

Odabrane analize hitozana iz dijetetskog suplementa na tržištu – razvoj modifikovanih metoda za određivanje stepena deacetilovanja

Bojan Marković^{1*},
Branka Ivković¹,
Milica Jankov²,
Katarina Karljaković-Rajić²

¹Katedra za farmaceutsku hemiju,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet,
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija
²Katedra za analitičku hemiju, Univerzitet u
Beogradu – Farmaceutski fakultet, Vojvode
Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

Rad primljen: 25.05.2017.

Autor za korespondenciju:

Bojan Marković
tel: +381 11 3951 341
e-mail: bojan@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Uvod Hitozan je linearni, binarni heteropolisaharid dobijen parcijalnom alkalnom deacetilacijom hitina. Hitozan je biokompatibilan i biodegradabilan polimer koji ima primenu u farmaciji i biomedicinskim istraživanjima. U dijetetskim suplementima hitozan ima primenu za održavanje normalne koncentracije holesterola.

Cilj Ciljevi analize hitozana iz kapsula dijetetskog suplementa na tržištu, bili su da se odredi: kontrola punjenja kapsula 0,15 g hitozana/kapsuli, karakteristike hitozana - stepen deacetilovanja (DDA(%) degree of deacetylation) poređenjem predloženih modifikovanih metoda: tehnika FTIR-ATR i kiselinsko-bazne titracije; sadržaj vlage i pepela i funkcionalne karakteristike hitozana - kapacitet vezivanja vode (WBC-water binding capacity) i kapacitet vezivanja masti (FBC-fat binding capacity).

Metod Ispitivanja su izvedena na dijetetskom suplementu sa tržišta (0,15 i 0,25 g hitozana/kapsuli). Za DDA(%) FTIR spektri su snimljeni na Nicolet iS10 Thermo-Scientific USA ATR tehnikom, a za kiselinsko-baznu titraciju - tehnika retitracije korišćen je indikator bromfenolplavo. Gubitak sušenjem određen je na 105°C i na 60°C (2 h), a pepeo na 650°C (4 h). Za određivanje WBC (10,00 ml redestilovane vode) i FBC (10,00 ml sojinog, suncokretovog i kukuruznog ulja) korišćene su kivete (30 ml) i centrifugiranje 3500 o/min (25 min).

Variranje mase hitozan kapsula (0,15 g/kapsuli) iz 2 serije od po 20 merenja daje $\bar{x}=0,1498\pm 0,0063$ g (99,87% od deklarirane mase). Primena FTIR-ATR spektroskopije (dva obrasca sa odnosom apsorbancija traka A1655/A3450 i A1320/A1420 uz odgovarajuće bazne linije) daje najusaglašenije rezultate za DDA(%) od 92,66% (bazna linija b za pik na 1650 cm⁻¹) i 89,40% (bazne linije b6(A1320) i b9(A1420)) u odnosu na kiselinsko-baznu titraciju 91,49%. Sadržaj vlage $\bar{x}_1=7,55\%$ (105 °C) i $\bar{x}_2=7,03\%$ (60 °C) (dozvoljeno <10%), a pepeo od 0,51% odgovara propisu za upotrebu u industriji hrane. Dobijen je veći WBC (496,8%) u odnosu na FBC (u rasponu 332,4-352,8%).

Zaključak Karakteristike hitozana: visok DDA(%), niski procenti vlage i pepela i funkcionalne karakteristike ukazuju na dobar izvor hitina (crvenonoge krabe – deklarirano od proizvođača) za suplement sa tržišta. Predložene modifikacije za određivanje DDA(%) pokazale su usaglašene vrednosti.

Gljučne reči: hitozan, dijetetski suplement, DDA(%), funkcionalne karakteristike

UVOD

Hitozan je jedan od najinteresantnijih polusintetskih biopolimera sa brojnim primenama, koji se dobija iz prirodnog izvora - hitina, parcijalnom alkalnom termohemijskom deacetilacijom [1]. Hitozan je linearni, binarni heteropolisaharid koji je biokompatibilan i biodegradabilan polimer i sastoji se od 2-acetamido-2-deoksi-β-D-glukopiranoze i 2-amino-2-deoksi-β-D-glukopiranoze koje su povezane β(1-4) glikozidnim vezama. Uslovi pod kojima se izvodi deacetilovanje određuju molekulska masu polimera i stepen deacetilovanja (DDA(%); degree of deacetylation ili se koristi skraćenica DD(%)). Kod hitina vrednosti DDA(%) su u opsegu od 5% do 15%, a kod hitozana od 70% do 95%. Stepem acetilovanja (degree of acetylation) se u

literaturi označava kao DA(%). Hitozan se u prirodi nalazi samo u određenim gljivama (*Mucoraceae*), dok je hitin gradivni polisaharid prirodnog porekla koji je sastavni deo egzoskeleta ljuskara (rakovi, škampi i školjke), a može se naći i kod nekih insekata i u ćelijskom zidu nekih gljiva.

Komercijalno dostupni hitozani podeljeni su u dve kategorije niskomolekularni čija je molekulska masa između 20 kDa i 190 kDa sa vrednostima DDA(%) < 75%, dok se visokomolekularni hitozani karakterišu molekulskom masom između 190 kDa i 374 kDa uz vrednosti DDA(%) > 75% [2]. Molekulska masa i DDA(%) direktno utiču na rastvorljivost hitozana, jer se amino grupe hitozana na nižim pH vrednostima (niže pH od oko 6) protonuju uslovljavajući polikatjonska

svojstva hitozana, što povećava rastvorljivost hitozana i omogućava elektrostatičke interakcije sa negativno naelektrisanim vrstama. Na višim pH vrednostima (iznad 6,5) amino grupe su deprotonovane i postaju reaktivne, a hitozan kao baza pokazuje hidrofobne interakcije sa masnim kiselinama i holesterolom [2]. Na pH vrednostima iznad pKa, niska rastvorljivost hitozana je osnovni ograničavajući faktor za primene, posebno kada se koriste u cilju poboljšanja apsorpcije/resorpcije lekovitih supstanci preko sluzokoža (mukoznih membrana).

Hitozan ima primenu u farmaciji i biomedicinskim istraživanjima za: koloidne nosače lekovitih supstanci sa modifikovanim oslobađanjem; preparate/sredstva za zarastanje rana; tkivno inženjstvo, a i kao dodatak ishrani. U periodu od 2000. do 2014. godine, objavljen broj radova o hitozanu i derivatima, eksponencijano raste od oko 500 do 7600 radova, prema podacima Scopus baze, a prikazano je histogramom u revijalnom radu [3].

Zavisnost fizičko-hemijskih karakteristika i bioloških svojstava hitozana od molekulske mase (M_w) i DDA(%), prema literaturi [4] prikazana je u Tabeli 1.

Objavljeni su brojni pregledni radovi i poglavlja u monografijama koji prikazuju svojstva i različite primene hitozana [5-9]. Nedavno su publikovane i dve monografije [10, 11].

Stepen deacetilovanja, kao osnovni parametar (pored M_w), značajan je za karakterizaciju hitozana i određuje se različitim metodama: spektroskopske UV-derivativna spektrofotometrija prvog izvoda je propisana u monografiji za hitozan-hidrohlorid u Evropskoj farmakopeji EP8 [12], brojne FTIR i 1H NMR, kao i većim brojem volumetrijskih metoda - potenciometrijske titracije i klasične titracije. Za primenu i poređenje različitih metoda za određivanje DDA(%) posebno su interesantna dva rada [13, 14].

U prehrambenoj industriji hitozan se koristi za konzervisanje hrane, kao emulgator, za stabilizaciju boja i za pripremu biodegradabilnih filmova. Hitozan ulazi i u sastav dijetetskih suplemenata za održavanje normalne koncentracije holesterola, a prema svojim nutritivnim osobinama svrstava se u dijetetska vlakna i ove primene su detaljno razmatrane u tri poglavlja koja su publikovana u dve monografije [15, 16]. Hitozani koji se koriste kao dodaci u ishrani potrebno je da imaju visoke vrednosti DDA(%) i M_w [17], jer je potvrđena apsorpcija hitozana malih molekulske mase 3,8 kDa (DDA(%) 88,4) i značajne koncentracije u plazmi posle *por os* primene, dok primena hitozana sa 230 kDa (DDA(%) 84,9) nije pokazala apsorpciju pri čemu su DDA(%) bili vrlo slični [2]. Od mehanizama koji su uključeni u hipoholesterolemično i hipolipemično dejstvo preovladavaju tri koji uključuju jonske

interakcije preko protonovanih amino grupa, zatim preko hidrofobnih interakcija i građenja mešoviti micela dolazi do smanjenja normalne apsorpcije masti, dok se preko kompetitivne inhibicije pankreasne lipaze smanjuje količina svarenih i aporbovanih masti [18]. Evropska uprava za bezbednost hrane EFSA (*European Food Safety Authority*) je potvrdila uticaj hitozana na održavanje normalnog nivoa LDL holesterola, koji se postiže dnevnim unosom od 3 g hitozana, a ovo regulatorno telo nije potvrdilo zdravstvenu izjavu kojom se hitozan dovodi u vezu sa smanjenjem telesne mase [19]. Strukturna različitost hitozana, preko DDA(%) i M_w koji utiču na biodistribuciju kao i na *in vivo* i *in vitro* toksičnost [20], dodatno otežava da hitozan dobije GRAS status (*Generally Recognized as Safe* – Generalno prihvatljivi kao bezbedni).

CILJ

Cilj ovih istraživanja je bio da se izvede ispitivanje karakteristika hitozana iz dijetetskog sluplementa na tržištu. Suplement je deklarisan kao čist hitozan (0,15 g hitozana/kapsuli i 0,25 g hitozana/kapsuli) sa poznatim izvorom hitina iz crvenonogih kraba. Za određivanje DDA(%) predložene su modifikacije dve metode: kiselinsko-baznom titracijom - tehnikom retitracije uz indikator bromfenolplavo i snimanjem FTIR spektara - tehnikom višestruke refleksije (ATR), gde je prvo određen procenat stepena acetilovanja (*degree of acetylation* – DA(%)), a preko DA(%) je izračunat DDA(%). Funkcionalna karakterizacija hitozana iz dijetetskog suplementa sa tržišta je izvedena određivanjem kapaciteta vezivanja vode (*water binding capacity* - WBC) i kapaciteta vezivanja masti (*fat binding capacity* - FBC), a pored toga su određeni i procenti pepela i vlage.

MATERIJALI I METODE

Materijali i instrumentacija

Korišćen je uzorak hitozana iz dijetetskog suplemenata na tržištu: 0,15 g hitozana/kapsuli i 0,25 g hitozana/kapsuli. Uzorci hitozana iz suplemenata sve vreme trajanja eksperimenata čuvani su u eksikatoru. Kiselinsko-bazni indikator bromfenolplavo (pH interval 3,0-4,6), standardni rastvor hlorovodonične kiseline ($c = 0,0860$ M) i natrijum-hidroksida ($c = 0,1004$ M). Ulja koja su korišćena su sojino (na pakovanju deklarirano kao: hladno presovano nerafinisano jestivo biljno ulje od soje, Uvita d.o.o., Debeljača, Srbija), suncokretovo (jestivo rafinisano suncokretovo ulje, Dijamant, Zrenjanin, Srbija) i kukuruzno (hladno presovano nerafinisano jestivo biljno ulje od kukuruznih klica, Uvita d.o.o., Debeljača, Srbija).

Odmeravanje intaktnih i kapsula sa zaostatkom (dve

Tabela 1. Uticaj stepena deacetilovanja (DDA(%)) i molekulske mase (M_w) na fizičko-hemijske karakteristike i biološka svojstva hitozana

Fizičko-hemijske karakteristike	Biološka svojstva
Rastvorljivost DDA ↑	Antimikrobna DDA ↑ M_w ↑ ili ↓
Kristalnost DDA ↓	Analgetska DDA ↑
Viskoznost DDA ↑	Antioksidantna DDA ↑ M_w ↓
Biodegradabilnost DDA ↓ M_w ↓	Hemostatska DDA ↑
Biokompatibilnost DDA ↑	Mukoadhezivna DDA ↑ M_w ↑
↑ Direktno proporcionalno ↓ Obrnuto proporcionalno	

serije od po 20 kapsula), izvedeno je na analitičkoj vagi Scaltec SBC 31 (Scaltec Instruments GmbH, Goettingen, Nemačka) za variranje mase - kontrole punjenja, kao i mase hitozana za određivanje stepena deacetilovanja (DDA(%)), gubitka sušenjem u laboratorijskoj sušnici ST-05 (Instrumentaria, Zagreb) i u vakuum sušnici Heraeus Vacuum Oven - VT6025 (Thermo Scientific) kao i za određivanje pepela u peći za žarenje (LP07 Instrumentaria Zagreb). Uzorci za kiselinno-baznu titraciju su rastvarani na magnetnoj mešalici (Tehnika Železniki MM-510). FTIR spektri snimljeni su tehnikom višestruke refleksije (ATR) na Nicolet iS10 (Thermo-Scientific, USA). Za određivanje WBC i FBC korišćene su mase hitozana odmerene na tehničkoj vagi (Adventurer™ OHAUS) u kivetama zapremine 30 ml, a uzorci su centrifugirani u centrifugi (T52 MLW). Uzorci za WBC i FBC pripremljeni su na mehaničkoj mešalici – vorteks mikser (Assistenza tecnica, VETROTECNICA, Padova).

Ispitivanje variranja mase (<2091>, *Weight variation of dietary supplements, USP 39-NF34*)

Variranje mase kapsula hitozana 0,15 g/kapsuli ispitano je u dve serije od po 20 intaktnih kapsula koje su odmerene pojedinačno i izračunata prosečna masa je poređena sa zahtevom da mase svih kapsula budu u opsegu od 90 - 110% u odnosu na prosečnu vrednost. Dodatno, prema propisu Evropske farmakopeje EP8 urađeno je variranje mase jednodoznih preparata, pri čemu je dozvoljeno odstupanje $\pm 10\%$ od srednje vrednosti mase sadržaja kapsula dobijeno pojedinačnim odmeravanje 20 slučajno odabranih kapsula [12].

Postupci određivanja stepena deacetilovanja

Masa hitozana (oko 0,1 g) odmerena je metodom diferencije (meri se masa aluminijumske folije sa hitozanom i masa folije sa ostatkom) sa tačnošću na četvrtoj decimali. Hitozan je prenet u erlenmajer od 100 ml u koji se doda 30,00 ml standardnog rastvora hlorovodonične kiseline iz birete i rastvara na magnetnoj mešalici 10 - 15 min. Dobijenom rastvoru se doda 5 kapi indikatora bromfenolplavog i titrira standardnim rastvorom natrijum-hidroksida do prve promene boje.

Za snimanje FTIR spektara tehnikom višestruke refleksije (vrsta kristala u ATR-u je dijament), u oblasti talasnih brojeva od 4000 do 650 cm^{-1} postavljeni su sledeći parametri: broj snimanja 16; rezolucija 4 cm^{-1} ; interval očitavanja podataka 0,482 cm^{-1} .

Postupci određivanja gubitka sušenjem i pepela

Na analitičkoj vagi odmereno je pet uzoraka hitozana iz suplementa (oko 1,2 g) u vegeglasima čija je konstantna masa prethodno određena, a zatim su sušeni u laboratorijskoj sušnici na 105 ± 3 °C tokom 2 h (ovi osušeni uzorci su korišćeni za određivanje WBC i FBC). U drugoj seriji tri uzorka hitozana (oko 1,0 g) odmerena su u vegeglasima čija je konstantna masa prethodno određena i sušeni su u vakuum sušnici na 60 °C tokom 2 h.

Tri uzorka hitozana (oko 2,0 g) odmerena su u tiglovima za žarenje, koji su prethodno dovedeni do konstantne mase, na analitičkoj vagi, a zatim su pažljivo spaljeni na plameniku u digestoru pri čemu je uzorak polako sagorevao – bez otvorenog plamena, a ostatak je dobijen u obliku ugljenisanog diska. Tiglovi su preneti u

peć za žarenje i postupak žarenja je trajao 4 h na 650 °C. Nakon 4 h peć je isključena, a tiglovi su ostavljeni u peći dok se temperatura nije spustila na oko 200 °C (hlađenje u peći je trajalo oko 2-3 h), i nakon hlađenja u eksikatoru odmerene su mase.

Postupci određivanja funkcionalnih karakteristika hitozana

Na tehničkoj vagi odmereni su osušeni ili neosušeni uzorci hitozana iz suplementa (oko 0,5 g - tačnost na dve decimale) u tarirane kivete (30 ml). Zatim se, u kivetu, trbušastom pipetom (*FORTUNA® GERMANY AS*) odmeri po 10,00 ml vode ili odgovarajućeg ulja. Za vodu je urađeno osam proba, po četiri za osušeni i neosušeni uzorak hitozana, dok je za ulja rađeno četiri probe, po dve (za osušeni i neosušeni uzorak hitozana) za svaku vrstu ulja. Uzorci se disperguju na vorteks mikseru u toku 1 min, a potom promešaju ručno u toku 5 s na svakih 10 min u periodu od 30 min. Kivete se stavljaju na centrifugiranje 3500 o/min tokom 25 min. Nakon dekantovanja supernatanta kivete se ponovo izmere.

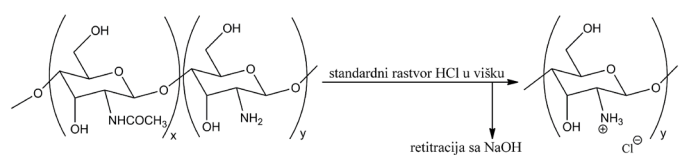
REZULTATI I DISKUSIJA

Ispitivanje variranja mase

Za ispitivanje variranja mase odabrane su kapsule hitozana sa deklarisanim sadržajem od 0,15 g/kapsuli. Na osnovu dobijenih rezultata, iz dve serije od po 20 kapsula, može se zaključiti da ispitivani preparat odgovara zahtevu Američke farmakopeje za variranje mase čvrstih doziranih oblika dijetetskih suplemenata. Iz prve serije prosečna masa intaktne kapsule iznosila je 0,2526 g (Sd = 0,0067 g; RSD = 2,65%) uz dozvoljenu donju i gornju granicu odstupanja od 0,2273 g i 0,2778 g, a realno dobijene minimalne i maksimalne mase iznosile su 0,2396 g i 0,2643 g što predstavlja 94,87% i 104,65% od prosečne mase. Iz druge serije prosečna masa intaktne kapsule iznosila je 0,2521 g (Sd = 0,0075 g; RSD = 2,97%) uz dozvoljenu donju i gornju granicu odstupanja od 0,2268 g i 0,2773 g, a realno dobijene minimalne i maksimalne mase iznosile su 0,2391 g i 0,2677 g što predstavlja 94,86% i 106,21%.

Variranje mase hitozana u suplementu 0,15 g hitozana/kapsuli urađeno je u dve serije pojedinačnim odmeravanje 20 punih i praznih kapsula (EP8) i dobijena je ista srednja vrednost u obe serije za masu hitozana od 0,1498 g, što predstavlja 99,87% od deklarisanane mase. U prvoj seriji dobijena je niža Sd = 0,0063 g i RSD = 4,21%, a nešto viša vrednost Sd = 0,0069 g u drugoj seriji uz očekivano nešto višu vrednost RSD = 4,61%. Prekoračenje dozvoljenog odstupanja mase prema EP8 (samo 2 pojedinačne mase smeju da odstupaju više od propisanog dozvoljnog procenta odstupanja $\pm 10\%$, a nijedna ne sme da odstupa više od dvostruke vrednosti dozvoljenog procenta odstupanja) nije pokazala nijedna od pojedinačno odmerenih kapsula iz dve serije.

U metodi kiselinno-bazne titracije, DDA(%) se određuje tehnikom retitracije za hitozan kao bazu, kao što je prikazano na Shemi 1.



Schema 1. Reakcija kiselinno-bazne titracije hitozan baze – tehnika retitracije

U ovom radu urađena je modifikacija metode koju su predložili Zhang i sar. [21], u delu detekcije završne tačke titracije (Z.T.T.) viška standardnog rastvora hlorovodonične kiseline sa standardnim rastvorom natrijum-hidroksida. Rezultati su pokazali da je znatno adekvatnija upotreba kiselinno-baznog indikatora bromfenolplavog (pH interval prelaza 3,0-4,6) u odnosu na prvobitno predloženi metiloranž (pH interval prelaza 3,1-4,4) zbog jasnije definisane Z.T.T., a pri tome su pH intervali prelaza boje veoma slični. Rezultati za DDA(%) uz upotrebu metiloranža nisu davali usaglašene vrednosti RSD(%) u opsegu od 2,75 – 3,37% zbog teškog uočavanja prelaza boje iz crvene u prvu narandžastu, a razlika u izračunatom DDA(%) za svaku kap titranta natrijum-hidroksida iznosi značajnih 0,8% pri čemu se DDA(%) sukcesivno smanjuje. Problem detekcije Z.T.T. nije bio naveden u radu Zhang i sar. [21]. Uz upotrebu bromfenolplavog jasno je definisan prelaz boje iz žute u zelenu, a za hitozan iz suplementa urađena je serija od pet titracija i dobijeni su sledeći rezultati: DDA(%) = 91,49±1,38%; RSD = 1,51%.

Primenom FTIR-ATR spektroskopije određen je stepen acetilovanja (DA(%) – *degree of acetylation*) primenom dva obrasca:

$$DA(\%) = \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times 100/1,33 \quad (1)$$

iz odnosa intenziteta traka koje odgovaraju valencionim vibracijama za C=O amidne grupe (1650 cm⁻¹) i O-H hidroksilne grupe (3400 cm⁻¹)

$$DA(\%) = \frac{(A_{1320}/A_{1420}) - 0,3822}{0,03133}$$

iz odnosa karakteristične trake koja odgovara –CH₂ grupi (1320 cm⁻¹) i referentne trake koja odgovara amidu III (1420 cm⁻¹).

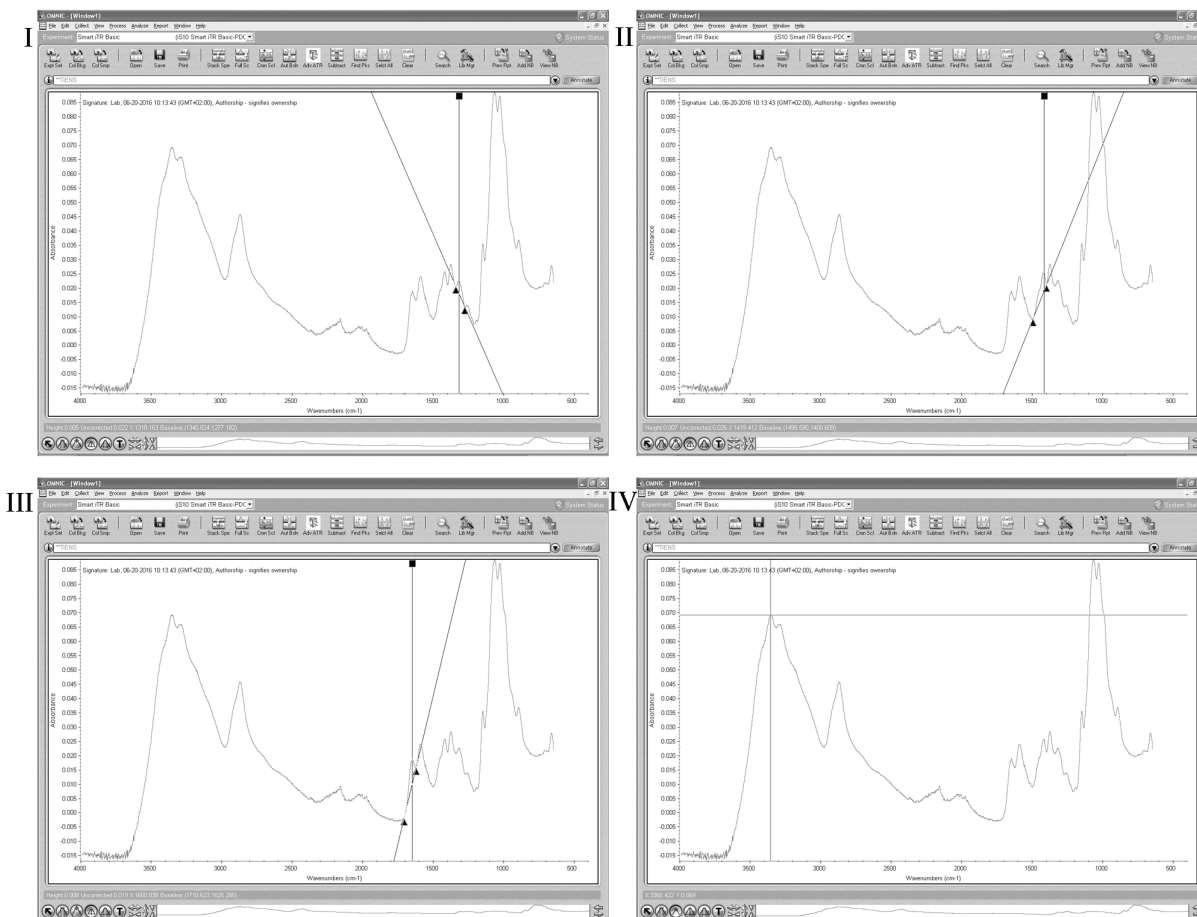
Obrazac (1) preuzet je iz literature [14], obrazac (2) iz literature [22], kao i primenom obrasca (3) koji je predložio Baxter i sar. [23]:

$$DA(\%) = \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times 115$$

Vrednosti apsorbancija na definisanim talasnim brojevima mogu da se očitavaju u odnosu na osnovnu baznu liniju ili u odnosu na postavljene bazne linije.

Na Slici 1 prikazani su FTIR-ATR spektri hitozana za bazne linije „b 6” i „b 9” koje se primenjuju za očitavanje traka prema obrascu (2) kao i za primenu obrasca (1) – za pik na 1655 cm⁻¹ u odnosu na postavljenu baznu liniju „b” i pik na 3450 cm⁻¹ u odnosu na osnovnu baznu liniju.

U Tabeli 2 prikazani su objedinjeni rezultati za DDA(%) hitozana iz suplementa 0,15 g hitozana/kapsuli. Uz primenu osnovnih baznih linija za obrazac (1) dobija se najniža vrednost DDA(%). Za isti obrazac postoji samo jedna bazna linija za pik na 3360 cm⁻¹, dok se za pik na 1650 cm⁻¹ mogu postaviti dve bazne linije



Slika 1. FTIR-ATR spektar hitozana iz suplementa za primenu obrasca (2) – pik na 1320 cm⁻¹ u odnosu na postavljenu baznu liniju „b6” (I) i pik na 1420 cm⁻¹ u odnosu na postavljenu baznu liniju „b9” (II); za primenu obrasca (1) – za pik na 1655 cm⁻¹ u odnosu na postavljenu baznu liniju „b” (III) i pik na 3450 cm⁻¹ u odnosu na osnovnu baznu liniju

a i **b**. Usaglašenija vrednost za DDA(%) od 92,66% je dobijena očitavanjem apsorbancije uz **b** baznu liniju primenom obrasca (1) u odnosu na kiselinsko-baznu titraciju (DDA(%) = 91,49%). Takođe, primenom obrasca (2) dobija se prihvatljiva vrednost za DDA(%) od 89,40%, a samo nešto niža vrednost dobijena je primenom obrasca (3).

Primenom FTIR-ATR spektroskopije potvrđena je saglasnost između hitozana iz suplemenata 0,15 g hitozana/kapsuli i 0,25 g hitozana/kapsuli. Vrednosti DDA(%) dobijene primenom obrasca (1) za hitozan iz suplementa 0,25 g hitozana/kapsuli za osnovne bazne linije iznosi 79,68%, uz baznu liniju **a** DDA(%) = 82,46% i uz baznu liniju **b** DDA(%) = 93,73%. Primenom obrasca (2) dobija se vrednost od 90,92%, a primenom obrasca (3) vrednost 90,42%.

Mala odstupanja na vrednostima talasnih brojeva očitavanih traka u odnosu na definisane vrednosti u primenjenim obrascima nastala su zbog primene tehnike višestruke refleksije (*attenuated total reflection* – ATR) u izvedenim eksperimentima kao modifikovane tehnike u odnosu na klasičnu transmisionu tehniku sa KBr diskovima koja je korišćena za izvođenje navedenih obrazaca. Snimanje FT-IR spektara primenom ATR tehnike ne zahteva pripremu uzorka, a poređenjem sa dobijenim metodom titracije pokazano je da se dobijaju prihvatljivi rezultati za DDA(%).

Za određivanje procenta pepela urađene su tri probe uz odmeravanje hitozana iz suplementa 0,25 g hitozana/kapsuli i dobijena je $\bar{x} = 0,51\%$ (Sd = 0,023%; RSD = 4,49%) koja zadovoljava propis za upotrebu hitozana u industriji hrane ($\leq 0,5\%$) [21]. Procenat pepela može da se kreće i do 1% što zavisi od redosleda početnih faza dobijanja hitozana iz hitina: demineralizacija i deproteinizacija [24].

U literaturi se gubitak sušenjem koji se dobija na 105°C [25, 26], definiše kao krajnji sadržaj vlage zbog uticaja temperature. Sušenje na temperaturi od 105°C u toku 2 h propisuje se za pripremu uzoraka hitozana za određivanje WBC i FBC [27, 28]. Gubitak sušenjem na 105°C u laboratorijskoj sušnici urađen je za pet proba, dobijene vrednosti su bile u opsegu 6,41–8,43% ($\bar{x} = 7,55\%$; Sd = 0,9878%; RSD = 13,08%). U literaturi [29, 30] se navodi da se procenat vlage u uzorcima hitozana određuje na 60°C u toku 24 h ili do konstantne

mase. U našim ispitivanjima pokušano je da se vreme od 24 h skрати sušenjem u vakuum sušnici 2 h na 60°C. Urađene su tri probe pri čemu je dobijena srednja vrednost od 7,03% uz značajno manje vrednosti Sd = 0,1012% i RSD = 1,44% u odnosu na sušenje na 105°C. Manje vrednosti Sd i RSD u odnosu na sušenje na 105°C su posledica strožije kontrolisanih uslova u vakuum sušnici u odnosu na laboratorijsku sušnicu, a mala razlika između srednjih vrednosti 7,55% i 7,03% je posledica efekta vakuuma iako je temperatura bila znatno niža (60°C).

U literaturi se WBC i FBC uglavnom određuju iz dve ili eventualno tri probe. U pregledanoj literaturi [27, 28] navodi se primena modifikovane metode koju su predložili Wang and Kinsella (1976). U većini radova gde su određeni WBC i FBC nije navedeno da se koristi prethodno osušeni uzorak hitozana, a samo u dva rada [27, 28] je navedeno da se koristi osušeni uzorak i navodi se propis za sušenje. Ispitivanja hitozana iz suplementa (0,15 g hitozana/kapsuli) urađena su paralelno i za osušeni i za neosušeni uzorak hitozana da bi se utvrdila razlika između vrednosti koje se dobijaju korišćenjem ova dva uzorka i ispitao uticaj temperature na funkcionalne karakteristike. Rezultati su prikazani u Tabeli 3.

Vrednost za kapacitet vezivanja vode WBC(%) je ispitana na četiri probe jer je konstatovano teže dispergovanje čvrste faze u vodi na vorteks mikseru, zadržavanje čvrste faze na zidovima kiveta i teže odlivanje vodenog supernatanta u odnosu na ulja. Dobijene su slične srednje vrednosti za WBC(%) između osušenog i neosušenog uzorka. Znatno više vrednosti Sd i RSD u odnosu na analize kapaciteta vezivanja masti FBC(%) su posledica navedenih eksperimentalnih zapažanja za dispergovanje čvrste faze i odlivanje tečne faze.

Vrednosti za FBC(%) su niže u odnosu na WBC(%) kao što se nalazi u gotovo svim literaturnim podacima. U literaturi se uglavnom koristi samo sojino ulje dok je ispitivanje na tri vrste ulja nađeno u radu Nessa i sar. [31]. Za uzorak hitozana iz ispitivanih kapsula najveću Sd i RSD vrednost daju osušeni i neosušeni uzorak hitozana kada se koristi sojino ulje, a najbolju saglasnost Sd i RSD za osušeni i neosušeni uzorak je kod kukuruznog ulja. Kod upotrebe suncokretovog ulja dobija se slična srednja vrednost za osušeni i neosušeni

Tabela 2. Rezultati za DA(%) i DDA(%) za uzorak hitozana iz suplementa 0,15 g hitozana/kapsuli primenom svih navedenih obrazaca

Obrazac	Bazna linija	Talasi broj (cm ⁻¹)	A	DA(%)	DDA(%)
(1)	Osnovna bazna linija	3360,4	0,069	20,70	79,30
		1650,7	0,019		
	Bazna linija a za pik na 1655 cm ⁻¹ Bazna linija za pik na 3450 cm ⁻¹	1650,8	0,020	18,34	81,66
		3357,1	0,082		
Bazna linija b za pik na 1655 cm ⁻¹ Bazna linija za pik na 3450 cm ⁻¹	1650,8	0,008	7,34	92,66	
	3357,1	0,082			
(2)	Bazna linija b 6 za pik na 1320 cm ⁻¹	1318,2	0,005	10,60	89,40
	Bazna linija b 9 za pik na 1420 cm ⁻¹	1419,4	0,007		
(3)	Bazna linija b za pik na 1655 cm ⁻¹ Bazna linija za pik na 3450 cm ⁻¹	1650,8	0,008	11,22	88,78
		3357,1	0,082		

uzorak, međutim odstupanja između Sd i RSD vrednosti ovih uzoraka su najveće. Najveću razliku između osušenog i neosušenog uzorka hitozana preko srednje vrednosti daje sojino ulje, a najmanje suncokretovo.

U radu Nessa i sar. [31] ne zapaža se tako značajna razlika između ispitivanih ulja (sojino, suncokretovo i kukuruzno) pri čemu su autori koristili četiri različite vrste hitozana, a dobili su *FBC* u rasponu $335,5 \pm 5,5$ - $351,7 \pm 6,4\%$ dok su za ostale vrste hitozana nađene znatno veće vrednosti $565,2 \pm 5,3$ - $589,6 \pm 8,7\%$, a te tri vrste uzoraka hitozana imale su i znatno veći *WBC* ($741,2 \pm 6,1$ - $784,4 \pm 4,9\%$).

ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata odabranih analiza za ispitivanje hitozana iz dijetetskih suplemenata (0,15 g hitozana/kapsuli i 0,25 g hitozana/kapsuli) dobijene vrednosti: visok stepen deacetilovanja (*DDA*(%)), nizak procenat vlage i pepela i funkcionalne karakteristike ukazuju na dobar izvor hitina (crvenonoge krabe – deklarisan od strane proizvođača) iz koga se, primenom odgovarajućih faza, dobija hitozan koji ulazi u sastav dijetetskog suplementa. Predložene modifikacije za određivanje *DDA*(%) pokazale su usaglašene vrednosti. Postoji potreba za ispitivanje kvaliteta dijetetskih suplemenata zbog potencijalne opasnosti da nisu odgovarajućeg kvaliteta. Na kongresima o dijetetskim suplementima

ukazano je na kompleksnost analitičke provere kvaliteta i sastava dijetetskih suplemenata. Istraživanja u okviru ovog rada potvrdila su kvalitet ispitanih uzoraka dijetetskog suplementa hitozana na tržištu.

ZAHVALNICA

Istraživanje prezentovano u okviru ovog rada je podržano od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u okviru projekta TR34031.

Tabela 3. Funkcionalne karakteristike hitozana iz suplementa 0,15 g hitozana/kapsuli

Kapacitet vezivanja vode (<i>WBC</i>)						
Podaci	Osušen uzorak		Neosušen uzorak			
Proba 1 <i>WBC</i> (%)	454,00		517,31			
Proba 1 <i>WBC</i> (%)	552,90		460,38			
Proba 3 <i>WBC</i> (%)	454,90		439,62			
Proba 4 <i>WBC</i> (%)	519,61		575,47			
Statistička analiza x (%) Sd (%) RSD (%)	495,35 49,15 9,92		498,20 61,10 12,26			
Kapacitet vezivanje masti (<i>FBC</i>)						
Podaci	Sojino ulje		Suncokretovo ulje		Kukuruzno ulje	
	Osušen uzorak	Neosušen uzorak	Osušen uzorak	Neosušen uzorak	Osušen uzorak	Neosušen uzorak
Proba 1 <i>FBC</i> (%)	329,41	337,25	315,69	336,54	349,02	350,94
Proba 2 <i>FBC</i> (%)	356,25	315,38	349,02	338,00	343,14	354,72
Statistička analiza x (%) Sd (%) RSD (%)	342,83 18,98 5,54	326,32 15,46 4,74	332,36 23,57 7,09	337,27 1,03 0,31	346,08 4,16 1,20	352,83 2,67 0,76

BIBLIOGRAFIJA

- Thakur VK, Thakur MK. Eco-friendly Polymer Nanocomposites Chemistry and Applications. India: Springer; 2015; 579.
- Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2011; 36:981-1014.
- Cheung RCF, Ng TB, Wong JH, Chan WY. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Mar Drugs* 2015; 13:5156-86.
- Kumirska J, Weinhold MX, Thöming J, Stepnowski P. Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials-Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and *N*-Acetylation. *Polymers* 2011; 3:1875-901.
- Čalija B, Milić J, Krajišnik D, Račić A. Karakteristike i primena hitozana u farmaceutskim/biomedicinskim preparatima. *Arh farm* 2013; 63:347-64.
- Rinuado M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* 2006; 31:603-32.
- Younes I, Rinuado M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, properties and Applications. *Mar Drugs* 2015; 13:1133-74.
- de Alvarenga ES. Characterization and Properties of Chitosan. In: Elnashar M, editor. *Biotechnology of Biopolymers*. InTech Europe, University Campus SteP Ri, Rijeka, Croatia 2011; 91-108.
- Miranda Castro SP, Paulín EGL. Is Chitosan a New Panacea? Areas of Applications. In: Karunaratne DN, editor. *The Complex World of Polysaccharides*. InTech Europe, University Campus SteP Ri, Rijeka, Croatia 2012; 3-46.
- Sashiwa H, Harding D. eds. *Advances in Marine Chitin and Chitosan*. MDPI AG, Switzerland 2015; 1-486.
- Shalby EA. editor. *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides*. Croatia: InTech Europe; 2017; 1-326.
- European pharmacopoeia, 8th ed. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France, 2014.
- Khan TA, Peh KK, Ch'ng HS. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods, *J Pharm Pharmaceut Sci* 2002; 5:205-12.
- Czechowska-Biskup R, Jarosinska D, Rokita B, Ulanski P, Rosiak JM (2012) Determination of deacetylation of chitosan - comparison of methods. In: *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, Polish Chitin Society, Vol. XVII, Lodz, Poland, pp. 5-20.
- Novak KN, Cupp MJ, Tracy TS: Chitosan. In: *Dietary Supplements Toxicology and Clinical Pharmacology*. SPRINGER SCIENCE+BUSINESS MEDIA, LLC, Humana Press Inc. New York 2003; 33-9.
- Staffolo MD, Bevilacqua AE, Rodriguez MS, Albertengo L. Dietary Fiber and Availability of Nutrients: A Case Study on Yoghurt as a Food Model. and Rodriguez MS, de Souza e Silva A, Lacerda FV. The Chitosan as Dietary Fiber: An *in vitro* Comparative Study of Interactions with Drug and Nutritional Substances. In: Karunaratne DN, editor. *The Complex World of Polysaccharides*. InTech Europe, University Campus SteP Ri, Rijeka, Croatia 2012; 455-490. and 603-16.
- Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Paños I, Miralles B, Acosta N, Galed G, Heras A. Funcional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr Chem Biol* 2009; 3(2): 203-30.
- Froese WM, Ludlow ME. Efficacy of Over-the-Counter (OTC) Medical Device Products as a Tool in Clinical Weight Management. *Food Nutr Sci* 2014; 5: 1637-1643.
- EFSA. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to chitosan and reduction in body weight (ID 679, 1499), maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 4663), reduction of intestinal transit time (ID 4664) and reduction of inflammation (ID 1985) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2011; 9(6):2214.
- Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliver Rev* 2010; 62(1): 3-11.
- Zhang AJ, Qin QL, Zhang H, Wang HT, Li X, Miao L, Wu YJ. Preparation and characterisation of food-grade chitosan from housefly larvae. *Czech J Food Sci* 2011; 29:616-23.
- Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea F.M, Argüelles-Monal W, Desbrières J, Rinaudo M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 2001; 42:3569-80.
- Baxter A, Dillon M, Antony Taylor KD, Roberts GAF. Improved method for i.r. determination of the degree of *N*-acetylation of chitosan. *Int J Biol Macromol* 1992; 14:166-9.
- Van Toan N. Production of Chitin and Chitosan from Partially Autolyzed Shrimp Shell Materials, *TOBIOMTJ* 2009; 1:21-4.
- Dotto GL, Souza VC, Pinto LAA. Drying of chitosan in a spouted bed: The influences of temperature and equipment geometry in powder quality. *LWT - Food Science and Technology* 2011; 44:1786-92.
- Dotto GL, Constantino de Souza V, Motta de Moura J, Motta de Moura C, Pinto LAA. Influence of Drying Techniques on the Characteristics of Chitosan and the Quality of Biopolymer Films. *Dry Technol* 2011; 29:1784-91.
- Cho YI, No HK, Meyers SP. Physicochemical Characteristics and Functional Properties of Various Commercial Chitin and Chitosan Products. *J Agric Food Chem* 1998; 46:3839-43.
- No HK, Lee KS, Meyers SP. (2000) Correlation Between Physicochemical Characteristics and Binding Capacities of Chitosan. *J Food Sci* 2000; 65, 1134-37.
- Alishahi A, Mirvaghefi A, Tehrani MR, Farahmand H, Shojaosadati SA, Dorkoosh FA, Elsabee MZ. Enhancement and Characterization of Chitosan Extraction from the Wastes of Shrimp Packaging Plants, *J Polym Environ* 2011; 19:776-83.

30. Al-Manhel AJ, Al-Hilphy ARS, Niamah AK. Extraction of chitosan, characterisation and its use for water purification. *J Saudi Soc Agric Sci* 2016; Article in press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2016.04.001>
31. Nessa F, Shah Md. Masum, Asaduzzaman M, Roy SK, Hossain MM, Jahan MS. A Process for the Preparation of Chitin and Chitosan from Prawn Shell Waste, Bangladesh. *J Sci Ind Res* 2010; 45(4):323-30.

Selected analyses of chitosan from dietary supplement on market – development of modified methods for degree of deacetylation determination

Marković B.¹,
Ivković B.¹,
Jankov M.²,
Karljković-Rajić K.²

¹Department of Pharmaceutical Chemistry,
University of Belgrade – Faculty of Belgrade,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia
²Department of Analytical Chemistry,
University of Belgrade – Faculty of Belgrade,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

Summary: Introduction Chitosan is an unbranched binary heteropolysaccharide obtained from chitin by partial alkaline deacetylation. Chitosan is biocompatible and biodegradable polymer used in pharmacy and biomedical investigations. In dietary supplements chitosan is used for weight loss and cholesterol-lowering properties.

Aim The aims of chitosan's analyses of capsules were to determine: the weight variation tests for chitosan in 0.15 g chitosan/capsule, chitosan characteristics – degree of deacetylation DDA(%) via comparison of proposed modifications of FTIR-ATR spectroscopy and acid-base titration; moisture and ash content and functional characteristics – water binding capacity (WBC) as well as fat binding capacity (FBC).

Method Tests were performed for dietary supplement on market TIENS (0.15 and 0.25 g pure chitosan/capsule). For DDA(%) FTIR spectra were recorded on Nicolet iS10 Thermo-Scientific USA (ATR technique) and for acid-base titration-retitration technique with indicator bromphenol blue was applied. Loss on drying determined at 105°C and 60°C (2 h) and ash at 650°C (4 h). For WBC (10.00 ml of redistilled water) and FBC (10.00 ml soybean, corn or sunflower oil) were placed in cuvetes (30 ml) and centrifuged 3,500 rpm (25 min).

The weight variation tests for 0.15 g chitosan/capsule from 2 series each of 20 weights gave $\bar{x}=0.1498\pm 0.0063$ g (99.87% of declared mass). Applying FTIR-ATR spectroscopy (two equations with absorbance ratio of bands A1655/A3450 and A1320/A1420 with corresponding baselines) provided the most harmonized DDA(%) of 92.66% (baseline b for peak at 1650 cm⁻¹) and 89.40% (baseline b₆(A1320) and b₉(A1420) in relation with acid-base titration 91.49%. Moisture content was $\bar{x}_1=7.55\%$ (105°C) and $\bar{x}_2=7.03\%$ (60°C) (acceptable values <10%) and ash content of 0.51% is in accordance with regulation for usage in food industry. Higher value of WBC (496.8%) in comparison to FBC (in range 332.4-352.8%) was obtained.

Conclusion

The characteristics of chitosan: high DDA(%), low moisture and ash contents and functional characteristics indicate the high-quality of chitin (red leg crab – declared by manufacturer) for supplement. The results obtained by proposed modifications for DDA(%) determination were in good accordance.

Keywords: chitosan, dietary supplement, DDA(%), functional characteristics