

Специализированный учебно-научный центр (факультет) — школа-интернат
имени А.Н. Колмогорова Московского государственного университета имени
М.В. Ломоносова

КУРСОВАЯ РАБОТА / КУРСОВОЙ ПРОЕКТ

**"Криоструктурированные широкопористые губки на основе хитозана в
качестве сорбентов ионов тяжелых металлов"**

Емельянова Елизавета Алексеевна,
10 «Н»

Руководитель: Инженер-исследователь
ИНЭОС РАН Звукова Наталья Дмитриевна

Москва, 2018

Введение

Получение новых эффективных сорбентов имеет первостепенное значение для решения экологических проблем, связанных с превышением предельно допустимой концентрации токсичных соединений в природных водах, используемых в системах водоснабжения городов и в рыбо-хозяйственных предприятиях. В промышленно развитых регионах России в связи с повышенным загрязнением водных источников вопрос усовершенствования сорбционных технологий водоочистки особенно актуален. В системах водоподготовки в основном используются традиционные сорбенты, в частности активированный уголь, однако в настоящее время перспективным является применение полимерных сорбентов и композитов на их основе.

Хитозан является нетоксичным, биоразлагаемым и биосовместимым полимером. Наличие в его составе аминогрупп обеспечивает возможность образования комплексов с ионами тяжелых металлов. Особый интерес представляют криоструктураты [1] на основе хитозана, благодаря простоте получения и уникальной пористой структуре.

В связи с актуальностью поиска новых полимерных сорбентов **целью нашей работы** является получение криоструктурированных макропористых материалов на основе хитозана, эффективных в процессах сорбции ионов тяжелых металлов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

- 1) получение образцов широкопористых криоструктуратов при «оптимальных» условиях;
- 2) определение длин волн, в которых наблюдаются максимумы поглощения для водных растворов исследуемых солей тяжелых металлов;
- 3) определение молярных коэффициентов светопоглощения;
- 4) определение величины сорбционной емкости хитозановых структуратов.

Литературный обзор

Хитозан: получение, свойства, применение

Хитозан[2] является катионным блочным полимером, состоящим из $\beta(1-4)$ -2-ацетиламино-2-деокси- β -D-глюкопиранозы и 2-амино-2-деокси- β -глюкопиранозы. По внешнему виду хитозан представляет собой чешуйки размером менее 10мм или порошки, от белого до кремового цвета, часто с розоватым, сероватым или желтоватым оттенком, без запаха. Хитозан гигроскопичен, поэтому хранится в герметичной светонепроницаемой упаковке в сухих помещениях при комнатной температуре.

Получают хитозан путем деацелирования природного хитина, в природе встречается в клеточных стенках клеток грибов отдела *Zygomycota* (в комплексе с хитином).

Хитин[2] — природное соединение из группы азотсодержащих полисахаридов. По своей структуре он близок к целлюлозе и только ей уступает по распространенности в природе. Потенциальные источники хитозана разнообразны. Наиболее доступным для масштабного получения источником хитина являются панцири промысловых ракообразных. Возможно также использование скелетной пластинки кальмаров, сепиона каракатицы, биомассы мицелиарных и высших грибов. Одомашненные и поддающиеся размножению насекомые тоже могут служить источником получения хитина.

Процесс деацетилирования хитина проводят с помощью концентрированных щелочей при повышенных температурах (Рис. 1).

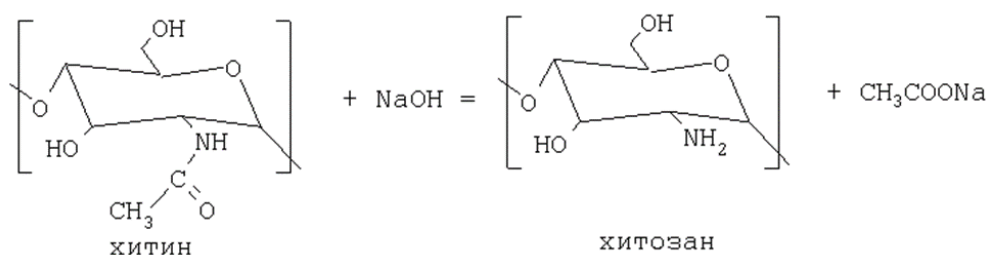


Рис.1 Схема получения хитозана из хитина

Первым опытом получения хитозана было сплавление хитина с твердой щелочью при 180°C. Этим способом получали продукт со степенью деацетилирования 95%, но значительно деструктурированный.

Наиболее распространено деацетилирование растворами щелочей 30-50%-ной концентрации, поскольку оно является более мягким.

Количество остаточных ацетильных групп в хитозане может достигать 30%. Характер распределения ацетильных групп по цепи полимера может заметно влиять на физико-химические свойства хитозана.

Хитин не растворим в воде, разбавленных кислотах, щелочах, спиртах и других органических растворителях. Он растворим в концентрированных растворах соляной, серной и муравьиной кислот, а так же в некоторых солевых растворах при нагревании, но при растворении заметно деполимеризуется. В растворе N-метил-2-пирролидона и хлористого лития хитин разрушается без разрушения полимерной структуры.

Хитозан также не растворим в воде, но растворим в подкисленных водных растворах (рН=4.0) и органических кислотах (уксусная, молочная и т.д.).

Хитозан — нетоксичный, биоразлагаемый, биосовместимый полимер, обладающий широким спектром биологической активности, включая антимикробную. По своим биохимическим свойствам хитозан близок к функциональным качествам дермы *in vivo*. В процессе получения хитозан практически полностью утрачивает антигенность, обладает антитромбогенной способностью и усиливает процессы регенерации поврежденной ткани. Все это позволяет рассматривать хитозан в качестве перспективного полимера для создания материалов для биомедицины и биотехнологии [3,4].

В статье [3] сообщается о получении катехол-хитозановых гидрогелей, сшитых дженипином. Добавление катехола позволило повысить и без того хорошие мукоадгезивные свойства хитозана. Данные материалы предполагается использовать в медицине для пролонгированного высвобождения лекарств (в качестве модельного был выбран моногидрат гидрохлорида лидокаина). Авторами [4] были получены кератин-хитозановые пленки путем литья растворов хитозана и кератина в 75%-ной уксусной кислоте на полипропиленовую подложку с последующей сушкой. Поскольку пленка на основе кератина оказалась очень хрупкой, механические свойства пленки регулировались количеством хитозана и добавлением глицерина. Данные пленки показали себя хорошими субстратами для культивирования клеток млекопитающих.

Также широко известно применение хитозана в качестве сорбента текстильных красителей[5-7] и ионов металлов тяжелых металлов[6, 10]. В работе [5] были получены и исследованы адсорбенты на основе порошка-хитозана с добавлением природных масел. Данные материалы были признаны эффективными для удаления красителей метиленового синего и Remazol Red из водных сред. Авторами [6] были получены композитные адсорбенты на основе хитозана и лигнина. Композит состава хитозан:лигнин = 50:50 показал практически абсолютную сорбционную способность в отношении ионов Cr (VI) и антрахиноновому красителю Remazol Brilliant Blue R. Также этот адсорбент оказался

активен в отношении других антрахиноновых, моноазидных и трифенилметановых красителей. В работе [7] ученые сообщают о получении терполимера на основе хитозана, акриламида и лигнина с помощью микроволнового метода. Варьированием соотношения компонентов, удалось достичь эффективности удаления способом флокуляции красителей реактивного оранжевого С-3R и метилового оранжевого 99,3% и 67,0% соответственно.

Криогели и криоструктураты на основе хитозана

На основе хитозана создается огромное количество материалов: пленки, волокна, смеси, гидрогели и тд. В отдельную группу можно выделить гели и структураты на основе хитозана, полученные в криогенных условиях [1]. Характерной особенностью различных полимерных криогелей является их гетерофазная и гетеропористая морфология. Кроме того, образующиеся макропоры обычно сообщаются, что объясняется особенностью роста кристаллов от периферии к центру до соприкосновения с гранью другого кристалла.

Криогенной обработкой называют подходящий режим замораживания, выдерживания в замороженном состоянии и оттаивания соответствующих исходных систем.

Криотропное гелеобразование — специфическое гелеобразование, которое происходит в результате криогенной обработки исходных систем, потенциально способных к желированию. При замораживании исходной системы основная масса растворителя кристаллизуется. Незамерзшие жидкие зоны называют незамерзшей жидкой микрофазой (НЖМФ). Там молекулы обладают высокой подвижностью. В НЖМФ концентрируются при условии достаточной растворимости компоненты исходного раствора и продукты реакций, если таковые происходят. Объем НЖМФ зависит от температуры замороженной системы, режима заморозки, концентрации исходных и уже набухших компонентов, природы растворителя и наличия примесей в исходных веществах. После оттаивания замороженного препарата получается макропористый криогель, содержащий крупные поры различной величины и геометрии. В этом случае порообразователями являются поликристаллы замороженного растворителя. Плавление или растворение указанных пороенов после разморозки оставляет в массе криогеля полости, заполняющиеся растаявшим растворителем. Силы поверхностного натяжения искривляют поверхность стенок макропор, которые принимают округлую форму вместо ограненной.

Образование фазы полимерного геля может происходить на одной из стадий криогенной обработки: либо непосредственно во время замерзания исходной системы,

либо во время выдерживания образцов в замороженном состоянии, либо в ходе оттаивания замороженных препаратов.

Существует несколько типов криогелей [1]:

- 1) криогели, образующиеся при реакциях полимеризации и поликонденсации;
- 2) формирование криогелей в системах «растворитель – полимер – сшивающий агент»;
- 3) ионные криогели;
- 4) криогели с физической сеткой полимерной фазы.

В нашей работе мы будем получать хитозановые криоструктуры ионного типа. При получении таких криогелей при одновременном смешении всех компонентов происходит преждевременное гелеобразование до процесса криогенной обработки, что мешает получению однородного материала требуемой формы. Для предотвращения этой проблемы было предложено использовать прием криоструктурирования, при котором в процессе криогенной обработки получают структурированный каркас, а гелевая сетка образуется после при обработке специальными агентами в среде нерастворителя полимера[9]. Так, при прибавлении по каплям уксуснокислого раствора хитозана к охлажденному до -15°C октану образуются замороженные сферические частицы, обработка которых при отрицательной температуре насыщенным раствором NaOH в ацетоне или метаноле приводит к гранулированному макропористому хитозану-основанию.

Обсуждение результатов

Формирование хитозановых криоструктуратов

В данной работе были получены широкопористые губки на основе растворимой в воде уксуснокислой соли линейного полисахарида хитозана, полимерная цепь которого состоит из β -1,4-связанных остатков D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина [2]. Он является продуктом деацетилирования природного полимера хитина.

Для формирования материалов использовали метод криоструктурирования, в котором на первом этапе путем замораживания растворов исходных полимеров при умеренно низких температурах с последующей лиофилизацией формируется криоструктурированный полимерный каркас, а затем переводится в нерастворимое состояние обработкой специальными сшивающими агентами (дженипин, глутаровый альдегид) или переводом солевой формы хитозана в форму хитозан-основания. Для целей данной работы представляет интерес хитозан-основание, NH_2 -группа которого имеет неподеленную электронную пару и способна координироваться с ионами тяжелых металлов (рис. 2) [10]. Перевод в основную форму осуществляли с помощью спиртового раствора водного аммиака.

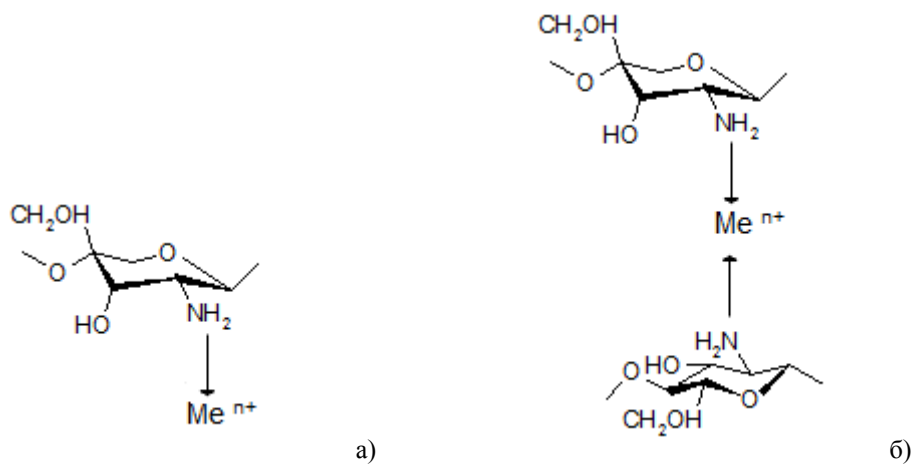


Рис.2 Модели комплексов (а- маятниковая, б - мостиковая)



Рис.3 Схема перевода хитозанового криоструктурата из водорастворимого состояния в водонерастворимое

Предварительно проведенные в лаборатории криохимии био(полимеров) ИНЭОС РАН исследования выявили «оптимальные» условия формирования полисахаридных криоструктуратов – концентрация полимера в исходном растворе 30 г/л и температура криогенной обработки -20°C.

Морфология полученных образцов, исследованная с помощью сканирующей электронной микроскопии, представлена на рис. 4.

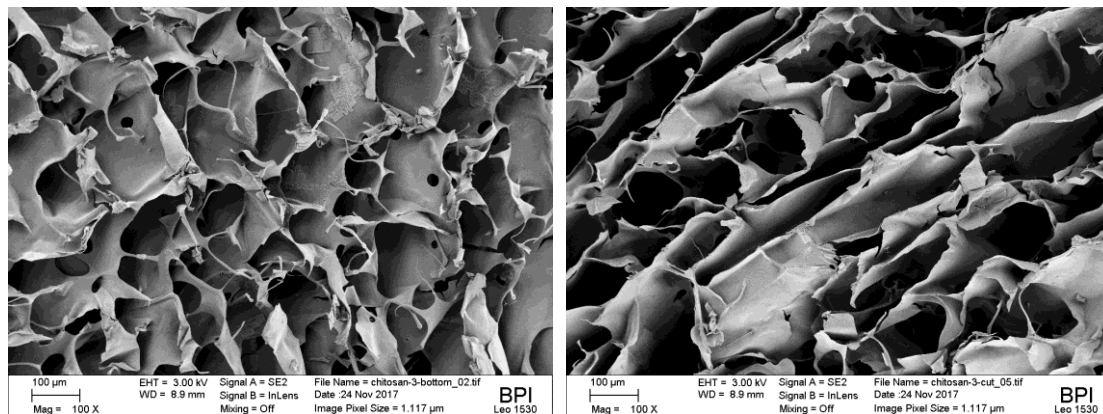
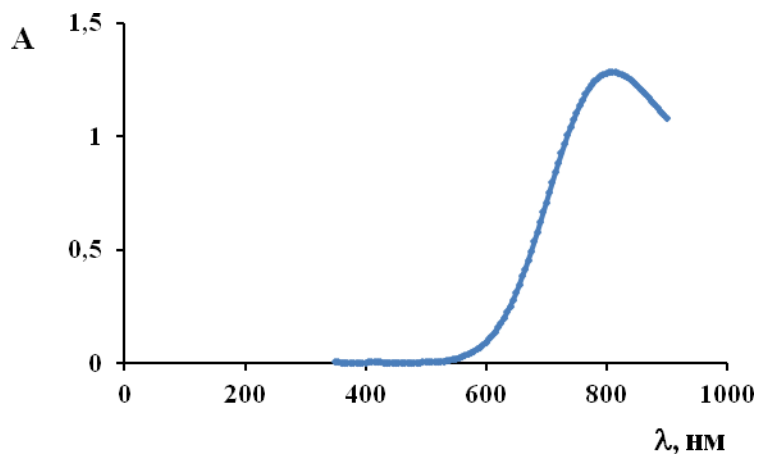


Рис. 4. Микрофотографии хитозановых криоструктуратов

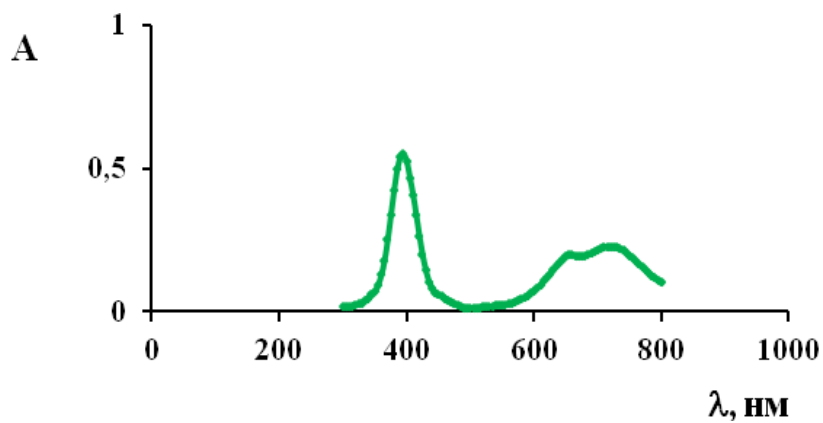
Изучение сорбции ионов тяжелых металлов хитозановыми криоструктуратами

В основе фотометрического метода анализа лежит избирательное поглощение света частицами (молекулами или ионами) вещества в растворе, при некоторых длинах волн светопоглощение происходит интенсивно, а при некоторых свет не поглощается.

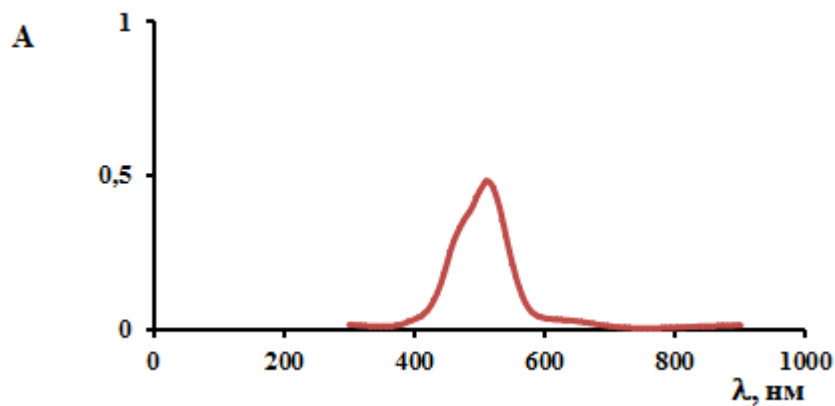
Изучение процессов сорбции ионов тяжелых металлов хитозановыми криоструктуратами начали с выбора оптимальной длины волны в видимой области поглощения света, при которой наблюдается максимум поглощения. Для этого приготовили стандартные 0,1 М растворы солей $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$. С помощью проведения измерений на спектрофотометре были получены зависимости поглощения света полученными растворами от длины волны (рис. 5). В случае Cu^{2+} и Co^{2+} в видимой области наблюдалось только по одному пику (при длинах волн 800 нм и 510 нм, соответственно). В случае Ni^{2+} - два пика (при длинах волн 400 и 720 нм). Поскольку при 400 нм величина поглощения была наибольшей, то дальнейшие измерения для Ni^{2+} проводили при этой длине волны.



а



б



в

Рис.5 Зависимости величин поглощения света растворами ионов (а - Cu^{2+} , б - Ni^{2+} , в - Co^{2+}) от длины волны

Основным законом поглощения света является закон Ламберта-Бугера-Бера:

$$A = \varepsilon cl,$$

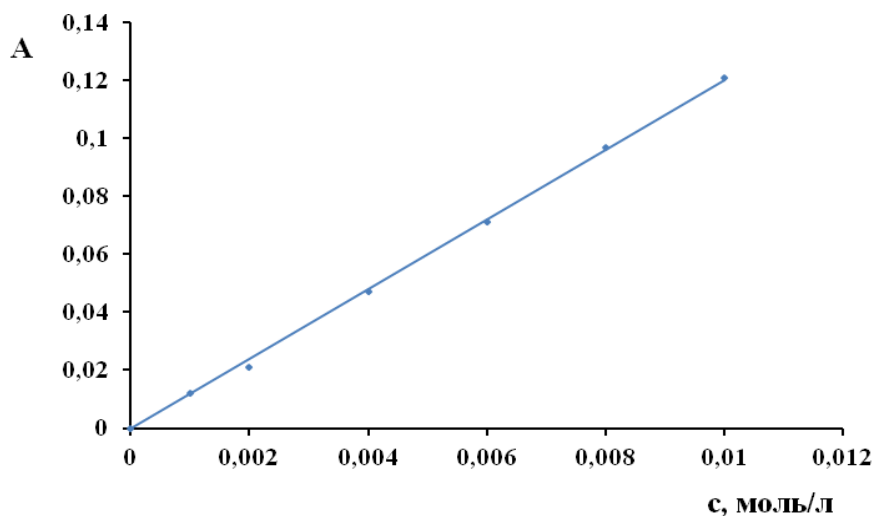
где A – оптическая плотность раствора, c – концентрация, моль/л; l – толщина поглощающего слоя, см; ε - молярный коэффициент светопоглощения при данной длине волны.

Молярный коэффициент светопоглощения характеризует чувствительность реакции и является постоянной величиной для данного окрашенного соединения.

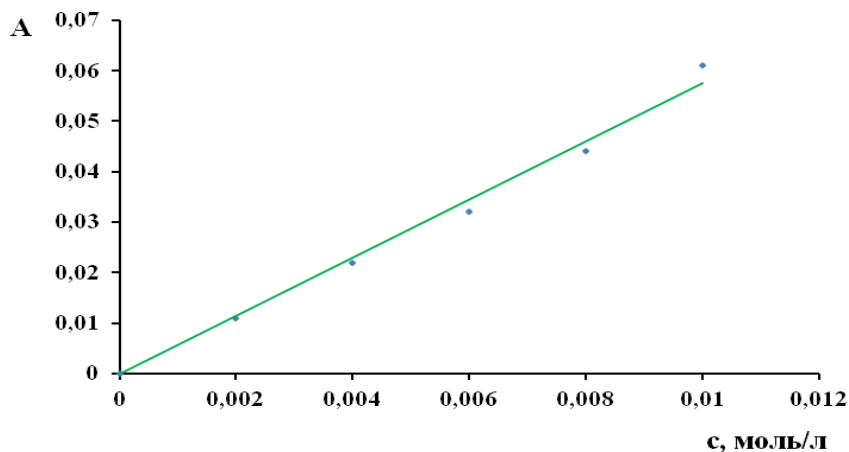
Закон Бугера – Ламберта – Бера справедлив только для разбавленных растворов.

Для определения молярного коэффициента светопоглощения были построены графики зависимостей оптических плотностей раствора от концентраций (рис. 6). Растворы готовили путем разбавления стандартных 0,1 М растворов. В случае разбавления растворов Cu^{2+} наблюдалось помутнение, что свидетельствует о гидролизе. Для предотвращения гидролиза растворы Cu^{2+} подкисляли 0,1 М раствором HCl до $\text{pH}=5$.

Тангенс угла наклона полученных прямых представляет собой молярный коэффициент светопоглощения. Для ионов Cu^{2+} его величина составила 12,00, для Co^{2+} – 4,40, для Ni^{2+} – 5,75.



а



б

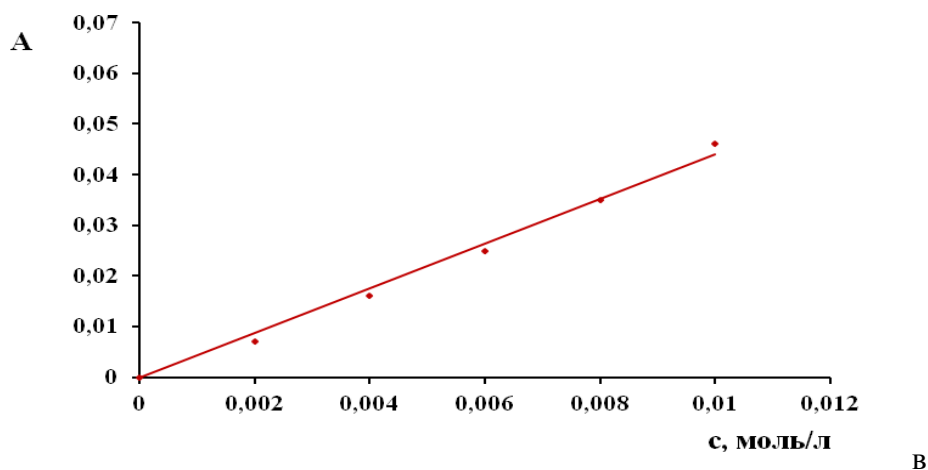


Рис.6 Зависимости величин поглощения света растворами ионов (а - Cu^{2+} , б - Ni^{2+} , в - Co^{2+}) от концентрации соли в растворе

Для определения сорбционной емкости хитозановых криоструктуратов использовали статический метод. Навески сорбента помещали в 0,01М водные растворы анализируемых ионов, получаемые разбавлением стандартных 0,1М растворов. Процесс сорбции вели в течение 2 ч. При проведении эксперимента в течение более длительного отрезка времени (до 10 ч) изменения величин поглощения света не обнаружено. Опыты проводили при двух значениях рН - 5 и 7. При значениях рН=4 и ниже наблюдается растворение хитозанового сорбента. При разбавлении 0,1М раствора Cu^{2+} наблюдалось помутнение, что свидетельствует о протекании реакции гидролиза, поэтому сорбцию ионов Cu^{2+} осуществляли только из растворов рН=5. Сорбционная емкость хитозановых криоструктуратов по отношению к ионам Cu^{2+} составила 1,1 ммоль/г. Величины сорбционных емкостей сорбента по отношению к ионам Ni^{2+} при рН=7 и рН=5 оказались идентичными и составили 1,0 ммоль/г. Сорбция ионов Co^{2+} на данном сорбенте не наблюдалась.

Экспериментальная часть

Материалы. В работе без дополнительной очистки использовались следующие вещества: ацетат хитозана, водный раствор аммиака (чда, ООО «Сигма Тек», Россия), 95%-ный этиловый спирт (ректификат), соляная кислота 38% («Реахим», Россия), пятиводный сульфат меди (II) («Реахим», Россия), шестиводный хлорид кобальта (II) («Реахим», Россия), шестиводный хлорид никеля (II) («Реахим», Россия), дистиллированная вода.

Оборудование. Замораживание образцов осуществляли в одноразовых медицинских пластиковых чашках Петри (ОАО «Медполимер», Россия) в камере криостата Proline RP 1840 («Lauda», Германия).



Рис.7. Криостат Proline RP 1840 («Lauda», Германия)

Для удаления растворителя из замороженных структуратов использовали лиофилизатор Alpha 1-2 LD plus («Martin Christ», Германия).



Рис.8. Лиофилизатор Alpha 1-2 LD plus («Martin Christ», Германия)

Измерения оптических плотностей растворов проводили с помощью спектрофотометра



Рис.9. Спектрофотометр T70 UV/VIS Spectrometr («PG Instruments Ltd», Великобритания)

Методика получения криоструктуратов. Для формирования полисахаридных криоструктуратов готовили растворы 0,3 г ацетата хитозана в 10 мл дистиллированной воды. Растворы фильтровали через пористый фильтр Шотта. В одноразовые пластиковые чашки Петри (внутренний диаметр 38 мм) помещали по 2,2 г раствора полимера так, чтобы толщина будущего криоструктурата составляла ~ 2 мм. Затем чашки помещали в камеру криостата и выдерживали 1 час при температуре -20°C . Из криостата образцы быстро переносили в лиофилизатор и сушили в течение 12 ч при давлении 0,040 мбар. Полученные сухие хитозановые криоструктураты обрабатывали спиртовым раствором водного аммиака. Затем образцы промывали этиловым спиртом и высушивали на вакууме при давлении 1 мм рт.ст.

Методика проведения спектрофотометрических измерений.

Определение оптимальной длины волны. Для получения стандартных 0,1 М растворов солей 2,50 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 2,38 г $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 2,38 г $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ растворяли в 50 мл дистиллированной воды, переносили в мерные колбы на 100 мл и доводили водой до метки. По 3 мл каждого раствора помещали в кювету и измеряли оптическую плотность растворов при длинах волн от 300 до 800 нм с шагом в 1 нм. В качестве раствора сравнения использовали дистиллированную воду. Оптимальные значения длин волн соответствуют максимумам величин поглощения в видимой области.

Определение коэффициента экстинкции. Для определения коэффициента экстинкции строили график зависимости поглощения света растворами солей от концентраций растворов. Для получения растворов с концентрациями 10^{-3} – 10^{-2} М отбирали аликвоты стандартных 0,1 М растворов солей, помещали в мерные колбы на 100 мл и доводили водой до меток.

Коэффициент экстинкции вычисляли по формуле:

$$\varepsilon = \Delta A / \Delta c = \text{tga},$$

где ε - коэффициент экстинкции, A - поглощение, c - концентрация (моль/л), $\operatorname{tg}\alpha$ – тангенс угла наклона калибровочной прямой.

Определения сорбционной емкости хитозановых криоструктуратов. Сорбционную емкость хитозановых криоструктуратов определяли статическим методом. В герметичные бюксы с притертыми крышками наливали по 5 мл 0,01 М растворов исследуемых солей. В каждый бюкс помещали навески сорбента и оставляли на 2 часа. Затем криоструктурат извлекали из раствора и с помощью спектрофотометра измеряли поглощение света раствором.

Изменение концентрации раствора вычисляли по формуле:

$$\Delta c_x = (A_1 - A_2) / \varepsilon,$$

где ε - коэффициент экстинкции, A_1 - поглощение света раствором до сорбции, A_2 - поглощение света раствором после сорбции.

Сорбционную емкость хитозановых криоструктуратов вычисляли по формуле:

$$A_x = \Delta c_x \times V / m,$$

где Δc_x – изменение концентрации раствора после сорбции, V – объем раствора, в который погружали сорбент, m – масса сорбента.

Выводы

- 1) Были сформированы широкопористые хитозановые криоструктураты при «оптимальных» условиях.
- 2) Были определены длины волн, в которых наблюдаются максимумы поглощения для водных растворов солей тяжелых металлов. Оптимальные длины волн составляют 800, 400 и 510 нм для $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ и $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, соответственно.
- 3) Определены молярные коэффициенты светопоглощения, которые составляют 12,00, 4,40 и 5,75 для ионов Cu^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} , соответственно.
- 4) Полученные материалы были протестированы в качестве сорбентов ионов тяжелых металлов: Cu^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} . Проведенные испытания показали эффективность использования хитозановых криоструктуратов для извлечения ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} из водных растворов, сорбционные емкости по отношению к ионам Cu^{2+} и Ni^{2+} составляют 1,1 ммоль/г и 1,0 ммоль/г, соответственно. Сорбция ионов Co^{2+} на данном сорбенте не наблюдалась.

Список литературы

1. В.И. Лозинский. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения// *Успехи химии*, 2002, **71** (6), 559-585.
2. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г.Скрябина, Г.А. Вихревой, В.П. Варламова. — М.:Наука, 2002. — 368 с.: ил.
3. Jinke Xu, Satu Strandman, Julian X.X. Zhu, Jake Barralet, Marta Cerruti, Genipin-crosslinked catechol-chitosan mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery// *Biomaterials* 37 (2015) 395-404.
4. Toshizumi Tanabe, Naoya Okitsu, Akira Tachibana, Kiyoshi Yamauchi, Preparation and characterization of keratin–chitosan composite film// *Biomaterials* 23 (2002) 817–825.
5. Clayane Carvalho dos Santos, Rodolpho Mouta, Manoel Carvalho Castro Junior, Sirlane Aparecida Abreu Santana, Hildo Antonio dos Santos Silva, Cícero Wellington Brito Bezerra, Clayane Carvalho dos Santos, Rodolpho Mouta, Manoel Carvalho Castro Junior, Sirlane Aparecida Abreu Santana, Hildo Antonio dos Santos Silva, Cícero Wellington Brito Bezerra, Chitosan-edible oil based materials as upgraded adsorbents for textile dyes// *Carbohydrate Polymers* 180 (2018) 182–191.
6. V. Nair, A. Panigrahy, R. Vinu, Development of novel chitosan–lignin composites for adsorption of dyes and metal ions from wastewater, *Chem. Eng. J.* 254 (2014), 491–502.
7. Tao Lou, Guangpeng Cui, Jinju Xun, Xuejun Wang, Nianyun Feng, Jia Zhang, Synthesis of a terpolymer based on chitosan and lignin as an effective flocculant for dye removal// *Colloids and Surfaces A* 537 (2018) 149–154.
8. Lie Maa, Changyou Gaoa, Zhengwei Maoa, Jie Zhoua, Jiacong Shena, Xueqing Hub, Chunmao Hanb, Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering// *Biomaterials* 24 (2003) 4833–4841.
9. Пат. РФ 2078099, *Chem. Abstr.*, 128, 13896 (1998).
10. С.Ю. Братская, А.В. Пестова, Хелатирующие производные хитозана. Владивосток: Дальнаука, 2016. – 232 с.