

Высокомолекулярные соединения

Серия А

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, Серия А, 2011, том 53, № 4, с. 515–524

ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТЫ

УДК 541(64+49):547.995.12

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ НЕСТЕХИОМЕТРИЧНЫЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИТОЗАНА¹

© 2011 г. В. А. Изумрудов*, И. Ф. Волкова**, Э. С. Григорян**, М. Ю. Горшкова**

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова.

Химический факультет

119991 Москва, Ленинские горы

**Учреждение Российской академии наук

Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН

119991 Москва, Ленинский пр., 29

Поступила в редакцию 13.10.2010 г.

Принята в печать 03.12.2010 г.

Алкилированием первичных аминогрупп хитозана глицидилтриметиламмоний хлоридом синтезирован модифицированный полисахарид, несущий практически в каждом деацетилованном звене функциональную вторичную аминогруппу и кватернизованную аминогруппу, обеспечивающую положительный заряд и растворимость полимера во всем диапазоне рН. Смешением раствора модифицированного хитозана с растворами полистиролсульфонатных или полиметакрилатных анионов в нейтральных средах получены отрицательно заряженные нестехиометричные полиэлектролитные комплексы, растворимые и стабильные при физиологических условиях. Выявлено влияние рН, ионной силы, степени полимеризации и природы лиофилизующего полианиона, а также заряд зарядового соотношения компонентов на границы существования растворимых комплексов. Полученные данные могут составить основу для разработки биосовместимых и биodeградируемых средств доставки генетического материала и лекарственных веществ в живые клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Природный полисахарид хитозан представляет собой продукт деацетилирования хитина — одного из наиболее распространенных природных полимеров. Биосовместимость, биodeградируемость, разнообразная биологическая активность, а также низкая токсичность хитозана обуславливают его широкое использование в медицине и фармакологии от покрытий на раны и ожоги до систем направленной доставки лекарств [1–3].

Протонирование первичных аминогрупп обеспечивает положительный заряд и растворимость макромолекул хитозана в кислых средах, а также их способность электростатически взаимо-

действовать с полианионами и анионными биополимерами. Результаты многочисленных исследований полиэлектролитных комплексов хитозана проанализированы и обобщены в обзорах [4, 5]. Подавляющее большинство работ посвящено описанию способов получения и исследованию свойств нерастворимых комплексов. Формированию растворимых комплексов препятствуют неоднородность образцов хитозана, выделяемых из природного сырья, сравнительно узкая область рН, где хитозан растворим, и специфическая структура этого катионного полисахарида, определяющая его склонность к образованию водородных связей, способствующих возникновению макромолекулярных агрегатов.

Особый интерес вызывает возможность использования этого биосовместимого и биodeградируемого катионного полисахарида в качестве вектора для доставки генетического материала в клетку. Смешением растворов хитозана и ДНК в

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 10-03-00019-а).

E-mail: izumrud@genebee.msu.ru (Изумрудов Владимир Алексеевич).

слабо кислых средах удалось получить растворимые комплексы [6, 7], но переход в нейтральные среды, приводящий к депротонированию аминогрупп, вызывал существенное увеличение размеров частиц, а при $\text{pH} \geq 6.5$ комплексы теряли растворимость. Попытки расширения области существования растворимых комплексов путем использования кватернизованных производных хитозана [8, 9] осложнялись наличием в продуктах модификации аминогрупп различной степени замещения и *O*-алкилированных фрагментов. Композиционная неоднородность образцов оказывала негативное влияние на растворимость и свойства комплексов. Сшитые специальным образом олигомеры хитозана [10] сохраняли растворимость в нейтральных средах вплоть до $\text{pH} 7.4$ и заметно увеличивали эффективность трансфекции (т.е. доставки ДНК в ядра клеток), однако для признания данного подхода перспективным необходимы физико-химические и биологические исследования комплексов. Помимо узкого интервала устойчивости растворимые комплексы хитозана с нуклеиновыми кислотами оказались весьма чувствительными к присутствию белков сыворотки крови [11]. Использование высокомолекулярных образцов хитозана ($M > 10^5$) позволило несколько ослабить связывание белков, но при этом снижалась устойчивость растворимых комплексов к изменению pH и ионной силы раствора. Таким образом, проблема получения растворимых комплексов хитозана с нуклеиновыми кислотами, стабильных при физиологических условиях ($\text{pH} 7.2$, 0.14 M NaCl) остается важной нерешенной задачей.

В литературе имеются работы по растворимым комплексам хитозана с анионными полисахаридами, в частности гепарином [12, 13], декстрансульфатом и альгинатом натрия [14–18]. Для получения комплексов авторам [12, 13] пришлось подвергать суспензию смеси растворов хитозана и гепарина многократному фильтрованию. Понятно, что такой путь должен сопровождаться неизбежными потерями полимеров и приводить к большим ошибкам определения состава комплексов. Растворимые комплексы хитозана с декстрансульфатом готовили смешением компонентов в концентрированных (6 М) растворах мочевины [14, 15], что вряд ли можно считать удачным, поскольку использование подобных комплексов для доставки физиологически активных соединений в клетки не представляется возможным из-за денатурирующего действия мочевины на биополимеры. Прозрачные системы получали смешением растворов хитозана с декстрансульфатом или альгинатом натрия в существенно неэквивальном соотношении [16–18], причем смеси растворялись при достижении определенного избытка как отрицательно заряженных групп полианионов, так и положительно заряженных ами-

ногрупп полисахарида. Растворимые комплексы декстрансульфата агрегировали при $\text{pH} > 6.0$ и концентрации хлористого натрия выше 0.10 моль/л . Продукты взаимодействия хитозана с альгинатом натрия были чуть стабильнее, сохраняя растворимость вплоть до $\text{pH} 6.4$. Таким образом, и для комплексов хитозана с анионными полисахаридами пока не удалось получить растворимых продуктов, устойчивых при физиологических условиях.

Дальнейшее продвижение в этой области требует изучения влияния природы и молекулярных характеристик полимеров (длины цепи, плотности заряда), а также внешних условий (pH , ионной силы, температуры) на комплексообразование. Удобным партнером хитозана в подобных модельных исследованиях может служить линейный синтетический полистиролсульфонатный анион (ПСС), несущий в каждом звене сульфонатную группу, которая практически полностью ионизована во всем исследуемом диапазоне pH . Немаловажным обстоятельством, определяющим успешное проведение опытов, является доступность коммерческих препаратов ПСС в виде хорошо охарактеризованных узких фракций различной ММ.

Результаты первой работы [19] в серии модельных исследований взаимодействия хитозана и ПСС-аниона [19–22] продемонстрировали возможность получения растворимых нестехиометрических полиэлектролитных комплексов в сильно кислых средах. Однако необходимость проведения опытов в условиях, далеких от физиологических, существенно ограничивало изучение и практическое применение комплексов.

Снять упомянутое ограничение удалось с помощью приема, разработанного ранее [23] для получения растворимых комплексов, содержащих полианион в качестве лиофилизующего компонента. Готовили сильно кислые растворы хитозана и ПСС-аниона, которые затем смешивали в неэквивальном заряд-зарядовом соотношении (полианион в значительном избытке), формируя растворимые нестехиометрические полиэлектролитные комплексы (НПЭК). Данный этап приготовления комплексов полностью соответствовал процедуре, описанной в работе [19]. На финальной стадии в системы добавляли раствор щелочи до нейтральных значений pH [20, 21]. Указанная последовательность действий позволила избежать фазового разделения, которое возникает при прямом смешении растворов хитозана и полианиона в нейтральных и слабо кислых средах. Приготовленные комплексы оставались растворимыми и стабильными вплоть до $\text{pH} 7.2$, отвечая критериям поведения водорастворимых НПЭК. При всей своей привлекательности такой путь получения НПЭК тоже не лишен недостатков. Не всякий анионный биополимер (белок,

фермент, нуклеиновая кислота) сохраняет свои функциональные свойства в сильно кислых средах, необходимых для осуществления первого этапа приготовления растворимых комплексов с хитозаном. Кроме того, даже незначительное подщелачивание среды при $pH > 7.2$ приводило к кооперативному разрушению системы ионных пар из-за депротонирования аминогрупп полисахарида, включенного в состав комплекса.

Настоящая работа представляет собой следующий важный этап проводимых модельных исследований. Основой послужило использование химически модифицированного поликатиона, который получали алкилированием первичных аминогрупп хитозана глицидилтриметиламмоний хлоридом [22]. Высокозаряженный и однородный по структуре полимер содержал в каждом модифицированном звене два типа аминогрупп — кватернизованную аминогруппу, обеспечивающую положительный заряд цепей и их растворимость во всем диапазоне pH , а также вторичную аминогруппу, способную (де)протонироваться при изменении кислотности среды. Специфика строения и свойства модифицированного хитозана позволили готовить комплексы в мягких условиях простым смешением растворов полисахарида и ПСС-аниона в нейтральных средах, а полученные таким образом растворимые НПЭК отличались повышенной устойчивостью. Результаты работы свидетельствуют о перспективности применения модифицированного хитозана в качестве основного компонента физиологически активных, растворимых, биосовместимых и биodeградируемых комплексов, пригодных для использования в широком интервале изменения внешних условий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Препарат хитозана производства закрытого акционерного общества “Биопрогресс” (степень деацетилирования исходного хитина 90%, массовая доля золя 5%) очищали осаждением из кислых растворов раствором щелочи, промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и лиофильно сушили. Модифицированный хитозан получали взаимодействием полисахарида с глицидилтриметиламмоний хлоридом как описано в работе [22]. Значения M_w образцов исходного и модифицированного хитозана, которые определяли статическим светорассеянием в 0.33 М уксусной кислоте, содержащей 0.2 моль/л ацетата натрия, составили соответственно 280×10^3 и 250×10^3 . Измерения светорассеяния осуществлены Н.П. Евлампиевой в Научно-исследовательском институте физики им. В.А. Фока

физического факультета Санкт-Петербургского государственного университета.

Полианионами служили фракции полистиролсульфоната натрия фирмы “DuPont” (Франция—США) степени полимеризации 10, 20, 40, 90, 170 и 360, которые будем обозначать соответственно ПСС₁₀, ПСС₂₀, ПСС₄₀, ПСС₉₀, ПСС₁₇₀ и ПСС₃₆₀. Кроме того, использовали фракции полиметакриловой (ПМА) кислоты ПМА₄₀, ПМА₇₀, ПМА₁₄₀, ПМА₂₃₀, ПМА₆₈₀, ПМА₉₈₀ и ПМА₃₅₀₀ фирмы “Polysciences” (США).

Низкомолекулярную соль КСI квалификации ч.д.а. (“Лабтех”, Россия) использовали без дополнительной очистки. Растворы буферов MES, HEPES и TRIS фирмы “Sigma” (США) готовили растворением навесок с последующим доведением pH соответственно до значений 5.5, 7.2 и 9.0, добавляя концентрированную щелочь или кислоту. Навески полимеров растворяли в 0.02 М растворах одного из перечисленных буферов. Концентрацию полимеров выражали в терминах мольной концентрации звеньев, а именно концентрации $[N]$ первичных аминогрупп для раствора хитозана, $[N_q]$ кватернизованных аминогрупп для раствора модифицированного хитозана, $[S]$ сульфонатных групп для раствора ПСС-аниона и суммарной концентрации $[COOH + COO^-Na^+]$ незаряженных карбоксильных и заряженных карбоксилатных групп для раствора ПМА-аниона.

Полиэлектролитные комплексы получали смешением соответствующих объемов растворов полиэлектролитов в растворе выбранного буфера, содержащего 0.05 М КСI. Величина $[S]$ и $[COOH + COO^-Na^+]$ в исходных смесях была одинаковой и равной 6.7×10^{-4} моль/л.

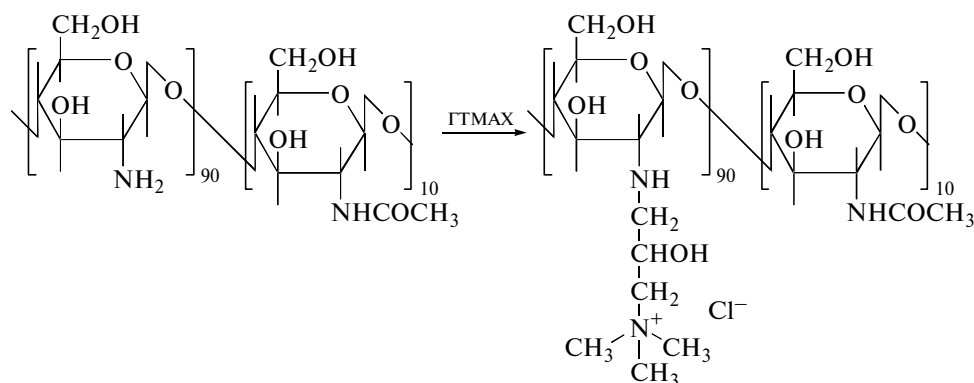
Методы

Турбидиметрическое титрование осуществляли последовательным добавлением концентрированного раствора титранта (полисахарида или хлористого калия) в стандартную кварцевую кювету, содержащую раствор ПСС-аниона или прозрачную смесь полиэлектролитов выбранного состава. Измерения проводили на спектрофотометре “Specord M-40” (Carl Zeiss, Jena, Германия) при постоянном перемешивании и температуре 25°C. Мутность оценивали по значениям оптической плотности D_{450} , измеренной при длине волны 450 нм, при которой ни один из полимерных компонентов не поглощал свет. Временной интервал между введением порций титранта составлял 5 мин. Смеси, отвечающие условию $D_{450} < 0.02$, рассматривали как прозрачные.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие хитозана с глицидилтриметиламмоний хлоридом (ГТМАХ) приводит к раскрытию эпоксидного цикла модифицирующего агента. Поскольку в нейтральных средах нуклео-

фильность первичных аминогрупп полисахарида значительно превышает нуклеофильность его гидроксильных групп, раскрытие эпоксидного цикла обеспечивают главным образом аминогруппы:



Высокая селективность и исчерпывающий характер модификации аминогрупп подтверждены методами ИК-Фурье спектроскопии, ЯМР и ПМР [22]. В результате образуется полимер, каждый из N-(2-окси-3-триметиламмоний) пропиловых фрагментов которого содержит два типа функциональных групп, а именно кватернизованную аминогруппу и вторичную аминогруппу. Кватернизованные аминогруппы обеспечивают положительный заряд и растворимость полимера во всем диапазоне pH. Вторичные аминогруппы тоже могут выполнять важную функцию. Полученные в работе [22] данные потенциометрического титрования растворов хитозана, его модифицированного производного и их смесей с ПСС-анионом, а также результаты измерения ζ -потенциала и турбидиметрическое титрование выявили способность вторичных аминогрупп полисахарида, связанного в комплекс, ионизоваться в слабо кислых средах. Протонирование аминогрупп вносит свою лепту в комплексообразование и может быть полезным для решения практических задач, в частности для повышения эффективности трансфекции генетического материала по механизму “протоновой губки” [24].

Цель настоящего исследования заключалась в разработке способа получения комплексов модифицированного хитозана, растворимых и стабильных в условиях, благоприятных для функционирования биополимеров, а также выявлении роли вторичных и четвертичных аминогрупп в комплексообразовании. В качестве партнеров катионного полисахарида использовали фракции сильного и слабого полианионов, а именно ПСС-аниона, полностью ионизованного в условиях опытов, и ПМА-аниона, степень ионизации которого варьировали изменением pH среды.

Водорастворимые комплексы модифицированного хитозана с ПСС-анионами

Как уже отмечалось выше, отрицательно заряженные растворимые комплексы немодифицированного хитозана и фракций ПСС получали смешением соответствующих количеств полимерных компонентов в сильно кислых средах [19]. Нейтрализация продуктов раствором щелочи не сопровождалась фазовым разделением, что позволило приготовить НПЭК, растворимые в нейтральных средах [20, 21]. Мы использовали те же фракции ПСС-анионов для получения растворимых НПЭК на основе модифицированного полисахарида. Опыты проводили последовательным введением порций буферного раствора модифицированного хитозана в буферный раствор выбранного ПСС-аниона при различных значениях pH, соответствующих нейтральным средам, а также слабо кислым и слабо щелочным растворам. Титрование осуществляли при постоянном перемешивании, добиваясь полного просветления системы после каждого добавления титранта. Помутнение, которое появлялось в первый момент, обусловлено возникновением нерастворимых продуктов существенно не завершенной интерполиэлектrolитной реакции, а исчезновение мутности во времени указывает на переход системы в равновесное состояние. Приготовленные таким образом смеси растворов компонентов различного состава $Z = [N_q] : [S]$ оставались прозрачными, свидетельствуя об образовании растворимых комплексов. При достижении в процессе титрования некоторого критического соотношения $Z_{кр}$ в системе возникала устойчивая опалесценция, не исчезающая при перемешивании, а добавление поликатиона при $Z > Z_{кр}$ приводило к

появлению и последующему накоплению нерастворимого комплекса.

Определенные таким образом значения $Z_{кр}$ представлены на рис. 1 в виде зависимости от степени полимеризации ПСС-аниона. Вид кривых 1 и 2, полученных соответственно при pH 7.2 и 9.0, свидетельствует о том, что системы отвечают одному из критериев поведения водорастворимых НПЭК. Так, в случае коротких олигомерных ПСС-анионов (левые участки кривых) значения $Z_{кр}$ близки к нулю, т.е. область существования растворимых НПЭК практически вырождается. Удлинение отрицательно заряженных цепей создает предпосылки для образования растворимых комплексов, причем в этой области величина критического состава смеси существенно возрастает с увеличением степени полимеризации полианиона. Наконец при переходе к высокомолекулярным фракциям ПСС (правые участки кривых) состав $Z_{кр}$ достигает своего максимального значения и перестает зависеть от длины цепи полианиона.

Такое поведение характерно для растворов НПЭК [25, 26] и обусловлено понижением лиофилизующей способности полиэлектролита (в данном случае ПСС-аниона) с уменьшением его длины. Образование растворимых комплексов с короткими лиофилизующими цепями термодинамически невыгодно, поскольку оно сопровождается потерей трансляционной и конфигурационной энтропии [27]. Чем короче полианион, тем больше его макромолекул требуется иммобилизовать, чтобы создать избыточное количество отрицательных зарядов, необходимое для придания комплексу растворимости. Включение цепей в состав комплекса влечет за собой энтропийно невыгодное уменьшение общего числа частиц в растворе, а в случае олигомерных образцов эффект столь значителен, что комплекс не переходит в раствор даже при подавляющем избытке отрицательно заряженных олигомеров в системе.

Обращает на себя внимание небольшое, но достоверное различие зависимостей, полученных при pH 7.2 и pH 9.0, которое можно объяснить некоторой разницей в числе образующихся ионных пар. По данным потенциометрии [22], при pH 9.0 только кватернизованные аминокгруппы модифицированного хитозана участвуют в связывании с ПСС-анионом, тогда как при pH 7.2 свой вклад начинают вносить вторичные аминокгруппы. Однако их степень протонирования в комплексе (а значит, и добавочное количество ионных пар) при pH 7.2 не превышает 10%, что отражается незначительным смещением кривой 1 вверх по оси ординат (кривая 2). Как известно [23], именно относительное содержание ионных пар в смеси полимерных компонентов определяет гидрофиль-

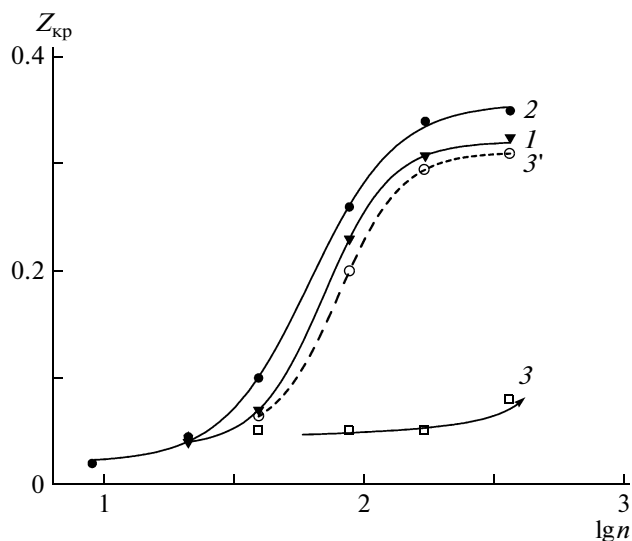


Рис. 1. Зависимость критического состава смеси $Z = [N_q] : [S]$, соответствующего началу фазового разделения при титровании раствора ПСС-аниона раствором модифицированного хитозана, от степени полимеризации n полианиона при pH 7.2 (1), 9.0 (2) и 5.5 (3). 0.02 М буфер, содержащий 0.05 М KCl; температура 25°C. Штриховая кривая 3' получена титрованием раствора ПСС-аниона раствором полисахарида при pH 9.0 и подкислением среды до pH 5.5. Пояснения в тексте.

но-липофильный баланс образующихся частиц и границы существования растворимых комплексов.

В слабо кислых средах приготовление растворимых комплексов существенно затрудняется. Добавление к раствору ПСС-аниона при pH 5.5 уже первой порции модифицированного хитозана (рис. 1, кривая 3) сопровождалось фазовым разделением, которое практически не изменялось во времени, причем удлинение цепи полианиона мало способствовало повышению растворимости образующегося комплекса (правая часть кривой 3). Неожиданно высокий темп снижения $Z_{кр}$ свидетельствует о катастрофическом изменении состояния системы при подкислении. По данным потенциометрического титрования [22], при pH 5.5 в условиях приготовления комплексов (ПСС-анион в избытке) практически все вторичные аминокгруппы модифицированного хитозана участвуют в электростатическом взаимодействии. Очевидно, что значительный прирост числа ионных пар в комплексе должен приводить к ослаблению лиофилизующей способности ПСС-аниона и сужению области существования растворимых НПЭК, как это и наблюдается в экспериментах. Однако практически полная утрата даже высокомолекулярными ПСС-анионами своей лиофилизующей способности указывает на параллельное действие других факторов, в частно-

сти кинетических затруднений, осложняющих приготовление НПЭК.

Аргументом в пользу этого предположения послужили результаты проведенных нами опытов, в которых изменили порядок приготовления НПЭК. Вначале титровали один полимерный компонент другим при pH 9.0, получая прозрачные смеси растворов ПСС и модифицированного хитозана разного состава $Z < Z_{кр}$. Затем систему подкисляли и определяли состав Z тех смесей, которые содержали наибольшее количество катионного полисахарида, но оставались прозрачными при pH 5.5. Полученные таким образом значения, которые представлены на рис. 1 штриховой линией (кривая 3'), оказались существенно более высокими по сравнению с величинами $Z_{кр}$, полученными в режиме прямого титрования (кривая 3). Эти данные свидетельствуют о важной роли интерполиэлектролитных реакций обмена, скорость протекания которых определяет время перехода систем в равновесное состояние. Поскольку стабильность комплексов модифицированного хитозана и ПСС-аниона в слабо кислых средах возрастает [22], перераспределение полиионов по образующимся в первый момент после смешения комплексам различного состава может существенно замедляться или не осуществляться вовсе за разумные времена [23]. Соответственно получить растворимые комплексы при pH 5.5 прямым титрованием не удастся (кривая 3). Предварительное формирование растворимых НПЭК в слабо щелочных средах, где стабильность комплексов ниже, а скорость обменных реакций выше, позволяет обойти кинетический запрет. Подкисление уже сформированных при pH 9.0 растворимых НПЭК вызывает протонирование вторичных аминогрупп, включенных в состав комплекса и образование дополнительных ионных пар. Знаменательно, что по данным потенциометрии [22] уменьшение pH от 9.0 до 5.5 вызывает ионизацию практически всех вторичных аминогрупп модифицированного хитозана в комплексе. Но вопреки ожиданиям, лиофилизирующая способность ПСС-аниона при этом уменьшается незначительно: кривая 3' мало отличается от кривых 1 и 2, полученных непосредственным смешением компонентов соответственно в нейтральных и слабо щелочных средах. Причина столь слабо выраженного эффекта не вполне ясна и требует дополнительного изучения. Одним из возможных объяснений может служить влияние близко расположенной кватернизованной аминогруппы, находящейся в том же звене, которое препятствует образованию стабильной ионной пары вторичной аминогруппы с сульфонатной группой. Кроме того, расположение вторичных аминогрупп в непосредственной близости от основной цепи полисахарида может создавать дополнительные стерические препятствия для

электростатического взаимодействия с ПСС-анионом. Действие обоих факторов может приводить к некоторому разупорядочению системы ионных пар и снижать гидрофобность участков образующегося комплекса, способствуя повышению растворимости НПЭК.

Как бы то ни было, приведенные результаты свидетельствуют о том, что использование модифицированного хитозана позволяет существенно расширить область существования растворимых комплексов. Если комплекс немодифицированного хитозана с ПСС-анионом начинает разрушаться при подщелачивании среды выше pH 7.2 и полностью диссоциирует на свободные компоненты при $pH \geq 9.0$ [22], то наличие кватернизованных аминогрупп в цепи модифицированного полимера обеспечивает его связывание с ПСС-анионом во всем диапазоне pH, включая pH 9.0 (рис. 1, кривая 2). Предложенная процедура предварительного формирования растворимых комплексов в щелочных растворах с последующим подкислением систем позволяет получать растворимые НПЭК даже в слабо кислых средах, что открывает перспективы использования модифицированного хитозана для разработки систем направленного транспорта физиологически активных веществ в ядра клеток.

Другим фундаментальным свойством растворов НПЭК является их специфическое фазовое поведение в водно-солевых средах. В большинстве случаев введение низкомолекулярного электролита в прозрачные растворы НПЭК не вызывает видимых изменений на начальном этапе, но при достижении некоторой критической концентрации соли (которую в дальнейшем будем обозначать $[KCl]^*$) приводит к фазовому разделению системы, которое сопровождается выделением в осадок стехиометричного комплекса за счет перераспределения заряженных цепей [23]. Аналогичным образом ведут себя прозрачные смеси растворов модифицированного хитозана и ПСС-аниона, приготовленные при различных значениях pH. Из кривых турбидиметрического титрования смесей выбранного состава $Z = [N_q] : [S]$ концентрированным раствором хлористого калия находили точку помутнения, соответствующую величине $[KCl]^*$. Для всех исследованных пар полиионов, содержащих ПСС-анионы разной длины, величина $[KCl]^*$ уменьшалась с ростом Z , т.е. с увеличением относительного содержания блокирующего поликатиона в системе (рис. 2). Такое поведение присуще растворимым НПЭК, устойчивость которых в водно-солевых средах снижается по мере заполнения лиофилизирующего полианиона блокирующим поликатионом [23]. Примером могут служить зависимости, полученные для смесей немодифицированного хитозана и ПСС-аниона при pH 7.2, которые заимствованы из работы [22] и представлены на рис. 2

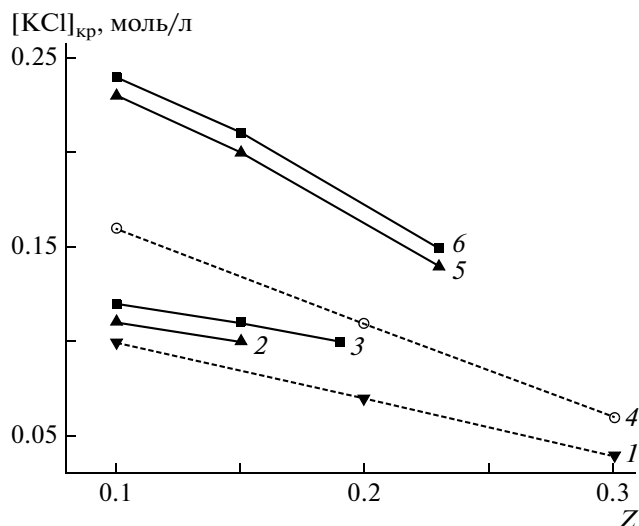


Рис. 2. Зависимость критической концентрации соли $[KCl]^*$, соответствующей началу фазового разделения, от соотношения компонентов $Z = [N_q] : [S]$ для смесей раствора модифицированного хитозана с раствором ПСС₉₀ (2, 3) и ПСС₃₆₀ (5, 6) при рН 7.2 (2, 5) и 9.0 (3, 6). 0.02 М буфер, содержащий 0.05 М КСl; температура 25°C. Пунктирные линии – кривые, полученные в работе [21] при рН 7.2 для смесей раствора немодифицированного хитозана с раствором ПСС₉₀ (1) и ПСС₃₆₀ (4).

пунктирными линиями (кривые 1, 4). Понятно, что в этом случае состав смеси выражен в терминах отношения первичных аминогрупп полисахарида и сульфонатных групп ПСС: $Z = [N] : [S]$.

Еще одним фактором, определяющим границы существования растворимых НПЭК в солевых средах, является степень полимеризации полиэлектролитов. Как и в изученных ранее системах [28, 29], с увеличением длины лиофилизующего ПСС-аниона область устойчивости растворимых НПЭК расширялась: кривые 5 и 6, относящиеся к высокомолекулярному образцу ПСС₃₆₀, располагаются на рис. 2 существенно выше аналогичных кривых 2 и 3, полученных для более коротких цепей ПСС₉₀.

Водорастворимые комплексы модифицированного хитозана с ПМА-анионами

ПСС-анионы являются удобными модельными полиэлектролитами, поскольку они практически полностью заряжены во всей исследуемой области рН, а их электростатическое связывание с поликатионами мало осложнено взаимодействиями другого рода. Однако в биологических и биотехнологических системах сульфосодержащие полианионы (например, гепарин и другие сульфированные полисахариды) встречаются гораздо реже по сравнению с фосфорсодержащими (нук-

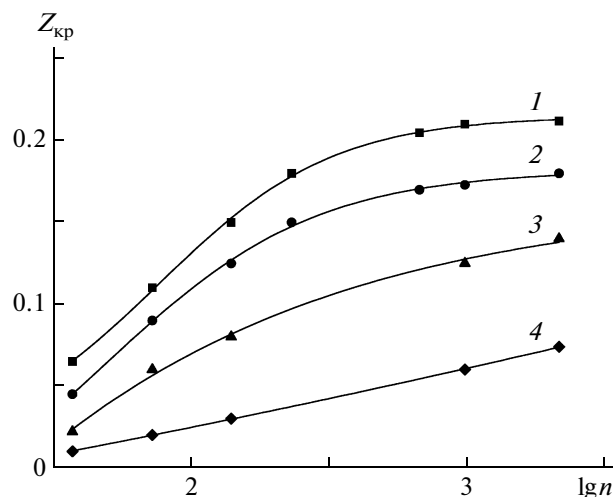


Рис. 3. Зависимость критического состава смеси $Z = [N_q] : [COOH + COO^-Na^+]$, соответствующего началу фазового разделения при титровании раствора ПМА-аниона раствором модифицированного хитозана, от степени полимеризации n полианиона при рН 9.0 (1), 7.2 (2), 6.4 (3) и 5.5 (4). 0.02 М буфер, содержащий 0.05 М КСl; температура 25°C.

леиновые кислоты) или карбоксилсодержащими (белки, ферменты) биополимерами. Кроме того, карбоксилсодержащие полианионы, например полимолочная кислота и ее производные, широко используемые в качестве биodeградируемых полимеров, могут выступать в качестве партнеров модифицированного хитозана для разработки перспективных носителей физиологически активных веществ. Следовательно, выявление возможностей приготовления растворимых НПЭК на основе модифицированного катионного полисахарида и синтетических полианионов, содержащих упомянутые группы, а также изучение свойств образующихся поликарбоксилатных комплексов представляет несомненный интерес.

В работе использовали набор различных фракций карбоксилсодержащего полиметакрилатного аниона, степень полимеризации которых мало отличались от степени полимеризации фракций ПСС. Это позволило не только изучить поведение смесей модифицированного хитозана с ПМА-анионами, но и сравнить его с поведением смесей того же полисахарида с ПСС-анионами, подробно рассмотренных в предыдущем разделе.

Общим для обеих систем является вид зависимостей $Z_{кр}$ от степени полимеризации полианиона. Как и для комплексов, содержащих ПСС (рис. 1), величину критического состава смесей катионного полисахарида с ПМА-анионами определяли титрованием раствора полианиона раствором модифицированного хитозана при различных значениях рН (рис. 3). Ход кривых свидетельствует о том, что и для указанной пары

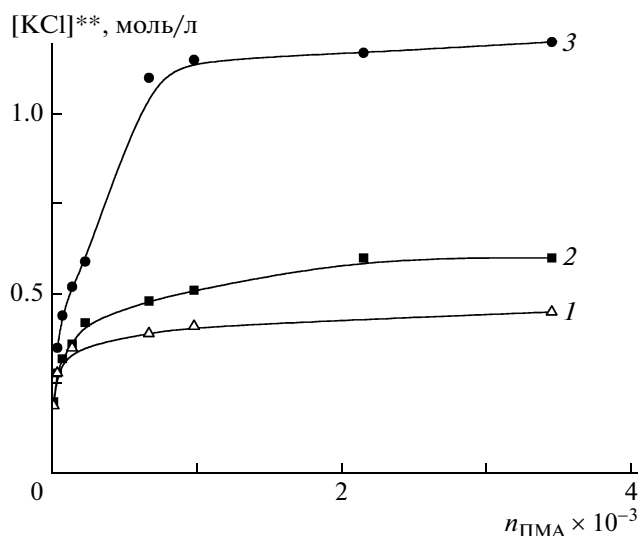


Рис. 4. Зависимость критической концентрации соли $[KCl]**$, соответствующей полному растворению эквимольной смеси растворов модифицированного хитозана и ПМА-аниона, от степени полимеризации полианиона при pH 9.0 (1), 7.2 (2) и 5.5 (3).

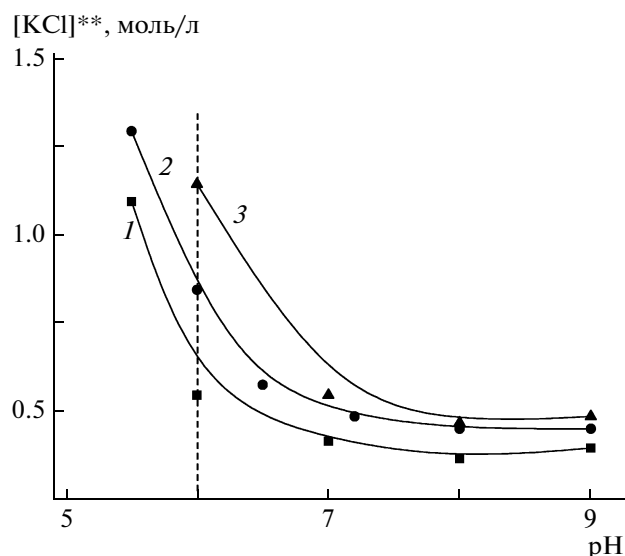


Рис. 5. pH-зависимости критической концентрации соли $[KCl]**$, соответствующей полному растворению эквимольных смесей ПМА-аниона с ПЭП (1), модифицированным хитозаном (2) и ПЭП-ОН (3).

полиэлектролитов снижение степени полимеризации полианиона приводит к сужению области существования растворимых комплексов, уменьшая значение $Z_{кр}$, а отрицательно заряженные олигомеры не способны обеспечивать растворимость комплексов (левые части кривых). Причины подобного поведения систем подробно рассмотрены выше. Что касается влияния pH на величину $Z_{кр}$, то оно не только сохраняется, но и становится более выраженным. При подкислении растворов кривые последовательно смещаются вниз по оси ординат, хотя при этом можно получить растворимый комплекс даже в слабо кислых средах, если титровать раствор высокомолекулярного ПМА-аниона раствором полисахарида при pH 5.5 (рис. 3, кривая 4). Характерно, что изменение порядка смещения полимерных компонентов, которое приводило к существенному расширению области существования растворимых НПЭК на основе ПСС-анионов (рис. 1, кривые 3 и 3'), практически не влияло на ход кривой 4.

Указанные различия в поведении систем можно объяснить следующим образом. Во-первых, поликарбоксилатные анионы, даже будучи полностью ионизованными, образуют с полиаминами гораздо менее стабильные комплексы: их устойчивость в водно-солевых средах на порядок ниже по сравнению с ПЭК, содержащими ПСС [26, 27]. Соответственно реакции интерполиэлектrolитного обмена с участием ПМА-анионов в нейтральных средах протекают быстрее, способствуя возникновению растворимых комплексов при титровании. Во-вторых, слабый ПМА-анион

теряет заряд при подкислении, что ослабляет его лиофилизующую способность и сужает область существования растворимых комплексов. И, наконец, понижение степени ионизации полианиона приводит к росту относительного содержания незаряженных карбоксильных групп, склонных к образованию водородных связей, которые стабилизируют полиэлектролитный комплекс по отношению к разрушающему действию соли [30, 31]. В исследуемой системе это отражается значительным подъемом профиля разрушения комплекса при переходе от нейтральных сред к слабо кислым растворам (рис. 4). Величины критической концентрации $[KCl]**$, соответствующей полному растворению, которые определяли турбидиметрическим титрованием смеси растворов состава $Z = [N_q] : [COOH + COO^-Na^+] = 1$ раствором соли, увеличивались более чем в 2 раза при изменении pH от 7.2 (кривая 2) до 5.5 (кривая 3). По всей вероятности, образование водородных связей затрудняет интерполиэлектrolитный обмен и способствует межмолекулярной агрегации в слабо кислых средах (рис. 3, кривая 4), вызывая фазовое разделение даже в системах с заранее сформированными растворимыми НПЭК.

Не исключено, что помимо незаряженных карбоксильных групп вклад в стабилизацию комплекса вносят водородные связи с участием гидроксильных групп и незаряженных вторичных аминогрупп модифицированного хитозана. В пользу такого предположения свидетельствуют результаты турбидиметрического титрования эквимольных смесей ПМА₉₈₀-аниона и модифицированного хитозана раствором соли при различ-

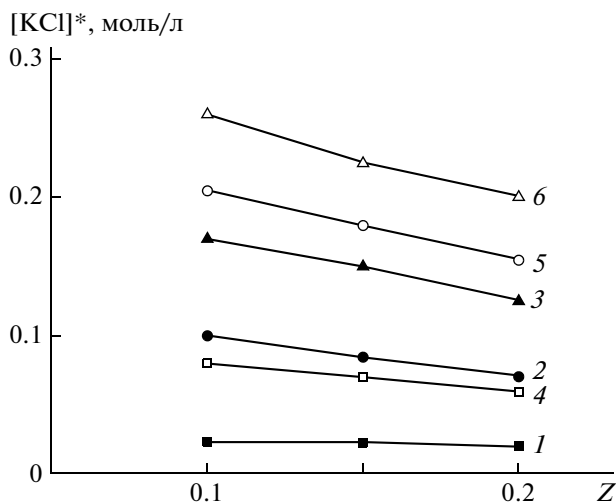


Рис. 6. Зависимость критической концентрации соли $[KCl]^*$, соответствующей началу фазового разделения, от соотношения компонентов $Z = [N_q] : [COOH + COO^-Na^+]$ для смесей раствора модифицированного хитозана с раствором ПМА₁₄₀ (1, 4), ПМА₉₈₀ (2, 5) и ПМА₃₅₀₀ (3, 6) при pH 7.2 (1–3) и 9.0 (4–6). 0.02 М буфер, содержащий 0.05 М KCl; температура 25°C.

ных значениях pH (рис. 5, кривая 2). Профиль разрушения комплекса располагается между кривыми, полученными аналогичным образом для эквимольных смесей ПМА₉₈₀-аниона с двумя высоко заряженными кватернизованными полиаминами, а именно поли-N-этил-4-винилпиридиний бромидом (ПЭП) (рис. 5, кривая 1) и его гидроксильным аналогом (ПЭП-ОН) (кривая 3). В опытах использовали образцы ПЭП и ПЭП-ОН степени полимеризации 1600, синтезированные ранее [32]. При фиксированном значении pH (например, pH 6.0, штриховая линия на рис. 5) величины критической концентрации соли резко возрастают при замене ПЭП (кривая 1) на ПЭП-ОН (кривая 3), что обусловлено стабилизацией комплекса водородными связями с участием большого числа групп OH [32]. Судя по промежуточным значениям $[KCl]^{**}$ (кривая 2), комплекс ПМА₉₈₀ с модифицированным хитозаном тоже стабилизирован, хотя и в меньшей степени. По-видимому, более эффективному образованию водородных связей препятствуют жесткость полисахарида и сравнительно невысокая плотность групп OH.

Таким образом, слабо щелочные и нейтральные среды наиболее приемлемы для приготовления растворимых комплексов поликарбонатов анионов и модифицированного хитозана. Полученные таким образом комплексы отвечают критериям поведения растворимых НПЭК. В частности, они претерпевают фазовое разделение, контролируемое соотношением полимерных

компонентов и степенью полимеризации цепей (рис. 6), подчиняясь закономерностям, присутствующим комплексам, содержащим ПСС (рис. 2). Важно, что использование высокомолекулярных ПМА-анионов в качестве партнеров модифицированного хитозана позволяет получать НПЭК, растворимые в физиологических условиях (рис. 6, кривая 3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lui Q., Dunn E.T., Grandmaison E.W., Goosen M.F. // Application of Chitin and Chitosan / Ed. by M.F.A. Goosen. Lancaster: Technomic Publ., 1997. P. 3.
2. Saravanakumar J.H.P.G., Kim K., Kwon I.C. // Advanced Drug Delivery Revs. 2010. V. 62. № 1. P. 28.
3. Illum L. // Pharm. Res. 1998. V. 15. № 9. P. 1326.
4. Краюхина М.А., Самойлова Н.А., Ямсков И.А. // Успехи химии. 2008. Т. 77. № 9. С. 854.
5. Ильина А.В., Варламов В.П. // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 1. С. 9.
6. Mato S., Sun W., Kissel T. // Advanced Drug Delivery Revs. 2010. V. 62. № 1. P. 127.
7. Mintzer B.P., Simanek E.E. // Chem. Revs. 2009. V. 109. № 1. P. 259.
8. Thanou M., Florea B., Geldorf I., Junginger H.E., Borchard G. // Biomaterials. 2002. V. 23. № 1. P. 153.
9. Kean T., Roth S., Thanou M. // J. Controlled Release. 2005. V. 103. № 3. P. 643.
10. Strand S.P., Issa M.M., Christensen B.E., Varum K.M., Artursson P. // Biomacromolecules. 2008. V. 9. № 11. P. 3268.
11. Sato T., Ishii T., Okahata Y. // Biomaterials. 2001. V. 22. № 15. P. 2075.
12. Kweon D.-K., Lim S.-T. // J. Appl. Polym. Sci. 2003. V. 87. № 10. P. 1784.
13. Kweon D.-K., Song S.-B., Park Y.-Y. // Biomaterials. 2003. V. 24. № 9. P. 1595.
14. Gamzazade A.I., Nasibov S.M. // Carbohydrate Polymers. 2002. V. 50. № 4. P. 339.
15. Gamzazade A.I., Nasibov S.M. // Carbohydrate Polymers. 2002. V. 50. № 4. P. 345.
16. Drogoz A., David L., Rochas C., Domard A., Delair T. // Langmuir. 2007. V. 23. № 22. P. 10950.
17. Schatz C., Domard A., Viton C., Pichot C., Delair T. // Biomacromolecules. 2004. V. 5. № 5. P. 1882.
18. Saether H.V., Holm H.K., Maurstad G., Smidsrod O., Stokke B.T. // Carbohydrate Polymers. 2008. V. 74. № 4. P. 813.
19. Волкова И.Ф., Горшкова М.Ю., Изумрудов В.А. // Высокомолек. соед. А. 2008. Т. 50. № 9. С. 1648.
20. Изумрудов В.А., Волкова И.Ф., Горшкова М.Ю. // Macromol. Chem. Phys. 2009. V. 211. № 4. P. 379.
21. Горшкова М.Ю., Волкова И.Ф., Изумрудов В.А. // Высокомолек. соед. А. 2010. Т. 52. № 4. С. 567.
22. Горшкова М.Ю., Волкова И.Ф., Алексеева С.Г., Молоткова Н.Н., Скорикова Е.Е., Изумрудов В.А. // Высокомолек. соед. А. 2011. Т. 53. № 1. С. 60.

23. *Кабанов В.А.* // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. № 2. С. 183.
24. *Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.P.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 7297.
25. *Izumrudov V.A., Gorshkova M.Yu., Volkova I.F.* // Eur. Polym. J. 2005. V. 41. № 6. P. 1251.
26. *Izumrudov V.A., Paraschuk V.V., Sybachin A.V.* // J. Drug. Del. Sci. Technol. 2006. V. 16. № 4. P. 267.
27. *Izumrudov V.A., Galaev I.Yu., Mattiasson B.* // Bioseparation. 1999. V. 7. P. 207.
28. *Izumrudov V.A., Kharlampieva E., Sukhishvili S.A.* // Macromolecules. 2004. V. 37. № 22. P. 8400.
29. *Иzumрудов В.А., Сыбачин А.В.* // Высокомолек. соед. А. 2006. Т. 48. № 10. С. 1849.
30. *Izumrudov V.A., Sukhishvili S.A.* // Langmuir. 2003. V. 19. № 13. P. 5188.
31. *Иzumрудов В.А.* // Высокомолек. соед. А. 2007. Т. 49. № 4. С. 691.
32. *Иzumрудов В.А., Жирякова М.В.* // Высокомолек. соед. А. 2009. Т. 51. № 6. С. 946.