



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410010767.9

[43] 公开日 2005 年 1 月 12 日

[11] 公开号 CN 1563106A

[22] 申请日 2004.3.29

[21] 申请号 200410010767.9

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

[72] 发明人 景遐斌 于海军 陈学思 徐效义  
吕常海

权利要求书 2 页 说明书 7 页

[54] 发明名称 辐射法制备小分子量或水溶性壳聚糖

## [57] 摘要

本发明属于一种辐射法制备小分子量或水溶性壳聚糖的方法。经过精制的高分子量壳聚糖的固体或溶液，用<sup>60</sup>Co $\gamma$  - 射线进行辐照降解，降解产物经溶解、脱色等后处理步骤得到小分子量或水溶性壳聚糖。本方法操作方便，快速简便，产率高，重复性好，分子量易于控制，对环境友好，污染少，成本低廉，既可用于少量水溶性壳聚糖样品的快速制备，又具有进一步工业化的可能性。所得壳聚糖具有多种用途，可作为农业的增产剂、食品干燥剂、天然抗菌材料及生物医学材料等。

1. 一种制备水溶性壳聚糖的固态辐射方法，主要有辐照降解和后处理两个步骤：

a) 用  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  一射线对精制过的壳聚糖固体进行室温辐照降解，照射剂量为 50~300kGy；

b) 将步骤 a 得到的产物溶解在无机酸或有机酸水溶液中，壳聚糖的质量浓度为 1~15%，无机酸或有机酸的质量浓度为 0.5~15%；用 0.2~0.6M 碱溶液调节 pH 至 6~8，过滤；滤液中加入 30 (w) % 过氧化氢溶液，搅拌，待滤液颜色褪淡后，减压浓缩滤液至原体积的 10~50%；加入甲醇、乙醇或丙酮，或乙醇与丙酮的混合液，乙醇/丙酮体积比：1/9~9/1，静置，过滤去溶剂，用乙醇或异丙醇洗涤 1~3 次，然后用丙酮洗涤，真空干燥即得水溶性低分子量壳聚糖。

2. 一种制备水溶性壳聚糖的溶液辐射方法，主要有样品溶解、辐照降解和后处理三个步骤：

a) 将经过精制的壳聚糖溶解在无机酸或有机酸水溶液中，或溶解在过氧化氢水溶液中，或溶解在加有无机酸或有机酸的过氧化氢水溶液中，其中壳聚糖在水溶液中的质量浓度为 1~15%，无机酸或有机酸的质量浓度为 0.5~15.0%，过氧化氢的质量浓度为 1~30%；

b) 将步骤 a 得到的溶液，用  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  一射线进行室温照射降解，照射剂量为 1~200kGy；

c) 向步骤 b 辐射降解的聚壳糖溶液中加入 0.2~0.6M 碱溶液，调节

pH 至 6~8, 过滤; 滤液中加入 30 (w) %过氧化氢溶液, 搅拌, 待滤液颜色褪淡后, 减压浓缩滤液至原体积的 10~50%; 加入甲醇、乙醇或丙酮, 或乙醇与丙酮的混合液, 乙醇与丙酮的体积比为 1:9~9:1, 静置, 过滤去溶剂, 用乙醇或异丙醇洗涤 1~3 次, 然后用丙酮洗涤, 真空干燥即得水溶性低分子量壳聚糖。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法, 其特征在于, 所述壳聚糖粘均分子量大于  $15 \times 10^4 \text{ gmol}^{-1}$ , 脱乙酰度大于 70%。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的方法, 其特征在于, 所述无机酸或有机酸为盐酸、甲酸、乙酸、柠檬酸和乳酸中的一种或二种以上混合酸。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的方法, 其特征在于, 所述碱溶液为  $\text{NaHCO}_3$  水溶液或  $\text{KOH}$ 、 $\text{NaOH}$  和  $\text{NaHCO}_3$  的混合溶液。

## 辐射法制备小分子量或水溶性壳聚糖

### 技术领域

本发明涉及使用辐射法（ $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -射线）制备低分子量水不溶性或小分子量水溶性壳聚糖的方法。

### 背景技术

壳聚糖是天然产物甲壳素的脱乙酰基产物，化学结构是以 2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖以 $\beta$ -1,4 糖苷键连接而成的多糖。壳聚糖分子中含有活性氨基，氨基可以带正电，是唯一的天然碱性多糖。糖环上又带有活性羟基，因而壳聚糖又具有很好的亲水性和保水性。近年来，人们对壳聚糖性质和功能进行了广泛的研究，发现壳聚糖在农业、环境、食品、生物、医学、材料等行业的重要应用。

低分子量壳聚糖或寡聚糖具有明显的抗菌活性和保水性，以及诱导植物生长的生物活性，可以促进植物生长，抑制微生物活性，吸收并保持水分，所以可以用作农业的增产剂，食品或水果的保鲜防腐剂，农作物种子的包衣材料，工业及日常生活用品的天然抗菌剂。

同时，国内外大量的毒理学试验证明壳聚糖或壳寡糖对人体无毒，可以和人体直接接触或被人体吸收。于是壳聚糖或寡聚糖的应用范围可以扩展到化妆品、保健食品、药物或酶载体、烧伤敷料等。

但是由甲壳素经脱乙酰化而制得的壳聚糖分子量很高，只能溶于酸性

水溶液，因而限制了它的广泛利用。另外，分子量不同的壳聚糖的性质差异很大，有时甚至表现出截然相反的特性，要完全体现以上所列的性能，壳聚糖的分子量必须降低到一定的范围。

目前，已见报道的壳聚糖的降解方法大致可分为三类：酸水解法、氧化法和酶降解法。酸降解法将壳聚糖的酸性（盐酸，磷酸，氢氟酸，乙酸等）溶液加热，使糖苷键断裂，生成低分子量壳聚糖或进一步生成壳寡糖（如中国专利 CN 1389477）。氧化法使壳聚糖的主链氧化断裂，制得小分子量水溶性壳聚糖，其中主要采用过氧化氢法（如中国专利 CN 1283634）。过氧化氢氧化法又分为酸法、碱法（如中国专利 CN 1318567）和中性法三种，即氧化反应的介质分别为酸性、碱性和中性。所以，酸降解法或氧化法往往使用浓酸或浓碱，造成一定程度的环境污染，在环保受到重视的今天已不宜提倡。最近出现的酶降解法具有效率高，环境污染小的特点，但是降解所用的酶成本过高，又涉及很复杂的发酵工艺，不适于对成本有严格要求的食品及农业用途。

## 发明内容

本发明的目的是提供一种辐射法制备小分子量或水溶性壳聚糖的制备方法。

本方法以工业级高分子量壳聚糖为起始原料，经过原料的提纯，辐射降解，后处理等步骤制得低分子量水不溶性或小分子量水溶性壳聚糖。附图 1 给出了本方法的工艺流程，简述如下：

原料的提纯：将工业级壳聚糖用过量乙酸水溶液充分溶解，乙酸溶液

浓度为 0.5%~15.0%，取 2.0%~10.0%较好，提高乙酸浓度，可减少乙酸溶液的用量。溶解好的壳聚糖溶液先用纱布过滤，后用 G2 玻璃砂芯漏斗过滤，弃去不溶物。搅拌下，将 10%~20%的 NaOH、NaHCO<sub>3</sub> 或 NaOH 与 NaHCO<sub>3</sub> 的混合溶液加入滤液中，调节 pH 至 7~8，充分振荡后，用 G1 玻璃砂芯漏斗过滤，沉淀物先用二次蒸馏水洗 1~3 次，后用甲醇、乙醇或异丙醇洗涤 1~3 次，将沉淀物在 20~50℃ 下真空烘干，得到精制的壳聚糖。

**壳聚糖辐射降解：** 用 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  一射线进行壳聚糖的辐照降解。辐照处理的壳聚糖可以是固体或溶液，可以在无氧或有氧条件下进行辐照，对壳聚糖固体进行辐照，剂量为 50~300kGy，优选 150~250kGy；对壳聚糖酸性溶液进行辐照，剂量为 1~200 kGy，优选 40~150 kGy；对壳聚糖乙酸、盐酸或乳酸/过氧化氢均一溶液进行辐照，剂量范围 1~200 kGy，优选 5~100 kGy；对壳聚糖/过氧化氢非均一溶液进行辐照，剂量范围 1~200 kGy，优选 40~150 kGy。

**辐照样品的后处理：** 搅拌下，在 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  一射线辐照过的壳聚糖溶液、壳聚糖酸性均一溶液，壳聚糖酸性/过氧化氢均一溶液，壳聚糖/过氧化氢非均一溶液中，加入 NaOH、KOH 或 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液，中和至 pH 为 6~8，以 0.2~0.6M NaHCO<sub>3</sub> 溶液调节 pH 至 6~7 较好。G2 玻璃砂芯漏斗过滤，除去不溶物，滤液中加入适量 30% (w) 过氧化氢溶液，搅拌，待滤液颜色褪淡后，减压浓缩滤液至原体积的 10~50%。搅拌下加入甲醇，乙醇、丙酮或乙醇与丙酮的混合液，乙醇/丙酮体积比：1/9~9/1；静置，待壳聚糖充分沉淀后，过滤去溶剂，用乙醇或异丙醇洗涤 1~3 次，然后用丙酮洗涤，真空干燥即得水溶性低分子量壳聚糖。对 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  一射线辐照降解的壳

聚糖固体，先用乙酸、乳酸或盐酸水溶液溶解，G2 玻璃砂芯漏斗过滤，除去不溶物，滤液中加入 30% (w) 过氧化氢溶液脱色。其余后处理步骤同上。

本发明选择目前在壳聚糖的制备中很少使用的  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  一射线辐照壳聚糖固体或酸性溶液制备水溶性壳聚糖。与其他方法相比，使用辐照方法降解高分子量壳聚糖只需少量的酸、碱，不会造成环境污染，也无需加热，只要在室温下对壳聚糖固体或溶液进行辐照，就可以达到降解的目的。辐射用钴源可连续运转，便于实现壳聚糖降解工艺的连续化和工业化。在壳聚糖辐射降解前后样品的红外光谱中（见附图 2）， $3450\sim 3200\text{cm}^{-1}$  处为  $-\text{OH}$  特征吸收峰， $1575\sim 1610\text{cm}^{-1}$  处为  $-\text{NH}_2$  的变角振动吸收峰， $1050\sim 1070\text{cm}^{-1}$  处为糖苷键  $\text{C}-\text{O}$  伸缩振动吸收峰。附图 4 中各特征峰强度无明显变化，证明辐射降解法所制壳聚糖的吡喃糖环不受破坏，辐射只是造成了壳聚糖分子主链的断裂，可以推断由辐射法制得的壳聚糖其生化功能与由其它方法制取的壳聚糖没有差别。同时，X—射线衍射（见附图 3）证明高分子量壳聚糖辐射降解后结晶度降低，这与辐射降解法制备的低分子量或水溶性壳聚糖具有很好的水溶性相一致。对辐射降解前后壳聚糖样品做元素分析（见实施例），N 元素含量变化很小，可见辐射降解不会对壳聚糖活性胺基产生明显的破坏。在降解产物的后处理中，使用过氧化氢水溶液作为脱色剂，消除了辐射造成的对样品颜色的影响，可以得到外观为原白色或淡黄色的产品。另外，可通过选择不同的辐射剂量和辐射条件控制辐射降解产物的分子量（附图 5、6）。不难看出，辐射法具备环境污染小，操作方便，快速，产率高，成本低，实验重复性好，分子量易控制等特点，既可用于

少量样品的制备，又有工业化的可能。

#### 附图说明

图 1：壳聚糖辐射降解流程图。

图 2：壳聚糖辐射降解前后红外光谱图：(a) 壳聚糖固体降解前样品；(b) 壳聚糖固体的  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线 250kGy 辐照降解产物；(c) 壳聚糖 1.5(w)%HAc/5(w)% $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线 40 kGy 辐照降解产物；(d) 壳聚糖 5(w)%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线 25 kGy 辐照降解产物。

图 3：壳聚糖辐照降解前后的 WAXD 曲线：(a) 壳聚糖固体降解前样品；(b) 壳聚糖固体的  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线 200 kGy 辐照降解产物；(c) 壳聚糖 5(w)% $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线 25 kGy 辐照降解产物；(d) 壳聚糖 1.5(w)%HAc/5(w)% $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线 40 kGy 辐照降解产物。

图 4：壳聚糖分子量方程和粘均分子量测定条件。

图 5：壳聚糖固体辐射降解前后粘均分子量~辐射剂量图。

图 6：5.0(w)%过氧化氢/1.5(w)%乙酸/5.0%壳聚糖溶液相对粘度随辐射剂量的变化。

#### 具体实施方式

下面通过实施例进一步说明本发明，但本发明并不仅限于此。

以下实施例中，壳聚糖分子量采用粘度法由乌氏粘度计测得，测定条件和计算公式见附图 4。

红外光谱图通过 KBr 压片由 Bio-Rad FTS135 红外光谱仪测得。

X-射线衍射谱图用壳聚糖粉末由理学 D/max2500V PC X 射线衍射仪测得。



元素分析由 Vario EL 元素分析仪测得。

#### 实施例 1:

将精制的高分子量壳聚糖（分子量  $M_n=5.8 \times 10^5 \text{ gmol}^{-1}$ ，脱乙酰度  $\text{DA} \geq 90\%$ ，氮含量  $\text{N}\%=7.47$ ，浙江玉环海洋生物有限公司提供）固体装入聚乙烯塑料袋中，直接封口或抽真空后充氮气封口， $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  一射线辐照降解，剂量  $200 \text{ kGy}$ ，剂量率  $9.0 \text{ kGyh}^{-1}$ 。辐照后的固体用乙酸或盐酸溶液溶解，后处理得低分子量壳聚糖，分子量  $M_n=5.6 \times 10^4 \text{ gmol}^{-1}$ ，产率  $90.0\%$ ， $\text{N}\%=6.10$ 。辐照前后的红外光谱和 WAXD 曲线见附图 2 和 3。

#### 实施例 2:

将高分子量壳聚糖(同实施例 1)制成  $5\%$ (w) 乙酸溶液，乙酸浓度为  $1.5\%$  (w)。室温下  $\gamma$  一射线辐照降解，剂量  $100 \text{ kGy}$ ，剂量率  $7.0 \text{ kGyh}^{-1}$ 。后处理得水溶性低分子量壳聚糖，分子量  $M_n=1.7 \times 10^4 \text{ gmol}^{-1}$ ，产率  $60\%$ ， $\text{N}\%=6.90$ 。辐照前后的红外光谱和 WAXD 曲线见附图 2 和 3。

#### 实施例 3:

将高分子量壳聚糖(同实施例 1)制成  $5\%$ (w) 乙酸溶液，乙酸浓度为  $1.5\%$  (w)，添加过氧化氢至其含量为  $5.0\%$  (w)，室温下  $\gamma$  一射线辐照降解，剂量  $25 \text{ kGy}$ ，剂量率  $0.35 \text{ kGyh}^{-1}$ 。后处理得水溶性低分子量壳聚糖，分子量  $M_n=1.2 \times 10^4 \text{ gmol}^{-1}$ ，产率  $60\%$ ， $\text{N}\%=6.00$ 。辐照前后的红外光谱和 WAXD 曲线见附图 2 和 3。

#### 实施例 4:

将高分子量壳聚糖(同实施例 1)装入细口安瓶中，添加过氧化氢至其

含量为 5.0% (w)，壳聚糖浓度为 5%(w)，室温下  $\gamma$  射线辐照降解，剂量 100 kGy，剂量率 7.0 kGyh<sup>-1</sup>。后处理得水溶性低分子量壳聚糖，分子量  $M_n=1.2 \times 10^4 \text{ gmol}^{-1}$ ，产率 60%，N%=5.00。辐照前后的红外光谱和 WAXD 曲线见附图 2 和 3。

实施例 5:

将精制的高分子量壳聚糖 ( $M_n=4.8 \times 10^5 \text{ gmol}^{-1}$ , DA $\approx$ 75%, N%=6.96, 安徽淮安生物科技有限公司提供) 固体装入聚乙烯塑料袋中，直接封口或抽真空后充氮气封口，<sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线辐照降解，剂量 250kGy，剂量率 9.0 kGyh<sup>-1</sup>。辐照后的固体用乙酸或盐酸溶液溶解；后处理得低分子量壳聚糖，分子量  $M_n=5.0 \times 10^4 \text{ gmol}^{-1}$ ，产率 90%，N%=6.63。