

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ НИЖЕГОРОДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.И. ЛОБАЧЕВСКОГО»

На правах рукописи



Мочалова Алла Евгеньевна

**ПРИВИТЫЕ И БЛОК-СОПОЛИМЕРЫ ВИНИЛОВЫХ МОНОМЕРОВ И
ХИТОЗАНА, НАНОКОМПОЗИТЫ НА ЕГО ОСНОВЕ. СИНТЕЗ,
СТРУКТУРА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА**

02.00.06 - высокомолекулярные соединения

Диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук

Научный консультант
доктор химических наук, профессор
Смирнова Лариса Александровна

Нижний Новгород - 2018

	Стр.
Введение	4
ГЛАВА 1. Химическая модификация хитозана.....	20
1.1. Структура и свойства хитозана.....	20
1.2. Полимераналогичные превращения хитозана. Синтез О- и N-производных полисахарида.....	23
1.3. Синтез привитых сополимеров хитозана.....	28
1.4. Блок-сополимеры на основе хитозана.....	42
1.5. Полимерные гидрогели хитозана с синтетическими и природными полимерами.....	44
1.6. Формирование наночастиц хитозана, наночастиц металлов в матрице хитозана.....	50
ГЛАВА 2. Синтез сополимеров хитозана с виниловыми мономерами, свойства пленочных материалов и гидрогелей на их основе	57
2.1. Привитая и блок – сополимеризация виниловых мономеров с хитозаном.....	57
2.2. Молекулярно-массовые характеристики привитых и блок-сополимеров хитозана с виниловыми мономерами.....	91
2.3. Исследование физико-механических свойств пленок на основе сополимеров хитозана с виниловыми мономерами.....	97
2.4. Флокулирующая, коагулирующая и сорбционная способности хитозана и его сополимеров.....	111
2.5. Биоразложение сополимеров на основе хитозана и виниловых мономеров.....	123
2.6. Гидрогели на основе хитозана и его сополимеров.....	134
ГЛАВА 3. Формирование наночастиц золота в растворах хитозана и исследование их биологической активности.....	156
3.1. Получение нанодисперсий золота в растворах хитозана. Определение факторов влияющих на рост, форму, полидисперсность и стабилизацию наночастиц.....	156

3.2. Биологическая активность наночастиц золота стабилизированных хитозаном при их пероральном введении экспериментальным животным.....	171
3.3. Новые биологически активные системы типа «наночастицы с ядром из благородных металлов и многослойной оболочкой из природных полимеров». Синтез, структурная организация, адаптогенные и цитотоксические свойства.....	180
ГЛАВА 4. Экспериментальная часть.....	195
4.1. Методы получения привитых и блок-сополимеров хитозана с виниловыми мономерами.....	195
4.2. Определение молекулярно – массовых характеристик (со)полимеров.....	200
4.3. Методы определения физико-механических свойств и грибостойкости пленок на основе привитых и блок-сополимеров хитозана и смесей гомополимеров.....	203
4.4. Методика синтеза производных хитозана по реакциям полимераналогичных превращений.....	207
4.5. Приготовление гидрогелей на основе хитозана и его сополимеров и изучение их свойств.....	209
4.6. Методики определения флокулирующей, коагулирующей и сорбционной способностей хитозана и его сополимеров.....	211
4.7. Методики формирования наночастиц благородных металлов в растворах хитозана и определение их размерных характеристик.....	212
4.8. Методики исследования биологической активности препаратов на основе хитозана, содержащих наночастицы золота.....	213
Заключение	218
Список сокращений.....	221
Список цитируемой литературы.....	223
Приложения.....	260

Актуальность темы исследования. В последние несколько десятилетий в мире наблюдается повышенный интерес исследователей к возобновляемым природным полимерам, среди которых особое место занимают хитин и его деацетилированное производное – хитозан (ХТЗ). Хитозан относят к наиболее перспективным полимерам XXI века, крупномасштабное внедрение которого может привести к не менее значимым результатам, чем производственное использование целлюлозы и ее производных. Уникальные свойства хитозана, такие как биосовместимость, физиологическая активность при отсутствии токсичности, биодеструкция определяют его применение, прежде всего, в медицине, фармации и косметологии [1]. Наряду с этим, органонерастворимость и низкие физико-механические свойства хитозана сдерживают его крупномасштабное использование в других отраслях. Наличие реакционноспособных групп в макромолекуле полисахарида позволяет проводить его химическую модификацию путем привитой и блок-сополимеризацией и совмещать с синтетическими полимерами с сохранением полезных свойств гомополимеров, а ряде случаев и их усилением. Широкий спектр виниловых мономеров, различные варианты их комбинирования открывают неограниченные возможности создания на основе хитозана новых функциональных материалов с заданным комплексом свойств. В работах, опубликованных к настоящему времени привитая полимеризация виниловых мономеров на хитозан в присутствии традиционных концентраций инициаторов ($\geq 10^{-2}$ моль/л) осложняется одновременным протеканием гомополимеризации, приводящее к образованию до 40-50% гомополимера синтетического мономера. Другим недостатком является существенная неконтролируемая деструкция цепей полисахарида в ходе реакции. Совокупность этих факторов приводит к низкой эффективности процесса и высокому выходу нецелевого продукта. Это является одной из причин того, что свойства привитых сополимеров и зависимость их от состава практически не изучались. Еще одним эффективным способом

модификации хитозана путем совмещения с синтетическими полимерами виниловых мономеров является блок-сополимеризация в растворе. Удивительным является отсутствие работ в этом направлении.

В свете сказанного актуальным является разработка научно обоснованной стратегии синтеза привитых и блок-сополимеров хитозана с виниловыми мономерами различной природы, обеспечивающих его высокую степень и эффективность, выявление особенностей процесса, определение влияния структуры, полидисперсности и состава сополимеров на их физико-механические, теплофизические свойства и способность к биоутилизации.

Полученные материалы перспективны для их функционального применения в качестве флокулянтов, коагулянтов, сорбентов широкого спектра действия, газоразделительных мембран, высокоэффективных компатибилизаторов для создания смесевых композиций на основе термодинамически несовместимых полисахаридов и синтетических полимеров, а также биоразлагаемых пленочных и упаковочных материалов. Многие из этих материалов могут найти крупномасштабное применение при решении экологических проблем - очистке промышленных сточных вод различных производств, включая гальванические, а также для защиты окружающей среды от непрерывно растущих полимерных отходов.

Высокие хелато- и комплексообразующие свойства и способность хитозана выступать в качестве восстановителя ионов металлов [2, 3] перспективны для разработки одностадийных методов синтеза нанокomпозиционных материалов полисахарида, содержащих наночастицы металлов и их оксидов. Возможный спектр использования таких нанокomпозиций на сегодняшний день чрезвычайно широк: от фотоники, новых высокоэффективных каталитических систем до многослойных наноструктурированных композиционных материалов для направленной доставки лекарственных средств и применения в термосенсибилизационной терапии [4, 5]. Актуальным является разработка «green» методов синтеза нанокomпозитов, не требующих очистки от

дополнительно вводимых реагентов и получение наночастиц с заданным размером, особенно в высокодисперсном состоянии с размером 10-20 нм.

Степень разработанности темы исследования. С момента начала исследований хитозана большое внимание уделялось его химической модификации по реакциям полимераналогичных превращений с веществами, отличающимися как химической природой, так и строением. Отработаны методы получения производных хитозана с максимальной степенью замещения и разработаны конкурентоспособные рыночные продукты, которые применяются в основном в парфюмерии, косметологии и, частично, в фармации. Полезные свойства, присущие хитозану, а также многообразие сырьевых источников, сложившихся в последнее время, определяют большой потенциал его крупномасштабного использования для получения пленок, гидрогелей, реагентов для очистки сточных вод – флокулянтов, коагулянтов, сорбентов, мембран, биоразлагаемых упаковочных пленок, материалов медико-биологического назначения. Раскрытие этого потенциала возможно при получении гибридных полимеров на основе хитозана с различными виниловыми мономерами (от водо- до органорастворимых) путем привитой и блок-сополимеризации по свободно-радикальному механизму. В подавляющем большинстве работ по привитой полимеризации виниловых мономеров на хитозан, опубликованных к настоящему времени, используются в качестве инициаторов персульфаты натрия (калия) или соединения Ce^{4+} и детально рассматривается стадия инициирования. Выход образующегося гомополимера в этих случаях чрезвычайно высок - достигает 40-50%. Кроме этого, происходит еще и деградация цепей полисахарида в процессе сополимеризации. Возможно поэтому практически не изучались свойства полученных сополимеров хитозана с виниловыми мономерами. Отсутствуют данные по систематическим исследованиям влияния природы мономера, условий проведения блок- и привитой сополимеризации на выход целевого продукта, его состав, свойства и применение. Следует отметить, что без внимания осталось направление исследований, связанных с выявлением возможных особенностей

процесса, обусловленных комплексообразующими свойствами и структурных особенностей хитозана. Детальное изучение комплекса этих параметров позволит оптимизировать условия сополимеризации, обеспечит высокий выход гибридного продукта и даст возможность разработать большой ассортимент новых продуктов целевого назначения с заданными свойствами, снизить их себестоимость, получить биоразлагаемые полимеры.

Высокая способность хитозана к комплексообразованию со многими биологически активными веществами определила разработку на его основе наноразмерных капсул для лекарственных средств, недостатком которых является снижение биологической активности при пероральном применении. Альтернативой таких препаратов могут стать многослойные наноструктуры, построенные по принципу «инертное ядро – биологически активное вещество – хитозан», где в качестве ядра используются наночастицы золота, а функции их стабилизатора, защиты биологически активных веществ от ферментов желудочно-кишечного тракта и обеспечение доставки препарата в русло крови живого организма несет хитозан. При получении таких композиций определяющим является размер индифферентного ядра – наночастиц золота, который должен лежать в интервале 2-30 нм, что исключает их токсичность. Это может быть достигнуто разработкой «green» метода получения нанодисперсий золота из HAuCl_4 в растворах хитозана, выполняющего одновременно функции восстановителя и стабилизатора. Изменение условий синтеза – молекулярной массы полисахарида, конформации его макромолекул (pH среды) может регулировать размер и полидисперсность образующихся наночастиц. До настоящего времени в качестве стабилизаторов наночастиц благородных металлов в основном применялись синтетические полимеры различной природы, а методы их синтеза позволяют получать нанодисперсии с размером частиц от 30 нм до 200 нм. При этом внимание исследователей, как правило, направлено на инъекционное введение таких препаратов, хотя неинвазивным является их применение *per`os*. Вопрос об эффективности доставки лекарственных средств

наночастиц золота, стабилизированных хитозаном, при их пероральном применении, их распределении, накоплении в органах и выведении из организма остается открытым.

Целью работы является разработка научных основ синтеза функциональных производных хитозана путем привитой и блок-сополимеризации с виниловыми мономерами, обеспечивающих высокую эффективность процесса и контролируемое изменение молекулярно-массовых характеристик цепи полисахарида с использованием традиционных и новых иницирующих систем, а также нанокomпозиций, содержащих наночастицы золота с узким распределением по размерам, комплексная диагностика физико-химических свойств полученных производных, выявление перспективных направлений их практического применения.

Достижение поставленной цели позволит разработать стратегию структурной и химической модификации полисахарида промышленными мономерами винилового ряда, оптимизировать условия получения сополимеров с высоким выходом целевого продукта и заданным комплексом свойств, создать основы формирования многослойных нанокomпозиций, построенных по принципу «инертное ядро-биологически активные вещества-хитозан», кроме этого, принципиально расширить спектр новых полимерных материалов целевого назначения, в том числе, биосовместимых и биоразлагаемых.

В связи с поставленной целью решались следующие **задачи**:

- исследование кинетических закономерностей привитой и блок-сополимеризации хитозана с широким спектром мономеров винилового ряда (N-винилпирролидоном (**ВП**), акриламидом (**АА**), метилакрилатом (**МА**), акрилонитрилом (**АН**), 2-этилгексилакрилатом (**2-ЭГА**), 2-гидроксиэтилметакрилатом (**2-ГЭМА**), 2-гидроксипропилметакрилатом (**2-ГПМА**) и стиролом (**Ст**)), выявление особенностей процесса, установление оптимальных условий синтеза (соотношения реагентов в реакционной смеси,

pH среды, природы и концентрации инициатора) для получения сополимеров с высокими эффективностью и степенью прививки;

- изучение влияния строения и состава сополимеров на их надмолекулярную организацию и физико-механические свойства;
- исследование флокулирующей, коагулирующей и сорбционной способностей хитозана и его сополимеров, разработка методов повышения эффективности очистки сточных вод различных отраслей и в процессах водоподготовки полифункциональными производными хитозана;
- получение pH- и термочувствительных гидрогелей на основе хитозана и его модифицированных форм, исследование термодинамических и вязкоупругих свойств, способности индуцировано растворять и пролонгировано выделять биологически активные вещества;
- создание биоразлагаемых полимерных материалов на основе сополимеров хитозана с виниловыми мономерами;
- изучение закономерностей получения нанокомпозитов хитозана, содержащих наночастицы золота (НЧ), при УФ-воздействии на растворы полисахарида, допированные золотохлористоводородной кислотой и исследование структурных особенностей и агрегативной устойчивости сформированных нанодисперсий;
- получение многослойных наноструктурированных композиций, построенных по принципу «инертное ядро из наночастиц золота - биологически активное вещество-защитный слой хитозана» и исследование *in vivo* биологической активности хитозана и его производных.

Научная новизна. Разработан новый подход к синтезу привитых сополимеров хитозана с широким спектром виниловых мономеров (АА, ВП, МА, АН, 2-ЭГА, 2-ГЭМА, 2-ГПМА, Ст), заключающийся в использовании низких концентраций инициаторов, что обеспечивает высокие эффективность (ЭП) и степень прививки (СП) при высоких скоростях. Высокие скорости обусловлены впервые выявленными концентрационными эффектами, вследствие

избирательной сольватации цепей полисахарида виниловыми мономерами, компенсирующими низкие концентрации инициаторов. Предложен новый высокоэффективный инициатор привитой сополимеризации хитозана с виниловыми мономерами без разрушения макроцепи полисахарида на основе соединений Co(III) . Разработан оригинальный метод синтеза блок-сополимеров виниловых мономеров с хитозаном в мягких условиях с высоким выходом целевого продукта (до 97%) в процессе радикальной деградации полисахарида под действием окислительно-восстановительной системы пероксид водорода-аскорбиновая кислота. Установлены полиблочное строение цепей сополимеров и способы управления длиной блоков в них.

Разработана методика определения молекулярно-массовых характеристик привитых цепей и блоков синтетических полимеров в сополимерах хитозана с виниловыми мономерами, выявлено влияние структуры и состава на физико-механические свойства.

Получены рН- и термочувствительные гидрогели производных хитозана с акриламидом и N-винилпирролидоном различного состава с высокой влагоемкостью – до 500 г воды на 1 г сухого продукта, изучены их физико-механические и термодинамические свойства, впервые выявлено содержание в них связанной воды. Синтезированы гидрогели, способные индуцировано растворять и пролонгированно выделять биологически активные вещества гидрофобной природы.

Разработаны на основе хитозана, его олигомеров и сополимеров с акриламидом высокоэффективные реагенты для очистки сточных вод различных производств и процессов водоподготовки – коагулянты, флокулянты, сорбенты.

Получены материалы на основе хитозана и его сополимеров с регулируемым временем биодеструкции в присутствии различных микромицетов. Впервые установлено, что процесс биоразложения протекает не только под действием микромицетов, но и продуктов их метаболизма.

Разработан метод УФ-индуцированного формирования НЧ золота в растворах хитозана и его производных без введения дополнительных реагентов, выявлено влияние ММ, конформации макромолекул хитозана на форму, размер, полидисперсность и устойчивость дисперсий НЧ. Разработана стратегия получения многослойных нанокомпозитов, построенных по принципу «инертное ядро-биологически активные вещества-хитозан». Впервые на примере нанокомпозита, содержащего биологически активное вещество пептидной природы (пчелиный яд) на экспериментальных животных при терапии лучевой болезни и злокачественных новообразований показано сохранение их высокой биологической активности и выраженного терапевтического эффекта.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Разработана концепция модификации хитозана путем привитой и блок-сополимеризации с широким кругом мономеров винилового ряда в присутствии низких концентраций традиционных и новых иницирующих систем, определены оптимальные условия синтеза, обеспечивающие высокую эффективность процессов. Впервые показано проявление эффекта избирательной сольватации в процессе привитой полимеризации виниловых мономеров на хитозан. Всесторонне исследовано влияние состава и структуры сополимеров на физико-механические свойства и биологическую активность. Разработаны принципы УФ индуцированного формирования НЧ золота в растворах хитозана методами «green» химии с размером частиц меньше 20 нм, узким распределением по размерам и высокой агрегативной устойчивостью дисперсий. Впервые разработаны многослойные нанокомпозиции со структурой «инертное ядро-биологически активное вещество-защитная оболочка хитозана» и выявлена их высокая биологическая активность в условиях гипоксии и действия γ -излучения.

Блок- и привитые сополимеры хитозана с мономерами акрилового ряда могут быть использованы в качестве основы для вододисперсионных красок, биоразлагаемых пленочных материалов и газоразделительных мембран. На базе сополимеров хитозана с АА, ВП и смесевых композиций гомополимеров хитозана

с поливинилпирролидоном (ПВП) получены гипоаллергенные материалы с регулируемым влагопоглощением для закрытия раневых поверхностей различной этимологии. Показано, что эти композиции перспективны для создания многослойных покрытий и гидрогелей, способных индуцировано растворять биологически активные вещества и пролонгировано их выделять. Нанодисперсии золота, стабилизированные хитозаном, могут быть использованы в качестве эффективных носителей биологически активных веществ к внутренним органам и применяться в качестве адаптогенов при гипоксии и в терапии злокачественных новообразований. На основе хитозана и его производных разработаны новые высокоэффективные многофункциональные катионоактивные флокулянты, сорбенты и коагулянты для очистки сточных вод предприятий различных отраслей промышленности.

Материалы диссертационной работы вошли в специальные курсы лекций «Химия хитозана и нанокomпозиционных материалов на его основе», «Нанокomпозиты благородных металлов» для магистрантов химического факультета Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, обучающихся по направлению подготовки 04.04.01 «Химия».

Объекты и методы исследования.

В работе использовали хитозан (акционерное общество «Сонат», Москва, «Биопрогресс», п. Биокомбинат, Московская обл.), полученный из панцирей краба, с молекулярной массой (ММ) 8.7×10^4 – 2.5×10^5 и степенью деацетилирования 80-82%. Массовая доля минеральных веществ в хитозане не превышала 0.6%, влаги – 6%, нерастворимых веществ – 0.1%. В качестве водорастворимых мономеров использовали ВП, АА, ограниченно растворимых в воде – МА, АН, 2-ЭГА, 2-ГЭМА, 2-ГПМА, Ст. В качестве инициаторов использовали ДАК, ПСА, $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$. Глубину превращения мономеров при привитой и блок-полимеризации в растворах хитозана контролировали хроматографически (газовый хромато-масс-спектрометр QP-2010Plus, Shimadzu), методом бромид-броматного титрования и весовым методом [6]. Методами

экстракции, турбидиметрического титрования и ИК-спектроскопии (спектрофотометр «Perkin-Elmer») очищенных продуктов доказывали образование сополимеров. Вязкость разбавленных растворов полимеров определяли на капиллярном вискозиметре Уббелоды, умеренно концентрированных растворов привитых сополимеров и смесей гомополимеров – с помощью ротационного вискозиметра «Реотест-2». Гидродинамические и молекулярные характеристики привитых и блок-сополимеров хитозана с АА исследовали методами поступательной диффузии с помощью диффузомера Цветкова, в котором используется интерферометрическая схема Лебедева, а также методом статической осмометрии. Молекулярно-массовые характеристики блоков и привитых цепей сополимеров определяли методом гель-проникающей хроматографии (жидкостной хроматограф Prominence LC-20VP, Shimadzu). Физико-механические свойства пленок сополимеров и смесей гомополимеров определяли на разрывной машине ZWIC Z005 (Германия), их структуру исследовали методами рентгенографического анализа (дифрактометр ДРОН-4, CuK α – излучение с монохроматором из пиролитического графита на отраженном пучке) и атомно-силовой микроскопии (АСМ) («Solver-P4», Зеленоград). Смачивание поверхности пленок изучали методом измерения краевого угла смачивания. Газопроницаемость пленок различных полимеров изучали хроматографическим методом, используя специально сконструированную приставку для пропускания газа. Флокулирующую способность хитозана и его сополимеров оценивали по изменению процента светопропускания изучаемой системы спектрофотометрическим методом на фотоколориметре ФЭК-М. Процесс зарождения и роста НЧ золота контролировали методом оптической спектроскопии (ОС) по изменению поглощения растворов полимера, содержащих допант, в ультрафиолетовой и видимой областях спектра. Размер и форму полученных НЧ определяли методами малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (РМУ) и высокоразрешающей просвечивающей электронной микроскопии (ТЭМ). Спектры абсорбции регистрировали на спектрофотометре UV-1650,

Shimadzu УФ и видимого диапазонов. Антиоксидантную активность НЧ золота *in vivo* оценивали по количеству в плазме крови крыс продуктов липопероксидации методами спектрофотометрии и биохемилюминесценции. Количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, лейкоцитарный коэффициент (отношение процентного содержания лимфоцитов к процентному содержанию сегментоядерных нейтрофилов) определяли по стандартным методикам [7, 8]. Исследование грибостойкости и бактерицидности сополимеров проводили по государственным стандартам (ГОСТ 9.049-91) [9, 10]. Для испытаний применяли следующие виды грибов: *Aspergillus niger van Tieghem*, *Aspergillus terreus Thorn*, *Aspergillus oryzae (Ahlburg) Cohn*, *Chaetomium globosum Kunze*, *Paecilomyces varioti Bainier*, *Penicillium funiculosuin Thorn*, *Penicillium chrysogenum Thorn*, *Penicillium cyclopium WestlIng*, *Trichoderma viride Pens*. Грибостойкость оценивали по интенсивности развития грибов (в баллах).

На защиту выносятся следующие положения:

- Результаты исследования блок- и привитой сополимеризации хитозана с широким спектром мономеров винилового ряда в присутствии различных типов иницирующих систем без разрушения основной цепи полисахарида, проявление концентрационных эффектов, выявление оптимальных условий, обеспечивающих высокие степень и эффективность прививки. Методика определения молекулярных масс привитых цепей и блоков синтетических полимеров в их сополимерах с хитозаном.
- Получение пленочных материалов с регулируемыми прочностными характеристиками, пластичностью и влагопоглощением, обусловленными строением, составом пленкообразующего сополимера. Разработка высокоэффективных мембран на основе блок- и привитых сополимеров хитозана с виниловыми мономерами.
- Уникальная полифункциональность базовой композиции на основе хитозана и его производных для создания новых флокулянтов, коагулянтов и сорбентов широкого спектра применения: от очистки сточных вод различных производств

(нефте содержащих сточных вод, гальваностоков) до процессов подготовки питьевой воды.

- Создание pH- и термочувствительных гидрогелей на основе хитозана и его модифицированных форм, разработка систем, обеспечивающих индуцированное растворение биологически активных веществ и пролонгированное их выделение.
- Синтезированные блок- и привитые сополимеры хитозана с виниловыми мономерами являются биоразлагаемыми, эффективность биодеструкции зависит от структуры и состава сополимеров, вида микромицетов и продуктов их метаболизма.
- Метод УФ-индуцированного формирования наночастиц золота с размером частиц менее 20 нм из допанта HAuCl_4 в растворах хитозана, кинетические закономерности формирования наночастиц золота, влияние молекулярной массы полисахарида и конформации его макромолекул на форму, размерные характеристики и полидисперсность наночастиц. Водные дисперсии наночастиц золота, стабилизированные хитозаном, характеризуются высокой агрегативной устойчивостью.
- Разработка стратегии создания многослойных наносистем построенных по принципу «наночастицы золота – пчелиный яд – хитозан», устойчивых к разрушающему действию ферментов желудочно-кишечного тракта и сохранении их биологической активности при апробации на экспериментальных животных.
- Способность наночастиц золота, стабилизированные хитозаном проникать во внутреннюю среду организма при пероральном применении, распределяться по органам с последующим выведением в течение 30 дней.

Обоснованность и достоверность полученных результатов обеспечивались комплексным подходом к решению поставленных задач с использованием современных методов экспериментальных исследований и их воспроизводимостью.

Апробация результатов работы. Основные результаты работы были представлены на IV Всероссийской Каргинской конференции «Наука о полимерах 21-му веку» (Москва, 2007, 2014), VIII, IX и X Международных конференциях Европейского хитинового общества EUCHIS (Анкара, Турция, 2007; Венеция, Италия, 2009; Санкт-Петербург, 2011), Всероссийской конференции по макромолекулярной химии (Улан-Удэ, 2008), XXVII научных чтениях имени академика Н.В. Белова (Нижний Новгород, 2008), IX, X и XIII-ой международных конференциях «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Ставрополь, 2008; Нижний Новгород, 2010; Уфа, 2016), IX Средиземноморской конференции термического анализа и калориметрии (Марсель, Франция, 2009), XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2009» (Москва, 2009), Европейском полимерном конгрессе «EPF09» (Грац, Австрия, 2009), VI Российской конференции по радиохимии «Радиохимия – 2009» (Москва, 2009), V международной конференции «Композит – 2010» (Энгельс, 2010), VI и VII Московских международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011; 2013), Первой Российской конференции по медицинской химии (Москва, 2013), XIV Международной конференции по термическому анализу и калориметрии (RTAC-2013) (Санкт-Петербург, 2013), VIII Всероссийской конференции с международным участием молодых ученых по химии (Москва, 2014), XXXIII Научных чтениях имени академика Н.В. Белова (Нижний Новгород, 2014), Международной конференции «Molecular Complexity in Modern Chemistry» (Москва, 2014), Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (Казань, 2015), Международной конференции «Ion Transport in Organic» (Италия, 2016).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано в соавторстве 41 статья в Российских и зарубежных журналах, в том числе 24 включенных в

перечень ВАК РФ, 55 тезисов докладов конференций различного уровня – от всероссийских до международных, получено 2 патента.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии во всех этапах работы – от постановки задачи, планирования и выполнения экспериментов до обсуждения и оформления полученных результатов. Основные результаты диссертации получены автором лично.

Экспериментальная часть работы по исследованию конформационных свойств макромолекул хитозана и полученных сополимеров выполнялась в Научно-исследовательском институте физики Санкт-Петербургского государственного университета под руководством профессора Павлова Г.М. Исследования хитозана, привитых и блок-сополимеров на его основе методом АСМ выполнены к.х.н Батенькиным М.А. (Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН). Газопроницаемость пленочных материалов изучалась совместно с д.т.н. Воротынцевым И.В. (НГТУ им. Р.Е. Алексеева). Термодинамические свойства полимеров и физические превращения гидрогелей определялись совместно с д.х.н. Урьяшом В.Ф., д.х.н. Смирновой Н.Н., д.х.н. Кирьяновым К.В. и д.х.н. Маркиным А.В. в лаборатории химической термодинамики НИИ Химии ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Эксперименты по рентгенофазовому анализу хитозана и его сополимеров проводились м.н.с. лаборатории Нанoeлектроники НИЧ ННГУ им. Н.И. Лобачевского Юниным П.А. Экспериментальная часть по определению размеров НЧ золота выполнена совместно с доцентом кафедры физического материаловедения физического факультета ННГУ Грачевой Т.А. Исследование антиоксидантной активности НЧ золота *in vivo* проводилась на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета ННГУ под руководством профессора Корягина А.С. Грибостойкость полимерных материалов определялась в отделе биологических исследований НИИ Химии ННГУ совместно с профессором Смирновым В.Ф.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность и искреннюю благодарность всем коллегам – соавторам публикаций, принимавшим участие в

представленной работе на различных этапах ее выполнения. Особую благодарность автор выражает научному консультанту д.х.н., профессору Смирновой Л.А. за всестороннюю помощь в работе. Автор благодарит коллектив кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии ННГУ им. Н.И. Лобачевского за помощь на протяжении всех лет проведения исследований и лично д.х.н., профессора Зайцева С.Д. за оказание всесторонней поддержки при подготовке диссертации.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, включающих обзор литературы (1 глава), обсуждение полученных результатов (2 и 3 главы), экспериментальную часть (4 глава), а также выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы (368 наименований). Диссертация изложена на 261 странице, содержит 42 таблицы, 93 рисунка, 2 приложения.

Во *Введении* сформулирована общая проблематика диссертационной работы, обоснована актуальность, научная и практическая значимость выбранной темы, определены цели и задачи исследования.

В *Первой главе (литературный обзор)* рассмотрены основные направления модификации хитозана реагентами различной химической природы, обобщены имеющиеся данные по физико-химическим свойствам полученных производных, отражены наиболее перспективные области их применения.

Во *Второй главе* приведены результаты исследований по синтезу сополимеров хитозана с виниловыми мономерами, изучению свойства пленочных материалов и гидрогелей на основе сополимеров.

Третья глава посвящена формированию наночастиц золота в растворах хитозана и исследованию их биологической активности.

В *Четвертой главе (экспериментальная часть)* приведены исходные вещества, способы их очистки и характеристики, методы получения и анализа привитых и блок-сополимеров, способы приготовления пленочных образцов и

гелей, методы синтеза нанокомпозитов на основе хитозана, а также методы исследования их свойств.

Соответствие диссертации паспорту специальности. Диссертационная работа по своим целям, задачам, содержанию, научной новизне и методам исследования соответствует пунктам 1-4, 9, 10 паспорта специальности 02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки и развивает направление в химии полимеров, связанное с синтезом новых многофункциональных производных природных полимеров и нанокомпозитов, выявлением взаимосвязи структуры полученных производных с их физико-химическими свойствами и биологической активностью.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 08-02-97031-р_поволжье_а, № 06-02-22004-НЦНИ_а, № 08-03-97051-р_поволжье_а; Аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010 годы)» (проект № 2.1.2/1056); Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. (государственные контракты № 02.740.11.0683, № 16.740.11.00.35); Научно-исследовательской работы в рамках проектной части государственного задания Минобрнауки России в сфере научной деятельности (задание № 4.1537.2014/К); Гранта № 02.В.49.21.0003 (соглашение от 27.08.2013 г.) между Минобрнауки России и ННГУ.

ГЛАВА 1. Химическая модификация хитозана

1.1. Структура и свойства хитозана

Хитозан - аминополисахарид, поли 2-амино-2-дезоксиг-β-D-глюкан, продукт деацетилирования хитина, является одним из самых перспективных в практическом плане полимеров, получаемых из постоянно возобновляемых источников сырья [11]. В результате отщепления ацетильных группировок от структурной единицы хитина – N-ацетил-D-глюкозамина, осуществляемого, как правило, концентрированными водными растворами NaOH при температурах 100 - 180°C, может быть получен хитозан с содержанием аминогрупп (степень деацетилирования (СД)) более 50% [12] (рисунок 1а). Реакция деацетилирования сопровождается одновременным разрывом гликозидных связей полимера, что приводит к получению полидисперсного по молекулярной массе хитозана.

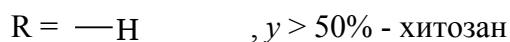
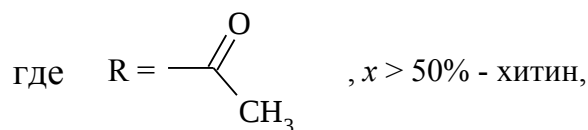
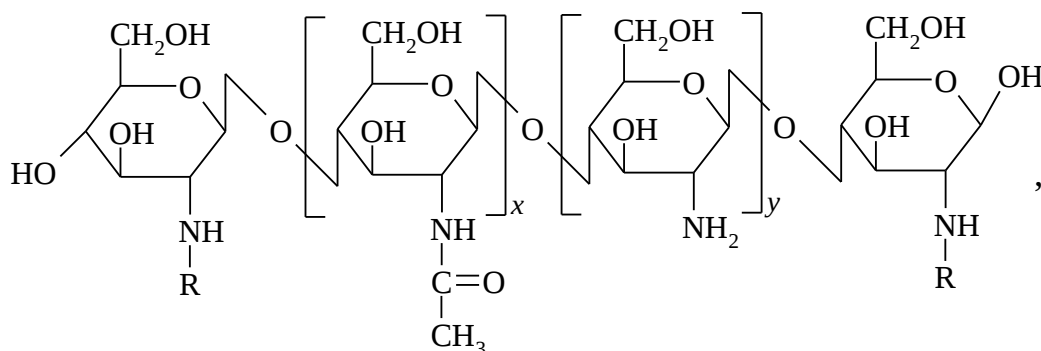


Рисунок 1а – Структура макромолекулы хитозана

Как и хитин, хитозан представляет собой аморфно-кристаллический полимер, для которого характерно явление полиморфизма, причем количество структурных модификаций при переходе от хитина к хитозану увеличивается до 6

[13]. Сохранение при этом размеров элементарной ячейки кристаллита вдоль оси макромолекулы на уровне, соответствующей характеристике для хитина (103 нм), свидетельствует о том, что конформация макромолекул при переходе от хитина к хитозану существенно не изменяется. Макромолекулы хитозана антипараллельно расположены друг относительно друга и упакованы в виде призматической ячейки с параметрами: $a=0.828$, $b=0.862$ и $c=1.043$ нм (рисунок 16) [14]. В то же время в процессе деацетилирования хитина заметно уменьшается общая упорядоченность структуры, (степень кристалличности снижается до 40-50%). Снижение степени кристалличности может быть обусловлено как внутрикристаллитным набуханием при деацетилировании, так и нарушением регулярности строения полимерной цепи в случае неполного отщепления N-ацетильных групп. Методами рентгеноструктурного анализа в работе [15] определен модуль упругости кристаллитов α -хитина и хитозана. Показано, что значение модуля упругости остается постоянным в широком диапазоне температур (-190°C – $+150^{\circ}\text{C}$) и составляет при 20°C для α -хитина 41 ГПа, для хитозана – 65 ГПа, что значительно ниже, чем для целлюлозы (138 ГПа).

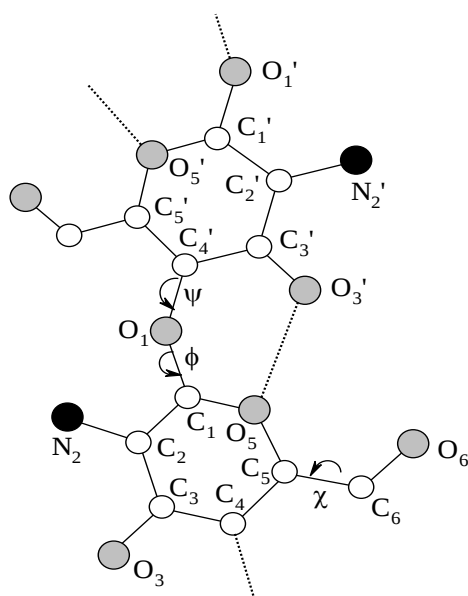


Рисунок 16 – Химическая структура элементарного звена хитозана: углы ψ и ϕ определяют ориентацию пиранозных колец друг относительно друга - строение цепи полисахарида и угол χ определяет ориентацию OH – группы у C_6 . Пунктирные линии показывают внутримолекулярные водородные связи у O_3 - O_5 . Межмолекулярные водородные связи между N_2 и O_6 атомами соседних цепей не представлены

Физические и химические свойства хитозана зависят от его молекулярной массы и степени деацетилирования. Наличие первичных аминогрупп в хитозане

придает полисахариду целый комплекс полезных свойств, основные из которых приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Свойства хитозана [16,17]

Физические и химические свойства:	-линейный полисахарид с высоким содержанием азота; -жесткоцепная структура D-глюкозамина; высокая степень кристалличности; гидрофильность; -слабое основание; депротонированная аминогруппа выступает в качестве мощного нуклеофила (рКа 6,3); -способность образовывать межмолекулярные водородные связи; высокая вязкость; -нерастворим в воде и органических растворителях; растворим в разбавленных водных растворах кислот; - высокая реакционная способность аминогрупп; - способность образовывать соли с органическими и неорганическими кислотами, высокая хелато- и комплексообразующая способность, ионная проводимость.
Полиэлектролитные свойства (при низких значениях pH):	- катионный биополимер с высокой плотностью положительных зарядов; - флокулирующая способность; комплексообразование с отрицательно заряженными молекулами; - высокая адсорбционная способность; - волокно- и пленкообразующие свойства.
Биологические свойства:	- биосовместимость; - отсутствие токсичности; - биodeградируемость; - гипоаллергенность; - стимулятор фитоиммунитета; - антимикробная активность (грибы, бактерии, вирусы); - антацидные, противоязвенные и противоопухолевые свойства; - антикоагулянт крови; - мукоадгезивная способность.

Наряду с этим, материалы на основе хитозана имеют невысокие физико-механические характеристики. Повышение молекулярной массы хитозана, снижение кристалличности его структуры, повышение пластичности и эластичности материалов на его основе может быть достигнуто путем модификации биополимера синтетическими полимерами. В настоящее время определились три основных направления модификации хитозана: реакции полимераналогичных превращений с участием функциональных групп полисахарида [18], реакции привитой и блок-сополимеризации с синтетическими мономерами [19, 20] и получение смесевых композиций с природными и синтетическими полимерами [1].

1.2. Полимераналогичные превращения хитозана.

Синтез О- и N-производных полисахарида

Наиболее детально изучена модификация хитозана по реакциям полимераналогичных превращений: кватернизации [21-23], сульфирования [24] (или фосфорилирования), (карбоксы)алкилирования [25-41], ацилирования [42-51]. Кроме этого, в настоящее время синтезированы разветвленные хитозан-дендридные гибриды [52-57], аминоксаноароматические и гетероциклические производные хитозана, что нашло отражение в ряде обзоров [58-60]. Остановимся подробнее на реакциях полимераналогичных превращений в свете выполняемой работы.

Простые эфиры хитозана. В работе [61] по реакции нуклеофильного присоединения (реакция Михаэля) получены производные хитозана с эфирами акриловой кислоты, растворимые в водных растворах с pH 1-11. Степень замещения (СЗ) хитозана не превышала 0.55 при соотношении акриловый реагент/ NH_2 -хитозан = 2 моль при 50 °C (рисунок 2).

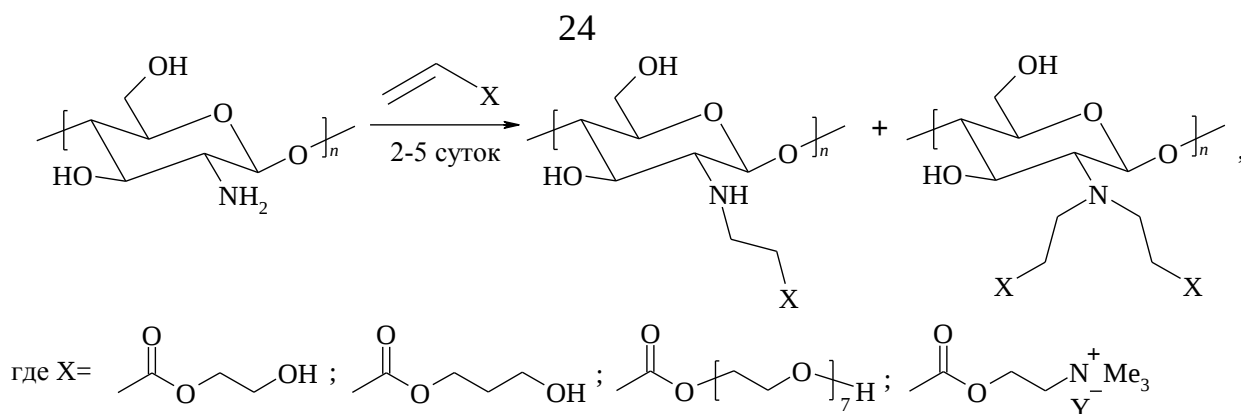


Рисунок 2 – Реакция Михаэля

Реакция цианэтилирования хитозана, частный случай реакции Михаэля, была подробно изучена в работе [62]. Направленность присоединения заместителей зависела от температуры реакции: при 20°C присоединение проходило исключительно по гидроксильным группам, при повышенных температурах в реакцию вступало до 30% аминогрупп с частичным гидролизом цианэтильных групп до карбоксиэтильных.

N-замещенные производные хитозана. *Основания Шиффа*. Одним из самых простых способов модификации первичного амина (I) в макромолекуле хитозана является реакция конденсации с альдегидной группой ароматических аминов с образованием соответствующего имина - основания Шиффа (II). Она впервые была использована для защиты аминогрупп хитозана в реакциях O-алкилирования (III). После удаления защитной группировки при действии кислоты получали продукт (IV), который не содержал алкильных групп у атома азота элементарного звена (рисунок 3).

Позднее основание Шиффа, было использовано в качестве промежуточного соединения при синтезе биологически активного производного на основе 2-O-формилметил-β'-циклодекстрина и хитозана с ММ 4×10⁴. Восстановление иминной связи проводили цианоборгидридом натрия [63]. При степени замещения 37% продукт реакции был растворим в воде, в нейтральной и щелочных средах. В работе [64] описаны условия синтеза сшитых хитозановых

производных, содержащих 2-пиридилметильные, 2-тиенилметильные и 3-(метилтио)пропильные группы. Аминогруппы активных адсорбционных центров хитозана перед сшивкой 2-(хлорметил)оксираном также предварительно были защищены основаниями Шиффа с их последующим восстановлением. Производные хитозана показали высокую селективность и превосходную емкость по ионам золота (3+), палладия (2+) и платины (4+) по сравнению с другими металлами.

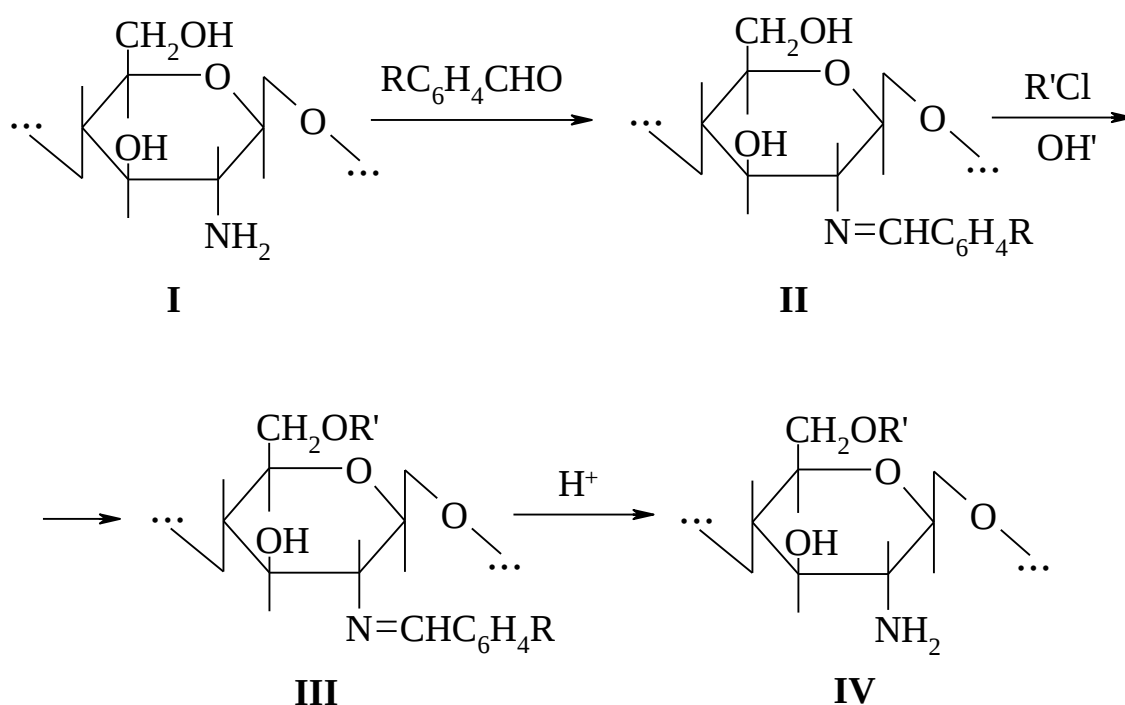


Рисунок 3 – Иминирование хитозана с последующим алкилированием

Основания Шиффа были использованы при синтезе органорастворимых производных хитозана. Синтез проводили конденсацией частично гидролизованного хитозана с 10-20-кратным избытком альдегида алифатического ряда или замещенных фенильных альдегидов при pH 5.5 в водно-спиртовой среде с последующим ацелированием [65]. Полученные соединения могут быть использованы для формирования пленок, волокон, сорбции ионов металлов, в косметологии.

С использованием в качестве промежуточного соединения оснований Шиффа также были получены производные хитозана с краун-эфирами, обладающие высокими селективными комплексообразующими свойствами к определенным ионам металлов (рисунок 4) [66].

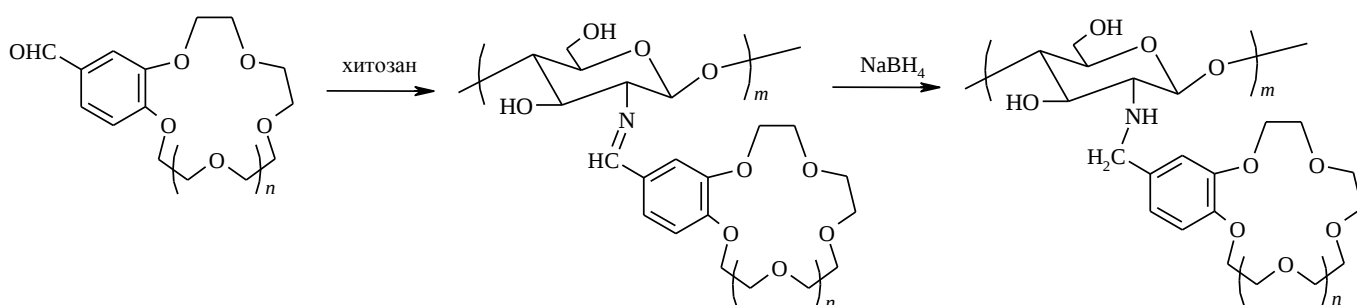
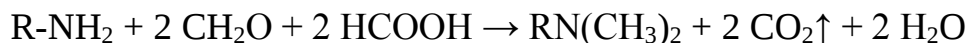


Рисунок 4 – Схема синтеза производных хитозана с краун-эфирами

N-диметилхитозан был получен по реакции восстановительного алкилирования (Эшвейлера-Кларка) [67]:



В работе [67] показано, что в гетерогенных условиях в присутствии этанола, степень *N*-алкилирования увеличивалась с повышением мольной доли муравьиной кислоты и при десятикратном избытке по отношению к хитозану составляла 1.

Сшитые материалы на основе хитозана. С целью получения нерастворимых материалов (гелей, волокон, пленок, сорбционных материалов, мембран) на основе хитозана и его производных используют бифункциональные сшивающие агенты – глутаровый альдегид, эпихлоргидрин, диглицидиловый эфир этиленгликоля и менее распространенные – *N,N*-метилен-бис-акриламид, гексаметилендиизоцианат (**ГМДИ**), толуиленидиизоцианат (**ТДИ**) и мочевиноформальдегидную смолу.

Изоцианаты легко реагируют с хитозаном образуя тризамещенные производные [68]. Диизоцианаты используют в качестве высокоэффективного

сшивающего агента при изготовлении инкапсулированных наночастиц на основе хитозана и его производных. Изоцианатная группа может реагировать как с амино-, так и с гидроксильными группами хитозана (рисунок 5) [69].

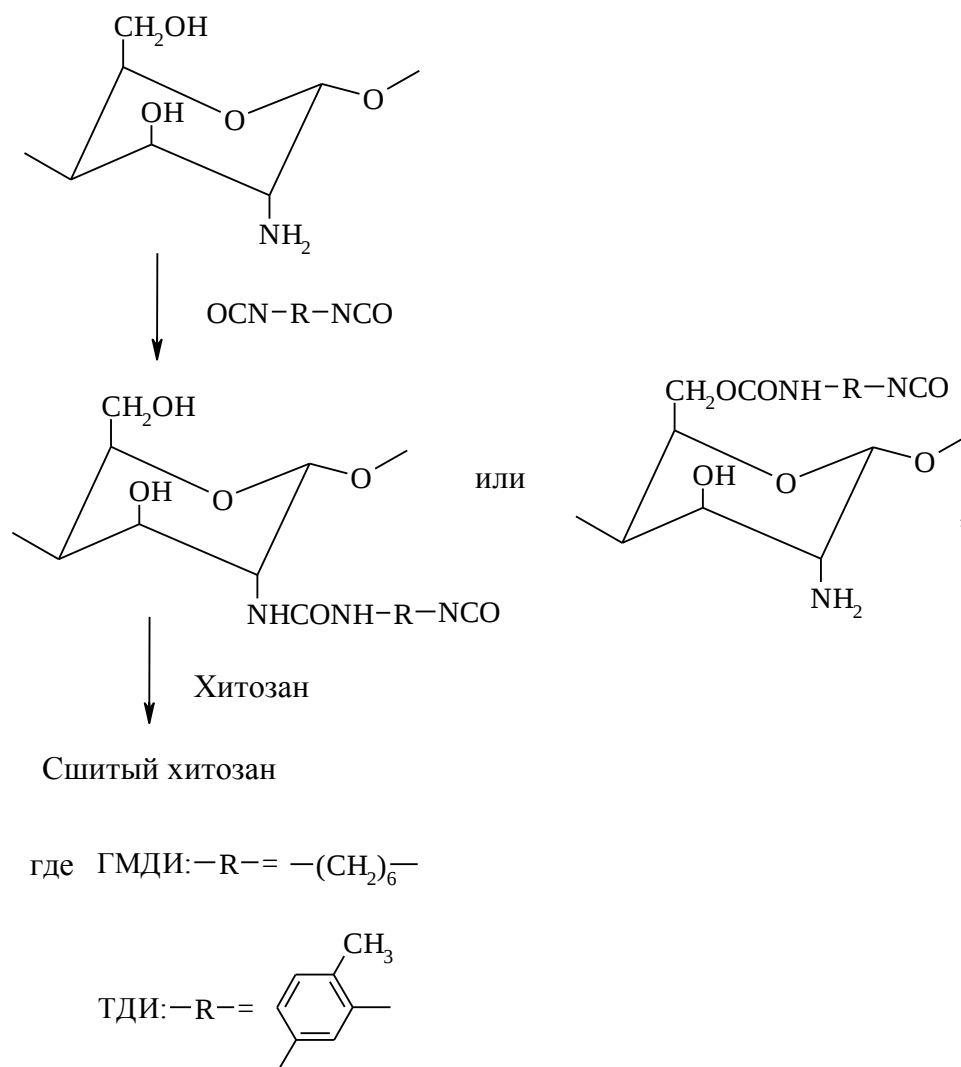


Рисунок 5 – Схема реакции взаимодействия изоционата с хитозаном

Таким образом, к настоящему времени разработаны методы модификации хитозана путем проведения полимераналогичных реакций по OH - и NH_2 - группам практически всеми классами органических соединений. Изменяя условия процесса и природу модифицирующего агента можно получить как водо-, так и органорастворимые производные хитозана с различной степенью замещения и, как следствие, с разными физико-механическими, сорбционными и биологическими свойствами. При этом следует контролировать не только pH

реакционной среды, соотношение реагентов и природу растворителя, но и, если необходимо направленное О- или N-замещение, для защиты соответствующих функциональных групп. Последнее требует введения дополнительной процедуры в схему синтеза, заключающуюся в снятии «защиты» после модификации хитозана, что не всегда приемлемо. Кроме этого, возможно протекание побочных реакций, приводящих к «сшиванию» модифицированных цепей хитозана и выделению их в виде продуктов, нерастворимых ни в одном растворителе. В связи с этим, задача получения материалов на основе хитозана с широким спектром свойств определяет его модификацию не только по реакциям полимераналогичных превращений, но и путем привитой и блок-сополимеризации полисахарида с синтетическими мономерами.

1.3. Синтез привитых сополимеров хитозана

Привитая полимеризация различных мономеров по гидроксильным и (или) амино-группам основной цепи хитозана позволяет получать сополимеры, отличающиеся составом, степенью разветвленности, молекулярно-массовыми характеристиками и с различным содержанием не модифицированных аминогрупп полисахарида [70]. Синтез привитых сополимеров хитозана осуществляют двумя путями: методом поликонденсации и методом свободно-радикальной полимеризации.

Поликонденсационные процессы применяются для создания привитых разветвленных полисахаридов, у которых боковые цепи образованы за счет присоединения на хитозан моносахаридов другого строения или сложных полиэфиров (полимолочная кислота, поликапролактон и т.д.). Такие синтезы позволяют получать аналоги редких природных мукополисахаридов, обладающих особо ценными биологическими свойствами [1], биосовместимые и биоразлагаемые ранозаживляющие материалы и импланты, а также системы направленной доставки лекарств [71-78].

В первых работах синтез сополимеров хитозана с полилактидом осуществляли методом поликонденсации L-лактида с участием аминогруппы хитозана при 80°С в отсутствие катализаторов [79]. Позднее были получены сополимеры хитозана с L-лактидом в растворе ДМСО при 90°С в атмосфере азота при использовании $Ti(OBu)_4$ в качестве катализатора [80]. Группой исследователей под руководством Yao [81] сополимеры хитозана с полилактидом были синтезированы в гетерогенных условиях восстановительным аминированием по реакции между аминогруппами хитозана и альдегидными группами предварительно полученного полилактида. Следует отметить, что во многих работах перед прививкой D,L-лактида на хитозан предварительно «защищают» аминогруппу полисахарида фталоильной группой [82-84]. Полилактид, функционализированный изоцианатом, был привит по гидроксильным группам N-защищенного фталоил-хитозана в гомогенных условиях (в ДМФА) [85]. По аналогичным схемам были синтезированы привитые сополимеры хитозана с поликапролактоном [86-95]. Полученные сополимеры использовались для формирования мицелл с гидрофобными ядрами, которые применяли для инкапсулирования лекарственных препаратов [96, 97].

Привитая радикальная полимеризация широкого круга виниловых мономеров на хитозан открывает возможности получать гибридные сополимеры, сочетающие полезные свойства синтетического полимера (высокие физико-механические характеристики, термопластичность) и катионного биополимера – адгезия к слизистым оболочкам (носовой, кишечной, глазной), адсорбция биофармацевтических препаратов, флокулирующая и коагулирующая способности, наряду с отсутствием токсичности и биосовместимостью. При этом разнообразие применяемых иницирующих систем (от классических радикальных инициаторов, окислительно-восстановительных систем, до систем, применяемых в RAFT и ATRP процессах) позволяет управлять архитектурой синтезируемых полимерных цепей. Этот вид сополимеров применяют в основном как биоматериалы, разделительные мембраны, гидрогели и т.д.

Первые работы по получению привитых сополимеров хитозана с метилметакрилатом методом свободно-радикальной полимеризации были опубликованы еще в 1979 [98]. С тех пор число публикаций каждый год только увеличивалось и в настоящее время сформировалось два основных подхода синтеза привитых сополимеров хитозана с виниловыми мономерами: 1) взаимодействие мономера с полисахаридом и 2) взаимодействие различных видов полимеров или олигомеров с полисахаридом (рисунок 6). В основе первого типа реакций лежит использование хитозана в качестве «инициатора», способного возбуждать цепную радикальную, ионную, координационно-ионную или какого-либо типа ступенчатую полимеризацию добавляемого в реакционную смесь мономера. При этом хитозан образует основную цепь получаемого привитого сополимера, а полимеризующийся мономер – боковые (привитые) цепи. Создание активных центров на макромолекулярном компоненте может либо предшествовать его смешению с мономером, либо происходить непосредственно в ходе реакции с мономером.

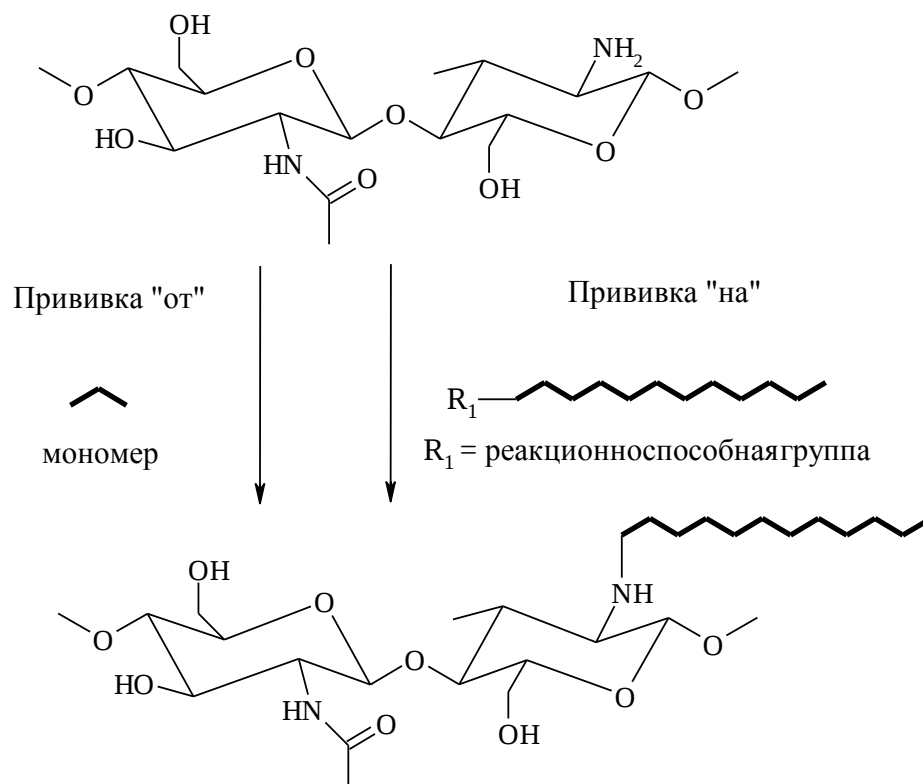


Рисунок 6 – Основные пути при синтезе привитых сополимеров хитозана с синтетическими мономерами

Второй тип реакций получения привитых сополимеров реализуется при обрыве «живых» цепей на «готовом» полимере, при рекомбинации макрорадикалов, полученных в результате γ -облучения или механического воздействия на смесь полимеров, при взаимодействии макромолекул, содержащих функциональные группы [99].

Привитую полимеризацию виниловых мономеров на хитозан, как правило, проводят в присутствии радикальных инициаторов [10] (таблица 2): ДАК [101, 102], окислительно-восстановительных систем (реактива Фентона, системы ион церия (IV) – первичный амин [103-111]), персульфата калия (персульфата аммония или окислительно-восстановительных системы на их основе) [112-116], трет-бутилгидропероксида [117], а так же при γ - [118, 119] или УФ-излучении [120] (таблица 2).

Таблица 2 – Типы инициаторов привитой сополимеризации хитозана с различными мономерами

Тип инициирования	Инициатор	Тип мономера, прививаемого на хитозан
Радикальное инициирование	Ce^{4+} , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, Реактив Фентона ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$), Третбутил боран	Акриламид [119], N- изопропилакриламид [105, 106, 109, 112, 113, 118, 121-129], метилметакрилат [130-134], акрилонитрил [135], винилацетат [136], акриловая кислота [137], 2-метил-2-оксазолин, N-винилпирролидон [138], стирол [139], др. виниловые мономеры [140].
Радикационное инициирование	γ -излучение, ^{60}Co	Стирол [120], 2- гидроксипропилметакрилат [141]
Микроволновое излучение		Полиакриламид
Поликонденсационные процессы		Полипептиды, поли-L-лизин [142-145], поликапролактон, полиэтиленимин, полилактид [146 -149] и тд.

В случае окислительно-восстановительного инициирования исследователями в качестве окислителя используются соединения церия (IV), причем, как правило $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ либо $\text{Ce}(\text{NO}_3)_4$. В присутствии этой системы были получены привитые сополимеры хитозана с полиакриламидом, поли-4-винилпиридином и полиакриловой кислотой [150, 151]. Авторы [151] предложили схему инициирования согласно которой, ионы церия образуют двухцентровый комплекс с NH_2 - и OH - группами при C_2 и C_3 молекулы хитозана с последующим разрывом связи пиранозного кольца и генерированием радикалов у 2-го и 3-го атома C , соответственно (рисунок 7).

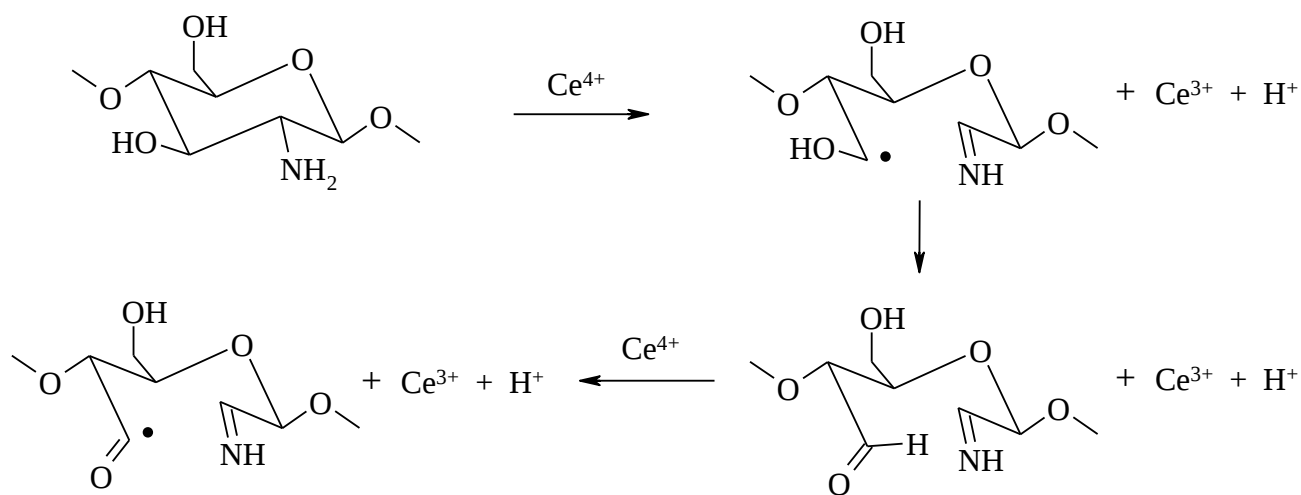
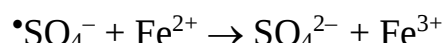
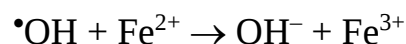
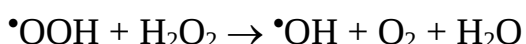
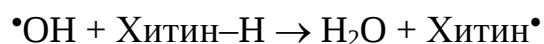
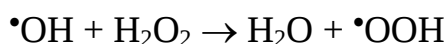
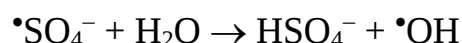
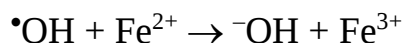
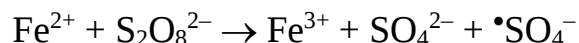


Рисунок 7 – Схема инициирования ионами Ce^{4+} радикальной полимеризации виниловых мономеров в растворах хитозана

Реактив Фентона ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) в качестве окислительно-восстановительного инициатора использовался при привитой полимеризации метилметакрилата (ММА) на хитозан. Реакция между ионами Fe^{2+} и пероксидом водорода приводит к образованию гидроксильных радикалов, которые генерируют макрорадикалы на полисахариде при отщеплении атомов водорода. Далее макрорадикал иницирует привитую полимеризацию (рисунок 8) [152, 153]. В работе [154] показано, что использование реактива Фентона в качестве инициатора радикальной полимеризации виниловых мономеров в растворах хитозана:

- сводит к минимуму вероятность образования гомополимера,

- обеспечивает высокий выход и эффективность прививки,
- снижает температуру проведения процесса полимеризации до комнатной.



а

б

Рисунок 8 – Схема образования первичных радикалов в реактиве Фентонв (а) и инициирования ими привитой полимеризации виниловых мономеров на хитозан (б)

При всех очевидных достоинствах, на наш взгляд, существует и серьезный недостаток использования реактива Фентона в качестве инициатора привитой полимеризации в растворах хитозана. Поскольку хитозан обладает высокой сорбционной и хелатообразующей способностями, удаление ионов железа из продуктов синтеза является практически невыполнимой задачей.

Другим типом водорастворимого радикального инициатора является персульфат калия (или аммония). В результате привитой полимеризации ВП на хитозан [138] в гомогенном растворе при иницировании $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (60°C) были получены нерастворимые в разбавленных органических и неорганических кислотах сополимеры. Степень и эффективность прививки увеличивались с ростом концентрации инициатора и достигали максимального значения 290% и 38%, соответственно. В работе Нудьги Л.А. [155] было показано, что процесс привитой полимеризации в присутствии ПСА (при 60°C) осложняется окислительной деструкцией хитозана. С увеличением концентрации ПСА возрастают начальная скорость реакции, конечное значение конверсии мономера и скорость обрыва цепи. Повышение концентрации ВП увеличивает как начальную скорость роста цепи, так и скорость обрыва цепи. Влияние

концентрации хитозана проявляется в промотирующем действии аминогрупп на реакцию роста цепи. При этом, скорость реакции прививки ВП на хитозан описывается уравнением:

$$V = k [\text{ВП}]^{0.46}[\text{ПСА}]^{0.11}[\text{ХТЗ}]^{1.45} \quad (1)$$

Существенными недостатками процесса являлись низкие значения конверсии мономера (до 60%), эффективности прививки (до 40%) и высокая доля образовавшегося гомополимера ПВП (до 50%), т.е. гомополимеризация и привитая полимеризация протекали одновременно с одинаковой скоростью [155]. Для устранения указанных недостатков были получены привитые сополимеры ВП и аллилхитозана со степенями замещения по аллильным группам 0.30 и 0.42. Присутствие аллильных групп повышало конверсию мономера до 90%, эффективность прививки - до 70%. Полученные сополимеры обладали антимикробной активностью, материалы на их основе имели хорошее соотношение водопоглощение/водоотдача и предотвращали бактериальное заражение [138].

В работах [156, 157] при синтезе привитых сополимеров хитозана с АА в присутствии персульфата калия одновременно проводили сшивание образующихся полимерных цепей ПАА N,N-метилен-бис-акриламидом. Введение сшивающего агента позволило авторам работ получить сополимеры нерастворимые в воде. При этом эффективность прививки в зависимости от условий синтеза (соотношение мономер/хитозан, температуры, концентрации инициатора и воды) оставалась низкой и не превышала 60%.

Авторами работ [158-162] было предложено несколько механизмов процесса привитой полимеризации виниловых мономеров на хитозан в присутствии персульфатов. Согласно одному из них при распаде персульфата калия образующиеся радикалы инициируют цепную полимеризацию мономера, находящегося в реакционной смеси [158-160]. С другой стороны, сульфатные анион- радикалы могут генерировать радикал на основной цепи полисахарида с последующим разрывом гликозидной связи макромолекулы (рисунок 9

направление I) или раскрытием пиранозного кольца и образованием макрорадикалов у C₂-C₃ (рисунок 9 направление II) и C₁-O-C₄ связях.

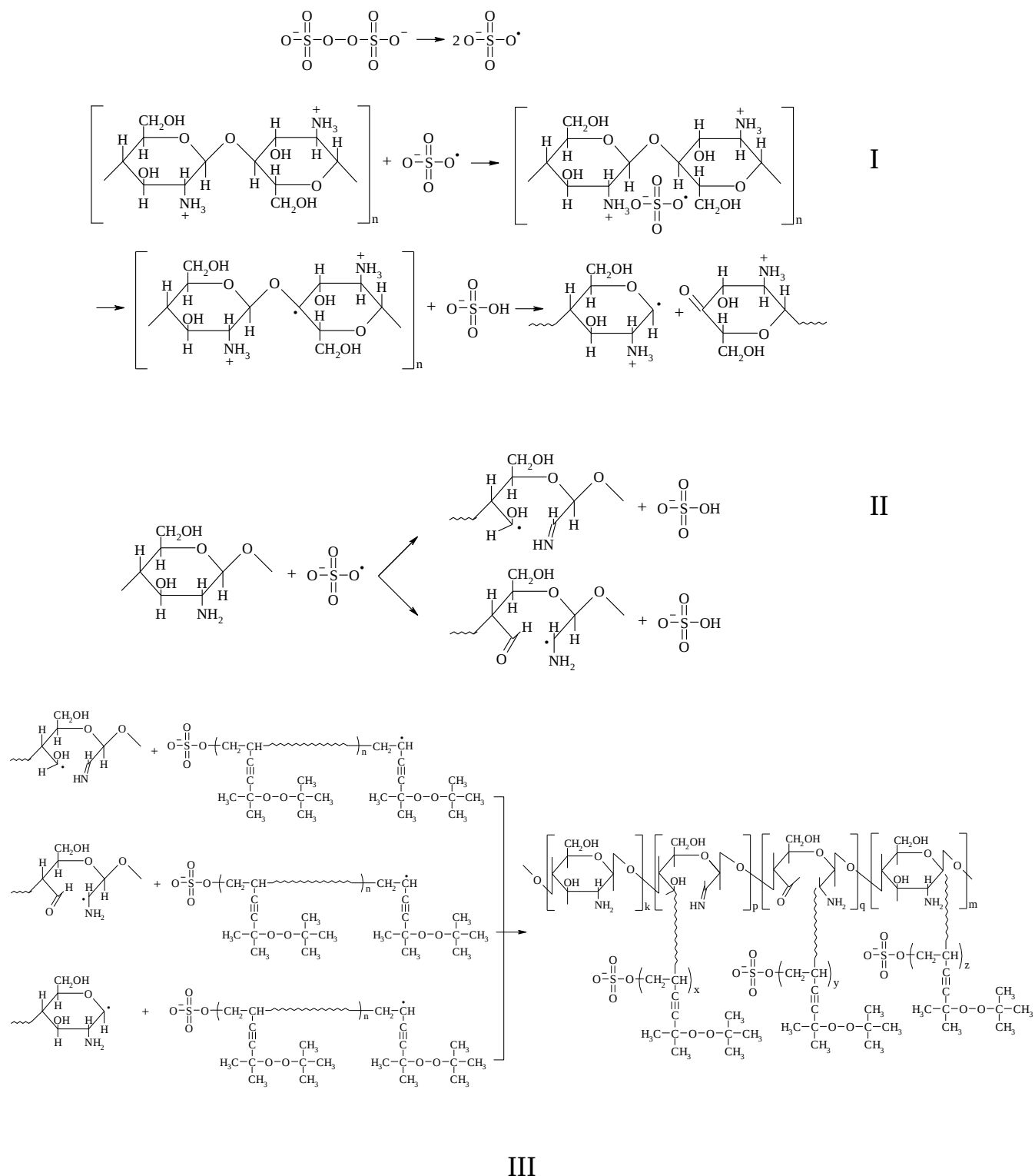


Рисунок 9 – Схема иницирования радикальной полимеризации виниловых мономеров в растворах хитозана сульфатными анион-радикалами (смешанный механизм) [159, 160]

Макрорадикалы хитозана взаимодействуют с виниловыми мономерами или по реакции рекомбинации с растущими цепями синтетического полимера, присутствующими в реакционной среде, что приводит к образованию привитых полимерных цепей типа (рисунок 9 направление III) [158,159]. Следует отметить, что в этом случае можно говорить, как об образовании привитых, так и блок-сополимеров.

Авторы [161] рассматривают другую схему инициирования, когда процесс идет без разрыва основной цепи полисахарида (рисунок 10).

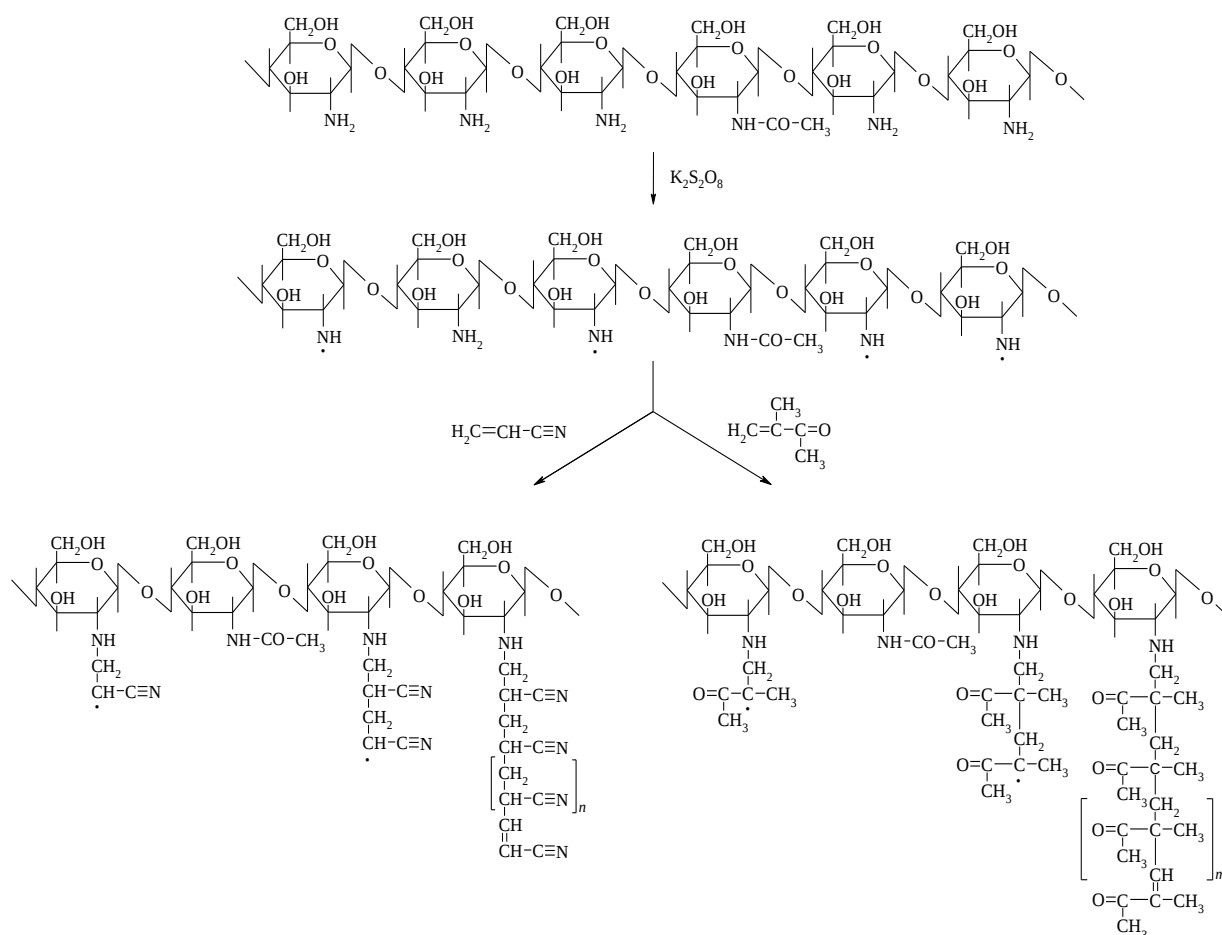


Рисунок 10 – Схема получения привитых сополимеров хитозана с виниловыми мономерами по NH_2 - группе в присутствии сульфатных анион-радикалов

В этом случае радикал образуется на аминогруппе хитозана при отрыве атома водорода. Депротонированная аминогруппа является нуклеофилом, который обладает высокой реакционной способностью и легко реагирует с электрофильным мономером. Однако, авторы работы [162] не исключают при этом и участие гидроксильных групп полисахарида в процессе привитой полимеризации виниловых мономеров (в частности 2-гидроксиэтилакрилата) (рисунок 11).

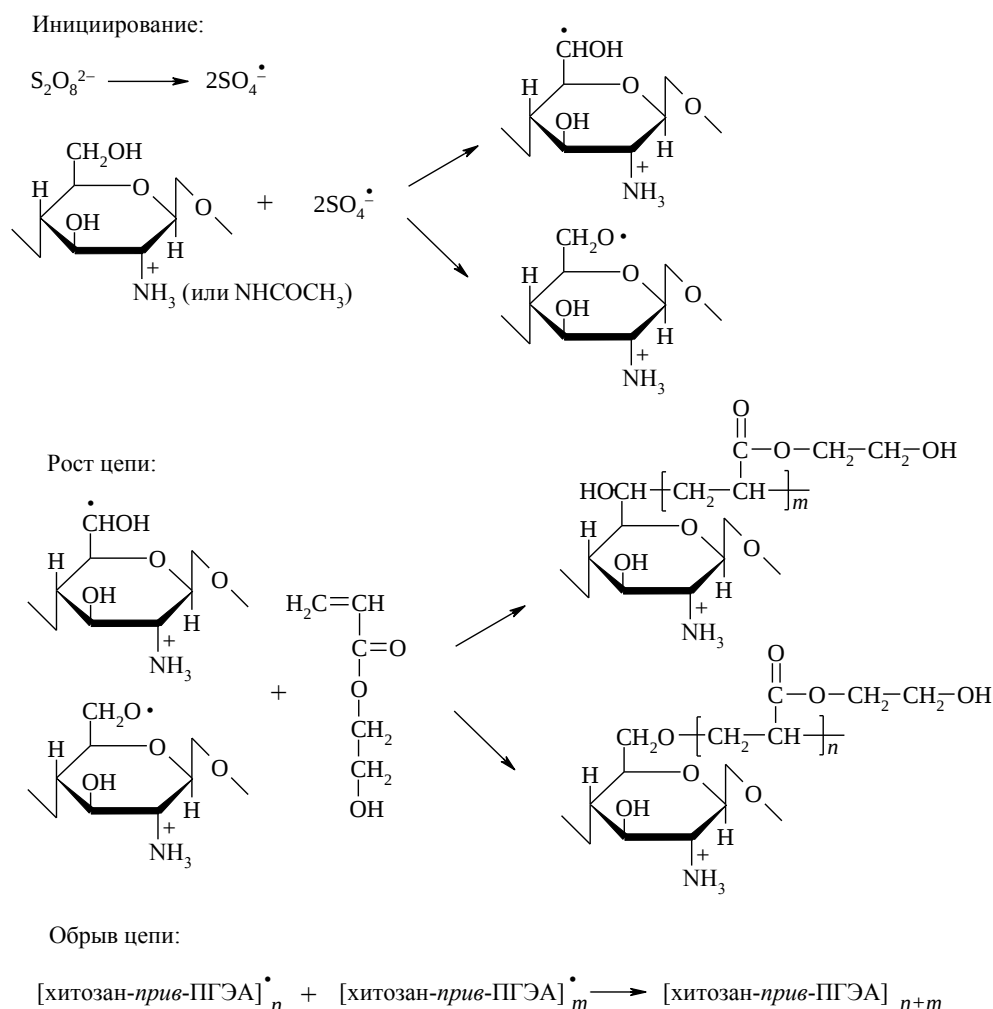


Рисунок 11 – Механизм привитой полимеризации 2-гидроксиэтилакрилата на хитозан в присутствии сульфатных анион-радикалов

В работе [163] показано, что в зависимости от условий полимеризации (концентрации реагентов, времени проведения процесса) могут быть получены сополимеры хитозана с винилацетатом, имеющие разветвленную или сшитую

структуру. Скорость привитой полимеризации винилацетата на хитозан в уксуснокислой среде (pH 3.6) при иницировании ПСА (60°C) описывается уравнением:

$$V = k [\text{BA}]^{1.03} [\text{ПСА}]^{0.14} [\text{ХТЗ}]^{-0.08} \quad (2)$$

Следует подчеркнуть, что полученная закономерность характерна для прививки водорастворимых мономеров на водорастворимые эфиры целлюлозы [163]. Зависимости степени и эффективности прививки, а также выходов привитого и гомополимеров, конверсии мономера (для реакции концентрация хитозана – 0.6 моль×л⁻¹, винилацетата – 1.0 моль×л⁻¹, ПСА - 3 ммоль×л⁻¹) показывают, что реакция привитой полимеризации начинается без индукционного периода, протекает с высокой скоростью и заканчивается за 30 мин. За это время степень прививки достигает 504%, эффективность – 57.5%, конверсия – 92.9%. Увеличение продолжительности реакции до 1 ч дает 100%-ную конверсию мономера за счет гомополимеризации. Высокие значения степени прививки и высокие скорости реакции авторы связывают с промотирующим влиянием аминогруппы хитозана при присоединении мономера.

Привитая полимеризация виниловых мономеров на хитозан приводит к существенному изменению его структуры (рисунок 12). Топография поверхности пленок показала изменение фибриллярной структуры полисахарида в привитых сополимерах от пористой морфологии (в случае акрилонитрила) до сгруппированных нерегулярных «бусинок» (в случае метилметакрилата) (рисунок 12) [164].

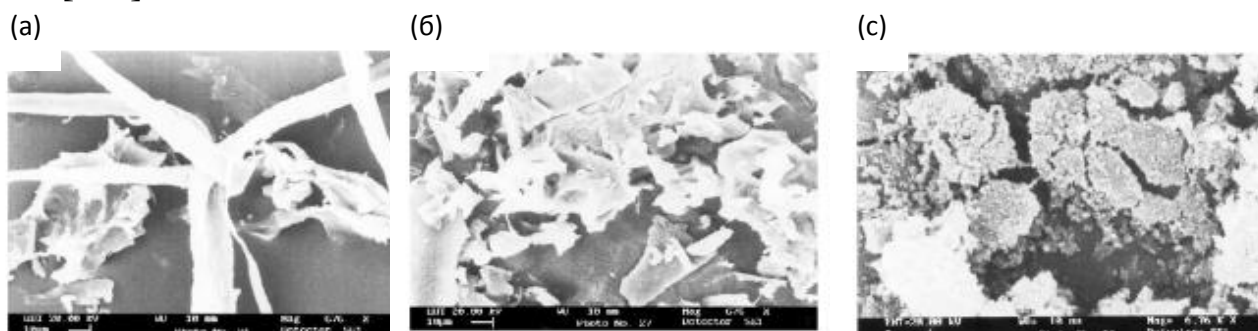


Рисунок 12 – Топография поверхности пленок хитозана (а), сополимера хитозан – акрилонитрил (б), сополимера хитозан – метилметакрилат (с)

Таким образом, из обзора литературы следует, что основными недостатками при использовании ПСА в качестве инициатора привитой полимеризации виниловых мономеров на ХТЗ являются высокий выход гомополимеров и деструкция цепей полисахарида. Разработка стратегии привитой полимеризации, снимающей эти два недостатка остается до настоящего времени актуальной.

В работах [120, 141] под действием радиационного облучения были получены термостабильные привитые сополимеры хитозана с АА (50% потеря массы наблюдается при 733°C). Привитые сополимеры имели высокую степень набухания в воде и были использованы для иммобилизации протеазы и в качестве флокулянтов и адсорбентов ионов металлов при очистке сточных вод бумажного производства. Хитозан со степенью прививки АА 92% абсорбировал 83.3% ионов Pb^{2+} , а со степенью прививки АА 80% – 68.85% ионов Cd^{2+} .

Привитая полимеризация виниловых мономеров на хитозан под действием β -, γ - и рентгеновского излучения, как отмечается авторами работы [120], проходит более эффективно, чем при химических методах инициирования. Тем не менее, основной недостаток этого типа реакции в том, что трудно контролировать процесс в силу его технического оформления. Поэтому были предприняты попытки инициировать привитую полимеризацию виниловых мономеров в растворах хитозана фотонами низкой энергии - ультрафиолетовым светом. Этот тип реакции необходимо проводить в присутствии фотосенсибилизаторов - бензофенона или азосоединений, которые выступают в качестве активаторов [165]. Однако, из-за ограниченности растворимости этих соединений в водных растворах и низкой проникающей способности УФ-излучения данный метод инициирования не нашел широкого применения при получении сополимеров на основе хитозана.

Авторами работ [166, 167] были получены сополимеры хитозана с виниловыми мономерами по механизму псевдоживой радикальной полимеризации (RAFT или ATRP). Следует отметить, что эти методы позволяют получать сополимеры сложной архитектуры с заранее заданной молекулярной

массой, узким молекулярно-массовым распределением, составом конечной полимерной цепи, что, несомненно, актуально в случае сополимеров на основе хитозана. Так, в работе [168] в качестве агента привитой полимеризации акриламида с переносом атома галогена использовался хитозан, модифицированный 2-бромизобутирилбромидом, введенным в цепь полисахарида по функциональным OH- и NH₂- группам (рисунок 13):

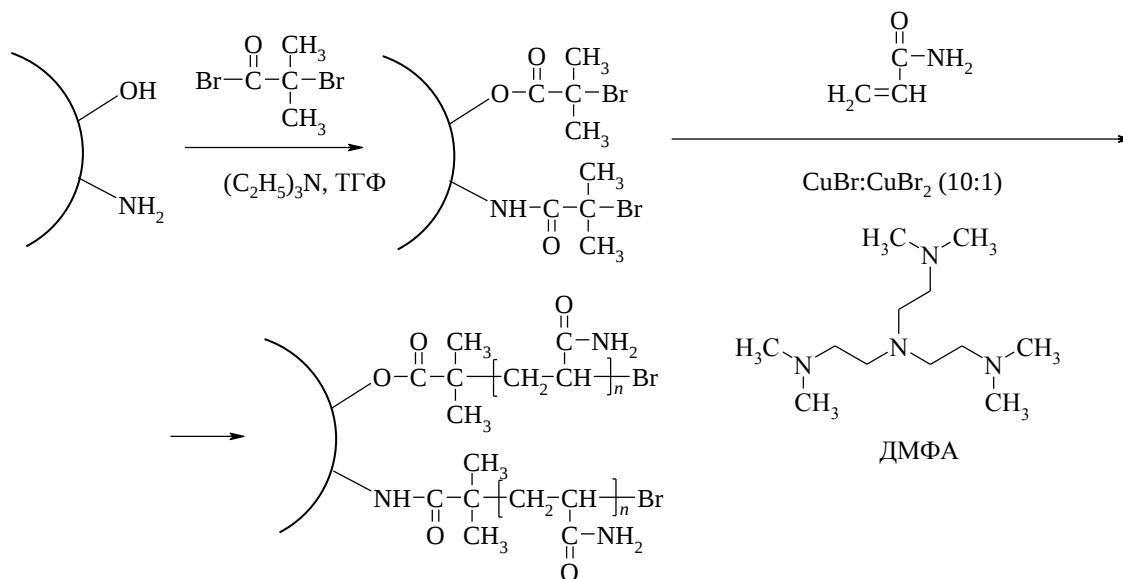


Рисунок 13 – Схема синтеза привитых сополимеров хитозана с использованием ATRP полимеризации

При синтезе привитых сополимеров хитозана со стиролом авторы работы [169] использовали предварительно полученный макроинициатор бромацетил хитозан, имеющий поверхностные амино- и гидроксильные группы. Реакцию проводили в толуоле с использованием в качестве катализаторов 1,10-фенантролина и CuBr. Было показано, что конверсия мономера и степень прививки возрастают с увеличением времени полимеризации и через 5 ч достигают значений 5.31% и 19.12%, соответственно. Методами ИК Фурье-спектроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрией, рентгеновской дифракцией и элементным анализом полученных привитых сополимеров хитозана с полистиролом было доказано, что реакция полимеризации является

контролируемой и протекает в режиме «живых» цепей. При этом гомополимер полистирола не образуется.

К сожалению, не многие полимеры могут быть привиты на хитозан по выше указанным методам, что, вероятно, обусловлено низкой эффективностью введения ATRP или RAFT агентов на макромолекулу полисахарида в гетерогенных условиях и низкой скоростью последующей полимеризации вводимого в реакционную смесь мономера [170]. Однако количество работ в данном направлении непрерывно растет [23].

В последние годы активно развивается направление создания привитых сополимеров хитозана с синтетическими полимерами методом твердофазного синтеза под действием давления и сдвиговых напряжений [1]. Первые работы в области твердофазных превращений полимеров проводились под руководством академика Н.С. Ениколопова и были связаны с модификацией наиболее распространенных полисахаридов - целлюлозы и хитина [171]. В работах [172-176] реакционной экструзией при температуре ниже температуры плавления реагентов были получены привитые сополимеры хитозана с синтетическими полимерами различной гидрофильности: полиакриламидом, полимолочной кислотой, поливинилацетатом, поливиниловым спиртом, модифицированным малеиновым ангидридом полиэтиленом (или полипропиленом), а также с мономерами - акриламидом или лактидом. Такое модифицирование позволяет сохранять ценные биохимические свойства хитозана, улучшать биосовместимость материалов и придавать им способность к контролируемой биodeградации. Кроме этого, на примере акриламида, олиго(L,L-/L,D-лактида) впервые показано влияние изомерии привитых цепей на физико-механические свойства сополимеров. Прививка на хитозан аморфно-кристаллического олиго(L,L-лактида) приводит к незначительному снижению прочности при разрыве (σ), в то время как прививка аморфного олиго(L,D-лактида) повышает σ на 40% по сравнению с немодифицированным полисахаридом.

Стратегия твердофазного синтеза производных хитозана имеет следующие достоинства: во-первых, отсутствие растворителей и разбавителей для реакционных систем («безрастворные технологии»), во-вторых – расширяется возможность синтеза производных на базе хитозана и несовместимых по растворимости синтетических полимеров, наконец – механическая активация реагентов позволяет избежать необходимость их расплавления и отказаться от использования катализаторов и инициаторов процессов, что повышает экологическую чистоту метода и является важным фактором при создании безопасных материалов биомедицинского назначения. К недостаткам можно отнести – сложность аппаратного оформления и реализации процесса. Методология твердофазного синтеза производных и привитых сополимеров хитозана, которая носит общий характер и применима ко всем реагентам, способным взаимодействовать с функциональными группами полисахарида подробно отражена в ряде работ [1, 171, 177].

В заключении следует отметить, что число публикаций по синтезу производных хитозана по реакциям привитой полимеризации с различными мономерами непрерывно растет. Это вызвано актуальностью создания на основе хитозана новых материалов целевого назначения для самых различных отраслей народного хозяйства. В последнее время появились сообщения, касающиеся использования ферментов при синтезе привитых сополимеров полисахарида [178].

1.4. Блок-сополимеры на основе хитозана

Большие возможности для дизайна различного рода структур открываются при синтезе блок-сополимеров [179, 180]. Сочетание в одной макромолекуле полезных свойств блоков хитозана и синтетического полимера представляет интерес при получении полимерных мицелл и везикул для направленной доставки биофармацевтических препаратов. Кроме того, сополимеры, содержащие блоки

хитозановых цепей и блоки гидрофильных мономерных звеньев, могут быть использованы для создания сложных полиэлектролитных мицелл. К настоящему времени в литературе описаны способы получения различных блок-сополимеров на основе декстрана, амилозы или гиалуроновой кислоты [171] и лишь незначительная часть работ посвящена синтезу блок-сополимеров на основе хитозана с полиэтиленгликолем (ПЭГ) и ПМА [175-185].

Авторы работ [182-185] получали блок-сополимеры хитозана с модифицированным ПЭГ при радикальном расщеплении персульфатом калия гликозидных связей полисахарида. Короткие цепи хитозана, несущие на концах свободные радикалы, взаимодействовали с концевыми группами монометокси полиэтиленгликоля с образованием блок-сополимера (рисунок 14).

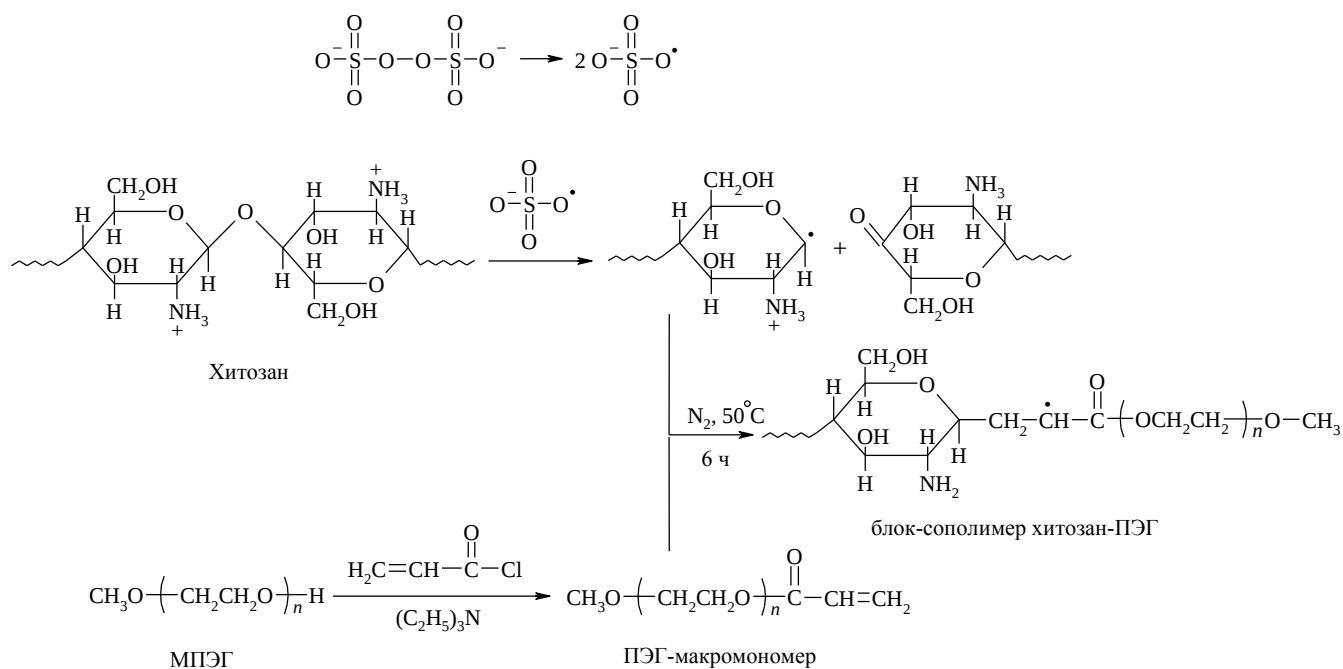


Рисунок 14 – Схема синтеза блок-сополимеров хитозана с полиэтиленгликолем [182]

Образование блок-сополимеров было доказано методами гель-проникающей хроматографии, ЯМР (^1H и ^{13}C), ИК-Фурье-спектроскопией и

дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). При увеличении персульфата калия в реакционной смеси в 10 раз (с 0.001 до 0.01 моль/л) содержание блоков ПЭГ в сополимерах увеличивалось (мольное соотношение ПЭГ/хитозан расло с 0.062 до 0.10). При более высоких концентрациях инициатора (больше, чем 0.01 моль/л) доля ПЭГ в продукте уменьшалась. Аналогичные результаты были получены при блок-сополимеризации МА в растворе хитозана методом эмульсионной полимеризации [185]. Недостатком данного процесса является протекание конкурирующей реакции присоединения мономеров к аминогруппам хитозана по реакции Михаэля. Авторы работы [184] показали, что блок-сополимеры хитозана с ПЭГ в водном растворе осуществляли самосборку в наночастицы, которые обладали термочувствительностью и низкой токсичностью.

Подводя итог, следует отметить, что разработка новых методов синтеза блок-сополимеров хитозана с виниловыми мономерами остается актуальной задачей, поскольку в данном направлении химии хитозана к настоящему времени сделаны лишь первые шаги. Кроме этого открыт вопрос о структуре уже полученных блок-сополимеров и, следовательно, об ее влиянии на комплекс свойств.

1.5. Полимерные гидрогели хитозана с синтетическими и природными полимерами

Полимерные гидрогели представляют собой гидрофильные сшитые макромолекулярные системы, способные удерживать значительные количества воды, с сохранением при этом свойств, присущих твердым телам (определенная форма, механические модули, характеризующие свойства материала при деформациях растяжения и сдвига). Такое сочетание свойств гидрогелей предопределяет широкий диапазон областей их применения – от технических сфер (сорбенты, газоразделительные и ионообменные мембраны) до пищевой

промышленности и медицины (структурообразователи пищевых продуктов, носители лекарственных средств, искусственные заменители биологических тканей, материалы для мягких и интраокулярных линз и т.д.) [186]. Появление новых областей применения полимерных гидрогелей выдвигает определенные требования к их свойствам. В последнее время усилилась необходимость применения гидрогелей, которые наряду с гидрофильными свойствами обладают и другими целевыми характеристиками, такими как газопроницаемость, свойственная гидрофобным материалам (полисилоксаны и фторполимеры), высокая механическая прочность материала в гидратированном состоянии, совместимость с биологическими тканями, оптическая прозрачность, электропроводность и т.п. Соединение в одном материале указанных свойств позволяет создавать уникальные полимерные изделия, например мягкие контактные линзы с высокой кислородопроницаемостью, носители не растворимых в воде лекарственных средств, сорбенты, способные поглощать как гидрофильные, так и гидрофобные вещества, новые мембранные материалы и другие объекты.

В настоящее время гидрогели разделяют на три группы:

1. Гидрогели, состоящие из двух гидрофильных полимеров, каждый из которых способен образовывать индивидуальный полимерный гидрогель.
2. Гидрогель, включающий гидрофильный и гидрофобный полимеры.
3. Полимерный гидрогель, содержащий неорганическую фазу.

Анализируя способы создания композиционных гидрогелей, можно выделить несколько групп методов [186]. К первой относятся методы смешения компонентов в общем растворителе, причем гелеобразование происходит благодаря возникновению межмолекулярных физических взаимодействий (водородное связывание, ионные и другие взаимодействия). Это, например, интерполимерные комплексы или гидрогели, наполненные наноразмерными неорганическими частицами. Вторая группа методов – одновременный синтез полимерных и неорганических фаз, если каждый из синтезов протекает по разным

механизмам. При образовании сшивок в каждой из полимерных фаз возникают взаимопроникающие полимерные сетки (ВПС). Если сшивке подвергается только одна из фаз, то образуется полу-ВПС. Данный метод используют для создания практически любых типов композиционных гидрогелей. Примером является синтез силикон-гидрогелевых ВПС или композиций гидрофильный полимер–кремнезем, в которых гидрофильный полимер получают по-обычному полимеризационному механизму, а кремнезем образуется из тетраалкоксисиланов (золь-гель-технология). Третья группа методов включает две или более последовательных стадий. На первой стадии синтезируют макромономер, линейный или сшитый полимер; затем их совмещают с компонентами, образующими в результате различных химических превращений вторую фазу. Наиболее типичные примеры – синтезы блок- и привитых сополимеров, последовательных ВПС или полу-ВПС, органо-неорганических гидрогелей путем формирования неорганической фазы в объеме полимера по золь-гель технологии.

Для того чтобы соответствовать определенным требованиям, предъявляемым к гидрогелям, полимерная сетка на основе хитозана должна удовлетворять двум условиям: (1) взаимодействия между цепочками полисахарида должны быть достаточно сильными, чтобы сформировалась молекулярная сеть, и (2) сеть должна быть проницаема для молекул воды. Гели, удовлетворяющие этим требованиям могут быть получены за счет физических взаимодействий (рисунок 15), которые включают в себя электростатические, водородные и ван-дер-ваальсовы связи, возникающие между полимерными цепями [187, 188]. На рисунке 15 показана схема основных физических взаимодействий (т.е. ионные, полиэлектролитные, сополимеры сложные и гидрофобные ассоциации), которые приводят к гелированию растворов хитозана. Физические гели на основе хитозана часто получают путем простого смешивания компонентов геля в соответствующих условиях. Недостатком этих гелей является короткое время «жизни» (от нескольких дней до месяца), в течение которого гель сохраняет свои физико-химические свойства. Несмотря на это, они хорошо

подходят для краткосрочного биологического действия, т.к. их формирование не требует введения дополнительных сшивающих агентов, порой токсичных для организма. Однако их широкое применение ограничено из-за слабой механической прочности и неконтролируемого растворения [189]. Благодаря наличию протонированных аминогрупп хитозан способен вступать в ионные взаимодействия с отрицательно заряженными молекулами и анионами. Получены ионные комплексы между хитозаном и различными видами анионов - сульфатов, цитратов и фосфатов [190, 191] или комплексных анионов, содержащих ионы металлов (Pt (II), Pd (II), и Mo (VI)) [192, 193].

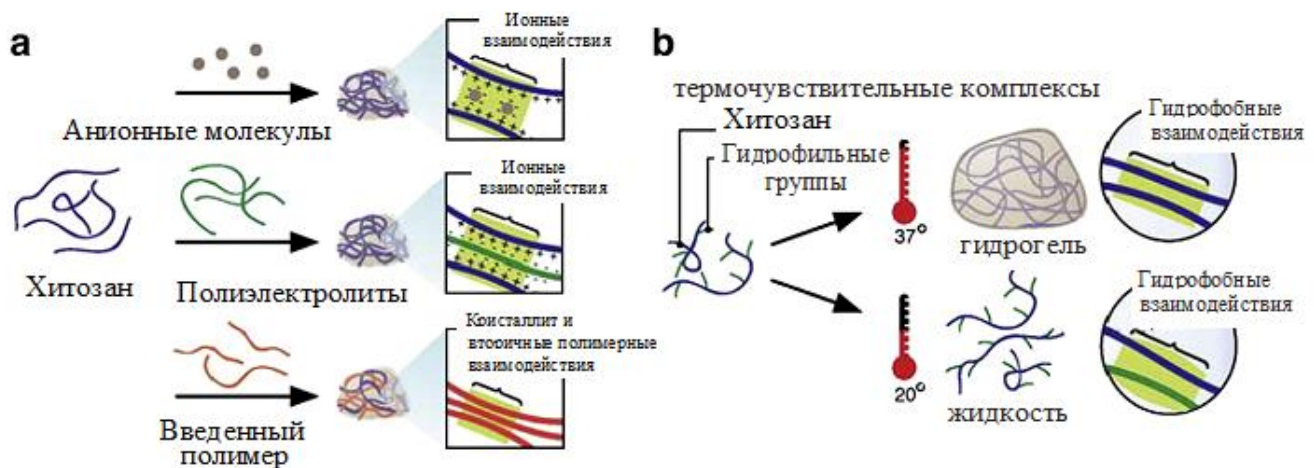


Рисунок 15 – Схематическое изображение гидрогелей хитозана полученных при различных физических взаимодействиях: (а) макромолекулы хитозана взаимодействуют с ионами, полиэлектролитами и нейтральными полимерами; (б) термочувствительные макромолекулы привитого сополимера хитозана – гель при температуре тела живого организма и жидкость, при температуре ниже комнатной [187]

Свойства сформированных гидрогелей существенно зависели от плотности заряда и размера анионного агента, а также степени деацетилирования и концентрации раствора хитозана. Кроме этого, возможно возникновение интерполимерных комплексов с макромолекулами другого полимера. При этом существенную роль играет не только наличие в структуре макромолекул соответствующих функциональных групп, но и молекулярные характеристики полимеров,

обеспечивающие комплементарность макромолекул. Закономерности формирования интерполимерных комплексов подробно рассмотрены в обзорах и монографиях [194-198]. При необходимости упрочнения интерполимерных гидрогелей комплексообразование дополняют процессами, приводящими к возникновению между макромолекулами ковалентных связей. Более управляемыми являются процессы, в которых осуществляется химическое взаимодействие между функциональными группами полимеров. Как правило, для структурирования полимеров применяют низкомолекулярный сшиватель, природа которого определяется типом реагирующих групп. Так, были получены гидрогели на основе хитозана и ПВС с использованием в качестве сшивающего агента глутарового альдегида [186]. Упрочнение интерполимерных гидрогелей ковалентными связями дает значительный выигрыш в свойствах материала.

Гидрогели, полученные в результате формирования полиэлектролитных комплексов между хитозаном и синтетическими полимерами обладают большей стабильностью и не требуют дополнительных сшивающих агентов. Стабильность этих комплексов зависит от плотности заряда, природы растворителя, ионной силы, pH и температуры [199]. Авторами работы [200] были получены растворимые в воде полиэлектролитные комплексы на основе хитозана и анионных макромолекул ДНК, анионных полисахаридов (например, альгината, хондроитин сульфата, гиалуроновой кислоты, гепарина), карбоксиметилцеллюлозы, и т.п.), белков (желатины, альбумина, фиброина, кератина и коллагена) и анионных синтетических полимеров (в частности, полиакриловой кислоты). Выбор анионогенной макромолекулы для формирования полиэлектролитных комплексов (ПЭК) зависит от ее заряда в физиологических средах, т.к. pH среды гидрогеля регулирует ионные взаимодействия и, впоследствии, свойства гидрогеля.

В последние годы внимание исследователей все больше привлекают, так называемые «умные полимерные гели», способные обратимо реагировать на небольшие изменения свойств окружающей среды (pH, температуры, ионной

силы, присутствия определенных веществ, освещенность, электрическое поле), причем ответ системы легко виден невооруженным глазом (образование новой фазы в гомогенном до этого растворе, резкое набухание или сжатие) [201]. С целью получения термочувствительных гидрогелей на хитозан были привиты поли(N-изопропилакриламид), плуроники (блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена) [202-205]. Эти препараты могут быть использованы для направленной доставки лекарственных средств, пептидов, белков в клетки. Предварительное смешивание этих компонентов с раствором хитозана при комнатных температурах, их инъекция в область поражения и последующее формирование гидрогеля внутри очага приводит к образованию системы с контролируемым высвобождением активного начала при температурах тела [103]. Кроме ковалентного связывания полимеров уже после завершения формирования гидрогеля возможна и другая двухстадийная технология формирования сшитой структуры. На первой стадии формируют один из полимерных компонентов, макромолекулы которого содержат реакционноспособные функциональные группы. На второй стадии в реакционную среду, содержащую полимер, синтезированный на стадии 1, вводят мономер(ы), образующий второй полимер, ковалентно связывающийся с первым. К этой группе синтезов относятся способы получения привитых, блок-сополимеров и макромолекулярных образований, называемых в англоязычной литературе “conetworks”, являющихся фактически не линейными, а сшитыми блок-сополимерами (блок-сополимерными сетками). При синтезе указанных структур применяют приемы, описанные в монографиях и обзорах [99, 206, 207]. В ряде случаев при создании гидрогелей с повышенными физико-механическими свойствами в композицию на стадии формирования вводят бифункциональный сшивающий агент - глутаровый альдегид, диглицидиловый эфир, диизоцианат, диакрилат и др. [208-211]. На основе декстран сульфата [212], полиакриловой кислоты [213] и хитозана созданы гели с высокой рН-чувствительностью, содержанием связанной воды и физико-механическими свойствами. Оптимальные механические свойства имеют гели

при отношении содержания $\text{NH}_2/\text{COOH}=25/75$. В этом случае содержание воды в гидрогеле минимально. Показана биодеструкция этих гидрогелей с помощью некоторых ферментов и почвенными нитевидными грибами [214]. Данные гидрогели имеют улучшенные физико-механические характеристики, по сравнению с физическими гелями, но при этом характеризуются рядом недостатков. Существенным недостатком является потеря физиологической активности функциональных групп полимера в результате реакции их со сшивающим агентом. Кроме того, не исключены токсические явления, обусловленные выделением сшивающего агента из геля, при разрушении его структуры внутри организма.

1.6. Формирование наночастиц хитозана, наночастиц металлов в матрице хитозана

Наночастицы из различных материалов давно привлекают особое внимание исследователей из-за присущих им специфических физических и химических свойств [215-230]. Достоинством хитозана является наличие в его макромолекуле ОН- и первичных аминогрупп, несущих положительный заряд в водных средах при кислотных и нейтральных значениях рН, что определяет возможность формирования полисахарида в наноструктурированном состоянии. Так, в работе [231] на основе хитозана и его производных методом ионотропного гелеобразования и осадительной коацервации были получены НЧ с размером от 20 нм до 100 нм. Выход НЧ (в пересчете на лиофильно высушенные) составлял 8-30% в зависимости от количественного соотношения и концентрации используемых компонентов, а также влияния различных внешних воздействий.

Из анализа литературы следует, что особый интерес представляют НЧ, способные выступать в качестве носителей биологически активных веществ в клетки-мишени. Наночастицы на основе хитозана и его производных отвечают требованиям, предъявляемым к таким системам. Благодаря высокой плотности

заряда на поверхности они активно взаимодействуют с мембраной клеток. Частицы биосовместимы с живыми тканями организма, не вызывают аллергических реакций и отторжения, постепенно биodeградируют под действием ферментов на аминоксахара, которые полностью усваиваются в живых организмах. Они не токсичны и легко выводятся из организма, не вызывая конкурентных побочных реакций. Эффективность действия большинства биологически активных веществ часто ограничивается их возможностью подойти к органу-мишени (месту терапевтического действия) с сохранением биологической активности. Применение НЧ на основе хитозана в качестве подложки для биологически активных веществ обеспечивает их целевую доставку, снижает применяемую дозу, пролонгирует эффективность действия и обеспечивает возможность применения для перорального или нозального введения, как наиболее удобных путей введения в живой организм [232].

В работе [233] производные хитозана были использованы для иммобилизации лекарств, применяемых в виде наноzeлей. Сублистанции левофлорсаина и мелатонина были включены в полисахарид в коллоидной форме или в виде НЧ [234, 235]. Средний размер образующихся НЧ - 45.84 нм; загрузка лекарственной сублистанции 8.35 % (эффект захвата при загрузке 38.33 %) [235]. N-гидроксиметил, 2-N-хлоргидроксипропилпроизводные хитозана были использованы для химической иммобилизации в их структуру препаратов с противотуберкулезной активностью (стрептомицина). При использовании тех же матриц был осуществлен синтез полимерных форм глицина, L-лизина гидрохлорида, L-глутаминовой кислоты [236]. В работе [237] были сформированы НЧ хитозана, содержащие в своем составе инсулин для перорального применения. При этом использовали комплекс хитозана и инсулина, а его лекарственная форма пролонгированного действия была получена в виде НЧ, несущих ацидоустойчивое покрытие. Размеры НЧ составили 265; 284; 342 нм. Эффективность захвата инсулина при загрузке НЧ хитозана достигала 81.5 %; показатель высвобождения инсулина за 2 часа – 24.0-49.3 %. Биодоступность

субстанции за 48 часов достигала 8.3 % по сравнению с инъекционным раствором. В работе [238] изучено формирование наноструктур на основе пектина и хитозана (10:1–1:10) размером 25-150 нм добавлением их раствора в осадитель при воздействии ультразвука (УЗ). Полученные высокодисперсные смеси положительно влияли на прорастание и развитие растительных объектов. Нано- и микрочастицы на основе геля альгината Са с поверхностным слоем хитозана использовались для регулируемого высвобождения рифампицина в организме в условиях хронотерапии [239].

В настоящее время возрастает поток публикаций по получению наночастиц металлов, применяемых в катализе, оптике [227-230], биомедицинских целях [216]. Во всех случаях необходима стабилизация образующихся НЧ металлов, для чего часто используют полимеры. НЧ золота, в силу своей высокой терапевтической активности, инертности, биосовместимости и отсутствия токсичности наиболее востребованы для применения в биологии и биомедицине, как в терапевтических целях, так и для визуализации степени тяжести различных заболеваний [217-226]. Хитозан, из-за присущих ему уникальных свойств, является наиболее перспективным стабилизатором для НЧ золота, применяемых в этих целях.

К настоящему времени известно три основных способа стабилизации при получении НЧ (рисунок 16):

- прямой синтез НЧ золота из золотохлористоводородной кислоты (допанта) в присутствии соответствующих восстановителей – боргидрид натрия (NaBH_4), функционализированного полимера [240] – «direct synthesis».

- «grafting to» ("прививка на") заключается в химическом присоединении функционализированных полимеров, содержащих тиольную или аминогруппу, на поверхность НЧ золота [241, 241].

- «grafting from» ("прививка от") включает в себя полимеризацию на поверхности НЧ золота, в присутствии соответствующих инициаторов или агентов передачи цепи, который вызывает последующий рост полимерных цепей

с поверхности НЧ золота. Полимеры с необходимой молекулярной массой и индексом полидисперсности синтезируют с использованием подходящих мономеров и RAFT агентов [243-245].

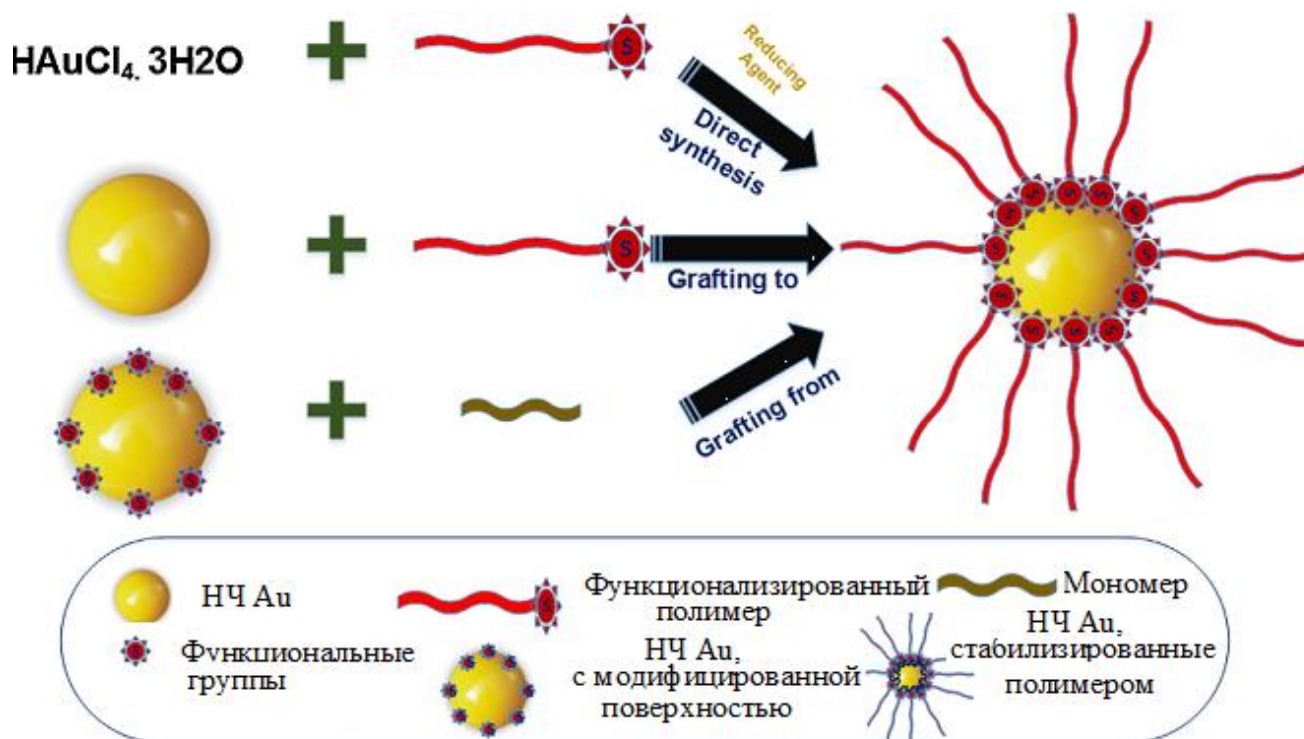


Рисунок 16 – Методы синтеза наночастиц золота, стабилизированных полимером [246]

Другой подход при стабилизации НЧ золота заключается в использовании физической адсорбции или инкапсулирования НЧ в гидрофобную внутреннюю часть амфифильного блок-сополимера. В работе [247] НЧ золота, модифицированные амфифильным блок-сополимером, были включены внутрь мицеллы на основе блок-сополимера полистирола с полиакриловой кислотой (или полистирола с полиакриламидом). Инкапсуляция НЧ золота в гидрофобное ядро представлена на рисунке 17.

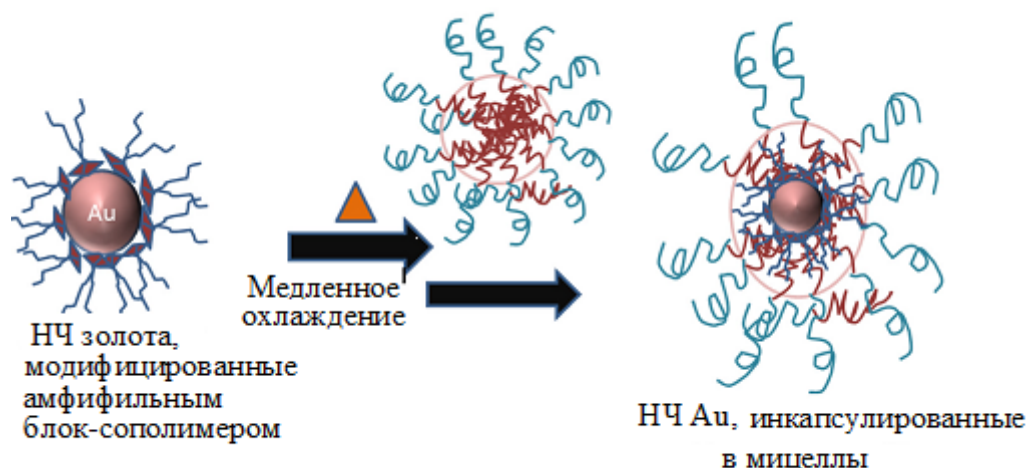


Рисунок 17 – Схема инкапсуляции наночастиц золота в гидрофобное ядро мицеллы

Авторами работы [248] предложен метод синтеза золотосодержащих наноструктур в среде хитозана, сшитого глутаровым альдегидом. Определено влияние участия в процессе глутарового альдегида и охлаждения на процесс формирования НЧ, их размер и оптические свойства. Привитой сополимер хитозана с цистеином был использован при формировании НЧ золота из HAuCl_4 . В этой системе, имеющей в своей структуре тиолятные группировки, формируются НЧ золота в виде цепей или игольчатых кристаллов, перекристаллизующихся в микрокубы. Изучен процесс самоорганизации НЧ в полученной системе [249].

Кроме того, хитозан и его производные используют и для стабилизации НЧ других металлов (серебра, железа, меди и кобальта) [250], а также НЧ неметаллической природы (фуллерены, НЧ на основе оксидов кремния и т.д.). Так, например, привитые сополимеры хитозана с метилметакрилатом использованы в качестве матриц при получении НЧ серебра. Введение в структуру материала НЧ серебра проводилось в условиях восстановления металла из растворов солей. Образование нанокристаллов серебра доказывали методами просвечивающей электронной микроскопии и УФ-спектроскопии. Образование

связей Ag-O подтверждено данными рентгеноэлектронной микроскопии. Полученные препараты обладают антимикробной активностью [251].

Таким образом, размеры НЧ металлов полученных из соответствующих допантов в присутствии слабых восстановителей (функционализированных полимеров) намного больше (~ 100 нм и больше) тех, которые получены с использованием распространенного восстановителя - боргидрида натрия (NaBH_4). Размер и форму образующихся НЧ можно регулировать, изменяя природу полимера-стабилизатора, его молекулярную массу, степень разветвленности и полидисперсность [252, 253]. Это имеет большое практическое значение, т.к. от размера, формы и полидисперсности НЧ существенно зависят их физико-химические свойства, биологическая активность и токсичность [254-260].

В заключении обзора литературы следует отметить, что наличие в макромолекуле хитозана реакционноспособных функциональных групп и его растворимость в водных растворах кислот обеспечивает возможность разнообразных химических модификаций полисахарида по реакциям полимераналогичных превращений, путем привитой и блок-сополимеризации. С момента начала исследований хитозана большое внимание уделялось реакциям полимераналогичных превращений с реагентами отличающимися как химической природой, так и строением. Отработаны методики формирования производных хитозана с максимальной степенью замещения (4) и разработаны конкурентоспособные рыночные продукты, которые заняли определенную, но недостаточно широкую нишу. Полезные свойства, присущие хитозану, определяют большой потенциал его крупномасштабного использования для получения пленок, гидрогелей, реагентов для очистки сточных вод - флокулянтов, коагулянтов, сорбентов, мембран, материалов медико-биологического назначения. Раскрытие этого потенциала возможно при модификации хитозана путем привитой и блок-сополимеризации с виниловыми мономерами по свободно-радикальному механизму. Детальное изучение этих процессов и отработка оптимальных условий синтеза позволит разработать неограниченное

количество новых продуктов целевого назначения с заданными свойствами, удешевить их себестоимость, облагородить используемые в настоящее время синтетические полимеры (придав им биоразлагаемость). Кроме этого, в настоящее время для создания гидрогелей на основе хитозана применяют сшивающие агенты, которые не способны обеспечить формирование стабильной структуры геля (глутаровый альдегид) или потенциально опасны для живого организма. Поиск новых сшивающих агентов, способных исключить эти недостатки при сохранении неоднократно высокой степени набухания геля остается достаточно сложной задачей. Следует подчеркнуть, что наряду с этим, остается практически неизученным вопрос высвобождения лекарственных средств из полученных гелей при их практическом использовании. И наконец, биологическая активность хитозана в сочетании с антимикробным действием делает актуальным разработку на его основе нанокомпозиций, пленочных материалов, гелей и губок медицинского назначения. Наночастицы металлов, стабилизированные хитозаном, являются хорошим средством доставки лекарственных средств в русло крови живого организма. Однако, до сих пор в качестве стабилизаторов НЧ в основном применяют синтетические полимеры различной природы. Кроме этого, внимание исследователей, как правило, направлено на инъекционное введение таких препаратов, хотя существуют и более щадящие методы, в частности, применение *per`os*. Остается открытым вопрос и об эффективности доставки лекарственных средств НЧ золота, стабилизированных хитозаном, при пероральном применении, их распределении и накоплении в органах и выведении из организма. Решению круга описанных вопросов посвящены следующие главы.

ГЛАВА 2. Синтез сополимеров хитозана с виниловыми мономерами, свойства пленочных материалов и гидрогелей на их основе

2.1. Привитая и блок – сополимеризация виниловых мономеров с хитозаном

В современном мире постоянно растет спрос на новые полимерные материалы с улучшенными эксплуатационными характеристиками. Если в прошлом столетии в промышленности находили применение в основном гомополимеры и их смеси, то в настоящее время в силу возможности регулирования структуры и состава возрастает роль сополимеров. Спектр сополимеров чрезвычайно широк [99] - статистические сополимеры, регулярные сополимеры, линейные блок-сополимеры, привитые сополимеры, звездообразные блок-сополимеры, сополимеры сложной молекулярной архитектуры. Одним из перспективных направлений в материаловедении является создания «гибридов» на основе природных и синтетических полимеров. Среди природных полимеров предпочтение отдается классу полисахаридов и, в частности, хитозану [261-263]. Последнее обусловлено, как уже отмечалось в литературном обзоре, уникальным комплексом его химических, физиологических и экологических свойств. Существенное расширение спектра приложений хитозана может быть достигнуто путем его модификации привитой и блок-сополимеризацией с мономерами винилового ряда. Использование последних позволит создать неограниченный круг новых материалов целевого назначения: гели, нанокомпозиты, флокулянты, сорбенты, коагулянты, пленкообразующие композиции, включая мембраны. При этом рассматриваются две группы мономеров: водорастворимые и мономеры с ограниченной растворимостью в воде.

Анализ литературных данных показывает, что для разработки методологии синтеза привитых сополимеров хитозана с виниловыми мономерами необходимо решить ряд основных задач:

- Поиск новых (или выбор среди известных) эффективных инициаторов сополимеризации виниловых мономеров в растворах хитозана, обеспечивающих высокий выход целевого продукта при сохранении основных молекулярно-массовых характеристик исходного полисахарида. С точки зрения практического применения эти показатели наиболее значимы, т.к. ММ является одним из основных параметров, существенно влияющих на физико-химические свойства и биологическую активность полимера, а в первых «поисковых» работах по привитой полимеризации на хитозан им совсем не уделялось внимания;

- Подбор оптимальных условий процесса (рН среды, температуры, природы растворителя), обеспечивающих высокую степень и эффективность прививки и низкий выход образующегося в ходе процесса гомополимера;

- Выбор эффективных средств защиты определенных функциональных групп полисахарида для синтеза сополимеров с привитыми цепями синтетического полимера либо по атому C_6 , либо по атому N у атома C_2 пиранозного кольца хитозана – формирование заранее выбранного скелета образующейся макромолекулы сополимера;

- Расширение спектра мономеров (от хорошо растворимых в подкисленных водных растворах полисахарида до плохо растворимых) и выявление условий процесса синтеза, обеспечивающих получение сополимеров амфифильного строения.

Следует подчеркнуть, что при решении этих задач, в большинстве случаев, исследователям не удастся однозначно ответить на вопросы, связанные с выявлением механизма привитой сополимеризации виниловых мономеров в растворах хитозана, ограничены также данные по свойствам сополимеров.

Для решения задачи повышения эффективности прививки и скорости процесса, а также снижения выхода образующегося в ходе процесса гомополимера необходимым является оптимизация условий (концентрация инициатора, температура, рН реакционной среды) привитой полимеризации виниловых мономеров на хитозан. Известно, что одним из распространенных

инициаторов привитой полимеризации виниловых мономеров на полисахариды является ПСА [20], который продуцирует одновременно нескольких активных центров на цепях хитозана за счет отрыва подвижных атомов водорода от amino-, гидроксигрупп или у атома С6 первичными сульфат-анион-радикалами [157-161]. Вместе с тем, к существенным недостатком ПСА как инициатора следует отнести: во-первых - высокий выход нецелевого продукта – гомополимера, во-вторых - разрушение цепей полисахарида в результате генерирования первичных радикалов на С2 углеродном атоме пиранозного кольца (связанного с аминогруппой), с последующей перегруппировкой, приводящей к деструкции гликозидной связи (рисунок 18) [159]:

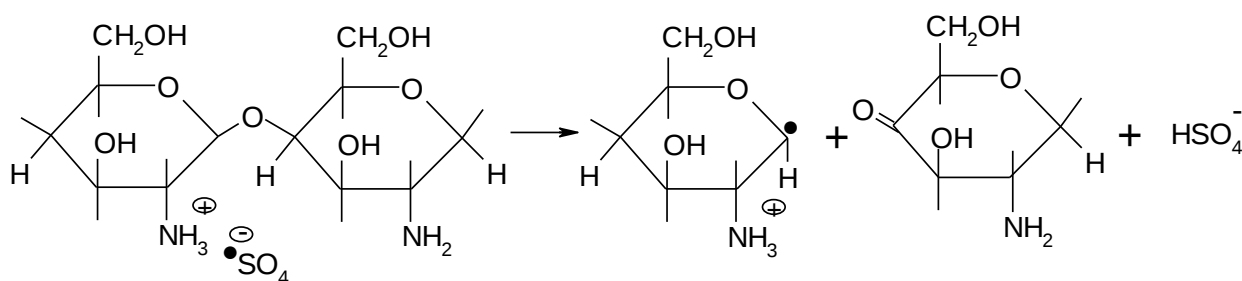


Рисунок 18 – Схема разрушения основной цепи хитозана в присутствии персульфатных анион-радикалов

Несмотря на то, что были отработаны оптимальные условия (концентрация ПСА, ДАК, температура, pH среды), обеспечивающие полимеризацию виниловых мономеров в растворах хитозана с высокими степенью и эффективностью прививки, актуальным оставался поиск и применение новых иницирующих систем, которые обеспечивали бы такие же высокие параметры прививки цепей синтетических полимеров, не разрушали основную цепь полисахарида при любых концентрациях (в отличие от ПСА) и хорошо растворялись в водных растворах (в отличие от ДАК). Известно [20, 264], что такие условия реализуются при привитой полимеризации виниловых мономеров на полисахариды (целлюлозу) в присутствии ионов переходных металлов (в частности Ce^{4+} и Co^{3+}). Если привитая полимеризация виниловых мономеров на ХТЗ в присутствии солей Ce^{4+} , причем,

как правило $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, либо $\text{Ce}(\text{NO}_3)_4$, достаточно детально изучена, предложен механизм стадии инициирования [61, 70, 265, 266], то круг аналогичных работ с использованием соединений Co^{3+} существенно ограничен и носит поисковый характер [266]. На основании этого, для синтеза привитых сополимеров хитозана с АН и МА в работе был использован в качестве инициатора хлорид гексаамминкобальта (III).

Исследована зависимость скорости полимеризации АН в растворах хитозана (рисунок 19) (3% раствор хитозана в 1.2% УК) (при pH 4.2) в присутствии различных концентраций $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$.

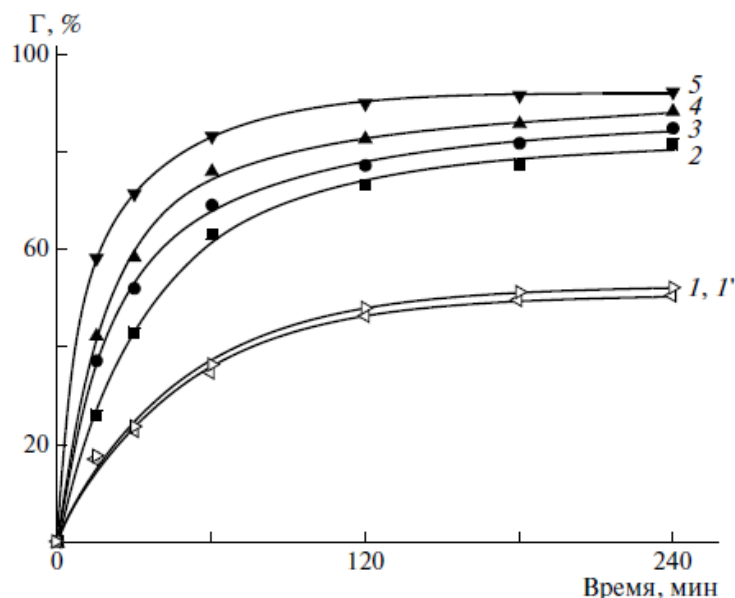


Рисунок 19 – Зависимость глубины превращения АН при полимеризации в присутствии хитозана от времени при различных концентрациях комплекса кобальта: 1, 1' – $3.4 \times 10^{-4} \div 1.7 \times 10^{-3}$, 2 – 3.5×10^{-3} , 3 – 7.0×10^{-3} , 4 – 1.05×10^{-2} , 5 – 1.6×10^{-2} моль/л, $[\text{ХТЗ}] = 0.186$ осново-моль/л, $[\text{АН}] = 1.24$ моль/л, $T = 333$ К

В интервале концентраций от 3.4×10^{-4} до 1.7×10^{-3} моль/л глубина превращения АН практически не зависит от концентрации комплекса кобальта и составляет всего лишь ~50%. При увеличении концентрации комплекса кобальта до 1.6×10^{-2} моль/л возрастает начальная скорость полимеризации, а предельная глубина превращения достигает 92%. В изученном интервале концентраций

зависимость начальной скорости полимеризации АН от концентрации $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ в логарифмических координатах носит линейный характер, порядок по инициатору составляет 0.5 (рисунок 20).

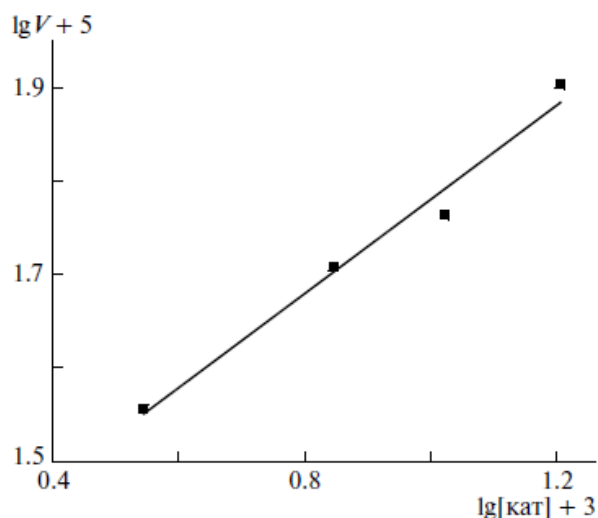


Рисунок 20 – Зависимость начальной скорости полимеризации АН в растворе хитозана от концентрации комплекса кобальта в логарифмических координатах. $[\text{ХТЗ}] = 0.186$ осново-моль/л, $[\text{АН}] = 1.24$ моль/л, $T = 333$ К

Из рисунков 21, 22 видно, что глубина превращения АН существенно зависит от концентрации мономера - с увеличением концентрации АН от 0.72 моль/л до 1.24 моль/л начальная скорость реакции возрастает в два раза, а предельная конверсия достигает 90%. Порядок реакции по мономеру (рисунок 22) составляет 3.3. Такое высокое значение порядка по мономеру обусловлено побочными процессами, главным из которых является цианэтилирование хитозана. Протекание реакции цианэтилирования доказано в специальных опытах, проводимых в условиях аналогичных таковым при привитой полимеризации, но в отсутствие инициатора [266].

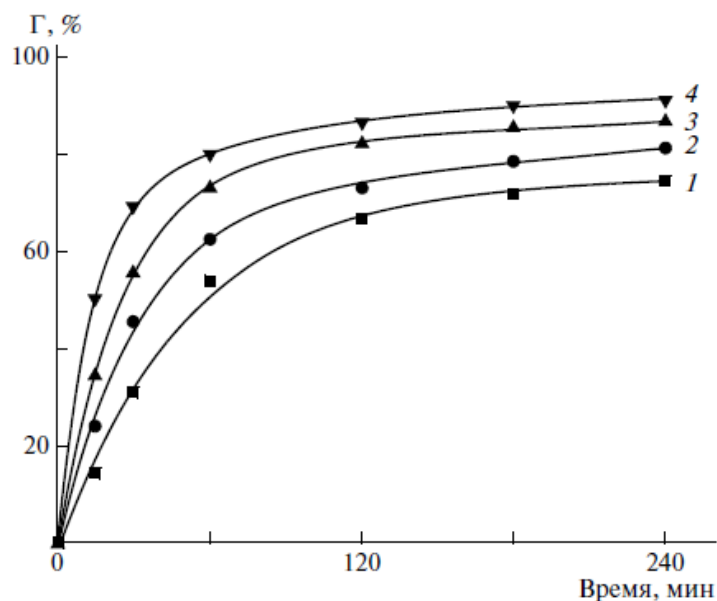


Рисунок 21 – Зависимость глубины превращения АН при полимеризации в присутствии хитозана от времени при различных начальных концентрациях мономера: 1 – 0.72, 2 – 0.86, 3 – 1.00, 4 – 1.24 моль/л, $[ХТЗ] = 0.186$ осново-моль/л, $[[Co(NH_3)_6]Cl_3] = 1.6 \times 10^{-2}$ моль/л, $T = 333$ К

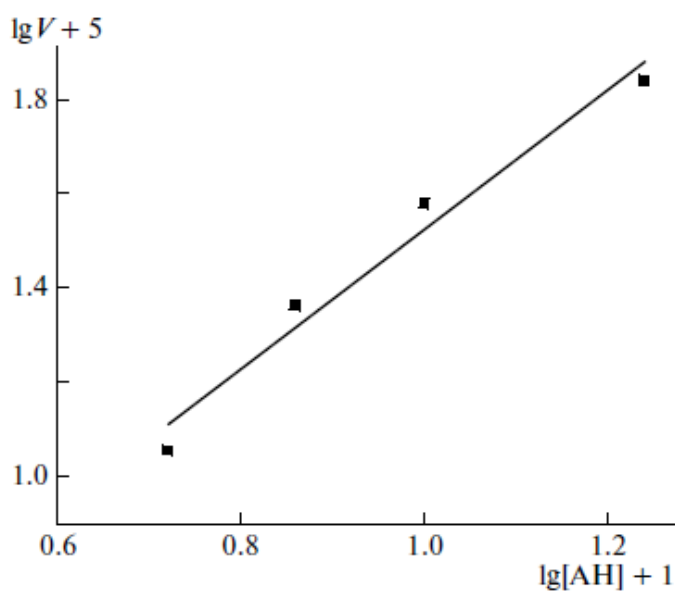


Рисунок 22 – Зависимость начальной скорости полимеризации акрилонитрила в растворе хитозана от концентрации мономера в логарифмических координатах. $[ХТЗ] = 0.186$ осново-моль/л, $[[Co(NH_3)_6]Cl_3] = 1.6 \times 10^{-2}$ моль/л, $T = 333$ К

С точки зрения понимания механизма привитой полимеризации представлялось существенным определение эффективной энергии активации (E_a) процесса. Было исследовано влияние температуры на скорость и глубину превращения АН в растворах хитозана (рисунок 23).

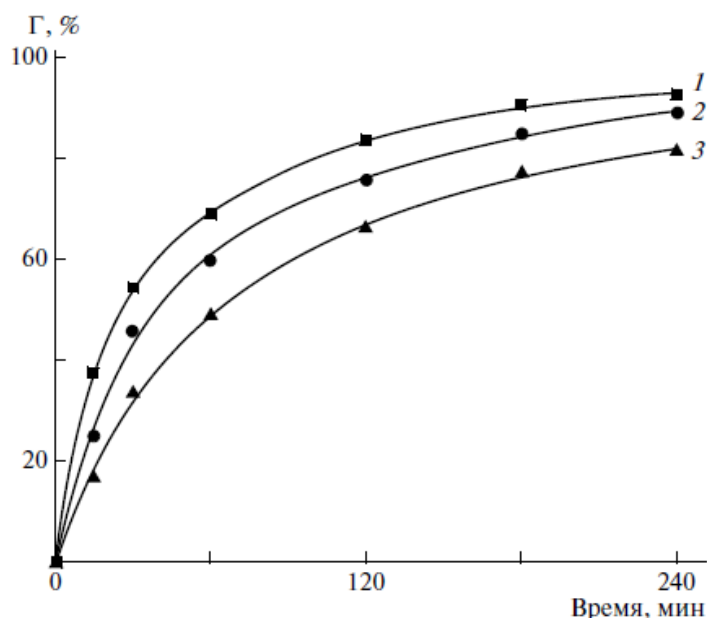


Рисунок 23 – Зависимость глубины превращения АН при полимеризации в присутствии хитозана от времени при различных температурах синтеза:

1 – 333 К, 2 – 313 К, 3 – 294 К, $[ХТЗ] = 0.186$ осново-моль/л,

$[Co(NH_3)_6]Cl_3 = 1.6 \times 10^{-2}$ моль/л, $[АН] = 1.24$ моль/л

С использованием уравнения Аррениуса рассчитано значение энергии активации полимеризации АН в растворе хитозана, которое составило 16.9 кДж/моль (рисунок 24). Такое низкое значение суммарной энергии активации характерно для инициирования полимеризации с использованием окислительно-восстановительных систем.

Аналогичные кинетические закономерности наблюдаются для привитой полимеризации МА на хитозан, энергия активации в пределах ошибки определения составляет ту же величину.

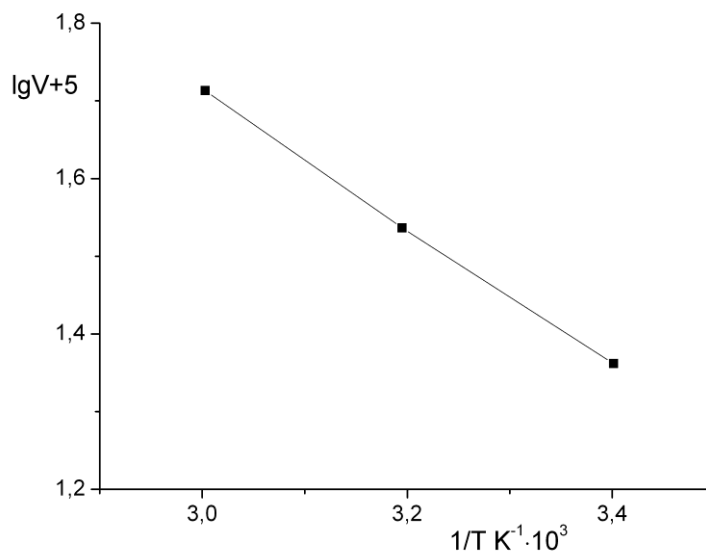


Рисунок 24 – Зависимость логарифма начальной скорости полимеризации АН в растворе хитозана от обратной температуры. $[\text{ХТЗ}] = 0.186$ осново-моль/л, $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3] = 1.6 \times 10^{-2}$ моль/л, $[\text{АН}] = 1.24$ моль/л

Во всех случаях продукт синтеза представлял собой устойчивую дисперсию. По схеме, аналогичной для привитой полимеризации АА и ВП на хитозан, в продуктах синтеза было определено содержание гомополимера ПАН (ПМА) и сополимера хитозана с АН (МА). Привитые сополимеры были отмыты от гомополимеров на аппарате Сокслета, сняты ИК-спектры исходного хитозана (рисунок 25 а), привитого сополимера хитозана с МА (рисунок 25 б), привитого сополимера хитозана с АН (рисунок 25 в). В ИК-спектре хитозана наблюдаются характеристические полосы поглощения, соответствующие частотам: 1659 см^{-1} (Амид I), 1565 и 1411 см^{-1} (C-O и CH_2 валентные колебания в AcO^-), 1153 см^{-1} , 1079 см^{-1} и 1036 см^{-1} (колебания, характерные для пиранозного кольца), 3374 см^{-1} (результат сложения пиков по N-H и O-H валентным колебаниям), 1257 см^{-1} (Амид II). ИК-спектр сополимера хитозана с АН содержит помимо полос, характерных для хитозана полосу – 2244 см^{-1} (валентные колебания алифатических CN-групп); ИК-спектр сополимера хитозана с МА – 2954 см^{-1} (валентные асимметрические колебания алифатических CH_3 -групп), 1737 см^{-1} (CO валентные колебания в алифатических сложных эфирах) 1162 см^{-1} (C-O валентные колебания группы O-

CH₃). Таким образом, по результатам анализа ИК-спектров можно сделать вывод, что полученные продукты являются привитыми сополимерами хитозана с АН и МА, соответственно.

При полимеризации АН было определено содержание побочного продукта, оно составило не более 8%.

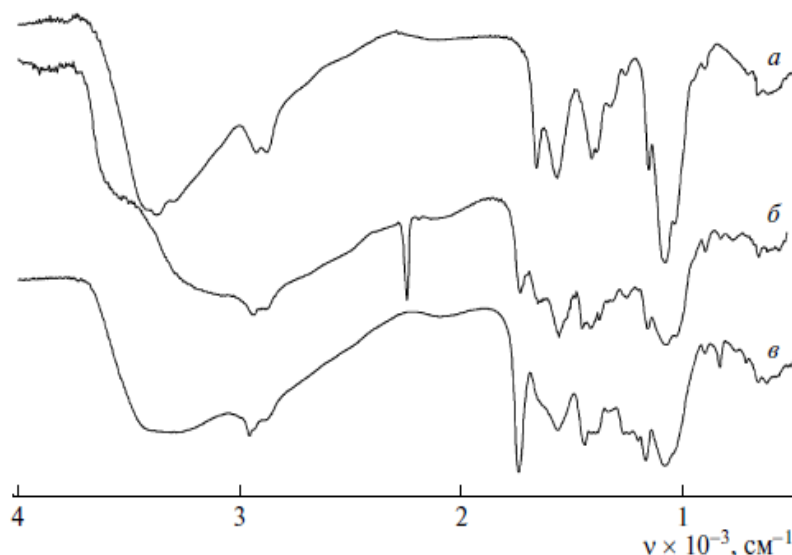


Рисунок 25 – ИК-спектры хитозана (а) и его привитых сополимеров с МА (б) и АН (в)

В таблице 3 приведены рассчитанные данные по степени и эффективности прививки АН и МА на хитозан в присутствии [Co(NH₃)₆]Cl₃.

Таблица 3 – Степень и эффективность прививки акрилонитрила на хитозан при различных концентрациях мономера ([АН]). [ХТЗ] = 0.186 осново-моль/л, $T = 333\text{ K}$, $[[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3] = 1.6 \times 10^{-2}\text{ моль/л}$

№	[АН], моль/л	Конверсия АН, %	Масса сополимера, г		СП, %	ЭП, %
			до экстракции	после экстракции		
1	0.70	75	0.38	0.37	90	97.4
2	0.86	81	0.35	0.34	120	98.1
3	1.00	87	0.51	0.50	151	98.5
4	1.24	91	0.40	0.39	164	98.6
5*	0.52	91	0.38	0.37	158	98

*- данные для МА.

Глубина превращения АН в полимер составляет 91%, при этом практически весь АН расходуется на образование привитого сополимера, ЭП достигает 98%. Степень и эффективность прививки МА на хитозан достигали 122 и 91% соответственно. Высокая эффективность прививки АН и МА на хитозан при инициировании $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (98%) дает основание предполагать, что стадия инициирования включает преимущественное образование активных центров на цепях хитозана.

Радикальный механизм образования привитых сополимеров хитозана с АН и другими виниловыми мономерами в присутствии ионов Ce^{4+} с высокой эффективностью прививки (98%) был предложен авторами [151] по схеме, представленной ниже (рисунок 26). Ионы церия образуют двухцентровый комплекс с NH_2 - и OH - группами при C_2 и C_3 молекулы хитозана с последующим разрывом связи пиранозного кольца и генерированием радикалов у 2-го и 3-го атома С, энергия активации процесса составляет 44.9 кДж/моль. В нашем случае, в противоположность солевой форме Ce^{4+} , зарождение первичных радикалов на цепи хитозана, по-видимому, протекает без разрушения пиранозного цикла полисахарида. В пользу этого свидетельствует несколько обстоятельств: во-первых, константа нестойкости ($K_{\text{нест}}$) гексаамминкобальта (III) хлорида равна 3.1×10^{-33} [267]; во-вторых, процесс не ингибируется введением ингибитора радикальной полимеризации (мет)акрилатов – гидрохиноном. Кроме того, как показано выше E_a процесса составляет 16.9 кДж/моль. Эта величина существенно ниже, чем при инициировании привитой полимеризации АН на хитозан ионами Ce^{4+} (44.9 кДж/моль) [151]. Вместе с тем, константа диссоциации по первой ступени $K_{L1} = 10^{-5}$, по второй - $K_{L2} = 10^{-6}$. Исходя из этих данных стадия инициирования может быть представлена схемой, в которой в соответствии с правилом циклов Л.А. Чугаева при образовании устойчивого комплекса (хитозан - $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$) лиганды NH_3 в координационной сфере кобальта замещаются на NH_2 или -OH группы элементарного звена хитозана.

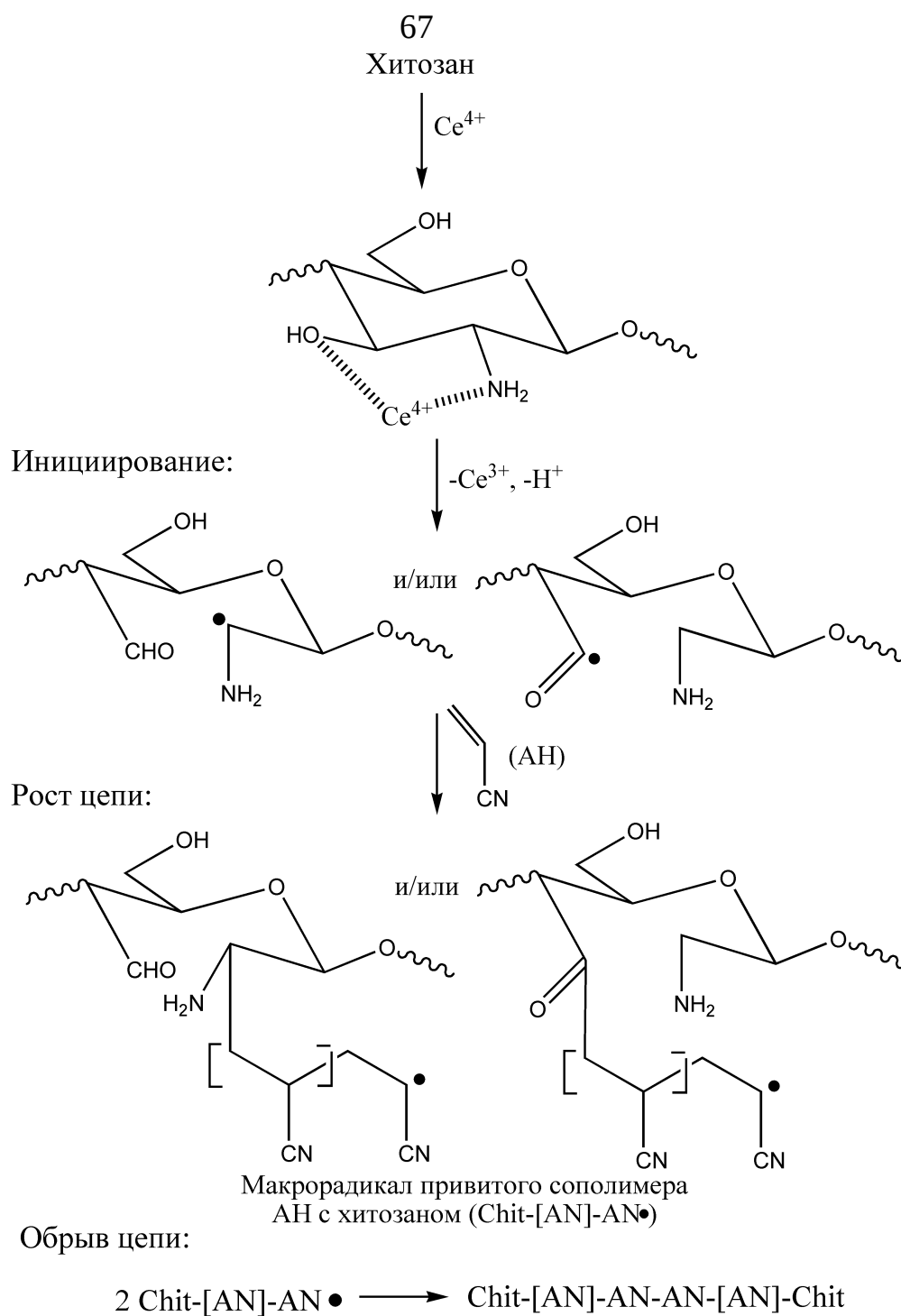


Рисунок 26 – Механизм привитой полимеризации АН на хитозан, иницируемой ионами Ce^{4+}

В результате чего происходит внутримолекулярный одноэлектронный перенос с атома водорода гидроксильной группы при C_3 пиранозного цикла на атом кобальта, восстановление Co^{3+} до Co^{2+} с сохранением его координационного числа

и одновременном появлении неспаренного электрона на атоме кислорода звена хитозана. Именно этот радикал и инициирует привитую полимеризацию АН на хитозан. Один из вариантов предполагаемого процесса замещения лигандов и возможная структура комплексов приведены на рисунке 27.

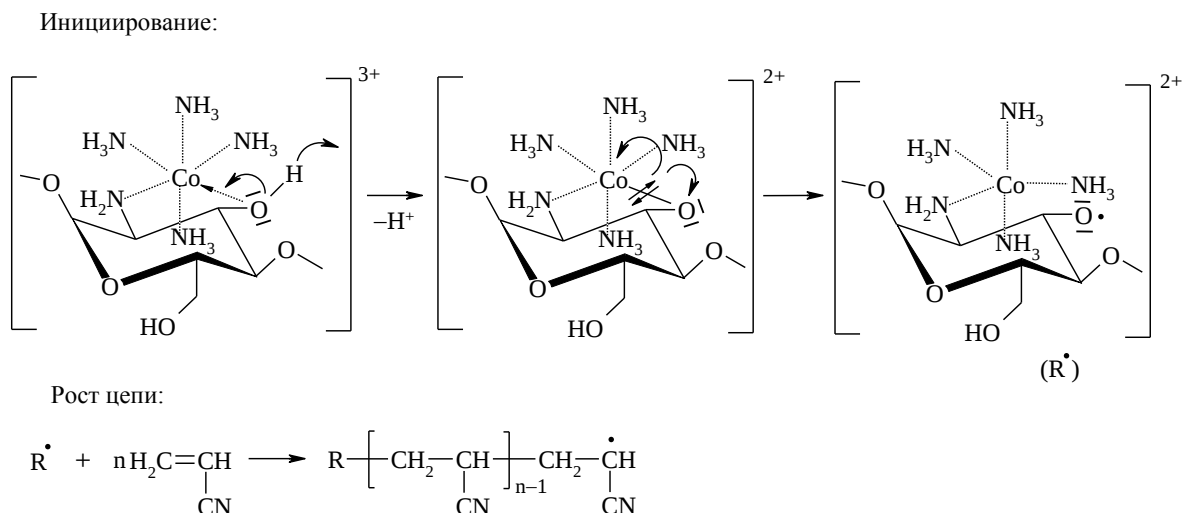


Рисунок 27 – Предполагаемая схема образования радикала на цепи хитозана

Рост боковых цепей происходит при присоединении АН к активным центрам хитозана, а обрыв осуществляется через рекомбинацию радикалов. Именно этот механизм нам представляется, как наиболее вероятный.

Однако, при всех достоинствах $[Co(NH_3)_6]Cl_3$ в ряде случаев (медицина, косметология, сельское хозяйство, пищевая промышленность) необходима очистка продуктов полимеризации от ионов Co^{3+} , что в силу высоких хелатообразующих свойств хитозана является трудоемким и энергозатратным процессом. Последнее определило детальный анализ и всестороннее исследование негативных сторон привитой полимеризации виниловых мономеров на хитозан в присутствии наиболее часто используемого ПСА. Как отмечалось ранее, к существенным недостаткам ПСА как инициатора следует отнести высокий выход гомополимера синтетического мономера и разрушение цепей хитозана. Одной из причин таких проявлений, на наш взгляд, является такая концентрация ПСА (традиционно используется $\geq 10^{-2}$ моль/л), которая обеспечивает распределение его между цепями полисахарида и объемом раствора

реакционной системы, где сосредоточен мономер. Последнее, по-видимому, и определяет высокий выход гомополимера. С целью устранения указанных недостатков и получения сополимеров с привитыми цепями по функциональным группам полисахарида исследовано влияние концентрации инициатора в широком диапазоне на деструкцию цепей полисахарида. О степени деструкции (M_w^0/M_w) судили по изменению динамической вязкости растворов полисахарида и его ММ. Использование ПСА с концентрацией $\geq 10^{-2}$ моль/л приводит к резкому падению вязкости растворов хитозана вследствие распада его цепей и существенного снижения ММ полисахарида – в 2-3 раза. Степень деструкции цепей хитозана зависит от условий проведения процесса (рисунки 28, 29) – температуры и pH, а по сути - от конформации макромолекул. При pH 4.2 макромолекулы хитозана в растворе принимают конформацию спирали, за счет вовлечения части функциональных групп в образование межмолекулярных водородных связей, вследствие чего деструкция цепей проходит в меньшей степени: ММ уменьшается в 2.5 раза. При pH 3.28 макромолекула полисахарида принимает конформацию статистического клубка, т.к. практически все амино группы протонированы и взаимодействуют с образующимися в ходе процесса сульфат-анион радикалами. Степень деструкции цепей хитозана возрастает и ММ снижается в ~ 3 раза. При повышении температуры реакционной смеси до 353 К был получен водорастворимый хитозан с ММ $\sim 3 \times 10^3$. Впервые установлено, что в присутствии низких концентраций ПСА $\sim 10^{-3}$ - 10^{-4} моль/л деструкция цепей хитозана незначительна, падение ММ при 10^{-3} моль/л составляет $\sim 10\%$, а при 10^{-4} моль/л ММ остается практически неизменной.

ИК-спектры исходного хитозана и продукта деструкции оказались полностью идентичными (рисунок 30), что свидетельствует о разрушении основной цепи и неизменности функциональных групп полисахарида.

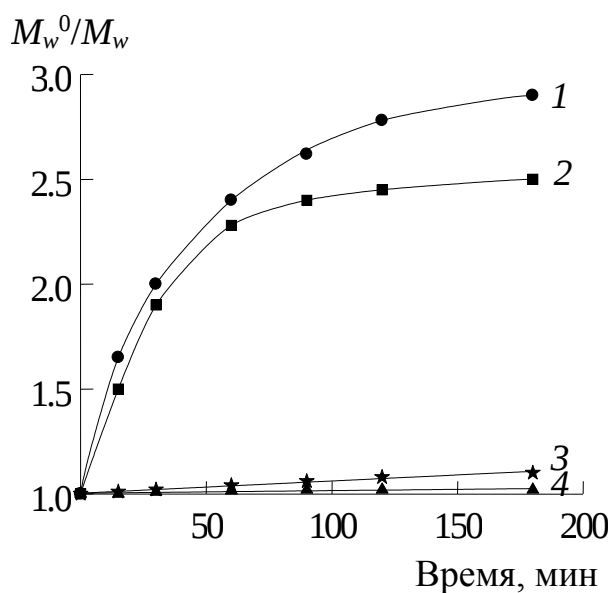


Рисунок 28 – Изменение степени деструкции (M_w^0/M_w) цепей хитозана ($[ХТЗ]=0.186$ осново-моль/л) со временем в присутствии различных концентраций $[ПСА] = 1 \times 10^{-2}$ (1,2), 1×10^{-3} (3), 1×10^{-4} (4) моль/л; pH 3.28 (1), pH 4.2 (2-4); 323 К (здесь и далее $[ХТЗ]$ – концентрация звеньев хитозана)

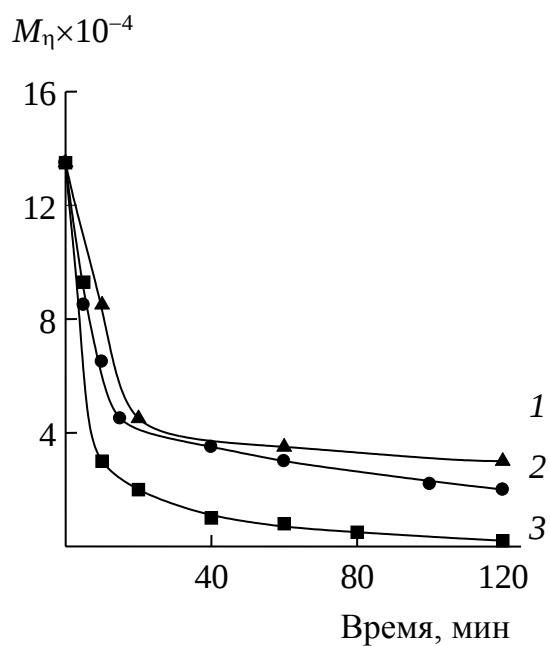


Рисунок 29 – Изменение средневязкостной молекулярной массы хитозана ($[ХТЗ]=0.186$ осново-моль/л) со временем; $T = 323$ (1), 333 (2), 353 (3); $[ПСА] = 1.3 \times 10^{-2}$ моль/л

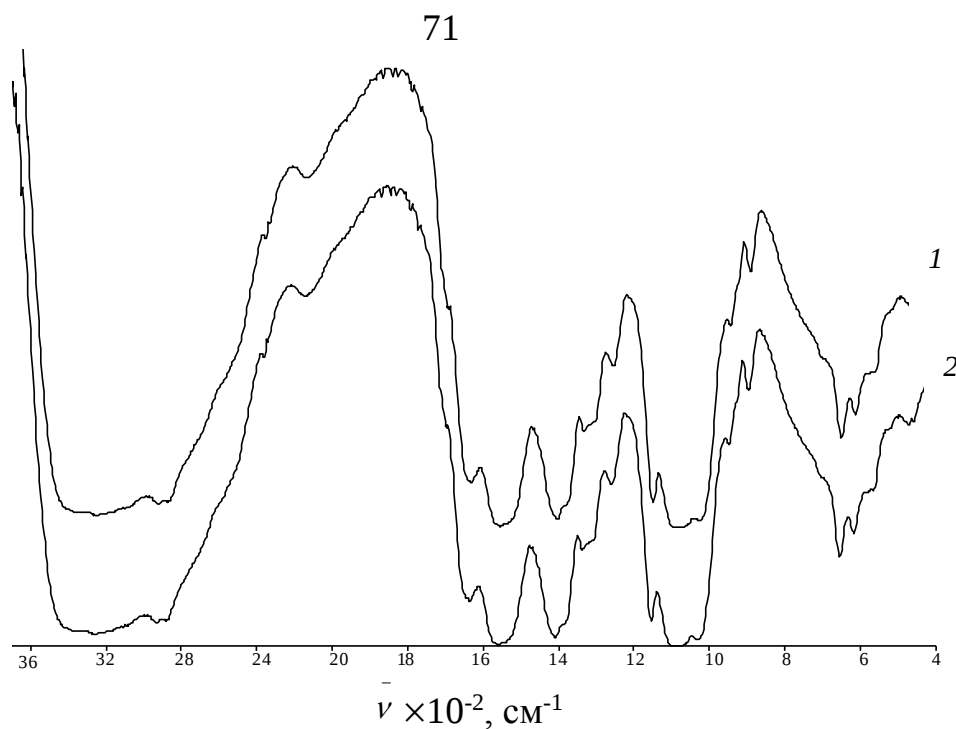


Рисунок 30 – ИК-спектры хитозана до (1) и после (2) деструкции в присутствии ПСА.

При повышении температуры реакционной смеси с 323 до 353 К был получен водорастворимый хитозан с ММ ~ 3000 . Таким образом, варьируя концентрацию ПСА возможно, с одной стороны, получение привитых сополимеров, при отсутствии разрушения основной цепи полисахарида, а с другой - олигомеров хитозана с заданной ММ. Последнее составляет предмет самостоятельных научных исследований.

Полученные данные легли в основу оптимизации условий привитой полимеризации виниловых мономеров на хитозан. Далее все опыты проводили при $[PSA] = 1.4 \times 10^{-3}$ моль/л в интервале температур 323–333 К, обеспечивающих высокие показатели привитой полимеризации при незначительной деструкции цепей полисахарида.

Кинетические кривые полимеризации АА в растворах хитозана приведены на рисунке 31.

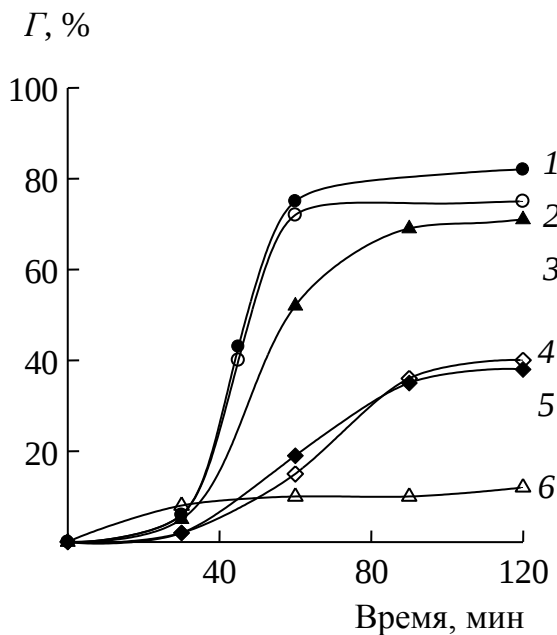


Рисунок 31 – Зависимость глубины превращения АА в растворах хитозана от времени при различных рН 5.5 (1, 6) и 4.2 (2–5) и мольном отношении АА и звеньев хитозана $[AA]:[XT3] = 3$ (1, 2), 2 (3), 0.33 (4), 1 (5); $[AA] = 0.56$ моль/л (6) (в отсутствие XT3); $[XT3] = 0.186$ основомоль; $[CH_3COOH] = 0.25$ моль/л; $[PCA] = 1.4 \times 10^{-3}$ моль/л, $T = 323$ К

Следует подчеркнуть, что в отсутствие хитозана, при выбранной концентрации ПСА (рН 5.5, $[(NH_4)_2S_2O_8] = 1.4 \times 10^{-3}$ моль/л, 323 К), АА практически не полимеризуется – скорость процесса составляет 9.5×10^{-4} моль/(л×с), а предельная конверсия не превышает 15%. (рисунок 31, кривая 6), в то время как в присутствии хитозана скорость превращения АА возрастает в 35 раз (3.3×10^{-2} моль/(л×с)), а максимальная конверсия достигает 87%.

Увеличение скорости полимеризации АА в присутствии полисахарида может быть обусловлено двумя эффектами:

1 – активации распада ПСА в присутствии хитозана, в результате чего образуются $R\cdot NH$ радикалы на свободных непротонированных аминогруппах полисахарида,

2 - концентрационного – увеличение концентрации мономера в зоне реакции, обусловленное избирательной сольватацией полимерных цепей XT3 молекулами АА.

Основанием для первого предположения послужила работа [268], в которой показано, что первичная аминогруппа полиаминов алифатического ряда может промотировать полимеризацию виниловых мономеров. Так, в присутствии алифатического полиамина и ПСА энергия активации (E_a) полимеризации АА

снижается в 3 раза по сравнению с ее значением под действием только ПСА. Механизм промотирования включает взаимодействие неподеленной пары электронов у атома азота с двойной связью мономера и образованием N-ион-радикала с последующей его трансформацией в N-радикал. С целью проверки первого предположения были проведены опыты по полимеризации АА в присутствии соединений, содержащих первичные аминогруппы: моноэтаноламин (одна серия) и моноглюкозамин (вторая серия) в отсутствие хитозана при всех прочих равных условиях. В обеих сериях не наблюдали полимеризации АА (таблица 4).

Таблица 4 – Глубина превращения АА в растворе низкомолекулярного аналога ХТЗ - моноглюкозамина: $[AA]/[глюкозамин] = 3$; $[AA] = 0.56$ моль/л, $[CH_3COOH]=0.25$ моль/л; $[(NH_4)_2S_2O_8]=1.4 \times 10^{-3}$ моль/л, 323К

t, мин	0	15	30	45	60	90	120
$\omega_{AA}, \%$	99.97	93.8	95.35	96.5	97.6	96.7	98.15

Это означает, что первичные аминогруппы пиранозного звена хитозана не выступают в качестве компонента окислительно-восстановительной системы персульфат – первичный амин. Аналогичные результаты были получены ранее в работе [269] при полимеризации стирола, метилметакрилата и метилакрилата в присутствии пероксида бензоила с различными аминами. Было показано, что анилин (метиланилин, дифениламин) совместно с пероксидом бензоила, в отличие от эффективной иницирующей окислительно-восстановительной системы – пероксид бензоила-диметиланилин (третичный амин), не вызывает полимеризацию мономеров [270]. Поэтому, ускорение процесса полимеризации АА в присутствии хитозана, на наш взгляд, обусловлено проявлением концентрационного эффекта, для подтверждения которого были поставлены опыты по изучению избирательной сольватации методами равновесного диализа

и дифференциальной рефрактометрии. Равновесный диализ проводили при повышенной температуре, соответствующей температуре синтеза (323 К). Поскольку в данных условиях не исключена гомополимеризация АА, в опытах был использован его гидрированный аналог – ацетамид. В одну камеру диализатора заливали водный раствор уксуснокислой соли хитозана и ацетамида, в другую (отделенную от первой полупроницаемой мембраной) – раствор амида в воде той же концентрации. После установления равновесия (2-4 ч, 323 К) определяли инкремент показателя преломления и рассчитывали коэффициент избирательной сольватации (λ) [270], который показывает изменение объемной доли сольватирующего компонента в области полимерных клубков по сравнению с содержанием в объеме, отнесенное к единице массы хитозана. Оказалось, что макромолекулы хитозана преимущественно сольватированы ацетамидом - коэффициент избирательной сольватации составил $\lambda = 1.5 \pm 0.1$ мл/г.

Из рисунка 31 видно, что на скорость полимеризации АА в растворах хитозана оказывает влияние рН реакционной среды. С ростом рН глубина превращения АА в полимер повышается, что, вероятно, связано с увеличением доли непротонированных NH_2 -групп и протеканием процесса сополимеризации АА на цепях хитозана с активными центрами не только у 6-го, но и у 2-го атома углерода полисахарида.

В процессе полимеризации наблюдается в 6-7 раз увеличение вязкости реакционной системы, зависимость которой от времени симбатна изменению глубины превращения АА (рисунок 32).

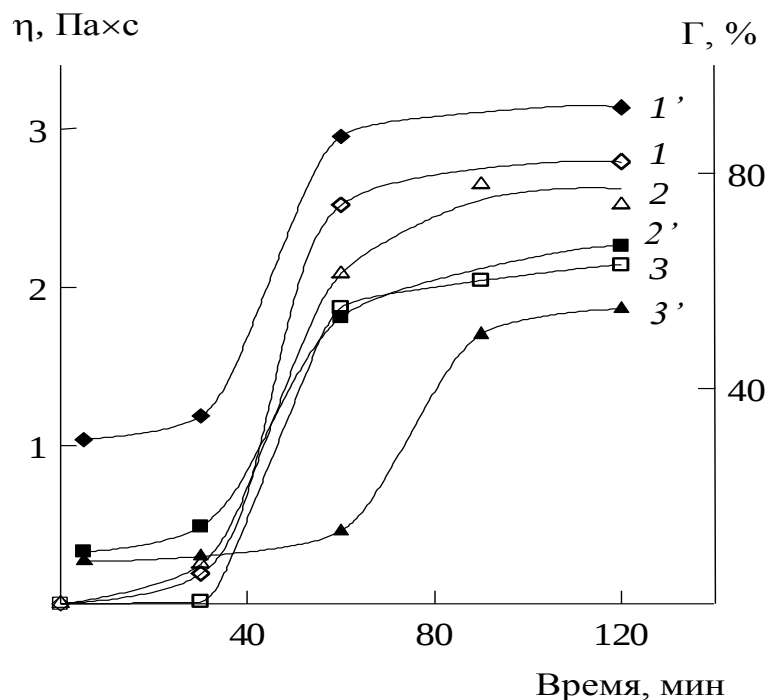


Рисунок 32 – Изменение динамической вязкости реакционной среды η (1', 2', 3') и глубины превращения Γ (1, 2, 3) при полимеризации АА в растворах хитозана со временем. $[AA]:[XT3]$ (моль/осново-моль): (1', 1) – 3; (2', 3', 2, 3) – 4.6; $[(NH_4)_2S_2O_8] = 1.4 \times 10^{-3}$ (моль/л); pH: (1', 2', 1, 2) – 5.5, (3', 3) – 4.0; $T=323$ К

Данные по исследованию зависимости глубины превращения другого водорастворимого мономера - ВП при полимеризации в растворах хитозана приведены на рисунках 33, 34. В качестве инициатора полимеризации кроме ПСА был использован ДАК. По полученным результатам была построена зависимость приведенной скорости превращения ВП (концентрация ВП изменялась) в растворах хитозана (концентрация хитозана оставалась постоянной величиной (0.12 осново-моль/л)) от отношения $[хитозан]:[ВП]$ (рисунок 35). Из рисунка 35 видно, что при уменьшении концентрации ВП, скорость процесса возрастает. Последнее может быть связано с увеличением концентрации мономера в зоне реакции. Это еще раз подтверждает проявление обнаруженного ранее при полимеризации АА концентрационного эффекта.

$\Gamma, \%$

76

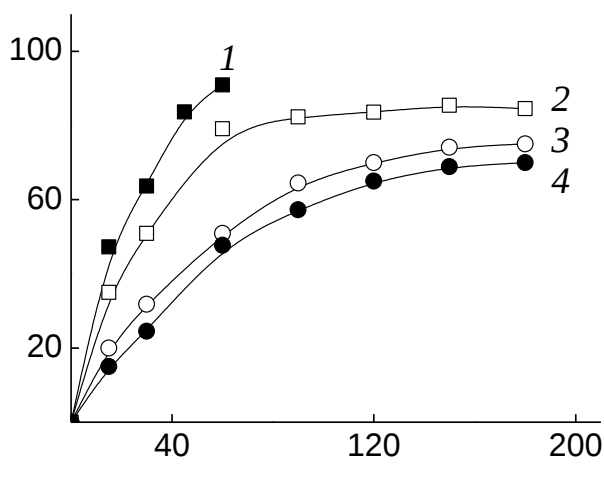


Рисунок 33 – Зависимость глубины превращения ВП в растворах хитозана от времени при различном мольном отношении ВП и звеньев хитозана (осново-моль): 1 – $[\text{ВП}] = 0.5$ моль/л (в отсутствие хитозана); $[\text{ВП}]:[\text{ХТЗ}] = 4:1$ (2); $[\text{ВП}]:[\text{ХТЗ}] = 1:1$ (3) и $[\text{ВП}]:[\text{ХТЗ}] = 0.25:1$ (4); $[\text{ХТЗ}] = 0.12$ осново-моль/л, $[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0.3$ моль/л, $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8] = 4 \times 10^{-3}$ моль/л, $T = 333$ К

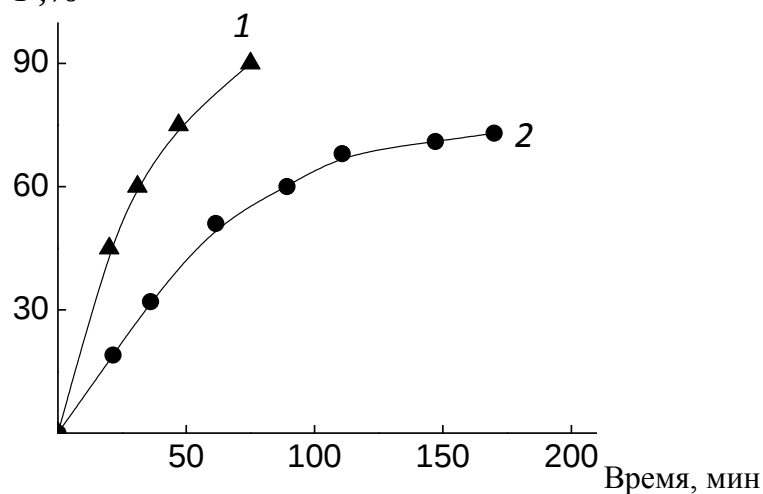
 $\Gamma, \%$ 

Рисунок 34 – Зависимость глубины превращения ВП в растворах хитозана от времени: 1 – $[\text{ВП}] = 0.5$ моль/л, 2 – $[\text{ХТЗ}] = [\text{ВП}] = 0.12$ осново-моль/л; $[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0.3$ моль/л, $[\text{ДАК}] = 5 \times 10^{-3}$ моль/л, $T = 333$ К

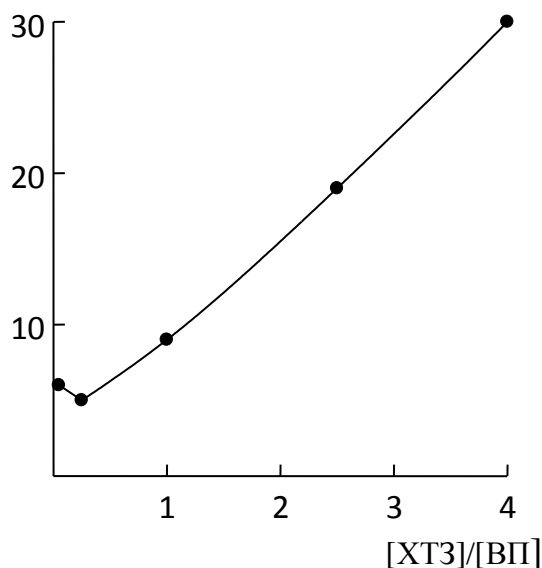
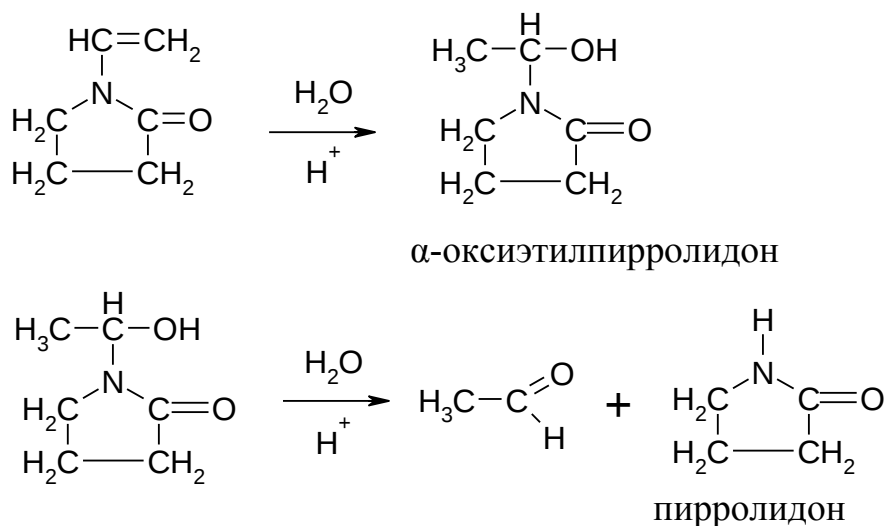
$V/[ВП], (\%/мин) \times (л/моль)$


Рисунок 35 – Зависимость приведенной скорости превращения ВП от отношения начальных концентраций хитозана и ВП. $[ХТЗ] = 0.12$ основомоль/л, $[CH_3COOH] = 0.3$ моль/л, $[(NH_4)_2S_2O_8] = 4 \times 10^{-3}$ моль/л, $T = 333$ К.

Полимеризация ВП осложняется протеканием побочных реакций. Во всех случаях после завершения полимеризации ВП суммарное содержание остаточного мономера в реакционной смеси и ВП в сополимере было ниже загрузочной концентрации. В работах [267, 268] показано, что в кислых средах ВП может гидролизываться с образованием α -оксиэтилпирролидона:



Действительно, данные хроматографического анализа продуктов синтеза, выполненного по методике [272], свидетельствуют о том, что в процессе

полимеризации гидролизуетсся до 6% ВП с образованием α -оксиэтилпирролидона. Было рассчитано значение энтальпии гидролиза ВП: $\Delta H^0_{\text{гидр}}$ (ВП, 333 К) = -28.0 ± 2.0 кДж/моль.

Образование привитых сополимеров доказано методами экстракции и ИК-спектроскопии. Выделенный после полимеризации продукт, гипотетически мог представлять собой привитой сополимер полисахарида и АА (ВП), либо смесь гомополимеров хитозана и ПАА (ПВП), или ПАА (ПВП) и привитой сополимер. Содержание гомополимера ПАА (ПВП) в продукте реакции определяли по разности массы навески полимера до и после экстракции его на аппарате Сокслета. В предварительных экспериментах было установлено время, необходимое для полного разделения гомополимеров ПАА (ПВП) и хитозана из механической смеси, которое составило 36-40 ч.

В ИК-спектрах продуктов полимеризации, отмытых от гомополимеров на аппарате Сокслета, присутствуют полосы, соответствующие колебаниям функциональных групп хитозана (рисунок 36) и звеньев соответствующих виниловых мономеров.

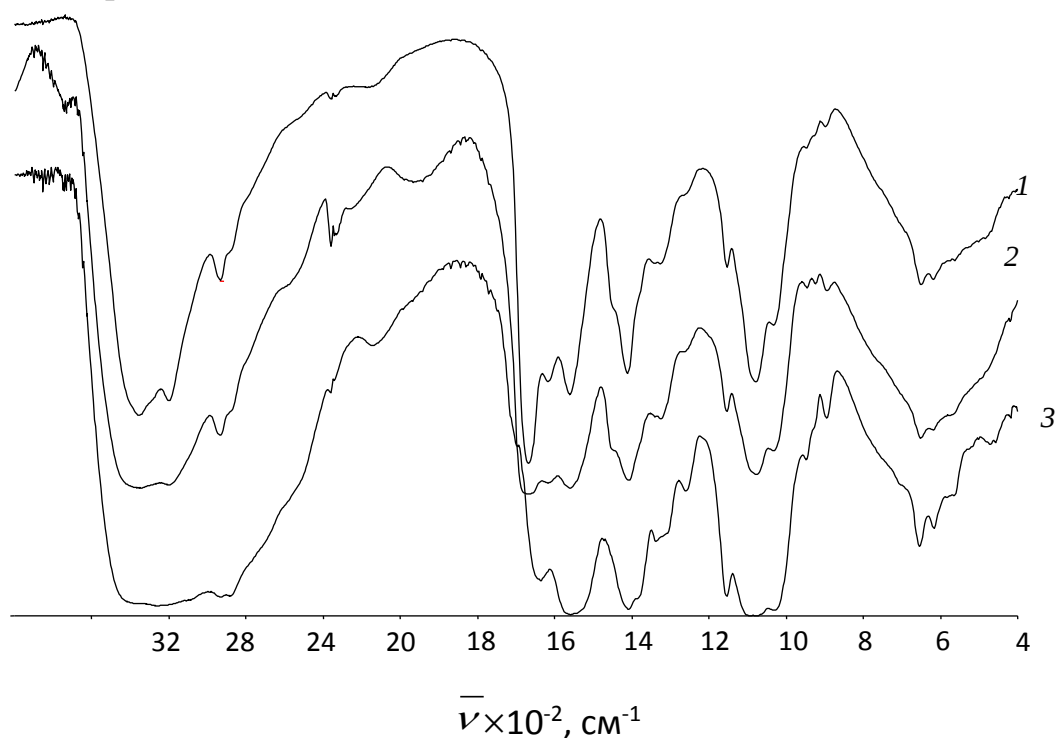


Рисунок 36 – ИК спектры механической смеси хитозан-ПАА (1), привитого сополимера ХТЗ-АА (2) и хитозана (3)

В спектре привитого сополимера ХТЗ-АА (рисунок 36) появляется полоса поглощения 1955 см^{-1} , характерная для валентных колебаний карбонильной группы амида (1921 см^{-1}), полоса при 1636 см^{-1} (амид 1 хитозана) смещается в область 1667 см^{-1} ; кроме того, имеет место смещение полос в области $1229\text{--}915\text{ см}^{-1}$. В ИК-спектре привитого сополимера ХТЗ-ВП появляется полоса поглощения карбонильной группы ПВП в области 1670 см^{-1} .

По данным экстракции были рассчитаны степень и эффективность прививки АА и ВП на хитозан (таблицы 5, 6). Из данных таблицы 5 видно, что степень и эффективность прививки АА зависят от рН среды и соотношения реагентов, достигая при оптимальных значениях последних 90 и 60%, соответственно.

Таблица 5 – Степень и эффективность прививки при привитой полимеризации АА на хитозан в зависимости от соотношения реагентов и рН среды

Соотношение [АА]:[ХТЗ]	рН	Степень прививки, мас.%	Эффективность прививки, мас.%
3:1	4.2	37	46
3:1	3.5	23	17
2:1	5.8	17	33
3:1	5.5	60	54
4:1	5.8	90	60

При увеличении отношения [ВП]:[ХТЗ] степень прививки ВП на хитозан, как и в случае с АА, возрастает от 15 до 135%, эффективность прививки – от 55 до 98% (таблица 6).

Таблица 6 – Степень и эффективность прививки при привитой полимеризации ВП на хитозан. $[XT3]=0.12$ осново-моль/л, $[CH_3COOH]=0.3$ моль/л, $[(NH_4)_2S_2O_8]=4 \times 10^{-3}$ моль/л, $T=333$ К

Соотношение [ВП]:[XT3]	Степень прививки, мас. %	Эффективность прививки, мас. %
0.25 : 1	15	55
1 : 1	50	80
4 : 1	135	98

На основании проведенных исследований и литературных данных привитую полимеризацию АА на хитозан в присутствии ПСА можно представить следующей схемой (рисунок 37):

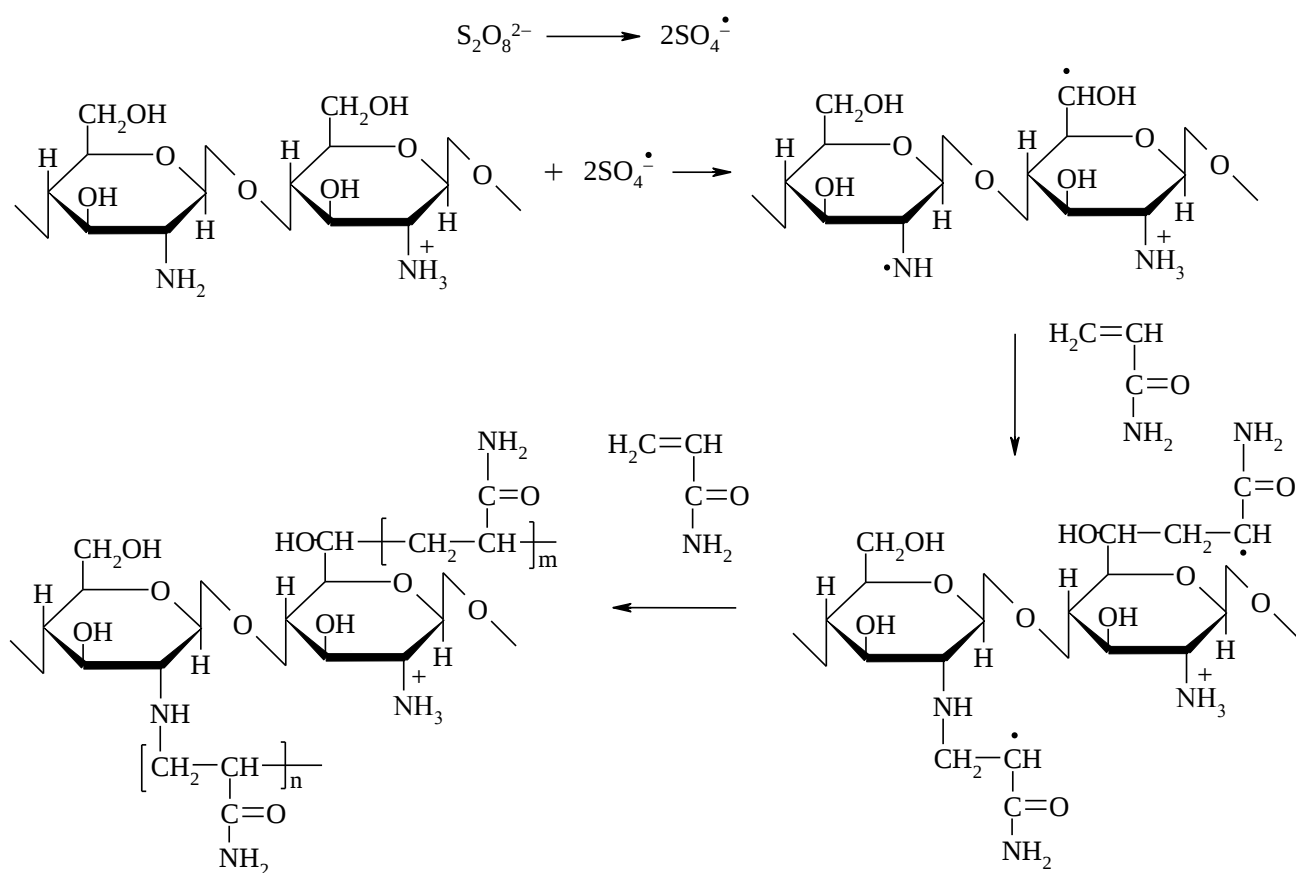


Рисунок 37 – Схема привитой полимеризации АА на хитозан в присутствии ПСА

Наряду с ПСА при полимеризации виниловых мономеров с хитозаном в его растворах в качестве инициаторов были использованы ДАК и комплексные соединения кобальта (III). Преимущество ДАК перед ПСА заключается в том, что он не разрушает цепей полисахарида. Это обуславливает получение привитых сополимеров с высокой молекулярной массой основной цепи ХТЗ. При синтезе привитых сополимеров хитозана с ограниченно растворимыми в воде мономерами МА, Ст, 2-ЭГА, 2-ГЭМА и 2-ГПМА концентрация мономеров в реакционной смеси во всех случаях не превышала значения их максимальной растворимости в водных растворах (в случае полимеризации 2-ЭГА и Ст в реакционную смесь дополнительно вводился диоксан), что обеспечивало гомогенность среды в начале реакции.

Привитая полимеризация ограниченно растворимых в воде мономеров (АН, МА, Ст, 2-ЭГА, 2-ГЭМА и 2-ГПМА) на хитозан в присутствии ДАК, как и в случае водорастворимых мономеров, характеризовалась высокими скоростями – за 1 ч конверсия мономера составляла не менее 40%, при этом последняя существенно зависела от природы мономера и pH реакционной среды и изменялась от ~40 до ~98%. Типичные кривые зависимости глубины превращения мономеров в растворах хитозана от времени приведены для МА, Ст (рисунок 38).

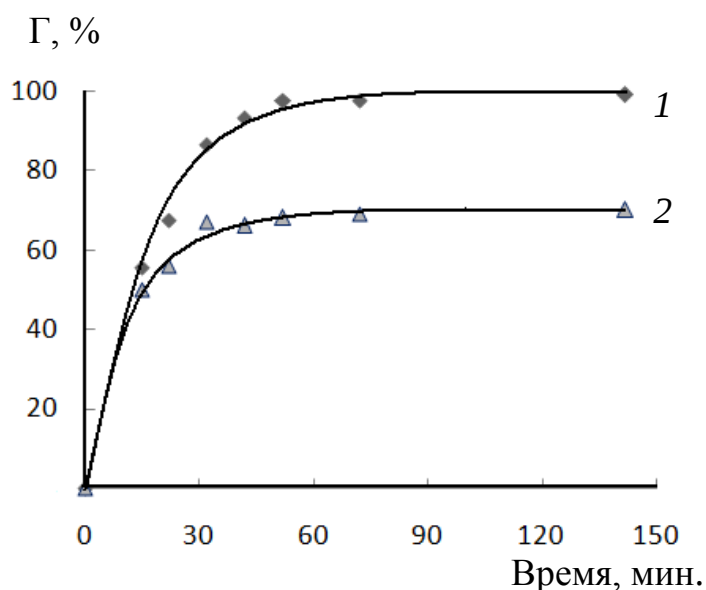


Рисунок 38 – Зависимость глубины превращения МА (1), Ст (2) в процессе привитой сополимеризации от времени ($[MA]=0.53$ моль/л, $[Ст]=0.072$ моль/л $[ДАК]=0.01$ моль/л, $[ХТЗ] = 0.186$ осново-моль/л, $[УК] = 1$ моль/л), $T=343$ К

Продукт полимеризации представлял собой устойчивую дисперсию. После экстракции на аппарате Сокслета гомополимеров ПМА, П-2-ЭГА и ПСт из продуктов синтеза были рассчитаны степень и эффективность прививки виниловых мономеров на хитозан в зависимости от соотношения реагентов в реакционной смеси (таблица 7). Идентификацию экстрагированных гомополимеров и отмытых сополимеров проводили методом ИК-спектроскопии (рисунки 39, 40).

Таблица 7 – Степень и эффективность прививки при привитой сополимеризации виниловых мономер на хитозан

Мономер	pH раствора хитозана	Соотношение [мономер]/[ХТЗ], моль/(основомоль)	Глубина превращения, %	Выход гомополимера, %	СП, мас. %	ЭП, мас. %
МА	4.2	2.8	44.4	5.2	66.7	95.0
			98.0		147.0	
2-ЭГА	4.2	0.11	49.4	2.3	7.4	98.0
Ст	3.9	0.47	75.3	5.6	21.4	94.0
	4.2		47.6	6.3	13.4	93.0
	5.5		98.0	10.0	27.0	90.0

Из таблицы 7 видно, что при полимеризации виниловых мономеров в растворах хитозана в основном образуется привитой сополимер, выход образующихся гомополимеров не превышает 10%. ЭП и СП зависят от природы мономера, его концентрации в реакционной смеси и pH среды. Для растворимого в воде МА степень прививки составляет 147 мас.%, эффективность прививки достигает ~95%. В случае 2-ЭГА достичь высоких степеней прививки не удастся, что, по-видимому, обусловлено высокой гидрофобностью молекул мономера. В

процессе синтеза при повышении температуры происходит их «выталкивание» на границу раздела вода-воздух. При полимеризации Ст в растворах хитозана выявлено существенное влияние pH реакционной среды на показатели процесса: при изменении pH реакционной смеси с 4.2 до 5.5 СП увеличивается с 13.4 мас.% до 27 мас.%, а ЭП остается выше ~ 90 мас.% при одной и той же начальной концентрации мономера.

ИК-спектры продуктов синтеза, отмытых от гомополимеров, приведены на рисунках 39, 40. На рисунках 39 и 40 видны полосы поглощения соответствующие валентным колебаниям функциональных групп хитозана, колебаниям C=O алифатических сложных эфиров (1736 см^{-1}) и бензольного кольца (1570 см^{-1}), что свидетельствует об образовании привитых сополимеров хитозана с МА, 2-ЭГА и Ст, соответственно.

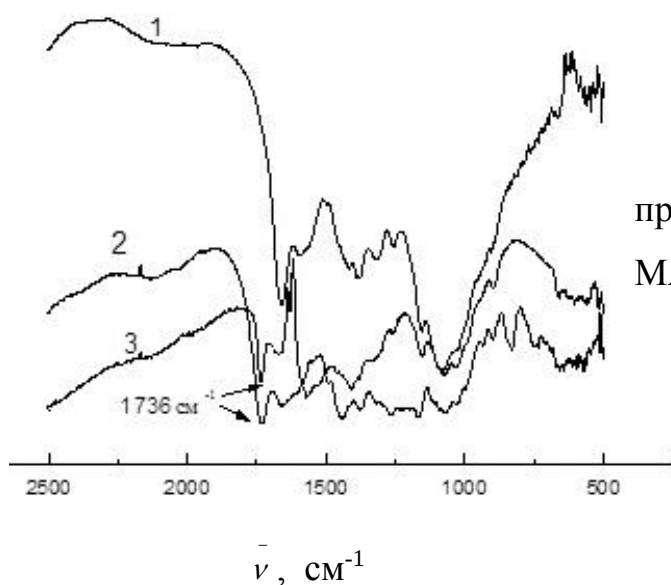


Рисунок 39 – ИК – спектры привитых сополимеров хитозана с МА (2), 2-ЭГА(3) и хитозана (1)

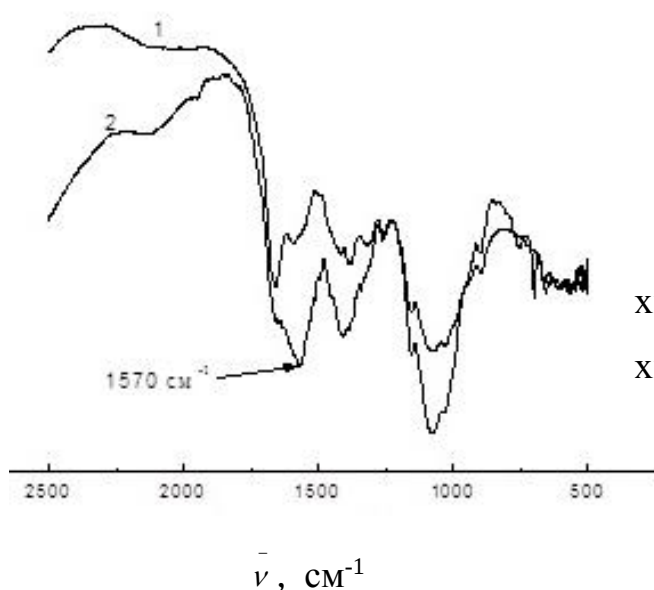


Рисунок 40 – ИК-спектры хитозана (1) и привитого сополимера хитозана со Ст (2)

Таким образом, при получении привитых сополимеров было исследовано влияние природы инициатора, температуры, pH реакционной среды, соотношения компонентов на полимеризацию виниловых мономеров в присутствии хитозана. Установлено ускорение процесса полимеризации виниловых мономеров в растворах полисахарида – проявление концентрационного эффекта (наиболее ярко выраженного для, мономеров хорошо растворимых в воде АА и ВП), т.е. полимеризация виниловых мономеров в растворах хитозана носит псевдоматричный характер [273].

Физико-химические свойства сополимеров зависят от структуры их макромолекул. Поэтому нами был разработан метод синтеза блок-сополимеров хитозана и сопоставлены свойства гибридных продуктов привитой- и блок-сополимеризации одних и тех же виниловых мономеров с ХТЗ. Радикальный механизм процесса деструкции цепей хитозана под действием окислительно-восстановительной системы пероксид водорода-аскорбиновая кислота (H_2O_2 -АК), рассматриваемый в работах [274 - 276], послужил основой для разработки оригинального одностадийного метода синтеза блок-сополимеров хитозана с виниловыми мономерами при комнатной температуре (293-297 К), что является несомненным достоинством процесса.

Прежде всего, было определено изменение ММ полисахарида в присутствии окислительно-восстановительной системы и время достижения предельного минимального ее значения в зависимости от соотношения ХТЗ и H_2O_2 (соотношение H_2O_2 и АК в окислительно-восстановительной системе всегда было эквимольным). Установлено, что предельная деструкция ХТЗ при добавлении иницирующей системы происходит в первые 10-15 мин, а изменение соотношения $[\text{ХТЗ}]/[\text{H}_2\text{O}_2]$ позволяет регулировать ММ образующихся цепей полисахарида. На основании этого можно предположить, что при синтезе блок-сополимеров виниловых мономеров с хитозаном при различных концентрациях $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (таблица 8) в сополимере будут присутствовать хитозановые фрагменты с соответствующей ММ. При молярном соотношении звено ХТЗ/ H_2O_2 , равным 100, 50, 20 ММ исходного хитозана ($\text{ММ}(\text{ХТЗ})_{\text{исх}} = 10^5$) снижается до $(17, 14 \text{ и } 8.1) \times 10^3$ соответственно (таблица 8).

Таблица 8 – Значение молекулярной массы хитозана после деструкции при различной концентрации H_2O_2 . M_w исходного хитозана 10^5

$[\text{ХТЗ}]/[\text{H}_2\text{O}_2]$, осново-моль/ моль	$\text{M}_w \times 10^{-3}$
20	8.1
50	14.1
100	17.2
50 в присутствии гидрохинона	17.2

Таким образом, изменение концентрации пероксида водорода при деструкции цепей хитозана позволяет в широком диапазоне варьировать молекулярную массу образующихся блоков полиглюкозамина.

Далее была исследована полимеризация виниловых мономеров (АА, МА, ВП, Ст, 2-ГЭМА) в процессе индуцированной деградации хитозана. На рисунках 41, 42 представлены кинетические кривые превращения АА и МА в растворах

полисахарида. Выявлено, что несмотря на разрушение цепей хитозана (рисунок 42, кривая 3), через 25-30 мин происходило возрастание вязкости реакционной среды, содержащей хитозан и МА, симбатное изменению содержания мономера в реагирующей системе (рисунок 42, кривые 1, 2). Глубина превращения МА увеличивается с ростом концентрации иницирующей системы, и во всех случаях при достижении определенной конверсии, выходит на плато. Аналогичные результаты были получены для АА.

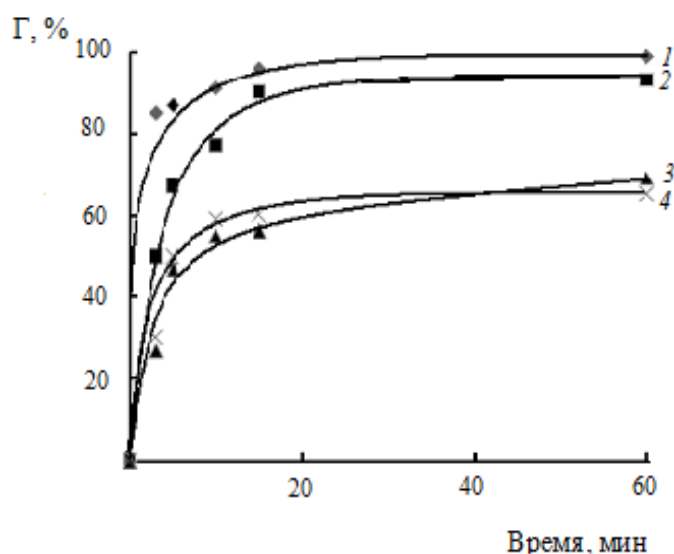


Рисунок 41 – Зависимость глубины превращения АА от времени в процессе деструкции ХТЗ при 295 К, $[AA]/[ХТЗ] = 45.4$ моль/(осново-моль) ($[AA] = 2.81$ моль/л), $[ХТЗ]/[H_2O_2]$, осново-моль/моль: 1 – 20, 2 – 50, 3 – 75, 4 – 100

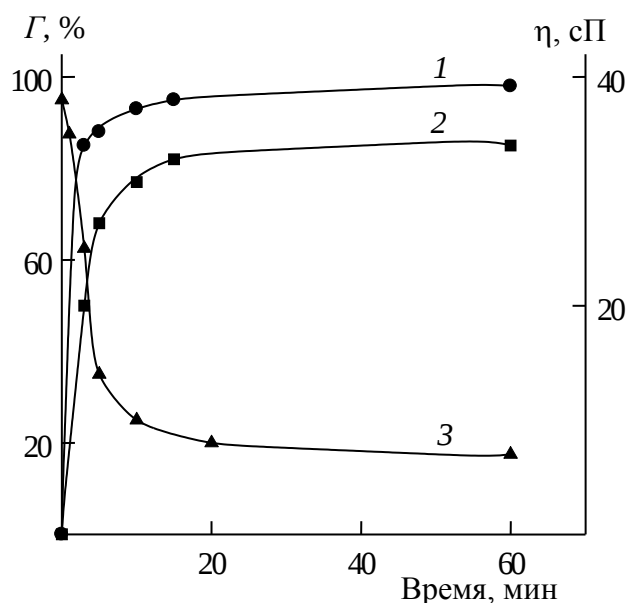
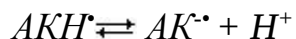
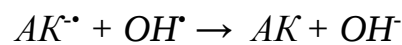
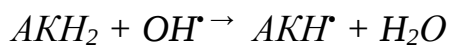
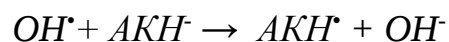
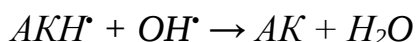
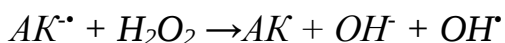


Рисунок 42 – Зависимость глубины превращения МА (1, 2) от времени в процессе деструкции цепей ХТЗ и изменение вязкости раствора хитозана со временем в присутствии окислительно-восстановительной системы H_2O_2 - АК (3) при 295 К: $[ХТЗ]/[H_2O_2] = 50$ (1, 3) и 100 (2) осново-моль/моль. $[МА] = 0.348$ моль/л, $[ХТЗ] = 0.186$ осново-моль/л, $[CH_3COOH] = 1$ моль/л

Блок-сополимеризацию хитозана с виниловыми мономерами можно представить, как каскад превращений, включающий образование комплексов H_2O_2 -АК, в которых обеспечивается перенос электронов от индуктора к пероксиду водорода и генерирование радикалов $HO^\bullet$, комплексных радикалов, ион-радикалов. Получаемые в этих условиях свободные радикалы генерируют образование радикалов на образующихся фрагментах цепей хитозана (рисунок 43). Последние инициируют полимеризацию АА (МА, ВП, Ст, 2-ГЭМА). Стадия обрыва цепи может происходить как за счет взаимодействия растущих цепей синтетических фрагментов по типу рекомбинации и диспропорционирования между собой, так и по реакции рекомбинации с фрагментами ХТЗ, несущими неспаренный электрон, в результате чего образуется блок-сополимер полиблочного строения. Общую схему образования первичных радикалов при блок-сополимеризации виниловых мономеров в растворах хитозана в присутствии окислительно-восстановительной системы аскорбиновая кислота – пероксид водорода можно представить следующим образом (рисунок 43):

Образование радикалов в окислительно-восстановительной системе:



Стадия инициирования представлена на следующей странице.

Рисунок 43 – Схема образования первичных радикалов при блок-сополимеризации виниловых мономеров в растворах хитозана в присутствии окислительно-восстановительной системы аскорбиновая кислота – пероксид водорода

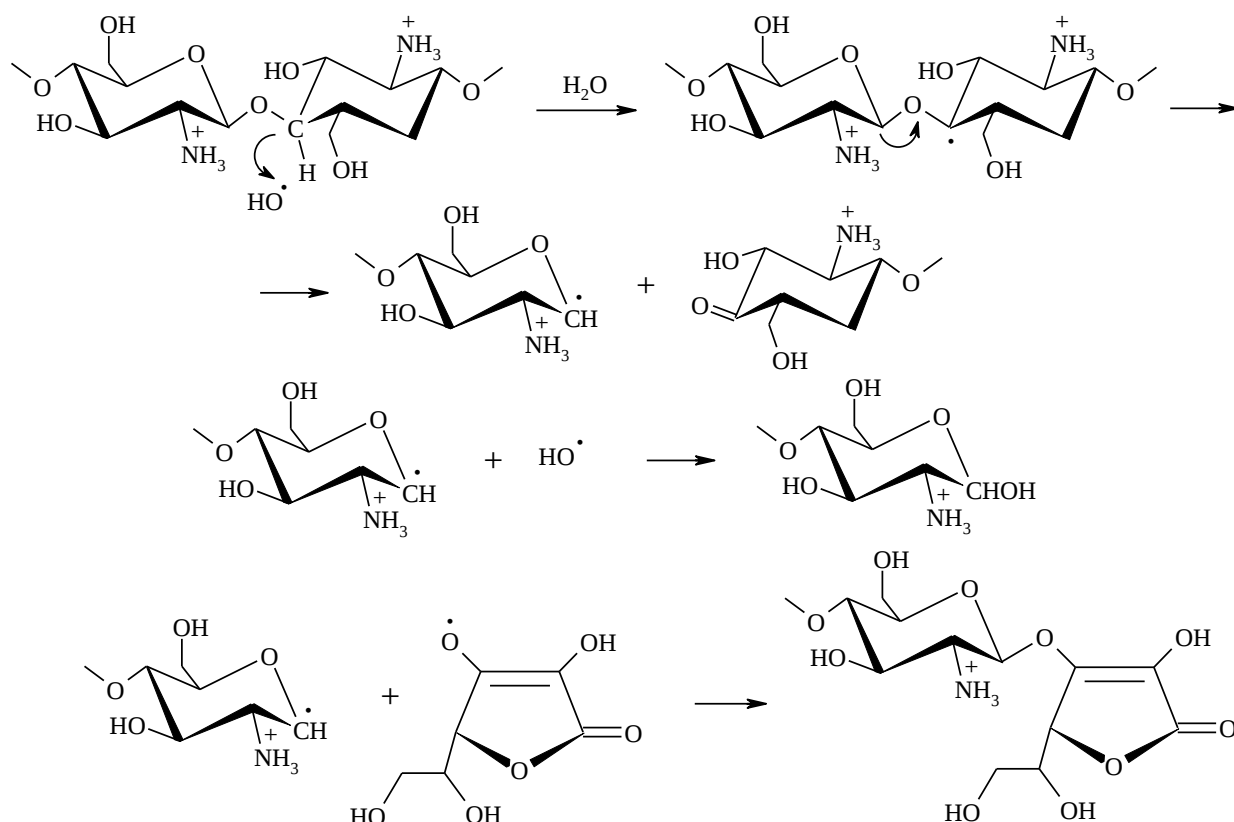
Инициирование:

Рисунок 43 – Схема образования первичных радикалов при блок-сополимеризации виниловых мономеров в растворах хитозана в присутствии окислительно-восстановительной системы аскорбиновая кислота – пероксид водорода (продолжение)

Как в случае привитой сополимеризации, так и в случае блок-сополимеризации не исключено образование гомополимеров виниловых мономеров. Методами экстракции и ИК-спектроскопии доказано образование блок-сополимеров. В ИК-спектрах продуктов синтезов хитозана с соответствующими мономерами, отмытых на аппарате Сокслета от гомополимеров, присутствуют полосы, соответствующие валентным колебаниям функциональных групп АА – 1651 см^{-1} (амидная группа), карбонильных групп (1736 см^{-1}) МА (2-ЭГА) и бензольного кольца Ст (1570 см^{-1}), что свидетельствует об образовании соответствующих блок-сополимеров (рисунки 44, 45).

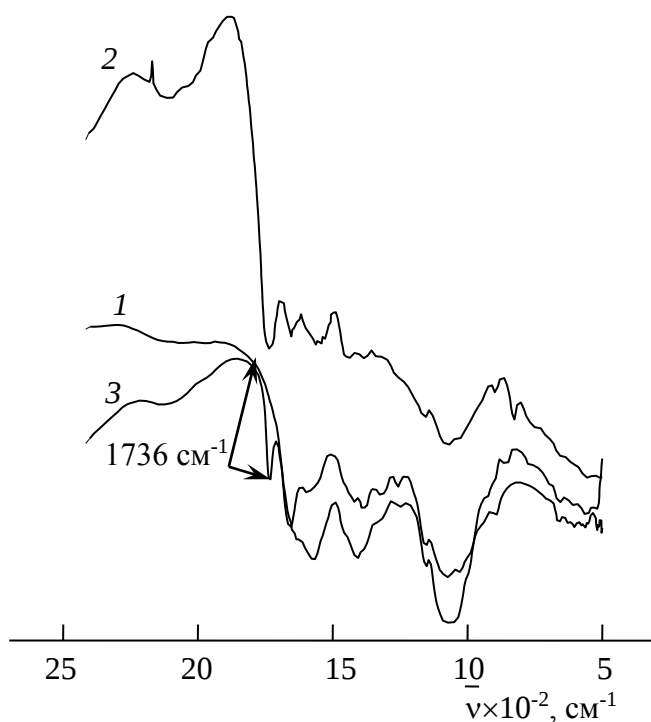


Рисунок 44 – ИК-спектры хитозана (1) и блок-сополимеров хитозана с МА (2) и 2-ЭГА (3)

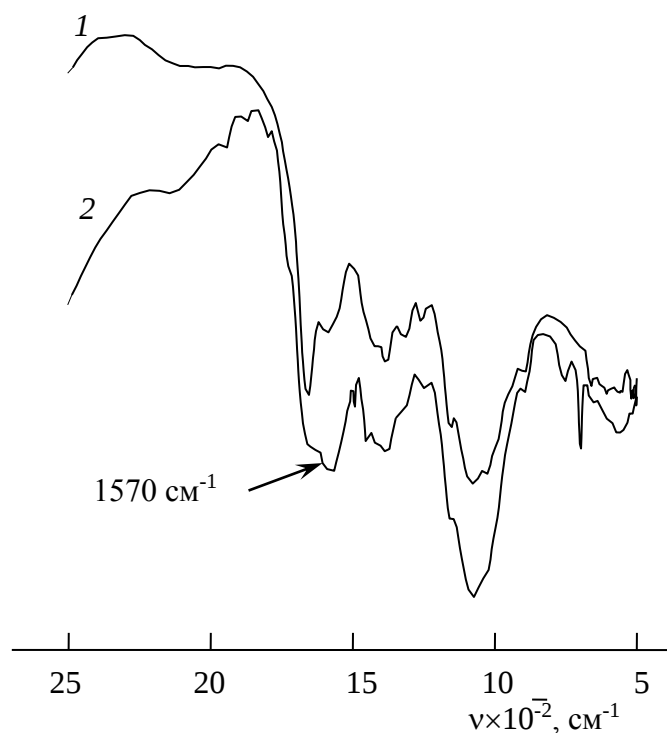


Рисунок 45 – ИК-спектры хитозана (1), блок-сополимера хитозана со Ст (2)

По результатам экстракции для блок-сополимеров хитозана с виниловыми мономерами были рассчитаны степень и эффективность блок-сополимеризации (таблица 9).

Таблица 9 – Степень и эффективность блок-сополимеризации виниловых мономеров с хитозаном в зависимости от соотношения реагентов ($[ХТЗ]/[H_2O_2] = 50$ осново-моль/моль)

Блок-сополимер	pH	Соотношение [мономер]/ [ХТЗ], моль/(осново- моль)	Выход гомопо- лимера, мас. %	Степень блок- сополимеризаци и мас. %	Эффективность блок- сополимеризации, мас. %
ХТЗ-2-ГЭМА	3.6	1.33	6	83	94
ХТЗ-МА	3.6	1.78	5	62	95
ХТЗ-ВП	3.6	1.52	11	100	89
ХТЗ-Ст	4.2	0.47	2.6	10	97
	3.9		3.3	32	97
	5.5		6.2	27	94

Следует отметить, что содержание гомополимера в продуктах синтеза является сравнительно низким и колеблется от 2 до 6 % в случае МА, Ст и 2-ГЭМА, в то время как, для хорошо растворимого в воде ВП этот показатель возрастает до 11%.

Из таблицы 9 видно, что при блок-сополимеризации виниловых мономеров в растворах хитозана, как и в случае привитой полимеризации, эффективность образования сополимера во всех случаях превышает 90%, а степень блок-сополимеризации изменяется от 9% до 100% в зависимости от условий проведения процесса и природы мономера – с увеличением растворимости мономера в водных средах выход блок-сополимера возрастает.

Таким образом, результаты систематических исследований привитой и блок-сополимеризации виниловых мономером с хитозаном позволили сформулировать следующие выводы:

- разработана методология радикальной привитой сополимеризации хитозана с широким спектром мономеров винилового ряда от хорошо растворимых в воде (АА, ВП) до ограниченно или практически не растворимых (МА, АН, 2-ЭГА, 2-ГЭМА, 2-ГПМА, Ст) в присутствии различных типов иницирующих систем (ПСА, ДАК и $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$) без разрушения основной цепи полисахарида. Скорость и глубина превращения мономеров в растворах хитозана зависят от рН среды, природы инициатора, растворителя и мономера, соотношения их концентраций и концентрации полисахарида, а также температуры. Впервые доказано проявление концентрационного эффекта, приводящее к ускорению процесса привитой полимеризации виниловых мономеров в растворах хитозана. Выявлены оптимальные условия, обеспечивающие высокие степень и эффективность прививки;

- впервые разработан оригинальный метод синтеза блок-сополимеров виниловых мономеров с ХТЗ в условиях радикальной деградации макромолекул полисахарида под действием окислительно-восстановительной иницирующей системы пероксид водорода - аскорбиновая кислота при комнатных температурах

с высокой эффективностью блок-сополимеризации и выходом целевого продукта (до 95%).

2.2. Молекулярно-массовые характеристики привитых и блок-сополимеров хитозана с виниловыми мономерами

Молекулярные характеристики полимеров и сополимеров: молекулярно-массовое распределение, разветвленность (распределение по типам разветвленности), композиционная неоднородность (распределение по химическому составу гетерополимеров) – играют важнейшую роль в химии, физике и технологии высокомолекулярных соединений. С одной стороны, эти характеристики позволяют судить о процессах полимеризации, сертифицировать полимерные материалы, с другой – прогнозировать технические характеристики полимерных изделий, получаемых при переработке полимерных материалов, определять оптимальные условия этой переработки. Кроме того, на физико-механические свойства сополимеров влияет не только строение макроцепи (цепное, разветвленное, полиблочное, звездообразное и т.д.), но и степень полимеризации каждого из фрагментов, составляющих эту макроцепь. В данной работе впервые разработана методика и определены ММ привитых цепей и блоков синтетических фрагментов в соответствующих сополимерах хитозана с виниловыми мономерами. В случае водорастворимых мономеров, когда система является однофазной были определены молекулярные массы макромолекулы сополимера и ее частей, для ограниченно растворимых мономеров – только ММ привитых цепей и синтетических блоков. Методами поступательной диффузии и вискозиметрии были исследованы конформационные свойства макромолекул хитозана и его привитых сополимеров с АА в смешанном растворителе 0.33 М CH_3COOH + 0.3 М NaCl . В работе [277] было показано, что в растворах с большой ионной силой гидродинамическое поведение макромолекул хитозана может быть адекватно описано с помощью модели частично протекаемой червеобразной цепи

и сходно с поведением других полисахаридов в органических растворителях. При этом молекулы хитозана характеризуются равновесной жесткостью цепи (сегмент Куна $A \approx (220 \pm 30) \text{ \AA}$), типичной для умеренно жесткоцепных полимеров. Расчетные данные по гидродинамическим и молекулярным характеристикам хитозана и его сополимеров с АА представлены в таблице 10. Видно, что ММ сополимеров в несколько раз превосходят ММ исходного хитозана. Вместе с тем, значения характеристической вязкости сополимеров существенно меньше, чем для хитозана. Результаты, приведенные ниже, подтверждают большую внутриклубковую плотностью сополимерных макромолекул по сравнению с ХТЗ (таблица 10). Выделение привитых цепей ПАА из сополимерных макромолекул проводили полным гидролизом их хитозановой части (подробно методика описана в главе 4). Было обнаружено, что привитые цепи ПАА имеют средневязкостную ММ $\sim 9.0 \times 10^4$, т.е. в среднем на макромолекулу хитозана прививается не менее 4-5 цепей ПАА (в таблице 10 это иллюстрируется для образца № 4). Результатом является отмеченное выше увеличение внутриклубковой плотности макромолекул привитого сополимера по сравнению с исходным хитозаном. Гидродинамический радиус зависит от молекулярной массы полимеров, зависимость имеет линейный характер (рисунок 46).

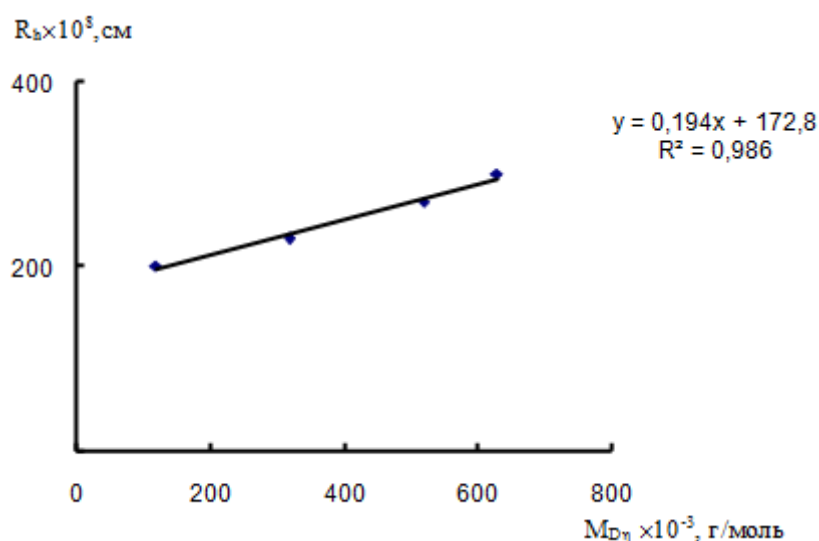


Рисунок 46 – Зависимость гидродинамического радиуса хитозана и его привитых сополимеров с АА от молекулярной массы

Таблица 10 – Гидродинамические и молекулярные характеристики хитозана и его привитых сополимеров с акриламидом

№	Состав мономерной смеси [AA]:[ХТЗ], моль/осново-моль	$D \times 10^7$, $\text{см}^2/\text{с}$	dn/dc , $\text{см}^3/\text{г}$	$[\eta]$, $\text{см}^3/\text{г}$	$M_{D\eta} \times 10^{-3}$	$R_h \times 10^8$, см	$\rho_{\text{ср}}$, $\text{г}/\text{см}^3$	Содержание N по Кьельдалю
1	Хитозан	1.15 ± 0.05	0.159	650	120	200	0.006	7.87 теор
2	[AA]:[ХТЗ]= 1	0.98 ± 0.03	0.142	400	320	230	0.010	8.78
3	[AA]:[ХТЗ]= 2	0.77 ± 0.02	0.136	420	630	300	0.009	13.52
4	[AA]:[ХТЗ]= 3	0.85 ± 0.01	0.157	380	520	270	0.011	14.93

Таким образом, в результате привитой полимеризации АА на хитозан получены сополимеры с ММ в несколько раз большей ММ исходного хитозана, при этом внутриклубковая плотность звеньев макромолекул сополимера возрастает ~ в 1.5 раза.

При получении блок-сополимеров хитозана с водорастворимыми мономерами на примере АА доказана возможность управления длиной блоков изменением концентрации полимеризующегося мономера. Варьируя соотношение $[AA]/[XT3]$ от 10 до 45 моль/осново-моль, можно получить сополимеры с различной длиной блоков ПАА от 1.02×10^5 до 8.17×10^5 (по молекулярной массе) (таблица 11).

Таблица 11 – Молекулярная масса блоков ПАА, выделенных из блок-сополимеров XT3-АА, при различных соотношениях концентраций мономера и хитозана ($[XT3]/[H_2O_2] = 50$ осново-моль/моль, $[XT3] = 1$ мас. %, $[CH_3COOH] = 1$ мас.%)

№	$[AA]/[XT3]$, моль/(осново-моль)	$[\eta_{уд}]/C$, дл/г	$\overline{M}_n \times 10^{-5}$
1	10	0.64	1.02
2	20	2.25	4.90
3	30	2.92	6.79
4	45	3.39	8.17

Анализ значений молекулярных масс блок-сополимеров, блоков ПАА и блоков хитозана (таблица 11, образец 4), равных $9.19 \pm 0.9 \times 10^5$, 8.17×10^5 , 0.14×10^5 соответственно, показывает, что продукты блок-сополимеризации имеют полиблочное строение.

Для сополимеров хитозана с МА, 2-ЭГА и Ст также были определены молекулярно-массовые характеристики привитых цепей и блоков синтетических полимеров ПМА, П-2-ЭГА, ПСт (таблица 12).

Таблица 12 – Молекулярно-массовые характеристики блок- и привитых цепей полиметилакрилата, поли-2-этилгексилакрилата и полистирола, выделенных из соответствующих сополимеров с хитозаном

Сополимер	рН исходного раствора хитозана	Соотношение [мономер]/[ХТЗ] в синтезе, моль/(осново- моль)	$M_n \times 10^{-3}$	$M_w \times 10^{-3}$	M_w/M_n
-----------	---	--	----------------------	----------------------	-----------

Привитые сополимеры

ХТЗ-МА	3.6	0.89	130	540	4.2
		1.78	240	1130	4.7
	4.2	2.85	520	2665	5.1
ХТЗ-2-ЭГА	4.2	0.11	155	251	1.6
		0.23	96	212	2.2
ХТЗ-СТ	3.9	0.47	54	142	2.6
	4.2		8.5	18	2.1
	5.5		13	26	2.0

Блок-сополимеры

ХТЗ-МА	3.6	2.32	130	501	3.9
		3.1	152	634	4.2
ХТЗ-2-ЭГА	4.2	0.11	180	680	3.8
		0.23	192	707	3.7
ХТЗ-СТ	3.9	0.47	26	94	3.6
	4.2		28	98	3.5
	5.5		64	206	3.2

Из таблицы 12 видно, что ММ цепей ПМА привитых на хитозан увеличивается с ростом концентрации мономера в реакционной смеси. В случае

умеренно растворимого в воде МА образуются очень высокие по молекулярной массе цепи, что менее выражено для гидрофобного 2-ЭГА. Молекулярная масса привитых цепей ПСт существенно зависит от pH реакционной среды и возрастает ~ в 4 раза (с 13×10^3 до 54×10^3) при снижении pH реакционной смеси с 5.5 до 3.9. В последнем случае, очевидно, играет роль доступность реакционных центров, обусловленная конформацией макромолекул хитозана. Макромолекулы хитозана при изменении степени протонирования аминогрупп меняют конформацию, реализуя переход спираль (pH 4.2) – клубок (pH 3.9). В умеренно концентрированных растворах в спиральных конформациях (pH 5.5) сильно проявляется межмолекулярное взаимодействие за счет H-связей, что ограничивает доступность реакционных центров и приводит к образованию большего количества гомополимера ПСт (таблица 12) и привитых цепей с меньшей ММ.

ММ блоков ПМА в блок-сополимерах ХТЗ-МА существенно ниже, чем ММ привитых цепей, при том, что концентрация мономера в реакционной смеси была выше, а радикалы, инициирующие процесс, образовывались на цепях ХТЗ. Как в случае привитой, так и в случае блок-сополимеризации наблюдается существенное влияние pH реакционной среды (изменение с 3.9 до 5.5) на ММ образующихся цепей ПСт, при чем, в случае привитых сополимеров этот эффект более выражен. По-видимому, в случае блок-сополимеризации конформация цепи полисахарида не оказывает существенного влияния на полимеризацию винилового мономера, т.к. в качестве реакционных центров выступают не функциональные группы хитозана, а образующиеся радикалы при деградации основной цепи в присутствии окислительно-восстановительной системы. Однако и в том и в другом случае параметр полидисперсности больше 2. Это еще раз подтверждает предположение о том, что обрыв растущей цепи синтетического полимера возможен как за счет передачи цепи на полисахарид, так и за счет взаимодействия растущих цепей синтетических полимеров на хитозане и соответствующих гомополимеров.

Таким образом, разработана методика определения ММ синтетических частей в блок- и привитых сополимерах хитозана с виниловыми мономерами, показана возможность регулирования ММ изменением pH реакционной среды и концентрации мономера, что важно для установления корреляции между строением гибридных макромолекул и физико-механическими свойствами материалов на их основе.

2.3. Исследование физико-механических свойств пленок на основе сополимеров хитозана с виниловыми мономерами

Многочисленные литературные данные свидетельствуют о перспективности использования хитозана и его производных в виде пленочных и волокнистых изделий, лечебных и защитных покрытий, а также в виде разделительных мембран в медицине, биотехнологии, фармацевтике, пищевой промышленности. Наряду с отсутствием токсичности, био- и гемосовместимостью, биоразрушаемостью, очень важную роль играет пористая структура этих изделий. Использование для получения указанных изделий хитозана, модифицированного привитой и блок-сополимеризацией с виниловыми мономерами и смесей хитозана с другими полимерами, позволяет находить рациональные решения при оптимизации их свойств.

В работе исследовали физико-механические свойства композиций, полученных при синтезе привитых и блок-сополимеров хитозана с виниловыми мономерами на пленочных образцах. Пленки получали методом полива на подложки различной природы в условиях равновесного испарения воды при комнатной температуре с последующим вакуумированием при 30⁰С до постоянной массы.

Рассмотрим свойства пленок на основе водорастворимых производных хитозана. Результаты исследования разрушающего напряжения и величины предельной деформации пленок на основе индивидуальных гомополимеров ХТЗ и ПАА, их смесей и привитых сополимеров представлены в таблице 13. Разрывная

прочность пленок возрастает с увеличением содержания АА в сополимере. Следует отметить, что пленки на основе смеси хитозана с ПАА имеют низкий уровень свойств, что связано с образованием интерполимерного комплекса.

Таблица 13 – Физико-механические свойства пленок привитых сополимеров хитозана и АА и смесей гомополимеров

Материал	[ПАА]:[ХТЗ]	pH	σ , МПа	ε , %
ПАА	-	-	86.0	60
Хитозан	-	4.2	27.0	1.9
Смесь привитых сополимеров ХТЗ-АА с ПАА	0.3	4.2	14.5	8
	1.0	4.2	23.2	22
	2.0	4.2	45.8	9
	3.0	4.2	39.3	33
	4.6	4.2	28.8	22
	4.6	5.5	62.0	19
Смесь гомополимеров ПАА и хитозана	0.5	-	14.0	15
	1.0	-	16.0	10
	2.5	-	24.0	15
	4.0	-	10.0	10
Привитые сополимеры ХТЗ-АА	1.0	4.2	9.6	19
	3.0	4.2	57.0	23
	4.0	4.2	58.0	22
	4.0	5.5	34.4	30

Так при соотношении $[ПАА]:[ХТЗ]>3$ система расслаивалась с выделением осадка белого цвета. Однако, использование сополимеров ХТЗ-АА вместо ПАА, позволяет получить высококачественные пленки на основе смесевых композиций сополимеров ХТЗ-АА - хитозан, сополимеров ХТЗ-АА – полиакриламид с удовлетворительными физико-механическими показателями, т.к. привитые цепи

создают стерические препятствия образованию интерполимерного комплекса. Изменяя соотношение компонентов в смесях, можно в широких пределах варьировать свойства пленок и их пористость. Смесевые композиции на основе хитозана с ПВП и привитые сополимеры также имеют улучшенные физико-механические показатели по сравнению с пленками из чистого хитозана (таблица 14). Зависимость прочности пленок от соотношения компонентов в сополимерах хитозан – ВП имеет экстремальный характер, причем наибольшая прочность наблюдается при содержании звеньев ВП 20 мол.%. Величина разрушающего напряжения возрастает в 3 раза для смесей гомополимеров по сравнению с немодифицированным хитозаном и лишь незначительно для привитых сополимеров. Относительное удлинение при разрыве увеличивается до 15%.

Таблица 14 Физико-механические свойства пленок модифицированного хитозана, полученных из водных растворов CH_3COOH (pH 3.8)

Состав пленки	[ПВП]:[ХТЗ]	σ , МПа	ε , %
Смесь гомополимеров	0.1	66.6	10
	0.25	88.2	12
	0.4	68.6	12
	4	32.3	15
Привитые сополимеры	0.25	42.1	70
	1	35.3	45
	4	32.3	35
Хитозан	-	27.0	1.9
ПВП	-	8.8	-

Известно, что в случае ионогенных полимеров существенное влияние на физико-механические характеристики пленок оказывает pH среды, из которой они формируются. При формировании хитозановых пленок в качестве растворителя, в большинстве случаев, используют водные растворы летучих одноосновных уксусной, муравьиной кислот, образующих с хитозаном соответствующие соли.

При удалении растворителя в процессе сушки происходит изменение не только концентрации полимера, состава и качества растворителя, но, возможно, и степени протонирования аминогрупп хитозана, что влияет на прочностные характеристики получаемой пленки. Из рисунка 47 видно, что изменяя значение рН среды и тем самым содержание непротонированной формы макромолекул полисахарида, можно повысить предел прочности даже чистого хитозана с ~ 30 (рН 5.5) при переводе его в солевую форму до 60 МПа (рН 2.0), а для смеси хитозан – ПВП до 100 МПа (рН = 4.0). (Для сравнения: прочность полиэтиленового волокна – 100÷200 МПа, ацетатного – 140÷180 МПа, вязкозного – 220÷250 МПа) .

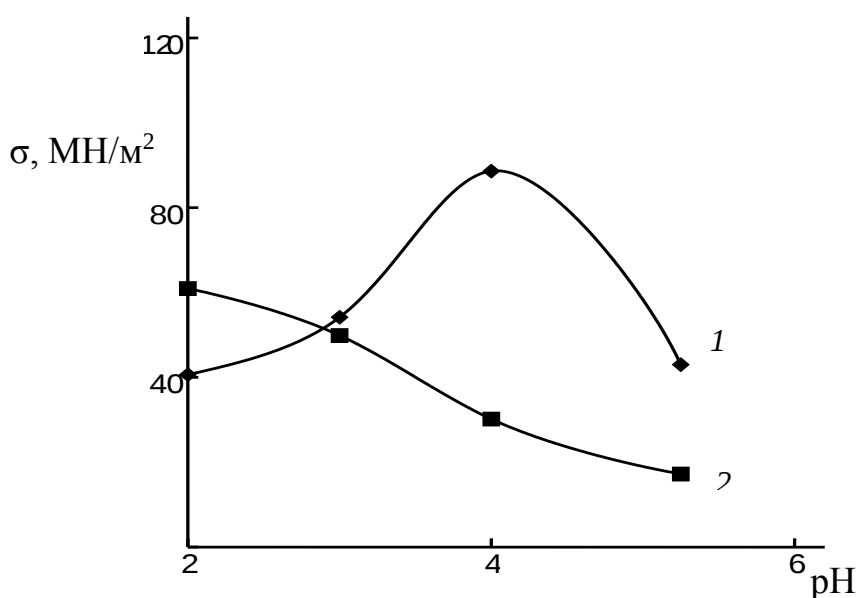


Рисунок 47 – Предел прочности σ , пленок на основе хитозана (2) и смеси гомополимеров хитозана с ПВП (1:0.25 осново-моль) (1), отлитых из растворов с разным значением рН

На примере привитых и блок-сополимеров хитозана с МА, 2-ЭГА, СТ изучено влияние их состава и структуры на физико-механические свойства (таблица 15). Типичные деформационные кривые представлены для пленок сополимеров хитозана с МА, Ст, 2-ЭГА (рисунок 48).

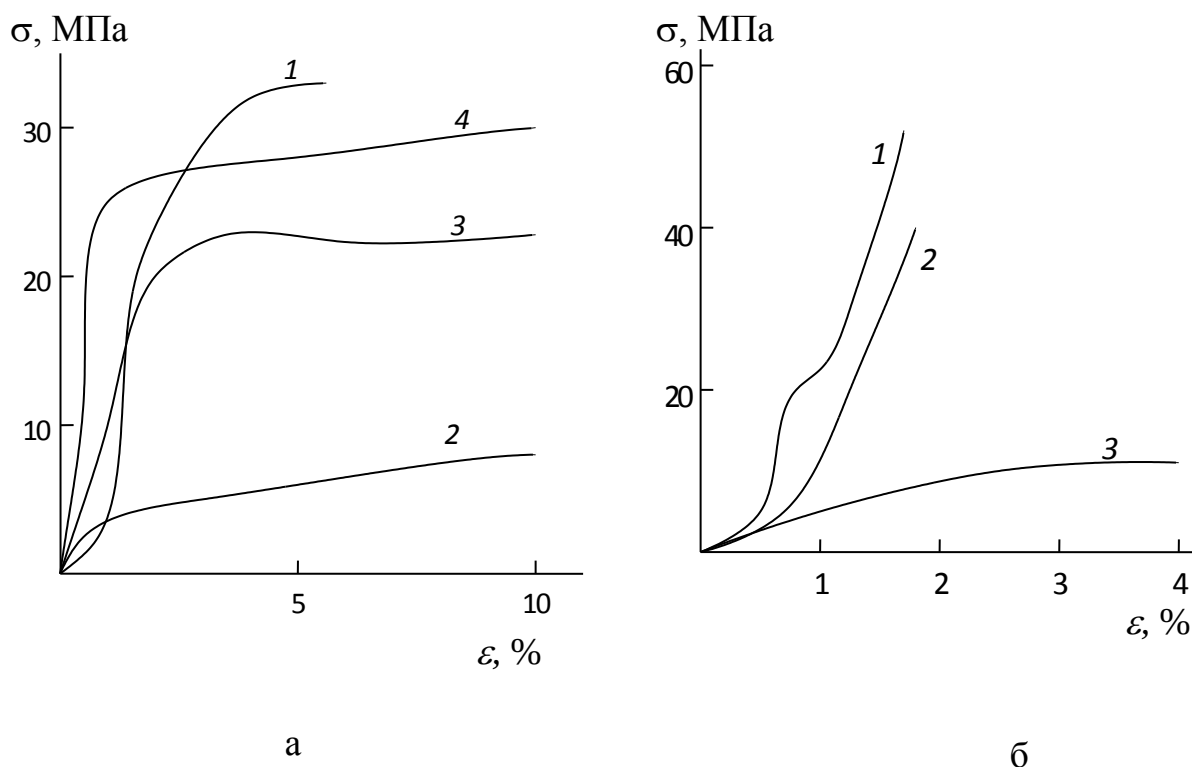


Рисунок 48 – Деформационные кривые блок- (а) и привитых (б) сополимеров хитозана: 1 а – ХТЗ-МА (рН 4.2), 2 а – ХТЗ-МА (рН 3.6), 3 а – ХТЗ-2-ЭГА (рН 4.2), [2-ЭГА]= 0.021 моль/л, 4 а – ХТЗ-Ст (рН 5.5), 1б – ХТЗ-Ст (рН 3.9), 2 б – ХТЗ-2-ЭГА (рН 4.2), 3 б – ХТЗ-Ст (рН 5.5)

Таблица 15 Физико-механические свойства привитых сополимеров хитозана с виниловыми мономерами

Привитой сополимер	рН исходного раствора хитозана	Соотношение [мономер]/[ХТЗ] в синтезе, моль/осново-моль	σ , МПа	ϵ , %
ХТЗ-МА	4.2	2.85	21.8	3.6
ХТЗ-2-ЭГА	4.2	0.11	42.7	1.8
ХТЗ-2-ГПМА	3.9	0.59	17.0	1.1
ХТЗ-2-ГЭМА	3.9	0.65	32.6	1.4
ХТЗ-Ст	3.9	0.47	49.8	2.0
	4.2		11.8	1.2
	5.5		16.0	9.2
ХТЗ	4.2		27.0	1.9

Из таблицы 15 видно, что изменяя состав привитых сополимеров ХТЗ-Ст и ХТЗ-МА можно получить пленки с большей деформацией, чем у исходного хитозана ($\varepsilon \sim 2\%$). Пленки на основе привитого сополимера ХТЗ-2-ЭГА в 1.5 раз более прочные, чем ХТЗ, при одном и том же уровне эластичности. Увеличение молекулярной массы привитых цепей ПСт в сополимере с хитозаном в ~ 4 раз сопровождается возрастанием прочности пленок на его основе $\sim$ в 4 раз (при изменении pH от 4.2 до 3.9).

Из таблиц 15 и 16 видно, что физико-механические свойства привитых и блок-сополимеров существенно отличаются и зависят от природы синтетического фрагмента и его молекулярной массы.

Таблица 16 – Физико-механические свойства блок-сополимеров хитозана с виниловыми мономерами

Блок-сополимер	pH исходного раствора хитозана	Соотношение [мономер]/[ХТЗ] в синтезе, моль/осново-моль	σ , МПа	ε , %
ХТЗ-МА	3.6	2.36	8.3	13.7
		3.12	8.7	31.7
	4.2	2.85	32.9	5.6
ХТЗ-2-ГЭМА	4.2	1.3	25.0	1.98
ХТЗ-2-ЭГА	3.6	0.11	29.1	16.0
		0.23	24.8	5.2
ХТЗ-Ст	3.9	0.47	18.5	1.2
	4.2		3.7	1.0
	5.5		38.5	12.8
ХТЗ	4.2		27.0	1.9
ПСт			30 – 70	1.5
ПМА			7.0	750

При введении в цепь ХТЗ блоков гибкоцепного ПМА с разной ММ (таблица 12) можно получить пленочные материалы с деформацией от 5% до 32%, что в 2-15 раз выше, чем у исходного полисахарида, и прочностными характеристиками выше, чем у немодифицированного ПМА, но на уровне ХТЗ. Блок-сополимеры ХТЗ с 2-ЭГА характеризуются прочностью при разрыве на уровне ХТЗ, при увеличении эластичности до 16%, что, по-видимому, обусловлено внутренней пластификацией, связанной с природой углеводородного заместителя в эфирной группе синтетического полимера. Следует отметить, что изменяя условия синтеза и природу винилового мономера можно получить сополимеры с ХТЗ, прочностные свойства которых не ниже, чем у используемых в настоящее время биоразлагаемых пленочных материалов на основе полиэтилена (разрушающее напряжение ~ 25 МПа).

Таким образом, модификация ХТЗ привитой и блок-сополимеризацией с виниловыми мономерами, изменение состава и структуры сополимеров оказывает существенное влияние на физико-механические свойства материалов на их основе. С другой стороны, различия в физико-механических свойствах пленок блок- и привитых сополимеров одинакового среднего состава могут быть обусловлены образованием разной молекулярной упаковки при их формировании из соответствующих растворов. Кристаллические области определяют прочность пленок, а аморфные (проходные цепи), в которых макромолекулы имеют большую подвижность при набухании в сорбате, - пластические, сорбционные и транспортные свойства полимерных пленок. При этом следует отметить, что наилучшие физико-механические показатели полимерных материалов реализуются при определенном соотношении аморфных и кристаллических областей в полимере (для каждого полимера такое соотношение индивидуально) [278]. Известно, что хитозан характеризуется достаточно высокой степенью кристалличности (до 40-50%). Данные рентгенографического анализа показывают, что для привитых сополимеров ХТЗ-АА степень кристалличности по сравнению с хитозаном снижается с 44 до 19% (рисунок 49).

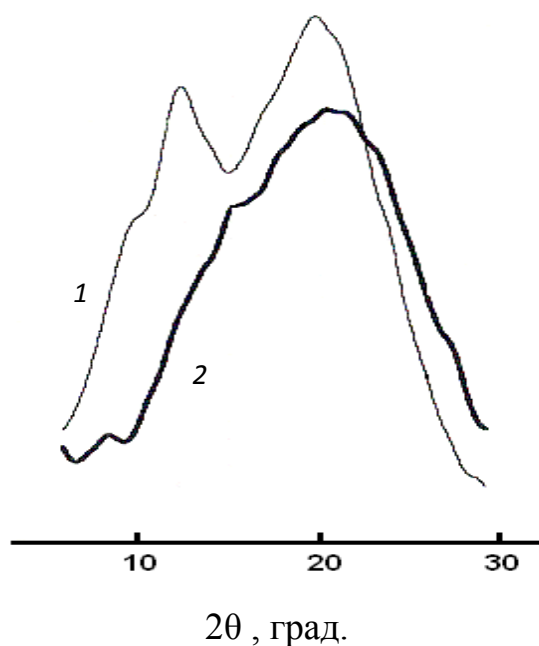


Рисунок 49 – Рентгеновские дифрактограммы пленок хитозана (1) и привитого сополимера XT3-AA ([AA]:[XT3]= 3) (2)

Пленки привитых сополимеров XT3-ВП имеют аморфную структуру (рисунок 50), в результате чего и наблюдается повышение деформации до 70% (таблица 14), по сравнению с 10-15% при сохранении кристалличности XT3 в смесях гомополимеров. Рассчитанные расстояния, соответствующие межцепной укладке макромолекул хитозана и его смесей с ПВП (таблица 17) показывают, что характер структуры не изменяется.

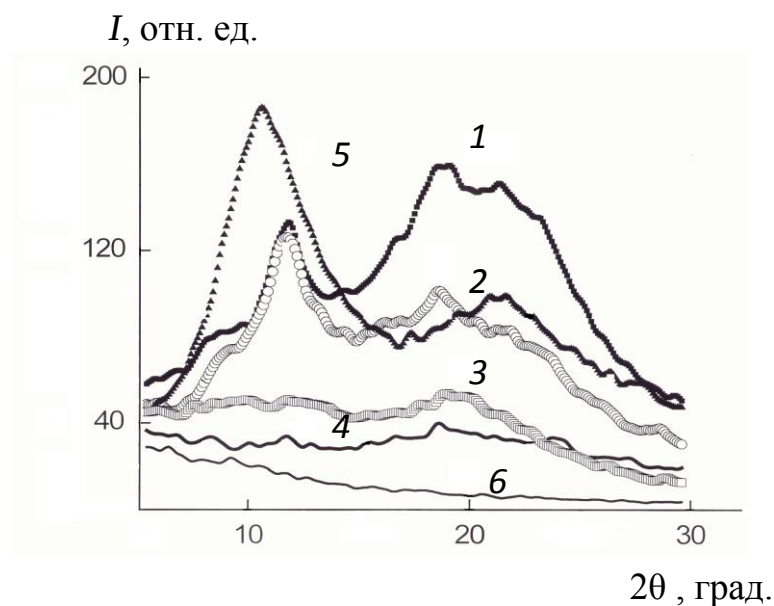


Рисунок 50 –Рентгеновские дифрактограммы пленок хитозана, полученных из водно-уксусно-кислых растворов: 1 – хитозан, (рН пленкообразующего раствора 3.8); 2 – смесь гомополимеров [XT3]:[ПВП] = 1.0:0.25 осново-моль (рН пленкообразующего раствора 3.8); 3, 4 – привитой сополимер XT3-ВП (1:1 и 0.25:1 осново-моль соответственно); 5 – ПВП; 6 – кювета без пленки

Таблица 17 – Угловое положение рефлексов и соответствующие межплоскостные расстояния для хитозана и его смесей с ПВП. В скобках – данные работы [279]

Рефлексы	2 θ , град	d, Å	2 θ , град	d, Å
	хитозан		ХТЗ:ПВП = 40:60, осново-моль	
1	9.5 (9.7)	9.28 (9.13)	9.5	9.28
2	20.0 (20.1)	4.43 (4.41)	20.5	4.32

В отличие от данных, полученных для смесевым композиций гомополимеров, при образовании блок- и привитых сополимеров наблюдаются некоторые изменения в структуре хитозана (рисунок 51).

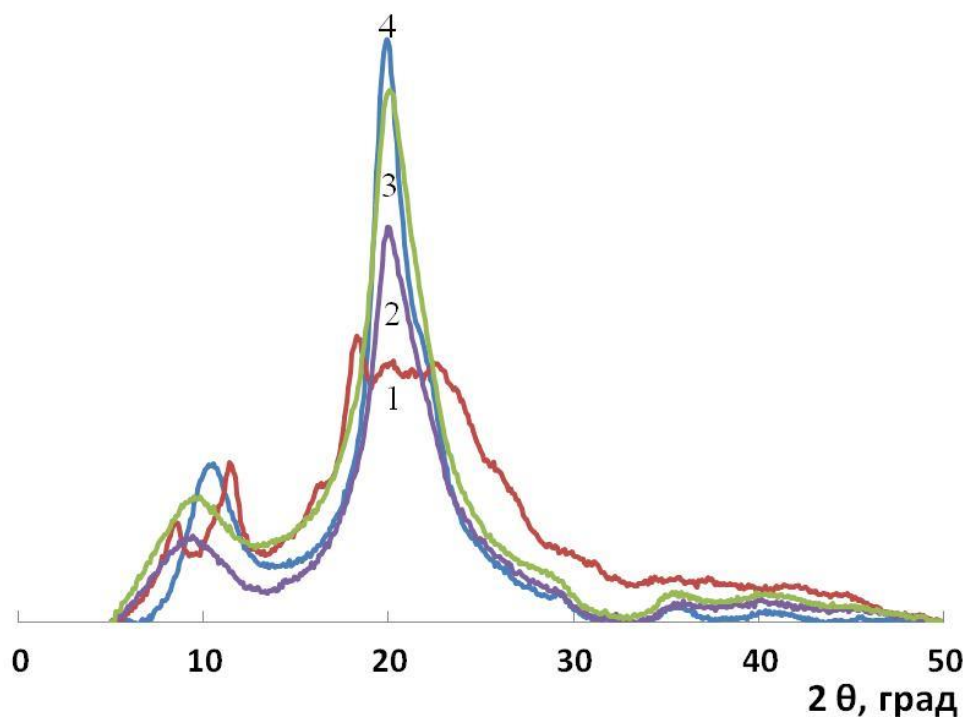


Рисунок 51 – Рентгеновские дифрактограммы пленок: 1 – блок-сополимер ХТЗ-2-ЭГА; 2 – блок-сополимер ХТЗ-Ст, 3 – привитой сополимер ХТЗ-Ст, 4 – хитозан

Выявлено небольшое смещение первого рефлекса (пик в районе 10 град) в область меньших углов, что свидетельствует об увеличении межплоскостного расстояния при укладке макромолекул сополимера. В блок-сополимере хитозана с 2-ЭГА доля кристаллических областей снижается: первый рефлекс разделяется на

два – 8.5 град и 11.3 град, что соответствует межплоскостным расстояниям 11.3 и 7.8 Å, второй рефлекс в области 20 град характерный для исходного хитозана, в блок-сополимере не четко выражен - структура пленки приближается к аморфной, в результате чего увеличиваются их деформационные свойства (таблица 16).

Данные рентгенографического анализа хорошо согласуются с результатами атомно-силовой микроскопии поверхности пленок полученных сополимеров (рисунок 52), где изменения более заметны.

Из рисунков 52 (ж) и 52 (з) видно, что существенное влияние на структуру пленок сополимеров хитозана одинакового состава оказывает pH растворов, из которых они были получены. Пленки хитозана, полученной из раствора с pH 3.6, более однородна и имеет глубину рельефа ~ 18 нм, что практически в 2 раза меньше, чем у пленки, полученной из раствора с pH 4.2. Последнее, очевидно, обусловлено конформацией макромолекул хитозана в растворе: при $\text{pH} > 4.2$ конформация макромолекулы близка к спирали и сильные межмолекулярные взаимодействия приводят к образованию агрегатов, в противоположность растворам с $\text{pH} < 3.6$, где цепи полисахарида принимают форму клубка, и вероятность образования агрегатов снижается [280].

Пленки привитых сополимеров имеют более равномерное распределение неоднородностей по поверхности, чем пленки соответствующих блок-сополимеров. Размер образующихся неоднородностей в привитых сополимерах хитозана со Ст и 2-ЭГА несколько больше, чем в соответствующих блок-сополимерах. Рельеф пленок блок-сополимеров менее выражен: пленки имеют меньшую шероховатость, а присутствующие неоднородности расположены друг от друга на значительно больших расстояниях – поверхность аморфизируется (рисунки 52 д, 52 е). Это, по-видимому, обусловлено различиями в ориентации фрагментов макроцепи при формировании пленки.

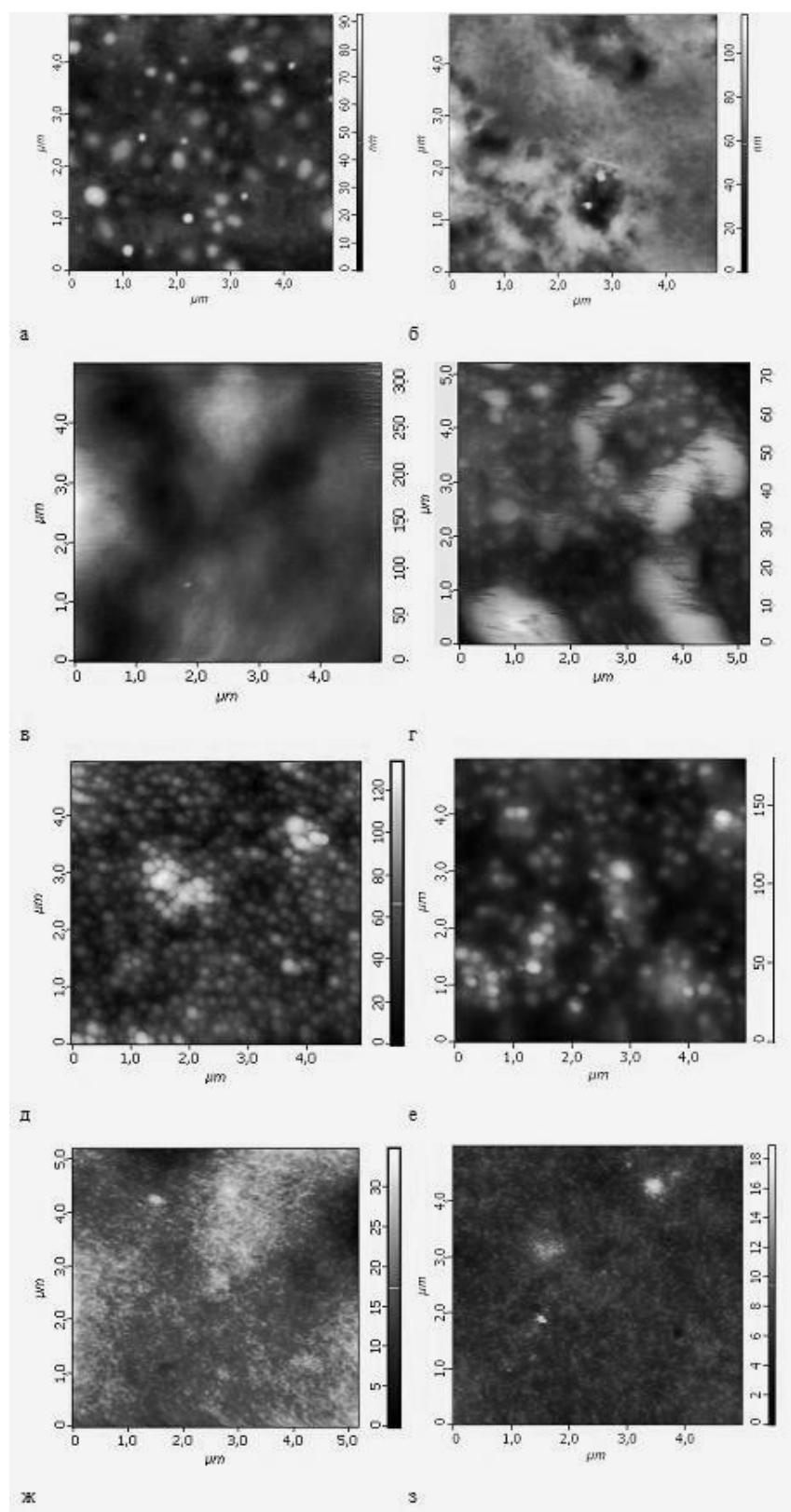


Рисунок 52 – Топография поверхностей пленок: а – привитой сополимер ХТЗ-МА, б – блок-сополимер ХТЗ-МА, в – привитой сополимер ХТЗ-2 – ЭГА; г – блок-сополимер ХТЗ-2 – ЭГА, д – привитой сополимер ХТЗ-Ст; е – блок-сополимер ХТЗ-Ст; ж – ХТЗ 3% в 1.2% УК; з – ХТЗ 3% в 6% УК

Для определения ориентации молекул хитозана и фрагментов синтетического полимера на подложке из лавсана проводили исследование смачивания поверхности пленок. Оказалось, что поверхность пленок блок-сополимеров ХТЗ и 2 -ЭГА являются более гидрофобными (значение $\cos \theta = -0.743$ (угол 138°), где θ - краевой угол смачивания) по сравнению с привитым сополимером того же состава (значение $\cos \theta = -0.392$ (угол 113°)). В этом случае, блоки хитозана ориентируются к лавсановой подложке, а блоки П-2-ЭГА к поверхности, что и препятствует растеканию капель воды. В привитом сополимере цепи П-2-ЭГА образуют неоднородности в виде редкой «щеточки», основой которой является цепь полисахарида. В образующиеся полости между привитыми цепями П-2-ЭГА вода проникает легче, вследствие чего смачиваемость поверхности увеличивается.

Достаточный уровень физико-механических свойств полученных сополимеров и смесевых композиций, заложенные основы управления величиной разрушающего напряжения и деформации, определяют перспективу получения на их основе упаковочных материалов, мембран, перевязочных материалов, искусственной кожи. Для целевого использования конкретных пленочных материалов необходимы данные по их газопроницаемости и влагопоглощению. Методом газовой хроматографии с использованием многокомпонентной стандартизированной газовой смеси: CO , CO_2 , CH_4 , C_2H_2 , C_2H_4 изучена газопроницаемость пленок на основе ХТЗ и его смесей с ПВП. Пленки, в которых хитозан находится в виде уксусно-кислой соли, газонепроницаемы. При удалении CH_3COOH формировались микропоры и пленки становились газопроницаемыми (таблица 18), состав композиций хитозан – ПВП не оказывал большого влияния на селективность газопроницаемости. Влагопоглощение привитых сополимеров ХТЗ с ВП достигает 1200%, тогда как для немодифицированного ХТЗ оно не превышает 200%.

Таблица 18 –Газопроницаемость пленок на основе хитозана и его смесей с ПВП

Пленки	Газопроницаемость, %				
	CO	CO ₂	CH ₄	C ₂ H ₂	C ₂ H ₄
хитозан	96.4	94.1	97.4	100	100
хитозан:ПВП= 40:60 мол.%	98.2	96.1	97.4	100	100
хитозан:ПВП= 20:80 мол.%	99.1	97.1	97.4	100	100

Пленки привитых и блок-сополимеров хитозана с ПАН и ПСт были исследованы в качестве газоразделительных мембран для индивидуальных тестовых газов: N₂, CO₂ и CH₄. Выбор последних связан с актуальностью проблемы выделения кислых примесей из природного газа, что необходимо для повышения энергоэффективности топлива и предотвращения износа оборудования, а также для изучения проницаемости мембран малыми молекулами. Актуальной задачей также является отделение диоксида углерода от азота необходимое при очистке выбросов перерабатывающих заводов. С целью повышения газоразделительных свойств полученных мембран их допировали ионными жидкостями (ИЖ): [bmim][BF₄] – тетрафлюэроборат 1-бутил-3-метилимидазолия, [bmim][Tf₂N] –бис(трифлюэрометилсульфанил)имид 1-бутил-3-метилимидазолия. Коэффициенты проницаемости газов для соответствующих мембран представлены на рисунке 53. Значения селективности мембран по выбранным газам представлены в таблице 19.

Р, Баррер

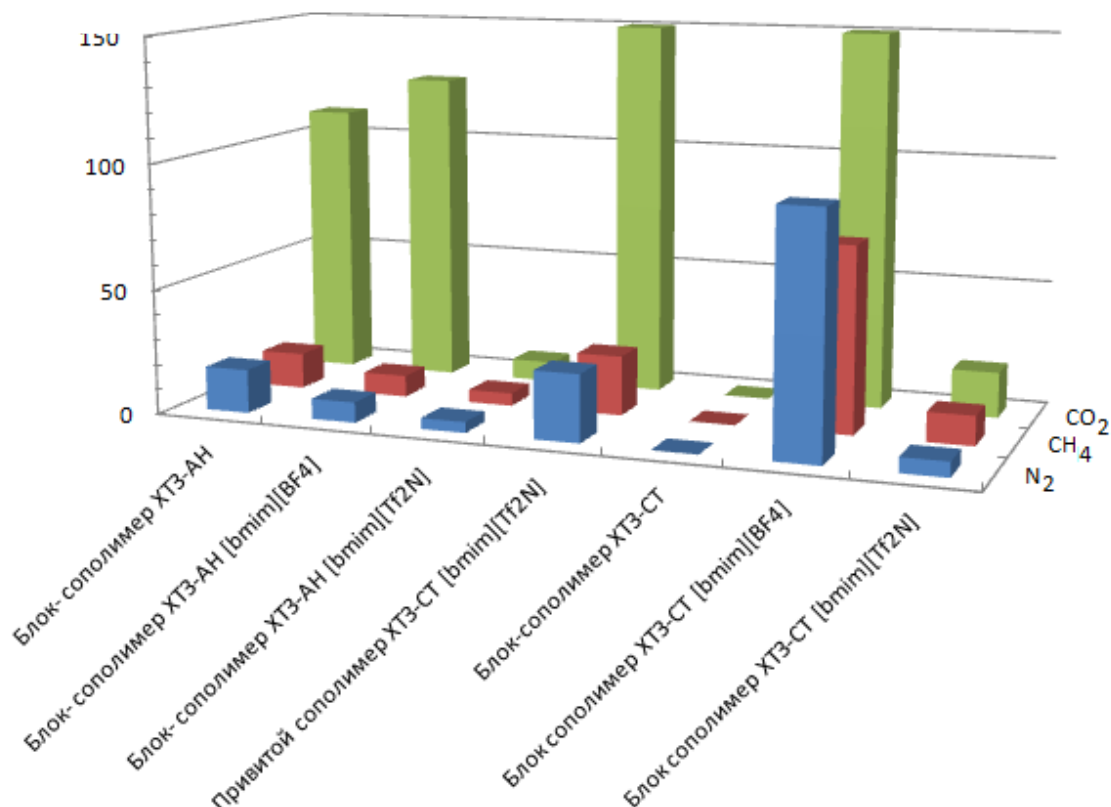
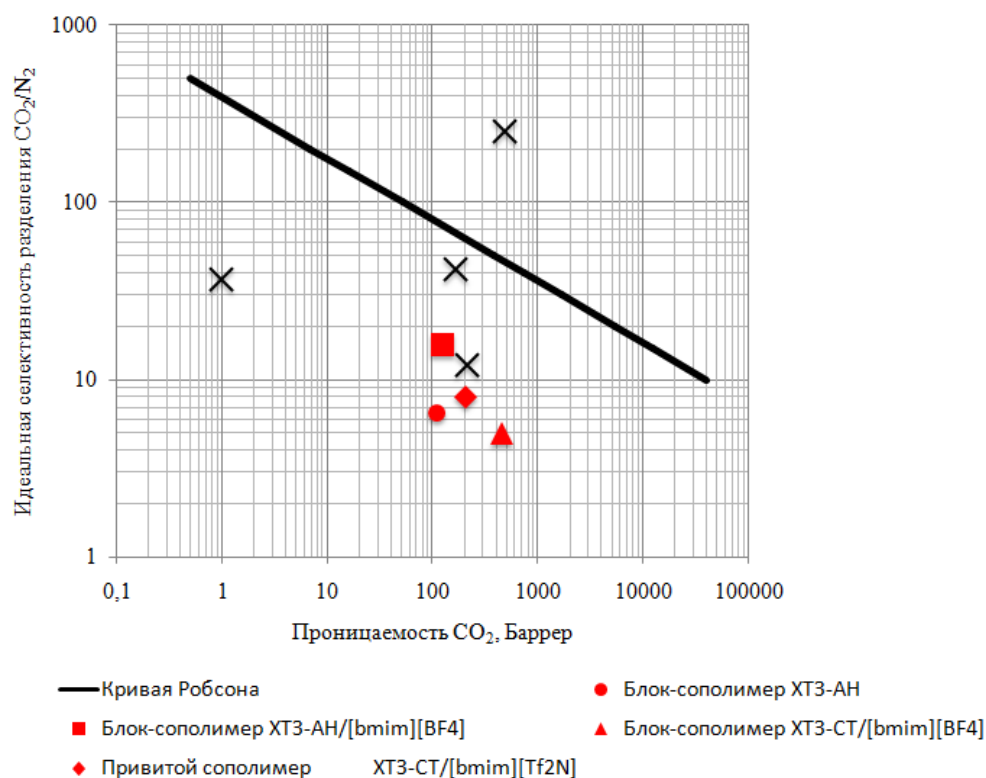


Рисунок 53 – Коэффициенты проницаемости мембран по тестовым газам

Полученные блок-сополимеры хитозана с АН оказались более проницаемы по отношению ко всем газам. Из рисунка 54 видно, что мембраны на основе производных хитозана по проницаемости CO_2 и селективности разделения CO_2/N_2 практически не отличаются от мировых аналогов – кривая Робсона (сводный график, показывающий последние достижения в области получения высокоэффективных разделительных мембран) [281].

Таблица 19 – Селективность полученных мембран

Состав	Блок- сополимер ХТЗ-АН		Привитой сополимер ХТЗ-СТ		Блок- сополимер ХТЗ-СТ	
	CO_2/CH_4	CO_2/N_2	CO_2/CH_4	CO_2/N_2	CO_2/CH_4	CO_2/N_2
Без ИЖ	7.8	6.3	-	-	-	-
[bmim][BF_4]	14.6	15.5	-	-	6.2	4.8
[bmim][Tf_2N]	1.6	1.9	8.6	7.6	1.5	3.0



Ри

сунок 54 – Кривая Робсона [281]

2.4. Флокулирующая, коагулирующая и сорбционная способности хитозана и его сополимеров

Одним из перспективных направлений крупномасштабного целевого использования хитозана и его производных, учитывая их высокие сорбционные и хелатообразующие способности является создание высокоэффективных реагентов: флокулянтов, коагулянтов и сорбентов для очистки сточных вод и процессов водоподготовки. Производственные сточные воды предприятий химической, нефтехимической, целлюлозно-бумажной, легкой, текстильной и других отраслей промышленности в большинстве случаев представляют собой слабо концентрированные, агрегативно-устойчивые эмульсии, коллоидные растворы или суспензии, содержащие отрицательно заряженные частицы размером 0.001-10 мкм [1]. В настоящее время для очистки сточных вод применяются методы коагуляции и флокуляции. По теории коагуляции Б.В. Дерягина и Л.Д. Ландау при уменьшении величины заряда коллоидных частиц,

т.е. при понижении значения электрокинетического потенциала, их способность к коагуляции возрастает. С наибольшей скоростью коагулируют коллоидные частицы, у которых заряд близок к нулю. Согласно представлениям Ла Мера [282], флокуляция представляет собой процесс адсорбции молекулярных цепочек на поверхности разных частиц коллоидного раствора и формирование мостиков полимера между отдельными частицами твердой фазы. В результате чего образуются флокулы, состоящие не из двух, а из большего числа частиц, которые при достижении критической массы выпадают в осадок.

В настоящее время круг катионных флокулянтов, выпускаемых промышленностью, ограничивается синтетическими сополимерами на основе амидов акриловой и метакриловой кислот, винилпиридинов, полиэтиленаминов [283]. В связи с этим расширение ассортимента и эффективности флокулянтов катионного типа остается актуальной задачей. Если учесть, что хитозан обладает высокой хелатообразующей способностью и может сорбировать практически все ионы металлов (за исключением ионов натрия и цезия), то открывается возможность получения на основе полисахарида и его производных универсального реагента, сочетающего функции флокулянта-сорбента и коагулянта для очистки сточных вод и процессов водоподготовки.

Целью данной части работы является сравнение эффективности флокуляции, сорбции и коагуляции модельных и реальных дисперсных систем сополимерами и метилированными производными хитозана с широко применяемыми катионными и анионными флокулянтами и низкомолекулярными коагулянтами. Для выявления универсальности были выбраны многопрофильные объекты как с процессов водоподготовки, так и сточные воды различных действующих производств г. Нижнего Новгорода и Нижегородской области: сточные воды МУП «Березовая пойма» и МУП «Артемовские луга», нефтесодержащие сточные воды завода автомобильных агрегатов (ЗАОА), сточные воды одного из гальванических производств, сточные воды лакокрасочного производства, речная вода с Сормовской водозаборной станции и сточные воды районных очистных сооружений г. Дзержинска.

Для оценки и сравнения флокулирующей активности хитозана и его привитых и блок-сополимеров использовали катионные полиэлектролиты марки «Praestol-851», представляющие собой сополимеры акриламида с кватернизованными аминокрилатами, анионоактивный «Praestol-2540» и полиакриловый флокулянт (ПАФ) применительно к модельной системе - 1%-ной дисперсии каолина в воде. Эта система характеризуется однородностью частиц по размерам и обеспечивает получение стабильных данных, вследствие чего широко применяется при изучении флокулирующих свойств водорастворимых полимеров [284]. В качестве коагулянта использовали сульфат алюминия и хлорид алюминия. Об эффективности флокуляции и коагуляции судили спектрофотометрическим методом по изменению светопропускания очищаемых растворов до и после обработки их соответствующими реагентами.

Из рисунка 55 видно, что наиболее эффективными флокулянтами являются сополимеры ХТЗ-АА.

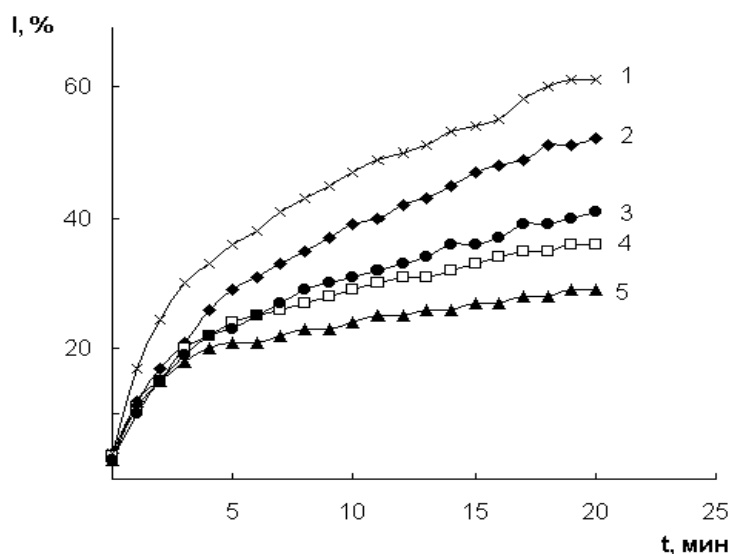


Рисунок 55 – Зависимость светопропускания модельных систем каолин-вода в присутствии различных флокулянтов от времени: 1- привитой сополимер ХТЗ-АА; 2 - исходная дисперсия каолина; 3-ХТЗ; 4 - ПАФ-ВМ; 5 -ПАФ.

Концентрация полимеров - 10^{-5} мас.%. (ПАФ – полианионный флокулянт)

В рассматриваемом случае адсорбция положительно заряженных макромолекул катионного сополимера могла происходить как за счет нейтрализации отрицательно заряженной поверхности каолина, так и за счет образования Н-

связей между функциональными группами сополимеров и гидратными слоями поверхности каолина.

Рассмотрим результаты, полученные на реальных объектах. Известно, что дисперсные частицы сточных вод г. Нижнего Новгорода, как и частицы каолина, отрицательно заряжены [283]. Причем, величина электрокинетического потенциала дисперсной фазы стоков, как показано нами в специальных опытах, составляет -70 мВ. Это объясняет высокую агрегативную устойчивость промышленных стоков - они сохраняются месяцами без признаков расслоения и осветления. Известно, что повышение флокулирующего действия высокомолекулярных соединений можно достичь при введении флокулянта методом «двойной добавки» [282]. Считается, что флокулы, образующиеся после прибавления первой порции раствора полимера, укрупняются при внесении второй порции, и скорость осветления дисперсии в итоге выше, чем при однократном введении флокулянта. Представлялось целесообразным модифицировать метод «двойной добавки», используя разные по природе флокулянты: на первой стадии – катионный (хитозан или его производные), на второй – анионный. Предполагалось, что при этом эффективность осаждения частиц может быть повышена за счет образования интерполимерных комплексов между катионным полимером, адсорбированным на частицах, и линейными макромолекулами анионного. Такую конструкцию можно уподобить «гроздьям на ветке» [282, 285]. Для того чтобы проверить это предположение, обработку дисперсий проводили тремя способами: 1) готовили раствор сополимеров и проводили осаждение; 2) вводили раствор сополимеров хитозана, затем раствор ПАФ; 3) вводили раствор ПАФ, затем сополимеров хитозана. Результаты осветления сточных вод МУП «Артемовские луга» представлены на рисунке 56.

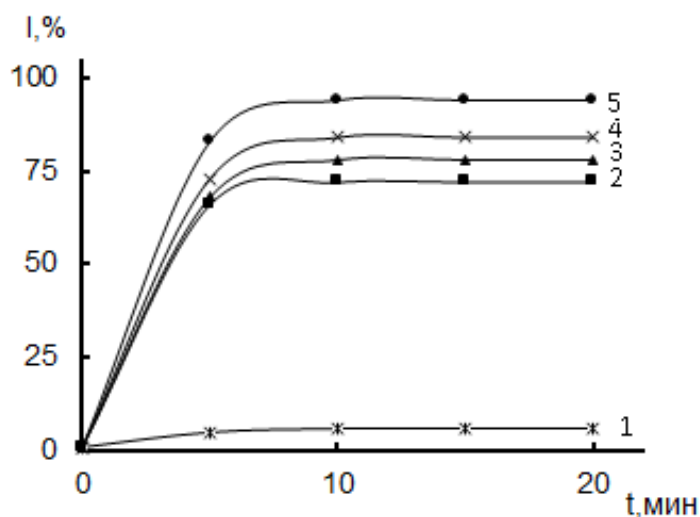


Рисунок 56 – Зависимость процента светопропускания от времени для сточных вод г.Н.Новгорода с МУП "Артемовские луга" в присутствии различных флокулянтов: 1 - исходная дисперсия; 2 - $C_{851}=5 \times 10^{-2}\%$ (концентрация "Праестола 851"); 3 - $C_{ХТЗ} = 10^{-2}\%$, $C_{ПАФ} = 5 \times 10^{-2}\%$; 4 - $C_{N-DMX} = 10^{-3}\%$ (концентрация N-диметил хитозана); 5 - $C_{N-DMX} = 10^{-2}\%$, $C_{ПАФ} = 5 \times 10^{-2}\%$

Сточные воды МУП "Березовая пойма" существенно чище и соответственно использовали другой уровень концентраций флокулянтов для их очистки. Результаты анализа представлены на рисунке 57. Как и следовало ожидать, последовательное введение флокулянтов - катионного и анионного более эффективно по сравнению с использованием индивидуальных компонентов. По-видимому, при его реализации образуются лабильные сетки из макромолекул привитого (катионного) и статистического (анионного) сополимеров, за счет интерполимерного взаимодействия.

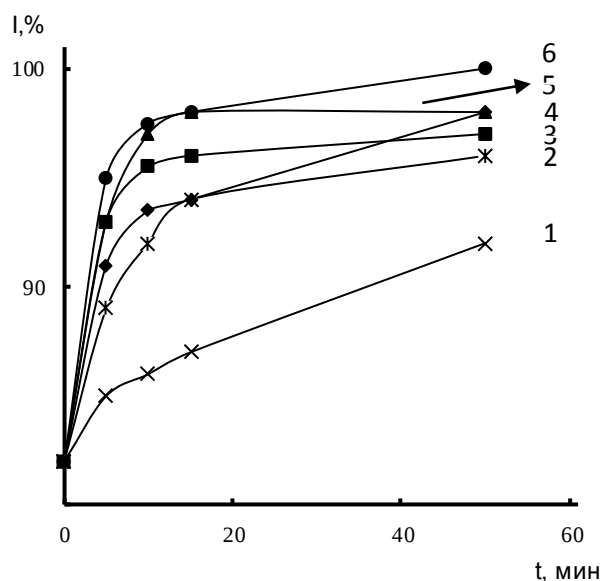


Рисунок 57 – Зависимость процента светопропускания от времени для сточных вод г.Н.Новгорода МУП "Березовая пойма" в присутствии различных флокулянтов: 1- исходная дисперсия; 2 - $C_{ХТЗ}=10^{-6}\%$; 3 - $C_{ПАФ}=10^{-6}\%$; 4 - $C_{N-DMX}=10^{-6}\%$; 5 - $C_{ХТЗ}=10^{-6}\%$, $C_{ПАФ}=10^{-6}\%$; 6 - $C_{N-DMX}=10^{-6}\%$, $C_{ПАФ}=10^{-6}\%$

Как уже отмечалось ранее, хитозан является нетоксичным, биосовместимым полимером, что послужило основанием для его использования в процессах подготовки питьевой воды. Совместно с Сормовской водозаборной станцией г. Нижнего Новгорода проводились испытания флокулянтов при очистке образцов речной воды. Было обработано 5 образцов речной воды, отличающейся, в основном, показателем мутности: 2.9; 2.6; 1.9; 1.6; 1.5 мг/дм³. В некоторых случаях для очистки воды добавляли незначительные количества коагулянта $Al_2(SO_4)_3$. Обработку и анализ воды проводили по ГОСТИрованным методикам, применяемым на водозаборной станции. В соответствии с ГОСТом вода после очистки должна иметь: мутность до 1.5 мг/дм³, цветность до 20 град, окисляемость до 5.0 мг O_2 /дм³. Результаты анализа представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Показатели качества обработанной речной воды

№	Количество введенного ХТЗ, %	Количество введенного ПАФ, %	Мутность	Цветность	Окисляемость	Al ₂ (SO ₄) ₃
1	Речная вода		2.9	35	10.4	
	5×10 ⁻⁵	5×10 ⁻⁶	2.6	30	12.6	
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	1.2	30	10.6	
	5×10 ⁻⁵		3.3	30	12.8	
		2.5×10 ⁻⁵	0.89	30	10.4	
	5×10 ⁻⁴	6×10 ⁻⁵	<0.58	24	10.6	
	5×10 ⁻⁴		<0.58	25	12.5	
		6×10 ⁻⁴	1.23	32	12.3	
2	Речная вода		1.9	35	10.2	
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	0.89	32	9.9	
	5×10 ⁻⁶	5×10 ⁻⁶	0.89	32	10.09	
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	0.55	32	10.2	
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	0.55	30	10.7	5×10 ⁻⁴
3	Речная вода		1.6	35	9.9	
	5×10 ⁻⁴	6×10 ⁻⁵	<0.58	23	8.96	
	10 ⁻⁴	6×10 ⁻⁵	0.7	27	9.44	10 ⁻³
4	Речная вода		1.5	35	10	
	10 ⁻⁴	6×10 ⁻⁵	<0.58	30	10.88	10 ⁻⁶
	4×10 ⁻⁵ N-ДМХ	6×10 ⁻⁵	0	30	10.88	
	10 ⁻⁵ N-ДМХ	6×10 ⁻⁵	<0.58	30	10.88	10 ⁻⁶
5	Речная вода		1.6	35	10	
	5×10 ⁻⁴ подш	6×10 ⁻⁵	0.35	20	7.36	4×10 ⁻³
	10 ⁻⁴ подш	6×10 ⁻⁵	0.35	20	5.6	7×10 ⁻³
	5×10 ⁻⁵ подш	6×10 ⁻⁵	0.6	25	5.92	7×10 ⁻³
	10 ⁻⁶ подш	6×10 ⁻⁵	0.6	25	7.04	8×10 ⁻³

Из таблицы 20 видно, что обработка речной воды хитозаном вызывает осадения взвешенных в ней частиц - наиболее эффективны концентрации ХТЗ –

$5 \times 10^{-4} \%$ и ПАФ– $6 \times 10^{-5} \%$, при этом образуются крупные хлопья, которые за 20 мин оседают на стенках и дне сосуда. В результате достигается значительное (<0.58 , существенно ниже ГОСТа) снижение мутности, а такие показатели, как цветность и окисляемость, находятся на уровне ~ 30 и ~ 10 ед., соответственно. Применение модифицированного хитозана (частично сшитого, привитого) позволяет снизить и эти показатели до ~ 20 , ~ 7 ед., соответственно (см. приложение 1).

Совместно с сотрудниками химической лаборатории отдела качества завода автомобильных агрегатов (ЗААг) г. Нижнего Новгорода были проведены лабораторные испытания флокулянтов на реальных объектах – нефтесодержащих сточных водах ЗААг. Испытания проводились в двух режимах:

1. очистка флокулянтном нефтесодержащих сточных вод, на входе во флотаторы (исходные), с содержанием нефтепродуктов от 270 до 2530 мг/л;
2. очистка флокулянтном сточных вод, из флотаторов (после рециркуляции), с содержанием нефтепродуктов от 20 до 720 мг/л.

В обоих случаях были получены положительные результаты. Степень очистки сточных вод составила до 99.8%, что в рамках производственного цикла обеспечивало сброс сточных вод с содержанием нефтепродуктов в пределах норм ПДК (см. приложение 2).

Сорбционную способность хитозана и его производных исследовали на сточных водах районных очистных сооружений (РОС) г. Дзержинска (Нижегородская обл.), содержащих как взвешенные частицы, так и ионы металлов. Использовали несколько модификаций хитозана. Во всех случаях в качестве второго компонента применяли анионоактивный акриловый сополимер. Результаты обработки воды бинарными композициями различных составов приведены в таблицах 21-23. Определяли как осветление воды, так и изменение содержания ионов железа, кальция, магния. Содержание ионов металлов определяли в соответствии с используемыми ГОСТированными методиками.

Совокупность приведенных результатов доказывает бифункциональность разработанных композиций - их эффективность и как флокулянтов, и как сорбентов ионов металлов.

Таблица 21 – Оптическая плотность воды через 60 мин после введения разных концентраций флокулянтов; оптическая плотность воды до обработки D_0 = 0.296

Содержание Привитой сополимер ХТЗ-АА+ПАФ, %	Оптическая плотность воды после обработки D	$\frac{D_0}{D}$
$5 \times 10^{-5} + 10^{-5}$	0.115	2.57
$5 \times 10^{-5} + 5 \times 10^{-6}$	0.101	2.77
$5 \times 10^{-5} + 10^{-6}$	0.170	1.70

Таблица 22 – Содержание ионов железа через 60 мин после введения флокулянтов-сорбентов; исходное содержание ионов железа $X_0 = 1.23$ мг/дм³

Содержание ХТЗ+ПАФ, %	Содержание ионов железа в обработанной воде X, мг/ дм ³	Степень уменьшения содержания ионов железа, $\frac{X_0}{X}$
$5 \times 10^{-5} + 10^{-5}$	0.803	1.53
$5 \times 10^{-5} + 5 \times 10^{-6}$	0.258	4.76
$5 \times 10^{-5} + 10^{-6}$	0.427	2.69

Показано, что флокулянты-сорбенты на основе модифицированного хитозана снижают в 4.7 раза содержание ионов железа, в 1.8 раза содержание ионов кальция и в 3.5 раза содержание ионов магния. Концентрации по ионам железа, кальция и магния снижаются до уровня ПДК. Существенно, что использование подобных флокулянтов-сорбентов не требует изменений существующих технологических линий очистных сооружений. В стадии

разработки находится способ получения товарной формы флокулянта-сорбента на основе биополимера хитозана в виде пористых гранул, для извлечения ионов металлов из отходов различных производств.

Таблица 23 Уменьшение общей жесткости воды и содержание в ней ионов кальция и магния относительно необработанной флокулянтами воды. Содержание флокулянтов: $5 \times 10^{-5}\%$ хитозана и $5 \times 10^{-6}\%$ ПАФ

C_0/C	$C_0(Ca^{2+})/C(Ca^{2+})$	$C_0(Mg^{2+})/C(Mg^{2+})$	t, мин
1.10	1.07	1.23	10
1.18	1.15	1.35	20
1.31	1.28	1.49	30
1.41	1.35	1.71	40
1.55	1.48	1.96	50
1.73	1.77	2.86	60
1.94	1.84	3.51	70
2.02	1.84	3.51	80

Сорбционные свойства хитозана были также апробированы при очистке сточных вод одного из гальванических производств г. Нижнего Новгорода (таблица 24). Из таблицы 24 видно, что содержание ионов $Cr^{(3+,2+)}$ и Cu^{2+} снижается на 85-90%, $Fe^{(3+,2+)}$ и Ni^{2+} - на 60-66%, Zn^{2+} - на 50%.

Таблица 24 –Изменение содержания ионов металлов в гальваностоках

Режим очистки	Cr общ.		Fe общ.		Cu ²⁺		Zn ²⁺		Ni ²⁺	
	Конц	Степень очистки %	Конц	Степень очистки %	Конц	Степень очистки %	Конц	Степень очистки %	Конц	Степень очистки %
[ХТЗ]= 0.5 мас%. Перемеш. 15 мин.	0.48	85.2	0.39	69.8	0.23	83.5	4.44	38.4	0.33	54.8
[ХТЗ]= 1 мас%. Перемеш. 15 мин.	0.36	88.9	0.51	60.5	0.11	92.2	5.01	30.5	0.26	65.8
[ХТЗ]= 2 мас%. Перемеш. 60 мин.	1.87	42.5	0.58	55.0	0.17	87.9	1.34	81.4	0.47	52.5
ПДК, мг/дм ³	0.05	—	0.02	—	0.09	—	0.1	—	0.13	—
Исходные гальваностоки pH=5.63	3.25	—	1.29	—	1.40	—	7.21	—	0.73	—

Наработанный опыт по получению олигомеров хитозана в присутствии окислительно-восстановительной системы пероксид водорода-аскорбиновая кислота и известные теоретические закономерности процесса коагуляции послужили основой для проверки низкомолекулярного хитозана и его производных в качестве коагулянтов при очистке сточных вод производства акрилатных латексов. Поскольку механизм коагуляции связан со снижением значения ζ -потенциала в присутствии электролитов и определяется зарядом коагулирующего иона, то в качестве коагулянтов были исследованы олигомеры хитозана с $MM < 5000$, заряд которых существенно выше, чем заряд ионов Al^{3+} наиболее часто применяемых коагулянтов $AlCl_3$ и $Al_2(SO_4)_3$.

Для решения поставленных задач, предварительно был определен порог коагуляции и величина ζ -потенциала латекса, который является количественной характеристикой устойчивости коллоидной системы, до и после обработки

различными концентрациями олигомеров хитозана и его производных в сравнении с AlCl_3 . Результаты представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Значения порога коагуляции и ζ -потенциала для полиметакрилатного латекса с различными коагулянтами

Коагулянт	Порог коагуляции S_k , %	ζ^* , мВ
AlCl_3	0.040	22.3
Низкомолекулярный хитозан (ММ=4500)	0.005	21.9
N,N-диметилхитозан (мольное соотношение реагентов в синтезе $[\text{XT3}]/[\text{CH}_2\text{O}]/[\text{HCOOH}]=1/0.25/5$)	0.0005	20.7
N,N-диметилхитозан (мольное соотношение реагентов в синтезе $[\text{XT3}]/[\text{CH}_2\text{O}]/[\text{HCOOH}]=1/1/1$)	0.00038	20.3

* ζ – потенциал латекса 31.8 мВ.

Выявлено существенное преимущество катионов олигохитозана по сравнению с AlCl_3 : величина ζ -потенциала снижается до 21.9 мВ при концентрации олигохитозана 0.005 мас.%, и достигает 20.3 мВ при концентрации N,N-диметилхитозана на порядок меньше (0.00038 мас.%). Порог коагуляции для N,N-диметилхитозана в 100 раз меньше, чем для хлорида алюминия.

Таким образом, совокупность полученных результатов показывает, что на базе одного полисахарида хитозана и его модифицированных форм возможно получение как коагулянтов, так и флокулянтов-сорбентов. Испытания, проведенные в лабораторных условиях действующих производств предприятий г. Нижнего Новгорода показали, что по эффективности предлагаемые композиции не уступают лучшим зарубежным флокулянтам и являются конкурентноспособными. Они могут применяться для: очистки воды от ионов

металлов и других вредных примесей, связывания и удаления белковых компонентов, очистки промышленных и бытовых стоков, нефтесодержащих сточных вод промышленных предприятий, автомоек. Экологическая чистота и полное отсутствие токсичности определяют перспективность их использования в процессах водоподготовки. Если учесть, что хитозан является биосовместимым и биоразлагаемым полимером, то можно рассматривать перспективу решения проблемы по биоутилизации полимерсодержащих осадков, полученных в результате очистки стоков.

2.5. Биоразложение сополимеров на основе хитозана и виниловых мономеров

Создание и внедрение биоразлагаемых материалов на основе хитозана и синтетических полимеров позволит подойти к решению двух актуальных проблем современности: во-первых, экологической – утилизации отходов производства и использования полимерных материалов, во-вторых – биомедицинской – разработки биосовместимых материалов с заданным уровнем эксплуатационных характеристик при определенном времени службы в организме.

Экологическая проблема в полной мере проявилась около 20 лет назад и ее решение в настоящее время наметилось лишь в отношении отходов упаковочных материалов на основе полиэтилена и его производных. По оценкам специалистов мировое производство полимеров к 2010 году составило ~ 260 млн. тонн в год, а прогнозируемый их ежегодный прирост составит в ближайшее время 5.5% в год, что приведет к еще большему усугублению ситуации. Определенный прорыв из сложившейся ситуации наметился с внедрением инновационных биотехнологий по созданию биоразлагаемых материалов [286]. Работы, посвященные созданию такого рода биоразлагаемых композитов, описаны в основном в патентной литературе [287-293]. Ведущие мировые компании BASF, DuPont, BAYER приступили к их выпуску. В работе [294] представлен обзор линейки биodeградируемых полимеров. Обращает на себя внимание, что все

анализируемые полимеры относятся к гетероцепным полимерам, содержащих в структуре цепей эфирные и амидные связи, а также природным класса полисахаридов. Однако эти достижения не снижают экологической напряженности, связанной с производством и использованием крупно- и среднетоннажных полимеров на основе мономеров винилового ряда, которые в ближайшие десятилетия, безусловно, будут выпускаться отечественной и зарубежной промышленностью. Потому актуальной является задача разработки биodeградируемых материалов на основе именно этих полимеров.

В настоящее время отсутствуют систематические фундаментальные исследования, которые бы раскрыли роль различных факторов, влияющих на процесс биодеструкции полимеров. Для понимания механизма биodeградации важно рассматривать не только факторы физико-биологической составляющей процесса - температура, кислород, влага, воздействие микроорганизмов, химическую природу самого полимера, но и, что принципиально важно, продуктов его разложения, также дискутируется вопрос о роли молекулярной массы сополимера и длине участков синтетических фрагментов его цепей [294]. Последние играют важную роль в организации надмолекулярной структуры полимера, образовании зон кристалличности в нем, активных центров для адсорбции энзимов, а возможно и их активности. Комплексный подход к выявлению зависимости способности сополимеров к биодеструкции от их структуры, состава и молекулярной массы с привлечением современных методов исследования - физико-механических, аналитических и реологических - позволит расширить представления о биоконверсии полимерных композитов и сформулировать основные принципы создания материалов с регулируемым временем биоразложения на основе полимеров винилового ряда в композиции их с природными.

В связи с вышеизложенным, целью данной части исследования являлось изучение начальных стадий деструкции микромицетами композиций на основе природных и синтетических полимеров винилового ряда. В качестве объектов исследования были выбраны пленочные материалы на основе блок- и привитых

сополимеров хитозана с виниловыми мономерами (МА, АА, АН) и смесевые композиции на их основе.

На примере сополимеров хитозана с МА была детально изучена деструкция пленочных материалов грибами, которую контролировали не только по степени обрастания микромицетами материалов, но и по изменению физико-механических свойств (σ , ϵ) пленок и молекулярно-массового распределения ПМА в сополимерах. Изучение проводилось как на индивидуальных видах микромицетов, так и на их ассоциатах.

В таблице 26 представлены результаты оценки роста стандартных культур микромицетов на исследуемых полимерных материалах. Анализ этих результатов показывает, что данные композиции способны подвергаться биодegradации микромицетами. При этом их способность к биодegradации различна под действием разных грибов. Привитой сополимер хитозана с МА, блок-сополимер хитозана с МА, привитой сополимер хитозана с АН подвергаются деструкции большим видовым составом грибов по сравнению с сополимерами хитозана с АА. Наиболее активными деструкторами для всех исследованных композиций оказались: *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium cyclopium*, *P. funiculosum*, *Trichoderma viride*.

Таблица 26 – Исследования устойчивости ряда полимерных композиций к действию микромицетов

№	Материал	Вид микромицета / Интенсивность развития плесневых грибов, балл										
		Метод 1 (ГОСТ 9.049-91) [9]										
		A. oryzae ВКМ F-2096	A. niger ВКМ F-1119	A. terreus ВКМ F-1025	Chaet. globosum ВКМ F-109	Paecil. variotii ВКМ F-378	Penic. funiculosus ВКМ F-1115	Penic. chrysogenum ВКМ F-245	Penic. cyclopium F-245	Trich. viride F-1117	Ассоциация Грибов	Активные биодegradанты
1	Привитой сополимер ХТЗ – МА	3	5	3	4	4	4	4	5	2	4	A. nig., P. cyclop.
2	Блок-сополимер ХТЗ – МА	3	3	5	5	3	4	4	5	4	4	A. terr., Chaet. globos., P. cyclop.
3	Привитой сополимер ХТЗ – АА	2	2	2	3	1	3	1	1	1	2	P. funicul., A. terr.
4	Смесь привитого сополимера ХТЗ-АА+ПАА	1	2	3	3	1	1	1	1	1	1	A. terr., Chaet. globos.
5	Привитой сополимер ХТЗ-АН	3	3	4	4	4	4	4	5	5	4	P. cyclop., Tr. viride

В таблице 27 представлены данные по устойчивости отдельных компонентов полимерных композиций к действию ассоциации микромицетов. Обращает на себя внимание тот факт, что индивидуальные гомополимеры (ПМА, ПАН), входящие в состав биоразлагаемых сополимеров, проявили устойчивость к действию грибов, тогда как хитозан и полиакриламид легко подвергались микробной деструкции. Это подтверждает предположение о том, что о грибостойкости полимерных композиций (сополимерных или механических) нельзя судить только исходя из грибостойкости их составляющих [295].

Таблица 27 – Устойчивость ряда полимеров к действию микромицетов (ассоциативная культура по ГОСТ 9.049-91)

Вид полимера	Грибостойкость в баллах (метод 1)	Оценка грибостойкости
Хитозан	5	Негрибостойкий
Полиметилакрилат	1	Грибостойкий
Полиакриламид	3	Негрибостойкий
Полиакрилонитрил	2	Грибостойкий

Одновременно была проведена серия биохимических экспериментов по оценке роли отдельных ферментов грибов: оксидоредуктаз (каталаза, пероксидаза) и гидролаз (хитозаназа, протеаза, эстераза) в деструкции ими синтезированных нами полимерных композиций. В данной серии экспериментов мы использовали культуры двух видов грибов *Aspergillus terreus* и *Penicillium cyclopium*, являющихся наиболее активными биodeградантами исследованных полимерных композиций. Результаты представлены в таблицах 28 и 29.

Во всех вариантах опыта отмечалось значительное увеличение хитозаназной активности по сравнению с контролем, что позволяет говорить о значительной доступности в качестве источника питания природного компонента полимерных композиций – хитозана. Повышение активности хитозаназы при деструкции культурами грибов *Aspergillus terreus* и *Penicillium cyclopium* различных полимерных композиций происходило неодинаково, что может быть связано как с физиолого-биохимическими особенностями грибов, так и с химическим составом полимеров.

Таблица 28 – Активность экзоферментов *Aspergillus terreus* в процессе деструкции им полимерных композиций

Название образца	Ферменты	Активность	
		опыт	контроль
Привитой сополимер ХТЗ- АА [АА]/[ХТЗ]= 9.5 моль/осново-моль	Хитозаназа (мг глюкозы/мг белка×час)	708.00	13.40
	Протеиназа кислая (мкМ тирозина/мг белка×час)	следы	следы
	Протеиназа щелочная (мкМ тирозина/мг белка×час)	432.00	следы
Привитой сополимер ХТЗ- АН [АН]/[ХТЗ]= 3 моль/осново-моль	Хитозаназа (мг глюкозы/мг белка×час)	893.00	54.00
	Пероксидаза (у.е.)	25.02	10.32
	Каталаза (у.е.)	91.23	24.78

$p < 0.05$

Таблица 29 – Активность экзоферментов *Penicillium cyclopium* в процессе деструкции им полимерных композиций

Название образца	Ферменты	Активность	
		опыт	контроль
Привитой сополимер ХТЗ-МА [МА]/[ХТЗ]= 1.9 моль/осново-моль	Хитозаназа (мг глюкозы/мг белка×час)	957.00	152.00
	Эстераза (мл 0.05N NaOH/мг белка×час)	1.20	1.98
Блок-сополимер ХТЗ- МА [МА]/[ХТЗ]= 2.5 моль/осново-моль	Хитозаназа (мг глюкозы/мг белка×час)	191.00	23.00
	Эстераза (мл 0.05N NaOH/мг белка×час)	3.45	6.46

$p < 0.05$

Синтетическая часть композиций использовалась грибами не во всех вариантах опытов, что определенным образом согласуется с явлением диауксического роста у микроорганизмов, т.е. сначала утилизируется наиболее

доступный субстрат [296]. Отмечено увеличение активности щелочной протеазы гриба *Aspergillus terreus* в присутствии привитого сополимера ХТЗ-АА, обусловленное тем, что в АА имеется амидная связь, которая расщепляется протеазами гриба. Это обеспечивает возможность роста гриба как за счет хитозана, так и за счет функциональных групп полиакриламида. Для данного гриба отмечено также увеличение активности экзooksидоредуктаз (каталазы, пероксидазы) при деструкции привитого сополимера хитозана с АН. Можно предположить, что эти ферменты определенным образом также способны участвовать в разрушении данного полимера.

Анализ потери массы и изучение состава сополимеров, а также увеличение во всех опытах хитозаназной активности показал, что на начальных стадиях деструкции затрагивается хитозановая часть композиций. Дальнейшая потеря массы композиций, после разрушения в них фрагментов полисахарида, дала основание предположить, что разрушается и синтетическая часть материала. Это подтверждается проведенными экспериментами по определению изменения молекулярной массы и физико-механических характеристик сополимеров ХТЗ-МА до и после 2, 4, 6, 12 и 20-ти недельного воздействия грибов *Penicillium cyclopium* и *Aspergillus terreus*. Результаты представлены в таблицах 30, 31 и рисунках 58, 59.

Из таблиц 30, 31 видно, что как в случае привитых, так и в случае блок-сополимеров наблюдается ухудшение физико-механических свойств – разрушающего напряжения и деформации при разрыве, которое свидетельствует о биодegradации полимеров [297-299]. В контрольных опытах эти показатели остаются без изменений.

Таблица 30 – Изменение физико-механических свойств пленок гибридного блок-сополимера ХТЗ-МА от времени воздействия на него гриба вида *Aspergillus terreus*. ([МА]/[ХТЗ]= 3.3 моль/осново-моль)

Время, недели	σ, МПа			ε, %		
	контроль	под газон	на газон	контроль	под газон	на газон
0	36.0	36.0	36.0	17.0	17.0	17.0
4	37.0	29.5	21.7	20.0	6.8	3.6
6	33.6	28.6	18.7	18.0	5.0	3.1
12	36.8	28.6	11.9	17.0	2.6	3.3
20	35.9	28.0	-	16.0	3.2	-

Таблица 31 – Изменение физико-механических свойств пленок гибридного привитого сополимера ХТЗ-МА от времени воздействия на него гриба вида *Penicillium cyclopium* ([МА]/[ХТЗ]= 3.3 моль/осново-моль)

Время, недели	σ, МПа			ε, %		
	контроль	на газон	суспензия	контроль	на газон	суспензия
0	32.0	32.0	32.0	18.0	18.0	18.0
2	29.0	-	29.0	19.0	-	28.0
4	28.9	26.4	28.9	20.0	37.9	26.0
6	27.0	22.1	22.0	19.0	7.6	7.0
20	26.0	23.3	19.0	18.1	7.3	8.0

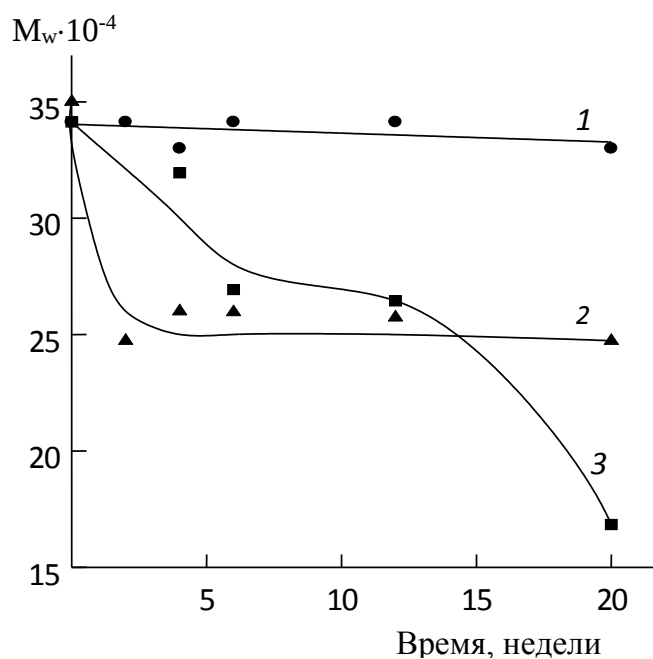


Рисунок 58 – Изменение молекулярной массы цепей полиметилакрилата от времени воздействия на гибридный блок-сополимер ХТЗ-МА гриба вида *Aspergillus terreus*: 1- контроль, 2 - под газон, 3 - на газон ([МА]/[ХТЗ]= 3.3 моль/осново-моль.)

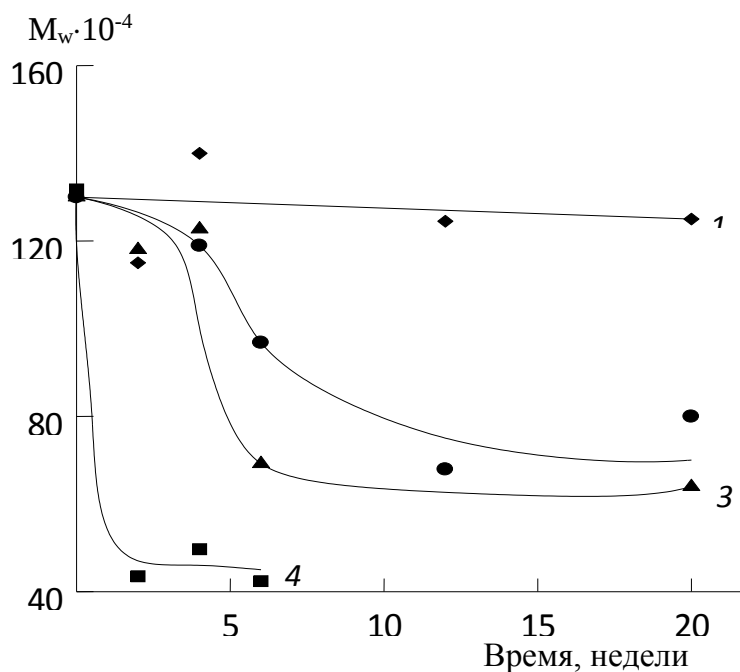


Рисунок 59 – Изменение молекулярной массы цепей полиметилакрилата от времени воздействия на гибридный привитой сополимер ХТЗ-МА гриба вида *Penicillium cyclopium*: 1 - контроль, 2 - на газон, 3 - под газон, 4 -сuspension ([МА]/[ХТЗ]= 3.3 моль/осново-моль.)

Выявлено существенное различие в поведении композиций под действием разных видов грибов *Penicillium cyclopium* и *Aspergillus terreus* и продуктов их жизнедеятельности. Для блок-сополимеров (таблица 30) падение прочностных характеристик под действием *Aspergillus terreus* монотонно в течение всего времени эксперимента (20 недель) и пленки практически полностью теряют пластичность (вариант на газон). Продукты жизнедеятельности гриба *Aspergillus terreus* оказывают несущественное влияние на физико-механические показатели пленок (вариант под газон). Другая картина наблюдается для привитого сополимера. В данной серии нами исследовалось изменение физико-механических характеристик при росте *Penicillium cyclopium* в варианте на газон, а вместо варианта под газон – полимерная композиция инокулировалась суспензией спор данного гриба (вариант суспензия). В обоих случаях наблюдалось в 1.5 раза снижение как величины разрушающего напряжения, так и деформации при разрыве (варианты на газон и суспензия). Это указывает на то, что разрушение пленок происходит не только под действием гриба, но и продуктов его жизнедеятельности. Изменение физико-механических свойств пленок связано с разрушением структуры сополимера. Грибы проникают в полимерную пленку и в процессе их жизнедеятельности происходит разрушение как ее надмолекулярной структуры, так и строения макроцепей [297-299], что и приводит к ухудшению физико-механических свойств композиций. Следует отметить, что наблюдаемое падение происходит в первые 6 недель и затем физико-механические показатели остаются практически неизменными.

На рисунке 60 представлены фотографии образцов, подвергнутых воздействию микромицетов через 2 и 12 недель, позволяющие провести визуальную оценку биоконверсии. На фотографиях отчетливо видно, что все образцы «на газон» уже через 12 недель практически полностью зарастают мицелиями. Образцы «под газон» равномерно окрашиваются, по-видимому, вследствие химического взаимодействия продуктов жизнедеятельности грибов с компонентами пленки, что, как отмечалось раньше, вносит дополнительный вклад в изменение их физико-механических характеристик.

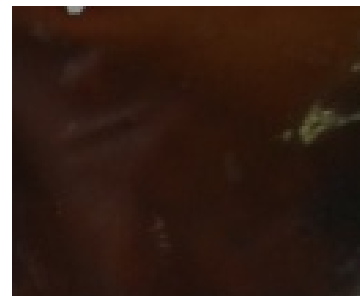


контроль



на газон

2 недели



под газон

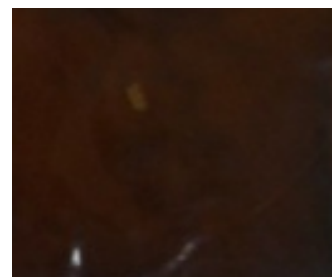


контроль



на газон

12 недель



под газон

Рисунок 60 – Фотографии образцов пленок через 2 и 12 недель после заражения *Aspergillus terreus*

Сопоставление полученных результатов с данными по изменению ММ (рисунки 58, 59) показывает, что именно в первые 6 недель происходит резкое снижение молекулярной массы цепей ПМА входящего в состав блок- и привитых сополимеров ХТЗ-МА. Молекулярная масса привитых цепей снижается в ~ 3 раза с 1.3×10^6 до 4.0×10^5 и далее остается практически неизменной. Для блок-сополимеров также наблюдается корреляция между изменением физико-механических свойств и ММ. Оба параметра изменяются монотонно в течение всего времени эксперимента - ММ снижается с 3.5×10^5 до 1.6×10^5 .

Таким образом, как в случае привитых, так и блок-сополимеров изменение ММ ПМА в составе сополимеров указывает на адаптацию микромицетов к синтетической составляющей сополимеров и непосредственное включение ПМА в метаболизм грибов, преводящее к снижению ММ ПМА: у привитых сополимеров на 900 000, у блок-сополимеров – на 190 000. Однако, следует

отметить, что в обоих случаях через определенное время процесс биodeградации останавливается, ММ ПМА перестает изменяться и достигает постоянного значения. По-видимому, несмотря на адаптацию микромицетов к синтетической составляющей сополимеров ПМА не является полноценным источником их питания, а практически полное исчерпание хитозановых фрагментов в сополимере в процессе жизнедеятельности грибов, приводит к нарушению биосинтеза их ферментов и прекращению процесса биодеструкции.

На основании полученных результатов можно сделать следующие принципиальные выводы:

- синтетические полимеры модифицированные ХТЗ включаются в процесс метаболизма грибов и подвергаются биоразрушению;
- Существует оптимальное значение молекулярной массы синтетического полимера ($4.0 \times 10^5 - 6.0 \times 10^5$) при котором может быть достигнуто создание композиционного материала, полностью биodeградируемого.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности создания гибридных природно-синтетических полимеров хитозана с (мет)акрилатами с высокими физико-механическими свойствами и регулируемым временем биоразложения.

2.6. Гидрогели на основе хитозана и его сополимеров

Еще одним перспективным направлением использования ХТЗ и его производных является создание биосовместимых гидрогелей, способных составлять конкуренцию существующим аналогам в качестве транспортных форм лекарственных препаратов различного назначения, ранозаживляющих покрытий, имплантируемых протезов, гидропоников и т.д. [26, 165]. Как показано в обзоре литературы, формирование трехмерной сетки гелей в большинстве случаев происходит в присутствии бифункционального сшивающего агента и может протекать либо по конденсационному механизму, либо в результате радикальной полимеризации. Существенное влияние на физико-механические характеристики

(модуль упругости, оптическую прозрачность, напряжение на изгиб), pH и термочувствительность гелей, способность к набуханию оказывает не только природа полимера, но и природа, концентрация сшивающего агента.

В настоящей работе при получении гелей на основе хитозана и его привитых сополимеров были использованы различные сшивающие агенты: глутаровый альдегид (ГА), диазид терефталевой кислоты (ДАТФ) и N,N-метилден-бис-акриламид (МБАА). Формирование трехмерной сетки гелей в первых двух случаях проходило по конденсационному механизму при участии функциональных групп хитозана, а в последнем (МБАА) - в результате “сшивания” цепей винилового мономера (АА) в процессе его привитой полимеризации на ХТЗ.

Одним из наиболее доступных и высокоэффективных бифункциональных сшивающих агентов, применяемых для синтеза гидрогелей на основе хитозана является глутаровый альдегид [300]. В работах [300, 301] показано, что первой стадией процесса сшивки макроцепей хитозана в присутствии ГА является образование оснований Шиффа в результате взаимодействия депротонированных аминогрупп полисахарида с моно- или дигидратированной формой диальдегида (рисунок 61).

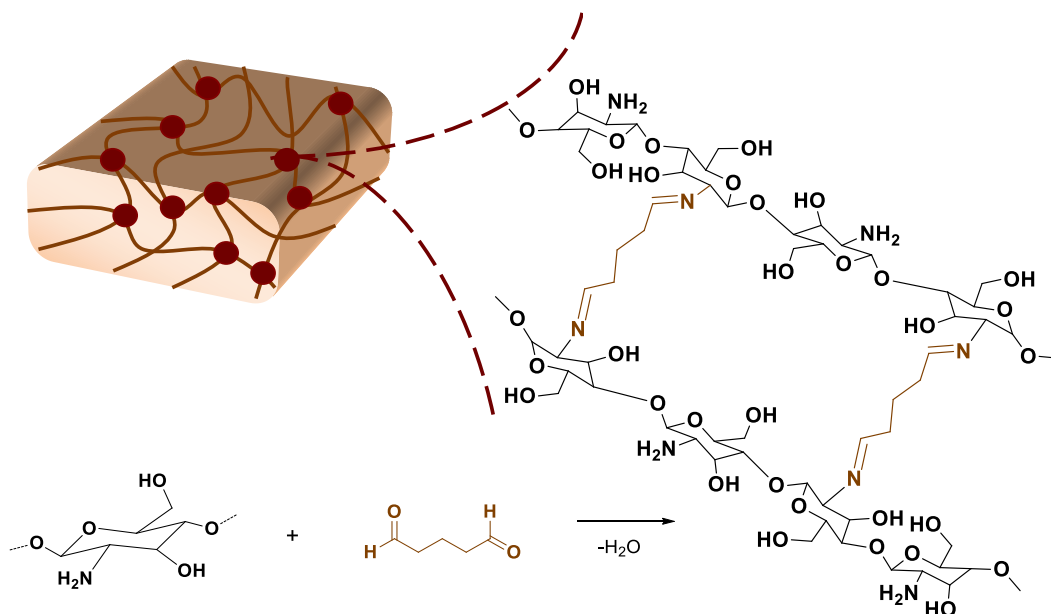


Рисунок 61 – Схема образования гидрогеля хитозана с использованием в качестве сшивающего агента глутарового альдегида

Оптимальная концентрация сшивающего агента, обеспечивающая значительное увеличение вязкости при сохранении текучести геля, была установлена на основании анализа зависимости вязкости гидрогелей от количества добавленного сшивающего агента (рисунок 62).

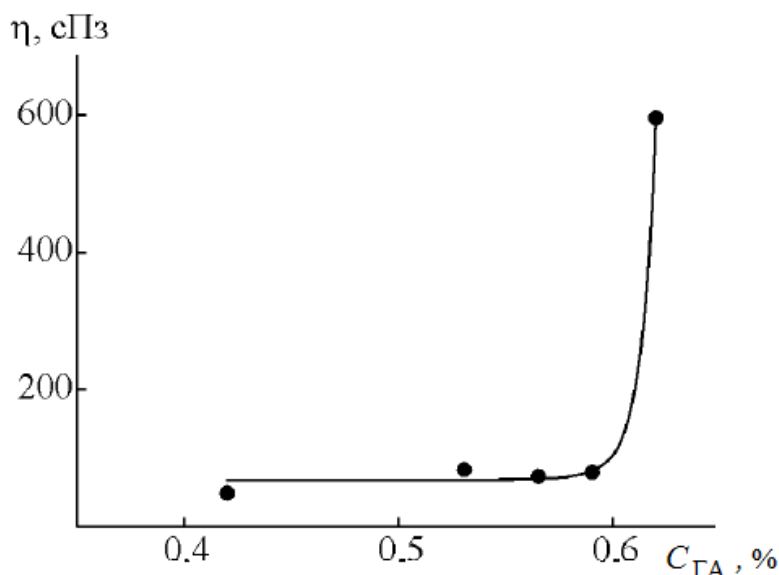
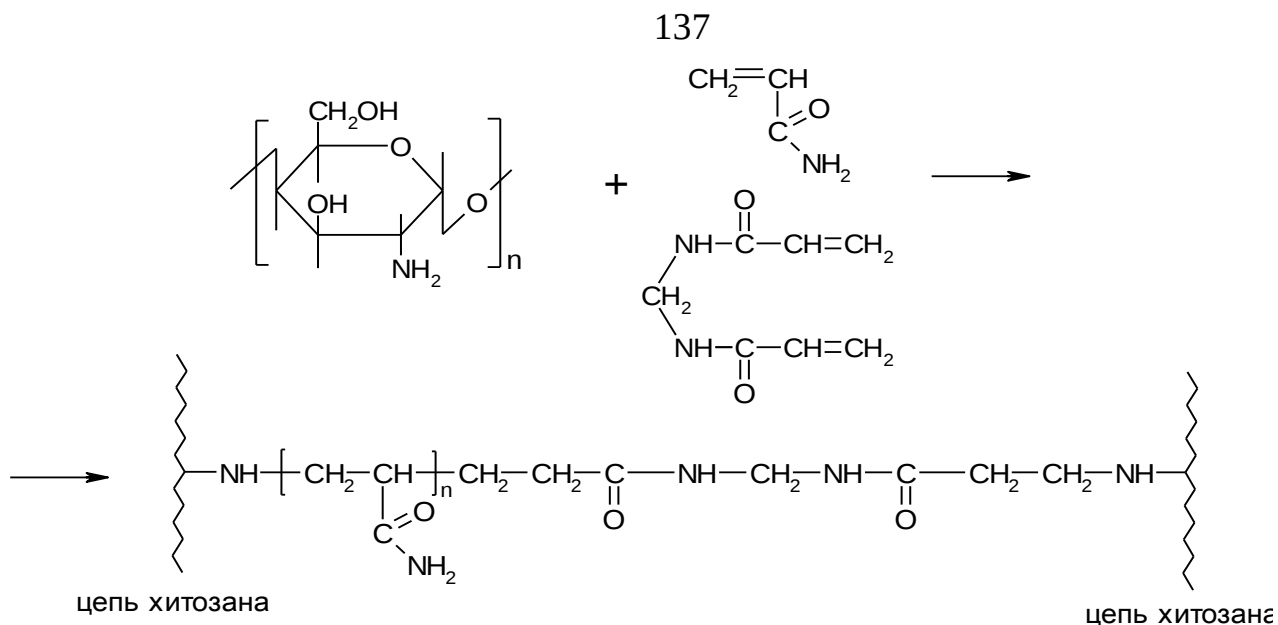


Рисунок 62 – Зависимость динамической вязкости (η , сПз) гидрогеля хитозана от концентрации сшивающего агента (% по отношению к массе хитозана)

Характерно, что до определенной (критической) концентрации сшивающего агента вязкость гидрогелей не изменялась. При концентрациях ГА свыше $1.8 \cdot 10^{-2}\%$ наблюдалось резкое увеличение вязкости образующихся гидрогелей, при содержании ГА свыше $2.1 \cdot 10^{-2}\%$ происходило формирование нетекучих формоустойчивых гелей. В соответствии с полученными данными было выбрано оптимальное содержание сшивающего агента, которое составило $1.80 \cdot 10^{-2}$ – $1.95 \cdot 10^{-2}\%$ от массы раствора полисахарида.

Формирование трехмерной структуры геля при использовании МБАА будет реализовываться за счет сшивания цепей образующихся в процессе привитой радикальной полимеризации винилового мономера на полисахарид по схеме:



На рисунке 63 приведены физико-механические свойства гидрогелей, полученных в присутствии различных концентраций сшивающего агента для образцов с различной молекулярной массой хитозана.

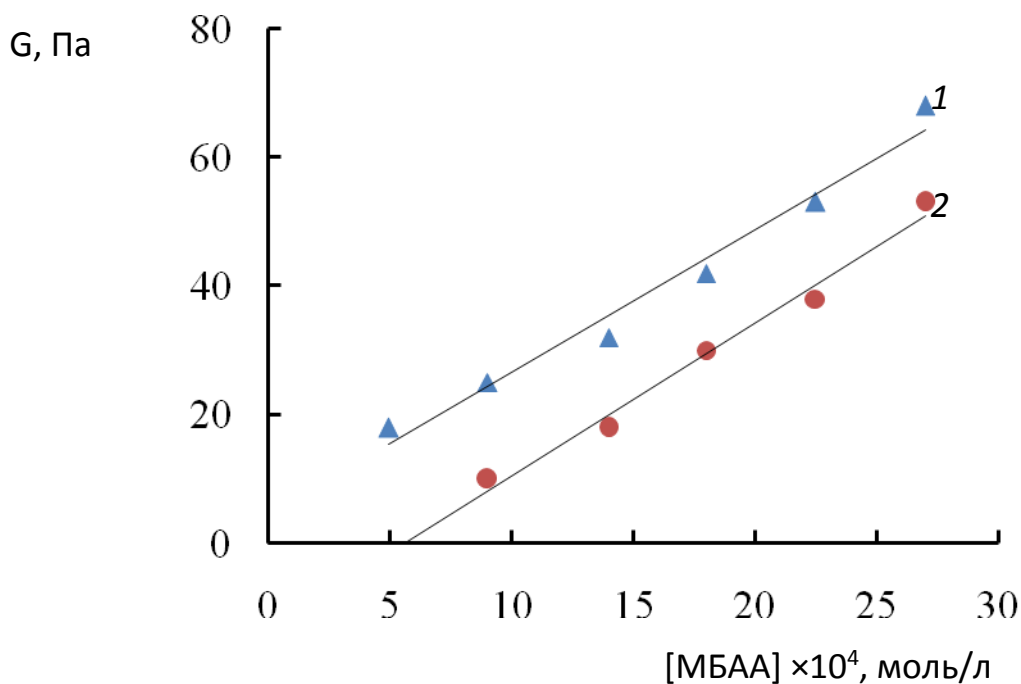


Рисунок 63 – Зависимость модуля упругости G гелей на основе привитого сополимера хитозана с АА от количества сшивающего агента (МБАА) и молекулярной массы хитозана: 1 - 1.4×10^5 , 2 - 8.8×10^4

С увеличением концентрации МБАА и ММ исходного хитозана модуль упругости повышается.

Существенным недостатком этих широко применяемых сшивающих агентов – ГА и МБАА – является токсичность продуктов их разложения, а следовательно, невозможность их применения для формирования материалов медицинского назначения. Поэтому, поиск эффективных и безопасных сшивающих агентов и в настоящее время остается актуальным.

Ранее отмечалось [118-120], что в качестве высокоэффективных сшивающих агентов при формировании гелей на основе хитозана и его производных могут выступать изоцианаты. На практике в процессе синтеза продуктов медицинского назначения часто используют не изоцианаты, а их «прекурсоры». Последние более предпочтительны, т.к. в отличие от изоцианатов являются нетоксичными. В настоящей работе в качестве таких «прекурсоров» были использованы диазиды терефталевой кислоты. Азиды при нагревании могут распадаться с выделением азота до нитренов, по одному пути, или до изоцианатов - по-другому [302-304], которые затем реагируют с гидроксильными и аминогруппами хитозана (рисунок 64).

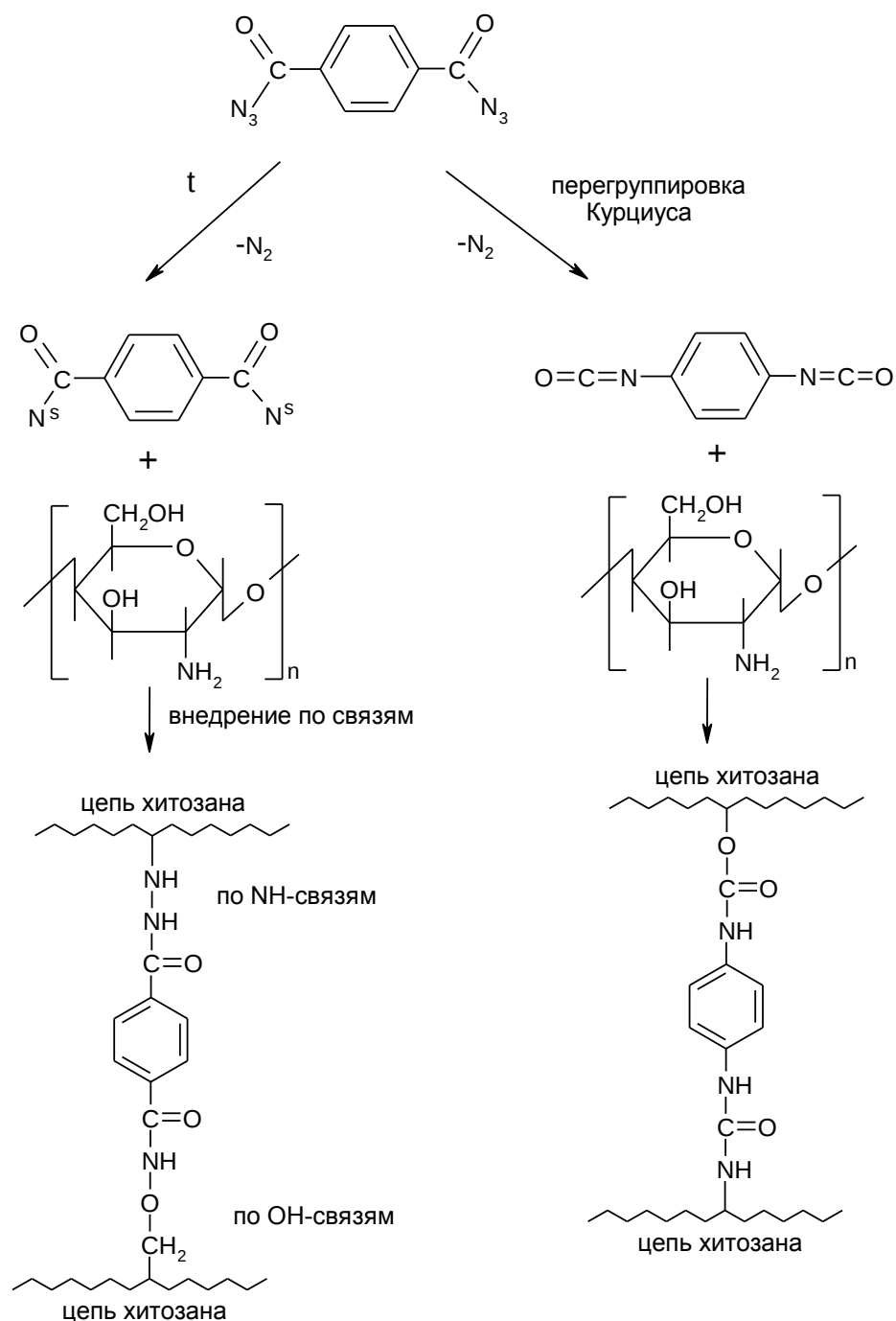


Рисунок 64 – Схема взаимодействия изоцианатов с функциональными группами хитозана

Наряду с реакцией «сшивания» возможно протекание побочного процесса – гидролиза изоцианатов в водноуксуснокислом растворе хитозана. Образующиеся в качестве промежуточного соединения неустойчивые карбаминные кислоты легко отщепляют диоксид углерода, давая первичные амины. Амины также могут взаимодействовать с изоцианатом, образуя производные мочевины. При взаимодействии последних со спиртовыми группами хитозана образуются

карбаматы, как показано на схеме, что также способствует формированию трехмерной сетки.

Исследована зависимость модуля упругости гелей на основе хитозана от количества сшивающего компонента (ДАТФ) (рисунок 65).

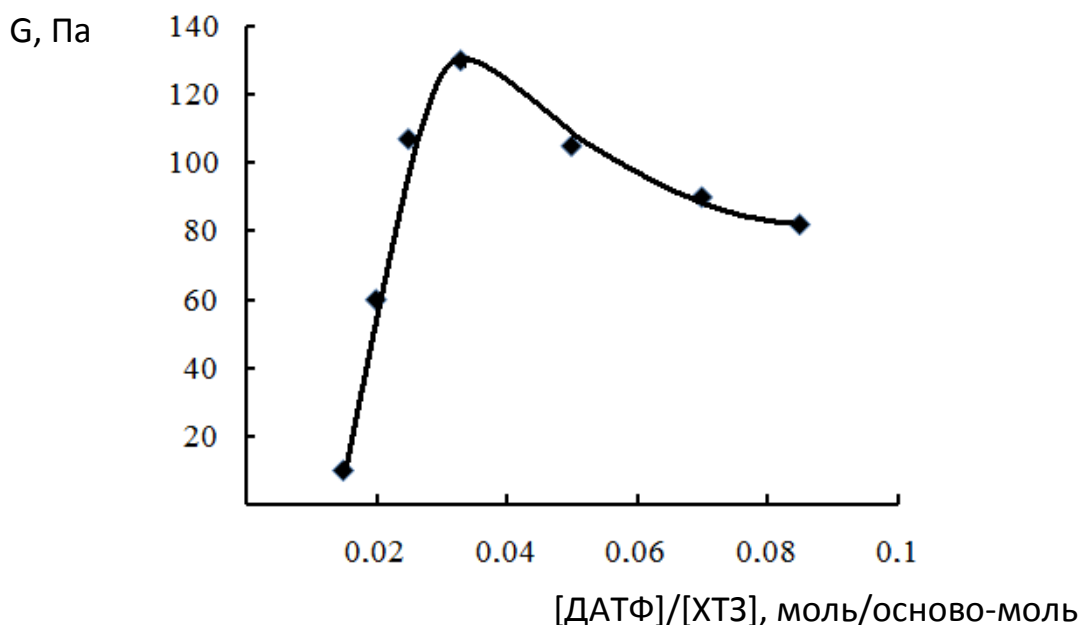


Рисунок 65 – Зависимость модуля упругости G гелей на основе хитозана, сшитого ДАТФ, от количества сшивающего агента (ДАТФ)

Зависимость носит экстремальный характер с максимумом при $[ДАТФ]/[ХТЗ] = 0.033$. Падение модуля упругости при высоких концентрациях ДАТФ обусловлено нарушением монолитности структуры геля вследствие интенсивного выделением азота при его формировании.

Важной характеристикой гидрогелей с точки зрения практического применения является их способность поглощать воду. Поскольку полученные гидрогели могут быть использованы в медицинских целях, то было исследовано набухание гелей в воде и в физиологическом растворе (рисунки 66, 67). Максимальная степень набухания определяется природой полимера и растворителя (сродством между ними) и плотностью пространственной сетки полимера. Из рисунков 66, 67 видно, что с увеличением содержания ДАТФ, а соответственно и плотности сшивки, в геле $\sim$ в 3 раза степень его набухания уменьшается $\sim$ в 2 раза.

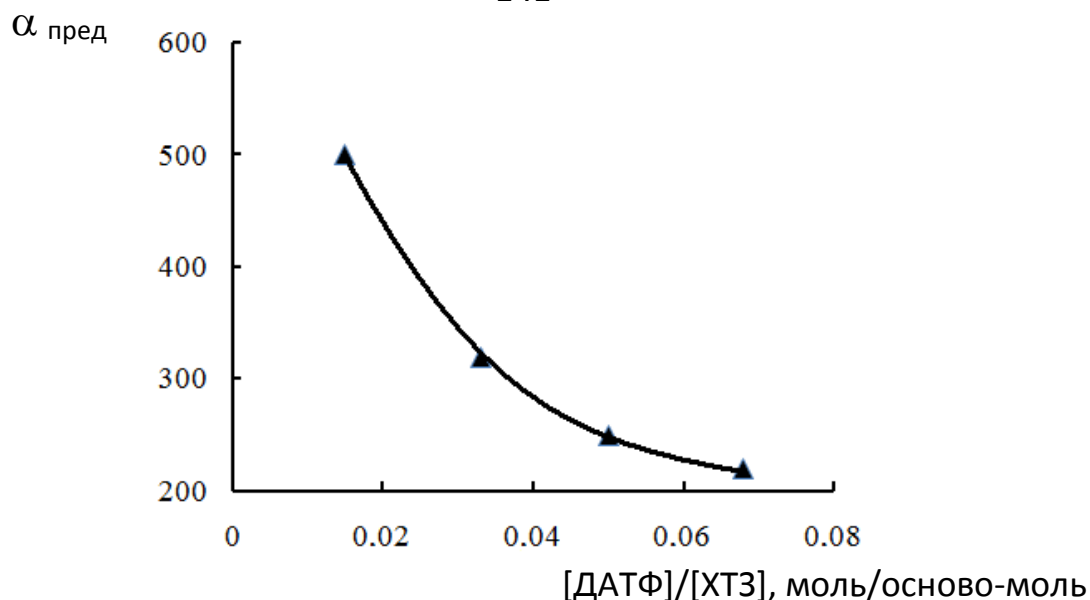


Рисунок 66 – Зависимость предельной степени набухания ($\alpha_{\text{пред}}$) в дистиллированной воде гелей на основе хитозана от количества сшивающего агента (ДАТФ).

Здесь и далее $\alpha = \frac{m - m_0}{m_0}$, где m и m_0 - масса набухшего образца геля и

масса сухого геля, соответственно

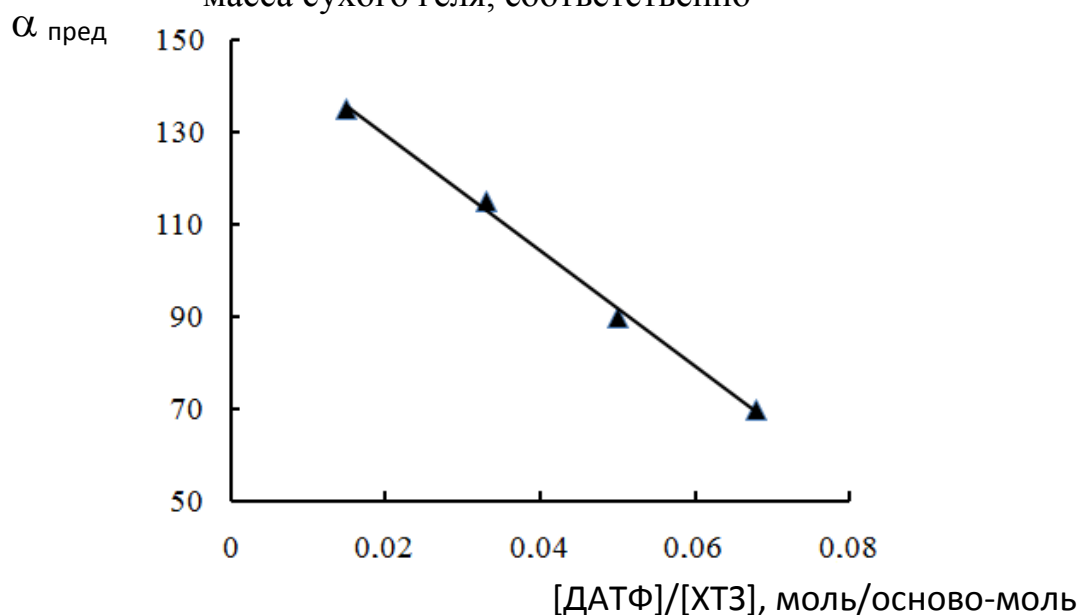


Рисунок 67 – Зависимость предельной степени набухания ($\alpha_{\text{пред}}$) в физиологическом растворе гелей на основе хитозана от количества сшивающего агента (ДАТФ)

Свойства гелей, находящихся вблизи порога коллапса (сильное уменьшение объема геля в десятки и даже сотни раз) могут чрезвычайно резко и обратимо изменяться при незначительном изменении внешних факторов ("восприимчивые

гели"). Эта чувствительность гелей к тому или иному внешнему воздействию определяется их химическим составом, а именно, наличием групп атомов, реагирующих на данный фактор. В зависимости от воздействия, которое вызывает фазовый переход, "восприимчивые гели" могут быть разделены на несколько групп: термочувствительные, pH-чувствительные, чувствительные к составу растворителя, ион-чувствительные, светочувствительные, чувствительные к действию электрического поля, биохимически чувствительные и т.д. В данной работе исследования pH- и термочувствительности были выполнены на гелях с оптимальным набуханием (~ 300), у которых влияние концентрации ДАТФ было менее выражено – $[\text{ДАТФ}]/[\text{ХТЗ}] = 0.05$.

Выявлено, что хитозановые гели, сшитые ДАТФ, являются pH- и термочувствительными (рисунки 68-70).

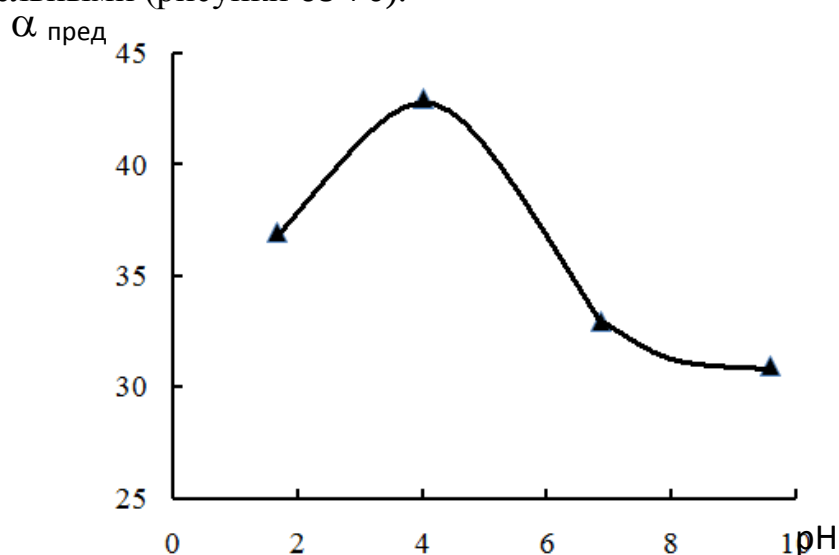


Рисунок 68 – Зависимость предельной степени набухания ($\alpha_{\text{пред}}$) геля на основе сополимера хитозана с АА, сшитого МБАА, от pH среды (буферный раствор). $[\text{ХТЗ}]/[\text{АА}] = 1:3$ (осново-моль/моль); $[\text{МБАА}] = 2.69 \times 10^{-3}$ моль/л; $T = 293 \text{ K}$

Установлено, что гель, сшитый ДАТФ, сильно набухает в сильноокислой среде (pH 1.98), при увеличении pH набухание уменьшается, и при $\text{pH} > 6.86$ гель коллапсирует. Влияние pH среды обусловлено изменением степени протонирования аминогрупп хитозана: при низких значениях pH почти все

аминогруппы несут положительный заряд, что ведет к отталкиванию звеньев, а следовательно, уменьшению межцепного взаимодействия, усилению сольватации ионов и повышению набухания.

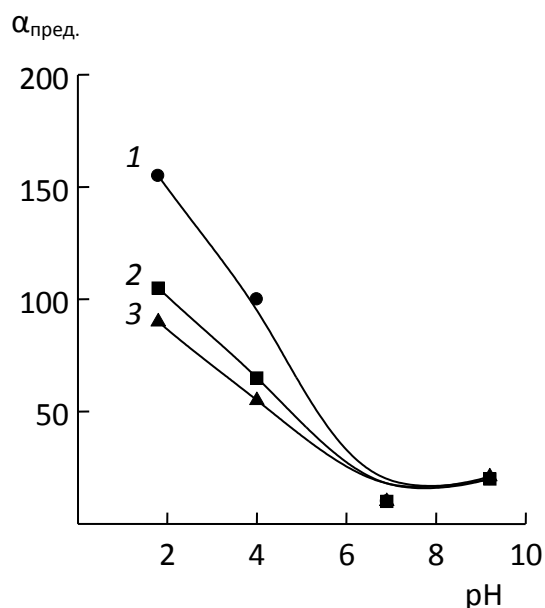


Рисунок 69 – Зависимость предельной степени набухания ($\alpha_{\text{пред.}}$) геля на основе ХТЗ, сшитого ДАТФ, от рН среды (буферный раствор) при температурах 60 (1), 40 (2) и 20°C (3). $[\text{ДАТФ}]/[\text{ХТЗ}] = 0.05$; $[\text{ДО}] = 1.68 \times 10^{-3}$ моль/л, $[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0.225$ моль/л

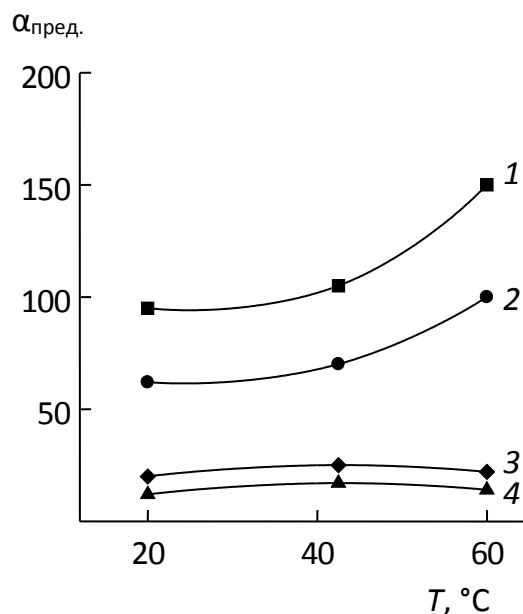


Рисунок 70 – Зависимость предельной степени набухания ($\alpha_{\text{пред.}}$) геля на основе ХТЗ, сшитого ДАТФ, от температуры при рН среды (буферный раствор) 1.68 (1), 4.01 (2), 9.18 (3) и 6.86 (4). $[\text{ДАТФ}]/[\text{ХТЗ}] = 0.05$, $[\text{ДО}] = 1.68 \times 10^{-3}$ моль/л, $[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0.225$ моль/л

Из рисунка 70 видно, что предельная степень набухания сильно зависит от температуры, т.е. полученные гели являются не только рН-, но и термочувствительными. С увеличением температуры способность геля поглощать воду возрастает.

Таким образом, гели на основе хитозана, сшитого ДАТФ обладают упругими свойствами и способны удерживать до 530 г воды на 1 г сухого полимера. Гели на основе привитых сополимеров хитозана с АА, сшитых МБАА, характеризуются меньшим набуханием (до 45 г воды на 1 г полимера) и являются рН-чувствительными, что свидетельствует о влиянии природы сшивающего агента на свойства образующихся гелей.

Вода, поглощенная гидрогелями, оказывает существенное влияние на их свойства. В составе гидрогеля выделяют "свободную" и "связанную" воду. "Свободная" вода не ассоциирована с молекулами полимера в гидрогелях и замерзает при обычной для воды температуре, "связанная" - адсорбирована на полимерной матрице [305]. От того, как и в каком количестве вода "связана" зависят транспортные и механические свойства гелевых мембран. Одним из наиболее информативных методов исследования состояния воды в гидрогелях является изучение их термодинамических свойств [306].

С целью определения в хитозановых гелях наличия «связанной» воды было выполнено калориметрическое изучение температурных зависимостей теплоемкости, температур и энтальпий физических превращений гидрогелей на основе хитозана с ПВП (Г I) или ПАА (Г II) и их полимерных составляющих; расчет по полученным экспериментальным данным количества связанной воды на условный моль полимерных систем и термодинамических функций гидрогелей $C_p^0(T)$, $H^0(T) - H^0(0)$, $S^0(T) - S^0(0)$, $G^0(T) - H^0(0)$ для области от $T \rightarrow 0$ до 350 К. Теплоемкость стеклообразных обезвоженных гидрогелей I и II в интервале 80-280 К плавно возрастает с повышением температуры (рисунок 71).

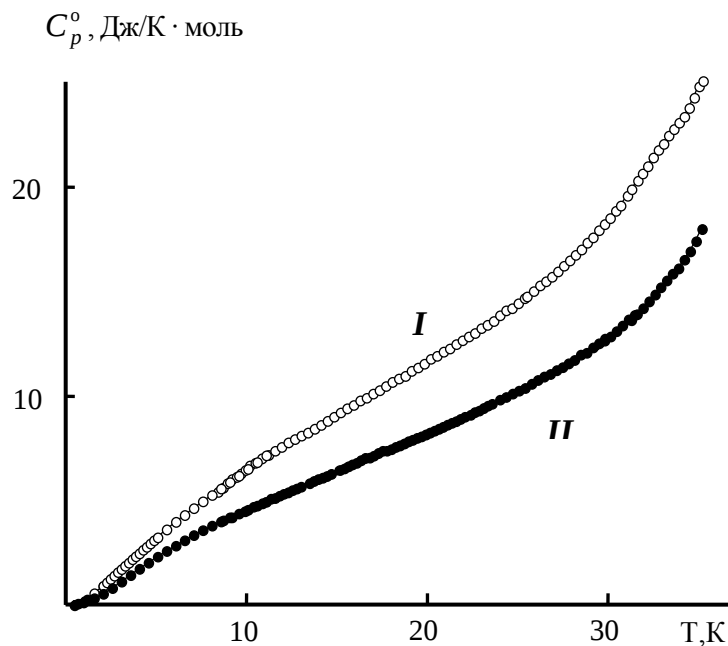


Рисунок 71 – Температурные зависимости теплоемкости стеклообразных обезвоженных гидрогелей I и II

Наблюдающееся при $280\text{ К} < T < 340\text{ К}$ более резкое возрастание теплоемкости **I** и **II** связано с началом расстекловывания. Характер температурной зависимости теплоемкости **ГI** и **ГII** одинаков: теплоемкость их плавно увеличивается с ростом температуры в области от 80 до 260 К, последующее резкое увеличение ее и разрыв графика $C_p^0 - T$ в интервале 260-273 К связан с плавлением свободной воды (рисунок 72).

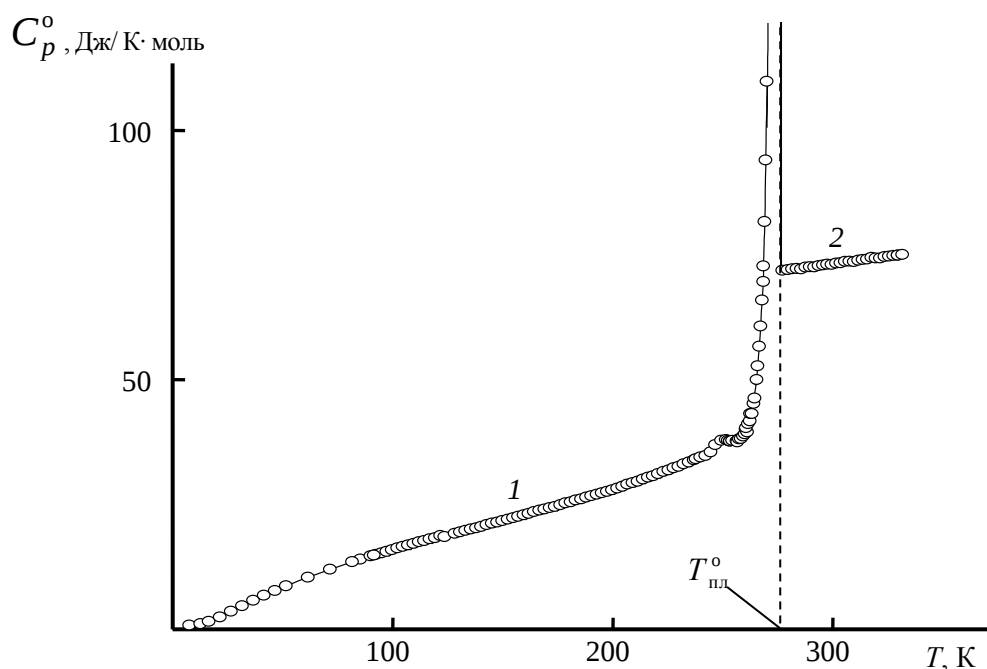


Рисунок 72 – Температурная зависимость теплоемкости гидрогеля ГI

При $T > T_{пл}^0$ также: наблюдается лишь незначительное увеличение теплоемкости с ростом температуры для гидрогелей **ГI** и **ГII**. Однако на кривой зависимости $C_p^0 - f(T)$ для **ГI** (рисунок 72) наблюдается аномальное изменение теплоемкости в области 245 - 255 К, которое, по-видимому, связано с расстекловыванием компонентов, входящих в состав гидрогеля. Это явление, на наш взгляд, объясняется тем, что наличие в геле большого количества растворителя существенно понижает температуру стеклования полимеров, что может быть обусловлено влиянием растворителя на сегментарную подвижность [307].

Представлялось интересным сравнить теплоемкость гидрогелей **ГІ** и **ГІІ** с соответствующими значениями ее, рассчитанными по аддитивной схеме, исходя из C_p^0 чистой воды, а также **І** и **ІІ** соответственно. Результаты сравнения представлены на рисунке 73. Видно, что при $T < 200$ К измеренная и вычисленная теплоемкость практически совпадают, в интервале от 200 К до $T_{пл}^0$ C_p^0 гидрогелей больше, чем аддитивной смеси, что обусловлено эффектом предплавления в образцах гидрогелей. При этом различие достигает 3% при $T_{пл}^0$. При $T > T_{пл}^0$ напротив теплоемкость аддитивной смеси превышает теплоемкость гидрогеля и эта разница достигает 6%. Можно предположить, что наблюдаемый эффект связан с наличием в составе гидрогеля связанной воды, теплоемкость которой намного меньше, чем теплоемкость свободной жидкой воды, которая учитывалась при расчете теплоемкости аддитивной смеси. Результаты экспериментальных измерений характеристик плавления и их обработки и представлены в таблице 32. Как следует из таблицы 32 различие $T_{пл}^0$ воды в гидрогелях **ГІ** и **ГІІ**, содержание H_2O в которых отличается лишь на 1 мас.%, составляет 0.4 ± 0.2 К. Указанное значение $T_{пл}^0$ для **ГІІ** меньше по сравнению с $T_{пл}^0$ чистой воды.

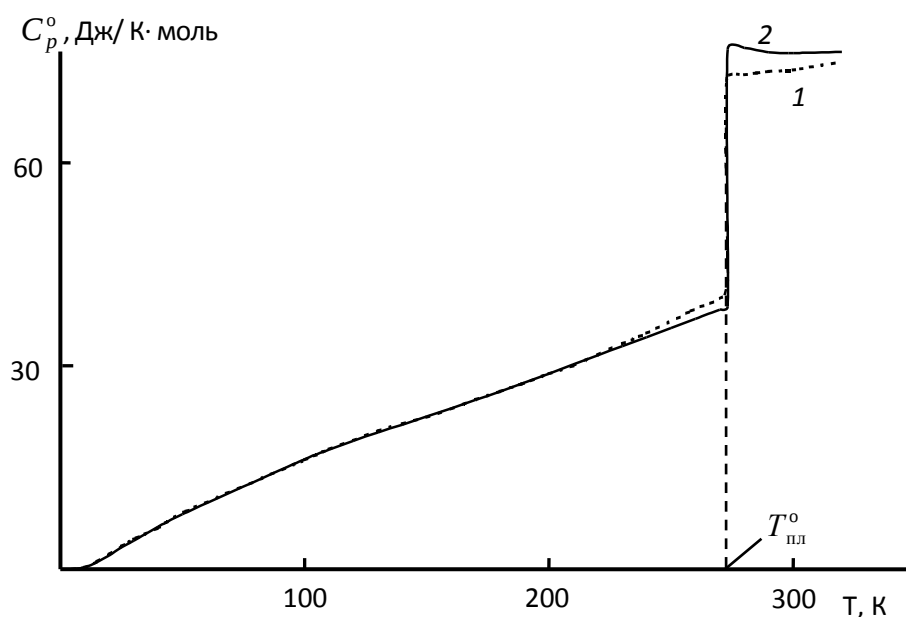


Рисунок 73 – Температурные зависимости теплоемкости: 1 – гидрогель **ГІ** (0.9946 молей H_2O , 0.074 сухого остатка), 2 – аддитивные смеси аналогичного состава

Таблица 32 – Термодинамические характеристики плавления закристаллизованной воды в изученных гидрогелях в расчете на моль воды

Вещество	Состав «условного моля» гидрогеля, моли					$T_{\text{пл}}^{\circ}, \text{K}$	$\Delta H_{\text{пл}}^{\circ},$ кДж/моль	$\Delta S_{\text{пл}}^{\circ},$ Дж/К·моль
	H ₂ O	ПВП	ХТЗ	ЯК	ГА			
ГІ (95 мас. % H ₂ O)	0.9926	1.2×10 ⁻³	2.6×10 ⁻³	3.6×10 ⁻³	0.1×10 ⁻³	272.7±0.3	5.92±0.02	21.7±0.1
	H ₂ O	АА	ХТЗ	УК	NN-метилен-бис- акриламид			
ГІІ (96 мас. % H ₂ O)	0.9817	1.04×10 ⁻²	3.3×10 ⁻³	4.6×10 ⁻³	0.05×10 ⁻³	273.1±0.3	5.38±0.02	19.7±0.1
Вода [167]	1.0	-	-	-		273.16±0.01	6.01±0.01	22.0±0.1

Понижение $T_{пл}^0$ льда в гидрогеле может быть обусловлено с одной стороны криоскопическим эффектом из-за присутствия в гидрогеле сополимеров, а с другой - наличием некоторого давления на плавящуюся систему из-за их взаимодействия с H_2O . Последнее, может быть обусловлено образованием армирующей сетки сополимера с адсорбированной H_2O , разделяющей весь объем гидрогеля на отдельные блоки, внутри которых содержится либо жидкая вода, либо кристаллы льда в зависимости от температуры. Согласно уравнению Клапейрона $dT_{пл}/dp = T_{пл}(\Delta V_{пл}/\Delta H_{пл})$ [308] указанное давление приводит к снижению $T_{пл}$, поскольку для процесса плавления льда H_2O $\Delta V_{пл} < 0$, а $\Delta H_{пл} > 0$, при этом $p > p^0$ (стандартное давление) температура плавления понижается.

Мольные энтальпии плавления льда в гидрогелях убывают от ГІ к ГІІ, что вероятно, связано с повышением количества адсорбированной ("связанной") сополимером ХТЗ-АА воды. В том же порядке изменяются и энтропии плавления. Сопоставление результатов по энтальпии плавления закристаллизованной воды с мольной энтальпией плавления чистой воды позволяет сделать заключение о наличии воды, "связанной" с полимером. Расчеты показывают, что в гидрогеле хитозан-ПВП ее количество составляет 2 мас.%, а в сополимере хитозан-ПАА – 11 мас.%. Такое различие в содержании "связанной" воды, по-видимому, обусловлено особенностями структуры, рассматриваемых гидрогелей. В случае гидрогеля на основе трехмерной сетки хитозана, сшитого глутаровым альдегидом и линейных цепей ПВП возможна более плотная упаковка макромолекул в результате образования водородных связей между цепями соответствующих гомополимеров. В гидрогеле ХТЗ-ПАА, образованного цепями привитых сополимеров хитозана с АА сшитых N,N-метилден-бис-акриламидом, формируется более рыхлая полимерная сетка. Привитые цепи ПАА препятствуют плотной упаковке макромолекул, выступая в качестве "распорок" между ними, и доля сольватированных цепей становится выше. Высокое содержание связанной воды в полиакриламидном геле обеспечивает его жизнестойкость (сохранение свойств) при многократных циклах «набухание-высыхание» (выполнено 5 циклов).

В таблице 33 приведены стандартные термодинамические функции образцов ГІ, ГІІ, І и ІІ. Для расчета термодинамических функций температурные зависимости теплоемкости экстраполировали от температур начала измерения до гелиевых температур по методу Кели-Паркса. При расчете теплоемкости в качестве стандартных веществ были приняты вода в случае гидрогеля, ПВП в случае І и ПАА в случае ІІ. Здесь же приведены стандартные термодинамические функции для $T = 298.15$ К. Расчет энтальпий $H^\circ(T) - H^\circ(0)$ и энтропий $S^\circ(T) - S^\circ(0)$ выполнен численным интегрированием зависимостей $C_p^\circ = f(T)$ и $C_p^\circ = f(\ln T)$ [308], функция Гиббса вычислена по значениям энтальпии и энтропии при соответствующих температурах.

Таблица 33 – Стандартные термодинамические функции гидрогеля ГІ и обезвоженных гидрогелей І и ІІ (в стеклообразном состоянии) при $T = 298.15$ К

Образец	C_p° , Дж/К·моль	$H^\circ(T) - H^\circ(0)$, кДж/моль	$S^\circ(T)$, Дж/К·моль	- [$G^\circ(T) - H^\circ(0)$], кДж/моль
ГІ	73.55	6.945	44.69	6.379
І	183.1	26.54	172.9	25.00
ІІ	127.0	18.64	119.9	17.09

Таким образом, получены гели на основе хитозана, его смесей с ПВП и сополимеров ХТЗ-АА с использованием различных сшивающих агентов: ГА, ДАТФ, МБАА. Гели являются рН- и термочувствительными и обладают хорошими физико-механическими характеристиками: предельное водопоглощение достигает 530 г воды на 1 г сухого геля, модуль упругости – 130 Па, количество связанной воды – 11%.

Гидрогели перспективны для использования в качестве многофункциональных средств доставки биологически активных веществ и лекарственных форм при терапии различного рода заболеваний. Применение

такого рода средств доставки позволяет увеличить срок хранения активного компонента, задать скорость высвобождения и, следовательно, время его воздействия на организм пациента. Выбор пути доставки активной субстанции позволяет достигать необходимого терапевтического эффекта при ее минимально необходимой дозе.

Способность разработанных гидрогелей связывать и пролонгированно выделять активную субстанцию показана *in vitro* на примере дигидрокверцетина (ДГК) – одного из наиболее сильных антиоксидантов, не обладающего токсичностью и мутагенной активностью. Удержание ДГК в гидрогеле хитозана может осуществляться под влиянием нескольких факторов. Во-первых, как и в растворе хитозана, это взаимодействия между гидрофобными непротонированными участками цепей хитозана и ДГК, во-вторых, образование водородных связей ДГК и хитозана с участием гидроксильных, карбонильных и аминогрупп, и, кроме того, формирование в геле полимерной сетки, затрудняющей диффузию ДГК в ее пределах. Полученные гидрогели хитозана, содержащие ДГК, в силу указанных факторов должны обладать способностью к замедленному высвобождению флавоноида.

Исследование процесса высвобождения ДГК из его растворов с хитозаном и гидрогелей в дистиллированную воду через ацетатцеллюлозную мембрану проводили при температуре 37.0 ± 0.5 °C. Результаты по изучению кинетики диффузии ДГК из гидрогеля и раствора для различных образцов с одинаковой исходной концентрацией ДГК представлены на рисунках 74 и 75.

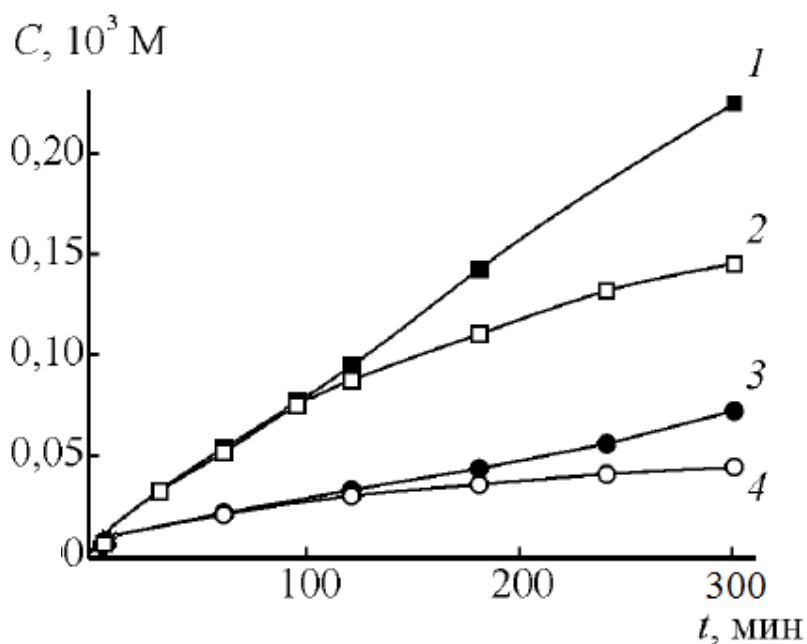


Рисунок 74 – Зависимости концентраций ДГК в воде C (моль/л), высвобожденного из исследуемого образца через мембрану от времени t (мин). 1, 2 – 5 г и 1 г смеси хитозана с ДГК, 3, 4 – 5 г и 1 г гидрогеля, соответственно. $[ДГК]_0 = 1.6 \times 10^{-2}$ моль/л, $T = 310$ К. Приведены усредненные данные по пяти экспериментальным сериям со стандартным отклонением не более 4%

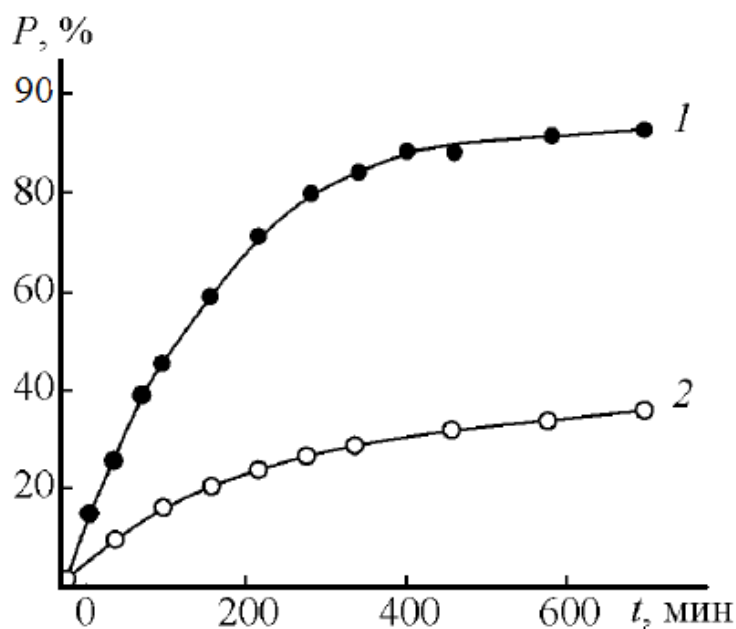


Рисунок 75 – Зависимости доли выделившегося через мембрану ДГК (P , %) от времени. 1 – 1 г раствора хитозана с ДГК, 2 – 1 г гидрогеля. $[ДГК]_0 = 1.6 \times 10^{-2}$ моль/л, $T = 310$ К. Приведены усредненные данные по пяти экспериментальным сериям со стандартным отклонением не более 4%

Установлено, что при одной и той же начальной концентрации ДГК практически полное высвобождение его из раствора (рисунок 75) достигается за 12 ч, в то время как из гидрогеля выделяется всего около 35 % ДГК. Таким образом, формирование трехмерной сетки в гидрогеле хитозана позволяет создавать препараты с содержанием ДГК в 5 раз превышающем его растворимость в воде и обеспечивает замедленное высвобождение флавоноида. Это может послужить основой для создания препаратов с пролонгированным действием, что актуально как при применении композиций, обладающих биологической активностью, так и для ранозаживляющих материалов, т.к. постоянное поступление активного компонента способствует повышению эффективности процесса регенерации тканей [309].

Следует обратить внимание на то, что использование диазида терефталевой кислоты позволяет получить не только гидрогели на основе хитозана, но и дает возможность синтезировать новый химически модифицированный биологически активным веществом или лекарственным средством полисахарид. При этом ковалентное связывание свободных аминогрупп полимера с молекулой фармацевтической субстанции происходит при использовании в качестве сшивающего агента *in situ* генерированного 1,4-фенилендиизоцианата, при термоллизе диазида терефталевой кислоты. При использовании этого метода активная субстанция должна содержать любую нуклеофильную группу, например, амино- или гидроксигруппу, которая вступает в реакцию нуклеофильного присоединения с изоцианатной группой 1,4-фенилендиизоцианата. Другая же изоцианатная группа этой молекулы реагирует с аминогруппой полисахарида.

В качестве активного компонента в модельной системе для синтеза химически модифицированной формы хитозана был выбран, как и при разработке гидрогелей – ДГК. Этот флавоноид содержит 5 гидроксильных групп, по которым могут присоединяться изоцианатные группы сшивающего агента с образованием уретановых связей. Активность различных гидроксильных групп ДГК существенно отличается и зависит как от их расположения, так и от природы реагента, участвующего в реакции нуклеофильного присоединения. Так как

основной задачей в работе было получение хитозана ковалентно-сшитого с ДГК, способного к высвобождению последнего в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), а не направленная модификация флаваноида по какой-либо конкретной гидроксильной группе, то селективная защита его гидроксильных групп не проводилась. Синтез проводили в два этапа. На первом, мольный избыток диазида терефталевой кислоты в присутствии ДГК подвергался термолизу в сухом 1,4-диоксане без доступа влаги воздуха. При нагреве диазида терефталевой кислоты *in situ* образовывался 1,4-фенилендиизоцианат, который реагировал с гидроксигруппами дигидрокверцетина. С целью сохранения непрореагировавшей одной из изоцианатных групп спейсера, реагенты брали в мольных соотношениях 5 : 1; 2 : 1 и 1:1. На следующей стадии охлажденный до комнатной температуры раствор продукта реакции дигидрокверцетина с 1,4-фенилендиизоцианатом в диоксане приливали при интенсивном перемешивании к раствору хитозана. В течение 10-15 секунд вязкость раствора резко увеличивалась с образованием густой массы сшитого полимера (рисунок 76):

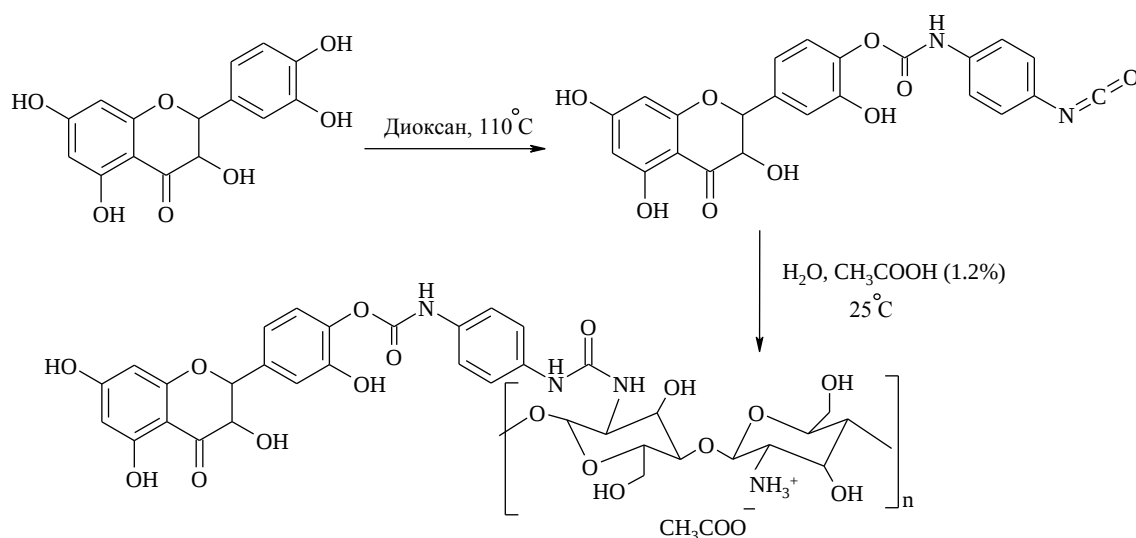


Рисунок 76– Схема получение ковалентно-сшитого хитозана с ДГК

Полученный гель ковалентно-сшитого хитозана с ДГК, отмывали от низкомолекулярных продуктов реакции изопропыловым спиртом. Установлено, что при соотношении 5:1 количество дигидрокверцетина не вступившего в реакцию составило 1.3%, то есть более 98% химически модифицированного

дигидрокверцетина прореагировало с хитозаном. При мольном соотношении 1:1 количество флавоноида не вступившего в реакцию составляло $\approx 6\%$.

Высвобождение из геля ДГК будет происходить только в результате гидролиза в нем либо уретановой, либо уретановой и карбамидной групп. Наиболее эффективно гидролиз этих групп протекает в щелочной среде. Однако при пероральном применении геля выделение свободного ДГК будет происходить только в результате ферментативного гидролиза уретановых и карбамидных групп и необходимо учитывать активность ферментов ЖКТ. Поскольку уретановая и карбамидная группы структурно наиболее близки к амидной группе пептидной связи, то, вероятно, наибольшую активность к гидролизу трехмерной структуры контейнера с высвобождением ДГК, будут проявлять ферменты ЖКТ группы протеаз – ферментов расщепляющих пептидную связь между аминокислотами в белках.

Известно, что в ЖКТ млекопитающих существуют два типа протеолитических ферментов. Это ферменты желудка, а именно пепсин, обладающий максимумом каталитической активности при pH в диапазоне 1.5 – 2.5, и группа ферментов тонкого кишечника – трипсин и хемотрипсин, обладающих максимальной активностью при pH 7.5 - 8.5. Так как время нахождения геля в желудке много меньше, чем в тонком кишечнике, то, можно полагать, что основную роль в гидролизе уретановых и карамидных групп будут проявлять ферменты тонкого кишечника. Поэтому для проверки эффективности ферментативного гидролиза геля *in vitro* был использован раствор трипсина-хемотрипсина в фосфатном буфере с pH = 8 и температурой 37°C. Концентрация фермента находилась в пределах, допустимых в организме человека. Ферментативный гидролиз проводили в течение 30 часов, при этом кинетическая кривая высвобождения ДГК не выходила на стадию насыщения. Гидролиз проводили для образцов геля с разным соотношением компонентов ДГК и диазида терефталевой кислоты (от 1:5 до 1:1).

Выявлено, что высвобождение дигидрокверцетина из геля носит сложный характер гетерогенной каталитической реакции. Скорость высвобождения

дигидрокверцетина не зависит от количества сшивающего агента и определяется только концентрацией фермента на 1 мг геля (рисунок 77).

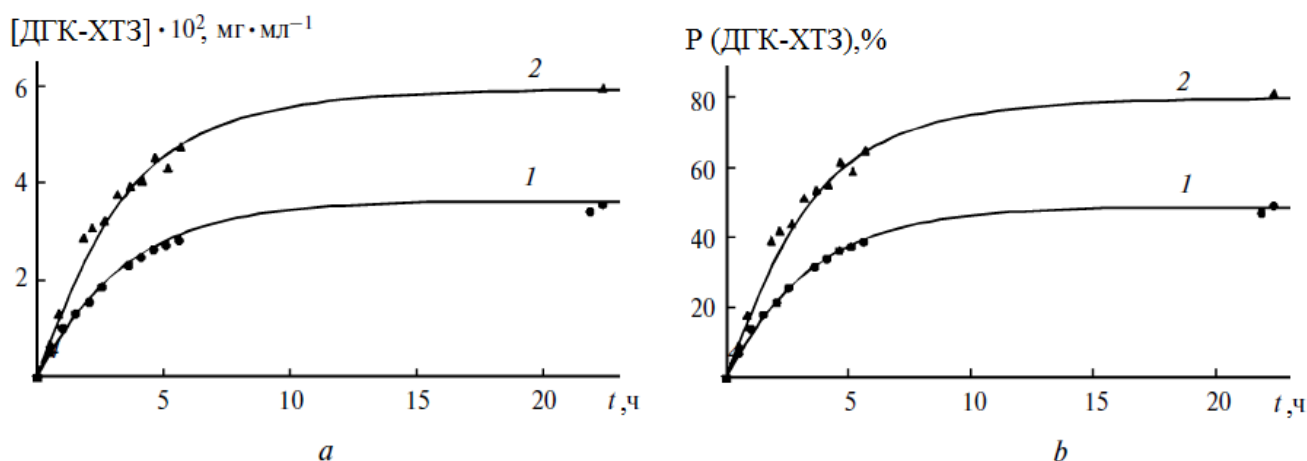


Рисунок 77 – Зависимость количества (а) и доли (б) высвободившегося ДГК из геля на основе хитозана ковалентно-сшитого с дигидрокверцетином (ДГК-ХТЗ) от времени при 0.09 (1) и 0.05 ммольях (2) сшивающего агента (диазида терефталевой кислоты) на 20 г геля

Из рисунка 77 видно, что полученный модифицированный хитозан подвергается гидролизу и способен, пролонгировано выделять дигидрокверцетин. При проведении ферментативного гидролиза в течение 28 часов, высвободилось всего около 3% дигидрокверцетина. Однако, стоит отметить, что скорость выделения дигидрокверцетина из полученного препарата в ЖКТ будет несколько выше, поскольку макромолекула полисахарида также подвергается гидролизу по гликозидным связям с образованием олигомерных фрагментов.

Таким образом, на основе хитозана и его модифицированных форм могут быть получены гели с заданным комплексом физико-механических свойств и степенью набухания, способные пролонгированно выделять лекарственные средства. Расширение спектра композиций на основе хитозана и его производных, способных выполнять адресную доставку лекарственных средств в условиях *per os* может быть достигнуто путем создания наносистем, сформированных по принципу «нано ядро-активная субстанция-защитный слой ХТЗ».

ГЛАВА 3. Формирование наночастиц золота в растворах хитозана и исследование их биологической активности

3.1. Получение нанодисперсий золота в растворах хитозана.

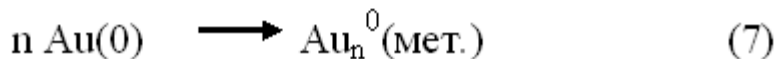
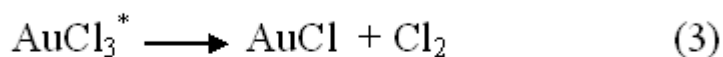
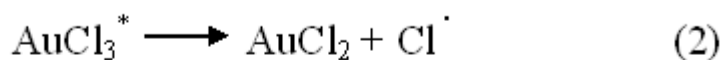
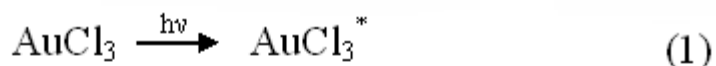
Определение факторов, влияющих на рост, форму, полидисперсность и стабилизацию наночастиц

Интенсивные исследования синтеза и свойств мультикомпонентных систем, включающих наноразмерные частицы, биологически активные вещества и другие органические макромолекулы, связаны с перспективностью их использования в фармации, медицине и косметологии. В качестве ядра для таких систем в работе были выбраны наночастицы золота – одного из эссенциальных, индифферентных элементов организма, в качестве полимера стабилизатора – хитозан, обладающий уникальными хелато – и комплексообразующими свойствами, растворимостью в водных растворах с $pH < 6.5$, биосовместимостью и гиппоаллергенностью. При получении наночастиц золота в растворах хитозана был использован комплексный подход, основанный на представлениях:

1. «Green» химии – формирование НЧ золота из допанта *in situ* в растворах полисахарида, без введения дополнительных реагентов – восстановителей;
2. О кооперативных нековалентных взаимодействиях между макромолекулами и наночастицами. По общему мнению, при формировании новой фазы (например, в результате восстановления ионов металлов) в полимерных растворах рост наночастицы прекращается в результате ее взаимодействия с макромолекулой, которая образует на поверхности частицы защитный экран.

Проведены фундаментальные исследования формирования наночастиц золота в растворах хитозана, в которых основное внимание уделялось поиску условий проведения процессов в полимерной матрице – макромолекулах полисахарида различной молекулярной массы и конформации, позволяющих методом псевдоматричного синтеза получать максимально "гомогенные" системы

– содержащие НЧ золота одинаковой формы и узким распределением по размерам, а также исследованию биологической активности полученных нанокомпозитов. В качестве допанта была использована золотохлористоводородная кислота (HAuCl_4). При разработке метода получения НЧ золота в основу были положены результаты работ Шульпина Г.Б. с соавторами по детальному исследованию фотолиза золотосодержащих соединений в водных растворах [310]. Механизм восстановления золотохлористоводородной кислоты был представлен следующей схемой:



В координационной сфере возбужденного комплекса Au(III) (1) может протекать окислительно-восстановительная реакция с переносом электрона от Cl^- к Au(III) , приводящая к образованию атома хлора (2), который вслед за этим с некоторой вероятностью выходит из «клетки». В этом случае не исключено также двухэлектронное восстановление Au(III) с образованием сразу Cl_2 (3). Возникающие в результате одноэлектронного восстановления соединения Au(II) неустойчивы, как и образующийся комплекс Au(I) и вступают в реакцию диспропорционирования (4, 5). В отсутствие стабилизатора формирование НЧ золота возможно по реакции (6).

Наночастицы золота в настоящей работе получали при УФ-воздействии на HAuCl_4 в растворах хитозана с различной молекулярной массой, выполнявшего функцию стабилизатора и, кроме того, участвующего в процессе восстановления ионов золота. Кинетику формирования НЧ исследовали методами оптической

спектроскопии (ОС) и малоуглового рентгеновского рассеивания (РМУ). О фотолизе HAuCl_4 и последующем образовании НЧ Au в растворах хитозана судили по изменению их спектров поглощения. Типичные спектры изменения оптической плотности растворов хитозана, содержащих допант HAuCl_4 , при УФ облучении приведены на рисунке 78а.

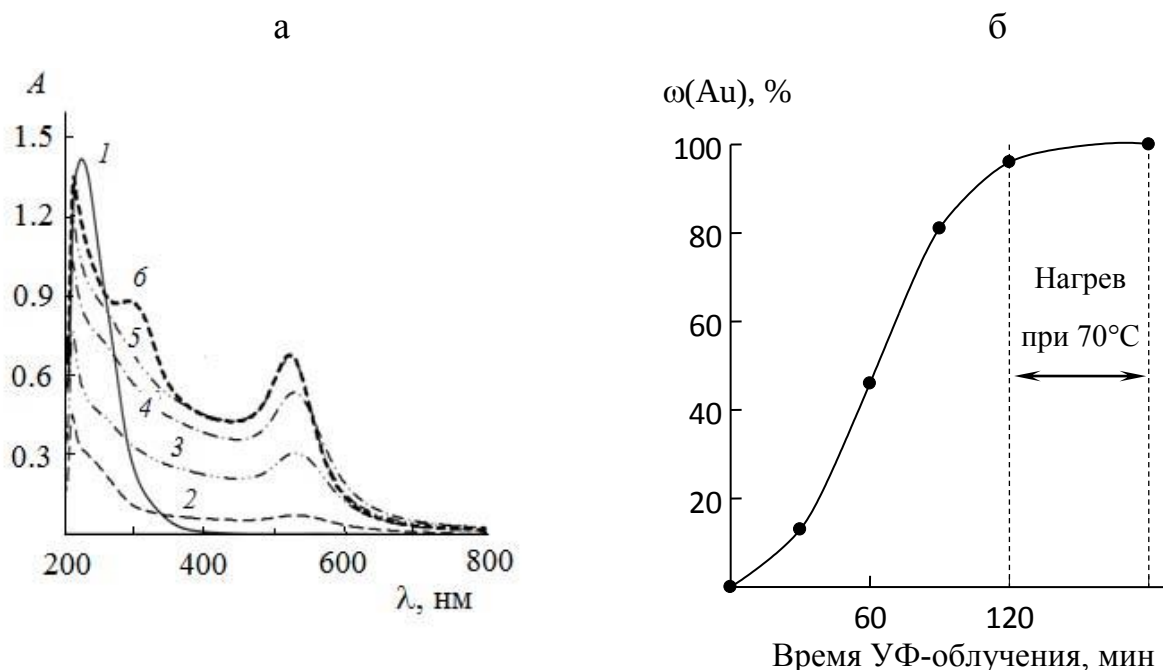


Рисунок 78 – Кинетика формирования наночастиц золота при УФ-облучении в растворах хитозана с начальной концентрацией 3 мас.% HAuCl_4 :

а – эволюция спектра поглощения нанодисперсий; время УФ-облучения, мин:

1 – 0, 2 – 30, 3 – 60, 4 – 90, 5 – 120, 6 – 120 мин УФ-облучения,

прогревание при 70°C в течение 1 ч

б – зависимость доли образовавшихся наночастиц от времени УФ-облучения

Кривая 1 рисунка 78а представляет собой спектр образца, допированного HAuCl_4 до УФ - облучения. Полоса поглощения в области 290 нм, характерная для иона AuCl_4^- [311-313], исчезает при УФ – облучении, что свидетельствует о фотолизе HAuCl_4 . Одновременно происходит формирование НЧ, на что указывает появление и нарастание полосы поглощения, соответствующей плазмонному резонансу НЧ золота (рисунок 78а, кривые 2-4). Следует отметить, что независимо от условий процесса (конформации макромолекул хитозана (рН

среды), ММ полисахарида) спектры имели идентичный вид, наблюдалось лишь смещение максимума полосы поглощения плазмонного резонанса НЧ в области 510-550 нм в зависимости от их размера. Во всех опытах процесс восстановления HAuCl_4 и формирование НЧ Au не превышает 2.5 часа. Известно, что процесс образования НЧ определяется диффузией атомарного золота и существенно зависит от температуры [311-313]. Поэтому, для завершения процесса формирования НЧ дисперсии, после достижения постоянной величины максимума оптической плотности, термостатировали при температуре 70°C в течение 1 часа. Однако это не привело к каким-либо значимым изменениям положения максимума плазмонного поглощения в спектрах нанокompозитов, т.е. в процессе УФ облучения происходит практически полное восстановление ионов золота, что было подтверждено, как будет показано ниже, данными РМУ (рисунок 78б).

Одним из основных методов получения количественных характеристик НЧ являлся РМУ. Данный метод является неразрушающим и позволяет исследовать образцы в виде тонких пленок (пластинок) или растворов без дополнительной подготовки в исходном структурном состоянии. Единственным является требование к толщине образца, которая должна быть близка к оптимальной $t_{\text{опт}} = 1/\mu$, где μ - линейный коэффициент ослабления. На практике в большинстве случаев $t_{\text{опт}}$ меняется от долей мм до десятых долей мкм. Область разрешения лежит в пределах от 1 до 100 нм. Нанодисперсии исследуемых растворов представляют собой двухфазные системы, в которых рассеивающей фазой являются НЧ золота ($\rho_{\text{Au}} = 19.3 \text{ г/см}^3$), а раствор хитозана – дисперсионной средой ($\rho_{\text{р-ра}} = 1.1 \text{ г/см}^3$). Развита к настоящему времени теория малоуглового рассеяния [314, 315] позволяет рассчитать по угловой зависимости интенсивности рассеянного излучения $I(s)$ размерные характеристики рассеивающих неоднородностей (НЧ золота): фактор формы – f ($f = 0.5$ для системы идентичных сферических частиц, $f = 1$ для полидисперсной системы сферических частиц), средний размер частиц l - и функцию распределения по размерам – $p(l)$.

Типичные кривые малоуглового рассеивания в координатах $\lg(I) - \lg(s)$ (I – интенсивность рассеяния, s – вектор дифракции) (экспериментальные данные) для дисперсий НЧ золота, стабилизированных хитозаном, и рассчитанные по ним значения функции $p(l)$ распределения НЧ золота по размеру приведены на рисунке 79.

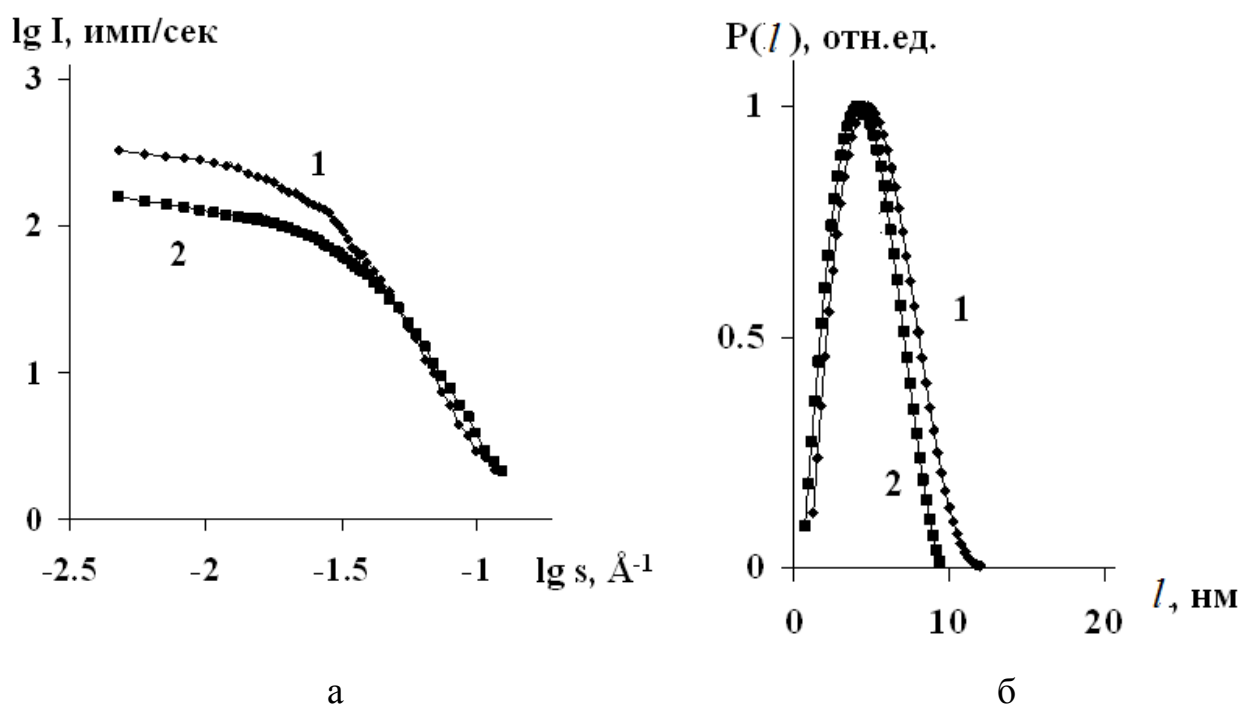


Рисунок 79 – Кривые малоуглового рассеивания в координатах $\lg(I) - \lg(s)$ (экспериментальные данные) (а) и рассчитанные по ним значения функции $p(l)$ распределения НЧ золота по размеру (б) для дисперсий НЧ золота, стабилизированных хитозаном, полученных при различных режимах синтеза:

1 – УФ-облучение 120 мин; 2 – УФ-облучение 120 мин, тепловая обработка при 70°C в течение 1 часа

Известно, что чем быстрее спадает кривая зависимости $\lg(I) - \lg(s)$, т.е. чем меньше угловая протяженность кривых малоуглового рассеяния, тем больше размеры рассеивающих неоднородностей. Из рисунка 79 видно, что положение и форма кривых малоуглового рассеяния не меняются после термообработки дисперсий НЧ золота, стабилизированных хитозаном. Распределение НЧ золота по размерам остается узким – от 2 до 12 нм, а средний размер наночастиц

незначительно увеличивается с 5.7 нм до 6.4 нм при термообработке. Используя известную методику [316], методом РМУ было доказано, что при УФ-восстановлении ионов Au^{3+} в растворе хитозана все атомарное золото переходит в НЧ. Полученные результаты согласуются с данными ОС.

Располагая данными по ОС и РМУ можно выявить зависимость между положением максимума плазмонного резонанса (λ) и размером (l) образующихся НЧ. Ранее такая зависимость была получена авторами работ [313, 316, 317] по обобщенным литературным данным по методам формирования НЧ золота в различных системах, методикам исследования их размера и формы для сравнительно крупных частиц с размером от 20 до 150 нм. Область для НЧ с размером от 2 нм до 20 нм осталась неизученной, хотя с точки зрения практического применения именно этот диапазон наиболее интересен, т.к. именно эти НЧ не являются токсичными. В настоящей работе по результатам собственных данных и ранее проведенных исследований [318] на нашей кафедре были получены образцы, допированные HAuCl_4 , в которых формирование НЧ происходило при УФ-инициировании (таблица 34): в воднокислотных растворах хитозана, содержащих 2 мас.% хитозана и 3 мас.% допанта при варьировании концентрации и природы кислоты (образцы 1 – 4), в растворах ПММА и сополимеров ММА+5мол.% 2-ЭГА (образцы 5 и 6 в виде пленок). Выбранные образцы исследовались одновременно методами оптической спектроскопии и РМУ. По результатам, приведенным в таблице 34, построена зависимость $\lambda - l$. Из рисунка 80 видно, что существует линейная корреляция между длиной волны, соответствующей максимуму плазмонного поглощения и средним размером НЧ в выбранном диапазоне.

Таблица 34 –Характеристика образцов для исследований методом РМУ

№	Матрица		l , нм	$\lambda_{\max}$, нм
1	хитозан в 1.5%-ой янтарной кислоте	Раствор	2.9	523
2	хитозан в 0.5%-HCl	Раствор	3.7	527
3	хитозан в 2%-ой уксусной кислоте	Раствор	3.9	529
4	хитозан в 0.5%-ой HCl + 0.8% сшивателя	Раствор	7.6	539
5	ПММА	пленка	10.0	540
6	ММА+5мол.% 2-ЭГА	пленка	12.0	550

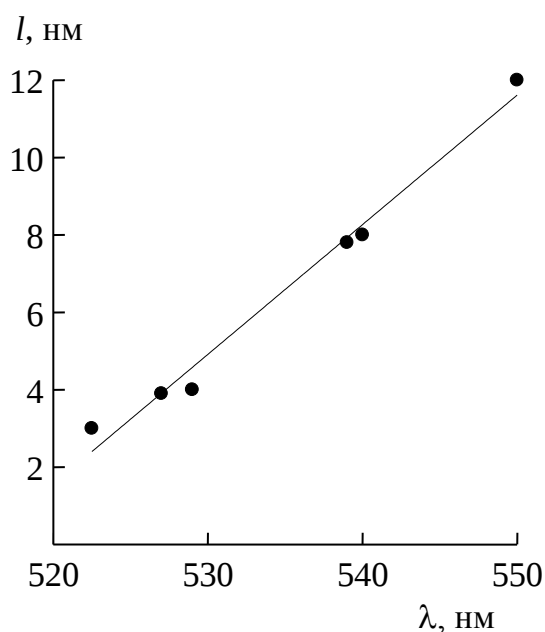
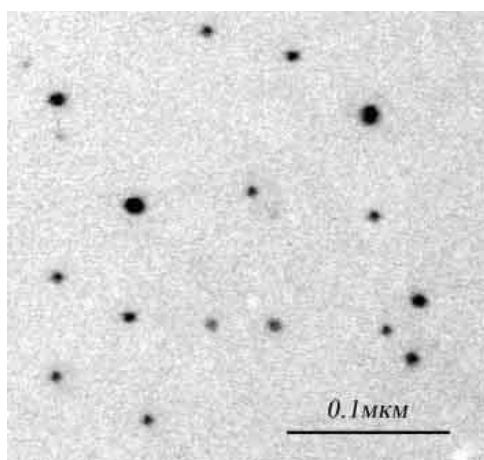


Рисунок 80 – Зависимость длины волны максимума поглощения нанодисперсий, содержащих Au, от среднего диаметра частиц

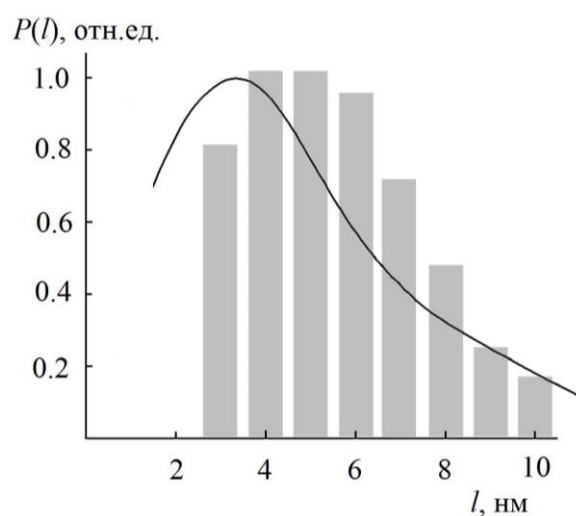
Наличие таких зависимостей позволяет по данным экспресс анализа методом ОС определить не качественные, а количественные размерные характеристики образующихся наночастиц золота.

Наряду с данными полученными РМУ размеры НЧ были определены высокоразрешающей просвечивающей электронной микроскопии (ТЭМ). Метод

ТЭМ в настоящее время широко применяется для исследования наносистем [319-321] и позволяет получать прямое изображение НЧ, то есть «визуализировать» их. Следует отметить, что в процессе подготовки образцов для ТЭМ не происходило слипания НЧ, что свидетельствует о высокой стабилизирующей способности хитозана. Используя программное обеспечение для обработки изображений, был рассчитан средний размер и распределение по размерам НЧ. Из рисунка 81а видно, что НЧ имеют сферическую форму, система НЧ является полидисперсной. По выборке, содержащей более ста частиц была построена гистограмма, приведенная на рисунке 81б. Сплошной линией изображена функция распределения $p(l)$, полученная для этого же образца методом РМУ. Как видно из рисунка 81б результаты методов ТЭМ и РМУ достаточно близки. Наблюдаемые расхождения объясняются тем, что при максимальном увеличении используемого электронного микроскопа порядка $9 \cdot 10^4$ не удастся наблюдать частицы размерами менее 2.5 нм.



а



б

Рисунок 81– ТЭМ изображение наночастиц золота (а) и распределения наночастиц по размерам по данным ТЭМ (гистограмма) и РМУ (кривая) (б)

Таким образом, комплексная диагностика размерных характеристик НЧ золота, полученных *in situ* в растворах хитозана, показала хорошее совпадение абсолютных значений размеров НЧ, определенных методами РМУ и ТЭМ.

Наночастицы имеют сферическую форму и характеризуются узким распределением по размерам. На основании результатов ОС и РМУ установлена линейная корреляция между средним размером НЧ золота и положением максимума плазмонного поглощения в интервале размеров от 2 до 20 нм.

Всегда актуальным является наличие набора приемов, позволяющих управлять размерами формирующихся НЧ. В этом свете было исследовано влияние рН среды и ММ хитозана на форму и размер НЧ золота: был использован хитозан существенно отличающийся молекулярной массой - 7.8×10^4 , его олигомер с молекулярной массой 4×10^3 , а также растворы, представляющие собой аликвотную смесь растворов хитозана и его олигомера. Размеры частиц определяли двумя методами: спектрофотометрически и методом РМУ. Результаты представлены на рисунках 82, 83.

На рисунке 82 представлены спектры поглощения растворов нанокмпозитов.

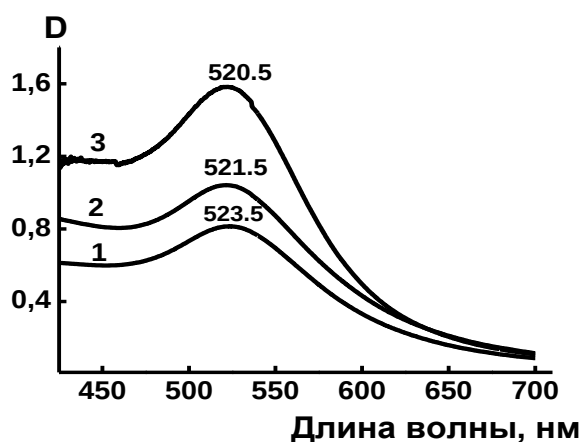


Рисунок 82 – Спектры поглощения дисперсий НЧ золота, стабилизированных хитозаном (1), его олигомером (3) и смесью растворов хитозана и его олигомера (2). Исходная концентрация HAuCl_4 – 1 мас. %

Видно, что максимум поглощения смещается в более длинноволновую область при переходе от раствора олигомера (520.5 нм) к раствору высокомолекулярного хитозана (523.5 нм), что позволяет говорить о формировании в растворе

высокомолекулярного хитозана более крупных по сравнению с раствором олигомера НЧ.

Кривые малоуглового рассеяния дисперсий НЧ золота, стабилизированных хитозаном (1), его олигомером (3) и смесью растворов хитозана и его олигомера (2), в координатах $\lg(I) - \lg(s)$ приведены на рисунке 83.

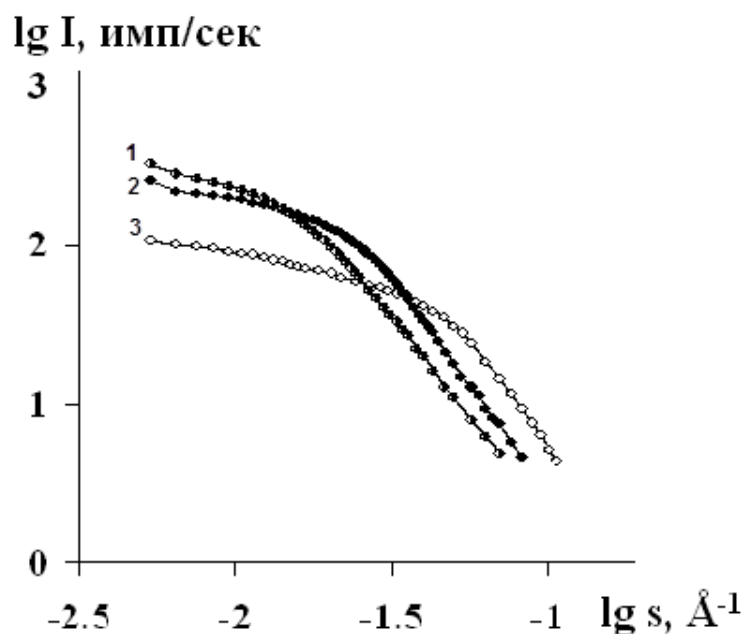


Рисунок 83 – Кривые малоуглового рассеяния дисперсий НЧ золота, стабилизированных хитозаном (1), его олигомером (3) и смесью растворов хитозана и его олигомера (2). Исходная концентрация HAuCl_4 – 1 мас. %

Значительные изменения формы кривых рассеяния свидетельствуют, что молекулярная масса стабилизатора является одним из факторов, определяющих размерные характеристики формирующихся НЧ золота. На рисунке 84 для тех же образцов представлены нормированные функции распределения частиц по размерам $p(l)$.

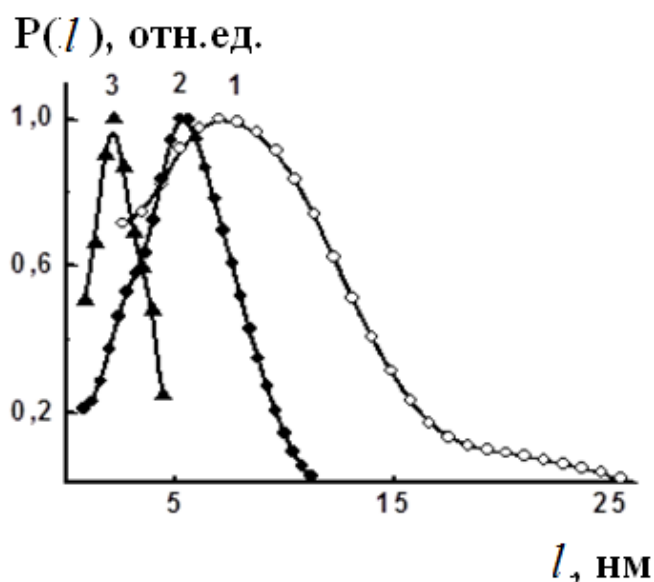


Рисунок 84 – Нормированные на максимум функции распределения частиц по размерам образцов хитозана (1), его олигомера (3) и смеси растворов хитозана и его олигомера (2). Исходная концентрация HAuCl_4 – 1 мас. %

Полученные данные показывают, что средние размеры частиц золота последовательного увеличиваются в ряду олигохитозан (3) → смесь высоко- и низкомолекулярного хитозана (2) → хитозан с высокой молекулярной массой (1) и составляют 3, 5 и 7 нм, соответственно. Анализ формы кривых распределения НЧ по размерам $P(l)$ на их соответствие закону Гауссова или Лоренцева распределения показал, что на начальных этапах формирования НЧ золота в растворах высокомолекулярного хитозана (до 60 мин УФ воздействия) их рост происходит за счет «параллельной» агрегации зародышей атомарного золота Au^0 (распределение Лоренца). Через 90 мин после начала процесса, происходит смена преобладающего механизма роста НЧ и их укрупнение происходит «последовательно» (распределение Гаусса) благодаря диффузии к поверхности кластеров сформировавшегося на этом этапе атомарного золота. Первоначальная концентрация последних вблизи макромолекул высокомолекулярного хитозана будет в несколько раз выше, чем для олигохитозана. Это обусловлено большим количеством аминогрупп в первом случае, протонирование которых при диссоциации HAuCl_4 , являющейся сильной кислотой, приводит к большему содержанию вблизи них ионов AuCl_4^- , а следовательно, и образующихся из них

атомов Au^0 . Принимая во внимание общепринятую модель «непротекаемого клубка», можно предполагать, что в растворах олигохитозана зародыши НЧ золота, полученные на начальных этапах далее практически не растут в силу меньшей локальной концентрации ионов AuCl_4^- вокруг цепей полисахарида по сравнению с таковой для молекул хитозана с высокой молекулярной массой.

Таким образом, использование в качестве стабилизатора хитозана обеспечивает получение НЧ золота с размером от 2 до 20 нм и узким распределением по размерам, а изменение молекулярной массы полисахарида позволяет контролировать их размеры в указанном диапазоне.

Далее было исследовано влияние конформации макромолекул хитозана – клубок или спираль, на размер формирующихся НЧ золота. Известно, что рост степени протонирования аминогрупп хитозана при увеличении концентрации кислот приводит к изменению конформации его макромолекул от жесткой спиральной до рыхлого клубка. Область перехода зависит от молекулярной массы и степени деацетилирования полисахарида. Была определена область конформационного перехода макромолекул хитозана (8.3×10^4 , 1.3×10^5 и 1.6×10^5) при одинаковой степени деацетилирования. Оказалось, что при концентрации в растворе уксусной кислоты 2% (рН 4.08) макромолекулы хитозана принимают конформацию спирали, 6% (рН 3.28) – конформацию статистического клубка. В соответствующих растворах хитозана были получены НЧ золота и определены их размеры (рисунок 85). Вид угловой зависимости интенсивности рассеянного излучения (рисунок 85а) свидетельствует, что в обоих случаях сформировались системы НЧ, для которых характерно достаточно узкое распределение по размерам. На рисунке 85б приведены функции распределения частиц по размерам $p(l)$ для образцов, полученных в растворах хитозана с различным значением рН. Средний размер НЧ золота составляет 2 и 5 нм, в случае спиральной конформации макромолекул полисахарида и конформации рыхлого клубка, соответственно.

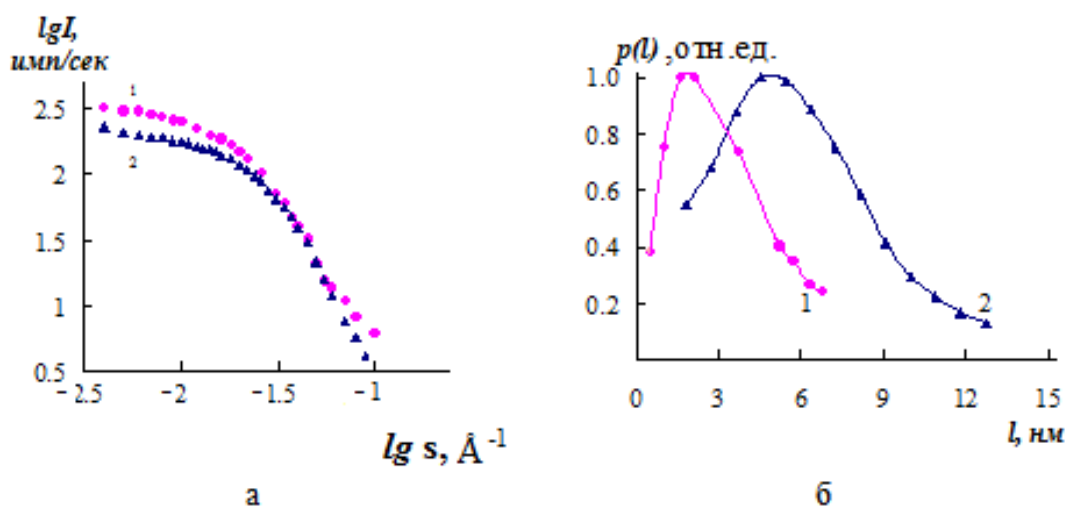


Рисунок 85 – Результаты исследования Au-содержащих нанодисперсий в растворах хитозана (1 - 2 мас.% хитозана в 2 мас.% УК (спираль); 2 - 2 мас.% хитозана в 6 мас.% УК (рыхлый клубок)): а) кривые малоуглового рассеяния в координатах $\lg I$ - $\lg s$, б) функции распределения наночастиц золота по размерам

Вид угловой зависимости интенсивности рассеянного излучения свидетельствует, что в обоих образцах сформировались сравнительно узкие по дисперсности системы НЧ золота без образования блочного золота. Значение фактора формы НЧ золота, стабилизированных макромолекулами ХТЗ в спиральной конформации, составило $f=0.57$, статистического клубка $f=0.78$, т.е. в растворе хитозана формируются НЧ золота сферической формы, полидисперсность системы зависит от конформации. На рисунке 85б приведены функции распределения частиц по размерам $p(l)$. Средний размер для конформации спирали составляет 2 нм, для конформации рыхлого клубка – 5 нм. Наблюдаемый экспериментально эффект, по-видимому, может быть обусловлен тем, что при формировании НЧ в растворах хитозана со спиральной конформацией большая часть НЧ образуется внутри спиралей, витки которых независимо от молекулярной массы полисахарида имеют одинаковые размеры. В силу полидисперсности хитозана по молекулярной массе статистические клубки имеют различное распределение по плотности звеньев, что, соответственно,

приводит к большей полидисперсности НЧ (рисунок 86), чем в случае спиральной конформации.

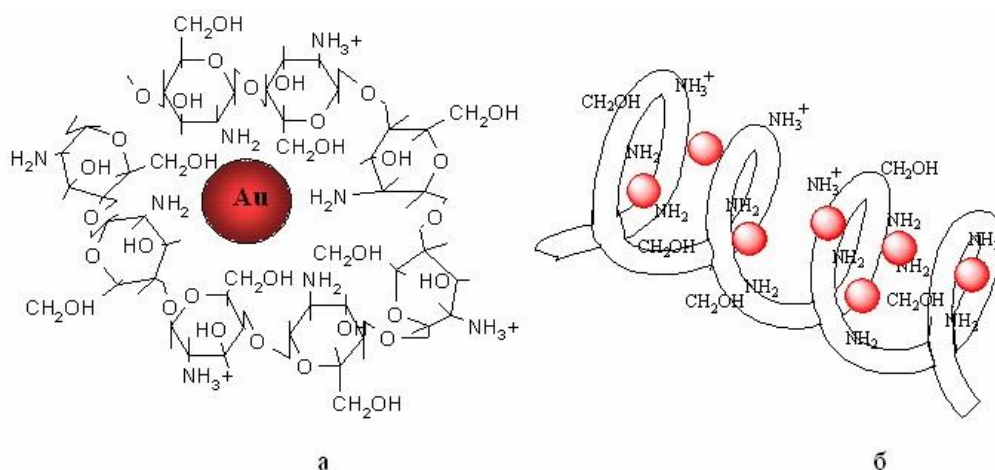


Рисунок 86 – Схема стабилизации наночастиц золота макромолекулами хитозана в его растворе для различных конформаций цепей: а – фрагмент цепи статистического клубка, б – фрагмент цепи спиральной конформации

В обоих случаях стабилизация НЧ происходит как за счет нековалентных взаимодействий полимер – частица, так и за счет непротонированных аминогрупп хитозана, а также гидроксильных групп полисахарида [323-324].

Принципиально важным с точки зрения практического применения дисперсий НЧ золота является их агрегативная устойчивость во времени. Методом РМУ контролировали структуру нанодисперсий в процессе хранения при комнатных температурах в течение 160 дней. На рисунке 87 представлены кривые распределения, полученные в разные сроки хранения. Практическое совпадение кривых распределения в течение изученного времени (~ 6 месяцев) указывает на высокую агрегативную устойчивость дисперсий НЧ золота, стабилизированных хитозаном.

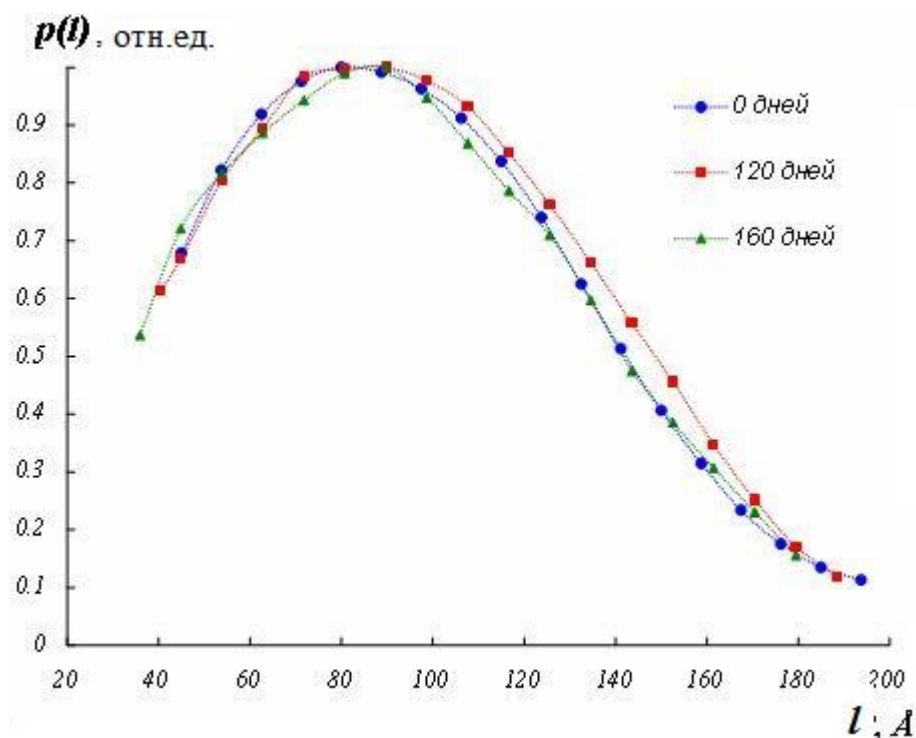


Рисунок 87 – Кривые распределения частиц золота по размерам в нанодисперсиях на основе хитозана в исходном состоянии и после хранения в течение 120 и 160 дней

Таким образом, впервые разработан «green» метод получения НЧ золота в растворах хитозана путем УФ-индуцированного восстановления предварительно введенного в него допанта HAuCl_4 без использования дополнительных восстановителей и стабилизаторов. Выявлено влияние конформационного состояния макромолекул хитозана на размер и полидисперсность образующихся НЧ золота: в растворах со спиральной конформацией макромолекул полисахарида формируются НЧ золота меньших средних размеров $l = 2$ нм и более узким распределением от 1 до 7 нм по сравнению с конформацией статистического клубка $l = 5$ нм и от 2 до 14 нм, соответственно. В обоих случаях форма частиц близка к сферической. Полученные нанокомпозиты характеризуются высокой агрегативной устойчивостью в течение, как минимум, 160 дней. НЧ золота, стабилизированные хитозаном, полученные в работе, представляют интерес не только для применения в медикобиологических целях (поскольку НЧ золота с

размером менее 30 нм являются нетоксичными), но и в качестве высокодисперсных каталитических систем.

3.2. Биологическая активность наночастиц золота стабилизированных хитозаном при их пероральном введении экспериментальным животным

Аминоглюканы, в частности хитозан, благодаря комплексу уникальных свойств могут быть использованы не только в качестве высокоэффективных стабилизаторов НЧ металлов, а также в качестве средств доставки лекарственных препаратов с пролонгированным выделением в тканях. Одной наиболее значимой особенностью хитозана, представляющей интерес для дозификации в фармацевтике и медицине, является его мукоадгезивность [325]. Катионный полисахарид хитозан взаимодействует с сialовыми кислотами слизи пищеварительного тракта: от желудка до ободочной кишки. Биоадгезия хитозана способствует увеличению времени нахождения фармпрепаратов в пищеварительном тракте за счет продолжительного взаимодействия полисахарида с эпителием стенок. В работе [325] на культуре клеток показано, что кроме того хитозан проявляет транспортную функцию. Причем способность хитозана открывать межклеточные контакты практически не зависит от его степени деацетилирования, при условии, что она составляет больше 60%, тогда как молекулярная масса при этом имеет большое значение: наиболее эффективны молекулярные массы полисахарида ~34 000. В литературном обзоре отмечалось, что НЧ металлов (в том числе золота), стабилизированные полимерами различной природы широко применяются в качестве средств доставки лекарственных средств. Однако внимание исследователей направлено, как правило, на использование в качестве стабилизаторов НЧ синтетических полимеров (полиэтиленоксид, ПМА и т.д.). При этом в большинстве случаев нанокомпозиты вводят в организм инъекционным путем, а не per`os.

Таким образом вопрос о поступлении НЧ золота стабилизированных хитозаном во внутреннюю среду организма и распределении их по органам при

пероральном введении остается открытым. При этом не менее важен вопрос и о выводе НЧ из организма.

Пероральный способ введения препаратов является более предпочтительным в силу неинвазивности, простоты, доступности и отсутствия болевого эффекта. В связи с этим было изучено распределение НЧ золота, стабилизированных хитозаном различной молекулярной массы ($\sim 10^5$ - хитозан и $\sim 4 \times 10^3$ - олиго хитозан) по органам экспериментальных животных при курсовом пероральном введении препарата. Результаты представлены в таблице 35.

Таблица 35 – Распределение наночастиц золота, стабилизированных хитозанов в органах экспериментальных животных

Время после окончания введения крысам препарата олигоХТЗ-НЧ золота (0.5мг/кг), сутки	Количество золота в органах (мкг/г или мг/кг)					
	почки	печень	мозг	легкие	селезенка	сердце
1	0.12	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	0.13	Не обнаружено
5	0.10	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	0.05	Не обнаружено
10	0.06	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
Время после окончания введения крысам препарата полиХТЗ-НЧ золота, сутки	Количество золота в органах (мкг/г или мг/кг)					
	почки	печень	мозг	легкие	селезенка	сердце
1	0.25	0.16	Не обнаружено	Не обнаружено	0.06	Не обнаружено
10	2.56	0.56	Не обнаружено	0.06	0.13	Не обнаружено
20	1.28	0.13	Не обнаружено	0.06	Не обнаружено	Не обнаружено

Сравнение данных работы [326] и таблицы 35 показывает, что природа стабилизатора оказывает существенное влияние на распределение НЧ золота по органам. Наночастицы золота, стабилизированные хитозаном, в противоположность системам НЧ золота-полиэтиленоксид и НЧ золота-декстрина, не проникают через гематоэнцефалический барьер и не обнаруживаются в головном мозге. По-видимому, это несоответствие обусловлено различной природой стабилизаторов НЧ (например, полиэтиленоксид) и заряженных макромолекул хитозана. Стенки капилляров мозга не имеют межклеточных щелей и дополнительно оплетены отростками астроцитов, формируя гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Следует отметить, что ГЭБ не является препятствием для диффузии через него лиофильных молекул, в частности, молекул полиэтиленгликоля и декстрина, в то время как заряженные молекулы хитозана-стабилизатора не позволяют НЧ проникать в ткани головного мозга. При этом на распределение НЧ по органам существенное влияние оказывает молекулярная масса полисахарида. При одинаковой дозе вводимого препарата более высокое содержание золота в органах (почти в 2 раза) наблюдается при использовании хитозана с молекулярной массой $\sim 10^5$. Следует отметить, что при приеме *per os* НЧ золота, стабилизированных олигохитозаном, у животных наблюдалось окрашивание помета в сиренево-розовую окраску, что свидетельствует об ограниченном его всасывании и проточном прохождении через кишечник, в противоположность препарату НЧ золота – хитозан высокомолекулярный.

При применении хитозана с молекулярной массой 4000 золото через сутки после окончания процедуры определяется только в двух органах – почках, являющихся органом выделения и селезенке, одной из функций которой является фагоцитоз чужеродных клеток и частиц, накопление антигенов с последующей активацией лимфоцитов. В других тканях золото обнаружено не было. На 5 сутки количество золота снижалось, на 10 сутки практически не определялось ни в каких органах. Использование для стабилизации НЧ золота хитозана с

молекулярной массой $\sim 10^5$ обеспечивало их доставку в ткани почек, печени, легких, селезенки.

По-видимому, существует несколько факторов, обеспечивающих транспорт НЧ золота, стабилизированных заряженным поликатионным хитозаном, к различным органам. Клетки эпителиального слоя слизистой кишечника соединены между собой плотными контактами, что исключает между ними любой промежуток и не позволяет молекулам и ионам проникать из полости пищеварительного тракта во внеклеточный матрикс по межклеточному пространству. Адсорбция и транспорт молекул различных веществ происходит в микроворсинках энтероцитов. Хитозан обладает уникальной способностью раздвигать плотные контакты, что позволяет НЧ транспортироваться между энтероцитами до базальной мембраны.

Базальная мембрана включает в себя коллаген, гликопротеин и отрицательно заряженные гепарансульфат протогликаны (мукополисахариды), которые выполняют роль молекулярного сита, обладающего избирательностью к размеру и заряду молекул. Нейтральные и положительно заряженные молекулы с радиусом до 4 нм (2.5 нм) свободно проникают через этот фильтр до эндотелиальных клеток кровеносных капилляров кишечных ворсинок. Положительный заряд молекул хитозана позволяет НЧ золота успешно преодолевать и этот барьер. Клетки эндотелиальных капилляров имеют поры диаметром до 70 нм (фенестрированный эндотелий) и пропускают почти все вещества за исключением очень крупных молекул. Через поры фенестрированного эндотелия капилляров НЧ попадают в кровоток и с током крови транспортируются к органам. Между клетками капилляров тканей имеются щели с минимальной шириной ~ 4 нм. В посткапиллярных венулах они обычно шире, чем в артериальных капиллярах. Эти особенности обеспечивают проникновение НЧ в ткани органов.

Наблюдаемое различие в проникающей способности и распределении в организме НЧ золота, стабилизированных хитозаном с молекулярными массами $\sim 10^3$ и $\sim 10^5$ может быть обусловлено двумя факторами. С одной стороны, в

макромолекуле полисахарида с молекулярной массой $\sim 10^5$ число NH_2 - групп в ~ 20 - 25 раз выше, чем в олигохитозане, а именно они определяют его мукоадгезивные свойства, следовательно обеспечивают более длительный контакт с эпителием стенок и более эффективное проникновение в межклеточные контакты. С другой стороны, в работе [325] показано, что положительного заряда самого по себе недостаточно для открытия плотных контактов между эпителиальными клетками, и полимер должен обладать достаточно высокой молекулярной массой, при этом наибольшей эффективностью для раскрытия цитоплазматических мембран обладают макромолекулы с молекулярной массой ~ 34000 .

В настоящей работе наибольшая эффективность при поступлении НЧ золота к органам, наблюдалась при использовании высокомолекулярного хитозана. Известно, что хитозан при попадании в пищеварительный тракт гидролизует, а затем расщепляется ферментами на фрагменты с различной молекулярной массой, вплоть до глюкозамина. Поэтому было исследовано изменение молекулярно-массовых и вязкостных характеристик хитозана и нанокомпозита хитозан-НЧ золота *in vitro* под действием полиферментного препарата «Панкреатин» (рисунок 88).

Из рисунка 88 видно, что при одной и той же молекулярной массе хитозана вязкость растворов исходного хитозана и препарата НЧ-хитозан отличается в ~ 2 раза. Последнее обусловлено более компактной структурой нанокомпозита по сравнению с макромолекулой немодифицированного полисахарида. В пределах ошибки вискозиметрического метода определения молекулярная масса хитозана в обоих случаях снижается одинаково (до $\sim 30\,000$), а ее значение соответствует наиболее оптимальной [325] для эффективного проникновения компонентов препарата в клетки организма.

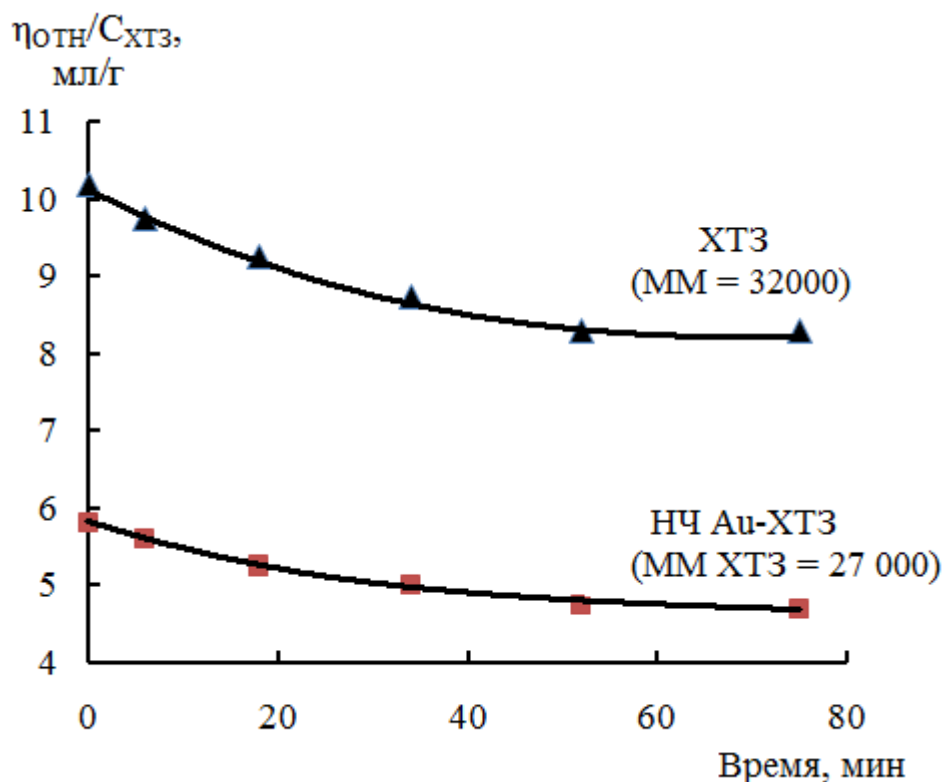


Рисунок 88 – Изменение приведенной вязкости ($\eta_{отн}/C_{хтз}$, мл/г) растворов хитозана (1) и нанокompозита хитозан-золото (2) в присутствии препарата «Панкреатин» во времени

Таким образом, молекулы хитозана с молекулярной массой $\sim 10^5$ обеспечивают не только получение стабильных во времени НЧ золота, но и осуществляют их направленную доставку к органам-мишеням организма. При этом ферментативная система организма расщепляет макромолекулы хитозана до оптимального значения их молекулярной массы $\sim 30\,000 - 35\,000$, наиболее эффективной при раскрытии межклеточных контактов.

Далее была изучена возможность использования нанокompозита хитозан – НЧ золота в качестве основы для создания мультикомпонентных препаратов и доставки лекарственных средств при пероральном применении. На экспериментальных животных исследовалась биологическая активность как основы, так и полученного препарата. Одним из показателей биологической активности является антиоксидантная способность препарата [327-329]. В данной работе в качестве модели окислительного стресса рассматривалась

гипоборическая гипоксия. Адаптогенные эффекты оценивали по соотношению в крови лактат/пируват, а также активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), которые являются ключевыми показателями состояния энергетического обмена при гипоксии, позволяющего судить о тяжести гипоксии и частичном переходе организма с аэробного энергообеспечения (окислительного фосфорилирования) на анаэробное (гликолиз). В норме протекает преимущественно аэробный гликолиз конечным продуктом, которого является пируват. В дальнейшем он окисляется в цикле Кребса и не накапливается. При гипоксии в связи с угнетением аэробного дыхания происходит снижение скорости реакций цикла Кребса, скорость утилизации пирувата уменьшается и поэтому он окисляется преимущественно до лактата (в присутствии ЛДГ), что приводит к закислению внутренней среды организма и увеличению соотношения лактат/пируват.

Исследование антигипоксических свойств золотосодержащих нанокмполитов высокомолекулярного хитозана через 1 сутки после окончания введения препаратов (1 серия опытов) показало отсутствие какого-либо защитного эффекта. Однако уже через 1 неделю после окончания введения препаратов (1 серия опытов) у экспериментальных животных наблюдалось явно выраженное формирование резистентности к гипоборической гипоксии. В крови у животных опытной группы ~ в 3 раза уменьшалось отношение лактат/пируват и на 27% общая активность фермента ЛДГ по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы (таблица 36). При этом активность ЛДГ в опытной группе не отличалась от уровня интактных животных, отношение лактат/пируват было достоверно меньше по сравнению с условной нормой (интактные) (таблица 36).

Полученные результаты показывают, что дисперсии НЧ золота в хитозане полностью нормализуют энергетический обмен при гипоксии, являющегося лимитирующим фактором нормального функционирования систем органов, характеризующихся высоким потреблением кислорода (сердце, головной мозг, которые потребляют до 50% всего кислорода, используемого организмом).

Таблица 36 – Некоторые показатели периферической крови у крыс при создании гипобарической гипоксии через 7 суток после окончания введения препаратов

Группа	Отношение лактат/пируват	Активность ЛДГ, мкмоль/мкг белка в мин	Гемоглобин, г/л	Эритроциты, кл/мкл ($\times 10^6$)
Интактные	1.55 $\pm$ 0.13	156.3 $\pm$ 13.9	120.3 $\pm$ 6.29	4.74 $\pm$ 0.28
Контроль (плацебо)	2.48 $\pm$ 0.23*	177.5 $\pm$ 17.8	134.0 $\pm$ 13.20*	4.13 $\pm$ 0.37
Наноккомпозит	0.84 $\pm$ 0.10*+	129.4 $\pm$ 4.9#+	134.0 $\pm$ 6.60*	4.57 $\pm$ 0.15

Примечание: *-p<0.05 по отношению к интактным; + -p<0.05 по отношению к уксусной кислоте

Потенциальное применение разработанных композиций в медицине и фармации предполагает наличие у них бактерицидной активности. Поэтому, совместно с отделом биологических исследований НИИ Химии ННГУ были проведены испытания бактерицидных свойств НЧ золота в растворах хитозана. В качестве тест культур использовали бактерии вида: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*. Результаты испытаний представлены в таблице 37. В таблице 37 указан радиус зоны ингибирования роста тест-культур бактерий.

Таблица 37 – Результаты исследования бактерицидной активности ряда композиций

Состав композиции	Зона ингибирования роста бактерий, R (мм)				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Хитозан без НЧ	-	1	-	3	2
НЧ золота 0.001 мас.%	1	2	2	2	2
НЧ золота 0.01 мас.%	3	3	2	2	2
НЧ золота 3 мас.%	-	5	-	5	5

Из таблицы 37 видно, что композиции, содержащие до 0.01 мас.% НЧ обладали слабобактерицидными свойствами по отношению к используемым тест-культурам бактерий. Увеличение содержания НЧ золота до 3 мас. % привело к заметному росту бактерицидного эффекта по отношению к тест-культурам наиболее опасных и распространенных бактерий.

Совокупность полученных результатов послужила основой для разработки наноструктурированных многокомпонентных систем типа «наночастицы золота-биологически активные вещества белковой природы-хитозан» для перорального применения.

3.3. Новые биологически активные системы типа « наночастицы с ядром из благородных металлов и многослойной оболочкой из природных полимеров». Синтез, структурная организация, адаптогенные и цитотоксические свойства

Хитозан благодаря низкой токсичности, биосовместимости, уникальным биологическим свойствам, широким возможностям химических модификаций и способности стабилизировать НЧ металлов, является исключительно перспективной основой при разработке препаратов нового поколения с адаптогенными и цитотоксическими свойствами. Разработанные ранее подходы к модификациям хитозана и направленному получению НЧ требуемого размера являются высокоэффективным и гибким инструментом для создания нанокомпозитов с заданными биологическими свойствами.

Одним из приоритетных направлений современной экспериментальной химии полимеров и материаловедения является дизайн и синтез нанокомпозитов, обладающих комплексом заданных свойств, определяемых синергетическим сочетанием размерных эффектов наночастиц и оригинальных полимеров, стабилизирующих эти наночастицы. В настоящее время для решения актуальных задач биологии, фармакологии, биотехнологии и медицины активно применяется нанотехнологический синтез неорганно-органических нанокомпозитов, способных осуществлять направленную доставку лекарственных средств к различным органам, пролонгированно их выделять, и предназначенных для лечения социально значимых заболеваний, таких как ишемическое состояние, злокачественные новообразования, сахарный диабет. Анализ литературных данных показывает, что наиболее перспективными для решения этих целей являются материалы на основе НЧ благородных металлов, заключенных в разнообразные полимерные матрицы [330-332].

Среди интенсивно развивающихся методов получения нанобиокомпозитных материалов наиболее привлекательным с позиции доступности и экологической безопасности является рассмотренный ранее метод восстановления прекурсоров

благородных металлов в водных средах под действием УФ, с одновременным включением образовавшихся НЧ в органические полимерные матрицы, прежде всего природных полимеров [319] - хитозана. Как отмечалось ранее, такой подход открывает новые возможности "green" химии синтеза НЧ металлов в одну стадию, без их дополнительного выделения, очистки и стабилизации. При этом ожидается синергетическое объединение свойств полимерной матрицы (биологическая активность, гидродинамические свойства) и наноразмерного металлического ядра (оптические, биологические, теплофизические, электрические свойства), что обуславливает получение необходимых характеристик нанокомпозитов.

Создание систем на основе хитозана для контролируемой, специфичной доставки лекарств является актуальной задачей, т.к. они могут применяться не только для инъекционного, но и для интраназального, перорального, трансдермального, окулярного введения лекарств [1]. С помощью таких систем, как показано выше, возможна доставка лекарств в кишечник, печень, почки и легкие. С другой стороны, возможности химических модификаций хитозана очень широки и для доставки лекарств предлагаются различного рода «контейнеры», в виде гидрогелей, химически-модифицированных форм полисахарида, а также полиэлектролитных комплексов хитозана как с природными, так и с синтетическими полимерами. Высвобождение лекарств можно контролировать с помощью температуры, pH, тканеспецифичной ферментативной активности или электромагнитного поля. Особую роль прицельная доставка лекарств играет в противоопухолевой терапии. Все противоопухолевые соединения токсичны для организма, и усиление терапевтического эффекта требует создания условий специфичного высвобождения препарата в опухоли.

Актуальной задачей является создание новых высокоэффективных многокомпонентных нанокомпозитов, предназначенных для лечения не только злокачественных опухолей, но и таких социально значимых и наиболее распространенных заболеваний, как сердечно-сосудистые и сахарный диабет. В настоящее время заместительная терапия больных сахарным диабетом проводится введением инсулина в форме инъекций. Последнее доставляет

достаточно много неудобств пациентам, что определяет необходимость создания инсулинсодержащих препаратов для перорального применения.

В проведенных ранее экспериментах на животных показаны высокая биологическая активность пчелиного яда при его парентеральном введении на сердечно-сосудистую, нервную, дыхательную системы, на антиоксидантную активность, выявлена его адаптогенная эффективность при действии экстремальных факторов [333, 334]. Однако из-за привычно высокой антигенной и биологической активности невозможно введение зоотоксина в форме инъекций в организм человека. Белковая природа инсулина и зоотоксина пчел делает невозможным их прямое пероральное применение, так как они подвергаются протеолитическому действию пищеварительных ферментов желудка и тонкого кишечника, распадаясь в конечном итоге до свободных аминокислот. Успехи нанотехнологии позволяют создавать НЧ, способные при пероральном введении в организм преодолевать эпителиальный барьер кишечника и попадать в кровь. Эффективным стабилизатором НЧ может служить либо хитозан либо сами белковые молекулы с сохранением активного начала.

С целью обоснования возможности формирования нанокompозита наночастицы золота-полипептид-оболочка хитозана был выполнен комплекс коллоидно-химических исследований:

- определение изоэлектрической точки и величины электрокинетического потенциала, которые бы охарактеризовали суммарный заряд белковых молекул при растворении его в воде и различных значениях pH-среды;
- изучение влияния зоотоксина на поверхностное натяжение водных растворов и дисперсий, содержащих наночастицы золота – как характеристику способности зоотоксина адсорбироваться на наночастицах золота;
- способность к смачиванию растворами пчелиного яда поверхностей, покрытых слоем наночастиц золота или хитозана – как доказательство образования межмолекулярного адгезионного взаимодействия этих компонентов.

- определение электрокинетического потенциала и направления движения нанокompозита, как доказательство создания поверхности защитного слоя полисахарида на наночастицах.

Поскольку стабилизация НЧ происходит за счет системы нековалентных взаимодействий и ионных связей была определена изоэлектрическая точка макромолекул пчелиного яда (рисунок 89) – рН, при котором количество ионизированных основных групп равно количеству ионизированных кислотных групп, при этом число как тех, так и других минимально, и в этих условиях выполнено формирование НЧ. Из рисунка 89 видно, что значение рН, равное 4.52 отвечает изоэлектрическому состоянию пчелиного яда. Это говорит о том, что кислотные свойства макромолекул белка доминируют над основными.

При электрофорезе водных растворов пчелиного яда наблюдалось движение его границы к положительному полюсу (для удобства растворы подкрашивали метиловым оранжевым концентрацией 10^{-4} М). Величина электрокинетического потенциала оказалась равной 36.3 мВ.

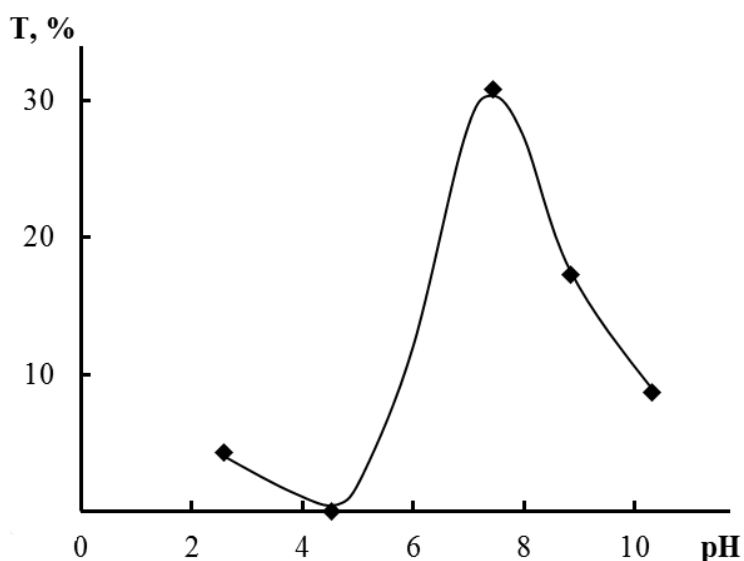


Рисунок 89 – Зависимость оптических свойств раствора пчелиного яда от рН среды, концентрация пчелиного яда 0.1 мас. %

Формирование НЧ золота из HAuCl_4 при ее фотолизе в растворах пчелиного яда проводили при рН 4.52, отвечающему изоэлектрической точке белка по методике, разработанной для хитозана. О формировании НЧ судили по

появлению полос поглощения в видимой области спектра ($\lambda=510-530$ нм), соответствующих их плазмонному резонансу.

Методом малоуглового рентгеновского рассеивания были установлены размеры НЧ, которые составили 8 – 10 нм. Дисперсия сохраняла агрегативную устойчивость в течение 3-х суток, о чем свидетельствовала неизменность спектра поглощения НЧ золота в течение этого времени. Таким образом, адсорбция белковых молекул на поверхности образующихся НЧ золота приводит к стабилизации последних.

Адсорбция макромолекул белка на поверхности НЧ подтверждена в опытах по изучению поверхностного натяжения. Из таблицы 38 видно, что при увеличении концентрации пчелиного яда в 10 раз, поверхностное натяжение его растворов уменьшается с 62.2 до 48.9 мН/м. Понижение поверхностного натяжения воды в растворах белков обусловлено формированием на границе раздела вода-воздух адсорбционных монослоев.

Таблица 38 – Поверхностное натяжение растворов пчелиного яда различных концентраций, $T=298$ К

Концентрация пчелиного яда %	0.01	0.02	0.05	0.08	0.1
σ_0 воды, ·мН/м	72.6				
σ растворов, ·мН/м	62.2	57.7	54.8	51.9	48.9

Дальнейшие измерения поверхностного натяжения позволили подтвердить адсорбцию макромолекул пчелиного яда на НЧ золота. Для исследования адсорбции пчелиного яда на НЧ золота параллельно контролировали нарастание содержания образующихся НЧ при УФ-воздействии на раствор HAuCl_4 и поверхностное натяжение этих растворов (рисунок 90).

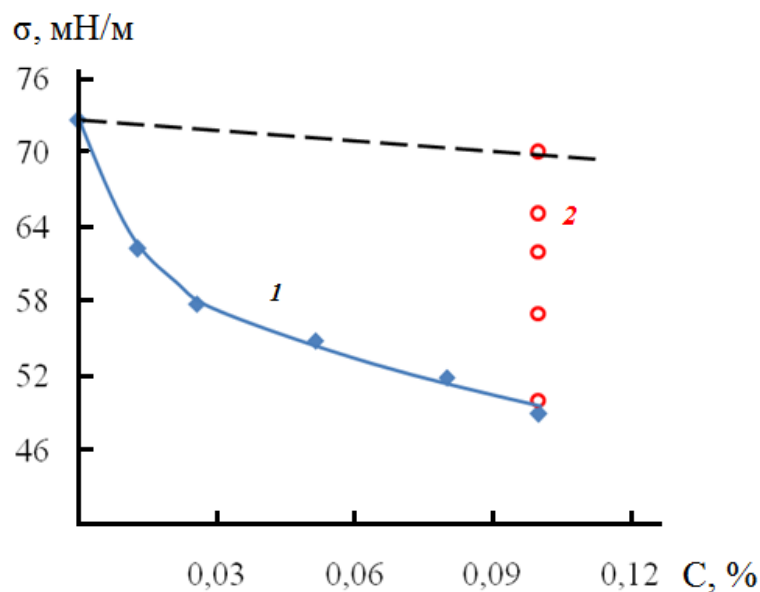


Рисунок 90 – Зависимость поверхностного натяжения растворов пчелиного яда различной концентрации (1) и его раствора с концентрацией 0.1 мас. %, содержащего HAuCl_4 в процессе формирования в нем наночастиц золота при УФ-воздействии (2-о)

Исследовали раствор пчелиного яда с концентрацией, когда поверхностное натяжение водного раствора достигало максимального снижения – 0.1 мас.%. Данные по изменению поверхностного натяжения согласуются с данными УФ-спектроскопии: через 7 часов 30 мин после начала УФ-воздействия на раствор пчелиного яда, допированного HAuCl_4 , практически все молекулы пептида адсорбировались на НЧ золота.

Для предотвращения разрушения белка в пищеварительном тракте защищали его избытком введенного в систему хитозана. Для подтверждения адсорбции пчелиного яда на НЧ золота, а также существования интерполимерного взаимодействия пчелиного яда с хитозаном была изучена смачиваемость поверхностей пластины, покрытой слоем НЧ золота или хитозана. Смачиваемость может зависеть от разных свойств твердой поверхности. На рисунке 91 представлены кинетические кривые, каждая из которых соответствует определенному значению концентрации пчелиного яда.

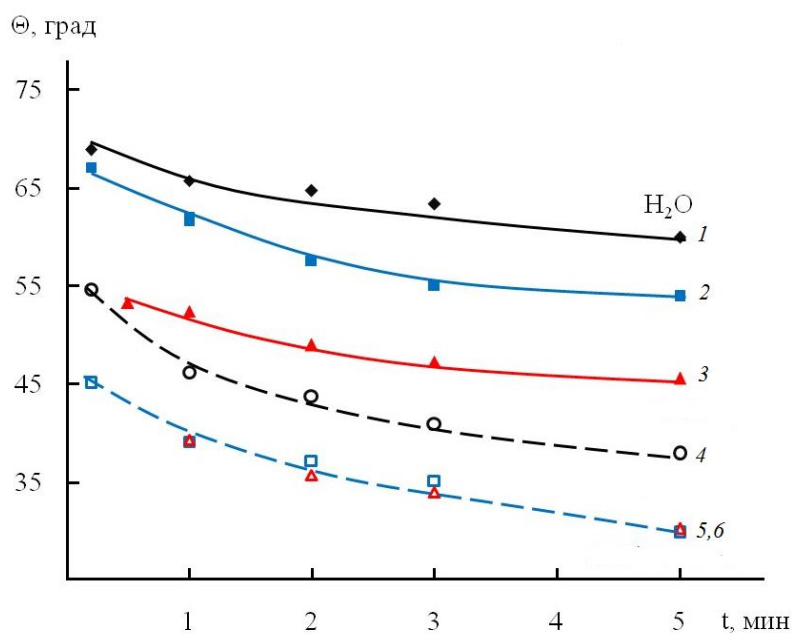


Рисунок 91 – Кинетика смачивания золотой пластины растворами различной концентрации зоотоксина: 1 – H₂O, 2 – 0.01% ПЯ, 3 – 0.02% ПЯ, 4 – 0.1 % ПЯ, 5 – 0.05% ПЯ, 6 – 0.08% ПЯ

Из рисунка 92 видно, что при увеличении концентрации пчелиного яда, значения косинусов краевого угла смачивания хитозановой пластины и пластины, покрытой золотом увеличивается.

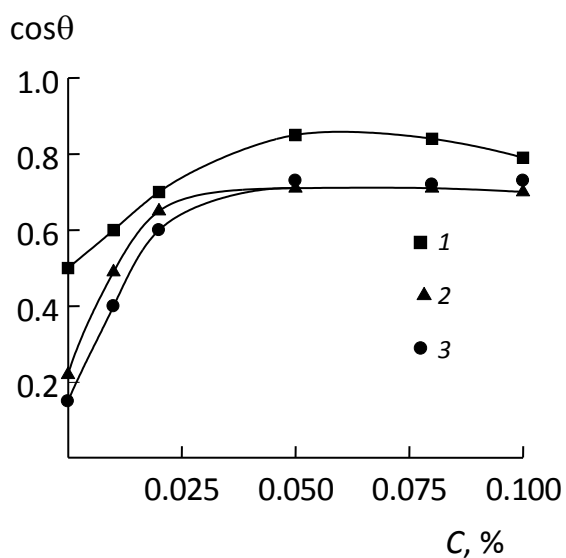


Рисунок 92 – Изотермы смачивания золотой пластины (1), хитозановых пластин (2, 3), растворами пчелиного яда в воде (1, 2) и в буферном растворе (3);

$T = 21^{\circ}\text{C}$

Таким образом, результаты по измерению поверхностного натяжения водных растворов пчелиного яда в присутствии НЧ золота и увеличении смачиваемости поверхности НЧ золота с повышением концентрации белка в растворе однозначно указывают на адсорбцию его молекул на НЧ золота. Изменение смачивания поверхности хитозановой пленки раствором пчелиного яда (рисунок 92) - существенное возрастание смачиваемости с увеличением концентрации – указывает на взаимодействие молекул белка и полисахарида.

Комплекс коллоидно-химических исследований позволил создать мультикомпонентную систему по принципу «индифферентное ядро-ПЯ-ХТЗ», а выявленная в условиях гипоксии антиоксидантная активность системы НЧ золота-ХТЗ и известные радиопротекторные свойства ПЯ при инъекционном применении послужили основанием для изучения радиозащитных свойств мультикомпонентной системы «НЧ Au-ПЯ-ХТЗ» (далее биопрепарат). Для этого животных подвергали однократному общему γ -облучению (^{60}Co) на терапевтической установке «АГАТ-С» в дозе 5 Гр (мощность дозы 1 Гр/мин), вызывающей развитие костномозговой формы лучевой болезни средней степени тяжести, при которой явно проявляются все признаки лучевого поражения. Облучение проводили через неделю после окончания курсового введения препаратов. Животные группы «контроль на облучение» биопрепараты не получали и подвергались только облучению. Через 3 и 14 сутки после облучения в крови животных определяли содержание лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, лейкоцитарный коэффициент и концентрацию гемоглобина.

В системе белой крови на 3 сутки после облучения в группах «контроль на облучение» и «хитозан+золото» наблюдалось снижение в 4 раза количества лейкоцитов по отношению к интактным животным, что свидетельствует о повреждающем действии гамма-облучения (таблица 39). При этом необходимо отметить, что содержание количества лейкоцитов в группе «НЧ золота – ПЯ – ХТЗ», было статистически значимо выше ($p < 0.05$) показателей животных группы «контроль на облучение» и приближалось к показателям интактных.

Таблица 39 – Влияние курсового перорального введения биопрепарата на некоторые показатели периферической крови экспериментальных животных в условиях гамма-облучения в дозе 5 Гр

Показатели	сутки	Группы животных			
		Интактные	Контроль (облучение)	Контроль (хитозан + золото)	НЧ золота – ПЯ (0.5 мг/кг)– ХТЗ (Биопрепарат)
Гемоглобин, г/л	3	164.2 ± 6.8	147.8 ± 6.3	136.2 ± 4.88	114.3 ± 3.1
	14	135.3 ± 5.68	93.2 ± 6.67*	93.75 ± 9.06*	114.7 ± 7.63
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	3	15.36 ± 1.48	3.1 ± 0.3	4.96 ± 0.37	10.5 ± 2.2 #
	14	14.5 ± 1.2	4.85 ± 1.07*	5.75 ± 1.1*	13.03 ± 1.1
Сегментоядерные нейтрофилы, %	3	19.7 ± 1.74	56.25 ± 1.78*	55.2 ± 1.59*	51.0 ± 3.0 *
	14	26.97 ± 1.44	23.4 ± 2.38	17.83 ± 2.34	21.83 ± 1.85
Лимфоциты, %	3	65.5 ± 5.3	28.88 ± 1.45*	11.8 ± 0.66*	22.4 ± 2.34 *
	14	64.4 ± 2.3	66.7 ± 3.65	68.83 ± 4.84	63.5 ± 3.14

Примечание: *- $p \leq 0.05$ по отношению к интактным животным, # - $p \leq 0.05$ по отношению к группе «контроль на облучение», + - $p \leq 0.05$ по отношению к контрольным животным.

В течение следующих 2-х недель количество лейкоцитов в группе «НЧ золота – ПЯ – ХТЗ» достигло уровня интактных животных. У животных контрольных групп через 14 суток после облучения – период максимального проявления повреждающего действия радиации – сохранялась выраженная лейкопения, в 1.8 раза уменьшалось содержание гемоглобина.

На 28 сутки после облучения у животных опытной группы «НЧ золота – ПЯ – ХТЗ» содержание лейкоцитов, гемоглобина практически не отличалось от значений у интактных животных, что указывало на окончание восстановительных процессов. У животных контрольных групп количество лейкоцитов превышало

норму в 2 раза (до 25.45×10^9 кл/л), что свидетельствовало о протекании воспалительных процессов в организме животных.

Таким образом, результаты этой серии экспериментов свидетельствуют, что курсовое пероральное введение животным наноструктурированных биопрепаратов (пчелиный яд – хитозан – наночастицы золота) сопровождается возникновением радиорезистентности, что с большой долей вероятности связано с развитием у них антистрессорной реакции устойчивой активации. При данном состоянии происходит истинное повышение активной резистентности организма - не за счет развития торможения и снижения чувствительности (как при стрессе), а за счет истинного подъема активности защитных подсистем организма.

Ранее в экспериментах на животных показаны высокая биологическая активность пчелиного яда при его парентеральном введении на сердечно-сосудистую, нервную, дыхательную системы, на антиоксидантную активность, выявлена его адаптогенная эффективность при действии экстремальных факторов [334]. Учеными Медицинской школы Вашингтонского университета успешно был инкапсулирован основной токсин пчелиного яда – мелитин и продемонстрировано его применение в качестве противораковой терапии у мышей [335, 336]. Однако исследований пчелиного яда, как комплексной многокомпонентной системы, эффективность которой гораздо выше, чем ее отдельных индивидуальных компонентов при опухолевых процессах, не проводилось.

Исследование антиоксидантной и противоопухолевой активности наноструктурированного препарата «наночастицы золота – пчелиный яд – хитозан» (НЧ золота – ПЯ – ХТЗ) при инъекционном применении проводили на лабораторных животных с привитой опухолью карциномы печени штамма РС-1. В работе использовали водные растворы дисперсии НЧ золота с адсорбированным на них пчелиным ядом, экранированным хитозаном с размером частиц от 5 до 10 нм. Ингибирующее действие препаратов на рост опухоли оценивали по площади новообразований у контрольных и опытных животных и по показателям крови. Результаты приведены в таблицах 40-42, рисунок 93.

Таблица 40 – Площадь поверхности опухоли на 28 сутки после окончания введения препаратов для различных групп животных опухоленосителей

Группы животных	Площадь (мм ²)	
	Начало терапии через 7 дней после перевивки опухоли	Начало терапии через 14 дней после перевивки опухоли
Контроль 1 Без введения препарата	1582±116	1750±68
Контроль 2 Введение препарата НЧ золота –ХТЗ	584±43**	812±51**
Опыт Введение препарата НЧ золота – ПЯ – ХТЗ	302±24**	617±37**

Примечание: статистически значимые отличия: ** - $p < 0.05$ по отношению к контрольным животным. Дозы компонентов препаратов: хитозан 100 мг/кг, наночастицы золота – 0.25 мг/кг, пчелиный яд – 0.5 мг/кг. Терапию проводили в течении 10 дней путем обкалывания опухоли 1 раз в 2 суток

Значение площади опухолей у опытных животных, получавших препарат НЧ золота – ПЯ – ХТЗ при более ранних сроках начала терапии (7 дней после перевивки) была в 5 раз меньше, а при более поздней (14 дней после перевивки) ~ в 3 раза меньше, чем в контроле 1 (животные опухоленосители) ($p < 0.05$). Полученные данные указывают, что многокомпонентный препарат НЧ золота – ПЯ – ХТЗ явно ингибирует рост опухоли. Положительное противоопухолевое действие препарата подтверждается также индикаторными показателями крови, характеризующими иммунный статус и функциональное состояние организма (таблица 41). Примечательно, что ингибирующий эффект зависит от стадии роста опухоли.

Таблица 41 – Количество лейкоцитов и значения индикаторных показателей крови крыс-опухоленосителей на 28 сутки после окончания введения препаратов

Группы животных	Количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	Сегментоядерные нейтрофилы, %	Лимфоциты, %	Лейкоцитарный коэффициент
Начало терапии через 7 дней после перевивки опухоли				
интактные	11.27 $\pm$ 1.45	8.70 $\pm$ 0.82	51.70 $\pm$ 4.40	6.73 $\pm$ 1.06
Контроль 1	9.36 $\pm$ 0.30*	19.14 $\pm$ 0.88*	36.00 $\pm$ 1.63*	1.91 $\pm$ 0.15*
Контроль 2	10.66 $\pm$ 0.89	9.22 $\pm$ 0.57**	48.22 $\pm$ 3.44	6.01 $\pm$ 0.81**
Опыт	8.64 $\pm$ 1.01**	11.25 $\pm$ 1.16**	54.25 $\pm$ 3.43**	5.36 $\pm$ 0.72**
Начало терапии через 14 дней после перевивки опухоли				
интактные		9.17 $\pm$ 0.57	67.20 $\pm$ 1.03	7.4 $\pm$ 1.03
Контроль 1		22.93 $\pm$ 1.03	48.14 $\pm$ 2.5 *	2.18 $\pm$ 0.41
Контроль 2		11.14 $\pm$ 3.26 **	55.04 $\pm$ 5.89 *	5.0 $\pm$ 0.84 **
Опыт		13.08 $\pm$ 1.48 **	61.78 $\pm$ 4.4 **	4.7 $\pm$ 0.97

Примечание: статистически значимые отличия: * - $p < 0.05$ по отношению к интактным животным; ** - $p < 0.05$ по отношению к контрольным животным. Группы животных и дозы компонентов препаратов как в таблице 40

У животных, получавших препарат, количество лимфоцитов, обеспечивающих специфический иммунитет, в обоих случаях стадии роста опухоли практически совпадало со значением интактных, в то время как у животных опухоленосителей контрольной группы 1 было в 1.5 раза меньше. Значение лейкоцитарного коэффициента у животных, которым проводили лечение, также было близко к показателям интактной группы, в то время как в контроле (животные без терапии) было в несколько раз ниже. Это свидетельствует о том, что состояние организма опытных животных, равно как и животных, получавших препарат наночастицы золота – хитозан близко к норме, в то время как животные контрольной группы 1 (без терапии) находятся в состоянии стресса.

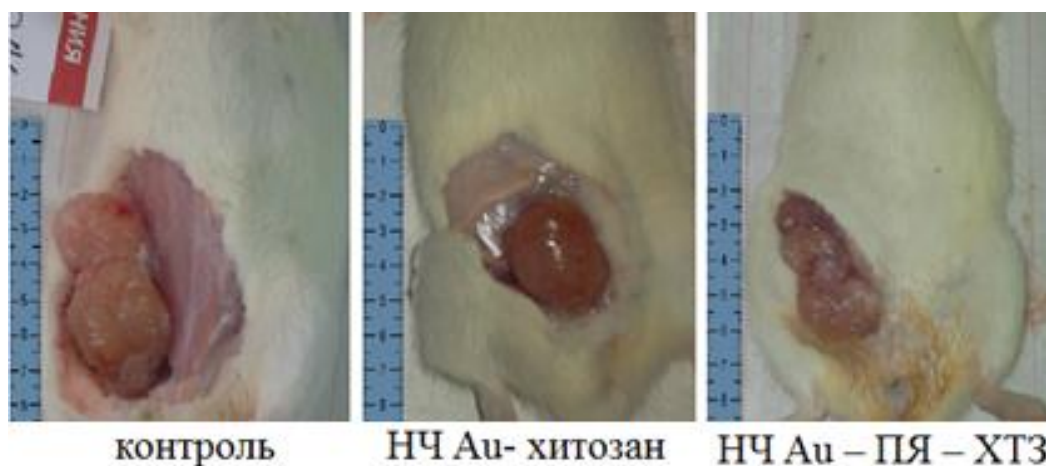


Рисунок 93 – Фотографии опухолей на 28-й день после окончания терапии препаратом для разных групп животных (терапия начинали на 14 день после перевивки опухоли)

С увеличением опухоли ее устойчивость к действию препарата при использованных концентрациях и режимах «терапии» возрастает, хотя лечебный эффект наблюдается и в этом случае. Это указывает на необходимость корректировки терапии в зависимости от степени роста опухоли.

В таблице 42 приведены показатели активности свободно-радикальных процессов по анализируемым группам животных. Для сравнительной характеристики активности свободно-радикальных и антиоксидантных процессов необходимо одновременно учитывать величины $I_{\max}$ и $1/S$, характеризующие, соответственно, способность системы к свободно-радикальному окислению и емкость антиоксидантной системы. В обоих случаях терапии значение $I_{\max}$ в контрольных группах 1 было значимо выше, чем у интактных. Показатель $I_{\max}$ опытных животных значительно ниже, чем у интактных, т.е. их организм вышел из состояния окислительного стресса. Способность малых доз пчелиного яда переводить организм из состояния стресса в состояние относительной нормы наблюдали в условиях гипоксии. Следует отметить, что выраженное антиоксидантное действие во второй серии опытов также проявляет система наночастицы золота – хитозан. У животных прошедших терапию препаратом с пчелиным ядом значение $1/S$ даже выше, чем у интактных, т.е. система

эффективно ингибирует развитие свободно-радикальных процессов. Высокое значение $I_{\max}$ при относительно низких величинах $1/S$ у животных-опухоленосителей контрольной группы 1 свидетельствует о сдвиге баланса между анти- и прооксидантными процессами у них в сторону последних.

Таблица 42 – Показатели БХЛ в плазме крови животных-опухоленосителей на 28 сутки после окончания введения препаратов

Группы животных	$I_{\max}$ (mv)	$1/S$ ($\times 10^{-3}$)
Начало терапии через 7 дней после перевивки опухоли		
Интактные	190.20 ± 9.34	1.00 ± 0.01
Контроль 1	$245.50 \pm 12.87^*$	1.06 ± 0.02
Контроль 2	$255.10 \pm 16.12^*$	1.00 ± 0.02
Опыт	$155.20 \pm 13.81^{**}$	$1.18 \pm 0.03^{*,**}$
Начало терапии через 14 дней после перевивки опухоли		
Интактные	171.25 ± 21.627	0.85 ± 0.01
Контроль 1	$218.50 \pm 23.23^*$	0.87 ± 0.02
Контроль 2	$148.20 \pm 20.12^{***}$	$1.51 \pm 0.08^{***}$
Опыт	$131.5 \pm 17.81^{***}$	$1.46 \pm 0.03^{*,**}$

Примечание: статистически значимые отличия: * - $p < 0.05$ по отношению к интактным животным; ** - $p < 0.05$ по отношению к контрольным животным(1). Группы животных и дозы компонентов препаратов как в таблице 40

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что наноструктурированный препарат НЧ золота – ПЯ – ХТЗ в терапевтических дозах (на порядок меньше токсичных) эффективно ингибирует рост перевитой опухоли РС-1(альвеолярный рак печени), проявляя при этом выраженную антиоксидантную и адаптогенную активность.

В заключении следует отметить, что пчелиный яд в составе комплексного биопрепарата (НЧ золота – ПЯ – ХТЗ) устойчив к действию протеаз при пероральном введении. Препарат способен проникать через слизистую кишечника

и оказывать синергетический энергосберегающий и адаптогенный эффект в условиях действия экологически неблагоприятных факторов: гипоксии и γ -излучения (перекрестная резистентность). Кроме того, обладает ярко выраженной противоопухолевой активностью. Полученные результаты могут послужить основой для создания нового многофункционального лекарственного средства, незаменимого для людей, работающих в экстремальных условиях и склонных к развитию злокачественных новообразований.

ГЛАВА 4. Экспериментальная часть

4.1. Методы получения привитых и блок-сополимеров хитозана с виниловыми мономерами

В работе использовали хитозан (акционерное общество “Сонат”, Москва, “Биопрогресс”, п. Биокомбинат, Московская обл.), полученный из панцирей краба, с молекулярной массой 8.7×10^4 - 2.5×10^5 и степенью деацетилирования 80-82% без дополнительной очистки. Массовая доля минеральных веществ в хитозане не превышала 0.6%, влаги – 6%, нерастворимых веществ – 0.1%.

Хитозан растворяли в разбавленных растворах уксусной или соляной кислот. Использовали кислоты марки «ХЧ». ВП, МА, АН, 2-ЭГА, 2-ГЭМА, ГПМА, Ст, ДМАЭМ очищали по стандартным методикам [6]. АА перекристаллизовывали из бензола, содержание основного вещества 99.5%, т. пл. 358.1 К, соответствовала справочным данным [337]. В качестве инициаторов привитой радикальной полимеризации использовали ПСА марки «ХЧ» (ГОСТ 20478-75) и ДАК, перекристаллизованный из этанола, а также хлорид гексаамминкобальта (III) $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$. Комплексные соединения кобальта были синтезированы по известной методике [338].

Дигидрокверцетин (ДГК) (ООО «Локус», г. Саров), 95% чистоты перекристаллизовывали из этилового спирта. В качестве растворителей для ДГК использовали ДМФА или 1,4-диоксан, которые очищали по стандартным методикам [339].

Синтез диазида терефталевой кислоты проводили по методике [340].

Привитые сополимеры хитозана с МА, 2-ЭГА, 2-ГЭМА, 2-ГПМА, Ст получали в водноуксуснокислых растворах полисахарида 3 мас.% с концентрацией уксусной кислоты 1.2 – 6 мас.% с использованием в качестве инициатора динитрила азоизомасляной кислоты (ДАК) при 333-353 К в течение 4 ч. Навеску ДАК (0.01 моль/л), в случае МА (2-ГЭМА, 2-ГПМА), предварительно

растворяли в объеме мономера, после чего смешивали с раствором полисахарида (рН раствора хитозана изменяли с 3.6 до 5.5). Соотношение $[MA]/[XT3]$ изменяли от 0.85 до 3.15 (моль/осново-моль), $[2-ГЭМА]/[XT3]$ - от 0.65 до 1.3 (моль/осново-моль), $[2-ГПМА]/[XT3]$ - от 0.55 до 1.2 (моль/осново-моль). В случае 2 – ЭГА и Ст, мономер и инициатор растворяли в небольшом количестве диоксана и затем смешивали с раствором полисахарида. Соотношение $[2-ЭГА]/[XT3]$ варьировали от 0.1 до 0.26 (моль/осново-моль), $[Ст]/[XT3] = 0.47$ (моль/осново-моль). При использовании в качестве инициатора $[Co(NH_3)_6]Cl_3$ привитую полимеризацию АН и МА на хитозан проводили в реакторе, снабженном мешалкой и обратным холодильником при температурах 294-333 К. Инициатор растворяли непосредственно в растворе хитозана, а затем вносили мономер. В работе использовали различные концентрации мономеров, но не превышающие их максимальную растворимость в воде: 1.3 моль/л для АН, 0.7 моль/л для МА.

Привитую полимеризацию мономеров, хорошо растворимых в воде - АА, ВП на хитозан также проводили в водном растворе CH_3COOH (рН раствора изменяли от 3.6 до 5.5), содержащем полисахарид, с использованием в качестве инициатора ПСА или ДАК при 333 К. Содержание мономеров варьировали от 0.33 до 4.6 моль на моль звена глюкозамина. В случае с АА, систему полисахарид – мономер перед началом синтеза продували аргоном, затем температуру реактора поднимали до 323 К и вводили в реакционную смесь инициатор, растворенный в воде.

Блок-сополимеры хитозана с указанными мономерами получали в водноуксуснокислых растворах полисахарида 3 мас. % с концентрацией уксусной кислоты 1.2 – 6 мас. % при 291-296 К. При перемешивании в раствор хитозана последовательно добавляли мономер (соотношение $[мономер]/[XT3]$ изменяли также, как и в случае привитой полимеризации), аскорбиновую кислоту ($[C_6H_8O_6]/[H_2O_2]=1$ (в моль)) и H_2O_2 ($[XT3]/[H_2O_2] = 50$ осново-моль/моль). В случае 2 –ЭГА и Ст – в раствор хитозана перед введением мономера добавляли до 20 об. % диоксана. Через 4 ч после начала реакции продукт высаживали

двухкратным объемом осадителя, после чего осадок сушили при 323 К под вакуумом до постоянной массы.

Глубину превращения МА, АН, 2-ЭГА и Ст при сополимеризации с хитозаном определяли по результатам анализа остаточного мономера методом газовой хроматографии. Определение концентрации мономера проводили на газовом хроматографе GCMS-QP2010, Shimadzu. Хроматографическая система: газовый хроматограф с детектором по теплопроводности и системой компьютерной регистрации, колонка: Equity-1 (длина - 30 м, диаметр – 0.25 мм, размер сорбента – 0.25 мкм), газ-носитель: гелий He. Скорость потока газа-носителя в колонке 1 мл/мин, температура колонки для определения МА - 40°C, Ст - 50°C, 2-ЭГА - 150°C.

Определение непрореагировавшего АН проводили титрованием с потенциометрической индикацией конечной точки по реакции с сульфитом натрия в соответствии с методикой [341].

Глубину превращения ВП контролировали весовым и хроматографическим методами, отбирая пробы по ходу процесса. Образовавшийся продукт, высаживали ацетоном и сушили до постоянной массы в вакуумном шкафу при 313 К. Фильтрат анализировали на содержание остаточного мономера с помощью газового хроматографа ЛХМ-80 (сорбент SE-30, длина колонки 2 м, 433 К, газ носитель - гелий). При анализе использовали методы абсолютной калибровки и внутреннего стандарта.

Глубину превращения АА при сополимеризации с хитозаном определяли двумя методами - гравиметрически и по содержанию непрореагировавшего мономера. С этой целью через определенные промежутки времени отбирали пробы, образовавшийся продукт высаживали ацетоном (5%-ным раствором NaOH) и сушили до постоянной массы в вакуумном шкафу; глубину превращения (Г) рассчитывали по формуле:

$$\Gamma = \frac{m_{\text{ПЛ}} - m_{\text{ХТЗ}}}{m_{\text{АА}}}, \quad (6) \quad \text{где}$$

Γ – глубина превращения АА, $m_{\text{ПЛ}}$ – масса полимера, выделенного из пробы, $m_{\text{ХТЗ}}$, $m_{\text{АА}}$ – масса хитозана и АА в пробе, соответственно.

В фильтрате определяли содержание остаточного мономера бромид-броматным методом [341]. Метод основан на присоединении брома, выделяющегося при подкислении бромид-броматной смеси, по двойной связи АА; избыток брома определяется иодометрически.

Вязкость реакционной смеси по ходу процесса измеряли с помощью ротационного вискозиметра “Реотест-2” при скорости сдвига 145.8 с^{-1} .

Образование привитых и блок-сополимеров виниловых мономеров с хитозаном доказывали методом ИК-спектроскопии (спектрофотометр “Perkin-Elmer”). Для анализа использовали образцы продуктов реакции, из которых на аппарате Сокслета экстракцией удаляли соответствующий гомополимер. Экстракцию ПМА и ПСт проводили ацетоном, П-2-ЭГА – тетрагидрофураном, ПАН – диметилформамидом, ПВП – изопропиловым спиртом, ПАА – водой в течение 48 ч. В предварительных опытах на смесях хитозана с соответствующими синтетическими гомополимерами было показано, что указанное время достаточно для полной экстракции последних. Растворитель из аппарата Сокслета и фильтрат, полученный при высаживании из раствора продукта реакции, анализировали на наличие гомополимеров. По результатам экстракции рассчитывали эффективность (ЭП) (отношение массы привитого полимера к массе всего запolyмеризовавшегося мономера) (формула 8) и степень прививки (СП) (отношение массы привитого полимера к массе хитозана) (формула 9) мономеров на хитозан.

$$\text{ЭП} = \frac{m_{\text{привполиим}} - m_{\text{хтз}}}{m_{\text{привполиим}} - m_{\text{хтз}} + m_{\text{гомополимер}}} \times 100 \quad (8)$$

$$\text{СП} = \frac{m_{\text{привполиим}} - m_{\text{хтз}}}{m_{\text{хтз}}} \times 100 \quad (9)$$

где $m_{\text{привполиим}}$ – масса сополимера в пробе, $m_{\text{хтз}}$ – масса хитозана в пробе, $m_{\text{гомополимера}}$ – масса гомополимера (ПВП или ПАА), экстрагированного из пробы.

Определение содержания азота в хитозане и его производных проводили методом Кьельдаля [341]. Массовую долю азота рассчитывали по формуле $\%N = (a - b) \times K \times 0.0053 \times 100 / c$, где K – поправочный коэффициент 0.1 н HCl, c – навеска анализируемого образца, a и b – объем 0.1 н HCl, затраченный на титрование контрольной и анализируемой проб, мл.

Определение энтальпии полимеризации ВП в растворе ХТЗ и энтальпии смешения ХТЗ и ПВП.

Энтальпию полимеризации ВП в растворе хитозана и энтальпию смешения хитозана и ПВП определяли с использованием дифференциального автоматического микрокалориметра ДАК1-1А [308]. Тепловыделение, наблюдаемое при полимеризации ВП в уксуснокислом водном растворе хитозана, складывается из энтальпии собственно полимеризации ВП, энтальпии побочной реакции гидролиза и энтальпии взаимодействия между молекулами мономера и макромолекулами хитозана [342]. Для расчета указанных составляющих в процессе полимеризации ВП были измерены энтальпии растворения его в воде (ΔH_p^0 (ВП)), 2%-ном растворе CH_3COOH ($\Sigma \Delta H_{\text{ук}}^0$ (ВП)) и 2%-ном растворе хитозана в 2%-ном водном растворе CH_3COOH ($\Sigma \Delta H_{\text{ук, хитозан}}^0$ (ВП)), а также ПВП – в воде (ΔH_p^0 (ПВП)), и 2%-ном растворе CH_3COOH при температуре полимеризации 333 К. Значения энтальпий растворения ПВП в воде и в водном растворе CH_3COOH совпали. Получено: ΔH_p^0 (ПВП, 333 К) = -8.9 ± 0.4 кДж/осново-моль в области концентраций 0.05 – 0.2 осново-моль полимера на литр растворителя; ΔH_p^0 (ВП, 333 К) = -3.3 ± 0.3 кДж/моль мономера, в области $[\text{ВП}] = 0.025 - 0.235$ моль/л, время тепловыделения 20-30 мин; $\Sigma \Delta H_{\text{ук}}^0$ (ВП, 333 К)

$= -30 \pm 2.0$ кДж/моль; $\Sigma \Delta H^0_{\text{УК, хитозан}}$ (ВП, 333 К) $= -22 \pm 2.0$ кДж/моль, тепловыделение наблюдалось на протяжении 200 – 300 мин. В двух последних случаях значение энтальпии отражает суперпозицию процессов собственно растворения ВП и его гидролиза. Различие в значениях $\Sigma \Delta H^0_{\text{УК}}$ и $\Sigma \Delta H^0_{\text{УК, хитозан}}$ указывает на то, что хитозан подавляет гидролиз ВП. Найдено значение энтальпии гидролиза ВП: $\Delta H^0_{\text{гидр, эксп}}$ (ВП, 2% CH_3COOH , 333 К) $= -27.0 \pm 2.0$ кДж/моль.

На основании приведенных выше данных и энтальпии полимеризации ВП в массе $\Delta H^0_{\text{пол}}$ (ВП, 333 К) $= -64.0 \pm 2.0$ кДж/моль [308] было рассчитано значение энтальпии полимеризации ВП в воде $\Delta H^0_{\text{пол}}$ (ВП, 333 К) $= -70.0 \pm 3.0$ кДж/моль.

Полученное прямыми калориметрическими измерениями значение энтальпии полимеризации ВП в 2%-ном водном растворе CH_3COOH при $[\text{ВП}] = 0.12$ моль/л и 333 К оказалось равным -68.0 ± 1.0 кДж/моль (степень конверсии 98%) и -65.0 ± 1.0 кДж/моль мономера (степень конверсии 90%) соответственно. Таким образом, реакция гидролиза практически не влияет на энтальпию полимеризации ВП в воде в пределах ошибок ее определения.

Было рассчитано значение энтальпии гидролиза: $\Delta H^0_{\text{гидр, расч}}$ (ВП, 333 К, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) $= -29.0 \pm 2.0$ кДж/моль. Эта величина практически совпадает с найденной выше экспериментально. В дальнейших расчетах использовали среднюю величину для энтальпии гидролиза ВП при полимеризации в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$: $\Delta H^0_{\text{гидр}}$ (ВП, 333 К) $= -28.0 \pm 2.0$ кДж/моль.

Исследования проводили совместно с д.х.н. Кирьяновым К.В.

4.2. Определение молекулярно- массовых характеристик (со)полимеров

ММ хитозана, ПВП и ПАА определяли вискозиметрическим методом на капиллярном вискозиметре Уббелюде. Расчет проводили по формуле $[\eta] = kM^\alpha$, где для хитозана при 21°C в смеси 0.33 N CH_3COOH и 0.3 N NaCl $k = 3.41 \times 10^{-3}$, $\alpha = 1.02$; для ПВП при 24°C в воде $k = 1.4 \times 10^{-4}$, $\alpha = 0.7$; для ПАА при 25°C в воде $K = 6.8 \times 10^{-4}$, $\alpha = 0.66$ [324].

Для определения ММ блоков ПМА, П-2-ЭГА и привитых цепей ПМА, П-2-ЭГА и ПСт, в сополимерах проводили деструкцию цепей хитозана HNO_2 , образующейся при смешении NaNO_2 с HCl . Для этого выделенный из реакционной системы продукт отмывали на аппарате Сокслета, растворяли в 0.01 н. HCl и добавляли эквимольное по отношению к звену глюкозамина количество NaNO_2 . Через 24 ч ПМА, П-2-ЭГА, ПСт выделяли и идентифицировали методом ИК-спектроскопии (спектрофотометр Infracum FT-801, г. Новосибирск). Контрольные опыты по обработке ПМА и П-2-ЭГА и ПСт раствором NaNO_2 в тех же условиях показали, что состав цепей синтетического полимера оставался неизменным. Молекулярно-массовое распределение (ММР) блоков и привитых цепей ПМА, П-2-ЭГА и ПСт определяли методом гель-проникающей хроматографии при 313К на жидкостном хроматографе Prominence LC-20VP «Shimadzu» (Япония) с набором колонок, наполненных полистирол-дивинилбензольными стандартами с размером пор 10^6 и 10^5 Å. В качестве детектора использовали дифференциальный рефрактометр. Элюентом служил тетрагидрофуран. Для калибровки применяли узко-дисперсные стандарты ПМА или ПСт.

Определение молекулярной массы и гидродинамических характеристик привитых сополимеров ХТЗ –АА диффузионным методом.

Измерение коэффициента диффузии проводили с помощью диффузометра Цветкова, в котором используется интерферометрическая схема Лебедева. Коэффициент диффузии вычисляли методом максимальной ординаты и нулевого момента (площади) кривой. По экспериментальным значениям максимальной ординаты δ_m и площади под интерференционной кривой Q определяли значение интеграла вероятности Ψ и дисперсии диффузионной границы σ^2 . Коэффициент диффузии $D=(1/2)(\Delta\sigma^2/\Delta t)$ вычисляли по наклону экспериментальных зависимостей σ^2 от времени t . Значения инкремента показателя преломления $\Delta n/\Delta c$, рассчитывали по площади, ограниченной диффузионной кривой.

Характеристики оптической схемы: коэффициент увеличения $K_{yb}=1.070$, величина двоения шпатов $a=0.094$ см, расстояние между интерференционными

полосами (постоянная оптического клина) $B = 0.149$ см. Использовали стеклянную кювету с длиной по ходу луча $l = 3$ см. Интерференционные картины фиксировали через определенные промежутки времени на фотопленке Микрат-200.

Измерения проводили в смешанном растворителе: $0.33M$ $CH_3COOH + 0.3M$ $NaCl$ со следующими характеристиками при $25^\circ C$: плотность $\rho_0 = 1.015$ г/см³, вязкость $\eta_0 = 0.95$ сП.

Характеристические вязкости $[\eta]$ образцов были определены по стандартным методикам с использованием вискозиметра Оствальда [343, 344].

Молекулярные массы образцов рассчитаны по значениям коэффициентов поступательной диффузии и характеристической вязкости с использованием концепции гидродинамического инварианта A_0 по формуле:

$$M_{D\eta} = A_0^3 / [D]^3 [\eta] \quad (10)$$

где характеристический коэффициент диффузии $[D] \equiv D_0 \eta_0 / T$, а в качестве значения гидродинамического инварианта было использовано значение $A_0 = 3.40 \times 10^{-10}$ эрг $\times$ град⁻¹ $\times$ моль^{-1/3}.

Гидродинамический радиус R_H рассчитывали по формуле Стокса:

$$R_H = kT / 6\pi\eta_0 D_0 \quad (11)$$

Среднюю плотность макромолекулярного клубка в растворе оценивали по формуле $\rho_{cp} = M_{D\eta} / N_A V$, где V – объем эквивалентной гидродинамической сферы.

Измерения выполняли в научно-исследовательском институте физики Санкт-Петербургского государственного университета д.ф.-м.н. Павлов Г.М. и к.ф.-м.н. Зайцева И.И. Личный вклад автора: синтез сополимеров и активное участие в обсуждении результатов.

Определение молекулярной массы блок-сополимеров ХТЗ –АА методом статической осмометрии.

Молекулярную массу блок-сополимеров хитозан-АА ($MM_{ст}$) определяли методом статической осмометрии по методике [345]. Значение MM рассчитывали по уравнению Вант-Гоффа в вариальной форме при бесконечном разведении $MM_{ст} = RT/(\pi/c)$, где R -универсальная газовая постоянная, T -температура (К), π/c -приведенное осмотическое давление.

В работе использовали металлический однокамерный осмометр типа осмометра Хелфрица, видоизмененный И.С. Гильманом и З.А. Роговиным [345]. Приведенное осмотическое давление определяли графической экстраполяцией зависимости π/c от c на $c=0$.

4.3. Методы определения физико-механических свойств и грибостойкости пленок на основе привитых и блок-сополимеров хитозана и смесей гомополимеров

Пленки на основе блок- и привитых сополимеров ХТЗ и МА, 2 – ЭГА, Ст, АН, 2-ГЭМА, 2-ГПМА, АА и ВП и смесей гомополимеров готовили методом полива растворов, образовавшихся после завершения процесса на стеклянную или лавсановую подложки, с последующей сушкой при комнатной температуре до постоянной массы [346]. Механические свойства пленок (разрывную прочность (σ) и относительное удлинение (ϵ)) определяли на разрывной машине ZWIC Z005 (Германия) при скорости растяжения 50 мм/мин.

Структуру полученных пленок исследовали методами рентгенографического анализа и атомно-силовой микроскопии. Измерения выполняли в институте прикладной физики РАН (г. Нижний Новгород).

Эксперимент по рентгенофазовому анализу (РФА) сополимеров хитозана с виниловыми мономерами выполняли на рентгеновском дифрактометре BrukerD8 Discover, с использованием CuK α излучения. Для проведения РФА образцы в виде пленок мелко перемалывали и помещали в кювету из плавленого кварца. Съемка дифрактограмм проводилась для углового диапазона 10-60° по углу дифракции 2θ в симметричной геометрии со щелью 0.6 мм на первичном пучке и линейным позиционно-чувствительным детектором LynxEye. Эксперименты по рентгенофазовому анализу хитозана и его сополимеров проводились младшим научным сотрудником лаборатории Нанoeлектроники НИЧ ННГУ им. Н.И. Лобачевского Юниным П.А..

Топографию поверхности пленок изучали методом сканирующей зондовой микроскопии на атомно-силовом микроскопе Solver-P47 (г. Зеленоград, Россия), образцы готовили нанесением растворов сополимеров на кремниевые пластины с последующим испарением растворителя в равновесном режиме при температуре 298 К, сканирование проводили в полуконтактном режиме. Исследования выполнены совместно с к.х.н Батенькиным М.А. (Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН).

Смачивание поверхности пленок изучали методом измерения $\cos \theta$ краевого угла смачивания. Наносили каплю дистиллированной воды на поверхность пленки и после достижения ее равновесного состояния определяли диаметр и высоту. Расчет косинуса краевого угла проводили по формуле:

$$\cos \theta = \frac{\left(\frac{d}{2}\right)^2 - h^2}{\left(\frac{d}{2}\right)^2 + h^2}, \quad (12)$$

где d – диаметр капли, мм, h – высота капли, мм.

Влаго- (d) и водопоглощение (α) сополимеров хитозана изучали по изменению массы их пленок, находящихся в парах воды или в воде при 298 К соответственно. Процент набухания рассчитывали по формуле:

$$d, \% = \frac{m - m_0}{m_0} \times 100 \quad (13),$$

где m_0 и m – масса исходной пленки и пленки в набухом состоянии.

Индивидуальные коэффициенты газопроницаемости азота, диоксида углерода и метана через полученные пленки сополимеров ХТЗ с виниловыми мономерами были измерены с помощью газоразделительной установки, сконструированной в лаборатории мембранных и каталитических процессов НГТУ им. Р.Е. Алексеева по схеме, предложенной в группе Crespo при 25-26°C [347]. Погрешности измерений проницаемости составили менее 10%. Идеальная селективность (α) для пар газов рассчитывалось как отношение их коэффициентов проницаемости. Коэффициент проницаемости (P) рассчитывали по формуле:

$$\frac{1}{\beta} \ln \left(\frac{[p_{\text{feed}} - p_{\text{perm}}]_0}{[p_{\text{feed}} - p_{\text{perm}}]} \right) = \frac{1}{\beta} \ln \left(\frac{\Delta p_0}{\Delta p} \right) = P \frac{t}{l}$$

Биодеструкцию пленочных образцов хитозана и его сополимеров проводили в присутствии штаммов грибов *Aspergillus terreus* ВКМ F- 1025, *Aspergillus niger*, ВКМ F-1119 и *Penicillium cyclopium* ВКМ F-245, исследования проводили в течение 20 недель.

Для выяснения влияния биодеструкции на физико-химические свойства полимерных композиций были поставлены три серии экспериментов. В первой серии пленки помещались под твердую полную агаризированную среду Чапека – Докса (поверхность среды засеивали грибом) (2 закладки), во-второй – образцы помещали на двухнедельный газон гриба (2 закладки). Контролем служили образцы полимерных композиций не подвергнутые воздействию грибов (2 закладки). В дальнейшем чашки Петри с исследуемыми образцами помещали в инкубатор, температура в котором поддерживается на уровне $28 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажности $> 95 \%$.

Исследование грибостойкости полученных сополимеров проводили по государственным стандартам [9-10]. Грибостойкость полимерных материалов определяли в отделе биологических исследований НИИХимии ННГУ совместно с д.б.н. Смирновым В.Ф.. Для испытаний применяли следующие виды грибов: *Aspergillus niger* van Tieghem, *Aspergillus terreus* Thorn, *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn, *Chaetomium globosum* Kunze, *Paecilomyces varioti* Bainier, *Penicillium funiculosuin* Thorn, *Penicillium chrysogenum* Thorn, *Penicillium cyclopium* WestlIng, *Trichoderma viride* Pens. Грибостойкость оценивали по интенсивности развития грибов (в баллах). Данный метод позволяет оценить природную грибостойкость материалов, то есть возможность их использования микромицетами в качестве источников питания. Сущность метода заключается в следующем: полимерную композицию помещали в чашки Петри и инокулировали суспензией спор грибов (1×10^6 в мл), помещали в термостат и выдерживали в течение 28 суток при $28 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажности $\geq 95 \%$. Грибостойкость оценивали

визуально по интенсивности роста грибов на испытуемых полимерах в баллах по шестибалльной шкале. Грибы выращивали на обедненной по углероду (1 г сахарозы на 1 л среды) жидкой питательной среде Чапека-Докса на качалках АПУ-4М со скоростью вращения 180 об/мин.

На 4-е сутки культивирования в опытные образцы вносили по 2.5 грамма соответствующих полимерных композиций. Продолжительность культивирования составляла 12 суток, после чего мицелий отфильтровывали, а в культуральной среде определяли активность соответствующих экзоферментов. Расчет удельной активности ферментов осуществляли на мг белка. Контролем служили

Определение протеазной активности проводили по методу Ансона [348]. Об активности ферментов судили по количеству образовавшегося после протеолиза субстрата свободного тирозина и тирозина варианты без добавления в состав питательной среды полимерных композиций. Для каждой полимерной композиции проводили две серии экспериментов в четырехкратных повторностях.

Определение активности ферментов проводили спектрофотометрически (СФ-2000): каталазы – при $\lambda = 240$ нм [349], в качестве субстрата использовали 30 мМ пероксид водорода, пероксидазы – при $\lambda = 535$ нм [350], в качестве субстрата использовали 0.03 % пероксид водорода и 0.1 М парафенилендиамин (по методу Aurand).

Наличие активности хитозанолитических ферментов определяли спектрофотометрически по их способности осахаривать хитин/хитозан (разлагать молекулы хитина/хитозана до редуцирующих сахаров). Концентрацию редуцирующих сахаров определяли по реакции с 3,5-динитросалициловой кислотой. Метод основан на том, что глюкоза образует с 3,5-динитросалициловой кислотой соединение, окрашенное в красный цвет [351] в составе коротких пептидов, не осаждающихся трихлоруксусной кислотой.

Активность эстераз определяли титриметрическим методом по степени гидролиза ферментом субстрата диоксиладапината, стабилизированного 2%-

водным раствором поливинилового спирта. Определение белка проводили по методу Лоури [352].

Степень деструкции пленочных материалов грибами контролировали по изменению физико-механических свойств (σ , ϵ) пленок и молекулярно-массового распределения ПМА в сополимерах. Для определения ММ блоков и привитых цепей ПМА проводили деструкцию хитозановой части сополимеров NaNO_2 . ПМА идентифицировали методом ИК-спектроскопии (спектрофотометр Infracum FT-801).

Молекулярно-массовое распределение (ММР) блоков и привитых цепей ПМА определяли методом гель-проникающей хроматографии.

4.4. Методика синтеза производных хитозана по реакциям полимераналогичных превращений

N,N-диметилхитозан получали по реакции Эшвейлера-Кларка по методике описанной в работе [67]. Синтез проводили при температуре 70-75°C в течение 3 часов, молярное соотношение: звено глюкозамина / CH_2O / HCOOH варьировали от 1 / 0.25 / 5 до 1 / 3 / 10. Продукты реакции идентифицировали методом ИК-спектроскопии (спектрофотометр “Shimadzu”). В ИК- спектрах продуктов реакции появляется полоса поглощения соответствующая колебаниям R_3N -групп в области 1230 см^{-1} , отсутствующая в спектрах поглощения исходного хитозана.

Синтез N- замещенного производного хитозана, содержащего ДГК.

В сухом диоксане (5 мл) растворяли ДГК (100 мг; 0.33 ммоль; 1 экв) и ДАТФ (142.5 мг; 0.66 ммоль; 2 экв) и кипятили с обратным холодильником на масляной бане в течении 4 часов при температуре 373-383 К без доступа влаги воздуха. Полученный раствор охлаждали до комнатной температуры. Затем, к 20 г 3% раствора хитозана в 1.2% водной уксусной кислоты при интенсивном перемешивании вливали реакционную смесь. Наблюдали резкое увеличение вязкости (10-15 с) с образованием густой массы. Полученную массу грели на водяной бане при температуре 353-363 К в течение 30 мин. Далее для удаления

низкомолекулярных реагентов продукты синтеза отмывали изопропиловым спиртом (85 мл). Модифицированный ДГК хитозан центрифугировали и сушили до постоянной массы в вакууме при температуре 303 К.

Методику, описанную выше, также применяли для получения модифицированного ДГК хитозан с мольными соотношениями компонентов ДГК и ДАТФ: 1:5 - ДГК (100 мг; 0.33 ммоль) и ДАТФ (356 мг; 1.65 ммоль) и 1:1 - ДГК (100 мг; 0.33 ммоль) и ДАТФ (71.3 мг; 0.33 ммоль) соответственно.

Методика проведения ферментативного гидролиза трипсином, химически модифицированного ДГК хитозана.

Ферментативный гидролиз химически модифицированного хитозана проводили на установке, состоящей из комплекса цилиндра и химического стакана. Предварительно измельченный модифицированный хитозан добавляли к 10 мл фосфатного буферного раствора (рН 8.0) и вливали в цилиндр, который был снабжен ацетатно-целлюлозным мембранным фильтром. После того как температура в термостате достигла $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ в цилиндр добавляли 10 мг трипсина. Цилиндр был установлен в термостатируемый стеклянный стакан, содержащий 15 мл фосфатного буферного раствора, так, чтобы мембранный фильтр был погружен в жидкость. Содержимое цилиндра постоянно перемешивалось. Затем, каждые 30 - 60 мин отбирали из стакана 5 мл раствора и определяли количество высвободившегося ДГК по изменению оптической плотности на аналитической длине волны – 360 нм на Analitik Jena Specord 40. Количество высвободившегося ДГК определяли по заранее построенному градуировочному графику.

Приготовление фосфатного буферного раствора (рН 8.0). Навески $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (12.93 г; 0.2 моль) и KH_2PO_4 (0.447 г; 0.2 моль) растворяли в 283.5 мл дистиллированной воды. Затем добавляли $\text{MgSO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (0.848 г; 11.5 ммоль). Полученный раствор доводили до метки в 300 мл. При стоянии в течение ночи из раствора выпадали кристаллы $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, которые в ферментативном гидролизе трипсином не использовались.

4.5. Приготовление гидрогелей на основе хитозана и его сополимеров и изучение их свойств

Гидрогели на основе хитозана с использованием диазида терефталевой кислоты в качестве сшивающего агента, получали термообработкой при 353-363 К смеси 3%-ного раствора полисахарида в 1.2 мас. % уксусной кислоте и раствора ДАТФ в ДМФА (или диоксане) при постоянном перемешивании. Минимальное время, температуру и соотношение реагентов при гелеобразовании фиксировали визуально по потере текучести раствора под действием собственного веса.

Гидрогели на основе сополимеров хитозана получали сополимеризацией АА в уксуснокислых растворах хитозана (при соотношении $[AA]/[XT3] = 3$, где $[AA]$ и $[XT3]$ в моль/л) в присутствии сшивающего агента N,N-метилен-бис-акриламида (2.6×10^{-3} моль/л) с использованием в качестве инициатора полимеризации ПСА при 323 К в течение 3 ч и прогреве при 333 К в течение 1 ч (гидрогель XT3 –ПАА).

Гидрогели на основе хитозана и ПВП получали нагреванием водного раствора (рН 4.5) смеси этих полимеров ($[ВП]/[XT3]=0.45$) в присутствии сшивающего агента -глутарового альдегида (7.5×10^{-3} моль/л) при 313 К в течение 6 ч. (гидрогель XT3 -ПВП (Г II)).

Образец гидрогеля XT3-ПВП содержал 95 мас.% H_2O , 0.69 мас.% ПВП, 2.3 мас.% XT3, 2.2 мас.% янтарной кислоты (ЯК) и 0.075 мас.% глутарового альдегида (ГА). Образец гидрогеля XT3–ПАА содержал 91.81 мас.% H_2O , 3.83 мас.% АА, 1.44 мас.% уксусной кислоты, 2.88 мас.% XT3 и 0.038 мас.% N,N – метилен-бис-акриламида. В расчете на условный моль в образце гидрогеля XT3-ПВП содержится 99.26 мол.% воды, 0.26 мол.% звеньев глюкозамина, 0.12 мол.% звеньев ПВП, 0.36 мол.% янтарной кислоты и 0.014 мол.% глутарового альдегида; в образце гидрогеля XT3-АА – 98.17 мол.% воды, 0.46 мол.% уксусной кислоты, 0.33 мол.% звеньев глюкозамина, 1.037 мол.% звеньев ПАА и 0.0048 мол.% N,N – метилен-бис-акриламида. Образцы представляли собой прозрачные,

каучукоподобные, упругие материалы. Массу «условного моля» гидрогелей вычисляли способом, описанным в работе [353, 354].

Вязкоупругие свойства гидрогелей в зависимости от концентрации сшивающего агента изучали методом тангенциального смещения пластинки на аналитических весах [355]. Степень набухания гидрогелей в воде, физиологическом растворе и буферных растворах с различными значениями pH (pH = 1.68 - 0.05 М раствор калия тетраоксалата; pH = 4.01 - 0.05 М раствор калия фталевокислого; pH = 6.86 - 0.025 М раствор калия фосфорнокислого однозамещенного и 0.25 М раствор натрия фосфорнокислого, двухзамещенного; pH = 9.18 - 0.01 М раствор натрия тетраборнокислого) определяли, как количество поглощенной гелем жидкости, отнесенное к единице массы сухого геля:

$$\alpha = \frac{m - m_0}{m_0}, \quad (14)$$

где m и m_0 - масса набухшего образца геля и масса сухого геля, соответственно.

Измерение теплоемкости, температур и энтальпий плавления воды в гидрогелях в области 80-350 К проводили на теплофизической установке БКТ-3 – полностью автоматизированный адиабатический вакуумный калориметр. Конструкция калориметра и методика работы описаны в публикациях [353, 354]. Надежность работы калориметра проверяли измерением теплоемкости меди особой чистоты марки ОСЧ 11-4, эталонных синтетического корунда и бензойной кислоты марки К-2, приготовленных в метрологических учреждениях Госстандарта РФ. Из анализа полученных результатов следует, что погрешность измерения при гелиевых температурах составляет около $\pm 2\%$; при повышении температуры до 40 К она уменьшалась до $\pm 0.5\%$ и при $T > 40$ К составляет $\sim 0.2\%$. Измерения выполняли в лаборатории термодинамики полимеров Научно-исследовательского института химии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского под руководством д.х.н. Смирновой Н.Н.

Личный вклад автора заключался в синтезе гидрогелей и обсуждении полученных результатов.

4.6. Методики определения флокулирующей, коагулирующей и сорбционной способностей хитозана и его сополимеров

Объектами исследования служили: образцы опытных партий ПАФ различной молекулярной массы, хитозана и его модифицированные формы. 0.5%-ые рабочие растворы флокулянтов готовили растворением хитозана и его сополимеров в водном растворе 1-2%-ной уксусной кислоты, остальных - в воде.

Активность флокулянтов определяли на модельных и реальных системах. В качестве модельного объекта использовали дисперсию 1 мас.% каолина в воде. В качестве реальных - речную воду с Сормовской водозаборной станции г. Нижнего Новгорода (р. Волга), бытовые и промышленные стоки г. Нижнего Новгорода и Нижегородской области: сточные воды МУП «Березовая пойма» и МУП «Артемовские луга», нефтесодержащие сточные воды завода автомобильных агрегатов (ЗАОАГ), сточные воды одного из гальванических производств, сточные воды лакокрасочного производства и сточные воды районных очистных сооружений г. Дзержинска.

Флокулирующую способность оценивали спектрофотометрическим методом по измерению светопропускания суспензии со временем на фотоколориметре (ФЭК-М) по формуле:

$$D = \lg (1 / \tau) \quad (15) \quad \text{где,}$$

D -оптическая плотность, τ - коэффициент светопропускания.

Метод подобен седиментационному методу и основан на измерении степени мутности при осаждении твердых частиц грязи в растворе полимеров [356]. За 100% принимают светопропускание чистого растворителя, то есть в нашем случае - воды.

Водные дисперсии каолина готовили диспергированием его в дистиллированной воде в течение 30 мин. при скорости вращения мешалки 180-

200 об/мин. Затем дозировали флокулянт, перемешивали и сразу же переносили смесь в кювету фотоколориметра ФЭК-М, где и измеряли изменение коэффициента светопропускания со временем. Строили зависимость I от времени, по которой определяли пределы осветления дисперсий. По полученным данным рассчитывали показатель флокуляции D_I :

$$D_I = J / J_0 - 1 \quad (16), \quad \text{где}$$

J и J_0 – коэффициенты светопропускания (пределы осветления) дисперсии в присутствии флокулянта и без него [356, 357].

При анализе реальных сточных вод были использованы стандартные методики определения содержания ионов металлов в соответствии с ГОСТ [358].

4.7. Методики формирования наночастиц благородных металлов в растворах хитозана и определение их размерных характеристик

Формирование НЧ золота проводили при УФ-индуцированном восстановлении Au^{3+} золотохлористоводородной кислоты ($HAuCl_4 \cdot nH_2O$ марки х.ч., содержащей не менее 48% золота (ОАО «Аурат», г. Москва, Россия)) в водноуксуснокислых (УК) (4-6 мас.%) растворах хитозана (2-3 мас.%) с последующей их термообработкой при 343 К в течение 1 часа. Концентрацию $HAuCl_4$ изменяли от 1 мас.% до 3 мас.%. В качестве источника УФ-излучения использовали ртутную лампу высокого и среднего давления ДРТ-400. Для монохроматизации излучения применяли светофильтр УФС-1. Лампу располагали на расстоянии 35 см от облучаемого раствора, температура которого не превышала 30 °С.

Спектроскопическим методом по изменению интенсивности полосы поглощения при $\lambda=290$ нм ($AuCl_4^-$) контролировали восстановление Au^{3+} . О формировании НЧ свидетельствовало появление и нарастание интенсивности поглощения в видимой области спектра, соответствующего плазмонному резонансу НЧ золота, максимум которого обычно лежит в интервале $\lambda \sim 510-550$ нм и зависит от размера частиц [313, 359, 360]. Спектры абсорбции снимали на

спектрофотометре УФ- и видимого диапазонов «SHIMADZU» модель UV-1650pc. Диапазон сканирования от 190 до 1100 нм.

Размерные характеристики НЧ золота определяли методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (малоугловой рентгенографии – РМУ [314]. Малоугловые рентгенограммы регистрировали с помощью малоугловой камеры КРМ-1 с коллимацией первичного пучка по схеме Кратки, излучение CuK_α , монохроматизированное Ni-фильтром; интенсивность рассеянного излучения регистрировали в угловом интервале от 5° до 160° . Точность регистрации не менее 3%.

Электронно-микроскопические исследования проводили на микроскопе Morgagni 268D(FEI) при увеличении $9 \cdot 10^4$. Объект-препараты представляли собой тонкие пленки, полученные методом полива из жидких растворов, в которых был полностью завершён процесс формирования НЧ золота. Эксперименты проводили совместно с доцентом кафедры физического материаловедения, физического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского Грачевой Т.А..

Для оценки бактерицидной активности нанокompозиции на основе хитозана помещали в цилиндры на поверхности агаризованной питательной среды. Питательная среда инокулировалась тест-культурами исследуемых бактерий. О наличии бактерицидной активности судили по наличию зоны ингибирования роста тест-культур бактерий, которая образуется вокруг цилиндров с исследуемой композицией.

4.8. Методики исследования биологической активности препаратов на основе хитозана, содержащих наночастицы золота

Работа была проведена на белых нелинейных крысах массой 150 – 200 г. Все процедуры над лабораторными животными осуществлялись в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных научных целях» (Страсбург, 18 марта, 1985 г); «Международными рекомендациями по проведению медико-

биологических исследований с использованием животных» (1993 г); «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ МЗ РФ № 267 от 19. 06. 2003) и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (МЗ 3 755 от 12.03.1977).

Исследование антиоксидантных свойств и адаптогенной активности растворов хитозана, содержащих наночастицы золота.

Антиоксидантную и адаптогенную активности наноструктурированных систем хитозан-наночастицы золота изучали в условиях гипобарической гипоксии и проводили на 4 группах животных по 7 особей в каждой. В первую группу вошли интактные животные (относительная норма), во вторую (контрольная) – крысы, которым вводили физиологический раствор, в третью – животные, получавшие раствор хитозана (доза ХТЗ 100 мг/кг), в четвертую – нанодисперсию хитозан-золото (ХТЗ – 100 мг/кг, золота – 0.5 мг/кг). Препараты вводили перорально при помощи зонда в объеме 1 мл на животное в течение 7 дней с периодичностью 1 раз в сутки. Кровь для анализа забирали из подъязычной вены наркотизированных животных и определяли в ней количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, лейкоцитарный коэффициент (отношение процентного содержания лимфоцитов к процентному содержанию сегментоядерных нейтрофилов), концентрацию гемоглобина, продуктов липопероксидации, а также активность лактатдегидрогеназы [361-364].

Животных опытной и контрольной групп подвергали гипобарической гипоксии, помещая их в барокамеру с последующим моделированием в ней подъема на высоту 8000 м над уровнем моря.

Параллельно была оценена временная характеристика развития адаптогенного эффекта к условиям гипоксии: гипоксию вызывали через 7 суток после окончания введения препарата (животных выдерживали в барокамере в течение 30 минут). Сразу после извлечения из барокамеры у животных из подъязычной вены брали кровь для анализов.

Исследование радиопротекторных свойств нанокompозитов на основе хитозана

При изучении радиопротекторных свойств препаратов животных подвергали однократному общему γ -облучению (^{60}Co) на терапевтической установке «АГАТ-С» в дозе 5 Гр (мощность дозы 1 Гр/мин), вызывающей развитие костномозговой формы лучевой болезни средней степени тяжести, при которой явно проявляются все признаки лучевого поражения. Облучение проводили через неделю после окончания курсового введения препаратов. Животные группы «контроль на облучение» биопрепараты не получали и подвергались только облучению. Через 3 и 14 суток после облучения в крови животных определяли содержание лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, лейкоцитарный коэффициент и концентрацию гемоглобина.

Исследование противоопухолевой активности нанокompозитов на основе хитозана

Для изучения противоопухолевой активности в работе использовали водные растворы нанокompозитов «хитозан- НЧ золота» и растворы нанокompозитов «хитозан- НЧ золота» с адсорбированным на частицах дисперсии пчелиным ядом, дополнительно экранированным хитозаном. В последнем случае НЧ золота поучали в растворе пчелиного яда при УФ-индуцированном восстановлении HAuCl_4 , а затем добавляли необходимое количество хитозана. Средний размер НЧ золота в биопрепарате составлял от 5 до 10 нм. Пчелиный яд был получен на пасеках Борского района Нижегородской области методом электростимуляции.

Штамм альвеолярного рака печени РС-1 был получен из банка опухолевых штаммов ГУ РОН им. Блохина РАМН. Перевивку опухоли (0.5 мл 30% взвеси опухолевых клеток в растворе Хенкса) осуществляли подкожно в паховую область справа [365]. Животные были разделены на 4 группы по 5 в каждой: 1 – интактные (относительная норма), 2 – контроль 1 – животные опухоленосители без лечения, 3 – контроль 2 – животные опухоленосители, которым вводили препарат «НЧ золота – ПЯ - ХТЗ» (доза ХТЗ – 100 мг/кг, ПЯ – 0.5 мг/кг, НЧ золота – 0.25 мг/кг). Введение препарата проводили спустя 2 недели после

перевивки опухоли путем ее пятикратного обкалывания через день в объеме 0.25 мл на животное (терапия в течение 10 дней).

Забор крови осуществляли из подъязычной вены на 1-ые, 14-ые и 28-ые сутки после окончания курсового введения препарата. В крови определяли: 1 – количество лейкоцитов при помощи гематологического анализатора «AbacusJunior 30»; 2 – индикаторные показатели - лимфоциты, сегментоядерные нейтрофилы на мазках крови общепринятым методом с окраской мазков по Романовскому-Гимзе [366]. Дополнительно рассчитывали значение лейкоцитарного коэффициента (отношение процента лимфоцитов к относительному содержанию сегментоядерных нейтрофилов), значение которого снижается при стрессе и увеличивается при адаптационной реакции устойчивой активации. В плазме крови определяли: 1 – содержание продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) методом И.А. Волчегорского [367]; интенсивность свободно-радикального окисления (СРО) и активности антиоксидантной системы (АОС) биохимилюминисцентным методом [367]. На 28-ые сутки после окончания инъекций препарата осуществляли измерение площади опухолей.

Результаты исследований статистически обрабатывали с помощью программы BIOSTAT. Независимые выборки сравнивали с помощью однофакторного анализа, *t* – критерия Стьюдента и непараметрического критерия Крускала-Уоллиса. При расчете *t*-критерия Стьюдента применяли поправку Бонферрони, позволяющую установить ошибку первого рода, возникающую при сравнении более, чем двух выборок данным методом [368]. Исследование антиоксидантной активности НЧ золота *in vivo* проводили совместно с кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета ННГУ под руководством профессора Корягина А.С..

Для определения интенсивности распределения введенных препаратов в органах животных и полноты их выведения из организма на 10, 15 и 20 сутки после окончания введения препаратов под эфирным наркозом осуществляли декапитацию животных, соответственно, по одной группе из каждой серии, и забор органов: головного мозга, сердца, легких, селезенки, почек и печени. Подготовка

проб и автоклавный метод минерализации для определения содержания золота проводили согласно методическим указаниям МУК 41.985-00. Содержание золота в пробе определяли методом атомно-эмисионного анализа. Возбуждение спектра проб, переведенных предварительно в устойчивую аналитическую форму и размещенных в кратере графитовых электродов, проводилось с применением дугового разряда постоянного тока с помощью генератора УГЭ-4. Регистрация их спектра осуществлялась при использовании спектрографа со сканирующей дисперсией СТЭ-1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертации проведено комплексное исследование модификации хитозана путем привитой и блок - сополимеризации с виниловыми мономерами различной природы в результате которого установлены закономерности и выявлены оптимальные условия проведения полимеризации, обеспечивающие высокую эффективность процесса и контролируемое изменение молекулярно-массовых характеристик цепи полисахарида с использованием новых и традиционных иницирующих систем. Детально изучены физико-механические свойства полученных производных, показана их способность к биодеструкции, изучены флокулирующие, коагулирующие, сорбционные свойства и установлено, что строение, состав и молекулярные массы фрагментов гомополимеров, составляющих полученные сополимеры оказывают существенное влияние на их свойства. Несомненное практическое значение имеет и создание нанокомпозитов на основе хитозана содержащих наночастицы золота. Разработана стратегия получения НЧ золота в растворах полисахарида с контролируемым размером и низким коэффициентом полидисперсности путем изменения молекулярной массы хитозана и конформации его макромолекул. Биологическая активность и агрегативная устойчивость полученных нанокомпозитов послужили основой для разработки систем направленной доставки лекарственных средств при пероральном применении построенных по принципу « инертное ядро (наночастицы золота)- биологически активное вещество- защитный слой хитоозана». Совокупность полученных результатов позволяет сделать следующие

ВЫВОДЫ:

1. Иницирование привитой полимеризации виниловых мономеров на хитозан впервые выполнено комплексным соединением $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$. Процесс протекает без разрушения основной цепи полисахарида с выходом сополимера не менее 98%.
2. Разработана методология радикальной привитой сополимеризации широкого спектра мономеров винилового ряда (АА, ВР, МА, АН, 2-ЭГА, 2-ГЭМА, 2-ГПМА, Ст) с хитозаном в присутствии промышленных инициаторов при их

концентрации на порядок меньше традиционно используемых, обеспечивающих высокую скорость и эффективность процесса с выходом целевого продукта не менее 90% и исключающих разрушение цепей полисахарида. Определены оптимальные условия (рН среды 5.5, температура 323 К, концентрация инициатора $\leq 1.4 \times 10^{-3}$ моль/л и соотношение реагентов,) для получения привитых цепей с заданными значениями молекулярной массы.

3. Высокие скорости процесса привитой полимеризации виниловых мономеров на хитозан при низких концентрациях инициаторов достигаются за счет проявления концентрационных эффектов (избирательная сольватация).
4. Разработан оригинальный метод синтеза блок-сополимеров виниловых мономеров с хитозаном в мягких условиях с высоким выходом целевого продукта (до 97%). Процесс инициируется радикалами, образующимися на цепях хитозана в результате радикальной деградации полисахарида под действием окислительно-восстановительной системы пероксид водорода-аскорбиновая кислота. Установлены полиблочное строение цепей сополимеров и способы управления длиной блоков в них.
5. На основе блок- и привитых сополимеров хитозана с виниловыми мономерами получены пленочные материалы с регулируемыми физико-механическими характеристиками и влагопоглощением, разработаны высокоэффективные газоразделительные мембраны.
6. Блок- и привитые сополимеры хитозана с виниловыми мономерами являются биоразлагаемыми. Впервые установлено, что процесс биоразложения протекает не только под действием микробиоты, но и продуктов их метаболизма.
7. Полифункциональность хитозана и его сополимеров была использована для разработки новых катионоактивных реагентов широкого спектра действия: флокулянтов, коагулянтов, сорбентов, применяемых для очистки сточных вод различных производств (нефтепродуктов, сточных вод, гальваносточных) и в процессах подготовки питьевой воды. Разработан и успешно применен для очистки сточных вод высокоэкономичный метод «двойной добавки», в

котором на первой стадии вводится катионоактивный флокулянт - сополимер хитозана, на второй – анионоактивный флокулянт (сополимер метакриловой кислоты).

8. На основе хитозана и его модифицированных форм при использовании в качестве сшивающих агентов диазида терефталевой кислоты, глутарового альдегида, N,N-метиленбисакриламида получены pH- и термочувствительные гидрогели с высокой влагоемкостью - до 500 г воды на 1 г сухого продукта. На примере дигидрокверцетина установлена способность гидрогелей индуцировано растворять ограниченно растворимые в воде органические биологически активные вещества и пролонгировано выделять их.
9. Разработан одностадийный метод получения нанокомпози́тов хитозана, содержащих наночастицы золота, при УФ-воздействии на растворы полисахарида, допированные HAuCl_4 . Размерные характеристики наночастиц зависят от молекулярной массы полисахарида и конформации его макромолекул и не превышают 20 нм при узком распределении по размерам. Высокая агрегативная устойчивость наночастиц золота стабилизированных хитозаном обеспечивает сохранение воспроизводимых размерных характеристик в многократных циклах «осаждение-растворение».
10. Разработана стратегия получения многокомпонентных наноструктурированных систем «инертное ядро (наночастицы золота) – биологически активное вещество – оболочка хитозана» как основы перпаратов для перорального применения. На экспериментальных животных впервые установлена способность наночастиц золота, стабилизированных хитозаном, при их пероральном применении поступать во внутреннюю среду организма, распределяться по органам (почки, печень, легкие, селезенка) с последующим выведением в течение 30 дней. На примере нанокомпози́та, содержащего биологически активное вещество пептидной природы (пчелиный яд) при его пероральном введении для терапии лучевой болезни и злокачественных новообразований у экспериментальных животных показано сохранение высокой биологической активности и выраженного терапевтического эффекта.

Список сокращений

АА	– акриламид
АК	– аскорбиновая кислота
АН	– акрилонитрил
АСМ	– атомно-силовая микроскопия
ВП	– N-винилпирролидон
ГА	– глутаровый альдегид
2-ГПМА	– 2 – гидроксипропилметакрилатом
ГЭБ	– гематоэнцефалический барьер
2-ГЭМА	– 2-гидроксиэтилметакрилатом
ГПХ	– гель-проникающая хроматография
ДАК	– динитрил азоизомасляной кислоты
ДАТФ	– диазид терефталевой кислоты
ДГК	– дигидрокверцетин
ДМАЭМ	– диметиламиноэтилметакрилат
ДМАА	– диметилацетамид
ДМФА	– диметилформамид
ДСК	– дифференциальная сканирующая калориметрия
ДТА	– дифференциально-термический анализ
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ИЖ	– ионная жидкость
ИПК	– интерполимерный комплекс
ИПС	– изопропиловый спирт
ЛДГ	- лактатдегидрогеназа
МА	– метилакрилат
МБАА	– N,N – метилен-бис-акриламид
ММ	– молекулярная масса
ММА	– метилметакрилат
НЧ	– наночастицы
ОС	– оптическая спектроскопия

ПАА – полиакриламид

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПАФ – полианионный флокулянт

ПВП – поливинилпирролидон

ПВС – поливиниловый спирт

ПДМАЭМ – полидиметиламиноэтилметакрилат

ПМА – полиметилакрилат

ПММА – полиметилметакрилат

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПСА – персульфат аммония

ПСт – полистирол

П-2-ЭГА – поли -2- этилгексилакрилат

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭК – полиэлектролитный комплекс

ПЯ – пчелиный яд

РМУ – малоугловое рентгеновское рассеяние

СЗ – степень замещения

СП – степень прививки

Ст – стирол

ТЭМ –высокоразрешающая просвечивающая электронная микроскопия

ХТЗ – хитозан

2-ЭГА – 2- этилгексилакрилат

ЭП – эффективность прививки

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

УК– уксусная кислота

ЯК – янтарная кислота

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Список цитируемой литературы

1. Хитозан: сборник статей / Под редакцией: К.Г. Скрябина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова. – М.: Центр «Биоинженерия» РАН, 2013. – 593 с.
2. Якимович, Н.О. Синтез и свойства полимерных нанокомпози́тов на основе метакрилатов и хитозана, содержащих наночастицы золота, и органо-неорганических компози́тов на основе поли(титаноокси́да): дис. ... кандидата химических наук: 02.00.06 / Якимович Надежда Олеговна.]. – Нижний Новгород., 2008. – 145 с.
3. Грачева, Т.А. Экспериментальные исследования кинетики формирования наночастиц золота в полимерных средах / Т.А. Грачева, Т.А. Кузьмичева, В.Н. Перевезенцев // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2011. – № 5. – С. 21.
4. Антонов, А.Ю. Влияние размерных эффектов нанесённых металлических частиц на каталитическую активность систем в реакциях гомомолекулярного изотопного обмена водорода / А.Ю. Антонов, О.А. Боева, А.А. Ревина, М.О. Сергеев, М.А. Кузнецов, К.Ф. Нуртдинова, К.Н. Жаворонкова // Перспективные материалы. – 2011. – Т. 10. – С. 268.
5. Одинцов, А.А. Адсорбционные свойства и каталитическая активность наночастиц золота, полученных в обратных мицеллах / А.А. Одинцов, М.О. Сергеев, А.А. Ревина // Успехи в химии и химической технологии. – 2013. –Т. 27. –№ 6 (146). – С. 75.
6. Справочник химика 21 химия и химическая технология [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.chem21.info>.
7. Кузьмина, Е.И. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах / Е.И. Кузьмина, А.С. Нелюбин, М.К. Щенникова // Межвуз. сб.: Биохимия и биофизика микроорганизмов. – Горький. – 1983. – С. 179.
8. Меньшиков, В.В. Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая и др. – М.: Медицина. – 1987. – 368 с.

9. ГОСТ 9.049 - 91 Единая система защиты от коррозии и старения. Материалы полимерные и их компоненты. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. – М.: Комитет стандартизации и метрологии СССР, 1992. – 15 с.
10. ГОСТ 9.048 – 89 Единая система защиты от коррозии и старения. Изделия технические. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. – М.: Комитет стандартизации и метрологии СССР, 1991. – 23 с.
11. Thakur, V.K. Recent advances in graft copolymerization and applications of chitosan: a review / V.K. Thakur, M. K. Thakur // ACS Sustainable Chem. Eng. – 2014. – V. 2. – № 12. – P. 2637.
12. Pillai, C.K.S. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation / C.K.S. Pillai, Willi Paul, Chandra P. Sharma // Progress in Polymer Science. – 2009. – V. 34. – P. 641.
13. Гальбрайх, Л.С. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение / Л.С. Гальбрайх // Сорровский образовательный журн. – 2001. – Т. 7. – № 1. – С. 51.
14. Yui, T. Conformational analysis of chitobiose and chitosan / T. Yui, H. Kobayashi, S. Kitamura, K. Imada // Biopolymers. – 1994. – V. 34 – P. 203.
15. Takashi, N. Elastic modulus of the crystalline regions of chitin and chitosan / N. Takashi, M. Ryousuke, N. Katsuhiko, N. Takashi // J. Polym. Sci. B. – 1999. – V. 37. – № 11. – P. 1191.
16. Crini, G. Application of chitosan a natural aminopolysaccharide for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: a review of recent literature / G. Crini, P.-M. Badot // Prog. Polym. Sci. – 2008. – V. 33. – P.399.
17. Aranaz, I. Functional characterization of chitin and chitosan / I. Aranaz, M. Mengibar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, Á. Heras // Current Chemical Biology. – 2009. – V. 3. – P. 203.
18. Balan, V. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: a review / V. Balan, L. Verestiuc // Eur. Polym. J. – 2014. – V. 53. – P.171.

19. Zohuriaan-Mehr, M. J. Advances in chitin and chitosan modification through graft copolymerization: a comprehensive review / M. J. Zohuriaan-Mehr // *Iran Polym. J.* – 2005. – V. 14. – P. 235.
20. Jenkins, D.W.M. Review of vinyl graft copolymerization featuring recent advances toward controlled radicalbased reactions and illustrated with chitin/chitosan trunk polymers / D. W. Jenkins, S. M. Hudson // *Chem. Rev.* – 2001. – V. 101. – P. 3245.
21. Плиско, Е.А. Хитин и его химические превращения / Е.А. Плиско, Л.А. Нудьга, С.И. Данилов // *Успехи химии.* – 1977. – Т. 46. – Вып. 8. – С. 1470.
22. Mourya, V.K. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery / V.K. Mourya, N.N. Inamdar // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2009. – V.20. – P. 1057.
23. Jia, Z. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan / Z. Jia, D. Shen, W. Xu // *Carbohydr. Res.* – 2001. – V. 333. – № 1. – P. 1.
24. Holme, K. R. Chitosan N-sulfate. A water-soluble polyelectrolyte / K.R. Holme, A.S. Perlin // *Carbohydr. Res.* – 1997. – V. 302. – P. 7.
25. Kurita, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin / K. Kurita // *Prog Polym Sci.* – 2001. – V. 26. – № 9. – P. 1921.
26. Hitoshi, S. Chemical modification of chitosan: preparation of chitosan–sialic acid branched polysaccharide hybrids / S. Hitoshi, M. Yutaka, R. Rene, S. Yoshihiro // *Chem. Commun.* – 2000. – № 11. – P. 909.
27. Sashiwa, H. Chemical modification of chitosan. Part 15: synthesis of novel chitosan derivatives by substitution of hydrophilic amine using N-carboxyethylchitosan ethyl ester as an intermediate / H. Sashiwa, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, H. Yajima, N. Yamamori, Y. Ichinose, J. Sunamoto, S. Aiba // *Carbohydr. Res.* – 2003. – V. 338. – P. 55.
28. Pestov, A.V. Imidazolyl derivative of chitosan with high substitution degree: synthesis, characterization and sorption properties / A.V. Pestov, A.V. Mehaev, M.I. Kodess, M.A. Ezhikova, Y.A. Azarova, S.Yu. Bratskaya // *Carbohydrate Polymers.* – 2016. – V. 138. – P. 252.

29. Pestov, A.V. Chitosan and its derivatives as highly efficient polymer ligands / A.V. Pestov, S.Yu. Bratskaya // *Molecules*. – 2016. – V. 21. – P. 330.
30. Dong, A-Jie Synthesis and properties of O-carboxymethyl chitosan/methoxy poly(ethylene glycol) graft copolymers / A. Dong, M. Feng, H. Qi, S. Li, L. Deng // *J. of materials science: Materials in Medicine* . – 2008. – V. 19. – P. 86.
31. Reis, R. L., Román J. S. Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine R.L. Reis, J.S. Román – CRC Press, 2004. – 592 p.
32. Pestov, A.V. Granulated catalytic materials based on chitosan and its derivatives / A.V. Pestov, Yu.O. Privar, E.B. Modin, A.Yu Ustinov, S.Yu Bratskaya // *Polymer Science – Series B*. – 2016. – V. 58. – № 6. – P. 730.
33. Sun, S. Adsorption kinetics of Cu(II) ions using N,O-carboxymethyl-chitosan/ S. Sun, A. Wang // *J. Hazard Mater.* – 2006. – V.131. – P. 103.
34. Mourya, V.K. Carboxymethyl chitosan and its applications / V.K Mourya, Nazma N. Inamdar, Ashutosh Tiwari // *Adv. Mat. Lett.* – 2010. – V. 1. – P. 11.
35. An, N.T. An improved method for synthesizing N,N'-dicarboxymethylchitosan / N. T. An, P. L. Dung, D.T. Thien, N.T. Dong, T. T. Y. Nhi // *Carbohydr. Polym.* – 2008. – V. 73. – P. 261.
36. Zhu, A. Effective loading and controlled release of camptothecin by O-carboxymethylchitosan aggregates / A. Zhu, J. Liu, W. Ye // *Carbohydr. Polym.* – 2006. – V. 63. – P. 89.
37. Chen, L. Synthesis and pH sensitivity of carboxymethyl chitosan-based polyampholyte hydrogels for protein carrier matrices / L. Chen, Z. Tian, Y. Du // *Biomaterials*. – 2004. – V. 25. – P. 3725.
38. Chen, X. G. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions / X. G. Chen, H. J. Park // *Carbohydr. Polym.* – 2003. – V. 53. – P. 355.
39. Muzzarelli, R.A.A. N-(Carboxymethylidene)chitosan and N-carboxymethylchitosan / R. A. A. Muzzarelli, F. Tanfani, M. Emanuelli, S. Mariotti // *Carbohydr. Res.* – 1982. – V. 107. – P. 199.

40. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: properties and applications / M. Rinaudo // *Prog. Polym. Sci.* – 2006. – V. 31. – P. 603.
41. Dung, P.L. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan / P. L. Dung, M. Milas, M. Rinaudo, J. Desbrières // *Carbohydrate Polymers.* – 1994. – V. 24. – P. 209.
42. Tiena, C. N-acylated chitosan: hydrophobic matrices for controlled drug release / C. Tiena, M. Lacroixb, P. Ispas-Szaboa, M. Mateescua // *J. of Controlled Release.* – 2003. – V. 93. – P.1.
43. Xu, J. Chitosan film acylation and effects on biodegradability / J. Xu, S.P. McCarthy, R.A. Gross // *Macromolecules.* – 1996. – V. 29. – № 10. – P. 3436.
44. Senso, A. Preparation of mixed 10-undecenoyl/phenylaminocarbonyl or benzoyl derivatives of chitosan / A. Senso, L. Oliveros, C. Minguillon // *Carbohydr. Res.* – 2000. – V. 328. – № 4. – P. 617.
45. Senso, A. Characterization of doubly substituted polysaccharide derivatives / A. Senso [et al.] // *Carbohydr. Res.* – 2000. – V. 329. – № 2. – P. 367.
46. Zong, Z. Characterization of chemical and solid state structures of chitosans / Z. Zong [et al.] // *Polymer.* – 2000. – V. 41. – № 3. – P. 899.
47. Васнев, В.А. Синтез ацилированных производных хитина и хитозана / В.А. Васнев [и др.] // *Высокомолек. соед. Сер. А.* – 2003. – Т. 45. – № 9. – С. 1446.
48. Loubaki, E. Modification chimique du chitosane avec la δ -gluconolactone, la α -propiolactone et la glycidol / E. Loubaki, S. Sicsic, F. Le Goffic // *Eur. Polym. J.* – 1989. – V. 25. – P. 379.
49. Kurita, K. N-Hydroxyacylation of chitosan with lactones / K. Kurita, S. Nishimura, T. Takeda // *Polym. J.* – 1990. – V. 22. – P. 429.
50. Роговина, С.З. Исследование взаимодействия хитозана с твердыми органическими кислотами в условиях сдвиговых деформаций / С.З. Роговина [и др.] // *Высокомолек. соед. Сер.А* – 1997. – Т. 39. – № 6. – С. 941.
51. Mourya, V.K. Carboxymethyl chitosan and its applications / V.K Mourya, N.N. Inamdar, A. Tiwari // *Adv. Mat. Lett.* – 2010. – V.1. – P. 11.

52. Sashiwa, H. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials / H. Sashiwa, S. Aiba // *Prog. Polym. Sci.* – 2004. – V. 29. – P. 887.
53. Sashiwa, H. Hyghly convergent synthesis of dendrimerized chitosan–sialic acid hybrid / H. Sashiwa, Y. Shigemasa, R. Roy // *Macromolecules.* – 2001. – V. 34. – P. 3211.
54. Sashiwa, H. Chemical modification of chitosan. 10. Synthesis of dendronized chitosan–sialic acid hybrid using convergent grafting of preassembled dendrons built on gallic acid and tri(ethylene glycol) backbone / H. Sashiwa, Y. Shigemasa, R. Roy // *Macromolecules.* – 2001. V. 34. – P. 3905.
55. Sashiwa, H. Chemical modification of chitosan 11: chitosan–dendrimer hybrid as a tree like molecule / H. Sashiwa, Y. Shigemasa, R. Roy // *Carbohydr. Polym.* – 2002. – V. 49. – P.195.
56. Matrosvich, M.N. Synthetic polymeric sialoside inhibitors of influenza virus receptor-binding activity / M.N. Matrosvich, L.V. Mochalova, V.P. Marinina, N.E. Byramova, N.V. Bovin // *FEBS Lett.* – 1990. – V. 272. – P. 209.
57. Reuter, J.D. In hibition of viral adhesion and infection by sialic acid conjugated dendritic polymers / J.D. Reuter [et al.] // *Bioconj Chem.* – 1999. – V.48. – P. 271.
58. Shukla, S. K. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review / S.K. Shukla, A.K. Mishra, O.A. Arotiba, B.B. Mamba // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2013. – V. 59. – P. 46.
59. Sahariah, P. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: a review of the structure–activity relationship / P. Sahariah, M. Másson // *Biomacromolecules.* – 2017. – № 9. – P. 1.
60. Macquarrie, D.J. Applications of functionalized chitosan in catalysis / D.J. Macquarrie, J.J.E. Hardy // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 2005. – V. 44. – P. 8499.
61. Sashiwa, H. Michael reaction of chitosan with various acryl reagents in water / H. Sashiwa [et al.] // *Biomacromolecules.* – 2003. – V.4. – № 6. – P.1250.
62. Нудьга, Л.А. Цианэтилирование хитозана / Л.А. Нудьга, Е.А. Плиско, С.Н. Данилов // *Журн. общ. Химии.* – 1975. – Т. 45. – № 5. – С. 1145.

63. Tanida, F. Novel synthesis of a water-soluble cyclodextrin-polymer having a chitosan skeleton / F. Tanida [et al.] // *Polymer*. – 1998. – V.39. – № 21. – P. 5261.
64. Yoshinari, B. Highly selective adsorption resins. I.Preparation of chitosan derivatives containing 2-pyridylmethyl, 2-thienylmethyl, and 3-(methylthio)propyl groups and their selective adsorption of precious metals / B. Yoshinari, K. Yoshinobu, H. Hiroyuki // *Bull. Chem. Soc. Jap.* – 1996. – V. 69. – № 5. – P. 1255.
65. Заявка 2630639 (Франция) МКИ5 СI. C08B37/08; A61K7/00; C08J5/18; D01F6/96; C09D3/10 Производные хитозана, растворимые в органических растворителях, способ их получения и их применение. Franzoni C., Gagniesi C., Porte H. 1990; РЖ Химия 1991. 2Ф50П.
66. Tang, X.H. Study of the synthesis of chitosan derivatives containing benzo-21-crown-7 and their adsorption properties for metal ions / X.H. Tang, S.Y. Tan, Y.T. Wang // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2002. –V. 83. – P. 1886.
67. Николаев, А.Ф. Синтез N- диметилхитозана по реакции Эшвейлера-Кларка / А.Ф. Николаев, А.А. Прокопов, Э.С. Шульгина, В.М. Чуднова // *Журнл. прикл. химии*. – 1985. – Т. 58. – № 8. – С. 1916.
68. Okamoto, Y. Chromatographic resolution. 7. Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers: phenylcarbamates of polysaccharides coated on silica gel / Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada // *J. Am. Chem. Soc.* – 1984. – V. 106. – P.5357.
69. Sasaki, T. Derivatives/calcium carbonate composite capsules crepared by the layer-by-layer deposition method II stabilization of the shell by crosslinking / T. Sasaki, H. Mizuuchi, K. Sakurai // *J. of Nanomaterials*. – 2011. – V. 2011. – P. 1.
70. Baldwin, A.D. Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials / A.D. Baldwin, K.L. Kiick // *Peptide Science*. – V. 94. –№. 1. – P. 128.
71. Sokolsky-Papkov, M. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering / M. Sokolsky-Papkov, K. Agashi, A. Olaye [et al.] // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2007. – V. 59. – P. 187.
72. Tudorachi, N. Poly(α -hydroxyacids) in biomedical applications: synthesis and properties of lactic acid polymers. e-Polymers [Электронный ресурс] / N.

Tudorachi, C. Vasile, R. Lipsa // Researchgate. – 2010. – Режим доступа: http://www.e-olymers.org/journal/papers/rlipsa_250810.pdf.

73. Woodruff, M.A. The return of a forgotten polymer – polycaprolactone in the 21st century / M.A. Woodruff, D.W. Hutmacher // Prog. Polym. Sci. – 2010. – V. 35. – P. 1217.

74. Feng, H. Preparation, characterization, and self-assembled properties of biodegradable chitosan–poly(L-lactide) hybrid amphiphiles / H. Feng, C.-M. Dong // Biomacromolecules. – 2006. – V. 7. – P. 3069.

75. Skotak, M. Biocompatible and biodegradable ultrafine fibrillar scaffold materials for tissue engineering by facile grafting of L-lactide onto chitosan / M. Skotak, A.P. Leonov, G. Larsen [et al.] // Biomacromolecules. – 2008. – V. 9. – P. 1902.

76. Yao, F. Synthesis and characterization of chitosan grafted oligo(L-lactic acid) / F. Yao, C. Liu, W. Chen [et al.] // Macromol. Biosci. – 2003. – V. 3. – P. 653.

77. Li, G. Preparation, characterization and aggregation behavior of amphiphilic chitosan derivative having poly (L-lactic acid) side chains / G. Li, Y. Zhuang, Q. Mu [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2008. – V. 72. – P. 60.

78. Zhou, Y.-Y. Preparation and pharmacodynamics of stearic acid and poly (lactico-glycolic acid) grafted chitosan oligosaccharide micelles for 10-hydroxycamptothecin / Y.-Y. Zhou, Y.-Z. Du, L. Wang [et al.] // Int. J. Pharm. – 2010. – V. 393. – P. 144.

79. Qu, X. Synthesis and characterization of pH-sensitive hydrogels based on chitosan and D,L-lactic acid / X. Qu, A. Wirsén, A.-C. Albertsson // J. Appl. Polym. Sci. – 1999. – V. 74. – P. 3193.

80. Luckachan, G.E. Chitosan/oligo L-lactide graft copolymers: Effect of hydrophobic side chains on the physico-chemical properties and biodegradability / G.E. Luckachan, G. K. S. Pillai // Carbohydr. Polym. – 2006. – V. 64. – P. 254.

81. Yao, F. Synthesis and characterization of chitosan grafted oligo(L-lactic acid) / F. Yao, C. Liu, W. Chen [et al.] // Macromol. Biosci. – 2003. – V. 3. – P. 653.

82. Yao, F. A novel amphoteric, pH-sensitive, biodegradable poly[chitosan-g(L-lactic-co-citric) acid] hydrogel / F. Yao, W. Chen, C. Liu, K. De Yao // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2003. – V. 89. – P. 3850.
83. Liu, L. Preparation of chitosan-g-polylactide graft copolymers via self-catalysis of phthaloylchitosan and their complexation with DNA / L. Liu, A. Shi, S. Guo [et al.] // *React. Funct. Polym.* – 2010. – V. 70. – P. 301.
84. Wu, Y. Synthesis and characterization of a novel amphiphilic chitosan-polylactide graft copolymer / Y. Wu, Y. Zheng, W. Yang, C. Wang, J. Hu, S. Fu // *Carbohydr. Polym.* – 2005. – V. 59. – P. 165.
85. Li, G. Preparation, characterization and aggregation behavior of amphiphilic chitosan derivative having poly (L-lactic acid) side chains / G. Li, Y. Zhuang, Q. Mu [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2008. – V. 72. – P. 60.
86. Liu, L. Microwave-assisted graft copolymerization of [ε]-caprolactone onto chitosan via the phthaloyl protection method / L. Liu, Y. Li, Y.-e. Fang, L. Chen, // *Carbohydr. Polym.* – 2005. – V. 60. – P. 351.
87. Detchprohm, S. Synthesis of a novel chitin derivative having oligo(ε-caprolactone) side chains in aqueous reaction media / S. Detchprohm, K. Aoi, M. Okada // *Macromol . Chem. Phys.* – 2001. – V. 202. – P. 3560.
88. Liu, L. Preparation of chitosan-g-polycaprolactone copolymers through ring-opening polymerization of ε-caprolactone onto phthaloyl-protected chitosan / L. Liu, Y. Wang, X. Shen, Y.e. Fang // *Biopolymers.* – 2005. – V. 78. – P. 163.
89. Feng, H. Preparation and characterization of chitosan-graft-poly (ε-caprolactone) with an organic catalyst / H. Feng, C.-M. Dong // *J. of Polym. Scien. Part A: Polymer Chemistry.* – 2006. – V. 44. – P. 5353.
90. Liu, L. Self-catalysis of phthaloylchitosan for graft copolymerization of ε-caprolactone with chitosan / L. Liu, L. Chen, Y.e. Fang // *Macromol. Rapid Commun.* – 2006. – V. 27. – P. 1988.

91. Wang, C. Crystalline and micellar properties of amphiphilic biodegradable chitooligosaccharide-graft-poly ([ϵ]-caprolactone) copolymers / C. Wang, G. Li, S. Tao [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2006. – V. 64. – P. 466.
92. Liu, L. Synthesis and characterization of chitosan-graft-polycaprolactone copolymers / L. Liu, Y. Li, H. Liu, Y.e. Fang // Eur. Polym. J. – 2004. – V. 40. – P. 2739.
93. Guan, X. Chitosan-graft-poly(ϵ -caprolactone)s: an optimized chemical approach leading to a controllable structure and enhanced properties / X. Guan, D. Quan, X. Shuai [et al.] // J. Polym. Sci. A Polym. Chem. – 2007. – V. 45. – P. 2556.
94. Yuan, W. Synthesis, characterization, and properties of amphiphilic chitosan copolymers with mixed side chains by click chemistry / W. Yuan, Z. Zhao, S. Gu, J. Ren // J. Polym. Sci. A Polym. Chem. – 2010. – V. 48. – P. 3476.
95. Liu, L. Synthesis and self-assembly of chitosan-based copolymer with a pair of hydrophobic/hydrophilic grafts of polycaprolactone and poly(ethylene glycol) / L. Liu, X. Xu, S. Guo, W. Han // Carbohydr. Polym. – 2009. – V. 75. – P. 401.
96. Duan, K. Fabrication of cationic nanomicelle from chitosan-graft-polycaprolactone as the carrier of 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin / K. Duan, X. Zhang, X. Tang [et al.] // Colloids Surf. B Biointerfaces. – 2010. – V. 76. – P. 475.
97. Lu, Y. Novel amphiphilic ternary polysaccharide derivatives chitosan-g-PCL-b-MPEG: synthesis, characterization, and aggregation in aqueous solution / Y. Lu, L. Liu, S. Guo // Biopolymers. – 2007. – V. 86. – P. 403.
98. Kojima, K. Tributylborane-initiated grafting of methyl methacrylate onto chitin / K. Kojima, M. Yoshikuni, T. Suzuki // J. Appl. Polym. Sci. – 1979. – V. 24. – P. 1587.
99. Ношей, А. Блок- сополимеры / А. Ношей, Дж. Мак-Грат. – М: Мир, 1980. – С. 20.
100. No, H.K. Preparation and characterization of chitin and chitosan – a review / H. K. No, S. P. Meyers // J. of Aquatic Food Product Technology. – 1995. – V. 4. – P. 27.

101. No, H.K. Effective deacetylation of chitin under conditions of 15 psi/121 degrees C / H.K. No, Y.I. Cho, H.R. Kim, S.P. Meyers // J Agric Food Chem. – 2000. – V. 48. – P. 2625.
102. Cho, J.H. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using a thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) and water-soluble chitosan copolymer / J.H. Cho, S.-H. Kim, K.D. Park [et al.] // Biomaterials. – 2004. – V. 25. – P. 5743.
103. Khan, T. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods / T. Khan, K. Peh, H. S. Ch'ng // J. Pharm. Pharm. Sci. – 2002. – V. 5. – P. 205.
104. Moorjani, M. N. Parameters affecting the viscosity of chitosan from prawn waste / M. N. Moorjani, V. Achutha, D. I. Khasim // J. Food Sci. Technol. – 1975. – V. 12. – P. 187.
105. Kim, S.Y. Thermo- and pH-responsive behaviors of graft copolymer and blend based on chitosan and N-isopropylacrylamide / S.Y. Kim, S.M. Cho, Y.M. Lee, S.J. Kim // J. Appl. Polym. Sci. – 2000. – V.78. – P.1381.
106. Don, T.-M. Synthesis and characterization of AB-crosslinked graft copolymers based on maleilated chitosan and N-isopropylacrylamide / T.-M. Don, H.-R. Chen // Carbohydr. Polym. – 2005. – V. 61. – P. 334.
107. Bae, J.W. Thermosensitive chitosan as an injectable carrier for local drugdelivery / J.W. Bae, D.H. Go, K.D. Park, S.J. Lee // Macromol. Res. – 2006. – V. 14. – P. 461.
108. Seetapan, N. Linear viscoelasticity of thermoassociative chitosan-g-poly (N-isopropylacrylamide) copolymer / N. Seetapan, K. Mai-ngam, N. Plucktaveesak, A. Sirivat // Rheol. Acta – 2006. – V. 45. – P. 1011.
109. Chuang, C.-Y. Synthesis of chitosan-based thermo- and pH-responsive porous nanoparticles by temperature-dependent self-assembly method and their application in drug release / C.-Y. Chuang, T.-M. Don, W.-Y. Chiu // J. Polym. Sci. A Polym. Chem. – 2009. – V.47. – P. 5126.

110. Chuang, C.-Y. Synthesis and characterization of stimuli-responsive porous/hollow nanoparticles by self-assembly of chitosan-based graft copolymers and application in drug release / C.-Y. Chuang, T.-M. Don, W.-Y. Chiu // *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* – 2010. – V. 48. – P. 2377.
111. Recillas, M. Thermoresponsive behavior of chitosan-g-N-isopropylacrylamide copolymer solutions / M. Recillas, L.L. Silva, C. Peniche, [et al.] // *Biomacromolecules* – 2009. – V. 10. – P. 1633.
112. Lee, C.-F. Morphology and temperature responsiveness–swelling relationship of poly(N-isopropylacrylamide–chitosan) copolymers and their application to drug release / C.-F. Lee, C.-J. Wen, C.-L. Lin, W.-Y. Chiu // *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* – 2004. – V. 42. – P. 3029.
113. Lin, C.-L. Preparation of thermoresponsive core-shell copolymer latex with potential use in drug targeting / C.-L. Lin, W.-Y. Chiu, C.-F. Lee // *J. Colloid Interface Sci.* – 2005. – V. 290. – P. 397.
114. Lee, C.-F. Synthesis of poly(chitosan-N-isopropylacrylamide) complex particles with the method of soapless dispersion polymerization / C.-F. Lee, C.-J. Wen, W.-Y. Chiu // *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* – 2003. – V. 41. – P. 2053.
115. Lin, C.-L. Thermal/pH-sensitive core-shell copolymer latex and its potential for targeting drug carrier application / C.-L. Lin, W.-Y. Chiu, C.-F. Lee // *Polymer*. – 2005. – V. 46. – P. 10092.
116. Mu, Q. Preparation of thermosensitive chitosan with poly(N-isopropylacrylamide) side at hydroxyl group via O-maleoyl-N-phthaloyl-chitosan (MPCS) / Q. Mu, Y.E. Fang // *Carbohydr. Polym.* – 2008. – V. 72. – P. 308.
117. Leung, M.F. New route to smart core-shell polymeric microgels: synthesis and properties / M.F. Leung, J. Zhu, F.W. Harris, P. Li // *Macromol. Rapid Commun.* – 2004. – V. 25. – P. 1819.
118. Cai, H. Synthesis and characterization of thermo- and pH- sensitive hydrogels based on chitosan-grafted N-isopropylacrylamide via [gamma]-radiation / H. Cai, Z.P. Zhang, P. Chuan Sun [et al.] // *Radiat. Phys. Chem.* – 2005. – V. 74. – P. 26.

119. Yazdani-Pedram, M. Synthesis and unusual swelling behavior of combined cationic/non-ionic hydrogels based on chitosan / M. Yazdani-Pedram, C. Tapia, J. Retuert, J.L. Arias // *Macromol. Biosci.* – 2003. – V. 3. – P. 577.
120. Beck, R.H.F. Handbook of Polymer Synthesis, Part B. / R.H.F. Beck, M.G. Fitton, H.R. Kricheldorf. – New York: Marcel Dekker, 1992. – P. 1517.
121. Chen, J.-P. Applications of chitosan-based thermo-sensitive copolymers for harvesting livingcell sheet / J.-P. Chen, T.-F. Yang // *Appl. Surf. Sci.* – 2008. – V. 255. – P. 297.
122. Sun, S.A. Thermoresponsive chitosan NIPAAm/vinylaurate copolymer vector for gene transfection / S. Sun, W. Liu, N. Cheng [et al.] // *Bioconjugate Chem.* – 2005. – V. 16. – P. 972.
123. Cao, Y. Poly(N-isopropylacrylamide)-chitosan as thermosensitive in situ gelforming system for ocular drug delivery / Y. Cao, C. Zhang, W. Shen [et al.] // *J. Control. Release* – 2007. – V. 120. – P. 186.
124. Fan, J. Preparation of dual-sensitive graft copolymer hydrogel based on N-maleoylchitosan and poly(N-isopropylacrylamide) by electron beam radiation / J. Fan, J. Chen, L. Yang [et al.] // *Bull. Mater. Sci.* – 2009. – V. 32. – P. 521.
125. Tang, J. Synthesis and properties of temperature-responsive chitosan by controlled free radical polymerization with chitosan-RAFT agent / J. Tang, D. Hua, J. Cheng [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2008. – V. 43. – P. 383.
126. Wang, J. Cell adhesion and accelerated detachment on the surface of temperature sensitive chitosan and poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels / J. Wang, L. Chen, Y. Zhao [et al.] // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2009. – V. 20. – P. 583.
127. Fei, B. Schizophrenic copolymer from natural biopolymer by facile grafting / B. Fei, Z. Yang, H. Yang [et al.] // *Polymer.* – 2010. – V. 51. – P. 890.
128. Bao, H. Thermo-responsive association of chitosan-graft-poly(N-isopropylacrylamide) in aqueous solutions / H. Bao, L. Li, W.C. Leong, L.H. Gan // *J. Phys. Chem. B.* – 2010. – V. 114. – P. 10666.

129. Bao, H. Thermo- and pH-responsive association behavior of dual hydrophilic graft chitosan terpolymer synthesized via ATRP and click chemistry / H. Bao, L. Li, L.H. Gan [et al.] // *Macromolecules*. – 2010. – V. 43. – P. 5679.
130. Goda, T. Soft contact lens biomaterials from bioinspired phospholipid polymers / T. Goda, K. Ishihara // *Expert Rev. Med. Devices*. – 2006. – V. 3. – P. 167.
131. Schwall, C. Micro- and nanoscale hydrogel systems for drug delivery and tissue engineering / C. Schwall, I. Banerjee // *Materials*. – 2009. – V. 2. – P. 577.
132. Zhu, S. Synthesis and characterization of PEG modified N-trimethylaminoethylmethacrylate chitosan nanoparticles / S. Zhu, F. Qian, Y. Zhang [et al.] // *Eur. Polym. J.* – 2007. – V. 43. – P. 2244.
133. Qian, F. Chitosan graft copolymer nanoparticles for oral protein drug delivery: preparation and characterization / F. Qian, F. Cui, J. Ding [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2006. – V. 7. – P. 2722.
134. Sajeesh, S. Novel pH responsive polymethacrylic acid-chitosan-polyethyleneglycol nanoparticles for oral peptide delivery / S. Sajeesh, C.P. Sharma // *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* – 2006. – V. 76. – P. 298.
135. Singh, V. Microwave promoted synthesis of chitosan-graft-poly(acrylonitrile) / V. Singh, D.N. Tripathi, A. Tiwari, R. Sanghi // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2005. – V. 95. – P. 820.
136. Don, T.-M. Synthesis and properties of chitosan-modified poly(vinyl acetate) / T.-M. Don, C.-F. King, W.-Y. Chiu // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2002. – V. 86. – P. 3057.
137. Shantha, K.L. Tailor-made chitosans for drug delivery / K.L. Shantha, U. Bala, K.P. Rao // *Eur. Polym. J.* – 1995. – V. 31. – P. 377.
138. Yazdani-Pedram, M. Homogeneous grafting reaction of vinyl pyrrolidone onto chitosan / M. Yazdani-Pedram, J. Retuert // *J. Appl. Polym. Sci.* – 1997. – V. 63. – P. 1321.
139. Ohya, Y. Graft polymerization of styrene on chitosan and the characteristics of the copolymers / Y. Ohya, S. Maruhashi, K. Shizuno [et al.] // *J. Macromol. Sci. A Pure Appl. Chem.* – 1999. – V. 36. – P. 339.

140. El-Shafei, A. Graft copolymerization of chitosan with butylacrylate and application of the copolymers to cotton fabric / A. El-Shafei, S. Shaarawy, A. Hebeish // *Polym-Plast. Technol. Eng.* – 2005. – V. 44. – P. 1523.
141. Carenza, M. Recent achievements in the use of radiation polymerisation and grafting for biomedical applications / M. Carenza // *Radiat. Phys. Chem.* – 1992. – V. 39. – P. 485.
142. Yu, H. Poly(L-lysine)-graft-chitosan copolymers: synthesis, characterization and gene transfection effect / H. Yu, X. Chen, T. Lu [et al.] // *Biomacromolecules.* – 2007. – V. 8. – P. 1425.
143. Kurita, K. Studies on chitin. 13. New polysaccharide/polypeptide hybrid materials based on chitin and poly(gamma.-methyl L-glutamate) / K. Kurita, A. Yoshida, Y. Koyama // *Macromolecules.* – 1988. – V. 21. – P. 1579.
144. Chi, P. Synthesis and characterization of polycationic chitosan-graft-poly (L-lysine) / P. Chi, J. Wang, C. Liu // *Mater. Lett.* – 2008. – V. 62. – P. 147.
145. Noh, S.M. Pegylated poly-L-arginine derivatives of chitosan for effective delivery of sirna / S.M. Noh, M.O. Park, G. Shim [et al.] // *J. Control. Release.* – 2010. – V. 145. – P. 159.
146. Sato, H. Characterization of chitin-based polymer hybrids by temperature programmed analytical pyrolysis techniques. 1. Chitin-graft-poly(2-methyl-2-oxazoline)/poly(vinyl chloride) blends / H. Sato, S. Tsuge, H. Ohtani [et al.] // *Macromolecules.* – 1997. – V. 30. – P. 4030.
147. Yoshikawa, S. Grafting reaction of living polymer cations with aminogroups on chitosan powder / S. Yoshikawa, T. Takayama, N. Tsubokawa // *J. Appl. Polym. Sci.* – 1998. – V. 68. – P. 1883.
148. Silva, S.S. Synthesis and characterization of polyurethane-g-chitosan / S.S. Silva, S.M.C. Menezes, R.B. Garcia // *Eur. Polym. J.* – 2003. – V. 39. – P. 1515.
149. Kim, I.Y. pH- and thermal characteristic sof graft hydrogels based on chitosan and poly(dimethylsiloxane) / I.Y. Kim, S.J. Kim, M.-S.Shin [et al.] // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2002. – V. 85. – P. 2661.

150. Yilmaz, E. Graft copolymerization of 4-vinyl pyridine onto chitosan by ceric ion initiation / E. Yilmaz, H. Hasopoglu, H.Caner, O. Yilmaz // *Eur. Polym. J.* – 1998. – V. 34. – P. 493.
151. Pourjavadi, A. Modified chitosan: optimized cerium ammonium nitrate-induced synthesis of chitosan-g-polyacrylonitrile / A. Pourjavadi, G.R. Mahdavinia, M.J. Zohuriaan-Mehr, H. Omidian // *J. of Appl. Polym. Scien.* – 2003. – V. 88. – P. 2048.
152. Lagos, A. Grafting onto chitosan: Graft copolymerization of methyl methacrylate onto chitosan with Fenton's reagent as a redox initiator / A. Lagos, J. Reyes // *Journal of Polymer Science.* – 1988. – V. 26. – P. 985.
153. Yazdani-Pedram, M. On the modification of chitosan through grafting / M. Yazdani-Pedram // *J. of Macromolec. Science: Pure and Applied Chemistry.* – 1995. – V. 32. – P. 1037.
154. Prashanth, H.K.V. Crosslinked chitosan-preparation and characterization / H.K.V. Prashanth, R.N. Tharanathan // *Carbohydrate Research.* – 2006. – V. 341. – P. 169.
155. Нудьга, Л. А. Синтез привитых сополимеров N-винилпирролидона и хитозана и их микробиологическая устойчивость / Л. А. Нудьга [и др.] // *Журнл. прикл. химии.* – 2002. – Т. 75. – № 10. – С. 1712.
156. Yazdani-Pedram, M. Study of the effect of reaction variables on grafting of polyacrylamide onto chitosan / M. Yazdani-Pedram, A. Lagos, P. J. Retuert // *Polym. Bull.* – 2002. – V. 48. – № 1. – P. 93.
157. Najjar Abduel Majid, K. Preparation and characterization of poly(2-acrylamido-2-methylpropane-sulfonic acid) grafted chitosan using potassium persulfate as redox initiator / K. Najjar Abduel Majid [et al.] // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2000. – V. 77. – № 10. – P. 2314.
158. Grunlan, J.C. Monodisperse latex with variable glass transition temperature and particle size for use as matrix starting material for conductive polymer composites / J.C. Grunlan, Y. Ma, M.A. Grunlan, W.W. Gerberich, L.F. Francis // *Polymer.* – 2001. – V. 42. – P. 6913.

159. Solomko, N.Y. Emulsion polymerization of vinyl monomers in presence of chitosan with peroxide groups / N.Y. Solomko, I.A. Dron, O.G. Budishevskaya, S.A. Voronov // *Procedia Chemistry* – 2009. – V. 1. – P. 1567.
160. Hsu, S.C. Synthesis of Chitosan-Modified Poly(methyl methacrylate) by Emulsion Polymerization / S.C. Hsu, T.M. Don, W.Y. Chiu // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2002. – V. 86. – P. 3047.
161. Harish Prashanth, K.V. Studies on graft copolymerization of chitosan with synthetic monomers / K.V. Harish Prashanth, R.N. Tharanathan // *Carbohydr. Polym.* – 2003. – V.54. – P. 343.
162. Mun, G.A. Studies on graft copolymerization of 2-hydroxyethyl acrylate onto chitosan / G.A. Mun, Z.S. Nurkeeva, S.A. Dergunov [et al.] // *Reactive&Functional Polymers.* – 2008. – V. 68. – P. 389.
163. Нудьга, Л.А. Привитая полимеризация винилацетата на хитозан в кислой среде / Л.А. Нудьга, В.А. Петрова, М.Ф. Лебедева, Г.А. Петропавловский // *Журн. прикл. химии.* – 1996. – Т. 69. – № 7 – С. 1194.
164. Don, T. M. Structures and thermal properties of chitosan modified poly(methylmethacrylate) / T. M. Don, S. C. Hsu, W. Y Chiu // *Journal of Polymer Science: Polymer chemistry.* – 2001. – V. 39. – № 8. – P. 1646.
165. Hebeish, A. The chemistry and technologie of cellulosic copolymers / A. Hebeish, J. T. Guthrie. – Berlin: Springer Verlag, 1981. – 1085 p.
166. Matyjaszewski, K. Controlled and living polymerizations: from mechanisms to applications / K. Matyjaszewski, A.H.E. Müller. – Weinheim: Wiley-VCH, 2009. – 634p.
167. Carreira, A.S. Temperature and pH responsive polymers based on chitosan: applications and new graft copolymerization strategies based on living radical polymerization / A.S. Carreira, F.A.M.M. Goncalves, P.V. Mendonca [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2010. – V. 80. – P. 618.
168. Li, N. Enhanced and selective adsorption of mercury ions on chitosan beads grafted with polyacrylamide via surface-Initiated atom transfer radical polymerization /

N. Li, R. Bai, C. Liu // Received June 11, 2005. In Final Form: September 25, 2005. – P. 315.

169. Liu, P. Surface-initiated atom transfer radical polymerization (SI-ATRP) of styrene from chitosan particles / P. Liu, Z. X. Su // *Mater. Lett.* – 2006. – V. 60. – P. 1137.

170. Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization / K. Matyjaszewski, I. Xia // *Chem. Rev.* – 2001. – V. 101. – № 9. – P. 2921.

171. Enikolopov, N.S. Solid phase chemical reactions and new technologies / N.S. Enikolopov // *Russ. Chem. Rev.* – 1991. – V. 60. – P. 283.

172. Prut, E.V. Chemical modification and blending of polymers in an extruder reactor / E.V. Prut, A.N. Zelenetskii // *Russian Chemical Reviews.* – 2001. – V. 70. – № 1. – P. 65.

173. Патент 2292354 РФ Способ получения привитых сополимеров хитина и хитозана с синтетическими полимерами / А.Н. Озерин, А.Н. Зеленецкий, Т.А. Акопова, С.Н. Зеленецкий, Л.В.Владимиров, В.А. Жорин, Е.Л. Могилевская, А.О. Чернышенко, Г.А. Вихорева – Дата публ.: 27.01.2007.

174. Akopova, T.A. Solid-state synthesis of amphiphilic chitosan-polyethylene systems by the maleinization of both components / T.A. Akopova, L.V. Vladimirov, V.A. Zhorin, A.N. Zelenetskii // *Polymer Science B.* – 2009. – V. 51. – P. 124.

175. Akopova, T.A. A novel approach to design chitosan-polyester materials for biomedical applications / T.A. Akopova, T.S. Demina, A.N. Shchegolikhin, T.S. Kurkin, Ch. Grandfils, N.S. Perov, A.S. Kechek'yan, A.N. Zelenetskii // *Int. J. Polym. Sci.* – 2012. – Article ID 827967. – 10 p. – DOI:10.1155/2012/827967.

176. Леснякова, Л.В. Влияние условий твердофазного получения привитых сополимеров хитозана и поливинилового спирта на их строение и растворимость / Леснякова Л.В., Акопова Т.А., Вихорева Г.А., Перов Н.С., Зеленецкий А.Н. // *Композиты и наноструктуры.* – 2012. – № 1. – С. 44.

177. Акопова, Т.А. Твердофазный синтез, структура, свойства и перспективы применения материалов на основе полисахарида хитозана: авт. дис.

... док. хим. наук: 02.00.06 / Акопова Татьяна Анатольевна. –М.: ИСПИМ РАН, 2013 – 46 с.

178. Aljawish, A. Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications / A. Aljawish, I. Chevalot, J. Jasniewski, J. Scher, L. Muniglia // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* – 2015. – V. 112. – P. 25.

179. Kataoka, K. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance / K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2001. – V. 47. – P. 113.

180. Van Dongen, S.F.M. Biohybrid polymer capsules / S.F.M. Van Dongen, H.-P.M. de Hoog, R.J.R.W. Peters [et al.] // *Chem. Rev.* – 2009. – V. 109. – P. 6212.

181. Schatz, C. Polysaccharide-containing block copolymers: synthesis, properties and applications of an emerging family of glycoconjugates / C. Schatz, S. Lecommandoux // *Macromol. Rapid Commun.* – 2010. – V. 31. – P. 1664.

182. Ganji, F. Synthesis and characterization of a new thermosensitive chitosan-PEGdiblock copolymer / F. Ganji, M.J. Abdekhodaie // *Carbohydr. Polym.* – 2008. – V. 74. – P. 435.

183. Ganji, F. The effects of reaction conditions on block copolymerization of chitosan and poly(ethylene glycol) / F. Ganji, M.J. Abdekhodaie // *Carbohydr. Polym.* – 2010. – V. 81. – P. 799.

184. Kong, X. Synthesis and characterization of a novel MPEG-chitosan diblock copolymer and self-assembly of nanoparticles / X. Kong, X., Li, X. Wang [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2010. – V. 79. – P. 170.

185. Hsu, S.C. Synthesis of chitosan-modified poly(methyl methacrylate) by emulsion polymerization / S.C. Hsu, T.M. Don, W.Y. Chiu // *Journal of Applied Polymer Science.* – 2002. – V. 86. – P. 3047.

186. Павлюченко, В. Н. Композиционные полимерные гидрогели / В. Н. Павлюченко, С. С. Иванчев // *Высокомолекулярные соединения, Сер. А и Б.* – 2009. – Т. 51. – N 7. – С. 1075.

187. Berger, J. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications / J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, R. Gurny // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2004. – V. 57. – P. 35.
188. Boucard, N. New aspects of the formation of physical hydrogels of chitosan in a hydroalcoholic medium / N. Boucard, C. Viton, A. Domard // *Biomacromolecules.* – 2005. – V. 6. – P. 3227.
189. Peppas, N.A. Hydrogels in medicine and pharmacy / N.A. Peppas. – FL: CRC Press, Boca Raton, 1986. – 250 p.
190. Shu, X.Z. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure / X.Z. Shu, K.J. Zhu // *Int. J. Pharm.* – 2002. – V. 233. – P. 217.
191. Shen, E.C. Tetracycline release from tripolyphosphate-chitosan cross-linked sponge: a preliminary in vitro study / E.C. Shen, C. Wang, E. Fu, C.Y. Chiang, T.T. Chen, S. Nieh // *J. Periodontal. Res.* – 2008. – V. 43. – P. 642.
192. Brack, H.P. A spectroscopic and viscometric study of the metal ion-induced gelation of the biopolymer chitosan / H.P. Brack, S.A. Tirmizi, W.M. Risen // *Polymer.* – 1997. – V. 38. – P. 2351.
193. Dambies, L. Preparation of chitosan gel beads by ionotropic molybdate gelation / L. Dambies, T. Vincent, A. Domard, E. Guibal // *Biomacromolecules.* – 2001. – V. 2. – P. 1198.
194. Платэ, Н.А. Макромолекулярные реакции / Н.А. Платэ, А.Д. Литманович, О.В. Ноа. – М.: Химия, 1977. – С. 233.
195. Зезин, А.Б. Новый класс комплексных водорастворимых полиэлектролитов / А.Б. Зезин, В.А. Кабанов // *Успехи химии.* – 1982. – Т. 51. – № 9. – С. 1447.
196. Бектуров, Е.А. Интерполимерные комплексы / Е.А. Бектуров, Л.А. Бимендина. – Алма-Ата: Наука, 1977. – 264 с.
197. Кабанов, В.А. Физико-химические основы и перспективы применения растворимых интерполимерных комплексов / В.А. Кабанов // *Высокомолек. соед. А.* – 1994. – Т. 36. – № 2. – С. 183.

198. Зезин, А.Б. Новый класс комплексных водорастворимых полиэлектролитов / А.Б. Зезин, В.А. Кабанов // Успехи химии. – 1982. – Т. 51. – № 9. – С. 1447.
199. Tsuchida, E. Interactions between macromolecules in solution and intermacromolecular complexes / E. Tsuchida, K. Abe // Adv. Polym. Sci. – 1982. – V. 45. – P. 1.
200. Евдокимов, Ю. М. Принципы создания наноконструкций с использованием молекул нуклеиновых кислот в качестве строительных блоков / Ю. М. Евдокимов, В. В. Сычев // Успехи химии. – 2008. – Т. 77. – N 2. – С. 194
201. Галаев, И.Ю. «Умные» полимеры в биотехнологии и медицине / И.Ю. Галаев // Успехи химии. – 1995. – Т. 64. – С. 505.
202. Chen, J.P. Thermo-responsive chitosan-graft-poly(N- isopropylacrylamide) injectable hydrogel for cultivation of chondrocytes and meniscus cells / J.P. Chen, T.H. Cheng // Macromol. Biosci. – 2006. – V. 6. – P. 1026.
203. Ohya, S. The potential of poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted hyaluronan and PNIPAM-grafted gelatin in the control of post-surgical tissue adhesions / S. Ohya, H. Sonoda, Y. Nakayama, T. Matsuda // Biomaterials. – 2005. – V. 26. – P. 655.
204. Alexandridis, P. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block-copolymer surfactants in aqueous-solutions and thermodynamics, structure, dynamics and modeling / P. Alexandridis, T.A. Hatton // Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. – 1995. – V. 96. – P. 1.
205. Park, K.M. Thermosensitive chitosan—Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration / K.M. Park, Y.K. Joung, S.J. Na, M.C. Lee, K.D. Park // Acta Biomaterialia. – 1965. – 2009. – V. 5. – P. 1956.
206. Баттерд, Г. Свойства привитых и блок-сополимеров / Г. Баттерд, Д.У. Трегер. – Л.: Химия, 1970. – 215 с.
207. Erdodi, G. Amphiphilic conetworks: definition, synthesis, applications / G. Erdodi, J.P. Kennedy // Prog. Polym. Sci. – 2006. – V. 31. – № 1. – P. 1.

208. Hoare, T.R. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges / T.R. Hoare, D.S. Kohane // *Polymer*. – 2008. – V. 49. – P. 1993.
209. Berger, J. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications / J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2004. – V. 57. – P. 19.
210. Hennink, W.E. Novel crosslinking methods to design hydrogels / W.E. Hennink, C.F. van Nostrum // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2002. – V. 54. – P. 13.
211. Kulkarni, A.R. A novel method for the synthesis of the PEG-crosslinked chitosan with a pH-independent swelling behavior / A.R. Kulkarni, V.I. Hukkeri, H.W. Sung, H.F. Liang // *Macromol. Biosci.* – 2005. – V. 5. – P. 925.
212. Sakiyama, T. Polyelectrolyte complex gel with high pH-sensitivity prepared from dextran sulfate and chitosan / T. Sakiyama, H. Takata, M. Kikuchi, K. Mikanishi // *J. Appl. Polym. Sci.* – 1999. – V. 73. – P. 2227.
213. Woo, L. J. Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogel composed of chitosan and poly(acrylic acid) / L. J. Woo [et al.] // *J. Appl. Polym. Sci.* – 1999. – V. 73. – № 1. – P. 113.
214. Kousaku, O. Образование и биодеструкция природных полимерных гидрогелей, волокон и капсул / O. Kousaku, T. Hideki, Y. Hiroyuki // *Jap. J. Polym. Sci. and Technol.* – 1999. – V. 56. – № 10. – P. 583. РЖХ 05.05 – 191.52
215. Гочжун, Ц. Наноструктуры и наноматериалы: синтез, свойства и применение / Ц. Гочжун, И. Ван. – М.: Научный мир, 2012. – 515 с.
216. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: синтез, свойства и биомедицинские применения. – М.: Наука, 2008. – 318 с.
217. Faraji, A.H. Nanoparticles in cellular drug delivery / A.H. Faraji, P. Wipf // *Bioorg Med Chem.* – 2009. – V. 17. – P. 2950.
218. Anker, N. Biosensing with plasmonic nanosensors / N. Anker, W.P. Hall, O. Lyandres [et al] // *Nat Mater.* – 2008. – V. 7. – P. 442.

219. Jain, P.K. Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine / P.K. Jain, X.H. Huang, I.H. El-Sayed [et al.] // *Acc Chem Res.* – 2008. – V. 41. – P. 578.
220. Boisselier, E. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity / E. Boisselier, D. Astruc // *Chem Soc Rev.* – 2009. – V. 38. – P. 1759.
221. Nel, A.E. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface / A.E. Nel, L. Madler, D. Velegol [et al.] // *Nat Mater.* – 2009. – V. 8. – P. 543.
222. Sperling, R.A. Biological applications of gold nanoparticles / R.A. Sperling, P. Rivera, F. Zhang [et al.] // *Chem Soc Rev.* – 2008. – V. 37. – P. 1896.
223. Hakkinen, H. The gold–sulfur interface at the nanoscale / H. Hakkinen // *Nat. Chem.* – 2012. – V. 4. – P. 443.
224. Louis, C. Gold nanoparticles for physics, chemistry, biology / C. Louis, O. Pluchery. – France: Université Pierre et Marie Curie, 2012. – 300 p.
225. Schroeder, A. / A. Schroeder, D.A. Heller, M.M. Winslow [et al.] // *Nat. Rev. Cancer.* – 2012. – V. 12. – P. 39.
226. Saha, K. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing / K. Saha, S.S. Agasti, C. Kim, X. Li, V.M. Rotello // *Chem. Rev.* – 2012. – V. 112. – P. 2739.
227. Hashmi, A.S.K. Gold catalysis / A.S.K. Hashmi, G.J. Hutchings // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2006. – V. 45. – P. 7896.
228. Dimitratos, N. Selective liquid phase oxidation with supported metal nanoparticles / N. Dimitratos, J. A. Lopez-Sanchez, G. J. Hutchings // *Chem. Sci.* – 2012. – V. 3. – P. 20.
229. Bardhan, R. Theranostic nanoshells: from probe design to imaging and treatment of cancer / R. Bardhan, S. Lal, A. Joshi, N.J. Halas // *Acc. Chem. Res.* – 2011. – V. 44. – P. 936.
230. Schatz, G.C. Using theory and computation to model nanoscale properties / G.C. Schatz, P. Natl // *Acad. Sci. U.S.A.* – 2007. – V. 104. – P. 6885.

231. Зубарева, А.А. Определение физико-химических параметров наночастиц модифицированного хитозана / А.А. Зубарева, Д.В. Курек, С.В. Сизова, Е.В. Свирщевская, В.П. Варламов // Российские нанотехнологии. – 2012. – Т.7. – № 7–8. – С. 102.
232. Свирщевская, Е.В. Наноносители лекарств на основе хитозана / Е.В. Свирщевская, Р.С. Гриневич, П.Д. Решетов, В.П. Зубов, А.А. Зубарева, А.В. Ильина, В.П. Варламов // Биотехносфера. – 2012. – Т. 19. – № 1. – С. 13.
233. Заявка 19940794. Германия. МП К7: А 61 К 9/10. Hoffmann Hans-Rainer, Asmussen Bodo. Фармацевтический препарат // Оpubл.: 01.03.2001. РЖХ 04.02—190.253П.
234. Jun-qing, Quin. Приготовление микросферы левофлоксацин-хитозан с длительным высвобождением лекарств / Quin Jun-qing, Ma Yue-zhen // Zhejiang gongue daxue xuebao. – 2004. – V. 32. – P. 20. РЖХ 05.05 – 190.37
235. Qiang, Xu. Приготовление и проектирование наночастиц, нагруженных мелатонином / Xu Qiang [et al.] // Yixueban. – 2004. – V. 39. – № 6. – P. 1041. РЖХ 05.12—190.16.
236. Кузнецов, В. А. Хитозан и дезоксикрахмал в качестве полимерных матриц для иммобилизации биологически активных компонентов / В. А. Кузнецов, В. Л. Лапенко // Вестник МИ ТХ Т. – 2009. – Т. 4. – №3. – С. 97.
237. Cui, F. Исследование наночастиц из комплекса инсулин/ хитозан, предназначенных для перорального введения / F. Cui [et al.] // J. Drug Deliv. Sci. and Technol. – 2004. – V. 14. – № 6. – P. 435.
238. Рашидова, С.Ш. Исследование процесса формирования наноструктур на основе пектина и хитозана / С. Ш. Рашидова [и др.] // 18 Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, Москва, 23—28 сент., 2007. Химия материалов, наноструктуры и нанотехнологии, Москва. – 2007. – Т. 2. – 482. С
239. Тлеумухамбетова, А. Хитозан-модифицированные микро- и наночастицы на основе альгинатов для пульсирующего выделения физиологически активных веществ / А. Тлеумухамбетова // Физика и химия наноматериалов. – 2005. – С. 791.

240. Scaravelli, R.C. Direct synthesis of coated gold nanoparticles mediated by polymers with amino groups / R.C. Scaravelli, R.L. Dazzi, F.C. Giacomelli [et al.] // *J. Colloid Interface Sci.* – 2013. – V. 397. – P. 114.

241. Ehlert, S. Polymer ligand exchange to control stabilization and compatibilization of nanocrystals / S. Ehlert, S.M. Taheri, D. Pirner [et al.] // *ACS Nano.* – 2014. – V. 8. – P. 6114.

242. Suzuki, D. Modification of gold nanoparticle composite nanostructures using thermosensitive core-shell particles as a template / D. Suzuki, H. Kawaguchi // *Langmuir.* – 2005. – V. 21. – P. 8175.

243. Navarro, J.R. Nanocarriers with ultrahigh chromophore loading for fluorescence bio-imaging and photodynamic therapy / J.R. Navarro, F. Lerouge, C. Cepraga [et al.] // *Biomaterials.* – 2013. – V. 34. – P. 8344.

244. Yang, D.P. Advances and prospects of gold nanorods / D.P. Yang, D.X. Cui // *Chem. Asian J.* – 2008. – V. 3. – P. 2010.

245. Takara, M. Polymer-modified gold nanoparticles via RAFT polymerization: a detailed study for a biosensing application / M. Takara, M. Toyoshima, H. Seto, Y. Hoshino, Y. Miura // *Polym. Chem.* – 2014. – V. 5. – P. 931.

246. Li, D. Smart core/shell nanocomposites: intelligent polymers modified gold nanoparticles / D. Li, Q. He, J. Li // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2009. – V. 149. – P. 28.

247. Hu, M. Ultrafast laser studies of the photothermal properties of gold nanocages / M. Hu, H. Petrova, J. Chen [et al.] // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. – V. 110. – P. 1520.

248. Dogwei, W. Exposure and processing glutaraldehyde cooled morphology Au-nanostructures synthesized from chitosan / W. Dogwei, Q. Weiping // *Carbohydr. Res.* – 2008. – V. 343. – №3. – P. 512.

249. Ding, Y. Cysteine-grafted chitosan-mediated gold nanoparticle assembly: from nanochains to microcubes / Ding Ya, Gu Gang // *J. Mater. Chem.* – 2009. – V. 19. – № 6. – P. 795.

250. Вохидова, Н.Р. Синтез, свойства и применение полимерметаллокомплексов хитозана BOMBYX MORI и хитозанстабилизированных наночастиц d-металлов: дис. ... докт. хим. наук: 02.00.06; 02.00.12 / Вохидова Нойира Рахимовна. – Ташкент., 2016. – 190 с.

251. Jing, An. Получение нанокмозитов с антимикробной активностью на основе продукта прививки на хитозан метилметакрилата и серебра / An Jing, Yuan Xiaoyan // Desong. Polym. Int. – 2010. – V. 59. – №1. – P. 62. PЖX 10.17–19T.41.

252. Mikami, T. PEI-assisted preparation of Au nanoparticles via reductive crystallization process / T. Mikami, Y. Takayasu, I. Hirasawa // Chem. Eng. Res. Des. – 2010. – V. 88. – P. 1248.

253. Kirtane, A.R. Exploiting nanotechnology to overcome tumor drug resistance: challenges and opportunities / A.R. Kirtane, S.M. Kalscheuer, J. Panyam // Adv. Drug Deliv.Rev. – 2013. – V. 65. – P. 1731.

254. Omkara, S. Current trends in using polymer coated gold nanoparticles for cancer therapy/ O.S. Muddineti, B. Ghosh, S. Biswas // International Journal of Pharmaceutics. – 2015. – V. 484. – P. 252.

255. Rotello, V. Nanoparticles. Building block for nanotechnology / V. Rotello. – New York: Kluwer Academic Publishers, 2004. – 285 p.

256. Schmid, G. Nanoparticles: From theory to application / G. Schmid. – Weinheim: Wiley–VCH, 2006. – 533 p.

257. Caruso, F. Colloids and colloid assemblies / F. Caruso. – Weinheim: Wiley–VCH, 2004. – 603 p.

258. Liz-Marzan, L.M. Nanoscale materials / L.M. Liz-Marzan, P.V. Kamat. – New York: Kluwer Academic Publishers, 2003. – 495 p.

259. Burda, C. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes / C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M.A. El-Sayed // Chem. Rev. – 2005. – V. 105. – P. 1025.

260. Xia, Y. Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics / Y. Xia, Y. Xiong, B. Lim, S.E. Skrabalak // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2009. – V. 48. – P. 60.
261. Marguerite, R. Chitin and chitosan: properties and applications / R. Marguerite // *Prog. Polym. Sci.* – 2006. – V. 31. – P. 603.
262. Ткачева, Н.И. Модификация целлюлозы - перспективное направление в создании новых материалов / Н.И. Ткачева, С.В. Морозов, И.А. Григорьев // *Высокомолек. соед.* – 2013. – Т. 55. – № 8. – С. 1086.
263. Brugnerotto, J. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization / J. Brugnerotto, J. Lizardi, F.M. Goycoolea, W. Arguelles Monal, J. Desbrieres, M. Rinaudo // *Polymer.* – 2001. – V. 42. – P. 3569.
264. Berlin, A.A. Kinetics and mechanism of radical graft polymerization of monomers onto polysaccharides / A.A. Berlin, V.N. Kislenco // *Prog. Polym. Sci.* – 1992. – V. 17. – P. 765.
265. Caner, H. Graft copolymerization of 4-vinylpyridine on to chitosan-1. By ceric ion initiation / H. Caner, H. Hasipoglu, O. Yilmaz, E. Yilmaz // *Eur. Polym. J.* – 1998. – V. 34. – P. 493.
266. Андриянова, Н.А. Модификация хитозана акрилонитрилом - блок- и привитая сополимеризация, полимераналогичные превращения: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.06 / Андриянова Наталья Александровна. – Нижний Новгород., 2005. – 108 с.
267. Баландина, В. А. Анализ полимеризационных пластмасс: практическое руководство / В. А. Баландина [и др.]; под общ. ред. В. Д. Безуглого. – М.: Химия, 1974. – 512 с.
268. *Polymer Biomaterials in Solution, As Interfaces and As Solids: A Festschrift Honoring the 60th Birthday of Dr. Allan S. Hoffman.* – Japan: VSP, 1995. – 1123 p.
269. Вопросы химической кинетики, катализа и реакционной способности: сборник статей. – М.: Изд-во АН СССР, 1955. – С. 303.

270. Багдасарьян, Х.С. Теория радикальной полимеризации / Х.С. Багдасарьян. – М.: Наука, 1966. – С. 56.
271. Изволенский, В.В. Влияние побочных реакций на сополимеризацию N-винилпирролидона с непредельными кислотами / В.В. Изволенский, И.В. Дровенкова // Высокомолек. соедин. Сер. Б. –1992. – Т. 34. – № 10. – С. 69.
272. Денисов, В.М. Реакция N-винилпирролидона с растворителем в присутствии кислот в водных и спиртовых растворах / В.М. Денисов [и др.] // Журн. прикл. химии. – 1989. – Т. 62. – № 3. – С. 660.
273. Литманович, А.А. Получение нанокомпозитов в процессах контролируемых макромолекулярными псевдоматрицами. Теоретическое рассмотрение / А.А. Литманович, И.М. Паписов // Высокомолекулярные соединения, Серия Б. – 1997. Т. 39. – №2. – С. 323.
274. Федосеева, Е.Н. Деградация хитозана под действием окислительно-восстановительных систем и модифицирование низкомолекулярных хитозанов полимераналогичными превращениями и сополимеризацией: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.06 / Федосеева Елена Николаевна. – Нижний Новгород., 2007. – 159 с.
275. Федосеева, Е.Н. Радикальная деградация хитозана при участии окислительно-восстановительной системы / Е.Н. Федосеева, Л.А. Смирнова, М.А. Сорокина, М.О. Пастухов // Журн. прикладн. химии. – 2006. – Т. 79. – Вып. 5. – С. 857.
276. Федосеева, Е.Н. Деструкция хитозана в растворах под действием окислительно-восстановительной системы / Е.Н. Федосеева, Ю.Д. Семчиков, Л.А. Смирнова // Высокомолек.соед. Сер. Б – 2006. – Т 48. – № 10. – С. 1930.
277. Гамзазаде, А.И. О вязкостных свойствах растворов хитозана / А.И. Гамзазаде, Д.М. Скляр, С.-С. А. Павлова, С.В. Рогожин // Высокомолек. соедин. – 1981. – Т. А. 23 – № 3. – С. 594.
278. Гуль, В.Е. Структура и механические свойства полимеров / В.Е. Гуль, В.Н. Кулезнев. М.: Высшая школа, 1979. – 351 с.

279. Горбачева, И.Н. Рентгенографическое изучение структуры хитозана / И.Н. Горбачева [и др.] // Высокомолек. соедин. – 1988. – Сер. А. – Т. 30. – № 12. – С. 2512.
280. Федосеева, Е.Н. Вязкостные свойства растворов хитозана и его реакционная способность / Е.Н. Федосеева, Л.А. Смирнова, В.Б. Федосеев // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2008. – № 4. – С. 59.
281. Robeson, L.M. The upper bound revisited / L.M. Robeson// Journal of Membrane Science. –2008. – 320. – Р. 390.
282. Вейцер, Ю.М. Высокомолекулярные флокулянты в процессе очистки природных и сточных вод / Вейцер Ю.М., Д.М. Минц. – М.: Стройиздат, 1984. – 202 с.
283. Куренков, В.Ф. Полиакриламидные флокулянты / В.Ф. Куренков // Соросовский образовательный журн. –1997. – №7. – С.57.
284. Куренков, В. Ф. Седиментация суспензии каолина в присутствии частично гидролизованного полиакриламида и сульфата алюминия / В. Ф. Куренков, Ф.Н. Чуриков, С.В. Снигирев // Журн. прикл. химии. – 1999. – Т. 72. – № 5. – С. 828.
285. Оудиан, Дж. Основы химии полимеров / Дж. Оудиан. – М.: Мир, 1974. –614 с.
286. Клинков, А.С. Утилизация и вторичная переработка полимерных материалов: учеб. пособие / А.С. Клинков, П.С. Беляев, М.В. Соколов. –Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2005. – 80 с.
287. Patent US 2010/0076099 A1, Int.Cl. C08J 9/00 C08K 3/34. Biodegradable polymeric nanocomposite compositions particularly for packaging / A.K. Morhanty, Y. Parulekar, M. Chidambarakumar, N. Kositruangchai, B.R. Harte – Pub.date: 25.03.2010.
288. Patent US 7,750,065 B2, Int. Cl. C08K 5/04 C09K 21/14 C09D 5/16 C08G 77/04. Flame-retardant biodegradable material and manufacturing method of the

same, flame-retardant biodegradable polymeric composition, and molded product and disposable method of the same / K. Yao – Pub.date: 6.07.2010.

289. Patent US 2007/0129467 A1, Int.Cl. D21H 19/54. Bio based biodegradable polymer compositions and use of the same / F. Scheer – Pub.date: 7.01.2007.

290. Patent US 2010/0120943 A1, Int. Cl. C08K 9/04 C08L 51/02 C08K 5/053. Strach-polyster biodegradable graft copolymers and a method of preparation thereof/ R. Narayan, S. Balakrishnan, Y. Nabar, J.-M. Raquez, Ph. Dubois – Pub.date: 13.05.2010.

291. Patent US 6, 660,211 B2, Int. Cl. B29C 35/10 B29C 47/00 B28C 71/04. Methods of making biodegradable film having enhanced ductility and breathability / V.A. Topolkaraev, D.A. Soerens – Pub. date: 9.12.2003;

292. Patent US 2004/0242722 A1, Int. Cl. A61F 2/00 C08K 3/00. Biodegradable polymer system /J. Rose, S. Hardwick – Pub. date: 2.12.2004.

293. Patent US 5,852,114 A, Int. Cl. C08L 29/04 C08L 29/02 C08L 23/08. Biodegradable thermoplastic polymer blend compositions with accelerated biodegradation / C.L. Loomis, M. Izbicki, A. Flammino – Pub. date: 22.12.1988.

294. Handbook of biodegradable polymers / editor: C. Bastioli. – UK: Rapra Technology Limited, 2005. – 549 p.

295. Соломатов, В.И. Биологическое сопротивление материалов / В.И. Соломатов, В.Т. Ерофеев, В.Ф. Смирнов, А.С. Семичева, Е.А. Морозов – Саранск: Изд-во Мордовского ун-та, 2001. – 195 с.

296. Кряжев, Д.В. Экологические и физиологические аспекты деструкции микромицетами композиций с регулируемой грибостойкостью на основе природных и синтетических полимеров: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16/ Кряжев Дмитрий Валерьевич. – Н. Новгород, 2005. – 305 с.

297. Vasnev, V.A. Biodegradable polymers / V.A. Vasnev // Polym. Sci. Ser. B. Polym. Chem. –1997. – V. 39. – P. 474.

298. Легонькова, О.А. Тысяча и один полимер от биостойких до биоразлагаемых / О.А.Легонькова, Л.А.Сухарева.–М.: РадиоСофт. – 2004. – 272 с.

299. Plisko, E.A. Chitin and its chemical transformations / E.A. Plisko, L.A. Nud'ga, S.N. Danilov // Rus Chem Rev. –1977. – V. 46. – P. 764.

300. Никоноров, В.В. Закономерности структурообразования в растворах хитозана в присутствии сшивающего реагента для получения волокнистых биокатализаторов / В.В. Никоноров, П.А. Перминов, Н.Р. Кильдеева // Хим. волокна. – 2006. – № 2. – С. 9.
301. Перминов, П.А. Закономерности взаимодействия хитозана с глутаровым альдегидом и их использование при получении ферментсодержащих полимерных материалов: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.06 / Перминов Петр Анатольевич. – Москва, 2007. – 152 с.
302. Bandgar, B.P. Synthesis of acyl azides from carboxylic acids using cyanuric chloride / B.P. Bandgar, S.S. Pandit // Tetrahedron Lett. – 2002. – V. 43. – P. 3413.
303. Саундерс, Дж. Химия полиуретанов / Дж. Саундерс, К. Фриш. – М: Химия, 1968. – С. 123.
304. Hine, J. Physical Organic Chemistry / J. Hine. – New York; San-Francisco: Toronto: London: McGray-Hill Book Co., 1962. – P. 486.
305. Hoffman, A.S. Hydrogels for biomedical applications / A.S. Hoffman // Adv. Drug Delivery Rev. – 2002. – V. 43. – № 1. – P. 3.
306. Вода в полимерах / Под ред. С. Роуланда. – М.: Мир, 1984. – С. 115.
307. Абрамова, Л.И. Полиакриламид / Л.И. Абрамова, Т.А. Байдуков, Э.П. Гаспарян – М.: Химия, 1992. – 250с.
308. Lebedev, B.V. Application of precise calorimetry in study of polymers and polymerization processes / B.V. Lebedev // Thermochim. Acta. – 1997. – V. 297. – P. 143 .
309. Illum, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient / L. Illum // Pharmaceutical Research. – 1998. – V. 15. – P. 1326.
310. Шульпин, Г.Б. Фотохимическое хлорирование насыщенных и ароматических углеводов / Г.Б. Шульпин, П. Ледерер, Ю.В. Гепетий // ЖОХ. – 1987. – Т. 57. – № 3 – С. 619.

311. Link, S. Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods/ S. Link, M.A. El-Sayed // J. Phys. Chem. B. –1999. – V. 103. –№ 7. – P. 8410.
312. Brown, K.R. Seeding of Colloidal Au Nanoparticle Solutions. 2. Improved Control of Particle Size and Shape / K.R. Brown, D.G. Walter, M.J. Natan // Chem. Mater. – 2000. – V. 2. – P. 306.
313. Хлебцов, Н.Г. Золотые наноструктуры с плазмонным резонансом для биомедицинских исследований / Н.Г. Хлебцов, В.А. Богатырев, Л.А. Дыкман, Б.Н. Хлебцов // Российские нанотехнологии. – 2007. – Т. 2. – № 3–4. – С. 69.
314. Гинье, А. Рентгенография кристаллов / А. Гинье. –М.: Физматгиз, 1961. – 604 с.
315. Свергун, Д.И. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние / Д.И. Свергун, Л.И. Фейгин. – М.: Наука, 1986. – 279 с.
316. Крутяков, Ю.А. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы / Ю.А. Крутяков, А.А. Кудринский, А.Ю. Оленин, Г.В. Лисичкин // Успехи химии. – 2008. – Т. 77. – № 3. – С. 233.
317. Yain, P.K. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape and composition: applications in biological imaging and biomedicine / P.K. Yain, K.S. Lee, I.N. El-Sayed, M.A.El-Sayed // J. Phys. Chem. B. – 2006. – V. 14. – P. 7238.
318. Якимович, Н.О. Золотосодержащие наноконпозиционные материалы на основе гомо- и сополимеров метилметакрилата / Н.О. Якимович, Н.В. Сапогова, Л.А. Смирнова, А.П. Александров, Т.А. Грачева, А.В. Кирсанов, Н.М. Битюрин // Химическая физика. – 2008. – Т. 27. – № 1. – С. 61.
319. Помогайло, А.Д. Наночастицы металлов в полимерах / А.Д. Помогайло, А.С. Розенберг, И.Е. Уфлянд. – М.: Химия, 2000. – 672 с.
320. Сергеев, Г.Б. Нанохимия. 2-е издание / Г.Б. Сергеев. – М.: Изд-во МГУ, 2007. – 336 с.

321. Daniel, M.-C. Gold Nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties and applications toward biology, catalysis and nanotechnology / M.-C. Daniel, D. Astruc // *Chem. Rev.* – 2004. – V. 1. – P. 293.

322. Литманович, О.Е. Дополнительная стабилизация золей меди смесью поли-N-виниллактамов / О.Е. Литманович, Е.А. Елисеева, А.Г. Богданов, И.М. Паписов // *Высокомолек. соед. А.* – 2003. – Т. 45. – № 3. – С. 507.

323. Литманович, О.Е. Избирательность взаимодействий наночастиц меди с макромолекулами полиэлектролита и неионогенного полимера / О.Е. Литманович, Г.В. Мармузов, А.А. Литманович, И.М. Паписов // *Высокомолек. соед. А.* – 2003. – Т. 45. – № 9. – С. 1533.

324. Погодина, Н.В. Конформационные характеристики молекул хитозана по данным диффузионно-седиментационного анализа и вискозиметрии / Н.В. Погодина, Г.М. Павлов, С.В. Бушин и др. // *Высокомолек. соед. А.* – 1986. – Т. 28. – № 2 – С. 232.

325. Хитозан per os. Перевод с английского / Под редакцией Риккардо А.А. Муццарелли. – Нижний Новгород: Изд-во «Вектор – ТиС», 2001. – 372 с.

326. Хлебцов, Н.Г. Биораспределение и токсичность золотых наночастиц / Н.Г. Хлебцов, Л.А. Дыкман // *Российские нанотехнологии.* – 2011. – Т.6. – №1-2. – С. 39.

327. Лукьянова, Л.Д. Современные проблемы гипоксии / Л.Д. Лукьянова // *Вестник РАМН.* – 2000. – №9. – С. 3.

328. Рябов, Г.А. Активированные формы кислорода и их роль в некоторых патологических состояниях / Г.А. Рябов, И.Н. Палечник, Ю.М. Азимов // *Анестезиология и реанимация.* – 1991. – №1. – С. 63.

329. Лукьянова, Л.Д. Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции / Л.Д. Лукьянова // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 1997. – № 9. – С. 244.

330. Hillyer, J.F. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles / J.F. Hillyer, R.M. Albrecht // *J. Pharm. Sci.* – 2001. – V. 90. – P. 1927.

331. De Jong, W.H. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration / W.H. De Jong, W.I. Hagens, P. Krystek, M.C. Burger, A.J. Sips, R.E. Geertsma // *Biomaterials*. – 2008. – V. 29. – P. 1912.
332. Singh, I. Nano Genotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials / I. Singh [et al.] // *Biomaterials*. – 2009. – V. 30. – P. 3891.
333. Крылов, В.Н. Пчелиный яд. Свойства, получение, применение / В.Н. Крылов – Н.Новгород: Изд-во ННГУ, 1995. – 224 с.
334. Корягин, А.С. Адаптогенные свойства пчелиного яда при действии экстремальных факторов различной природы / А.С. Корягин, Е.А. Ерофеева, О.И. Александрова // *Вестник ННГУ*. – 2007. – №3. – С. 113.
335. Терещенко, В.П. Медико-биологические эффекты наночастиц: реалии и прогнозы / В.П. Терещенко, Н.Т. Картель. – Киев: Наукова думка, 2010. – 240 с.
336. Soman, N.R. Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth / N.R. Soman, S.L. Baldwin, G. Hu [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2009. – V. 119. – P. 2830.
337. Савицкая, М.Н. Полиакриламид / М.Н. Савицкая, Ю.Д. Холодова. – Киев: Наук. Думка, 1969. – С. 58.
338. Bjerrum, J. Inorganic syntheses / J. Bjerrum, J. P. McReynolds – New York: Wiley, 1946. – P. 217.
339. Воскобойникова, И.В. Количественное определение дигидрокверцетина методом ВЭЖХ / И.В. Воскобойникова [и др] // *Фармация*. – 1992. – N 6. – С. 74.
340. Будруев, А.В. Реакция азидов органических кислот с вторичными аминами в присутствии ацетата меди(II) / А.В. Будруев, Д.Ю. Синягина // *Известия РАН (Серия Химическая)*. – 2013. – № 6. – С. 1366.
341. Siggia, S. Quantitative organic analysis via functional groups / S. Siggia, J. G. Hanna. – New York: John Wiley, 1979. – 425 p.
342. Кальве, Э. Микрокалориметрия / Э. Кальве, А. Грат. – М.: Изд-во иностр. лит., 1963. – С. 65.

343. Энциклопедия полимеров. М.: Советская энциклопедия, 1972. – Т.1.
344. Рафиков, С.Р. Введение в физикохимию растворов полимеров / С.Р. Рафиков, В.П. Будтов, Ю.Б. Монаков. – М.: Наука, 1978. – С. 192.
345. Шатенштейн, А.И. Инструкции по методам определения молекулярного веса полимеров, фракционированию и определению молекулярно-весового распределения / А.И. Шатенштейн, Ю.Л. Вырский, Н.А. Правикова и др. – М.: Изд-во АН СССР, 1963. – 334 с.
346. Серенсон, У. Препаративные методы химии полимеров / У. Серенсон, Т. Кемпбел. – М.: Изд-во иностр. лит., 1963. – С. 70.
347. Neves, L.A. Gas permeation studies in supported ionic liquid membranes/ L.A.Neves, J.G. Crespo, I.M. Coelho // J. Membr. Sci. – 2010. – V. 357. – P. 160.
348. Анисимов, А.А. Действие фунгицидов на эстеразную активность гриба *Aspergillus niger* / А.А. Анисимов, В.М. Линовицкая, В.Ф. Смирнов, Г.Г. Бочкарева, Е.К. Крапивина // Прикладная биохимия и микробиология. – 1981. – Т. 17. – Вып. 4. – С. 605.
349. Aurand, L.W. A method for the estimation of peroxidase activity in milk / L.W. Aurand, W. M. Roberts, J. T. Cardwell // Journal of Dairy Science. – 1956. – V. 39. – № 5. –P. 568.
350. Miller, G.L. Use of Dinitrisalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar / G.L. Miller // Anal. Chem. – 1959. – V. 31. – № 3. – P. 426.
351. Методы экспериментальной микологии. – Киев: Наукова думка, 1982. – 550с.
352. Lowry, O.H. Protein measurement with the folinphenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosbraigh, A.L. Farr // J. Biol.Dhem. –1951. – V.193. – № 2. – P. 265.
353. Смирнова, Н.Н. Термодинамические свойства полиакриламида и гидрогелей на его основе в области от Т - 0 до 340 К / Н.Н. Смирнова, Б.В. Лебедев, А.Р. Коригодский, Н.Н. Санина, В.В. Киреев // Высокомолек. соед. Сер.А. – 2003. – Т. 45. – № 9. – С. 1552.

354. Малышев, В.М. Автоматический низкотемпературный калориметр / В.М. Малышев, Г.А. Мильнер, Е.Л. Соркин, В.Ф. Шибакин // Приборы и техника эксперимента. – 1985. – № 6. – С.195.
355. Практикум по физической и коллоидной химии // Под редакцией Евстратова К.И. – М.: Выс. шк., 1990. – 255с.
356. Булидорова, Г.В. Кинетика седиментации каолина при совместном введении флокулянта (катионного полиакриламида) и коагулянтов / Г.В. Булидорова, В.А. Мягченков // Коллоид. журн. – 1996. – Т. 58. – № 1. – С.29.
357. Баран, А.А. Флокулянты в Биотехнологии / А.А. Баран, А.Я. Тесленко – Л.: Химия, 1990. –144 с.
358. ГОСТ Р 52407-2005 Вода питьевая. Методы определения жесткости– М.: Комитет стандартизации и метрологии СССР, 2007. – 15 с.
359. Link, S. Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods / S. Link, M.A. El-Sayed // J. Phys. Chem. B. – 1999. – V. 103. – № 7. – P. 8410.
360. Стальная, И.Д. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича – М.: Медицина, 1977. – 280 с.
361. Fletcher, B. L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues / B. L. Fletcher, C. J. Dillard, A. L. Tappele // Analyt. Biochem. – 1973. –V. 52. – P. 1.
362. Меньшиков, В.В. Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая – М.: Медицина, 1987. – 350 с.
363. Горизонтов, П.Д. Стресс и система крови / П.Д. Горизонтов, О.И. Белоусова, М.И. Федотова – М.: Медицина, 1983. – 240 с.
364. Алясова, А.В. Влияние низких терапевтических концентраций озонированного физиологического раствора на терапевтический патоморфоз опухоли в эксперименте / А.В. Алясова, К.Н. Конторщикова, И.Г. Терентьев и др.// Современные технологии в медицине. – 2011. – Т. 1. – С. 5.

365. Козинец, Г.И. Исследование системы крови в клинической практике / Г.И. Козинец, В.И. Макаров. – М.: Триада, 1998. – 480 с.

366. Волчегорский, И.А. Сопоставление различных подходов к определению продуктов ПОЛ в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, Б.Г. Яровинский, Р.И. Лифшиц // Вопросы мед. Химии. – 1989. – Т.1. – С. 127.

367. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах: сборник статей. – Горький: Межвузовский сборник биохимии и биофизики микроорганизмов, 1983. – 183 с.

368. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц – М.: Практика, 1999. – 459 с.

Приложения

Приложение 1

СПРАВКА

о результатах испытания биополимера

В ЦХБЛ при Ново-Сормовской водопроводной станции аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.512495 от 16 ноября 2000 г. выполнялся анализ проб воды, доставленных ООО НПК «Биофлокулянт».

Подбор доз и внесение в обрабатываемую воду биофлокулянта на основе природного биополимера хитозана производился фирмой в своей лаборатории.

Результаты анализов обработанной воды представлены в табл.1 и 2.

Результаты анализов проб от 2.04.03г.

Таблица 1.

	Мутность, мг/л	Цветность, градус	Окисляемость, мг/л
1	<0,58	20	7,36
2	<0,58	20	5,6
3	0,6	25	5,92
4	0,6	25	6,4
5	0,6	25	7,04
6	<0,58	30	9,6
7	<0,58	30	10,4
8	<0,58	30	6,88
9	<0,58	30	6,56
10	<0,58	30	6,88
Норматив	<0,58	<20	<5

Результаты анализов проб от 30.05.03г.

Таблица 2.

	Мутность, мг/л	Цветность, градус	Окисляемость, мг/л
1	1,4	15	6,4
3	1,1	30	11,5
5	1,4	30	8,5
Норматив	<1,5	<20	<5

Главный технолог
МУП «Водоканал»



Т.А.Миронова

Отчет о результатах испытания биофлокулянтов-сорбентов на основе хитозана.

В период с 11 августа по 20 сентября 2003 года совместно, сотрудниками химической лаборатории отдела качества завода автомобильных агрегатов (ЗААг) г.Нижнего Новгорода и представителями кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии ННГУ им. Н.И. Лобачевского, проводились испытания, с целью очистки нефтесодержащих сточных вод, трех марок биофлокулянтов-сорбентов на основе модифицированного хитозана:

марка 1 – хитозан модифицированный по аминогруппе;

марка 2 – хитозан модифицированный (мет)акрилатами с содержанием последних до 20%;

марка 3 – бинарная система: марка 2 в сочетании с хитозаном модифицированным (мет)акрилатами с содержанием последних до 80%.

Испытания проводились в двух режимах:

1. очистка нефтесодержащих сточных вод, на входе во флотаторы (исходные), с содержанием нефтепродуктов от 270 до 2530 мг/л;

2. очистки сточных вод, из флотаторов (после рециркуляции), с содержанием нефтепродуктов от 20 до 720 мг/л.

Установлено, что все образцы флокулянтов (марки 1-3) эффективно работают в интервале pH=5,8-7,0. Ниже приведены оптимальные концентрации каждого из флокулянтов и остаточное содержание нефтепродуктов в сточных водах при различных режимах проведения очистки:

Вид флокулянта	Концентрация флокулянта, %.	Остаточное содержание нефтепродуктов в исходных сточных водах, мг/л.	Остаточное содержание нефтепродуктов в сточных водах из флотаторов, мг/л.
Марка 1	$4,0 \cdot 10^{-4} - 7,0 \cdot 10^{-4}$	2,0 – 6,0	
	$3,0 \cdot 10^{-4} - 6,0 \cdot 10^{-4}$		1,5 – 3,0
Марка 2	$4,0 \cdot 10^{-4} - 10^{-3}$	3,0 – 7,0	2,5 – 6,0
Марка 3	$2 \cdot 10^{-4} - 6 \cdot 10^{-4}$	3,0 - 7,0	1,7 – 4,5
	$1,2 \cdot 10^{-4} - 3,0 \cdot 10^{-4}$		

Содержание остаточных нефтепродуктов во всех случаях приближается к уровню ПДК.

Главный инженер ЗААг

Золотарев А.В.

Ведущий инженер химической лаборатории
отдела качества ЗААг

Свящева В.П.

Аспирант химического факультета
ННГУ им. Н.И. Лобачевского

Мочалова А.Е.