

幾丁質與幾丁聚醣之製備與鑑定

呂卦南*

摘要

本研究係利用草蝦蝦殼製備幾丁質，再將鹼液加入幾丁質進行去乙醯化，使原來幾丁質上的乙醯胺基 (-NHCOCH₃) 轉變為胺基 (-NH₂)，製得幾丁聚醣。透過樣品元素分析 (EA)、廣角 X-射線繞射分析 (WAXD) 與傅立葉紅外線光譜 (FT-IR) 來鑑定幾丁質與幾丁聚醣的元素成分、結構與差異：就成分與結構而言，所製備之幾丁質與幾丁聚醣皆符合理論值與參考譜圖，而且兩者皆有良好的結晶性。掃描式電子顯微影像 (SEM) 顯示幾丁質具有高度的孔隙性，其平均孔隙大小約為 0.3-1.5 μm，而幾丁聚醣的影像呈現出棉花般的長條纖維狀結構，直徑約為 0.3-0.6 μm。藉由熱重量分析得知兩者以幾丁質的熱穩定性較佳，這是因為幾丁質結構上乙醯胺基的化學穩定性優於幾丁聚醣中的胺基。

關鍵詞：幾丁質、幾丁聚醣、去乙醯化

*康寧醫護暨管理專科學校 通識教育中心助理教授

電子郵件：alumina@knjc.edu.tw

收稿日期：2005.11.15

修改日期：2006.4.25

接受日期：2006.5.1

Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan

Kwa-Nan Lu*

Abstract

In this research chitin was prepared from grass shrimp's shell. The addition of basic solution into chitin produced chitosan via deacetylation, converting acetylamino group into amine group. The element composition and structure of both chitin and chitosan were characterized with elemental analysis (EA), wide angle X-ray diffraction (WAXD) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). These results are consistent with theoretical C/N values and their reference spectra. Both chitin and chitosan exhibit good crystallinity. The scanning electron microscopy (SEM) shows that chitin owns high degree of porosity with mean pore size about 0.3-1.5 μm while chitosan has rectangular fibrous structure like the cotton with diameter about 0.3-0.6 μm . Based on the results of thermogravimetric analysis, chitin shows better thermal stability than chitosan because the acetylamino group in chitin is more stable than amino group in chitosan.

Key Words : chitin, chitosan, deacetylation

* Assistant professor, Center of General Education, Kang-Ning Junior College of Medical Care and Management

壹、前言

地球提供生物活動的空間與資源，人類充分利用這些資源造就了今日高科技的社會，滿足了物質生活方面的需求。然而地球上的資源並不是取之不盡，用之不竭的；長期以來追求物質文明所帶來對環境的傷害，更是未曾休止。今天不論是大氣圈、水圈、土石圈與生物圈皆遭受環境污染的嚴重威脅。我們只有一個地球，爲了萬物的永續生存，了解問題焦點並消弭問題，實是刻不容緩的議題。而幾丁質與幾丁聚醣不論是在環境保護、污染防治或人體醫療等方面皆能有所裨益。

幾丁質的結構類似於纖維素，由 N-乙醯葡萄糖胺的單元體組成，是一種高分子多醣體，在自然界的蘊藏量僅次於纖維素，多存於蝦、蟹等甲殼類動物的外殼、昆蟲的外殼，以及真菌類的細胞壁，用來支撐與保護生物。幾丁聚醣則是由 N-葡萄糖胺的單元體聚合而成的高分子多醣體，可利用幾丁質添加強鹼，去除乙醯基後製得[1-6]。

由於幾丁質得自於天然聚合物，具有高度的生物相容性與生物分解性，對人體的排斥性低、親和性高，以幾丁質爲基質再製之聚合物，已製成人工皮膚、人工血管、人工韌帶與人工透析膜等醫療器材。這些聚合物同時具有止血與消炎抗菌的功能。以之所製之手術縫合線可融於體內而不必拆線。此外，以幾丁質爲原料可製得環保塑膠，在自然界可被微生物或植物所分泌的幾丁質酵素所分解，不會引起環境污染問題。

幾丁聚醣可藉高分子糖環結構對重金屬離子產生吸附、螯合或靜電吸引力，從廢液中將重金屬離子移除或回收貴重金屬。分子結構上的胺基與羥基扮演配位子 (ligand) 的角色，經螯合作用 (chelation) 易與重金屬離子形成配位鍵。另外，在酸性環境中，高度質子化的胺基帶正電荷，易吸引廢液中帶負電荷的離子而脫除。近幾年來，藉由化學修飾 (chemical modification) 或交聯 (crosslink) 方式已成功地將幾丁聚醣吸附劑的材料性質改良，用來吸附各種不同環境中的重金屬離子[7-10]。由此可見，幾丁聚醣的確是優良的生物吸附劑。

從廢棄物與污染物的觀點來看，幾丁質與幾丁聚醣的研究，對於這兩方面皆具有很大的貢獻。幾丁質主要是從廢棄的海洋無脊椎生物的外殼上取得，一方面可以降低成本，將廢棄物再利用；另一方面幾丁質與幾丁聚醣對於製成無

污染的環保塑膠或廢水處理均具有良好的效果。

除了上述的重要用途外，因為幾丁質與幾丁聚醣尚具有相當多獨特的性質，譬如：吸收性、吸濕保水性、強韌性、去除放射性物質、酵素固定化、藥物釋放控制...等，所以目前應用的範圍還包括：醫藥、健康食品、食品工業、紡織、保濕性化妝品、農業與生化工程等 [1-2, 11-13]，可見其功效卓著。然而在幾丁質與幾丁聚醣的開發量上，相較於已被大量開發利用的纖維素仍顯得相當匱乏。對於海島型的台灣而言，海洋資源豐富，幾丁質與幾丁聚醣的開發仍有相當大的空間。

對幾丁質與幾丁聚醣的製備與基本性質，過去雖有不少的研究 [1-3, 5-6]，但系統性的探討兩者性質的差異則不多見。本研究藉由國人喜食之草蝦的蝦殼，尋求有效率的方法來製備幾丁質，並找出適當條件將幾丁質轉化為幾丁聚醣。此外，利用元素分析儀、廣角 X-射線繞射儀、掃描式電子顯微鏡、熱重量分析儀與傅立葉紅外線光譜儀對幾丁質與幾丁聚醣做特性分析與鑑定，同時將兩者的性質作一比較，盼能更廣而深的了解其特性，以利未來提高開發產能，進一步擴大應用範圍。

貳、實驗

從草蝦蝦殼製備幾丁質的方法如下：首先將蝦殼置於 120°C 烘箱乾燥 2 小時後磨碎；接著在 75°C 下，以每克蝦殼粉末添加 5 毫升 NaOH 水溶液的比例，加入 2.5N NaOH (aq)，攪拌 6 小時後，經離心取得泥狀物 (slurry)，再加入去離子水沖洗後離心，重複三次；最後在室溫下，以每克蝦殼粉末添加 9 毫升 HCl 水溶液的比例，加入 1.7N HCl (aq)，攪拌 6 小時後再經上述離心步驟，將所得泥狀物在烘箱中乾燥製得 [14-15]。

由幾丁質製備幾丁聚醣的方法如下：稱取適量之幾丁質，在 107°C 下，以每克幾丁質添加 26 毫升 NaOH 水溶液的比例，加入 60% NaOH (aq)，攪拌 6 小時後，將離心所得的泥狀物，置於烘箱中乾燥製得 [14-15]。

樣品的元素分析 (Elemental Analysis; EA) 使用 Perkin-Elmer 240CHN 型儀器測定之。

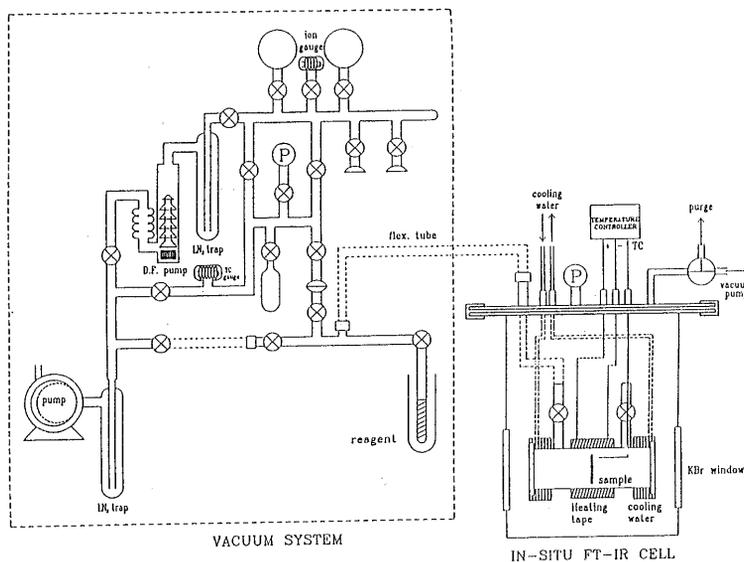
樣品的結構鑑定使用廣角 X-射線繞射 (Wide Angle X-ray Diffraction; WAXD)。取適量的樣品均勻的壓抹在磨砂之蓋玻片上，以 Rigaku D/Max-III 繞

射儀測得，X-射線來源是銅靶的 $K\alpha$ 射線，測量時電壓與電流設定值為 35 kV 和 20 mA。

樣品的形態與大小之影像使用 JOEL EM5400 掃描式電子顯微鏡 (Scanning Electron Microscopy; SEM) 測得。將幾丁質與幾丁聚醣分散於銅鋅合金的樣品座上，接著在樣品表面鍍金，再放入樣品室中抽真空，使用 20kV 的加速電壓偵測。

熱重量分析(Thermogravimetric Analyzer; TGA)使用 Du Pont 951 TGA 熱分析儀。取適量樣品置於白金稱盤，以 30 ml/min 的流速引入氮氣，並以 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升溫速率加熱，測得幾丁質與幾丁聚醣之熱重量分析圖譜。

原位傅立葉紅外線光譜 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy; FT-IR) 是以 Bomem DA-8 傅立葉轉換紅外線光譜儀測得。實驗時將幾丁質以 8-10 噸的壓力壓成 $20\text{-}30\text{ mg}/\text{cm}^2$ 之盤片，架於石英樣品架上，放入反應管中，再置於光譜儀的樣品槽後連上真空系統，如圖一所示，其真空度可達 10^{-5} torr 範圍，可作原位活化處理及高溫反應測試。樣品放置槽是由不銹鋼焊製而成，其槽蓋部份留有冷卻水、氣體出入口、程溫控制用的線路、壓力錶與用耐力板製成的視窗；槽身部份有 KBr 視窗，由於槽蓋與槽身之間裝置有迫緊 (Packing)，使整個樣品放置槽能達到高度真空，排除水氣與二氧化碳的干擾。將樣品抽氣至 2×10^{-5} torr，測其紅外線光譜，再以 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升溫速率升溫，每間隔五分鐘記錄光譜一次，測得幾丁質之程溫紅外線光譜。

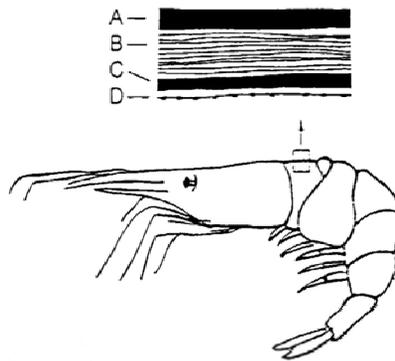


圖一 紅外線光譜分析真空系統

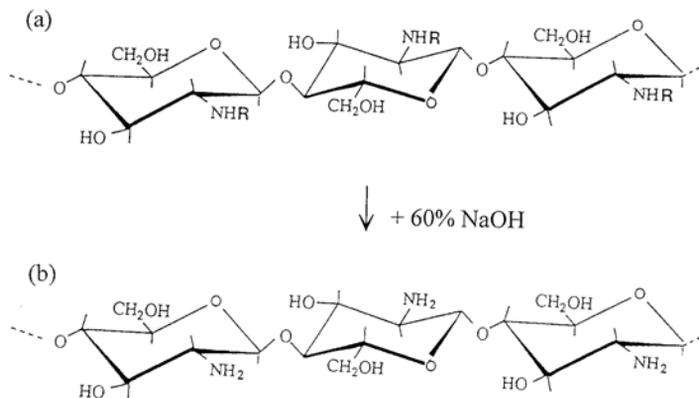
參、結果與討論

蝦殼的主要成分是蛋白質、碳酸鈣與幾丁質，幾丁質主要位於蝦殼中軟而薄的 C 層，如圖二 [16] 所示。

製備過程中，先以強鹼氫氧化鈉萃取出蛋白質，接著再加入強酸鹽酸萃取出碳酸鈣，最後所剩之土黃色沉澱物即為幾丁質。將乾燥後之幾丁質加入強鹼，進行去乙酰化，即可產生淡黃色之幾丁聚醣，其分子結構與反應過程如圖三所示。



圖二 蝦殼形態與構造 [16]。(A) 堅硬的外表層 (B) 含碳酸鈣之堅韌層 (C) 含幾丁質之軟薄層 (D) 內部含藍紫色聚烯類色素之柔軟層



圖三 幾丁質去乙酰化形成幾丁聚醣

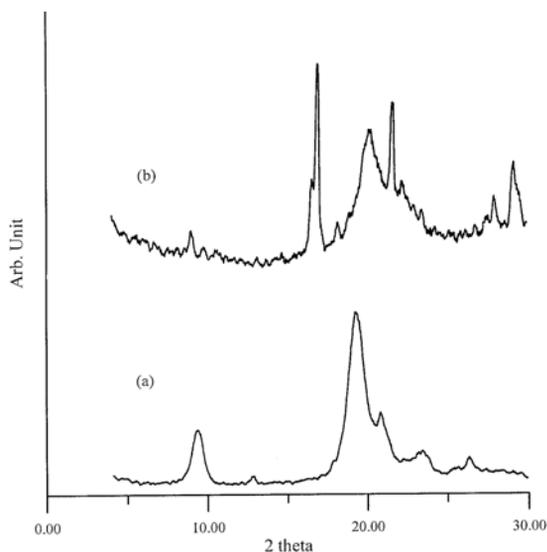
幾丁質之分子式為 $(C_8H_{13}O_5N)_n$ ，而幾丁聚醣之分子式為 $(C_6H_{11}O_4N)_n$ ，經由表一元素成分分析 (EA) 結果顯示，所製得之幾丁質與幾丁聚醣，氮、碳兩元素的比例與已知組成頗相近。

表一 幾丁質與幾丁聚醣的元素成分分析

幾丁質 ^a	C	N	N/C	N/C (理論值)
(1)	44.55	6.37	0.143	0.146
(2)	44.26	6.31	0.143	0.146
(3)	42.86	6.21	0.145	0.146
幾丁聚醣 ^b	C	N	N/C	N/C (理論值)
(1)	29.90	5.65	0.189	0.194
(2)	31.35	5.87	0.187	0.194

^a 三次製備；^b 兩次製備。

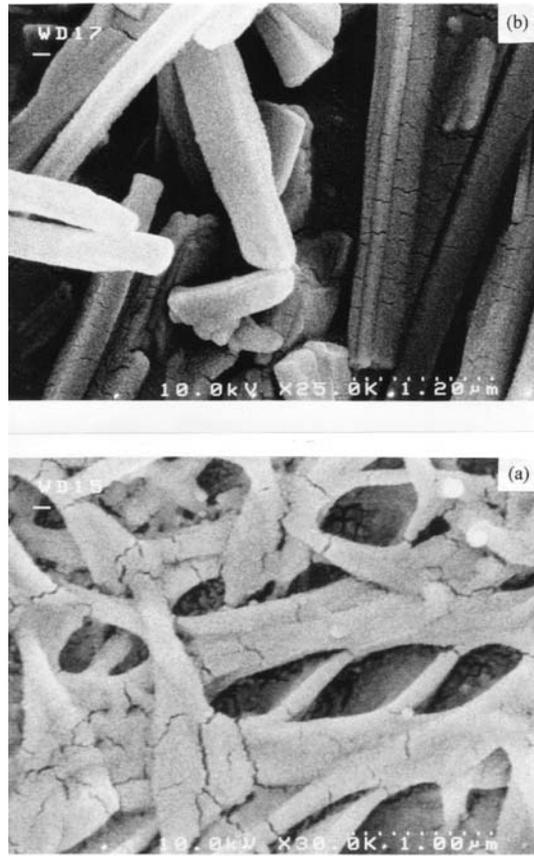
圖四是幾丁質與幾丁聚醣的廣角 X-射線繞射圖譜 (WAXD)。幾丁質的主要結晶峰出現在 $2\theta = 9.3^\circ$ 與 19.3° ，分別是由於 (020) 與 (110) 的繞射晶面所致 [5, 8, 16-18]；此外，三個較小的結晶峰介於 $2\theta = 20^\circ$ 與 27° 間，是來自 (101)、(130) 與 (140) 三個繞射晶面。此一結果與 Li 等人 [5] 取材自蟹殼的 α -幾丁質一致，亦與 Kim 等人 [18] 研究結果相符，但異於取材自魷魚介殼所研究的 β -幾丁質 [18]。由幾丁質在 60% NaOH 中水解 6 小時所得之幾丁聚醣，明顯可見源自於幾丁質的主要繞射峰強度大幅降低 [5, 8]，說明了在結晶區域確實產生去乙酰化效應，而新的結晶峰出現在 $2\theta = 16.9^\circ$ 、 20.3° 與 21.3° ，是屬於幾丁聚醣在 (002)、(102) 與 (200) 的繞射晶面 [19-20]。Kim 等人 [8] 曾指出去乙酰化程度 (Degree of deacetylation) 45% 時可減少幾丁質的結晶性，而此程度達 90% 時，在不同的繞射峰位置將有新的結晶結構出現。由圖譜可見，本研究所製備的幾丁聚醣去乙酰化程度的確已達 90% 以上，幾丁聚醣與幾丁質兩者皆有良好的結晶性。



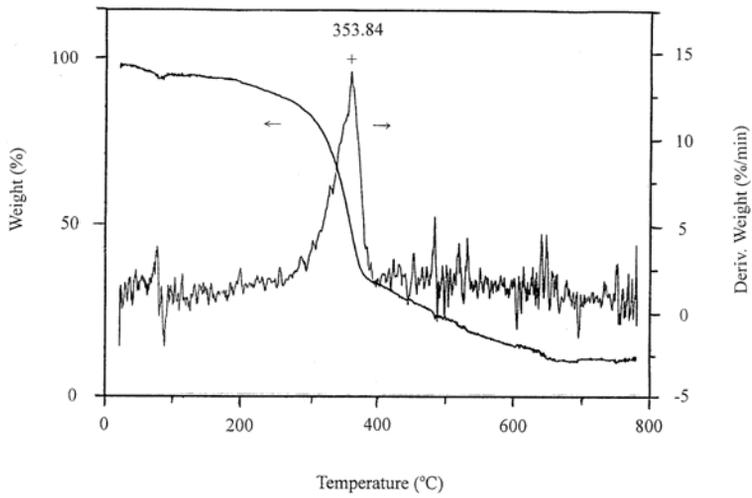
圖四 廣角 X-射線繞射圖譜 (a) 幾丁質 (b) 幾丁聚醣

圖五是幾丁質與幾丁聚醣的掃描式電子顯微影像 (SEM)。幾丁質影像具有高度的孔洞性結構，其平均孔隙大小約為 $0.3-1.5 \mu\text{m}$ ，並且相互交錯，似網狀分布；而粗糙的表面則歸因於幾丁質疏水的纖維特性，當水分蒸發時，表面的纖維不規則的沉澱所造成 [21-22]。至於幾丁聚醣的影像呈現出似棉花般的特殊長條纖維狀結構，外表亦顯粗糙，直徑約為 $0.3-0.6 \mu\text{m}$ 。幾丁質較複雜的形狀是得自於有較強的分子間氫鍵 [18]。纖維狀的幾丁聚醣略帶淡黃色，在水與鹼液中相當穩定，然而在酸液中不穩定且易溶 [23]。

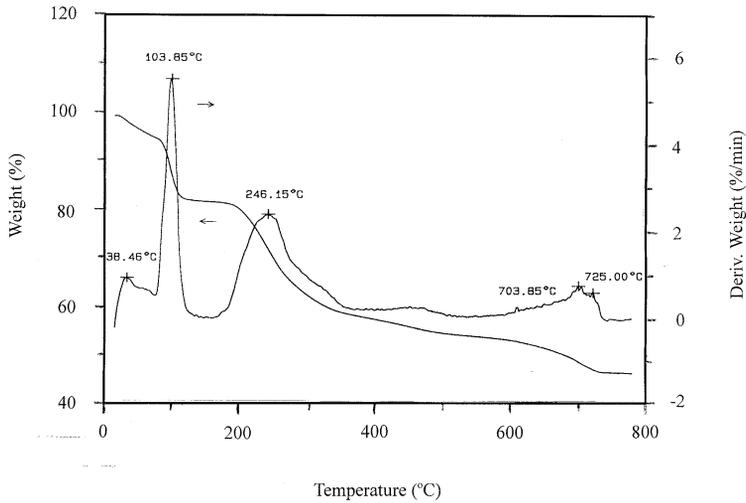
圖六是幾丁質的熱重量分析圖譜。溫度範圍由室溫記錄至 800°C ，是爲了確實了解樣品詳細的分解情形。幾丁質 2.5% 以上的重量損失發生在 100°C 之後，最後在 800°C 時剩餘的重量百分率約爲原來的 10%。起初的熱分解之後，由 253.8°C 開始，幾丁質的重量百分率迅速減少，在 353.84°C 出現極大值後遞減至 10%。圖七是幾丁聚醣的熱重量分析圖譜。幾丁聚醣內水分蒸發的重量損失發生在 103.85°C 左右 [20]，而 20% 以上的重量損失發生在 200°C 之後。極大值出現在 246.15°C 。幾丁質與幾丁聚醣之微分重量分析顯示極大值的溫度，前者明顯高於後者，所以幾丁質的熱穩定性較佳。幾丁質較佳的熱穩定性，應是得自於結構中所含乙醯胺基 ($-\text{NHCOCH}_3$) 的化學穩定性優於幾丁聚醣中的胺基 ($-\text{NH}_2$)。



圖五 掃描式電子顯微鏡影像 (a) 幾丁質 (b) 幾丁聚醣

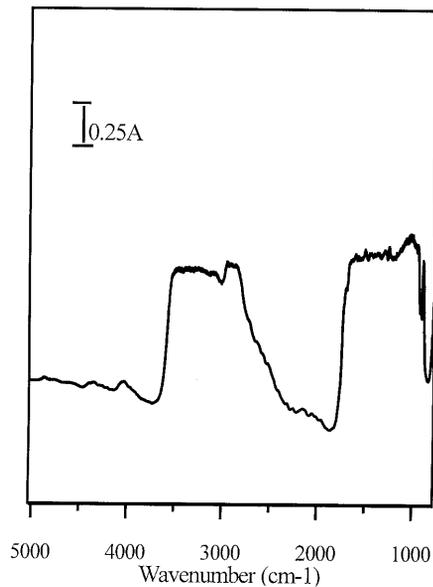


圖六 幾丁質之熱重量分析圖譜



圖七 幾丁聚醣之熱重量分析圖譜

圖八是幾丁質的紅外線光譜。光譜中 1640 cm^{-1} 與 1620 cm^{-1} 兩吸收峰是幾丁質中乙醯胺基第 I 帶 (I band) 的吸收，而 1560 cm^{-1} 是第 II 帶 (II band) 的吸收 [8, 18]。此外， $1070\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ 的譜峰屬於 C-O 伸張振動的吸收， $2850\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ 的譜峰屬於 C-H 伸張振動的吸收，而 3400 cm^{-1} 附近的寬帶 (broad band) 則是 O-H 伸張振動的吸收 [24-25]。至於幾丁聚醣的紅外光譜，乙醯胺基的 I、II 帶譜峰明顯減弱，然而在 1600 cm^{-1} 附近會出現 $-\text{NH}_2$ 彎曲振動的吸收譜峰 [7]。藉由紅外線吸收光譜進一步確認了所製備的幾丁質與幾丁聚醣，以及兩者在光譜上的差異，並可與前述元素分析 (EA)，連同廣角 X-射線繞射分析 (WAXD) 的結果相印證。此外，透過程溫原位紅外線光譜亦證實了兩者的熱穩定性結果與熱重量分析 (TGA) 一致。



圖八 幾丁質之紅外線光譜

肆、結論

本研究將草蝦蝦殼先以鹼液去蛋白質，後以酸液去碳酸鈣，成功地製得幾丁質。參酌文獻並多次嘗試，終求得幾丁質加鹼去乙醯化的最佳條件，幾丁聚醣的產率達 90% 以上。所製備的幾丁質與幾丁聚醣透過樣品元素分析 (EA)、廣角 X-射線繞射分析 (WAXD) 與傅立葉紅外線光譜 (FT-IR) 來確認其成分與結構，鑑定結果顯示兩者皆具備良好的結晶性。幾丁質在掃描式電子顯微鏡下呈現高度的孔洞性，其平均孔隙大小約為 0.3-1.5 μm ，並且相互交錯，似網狀分布；而幾丁聚醣的影像則顯示出棉花般的長條纖維狀結構，直徑約為 0.3-0.6 μm 。幾丁質較複雜的形狀是得自於有較強的分子間氫鍵。透過熱重量分析比較兩者的熱穩定性，結果亦以幾丁質較佳，這是因為在幾丁質結構上含乙醯胺基，其化學穩定性優於幾丁聚醣中的胺基之故。

參考文獻

- 吳豐智、曾如玲 (1997):「神奇的物質-幾丁質和幾丁聚醣」, *化工技術*, 第5卷, 第7期, pp.196-201。 [1]
- 徐新興、糜福龍 (1999):「海洋資源與化工技術-幾丁質與幾丁聚醣在化工領域之應用」, *化工*, 第46卷, 第3期, pp.51-66。 [2]
- Ravindra, R., Krovvidi, K.R. and Khan, A.A. (1998) "Solubility Parameter of Chitin and Chitosan", *Carbohydrate Polymers*, vol.36, pp.121-127. [3]
- Takahashi, Y., Miki, F. and Nagase, K. (1995) "Effect of Sonolysis on Acid Degradation of Chitin to Form Oligosaccharides", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol.68, pp.1851-1857. [4]
- Li, J., Revol, J. and Marchessault, R.H. (1997) "Effect of Degree of Deacetylation of on the Properties of Chitin Crystallites", *J. of Applied Polymer Science*, vol.65, pp.373-380. [5]
- Koide, S.S. (1998) "Chitin-Citosan: Properties, Benefits and Risks", *Nutrition Research*, vol.18, no.6, pp.1091-1101. [6]
- Aly, S.A., Jeon, B.D. and Park, Y.H. (1997) "Preparation and Evaluation of the Chitin Derivatives for Wastewater Treatments", *J. of Applied Polymer Science*, vol.65, pp.1939-1946. [7]
- Kim, C.Y., Choi, H.M. and Cho, H.T. (1997) "Effect of Deacetylation on Sorption of Dyes and Chromium on Chitin", *J. of Applied Polymer Science*, vol.63, pp.725-736. [8]
- Peter, M.G. (1995) "Applications and Environmental Aspects of Chitin and Chitosan", *J.M.S.-Pure Appl. Chem.*, vol.A32, no.4, pp.629-640. [9]
- Shigemasa, Y. and Sashiwa, H. (1999) "Chemical Modification of Chitin and Chitosan 2: Preparation and Water Soluble Property of N-acylated Partially Deacetylated Chitins", *Carbohydrate Polymers*, vol.39, pp.127-138. [10]
- Genta, I., Costantini, M., Asti, A., Conti, B. and Montanari, L., (1998) "Influence of Glutaraldehyde on Drug Release and Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres", *Carbohydrate Polymers*, vol.36, pp.81-88. [11]

- Muzzarelli, R.A.A.(1996)“Chitosan-Based Dietary Foods”, *Carbohydrate Polymers*, vol.29, pp.309-316. [12]
- Austin, P.R., Brine, C.J., Castle, J.E. and Zikakis, J.P. (1996) “Chitin: New Facets of Research”, *Science*, vol.212, pp.749-753. [13]
- Chang, K.L.B., Tsai, G, Lee, J. and Fu, W.R.(1997)“Heterogeneous N-deacetylation of Chitin in Alkaline Solution”, *Carbohydrate Research*, vol.303, pp.327-332. [14]
- Chang, K.L.B. and Tsai, G. (1997) “Response Surface Optimization and Kinetics of Isolating Chitin from Pink Shrimp (*Solenocera*), *J. of Agric. Food Chem.*”, vol.45, p.1900-1904. [15]
- Mikkelsen, A., Engelsen, S.B., Hansen, H.C.B., Larsen, O. and Skibsted L.H. (1997) “Calcium Carbonate Crystallization in the α -chitin Matrix of the Shell of Pink Shrimp, *Pandalus Borealis*, during Frozen Storage”, *J. of Crystal Growth*, vol.177, pp.125-134. [16]
- Manoli, F., Koutsopoulos, S. and Dalas, E. (1997) “Crystallization of Calcium on Chitin”, *J. of Crystal Growth*, vol.182, pp.116-124. [17]
- Kim, S.S., Kim, S.H. and Lee, Y.M. (1996) “Preparation, Characterization, and Properties β -Chitin and N-acetylated β -Chitin”, *J. of Polymer Science Part-B-Polymer Physics*, vol.34, pp.2367-2374. [18]
- Singh, D.K. and Ray, A.R. (1998) “Characterization of Grafted Chitosan Films”, *Carbohydrate Polymers*, vol.36, pp.251-255. [19]
- Rueda, D.R., Secall, T. and Bayer, R.K. (1999) “Differences in the Interaction of Water with Starch and Chitosan Films as Revealed by Infrared Spectroscopy and Differential Scanning Calorimetry”, *Carbohydrate Polymers*, vol.40, pp.49-56. [20]
- Khor, E., Wan, A.C.A., Tee, C.F. and Hastings, G.W. (1997) “Reversible Water-Swellable Chitin Gel”, *J. of Polymer Science Part-A-Polymer Chemistry*, vol.35, pp.2049-2053. [21]
- Tojima, T., Katsura, H., Nishiki, M., Tokura, S. and Sakairi, N. (1999) “Chitosan Beads with Pendant α -Cyclodextrin: Preparation and Inclusion Property to

- Nitrophenolates”, *Carbohydrate Polymers*, vol.40, pp.17-22. [22]
- Hirano, S., Nagamura, K., Zhang, M., Kim, S.K., Chung, B.G., Yoshikawa, M. and Midorikawa, T. (1999) “Chitosan Staple Fibers and Their Chemical Modification with Some Aldehydes”, *Carbohydrate Polymers*, vol.38, pp.293-298. [23]
- Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Cosani, A. and Terbojevich, M. (1999) “6-Oxychitins, Novel Hyaluronan-like Regiospecifically Carboxylated Chitins”, *Carbohydrate Polymers*, vol.39, pp.361-367. [24]
- Sugimoto, M., Morimoto, M., Sashiwa, H., Saimoto, H. and Shigemasa, Y. (1998) “Preparation and Characterization of Water-soluble Chitin and Chitosan Derivatives”, *Carbohydrate Polymers*, vol.36, pp.49-59. [25]