

УДК 541.64:547.995

## БЕССОЛЕВЫЕ РАСТВОРЫ ХИТОЗАНА: ТЕРМОДИНАМИКА, СТРУКТУРА, БАЛАНС МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИЛ<sup>1</sup>

© 1999 г. В. Л. Алексеев, Г. А. Евмененко

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константина Российской академии наук  
188350 Гатчина, Ленинградская обл.

Поступила в редакцию 04.11.98 г.

Принята в печать 24.12.98 г.

Методом осмотического сжатия в комбинации с малоугловым рассеянием тепловых нейтронов изучены бессолевые растворы двух образцов хитозана. В экспериментах по осмотическому сжатию основной интерес представляло определение осмотических вириальных коэффициентов, второго и более высоких порядков. Проведена оценка баланса межмолекулярных сил на микроскопическом уровне, что позволило получить скейлинговую зависимость между упругим ответом одиночной цепи и ее радиусом инерции. Малоугловые нейтронные измерения структурного фактора показали, что при умеренных концентрациях хитозана наблюдается ближний порядок, который является результатом электростатического отталкивания между макромолекулами.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время полиэлектролиты являются предметом интенсивных теоретических и экспериментальных исследований [1–3]. С практической точки зрения они интересны тем, что принадлежат к материалам, легко реагирующим на различные внешние стимулы, такие как изменения pH, ионной силы, температуры и т.д. Поэтому полиэлектролиты привлекательны для создания систем по направленной доставке лекарственных препаратов [2].

Природные полисахариды являются наиболее подходящими кандидатами для этой цели. Среди них – хитозан, полностью или частично деацетилированное производное хитина с прекрасными хелатирующими свойствами, благодаря наличию реакционноспособных аминогрупп [4, 5]. Различные пептиды, в том числе иммуномодуляторы, могут быть химически присоединены к хитозану через аминогруппы [6]. Кроме того, хитозан – это биосовместимый и биоразрушающий полимер, который может быть использован для биомеди-

цинских целей *per os*, в частности, как переносчик для лекарственных средств. Следует подчеркнуть, что природным полимерам благодаря их биосовместимости в целом уделяется в последнее время значительное внимание при создании носителей для лекарственных средств [7].

Несмотря на многообразные применения хитозана, до настоящего времени изучению межмолекулярных взаимодействий в его растворах уделялось недостаточное внимание. Знание же межмолекулярных взаимодействий – необходимая предпосылка для дальнейшего расширения областей применения хитозана.

Несмотря на то, что литература по полиэлектролитам очень обширна, существует разрыв между экспериментальными и теоретическими исследованиями. Детальные аналитические теории разрабатываются обычно для идеализированных систем, которые довольно редко встречаются в эксперименте. Основная трудность состоит в том, чтобы установить, каким образом структурные параметры макромолекул связаны с термодинамическими свойствами их растворов. Хотя в настоящее время разработан ряд теоретических подходов для описания растворов полиэлектролитов [8–11], следует все же признать, что не существует статистической теории, полностью согласующейся с

<sup>1</sup> Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (коды проектов 96-03-33852а и 96-15-96775) и Российской федеральной научно-технической программы "Нейтронные исследования вещества".

Таблица 1. Характеристики образцов хитозана

Образец фирм	$M_w$	$M_n$	$M_w/M_n$	Степень деацетилирования
"Aber"	$1.26 \times 10^4$	$4.5 \times 10^3$	2.78	0.85
"Sigma"	$4 \times 10^5$	$1.06 \times 10^4$	3.8	0.96

экспериментом. Наиболее часто используется скейлинговый подход [12–15], который не требует детальной информации о том, каким образом изменяются микроскопические структурные параметры сетки в процессе набухания.

Экспериментальная связь между термодинамическими и структурными параметрами полизелектролитного раствора может быть установлена в экспериментах по осмотическому сжатию таких растворов в комбинации с методом малоуглового рассеяния. Это сочетание термодинамического и структурного подхода, предложенного в работе [16], оказалось весьма информативным при изучении разнообразных систем, набухающих или растворенных в воде, таких как фосфолипидные бислои [16], спирали ДНК [17], полизелектролитные растворы и гели [13, 14, 18], смеси колloidных частиц с ПАВ [19] и т.д.

Термодинамический метод состоит в измерении зависимости осмотического давления от концентрации полимера в растворе, в то время как структурные исследования основаны на измерении расстояний между макромолекулами на каждой стадии удаления воды, что можно сделать методом малоуглового нейтронного рассеяния. Из таких экспериментов определяется уравнение состояния системы, т.е. зависимость осмотического давления от размеров макромолекул. Далее можно определить силы, действующие между макромолекулами, их величину и диапазон действия.

Основная задача настоящей работы – изучение термодинамики и баланса межмолекулярных сил для бессолевых растворов хитозана с использованием методики осмотического сжатия в комбинации с малоугловым рассеянием нейtronов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали два образца хитозана краба фирм "Sigma" (США) и "Aber" (Франция). Их характеристики приведены в табл. 1.

ММ образцов определяли методом ГПХ на хроматографе фирмы "Knauer" с RI-детектором и малоугловым лазерным детектором KMX-6 ("Chro-

matix"). Использовали две колонки TSK-G6000 PW и TSK-G5000 PW. Элюентом служил буфер состава 0.23 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и 0.15 М  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (рН 4.5). В табл. 1 представлены значения ММ по данным ГПХ. Степень деацетилирования определяли методом титрования по методике [20].

Готовили растворы хитозана (3 мас. %) в водных растворах, содержащих 2% уксусной кислоты. Растворы помещали в диализные мешки ("Visking",  $M_w = 1.2 \times 10^4$ ), которые погружали в растворы ПЭО ("Fluka",  $M = 3.5 \times 10^4$ ) с различной концентрацией последнего. Раствор полимера снаружи диализного мешка должен быть в достаточном избытке или периодически заменяться на свежий, чтобы обеспечить условие постоянства его химической активности в процессе уравновешивания. Уравновешивание осмотических давлений по обе стороны диализных мешков проводили при 20°C, и оно достигалось через две недели. После этого часть образцов использовали для сушки в вакуумной печке при 50°C для определения концентрации хитозана, а другую часть образцов – в малоугловых нейтронных экспериментах.

Для увеличения соотношения сигнал/шум в нейтронных экспериментах применяли тяжелую воду. Для поддержания постоянства рН и ионной силы в процессе уравновешивания осмотических давлений, в растворы ПЭО добавляли 0.35 М уксусную кислоту. Известно, что осмотическое давление  $\Pi$  растворов ПЭО не сильно изменяется при умеренной ионной силе, и может быть рассчитано по формуле [21]

$$\lg \Pi = 1.61 + 2.72w^{0.21}, \quad (1)$$

где  $\Pi$  выражено в дин/см<sup>2</sup> (1 Па = 10 дин/см<sup>2</sup>),  $w$  – мас. % ПЭО. Для растворов ПЭО с концентрацией меньше 10 мас. %, растворы хитозана набухали, а при более высокой концентрации ПЭО наблюдали дегидратацию растворов хитозана (осмотическое сжатие).

Для увеличения точности экспериментов по осмотическому сжатию необходимо иметь образцы, из которых удалены все низкомолекулярные примеси, поэтому предварительно проводили диализ образцов относительно бидистиллированной воды с добавкой 0.35 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Было замечено, что образец фирмы "Aber" содержал низкомолекулярные примеси, которые проходили через мембранные и давали слабое желто-коричневое окрашивание растворов снаружи диализных мешков. Природу этих примесей в данной работе не изучали, однако, предварительно проводили предиализ для очистки образцов. После этого образцы высушивали при 50°C в вакуумной сушилке

и затем использовали в экспериментах по осмотическому сжатию. Проникаемые через мембрану примеси не были замечены для образца хитозана фирмы "Sigma", и этот образец применяли без предварительного анализа.

Малоугловые нейтронные измерения выполняли на дифрактометре "Мембрана-2" (Петербургский институт ядерной физики РАН). Средняя длина волны падающих на образец нейтронов составляла 3.0 Å, полуширина спектра 0.35.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

### *Результаты экспериментов по осмотическому сжатию*

Результаты осмотических экспериментов представлены на рис. 1. Феноменологически уравнение состояния, т.е. зависимость  $\Pi(c)$ , для более высокомолекулярного хитозана может быть описана следующим образом. Имеется участок, где осмотическое давление с повышением концентрации увеличивается линейно, затем давление слабо растет, что соответствует образованию физического геля хитозана – полимерные цепи начинают прогрессивно перекрываться. Наконец, наблюдается тенденция к резкому подъему осмотического давления; это свидетельствует о том, что работа по удалению воды из набухших в воде цепей хитозана довольно высока из-за сильного электростатического отталкивания между макромолекулами.

Для более низкомолекулярного хитозана фирмы "Aber" первые два участка те же, но затем вместо резкого подъема осмотического давления была обнаружена преципитация хитозана в диализных мешках. Последнее обстоятельство указывает на то, что работа по удалению воды была достаточна, чтобы преодолеть электростатическое отталкивание между макромолекулами, приводя их к осаждению из раствора.

Концентрационную зависимость осмотического давления обычно выражают в виде вириального разложения [22, 23]

$$\Pi = RT(A_1c + A_2c^2 + A_3c^3 + \dots), \quad (2)$$

где  $A_i$  – вириальные коэффициенты,  $c$  – концентрация в  $\text{г}/\text{см}^3$ .

Определение вириальных коэффициентов из выражения (2) может быть сделано по зависимости  $\Pi/c$  от  $c$ . Тогда  $A_1$  и  $A_2$  определяются как пересечение и наклон графика  $\Pi/c$  от  $c$  соответственно. Продолжение данной процедуры позволяет определить вириальные коэффициенты более высокого порядка [22].

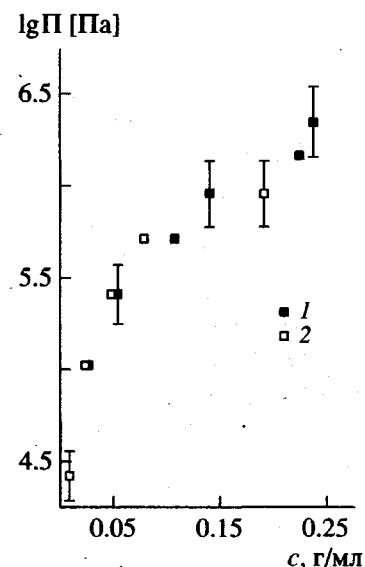


Рис. 1. Зависимости осмотического давления водных растворов хитозана фирм "Sigma" (1) и "Aber" (2) в 2%-ной уксусной кислоте от концентрации, определенные методом осмотического сжатия.

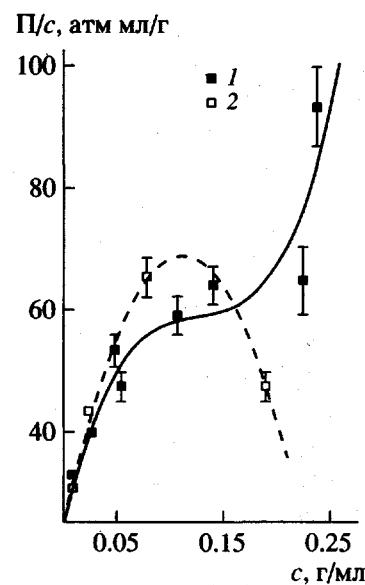


Рис. 2. Приведенное осмотическое давление в зависимости от концентрации растворов хитозана фирм "Sigma" (1) и "Aber" (2). Сплошная линия – подгонка полиномом третьей степени, точечная линия – подгонка полиномом второй степени.

Точное определение второго вириального коэффициента возможно только для очень разбавленных растворов (концентрация порядка  $0.01 \text{ г}/\text{см}^3$ ). В настоящей работе вириальные коэффициенты были определены путем подгонки полиномом

(уравнение (2)) экспериментально измеренных зависимостей осмотического давления во всем диапазоне измеренных концентраций (рис. 2). Такая процедура менее точная по сравнению с той, что описана в работе [22]; тем не менее, на ее основании можно сравнить два образца хитозана.

Значение  $A_2$ , полученное указанным методом, составляет  $2.9 \times 10^{-3} \pm 0.3 \text{ м}^3 \text{ моль/кг}^2$  для высокомолекулярного образца и  $3.3 \times 10^{-3} \pm 0.1 \text{ м}^3 \text{ моль/кг}^2$  для низкомолекулярного хитозана. Третий вириальный коэффициент для обоих образцов отрицательны, и, наконец, четвертый вириальный коэффициент для низкомолекулярного хитозана равен нулю. Это подтверждает хорошо установленную экспериментально тенденцию, состоящую в том, что растворы более высокомолекулярных полимеров являются менее идеальными.

Полученные для второго вириального коэффициента значения согласуются с полученными ранее данными для хитозана ( $M_w = 4.4 \times 10^5$ ,  $M_w/M_n = 1.8$ ) в водных растворах 0.2 M NaCl ( $A_2 = -5.8 \times 10^{-3} \text{ м}^3 \text{ моль/кг}^2$ ) [24].

Хорошо установленным экспериментальным фактом является также зависимость второго вириального коэффициента от ММ полимера. При этом второй вириальный коэффициент уменьшается с увеличением ММ [22, 25]. Эта зависимость может быть записана в следующем виде [25]:

$$A_2 = (2/3)^{5/2} (\pi N_A / M_0^{3/2}) (\alpha^3 \beta^3 \gamma^3 / M_n^{1/2}), \quad (3)$$

где  $M_0$  и  $M_n$  – ММ растворителя и полимера соответственно;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  – эмпирические параметры, причем  $\gamma$  связывает радиус инерции цепи  $R_g$  и радиус эквивалентной твердой сферы  $\sigma$  как  $\sigma = \gamma R_g$ . Согласно работе [25], формула (3) предсказывает зависимость  $A_2$  от ММ в виде  $A_2 \sim (1/M_n)^{0.05-0.30}$ . Для двух образцов хитозана второй вириальный коэффициент пропорционален  $M_n^{0.16}$ .

Полидисперсность также оказывает влияние на величину второго вириального коэффициента:  $A_2$  уменьшается с увеличением полидисперсности. Отметим, что полидисперсность образца фирмы "Sigma" выше, чем образца фирмы "Aber". Качественно этот факт объясняется тем, что для макромолекул различного размера может быть достигнута более плотная упаковка в растворе по мере удаления воды, чем для макромолекул одинакового размера [22].

### Результаты малоугловых нейтронных измерений

Структура растворов хитозана была изучена с помощью малоуглового нейтронного рассеяния. Общая формула для интенсивности рассеяния от системы монодисперсных частиц в растворе  $I(Q)$  может быть записана в виде [26, 27]

$$I(Q) = (\rho_p - \rho_s)^2 N V^2 P(Q) S(Q), \quad (4)$$

где  $Q$  – величина вектора рассеяния,  $\rho_p$  и  $\rho_s$  – плотности амплитуд рассеяния полимера и растворителя соответственно, причем их разность называется контрастом,  $N$  – число рассеивающих частиц,  $V$  – их объем,  $P(Q)$  – форм-фактор рассеяния отдельной полимерной цепи и  $S(Q)$  – структурный фактор, описывающий интерференцию лучей, рассеянных от различных полимерных молекул.  $S(Q)$ , таким образом, учитывает межчастичную интерференцию.

В разбавленных растворах невзаимодействующих полимерных молекул интерференция лучей, рассеянных различными полимерными молекулами, гасится так, что  $S(Q) = 1$ . Итак, в разбавленных растворах, когда межчастичная интерференция мала, можно определить форм-фактор рассеяния отдельной полимерной цепи. Для полуразбавленных полимерных растворов при малых величинах вектора рассеяния, форм-фактор рассеяния отдельной полимерной цепи можно аппроксимировать функцией Орнштейна–Цернике [12]. Классическим методом определения радиуса инерции из форм-фактора  $P(Q)$  является построение графика Зимма

$$P^{-1}(Q) = 1 + Q^2 R_g^2 / 3 \quad (5)$$

Интенсивность рассеяния также может быть выражена через такое макроскопическое свойство, как осмотическая сжимаемость раствора [27]

$$I(Q) = \Delta \rho^2 S(Q) \frac{kT\phi}{\partial \Pi / \partial \phi} \quad (6)$$

( $\Delta \rho$  – контраст,  $\phi$  – объемная доля полимера).

Считается, что межчастичная интерференция пренебрежимо мала для концентрации полимера в растворе меньшей, чем  $c^*$ , которая пропорциональна  $M/R_g^3$ . Значения  $c^*$ , определяющие границу между разбавленным и полуразбавленным режимами полимерного раствора очень малы и вряд ли могут быть достигнуты в малоугловом нейтронном эксперименте, во всяком случае при современном состоянии инструментальных возможностей. Для увеличения соотношения сигнал/шум, малоугловые нейтронные эксперименты

проводят для полуразбавленного режима, где необходимо учитывать межчастичную интерференцию. Это можно сделать, например, с помощью специфического дейтерирования макромолекул, что позволяет разделить  $P(Q)$  и  $S(Q)$  и наблюдать отдельные дейтерированные макромолекулы, статистически распределенные среди протонированных [27–29].

Верхняя оценка концентрации перекрывания полимерных цепей  $c^*$ , основанная на хорошо известной формуле  $c^* = M_w/(N_A 4\pi R_g^3/3)$ , составляет  $\sim 0.2 \times 10^{-2}$  г/мл для хитозана фирмы "Aber" ( $R_g \sim 150 \text{ \AA}$ ) и  $0.2 \times 10^{-1}$  г/мл для хитозана фирмы "Sigma" ( $R_g \sim 200 \text{ \AA}$ ). Поскольку специфически дейтерированные образцы хитозана пока недоступны, в настоящей работе для увеличения интенсивности рассеяния малоугловые измерения были выполнены для полуразбавленного режима полимерного раствора. В этом случае межчастичная интерференция приводит к занижению интенсивности рассеяния в области очень малых векторов рассеяния при  $Q \rightarrow 0$ . Тогда значения радиусов инерции, полученные из графика Гинье, могут рассматриваться как приближенные, дающие только верхнюю оценку данной величины. Эти значения приведены в табл. 2.

Наклон зависимости  $R_g$  от концентрации в двойном логарифмическом масштабе (рис. 3), определенный с использованием метода наименьших квадратов, равен  $-1/4$ . Такая скейлинговая зависимость ранее была установлена для других синтетических полиэлектролитов в бессолевых растворах [30]. Таким образом, можно полагать, что несмотря на то, что молекулярные размеры цепей хитозана были определены в полуразбавленном режиме, они все же заслуживают доверия. По-видимому, растворы полиэлектролитов из-за электростатического отталкивания цепей допускают в определенном интервале увеличение концентрации полимера. Полученная скейлинговая зависимость была использована для оценки  $R_g$  при остальных значениях концентрации (табл. 2 и 3), определенных в экспериментах по осмотическому сжатию.

#### Упорядочение в концентрированных растворах

На зависимости межчастичного структурного фактора  $S(Q)$  может существовать пик, что указывает на преимущественное пространственное расположение цепей в растворе. Методологию оп-

Таблица 2. Молекулярные размеры хитозана фирм "Aber" и "Sigma"

$c, \%$	$c, \text{моль/л}$	$R_g, \text{\AA}$	$\langle h^2 \rangle, \text{\AA}^2$
Хитозан фирмы "Aber"			
2.4	0.17	$150 \pm 5^*$	$368 \pm 12^*$
3.0	0.21	$148 \pm 6^*$	$363 \pm 14^*$
4.8	0.34	$133 \pm 7^*$	$326 \pm 17^*$
7.8	0.55	114	279
19.1	1.34	89	218
Хитозан фирмы "Sigma"			
2.6	0.22	$219 \pm 6^*$	$536 \pm 15^*$
3.0	0.26	$208 \pm 8^*$	$509 \pm 20^*$
5.0	0.43	$187 \pm 8^*$	$458 \pm 20^*$
5.4	0.47	184	451
10.7	0.92	158	387
14.0	1.2	148	363
22.4	1.9	133	326
23.7	2.05	130	318

Примечание.  $c$  – концентрация (ММ мономерного звена для образца хитозана фирмы "Aber", который использовался в хлоридратной форме, равна 197 г/моль, для образца хитозана фирмы "Sigma" 161 г/моль);  $R_g$  – радиус инерции,  $\langle h^2 \rangle$  – среднеквадратичное расстояние между концами цепи.

\* Экспериментально измеренные значения, остальные значения оценены из скейлинговой зависимости (пояснения в тексте).

ределения структурного фактора хорошо разработана для твердых сферических частиц [31] и мицелл [32].

Структурный фактор монодисперсной системы коллоидных частиц может быть определен с помощью следующей процедуры [31]. Сначала измеряется интенсивность рассеяния для разбавленной системы  $I_1(Q)$ , где парными корреляциями в расположении рассеивающих частиц можно пренебречь, т.е.  $S(Q) \sim 1$ . В этом случае  $I_1(Q) \sim N_1 V^2 P(Q)$ . Затем измеряется интенсивность рассеяния для концентрированной дисперсии  $I_2$ , которая пропорциональна  $I_2(Q) \sim N_2 V^2 P(Q) S(Q)$ . Отношение второго измерения к первому пропорционально  $(N_2/N_1)S(Q)$ .

Такую процедуру широко используют для твердых сферических частиц, когда есть уверенность,

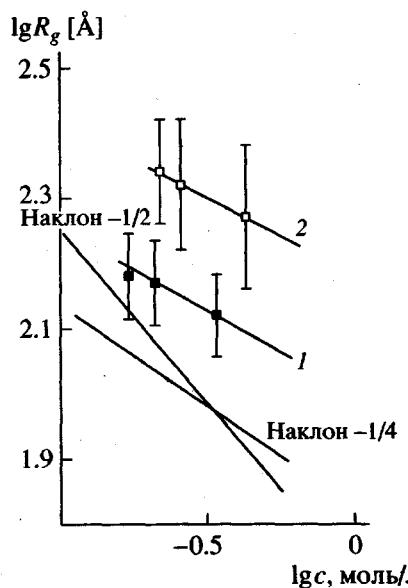


Рис. 3. Скейлинговые зависимости радиуса инерции от концентрации для образцов хитозана фирм "Aber" (1) и "Sigma" (2).

что  $P(Q)$  не изменяется с увеличением числа рассеивающих частиц. Она была использована и для заряженных мицел [32–34]. В литературе также описаны попытки измерения структурного фактора для звездообразных полимеров [35] на осно-

ве описанного выше метода, который иногда называют "коллоидным подходом" [35].

Для полимерных систем основная неопределенность в определении структурного фактора на основе коллоидного подхода связана с тем, что форм-фактор отдельной цепи  $P(Q)$  изменяется при концентрациях выше уровня перекрывания полимерных клубков. В этом случае основной эффект связан со сжатием полимерных клубков. Предполагается, что такой эффект не должен изменять форму структурного фактора. Аргументы в пользу данного предположения были приведены в работе [35]. Действительно, форм-фактор отдельных цепей является монотонно спадающей функцией без каких-либо максимумов формы. Поэтому эффект сжатия полимерных цепей в процессе удаления растворителя в экспериментах по осмотическому сжатию будет приводить только к ошибкам в нормализации  $S(Q)$ . В настоящей работе такую нормализацию не проводили. На рис. 4 и 5 представлены структурные факторы для образцов хитозана, демонстрирующие пространственное упорядочение полимерных цепей хитозана в умеренно концентрированных растворах. При этом полидисперсность образцов приводит к "размытию" структурных пиков. Очевидно, что упорядочение является результатом тонкого баланса сил между макромолекулами, причем электростатическое отталкивание играет в этом

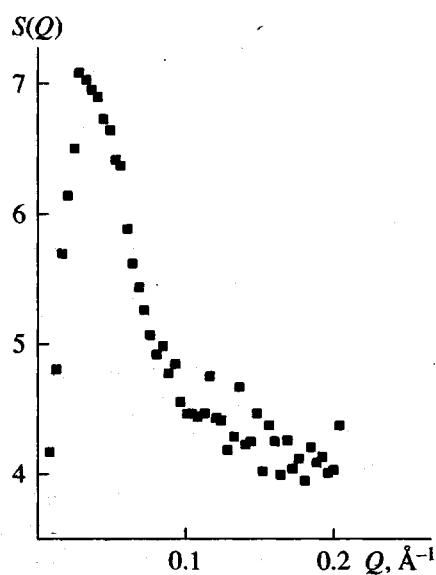


Рис. 4. Структурный фактор для раствора хитозана фирмы "Sigma" по данным малоуглового нейтронного рассеяния,  $S(Q) \sim I_2(Q)/I_1(Q)$ , где  $I_1(Q)$  и  $I_2(Q)$  – интенсивность рассеяния нейтронов от раствора хитозана с концентрацией 3 и 14 мас. % соответственно. Нормализацию структурного фактора не проводили.

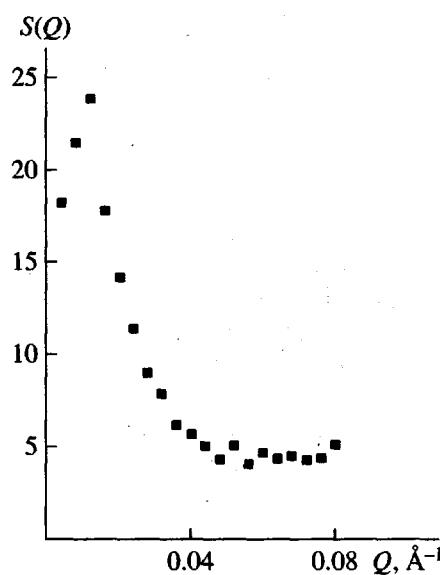


Рис. 5. Структурный фактор для раствора хитозана фирмы "Aber",  $S(Q) \sim I_2(Q)/I_1(Q)$ , где  $I_1(Q)$  и  $I_2(Q)$  – интенсивность рассеяния нейтронов от раствора хитозана с концентрацией 4.8 и 19 мас. % соответственно. Нормализацию структурного фактора не проводили.

случае доминирующую роль. Пространственное упорядочение возникает как результат минимизации такого отталкивания.

## БАЛАНС СИЛ

### *Макроскопический уровень*

Баланс сил, действующих между макромолекулами хитозана в растворе, может быть оценен как на макроскопическом, так и на микроскопическом уровнях. На макроскопическом уровне этот баланс может быть записан как [18]

$$\Pi_{sw} = \Pi_{osm} - \Pi_{el}, \quad (7)$$

где  $\Pi_{sw}$  представляет собой осмотическое давление, измеряемое в экспериментах по осмотическому сжатию,  $\Pi_{osm}$  – вклад в давление, связанный с эффектом полиэлектролитного набухания, и  $\Pi_{el}$  учитывает вклад эластического напряжения цепей. Для разделения двух вкладов наиболее часто используют скейлинговый подход [13, 14, 18, 36]. Для сшитых гидрогелей было предложено следующее соотношение для  $\Pi_{sw}$  [37, 38]:

$$\Pi_{sw} = \Pi_{osm} - \Pi_{el} = A_{osm}c^n - B_{el}c^m, \quad (8)$$

причем,  $n = 2.25$  или  $3.0$  [38] и  $m = 1/3$  [39]. Таким образом,  $\Pi_{el} \sim c^{1/3}$ , что является прямым результатом теории Флори–Ренера [40]. В некоторых других моделях предсказывается, что  $\Pi_{el} \sim c^{5/6}$  [41, 42]. Однако было показано [43], что при слабом растяжении (сжатии) полиэлектролитной сетки, степенная зависимость модуля упругости от концентрации лучше согласуется с классической теорией Флори–Ренера, чем с моделью [41, 42].

Таким образом, эксперименты по осмотическому сжатию полиэлектролитных растворов в комбинации с измерением макроскопического модуля упругости позволяют разделить различные вклады в  $\Pi_{sw}$ . В настоящей работе измерения модуля упругости не проводили, и баланс сил был оценен на микроскопическом уровне.

### *Микроскопический уровень*

Методика осмотического сжатия позволяет определить незначительные изменения активности воды, которые не поддаются определению многими другими методами. Мольная работа  $-\mu_w$  (Дж/моль) по переносу воды из растворов хитоза-

на в процессе осмотического сжатия может быть рассчитана по формуле [21]

$$-\mu_w = \Pi V_w = \Pi(\text{Па}) \times 18 \times 10^{-6} (\text{м}^3), \quad (9)$$

где  $V_w$  – мольный объем воды. Результаты расчета приведены ниже.

[ПЭО], мас. %	5	10	15	20	25	28	30	35
$-\mu_w$ , Дж/моль	0.48	1.89	4.66	9.29	16.3	21.9	26.4	40.2

Для полимерного раствора работа затрачивается на сжатие и сближение полимерных цепей. Поскольку в растворах хитозана не обнаружено образования каких-либо упорядоченных мезофаз, эти два эффекта трудно различить экспериментально. Однако можно сделать упрощение и предположить, что для концентраций, превышающих уровень перекрывания полимерных клубков, большая часть работы идет на сжатие полимерных клубков. Тогда можно получить верхнюю оценку силы  $F$ , сжимающей отдельные молекулы хитозана по мере удаления воды [16, 17]

$$F = -\Pi_{sw}S, \quad (10)$$

где  $S$  – площадь поверхности эквивалентной сферы, занятой отдельной молекулой хитозана, при  $S = 4\pi(1.29 R_g^2)$ . Результаты такой оценки даны в табл. 3.

При условии достижения термодинамического равновесия по обе стороны мембранны для диализа, приложенное осмотическое сжатие в точности равно балансу различных сил, действующих между макромолекулами. Этот баланс в самом общем виде может быть записан в виде

$$-F = F_{es} + F_h - F_w - F_{el} \quad (11)$$

Здесь  $F_{es}$ ,  $F_h$ ,  $F_w$  и  $F_{el}$  – вклады электростатических, гидратационных, ван-дер-ваальсовых и упругих сил. Рассматривая баланс сил (11), можно сделать одно обоснованное упрощение, а именно, принять, что  $F_h \approx F_w$  [17]. Действительно, силы обоих типов доминируют только при расстояниях меньше  $< 25 \text{ \AA}$ . В экспериментах по осмотическому сжатию такие расстояния между макромолекулами, по-видимому, были достигнуты только для преципитированных молекул хитозана фирмы "Aver" при удалении более 80% первоначально содержащейся в образце воды. В остальных случаях межчастичные расстояния, определенные из позиций структурных пиков (рис. 4 и 5) как

**Таблица 3.** Сила осмотического сжатия  $F$  и сила электростатического отталкивания  $F_{ES}$  на одну макромолекулу хитозана фирм "Sigma" и "Aber"

Концентрация хитозана, %	$\Pi_{SW}$ , Па	$F \times 10^{-10}$ , Н	$R^* \times 10^{-8}$ , м	$(\delta G_e / \delta n) \times 10^{-18}$ , Дж	$F_{ES} \times 10^{-10}$ , Н
Хитозан фирмы "Sigma"					
2.6	104952	10.56	2.83	0.300	0.056
3.0	—	—	2.68	0.302	0.059
5.0	—	—	2.41	0.322	0.070
5.4	258821	18.42	2.38	0.324	0.072
10.7	516416	27.01	2.04	0.350	0.090
14.0	905733	41.52	1.91	0.362	0.100
22.4	1465548	54.48	1.72	0.384	0.118
23.7	2233572	79.22	1.68	0.389	0.122
Хитозан фирмы "Aber"					
2.4	104952	4.96	1.94	0.285	0.077
4.8	258821	9.62	1.72	0.303	0.093
7.8	516416	14.02	1.47	0.297	0.106
19.1	905733	15.05	1.15	0.300	0.138

\* Радиус эквивалентной сферы  $R = 1.29R_g$ .

$d = 2\pi/Q$ , превышают 25 Å. Таким образом, баланс сил записывался следующим образом:

$$-F = F_{ES} - F_{EL} \quad (12)$$

Сила электростатического отталкивания может быть оценена, если известна электрическая работа по ионизации одной макромолекулы  $\delta G_e$ , которую можно рассчитать по формуле [44]

$$(\delta G_e / \delta n)_{k,h} = ne^2 / 2\pi\epsilon\epsilon_0 h (1 + 6h/kN_A A^2), \quad (13)$$

где  $n$  – число ионизованных групп,  $e$  – элементарный электрический заряд,  $h$  – среднеквадратичное расстояние между концами цепи (приведены в табл. 2 и 3),  $k$  – константа Дебая,  $A$  – длина мономерного звена,  $N_A$  – число Авогадро,  $\epsilon$  – диэлектрическая проницаемость среды,  $\epsilon_0$  – диэлектрическая проницаемость вакуума.

Степень ионизации двух исследованных образцов хитозана в кислых средах различна, так как в настоящей работе их использовали в различных формах. Хитозан фирмы "Sigma" применяли в виде аминосахара, в то время как хитозан фирмы "Aber" – в виде хлоргидрата  $-R(NH_2 \cdot HCl)-$ , где  $R$  обозначает глюкановое кольцо. В кислых средах хитозан фирмы "Aber" практически полностью ионизован, в то время как верхняя оценка для степени ионизации хитозана фирмы "Sigma" составляет ~50% [4]. Таким образом, для хитозана фирмы "Aber" число ионизированных групп  $n \approx (M_w/M_{\text{монаомер}})\alpha = 54$ , где  $M_{\text{монаомер}} = 197.5$  г/моль,  $\alpha$  – степень деацетилирования, и для хитозана "Sigma"  $n = 1192$ , где  $M_{\text{монаомер}} = 161$  г/моль. Эти значения уменьшаются с ростом концентрации. В первом приближении будем рассматривать их как постоянные. Возможно, что в ограниченном концентрационном диапазоне это упрощение недалеко от истины. Значения  $(\delta G_e / \delta n)_{k,h}$  по формуле (13) были рассчитаны при следующих параметрах:  $A = 10^{-9}$  м,  $k^{-1} = 96.2$  Å,  $\epsilon = 78.7$ ,  $\epsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12}$  Кл<sup>2</sup>/Н м<sup>2</sup>,  $e = 1.602 \times 10^{-19}$  Кл. Из полученных значений работы ионизации была рассчитана  $F_{ES}$  на одну макромолекулу для данного значения среднеквадратичного расстояния между концами цепи. Значения  $F_{ES}$  также приведены в табл. 5 и 6.

Из уравнения (12) можно оценить силу упругого сжатия (растяжения)  $F_{EL}$ , приходящуюся на одну макромолекулу. На рис. 6 представлена зависимость  $R_g$  от  $F_{EL}$  в двойном логарифмическом масштабе. При этом  $R_g \sim F_{EL}^{-1/3}$ , что хорошо согласуется с теоретическими предсказаниями относительно упругого поведения идеальной одиночной полимерной цепи [12, 40]. Видно также, что последняя точка для низкомолекулярного хитозана не подчиняется этой зависимости. Указанная точка соответствует высокой степени дегидратации (сжатия), что могло привести к значительному уменьшению степени ионизации, которое было достаточным для преодоления электростатического отталкивания между макромолекулами, их сближению на расстояния порядка 25 Å, где начинают доминировать ван-дер-ваальсовы силы притяжения, и выпадению макромолекул в осадок. Эти наблюдения хорошо согласуются с результатами измерений межмолекулярных сил между слоями хитозана на поверхности слюды, проведенные с помощью установки для измерения поверхностных сил [45].

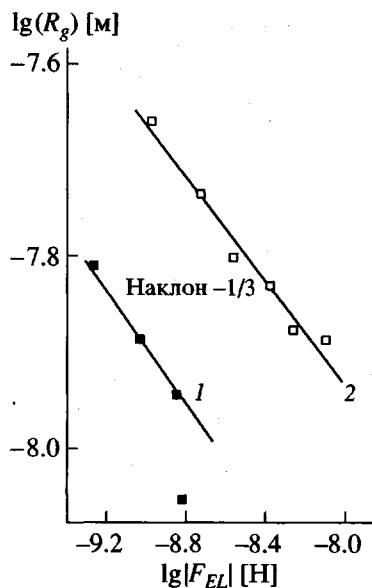


Рис. 6. Скейлинговые зависимости радиуса инерции  $R_g$  от силы упругого сжатия (растяжения)  $F_{EL}$  одиночной цепи для хитозана фирм "Aber" (1) и "Sigma" (2).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе методом осмотического сжатия в комбинации с малоугловым рассеянием нейтронов изучены бессолевые растворы двух образцов хитозана. Осмотическое сжатие позволило исследовать более широкий диапазон концентраций хитозана, чем это достигается в обычной осмометрии. Кроме того, получение растворов хитозана с концентрацией более 10 мас. % представляет непреодолимую трудность, особенно для высокомолекулярных образцов. Однако с помощью осмотического сжатия такие концентрации могут быть достигнуты.

Данные по осмотическому сжатию показывают, что бессолевые растворы хитозана подчиняются основным тенденциям, установленным в настоящее время для других полиэлектролитных систем. Второй вириальный коэффициент растворов хитозана в 2%-ной уксусной кислоте зависит от ММ как  $A_2 \sim 1/M_n^{0.16 \pm 0.02}$ .

Данные по малоугловому рассеянию не обнаруживают образования каких-либо упорядоченных мезофаз в исследованном диапазоне концентраций в отличие от других полисахаридов, например ксантана [46]. Однако растворы хитозана не являются полностью неупорядоченными; при умеренных концентрациях обнаруживается упорядочение. Наличие пространственных корреляций предполагает, что электростатическое взаи-

модействие между цепями играет доминирующую роль, в то время как притяжение редко выступает на сцену межмолекулярных сил для полиэлектролитов. Притяжение может доминировать только при высокой степени дегидратации (>80%) образцов хитозана, что эквивалентно уменьшению степени ионизации, достигаемой с помощью обычно используемых экспериментальных приемов, таких как изменения pH или добавления солей.

Комбинация осмотического сжатия и малоуглового рассеяния позволила оценить баланс сил на молекулярном уровне. На примере макромолекул хитозана экспериментально показано, что скейлинговая зависимость упругого отклика полиэлектролитной цепи от ее радиуса инерции  $R_g \sim F_{EL}^{-1/3}$  в исследованном диапазоне концентраций подчиняется теоретически предсказанному для идеальной цепи. Вместе с тем наличие точек, выпадающих из этой зависимости, подразумевает, что предположение о полной ионизации макромолекул хитозана фирмы "Aber" не вполне обосновано. Это может также свидетельствовать о том, что при высоких степенях осмотического сжатия достигается режим предельно сильных сжатий (растяжений). В данном случае теоретические модели предсказывают мультискейлинговые зависимости между упругим модулем и концентрацией полимера [41, 42].

Мы признательны P. Lixon из CE-Saclay (France) любезно сделавшей для нас ГПХ образцов хитозана.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Faraday Discuss. 1995. № 101. (Выпуск полностью посвящен гелям, включая полиэлектролитные гидрогели).
2. Program Booklet 36 Mycosymposium "High-Swelling Gels". Prague, 1995.
3. Bastide J. // Principal Properties of Gels / Ed. by Cotton-Addad J.P. New York: Wiley, 1995.
4. Muzzarelli R.A.A. Natural Chelating Polymers. Oxford: Pergamon Press, 1973.
5. Chitin and Chitosan / Ed. by Skjak-Braek G., Anthonissen T., Sanford P. London: Elsevier, 1989.
6. Byung-Jo Ha, Ok-Sub Lee, Yoon-Sik Lee // J. Ind. Eng. Chem. 1995. V. 1. № 1. P. 57.
7. Kaplan D.M., Wiley B.J., Mayer J.M., Arcidiacono S., Keith J., Lombardi S.J., Ball D., Allen A.L. // Biomedical Polymers / Ed. by Shalaby S.W. New York: Hanser Publ., 1994. P. 189.

8. *De Gennes P.G., Pincus P., Velasco R.M., Brochard F.* // *J. Phys. France.* 1976. V. 37. № 12. P. 1461.
9. *Khokhlov A.R.* // *J. Phys., Math Gen.* 1980. V. 13. № 3. P. 979.
10. *Joanny J.F., Leibler L.* // *J. phys. II, France.* 1990. V. 51. № 6. P. 545.
11. *Warren P.B.* // *J. phys. II, France.* 1997. V. 7. № 2. P. 343.
12. *De Gennes P.G. Scaling Concepts in Polymer Physics.* Ithaca; New York: Cornell Univ. Press, 1979.
13. *Bastide J., Candau S., Leibler L.* // *Macromolecules.* 1981. V. 14. № 3. P. 719.
14. *Horkay F., Zrinyi M.* // *Macromolecules.* 1982. V. 15. № 5. P. 1306.
15. *Басилевская В.В., Хохлов А.Р.* // *Высокомолек. соед.* А. 1986. Т. 28. № 2. С. 316.
16. *Parsegian V.A., Fuller N., Rand R.P.* // *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 1979. V. 76. № 6. P. 2750.
17. *Rau D.C., Lee B., Parsegian V.A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 1984. V. 81. № 9. P. 2621.
18. *Cohen Y., Ramon O., Kopelman J., Mizrahi S.J.* // *J. Polym. Sci., Polym. Phys.* 1992. V. 30. № 9. P. 1055.
19. *Alexeev V.L., Illekti P., Persello J., Lambard J., Gulik T., Cabane B.* // *Langmuir.* 1996. V. 12. № 10. P. 2392.
20. *Sannon T., Kurita K., Ogura K., Iwakura Y.* // *Polymer.* 1978. V. 19. № 3. P. 458.
21. *Parsegian V.A., Rand R.P., Fuller N.L., Rau D.C.* // *Methods in Enzymology.* New York: Press, 1986. V. 127. Pt. 0. P. 400.
22. *Vink H.* // *Eur. Polym. J.* 1971. V. 7. № 9. P. 1411.
23. *Тагер А.А. Физикохимия полимеров.* М.: Химия, 1978.
24. *Domard A., Rinaudo M.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 1983. V. 5. № 1. P. 49.
25. *Tanford C. Physical Chemistry of Macromolecules.* New York; London: Wiley, 1963.
26. *Свергун Д.И., Фейгин Л.А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние.* М.: Наука, 1986.
27. *Higgins J., Benoit H.C. Polymers and Neutron Scattering.* Oxford: Clarendon Press, 1994.
28. *Williams C., Nierlich M., Cotton J.P., Jannik G., Boue F., Daoud M., Farnoux B., Picot C., de Gennes P.G., Rinaudo M., Moan M., Wolff C.* // *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.* 1979. V. 17. № 6. P. 379.
29. *Boue F., Cotton J.P., Jannik G.* // *J. Chem. Phys.* 1994. V. 101. № 3. P. 2562.
30. *Nierlich M., Boue F., Lapp A., Oberthur R.* // *J. Phys.* 1985. V. 46. № 4. P. 649.
31. *Ottewill R.H.* // *Colloidal Dispersions / Ed. by Goodwin J.W.* London: The Royal Society of Chemistry. 1981. Special Publ. № 43. P. 197.
32. *Hayter J.B., Penfold J.* // *Mol. Phys.* 1981. V. 42. № 1. P. 109.
33. *Cabane B.* // *Surfactant Solutions: New Methods of Investigation. / Ed. by Zana R.* New York: Marcell Dekker, 1987. P. 57.
34. *Chevalier Y., Belloni L., Hayter J.B., Zemb T.* // *J. phys., France.* 1985. V. 46. № 5. P. 749.
35. *Richter D., Jucknischke O., Willner L., Fetters L.J., Lin M., Huang J.S., Roovers J., Toporovski C., Zhan L.L.* // *J. phys. IV, France.* 1993. V. 3. Suppl. JP III. № 12. P. 3.
36. *Gottlieb M.* // *Biological and Synthetic Polymer Networks / Ed. by Kramer O.* New York: Elsevier, 1988.
37. *Geissler E., Hecht A.M., Horkay F., Zrinyi M.* // *Macromolecules.* 1988. V. 21. № 8. P. 2594.
38. *Mallam S., Horkay F., Hecht A.M., Geissler E.* // *Macromolecules.* 1989. V. 22. № 8. P. 3356.
39. *Treloar L.R.G.* // *The Physics of Rubber Elasticity.* Oxford: Clarendon Press, 1975.
40. *Flory P.J. Principles of Polymer Chemistry.* Ithaca; New York: Cornell Univ. Press, 1953.
41. *Dobrynin A.V., Colby R.H., Rubinstein M.* // *Macromolecules.* 1995. V. 28. № 6. P. 1859.
42. *Obukhov S.P., Rubinstein M., Colby R.H.* // *Macromolecules.* 1994. V. 27. № 12. P. 3191.
43. *Nisato G., Skouri R., Schosseler F., Munch J.-P., Candau S.J.* // *Faraday Discuss.* 1995. № 101. P. 133.
44. *Dvorak J., Koryta J., Bohackova V.* *Electrochemie.* Praha: Academia, 1975.
45. *Claesson P.M., Ninham B.W.* // *Langmuir.* 1992. V. 8. № 5. P. 1406.
46. *Milas M., Rinaudo M., Duplessix R., Borsali R., Lindner P.* // *Macromolecules.* 1995. V. 25. № 9. P. 3119.

## Salt-Free Chitosan Solutions: Thermodynamics, Structure, and Intermolecular Force Balance

V. L. Alekseev and G. A. Evmenenko

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

**Abstract**—The salt-free solutions of two chitosan samples were studied by the osmotic stress (OS) technique in combination with the small-angle scattering of thermal neutrons (SANS). The OS experiments provided data on the osmotic virial coefficients of the second and higher orders. The balance of intermolecular forces on a microscopic level was estimated and a scaling relationship between the elastic response of a single chain and its radius of gyration was established. The SANS data on the structural factor show evidence of a short-range order in the chitosan solutions of moderate concentrations, which is due to the electrostatic repulsion between macromolecules.