

АССОЦИАЦИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ КАРБОКСИМЕТИЛХИТИНА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

© 2019 г. В. А. Александрова^{а,*}, Л. Н. Широкова^а, Е. А. Литманович^б, Г. Н. Бондаренко^а

^аИнститут нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук
119991 Москва, Ленинский пр., 29, Россия

^бМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова. Химический факультет
119899 Москва, Ленинские горы, Россия

*e-mail: alexandrova@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 28.12.2018 г.

После доработки 06.03.2019 г.

Принята к публикации 18.03.2019 г.

Методом динамического светорассеяния исследованы процессы ассоциации макромолекул 6-О-карбоксиметилхитина (в солевой и смешанной форме) в водном растворе. Установлено, что раствор 6-О-карбоксиметилхитина в форме соли содержит два вида частиц: мелкие (9–16 нм), соответствующие размеру единичных макромолекул, и более крупные (150–177 нм) – ассоциаты. В растворе смешанной формы 6-О-карбоксиметилхитина присутствуют только ассоциированные частицы (80–800 нм). С использованием метода ИК-фурье-спектроскопии показано, что ассоциирование макромолекул 6-О-карбоксиметилхитина в водном растворе обусловлено образованием как водородных связей, так и ионных пар между функциональными группами полимера.

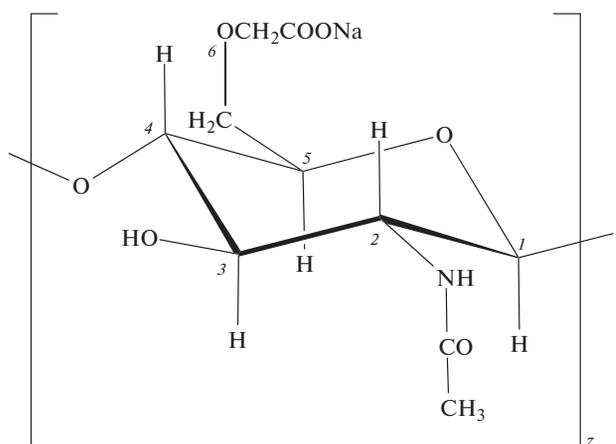
DOI: 10.1134/S2308112019040011

Хитин, поли-β-2-ацетиамидо-2-дезоксид-глюкопираноза, является вторым по распространенности в природе полисахаридом после целлюлозы. В наибольшем количестве хитин находится в составе экзоскелета большинства классов беспозвоночных животных (крабы, креветки и т.д.), а также этот полисахарид входит в состав грибов, водорослей и других организмов. Хитин обладает уникальным комплексом физико-химических свойств и биологических характеристик, однако он не растворяется в большинстве доступных растворителей, что существенно ограничивает возможности его применения. Путем химических модификаций хитин может быть преобразован в водорастворимые формы. Одно из таких производных хитина – 6-О-карбоксиметилхитин (КМХ), который растворяется в воде в широком интервале рН. Для КМХ характерны низкая токсичность, биodeградируемость и биосовместимость. Благодаря наличию таких свойств КМХ широко используется в пищевой промышленности, фармацевтике, косметологии, медицине и других областях. В частности, в медицине КМХ используют для восстановления живых тканей, создания перевязочных материалов, а также систем контролируемого высвобождения фармацевтических средств [1, 2]. При этом доставляемый субстрат может быть присоединен к цепи полимера ковалентными, ионными связями или за счет специфической адсорбции. Следует отметить, что при проведении полимераналогичных превращений макромолекул

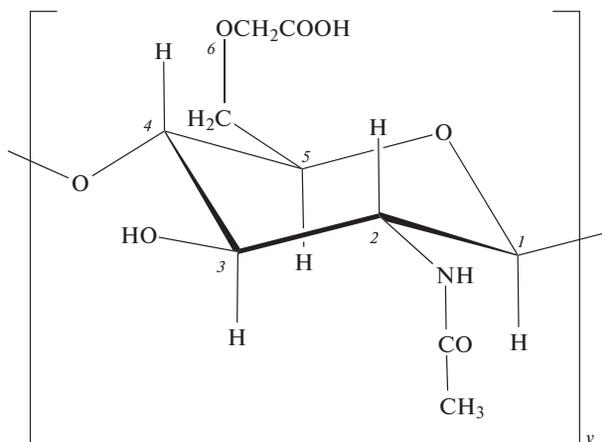
КМХ, рН среды может изменяться в интервале от 3 до 8 в зависимости от формы, в которой получен полимер [3]. В связи с этим необходимо понимать поведение макромолекулы – носителя лекарственного препарата при различных рН среды.

Известно, что метод динамического светорассеяния успешно применяется для изучения ассоциации полиэлектролитов, в частности различных производных хитина [4, 5].

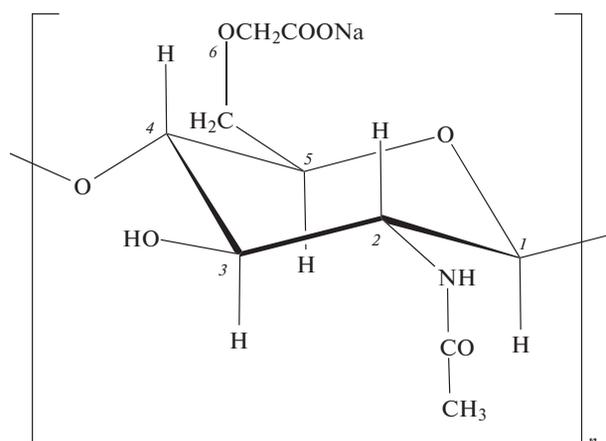
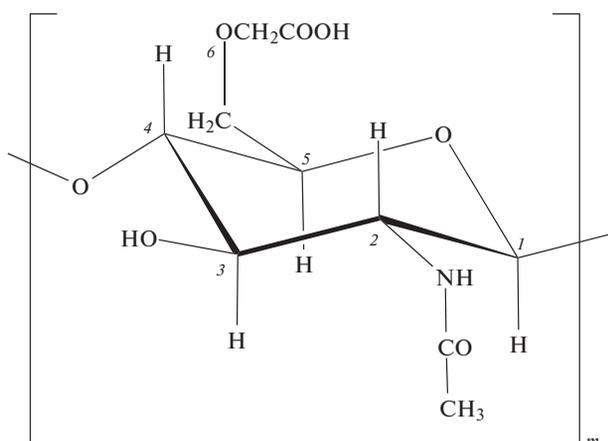
Учитывая это, в настоящей работе с помощью методов динамического светорассеяния и ИК-фурье-спектроскопии было изучено ассоциирование макромолекул КМХ, полученного в различных формах: в солевой, содержащей карбоксильную группу в виде соли –COONa (КМХ-Na)



в кислой, содержащей карбоксильную группу в виде $-\text{COOH}$ (**КМХ-Н**)



и смешанной, содержащей в макромолекуле в равном соотношении звенья цепи в кислой и солевой формах ($n = m = 0.5$) (**КМХ-50Н**)



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Водорастворимый полимер КМХ синтезировали из хитина по методу [6]. В качестве карбоксиллирующего агента использовали CH_2ClCOOH , которой обрабатывали предварительно активированный хитин в присутствии избытка NaOH в водно-спиртовой среде при повышенной температуре 72°C . В результате синтезировали КМХ с $M_w = 7 \times 10^4$ (метод ультрацентрифугирования) и степенью карбоксиметилирования 1.0 [6].

Смешанную форму КМХ-50Н (рН 4.5) и солевую форму КМХ- Na (рН 8.5) получали из кислой формы КМХ-Н, добавляя 0.1 М NaOH в количестве, необходимом для превращения 50% и 100% групп $-\text{COOH}$ в группы $-\text{COONa}$, в соответствии с кривой титрования кислой формы [7].

Рентгеноструктурный анализ

Рентгеноструктурные исследования образцов проводили на установке на базе 12-кВт генерато-

ра с вращающимся медным анодом “RU-200 Rotaflex” (“Rigaku”, Япония) в режиме на прохождение (40 кВ, 140 мА). Использовали $\text{CuK}\alpha$ -излучение с длиной волны $\lambda = 0.1542$ нм. Образцы толщиной 0.4 мм помещали в тонкий лавсановый пакет, который закрепляли в стандартном держателе. Степень кристалличности определяли с помощью специализированного программного обеспечения “EVA Diffrac plus” (“Bruker AXS”, Германия).

Динамическое светорассеяние

В работе использовали гониометр рассеянного лазерного света “Photocor Complex” (“Photocor Instruments”, США) с He-Ne-лазером (длина волны $\lambda = 633$ нм, мощность 25 мВт) в качестве источника. Временную автокорреляционную функцию g_2 флуктуаций интенсивности рассеянного света определяли на 288-канальном корреляторе “Photocor-FC” (“Photocor Instruments”, США) и

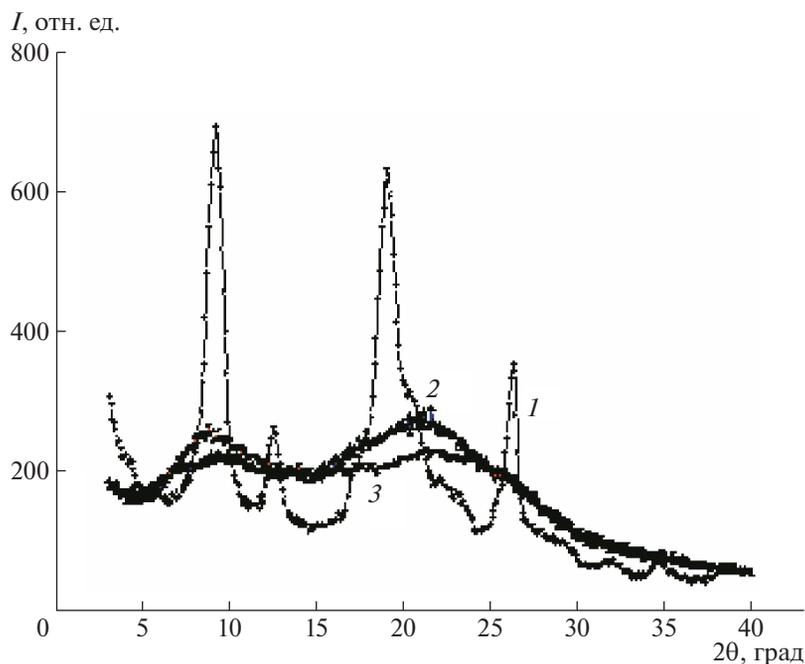


Рис. 1. Дифрактограммы хитина (1), а также КМХ в кислой КМХ-Н (2) и солевой КМХ-Na (3) формах.

обрабатывали с использованием программы ДунаLS [8] по уравнению

$$g_2(\tau) = 1 + C \left[\int_{D_{\min}}^{D_{\max}} Z(D) \exp(-q^2 D \tau) dD \right]^2,$$

где $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$ – волновой вектор при рассеянии на угол θ , τ – время удерживания сигнала, D – коэффициент диффузии, $Z(D)$ – функция распределения рассеивающих частиц по величине D .

При обработке автокорреляционной функции всех образцов применяли одинаковые параметры регуляризации: каналы коррелятора с 30 по 180, число интервалов 200. Из распределений по коэффициентам диффузии получали распределения по гидродинамическим радиусам с использованием формулы Стокса–Эйнштейна

$$R_h = kT / (6\pi\eta D),$$

где k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, η – вязкость растворителя.

ИК-фурье-спектроскопия

Образцы водных растворов различных форм КМХ исследовали на ИК-фурье-спектрофотометре IFS/66V (“Bruker”, Германия) пленочным методом в диапазоне $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$ при 20°C .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хитин, используемый в настоящей работе, получен из панцирей крабов и, как известно, 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 относятся: ацетамидная группа при С2 и группа $-\text{CH}_2\text{OH}$ при С6 углеродных атомов глюкопиранозного цикла. При синтезе КМХ происходит значительное разрушение межмолекулярных водородных связей в α -хитине, что приводит к образованию водорастворимого полимера.

Для исследования структуры исходного хитина, а также полученного на его основе КМХ, представленного в солевой КМХ-Na и кислой форме КМХ-Н, использовали метод РСА (рис. 1).

Из анализа данных и из сопоставления с описанными в литературе параметрами [9] следует, что исходный полисахарид является α -хитином с ячейкой орторомбической структуры ($a = 4.74\text{ \AA}$, $b = 18.86\text{ \AA}$, $c = 10.32\text{ \AA}$) и высокой степенью кристалличности 89%, которая была определена с помощью специализированного программного обеспечения.

В отличие от высокоупорядоченной структуры исходного α -хитина, КМХ, полученный на его основе, имеет аморфную структуру. При этом для КМХ-Na и КМХ-Н на дифрактограмме (рис. 1)

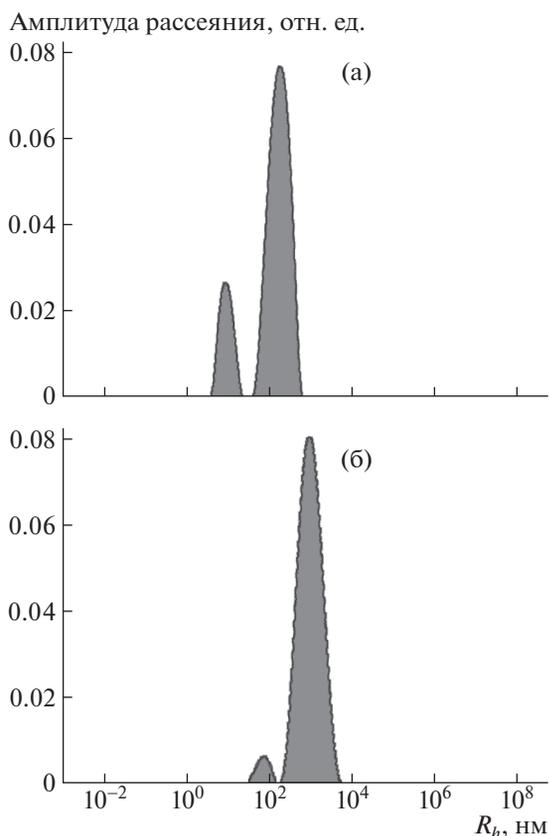


Рис. 2. Распределение рассеивающих частиц по гидродинамическим радиусам R_h в водных растворах КМХ-Na (а) и КМХ-50Н (б). Концентрация раствора полимера 0.5 мас. %, $I = 0.5$ М NaCl, $T = 20^\circ\text{C}$.

видны две области аморфного гало. Для КМХ-Na более выраженной является область первого аморфного гало ($2\theta = 9^\circ$). Эта область может быть охарактеризована неким ближним порядком макромолекул с усредненным расстоянием около 1 нм. Для структуры КМХ-Н более выраженной является область второго аморфного гало ($2\theta = 21.5^\circ$), что указывает на ближний порядок в системе с усредненным расстоянием 0.4 нм. По-видимому, в пленках, полученных из КМХ-Н, присутствуют ассоциаты макромолекул, возникающие за счет образования водородных связей между цепями полимера. Область первого аморфного гало близка по положению к рефлексу кристаллической решетки хитина, находящейся на расстоянии $2\theta = 9^\circ$. Область второго аморфного гало приближается по положению к рефлексам кристаллической решетки α -хитина, лежащих в области $2\theta = 15^\circ\text{--}25^\circ$. Это может свидетельствовать о лишь незначительном смещении рассеивающих центров в кристаллическом α -хитине при проведении реакции полимераналогичных превраще-

ний с целью получения КМХ – водорастворимого производного хитина.

Чтобы подтвердить наличие ассоциатов макромолекул в растворе КМХ, имеющем в своей структуре карбоксильные группы в кислой форме было проведено исследование растворов КМХ-Na и КМХ-Н с использованием метода динамического светорассеяния. Подчеркнем, что вследствие ограниченной растворимости в воде КМХ-Н была выбрана форма КМХ-50Н, содержащая карбоксильные группы как в солевой КМХ-Na, так и в кислой форме КМХ-Н.

Результаты исследования ассоциации макромолекул в водном растворе КМХ-Na (рис. 2а) показали, что в системе присутствуют и единичные макромолекулы (9 нм), и их ассоциированные формы (177 нм). При уменьшении ионной силы раствора КМХ-Na (с 0.5 до 0.125 М NaCl) размер макромолекулярного клубка увеличивался до 16 нм вследствие полиэлектролитного набухания. Образование ассоциированных форм в КМХ-Na (рис. 2а) может быть связано не только с гидрофильным (с образованием водородных связей), но также и с гидрофобным взаимодействием группы $-\text{CH}_3$ в ацетамидном заместителе при С2 глюкопиранозного цикла. При введении карбоксильных групп в кислой форме в структуру КМХ повышается вероятность гидрофильного взаимодействия между макромолекулами, что подтверждают данные, полученные при исследовании КМХ-50Н методом динамического светорассеяния.

Как видно на рис. 2б, в растворе КМХ-50Н практически отсутствуют единичные макромолекулы, при этом обе популяции частиц (80 и 800 нм) представляют собой ассоциированные формы, что обусловлено увеличением вероятности образования межмолекулярных водородных связей с ростом доли протонодонорных групп в структуре КМХ.

При уменьшении концентрации КМХ, как в КМХ-Na (рис. 3а и 3в) так и в КМХ-50Н (рис. 3б и 3г) формах, наблюдали снижение размеров ассоциатов, что связано с уменьшением вероятности возникновения зон контакта макромолекул [10].

С появлением в структуре КМХ карбоксильных групп в кислой форме увеличивается доля ассоциатов макромолекул. Это может быть вызвано межмолекулярным взаимодействием функциональных групп полимера, что подтверждают спектральные данные, полученные методом ИК-фурье-спектроскопии.

Так, в спектре КМХ-50Н (рис. 4, спектр 2) появление полосы поглощения, характерной для валентных колебаний неионизованной карбоксильной группы (1731 см^{-1}), сопровождалось резким увеличением интенсивности и уширением полосы поглощения амидной группы (1655 см^{-1}).

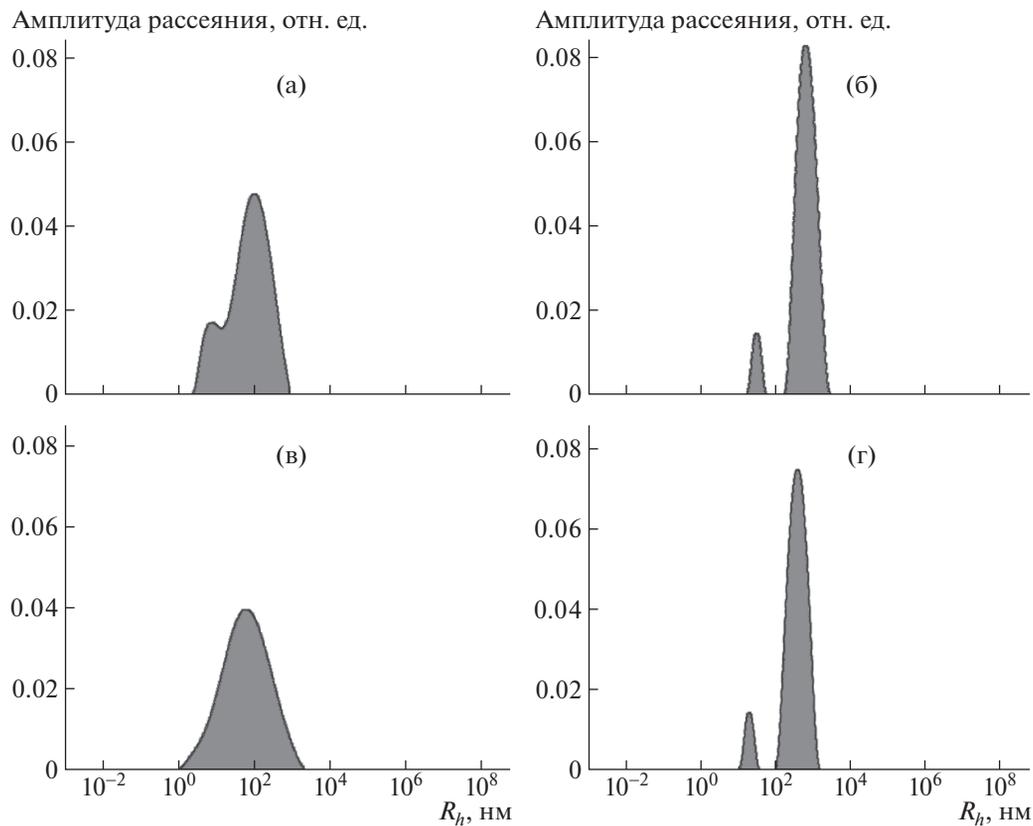


Рис. 3. Распределение рассеивающих частиц по гидродинамическим радиусам R_h в водных растворах КМХ-На (а, в) и КМХ-50Н (б, г). Концентрация раствора полимера 0.25 (а, б) и 0.125 мас. % (в, г), $I = 0.5$ М NaCl, $T = 20^\circ\text{C}$.

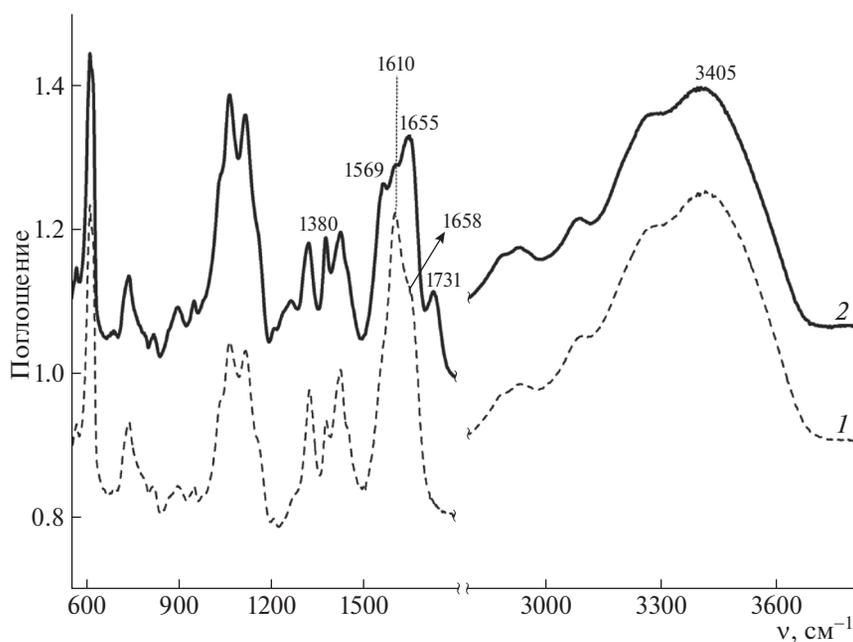


Рис. 4. ИК-спектры пленок, полученных из водных растворов КМХ-На (1) и КМХ-50Н (2).

Возможно, это связано с образованием межмолекулярных ассоциатов между группами $-C(O)OH$ и $-C(O)NH$ с участием протона карбоксильной группы.

Кроме того, в спектре КМХ-50Н (рис. 4, спектр 2) полоса 1569 см^{-1} , отсутствующая в спектре КМХ-На, может быть отнесена к валентным колебаниям карбоксилат-аниона с противоионом — аммониевым катионом. Ионные пары могут появиться в присутствии ионизированных в кислой среде аминокрупп, которые могут образоваться при частичном дезацетилировании хитина. Какой-то процент дезацетилирования мог быть в исходном хитине, как описано в работе [6], где в исходном хитине было 3% дезацетилирования. Второй источник дезацетилированных фрагментов — сам процесс обработки хитина: активация и карбоксиметилирование в щелочных средах. Другая полоса, которая также характерна для карбоксилат-аниона — 1380 см^{-1} , проявляется более интенсивно в спектре КМХ-50Н, чем в спектре КМХ-На. Известно, что интенсивность этой полосы растет с увеличением размера противоиона, и помимо карбоксилат-анионов с противоионом Na^+ в структуре КМХ-50Н присутствуют карбоксилат-анионы с противоионами большего размера.

Нельзя исключить образование ассоциированных форм между карбоксилатными и амидными группами с участием молекул воды. На присутствие воды в образце указывает очень интенсивная расщепленная полоса в области $3600-3300\text{ см}^{-1}$, которая может быть отнесена к валентным колебаниям $N-H$ и $O-H$. Полоса от карбоксилат иона 1610 см^{-1} в спектре солевой формы (рис. 4, спектр 1) имеет хорошо выраженное плечо при 1658 см^{-1} , что также указывает на присутствие воды, поскольку именно в этой области лежат полосы от деформационных колебаний молекулы воды. Таким образом, если в ассоциацию между карбоксильными и амидными группами включаются молекулы воды, то размер таких ассоциатов сильно возрастет. Именно такая ассоциация может быть причиной плохого удаления воды из образцов несмотря на длительное высушивание их.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано, что растворы солевой формы КМХ помимо частиц мелкого размера (единичные макромолекулы) содержат ассоциаты. При появлении в структуре КМХ карбоксильных групп в кислой форме в растворе исчезают одиночные макромолекулы и образуются ассоциаты, включающие большое число макромолекул. При понижении концентрации полимера в растворе размер ассоциатов уменьшается, что связано с понижением вероятности возникновения зон контакта макромолекул.

Из анализа данных ИК-фурье-спектроскопии следует, что ассоциирование макромолекул КМХ в водном растворе может быть обусловлено образованием как водородных связей, так и ионных пар между функциональными группами полимера. В большей степени это характерно для макромолекул КМХ-50Н, где появляются карбоксильные группы в кислой форме.

Работа выполнена в рамках Госзадания Института нефтехимического синтеза РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wongpanit P., Sanchavanakit N., Pavasant P., Supaphol P., Tokura S., Rujiravanit R.* // *Macromol. Biosci.* 2005. V. 5. № 10. P. 1001.
2. *Tokura S., Tamura H.* // *Biomacromolecules.* 2001. V. 2. № 2. P. 417.
3. *Dudarev V.G., Iozep A.A.* // *Russ. J. Appl. Chem.* 2009. V. 82. № 10. P. 1867.
4. *Philippova O.E., Korchagina E.V., Volkov E.V., Smirnov V.A., Khokhlov A.R., Rinaudo M.* // *Carbohydr. Polym.* 2012. V. 87. P. 687.
5. *Wu C., Zhou S., Wang W.* // *Biopolym.* 1995. V. 35. № 4. P. 385.
6. *Vihoreva G.A., Gladyshev D.Yu., Bazt M.R., Barkov V.V., Gal'braikh L.S.* // *Cellul. Chem. Technol.* 1992. V. 26. № 6. P. 663.
7. *Aleksandrova V.A., Shirokova L.N.* // *Polymer Science B.* 2018. V. 60. № 6. P. 727.
8. *Yudin I.K., Nikolaenko G.L., Kosov V.I., Agayan V.A., Anisimov M.A., Sengers J.V.* // *Int. J. Thermophys.* 1997. V. 18. № 5. P. 1237.
9. *Paralikar K., Balasubramanya R.* // *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.* 1984. V. 22. P. 543.
10. *Tager A.A.* Физико-химия полимеров / Под ред. А.А. Аскадского. М.: Научный мир, 2007.