СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ИНТЕРПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И СУЛЬФАТИРОВАННОГО АРАБИНОГАЛАКТАНА

© 2020 г. Н. В. Слюсаренко^{а,*}, Н. Ю. Васильева^а, А. С. Казаченко^б,
М. А. Герасимова^а, А. С. Романченко^б, Е. А. Слюсарева^а

^а Сибирский федеральный университет 660041 Красноярск, пр. Свободный, 79, Россия

^б “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”.

Институт химии и химической технологии

660036 Красноярск, ул. Академгородок, 50/24, Россия

*e-mail: sci_box@mail.ru

Поступила в редакцию 25.07.2019 г.

После доработки 07.11.2019 г.

Принята к публикации 22.11.2019 г.

Синтезированы стабильные в течение 30 дней интерполимерные комплексы на основе хитозана и арабиногалактана с различной степенью сульфатирования (7.7–40.8%). Полученные комплексы охарактеризованы с помощью электронной сканирующей микроскопии, ИК-спектроскопии, динамического светорассеяния и электрофоретического измерения ζ -потенциала. Основной механизм образования комплексов рассмотрен в терминах электростатического связывания полиионов. Новые комплексы имеют перспективу применения в качестве биосорбентов и систем доставки лекарств.

DOI: 10.31857/S2308113920020059

ВВЕДЕНИЕ

Среди природных полисахаридов хитозан — продукт дезацетилирования хитина — занимает уникальное место. Он имеет поликатионную природу в кислых средах, биоразлагаем, обладает антибактериальным эффектом, биоадгезивными и заживляющими свойствами [1]. Формирование гидрофильных нестехиометрических интерполимерных комплексов (ИПК) на основе хитозана позволяет не только сохранить важные для биомедицины свойства полимера, но и дополнить их присущими частицам свойствами: подвижностью, увеличенной эффективной поверхностью, фильтрацией. Это дает возможность применять их в качестве биосорбентов или средств доставки лекарственных средств [2–5]. Катионная природа хитозана позволяет формировать комплексы (в литературе их также называют полиэлектролитными комплексами) с различными анионными полисахаридами, например гепарином, каррагинанами, хондроитин сульфатом, гиалуронатом и другими [6–12]. Создание новых интерполимерных комплексов, выгодно сочетающих в себе свойства частиц и биополимеров, продолжается, а важным вопросом их практического применения является коллоидная стабильность.

В настоящей работе впервые исследована возможность создания нестехиометрических субмикронных интерполимерных комплексов на основе хитозана и сульфатированного арабиногалактана (САГ). Источником арабиногалактана в основном служит древесина лиственницы. Сульфатирование арабиногалактана значительно расширяет его границы применимости. Так, анионная активность позволяет формировать полиэлектролитные комплексы с поликатионами, а гипополидемические и антикоагулянтные свойства дают возможность применять его как аналог гепариноидов или в качестве антимикробного агента [13, 14]. Совместное успешное использование указанных двух полисахаридов для тканевой инженерии было продемонстрировано на примере создания высокопористых губок [15].

Свойства комплексов, полученных из арабиногалактана с разной степенью сульфатирования, изучены методами сканирующей электронной микроскопии и динамического рассеяния света, приведены результаты измерений ИК-спектров интерполимерных комплексов (размер и ζ -потенциал), а также исходных полимеров, образующих ИПК. Новые коллоидно-стабильные суб-

Таблица 1. Характеристика сульфатированного арабиногалактана и ИПК

Образец, №	Сульфатированный арабиногалактан		ИПК			
	содержание серы, мас. %	степень сульфатирования, %	1 день после синтеза		30 дней после синтеза	
			размер, нм (PDI)	ζ-потенциал, мВ	размер, нм (PDI)	ζ-потенциал, мВ
1	13.5 ± 0.2	40.8 ± 1	439 ± 22 (0.17)	40 ± 2	305 ± 18 (0.19)	35 ± 2
2	11.7 ± 0.2	32.4 ± 1	424 ± 18 (0.12)	39 ± 2	404 ± 8 (0.14)	34 ± 3
3	12.1 ± 0.2	34.1 ± 1	426 ± 31 (0.14)	38 ± 2	377 ± 11 (0.08)	26 ± 2
4	4.0 ± 0.5	8.1 ± 1	334 ± 11 (0.20)	38 ± 1	216 ± 11 (0.12)	22 ± 2
5	3.8 ± 0.5	7.7 ± 1	328 ± 7 (0.20)	38 ± 4	228 ± 3 (0.12)	32 ± 3

микронные комплексы на основе хитозана и САГ являются перспективным биологически активным материалом, поскольку сочетают уникальные свойства входящих в его состав биополимеров [16–18].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве исходных полимеров для синтеза ИПК в работе использовали хитозан низковязкий из панциря креветки с молекулярной массой $M = (20–200) \times 10^3$ производства “Sigma–Aldrich”:

и арабиногалактан древесины лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) со средней молекулярной массой $M \sim 17 \times 10^3$, предоставленный Об-

ществом с ограниченной ответственностью “Химия древесины” (Россия) под наименованием препарата “ФиброларС” [19]:

Синтез сульфатированного арабиногалактана осуществляли по методике [16] добавлением сульфаминовой кислоты в 1,4-диоксане или в диметилсульфоксиде в присутствии мочевины при различном температурном режиме и продолжительности процесса с последующим выделением САГ в виде аммониевой соли. Для удаления непрореагировавших реагентов продукт диализировали против воды в течение 8–10 ч, меняя воду каждый час. Диализ проводили с использованием целлюлозной мембраны Cellu Sep T1 (“Membrane Filtration Products Inc.”, США) с отсечкой по молекулярной массе 3.5×10^3 . После диализа водный раствор САГ упаривали до полного высыхания (таблица 1, образцы 1, 3 и 4) или небольшого объема в вакууме на ротационном испарителе и осаждали в этанол. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали на фильтре этанолом и высушивали на воздухе (образцы 2, 5). Образец 1 получали путем сульфатирования арабиногалактана в диметилсульфоксиде при температуре 85°C в течение 3 ч, образцы 2 и 3 – в 1,4-диоксане при 100°C также в течение 3 ч, а образцы 4 и 5 – в диоксане при 85°C в течение 2 ч.

Содержание серы и степени сульфатирования арабиногалактана в образцах определяли по модифицированной методике [20] сжиганием их в токе кислорода при температуре 1000°C с последующим поглощением продуктов сжигания 6%-ным водным раствором пероксида водорода. Согласно работе [19], степень сульфатирования (СС) рассчитывали по формуле:

$$CC = \frac{M_{\text{САГ}} W_s / 100}{(M_S - (M_{\text{OSO}_3\text{NH}_4} - M_{\text{ОН}}) W_s / 100) \times 2.8} \times 100\%$$

Здесь $M_{\text{САГ}}$, M_S , $M_{\text{OSO}_3\text{NH}_4}$ и $M_{\text{ОН}}$ – молекулярные массы одной условной структурной единицы арабиногалактана, серы, групп OSO_3NH_4 и ОН соответственно; W_s – содержание серы (мас. %). Результаты для серии образцов САГ приведены в таблице.

Степень дезацетилирования (СД) хитозана устанавливали из ИК-спектров поглощения по методике [21]:

$$\text{СД} = 100\% - \frac{A_{1655}}{A_{3430}} \times 100 / 1.33, \quad (2)$$

где A_{1655} , A_{3430} – оптические плотности на соответствующих значениях волновых чисел (см^{-1}).

За основу синтеза интерполимерных комплексов взяли методику, использованную ранее для хитозана и другого сульфатированного биополимера – хондроитин сульфата при близком значении pH [22, 23].

Для приготовления раствора хитозана применяли ацетатный буфер $\text{pH } 5.40 \pm 0.03$ и ионной силой 0.15 моль/л. Раствор хитозана (0.1 мас. %) предварительно очищали от нерастворимых примесей с помощью бумажных фильтров, после чего к нему добавляли по каплям 0.1 мас. % водного раствора САГ ($\text{pH } 5.40 \pm 0.10$). Добавление САГ прекращали после появления опалесценции раствора, объемное соотношение растворов хитозана и арабиногалактана составляло 2 : 1. Растворы интенсивно перемешивали с помощью магнитной мешалки в течение 2 ч. Молекулярную полимерную фракцию от коллоидного раствора интерполимерных комплексов отделяли путем седиментации с помощью центрифуги “Eppendorf Mini Spin Plus” (Германия) в течение 5 мин (14500 об/мин). После удаления молекулярной фракции осадок ресуспендировался в ультразвуковой ванне “Elma Elmasonic S-30Н” (Германия) в течение 30 мин при комнатной температуре в безбуферном водном растворе ($\text{pH } 5.4 \pm 0.10$). Концентрацию ИПК оценивали путем взвешивания сухого остатка: для всей серии экспериментов она составляла 0.4–0.8 г/л. На основании средних молекулярных масс полимеров стехиометрическое соотношение макромолекул хитозана к сульфатированному арабиногалактану в ИПК примерно 1 : 3:

ИК-спектры хитозана, сульфатированного арабиногалактана и ИПК снимали с использова-

нием ИК-фурье-спектрометра “Tensor-27” (“Bruker”, Германия) в области длин волн 400–

Рис. 1. Снимок со сканирующего электронного микроскопа.

4000 см^{-1} . Твердые образцы для анализа готовили в виде таблеток в KBr ($\sim 2\text{ мг}$ образца/ 1000 мг KBr). ИК-спектры интерполимерных комплексов измеряли в первые три дня после синтеза.

Морфологию ИПК исследовали с применением сканирующего электронного микроскопа S-5500 (“Hitachi”, Япония). Для этого каплю разбавленного раствора ИПК в первый день после синтеза наносили на кремниевые подложки и высушивали.

Распределение частиц ИПК по размерам выполняли методом динамического рассеяния света

с использованием “Zetasizer Nano ZS” (“Malvern Instruments Ltd.”, Великобритания). Угол рассеяния составлял 173° ; длина волны лазерного излучения 532 нм . Исследования автокорреляционной функции осуществляли методом кумулянтного анализа. Каждый образец измеряли в трех сериях с двадцатью повторениями в каждой серии. Устанавливали ζ -потенциал частиц на этом же приборе методом электрофоретического рассеяния света; данные собирали в четырех сериях по пятьдесят повторений в каждой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для синтеза ИПК было использовано 5 образцов арабиногалактана, полученных в различных условиях и отличающихся степенью сульфатирования (таблица).

Об образовании комплексов свидетельствуют данные сканирующей электронной микроскопии (рис. 1) и ИК-спектроскопии (рис. 2). На микрограмме видны отдельно расположенные частицы ИПК, неоднородные по размерам и форме в субмикронном диапазоне.

ИК-полосы хитозана и САГ во многом схожи благодаря их подобной структуре. Типичные для полисахаридов полосы могут быть идентифицированы в областях 3435 , 2921 – 2924 и 1047 – 1075 см^{-1} . Однако можно выделить характеристичные линии, присущие каждому полисахариду в отдельности. Для идентификации хитозана наглядными представляются полосы поглощения

Рис. 2. ИК-спектры САГ (1), хитозана (2) и ИПК (3), полученного на основе сульфатированного арабиногалактана образца 2 в таблице.

Рис. 3. Распределение частиц ИПК по размерам, синтезированных из образцов сульфатированного арабиногалактана 1–5 в соответствии с таблицей. На вставке показана зависимость среднего размера ИПК от степени CC , входящего в его состав.

для амидных групп: 1656 (амид I) и 1322 см^{-1} (амид III). Показательным индикатором сульфатного замещения в арабиногалактане считается появление пика поглощения ~ 1241 см^{-1} , соответствующего S=O асимметричным валентным колебаниям и пика при 809 см^{-1} , характерного для валентных колебаний C–O–S. В интерполимерном комплексе эти линии оказываются смещенными по сравнению с исходными компонентами из-за взаимодействий, ведущих к комплексообразованию. Характерные пики поглощения амида I и S=O асимметричных валентных колебаний для ИПК лежат на 1633 и 1259 см^{-1} соответственно. Пик поглощения амида III исчезает, а для пика валентных колебаний C–O–S достоверного смещения не обнаружено.

Распределение частиц ИПК по размерам в первый день после синтеза показано на рис. 3. Видно мономодальное распределение частиц по размерам, максимум которого приходится на 330 – 440 нм. Эти данные не противоречат результатам микроскопических исследований. Характерно, что размер частиц коррелирует со степенью сульфатирования арабиногалактана, входящего в его состав (рис. 3, вставка).

Следует отметить, что образцы ИПК как с низкой (7.7 – 8.1%), так и с высокой степенью сульфатирования (32.4 – 40.8%) в первый день имеют близкое значение ζ -потенциала (~ 40 мВ), которое удовлетворяет требованиям коллоидной стабильности (ζ -потенциал > 30 мВ [24]). С течением

времени происходит уменьшение размеров не только самих частиц, но и их ζ -потенциала (рис. 4). При этом ζ -потенциал ИПК на основе образцов 1, 2, 5 уменьшается не более чем на 15% и не преодолевает критического значения для коллоидно-стабильных частиц, а ζ -потенциал ИПК на основе образцов 3 и 4 снижается на 31 – 42% и преодолевает этот порог. Эти результаты не коррелируют со степенью сульфатирования арабиногалактана и могут быть связаны со способом синтеза самого САГ. Так, наиболее стабильными оказались невысаженные образцы и образец, синтезированный с использованием диметилсульфоксида. Предположительно, это связано со спецификой высаживания САГ, которая может косвенно влиять на молекулярную массу выделенной фракции полисахарида, а также с остатками прекурсоров синтеза.

Уменьшение размеров частиц со временем возможно из-за их коллоидной нестабильности и выпадения в осадок наиболее крупных из них. Однако наименьшему изменению размеров оказались подвержены ИПК на основании образцов 2 и 3 (изменение 5 – 12%), в то время как средний размер частиц на основе образцов 1, 4 и 5 уменьшился на 30 – 35% . Это свидетельствует о более сложной связи между стабильностью размеров и ζ -потенциала. Как показано в работе [25], формирование полиэлектролитных комплексов состоит из нескольких этапов: начальное формирование полиэлектролитных комплексов,

Рис. 4. ζ-Потенциал (а) и размер (б) ИПК, синтезированных из образцов сульфатированного арабиногалактана в соответствии с таблицей: 1 – 1 день, 2 – 30 дней после синтеза. Штриховой линией показан уровень, отвечающий требованию коллоидной стабильности.

формирование новых внутренних связей, межкомплексная агрегация. Разделение этих этапов является сложной задачей. Полученные в настоящей работе показатели по стабильности частиц (например, для образца 2 изменение размера и ζ-потенциала за 30 дней не превышает 5 и 15% соответственно) сопоставимы или улучшены по сравнению с другими полиэлектролитными комплексами на основе хитозана [26, 27].

Образование ИПК рассмотрено с точки зрения анализа электростатического механизма связывания двух биополимеров. Подобный количественный анализ был сделан ранее в работе [26]. Эффективность электростатического связывания зависит от количества заряженных групп биополимеров, определяемых константами диссоциации при заданных условиях (pK_a). Так, величина pK_a для аминогрупп хитозана составляет 6.2–6.8 [28]. Для сульфогрупп арабиногалактана она мо-

жет быть взята равной 1.5–2.0 по аналогии с сульфогруппами хондроитин сульфата [29]. Степень диссоциации α полиэлектролитов выражается уравнением Хендерсона–Хассельбаха, описывающим соответствие между pH и pK_a :

$$pH = pK_a + \lg \frac{\alpha}{1 - \alpha} \quad (3)$$

Согласно этому уравнению, при pH 5.4 значение α для хитозана составляет 75%, а для САГ 78%. Учитывая средние молекулярные массы полимеров, степень деацетилирования хитозана (88%) и степень сульфатирования арабиногалактана (7.7%–40.8%), а также массовое соотношение биополимеров при смешивании, получаем оценку соотношения положительно заряженных групп хитозана к отрицательно заряженным группам САГ – от 4 : 1 до 21 : 1. Смесь противоположно заряженных полиионов привела к образованию нестехиометрических комплексов, которые обычно состоят из нейтрального ядра и избыточных полиионных цепей [30]. Поскольку положительно заряженные аминогруппы хитозана находятся в избытке по сравнению с отрицательно заряженными группами САГ, то ζ-потенциал частиц оказывается положительным.

Увеличение размера ИПК (рис. 3) и уширение распределения частиц по размерам при повышении степени сульфатирования (для образцов с низкой степенью сульфатирования ширина на полувысоте составляет 340 нм, а для высокой 410–420 нм) указывает на то, что в образовании частиц с высокой степенью сульфатирования участвует большее число молекул полисахаридов и(или) частицы имеют более рыхлую структуру. Кроме того, образование подобных комплексов зависит не только от электростатических, но и гидрофобных взаимодействий. Ранее [30] это было показано на примере комплексообразования сульфопроизводных лигнина и хитозана.

Полученные интерполимерные комплексы обладают положительным поверхностным зарядом, имеют стабильные коллоидные свойства, а также содержат в своем составе биополимеры с известной биологической активностью. Подобные системы могут быть использованы в качестве биосорбентов органических соединений или тяжелых металлов, а также систем доставки лекарств [31–33].

Авторы выражают благодарность Красноярскому региональному центру коллективного пользования “Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН” за снятие ИК-спектров и проведение микроскопических измерений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, правительства Красноярского края и Красноярского краевого фонда науки (код проекта 18-43-242003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Berger J., Reist M., Mayer J.M., Felt O., Gurny R.* // *Biopharmaceutics*. 2004. V. 57. № 1. P. 35.
2. *Du W.L., Xu Z.R., Han X.Y., Xu Y.L., Miao Z.G.* // *J. Hazard. Mater.* 2008. V. 153. P. 152.
3. *Wang R., Jiang X., He A., Xiang T., Zhao C.* // *RSC Adv.* 2015. V. 5. P. 51631.
4. *Prabaharan M., Mano J.F.* // *Drug Delivery*. 2004. V. 12. P. 41.
5. *Krayukhina M.A., Samoilova N.A., Yamskov I.A.* // *Russ. Chem. Rev.* 2008. V. 77. № 9. P. 799.
6. *Kumar G.V., Su C.-H., Velusamy P.* // *Mater. Lett.* 2016. V. 12. P. 119.
7. *Lai C.K., Lu Y.L., Hsieh J.T., Tsai S.C., Feng C.L., Tsai Y.S., Tsai P.C., Su H.L., Lin Y.H., Lai C.H.* // *Nanomedicine (Lond)*. 2014. V. 9. P. 803.
8. *Grenha A., Gomes M.E., Rodrigues M., Santo V.E., Mano J.F., Neves N.M., Reis R.L.* // *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2010. V. 92. № 4. P. 1265.
9. *Rodrigues S., Rosa da Costa A.M.* // *Grenha, Carbohydr. Polym.* 2012. V. 89. P. 282.
10. *Abdullah T.A., Ibrahim N.J., Warsi M.H.* // *Int. J. Pharm. Investig.* 2016. V. 6. P. 96.
11. *Santo V.E., Gomes M.E., Mano J.F., Reis R.L.* // *J. Tissue Eng. Regen. M.* 2012. V. 6. P. 47.
12. *Lallana E., De La Rosa J.R., Tirella A., Pelliccia M., Gennari A., Stratford I., Puri S., Ashford M., Tirelli N.* // *Mol. Pharmaceut.* 2017. V. 14. P. 2422.
13. *Костыро Я.Н., Силизерцева О.А., Искра А.И., Петрова Е.Н., Корякина Л.Б., Верещагина С.А., Фадеев Т.Б., Алексеев К.В., Гуменникова Е.Н., Костыро В.В., Ганенко Т.В., Станкевич В.К., Трофимов Б.А.* // *Бюлл. ВСНЦ СО РАМН*. 2011. Т. 80. № 4. С. 249.
14. *Медведева Е.Н., Бабкин В.А., Остроухова Л.А.* // *Химия растительного сырья*. 2003. № 1. С. 27.
15. *Ehrenfreund-Kleinman T., Domb A.J., Golenser J.* // *J. Bioact. Compat. Polym.* 2003. V. 18. P. 323.
16. *Vasil'eva N.Y., Levianskaya A.V., Kuznetsova B.N., Skvortsova G.P., Kazachenko A.S., Djakovitch L., Pinnel C.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015. V. 41. № 7. P. 725.
17. *Костыро Я.А., Ковальская Г.Н.* // *Бюлл. ВСНЦ СО РАМН*. 2008. Т. 60. № 2. С. 117.
18. *Дрозд Н.Н., Кузнецова С.А., Лапикова Е.С., Давыдова А.И., Макаров В.А., Кузнецов Б.Н., Бутылкина А.И., Васильева Н.Ю., Скворцова Г.П.* // *Экспер. клин. фармакол.* 2008. Т. 71. № 4. С. 30.
19. *Черонис Н.Д., Ма Т.С.* Микро- и полумикрометоды органического функционального анализа / Пер. с англ. под ред. В.А. Климовой. М.: Химия, 1973.
20. *Бабкин В.А., Неворова Н.А., Медведева К.Н., Федорова Т.Е., Левчук А.А.* // *Химия растительного сырья*. 2015. № 2. С. 29.
21. *Czechowska-Piskup R., Jarosińska D., Rokita B., Ulański P., Jank J.M.* // *Prog. Chem. Appl. Chitin. Deriv.* 2012. V. 17. P. 5.
22. *Slyusareva E., Gerasimova M., Plotnikov A., Sizykh A.* // *Colloid Int. Sci.* 2014. V. 417. P. 80.
23. *Slyusareva E., Gerasimova M., Slabko V., Abuzova N., Plotnikov A., Eychmiller A.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015. V. 16. P. 3997.
24. *Boddohi S., Moore N., Johnson P.A., Kipper M.J.* // *Biomacromolecules*. 2009. V. 10. P. 1402.
25. *Kulkarni A.D., Vanjari Y.H., Sancheti K.H., Patel H.M., Belgamwar V.S., Surana S.J., Pardeshi C.V.* // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2016. V. 44. P. 1615.
26. *Slyusarenko N., Gerasimova M., Plotnikov A., Gaponik N., Slyusareva E.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2019. V. 21. P. 4831.
27. *Jonassen H., Kjøniksen A.-L., Hiorth M.* // *Biomacromolecules*. 2012. V. 13. P. 3747.
28. *Schmuhl R., Krieg H.M., Keizer K.* // *Water SA*. 2001. V. 27. P. 1.
29. *Chandran P., Horkay F.* // *Acta Biomater.* 2012. V. 8. P. 3.
30. *Паламарчук И.А., Бровко О.С., Бойцова Т.А., Вишнякова А.П., Макаревич Н.А.* // *Химия растительного сырья*. 2011. Т. 2. С. 57.
31. *Kyzas G.Z., Bikiaris D.N., Mitropoulos A.C.* // *Polym. Int.* 2017. V. 66. P. 1800.
32. *Hritsu D., Dodi G., Popa M.I.* // *IRECHE*. 2012. V. 4. № 3. P. 364.
33. *Bernkop-Schnürch A., Dünhaupt S.* // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012. V. 81. P. 463.