
doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.05.080>

УДК 544.7: 547.458.61:547.466

К.А. Филатова, Т.В. Крупская, В.В. Туров

Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины, Киев
E-mail: krupska@ukr.net

Влияние органических растворителей и кислот на гидратацию хитозана

Представлено членом-корреспондентом НАН Украины В.В. Туровым

Методом низкотемпературной ^1H ЯМР спектроскопии изучено состояние воды и водного раствора трифторуксусной кислоты в набухшем хитозане и хитозане, наполненном нанокремнеземом А-300. Показано, что в полимерной матрице основная часть воды входит в состав доменов с $R > 10$ нм. Введение в полимер нанокремнезема приводит к уменьшению энергии связывания воды почти на 30 %, за счет формирования связей хитозан—кремнезем. В присутствии сильной кислоты (ТФУК) внутри полимерной матрицы чистого и наполненного SiO_2 хитозана выявляются водные полиассоциаты с разной растворяющей способностью по отношению к кислотам, причем значительная часть воды относится к доменам, плохо растворяющим кислоту.

Ключевые слова: хитозан, нанокремнезем, гидратация, ^1H ЯМР спектроскопия.

Хитозан, получаемый из хитина, является одним из перспективных биополимеров для разработки систем доставки. Хитозан совместим с тканями млекопитающих, малотоксичен, деградируется ферментами организма. Значительным преимуществом хитозана по сравнению с прочими биополимерами является наличие многочисленных реакционноспособных групп, что позволяет получить необходимые характеристики с помощью химических модификаций [1].

Перспективным направлением применения хитозана в медицине может стать его иммобилизация на частицах наноразмерного кремнезема с последующей адсорбцией таким композитом лекарственных препаратов или биологически активных веществ. Нанокремнеземы относятся к минеральным адсорбентам, обладающим высоким сродством к белкам и некоторым другим типам биополимерных молекул [2–4]. Хотя сахара адсорбируются на поверхности кремнезема в значительно меньшем количестве, чем белки, путем импрегнирования нанокремнезема раствором хитозана, при высушивании суспензии, на поверхности частиц SiO_2 формируется плотная пленка биополимера, обеспечивающая тесный контакт полисахаридных молекул с поверхностью [5]. Такие композитные системы могут обладать значительным преимуществом по сравнению с чистым хитозаном, поскольку их частицы

© К.А. Филатова, Т.В. Крупская, В.В. Туров, 2017

достаточно стабильны в биологических средах, а это обеспечивает оптимальное распределение носителей лекарственного вещества по поверхности слизистых оболочек.

В водных системах хитозан способен поглощать значительное количество воды. Поэтому для создания композитных систем SiO₂/хитозан/лекарственное вещество первоначально должны быть изучены характеристики воды, поглощаемой хитозаном и его аддуктом с нанокремнеземом, а также влияние на связанную воду органических веществ и кислот, присутствующих в биологических средах или желудочном соке. Одним из немногих способов определения параметров связанной воды в биополимерах и суспензиях минеральных адсорбентов является метод низкотемпературной ¹H ЯМР спектроскопии [6–8]. Для гидратированных композитных систем, содержащих частицы нанокремнезема с адсорбированными на их поверхности биополимерами, в органических средах (хлороформ, ацетонитрил, ДМСО и др.) возможна раздельная регистрация нескольких типов сильно- и слабоассоциированной воды [6], обусловленная замедлением молекулярного обмена между молекулами воды, входящей в состав разных типов поверхностных полиассоциатов. Такой же эффект может наблюдаться и при добавлении к образцу кислотных агентов, таких как минеральные кислоты или перекись водорода [6, 9]. Он обусловлен разной растворимостью кислот и органических веществ в кластерах воды, сформированных на межфазной границе твердых или биополимерных веществ.

Целью настоящего исследования было изучение параметров связанной воды в исходном хитозане и хитозане, иммобилизованном на поверхности нанокремнезема А-300, а также влияние на состояние связанной воды гидрофобной среды (CDCl₃) и кислотного агента (трифторуксусная кислота).

Материалы и методы исследования. Исследовали нанокремнеземы А-300 с удельной поверхностью 285 м²/г производства Калушского опытно-экспериментального завода Института химии поверхности им. А.А. Чуйко.

Использовались низкомолекулярный хитозан (М.м. <10⁴ г/моль, степень деацетилирования 75–85 %) производства “Sigma-Aldrich” и уксусная кислота >99,9 %, класса HPLC (“ChromSpec”, Чехия). Для импрегнирования кремнезема навеску хитозана растворяли в 3 % водном растворе уксусной кислоты, смешивали с навеской кремнезема и оставляли при 290 К на 48 ч для испарения растворителя. Навески ингредиентов рассчитывали таким образом, чтобы в сухом виде соотношение концентраций кремнезем/хитозан составляло 1:1.

Перед ЯМР измерениями к навеске кремнезема (200 мг) или кремнезема с иммобилизованным на его поверхности хитозаном прибавляли 500 мг/г дистиллированной воды. После тщательного перемешивания, которое осуществлялось многократным встряхиванием, образцы уравнивались в течение 2 ч, после чего помещались в датчик ЯМР спектрометра. Измерения влажных порошков в воздушной среде и среде CDCl₃ проводились на одном и том же образце.

ЯМР спектроскопия. Спектры ЯМР снимали на ЯМР спектрометре высокого разрешения (Varian “Mercury”) с рабочей частотой 400 МГц. Использовали восемь 60° зондирующих импульсов длительностью 1 мкс при ширине полосы 20 кГц. Температуру в датчике регулировали с помощью термодатчика Bruker VT-1000 с точностью ±1 град. Интенсивности сигналов определяли путем измерения площади пиков с использованием процедуры

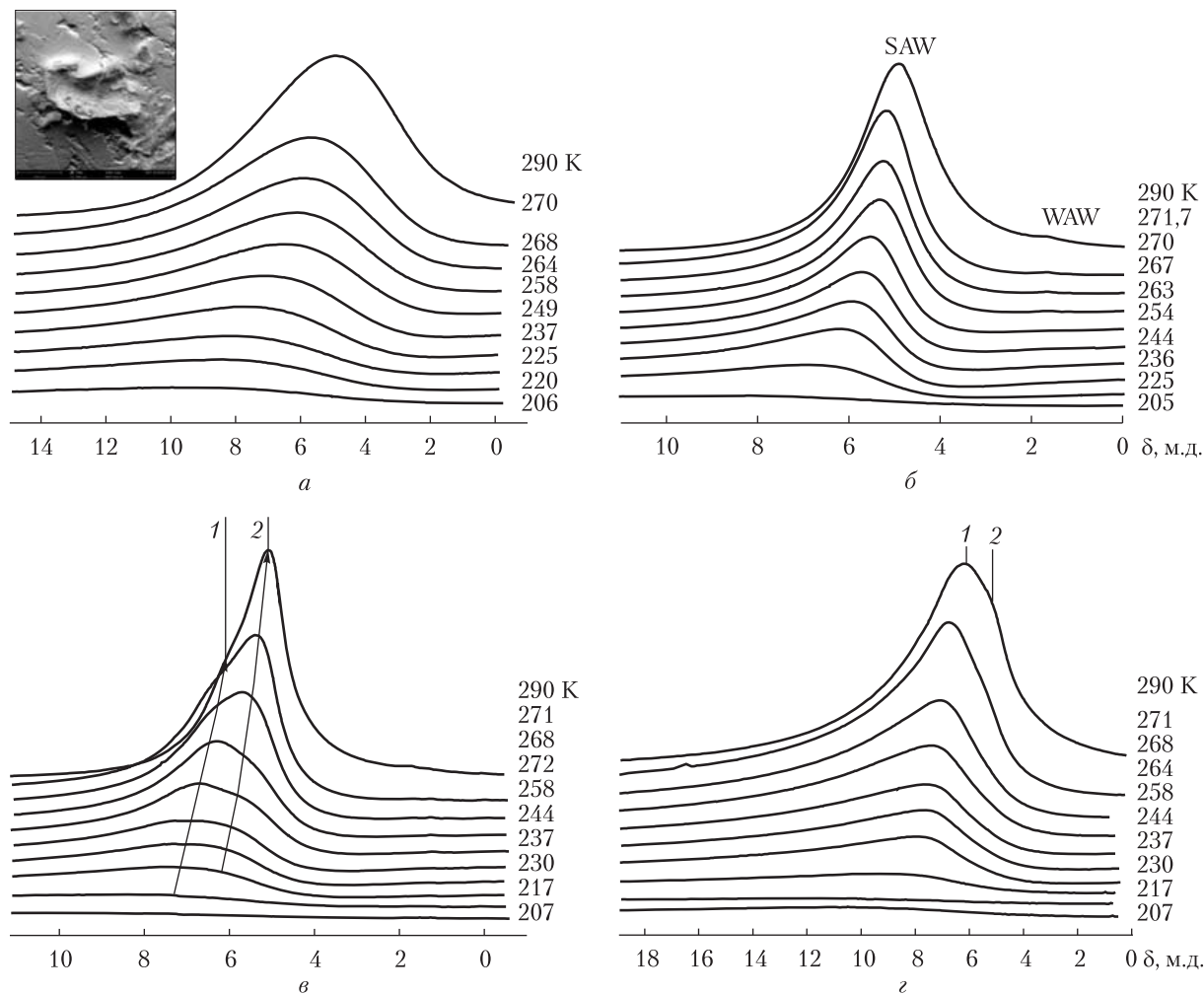


Рис. 1. Снятые при разных температурах ^1H ЯМР спектры хитозана, содержащего адсорбированную воду в воздушной среде (а), в среде CDCl_3 (б–з) с добавками трифторуксусной кислоты (ТФУК) (в, з) и CD_3CN (з)

разложения сигнала на его составляющие в предположении гауссовской формы сигнала и оптимизации нулевой линии и фазы с точностью, которая для хорошо разрешенных сигналов была не ниже 5 %, а для перекрывающихся сигналов ± 10 %. Для предотвращения переохлаждения воды в исследуемых объектах измерения концентрации незамерзающей воды проводили при нагревании образцов, предварительно охлажденных до температуры 210 К. Температурные зависимости интенсивности сигналов ЯМР определяли в автоматизированном цикле, когда время выдерживания образца при постоянной температуре составляло 9 мин, а время измерения – 1 мин [6–8].

Результаты исследований и их обсуждение. Снятые при разных температурах ^1H ЯМР спектры хитозана, содержащего адсорбированную воду в воздушной среде (а), в среде хлороформа (CDCl_3) (б–з) с добавками трифторуксусной кислоты (ТФУК) (в, з) и ацетонитрила (CD_3CN) (з) представлены на рис. 1. В воздушной среде адсорбированная вода проявляется в виде уширенного сигнала, химический сдвиг (δ_{H}) которого изменяется с 4,5 м.д.

при $T = 290$ К до 8,5 м.д. при $T = 206$ К. Поскольку максимальная величина химического сдвига объемной воды не превышает 7 м.д., что соответствует воде, в которой каждая молекула участвует в формировании четырех водородных связей (гексагональный лед [6]), можно предположить, что значительно большие значения δ_H при низких температурах обусловлены участием молекул воды в формировании более прочных, чем в самоассоциатах, водородных связей (например, с атомами азота аминсахара) или присутствием в хитозане некоторого количества кислотных агентов, используемых для повышения его растворимости в воде. С понижением температуры интенсивность сигнала воды уменьшается ввиду ее частичного замерзания.

В среде хлороформа (см. рис. 1, б) ширина сигнала воды несколько уменьшается. Кроме основного сигнала воды, который соответствует случаю, когда каждая молекула участвует в формировании нескольких водородных связей (сильноассоциированная вода), при $\delta_H = 1,5$ м.д. в спектрах появляется слабоинтенсивный сигнал, который может быть отнесен к слабоассоциированной воде (WAW). В присутствии ТФУК спектр сильноассоциированной воды (SAW) усложняется. В нем регистрируются два сигнала (сигналы 1 и 2), химические сдвиги которых увеличиваются с понижением температуры. Такое разделение сигнала отвечает случаю, когда в полимере формируется два типа кластеров раствора вода–ТФУК, между которыми имеет место медленный (в шкале времени ЯМР) молекулярный обмен [10, с. 165–180]. Если считать, что химический сдвиг протонов в ТФУК составляет 11 м.д., а в сильноассоциированной воде — 5 м.д., то можно оценить концентрацию растворов кислоты, присутствующей на поверхности в виде отдельных кластерных структур. При $T = 290$ К сигнал 1 отвечает концентрации раствора ТФУК 10 % (мас.), а сигнал 2 — 3 % (мас.). С понижением температуры вода частично замерзает и концентрация кислоты в незамерзшей фазе увеличивается. Следовательно, в набухшем хитозане термодинамически более выгодным является формирование кластеров воды, плохо растворяющих ТФУК.

В присутствии CD_3CN соотношение интенсивностей сигналов 1 и 2 изменяется слабо. Однако в спектрах появляется один или два сигнала, соответствующих водородносвязанным комплексам $H-O-H \dots NC-CD_3$, которые могут формироваться как на поверхности полимера, так и в объеме дисперсионной среды.

Температурные зависимости концентрации незамерзающей воды, рассчитанные по суммарным интенсивностям сигналов 1 и 2, приведены на рис. 2, а. Возможность такого расчета для систем, содержащих ТФУК, обусловлена тем, что при добавлении к дисперсионной среде безводной дейтерированной ТФУК общее количество протонов в системе отвечает их количеству в отсутствие кислоты, несмотря на то, что часть протонов воды замещается дейтронами, а дейтроны ТФУК — протонами.

В соответствии с классификацией, приведенной в работе [6], та часть воды, которая замерзает при $T < 265$ К, может быть квалифицирована как сильносвязанная (SBW). По графикам зависимости $C_{uw}(T)$ могут быть рассчитаны зависимости изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды (см. рис. 2, а), а также получены распределения по радиусам наночапель воды, присутствующей в полимерной матрице хитозана (см. рис. 2, б). Набухший полимер можно рассматривать как композитную систему, состоящую из полимерной и водной фаз. Тогда распределения на рис. 2, б отражают пара-

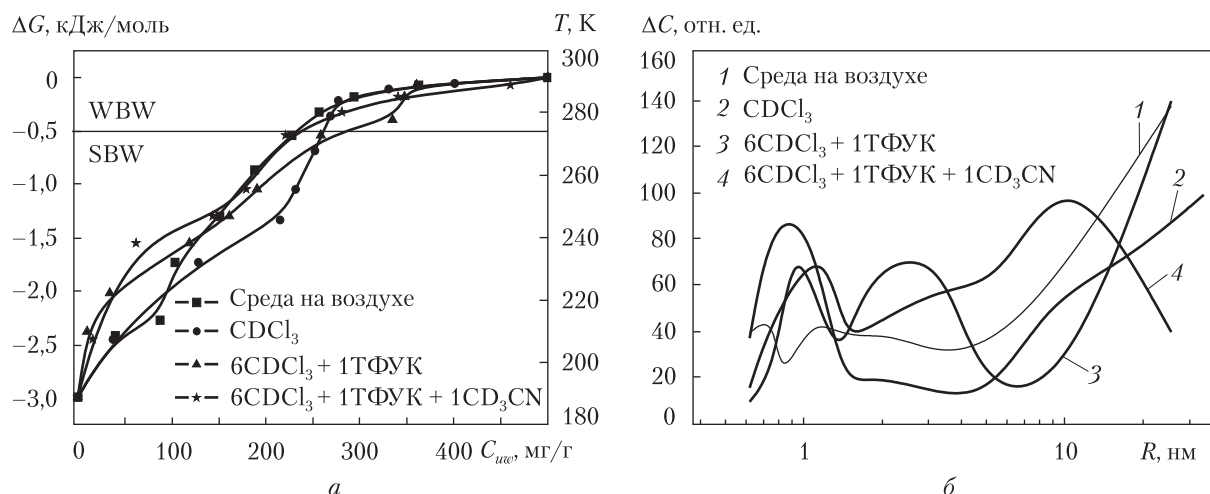


Рис. 2. Температурные зависимости концентрации незамерзающей воды и зависимости изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды (а); распределения по радиусам кластеров (доменов) адсорбированной воды (б) в гидратированном хитозане ($C_{H_2O} = 500$ мг/г)

Характеристики слоев связанной воды в гидратированном порошке хитозана и композита SiO₂/хитозан в разных средах

Система	Среда	$-\Delta G^s$, кДж/моль	C_{uw}^s , мг/г	C_{uw}^w , мг/г	γ^s , Дж/г
Хитозан	Воздух	3,0	220	280	23,6
	CDCl ₃	3,0	260	240	27,2
	6CDCl ₃ + 1ТФУК	2,8	250	250	23,5
	6CDCl ₃ + 1ТФУК + 1CD ₃ CN	3,0	220	280	21,3
Хитозан/SiO ₂	Воздух	2,5	200	300	18,4
	CDCl ₃	2,5	190	310	17,7

метры пустот между молекулами биополимера, заполненных водой. Характеристики слоев связанной с хитозаном воды, полученные в разных дисперсионных средах, суммированы в таблице.

При добавлении к гидратированному порошку хитозана хлороформа, наблюдается некоторое перераспределение количества сильно- и слабосвязанной воды (C_{uw}^s и C_{uw}^w соответственно) за счет увеличения количества C_{uw}^s . При этом межфазная энергия (γ^s), которая характеризует суммарное изменение энергии воды, за счет взаимодействия с молекулами биополимера, возрастает примерно на 17 %. В соответствии с данными рис. 2, б это происходит благодаря стабилизации хлороформом меньших по размеру кластеров воды.

Можно было ожидать, что в случае растворения в связанной с молекулами хитозана воде ТФУК будет наблюдаться понижение температуры ее замерзания за счет формирования гидратных комплексов кислота—вода. Однако этого не происходит. В присутствии ТФУК межфазная энергия воды несколько уменьшается, что свидетельствует об ослаблении энергии ее взаимодействия с молекулами хитозана, которое не компенсируется форми-

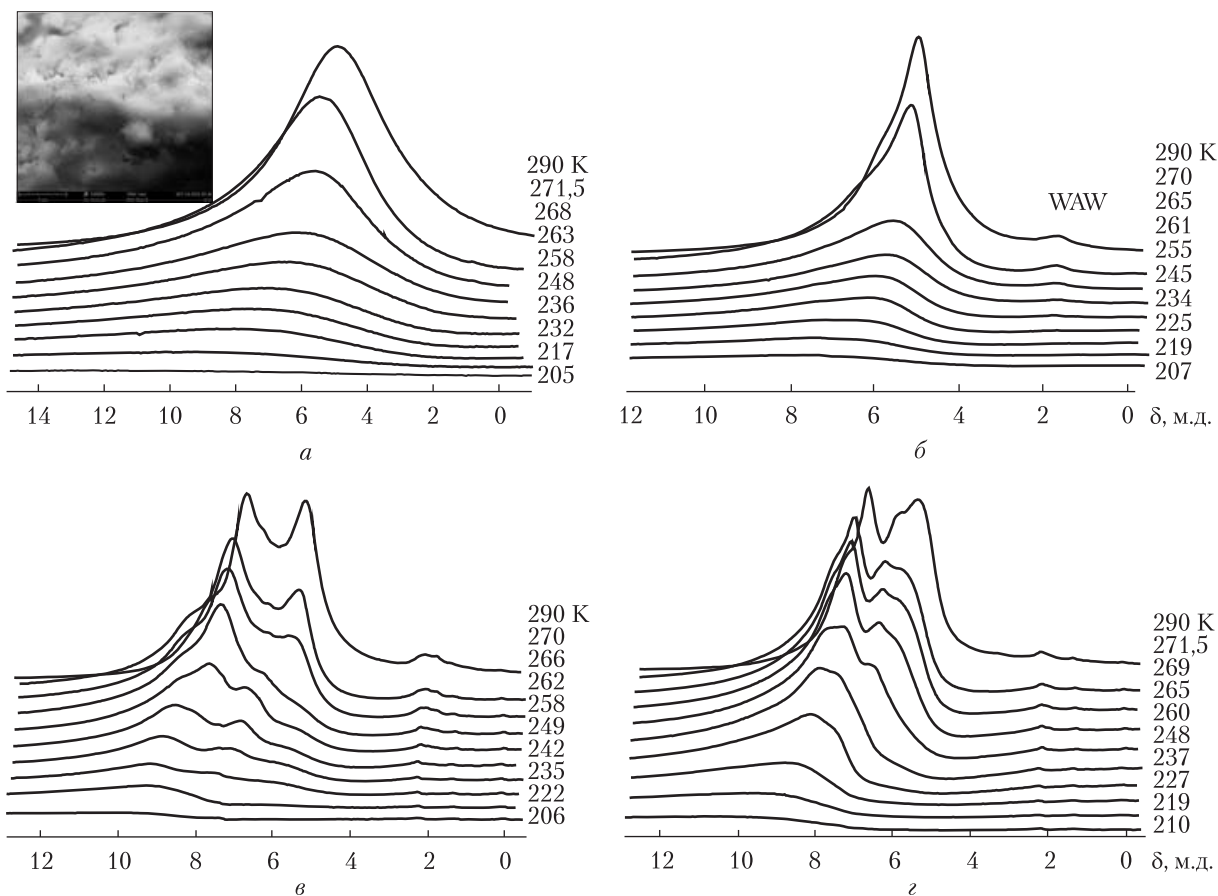


Рис. 3. Снятые при разных температурах спектры ^1H ЯМР композитной системы SiO_2 /хитозан 1/1 на воздухе (*a*), в среде CDCl_3 (*б*) и смеси 7/1 CDCl_3 /TFAA (*в*, *г*)

рованием концентрированного раствора вода—кислота. Вероятной причиной может служить связывание гидратированных молекул ТФУК с аминогруппами, что сопровождается вытеснением от поверхности кластеров воды, которые плохо растворяют кислоту (им соответствует сигнал 2 на рис. 2, *в*, *г*). Еще сильнее этот эффект наблюдается в присутствии полярных молекул ацетонитрила (см. таблицу).

Снятые при разных температурах спектры воды ($C_{\text{H}_2\text{O}} = 500$ мг/г), адсорбированной композитом 1:1 SiO_2 /хитозан, представлены на рис. 3. В воздушной среде (*a*) и в среде CDCl_3 (*б*) вид спектров близок к приведенным на рис. 1 для чистого хитозана. К различиям следует отнести появление сигнала при $\delta_{\text{H}} = 6$ м.д., который может быть связан с гидратированными молекулами уксусной кислоты, оставшейся в биополимере после процесса импрегнирования нанокремнезема раствором хитозана. Следует также отметить несколько большую интенсивность сигнала WAW. Зависимости изменения концентрации незамерзающей воды от температуры и изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды (рис. 4, *a*) слабо различаются. Для обеих систем отмечаются близкие значения концентраций сильно- и слабосвязанной воды или величины межфазной энергии (см. таблицу). Некоторые различия можно наблюдать на распределениях по радиусам кла-

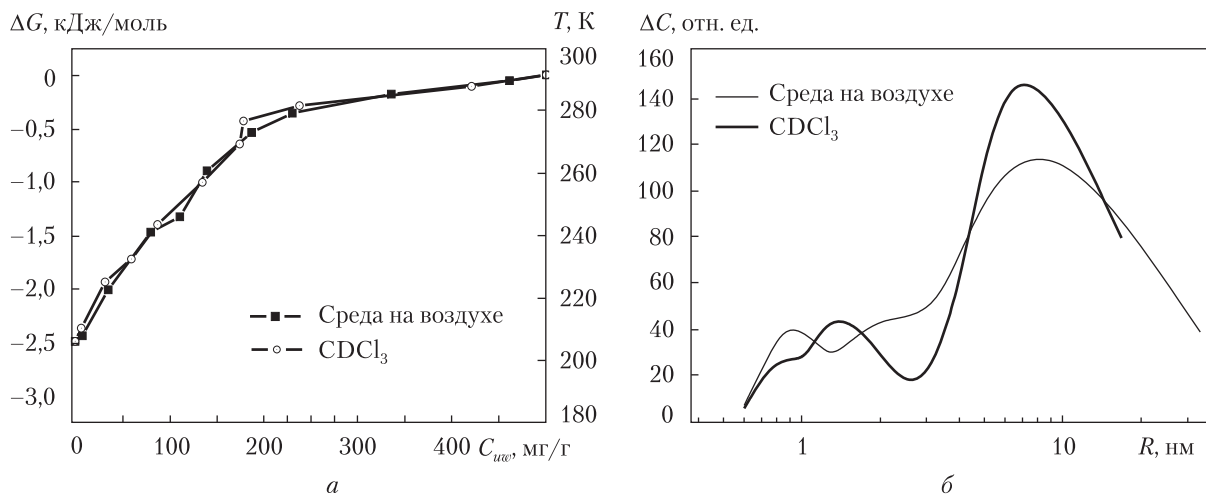


Рис. 4. Температурные зависимости концентрации незамерзающей воды и зависимости изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды (*а*); распределения по радиусам кластеров (доменов) адсорбированной воды (*б*) в гидратированном композите $\text{SiO}_2/\text{хитозан}$ ($C_{\text{H}_2\text{O}} = 500$ мг/г)

стеров (доменов) адсорбированной воды. В среде CDCl_3 более интенсивным является максимум при $R = 10$ нм.

Добавление к дисперсионной среде (CDCl_3) ТФУК приводит к значительным изменениям в спектрах. Вместо плохо разделенных сигналов 1, 2 (см. рис. 1, *а*, *б*), каждый из них превращается в группу сигналов, состоящих из нескольких линий (см. рис. 1, *в*, *г*). Как уже отмечалось, эти сигналы отвечают формированию в композите кластеров (доменов) раствора вода–кислота, различающихся по концентрации кислоты. Сигналы с химическими сдвигами $\delta_{\text{H}} \approx 5$ м.д. относятся к воде, практически не растворяющей кислоту, а $\delta_{\text{H}} = 8\text{--}8,5$ м.д. — к концентрированным растворам ТФУК. Соотношение интенсивностей и ширина сигналов несколько изменяются в процессе выдерживания образца в дисперсионной среде, что может быть связано с изменением пространственного расположения компонентов композитной системы.

Сопоставление значений межфазной энергии гидратированного хитозана и композитной системы $\text{SiO}_2/\text{хитозан}$, содержащих равные количества связанной воды, позволяет заключить, что при формировании композита происходит уменьшение величины γ^s на 5 Дж/г (см. таблицу). Это уменьшение характеризует изменение свободной энергии системы кремнезем–хитозан при формировании композита. Оно обусловлено взаимодействием биополимерных молекул с поверхностью кремнезема.

При насыщении хитозана водой формируется композитная система, в которой между полимерными цепями находятся кластеры или домены воды, радиус которых составляет 0,6–50 нм, причем основная часть воды входит в состав доменов с $R > 10$ нм. Совместная абсорбция полимером воды и хлороформа (CDCl_3) сопровождается ростом энергии связывания воды, которое, вероятно, обусловлено уменьшением взаимодействия между полимерными цепями, сопровождающемся появлением дополнительных центров сильного связывания воды. В присутствии сильной кислоты (ТФУК) внутри полимерной матрицы выявляются водные полиассоциаты с разной растворяющей способностью по отно-

шению к кислотам, причем основная часть воды относится к доменам, плохо растворяющим кислоту.

В композитных системах, содержащих кроме хитозана, нанокремнезем А-300 энергия связывания воды уменьшается почти на 30%, за счет формирования связей хитозан–кремнезем (вытеснения воды из зазора биополимер– SiO_2). Вода или водный раствор ТФУК в таком композите неоднородны и присутствуют в виде нескольких типов кластеров или доменов с разной растворяющей способностью по отношению к кислоте.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Rao W., Wang H., Han J., Zhao S., Dumbleton J., Agarwal P., Zhang W., Zhao G., Yu J., Zynger D.L., Lu X., He X. Chitosan-Decorated Doxorubicin-Encapsulated Nanoparticle Targets and Eliminates Tumor Reinitiating Cancer Stem-like Cells. *ACS Nano*. 2015. **9**, Iss. 6. P. 5725–5740.
2. Медицинская химия и клинические применения диоксида кремния. А.А. Чуйко (ред.). Киев: Наук. думка, 2003. 416 с.
3. Jaroniec M., Madey R. Physical adsorption on heterogeneous solids. Amsterdam: Elsevier, 1988. 353 p.
4. Kiselev A.V., Lygin V.I. Infrared Spectra of Surface Compounds. New York: Wiley, 1975. 384 p.
5. Tiraferri A., Maroni P., Rodríguez D.C., Borkovec M. Mechanism of Chitosan Adsorption on Silica from Aqueous Solutions. *Langmuir*. 2014. **30**, № 17. p. 4980–4988.
6. Gun'ko V.M., Turov V.V. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena. New York: Taylor & Francis, 2013. 1076 p.
7. Туров В.В., Гунько В.М. Кластеризованная вода и пути ее использования. Киев: Наук. думка, 2011. 316 с.
8. Gun'ko V.M., Turov V.V., Bogatyrev V.M., Zarko V.I., Leboda R., Goncharuk E.V., Novza A.A., Turov A.V., Chuiko A.A. Unusual Properties of Water at Hydrophilic/Hydrophobic Interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci*. 2005. **118**. P. 125–172.
9. Turov V.V., Gun'ko V.M., Turova A.A., Morozova L.P., Voronin E.F. Interfacial behavior of concentrated HCl solution and water clustered at a surface of nanosilica in weakly polar solvents media. *Colloids Surf. A: Physicochem. Engin. Aspects*. 2011. **390**. P. 48–55.
10. Pople J. A., Schneider W. G., Bernstein H. J. High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance. New York: McGraw-Hill, 1959. 502 p.

Поступило в редакцию 01.11.2016

REFERENCES

1. Rao, W., Wang, H., Han, J., Zhao, S., Dumbleton, J., Agarwal, P., Zhang, W., Zhao, G., Yu, J., Zynger, D. L., Lu, X. & He, X. (2015). Chitosan-Decorated Doxorubicin-Encapsulated Nanoparticle Targets and Eliminates Tumor Reinitiating Cancer Stem-like Cells. *ACS Nano*, 9, Iss. 6, pp. 5725-5740.
2. Chuiko, A. A. (Ed.). (2003). *Medical Chemistry and Clinical Application of Silica*. Kiev: Naukova Dumka, (in Russian).
3. Jaroniec, M. & Madey, R. (1988). *Physical Adsorption on Heterogeneous Solids*. Amsterdam: Elsevier.
4. Kiselev, A. V. & Lygin, V. I. (1975). *Infrared Spectra of Surface Compounds*. New York: Wiley.
5. Tiraferri, A., Maroni, P., Rodríguez, D. C. & Borkovec, M. (2014). Mechanism of Chitosan Adsorption on Silica from Aqueous Solutions. *Langmuir*, 30, No. 17, pp. 4980-4988.
6. Gun'ko, V. M. & Turov, V. V. (2013). *Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena*. New York: Taylor & Francis.
7. Turov, V. V. & Gun'ko, V. M. (2011). *Clustered water and its application*. Kiev: Naukova Dumka.
8. Gun'ko, V. M., Turov, V. V., Bogatyrev, V. M., Zarko, V. I., Leboda, R., Goncharuk, E. V., Novza, A. A., Turov, A. V. & Chuiko, A. A. (2005). Unusual Properties of Water at Hydrophilic/Hydrophobic Interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 118, pp. 125-172.

9. Turov, V. V., Gun'ko, V. M., Turova, A. A. Morozova, L. P. & Voronin, E. F. (2011). Interfacial behavior of concentrated HCl solution and water clustered at a surface of nanosilica in weakly polar solvents media. *Colloids Surf. A: Physicochem. Engin. Aspects*, 390, pp. 48-55.
10. Pople, J. A., Schneider, W. G. & Bernstein, H. J. (1959). *High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance*. New York: McGraw-Hill, JNC.

Received 01.11.2016

К.О. Філатова, Т.В. Крупська, В.В. Туров

Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України, Київ
E-mail: krupska@ukr.net

ВПЛИВ ОРГАНІЧНИХ РОЗЧИННИКІВ І КИСЛОТ НА ГІДРАТАЦІЮ ХІТОЗАНУ

Методом низькотемпературної ^1H ЯМР спектроскопії вивчено стан води і водного розчину трифтороцтової кислоти в набряклому хітозані та хітозані, який наповнений нанокремнеземом А-300. Показано, що в полімерній матриці основна частина води входить до складу доменів з $R > 10$ нм. Введення до полімеру нанокремнезему приводить до зменшення енергії зв'язування води майже на 30 %, за рахунок формування зв'язків хітозан—кремнезем. За наявності сильної кислоти (ТФОК) всередині полімерної матриці чистого та наповненого SiO_2 хітозану виявляються водні поліасоціати з різною розчинною здатністю щодо кислот, причому значна частина води належить до доменів, які погано розчиняють кислоту.

Ключові слова: хітозан, нанокремнезем, гідратація, ^1H ЯМР спектроскопія.

К.О. Filatova, T.V. Krupska, V.V. Turov

Chuiko Institute of Surface Chemistry of the NAS of Ukraine, Kiev
E-mail: krupska@ukr.net

INFLUENCE OF ORGANIC SOLVENTS AND ACIDS ON HYDRATION PROPERTIES OF CHITOSAN

The states of water and an aqueous solution of trifluoroacetic acid in a swollen chitosan and chitosan filled with nanosilica A-300 by low-temperature ^1H NMR spectroscopy are studied. It is shown that the main part of water in the polymer matrix is included in the domains with $R > 10$ nm. Introduction of nanosilica into the polymer matrix reduces the binding energy by almost 30 % through the formation of bonds between chitosan and silica (water displacement in the gaps between the biopolymer and SiO_2). In the presence of a strong acid (TFA), polyassociations of water with varying solubility relative to acids within the polymeric matrix of pure chitosan and chitosan filled with SiO_2 are present, while a large part of water refers to the domains, which dissolve the acid poorly.

Keywords: chitosan, nanosilica, hydration, ^1H NMR spectroscopy.