

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра полимеров на базе ООО «АКРИПОЛ»

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БИОСОВМЕСТИМЫХ  
НАНОЧАСТИЦ ХИТОЗАНА**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки     II     курса     251     группы  
направления     04.04.01 – «Химия»    

Института химии

**Сбитневой Софии Вячеславовны**

**Научный руководитель:**

Зав. кафедрой полимеров  
на базе ООО «АКРИПОЛ»,  
д.х.н., профессор

А.Б. Шиповская

(подпись, дата)

**Зав. кафедрой** полимеров  
на базе ООО «АКРИПОЛ»,  
д.х.н., профессор

А.Б. Шиповская

(подпись, дата)

Саратов 2020

## Введение

**Актуальность работы.** Новые поколения лекарственных средств характеризуются высокой эффективностью, отсутствием побочных эффектов, предполагают направленный транспорт лекарственного вещества и его векторное действие в зоне запланированной локализации [1]. Перспективным полимером для создания лекарств и вакцин нового поколения является хиральный аминополисахарид хитозан [2, 3] вследствие его биосовместимости, цитонетоксичности, гипоаллергенности, способности к регенерации тканей, биорезорбируемости в метаболической среде [4, 5]. При этом наибольшим потенциалом обладают наноразмерные хитозансодержащие структуры [6]. Однако, разработанные в настоящее время методики получения наночастиц хитозана являются многостадийными, требуют дорогостоящего оборудования и зачастую предполагают использование сшивающих реагентов, приводящих к образованию токсичных побочных продуктов [7]. Последнее негативно влияет на биосовместимость и другие биохимические свойства готового материала, что ограничивает его применение в медицинской практике.

Не растворимость хитозана в воде определяет некоторые сложности получения материалов на основе данного полисахарида. Как известно, хитозан растворяется только в кислых средах [8]. Использование биосовместимых кислот для растворения хитозана определяет возможность получения биосовместимых наночастиц хитозана. В настоящей работе в качестве добавки для растворения полисахарида была выбрана *L*-аспарагиновая кислота. Выбор данной кислоты обусловлен ее уникальными биологическими функциями. *L*-аспарагиновая кислота встречается в организме как в свободном виде, так и в составе белков, выполняет роль нейромедиатора, проявляет антимикробное действие [9].

Ранее при написании бакалаврской работы было установлено, что при растворении хитозана в водном растворе *L*-аспарагиновой кислоты в результате протонирования аминогрупп полимера образуется полисоль –

аспарагинат хитозана. Растворы аспарагината хитозана кинетически нестабильны и в течение 24-25 часов хранения в условиях комнатной температуры и нормальном атмосферном давлении наблюдается фазовое разделение с выпадением мелкодисперсного осадка. Формирование новой фазы, предположительно наноразмерной на начальном этапе зародышеобразования, позволяет рассматривать исследуемую полисоль аспарагината хитозана как потенциальный источник получения биологически-активных наночастиц.

**Цель данной работы** – получение и характеристика наночастиц хитозана. Для достижения вышеуказанной цели были поставлены следующие **задачи**:

– Исследование кинетики физико-химических характеристик (вязкость, электропроводность, рН, показатель преломления, оптическая активность) системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота – вода в процессе ее фазового разделения с целью изыскания оптимальных условий для получения наночастиц хитозана.

– Изучение влияния низкомолекулярного электролита на свойства растворов хитозана в *L*-аспарагиновой кислоте и их стабильность во времени.

– Определение влияния концентрации полимера, температуры среды на электрохимические свойства растворов аспарагината хитозана.

– Исследование оптической активности водной системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота.

– Получение (микро)наночастиц аспарагината хитозана в водных растворах. Выделение, визуализация и определение  $\zeta$ -потенциала полученных при различных условиях дисперсий.

– Изыскание оптимальных условий фазового разделения хитозансодержащей системы для формирования наноразмерных частиц.

– Исследование состава частиц хитозана. Получение доказательств присутствия (отсутствия) в составе частиц солевой формы хитозана.

– Изучение биосовместимости полученных нанодисперсий аспарагината хитозана.

В качестве **объектов** исследования использовали водные системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота, хитозан – *L*-аспарагиновая кислота – хлорид натрия, хитозан – *L*-аспарагиновая кислота – тетраглицеролат кремния и воздушно-сухие (микро)наночастицы хитозана, выделенные из соответствующих систем. В качестве исходных материалов использовали хитозан с молекулярной массой 200 кДа, степенью деацетилирования 82 моль.% производства ЗАО «Биопрогресс» (г. Щелково); *L*-аспарагиновую кислоту производства ЗАО «Биоамид» (г. Саратов) аналитической степени чистоты; тетраглицеролат кремния (лабораторный образец), дистиллированную воду, *n*-бутиловый спирт, изопропиловый спирт, гидроксид натрия и хлорид натрия.

**Структура и объем работы.** Выпускная квалификационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения и списка используемых источников, включающего 102 наименований. Работа изложена на 65 листах машинописного текста, содержит 31 рисунок и 10 таблиц.

### **Основное содержание работы**

#### **1. Изучение кинетики физико-химических свойств системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота – вода для изыскания условий управления процессом фазового разделения**

С целью управления процессом фазового разделения для получения наночастиц хитозана исследованы изменения физико-химических свойств (рН, удельная электропроводность, относительная вязкость) системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота – вода во времени.

В течение первых ~24 часов, когда визуальное фазовое разделение полимерной системы еще не наблюдается, значения рН и  $\kappa_{уд}$  во времени закономерно увеличиваются, а  $\eta_{отн}$  – уменьшается. Эти изменения более

интенсивны в первые 2 – 3 часа с момента приготовления растворов и в наибольшей степени характерны для растворов с наибольшей концентрацией хитозана. Далее наблюдается снижение рН, удельной электропроводности и относительной вязкости системы. При этом понижение  $\eta_{\text{отн}}$  систем с  $C_{\text{ХТЗ}} = 0.04 - 0.15$  г/дл составило всего лишь 7 – 10%, а  $C_{\text{ХТЗ}} = 0.6$  г/дл – 23%.

Был проведен сравнительный анализ кинетики рН и относительной вязкости растворов аспарагината хитозана без и с добавлением низкомолекулярного электролита. При добавлении низкомолекулярного электролита система стабилизируется, наблюдается незначительное повышение рН раствора со временем в сравнении с бессолевой раствор аспарагината хитозана.

Относительная вязкость солевого раствора значительно ниже, чем без добавления электролита. Это обусловлено компактизацией макромолекулярного клубка. Для бессолевого раствора понижение относительной вязкости наблюдалось на 23%, для солевого водного раствора всего лишь на 5%, что так же свидетельствует о стабилизации системы при добавлении низкомолекулярного электролита.

## **2. Электрохимические свойства растворов раствора аспарагината хитозана**

Для более детального изучения процесса фазового разделения были исследованы электрохимические характеристики водной системы хитозан-аспарагиновая кислота.

Концентрационная зависимость эквивалентной электропроводности аспарагиновокислых растворов хитозана в координатах уравнения Кольрауша ( $\lambda = f(\sqrt{C_{\text{ХТЗ}}})$ ) типична для слабых полиэлектролитов. Характер зависимости указывает, что лишь часть противоионов находится в объеме раствора. Повышение значений эквивалентной электропроводности с уменьшением концентрации хитозана обусловлено увеличением количества анионов за счет ослабления ионных взаимодействий с поликатионом.

Об этом же свидетельствуют рассчитанные по уравнению Освальда условная константа диссоциации  $K_d$  и степень диссоциации. С повышением концентрации полимера с 0.04 до 0.6 г/дл значения  $K_d$  снижаются в среднем на ~87%.

Температурные зависимости условной константы и степени диссоциации практически прямолинейны, но при температуре 60-70°C появляется излом, свидетельствующий, вероятно, о конформационных изменениях макромолекул хитозана.

Кондуктометрические политермы водных растворов аспарагината хитозана также характеризуются прямолинейной монотонно возрастающей зависимостью.

Рассчитана энергия активации электропроводности. Энергия активации электропроводности в зависимости от концентрации хитозана в растворе незначительно возрастает от 10.6 до 12.9 кДж/моль.

### **3. Титрование водных суспензий хитозана аспарагиновой кислотой и определение проводимости растворов**

С целью определения концентрации аспарагиновой кислоты, необходимой для полного растворения суспензий хитозана, было проведено кондуктометрическое титрование водных суспензий хитозана *L*-аспарагиновой кислотой, а также построены зависимости. Все зависимости характеризовались двумя прямолинейными участками. На основании данных зависимостей графически были найдены точки эквивалентности, которые соответствуют количеству протонов, необходимых для получения гомогенного раствора. С повышением концентрации хитозана закономерно увеличивается объем кислоты.

### **4. Оптическая активность системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота – вода**

Исследовали оптическую активность свежеприготовленных растворов хитозана в *L*-аспарагиновой кислоте при разном мольном соотношении

компонентов. В исследуемом диапазоне длины волны спектр удельного оптического вращения (ДОВ) как индивидуального водного раствора *L*-аспарагиновой кислоты, так и растворов хитозана в *L*-аспарагиновой кислоте описывается монотонными кривыми ДОВ. Раствор *L*-аспарагиновой кислоты характеризуется положительными значениями  $[\alpha]$ , а хитозансодержащие растворы показывают отрицательные значения  $[\alpha]$ . Уменьшение мольного соотношения смещает кривые ДОВ в более отрицательную область значений удельного оптического вращения.

При исследовании температурных зависимостей степени диссоциации и условной константы диссоциации при температуре 60-70°C наблюдается излом, свидетельствующий, вероятно, о конформационных изменениях макромолекул хитозана. С целью доказательства конформационного перехода была исследована оптическая активность водных растворов хитозана в *L*-аспарагиновой кислоте при различных температурах. На всех зависимостях удельного оптического вращения от температуры имеется пик при 60°C, который свидетельствует об конформационном изменении макромолекулы хитозана при данной температуре.

## **5. Характеризация (микро)наночастиц аспарагината хитозана**

Методом динамического светорассеяния был исследован ряд систем на основе хитозана - *L*-аспарагиновой кислоты и установлено влияние различных факторов (концентрации полимера, времени хранения растворов, присутствия низкомолекулярного электролита и стабилизатора) на гидродинамический размер сформированных частиц.

С увеличением концентрации хитозана гидродинамический диаметр частиц закономерно увеличивается. При концентрации хитозана не более 0.08 г/дл образуются частицы размером до 600 нм, при концентрации более 0.08 г/дл – микрочастицы с размером до 1.7 мкм. На размер частиц также влияет время хранения растворов. С увеличением продолжительности хранения растворов до 48 часов размер сформированных частиц несколько уменьшается. А через 48

часов после приготовления растворов наблюдается укрупнение частиц и их седиментация

С целью регулирования размера частиц в исследуемую систему вводили низкомолекулярный электролит. Это приводит к компактизации макромолекулярного клубка и позволяет снизить гидродинамический диаметр частиц в среднем на ~70%. При концентрации  $C_{\text{NaCl}} = 0.1$  М и  $C_{\text{ХТЗ}} \leq 0.3$  г/дл размер сформированных частиц аспарагината хитозана не превышает 300 нм. При более высоких концентрациях полимера  $C_{\text{ХТЗ}} \geq 0.3$  г/дл размер частиц не превышает 60 нм.

Добавление тетраглицеролата кремния в качестве стабилизатора позволяет сохранять размер частиц до 60 суток при  $C_{\text{ХТЗ}} < 0.3$  г/дл и до 7 суток при концентрации полимера 0.6 г/дл.

В свежеприготовленных водных растворах аспарагиновокислого хитозана присутствуют положительно заряженные частицы с  $\zeta$ -потенциалом, равным 52 – 55 мВ. Величина и знак  $\zeta$ -потенциала слабо зависит от концентрации полимера и времени хранения растворов.

При добавлении в систему низкомолекулярного электролита и стабилизатора наблюдается значительное снижение величины  $\zeta$ -потенциала поверхности частиц в среднем на ~30-37 мВ по сравнению с частицами аспарагината хитозана в водном растворе

## **6. Изыскание оптимальных условий фазового разделения хитозансодержащей системы для формирования наноразмерных частиц**

Для визуализации формирования нано- и микрочастиц хитозана была использована растровая электронная микроскопия. Частицы, выделенные «сухим» способом из водных систем хитозан – *L*-аспарагиновая кислота, через 24 часа выдерживания раствора характеризуются практически сферической формой и размером от 50 до 80 нм. С увеличением времени хранения системы до ~48 час размер частиц увеличивается, они приобретают вытянутую овальную (анизодиаметричную) форму и склонность к агрегации. Через ~96

час выдерживания средний размер хитозансодержащих частиц составил ~760 нм.

Несколько иные закономерности наблюдаются при выделении частиц «мокрым» способом. Введение этилового спирта (осадитель) в объем свежеприготовленной полимерной системы до появления опалесценции приводит к формированию анизодиаметричных частиц с очень большим размером от 1.0 до 1.1 мкм.

Однако, выделение частиц соосаждением на поверхности этилового спирта приводит к формированию наноразмерных частиц (50 – 80 нм) практически сферической формы.

В следующей серии опытов использовался «мокрый» способ, а также различные соосадители и подходы (подход 1 – метод микроколичеств, подход 2 – метод распыления) для формирования частиц хитозана.

Частицы хитозана, выделенные из водных систем хитозан – *L*-аспарагиновая кислота методом микроколичеств с использованием в качестве соосадителя гидроксида натрия, характеризовались сферической формой и размером 4.2 – 5.6 мкм.

При использовании изопропилового спирта в качестве соосадителя и метода распыления размер части составил 0.3 – 4 мкм, метода микроколичеств – 125 – 500 нм.

При использовании в качестве соосадителя *n*-бутилового спирта наблюдается наименьший размер (80 – 250 нм) и наибольшая концентрация частиц. Вероятно, малый размер частиц связан с относительно низкой диэлектрической проницаемостью *n*-бутилового спирта, в сравнении с изопропиловым спиртом и водным раствором гидроксида натрия.

## **7. ИК и ЯМР <sup>1</sup>Н спектроскопия аспарагината хитозана**

В ходе выполнения магистерской работы были получены и исследованы методом ИК-спектроскопии сухие образцы двух систем:

- 1) Сухой образец нерастворимого в воде аспарагината хитозана. Для этого водный раствор хитозан – *L*-аспарагиновая кислота выдерживали во

времени до образования нерастворимого осадка ( $t = 30$  сут), а затем отделяли его.

2) Воздушно сухой порошок, выделенный из свежеприготовленной водной системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота с добавкой тетраглицеролата кремния.

Для сравнительного анализа использовали ИК-спектр сухого образца аспарагината хитозана.

ИК-спектры типичны для хитозансодержащих систем. Примечательно, что во всех спектрах присутствует полоса поглощения при  $1380\text{ см}^{-1}$ , характерная для солевой формы хитозана.

Исследованы ЯМР  $^1\text{H}$  спектры растворов аспарагината хитозана и *L*-аспарагиновой кислоты в дейтерированной воде. Видно, что спектр раствора аспарагината хитозана включает в себя спектр аспарагиновой кислоты с небольшим химическим сдвигом.

## **8. Исследование биосовместимости нанодисперсий аспарагината хитозана**

В отдельной серии опытов изучена биосовместимость нанодисперсий аспарагината хитозана. Установлено, что добавка в питательную среду нанодисперсий положительно влияет на скорость распластывания и пролиферацию человеческих фибробластов.

Так, через 1 ч культивирования в среде с добавкой аспарагината хитозана наблюдалось в 4 раза больше распластанных клеток, чем в контроле. В течение последующих 72-х часов в присутствии аспарагината хитозана формирование монослоя клеток шло также более быстрыми темпами. На четвертые сутки форма и размеры клеток зрелого монослоя соответствовали норме, что свидетельствует о высокой совместимости аспарагиновокислого хитозана с тканями человека и об отсутствии у него цитотоксического действия.

## Заключение

1. Проведены исследования кинетики физико-химических свойств системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота – вода. Обнаружено изменение во времени вязкости, электропроводности и рН, в наибольшей степени выраженное для высококонцентрированных по хитозану систем. Это приводит к фазовому разделению системы, которое начинается через ~24 часа выдерживания раствора. Добавление низкомолекулярного электролита оказывает стабилизирующее действие на водную систему хитозан – *L*-аспарагиновая кислота. Для бессолевого раствора понижение относительной вязкости при 3.5 сут хранения составило 23%, для солевого водного раствора – 5%.

2. Изучены электрохимические свойства растворов аспарагиновокислого хитозана в широком диапазоне концентраций и температур. Установлено, что хитозан относится к слабым полиэлектролитам. Рассчитанная энергия активации электропроводности аспарагината хитозана показала близкие значения с водным раствором *L*-аспарагиновой кислоты. Найдены точки эквивалентности, которые соответствуют количеству протонов, необходимых для получения гомогенного раствора.

3. Исследована оптическая активность растворов хитозана в *L*-аспарагиновой кислоте. Хирооптические свойства показывают нормальную дисперсию и отрицательный знак удельного оптического вращения. Доказано, что при температуре 60°C происходит конформационное изменение макромолекулы хитозана. Это определяет возможность получения комплементарно-стереоспецифических хиральных наночастиц хитозана.

4. Получены микро и наночастицы аспарагината хитозана, установлено влияние концентрации полимера, времени хранения растворов, присутствия низкомолекулярного электролита и стабилизатора, метода выделения на размер и форму частиц.  $\zeta$ -потенциал свежеприготовленных водных растворов составил 52 – 55 мВ. Величина и знак  $\zeta$ -потенциала не зависит от концентрации полимера и времени хранения растворов. При

добавлении в систему низкомолекулярного электролита и стабилизатора наблюдается значительное снижение величины  $\zeta$ -потенциала.

5. Найдены оптимальные методы выделения наночастиц из водных растворов аспарагината хитозана методом нанопреципитации (соосаждения). Показано, что при использовании в качестве соосаждителя *n*-бутилового спирта формируется достаточное количество сферических наночастиц размером 80 – 250 нм.

6. Методом ИК-спектроскопии исследованы воздушно сухие порошки, выделенные из свежеприготовленной водной системы хитозан – *L*-аспарагиновая кислота без и с добавкой кремнийсодержащего стабилизатора, и аспарагинат хитозана, выделенный из хранившегося 30 сут водного раствора хитозан – *L*-аспарагиновая кислота. Приведенные данные свидетельствуют о том, что во всех образцах присутствует полоса поглощения при  $1380\text{ см}^{-1}$ , характерная для солевой формы хитозана.

7. Тестирование наночастиц хитозана на биосовместимость показало, что наночастицы аспарагината хитозана не цитотоксичны и биосовместимы, поскольку не угнетают рост клеточной культуры человеческих дермальных фибробластов. Кроме того, присутствие в ростовой среде наночастиц аспарагината хитозана значительно ускоряет рост клеточной популяции фибробластов.

## Список используемых источников

1. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуногены и вакцины нового поколения. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2011. – 608 с.
2. Samal S.K., Dash M., Van Vlierberghe S., Kaplan D.L., Chiellini E., Van Blitterswijk C., Moronid L., Dubruel P. Cationic polymers and their therapeutic potential // Chem. Soc. Rev. – 2012. – Vol. 34. – №21. – P. 7147-7194.
3. Vasiliev Y.M. Chitosan-based vaccine adjuvants: incomplete characterization complicates preclinical and clinical evaluation // Exp. Rev. Vaccines. – 2015. – Vol. 14. – №1. – P. 37-53.
4. Ткачук В.А. Нанотехнологии и медицина // Российские нанотехнологии. – 2009. – Т. 4. – № 7-8. – С. 9-11.
5. Yang Y., Wang Sh., Wang Y., Wang X. Wang Q., Chen M. Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery // Biotechnology Advances. – 2014. – Vol. 32. – №7. – P. 1301-1316.
6. Grenha A. Chitosan nanoparticles: a of preparation methods // Journal of drug targeting. – 2012. – Vol. 20. – №4. – P. 291-300.
7. Ильина А.В., Варламов В.П., Ермаков Ю.А., Орлов В.Н., Скрыбин К.Г. Хитозан – природный полимер для формирования наночастиц // ДАН. – 2008. – Т. 421. – №2. – С. 199-201.
8. Филиппова О.Е., Корчагина Е.В. Хитозан и его гидрофобные производные: Получение и агрегация в разбавленных водных растворах // Высокомогл. соедин. – 2012. – Т. 54 А. – №7. – С. 1130-1152.
9. Rafey A., Shrivastavaa K.B.L., Iqbal S.A., Khan Z. Growth of Ag-nanoparticles using aspartic acid in aqueous solutions // Journal of colloid and Interface Science. – 2011. – Vol. 35. – №1. – P.190-195.

