方法相比, 微波法反应时间短, 碱液用量少, 制备的壳聚糖粘均分子量和黏度较高, 对羟基(·OH)自由基的清除效果好, 吸湿性佳; 间歇碱液法制备的壳聚糖脱乙酰度较高(88.95%), 对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基的清除效果较好, 对原料的破碎化程度较高, 但反应时间长, 碱液用量多。

结论 从节能高效、绿色环保的角度考虑, 微波法制备壳聚糖较理想。

关键词: 甲壳素; 壳聚糖; 微波法; 间歇碱液法; 性能

Comparison of preparation methods and properties of chitosan

JI Lei^{1,2}, LIU Tian-Hong^{1,2}, WANG Ying^{1,2*}, TANG Huan-Huan¹, LI Xiao^{1,2}, LI Hong-Yan¹,
JIANG Xiao-Dong¹, SUN Yuan-Qin¹, YANG Qing^{3,4}

(1. Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104, China; 2. Qingdao Aquatic Organisms Quality Evaluation and Utilization Engineering Research Center, Qingdao 266104, China; 3. National and Local United Engineering Lab of Marine Functional Food, Weihai 264309, China; 4. Rongcheng Taixiang Food Products Co., Ltd, Weihai 264309, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the preparation method of chitosan. **Methods** Chitin was used as raw material to prepare chitosan by microwave method and alkalinity batch process respectively. The differences of viscosity average molecular weight, viscosity, oxidation resistance, moisture absorption and moisture retention properties and surface morphology of chitosan prepared by different methods were analyzed. **Results** The optimum conditions for the preparation of chitosan by microwave were as follows: the concentration of sodium hydroxide was 55%, the solid-liquid ratio was 1:15 (g/mL), the microwave power was 400 W, and the time was 20 min. The optimum conditions for preparing chitosan by alkalinity batch process were as follows: the concentration of sodium hydroxide was 55%, the ratio of material to liquid was 1:20 g/mL, the temperature was 100 °C, the time was 10 h, and the alkali liquor was replaced once for 5 h. Compared with the two methods, the microwave method had shorter

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系虾蟹类创新团队项目(SDAIT-13-07)

Fund: Supported by Project of Shandong Provincial Department of Agriculture (SDAIT-13-07)

*通信作者: 王颖, 研究员, 主要研究方向为水产加工与质量安全。E-mail: food_rc@sina.com

*Corresponding author: WANG Ying, Professor, Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao 266104, China. E-mail: food_rc@sina.com

reaction time, less alkali dosage, higher viscosity average molecular weight and viscosity, better hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) scavenging effect and hygroscopicity. Chitosan prepared by alkalinity batch process had higher degree of deacetylation (88.95%), better 1,1-diphenyl 2-trinitrophenylhydrazine(DPPH) scavenging effect and higher degree of raw material fragmentation, but long reaction time and large dosage of lye. **Conclusion** From the point of view of energy saving, high efficiency and environmental protection, the microwave method is ideal to prepare chitosan.

KEY WORDS: chitin; chitosan; microwave method; alkalinity batch process; property

0 引言

壳聚糖(chitosan, CTS), 化学名称为聚葡萄糖胺(1-4)-2-氨基-B-D 葡萄糖, 是甲壳素经脱乙酰化后的产物, 为自然界中唯一的聚阳离子多糖^[1-2], 具有无毒、生物相容性好、易于降解等独特的生物活性, 在医药保健、生物环保、食品饲料等众多领域有广泛的用途^[3-5], 曾在 1991 年国际甲壳素大会上被誉为继蛋白质、脂肪、糖类、维生素和无机盐之后的第六生命要素^[6]。

壳聚糖的制备方法主要包括物理法、碱液法、微生物法等。碱液法是采用浓碱煮沸的方法制备壳聚糖, 因其设备简单且成本较低, 早期学者对碱液法的研究较多, 但随着绿色、安全生产理念的兴起, 人们将更多关注的重点放在物理法和微生物法, 常见的物理法包括微波法、超声法等, 研究发现, 微波处理可以增强乙酰基的反应活性, 提高反应速率, 缩短反应时间^[7-8]。目前已有壳聚糖微波制备工艺的研究报道^[9-11], 但主要集中在单一工艺条件的确定和优化, 周能等^[12]确定了微波半干一步法制备壳聚糖的优化条件, 并制得褐色片状粘度达 53.6 mPa·s, 脱乙酰度为 60%~70%的壳聚糖; 丁恒生等^[13]以龙虾壳为原料, 探讨微波辐射法快速制备壳聚糖的工艺, 发现在碱液浓度 45%、微波加热 15 min、微波功率 280 W 下制备具高效性。到目前为止, 对不同制备方法的比较分析较少, 对壳聚糖性能的研究也较少, 更少见对不同方法制备的壳聚糖抗氧化性、吸湿保湿性等的分析比较。鉴于此, 本研究主要对微波法和间歇碱液法制备壳聚糖的工艺条件进行研究, 分析比较产物壳聚糖理化性能的差异, 以为壳聚糖产业化发展提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

甲壳素: 购自上海源叶生物科技有限公司。

1.2 试剂

盐酸、氢氧化钠、硫酸铵、碳酸钠、甲基橙、苯胺蓝、乙酸、乙酸钠、1,1-二苯基 2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl 2-trinitrophenylhydrazine, DPPH)、甲醇、乙醇、过氧化氢、

硫酸铁、水杨酸(分析纯, 国药集团化学试剂北京有限公司)。

1.3 仪器

UV-2450 紫外分光光度计(日本岛津仪器有限公司); ZNCL-DLS 智能多联磁力加热锅(上海科升仪器有限公司); VEGA3 扫描电子显微镜(泰思肯(中国)有限公司); SNB-1 数字黏度计(上海精密科学仪器有限公司); MC4-0.5-0.6 乌氏黏度计(上海试剂有限公司); 9052B-1 电热鼓风干燥机(上海福马试验设备有限公司); TP-313 电子分析天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司); WD800ATL28 微波炉(广东格兰仕集团有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 微波法制备壳聚糖

称取 5 g 甲壳素于聚四氟烧杯中, 加入一定浓度的氢氧化钠溶液, 搅拌均匀后, 浸泡 10 min, 放入微波炉内(炉内转盘上放置半杯水, 以尽可能减少反应过程中反应液水分的蒸发), 然后启动微波炉, 反应结束后过滤, 水洗至中性, 在 70 °C 下烘干, 待用。

1.4.2 间歇碱液法制备壳聚糖

称取 5 g 甲壳素于烧杯中, 加入适量乙醇超声 10 min, 然后加入一定浓度的氢氧化钠溶液, 置于水浴锅中反应一定时间, 反应过程中进行搅拌, 中间更换碱液 1 次, 反应结束后过滤, 水洗至中性, 在 70 °C 下烘干, 待用。

1.4.3 脱乙酰度的测定

采用碱量法测定脱乙酰度^[14]。称取样品 0.2 g, 加入 0.1 mol/L 的盐酸标准溶液 30.00 mL 反应 3 h, 加入 1 滴 0.1% 甲基橙溶液和 2 滴 0.1% 苯胺蓝溶液, 用 0.1 mol/L 的氢氧化钠标准溶液滴定, 记录消耗氢氧化钠用量。用下列公式计算脱乙酰度:

$$\text{NH}_2\% = \frac{(C_1V_1 - C_2V_2) \times 0.016}{G \times (100 - W)} \times 100\%$$
$$\text{NH}_2\% = \frac{(\text{NH}_2\%)}{9.94\%} \times 100\%$$

式中: C_1 —盐酸标准溶液的浓度, mol/L; C_2 —氢氧化钠标准溶液的浓度, mol/L; V_1 —加入的盐酸标准溶液的体积, mL; V_2 —滴定耗用的氢氧化钠标准溶液的体积, mL; G —样品重, g; W —样品的水分, %; 0.016—与 1 mL 1 mol/L 盐酸溶液相当的氨基量, g。

1.4.4 粘均分子量的测定^[15]

参照赵东科^[15]的方法, 采用一点法测定壳聚糖的粘

均分子量。以 0.1 mol/L 乙酸钠-0.2 mol/L 乙酸溶液为溶剂, 使用乌氏黏度计, 在 25 °C 下测出壳聚糖溶液的流出时间 t 及溶剂流出时间 t_0 , 根据公式计算特性黏度 η 。

$$\eta_r = t/t_0$$
$$\eta_{sp} = \eta_r - 1$$
$$\eta = (\eta_{sp} + 3 \ln \eta_r) / 4C$$

其中, η —特性黏度, mL/g; η_{sp} —增比黏度; η_r —相对黏度; C —壳聚糖溶液浓度, g/mL。

根据上述公式测定壳聚糖特性黏度后, 按 Mark-Houwink 方程计算粘均分子量 M_w 。

$$\eta = K \times M_w^\alpha, \text{ 其中 } K = 6.589 \times 10^{-3}, \alpha = 0.88。$$

1.4.5 黏度的测定

将 3.00 g 壳聚糖溶于 300 mL 1% 的乙酸溶液, 20 °C 时用 SNB-1 数字黏度计进行测定。

1.4.6 抗氧化性能的测定

(1) DPPH 自由基清除率的测定

参照 LI 等^[16]的方法。取 0.2 mmol/L DPPH 甲醇溶液 2 mL, 甲醇定容至 3 mL, 测量 517 nm 处吸光值作为 A_0 ; 取 DPPH 甲醇溶液 2 mL, 加入 100 μ L 不同浓度壳聚糖溶液, 甲醇定量至 3 mL, 充分混匀, 置于暗处反应 30 min 后, 测量 517 nm 处吸光值作为 A , 甲醇调仪器零点。DPPH 清除率计算公式如下: DPPH 自由基清除率 = $\frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$ 。

(2) 羟基($\cdot$ OH)自由基清除率的测定

采用水杨酸法^[17]测定 $\cdot$ OH 清除率。取 1 mL 1.8 mmol/L FeSO_4 溶液、1 mL 9 mmol/L 乙醇-水杨酸溶液、250 μ L 双蒸水和 1 mL 8.8 mmol/L H_2O_2 混合作为 A_0 ; 取 1 mL FeSO_4 溶液、1 mL 乙醇-水杨酸溶液与 100 μ L 不同浓度的样品溶液混合, 用双蒸水定量到 2250 μ L, 最后加入 1 mL H_2O_2 混合均匀作为 A_x ; 取 1 mL FeSO_4 溶液、1 mL 乙醇-水杨酸溶液与 100 μ L 不同浓度壳聚糖溶液混合, 用双蒸水定量到 3250 μ L, 混合均匀作为 A_{x0} , 均置于 37 °C 水浴 10 min, 于 505 nm 下测定吸光值。 $\cdot$ OH 清除率计算公式如下: $\cdot$ OH 自由基清除率 = $\frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100\%$ 。

1.4.7 吸湿保湿性能的测定

参照武大引等^[18]的方法。取 2 份干燥后的原料称其质量, 记 m_0 , 分别放置于 2 个称量瓶中, 其中一个称量瓶置于装有硫酸铵饱和溶液(相对湿度 81%)的干燥器内, 另一个放入装有饱和碳酸钠溶液(相对湿度 43%)的干燥器内, 分别称量并计算放置 10、20、30、40、50、60 h 后, 原料的质量 m_n 。计算吸湿率 η 。

$$\eta = \frac{m_n - m_0}{m_0} \times 100\%$$

取 2 份干燥后的原料, 加入质量为 m'_0 的蒸馏水, 分别放置于 2 个称量瓶中, 其中一个称量瓶放入装有饱和碳酸钠溶液(相对湿度 43%)的干燥器内, 另一个置于装有干硅胶的干燥器内, 分别称量并计算放置 10、20、30、40、50、60 h 后的水分含量 m'_n , 计算水分残存率 η' 。

$$\eta' = \frac{m'_n - m'_0}{m'_0} \times 100\%$$

1.4.8 扫描电镜分析

样品经干燥处理, 喷金, 在 VEGA3 扫描电子显微镜上完成。

1.5 实验方案

1.5.1 微波法的单因素试验

固定其他条件不变, 分别考察氢氧化钠浓度(35%、40%、45%、50%、55%)、料液比(1:15、1:20、1:25、1:30、1:35, g/mL)、微波功率(200、300、400 W)、时间(5、10、15、20、25 min)对壳聚糖脱乙酰度的影响。

1.5.2 微波法的正交试验

根据单因素试验结果, 设计四因素三水平正交试验, 如表 1, 确定最优工艺条件。

表 1 微波法正交试验因素与水平
Table 1 Factors and levels of orthogonality test of microwave method

水平	因素			
	氢氧化钠浓度 /%	料液比/(g/mL)	微波功率/W	时间 /min
	A	B	C	D
1	45	1:15	200	10
2	50	1:20	300	15
3	55	1:25	400	20

1.5.3 间歇碱液法的单因素试验

固定其他条件不变, 分别考察氢氧化钠浓度(35%、40%、45%、50%、55%)、料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30, g/mL)、温度(80、85、90、95、100 °C)、时间(2、4、6、8、10 h)对壳聚糖脱乙酰度的影响。

1.5.4 间歇碱液法的正交试验

根据单因素试验结果, 设计四因素三水平正交试验, 如表 2, 确定最优工艺条件。

表 2 间歇碱液法正交试验因素与水平
Table 2 Factors and levels of orthogonal test of alkalinity batch process

水平	因素			
	氢氧化钠浓度/%A	料液比/(g/mL) B	温度/°CC	时间/hD
1	45	1:20	90	6
2	50	1:25	95	8
3	55	1:30	100	10

1.5.5 壳聚糖的性能比较

分别测定 2 种方法制备的壳聚糖的粘均分子量、黏度、

抗氧化性和吸湿保湿性能,同时对表面形态进行电镜分析。

1.6 数据分析

数据采用平均值±标准偏差表示,采用 Excel 2007 对实验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 微波法制备壳聚糖单因素试验

由图 1 可知,氢氧化钠浓度、微波功率、时间与壳聚糖的脱乙酰度呈正相关,料液比与壳聚糖脱乙酰度呈负相关,不同料液比对脱乙酰度的影响差异不大,适宜的氢氧

化钠浓度为 45%~55%,料液比为 1:15~1:25(g/mL),微波功率为 400 W,时间为 10~20 min。

2.2 微波法制备壳聚糖正交试验

由表 3、4 可知:4 项因素对脱乙酰度的影响次序为 $C>D>A>B$ 。 C 、 D 对脱乙酰度的影响极显著($P<0.01$), A 、 B 对脱乙酰度的影响显著($0.01<P<0.05$),最佳条件组合为 $A_3B_1C_3D_3$,即氢氧化钠浓度为 55%,料液比为 1:15 (g/mL),微波功率为 400 W,时间 20 min。按此最佳条件进行验证试验,提取次数为 3 次,结果测得脱乙酰度为 $86.42\%\pm 0.43\%$,高于其他实验组。

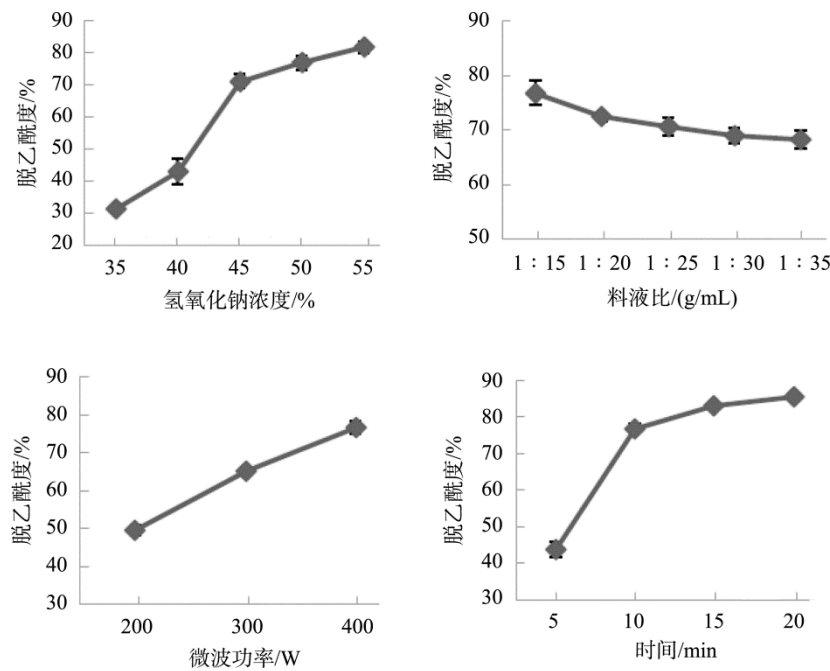


图 1 单因素对壳聚糖脱乙酰度的影响($n=3$)
Fig.1 Effects of single factor on deacetylation degree of chitosan ($n=3$)

表 3 $L_9(3^4)$ 正交表试验方案设计及计算
Table 3 Layout and results of orthogonal test $L_9(3^4)$

处理	A	B	C	D	脱乙酰度/%
1	1	1	1	1	52.95
2	1	2	2	2	73.22
3	1	3	3	3	83.05
4	2	1	2	3	76.7
5	2	2	3	1	75.49
6	2	3	1	2	60.88
7	3	1	3	2	86.09
8	3	2	1	3	60.48
9	3	3	2	1	71.24
K_1	69.74	71.91	58.10	66.56	
K_2	71.02	69.73	73.72	73.40	
K_3	72.60	71.72	81.54	73.41	
R	2.86	2.18	23.44	6.85	

表 4 方差分析 Table 4 Variance analysis					
变异来源	偏差平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>A</i>	12.342	2	6.171	5.522	*
<i>B</i>	8.776	2	4.388	5.288	*
<i>C</i>	854.518	2	427.259	467.563	**
<i>D</i>	93.663	2	46.831	52.235	**

注: *表示差异显著(0.01<*P*<0.05);**表示差异极显著(*P*<0.01)。

2.3 间歇碱液法制备壳聚糖单因素试验

由图 2 可知, 氢氧化钠浓度、料液比、温度、时间均

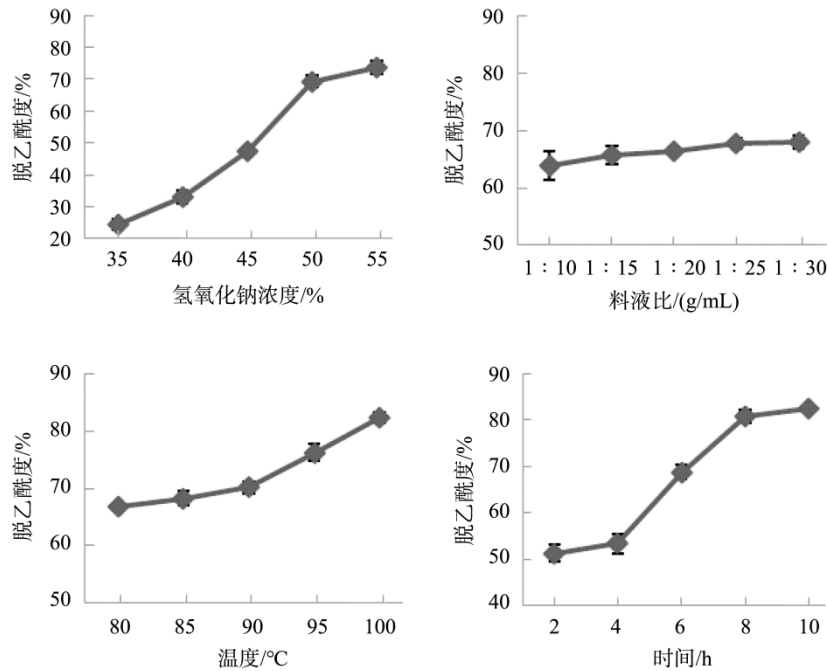


图 2 单因素对壳聚糖脱乙酰度的影响(*n*=3)
Fig.2 Effects of single factor on deacetylation degree of chitosan (*n*=3)

表 5 $L_9(3^4)$ 正交表试验方案设计及计算 Table 5 Layout and results of orthogonal test $L_9(3^4)$					
处理	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	脱乙酰度/%
1	1	1	1	1	53.35
2	1	2	2	2	63.29
3	1	3	3	3	72.7
4	2	1	2	3	82.63
5	2	2	3	1	75.49
6	2	3	1	2	76.3
7	3	1	3	2	88.86

与壳聚糖的脱乙酰度呈正相关, 但与其他三因素相比, 料液比对脱乙酰度的影响差异不大, 适宜的氢氧化钠浓度为 45%~55%, 料液比为 1:20~1:30 (g/mL), 温度为 90~100 °C, 时间为 6~10 h。

2.4 间歇碱液法制备壳聚糖正交试验

由表 5、6 可知: 4 项因素对脱乙酰度的影响次序为 $A>D>C>B$ 。*A*、*C*、*D* 对脱乙酰度的影响极显著($P<0.01$), *B* 对脱乙酰度的影响显著($0.01<P<0.05$), 最佳条件组合为 $A_3B_1C_3D_3$, 即氢氧化钠浓度为 55%, 料液比为 1:20 (g/mL), 温度 100 °C, 时间 10 h。按此最佳条件进行验证试验, 提取次数为 3 次, 结果测得脱乙酰度为 88.95%±0.72%, 高于其他实验组。

表 5(续)					
处理	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	脱乙酰度/%
8	3	2	1	3	77.88
9	3	3	2	1	71.64
K_1	63.11	74.95	69.18	66.83	
K_2	78.14	72.22	72.52	76.15	
K_3	79.46	73.55	79.02	77.74	
<i>R</i>	16.35	2.73	9.84	10.91	

表 6 方差分析
Table 6 Variance analysis

变异来源	偏差平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>A</i>	494.757	2	247.378	181.109	**
<i>B</i>	11.155	2	5.577	4.079	*
<i>C</i>	150.210	2	75.105	54.974	**
<i>D</i>	208.470	2	104.235	76.372	**

注: *表示差异显著(0.01<*P*<0.05);**表示差异极显著(*P*<0.01)。

2.5 工艺条件比较

由表 7 可知,微波法和间歇碱液法的适宜氢氧化钠浓度均为 55%,高浓度氢氧化钠有利于脱除乙酰基,提高壳聚糖的脱乙酰度;微波法反应所需时间(20 min)明显少于间歇碱液法(10 h),可以在较短的时间内获得较高脱乙酰度的壳聚糖;间歇碱液法的料液比高于微波法,且反应过程需要更换一次碱液,因此微波法消耗的氢氧化钠的量较少,综上所述,微波法优于间歇碱液法,可以缩短反应时间,减少氢氧化钠用量。

表 7 工艺条件比较
Table 7 Comparison of preparation conditions

	氢氧化钠浓度/%	时间/h	料液比 (g/mL)	脱乙酰度 /%
微波法	55	1/3	1:15	86.42±0.43
间歇碱液法	55	10	1:20	88.95±0.72

2.6 壳聚糖的性能比较

2.6.1 粘均分子量

实验结果表明,间歇碱液法制备壳聚糖的粘均分子量为 $(2.24\pm0.14)\times10^5$,微波法制备壳聚糖的粘均分子量为 $(3.17\pm0.06)\times10^5$,前者的粘均分子量略低于后者。

2.6.2 黏度

黏度是衡量壳聚糖质量的一个重要指标,其值越高,表示壳聚糖质量越好,图 3 为不同方法制备的壳聚糖的黏度,从图中可以看出,微波法制备的壳聚糖黏度略高于间歇碱液法,微波法可避免高温长时间处理导致壳聚糖大分子链的降解,使其具有较高的粘性。但考虑到在加热过程中,碱液中会有部分水分蒸发,可能会对壳聚糖黏度有一定影响。

2.6.3 抗氧化性

目前,使用最广泛的体外抗氧化评价方法为体外化学评价法,它是基于受试物与氧化物间的氧化还原反应,包括自由基清除能力和还原氧化物能力 2 种表征方法。前者常见的评价指标包括 DPPH 自由基评价法、超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)自由基评价法和羟基($\cdot OH$)自由基评价法^[19]。

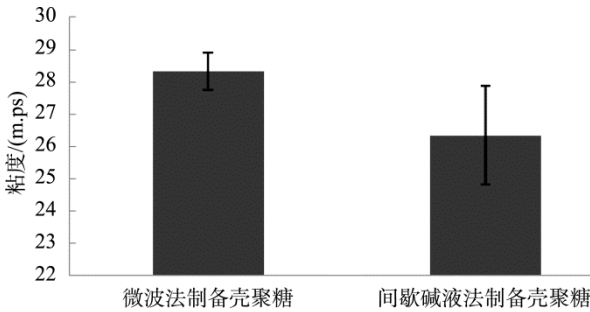


图 3 壳聚糖黏度(*n*=3)
Fig.3 Viscosity of chitosan (*n*=3)

(1) DPPH 清除率的测定

图 4 为不同方法制备的壳聚糖对 DPPH 的清除率,从图中可以看出,随着壳聚糖浓度的增加,其对 DPPH 的清除率也逐渐增大,从清除效果看,间歇碱液法优于微波法。

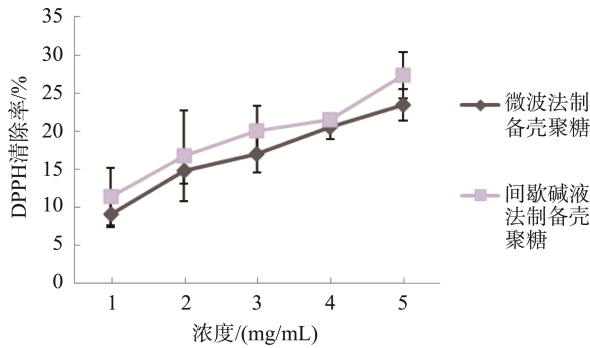


图 4 壳聚糖对 DPPH 的清除率(*n*=3)
Fig.4 Scavenging rate of chitosan to DPPH(*n*=3)

(2) 羟基($\cdot OH$)自由基清除率的测定

图 5 为不同方法制备的壳聚糖对 $\cdot OH$ 的清除率,从图中可以看出,随着壳聚糖浓度的增加,其对 $\cdot OH$ 的清除率逐渐下降,从清除效果看,微波法优于间歇碱液法。

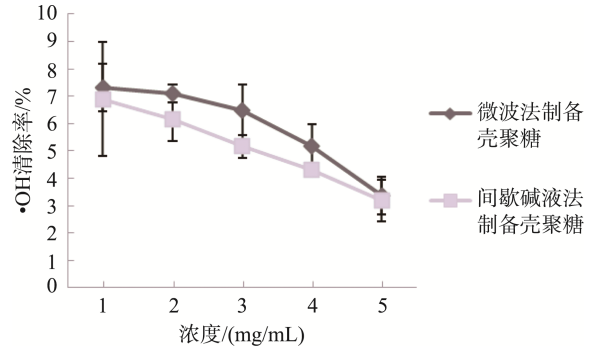


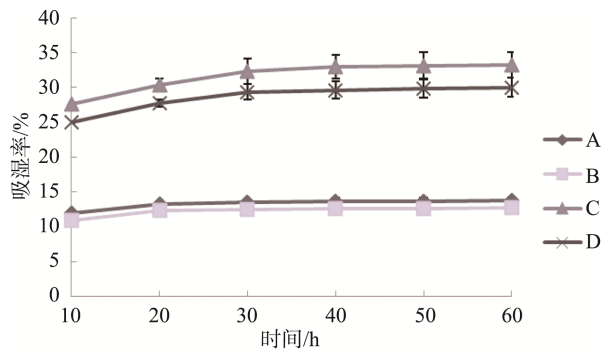
图 5 壳聚糖对 $\cdot OH$ 的清除率(*n*=3)
Fig.5 Scavenging rate of chitosan to $\cdot OH$ (*n*=3)

2.6.4 吸湿保湿性能

(1)吸湿性能

图 6 为壳聚糖在不同湿度环境中吸湿性能的测定结

果。从图中可以看出,在0~40 h之间,随着时间的延长,壳聚糖的吸湿率不断增加,当40 h后,壳聚糖吸湿率逐渐趋于平缓。在湿度分别为43%、81% 2种环境下,微波法制备的壳聚糖吸湿性均优于间歇碱液法制备的壳聚糖。



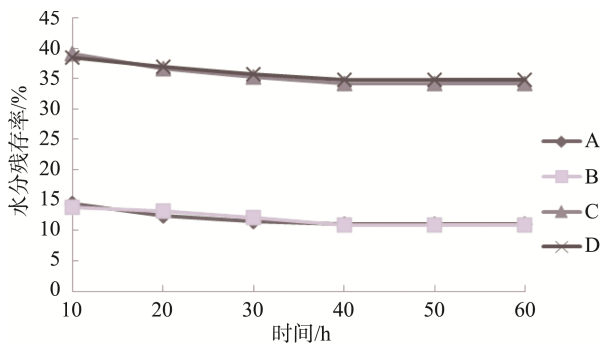
A: 微波法制备壳聚糖(湿度 43%); B: 间歇碱液法制备壳聚糖(湿度 43%); C: 微波法制备壳聚糖(湿度 81%); D: 间歇碱液法制备壳聚糖(湿度 81%)。

图6 壳聚糖吸湿性能(n=3)

Fig.6 Moisture-absorption capacity of chitosan (n=3)

(2)保湿性能

图7为壳聚糖在不同湿度环境中保湿性能的测定结果。从图中可以看出,在0~40 h之间,随着时间的延长,壳聚糖的水分残存率逐渐下降,当40 h后,壳聚糖水残存率逐渐趋于平缓。在干硅胶和43%的湿度环境下,2种方法制备的壳聚糖的保湿性差异不大。



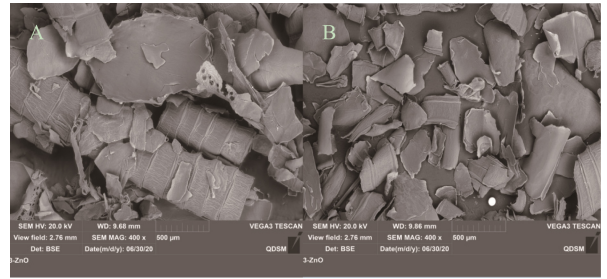
A: 微波法制备壳聚糖(干硅胶); B: 间歇碱液法制备壳聚糖(干硅胶); C: 微波法制备壳聚糖(湿度 43%); D: 间歇碱液法制备壳聚糖(湿度 43%)。

图7 壳聚糖保湿性能(n=3)

Fig.7 Moisture-retention capacity of chitosan (n=3)

2.6.5 表面形态

图8为壳聚糖电镜扫描的表面形态。从图中可观察到,经微波法和间歇碱液法制备的壳聚糖表面显示出高密度多孔的纤维网状结构,间歇碱液法由于经长时间高温处理,使样品碎片化程度更高。



注: A 微波法制备壳聚糖, B 间歇碱液法制备壳聚糖。

图8 电镜扫描图(400×)

Fig.8 Scanning electron microscopy (400×)

3 结论与讨论

3.1 壳聚糖的脱乙酰度、粘均分子量及黏度

脱乙酰度是脱去乙酰基的葡萄糖胺单元数占总葡萄糖胺单元数的比例,它是考察壳聚糖最基本的结构参数之一。脱乙酰度对壳聚糖的溶解性能、黏度等都有一定影响。庄晨俊等^[20]的研究发现,随脱乙酰度的增加,壳聚糖溶液的表观黏度呈先减小后增大的趋势,在脱乙酰度88.1%时达到最小值;本研究结果表明,间歇碱液法的脱乙酰度(88.95%)较高,其黏度(26.33 m·Ps)较低,与庄晨俊等的研究结果一致。此外,王伟等^[21]的研究发现,壳聚糖黏度随着分子量增大而增加;壳聚糖在水溶液中分子链充分伸展,会产生特殊的相互作用力,如分子间氢键等,分子量大的壳聚糖代表其聚合度较高,分子链较长,在溶液中的相互缠结能力、聚集能力都极大提升,在溶液中引起的氢键与疏水相互作用增大,故可得到较高黏度^[22];本研究结果表明,微波法的粘均分子量(3.17×10^5)较高,其黏度(28.33 m·Ps)也较高,与王伟等的研究结果一致。

3.2 壳聚糖的抗氧化性

抗氧化是机体免受自由基损伤的一种自我保护机制。自由基是机体产生的具有强氧化性,损害机体组织与细胞的有害化合物,能引起疾病和机体衰老。生物体内存在的自由基包括羟自由基、超氧阴离子自由基、脂类过氧化物自由基等^[23]。国外学者研究发现^[24],壳聚糖对机体具有清除自由基、抵抗过氧化损伤等作用;高晶晶等^[25]的研究表明,壳聚糖对自由基的清除效率随着其浓度的增加而增大;本研究发现,壳聚糖对不同自由基的清除效果不同,对DPPH的清除能力较强,与浓度呈正相关,而对羟基($\cdot\text{OH}$)自由基的清除效果较弱,与浓度呈负相关。此外,有研究发现,壳聚糖的抗氧化能力大小与其质量浓度高低、相对分子质量大小、乙酰度等因素密切相关;赵盼^[26]发现,相对分子质量越低的壳寡糖其抗氧化效果越强;本研究发现,间歇碱液法粘均分子量较高,对DPPH的清除率也较高,

但对羟基($\cdot\text{OH}$)自由基的清除率较低。

3.3 壳聚糖的吸湿保湿性能

壳聚糖中含有大量羟基、氨基等极性基团,可结合水分子,具有良好的吸水性和保湿性,可以作为功能性添加剂在化妆品及外用制剂中应用。李家敏等^[27]研究了不同分子量壳聚糖的吸湿保湿性,发现相对分子量为3 kDa的壳聚糖吸湿保湿性能较好;李欣等^[28]将壳聚糖制备成羧甲基壳聚糖、N-羧丁基壳聚糖等衍生物,提高其保湿性;李瑞国^[29]也考察了壳聚糖衍生物-羧甲基壳聚糖的吸湿保湿性,发现其吸水率约为透明质酸的2倍,吸湿保湿性能优于透明质酸,同时具有润肤和抑菌性,可以应用到化妆品中作为保湿剂;目前关于壳聚糖吸湿保湿性能的研究并不多见,具体作用机理尚不明确,另外壳聚糖的合理用法用量不确定,相关问题有待进一步研究。

本研究通过正交试验确定了微波法和间歇碱液法制备壳聚糖的工艺条件。微波法制备壳聚糖的最佳工艺条件为:氢氧化钠浓度为55%,料液比为1:15(g/mL),微波功率为400 W,时间20 min;间歇碱液法制备壳聚糖的最佳工艺条件为:氢氧化钠浓度为55%,料液比为1:20(g/mL),温度100℃,时间10 h,中间更换碱液1次。对微波法和间歇碱液法2种工艺方法进行比较,各有特点。微波法反应时间短,碱液用量少,制备的壳聚糖粘均分子量和黏度较高,对羟基($\cdot\text{OH}$)自由基的清除效果和吸湿性能较好;而间歇碱液法制备的壳聚糖脱乙酰度较高,对DPPH的清除效果较好,对原料的破碎化程度较高,但反应时间较长,生产成本较高。微波法的优点是能极大缩短生产时间,减少碱液用量,既能保证壳聚糖较高的脱乙酰度,还可避免因高温长时间处理导致壳聚糖产品的分子量和黏度下降,是一种节能高效、绿色环保的制备方法。

参考文献

- [1] 陈西广. 甲壳素/壳聚糖结构形态与生物材料功效学研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(9): 126–140.
- [2] 姚庆达, 梁永贤, 温会涛, 等. 壳聚糖基复合材料及其在制革工业中的应用研究进展[J]. 皮革与化工, 2019, 36(6): 16–29.
- [3] SARKAR S, DAS D, DUTTA P, *et al.* Chitosan: A promising therapeutic agent and effective drug delivery system in managing diabetes mellitus [J]. Carbohydr Polym, 2020, 247: 9–13.
- [4] AHMAD SH, FATIMAH MN, ARMAN ZMS, *et al.* Efficacy of chitosan derivative films versus hydrocolloid dressing on superficial wounds [J]. J Taibah Univ Med Sci, 2018, 13(6): 11–15.
- [5] NABEL AN, MARAM THAK, SAMAR AA, *et al.* Effectuality of chitosan biopolymer and its derivatives during antioxidant applications [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 164: 13–19.
- [6] 康贻军. 壳聚糖的研究与开发进展[J]. 内蒙古民族大学学报, 2004, (3): 293–296.
- [7] KANG YJ. Progress in research and development of chitosan [J]. J Inner Mongolia Univ Nat, 2004, (3): 293–296.
- [8] 李巧霞, 宋宝珍, 仰振球, 等. 微波间歇法快速制备高粘均分子量和高脱乙酰度的壳聚糖[J]. 过程工程学报, 2006, (5): 789–793.
- [9] LI QX, SONG BZ, YANG ZQ, *et al.* Preparation of chitosan with high viscosity-average molecular weight and high degree of deacetylation by rapid interim microwave heating method [J]. Chin J Process Eng, 2006, (5): 789–793.
- [10] 许庆陵, 曾庆祝. 虾壳甲壳素及壳聚糖提取工艺的研究[J]. 中国食品添加剂, 2013, (6): 104–109.
- [11] XU QL, ZENG QZ. Study on extraction of chitin and chitosan from shrimp shells [J]. China Food Addit, 2013, (6): 104–109.
- [12] 代养勇, 曹健, 王中太. 甲壳素传统法与微波法制备壳聚糖的比较[J]. 食品工业科技, 2006, (6): 54–55.
- [13] DAI YY, CAO J, WANG ZT. Comparison of preparation of chitosan with conventional chitin method and microwave method [J]. Sci Technol Food Ind, 2006, (6): 54–55.
- [14] 宋林, 年中峰, 杨颀, 等. 微波辐射下以离子交联法制备壳聚糖微粒[J]. 沈阳化工大学学报, 2017, 31(1): 29–35.
- [15] SONG L, NIAN ZF, YANG D, *et al.* Prepared of chitosan microspheres by ionic crosslinking method under microwave irradiation [J]. J Shenyang Univ Chem Technol, 2017, 31(1): 29–35.
- [16] 张洁, 史劲松, 孙达峰, 等. 微波法制备壳聚糖研究[J]. 中国野生植物资源, 2011, 30(6): 38–43.
- [17] ZHANG J, SHI JS, SUN DF, *et al.* Study on the preparation of chitosan by microwave irradiation [J]. Chin Wild Plant Res, 2011, 30(6): 38–43.
- [18] 周能, 蒋先明. 微波半干一步法制备壳聚糖的研究[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 1998, (2): 3–5.
- [19] ZHOU N, JIANG XM. A one-step method for the preparation of chitosan with microwave irradiation [J]. J Guangxi Normal Univ (Nat Sci Ed), 1998, (2): 3–5.
- [20] 丁恒生, 王亚娜, 郑铁生. 微波辐射法快速制备龙虾壳聚糖工艺的研究[J]. 世界科技研究与发展, 2009, 31(5): 886–888.
- [21] DING HS, WANG YN, ZHENG TS. Discuss on the craft of quickly make lobster chitosan by microwave radiation method [J]. World Sci-Tech ol R & D, 2009, 31(5): 886–888.
- [22] 徐文峰, 廖晓玲. 碱量法测定壳聚糖脱乙酰度的研究[J]. 分析试验室, 2008, (S1): 218–221.
- [23] XU WF, LIAO XL. Study on determination of deacetylation degree of chitosan by alkalimetry [J]. Chin J Anal Lab, 2008, (S1): 218–221.
- [24] 赵东科. 壳聚糖衍生物的制备及生物活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [25] ZHAO DK. Preparation and biological activities of chitosan derivatives [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [26] LI XC, LIN J, GAO YX, *et al.* Antioxidant activity and mechanism of *Rhizoma cimicifugae* [J]. Chem Central J, 2012, 6(1): 140–141.
- [27] 孙兰凤, 李本俊, 潘琦. 分光光度法测定羟自由基的捕捉剂比较研究[J]. 辽宁化工, 2013, 42(12): 1503–1506.
- [28] SUN LF, LI BJ, PAN Q. Comparative study on spectrophotometric

- determination of hydroxyl free radical by using different catching agents [J]. Liaoning Chem Ind, 2013, 42(12): 1503–1506.
- [18] 武大引, 李露. 甲壳低聚糖的制备及其吸湿保湿性[J]. 青岛科技大学学报(自然科学版), 2017, 38(5): 27–31.
- WU DY, LI L. Preparation and moisture absorption of chitooligosaccharide [J]. J Qingdao Univ Sci Technol (Nat Sci Ed), 2017, 38(5): 27–31.
- [19] 彭钦. 天然多糖体外抗氧化活性研究[D]. 天津: 天津大学, 2014.
- PENG Q. Antioxidation of natural polysaccharides *in vitro* [D]. Tianjin: Tianjin University, 2014.
- [20] 庄晨俊, 钟宇. 分子量、脱乙酰度与浓度对壳聚糖流变性影响[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(7): 1–6.
- ZHUANG CJ, ZHONG Y. Effect of molecular weight, degree of deacetylation and concentration on rheological properties of chitosan [J]. Food Res Dev, 2019, 40(7): 1–6.
- [21] 王伟, 徐德时. 壳聚糖浓溶液流变性质研究-分子量的依赖性[J]. 高分子学报, 1995, (5): 596–600.
- WANG W, XU DS. Rheological properties of chitosan concentrated solution-molecular weight dependence [J]. Acta Polym Sin, 1995, (5): 596–600.
- [22] HOSSEINNEJAD M, JAFARI SM. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 85: 467–475.
- [23] 彭媛媛, 欧阳富龙, 贺建华. 壳寡糖在动物体内抗氧化功能研究进展[J]. 饲料博览, 2015, (8): 16–18.
- PENG YY, OUYANG FL, HE JH. Research advances of chitosan oligosaccharide on the antioxidant function in animal [J]. Feed Rev, 2015, (8): 16–18.
- [24] NGO DN, KIM MM, KIM SK. Chitin oligosaccharides inhibit oxidative stress in live cells [J]. Carbohydrate Polym, 2008, 74(2): 228–234.
- [25] 高晶晶, 张凤洪, 王立红, 等. 壳聚糖抗氧化效果的研究[J]. 兽医导刊, 2017, (23): 69–71.
- GAO JJ, ZHANG FH, WANG LH, *et al*. Study on the antioxidation effect of chitosan [J]. Vet Orient, 2017, (23): 69–71.
- [26] 赵盼. 壳聚糖和壳寡糖的抗氧化特性及其抑制苹果果汁褐变机理的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- ZHAO P. Study on chitosans and oligochitosans anti-oxidative activity and anti-browning mechanism of apple juice [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.
- [27] 李家敏, 肖欢. 不同分子量壳聚糖的吸湿性及保湿性测定[J]. 宜春学院学报, 2017, 39(12): 17–18, 106.
- LI JM, XIAO H. Assay of hygroscopicity and moisture retention property of chitosan with different molecular weight [J]. J Yichun Univ, 2017, 39(12): 17–18, 106.
- [28] 李欣, 易军鹏. 壳聚糖及其衍生物的制备和保湿吸湿性能评价[J]. 河南化工, 2004, (3): 23–25.
- LI X, YI JP. Preparation of chitosan and its derivatives and evaluation of their moisture adsorption and moisture retention [J]. Henan Chem Ind, 2004, (3): 23–25.
- [29] 李瑞国. 壳聚糖衍生物的合成及其在化妆品中的应用[J]. 日用化学工业, 2004, (5): 319–322.
- LI RG. Preparation of chitosan derivatives and its applications in cosmetics [J]. China Surf Deterg Cosmet, 2004, (5): 319–322.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



纪 蕾, 助理研究员, 主要研究方向为水产品加工与贮藏研究。
E-mail: lrubbit@126.com



王 颖, 研究员, 主要研究方向为水产加工与质量安全。
E-mail: food_rc@sina.com