

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

---

На правах рукописи

**Корчагина Евгения Викторовна**

АГРЕГАЦИЯ ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

В РАЗБАВЛЕННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

02.00.06 – высокомолекулярные соединения,  
физико-математические науки

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва – 2012

Работа выполнена на кафедре физики полимеров и кристаллов Физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель доктор физико-математических наук, профессор  
**Филиппова Ольга Евгеньевна**

Официальные оппоненты доктор физико-математических наук  
**Никитин Лев Николаевич**

доктор химических наук, профессор  
**Зубов Виталий Павлович**

Ведущая организация **Институт синтетических полимерных материалов имени Н.С. Ениколопова РАН**

Защита состоится “15” февраля 2012 года в 15.30 на заседании диссертационного совета Д 501.002.01 в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991 ГСП-1, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 35, конференц-зал Центра коллективного пользования МГУ им. М.В. Ломоносова.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан “14” января 2012 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д.501.002.01,  
кандидат физико-математических наук

Лаптинская Т.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Хитозан является природным полисахаридом, выделяемым, главным образом, из отходов переработки морепродуктов. Этот полимер обладает целым рядом замечательных свойств. Будучи практически единственным поликатионом природного происхождения, он нетоксичен, биосовместим, а также биоразлагаем, что исключает возможность его накопления в организме человека и окружающей среде. Благодаря своим уникальным свойствам хитозан уже нашел широкое применение в медицине, фармацевтической, пищевой, парфюмерно-косметической промышленности, сельском хозяйстве, водоочистке.

Из всех областей применения хитозана на первом месте стоит здравоохранение. Это связано, в частности, с его высокой биологической активностью. Обнаружено, что этот полимер обладает кровоостанавливающими, бактерицидными, фунгицидными, противоопухолевыми, антихолестериновыми и иммуномодулирующими свойствами, также он оказывает успокаивающее действие на центральную нервную систему. Очень перспективным является использование этого полимера в качестве носителя лекарственных средств. Положительный заряд хитозана способствует его проникновению через клеточные мембраны и плотные слои эпителия, обеспечивает хорошую адгезию к слизистым оболочкам и противомикробные свойства. Благодаря своей способности связывать противоположно заряженную ДНК, хитозан также может быть использован для доставки генов.

Хитозану можно придать новые свойства, если химически модифицировать его путем введения различных заместителей. Если в результате такой модификации не затрагиваются основной скелет полимерной цепи и часть функциональных групп, то ценные свойства самого хитозана сохраняются. Полученный таким образом гидрофобно модифицированный (ГМ) хитозан способен образовывать гидрофобные домены, которые могут солюбилизировать плохо растворимые в воде лекарственные вещества. Это расширит возможности применения хитозана в качестве носителя лекарств. Также гидрофобные заместители могут усиливать трансфекцию, что повысит эффективность хитозана при доставке генов.

Большинство применений хитозана связано с его водными растворами, поэтому важно понимать поведение полимера в этой среде. В одних случаях он

образует истинные растворы одиночных макромолекул, в других случаях он агрегирует. Растворы индивидуальных макромолекул важны для того, чтобы охарактеризовать отдельные цепи хитозана, например, определить их молекулярную массу. Но особый интерес вызывают самопроизвольно формирующиеся агрегаты хитозана, перспективные в качестве носителей лекарственных веществ и генов. Зная закономерности образования агрегатов хитозана и факторы, определяющие их размер, можно направленно получать полимерные носители требуемого размера.

Теория, описывающая поведение ассоциирующих полиэлектролитов в разбавленных водных растворах, предсказывает<sup>1</sup>, что стабилизация таких межмолекулярных агрегатов определяется конкуренцией между притяжением ассоциирующих групп и отталкиванием, вызванным заряженными группами на цепи полимера и осмотическим давлением противоионов, препятствующим агрегации. При этом размеры агрегатов зависят от содержания ассоциирующих и заряженных групп. Однако, имеющиеся экспериментальные данные противоречивы. Более того, влияние на агрегацию таких факторов, как длина основной цепи хитозана, концентрация и тип соли, практически не изучены.

**Целью работы** является экспериментальное исследование агрегации макромолекул хитозана и его гидрофобных производных в разбавленных водных растворах, которое включает в себя определение размера агрегатов и числа составляющих их полимерных цепей в зависимости от следующих факторов: длины цепи полимера, содержания гидрофобных групп, концентрации и типа низкомолекулярной соли.

**Научная новизна** работы характеризуется следующими основными результатами:

1. Впервые показано, что размер агрегатов хитозана и ГМ хитозана не зависит от длины составляющих их полимерных цепей.
2. Обнаружено, что число макромолекул, образующих агрегат, увеличивается при уменьшении молекулярной массы полимера.
3. Показано, что агрегаты хитозана и ГМ хитозана представляют собой наногели с более плотным ядром и разреженным поверхностным слоем.

---

<sup>1</sup> Potemkin, I. I.; Vasilevskaya, V. V.; Khokhlov, A. R. *J. Chem. Phys.* **1999**, V. 111, pp. 2809-2817.

4. Найдено, что введение в хитозан гидрофобных групп приводит к увеличению доли агрегированных макромолекул и агрегационного числа.

5. Впервые обнаружено, что при увеличении содержания гидрофобных групп в ГМ хитозане от 2 до 4 мол.% агрегационное число остается постоянным.

6. Показано, что увеличение концентрации соли приводит к поджатию агрегатов и увеличению доли агрегированных макромолекул, при этом агрегационное число не меняется.

7. Обнаружено, что агрегация сильно зависит от типа соли: в присутствии хлорида натрия доля агрегатов намного больше, а агрегационное число меньше, чем в присутствии ацетата натрия.

**Практическая значимость.** Полученные результаты позволяют описать поведение хитозана и его гидрофобных производных в разбавленных водных растворах. Они носят не только фундаментальный характер, но также могут быть использованы для создания на основе этих полимеров носителей лекарственных средств, обладающих требуемыми характеристиками (размер, плотность, структура).

**Апробация работы.** Результаты работы были доложены на Международных конференциях студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2005» (Москва, 2005), «Ломоносов-2006» (Москва, 2006), «Ломоносов-2007» (Москва, 2007), «Ломоносов-2008» (Москва, 2008), «Ломоносов-2009» (Москва, 2009), «Ломоносов-2010» (Москва, 2010), на Малом полимерном конгрессе (Москва, 2005), на четвертой и пятой Всероссийских Каргинских конференциях (Москва, 2007, 2010), на Санкт-Петербургских конференциях молодых ученых с международным участием «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2007, 2008), на Международном студенческом форуме (Оаха, США, 2008), на шестой Украинской открытой конференции молодых ученых «ВМС-2008» (Киев, Украина, 2008), на пятом Международном симпозиуме по супрамолекулярным системам в химии и биологии (Киев, Украина, 2009), на третьей Международной конференции по коллоидной химии и физико-механике, посвященной двухсотлетию открытия электрокинетических явлений Ф.Ф.Рейсом (Москва, 2008), на 43-ем Всемирном Полимерном конгрессе «Макро-2010» (Глазго, Великобритания, 2010), на второй Всероссийской школе-конференции для молодых ученых «Макромолекулярные объекты и полимерные нанокомпозиты» (Московская область, 2010), на восьмом Международном симпозиуме по полиэлектролитам (Шанхай, Китай, 2010), на десятой Международной

конференции Европейского хитинового общества «EUCHIS'11» (Санкт-Петербург, 2011), на Европейском полимерном конгрессе (Гранада, Испания, 2011), на Международной конференции по инновациям в полимерной науке и технологии «IPST2011» (Денпасар, Индонезия, 2011).

**Публикации.** По результатам работы опубликованы 2 статьи и 23 тезисов докладов.

**Личный вклад диссертанта.** Экспериментальные данные, приведенные в диссертационной работе, получены автором лично или при его непосредственном участии.

**Структура работы.** Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов и списка литературы и содержит 100 страниц текста, включая 44 рисунка и 8 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность темы исследований, отражены ее научная новизна и практическая значимость.

**В первой главе** приведён анализ литературных данных по теме диссертации.

**Во второй главе** описаны методика приготовления образцов и физические методы, используемые в работе.

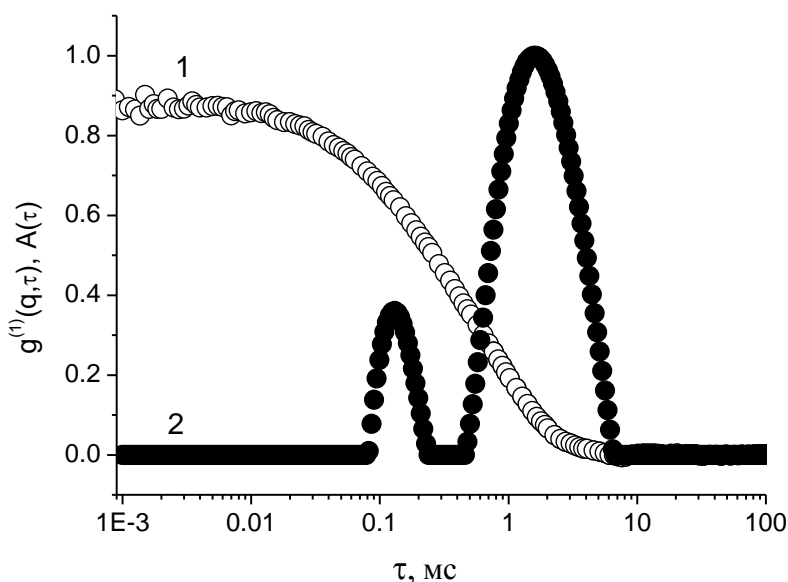
**В третьей главе** представлены оригинальные результаты экспериментальных исследований по теме диссертации. Она состоит из четырех частей. Первая часть посвящена обнаружению и доказательству существования агрегатов хитозана и ГМ хитозана в разбавленных водных растворах, вторая – влиянию молекулярной массы на агрегацию, третья – влиянию гидрофобных групп на агрегацию, четвертая – влиянию соли на агрегацию ГМ хитозана.

### I. Агрегаты хитозана и ГМ хитозана в разбавленных водных растворах

С помощью метода динамического рассеяния света показано, что для всех исследуемых образцов хитозана и ГМ хитозана корреляционная функция рассеянного света  $g^{(1)}(q,t)$  имеет бимодальный характер с быстрой и медленной релаксационными модами (рис.1):

$$g^{(1)}(q,t) = A_{fast} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{fast}}\right) + A_{slow} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{slow}}\right),$$

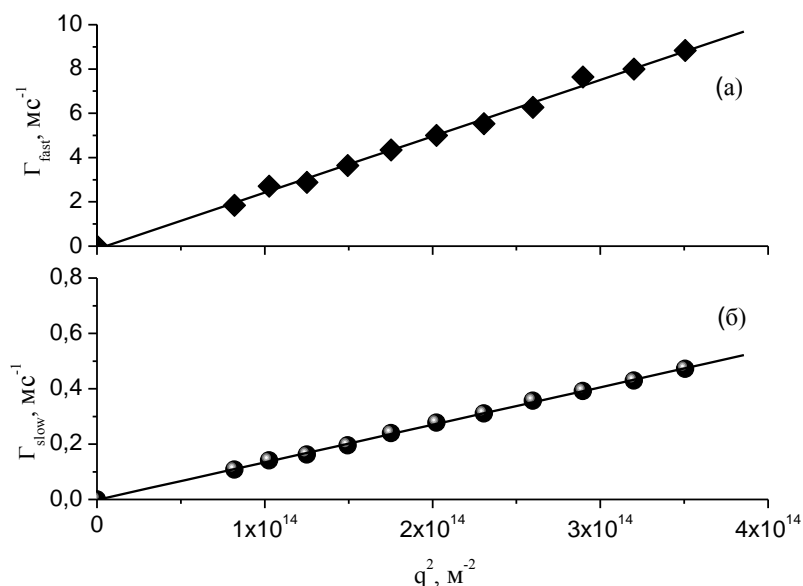
где  $\tau_{fast}$  и  $\tau_{slow}$  - времена релаксации быстрой и медленной моды, соответственно, а  $A_{fast}$  и  $A_{slow}$  - соответствующие амплитуды корреляционной функции электрического поля.



**Рис.1.** Корреляционная функция (1) интенсивности рассеянного света  $g^{(1)}(q, \tau)$  и распределение частиц (2) по временам релаксации  $A(\tau)$  на угле рассеяния  $\theta=90^\circ$  для водных растворов ГМ хитозана ( $M_M=70000$  г/моль), содержащего 4 мол.% н-додецильных групп, концентрации 0,5 г/л в присутствии 0,3М уксусной кислоты и 0,05М ацетата натрия.

Для обеих мод зависимости скорости релаксации  $\Gamma$  (величины, обратной времени релаксации  $\tau$ ) от квадрата волнового вектора  $q^2$  представляют собой прямые, проходящие через начало координат, что свидетельствует о диффузионном характере движения частиц в обоих случаях (рис.2).

Из наклона зависимостей  $\Gamma(q^2)$  определяли кажущийся коэффициент диффузии частиц  $D_{app}$  и аппроксимировали его к нулевой концентрации, определяя таким образом коэффициент диффузии при бесконечном разбавлении. Из него по формуле Эйнштейна-Стокса рассчитывали гидродинамический радиус частиц  $R_H$ . Значения  $R_H$  представлены в табл.1.



**Рис.2.** Скорость релаксации как функция квадрата волнового вектора  $q^2$  для быстрой (а) и медленной (б) мод в водных растворах хитозана ( $M_n=70000$  г/моль) концентрации 0,7 г/л, содержащих 0,3М уксусной кислоты и 0,05М ацетата натрия.

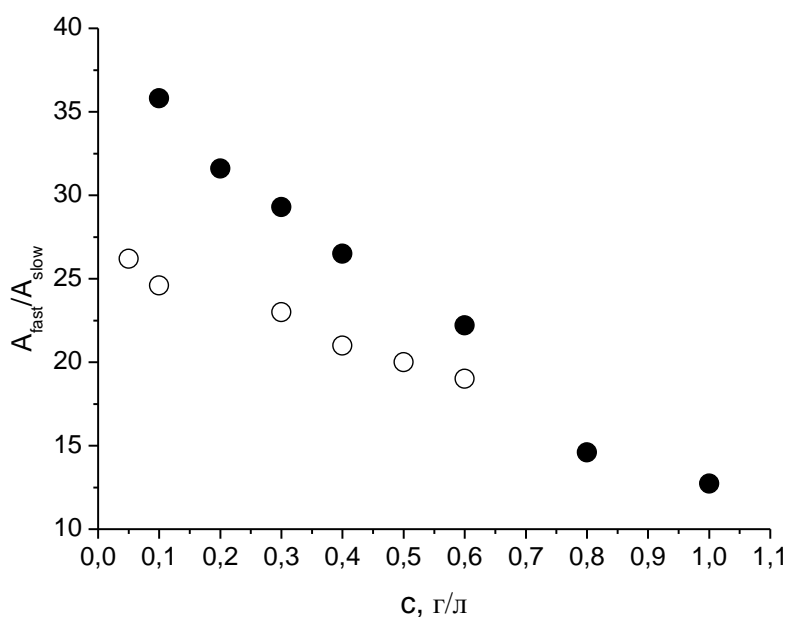
**Табл.1.** Молекулярная масса, теоретически рассчитанный  $R_{uni}^{теор}$  и экспериментально полученный  $R_{uni}^{эксп}$  гидродинамические радиусы одиночных макромолекул хитозана в водном растворе, содержащем 0,3М уксусной кислоты и 0,05М ацетата натрия.

Образец	$M_{uni}^* 10^4, \text{г/моль}$	$R_{uni}^{теор}, \text{нм}$	$R_{uni}^{эксп}, \text{нм}$
Хитозан 55	5,5	13	$13 \pm 2$
Хитозан 70	7,0	15	$15 \pm 2$
Хитозан 125	12,5	20	$18 \pm 2$

Гидродинамический радиус меньших частиц близок по значению к теоретически рассчитанному гидродинамическому радиусу идеальной полимерной цепи хитозана при  $\theta$  – условиях (табл.1). Это позволяет сделать вывод о том, что меньшие частицы – это одиночные макромолекулы, а частицы большего размера – агрегаты, состоящие из нескольких полимерных цепей. Аргументом в пользу этого является тот факт, что если использовать в качестве растворителя аммониевый буфер, в котором агрегация подавляется, то после фильтрации через фильтр с размерами пор 100 нм, в растворе присутствуют только одиночные



макромолекулы; и лишь спустя сутки в системе начинают образовываться агрегаты. Предположение о том, что меньшие частицы представляют собой одиночные макромолекулы, подтверждается также тем фактом, что при разбавлении раствора динамическое равновесие между макромолекулами и агрегатами сдвигается в сторону макромолекул (рис.3). Это связано с тем, что при увеличении общего объема раствора ассоциация одиночных макромолекул становится энергетически менее выгодной, поскольку это ведет к значительным потерям энтропии.



**Рис.3.** Зависимость отношения амплитуд быстрой  $A_{fast}$  и медленной  $A_{slow}$  мод корреляционной функции электрического поля от концентрации водного раствора хитозана молекулярной массы 55000 г/моль (●) и 125000 г/моль (○) в присутствии 0,3М уксусной кислоты и 0,05М ацетата натрия на угле рассеяния  $\theta=90^\circ$ .

Таким образом, как хитозан, так и ГМ хитозан агрегируют в разбавленных водных растворах. Если причина агрегации ГМ хитозана достаточно очевидна – гидрофобные взаимодействия н-алкильных боковых групп, то причины агрегации немодифицированного хитозана пока недостаточно ясны. Можно полагать, что к агрегации хитозана может приводить образование кристаллитов, включающих участки цепей разных макромолекул. В пользу этого предположения свидетельствуют следующие экспериментальные результаты, полученные нами. Во-первых, склонность к агрегации выше у образцов хитозана с меньшей степенью ацетилирования, а, значит, с большей склонностью к кристаллизации из-за

регулярности их строения. Во-вторых, агрегаты сохраняются в присутствии 7М мочевины, известной своей способностью разрушать водородные связи, а также ослаблять гидрофобные взаимодействия. Высказано предположение, что такое поведение возможно только, если водородные связи “спрятаны” внутри кристаллитов.

Таким образом, показано, что в разбавленных водных растворах хитозан и ГМ хитозан образуют межмолекулярные агрегаты, которые сосуществуют в динамическом равновесии с одиночными цепями.

## II. Влияние молекулярной массы на агрегацию

Для исследования влияния молекулярной массы на агрегацию были использованы образцы хитозана с молекулярными массами 55000 г/моль, 70000 г/моль и 125000 г/моль.

Методом динамического светорассеяния были определены гидродинамический радиус и радиус инерции агрегатов (табл.2).

**Табл.2.** Гидродинамический радиус  $R_{H\text{ agg}}$ , радиус инерции  $R_{g\text{ agg}}$  и их отношение для агрегатов хитозана в водном растворе, содержащем 0,3М уксусной кислоты и 0,05М ацетата натрия.

Образец	$R_{H\text{ agg}}$ , нм	$R_{g\text{ agg}}$ , нм	$(R_g/R_H)_{\text{agg}}$
Хитозан 55	134±5	87±3	0,65±0,05
Хитозан 70	135±8	87±3	0,64±0,05
Хитозан 125	132±9	89±3	0,67±0,05

Показано, что они не зависят от молекулярной массы хитозана. Этот результат может быть связан с присутствием незранированных зарядов на полимерной цепи, поскольку в исследуемых системах радиус Дебая  $r_D$  в 2,5 раза больше среднего расстояния между зарядами на цепи хитозана (5,5 Å). Наблюдаемое поведение может быть обусловлено электростатической природой стабилизации агрегатов. Так, в классической проблеме Рэля о заряженной капле сферическая капля, чей заряд превышает некоторое критическое значение, распадается на несколько более маленьких капель определенного размера с зарядом ниже критического значения. С другой стороны, независимость размера агрегата от

длины составляющих его макромолекул означает, что внутри него каждая полимерная цепь имеет более двух «точек» связывания с другими цепями, в результате чего память о длине исходных макромолекул теряется.

Рассчитано среднее количество макромолекул, входящих в один агрегат. Для этого из результатов динамического светорассеяния определена массовая доля агрегатов  $x_{agg}$ , а из диаграмм Зимма, полученных с помощью метода статического светорассеяния, определена кажущаяся средневесовая молекулярная масса  $M_w^*$ , которая содержит вклады агрегатов  $M_{agg}$  и отдельных макромолекул  $M_{uni}$ :  $M_w^* = (1 - x_{agg})M_{uni} + xM_{agg}$ . Рассчитанные молекулярные массы агрегатов, а также агрегационные числа, вычисленные из соотношения  $M_{agg}/M_{uni}$ , приведены в табл.3. Видно, что агрегационные числа падают с увеличением длины одиночных макромолекул. Этот результат можно объяснить следующим образом. Энергия ассоциации одного агрегата определяется количеством притягивающихся групп. Поскольку короткие полимеры содержат меньше таких групп, то для реализации необходимого вклада в энергию ассоциации требуется больше таких макромолекул. Это предположение подтверждается тем фактом, что число мономерных звеньев в одном агрегате  $n_{agg}$ , которое пропорционально числу ассоциирующих групп, практически не меняется с изменением молекулярной массы хитозана (табл.3).

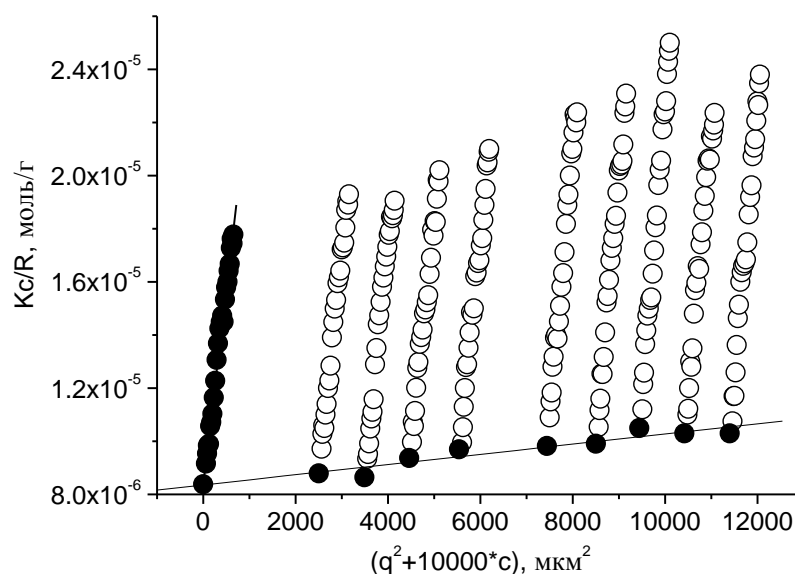
**Табл.3.** Кажущаяся средневесовая молекулярная масса  $M_w^*$ , определенная из диаграмм Зимма, молекулярная масса агрегатов  $M_{agg}$  и их агрегационные числа в водных растворах хитозана, содержащих 0,3М уксусной кислоты и 0,05М ацетата натрия.

Образец	$M_w^* \cdot 10^5$ , г/моль	$M_{agg} \cdot 10^5$ , г/моль	$N_{agg}^a$	$n_{agg}^b$
Хитозан 55	1,25±0,05	11±1	20±3	6750±1250
Хитозан 70	1,5±0,1	11±1	16±3	6750±1250
Хитозан 125	2,2±0,2	12±1	10±2	7300±1450

<sup>a</sup> Число полимерных цепей в одном агрегате

<sup>b</sup> Число мономерных звеньев в одном агрегате

Следует отметить, что угловые зависимости на диаграммах Зимма линейны (рис.4), что позволяет сделать вывод о том, что размер агрегатов не зависит от концентрации полимера.



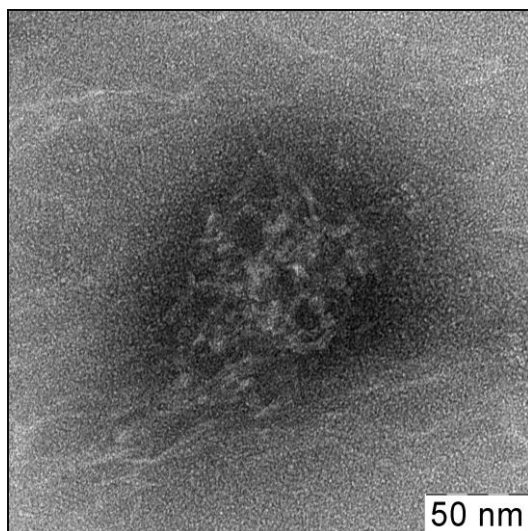
**Рис.4.** Диаграмма Зимма для водных растворов хитозана с молекулярной массой 55000 г/моль в диапазоне концентраций 0,25 – 1,14 г/л и углов от 35° до 150° при 25°С в присутствии 0,3М уксусной кислоты и 0,05М ацетата натрия.

Чтобы получить представление о строении агрегатов хитозана, анализировали отношение  $(R_g/R_H)_{agg}$  (табл. 2). Видно, что оно лежит в диапазоне от 0,64 до 0,67, что ниже соответствующего отношения для твердой сферы (0,778). Такие низкие значения могут наблюдаться, если рассеивающий объект имеет более плотное ядро и разреженную оболочку, в результате чего  $R_H$  оказывается намного больше, чем для твердой сферы с четко выраженной поверхностью. Поскольку объемная доля полимера  $\phi_{agg}$  в таких агрегатах порядка  $10^{-3}$ , можно полагать, что они представляют собой наногели, набухшие в растворителе.

Следует отметить, что все описанные закономерности влияния молекулярной массы на агрегацию наблюдаются и для ГМ хитозана.

Для визуализации агрегатов использовали метод просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Типичная микрофотография агрегатов представлена на рис.5. Видно, что форма агрегатов близка к сферической.

Средний радиус агрегатов по данным ПЭМ намного меньше гидродинамического радиуса агрегатов  $R_H_{agg}$  (табл.2), полученного с помощью метода светорассеяния. Такое различие, по-видимому, связано с тем, что в первом методе наблюдают высохшие агрегаты на подложке, в то время как светорассеяние дает размер набухшего агрегата в растворе.



**Рис.5.** Микрофотография агрегата хитозана ( $M_n=70000$  г/моль), полученная методом ПЭМ.

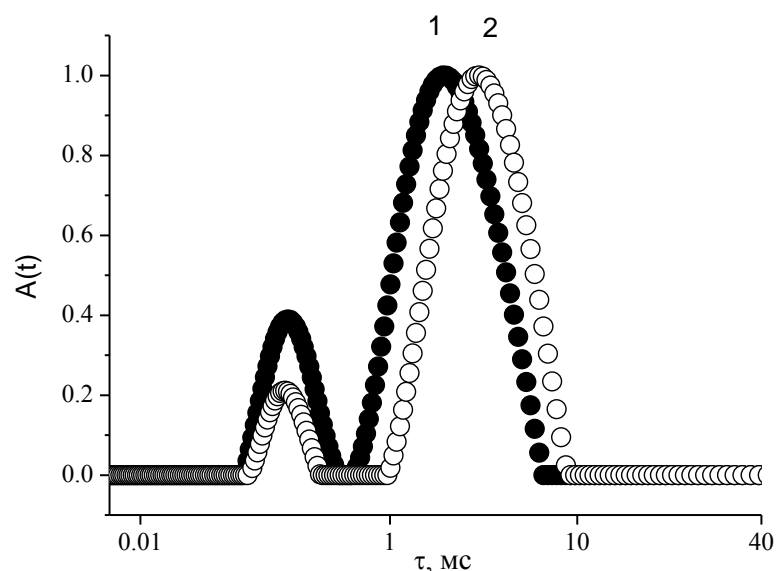
Таким образом, впервые обнаружено, что размер агрегатов хитозана и ГМ хитозана не зависит от молекулярной массы полимера, а агрегационное число растет с уменьшением длины полимерной цепи, при этом агрегаты представляют собой наногели с более плотным ядром и разреженной оболочкой.

### **III. Влияние гидрофобных групп на агрегацию**

ГМ хитозан получали путем введения в макромолекулы хитозана боковых гидрофобных *n*-додецильных групп. Можно ожидать, что в случае ГМ полимера агрегаты в водной среде будут образовываться за счет формирования двух типов сшивок между полимерными цепями: (1) гидрофобных мицеллоподобных доменов, типичных для полиэлектролитов с боковыми гидрофобными группами, (2) сшивок, присутствующих в агрегатах самого хитозана.

Чтобы оценить влияние ковалентно связанных гидрофобных групп на агрегацию хитозана, провели сравнение данных для ГМ и немодифицированного хитозана. Показано, что независимо от наличия гидрофобных заместителей в растворе всегда присутствуют два типа частиц: одиночные макромолекулы и агрегаты (рис. 6). Введение в полимерную цепь гидрофобных групп приводит к увеличению массовой доли агрегатов  $x_{agg}$  (табл.4), то есть гидрофобные взаимодействия способствуют ассоциации одиночных макромолекул. Из табл.3 и 4 видно, что гидродинамический радиус агрегатов ГМ хитозана и их агрегационное число больше, чем для его немодифицированного аналога. Это объясняется тем,

что гидрофобные группы увеличивают притяжение между полимерными цепочками, что способствует вовлечению большего числа макромолекул в один агрегат и, как следствие, ведет к росту агрегатов. Следует отметить, что агрегаты ГМ хитозана также, как и агрегаты немодифицированного хитозана, имеют сферическую форму, согласно данным ПЭМ.



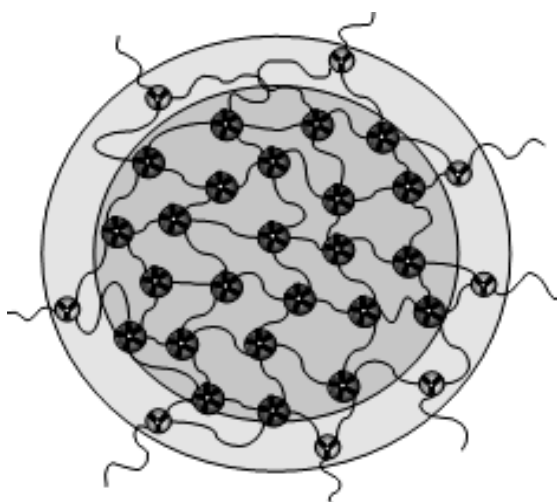
**Рис.6.** Распределение интенсивности рассеянного света по временам релаксации для водного раствора немодифицированного (1) и ГМ хитозана (2) ( $M_w=75000$  г/моль), содержащего 4 мол.% н-додецильных групп, с концентрацией 0,6 г/л на угле рассеяния  $\theta=90^\circ$  в присутствии 0,3М уксусной кислоты и 0,05М ацетата натрия.

**Табл.4.** Размеры агрегатов и одиночных макромолекул, массовая доля агрегатов  $x_{agg}$  и их агрегационное число  $N_{agg}$  в водных растворах хитозана и ГМ хитозана, содержащих 0,3М уксусной кислоты и 0,05М ацетата натрия.

Содержание н-додецильных групп, мол.%	$R_{H\ uni}$ , нм	$R_{H\ agg}$ , нм	$R_{g\ agg}$ , нм	$x_{agg}$	$N_{agg}$
0	15±1	135±8	87±2	8±1	15±2
2	14±1	145±5	90±2	15±2	48±5
4	14±1	180±10	102±2	20±2	49±3

Таким образом, показано, что доля агрегированных макромолекул, гидродинамический радиус агрегатов и их агрегационное число в случае ГМ хитозана больше, чем у его немодифицированного аналога, что связано с дополнительным вкладом боковых н-додецильных групп в энергию притяжения.

Отношение  $R_g/R_H$  для агрегатов ГМ хитозана лежит в диапазоне 0,57-0,62. Как отмечено выше, столь низкие значения  $R_g/R_H$  указывают на то, что агрегаты представляют собой наногели с более плотным ядром и сильно набухшей оболочкой и, следовательно, характеризуются значительно бóльшим гидродинамическим радиусом по сравнению с радиусом инерции, чем для непроницаемой сферы с тем же радиусом инерции. Образование такого набухшего поверхностного слоя можно объяснить двумя причинами. Первая причина состоит в том, что в поверхностном слое домены, играющие роль сшивок, намного меньше, чем в ядре, так как вблизи границы с растворителем из-за недостатка ассоциирующих групп их оптимальное содержание в домене не может быть достигнуто (рис.7). Небольшое количество ассоциирующих групп в доменах поверхностного слоя означает более низкую плотность в этой области. Вторая причина – наличие свободных концов полимерных цепей на поверхности наногеля. Макромолекулы ГМ хитозана, модифицированные 2 и 4 мол.% гидрофобных групп, имеют очень длинные концы полимерной цепи, не содержащие гидрофобов. Большинство таких концевых участков вытесняются из агрегата, потому что не несут на себе ассоциирующих групп и, более того, имеют много заряженных звеньев, которые отталкиваются от одноименно заряженного агрегата.



**Рис.7.** Схематическое изображение агрегатов ГМ хитозана в водных растворах. Агрегат состоит из ядра с большим количеством плотных сшивок, образованных оптимальным количеством ассоциирующих групп ( $\bullet$ ), и разреженного поверхностного слоя с низкой плотностью сшивок ( $\circ$ ), содержащих меньшее количество ассоциирующих групп, и свободными концами полимерных цепей.

Рассмотрим теперь влияние количества *n*-додецильных групп в полимере на агрегацию. Из табл.4 видно, что при увеличении содержания гидрофобных групп от 2 до 4 мол.% массовая доля агрегатов ГМ хитозана увеличивается, что объясняется усилением межмолекулярного притяжения, которое приводит к агрегации бóльшего числа одиночных макромолекул, уменьшая их долю в растворе. Следует отметить, что агрегационное число при этом остается неизменным (табл.4). Можно полагать, что это связано с двуслойной структурой агрегата, в которой гидрофобные группы преимущественно локализованы в ядре, а гидрофильные группы – в оболочке. Это приводит к низкой поверхностной энергии такой системы, благодаря чему введение в полимерную цепь небольшого количества дополнительных гидрофобных групп уже не приводит к перестраиванию агрегатов с включением в него дополнительных макромолекул.

Несмотря на постоянство агрегационного числа радиус агрегатов ГМ хитозана возрастает при увеличении количества гидрофобных групп (табл.4), что указывает на уменьшение объемной доли полимера внутри агрегата. Это может быть обусловлено тем, что гидрофобные боковые группы затрудняют формирование кристаллитов, связывающих различные макромолекулы между собой, что приводит к более рыхлой упаковке полимерных цепей в агрегате.

Таким образом, показано, что при изменении содержания *n*-додецильных групп от 2 до 4 мол.% массовая доля агрегатов ГМ хитозана увеличивается из-за усиления межмолекулярного притяжения, при этом агрегационное число остается неизменным, так как низкая поверхностная энергия делает невыгодным встраивание в агрегат дополнительных макромолекул.

#### **IV. Влияние соли на агрегацию**

**Концентрация соли.** Поскольку в исследуемых системах происходит агрегация одноименно заряженных макромолекул, то она должна существенно зависеть от электростатических взаимодействий. Чтобы варьировать электростатические взаимодействия, в растворы добавляли низкомолекулярную соль NaCl. Концентрацию соли изменяли в диапазоне 0,025-0,1 М, при этом величина радиуса Дебая  $r_D$  менялась от 19 до 9,7 Å, оставаясь существенно больше среднего расстояния между заряженными звеньями  $l$  (5,5 Å) вдоль цепи, что



указывает на неполную экранировку электростатических взаимодействий в условиях экспериментов.

В табл.5 представлены результаты вискозиметрических измерений, из которых видно, что соль приводит к уменьшению характеристической вязкости, что обусловлено поджатием полимерных клубков одиночных макромолекул. Эти данные согласуются с данными светорассеяния (табл.6), согласно которым гидродинамический радиус макромолекул  $R_{Huni}$  уменьшается с увеличением концентрации соли. Из табл.5 видно также, что характеристическая вязкость не зависит от содержания гидрофобных групп, следовательно, гидрофобные взаимодействия не ведут к дополнительной компактизации полимерного клубка. Таким образом, поджатие полимерных клубков объясняется двумя причинами: экранировкой электростатических взаимодействий между одноименно заряженными группами на цепи хитозана и уменьшением осмотического давления противоионов, локализованных внутри макромолекул.

**Табл.5.** *Характеристическая вязкость  $[\eta]$  разбавленных водных растворов ГМ хитозана, содержащих 0,3М уксусной кислоты и разную концентрацию соли NaCl.*

Содержание <i>n</i> -додецильных групп, мол. %	$C_{NaCl}$ , М	$[\eta]$ , л/г
2	0,025	0,65±0,03
	0,05	0,50±0,02
	0,1	0,48±0,02
4	0,025	0,65±0,03
	0,05	0,50±0,02
	0,1	0,48±0,02

Рассмотрим теперь влияние соли на агрегацию. Методом динамического светорассеяния показано (табл.6), что при увеличении концентрации соли массовая доля агрегатов растет, т.е. соль способствует агрегации ГМ хитозана. В то же время агрегационное число  $N_{agg}$  не меняется (табл.6). По-видимому, обедненная ассоциирующими группами заряженная оболочка с низкой поверхностной энергией делает невыгодным рост агрегатов.

Следует отметить, что соль приводит к незначительному изменению радиуса инерции  $R_g$  агрегатов в то время, как их гидродинамический радиус  $R_H$

существенно уменьшается по мере увеличения ионной силы (табл.6), что указывает на то, что набухший слой наногеля поджимается в соли сильнее, чем более плотное ядро. Поджатие агрегатов при постоянном содержании в них макромолекул можно объяснить экранировкой зарядов на цепи хитозана и уменьшением осмотического давления противоионов, локализованных внутри агрегата.

**Табл.6.** Гидродинамические радиусы одиночных макромолекул и агрегатов, массовая доля  $x_{agg}$  агрегатов и их агрегационное число  $N_{agg}$  в разбавленных водных растворах ГМ хитозана, содержащих 0,3М уксусной кислоты и разную концентрацию соли NaCl.

Содержание <i>n</i> -додецильных групп, мол.%	$C_{NaCl}$ , М	$R_{H\ uni}$ , нМ	$R_{H\ agg}$ , нМ	$R_{g\ agg}$ , нМ	$x_{agg}$	$N_{agg}$
2	0,025	24±2	158±5	73±1	0,17±0,03	19±2
	0,05	19±1	134±5	71±1	0,31±0,04	19±3
	0,1	15±1	104±2	69±2	0,36±0,04	18±2
4	0,025	24±2	160±5	77±2	0,33±0,03	20±2
	0,05	19±1	134±5	75±2	0,38±0,04	20±3
	0,1	15±1	106±3	70±2	0,63±0,05	19±2

Таким образом, с ростом концентрации соли увеличивается доля агрегированных макромолекул, а агрегационное число остается постоянным. Соль способствует уплотнению и поджатию агрегатов ГМ хитозана.

**Тип соли.** Эффект типа соли исследовали на примере двух моновалентных солей, отличающихся анионами: NaCl и CH<sub>3</sub>COONa. Из табл.6 и 7 видно, что гидродинамические радиусы одиночных макромолекул в присутствии ацетата натрия меньше, чем в присутствии хлорида натрия. Это можно объяснить тем, что ацетат ионы эффективнее экранируют заряды на цепи хитозана. Причины этого могут быть следующие. Во-первых, ацетат-ион может фиксировать NH<sub>3</sub><sup>+</sup> группы хитозана между своими двумя атомами кислорода. Во-вторых, ионы ацетата содержат гидрофобные участки, которые могут взаимодействовать с полимерной цепью посредством гидрофобных взаимодействий.

Что касается агрегатов, то в присутствии ацетата натрия их размер, наоборот, несколько больше, а их агрегационные числа существенно выше, чем в присутствии

хлорида натрия. Это также можно объяснить более эффективным экранированием зарядов на цепи хитозана ацетат-ионами, что позволяет встроиться в агрегат большему количеству одноименно заряженных макромолекул.

**Табл.7.** Гидродинамические радиусы одиночных макромолекул и агрегатов, массовая доля агрегатов  $x_{agg}$  и агрегационное число  $N_{agg}$  в разбавленных растворах ГМ хитозана, содержащих 0,3М уксусной кислоты и разную концентрацию соли ацетата натрия  $AcNa$ .

Содержание <i>n</i> -додецильных групп, мол.%	$C_{AcNa}$ , М	$R_{H\ uni}$ , нМ	$R_{H\ agg}$ , нМ	$x_{agg}$	$N_{agg}$
2	0,025	19±2	153±5	0,08±0,01	47±6
	0,05	14±1	145±5	0,15±0,02	48±5
4	0,025	19±2	190±5	0,11±0,02	50±8
	0,05	14±1	180±5	0,20±0,03	49±5

В то же время следует отметить, что доля агрегированных макромолекул хитозана в растворе хлорида натрия существенно выше, чем в растворе ацетата натрия (табл.6 и 7). Это может быть связано с более высокой склонностью хлорида хитозана к кристаллизации, что дополнительно способствует агрегации макромолекул. В отличие от хлорида, ацетат хитозана не обнаруживает признаков кристалличности, по-видимому, из-за большого объема ацетатных ионов, препятствующего плотной упаковке макромолекул. Однако этот фактор не приводит к росту агрегационного числа, поскольку в крупных агрегатах стерические ограничения могут препятствовать формированию кристаллитов.

Таким образом, показано, что агрегация ГМ хитозана сильно зависит от типа соли. В присутствии ацетат ионов агрегационные числа больше, чем в присутствии ионов хлора, что связано с более эффективной экранировкой зарядов на цепи полимера ацетат ионами. В то же время, доля агрегированных макромолекул в присутствии хлорида натрия существенно выше, что можно объяснить высокой склонностью хлорида хитозана к кристаллизации, что способствует агрегации.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что размер агрегатов хитозана и ГМ хитозана не зависит от длины составляющих их полимерных цепей, что связано с электростатической природой их стабилизации.

2. Обнаружено, что число макромолекул, образующих агрегат, увеличивается при уменьшении молекулярной массы полимера, что связано с необходимостью обеспечения определенного выигрыша в энергии ассоциации. В то же время содержание в агрегате заряженных и гидрофобных групп остается неизменным.

3. Показано, что агрегаты хитозана и ГМ хитозана представляют собой наногели с более плотным ядром и разреженным поверхностным слоем.

4. Обнаружено, что введение в хитозан *n*-додецильных гидрофобных групп приводит к увеличению доли агрегированных макромолекул и агрегационного числа, что связано с дополнительным вкладом гидрофобных взаимодействий в энергию ассоциации. В то же время при увеличении содержания гидрофобных групп от 2 до 4 мол.% агрегационное число остается постоянным. Этот результат можно объяснить низкой поверхностной энергией агрегата, благодаря чему введение в полимерную цепь небольшого количества дополнительных гидрофобных групп уже не приводит к перестраиванию агрегатов с включением в него дополнительных макромолекул.

5. Показано, что увеличение концентрации соли приводит к поджатию агрегатов и увеличению доли агрегированных макромолекул, что связано с подавлением электростатического отталкивания одноименно заряженных звеньев и осмотического давления противоионов. В то же время при изменении концентрации соли агрегационное число остается постоянным, благодаря двуслойной структуре агрегатов, обеспечивающей низкую поверхностную энергию.

6. Обнаружено, что агрегация сильно зависит от типа соли. В присутствии хлорида натрия доля агрегированных макромолекул намного больше, поскольку хлорид-ионы способствуют формированию кристаллитов, стабилизирующих агрегаты. В то же время в присутствии ацетата натрия агрегационное число и плотность агрегатов ГМ хитозана больше, что связано с тем, что ацетат-ионы более эффективно экранируют электростатические отталкивания одноименно заряженных полимерных цепей.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации:

- 1) Korchagina E.V., Philippova O.E. “Multichain aggregates in dilute solutions of associating polyelectrolytes keeping a constant size at the increase in the chain length of individual macromolecules”. *Biomacromolecules* 2010, v.11, № 12, pp. 3457-3466.
- 2) Philippova O.E., Korchagina E.V., Volkov E.V., Smirnov A.V., Khokhlov A.R., Rinaudo M. “Aggregation of some water-soluble derivatives of chitin in aqueous solutions: Role of the degree of acetylation and effect of hydrogen bond breaker”. *Carbohydrate Polym.* 2012, v.87, № 1, pp. 687-694.
- 3) Филиппова О.Е., Корчагина Е.В. “Хитозан и его гидрофобные производные: получение и агрегация в разбавленных водных растворах”. *Высокомолек. Соед., Сер. С* 2012, в печати.
- 4) Корчагина Е.В., Андреева А.С. “Создание полисахаридных микрогелей”. Тезисы Малого полимерного конгресса 2005, 29 ноября – 1 декабря 2005, Москва, Россия, с.97.
- 5) Корчагина Е.В., Андреева А.С. “Хитозан – природный полимерный носитель для противотуберкулёзных препаратов нового поколения”. Тезисы XIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов-2006”, 12-16 апреля 2006, Москва, Россия, т. 1, с. 240.
- 6) Корчагина Е.В., Андреева А.С. “Использование метода динамического светорассеяния для исследования агрегации в разбавленных водных растворах хитозана”. Тезисы III Конференции молодых учёных “Современные проблемы в науке о полимерах”, 17 – 19 апреля 2007, Санкт-Петербург, Россия, с. 337.
- 7) Корчагина Е.В., Андреева А.С., Филиппова О.Е., Хохлов А.Р. “Кластеры конечного размера в разбавленных водных растворах хитозана”. Тезисы 4-ой Каргинской конференции “Наука о полимерах 21 веку”, 29 января – 2 февраля 2007, Москва, Россия, т. 2, с.395.
- 8) Корчагина Е.В., Андреева А.С., Филиппова О.Е. “Исследование агрегации хитозана в разбавленных водных растворах методом динамического светорассеяния”. Тезисы XIV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов-2007”, 11-14 апреля 2007, Москва, Россия, секция “химия”, с.130.
- 9) Корчагина Е.В., Филиппова О.Е. “Исследование разбавленных растворов хитозана и его производных методом динамического светорассеяния”. Тезисы XV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов-2008”, 8-11 апреля 2008, Москва, Россия, секция “химия”, с.150.
- 10) Korchagina E.V., Andreeva A.S., Philippova O.E. “Two types of particles in dilute aqueous solutions of chitosan and its hydrophobic derivatives”. Abstracts of IV<sup>th</sup> Saint-Petersburg Young Scientists Conference “Modern Problems of Polymer Science”, April 15 – 17, 2008, Saint-Petersburg, Russia, p. 85.
- 11) Korchagina E.V., Philippova O.E., Velezheva V.S., Khokhlov A.R. “Self-assembled nanogels as prospective drug carriers”. Abstracts of International Student Research Forum 2008 , June 1-3, 2008, Omaha, Nebraska, USA, p. 57.
- 12) Korchagina E.V., Philippova O.E. “Nanogels in dilute aqueous solutions of chitosan”. Abstracts of III International Conference of Colloid Chemistry and Physicochemical Mechanics, June 24-28, 2008, Moscow, Russia, p. 80.
- 13) Korchagina E.V., Philippova O.E., Khokhlov A.R. “Nanogels of chitosan in dilute aqueous solutions”. Abstracts of VI Open Ukrainian Conference of Young Scientists on Polymer Science “VMS-2008”, September 30 –October 3, 2008, Kyiv, Ukraine, p. 37.
- 14) Корчагина Е.В., Филиппова О.Е. “Агрегация хитозана и его гидрофобных производных в разбавленных водных растворах”. Тезисы XVI Международной научной конференции студентов,

аспирантов и молодых учёных “Ломоносов-2009”, 13-18 апреля 2009, Москва, Россия, секция “химия”, с.64.

15) Korchagina E.V., Philippova O.E. “Nanogels of chitosan and of its hydrophobic derivatives in dilute aqueous solutions”. Abstracts of V International Symposium «Supramolecular Systems in Chemistry and Biology», May 12-16, 2009, Kyiv, Ukraine, p. 127.

16) Корчагина Е.В., Филиппова О.Е. “Исследование влияния характеристик хитозана на его агрегацию в разбавленных водных растворах методами динамического и статического светорассеяния”. Тезисы XVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов-2010”, 12-15 апреля 2010, Москва, Россия, секция “химия”, подсекция “высокомолекулярные соединения”.

17) Корчагина Е.В., Филиппова О.Е. “Влияние молекулярной массы и гидрофобных групп хитозана на размер и агрегационное число нанокластеров в разбавленных водных растворах”. Тезисы 5-ой Всероссийской Каргинской конференции “Полимеры-2010”, 21 – 25 июня 2010, Москва, Россия, С5-120.

18) Барабанова А.И., Болотова Г.В., Корчагина Е.В., Федорова И.Н., Вележева В.С., Филиппова О.Е., Хохлов А.Р. “Наногели на основе хитозана для создания нового препарата, активного против резистентных штаммов микобактерий туберкулеза”. Тезисы 5-ой Всероссийской Каргинской конференции “Полимеры-2010”, 21 – 25 июня 2010, Москва, Россия, С2-3.

19) Korchagina E.V., Philippova O.E., Khokhlov A.R. “Aggregation numbers of chitosan clusters in dilute aqueous solutions”. Abstracts of 43<sup>rd</sup> IUPAC World Polymer Congress “Macro-2010”, July 11 – 16, 2010, Glasgow, UK, F19\_P30.

20) Philippova O.E., Korchagina E.V., Bolotova G.V., Barabanova A.I. “Nanogels of chitosan and its derivatives”. Abstracts of 43<sup>rd</sup> IUPAC World Polymer Congress “Macro-2010”, July 11 – 16, 2010, Glasgow, UK, F19\_P21.

21) Корчагина Е.В., Филиппова О.Е. “Агрегация макромолекул хитозана в разбавленных водных растворах”. Тезисы 2-ой Всероссийской школы-конференции для молодых ученых “Макромолекулярные объекты и полимерные наноконпозиты”, 24 – 29 октября 2010, Московская область, Россия, с. 94.

22) Philippova O.E., Korchagina E.V. “Multichain aggregates of chitosan and its hydrophobic derivative in aqueous solution”. Abstracts of 8<sup>th</sup> International Symposium on Polyelectrolytes, November 14 – 16, 2010, Shanghai, China, p. 51.

23) Korchagina E.V., Philippova O.E. “Aggregation numbers and other characteristics of nanoclusters of chitosan and its hydrophobic derivative in dilute aqueous solutions”. Abstracts of 8<sup>th</sup> International Symposium on Polyelectrolytes, November 14 – 16, 2010, Shanghai, China, p. 98.

24) Korchagina E.V., Philippova O.E. “Aggregation of chitosan and its hydrophobic derivatives in dilute aqueous solutions”. Abstracts of 10<sup>th</sup> International Conference of the European Chitin Society EUCHIS`11, May 20-24, 2011, St.Petersburg, Russia, p. 119.

25) Korchagina E.V., Philippova O.E. “Aggregates of constant size in dilute solutions of associating polyelectrolyte”. Abstracts of European Polymer Congress 2011, June 26 – July 1, 2011, Granada, Spain, p. 374.

26) Philippova O.E., Korchagina E.V. “Nanogels of constant size in dilute solutions of associating polyelectrolyte”. Abstracts of International Conference on Innovation in Polymer Science and Technology 2011, November 28 - December 1, 2011, Denpasar, Indonesia, p. 68.