

ZASTOSOWANIE ABSORPCJI RENTGENOWSKIEJ DO WYZNACZENIA KOORDYNACJI ŻELAZA W CHITOSANIE

M. Klepka¹, K. Lawniczak-Jablonska¹, I.N. Demchenko¹, N. Nedelko¹,
A. Ślawska-Waniewska¹, C.A. Rodrigues² i C. Bordini²

¹*Instytut Fizyki Polskiej Akademii Nauk, al. Lotników 32/46, 02-668 Warszawa*

²*NIQFAR CCS, Universidade do Vale do Itajaí, CEP 88302-202, Itajaí, SC, Brasil*

Streszczenie: Zainteresowanie badaniem właściwości chitosanów motywowane jest ich zdolnością do wiązania metali ciężkich i toksycznych. Daje to szerokie możliwości zastosowań w takich dziedzinach jak: biomedycyna, ekologia czy przemysł spożywczy. Chitosany są produktem reakcji deacetylacji chityny, która pozyskiwana jest głównie z pancerzy skorupiaków morskich. Obydwa materiały są ważnymi naturalnymi polimerami. Biopolimery zawierające Fe są obecnie intensywnie badane, jako perspektywiczne nośniki leków, z kontrolowanym uwalnianiem substancji aktywnych. Pomimo intensywnych badań nad procesem wiązania metali w chitosanach, wciąż nie ma jasności, co do koordynacji metali w tych związkach. W prezentowanej pracy podjęto próbę wyznaczenia koordynacji metalu w chitosanach z krzyżowo połączonymi atomami żelaza. Wykorzystano w tym celu technikę absorpcji rentgenowskiej (ang. *X-Ray Absorption Spectroscopy*; XANES oraz EXAFS) ze względu na jej selektywność na rodzaj atomu.

X-ray Absorption Spectroscopy investigation of Fe in metal-chitosan complexes.

Abstract: The scientific interest in metallo-organic chelating compounds is motivated by possibility of biomedical, ecological and industrial applications. The present studies are concentrated on iron-chitosan complexes. Chitosan is N-deacetylated product of chitin. Chitin is obtained in large quantities from crustacean shells (waste products of seafood processing industries). Both materials are significant natural polymers. Nowadays, the iron containing biopolymers are examined as possible useful drug carriers and controlled release beads for various model of drugs. In spite of intensive studies of the process of metal bonding in chitosans there is still no clear how metals are bound and what their coordination in chitosan is. In the presented paper the X-ray Absorption Spectroscopy - XAS (EXAFS and XANES) was used to study Fe-chitosan complexes due to it is selectivity on the kind of studied atom.

1. Wstęp

Chitosan jest poliaminosacharydem powstającym w wyniku reakcji deacetylacji chityny, będącej naturalnie występującym polimerem. Pozyskuje się ją między innymi z pancerzy skorupiaków morskich. Takie własności chitosanu jak: biokompatybilność, bioaktywność, łatwa biodegradacja, a szczególnie zdolność do wiązania w swoją strukturę metali ciężkich i toksycznych czynią go szczególnie przydatnym w różnorodnych dziedzinach i procesach takich jak: biomedycyna, kosmetyka, przetwarzanie żywności czy oczyszczanie wód z zanieczyszczeń metalicznych [1].

Przedmiotem analizy był chitosan z krzyżowo połączonymi atomami żelaza (ang. *Fe crosslinked chitosan*). Proces krzyżowego łączenia chitosanów ma na celu zwiększenie wydajności wiązania metali w ich strukturę. Wydajność ta jest z reguły odwrotnie proporcjonalna do stopnia skrzyżowania [2]. Dodatkowo dowiedziono, że krzyżowo połączony chitosan zawierający Fe wykazuje właściwości magnetyczne [3], co stwarza możliwości zastosowania go w medycynie. Prowadzone są badania nad przyłączaniem do tych polimerów aktywnych komponentów leków, oraz ich magnetycznym transportem w organizmach żywych.

Pomimo intensywnych badań, ciągle nie ma jasności, co do najbliższego otoczenia wiązanych metali w chitosanach. Dane literaturowe bazujące na badaniach Mössbauerowskich [4, 5] wskazują, że w analizowanym chitosanie żelazo powinno mieć koordynację pięć lub sześciokrotną. Metoda absorpcji rentgenowskiej (ang. *X-ray Absorption Spectroscopy*), ze względu na jej lokalny charakter wydaje się użytecznym narzędziem do wyznaczenia najbliższego otoczenia żelaza.

Rentgenowskie widmo absorpcyjne rozdziela się na dwa podobszary. Pierwszy z nich to struktura bliska krawędzi absorpcji, zawierająca się w przedziale od 30 eV przed krawędzią i rozciągająca się do 50 eV za krawędzią. Obszar ten nazywany jest XANES (ang. *X-ray Absorption Near Edge Structure*). XANES dostarcza informacji na temat stanu chemicznego badanego pierwiastka oraz jego konfiguracji elektronowej. Wiedząc, że kształt widma XANES jest „odciskiem” jego wiązania chemicznego, można określić stopień jonowości badanego pierwiastka poprzez porównanie widm eksperymentalnych z widmami materiałów referencyjnych, o znanym stopniu jonowości. Zmiana stopnia utlenienia przesunęła energetycznie położenie krawędzi absorpcji [6, 7, 8].

Drugi obszar dostarcza informacji o rozciągniętej subtelnej strukturze widma absorpcyjnego promieniowania X (ang. *Extended X-ray Absorption Fine Structure*, EXAFS) i pokrywa obszar od 50 eV do około 1000 eV za krawędzią. EXAFS ze względu na selektywność pozwala otrzymać krzywą rozkładu radialnego atomów niezależnie dla każdego pierwiastka wchodzącego w skład próbki. Technika ta pozwala nie tylko wyznaczyć długości wiązań i liczbę koordynacyjną na podstawie rozkładu radialnego atomów, lecz również rodzaj atomów w otoczeniu atomu absorbującego [9].

Zarówno XANES jak i EXAFS są technikami selektywnymi ze względu na rodzaj atomu. W celu zarejestrowania widma absorpcyjnego należy energię promieniowania rentgenowskiego dostroić do rezonansu z wybraną powłoką atomu. Dlatego konieczne jest stosowanie promieniowania synchrotronowego, które dzięki swoim unikatowym właściwościom pozwala wybrać energię i zmieniać ją w szerokim zakresie.

Motywacją zastosowania technik absorpcji rentgenowskiej do badania chitosanu krzyżowo połączonego z żelazem, była możliwość uzyskania informacji na temat stopnia jonowości żelaza, oraz rozkładu radialnego atomów wokół żelaza w pierwszej strefie koordynacyjnej.

Dodatkową motywacją był brak doniesień literaturowych na temat tego rodzaju badań.

2. Eksperyment

Badanym materiałem był chitosan krzyżowo połączony z atomami żelaza. Preparatyka materiału była następująca: chitosan był rozpuszczany w 0.1 molowym roztworze $\text{Fe}(\text{NO})_3$ przez 4 godziny. Uzyskany materiał został przefiltrowany i wypłukany w acetonie w celu usunięcia nadmiaru $\text{Fe}(\text{NO})_3$ i ostatecznie wysuszony w próżni. Następnie próbek przez 2 godziny pozostawał w acetonie zawierającym 15% aldehydu glutarowego. Chemiczne krzyżowanie chitosanu z aldehydem glutarowym zachodzi na zasadzie reakcji Shiffa i polega na połączeniu grup aldehydowych aldehydu glutarowego z grupami aminowymi chitosanu [4].

W rezultacie otrzymano krzyżowo połączony chitosan z żelazem CH-Fe-CL o zawartości żelaza 118 mg/g, w formie proszkowej.

Pomiary absorpcyjne dla krawędzi K żelaza zostały przeprowadzone na stacji A1 w Hasylab (Hamburg, Niemcy). Widma zostały zarejestrowane za pomocą detekcji fluorescencyjnej przy użyciu siedmioelementowego detektora półprzewodnikowego Si(Li). W celu dostrojenia energii wiązki stosowano dwukrystaliczny monochromator krzemowy z orientacją płaszczyzn (111). Pomiary przeprowadzono w temperaturze ciekłego azotu w celu zminimalizowania drgań termicznych. Chitosan został równomiernie rozproszony w dwustronnej taśmie węglowej, a następnie tak przygotowana próbka była umieszczona w wiązce promieniowania synchrotronowego.

3. Wyniki

W celu uzyskania informacji na temat stanu chemicznego żelaza w chitosanie, wykonano pomiary widm XANES za-

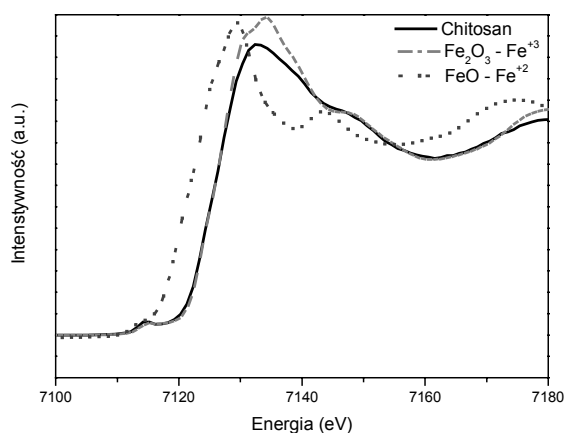
równo chitosanu jak i tlenków żelaza, będących materiałami referencyjnymi na różnych stopniach utlenienia. Zmierzono tlenek Fe_2O_3 , gdzie żelazo występuje w postaci jonu Fe^{3+} oraz FeO , gdzie żelazo występuje w postaci jonu Fe^{2+} .

Aby porównać widma XANES badanego materiału z widmami referencyjnymi należy przygotować wszystkie widma eksperymentalne w jednakowy sposób. Do odjęcia tła i znormalizowania widm wykorzystano ogólnie dostępny program XANDA [10].

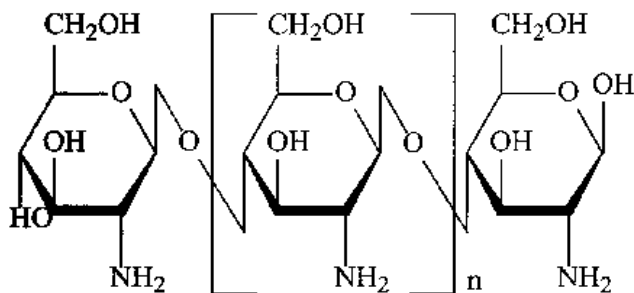
Tło zostało odjęte poprzez aproksymację linią prostą i normalizację w kilku punktach na gładkiej części krzywej absorpcji poza krawędzią absorpcji. Rysunek 1 przedstawia znormalizowane widma chitosanu, Fe_2O_3 i FeO . Z porównania tych widm wynika, iż żelazo jest na trzecim stopniu utlenienia (Fe^{3+}).

Do analizy widm EXAFS skorzystano z programów Athena i Artemis [11], wykorzystujących pakiet analityczny IFEFFIT. Teoretyczne amplitudy i fazy dla ścieżek rozpraszania Fe – O oraz Fe – N, zostały policzone za pomocą programu FEFF 8.2 [12, 13].

Chitosan łączy w swoją strukturę metale najlepiej ze wszystkich znanych polimerów. Tę własność łączy się z występującymi w jego strukturze grupami aminowymi $-\text{NH}_2$ (Rys. 2). W literaturze rozważa się różne możliwości wiązania się metali ze strukturą chitosanu. Jedną z nich jest łączenie się pojedynczego atomu metalu z grupą aminową tzw. ang. „*pendant model*”, w drugim natomiast proponuje się koordynację atomów metalu z kilkoma grupami aminowymi, tego samego bądź różnych łańcuchów polimeru (tzw. ang. „*the bridge or chelating model*”) [14, 15]. Niedawne badania Mössbauerowskie chitosanów zawierających cynę i żelazo wykazały, iż zarówno grupy $-\text{NH}_2$ jak i $-\text{OH}$, są odpowiedzialne za związkiwanie metali w tych polimerach [16]. Dodatkowo zasugerowano, że Fe^{3+} ma koordynację pięć lub sześć.



Rys. 1. Porównanie znormalizowanych widm XANES chitosanu i związków referencyjnych.



Rys. 2. Struktura chitosanu.

Informacje te posłużyły do przygotowania modelu, który został zastosowany do dopasowania pierwszej strefy koordynacyjnej chitosanu z krzyżowo połączonymi atomami żelaza. Rozważania zostały ograniczone do pierwszej strefy, ze względu na fakt, iż poza pierwszą strefą w strukturze chitosanu obserwuje się duży nieporządek strukturalny. Analizowano kilka różnych modeli w różnych koordynacjach. Najlepszym przybliżeniem okazał się model z pięcioma atomami w najbliższym otoczeniu żelaza.

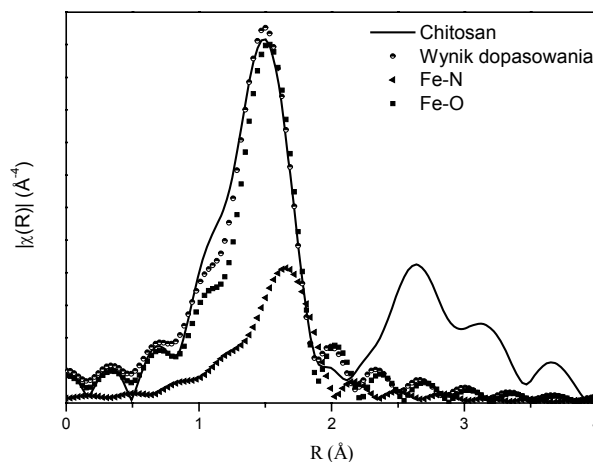
W celu zachowania jednakowego błędu systematycznego w trakcie analizy, wszystkie dane były traktowane w jednokowy sposób. Czynnikiem redukujący amplitudę S_0^2 oszacowano na początku dopasowywania przy stałej ilości atomów i odległościach między nimi w pierwszej strefie i wyniósł 0.68. Funkcja oscylacji $\chi(k)$ została pomnożona przez wektor falowy fotoelektronu podniesiony do potęgi trzeciej, k^3 . Transformatę Fouriera policzono używając funkcji filtrującej

Hanninga. Zakres wektora funkcji falowej fotoelektronu (\vec{k}) dla transformaty Fouriera wyniósł od 2.54 do 12.04 [\AA^{-1}], a zakres transformaty odwrotnej R od 0.84 do 1.94 [\AA].

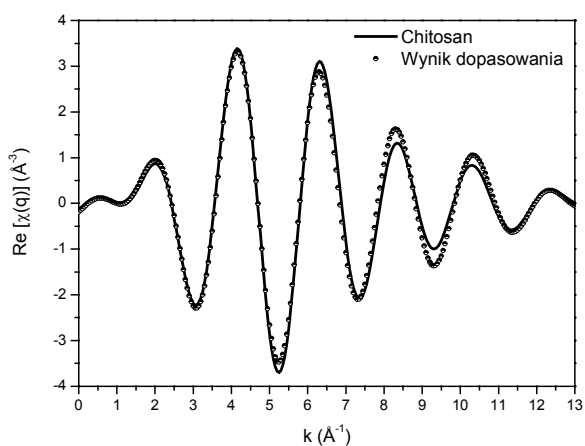
W Tabeli 1 zebrano wyniki dopasowania. Błędy do parametrów dopasowania zostały oszacowane w programie Artemis. Otrzymane wyniki pozwoliły ustalić, iż żelazo w badanym chitosanie ma koordynację bliską pięciu atomów. W pierwszej strefie koordynacyjnej znajdują się 3 atomy tlenu (O) w odległości 1.96 \AA oraz nieco dalej 2 atomy azotu (N) w odległości 2.12 \AA . Stosunkowo duży błąd wyznaczenia amplitudy i czynnika Debye-Wallera oraz ich zachowanie w trakcie rozważania różnych modeli wskazuje na możliwość istnienia atomów Fe, które posiadają 2 grupy OH w odległości 1.94 \AA i odpowiednio trzy grupy aminowe w odległości 2.09 \AA . Ustalenie liczby jednej z grup powoduje znaczne zmniejszenie błędu (do ± 0.3) wyznaczenia liczby grup drugiego rodzaju przy takim samym czynniku dopasowania modelu do danych eksperymentalnych. Natomiast zwiększenie koordynacji do sześciu prowadzi do niefizycznych parametrów modelu. Czynnikiem dopasowania modelu do eksperymentu (R -factor) wynosi 0.008. Rysunek 3 przedstawia widmo eksperymentalne wraz z dopasowanym modelem oraz ścieżki rozpraszania na atomach tlenu i azotu w przestrzeni R , natomiast na Rysunku 4 pokazano wyniki dopasowania transformaty odwrotnej pierwszej strefy koordynacyjnej widma doświadczalnego w przestrzeni \vec{k} .

Tabela 1. Długość wiązań R , ilość atomów N , czynniki Debye-Wallera σ^2 , i czynniki dopasowania teorii do eksperymentu dla pierwszej strefy koordynacyjnej chitosanu.

Typ wiązania	R [\AA]	N	σ^2 [\AA^2]	Czynnik dopasowania (R -factor)
Fe-O	1.957 ± 0.001	3.04 ± 0.82	0.004 ± 0.002	0.008
Fe-N	2.122 ± 0.004	2.00 ± 0.95	0.006 ± 0.005	



Rys. 3. Rozkład radialny atomów dla chitosanu wraz z wynikiem dopasowania, oraz ścieżkami rozpraszania na atomach tlenu i azotu, policzonymi za pomocą programu FEFF 8.2.



Rys. 4. Porównanie wyniku dopasowania z eksperymentem w przestrzeni wektora falowego.

4. Wnioski

Zastosowanie do analizy chitosanu, z krzyżowo połączonymi atomami żelaza, absorpcji rentgenowskiej dało wiarygodne rezultaty. Analiza widm XANES potwierdziła stopień utlenienia żelaza +3 w tym materiale, co jest zgodne z oczekiwaniem. Potwierdziła, również słuszność modelu zakładającego możliwość łączenia się atomu żelaza z kilkoma grupami aminowymi. Z przeprowadzonej analizy wynika, że koordynacja atomu żelaza jest bliska 5, natomiast część atomów żelaza w pierwszej strefie posiada trzy grupy aminowe i dwie OH, a część dwie grupy aminowe i trzy OH. Grupy te w każdym przypadku znajdują się w nieco innych odległościach. Natomiast zawsze grupy OH położone są bliżej atomu Fe niż grupy NH. Założenie koordynacji 6 prowadziło do niefizycznego modelu. Koordynacja taka nie występuje, więc w znaczącej ilości w badanej próbce.

Literatura:

- [1] M.N.V. Ravi Kumar, "A review of chitin and chitosan applications", *Reactive & Functional Polymers* **46** (2000) 1-27.
- [2] A.J. Varma, S.V. Deshpande, J.F. Kennedy, "Metal complexation by chitosan and derivatives: a review", *Carbohydr. Polym.* **55** (2004) 77-93.
- [3] N. Nedelko, A. Ślawska-Waniewska, J. Kaźmierczak, C.A. Rodrigues, C. Bardini, "Magnetic studiem of Fe(III)-crosslinked chitosan", *phys. stat. sol. C* **3** (2006) 126-129.
- [4] S.C. Bhatia, N. Ravi, "A Magnetic study of an Fe-Chitosan complex and its relevance to other biomolecules", *Biomacromolecules* **1**(3) (2000) 413-417.
- [5] S.C. Bhatia, N. Ravi, "A Mössbauer study of the interaction of chitosan and D-glucosamine with iron and its relevance to other metalloenzymes", *Biomacromolecules* **4** (2003) 723-727.
- [6] M. Brown, R.E. Peierls, E.A. Stern, "White lines in x-ray absorption", *Phys. Rev. B* **15** (1977) 738-744.
- [7] G. Mitchell, W.W. Beeman, "The X-ray K absorption edges of covalently bonded Cr, Mn, Fe, and Ni", *J. Chem. Phys.* **20** (1952) 1298-1301.
- [8] Y. Cauchois, N.F. Mott, *Philos. Mag.* **40** (1949) 1260.
- [9] *X-Ray Absorption: Principles, Applications, Techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES* (Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications), D.C. Koningsberger, R. Prins (Eds.), (Wiley-Interscience, New York, 1988).
- [10] K.V. Klementiev, *XANES dactyloscope for Windows*, freeware: www.desy.de/~klmn/xanda.html.
- [11] B. Ravel, M. Newville, "ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT", *J. Synchrotr. Radiat.* **12** (2005) 537.
- [12] A.L. Ankudinov, C. Bouldin, J.J. Rehr, J. Sims, H. Hung, "Parallel calculation of electron multiple scattering using Lanczos algorithms", *Phys. Rev. B* **65** (2002) 104-107.
- [13] <http://cars9.uchicago.edu/~ravel/software/>.
- [14] K. Ogawa, K. Oka, T. Miyanishi, S. Hirano, In: *Chitin, chitosan and related enzymes*, J.P. Zikakis (Ed.), (Academic Press, Orlando FL 1984) 327-345.
- [15] K. Ogawa, *Nippon Nogeikagaku Kashi* **62** (1988) 1225.
- [16] B.E. Gamblin, J.G. Stevens, K.L. Wilson, "Structural investigation of chitin and chitosan complexed with iron or tin", *Hyperfine Interact.* **112** (1998) 117.