

# КВАТЕРНИЗАЦИЯ ХИТОЗАНА И ЕГО АМФИФИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

*Е.А. Степнова, В.Е. Тихонов, В.Г. Бабак, И.А. Ямсков*

Институт элементоорганических соединений  
им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, E-mail: tikhon@ineos.ac.ru

## QUATERNIZATION OF CHITOSAN AND ITS AMPHIPHYLIC DERIVATIVES

*E.A. Stepnova, V.E. Tikhonov, V.G. Babak, I.A. Yamskov*

A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds,  
Russian Academy of Sciences, Moscow, E-mail: tikhon@ineos.ac.ru

### ABSTRACT

Chitosan and hydrophobically modified chitosans bearing  $C_{12}$  or  $C_{18}$  long chain alkyl groups were quaternized via reaction with betaine in the presence of the coupling reagent. The degree of quaternization decreased with the increase of content and length of alkyl substituent and reached a maximum of 60 mol.%. Quaternized chitosan and amphiphilic chitosans formed in aqueous media microaggregates of 40–500 nm in sizes suitable for DNA binding and hydrophobic substances solubilization.

Хитозан, полиаминосакхарид, имеет кажущуюся константу диссоциации сопряженной кислоты  $pK_a$ –6,5–6,7 и растворим в воде только при  $pH < 6$ , что не позволяет использовать его при физиологических значениях  $pH$  в качестве переносчика генов, промотора адсорбции и диффузии лекарственных средств. Введение в полимерную цепь хитозана гидрофобных групп приводит к еще большему снижению растворимости за счет изменения гидрофильно-липофильного баланса и образованию в водной среде мицеллярных и коллоидных систем. Размеры частиц и устойчивость таких систем определяются как химическими (размер алкильной или ацильной группы, степень замещения,  $pH$  раствора), так и физическими факторами (концентрация полимера, температура, ионная сила раствора, природа противоиона).

При этих условиях очевидным решением проблемы растворимости хитозана и его амфифильных производных является введение дополнительных ионогенных групп, таких, как карбоксильные, отрицательно заряженных при физиологических значениях  $pH$  и выше, путем карбоксиметилирования хитозана или введение четвертичных аммониевых групп, положительно заряженных во всей области  $pH$ , путем алкилирования хитозана (реакция кватернизации) или реакцией хитозана с соединением, содержащим в своей структуре четвертичную триметиламмониевую группу.

Однако введение карбоксильных групп, приводя к увеличению растворимости хитозана, одновременно снижает положительный заряд его полимерной цепи и, как следствие, приводит к снижению мукоадгезивных свойств, способности к адсорбции на отрицательно заряженных поверхностях клеточных мембран, а также образованию полиэлектролитных комплексов с отрицательно заряженными полианионами (ДНК).

В отличие от карбоксильных наличие в полимерной цепи хитозана триметиламмониевых групп приводит к увеличению положительного заряда цепи, увеличению размера молекул в водных растворах за счет отталкивания одноименных зарядов и увеличению способности к адсорбции на отрицательно заряженных поверхностях и, как следствие, к усилению бактерицидной активности хитозана [1–6].

Получение четвертичных аммониевых солей хитозана достигается путем алки-

лирования хитозана [7–12] или N-алкилхитозана [13–15] галоидным алкилом (обычно иодистым метилом), т.е. реакцией кватернизации, или взаимодействием с хлоридом глицидилтриметиламмония [3,4,16,17]. Оба этих процесса введения четвертичных аммониевых групп в молекулы хитозана обычно называют общим словом “кватернизация” хитозана, а сам продукт – “кватернизованным хитозаном”. Далее мы будем пользоваться этими условными терминами, отдавая себе отчет, что реакцией кватернизации в классическом смысле называют реакцию взаимодействия амина с галоидным алкилом, приводящую к образованию четвертичной аммониевой соли.

Несмотря на кажущуюся простоту процесса кватернизации хитозана, следует обратить внимание на ряд особенностей протекания этих двух реакций. Так, взаимодействие хитозана с иодистым метилом протекает в органическом растворителе (пиридине, триэтилаmine, спирте) или смеси вода – органический растворитель (N-метилпирролидон), в которой растворим алкилирующий агент, в присутствии оснований (NaOH, триалкиламин) при температуре 60–70°C. Однако в этой среде хитозан нерастворим и находится в виде дисперсии, что с очевидностью приводит к неравномерному распределению триметиламмониевых групп по цепи полимера. При этом для достижения высоких степеней замещения требуется не менее 2–4 повторных процессов кватернизации. Проведение процесса кватернизации при повышенной температуре в присутствии оснований приводит также к снижению молекулярного веса хитозана [9,10,13]. Кроме того, хотя вначале ряд авторов отмечали, что процесс метилирования хитозана в указанных условиях протекал по атому азота без образования O-метильных производных, позднее методом  $^1\text{H-NMR}$  было показано, что O-метилирование протекает в значительной степени [11], сравнимой с N-метилированием, с образованием 3-O- и 6-O-метильных производных кватернизованного хитозана: так за один цикл при степени кватернизации N (т.е. реакции по атому азота) 29,7% наблюдали образование 3-O (17,9%) и 6-O (25,5%) метиловых эфиров, тогда как при достижении степени кватернизации N 90,5% за четыре цикла наблюдали образование 3-OMe (82,8%) и 6-OMe (98,5%). При этом отмечалось значительное снижение растворимости продукта с увеличением степени O-метилирования [11]. В процессе неполной кватернизации хитозана последний содержал также N-монометил- и N,N-диметилпроизводные хитозана [9].

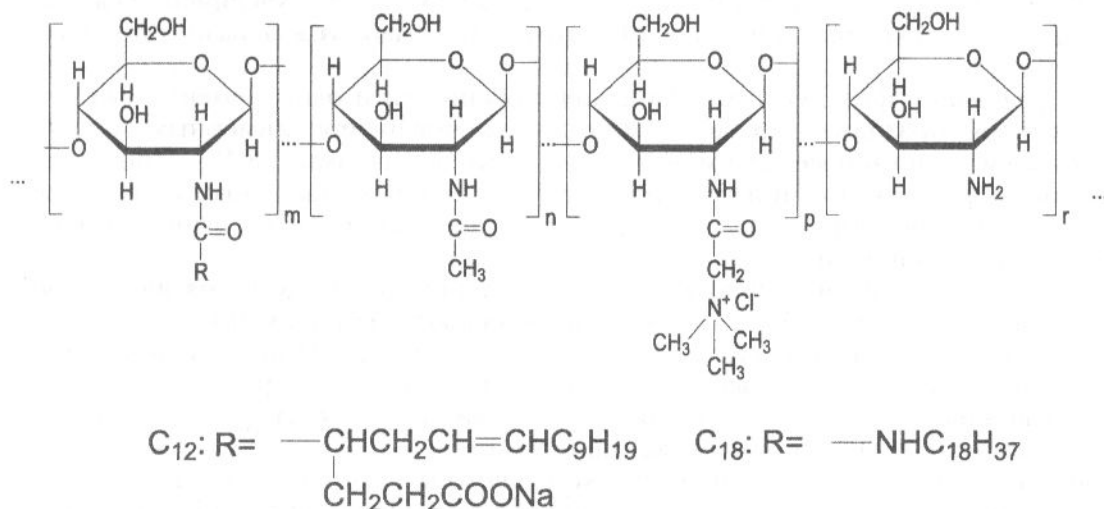
Другим путем получения кватернизованного хитозана является взаимодействие хитозана с избытком (обычно 6-кратным) хлорида глицидилтриметиламмония. Согласно опубликованным данным, реакция протекала в гетерогенных условиях (pH=7) при 60–75°C с образованием растворимого в воде высокозамещенного продукта. При этом продукт со степенью кватернизации менее 50% был нерастворим. Авторы не указывали на использование каких-либо катализаторов в данной реакции.

Однако наши попытки воспроизвести опубликованные результаты и получить кватернизованный хитозан взаимодействием даже переосажденного хитозана (для этого хитозан был растворен в 1% уксусной кислоте, а затем высажен добавлением водного раствора NaOH и отмыт от солей щелочи дистиллированной водой) с глицидилтриметиламмоний хлоридом в описанных условиях не удалась. Водорастворимой фракции со степенью кватернизации 5–7% было получено не более 10% от массы исходного хитозана, а его основная часть так и оставалась в виде водной дисперсии, растворимой только в разбавленной уксусной кислоте. Кватернизованный хитозан был получен только при проведении реакции в водном растворе гидроксида натрия (0,5–1M). В этих условиях за один цикл процесса степень кватернизации растворимой фракции достигала 25%. Однако очевидно, что реакция в этих условиях могла протекать как по аминок группам хитозана, так и по его гидроксильным группам с неоднородным распределением четвертичных аммониевых групп по цепи полимера. Следует отметить, что нами был использован в качестве исходного хитозан низкого молекулярного веса фирмы “ALDRICH” (по данным вискозиметрии  $M_v=100\pm 10$  kDa).

В связи с вышеизложенным проведение региоселективной реакции кватерни-

зации хитозана в гомогенной среде является предпочтительным путем получения кватернизованного хитозана с точки зрения определенности структуры и интерпретации его физико-химических свойств и биологической активности.

С этой целью нами была проведена реакция хитозана и его амфифильных производных с бетаином в присутствии конденсирующего агента 2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолина (EEDQ). Структура полученных производных приведена на рисунке.



Структура полученных соединений

Реакцию проводили в водно-метанольной смеси при pH 5,0–5,5, т.е. в среде, в которой были растворимы хитозан и EEDQ. В этих условиях происходила конденсация бетаина исключительно с аминогруппами хитозана с образованием полностью растворимого во всей области pH продукта. В таблице представлены результаты кватернизации хитозана и его производных, содержащих  $C_{12}$  или  $C_{18}$  алифатическую группу. Как видно из этой таблицы, при мольном соотношении хитозан (по аминогруппам): бетаин = 1:2 степень кватернизации увеличивается с увеличением количества используемого EEDQ и достигает максимума ~60–65 мол.%, в то время как степень кватернизации  $C_{12}$ – $C_{18}$ -хитозана определяется еще и содержанием алкильного заместителя. Увеличение длины заместителя и его содержания приводило к уменьшению степени кватернизации при прочих равных условиях синтеза.

Хитозан или его производные	Алкил( $C_{12}$ или $C_{18}$ ), мол.%	EEDQ, ммоль	Степень кватернизации, мол.%
Хитозан	–	1	10
Хитозан	–	2	25
Хитозан	–	4	60
Хитозан	–	6	65
$C_{12}$ -хитозан	6	6	20
$C_{12}$ -хитозан	12	6	12
$C_{18}$ -хитозан	0,6	6	60
$C_{18}$ -хитозан	3	6	25

Указанные эффекты процесса кватернизации хитозана и его амфифильных производных, по-видимому, связаны с состоянием полимерных цепей хитозана в

его растворе. Что касается хитозана, то увеличение положительного заряда полимерной цепи хитозана при введении триметиламмониевых групп вызывает их взаимное отталкивание, а также ограничение диффузии положительно заряженных молекул реакционно-способного смешанного ангидрида О-этоксикарбонил-бетаина и, как следствие, практически равные результаты кватернизации при увеличении используемого в реакции EEDQ с 4-х до 6-тикратного мольного избытка.

В то время как при кватернизации хитозана наблюдается увеличение вязкости его раствора, кватернизация  $C_{12}$ - и  $C_{18}$ -хитозана приводит к образованию макрогеля.

Образование физического геля алкилированными и одновременно кватернизованными образцами хитозана происходит за счет интерполимерных гидрофобных взаимодействий между мицеллоподобными агрегатами [18,19]. При этом агрегаты, образованные при участии интраполимерных алкильных групп служат "узлами" физического геля, а интерполимерные алкильные группы образуют "мостики", стабилизирующие гель.

Поскольку энергия гидрофобного взаимодействия между двумя алкильными группами составляет ~10 кТ, то такие связи являются обратимыми и легко разрушаются при механическом (ультразвуковом) воздействии. При этом твердоподобный физический гель с ярко выраженной эластичностью превращается в прозрачную жидкость, вязкость которой сопоставима с вязкостью раствора неалкилированного хитозана такой же концентрации.

Как показали опыты по динамическому светорассеянию, макроионы модифицированного хитозана образуют частицы нано- и микрогеля с размером от 40 нм до 500 нм при рН 7–8. Увеличение длительности и мощности озвучивания приводило к систематическому уменьшению размеров частиц таких гелевых образований. Снижение рН до 3 уменьшало размеры таких частиц, что может быть объяснено дополнительной ионизацией аминогрупп хитозана, приводящей к повышению положительного заряда цепи полимера и "расталкиванию" алкильных групп.

Интересно отметить относительно высокую кинетическую устойчивость таких дисперсий к коагуляции (укрупнению размеров частиц) во времени, которая увеличивается с ростом степени кватернизации. Такие дисперсии остаются жидкоподобными и прозрачными (или слегка опалесцирующими) в течение нескольких месяцев. Однако опыты по светорассеянию показали, что при старении такой дисперсии все же происходит постепенное увеличение среднего размера частиц и появление более крупных частиц.

Нанодисперсии алкилированных и кватернизованных хитозанов, по-видимому, можно использовать в качестве векторов биологически-активных веществ после решения проблем с очисткой и дозировкой таких дисперсий. Гидрофобные лекарственные средства могут быть солюбилизированы внутри мицеллоподобных агрегатов таких частиц. Противоположно заряженные (анионные) полиэлектролиты, такие как ДНК, могут образовывать комплексы с такими частицами при нормальных рН и в физиологических растворах, размер которых определяется размером наночастиц физического геля.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. M.Tanou, B.I.Florea, M.W.E.Langemeyer, J.C.Verhoef, H.E.Junginger (2000). Pharm.Res., 17. P. 27–31.
2. A.F.Kotze, M.Thanou, H.L.LueJen, A.G.Boer, J.C.Verhoef, H.E.Junginger (1999). Eur.J.Pharm. Boipharm., 47. P. 269–274.
3. R.Hang, Y.Du, J.Yang, L.Fan (2003). Carbohydrate Res., 338. P. 483–489.
4. S.-H.Lim, S.M.Hudson (2004). Carbohydrate Res., 339. P. 313–319.
5. E.A.Rabea, M.E.-T.Badawy, C.V.Stevens, G.Smagghe, W.Steurbaut (2003). Biomolecules, 4. P. 1457–1465.
6. Z.Jia, D.Shen, W.Xu (2001). Carbohydrate Res., 33. P. 1–6.
7. R.A.A.Muzzarelli, F.Tanfani (1983). Carbohydrate Polymers, 5. P. 297–307.
8. A.B.Sieval, M.Thanou, A.F.Kotze, J.C.Verhoef, J.Brussie, H.E.Junginger (1998). Carbohydrate Polymers, 36. P. 157–165.

9. *D.Snyman, J.H.Hamman, J.E.Kotze, J.E.Rollings, A.F.Kotze* (2002). *Carbohydrate Polymers*, 50. P. 145–150.
10. *J.H.Hamman, A.F.Kotze* (2001). *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27. P. 367–374.
11. *A.Polnok, G.Borchard, J.C.Verhoef, N.Sarisuta, H.E.Junginger* (2004). *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 57. P. 77–83.
12. *P.Le Dung, M.Milas, M.Rinaudo, J.Desbrieres* (1994). *Carbohydrate Polymers*, 24. P. 209–214.
13. *A.Domard, M.Rinaudo, C.Terrassin* (1986). *Int. J. Biol. Macromol.*, 8. P. 105–107.
14. *A.Domard, M.Rinaudo, C.Terrassin* (1987). *Int.J.Biol.Macromol.*, 9. P. 233–237.
15. *Л.А.Нудьга, Е.А.Плуско, С.Н.Данилов* (1973). *Журн. Общ. Хим.* № 43. С. 2756–2760.
16. *E.Loubaki, S.Sicsic, F.LeGoffic* (1989). *Eur.Polymer J.*, 25. P. 379–382.
17. *E.Loubaki, M.Ourevitch, S.Sicsic* (1991). *Eur.Polymer J.*, 27. P. 311–317.
18. *O.E.Philippova, E.V.Volkov, N.L.Sitnikova, A.R.Khokhlov* (2001). *Biomacromolecules*, 2. P. 483–490.
19. *V.G.Babak, J.Desbrieres, V.E.Tikhonov* (2005). *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 255(1–3). P. 119–130.