

УДК 615.074

ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛЕНКООБРАЗУЮЩИХ СУБСТАНЦИЙ ХИТОЗАНА

²Векшин Н.Л., ¹Глотова И.А., ¹Балабаев В.С., ¹Измайлов В.Н.

¹ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Воронеж;

²ФГБУН «Институт биофизики клетки РАН», Пущино, e-mail: nvekshin@rambler.ru

Хитозансодержащие субстанции востребованы в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности, где имеют перспективу при разработке барьерных технологий переработки животноводческой продукции. В соответствии с областями применения хитозансодержащих субстанций актуальна задача обоснования технологических параметров переработки хитинсодержащего сырья. С учётом специфики требований к физико-химическим и функциональным свойствам хитозансодержащих субстанций актуальна разработка средств и методов контроля целевых параметров, ключевыми из которых являются качественная идентификация и комплексное определение хитозана в составе пленкообразующих композиций и пленочных покрытий. В качестве хромофора для измерения поверхностного потенциала хитозановых субстанций использован 1-анилин-8-нафталинсульфат (АНС). Свободный краситель обладает весьма низкой интенсивностью флуоресценции, а связывание красителя с хитозаном приводит к кратному увеличению квантового выхода флуоресценции. Соотнесены параметры спектров флуоресценции хитозановых субстанций с их физико-химическими характеристиками (молекулярная масса, вязкость). Доказано, что максимум флуоресценции красителя в хитозановых пленках сдвигается в длинноволновую область спектра по сравнению с хитозановыми гелями, в связи с большей полярностью среды пленок по отношению к гелеобразным хитозановым субстанциям. Полученные с помощью флуориметрических исследований данные в дальнейшем могут быть использованы при разработке методики детекции хитозана с использованием АНС в качестве зонда.

Ключевые слова: хитозан, субстанции, спектры, флуоресценция, рассеивание

FLUORIMETRIC STUDY OF FILM-FORMING SUBSTANCES CHITOSAN

²Vekshin N.L., ¹Glотоva I.A., ¹Balabaev V.S., ¹Izmailov V.N.

¹FSBEI HPE «Voronezh State Agrarian University», Voronezh;

²FGRUN «Institute of cell Biophysics, Russian Academy of Sciences», Puschino, e-mail: nvekshin@rambler.ru

Chitosancontaining substances are used in medicine, veterinary medicine, food industry, where they have the prospect at the development of a barrier in technologies for processing of livestock products. In accordance with the applications of chitosancontaining substances it is actual the problem of substantiation of technological parameters of processing of chitin-containing raw material. Specific requirements for physico-chemical and functional properties of chitosancontaining substances make actual the means and methods of control of the target parameters, the key of which are qualitative identification and comprehensive determination of chitosan in the composition of film-forming compositions and films coatings. As the chromophore to measure the surface potential of the chitosan substances, we used 1-aniline-8-naphthalenesulfonate (ANS). Although the free dye has rather low intensity of fluorescence, the binding of the dye with chitosan leads to a multiple increase in the quantum yield of fluorescence. There have been correlated parameters of fluorescence spectra of chitosan substances and their physicochemical characteristics (molecular weight, viscosity). It is proved that the maximum fluorescence of the dye in chitosan films is shifted to longer wavelengths compared to chitosan gels, because of the increased polarity of the medium of films on the attitude to gel-like chitosan substances. The data obtained with the use of fluorimetric studies can later be used in the development of methods for the detection of chitosan with the use of ANS as a probe.

Keywords: chitosan, substance, spectrum, fluorescence, scattering

Пленкообразующие субстанции находят применение в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности [8]. Они перспективны при разработке биодegradуемых съедобных пленкообразующих материалов, обладающих барьерными свойствами. Этим требованиям отвечают структурные полимеры в составе панцирьсодержащего сырья (ПСС) гидробионтов — хитин и его простейшее производное хитозан, получаемый деацетилированием исходного биополимера (рис. 1). Барьерные свойства хитозановых субстанций обусловлены наличием у них бактериостатических и антиоксидантных свойств [3, 4].

Формовочные свойства хитозансодержащих субстанций зависят от молекулярной массы хитозана, степени его деацетилирования, массовой доли сухих веществ, природы и объемной доли органической кислоты в составе дисперсионной среды [6, 7].

Флуоресцентная спектроскопия является одним из высокочувствительных методов, позволяющих детектировать вещества в очень низких концентрациях с целью их идентификации. Она является чрезвычайно информативным методом, поскольку позволяет получать данные о структурных свойствах и ориентации, конформацион-

ной подвижности, комплексообразовании и в целом о межмолекулярных взаимодействиях. К достоинствам флуоресцентной спектроскопии относится также возможность неразрушающего контроля образца в ходе исследования [1, 2, 5].

Цель работы: обоснование условий идентификации хитозана в составе пленкообразующих субстанций с использованием методов флуоресцентной спектроскопии.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали образцы хитозана производства ЗАО «Биопрогресс» (ТУ 9289-067-00472124-03) с различной молекулярной массой: образец I ($M_m = 260$ кДа) и образец II ($M_m = 350$ кДа).

Пленкообразующие субстанции хитозана с массовой долей полимера 2% получали путем диспергирования в органических кислотах: уксусной, янтарной, молочной, лимонной. Использовали растворы кислот с массовой долей 2–4%.

Приготовление раствора 1-анилин-8-нафталинсульфоната (АНС): в связи с выраженным гидрофобным характером АНС в качестве растворителя использовали водно-спиртовой раствор с соотношением «спиртовая фаза: водная фаза – 1:9». Раствор АНС вносили в хитозановые дисперсии в дозировке 100 мкл на 2 см³ дисперсии.

Концентрацию АНС в образцах определяли спектрофотометрически на спектрофотометре «Промэк-лаб» в стеклянной кювете по воде, при длине волны 360 нм по следующей формуле:

$$c = \frac{D}{\epsilon l},$$

где ϵ – коэффициент экстинкции, l – длина кюветы.

Спектральные свойства хитозановых дисперсий и пленок изучали на флуоресцентном двухлучевом сканирующем спектрофотометре PERKIN ELMER Lambda 800. Спектры флуоресценции регистрировали при 20 °С в зеркальной кювете с длиной оптического пути 1 см в диапазоне 400–550 нм (при возбуждении на 370 нм) и 430–500 нм (при возбуждении на 380 нм). Светопропускающие щели устанавливали по 8 мм. Образцы для флуоресцентных исследований, содержащие хитозан и гидрофобный краситель с концентрацией $1 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³, инкубировали в течение 2–3 часов при 20 °С. Спектры флуоресценции растворов красителей и хитозансодержащих композиций вычитались из спектров флуоресценции образцов.

При определении степени поляризации использовали длины волн возбуждения 380 нм и излучения – 430 нм. Светопропускающие щели устанавливали по 8 мм.

Величину светорассеяния определяли на спектрофлуориметре аналогично предыдущим опытам (в зеркальных кюветах) при скрещенных монохроматорах: при одинаковой длине волны 560 нм (щель 8 нм в первом монохроматоре и 1 нм во втором) в канал регистрации попадал рассеянный свет, пропорциональный размерам частиц и их количеству.

Хитозановые пленочные покрытия готовили из хитозановых субстанций с добавлением АНС с концентрацией $1,56 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³ методом растекания на полиэтиленовой, либо стеклянной подложке с по-

следующим испарением кислоты на воздухе. Пленки выдерживали до испарения кислоты при комнатной температуре в течение 36–48 ч. Для исследования пленки наносились на покровные стекла и помещались в стеклянные кюветы по диагонали.

Спектры флуоресценции снимали в диапазоне 430–500 нм, при длине волны возбуждения 310 нм. Щели устанавливали по 5 нм на возбуждение и по 2,5 нм на излучение.

Результаты исследования и их обсуждение

В связи с тем что хитозан не обладает флуоресцирующими свойствами, была проведена работа по выбору хромофора, способного в наибольшей степени связываться с биополимером. При этом определяющим требованием к хромофору в случае детекции хитозана является его гидрофобный характер.

Гидрофобный хромофор будет связываться с гидрофобными участками на поверхности полимера. Изменение окружающего хромофор растворителя непосредственно влияет на спектр флуоресценции и поглощения, поэтому свободный и связанный красители можно различить оптическими методами. Если краситель заряжен, то поверхностный потенциал будет непосредственно влиять на сродство красителя к субстанции (положительно заряженные зонды связываются хитозаном сильно, отрицательно заряженные – слабо). При изменении поверхностного потенциала сродство красителя к поверхности будет меняться, что можно зарегистрировать по изменению его оптических свойств.

В качестве зондов для измерения поверхностного потенциала хитозановых субстанций использовали следующие флуорофоры: рибофлавин, родамин С и 1-анилино-8-нафталинсульфоната (АНС). Наилучшие результаты получены с использованием в качестве зонда высокочувствительного к изменениям поверхностного заряда полимера отрицательно заряженного красителя АНС.

В данном случае свободный краситель обладает крайне низкой интенсивностью флуоресценции. Уменьшение поверхностного заряда полимера приводит к увеличению связывания АНС и разгоранию его флуоресценции.

С помощью устройства, подключенного к ПК, снимали спектры излучения при возбуждении $\lambda_1 = 370$ нм и $\lambda_2 = 400$ нм.

Светорассеяние определяли в условных единицах по контролю – водно-спиртовому раствору хитозана (0) при $\lambda_1 = \lambda_2 = 560$ нм (щели на входе – по 8 мм, щели на выходе по 1 мм). Результаты представлены на рис. 2.

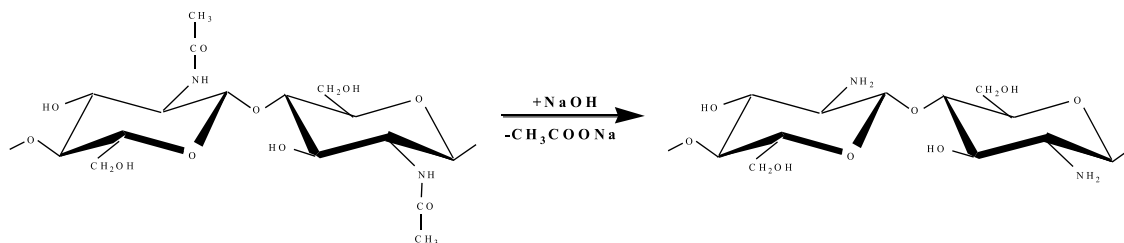
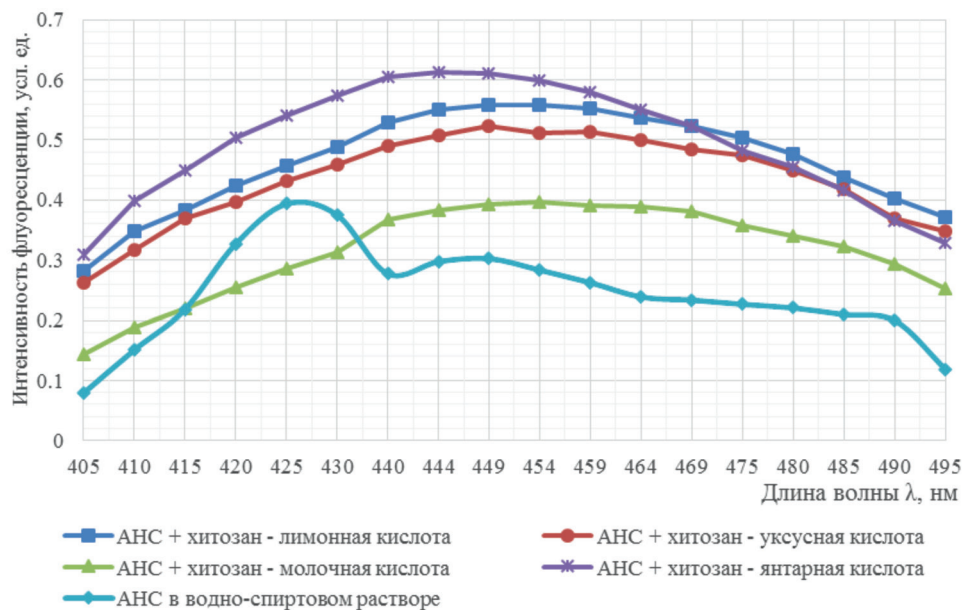
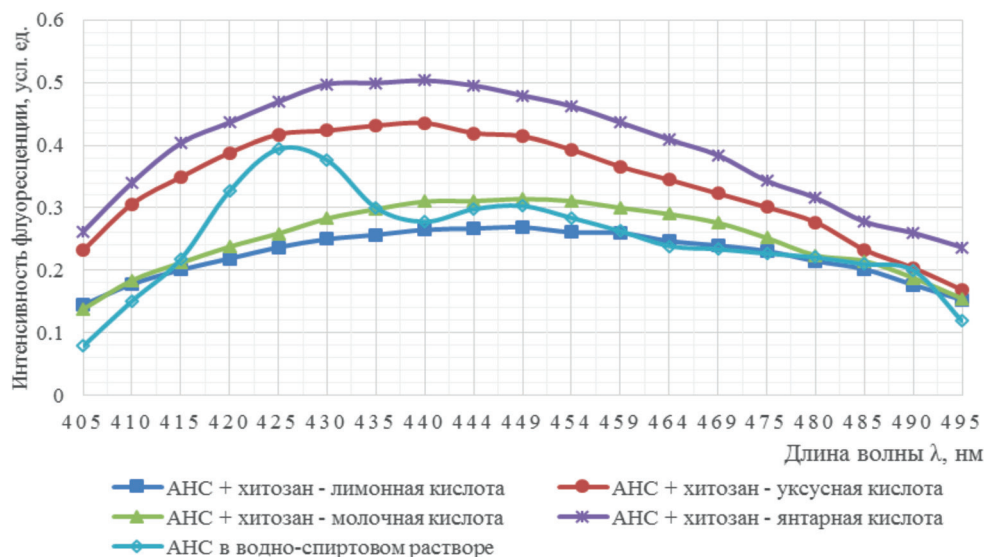


Рис. 1. Деацетилирование хитина с получением хитозана



а)



б)

Рис. 2. Спектры флуоресценции водно-спиртового раствора АНС в хитозановых дисперсиях: а – образец I; б – образец II

Спектральные характеристики кислоторастворимых субстанций хитозана

Вид системы	Молекулярная масса хитозана, кДа	Максимум флуоресценции, нм	Полуширина спектра	Рассеивание	Вязкость, Пуаз
АНС, водно-спиртовой раствор	—	425	85	0,01	—
АНС + хитозан – уксусная кислота	350	440	85	0,18	2,17
АНС + хитозан – лимонная кислота	350	450	95	0,17	2,08
АНС + хитозан – янтарная кислота	350	445	85	0,24	1,8
АНС + хитозан – молочная кислота	350	450	83	0,51	0,67
АНС + хитозан – уксусная кислота	260	445	102	0,11	2,43
АНС + хитозан – лимонная кислота	260	450	105	0,10	2,38
АНС + хитозан – янтарная кислота	260	450	95	0,12	1,86
АНС + хитозан – молочная кислота	260	455	95	0,24	0,51

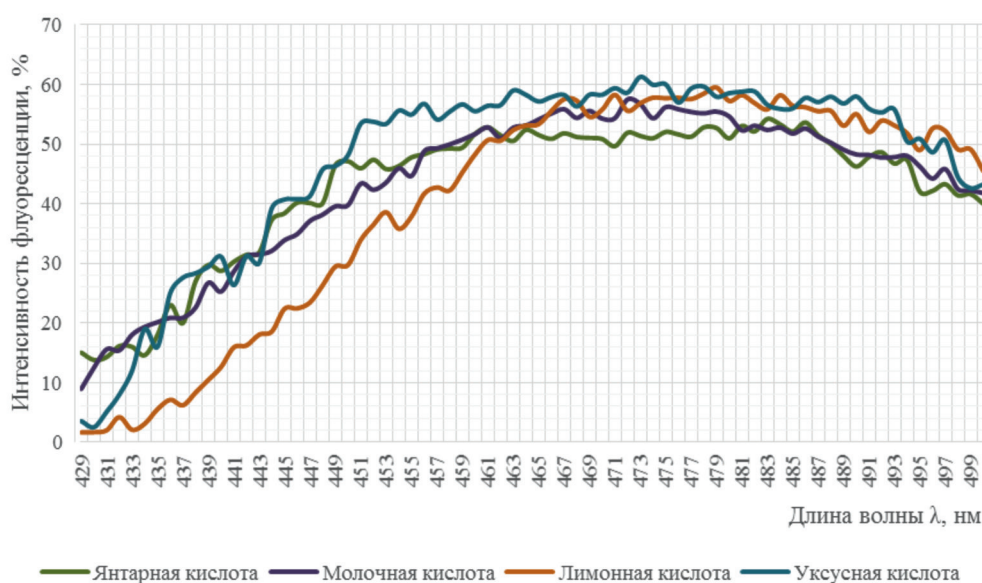


Рис. 3. Спектры флуоресценции АНС в хитозановых пленках, при формировании их из дисперсий в различных органических кислотах

Сдвиг максимума излучения в коротковолновую область по полученным графикам свидетельствует о том, что АНС практически полностью связался с молекулами хитозана. Установленный эффект впоследствии может быть использован при разработке методики детекции хитозана флуориметрическим способом.

Спектры водно-спиртового раствора АНС, приведенные на рис. 2, получены с увеличением чувствительности прибора в 100 раз, следовательно, по полученным выше спектрам можно сделать вывод, что интенсивность флуоресценции в хитозановых композициях в 100 раз выше, чем интенсивность флуоресценции водно-спиртового раствора АНС, что свидетельствует о связывании АНС с молекулами хитозана. Молеку-

лы красителя взаимодействуют с гидрофобными участками полимера. Неодинаковая интенсивность флуоресценции красителя в аналогичных хитозановых дисперсиях связана с различной молекулярной массой полимеров – образец I ($M_m = 260$ кДа), образец II ($M_m = 350$ кДа).

Соотношение спектральных характеристик полученных кислоторастворимых субстанций хитозана с его физико-химическими показателями представлено в таблице.

Установлено, что наиболее подходящим красителем для идентификации молекул хитозана спектральными методами является гидрофобный краситель 1-анили-8-нафтолинсульфанат (АНС). Он перспективен для использования в качестве зонда в спектральных методах детекции хитозана.

В хитозановых пленках среда более полярна, чем в гелях, поэтому краситель АНС находится в более полярной фазе, что подтверждается сдвигом спектра в длинноволновую область с максимумом флуоресценции 470–480 нм (рис. 3).

Заключение

Изучены спектральные характеристики хитозановых субстанций, полученных с применением водных растворов органических кислот в диапазоне концентраций 2–4%. Хитозановые субстанции получены в двух формах: дисперсии с массовой долей сухих веществ 2% и плёнки. Ввиду того, что сам по себе хитозан не обладает флуоресцирующими свойствами, обоснован выбор гидрофобного красителя, способного максимально связываться с гидрофобными участками молекулы хитозана – АНС. Результаты исследования могут быть положены в основу для разработки методики качественного и количественного определения хитозана методом флуоресцентной спектроскопии.

Список литературы

1. Векшин Н.Л. Флуоресцентная спектроскопия биополимеров: краткий учебный курс – Пушкино: Фотон-Век, 2008. – С. 168.
2. Воинов Ю.П. Разностная флуоресцентная спектроскопия структуры и состава биоактивных препаратов [Текст] / Ю.П. Воинов, В.С. Горелик, М.Ф. Умаров, С.В. Морозова // Краткие сообщения по физике Физического института им. П.Н. Лебедева Российской Академии Наук. – 2011. – № 11. – С. 13–19.
3. Кириллов О.И. Медико-биологические исследования в институте биологии моря ДВО РАН [Текст] / О.И. Кириллов // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. – 2005. – № 1. – С. 51–61.
4. Колеченко Е.А. Сравнительная оценка антиоксидантной активности некрахмальных полисахаридов: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Владивосток, 2004. – 24 с.
5. Перевошикова И.В. Флуоресцентная корреляционная спектроскопия в биологии, химии и медицине [Текст] / И.В. Перевошикова, Е.А. Котова, Ю.Н. Антоненко // Биохимия. – 2011. – Т. 76, № 5. – С. 613–635.
6. Хотимченко Ю.С. Фармакология некрахмальных полисахаридов [Текст] / Ю.С. Хотимченко, И.М. Ермак, А.Е. Бедняк, Э.И. Хасина, А.В. Кропотов, Е.А. Колечен-

ко, И.С. Сергушенко, М.Ю. Хотимченко, В.В. Ковалев // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. – 2005. – № 1. – С. 72–82.

7. Хотимченко Ю.С. Противоопухолевые свойства некрахмальных полисахаридов: фукоиданы, хитозаны [Текст] / Ю.С. Хотимченко // Биология моря. – 2010. – Т. 36, № 5. – С. 319–328.

8. Kumar M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications // React. Funct. Polym. – 2000. – Vol. 46. – P. 127.

References

1. Vekshin N.L. Fluorescentnaja spektroskopija biopolimerov: kratij uchebnyj kurs Pushhino: Foton-Vek, 2008. pp. 168.
2. Voinov Ju.P. Raznostnaja fluorescentnaja spektroskopija struktury i sostava bioaktivnyh preparatov [Tekst] / Ju.P. Voinov, B.C. Gorelik, M.F. Umarov, S.V. Morozova // Kratkie soobshhenija po fizike Fizicheskogo instituta im. P.N. Lebedeva Rossijskoj Akademii Nauk. 2011. no. 11. pp. 13–19.
3. Kirillov O.I. Mediko-biologicheskie issledovaniya v institute biologii morja DVO RAN [Tekst] / O.I. Kirillov // Vestnik Dalnevostochnogo otdelenija Rossijskoj aka-demii nauk. 2005. no. 1. pp. 51–61.
4. Kolenchenko E.A. Sravnitel'naja ocenka antioksidantnoj aktivnosti nekrakhmalnyh polisaharidov: Avtoref. dis. kand. biol. nauk. Vladivostok, 2004. 24 p.
5. Perevoshhikova I.V. Fluorescentnaja korrelyacionnaja spektroskopija v biologii, himii i medicine [Tekst] / I.V. Perevoshhikova, E.A. Kotova, Ju.N. Antonenko // Biohimija. 2011. T. 76, no. 5. pp. 613–635.
6. Hotimchenko Ju.S. Farmakologija nekrakhmalnyh polisaharidov [Tekst] / Ju.S. Hotimchenko, I.M. Ermak, A.E. Bednjak, Je.I. Hasina, A.V. Kropotov, E.A. Kolenchenko, I.S. Sergushenko, M.Ju. Hotimchenko, V.V. Kovalev // Vestnik Dalnevostochnogo otdelenija Ros-sijskoj akademii nauk. 2005. no. 1. pp. 72–82.
7. Hotimchenko Ju.S. Protivoopuholevye svojstva nekrakhmalnyh polisaharidov: fukoidany, hitozany [Tekst] / Ju.S. Hotimchenko // Biologija morja. 2010. T. 36, no. 5. pp. 319–328.
8. Kumar M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications // React. Funct. Polym. 2000. Vol. 46. pp. 127.

Рецензенты:

Кучменко Т.А., д.х.н., профессор, зав. кафедрой физической и аналитической химии, ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», г. Воронеж;

Селеменев В.Ф., д.х.н., профессор, член Российской экологической академии, зав. кафедрой аналитической химии, ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», г. Воронеж.