

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ХИТОЗАНА С ГЛУТАРОВЫМ АЛЬДЕГИДОМ

*П.А. Перминов**, *Н.Р. Кильдеева**, *Г.А. Вихорева**, *Л.В. Владимиров***,
*Т.А. Аконова****, *В.Г. Бабак*****

*Московский государственный текстильный университет, Москва,
E-mail: kildeeva@mail.ru

**Институт химической физики РАН, Москва

***Институт синтетических полимерных материалов РАН, Москва

****Институт элементоорганических соединений РАН, Москва

STUDYING OF INTERACTION BETWEEN CHITOSAN AND GLUTARALDEHYDE

*P.A. Perminov**, *N.R. Kildeeva**, *G.A. Vikhoreva**,
*L.V. Vladimirov***, *T.A. Akohova****, *V.G. Babak*****

*Moscow State Textile University, Moscow, E-mail: kildeeva@mail.ru

**Institute of Chemical Physics RAS, Moscow

***Institute of Synthetic Polymer Materials RAS, Moscow

****Institute of Organoelement Compounds RAS, Moscow

ABSTRACT

Process of gelation in chitosan solutions at presence glutaraldehyde (GA) is investigated. It is found, that changes of viscosity during glutaraldehyde cross-linking chitosan depend on ratio $GA/-NH_2$ and pH the reaction media. Chitosan cross-linking process proceeds after formation of gel, the module of elasticity of cross-linked gel increases in time and depends on conditions of reaction. A new mechanism of interaction between chitosan and glutaraldehyde is offered and confirmed by FTIR data.

Реакция сшивки хитозана глутаровым альдегидом (ГА) используется для получения волокон, пленок, микросфер, систем контролируемой доставки лекарственных веществ, полимерных раневых покрытий и т.п. [1–3]. Модификация ГА позволяет регулировать скорость биodeградации хитозана [4]. Включение белков в состав сшитых микросфер приводит к изменению характера кинетических кривых их выделения по сравнению с немодифицированным материалом и, замедляя десорбцию, увеличивает время выделения белка до нескольких суток и даже недель [2], а варьирование степени сшивки позволяет получать лекарственные формы с регулируемыми фармакодинамическими свойствами. Создание технологии получения новых лекарственных форм с использованием хитозана, модифицированного сшивкой ГА, возможно на основе результатов изучения кинетики реакции взаимодействия аминогрупп хитозана с ГА. Настоящая работа является продолжением наших исследований, посвященных изучению характера взаимодействий в растворах хитозана в присутствии ГА [5,6].

В работе использован хитозан производства ЗАО "Биопрогресс" с Мм 170 кДа и степенью дезацетилирования 0,92 в виде 2%-ного раствора в 2%-ной уксусной кислоте, pH раствора хитозана 4,1. Для увеличения pH в раствор хитозана добавляли раствор NaOH до pH 5,6, что на 0,1 меньше точки помутнения. Взаимодействие хитозана с ГА изучали при концентрации хитозана в реакционной смеси 1,31%, соотношение $GA/-NH_2$ регулировали изменением концентрации раствора ГА (Merk). Кинетику изменения вязкости раствора изучали на реовискозиметре "Rheotest 2" с использованием устройства "конус-плоскость". Кинетику измерения модуля упругости гелей сшитого хитозана изучали методом пенетрации при постоянной нагрузке. Фурье-ИК-спектры регистрировали на ИК-спектрометре

Bio-Rad (Digilab Division) FTS-40 (Япония). Специально подготовленные образцы сшитого хитозана не содержали уксусной кислоты, воды и свободного ГА.

Взаимодействие аминогрупп хитозана с ГА происходит в результате реакции конденсации с образованием оснований Шиффа. С ростом молекулярной массы и концентрации раствора хитозана увеличивается вероятность межмолекулярной сшивки, приводящей к образованию пространственно-структурированного геля [5,6]. Процесс гелеобразования в растворе хитозана в присутствии ГА протекает в несколько стадий: 1) модификация аминогрупп хитозана, 2) образование в результате межмолекулярных сшивок кластеров из макромолекул хитозана и 3) взаимодействие модифицированных и немодифицированных функциональных групп макромолекул хитозана в соседних кластерах, приводящее к образованию пространственно-структурированного геля. Сшивка хитозана, как и любая реакция, сопровождающаяся увеличением молекулярной массы, приводит к росту вязкости системы. Если в результате реакции образуется гель, то система перестает течь, приобретая свойства вязкоупругого тела. После завершения процесса сшивки характеристики прочности геля перестают изменяться, а их величина определяется числом сшивок, фиксирующих структуру геля, которое, в свою очередь, зависит от условий реакции.

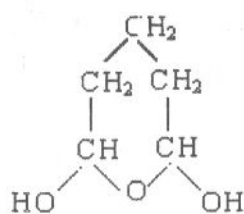
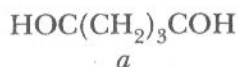
Влияние условий реакции взаимодействия хитозана с ГА на скорость гелеобразования изучали при рН 4,1 и 5,6. За точку гелеобразования принимали время, при котором система теряла способность к течению. Время гелеобразования закономерно уменьшалось с ростом соотношения $\text{ГА}/\text{-NH}_2$, причем при рН 5,6 оно было существенно меньше, чем при рН 4,1, что особенно заметно при низких концентрациях ГА в реакционной смеси.

Процесс гелеобразования сопровождался увеличением динамической вязкости раствора хитозана. Вязкость росла вплоть до точки гелеобразования, в которой происходило разрушение геля под воздействием напряжений сдвига в системе конус-плоскость. Снижение мольного соотношения $\text{ГА}/\text{-NH}_2$ приводило к уменьшению скорости изменения вязкости и значения вязкости, соответствующего переходу псевдопластическая жидкость – вязкоупругое тело. Скорость роста вязкости увеличивалась также при увеличении рН (рис.2). Следует отметить, что зафиксировать скорость изменения вязкости во времени при таком же соотношении $\text{ГА}/\text{-NH}_2$, как при рН 5,6, не представлялось возможным, так как образование геля происходило в течение нескольких минут. Так как при меньшем соотношении $\text{ГА}/\text{-NH}_2$ (1,04 моль/моль) число сшивок в образующемся геле меньше, максимум на кинетической кривой изменения вязкости при рН 4,1 ниже, однако он достигается в два раза быстрее.

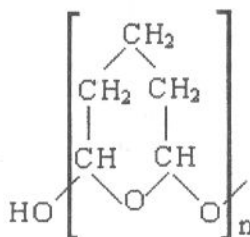
Переход от псевдопластической жидкости к пространственно-сшитой структуре геля, происходящий в растворе хитозана в присутствии ГА, соответствует завершению гелеобразования, но не реакции сшивки хитозана ГА. Об этом свидетельствует кинетика изменения модуля упругости гелей, полученных в разных условиях. Рост модуля упругости во времени указывает на образование дополнительных сшивок, фиксирующих структуру геля. Достижимая после завершения реакции сшивки величина модуля упругости зависит от концентрации в реакционной смеси ГА, хитозана и величины рН. При рН 5,6 значение модуля упругости приближается к 50 кПа, что более, чем на порядок выше, чем при рН 4,1 и том же соотношении $\text{ГА}/\text{-NH}_2$.

Теоретически полная модификация аминогрупп бифункциональным сшивающим реагентом должна быть достигнута при эквимольном соотношении альдегидных групп ГА и аминогрупп хитозана, что соответствует соотношению $\text{ГА}/\text{-NH}_2$ 0,5 моль/моль. Учитывая, что значительная часть аминогрупп хитозана при рН 5,6, а тем более при рН 4,1, протонирована, это соотношение может быть еще ниже. Однако изучение кинетики изменения вязкости в растворах хитозана в присутствии ГА и изменения модуля упругости гелей обнаружило рост этих показателей при увеличении содержания ГА в системе свыше 1 моль/моль. Эти результаты, а также выраженная зависимость скорости сшивки от величины рН свидетельствуют о более сложном механизме взаимодействия аминогрупп хитозана с ГА.

Известно, что водные растворы ГА содержат не только свободный ГА (а), но и другие его формы (б-г), являющиеся продуктами альдольной конденсации ГА:



б



в



г

В коммерческом препарате ГА (25%-ный водный раствор, рН 3,0) содержатся все указанные формы [7], а с увеличением рН содержание олигомерной формы (г) и ее молекулярная масса увеличиваются. В результате взаимодействия аминогрупп хитозана с такой формой ГА образуется продукт, содержащий карбонильные группы, способные к дальнейшей альдольной конденсации, что может служить причиной увеличения модуля упругости геля после завершения процесса гелеобразования.

При добавлении раствора ГА в реакционную смесь с более высоким рН равновесие реакции альдольной поликонденсации ГА сдвигается в сторону образования полимерного продукта, поэтому наряду с реакцией сшивки хитозана по аминогруппам может происходить реакция конденсации как хитозана с олигомерными производными ГА, так и производных хитозана с ГА, что объясняет как влияние рН на кинетику сшивки хитозана, так и высокие соотношения ГА/-NH₂ в реакционной смеси.

Представления о механизме сшивки хитозана ГА были подтверждены результатами ИК-спектроскопии. Наиболее существенные изменения в спектрах сшитых образцов наблюдаются в областях 295–2850 и 1700–1300 см⁻¹, где поглощают СН₂-группы, альдегидные, амидные и аминогруппы. В спектре относительно слабо сшитого образца 2, полученного при рН 4 и мольном соотношении ГА/-NH₂, равном 0,4, изменения интенсивности полос аминогрупп хитозана с максимумом при 1600 см⁻¹ и СН₂-групп глутарового альдегида с максимумом при 2940 и в области 1450–1350 см⁻¹ невелики, однако в образце 3, полученном с таким же количеством сшивающего реагента, но в менее кислой среде (рН 5,6), изменения интенсивности этих полос становятся более выраженными.

Особенно следует отметить изменение соотношения полос с максимумом при 1600 см⁻¹ (аминогруппы) и при 1630–1660 см⁻¹ (С=N-связи в основаниях Шиффа, амид I хитозана и С=C в присоединенном в форме (г) ГА) в пользу последних. Наконец, в спектре образца 4, полученном при большом избытке ГА, наряду с указанными изменениями необходимо отметить и появление хорошо разрешенной полосы альдегидных групп с максимумом при 1700 см⁻¹, что также подтверждает присоединение ГА в форме (г).

Сформулированные представления о механизме взаимодействия аминогрупп хитозана с ГА, а также результаты изучения кинетики гелеобразования в растворах хитозана в присутствии сшивающего реагента были использованы при получении капсул разной дисперсности и волокнистых биокатализаторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Knaut J., Hudson S., Creber R.* Crosslinking of chitosan fibers with dialdehyds: proposal of f new reaction mechanism // *J. Pol. Sci.* 1999. V. 37. P. 1079–1094.
2. *Glutaraldehyde* as a ficsative in bioprotheses and drug delivery matrises // *Biomaterials.* 1996. V 17. P. 471–484.
3. *Кульдеева Н.Р., Бабак В.Г., Вихорева Г.А., Гальбрайт Л.С.* Новый подход к созданию высоконабухающих перевязочных средств // *Вестник МГУ (Химия).* 2000. № 6. С. 423–425.

4. *Djameela SR., Jayacrishnan A.* Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle // *Biomaterials*. 1995. V. 16. P. 769–775.

5. *Кильдеева Н.Р., Вихорева Г.А., Ефременко Е.Н., Перминов П.И.* Использование хитозана и его производных для иммобилизации белков // Матер. Седьмой Междунар. конф. “Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана” СПб-Репино. Сентябрь 2003. М.: ВНИРО. С. 395–398.

6. *Меркович Е.А., Карруэт М.-Л., Бабах В.Г., Ким В.Е., Вихорева Г.А.* Вискозиметрическое исследование кинетики начальной стадии гелеобразования в растворах хитозана в присутствии глutarового альдегида // *Коллоидный журнал*. 2001. Т. 63, № 2.

7. *Richards F.M., Knowles J.* Glutaraldehyde as cross-linking reagent // *J.Mol.Biol.* 1968. V. 37. P. 231–233.