

文章编号 :1009-038X(2004)04-0020-04

双突跃电位滴定法测定壳聚糖脱乙酰度的影响因素

张龙, 夏文水*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:研究了双突跃电位滴定法测定壳聚糖脱乙酰度的准确性以及壳聚糖溶液质量浓度、粘度、不同脱乙酰度等因素对滴定终点测定结果的影响. 结果表明:壳聚糖样品质量浓度控制在2~6 g/L, 利用双突跃电位滴定法可以测定壳聚糖的脱乙酰度, 不同样品脱乙酰度测定结果 RSD(相对标准偏差)小于0.61%($n=3$), 该方法具有较高地准确性, 可以用于壳聚糖生产和加工过程中的质量控制与检测.

关键词:壳聚糖; 脱乙酰度; 电位滴定; 滴定终点

中图分类号:O 655.22

文献标识码:A

The Factors Influencing Deacetylation Degree of Chitosan Determined by Two Abrupt Change Conductometric Titration

ZHANG Long, XIA Wen-shui*

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Accuracy of determination of deacetylation degree of chitosan by two abrupt change conductometric titration was studied, and effects of chitosan solution concentration, viscosity and deacetylation degree on the result of equivalence point were also investigated. The results showed that deacetylation degree of chitosan can be determined accurately by means of two abrupt change conductometric titration when chitosan sample concentration was between 2 ~ 6, and RSD of determination result of different chitosan was less than 0.61% ($n=3$).

Key words: chitosan; deacetylation degree; conductometric titration; equivalence point

壳聚糖(Chitosan)是一种直链天然高分子聚合物,其化学名称为(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡聚糖.壳聚糖是自然界中惟一存在的碱性多糖,具有生物相容性、化学稳定性和生物可降解性的特点,被称为人体所必需的第六生命要素,在农业、医药、食品、化妆品、纺织、环保、材料工业等行业和领域有着极其广泛的应用^[1~2].

脱乙酰度(deacetylation degree,缩写为D.D)是

壳聚糖的一个重要的质量指标,它对壳聚糖的理化性质,如在稀酸中的溶解度、富集离子的能力、粘度、离子交换能力、壳聚糖膜的机械性能、絮凝能力和N-选择性酰化能力有重要的影响^[3~4].

壳聚糖的脱乙酰度可定义为壳聚糖分子中脱除乙酰基的糖残基数占壳聚糖分子中总的糖残基数的百分数,其测定方法主要有酸碱指示剂滴定法、电位滴定法、氢溴酸盐法、胶体滴定法、红外光

收稿日期 2003-11-05; 修回日期 2004-02-20.

基金项目 江苏省“十五”科技攻关项目(BE2001394)资助课题.

作者简介:张龙(1976-)男,安徽铜陵人,食品科学与工程硕士研究生;* 责任作者.

谱法等^[5-7]。其中酸碱滴定法由于操作简单、不需要特殊的仪器,试剂易得,特别适用于生产过程中的质量监测,已经成为测定脱乙酰度最为常用的方法。

酸碱滴定法的原理是壳聚糖的自由氨基呈碱性,可与酸定量地发生质子化,形成壳聚糖的胶体溶液。溶液中过量的、没有和氨基结合的酸,可以用碱来进行反滴定。于是,从用于溶解壳聚糖的酸量与滴定用去的碱量的差值,就可推算出与壳聚糖自由氨基结合的酸量,从而计算出壳聚糖中自由氨基的含量。

由于壳聚糖在生产过程中常常吸附残酸或残碱,当用酸碱指示剂滴定法测定脱乙酰度时将会影响测定结果的可靠性,采用电位滴定法可以有效地消除残酸或残碱的影响^[3]。

在电位滴定法中,双突跃电位法最为常用,但目前对影响该方法测定壳聚糖脱乙酰度的一些因素还缺乏系统地研究。作者主要研究双突跃电位滴定法测定壳聚糖脱乙酰度的准确性,以及壳聚糖溶液浓度、粘度及不同脱乙酰度等因素对测定滴定终点结果的影响,以提高测定方法的准确性和精确性,扩大方法的适用范围,为壳聚糖的质量控制提供有效的方法。

1 材料与方 法

1.1 材料

壳聚糖:浙江、江苏、山东等厂家生产的不同脱乙酰度样品。

1.2 试剂

标准 HCl 溶液、标准 NaOH 溶液 均为分析纯。

1.3 仪器

90-2 型恒温磁力搅拌器:上海亚荣生化仪器厂制造;DZ-1 型滴定装置:上海第二分析仪器厂制造;320-S 型 pH 计:Mettler Toledo 公司生产;NDJ-79 型旋转式粘度计:同济大学机电厂制造。

1.4 实验方法

1.4.1 壳聚糖双突跃酸碱滴定 准确称取 0.2 g 经 105 °C 干燥至恒重的壳聚糖样品置于 50 mL 烧杯中,加入 20 mL 0.1 mol/L HCl 标准溶液,室温下磁力搅拌 1 h 使其完全溶解,再加入 30 mL 蒸馏水。将 pH 电极放入样品溶液中,用 0.1 mol/L NaOH 标准溶液滴定,记录原 pH 值及加入不同体积 NaOH 标准溶液后被滴定液的 pH 值,以溶液的 pH 值对 NaOH 标准溶液滴定体积作图,即得到酸碱滴定曲线。做 pH 值对 $\frac{1}{c_{\text{NaOH}}}$ 的一级微商曲线,得到双突跃

滴定曲线^[8]。

1.4.2 脱乙酰度计算 根据脱乙酰度的定义,依据上述滴定数值,按下面的公式计算脱乙酰度:

$$\text{脱乙酰度} = \frac{M}{(m - M \times 161) / 203} \times 100\%$$

式中: $M = \frac{\Delta V_{\text{NaOH}}}{1\ 000} \times c_{\text{NaOH}}$ (ΔV_{NaOH} 为滴定曲线中两突跃之间消耗的 NaOH 标准溶液的体积; c_{NaOH} 为 NaOH 标准溶液的摩尔浓度; m 为壳聚糖样品质量(g,以干基计); 161 为壳聚糖中氨基葡萄糖残基的相对分子质量, 203 为壳聚糖中 N-乙酰氨基葡萄糖残基的相对分子质量。

1.4.3 壳聚糖溶液质量浓度对滴定终点的影响

准确称取 0.1 ~ 0.5 g 的已知脱乙酰度的同一壳聚糖样品,配制 2 ~ 6 g/L 不同质量浓度的壳聚糖-HCl 溶液,按 1.4.1 的方法绘制双突跃滴定曲线,测定滴定终点,每一样品测定 3 次。

1.4.4 壳聚糖脱乙酰度对滴定终点的影响

分别准确称取一定量的已知不同脱乙酰度的壳聚糖样品,配制相同质量浓度的壳聚糖-HCl 溶液,按 1.4.1 的方法测定滴定终点,每一样品测定 3 次。

1.4.5 壳聚糖粘度对滴定终点的影响

分别准确称取一定量的已知脱乙酰度,不同粘度的壳聚糖样品,配制相同质量浓度的壳聚糖-HCl 溶液,按 1.4.1 的方法绘制滴定曲线,测定滴定终点,每一样品测定 3 次。

2 结果与讨论

2.1 双突跃滴定曲线

在壳聚糖酸溶液中存在过量的酸质子和胺基离子,当用碱中和时则会相应出现两个突跃点。见图 1 2。

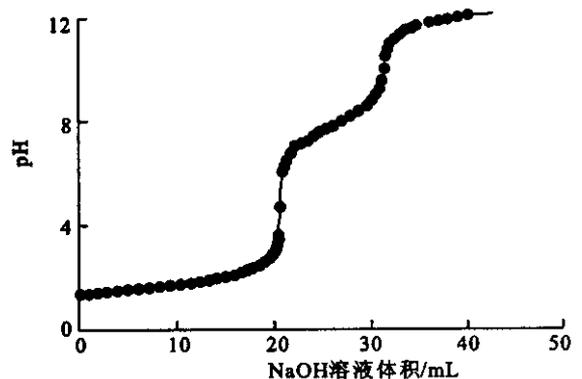


图 1 壳聚糖酸碱滴定曲线

Fig. 1 Curve of acid-base conductometric titration of chitosan

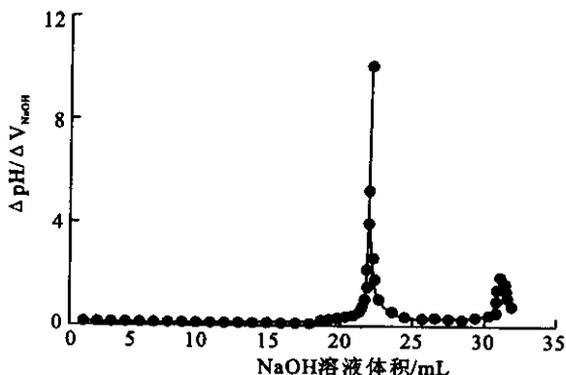


图2 壳聚糖双突跃滴定曲线

Fig. 2 Curve of two abrupt change conductometric titration of chitosan

从图1可以看出,用NaOH标准溶液滴定壳聚糖-HCl体系时明显存在两个滴定突跃点.第一个滴定突跃的范围在pH值为3~5之间,第二个滴定突跃的范围在pH值为8~10之间.前一突跃对应NaOH中和溶液中过量的HCl滴定终点前后滴定反应的情况,后一突跃对应于NaOH中和质子化的氨基滴定终点前后滴定反应情况.

第一突跃滴定终点处所对应滴定消耗的NaOH标准溶液的体积 V_e 的大小将直接影响壳聚糖脱乙酰度的测定结果.由上述脱乙酰度的计算公式可以看出, V_e 偏大则脱乙酰度的测定结果偏小,

表1 不同质量浓度壳聚糖的滴定终点测定结果

Tab. 1 Result of titration equivalence point of chitosan with different concentration

样品编号	样品溶液质量浓度/(g/L)	样品脱乙酰度/%	滴定终点 pH 值				标准差 S	相对标准偏差/%
			第1次	第2次	第3次	平均值		
1#	2	90	4.32	4.41	4.29	4.34	0.0624	1.44
2#	4	90	3.93	3.89	4.01	3.94	0.0611	1.55
3#	5	90	3.89	3.87	3.93	3.90	0.0301	0.78
4#	6	90	3.79	3.82	3.79	3.80	0.0173	0.46

表2 不同脱乙酰度壳聚糖的滴定终点测定结果

Tab. 2 Result of titration equivalence point of chitosan with different D. D

样品编号	样品溶液质量浓度/(g/L)	样品脱乙酰度/%	滴定终点 pH 值				标准差 S	相对标准偏差/%
			第1次	第2次	第3次	平均值		
1#	4	72	3.96	4.01	4.06	4.01	0.1193	2.98
2#	4	83	3.93	3.89	4.01	3.94	0.0611	1.55
3#	4	90	3.83	3.90	3.92	3.88	0.0473	1.22

从表2所得的结果可以看出,相同质量浓度、不同脱乙酰度的壳聚糖样品,其滴定终点相差不是很大,同时壳聚糖的滴定终点pH值的大小与脱乙酰度的高低有着直接的正相关关系.脱乙酰度越高,滴定终点pH值越小,消耗的NaOH的体积(V_e)

反之造成结果偏大.以下就一些因素对第一滴定突跃滴定终点测定结果的影响进行讨论.

2.2 壳聚糖溶液质量浓度对滴定终点的影响

滴定终点的测定结果见表1.实验结果表明,随着壳聚糖质量浓度的升高,测定滴定终点pH值有逐渐降低的趋势.质量浓度高时,滴定终点pH值则低;质量浓度低时,滴定终点则升高.这是由于随着壳聚糖溶液质量浓度的升高,壳聚糖分子中游离的自由氨基的数目增多,与自由氨基结合的 H^+ 数目也增多,溶液中过量HCl的分子数降低.这样滴定过量HCl所消耗的NaOH标准溶液的量减少,滴定终点pH值降低.测定结果均在3.80至4.40之间,结果的相对标准偏差小于2%.实验中发现样品的质量浓度不宜太大(质量浓度大于6g/L),否则质子化的壳聚糖会脱去质子,形成电中性凝集体.脱去的质子被碱所滴定,造成测定结果偏低.同时,壳聚糖质量浓度增高,溶液由透明逐渐变得浑浊,溶液的粘度也增大,不利于分子的扩散,影响测定结果的可靠性.因此综合考虑以上因素,测定样品的质量浓度应控制在2~6g/L为宜.

2.3 壳聚糖脱乙酰度对滴定终点的影响

对不同脱乙酰度的壳聚糖样品进行滴定测定,结果见表2.

越少.这是由于壳聚糖脱乙酰度越高,自由氨基的数目就越多,和自由氨基结合的 H^+ 数也就越多,因而滴定过量酸所需要的标准NaOH溶液的体积也就越少.从多次重复测定的结果看,其标准差S均在0.15以下,相对标准偏差在3%以下.因而双突

跃电位滴定法可以测定低、中、高不同脱乙酰度的壳聚糖样品,具有较宽的适用性。

2.4 壳聚糖粘度对滴定终点的影响

不同粘度壳聚糖的酸碱滴定曲线见图2,测定结果见表3。

3个样品分别代表了低、中、高3种不同粘度的壳聚糖,从滴定曲线和表3的测定结果中可以看出,中等粘度壳聚糖的滴定终点pH值最大,其次是高粘度壳聚糖,低粘度壳聚糖的滴定终点pH值最小。这说明在高、低粘度壳聚糖-HCl体系中,HCl过量较少时,较多的 H^+ 是与壳聚糖中的自由氨基结合,而中等粘度壳聚糖的情况则相反。

从表3中不同粘度壳聚糖样品滴定终点的测定结果看,在相同的溶液质量浓度下,滴定终点的pH值范围在3.85~4.20之间,结果的相对标准偏差都小于1.5%,说明测定方法具有较高的准确性,可以用于不同粘度壳聚糖样品脱乙酰度的测定。

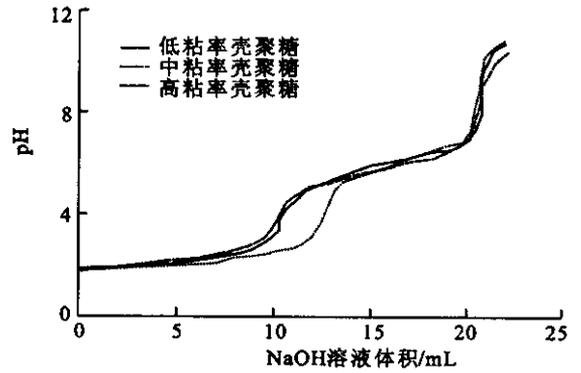


图3 不同粘度壳聚糖酸碱滴定曲线

Fig. 3 Curve of acid-base conductometric titration of chitosan with different viscosity

2.5 方法准确性的验证

分别配制相同质量浓度的不同脱乙酰度的壳聚糖样品溶液,用双突跃电位滴定法测定各样品的脱乙酰度,测定结果见表4。

表3 不同粘度壳聚糖的滴定终点测定结果

Tab. 3 Result of titration equivalence point of chitosan with different viscosity

样品编号	样品溶液质量浓度/(g/L)	样品粘度*/(mPa·s)	滴定终点 pH 值				标准差 S	相对标准偏差/%
			第1次	第2次	第3次	平均值		
1#	4	30	3.83	3.90	3.92	3.88	0.0473	1.22
2#	4	190	4.05	4.16	4.18	4.13	0.07	1.69
3#	4	370	3.98	4.00	3.96	3.98	0.02	0.50

注:*为质量浓度1 g/L的壳聚糖溶液(溶剂为2 g/L醋酸)在25℃条件下,用NDJ-79型旋转式粘度计测定。

表4 脱乙酰度测定结果

Tab. 4 Result of D. D determined by two abrupt change conductometric titration

样品编号	样品溶液质量浓度/(g/L)	脱乙酰度/%	滴定终点 pH 值				标准差 S	相对标准偏差/%
			第1次	第2次	第3次	平均值		
1#	4	67	66.7	67.2	66.4	66.8	0.4041	0.60
2#	4	75	75.5	74.3	74.7	75.0	0.4360	0.58
3#	4	86	85.8	85.6	86.2	85.9	0.3060	0.36
4#	4	90	90.2	89.8	90.3	90.1	0.2640	0.29
5#	4	94	94.8	93.6	94.3	94.2	0.6028	0.64

从表4的结果可以看出,测定的脱乙酰度值于标称的数值十分接近,3次测定值的标准偏差均小于0.65,相对标准偏差均小于0.61%,说明采用双突跃电位滴定法测定壳聚糖的脱乙酰度具有较高的准确性,可以用来测定不同的壳聚糖样品。

3 结论

双突跃电位滴定法作为测定壳聚糖脱乙酰度

的主要方法,可以较为准确地测定滴定过程中的滴定终点,滴定终点判断直观,测定结果准确可靠。壳聚糖样品的质量浓度控制在2~6 g/L,可以测定不同脱乙酰度和不同粘度的壳聚糖,方法具有较宽的适用性,因而可以作为壳聚糖生产和加工过程中质量控制与检测的一种有效方法。

(下转第27页)

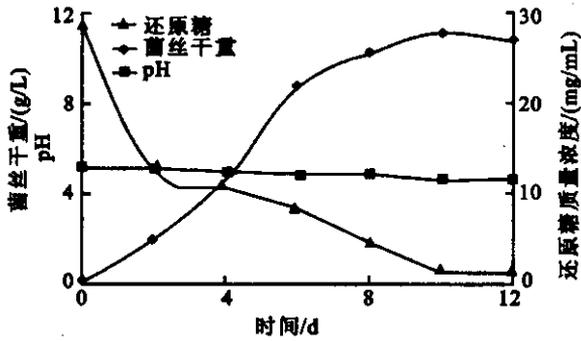


图6 黄伞菌丝摇瓶发酵生长曲线

Fig. 6 Growth curve of *Pholiota adiposa* in shaking flask culture

3 结论

1)在碳源、氮源筛选的基础上,通过正交试验初步得出黄伞菌丝深层发酵较佳培养基配方为:葡萄糖 3 g/dL,牛肉膏 1.5 g/dL, K_2HPO_4 0.5 g/dL, $MgSO_4$ 0.1 g/dL.

2)单因子试验表明,黄伞菌丝深层发酵最适培养条件为:培养温度 25 °C,起始 pH 值 5.0,接种量 15%,发酵周期 10 d.在优化的试验条件下,进行摇瓶发酵,菌丝干重达 11.16 g/L.

参考文献:

- [1] 苏延友. 泰山黄伞的优质高产栽培及加工技术[J]. 中国实用菌, 2003, 22(1): 45-48.
- [2] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京: 中国农业出版社, 1993. 142.
- [3] Takeshi T, Kawagishi H, Hiromichi O. Isolation of an anti-tumor compound from *Agaricus blazei* murill and its mechanism of action [J]. *J Nutr* 2001, 131(4): 1409.
- [4] 甘彦欢. 抗肿瘤药物开发新方向——肿瘤血管生成抑制剂[J]. 医药导报, 2001, 20(9): 25.
- [5] 张剑斌, 徐连峰, 董希文, 等. 黄伞的生物学特性及人工驯化栽培技术[J]. 防护林科技, 2000(4): 67-68.
- [6] 崔颂英, 杨玉娜, 曲波. 野生黄伞 Ph-1 的生物学特性及栽培技术[J]. 食用菌, 2003(1): 13-14.
- [7] 张惟杰. 糖复合生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 6-7.

(责任编辑: 李春丽)

(上接第23页)

参考文献:

- [1] 高福成. 食品分离重组工程技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [2] Majeti N V, Ravi Kumar. A review of chitin and chitosan application [J]. *Reactive & Functional Polymers* 2000, 46: 1-27.
- [3] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [4] 杜予民. 甲壳素化学与应用进展[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 2000, 46(2): 181-186.
- [5] 汪志君. 碱量法测定壳聚糖中的氨基[J]. 化学世界, 1986, 27(1): 22-23.
- [6] 林瑞洵, 蒋苏洪, 张慕珊. 脱乙酰度测定方法[J]. 化学通报, 1992, 3: 39.
- [7] 陈洁, 杨方琪. 甲壳素脱乙酰度的测定方法[J]. 无锡轻工业学院学报, 1993, 12(3): 255-259.
- [8] 贾之慎, 李奇彪. 双突跃电位滴定法测定壳聚糖脱乙酰度[J]. 化学世界, 2001(5): 240-241.

(责任编辑: 杨萌)