

УДК 541.64:547.955

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СВОЙСТВА МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИТОЗАНА, СОДЕРЖАЩЕГО ЧЕТВЕРТИЧНУЮ АМИНОГРУППУ

© 2011 г. Н. П. Евлампиева\*, М. Ю. Горшкова\*\*, И. Ф. Волкова\*\*,  
Э. С. Григорян\*\*, А. А. Лезов\*, А. П. Хурчак\*, Е. И. Рюмцев\*

\* Научно-исследовательский институт физики им. В.А. Фока  
Санкт-Петербургского государственного университета  
198504 Санкт-Петербург, Ульяновская ул., 1

\*\* Учреждение Российской академии наук  
Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН  
119991 Москва, Ленинский пр., 29

Поступила в редакцию 21.05.2010 г.

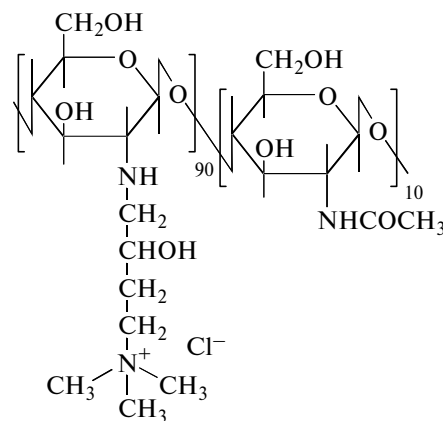
Принята в печать 03.08.2010 г.

Исследован гомологический ряд производного хитозана – N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозана в смеси 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  методами вискозиметрии, статического и динамического светорассеяния. Найдены абсолютные значения ММ и получены скейлинговые соотношения для характеристической вязкости, коэффициента поступательной диффузии и гидродинамического радиуса молекул. Для указанной системы полимер–растворитель установлено среднее значение гидродинамического инварианта  $A_0 = (3.4 \pm 0.1) \times 10^{-15} \text{ кг м}^2/\text{с}^2 \text{ град моль}^{1/3}$ . Определена величина равновесной термодинамической жесткости цепи модифицированного хитозана ( $20 \pm 2$ ) нм, которая, как и параметры скейлинговых соотношений, свидетельствует о принадлежности исследованного производного к классу жесткоцепных полимеров. Показано, что в избранном смешанном растворителе при близких степенях полимеризации молекулы модифицированного хитозана имеют более компактные размеры по сравнению с немодифицированным аналогом.

Практическое применение хитозана – деацетилированного производного хитина – постоянно расширяется, что объясняется его биосовместимостью, биодegradируемостью, нетоксичностью для человеческого организма и ярко выраженной антимикробной активностью. Хитозан традиционно используется в виде гелей, пленочных покрытий на раны и ожоги, а также покрытий, улучшающих биосовместимость имплантантов. В последние годы ведутся интенсивные исследования, направленные на создание систем доставки лекарственных препаратов и генетического материала в живую клетку с использованием этого полисахарида [1–3]. Однако практическому применению хитозана в новых областях часто препятствуют его нерастворимость в подавляющем большинстве органических растворителей и ограниченная растворимость в водно-солевых растворах при физиологических значениях рН и ионной силы.

Улучшения растворимости хитозана можно добиться за счет снижения его ММ, степени деацетилирования или получения различных производных. К сожалению, все перечисленные способы имеют недостатки, наиболее общим и существенным из которых является уменьшение количества аминогрупп в цепи полимера, что отрицательно влияет на биологическую активность, затрудняет получение конъюгатов хитозана с биологически

активными веществами и дестабилизирует полиэлектролитные комплексы на его основе [4, 5]. Химическая модификация хитозана также может приводить к композиционной неоднородности его производных и образованию значительного количества побочных продуктов [6–9]. Но в то же время химическая модификация, помимо улучшения растворимости, позволяет получать производные хитозана, обладающие некоторыми важными преимуществами по сравнению с исходным полисахаридом. К числу таких производных относится N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан (ГТТХ), получаемый в солевой форме при взаимодействии хитозана с глицидилтриметиламмоний хлоридом [10–12]:



E-mail: yevlam@paloma.spbu.ru (Евлампиева Наталья Петровна).

N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]-хитозан является однородным по структуре высокозаряженным поликатионом, растворимым во всем диапазоне рН за счет наличия концевой четвертичной аминогруппы в каждом введенном боковом заместителе [10, 11]. При этом вторичная аминогруппа мономерного звена ГТПХ не утрачивает способность (де)протонироваться при изменении кислотности среды, как было показано в работе [12], что представляет особый интерес для разработки биосовместимых и биodeградируемых средств доставки генетического материала и лекарственных веществ в клетки. Дополнительным преимуществом ГТПХ является его достаточно высокая ММ, необходимая для обеспечения стабильности транспортных систем на основе водорастворимых полимеров, в частности хитозана [13].

Молекулярные свойства ГТПХ детально еще не исследовались. В упомянутых выше работах [11, 12] ММ образцов ГТПХ определялась не абсолютными методами с использованием соотношений Марка–Куна–Хаувинка–Сакурады, полученных для немодифицированного хитозана. Между тем для решения задачи создания транспортных систем совершенно необходимо располагать точной информацией о ММ и гидродинамическом поведении полимера-носителя. В случае биологически активных полимеров такая информация чрезвычайно важна, поскольку биологическая активность, токсичность, распределение по органам и тканям, длительность циркуляции как самих полимеров, так и транспортных систем доставки лекарств на их основе, определяются, главным образом, ММ и размерами макромолекул.

Исследование биологически активных полимеров в растворах осложняется их полиэлектролитной природой, что накладывает дополнительные требования на условия анализа. В данной работе гомологический ряд из 6 образцов ГТПХ изучали в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  – растворителе, полностью подавляющем полиэлектролитные эффекты, методами вискозиметрии, статического и динамического светорассеяния. Были определены значения  $M_w$  членов ряда, их характеристическая вязкость  $[\eta]$ , коэффициенты поступательной диффузии  $D_0$ , размеры макромолекул, установлены скейлинговые соотношения Марка–Куна–Хаувинка–Сакурады между  $[\eta]$ ,  $D_0$ , размерами и  $M_w$ , а также равновесная термодинамическая жесткость макромолекул ГТПХ. Кроме того, в работе проведено сопоставление молекулярных свойств ГТПХ и немодифицированных хитозанов, исследованных ранее в аналогичных условиях [14–16].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Препарат хитозана производства Закрытого акционерного общества “Биопрогресс” (степень деацетилирования хитина ~90%, массовая доля золя менее 5%) осаждали из кислых растворов NaOH и лиофильно высушивали, как описано в работе [17]. Образцы хитозана с разными ММ получали деполимеризацией очищенного хитозана по методу [18]. К 1%-ным растворам хитозана в 6 об. % уксусной кислоте добавляли по 4 мл свежеприготовленного раствора  $\text{NaNO}_2$  с концентрацией 0.14–2.8 мг/мл и выдерживали 1 ч при 303 К, постоянно перемешивая. Далее реакционную смесь высаживали в двукратный избыток холодного осадителя (70% MeOH + 30% водного аммиака), собирали осадок на фильтре Шота, промывали водой, затем ацетоном и сушили в вакууме до постоянной массы. Состав определяли с помощью элементного анализа. Структуру образцов подтверждали методами ИК- и ЯМР-спектроскопии. Степень деацетилирования образцов рассчитывали из данных ЯМР  $^1\text{H}$  и потенциометрии.

Модифицированный хитозан ГТПХ получали обработкой образцов хитозана по адаптированной методике [11]. К дисперсии 0.8 г (5.0 ммоль) хитозана в 16 мл дистиллированной воды добавляли при непрерывном перемешивании при 353 К каждые 2 ч тремя равными порциями (15.0 ммоль) глицидил(триметиламмоний) хлорид. Через 10 ч реакционную смесь высаживали в 30 мл ацетона и хранили 12 ч при температуре 277 К. Ацетон декантировали, гелеобразный продукт растворяли в 24 мл смеси вода : метанол (2 : 1), фильтровали и высаживали в 75 мл смеси ацетон : этанол (4 : 1). Осадок собирали на фильтре Шота, экстрагировали двое суток этанолом в аппарате Сокслета и высушивали в вакууме. Водный раствор ГТПХ диализовали 48 ч на мембране “Spectra/Por CE MWCO500” против бидистиллированной воды и лиофильно высушивали. Степень кватернизации определяли по данным спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и методом химического анализа на содержание хлора.

Средняя степень деацетилирования полученных образцов ГТПХ составляла 85%, средняя степень кватернизации 90%.

Растворитель 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  готовили, используя бидистиллированную воду, ледяную уксусную кислоту и тригидрат ацетата натрия квалификации х.ч. (“Вектон”, Санкт-Петербург, Россия). Образцы ГТПХ растворяли в течение 1–2 суток непосредственно в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  при комнатной температуре.

Определение молекулярных характеристик образцов ГТПХ в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М

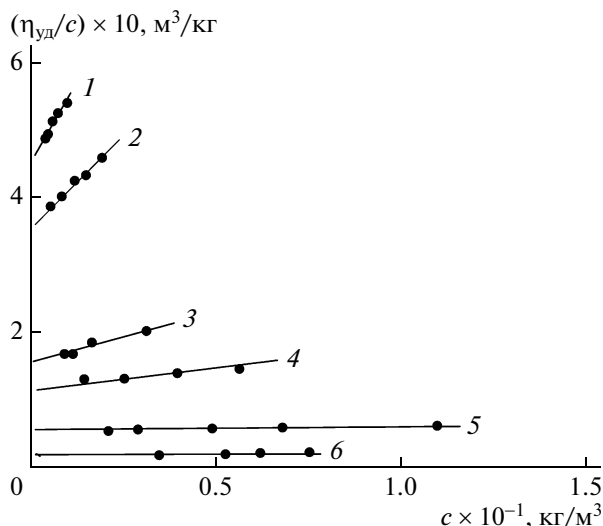


Рис. 1. Зависимость величины  $\eta_{уд}/c$  от концентрации  $c$  растворов образцов ГТПХ в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ . Номера кривых соответствуют номерам образцов табл. 1.

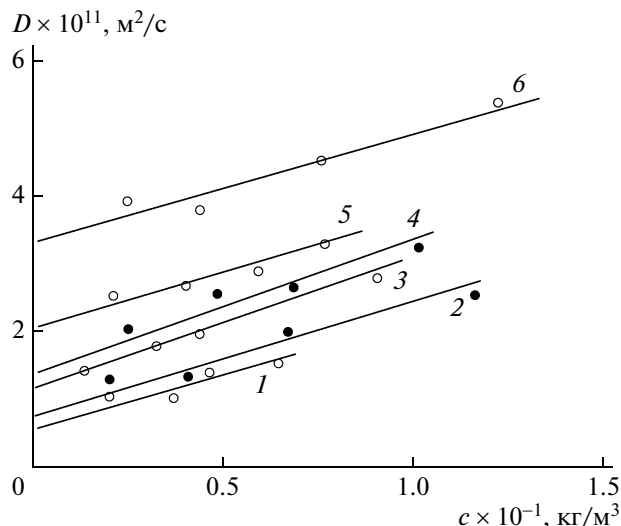


Рис. 2. Концентрационные зависимости коэффициента поступательной диффузии  $D$  для образцов ГТПХ в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ . Номера кривых соответствуют номерам образцов табл. 1.

$\text{CH}_3\text{COONa}$  проводили при 298 К. При указанной температуре растворитель имел следующие характеристики: плотность  $1.02 \times 10^3$  кг/м<sup>3</sup>, вязкость  $1.165 \times 10^{-3}$  Па с, показатель преломления 1.3395.

Вискозиметрические измерения проводили в капиллярном вискозиметре Оствальда со временем течения растворителя 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  67.1 с. Характеристическую вязкость  $[\eta]$  полимеров определяли по Хаггинсу, графически экстраполируя величину  $\eta_{уд}/c$  к нулевой концентрации раствора (рис. 1) [19]

$$\eta_{уд}/c = [\eta] + k'[\eta]^2c + \dots, \quad (1)$$

где  $\eta_{уд}/c = (\eta - \eta_0)/\eta_0c = (t - t_0)/t_0c$ ,  $\eta$  и  $\eta_0$  – вязкость раствора и растворителя соответственно;  $t$  и  $t_0$  – время течения в вискозиметре раствора и растворителя;  $c$  – концентрация полимера в растворе;  $k'$  – постоянная Хаггинса, соответствующая наклону линейной зависимости  $\eta_{уд}/c = f(c)$ .

Поскольку ГТПХ неограниченно растворим в воде, вискозиметрические свойства образцов, помимо 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , изучали также и в  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.2 М  $\text{NaCl}$ . Для этого ГТПХ растворяли в бидистиллированной воде, добавляя 0.2 М  $\text{NaCl}$  только после полного растворения полимера. Целью этой части работы было установление соотношения Марка–Куна–Хаувинка–Сакурады, удобного для экспресс-определения ММ модифицированных хитозанов.

Величины  $[\eta]$  и постоянные Хаггинса  $k'$ , определенные для образцов ГТПХ в двух использованных растворителях, приведены в табл. 1.

Исследование статического и динамического светорассеяния растворов образцов в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  проводили на установке “PhotoCor Complex” (“Фотокор”, Россия), в комплект которой входили коррелятор реального времени “PhotoCor-FC” (288 каналов, 20 нс), гониометр, термостат со стабилизацией в пределах  $\pm 0.05$  К, источник света He–Ne-лазер ( $\lambda_0 = 632.8$  нм) мощностью 25 мВт. Перед измерением светорассеяния растворы подвергали фильтрации и центрифугированию. Измерения проводили при углах рассеяния  $\theta = 30^\circ - 130^\circ$ . Автокорреляционные функции интенсивности рассеянного света обрабатывали с помощью программы “DynaLS” методом обратного преобразования Лапласа [20], что позволяло анализировать функции распределения рассеивающих частиц в растворе по временам релаксации  $\tau$ .

Коэффициенты поступательной диффузии  $D$  молекул ГТПХ в растворе определяли из наклонов зависимостей обратного времени релаксации  $1/\tau = Dq^2$  от квадрата амплитуды вектора рассеяния  $q = (4\pi n_0/\lambda_0)\sin(\theta/2)$ , где  $n_0$  – показатель преломления растворителя,  $\lambda_0$  – длина волны источника света [20]. Коэффициент поступательной диффузии  $D_0$  (рис. 2) макромолекул определяли согласно экстраполяционному соотношению:

$$D_0 = \lim_{c \rightarrow 0} D \quad (2)$$

В области концентраций  $c < 1.5 \times 10$  кг/м<sup>3</sup> зависимости (2) были линейны и подчинялись закономерности  $D = D_0 + k_Dc$ . Для исследованной серии образцов получили среднее значение  $k_D = (1.46 \pm \pm 0.05) \times 10^{-12}$  м<sup>5</sup>/кг с.

**Таблицы 1.** Гидродинамические характеристики образцов ГТПХ в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ 

Образец, №	$M_w \times 10^{-3}$	$[\eta] \times 10, \text{ м}^3/\text{кг}$	$D_0 \times 10^{11}, \text{ м}^2/\text{с}$	$R_h \times 10^{10}, \text{ м}$	$R_g \times 10^{10}, \text{ м}$	$R_g/R_h^*$	$A_0^* \times 10^{15}, \text{ кг м}^2/\text{с}^2 \text{ град моль}^{1/3}$	$[\eta] \times 10, \text{ м}^3/\text{кг}$ ( $\text{H}_2\text{O} + 0.2 \text{ М NaCl}$ )
1	700	4.46 ( $k' = 0.41$ )	0.62	302	600	1.99	3.53	4.30 ( $k' = 0.39$ )
2	560	3.61 ( $k' = 0.39$ )	0.71	264	460	1.74	3.50	2.81 ( $k' = 0.44$ )
3	250	1.59 ( $k' = 0.41$ )	1.20	156	260	1.82	3.44	1.79 ( $k' = 0.40$ )
4	200	1.23 ( $k' = 0.31$ )	1.39	135	210	1.56	3.40	1.21 ( $k' = 0.35$ )
5	110	0.56 ( $k' = 0.35$ )	2.12	88	150	1.71	3.30	0.63 ( $k' = 0.42$ )
6	50	0.33 ( $k' = 0.40$ )	3.39	55	100	1.82	2.99	0.32 ( $k' = 0.33$ )

Примечание. В скобках приведены константы Хаггинса.

\* Среднее значение  $A_0 = (3.4 \pm 0.1) \times 10^{-15} \text{ кг м}^2/\text{с}^2 \text{ град моль}^{1/3}$  для образцов ГТПХ соответствует гидродинамическому инварианту для других полисахаридов  $A_0 = (3.4-3.2) \times 10^{-15} \text{ кг м}^2/\text{с}^2 \text{ град моль}^{1/3}$  [15]; средняя величина  $R_g/R_h = (1.8 \pm 0.2)$  соответствует теоретическому отношению размеров  $R_g/R_h = 1.78$  для статистически свернутых полимерных клубков в растворителях, близких к идеальным [19].

Гидродинамический радиус  $R_h$  макромолекул рассчитывали, используя экспериментальные значения  $D_0$  и соотношение Стокса–Эйнштейна для частиц сферической формы:

$$R_h = kT/6\pi\eta_0 D_0 \quad (3)$$

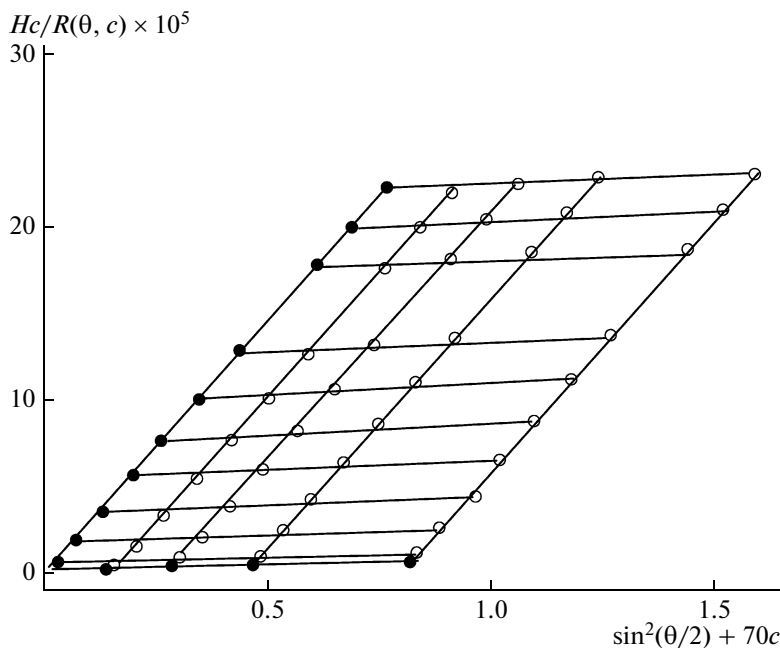
( $k$  – постоянная Больцмана).

Из измерений статического светорассеяния, применяя метод двойной экстраполяции Зимма (рис. 3), определяли величины средневесовой

массы молекул  $M_w$  и их радиусы инерции  $R_g$  согласно соотношению

$$Hc/R_\theta = (1/M_w)(1 + q^2 R_g^2/3) + 2A_2c \quad (4)$$

Здесь  $R_\theta$  – релеевский фактор,  $H = 4\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2 / \lambda_0^4 N_A$  – оптическая постоянная,  $dn/dc = \lim_{c \rightarrow 0} [(n - n_0)/c]$  – инкремент показателя преломления растворенного полимера,  $n_0$  и  $n$  – показатели преломления растворителя и раствора при концентрации вещества  $c$ ;  $N_A$  – число Авога-



**Рис. 3.** Двойная экстраполяция (диаграмма Зимма) интенсивности светорассеяния для растворов образца 2 ГТПХ в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  при  $c = 1.162, 0.671, 0.409$  и  $0.203 \times 10 \text{ кг}/\text{м}^3$ .

**Таблица 2.** Параметры соотношения  $[\eta] = K_{\eta}M^a$  для хитозана при различной степени деацетилирования и вариациях состава растворителя

Растворитель	<i>T</i> , К	Степень деацетилирования, %	$K_{\eta} \times 10^3$	<i>a</i>	Литература
0.2 М CH <sub>3</sub> COOH + 0.1 М CH <sub>3</sub> COONa	303	69	0.104	1.12	[27]
		84	1.424	0.96	
		91	6.589	0.88	
		100	16.80	0.81	
0.2 М CH <sub>3</sub> COOH + 0.1 М CH <sub>3</sub> COONa	303	92	5.26	0.88	[11]
0.2 М CH <sub>3</sub> COOH + 0.1 М CH <sub>3</sub> COONa	303	97	10.86	0.83	[11]
0.1 М CH <sub>3</sub> COOH + 0.2 М NaCl	298	~80	1.81	0.93	[28]
0.2 М CH <sub>3</sub> COOH + 0.1 М CH <sub>3</sub> COONa + 4 М мочевины	298	90	0.893	0.71	[29]
0.33 М CH <sub>3</sub> COOH + 0.2 М CH <sub>3</sub> COONa	298	90	0.138	0.85	[14]
0.33 М CH <sub>3</sub> COOH + 0.3 М NaCl	298	82	3.41	1.02	[15]

дро,  $A_2$  – второй вириальный коэффициент [19–21].

Следует отметить, что при исследовании растворов хитозана и его производных методом светорассеяния всегда фиксируется некоторое количество агрегированных частиц, причина образования которых остается дискуссионной [22–24]. Частицы крупных размеров, намного превышающих молекулярные, были зафиксированы и в растворах исследованного нами модифицированного хитозана, но при анализе корреляционных функций моду, соответствовавшую молекулярным размерам, всегда можно было выделить однозначно. Доля агрегатов в растворах ГТПХ была невелика.

Инкремент показателя преломления  $dn/dc$  ГТПХ в 0.33 М CH<sub>3</sub>COOH + 0.2 М CH<sub>3</sub>COONa определяли, используя образец 1 (табл. 1), на дифференциальном рефрактометре-интерферометре, описанном в работе [25]. Измерения проводили в двухсекторной кювете длиной  $1.085 \times 10^{-2}$  м. Полученное значение  $dn/dc = (0.15 \pm \pm 0.01) \times 10^{-3}$  м<sup>3</sup>/кг для ГТПХ в пределах экспериментальной погрешности не отличалось от  $dn/dc$  для немодифицированного хитозана и  $dn/dc$  для фракций хитозана в 0.33 М CH<sub>3</sub>COOH + 0.3 М NaCl [15, 16]. Для сравнительных измерений использовали образец немодифицированного хитозана, имеющего степень деацетилирования 90%. Для этого образца хитозана были определены следующие молекулярные характеристики:  $M_w = (200 \pm 20) \times 10^3$ ,  $[\eta] = (4.03 \pm 0.09) \times 10^{-1}$  м<sup>3</sup>/кг ( $k' = 0.44$ ), коэффициент поступательной диффузии  $D_0 = (0.7 \pm 0.1) \times 10^{-11}$  м<sup>2</sup>/с.

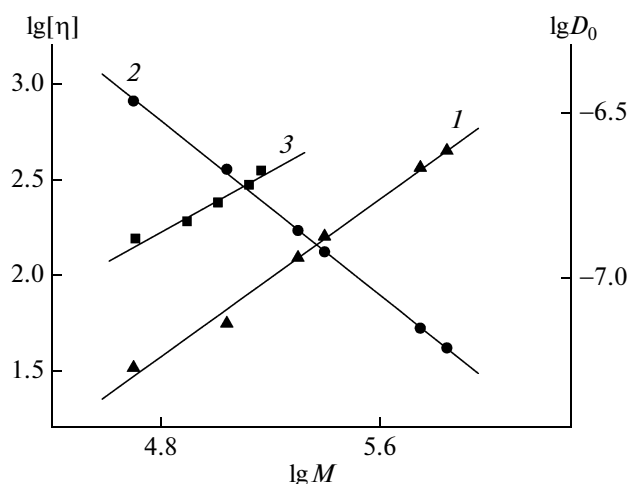
Экспериментальные значения  $M_w$ ,  $D_0$ ,  $R_h$  и  $R_g$  для образцов гомологического ряда ГТПХ приведены в табл. 1. Соотношения между  $R_h$  и  $R_g$ , также представленные в табл. 1, хорошо соответствуют

теоретическим значениям отношения  $R_g/R_h$  для статически свернутых немодисперсных полимерных клубков [19, 26].

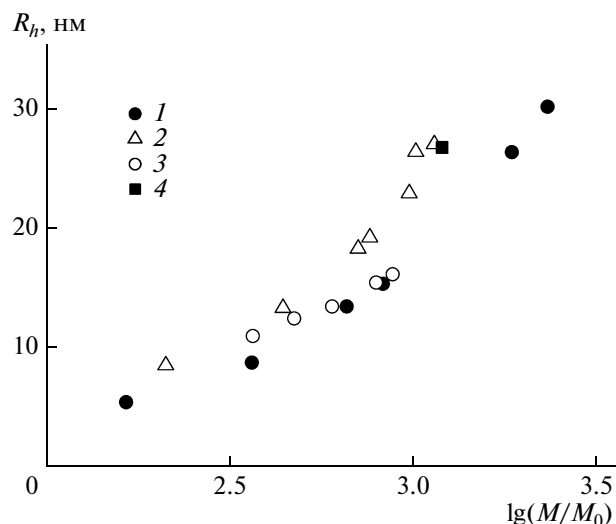
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то что ГТПХ легко растворялся в воде и водно-солевых растворах, молекулярные характеристики полученного гомологического ряда образцов были исследованы в смеси 0.33 М CH<sub>3</sub>COOH + 0.2 М CH<sub>3</sub>COONa. Главным аргументом в пользу такого выбора было наличие литературных данных о гидродинамических свойствах хитозанов различного происхождения в указанном [14] или подобных растворителях [15, 16, 27–29]. Сопоставляя молекулярные свойства полученного производного хитозана со свойствами немодифицированного аналога в условиях, обеспечивающих полное экранирование заряженных групп, мы имели возможность выявить особенности гидродинамического поведения цепей ГТПХ.

Молекулярные свойства производных хитозана в слабых водных растворителях обычно полагают полностью подобными свойствам исходного полисахарида и считают скейлинговые соотношения, известные для хитозана, пригодными для определения ММ химически модифицированных образцов [11, 12]. Такое упрощение некорректно, поскольку хитозан проявляет сильную зависимость свойств от условий среды и средней степени деацетилирования. Об этом свидетельствуют представленные в табл. 2 значения параметров соотношения Марка–Куна–Хауинка–Сакурады для хитозанов с различной степенью деацетилирования в условиях полного подавления полиэлектролитного эффекта. Общая тенденция, которую можно отметить, заключается в увеличении параметра  $a$  от 0.7 до значений поряд-



**Рис. 4.** Зависимости характеристической вязкости  $[\eta]$  (1) и коэффициента поступательной диффузии  $D_0$  (2) от ММ для образцов ГТПХ, а также  $[\eta]$  от ММ для хитозана (степень деацетилирования 90%, [14]) (3) в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  в билогарифмических координатах.



**Рис. 5.** Зависимость гидродинамического радиуса  $R_h$  молекул в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  с добавкой ацетата натрия от логарифма степени полимеризации  $M/M_0$  в гомологических рядах ГТПХ (1) и хитозанов (2, 3) с разной степенью деацетилирования [14, 15]; 4 – образец немодифицированного хитозана.

ка единицы и выше при снижении степени деацетилирования хитозана до 70–80%. При этом параметр  $K_\eta$  может отличаться более, чем на порядок, даже при близких величинах степени деацетилирования (см.  $K_\eta$  для хитозанов при степени деацетилирования ~90%).

Таким образом, табл. 2 демонстрирует зависимость численных коэффициентов соотношений Марка–Куна–Хаувинка–Сакурады для хитозана от степени деацетилирования, температуры и компонентов уксуснокислого растворителя, а также убеждает в том, что при химической модификации хитозана, приводящей к изменению состава и расположения заряженных групп, необходимо определять собственное соотношение Марка–Куна–Хаувинка–Сакурады для каждого производного этого полисахарида.

Молекулярная масса образцов в исследованном гомологическом ряду изменяется в четырнадцатикратном интервале (табл. 1), что вполне достаточно для надежного определения скейлинговых соотношений. На рис. 4 представлены экспериментальные зависимости  $\lg[\eta]$  и  $\lg D_0$  от  $\lg M_w$  для образцов ГТПХ в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , из которых были получены соотношения:

$$\begin{aligned} [\eta] &= (0.47 \pm 0.03) \times 10^{-3} M^{1.02 \pm 0.05} \\ D_0 &= (0.39 \pm 0.04) \times 10^{-3} M^{-0.65 \pm 0.02} \end{aligned} \quad (5)$$

Скейлинговое соотношение для гидродинамического радиуса  $R_h$  молекул ГТПХ имеет вид

$$R_h = (0.46 \pm 0.04) \times 10^{-10} M^{0.65 \pm 0.02}$$

Показатели степени в соотношениях (5) характерны для жесткоцепных протекаемых макромолекул в растворах [30].

Сопоставление соотношений (5) с аналогичными соотношениями для хитозана с близкой степенью деацетилирования (6), которые были определены в том же растворителе и при той же температуре [14], позволяет сделать заключение об их существенном отличии, а следовательно, и об отличии в гидродинамическом поведении молекул ГТПХ и хитозана в одинаковых условиях

$$\begin{aligned} [\eta] &= 0.138 \times 10^{-3} M^{0.85} \\ D_0 &= 0.188 \times 10^{-4} M^{-0.43} \end{aligned} \quad (6)$$

Зависимость  $\lg[\eta]$  от  $\lg M$  для хитозана по данным работы [14] также приведена на рис. 4. Хорошо видно, при одинаковых ММ образцы хитозана обладают существенно большими величинами  $[\eta]$ , чем образцы ГТПХ, а значит, отличаются и размеры макромолекул этих полимеров в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ . При этом ГТПХ имеет более компактные размеры, хотя его мономерное звено почти в 2 раза тяжелее, чем мономерное звено хитозана. Различие в  $M_0$  ( $M_0$  – ММ мономерного звена) этих полимеров учтено на рис. 5, где показаны зависимости средних гидродинамических размеров  $R_h$ , рассчитанных по формуле (3), от логарифма степени полимеризации  $M/M_0$  для ГТПХ и хитозана (степень деацетилирования 90%, [14]) в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , а также хитозана (степень деацетилирования 82%, [15]) в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.3 М

NaCl. Здесь следует принимать во внимание, что коэффициенты диффузии и  $R_h$  хитозанов получены из данных поступательной изотермической диффузии их молекул, основанных на ином методе усреднения, нежели динамическое рассеяние света [21]. Тем не менее сравнительное построение рис. 5 подтверждает вывод, сделанный выше (см. рис. 4): различие в размерах молекулярных клубков хитозанов и ГТПХ сохраняется.

ГТПХ имеет довольно длинный боковой заместитель у 90% мономерных звеньев, что должно было бы увеличивать размеры его молекулярных клубков в растворе по сравнению с хитозаном. Именно так, к примеру, ведут себя не несущие заряженных групп производные целлюлозы, размеры клубков которых обычно увеличиваются с удлинением боковых заместителей у этого полисахарида [30]. По-видимому, в отличие от незаряженных полисахаридов взаимодействие заряженных групп ГТПХ сказывается на гидродинамическом поведении этого полимера.

Согласно общим представлениям о гидродинамическом поведении макромолекул, имеющих одну и ту же основную цепь, но отличающихся структурой боковых заместителей, подобные различия в размерах могут быть обусловлены либо неодинаковой равновесной жесткостью полимерных цепей, либо неодинаковым термодинамическим качеством растворителя для каждой системы полимер–растворитель.

Полученные нами данные статического светорассеяния свидетельствуют о некотором ухудшении термодинамических условий в системе ГТПХ–0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ –0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  по сравнению с растворами хитозана в том же растворителе. Из построения диаграммы Зимма (рис. 3), согласно соотношению (4), по величине наклона концентрационной зависимости светорассеяния при  $\theta = 0$  можно определить второй вириальный коэффициент  $A_2$ , характеризующий термодинамические условия в растворе полимера [20, 21]. Анализ данных статического светорассеяния в растворах образцов ГТПХ и немодифицированного образца хитозана в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  показал, что для последнего величина  $A_2$  несколько выше. Среднее значение для всех образцов ГТПХ  $A_2 = (5 \pm 1) \times 10^{-4}$  моль  $\text{м}^3/\text{кг}^2$ , тогда как для немодифицированного хитозана  $A_2 = 7 \times 10^{-4}$  моль  $\text{м}^3/\text{кг}^2$ . Это, конечно, может качественно объяснить уменьшение гидродинамических размеров молекул ГТПХ по сравнению с размерами молекул хитозанов в одном и том же растворителе, однако достаточно высокая погрешность определения  $A_2$  все-таки не позволяет однозначно трактовать результаты сравнения, представленные на рис. 5. Чтобы сделать окончательный вывод, нужно определить

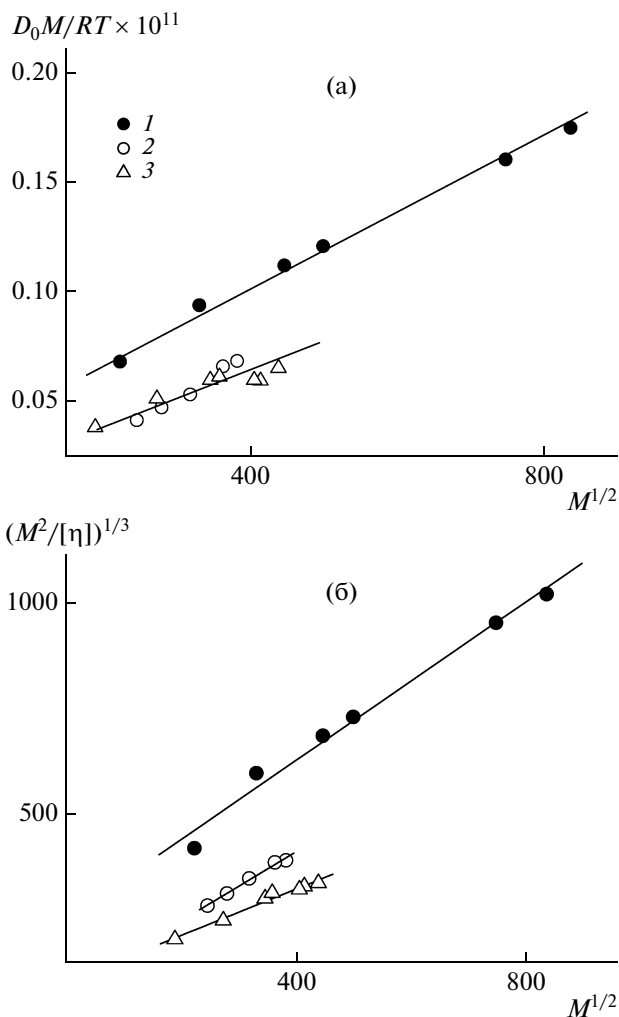


Рис. 6. Зависимости  $D_0M/RT$  от  $M^{1/2}$  (а) и  $(M^2/[\eta])^{1/3}$  от  $M^{1/2}$  (б) для гомологических рядов ГТПХ (1), хитозана в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (2) и 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.3 М NaCl (3). Степень деацетилирования хитозана 90 (2) и 82% (3).

равновесную термодинамическую жесткость цепей ГТПХ.

Используя значения характеристической вязкости  $[\eta]$ , коэффициентов поступательной диффузии  $D_0$  и ММ членов гомологического ряда полимера, это можно сделать, применив классическое построение (7) теории поступательного трения макромолекулярных цепей с учетом их протекаемости, моделируемых персистентным ожерельем [31] или персистентным сфероцилиндром [32], или же известное построение (8), предложенное в работе [33]:

$$DM/RT = (1/P_\infty N_A \eta_0) (M_L/A)^{1/2} M^{1/2} + (M_L/3\pi N_A \eta_0) M^{1/2} [\ln(A/d) - Q] \quad (7)$$

$$(100M^2/[\eta])^{1/3} = (R/P_\infty N_A \eta_0)(M_L/A)^{1/2} M^{1/2} + (RM_L/3\pi N_A A_0)M^{1/2}[\ln(A/d) - Q] \quad (8)$$

Здесь  $R$  – универсальная газовая постоянная;  $P_\infty = 5.11$  – гидродинамическая постоянная Флори;  $A$  – длина статистического сегмента Куна;  $M_L = M_0/\lambda$  – молекулярная масса, приходящаяся на единицу длины цепи;  $\lambda = 0.515$  нм – длина проекции глюкозидного цикла на направление роста цепи;  $A_0$  – гидродинамический инвариант [30];  $d$  – диаметр полимерной цепи; численный коэффициент  $Q$  не совпадает в упомянутых выше теориях, он равен 1.43 в теории [31] или 1.056 в работе [32].

Литературные данные демонстрируют существенные расхождения в оценке равновесной жесткости цепей хитозана. Длина статистического сегмента Куна хитозана по разным источникам характеризуется величиной от 11 [14] до 30 нм [29], но, несомненно, это полимер с повышенной жесткостью по сравнению с типично гибкоцепными полимерами, сегмент Куна которых обычно не превышает 5 нм [30]. Это оправдывает выбор теоретических соотношений (7) и (8) для описания гидродинамических свойств цепей ГТПХ.

На рис. 6а приведено построение  $D_0M/RT = f(M^{1/2})$ , а на рис. 6б построение  $(M^2/[\eta])^{1/3} = f(M^{1/2})$  для гомологических рядов ГТПХ, хитозана (степень деацетилирования 90%, по данным работы [14]) и хитозана (степень деацетилирования 82%, фракции образца 4 [15]). Величину равновесной жесткости  $A$ , согласно соотношениям (7) и (8), можно получить из наклона зависимостей на рис. 6а и 6б, а отсекаемый на оси ординат отрезок при условии  $M \rightarrow 0$  позволяет определить гидродинамический диаметр  $d$  молекул полимера в растворе. При расчетах величин  $A$  и  $d$  использовали экспериментальное значение гидродинамического инварианта  $A_0 = 3.4 \times 10^{-15}$  кг м<sup>2</sup>/с<sup>2</sup> град моль<sup>1/3</sup> (табл. 1),  $M_L = 58 \times 10^7$  кг/моль м (рассчитана с учетом степени деацетилирования 85%) для ГТПХ,  $M_L = 32.08 \times 10^7$  кг/моль м для хитозана со степенью деацетилирования 90% и  $M_L = 32.73 \times 10^7$  кг/моль м для хитозана со степенью деацетилирования 82%.

На рис. 6а видно, что хитозаны с разной степенью деацетилирования очень близки по своим конформационным свойствам, поэтому точки, соответствующие этим хитозанам, аппроксимировали одной прямой. Из этого построения получили следующие значения:  $A = (16 \pm 2)$  нм,  $d = (0.5 \pm 0.1)$  нм для ГТПХ и  $A = (19 \pm 2)$  нм,  $d = (0.5 \pm 0.1)$  нм для немодифицированных хитозанов.

Построение, приведенное на рис. 6б, которое аккумулирует данные трех независимых методов исследования, привело к следующему результату

для ГТПХ:  $A = (20 \pm 2)$  нм,  $d = (0.5 \pm 0.1)$  нм. Для хитозана со степенью деацетилирования 82% в этом случае получили  $A = (23 \pm 2)$  нм,  $d = (0.5 \pm 0.1)$  нм и  $A = (16 \pm 2)$  нм,  $d = (0.5 \pm 0.1)$  нм для хитозана со степенью деацетилирования 90%. Определенные нами величины равновесной жесткости хитозанов близки к соответствующим величинам, полученным для них ранее в работах [14–16].

Проведенное сопоставление позволяет заключить, что в пределах погрешности равновесная жесткость и гидродинамический диаметр всех трех полимеров (ГТПХ и двух хитозанов с разной степенью деацетилирования) близки по величине в растворителе, полностью экранирующем заряженные группы полимеров. Значит, конформационные свойства молекул немодифицированного и модифицированного хитозана в  $\text{CH}_3\text{COOH} + 0.2 \text{ M CH}_3\text{COONa}$  оказались одинаковыми. Здесь важно напомнить, что равновесная термодинамическая жесткость полимеров, являющихся полиэлектролитами, определяется суммой вкладов скелетной жесткости и электростатического взаимодействия заряженных групп в их цепях, которое весьма чувствительно к условиям внешнего окружения. Поэтому сделанный выше вывод о том, что конформационные свойства и ГТПХ, и хитозана в  $0.33 \text{ M CH}_3\text{COOH} + 0.2 \text{ M CH}_3\text{COONa}$  соответствуют свойствам эквивалентной свободносочлененной цепи с длиной статистического сегмента  $\sim 20$  нм, свидетельствует в то же время об изменившемся балансе отмеченных выше факторов, влияющих на равновесную жесткость рассматриваемых полимеров.

Действительно, хорошо известно, что жесткость цепи хитозана в значительной степени зависит от вклада электростатической составляющей. Этот вывод следует из сопоставления длины сегмента Куна хитозана и его ближайшего незаряженного структурного аналога – целлюлозы, равновесная жесткость молекул которой оценивается величиной примерно в 2 раза меньшей ( $\sim 9.5$  нм), чем у хитозана [34, 35]. Очевидно, что изменения, произведенные в химической структуре хитозана при использованном методе модификации, могли повлиять как на скелетную, так и на электростатическую составляющую равновесной жесткости ГТПХ за счет удлинения боковой цепи и появления несущей заряд четвертичной аминогруппы, удаленной от основной цепи полисахарида. Однако ответ на эти вопросы требует дополнительных исследований, поскольку выделить электростатическую составляющую жесткости полиэлектролита, как правило, весьма непросто [36].

Таким образом, модификация хитозана четвертичными аминогруппами, удаленными от основной цепи на расстояние, сравнимое с разме-



рами глюкозидного цикла, не изменила конформационные параметры макромолекул  $A$  и  $d$ , но очевидно повлияла на соотношение вкладов термодинамической и электростатической составляющих жесткости цепи хитозана, проявившегося в снижении величины второго вириального коэффициента и уменьшении гидродинамических размеров ГТПХ в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  по сравнению с немодифицированным хитозаном (рис. 5).

Если формальным образом сопоставить параметры скейлинговых соотношений для ГТПХ (уравнения (5)) и хитозанов с различной степенью деацетилирования, которые приведены в табл. 2, то можно сделать вывод о соответствии между величинами  $a$  и  $K_\eta$  для ГТПХ и хитозанов, имеющих степень деацетилирования от 69 до 84%. Качественно из подобного сопоставления можно заключить, что модификация, реализованная в ГТПХ, оказалась эквивалентна по своим результатам снижению степени деацетилирования исходного хитозана, которое способствует улучшению его растворимости в воде.

Молекулярные массы образцов ГТПХ, определенные в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , и величины их характеристических вязкостей в другом растворителе  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.2 М  $\text{NaCl}$  (табл. 1) использовали для установления еще одного соотношения Марка—Куна—Хаувинка—Сакурады

$$[\eta] = (0.95 \pm 0.05) \times 10^{-3} M^{0.96 \pm 0.05} \quad (9)$$

Здесь следует обратить внимание на практическое совпадение значений  $[\eta]$  и постоянных Хаггинса  $k'$  (табл. 1), и, как следствие, на близость параметров скейлинговых соотношений (9) и (5) для образцов ГТПХ в растворителях с различными рН. Это означает, что модифицированный хитозан гораздо менее чувствителен к условиям растворяющей среды, чем исходный аналог, который полностью растворим в воде только при невысоких ММ, и его свойства сильно зависят от рН и ионной силы растворителя [11, 26]. Подобие вискозиметрических свойств ГТПХ в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  и  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.2 М  $\text{NaCl}$  также означает, что размеры и форма его молекул в этих растворителях должны быть близки, поэтому выводы о конформационных свойствах модифицированного хитозана в 0.33 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0.2 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , сделанные выше, можно считать справедливыми и для системы ГТПХ— $\text{H}_2\text{O}$ —2М  $\text{NaCl}$ .

Авторы выражают благодарность Г.М. Павлову за предоставленную возможность провести измерения инкрементов показателя преломления.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu W.G., Yao K.D. // J. Controlled Release. 2002. V. 83. № 1. P. 1.
2. Mintzer M.A., Simanek E.C. // Chem. Rev. 2009. V. 109. P. 259.
3. Mao S., Sun W., Kissel T. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2009. doi:10.1016/j.addr.2009.08.004.
4. Strand S.P., Danielsen S., Christensen B.E., Varum K.M. // Biomacromolecules. 2005. V. 6. № 6. P. 3357.
5. Ильина А.В., Варламов В.П. // Матер. XIII Междунар. конф. "Современные перспективы в исследованиях хитина и хитозана". Казань, 2001. С. 280.
6. Domard A., Rinaudo M., Terrassin C. // Int. J. Biol. Macromol. 1986. V. 8. № 4. P. 175.
7. Le Dung P., Milas M., Rinaudo M., Desbrieres J. // Carbohydr. Polym. 1994. V. 24. № 3. P. 209.
8. Runarsson O.V., Holappa J., Jonsdottir S., Steinsson H., Masson M. // Carbohydr. Polym. 2008. V. 74. № 3. P. 740.
9. Stepnova E.A., Tikhonov V.E., Babushkina T.A., Klimova T.P., Vorontsov E.V., Babak V.G., Lopatin S.A., Yamskov I.A. // Eur. Polym. J. 2007. V. 43. № 6. P. 2414.
10. Loubaki E., Sicsic S., Le Goffic F. // Eur. Polym. J. 1989. V. 25. № 4. P. 379.
11. Lim S.H., Hudson S.M. // Carbohydr. Res. 2004. V. 339. № 2. P. 313.
12. Горшкова М.Ю., Волкова И.Ф., Изумрудов В.А. // Высокомолек. соед. А. 2011. Т. 53. № 1. С. 60.
13. Boussif O., Lezoualch F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 7297.
14. Гамзада А.И., Шлимак В.М., Скляр А.М., Штыкова Э.В., Павлова С.А., Рогожин С.В. // Acta Polym. 1985. V. 36. № 8. P. 420.
15. Погодина Н.В., Павлов Г.М., Бушин С.В., Мельников А.Б., Лысенко Е.Б., Маршева В.Н., Марченко Г.Н., Цветков В.Н. // Высокомолек. соед. А. 1986. Т. 28. № 2. С. 232.
16. Погодина Н.В., Евлампиева Н.П., Хрусталева А.З., Маршева В.Н., Марченко Г.Н., Цветков В.Н. // Высокомолек. соед. А. 1986. Т. 28. № 2. С. 240.
17. Chavasit V., Kienzle-Sterzer C., Torres J.A. // Polym. Bull. 1988. V. 19. № 3. P. 223.
18. Huang M., Khor E., Lim L.-Y. // Pharm. Res. 2004. V. 21. № 3. P. 344.
19. Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я. Структура макромолекул в растворах. М.: Наука, 1964.
20. Dynamic Light Scattering: The Method and Some Applications / Ed. by W. Brown. Oxford: Clarendon Press, 1993.
21. Berne B.J., Pecora R. Dynamic Light Scattering. New York: Wiley, 1976.
22. Anthonsen M.W., Varum K.M., Hermansson A.M., Smidsrod O., Brant D.A. // Carbohydr. Polym. 1994. V. 25. № 1. P. 13.
23. Buhler E., Rinaudo M. // Macromolecules. 2000. V. 33. № 6. P. 2098.
24. Volkov E.V., Sitnikova N.L., Khokhlov A.R. // Biomacromolecules. 2001. V. 2. № 2. P. 483.

25. Павлов Г.М. // Вестн. ЛГУ. Сер. 4. Вып. 3. 1988. № 18. С. 89.
26. Williams R.J.P., Fernandes D.L. // Dynamic Properties of Biomolecular Assemblies / Ed. by S.E. Harding, A.J. Row. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1988. P. 276.
27. Wang W., Bo Sh., Li Sh., Quin W. // Int. J. Biol. Macromol. 1991. V. 13. № 10. P. 291.
28. Roberts G., Domszy J. // Int. J. Biol. Macromol. 1982. V. 4. № 6. P. 374.
29. Muzzarelli R. Chitin. London: Pergamon Press, 1977.
30. Цветков В.Н. Жесткоцепные полимерные молекулы. Л.: Наука, 1986.
31. Hearts J.E., Stockmayer W.H. // J. Chem. Phys. 1962. V. 37. № 7. P. 1425.
32. Yamakawa H., Fujii M. // Macromolecules. 1973. V. 6. № 3. P. 407.
33. Бушин С.В., Цветков В.Н., Лысенко Е.Б., Емельянов В.Н. // Высокомолек. соед. А. 1981. Т. 23. № 11. С. 2494.
34. Любина С.Я., Кленин С.И., Стрелина И.А., Троицкая А.В., Хрипунов А.Н., Уринов Е.И. // Высокомолек. соед. А. 1977. Т. 19. № 2. С. 244.
35. Погодина Н.В., Мельников А.Б., Евлампиева Н.П. // Химия древесины. 1984. № 6. С. 3.
36. Schmitz K.S., Yu J.-W. // Macromolecules. 1988. V. 21. № 2. P. 484.