

УДК 541.64:546.57:547.995.12

НАНОКОМПОЗИТЫ СЕРЕБРА И N-КАРБОКСИМЕТИЛХИТОЗАНА *Bombyx mori*

© 2020 г. В. А. Александрова^{а,*}, О. Б. Кличева^б,
А. М. Футорянская^а, С. Ш. Рашидова^б

^а Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук
119991 Москва, Ленинский пр., 29, Россия

^б Институт химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан
100128 Ташкент, ул. А. Кадыри, 7б, Узбекистан

*e-mail: alexandrova@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 26.11.2019 г.

После доработки 28.02.2020 г.

Принята к публикации 27.03.2020 г.

С использованием куколок тутового шелкопряда в качестве альтернативного источника возобновляемого сырья синтезировано водорастворимое производное хитозана *Bombyx mori* N-карбоксиметилхитозан. Разработан метод фотохимического восстановления ионов серебра в наночастицы серебра в матрице N-карбоксиметилхитозана. Наличие наночастиц серебра в коллоидном растворе подтверждено данными УФ-спектроскопии, их форма и размеры установлены с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

DOI: 10.31857/S2308112020050016

Одно из важных направлений современных исследований в области высокомолекулярных соединений – создание новых металлополимерных наноконструкций [1]. Так, наличие наночастиц серебра в наноконструкте благодаря их уникальным физико-химическим свойствам позволяет применять такие материалы в электронике, оптике, катализе [2–6], а также для решения различных экологических проблем, в частности для очистки воды [7]. Поскольку одним из отличительных свойств серебра является его бактерицидная активность [8], композитные материалы, содержащие наночастицы серебра, являются перспективными для их применения в медицине при создании перевязочных материалов, а также различных фармакологических средств [9].

Среди основных подходов получения металлополимерных наноконструкций особое место занимают методы восстановления ионов металлов в полимерной матрице. При этом полимер служит также стабилизатором образующихся наночастиц металлов. Для осуществления подобных реакций используют ряд методов: химическое восстановление [10], с применением различных восстановителей радиационное и фотохимическое восстановление [11, 12], микроволновое облучение [13, 14]. Наиболее простой препаративный – химическое восстановление. Однако большинство восстановителей, используемых в данном случае (амины,

формальдегид, гидразин и т.д.), токсичны для окружающей среды. К тому же наночастицы металлов, полученные путем восстановления, часто содержат примеси исходных реагентов.

Для восстановления ионов серебра в наночастицы в растворе производного хитозана *Bombyx mori* мы применяли УФ-облучение. По сравнению с радиационным облучением метод прост в аппаратурном оформлении и более доступен. Кроме того, отсутствует необходимость длительного барботирования системы инертным газом для удаления следов кислорода.

Значительный рост исследований в области создания новых нетоксичных биодegradируемых материалов обуславливает необходимость поиска новых возобновляемых источников для выделения природных полисахаридов. Одним из таких источников для выделения хитина и хитозана служат куколки тутового шелкопряда *Bombyx mori*, которые являются отходом шелкового производства Республики Узбекистан [15].

Большой интерес к полимерным композитам на основе хитозана связан с уникальным комплексом его химических и физических свойств. Этот полисахарид природного происхождения нетоксичный, биосовместимый и способный к биодegradации. На его основе могут быть получены волокна, пленки и другие материалы для использования в медицине, косметологии, в тек-

стильной и пищевой промышленности [16]. Однако хитозан не растворим в воде, что снижает в некоторой степени возможности его применения в биологии и медицине.

Для преодоления указанного недостатка синтезируют водорастворимые производные хитозана, используя методы модификации с введением различных функциональных групп в его структуру, в частности карбоксильных. При этом наличие данных групп обуславливает его способность образовывать комплексы с ионами металлов. Такие комплексы обеспечивают равномерное распределение ионов металлов и последующее формирование кластеров и наночастиц металлов в полимерной матрице [17].

В настоящей работе введение карбоксильных групп в боковую цепь хитозана осуществляли путем взаимодействия его первичных аминогрупп с глиоксиловой кислотой с образованием *N*-карбоксиметилхитозана (**N-KMX**).

Цель работы – исследовать возможность получения водорастворимого производного хитозана *Bombux mori* **N-KMX** с использованием альтернативного источника возобновляемого в природе сырья – куколок тутового шелкопряда, а также разработать подход к осуществлению фотохимического восстановления ионов серебра в наночастицы серебра с использованием в качестве матрицы **N-KMX**.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для синтеза **N-KMX** использовали хитозан с $M = 6.5 \times 10^4$ и степенью деацетилирования 85%. Хитозан получали из хитина, выделенного из куколок тутового шелкопряда. Глиоксиловую кислоту производства Mumbai-400086, India Customer Care No: 022-6116 9797; вода-бидистиллят ($18 \text{ МОМ} \times \text{см}^{-1}$); боргидрид натрия (NaBH_4), гидроксид натрия, уксусную кислоту, этанол, хлорид натрия, азотнокислое серебро применяли квалификации х.ч. Все остальные вещества дополнительной очистке не подвергали.

Синтез N-карбоксиметилхитозана Bombuxmori

К раствору 10 г (0.062 моля) хитозана в 2 л 2%-ной уксусной кислоты при перемешивании порциями добавляли 5.75 г (0.062 моля) моногидрата глиоксиловой кислоты. При помощи 1 *N*NaOH полученный раствор доводили до pH 4.5, после чего в полученную реакционную смесь вводили 2.41 г (0.064 моля) NaBH_4 (pH раствора составляла 6–7). Образовавшийся **N-KMX** высаживали из реакционной смеси в этанол с трехкратной промывкой. Затем образец подвергали лиофилизации.

Восстановление ионов серебра в наночастицы серебра в водном растворе N-карбоксиметилхитозана Bombux mori

К раствору **N-KMX** в бидистиллированной воде (концентрация 0.25 мас. %) при перемешивании добавляли расчетное количество 0.3 М водного раствора AgNO_3 . Полученную реакционную смесь доводили до pH 7.0–7.5, при помощи 0.1 *N*NaOH. Фотохимическое восстановление ионов серебра проводили при комнатной температуре на воздухе с использованием лампы Vilber Lourmat VL-208BL мощностью 30 Вт.

Методы исследования

Вискозиметрия. Молекулярную массу исходного хитозана и **N-KMX** оценивали методом вискозиметрии. Для подавления полиэлектролитного эффекта в случае хитозана применяли раствор 2%-ного уксуснокислого натрия, а для **N-KMX** использовали 2%-ный раствор NaCl. Молекулярную массу образцов хитозана рассчитывали по уравнению Марка–Куна–Хаувинка. Характеристическую вязкость $[\eta]$ определяли с использованием вискозиметра Уббелодде при 25°C.

Кондуктометрическое титрование. Степень замещения **N-KMX** находили с помощью кондуктометрического титрования на приборе ЕС 214. Для этого были приготовлены растворы хитозана и **N-KMX** 1 г/л в 0.1 *N* растворе HCl. Полученные растворы оттитровывали 0.5 *N* раствором NaOH. При этом контролировали изменения электропроводности G_{sm} в зависимости от объема V , добавленного титранта.

ЯМР-спектроскопия. Спектры ЯМР ^{13}C регистрировали на приборе “Varian 400” (США) относительно сигналов растворителя при комнатной температуре. В качестве растворителя использовали $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$.

УФ-спектроскопия. Электронные спектры снимали на УФ-спектрофотометре “Specord M-40” (“CarlZeiss”, Германия) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 0.2 см при 25°C, используя в качестве сравнения бидистиллированную воду.

Просвечивающая электронная микроскопия. Размеры наночастиц серебра в водном растворе **N-KMX** определяли при помощи просвечивающей электронной микроскопии на приборе “LEO-912 ABOMEGA”, Германия.

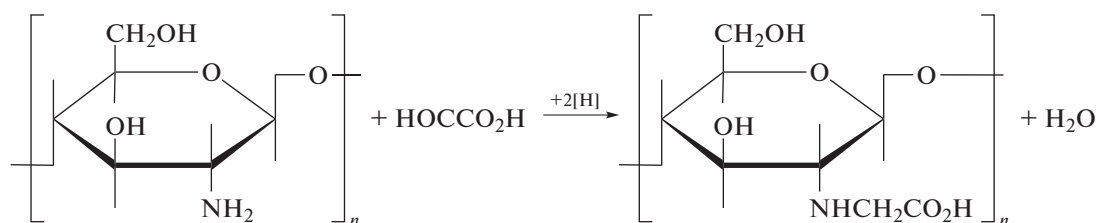
Рентгенофазовый анализ. Рентгенофазовый анализ проводили с использованием дифрактометра “RigakuRotaflex RU-200”, излучение $\text{CuK}\alpha$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для улучшения растворимости хитозана в воде получают различные производные на его основе,

в частности N-КМХ. Обычно синтез N-КМХ осуществляют путем взаимодействия хитозана с монохлоруксусной кислотой в присутствии NaOH [18]. При этом происходит карбоксиметилирование гидроксильных и аминогрупп хитозана. Таким образом, в результате реакции хитозана с монохлоруксусной кислотой образуется N,О-КМХ. С целью создания полимерной матрицы-стабилизатора, необходимой для проведения фотохимического восстановления ионов серебра в наночастицы, мы использовали метод, позволяющий синтезировать исключительно N-КМХ [19].

При N, О-замещении возможно увеличение вероятности гидрофильного взаимодействия макромолекул с образованием ассоциатов [20]. Такой эффект может приводить к снижению стабилизирующей способности полимерной матрицы. Однако в работе [21] было показано, что су-



Выход N-КМХ составил 85–89%. С использованием метода вискозиметрии была определена ММ полученного полимера, равная 4.5×10^4 . При этом содержание азота в N-КМХ составляло 4.78%, что почти вдвое меньше, чем в исходном хитозане – 7.96%.

Проведено сравнение ЯМР-спектров синтезированного N-КМХ (рис. 1) с описанными в литературе спектрами аналогичных производных, полученных из других источников хитина и хитозана [22]. ЯМР ^{13}C -спектр N-КМХ состоит из сигналов C-6 (O–CH₂) – 73 м.д., C-3 (O–CH₂) – 72 м.д., (N–CH₂) – 53 м.д., (C=O) – 176 м.д., CH₃CONH – 177.6 м.д., которые подтверждают структуру полученного полимера.

Одной из важных характеристик, определяющих реакцию способность полиэлектролита, является соотношение катионо- и анионогенных групп в его структуре. Для синтезированного N-КМХ такое соотношение было установлено с использованием метода кондуктометрического титрования. Полученные результаты позволили оценить содержание первичных амино- и карбоксильных групп в боковой цепи полимера: 20 и 80% соответственно.

Поскольку карбоксильные группы играют важную роль в формировании и стабилизации образующихся наночастиц серебра, важно было убедиться в том, что синтезированный полиэлек-

ществует пороговое значение относительного содержания карбоксилатных групп (около 0.7) в полиакриловой кислоте (ПАК), выше которого макромолекулы полимера формируют достаточно прочный комплекс с ионами серебра, и фотохимическое восстановление приводит к образованию наночастиц сферической формы. При частичном декарбоксилировании ПАК процессы формирования наночастиц серебра нарушаются, образуются наночастицы металла несферической формы и происходит их агрегация [21].

Для получения водорастворимого производного хитозана N-КМХ реакцию проводили в два этапа. На первой стадии путем взаимодействия хитозана с глиоксильной кислотой получали основание Шиффа. Вторая стадия включала восстановление полученного основания NaBH₄:

тролит N-КМХ может быть использован в качестве матрицы-стабилизатора при фотоиницированном восстановлении ионов серебра.

Фотохимический синтез наночастиц серебра проводили восстановлением ионов серебра в матрице полимера N-КМХ при 25°C в водном растворе. Путем предварительных исследований были выявлены оптимальные концентрации полимера и исходной соли AgNO₃ (см. Экспериментальную часть).

По мере увеличения продолжительности облучения 0–15–30–45–60 мин окраска раствора изменялась от светло-желтой до коричневой.

Проведение спектрофотометрических измерений оптического поглощения растворов позволило выявить полосы в диапазоне 380–420 нм с $\lambda_{\text{макс}} = 410$ нм, характерной для наночастиц серебра (рис. 2).

На основе полученных данных установлено, что с увеличением продолжительности УФ-облучения оптическая плотность растворов полимера возрастает и достигает значений 2.0–2.5. Дальнейшее увеличение продолжительности облучения приводит к уширению полосы поглощения, характеризующей наночастицы серебра. Это может быть обусловлено более широким распределением частиц по размерам.

Стабильность наночастиц серебра в полимерной матрице N-КМХ оценивали, выдерживая их

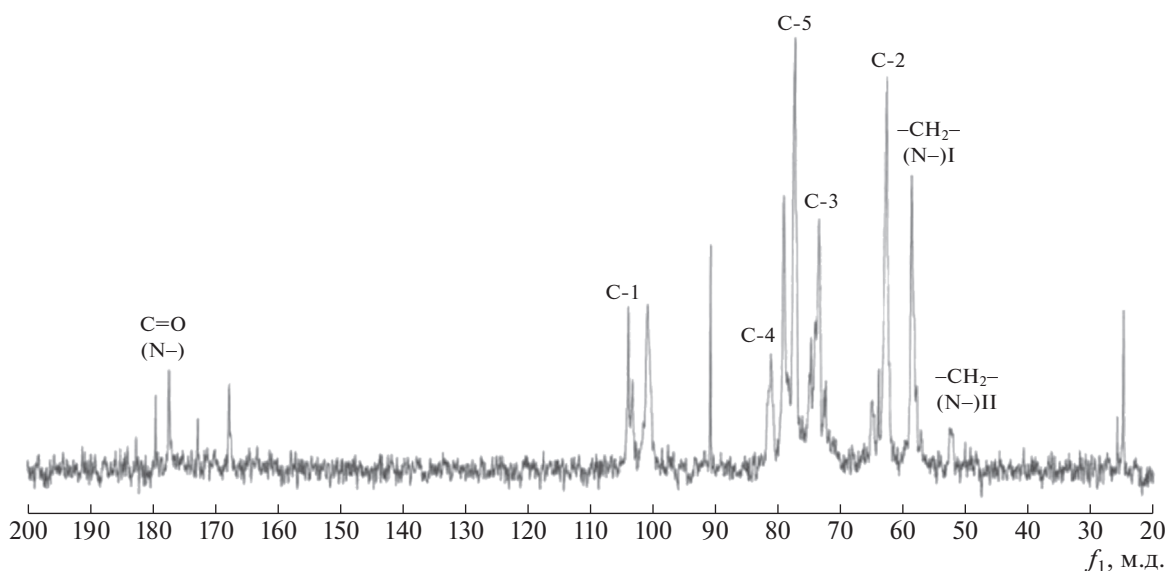


Рис. 1. ЯМР ¹³C-спектр N-KMX.

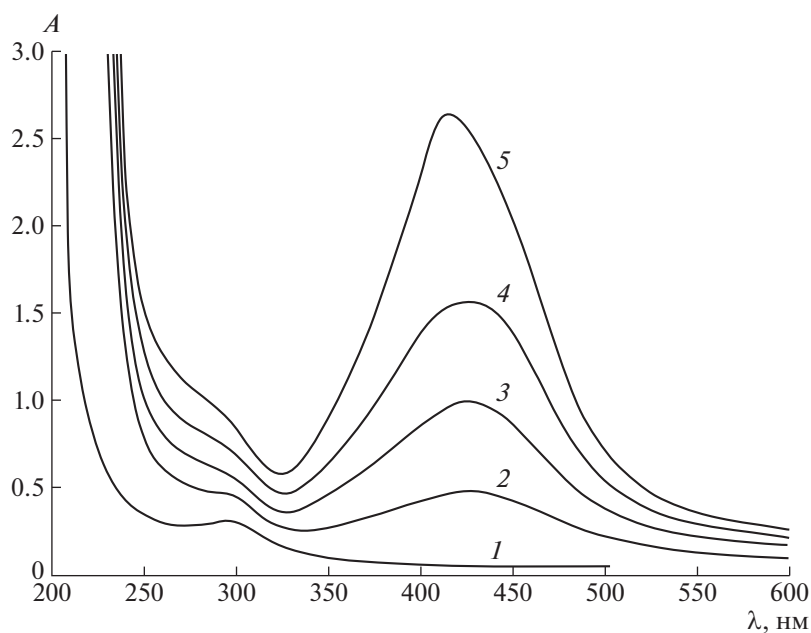


Рис. 2. Электронные спектры поглощения раствора наночастиц Ag в матрице N-KMX: 1 – исходный N-KMX, 2–5 – N-KMX + Ag⁺ при продолжительности облучения 15 (2), 30 (3), 45 (4) и 60 мин (5).

коллоидный раствор в темноте при комнатной температуре в течение 1 месяца. После этого проводили спектрофотометрические измерения оптического поглощения исследуемого раствора (рис. 3). Из сравнения спектров 1 и 2 (рис. 3), видно, что с увеличением продолжительности выдержки не наблюдается снижение оптической плотности раствора. Более того, в течение месяца

происходит некоторое ее возрастание (рис. 3, кривая 2). Это может быть обусловлено тем, что образовавшаяся коллоидно-металлическая фаза катализирует последующее восстановление ионов металла [23].

Форму и размер синтезированных наночастиц серебра в водном растворе полимера N-KMX оценивали методом ПЭМ. На основании представ-

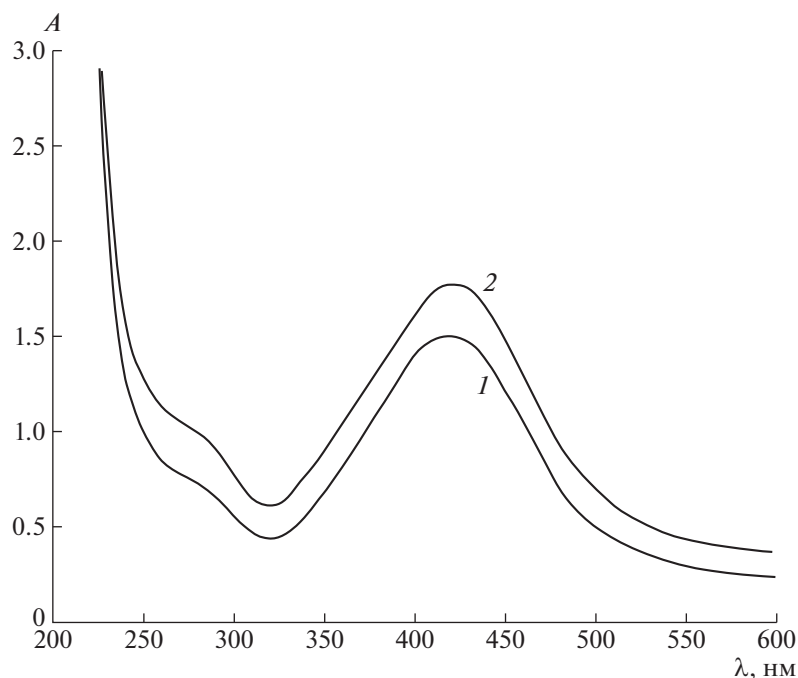


Рис. 3. Спектры поглощения наночастиц Ag в водном растворе N-KMX при продолжительности облучения 45 мин (1) и после выдержки в темноте в течение 30 дней (2).

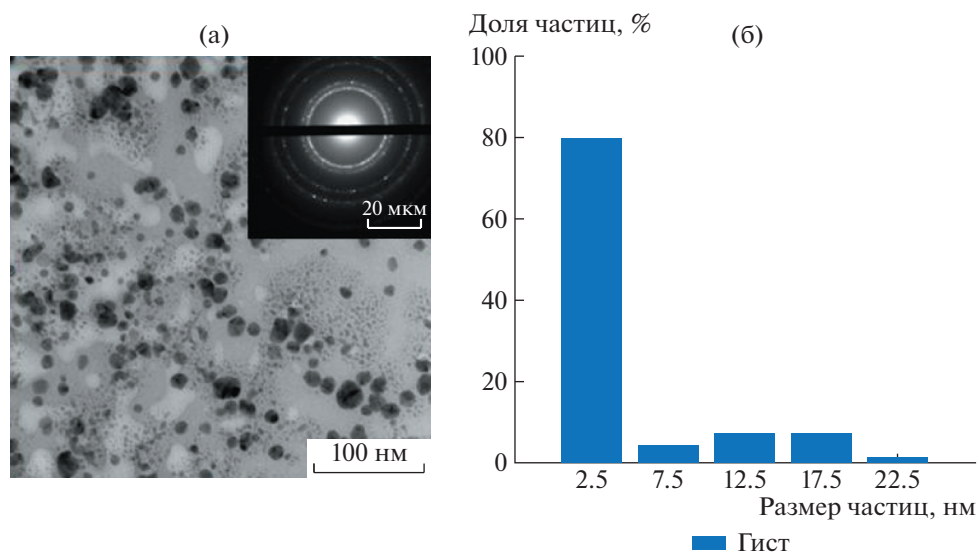


Рис. 4. Электронная микрофотография пленки из водного раствора системы N-KMX–наночастицы Ag (а) и соответствующая гистограмма (б).

ленных данных ПЭМ (рис. 4а) и соответствующей гистограммы (рис. 4б), построенной с применением компьютерного приложения DEAM [24], можно заключить, что в результате УФ-облучения образуются наночастицы серебра сферической формы, при этом содержание частиц размером 2–3 нм составляет 80%.

На вставке к рис. 4а показана микродифрактограмма, на основании которой определены межплоскостные расстояния 2.36, 2.04, 1.23, 1.17 Å, характерные для кристаллической решетки металлического серебра. Данные РФА пленок из нанокompозита на основе N-KMX–наночастицы Ag также подтверждают, что в составе нано-

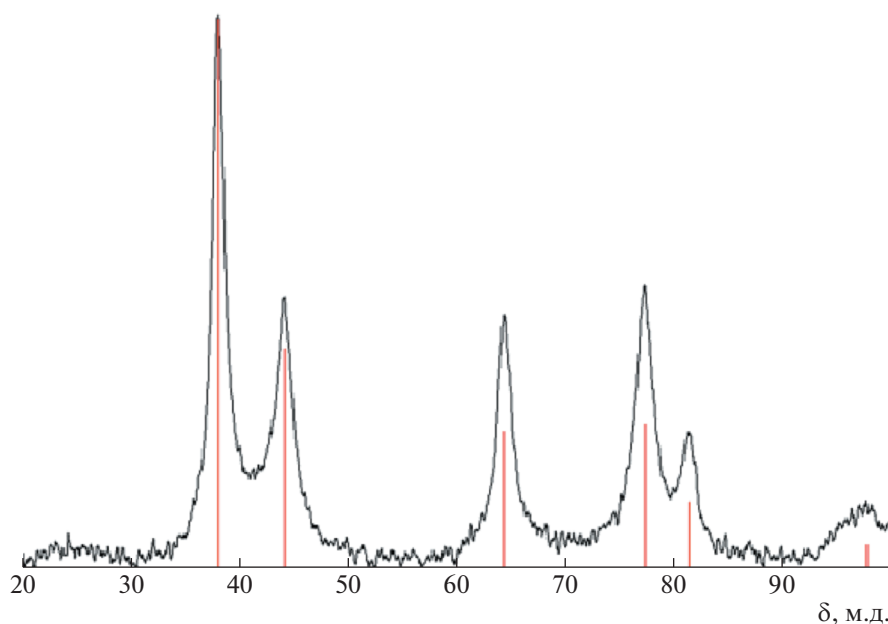


Рис. 5. Рентгенофазовый анализ пленки из нанокompозита.

композита содержится металлическое серебро (рис. 5).

Таким образом, при карбоксиметилировании хитозана в описанных условиях образуется водорастворимое производное, содержащее катионно- и аниогенные группы в боковой цепи полимера.

Результаты исследований морфологии и стабильности полученных наночастиц серебра подтверждают, что синтезированный N-КМХ является матрицей и стабилизатором при фотохимическом восстановлении ионов серебра в наночастицы.

Полученные нанокompозитные системы могут найти применение при разработке пленочных биodeградируемых покрытий для лечения открытых ран и ожогов, а также при создании антибактериальных препаратов (аэрозоли, мази, жидкие пластыри и другие материалы). Помимо этого такие нанокompозиты могут быть использованы в качестве имплантов для регенерации костных тканей [25–27].

Работа выполнена в рамках госзадания Института нефтехимического синтеза РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Помогайло А.Д., Джардималиева Г.И. Металлполимерные гибридные нанокompозиты. М.: Наука, 2015.
2. Wang S., Bai J., Li C., Zhang Y., Zhang J. // *Colloid Polym Sci.* 2012. V. 290. № 7. P. 667.
3. Nagarajan S., Mohana M., Sudhagar P., Raman V., Nishimura T., Kim S., Rajendran N. // *ACS Appl Mater Interfaces.* 2012. V. 4. № 10. P. 5134.
4. Dynich R.A., Zamkovets A.D., Ponyvin A.N. // *J. Belarusian State University. Physics.* 2018. № 2. P. 25.
5. Сергеев А.А., Мироненко А.Ю., Назиров А.Е., Леонов А.А., Вознесенский С.С. // *Журн. техн. физики.* 2017. Т. 87. № 8. С. 1264.
6. Bai B., Qiao Q., Li J., Hao J. // *Chin. J. Catal.* 2016. V. 37. P. 102.
7. Pandian C.J., Palanivel R., Dhananasekaran S. // *Chin. J. Chem. Eng.* 2015. V. 23. P. 1307.
8. Palza H. // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. № 1. P. 2099.
9. Hassan M. Ibrahim, Enas M.R. El-Zairy // *J. Appl. Pharm. Sci.* 2016. V. 6 (07). P. 043.
10. Barrera N., Guerrero L., Debut A., Santa-Cruz P. // *PLoS ONE* 2018. 13 (7). P. 1.
11. Madhu Kumar R., Lakshmeesha Rao B., Asha S., Narayana B., Byrappa K., Youjiang Wang, Donggang Yao, Sangappa Y. // *Adv. Mater. Lett.* 2015. V. 6. № 12. P. 1088.
12. Le Thi An Nhien, Nguyen Duc Luong, Le Thi Thuy Tien, and Le Quang Luan // *J. Nanomater.* 2018. P. 1.
13. Nguyen Thi Hiep, Huynh Chan Khon, Vo Van Thanh Niem, Vo Van Toi, Tran Ngoc Quyen, Nguyen Dai Hai, and Mai Ngoc Tuan Anh // *Int. J. Polym. Sci.* 2016. № 3. P. 11.
14. Milad Torabfam and Hoda Jafarizadeh-Malmiri // *Green Proc. Synth.* 2018. V. 7. P. 530.
15. Милушева Р.Ю., Рашидова С.Ш. Хитин, хитозан *Bombyx mori* и наносистемы на их основе. Ташкент: ФАН, 2016.
16. Yun G., Pan S., Wang TY., Guo J., Richardson JJ., Caruso F. // *Adv. Healthcare mater.* 2018. V. 7. № 5. P. 1700.

17. *Kiryukhin M.V., Sergeev B.M., Sergeev V.G., Prusov A.N.* // Polym. Sci. B. 2000. V. 42. № 5–6. P. 158.
18. *Muzzarelli R.A.* // Carbohydr. Polym. 1988. V. 23. P. 437.
19. *Muzzarelli R.A., Tanfani T., Emanuelli M., Mariotti S.* // Carbohydr. Res. 1982. V. 107. P. 199.
20. *Philippova J.E., Korchagina E.V., Volkov E.V., Smirnov V.A., Khokhlov A.R., Rinaudo M.* // Carbohydr. Polym. 2012. V. 87. P. 687.
21. *Сергеев Б.М., Кирюхин М.В., Бахов Ф.Н., Сергеев В.Г.* // Вест. МГУ. Сер. 2. Химия. 2001. Т. 42. С. 308.
22. *Пестов А.В., Ятлук Ю.Г.* Карбоксилалкилированные производные хитина и хитозана. Екатеринбург: УрО РАН, 2007.
23. *Помогайло А.Д., Розенберг А.С., Уфлян Т.д И.Е.* Наночастицы металлов в полимерах. М.: Химия, 2000.
24. Свидетельство 2019660702 № 2019616119 РФ. 2019. Реестр программ для ЭВМ.
25. *Станишевская И.Е., Стойнова А.М., Марахова А.И., Станишевский Я.М.* // Фармацевт. технология и нанотехнологии. 2016. № 1 (14). С. 66.
26. *Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г.* // Сибирское медицинское обозрение. 2018. № 4. С. 31.
27. *Nasef S.M., Khozemy E.E., Kamoun E.A., El-Gendi H.* // Int. J. Biolog. Macromol. 2019. V. 137. № 15. P. 878.