

МОДИФИКАЦИЯ ХИТОЗАНА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИНТЕЗА НАНОЧАСТИЦ И ПЛЕНОК

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

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

Статья посвящена химической модификации природного полимера хитозана с целью повышения его качества и пригодности для дальнейшего синтеза наночастиц и пленок. Были синтезированы образцы хитозана, очищенные гидроксидом натрия с последующим переосаждением, обладающие повышенной степенью деацетилирования и сниженной молекулярной массой. Также обработкой янтарной кислотой, цистеином, соляной кислотой получены растворимые при нейтральных значениях рН производные хитозана. Для каждого из синтезированных образцов были получены инфракрасные спектры диффузионного отражения на ИК-Фурье спектрометре IR Prestige-21 (Shimadzu, Япония), определены степень деацетилирования и молекулярная масса.

Ключевые слова: хитозан, модификация, степень деацетилирования, молекулярная масса, наночастицы, пленки.

Хитозан - природный гидрофильный полисахарид, составленный из остатков 2-амино-2-деокси-D-глюкозы, соединенных 1,4-гликазидной связью, и полученный деацетилированием раствором щелочи хитина, который является основным компонентом экзоскелета ракообразных, насекомых и клеточных стенок некоторых грибов [1]. Важнейшими характеристиками хитозана являются степень деацетилирования и молекулярная масса. Степень деацетилирования – это отношение количества глюкозаминных (деацетилированных) звеньев к общему числу мономерных звеньев в молекуле полисахарида [2]. Хитозан имеет высокую молекулярную массу, однако, она варьируется в зависимости от источников сырья и способа получения. Коммерческие образцы хитозана имеют диапазон молекулярных масс от 100 до 1200 КДа [3]. Благодаря уникальному для природных полимеров строению (содержит первичные амины, а также гидрофильные гидроксильные группы), хитозан обладает широким спектром полезных свойств и применяется во многих областях науки, промышленности и лабораторных исследований [4]. Кроме того, перспективы этого биополимера расширяются за счет его распространенности в природе, экологичности и биodeградируемости [5]. Наличие реакционноспособной аминогруппы дает возможность получать поперечно-сшитые прочные хитозановые пленки, которые могут быть использованы в качестве упаковки (в том числе – пищевой) и

мембран в различных областях [1]. Также на основе хитозана могут быть синтезированы многофункциональные наночастицы, способных выполнять функции носителя для ферментов, наночастиц металлов, магнитных наночастиц [6]. Однако, несмотря на уникальные полезные свойства, материалы на основе хитозана чаще всего имеют невысокий уровень физико-механических характеристик, а также недостаточный для использования в тонком органическом синтезе уровень чистоты [7]. Поэтому в большинстве отраслей хитозан подвергают химическим модификациям для расширения сферы его применения и улучшения его физико-механических и структурных свойств. Среди наиболее распространенных методов модификации выделяют обработку нагретыми растворами щелочей для удаления примесей белков и пигментов, частичное разрушение гликазидной связи для сокращения длины полимерной цепи и снижения молекулярной массы, а также обработку функциональными реагентами с целью получения растворимых в воде форм хитозана [8].

Целью настоящей работы является модификация хитозана различными способами с целью повышения его качества и пригодности для дальнейшего синтеза наночастиц и пленок и изучение физико-химических свойств модифицированных хитозанов.

Экспериментальная часть

В работе использовали хитозан средней вязкости («Biochimika», Япония). Все используемые реактивы были химической степени чистоты.

Инфракрасные спектры диффузионного отражения были получены с использованием инфракрасного спектрофотометра с преобразованием Фурье и приставкой диффузионного отражения IRPrestige-21 («Shimadzu», Япония).

Для определения молекулярной массы образцов модифицированных хитозанов использовался вискозиметрический метод определения молекулярной массы полимеров с помощью стеклянного вискозиметра типа ВПЖ-2 («Союзнауцприбор», Россия). Молекулярную массу образцов хитозана рассчитывали, используя значение характеристической вязкости и зависимость Марка-Хаувинка-Сакурада [9].

Для определения степени дезацетилирования хитозана проводилось потенциометрическое титрование 1%-ного раствора хитозана в 0,1 н. растворе HCl 0,03 н. раствором NaOH с использованием рН-метра [10].

В работе были использованы следующие методики модификации хитозана:

1. Методика очистки 1. 5 г хитозана растворяли в 400 мл раствора 2%-ной (масс./об) уксусной кислоты в бидистиллированной воде. Полное

растворение было достигнуто через 16 часов перемешивания на магнитной мешалке при скорости перемешивания около 300 мин^{-1} . Раствор был прокипячен в течение 15 минут для денатурации и выпадения в осадок всех побочных белковых веществ. Далее смесь центрифугировалась 10 минут при 5000 об./мин , и надосадочная жидкость далее фильтровалась через фильтр с размером пор 1 мкм . Далее рН раствора был скорректирован до 9 раствором 1 Н NaOH для осаждения хитозана из водной фазы. После центрифугирования осадок был редиispersгирован и снова центрифугирован дважды, всегда используя воду с $\text{pH}=9$ в качестве растворителя. Далее образец высушивался лиофильно и хранился при $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

2. Методика очистки 2. 1 г хитозана смешивали с 10 мл 1 М раствора NaOH . Эта смесь нагревалась и перемешивалась в течение 2 часов при $70 \text{ }^\circ\text{C}$, после чего фильтровалась через воронку Бюхнера. Хитозан нерастворим в растворе NaOH , и восстановленные хлопья были тщательно промыты и высушены при $40 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 12 часов. Далее очищенные хлопья хитозана были растворены в $0,1 \text{ М}$ растворе уксусной кислоты, после чего раствор был отфильтрован через бумажный фильтр для удаления нерастворимых частиц. Для доведения рН раствора до $8,0$ использовали 1 М раствор NaOH , в результате был получен очищенный хитозан в форме белого осадка. Осадок далее был тщательно промыт деионизированной водой и продукт был высушен под вакуумом в течение 24 часов.

3. Получение сукцината хитозана. Для получения сукцината хитозана использовали его взаимодействие с янтарной кислотой. В круглодонную трехгорлую колбу емкостью 250 мл , снабженную механической мешалкой, обратным холодильником и термометром, помещали $0,17 \text{ г}$ янтарной кислоты, добавляли 100 мл дистиллированной воды и растворяли при перемешивании и температуре 20°C . После растворения янтарной кислоты полученную массу фильтровали и снова помещали в реактор, затем прибавляли $0,17 \text{ г}$ хитозана (средняя молекулярная масса 30 кДа) при перемешивании со скоростью 200 мин^{-1} . Реакционную массу в этих условиях перемешивали в течение 2 часов. По окончании реакции прибавляли 75 мл этанола и центрифугировали. Твердый остаток фильтровали и сушили в сушильном шкафу при температуре 30°C .

4. Получение гидрохлорида хитозана. Получение растворимой формы хитозана включало обработку хитозана соляной кислотой в гетерогенной среде с предварительным набуханием хитозана с последующим выделением производных хитозана. Метод позволяет воспроизводимо, в мягких условиях, без применения специального оборудования и с использованием минимального объема растворителя превращать хитозан в его соль, осуществлять его частичную деструкцию с понижением молекулярной массы, а также получать производные

хитозана при комнатной температуре. Продукт реакции остается в нерастворенном состоянии, легко отфильтровывается, при необходимости промывается соответствующим растворителем и затем сушится. Таким образом, полностью исключаются многостадийные обработки, связанные с активированием хитозана. 10 г хитозана прибавляли 65 мл 2М раствора соляной кислоты, перемешивали 1 час, добавляли 15 мл 2М раствора нитрита натрия, перемешивали 15 мин, добавляли 50 мл этанола, осадок отфильтровывали, промывали небольшим количеством этанола, сушили и получали 110 г водорастворимого гидрохлорида хитозана.

5. Получение тиолированного хитозана. Тиолированный хитозан был получен ковалентной сшивкой N-ацетилцистеина с хитозаном. 500 мг хитозана растворяли в 1%-ном водном растворе HCl и pH раствора доведено до 5 1 М раствором NaOH. 4 г N-ацетилцистеина было растворено в 50 мл деминерализованной воды. Карбоксильные группы N-ацетилцистеина были активированы добавлением в течение 20 минут карбодиимида. Значение pH поддерживалось постоянно в диапазоне 4–5 во время всего эксперимента. В завершение процесса смесь была объединена и выдержана в течение 6 часов при постоянном перемешивании при комнатной температуре. Полученный конъюгат были изолирован в темноте диализом при против 1 mM HCl, содержащим 2 mM ЭДТА, 2 раза против того же средства, содержащего 1% NaCl, и в завершении - против 0,5 mM HCl; значение pH конъюгата при этом доводилось до 4,5 раствором 1 М NaOH. Далее конъюгат был заморожен и лиофильно высушен.

Обсуждение результатов

Описанными выше методами были определены молекулярная масса (387 КДа) и степень деацетилирования (83,7 %) исходного (немодифицированного) образца хитозана.

На Рис. 1 приведены спектры очищенного по методике очистки 1 хитозана и исходного образца хитозана до модификации. Как видно из Рис. 1, в обоих образцах спектрах определяются полосы в районе 3440 см^{-1} и 1655 см^{-1} , относящиеся к колебаниям аминогруппы, причем в районе 3440 см^{-1} полоса частично перекрывается колебаниями межмолекулярных и внутримолекулярных связанных OH-групп. Также в обоих спектрах отчетливо видны полосы в области $3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$, принадлежащие метиленовой группе пиранозного кольца [11].

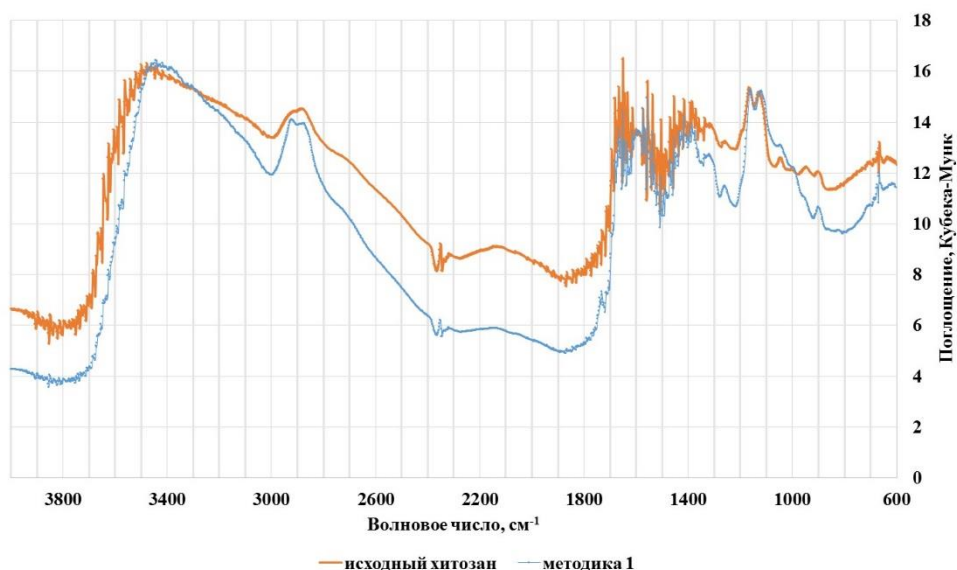


Рис. 1. Инфракрасный спектр диффузионного отражения образца хитозана, очищенного по методике очистки 1, в сравнении с исходным хитозаном

В целом оба спектра схожи, однако в области $1100\text{--}900\text{ см}^{-1}$, которая принадлежат гликозидной связи между эфирными связями и пиранозными кольцами, в спектре очищенного образца наблюдается существенное снижение пика, которое может указывать на уменьшение длины полимерной цепи и молекулярной массы, а также увеличение степени деацетилирования образца. Кроме того, в исходном образце более ярко выражены полосы в областях $1653\text{--}1620\text{ см}^{-1}$ (амидная связь I) и 1553 см^{-1} (амидная связь II), которые относятся к недеацетилированным остаткам хитина в образце хитозана и белковым примесям. Снижение уровня этих полос в очищенном образце также подтверждает увеличение степени деацетилирования хитозана в процессе очистки, а также удаление посторонних примесей из образца [11].

На рис. 2 приведены спектры очищенного по методике очистки 2 хитозана и исходного образца хитозана до модификации. Как видно из рис. 2, интенсивность полос в районе 3440 см^{-1} и 1655 см^{-1} , в очищенном образце существенно выше, что связано с увеличением содержания свободных аминогрупп в очищенном образце. Спектры образцов существенно различаются в области $1700\text{--}800\text{ см}^{-1}$, что связано с существенным снижением содержания примесей в очищенном образце, а также увеличением степени деацетилирования хитозана в процессе очистки [11].

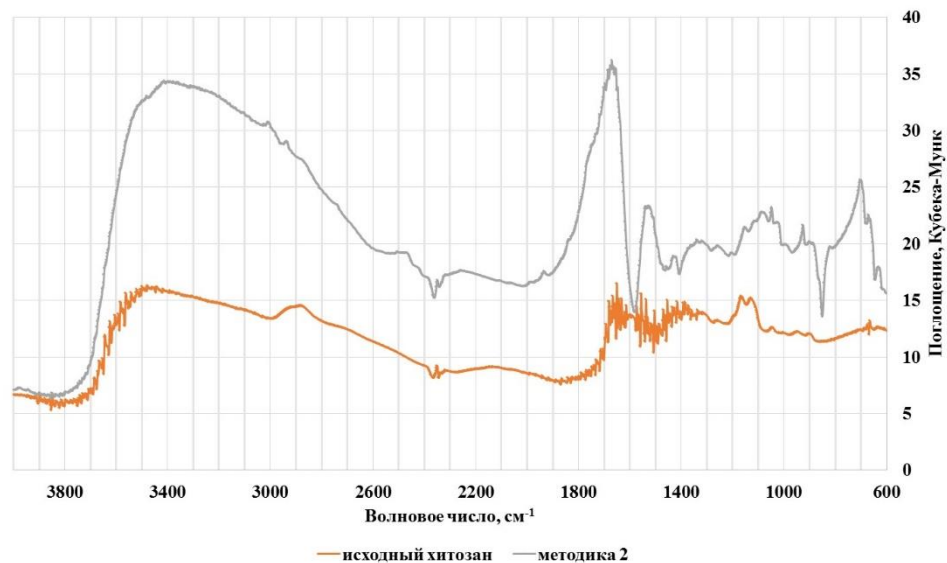


Рис. 2. Инфракрасный спектр диффузионного отражения образца хитозана, очищенного по методике очистки 2, в сравнении с исходным хитозаном

На рис. 3 приведены спектры синтезированного сукцината хитозана и исходного образца хитозана до модификации.

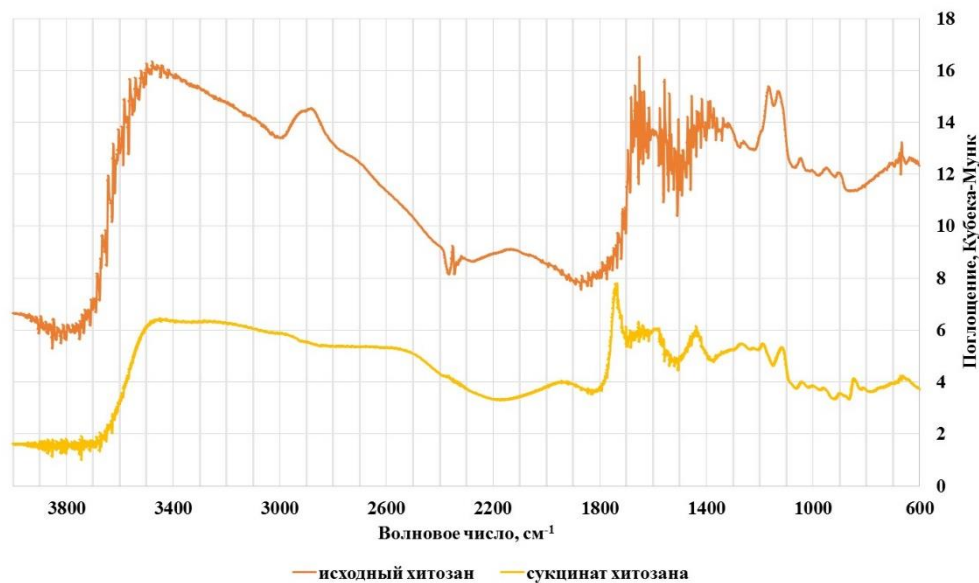


Рис. 3. Инфракрасный спектр диффузионного отражения образца сукцината хитозана в сравнении с исходным хитозаном

Как видно из представленного рисунка, в спектре сукцината хитозана присутствуют все описанные ранее полосы, типичные для хитозана, при этом в спектре сукцината существенно снижена интенсивность полос свободных аминогрупп (1655 см^{-1}) и выявлена новая полоса 1736 см^{-1} , присущая сукцинатам (солям янтарной кислоты), что подтверждает успешное проведение реакции синтеза.

На Рис. 4. приведены спектры синтезированного гидрохлорида хитозана в сравнении с исходным хитозаном до модификации.

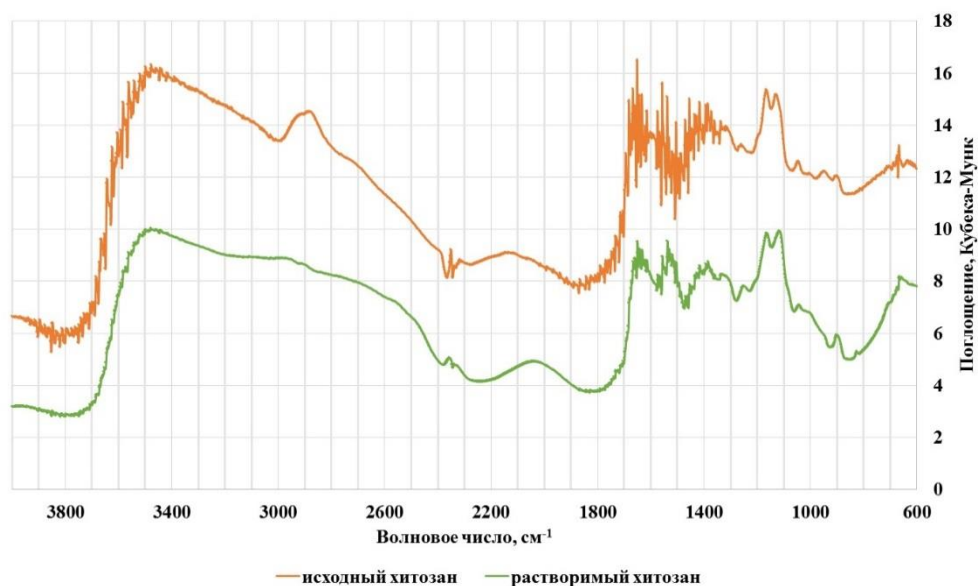


Рис. 4. Инфракрасный спектр диффузионного отражения образца гидрохлорида хитозана в сравнении с исходным хитозаном

Как видно из рис.4, спектры образцов очень близки и немного отличаются интенсивностью, что может быть связано с различной степенью измельчения образцов, при этом все типичные для хитозана полосы в спектре растворимого хитозана присутствуют.

На рис. 5 приведены спектры синтезированного тиолированного хитозана (конъюгата «хитозан-цистеин») в сравнении с исходным хитозаном до модификации. Как видно из рис. 5, в спектре конъюгата «хитозан-цистеин» присутствуют все присущие хитозану полосы, при этом выявлены новые полосы в области $940\text{--}930\text{ см}^{-1}$, присущие тиольной группе цистеина, что подтверждает успешное проведение реакции синтеза [12].

В таблице приведены рассчитанные значения молекулярных масс и степеней деацетилирования полученных образцов модифицированного хитозана.

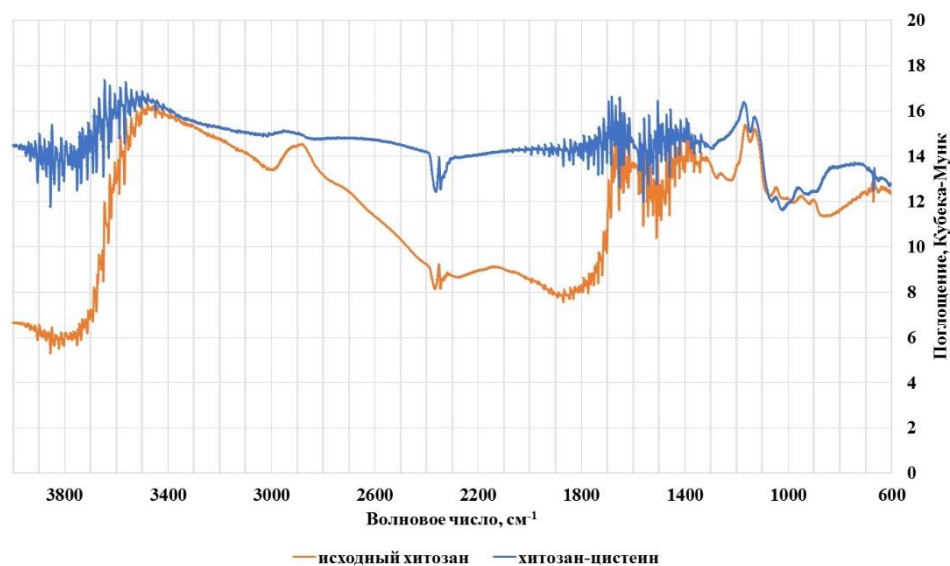


Рис. 5. Инфракрасный спектр диффузионного отражения образца тиолированного в сравнении с исходным хитозаном

Таблица 1
Молекулярные массы и степени деацетилирования полученных образцов модифицированного хитозана

№ п/п	Образец	Молекулярная масса, КДа	Степень деацетилирования, %
1	Исходный хитозан (до модификации)	387	83,7
2	Методика очистки 1	232	91,7
3	Методика очистки 2	198	90,3
4	Сукцинат хитозана	380	83,3
5	Гидрохлорид хитозана	386	82,9
6	Тиолированный хитозан	378	84,6

Как видно из данных, приведённых в табл. 1, методики очистки хитозана с помощью раствора NaOH приводят к существенному снижению его молекулярной массы и увеличению степени деацетилирования, что благоприятствует синтезу из модифицированного хитозана наночастиц и пленок меньших размеров с меньшей полидисперсностью. Тиолизация и обработка янтарной и соляной кислотами существенно не повлияли на молекулярную массу и степень

деацетилирования образцов хитозана, однако эти методы модификации существенно расширили диапазоны растворимости хитозана (для исходного хитозана $pH = 1 \div 5$; для модифицированных хитозанов $pH = 1 \div 8$), что позволяет использовать биополимер в тех сферах, где использование кислотных растворов нежелательно или запрещено – для иммобилизации живых клеток и ферментов, а также в фармацевтике и косметологии.

Выводы

По результатам исследования были сделаны следующие выводы:

1) Синтезированы образцы хитозана, очищенные гидроксидом натрия с последующим переосаждением, обладающие повышенной степенью деацетилирования (более 90%) и сниженной молекулярной массой (менее 250 КДа).

2) Обработкой янтарной кислотой, цистеином, соляной кислотой получены растворимые при нейтральных значениях pH (до $pH = 8,0$) производные хитозана.

3) Для каждого из синтезированных образцов были получены инфракрасные спектры диффузионного отражения на ИК-Фурье спектрометре IR Prestige-21 (Shimadzu, Япония), определены степень деацетилирования и молекулярная масса.

Модифицированные образцы хитозана могут быть использованы для синтеза наночастиц и тонкодисперсных пленок, которые являются перспективными носителями для иммобилизации живых клеток и ферментов, а также могут использоваться в фармацевтике и косметологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (проект № 075-15-2022-1232).

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. Pérez-Álvarez L., Ruiz-Rubio L., Vilas-Vilela J. L. Determining the Deacetylation Degree of Chitosan: Opportunities To Learn Instrumental Techniques // *J. Chem. Educ.* 2018, V. 95, № 6, P. 1022–1028, <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00902>
3. Варламов В. П., Ильина А. В., Шагдарова Б. Ц., Луньков А. П., Мысякина И. С. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты // *Успехи биологической химии*, 2020, Т. 60, С. 317–368.
4. Boominathan T., Sivaramakrishna A. Recent Advances in the Synthesis, Properties, and Applications of Modified Chitosan Derivatives: Challenges and Opportunities // *Topics in Current Chemistry*. 2021. V. 379. P. 19.

5. Frigaard J., Jensen J.L., Galtung H.K., Hiorth M. The Potential of Chitosan in Nanomedicine: An Overview of the Cytotoxicity of Chitosan Based Nanoparticles // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13. P. 880377.
6. Divya K., Jisha M.S. Chitosan nanoparticles preparation and applications // *Environ. Chem. Lett.* 2018. V. 16. P. 101–112.
7. Kaczmarek M.B., Struszczyk-Swita K., Li X., Szczesna-Antczak M., Daroch M. Enzymatic Modifications of Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019. V. 7. P. 243.
8. Мочалова А. Е. Целевая функциональная модификация хитозана. Дис. д. х. н., Нижний Новгород, 2017, 257 с.
9. Acosta N., Jimenez C., Borau V., Heras A. Extraction and characterization of chitin from crustaceans // *Biomass Bioenerg.* 1993. V. 5 (2). P. 145–153.
10. Кучина Ю.А., Долгопятова Н.В., Новиков В.Ю., Сагайдачный В.А., Морозов Н.Н. Инструментальные методы определения степени деацетилирования хитина // *Вестник МГТУ. Труды Мурманского государственного технического университета.* 2012. Т. 15. № 1. С. 107–113.
11. Хабибуллаева Н.Ф., Сидикова Н.А., Хаитбаев А.Х. Получение хитозана и его производных на основе *Apis Mellifera* // *Universum: химия и биология.* 2021. №9. С. 87.
12. Миньков В.С., Чесалов Ю.А., Болдырева Е.В. Исследование влияния температуры на ИК спектры кристаллических аминокислот, дипептидов и полиаминокислот. IV L-цистеин и DL-цистеин // *Журнал структурной химии.* 2008. Том 49, №6. С. 1061-1073.

Об авторах:

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

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

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

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

MODIFICATION OF CHITOSAN TO INCREASE EFFICIENCY OF SYNTHESIS OF NANOPARTICLES AND FILMS

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

Tver State Technical University, Tver

The article is devoted to the chemical modification of the natural chitosan polymer in order to improve its quality and suitability for further synthesis of nanoparticles and films. Chitosan samples purified with sodium hydroxide followed by reprecipitation having an increased degree of deacetylation and a reduced molecular weight were synthesized. Also, by treatment with succinic acid, cysteine, acetic acid and hydrochloric acid, chitosan derivatives soluble at neutral pH values are obtained. Infrared diffusion spectra were obtained for each of the synthesized samples on an IR-Fourier IR Prestige-21 spectrometer (Shimadzu, Japan), the degree of deacetylation and molecular weight were determined.

Keywords: *chitosan, modification, deacetylation grade, molecular weight, nanoparticles, films.*

Дата поступления в редакцию 10.01.2023.

Дата принятия в печать 21.02.2023.