



УДК 547.458:547.995.12:543.422.4

ИК-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ХИТИНА

© 1995 г. В. П. Глазунов, С. Е. Одинокоев

Тихоокеанский океанологический институт ДВО РАН,
690041, Владивосток, ул. Балтийская, 43

Поступила в редакцию 27.12.94 г.

Предложен способ определения степени ацетилирования хитина по ИК-спектрам его N-трифтороацетата в пленках, полученных из раствора в гексафторизопропанол. С этой целью осуществлено трифторацетилирование свободных NH_2 -групп хитина в его растворе в гексафторизопропанол ангидридом трифторуксусной кислоты и по полосе карбонила трифторацетамида (1720 см^{-1}) определено содержание трифторацетилированных NH_2 -групп. Предлагаемый спектральный способ определения степени ацетилирования хитина применим для образцов хитина, растворимых в гексафторизопропанол.

Ключевые слова: ИК-спектры; степень ацетилирования; хитин; трифторацетилирование.

Природный полисахарид хитин, поли(N-ацетил-D-глюкозамин), широко распространен в природе. Использование самого хитина затруднено из-за его плохой растворимости. Хитозан, получаемый из хитина путем частичного или полного деацетилирования щелочью, а также другие производные, полученные на основе хитозана, обладают лучшей растворимостью и находят применение в различных отраслях промышленности, таких, как химическая, медицинская, и в сельском хозяйстве [1 - 3]. Физические и химические свойства этих полимеров зависят от достигнутой степени деацетилирования хитина. Полная характеристика образцов требует точных и быстрых методов определения числа свободных остатков глюкозамина.

Степень ацетилирования хитина и хитозана определяется химическими методами: кислотным гидролизом ацетамидных групп с последующим титрованием образующихся свободной уксусной кислоты [4] и аминогрупп [5]; определением свободных аминогрупп реакцией с нингидрином [6] и пикриновой кислотой [7]; дезаминированием остатков глюкозамина азотистой кислотой [8]. Химические методы достаточно достоверны, но относительно сложны в исполнении и требуют много времени.

Спектральные методы более просты, требуют меньше времени и достаточно достоверны при определении степени ацетилирования хитина. Содержание N-ацетата может быть определено с помощью ИК-спектроскопии [9 - 12], УФ-спектрометрии [13, 14], измерения КД [15] и ЯМР-спек-

троскопии [16]. Для хитозана, который в отличие от хитина обладает лучшей растворимостью, был предложен способ определения степени ацетилирования по ИК-спектрам пленок, полученных из его раствора в водной уксусной кислоте. Измерение производится по отношению интенсивности в максимуме полосы поглощения колебания карбонила ацетамидной группы (Амид I) и полосы поглощения валентного колебания гидроксильных групп [12]. При очень низком содержании N-ацетатов (менее 10%) большую точность дают измерения по отношению интенсивности полосы Амид I к полосе валентного $-\text{CH}$ -колебания при 2867 см^{-1} [10] или измерения с помощью КД-спектроскопии [15]. Для хитина из-за его плохой растворимости эти методы неприемлемы. Для него был предложен метод определения степени ацетилирования по ИК-спектрам образцов в твердой фазе, которые в виде порошков запрессовываются в таблетки из бромистого калия [9]. Измерение осуществляется по отношению интенсивности полосы поглощения деформационного колебания NH ацетамидной группы (Амид II) и полосы поглощения валентного колебания $-\text{CH}$ при 2878 см^{-1} . Трудности, возникающие при количественных измерениях интенсивности ИК-полос для твердых образцов, связаны прежде всего с приготовлением для анализа самих полисахаридных образцов и степенью их неоднородности, приводящей к рассеиванию излучения и искажению ИК-спектров.

Предлагаемый в настоящей работе спектральный метод определения степени ацетилирования (в %) хитина ($100 - \alpha$, где α - содержание свободных

аминогрупп) лишен этих недостатков, так как основан на измерениях ИК-спектров пленок хитина, полученных из его растворов в гексафторизопропанол (HFIP). Растворимость хитина в HFIP [17] позволяет производить N-трифторацетилирование присутствующих в хитине свободных аминогрупп. В работе [18] было показано, что обработка метилгликозидов 2-ацетиламиносахаров в растворе трифторуксусной кислоты ангидридом этой же кислоты при 20°C быстро дает их метил-2-ацетиламино-3,4,6-три-O-трифторацетилгликозиды и лишь при выдерживании при 100°C в течение 48 ч происходит переамирирование, приводящее к метил-2-трифторацетиламино-3,4,6-три-O-трифторацетилгликозидам. Предлагаемые нами условия трифторацетилирования свободных аминогрупп в растворе хитина (20 ч, 20°C, см. "Экспер. часть") не вызывают трансамирирования ацетиламинных групп.

При обработке раствора хитина в HFIP ангидридом трифторуксусной кислоты образуются O- и N-трифторацетаты. В ИК-спектре пленки, полученной из такого раствора, присутствует интенсивная полоса 1794 см⁻¹, принадлежащая валентному колебанию карбонила 3,6-O-бистрифторацетатов. O-Трифторацетильные группы удаляли из O,N-трифторацетилированного хитина обработкой пленок спиртовым раствором аммиака (см. "Экспер. часть"). В ИК-спектре пленки N-трифторацетилированного хитина полоса поглощения карбонила, принадлежащая трифторацетиламиниду, находится при 1720 см⁻¹, достаточно далеко от полосы Амид I ацетиламинной группы хитина (1660 см⁻¹). Это позволяет по интенсивности в максимуме полосы 1720 см⁻¹ количественно определять содержание трифторацетилированных аминогрупп, т.е. свободных NH₂-групп в исходном хитине. Вклад поглощения от полосы Амид I (1660 см⁻¹) в максимуме поглощения полосы карбонила трифторацетиламина (1720 см⁻¹) составляет менее 2%, что было измерено по ИК-спектру исходного хитина в пленке, полученной из его раствора в HFIP.

Содержание трифторацетиламина в трифторацетилированном хитине определяли из ИК-спектров пленок по отношению (*R*) интенсивностей в максимуме полос поглощения валентного колебания карбонила трифторацетиламина (1720 см⁻¹) и валентного колебания сахарного кольца (1073 см⁻¹), выбранного нами в качестве внутреннего стандарта. С этой целью нами были исследованы в качестве моделей N-трифторацетилированные производные хитозанов с различной степенью ацетилирования. N-Трифторацетилированные производные хитозанов получали следующим способом. Производили полное O,N-трифторацетилирование хитозана простой процедурой обработки рас-

твора хитозана в трифторуксусной кислоте ангидридом этой же кислоты [19] (20 ч, 20°C, см. "Экспер. часть"). O-Трифторацетильные группы удаляли из O,N-трифторацетилированного хитозана обработкой пленок спиртовым раствором аммиака (см. "Экспер. часть"). В ИК-спектре N-трифторацетилированного хитозана в пленке полоса поглощения карбонила трифторацетиламина имеет частоту 1712 см⁻¹, которая несколько ниже, чем в пленках N-трифторацетилированных производных хитина 1720 см⁻¹. В то же время частота полосы Амид II плоского деформационного колебания NH-групп (1566 см⁻¹) для N-трифторацетилированных производных хитозана немного выше, чем для N-трифторацетилированных производных хитина (1560 см⁻¹). Наблюдаемое различие в значениях частот для карбониллов трифторацетиламина (1720, 1712 см⁻¹) и Амид II (1560 и 1566 см⁻¹) в ИК-спектрах N-трифторацетилированных производных хитина и хитозана соответственно может быть обусловлено влиянием водородных связей >C=O...H-N<, которые в хитине, по данным рентгеноструктурного анализа, образуются между соседними цепями полимера [20]. N-Трифторацетилированный хитозан можно рассматривать как хитин, где вместо ацетатов присутствуют трифторацетаты. Здесь также, вероятно, образуются водородные связи типа >C=O...H-N<, более прочные, чем в хитине, так как известно, что с увеличением прочности водородной связи частота валентного колебания карбонила понижается, а плоского деформационного колебания повышается.

Нами были измерены отношения (*R*) интенсивности в максимуме полосы (1712 см⁻¹) к интенсивности в максимуме полосы сахарного кольца (1073 см⁻¹) в качестве внутреннего стандарта для N-трифторацетилированных производных хитозанов с различной степенью ацетилирования. Экстраполяция этих значений *R* к полностью дезацетилированному хитину (рисунок) дает значение 1.33, которое позволяет измерять содержание трифторацетиламина, эквивалентное содержанию свободных NH₂-групп, по ИК-спектрам N-трифторацетилированных хитинов в пленках согласно уравнению

$$\alpha = (R/1.33) \times 100\%,$$

где α – содержание свободных NH₂-групп.

Предлагаемым способом мы измерили степень ацетилирования (как 100 – α , %) для трех образцов хитина из разных источников: 80 - 81% для хитина-1 из панциря краба камчатского; 88 - 89% для хитина-2 из хитиновых тяжей конечностей краба камчатского; 87 - 88% для хитина-3 из пера кальмара тихоокеанского. Содержание ацетатов, определенное для хитина-1 из панциря краба

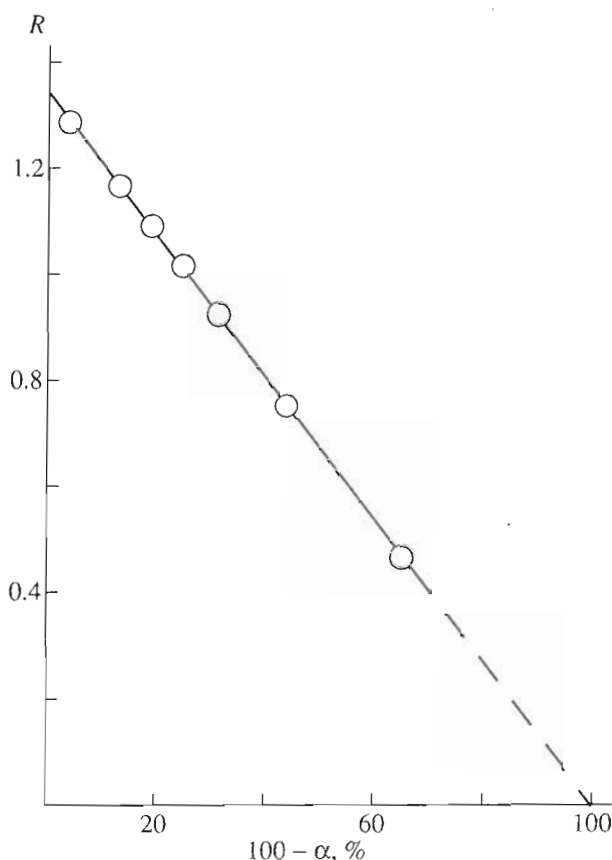
камчатского (80%), близко к содержанию ацетатов (78%) для хитина из панциря красного краба (японский), определенному в работе [17] химическим методом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы хитина и хитозана. Хитин-1 из панциря краба камчатского, хитин-2 из хитиновых тяжей конечностей краба камчатского и хитин-3 из пера кальмара тихоокеанского получали при одинаковых условиях депротенирования и диминерализации, как описано в работе [21].

Пять образцов хитозана было получено из хитина-1 щелочным дезацетилением в 40% NaOH при 110°C. Различная степень дезацетиления (96, 88, 82, 75 и 69%) достигалась варьированием времени дезацетиления. Хитозаны с высоким содержанием ацетатов (50% и более), полученные из хитина щелочным дезацетилением, не растворяются в трифторуксусной кислоте. Поэтому два образца хитозана с высоким содержанием ацетатов (45 и 65%) были получены ацетилением хитозана с высокой степенью дезацетиления (96%) ангидридом уксусной кислоты в водно-метанольной среде. Для этого 100 мг хитозана со степенью дезацетиления 96% растворяли в 5 мл 1% водной уксусной кислоты и добавляли 6 мл метанола. В полученный раствор хитозана добавляли для первого образца 30, а для второго 50 мг ангидрида уксусной кислоты и выдерживали растворы 1 ч при 20°C. Реакцию ацетиления останавливали добавлением в реакционную смесь 10% раствора аммиака в метаноле. Полученный осадок отмывали водой на фильтре до нейтрального значения pH, сушили метанолом и серным эфиром. Степень ацетиления всех образцов хитозанов определяли по ИК-спектрам, согласно методу [12].

Получение N-трифторацетилованных производных хитина. 10 мг хитина растворяли в 1 мл HFIP (Fluka AG. Chem. Fabrik CN-9470 Buchs) на магнитной мешалке в течение 20 ч при 20°C. В полученный вязкий раствор добавляли 0,2 - 0,3 мл ангидрида трифторуксусной кислоты (марки ч.) и выдерживали 20 ч при 20°C на магнитной мешалке. Дальнейшее выдерживание раствора не показывало увеличения содержания трифторацетамида. Около 0,1 - 0,2 мл раствора наносили на окно из фтористого кальция, слегка подсушивали на воздухе до образования пленки и досушивали в сушильном шкафу при 100°C в течение 15 мин. Остывшую пленку на подложке обрабатывали 1 мин 1 мл 5% раствора аммиака в этаноле. После этого пленку промывали дважды по 2 мл этанола, сушили 1 ч в сушильном шкафу при 170 - 180°C. Высушивание пленок при такой температуре полностью удаляет влагу в образцах хитина и не приводит к их термическому разложению [22].



Зависимость величины отношения интенсивности (R) в максимуме полосы карбонила трифторацетамида (1712 см^{-1}) и сахарного кольца (1073 см^{-1}) в ИК-спектрах пленок N-трифторацетилованных производных хитозана от степени ацетилования.

Получение N-трифторацетилованных производных хитозана. 10 мг хитозана растворяли в 1 мл трифторуксусной кислоты (марки ч., фракция, кипящая при 72°C, перегнанная над небольшим количеством пятиокси фосфора) в течение 2 ч при 20°C на магнитной мешалке. В полученный вязкий раствор добавляли 0,2 - 0,3 мл ангидрида трифторуксусной кислоты и выдерживали 20 ч при 20°C на магнитной мешалке. Пленки получали аналогично описанному выше для N-трифторацетилованных производных хитина. О полноте N-трифторацетилования судили по насыщению величины отношения (R) интенсивности в максимуме полосы поглощения карбонила трифторацетамида 1712 см^{-1} к интенсивности в максимуме полосы поглощения колебания сахарного кольца 1073 см^{-1} от времени реакции после дезацетилования O-трифторацетилованных групп 5% раствором аммиака в этаноле (аналогично описанному выше для пленок хитина). Полноту N-трифторацетилования также подтверждает совпадение отношения содержания N-трифторацетатов для любой пары N-трифторацетилованных

производных образцов хитозана с отношением содержания в них свободных аминогрупп.

Регистрация ИК-спектров. ИК-спектры хитина, хитозана и их производных в пленках регистрировали на подложках из фтористого кальция на спектрофотометре Spexord M80 (Karl Zeiss, Jena). Пленки перед регистрацией сушили 1 ч в сушильном шкафу при 170 - 180°C. Поглощение реперных полос в спектрах не превышало 1. Прибор калибровали по известным частотам полос пленки полистирола с точностью $\pm 1 \text{ см}^{-1}$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Muzzarelli R.A.A. *Natural Chelating Polymers*. N.Y.: Pergamon Press, 1973. P. 177 - 227.
- Muzzarelli R.A.A. *Chitin*. Oxford: Pergamon Press, 1977.
- Chitin in Nature and Technology* / Eds R.A.A. Muzzarelli, C. Jeuniaux, G.W. Gooday. N.Y.: Plenum Press, 1986.
- Kurita K., Sannan T., Iwakura Y. // *Makromol. Chem.* 1977. V. 178. P. 3197 - 3202.
- Sannan N., Kurita K., Iwakura Y. // *Makromol. Chem.* 1976. V. 177. P. 3589 - 3595.
- Fahmy A.R., Neiderweiser A., Pataki G., Braner M. // *Helv. Chim. Acta*. 1961. V. 44. P. 2022 - 2026.
- Neugebauer W.A., Neugebauer E., Brzezinski R. // *Carbohydr. Res.* 1989. V. 189. P. 363 - 367.
- Streker G., Piece-Cretel A., Fournet B., Spik G., Montrenil J. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 111. P. 17 - 26.
- Sannan N., Kurita K., Ogura K., Iwakura Y. // *Polymer*. 1978. V. 19. P. 458 - 459.
- Miy M., Iwamoto R., Yoshikawa S., Mima S. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1980. V. 2. P. 323, 324.
- Moore G.K., Roberts G.A.F. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1980. V. 2. P. 115, 116.
- Domzy J.G., Roberts G.A.F. // *Makromol. Chem.* 1985. V. 186. P. 1671 - 1677.
- Aiba S. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1986. V. 6. P. 173 - 176.
- Muzzarelli R.A.A., Rocchetti R. // *Carbohydr. Polym.* 1985. V. 5. P. 461 - 472.
- Domard A. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1987. V. 9. P. 333 - 336.
- Hirano S., Tsuneyasu S., Kondo Y. // *Agric. Biol. Chem.* 1981. V. 45. P. 1335 - 1339.
- Rutherford F.A., Austin P.R. // *Proc. of the I Internat. Conf. on Chitin / Chitosan* / Eds R.A.A. Muzzarelli, E.R. Pariser. Cambridge, Massachusetts: Massachusetts Institute of Technology, 1978. P. 182 - 192.
- Nilsson B., Svenssen S. // *Carbohydr. Res.* 1978. V. 63. P. 377 - 380.
- Hirano S., Kondo Y. // *Chem. Soc. Jpn.* 1982. P. 1622 - 1625.
- Minke R., Blakwell J. // *J. Mol. Biol.* 1978. V. 120. P. 167 - 181.
- No H.K., Meyers S.P., Lee K.S. // *J. Agricult. and Food Chem.* 1989. V. 37. P. 575 - 579.
- Kataoka S., Ando T. // *Kobunshi Ronbunshu*. 1979. V. 36. P. 175 - 181.

Determination of Chitin Acetylation Degree by Infrared Spectroscopy

V. P. Glazunov and S. E. Odinkov

*Pacific Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Far East Division,
ul. Baltiiskaya 43, Vladivostok, 690041 Russia*

Abstract – A method for determination of the degree of chitin acetylation by IR spectroscopy of the films prepared from a solution of chitin *N*-trifluoroacetate in hexafluoroisopropanol was developed. For this purpose, free NH_2 -groups of chitin were trifluoroacetylated by trifluoroacetic anhydride in hexafluoroisopropanol; and a degree of trifluoroacetylated amino groups was determined using the absorption band of trifluoroacetamide (1720 cm^{-1}). The method proposed is applicable for the hexafluoroisopropanol-soluble chitin samples.

Key words: IR spectra, degree of acetylation, chitin, trifluoroacetylation.