

ELŻBIETA TYLEK, JOLANTA POLACZEK, JAN PIELICHOWSKI

Politechnika Krakowska  
 Samodzielna Katedra Chemii i Technologii Tworzyw Sztucznych  
 ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków

## Metody analizy poli(kwasu asparaginowego) i jego pochodnych<sup>\*)</sup>

### METHODS OF ANALYSIS OF POLY(ASPARTIC ACID) AND ITS DERIVATIVES

**Summary** — General characteristics of the methods of analysis of poly(aspartic acid) (PKA) has been presented on the basis of literature (mainly patents). PKA is a biodegradable polymer what let use it in medicine, environmental protection, agriculture and cosmetics. It can occur in cyclic form [as polysuccinimide, PSI, Formula (I)] or linear one [Formula (II)]. The results of investigation of the structures of sodium salts of PKA and PSI by nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR), infrared spectroscopy, gel permeation chromatography and thermogravimetry were discussed.

**Key words:** poly(aspartic acid), analysis, chemical structure, molecular weight, thermal stability.

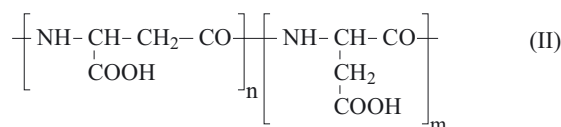
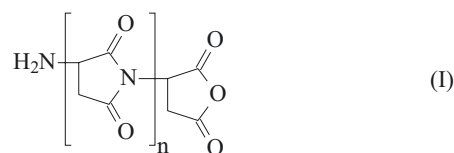
### OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA STRUKTURY POLIMERÓW KWASU ASPARAGINOWEGO I METOD JEJ OCENY

Pod koniec ubiegłego wieku zwrócono szczególną uwagę na polimery biodegradowalne, które znalazły zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. Ważną rolę odgrywa wśród nich poli(kwas asparaginowy) (PKA) oraz jego pochodne — nietoksyczne i higroskopijne związki ulegające biodegradacji [1—7]. Z tego względu interesujące wydają się możliwości stosowania poliasparaginianów w inżynierii biomedycznej i farmacji [4, 6, 8—11].

W zależności od rodzaju monomerów stosowanych do syntezy PKA oraz sposobu prowadzenia takiej reakcji powstają poliasparaginiany o różnej budowie chemicznej i odmiennych właściwościach, dlatego też bardzo istotna jest pełna charakterystyka otrzymywanych polimerów. W tym celu stosuje się różne techniki instrumentalne, a przede wszystkim magnetyczny rezonans jądrowy (NMR), spektroskopię w podczerwieni (IR) [2, 12—19], chromatografię żelową (GPC) [20—35], termogravimetrię (TG) oraz różnicową kalorymetrię skaningową (DSC) [36—40].

Znane są dwa typy struktury polimerów kwasu asparaginowego [HOOC-CH(NH<sub>2</sub>)-CH<sub>2</sub>-COOH]: cykliczna, czyli poli(imid kwasu bursztynowego) [ang. *polysuccinimide* (PSI)] [wzór (I)] oraz liniowa, powstająca w wy-

niku hydrolizy PSI prowadzonej w środowisku zasadowym, z zastosowaniem wodorotlenku potasu, sodu, magnezu, wapnia lub amonu [1, 41—44]. Tworzą się wówczas różne postacie PKA o strukturze liniowej, takie jak α-α, α-β (β-α) i β-β, charakteryzujące się odmiennymi właściwościami. Na przykład, postać β-β PKA



rozpuszcza się w wodzie w odróżnieniu od struktury α-α i α-β [1, 45]. Wzór (II) przedstawia postać α-β PKA [18].

W celu określenia budowy PKA wykorzystuje się metodę NMR, która umożliwi scharakteryzowanie łańcucha głównego polimeru, udziału w nim poszczególnych sekwencji oraz konformacji, a także identyfikację grup końcowych w PSI, tj. grup aminowych, α- i β-karboksyłowych oraz imidowych [2, 3, 16—18]. Na podstawie widm <sup>1</sup>H NMR można ocenić rozgałęzienia łańcucha w strukturze PKA oraz stopień otwarcia pierścienia imidowego PSI w toku hydrolizy, natomiast metodą <sup>13</sup>C NMR określa się m.in. rozgałęzienia łańcucha w PSI, charakterystyczne konformacje oraz nieregularną struk-

<sup>\*)</sup> Artykuł przedstawia treść wystąpienia na konferencji „Materiały polimerowe, Pomerania-Plast 2004”, Międzyzdroje, 2—4 czerwca 2004 r.

ture polimeru, a także można scharakteryzować przesunięcia chemiczne atomów węgla nierównocennych grup karbonylowych w jednostkach imidowych PSI [3, 13, 14, 16–19].

Zastosowanie spektroskopii IR umożliwia potwierdzenie obecności pięciocząłowego pierścienia imidowego w PSI oraz pasm absorpcyjnych charakterystycznych dla wiązania C-O grupy karboksylowej i amidowej.

Ciężary cząsteczkowe powstających poliasparagininów wyznaczone metodą GPC mieszczą się w przedziale 1000 D–100 000 D, przy czym najczęściej otrzymuje się PKA o ciężarach cząsteczkowych od 3000 D do 5000 D [20–34].

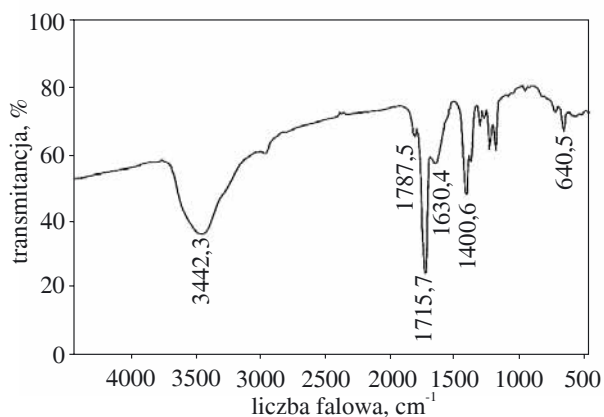
Z punktu widzenia ewentualnych zastosowań poliasparagininów w inżynierii biomateriałów interesująca wydaje się ocena ich właściwości termicznych, takich jak temperatura topnienia, temperatura zeszklenia oraz odporność cieplna. W tym celu wykorzystuje się metody różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) oraz termogravimetrii (TG) [38–40].

## METODY SPEKTROSKOPOWE

### Spektroskopia w podczerwieni

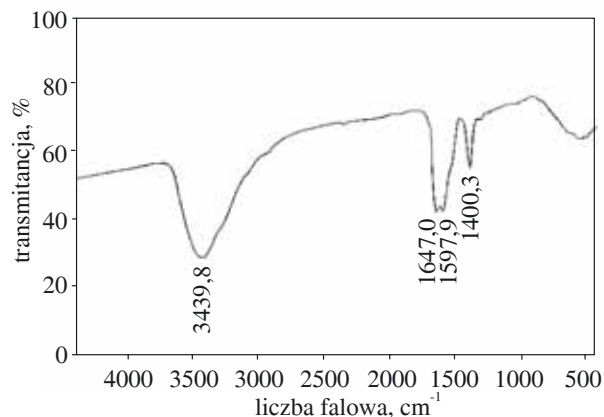
Pasma absorpcji charakterystyczne dla poliasparagininów omawiamy tu na przykładzie PSI oraz soli sodowej PKA.

W widmie FT-IR PSI (rys. 1) jest widoczny intensywny dublet w zakresie 1790–1690  $\text{cm}^{-1}$  pochodzący od pięciocząłowego pierścienia imidowego oraz pasmo absorpcyjne o średniej intensywności w zakresie 3700–3100  $\text{cm}^{-1}$  pochodzące od drgań rozciągających N-H. Pasma absorpcyjne o średnim natężeniu, z wyraźnym sygnałem odpowiadającym drganiom rozciągającym wiązania grupy C-O z maksimum przy ok. 1400  $\text{cm}^{-1}$ , pojawia się też w obszarze 1450–1350  $\text{cm}^{-1}$  [1, 12–15].



Rys. 1. Widmo FT-IR poli(imidu kwasu bursztynowego) (PSI) [22]

Fig. 1. FT-IR spectrum of polysuccinimide (PSI) [22]



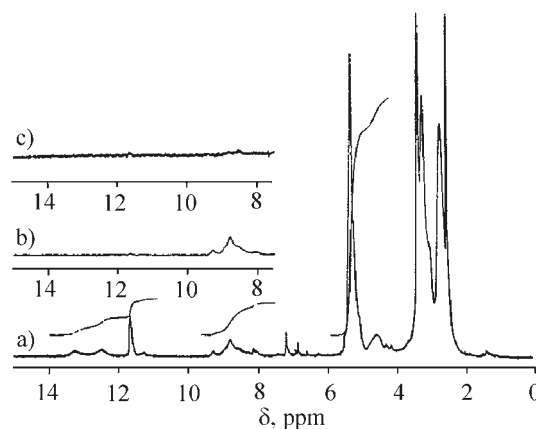
Rys. 2. Widmo FT-IR soli sodowej poli(kwasu-asparagino-wego) (PKA) [22]

Fig. 2. FT-IR spectrum of sodium salt of poly(aspartic acid) (PKA) [22]

Inny jest obraz widma IR soli sodowej PKA (rys. 2). Pojawia się tu pasmo absorpcji o średniej intensywności (przedział 3500–3400  $\text{cm}^{-1}$ ) pochodzące od drgań rozciągających N-H. Charakterystyczny dublet grupy amidowej o podobnej intensywności występuje ok. 1600–1650  $\text{cm}^{-1}$ . Z kolei sygnał z maksimum przy ok. 1400  $\text{cm}^{-1}$  w paśmie o średniej intensywności odpowiada drganiom rozciągającym wiązania grupy C-O [1, 12–15].

### Spektroskopia protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego

Widmo  $^1\text{H}$  NMR PSI w DMSO- $d_6$  (rys. 3a) charakteryzuje się w obszarze 4,5–5,4 ppm intensywnymi sygnałami pochodzącymi od protonów grup metinowych



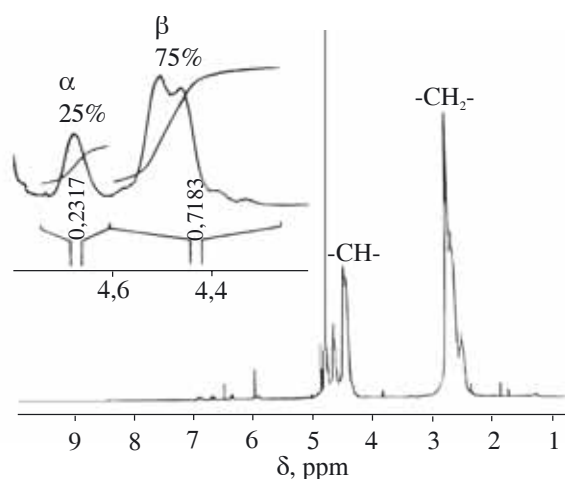
Rys. 3. Widmo  $^1\text{H}$  NMR PSI w DMSO- $d_6$  (a), natychmiast po dodaniu 5 kropli  $\text{D}_2\text{O}$  (b) oraz po upływie 3 dób od chwili dodania  $\text{D}_2\text{O}$  (c) [18]

Fig. 3.  $^1\text{H}$  NMR spectra of PSI in DMSO- $d_6$  (a), immediately after addition of 5 drops of  $\text{D}_2\text{O}$  (b) and 3 days after addition of  $\text{D}_2\text{O}$  (c) [18]

(>CH-) jednostek imidowych. Sygnały protonów metylenowych (>CH<sub>2</sub>-) jednostek imidowych o prawie jednakowej intensywności występują przy ok. 3,3 i 2,6 ppm. Sygnał pochodzący od wzorca znajduje się przy 2,49 ppm, a od wody przy ok. 3,5 ppm. Dwa szerokie pasma można zaobserwować przy 12,48 ppm i 13,22 ppm, a niezbyt ostre linie rezonansowe znajdują się przy 11,60 ppm i 11,22 ppm. Sygnały te prawdopodobnie pochodzą od protonów karboksylowych lub aminowych, które ulegają wymianie z pozostałością wody. Natomiast sygnały protonów amidowych znajdują się w zakresie 8,0–9,5 ppm i pochodzą najprawdopodobniej z rozgałęzienia łańcucha lub otwarcia pierścienia imidowego. Dodanie kilku kropeł D<sub>2</sub>O powoduje, że protony grup aminowych i kwasowych zanikają natychmiast, natomiast protony amidowe zanikają powoli, nawet w czasie kilku dób (rys. 3b i 3c) [1, 17, 18].

Reakcja hydrolizy PSI prowadzi do otrzymania soli PKA zawierających jednostki  $\alpha$ - i  $\beta$ -asparaginowe, których powstanie jest spowodowane atakiem czynnika nukleofilowego na wiązanie C-N w pierścieniu imidowym PSI, przy czym możliwe jest otwarcie pierścienia imidowego w położeniu  $\alpha$ - i  $\beta$ - [17, 28–30].

Widmo <sup>1</sup>H NMR soli sodowej PKA w D<sub>2</sub>O (rys. 4) charakteryzuje się tym, że zanikają sygnały protonów (>CH-) i (-CH<sub>2</sub>-) jednostek imidowych PSI (por. rys. 3), natomiast pojawiają się sygnały protonów (>CH-) przy



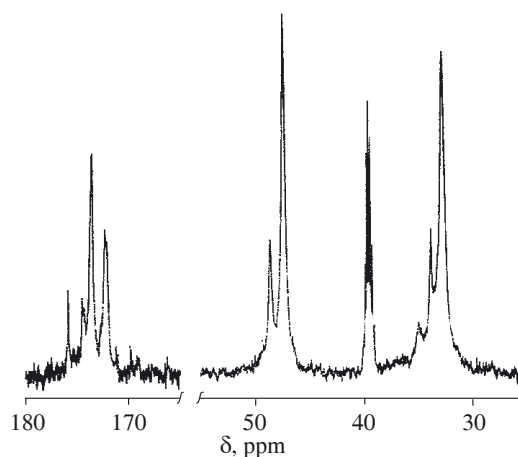
Rys. 4. Widmo <sup>1</sup>H NMR soli sodowej PKA w D<sub>2</sub>O [18]

Fig. 4. <sup>1</sup>H NMR spectrum of sodium salt of PKA in D<sub>2</sub>O [18]

4,7 i 4,2 ppm oraz protonów (-CH<sub>2</sub>-) przy 2,8, 2,7 i 2,4 ppm. Dwa różne przesunięcia chemiczne protonów wskazują na różne kierunki otwarcia pierścienia imidowego PSI ( $\alpha$ - i  $\beta$ -), których wzajemny stosunek można określić właśnie na podstawie analizy widm <sup>1</sup>H NMR. Gdy zachodzi całkowita hydroliza jednostek imidowych PSI, to stosunek  $\alpha$ : $\beta$  wynosi zawsze 25/75. Omawiane widmo zawiera także intensywny sygnał od D<sub>2</sub>O przy 4,75 ppm [1, 3, 13, 16–19, 44].

## Spektroskopia węglowego magnetycznego rezonansu jądrowego

Widmo <sup>13</sup>C NMR PSI w DMSO-d<sub>6</sub> (rys. 5) wyróżnia się dwoma typowymi sygnałami, umiejscowionymi przy 173 i 174 ppm a pochodzącymi od dwóch nierównocennych grup karbonylowych z jednostek imidowych

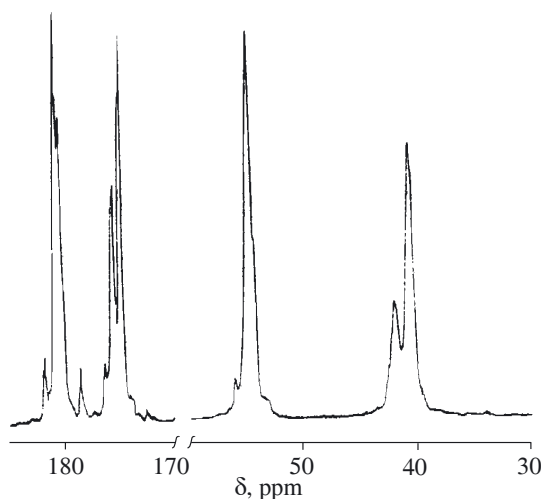


Rys. 5. Widmo <sup>13</sup>C NMR PSI w DMSO-d<sub>6</sub> [18]

Fig. 5. <sup>13</sup>C NMR spectrum of PSI in DMSO-d<sub>6</sub> [18]

występujących w PSI. Sygnały pochodzące od atomów węgla grup (-CH<sub>2</sub>-) oraz (>CH-) w powtarzających się jednostkach imidowych znajdują się odpowiednio przy ok. 32 ppm i 47 ppm. Pozostałe małe piki w obszarach 33–35 ppm oraz 174–178 ppm wskazują na nieregularną strukturę polimeru bądź na obecność różnych grup końcowych znajdujących się w PSI. Charakterystyczny sygnał pochodzący od substancji wzorcowej znajduje się przy 39,5 ppm [18].

Widmo <sup>13</sup>C NMR soli sodowej PKA w D<sub>2</sub>O (rys. 6) charakteryzuje się szerokimi i intensywnymi sygnałami



Rys. 6. Widmo <sup>13</sup>C NMR soli sodowej PKA w D<sub>2</sub>O [18]

Fig. 6. <sup>13</sup>C NMR spectrum of sodium salt of PKA in D<sub>2</sub>O [18]

widocznymi w zakresie 170—185 ppm. Sygnały te obejmują dwa różne sygnały atomów C grupy karboksylowej i amidowej.

W alifatycznym zakresie przesunięć chemicznych sygnałów atomów węgla obserwuje się trzy różne sygnały. Pierwszy z nich, występujący w przedziale 51—57 ppm, pochodzi od sygnału atomu węgla grupy >CH- w PKA. Sygnał ten jest ostry i bardzo intensywny. Dwa pozostałe sygnały (przesunięcia chemiczne w zakresie od 37 ppm do 44 ppm) pochodzą od atomów węgla grupy -CH<sub>2</sub>- [18].

#### CIĘŻAR CZĄSTECZKOWY (METODA CHROMATOGRAFII ŻELOWEJ)

Wartość ciężaru cząsteczkowego poliasparaginianów zależy przede wszystkim od rodzaju wyjściowego substratu, rozpuszczalnika oraz warunków prowadzenia polimeryzacji. W zależności od ilości odprowadzanej z układu wody, otrzymuje się poliasparaginiany o różnych ciężarach cząsteczkowych [20, 23, 25]. Wpływ na ciężar cząsteczkowy PSI wywiera rodzaj zastosowanej w polimeryzacji atmosfery (tabela 1, [24, 25]).

**Tabela 1.** Wpływ rodzaju atmosfery gazowej w syntezie PSI na wartość ciężaru cząsteczkowego ( $M_n$ ,  $M_w$ ) produktów<sup>a)</sup> [24, 25]

**T a b l e 1.** Effect of the type of gas environment during PSI synthesis on molecular weight ( $M_n$ ,  $M_w$ ) of the product [24, 25]

Atmosfera gazowa	$M_n$	$M_w$
Powietrze	2955	7159
Azot	3250	7484
Obniżone ciśnienie	5225	18 693

<sup>a)</sup> Skład mieszaniny reakcyjnej: kwas asparaginowy — 3,01 g, katalizator (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) — 1,03 g, rozpuszczalnik (węglan propylenu) — 15,03 g.

W celu otrzymania polimeru o większym ciężarze cząsteczkowym PSI poddaje się reakcji przedłużania łańcucha metodą chemiczną przy użyciu odpowiednich reagentów. Jako środki sieciujące stosuje się etylenodiaminę, 1,3-bis-aminoetylenocykloheksan, heksametylenodiaminę, trietylenodiaminę, *m*-ksylenodiaminę oraz polieterodiaminy. Otrzymywane produkty składają się z jednostek imidowych oraz  $\alpha$ - i  $\beta$ -asparaginowych, mają więc charakter kopolimerów PKA. Ich wagowo średni ciężar cząsteczkowy mieści się na ogół w przedziale 3400—78 000 D, a wartości  $M_n$  wynoszą od 1200 D do ok. 8000 D [32—34].

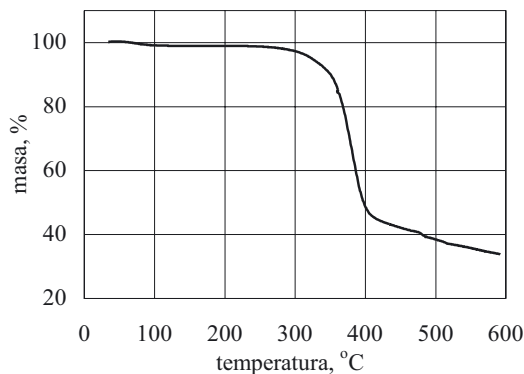
Polimery o ciężarach cząsteczkowych od 100 000 D można otrzymać w wyniku reakcji soli poliasparaginowych z dihydrazidem kwasu malonowego, adypinowego lub tereftalowego w *N,N*-dimetyloformamidzie. Znana jest też metoda otrzymywania hydrożeli na drodze naświetlania PKA promieniowaniem  $\gamma$  [36, 39]. Tą metodą otrzymuje się hydrożele o chłonności wody dochodzącej do 3400 g wody/g suchego żelu.

Średnie ciężary cząsteczkowe PSI można także charakteryzować za pomocą metody MALDI-MAS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* — desorpcja i jonizacja za pomocą lasera, technika spektroskopii mas). Wyznaczony tą metodą średni ciężar cząsteczkowy PSI wynosi 13 710 D [5, 35].

#### ANALIZA TERMOGRAWIMETRYCZNA

W Samodzielnej Katedrze Chemii i Technologii Tworzyw Sztucznych Politechniki Krakowskiej wykonano analizę termogravimetryczną PSI otrzymanego w wyniku polikondensacji kwasu asparaginowego lub soli amonowej kwasu maleinowego w warunkach promieniowania mikrofalowego.

Próbki o masie ok. 4,5 mg analizowano z szybkością ogrzewania 10 K/min w atmosferze argonu, w temp. 303—703 K, stosując aparat „Netzsch TG-209”. Stwierdzono, że degradacja termiczna PSI przebiega kilkietapowo, co jest wynikiem nałożenia się kilku procesów degradacji charakteryzujących się zbliżonymi wartościami



**Rys. 7.** Krzywa termogravimetryczna PSI  
**Fig. 7.** Thermogravimetric curve for PSI

ciami energii dysocjacji. Na krzywej termogravimetrycznej PSI (rys. 7, [36, 37, 46, 47]) można wyodrębnić wyraźny etap rozkładu rozpoczynający się w temp. ok. 250 °C. Bardziej intensywny rozkład polimeru, w zależności od jego struktury, zachodzi w przedziale temp. 290—420 °C. Ilość stałej pozostałości po rozkładzie wynosi ok. 30 %.

#### LITERATURA

1. Polaczek J., Dziki E., Pielichowski J.: *Polimery* 2003, **28**, 61.
2. Nakato T., Yoshitake H., Matsubara K., Tomida M., Kokuchi T.: *Macromolecules* 1998, **31**, 2107.
3. Schwamborn M.: *Polym. Degrad. Stab.* 1998, **59**, 39.
4. Roweton S., Huang S. J., Swift G.: *J. Environ. Polym. Degrad.* 1997, **5**, 175.
5. *Pat. USA* 6 072 025 (2000).



6. *Pat. USA* 6 001 956 (1999).
7. *Pat. USA* 5 610 267 (1997).
8. *Pat. USA* 4 590 260 (1986).
9. Kapoor D., Misra N. K., Tandon P., Gupra V. D.: *Eur. Polym. J.* 1998, **34**, 1781.
10. *Pat. USA* 5 714 558 (1998).
11. *Pat. USA* 4 696 981 (1987).
12. *Pat. USA* 5 981 691 (1999).
13. Kokofuta E., Suzuki S., Harada K.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1978, **51**, 1555.
14. Vanga S. R., Lapointe P., MacGregor D. N.: *Macromol. Chem.* 1993, **194**, 195.
15. Gonsalves K. E., Jin S., Barton M. I.: *Biomaterials* 1998, **19**, 1501.
16. Sivcova H., Saudek V., Drobnik H.: *Polymer* 1982, **23**, 1237.
17. Tomida M., Nakato T.: *Polymer* 1997, **38**, 4733.
18. Wolk S. K., Swift G., Smith R. L.: *Macromolecules* 1994, **27**, 7613.
19. Matsubara K., Nakato T., Tomida M.: *Macromolecules* 1998, **31**, 1466.
20. *Pat. USA* 5 315 010 (1994).
21. *Pat. USA* 6 197 897 (2001).
22. *Pat. USA* 5 478 919 (1995).
23. *Pat. USA* 5 756 595 (1998).
24. *Pat. USA* 5 939 518 (1999).
25. *Pat. USA* 5 939 517 (1999).
26. *Pat. USA* 6 380 350 (2002).
27. *Pat. USA* 5 373 088 (1994).
28. *Pat. USA* 5 466 779 (1995).
29. *Pat. USA* 5 371 180 (1994).
30. *Pat. USA* 5 468 838 (1995).
31. *Pat. USA* 5 288 783 (1994).
32. *Pat. USA* 6 001 956 (1999).
33. *Pat. USA* 5 854 378 (1998).
34. *Pat. USA* 5 552 516 (1996).
35. Wensheng X., Regnier F. E.: *J. Chrom.* 1999, A853, 243.
36. Polaczek J., Dziki E., Pielichowski J.: „Prace Naukowe ITO i TSzt Politechniki Wrocławskiej”, 2003, nr 52, seria 25, 45.
37. *Polskie zgłosz. pat.* P-346 885 (2001).
38. Polaczek J., Dziki E., Pielichowski J.: *Inż. biomat.* 2003, nr 27, 6.
39. Polaczek J., Dziki E., Pielichowski J.: *Inż. biomat.* 2003, nr 28, 21.
40. Polaczek J., Dziki E., Pielichowski J.: „Prace Naukowe ITO i TSzt Politechniki Wrocławskiej”, 2003, nr 52, seria 25, 560.
41. *Pat. USA* 5 373 086 (1994).
42. *Pat. USA* 4 839 461 (1989).
43. *Pat. USA* 5 296 578 (1994).
44. *Pat. USA* 5 221 733 (1993).
45. Kovaces J., Nagy Kovaces H. i in.: *J. Org. Chem.* 1960, **26**, 1084.
46. *Pat. USA* 6 180 752 (2001).
47. *Pat. USA* 5 219 952 (1993).