

# 用 FTIR 测定羧酰化壳聚糖和氰乙基壳聚糖的取代度

董炎明,梅雪峰,袁清,吴玉松,王勉,阮永红

(厦门大学材料科学与工程系和固体表面物理化学国家重点实验室,福建 厦门 361005)

**摘要:**从壳聚糖(脱乙酰度分别为 84% 和 70%)合成不同取代度的羧酰化壳聚糖和氰乙基壳聚糖作为标样,标样的取代度(DS)由 NMR 或元素分析确定.研究以 FTIR 作为工具测定这两个系列衍生物的取代度的方法.吸光度用基线法得到,对所有不同探针谱带,参比谱带和基线作图法的组合进行比较,并通过  $(A_{\text{探针}}/A_{\text{参比}})/DS$  的平均相对偏差评价每种组合的优劣.结果表明,对羧酰化壳聚糖,最合适的  $A_{\text{探针}}/A_{\text{参比}}$  是  $A_{1740}/A_{1527}$ ;对氰乙基壳聚糖,最合适的  $A_{\text{探针}}/A_{\text{参比}}$  是  $A_{2249}/A_{1590}$ .前者不仅适用于不同取代度的同一种 O-羧酰化壳聚糖(如丙酰化壳聚糖)而且适用于不同取代度且不同碳数的 4 个 O-脂肪酸酰基取代的壳聚糖样品.这两种组合的工作曲线的斜率分别为 2.1(对  $A_{1740BL1}/A_{1527BL1}$ ), 0.59(对  $A_{2249}/A_{1590BL1}$ ) 和 0.66(对  $A_{2249}/A_{1590BL2}$ ).实验还表明,不同的基线作法对结果影响甚小.

**关键词:**壳聚糖;羧酰化壳聚糖;氰乙基壳聚糖;富立叶红外光谱;取代度;定量分析

**中图分类号:** O 636.1

**文献标识码:** A

壳聚糖是第二大天然高分子甲壳素的脱乙酰化产物.它存在活泼的羟基和氨基,可以进行多种化学修饰<sup>[1,2]</sup>,如羟烷基化、烷基化、酰化、磺化、醛亚胺化、叠氮化、卤化、成盐、螯合、水解、氧化、接枝等.化学改性极大地扩展了它的用途.对于壳聚糖衍生物,取代度是其重要的参数.测定取代度的主要方法是化学方法、元素分析或核磁共振(NMR).化学方法费时费力,而且并不是每一种衍生物都有合适的反应可以采用.元素分析是靠 C、H、O、N 之组成来推断结构式的,而壳聚糖衍生物常含有结晶水甚至吸附水,且壳聚糖的脱乙酰度也常不完全,这些复杂的因素给计算带来很大困难.NMR 显然是一个较准确的方法,但由于一些壳聚糖衍生物难以找到合适的溶剂,而且测定费用也高,使其应用受到限制.红外光谱法不仅可用于定性分析,也可用于取代度的定量分析,由于它可直接利用固体样品(粉末或薄膜),而且方法快速、价廉,易于应用.

用红外光谱法测定壳聚糖的脱乙酰度已有不少报道<sup>[3,4]</sup>,而测定壳聚糖衍生物取代度的研究则不多.本文研究了羧酰化壳聚糖和氰乙基壳聚糖这两类衍生物的取代度的红外光谱测定方法,对探针吸收带(即分析带)、参比吸收带以及基线的选取进行了系统的比较和探讨.

## 1 实验部分

### 1.1 羧酰化壳聚糖的合成

#### 1) 不同取代度的丙酰化壳聚糖

按文献方法<sup>[5,6]</sup>,将 0.95 g 壳聚糖(浙江玉环化工厂产,经沉淀法提纯,过 100 目筛,碱量法脱乙酰度为 84%,粘度法分子量为  $8.43 \times 10^5$ )溶于 5 mL 甲磺酸,于 0℃ 搅拌 15 min 至均匀后,分别加入 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 或 4.6 mL 丙酸酐,在 0℃ 下搅拌 2 h,然后在 -18℃ 冰柜中静置过夜.将粗产物倒入

收稿日期:2000-09-21

基金项目:国家自然科学基金(29974023)和福建省自然科学基金(Z9910006)资助项目

作者简介:董炎明(1947-),男,教授.

140 mL 丙酮中沉淀,过滤,产物用丙酮萃取 18 h 后再次过滤烘干,获得 5 个不同取代度样品.取代基本发生在  $C_6$  和  $C_3$  的羟基上<sup>[5]</sup>.

## 2) 不同酰基的羧酰化壳聚糖

合成方法同上,反应试剂分别为乙酸酐、丙酸酐、丁酸酐、己酸酐和庚酸(酸酐或酸与壳聚糖的摩尔比均为 9.3:1),反应温度对乙酸酐改为 0,对庚酸改为 23.

## 1.2 不同取代度氰乙基壳聚糖的合成

按文献方法<sup>[7,8]</sup>,将 1 g 壳聚糖(浙江玉环化工厂产,经沉淀法提纯,过 40 目筛,碱量法脱乙酰度 70%,在 1% 壳聚糖的 1% 乙酸中 20 测得粘度 1000 mPa·s)与 5 mL NaOH 溶液(含 0.7 g NaOH 和 10 mg 十二烷基硫酸钠)混合,室温下放置几小时使其充分溶胀后置于 -18 冰柜中过夜,制得碱壳聚糖.将此冰冻的壳聚糖直接与 20 mL 丙烯腈混合,在室温下控制不同的反应时间(依次为 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 24 h).产物用乙醇洗涤至中性,过滤,烘干,得到 7 个不同取代度样品.对室温反应,氰乙基化取代反应主要发生在氧上.

## 1.3 取代度(DS)的测定方法

羧酰化壳聚糖的取代度均由 Heraeus CHN-O-Rapid 元素分析仪(德国)测定,通过 C、H、N 含量计算而得<sup>[9]</sup>. 氰乙基壳聚糖的取代度由 400 MHz Bruker DRX-400 <sup>1</sup>H-NMR 仪(德国-瑞士)测定,通过氰乙基上质子(与氰基相连的  $CH_2$  上的质子  $\delta = 2.5$  左右)与  $C_2$  上质子( $\delta = 2.9$ 左右)的峰面积之比而获得<sup>[10]</sup>,其它质子的峰(包括  $C_1 \delta = 4.7$  左右,  $C_3 \sim C_6$  以及氰乙基上与氧相连的  $CH_2$  的质子  $\delta = 3.6$  左右)均不会干扰测定.

## 1.4 红外光谱测定方法

将粉末样品(过 40 目筛)通过 KBr 压片法制得薄片,用 Nicolet Avatar 360(美国)和 Analect RFX-

65(美国)富立叶红外光谱仪测定(后者只用于测定不同取代度的丙酰化壳聚糖).在吸收光谱上,以基线法测定吸收带的强度最大值用于定量计算.

## 2 结果与讨论

### 2.1 羧酰化壳聚糖、氰乙基壳聚糖与壳聚糖 FTIR 谱图的比较

壳聚糖及其两类衍生物的结构示意图见图 1(图中忽略了残存的乙酰氨基).

人们已经熟知壳聚糖的 FTIR 谱图(图 2),观察到  $1655\text{ cm}^{-1}$ (酰胺谱带)、 $1596\text{ cm}^{-1}$ (N-H 谱带)和  $1317\text{ cm}^{-1}$ (酰胺谱带).其中酰胺谱带和酰胺谱带的存在与本壳聚糖样品含有少部分甲壳素链节有关.

O-羧酰化壳聚糖的特征谱带是  $1740\text{ cm}^{-1}$  左右(乙酰化  $1740$ ,丙酰化  $1740$ ,丁酰化  $1737$ ,己酰化  $1742$ ,庚酰化  $1739$ )的羰基伸缩振动谱带.原壳聚糖(O-H)谱带减弱,而(C-H)谱带增强,并随着取代度或羧酰基碳数增加而增加.此外,由于羧酰基带来的一类新的 C-O 键,因而原壳聚糖中羟基(C-O)谱带的位置  $1030, 1071\text{ cm}^{-1}$  向高波数位移,在  $1100$  和  $1200\text{ cm}^{-1}$  各突现一个强峰.两个峰强度差不多,说明  $C_3$  或  $C_6$  醇羟基没有择优取代的倾向,与 Grant 观察到的结果相似<sup>[5]</sup>.  $784\text{ cm}^{-1}$  左右新出现一个锐峰,应当跟 C-H 的面内摇摆振动有关.

以丙酰化壳聚糖为例(见图 3),由于酰化反应生成了大量羰基,同时减少了羟基,分子内和分子间的基团相互作用(特别是氢键)发生了复杂的变化,使相关谱带随着发生显著的位移.原  $1655$  和  $1596\text{ cm}^{-1}$  谱带合并为较宽的  $1635\text{ cm}^{-1}$  谱带(仍称之为酰胺谱带).原来被掩盖的酰胺谱带显露了出

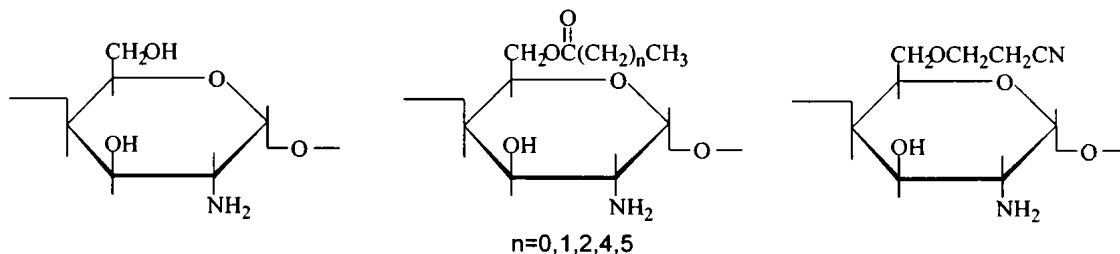


图 1 壳聚糖、羧酰化壳聚糖和氰乙基壳聚糖的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of chitosan, acylated chitosan and cyanoethyl chitosan

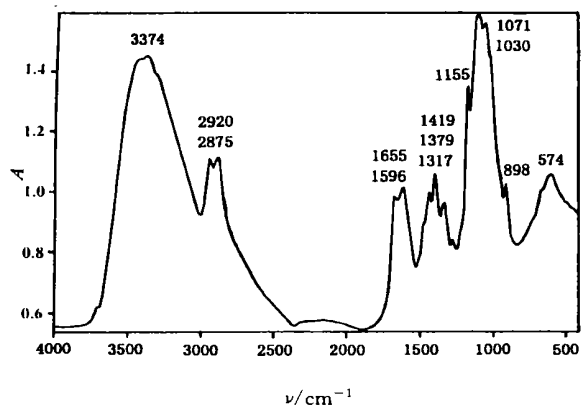


图2 壳聚糖(脱乙酰度为 70%)的红外光谱图  
Fig. 2 FTIR spectrum of chitosan with the degree of deacetylation 70%

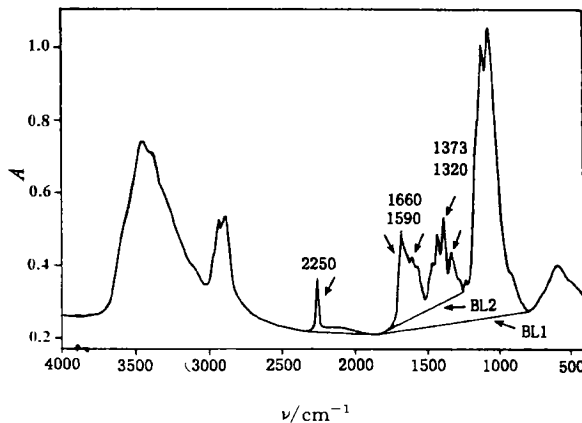


图4 氰乙基壳聚糖(DS = 1.27)的红外光谱  
Fig. 4 FTIR spectrum of cyanoethyl chitosan (DS = 1.27)

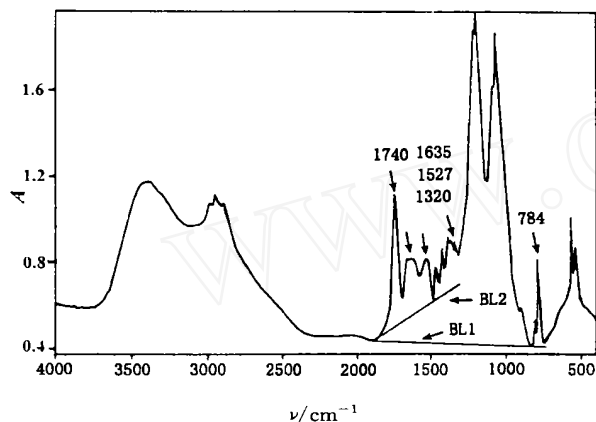


图3 丙酰化壳聚糖(DS = 0.94)的红外光谱图  
Fig. 3 FTIR spectrum of propionyl chitosan (DS = 0.94)

来,出现在  $1527\text{ cm}^{-1}$ .而原来在  $1317\text{ cm}^{-1}$  的酰胺谱带略有位移,出现在  $1320\text{ cm}^{-1}$ .其他 O-羧酰化壳聚糖也有类似情况.

氰乙基壳聚糖的氰基特征吸收  $2249\text{ cm}^{-1}$  非常突出(图 4).同时原壳聚糖(O-H)谱带减弱,而(C-H)和(C-O)均增强.(C-O)表现为  $1061\text{ cm}^{-1}$  和  $1107\text{ cm}^{-1}$  双重峰,也是由于形成新的 C-O 键而使原壳聚糖两类羟基伸缩振动峰向高波数移动,没有观察到  $\text{C}_3$  或  $\text{C}_6$  醇羟基有择优取代的趋势.同样由于基团间相互作用的变化(新出现氰基,羟基减少),特别是氢键的变化,原壳聚糖的  $1655, 1596$  和  $1317\text{ cm}^{-1}$  三条谱带位移到  $1660, 1590$  和  $1320\text{ cm}^{-1}$ ,仍分别归属于酰胺谱带, N-H 变形振动谱带和酰胺谱带.

## 2.2 O-丙酰化壳聚糖取代度的测定

在红外定量分析中,通常采用基线法进行谱带吸光度的测量<sup>[11]</sup>.以探针谱带和作为浓度内标的参比谱带吸光度之比  $A_{\text{probe band}}/A_{\text{reference band}}$  (以下简称为  $A_{\text{PB}}/A_{\text{RB}}$ ) 对一系列已知标样的取代度(取代度通过其它方法测定)作图,就可得到一条工作曲线.因而主要问题是如何确定探针谱带、参比谱带和基线.

对丙酰化壳聚糖,根据 2.1 的分析,本文确定  $1740\text{ cm}^{-1}$  或  $784\text{ cm}^{-1}$  为探针谱带.由于合成时  $\text{C}_2$  的酰胺基不参与反应,所以酰胺的三条谱带分别用作参比谱带.基线可有  $\text{BL}_1$  和  $\text{BL}_2$  两种作法(见图 3).于是可以得到 9 种组合.

本文将不同组合  $A_{\text{PB}}/A_{\text{RB}}$  与取代度(DS)之商定义为  $x$ ,计算出测量值  $x$  的相对偏差 RD

$$RD = \frac{|x_i - \bar{x}|}{\bar{x}}$$

其中  $x_i = (A_{\text{PB}}/A_{\text{RB}})/DS$ ,  $\bar{x} = \frac{x_i}{x_j}$

并以平均相对偏差 RD 的大小来评价工作曲线的线性关系的好坏.丙酰化壳聚糖的分析结果列于表 1.

可见探针谱带以  $1740\text{ cm}^{-1}$  为好,而参比谱带以  $1527\text{ cm}^{-1}$  为最好.这样最佳的工作曲线为  $A_{1740\text{BL}_1}/A_{1527\text{BL}_1}$  对 DS 的曲线(图 5),有相当好的线性关系.

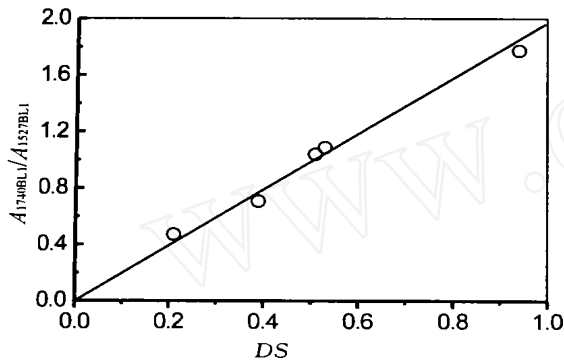
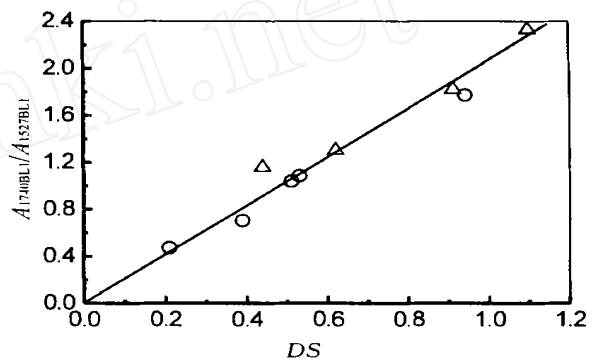
## 2.3 O-羧酰化壳聚糖取代度的测定

因为对于其它羧酰化壳聚糖也是每个取代增加一个脂肪酰基上的羧基,所以丙酰化壳聚糖的工作

表 1 对于不同取代度的丙酰化壳聚糖不同组合  $A_{\text{探针}}/A_{\text{参比}}$  的相对偏差Tab. 1 Relative derivation (RD) of  $A_{\text{PB}}/A_{\text{RB}}$  ratios of different combinations for propionyl Chitosan with different DS

$A_{\text{PB}}/A_{\text{RB}}$	DS					RD
	0.21	0.39	0.51	0.53	0.94	
$A_{1740\text{BL}1}/A_{1635\text{BL}1}$	0.16	0.26	0.02	0.15	0.27	0.17
$A_{1740\text{BL}2}/A_{1635\text{BL}2}$	0.22	0.33	0.00	0.13	0.69	0.27
$A_{1740\text{BL}1}/A_{1527\text{BL}1}$	0.12	0.10	0.02	0.02	0.06	0.06*
$A_{1740\text{BL}2}/A_{1527\text{BL}2}$	0.25	0.08	0.05	0.08	0.21	0.13
$A_{1740\text{BL}1}/A_{1320\text{BL}1}$	0.25	0.17	0.02	0.06	0.16	0.13
$A_{1740\text{BL}2}/A_{1320\text{BL}2}$	0.16	0.14	0.05	0.23	0.01	0.12
$A_{784}/A_{1635\text{BL}1}$	0.95	0.05	0.36	0.33	0.31	0.40
$A_{784}/A_{1527\text{BL}1}$	0.83	0.24	0.35	0.22	0.21	0.37
$A_{784}/A_{1320\text{BL}1}$	1.01	0.52	0.36	0.20	0.57	0.53

\* the best value

图 5 对于不同取代度的丙酰化壳聚糖(取代度用元素分析法测定)  $A_{1740\text{BL}1}/A_{1527\text{BL}1}$  与  $DS$  值的关系图Fig. 5 The plot of  $A_{1740\text{BL}1}/A_{1527\text{BL}1}$  vs.  $DS$  values for propionylchitosan ( $DS$  values were determined by element analysis)图 6 对于不同取代度的丙酰化壳聚糖( ) 和其他羧酰化壳聚糖( )  $A_{1740\text{BL}1}/A_{1527\text{BL}1}$  与  $DS$  值的关系图Fig. 6 The plot of  $A_{1740\text{BL}1}/A_{1527\text{BL}1}$  vs.  $DS$  values for both propionyl chitosan with different  $DS$  ( ) and other acylated chitosans with different  $DS$  ( )

曲线有可能推广到其他羧酰化壳聚糖. 本文将相同基线的所有不同取代度的丙酰化壳聚糖和 4 个其他不同长度的羧酰化壳聚糖样品(乙酰化壳聚糖  $DS = 1.1$ , 丁酰化壳聚糖  $DS = 0.44$ , 己酰化壳聚糖  $DS = 0.91$  和庚酰化壳聚糖  $DS = 0.62$ ) 的测定结果绘制在一起, 发现也具有线性关系(图 6 和图 7). 可见丙酰化壳聚糖的工作曲线也适用于其它的脂肪羧酰化壳聚糖的取代度测定. 比较图 6 和图 7 还表明基线的影响不显著.

## 2.4 氰乙基壳聚糖取代度的测定

$2249\text{ cm}^{-1}$  氰基伸缩振动谱带是唯一可用的探针谱带. 而参比谱带除酰胺和谱带以及 N-H 的变形振动谱带外, 由于壳聚糖中未完全脱乙酰部分

的甲基在合成反应中没有变化,  $1373\text{ cm}^{-1}$  也可考虑. 用前述方法对实验数据处理的结果列于表 2, 可见只有  $A_{2249}/A_{1590\text{BL}1}$  或  $A_{2249}/A_{1590\text{BL}2}$  两种组合有较小的实验偏差. 从表 2 还可以观察到, 用  $1373\text{ cm}^{-1}$  作参比的效果与  $1660\text{ cm}^{-1}$  或  $1320\text{ cm}^{-1}$  差不多, 但都不如  $1590\text{ cm}^{-1}$  好. 两条最佳的工作曲线示于图 8, 该系列氰乙基壳聚糖样品的已知取代度是用 NMR 和元素分析同时进行测定而得的, 结果相当一致, 图 8 采用了 NMR 的结果. 比较两条曲线可见两种基线作法对结果的影响很小.

表 2 对于不同取代度的氰乙基壳聚糖不同组合  $A_{PB}/A_{RB}$  的相对偏差

Tab.2 Relative derivation (RD) of  $A_{PB}/A_{RB}$  ratios of different combinations for cyanoethyl Chitosan with different DS

$A_{PB}/A_{RB}$	DS							RD
	0.31	0.81	0.94	0.98	1.07	1.21	1.27	
$A_{2249}/A_{1660BL1}$	0.52	0.07	0.09	0.07	0.18	0.12	0.14	0.17
$A_{2249}/A_{1660BL2}$	0.53	0.08	0.10	0.09	0.18	0.14	0.12	0.18
$A_{2249}/A_{1590BL1}$	0.36	0.05	0.13	0.04	0.18	0.08	0.04	0.13*
$A_{2249}/A_{1590BL2}$	0.33	0.06	0.15	0.02	0.18	0.06	0.11	0.13*
$A_{2249}/A_{1373BL1}$	0.58	0.01	0.19	0.06	0.19	0.14	0.10	0.18
$A_{2249}/A_{1373BL2}$	0.57	0.05	0.24	0.10	0.20	0.14	0.05	0.19
$A_{2249}/A_{1320BL1}$	0.56	0.05	0.14	0.04	0.17	0.17	0.11	0.18
$A_{2249}/A_{1320BL2}$	0.51	0.02	0.23	0.05	0.17	0.14	0.03	0.17

\* the best value

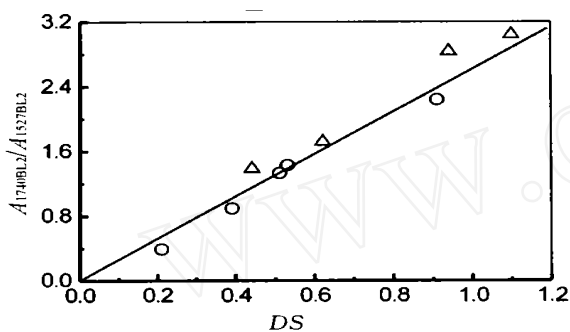


图 7 对于不同取代度的丙酰化壳聚糖 ( ) 和其他羧酰化壳聚糖 ( )  $A_{1740BL2}/A_{1527BL2}$  与 DS 值的关系图

Fig. 7 The plot of  $A_{1740BL2}/A_{1527BL2}$  vs. DS values for both propionyl chitosan with different DS ( ) and other acylated chitosans with different DS ( )

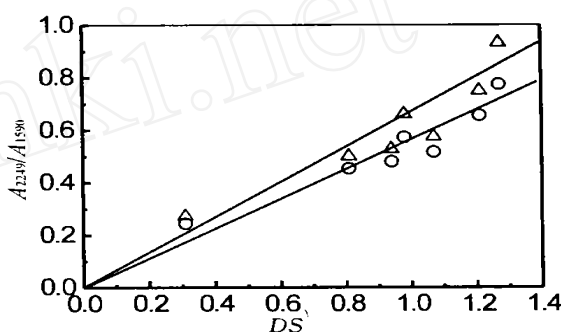


图 8 对于不同取代度的氰乙基壳聚糖 (取代度用 NMR 法测定)  $A_{2249}/A_{1590}$  与 DS 值的关系图

Fig. 8 The plot of  $A_{2249}/A_{1527}$  vs. DS values for cyanoethyl chitosans (DS values were determined by NMR) ( )  $A_{2249}/A_{1590BL1}$  ( )  $A_{2249}/A_{1590BL2}$

### 3 结 论

对羧酰化壳聚糖和氰乙基壳聚糖两个系列,用 FTIR 测定取代度的最佳  $A_{PB}/A_{RB}$  组合分别为  $A_{1740BL1}/A_{1527BL1}$  和  $A_{2249}/A_{1590BL1}$  (or  $BL2$ ). 这两种组合的工作曲线的斜率分别为 2.1 (对  $A_{1740BL1}/A_{1527BL1}$ ), 0.59 (对  $A_{2249}/A_{1590BL1}$ ) 和 0.66 (对  $A_{2249}/A_{1590BL2}$ ). 影响取代度测定准确性的因素主要是选择合适的探针谱带和参比谱带,基线的作法影响不大.

由于参比谱带采用酰胺或氨基谱带,它们均与原料壳聚糖的脱乙酰度有关,因而本文结果仅直接适用于具有相同脱乙酰度的未知样品.从原理上看,具有其他脱乙酰度的未知样品也可以根据脱乙酰度折算其  $A_{1527}$  等参比谱带吸收值,因为该谱带已证明

可用于脱乙酰度的定量测定<sup>[3]</sup>.这一推断尚待进一步工作的验证.

### 参考文献:

- [1] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京:中国环境出版社,1999. 117 - 215.
- [2] 杨安乐,陈长春,孙康,等. 甲壳素的改性研究及其在功能材料上的应用[J]. 现代化工,1999,19(4):50 - 52.
- [3] Sannan T, Kurita K, Ogura K, et al. Studies on chitin: 7. I.r. spectroscopic determination of degree of deacetylation[J]. Polymer, 1978, 19:458 - 459.
- [4] Ferreira M C, Duarte M L, Marvao M R, et al. FT-IR spectroscopy as a tool to determine the degree of acetylation of - chitin/ chitosan from loligo pen. Proceedings of the third Asia-Pacific chitin and chitosan symposium (Chen R H, Chen H C, Ed.) [C]. Taiwan, 1998:123

- 128.
- [5] Grant S, Blair H S, Mckay G. Water-soluble derivatives of chitosan[J]. Polymer Communications, 1988, 29:342 - 344.
- [6] 董炎明,李志强,郭榕. 一种新的液晶高分子-丁酸壳聚糖的合成与表征[J]. 高等学校化学学报,1998,19(1):161 - 163.
- [7] Tokura S, Nishi N, Nishimura S, et al. Studies on chitin. Specific binding of calcium ions by carboxymethyl-chitin[J]. Polymer J., 1983, 15(7):553 - 556.
- [8] 董炎明,李志强. 新的液晶性壳聚糖-氰乙基壳聚糖的合成与表征[J]. 高等学校化学学报,1998,19(8):1343 - 1345.
- [9] 董炎明,汪剑炜,梅雪峰,等. 甲壳素溶致液晶的研究-分子量和取代度对羧酰化壳聚糖液晶性的影响[J]. 高分子学报,1999,(6):668 - 673.
- [10] Dong Y, Yuan Q, Wu Y, et al. Studies on the effect of substitution degree on the liquid crystalline behavior of cyanoethyl chitosan[J]. J. Appl. Polym. Sci., 2000, 76:2057 - 2061.
- [11] 沈德言. 红外光谱在分子研究中应用[M]. 北京:科学出版社,1982.106 - 107.

## Determination of Degree of Substitution for Acylated Chitosan and Cyanoethyl Chitosan Using FTIR

DONG Yan-ming<sup>\*</sup>, MEI Xue-feng, YUAN qing, WU Yu-song,  
WANG Mian, RUAN Yong-hong

(Dept. of Materials Sci. and Engin., State Key Lab. for Phys. Chem.  
of Solid Surfaces, Xiamen 361005, China)

**Abstract :** FTIR spectroscopy was used to determine the degree of substitution (*DS*) of both acylated chitosans and cyanoethyl chitosans prepared from chitosan with the degree of deacetylation 84 % and 70 % respectively. All the probable probe bands, reference bands and baselines were combined to be discussed, and the *DS* values of standard samples were determined by NMR or element analysis. An evaluation of the most suitable ratios  $A_{\text{probe band}}/A_{\text{reference band}}$  from FTIR spectra to determine *DS* was based on the comparison of the mean relative derivations of  $(A_{\text{probe band}}/A_{\text{reference band}})/DS$ . It was concluded that the most suitable ratios to determine *DS* of acylated chitosans and cyanoethyl chitosans are  $A_{1740}/A_{1527}$  and  $A_{2249}/A_{1590}$  respectively. The slopes of standard curves are 2.1 (for  $A_{1740BL1}/A_{1527BL1}$ ), 0.59 (for  $A_{2249}/A_{1590BL1}$ ) and 0.66 (for  $A_{2249}/A_{1590BL2}$ ). The former is suitable for four other acylated chitosans in this study with both different carbon number of acylgroup and *DS*. The results were affected very slightly by different baseline methods.

**Key words :** chitosan; acylated chitosan; cyanoethyl chitosan; FTIR; degree of substitution; quantitative analysis