

УДК 541.64:547

## Твердофазная сополимеризация L,D-лактида с хитозаном

Т. С. ДЕМИНА<sup>1</sup>, Л. В. ВЛАДИМИРОВ<sup>2</sup>, Т. А. АКОПОВА<sup>1</sup>, А. Н. ЗЕЛЕНЕЦКИЙ<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт синтетических полимерных материалов им. Н. С. Ениколопова РАН,  
ул. Профсоюзная, 70, Москва 117393 (Россия)

E-mail: detans@gmail.com

<sup>2</sup>Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН,  
ул. Косыгина, 4, Москва 119991 (Россия)

### Аннотация

Методом твердофазного синтеза в экструдере получены привитые сополимеры хитозана с L,D-лактидом. Предложен механизм привитой полимеризации, исследовано влияние условий процесса на выход и структуру целевых продуктов. На основании данных фракционирования, ИК-спектроскопии и исследования элементного состава фракций рассчитана степень замещения аминогрупп хитозана, которая составляет 0.19–0.41. Определены средняя степень полимеризации лактида в привитых цепях и влияние прививки на растворимость хитозана и физико-механические характеристики пленочных материалов. На основе синтезированных сополимеров получены трехмерные матриксы для тканевой инженерии (макропористые гидрогели, сферические микрочастицы), оценены биосовместимость и скорость биодеградации материалов.

**Ключевые слова:** твердофазный синтез, хитозан, лактид, привитые сополимеры, биосовместимые материалы

### ВВЕДЕНИЕ

Биополимеры, получаемые из возобновляемых источников, в настоящее время привлекают внимание исследователей. Они могут применяться при создании материалов биомедицинского назначения в качестве покрытий на раны, матриксов для тканевой инженерии и средств адресной доставки лекарств. Хитозан, продукт дезацетилирования природного полимера хитина, обладает хорошими пленочно-волоконнообразующими свойствами и является одним из перспективных компонентов подобных биологически активных систем [1, 2]. Как большинство полисахаридов, хитозан биосовместим и способен к биодеградации [3, 4]. Будучи единственным природным катионным полимером, хитозан широко используется для эффективной сорбции ионов тяжелых металлов, белков и кислых веществ [5, 6].

Несмотря на высокий потребительский потенциал хитозана, его применение сдержи-

вают технологические сложности синтеза производных, особенно привитых сополимеров, и переработки в изделия. В то же время, немодифицированный хитозан не растворяется в водной нейтральной среде по причине развитой системы межмолекулярных водородных связей и способности к кристаллизации [7, 8], а это существенно затрудняет получение материалов биомедицинского назначения. Попытки получить привитые сополимеры хитозана и полилактида предпринимались неоднократно. Согласно данным [9, 10], хитозан, модифицированный лактидными цепями различной длины, обладает улучшенными физико-химическими и биологическими свойствами, благодаря чему его можно успешно применять в биотехнологических и фармацевтических областях. Модифицирование хитозана с использованием растворных технологий – трудоемкий и многостадийный процесс. Наличие аминогруппы и двух гидроксильных групп в каждом звене хитозана способствует

большому вкладу передачи цепи на полимер при полимеризации лактида и образованию коротких привитых цепей. При проведении процесса в растворе ДМСО с использованием катализатора  $Ti(OBu)_4$  в атмосфере азота образуются боковые цепи олиголактида со степенью полимеризации 1–5 на аминоклуппах хитозана [10]. Реакция протекает гетерогенно и затрагивает только поверхность частиц полимера. Продукт реакции также представляет собой суспензию, набухающую в ДМСО. Проведение сополимеризации в той же среде, но с использованием триэтиленамина в качестве катализатора позволило авторам работы [11] получить привитые цепи с числом мономерных звеньев молочной кислоты до семи. Авторы работы [12] сообщают о получении привитых сополимеров в процессе полимеризации лактида в суспензии хитозана в толуоле с использованием триэтиллалюминия в качестве катализатора. При 40-кратном молярном избытке лактида получены привитые цепи олиголактида со степенью полимеризации 10. В основе метода определения длины привитой цепи лежит разность масс модифицированного продукта и массы исходного хитозана. Прямым методом длину привитых цепей не определяют. При катализируемой реакции, особенно в присутствии третичного амина, более чем вероятно реакция лактида с гидроксильными группами хитозана. Как следствие, длина привитых цепей еще меньше, чем указывают авторы, хотя степень замещения в звене хитозана при этом выше. В работе [13] опи-

сан двухстадийный синтез боковых полилактидных цепей, привитых на гидроксильные группы хитозана. На первой стадии проведена защита аминоклупп хитозана с помощью фталевого ангидрида, на второй – сополимеризация с лактидом с использованием в качестве катализатора 4-диметиламинопиридина.

Возможность твердофазного синтеза сополимеров хитозана и D,L-лактида позволяет отказать от применения катализаторов, растворителей и разбавителей систем, что привлекательно в плане получения материалов биомедицинского назначения. В образующихся продуктах не будет токсичных компонентов, удалить которые из полисахаридной матрицы полностью практически невозможно. Эффективность твердофазных реакций аминоклупп хитозана в условиях сдвиговых деформаций в экструдере показана нами на примере ацилирования хитозана карбоновыми кислотами [14, 15].

Цель настоящей работы – изучение механизма сополимеризации L,D-лактида с хитозаном в условиях твердофазного синтеза, исследование структуры и свойств сополимеров и полученных из них материалов для целей регенеративной медицины.

#### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали хитозан из хитина панцирей краба, поли[(1→4)-2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкозу], полученный в ИСПМ РАН твердофазным синтезом [16]. Молекулярная

ТАБЛИЦА 1

Условия процесса и выход продуктов реакции

Номер образца	Молярное (массовое) соотношение лактид/хитозан	Температура соэкструдирования, °С	Количество прореагировавшего лактида, отн. %	Степень прививки, %	Молярное содержание звеньев молочной кислоты
1	0.5 (31 : 69)	90	95.8	43	0.96
2	0.5 (31 : 69)	120	57.1	26	0.58
3	1 (47 : 53)	80	76.0	67	1.49
4	1 (47 : 53)	90	85.3	76	1.69
5	1 (47 : 53)	100	85.7	78	1.74
6	3 (73 : 27)	120	59.3	160	3.58

*Примечание.* Степень прививки рассчитывали по отношению разности масс образцов сополимера и хитозана в сополимере к массе полисахарида в образце; молярное содержание звеньев молочной кислоты определяли как произведение степени прививки и соотношения массы элементарных звеньев, равного 161/72.

масса (ММ) хитозана составляла  $4 \cdot 10^4$ ; степень ацелирования, по данным потенциометрического титрования и элементного анализа, равна 0.4. Рацемическую смесь L- и D-лактидов (L,D-лактид, *цис*-(±)-3,6-диметил-1,4-диоксан-2,5-диол) фирмы PURAC Biochem (Нидерланды) с температурой плавления  $T_{пл} = 124-128$  °С применяли без дополнительной очистки. Твердофазный синтез проводили в опытно-промышленном двухшнековом экструдере (Berstorff ZE-40, Германия) с диаметром шнеков 40 мм и контролируемым нагревом зон при различных соотношениях компонентов и температурных режимах (табл. 1).

Непрореагировавший мономер удаляли экстракцией хлороформом. Для определения содержания N-ацелированных звеньев хитозана (узлов прививки) образцы подвергали длительному диализу против дистиллированной воды после нейтрализации ионно-связанных продуктов щелочью.

Элементный анализ выполняли на элементном анализаторе FLASH 2000 (Thermo, Великобритания). Расчет степени ацелирования проводили по изменению соотношения C/N в образцах относительно исходного хитозана. ИК-спектры снимали на спектрометре FTS-40 при разрешении  $4 \text{ см}^{-1}$ . Регистрацию и обработку спектров проводили с помощью пакета программ Win-IR версия 4 (Bio-Rad, Digilab Division). Спектры всех исследованных продуктов, содержащих хитозан, нормированы с использованием в качестве внутреннего стандарта составной полосы валентных колебаний C–O пиранозного цикла  $1075 \text{ см}^{-1}$  [17].

Для получения гидрогелей 1.5–2 % растворы хитозана и его производных замораживали при  $-5$  °С, сушили под вакуумом в замороженном состоянии и термически обрабатывали для получения нерастворимых форм. Исследование кинетики деградации гидрогелей *in vitro* при 37 °С проводили в присутствии лизоцима (2 мг/мл).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе предстояло оценить эффективность некаталитической реакции ацилирования функциональных групп полисахарида при взаимодействии с лактидом – циклическим димером молочной кислоты. Исходя из различия в нуклеофильности гидроксильных и аминогрупп хитозана в отсутствие катализа, прививка L,D-лактида на хитозан должна проходить согласно предполагаемой схеме (рис. 1). Видно, что реакция заключается в нуклеофильном присоединении первичной аминогруппы к лактидному циклу и последующей полимеризации дилактона за счет присоединения образующейся при раскрытии цикла гидроксильной группы заместителя к энергетически напряженному циклу мономера. Первичный амин не может вести анионную полимеризацию мономера, так как быстро передает протон уже в переходном состоянии уходящему гидроксил-аниону.

Согласно данным табл. 1, выход продуктов реакции в зависимости от условий обработки варьирует в пределах 57–96 %. При этом

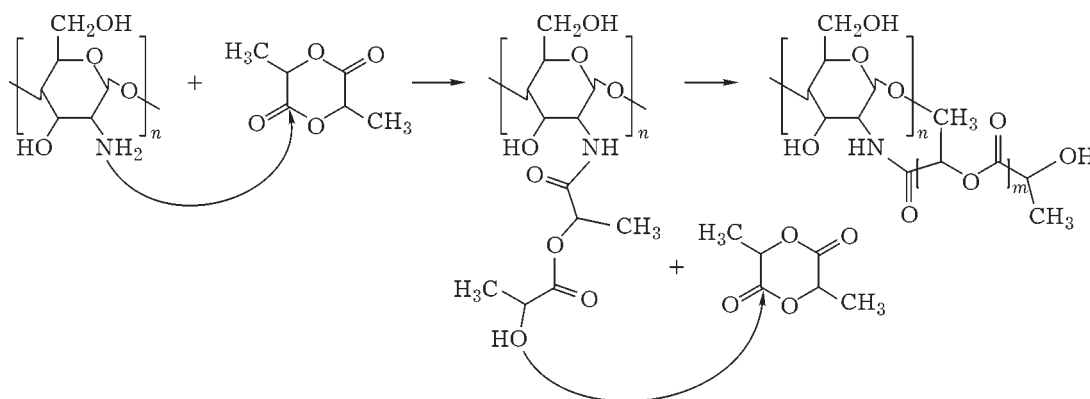


Рис. 1. Схема сополимеризации L,D-лактида с хитозаном.

поведение полученных образцов в хлороформе, который традиционно используется как растворитель для полиэфиров, зависит от содержания лактида в исходной смеси. Образцы, полученные при молярном недостатке лактида (образцы № 1 и 2), образуют относительно стабильную суспензию в хлороформе, в котором исходный хитозан нерастворим и не набухает. При увеличении содержания лактида в исходных смесях до трехкратного молярного избытка (образец № 6) образец равномерно набухает в хлороформе с образованием геля. Наблюдаемое поведение полученных продуктов в гидрофобной среде означает глубокое модифицирование макромолекул хитозана с прививкой олигомерных цепей лактида в выбранных условиях твердофазного синтеза.

На ИК-спектрах очищенных от непрореагировавшего мономера образцов (рис. 2, а) диапазон amino/амидогрупп перекрывается огибающими, которые образованы наложением полос Амид I и II ( $1650$  и  $1550$   $\text{см}^{-1}$  соответственно), полос деформационных колебаний аминогрупп хитозана ( $1600$   $\text{см}^{-1}$ ) и валентных колебаний карбоксилат-ионов. Полоса при  $1383$   $\text{см}^{-1}$  принадлежит симметричным колебаниям групп  $\text{COO}^-$ . Появление полос поглощения Амид I и II и возрастание их интен-

сивности при увеличении температуры соэкструдирования указывает на эффективное протекание реакции аминолита сложноэфирных связей лактидного цикла. Это подтверждается также изменением соотношения C/N, согласно данным элементного анализа (табл. 2). Присутствие в спектрах образцов интенсивной полосы поглощения сложноэфирных групп при  $1755$   $\text{см}^{-1}$ , относящейся к колебаниям карбонильных групп в боковых лактидных цепях, означает, что связанный с хитозаном лактид находится в виде как минимум димера. На ИК-спектрах образцов после длительного диализа (см. рис. 2, б) наблюдается слабое плечо в области сложноэфирных групп (при  $1735$   $\text{см}^{-1}$ ), которое отсутствует в спектре исходного хитозана и свидетельствует о частичном протекании прививки по пути O-ацилирования. Однако вклад этой реакции в образование продуктов синтеза незначителен. Интенсивная полоса Амид I в спектрах продуктов не позволяет полосе сложноэфирных связей разрешаться полностью. Таким образом, в выбранных условиях очистки обеспечивается практически селективный гидролиз сложноэфирных групп привитых цепей, и это позволило рассчитать содержание амидных связей, представляющих собой основные узлы прививки (см. табл. 2). Установлено, что эти

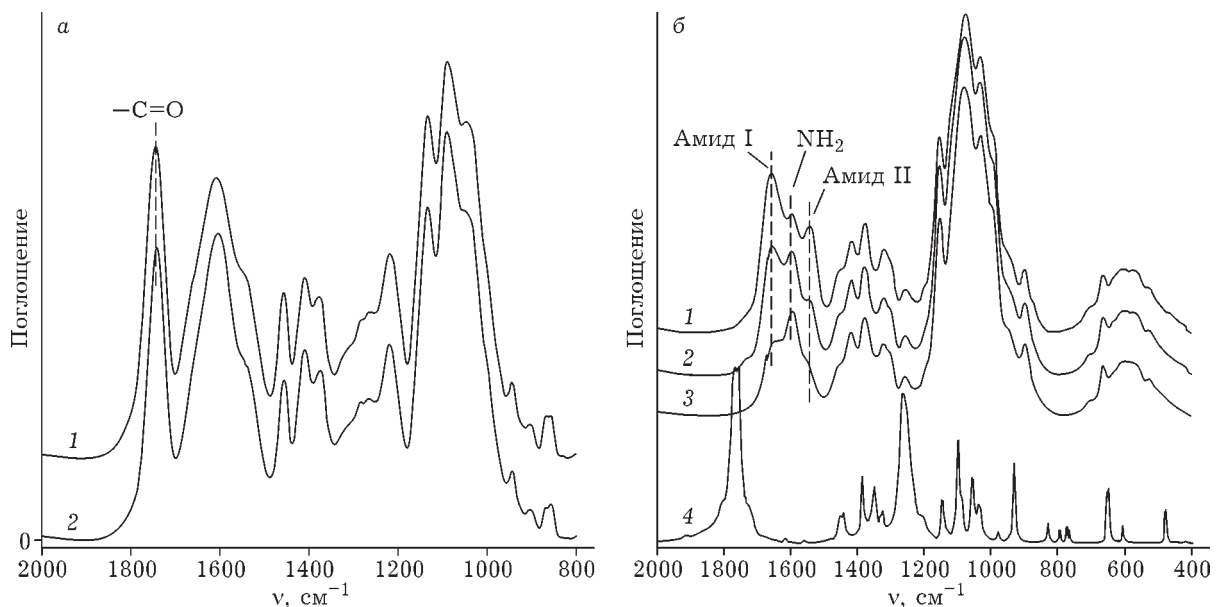


Рис. 2. ИК-спектры образцов хитозан/лактид, полученных при эквимольном соотношении компонентов при  $80$  и  $90$   $^{\circ}\text{C}$  после экстракции непрореагировавшего лактида хлороформом (а) и после диализа против дистиллированной воды (б): 1, 2 – образцы после обработки при температурах  $90$  и  $80$   $^{\circ}\text{C}$  соответственно, 3 – хитозан, 4 – L,D-лактид.

значения минимальны, так как конкурентного гидролиза амидных групп при диализе избежать невозможно.

Из данных табл. 2 видно, что при повышении температуры обработки всего на 10 °С (образцы № 3 и 4) выход продуктов реакции N-ацилирования возрастает в два раза, что согласуется с анализом ИК-спектров образцов. Такое же влияние оказывает увеличение концентрации лактида в реакционной смеси при одинаковой температуре деформирования (образцы № 1 и 4). При этом увеличение содержания лактида до трехкратного молярного избытка (образец № 6) не приводит к дальнейшему росту степени ацилирования (СА) аминогрупп хитозана. Повышение температуры синтеза сверх 90–100 °С влечет уменьшение выхода продуктов целевой реакции и степени полезного использования реагента (см. табл. 2, образцы № 1 и 2, № 4–6). Таким образом, эффективность механохимического процесса снижается при относительно высоком содержании “механически мягкого” и термопластичного компонента. Эффективная температура синтеза по величине примерно равна  $0.7T_{пл}$  лактида.

Для достижения высокой степени прививки лактида на хитозан синтез образца № 6 проводили в два этапа: сначала шло образование узлов прививки при молярном недостатке лактида (образец № 2), затем – обработка с дополнительным расчетным количеством реагента при температуре, близкой к его температуре плавления, что необходимо для создания локальных зон с высокой концентрацией лактида в реакционной смеси. Гель-хроматографический анализ растворимых в

хлороформе фракций образца показал наличие широкого плеча в области высоких молекулярных масс, которого нет на хроматограмме исходного лактида. Это указывает на протекание процесса гомополимеризации лактида при повышенных температурах механосинтеза. Как следствие, возрастает степень прививки лактидных звеньев на хитозан, которая достигает 160 %, и увеличивается длина привитых цепей.

Расчет средней длины цепи из сопоставления данных о молярном содержании звеньев молочной кислоты в очищенных от непрореагировавшего лактида образцах и амидных связей в гидролизованных фракциях (см. табл. 2) показывает, что степень полимеризации (СП) привитых цепей невысокая и закономерно снижается при меньшем содержании лактида в исходных смесях и при увеличении СА аминогрупп хитозана. Очевидно, что при избытке аминогрупп хитозана в реакционных смесях заметный вклад вносит реакция аминолиза привитой цепи, в результате которой вдвое возрастает степень замещения, и вдвое же укорачивается боковая цепь. Однако, поскольку шестичленный цикл лактида напряжен (превышение энергии цикла по сравнению с линейными аналогами составляет 10 ккал/моль), константа скорости реакции аминолиза образовавшегося заместителя меньше по сравнению с таковой для целевых реакций полимеризации лактида на хитозан.

Из данных фракционного анализа в водных средах следует, что повышение температуры обработки до 100 °С при эквимольном соотношении компонентов не влияет на

ТАБЛИЦА 2

Данные элементного анализа и степень ацилирования аминогрупп хитозана

Номер образца	Концентрация, ат. %			C/N	Содержание звеньев молочной кислоты, мас. %	Степень ацилирования аминогрупп хитозана	Средняя СП привитых цепей
	C	H	N				
Хитозан	44.70	6.8	8.70	4.57	0	–	–
1	44.26	6.83	7.86	5.63	9.7	0.19	5.0
2	44.39	6.87	7.91	5.61	9.1	0.19	3.0
3	43.81	6.88	7.89	5.55	9.3	0.19	7.8
4	41.92	6.79	6.65	6.30	23.5	0.41	4.1
5	42.86	6.61	6.65	6.44	23.5	0.41	4.2
6	44.66	6.75	6.84	6.53	21.1	0.37	9.7

Примечание. СП – степень полимеризации.

выход продуктов реакции (образец № 5), но приводит к потере растворимости образца (до 37 % от общей массы и 70 % в пересчете на содержание в образцах хитозана) за счет процессов ветвления и частичного сшивания полимера. Образцы № 1 и 2, полученные при молярном недостатке лактида, также содержат нерастворимую в воде фракцию (до 38 %), но ее наличие связано с низкой СА аминокрупп хитозана. Это подтверждается практически полным растворением образцов при подкислении среды до pH 6. Увеличение степени прививки лактидных звеньев на хитозан в образце № 6 приводит к тому, что модифицированный хитозан набухает в хлороформе, при этом его растворимость в водных средах, как при нейтральных, так и при кислых значениях pH, закономерно снижается. Содержание нерастворимой в воде фракции образца № 6 составляет 62 % от массы хитозана в образце.

Во всех экспериментах выявляется общая закономерность: липофильность системы возрастает при повышении степени замещения. Однако вследствие того, что система привитых цепей сополимера характеризуется сложным статистическим распределением по длинам основных и привитых молекул, а также по узлам прививки в макромолекулах основы, свойства таких молекулярных систем

очень разнообразны. Среди них можно выделить следующие: растворимость и набухание в хлороформе; растворимость в кислых водных средах; наличие фракции, растворимой в нейтральной воде (при этом содержащей хитозан). Способность растворяться и набухать в хлороформе обеспечивается длиной сложноэфирной подвески к хитозану и числом привитых цепей у одной его цепи. Растворимость в нейтральной воде указывает на образование относительно коротких цепей хитозана, содержащих остаток молочной кислоты (2-гидроксипропионил). Эти данные подтверждают протекание реакции аминотрансферного замещения.

В работе также исследовали возможность получения различных форм материалов из синтезированных сополимеров для регенеративной медицины. Для исходного хитозана и образца № 4 подобраны условия формирования макропористых полимерных гидрогелей с размерами пор, достаточными для диффузии питательных веществ и роста клеток размера (80–150 мкм) (рис. 3, а). Обнаружено, что гидрогели из сополимера полностью разрушаются в течение двух недель, в то время как потеря массы образца из хитозана составила 90 % за один месяц. При этом жизнеспособность клеток мышечных фибробластов (L929) на гидрогелях из сополимера оказалась выше на (80±4) %. Использование синтези-

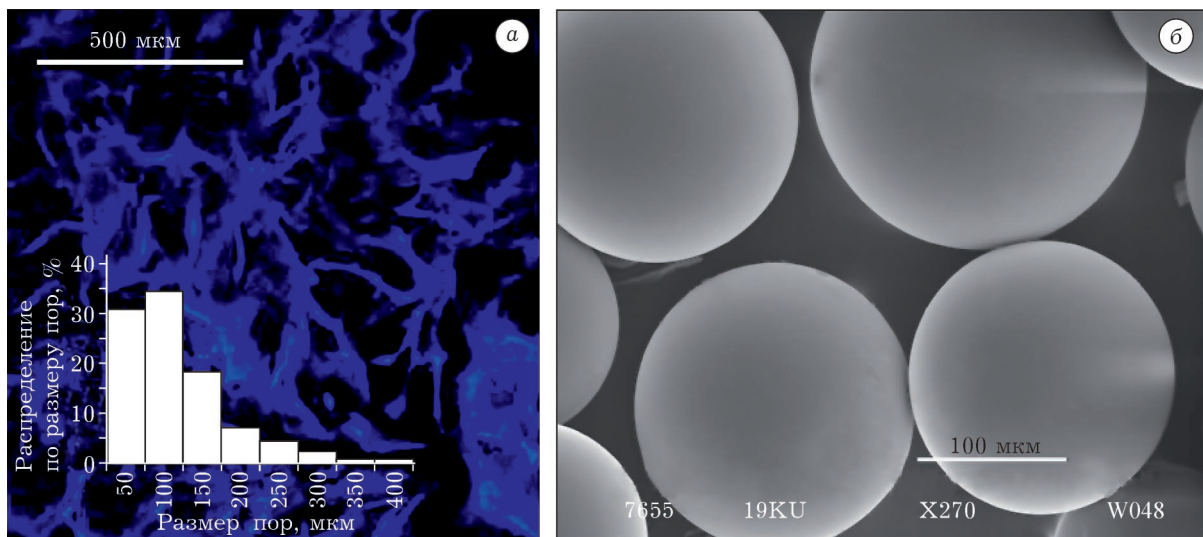


Рис. 3. Различные матричные формы для регенеративной медицины на основе сополимеров хитозана и лактида: а – конфокальная микрофотография гидрогеля; б – микрофотография микрочастиц, полученных при использовании образцов хитозан/лактид в качестве эмульгатора.

рованных сополимеров в качестве эмульгатора в водной фазе позволило получить безопасные для организма сферические микрочастицы из полилактида, которые характеризуются однородной поверхностью и необходимым для эффективного роста клеток распределением по размерам (см. рис. 3, б). Они представляют собой одни из наиболее перспективных видов матриксов для тканевой инженерии в качестве клеточных микроносителей.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, взаимодействие в условиях твердофазного синтеза хитозана и L,D-лактида приводит к прививке лактида на хитозан преимущественно за счет реакции ацилирования аминогрупп хитозана со степенью замещения не менее 0.19–0.41 и сопровождается полимеризацией лактида с раскрытием цикла. Степень прививки олиголактида в сополимерах достигает 160 % при средней степени полимеризации привитых цепей от трех до десяти звеньев. Введение в химическую структуру хитозана коротких привитых цепей лактида обеспечивает бифильность системы и способность хитозана набухать в органических растворителях. Полученные сополимеры могут быть успешно использованы при создании материалов для биотехнологий и медицины, так как характеризуются высокой биосовместимостью и скоростью биодеградации.

Авторы выражают глубокую признательность Д. С. Зайцевой-Зотовой, Е. А. Марквичевой (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН) и проф. К. Грандфису (Центр биоматериалов, Университет г. Льеж,

Бельгия) за помощь в получении и исследовании матриксов для регенеративной медицины на основе сополимеров хитозана и лактида.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Pillai C. K. S., Paul W., Sharma C. P. // *Progress in Polymer Science*. 2009. Vol. 34. P. 641–678.
- 2 Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение // под ред. К. Г. Скрябина, Г. А. Вихорева, В. П. Варламова. М.: Наука, 2003. С. 365.
- 3 Muzzarelli R. A. A. *Chitin Chemistry* // *The Polymeric Materials Encyclopedia*. Boca Raton FL: CRC Press, 1996.
- 4 *Biodegradable Polymer Blends and Composites from Renewable Resources* // Ed. by L. Yu. NY: John Wiley & Sons, Inc., 2009. P. 487.
- 5 Muzzarelli R. A. A., Muzzarelli C. // *Advances in Polymer Science*. 2005. Vol. 186. P. 151–209.
- 6 Haider S., Park S. Y. // *J. Membrane Science*. 2009. Vol. 328. P. 90–96.
- 7 Majeti N. V., Kumar R. // *Reactive and Functional Polymers*. 2000. Vol. 46. P. 1–27.
- 8 Park J. H., Cho Y. W., Chung H., Kwon I. C., Jeong, S. Y. // *Biomacromolecules*. 2003. Vol. 4. P. 1087–1091.
- 9 Yao F., Chen W., Wang H., Liu H., Yao K., Sun P., Lin H. // *Polymer*. 2003. Vol. 44. P. 6435–6441.
- 10 Luckachan G. E., Pillai C. K. S. // *Carbohydrate Polymers*. 2006. Vol. 64. P. 254–266.
- 11 Wu Y., Zheng Y., Yang W., Wang C., Hu J., Fu S. // *Carbohydrate Polymers*. 2005. Vol. 59. P. 165–171.
- 12 Liu Y., Tian F., Hu K. A. // *Carbohydrate Research*. 2004. Vol. 339. P. 845–851.
- 13 Feng H., Dong C.-M. // *Carbohydrate Polymers*. 2007. Vol. 70. P. 258–264.
- 14 Роговина С. З., Акопова Т. А., Вихорева Г. А., Горбачева И. Н., Зеленецкий С. Н. // *Высокомолекулярный соед.* А. 1998. Т. 40, № 8. С. 1389–1393.
- 15 Демина Т. С., Акопова Т. А., Владимиров Л. В., Щеголихин А. Н., Кечекьян А. С., Перов Н. С., Чернышенко А. О., Зеленецкий А. Н. // *Высокомолекулярный соед.* Б. 2011. Т. 53, № 6. С. 995–1008.
- 16 Акопова Т. А., Роговина С. З., Горбачева И. Н., Вихорева Г. А., Зеленецкий С. Н. // *Высокомолекулярный соед.* А. 1996. Т. 38, № 2. С. 263–268.
- 17 Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F. M., Arguelles-Monal W., Desbrieres J., Rinaudo M. // *Polymer*. 2001. Vol. 42. P. 3569–3580.