

МОДИФИКАЦИЯ ХИТОЗАНА ДИОКСИДОМ ТИОМОЧЕВИНЫ**Е.В. Найденко, С.В. Макаров, Е.А. Покровская, А.М. Никулин**

Екатерина Викторовна Найденко, Сергей Васильевич Макаров*, Елизавета Александровна Покровская, Антон Михайлович Никулин

Кафедра технологии пищевых продуктов и биотехнологии, Ивановский государственный химико-технологический университет, пр. Шереметевский, 7, Иваново, Российская Федерация, 153000

E-mail: makarov@isuct.ru*

Предложено использовать диоксид тиомочевина (ДОТМ, аминоиминометансульфиновую кислоту, формамидинсульфиновую кислоту) в процессах химической модификации хитозана. Взаимодействие диоксида тиомочевина с хитозаном в присутствии щелочи дает возможность получить гуанидированный хитозан, степень гуанидирования составляет 0,25-0,27. Показано, что модификация хитозана осуществляется в мягких условиях; увеличение отношения [ДОТМ]/[хитозан] слабо влияет на степень гуанидирования хитозана. Для доказательства изменения структуры хитозана при его взаимодействии с ДОТМ использовались методы УФ и ИК-спектроскопии, а также элементного анализа. Показано, что, в отличие от хитозана, его гуанидированное производное обладает бактерицидными свойствами в близких к нейтральным средах (рН 6,2) как по отношению к грамотрицательным, так и грамположительным микроорганизмам. Это объясняется частичной заменой аминок групп гуанидиновыми, находящимися в нейтральной среде преимущественно в протонированной форме. Для окислительной модификации хитозана использовалась система диоксид тиомочевина – пероксид водорода. Использование пероксида водорода в отсутствие ДОТМ, так и применение ДОТМ без добавления пероксида водорода не приводит к окислению хитозана. Окислительная модификация хитозана наблюдается лишь при их совместном присутствии. Для доказательства появления в структуре молекулы новых функциональных групп определено содержание карбоксильных групп в модифицированном и нативном хитозане титрованием гидроксидом натрия. Строение окисленного хитозана доказано также с использованием метода ИК-спектроскопии. Для определения влияния отношения [ДОТМ]/[H₂O₂] на степень модификации хитозана проведены эксперименты, в которых варьировалось количество диоксида тиомочевина при постоянном количестве пероксида водорода. Показано, что количество карбоксильных групп в полимере возрастает с ростом отношения [ДОТМ]/[H₂O₂].

Ключевые слова: хитозан, гуанидины, модификация, диоксид тиомочевина, пероксид водорода, окисление

MODIFICATION OF CHITOSAN BY THIOUREA DIOXIDE**E.V. Naidenko, S.V. Makarov, E.A. Pokrovskaya, A.M. Nikulin**

Ekaterina V. Naidenko, Sergei V. Makarov*, Elizaveta A. Pokrovskaya, Anton M. Nikulin

Department of Food Technology and Biotechnology, Ivanovo State University of Chemistry and Technology, Sheremetevskiy ave., 7, Ivanovo, 153000, Russia

E-mail: makarov@isuct.ru*

Thiourea dioxide (TDO, aminoiminomethanesulfinic acid, formamidinesulfinic acid) was used for the chemical modification of chitosan. The interaction of TDO with chitosan in the presence of alkali results in the guanidinylated chitosan, the substitution degree is 0.25-0.27 and does not depend largely on molar ratio of thiourea dioxide to chitosan. The structure of modified chitosan has been proved using UV and IR spectroscopy as well as elemental analysis. It is shown that

modification of chitosan proceeds under mild conditions. Contrary to chitosan, its guanidinylated derivative has biocidal properties against Gram-positive and Gram-negative bacteria in the aqueous solutions close to neutral (pH 6.2). It can be explained by the partial substitution of amino groups by guanidine groups existing predominantly in the protonated form in the neutral aqueous solutions. The system thiourea dioxide-hydrogen peroxide was used for the oxidative modification of chitosan. It is shown that thiourea dioxide and hydrogen peroxide separately do not oxidize chitosan but in the presence of their mixture the formation of carboxylic groups in chitosan has been observed. The quantity of carboxylic groups in the modified and native chitosan has been determined by the titration with sodium hydroxide. The presence of carboxylic groups has been proved also using IR spectroscopy. It is shown that the quantity of carboxylic groups increases with the increase of the ratio [TDO]/[chitosan].

Key words: chitosan, guanidines, modification, thiourea dioxide, hydrogen peroxide, oxidation

Для цитирования:

Найденко Е.В., Макаров С.В., Покровская Е.А., Никулин А.М. Модификация хитозана диоксидом тиомочевин. *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2021. Т. 64. Вып. 1. С. 73–78

For citation:

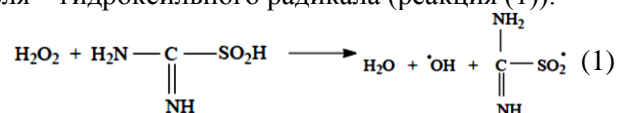
Naidenko E.V., Makarov S.V., Pokrovskaya E.A., Nikulin A.M. Modification of chitosan by thiourea dioxide. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* [ChemChemTech]. 2021. V. 64. N 1. P. 73–78

ВВЕДЕНИЕ

Хитин является одним из наиболее распространенных в природе полисахаридов. Основным недостатком, ограничивающим его непосредственное использование, является практически полная нерастворимость в воде. Его деацетилированное производное – хитозан растворим в разбавленных кислотах. Благодаря своим уникальным свойствам – биосовместимости с тканями человека, низкой токсичности, способности усиливать регенеративные процессы при заживлении ран, биоцидному эффекту – хитозан нашел широкое применение в медицине и пищевой промышленности [1-3]. Эти свойства хитозана, отличающие его от большинства других полисахаридов, обусловлены прежде всего его поликатионной природой вследствие наличия аминогрупп. Показано, что модификация хитозана, т.е. преобразование аминогрупп в другие группы при сохранении поликатионной природы способствует усилению биоцидных свойств хитозана [4]. Важным способом получения хитозана с более выраженными, чем у собственно хитозана, биоцидными свойствами является синтез гуанидированного полимера [4, 5]. Одним из наиболее эффективных гуанидирующих агентов является триоксид тиомочевин (аминоиминометансульфоновая кислота, формамидинсульфоновая кислота) $(\text{NH}_2)_2\text{CSO}_3$ [6, 7]. Это соединение было использовано, в частности, и для гуанидирования хитозана [4, 5]. Вызывает удивление, однако, тот факт, что для гуанидирования хитозана не применялся диоксид тиомочевин (аминоиминометансульфиновая кислота, формамидинсульфиновая кислота)

$(\text{NH}_2)_2\text{CSO}_2$ – коммерчески доступный крупнотоннажный, в отличие от триоксида тиомочевин, продукт, хотя сведения о его использовании для гуанидирования других аминсоединений в литературе имеются [6-9]. Настоящая работа выполнена с целью восполнить имеющийся пробел.

Помимо гуанидирования, возможно также окисление хитозана [10]. Для этой цели рекомендуется использовать гипохлорит натрия, смеси гипохлорита и ТЕМПО (2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидин оксоаммония) [10], персульфат и периодат натрия [11], аскорбат- и гидроксил-радикалы [12], а также фотокаталитическое окисление в присутствии TiO_2 [13]. Недавно нами показано [14], что система диоксид тиомочевин – пероксид водорода может быть использована для окисления крахмала. Эта система применялась также для иницирования полимеризации виниловых мономеров [15], для гидроксирования кумарина и терефталевой кислоты [16]. Система Fe^{2+} – H_2O_2 – ДОТМ использовалась для структурной и функциональной модификации целлюлозы [17]. В работах [14-16] показано, что взаимодействие ДОТМ и пероксида водорода приводит к образованию сильного окислителя – гидроксильного радикала (реакция (1)).



В настоящей работе изучена возможность применения этой системы для окисления хитозана.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использованы хитозан пищевой кислоторастворимый, ТУ 9289-067-00472124-03

(ООО «Биопрогресс»), молекулярная масса – 200 кДа, степень деацетилирования – 84%, содержание основного вещества 89,7%; диоксид тиомочевины (Sigma-Aldrich, содержание основного вещества 98%), 3% водный раствор пероксида водорода, спиртовой раствор фенолфталеина (1 г на 1 дм³ 90%-ного этилового спирта). Другие использованные в работе вещества имели марку «х.ч.». Все реактивы использовались без предварительной очистки. В качестве растворителя применялась дистиллированная вода.

ИК спектры получены на приборе Avatar 360 FT-IR ESP. УФ спектры снимали на приборе Shimadzu UV-1800 при комнатной температуре.

Для получения гуанидированного хитозана с использованием диоксида тиомочевины хитозан (5 г) суспендировали в 40 см³ 0,05 моль/л водном растворе гидроксида натрия. В полученный раствор медленно добавляли диоксид тиомочевины (в мольном отношении к хитозану 1:1 и 2:1), нагревали до 50 °С и выдерживали 30 мин при перемешивании. Далее смесь охлаждали до комнатной температуры, отфильтровывали на воронке Бюхнера, промывали фильтр водой и затем осадок высушивали при комнатной температуре. Степень гуанидирования определялась по результатам элементного анализа [4].

Для получения окисленного хитозана с использованием системы пероксид водорода – диоксид тиомочевины хитозан (13 г) суспендировали в 50 см³ дистиллированной воды, нагревали до 60 °С и выдерживали при перемешивании в течение 3-7 мин до получения однородного раствора. В полученный раствор добавляли 37,5 г 3% водного раствора пероксида водорода и необходимое количество диоксида тиомочевины (1; 4; 6; 8; 10; 50 мол.% от количества пероксида водорода), выдерживали при температуре 60 °С при перемешивании в течение 3 ч. Затем смесь охлаждали, разделяли на фильтре, осадок на фильтре промывали водой и сушили при комнатной температуре. Содержание карбоксильных групп в окисленном хитозане определяли титриметрическим методом по методике, предложенной для анализа состава окисленного крахмала [18].

Оценку бактериальной активности гуанидированного хитозана проводили в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*) микроорганизмов методом диффузии в агар. Метод диффузии в агар основан на способности антибиотических веществ диффундировать в агар и вызывать задержку, торможение и подавление роста тест-микроба [19]. На чашку Петри с плотной питательной

средой для соответствующих тестовых культур (грамположительных *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных *Escherichia coli*) нанесенных методом «Газон», стеклянной палочкой цилиндрической формы (8 мм), наносили испытуемые образцы полимера. Для этого торцом стеклянной палочки прикасались к определенному образцу полимера и переносили его на соответствующие тест-культуры, в соответствующую зону чашки Петри. Тест-образец гуанидированного хитозана сравнивали с контрольным образцом хитозана.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке представлены УФ спектры хитозана до и после его взаимодействия с диоксидом тиомочевины в присутствии NaOH. Из рисунка видно, что, в отличие от спектра исходного хитозана, в спектре этого вещества после взаимодействия с ДОТМ появляется максимум при 227 нм. Вид спектра 2 соответствует спектру гуанидированного хитозана, полученного ранее с использованием триоксида тиомочевины [4], хотя имеются некоторые различия в положении максимума поглощения – авторами [4] максимум поглощения зафиксирован при 233 нм.

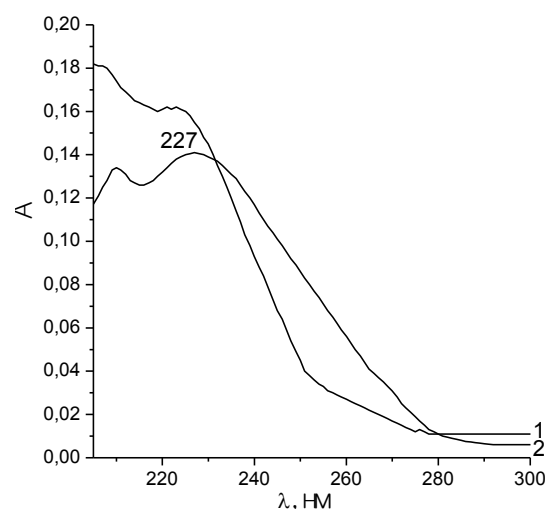


Рис. УФ спектры поглощения раствора исходного (1) и гуанидированного (2) хитозана [10^{-3} моль/л]
Fig. UV spectra of solutions of original (1) and guanidinylated (2) chitosan [10^{-3} моль/л]

Изменения в строении хитозана после его взаимодействия с ДОТМ в присутствии щелочи подтверждаются также данными ИК-спектроскопии (табл. 1). В спектре появляются новые максимумы поглощения при 1634 и 1549 см⁻¹, соответствующие валентным колебаниям связи C=N и деформационным колебаниям связи NH, соответ-

ственно [4]. Максимум при 3475 см⁻¹, соответствующий валентным колебаниям связей NH₂ и OH, смещается в область меньших частот (3438 см⁻¹). Максимум при 1600 см⁻¹, присутствующий в спектре хитозана и соответствующий деформационным колебаниям NH₂, в спектре гуанидированного хитозана отсутствует.

Таблица 1

Основные полосы поглощения (см⁻¹) в ИК спектре хитозана и гуанидированного хитозана

Table 1. The main absorption bands in IR-spectrum of chitosan and guanidylated chitosan

Хитозан [2]	Гуанидированный хитозан [2]	Хитозан (настоящая работа)	Гуанидированный хитозан (настоящая работа)
		680	600
1091	1071	898	896
1154	1114	1258	1250
	1380	1382	1379
1597	1555	1600	1549
			1634
	1649	2150	2150
3438	3413	3475	3438

Степень гуанидирования хитозана определяли на основании данных элементного анализа по величине отношения содержания углерода и азота [4] (табл. 2) – уменьшение этого отношения указывает на присутствие в этом продукте богатой азотом гуанидиновой группы. По величинам C/N рассчитана степень гуанидирования хитозана, которая составляет при мольном отношении хитозана и ДОТМ 1:1 0,25, а при мольном отношении 1:2 – 0,27. Полученные результаты показывают, что увеличение отношения [ДОТМ]/[хитозан] слабо влияет на степень гуанидирования хитозана. Аналогичные результаты были получены ранее при использовании триоксида тиомочевины [4].

Таблица 2

Содержание углерода и азота в хитозане и его гуанидированном производном

Table 2. Elemental analysis of chitosan and its guanidylated derivative

Исследуемое вещество	Содержание углерода и азота (экспериментальные данные), %		
	C	N	C/N
Хитозан	36,7	6,6	5,56
Гуанидированный хитозан ([хитозан]/[ДОТМ] = 1:1)	30,8	8,3	3,71
Гуанидированный хитозан ([хитозан]/[ДОТМ] = 1:2)	31,9	9,1	3,51

Таблица 3

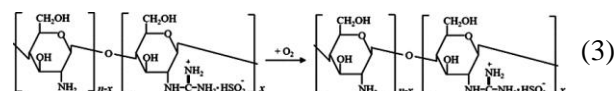
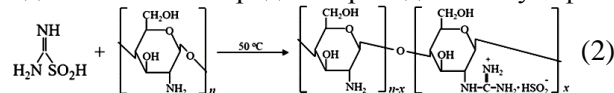
Биоцидная активность хитозана и его гуанидированного производного, pH 6,2

Table 3. Biocidal activity of chitosan and its guanidylated derivative, pH 6.2

Исследуемое вещество	Зона ингибирования, мм	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Хитозан	0	0
Гуанидированный хитозан	5,1	4,0

Табл. 3 показывает, что хитозан практически не проявляет биоцидные свойства в нейтральной среде. Это согласуется с данными других исследований [4, 20]. Наоборот, гуанидированный хитозан обладает бактерицидными свойствами в близкой к нейтральной среде как по отношению к грамотрицательным, так и грамположительным микроорганизмам. Это объясняется частичной заменой аминогрупп гуанидиновыми, находящимися в нейтральной среде преимущественно в протонированной форме.

Таким образом, приведенные выше результаты указывают на возможность использования диоксида тиомочевины в процессах получения гуанидированного хитозана (реакции 2, 3). По-видимому, на первой стадии реакции ДОТМ и хитозана образуется сульфоксилатная соль, которая при взаимодействии с кислородом переходит в бисульфит.



В настоящей работе изучена также возможность использования системы ДОТМ – пероксид водорода для окислительной модификации хитозана. Предварительно было установлено, что как использование пероксида водорода в отсутствие ДОТМ, так и применение ДОТМ без добавления пероксида водорода не приводит к окислению хитозана. Окислительная модификация хитозана наблюдается лишь при их совместном применении. Для доказательства появления в структуре молекулы новых функциональных групп определено содержание карбоксильных групп в модифицированном и нативном хитозане титрованием гидроксидом натрия. Для определения влияния отношения [ДОТМ]/[H₂O₂] на степень модификации хитозана были проведены эксперименты, в которых варьировалось количество диоксида тиомочевины при постоянном количестве пероксида водорода.

По окончании процесса окислительной модификации хитозана определялось содержание карбоксильных групп в полученном полимере (табл. 4). Как следует из данных табл. 4, количество карбоксильных групп в полимере с ростом $[ДОТМ]/[H_2O_2]$ возрастает.

Таблица 4

Зависимость содержания карбоксильных групп в модифицированном хитозане от молярного отношения диоксида тиомочевинны и пероксида водорода
Table 4. Dependence of carboxyl group content in the modified chitosan on molar ratio of thiourea dioxide to hydrogen peroxide

$[ДОТМ]/[H_2O_2]$	Количество карбоксильных групп в модифицированном хитозане (на 100 единиц)
0,01	9
0,04	20
0,06	25
0,08	28
0,1	30
0,5	51

Для изучения изменений, произошедших в молекуле хитозана после модификации, использовались также данные инфракрасной спектроскопии. Сопоставление ИК спектров исходного и модифицированного хитозана показывает, что, в отличие от ИК спектра хитозана, в спектре окисленного полимера появляется максимум при 1658 см^{-1} , соответствующий валентным колебаниям связи $C=O$ в карбоксильных группах; это свидетельствует о протекании окислительной модификации хитозана.

ВЫВОДЫ

Предложенные способы гуанидирования и окисления хитозана с использованием диоксида тиомочевинны (ДОТМ) и системы ДОТМ – пероксид водорода, соответственно, позволяют получать в мягких условиях модифицированный хитозан, содержащий гуанидиновые или карбоксильные группы. Степень гуанидирования слабо зависит от отношения $[ДОТМ]/[\text{хитозан}]$ и составляет 0,25–0,27. Наоборот, количество карбоксильных групп в полимере с ростом $[ДОТМ]/[H_2O_2]$ существенно возрастает. Показано, что, в отличие от хитозана, его гуанидированное производное обладает бактерицидными свойствами в близких к нейтральным средах (рН 6,2) как по отношению к грамотрицательным, так и грамположительным микроорганизмам.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований, грант № 19-33-90019.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant 19-33-90019.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Филлипс Г.О., Вильямс П.А. Справочник по гидроколлоидам. СПб.: ГИОРД. 2006. 536 с. Phillips G.O., Williams P.A. Handbook of hydrocolloids. SPb: GIORD. 2006. 536 p. (in Russian).
2. Omura Y., Shigemoto M., Akiyama T., Saimoto H., Shigemasa Y., Nakamura I., Tsuchido T. Antimicrobial activity of chitosan with different degrees of acetylation and molecular weights. *Biocontrol Sci.* 2003. V. 8. N 1. P. 25-30. DOI: 10.4265/bio.8.25.
3. Liu H., Du Y., Wang X., Sun L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int. J. Food Microbiol.* 2004. V. 95. N 2. P. 147-155.
4. Hu Y., Du Y., Yang J., Kennedy J.F., Wang X., Wang L. Synthesis, characterization and antibacterial activity of guanidylated chitosan. *Carbohydr. Polymers.* 2007. V. 67. N 1. P. 66-72. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.04.015.
5. He B., Shao Y., Liang M., Li J., Cheng Y. Biodiesel production from soybean oil by guanidylated chitosan. *Fuel.* 2015. V. 159. P. 33-39. DOI: 10.1016/j.fuel.2015.06.038.
6. Makarov S.V., Horváth A.K., Silaghi-Dumitrescu R., Gao Q. Sodium Dithionite, Rongalite and Thiourea Oxides. Chemistry and Application. Singapore: World Scientific. 2016. 219 p.
7. Makarov S.V., Horváth A.K., Silaghi-Dumitrescu R., Gao Q. Recent developments in the chemistry of thiourea oxides. *Chem. Eur. J.* 2014. V. 20. P. 14164-14176. DOI: 10.1002/chem.201403453.
8. Jursic B.S., Neumann D., McPherson A. Preparation of N-Formamidinylamino Acids from Amino and Formamidinesulfonic Acids. *Synthesis.* 2000. N 12. P. 1656-1658. DOI: 10.1055/s-2000-8201.
9. Shallu, Sharma M.L., Singh J. First total synthesis of a guanidine alkaloid Nitensidine D using immobilized ionic liquid, microwaves and formamidinesulfonic acid. *J. Chem. Sci.* 2014. V. 126. N 6. P. 1869-1874. DOI: 10.1007/s12039-014-0723-8.
10. Yoo S.-H., Lee J.-S., Park S.Y., Kim Y.-S., Chang P.-S., Lee H.-G. Effects of selective oxidation of chitosan on physical and biological properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 2005. V. 35. P. 27-31. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2004.11.004.
11. Zhang S., Feng J., Feng J., Jiang Y. Oxidation-mediated chitosan as additives for creation of chitosan aerogels with diverse three-dimensional interconnected skeletons. *Appl. Surface Sci.* 2017. V. 396. P. 1220-1225. DOI: 10.1016/j.apusc.2016.11.116.
12. Liu J., Pu H., Zhang X., Xiao L., Kan J., Jin C. Effects of ascorbate and hydroxyl radical degradations on the structural, physicochemical, antioxidant and film forming properties of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 114. P. 1086-1093. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.021.

13. **Jawad A.H., Nawi M.A., Mohamed M.H., Wilson L.D.** Oxidation of Chitosan in Solution by Photocatalysis and Product Characterization. *J. Polym. Environ.* 2017. V. 25. N 3. P. 828-835. DOI: 10.1007/s10924-016-0867-3.
14. **Покровская Е.А., Макаров С.В., Аманова А.В., Кудрик Е.В.** Получение модифицированного крахмала с использованием системы пероксид водорода – диоксид тиомочевин. *Журн. прикл. химии.* 2019. Т. 92. Вып. 11. С. 1416-1419. DOI: 10.1134/S1070427219110077.
Pokrovskaya E.A., Makarov S.V., Amanova A.V., Kudrik E.V. Production of Modified Starch Using System Hydrogen Peroxide – Thiourea Dioxide. *Russ J. Appl. Chem.* 2019. V. 92. N11. P. 1513-1516. DOI: 10.1134/S1070427219110077.
15. **Hebeish A., El-Rafie M.H., Waly A., Moursi A.Z.** Craft copolymerization of vinyl monomers onto modified cotton. IX. Hydrogen peroxide – thiourea dioxide redox system induced grafting of 2-methyl-5-vinylpyridine onto oxidized cellulose. *J. Appl. Polymer Sci.* 1978. V. 22. N 7. P. 1853-1866. DOI: 10.1002/app.1978.070220709.
16. **Молодцов П.А., Макарова А.С., Макаров С.В., Кузнецова А.А., Коифман О.И.** Взаимодействие диоксида тиомочевин и пероксида водорода с кумарином. *Журн. общей химии.* 2018. Т. 88. № 6. С. 905-908. DOI: 10.1134/S1070363218060063.
17. **Molodtsov P.A., Makarova A.S., Makarov S.V., Kuznetsova A.A., Koifman O.I.** Reaction of thiourea dioxide and hydrogen peroxide with coumarin. *Russ J. Gen. Chem.* 2018. V. 88. N 6. P. 1086-1089. DOI: 10.1134/S1070363218060063.
18. **Guo L., Li D., Lennholm H., Zhai H., Ek M.** Structural and functional modification of cellulose nanofibrils using graft copolymerization with glycidyl methacrylate by Fe²⁺ - thiourea dioxide – H₂O₂ redox system. *Cellulose.* 2019. V. 26. N 8. P. 4853-4864. DOI: 1007/s10570-019-02411-2.
19. **Parovuori P., Hamunen A., Forssell P., Autio K., Poutanen K.** Oxidation of Potato Starch by Hydrogen Peroxide. *Starch.* 1995. V. 47. N 1. P. 19-23. DOI: 10.1002/star.19950470106.
20. **Елинов Н.П.** Основы биотехнологии. СПб: Наука. 1995. 601 с.
Elinov N.P. Bases of biotechnology. SPb: Nauka. 1995. 601 p. (in Russian).
21. **Helander I.M., Nurmiho-Lassila E.L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller S.** Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2001. V. 71. N 2-3. 235-244. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00609-2.

Поступила в редакцию 23.06.2020
Принята к опубликованию 14.09.2020

Received 23.06.2020
Accepted 14.09.2020