

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра полимеров на базе ООО «АКРИПОЛ»

**ПРОТИВОИОННАЯ АССОЦИАЦИЯ В СИСТЕМЕ
ХИТОЗАН + АСПАРАГИНОВАЯ КИСЛОТА + ВОДА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 412 группы
направления 04.03.01 «Химия»

Института химии

Шипенок Ксении Михайловны

Научный руководитель
д.х.н., профессор

подпись, дата

А.Б. Шиповская

Зав.кафедрой
д.х.н., профессор

подпись, дата

А.Б. Шиповская

Саратов 2022

Введение

Актуальность работы. В настоящее время полимерные наночастицы, способы их получения и применение является развивающимся направлением нанотехнологий. Преимуществом наночастиц на основе природных полимеров является их биологическая активность, биосовместимость, цитонетоксичность, гипоаллергенность, способность к регенерации тканей, биорезорбируемость в метаболической среде [1–2]. Наибольший потенциалом обладают наночастицы хитозана (ХТЗ) [3]. Нано- и микрочастицы ХТЗ могут быть весьма перспективны в медико-биологических и фармакологических приложениях в качестве переносчиков лекарственных средств, тераностике, а также для создания оптических датчиков, сенсоров и хемомеханических материалов.

Хитозан активно используется в медицине и фармацевтике, поэтому целесообразно использование биологически активных кислот для формирования солевой формы хитозана. Это определяет возможность получения биологически активных материалов, в том числе наночастиц.

В настоящей работе для получения солевой формы ХТЗ использовали биологически активную аспарагиновую кислоту (AspA). При растворении ХТЗ в водном растворе AspA формируется аспарагиновокислый хитозан, реакция протекает при pH 3.5–3.8 и минимальном стехиометрическом отношении $[Asp]/[-NH_2] \sim 0.43$ [4, 5]. При этом обнаружена кинетическая нестабильность кислотно-основных, вязкостных и электрохимических свойств системы ХТЗ + AspA + вода, приводящая к фазовой сегрегации полимерного вещества на уровне микро- и наночастиц [6, 7]. Предположительно данный процесс связан с противоионной ассоциацией поликатион–анион.

Целью работы является исследование гидродинамических и электрофизических свойств растворов ХТЗ в AspA для получения доказательств противоионной ассоциации и разработка подходов к стабилизации микро- и наночастиц аспарагината хитозана.

Задачи:

1. методом ИК спектроскопии доказать солеобразование в системе хитозан + аспарагиновая кислота + вода при использовании диастереомеров аспарагиновой кислоты (*L*-AspA, *D*-AspA);
2. изучить вискозиметрические свойства водных и водно-солевых растворов ХТЗ в *L*- и *D*-AspA, определить предельное число вязкости и эффективный радиус макромолекулярного клубка;
3. измерить диэлектрическую проницаемость раствора аспарагината хитозана без и с добавлением этилового спирта;
4. оценить кинетическую стабильность системы хитозан + *L*-аспарагиновая кислота + вода и определить оптимальные условия для стабилизации микрочастиц аспарагината хитозана.

В качестве **объектов** исследования были выбраны водные растворы аспарагината хитозана и его порошкообразная форма, выделенная из соответствующих растворов. В отдельных экспериментах использовали водные растворы *L*-AspA, *D*-AspA и NaCl. Для их получения были выбраны порошкообразный хитозан со средневязкостной молекулярной массой $\bar{M}_\eta = 200$ кДа, степенью деацетилирования 82 моль.%; порошок *L*-аспарагиновой кислоты фармакологической степени чистоты, полученной биокаталитическим синтезом; тетраглицеролат кремния в 3-мольном избытке. Все остальные реагенты были квалификации ч.д.а.

Структура и объем работы. Выпускная квалификационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, 6 обсуждения результатов, заключения, 2 приложений и списка используемых источников, включающего 47 наименований. Работа изложена на 59 листах машинописного текста, содержит 21 рисунок, 10 таблиц.

Основное содержание работы

1 Изучение солеобразования хитозана с аспарагиновой кислотой методом ИК-спектроскопии

При растворении хитозана в *L*-аспарагиновой кислоте происходит солеобразование. Для того, чтобы доказать данный процесс, мы сравнили инфракрасные спектры хитозана и аспарагината хитозана ($\text{ХТЗ} \cdot \text{L-AspA}$).

В спектре присутствует максимум поглощения в диапазоне частот 3300–3440 см^{-1} , соответствующий характеристическим валентным колебаниям NH и OH связей. Ширина полосы говорит о наличии внутримолекулярных водородных связей. Для обоих образцов проявляются колебания, характерные для симметричных и ассиметричных колебаний связей CH, CN, амид I и амид II, также присутствуют типичные колебания глюкопиранозного кольца.

Отличие инфракрасного спектра аспарагината хитозана от хитозана в том, что в области 3000 см^{-1} в спектре проявляется изгиб, что соответствует валентным колебаниям связи N-H в протонированной аминногруппе. Кроме того, наблюдаются валентные колебания C-O диссоциированной группы кислотного остатка. В спектре аспарагината хитозана наблюдается сдвиг деформационных колебаний связи C=O в коротковолновую область спектра. Таким образом, удалось доказать, что в системе $\text{ХТЗ} + \text{AspA} + \text{H}_2\text{O}$ происходит солеобразование.

На следующем этапе были проведены исследования спектров аспарагината хитозана ($\text{ХТЗ} \cdot \text{L-AspA}$) при разном мольном соотношении полимер-кислота. Установлено, что в инфракрасных спектрах принципиальных отличий нет, но с увеличением концентрации кислоты усиливается интенсивность спектров. Колебания, соответствующие аспарагиновой кислоте, более выражены с увеличением мольного соотношения полимер-кислота.

2 Вискозиметрические свойства растворов аспарагина хитозана

На первом этапе, как и в работе [4] исследованы вискозиметрические свойства растворов при $C_{\text{L-AspA}}=0.4, 0.8$ г/дл. Показано, что концентрационная зависимость приведенной удельной вязкости не линейная и имеет небольшой

максимум. Интересно было изучить растворы с меньшей концентрацией кислоты. Для этого исследовали гидродинамические параметры растворов с $C_{L-AspA}=0.2$ г/дл и сравнивали с ранее изученными.

Концентрационная зависимость числа вязкости не линейна, но и прямо пропорционального понижения вязкости при разбавлении не замечено. Это связано с тем, что аспарагинат хитозана в водной среде проявляет свойства полиэлектролита с частично скомпенсированным зарядом. При $C_{L-AspA}=0.4$ г/дл зависимость проходит через максимум, а при $C_{L-AspA}= 0.8$ г/дл и 0.2 г/дл наблюдается плато в области с $C_{ХТЗ} > 0.15$ г/дл.

Установлено, что с увеличением концентрации аспарагиновой кислоты и, соответственно, мольного соотношения кислота-полимер уменьшается предельное число вязкости водных растворов аспарагината хитозана и эффективный радиус макромолекулярного клубка. Это, вероятно, обусловлено увеличением числа противоионов внутри макромолекулярных клубков. В результате макроклубок более нейтрализован и сжимается.

Для исключения полиэлектролитного эффекта в водный раствор аспарагината хитозана добавляли сильный электролит – низкомолекулярную соль NaCl с концентрацией 0.17 М. Её выбор обусловлен подавлением полиэлектролитного эффекта в растворе хитозана в *L-AspA* при данной ионной силе [5]. Были построены концентрационные зависимости числа вязкости при добавлении 0.17 М NaCl. Показано, что для всех трёх концентраций *L-AspA* наблюдается прямолинейная зависимость. Увеличение концентрации кислоты способствует снижению количества положительных зарядов на макроцепи, и, следовательно, нейтрализации макроклубка.

Таким образом, для растворов аспарагината хитозана характерно поведение полиэлектролита с частично компенсированным зарядом. Повышение мольного соотношения кислота-полимер приводит к увеличению количества противоионов внутри макромолекулярного клубка, и, следовательно к уменьшению предельного числа вязкости и эффективного радиуса макроклубка.

3 Диэлектрическая проницаемость растворов аспарагината хитозана

Были получены спектры диэлектрической проницаемости и тангенса диэлектрических потерь растворов аспарагината хитозана. В области больших частот ($f > 1.8 \cdot 10^9$ Гц) значения диэлектрической проницаемости растворов полимера, кислоты и воды близки. При малых частотах ($f < 1.8 \cdot 10^8$ Гц) значения ϵ' растворов аспарагината хитозана и AspA меньше, чем H_2O и с увеличением концентрации полимера диэлектрическая проницаемость уменьшается. При этом, в отличие от дисперсии ϵ' воды, характер $\epsilon'(f)$ для растворов кислоты и полимера идентичен.

Обнаруженный характер зависимости $\epsilon'(f)$ может быть объяснен разным размером заряженных частиц в растворах аспарагината хитозана, AspA и H_2O , а также отличиями в подвижности частиц в разном диапазоне частот. При больших f скорость перемещения макроиона в электрическом поле существенно ниже, чем ионов диссоциированных молекул кислоты и воды. При малых f макродиполи успевают ориентироваться вдоль электрического поля, что выражается в более низких значениях ϵ' по сравнению с таковыми для низкомолекулярных ионов.

Частотная зависимость тангенса угла диэлектрических потерь также подтверждает, что в диапазоне $f < 1.8 \cdot 10^8$ Гц вклад в действительную часть диэлектрической проницаемости вносят не только малые ионы, но и макродиполи. Чем меньше частота и больше концентрация аспарагиновокислого хитозана в растворе, тем отношение рассеянной энергии к запасенной (за один период наложения внешнего электрического поля) более высокое. Диэлектрические потери в полимерных растворах больше по сравнению с раствором AspA.

На следующем этапе изучали влияние полярности на диэлектрическую проницаемость растворов аспарагината хитозана посредством добавки этилового спирта. Были исследованы водные растворы аспарагината хитозана при $C_{ХТЗ} = 0.15$ – 0.6 г/дл и $C_{L-AspA} = 0.4$ г/дл. При добавлении этилового спирта в систему ХТЗ·L-AspA характер зависимости не изменяется. С увеличением концентрации C_2H_5OH диэлектрическая проницаемость и диэлектрические потери уменьшаются по сравнению с исходным раствором.

Для сравнения были изучены зависимости действительной части диэлектрической проницаемости от концентрации спирта для растворов с разным мольным соотношением полимер-кислота. Установлено, что с уменьшением концентрации хитозана значения ϵ' закономерно уменьшаются.

Таким образом, с увеличением концентрации полимера и уменьшением частоты диэлектрическая проницаемость раствора аспарагината хитозана понижается, а диэлектрические потери возрастают. Установлено, что добавка этилового спирта в систему ХТЗ + AspA + H₂O понижает полярность среды, снижает диэлектрическую проницаемость и диэлектрические потери.

4 Характеристика системы ХТЗ + L – AspA + H₂O

В совокупности установленные особенности гидродинамических и электрофизических свойств аспарагината хитозана являются прямыми доказательствами противоионной ассоциации. Такое гидродинамическое поведение свидетельствует о реализации смешанного полиэлектролитно-иономерного режима, когда часть противоионов HAsp⁻ находится в ассоциированном (связанном) состоянии с -NH₃⁺ группами макроцепи с образованием ионных пар [7]. Через 1 сут хранения системы ХТЗ + AspA + H₂O наблюдается фазовая сегрегация полимерного вещества на уровне микро- ($d = 0.6 - 1.4$ мкм, ~90%) и наночастиц ($d = 40 - 90$ нм, ~10%), через 7 сут – выделение хлопьевидного осадка [6]. Для того, чтобы повысить агрегативную устойчивость частиц, на их поверхности стоит сформировать защитную оболочку. Введение биологически активного тетраглицеролат кремния (ТГК), претерпевающего в водной среде гидролиз и конденсацию [8], может привести к образованию полисилоксановой сетки на поверхности частиц. Для определения оптимальных условий для стабилизации частиц было исследовано 12 систем. В опытах варьировали количество вводимого тетраглицеролат кремния, мольное соотношение хитозан – кислота и температуру приготовления раствора.

На первом этапе исследования варьировали количество вводимого ТГК. Установлено, что с увеличением концентрации золь-гель прекурсора, размер формирующихся частиц также возрастает. Наиболее устойчивые частицы

наименьшего размера формируются при оптимальном количестве тетраглицеролата кремния, соответствующее 0.08 г на 25 мл. Но со временем частицы агрегируют, а в системах образуется хлопьевидный осадок.

На следующем этапе варьировали мольное соотношение хитозан – кислота путем изменения концентрации хитозана. Установлено, что оптимальной является $C_{ХТЗ} = 0.3$ г/дл, т.к. при данной концентрации формируются частицы минимального размера, но и для неё через 7 суток наблюдается фазовое разделение и выпадение хлопьевидного осадка и в некоторых образцах формирование геля.

Также в ходе исследования изменяли температуру приготовления раствора. При определенных оптимальных условиях и при 50°C полученная система ХТЗ + L – AspA + H₂O + ТГК сохраняет агрегативную устойчивость до 90 суток (наблюдения продолжаются). Проведенные исследования подтвердили фазовую сегрегацию полимерного вещества на уровне микрочастиц в ходе противоионной ассоциации поликатион – анион. Формирование на поверхности частиц полисилоксановой оболочки существенно увеличивает кинетическую стабильность системы ХТЗ + AspA + H₂O.

5 Влияние наночастиц хитозана на всхожесть семян

Для проведения данных экспериментов исходную систему ХТЗ + AspA + H₂O разбавляли дистиллированной водой использовали для проращивания семян. Была проведена сравнительная оценка влияния биостимулятора из аспарагината хитозана по сравнению с водой на всхожесть тест-семян. Установлено, что всхожесть тест-семян пшеницы *Triticum aestivum*, фасоли *Phaseolus vulgaris*, тыквы *Cucurbita pepo*, овса *Avena sativa*, моркови *Kuroda shantane* и рукколы *Indau* в среде раствора аспарагината хитозана выше, чем в среде дистиллированной воды.

Таким образом, выявлено, что микрочастицы аспарагината хитозана обладают высокими биостимулирующей активностью и ростостимулирующей способностью. Их применение в качестве биостимулятора повышает всхожесть тест-семян, рост и вегетацию тест-растений. По полученным результатам подана заявка на изобретение РФ [9].

Заключение

В ИК-спектре аспарагината хитозана выявляются характеристические колебания протонированной аминогруппы (3050 см^{-1}) и диссоциированной карбоксильной группы аспарагиновой кислоты (1430 см^{-1}). Это подтверждает образование солевой формы ХТЗ. Отмечены сдвиги полос поглощения в область больших волновых чисел в инфракрасных спектрах ХТЗ·*D*-AspA по сравнению с ХТЗ·*L*-AspA.

Установлено, что концентрационные зависимости числа вязкости растворов аспарагината хитозана не линейны, однако резкого повышения вязкости при разбавлении не наблюдается. Такой характер гидродинамического поведения обусловлен тем, что аспарагиновокислый хитозан в водной среде проявляет свойства катионного полиэлектролита с частично компенсированным зарядом. С повышением мольного соотношения кислота-полимер происходит увеличение числа противоионов внутри макроклубка, и, следовательно, уменьшаются числа вязкости, предельное число вязкости и эффективный радиус макромолекулярного клубка. Отмечены отличия гидродинамических свойств при использовании *L*-AspA и *D*-AspA, наиболее проявляющиеся при малом мольном соотношении кислота-полимер.

Спектры диэлектрической проницаемости растворов ХТЗ·AspA показали, что в области малых частот значения ϵ' раствора аспарагината хитозана меньше, чем кислоты и воды. В области больших частот ϵ' растворов полимера, кислоты и воды соизмеримы. Частотная зависимость тангенса угла диэлектрических потерь также подтверждает, что в диапазоне малых f вклад в ϵ' вносят не только малые ионы, но и макродиполи. С увеличением концентрации полимера и уменьшением частоты диэлектрическая проницаемость раствора аспарагината хитозана понижается, а диэлектрические потери возрастают. Добавка этилового спирта повышает полярность раствора, уменьшает диэлектрическую проницаемость и диэлектрические потери в системе

В совокупности установленные особенности гидродинамических и электрофизических свойств аспарагината хитозана являются прямыми

доказательствами протекания противоионной ассоциации в исследуемой системе. Показано, что введение тетраглицеролата кремния, претерпевающего в водной среде гидролиз и конденсацию, приводит к образованию полисилоксановой сетки на поверхности частиц и способствует повышению их агрегативной устойчивости до 90 сут.

Проведенные исследования подтвердили предположение о противоионной ассоциации, а формирование на поверхности частиц полисилоксановой оболочки существенно увеличивает кинетическую стабильность системы ХТЗ + AspA + H₂O.

Применение микрочастиц аспарагината хитозана повышает всхожесть тест-семян и рост тест-растений за счёт высокой биостимулирующей активности и ростостимулирующей способности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Yang Y., Wang Sh., Wang Y. Wang X. Wang Q., Chen M. Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery // *Biotechnol. Adv.* 2014. Vol. 32. Is. 7. P. 1301–1316.
2. Chua B.Y., Kobaisi M.Al., Zeng W. Mainwaring D., Jackson D.C. Chitosan microparticles and nanoparticles as biocompatible delivery vehicles for peptide and protein-based immunocontraceptive vaccines. // *Mol. Pharm.* 2012. Vol. 9. Is. 1. P. 81–90.
3. Grenha A. Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods // *J. Drug Target.* 2012. Vol. 20. Is. 4. P. 291–300.
4. Луговицкая Т.Н., Шиповская А.Б. Физико-химические свойства водных растворов L-аспарагиновой кислоты с добавкой хитозана // *Журн. общ. химии.* 2017. Т. 87. Вып. 4. С. 650–656
5. Луговицкая Т.Н., Зудина И.В., Шиповская А.Б. Получение и свойства аспарагиновокислых растворов хитозана // *Журнал прикладной химии.* 2020. Т. 93. Вып. 1. С. 90–99.
6. Lugovitskaya T.N., Shipovskaya A.B., Shmakov S.L., Shipenok X.M. Formation, structure, properties of chitosan aspartate and metastable state of its solutions for obtaining nanoparticles // *Carbohydrate Polymers.* 2022. Vol. 277. P. 118773.
7. Lugovitskaya T.N., Shipovskaya A.B., Shipenok X.M. Kinetic instability of a chitosan – aspartic acid – water system as a method for obtaining nano- and microparticles // *Chimica Techno Acta.* 2021. Vol. 8. Is. 4. № 20218405.
8. Шадрина Е.В, Малинкина О.Н., Хонина Т.Г. Шиповская А.Б., Фомина В.И., Ларченко Е.Ю., Попова Н.А., Зырянова И.Г., Ларионов Л.П. Исследование процесса образования и фармакологической активности кремнийхитозансодержащих глицерогидрогелей, полученных методом биомиметической минерализации // *Известия Академии наук. Серия химическая.* 2015. №. 7. С. 1633–1633.
9. Шипенко К.М., Луговицкая Т.Н., Шиповская А.Б. Биостимулятор роста растений из аспарагината хитозана. Заявка на изобретение №2021136658. МПК: A01N 63/10, C08B 37/08.