

УДК 541.64:547

РЕАКЦИИ КАРБОКСИМЕТИЛИРОВАНИЯ ХИТОЗАНА *Bombyx mori*

О.Б. Кlicheва, С.Ш. Рашидова

Научно-исследовательский Центр химии и физики полимеров при Национальном университете Узбекистана; г.Ташкент

Впервые синтезирован карбоксиметилхитозан *Bombyx mori*, определены условия реакции химической модификации хитозана монохлоруксусной кислотой, выявлена биологическая активность карбоксиметилхитозана *Bombyx mori*, стимулирующая прорастание семян сельскохозяйственных культур, что способствует получению здоровых всходов и увеличению урожайности.

Ключевые слова: полисахариды, хитозан, карбоксиметилхитозан.

Карбоксиметилхитозан (карбоксиметил-поли-Д-глюкозамин) – представляет собой водорастворимый полиамфолит, обладающий рядом интереснейших свойств: растворимостью в воде, высокой биологической активностью, совместимостью с тканями человека, животных и растений, биоразрушаемостью, биodeградируемостью, пленко- и волоконобразующей способностью, доступностью и относительной простотой получения [1–3]. Наличие в молекуле хитозана свободных аминогрупп и возможность их защиты в условиях проведения реакции карбоксиметилирования явились предпосылкой для синтеза избирательно замещенных производных. Задача выбора методов синтеза и исследование свойств карбоксиметилхитозана (КМХЗ) является актуальной, поскольку его применение потенциально шире и перспективнее по сравнению с исходным хитозаном.

Замещение функциональных групп в молекуле хитозана возможно по трем активным центрам, в связи с этим в результате реакции карбоксиметилирования возможно получение в основном следующих трех производных: N – КМХЗ, N,O – КМХЗ и O – КМХЗ.

Изучение характеристик и закономерностей получения замещенных производных хитозана и определение областей их практического применения является актуальным в проведении комплекса экспериментальных исследований. Анализ литературных данных позволил установить условия реакции карбоксиметилирования хитозана *Bombyx mori*.

Одним из перспективных источников сырья для получения карбоксиметилхитозана является хитин куколок тутового шелкопряда [4].

Впервые проведена реакция карбоксиметилирования и изучены основные физико-химические свойства карбоксиметилхитозана *Bombux mori* (КМХЗ) [5–8].

Синтез образцов карбоксиметилхитозана проводили методом алкилирования в среде изопропилового спирта путем подбора оптимальных условий реакции (ХЗ:МХУК (1:1); $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\tau=3\text{ ч}$). Важную роль играет концентрация использованного раствора щелочи, при увеличении которой наблюдается неизбирательное замещение с образованием N,O-КМХЗ. При увеличении концентрации раствора NaOH от 15 до 30% наблюдается увеличение растворимости образца хитозана (87.9-93.4%), полученного при щелочной обработке. Данное явление обусловлено тем, что при щелочной обработке жесткоцепного хитозана происходит набухание образца, которое приводит к расслаблению водородных связей гидроксильных групп в макромолекуле и к уменьшению межмолекулярного взаимодействия, что обеспечивает доступность функциональных групп. В связи с этим увеличение концентрации раствора щелочи приводит к повышению растворимости образца [9].

Проведены ИК-спектроскопические исследования образцов в натриевой форме и в Н-форме КМХЗ (рис.1).

При рассмотрении ИК-спектра натриевой соли КМХЗ наблюдается характерный пик в области $3489\text{--}3415\text{ см}^{-1}$ (ОН), характерный пик для C=O групп в (-COONa) при 1598 см^{-1} , NH₂ –групп в области 1592 см^{-1} . Кислотная обработка образцов КМХЗ соляной кислотой приводит к образованию КМХЗ в кислой форме.

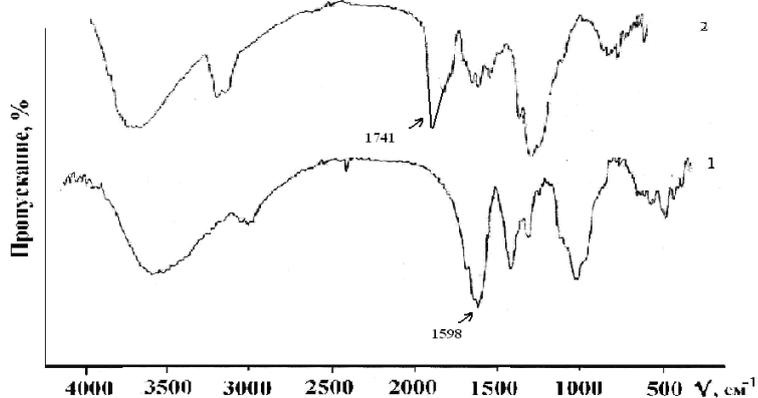
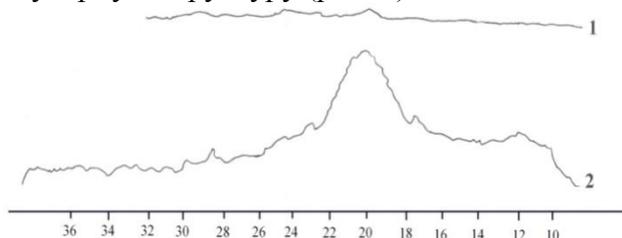


Рис. 1. ИК-спектры Na-карбоксиметилхитозана (1) и Н-карбоксиметилхитозана *Bombux mori* (2)

На ИК- спектрах КМХЗ в кислой форме возникает новый пик при 1741 см^{-1} , который соответствует карбоксильной группе - COOH, что однозначно доказывает переход КМХЗ хитозана в Н-форму, область поглощения при $1470\text{--}1136\text{ см}^{-1}$ соответствует (-C-O-), 1624 и 1506 см^{-1} (-NH₃⁺) группам.

Проведены рентгеноструктурные исследования, при которых обнаружено, что при карбоксиметилировании образец хитозана изменяет свою надмолекулярную структуру (рис. 2).



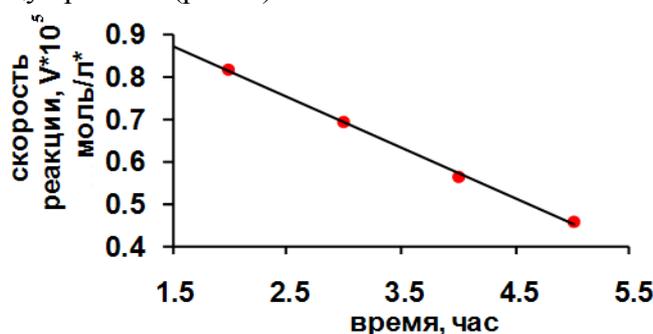
Р и с . 2. Дифрактограмма карбоксиметилхитозана *Bombyx mori* (1), хитозана *Bombyx mori* (2)

Рентгенограмма КМХЗ практически представляет собой прямую линию без ярко выраженных пиков на дифрактограмме, что указывает на аморфную структуру полученного образца КМХЗ. Таким образом, карбоксиметилирование приводит к практически полной аморфизации образца [10].

Проведено исследование влияния продолжительности реакции (2–5ч) на карбоксиметилирование хитозана *Bombyx mori* при постоянном соотношении ХЗ:МХУК (1:1) и температуре ($T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$). Определена степень замещения КМХЗ методом кондуктометрического титрования [12].

При продолжительности реакции карбоксиметилирования хитозана от 2 до 5 ч содержание карбоксиметильных групп полученных образцов КМХЗ увеличивается от 16.91 до 21.98 %.

Проведены расчеты скорости реакции карбоксиметилирования, исходя из концентрации карбоксиметильных групп в образце, образующихся за единицу времени (рис. 3).



Р и с . 3. Зависимость скорости реакции от времени карбоксиметилирования ХЗ:МХУК (1:1), конц. [МХУК]=0,183 моль/л, $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$

Как видно из рис. 3, средняя скорость реакции карбоксиметилирования снижается с увеличением времени синтеза, что может быть вызвано уменьшением концентрации монохлоруксусной кислоты (МХУК)

с течением времени. Кроме того, следует отметить, что при проведении синтеза КМХЗ с увеличением длительности реакции карбоксиметилирования уменьшается молекулярная масса конечного продукта КМХЗ в результате химической деструкции макромолекулярных цепей. Поэтому дальнейшие исследования были проведены при продолжительности синтеза 3 часа [11].

Возможность получения образцов КМХЗ с различным содержанием карбоксиметильных групп обусловлено и изменением температуры, в связи с этим проведено исследование влияния температуры (40–70 °С) на реакцию карбоксиметилирования хитозана *Bombux mori*. Выявлено, что в результате увеличения температуры степень замещения образцов КМХЗ увеличивается от 0.59 до 0.79 и растворимость от 85.0 до 91.0%.

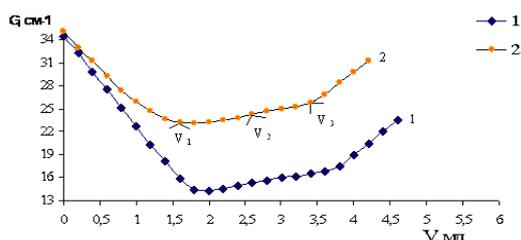
При повышении температуры увеличивается скорость реакции, приводящая к образованию КМХЗ. Величина энергии активации, рассчитанная по уравнению Аррениуса, составила 9.4 КДж/моль. Низкие значения энергии активации, характерны для случая протекания реакций замещения с участием низкомолекулярных агентов. При этом происходит интенсивное разрушение надмолекулярной структуры исходного хитозана, что способствует эффективному замещению карбоксиметильных групп в образцах. Однако длительность реакции приводит к уменьшению молекулярной массы КМХЗ в результате неизбежной термохимической деструкции макромолекулярных цепей [12].

Реакция карбоксиметилирования протекает за счёт взаимодействия молекул хитозана и алкилирующего агента (монохлоруксусной кислоты), увеличение концентрации которой приводит к возрастанию степени замещения в полученных образцах КМХЗ.

Наибольшим значением СЗ (γ) обладают образцы КМХЗ, полученные при соотношении ХЗ/МХУК 1:4, значение которого достигает 1.0. Следует также отметить увеличение растворимости полученных образцов карбоксиметилхитозана с 82.6 до 97.0%.

Исследованы кривые кондуктометрического титрования для карбоксиметилхитозана (СЗ=0.7), полученного при $T=60$ °С, трех часовом ведении реакции и соотношении ХЗ/МХУК 1:1, которые характеризуются изломанной линией, соответствующей определенным диапазонам объемного расхода титранта (рис. 4).

Из сравнительных данных, приведенных на рис. 4, видно, что кривые кондуктометрического титрования характеризуются изломанными участками, поскольку образцы КМХЗ характеризуются наличием карбоксиметильных (CH_2COOH) и аминогрупп (NH_2).



Р и с . 4. Кривые кондуктометрического титрования растворов образцов: 1– ХЗ; 2 – КМХЗ (СЗ=0.76)

Для растворов образцов КМХЗ на начальном этапе титрования раствором NaOH интервал от 0 до V_1 соответствует объему основания, добавленного для нейтрализации сильной кислоты (H_3O^+), присутствующей в растворе. Далее наблюдаются характерные отрезки (V_1-V_2), которые соответствуют титрованию карбоксиметильных групп (CH_2COOH). При дальнейшем титровании наблюдается небольшой отрезок (V_2-V_3), соответствующий объему основания (NaOH), необходимого для нейтрализации (NH_3^+ ; $^+NH_2R$; $^+NHR_2$; где $R-CH_2COOH$). При последующем титровании наблюдается рост значения электропроводности G_{sm} , характеризующий избыток сильного электролита (NaOH) [12].

Оценку степени замещения карбоксиметилхитозана осуществляли с помощью ядерно-магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопии) [13].

Различие в строении полимерных цепей хитозана и карбоксиметилхитозана отражается и в величинах их молекулярной массы (M_η). Для оценки такой особенности исследуемых образцов проводили расчеты по уравнению Марка–Куна–Хаувинка $[\eta] \approx KM_\eta^\alpha$. Было определено, что $M_\eta \approx 165200$ для хитозана в 2 %-ном водном растворе $CH_3COOH+2\% CH_3COONa$ ($K \approx 1.44 \cdot 10^{-4}$ дл/г, $\alpha = 0.83$) и $M_\eta \approx 78900$ для карбоксиметилхитозана в $H_2O +2\% NaCl$ ($K \approx 1.38 \cdot 10^{-4}$ дл/г, $\alpha = 0.85$). Такое различие в молекулярных массах образцов свидетельствует о том, что процесс карбоксиметилирования хитозана сопровождается значительным уменьшением молекулярной массы цепей [14].

Известно, что КМХЗ, полученный на основе переработки панцирьсодержащего сырья, широко применяется в сельском хозяйстве. Проведено изучение влияния полимерных систем на основе КМХЗ *Вомбух тогі* на рост и развитие семян сельскохозяйственных культур.

Проведены биологические испытания карбоксиметилхитозана при обработке семян овощебахчевых культур (таблица). Из данных таблицы видно, что семена, обработанные 0,1% растворами КМХЗ, имеют энергию прорастания 88.0%, а необработанные семена 80.5%; всхожесть семян составила –94.5%, контроль – 91.0%. На семенах тыквы энергия

прорастания составляет 64.0%, а для необработанных семян 50.5%; всхожесть для необработанных семян составляет – 84.0%, а для обработанных 0.1% раствором КМХЗ показатель всхожести составляет – 97.0%, что на 13% выше по сравнению с контролем [15, 16].

Биологические испытания КМХЗ при обработке семян болгарского перца

№	Препарат	S, %	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
1.	КОНТРОЛЬ	-	80.5	91.0
2.	КМХЗ 0,1%	90.51	88.0	94.5
Биологические испытания карбоксиметилхитозана при обработке семян тыквы (сорт-73 Испания)				
1.	Контроль	-	50.5	84.0
2.	КМХЗ 0,1%	90.51	64.0	97.0

Таким образом, впервые синтезирован карбоксиметилхитозан *Bombux mogi*, определены условия реакции химической модификации хитозана монохлоруксусной кислотой, выявлена биологическая активность карбоксиметилхитозана *Bombux mogi*, стимулирующая прорастание семян сельскохозяйственных культур, что способствует получению здоровых всходов и увеличению урожайности.

Список литературы

1. Пестов А.В. Ятлук Ю.Г. Карбоксиалкилированные производные хитина и хитозана. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. 102 с.
2. Гальбрайт Л.С. // Соросовский образовательный журнал Т. 7, №1, С.51–56.
3. Быкова В.М. Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана: Хитин, его строение и свойства // Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002. С. 7–23.
4. Кличева О.Б., Рашидова С.Ш. // Труды ИХФП АН РУз. 2011. С.110–128.
5. Кличева О.Б., Рашидова С.Ш.// . Шестая Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры — 2014» С. 376
6. Кличева О.Б., Рашидова С.Ш. // «Роль полимерных материалов в инновационном развитии промышленности» Ташкент. 2014. С.18–19
7. Klicheva O.B., Yugay S.M., Rashidova S.Sh. // Book of Abstracts. «Regional Conference of Young Scientists on Nanoscience & Nanomaterials», Bengaluru, 2015, PS50.
8. Кличева О.Б., Нургалиев И.Н., Рашидова С.Ш. // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана Пермь. 2014. С. 403–407.
9. Рашидова С.Ш, Милушева Р.Ю. Тураханова И.В, Кличева О.Б., Карева Н.Д., Пулатова Х.П. // XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: Москва, 2007. С. 398.

10. Рашидова С.Ш., Милушева Р.Ю., Кличева О.Б., Тураханова И.В., Карева Н.Д., Мирсагатова Д. // Конференция ИУРАС: Москва - С.Петербург, 2008. С. 251–252.
11. Решетникова И.В., Кличева О.Б., Милушева Р.Ю., Карева Н.Д., Юнусов М.Ю., Рашидова С.Ш. // Международная конференция. «Наноструктуры в полисахаридах: формирование, структура, свойства, применение»: Тез. докл. Ташкент, 2008. С. 119–122.
12. Кличева О.Б., Рашидова С.Ш. //Актуальные проблемы науки о полимерах: Тез. докл. Ташкент, 2010. С. 22–24.
13. Кличева О.Б., Милушева Р.Ю., Карева Н.Д., О.Б. Рашидова С.Ш. // Доклады конференции молодых ученых, посвященной памяти акад. С.Ю. Юнусова:- Тез. докл. Ташкент, 2011. С. 122.
14. Рашидова С.Ш., Кличева О.Б., Милушева Р.Ю., Холмуминов А.А. // Узб. хим. журнал, Ташкент. 2010. №1. С. 26–30.
15. Кличева О.Б., Эргашев Б.З., Фахруддинов М.З., Рашидова С.Ш. //Узб. Биолог. журнал, Ташкент. 2011. № 6. С. 8–10
16. Искандаров Т.И., Романова Л.Х., Искандарова Г.Т. // Докл. Республиканской конф. Экологически безопасные полимеры для агропромышленного комплекса. Ташкент 2012, с.16.

REACTIONS OF CHITOSAN *Bombyx mori* CARBOXYMETHYLATION

О.В. Klicheva, S.Sh. Rashidova

Polymer chemistry and physics research Center at the National University
on Uzbekistan, Tashkent

Bombyx mori carboxymethylchitosan has been synthesized, the conditions of the reaction of chemical modification of chitosan with monochloroacetic acid have been defined, the biological activity of *Bombyx mori* carboxymethylchitosan has been revealed; that stimulates the growth of agricultural crops and makes it possible to have healthy sprouts, thereby increasing the crop yield.

Keywords: polysaccharides, chitosan, carboxymethylchitosan

Об авторах:

КЛИЧЕВА Оля Бахтияровна – младший научный сотрудник, Научно-исследовательский Центр химии и физики полимеров при Национальном Университете Узбекистана, e-mail: carbon@uzsci.net

РАШИДОВА Сайёра Шарафовна – доктор химических наук, профессор, академик, директор, Научно-исследовательский Центр химии и физики полимеров при Национальном Университете Узбекистана, e-mail: carbon@uzsci.net