

УДК 544.016, 543.421.424, 543.442.2

Н. М. Селиванова, М. В. Зими́на, Ю. Г. Галяметдинов

ФАЗОВОЕ ПОВЕДЕНИЕ ХИТОЗАНА В ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТАХ

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
ул. К. Маркса, д. 68, 420015 Казань, Россия. E-mail: natsel@mail.ru

Создание биосовместимых транспортных систем доставки биоактивных субстанций является актуальной задачей биомедицины и фармакологии. Лиотропные жидкокристаллические системы представляются перспективными средами для инкапсулирования как гидрофобных, так и гидрофильных субстанций. В работе представлен поиск условий создания новых биосовместимых, нетоксичных систем на основе биополимера хитозана и ряда органических кислот, биотичных по своей природе: аскорбиновой, янтарной, молочной и лимонной. Методом поляризационной оптической микроскопии исследовано фазовое поведение систем. Найдены области формирования гелей и лиомезофаз в зависимости от варьирования концентрации кислот и содержания хитозана. Оценены температурные диапазоны существования мезофаз. В исследуемом ряду кислот наиболее широкие области проявления лиомезоморфизма как по концентрации, так и по температуре найдены в трехосновной лимонной кислоте. Выявленные закономерности фазового поведения хитозана в ряду исследуемых кислот позволят в дальнейшем использовать данные биосовместимые среды в качестве систем доставки и хранения биоактивных субстанций.

Ключевые слова: *лиотропные жидкие кристаллы, хитозан, органические кислоты, биосовместимые системы.*

DOI: 10.18083/LCAppl.2019.3.76

N. M. Selivanova, M. V. Zimina, Yu. G. Galyametdinov

PHASE BEHAVIOR OF CHITOSAN IN ORGANIC ACIDS

Kazan National Research Technological University,
68 Karl Marx St., Kazan, 420015, Russia. E-mail: natsel@mail.ru

The creation of biocompatible transport systems for the delivery of bioactive substances is an urgent task of biomedicine and pharmacology. Lyotropic liquid crystal systems seem to be promising media for encapsulating hydrophobic and hydrophilic substances. The paper presents a search for conditions for creating new biocompatible, non-toxic systems based on biopolymer chitosan and some organic acids that are biotic in nature: ascorbic, succinic, lactic, and citric. The phase behavior of the systems was investigated using polarization optical microscopy. The formation areas of gels and lyomesophases are found, depending on the variation of acid concentration and the content of chitosan. The temperature ranges of the mesophase existence are estimated. In the studied range of acids, the widest areas of lyomesomorphism manifestation, both in concentration and temperature, are found in tribasic citric acid. The revealed regularities of the phase behavior of chitosan in the series of the studied acids will further allow using these biocompatible media as systems for the delivery and storage of bioactive substances.

Key words: *lyotropic liquid crystals, chitosan, organic acids, biocompatible systems.*

Введение

Прогрессирующая тенденция к исследованию биополимерных систем обусловлена глобальной проблемой использования возобновляемых ресурсов, а также применением биосовместимых систем в широком спектре практических областей.

Биополимер хитозан, состоящий из β -D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозамина, полисахарид, получаемый путем N-деацетилирования хитина. Последний является вторым по распространенности природным полисахаридом и наличествует в основном в панцирях морских ракообразных. На сегодняшний день хитозан широко используется в медицине и фармакологии ввиду высокой биосовместимости, антибактериальной и антиоксидантной активности, продукты его разложения нетоксичны, неиммуногенны и не канцерогенны [1–4]. Его уникальные физико-химические и биологические свойства позволяют применять его в системах адресной доставки лекарственных препаратов [5–7]. Современным подходом адресной доставки активных веществ являются биосовместимые системы, проявляющие лиотропный мезоморфизм. В зависимости от типа мезофазы ввиду определенной структурной самоорганизации, такие системы способны к инкапсулированию как гидрофобных, так и гидрофильных молекул в достаточно широких пределах [8–10]. Однако применение хитозана в качестве основы транспортных систем имеет ряд ограничений, одно из которых – низкая растворимость в воде. Из литературных данных известно, что хитозан растворяется в некоторых органических кислотах [11]. Авторы [12] показали, что растворы хитозана в муравьиной, уксусной и хлоруксусной кислотах при определенных концентрациях проявляют холестерическую мезофазу.

Ранее нами изучались лиомезофазы на основе хитозана и уксусной кислоты, а также тройные системы хитозан/уксусная кислота/неионный ПАВ [13]. Построены фазовые диаграммы состояния, исследованы реологические свойства и изучена кинетика высвобождения флуорофора родамина 6G. Целью данной работы являлось изучение фазового поведения хитозана в растворах кислот различной основности: аскорбиновой, янтарной, молочной и лимонной для выявления концентрационных и температурных областей проявления лиотропного мезоморфизма.

Экспериментальная часть

Объектом исследования являлся хитозан (Chit), степень деацетилирования 75–85 % фирмы «Aldrich», он использовался без дополнительной обработки. Структурная формула представлена на рисунке 1.

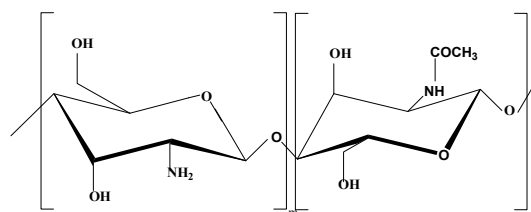


Рис. 1. Структурная формула хитозана

Fig. 1. Chitosan structure

В качестве растворителей использовались органические кислоты: лимонная $C_6H_8O_7$ (CA), молочная $C_3H_6O_3$ (LA) производства «Татхимпродукт»; янтарная кислота $C_4H_6O_4$ (SA) производства «Аквахим», аскорбиновая кислота $C_6H_8O_6$ (AA) «Марбиофарм».

Системы на основе хитозана и растворов кислот готовились смешением компонентов при определенных массовых соотношениях в стеклянных виалах, при варьировании концентрации биополимера и кислот. Системы выдерживались при 25 °C в течение 7 дней перед использованием.

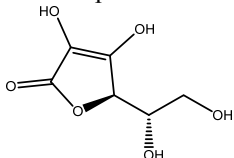
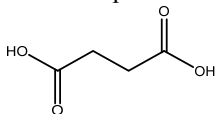
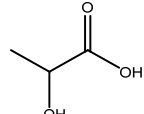
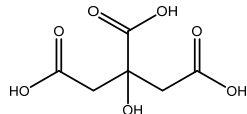
Поляризационная оптическая микроскопия (ПОМ) использовалась для исследования жидкокристаллических свойств систем. Измерения проводили на поляризационном микроскопе *Olympus BX51* с нагревательной системой *Linkam*. Температуры фазовых переходов регистрировали с точностью ± 2 %. Для определения температур фазового перехода проводили нагревание образцов со скоростью 5 °C/мин.

Результаты и их обсуждение

При создании систем доставки биоактивных субстанций важным фактором является биосовместимость компонентов. Выбор используемых в работе кислот был обусловлен их биотической природой. Кроме того, важным представляется нахождение закономерностей формирования лиомезофаз в зависимости от строения кислот, в частности их основности.

Таблица 1. Характеристики кислот

Table 1. Characteristics of acids

Аскорбиновая 		Янтарная 	Молочная 	Лимонная 
С, моль/л	0,1 0,3 0,6 1	0,2 0,5 1	0,3 0,7 1,4	2,3 2,6 3

В ходе работы были проведены исследование растворимости хитозана в аскорбиновой кислоте и поиск условий проявления лиотропного мезоморфизма. С помощью метода ПОМ были исследованы образцы систем, где содержание хитозана варьировалось в диапазоне 2–18 мас. %, а концентрация кислоты изменялась от 0,1 до 1 моль/л. На рис. 2 представлены микрофотографии образцов систем, наблюдаемые в поляризованном свете.

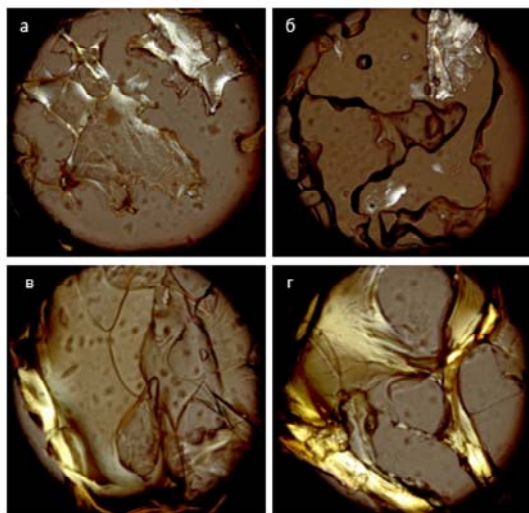


Рис. 2. Микрофотографии образцов системы Chit/AA:
 а – $C_{\text{Chit}} = 10$ мас. %, $C_{\text{AA}} = 0,3$ моль/л,
 б – $C_{\text{Chit}} = 8$ мас. %, $C_{\text{AA}} = 0,1$ моль/л, в – $C_{\text{Chit}} = 14$ мас. %, $C_{\text{AA}} = 0,6$ моль/л, г – $C_{\text{Chit}} = 17$ мас. %, $C_{\text{AA}} = 1$ моль/л

Fig. 2. Microphotographs of the Chit/AA system:
 а – $C_{\text{Chit}} = 10$ wt. %, $C_{\text{AA}} = 0,3$ mol/l, б – $C_{\text{Chit}} = 8$ wt. %, $C_{\text{AA}} = 0,1$ mol/l, в – $C_{\text{Chit}} = 14$ wt. %, $C_{\text{AA}} = 0,6$ mol/l, г – $C_{\text{Chit}} = 17$ wt. %, $C_{\text{AA}} = 1$ mol/l

Как видно, образцы систем обладают двулучепреломлением, в поляризованном свете прояв-

ляют негеометрические текстуры. Данные, полученные методом ПОМ, обобщены на рис. 3.

При концентрациях аскорбиновой кислоты 0,1, 0,3 и 0,6 моль/л область формирования мезофазы была найдена только для 8, 10 и 14 мас. % хитозана, соответственно. При более низком содержании хитозана формировались гели, при более высоком – хитозан не растворялся. С увеличением концентрации кислоты до 1 моль/л область проявления лиомезофазы расширялась, она наблюдалась в диапазоне 15–18 мас. % хитозана. Температуры фазовых переходов в изотропную жидкость для данных систем представлены на рис. 3, б. Видно, что с увеличением содержания хитозана $T_{\text{ф.п.}}$ уменьшается. Следует отметить, что образцы с аскорбиновой кислотой подвергались деструкции после месяца хранения.

Янтарная кислота является двухосновой предельной карбоновой кислотой, широко применяемой в медицине в профилактических и терапевтических целях. С помощью ПОМ были исследованы образцы систем (рис. 4), где концентрация янтарной кислоты изменялась от 0,2–1 моль/л, а содержание хитозана варьировалось от 5–18 мас. %.

Как следует из рис. 4, лиомезофаза проявляется в граничных областях. На рис. 5 представлена диаграмма, характеризующая области растворимости хитозана в янтарной кислоте. При концентрациях 0,2 и 0,5 моль/л в диапазоне от 2 до 16 мас. % хитозана лиотропная мезофаза не образуется, происходит формирование гелей. При концентрации кислоты 1 моль/л лиомезофаза формировалась локально при содержании хитозана 14, 15 и 16 мас. %, температуры фазовых переходов для данных систем представлены на рис. 5. Как и в случае с аскорбиновой кислотой, сохраняется тенденция уменьшения $T_{\text{ф.п.}}$ при увеличении C_{Chit} .

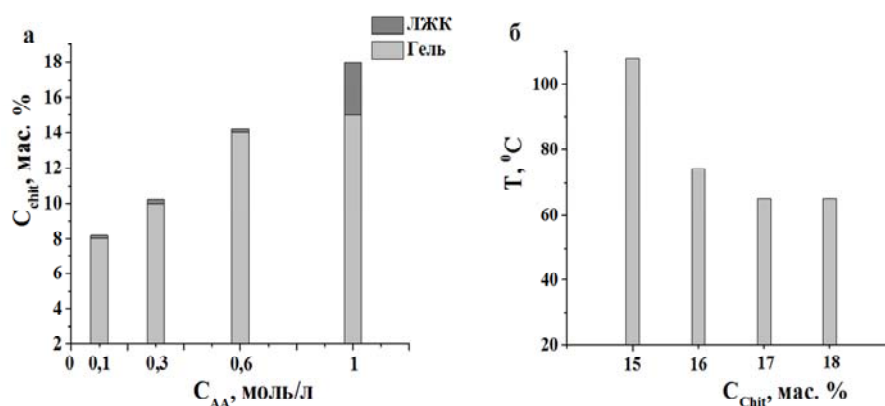


Рис. 3. Диаграмма, характеризующая области растворимости хитозана в аскорбиновой кислоте (а) и температурные интервалы существования мезофаз в системах Chit/AA при различном содержании хитозана ($C_{AA} = 1$ моль/л) (б)

Fig. 3. Diagram characterizing areas of solubility of chitosan in ascorbic acid (a), and temperature diapasons of mesophase existence of the Chit/AA systems at various content of chitosan ($C_{AA} = 1$ mol/l) (b)

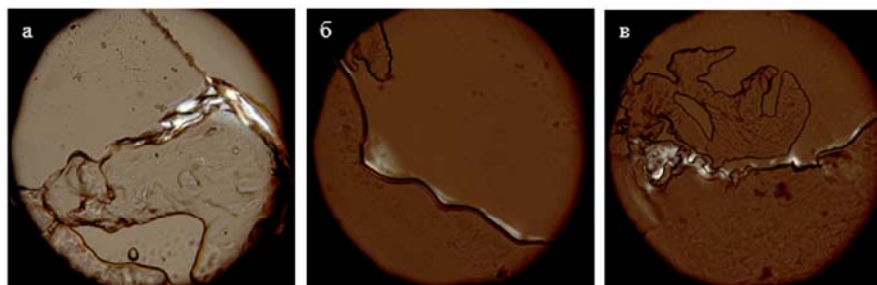


Рис. 4. Микрофотографии образцов системы Chit/AA ($C_{AA} = 0,5$ моль/л) при содержании хитозана: а – $C_{Chit} = 14$ мас. %, б – $C_{Chit} = 15$ мас. %, ($C_{AA} = 2,1$ моль/л), в – $C_{Chit} = 16$ мас. %

Fig. 4. Microphotographs of the Chit/AA systems ($C_{AA} = 0,5$ mol/l) at concentration of chitosan: а – $C_{Chit} = 14$ wt. %, б – $C_{Chit} = 15$ wt. %, с – $C_{Chit} = 16$ wt. %

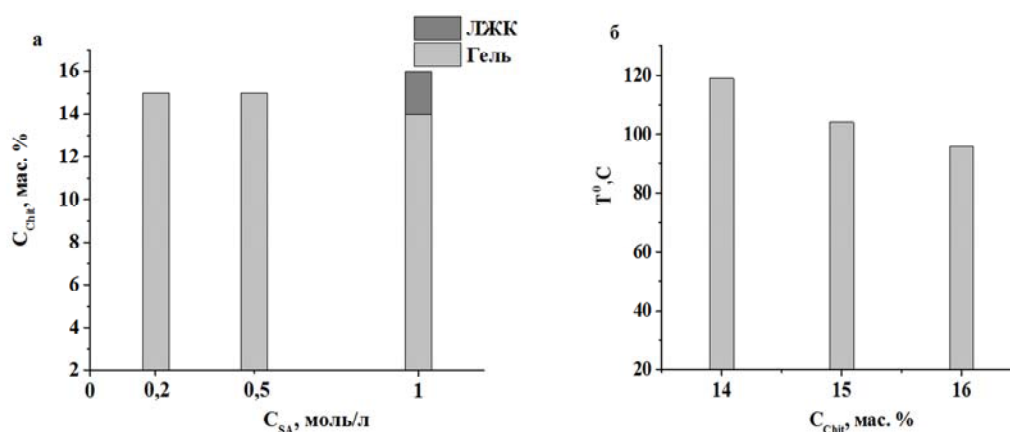


Рис. 5. Диаграмма, характеризующая области растворимости хитозана в янтарной кислоте (а) и температурные интервалы существования мезофаз в системах Chit/SA при различном содержании хитозана ($C_{SA} = 1$ моль/л) (б)

Fig. 5. Diagram characterizing areas of solubility of chitosan in succinic acid (a), and temperature diapasons of mesophase existence in the Chit/SA systems at various content of chitosan ($C_{SA} = 1$ mol/l) (b)

Для создания биосовместимых транспортных систем молочная кислота представляется наиболее привлекательным растворителем, поскольку она играет важную роль во многих биохимических процессах, протекающих в организме. Для оценки растворимости хитозана в растворах молочной кислоты и поиска условий проявления лиотропного мезоморфизма, методом ПОМ были исследованы образцы систем, где концентрация хитозана варьировалась от 5 до 18 мас. %, а концентрация кислоты изменялась в интервале 0,3–2,1 моль/л. Текстуры бинарных систем, наблюдаемые в поляризованном свете, представлены на рис. 6.

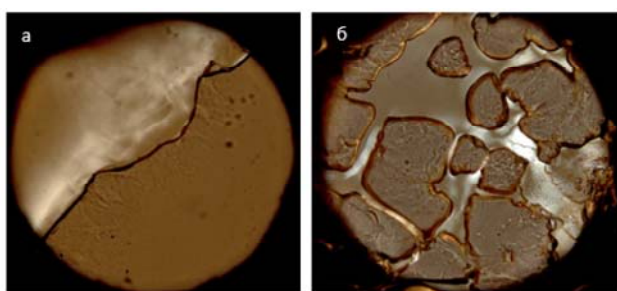


Рис. 6. Микрофотографии образцов системы Chit/LA ($C_{\text{Chit}} = 14$ мас. %), наблюдаемые в поляризованном свете при различном содержании молочной кислоты:

$a - C_{\text{LA}} = 1,4$ моль/л, $b - C_{\text{LA}} = 2,1$ моль/л

Fig. 6. Microphotographs of the Chit/LA systems ($C_{\text{Chit}} = 14$ wt. %), observed in polarized light at various concentrations of lactic acid: $a - C_{\text{LA}} = 1,4$ mol/l, $b - C_{\text{LA}} = 2,1$ mol/l

Данные, полученные ПОМ, обобщены на рис. 7. При малой концентрации кислоты наблюдалось формирование гелей. Для систем с концент-

рацией кислоты 1,4 и 2,1 моль/л и хитозана – 14–16 мас. % происходило образование лиотропной мезофазы. Выше 16 мас. % образцы представляли собой гетерогенную систему, содержащую кристаллы хитозана. Независимо от концентрации компонентов температуры фазовых переходов были близки и составляли около 121 °С.

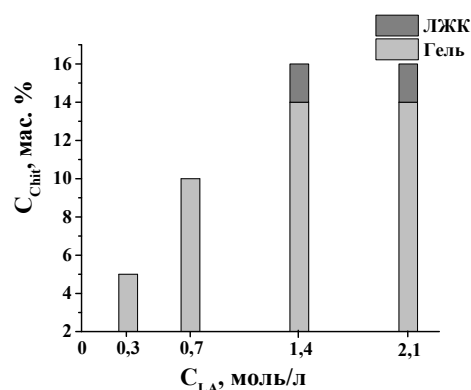


Рис. 7. Диаграмма, характеризующая области растворимости хитозана в молочной кислоте

Fig. 7. The diagram characterizing areas of solubility of chitosan in lactic acid

Лимонная трехосновная кислота является биотичной и участвует в процессе обмена веществ в организме. Для оценки растворимости хитозана в растворах лимонной кислоты были исследованы образцы систем, где концентрация хитозана варьировалась от 5 до 18 мас. %, а концентрация кислоты изменялась в интервале 2,2–3 моль/л. Микрофотографии образцов систем в поляризованном свете представлены на рис. 8.

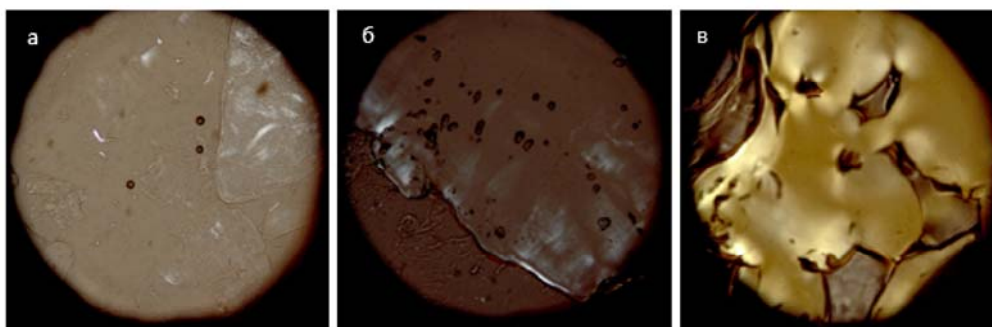


Рис. 8. Микрофотографии образцов системы Chit/CA ($C_{\text{CA}} = 2,2$ моль/л), наблюдаемые в поляризованном свете при различном содержании хитозана: $a - C_{\text{Chit}} = 10$ мас. %, $b - C_{\text{Chit}} = 14$ мас. %, $в - C_{\text{Chit}} = 18$ мас. %

Fig. 8. Microphotographs of the Chit/CA systems ($C_{\text{CA}} = 2,2$ mol/l) observed in polarized light at various concentrations of chitosan: $a - C_{\text{Chit}} = 10$ wt. %, $b - C_{\text{Chit}} = 14$ wt. %, $c - C_{\text{Chit}} = 18$ wt. %

На рисунке 9 представлена диаграмма, характеризующая области формирования гелей и лиомезофазы.

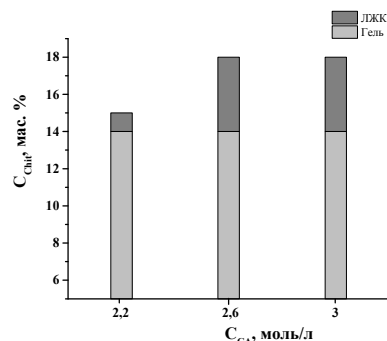


Рис. 9. Диаграмма, характеризующая области растворимости в лимонной кислоте

Fig. 9. The diagram characterizing areas of solubility in citric acid

Для систем Chit/CA при концентрации раствора лимонной кислоты 2,2 моль/л характерно проявление лиотропной мезофазы при содержании хитозана 14–15 мас. %. С увеличением содержания хитозана системы растворяются не полностью, в образце остаются кристаллы хитозана. С увеличением концентрации лимонной кислоты ($C_{CA} = 2,6$ моль/л и 3 моль/л) расширяется область формирования лиомезофазы в пределах $C_{Chit} = 14$ –18 мас. %. Температурные области существования мезофаз имеют близкие значения независимо от концентрации компонентов (рис. 10).

Для систем $C_{CA} = 2,6$ моль/л и 3 моль/л с увеличением содержания хитозана наблюдается монотонное увеличение температуры фазового перехода в изотропную жидкость. Максимальная температура фазового перехода – 147 °С при содержании хитозана 18 мас. %.

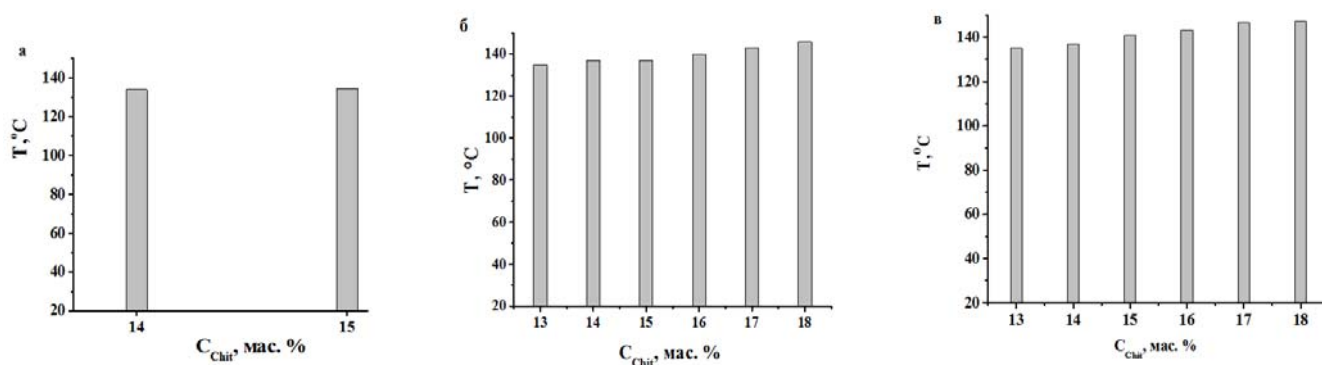


Рис. 10. Температурные интервалы существования мезофаз в системах Chit/CA: а – ($C_{CA} = 2,2$ моль/л), б – ($C_{CA} = 2,6$ моль/л), в – ($C_{CA} = 3$ моль/л) при различном содержании хитозана

Fig. 10. Temperature diapasons of mesophase existence in the Chit/CA systems: а – ($C_{CA} = 2,2$ mol/l), б – ($C_{CA} = 2,6$ mol/l), в – ($C_{CA} = 3$ mol/l) at various concentration of chitosan

Выводы

Изучено фазовое поведение хитозана в аскорбиновой, янтарной, молочной и лимонной кислотах. На основании метода поляризационной оптической микроскопии найдены области формирования гелей и лиотропных мезофаз при варьировании содержания биополимера и концентрации кислот. Найдено, что в растворах аскорбиновой кислоты область формирования лиомезофазы лежит в пределах 13–16 мас. % хитозана. Однако

образцы не отличались стабильностью и подвергались деструкции после одного месяца хранения.

В растворах янтарной кислоты лиотропная мезофаза в исследуемом ряду концентраций возникает только при $C_{SA} = 1$ моль/л и содержании хитозана 14–16 мас. %. С увеличением содержания хитозана температура фазового перехода в изотропную жидкость уменьшается.

Молочная одноосновная кислота представляется перспективной для создания биосовместимых систем. Образование лиомезофазы происходило

при концентрации кислоты 1,4 и 2,1 моль/л при содержании хитозана 14–16 мас. %. Фазовый переход фиксировали при 121 °С.

В случае использовании трехосновной лимонной кислоты лиомезофаза наблюдалась при содержании хитозана 13–18 мас. %, при этом температура фазового перехода в изотропную жидкость составляла порядка 133–147 °С. Следует отметить, что в отличие от других кислот, мезофаза формируется только в достаточно концентрированных растворах (2,3–3 моль/л). В системах Chit/CA с увеличением концентрации лимонной кислоты увеличивается область проявления лиотропного мезоморфизма. Обобщая полученные экспериментальные данные, можно сделать вывод, что в исследуемом ряду кислот наиболее широкие области проявления лиомезоморфизма как по концентрации, так и по температуре найдены в трехосновной лимонной кислоте.

Таким образом, найденные закономерности фазового поведения хитозана в ряду исследуемых кислот позволят в дальнейшем использовать данные биосовместимые среды в качестве систем доставки и хранения биоактивных субстанций.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 18-03-0173.

Список литературы / References

1. Mahé O., Brière J., Dez I. Chitosan: An Upgraded Polysaccharide Waste for Organocatalysis. *European Journal of Organic Chemistry*, 2015, **2015** (12), 2559–2578. DOI: 10.1002/ejoc.201403396.
2. Kadib A. Chitosan as a Sustainable Organocatalyst: A Concise Overview. *ChemSusChem*, 2014, **8** (2), 217–244. DOI: 10.1002/cssc.201402718.
3. Zhao D., Yu S., Sun B., Gao S., Guo S., Zhao K. Bio-medical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles. *Polymers*, 2018, **10** (4), 462, 17 p. DOI: 10.3390/polym10040462.
4. Vunain E., Mishra A., Mamba B. Fundamentals of chitosan for biomedical applications. Chitosan Based Biomaterials. Netherlands: Elsevier Ltd., 2017, **1**, 3–30. DOI: 10.1016/B978-0-08-100230-8.00001-7.
5. Bernkop-Schnürch A., Dünhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012, **81** (3), 463–469. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.04.007.
6. Munawar A., Jaweria T., Syeda M., Kishor M., Wasan E. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 2017, **9** (4), 53, 26 p. DOI: 10.3390/pharmaceutics9040053.
7. Akbar A., Shakeel A. A Review on Chitosan and its Nanocomposites in Drug Delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier, 2018, **109**, 273–286. DOI: org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078.
8. Negrini R., Mezzenga R. pH-Responsive Lyotropic Liquid Crystals for Controlled Drug Delivery. *Langmuir*, 2011, **27**, 5296–5303. DOI: org/10.1021/la200591u.
9. Селиванова Н. М., Вандюков А. Е., Губайдуллин А. Т., Галяметдинов Ю. Г. Инкапсулирование глобулярных молекул в структуру ламеллярных лантансодержащих мезофаз // *Жидк. крист. и их практич. использ.* 2015. Т. 15, № 4. С. 88–95. [Selivanova N.M., Vandyukov A.E., Gubaidullin A.T., Galyametdinov Yu.G. Encapsulation of Globular Molecules in the Structure of the Lamellar Lanthanum-Containing Mesophases. *Liq. Cryst. and their Appl.*, 2015, **15** (4), 88–95 (in Russ.). DOI: 10.18083/LCAppl.2015.4.88].
10. Selivanova N.M., Gubaidullin A.T., Padnya P., Stoikov I.I., Galyametdinov Yu.G. Phase behaviour, structural properties and intermolecular interactions of systems based on substituted thiocalix[4]arene and nonionic surfactants. *Liquid Crystals*, 2019, **46** (3), 415–421. DOI: 10.1080/02678292.2018.1503351.
11. Romanazzi G., Gabler F., Margosan D., Mackey B., Smilanick J. Effect of Chitosan Dissolved in Different Acids on Its Ability to Control Postharvest Gray Mold of Table Grape. *The American Phytopathological Society*, 2009, **99** (9), 1028–1036. DOI: 10.1094/PHYTO-99-9-1028.
12. Prabakaran M., Borges J.P., Godinho M.H., Mano J.F. Liquid Crystalline Behaviour of Chitosan in Formic, Acetic, and Monochloroacetic Acid Solutions. *Materials Science Forum*, 2006, **514–516**, 1010–1014. DOI: 10.4028/www.scientific.net/MSF.514-516.1010.
13. Селиванова Н. М., Губайдуллин А. Т., Галяметдинов Ю. Г. Лиотропные мезофазы на основе биополимера хитозана, уксусной кислоты и неионных ПАВ как системы доставки биоактивных субстанций // *Жидк. крист. и их практич. использ.* 2018. Т. 18, № 3, С. 6–13. [Selivanova N.M., Vandyukov A.E., Gubaidullin A.T., Galyametdinov Yu.G. Lyotropic mesophases based on chitosane biopolymer, acetic acid and non-ionic surfactants, as delivery systems of bioactive substances. *Liq. Cryst. and their Appl.*, 2018, **18** (3), 6–13. (in Russ.). DOI: 10.18083/LCAppl.2018.3.6].

Поступила в редакцию 15.05.2019 г.
Received 15 May 2019