doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2020.23.008

不同壳聚糖黏均分子量测定

朱静毅,王 威△,房克慧,尹 萌
(江苏省扬州市食品药品检验检测中心,江苏 扬州 225001)

摘要:目的 测定不同壳聚糖的黏均分子量。**方法** 采用乌氏毛细管黏度计法测定不同来源、不同脱乙酰度、不同灭菌方式及不同辐照剂量 ^{60}Co 灭菌壳聚糖的特性黏度,并利用经验公式推算黏均分子量。**结果** 不同来源壳聚糖的相对分子质量相差较大,且与脱乙酰度成正相关;环氧乙烷及辐照灭菌均会使壳聚糖的相对分子质量下降,^{60}Co 辐照剂量为 4～8 kGy 时,壳聚糖相对分子质量降低幅度依次增大。**结论** 乌氏毛细管黏度计法测定壳聚糖的黏均分子量简便、准确,不同处理方法对壳聚糖黏均分子量的影响较大。

关键词:壳聚糖;黏均分子量;特性黏度;乌氏毛细管黏度计;一点法;脱乙酰度;灭菌
中图分类号:R932;R283.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1006－4931(2020)23－0033－03

Determination of Viscosity Average Molecular Weight of Different Chitosan

ZHU Jingyi, WANG Wei, FANG Kehui, YIN Meng
(*Yangzhou Center for Food and Drug Control, Yangzhou, Jiangsu, China 225001*)

Abstract: Objective To determine the viscosity average molecular weight of different chitosan. **Methods** The intrinsic viscosity of chitosan with different sources, different degrees of deacetylation, different ways of sterilization and different doses of ^{60}Co irradiation were determined by ubbelohde viscometer method, and the average molecular weight of viscosity was calculated by the empirical formula. **Results** The molecular weight of chitosan from different sources was quite different, and it was positively correlated with the degree of deacetylation. Ethylene oxide and irradiation sterilization would cause the molecular weight of chitosan to decrease. When the ^{60}Co radiation dose increased from 4 kGy to 8 kGy, the relative molecular weight of chitosan decreased gradually. **Conclusion** The ubbelohde viscometer method is simple and accurate for determining the viscosity average molecular weight of chitosan. Different treatment methods have a great influence on the viscosity average molecular weight of chitosan.

Key words: chitosan; viscosity average molecular weight; intrinsic viscosity; ubbelohde viscometer; one－point method; degree of deacetylation; sterilization

壳聚糖(CS)是天然来源的甲壳素脱乙酰基后得到的高分子氨基多糖,是自然界中产量仅次于纤维素的天然有机高分子材料,具有可生物降解、生物相容性好、无免疫原性等特点,广泛应用于医药、食品、化工、化妆品、环保等领域[1]。壳聚糖的相对分子质量大小对其理化性质和生理活性有至关重要的影响,测定壳聚糖的相对分子质量具有重要意义[2],测定方法包括黏度法、分子排阻色谱法、质谱法[3]、多角度激光光散射法[4]等。黏度法采用乌氏毛细管黏度计,设备简单,操作方便,是目前较常用的方法。本研究中选取市售壳聚糖样品,分析不同脱乙酰度及采用不同灭菌方式对壳聚糖特性黏度及黏均分子量的影响,为壳聚糖的进一步开发和应用提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

试药:壳聚糖(详见表 1);冰醋酸(批号为20181008),36% 乙酸(批号为 20180725),氯化钠(批号为 20180904),均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

表 1 壳聚糖样品信息

编号	厂家	编号	厂家
1	粉碎,低黏,来源于鳕蟹壳,厂家 1	7	DAC≥90%,^{60}Co 辐照灭菌,辐照剂量 4 kGy,厂家 3
2	TK－03015,中黏,厂家 2	8	DAC≥95%,无前期处理,厂家 3
3	TK－03016,低黏,厂家 2	9	DAC≥95%,^{60}Co 辐照灭菌,辐照剂量 4 kGy,厂家 3
4	DAC≥85%,无前期处理,厂家 3	10	DAC≥85%,^{60}Co 辐照灭菌,辐照剂量 4 kGy,厂家 4
5	DAC≥85%,环氧乙烷灭菌,厂家 3	11	DAC≥85%,^{60}Co 辐照灭菌,辐照剂量 6 kGy,厂家 4
6	DAC≥90%,无前期处理,厂家 3	12	DAC≥85%,^{60}Co 辐照灭菌,辐照剂量 8 kGy,厂家 4

仪器:乌氏毛细管黏度计(毛细管内径为 0.5～0.6 mm,上海前锋橡塑玻璃制品厂);水银温度计(范围为 0～50 ℃,精度为 0.5 ℃,中华人民共和国常州热工仪表总厂);J9－2 型秒表(精度为 0.1 s,上海手表五厂);XS205DU 型电子分析天平(精度为 0.01 mg,梅特勒托利多公司);恒温水浴缸(精度为 0.05 ℃,上海标本模型厂)。

1.2 方法

1.2.1 温度调节

接通恒温水浴缸和搅拌器电源,调节水浴温度至(25±0.05)℃。

第一作者:朱静毅,女,大学本科,副主任药师,研究方向为非法添加药物成分检验及质量管理,(电话)0514－80976859(电子信箱)54757387@qq.com。
△**通信作者:**王威,男,大学本科,副主任药师,研究方向为生物安全检验及实验室管理,(电话)0514－80976871(电子信箱)effortyzidc@163.com。

1.2.2 溶液配制

不同浓度溶液：精密称取壳聚糖样品(1)100 mg，以0.2 mol/L CH_3COOH－0.1 mol/L CH_3COONa缓冲液作溶剂，配制成质量浓度为1 mg/mL的溶液，再逐级稀释，依次配制成质量浓度为0.8，0.4，0.2，0.1 mg/mL的供试品溶液。

不同离子强度溶液：分别取壳聚糖样品2，3，4，6，8各40 mg，精密称定，各5份，置100 mL容量瓶中，分别加冰醋酸浓度为0.2 mol/L，NaCl浓度依次为0，0.05，0.1，0.2，0.4 mol/L的混合溶液溶解，定容。

不同灭菌方法样品溶液：分别取壳聚糖样品4～9各40 mg，精密称定，置100 mL容量瓶中，用0.2 mol/L CH_3COOH－0.1 mol/L CH_3COONa缓冲液溶解，并稀释至刻度。

不同辐照剂量样品溶液：分别取壳聚糖样品10～12各40 mg，精密称定，置100 mL容量瓶中，用适量0.2 mol/L CH_3COOH－0.1 mol/L CH_3COONa缓冲液溶解，并稀释至刻度。

1.2.3 溶剂流出时间测定

取洁净干燥的乌氏黏度计，加入空白溶剂，用秒表准确读取时间。重复测量3次，偏差应小于0.2 s，计算平均值(t_0)。

1.2.4 溶液流出时间测定

取3号垂熔玻璃漏斗过滤供试品溶液，弃去初滤液1 mL，取续滤液。取供试品溶液适量，润洗黏度计2～3次，安装并调节好乌氏毛细管黏度计，同法测定供试品溶液的流出时间(记为 t)。

2 结果

2.1 不同浓度溶液的测定结果

采用外推作图法，取4个质量浓度[5]进行测定。各个质量浓度的相对黏度(η_r)见表2，在1.1～2.1范围内。由表2可见，采用最小二乘法得到样品(1)的线性回归方程，分别为 $\eta_{sp}/C = 392\,083X + 1\,048.7$(方程1)，$r = 0.9930$；$\ln(\eta_r/C) = -158\,561X + 1\,049.7$(方程2)，$r = 0.9752$。由方程1外推至浓度 $C = 0$ 处，得$[\eta] = 1\,049.7$；由方程2外推至浓度 $C = 0$ 处，得$[\eta] = 1048.7$，故$[\eta]$平均为1 049.2。根据一点法，$[\eta]$在919～1 060之间，误差较大，故采用一点法经验公式进行修正。由表3可见，经验公式1计算得到的特性黏度值与外推法所得结果相比，偏差最小[6]。根据经验公式 $[\eta] = KM^{\alpha}$，式中，$K = 3.72 \times 10^{-5}$ cm/g，M 为相对分子质量，$\alpha = 1.37$[7]，计算 M 为274 132。

表2 壳聚糖样品(1)的实验测定结果及数据处理结果

C(g/mL)	t(s)	η_r	η_{sp}	$\ln\eta_r$	$\ln\eta_r/C$	η_{sp}/C
0.000 806	228.25	2.098	1.098	0.741	919.38	1 362.38
0.000 403	162.35	1.492	0.492	0.400	993.39	1 221.65
0.000 201	133.05	1.223	0.223	0.201	1 001.52	1 109.44
0.000 101	120.85	1.111	0.111	0.105	1 040.90	1 097.58

注：C 为供试品溶液的质量浓度，t 为溶液流出时间，η_r 为相对黏度，η_{sp} 为增比黏度。

表3 一点法经验公式修正结果

C(g/mL)	外推值$[\eta]$	经验公式1		经验公式2		经验公式3	
		计算值$[\eta]$	偏差(%)	计算值$[\eta]$	偏差(%)	计算值$[\eta]$	偏差(%)
0.000 806	1 049.2	1 030.13	1.82	993.22	5.34	998.28	4.85
0.000 403		1 050.45	0.12	1 031.43	1.69	1 038.57	1.01
0.000 201		1 028.50	1.97	1 019.51	2.83	1 024.17	2.39
0.000 101		1 055.07	0.56	1 050.35	0.11	1 053.13	0.37

注：偏差 = |计算值－外推值|/外推值。

$$[\eta] = \frac{\eta_{sp} + 3\ln\eta_r}{4C} \quad \text{(经验公式1)}[8]$$

$$[\eta] = \frac{\eta_{sp} + 5\ln\eta_r}{6C} \quad \text{(经验公式2)}[9]$$

$$[\eta] = \frac{\ln\eta_r}{C}\eta_r^{1/9} \quad \text{(经验公式3)}[10]$$

2.2 不同离子强度溶液的测定结果

由图1可见，NaCl的浓度对壳聚糖的特性黏度影响较大，且对相对分子质量大的壳聚糖影响更大。NaCl的浓度小于0.05 mol/L时，离子强度对壳聚糖特性黏度产生的波动较显著，之后逐渐趋于平缓。

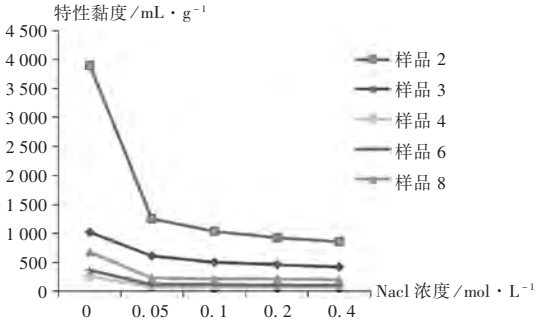


图1 离子强度对壳聚糖特性黏度的影响($n = 5$)

2.3 不同脱乙酰度及灭菌方式的测定结果

由表4可见，随着壳聚糖脱乙酰度的增大，其特性黏度及相对分子质量依次增大[11]，采用环氧乙烷和 ^{60}Co 辐照灭菌均会使样品的特性黏度降低，且呈

表4 不同脱乙酰度及不同灭菌方式壳聚糖的相对分子质量($n = 5$)

样品序号	灭菌方式			脱乙酰度(%)	特性黏度(修正值,mL/g)	相对分子质量
	无前期处理	环氧乙烷灭菌	^{60}Co 辐照灭菌			
4	√			≥85	265.007 9	100 458
5		√		≥85	200.658 5	81 999
6	√			≥90	369.699 1	128 092
7			√	≥90	265.007 9	100 458
8	√			≥95	685.757 8	201 084
9			√	≥95	328.193 7	117 428

现出脱乙酰度越大，特性黏度及相对分子质量降幅越大的趋势[12]。

2.4 不同辐照剂量壳聚糖的测定结果

由表 5 可见，当 ^{60}Co 辐照剂量为 4～8 kGy 时，壳聚糖相对分子质量降低幅度依次增大。

表 5 不同辐照剂量壳聚糖相对分子质量（$n=5$）

样品序号	辐照剂量(kGy)	特性黏度(修正值,mL/g)	相对分子质量
10	0	620.347 4	186 896
11	4	435.295 9	144 311
12	6	385.477 3	132 060
13	8	352.703 9	123 767

3 讨论

3.1 溶液浓度选择

壳聚糖样品的相对分子质量越高、溶液浓度越小，一点法测得溶液特性黏度的相对误差越小，质量浓度在 0.2～0.4 mg/mL 时，计算得到的特性黏度值相对误差绝大多数在 5% 以内。实际操作中，取 0.2 mol/L CH_3COOH – 0.1 mol/L CH_3COONa 缓冲液作为溶剂，壳聚糖溶液质量浓度为 0.4 mg/mL，用一点法测得的特性黏度相对误差最小（0.18%），故首选其溶液质量浓度为 0.4 mg/mL。

3.2 溶剂选择

由于壳聚糖不溶于水和碱性溶液，也不溶于硫酸和磷酸，但可溶于乙酸溶液，形成透明黏稠的壳聚糖胶体溶液[13]。故考察离子强度的影响时，选择 NaCl – CH_3COOH 混合溶液为实验溶剂。

3.3 外推法与一点法比较

壳聚糖的黏度计算一般采用外推法与一点法。外推法需配制系列不同浓度（通常为 5 个）的壳聚糖供试品溶液，通过测定不同浓度（C）下的壳聚糖样品的相对黏度（η_r）与增比黏度（η_{sp}），计算、作图，外推至 $C=0$ 处则可得到特性黏度[η]。一点法只需测 1 个浓度下的 η_r 和 η_{sp}，即可计算出壳聚糖的特性黏度，进而求得其黏均相对分子质量。需要注意的是，在应用一点法测定壳聚糖样品特性黏度时，需运用一点法经验公式进行修正，以减小实验误差。

3.4 高效液相色谱分析结果

曾考察高效液相色谱凝胶分析系统来进行壳聚糖相对分子质量的测定。色谱条件：岛津 LC – 20AD 型高效液相色谱仪，RI 检测器，色谱柱为 SRT® SEC – 500 型（300 mm × 7.8 mm，5 μm，500 Å），柱温为 25 ℃，流动相为 0.2 mol/L CH_3COOH – 0.1 mol/L NaAc 缓冲液（pH4.3），流速为 1.0 mL/min，进样体积为 10 μL。结果，壳聚糖相对分子质量范围较大，大分子量部分被排阻，小分子量部分被渗透，导致未能成功检测。

3.5 注意事项

配制溶液时，必须保证其完全溶解，否则会影响溶液起始浓度，导致结果偏低[14]。温度是高分子溶液黏度测试中最敏感的物理因素，故测试系统中必须适时监控不同位点的温度，以便适时调控温度[15]，确保测定温度稳定在（25 ± 0.05）℃。实验中要选择合适的梯度溶液浓度，确保溶液流出时间超过 100 s。

参考文献：

[1] 陈 声，侯婷婷，江雅婷，等. 壳聚糖分子量调控研究进展[J]. 广州化工，2019，47（23）：14 – 19.
[2] 柯 松，王 敏，徐 源，等. 壳聚糖抑菌性能的研究进展[J]. 生物骨科材料与临床研究，2019，16（3）：59 – 62.
[3] LI JF，CHEN LF，MENG ZY，et al. Development of a mass spectrometry method for the characterization of a series of chitosan[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2019，（121）：89 – 96.
[4] 仲宣惟，黄清泉，奚廷斐. 多角度激光光散射检测器和示差折光检测器联用测定壳聚糖分子量及分子量分布[J]. 药物分析杂志，2006，26（9）：1258 – 1260.
[5] 贺 岚，白海红，艾有年. 黏度法测定壳聚糖分子量的一些体会[J]. 中国卫生检验杂志，2001，11（5）：631 – 632.
[6] 李 建，毕松梅. 一点法分析壳聚糖特性黏度偏差值的研究[J]. 安徽工程科技学院学报（自然科学煤炭经济研究版），2009，24（4）：16 – 18.
[7] 方文建，隋斯光，郑连英. 壳聚糖相对分子质量的测定方法[J]. 化学进展，2006，25（4）：420 – 423.
[8] 范金石，陈国华，孙明昆，等. 壳聚糖特性黏度的快速测定[J]. 青岛海洋大学学报（自然科学版），2002，32（2）：296 – 300.
[9] 宣 寒. 一点法测定壳聚糖的特性黏度[J]. 安徽建筑工业学院学报（自然科学版），2008，16（3）：82 – 84.
[10] 梁 燕. 壳聚糖降解及高分子溶液特性黏度测定方法的研究[D]. 上海：华东师范大学，2007.
[11] 李星科，纵 伟，章银良，等. 脱乙酰度、pH 和离子强度对壳聚糖溶液流变性质的影响[J]. 现代食品科技，2013，29（1）：11 – 14.
[12] 崔文慧，郭 芹，李庆鹏，等. 不同辐照剂量壳聚糖酰化改性产物的结构和性质比较[J]. 现代食品科技，2016，32（6）：77 – 84.
[13] 林春梅. 壳聚糖黏均分子量的测定[J]. 山东农业科学，2011（7）：105 – 106.
[14] 陈 颋，王 磊，林 羽. 3 种市售壳聚糖创伤修复类产品的黏均分子量测定[J]. 海峡药学，2015，27（1）：37 – 40.
[15] 罗文君，卜庭江，马 睿. 乌氏黏度计测量高分子溶液黏度的影响因素[J]. 实验技术与管理，2011，28（4）：39 – 41.

（收稿日期：2020 – 08 – 08）