

**ЛЕВИТИН СЕРГЕЙ ВАДИМОВИЧ**

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И  
СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ ХИТОЗАНА**

05.17.06 – Технология и переработка полимеров и композитов

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Работа выполнена на кафедре технологии химических волокон и наноматериалов  
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего  
профессионального образования «Московский государственный университет дизайна и  
технологии»

- Научный руководитель:** доктор химических наук профессор, заведующий  
кафедрой технологии химических волокон  
и наноматериалов  
**Гальбрайх Леонид Семёнович**
- Официальные оппоненты:** доктор технических наук профессор,  
Академик Международной Инженерной Академии  
Генеральный директор ООО «Колетекс»  
**Олтаржевская Наталия Дмитриевна**
- кандидат технических наук доцент кафедры  
«Химические технологии» ФГБОУ ВПО  
«Саратовский государственный университет имени  
Гагарина Ю.А.»  
**Абдуллин Валерий Филарисович**
- Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт синтетических  
полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова  
Российской академии наук (ИСПМ РАН)

Защита диссертации состоится «24» сентября 2015 г в 13:00 часов на заседании  
диссертационного совета Д 212.144.07 при Московском государственном университете дизайна  
и технологии по адресу: 117997, г. Москва, ул. Садовническая, д. 33, стр. 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО МГУДТ 117997, г.  
Москва, ул. Садовническая, д. 33, стр. 1 и на сайте:

<http://www.mgudt.ru/aspirantura/files/defence/LevitinSV/диссер%20Левитин%20С.В..pdf>

Автореферат разослан «24» августа 2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета, к.х.н.

Алексамян К.Г.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** В настоящее время природный полимер хитозан находит все большее применение в различных областях промышленности и медицины. Это связано, в первую очередь, с его доступностью, а также уникальным свойствам, которые присущи именно этому полисахариду (растворимость в кислых средах, ранозаживляющие и противовоспалительные свойства, антимикробная и противогрибковая активность). Поскольку уровень проявляемых свойств хитозана в значительной степени зависит от его молекулярной массы, степени дезацетилирования и надмолекулярной структуры, значительное число работ посвящено исследованиям процесса деструкции хитозана с целью получения низкомолекулярных препаратов, обладающих высокой биологической активностью. Однако систематические исследования изменения кристаллической структуры хитозана в процессе его деструкции отсутствуют. В то же время возможность использования в качестве основного компонента при получении волокнистых материалов нанокристаллитов хитозана, а также их применение для модифицирования полимерных материалов представляет значительный интерес. Поэтому актуальным является поиск новых технологически приемлемых методов получения низкомолекулярных нанокристаллитов хитозана и исследование возможности их применения в полимерных материалах, в том числе и медицинского назначения.

Диссертация выполнялась в рамках темы №12-621-45 «Разработка принципов получения наноструктурированных функционально-активных полимерных материалов» (задание Минобрнауки РФ –проект 3.1305, 2011 г.).

**Целью работы** является разработка методов снижения молекулярной массы хитозана, получения полимера с высокой степенью кристалличности, исследование его физико-химических и функциональных свойств и возможности получения полимерных материалов медицинского назначения на основе низкомолекулярного хитозана.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить **следующие задачи:**

- установить зависимость кинетических характеристик процессов гидролиза и алкоголиза хитозана от условий их проведения;
- определить основные количественные характеристики надмолекулярной структуры продуктов кислотно-каталитической деструкции хитозана и реологические свойства растворов низкомолекулярного хитозана и его смесей с поливиниловым спиртом;
- определить условия бескапиллярного электроформования нановолокнистого материала на основе смесей низкомолекулярного хитозана и поливинилового спирта и его биологическую активность.

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

- результаты исследования основных закономерностей кислотно-каталитической деструкции хитозана в гомогенной и гетерогенной среде, разработка параметров и лабораторного регламента процесса получения низкомолекулярного хитозана;
- установление возможности получения нанокристаллитов хитозана по механизму рекристаллизации из раствора и количественная оценка основных параметров надмолекулярной структуры и сорбционных свойств продуктов деструкции (степень кристалличности, размеры кристаллитов, удельная поверхность, характеристики термолита);
- установление параметров бескапиллярного электроформования из растворов смеси низкомолекулярного хитозана и поливинилового спирта нановолокнистого материала, содержащего иммобилизованный антимикробный препарат мирамистин, и определение его цитотоксичности и антимикробной активности.

**Научная новизна**

В работе впервые:

- получены сравнительные количественные характеристики процесса гомогенного и гетерогенного кислотного гидролиза хитозана в водных и спиртовых растворах серной кислоты;

- установлена возможность получения низкомолекулярного полимера высокой степени кристалличности при проведении гомогенного гидролиза хитозана в растворах серной кислоты умеренной концентрации;

- определены основные характеристики низкомолекулярных препаратов хитозана – степень кристалличности, сорбционная ёмкость, термостабильность, растворимость, способность к волокну- и пленкообразованию;

- показана неаддитивная концентрационная зависимость реологических характеристик смесевых растворов низкомолекулярного хитозана и поливинилового спирта;

- показано, что растворы низкомолекулярного хитозана в водном растворе олигоэтиленоксидсульфокислоты характеризуются низкой степенью структурирования.

**Практическая значимость** заключается в:

- разработке принципов и параметров процесса получения нанокристаллитов хитозана путем гомогенного кислотного гидролиза и гетерогенного кислотного этанолиза хитозана в растворах серной кислоты;

- разработке процесса получения методом электроформования нановолокнистых материалов из растворов смесей низкомолекулярного хитозана и поливинилового спирта в водных растворах уксусной кислоты;

- определении цитотоксичности, и антимикробных свойств нановолокнистого материала из смеси полимеров (хитозан-поливиниловый спирт), содержащего мирамистин;

- разработке лабораторного регламента получения опытных образцов низкомолекулярного хитозана (нанокристаллитов);

- подготовке к защите двух выпускных квалификационных работ и одной магистерской диссертации студентов Института химических технологий и промышленной экологии ФГБОУ ВПО МГУДТ.

**Достоверность результатов проведенных исследований** определяется использованием современных химических и физических методов исследования (ИК-спектроскопия, ядерный магнитный резонанс, атомно-силовая микроскопия, термогравиметрический анализ, потенциометрия, УФ-фотокolorиметрия, сорбционные, биохимические и др.), обработкой данных методами математической статистики.

**Личный вклад соискателя:**

Основные результаты и положения, выносимые на защиту, получены автором лично. Автор принимал непосредственное участие в разработке и планировании экспериментов, самостоятельно проводил экспериментальные исследования, обработку и анализ их результатов, подготовку публикаций и докладов по теме диссертации.

**Апробация результатов**

Основные положения диссертации и результаты работы обсуждались на заседаниях кафедры технологии химических волокон и наноматериалов МГУДТ, научных конференциях: Международной научно-технической конференции «Современные технологии и оборудование текстильной промышленности» (ТЕКСТИЛЬ-2012). Москва, МГТУ им. А.Н. Косыгина, 2012 г.; Международной научно-технической конференции «Дизайн, технологии и инновации в текстильной и легкой промышленности», Москва, МГУДТ, 2013 г.; на 6-й всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2014», Москва, МГУ, 2014г.

**Публикации.** Основные положения диссертационной работы опубликованы в 12 печатных работах, в том числе две - в журнале, включенном в перечень ВАК рецензируемых научных изданий, и две - в журнале, включенном в базы данных Web of Science и Scopus.

**Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 131 странице, содержит 63 рисунка и 6 таблиц, библиография – 170 наименований. Диссертация состоит из введения, основной части, содержащей литературный обзор, методический раздел и основные результаты и их обсуждение, выводов, списка использованной литературы и приложения.

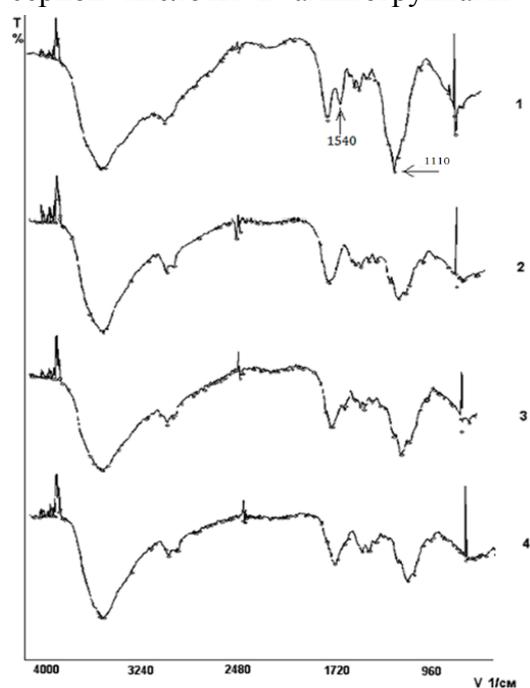
## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1 Получение и свойства нанокристаллитов хитозана

С целью определения условий получения нанокристаллитов исследованы закономерности кислотно-каталитической деструкции хитозана. На основании экспериментальных исследований было установлено, что хитозан, обычно нерастворимый в низко- и умеренно концентрированной серной кислоте, переходит в раствор при нагревании при температуре выше 100 °С. Установлен концентрационный диапазон (9-17%), в котором при повышенной температуре происходит растворение хитозана.

Гидролизу в 17%-ном водном растворе серной кислоты при 115°С подвергали коммерческий хитозан с ММ 190 кДа.

Установлено что при охлаждении раствора до комнатной температуры происходит осаждение продукта гидролиза хитозана в виде тонкодисперсной фракции, после промывки до нейтрального значения рН не растворяющегося как в буферных растворах, так и в концентрированных кислотах. Возможной причиной этого могло стать формирование сетки межмолекулярных солевых связей в результате взаимодействия между сульфатными группами серной кислоты и аминогруппами хитозана, что привело к образованию пространственно



сшитого полимера. Это предположение подтверждается данными ИК-спектроскопии (рисунок 1), согласно которым в спектре нерастворимого образца хитозана имеются характерные полосы: 1110 см<sup>-1</sup> соответствующая соединению SO<sub>2</sub><sup>2-</sup> или R-SO<sub>2</sub>-R и полоса амид II (1540 см<sup>-1</sup>), соответствующая ковалентной связи с аминогруппой.

Рисунок 1 - ИК-спектры препаратов хитозана  
1 - нерастворимый хитозан; 2 - растворимый хитозан после этанолиза; 3- растворимый хитозан после гидролиза; 4-исходный хитозан

Растворимые образцы продукта гидролиза хитозана были получены при высаживании хитозана из сернокислого раствора 10%-ным раствором гидроксида натрия с доведением рН до 11, последующей промывке полученных препаратов до нейтральной среды дистиллированной водой, затем спиртом и ацетоном и сушке при комнатной температуре. Возможность при проведении гидролиза с последующим осаждением щелочным реагентом получить растворимые продукты позволила исследовать кинетику кислотно-каталитической деструкции хитозана в гомогенной среде.

В качестве среды для проведения гетерогенной кислотно-каталитической деструкции хитозана был использован 20%-ный раствор серной кислоты в этаноле. Сопоставление данных, полученных при определении ММ продуктов этанолиза и гидролиза хитозана в гомогенной среде, позволило дать оценку различий в скорости этих процессов. Заметно меньшая скорость этанолиза, как и следовало ожидать, наблюдается на первом участке кинетической кривой (рисунок 2).

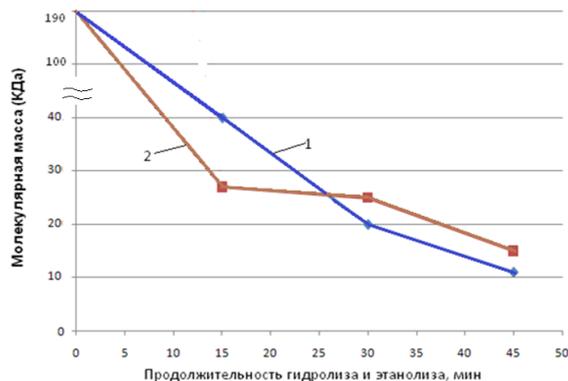


Рисунок 2 - Кинетика деструкции хитозана в условиях гидролиза (1) и этанолиза (2)

При сопоставлении полученных данных о константах скорости деструкции хитозана с

приведенными в литературе для гидролиза целлюлозы, отличающейся от хитозана наличием у С(2) гидроксильной группы вместо аминогруппы, показано (таблица 1), что константы скорости деструкции целлюлозы и хитозана имеют одинаковый порядок. В то же время условия деструкции хитозана гораздо более жесткие (более высокие концентрация кислоты и температура), чем в случае целлюлозы. Таким образом, подтверждается вывод о повышении устойчивости гликозидной связи к действию гидролизующих реагентов кислотного характера при наличии в элементарном звене макромолекулы аминогруппы в альфа-положении.

Таблица 1 - Константы скорости кислотной деструкции целлюлозы и хитозана

Гидролиз целлюлозы в 3%-ной H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Деструкция целлюлозы кислотой Льюиса TiCl <sub>4</sub> в гексане	Гидролиз хитозана в 16,9%-ной H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Этанолиз хитозана в 20%-ной H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
15 мин. $1,38 \times 10^{-2}$	15 мин. $8,1 \times 10^{-2}$	15 мин. $5,43 \times 10^{-2}$	15 мин. $1,56 \times 10^{-2}$
30 мин. $2,75 \times 10^{-2}$	30 мин. $4,81 \times 10^{-2}$	30 мин. $2,91 \times 10^{-2}$	30 мин. $2,15 \times 10^{-2}$

Надмолекулярная структура продуктов кислотно-гидролитической деструкции хитозана была исследована методом ЯМР-спектроскопии. Установлено, что ЯМР-спектр воздушно – сухих образцов хитозана и продуктов его кислотно-катализируемой деструкции (гидролиза и этанолиза) состоит из трёх компонент:

1. Широкой (соответствует коротко-временной компоненте ССИ) с амплитудой  $A_1$  и временем спин-спиновой релаксации  $T_2^{(1)}$  (10-12 мкс), представленной протонами внутренних областей кристаллитов хитозана, для которых характерна пространственная упорядоченность в расположении протонов, что проявляется в дублетном расщеплении линии;

2. Средней (соответствует средней компоненте ССИ) с амплитудой  $A_2$  и временем спин-спиновой релаксации  $T_2^{(2)}$  (20-25 мкс), характерным для более подвижных и, как мы полагаем, не столь упорядоченно расположенных поверхностных протонов полимера;

3. Узкой компоненты (соответствует длинновременной компоненте ССИ), образованной, в основном, протонами адсорбированной воды с амплитудой  $A_3$  и временем спин-спиновой релаксации  $T_2^{(3)}$  порядка 100-180 мкс.

Поскольку протонная населенность, дифференцированно принадлежащая молекулам поверхностных и внутренних участков полимера, соответственно пропорциональна содержанию самих молекул в этих участках, это позволило определить степень кристалличности образца  $K$  по соотношению амплитуды короткой компоненты  $A_1$  к сумме амплитуд средней и короткой компонент ССИ ( $A_2+A_1$ ):

$$K = \frac{1}{1 + \frac{A_2}{A_1}} \quad (1)$$

Значения  $A_1$  и  $A_2$  рассчитываются на основе уравнения 1 описывающего форму экспериментально наблюдаемого сигнала ССИ. Полученные в результате расчета данные о степени кристалличности исходного хитозана и продуктов его кислотно- каталитической деструкции приведены в таблице 2.

$$FID(t) = A_1 \exp\left(-\left(\frac{t}{T_2^{(1)}}\right)^{b_1}\right) \cos \omega_1 t + A_2 \exp\left(-\left(\frac{t}{T_2^{(2)}}\right)^{b_2}\right) + A_3 \exp\left(-\left(\frac{t}{T_2^{(3)}}\right)^{b_3}\right) \quad (2)$$

Таблица 1 - Параметры надмолекулярной структуры хитозана и продуктов его деструкции

Образец	СП	k, %	$S_{уд}, м^2/г$	$d_K, \text{Å}$
исходный хитозан	1172	72	109	80
хитозан после гомогенного гидролиза в 17%-ной серной кислоте	154	79	82	109
хитозан после гетерогенного этанолиза в 20%-ной серной кислоте	123	75	97	92
Хлопок (25°ШР)	1900	81	78	108
Целлюлоза небеленая сульфатная (33°ШР)	2200	76	120	67
Целлюлоза беленая сульфитная (32°ШР)	1600	75	110	76

В результате оценки структуры препарата хитозана, полученного при гомогенном гидролизе, впервые показано, что в процессе осаждения продуктов гидролиза из раствора происходит формирование кристаллической структуры. Сопоставление уровней степени полимеризации и степени кристалличности полученных образцов, а также сравнение этих характеристик с аналогичными характеристиками целлюлозы свидетельствует о получении в принятых условиях нанокристаллитов хитозана. Нанокристаллиты хитозана были получены и при гетерогенном этанолизе. При этом и степень полимеризации, и степень кристалличности оказались более низкими, чем у продукта гидролиза.

Изменения структуры в процессе кристаллизации обычно сопровождаются вариацией поперечных размеров микрофибрилл и их кристаллических фрагментов, чаще всего в направлении оси «а» кристаллографической ячейки. На основе модельных представлений о микрофибрилле как о параллелепипедном кристаллите по уравнению (3) был рассчитан средний поперечный размер кристаллических областей микрофибриллы

$$d_K = \frac{1}{1-\sqrt{k}} \quad (3)$$

Согласно полученным данным (таблица 1), при выделении продуктов кислотно-каталитической деструкции хитозана происходит увеличение поперечных размеров кристаллитов, особенно значительное для продуктов, полученных при осаждении из сернокислотных растворов.

Поскольку процессы гидролиза и этанолиза сопровождаются изменениями структуры полимера (разрушение исходной морфологической структуры, аморфизация, докристаллизация), представляло интерес исследовать влияние этих изменений на свойства полученных низкомолекулярных продуктов химических превращений хитозана.

Исследование методом ТГА показало (рисунки 3-5), что низкомолекулярные препараты хитозана более термоустойчивы по сравнению с исходным хитозаном: пики, соответствующие процессу дегидратации в аморфных областях, для продуктов гидролиза и этанолиза смещены в область более высоких температур на 12°С и 8°С соответственно, а пики, соответствующие деполимеризации кристаллических областей, - на 71°С и 54°С.

Это показывает, что структура полученных низкомолекулярных препаратов хитозана более упорядочена и вследствие этого более термоустойчива. В то же время у нерастворимого образца хитозана эти пики смещены в область более низких температур, что свидетельствует об аморфизованной структуре. Кроме того, на дифференциальной кривой этого образца при температуре 225,17°С, предшествующей началу стадии дегидратации, имеется еще один пик, который может свидетельствовать о разложении поперечных сульфатных (сульфамидных) связей, образовавшихся в процессе осаждения хитозана из сернокислого раствора при его охлаждении.

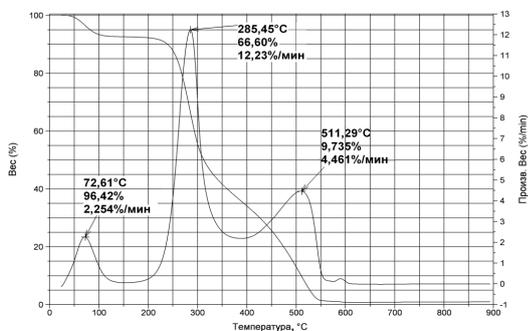


Рисунок 3 - Кривые ТГА исходного хитозана

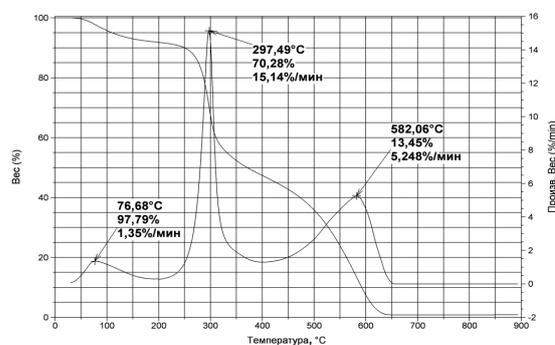


Рисунок 4 - Кривые ТГА продукта гидролиза хитозана

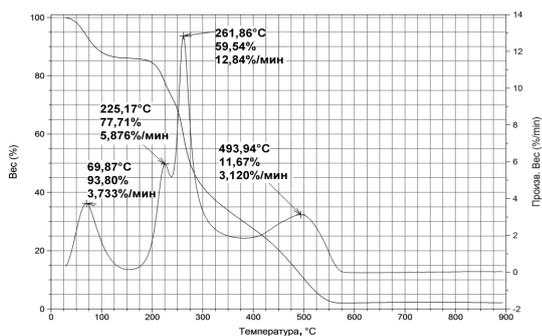


Рисунок 5 - Кривые ТГА нерастворимого продукта

При исследовании морфологии полученных наночастиц хитозана методом АСМ установлено, что их средний размер составляет 100-200 нм (рисунки 6, 7). С учетом данных о размерах кристаллитов (таблица

1) очевидно, что наночастицы представляют собой агрегаты, состоящие из 12-25 кристаллитов.

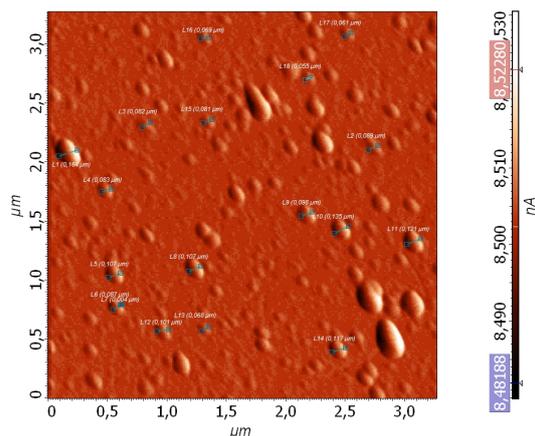


Рисунок 6 - Микрофотография наночастиц хитозана, полученных при гомогенном гидролизе

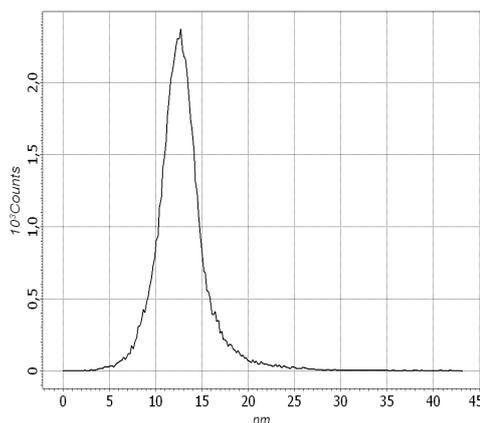


Рисунок 7 – Кривая распределения по размеру наночастиц хитозана, полученных при гомогенном гидролизе

Сернокислотный гомогенный гидролиз весьма эффективен в сравнении с другими методами деструкции хитозана. Так, по сравнению с уксуснокислотным гидролизом продолжительность реакции до получения полимера с молекулярной массой 25-20 кДа сокращается с 1500 до 30 минут, и в отличие от использования при деструкции ультразвука, действие которого приводит к разрушению кристаллической решетки, условия выделения продукта гидролиза позволяют получить нанокристаллиты хитозана.

Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности применения гомогенного сернокислотного гидролиза как метода получения низкомолекулярного, нанодисперсного хитозана с высокой степенью кристалличности (нанокристаллитов хитозана). Полученные результаты исследований послужили основой для разработки лабораторного регламента получения хитозана низкомолекулярного (см. Приложение к диссертации). Технологический процесс, согласно данному регламенту, включает проведение гомогенного

гидролиза в три этапа на лабораторном реакторе, промывку продуктов гидролиза до нейтральной среды на вакуум-фильтре в два этапа, сушку и упаковку готового продукта.

Проведенный расчет (таблица 1) показал, что увеличение степени кристалличности привело к соответствующему уменьшению удельной поверхности образцов, причем между этими характеристиками имеет место практически линейная антибатная зависимость.

Для оценки влияния надмолекулярной структуры полученных препаратов хитозана на их сорбционные свойства при построении изотерм адсорбции воды в работе применялся метод изопиестических серий. Предварительно высушенные при температуре 105°C в течение 12 часов образцы выдерживались в эксикаторах с заданными значениями относительных давлений паров воды до постоянной массы при 20°C.

Анализ изотерм адсорбции паров воды образцами исходного (ХИ) и низкомолекулярного хитозана (Х25) и (Х20) (рисунок 7) показывает, что продукты гетерогенного этанолиза (Х20), и, в особенности, - гомогенного гидролиза (Х25), характеризуются пониженной гигроскопичностью.

Расчет изотерм адсорбции был проведен по уравнению БЭТ в линейной форме (4):

$$f(x) = y = B \cdot x + A \rightarrow f\left(\frac{p}{p_s}\right) = \frac{\frac{p}{p_s}}{a \cdot \left(1 - \frac{p}{p_s}\right)} \quad (4)$$

где:  $x = \frac{p}{p_s}$  - относительная влажность воздуха;  $a$  - влагосодержание образца;

$a_m$  - емкость монослоя;

коэффициенты уравнения:  $B = \frac{c-1}{a_m \cdot c}$ ,  $A = \frac{1}{a_m \cdot c}$  ( $c$  – константа адсорбционного равновесия (константа БЭТ))

На линейных участках изотерм с использованием специально разработанной компьютерной программы были определены коэффициенты  $A$  и  $B$  и рассчитаны константа адсорбционного равновесия  $c = \frac{1}{a_m \cdot A} = 1 + \frac{B}{A}$  и емкость монослоя  $a_m = \frac{1}{B+A}$ .

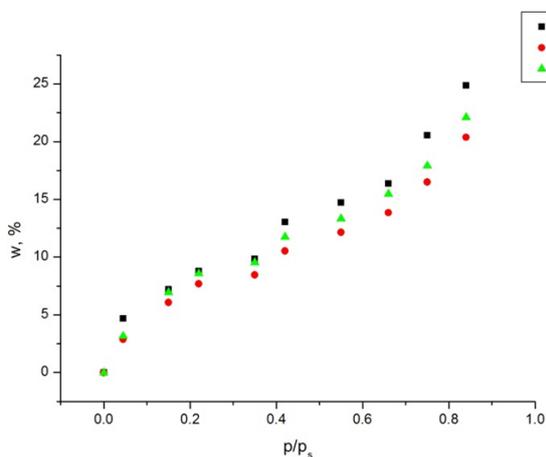


Рисунок 7 - Изотермы адсорбции  
 ХИ исходный хитозан ММ=190кДа  
 Х25 хитозан после гомогенного гидролиза ММ=25кДа  
 Х20 хитозан после гетерогенного этанолиза ММ=20кДа

Согласно полученным данным, в результате гидролиза и этанолиза хитозана уменьшаются емкость монослоя адсорбированной воды  $w_m$ , активная удельная поверхность полимера  $S_{уд}$  и константа адсорбционного равновесия  $c$ , характеризующая энергию адсорбционного взаимодействия (таблица 2). Указанные изменения следует связать с перестройкой надмолекулярной структуры хитозана. Об этом, в частности, свидетельствует характер спада времен спин-решеточной  $T_1$  релаксации для исходного (ХИ) и продуктов деструкции (Х25, Х20) хитозана при их увлажнении (рисунок 8).

	X1	X2	X3
$w, \%$	7.47	6.41	7.18
$S_{уд}, (m^2/g)$	259	228	253
$c$	27.9	20	20.1

Таблица 2 - Сорбционные характеристики исходного хитозана и продуктов кислотно-каталитической деструкции

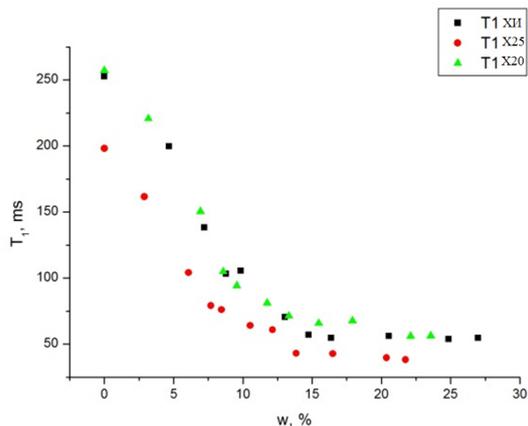


Рисунок 8 - Зависимость времени спин-решеточной релаксации от влагосодержания образцов хитозана

Полученные результаты ЯМР-измерений и анализ изотерм адсорбции показывают, что для всех исследованных образцов характерна очень низкая молекулярная подвижность при аномально высоких значениях емкости адсорбированного монослоя воды и общего влагосодержания образцов хитозана по сравнению с целлюлозой. Учитывая квазиплоскую слоистую надмолекулярную структуру

микрофибрилл хитозана, можно предположить, что микропоры этого полимера имеют щелевидную ячеистую форму. Электрические поля поверхностных активных центров и малые средние поперечники таких пор сильно ограничивают молекулярную подвижность адсорбированной воды, увеличивают емкость адсорбционного монослоя и, как следует из данных таблица 2, все исследованные образцы обладают весьма высокими значениями удельной поверхности. Сопоставляя отмеченные выше зависимости времен T1 и T2 от влагосодержания с изотермами адсорбции (рисунок 7), можно прийти к выводу, что при влагосодержании образцов в диапазоне 12-15% происходит завершение заполнения молекулами воды большинства микропор, находящихся в микрофибриллах хитозана, и начинается полимолекулярный сорбционный процесс, переходящий в капиллярную конденсацию в межфибриллярных мезопространствах.

## 2 Исследование реологических характеристик растворов хитозана и его смесей с ПВС

При переработке растворов полимеров одной из важнейших характеристик является их вязкость. Как известно, надмолекулярная структура полимеров в растворе в определенной степени сохраняет «память» о структуре исходного полимера. Поскольку реологические свойства растворов в значительной степени определяются уровнем молекулярной массы полимеров, можно было ожидать, что свойства растворов низкомолекулярного хитозана и его смесей с ПВС будут отличаться от свойств растворов, содержащих высокомолекулярный хитозан.

С целью подтверждения этого предположения были исследованы реологические свойства растворов ПВС с концентрацией 3-10%, растворы хитозана с ММ 25 кДа (X 25) и 190 кДа (ХИ) с концентрациями от 1 до 20%, и растворы смесей этих полимеров. В качестве растворителя использовали буферный раствор и 4%-ный раствор уксусной кислоты.

Эффективная вязкость растворов хитозана закономерно увеличивается с увеличением концентрации полимера (рисунок 9). Однако для X25 появляется возможность получения растворов с концентрацией до 24%, в то время как концентрация растворов высокомолекулярного хитозана ограничивается областью 9-10%.

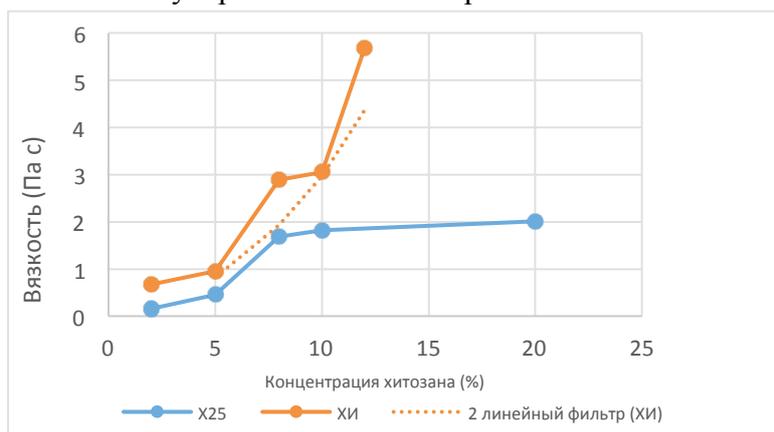


Рисунок 9 - Зависимость динамической вязкости растворов хитозана в ацетатном буфере от концентрации

При этом имеются существенные различия в характере концентрационной зависимости

вязкости растворов смесей с ПВС хитозана различной молекулярной массы. В случае растворов, содержащих исходный высокомолекулярный хитозан, эффективная вязкость монотонно повышается при увеличении концентрации хитозана. В то же время вязкостные характеристики растворов, содержащих X-25, имеют сложную зависимость от концентрации хитозана в растворе.

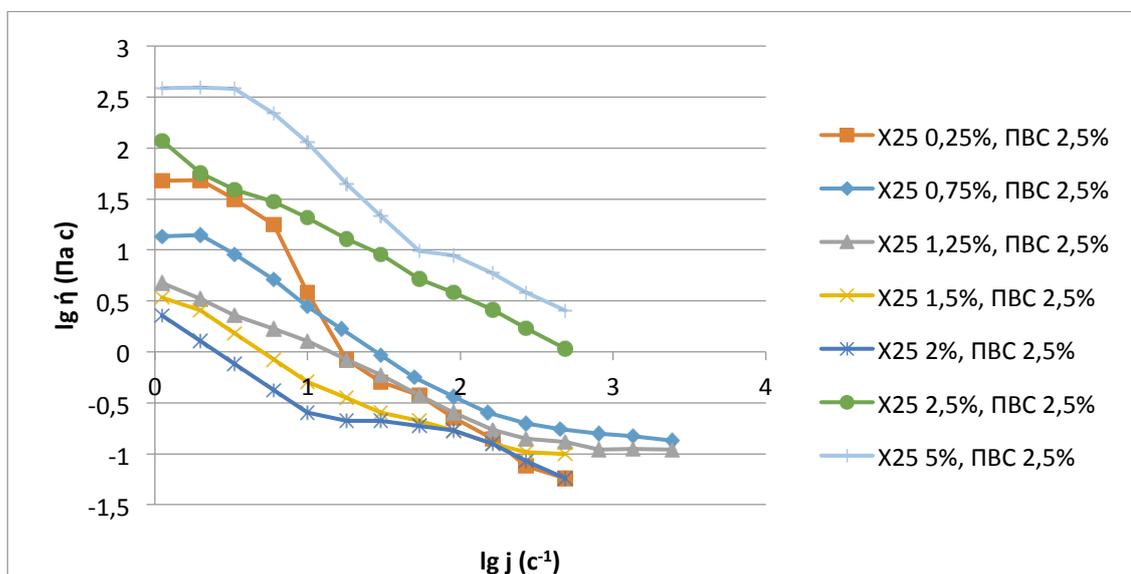


Рисунок 10 - Кривые течения растворов в ацетатном буфере смеси X-25-ПВС с различной концентрацией хитозана

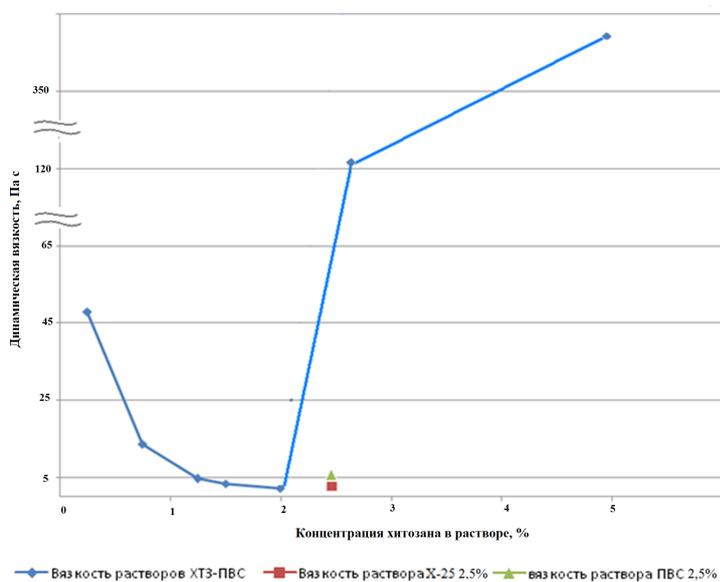


Рисунок 11 - Зависимость динамической вязкости растворов X-25-ПВС в ацетатном буфере от концентрации хитозана при концентрации ПВС – 5%

Согласно полученным данным (рисунки 10, 11), даже небольшое содержание хитозана (0,5%) приводит к резкому увеличению вязкости системы. Такой результат может быть следствием взаимодействия между протонированными аминогруппами хитозана и ПВС, приводящего к образованию ассоциатов и возникновению сетки физических зацеплений. При дальнейшем повышении концентрации хитозана вязкость начинает снижаться до уровня вязкости раствора хитозана. Это может свидетельствовать о протекании процесса микрофазового расслоения системы, в которой фаза низкомолекулярного хитозана выступает в качестве пластифицирующей добавки. Повышение концентрации хитозана до эквивалентного соотношения с ПВС в смеси ведет снова к резкому увеличению вязкости полимерной системы, причем при различных соотношениях X-25 и ПВС. Возможной причиной такой зависимости может быть возникновение структуры раствора, в которой ассоциаты хитозан-ПВС оказываются иммобилизованными в трёхмерной сетке, образованной молекулами хитозана.

Поскольку использование уксусной кислоты в технологических процессах переработки растворов сопряжено с негативным влиянием на окружающую среду и усложнением производства ввиду необходимости установки специального оборудования для улавливания

паров УК, представляло интерес исследовать возможность использования для растворения хитозана нетоксичного растворителя. В качестве такого растворителя был выбран водный раствор Огсафола (олигоэтиленоксидсульфонокислоты) с концентрацией 60 г/л.

Поскольку вязкостные свойства растворов полиэлектролитов зависят от степени ионизации ионогенных групп, для ответа на вопрос об интенсивности взаимодействия аминогрупп хитозана и сульфогрупп Огсафола было исследовано влияние УК на вязкостные свойства 4%-ных растворов хитозана в Огсафоле (рисунок 12). Из кривых течения видно, что УК практически не влияет на вязкость растворов хитозана, что свидетельствует о протонировании аминогрупп хитозана Огсафолом.

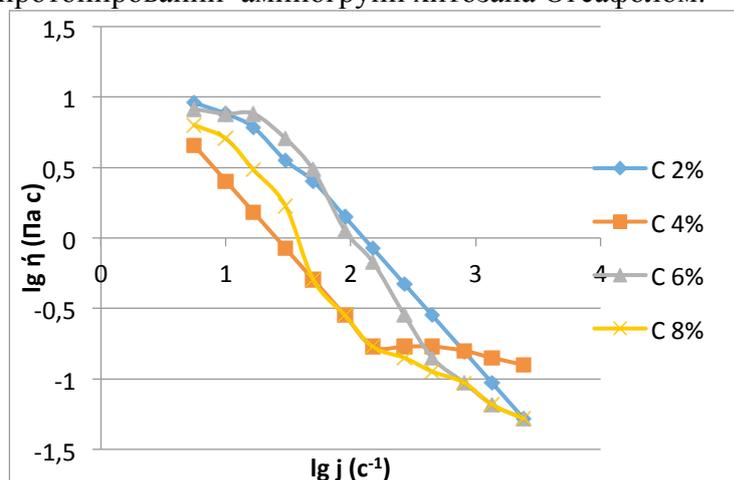


Рисунок 12 - Кривые течения растворов 4% хитозана в Огсафоле при различной концентрации УК

Поскольку ранее было показано, что низкомолекулярный хитозан не способен к самостоятельному волокну- и пленкообразованию, с целью определения оптимального соотношения компонентов в растворе для процесса электроформования были исследованы реологические характеристики смесей

растворов низкомолекулярного хитозана и ПВС (рисунок 13).

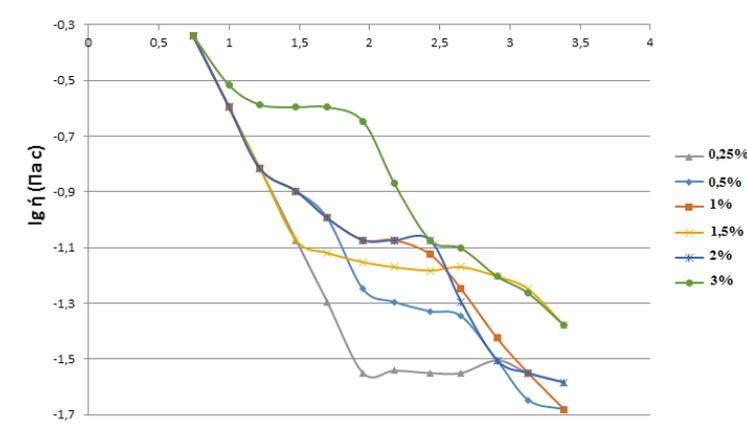


Рисунок 13 - Кривые течения 0,25-3%-ных растворов низкомолекулярного хитозана, содержащих 3% ПВС, в Огсафоле с добавлением 2% УК.

Согласно полученным данным, наибольшей вязкостью обладает раствор с содержанием хитозана 3%. Эквивалентное соотношение X25 и ПВС, как было показано ранее, ведет к увеличению вязкости раствора, однако

необходимо отметить, что введение ПВС резко снижает структурированность системы. Очевидно, ПВС не совместим с Огсафолом, что подтверждается характером кривых, где области стабильного течения возрастают с увеличением концентрации хитозана, который вносит свой вклад в общую вязкость, в то время как вклад ПВС характеризуется резким её падением.

### 3 Исследование возможности формования нановолокон из смеси хитозан – ПВС

В настоящее время развитие технологий получения ультратонких наноразмерных волокон с высокой величиной удельной поверхности обеспечило создание высокопроизводительного бескапиллярного метода электроформования. Сложность процесса электроформования делает актуальным установление условий получения хитозансодержащего нановолокнистого материала - величин напряженности поля, расстояния между электродами, состава и свойств формовочного раствора (концентрации, вязкости, электропроводности, поверхностного натяжения) и др. Для бескапиллярного электроформования на лабораторной установке «Nanospider» NSLAB 200S были использованы формовочные растворы смеси

низкомолекулярного хитозана и ПВС в 40%-ном водном растворе УК с концентрацией каждого из компонентов 3%. Начальная динамическая вязкость раствора 4,56 Па·с., поверхностное натяжение 0,05 Н/м, напряжение электрического поля 45-50 кВ, межэлектродное расстояние 170 мм.

С целью расширения спектра потенциальной биологической активности нановолокнистого материала в раствор вводили добавку антибактериального вещества – мирамистина в количестве 0.5% от массы полимеров.

При таком соотношении компонентов в растворе при межэлектродном расстоянии 165 мм происходит формирование сетки зацеплений, которая деформируется под действием магнитного поля напряжением с устойчивым образованием нитей. Диаметр полученных нановолокон составляет 300 – 400 нм (рисунок 14). Таким образом, хотя, согласно литературным данным, устойчивое формование нановолокнистого материала из смеси хитозан-ПВС может быть осуществлено только из растворов УК с концентрацией 70-80%, использование низкомолекулярного хитозана позволяет её снизить вдвое.

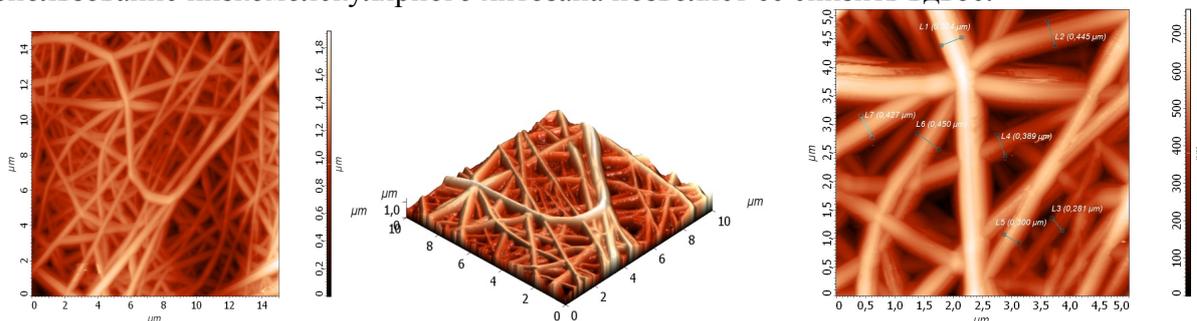


Рисунок 14 – Топографический образ морфологической структуры (АСМ изображения) нановолокон сформованных на основе X-25 - ПВС

Была предпринята попытка осуществить электроформование нановолокнистого материала из раствора в водном растворе Огсафола, содержащем 2% УК, смеси 3% X25 и 3% ПВС. Формование проводили при напряжении 50 кВ и межэлектродном расстоянии 170 мм.

Исследование морфологии поверхности полученного материала показало (рисунок 15), что в процессе электроформования происходит обрыв струй раствора, вследствие чего образуется большое количество капель. Вероятно, это связано как с несовместимостью ПВС и Огсафола, так и с меньшим поверхностным натяжением раствора X25-ПВС в этом растворителе. Очевидно, что для получения нановолокон хитозана из растворов в Огсафоле необходимо увеличение содержания низкомолекулярного хитозана при уменьшении содержания ПВС в растворе.

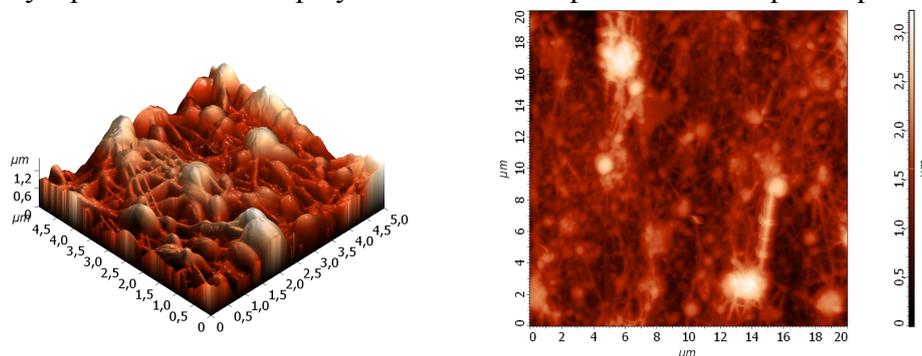


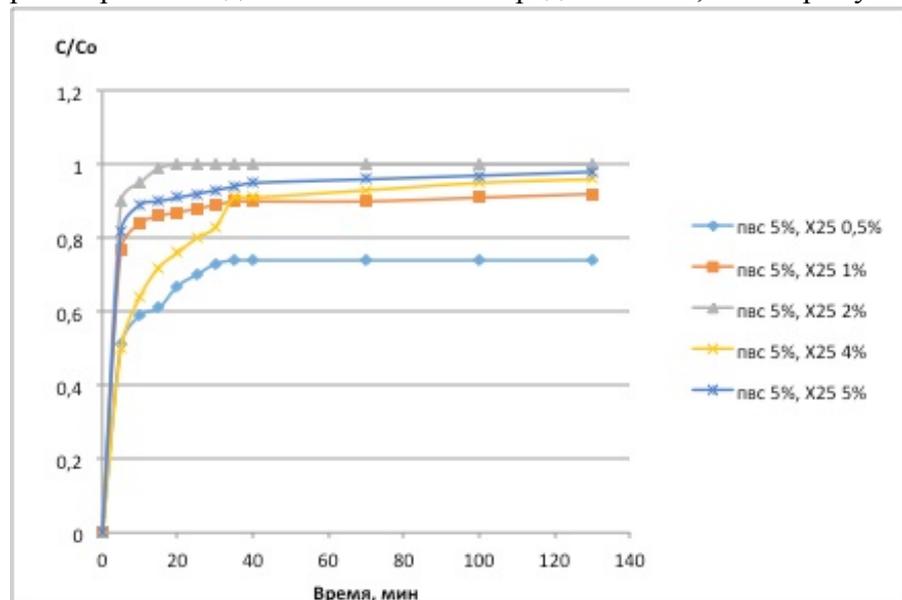
Рисунок 15 - Топографический образ морфологической структуры (АСМ изображения) нановолокон сформованных на основе смеси 3% X25 и 3% ПВС в водном растворе Огсафола, содержащем 2% УК

#### 4 Исследование скорости выделения мирамистина из модельных пленок

Важной характеристикой перевязочных материалов, содержащих иммобилизованные биологически активные вещества, является кинетика их выделения в контактирующие с материалом ткани.

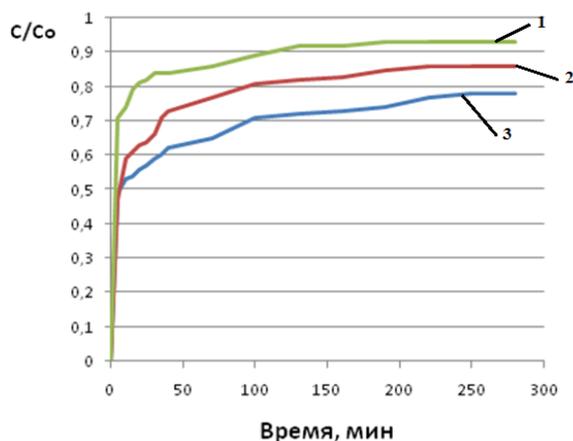
В связи с высокой степенью набухания нановолокнистого материала и последующем быстром его диспергировании в объеме физиологического раствора в качестве модельной системы были использованы пленки с содержанием мирамистина 0,5%.

Согласно полученным данным (рисунок 16), скорость выделения антимикробного вещества увеличивается с увеличением концентрации хитозана в исходном формовочном растворе. Это дает возможность предположить, что при увеличении содержания коротких



макромолекул хитозана формируется менее упорядоченная структура. Однако, несмотря на прослеживаемую зависимость, больше 50% мирамистина из всех пленок выделяется в первые 50-60 минут.

Рисунок 16 - Зависимость скорости выделения мирамистина от концентрации хитозана в формовочном растворе.



С целью увеличения продолжительности выделения антимикробного вещества была осуществлена термообработка полученных пленок, которую мы рассматриваем как способ формирования более упорядоченной структуры.

Рисунок 17 - Зависимость скорости выделения мирамистина от условий формирования пленки

Растворитель: 1, 2 - буферный раствор, 3 - 70%-ный раствор уксусной кислоты. Температура формирования: 1, 3 – 70 °С, 2 – 20 °С (с последующей термообработкой при 100 °С)

Для решения этой задачи были сформованы пленки хитозан – ПВС при комнатной и повышенной температуре, подвергнутые последующей термообработке. Согласно полученным данным (рисунок 17), скорость выделения мирамистина зависит не только от температуры формирования, но и от типа использованного растворителя. Так, наименьшая скорость выделения мирамистина характерна для пленки, сформованной из раствора хитозана в буферном растворе при повышенной температуре. При этом даже при увеличении продолжительности экспонирования до 5 часов в пленке сохраняется свыше 20% исходного количества мирамистина. Для пленки, сформованной из раствора хитозана в буферном растворе при комнатной температуре с последующей термообработкой при 100°С, характерна несколько более высокая скорость выделения мирамистина. Можно предположить, что в этих условиях

происходит формирование более дефектной структуры, заметно не изменяющееся при последующей термообработке.

### 5 Исследование цитотоксичности и антимикробной активности нановолокнистого материала на основе низкомолекулярного хитозана

Поскольку низкомолекулярный хитозан обладает как ранозаживляющими, так и антимикробными свойствами, нановолокнистый материал, полученный при электроформовании из раствора смеси низкомолекулярного хитозана и ПВС, является перспективным для применения в качестве аппликативного покрытия для гнойных, ожоговых и послеоперационных ран. Для усиления потенциальной антимикробной активности был сформован также нановолокнистый материал на основе хитозана с включенным в него антибактериальным препаратом – мирамистином в количестве 0,5% от массы волокна.

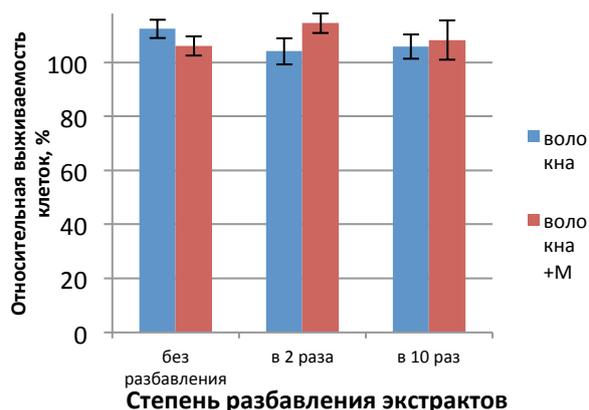


Рисунок 18 Выживаемость клеток линии мышинных фибробластов L929 после 24 часов инкубирования с экстрактами. Результат МТТ-теста, контроль (100%) – клетки, культивируемые в среде без добавления экстрактов.

Для предварительной медико-биологической характеристики полученных материалов было проведено определение их цитотоксичности и антимикробной активности.

Согласно полученным данным, культивирование клеток в присутствии экстрактов материалов не снижает жизнеспособность клеток (рисунок 18) и не влияет на их морфологию.

Антимикробную активность полученных нановолокнистых материалов определяли по отношению к грамположительной микрофлоре *Staphylococcus aureus* и к грамотрицательной микрофлоре *Escherichia coli* (таблица 3).

Для предварительной медико-биологической характеристики полученных материалов было проведено определение их цитотоксичности и антимикробной активности.

Таблица 3 - Результаты испытаний образцов

Образец	Размер образца, мм <sup>2</sup>	d зоны лизиса, мм	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Нановолокнистый материал, содержащий мирамистин	6	Полупрозрачный 11	Полупрозрачный 10
Нановолокнистый материал без мирамистина	6	Полупрозрачный 9	Полупрозрачный 8
Нановолокнистый материал с добавлением 0,05 мл 1%-ного водного раствора мирамистина	16	14	13

Оценка полученных данных позволяет сделать вывод о том, что полученные нановолокнистые материалы обладают удовлетворительной антимикробной активностью. Обращает на себя внимание то, что материал на основе низкомолекулярного хитозана, не содержащий мирамистин, обладает собственной антимикробной активностью. При этом разница в размерах зон лизиса при контакте с материалом, содержащим мирамистин, и в его отсутствие, не превышает 2 мм. Заметное повышение уровня антимикробной активности в контрольном опыте, в котором в зону контакта материала и микрофлоры вводили 0,05 мл 1%-ного водного раствора мирамистина, свидетельствует о том, что содержание мирамистина в волокнистом материале недостаточно для достижения в результате его диффузии в культуральную среду концентрации, которая могла бы обеспечить четкое выявление антимикробной активности мирамистина.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С целью разработки способа получения низкомолекулярного высококристаллического хитозана (нанокристаллитов хитозана) исследованы основные закономерности кислотно-каталитической деструкции хитозана.

Количественная оценка кинетики деструкции в гомогенной (гидролиз в растворе серной кислоты) и гетерогенной (алкоголиз в растворе серной кислоты в этаноле) среде позволила сделать вывод, что деструкция протекает по механизму, описываемом уравнением реакции 1-го порядка. На основании данных ЯМР-спектроскопии, ТГА и атомно-силовой микроскопии определены основные параметры надмолекулярной структуры и сорбционные свойства продуктов деструкции (степень кристалличности, размеры кристаллитов, удельная поверхность, характеристики термолиза) и показана возможность получения нанокристаллитов хитозана по механизму рекристаллизации из раствора.

Исследованы реологические характеристики растворов низкомолекулярного хитозана и его смесей с поливиниловым спиртом в различных растворителях (уксусная кислота, буферный раствор, водный раствор олигоэтиленоксидсульфокислоты). Установлены особенности концентрационной зависимости вязкости растворов смесей хитозана различной молекулярной массы с ПВС (неаддитивная зависимость вязкости от концентрации полимеров).

Определены параметры бескапиллярного электроформования из растворов эквивалентной смеси низкомолекулярного хитозана и поливинилового спирта на лабораторной установке «Nanospider» NSLAB 200S, что позволило получить нановолокнистый материал, содержащий иммобилизованный антимикробный препарат мирамистин, с диаметром волокон 300-400 нм. Определены цитотоксичность и антимикробная активность полученного нановолокнистого материала. Показано, что низкомолекулярный хитозан обладает собственной антимикробной активностью.

На основании полученных результатов разработан лабораторный регламент на производство низкомолекулярного хитозана (приведен в приложении к диссертации).

### Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Левитин С.В. Исследование процесса кислотно – катализируемой деструкции хитозана в растворах серной кислоты [Текст] / Левитин С.В., Гальбрайх Л.С., Истомин А.В., Чупина А.А. // Химические волокна. – 2013. - №6. – С. 22-26 (**из перечня ВАК**)
2. Левитин С.В. О надмолекулярной структуре продуктов кислотно-гидролитической деструкции хитозана [Текст] / Левитин С.В., Гальбрайх Л.С., Грунин Ю.Б., Масас Д.С. // Химические волокна. – 2014. - №3. – С. 8-11 (**из перечня ВАК**)
3. Levitin S.V. Acid-catalyzed destruction of chitosan in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution [Текст] // Levitin S.V., Gal'braikh L.S., Istomin A.V., Chupina A.A. // Fibre Chemistry – 2014. - V. 45. - № 6. – P. 350-355 (**включен в базы данных Web of Science и Scopus**)
4. S. V. Levitin Supramolecular Structure of Chitosan Acid-Hydrolysis Products [Текст] / S. V. Levitin, L. S. Gal'braikh, Yu. B. Grunin, D. S. Masas // Fibre Chemistry – 2014. - V. 46. - № 4. – P. 147-150 (**включен в базы данных Web of Science и Scopus**)
5. Левитин С.В. Деструкция хитозана в условиях кислотно-каталитического гидролиза [Текст] / Левитин С.В., Гальбрайх Л.С. // Тезисы докладов международной научно-технической конференции «Современные технологии и оборудование текстильной промышленности» (ТЕКСТИЛЬ-2012). – Москва: МГТУ им. А.Н. Косыгина 2012. – С.93
6. Левитин С.В. Изучение механизма и кинетики кислотного гидролиза хитозана [Текст] / Левитин С.В., Гальбрайх Л.С. // Тезисы докладов международной научно-технической конференции «Современные наукоемкие технологии и перспективные материалы текстильной и легкой промышленности» (ПРОГРЕСС – 2013). – Иваново. – 2013. – С. 423-424
7. Веселовская В.Д. Исследование кислотно-каталитического гидролиза [Текст] / Веселовская В.Д., Гальбрайх Л.С., Левитин С.В. // Сборник тезисов докладов 65-й научной конференции студентов и аспирантов «Молодые ученые XXI веку». – Москва: МГУДТ. – 2013. - С. 99

8. Левитин С.В. Реология растворов низкомолекулярного хитозана и его смесей с поливиниловым спиртом [Текст] / Левитин С.В., Гальбрайт Л.С., Чупина А.А. // Сборник тезисов международной научно-технической конференции «Дизайн, технологии и инновации в текстильной и легкой промышленности». – Москва: МГУДТ. – 2013. – Ч.1. – С. 126-127

9. Левитин С.В. Получение нанокристаллитов хитозана и исследование их структуры и свойств [Текст] / Левитин С.В., Гальбрайт Л.С. // Материалы II международной научно – практической конференции «Фундаментальная наука и технологии – перспективные разработки. Москва. – 2013. – V.1. – С. 186-188.

10. Чупина А.А. Исследование процесса формирования и свойств пленок на основе смесей низкомолекулярного хитозана и поливинилового спирта, содержащих антимикробное вещество [Текст] / Чупина А.А., Левитин С.В., Гальбрайт Л.С. // Сборник тезисов докладов 66-й научной конференции студентов и аспирантов «Молодые ученые – инновационному развитию общества (МИР-2014)». Москва: МГУДТ. – 2014.

11. Левитин С.В. О влиянии молекулярной массы хитозана на реологические свойства растворов его смесей с поливиниловым спиртом [CD] Левитин С.В., Чупина А.А., Гальбрайт Л.С. // Тезисы докладов 6-й всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2014». – Москва: МГУ. – 2014.

12. Левитин С.В. Исследование возможности получения нановолокнистого материала из смеси биосовместимых полимеров, содержащего антибактериальное вещество [Текст] / Левитин С.В., Гальбрайт Л.С., Чупина А.А. // Тезисы докладов третьей международной конференции стран СНГ «Золь-гель синтез и исследование неорганических соединений, гибридных функциональных материалов и дисперсных систем». – Суздаль. – 2014. – С. 121