



УДК 547.458:547.995.12:543.422.4

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АМИНОГРУПП В ХИТОЗАНЕ

© 1999 г. В. П. Глазунов[#], В. И. Горбач

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159*

Поступила в редакцию 20.05.98 г. Принята к печати 15.09.98 г.

Разработан спектрофотометрический метод определения содержания аминокрупп в хитозане с использованием анионного красителя – натриевой соли 4-(2-гидрокси-1-нафтилазо)бензолсульфокислоты (тропеолин 000-1). Спектры в видимой области растворов смеси хитозана и красителя в 1% уксусной кислоте свидетельствуют об образовании комплекса красителя с протонированными аминокгруппами хитозана состава 1 : 1, что отражается в уменьшении максимума поглощения красителя при 483 нм. С использованием семи образцов хитозана с известной степенью *N*-ацетилирования получена калибровочная прямая – линейная зависимость между уменьшением поглощения при 483 нм в спектре комплекса хитозан–краситель и молярной концентрацией аминокгрупп. Предлагаемый метод позволяет с большой точностью определять содержание аминокгрупп в хитозанах и, следовательно, рассчитывать их степень *N*-ацетилирования.

Ключевые слова: спектрофотометрия в видимой области; хитозан, степень N-ацетилирования; анионный краситель (тропеолин 000-1).

Хитозан представляет собой полисахарид, состоящий из остатков *D*-глюкозамина, связанных β-1,4-гликозидными связями. Источником его получения является природный полисахарид – хитин, полимер *N*-ацетил-*D*-глюкозамина, компонент покровных тканей всех членистоногих и клеточных стенок грибов. Наиболее употребительным сырьем для производства хитина служат панцири крабов. Хитозан получают из хитина путем частично или полного его дезацетилирования щелочью.

Коммерческие образцы хитозана с молекулярными массами 10–600 кДа обычно содержат от 5 до 30% *N*-ацетильных групп (отношение числа *N*-ацетилированных остатков глюкозамина к общему числу мономерных единиц × 100). Значительный прогресс достигнут и в получении высоко дезацетилированных образцов хитозана [1, 2], содержание *N*-ацетатов в которых составляет менее 5%. Так как большинство химических и физических свойств полисахарида тесно связаны с этим параметром [1, 3, 4], важно уметь определять его простыми и точными методами.

К настоящему времени существует достаточно много методов для определения содержания *N*-ацетильных групп в хитозане. Широко применяются для этой цели спектральные методы – как наиболее простые и быстрые. Однако их критический анализ показал, что наблюдаются значительные расхождения при определении количест-

ва *N*-ацетильных групп не только разными спектральными методами, но также и одинаковыми – при различных методиках измерения [5, 6]. Особенно это заметно для образцов хитозана с низким (менее 10%) содержанием *N*-ацетильных групп. Для анализа таких хитозанов среди оптических спектральных методов наиболее приемлемы методы КД- [6] и ИК-спектроскопии [7]. Более точен метод КД, в котором проводится прямое измерение эллиптичности отрицательной полосы *N*-ацетатов при 210 нм.

Метод спектрофотометрии, как относительно более простой и доступный при высокой точности измерения, несомненно стал бы полезным при анализе образцов хитозана с низким содержанием *N*-ацетатов. Ранее была показана возможность использования для анализа содержания аминокгрупп в хитозане спектрофотометрии в видимой области с применением красителей (натриевых солей 4-(2-гидрокси-1-нафтилазо)бензолсульфокислоты, а также подобных дисульф- и трисульфокислот) [8, 9]. В этих работах предлагается определять содержание аминокгрупп по изменению интенсивности полосы поглощения красителей в области 485–505 нм при титровании раствора красителя раствором хитозана [8] или методом равновесной гетерогенной адсорбции красителя из его раствора хитозаном [9]. Стандартные образцы хитозана, используемые для построения калибровочной прямой, содержали от 15 до 60% *N*-ацетатов, количество которых опре-

[#] Автор для переписки (тел.: (4232) 31-14-09; факс: 7(4232) 31-40-50).

деляли методом ИК-спектроскопии [10]. Применение спектрофотометрии в видимой области с использованием красителей для анализа хитозанов с низким содержанием *N*-ацетатов, таким образом, остается нерешенным.

В настоящей работе мы предлагаем относительно простой в исполнении и точный спектрофотометрический метод определения количества свободных аминогрупп для хитозанов в водном растворе 1% уксусной кислоты с применением красителя тропеолина 000-I – натриевой соли 4-(2-гидрокси-1-нафтилазо)бензолсульфо кислоты. Содержание *N*-ацетатов в стандартных образцах хитозана определено по КД-спектрам согласно работе [6], что позволило применить предлагаемый нами метод для образцов с разной степенью *N*-ацетилирования, в том числе и с низкой.

Краситель тропеолин 000-I в водном растворе 1% уксусной кислоты в видимой области спектра имеет интенсивную полосу с максимумом поглощения при 483 нм и плечом при 417 нм (рис. 1, 1). При добавлении к раствору красителя раствора хитозана наблюдается уменьшение поглощения этой полосы вплоть до ее полного исчезновения, причем зависимость между уменьшением поглощения красителя при 483 нм (A_{483}) и концентрацией аминогрупп в хитозане имеет линейный характер в области соотношения молярных концентраций краситель : ионизированная аминогруппа хитозана от 1 : 0 до 1 : 1 (рис. 2). По окончании титрования в спектре наблюдается лишь широкая полоса комплекса краситель–хитозан с максимумом поглощения при 435 нм (рис. 1, 2). При достижении равенства концентраций аминогрупп хитозана и красителя дальнейшее добавление хитозана не изменяет (с учетом разбавления) значение A_{483} . Линейная зависимость величины ΔA_{483} от концентрации добавленного к красителю хитозана позволяет выбрать этот параметр для измерения количества аминогрупп в полисахариде. С этой целью мы проверили зависимость величины ΔA_{483} от молярной концентрации аминогрупп в добавляемом к красителю хитозане (численно равной молярной концентрации остатков глюкозамина) для семи образцов хитозана (I)–(VII) с содержанием *N*-ацетатов в них (определено методом КД) от 3 до 43% (рис. 3). Для трех разных концентраций каждого из семи образцов хитозана в растворе 1% водной уксусной кислоты были получены смеси с красителем, где молярные отношения концентраций краситель–аминогруппа изменялись от 6 : 1 до 1.2 : 1. Как видно из рис. 3, все измерения хорошо описываются линейной зависимостью (1) с коэффициентом корреляции 0.995, рассчитанному по методу наименьших квадратов:

$$C_{\text{NH}_2} = \Delta A_{483} / 15580, \quad (1)$$

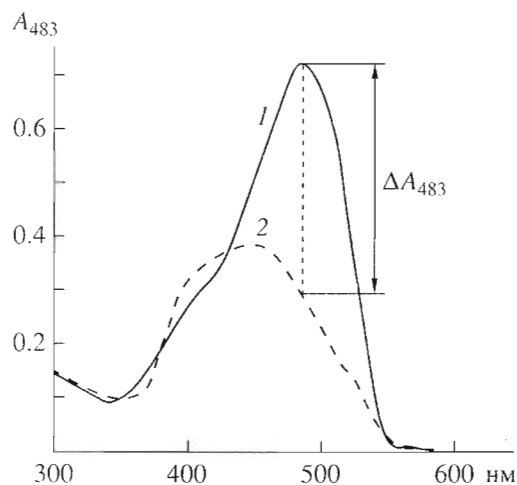


Рис. 1. Спектр красителя тропеолина 000-I (1) и комплекса краситель–хитозан (2) в водном растворе 1% уксусной кислоты.

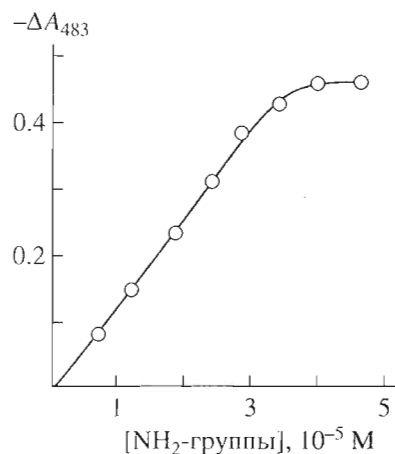


Рис. 2. Зависимость величины убыли поглощения полосы 483 нм ΔA_{483} в спектре красителя (45.6 мкМ) от концентрации добавленного в раствор хитозана (1).

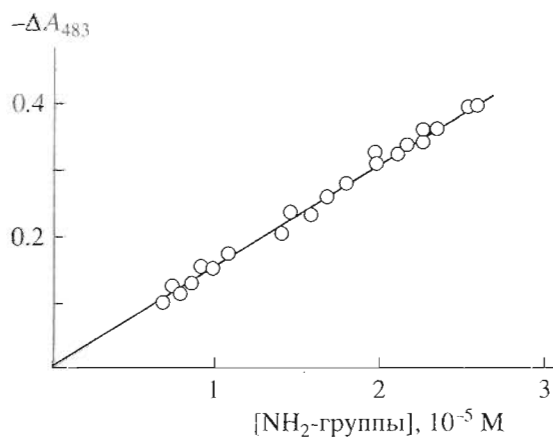


Рис. 3. Зависимость убыли поглощения полосы 483 нм в спектре красителя от молярной концентрации аминогрупп при титровании различными образцами хитозана.

где 15580 – молярный коэффициент убыли поглощения при 483 нм, когда весь краситель связан с хитозаном. Концентрацию аминогрупп в хитозане в процентах (выраженную как отношение числа остатков глюкозамина в полисахариде, имеющих массу 161 Да, к общему числу мономерных единиц) можно определить предлагаемым методом, согласно уравнению (2):

$$C_{\text{NH}_2}, \% = [(\Delta A_{483} \times 161 / 15580) / C] \times 100, \quad (2)$$

где C – концентрация хитозана в мг/мл.

Тогда процентное содержание N -ацетатов в хитозане можно вычислить по разности

$$C_{\text{NHAc}} = 100 - C_{\text{NH}_2}. \quad (3)$$

Относительная ошибка в измерении содержания NHAc -групп (%) не превышает $\pm 5\%$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы хитозана. Хитин из панциря камчатского краба получали согласно методу [11]. Три образца хитозана с содержанием N -ацетатов (%) 3 (M 25 кДа), I, 14 (M 100 кДа), II и 22 (M 250 кДа), III были получены из хитина щелочным дезацелированием в 40% NaOH при 110°C как описано ранее [12]. Из образца хитозана (I) ацелированием уксусным ангидридом в водно-метанольной среде, согласно методу [13], нами были получены еще три образца хитозана с низким содержанием N -ацетатов 5 – IV, 9 – (V) и 13.6% – (VI) и один с высоким содержанием – 43% – (VII). Лиофильно высушенные из раствора в 1% водной уксусной кислоте соли хитозана обрабатывали 5–10 мин 10% спиртовым раствором аммиака (переводили хитозан в основную форму) и затем отмывали два раза этанолом. Далее образцы хитозана сушили в вакууме при 80°C в течение 5 ч.

Молекулярные массы хитозана определяли капиллярной вискозиметрией в водном растворе 0.1 М уксусной кислоты, содержащем 0.2 М NaCl при 25°C, согласно работе [14].

Коммерческий образец тропеолина 000-I (Союзхимреактив) был очищен двукратной перекристаллизацией из этанола и высушен в вакууме при 50°C. Его концентрацию определяли спектрофотометрически по молярному коэффициенту поглощения ϵ_{483} , равному 19750 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Содержание N -ацетатов в образцах хитозана определяли по спектрам КД на спектрополяриметре JASCO J-500A в кварцевых кюветках с толщиной слоя 1 мм согласно [6]. В качестве стандарта использовали N,N',N'' -триацетилхитотриозу, предварительно высушенную в вакууме при 80°C. Это соединение было получено согласно методике [15]. Спектрополяриметр калибровали по водному 0.06% раствору аммоний d -камфора-

10-сульфоуксусной кислоты. Отношение эллиптичностей полос при 190 и 250 нм составляло 2.06 ± 0.04 .

Определение N -ацетатов в хитозане спектрофотометрическим методом. Навеску 150 мг хитозана растворяли в 200 мл 1% водной уксусной кислоты, затем 20 мл аликвоты доводили до объема 200 мл тем же растворителем. К 3 мл раствора красителя с концентрацией 45.6 мкМ (16 мг красителя растворяли в 100 мл 1% водной уксусной кислоты, а затем 20 мл аликвоты доводили до объема 200 мл тем же растворителем) в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см добавляли 0.16 мл приготовленного раствора хитозана, тщательно перемешивали раствор и записывали спектр против 1% водного раствора уксусной кислоты. Измеряли величину ΔA_{483} и с учетом разбавления определяли концентрацию аминогрупп в растворе согласно уравнению (2), а N -ацетатов – согласно (3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mima S., Miya M., Iwamoto R. // J. Appl. Polym. Sci. 1983. V. 28. P. 1090–1095.
2. Domard A., Rinaudo M. // Int. J. Biol. Macromol. 1983. V. 5. P. 49–54.
3. Domzy J., Moor G., Roberts G. // Cellulose, its Derivatives. / Ed. J. Kennedy. Chichester: Horwood, 1985. P. 463.
4. Domard A. // Int. J. Biol. Macromol. 1987. V. 9. P. 98–103.
5. Aiba S. // Int. J. Biol. Macromol. 1986. V. 8. P. 173–176.
6. Domard A. // Int. J. Biol. Macromol. 1987. V. 9. P. 333–336.
7. Miya M., Iwamoto R., Yoshikawa S., Mima S. // Int. J. Biol. Macromol. 1980. V. 2. P. 323–324.
8. Gummow B.D., Roberts G.A.F. // Makromol. Chem. 1985. V. 186. P. 1239–1244.
9. Maghami G.G., Roberts G.A.F. // Makromol. Chem. 1988. V. 189. P. 2239–2243.
10. Domzy J.F., Roberts G.A.F. // Makromol. Chem. 1985. V. 186. P. 1671–1677.
11. No H.K., Meyers S.P., Lee K.S. // J. Agricult. and Food Chem. 1989. V. 37. P. 575–579.
12. Глазунов В.П., Одинокоев С.Е. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 881–884.
13. Hirano S., Ohe Y., Ono H. // Carbohydr. Res. 1976. V. 47. P. 315–320.
14. Maghami G.G., Roberts G.A.F. // Makromol. Chem. 1988. V. 189. P. 195–200.
15. Дистлер Д., Роземан С.В. // Методы химии углеводов / Ред. Н.К. Кочетков. М.: Мир, 1967. С. 240–243.

A Spectrophotometric Determination of the Amino Group Content in Chitosan

V. P. Glazunov[#] and V. I. Gorbach

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences,
pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia*

A spectrophotometric method for the determination of amino group content in chitosan based on the use of the tropaeolin 000-I anionic dye [sodium 4-(2-hydroxy-1-naphthylazo)benzenesulfonate] was developed. The electronic spectra of chitosan-dye solutions in 1% acetic acid in the visible light area indicated that complexes between the dye and the protonated amino groups of chitosan in the ratio of 1 : 1 were formed, which resulted in a decrease in the dye absorption maximum at 483 nm. The linear dependence of this decrease on the molar concentration of the amino groups for seven chitosan samples with a known degree of *N*-acetylation was used for calibration. The amino group content in chitosan samples can be precisely determined by our method and their *N*-acetylation degree can thus be calculated.

Key words: spectrophotometry in visible area; chitosan, degree of N-acetylation; anionic dye (tropaeolin 000-I)

[#] *To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (4232) 31-1409; fax: +7 (4232) 31-4050.*