

# Preliminary Study on the Effect of Accessibility on the Deacetylation Efficiency of Chitin

Meng Zhuo<sup>1</sup>, Mingyong Zhang<sup>2</sup>, Kai Chen<sup>2</sup>, Jing Li<sup>1</sup>, Bin Sun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Material Science and Engineering, Donghua University, Shanghai

<sup>2</sup>Hismer Bio-Technology Co., Ltd., Tai'an Shandong

Email: \*sunbin@dhu.edu.cn

Received: Feb. 3<sup>rd</sup>, 2019; accepted: Feb. 26<sup>th</sup>, 2019; published: Mar. 4<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

The intramolecular and intermolecular hydrogen bond interaction of chitin makes chitin form a highly crystalline ordered structure of microfibrils, which makes chitin itself difficult to dissolve and difficult to deacetylate. In this paper, the NaOH/urea mixed solution was used to dissolve chitin at low temperature, and then it was precipitated to change its condensed structure, and then deacetylation reaction was carried out. The effects of NaOH/urea weight ratio on the solubility of chitin and NaOH concentration on deacetylation were studied. The structural properties of chitin after dissolution-precipitation treatment were analyzed by FTIR, SEM, XRD and TG. The results show that the NaOH/urea = 12/6(w/w) mixed solution has the best dissolution effect and the solubility is 90%. The original microfibrillar ordered structure of chitin after dissolution-precipitation treatment is destroyed, and it has an amorphous state and the accessibility of acetylamine group becomes large. When the NaOH concentration is lowered to 50 wt%, the same degree of deacetylation with 60 wt% of the chitin raw powder is obtained.

## Keywords

Chitin, Deacetylation, Dissolution in Low Temperature, High Accessibility

# 可及度对甲壳素脱乙酰效率的影响初探

卓 猛<sup>1</sup>, 张明勇<sup>2</sup>, 陈 凯<sup>2</sup>, 李 敬<sup>1</sup>, 孙 宾<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>东华大学, 材料科学与工程学院, 上海

<sup>2</sup>海斯摩尔生物科技有限公司, 山东 泰安

Email: \*sunbin@dhu.edu.cn

\*通讯作者。

## 摘要

甲壳素的分子内与分子间氢键相互作用使甲壳素形成微纤维网状的高度结晶有序结构，导致甲壳素本身难脱乙酰。本文以NaOH/尿素混合溶液作为溶剂低温下溶解甲壳素，再将其沉淀，改变其凝聚态结构，然后进行脱乙酰反应。研究了NaOH/urea对比对甲壳素溶解度及NaOH浓度对脱乙酰反应的影响，采用FTIR、SEM、XRD、TG表征分析了溶解-沉淀过程处理后甲壳素的结构性能。结果表明，NaOH/urea = 12/6(w/w)混合溶液的溶解效果最佳，溶解度可达90%。溶解-沉淀处理后的甲壳素原有的微纤维状有序结构被破坏，呈无定形态且乙酰胺基可及度变大。NaOH浓度降低至50 wt%时即会起到用60 wt%处理甲壳素原粉同样的脱乙酰度，制得壳聚糖。

## 关键词

甲壳素，脱乙酰，低温溶解，高可及度

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

甲壳素主要从废弃蟹、虾和龙虾壳等海产品废弃物中提取，来源广泛且可再生，是最丰富的天然多糖，也是最重要的化学原料之一[1]。壳聚糖是甲壳素的脱乙酰产物。甲壳素及壳聚糖可以方便地加工成不同的材料，如膜[2]、凝胶[3] [4]、微球[5]和纳米纤维[6]。这些材料可用于生物医学领域，包括药物递送、组织工程和伤口愈合等[7]。

天然甲壳素结构是由排列有序的结晶区和排列无序的无定形区交错排列而成，也就是说甲壳素结晶区在三维空间上是规则的、伸直的、紧密的有序排列，无定形区则是由疏松的分子链无规则卷曲和相互缠结而成的[8]。甲壳素的分子内与分子间氢键相互作用使甲壳素形成微纤维网状的高度结晶有序结构，这导致甲壳素难以脱乙酰制备壳聚糖。壳聚糖经由甲壳素在浓 NaOH 溶液、高温下脱除乙酰基制得。但是，由于甲壳素的半结晶结构，乙酰胺基可及度较小，即 OH-不易接触到乙酰胺基，使得脱乙酰反应效率低、脱乙酰不完全。

迄今为止，只有少量的溶剂可以溶解甲壳素[9]，例如 LiCl/DMAc、CaCl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH、离子液体、六氟异丙醇，碱/尿素。碱/尿素是一种近年来开发的新型绿色溶剂。其溶解机理为：在低温下，溶剂中的 NaOH 和 urea 小分子先组装成水合物，水合物破坏了甲壳素大分子链间原有的分子间作用力，与之形成新的氢键。最后，氢氧化钠/尿素水合物包覆在甲壳素分子链上形成管状包合物而导致甲壳素溶解在溶剂中[10] [11]。

本文为了增大乙酰胺基可及度，使 OH-能够充分接触乙酰胺基，使其易于脱乙酰高效地制备高脱乙酰壳聚糖。选用 NaOH/urea 混合溶液低温下溶解甲壳素，再将甲壳素析出，通过溶解-沉淀的方法改变甲壳素凝聚态结构，使原有致密的结构变得松散。然后进行脱乙酰反应，探究溶解-沉淀后甲壳素对脱乙酰反应的促进作用。

## 2. 实验材料与方法

### 2.1. 材料与试剂

甲壳素，高密度，浙江金壳药业有限公司；NaOH，分析纯，国药；尿素，分析纯，国药。

### 2.2. 实验设备

超低温冰箱：DW-60W108，浙江捷盛制冷科技有限公司；油浴锅：DF-101S，湖南力辰仪器科技有限公司；环境扫描电镜：S-4800，HITACHI；红外光谱仪：Nicolet6700，美国赛默飞世尔科技；X 射线衍射仪：D8，Bruke。

### 2.3. 实验方法

#### 2.3.1. NaOH/urea 混合溶液溶解甲壳素

配置一系列不同质量比例 8:4:88、10:5:85、12:6:82、14:7:79、16:8:76 的 NaOH/urea/water 溶液，置于超低温冰箱-40℃预冻至冰状。称取得到的冰状碱溶液 97 g，加入 3 g 甲壳素粉末，室温下搅拌至大部分溶解，待其温度升到室温后，再放入冰箱-40℃冷冻，重复 2~3 次冻融循环。

#### 2.3.2. 高可及度甲壳素的制备

室温下，7000 转/min 离心 6 min，去除未溶解的甲壳素，制得甲壳素低温冻融液。将甲壳素冻融液逐步加入到 400 mL 去离子水中，500 rpm 磁力搅拌 10 min 后，用砂芯漏斗过滤析出的甲壳素。

#### 2.3.3. 甲壳素粉末的脱乙酰反应

分别称取 3 g 甲壳素粉末和溶解-沉淀后的甲壳素，量取 150 mL 40~60 wt% 的 NaOH 溶液，80℃下反应 6 h，过滤出产物水洗至中性，干燥后保存。甲壳素脱乙酰反应方程如图 1 所示。

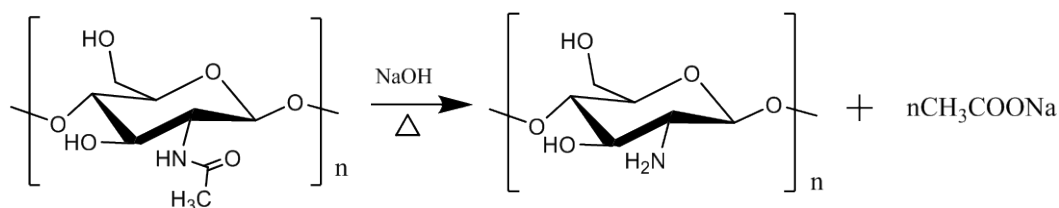


Figure 1. Chemical equation of chitin deacetylation  
图 1. 甲壳素脱乙酰反应方程式[12]

### 2.4. 溶解度测试

溶解过程中得到的未完全溶解的甲壳素碎片放入真空干燥箱，在 40℃下干燥，称重记为 W。

$$\text{Solubility} = \frac{3 - W}{3} \times 100\%$$

### 2.5. 脱乙酰度测试

将脱乙酰后粉末，置于真空干燥箱中 60℃干燥。采用红外 KBr 压片法测试，设置扫描范围 4000~400  $\text{cm}^{-1}$ ，扫描次数 32 次，频率 4  $\text{cm}^{-1}$ 。DD 为脱乙酰度， $A_{1560}/A_{2875}$  是 1560 和 2875  $\text{cm}^{-1}$  吸收峰强度比例[11]。

$$\frac{A_{1560}}{A_{2875}} = 0.0125 \times (1 - DD) + 0.2$$

## 2.6. XRD 分析

将脱乙酰后粉末，置于真空干燥箱中 60℃干燥。采用粉末 X 射线衍射仪测试纤维的结晶性能。测试条件：铜靶，管压 40 kV，管流 200 mA，扫描范围 5°~60°。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. NaOH/Urea 溶解甲壳素的影响因素

图 2 为甲壳素粉末溶解于-40℃预冻碱液的实物照片，将甲壳素粉末和预冻后的冰状碱液混合后，不断搅拌，甲壳素会逐渐溶解。再次冷冻-溶解操作过程中，液态水结冰则体积增大，水结成冰的作用力能够进一步削弱、打断甲壳素分子间氢键，破坏其结晶结构，因此，更多的碱溶液分子能够渗透入甲壳素的分子链段中，进而逐渐破坏其整体结构，促进甲壳素的溶解。NaOH/urea 质量比对甲壳素溶解度的影响如图 3 所示，NaOH/urea = 12/6(w/w)溶解效果最好，溶解度可达 90%，见图 2。溶解度先增大后减小，因为随着 NaOH、urea 溶质比例的增加，混合溶液冰点越低，没有来自于水结冰的作用力进一步削弱、打断甲壳素分子间氢键，破坏其结晶结构，导致溶解甲壳素能力变小。



Figure 2. The photo of the dissolution process of chitin in low temperature

图 2. 甲壳素粉末低温溶解过程实物照片

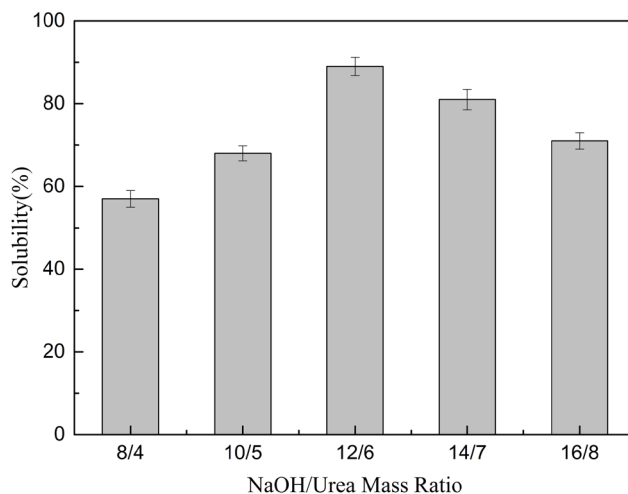
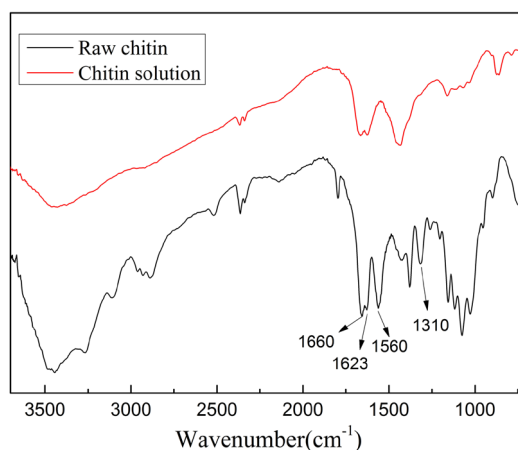


Figure 3. Effect of NaOH and Urea weight ratio on the dissolution of chitin

图 3. NaOH 和 Urea 质量比例对甲壳素溶解的影响

为了探究 NaOH/urea 低温溶解过程对甲壳素结构的影响，利用红外光谱分析甲壳素冻融前后的基团变化。如图 4 所示，未处理甲壳粉末的 FTIR 谱图中，3445  $\text{cm}^{-1}$  处的宽带对应于甲壳素-OH 振动及氢键作用、1660  $\text{cm}^{-1}$  处为 C=O 的酰胺 I 谱带、在 1623  $\text{cm}^{-1}$  处归属于 C-N 振动与 C=O 基团的拉伸的叠加、

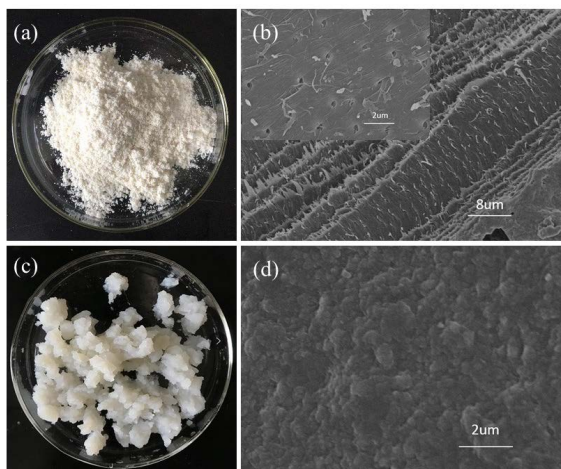
1560  $\text{cm}^{-1}$  处的强峰是酰胺 II 谱带、1310  $\text{cm}^{-1}$  处为 C-N 振动。在甲壳素冻融液( $\text{NaOH}/\text{Urea} = 12/6$ )红外谱图中, 1560  $\text{cm}^{-1}$  处酰胺 II 谱带和 1310  $\text{cm}^{-1}$  处峰消失, 因为低温下,  $\text{NaOH}$  和  $\text{Urea}$  混合溶液组装形成水合物, 水合物再和甲壳素分子链上乙酰胺基( $-\text{NHCOCH}_3$ )、羟基( $-\text{OH}$ )基团相互作用, 破坏原有的分子间氢键作用, 与之形成新的氢键, 从而包裹在甲壳素分子链周围, 形成管状包含状物, 使甲壳素溶解在混合碱/尿素溶液中[10][11]。



**Figure 4.** FTIR spectrum of chitin powder and chitin solution  
**图 4.** 甲壳素粉末和甲壳素冻融液( $\text{NaOH}/\text{Urea} = 12/6$ ) FTIR 谱图

### 3.2. 高可及度甲壳素结构分析

图 5(a)和图 5(c)分别为甲壳素粉末和溶解 - 沉淀后甲壳素实物照片。由图 5(b) (放大倍数 2k 及 10k) 可见, 甲壳素粉末为致密有序的微纤状结构, 一束束粗纤维束同向排列, 粗纤维束又由很多条微纤维组成, 中间孔洞为脱钙后留下的空穴。正是由于这种有序的结晶结构导致甲壳素本身难溶解及难脱乙酰。溶解 - 沉淀后的甲壳素失去了微纤维结构, 变成细小的颗粒状结构, 图 5(d) (放大倍数 10k)。因为沉淀过程中, 大量的水导致甲壳素与  $\text{NaOH}/\text{urea}$  溶液形成的复合物被破坏, 使得裸露的甲壳素分子链自缔合聚集, 图中没有发现致密的微纤维状结构, 这表明溶解 - 沉淀后的甲壳素乙酰胺基的可及度变大。



**Figure 5.** Photo and SEM image of chitin powder after dissolution-precipitation  
**图 5.** 甲壳素粉末溶解 - 沉淀后的实物照片及 SEM 图

XRD 衍射谱图也可佐证说明溶剂-沉淀后甲壳素乙酰胺基可及度变大。由图 6 可知, 溶解-沉淀后甲壳素(020)、(120)、(110)、(130)、(013)晶面所对应特征衍射峰强度锐减, 几乎消失。(020)晶面是 a 方向上甲壳素链的紧密排列, (110)晶面是 b 方向上的紧密堆积。这表明经溶解 - 沉淀过程后甲壳素原有的结晶结构被破坏, 致密整齐的分子排列变得杂乱, 变成无定形结构, 乙酰胺基可及度变大。

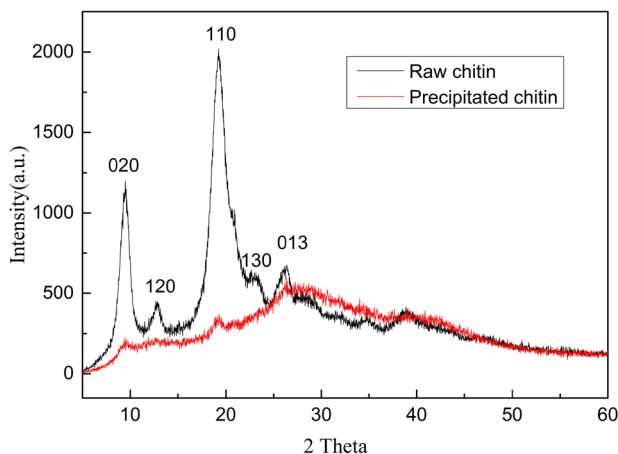


Figure 6. XRD pattern of chitin powder and precipitated chitin  
图 6. 甲壳素粉末和溶解 - 沉淀后甲壳素 XRD 谱图

TG 分析同样表明溶解 - 沉淀后甲壳素结构变得松散, 可及度变高。由图 7 可知, 未经处理的高度有序甲壳素具有良好的热稳定性, 其起始分解温度在 342.1℃, 最大热分解速率-19.74%/min, 最大热分解温度 395.2℃, 溶解 - 沉淀后甲壳素起始分解温度 321.6℃, 最大热分解速率-13.72%/min, 最大热分解温度 360.3℃。这表明溶解 - 沉淀后的甲壳素热稳定性有所下降, 因为其结晶结构被破坏, 结构变得松散不致密。

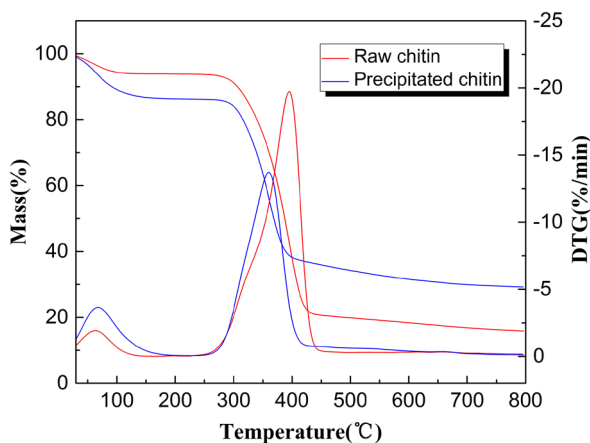
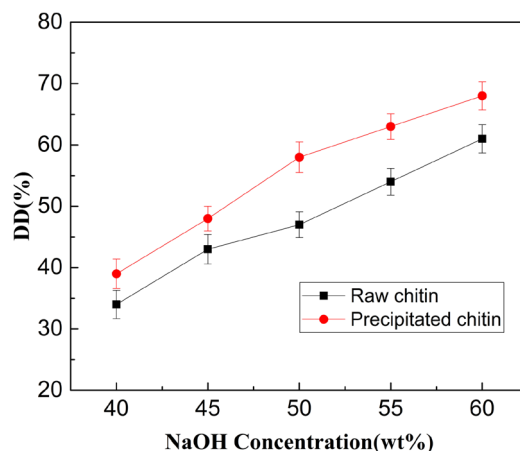


Figure 7. XRD pattern of chitin powder and precipitated chitin  
图 7. 甲壳素粉末和溶解-沉淀后甲壳素 XRD 谱图

### 3.3. 脱乙酰度分析

甲壳素和壳聚糖的根本区别在于乙酰度(DA: Degree of Acetylation)或脱乙酰度(DD: Degree of Deacetylation)的不同。当  $DA < 45\%$  或  $DD > 55\%$ , 即为壳聚糖。



**Figure 8.** Effect of alkali concentration on degree of deacetylation

**图 8.** 碱浓度与脱乙酰度的关系

甲壳素的脱乙酰反应实际上是酰胺键在碱性条件下的水解反应。作为催化剂, NaOH 在甲壳素乙酰化过程中起催化作用[13]。本文将未处理的甲壳素和经溶解-沉淀处理后的甲壳素在 80℃下反应 6 h, 比较不同 NaOH 浓度对脱乙酰的影响, 见图 8。随着 NaOH 浓度从 40 wt%增加到 60 wt%, 未处理的甲壳素脱乙酰度由 34.5%逐渐增加至 58.2%。NaOH 浓度要达到 60 wt%, 才能使未处理的甲壳素有效的脱乙酰, 制得壳聚糖。而经过溶解-沉淀后, NaOH 浓度为 50 wt%时就有脱乙酰效果, 脱乙酰度为 57.3%, 而 60 wt% NaOH 处理后, 其脱乙酰度可达 67.4%。溶解-沉淀后的甲壳素, 凝聚态结构变得松散, 晶区被破坏, 乙酰胺基的可及度变大, 更容易受到 OH<sup>-</sup>的进攻, 因此制得的壳聚糖脱乙酰度更高。

#### 4. 结论

甲壳素的脱乙酰化反应受天然甲壳素紧密有序的微纤维状结构及空间位阻影响很大。经溶解-沉淀后的甲壳素, 晶区被破坏, 微纤维状结构也被破坏, 凝聚态结构变得松散, 乙酰胺基的可及度变大。脱乙酰反应中, 未处理的甲壳素要在碱浓度达 60 wt%时才能制得壳聚糖, 而经溶解-沉淀处理后, 在更低的碱浓度 50 wt%即可达相近的脱乙酰度, 表明溶解-沉淀后的甲壳素乙酰胺基的可及度变大, 促进脱乙酰反应的进行, 提高了脱乙酰效率。溶解-沉淀工艺制备的壳聚糖预期会有着更窄的分子量分布, 将在后续研究。

#### 参考文献

- [1] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [2] Fang, Y., Zhang, R., Duan, B., *et al.* (2017) Recyclable Universal Solvents for Chitin to Chitosan with Various Degrees of Acetylation and Construction of Robust Hydrogels. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **5**, 2725-2733. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b03055>
- [3] Xu, D., Huang, J., Zhao, D., *et al.* (2016) High-Flexibility, High-Toughness Double-Cross-Linked Chitin Hydrogels by Sequential Chemical and Physical Cross-Linkings. *Advanced Material*, **28**, 5844-5849. <https://doi.org/10.1002/adma.201600448>
- [4] 陈楚楚, 邓淑文, 刘育绮. 甲壳素纳米纤维/碳纳米管复合凝胶膜的制备与性能[J]. 高分子材料科学与工程, 2018, 34(8): 154-160.
- [5] Duan, B., Shou, K., Su, X., *et al.* (2017) Hierarchical Microspheres Constructed from Chitin Nanofibers Penetrated Hydroxyapatite Crystals for Bone Regeneration. *Biomacromolecules*, **18**, 2080-2089. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00408>
- [6] Wu, J. and Meredith, J.C. (2014) Assembly of Chitin Nanofibers into Porous Biomimetic Structures via Freeze Drying.

*ACS Macro Letters*, **3**, 185-190. <https://doi.org/10.1021/mz400543f>

- [7] Duan, B., Huang, Y., Lu, A., *et al.* (2018) Recent Advances in Chitin Based Materials Constructed via Physical Methods. *Progress in Polymer Science*, **82**, 1-33. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.04.001>
- [8] Deringer, V.L., Englert, U. and Dronskowsk, R. (2017) Nature, Strength, and Cooperativity of the Hydrogen-Bonding Network in Alpha-Chitin. *Biomacromolecules*, **17**, 996-1003. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01653>
- [9] Rinaudo, M. (2006) Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Progress in Polymer Science*, **31**, 603-632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- [10] Fang, Y., Duan, B., Lu, A., *et al.* (2015) Intermolecular Interaction and the Extended Wormlike Chain Conformation of Chitin in NaOH/urea Aqueous Solution. *Biomacromolecules*, **16**, 1410-1417. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00195>
- [11] Jiang, Z., Fang, Y., Xiang, J., *et al.* (2014) Intermolecular Interactions and 3D Structure in Cellulose-NaOH-Urea Aqueous System. *The Journal of Physical Chemistry B*, **118**, 10250-10257. <https://doi.org/10.1021/jp501408e>
- [12] Liu, C., Wang, G., Sui, W., An, L., *et al.* (2017) Preparation and Characterization of Chitosan by a Novel Deacetylation Approach Using Glycerol as Green Reaction Solvent. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **5**, 4690-4698. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00050>
- [13] Methacanona, P., Prasitsilpa, M., Pothsreea, T., *et al.* (2003) Heterogeneous N-Deacetylation of Squid Chitin in Alkaline Solution. *Carbohydrate Polymers*, **52**, 119-123. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00300-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00300-4)

#### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-5566, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [bp@hanspub.org](mailto:bp@hanspub.org)