

Bestimmung des Acetylierungsgrades (DA) von Chitin bzw. Chitosan

Entwicklung eines einfachen Verfahrens für Reihenuntersuchungen

Bei der an der deutschen Nordseeküste verbreiteten Krabbenfischerei fallen die Krabbenschalen als Abfälle an. Sie enthalten Fleischreste (Proteine) und das Schalengerüst aus Chitin. Aus dem Chitin kann Chitosan gewonnen werden, das als Ausgangsstoff für eine Reihe interessanter Produkte dient. Es wird in den Bereichen Medizintechnik, Kosmetik, Landwirtschaft, Kläranlagen usw. eingesetzt. Ein wichtiges Qualitätsmerkmal ist der Acetylierungsgrad (DA = Degree of Acetylation).

Die Anwendung und Evaluierung der FTIR-Spektroskopie zur Bestimmung des Acetylierungsgrades von Chitin und Chitosan soll hier vorgestellt werden.

Bei den bisherigen Verfahren zur Bestimmung des Acetylierungsgrades von Chitin- bzw. Chitosan-Proben mittels Infrarot-Spektroskopie war die Genauigkeit der Ergebnisse bei geringem Acetylierungsgrad in der Regel unzureichend. Dies lag an den verwendeten Mess- und Auswerte-Verfahren. Bislang wurden meistens Presslinge aus KBr und Chitin-/Chitosan-Pulver untersucht. Die Presslinge sind immer trüb, da sich das Chitin-/Chitosan-Pulver auch unter hohem Druck nicht in KBr löst. Meistens ist das Chitin-/Chitosan-Pulver nicht homogen im Pressling verteilt. Hier wird nun eine FTIR-Methode vorgestellt, bei dem die Reflexion direkt an der unbehandelten Chitin- bzw. Chitosan-Probe gemessen und mittels der Software des IR-Spektrometers schnell und mit sehr geringem Fehler der Acetylierungsgrad durch Spektren-Simulation bestimmt werden kann.

Acetylierungsgrad von Chitin/Chitosan

Chitin und Chitosan sind Polysaccharide, die als Copolymere von β -1,4-verknüpften N-Acetyl-



► V.l.n.r.: Prof. Dr. Michael Schlaak, Prof. Dr. Eike Siefert, Dr. Wolfgang Lindenthal, Emdener Institut für Umwelttechnik (EUTEC), Fachhochschule Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven

Glucosamin-Einheiten und Glucosamin-Einheiten aufzufassen sind.

„Ideales Chitin“ besteht vollständig aus N-Acetyl-Glucosamin (Abb. 2), „ideales Chitosan“ vollständig aus Glucosamin (Abb. 3); die Acetat-Gruppen sind abgespalten.

Der Acetylierungsgrad gibt an, wie viel % der N-Acetyl-Glucosamin-Gruppen im „idealen Chitin“ noch vorhanden sind, der Rest ist durch Glucosamin-Gruppen ausgetauscht worden.

Natürlich vorkommendes Chitin hat einen Acetylierungsgrad zwischen ca. 90 % und 50 % (und löst sich nicht in verdünnten Säuren), Chitosan von unter 50 % (und löst sich in verdünnten Säuren).

Methoden zur Bestimmung des Acetylierungsgrades von Chitosan

Die Acetyl-Gruppe (aus den N-Acetyl-Glucosamin-Einheiten des Chitin) gehört zu den Carbonyl-Gruppen; diese können von infrarotem Licht angeregt werden. Je weniger Carbonyl-Gruppen sich in der Chitosan-Probe befinden (also je geringer der Acetylierungsgrad ist), desto geringer (im Vergleich zu einer Referenz-Bande) sollte die entsprechende Bande im Spektrum werden. Weitere Verfahren zur Bestimmung des Acetylierungsgrades sind ^1H - und ^{13}C -NMR Spektroskopie, die zwar exakter sind, jedoch einen

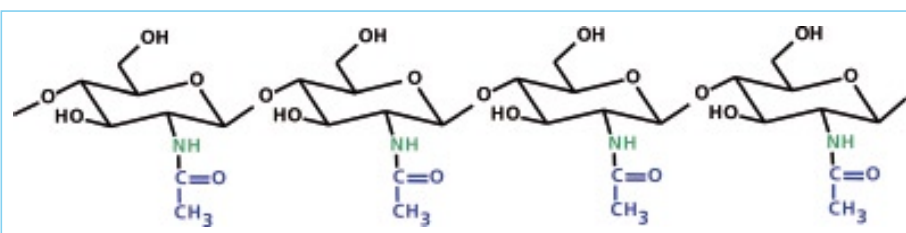


Abb. 1: Chitin, bestehend aus N-Acetyl-Glucosamin-Einheiten

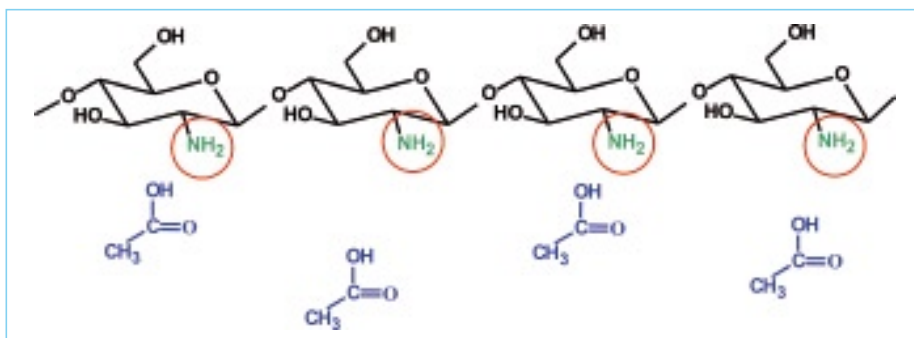


Abb.2: Chitosan, bestehend aus Glucosamin-Einheiten (und abgespaltenen Essigsäure-Gruppen)

wesentlich höheren Aufwand erfordern, und die Säure-/Base-Titration.

Es besteht die Möglichkeit, diese Verfahren miteinander zu kombinieren, um ein schnelleres zu handhabendes Verfahren (FTIR) mit den anderen (aufwändigeren) zu kalibrieren.

IR-Spektroskopie

Grundlagen

Um den Acetylierungsgrad mittels IR-Spektroskopie bestimmen zu können, benötigt man eine Referenzgruppe, die bei Chitin und Chitosan identisch ist. Hierzu bietet sich das Polysaccharid-Gerüst mit den entsprechenden Gerüstschwingungen an, die CH-Stretching-Banden (bei ca. 2.880 cm^{-1}) oder die OH- und NH-Stretching-Banden (bei ca. 3.450 cm^{-1}).

Sowohl Amid I als auch Amid II (Amid I $1.600 - 1.700\text{ cm}^{-1}$ im Wesentlichen C=O Streckschwingung; Amid II $1.480 - 1.575\text{ cm}^{-1}$ N-H-Biege-/C-N-Streckschwingung) können als

„Doppelbande“ auftreten, je nachdem ob durch H-Brücken (bzw. fehlende Wasserstoff-Brücken) zwei unterschiedliche Umgebungen an einer Amid-Bindung auftreten können (Abb. 4).

In Abbildung 4 ist in die Spektren eingezeichnet worden, bei welchen Wellenzahlen welche Schwingungen angeregt werden. Es ist aber auch deutlich erkennen, dass es im Bereich von ca. $1.680\text{ cm}^{-1} - 1.480\text{ cm}^{-1}$ zu Überlagerungen von verschiedenen Schwingungen kommt. Hierdurch ist eine direkte Auswertung der Spektren durch Ablesen der Adsorptionswerte (auch unter Berücksichtigung gegebener Basislinien) häufig zu ungenau.

Stand der Technik

IR-Verfahren zur Bestimmung des Deacetylierungsgrades von Chitin und Chitosan wandte als erster GAF Roberts 1992 an [1]. Er benutzte hierzu die OH- und NH-Stretching-Schwingungen, die sich bei Chitin und Chitosan nicht un-

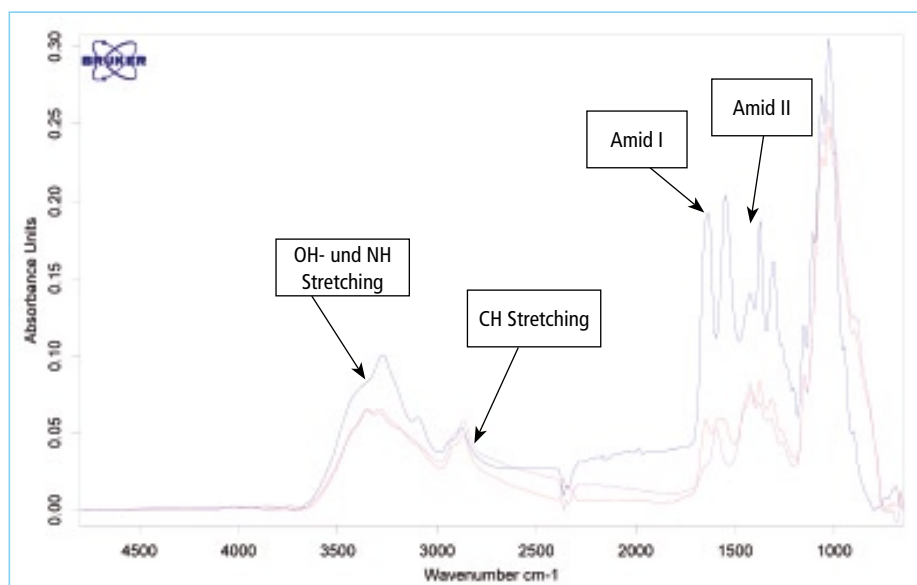


Abb. 3: Spektren-Vergleich: Chitin, Chitosan 1. Deacetylierung, Chitosan 2. Deacetylierung mit Kennzeichnung der wichtigsten Banden

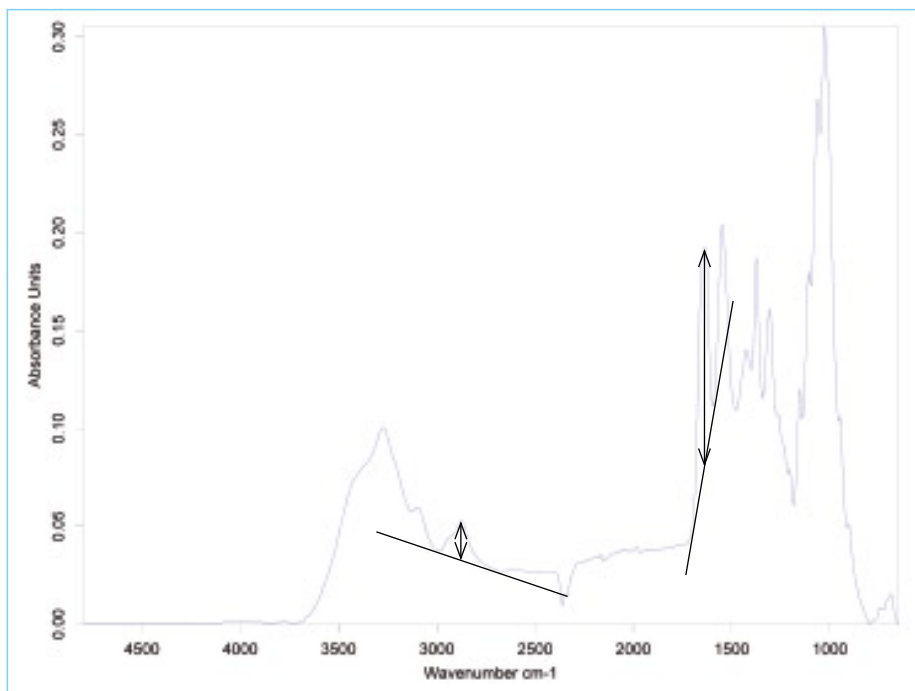


Abb. 4: Absorptions-Spektrum von Chitin mit Grundlinien und Höhen für die CH-Gerüstschwingung bei 2880 cm^{-1} und die Amid I Bande bei 1.660 cm^{-1}

terscheiden und die Carbonyl- ($>C=O$) Stretching-Schwingung, die sich mit zunehmendem Deacetylierungsgrad verringert

M.L. Duarte [2] untersuchte 2002 die Bestimmung des Acetylierungsgrades mit mehreren möglichen Kombinationen von Banden und verschiedenen Grundlinien.

Zu den besten Ergebnissen kommt sie, wenn das Verhältnis der Absorptionen bei ca. 1.660 cm^{-1} und der Absorption bei ca. 2.880 cm^{-1} bestimmt wird. Hierzu werden die Höhen der Peak-

Maxima mit verschiedenen Grundlinien benutzt (Abb.: 5).

ATR-Spektroskopie

Bei dem hier vorgestellten Verfahren wird ein FTIR-Spektrometer (Bruker Equinox 55, Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany mit der Software OPUS incl. Quant 2 [3]) verwendet. Die Spektren der gemahlene Chitin-/Chitosan-Probe können mit ATR direkt aufgenommen und

dann mit dem Computer bearbeitet und ausgewertet werden.

ATR („attenuated total reflection“) bedeutet soviel wie verminderte oder geschwächte Totalreflexion, die bei der Reflexion an absorbierenden Materialien auftreten kann. Die reflektierte Intensität wird gemessen und lässt Rückschlüsse über das absorbierende Medium zu.

Zuerst wird eine Hintergrund-Messung ohne Probe durchgeführt. Die Aufnahme selbst wird mit gemahlene und gesiebte ($100\text{ }\mu\text{m}$) Proben durchgeführt.

Bei dem erhaltenen Spektrum wird zuerst eine Grundlinien-Korrektur durchgeführt.

Das IR-Auswerteprogramm Quant 2

Zur Kalibrierung werden Spektren verschiedener Mischungen von Mehrkomponenten-Systemen aufgenommen. Den Spektren können somit exakte Mischungsverhältnisse zugeordnet werden, die keine Korrelationen aufweisen sollten [10% A + 7% B in einer Matrix (KBr oder Wasser)]. Das heißt, die Konzentrationen sollen sich bei den Komponenten nicht parallel erhöhen (z.B. beide verdoppeln) und sich auch nicht zu 100% ergänzen.

Dies ist allerdings bei Spektren von reinem Chitosan nicht möglich, da das Chitosan per Definition nur aus Polysaccharid-Einheiten mit jeweils einer Glucosamin- oder N-Acetyl-Glucosamin-Gruppe besteht. (Siehe Abb.: 2 und 3)

Die Software sucht sich dann selbständig mehrere Banden aus, aus deren Flächen-Verhältnissen der Gehalt der verschiedenen Komponenten bestimmt wird.

Diese Banden können allerdings auch interaktiv geändert werden, das heißt es können bestimmte Bereiche des Spektrums festgelegt werden, die untersucht werden sollen.

Zur Eichung wurden vier Chitin- und 10 Chitosan-Proben gewählt, von denen auswertbare

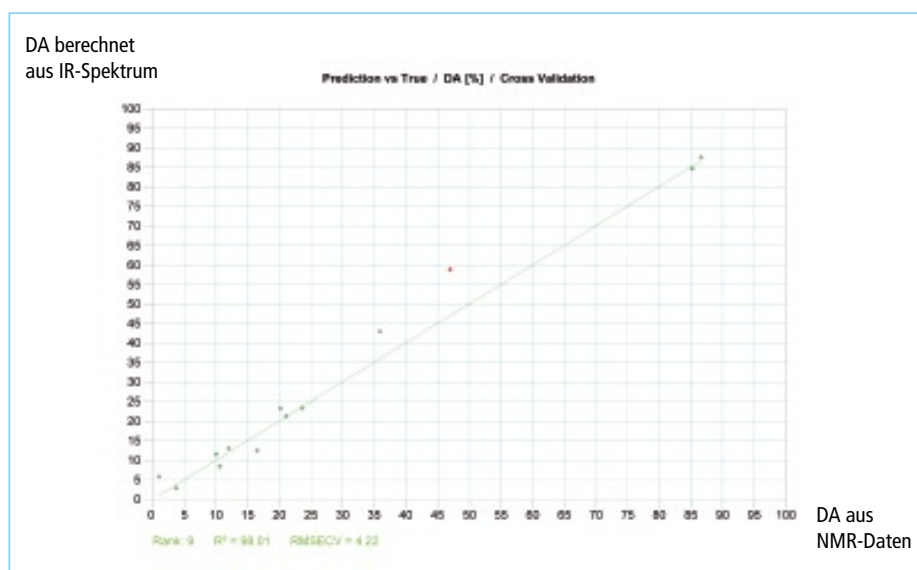


Abb. 5: Quant 2 Methode: keine Datenvorbehandlung, 2 Spektren-Bereiche ca. 1.650 cm^{-1} und ca. 2.880 cm^{-1} . Die berechneten Daten wurden mit NMR-Messungen in Beziehung gesetzt.

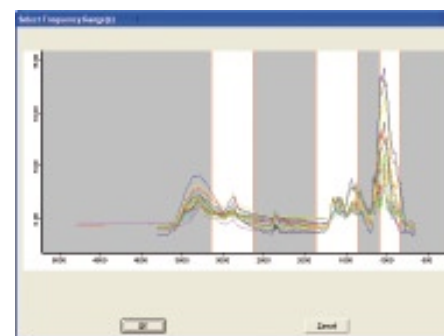


Abb. 6: Anpassung des Programms Quant2 mit allen Datensätzen, 3 untersuchte Bereiche (weiß); Alle Spektren mit den untersuchten Bereichen

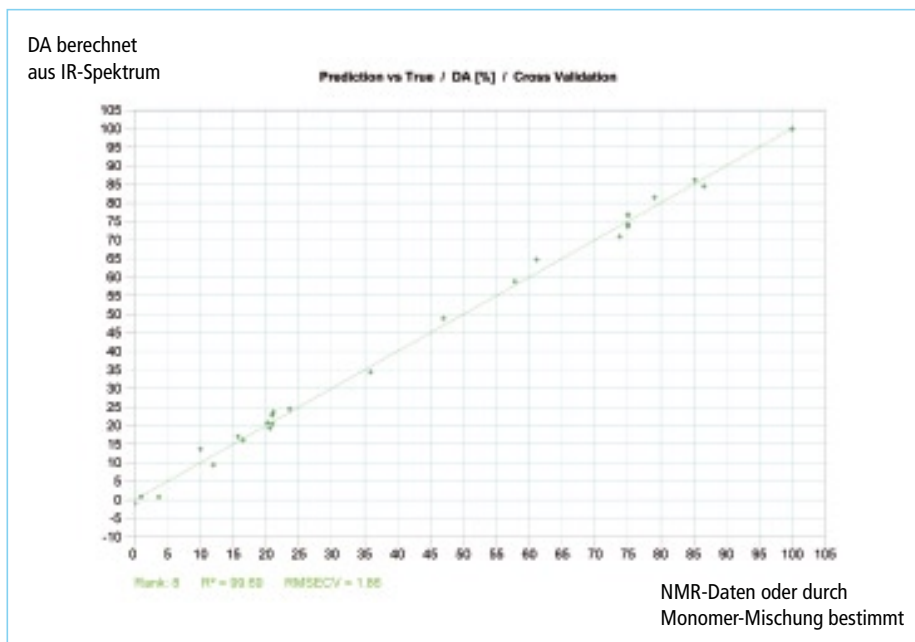


Abb. 7: Anpassung des Programms Quant2 mit allen Datensätzen – 3 Bereiche: 3147,7 cm^{-1} bis 2626,9 cm^{-1} ; 1859,3 cm^{-1} bis 1342,4 cm^{-1} ; 1087,8 cm^{-1} bis 829,4 cm^{-1}

^1H - oder ^{13}C -NMR-Spektren vorlagen und deren Acetylierungsgrad somit als bekannt angesehen werden kann.

Die Werte der Chitosane lagen alle in einem sehr engen Bereich (12 % < DA < 1 %).

Manuell konnten mehrere Spektren-Bereiche angewählt werden, die verglichen werden sollten (Abb.: 7).

Es wurde nun versucht, diese Prozedur von der Software Quant 2 durchführen zu lassen. Hierfür wurden die Absorptions-Spektren dieser 14 Chitin- und Chitosan-Proben mit bekanntem Acetylierungsgrad eingelesen und zum Acetylierungsgrad in Beziehung gesetzt (Abb.: 6).

Da dieses Verfahren mit dem gesamten Spektrum keine guten Ergebnisse erbrachte, wurde versucht, die Banden auszuwählen, die in der Veröffentlichung von GAF Roberts [1] und M.L. Duarte [2] als optimal beschrieben wurden. Hierdurch wurden schon recht gute Ergebnisse erzielt.

Da Chitin und Chitosan (wie beschrieben) als Copolymere von N-Acetyl-Glucosamin und Glucosamin aufgefasst werden können, wurde versucht, verschiedene „künstliche Chitosane“ herzustellen und ihre Spektren aufzunehmen.

Es wurden die Spektren von N-Acetyl-Glucosamin (Chitin-Monomer, DA = 100 %) und Glucosamin (Chitosan-Monomer, DA = 0 %) verwendet. Die Spektren dieser Monomere unterscheiden sich vermutlich von denen der Polymere, da zusätzlich die endständigen OH-Gruppen angeregt werden können. Die entsprechende Absorption liegt an anderer Stelle

als die der COC-Gerüstschiwingung und durfte für diese Auswertung nicht stören. Weiterhin liegt bei der Monomer-Einheit ein Gleichgewicht zwischen linearer und Ring-Form vor.

Dann wurden beliebige Mengen (im mg-Bereich) der beiden Monomere ausgewogen. Die beiden Proben wurden gemischt und der Gehalt an N-Acetyl-Glucosamin (DA in %) wurde errechnet.

Hierzu wurden wieder die schon vorher getesteten Banden um 2880 cm^{-1} und 1.660 cm^{-1} und der Fingerprint-Bereich um 1000 cm^{-1} , ausgewählt und dem Programm zur Anpassung vorgegeben.

Hier befinden sich die symmetrischen NH-Stretching-Schwingungen des Glucosamin und die CH-Gerüstschiwingungen im ersten Bereich, der zweite Bereich schließt die Amid I und II Banden mit ein und der dritte Bereich weist CO-Stretching- und CN-Stretching-Schwingungen auf. Dies ist der Fingerprint-Bereich, in dem sich nicht mehr genau zuordnen lässt, welche Schwingung angeregt wird, da es häufig zu Überlagerungen kommt (Abb.: 7).

Für unsere Zwecke kann dieser Bereich allerdings sehr nützlich sein, da er stark von der Konzentration abhängig ist.

Mit dieser Methode wurden dann alle Spektren behandelt.

So wurden 9 Mischungen und die beiden Monomere gemessen und die erhaltenen Spektren mit den entsprechenden Acetylierungsgraden zur Herstellung einer Kalibrierungskurve mit der Software Quant 2 verwendet. Weiterhin wurden

die Datensätze der Chitin- und Chitosan-Proben verwendet, von denen NMR-Daten vorlagen.

Es zeigt sich, dass eine lineare Abhängigkeit (Korrelation 99,68 %) der Banden-Flächen zum Acetylierungsgrad besteht. Wird jetzt das Spektrum einer Chitin- oder Chitosan-Probe mit unbekanntem Acetylierungsgrad aufgenommen, berechnet die Software aus dem Verhältnis der Flächen den Acetylierungsgrad der Probe.

Zusammenfassung

Mit dem hier beschriebenen Verfahren wurde eine Möglichkeit entwickelt, sehr schnell und mit hoher Genauigkeit den Acetylierungsgrad beliebiger (möglichst reiner) Chitin- und Chitosan-Proben mittels ATR-IR Spektren zu bestimmen.

Dazu wurde für einige Chitin- und Chitosan-Proben der Acetylierungsgrad durch NMR-Messungen ermittelt. Diese Proben wurden als Standard eingesetzt. Weitere Chitine und Chitosane von definiertem Acetylierungsgrad wurden durch Mischungen der Monomere N-Acetyl-Glucosamin und Glucosamin simuliert.

Durch dieses Verfahren ist es gelungen, bei Chitin- und Chitosan-Proben ohne großen Aufwand (ohne Herstellung von Presslingen) sehr genau den Acetylierungsgrad zu bestimmen. Das Verfahren ist daher besonders für Reihenuntersuchungen geeignet.

Literatur

- [1] Roberts, G.A.F. Chitin chemistry; The MacMillan Press Ltd, London; 85 (1992)
- [2] Duarte, M.L. et. al.: An optimized method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy, Int. Journal of Biological Macromolecules 31, 1–8 (2002)
- [3] Handbuch zu Opus Version 5,0 Build: 5, 0, 53 (20040421), Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany (2004)

KONTAKT

Dr. Wolfgang Lindenthal
Prof. Dr. M. Schlaak
Prof. Dr. E. Siefert
 Emdener Institut für Umwelttechnik (EUTECH)
 Fachhochschule Oldenburg/Ostfriesland/
 Wilhelmshaven, Emden
 Tel.: 04921/807-1517
 Tel.: 04941/998005
 Fax: 04921/807-1593
 lindenthal@fh-ooow.de