

การเตรียมน้ำตาลอะมิโน โมเลกุลเดี่ยวจากการไฮโดรไลซ์แอลฟาไคติน  
ด้วยกรด โดยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก

นางสาวเอมจิต สมบุตร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2550  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 8 7 2 5 6 4 3 2 3

PREPARATION OF AMINO MONOSACCHARIDE FROM ACID HYDROLYSIS  
OF  $\alpha$ -CHITIN USING ULTRASONICATION

Miss Aimjit Somboot

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Petrochemical and Polymer Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

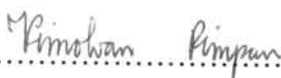
Copyright of Chulalongkorn University

502087


Thesis Title Preparation of amino monosaccharide from acid hydrolysis of  
 $\alpha$ -chitin using ultrasonication  
By Aimjit Somboot  
Field of study Petrochemical and Polymer Science  
Thesis Advisor Associate Professor Mongkol Suwattanasinitt, Ph.D.  
Thesis Co-advisor Anawat Ajavakom, Ph.D.


---


Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

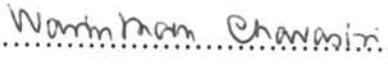
..... Deputy Dean for Administrative Affairs,  
Acting Dean of Faculty of Science  
(Associate Professor Vimolvan Pimpan, Ph.D.)


#### THESIS COMMITTEE

..... Chairman  
(Associate Professor Supawan Tantayanon, Ph.D.)

..... Thesis Advisor  
(Associate Professor Mongkol Sukwattanasinitt, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor  
(Anawat Ajavakom, Ph.D.)

..... Member  
(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)

..... Member  
(Assistant Professor Varawut Tangpasuthadol, Ph.D.)

เอมจิต สมบุตร: การเตรียมน้ำตาลอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวจากการไฮโดรไลซ์แอลฟาไคตินด้วยกรดโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิก. (PREPARATION OF AMINO MONOSACCHARIDE FROM ACID HYDROLYSIS OF  $\alpha$ -CHITIN USING ULTRASONICATION) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. มงคล สุขวัฒนาสินธิ์, อ.อนวัช อาชาวาคม, 46 หน้า.

ในทางทฤษฎี การย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสามารถให้ผลิตภัณฑ์ทั้งที่เป็นน้ำตาลเอ็น-แอสทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) หรือเกลืออวกุโคซามีน ไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติผลิตภัณฑ์ในการย่อยคือ เกลือ GlcNHCl ดังนั้นในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยทั้งแบบการใช้และไม่ใช้คลื่นอัลตราโซนิกเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สูงสุดและมีความบริสุทธิ์ โดยศึกษาสภาวะที่อุณหภูมิและระยะเวลาในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และอัตราส่วนไคตินต่อกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น(w/w) ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเกลือ GlcNHCl คืออัตราส่วนไคตินต่อกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นเท่ากับ 1:1 (w/w) ที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 120 นาที ตามลำดับให้ผลิตภัณฑ์หลังการแยก 64% เมื่อใช้คลื่นอัลตราโซนิกพบว่าสามารถย่อยได้ที่อุณหภูมิ 40°C และได้ผลิตภัณฑ์หลักจากการย่อยคือน้ำตาล GlcNAc

สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์  
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต..... ๑๐ ม.ก. สมบุตร.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# # 4872564323 : MAJOR CHEMISTRY

KEY WORD: chitin, hydrolysis, glucosamine hydrochloride, acetylglucosamine, sonochemistry, sonication

AIMJIT SOMBOOT : PREPARATION OF AMINO MONOSACCHARIDE FROM ACID HYDROLYSIS OF  $\alpha$ -CHITIN USING ULTRASONICATION. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. MONGKOL SUKWATTANASINITT, Ph.D. THESIS COADVISOR ANAWAT AJAVAKOM, Ph.D. 46 pp.

Amino monosaccharide is an important class of sugar used as nutraceutical agents and chemical building blocks for biologically active compounds. In this thesis, hydrolyses of shrimp  $\alpha$ -chitin in concentrated hydrochloric acid to produce amino monosaccharide were studied. At high hydrolysis temperature, 90-150 °C, the hydrolysis produced 2-ammonium-2-deoxy-D-glucopyranose chloride salt (D-glucosamine hydrochloride salt, GlcNHCl) as the only isolated product. The optimum hydrolysis temperature and time for preparation of GlcNHCl were 120 min and 120 °C, respectively, where the reaction typically gave 65% isolated yield with essentially 100% pure of GlcNHCl. With sonication assisted solubilization, the hydrolysis was conducted at lower temperature, 30-40 °C, that yielded 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (*N*-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc) as a major product. A reasonable 37% yield and 95% purity of GlcNAc was obtained from the hydrolysis at 30 °C for 4 hours.

Department : Chemistry

Field of Study : Petrochemical and Polymer Science

Academic Year : 2007

Student's Signature..... *Aimjit somboot*

Advisor's Signature..... *Mongkol Sukwattanasinitt*

Co-advisor's Signature..... *Anawat Ajavakom*

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express her sincere gratitude to her advisor, Associate Professor Mongkol Sukwattanasinitt and Dr. Anawat Ajawakom for their invaluable guidance, excellent and kind supervision and encouragement throughout this research.

Her appreciation is also given to Assistant Professor Warinthorn Chavasiri and Assistant Professor Varawut Tangpasuthadol, thesis defense committees for their kind attention and recommendations.

She is grateful to all teachers who educated and gave her valuable suggestions.

She wishes to thank the staff of Program of Petrochemical and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University for providing all facilities and kind assistance.

Furthermore, she expresses her appreciation to her friends for their genuine, friendly support and friendship, especially those in Plant Biomass Utilization Research Unit and MS-Group, Thoedtoon, Sunsanee, Phakapob, Anupat, Arisa, Chantana and Thitima..

Finally, she would like to manifest her gratitude to her family for their love, care, encouragement, and understanding throughout her study.

## CONTENTS

	<b>Page</b>
Abstract in Thai .....	iv
Abstract in English .....	v
Acknowledgement .....	vi
List of Figures .....	ix
List of Tables .....	x
List of Scheme .....	xi
List of Abbreviation .....	xii
<b>CHAPTER I INTRODUCTION</b>	
1.1 Chitin and Chitosan .....	1
1.2 Applications of <i>N</i> -acetyl- <i>D</i> -glucosamine and glucosamine hydrochloride .....	6
1.3 Preparation of <i>N</i> -acetyl- <i>D</i> -glucosamine and glucosamine hydrochloride .....	8
1.3.1 Enzymatic hydrolysis .....	8
1.3.2 Chemical hydrolysis .....	10
1.4 Liquid chromatography/ mass spectrometry (LC/MS/MS) .....	14
1.5 Aim of thesis .....	15
<b>CHAPTER II EXPERIMENTS</b>	
2.1 Instruments and apparatus .....	16
2.2 Materials and chemicals .....	17
2.3 Shrimp $\alpha$ -chitin (Starting materials) .....	18
2.4 General procedure for acid hydrolysis of chitin .....	18
2.5 Monitoring of hydrolysis of chitin by ESI-MS .....	18
2.5.1 Sample preparation .....	18
2.5.2 ESI-MS analysis .....	19
2.6 Preparation of glucosamine hydrochloride (GlcNHCl) .....	19
2.7 Preparation of <i>N</i> -acetyl- <i>D</i> -glucosamine(GlcNAc) .....	20
2.8 Product analysis .....	23

2.8.1 Purity analysis of GlcNHCl by titration.....	23
2.8.2 Purity analysis of GlcNAc by ESI-MS.....	23
2.8.3 <sup>1</sup> H NMR of products.....	23

### **CHAPTER III RESULTS AND DISCUSSION**

3.1 Shrimp chitin.....	24
3.2 Preparation of glucosamine hydrochloride (GlcNHCl).....	25
3.2.1 Effect of sonication and chitin/conc. HCl weight ratio.....	25
3.2.2 Effect of hydrolysis temperatures and times.....	26
3.3 Sonication assisted hydrolysis of chitin for preparation of GlcNAc .....	28
3.4 Monitoring of the hydrolysis of chitin by ESI-MS.....	30
3.5 Preparation of GlcNAc.....	33
3.6 Determination of purified products by using ESI-MS .....	36

### **CHAPTER IV CONCLUSIONS**

REFERENCES .....	38
APPENDICES .....	42
VITAE .....	46



## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Chemical structures of (a) cellulose and (b) chitin.....	2
1.2 Diagrammatic illustration of antiparallel arrangement and X-ray crystal structure of hydrogen bond linkage between O=CNH groups of $\alpha$ -chitin.....	4
1.3 Diagrammatic illustration of parallel arrangement and X-ray crystal structure of hydrogen bond linkage between to O=CNH groups of $\beta$ -chitin. .	4
1.4 Simplified flowsheet for preparation of chitin and chitosan, their monomers and oligomers from invertebrate marine waste .....	5
1.5 Pathway for conversion of chitin and chitosan into their oligomers by enzymatic means.....	9
1.6 Reactions for acid hydrolysis of chitin. ....	11
1.7 Electrospray ionization .....	14
3.1 Photographs of (a) shrimp pen chitin as purchased, (b) after grinding .....	24
3.2 GlcNHCl yield obtained from and the hydrolysis of chitin ratio of chitin/conc HCl (w/w). The averages from duplicated experiments are used in the plot.....	26
3.3 GlcNHCl yields obtained from the hydrolysis of chitin using various hydrolysis times and temperatures after (a) preheating and (b) sonication treatments The averages from duplicated experiments are used in the plot....	27
3.4 Mass spectra of GlcNAc (a) and GlcNHCl (b).....	31
3.5 Relative abundance of GlcNAc detected by ESI-MS at various hydrolysis temperature and time. ....	32
3.6 Relative abundance, MS signal intensity of GlcNAc and GlcN during hydrolysis of chitin.....	32
3.7 Weight of purify product at the optimal condition .....	33
3.8 $^1\text{H}$ NMR spectrum comparison between GlcNAc standard and purification solid (solid A, B and C). ....	36

## LIST OF TABLES

<b>Tables</b>	<b>Pages</b>
1.1 Application of chitin, chitosan, their monomers and oligomers.....	7
3.1 Size of chitin was measured by the sieving shaker.....	24
3.2 % hydrolysis of chitin with concentrated HCl with and without sonication assisted solubilization.....	28
3.3 % Weight and % purity of solid A, solid B and solid C from the purified products.....	36

## LIST OF SCHEME

<b>Scheme</b>	<b>Page</b>
1.1 Acid hydrolysis of chitin.....	15
2.1 Isolation of GlcNHCl.....	20
2.2 Isolation of GlcNAc.....	22
3.1 Isolation of GlcNAc.....	29