

N-乙酰化壳聚糖的 FTIR 和 XRD 研究

任东文¹, 包德才^{1,2}, 王 为¹, 马小军^{1*}

1. 中国科学院大连化学物理研究所生物医学材料工程组, 中国科学院研究生院, 辽宁 大连 116023
2. 渤海大学化学与化工学院, 辽宁 锦州 121000

摘 要 壳聚糖分子的脱乙酰度(DD)是影响壳聚糖性质的主要因素之一。文章通过壳聚糖的 N-乙酰化反应制备了不同脱乙酰度的壳聚糖。采用傅里叶变换红外光谱(FTIR)和 X 射线衍射(XRD)分别研究了由 N-乙酰化反应得到的不同脱乙酰度的壳聚糖的红外光谱特性和晶体结构, 并由此分别计算确定了样品的脱乙酰度和结晶度, 探讨了 N-乙酰化程度对壳聚糖脱乙酰度以及结晶度的影响。由 FTIR 可知, 随 N-乙酰化程度的增加, 壳聚糖分子中剩余氨基的反应速度变慢。另外 XRD 也表明, 伴随 N-乙酰反应, 壳聚糖分子的结晶区被破坏, 规整度下降, 并逐渐形成新的结晶区。

主题词 壳聚糖; N-乙酰化; 脱乙酰度; 结晶度

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)07-1217-04

引 言

壳聚糖是由天然高分子甲壳素经脱乙酰化而得到的一种氨基多糖, 由于其较好的生物相容性和生物降解性^[1], 在生物医用材料领域, 如药物控释、组织支架方面, 受到广泛的关注和研究^[2, 3]。在壳聚糖的研究中发现, 壳聚糖分子链中的脱乙酰度(DD)是影响壳聚糖性质的主要因素之一, 它与壳聚糖的 pK_a 值、溶解性、结晶度、生物降解性等密切相关。在实际应用中, 也经常根据要求, 需要不同脱乙酰度的壳聚糖。制备不同 DD 的壳聚糖一般有两种方法: 一是甲壳素在浓碱作用下可部分或完全脱去 N 原子上的乙酰基^[4], 由于脱乙酰反应在较高温度和浓碱存在下进行, 壳聚糖分子链易发生断裂, 同时反应进行程度的控制较难; 二是将由方法一得到的高 DD 壳聚糖与乙酸酐在室温下进行 N-乙酰化反应^[5], DD 可以通过调整加入的乙酸酐的量来控制, 反应条件温和, 基本不影响壳聚糖分子链。因此一般采用方法二来制备各种不同 DD 的壳聚糖。

本文使用的不同 DD 的壳聚糖样品即是通过壳聚糖的 N-乙酰化反应得到。运用傅里叶变换红外光谱(FTIR)和 X 射线衍射(XRD)分别研究了不同 DD 的壳聚糖的红外光谱特性和结晶性, 并分别确定了样品的 DD 和结晶度, 探讨了 N-乙酰化程度对壳聚糖 DD 以及结晶度的影响。

1 材料与实验方法

1.1 材料与仪器

壳聚糖(浙江玉环海洋生物化学制品有限公司, DD 93.5%, 分子量 83.6 kD); 乙酸酐、甲醇、氢氧化钠为分析纯, 使用前未经进一步纯化。冷冻干燥机(北京博医康); 傅里叶变换红外光谱仪(Bruker); X 射线衍射仪(Rigaku)。

1.2 壳聚糖的 N-乙酰化

壳聚糖的 N-乙酰化反应根据文献^[5], 将 2 g 壳聚糖溶于 50 mL 2%(φ)醋酸溶液, 缓慢搅拌溶解, 然后加入 50 mL 甲醇, 得到均匀透明的微黄色溶液。然后加入一定量的乙酸酐, 在室温下搅拌反应过夜。加入 1 mol · L⁻¹ NaOH 溶液沉淀出溶液中的壳聚糖, 过滤, 洗涤至中性, 冷冻干燥, 即可得到不同 DD 的壳聚糖。经 200 目过筛后, 于干燥器中保存备用。

1.3 N-乙酰化壳聚糖的红外光谱

将得到的壳聚糖粉末与充分干燥后的 KBr 混合研磨, 压片, 在 Bruker Vector 22 红外光谱仪上记录壳聚糖的红外光谱图。壳聚糖材料的 DD 可用如下公式计算^[6]

$$DD = (1 - 1.15 \times A_{1655} / A_{3450}) \times 100\%$$

其中 A_{1655} 为 1655 cm⁻¹ 处的吸收强度, A_{3450} 为 3450 cm⁻¹ 处的吸收强度。

收稿日期: 2005-03-21, 修订日期: 2005-07-10

基金项目: 国家“863”计划项目(2001AA326020)和国家自然科学基金(2002CB713804)资助

作者简介: 任东文, 1974 年生, 中国科学院大连化学物理研究所博士研究生 * 通讯联系人

1.4 壳聚糖的 X 射线衍射光谱

将得到的壳聚糖粉末在 Rigaku D/max-rC X 射线衍射仪上扫描, 电压 40 kV, 电流 25 mA, Cu $K\alpha$ 谱线($\lambda=0.15418$ nm), 扫描范围 $5\sim 40^\circ$, 扫描速度 $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ 。可得到 N-乙酰化程度不同的壳聚糖的 X 射线光谱图。其结晶指数(CrI)可用下列公式计算^[7]

$$CrI\% = (I_{110} - I_{am})/I_{110} \times 100\%$$

其中 I_{110} 为 20° 处壳聚糖 110 晶面的最大衍射强度, I_{am} 为 16° 处壳聚糖无定形区的衍射强度。

2 结果与讨论

2.1 N-乙酰壳聚糖的红外光谱

在壳聚糖的红外光谱图中, 比较特征的有 3450 cm^{-1} 左右由 O—H 的伸缩振动吸收峰和 N—H 的伸缩振动吸收峰重叠而成的一个宽峰, 2920 cm^{-1} 附近有甲基或次甲基的 C—H 伸缩振动吸收峰。此外由于壳聚糖分子中含有一定量的乙酰氨基, 所以还有酰胺 (NH—C=O) 的三个特征吸收峰, 分别是 1650 cm^{-1} (酰胺 I)、 1550 cm^{-1} (酰胺 II) 和 1310 cm^{-1} (酰胺 III), 以及氨基 ($-\text{NH}_2$) 在 1600 cm^{-1} 附近的特征吸收谱带。壳聚糖是由甲壳素经脱乙酰反应得到, 但由于分子中的乙酰氨基很难完全脱除, 所以在壳聚糖中往往同时存在氨基和乙酰氨基。在脱乙酰度较高 ($DD>90\%$) 的壳聚糖中, 氨基的特征谱线 1600 cm^{-1} 非常明显, 而乙酰氨基的三个酰胺谱线则非常微弱, 仅在 1650 cm^{-1} (酰胺 I) 有一个稍稍突起的小峰 (见图 1a)。

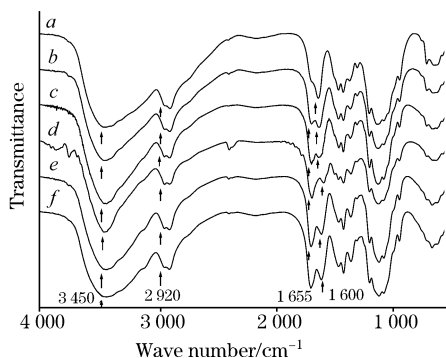


Fig. 1 FTIR spectra of chitosans with different DD

a: DD=93.5%; b: DD=81.7%; c: DD=71.7%;

d: DD=62.4%; e: DD=56.1%; f: DD=52.6%

当用乙酸酐对壳聚糖进行乙酰化时, 在含有 50% 甲醇的醋酸溶液中, 反应一般发生在氨基上, 乙酰化的程度可以通过反应中添加的乙酸酐的量来控制。随 N-乙酰化反应的进行, 壳聚糖的红外谱图中比较明显的变化就是 1650 cm^{-1} (酰胺 I) 吸收强度增加, 有非常明显的吸收峰出现, 而且其强度随反应中添加的乙酸酐量的增加而逐步增大, 同时 1600 cm^{-1} 处氨基的吸收强度有所减小 (见图 1b-图 1f)。用 Kurita 等^[6] 提出的公式计算其脱乙酰度 (DD), 将由此计算得到的 DD 与反应时添加的乙酸酐量关联, 即可得到如图 2 所示的曲线。由该曲线可知, 随着反应中添加的乙酸酐量的

增加, 壳聚糖的 DD 逐渐减小。在开始阶段, 二者呈线性关系, 但当壳聚糖的 DD 降低到约 60% 以后, 该曲线下降趋势逐步平缓, 这表明壳聚糖分子中的部分氨基的 N-乙酰化变得困难起来。这是由于壳聚糖分子中存在非定形区和较规整的结晶区, 乙酸酐与非定形区的氨基反应较为容易, 而与结晶区的氨基反应需要克服晶格能, 反应速度降低。

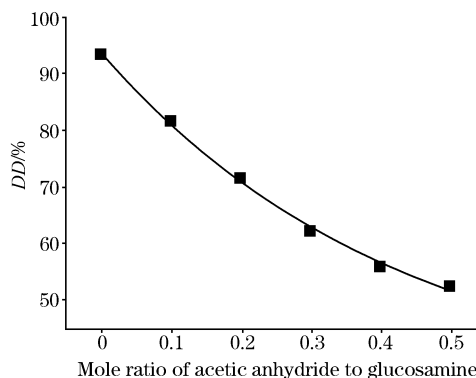


Fig. 2 Changes of DD of chitosans with different amount of acetic anhydride added

2.2 N-乙酰壳聚糖的 X 射线衍射图谱

由壳聚糖粉末的 X 射线衍射谱图 (见图 3) 可以看到壳聚糖具有两种不同的晶体形态, 均属于单斜晶系。根据 Samuels 等^[8] 的研究结果, 壳聚糖的这两种晶形分别称为 Form I (2θ 在 10° 左右) 和 Form II (2θ 在 20° 左右)。如图 3a 所示, DD 为 93.5% 的原料壳聚糖仅在 20.6° 有明显的衍射峰, 表明原料壳聚糖粉末中只有 Form II 一种晶形存在。当壳聚糖分子中的氨基被乙酰化时, 该衍射峰的强度逐渐降低 (见图 3b~图 3e), 显然乙酰基的引入改变了壳聚糖分子的结构, 降低了结构的有序性。同时随着乙酰化程度的增加, 壳聚糖分子中出现 Form I 晶形。当壳聚糖的 DD 从 81.7% 降到 52.6% 时, Form I 晶形的衍射峰从 11.8° 迁移到 8.8° , 其 d 间距值和强度也不断增大 (见表 1 和图 3b-图 3f)。这表明伴随着壳聚糖的 N-乙酰化, 一种新的晶形逐步形成。

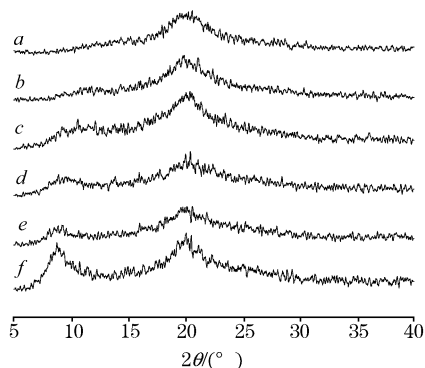


Fig. 3 X-ray diffraction patterns of chitosans with different DD

a: DD=93.5%; b: DD=81.7%; c: DD=71.7%;

d: DD=62.4%; e: DD=56.1%; f: DD=52.6%

Table 1 Effect of N-acetylation on the crystal structure of chitosans

壳聚糖样品	DD/%	CrI/%	2θ(°)	d 间距值(Å)
a	93.5	62.2	20.6	4.31
b	81.7	54.3	11.8, 19.9	7.50, 4.46
c	71.7	52.0	10.6, 20.4	8.35, 4.35
d	62.4	47.0	9.6, 20.5	9.21, 4.33
e	56.1	44.3	9.3, 20.2	9.51, 4.40
f	52.6	59.5	8.8, 20.1	10.05, 4.42

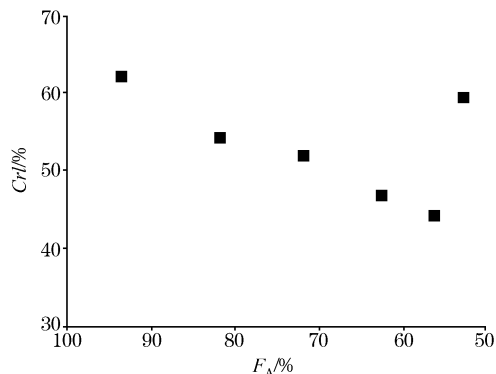


Fig. 4 Changes of CrI of chitosans with DD

壳聚糖的 N-乙酰化过程不仅是其化学结构的变化,同时也伴随着物理结构的改变。如图 4, 可以看到原料壳聚糖结构较为规整, 结晶度很高(CrI=62.2%)。随着 DD 的降低, 也就是乙酰氨基的增加, 破坏了其结构的规整性, 结晶

度不断降低, 当 DD 为 56.1% 时, CrI 降至 44.3%。但是随着乙酰氨基的增多, 形成的乙酰氨基葡萄糖单元开始形成彼此有序的结构(Form I 晶形), 结晶度开始增加。因此当 DD 进一步降低为 52.6% 时, 其结晶度反而增加(CrI=59.5%)。

由图 5 的示意图也可以看出, 壳聚糖的 DD 大于 90% 时, 壳聚糖分子中大部分是由氨基葡萄糖单元形成的结晶区, 结构非常规整。当壳聚糖的氨基被部分 N-乙酰化时, 由于反应在均相条件下进行, 在壳聚糖分子链上的取代部位较均匀^[9], 导致氨基葡萄糖单元形成的结晶区被不断破坏, 结构的规整度不断下降。当 N-乙酰化继续进行, 至 DD 约为 50% 时, 反应生成的 N-乙酰氨基葡萄糖单元数量不断增加, 同时开始形成新的不同的结晶区。壳聚糖对于生物医学是一种有应用价值的材料, 所以本工作的研究很有意义, 得到一些新的成果。近来也有这方面的报道^[10]。

3 结 论

壳聚糖的 N-乙酰化常用来制备不同 DD 的壳聚糖。通过 FTIR 计算 DD, 发现随 N-乙酰程度的增加, 剩余氨基的反应速度变慢。壳聚糖的 XRD 也表明, 伴随 N-乙酰反应, 壳聚糖分子的结晶区被破坏, 规整度下降。当 DD 降低到一定程度时, 开始形成新的结晶区。这表明壳聚糖的 N-乙酰化过程不仅是其化学结构的变化, 同时也伴随着物理结构的改变。这有助于更加深入地了解 N-乙酰化反应对壳聚糖结构的影响, 并促进壳聚糖作为一种重要生物医用材料的应用研究。

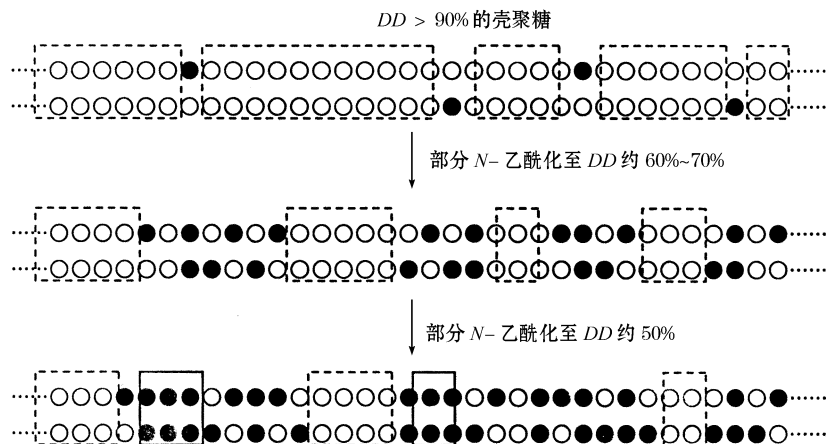


Fig. 5 Speculative representation of the structures of partially N-acetylated chitosans

○: Glucosamine; ●: N-acetyl glucosamine; ---: Crystalline zone formed with glucosamine; —: Crystalline zone formed with N-acetyl glucosamine

参 考 文 献

- [1] Tomihata K, Ikada Y. *Biomaterials*, 1997, 18: 567.
- [2] Shi Xin-yuan, Tan Tian-wei. *Chinese J. Chem. Eng.*, 2003, 11(1): 94.
- [3] Chenite A, et al. *Biomaterials*, 2000, 21: 2155.
- [4] Chang K L B, et al. *Carbohydr. Res.*, 1997, 303: 327.
- [5] Hirano S, et al. *Carbohydr. Res.*, 1976, 47: 315.
- [6] Khor E. *Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise*. Elsevier, Amsterdam, 2001.
- [7] Prashanth K V H, et al. *Carbohydr. Polym.*, 2002, 50: 27.
- [8] Samuels R J. *J. Polym. Sci. Polym. Phys.*, 1981 19: 1081.
- [9] Aiba S. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1991, 13: 40.
- [10] MA Xiao-li, YAO Zi-hua(马晓莉, 姚子华). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2005, 25(3): 456.

Study on N-Acetylated Chitosans by FTIR and XRD

REN Dong-wen¹, BAO De-cai^{1, 2}, WANG Wei¹, MA Xiao-jun^{1*}

1. Lab Biomedical Materials Engineering, Dalian Institute of Chemical Physics, Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China
2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Bohai University, Jinzhou 121000, China

Abstract The degree of N-deacetylation (*DD*) is an important property of chitosan. In the present article the reaction of N-acetylation was applied to prepare six chitosan samples with various *DD*s. The samples were studied by FTIR and XRD to investigate their IR absorbance characteristics and crystallinity, from which the *DD*s and crystallinity index (*CrI*) of chitosans were also determined respectively. The influence of N-acetylation on *DD* and *CrI* was also discussed, and it could be found from FTIR that the N-acetylation reaction became difficult for the remaining amino group in chitosan molecule as the reaction proceeded. XRD also indicated that the crystalline zone was broken by N-acetylation gradually, and another kind of crystal form appeared instead.

Keywords Chitosan; N-acetylation; Degree of deacetylation; Crystallinity

(Received Mar. 21, 2005; accepted Jul. 10, 2005)

* Corresponding author