

УДК 543.422+547.458+543.3

ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТ–ВОДА МЕТОДОМ ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ

Н. В. Баграташвили, Н. Ю. Игнатъева, В. В. Лунин, А. П. Свиридов, А. Н. Харланов

(кафедра физической химии)

Были получены ИК-спектры пленок хондроитинсульфата с различным содержанием воды. Дифференциальные спектры в области валентного колебания воды ($3300\text{--}3700\text{ см}^{-1}$) аппроксимировались суперпозицией трех гауссовских составляющих, соответствующих поглощению «связанных» и «свободных» ОН-групп. Показано, что доля «связанных» ОН-групп увеличивается с уменьшением общего содержания воды в системе.

Воздействие лазерного излучения на биологические ткани активно исследуется в связи с разработкой новых подходов в медицине. Лазерная септохондрокоррекция хрящевых тканей находится на стадии внедрения в клиническую практику [1–2]. Для оптимизации лазерного воздействия на хрящевую ткань необходима разработка методов, позволяющих

определять и контролировать степень изменения состояния биоткани. Биоткани – сложные, многокомпонентные системы, в которых взаимодействие макромолекул с водой оказывает решающее воздействие на вторичную и третичную структуры биополимеров, а также определяет надмолекулярную организацию макромолекул [3].

Важнейшими составляющими внеклеточного матрикса хрящевой ткани являются гликозаминогликаны. Эти соединения благодаря наличию полярных и частично ионизированных заместителей способствуют гипергидратации хрящевых тканей, в значительной степени определяющей механические свойства [4–5]. Хондроитинсульфат (ХС), составляющий около 80% всех гликозаминогликанов, представляет линейный полисахарид, состоящий из повторяющихся остатков β -D-глюкопиранозилуруновой кислоты и 2-ацетидамо-2-дезоксид- β -D-галактозпиранозил-4 (или 6) сульфата, соединенных (1→3)- и (1→4)-связями соответственно.

Цель данной работы состояла в изучении состояния воды в пленках ХС методом ИК-Фурье-спектроскопии.

Экспериментальная часть

В экспериментах использовали хондроитинсульфат-А (*Fluka*). ИК-спектры регистрировали на однолучевом Фурье-спектрофотометре «*EQUINOX 55/S*» в диапазоне частот 1000–8000 см^{-1} со спектральным разрешением 4 см^{-1} .

Для приготовления пленок на пластину из BaF_2 наносили 5%-й водный раствор ХС, который затем высушивали в среде с 60%-й влажностью при комнатной температуре (20°) и визуальном контроле однородности толщины получающейся пленки. Полученные пленки имели толщину ~20 мкм для исследований в спектральной области 1000–3700 см^{-1} или ~100 мкм для исследования в спектральной области 5000–8000 см^{-1} . После измерения спектра полученной пленки содержание воды в ней корректировалось путем приведения в равновесие в замкнутом объеме эксикатора со средой с различной влажностью. Для создания 100%-й влажности среды на дно эксикатора наливали дистиллированную воду. Влажность (~15%) достигалась при помещении в эксикатор осушителя (силикагеля). В обоих случаях пленку выдерживали в эксикаторе в течение 48 ч.

Содержание воды в исходных пленках при относительной влажности 60% определяли термогравиметрическим методом на термоанализаторе «*Netzsch STA-409*». Образцы нагревали от 20 до 120° со скоростью 5 град/мин и выдерживали при 120° в течение 1 ч. Потеря массы составила 9,72%. В этом диапазоне температур, по данным работы [6], химические превращения ХС не происходят, следовательно, указанная потеря массы связана с испарением воды.

Обсуждение результатов

На рис. 1 приведены спектры поглощения пленок ХС. Положение полос, связанных с поглощением макромолекулы ХС, совпадает с положением полос в спектрах, полученных для растворов ХС методом ИК-спектроскопии и для порошков ХС методом спектроскопии комбинационного рассеяния [7]. В ИК-спектре активны валентные колебания СН (2920 см^{-1}), С=О амидной группы N-ацетилгалактозамина (1615 см^{-1} , амид I), деформационные колебания амидной группы (1570 см^{-1} , амид II и 1345 см^{-1} , амид III), симметричные деформационные колебания CH_3 группы (1375 см^{-1}) и деформационные колебания CH_2 -группы

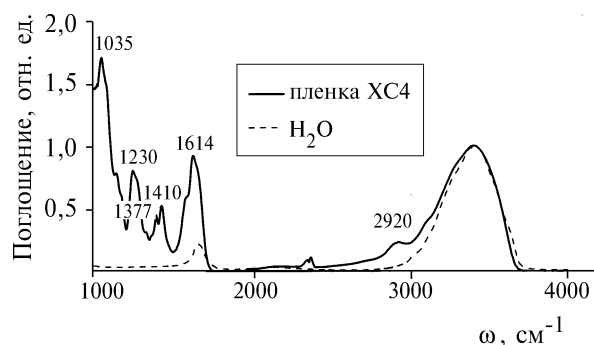


Рис. 1. ИК-спектр пленки хондроитинсульфата (для сравнения представлен ИК-спектр H_2O)

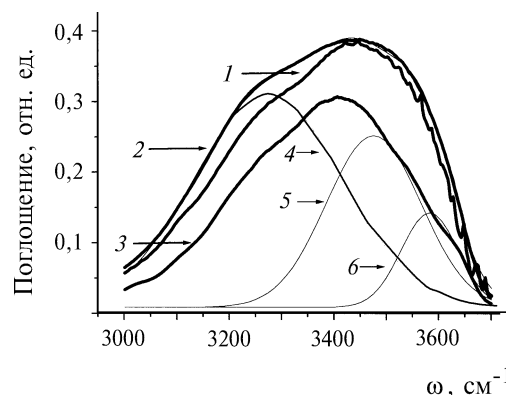


Рис. 2. Дифференциальный спектр воды в пленках хондроитинсульфата при относительной влажности (%): 100–60 (1); 60–15 (2); для сравнения представлен ИК-спектр H_2O (3) кривые 4–6 представляют гауссовские составляющие полосы поглощения валентного колебания ОН-группы воды

(1410 см^{-1}), а также асимметричные и симметричные колебания OSO_3^- группы (1230 и 1067 см^{-1}).

Спектр поглощения в области 3000–3800 см^{-1} представляет собой суперпозицию нескольких полос поглощения. Суммарная полоса поглощения валентных колебаний ОН-группы воды перекрывается полосами валентных колебаний ОН- и NH-групп ХС. Поэтому для анализа истинного состояния воды использовались дифференциальные (разностные) спектры воды. Дифференциальный спектр воды в пленке определялся путем вычитания спектров пленок с большим содержанием воды из спектров пленок с меньшим содержанием воды (рис. 2, кривые 1–2).

Полоса поглощения 3000–3800 см^{-1} в дифференциальном спектре воды численно аппроксимировалась суперпозицией нескольких гауссовских составляющих с варьированием всех параметров гауссовой функции. Наилучшее соответствие с экспериментальными спектрами дала аппроксимация тремя пиками (рис. 2, кривые 4–6). Эти пики могут быть отнесены к поглощению «связанными» ОН-группами (полоса поглощения 3240 см^{-1}), слабосвязанными ОН-группами (с центром 3440 см^{-1}) и свободными гидроксилами (~3600 см^{-1}) [8–11]. В качестве количественной характеристики доли связанных ОН-групп было выбрано отношение площади пика 3240 см^{-1} к общей площади полосы 3000–3700 см^{-1} . Результаты такой обработки спектров приведены в таблице. Из этих данных видно, что количество связанных ОН-групп молекул воды

**Изменение относительного количества связанных
ОН-групп молекул воды в пленках хондроитинсульфата**

Образец	Относительная площадь пика 3240 см ⁻¹
ХС-пленка (15–60% влажности)	0,70±0,05
ХС-пленка (60–100% влажности)	0,55±0,15
Вода	0,37

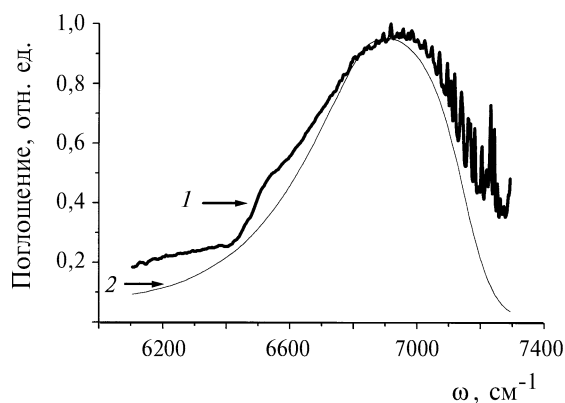


Рис. 3. Поглощение воды в пленке ХС в области обертона валентного колебания (1), для сравнения показана полоса поглощения чистой воды (2)

в пленках биополимеров существенно больше, чем в чистой воде.

На основании данных дифференциальной сканирующей калориметрии системы ХС–вода [12] и теоретического моделирования методом молекулярной динамики [13] было показано, что дисахаридное звено ХС связывает около 20 молекул воды, включая водно-мостиковые связи между остатками сахаров. Однако в наших образцах

содержание воды составляло < 20 молекул на дисахарид, поэтому все ОН-группы молекул воды могут образовывать водородные связи с полярными группами макромолекул. В ИК-спектре валентного колебания ОН это проявляется как увеличение вклада полосы 3240 см⁻¹ сильносвязанных ОН-групп. Усиление водородных связей качественно проявляется и в спектральной области обертона валентного колебания ОН 6200–7200 см⁻¹ (рис. 3). Однако количественное описание этой полосы затруднено из-за незначительного молярного коэффициента поглощения в этой области (30 см⁻¹ [14]).

При высушивании пленок ХС относительная доля пика 3240 см⁻¹ возрастает. По-видимому, в первую очередь десорбируются молекулы воды, менее жестко связанные с полярными группами полимера. Подобный эффект описан в работе [15], авторами которой было показано, что с уменьшением содержания воды в образцах пленок коллагена I относительная интенсивность поглощения менее «связанных» ОН-групп (3440 см⁻¹) падает быстрее, чем интенсивность более «связанных» ОН-групп.

В водных растворах и гелях полимеров, содержащих преимущественно гидрофобные группы, число дефектов в структуре водородных связей растворителя возрастает с увеличением концентрации полимера, в ИК-спектре это проявляется как относительное увеличение поглощения в полосе 3440 см⁻¹ слабосвязанных ОН-групп и содержания воды [11–12]. Полученное нами относительное увеличение поглощения в полосе сильносвязанных ОН-групп 3240 см⁻¹ свидетельствует об упорядоченной структуре воды, связанной водородными связями с полярными группами хондроитинсульфата.

Авторы благодарят за финансовую поддержку РФФИ (грант 00-02-16263), Фонд поддержки ведущих научных школ (грант 00-15-96596) и выражают признательность проф. В.Н. Баграташвили за участие в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Helidonis E., Sobol E., Kavvalos G., Bizakis J., Christodoulou P., Velegrakis G., Segas J., Bagratashvili V. // Amer. J. Otolaryngol. 1993. **14**. P. 410
2. Bagratashvili V.N., Sobol E.N., Omelchenko A.I., Sviridov A.P. // J. Biomechanic. 1997. **30**. P. 813.
3. Структура и стабильность биологических макромолекул / Под ред. С.Н. Тимашофф, Дж.Д. Фасман. М., 1973.
4. Comper W. D. Physicochemical aspects of cartilage extracellular matrix in Cartilage: Molecular Aspects. Boston; London, 1991.
5. Cohen N.P., Foster R.G., Mow V.C. // J. Orthop. Sports Phys. Ther. 1998. **28**. P. 203.
6. Peper J.S., Oosterhof A., Dijkstra P. J., Veerkamp J. H., Kuppeveet T. H. // Biomaterials. 1999. **20**. P. 847.
7. Bensil R., Yannis I.V., Stenley H.E. // Biochim. Biophys. Acta. 1978. **541**. P. 535.
8. Water and Biological Macromolecules. L., 1993.
9. The Hydrogen Bond Schuster-Zundel-Sandorfy / Ed. Verlag North Holland Publ. 1976. P. 527.
10. Terada T., Maeda Ya., Kitano H. // J. Phys. Chem. 1993. **97**. P. 3619.
11. Lafleur M., Rigeon M., Pezolet M. // J. Phys. Chem. 1989. **93**. P. 1522.
12. Вода в полимерах / Под ред. С.П. Роуланд. М., 1984.
13. Kaufmann J., Muhle K., Hofmann H.J., Arnold K. // Carbohydrate Research. 1999. **318**. P. 1.
14. Wieliczka D. M., Weng S., Query M.R. // Appl. Opt. 1989. **28**. P. 1714.
15. Shibata T., Tonan K., Yasuda T., Ikawa S.-I. // Applied Spectroscopy. 1997. **51**. P. 337.

Поступила в редакцию 20.04.01