

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА КАРБОКСИМЕТИЛХИТИНА В СОЛЕВОЙ, КИСЛОЙ И СМЕШАННОЙ ФОРМЕ

© Л. Н. Широкова, В. А. Александрова, Г. Н. Бондаренко, Г. А. Шандрюк

Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчиева РАН,
119991, г. Москва, Ленинский пр., д. 29
E-mail: shirokova@ips.ac.ru

Поступила в Редакцию 13 февраля 2020 г.
После доработки 2 августа 2020 г.
Принята к публикации 7 августа 2020 г.

Получены различные формы 6-О-карбоксиметилхитина: солевая, содержащая карбоксильную группу в виде соли —COONa, кислая, содержащая карбоксильную группу в виде —COOH, и смешанная, содержащая в макромолекуле в равном соотношении звенья цепи в кислой и солевой форме. Состав и строение синтезированных карбоксиметилхитинов и пленок на их основе подтверждали с использованием методов ИК-Фурье-спектроскопии, твердотельной ^{13}C ЯМР-спектроскопии, термогравиметрического анализа, дифференциальной сканирующей калориметрии. Механические свойства пленок, полученных из 6-О-карбоксиметилхитина в солевой и кислой форме, оценивали путем сравнения их деформационных характеристик. Данные ИК-Фурье-спектроскопии подтверждают, что в 6-О-карбоксиметилхитине в кислой форме при межмолекулярном взаимодействии функциональных групп полимера могут возникать водородные связи, а также ионные пары. С помощью твердотельной ^{13}C ЯМР-спектроскопии показано, что при синтезе 6-О-карбоксиметилхитина из хитина замещение на группу —CH₂COONa происходит преимущественно по гидроксильной группе у атома С-6 глюкопиранозного цикла. Из сравнения представленных данных термогравиметрического анализа и дифференциальной сканирующей калориметрии следует, что количество воды, сорбируемой полимером, зависит от формы, в которой находится 6-О-карбоксиметилхитин, наиболее гигроскопичной является солевая форма 6-О-карбоксиметилхитина. Деформационные свойства пленок изучались на образцах 6-О-карбоксиметилхитина в солевой и кислой форме. Показатель модуля упругости 6-О-карбоксиметилхитина в кислой форме существенно отличается от значения для 6-О-карбоксиметилхитина в солевой форме. Возможно, такое различие обусловлено более высоким содержанием сорбированной полимером воды в пленках, полученных из солевой формы 6-О-карбоксиметилхитина (20%), по сравнению с пленками из кислой формы 6-О-карбоксиметилхитина (9%).

Ключевые слова: карбоксиметилхитин; пленки; ИК-Фурье-спектроскопия; термический анализ; механические свойства; водородная связь

DOI: 10.31857/S0044461820110043

Хитин, или поли-β-2-ацетиамидо-2-дезоксид-глюкопираноза, является одним из наиболее распространенных полисахаридов, встречающихся в природе. Хитин нерастворим в обычных растворителях. Это ограничивает практическое использование этого

полимера. Карбоксиметильное производное хитина растворимо в воде в широком интервале pH и характеризуется низкой токсичностью, биоразлагаемостью, сорбционной способностью, а также возможностью получать на его основе пленки, волокна и гидроге-

ли [1–3]. Благодаря такому уникальному сочетанию свойств 6-О-карбоксиметилхитин нашел широкое применение в различных областях биологии и медицины: системы контролируемой доставки лекарств, биосенсоры, восстановление различных тканей и т. д. [4, 5].

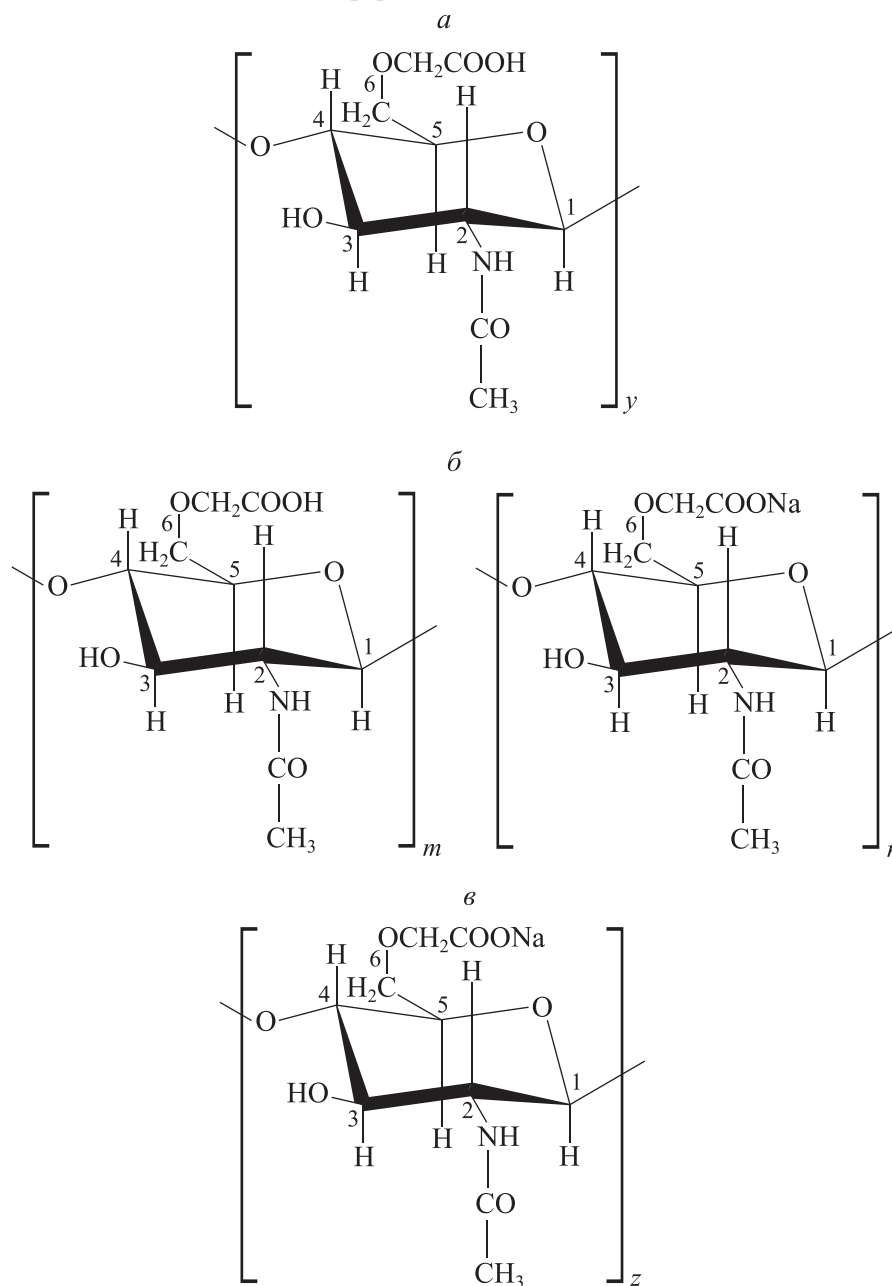
Для получения новых материалов на основе 6-О-карбоксиметилхитина необходимо изучить поведение и свойства этого полиэлектролита при различных рН среды. С этой целью были получены

различные формы 6-О-карбоксиметилхитина: солевая (КМХ-Na), содержащая карбоксильную группу в виде соли —COONa, кислая (КМХ-H), содержащая карбоксильную группу в виде —COOH, и смешанная (КМХ-50H), содержащая в макромолекуле в равном соотношении звенья цепи в кислой и солевой форме (см. схему).

Цель работы — исследование структуры и свойств этих форм 6-О-карбоксиметилхитина и пленок на их основе.

Схема

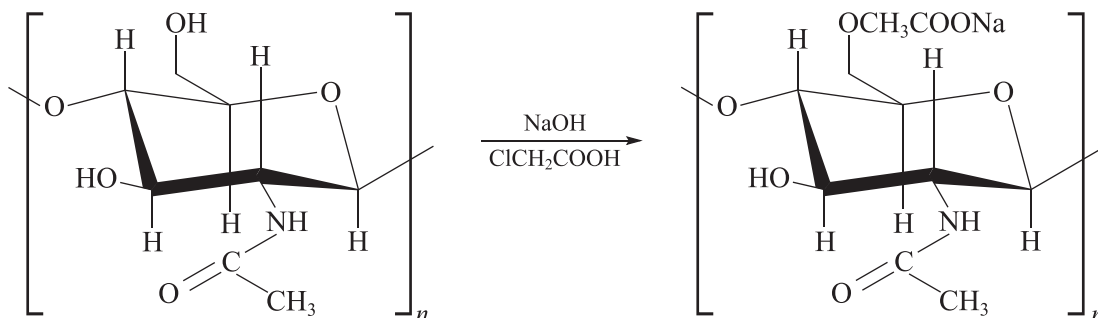
Структурные формулы 6-О-карбоксиметилхитина в кислой форме КМХ-H (а), солевой форме КМХ-Na (б) и смешанной форме КМХ-50H (в), $n = m = 0.5$



Экспериментальная часть

Хитин производился в ЗАО «Биопрогресс». Все другие химические вещества (гидроксид натрия, монохлоруксусная кислота, изопропанол) были аналитической чистоты и использовались без дальнейшей очистки.

Водорастворимое производное хитина — 6-О-карбоксиметилхитин со среднемассовой молекулярной



Среднемассовую молекулярную массу карбоксиметилированного хитина оценивали с помощью метода седиментации на аналитической ультрацентрифуге MOM 3180 (MOM Hungarian Optical Works), оснащенной рефрактометрической оптической системой Philpot-Svenson. Скорость вращения ротора ультрацентрифуги 5000 об·мин⁻¹.

Для получения КМХ-Н использовали стеклянную колонку, заполненную катионитным ионообменником КУ-2-8 (полная статическая обменная емкость не менее 1.8 мг-экв·см⁻³, размер зерна 0.315–1.25 мм). Требуемое количество полимера КМХ-Na (pH 7.5) пропускали через ионообменную колонку со скоростью 20 капель/мин. Элюат собирали при pH 3.

Смешанную форму КМХ-50Н (pH 4.5) и солевую форму КМХ-Na (pH 8.5) получали из кислой формы КМХ-Н, добавляя раствор 0.1 М NaOH в количестве, необходимом для превращения 50 и 100% —COOH-групп в —COONa-группы (количество раствора 0.1 М NaOH определяли по данным титрования кислой формы КМХ-Н) [7]. Потенциометрическое титрование карбоксиметилового эфира хитина проводили с использованием pH-метра РНМ 82 Standard pH-Meter (Radiometer).

Состав и строение синтезированных КМХ-Na, КМХ-50Н и КМХ-Н подтверждали с использованием методов ИК-Фурье-спектроскопии, твердотельной ¹³С ЯМР-спектроскопии, термогравиметрического анализа (ТГА) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК); механические свойства пленок, полученных из КМХ-Na и КМХ-Н, оценивали путем сравнения их деформационных характеристик.

массой 80 000 и степенью карбоксиметилирования 1.0 получали из хитина в форме соли (КМХ-Na), как описано в [6]. В качестве карбоксилирующего агента использовали монохлоруксусную кислоту CH₂ClCOOH, которой обрабатывали предварительно активированный хитин в присутствии избытка гидроксида натрия NaOH в водно-спиртовой среде при повышенной температуре 72°C:

Образцы полимерных систем исследовали на ИК-Фурье-спектрофотометре IFS/66V (Bruker) пленочным методом на чипе и по методике отражения с поверхности образца в диапазоне 4000–400 см⁻¹ при 20°C.

Структурные исследования исходного хитина и полученного карбоксиметилированного производного хитина проводили с использованием метода твердотельной ¹³С ЯМР-спектроскопии. Спектры образцов предварительно измельченного до размера ~40–50 мкм на шаровой мельнице хитина и лиофильно высушенных КМХ-Na и КМХ-Н регистрировали на ядрах углерода с кросс-поляризацией, используя универсальный ЯМР-спектрометр Varian Unity Inova AS 500 (Varian). Величина протонного импульса составляла 3.3 мкс, время накопления — 1 мс. Было накоплено 2048 сканов с интервалами 2 с при скорости вращения 15 кГц. Величина контактного времени составляла 2 мс.

Термогравиметрический анализ и дифференциальную сканирующую калориметрию образцов проводили на приборе TGA/DSC1 (Mettler Toledo Ltd) при скорости нагрева 10 град·мин⁻¹ от 30 до 550°C в атмосфере аргона, масса навески образца — 8 мкг. Относительная погрешность измерения энтальпии не более ± 3%.

Пленки из 6-О-карбоксиметилхитина были сформованы методом полива из раствора полимера в воде на подложке из оргстекла толщиной 50 мкм. Испытания полимерных пленок проводили на разрывной машине Instron 1121 (Instron Ltd). Испытывали образцы с длиной рабочей части 10 мм и шириной 3 мм. Образцы пленок деформировали

до разрыва со скоростью $5 \text{ мм} \cdot \text{мин}^{-1}$. Определение поперечного сечения лопатки осуществляли с помощью микрометра, толщина варьировалась в пределах $0.040\text{--}0.045 \text{ мм}$. Механические характеристики определяли усреднением измерений минимум для шести образцов. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Series IX Automated Materials Testing System — Version 5.25 Instron Corporation © 1985–92. Регистрировалось постепенное изменение длины образца и возрастающее напряжение, рассчитанное по формуле

$$\zeta = P/\varepsilon, \quad (1)$$

где ζ — модуль упругости; P — напряжение, вызываемое в образце действующей силой (равно силе, деленной на площадь приложения силы); ε — упругая деформация образца, вызванная напряжением (равна отношению изменения размера образца после деформации к его первоначальному размеру).

Обсуждение результатов

Хитин, используемый в данной работе, получен из панцирей крабов и имеет α -структуру, которая отличается высокой степенью кристалличности, обусловленной системой регулярно чередующихся водородных связей, образующихся между цепями макромолекул при взаимодействии протоноакцепторных и протонодонорных групп. К таким группам

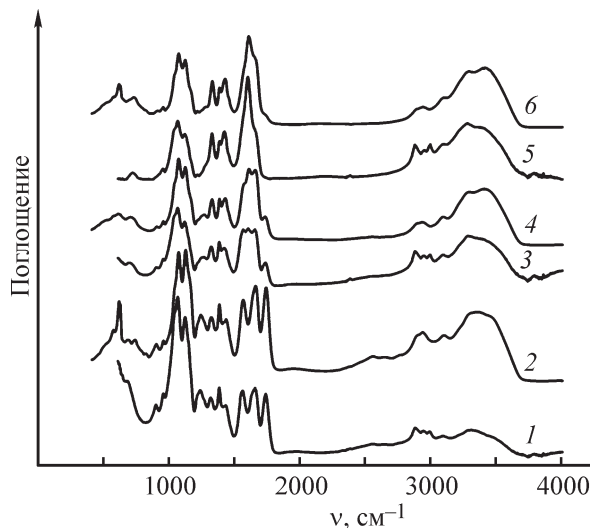


Рис. 1. ИК-спектры пленок на чипе образцов из водных растворов 6-О-карбоксиметилхитина в солевой (2), смешанной (4) и кислой форме (6); спектры отражения с поверхности порошка лиофильно высушенных образцов 6-О-карбоксиметилхитина в солевой (1), смешанной (3) и кислой форме (5).

относятся: ацетамидная группа при С-2 и группа $\text{—CH}_2\text{OH}$ при С-6 углеродных атомов глюкопиранозного цикла. При синтезе 6-О-карбоксиметилхитина происходит значительное разрушение межмолекулярных водородных связей в α -хитине, что приводит к образованию водорастворимого полимера.

В спектрах КМХ-Н, полученных как в пленке на чипе из водного раствора (рис. 1, кривая б), так и по методике отражения с поверхности лиофильно высушенного образца (рис. 1, кривая 5), регистрируются интенсивные полосы при 1733 и 1567 см^{-1} , относящиеся к связи C=O в карбоксильной группе и в карбоксилат-ионе соответственно. Противоионом в карбоксилат-ионе может быть ион аммония или его замещенная форма. Подтверждением того, что катионом в КМХ-Н может быть замещенный ион аммония, является слабая широкая полоса 2534 см^{-1} . Полоса 1652 см^{-1} относится к связи C=O в амидной группе КМХ-Н. Высокая интенсивность полосы в области 3430 см^{-1} в образце, полученном из раствора КМХ-Н, связана с остатками воды. Остатки воды полностью удалить из пленки на чипе не удается.

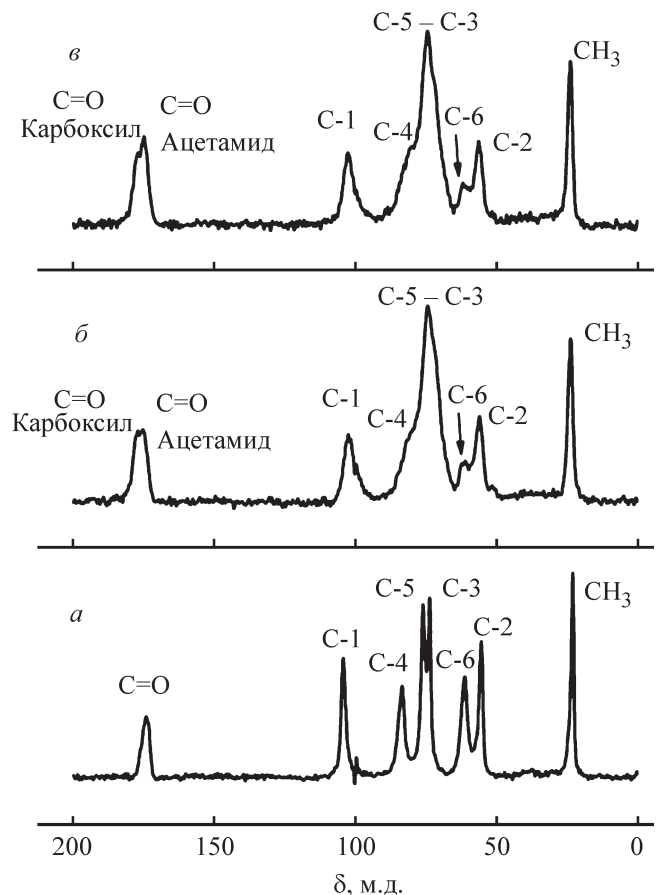


Рис. 2. Твердотельные ^{13}C ЯМР-спектры хитина (а), 6-О-карбоксиметилхитина в солевой (б) и кислой (в) форме.

В ИК-спектрах смешанной формы КМХ-50Н полоса $\nu_{\text{C=O}}$ карбоксильной группы сильно убывает по интенсивности, при этом появляется новая полоса карбоксилат-аниона — 1600 см^{-1} , противоионом такого аниона является Na^+ (рис. 1, кривые 4 и 3). Отметим, что резко уменьшается по интенсивности, но остается полоса 1563 см^{-1} , отражающая появление ионной пары с замещенным аммонийным катионом [8].

В ИК-спектрах солевой формы КМХ-На слабый перегиб в области 1733 см^{-1} свидетельствует о следовых количествах кислых карбоксильных групп (рис. 1, кривые 1 и 2). Появляется новая полоса карбоксилат-аниона 1600 см^{-1} , противоионом такого аниона является Na^+ . Полоса амидной группы 1652 см^{-1} проявляется как плечо к полосе 1600 см^{-1} . Полосы при 1567 и 2534 см^{-1} в спектре солевой формы КМХ-На отсутствуют.

Данные ИК-Фурье-спектроскопии подтверждают, что в КМХ-Н могут образовываться водородные связи, а также ионные пары.

Анализ структуры исходного хитина, изученной методом твердотельной ^{13}C ЯМР-спектроскопии, показал наличие двух легко различимых характеристических двоянных сигналов в области химических сдвигов $\delta 73.7$ и 76.1 м. д., отнесенных к атомам С-3 и С-5 соответственно (рис. 2, а).

Появление такого частично разрешенного дублета можно объяснить образованием особой конфигурации атомов С-3 и С-5 глюкопиранозного кольца, образующейся в результате формирования системы водородных связей и характерной для α -формы хитина. Отметим, что для β -хитина характерен один сигнал при $\delta \sim 75.2$ м. д. В спектрах КМХ-На (рис. 2, б) и КМХ-Н (рис. 2, в) наблюдаются сигналы при $\delta 174.9$ и 177.0 м. д., соответствующие С=О-связи при ацетамидных ($-\text{NHCOCH}_3$) и карбоксиметильных группах ($-\text{CH}_2\text{COONa}$) соответственно. Таким образом, с помощью метода твердотельной ^{13}C ЯМР-спектроскопии показано, что в структуре 6-О-карбоксиметилхитина, синтезированного по методике [6], замещение на группу $-\text{CH}_2\text{COONa}$ идет преимущественно по гидроксильной группе у атома С-6 глюкопиранозного кольца.

Данные ИК-Фурье-спектроскопии позволяют предполагать, что в кислой форме КМХ-Н наблюдается межмолекулярное взаимодействие с участием функциональных групп различных цепей полимера. Такое взаимодействие может приводить к изменению свойств композитных материалов, получаемых на основе карбоксиметилированных производных хитина.

Особенности строения производных хитина проявляются при исследовании их термической устойчивости, оценка которой имеет практическое значение.

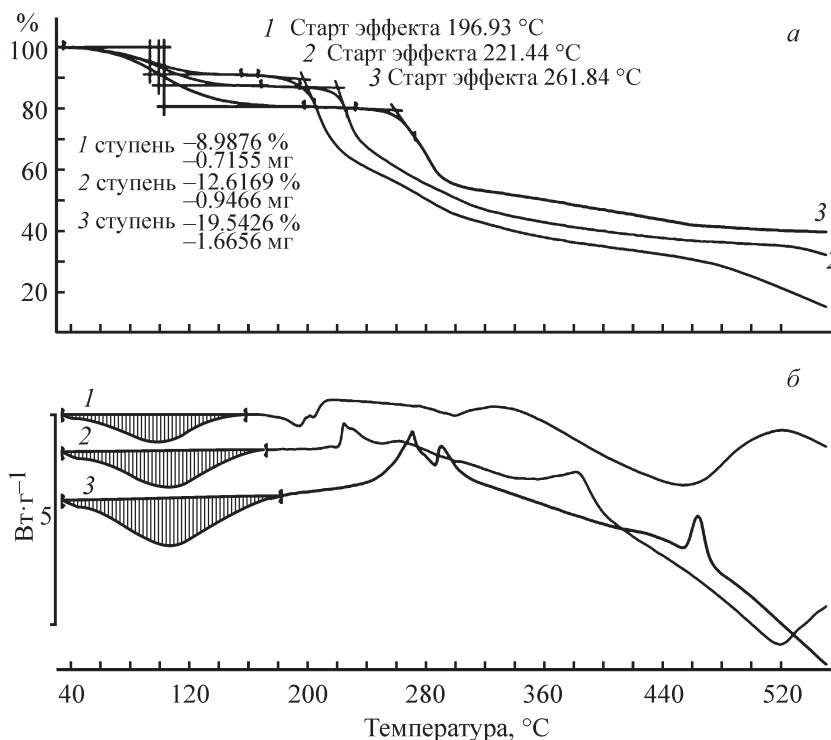


Рис. 3. Термогравиметрический анализ (а) и дифференциальная сканирующая калориметрия (б) образцов лиофильно высушенных образцов 6-О-карбоксиметилхитина в солевой (1), смешанной (2) и кислой (3) форме.

Из анализа данных ТГА можно сделать вывод, что эффекты, возникающие при нагреве всех трех форм КМХ-Na, КМХ-50Н и КМХ-Н, регистрируются в несколько этапов. Первый этап (до 160–180°C) связан с испарением связанной (сорбированной) воды, присутствующей в лиофильно высушенных образцах трех форм 6-О-карбоксиметилхитина. На втором этапе при нагревании образцов выше 190–260°C регистрировали экзотермический пик, который связан с разложением полимера (деацетилирование, декарбоксилирование и др.). На третьем этапе потеря массы при температуре 335°C и выше связана с карбонизацией образцов в связи с расщеплением макромолекул полимера по гликозидным связям. Эти результаты находятся в согласии с [9].

Количество воды, сорбируемой полимером, зависит от формы, в которой находится 6-О-карбоксиметилхитин. Так, КМХ-Н при комнатных условиях сорбирует ~9% воды, КМХ-50Н — около 13% воды, КМХ-Na — 20% (рис. 3). Таким образом, наиболее гигроскопичной является форма КМХ-Na, что согласуется с данными других авторов [9].

Температура начала разложения для КМХ-Н составляла 197°C, для КМХ-50Н — 221 и для КМХ-Na — 262°C. Отметим, что для КМХ-Na при термодеструкции получен наибольший коксовый остаток. Таким образом, наибольшей термической стабильностью характеризуется форма КМХ-Na, наименее термически стабильна Н-форма. По-видимому, наличие свободных карбоксильных групп в КМХ-Н способствует протеканию таких реакций, как декарбоксилирование, образование ангидридных связей и т. д., сопровождающих термические превращения полимера.

Важной характеристикой полимерных материалов является их механическая прочность, которую обычно определяют в условиях одноосного растяжения на разрывных машинах или динамометрах. Деформационные свойства пленок изучали на образцах КМХ-Na и КМХ-Н. Показатели, характеризующие механические свойства пленок для исследованных форм КМХ-Na (модуль упругости 1.9 ГПа и прочность 47 МПа) и КМХ-Н (модуль упругости 2.4 ГПа и прочность 52 МПа), близки. В то же время следует отметить, что показатель модуля упругости КМХ-Н существенно отличается от значения для КМХ-Na. Такое различие обусловлено, возможно, более высоким содержанием сорбированной воды в образце КМХ-Na. Согласно данным ТГА, содержание воды в образце КМХ-Na более чем в 2 раза выше, чем в КМХ-Н.

Выводы

Свойства трех форм 6-О-карбоксиметилхитина (солевая форма КМХ-Na, смешанная форма КМХ-50Н, кислая форма КМХ-Н) обусловлены, очевидно, конформационными различиями цепей полиэлектролита при различных значениях pH. В случае образования пленок такие различия обусловлены особенностями протекания процессов структурообразования при удалении растворителя, а также различиями в фазовой структуре пленок. Подтверждением этому служат данные метода ИК-спектроскопии, на основании которого было показано, что образование водородных связей в КМХ-Н протекает более интенсивно, чем в КМХ-Na.

Проведенные исследования позволили выявить связь между структурой и составом 6-О-карбоксиметилхитина, синтезированным в различных формах, и его свойствами. Такой анализ может являться научным обоснованием подходов к созданию новых материалов с прогнозируемыми свойствами с использованием возобновляемых в природе источников сырья.

Финансирование работы

Работа выполнена в рамках госзадания Института нефтехимического синтеза РАН.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Информация об авторах

Широкова Людмила Николаевна, к.х.н., н.с. ИНХС РАН, ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4782-8502>

Александрова Валентина Андреевна, к.х.н., в.н.с. ИНХС РАН,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3946-4289>

Бондаренко Галина Николаевна, д.х.н., проф., г.н.с. ИНХС РАН,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6637-7594>

Шандрюк Георгий Александрович, с.н.с. ИНХС РАН, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4349-5296>

Список литературы

- [1] Tokura S., Nishimura S., Sakairi N., Nishi N. Biological activities of biodegradable polysaccharide // Macromol. Symp. 1996. V. 101. N 1. P. 389–396. <https://doi.org/10.1002/masy.19961010144>

- [2] Tokura S., Tamura H. O-carboxymethyl-chitin concentration in granulocytes during bone repair // *Biomacromolecules*. 2001. V. 2. N 2. P. 417-421. <https://doi.org/10.1021/bm0001345>
- [3] Zhao L., Mitomo H., Nagasawa N., Yoshii F., Kume T. Radiation synthesis and characteristic of the hydrogels based on carboxymethylated chitin derivatives // *Carbohydr. Polym.* 2003. V. 51. N 2. P. 169–175. [http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00210-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00210-2)
- [4] Tokura S., Miura Y., Johmen M., Nishi N., Nishimura S. I. Induction of drug specific antibody and the controlled release of drug by 6-O-carboxymethyl-chitin // *J. Control. Release*. 1994. V. 28. N 1–3. P. 235–241. [http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00210-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00210-2)
- [5] Tokura S., Baba S., Uraki Y., Miura Y., Nishi N., Hasegawa O. Carboxymethyl-chitin as a drug carrier of sustained release // *Carbohydr. Polym.* 1990. V. 13. N 3. P. 273–281. [http://dx.doi.org/10.1016/0144-8617\(90\)90059-2](http://dx.doi.org/10.1016/0144-8617(90)90059-2)
- [6] Tokura S., Nishi N., Tsutsumi A., Somorin O. Studies on chitin VIII. Some properties of water soluble chitin derivatives // *Polym. J.* 1983. V. 15. N 6. P. 485–489. <http://dx.doi.org/10.1295/polymj.15.485>
- [7] Aleksandrova V. A., Shirokova L. N. Radiation-chemical reduction of silver ions in polyelectrolyte matrix–carboxymethyl chitin // *Polym. Sci. Ser. B*. 2018. V. 60. N 6. P. 727–734. <https://doi.org/10.1134/S1560090418060027>
- [8] Pretsch E., Bühlmann F., Affolter C. Structure determination of organic compounds: tables of spectral data. Heidelberg: Springer, 2000. P. 321–322.
- [9] Kittur F. S., Harish Prashanth K. V., Udaya Sankar K., Tharanathan R. N. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry // *Carbohydr. Polym.* 2002. V. 49. N 2. P.185–193. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00320-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00320-4)
-