

УДК 544.7 + 577.1

## ОСОБЕННОСТИ ГИДРАТАЦИИ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ПО ДАННЫМ $^1\text{H}$ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

В.В. Туров\*, А.П. Угнивенко, А.П. Головань, В.Н. Барвинченко, В.М. Гунько

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины  
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина*

*Методом низкотемпературной  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии изучена гидратация гиалуроновой кислоты на воздухе и в среде слабополярного растворителя дейтерохлороформа, а также в замороженных водных растворах. Определены термодинамические параметры сильно- и слабосвязанной воды, а также межфазной энергии системы полимер-вода. Обнаружено, что среда дейтерохлороформа в условиях невысокой гидратации оказывает на связанную воду дифференцирующее действие. При этом в спектрах отдельно регистрируются четыре сигнала сильноассоциированной воды и сигнал слабоассоциированной воды. С ростом гидратации формируется единая водная система. В водных растворах максимальное значение межфазной энергии полимер-вода наблюдается при 2% гиалуроновой кислоты, что отвечает началу формирования гелеобразных структур.*

### ВВЕДЕНИЕ

Гиалуроновая кислота (ГК или ее соль – гиалуронат натрия, ГН), которая относится к полимерным гликозаминогликанам с молекулярной массой 4–20 кДа, в последние годы широко используется в медицинской практике в качестве биоактивного вещества, способного оказывать стимулирующее действие на восстановление и регенерацию тканей [1, 2]. Она входит в состав синовиальной жидкости и многих органов, в частности, глазного яблока, слизистой оболочки желудка и кишечника, а также соединительных тканей. В настоящее время на основе ГК и ГН разработан ряд препаратов для лечения таких заболеваний, как остеопороз, артриты и артрозы путем введения ГК непосредственно в суставную сумку. При этом экзогенный ГН может стимулировать образование собственного полноценного ГН [3, 4]. При воздействии на синовиальные фибробласты больных остеопорозом ГК с различной молекулярной массой количество вновь синтезированного ГН зависит как от концентрации, так и от молекулярного веса экзогенного гликозаминогликана.

Благодаря присутствию в ГК большого количества гидроксильных, карбонильных и ацетамидных групп, ее молекулы могут связывать значительное количество воды, с

которой они легко формируют коллоидные, гелеподобные системы [5]. Эти гели используются в косметологии в качестве активной компоненты некоторых омолаживающих композиций [6–8]. При этом вода служит структурообразующим компонентом, во многом определяющим не только физико-химические, но и функциональные свойства материалов. Поэтому изучение гидратационных свойств ГК/ГН в водной, органической и газовой средах является актуальным.

К наиболее информативным методам исследования гидратации биополимеров относится  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопия с послонным вымораживанием жидкой фазы [9–12]. С ее помощью (в приближении гиббсовского адсорбционного слоя конечной толщины [13]) путем сравнения интенсивностей сигнала воды до и после замораживания образца может быть измерено количество воды, связанной с полимером (концентрация незамерзающей воды,  $C_{nw}$ ), изменение свободной энергии Гиббса ( $\Delta G$ ) воды в адсорбционном слое, а также величина межфазной энергии связанной воды, которая определяется как суммарное понижение свободной энергии воды, обусловленное наличием границы раздела фаз. По изменению температуры замерзания связанная вода может быть разделена на

\* контактный автор v\_turov@ukr.net  
ХФТП 2012. Т. 3. № 2

слабосвязанную (замерзающую при  $T > 250$  К) и сильносвязанную (замерзающую при  $T < 250$  К). Значение концентрации каждого типа воды в разных образцах может быть определено по зависимости  $C_{им}(T)$ . Используя уравнение Гиббса-Томсона (формула (1)) как базовое в ЯМР-крипорометрии [9, 10, 14], можно рассчитать распределение по размерам наноклапел/кластеров связанной воды. Эту зависимость можно рассматривать как распределение пор/карманов в порошке ГК. В случае растворов она относится только к связанной воде – объемная вода не учитывается, поскольку она не чувствует наличия ГК.

Пространственная структура связанной воды может быть определена на основании  $^1\text{H}$  ЯМР спектров по значениям химического сдвига ( $\delta_{\text{H}}$ ), поскольку величина  $\delta_{\text{H}}$  изменяется от 1–1.5 м.д. для воды, не участвующей в формировании водородно-связанных комплексов как протонодонор (слабоассоциированная вода), до 7 м.д. в гексагональном льду [9, 10, 15]. В жидкой объемной воде, в зависимости от температуры измерения,  $\delta_{\text{H}}$  составляет 4.5–5 м.д. (сильноассоциированная вода). Рост упорядоченности сетки водородных связей (лед) приводит к росту, а ее разупорядочение (нагретая вода) к уменьшению химического сдвига. Упорядоченность воды, контактирующей с разными участками поверхности частиц дисперсионной фазы (в том числе и макромолекул) может быть различной. Кроме того, наличие растворенных ионов, свободных протонов, высокополярных групп приводит к росту величины  $\delta_{\text{H}}$ , т.е. к снижению электронного экранирования протонов в молекулах воды. Поэтому в спектрах могут наблюдаться несколько сигналов связанной воды. Однако в случае быстрого молекулярного обмена (например, единая водная система в растворе) химические сдвиги сигналов, отвечающих разным водным структурам, усредняются. В результате в спектре наблюдается один широкий сигнал с химическим сдвигом, определяемым статистическим весом всех присутствующих акваассоциатов. Введение соразтворителей (например, дейтерохлороформа  $\text{CDCl}_3$ ) или значительное уменьшение концентрации воды приводит к фрагментарности связанной

воды и отсутствию быстрого обмена между разными структурами. Это позволяет анализировать строение системы более детально, особенно последовательно изменяя содержание воды. Поэтому целью настоящей работы было изучение методом низкотемпературной ЯМР-спектроскопии и ЯМР-крипорометрии строения гидратных комплексов в порошках гиалуроновой кислоты с разной гидратированностью в среде слабополярного органического растворителя – дейтерохлороформа, а также в водных растворах ГК различной концентрации.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследованиях использовали лиофилизированную гиалуроновую кислоту (китайского производства), содержащую 1.7 мас. % воды. Для приготовления образцов 200–250 мг порошка ГК помещали в 5 мм измерительную ампулу ЯМР и проводили измерение спектров ЯМР в температурном интервале 200–280 К. Далее, к образцу добавляли 500 мкл дейтерохлороформа и повторяли измерения в среде органического растворителя. Дополнительные порции воды (5 и 15 % по отношению к массе кислоты) вводили через органическую фазу. После интенсивного встряхивания образец герметизировали и уравнивали при комнатной температуре в течение недели. Водные суспензии ГК и образец, содержащий 2.15 г/г воды, готовили непосредственно перед измерением с уравниванием в течение 1 часа.

Спектры ЯМР получали на ЯМР-спектрометре высокого разрешения (Varian “Mercury”) с рабочей частотой 400 МГц. Использовали  $90^\circ$  зондирующий импульс длительностью 3 мкс. Температура в датчике регулировалась термоприставкой Bruker VT-1000 с точностью  $\pm 1$  град. Интенсивности сигналов определяли измерением площади пиков с использованием процедуры разложения сигнала на его составляющие в предположении гауссовской формы сигнала и оптимизации его нулевой линии и фазы с точностью, которая для хорошо разрешенных сигналов была не хуже 5 %, а для перекрывающихся сигналов –  $\pm 10$  %. Для предотвращения переохлаждения воды в исследуемых объектах измерения концентрации незамерзающей воды проводили при нагревании образцов, предварительно охлажденных до 200 К. Методика ЯМР-измерений и

определения термодинамических характеристик и радиуса кластеров межфазной воды подробно описана в [9–12].

Для определения геометрических размеров кластеров связанной воды использовали уравнение Гиббса-Томпсона, связывающее радиус цилиндрической поры ( $R$ ) со снижением температуры замерзания воды в ней:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl}T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (1)$$

где  $T_m(R)$  – температура плавления льда, локализованного в порах радиуса  $R$ ,  $T_{m,\infty}$  – температура плавления объемного льда,  $\rho$  – плотность твердой фазы,  $\sigma_{sl}$  – энергия взаимодействия твердого тела (макромолекулы, лед) с жидкостью и  $\Delta H_f$  – объемная энтальпия плавления.

Это уравнение может быть использовано для вычисления распределения пор по размерам из температурной зависимости величины  $C_{uw}$ , полученной на основе метода  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии с послойным вымораживанием воды, для водных суспензий твердых тел или гидратированных биологических объектов, когда применение других методов анализа структурных характеристик затруднительно [9]. Для практического использования уравнение (1) можно применять в виде  $\Delta T_m = (k/R)$ , в котором константа  $k$  для полимерных систем, содержащих воду, близка к  $50 \text{ K}\cdot\text{нм}$  [14].

В методе слоя конечной толщины [13] предполагают, что влияние поверхности границы раздела фаз распространяется на несколько молекулярных слоев вглубь жидкой фазы. Процесс замерзания (плавления) межфазной воды, локализованной на границе твердой пористой матрицы, характеризуется соответствующими изменениями свободной энергии Гиббса, обусловленными влиянием поверхности. Эти изменения тем меньше, чем дальше от поверхности изучаемый слой воды. При  $T = 273.15 \text{ K}$  замерзает вода, свойства которой не отличаются от объемных, а по мере понижения температуры (без учета эффекта переохлаждения) замерзают слои воды, все ближе расположенные к поверхности. Для льда справедливо соотношение:

$$\Delta G_{ice} = -0.036(273.15 - T), \quad (2)$$

где численный коэффициент представляет собой параметр, связанный с температурным коэффициентом изменения свободной энергии Гиббса для льда [16].

Определяя по величине интенсивности сигнала температурную зависимость концентрации незамерзающей воды  $C_{uw}(T)$  по методике, подробно описанной в [5–8], можно рассчитать количества сильно- и слабосвязанной воды, а также термодинамические характеристики этих слоев в предположении, что изменение температуры замерзания связанной воды связано с изменением свободной энергии в соответствии с уравнением (2).

Межфазную энергию воды ( $\gamma_s$ ) на границе с твердыми частицами ГК или в ее водных растворах определяли как модуль суммарного понижения свободной энергии воды, обусловленного наличием границы раздела фаз [9–12], по формуле:

$$\gamma_s = -K \int_0^{C_{uw}^{\max}} \Delta G(C_{uw}) dC_{uw}, \quad (3)$$

где  $C_{uw}^{\max}$  – общее количество незамерзающей воды при  $T = 273 \text{ K}$ .

Квантово-химические расчеты гидратированной ГК были проведены методом РМ6 (программа MOPAC2009) [17].

Величину химического сдвига рассчитывали по корреляционному уравнению  $\delta_H = a + bq_H$  ( $a = -27.97889$  и  $b = 87.56668$ ), где  $q_H$  – заряд на атомах водорода (РМ6).

Приведенные константы были рассчитаны на основе параллельных DFT (GIAO/B3LYP/6-31G(d,p)) расчетов ЯМР спектров и РМ6 расчетов электронной структуры различных кластеров молекул воды с полной оптимизацией их пространственного строения в рамках обоих методов.

Функцию распределения величин  $\delta_H$  рассчитывали по формуле

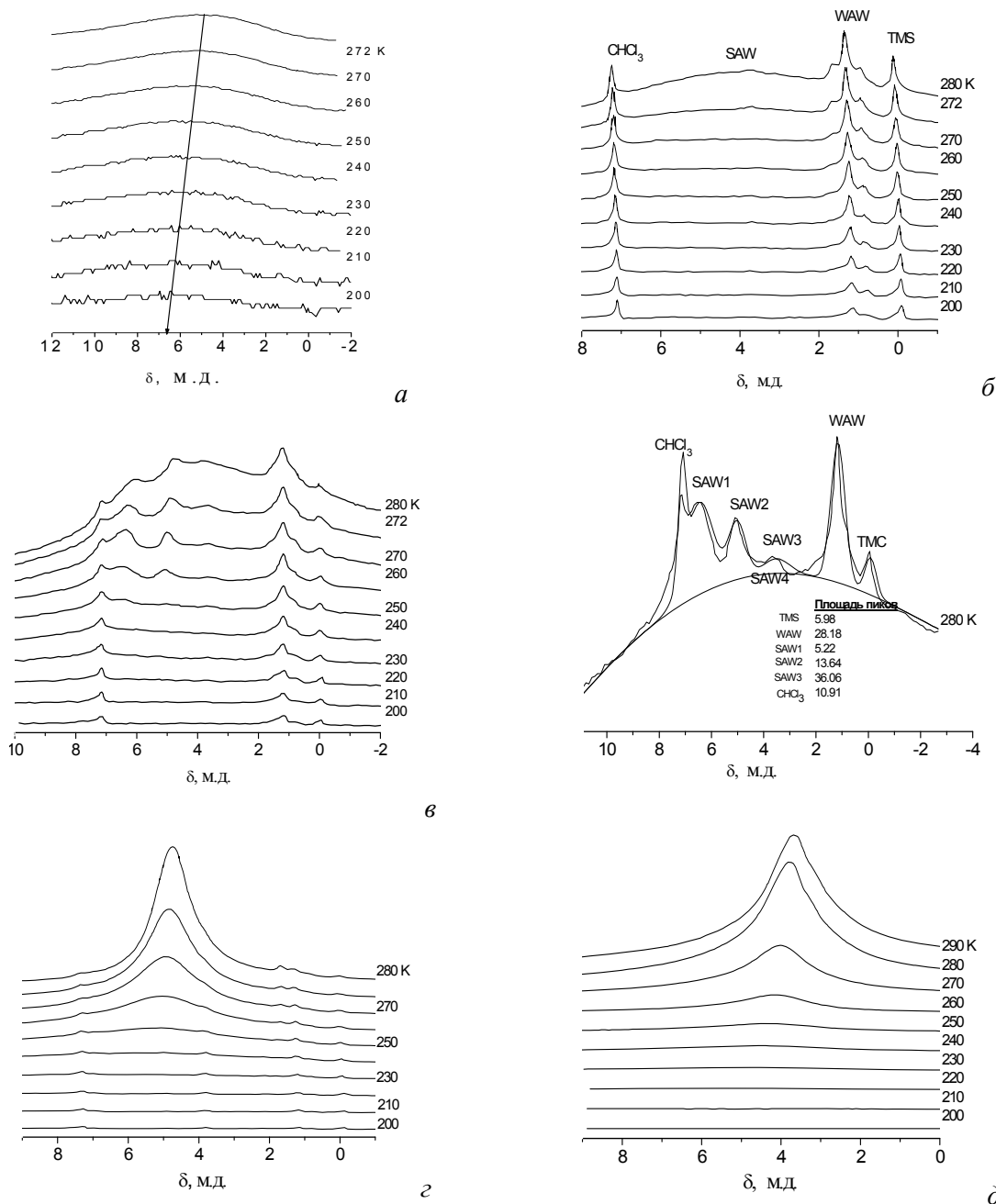
$$f(\delta_H) = (2\pi\sigma^2)^{-0.5} \sum_j \exp[-(\delta_j - \delta_H)^2 / 2\sigma^2], \quad (4)$$

где  $j$  – номер атома Н в системе,  $\sigma^2$  – дисперсия распределения и  $\delta_j$  – величина химического сдвига на  $j$ -ом атоме Н.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При содержании воды  $C_{H_2O} = 17$  мг/г в порошке ГК, находящейся в воздушной среде,  $^1H$  ЯМР спектр (рис. 1, а) представляет собой широкий одиночный сигнал, интенсивность которого уменьшается с понижением температуры вследствие частичного

замерзания связанной воды. Химический сдвиг смещается в сторону слабых полей, что показано пунктирной линией, проходящей через максимальные значения интенсивности сигналов.



**Рис. 1.** Спектры  $^1H$  ЯМР воды, адсорбированной порошками гиалуроновой кислоты при разной гидратированности: а - 17мг/г  $H_2O$  на воздухе; б - 17 мг/г  $H_2O$  в среде  $CDCl_3$ ; в - 67 мг/г  $H_2O$  в  $CDCl_3$  (справа в увеличенном масштабе показан спектр, снятый при 280 К, и его разложение на составляющие); г - 167 мг/г  $H_2O$  в  $CDCl_3$ ; д - 2176 мг/г  $H_2O$  в  $CDCl_3$

Химический сдвиг сигнала находится в интервале 5.0–6.8 м.д., поэтому всю воду можно отнести к сильноассоциированной (SAW). Это можно объяснить тем, что вода образует единую недифференцированную систему. Структура такой воды показана на рис. 3. Расчет спектра воды, локализованной в порах (карманах) ГК, дает значения химического сдвига (рис. 2, кривая 1), близкие к экспериментальным. Протоны в COOH-группах ГК, как наиболее кислые, проявляются в области 7–8 м.д. (рис. 2, кривая 2). Интенсивность в этой области спектра невысока, поскольку относительное число протонов в таких группах невелико. Меньший химический сдвиг протонов в C–H и N–H-группах обуславливает большую интенсивность спектра в области более сильных магнитных полей, поскольку электронное экранирование этих протонов выше, чем в молекулах воды. Следует отметить, что в экспериментальных спектрах атомы водорода в ГК (как и во льду) не проявляются, поскольку время релаксации протонов в твердых телах (лед, ГК) на несколько порядков меньше, чем для адсорбированной воды. Тогда в спектрах регистрируются только протоны от той воды, которая не перешла в фазу гексагонального льда. [10, 11].

При помещении гидратированного порошка ГК в среду  $\text{CDCl}_3$  (рис. 1, б) кроме сигнала SAW в спектрах наблюдаются сигналы слабоассоциированной воды (WAW) с химическими сдвигами в диапазоне 0.8–1.5 м.д. Количество WAW возрастает с ростом температуры, поскольку происходит размораживание части воды. В спектрах наблюдаются также сигналы тетраметилсилана (TМС,  $\delta_{\text{H}} = 0$  м.д.) и непродейтерированной составляющей хлороформа ( $\delta_{\text{H}} = 7.2$  м.д.). Наличие нескольких сигналов WAW свидетельствует о неоднородности воды. Некоторая (незначительная) часть воды может быть растворена в жидкой фазе хлороформа. Такая вода также является слабоассоциированной (неассоциированной). В спектрах она может быть идентифицирована как сигнал WAW, расположенный ближе всего к сигналу TМС, с химическим сдвигом  $\delta_{\text{H}} = 0.8$  м.д. (рис. 1, б). Остальные типы WAW можно отнести к гидратным структурам, формирующимся на межфазных границах частиц полимера с участием  $\text{CDCl}_3$  - хлороформ разделяет часть воды на малые

кластеры, между которыми нет контакта, т.е. нет быстрого обмена. Эти кластеры могут быть локализованы в узких карманах (рис. 3). Сопоставление интенсивностей сигналов SAW и WAW показывает, что максимальная концентрация WAW достигает 10 % от общего количества связанной воды.

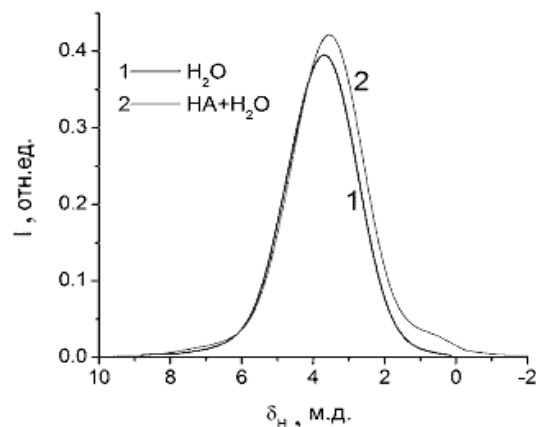


Рис. 2. Расчетные  $^1\text{H}$  ЯМР спектры воды, связанной водородными связями с гиалуроновой кислотой (1), и суммарный спектр с учетом протонов ГК (2)

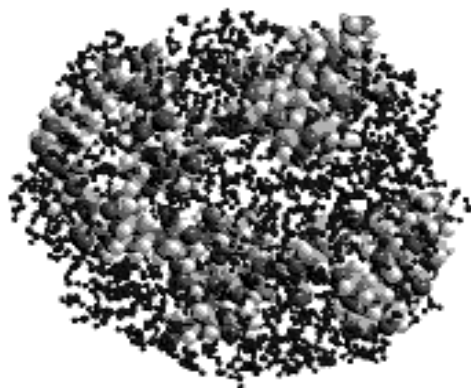


Рис. 3. Строение гидратированной гиалуроновой кислоты (метод РМ6)

С повышением гидратированности образца до 67 мг/г (рис. 1, в) вид спектров изменяется. В них кроме (сигналов) слабоассоциированной воды, наблюдается несколько узких сигналов сильноассоциированной воды (SAW1-3) с химическими сдвигами 6.5, 5 и 4 м.д., которые можно выделить на фоне широкого сигнала (SAW4) с  $\delta_{\text{H}} = 4$  м.д. Это можно интерпретировать как формирование системы микро- и нанодоменов SAW с разной степенью ассоциированности молекул. В правой части рис. 1, в приведен спектр сигнала воды при 270 К и его

разложение на составляющие в предположении гауссовской формы линий. Цифры на спектре соответствуют интегральной интенсивности разных форм связанной воды. С понижением температуры сигналы разных форм SAW уширяются и смещаются в слабые магнитные поля, что характеризует общее упорядочение гидратной оболочки полимера и формированием в ней максимального количества тетракоординированной воды, со структурой близкой к структуре гексагонального льда. Сопоставление рис. 1, б и 1, в показывает, что с ростом гидратированности полимера возрастает также и интенсивность сигнала слабоассоциированной воды.

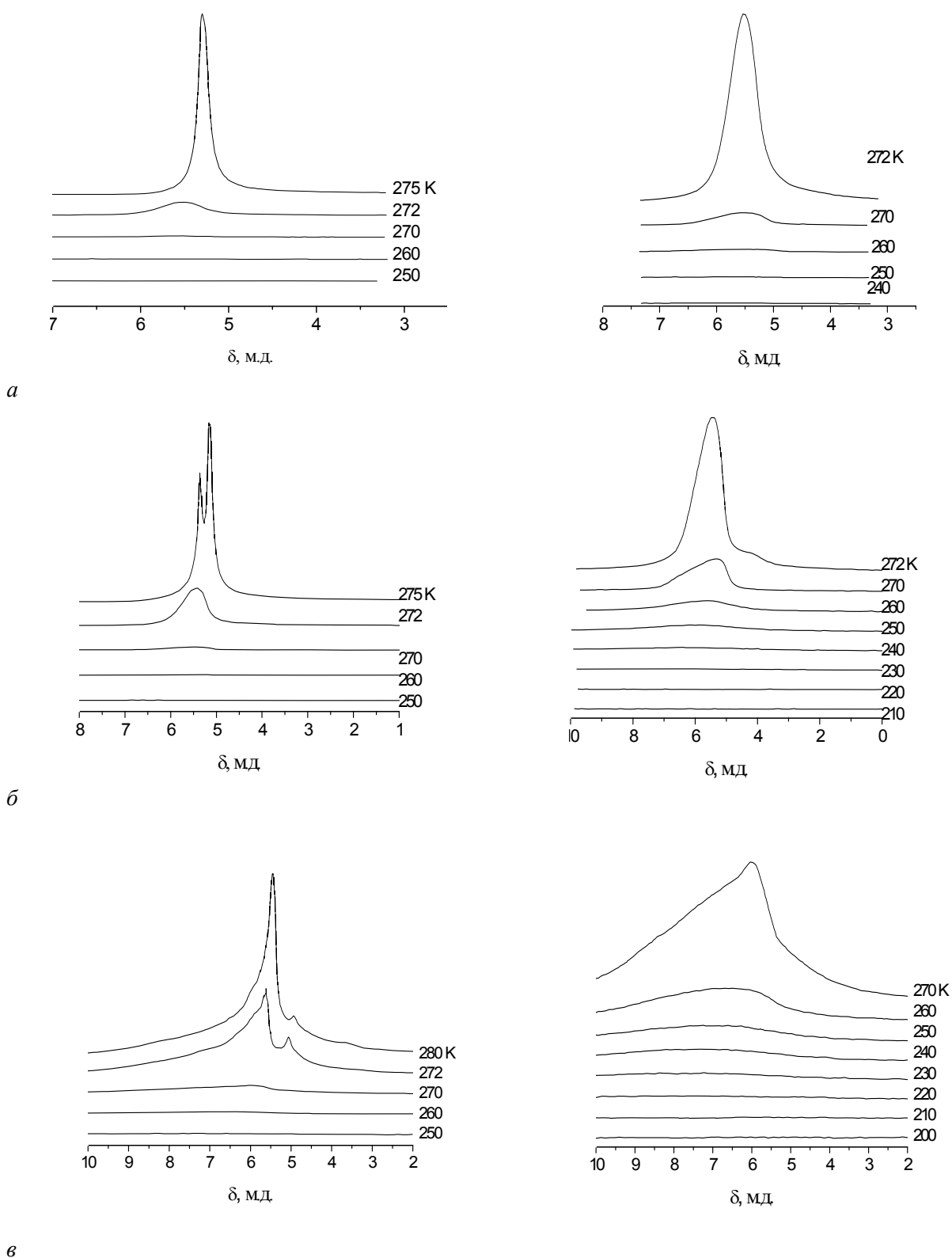
Дальнейший рост концентрации адсорбированной воды (рис. 1, з, д) приводит к исчезновению в спектрах отдельно наблюдающихся кластерных структур воды и появлению одного сигнала, химический сдвиг которого составляет  $\delta_H = 4.5$  м.д. при  $C_{H_2O} = 167$  мг/г и 3.5 м.д. при  $C_{H_2O} = 2167$  мг/г. Вероятно дифференциация связанной воды обусловлена наличием пор (межчастичных зазоров) различной формы и размера. При адсорбции воды в порошках ГК формируются кластеры и домены, размеры которых увеличиваются с ростом гидратированности ГК. Ранее кластерная адсорбция воды наблюдалась на различных высокодисперсных оксидных и углеродных материалах, полимерах и биополимерах [9–12]. В случае, когда размеры кластеров достигают некоторой критической величины, происходит их перекрывание и формирование сплошной гидратной структуры, в которой осуществляется быстрый молекулярный обмен между участками с разной средней ассоциированностью. При этом влияние поверхности ГК на удаленные слои воды уменьшается с ростом гидратированности. Кроме того, вода контактирует и с гидрофобными группами ГК. Вода растекается по всей поверхности ГК, и ее ассоциированность несколько снижается. В сумме, эти эффекты обуславливают смещение сигнала  $^1H$  ЯМР в сильные магнитные поля (ср. рис. 1, з и 1, д).

В водных растворах ГК (рис. 4) интенсивность сигнала незамерзающей воды с понижением температуры быстро уменьшается. Следовательно, основная часть незамерзающей воды относится к слабо связанной. При замораживании 1 % раствора ГК в спектрах

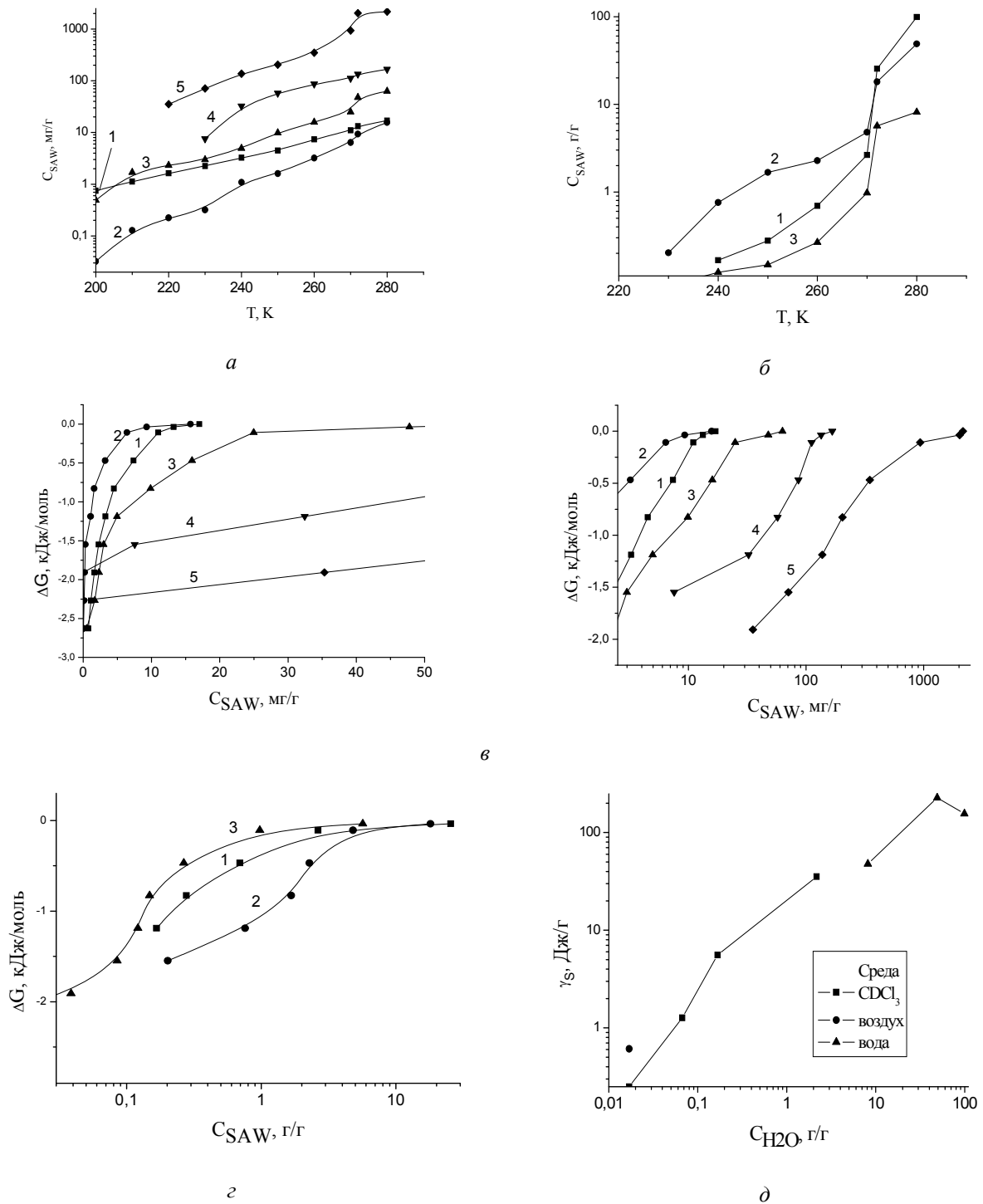
наблюдается одиночный, почти симметричный сигнал, форма которого близка к гауссовской. С ростом концентрации ГК сигнал распадается на 2–3 сигнала, которые регистрируются как в замороженных растворах, так и после их размораживания (рис. 4, б, в). Как и следовало ожидать, в замороженных растворах стабилизируются формы связанной воды с большими значениями химического сдвига. Это свидетельствует о повышении ассоциированности структур в связанной воде.

На кривых зависимостей  $C_{uw}(T)$  при  $T > 250$  К наблюдаются изломы (рис. 5), отделяющие области, которые относятся к сильно- и слабо связанной воде. Соотношения между изменениями свободной энергии Гиббса и концентрацией незамерзающей воды показаны на рис. 5, в для гидратированных порошков, а на рис. 5, з – для замороженных растворов ГК. Рассчитанные в соответствии с методикой, описанной в [5–8], термодинамические характеристики слоев сильноассоциированной воды суммированы в таблице. Зависимость величины межфазной энергии связанной воды от ее содержания приведена на рис. 5, д. На рис. 6 показаны распределения по размерам кластеров связанной воды в гидратированных порошках и замороженных растворах ГК, рассчитаны по формуле (1).

Величина  $\Delta G^S$  характеризует максимальное понижение свободной энергии в слое сильно связанной воды и отражает влияние поверхностных сил на воду в ближайшем к поверхности адсорбционном слое. При минимальной гидратированности ГК замена воздушной среды на среду слабополярного органического растворителя  $CDCl_3$  приводит к уменьшению значений  $\Delta G^S$  и  $\gamma_s$ . Это следует интерпретировать как вызванное органической средой уменьшение взаимодействия связанной воды с поверхностью полимера, что проявляется в росте среднего размера кластеров адсорбированной воды (рис. 6, а). В среде  $CDCl_3$  с ростом гидратированности величина  $\gamma_s$  монотонно возрастает, в то время как минимальное значение  $\Delta G^S$  фиксируется при  $C_{H_2O} = 167$  мг/г. При этой концентрации имеет место минимальное связывание воды с полимером вследствие формирования более крупных доменов адсорбированной воды (рис. 6, а).



**Рис. 4.** Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР замороженных растворов гиалуроновой кислоты разной концентрации: 1 (а), 2 (б) и 12 % (е) растворы в  $\text{H}_2\text{O}$

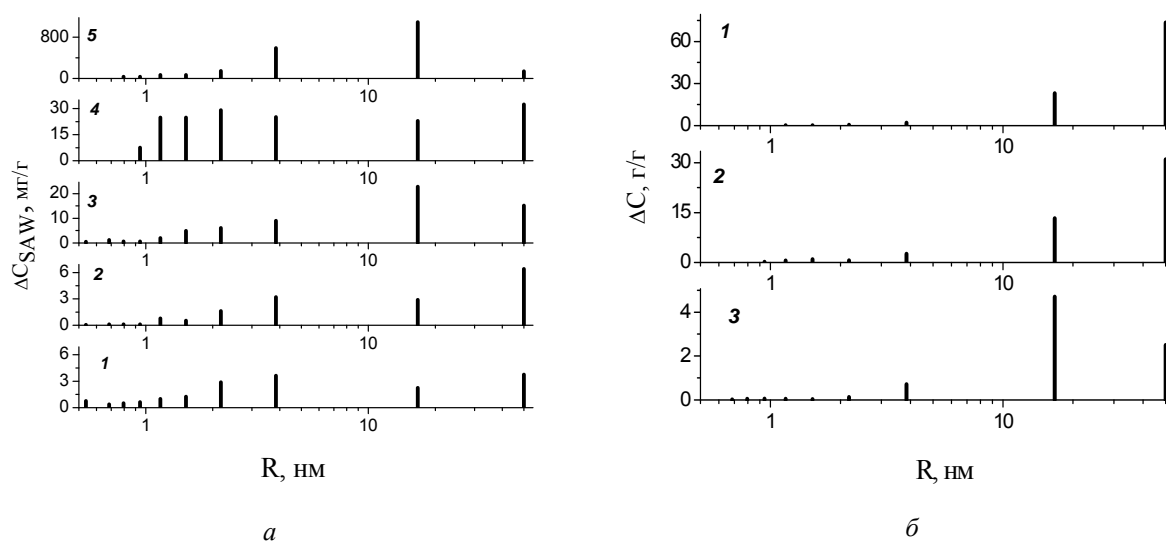


**Рис. 5.** Температурные зависимости интенсивности сигнала сильноассоциированной воды в гидратированных порошках гиалуроновой кислоты (а) и ее растворах (б); зависимости изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды в гидратированных порошках (в): (1 – 17 мг/г H<sub>2</sub>O на воздухе; 2 – 17 мг/г H<sub>2</sub>O в среде CDCl<sub>3</sub>; 3 – 67 мг/г H<sub>2</sub>O в CDCl<sub>3</sub>; 4 – 167 мг/г H<sub>2</sub>O в CDCl<sub>3</sub>; 5 – 2176 мг/г H<sub>2</sub>O в CDCl<sub>3</sub>) и растворах ГК (г): (1 (1), 2 (2), 12 % (3) растворы); зависимость межфазной энергии от содержания воды в образцах (д)



**Таблица.** Термодинамические характеристики сильноассоциированной воды в гидратированных порошках и суспензиях гиалуроновой кислоты

$C_{\text{H}_2\text{O}}$ , мг/грамм ГК	Среда	$-\Delta G^S$ , кДж/моль	$-\Delta G^W$ , кДж/моль	$C_{\text{ув}}^S$ , мг/г	$C_{\text{ув}}^W$ , мг/г	$\gamma_S$ , Дж/г
17	воздух	3.5	0.4	5	12	0.61
17		2.8	0.25	2	14	0.25
67		3	0.25	25	42	1.27
$1.67 \times 10^2$	$\text{CDCl}_3$	1.9	0.3	120	47	5.58
$2.167 \times 10^3$		2.27	0.2	450	$1.6 \times 10^2$	35.4
$8.2 \times 10^3$		2.7	0.12	300	$5.9 \times 10^2$	47.7
$4.9 \times 10^4$	вода	1.8	0.12	$3.1 \times 10^2$	$1.5 \times 10^3$	228
$9.9 \times 10^4$		1.55	0.1	$2.5 \times 10^2$	$2.3 \times 10^3$	156



**Рис. 6.** Распределение по радиусам кластеров адсорбированной воды в гидратированных порошках (а): 1 – 17 мг/г  $\text{H}_2\text{O}$  на воздухе; 2 – 17 мг/г  $\text{H}_2\text{O}$  в среде  $\text{CDCl}_3$ ; 3 – 67 мг/г  $\text{H}_2\text{O}$  в  $\text{CDCl}_3$ ; 4 – 167 мг/г  $\text{H}_2\text{O}$  в  $\text{CDCl}_3$ ; 5 – 2176 мг/г  $\text{H}_2\text{O}$  в  $\text{CDCl}_3$  и растворах гиалуроновой кислоты (б): 1 (1), 2 (2) и 12 % (3) растворы

Сопоставление значений концентрации сильносвязанной воды ( $C_{\text{ув}}^S$ ) и величины  $\gamma_S$  показывает, что они изменяются симбатно, т.е. сильносвязанная вода в основном и определяет величину межфазной энергии. В образце, содержащем максимальное количество адсорбированной воды ( $C_{\text{H}_2\text{O}} = 2167$  мг/г), формируются домены воды с радиусами 2–20 нм, при этом только треть от общего количества адсорбированной воды может быть отнесена к слабосвязанной. Слабосвязанная вода регистрируется только при  $T > 260$  К, что определяет малые значения  $\Delta G^W$ , существенно меньшие, чем для исследованных ранее высокодисперсных или гелеобразных систем [9–12]. Это можно объяснить как пространственным, так и химическим строением ГК. Нет истинных

нанопор в ГК, но есть как высокополярные (COOH), так и менее полярные (OH, NH) и гидрофобные C–H группы. Поэтому адсорбционный потенциал ГК по отношению к слабосвязанной воде оказывается невысоким, что и объясняет отмеченную температурную зависимость.

В водных растворах (рис. 5, б-д и 6, б) на зависимости  $\gamma_S(C_{\text{H}_2\text{O}})$  фиксируется максимум для 2 % раствора. Рост концентрации полимера приводит к уменьшению концентрации сильно- и слабосвязанной воды, а также величины межфазной энергии (таблица). Вероятным объяснением служит формирование в растворе гелеподобной структуры или агрегатов полимерных молекул. В результате происходит сближение полимер-

ных цепей и часть связанной воды удаляется из зазоров между ними. В 1 % растворе ГК формируются кластеры воды с радиусом в диапазоне 15–50 нм. Вклад от малых кластеров не превышает нескольких процентов. С ростом концентрации полимера возрастает вклад от доменов с радиусом 16.6 нм. Для 12 % раствора этот размер кластеров воды становится доминирующим.

### ВЫВОДЫ

В воздушной среде в гидратированных порошках ГК, содержащих не более 0.2 г/г H<sub>2</sub>O, связанная вода характеризуется большим химическим сдвигом, чем объемная вода, вследствие депротонирования кислотных групп. В среде слабополярного растворителя CDCl<sub>3</sub> происходит дифференциация адсорбированной воды на систему кластеров и доменов с разной ассоциированностью, между которыми молекулярный обмен происходит медленно в шкале времени ЯМР. Регистрируются кластеры слабоассоциированной воды и четыре типа кластеров сильноассоциированной воды разного размера и ассоциированности. С ростом гидратированности порошка ГК формируется единая система (пленка) адсорбированной воды, в которой среднее число водородных связей, приходящееся на каждую молекулу воды, уменьшается с ростом температуры. С ростом C<sub>H<sub>2</sub>O</sub> наблюдается снижение химического сдвига, что можно объяснить взаимодействием воды не только с полярными, но и с гидрофобными структурами ГК.

В растворах ГК при варьировании ее концентрации в диапазоне 1–12 мас. % наблюдается максимум межфазной энергии  $\gamma_S = 228$  Дж/г для 2 % раствора. Он отвечает формированию в растворе такого состояния полимера, когда с ним связано максимальное количество воды.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Toole B.P.* Hyaluronan in morphogenesis // *J. Intern. Med.* – 1997. – V. 42. – P. 35–40.
2. *Hardingham T.E., Fosang A.J.* Proteoglycans: many forms and functions // *FASEB J.* – 1992. – V. 6. – P. 861–870.
3. *Smith M.M., Ghosh P.* The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment // *Rheumatol Int.* – 1987. – V. 7. – P. 113–122.
4. *Bagga H., Burkhardt D., Sambrook P., March L.* Longterm effects of intraarticular hyaluronan on synovial fluid in osteoarthritis of the knee // *J. Rheumatol.* – 2006. – V. 33, N 5. – P. 946–950.
5. *Ленинджер А.* Основы биохимии. – Москва: Мир, 1985. – 767 с.
6. *Goa K.L., Benfield P.* Hyaluronic Acid: a review of its pharmacology and use a surgical Aid in ophtalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing // *Drugs.* – 1994. – V. 47, N 3. – P. 536–566.
7. *Foschi D., Castoldi L., Radaelli E. et al.* Hyaluronic acid prevents oxygen free-radical damage to granulation tissue: a study in rats // *J. Hiss. Reac.* – 1990. – V. 12, N 6. – P. 333–339.
8. *Касавина Б.С., Кольчинский Т.А., Зенкевич Г.Д.* // *Успехи современной биологии.* – 1970. – Т. 69, Вып. 3. – С. 353–363.
9. *Туров В.В., Гунько В.М.* Кластеризованная вода и пути ее использования. – Киев: Наукова думка, 2011. – 313 с.
10. *Гунько В.М., Туров В.В., Горбик П.П.* Вода на межфазной границе. – Киев: Наукова думка, 2009. – 694 с.
11. *Gun'ko V.M., Turov V.V., Bogatyrev et al.* Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2005 – V. 118, N 1–3. – P. 125–172.
12. *Turov V.V., Leboda R.* Application of 1H NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbents // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 1999. – V. 79, N 2–3. – P. 173–211.
13. *Фролов Ю.Г.* Курс коллоидной химии. Поверхностные явления и дисперсные системы. – Москва: Химия, 1982. – 400 с.
14. *Petrov O.V., Furo I.* NMR cryoporometry: Principles, application and potential // *Progr. NMR.* – 2009. – V. 54. – P. 97–122.
15. *Kinney D.R., Chaung I-S., Maciel G.E.* Water and the silica surface as studied by variable temperature high resolution 1H NMR // *J. Am. Chem Soc.* – 1993. – V. 115. – P. 6786–6794.

16. Глушко В.П. Термодинамические свойства индивидуальных веществ. – Москва: Наука, 1978. – 495 с.
17. Stewart J.J.P. MOPAC2009, Stewart computational chemistry // Colorado Springs, CO, USA, <http://openmopac.net/>, 2008.

Поступила 24.11.2011, принята 26.03.2012

## Особливості гідратації гіалуронової кислоти за даними $^1\text{H}$ ЯМР–спектроскопії

**В.В. Туров, А.П. Угнівенко, А.П. Головань, В.М. Барвінченко, В.М. Гунько**

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України  
бул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, v\_turov@ukr.net*

*Методом низькотемпературної  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопії вивчено гідратацію гіалуронової кислоти на повітрі та в середовищі слабкополярного розчинника  $\text{CDCl}_3$ , а також в заморожених водних розчинах. Визначені термодинамічні параметри сильно- і слабкозв'язаної води, а також міжфазної енергії системи полімер-вода. Виявлено, що середовище  $\text{CDCl}_3$  в умовах невисокої гідратації впливає на зв'язану воду диференціюючим чином. При цьому в спектрах окремо реєструються чотири сигнали сильноасоційованої води та сигнал слабкоасоційованої води. Зі зростанням гідратації формується єдина водна система. В водних розчинах максимальне значення міжфазної енергії полімер-вода спостерігається при 2 % гіалуронової кислоти, що відповідає початку формування гелеподібних структур.*

## The peculiarities of hydration of hyaluronic acid according to $^1\text{H}$ NMR spectroscopy

**V.V. Turov, A.P. Ugnivenko, A.P. Golovan, V.N. Barvinchenko, V.M. Gun'ko**

*Chuiiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine  
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, v\_turov@ukr.net*

*The hydration of hyaluronic acid in air, frozen aqueous solutions, and weakly polar solvent  $\text{CDCl}_3$  has been studied by low-temperature  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. Thermodynamic parameters of the strongly and weakly bounded water as well as interfacial energy of polymer-water system have been specified. It has been found that environment of  $\text{CDCl}_3$  produces a differentiating effect on bounded water in case of low hydration. Four signals of strongly associated water and one signal of weakly associated water have been detected separately in the spectra. A joint water system is formed with increasing hydration. The maximum value of interfacial energy of polymer-water in the aqueous solution is observed at 2 % hyaluronic acid what corresponds to the beginning of gel structure formation.*