

С. В. Шилова, О. А. Зинурова, Р. Р. Хусаинова,
А. Я. Третьякова, В. П. Барабанов

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИИ ХИТОЗАНА В ВОДНО-БУТАНОЛЬНЫХ СРЕДАХ МЕТОДОМ ЗОНДОВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Ключевые слова: хитозан, ассоциация, метод флуоресцентной спектроскопии, пирен.

Методом зондовой флуоресцентной спектроскопии изучена ассоциация хитозана в водно-бутанольных средах. Показано, что при концентрации выше критической, хитозан формирует в растворе гидрофобные области, в которых солюбилизируется пирен. Введение в водный раствор хитозана добавок бутанола способствует снижению критической концентрации ассоциации и усилению склонности полимера к ассоциации.

Keywords: chitosan, assotiation, fluorescence probe investigation, pyrene.

Due to the probe fluorescence spectroscopy method there was studied the chitosan assotiation in aqueous-butanol media. There was defined, that due to highest critical concentration, chitosal can form hydrophobic areas, where pyrene is solubilizing. The introduction of butanol into chitosan aqueous solution, promotes the reduction of critical assotiation concentration and strengthening of polimer's disposition to assotiation.

Введение

В последние десятилетия хитин и хитозан являются предметом интенсивных исследований. Это обусловлено комплексом уникальных свойств, присущих данным полисахаридам – способности к биодеструкции, гипоаллергенности, совместимости с тканями живых организмов, высокой хелато- и комплексообразующей способности. Благодаря своим уникальным свойствам хитозан нашел широкое применение в медицине, косметической, текстильной, пищевой и других областях промышленности [1-7]. К неоспоримым достоинствам хитозана относится его безопасность для человека и окружающей среды: он экологически чист и полностью распадается в природных условиях.

Как и большинство природных полимеров, хитозан имеет тенденцию к самоассоциации в разбавленных водных растворах. Даже в случае полностью заряженных полимерных цепей он не всегда образует истинные растворы одиночных макромолекул, часто в растворе наряду с отдельными макромолекулами присутствуют ассоциаты [8]. Такие самопроизвольно формирующиеся ассоциаты хитозана исключительно перспективны в качестве носителей лекарственных средств и генов [9]. Зная закономерности формирования ассоциатов хитозана в различных средах и факторы, определяющие их размер, можно направленно получать полимерные носители необходимого размера.

В ранее проведенных исследованиях [10-12] методом потенциометрии были изучены закономерности ассоциации хитозана с анионным ПАВ в водно-этанольных растворах и показана возможность регулирования данного процесса путем варьирования состава растворителя. Метод флуоресцентной спектроскопии, основанный на изменении свойств флуоресцентных проб в зависимости от локального микроокружения, позволяет изучать структурные и динамические свойства систем [13]. В настоящей работе данный метод использован для исследования ассоциации хитозана в водно-бутанольных средах.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовали хитозан (ЗАО «Биопрогресс», Щелково) с молекулярной массой 38700 и степенью деацетилирования 80 %.

Для приготовления растворов использовали смеси бидистиллированной воды с бутанолом-1 (марки х.ч.) различного состава, что позволяло варьировать характеристики среды в определенных пределах. Чистоту воды контролировали по величине удельной электропроводимости, которая составляла 3 мкСм/см.

В качестве флуоресцентного зонда применяли пирен фирмы «Aldrich» (США). Растворителем для флуоресцентного зонда служил дважды перегнанный ректифицированный этанол. Спектры флуоресценции пирена в растворах хитозана регистрировали при комнатной температуре на люминесцентном спектрофлуориметре Varian Cary Eclips для щелей возбуждения и эмиссии 5 нм. Возбуждение производили при длине волны 335 нм. По спектрам поглощения находили интенсивности флуоресценции при 373 нм (1-ый пик) и 384 нм (3-ий пик).

Концентрацию хитозана варьировали в интервале 0,001 – 10 г/л. Серию растворов готовили путем разбавления исходного раствора (10 г/л) и выдерживали их сутки при комнатной температуре. Добавляли пирен для достижения его концентрации в растворе 2×10^{-6} моль/л, перемешивали и спустя 15-20 мин приступали к измерениям.

Результаты и их обсуждение

Хитозан получают деацетилированием хитина. Полученный полимер помимо звеньев D-глюкозамина содержит звенья N-ацетил-D-глюкозамина, оставшиеся от хитина [1]. Хитозан ведет себя как ассоциирующий полиэлектролит: самопроизвольно формирует агрегаты макромолекул, размеры которых определяются конкуренцией притяжения ассоциирующих групп,

вызывающих агрегацию, и отталкивания из-за наличия заряженных звеньев и противоионов, препятствующего агрегации [8].

На рис. 1 представлены спектры флуоресценции пирена в водном растворе хитозана. При переходе от воды (спектр а) к растворам хитозана с увеличивающейся концентрацией отмечается существенное снижение интенсивности пиков. Спектр (а) характерен для гидрофильного окружения пирена, тогда как спектр (б) указывает на то, что пирен находится в сильно гидрофобном окружении.

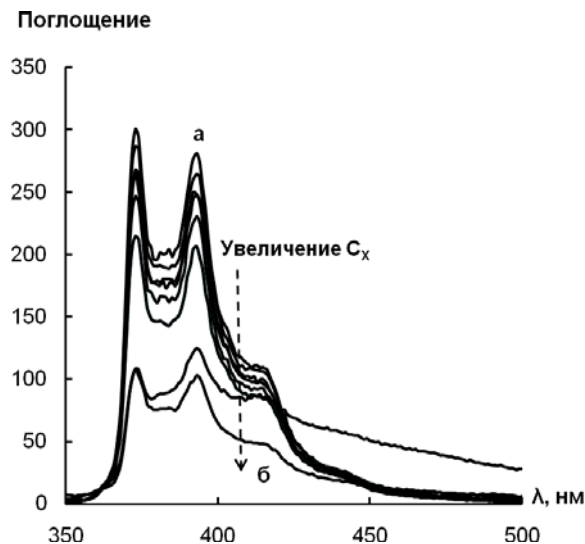


Рис. 1 – Спектры флуоресценции пирена в водном растворе хитозана. Спектр (а) $C_x = 0$; спектр (б) $C_x = 10$ г/л

Наряду с изменением формы спектра с увеличением концентрации хитозана наблюдается изменение отношения интенсивностей первого (373 нм) и третьего (384 нм) пиков пирена. Известно, что отношение интенсивности первого и третьего пиков I_1/I_3 в спектре флуоресценции пирена чрезвычайно чувствительно к диэлектрической проницаемости среды в микроокружении зонда [12]. В полярной среде (в воде) «параметр полярности» $I_1/I_3 = 1,4-1,6$, в неполярной среде (например, в гексане) – 0,6. На рис. 2 приведены зависимости параметра полярности микроокружения пирена I_1/I_3 от концентрации водно-бутанольных растворов хитозана.

Из рисунка видно, что при низких концентрациях хитозана параметр полярности микроокружения пирена не изменяется, оставаясь в пределах 1,4-1,6. Это указывает на то, что молекулы пирена окружены водой. Затем в некотором диапазоне концентраций хитозана параметр полярности уменьшается, что свидетельствует о формировании хитозаном гидрофобных областей, в которых могут располагаться молекулы пирена. Резкое снижение параметра I_1/I_3 связано, по-видимому, с ассоциацией полимерных цепей хитозана при некоторой концентрации в растворе, превышающей критическую (C_k). Пирен воспринимает как гидрофобные домены гидрофильные участки цепи, вовлеченные в образование водородных связей. Взаимодействующие

гидрофильные группы оказываются скрытыми от растворителя, что существенно повышает гидрофобность хитозана [8, 14].

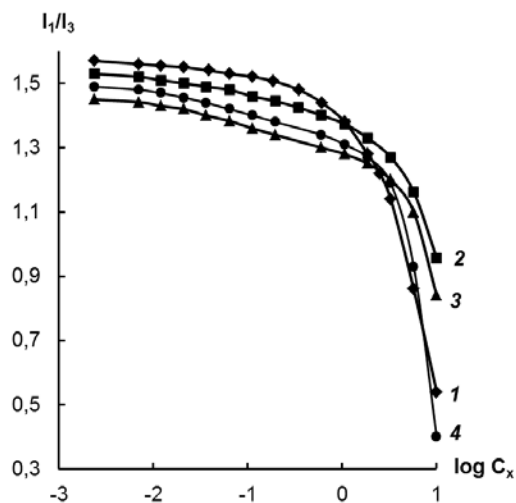


Рис. 2 – Зависимость отношения I_1/I_3 пирена от логарифма концентрации раствора хитозана при содержании бутанола в растворителе: 0 (1), 1 (2), 3 (3) и 5 об. % (4).

Обращает на себя внимание тот факт, что параметр полярности микроокружения пирена в водно-бутанольных растворах хитозана снижается до значений более низких (см. кривые 1, 4 на рис. 2), чем у пирена, солюбилизированного в мицеллах низкомолекулярных ПАВ ($I_1/I_3 = 0,9 - 1$ [15]). Ранее в ряде работ по исследованию агрегации хитозана в разбавленных водных растворах также было обнаружено снижение параметра полярности пирена до значений 0,5-0,6, однако причины данного факта остаются невыявленными.

Критическую концентрацию хитозана, при которой начинаются ассоциативные взаимодействия макромолекул в водно-бутанольных растворах, определяли по методу, предложенному в работе [16]. В основе метода лежит нахождение точки пересечения двух прямых: наклона кривых отношения I_1/I_3 при $C_x \rightarrow 0$ ($\lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\partial(I_1/I_3)}{\partial C} \right)$) и

экстраполяции I_1/I_3 при высоких концентрациях хитозана ($\lim_{C \rightarrow 0} (I_1/I_3)$).

Тогда C_k можно найти по формуле [16]:

$$C_k = \frac{\left(\frac{I_1}{I_3} \right)_{C=0} - \left(\frac{I_1}{I_3} \right)_{C=0}}{\left(\frac{\partial \left(\frac{I_1}{I_3} \right)}{\partial C} \right)_{C=0}}$$

На рис. 3 представлены зависимости отношения I_1/I_3 пирена от концентрации хитозана в области низких значений и показан пример определения C_k полимера для одного из составов водно-бутанольного растворителя.

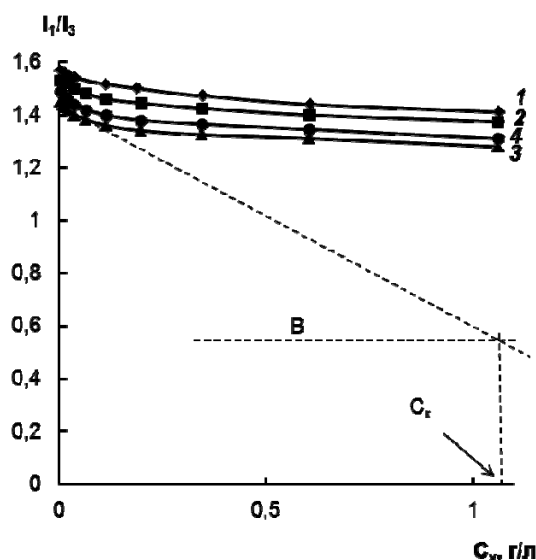


Рис. 3 – Зависимость отношения I_1/I_3 пирена от концентрации раствора хитозана при содержании бутанола в растворителе: 0 (1), 1 (2), 3 (3) и 5 об. % (4).

Найденные по графику значения C_k хитозана в присутствии в растворителе добавок бутанола приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Зависимость критической концентрации ассоциации хитозана от состава водно-бутанольного растворителя

X, об. % BuOH	A*	B**	C_{k2} г/л
0	-1,35	0,50	1,35
1	-1,08	0,70	1,10
3	-0,83	0,54	1,09
5	-0,79	0,62	0,99

$$^* A = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\partial(I_1/I_3)}{\partial C} \right); \quad ^{**} B = \lim_{1/C \rightarrow 0} (I_1/I_3)$$

Как видно из табл. 1, при переходе от водного раствора хитозана к водно-бутанольному отмечается снижение C_k , свидетельствующее об усилении склонности полимера к ассоциации. Для всех исследованных концентраций бутанола в растворителе

критическая концентрация ассоциации хитозана составляет около 1 г/л.

Таким образом, показано что в водно-бутанольных растворах макромолекулы хитозана ассоциируют при достижении критической концентрации, формируя при этом гидрофобные области, в которых может находиться пирен. Введение в водный раствор хитозана добавок бутанола способствует снижению критической концентрации и, следовательно, усилению склонности полимера к ассоциации.

Литература

1. Хитин и хитозан: природа, получение и применение / Под ред. В.П. Варламова, С.В. Немцева, В.Е. Тихонова. М.: Российское хитиновое общество, 2010.
2. Симонова, Л.В. Хитин и хитозан / Л.В. Симонова, Л.К. Пашук // Косметика и медицина. 1998. №15. С. 12.
3. Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Application / Ed. by G. Skjak-Brek, T. Anthonsen, P. Sandford. London: Elsevier, 1989.
4. Вихорева Г.А., Бабак В.Г., Галич Е.Ф., Гальбрайт Л.С. // Высокомолек. соед. 1997. Т. 39. №7. С. 947.
5. Rinaudo M. // Prog. Polym. Sci. 2006. V. 31. № 7. P. 603.
6. Material Science of Chitin and Chitosan / Ed. by T. Uragami, S. Tokura. Tokyo: Springer, 2006.
7. Kulikov S., Tikhonov V., Blagodatskikh I., Bezrodnykh E., Lopatin S., Khairullin R., Philippova Y., Abramchuk S. // Carbohydrate Polymers. 2012. V. 87. P. 545.
8. Филиппова О.Е., Корчагина Е.В. // Высокомолек. соед. 2012. Т. 54. №7. С. 1130.
9. Sinha V.R., Singla A.K., Wadhawan S., Kaushic R., Kumria R., Bansal K., Dhawan S. // Int. J. Pharm. 2004. V. 274. №1-2. P. 1.
10. Шилова С.В., Безруков А.Н., Третьякова А.Я., Барабанов В.П. // Вестник Казан. технол. ун-та. 2010. №7. С. 27.
11. Шилова С.В., Третьякова А.Я., Барабанов В.П. // Вестник Казан. технол. ун-та. 2010. №11. С. 11.
12. Шилова С.В., Десятникова О.А., Третьякова А.Я., Барабанов В.П. // Вестник Казан. технол. ун-та. 2011. №15. С. 42.
13. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М., 1986.
14. Yu X., Tanaka A., Tanaka K., Tanaka T. // J. Chem. Phys. 1992. V. 97. P. 7805.
15. Burke S.E., Andrecyk S.L., Palepu R. // Colloid Polym. Sci. 2001. P. 131.
16. Ortona O., D'Errico G., Mangiapia G., Ciccirelli D. // Carbohydrate Polymers. 2008. V. 74. P. 16.