

Критченков Андрей Сергеевич

**НОВЫЕ ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ХИТОЗАНА:
ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ И СВОЙСТВА**

02.00.03 – Органическая химия
02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
доктора химических наук

Москва 2021

Работа выполнена на кафедре неорганической химии факультета физико-математических и естественных наук Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» (РУДН).

Научный консультант:

Хрусталёв Виктор Николаевич

доктор химических наук, профессор РАН, заведующий кафедрой неорганической химии РУДН, директор Объединённого института химических исследований РУДН

Официальные оппоненты:

Антипин Игорь Сергеевич

член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор кафедры органической и медицинской химии Казанского (Приволжского) федерального университета, Химического института им. А.М. Бутлерова

Чвалун Сергей Николаевич

член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник Института синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН

Варламов Валерий Петрович

доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биополимеров Института биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН, президент Российского хитинового общества

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2021 г. в __ час. 00 мин. на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций ПДС 0200.002 при Российском университете дружбы народов по адресу: 117923, Москва, ул. Орджоникидзе, д. 3, ауд. 708 (зал №2).

С диссертацией можно ознакомиться на сайте <http://dissovet.rudn.ru> и в Учебно-научном информационном библиографическом центре Российского университета дружбы народов по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат химических наук, ст. преподаватель

Е.Б. Маркова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. До недавнего времени химия хитина и хитозана была в значительной степени ограничена традиционными подходами к химической модификации данных полисахаридов. Использование новых подходов, в том числе и клик-химии, позволило получить ряд производных хитина и хитозана с привлекательными физико-химическими и биологическими свойствами. Однако в химии хитозана были использованы среди клик-реакций только реакции Cu(I)-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения, тиол-енового присоединения и Дильса-Альдера¹, а в химии хитина был описан лишь один пример Cu(I)-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения². Таким образом, внедрение в химию хитозана и хитина новых клик-реакций представляется весьма актуальным, поскольку позволит получать эффективно и с препаративным удобством новые производные данных полимеров с ценными свойствами.

В то же время в литературе имеется ряд сообщений об эффективности использования ультразвука для проведения многих органических реакций. При этом в химии хитина и хитозана данная тематика развита весьма слабо и представлена лишь единичными примерами ультразвуковой деполимеризации последних. Лишь в химии хитозана рассмотрена возможность проведения под действием ультразвука нескольких простейших полимераналогичных реакций, приводящих к получению производных хитозана³. Однако в последнем случае не приводится сопоставления эффекта «ультразвуковых» условий по сравнению с классическими, а также влияния ультразвукового облучения на целостность цепи полисахарида в процессе синтеза под действием ультразвука. В связи с этим внедрение ультразвукового подхода в химию хитина и хитозана также актуально, поскольку может способствовать разработке новых высокоэффективных и удобных методик синтеза производных данных полисахаридов с привлекательными свойствами. Особо интересны в данном контексте водорастворимые производные хитина, крайне ограничено описанные в литературе.

Поиск новых катионных производных хитина и хитозана, обладающих выраженной противомикробной активностью является весьма перспективным и актуальным направлением в современной медицинской химии. Это связано в первую очередь с тем, что механизм противомикробного действия таких полимеров основан на универсальных физико-химических процессах (взаимодействие катиона с отрицательно заряженными участками поверхности бактерий, с бактериальной ДНК и т.д.). Следовательно, формирование резистентности бактерий к действию катионных производных крайне затруднительно, если вообще возможно.

Разработка высокоэффективных активных пищевых покрытий на основе производных хитина и хитозана весьма актуальна в пищевой химии, поскольку

¹ Kritchenkov A. S., Skorik Y. A. Click reactions in chitosan chemistry // Russian Chemical Bulletin. – 2017. – V. 66, № 5. – P. 769-781.

² Chen Y., Ye Y., Wang L., Guo Y., Tan H. Synthesis of chitosan C6-substituted cyclodextrin derivatives with tosyl-chitin as the intermediate precursor // Journal of Applied Polymer Science. – 2012. – V. 125, № S2. – P. E378-E383.

³ Cravotto G., Tagliapietra S., Robaldo B., Trotta M. Chemical modification of chitosan under high-intensity ultrasound // Ultrasonics Sonochemistry. – 2005. – V. 12, № 1-2. – P. 95-98.

находится в тренде стремления к снижению экологической нагрузки, с одной стороны, и соответствует крайне актуальной тенденции развития различных путей продления срока годности продуктов, с другой стороны. Напрямую об актуальности данного направления свидетельствует постоянно увеличивающееся количество высокорейтинговых публикаций в данной области.

Повышенный спрос на экологичные материалы и химические процессы значительно продвинул использование природных нетоксичных полимеров хитозана и хитина в области катализа ряда органических реакций как в качестве полимерной подложки для катализаторов, так и в качестве органокатализаторов. Однако зачастую упомянуты природные полимеры характеризуются недостаточной каталитической активностью, но их химическая модификация способна преодолеть имеющиеся недостатки. Следовательно, химическая модификация хитозана и хитина является актуальным направлением в области поиска новых экологичных высокоэффективных катализаторов органических превращений⁴.

Цель работы – развитие методов химической модификации хитина и хитозана посредством превращений (включая клик-реакции), протекающих под действием ультразвука. **Задачи работы** состояли в (i) выявлении акустических условий (частота и мощность ультразвукового облучения), позволяющих интенсифицировать изучаемые реакции без потери их селективности и без деструкции цепи полисахарида; (ii) разработке методик синтеза производных хитозана и хитина под действием ультразвука; (iii) выявлении новых производных хитина и хитозана с выраженной противомикробной и каталитической активностью.

Научная новизна работы заключается в том, что (i) впервые выявлены акустические условия, позволяющие интенсифицировать ряд полимераналогичных реакций в химии хитина и хитозана (в подавляющем большинстве случаев в водной среде) практически без деструкции полисахаридной цепи; (ii) впервые продемонстрировано, что клик-реакция тиол-инового присоединения, клик-реакция фенол-инового присоединения и реакция промотируемого платиной(II) 1,3-диполярного нитрон-нитрильного циклоприсоединения эффективно интенсифицируются ультразвуком; (iii) в химии хитозана впервые использован ряд новых для этой области полимераналогичных превращений (клик-реакция тиол-инового присоединения, фенол-инового присоединения, катализируемое Zn^{2+} и Al^{3+} 1,3-диполярное азид-нитрильное циклоприсоединение и промотируемое платиной(II) 1,3-диполярное нитрон-нитрильное циклоприсоединение (причём последнее является оригинальным способом построения дигидрооксадиазольного цикла на природной молекуле и представлено впервые не только в хитинологии, но и вообще в химии природных соединений)); также получено шесть новых водорастворимых производных хитина; (iv) тетразольные и триазольные производные хитина и хитозана впервые использованы как эффективные органокатализаторы в альдольной реакции, а оксадиазольные производные хитозана – в реакции синтеза моноглицеридов через

⁴ El Kadib A. Chitosan as a Sustainable Organocatalyst: A Concise Overview // ChemSusChem. – 2015. – V. 8, № 2. – P. 217-244.

раскрытие эпоксидного кольца; также впервые использован имино-изонитрильный комплекс палладия(II) на основе хитина как эффективный катализатор реакции Соногаширы в воде; (v) впервые получены высокоэффективные нетоксичные противомикробные системы на основе хитозана, по активности *in vivo* не уступающие антибиотикам ампициллину и гентамицину и новые пищевые покрытия на их основе.

Теоретическая и практическая ценность работы состоит в том, что в полученные результаты вносят вклад в фундаментальную химию хитина и хитозана, а основным итогом диссертационной работы является развитие нового научного направления в химии хитина и хитозана – «полимераналогичные превращения хитина и хитозана под действием ультразвуковых колебаний», открывающего новые перспективы для синтеза производных хитина и хитозана и материалов на их основе с заданными свойствами. Также в результате выполнения работы получены новые высокоэффективные катализаторы, новые высокоактивные *in vivo* антибактериальные соединения, а также новые экологичные активные пищевые покрытия.

Методология и методы. Для выполнения работы применялись современные физико-химические методы анализа, а также классические и современные методы синтетической химии.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на ряде всероссийских и международных конференций в виде устных и стендовых докладов, среди которых два пленарных доклада.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов работы подтверждается исследованиями с помощью ряда физико-химических методов: ИК-спектроскопией, спектроскопией ЯМР, масс-спектрометрией высокого разрешения, элементным анализом, рентгеноструктурным анализом, термогравиметрическим анализом и др.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 20 статей в журналах, из которых 19 статей опубликованы в журналах, реферируемых в базах данных Web of Science и Scopus, причём 14 статей – в журналах первого квартиля Q1 Web of Science и Scopus, 1 статья в журнале перечня РУДН/ВАК. По материалам диссертации опубликована одна монография и одна глава в коллективной монографии. Также опубликовано 6 тезисов докладов на конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 396 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературных данных, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части, основных результатов и выводов, а также списка цитируемой литературы, включающего 460 наименований; в диссертации 5 глав. Обзор литературных данных включает в себя описание и анализ современного состояния науки в области (i) клик-реакций в химии хитина и хитозана, (ii) химических реакций хитина и хитозана под действием ультразвука, (iii) противомикробной активности хитина, хитозана и их производных, (iv) вопросов,

посвящённых получению умных и активных пищевых плёнок и покрытий. Диссертация содержит 49 схем, 55 таблиц и 82 рисунка.

Положения, выносимые на защиту:

1. Возможность интенсификации ультразвуком ряда превращений в химии хитина и хитозана без деструкции полисахаридной цепи.
2. Новые реакции в химической модификации хитозана и хитина (азид-нитрильное циклоприсоединение (хитозан и хитин), фенол-иновое и тиол-иновое присоединение (хитозан), промотируемое Pt(II) нитрон-нитрильное циклоприсоединение(хитозан)).
3. Эффективные и препаративно удобные подходы к синтезу шести новых водорастворимых производных хитина.
4. Высокая каталитическая активность в качестве гомогенных органокатализаторов тетразольных и триазольных производных хитина и хитозана в альдольной реакции, оксадиазольных производных хитозана – в реакции синтеза моноглицеридов через раскрытие эпоксидного кольца. Каталитическая активность имино-изонитрильного комплекса палладия(II) на основе производного хитина в реакции Соногаширы в воде.
5. Высокая противомикробная активность полученных производных хитина и хитозана, а также агрегатов на их основе (в том числе *in vivo*).
6. Получение высокоактивных покрытий для бананов путём смешения триазолбетаинового производного хитозана с натриевой солью сукцинилхитозана.

Личный вклад соискателя. Замысел работы и все направления исследований были полностью определены и сформулированы самостоятельно диссертантом. Диссертант лично выполнил подавляющий объём синтетической работы, участвовал в выполнении биологических экспериментов, являлся руководителем грантов (РФФИ 16-34-60173, 19-016-00077, 20-04-60014, 20-13-00004), в рамках которых проведено диссертационное исследование. Диссертантом практически полностью самостоятельно написаны все публикации по теме диссертации.

Работа выполнена в рамках реализации следующих проектов (грантов): РФФИ 16-34-60173, 19-016-00077, 20-04-60014, 20-13-00004, а также гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 075-03-2020-223 (FSSF-2020-0017, госзадание).

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1. Синтез производных хитозана и хитина под действием ультразвука и в традиционных условиях

2.1.1. Общие положения. Именно катионная природа хитозана и его производных обуславливает их антимикробную активность. Важнейшим направлением в области поиска новых производных хитозана с повышенной антимикробной активностью является синтез производных с повышенной катионной плотностью. Существует два главных подхода к получению таких производных: (i) введение в макромолекулу хитозана вторичных и третичных аминогрупп, обладающих более

выраженными основными свойствами по сравнению с первичной аминогруппой, и, следовательно, в большей степени протонированных при физиологическом значении pH; (ii) введение в макромолекулу фрагментов, содержащих кватернизированный атом азота. Оба описанных подхода получили своё развитие в рамках данной работы.

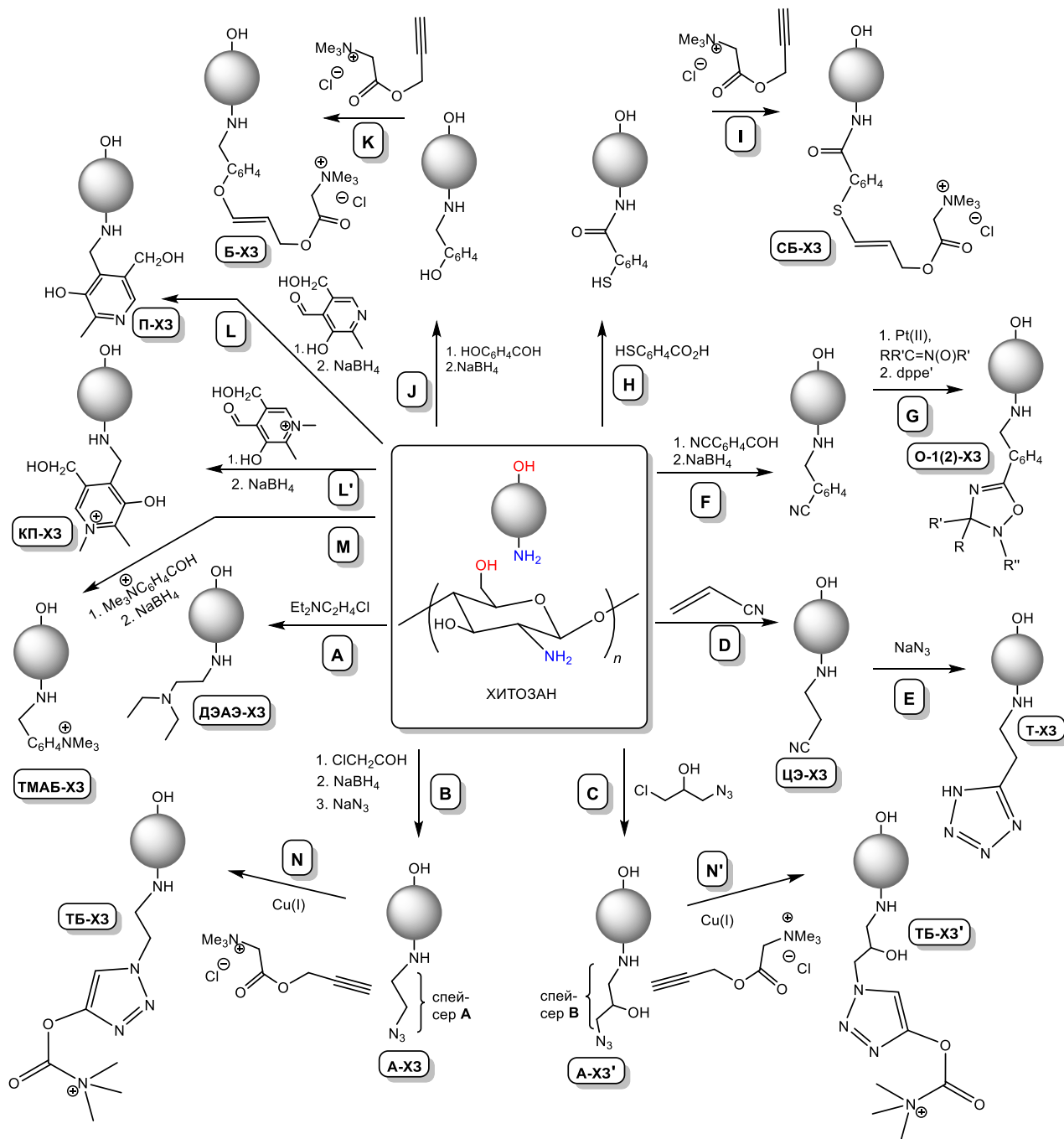


Схема 1. Используемые в работе подходы к получению производных хитозана.

В настоящем исследовании в рамках первого подхода был реализован синтез (i) диэтиламиноэтильных производных хитозана путём действия на хитозан диэтиламиноэтилхлоридом (схема 1, путь А); (ii) новых не описанных ранее азидных производных хитозана, получаемых восстановительным алкилированием с использованием хлоруксусного альдегида с последующей заменой галогена на азидную

группу (**схема 1**, путь В) или обработкой хитозана 3-хлоро-1-азидопропан-2-олом (**схема 1**, путь С); (iii) новых тетразольных производных хитозана, получаемых обработкой хитозана акрилонитрилом с последующим 1,3-диполярным циклоприсоединением азид-иона к полученному цианоэтилхитозану (**схема 1**, пути D и E). Так же в рамках первого подхода в данной работе реализован оригинальный способ построения дигидрооксадиазольного цикла на молекуле хитозана путём промотируемого платиной(II) 1,3-диполярного нитрон-нитрильного циклоприсоединения (**схема 1**, пути F и G). Также к первому подходу относится получение пиридоксальных производных хитозана (**схема 1**, путь L).

В рамках второго подхода был реализован синтез (i) новых серосодержащих бетаиновых производных с использованием тиол-иновой клик-реакции (**схема 1**, пути H и I), (ii) новых бетаиновых производных посредством фенол-иновой клик реакции (**схема 1**, пути J и K), (iii) новых производных хитозана содержащих катионный *N*-метилпиридоксальный заместитель (**схема 1**, путь L') и триметиламинобензильных производных хитозана (**схема 1**, путь M), (iv) новых бетаиновых производных с использованием катализируемого медью(I) азид-алкинового 1,3-диполярного циклоприсоединения (**схема 1**, пути N и N'). Тиол-иновая и фенол-иновая реакции при этом были впервые вовлечены в химию полисахаридов. Особо следует отметить, что подавляющее большинство представленных на схеме превращений протекает в воде.

Антибактериальная активность хитина невелика и одной из важнейших причин этого является его нерастворимость в воде. Химия хитина чрезвычайно скудна (в сравнении с химией хитозана), а число полученных водорастворимых производных полностью *N*-ацелитированного хитина до представляемого исследования не превышало восьми.

В рамках данного исследования была проведена азидная преклик-модификация хитина (**схема 2**, пути A, B). Полученные азидные производные были вовлечены в клик-реакции азид-алкинового циклоприсоединения с пропаргильным эфиром никотиновой кислоты и её *N*-метилированного аналога (**схема 2**, пути C, D), бетаина и глицина (**схема 2**, пути E, F). Также получено цианоэтильное производное хитина, которое затем было вовлечено в реакцию металлокатализируемого азид-нитрильного циклоприсоединения с образованием тетразольного производного хитина (**схема 1**, пути G, H).

В препаративной части данного исследования широко использовались полимераналогичные превращения хитозана, хитина и их производных под действием ультразвука. В период, предшествующий данной работе, были описаны лишь единичные примеры таких реакций в химии хитозана, а в химии хитина вообще отсутствовали. Кроме того, в представленных в литературе работах не выяснялось влияние акустических условий на селективность реакций и степень замещения продукта и не проводилось сравнение с традиционными условиями. В данной работе представленные превращения исследовались как в традиционных условиях, так и под действием ультразвукового облучения с целью исследования влияния ультразвуковой обработки на результат изучаемых реакций.

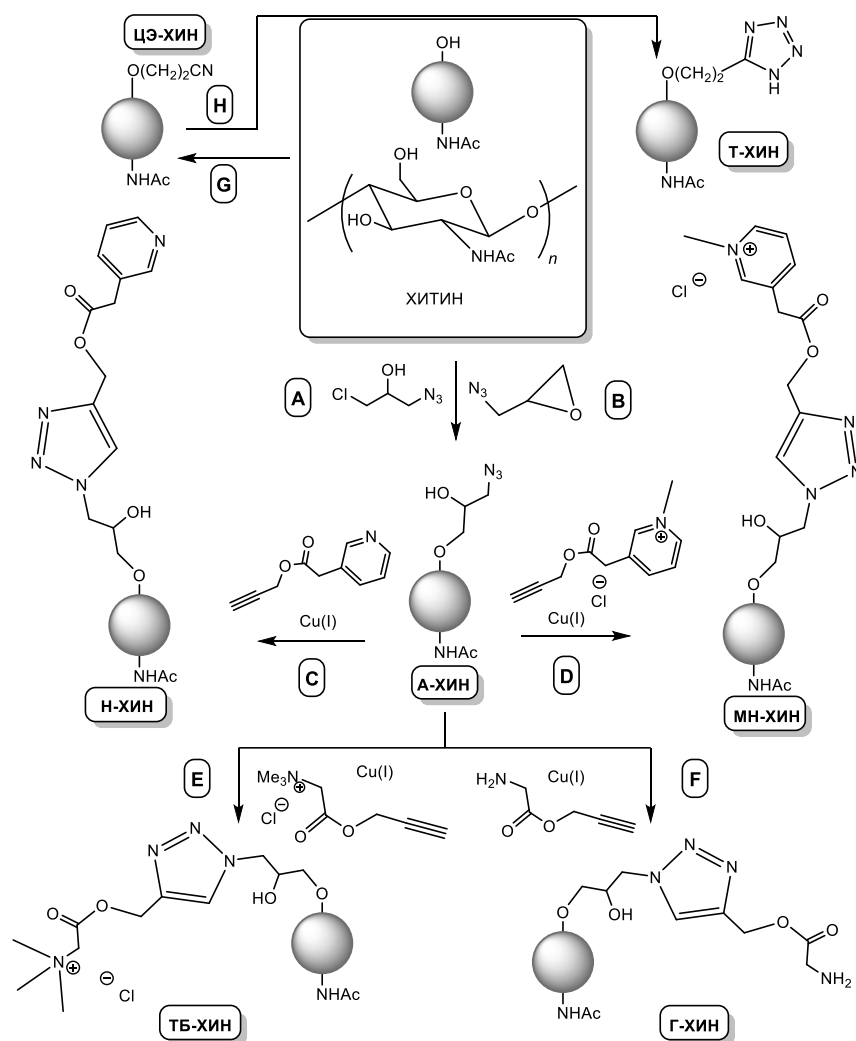


Схема 2. Используемые в работе подходы к получению производных хитина.

2.1.1. Синтез ДЭАЭ-ХЗ и А-ХЗ’. В начале реализации данного диссертационного исследования было выявлено, что ультразвуковое облучение образцов хитина и хитозана⁵ в виде водного раствора или суспензии частотой 80–100 кГц мощностью 250–300 Вт в течение 15–25 минут не вызывает разрушения полисахаридной цепи. Данный факт, а также литературные данные о том, что алкилирование первичных аминов алкилгалидами может быть интенсифицировано ультразвуком, были использованы в данной работе для получения диэтиламиноэтильных производных хитозана и азидных производных хитозана (ДЭАЭ-ХЗ и А-ХЗ, **Схема 1**).

Реакции между диэтиламиноэтилхлоридом (ДЭАЭ) или 1-азидо-3-хлорпропан-2-олом (АХП) и хитозаном (**Схема 1**, пути А и С, соответственно) изучались как под

⁵ В работе использовали крабовый хитозан со средневязкостной молекулярной массой 3.7×10^4 (**ХЗ-А**), степенью ацетилирования 0.26, влажностью 8%, хитозан со средневязкостной молекулярной массой 6.9×10^4 (**ХЗ-Б**), степенью ацетилирования 0.28, влажностью 8.9%, крабовый хитозан со средневязкостной молекулярной массой 17.8×10^4 (**ХЗ-В**), степенью ацетилирования 0.24, влажностью 9.8%, хитин со средневязкостной молекулярной массой 3.5×10^4 (**ХИН-А**), влажностью 9.2%, хитин со средневязкостной молекулярной массой 7.1×10^4 (**ХИН-Б**), влажностью 8.8%, хитин со средневязкостной молекулярной массой 17.2×10^4 (**ХИН-В**), влажностью 9%, степень ацетилирования используемых хитинов – около 100%.

действием ультразвукового облучения, так без него. Обработку хитозана ДЭАЭ проводили в гомогенных условиях при $\text{pH} = 6$, $T = 60^\circ \text{C}$ в течение 5 часов (без ультразвука) или 10 минут (под ультразвуковым облучением 80 кГц, 250 Вт). Здесь и далее ультразвуковые синтезы проводились в импульсном режиме при термостатировании. Взаимодействие ДЭАЭ с хитозаном без ультразвука при мольном соотношении хитозан:ДЭАЭ 1:2 или 1:6 селективно приводило к *N*-замещенным производным хитозана со степенью замещения 0.15 или 0.45 соответственно. При мольном соотношении хитозан:ДЭАЭ 1:13 были получены *N,O*-замещенные продукты (общая степень замещения 0.65, степени *N*- и *O*-замещения 0.52 и 0.13 соответственно). Использование ультразвукового облучения сокращает как время реакции, так и количество требуемого ДЭАЭ для достижения такой же степени замещения. Более того, использование ультразвука приводило к селективному *N*-замещению даже в тех случаях, когда были получены высокозамещенные продукты (**таблица 1**).

Обработку хитозана 1-азидо-3-хлорпропан-2-олом (АХП) проводили при комнатной температуре при $\text{pH} = 6$. **Таблица 1** показывает, что ультразвуковая обработка (80 кГц, 250 Вт) реакционных смесей приводит к заметному уменьшению времени реакции и количества АХП, необходимого для достижения такой же степени замещения по сравнению с соответствующими условиями без ультразвукового воздействия. Более того, ультразвуковая обработка улучшает селективность взаимодействия АХП и хитозана, что приводит к селективно *N*-замещенным продуктам. Лишь при использовании молярного соотношения хитозан:АХП 1:3 были получены *N,O*-замещенные продукты с высокой степенью замещения 0.65. Селективно *N*-замещенные производные типа **A-X3'** со степенью замещения 0.65 удалось получить в тех же акустических условиях, но при $\text{pH} = 3$ (**таблица 1**).

2.1.2. Синтез ТМАБ-X3, A-X3, П-X3 и КП-X3. Восстановительное алкилирование хитозана является одним из наиболее эффективных способов функционализации хитозана. В соответствии с литературными данными степень замещения конечного продукта определяется стадией образования имина. Примеры реакций между альдегидами и первичными аминами под действием ультразвука представлены в нескольких публикациях, однако они никогда не применялись к хитозану. В рамках данной работы реакции $\text{Ad}_N\text{-E}$ между 2-хлоруксусным альдегидом, *N*-метилпиридоксаль йодидом или 4-(*N,N,N*-триметиламино)бензальдегида хлоридом проводились при комнатной температуре, $\text{pH} 6$, в течение 3 часов (без ультразвука) или 10 минут (под действием ультразвука 80 кГц, 250 Вт) (**схема 1**, пути B1, L1, L'1, M1, **таблица 1**). Ультразвуковая обработка позволяет очень быстро получать производные хитозана с заданной степенью замещения и расходовать гораздо меньше альдегида по сравнению с традиционными условиями. Образующиеся основания Шиффа восстанавливали *one-pot* (**схема 1**, пути B2, L2, L'2, M2). Полученное же хлорпроизводное конвертировали в соответствующее азидное производное обработкой NaN_3 (**схема 1**, путь B3) для дальнейших химических модификаций и биологических исследований.

2.1.3. Синтез ЦЭ-ХЗ. В литературе описано получение цианоэтильных производных хитозана по реакции аза-Михаэля в воде, однако в таком случае происходит частичная гидратация нитрильных групп, и в образующемся продукте неизбежно присутствуют функциональные группы, образовавшиеся в результате данной побочной реакции. В представляемой работе был использован сухой диметилформамид (ДМФ) в качестве реакционной среды, что позволило получить цианоэтильные производные хитозана, не содержащие нежелательных функциональных групп (схема 1, путь D). Также в рамках данной работы было изучено влияние ультразвукового облучения на взаимодействие акрилонитрила с хитозаном в ДМФ в сравнении с традиционными условиями (таблица 1). В результате оптимизации параметров ультразвукового облучения было установлено, что действие на реакционную смесь ультразвуком частотой 70 кГц мощностью 250 Вт обеспечивает селективное образование *N*-замещенных продуктов при значительно меньшем количестве акрилонитрила и времени реакции в сравнении с традиционными условиями (таблица 1). Так, например, для достижения высокой степени замещения (0.65) в традиционных условиях требуется обработка хитозана 5 эквивалентами акрилонитрила в течение 3 часов, в то время как под действием ультразвука необходимое для достижения такой же степени замещения мольное соотношение акрилонитрил:хитозан составляет лишь 1:1, а время реакции составляет 10 мин.

Таблица 1. Сравнение эффективности классических и «ультразвуковых» условий синтеза производных хитозана.

Одинаковые условия			Условия синтезов без использования ультразвука				Условия синтезов под воздействием ультразвука			
СЗ	Т, °С	рН	СЗ _N	СЗ _O	реагент :ХЗ	Время, мин	СЗ _N	СЗ _O	реагент :ХЗ	Время, мин
ДАЭА-ХЗ										
0.15	60	6	0.15	0	2:1	300	0.15	0	0.5:1	10
0.45	60	6	0.45	0	6:1	300	0.45	0	1:1	10
0.65	60	6	0.52	0.13	13:1	300	0.65	0	1.6:1.	10
А-ХЗ										
0.15	25	6	0.15	0	0.5:1	240	0.15	0	0.3:1	10
0.45	25	6	0.45	0	1.5:1	240	0.45	0	0.7:1	10
0.65	25	6	0.65	0	2.5:1	240	0.65	0	1.1:1	10
А-ХЗ'										
0.15	25	6	0.09	0.11	1:1	300	0.15	0	0.5:1	15
0.45	25	6	0.22	0.23	8:1	300	0.45	0	2:1	15
0.65	25	6	0.32	0.33	13:1	300	0.55	0.10	3:1	15
0.65	25	3	300				0.65	0	3:1	15
ЦЭ-ХЗ										
0.15	25	-	0.15	0	0.8:1	180	0.15	0	0.2:1	10
0.45	25	-	0.45	0	2.6:1	180	0.45	0	0.6:1	10

0.65	25	-	0.65	0	5:1	180	0.65	0	1:1	10
ТМАБ-ХЗ										
0.19	25	6	0.19	0	0.4:1	180	0.19	0	0.2:1	10
0.32	25	6	0.32	0	1.7:1	180	0.32	0	0.9:1	10
0.66	25	6	0.66	0	2.5:1	180	0.66	0	1.5:1	10
П-ХЗ										
0.15	25	6	0.15	0	1:1	180	0.15	0	0.3:1	10
0.40	25	6	0.40	0	1.6:1	180	0.40	0	0.5:1	10
0.65	25	6	0.65	0	5:1	180	0.65	0	1:1	10
КП-ХЗ										
0.20	25	6	0.20	0	0.8:1	180	0.19	0	0.3:1	10
0.31	25	6	0.31	0	1.3:1	180	0.31	0	0.5:1	10
0.67	25	6	0.67	0	1.8:1	180	0.67	0	0.7:1	10

2.1.4. Синтез Т-ХЗ. Полученные цианоэтильные производные были вовлечены в реакцию металлокатализируемого 1,3-диполярного циклоприсоединения с азид-ионом с образованием тетразольных производных хитозана (**схема 1**, путь Е) в водной среде. Данное катализируемое цинком(II) в воде превращение описано Шарплессом, однако не было использовано в химии полисахаридов. В рамках данной работы было выявлено, что среди ионов Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , последний является наиболее эффективным катализатором. Также было обнаружено, что воздействие ультразвуком значительно снижает выход целевых тетразольных производных.

2.1.5. Синтез Б-ХЗ и СБ-ХЗ. Фенол-иновая реакция представляет собой катализируемое диметиламинопиридином (ДМАП) присоединение фенолов к терминальным алкинам. Какие-либо данные о влиянии ультразвукового воздействия на фенол-иновую реакцию до настоящего исследования в литературе отсутствовали. В представляемой работе был изучен эффект ультразвука на фенол-иновое присоединение на модельной реакции *п*-гидроксibenзальдегида с пропаргиловым эфиром бетаина (**схема 2**).

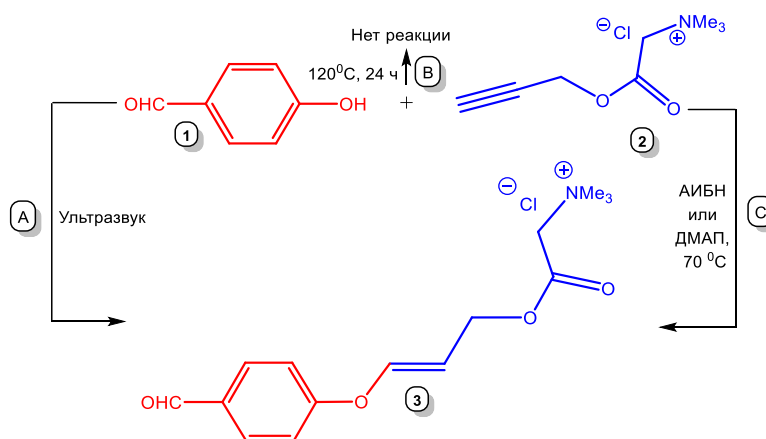


Схема 2. Модельная реакция фенол-инового присоединения.

Реакционная смесь обрабатывалась ультразвуком частотой 45, 80, 100 и 300 кГц мощностью от 120 до 300 Вт (мольное соотношение **1:2** = 1:1.2). Продукт **3** (схема 2) был детектирован в реакционной смеси при обработке ультразвуком не ниже частоты 80 кГц, мощности 200 Вт. В таких условиях полная конверсия **1** в **3** (схема 2) достигается за 20 мин, а при использовании ультразвука частотой 100 кГц мощностью 300 Вт полная конверсия достигается за 5 мин с выходом **3** (схема 2), близким к количественному. При частоте 300 кГц мощности 120 Вт реакция теряет селективность и наряду с соединением **3** (схема 2) образуется широкая смесь не идентифицированных продуктов.

В случае проведения фенол-иновой реакции под действием ультразвука, возможен механизм, включающий гомолитический разрыв связи Н–О, приводящий к образованию фенолоксильного радикала. Радикальный процесс может быть инициирован с помощью ультразвука образованием свободных радикалов из воды. Чтобы подтвердить или исключить «радикальный» путь, реакция фенол-инового присоединения под действием ультразвука была проведена в присутствии *N*-оксида *N*-бензилиден-трет-бутиламина в качестве ловушки радикалов. В таких условиях взаимодействия между **1** и **2** (схема 2) не наблюдалось, что является свидетельством в пользу радикального механизма прототируемого ультразвуком фенол-инового присоединения. Это наблюдение привело к попытке инициировать взаимодействие **1** и **2** азобисизобутиронитрилом (АИБН) (схема 2, путь С). Было выявлено, что в присутствии 0.01 эквивалента АИБН при 70 °С, наблюдается селективное образование **3**. При сравнении эффекта ДМАП (70 °С, 0.01 экв.), АИБН (70 °С, 0.01 экв.), и ультразвука (100 кГц/300 Вт) на модельной фенол-иновой реакции было показано, что лучший эффект демонстрируют АИБН и ультразвук (время полной конверсии **1** в **3** около 5 минут), в то время как в присутствии ДМАП полная конверсия достигается лишь за 45 мин.

Фенол-иновая клик-реакция под действием ультразвука была использована для стадийной химической модификации хитозана. На первой стадии была проведена преклик-модификация хитозана (схема 1, путь J), после чего полученное фенольное производное хитозана было вовлечено в фенол-иновую реакцию с пропаргиловым эфиром бетаина, выступающего в качестве иновой компоненты (схема 1, путь К). В результате были получены бетаиновые производные хитозана **Б-ХЗ** с высокими (0.60), низкими (0.20) и средними (0.40) степенями замещения, причём степень замещения полученных бетаиновых производных была равна степени замещения исходных фенольных производных.

Тиол-иновое присоединение в его классическом варианте протекает либо при температуре выше 120 °С, либо под действием инициаторов радикальных превращений, или же оснований, например, фосфат-иона. В литературе не сообщалось о возможности инициирования тиол-иновой реакции ультразвуком. Для модельной ультразвуковой тиол-иновой клик-реакции в качестве реагентов были использованы *n*-меркаптобензойная кислота **1** и пропаргиловый эфир бетаина **2** (схема 3). При

ультразвуковом облучении взаимодействие **1** и **2** мольном соотношении 1:1.2 приводит к образованию **3** (схема 3) при 25 °С, в то время как без ультразвука данная реакция протекает только при длительном нагревании (120 °С, 12 ч).

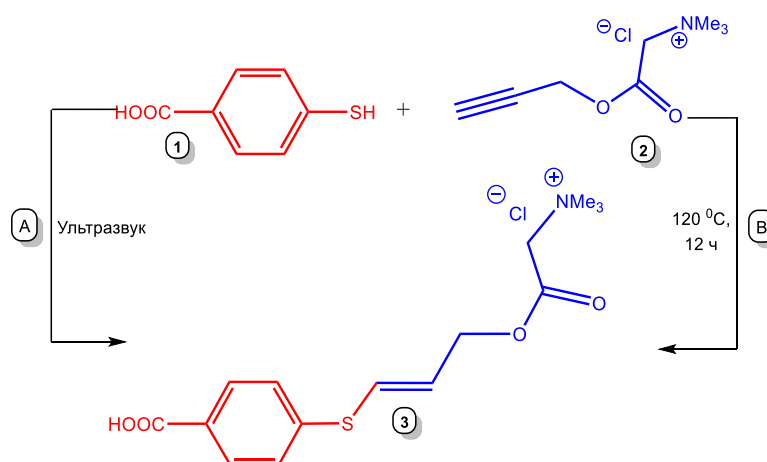


Схема 3. Модельная реакция тиол-инового присоединения.

Частота и мощность ультразвукового облучения оказывает выраженное влияние на селективность и скорость модельной реакции. Продукт **3** (схема 3) идентифицировали в реакционной смеси при 25 °С, только в случае обработки ультразвуковым излучением с частотой выше 80 кГц. При действии ультразвуком 80 кГц 180 Вт реакция селективно завершается в течение 30 мин, а при использовании частоты 100 кГц и мощности 280 Вт реакция также протекает селективно и завершается всего лишь за 10 минут. Использование более высоких частот и мощностей ультразвуковых колебаний приводит к потере селективности и образованию смеси не идентифицированных продуктов. Изучаемая модельная тиол-иновая клик-реакция под действием ультразвука протекает по радикальному механизму. Это было подтверждено при проведении реакции в присутствии ловушки радикалов *N*-бензилиден-*трет*-бутиламин-*N*-оксида.

Как и в случае с фенол-иновой реакцией, тиол-иновая клик-реакция под действием ультразвука была использована для химической модификации хитозана. На стадии преклик-модификации были получены тиольные производные хитозана путём обработки последнего *n*-меркаптобензойной кислотой в присутствии EDC и NHS (схема 1, путь Н). На следующем этапе полученные производные были вовлечены в тиол-иновую клик-реакцию под действием ультразвука (схема 1, путь I) с образованием серосодержащих бетаиновых производных хитозана **СБ-ХЗ** со степенями замещения около 0.15, 0.40 и 0.60, соответствующими степеням замещения тиольных производных.

2.1.6. Синтез ТБ-ХЗ. Реакция катализируемого медью(I) азид-алкинового 1,3-диполярного циклоприсоединения является одной из самых широко применяемых среди клик-реакций не только для модификации природных соединений (в том числе и хитозана), но и вообще в органическом синтезе. Примеры катализируемого медью(I)

азид-алкинового 1,3-диполярного циклоприсоединения под действием ультразвука описаны в литературе лишь на нескольких примерах и никогда не использовались в хитинологии. В рамках представленной работы в первую очередь была изучена модельная клик-реакция пропаргилового эфира бетаина **1** (схема 4,) и азидов $\text{NH}_2\text{--CH}_2\text{--CH(OH)--CH}_2\text{--N}_3$ (схема 4, **2a**) или $\text{NH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2\text{--N}_3$ (схема 4, **2b**) в традиционных условиях и под действием ультразвука.

Эксперимент проводили при 25 °С в воде с использованием классической каталитической системы $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ /аскорбат натрия в атмосфере азота. Мольное соотношение представленных на схеме 4 реагентов **1**:**2a**(или **2b**): $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$:аскорбат натрия составляло 1.1:1:0.05:0.1. Реакционные смеси обрабатывали ультразвуком частотой 50, 100 и 200 кГц мощностью от 120 до 300 Вт. При обработке реакционных смесей ультразвуком частотой 45 кГц мощностью 120 Вт реакция заканчивается за 25 минут, в то время как частоте 100 кГц и мощности 300 Вт реакция заканчивается всего лишь за 10 минут с образованием **3a** и **3b** с количественными выходами (схема 4). При обработке ультразвуком частотой 200 кГц и мощностью 120 Вт реакция теряет селективность.

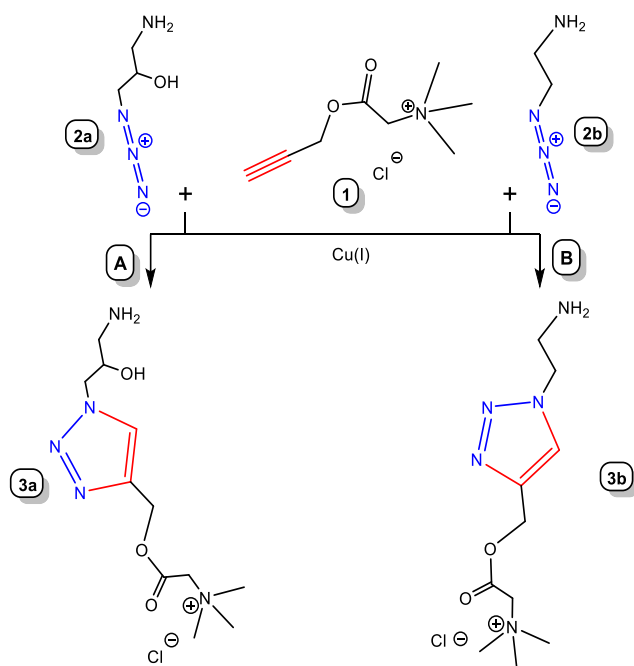


Схема 4. Модельная клик-реакция катализируемого медью(I) азид-алкинового 1,3-диполярного циклоприсоединения.

Также был проведён скрининг различных солей меди на предмет их каталитической эффективности как в атмосфере азота, так и на воздухе. Эффективность каталитических систем на основе меди в анаэробных условиях для обеих модельных реакций А и В (схема 4) одинакова и уменьшается в следующем порядке: $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ /аскорбат натрия $\approx$ Cu(проволока)/ $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ > CuCl > CuBr > CuI . Почти все каталитические системы теряют свою активность в аэробных условиях,

однако активность каталитической системы Cu(проволока)/CuSO₄×5H₂O практически не уменьшается. Таким образом, было обнаружено, что оптимальными условиями для модельной реакции являются аэробные, 25 °С, вода в качестве растворителя и ультразвуковое облучение частотой 100 кГц мощностью 300 Вт.

Азидные производные хитозана обоих структурных типов (со спейсером А, **схема 1, А-ХЗ** и со спейсером В, **схема 1, А-ХЗ'**) были использованы в качестве азидной компоненты в реакции катализируемого медью(I) 1,3-диполярного циклоприсоединения с пропаргиловым эфирам бетаина (**схема 1**, пути **N** и **N'**) в воде при ультразвуковом облучении частотой 100 кГц мощностью 300 Вт. Молярное соотношение азидозамещенных глюкозаминных звеньев хитозана к пропаргилловому эфиру бетаина и к CuSO₄×5H₂O составляло 1:1.3:0.05, в реакционную смесь также помещали медную проволоку. В результате были получены триазолбетаиновые производные хитозана (отличающиеся спейсерами А и В) с низкими, средними и высокими степенями замещения, равными степеням замещения исходных азидных производных хитозана.

2.1.7. Промотируемое Pt(II) нитрон-нитрильное циклоприсоединение под действием ультразвука. Синтез О-1(2)-ХЗ. Реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения нитронов к нитрилам открывают простой и удобный путь к получению редких гетероциклов – 2,3-дигидро-1,2,4-оксадиазолов. Однако нитрилы являются весьма инертными диполярофилами и требуют активации. Торцевая N-координация нитрильной группы к подходящему металлоцентру представляет собой весьма удобный способ активации нитрила по отношению к [2+3]-циклоприсоединению 1,3-диполярных реагентов. В частности, арилцианиды в реакциях с нитронами (1,3-диполями) эффективно активируются путём координации к платине(II).

В литературе не было описано влияние ультразвука на промотируемое платиной(II) нитрон-нитрильное 1,3-диполярное циклоприсоединение. Для оценки влияния ультразвука на данный процесс в рамках представляемой работы была использована модельная реакция между альдонитроном ClC₆H₄CH=N(O)CH₃ или кетонитроном Ph₂C=N(O)Ph и нитрильным лигандом в комплексе [PtCl₂(HOCC₆H₄CN)(DMSO)] (**схема 5**).

Обработка реакционных смесей ультразвуком на частотах 45 кГц, 80 кГц, 100 кГц и 300 кГц с мощностью от 110 Вт до 350 Вт позволила выявить оптимальные параметры облучения, которые обеспечивают селективное образование продукта циклоприсоединения с максимальным выходом за минимальное время. Обработка ультразвуком частотой 80 кГц мощностью 250 Вт оказалась оптимальной. В этих условиях реакции, представленные на **схеме 5** протекают селективно и быстро (за 20 мин или 5 мин для **1** и **3** или **2** и **3**, соответственно). В условиях отсутствия ультразвука полная трансформация **1** и **3** в **4** занимает 8 часов (**схема 5**), в то время как реакция **2** и **3**, приводящая к **5**, заканчивается за 2 часа (**схема 5**). Таким образом использование ультразвука позволяет существенно сократить время реакции.

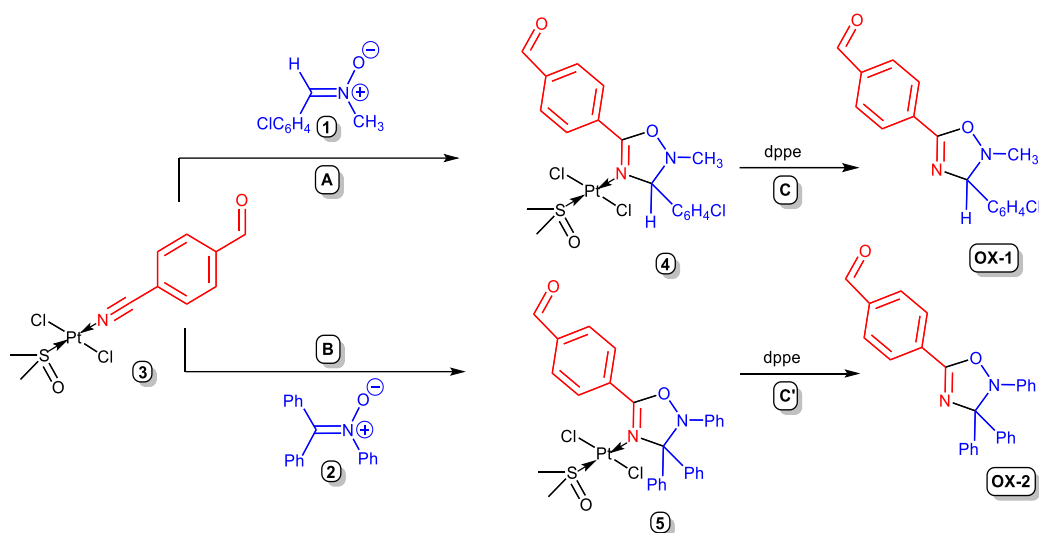


Схема 5. Модельная реакция промотируемого платиной(II) 1,3-диполярного циклоприсоединения.

На следующем этапе данной работы промотируемое платиной(II) циклоприсоединение альдонитрона $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{N}(\text{O})\text{CH}_3$ или кетонитрона $\text{Ph}_2\text{C}=\text{N}(\text{O})\text{Ph}$ под действием ультразвука было использовано для химической модификации хитозана (схема 1, пути F, G).

На начальном этапе в полимерную цепь хитозана была введена нитрильная группа путём действия на хитозан *n*-формилбензонитрилом с последующей обработкой NaBH_4 (схема 1, путь F). Следующий этап заключался в получении комплексов нитрильных производных хитозана, в которых нитрильная группа координирована к платине(II). Комплексы Pt(II) нитрильных производных хитозана (рисунок 1) получали действием на последние $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$. Полнота комплексообразования была подтверждена с помощью ИК-спектроскопии.

Полученные комплексы Pt(II) с нитрильными производными хитозана (рисунок 1) были использованы в качестве нитрильных субстратов в промотируемом платиной(II) 1,3-диполярном циклоприсоединении нитронов $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{N}(\text{O})\text{CH}_3$ ($\text{R}_1 = p\text{-ClC}_6\text{H}_4$, $\text{R}_2 = \text{H}$, $\text{R}_3 = \text{CH}_3$) и $\text{Ph}_2\text{C}=\text{N}(\text{O})\text{Ph}$ ($\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{Ph}$) (схема 6, путь A).

Для получения демеаллированных 1,2,4-оксадиазолиновых производных хитозана полученные циклоаддукты были обработаны dppe (1,2-дифенилфосфинэтан) в нитрометановой суспензии (схема 10, путь B). Таким образом, были получены оксадиазольные производные хитозана с высокими (0.60), низкими (0.18) и средними (0.40) степенями замещения, причём степень замещения полученных оксадиазольных производных была равна степени замещения исходных нитрильных производных. Важно отметить, что варьирование природы нитрона позволяет получить как водорастворимые (на основе альдонитронов), так и растворимые в толуоле (на основе кетонитронов) производные хитозана.

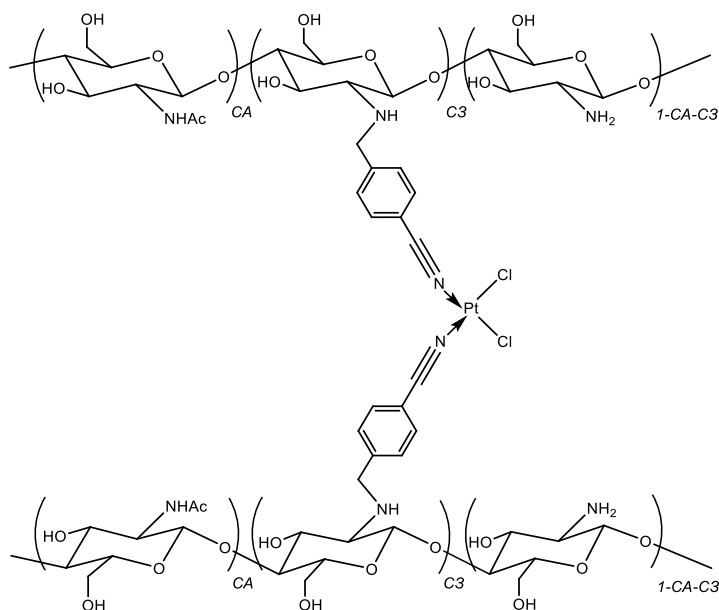


Рисунок 1. Предполагаемая структура комплекса Pt(II) с нитрильными производными хитозана.

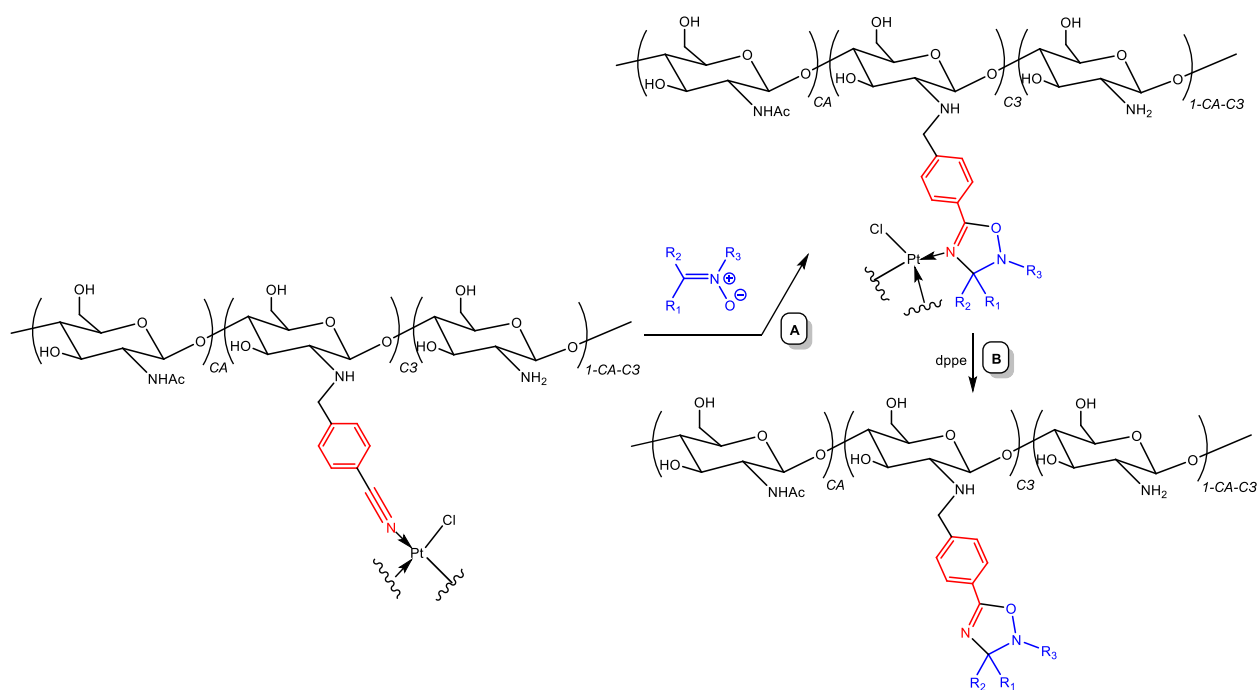


Схема 6. 1,3-диполярное циклоприсоединение нитронов к нитрильным лигандам – производным хитозана в комплексах Pt(II) под действием ультразвука.

2.1.8. Синтез А-ХИН. Химия хитина значительно скуднее химии хитозана, что обусловлено нерастворимостью хитина в воде практически во всех органических растворителях за исключением, например, сухого диметилацетамида в присутствии хлорида лития (ДМАА/LiCl). В литературе описан лишь один подход к получению

азидных производных хитина (действие на хитин тозилхлоридом с последующей обработкой азидом натрия). Однако данный подход характеризуется препаративной сложностью и плохой воспроизводимостью. В рамках диссертации было решено провести попытку получения азидных производных хитина путём обработки хитина 1-азидо-3-хлорпропан-2-олом (АХП) в гетерогенных условиях в воде (схема 2, путь А). Ни использование большого избытка АХП (13 экв.), ни высоких температур (80 °С), ни длительного времени реакции (24 ч) не привело к образованию азидных производных хитина со степенью замещения более 0.2. В связи с этим было решено проводить синтез под действием ультразвука.

В сонохимии представлены примеры алкилирования спиртов, и акустические условия для этой реакции 15–150 кГц 80–350 Вт. Однако в химии хитина не использовалась обработка ультразвуком для его химической модификации. В предварительных экспериментах было установлено, что ультразвуковая обработка водной суспензии хитина с 3 экв. АХП приводит к образованию азидных производных хитина, причем результат реакции сильно зависит от частоты и мощности применяемого ультразвукового облучения. Было обнаружено, что оптимальные акустические условия находятся в области частот 80–100 кГц и мощностей 250–300 Вт, оптимальное время реакции составляет 20 мин. Таким образом были получены азидные производные хитина со степенью замещения 0.15. Для получения более замещенных продуктов в тех же акустических условиях было увеличено мольное соотношение хитин:АХП до 1:6 и 1:10. В результате были синтезированы азидные производные хитина с низкой, средней и высокой степенью замещения.

Основываясь на описанных выше результатах, было предположено, что вполне эффективным подходом к синтезу азидных производных хитина может оказаться обработка хитина 2-азидометилоксираном (схема 2, путь В). Однако оказалось, что обработка хитина 2-азидометилоксираном в водной суспензии ни в традиционном, ни в ультразвуковом исполнении не приводит к образованию желаемых азидных производных хитина даже в жёстких условиях (температура 80 °С, 30 экв. 2-азидометилоксирана). Во всех случаях оксиран либо гидролизировался, либо полимеризовался с раскрытием цикла. В связи с этим было решено проводить реакцию в гомогенных условиях в ДМАА с добавлением хлорида лития (также было решено использовать диизопропилэтиламин (ДИЭА) в качестве основания для повышения нуклеофильности гидроксильных групп хитина). Предварительный эксперимент показал, что обработка хитина 5 экв. 2-азидометилоксирана в присутствии 1 экв. ДИЭА в течение 12 часов при комнатной температуре приводит к образованию азидных производных хитина со степенью замещения 0.68. Таким образом, были разработаны методики получения азидных производных хитина, в которых степень замещения продукта (низкая 0.18, средняя 0.40, высокая 0.80) регулируется простым варьированием мольного соотношения реагентов.

2.1.9. Синтез ТБ-ХИН, Н-ХИН, МН-ХИН и Г-ХИН. Азидные производные хитина, подобно азидным производным хитозана, могут быть использованы в качестве азидной компоненты в клик-реакции катализируемого медью(I) 1,3-диполярного азид-

алкинового циклоприсоединения с пропаргиловым эфиром бетаина (**схема 2**, путь **E**). Протокол с использованием ультразвука (100 кГц, 300 Вт, аналогично описанному в п. **2.1.6**) является очень удобным в препаративном отношении, поскольку он занимает мало времени (около 10 минут), в то время как методика проведения синтеза в традиционных условиях требует 5–8 часов.

Точно так же, как и пропаргиловый эфир бетаина, в клик-реакцию катализируемого медью(I) 1,3-диполярного азид-алкинового циклоприсоединения были вовлечены пропаргиловые эфиры (i) никотиновой кислоты (**схема 2**, путь **C**) (ii) *N*-метилникотиновой кислоты йодида (**схема 2**, путь **D**) и (iii) глицина (**схема 2**, путь **F**).

В результате были получены триазолбетаиновые, никотиновые, метилникотиновые и глициновые производные хитина с низкими, средними и высокими степенями замещения, которые соответствовали степеням замещения исходных азидных производных хитина.

2.1.10. Синтез ЦЭ-ХИН и Т-ХИН. В п. **2.1.3** был описан синтез цианоэтильных производных хитозана и образующихся из них тетразольных производных хитозана. Следуя аналогии протоколов синтеза тетразольных производных хитозана в традиционных условиях, были получены и тетразольные производные хитина (**схема 2**, пути **G** и **H**). Синтез цианоэтильных производных хитина проводили в растворе хитина в безводном диметилацетамиде с добавлением хлорида лития. При обработке хитина акрилонитрилом (60 °С, **схема 1**, путь **G**) образуются производные со степенью замещения 0.15 (хитин:акрилонитрил 1:3), 0.34 (хитин:акрилонитрил 1:7), 0.66 (хитин:акрилонитрил 1:12). Далее путём конверсии нитрильных групп в тетразольные гетероциклы при обработки азидом натрия в присутствии хлорида цинка или хлорида алюминия были получены тетразольные производные хитина с такой же степенью замещения (0.15, 0.34 и 0.64), как и исходные цианоэтильные производные (**схема 1**, путь **H**).

Особо следует отметить, что все шесть полученных новых производных хитина являются водорастворимыми, что представляет собой высокий интерес, новизну и актуальность для химии хитина.

2.1.11. Синтез нового палладиевого комплекса на основе хитина. В п. **2.1.7** было описано промотируемое платиной(II) 1,3-диполярное циклоприсоединение альдо- и кетонитронов к нитрилам под действием ультразвука и показана возможность использования этого превращения в качестве полимераналогичной реакции в химии хитозана. В принципе, в металлопромотируемом 1,3-диполярном циклоприсоединении в качестве субстратов могут выступать не только нитрильные субстраты, но и изонитрильные субстраты. Кроме того, в качестве металлоцентра может быть использована не только платина(II), но и палладий(II). Так, например, в публикациях автора диссертации, предшествующих данному исследованию, описано промотируемое палладием(II) взаимодействие кетонитронов с изонитрилами. Данная реакция протекает не по пути 1,3-диполярного циклоприсоединения, а по пути нуклеофильного оксигенирования с образованием имино-изонитрильных комплексов палладия(II) (**рисунок 2**).

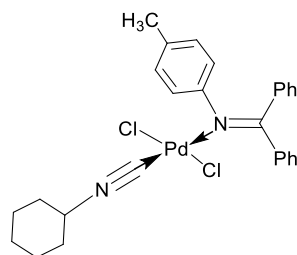


Рисунок 2. Имино-изонитрильный комплекс палладия(II).

Упомянутый имино-изонитрильный комплекс проявляет очень высокую каталитическую активность в реакции кросс-сочетания Соногаширы (выходы до 95 %, ТОН около 9950), кроме того он не требует медного сокатализатора и анаэробных условий. Главным же минусом данного катализатора является то, что он не может быть использован вторично и не может использоваться в воде. Для того, чтобы обойти эту проблему, в рамках данного исследования было решено использовать упомянутый катализатор (**рисунок 2**) на полимерной подложке, и в качестве полимера было решено использовать глицинтриазольное производное хитина. Данное производное хорошо растворимо в воде и в метаноле. Кроме того, структура данного производного позволяет предполагать широкие координационные способности (в структуре производного имеется ряд координирующихся групп и потенциальных хелаторов).

Действительно, смешивание метанольного раствора имино-изонитрильного комплекса палладия(II) (**руисунок 2**) с метанольным раствором глицинового производного хитина (**Г-ХИН-II-A⁶**) в молярном соотношении 1:1 (1 эквивалент комплекса Pd(II) к 1 замещенному звену производного хитина) привело к практически мгновенному формированию осадка, связанному с образованием комплекса Pd(II) на основе производного хитина.

Анализ ИК-спектра образовавшегося комплекса выявил (i) полосу валентных колебаний колебаний $C\equiv N$ координированного к Pd(II) изонитрильного лиганда при 2240 см^{-1} , (ii) смещеную (1430 см^{-1}) из-за координации к металлоцентру триазольного цикла атомом азота полосу колебаний $N=N$ (соответствующая полоса некоординированного триазольного производного хитина появляется в ИК спектре при 1400 см^{-1}), (iii) несмещённую по сравнению с некоординированным производным хитина полосу сложноэфирной группировки $C=O$ при 1728 см^{-1} и (iv) отсутствие полосы колебаний $Pd-Cl$ при 335 см^{-1} . Кроме того, было выявлено, что полосы валентных колебаний аминогрупп NH_2 образовавшегося палладиевого комплекса на основе хитинового производного находятся в той же области спектра ($3375\text{--}3300\text{ см}^{-1}$), что и валентные колебания первичных аминогрупп NH_2 исходного полимера. Кроме того, после взаимодействия имино-изонитрильного комплекса Pd(II) (**рисунок 2**) с

⁶ Здесь и далее **I** обозначает производное низкой степени замещения, **II** – средней, **III** – высокой, в конце названия **A** – производное хитина или хитозана **X3-A** или **XИН A**, **B** – производное **X3-B** или **XИН-B**, **B** – производное **X3-B** или **XИН-B**.

производным хитина в молярном соотношении 1:1 исходные соединения не были обнаружены в супернатанте после отфильтровывания выпавшего осадка образовавшегося хитинового комплекса и испарения растворителя. Эти факты позволили предложить следующую структуру образовавшегося хитинового комплекса Pd(II) (**рисунок 3**).

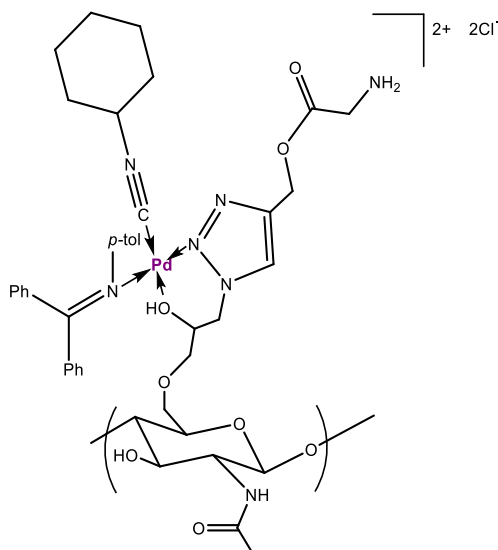


Рисунок 3. Предлагаемая структура образовавшегося хитинового комплекса Pd(II).

Если же проводить описанный выше эксперимент несколько иначе, используя сильно разбавленные растворы и добавляя раствор имино-изонитрильного комплекса Pd(II) (**рисунок 2**) к раствору триазольного производного хитина **Г-ХИН-II-Н** при энергичном перемешивании по каплям, то наблюдается образование слегка опалесцирующей наносuspension. Эксперименты по оптимизации условий показали, что добавление раствора имино-изонитрильного комплекса Pd(II) к раствору **Г-ХИН-II-Н** со скоростью 1 капля в 3 минуты приводит к образованию наночастиц с унимодальным распределением по размерам. Изменяя скорость добавления раствора комплекса палладия, можно получать наночастицы различных размеров, хотя и в довольно узком диапазоне (20–110 нм). Таким образом, были получены частицы комплекса с гидродинамическим диаметром 20 (1/4), 30 (1/3), 50 (1/2), 80 (1/1) и 110 (2/1) нм.⁷

В последующих экспериментах (см. раздел 2.3) была выявлена высокая каталитическая активность полученных наночастиц в реакции кросс-сочетания Соногаширы.

⁷ В скобках приведена скорость добавления раствора комплекса палладия к раствору полимера число капель/число минут.

2.2. Получение агрегатов на основе синтезированных производных

Известно, что полученные методом ионного гелирования агрегаты на основе хитозана и его производных в ряде случаев характеризуются более выраженными свойствами (например, антибактериальной активностью), чем полимер в нативной форме⁸. Зачастую в химии хитина и хитозана такие агрегаты называют наночастицами, даже если их размер превышает 100 нм⁸. Однако автор работы будет использовать термин «агрегаты», а не «наночастицы», т.к. макромолекулярный клубок сам по себе характеризуется наноразмерами. В рамках данной работы были получены агрегаты на основе синтезированных полимеров с использованием метода ионного гелирования. В качестве гелирующего агента был использован триполифосфат натрия (ТПП).

В итоге на основе подавляющего большинства синтезированных полимеров были получены агрегаты с гидродинамическим диаметром около 100, 200, 300, 500 и 800 нм (унимодальное распределение) и положительной величиной дзета-потенциала 18–68 мВ. Примеры изображений, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии представлены на **рисунке 4**.

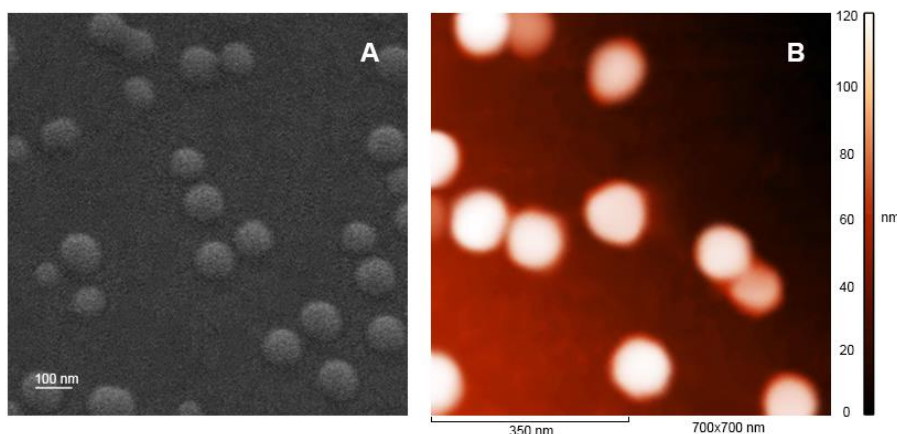


Рисунок 4. СЭМ- и АСМ-изображение агрегатов Аг-ТБ-ХЗ-III-A-100 (А и В, соответственно).

2.3. Каталитические свойства полученных полимеров и агрегатов на их основе

Альдольная реакция является мощным инструментом для образования С–С связей в органическом синтезе. Альдольная реакция используется в крупномасштабном производстве пентаэритрита, в синтезе аторвастатина, одного из важнейших препаратов для лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, и многих других практически важных веществ. Традиционный протокол альдольной реакции заключается в её проведении в неводной среде в присутствии этоксида натрия, или диизопропиламида лития или бис(триметилсилил)амида натрия. Хотя в некоторых случаях требуется только каталитическое количество основания, тем не менее чаще

⁸ Debnath S., Kumar R., Babu M. Ionotropic gelation - a novel method to prepare chitosan nanoparticles // Research Journal of Pharmacy and Technology. – 2011. – V. 4. – P. 492-495.

встречается использование стехиометрического количества сильного основания. Однако это может привести к нежелательным побочным реакциям (например, элиминированию).

Органокатализаторы, включая производные тетразола, становятся все более популярными в качестве альтернативных катализаторов. Литературные данные свидетельствуют о том, что тетразольные производные пролина проявляют высокую эффективность в качестве катализаторов альдольной реакции. Одним из наиболее эффективных катализаторов альдольной реакции из группы гомоприн-тетразольных производных на сегодняшний день является тетразольное производное гомопрлина (**рисунок 5**). Этот катализатор содержит фрагмент, имеющий структурное сходство с фрагментом тетразольного производного хитозана (**рисунок 5 А и В, синий**).

В литературе также имеются данные об использовании хитозана в качестве «зелёного» и пригодного для многократного использования катализатора ряда органических реакций, включая альдольную реакцию. Эти обстоятельства побудили автора оценить в препаративном эксперименте каталитический эффект тетразольных производных хитозана и агрегатов на их основе в модельной альдольной реакции между бензальдегидом и ацетоном, приводящей к образованию альдоля – 4-гидрокси-4-(4-хлорфенил)бутан-2-она (**схема 7, R = Cl**).

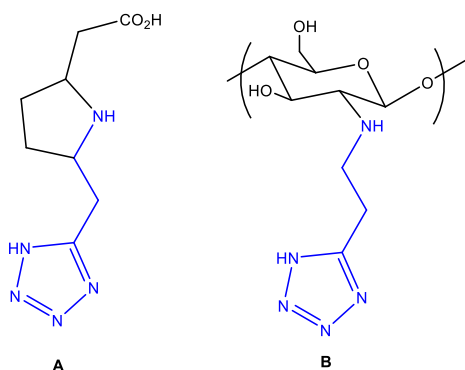


Рисунок 5. Активные каталитические центры тетразольного производного гомопрлина (А) и тетразольного производного хитозана (В).

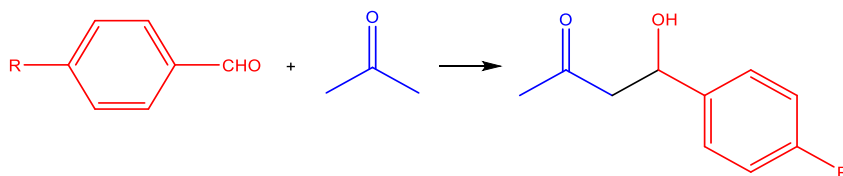


Схема 7. Модельная альдольная реакция (мольное соотношение реагентов 1:3).

С другой стороны, ряд исследований посвящен вовлечению не тетразолов, а 1,2,3-триазолов в качестве органокатализаторов альдольной конденсации. В рамках данной работы, как указывалось выше, были получены триазолсодержащие

производные хитина и хитозана (**ТБ-ХЗ**, **ТБ-ХЗ'**, **ТБ-ХИН**, **Н-ХИН**, **МН-ХИН**, **Г-ХИН**). Было решено исследовать каталитическую активность данных производных и агрегатов на их основе в модельной альдольной реакции между ацетоном и *n*-гидроксibenзальдегидом (**схема 7**, R = OH).

Модельные реакции проводили в воде при комнатной температуре. В таких условиях катализаторы растворимыми и каталитический процесс гомогенный. В случае же агрегатов катализ является гетерогенным. Каталитические свойства производных хитозана характеризуются выраженной зависимостью от степени замещения. Во всех случаях альдольная реакция, катализируемая низкозамещёнными производными, завершается за 60 минут, в то время как реакция, катализируемая высокозамещёнными производными, заканчивается за 20 минут.

Также была оценена селективность реакции путём мониторинга реакционной системы с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (электроспрей), спектроскопии ЯМР ^1H и ТСХ. В реакционных смесях в ходе реакции были обнаружены только исходный ароматический альдегид и полученный альдоль, а по окончании реакции только альдоль. Следует отметить, что каталитическая активность всех производных при условии равной степени замещения примерно одинакова, что связано с их структурным сходством. Так же во всех случаях каталитическая активность агрегатов оказалась меньше активности соответствующих производных хитозана и хитина, что видимо объясняется гетерогенностью каталитического процесса в случае агрегатов. Особо следует отметить, что использование данных производных в качестве катализаторов отличается препаративным удобством – для отделения катализатора от продуктов требуется лишь его осаждение этанолом с последующим центрифугированием и промывкой. После этого продукт выделяется в чистом виде путём удаления воды и избытка ацетона в вакууме, а катализатор может быть повторно использован без потери активности как минимум 10 раз.

Обработка жирных кислот или их солей глицидолом является наиболее прямым и удобным способом получения их моноэфиров (широко применяющихся в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности), полученных из глицерина (**схема 8**). Для гетерогенных катализаторов синтеза моноглицеридов, описанных в литературе (включая гетерогенные каталитические системы на основе хитозана), характерно быстрое ухудшение их каталитической активности при их повторном использовании. Примеры гомогенного катализа для синтеза моноглицеридов через раскрытие эпоксидного кольца освещены в литературе весьма скудно и представлены, главным образом, использованием аминов в качестве катализаторов. В представляемой работе была оценена каталитическая активность оксадиазолиновых производных хитозана, полученных исходя из кетонитрона $\text{Ph}_2\text{C}=\text{N}(\text{O})\text{Ph}$ (**схема 1**, путь **G**, **O-2-X3**), в качестве гомогенных катализаторов в реакции, изображённой на **схеме 8**, поскольку в данной реакции в качестве растворителя используется толуол, а производные хитозана **O-2-X3** хорошо растворимы в толуоле.

Результаты экспериментов указывают на то, что каталитическая активность оксадиазолиновых производных хитозана, полученных из кетонитрона высока и

характеризуется выраженной зависимостью от степени замещения производных. Высокозамещенные полимеры намного более эффективны по сравнению с полимерами средней или низкой степени замещения, что объясняется увеличением числа каталитических центров с ростом степени замещения. Агрегаты на основе производных оксадиазольных хитозана являются плохими катализаторами, в то время как сам хитозан вообще не проявляет каталитической активности в данной реакции.

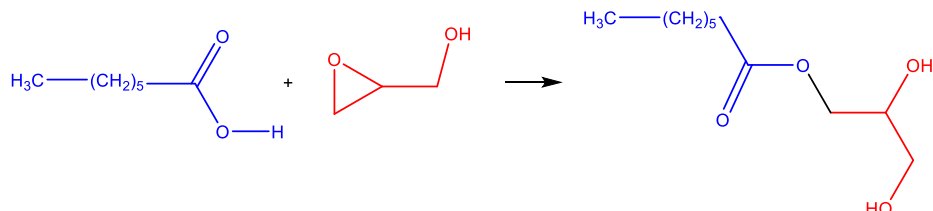


Схема 8. Синтез моноглицеридов через раскрытие эпоксидного кольца.

Также была оценена каталитическая активность соответствующих свободных оксадиазолиновых гетероциклов **ОХ-1** (см. **схема 5**, путь **С**) и **ОХ-2** (см. **схема 5**, путь **С'**). Нерастворимый в толуоле **ОХ-1** продемонстрировал низкую каталитическую активность, в то время как растворимый в толуоле **ОХ-2** оказался несколько более эффективным по сравнению с самыми активными полимерами на его основе. Однако, по сравнению с другими описанными низкомолекулярными гомогенными катализаторами (включая **ОХ-2**), разработанная полимерная каталитическая система является наиболее эффективной т.к. она (i) обеспечивает легкое её отделение от продукта реакции путем её осаждения ацетоном, (ii) устраняет необходимость хроматографической очистки продукта и (iii) облегчает повторное использование катализатора (как минимум 10 раз).

О преимуществах катализаторов на основе полимеров упоминалось выше. В связи с этим было решено протестировать в модельной реакции Соногаширы (**схема 9**) каталитическую активность палладиевого комплекса на основе хитина, описанного в п. **2.1.11** (**рисунок 3**), в двух его формах: в виде порошка и в виде наночастиц в такой же модельной реакции Соногаширы.

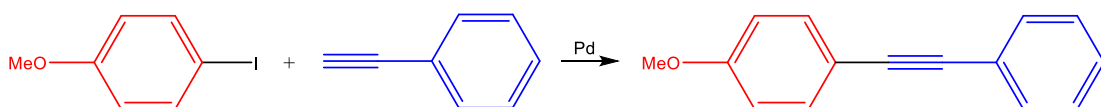


Схема 9. Модельная реакция кросс-сочетания Соногаширы.

В модельной реакции Соногаширы были испытаны различные растворители (вода, метанол, этанол, ацетонитрил, ТГФ, толуол, гексан), и было выявлено, что наиболее высокие выходы достигаются в воде, метаноле, этаноле и ацетонитриле. Поскольку вода считается эталонным «зелёным» растворителем, последующие

эксперименты проводили в воде. В результате было выявлено, что каталитическая активность хитинового комплекса на основе Pd(II) в форме наночастиц значительно выше, чем в виде порошка. При этом активность катализатора в форме имеет ярко выраженную зависимость от их размера. Каталитический эффект наночастиц значительно возрастает с уменьшением их гидродинамического диаметра до 30 нм. Дальнейшее уменьшение гидродинамического диаметра наночастиц не привело к заметному увеличению каталитической активности. Таким образом, наночастицы гидродинамического диаметра 30 нм были выбраны в качестве оптимальных каталитических наночастиц комплекса Pd(II) на основе хитина. Для скрининга оснований оценивали модельную реакцию кросс-сочетания Соногаширы с различными основаниями (K_2CO_3 , K_3PO_4 , DBU, Et_3N), среди которых K_2CO_3 показал наилучшие результаты. Следует отметить, что наночастицы могут быть повторно использованы в качестве катализатора модельной реакции Соногаширы не менее 10 раз.

2.4. Материалы на основе полученных производных полисахаридов

Противомикробные производные хитозана могут быть использованы при создании новых материалов, в частности, плёнок и пищевых покрытий, характеризующихся высокой эффективностью и экологичностью. Так, в рамках представляемого исследования было продемонстрировано, что смешением поликатионного высокоактивного антимикробного производного **ТБ-ХЗ-III-Б** и полианионного **СХ-Na** (натриевой соли сукцинилхитозана) можно легко получить компактные и однородные плёнки с улучшенными механическими и барьерными характеристиками.

Характеристики плёнок зависят от соотношения полимеров. Так, например, данные РСА (здесь и далее – порошковая дифракция) показывают, что по сравнению чистыми плёнками (т.е. плёнками на основе несмешанных исходных производных) дифракционные картины всех смешанных пленок характеризуются наличием более широких, более интенсивных пиков, указывающих на их полукристаллическую природу. Минимальная кристалличность характерна для чистых пленок на основе **ТБ-ХЗ-III-Б** или **СХ-Na**, а максимальная кристалличность – для соотношения 1:1 **СХ-Na:ТБ-ХЗ-III-Б** (рисунок 6).

Данные термогравиметрического анализа (ТГА) свидетельствуют, что термическая стабильность «чистых» плёнок примерно одинакова. Смешанные плёнки характеризуются повышенной термостабильностью, причём максимума она достигает при соотношении 1:1 **СХ-Na:ТБ-ХЗ-III-Б** (кривые ТГА представлены на рисунке 7).

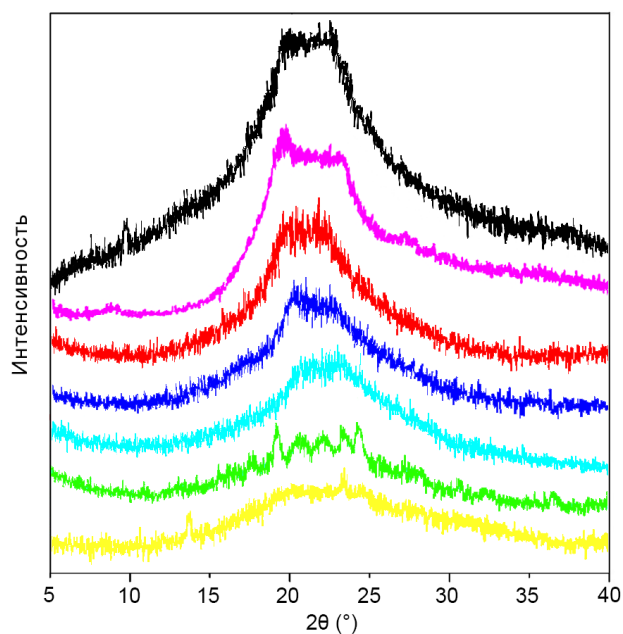


Рисунок 6. Рентгенограммы чистой плёнки **ТБ-ХЗ-III-Б** (желтая), чистой плёнки **СХ-Na** (зеленая) и смешанных пленок с соотношением **СХ-Na:ТБ-ХЗ-III-Б** 1:0.3 (лазурное), 1:0.4 (синее), 1:0.5 (красный), 1:2 (розовый) и 1:1 (черный).

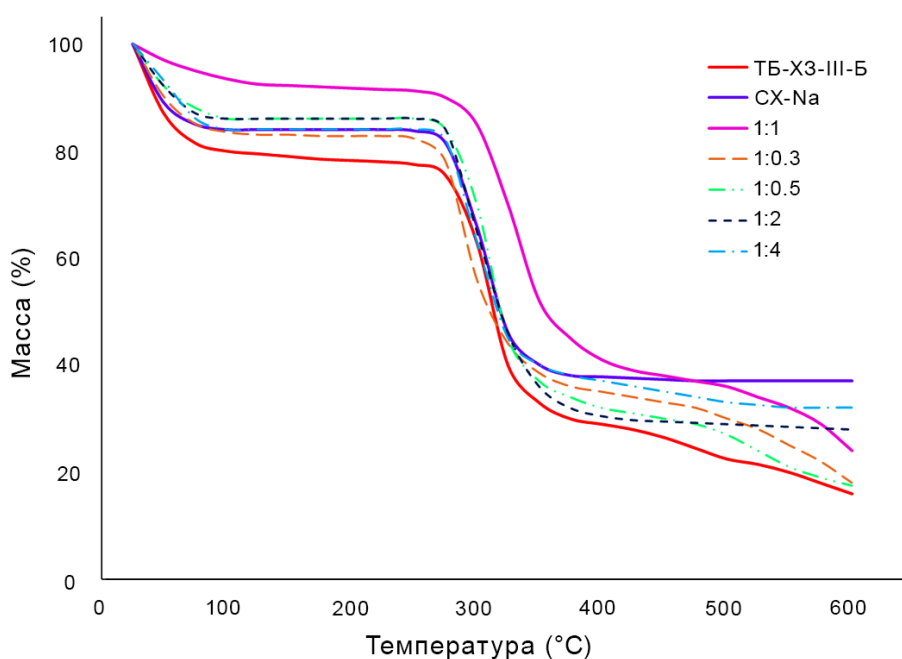


Рисунок 7. Данные ТГА для полученных плёнок.

Механические свойства (прочность на разрыв σ_b , относительное удлинение при разрыве ϵ_b), а также барьерные свойства (проницаемость кислорода (ОР) и водяного пара (WVP)) полученных плёнок представлены в **таблице 2**. Минимальные значения σ_b характерны для чистых плёнок, в то время, как максимальное значение σ_b наблюдается для смешанных плёнок при соотношении 1:1 **СХ-Na:ТБ-ХЗ-III-Б**. Напротив,

максимальные значения ε_b наблюдаются у чистых плёнок, а минимальное – у смешанной плёнки с соотношением производных 1:1. Барьерные же свойства достигают своего максимума у смешанных плёнок при соотношении 1:1 **СХ-Na:ТБ-ХЗ-III-Б**, в то время как у чистых плёнок они минимальны.

Таблица 2. Механические и барьерные свойства плёнок.

Плёнка	σ_b (МПа)	ε_b (%)	ОР ($\text{см}^3 \text{ мм м}^{-2} \text{ атм}^{-1} \text{ сут}^{-1}$)	WVP ($\times 10^{-10} \text{ г м}^{-1} \text{ с}^{-1} \text{ Па}^{-1}$)
ТБ-ХЗ-III-Б	4.01±1.19	351.25±0.55	0.97±0.11	56.23±0.11
1:0.3	18.92±1.88	81.40±0.37	0.74±0.15	31.33±0.29
1:0.5	41.37±1.58	32.11±1.23	0.52±0.22	9.57±0.13
1:1	87.22±2.17	09.08± 0.64	0.11±0.13	1.04±0.09
1:2	45.53±2.24	34.23± 0.56	0.43± 0.19	11.84±0.32
1:4	20.16±1.28	84.79± 0.43	0.82±0.21	32.75±0.21
СХ-Na	4.83±1.26	323.51±0.48	1.02±0.17	61.12±0.07

* Среднее значение $\pm$ С.О., n = 3

Полученные плёнки были охарактеризованы с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), см. **рисунок 8**. Поверхность чистых плёнок характеризуются морщинистостью, которая не наблюдается в случае комбинированных плёнок. Исчезновение морщин достигает своего максимума при соотношении **СХ-Na:ТБ-ХЗ-III-Б** 1:1. Поверхность плёнки с соотношением **СХ-Na:ТБ-ХЗ-III-Б** 1:1 выглядит компактной и непрерывной. Таким образом, данные СЭМ согласуются с данными анализа порошковой рентгеновской дифракции и барьерными свойствами для соответствующих плёнок.

Антибактериальная активность плёнок обусловлена наличием в последних высокоактивного антибактериального производного хитозана **ТБ-ХЗ-III-Б**, поэтому неудивительно, что их антибактериальная активность увеличивается с ростом массовой доли **ТБ-ХЗ-III-Б**.

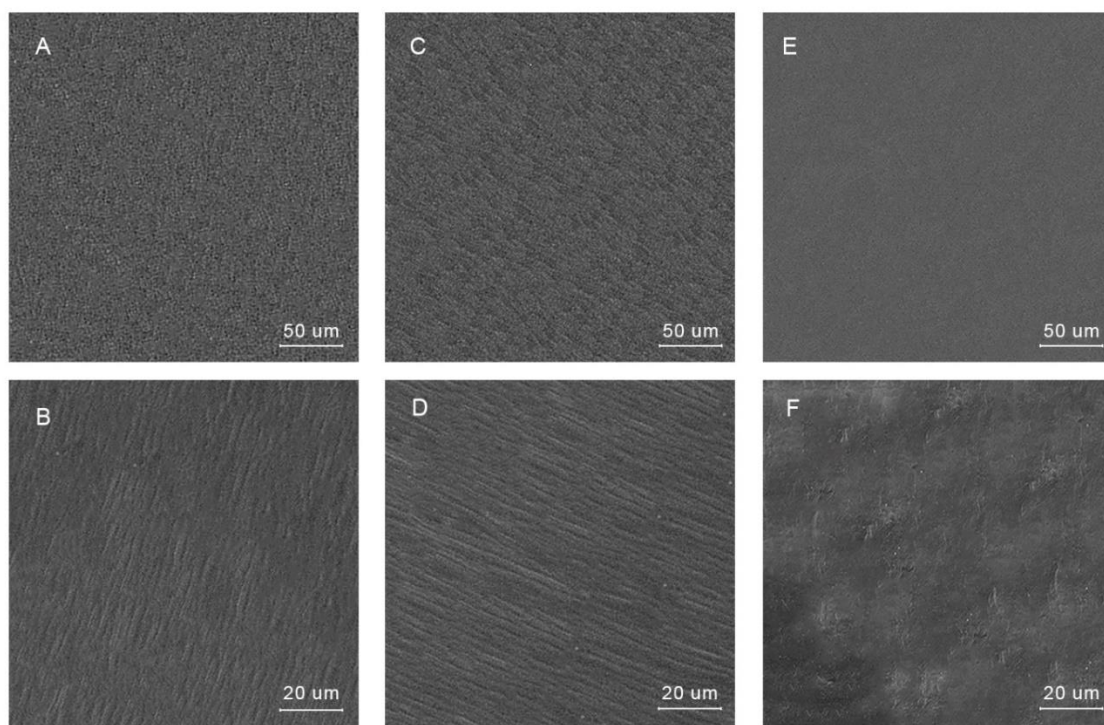


Рисунок 8. СЭМ поверхности плёнки **ТБ-ХЗ-III-Б** (А, В), **СХ-На** (С, D) и **ТБ-ХЗ-III-Б:СХ-На 1:1** (Е, F).

В рамках диссертации была изучена способность полученных покрытий увеличивать срок годности бананов. Было выявлено, что потеря веса, потеря витамина С и частота дыхания максимальны для покрытий на основе чистых производных, а минимальны для покрытия с соотношением **СХ-На:ТБ-ХЗ-III-Б** 1:1. Визуальный осмотр также выявил высокую эффективность последних покрытий (**рисунок 9**).

Таблица 3. Потеря массы, витамина С и скорость дыхания для бананов с покрытием и без покрытия.

Sample	Потеря массы* (г кг ⁻¹)			Потеря вит. С* (%)	Скорость дыхания* (CO ₂ : мл кг ⁻¹ ч ⁻¹)		
	1 ^й день	5 ^й день	10 ^й день		1 ^й день	5 ^й день	10 ^й день
ТБ-ХЗ-III-Б	24.1±0.17	39.3±0.21	64.5±0.25	50.2±0.18	51.1±0.15	51.5±0.41	52.1±0.33
1:0.3	18.8±0.12	32.1±0.11	52.5±0.10	30.9±0.12	42.5±0.18	42.8±0.34	41.2±0.21
1:0.5	12.6±0.11	24.5±0.32	40.1±0.17	19.6±0.16	34.1±0.11	33.5±0.23	33.4±0.15
1:1	7.3±0.08	18.1±0.52	23.7±0.12	8.1±0.43	20.6±0.11	21.3±0.28	19.8±0.12

1:2	13.1±0.19	24.9±0.11	38.6±0.12	18.3±0.22	32.4±0.24	31.8±0.19	31.2±0.17
1:4	19.1±0.15	30.3±0.13	50.7±0.19	28.5±0.10	45.41±0.11	44.2±0.16	43.7±0.17
CX-Na	24.6±0.18	38.7±0.14	63.2±0.11	52.8±0.09	53.6±0.10	51.2±0.18	52.2±0.12
Контроль	28.8±0.12	43.4±0.36	74.9±0.27	64.3±0.13	60.5±0.11	57.3±0.18	53.2±0.13

* Среднее значение ± С.О., n = 3



Рисунок 9. Эффективность покрытия на основе соотношения **CX-Na:ТБ-ХЗ-III-Б 1:1.**

В рамках получения новых материалов на основе синтезированных производных хитозана был разработан композит на основе производного **КП-ХЗ-III-A**. Для получения композита **КП-ХЗ-III-A** обрабатывали раствором хлорида цинка, а на следующем этапе – раствором гидроксида натрия (2 экв. по отношению к $Zn(II)$), получая, таким образом композит **КП-ХЗ-III-A-Zn**. Параллельно проводили такой же эксперимент, но используя хитозан вместо **КП-ХЗ-III-A**, и получая композит **ХЗ-Zn**. Полученные композиты были охарактеризованы с помощью комплекса инструментальных методов анализа, включающих ИК-спектроскопию, СЭМ, ТГА и РСА. Эти композиты представляли интерес для исследования в качестве полифункциональных материалов: легко регенерируемых цинксодержащих катализаторов и противомикробных материалов.

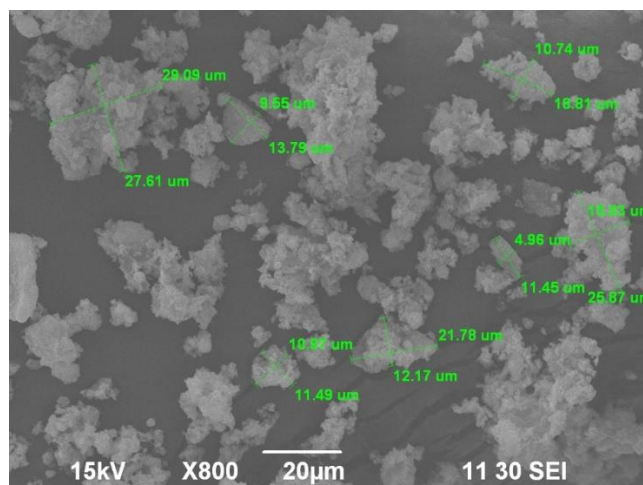


Рисунок 10. СЭМ изображение композита **КП-ХЗ-III-A-Zn**.

Каталитическая активность полученных систем была апробирована на модельной реакции, представленной на **схеме 10**.

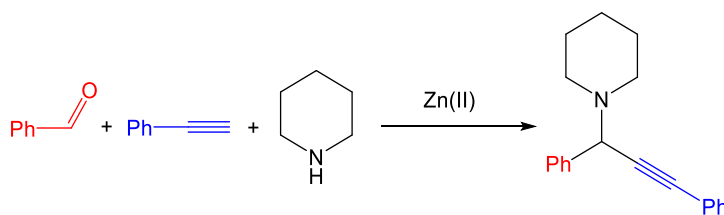


Схема 10. Катализируемый Zn(II) синтез пропаргиламинов.

Композиты **X3-Zn** и **КП-ХЗ-III-A-Zn** проявляют более высокую каталитическую активность чем $\text{ZnCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{Zn}(\text{OTf})_2$, $\text{Zn}(\text{OH})_2$ и ZnO . Наиболее эффективным катализатором является **КП-ХЗ-III-A-Zn**, а наиболее подходящим растворителем – толуол. Кроме того, было выявлено, что **КП-ХЗ-III-A-Zn** может быть использован повторно 6 раз без снижения его каталитической активности (после отделения от реакционной смеси центрифугированием, промывки толуолом, Me_2CO и Et_2O и сушки при комнатной температуре). Высокая каталитическая активность **КП-ХЗ-III-A-Zn** по сравнению с **X3-Zn** и возможность повторного использования **КП-ХЗ-III-A-Zn** могут быть объяснены высокой термостабильностью **КП-ХЗ-III-A-Zn**, что было подтверждено данными ТГА.

Антибактериальная активность **КП-ХЗ-III-A-Zn** и **X3-Zn** *in vitro* была изучена в сравнении с антибактериальной активностью исходного хитозана, **КП-ХЗ-III-A**, $\text{ZnCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{OH})_2$, ZnO и коммерчески доступными антибиотиками ампициллином и гентамицином в отношении *E. coli* и *S. aureus*. **КП-ХЗ-III-A-Zn** характеризуется высокой антибактериальной активностью. Это может быть объяснено симбатным эффектом повышенной катионной плотности **КП-ХЗ-III-A** по сравнению с исходным хитозаном и присутствием $\text{Zn}(\text{II})$ в композите.

Токсичность исходного хитозана, **КП-ХЗ-III-A**, **ХЗ-Zn**, **КП-ХЗ-III-A-Zn**, $\text{ZnCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{OH})_2$, ZnO , ампициллина и гентамицина исследовали *in vitro* с помощью МТТ-теста. При концентрациях менее 700 нг/мкл **КП-ХЗ-III-A**, **ХЗ-Zn**, **КП-ХЗ-III-A-Zn** характеризуются токсичностью, сходной с токсичностью исходного хитозана. При тех же концентрациях $\text{ZnCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{OH})_2$, ZnO , ампициллин и гентамицин проявили двукратную и более высокую токсичность.

2.5. Противомикробная активность полученных производных и агрегатов на их основе

Антибактериальную активность исследовали в отношении *S. aureus* и *E. coli*. Антибактериальная активность *in vitro* была исследована с помощью диффузии в агар по зоне ингибирования роста бактерий в сравнении с исходным хитозаном и антибиотиками ампициллином и гентамицином. В исследования были вовлечены производные хитозана низкой, средней и высокой молекулярной массы с низкими, средними и высокими степенями замещения. В **таблице 4** представлены данные по антибактериальной активности (зона ингибирования, минимальная ингибирующая концентрация (МИК)) наиболее активных производных хитозана и хитина. Также в таблице указано, какая молекулярная масса и степень замещения является оптимальной в плане антибактериальных свойств для каждого типа производных.

С целью исследования влияния полученных производных на целостность мембраны использовалась спектрофотометрия суспензии бактериальных клеток в 0.5 % водном растворе хлорида натрия в УФ области. Этот подход основан на том, что внутриклеточные компоненты характеризуются сильным поглощением при 260 нм. Посредством данного способа в рамках данной работы изучался эффект хитозана и полученных производных на целостность клеточных мембран *S. aureus* и *E. coli*. Для исследований были выбраны наиболее активные в подавляющем большинстве случаев производные хитозана средней молекулярной массы. Результаты представлены в **таблице 4**.

Таблица 4. Сводная таблица данных испытаний *in vitro* наиболее активных производных хитозана и **ХЗ-С**.

Образец	Зона ингибирования, нм*		МИК		ММ опт. $\times 10^4$ Да исх. хитозана	СЗ опт.	Высвобождение содержимого клетки <i>S. aureus</i>		Высвобождение содержимого клетки <i>E. coli</i>		Относительная флуоресценция на плато	β -галактозидазная активность (A_{420} на плато)
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>			A_{260} на плато	Время выхода на плато, мин	A_{260} на плато	Время выхода на плато, мин		
ДЭАЭ-ХЗ-III-Б	22.8 $\pm$ 0.2	18.1 $\pm$ 0.3	0.87	2.48	6.9	В.	0.96	50	0.61	60	561	0.0464
ДЭАЭ-ХЗ-III-Б(N,O)	22.4 $\pm$ 0.2	18.5 $\pm$ 0.1	0.87	2.50	6.9	В.	0.92	50	0.62	60	561	0.0462
А-ХЗ-III-Б	23.5 $\pm$ 0.6	16.7 $\pm$ 0.6	1.19	4.15	Н. вл.	В.	0.89	45	0.56	45	506	0.0490
А-ХЗ-III'-Б	26.5 $\pm$ 0.3	18.2 $\pm$ 0.1	0.62	2.49	Н. вл.	В.	0.94	35	0.63	35	552	0.0481
А-ХЗ-III'-Б(N,O)	26.3 $\pm$ 0.4	18.1 $\pm$ 0.2	0.63	2.49	Н. вл.	В.	0.93	35	0.64	35	555	0.0480
А-ХИН-III-Б	31.5 $\pm$ 0.6	21.4 $\pm$ 0.6	0.23	1.92	Н. вл.	В.	0.92	35	0.62	30	560	0.0488
Т-ХЗ-III-Б	29.1 $\pm$ 0.2	17.4 $\pm$ 0.2	0.98	1.27	6.9	В.	0.90	35	0.55	45	509	0.0493
Т-ХИН-III-Б	30.9 $\pm$ 0.5	21.9 $\pm$ 0.1	0.67	1.92	6.9	Н. вл.	0.95	15	0.62	25	697	0.0519
О-1-ХЗ-III-Б	36.3 $\pm$ 0.1	28.9 $\pm$ 0.2	0.90	1.01	6.9	В.	1.04	35	0.69	40	552	0.0643
II-ХЗ-III-Б	27.0 $\pm$ 0.1	20.9 $\pm$ 0.2	0.67	2.12	6.9	В.	-	-	-	-	-	-
КП-ХЗ-III-Б	14.2 $\pm$ 0.1	14.2 $\pm$ 0.1	0.87	2.65	6.9	В.	-	-	-	-	-	-
ТМАБХ-ХЗ-III-Б	27.5 $\pm$ 0.1	18.8 $\pm$ 0.3	0.69	2.21	6.9	В.	1.03	35	0.72	50	604	0.0415
Б-ХЗ-III-Б	39.3 $\pm$ 0.3	22.0 $\pm$ 0.2	0.54	1.06	6.9	В.	1.06	35	0.79	40	709	0.0531
СБ-ХЗ-III-Б	28.1 $\pm$ 0.2	21.8 $\pm$ 0.1	0.62	1.61	6.9	В.	1.04	35	0.78	40	659	0.0504
ТБ-ХЗ-III-Б	36.5 $\pm$ 0.1	28.2 $\pm$ 0.2	0.69	0.74	6.9	В.	1.13	40	0.78	30	915	0.0711
ТБ-ХЗ-III'-Б(N,O)	41.3 $\pm$ 0.2	34.2 $\pm$ 0.2	0.24	0.37	6.9	В.	1.19	40	0.84	45	1097	0.0952
ТБ-ХЗ-III'-Б	41.8 $\pm$ 0.3	34.4 $\pm$ 0.2	0.25	0.38	6.9	В.	1.14	40	0.85	45	1095	0.0950
ТБ-ХИН-III-Б	41.0 $\pm$ 0.2	36.2 $\pm$ 0.2	0.27	0.28	6.9	В.	1.16	40	0.89	45	1003	0.0906
Н-ХИН-III-Б	37.4 $\pm$ 0.1	24.8 $\pm$ 0.2	0.69	1.02	6.9	В.	1.02	35	0.73	45	986	0.0788
МН-ХИН-III-Б	40.8 $\pm$ 0.2	34.6 $\pm$ 0.2	0.23	0.38	6.9	В.	1.19	40	0.84	45	1021	0.0917
ХЗ-Б	13.5 $\pm$ 0.3	10.4 $\pm$ 0.1	68	122	6.9	-	0.87	60	0.51	70	302	0.0253

* Среднее значение $\pm$ С.О., n=3.

ММ опт. – оптимальная молекулярная масса, СЗ опт. – оптимальная степень замещения, В – высокая степень замещения, Н. вл. – не влияет. Прочерк – эксперименты не проводились.

В рамках данной работы исследование проницаемости внешней мембраны *S. aureus* и *E. coli* проводили с помощью мониторинга поглощения 1-*N*-фенилнафтиламина (ФНА). ФНА, являющийся гидрофобным зондом, в норме не поглощается из внешней среды грамотрицательными бактериями. Усиленное поглощение ФНА происходит в бактериальных суспензиях, содержащих бактериальные клетки, наружная мембрана которых повреждена. Поглощение проявляется в виде резкого усиления флуоресценции, поскольку квантовый выход ФНА значительно увеличивается в среде глицерофосфолипидов, а не в водной. Для подтверждения того, что используемый в работе хитозан и его производные проникают через клеточную стенку *E. coli*, взаимодействуют с внутренней мембраной и нарушают её проницаемость, нами было проведено исследование выхода галактозидазы во внешнюю среду. Результаты исследований проницаемости внешней мембраны и β -галактозидазной активности представлены в **таблице 4**.

Также была исследована *in vitro* противогрибковая активность полученных производных в отношении *A. fumigatus* и *G. candidum* в сравнении с хитозаном и противогрибковым препаратом амфотерицином В (данные по эффекту наиболее активных производных представлены в **таблице 5**). Характер проявления противогрибковой активности аналогичен характеру проявления антибактериальной активности последних.

Таблица 5. Противогрибковая активность наиболее эффективных производных.

Образец	Микроорганизм	
	<i>A. fumigatus</i>	<i>G. candidum</i>
	Зона ингибирования, мм	
Н-ХИН-I-A	16.1±0.1	7.9±0.3
Н-ХИН-I-B	18.0±0.3	9.1±0.2
Н-ХИН-I-B	16.2±0.1	7.7±0.2
Н-ХИН-II-A	18.2±0.3	16.1±0.2
Н-ХИН-II-B	22.1±0.1	20.5±0.3
Н-ХИН-II-B	18.0±0.1	16.2±0.3
Н-ХИН-III-A	21.8±0.1	20.1±0.1
Н-ХИН-III-B	26.2±0.1	24.3±0.2
Н-ХИН-III-B	22.0±0.1	20.3±0.3
МН-ХИН-I-A	19.2±0.6	17.1±0.2
МН-ХИН-I-B	20.2±0.1	19.9±0.1
МН-ХИН-I-B	18.7±0.3	17.4±0.2
МН-ХИН-II-A	20.3±0.2	19.1±0.1
МН-ХИН-II-B	25.7±0.2	23.9±0.5
МН-ХИН-II-B	20.0±0.3	19.5±0.1
МН-ХИН-III-A	23.5±0.1	22.2±0.1
МН-ХИН-III-B	28.3±0.1	26.6±0.2
МН-ХИН-III-B	23.1±0.1	22.2±0.3
Амфотерицин В	28.7±0.2	26.4±0.2

* Среднее значение ± С.О., n=3.

Следует отметить, что противомикробная активность полученных производных выражена в большей степени у соединений, содержащих кватернизованный атом азота. Кроме того, противомикробную активность триазолбетаиновых и азидных производных как хитина, так и хитозана, а также оксадиазольных производных хитозана обуславливает вводимый в полимерную цепь заместитель, что было подтверждено высокой противомикробной активностью соответствующих вводимому заместителю низкомолекулярных соединений (2-азидоэтанола, 1-азидо-3-хлорпропан-2-ола, [3-(4-хлорфенил)-2-метил-5-*пара*-толил]-2,3-дигидро-1,2,4-оксадиазола, триазолбетаина ({2-[(1-(3-хлор-2-гидроксипропил)-1*H*-1,2,3-триазол-4-ил]метокси}-*N,N,N*-триметил-2-оксоэтан-1-аммоний хлорида)).

Во многих случаях агрегаты на основе полимеров характеризуются более выраженной противомикробной активностью, чем исходные полимеры в их нативной форме. В связи с этим была исследована противомикробная активность агрегатов наиболее активных производных с гидродинамическим диаметром около 100, 200, 300, 500 и 800 нм. Было выявлено, что наиболее эффективными являются агрегаты с наименьшим гидродинамическим диаметром 100 нм.

С помощью МТТ-теста была оценена *in vitro* токсичность полученных производных и агрегатов на их основе, а также соответствующих вводимому заместителю низкомолекулярных соединений (см. выше). Было выявлено, что наибольшей токсичностью характеризуются диэтиламиноэтильные производные. Токсичность же всех остальных производных сопоставима с токсичностью исходного хитозана. Токсичность агрегатов практически не отличается от токсичности соответствующих производных хитозана. Токсичность испытанных низкомолекулярных соединений значительно выше токсичности производных хитозана на их основе. Следовательно, конъюгация с хитином или хитозаном снижает их токсичность.

В целях дальнейшей проверки эффективности полученных высокоактивных полимеров **ТБ-ХЗ-III-Б**, **ТБ-ХЗ-III'-Б**, **ТБ-ХИН-III-Б**, **МН-ХИН-III-Б** и агрегатов на их основе, в рамках данной работы были тестированы эти антибактериальные системы на основе хитозана *in vivo* на крысах в модельном перитоните в сравнении с исходным хитозаном, ампициллином, гентамицином, а также триазолбетаином. По результатам испытаний установлено, что полимеры и их агрегаты проявляют чрезвычайно высокую антибактериальную активность *in vivo*: после отбора экссудата рост колоний не был обнаружен (результаты представлены в **таблице 6**). Более низкая эффективность ампициллина, гентамицина или триазолбетаина связана с быстрой элиминацией этих веществ при внутриполостном введении. Элиминация полимеров и агрегатов происходит значительно медленнее, что приводит к увеличению антибактериальной активности.

Таблица 6. Результаты исследования антибактериальной активности *in vivo*.

Образец	КОЕ/мл экссудата (7 ч после лечения или 31 час после инфицирования)
Контроль без лечения (24 ч после инфицирования)	2550
Хитозан	1800
ТБ-ХЗ-III-Б	0 (нет роста)
НЧ-ТБ-ХЗ-III-Б	0 (нет роста)
ТБ-ХЗ-III'-Б	0 (нет роста)
НЧ-ТБ-ХЗ-III'-Б	0 (нет роста)
ТБ-ХИН-III-Б	0 (нет роста)
НЧ-ТБ-ХИН-III-Б	0 (нет роста)
МН-ХИН-III-Б	0 (нет роста)
НЧ-МН-ХИН-III-Б	0 (нет роста)
Ампициллин	550
Гентамицин	340
Триазолбетаин	600

ВЫВОДЫ

Основным итогом диссертационной работы является развитие нового научного направления в химии хитина и хитозана – «полимераналогичные превращения хитина и хитозана под действием ультразвуковых колебаний», открывающего новые перспективы для синтеза производных хитина и хитозана и материалов на их основе с заданными свойствами.

1. Выявлены акустические условия, позволяющие промотировать ряд классических и новых полимераналогичных реакций хитина и хитозана с сохранением целостности полисахаридной цепи.

2. Установлено активирующее влияние ультразвукового облучения на фенол-иновую клик-реакцию, тиол-иновую клик-реакцию, а также реакцию промотируемого платиной(II) нитрон-нитрильного 1,3-диполярного циклоприсоединения.

3. В химию хитозана внедрены новые для хитинологии реакции фенол-инового, тиол-инового, металлокатализируемого азид-нитрильного и металлопромотируемого нитрон-нитрильного 1,3-диполярного циклоприсоединения под действием ультразвука, а также разработаны методики синтеза новых производных хитозана на основе систематического исследования упомянутых реакций.

4. Выявлено активирующее влияние ультразвука на катализируемое медью(I) азид-алкиновое циклоприсоединение. С использованием упомянутого эффекта разработаны методики синтеза шести новых водорастворимых производных полностью *N*-ацетилированного хитина (за период, предшествующий данному диссертационному исследованию, в литературе было описано лишь восемь водорастворимых производных полностью *N*-ацетилированного хитина).

5. На основе синтезированных производных хитина и хитозана получен ряд высокоактивных катализаторов органических реакций (альдольной реакции, реакции сочетания бензальдегида с фенилацетиленом и пиперидином, реакции синтеза моноглицеридов из глицидола, а также реакции кросс-сочетания Соногаширы). Выявлена высокая каталитическая активность комплекса палладия(II) на основе триазолбетаинового производного хитина в реакции Соногаширы в аэробных условиях без медного сокатализатора в воде.

6. Проведено систематическое исследование противомикробной (антибактериальной и противогрибковой) активности полученных производных хитина и хитозана, а также агрегатов на их основе. Выявлена низкая токсичность и высокая антибактериальная активность триазолбетаиновых производных хитина и хитозана агрегатов на их основе, превышающая активность антибиотиков ампициллина и гентамицина *in vivo*.

7. На основе наиболее активного противомикробного производного хитозана созданы новые плёнки и пищевые покрытия, характеризующиеся высокой эффективностью, экологичностью и значительно продлевающие срок годности скоропортящихся фруктов (бананов).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ОПУБЛИКОВАНО В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ:

Монографии:

1. Критченков А.С., Ягафаров Н.З., Хрусталёв В.Н. Производные хитозана: синтез, антибактериальная и трансфекционная активность // Москва : РУДН, 2020. – 207 с. : ил.
2. Критченков А.С., Егоров А.Р., Дысин А.П., Рубаник В.В., Рубаник В.В.-мл. Актуальные проблемы прочности (Гл. 28. Ультразвук в химии полимеров) // Молодечно, Победа, 2020, в 2 т.

Статьи:

1. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Abramovich R. A., Kurliuk A. V., Shakola, T. V, Kultyshkina E. K., Meza M. J. B., Pavlova A. V., Suchkova E. P., Thuy G. L., Van Tuyen N., Khrustalev V. N. Water-soluble triazole chitin derivative and its based nanoparticles: Synthesis, characterization, catalytic and antibacterial properties // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – V. 257. – 117593.
2. Kritchenkov A. S., Kurasova M.N., Godzishvskaya A.A., Mitrofanova E.S., Egorov A. R., Yagafarov N. Z., Ballesteros Meza M. J., Tskhovrebov A. G., Artemjev A. A., Andrusenko E.V., Khrustalev V. N. High antibacterial activity and low toxicity of pyridoxal derivatives of chitosan and their nanoparticles // *Mendeleev Communications*. – 2021. – V. 31, № 4. – P. 504-506.
3. Kritchenkov A. S., Kurachenkov A. I., Egorov A. R., Yagafarov N. Z., Fortalnova E. A., Lobanov N. N., Khomik A.S., Khrustalev V. N. Novel Zn(II)/chitosan-based composite: ultrasound assisted synthesis, catalytic and antibacterial activity // *Mendeleev Communications*. – 2020. – V. 30, № 5. – P. 642-644.
4. Kritchenkov, A. S., Kletskov A. V., Egorov, A. R., Tskhovrebov A. G., Kurliuk A. V., Zhaliashniak N. V., A. V. Shakola, T. V, Khrustalev V. N. New water-soluble chitin derivative with high

- antibacterial properties for potential application in active food coatings // *Food Chemistry*. – 2021. – V. 343, – 128696.
5. Kritchenkov A. S., Kletskov A. V., Egorov A. R., Kurasova M. N., Tskhovrebov A. G., Khrustalev V. N. Ultrasound and click chemistry lead to a new chitin chelator. Its Pd(II) complex is a recyclable catalyst for the Sonogashira reaction in water // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – V. 252. – 117167.
 6. Kritchenkov A. S., Lipkan N. A., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Egorov A. R., Volkova O. V., Meledina T. V., Suchkova E. P., Zabodalova L. A., Dysin A. P. Synthesis and Antibacterial Activity of Chitin Tetrazole Derivatives // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2020. – V. 54, № 2. – P. 138-141.
 7. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Artemjev A. A., Kritchenkov I. S., Volkova O. V., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Rubanik V. V., Tskhovrebov A. G., Yagafarov N. Z., Khrustalev V. N. Ultrasound-assisted catalyst-free thiol-yne click reaction in chitosan chemistry: Antibacterial and transfection activity of novel cationic chitosan derivatives and their based nanoparticles // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – V. 143. – P. 143-152.
 8. Kritchenkov A. S., Kletskov A. V., Egorov A. R., Kurliuk A. V., Rubanik V. V., Khrustalev V. N. New water-soluble derivatives of chitin and their based nanoparticles: Antibacterial and catalytic activity // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – V. 163. – P. 2005-2012.
 9. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Artemjev A. A., Kritchenkov I. S., Volkova O. V., Kiprushkina E. I., Zabodalova L. A., Suchkova E. P., Yagafarov N. Z., Tskhovrebov A. G., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Khrustalev V. N. Novel heterocyclic chitosan derivatives and their derived nanoparticles: Catalytic and antibacterial properties // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – V. 149. – P. 682-692.
 10. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Yagafarov N. Z., Volkova O. V., Zabodalova L. A., Suchkova E. P., Kurliuk A. V., Khrustalev V. N. Efficient reinforcement of chitosan-based coatings for Ricotta cheese with non-toxic, active, and smart nanoparticles // *Progress in Organic Coatings*. – 2020. – V. 145. – 105707.
 11. Kritchenkov A. S., Zhaliashniak N. V., Egorov A. R., Lobanov N. N., Volkova O. V., Zabodalova L. A., Suchkova E. P., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Rubanik V. V., Rubanik V. V., Yagafarov N. Z., Khomik A. S., Khrustalev V. N. Chitosan derivatives and their based nanoparticles: ultrasonic approach to the synthesis, antimicrobial and transfection properties // *Carbohydrate Polymers*. – 2020. – V. 242. – 116478.
 12. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Volkova O. V., Zabodalova L. A., Suchkova E. P., Yagafarov N. Z., Kurasova M. N., Dysin A. P., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Khrustalev V. N. Active antibacterial food coatings based on blends of succinyl chitosan and triazole betaine chitosan derivatives // *Food Packaging and Shelf Life*. – 2020. – V. 25. – 100534.
 13. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Volkova O. V., Kritchenkov I. S., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Khrustalev V. N. Ultrasound-assisted catalyst-free phenol-yne reaction for the synthesis of new water-soluble chitosan derivatives and their nanoparticles with enhanced antibacterial properties // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – V. 139. – P. 103-113.
 14. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Kurasova M. N., Volkova O. V., Meledina T. V., Lipkan N. A., Tskhovrebov A. G., Kurliuk A. V., Shakola T. V., Dysin A. P., Egorov M. Y., Savicheva E. A., dos Santos W. M. Novel non-toxic high efficient antibacterial azido chitosan derivatives with potential application in food coatings // *Food Chemistry*. – 2019. – V. 301. – 125247.

15. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Dysin A. P., Volkova O. V., Zabodalova L. A., Suchkova E. P., Kurliuk A. V., Shakola T. V. Ultrasound-assisted Cu(I)-catalyzed azide-alkyne click cycloaddition as polymer-analogous transformation in chitosan chemistry. High antibacterial and transfection activity of novel triazol betaine chitosan derivatives and their nanoparticles // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – V. 137. – P. 592-603.
16. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Krytchankou I. S., Dubashynskaya N. V., Volkova O. V., Shakola T. V., Kurliuk A. V., Skorik Y. A. Synthesis of novel 1H-tetrazole derivatives of chitosan via metal-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition. Catalytic and antibacterial properties of [3-(1H-tetrazole-5-yl)ethyl]chitosan and its nanoparticles // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – V. 132. – P. 340-350.
17. Критченков А.С., Скорик Ю.А. Промотируемое цинком(II) 1,3-диполярное циклоприсоединение азид-иона к цианоэтилхитозану: синтез тетразольного производного хитозана // *Известия Уфимского научного центра РАН*. – 2018. – Т.3-2. – С. 64-66.
18. Raik S. V., Poshina D. N., Lyalina T. A., Polyakov D. S., Vasilyev V. B., Kritchenkov A. S., Skorik Y. A. N-4-(N,N,N-trimethylammonium)benzyl chitosan chloride: Synthesis, interaction with DNA and evaluation of transfection efficiency // *Carbohydrate Polymers*. – 2018. – V. 181. – P. 693-700.
19. Kritchenkov A. S., Egorov A. R., Skorik Y. A. Azide pre-click modification of chitosan: N-(2-azidoethyl)chitosan // *Russian Chemical Bulletin*. – 2018. – V. 67, № 10. – P. 1915-1919.
20. Kritchenkov A. S., Skorik Y. A. Click reactions in chitosan chemistry // *Russian Chemical Bulletin*. – 2017. – V. 66, № 5. – P. 769-781.

Тезисы докладов и научные труды по итогам конференций

1. Kritchenkov A.S., Kritchenkov I.S. Ultrasound-promoted polymer-analogous transformation of chitin and chitosan, antimicrobial activity of the derivatives obtained and new materials based on them // International scientific conference, Catalysis for a Sustainable World: тез. докл., Москва, декабрь 2020 г., С. 43–46.
2. Kritchenkov A.S., Skorik Y.A. Click reactions in chitosan chemistry // 29th International Carbohydrate Symposium: тез. докл., Лиссабон (Lisbon), июль 2018 г., С. OC71.
3. Критченков А.С. Click reactions + ultrasound = a new aurora of chitosan chemistry // II Стручковские чтения. Международная конференция по кристаллохимии и структурной биологии: тез. докл., Москва, ноябрь 2018 г., С. 31 (пленарный доклад)
4. Kritchenkov A.S., Skorik Y.A. Novel chitosan-betaine derivatives obtained via click-chemistry // Тринадцатая международная Санкт-Петербургская конференция молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах»: тез. докл., Санкт-Петербург, ноябрь 2017 г., С. 41.
5. Критченков А.С., Скорик Ю.А. Синтез пиридоксального производного хитозана, потенциального генно-терапевтического вектора // Российская конференция с международным участием «Неделя науки в СПбПУ»: тез. докл., Санкт-Петербург, ноябрь 2017 г., С. 19.
6. Раик С.В., Пошина Д.Н., Поляков Д.С., Критченков А.С., Скорик Ю.А. Синтез и трансфекционная активность N-[4-(триметиламмоний)бензил]хитозана // VII Всероссийская Каргинская конференция: тез. докл., Москва, июнь 2017 г., С. 339.

Критченков Андрей Сергеевич

Новые функционализированные производные хитозана: подходы к получению и свойства

В работе выявлены оптимальные акустические условия, позволяющие использовать ультразвуковые колебания для промотирования ряда полимераналогичных превращений хитина и хитозана. Впервые в хитинологии использованы клик-реакции фенол-инового и тиол-инового присоединения, азид-нитрильного и нитрон-нитрильного 1,3-диполярного циклоприсоединения в качестве полимераналогичных превращений. В результате работы получен ряд новых водорастворимых производных хитина и хитозана. На основе синтезированных производных методом ионного гелирования триполифисфатом натрия получены наночастицы. Для производных хитина и хитозана, а также наночастиц на их основе выявлена высокая противомикробная активность (в том числе *in vivo*) и каталитическая активность в ряде органических реакций (реакция Соногашеры в воде, альдольная реакция, реакция синтеза моноглицеридов). С использованием наиболее активного в антимикробном отношении производного хитозана получены новые высокоэффективные пищевые покрытия, значительно продляющие срок годности скоропортящихся фруктов (бананов).

Kritchenkov Andreii (Krytchankou Andrei)

New functionalized derivatives of chitosan: approaches to preparation and properties

The work revealed the optimal acoustic conditions that allow the use of ultrasonic vibrations to promote a number of polymer-analogous transformations of chitin and chitosan. For the first time in chitinology, phenol-yne and thiol-yne click reactions, azido-nitrile and nitron-nitrile 1,3-dipolar cycloadditions were used as polymer-analogous transformations. As a result of the work, a number of new water-soluble derivatives of chitin and chitosan were obtained. Nanoparticles were obtained on the basis of the synthesized derivatives by ionic gelation with sodium tripolyphosphate. For derivatives of chitin and chitosan, as well as nanoparticles based on them demonstrated high antimicrobial activity (including *in vivo*) and catalytic activity in a number of organic reactions (Sonogashira reaction in water, aldol reaction, reaction of monoglyceride synthesis). Using the most antimicrobially active chitosan derivative, new highly effective food coatings have been obtained that significantly extend shelf life of bananas.