

УДК 541(64+49):539.199

КОНФОРМАЦИЯ ЦЕПЕЙ ХИТИН-ГЛЮКАНОВОГО КОМПЛЕКСА ПО ДАННЫМ МАЛОУГЛОВОГО НЕЙТРОННОГО РАССЕЯНИЯ

© 1998 г. Г. А. Евмененко*, В. Л. Алексеев*, Л. А. Нудьга**, В. А. Петрова**

*Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Российской академии наук
188350 Гатчина Ленинградской обл.

**Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук
199004 Санкт-Петербург, Большой пр., 31

Поступила в редакцию 12.01.98 г.

Принята в печать 26.02.98 г.

Методом малоуглового рассеяния тепловых нейтронов изучена конформация отдельных цепей частично дейтерированного хитин-глюканового комплекса, введенного в аморфные пленки обычного комплекса. Показано, что конформация цепей является более сжатой по сравнению с конформацией гауссового клубка, что, по-видимому, связано с быстрой коагуляцией полимера в процессе приготовления пленок. Определенное из малоугловых данных ММР согласуется с данными по динамическому светорассеянию от хитин-глюканового комплекса в растворе.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все возрастающее внимание уделяют изучению природных полисахаридов, среди которых хитин и его частично или полностью деацетилированный продукт – хитозан [1–10]. Для практического использования они привлекательны тем, что представляют собой биоразрушаемые и биосовместимые полимеры, источники которых постоянно обновляются в природе. Являясь прекрасным хелатирующим агентом для тяжелых токсичных металлов [1–3], хитин и хитозан очень перспективны в качестве носителей для создания лекарственных препаратов [8, 9], особенно их конъюгаты с пептидами или аминокислотами. Знание надмолекулярной структуры полимеров является необходимой предпосылкой для успешного создания таких препаратов.

Как известно, методы структурного анализа, основанные на рассеянии излучения, особенно информативны при исследовании надмолекулярной структуры полимеров [11–14]. Среди них выделяется малоугловое рассеяние нейтронов благодаря очень эффективной методике дейтериевого контрастирования образцов, основанной на большой разнице амплитуд когерентного ядерного рассеяния для протонов и дейтронон. Для макромолекул в растворе нейтронное рассеяние определяется контрастом [12, 13] – величиной, которая представляет собой разницу в плотностях амплитуд рассеяния макромолекул и растворителя. В этом случае вариация контраста легко достигается простым варьированием соотношения легкой и тяжелой воды, если полимер является водорастворимым. Как известно, большая часть

биологических макромолекул содержит лабильные протоны в гидрокси-, амино- и других полярных группах. В таком случае имеется возможность дейтерообмена между лабильными протонами в молекулах полимера и дейтерием растворителя. Этот процесс увеличивает плотность амплитуды рассеяния полимера, а следовательно, и его рассеивающую способность, но в то же время эффект дейтерообмена необходимо принимать во внимание при проведении малоугловых нейтронных измерений [12, 13].

Другой подход [15–18] был разработан для исследования синтетических полимеров в блоке или в расплаве. Для этой цели используют специфически дейтерированные производные полимеров, малые количества которых вводят в качестве метки в матрицу, состоящую из Н-содержащих макромолекул. Таким образом можно исследовать конформацию отдельных цепей [15–18].

Для биомедицинских целей хитин и хитозан часто применяют в твердом состоянии (в виде мембран, покрытий и т.д.). Конформацию же цепей хитина в твердом состоянии методом малоуглового рассеяния нейтронов не исследовали, что было связано с отсутствием специфически дейтерированных производных хитина. В растворах такое дейтерирование может происходить за счет обмена лабильных аминопротонов на дейтроны. Для исследования конформации отдельных цепей в блоке необходимо иметь специфически дейтерированные производные хитина, содержащие необмениваемые при комнатной температуре дейтроны. Таким требованиям удовлетворяют дейтроны, связанные с углеродным атомом. Лабильные дейтроны могут быть потеряны в

процессе приготовления пленок, если для этого использовать протонные растворители. Совсем недавно специфически дейтерированный хитин-глюкановый комплекс (ХГК) стал доступен для нейтронных исследований [19]. Основная цель настоящей работы состоит в изучении конформации отдельных цепей ХГК в пленках методом малоуглового нейтронного рассеяния.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

ХГК, выделенный из мицеллия гриба *Aspergillus niger* путем последовательной экстракции эфиром, раствором щелочи (6% NaOH) и раствором соляной кислоты (10% HCl), растворяли в ДМАА с добавкой 9% LiCl (ДМАА + 9% LiCl), предварительно вытесняя воду инклузией метанолом и ДМАА. Полученный 3%-ный раствор ХГК фильтровали под давлением, дегазировали и наносили на стеклянную подложку. Подложку с раствором погружали в осадительную ванну, содержащую *n*-бутанол. После осаждения пленку тщательно отмывали от хлорида лития и сушили на тефлоновой подложке с фиксацией.

Дейтерированный ХГК выделяли описанным выше способом из мицеллия *Aspergillus niger*, выращенного в питательной среде на D₂O [19], и растворяли отдельно в ДМАА + 9% LiCl. Затем смешивали растворы обычного и дейтерированного ХГК с таким условием, чтобы концентрация дейтерированного ХГК в пленке была 3 мас.%. Перемешивание проводили на механической мешалке в течение 2 недель. Мешанный раствор обычного и дейтерированного ХГК использовали для приготовления пленок по описанной выше методике. Согласно данным по широкоугловому рассеянию рентгеновских лучей, полученные пленки являлись полностью аморфными.

Малоугловые измерения

Малоугловые нейтронные измерения проводили на дифрактометре "Мембрана-2" (Петербургский институт ядерной физики РАН). Падающий на образец пучок нейтронов имел следующие параметры: средняя длина волны $\langle \lambda \rangle = 0.3$ нм, полуширина спектра $\Delta \lambda / \langle \lambda \rangle = 0.35$. Пленки нарезали на полоски и упаковывали в виде стопки. Измеряли кривые рассеяния от пленок, содержащих дейтерированный ХГК, и от протонированных пленок. Кривую рассеяния для протонированных пленок вычитали из кривой, полученной для пленок, содержащих дейтерированный ХГК в качестве метки. При сравнении модельных и экспериментально измеренных кривых рассеяния в теоретические кривые вводили коллимационные и спектральные поправки, учитывающие прибор-

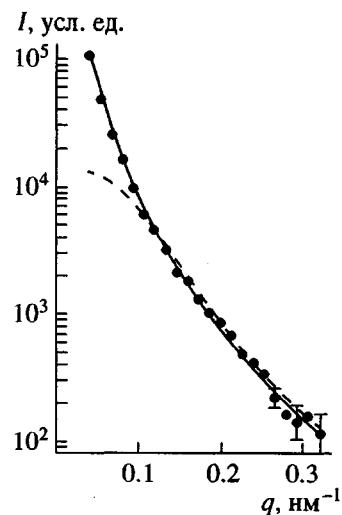


Рис. 1. Кривая малоуглового нейтронного рассеяния от дейтерированного ХГК. Штриховой и сплошной линиями показаны теоретические кривые рассеяния для разных модельных параметров.

ные искажения дифрактометра. В процессе предварительной обработки данных вводили также поправки на колебания мощности реактора (показания мониторов), эффективность счета в каждом измерительном канале, пропускание образца и некогерентный фон.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена кривая малоуглового нейтронного рассеяния от дейтерированного ХГК. Предварительный анализ функции рассеяния $I(q)$ показал, что, во-первых, при определении структурных параметров рассеивающей системы необходимо учитывать ее довольно полидисперсный характер. При построении графика Зимма, т.е. зависимости $\ln I(q)$ от q^2 (здесь не приведена) для данных, представленных на рис. 1, обнаруживалась нелинейная зависимость, которая связана с полидисперсным характером рассеивающих центров. Таким образом, основная задача малоуглового эксперимента состояла в определении размеров вкрапленных в протонированную матрицу внедрений дейтерированного ХГК и в отыскании функции распределения рассеивающих частиц по размерам — $N(R)$, наилучшим образом согласующихся с полученной кривой рассеяния.

Во-вторых, известно, что анализ асимптотик кривой рассеяния позволяет выявить дополнительно ряд особенностей структуры исследуемого объекта (степень гауссовости полимерной макромолекулы, форму и однородность рассеивающих частиц, изрезанность их поверхности, наличие резких границ и т.д.). В данном случае, несмотря на то, что кривые малоуглового рассеяния получали в

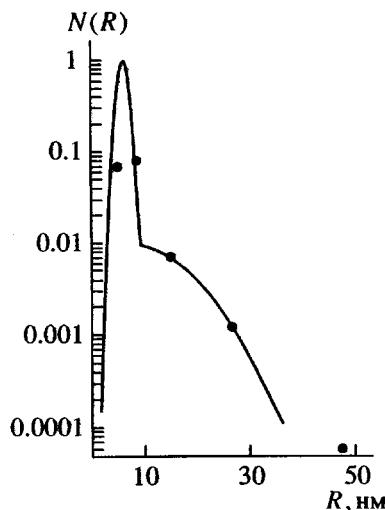


Рис. 2. Функция распределения $N(R)$ рассеивающих частиц по размерам, полученная из малоугловых нейтронных данных. Точки – $N(R)$ по данным динамического светорассеяния.

диапазоне длины векторов рассеяния $0.04\text{--}0.8 \text{ нм}^{-1}$, выделение сигнала от дейтерированного компонента привело к сужению анализируемой области q до $0.04\text{--}0.3 \text{ нм}^{-1}$ вследствие малой разницы в интенсивности рассеяния при $q > 0.3 \text{ нм}^{-1}$ от полностью протонированного образца и образца, содержащего 3% дейтерированных молекул. Подобное сужение измеряемого диапазона длины векторов рассеяния наряду с большой немонохроматичностью падающего излучения не позволяет использовать при нахождении функции распределения $N(R)$ методы восстановления неискаженной приборными погрешностями интенсивности рассеяния. Единственно возможным в данном случае методом получения $N(R)$ является метод извлечения структурной информации из кривых малоуглового рассеяния, основанный на сравнении экспериментальной и теоретических кривых без решения обратной задачи, когда все искажения учитываются в модели.

Анализ асимптотического поведения полученной в указанном диапазоне разностной кривой рассеяния дает зависимость $I(q) \sim q^{-2.8 \pm 0.1}$ при $q > 0.15 \text{ нм}^{-1}$, причем подобный закон падения интенсивности характерен практически для всей кривой рассеяния. Подчеркнем, что закон получен с учетом коллимационных и спектральных поправок дифрактометра. Отсюда следует, что в данном случае нельзя рассматривать рассеивающие частицы в качестве гауссовых клубков, поскольку для них должна наблюдаться зависимость $I(q) \sim q^{-d}$ с $d \leq 2$. На наш взгляд, молекулы ХГК находятся в пленках в довольно поджатом состоянии и поэтому в качестве модели рассеива-

ющего центра нами был выбран однородный шар, форм-фактор которого записывается в виде

$$F(qR) = \left[\frac{3 \sin qR - 3qR \cos qR}{(qR)^3} \right]^2 \quad (1)$$

(R – радиус шара, $q = 4\pi/\lambda \sin \theta$ – длина вектора рассеяния).

Для изотропной полидисперсной системы шаров, расстояния между которыми велики по сравнению с их размерами, для интенсивности рассеяния $I(q)$ можно записать [20]

$$I(q) = \frac{\int_0^{\infty} N(R) R^6 F(qR) dR}{\int_0^{\infty} N(R) R^6 dR} \quad (2)$$

Здесь $N(R)$ – функция распределения числа частиц по радиусам, $F(qR)$ дается выражением (1). Распределение $N(R)$ задавали в виде нормального закона распределения

$$N(R) = \frac{1}{2\pi} \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{R - \langle R \rangle}{\sigma} \right)^2 \right], \quad (3)$$

где $\langle R \rangle$ и σ – математическое ожидание (среднее значение радиуса) и дисперсия распределения $N(R)$. Дальнейшая обработка малоугловых нейтронных данных заключалась в подгонке модельной интенсивности рассеяния, рассчитанной в соответствии с выражением (2), к экспериментальным данным по методу наименьших квадратов. Варьируемыми параметрами являлись как величины $\langle R \rangle$ и σ , так и форма распределения $N(R)$, изменения которой потребовала необходимость хорошего совпадения экспериментальной и теоретической кривых рассеяния при $q < 0.12 \text{ нм}^{-1}$. На рис. 1 штриховой линией показана модельная кривая рассеяния для распределения (3) с $\langle R \rangle = 7 \text{ нм}$ и $\sigma = 1 \text{ нм}$, довольно хорошо совпадающая с экспериментально измеренной кривой рассеяния при $q > 0.12 \text{ нм}^{-1}$. Видно, что при $q < 0.1 \text{ нм}^{-1}$ начинается существенное расхождение в поведении кривых (значительный рост интенсивности рассеяния на экспериментальной кривой). Это потребовало ввести асимметрию в форму распределения $N(R)$, а именно предположить наличие фракции более крупных молекул по сравнению с основной фракцией.

На рис. 2 представлена полученная в результате обработки малоугловых нейтронных данных функция распределения по размерам частиц ХГК (кривая). Более мелкая фракция частиц может быть задана в виде нормального закона распределения с $\langle R \rangle = 6 \text{ нм}$ и $\sigma = 1 \text{ нм}$. Доля этих частиц по отношению к общему числу составляет 96.4%

(51.8% по массе). Далее распределение $N(R)$ оказывается затянутым в область больших размеров, что и приводит к соответствующему возрастанию интенсивности рассеяния $I(q)$ в области очень малых углов рассеяния. Поскольку массовая доля таких частиц сопоставима с мелкой фракцией, это радикально меняет начальный участок полученной кривой рассеяния.

Несмотря на то, что в качестве модели рассеивающего центра был выбран форм-фактор шара, при рассеянии от которого на кривых должны наблюдаваться максимумы формы, в данном случае, как мы видим, кривая рассеяния имеет монотонный характер. Это обусловлено несколькими причинами. Хотя влияние сферического строения рассеивающих центров и должно приводить к возникновению первого минимума при $q \approx 4.5/\langle R \rangle$, однако в нашем случае при размерах 5–35 нм изменения хода кривой рассеяния должны наблюдаться в районе $q > 0.13 \text{ нм}^{-1}$ (на "хвосте" кривой рассеяния). В то же время сильная полидисперсность рассеивающих частиц в сочетании с коллимационными и спектральными искажениями дифрактометра полностью нивелирует характерные признаки их формы, которые должны наблюдаваться при рассеянии в указанном диапазоне длины векторов рассеяния, и приводят к монотонности самой кривой рассеяния.

Чтобы представить дальнейшие аргументы в пользу распределения, представленного на рис. 2, здесь же даны результаты по динамическому светорассеянию, полученному для растворов ХГК в ДМАА + 9% LiCl. Эти эксперименты были выполнены с разрешением, которое не позволило прописать более подробно распределение фракции мелких частиц. Однако для нас важным является демонстрация того, что образец имеет распределение, "затянутое" в область более крупных размеров.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать некоторые обобщения. Показано, что молекулярно-массовое распределение ХГК, выделенного из *Aspergillus niger* по методу, описанному в работе [19], содержит небольшое количество макромолекул более крупной фракции. Эта фракция, по-видимому, соответствует нативным макромолекулам, которые в значительной степени деградируют в процессе выделения. Конформация отдельных цепей ХГК более компактна по сравнению с конформацией гауссового клубка. На наш взгляд, последнее является результатом методики приготовления пленок, которая заключалась в коагуляции растворов под действием осадителя. Хотя в настоящее время общепризнано, что конформация полимерных цепей в аморфном состоянии близка к гауссовой, тем не менее в некоторых конкрет-

ных случаях это может быть и не так. Последнее, по-видимому, должно сказываться на физико-химических свойствах полисахаридных пленок, важных для их практического использования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Нейтронные исследования были проведены при финансовой поддержке со стороны Государственной научно-технической программы России "Актуальные проблемы физики конденсированных сред" по направлению "Нейтронные исследования вещества". Мы признательны В.В. Клюбину сотруднику Института синтетического каучука им. С.В. Лебедева за проведение экспериментов по динамическому светорассеянию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mazzarelli R.A.A. Natural Chelating Polymers. Oxford: Pergamon Press, 1973.
2. Chitin and Chitosan / Ed. by Skjak-Braek G., Anthonsen T., Sanford P. London: Elsevier, 1989.
3. Nishi N., Maekita Y., Nishimura S., Hasegawa O., Tokura S. // Int. J. Biol. Macromol. 1987. V. 9. № 2. P. 109.
4. Domard A., Rinaudo M. // Int. J. Biol. Macromol. 1983. V. 5. № 1. P. 49.
5. Tsezos M., Voilesky B. // Biotechnology and Bioengineering. 1981. V. 23. № 3. P. 583.
6. Скорикова Е.Е., Вихорева Г.А., Калюжная Р.И., Зезин А.Б., Гальбрайх Л.С., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1989. Т. 31. № 7. С. 1441.
7. Нудыга Л.А., Бошек А.М., Каллистов О.В., Кучинский С.А., Петропавловский Г.А. // Журн. прикл. химии. 1993. Т. 66. № 1. С. 198.
8. Byung-Jo Ha, Ok-Sub Lee, Yoon-Sik Lee // J. Ind. Eng. Chem. 1995. V. 1. № 1. P. 57.
9. Byung-Jo Ha, Ok-Sub Lee, Yoon-Sik Lee // Macromol. Reps. A. 1996. V. 33 (Suppl. V. 6). P. 297.
10. Евмененко Г.А., Алексеев В.Л. // Высокомолек. соед. А. 1997. Т. 39. № 4. С. 650.
11. Свергун Д.И., Фейгин Л.А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука, 1986.
12. Stuhrmann H.B., Miller A. // J. Appl. Cryst. 1978. V. 11. № 5. P. 325.
13. Jacrot B. // Rep. Prog. Phys. 1976. V. 39. № 10. P. 911.
14. Guinier A., Fournet G. Small Angle Scattering of X-rays. New York: Wiley, 1955.
15. Cotton J.P., Farnoux B., Jannik G., Picot G., Summerfield G. // J. Polym. Sci., Polym. Symp. 1973. № 42. Pt. 2. P. 807.

16. Schelten J., Wignall G.D., Ballard D.G., Schmatz W. // Colloid Polym. Sci. 1974. V. 252. № 2. P. 749.
17. Lieser G., Fisher E.W., Ibel K. // J. Polym Sci., Polym. Lett. 1975. V. 13. № 1. P. 39.
19. Kirste R.G., Kruse W.A., Ibel K. // Polymer. 1975. V. 16. № 2. P. 120.
18. Нуд'га Л.А., Петрова В.А., Ганичева С.И., Выборнова Т.В., Львова Е.Б., Алексеев В.Л., Евмененко Г.А., Петропавловский Г.А. // Журн. прикл. биохимии и микробиологии (в печати).
20. Агамалиян М.М., Евмененко Г.А., Бабкин И.Ю., Бурухин С.Б., Дударев В.Я., Нойфех А.И. // Высокомолек. соед. А. 1987. Т. 29. № 4. С. 888.

Conformation of Chains of Chitin-Glucane Complex according to Small-Angle Neutron Scattering Data

G. A. Evmenenko*, V. L. Alekseev*, L. A. Nud'ga**, and V. A. Petrova**

* Konstantinov Institute of Nuclear Physics, Russian Academy of Sciences,
Gatchina, 188350 Russia

** Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences,
Bol'shoi pr. 31, St. Petersburg, 199004 Russia

Abstract—Small-angle scattering of thermal neutrons (SANS) was used to study the conformation of single chains of a partially deuterated chitin–glucane complex introduced in amorphous films of a normal complex. It is shown that chain conformation are more compact as compared to that of a Gaussian coil. This is probably due to fast coagulation of a polymer in the course of film preparation. Molecular mass distribution determined from SANS data is consistent with the data on dynamic light scattering from chitin–glucane complex in solution.