

УДК 544.773

DOI 10.26456/vtchem2022.3.2

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ СИНТЕЗА НАНОЧАСТИЦ ХИТОЗАНА

**В.Г. Матвеева, Б.Б. Тихонов, П.Ю. Стадольникова, Д.Р. Лисичкин,
О.В. Манаенков, М.Г. Сульман**

ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет»,
г. Тверь

В работе методом ионотропного гелеобразования синтезированы стабильные наночастицы хитозана. Изучены свойства образца хитозана – определены его степень деацетилирования (83,7%), а также относительная и характеристическая вязкости его растворов. Определены размеры наночастиц и дзета-потенциал методом динамического рассеяния света. Проведено исследование влияния соотношений реагентов – хитозана и триполифосфата натрия на средний диаметр синтезированных частиц и дзета-потенциал. Получены спектры образцов наночастиц в области 400-800 нм, свидетельствующие об образовании агрегатов частиц при определенных соотношениях реагентов.

Ключевые слова: хитозан, наночастицы, ионотропное гелеобразование, дифференциальное рассеяние света, размер частиц.

Одним из перспективных продуктов переработки биомассы (отходов рыбных промыслов и переработки морепродуктов) является хитозан – природный гидрофильный полисахарид, составленный из остатков 2-амино-2-деокси-D-глюкозы, связанных 1,4-гликозидной связью, продукт деацетилирования хитина, основного компонента экзоскелета членистоногих и ряда других беспозвоночных животных, а также клеточных стенок грибов, бактерий и сине-зелёных водорослей [1]. Благодаря способности хитозана к гелеобразованию, он может быть эффективно использован для получения многофункциональных наночастиц, способных выполнять функции носителя для ферментов, наночастиц металлов, магнитных наночастиц, а также быть основой для получения биоразлагаемых пленок [2]. Большая удельная поверхность наночастиц биополимеров, а также наличие на этой поверхности функциональных групп с высокой реакционной способностью позволяют прочно закреплять на их поверхности различные активные компоненты, минимизируя потери активной фазы как в процессе синтеза, так и в процессе их дальнейшего использования [3]. Наиболее простым и технологичным способом получения наночастиц хитозана является метод ионотропного гелеобразования [4]. Хитозан является

поликатионом, поэтому его легко можно модифицировать с помощью ионных сшивающих реагентов (анионов или полианионов) за счет электростатических взаимодействий [5]. Хитозановые частицы, не растворимые во всем диапазоне pH, могут быть получены путем добавления раствора хитозана по каплям в раствор триполифосфата натрия [6]. Наночастицы, синтезированные данным методом, обладают достаточно высоким остаточным зарядом, благодаря которому, во-первых, они достаточно устойчивы в определенном диапазоне соотношений компонентов, во-вторых, имеется возможность модификации наночастиц полианионными и другими компонентами с необходимыми функциональными группами на поверхности, что может существенно расширить функциональные возможности наночастиц и их устойчивость [7].

В данной работе были синтезированы наночастицы хитозана методом ионотропного гелеобразования и проведена оптимизация условий их синтеза на основе результатов исследований свойств наночастиц.

Методы и методики

В работе использовали хитозан низкой вязкости («Biochimika», Япония).

Для определения степени деацетилирования хитозана проводилось потенциметрическое титрование с использованием pH-метра. Перед работой прибор настраивали по стандартным буферным растворам. Навеску хитозана 0,2 г растворяли при перемешивании в 20 мл 0,1н растворе HCl при перемешивании на магнитной мешалке в течение 1ч. Полученный раствор титровали потенциметрически 0,03 н. раствором NaOH до pH около 11. Первый перегиб кривой титрования соответствует избыточному количеству HCl, а второй – концентрации аминогрупп в навеске хитозана. Степень деацетилирования определяли по формуле:

$$CD = \frac{203 \cdot m}{G + 42 \cdot m} \cdot 100\% \quad (1)$$

где: G – навеска хитозана в г; m – количество молей аминоксодержащих звеньев в навеске хитозана, моль; $m = V \cdot T$; V – объем раствора NaOH в мл, соответствующий нейтрализации кватернизированной формы аминогрупп хитозана, определяемый разностью объемов второго и первого перегибов на кривой потенциметрического титрования; T – титр раствора NaOH в моль/мл, определяемый в холостом титровании 0,1н раствора HCl.

Для определения относительной и характеристической вязкости растворы хитозана определённой концентрации были приготовлены в ацетатном буферном растворе с pH = 4,3 (68 мл 0,2 М раствора

уксусной кислоты, 32 мл 0,2 М раствора уксуснокислого натрия). Для измерения вязкости обработанных растворов применялся капиллярный вискозиметр с внутренним диаметром капилляра 0,73 мм. Для определения характеристической вязкости был применен одноточечный метод, основанный на использовании уравнения Соломона-Сьюта, позволяющего рассчитать величину характеристической вязкости на основании одного измерения относительной вязкости:

$$[\eta] = \frac{\sqrt{2}}{c} \cdot \sqrt{\eta_{отн} - 1 - \ln \eta_{отн}} \quad (2)$$

где с – концентрация хитозана, г/100 мл.

Для синтеза наночастиц хитозана были приготовлены растворы хитозана и триполифосфата натрия различных концентраций в ацетатном буферном растворе с рН = 4,3. Приготовленные растворы смешивались в количестве по 10 мл каждый с получением различных соотношений «триполифосфат натрия/хитозан» при постоянном перемешивании.

Для всех образцов наночастиц определялись размеры частиц и дзета-потенциал методом динамического рассеяния света с помощью спектрометра фотон-корреляционной спектроскопии 90Plus. Кроме того, были сняты спектры поглощения синтезированных наночастиц в диапазоне длин волн 400-800 нм на спектрофотометре СФ-2000.

Результаты и обсуждение

Для определения степени дезацетилирования хитозана была взята его навеска массой 1 г, при этом титр раствора NaOH был равен 0,00003 моль/мл. На титрование образца было израсходовано 166 мл титранта. Рассчитана степень дезацетилирования образца – 83,7%, которая соответствует заявленной в сопроводительной документации образца хитозана (не менее 80 %).

Результаты определения относительной ($\eta_{отн}$) и характеристической $[\eta]$ вязкости для образца хитозана приведены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты расчёта относительной и характеристической вязкости раствора хитозана

№	$c_{хит.}$, Г/МЛ	t, сек	$\eta_{отн}$
1	0,002	81,6	2,428571
2	0,001	52	1,547619
3	0,0005	41,9	1,247024
4	0,00025	36,7	1,092262
5	0,000125	34,8	1,035714
6	0,0000625	33,8	1,005952
$[\eta] = 443,275$ мл/г			

Как видно из таблицы 1, вязкость раствора хитозана существенно зависит от концентрации хитозана в растворе. Однако для получения наночастиц меньшего размера с более тонким распределением по размерам необходимо использование растворов низкой вязкости. Повышенная вязкость раствора хитозана приводит к образованию агрегатов частиц и их отклонению от сферической формы, что отрицательно сказывается на их устойчивости в коллоидной системе.

Результаты проведенных экспериментов по синтезу наночастиц хитозана при различных соотношениях хитозана и триполифосфата натрия объединены в таблицах 2-3, где приведены значения среднего размера частиц и дзета-потенциала образцов смеси, соответственно.

Таблица 2
Зависимость среднего диаметра частиц в исследованных образцах от соотношения «триполифосфат натрия/хитозан»

Исходная концентрация хитозана, мг/мл	Исходная концентрация ТРР, мг/мл					
	0,05	0,25	1,0	2,0	3,0	5,0
0,1	186,1	95,3	A*	A	A	A
0,5	229,4	101,9	A	A	A	A
1,5	739,2	171,2	A	A	A	A
3,0	1147,7	267,6	164,2	A	A	A
5,0	1891,7	878,6	571,6	A	A	A
10,0	3069,6	1477,7	A	A	A	A

* A – агрегаты

Таблица 3
Зависимость дзета-потенциала исследованных образцах от соотношения «триполифосфат натрия/хитозан»

Исходная концентрация хитозана, мг/мл	Исходная концентрация ТРР, мг/мл					
	0,05	0,25	1,0	2,0	3,0	5,0
0,1	49,49	53,47	A	A	A	A
0,5	53,64	59,07	A	A	A	A
1,5	55,77	61,69	A	A	A	A
3,0	58,50	64,51	67,19	A	A	A
5,0	62,51	68,22	33,61	A	A	A
10,0	70,17	72,14	A	A	A	A

В полученной смеси возможны 3 состояния: прозрачный раствор; опалесцирующая суспензия; агрегаты. Как видно из таблицы 2, при увеличении концентраций смешиваемых реагентов происходит

увеличение размеров частиц, которое в определенный момент заканчивается при достижении критической массы выпадением частиц в хлопьевидный осадок (агрегаты). При этом дзета-потенциал синтезированных наночастиц положительный, что обусловлено присутствием в смеси поликатиона – хитозана. При увеличении концентрации хитозана и полифосфата натрия дзета-потенциал снижается, при этом по мере снижения положительного дзета-потенциала наночастиц снижается их устойчивость в системе, что в итоге при достижении минимального значения дзета-потенциала приводит к выпадению частиц в осадок. Как видно из таблицы 3, зона формирования опалесцирующей суспензии находится в диапазоне концентраций хитозана 0,1–10 мг/мл и триполифосфата 0,05–0,25 г/мл. Таким образом, варьируя соотношения реагентов – хитозана и триполифосфата натрия, можно целенаправленно синтезировать частицы с заданными размерами и поверхностными свойствами.

Спектры поглощения синтезированных наночастиц хитозана при фиксированной концентрации хитозана 5 мг/мл и варьировании концентрации триполифосфата в диапазоне 400–800 нм приведены на рисунке 1.

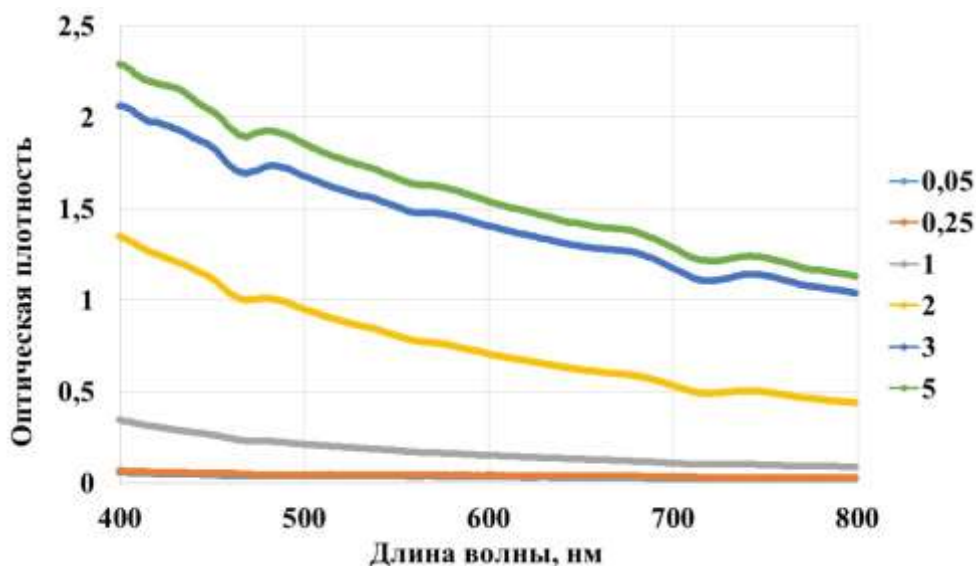


Рис. 1. Спектры поглощения синтезированных наночастиц хитозана при варьировании концентрации триполифосфата натрия (концентрация хитозана 5 мг/мл)

На рисунке 1 спектры поглощения образцов, полученных при добавлении триполифосфата с концентрацией 0,05 и 0,25 мг/мл, совпадают. Из рисунка 1 видно, что при концентрациях триполифосфата до 0,25 мг/мл спектры не имеют характерных пиков по

всему диапазону длин волн, при этом визуально смесь практически прозрачная со слабой опалесценцией. При увеличении концентрации триполифосата в смеси более 0,25 мг/мл происходит резкое увеличение оптической плотности во всем диапазоне длин волн, что свидетельствует о начале процесса образования агрегатов частиц. Этот факт подтверждается снижением дзета-потенциала частиц при соотношении «хитозан/триполифосфат натрия» 5/1, а также небольшим помутнением коллоидной смеси. При дальнейшем увеличении концентрации триполифосата смесь сильно мутнеет, при этом оптическая плотность раствора существенно повышается по всему спектру.

Таким образом, варьируя соотношения реагентов – хитозана и триполифосфата натрия, можно целенаправленно синтезировать частицы с заданными размерами и поверхностными свойствами.

Выводы

В ходе исследования были сделаны следующие выводы:

1. Изучены свойства коммерческого образца хитозана – определены его степень дезацетилирования (83,7%), а также относительная и характеристическая вязкости его растворов.

2. Методом ионотропного гелеобразования синтезированы стабильные наночастицы хитозана.

3. Методом динамического рассеяния света определены размеры наночастиц и дзета-потенциал, исследовано влияние соотношений реагентов – хитозана и триполифосфата натрия на средний диаметр синтезированных частиц и дзета-потенциал.

4. Получены спектры образцов наночастиц в области 400-800 нм, свидетельствующие об образовании агрегатов частиц при определенных соотношениях реагентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (проект №13.2251.21.0183).

Список литературы

1. Aranaz I., Alcántara A.R., Civera M.C., Arias C., Elorza B., Heras Caballero A., Acosta N. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications // *Polymers*. 2021. V. 13. P. 3256.
2. Divya K., Jisha M.S. Chitosan nanoparticles preparation and applications // *Environ. Chem. Lett.* 2018 V. 16. P. 101–112.
3. Леваньков С.В., Якуш Е.В. Удельная поверхность хитозана и способ ее определения // *Известия Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра*. 2001. Том 129. С. 109-115.
4. Белоконь М.А. Использование сшивающих реагентов ковалентного или ионного типа для получения материалов медико-биологического

- назначения на основе гидрогелей хитозан. Дис. к.т.н., Москва – 2016, 152 с.
5. Samaneh B., Hamidreza S., Abtin E. A., Saeed Sh., Seeram R. Biodegradable Polymers for Membrane Separation // Sep. Purif. Technol. 2021. V. 269. 118731
 6. Sawtarie N., Cai Y., Lapitsky Y. Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity // Colloids Surf. B: Biointerfaces. 2017. V. 157. p. 110-117.
 7. Li P., Dai Y.-N., Wang A., Wei Q. Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine // Int. J. Biomed. Sci: IJBS. 2008. V. 4. P. 221-228.

Об авторах:

МАТВЕЕВА Валентина Геннадьевна – доктор химических наук, профессор, профессор кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: valen-matveeva@yandex.ru

ТИХОНОВ Борис Борисович – кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: tiboris@yandex.ru

СТАДОЛЬНИКОВА Полина Юрьевна – аспирант, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: p.stadolnikova@mail.ru

ЛИСИЧКИН Даниил Русланович – студент, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: danok9900@gmail.com

МАНАЕНКОВ Олег Викторович – кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: ovman@yandex.ru

СУЛЬМАН Михаил Геннадьевич – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: sulmanmikhail@yandex.ru

OPTIMIZATION OF CHITOSAN NANOPARTICLES SYNTHESIS CONDITIONS

**V.G. Matveeva, B.B. Tikhonov, P. Yu. Stadolnikova, D.R. Lisichkin,
O.V. Manaenkov, M.G. Sulman**

Tver State Technical University, Tver

The article describes the synthesis of stable chitosan nanoparticles by ionotropic gelation. The properties of the chitosan sample were studied. A degree of deacetylation was determined to be 83.7%. Moreover, the relative and intrinsic viscosity of chitosane solutions were estimated. Nanoparticle sizes and zeta potential were determined by dynamic light scattering method. The effect of reagent ratios – chitosan and sodium tripolyphosphate – on the average diameter of synthesized particles and zeta-potential was studied. Spectra of nanoparticle samples were obtained in the region of 400-800 nm, indicating the formation of particle aggregates at certain ratios of reagents.

Keywords: *chitosan, nanoparticles, ionotropic gelation, differential light scattering, particle size.*