

УДК 541.18.02.025

## СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ПЛЕНОК ХИТОЗАНА, СШИТОГО ДЖЕНИПИНОМ<sup>1</sup>

Чалых А.Е., Кильдеева Н.Р., Касаткина М.А., Петрова Т.Ф., Герасимов В.К.,  
Матвеев В.В., Хасбиуллин Р.Р.

*Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук,  
119071, Москва, Ленинский проспект, 31, корп. 4, petr@ttt@mail.ru.  
Московский государственный университет дизайна и технологии,  
117997, Москва, Садовническая ул., дом 33*

Методом статической сорбции, термогравиметрии, рентгеноструктурного анализа исследована кинетика сорбции паров воды пленками хитозана, сшитого дженипином. Получены изотермы сорбции. Показано, что для всех исследованных сорбентов изотермы сорбции S-образны и могут быть аппроксимированы в суперпозиции изотерм Лэнгмюра и Флори-Хаггинса. Рассчитаны парные параметры взаимодействия пространственно-сшитых полисахаридов с водой. Определены коэффициенты диффузии воды, рассчитаны эффективные энергии активации воды, обобщены данные по концентрационной зависимости коэффициента диффузии воды в линейном и пространственно-сшитом и хитозане.

Для разработки новых материалов медико-биологического назначения весьма перспективными являются природные полисахариды, которые обладают биосовместимостью и способностью резорбироваться в условиях организма. Хитозан, помимо перечисленных достоинств, обладает гидрофильностью, высокой сорбционной емкостью и биологической активностью. Изделия на его основе широко используются в биотехнологии, медицине, тканевой инженерии и др. [1]. На рис. 1 представлена структура мономерного звена хитозана.

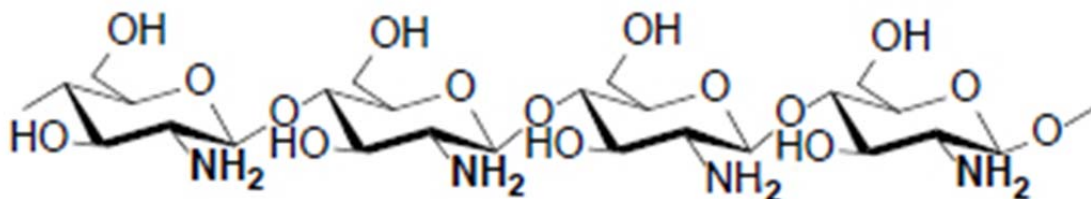


Рис. 1. Формула мономерного звена хитозана.

<sup>1</sup> Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, проект № 2698 на 2014 – 2016 гг.

Благодаря наличию реакционноспособных аминогрупп хитозан растворим в разбавленных водных растворах кислот, что наряду с волокно- и пленкообразующей способностью облегчает его переработку в полимерные изделия. Материалы, полученные удалением растворителя из растворов хитозана (путем испарения или лиофильной сушки) содержат хитозан в солевой форме и потому водорастворимы. Для перевода хитозана из солевой формы в нерастворимую в воде форму полиоснования применяют растворы щелочей. Использование сшивающих реагентов позволяет получать на основе хитозана нерастворимые в воде и обладающие высокой способностью к набуханию гидрогели.

Перспективы использования различных сшивающих реагентов для получения гидрогелей на основе биосовместимых полимеров определяются не только реакционной способностью, но и уровнем токсичности. В связи с этим во многих работах, посвященных получению микрокапсул, гидрогелей и других материалов медико-биологического назначения отмечают перспективы использования дженипина как природного соединения [2,3]. Исследования хитозановых материалов, сшитых дженипином, показали меньшую цитотоксичность по сравнению с материалами, полученными с использованием широко применяемого для сшивки хитозана реагента глутарового альдегида [4].

Дженипин (рис. 2а) получают путем ферментативного гидролиза дженипозид (рис. 2б)  $\beta$ -глюкозидазой. Дженипозид выделяют из плодов двух растений *Genipa Americana* и *Gardenia jasminoides Ellis*.



Рис. 2. Структурные формулы дженипина (а) дженипозид (б).

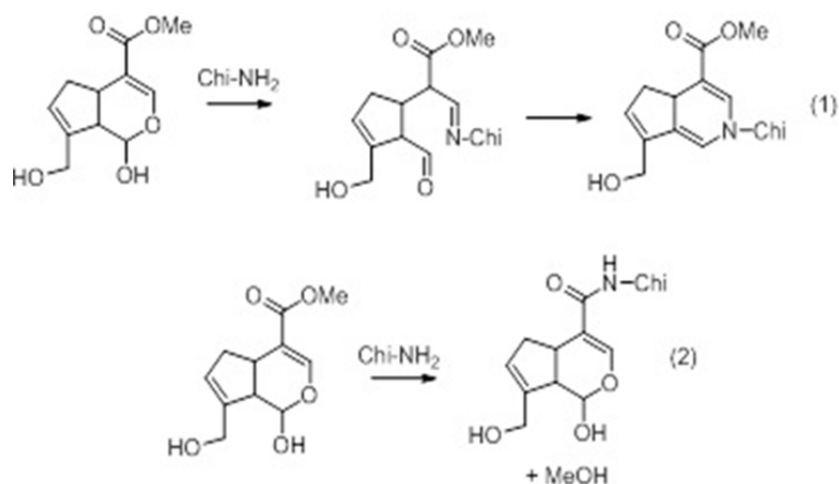


Рис. 3. Механизмы реакций дженипина с хитозаном, приводящих к сшивке [5]; быстрая (1) и медленная (2) стадии реакции.

При взаимодействии дженипина с хитозаном протекает две реакции (рис. 3). Наиболее быстрая первая реакция протекает в результате нуклеофильной атаки первичной аминогруппы на C<sub>3</sub> углеродный атом дженипина, что приводит к формированию гетероциклического соединения дженипина связанного с глюкозаминным остатком хитозана. Вторая, медленная, реакция - это реакция нуклеофильного замещения, содержащихся в дженипине эфирных групп с образованием амидной связи с хитозаном [5].

В настоящей работе представлена информация о структуре и свойствах сшитых образцов хитозана. Полученные результаты сопоставлены с аналогичными данными для линейных хитозанов.

### Объекты исследования

В работе использовали хитозан с молекулярной массой 320 кДа и степенью деацетилирования 88.5% («Биопрогресс», Россия); сшивающий реагент дженипин (Gp) («Sigma-Aldrich», США).

Пленки толщиной ~100 мкм получали методом полива на чашки Петри растворов хитозана в 2%-ной уксусной кислоте, а также растворов хитозана, содержащих дженипин, с последующим испарением растворителя при комнатной температуре. С целью перевода хитозана в форму основания, часть пленок обрабатывали 0,5М раствором NaOH в течение 1 часа с последующей промывкой водой до нейтрального pH. Условия получения образцов приведены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика образцов

| № образца | Концентрация хитозана, % | pH раствора хитозана | Соотношение Gr/NH <sub>2</sub> , моль/моль | Концентрация щелочи, М | $\chi$ |
|-----------|--------------------------|----------------------|--|------------------------|--------|
| 1         | 2                        | 3,8                  | -  | -                      | 0,98   |
| 2         |                          |                      | -  | 0,5                    | 0,86   |
| 3         |                          |                      | 0,003                                      | -                      | 0,85   |
| 4         |                          |                      | 0,003                                      | 0,5                    | 0,88   |
| 5         |                          |                      | 0,02                                       | -                      | 0,99   |
| 6         |                          |                      | 0,02                                       | 0,5                    | 0,85   |

Соотношение Gr/NH<sub>2</sub> для получения нерастворимых в воде пленок хитозана изменялась от 0,003 моль/моль до 0,02 моль/моль. В процессе испарения растворителя пленки приобрели голубую окраску, интенсивность которой увеличивалась с увеличением содержания дженипина. Выраженный голубой цвет пленок хитозана, сшитого дженипином, является результатом индуцированной кислородом воздуха реакции радикальной полимеризации дженипина, протекающей как побочный процесс после образования связи между аминогруппой хитозана и дженипином [5]. Обнаруженные частицы новой фазы в пленках, сшитых дженипином, могут быть результатом привитой полимеризации дженипина к хитозану.

Сорбционные измерения проводили в изобарно-изотермических условиях в эксикаторах при температуре 20±1°C. Были использованы методики интегральной и интервальной сорбции. Все образцы перед проведением измерений кондиционировали в сухом эксикаторе при нулевой влажности.

Кинетику неизотермической десорбции измеряли на термовесах NETZSCH TG 209 F1 Iris в интервале температур от 20 до 250 °C. Набухание образцов проводили в воде при комнатной температуре. Погрешность определения массы составляла 1\*10<sup>-4</sup> г. Для структурно-морфологических исследований использовали метод просвечивающей электронной микроскопии на микроскопе EM 301. Надмолекулярную структуру выявляли плавлением в плазме ВЧ-кислородного разряда.

## Результаты и их обсуждение

Типичные кинетические кривые сорбции паров воды и набухания в воде пленок хитозана и отвержденных дженипином образцов приведены на рис. 4. Можно видеть, что на начальной стадии процесса сорбции и набухания количество сорбированного пара линейно зависит от  $t^{1/2}$ . Вне линейного участка кривые выпуклы к оси  $t^{1/2}$  без точки перегиба. Полученные данные свидетельствуют о диффузионном механизме поглощения паров воды как линейным, так и пространственно-сшитым хитозаном. Следует отметить, что с увеличением содержания отвердителя сорбционная емкость и степень набухания образцов снижается, что говорит об увеличении плотности сетки с введением в хитозан дженипина.

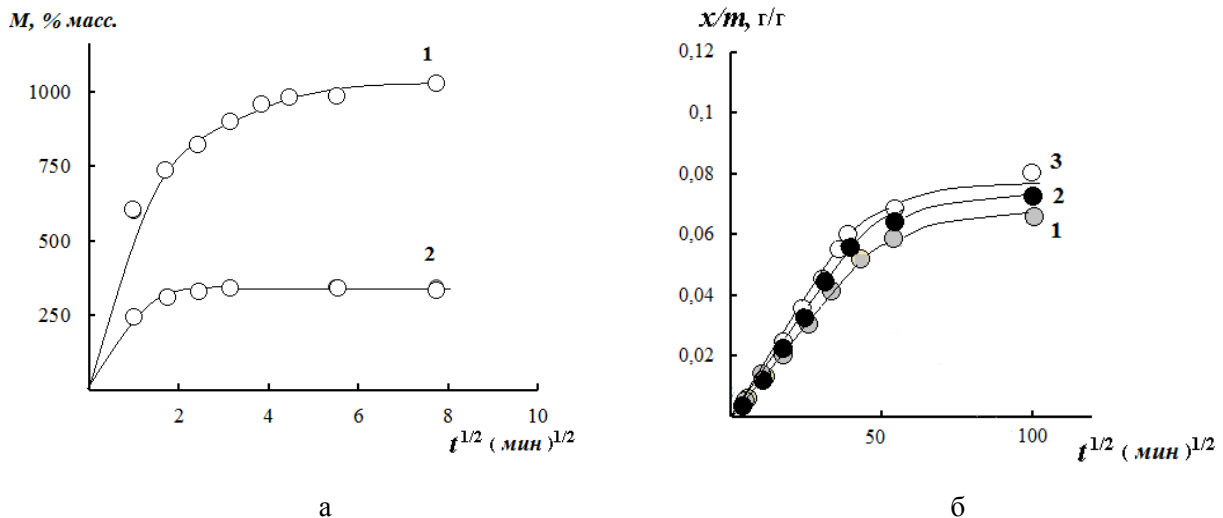


Рис. 4. Кинетические кривые набухания в воде образцов №3 – 1, № 5 - 2 (а) и сорбции паров воды при  $p/p_0 = 0,5$  пленками хитозан-дженипин (б) образцов №4 -1; №2 -2; №6 – 3.

На рис.5 представлены изотермы сорбции паров воды пленками хитина исходного и промытого щелочью (а) и сшитого хитина и обработанного щелочью (б). Можно видеть, что для всех исследованных образцов изотермы сорбции паров воды S-образны, сорбционная емкость пространственно-сшитых образцов хитина во всем интервале давления паров воды ниже, чем у исходных образцов. Поскольку, согласно данным ДСК, все исследованные образцы характеризуются аморфной структурой, описанное выше снижение сорбционной емкости можно связывать с влиянием сетки пространственных связей. Следуя модели двойной сорбции и предложенной нами ранее методикой [6], проведено

разложение изотерм сорбции в пакете программы TWOFL на Лэнгмюровскую и Флори-Хаггинса составляющие (рис. 6). Видно, что заполнение молекулами воды доступных функциональных групп хитозана реализуется в области низкой активности пара, тогда как в области высокой влажности основную долю составляют молекулы свободной, подвижной воды.

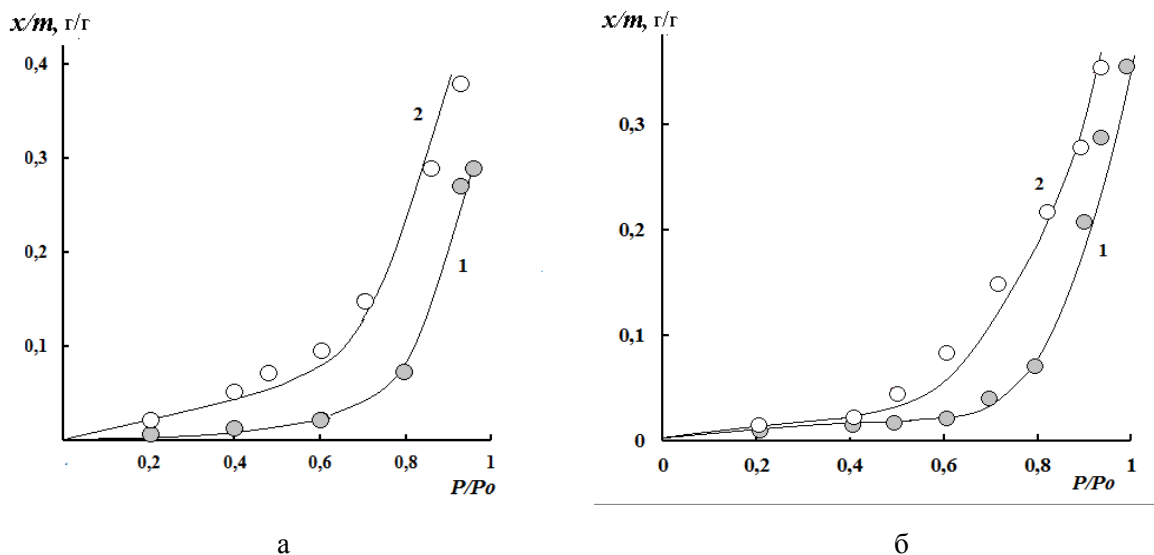


Рис. 5. Изотермы сорбции паров воды пленками хитозана (а) и хитозан – дженипин (б): исходные – 1 и обработанные щелочью - 2.

Численные значения парных параметров взаимодействия  $\chi$  приведены в табл.1. При рассмотрении этих данных обращает на себя внимание близость значений  $\chi$  для всех исследованных сорбентов. В то же время рассчитываемый парный параметр весьма чувствителен к составу мономерного звена полисахаридов. Так при переходе сорбента от основной к солевой форме хитозана, парный параметр взаимодействия снижается от 0.98 до 0.85, что однозначно указывает на растворимость солевой формы хитозана в воде.

Используя значения парного параметра взаимодействия и значения максимальной степени набухания, по уравнению Флори-Ренера были рассчитаны величины молекулярной массы сетки между узлами зацеплений. Интересно отметить, что при образовании пространственной сетки возникают частицы дисперсной фазы, появление которых связано с самосшиванием молекул дженипина (рис. 7), поэтому рассчитанные по изотермам сорбции  $M_c$  следует рассматривать как эффективные.

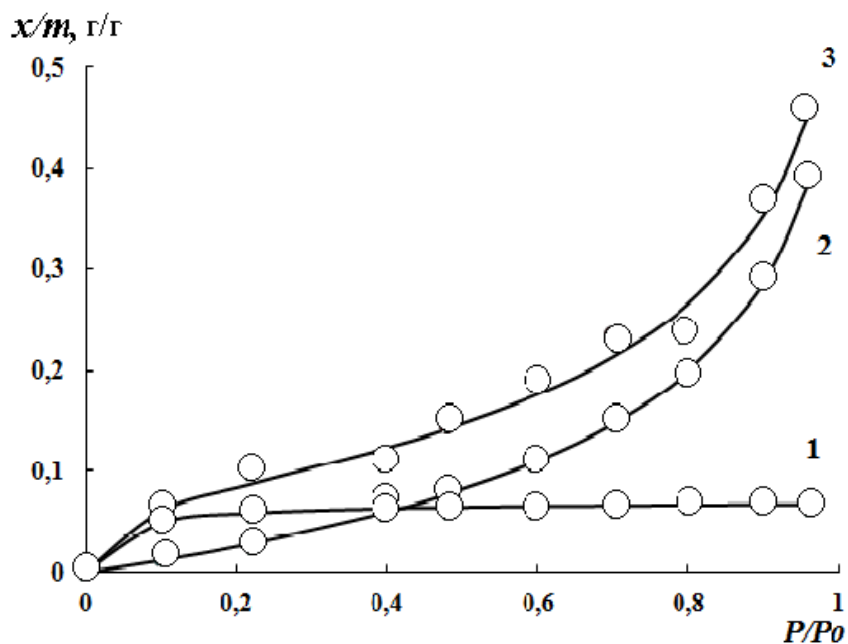


Рис. 6. Разложение изотермы сорбции (3) паров воды хитозан – дженипин в рамках модели Флори-Хаггинса: 1 – изотерма Лэнгмюра, 2 – изотерма Флори-Хаггинса.

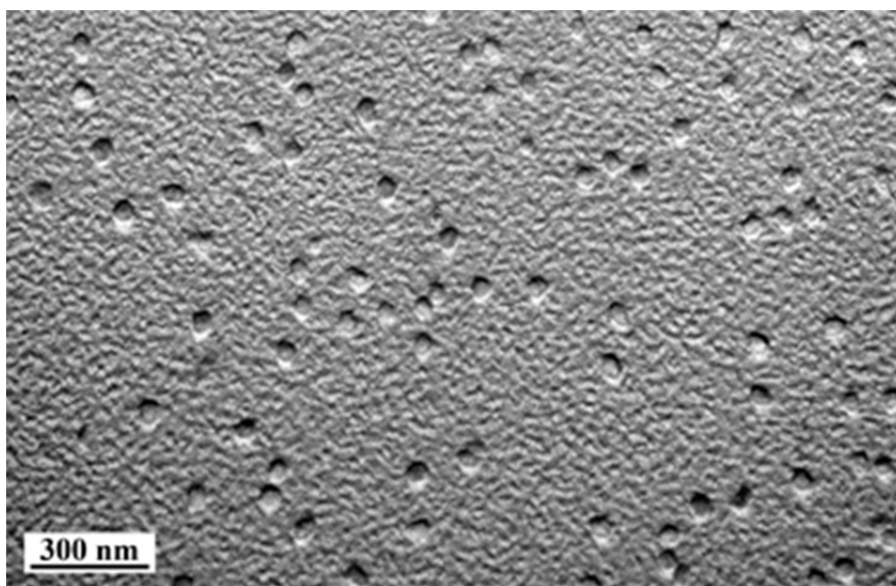


Рис. 7. Микрофотография поверхности пленки хитозан – дженипин

Особое внимание в работе было уделено исследованию кинетики неизотермической десорбции. Типичные кинетические кривые неизотермической десорбции пленок хитозана, содержащих различное количество сорбированной воды, представлены на рис 8.

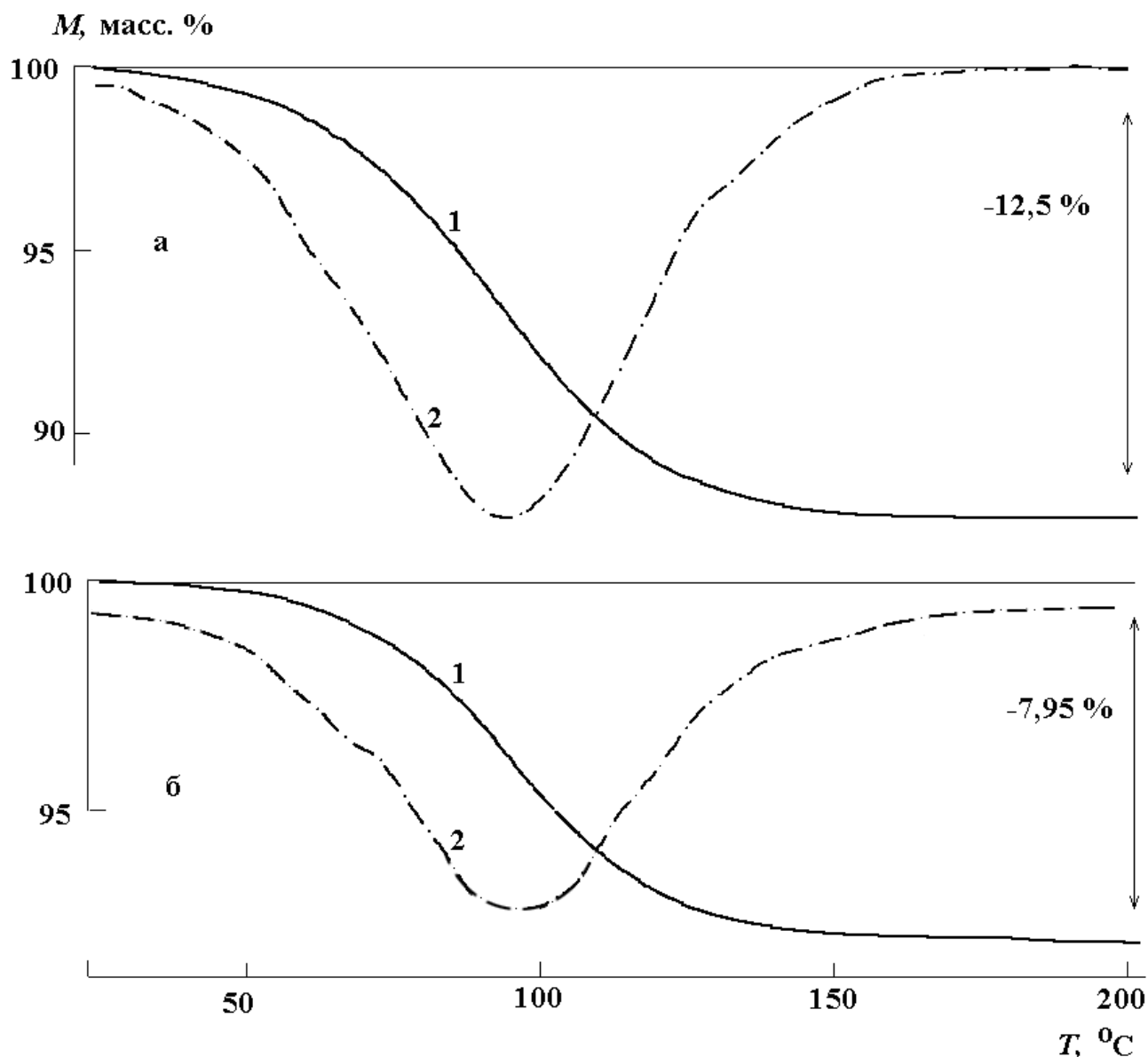


Рис. 8. Неизотермические кинетики десорбции (1) и скорости десорбции (2) воды из образцов хитина (а) и хитозана (б).

Можно видеть, что процесс десорбции начинается уже при температурах  $20 - 40^{\circ}\text{C}$ , а максимальные скорости достигаются при температуре  $90^{\circ}\text{C}$ , а завершается при  $150 - 160^{\circ}\text{C}$ . С увеличением скорости нагревания кинетическая кривая неизотермической десорбции смещается в область более высоких температур, что позволяет определить коэффициенты диффузии как в области низких, так и высоких температур.



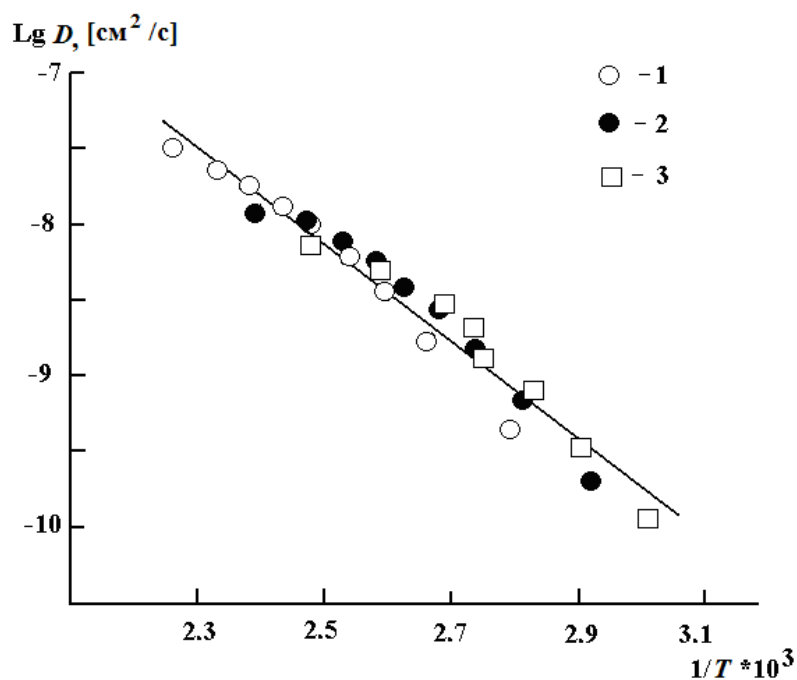


Рис.9. Температурные зависимости коэффициента диффузии воды в хитозане, рассчитанные по неизотермической кинетике десорбции: скорости нагревания 1- 50, 2 – 20, 3 – 10 град/мин, содержание воды 6.6 %.

По методике, предложенной [7], нами были рассчитаны эффективные коэффициенты диффузии на различных участках кинетических кривых десорбции, полученные при различных скоростях подъема температуры. Результаты расчетов представлены на рис. 9 в координатах уравнения Аррениуса. Можно видеть, что для всех образцов, содержащих различные количества сорбированной воды в интервале температур от 20 до 150°C наблюдаются единые линейные зависимости. Для хитозана эффективная энергия активации, рассчитанная по тангенсу угла наклона этой зависимости, равна ~70 кДж/моль.

## Литература

1. Хитозан /под ред. К.Г. Скрыбина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова. – Москва: Центр «Биоинженерия» РАН, 2013. – 600с.
2. Berger J., Reist M., Mayer J.M., Felt O., Peppas N.A., Gurny R. 2004. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57**, 19–34.

3. Pujana M.A., Pérez-Álvarez L., Iturbe L.C.C., Katime I. 2013. Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin. *Carbohydrate Polymers*. **94**, 836–842.
4. Lai J.-Y., Li Y.-T., Wang T.-P. 2010. In Vitro response of retinal pigment epithelial cells exposed to chitosan materials prepared with different cross-linkers. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 5256-5272.
5. Butler M.F., Ng Y.-F., Pudney P.D. 2003. Mechanism and kinetics of the cross-linking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *J. Polym. Sci. Part A: Pol. Chem.* **41**, 3941–3953.
6. Чалых А.Е., Петрова Т.Ф., Хасбиуллин Р.Р., Озерин А.Н. Сорбция и диффузия воды в хитине и хитозане. *Высокомолек. соед. А*. 2014. Т.56. С. 526-535.
7. Алиев А.Д., Рубцов А.Е., Чалых А.Е. Электронно-зондовый микроанализ в исследовании полимеров. М.: Наука, 1990.