

NGHIÊN CỨU HIỆU ỨNG ĐỒNG VẬN CẮT MẠCH BETA-CHITOSAN BẰNG BỨC XẠ GAMMA CO-60 KẾT HỢP VỚI HYDROPEROXIT

NGUYỄN THỊ KIM LAN, NGUYỄN VĂN PHƯƠNG, NGUYỄN NGỌC DUY, NGUYỄN QUANG HIỂN

*Trung tâm Nghiên cứu Triển khai Công nghệ Bức xạ, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt nam
202A, Đường 11, P. Linh Xuân, Q. Thủ Đức, Tp. HCM*

Phone: (08) 62829159, Fax: (08) 38975921, Email: lktnguyen345@gmail.com

Tóm tắt: Beta-chitosan (β CTS) có độ acetyl $\sim 70\%$ và khối lượng phân tử (M_{w0}) $91,5 \times 10^3$ tan trong dung dịch axit lactic loãng được xử lý cắt mạch bằng H_2O_2 1% kết hợp với chiếu xạ gamma Co-60 (1,3 kGy/h) trong khoảng liều đến 16 kGy. Hiệu ứng cắt mạch được khảo sát trên cơ sở đo khối lượng phân tử (M_w) của β CTS bằng phương pháp sắc ký gel thấm qua (GPC). Kết quả cho thấy hiệu ứng đồng vận cắt mạch β CTS trong dung dịch 5% (w/v) là 58,4% ở 4 kGy và giảm đến 0% ở 16 kGy. Hiệu suất cắt mạch bức xạ là $G_s = 2,2 \mu\text{mol/J}$ và $G_s = 0,2 \mu\text{mol/J}$ được xác định tương ứng đối với dung dịch β CTS 5% có và không có H_2O_2 1%. Cấu trúc của β CTS sau khi cắt mạch được khảo sát bằng phổ hồng ngoại. Độ acetyl của β CTS hầu như không thay đổi sau chiếu xạ. Hàm lượng oligochitosan hòa tan trong nước của dung dịch β CTS chiếu xạ cũng được khảo sát.

Từ khóa: Chitosan, Hiệu ứng đồng vận, Cắt mạch, Chiếu xạ gamma.

I. MỞ ĐẦU

Chitosan (CTS), poly- β -(1-4)-D- glucosamin, được chế tạo từ quá trình acetyl hóa chitin bằng kiềm đặc, chủ yếu là alpha-chitosan (từ vỏ tôm) và beta-chitosan (từ mai mực) [1, 2]. CTS có tính chất tương hợp sinh học, phân hủy sinh học, thân thiện môi trường [3]... Vì vậy, CTS được ứng dụng rộng rãi trong công nghệ sinh học, xử lý nước, nông nghiệp, dược phẩm và thực phẩm [4]. Tuy nhiên, tính chất của CTS không chỉ phụ thuộc vào cấu trúc mà còn phụ thuộc khối lượng phân tử. CTS được xử lý cắt mạch có khối lượng phân tử thấp và oligochitosan có thể hòa tan tốt trong nước, thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, kích thích tăng trưởng cây trồng tốt hơn so với CTS ban đầu [1, 5]. Có nhiều phương pháp cắt mạch CTS tạo oligome như: thủy phân trong môi trường axit, oxi hóa, phương pháp enzyme, chiếu tia UV, chiếu xạ gamma [6]. Phương pháp cắt mạch oxi hóa sử dụng hydroperoxit (H_2O_2) đã được quan tâm nghiên cứu do quá trình dễ thực hiện và không độc đối với môi trường. Nhưng phương pháp này cũng có hạn chế là làm thay đổi màu sắc và cấu trúc sản phẩm khi sử dụng hàm lượng H_2O_2 và nhiệt độ cao [7]. Phương pháp chiếu xạ gamma Co-60 cắt mạch CTS cũng được quan tâm nghiên cứu do phương pháp này thân thiện môi trường, thực hiện ở nhiệt độ thường, không làm thay đổi cấu trúc hóa học của CTS. Nhưng nếu chỉ sử dụng một mình phương pháp này thì sự cắt mạch giảm chậm, phải cần liều xạ khá cao mới đạt được oligochitosan có khối lượng phân tử mong muốn [7,8]. Vì vậy để đạt được CTS có khối lượng phân tử thấp ở liều xạ thấp, chúng tôi kết hợp hai phương pháp trên, CTS được chiếu xạ với H_2O_2 như một tác nhân nhạy cắt mạch bức xạ. Qua đó nghiên cứu hiệu ứng đồng vận cắt mạch beta-chitosan (β CTS) bằng bức xạ gamma kết hợp với hydroperoxit.

II. THỰC NGHIỆM

1. Nguyên liệu và hóa chất

- Beta-chitosan, Việt nam
- Axit lactic, H_2O_2 và các hoá chất khác ở dạng tinh khiết.

2. Ph- ơng pháp

- Hiệu ứng đồng vận (synergic effect): Chiếu xạ cắt mạch β CTS có chất oxi hóa trong dung dịch: hòa tan β CTS với hàm l- ợng 5% (w/v) (50 g/l) trong dung dịch axit lactic nồng độ 3% (v/v) (30 ml/l). Cho H_2O_2 vào dung dịch β CTS trên với nồng độ 1%, sau đó chiếu xạ trên nguồn gamma SV-ST Co-60/B tại Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ, trong khoảng liều cho đến 16 kGy.

- Xác định hàm l- ợng oligochitosan tan trong n- ớc: Hàm l- ợng oligochitosan tan trong n- ớc pH7 (OCtan) đ- ợc xác định bằng ph- ơng pháp trung hòa dung dịch β CTS sau chiếu xạ bằng dung dịch NaOH 2M cho đến pH7, tách phần kết tủa bằng cách ly tâm, sấy khô, cân. Hàm l- ợng OTCtan đ- ợc tính theo công thức [9]:

$$\text{OCtan (\%)} = (m_0 - m_1) \times 100 / m_0 \quad (1)$$

Trong đó m_0 là hàm l- ợng β CTS khô (g) của dung dịch ban đầu, m_1 là hàm l- ợng β CTS không tan khi trung hòa.

- Xác định độ đề acetyl của β CTS bằng phổ hồng ngoại: độ đề acetyl (ĐĐA%) của β CTS đ- ợc xác định bằng phổ hồng ngoại (IR) trên máy EQUINOX55 của hãng BRUKER, USA và ĐĐA% đ- ợc tính nh- sau [10]:

$$A_{1320}/A_{1420} = 0,3822 + 0,0313 \times (100 - \text{ĐĐA\%}) \quad (2)$$

Trong đó: A_{1320} và A_{1420} là mật độ quang t- ơng ứng tại mũi 1320 và 1420 cm^{-1} .

- Xác định khối l- ợng phân tử của β CTS bằng GPC: M_w đ- ợc xác định bằng ph- ơng pháp sắc ký gel thấm qua trên máy HP-GPC 1100 của hãng Agilent USA, dùng cột Ultrahydrogel 250, 500 của hãng Water USA. Chất chuẩn sử dụng là loại polysacarit Pullulan, khối l- ợng phân tử trong khoảng 780-380000 Da. Mẫu β CTS nồng độ 0,4% trong hỗn hợp dung môi: 0,25M $CH_3COOH/0,25M CH_3COONa$ đ- ợc đ- a vào cột, tốc độ dòng 1 ml/phút, nhiệt độ 30°C.

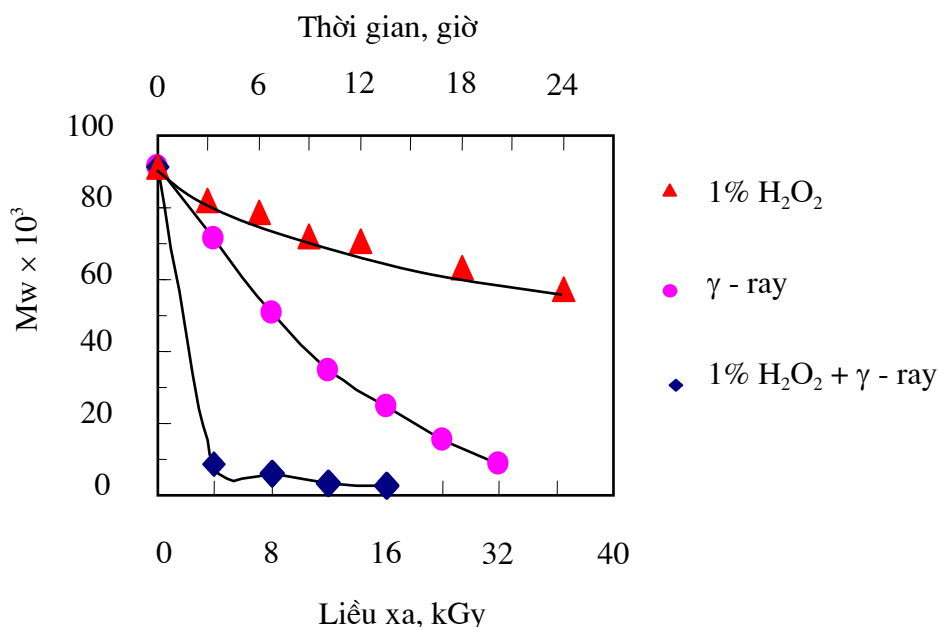
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bảng 1: KLPT (M_w) của β CTS theo thời gian oxi hóa bằng H_2O_2 1%

Thời gian, giờ	0	3	6	9	12	18	24
$M_w \times 10^3$	91,5	82,0	78,2	72,0	70,0	62,5	60,3

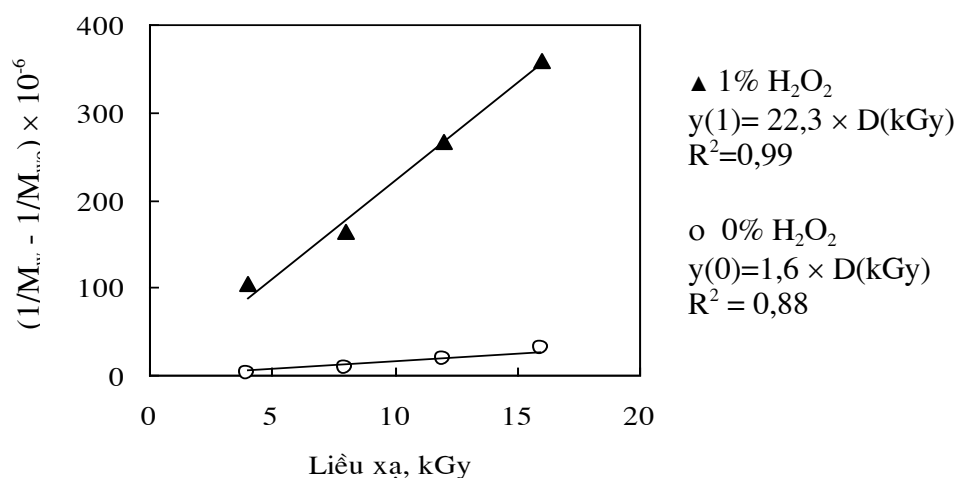
Bảng 2: KLPT (M_w) của β CTS theo liều xạ

Liều xạ, kGy		0	4	8	12	16	24	32
$M_w \times 10^3$	0% H_2O_2	91,5	71,6	50,5	34,9	24,4	15,2	8,9
	1% H_2O_2	91,5	8,6	5,7	3,6	2,7	-	-



Hình 1: Sự phụ thuộc KLPI M_w của β CTS theo liều xạ và thời gian phản ứng

Từ kết quả bảng 1, 2, hình 1 cho thấy hiệu quả cắt mạch làm giảm M_w của β CTS trong dung dịch có 1% H_2O_2 không chiếu xạ chậm hơn so với chiếu xạ dung dịch β CTS không có H_2O_2 . So sánh cả 3 ph-ong pháp thì hiệu ứng đồng vận (kết hợp chiếu xạ gamma và H_2O_2) làm cắt mạch phân tử β CTS nhanh nhất, đặc biệt trong khoảng liều từ 0 đến 4 kGy. Dung dịch β CTS 5%/H₂O₂ 1% có độ suy giảm khối l-ợng phân tử rất nhanh (90,5%, bảng 3). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Kang et al. [6]. Nhóm tác giả khẳng định với sự cắt mạch kết hợp bức xạ gamma và hydroperoxit thì làm giảm khối l-ợng phân tử CTS nhanh hơn so với chỉ sử dụng một mình bức xạ gamma hay hydroperoxit.



Hình 2: Sự phụ thuộc $(1/M_w - 1/M_{w0})$ theo liều xạ

Từ bảng 2 xác định hiệu suất cắt mạch bức xạ Gs theo công thức [11] nh- sau:

$$(1/M_w - 1/M_{w_0}) = G_s \times D \times d \times 1000/2C \quad (3)$$

$$\text{Đặt } y = (1/M_w - 1/M_{w_0})$$

Trong đó M_{w_0} , M_w là KLPT của β CTS ban đầu và tại các liều xạ khác nhau, D : liều xạ hấp thụ (kGy), d : tỷ trọng dung dịch (g/cm^3), C : nồng độ dung dịch (g/lít), G_s : hiệu suất cắt mạch bức xạ ($\mu\text{mol/J}$).

Từ kết quả hình 2 tính được hiệu suất cắt mạch bức xạ đối với dung dịch β CTS 5% có và không có H_2O_2 1% tương ứng là $G_s = 2,2 \mu\text{mol/J}$ và $G_s = 0,2 \mu\text{mol/J}$. Như vậy khi có H_2O_2 trong dung dịch β CTS thì hiệu suất cắt mạch bức xạ tăng lên khoảng 10 lần. Các tác giả trong công trình [7] so sánh hiệu suất cắt mạch bức xạ của mẫu CTS chứa 5,7% H_2O_2 cao gấp 20 lần so với mẫu chiếu xạ không có H_2O_2 . Sự khác biệt này có thể là do nồng độ H_2O_2 sử dụng, suất liều, nồng độ và loại CTS sử dụng ban đầu.

Ngoài ra liều xạ cắt mạch giảm khoảng 8 lần, từ 32 kGy trong dung dịch 0% H_2O_2 giảm xuống còn 4 kGy trong dung dịch chứa 1% H_2O_2 (bảng 2).

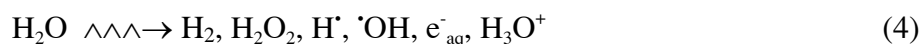
Bảng 3: Hiệu ứng đồng vận cắt mạch β CTS bằng bức xạ gamma và H_2O_2

Ký hiệu mẫu		Suy giảm KLPT M_w , % = $100 \times (M_{w_0} - M_w)/M_{w_0}$			
		4 kGy (3h)	8 kGy (6 h)	12 kGy (9 h)	16 kGy (12 h)
a	Ox (1% H_2O_2)	10,4	14,5	21,3	23,5
b	γ -Ray (1,33 kGy/h)	21,7	44,8	61,9	73,4
c	γ -Ray + Ox	90,5	93,8	96,2	97,1
Hiệu ứng đồng vận %, d					
d	$d = c - (a+b)$	58,4	34,5	13,0	0,2

Hiệu ứng đồng vận (bức xạ gamma & H_2O_2) được định nghĩa là tác dụng toàn phần của hai thành phần phản ứng đồng thời lớn hơn tổng tác dụng của các thành phần khi tác dụng riêng rẽ.

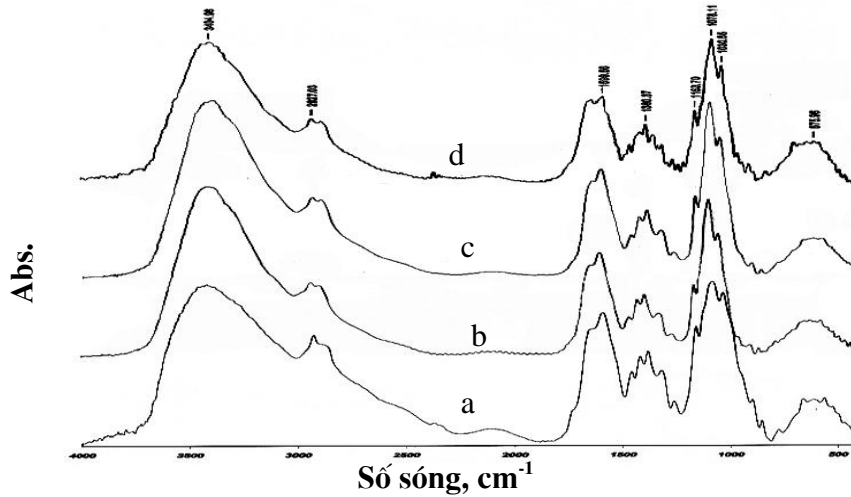
Hiệu ứng đồng vận khoảng 58,4% ở liều xạ 4 kGy, tiếp tục chiếu xạ đến 16 kGy hiệu ứng đồng vận là 0,2%. Hiệu ứng đồng vận chiếu xạ tia γ và 1% H_2O_2 làm tăng hiệu suất cắt mạch β CTS so với chỉ chiếu xạ tia γ . Điều này có thể giải thích là các sản phẩm phân ly bức xạ nước (4) tương tác cắt mạch liên kết glycozit của β CTS mà chủ yếu là gốc tự do hydroxy ($\cdot\text{OH}$) [6]. Nếu thêm H_2O_2 vào dung dịch β CTS thì nồng độ gốc $\cdot\text{OH}$ tăng lên theo phản ứng (5).

Gốc tự do $\cdot\text{OH}$ cắt mạch liên kết 1-4 glycozit làm giảm khối lượng phân tử β CTS theo phản ứng (6, 7).



Bảng 4: ĐDA và KLPT M_w của β CTS trong dung dịch theo liều xạ

Thông số khảo sát	βCTS ban đầu	βCTS (H ₂ O ₂ & bức xạ gamma)			
		4 kGy	8 kGy	12 kGy	16 kGy
ĐĐA%	70,4	70,5	73,2	-	74,6
M _w	91.500	8.600	5.600	3.600	2.700



Hình 3: Phổ đồ IR của các mẫu βCTS theo liều xạ

a) βCTS ban đầu ; b) Ox & 4 kGy; c) Ox & 8 kGy; d) Ox & 16 kGy

Kết quả bảng 3 và hình 3 cho thấy khi cắt mạch βCTS trong dung dịch có 1% H₂O₂ trong khoảng liều chiếu xạ cho đến 16 kGy, ĐĐA thay đổi không đáng kể.

Bảng 5: Hàm l- ợng OCTan (%) trong n- ớc pH7 của βCTS

	Liều xạ, kGy	4	8	12	16	24	32
OCTan, %	0% H ₂ O ₂	-	45,0	-	61,9	69,8	78,2
	1% H ₂ O ₂	74,9	86,0	93,9	100,0	-	-

Hàm l- ợng oligochitosan tan trong n- ớc (OCTan) của mẫu βCTS ĐĐA70% trong dung dịch 0% H₂O₂ đạt ~78 % tại liều xạ 32 kGy. Trong khi đó hàm l- ợng OCTan trong dung dịch 1% H₂O₂ là 100% tại liều xạ 16 kGy. Từ kết quả thí nghiệm về độ tan của oligochitosan trong n- ớc pH7 và đo khối l- ợng phân tử M_w bằng sắc ký gel thấm qua (GPC) chúng tôi thấy rằng oligochitosan từ βCTS 5% & H₂O₂ 1% chiếu xạ 16 kGy có M_w = 2.700 thì tan hoàn toàn trong n- ớc.

IV. KẾT LUẬN

- Hiệu ứng đồng vận (bức xạ gamma Co-60 & H₂O₂) cắt mạch làm giảm khối l- ợng phân tử βCTS trong dung dịch là rất hiệu quả.

- Hàm l- ợng OCTan trong dung dịch βCTS 5% & H₂O₂ 1% đạt ~75% tại liều xạ 4 kGy và 100% tại liều 16 kGy.

- Độ đề acetyl của βCTS sau chiếu xạ có và không có 1% H₂O₂ trong khoảng liều đến 16 kGy thay đổi không đáng kể.

- Hiệu ứng đồng vận làm giảm liều xạ cắt mạch β CTS trong dung dịch 5% khoảng 8 lần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Qin C. et al., Moisture retention and antibacterial activity of modified chitosan by hydrogen peroxide, *J. Appl. Polym. Sci.*, 86, pp. 1724-1730, 2002.
- [2]. Qin C. et al., Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan, *Polym. Deg. Stab.*, 76, pp. 211-218, 2002.
- [3]. Shao J. et al., Studies on preparation of oligoglucosamine by oxidative degradation under microwave irradiation, *Polym. Deg. Stab.*, 82, pp. 395-398, 2003.
- [4]. Bùi Ph-ớc Phúc và ccs., Nghiên cứu chế tạo oligochitosan bằng ph-ong pháp chiếu xạ dung dịch chitosan, *Tạp chí Hóa học và Ứng dụng*, Số 9 (57), Tr. 38-41, 2006.
- [5]. Luan L.Q. et al., Biological effect of irradiated chitosan on plants in vitro, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 41, pp. 49-57, 2005.
- [6]. Kang B. et al., Synergetic degradation of chitosan with gamma radiation and hydrogen peroxide, *Polym. Deg. Stab.*, 92, pp. 359-362, 2007.
- [7]. Lu Y. et al., Radiation degradation of chitosan in the presence of H_2O_2 , *Chinese J. Polym. Sci.*, 22, pp. 439-444, 2004.
- [8]. Nguyễn Quốc Hiến và ccs., Nghiên cứu chế tạo oligochitosan bằng kỹ thuật bức xạ, *Tạp chí Hóa học*, Số 2 (38), Tr. 22-24, 2000.
- [9]. Choi W.S. et al., Preparation of chitosan oligomers by irradiation, *Polym. Deg. Stab.*, 78, pp. 533-538, 2001.
- [10]. Brugnerotto J. et al., An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer*, 42, pp. 3569-3580, 2001.
- [11]. Wasikiewicz J.M. et al., Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical, ultraviolet methods, *Radiati. Physi. Chem.*, 73, pp. 287-295, 2005.

STUDY ON SYNERGIC EFFECT FOR DEGRADATION OF CHITOSAN IN SOLUTION WITH GAMMA Co-60 RADIATION AND HYDROGEN PEROXIDE.

Abstract: Chitosan with deacetylation degree (DD) 70% and mass average molecular weight (M_{w0}) 91.5×10^3 in dilute lactic acid solution containing H_2O_2 (1%) was effectively degraded by irradiation with gamma Co-60 radiation (1.3 kGy/h) in low dose range up to 16 kGy. The degradation effect was studied by measurement of M_w with gel permeation chromatography (GPC). Based on M_w results, the synergic effect of degradation was of 58.4% at 4 kGy and gradually decreased to zero at 16 kGy. Values of scission yield (Gs) were found out to be $G_s = 2.2 \mu\text{mol/J}$ and $G_s = 0.2 \mu\text{mol/J}$ for 5% chitosan with and without 1% hydroperoxide, respectively. In addition, the structure of degraded product was characterized by Fourier Transform infrared (FTIR) spectroscopy. The DD values of chitosan were almost unchanged by irradiation of chitosan solution either with or without 1% hydroperoxide. Water soluble content of oligochitosan in irradiated chitosan solution was also investigated.