

© 1992 г. Л. А. Мышкина, Т. В. Петухова, О. И. Левина,
Г. К. Коротаев

ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ КОЛЛАГЕНА С ХИТОЗАНОМ

Методом турбидиметрии изучена реакция образования полиэлектролитных комплексов коллагена с хитозаном. Установлено, что состав полиэлектролитного комплекса существенно зависит от условий эксперимента, в частности от соотношения исходных компонентов, pH среды, ионной силы, структуры коллагена и хитозана. Полиэлектролитные комплексы выделены количественно центрифугированием.

Хитозан — природный полисахарид, образующийся при деацетилировании хитина в присутствии щелочных агентов и представляющий собой неразветвленную цепь, состоящую из β -(1 \rightarrow 4)-2-амино-2-дезоксид-глюкановых остатков. Этот полисахарид находит широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности и в биотехнологии.

Макромолекула хитозана, содержащая в своей структуре незамещенные аминогруппы ($pK_a=6,3-7,0$), является слабым полимерным основанием [1], способным образовывать с синтетическими или природными полианионами полиэлектролитные комплексы (ПЭК), в которых макромолекулы полиэлектролитов удерживаются кооперативной системой ионных связей. В частности, к образованию ПЭК приводит полиионное интермолекулярное взаимодействие хитозана или его производных с противоположно заряженными полиэлектролитами: карбоксиметилцеллюлозой [2], гепарином [3] и полиакриловой кислотой [4].

В настоящей работе изучено взаимодействие хитозана с коллагеном в водной среде, приводящее к образованию нерастворимого коллаген-хитозанового комплекса. Образование ПЭК изучали в зависимости от соотношения исходных компонентов, pH среды, ионной силы, температуры и времени инкубации кислого раствора коллагена. Для оценки образования нерастворимого ПЭК использовали турбидиметрический метод — измерение величины кажущейся оптической плотности D смеси полиэлектролитов. В отдельных случаях ПЭК был выделен количественно центрифугированием смеси полиэлектролитов с последующим промыванием и высушиванием осадка до постоянной массы. Количество выделенного осадка хорошо коррелирует с определяемыми значениями D , что дало основание считать последние достоверно отражающими степень коагуляции ПЭК.

В работе использовали хитозан краба, полученный методом [5]. $\bar{M}_w \sim 1,18 \cdot 10^6$ (определяли вискозиметрическим способом [6]). Степень деацетилирования $\alpha=0,93$ (определяли потенциометрическим титрованием [5]), влага до 8%, общий азот 7,33%.

Использовали образец коллагена, полученный по методу [7], содержащий до 13% оксипролина с $\bar{M}_w \sim 2,3 \cdot 10^5$ (определяли методом [8]).

Интерполиэлектролитную реакцию коллагена с хитозаном изучали на спектрофотометре PVE Unicam PU 8610 UV/VIS при длине волны 420 нм, pH растворов полиэлектролитов контролировали при помощи pH-метра PHM 84 Research Radiometer Copenhagen. В качестве эталона использовали дистиллированную воду.

Хитозан и коллаген растворимы только в кислых растворах, поэтому интермолекулярное взаимодействие их изучали смешиванием солянокислых растворов, предварительно доводя pH последних до одинакового значения с помощью раствора едкого натра. Были выбраны следующие соот-

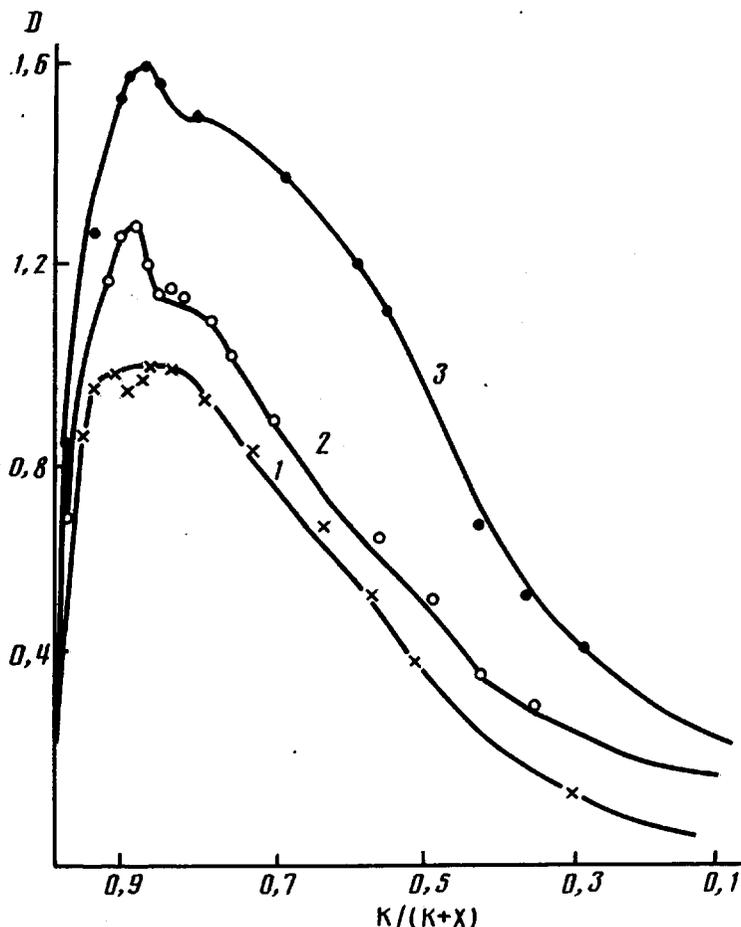
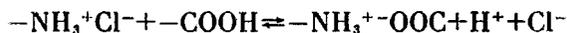


Рис. 1. Зависимость кажущейся оптической плотности реакционной смеси от соотношения $K/(K+X)$ при $pH=4,7$ и ионной силе 0,036: 1 – раствор коллагена без предварительной инкубации; 2, 3 – растворы коллагена, инкубированные в течение 30 мин при 30 (2) и 40° (3)

ношения масс коллагена и хитозана: 0,05 : 6,95; 0,1 : 6,9; 0,15 : 6,85; 0,2 : 6,8; 0,25 : 6,75; 0,3 : 6,7; 0,35 : 6,65; 0,4 : 6,6; 0,7 : 6,3; 0,8 : 6,2; 0,9 : 6,1; 1,0 : 6,0; 1,5 : 5,5; 2,0 : 5,0; 2,5 : 4,5; 3,0 : 4,0; 4,0 : 3,0; 4,5 : 2,5; 5,0 : 2,0; 5,5 : 1,5; 6,0 : 1,0.

В работе использовали свежеприготовленный 0,25%-ный раствор коллагена, полученный растворением нейтрального коллагена в 0,1 м. растворе HCl при 20° в течение 3–4 ч и выдерживании этой коллагеновой массы в течение 14–15 ч при 5°, а также растворы коллагена, имеющие $pH=1,2$, инкубированные при 30, 35 и 40° в течение 5, 15, 30, 45, 60 мин и 0,25%-ный раствор хитозана в 0,1 м. растворе HCl .

При смешивании 0,25%-ного солянокислого раствора коллагена при $pH=4,7$ с 0,25%-ным солянокислым раствором хитозана с тем же pH отмечалось уменьшение pH среды на 0,1–0,2. Увеличение кислотности смеси полиэлектролитов свидетельствует об образовании коллаген-хитозанового комплекса, сопровождающемся следующей реакцией:



Зависимости кажущейся оптической плотности D смеси растворов коллагена и хитозана от состава приведены на рис. 1. При одинаковых значе-

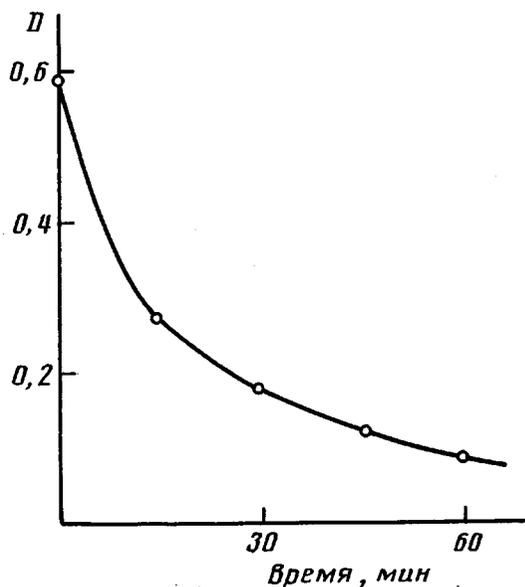


Рис. 2. Зависимость кажущейся оптической плотности солянокислого раствора коллагена от времени инкубации при 30°

ниях pH растворов полиэлектролитов (4,7), ионной силе 0,036 и сохранении постоянного объема смеси увеличение количества содержащегося в ней хитозана приводит к росту выхода нерастворимого ПЭК, который достигает максимального значения в интервале величин $K/(K+X)$ (где K — количество коллагена, г; X — количество хитозана, г) от 0,95 до 0,85. При последующем добавлении хитозана к смеси полиэлектролитов мутность смеси уменьшается и величина D приближается к таковой для исходного раствора коллагена. Последнее свидетельствует о том, что образование нерастворимого коллаген-хитозанового ПЭК является процессом обратимым.

Предварительное нагревание коллагенового раствора приводит к увеличению выхода нерастворимого ПЭК и влияет на структуру белка. В частности, при инкубации 0,25%-ного солянокислого раствора коллагена с pH=1,2 при 30° кажущаяся оптическая плотность последнего уменьшается (рис. 2), достигая минимума через 30 мин ($D=0,12-0,15$). Таким образом, изменение структуры макромолекулы коллагена в солянокислом растворе протекает довольно быстро и в сравнительно узком интервале температур. По-видимому, карбоксильные группы в макромолекуле коллагена, растворенного при комнатной температуре, стерически экранированы и недоступны для аминогрупп макромолекулы хитозана. Интермолекулярное взаимодействие при pH=4,7 оказывается слабым, о чем свидетельствует незначительное помутнение смеси полисахарида и белка. Но уже после предварительной 10–20-минутной инкубации солянокислого раствора коллагена при 30° наблюдается увеличение выхода нерастворимого ПЭК. Повышение температуры до 40° или увеличение до 30 мин длительности термической обработки при 30° солянокислого раствора коллагена, используемого для образования коллаген-хитозанового нерастворимого ПЭК, еще больше увеличивает количество ПЭК. Это подтверждается возрастанием величины D для смесей, полученных с использованием коллагена, подвергнутого различной термической обработке. Как видно из рис. 1, предварительное термическое воздействие на коллаген вызывает увеличение количества нерастворимого ПЭК, хотя положение максимума его образования остается неизменным (80–90% коллагена).

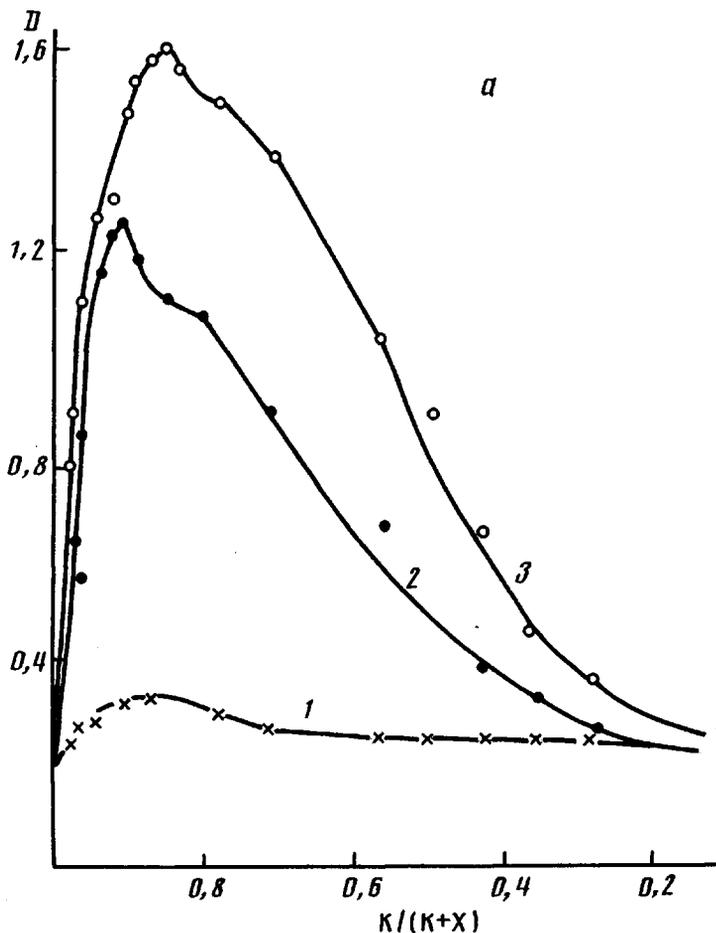


Рис. 3. Зависимость кажущейся оптической плотности образовавшегося ПЭК от соотношения $K/(K+X)$. *a* – раствор коллагена, инкубированный при 30° в течение 30 мин при значениях $pH=3,6$ (1), $4,7$ (2), $5,5$ (3) и ионной силе $-0,036$; *б, в* – неинкубированный (1, 3) и инкубированные 30 мин при 30° (2, 4) растворы коллагена при ионной силе смеси $0,36$ (1, 2) и $0,72$ (3, 4) $pH=4,7$ (6) и $5,5$ (6)

Интермолекулярная реакция коллагена с хитозаном протекает в довольно узком интервале pH . При $pH=3,6$ и ионной силе $0,036$ растворов полиэлектролитов нерастворимый ПЭК практически не образуется, но при повышении pH растворов количество нерастворимого ПЭК монотонно возрастает и достигает максимума при $pH=5,5$. Дальнейшее повышение pH растворов полиэлектролитов приводит к выпадению хитозана и коллагена в осадок до смешения растворов (рис. 3). Учитывая несовершенство турбидиметрического метода, в данном случае не следует делать строгих количественных оценок степени коагуляции на основании значения D . Тем не менее несомненный рост количества коагулята при повышении pH от $3,6$ к $4,7$ придает достаточную достоверность утверждению и об увеличении количества коагулята с ростом pH в интервале $4,7-5,5$.

Как следует из кривых зависимости величины D от значений $K/(K+X)$ (рис. 3, *a*), наряду с основным максимумом имеется либо второй максимум, либо плечо. Это дает основание предполагать образование двух типов нерастворимых ПЭК, характеризующихся различным составом.

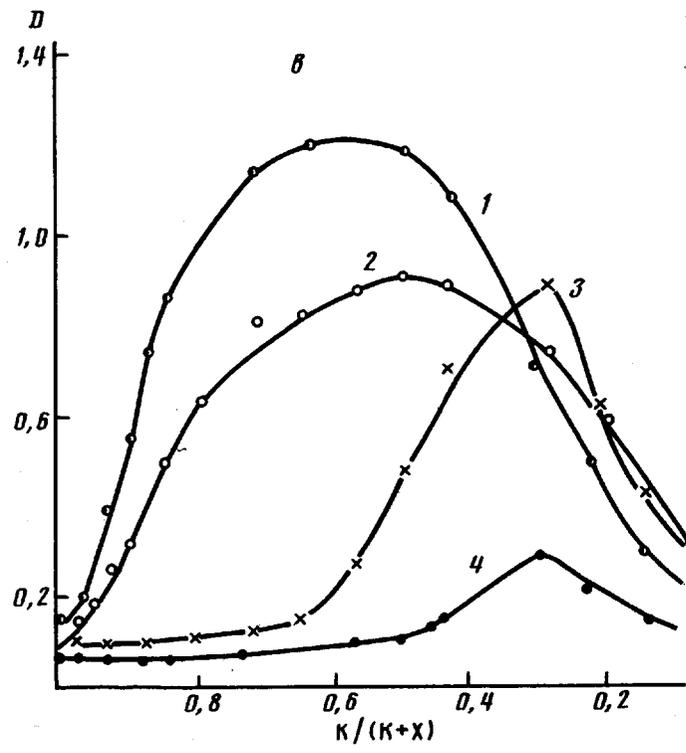
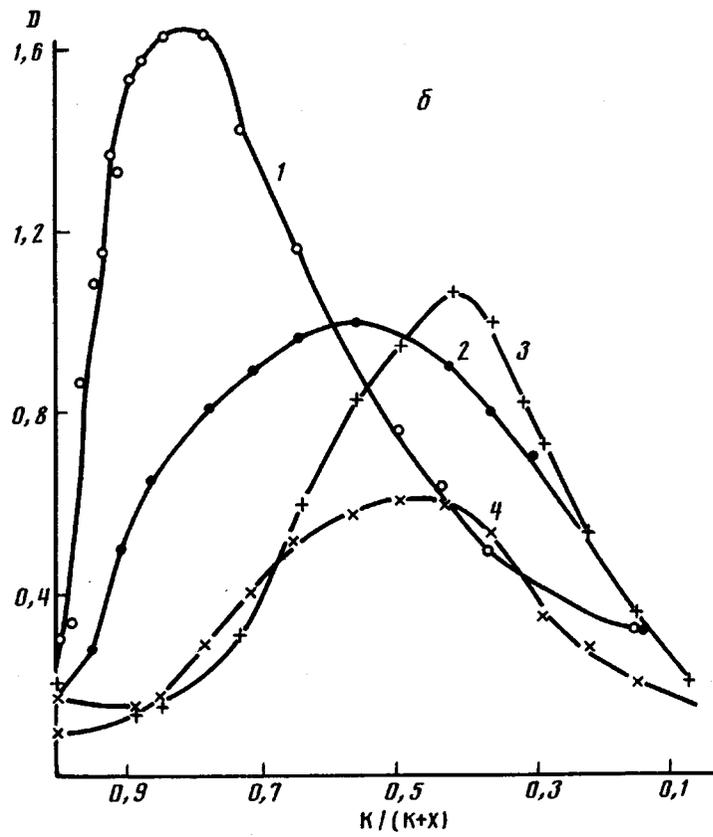


Рис. 36, в

Коллаген-хитозановые комплексы

Условия получения ПЭК			Значение K/(K + X)	Масса ПЭК, г
pH	ионная сила	инкубация коллагена, град/мин		
4,7	0,036	30/30	0,9142	0,152
4,7	0,036	30/30	0,7143	0,121
5,5	0,036	30/30	0,8857	0,162
5,5	0,036	30/30	0,7143	0,129
4,7	0,36	20/—	0,8571	0,189
4,7	0,36	20/—	0,6429	0,162
4,7	0,72	20/—	0,4286	0,141
4,7	0,72	20/—	0,2143	0,094
5,5	0,36	20/—	0,5000	0,165
5,5	0,36	20/—	0,2857	0,103
5,5	0,72	20/—	0,2857	0,110
5,5	0,72	20/—	0,1429	0,077

Установлено, что ионная сила раствора полиэлектролитов влияет не только на степень образования, но и на состав коллаген-хитозанового комплекса. Например, если при смешении не подвергнутого термической обработке коллагенового раствора с ионной силой 0,036 с раствором хитозана при pH=4,7 нерастворимый ПЭК образуется в небольшом количестве, то при 10-кратном увеличении ионной силы при том же pH в смеси обнаруживается значительное количество коагулята — результат интермолекулярной реакции коллагена с хитозаном. При этом положение максимума величины *D* смещается в интервале значений величины K/(K+X) от 0,90 до 0,75, что свидетельствует об обогащении ПЭК хитозаном. Механизм влияния ионной силы можно рассматривать с двух позиций. С одной стороны, противоионы добавленной соли экранируют заряды обоих полиэлектролитов, что должно понижать эффективность образования ПЭК. Но с другой стороны, при увеличении ионной силы можно ожидать усиления раскручивания цепей коллагена, что в свою очередь приводит к увеличению его эффективной валентности. Следует также принять во внимание, что ионная сила раствора влияет и на структуру хитозана [9]. Подтверждением этому является резкое уменьшение доли нерастворимого ПЭК при дальнейшем повышении ионной силы (рис. 3, б). В последнем случае, по-видимому, экранирование зарядов полиэлектролитов является определяющим фактором при образовании ПЭК.

Можно было ожидать, что повышенная ионная сила и предварительная термообработка раствора коллагена совместно должны увеличить количество образующегося ПЭК. Однако, как видно на рис. 3, б, предварительное инкубирование при 30° в течение 30 мин раствора коллагена при повышенной ионной силе заметно понижает значение *D*, что скорее всего свидетельствует об обратимом уменьшении доли нерастворимого ПЭК. Не пытаясь дать исчерпывающее объяснение этому явлению, отметим все же, что раскручивание цепей коллагена при повышении ионной силы, по-видимому, исчерпывает демаскирование скрытых заряженных групп белка, в результате чего термообработка в этих условиях не повышает эффективного заряда коллагена. Более того, структурные изменения при термообработке, судя по всему, создают условия для более эффективного экранирования макромолекул коллагена противоионами добавленной соли. Вместе с тем следует полагать, что в образующемся при этом осадке валентность коллагена максимальна, т. е. соответствует числу демаскированных зарядов. Это подтверждается тем, что в результате термообработки раствора коллагена при повышенной ионной силе содержание коллагена

в осадке понижается: положение максимума D смещается от значений $K/(K+X)=0,65$ к $0,40$.

Аналогичный описанному выше эффект ионной силы и инкубации просматривается при $pH=5,5$ (рис. 3, в).

Качественная близость эффектов предварительного нагревания раствора коллагена и увеличения ионной силы свидетельствует о сходстве процессов, происходящих в коллагене при действии обоих факторов. Существенно все же отметить, что в случае использования соли на кривых зависимости величины D от доли коллагена в смеси проявляется только один максимум, что указывает на различие в воздействии названных факторов. Качественные характеристики коллаген-хитозановых нерастворимых ПЭК приведены в таблице.

Результаты проведенных исследований могут служить основой для отработки методов приготовления губчатых материалов, предназначенных для использования в медицине.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скорикова Е. Е., Визорева Г. А., Калужная Р. И., Зезин А. В., Гальбраз Л. С., Кабанов В. А. // Высокомолек. соед. А. 1988. Т. 30. № 1. С. 44.
2. Fukuda H. // Makromol. Chem. 1979. В. 180. № 6. S. 1631.
3. Kikuchi Y., Noda A. // J. Appl. Polym. Sci. 1976. V. 20. № 9. P. 2561.
4. Chavasit V., Kienzle-Sterzer C., Torres J. A. // Polym. Bull. 1988. V. 19. № 3. P. 223.
5. Гамзааде А. И., Скляр А. М., Рогожин С. В. // Высокомолек. соед. А. 1985. Т. 27. № 6. С. 1179.
6. Roberts G. A. F., Domszy J. G. // Int. J. Biol. Macromol. 1982. V. 4. № 10. P. 374.
7. Истранов Л. П., Болдарева Л. Н. // Лекарственные средства. Экономика, технология и перспективы получения. Обзор информ. М., 1989. Вып. 4. С. 10.
8. Nishipara T., Doty P. // Nat. Acad. Sci. USA. 1958. V. 44. № 5. P. 411.
9. Беркович Л. А., Тимофеева Г. И., Цюрупа М. П., Даванков В. А. // Высокомолек. соед. А. 1980. Т. 22. № 8. С. 1834.

Научно-производственное объединение
«Биотехнология», Москва

Поступила в редакцию
11.05.91

УДК 541(127+64) : 542.954

© 1992 г. Б. А. Юльчибаев, З. Б. Артыкова, Э. У. Уринов,
Н. Р. Ашуров, Б. Х. Стрелец, В. Г. Куличихин

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ ПОЛИКОНДЕНСАЦИИ ПОЛИЭТИЛТЕРЕФТАЛАТА С *пара*-АЦЕТОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТОЙ

Исследована поликонденсация ПЭТФ с *n*-ацетоксibenзойной кислотой с использованием методов вискозиметрии, ПМР и ГПХ. Выявлено наличие конкурирующих реакций ацидолиза и конденсации, определены способы их регулирования. Рассмотрено влияние температуры, природы и концентрации катализатора на ход синтеза. Образованию статистического сополиэфира с высокой ММ способствует повышение температуры синтеза и использование в качестве катализатора ацетата цинка. В исходном сополиэфире присутствуют две фракции разного состава: обогащенной гибкими фрагментами ПЭТФ и жесткими элементами диад остатков гидроксibenзойной кислоты.

Известно, что сополиэфир на основе ПЭТФ и *n*-гидроксibenзойной кислоты (ОБК) при содержании последней >35 мол. % проявляет термотропный мезоморфизм [1]. Особенностью строения макроцепи сополиэфира яв-