

氨基葡萄糖盐酸盐的制备及其某些性质

周培根 尤瑜敏 戚晓玉 张宗恩 耿作献 戴辉明
(上海水产大学食品学院, 200090)

摘 要 采用浓盐酸水解法从甲壳素制备氨基葡萄糖盐酸盐,经离子交换柱层析纯化后,以吡啶-乙酸-乙酯-水-冰醋酸(5:5:3:1, V/V)为展层剂进行纸层析鉴定,其 R_f 值为 0.44。氨基葡萄糖盐酸盐重新溶于水后比旋光度随时间而变化,从 100° 降至 72° 左右,2 小时后处于稳定, $[\alpha]_D^{20}$ 为 71.9 。经化学测定,氯离子含量为 16.74%。红外光谱显示,在 3307.8cm^{-1} 、 3098.9cm^{-1} 、 1615.0cm^{-1} 、 1534.1cm^{-1} 、 1417.9cm^{-1} 、 1093.8cm^{-1} 、 1033.6cm^{-1} 、 912.0cm^{-1} 和 579.1cm^{-1} 处有特征吸收峰。

关键词 甲壳素,氨基葡萄糖盐酸盐,离子交换层析,纸层析,变旋,红外光谱

Preparation and some properties of glucosamine hydrochloride

Zhou Peigen, You Yumin, Qi Xiaoyu, Zhang Zongen, Geng Zuoxian, Dai Huiming
(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, 200090)

ABSTRACT Glucosamine hydrochloride was prepared by hydrolysis of chitin with concentrated hydrochloric acid and then chromatographed on 732 cation exchange column for purification. The purified glucosamine hydrochloride was identified by paper chromatography using the solvent system of pyridine, ethyl acetate, water and glacial acetic acid (5:5:3:1) and its R_f value was 0.44. On redissolving in water, the value of the specific optical rotation of glucosamine hydrochloride decreased with time from nearly 100° to about 72° , and was stable after 2 hrs with $[\alpha]_D^{20} = 71.9$. The chloride content of glucosamine hydrochloride product was 16.74%. Its infrared spectrum shows that the characteristic absorption peaks occurred at 3307.8cm^{-1} 、 3098.9cm^{-1} 、 1615.0cm^{-1} 、 1534.1cm^{-1} 、 1417.9cm^{-1} 、 1093.8cm^{-1} 、 1033.6cm^{-1} 、 912.0cm^{-1} and 579.1cm^{-1} .

KEYWORDS chitin, glucosamine hydrochloride (GAH), ion-exchange chromatography, paper chromatography, mutarotation, infrared spectrum

D-氨基葡萄糖盐酸盐(D-Glucosamine Hydrochloride,简称 GAH)是从甲壳素制备的一种重要衍生物,对人体具有重要的生理功能。它参与肝肾解毒,发挥抗炎护肝的作用;刺激婴儿肠道中双歧杆菌增长^[1];对治疗风湿性关节炎和胃溃疡疾病有良好的疗效^[2];可抑制癌细胞的生长,是合成抗生素和抗癌药物的主要原料;还可应用于食品、化妆品和饲料添加剂中,用途相当广泛。因此,该产品已受到世界各国医药、工业界和研究人员的的高度重视。

本文以甲壳素为原料制备 GAH,通过离子交换层析进行纯化,并对其产品的一些特性进行研究,为生产高质量的 GAH 提供依据。

上海市高校科技发展基金资助(甲壳素制备氨基葡萄糖硫酸盐新工艺的开发及应用),97JG05056号。

第一作者简介:周培根,男,1941年10月生,教授。E-mail:pgzhou@sfnu.edu.cn

收稿日期:1999-06-11

1. 材料和方法

1.1 实验材料

甲壳素购自上海鱼品厂。在酸水解前分别用 1.5mol/L HCl 溶液和 1.0mol/L NaOH 溶液处理,然后用水洗至中性,干燥后粉碎并过 20 目筛,待用。

1.2 GAH 的制备

用浓盐酸水解法从甲壳素制备 GAH,按文献[3]的方法进行。

1.3 GAH 的纯化

重结晶:按上述方法制备的 GAH 晶体溶于最少量的沸水中,加入适量活性炭,在 60℃下连续搅拌 1.5 小时进行脱色。然后将溶液趁热过滤,加入过量的 95% 乙醇,剧烈搅拌 4~ 6h,收集晶体并真空干燥。

离子交换层析:称取 5g 重结晶的 GAH 溶解于 30mL 重蒸水中,进行 732 阳离子交换柱(2.0cm × 30cm)层析纯化。上样后,先用重蒸水洗脱,用 5% AgNO₃ 试剂检验洗脱液中的氯离子,直至无氯离子被检出。然后用 0.3mol/L HCl 溶液洗脱并分步收集,流速为 6mL/hr,每 2mL 收集 1 管。用茚三酮显色,通过分光光度法^[4~5]在波长 570nm 处测量洗脱液的吸光度,将吸光度最高的几管洗脱液合并,在 45~52℃下减压浓缩,加入过量 95% 乙醇,结晶,真空干燥。

1.4 GAH 含量的测定

按照文献[6]方法进行。GAH 标准样品购自美国 Sigma 公司(纯度> 99%)。

1.5 GAH 的纸层析

纸层析在 Whatman No. 31 滤纸(36cm × 5cm)上进行。展层剂为吡啶:乙酸乙酯:水:冰醋酸(5:5:3:1,V/V)。GAH 样品及标准溶液浓度均为 10%(W/V),点样量 1~ 2μL,层析大约 6h 后,取出滤纸条,吹干。然后,分别用两种方法进行检测。一种是用 0.1%(W/V)茚三酮-丙酮试剂喷洒,在 105℃下加热显色。另一种方法是先用 Morgan 和 Elson 反应试剂(a)即乙酰丙酮喷洒,在 80℃下加热 15min,然后用试剂(b)即对二甲氨基苯甲醛喷洒,在 70℃下加热 10min 左右显色^[7]。

1.6 旋光度的测定

准确称取 5.0000g GAH 迅速溶解于重蒸水中,定容至 50mL。每隔一定的时间在旋光仪上测定 20℃ 时溶液的旋光度,由公式 $[\alpha]_D^{20} = \alpha / LC$ 计算出比旋光度,绘出比旋光度随时间的变化曲线。

1.7 氯离子含量的测定

采用硝酸汞法进行测定据文献[8]。

1.8 GAH 红外光谱测定

用 KBr 压片,在 Perkin Elmer-1650 傅立叶变换红外光谱仪上测定。

2. 结果与讨论

2.1 甲壳素的预处理

甲壳素是一种天然氨基高分子物质,广泛存在于节肢动物(如虾、蟹等)的外壳、昆虫体表以及真菌

的细胞壁。它与蛋白质和无机盐,如碳酸盐和磷酸盐结合。在甲壳素酸解过程中,这种结合的蛋白质会水解产生游离的氨基酸,而无机盐则阻碍甲壳素的酸解反应,从而影响GAH的产量和质量^[9]。因此,对这两种成份含量高的甲壳素进行预处理,尤其在制备高纯度GAH时,显得尤为重要。在本研究中,预处理的方法是,首先用稀盐酸浸泡甲壳素以除去无机盐成份,然后再用稀碱煮沸除去蛋白质。

2.2 GAH的纯化

从甲壳素开始,按^[3]方法进行酸水解,经脱色、浓缩和结晶等步骤,得到的GAH产率为71%。重结晶后的得率为42%。造成损失的原因主要是在重结晶过程中少量产品被活性碳吸附,另外也有少部分GAH溶解于过量的乙醇溶液中。但是,这部分溶解的GAH可通过加入乙醚进行回收。研究中,GAH的进一步纯化采用离子交换柱层析,洗脱曲线见图1。从图中可以看出,在第72~111收集管之间有一个GAH洗脱峰,其中在第80~100管中的GAH含量较高,将这20管中的洗脱液合并,在50℃下真空浓缩,经结晶后得到3.5g GAH晶体,纯度为99.8%,回收率为70%。

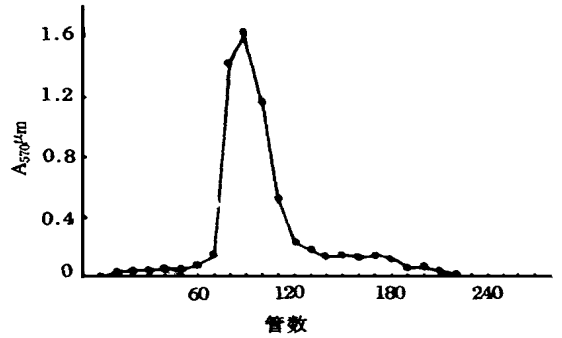
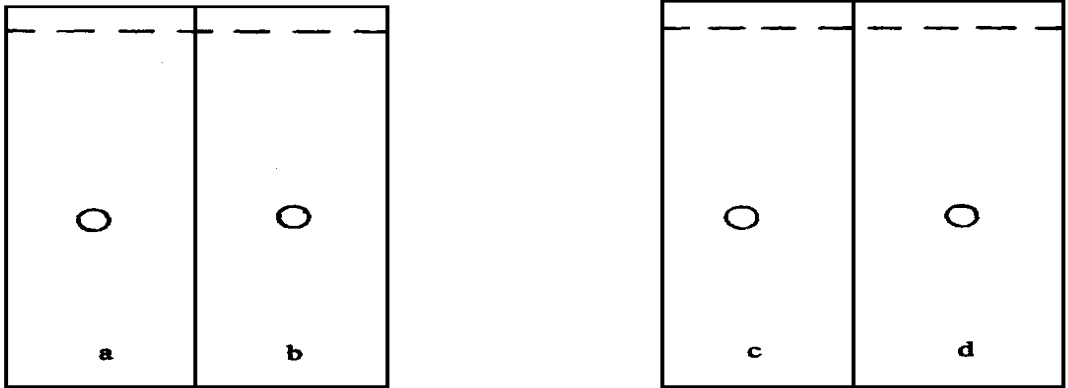


图1 GAH的离子交换层析洗脱曲线
Fig. 1 The elution profile of GAH on ion-exchange chromatographic column



(A) (B)

图2 GAH纸层析图谱

Fig. 2 Paper chromatograms of GAH.

(A)GAH的标准溶液(a)与样品溶液(b),用茚三酮试剂显色;(B)GAH的标准溶液(c)与样品溶液(d),用Morgan & Elson试剂显色(展层剂为吡啶:乙酸乙酯:水:冰醋酸=5:5:3:1)。

A: GAH standard(a) and GAH product(b) detected with ninhydrin reagent;

B: GAH standard(c) and GAH product(d) detected with Morgan & Elson reagent.

The developing solvent system: pyridine, ethyl acetate, water and glacial acetic acid(5:5:3:1).

2.3 GAH的纸层析

GAH的纸层析图谱如图2所示。从图谱上可以看出,用茚三酮试剂显色后仅出现一个紫红色斑点,这表明该化合物中含有氨基。用Morgan和Elson试剂显色后,也仅出现一个樱桃红斑点,这说明有氨基葡萄糖存在。这两个斑点的Rf值均为0.44,与标准GAH的Rf值一致。这一结果也可以说明,本研究制备的GAH的纯度是相当高的。

2.4 GAH 的旋光度

GAH 的比旋光度随时间变化的曲线见图 3。从图中可以看出, D- GAH 重新溶解于水中后出现变旋现象。当它刚溶于水时其比旋光度值最高, 几乎接近 100, 随着时间的延长, 其比旋光度迅速下降, 大约 2 小时后, 比旋光度趋于稳定, $[\alpha]_D^{20}$ 为 71.9。这一现象可以被解释为, 用乙醇进行重结晶的过程中, GAH 是以 α 形式析出。当它重新溶解于水中后, α 型的 GAH 将向 β 型转变, 稳定的 GAH 水溶液是它的 α 型和 β 型的平衡混合物^[9]。

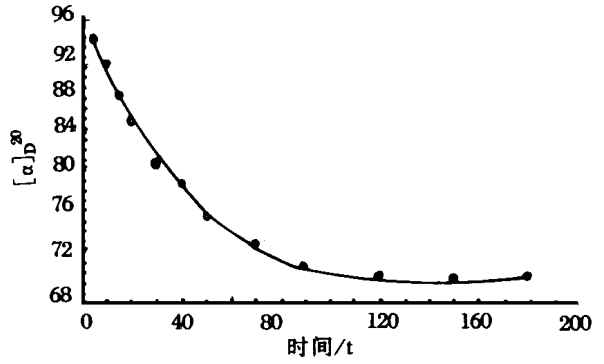


图 3 GAH 溶液(10%)的比旋光度- 时间变化曲线
Fig. 3 The profile of specific rotatory power of GAH solution(10%) versus time.

2.5 Cl⁻含量

在本研究中, GAH 经离子交换柱层析纯化和乙醇重结晶后其 Cl⁻含量为 16.74%, 非常接近于理论含量 16.47%。这也可以说明本 GAH 产品已经达到了很高的纯度。在实验中也发现, 用水重结晶的 GAH 中 Cl⁻含量为 18.82%。这一结果说明用乙醇进行结晶优于用水进行结晶。

2.6 GAH 的红外光谱

本研究制备的高纯度 GAH 和标准样品(纯度 > 99%) 的红外光谱图分别如图 4 和图 5 所示。从图中可以看出, GAH 产品在 3307.8cm⁻¹、3098.9cm⁻¹、1615.0cm⁻¹、1534.1cm⁻¹、1417.9cm⁻¹、1093.8cm⁻¹、1033.6cm⁻¹、912.0cm⁻¹、579.1cm⁻¹ 存在特征吸收峰, 与标准样品十分符合。

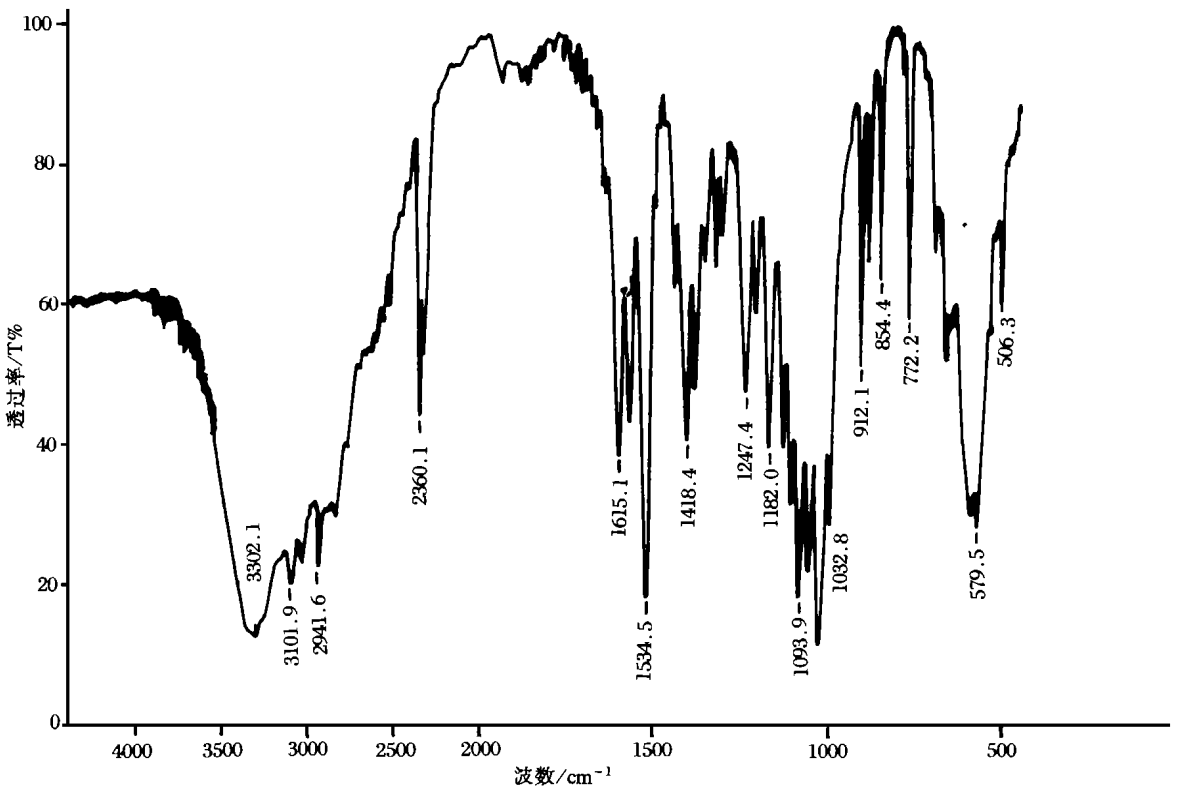


图 4 标准 GAH 红外光谱图

Fig. 4 Infrared spectrum of GAH standard.

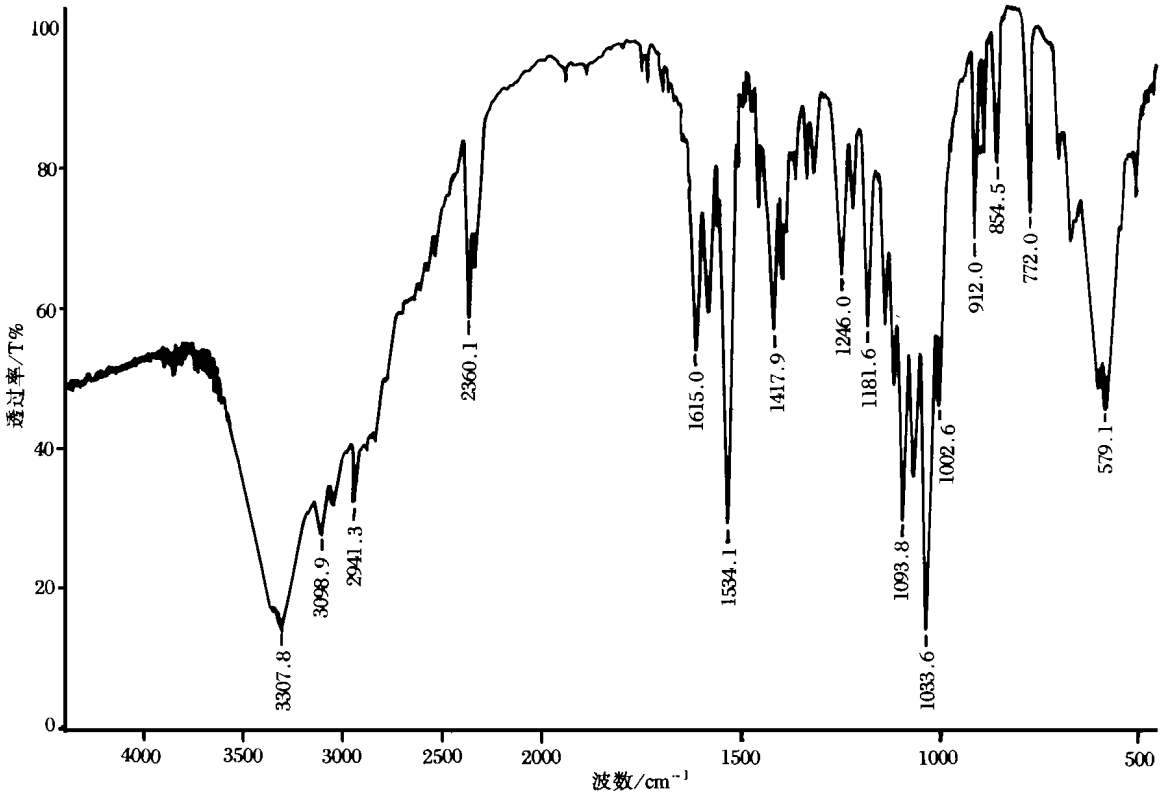


图5 GAH 产品红外光谱图

Fig. 5 Infrared spectrum of GAH product

在本研究过程中,得到食品学院严伯奋教授的指导,在此表示真诚的谢意。

参 考 文 献

- 1 Muzzarelli R. In: vivo biochemical significance of chitin-based medical items. *Polymeric Biomaterials*. 1993, 179~ 197
- 2 Prudden J F, Nyack U. Method and agent for treating inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. U S Patent. 1977, 4006224
- 3 Purchase E R, Brown C E. (α - Glucosamine hydrochloride. In: *Organic Synthesis*, 1946, 26~ 36
- 4 Moore S, Stein W H. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J Biol Chem*. 1948, 176: 367
- 5 Moore S, Stein W H. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J Biol Chem*. 1951, 192: 663~ 681
- 6 Johnston J. P., Ogston A G and Stanier J E. A modification of the Elson and Morgan method for the estimation of glucosamin *Analyst*, 1951, 76: 88
- 7 Patridge S M. Filter- paper partition chromatography of sugars. *Biochem J*. 1948, 42(2): 238~ 248
- 8 AOAC. Official methods of analysis, 12th ed., Association of official analytical chemists, 1975, 615
- 9 Kent P W, Whitehouse M W. Biochemistry of the Aminosugars. In: England: Oxford University Press, 1955. 162~ 186