

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ДИЗАЙНА И
ТЕХНОЛОГИИ»

на правах рукописи

Левитин Сергей Вадимович

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И
СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ ХИТОЗАНА

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук

Специальность 05.17.06 – Технология

и переработка полимеров и композитов

Научный консультант

доктор химических наук, профессор

Л.С. Гальбрайх

Москва 2015

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение.....	4
2. Основная часть.....	9
2.1 Литературный обзор.....	9
2.1.1 Хитин: строение, структура, свойства.....	9
2.1.2 Получение хитозана, его химическое строение и структура.....	12
2.1.3 Получение низкомолекулярного хитозана.....	18
2.1.4 Особенности кислотно-каталитического гидролиза хитозана.....	19
2.1.5 Реологические характеристики растворов хитозана.....	24
2.1.6 Электроформование – технология получения нановолокнистых материалов.....	31
2.1.7 Особенности получения нановолокон на основе хитозана методом электроформования.....	34
2.1.8 Биологическая активность низкомолекулярного хитозана и материалов на его основе.....	42
2.2 Методический раздел.....	47
2.2.1 Характеристика сырья и реактивов.....	47
2.2.2 Проведение кислотно-каталитической деструкции хитозана.....	47
2.2.3 Приготовление формовочного раствора.....	48
2.2.4 Формование пленок.....	49
2.2.5 Формование нановолокон на установке Nanospider.....	49
2.2.6 Определение молекулярной массы хитозана вискозиметрическим методом.....	52
2.2.7 Исследование реологических характеристик растворов.....	52
2.2.8 Изучение поверхности материалов методом атомно-силовой микроскопии.....	54
2.2.9 Исследование структуры нанокристаллитов хитозана методом ядерно- магнитного резонанса.....	55

2.2.10 УФ- спектрофотометрическое определение скорости выделения мирамистина.....	55
2.2.11 Исследование продуктов гидролиза хитозана методом ИК- спектроскопии.....	55
2.2.12 Исследование цитотоксичности хитозаносодержащих нановолокон.....	56
2.2.13 Определение антимикробной активности нановолокнистых материалов на основе хитозана.....	57
2.3 Основные результаты и их обсуждение.....	58
2.3.1 Исследование процесса кислотно-каталитического гидролиза хитозана.....	58
2.3.2 Структура и свойства продуктов кислотно-каталитической деструкции хитозана.....	69
2.3.3 Исследование реологических характеристик растворов хитозана и его смесей поливиниловым спиртом.....	92
2.3.4 Исследование возможности формирования нановолокон из смеси хитозан- поливиниловый спирт	100
2.3.5 Исследование скорости выделения мирамистина из модельных пленок.....	107
2.3.6 Исследование цитотоксичности и антимикробной активности нановолокнистого материала на основе смеси низкомолекулярный хитозан- поливиниловый спирт.....	110
3. Заключение	114
Список сокращений и условных обозначений.....	115
4. Список литературы.....	116

1 ВВЕДЕНИЕ

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 деацетилирования 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 термолиза);
- 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-фотоколориметрия, 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.

2 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

2.1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

2.1.1 Хитин: строение, структура, свойства

Хитин – линейный аминополисахарид, макромолекула которого состоит из N-ацетил-2-амино-2-дезоксид-Д-глюкопиранозных звеньев [1].

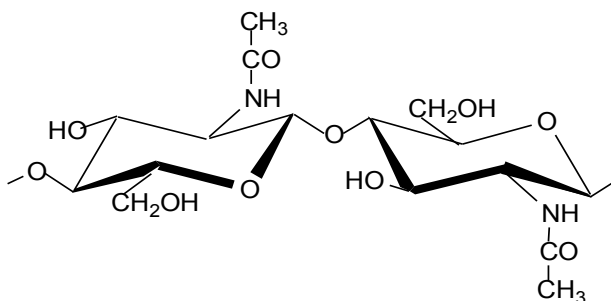


Рисунок 1 – Химическая структура хитина

По химическому строению он близок к целлюлозе и только ей уступает по распространенности в природе. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, элементарные звенья хитина имеют конформацию $4C_1$.

Большая длина и ограниченная гибкость макромолекул являются предпосылками для образования биополимерами сложных надмолекулярных структур в тканях живых организмов. Для хитина основным элементом такой структуры являются фибриллы - высокоориентированные агрегаты макромолекул диаметром 25-50 нм, в свою очередь состоящие из микрофибрилл диаметром 2,5-2,8 нм. Такая структура обеспечивает выполнение важной биологической функции армирования содержащих хитин тканей [2].

Благодаря регулярности строения полимерной цепи хитина формируется высокоупорядоченная структура, обладающая признаками, характерными для кристаллического фазового состояния полимеров. При этом кристаллические области структуры хитина могут существовать в трех кристаллографических

(структурных) модификациях, отличающихся расположением молекулярных цепей в элементарной ячейке кристаллита (явление, известное под названием полиморфизма) [3].

В зависимости от расположения полимерных молекул различают три формы структуры хитина - α , β и γ . α -Хитин, наиболее стабильная форма, представляет собой плотно упакованный, наиболее кристаллический полимер, в котором цепочки располагаются антипараллельно. В β -хитине макромолекулы располагаются параллельно относительно друг другу, а в γ -хитине две макромолекулы полимера направлены “вверх” относительно одной, направленной «вниз» [4].

Специфика полимерного состояния хитина, как и других высокомолекулярных соединений, обуславливает невозможность существования этого полимера как однофазной системы (полная кристалличность). Однако содержание кристаллических областей в хитине достаточно велико и составляет в зависимости от происхождения и способа выделения 60-85%. При этом фиксация взаимного расположения макромолекул хитина обеспечивается системой внутри- и межмолекулярных водородных связей: ОН-группа у С3 элементарного звена включена в водородную связь с атомом кислорода в цикле соседнего элементарного звена; ОН-группа у С6 может быть связана водородными связями как внутримолекулярно - с атомом кислорода гликозидной связи и (или) атомом азота ацетамидной группы (рисунок 2), так и межмолекулярно - с ОН-группой у С6 соседней макромолекулы. Хитин, входящий в состав панциря ракообразных, связан с белками посредством пептидной связи аминокислоты с диаминомонокислотами неароматического строения, имея вид хитин-белкового комплекса (ХБК) (рисунок 3).

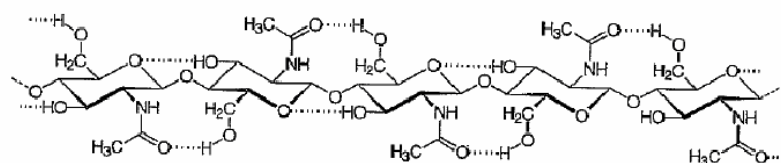


Рисунок 2 - Химическая структура хитина с внутримолекулярными водородными связями между элементарными звеньями [5].

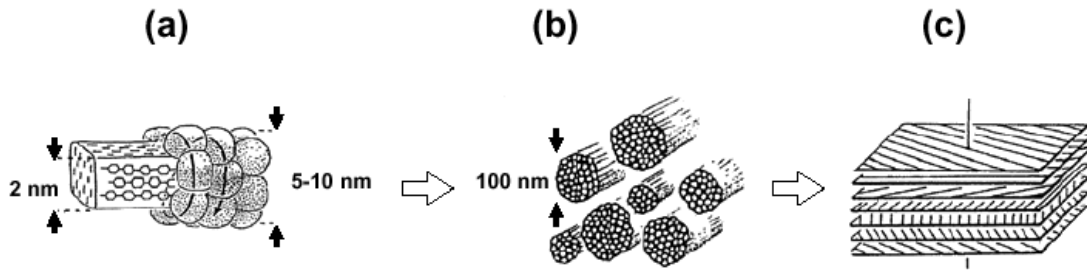


Рисунок 3 - Иерархическая структура хитин-белкового комплекса в ракообразных и кутикулах насекомых: (a) - кристаллиты хитина в окружении белков; (b) - хитин-белковая фибрилла; (c) - схематическое изображение фибрилл, лежащих горизонтально в последовательных и параллельных плоскостях [5].

Панцирь краба построен из трёх основных элементов – хитина, играющего роль каркаса, минеральной части, придающей панцирю необходимую прочность и белков. В состав панциря входят также липиды, меланины и другие пигменты. В кутикуле взрослых насекомых хитин также ковалентно связан с белками, а также с большим количеством меланиновых соединений, которые могут составлять до 40% массы кутикулы. Хитин у грибов, как правило, ассоциируется с другими полисахаридами, например β -1-3-глюканом, у членистоногих он связан с белками. Структурный компонент хитина N-ацетил-D-глюкозамин у бактерий, наряду с N-ацетилмурамовой кислотой, является компонентом клеточной стенки. В животном мире N-ацетилглюкозамин входит в состав мукополисахаридов (гликозаминогликаны) соединительной ткани (гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфатов, гепарина), групповых веществ крови и других гликопротеинов. Остаток N-ацетил-D-глюкозамина обычно находится на восстанавливающем конце углеводных цепей животных гликопротеинов, образуя связь углевод – белок. Этим объясняется совместимость хитина и хитозана с живыми тканями [6].

Богатые природные ресурсы хитина используются в весьма небольшой степени. Только в биоцикле Средиземного моря ежегодно образуется около 2,3 миллионов тонн хитина. В то же время, по данным ФАО производство хитина из морского сырья составляет всего около 36,7 тысяч тонн в год. В производстве хитозана из хитина лидируют Япония и США, получающие в год 700 и 500 тонн хитозана соответственно. В незначительных количествах хитозан производят Вьетнам, Таиланд, Бразилия, Куба, Аргентина и Пакистан [7].

2.1.2 Получение хитозана, его химическое строение и структура

Хитозан – наиболее известное и изученное производное хитина. Он представляет собой высокомолекулярный полимер глюкозамина, растворимый в разбавленных органических и неорганических одноосновных кислотах. Этот уникальный биополимер при нейтральных и щелочных значениях pH содержит свободные аминогруппы (NH_2). В кислой среде они протонированы ($-\text{NH}_3^+$), что открывает возможности ионного сшивания при взаимодействии с полианионами [3]. Наличие реакционноспособной аминогруппы в ангидропиранозном мономерном звене хитозана делает его перспективным носителем биологически активных соединений [1].

Как и хитин, хитозан представляет собой аморфно-кристаллический полимер, для которого также характерно явление полиморфизма, причем количество структурных модификаций при переходе от хитина к хитозану увеличивается до 6. Сохранение при этом размеров элементарной ячейки кристаллита вдоль оси макромолекулы на уровне соответствующей характеристики для хитина (103 нм) свидетельствует о том, что конформация макромолекул при переходе от хитина к хитозану существенно не изменяется.

Конформационные изменения в элементарной кристаллической ячейке хитозана (рисунки 4а и 4b) зависят от наличия молекул воды в системе водородных связей, а также от типа солевой формы, в которой находятся

макромолекулы хитозана. Цепи хитозана в такой ячейке упакованы антипараллельно и удерживаются системой водородных связей, в которую встроены молекулы воды по оси *a* (а), вдоль оси *c* (b) эти ячейки соединены водородными связями [8].

При удалении связанной воды из хитозана образуется безводная кристаллическая структура, которая отличается от гидратированной лишь системой водородных связей (рисунок 5).

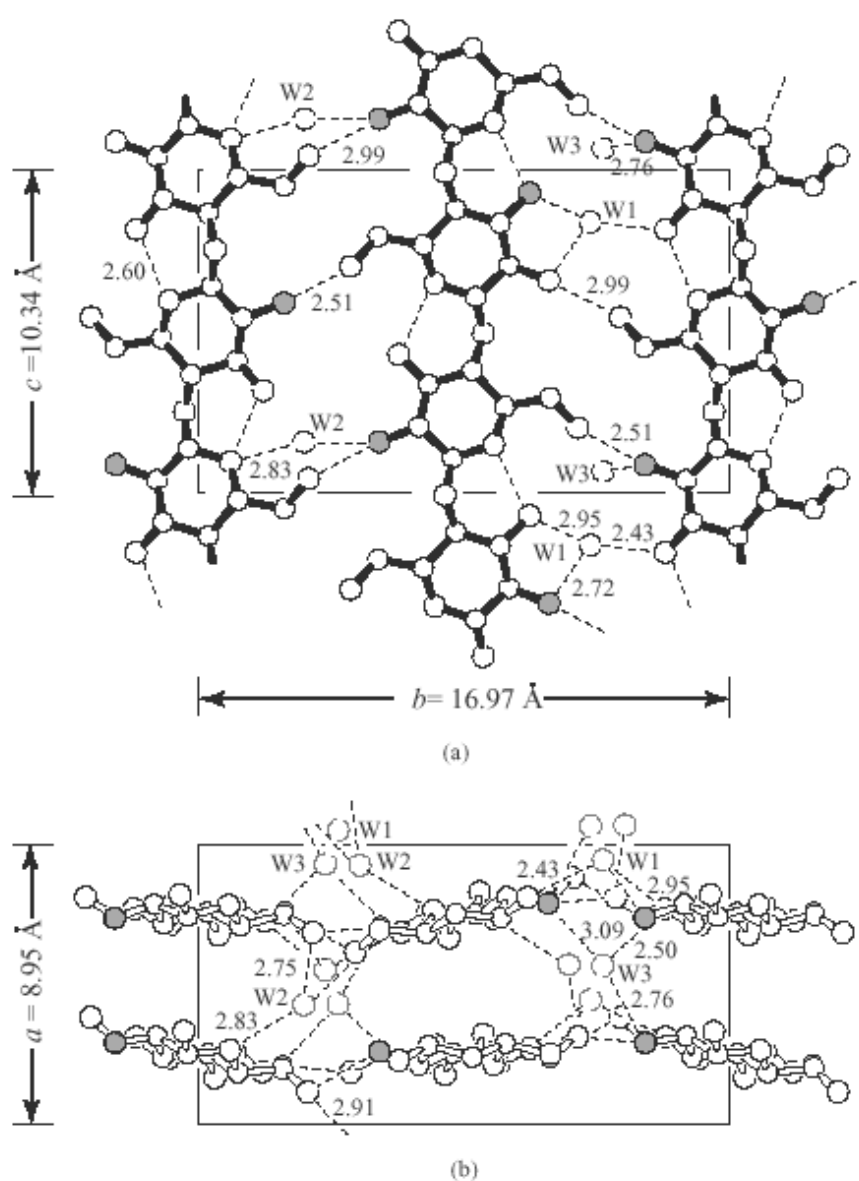


Рисунок 4 - Конформация гидратированного хитозана вдоль оси *a* (а) и вдоль оси *c* (b) [8].

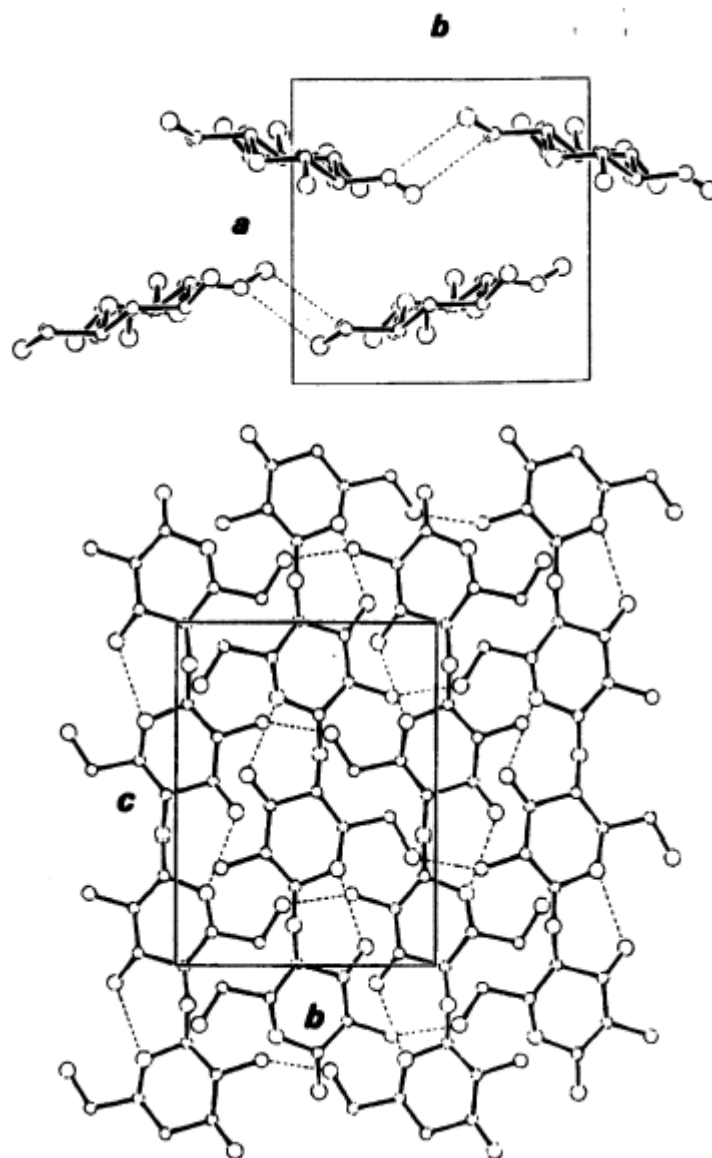
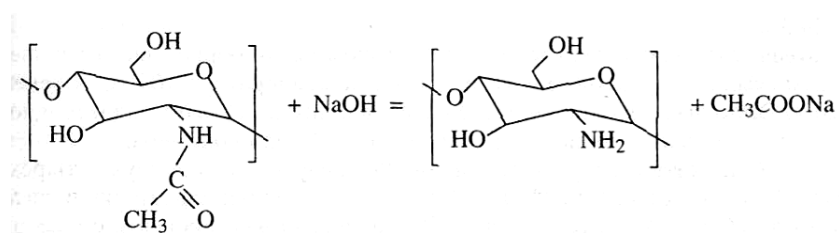


Рисунок 5 – Кристаллическая структура безводного хитозана. Плоскость ab (вверху) и плоскость bc (внизу).

Все атомы водорода опущены, водородные связи показаны пунктирными линиями.

В основе получения хитозана лежит реакция деацетилирования хитина:



Процесс щелочного деацетилирования имеет ряд особенностей. Высокая устойчивость хитина к деацетилированию объясняется наличием водородной связи между карбонильной группой и азотом амидной группы. Для разрушения этой прочной связи процесс ведут при повышенной температуре. С увеличением температуры степень деацетилирования достигает предельного значения (98%), но при этом снижается молекулярная масса. Реакция деацетилирования быстро проходит в течение первого часа щелочной обработки. За это время при обработке 50%-ным раствором NaOH при 100°C происходит отщепление 70% ацетильных групп, далее реакция замедляется, и достижение больших значений величины степени деацетилирования требует дополнительных более жестких воздействий. Для получения высокодеацетилированного хитозана требуется не менее, чем десятикратный мольный избыток NaOH.

Стандартного процесса деацетилирования хитина не существует, но в большинстве традиционных способов используются концентрированные растворы NaOH в широком диапазоне концентраций (от 35 до 50%) и гидромодуля (от 3 до 10), нагрев до 140 °C и время обработки от 0,5 до 10 суток.

Более экологически чистым и экономически выгодным является твердотельный способ, при использовании которого требуется только 5-кратный мольный избыток щелочи. Тем не менее, и в этом случае получается реакционная смесь, лишь на 33% состоящая из хитозана, а 67% приходится на CH_3COONa и избыток NaOH. Именно поэтому очистка хитозана от низкомолекулярных компонентов реакционной смеси является важной стадией технологического процесса его получения [9].

В процессе деацетилирования хитина заметно уменьшается общая упорядоченность структуры (степень кристалличности снижается до 40-50%). Снижение степени кристалличности может быть обусловлено как аморфизацией структуры вследствие внутрикристаллитного набухания при деацетилировании, так и нарушением регулярности строения полимерной цепи в случае неполного отщепления N-ацетильных групп [2]. При увеличении степени деацетилирования кристалличность хитина снижается, а затем начинает формироваться новая

кристаллическая структура, присущая хитозану. Рентгеноструктурным методом подтверждено, что при переосаждении из щелочных и кислотных растворов и последующем высушивании кристаллическая структура хитина восстанавливается. Переосажденные влажные образцы хитина и хитозана имеют дифракционные картины практически полностью аморфных веществ (рисунки 6а и 6б).

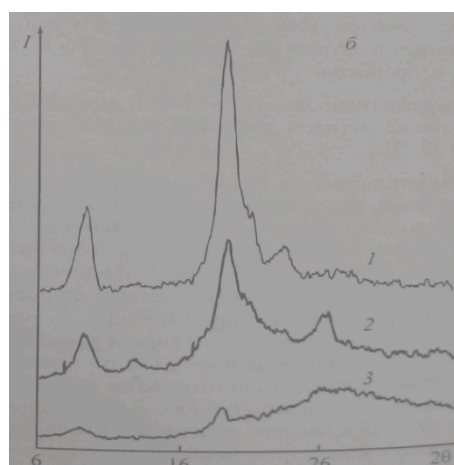
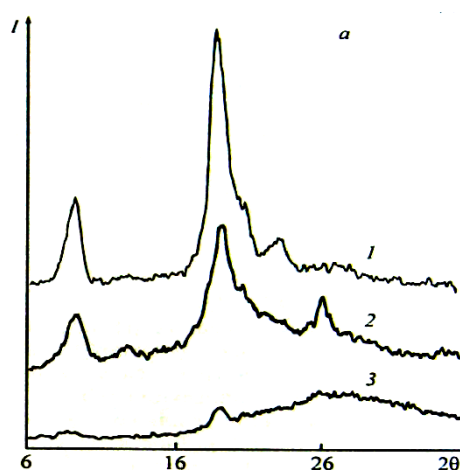


Рисунок 6 – Дифракционные картины исходного хитина (1) и хитина, переосажденного из NaOH (а) и HCl (б), сухого (2) и влажного (3).

I – интенсивность сигнала, 2θ – угол дифракции [10]

В работе [10] было показано влияние кристалличности образцов хитина на кинетику дезацетилирования. Согласно [11], кинетика дезацетилирования хитина зависит от влажности полимера (рис. 7).

Скорость дезацетилирования, и предельная степень дезацетилирования при щелочном гидролизе влажного хитина оказались ниже, чем у исходного сухого хитина. В сухом образце, имеющем кристаллическую структуру, похожую на структуру исходного хитина, скорость дезацетилирования на первом участке оказалась меньше, хотя предельная степень дезацетилирования достигла таковой исходного сухого образца.

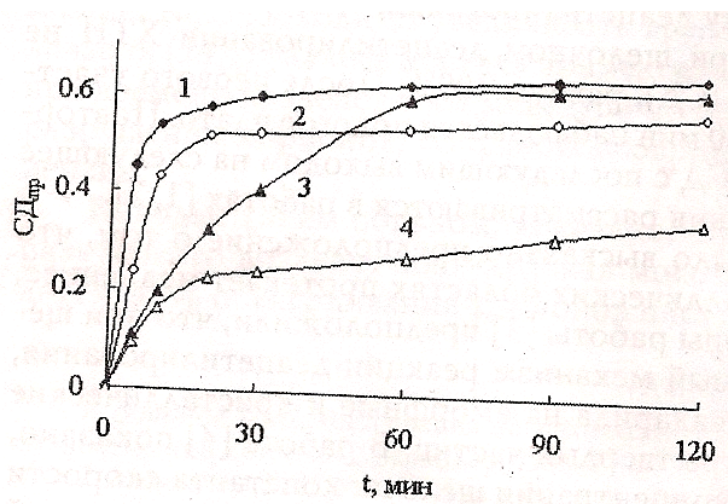


Рисунок 7 – Кинетические кривые деацетилирования хитина в 50%-ном NaOH при 100°C [11] 1 – исходный сухой хитин; 2 – исходный влажный хитин; 3 – переосажденный сухой хитин; 4 – переосажденный влажный хитин

При деацетилировании влажного аморфного хитина, имеющего наименьшую кристалличность ($\chi_{кр} = 8,5\%$), скорость деацетилирования, и предельная степень деацетилирования были самыми низкими.

Реакция описывается двумя реакциями псевдопервого порядка, одна из которых - деацетилирование, а другая – образование комплекса хитина с гидроксил-ионами. В соответствии с механизмом реакции деацетилирования в щелочной среде гидролиз ацетамидной связи начинается с нуклеофильной атаки ионами OH по карбонильному углероду ацетамидной группы. Гидратная оболочка затрудняет эту нуклеофильную атаку, что приводит к снижению скорости деацетилирования.

Снижение скорости деацетилирования переосажденного сухого хитина по сравнению с сухим и влажным исходным хитином можно объяснить различной плотностью хитиновых частиц. В исходных образцах хитина, полученного депротеинизацией и деминерализацией панциря краба, частицы хитина более пористые, после кристаллизации хитина из раствора образуются частицы с более плотной упаковкой молекул полисахарида [11, 12].

Композиционная неоднородность, присущая хитину, сохраняется и в хитозане, что влияет на физико-химические свойства и структурно-молекулярную

неоднородность образующегося хитозана, а, следовательно, и на свойства изделий на его основе. Распределение ацетильных групп зависит от степени кристалличности используемого хитина. Так как реакция дезацетилирования легче протекает в аморфных областях, распределение имеет блочный характер, при этом длина блоков зависит от размера и расположения аморфных областей хитозана [4].

2.1.3 Получение низкомолекулярного хитозана

Свойства хитозана резко меняются в зависимости от его молекулярной массы. Именно поэтому большое число работ посвящено получению низкомолекулярного хитозана и наночастиц на его основе. Методы снижения молекулярной массы хитозана достаточно разнообразны – это кислотный гидролиз [13], окислительная деполимеризация [14], облучение ультразвуком [15].

Основным способом снижения молекулярной массы хитозана является гомогенный кислотно-каталитический гидролиз. Его проводят в растворах минеральных и органических кислот – соляной, уксусной, молочной, муравьиной. Скорость гидролиза зависит от концентрации кислоты, температуры и продолжительности реакции [13, 16]. Для получения низкомолекулярного хитозана используют также окислительную деструкцию в среде уксусной кислоты. Окислителем выступает перекись водорода, степень деструкции хитозана зависит от её концентрации. Однако при этом происходит не только гидролиз, но и окисление гидроксильных и аминогрупп [14]. Скорость гидролиза хитозана гораздо ниже, чем целлюлозы из-за наличия аминогруппы в альфа-положении к гликозидной связи. Влияние положительного заряда в молекуле, замедляющее гидролиз, сказывается путём индукционной передачи заряда через цепь связей [17].

Для выделения продуктов гидролиза хитозана из раствора обычно используют щелочные реагенты, доводя рН до нейтрального значения. Наряду с

этим традиционным методом используют также ионное гелеобразование [18, 19], при котором в качестве противоположно заряженных полимеров могут выступать Na-соль триполифосфорной кислоты и альгинат натрия.

Преимуществом ферментативного гидролиза, который проводят в гомогенной среде, является возможность достижения большого выхода олигосахаридов, и малая степень реацетилирования. Для гидролиза используют как специфический для хитозана фермент хитиназу, так и неспецифические – коллагеназу, целловиридин, трипсин, пепсин, лиразу [20, 21].

К физическим методам можно отнести обработку ультразвуком [22] и деструкцию в токе плазмы [23].

Для выделения высокоупорядоченных элементов структуры полисахаридов применяют гетерогенный гидролиз, скорость которого намного ниже, чем в случае гомогенного. Основное количество исследований гетерогенного гидролиза было посвящено целлюлозе. В работах [24-26] были сформулированы основные закономерности гетерогенного гидролиза полисахаридов – незначительное влияние строения макромолекулы (конфигурации гликозидной связи, пространственного расположения гидроксильных групп, состава элементарного звена), на устойчивость гликозидной связи при гомогенном гидролизе и решающее значение при реакции в гетерогенной среде, а также зависимость скорости гидролиза от надмолекулярной структуры полимера. Поскольку надмолекулярная структура хитозана характеризуется наличием чередующихся аморфных и кристаллических участков [26], доступ реагентов в плотно упакованные участки ограничен, поэтому реакция идёт, главным образом, в аморфных областях, что приводит к получению продуктов гидролиза и алкоголиза с предельной степенью полимеризации.

2.1.4 Особенности кислотно-каталитического гидролиза хитозана

Поскольку свойства хитозана чрезвычайно сильно зависят от молекулярной массы, кислотный гидролиз является важной стадией переработки этого

биополимера. Изучение закономерностей гидролиза хитина и хитозана представляет актуальную проблему в связи с производством и использованием различных продуктов на их основе. Совершенствование химических способов переработки хитинсодержащего сырья, и разработка новых технологий требует детального изучения механизмов гидролиза хитина и хитозана в кислых и щелочных условиях и установления основных закономерностей этих превращений.

В процессе кислотного гидролиза расщепляются как амидные, так и гликозидные связи, т.е. происходят процессы деацетилирования, деструкции и деполимеризации, при щелочном гидролизе расщепляются, главным образом, амидные связи [27].

Гликозидная связь между элементарными звеньями в молекуле хитозана достаточно устойчива к щелочам и не устойчива к действию кислот. При гидролизе хитозана в концентрированных растворах минеральных кислот (70%-ная H_2SO_4 , 40%-ная HCl или 85%-ная H_3PO_4) при $0-10^\circ$, процесс гидролиза сопровождается образованием оксониевых соединений и этерификацией. Если не доводить гидролиз до конца, можно выделить из реакционной среды различные олигосахариды [28].

Многие исследователи придерживаются мнения о равноценности гликозидных связей между элементарными звеньями макромолекулы природного хитозана [29]. Однако некоторые авторы [30] приводят данные, указывающие на наличие в молекуле хитозана некоторого количества гликозидных связей, наиболее легкогидролизуемых под действием кислот. Структурные изменения, а также превращение гидроксильных групп в карбоксильные или карбонильные, раскрытие пиранозного цикла, которые имеют место при выделении и очистке хитозана, облегчают расщепление гликозидной связи. Поэтому предположение об однородности природного хитозана вполне допустимо.

Как уже упоминалось, наличие аминогруппы в хитозане заметно уменьшает скорость гидролиза по сравнению с другими природными полисахаридами. Это связано со стерическим и индукционным эффектами, которые она вызывает [17].

Конформационный переход, необходимый для образования гликозил-катиона, сопряжен с поворотом атомов C-2 и C-5 вокруг связей (C-2) – (C-3) и (C-4) – (C-5) (рисунок 8).

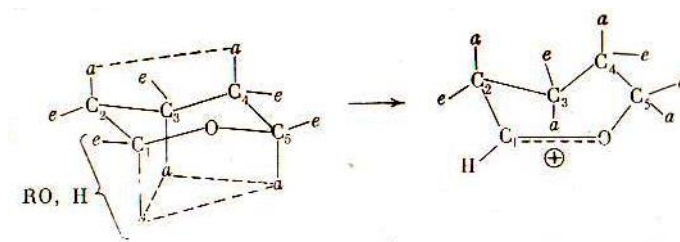


Рисунок 8 - Конформационный переход при образовании гликозил-катиона [17]

Очевидно, что любые факторы, затормаживающие вращение вокруг указанных связей, должны снижать скорость гидролиза.

Помимо стерического эффекта, вклад вносит индукционное влияние аминогруппы, заряженной положительно в условиях кислотно-катализируемого гидролиза. Влияние полного положительного заряда в молекуле, замедляющее гидролиз, сказывается не только путем индукционной передачи через цепь связей, но и путём общей дестабилизации интермедиатов (рисунок 9 а, б).

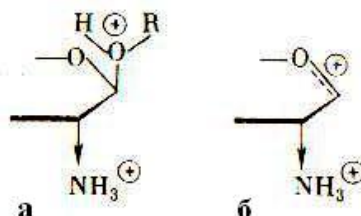


Рис. 9 - Интермедиаты, образующиеся при кислотно-каталитическом гидролизе

В [16] был предложен альтернативный механизм, гомогенного гидролиза хитозана в растворах уксусной кислоты (рисунок 10).

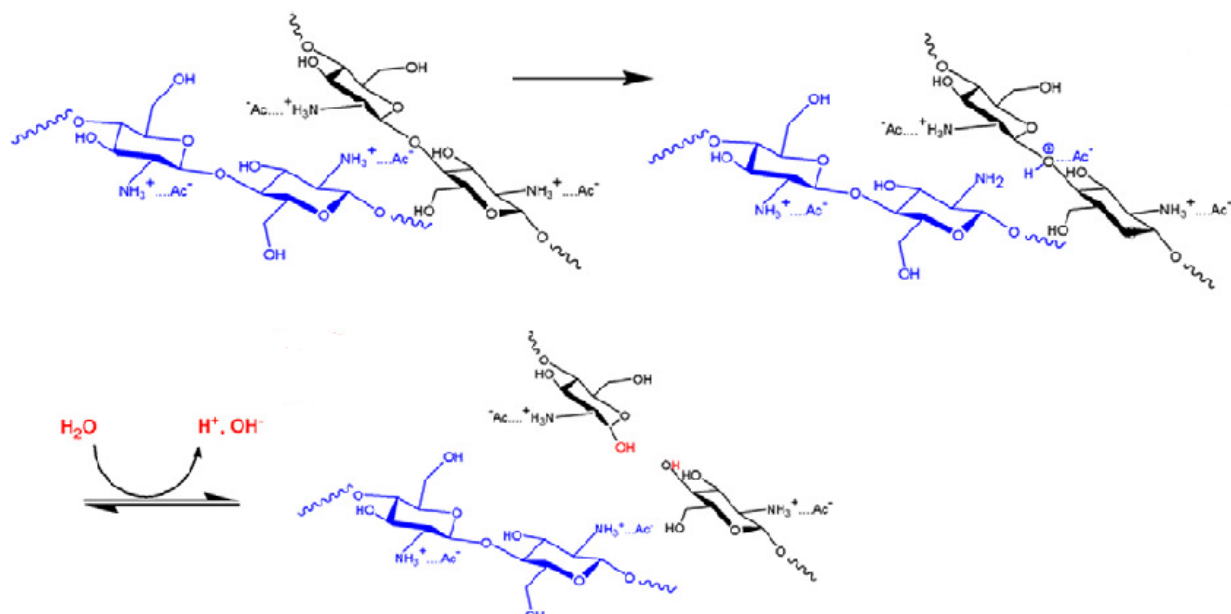


Рисунок 10 - Схема кислотно-каталитического гидролиза хитозана в растворе уксусной кислоты [16]

Согласно [16], в гидролизе участвуют две молекулы хитозана. После протонирования аминогрупп, по мнению авторов, существует вероятность столкновения двух молекул хитозана. При этом происходит протонирование гликозидной связи, присоединение ацетильной группы к образовавшемуся оксониевому иону с последующим гидролизом гликозидной связи.

При проведении гидролиза хитозана в гетерогенной среде скорость этого процесса в начальной стадии всегда выше, чем на дальнейших стадиях. Это объясняется различной степенью упорядоченности отдельных участков надмолекулярной структуры. Как указывалось, ранее, повышение скорости реакций в более доступных областях и понижение - в более упорядоченных участках структуры часто наблюдаются при осуществлении различных реакций хитозана в гетерогенной среде. После окончания начальной стадии гидролиза скорость процесса снижается, и степень полимеризации достигает величины предельной степени полимеризации, соответствующей величине выделенных на этой стадии гидролиза кристаллитов.

Водные растворы кислот, применяемые в качестве гидролизующих реагентов, вызывают значительное набухание хитозана, и концы цепи, образующиеся при разрыве гликозидных связей, достаточно подвижны. Это может вызвать «рекристаллизацию» и повышение степени упорядоченности на этих участках по сравнению с упорядоченностью исходного хитозана. Следует отметить, что этот эффект повышения упорядоченности сказывается на результатах исследования надмолекулярной структуры хитозана методом кислотного гидролиза. Этот метод заключается в определении зависимости скорости гидролиза от условий реакции и последующем экстраполировании линейного участка полученной кривой к нулевому времени гидролиза или в определении потери веса образцов хитозана через определенные отрезки времени и сопоставлении полученных результатов. Для гидролиза в этих исследованиях обычно применяют 2,5—6 Н. растворы HCl [31].

Алкоголиз — деструкция хитозана в спиртовой среде в присутствии кислотного катализатора, чаще всего соляной кислоты. Эта реакция протекает с большей скоростью, чем гидролиз, и может быть осуществлена при комнатной температуре. Начальная стадия этого процесса включает, по-видимому, стадию гидролиза, причем вода образуется в результате взаимодействия спирта с кислотой, однако в реакционной среде не происходит заметного набухания и, следовательно, рекристаллизации [32].

Несмотря на то, что гликозидная связь в хитозане устойчива в условиях щелочного гидролиза, тем не менее, деструкция хитозана может протекать и в щелочной среде из-за наличия (или образования) концевых восстанавливающих групп. Механизм этой реакции заключается в образовании глюкоизосахариновой кислоты в концевом элементарном звене, сопровождающемся отрывом этого звена. Оставшаяся молекулярная цепь также содержит концевые восстанавливающие группы, и процесс деполимеризации протекает дальше [33].

Конкурирующей реакцией является реакция «обрыва», которая заключается в образовании в концевом элементарном звене глюкометасахариновой кислоты, не сопровождающаяся его отщеплением. Реакция «обрыва» при действии

известковой воды протекает быстрее, чем при действии гидроксида натрия, поэтому деструкция хитозана в первом случае менее интенсивна [34].

2.1.5 Реологические характеристики растворов хитозана

Реология – наука о деформациях и текучести сплошных сред, обнаруживающих упругие, пластические и вязкие свойства в различных сочетаниях. Упругие деформации возникают при приложении нагрузки и исчезают, если эти нагрузки снять; пластические деформации появляются только в том случае, когда вызванные нагрузкой напряжения превышают предел текучести; они сохраняются после снятия нагрузки; вязкое течение отличается тем, что оно возникает при любых малых напряжениях; с ростом напряжений увеличивается скорость течения. Еще одно свойство, которым обладают среды, изучаемые реологией – это высокоэластичность [35].

Реологические свойства растворов полимеров, в том числе хитозана, представляют практический и теоретический интерес при рассмотрении вопроса о переработке полимеров. Поскольку вязкость системы определяет расход энергии на проведение процессов растворения и гомогенизации, влияет на продолжительность процессов фильтрации и обезвоздушивания раствора перед формованием, является фактором, обуславливающим скорость растекания и равномерность жидкого слоя при формовании пленок, высокие значения вязкости полимерных систем являются ограничением для использования повышенных концентраций полимеров в рабочих растворах.

Специфика концентрированных растворов полимеров состоит в том, что отдельные макромолекулы не могут перемещаться независимо друг от друга. Структуру раствора полимера можно представить, как нерегулярную сетку, узлы которой обусловлены наличием зацеплений макромолекул, закрепленными межмолекулярными связями. Такая сложная пространственная система взаимодействующих макромолекул и надмолекулярных образований обуславливает достаточно высокую вязкость системы [35].

При малых скоростях сдвига такая система не реагирует на воздействие, и возникающее в ней сопротивление, пропорциональное скорости сдвига, не меняется. При больших скоростях течение жидкости перестает подчиняться закону Ньютона, и жидкость является «неньютоновской» [36].

На реологические свойства растворов полимеров оказывают влияние молекулярная масса полимера, степень полидисперсности, а также напряжение сдвига (градиент скорости), температура системы, концентрация полимера в растворе, тип растворителя и др.

Для полидисперсных полимеров связь между молекулярными параметрами и результатами реологических измерений устанавливается в виде интегральных уравнений [37].

Установлено, что физико-химические характеристики хитозана и конформационное состояние его молекул в растворе зависят, главным образом, от СД хитозана, распределения ацетильных групп вдоль полимерной цепи, рН и ионной силы среды [38-40]. При СД 80 % в определенном интервале значений ионной силы кулоновское отталкивание протонированных аминогрупп хитозана является доминирующим. При СД 50- 80 % дополнительный вклад в межмолекулярные взаимодействия вносят водородные связи, образующиеся с участием ацетильных групп хитозана. Объемность ацетильных остатков и сеть водородных связей создают стерические затруднения в макромолекуле полимера и затормаживают вращение пиранозных звеньев относительно гликозидной связи, в результате чего повышается жесткость полисахаридной макромолекулы. По мере уменьшения СД влияние этих эффектов возрастает, усиливаются гидрофобные взаимодействия, что в результате приводит к усилению самоагрегации молекул хитозана в растворах [41].

Как известно [42], вязкость растворов хитозана зависит от концентрации уксусной кислоты. При этом зависимость может иметь экстремальный характер, т. к. повышение содержания УК, с одной стороны, приводит к повышению степени протонирования аминогрупп, усилению их электростатического отталкивания, распрямлению цепей и повышению вязкости раствора, а с другой -

электростатическое отталкивание препятствует образованию ассоциатов макромолекул, повышающих вязкость. Очевидно, что в слабо структурированных разбавленных и сильно структурированных концентрированных растворах полимера баланс указанных разнонаправленных факторов будет складываться по-разному, и экстремальное значение вязкости может достигаться при разной концентрации уксусной кислоты. В работе [43] показано, что наибольшее значение характеристической вязкости хитозана достигается при концентрации уксусной кислоты около 10%, а наибольшее значение динамической вязкости 2%-ный раствор хитозана имеет в 75-80%-ой кислоте. При этом последнее авторы связывают с высокой степенью структурирования системы и за счет структурирования самого растворителя.

Другой особенностью неньютоновских псевдопластичных жидкостей, какими являются концентрированные уксуснокислотные растворы хитозана, является снижение их вязкости практически во всем интервале изменения скорости деформации и трудность определения наибольшей ньютоновской вязкости.

Наконец, учитывая нестабильность вязкостных свойств растворов данного полимера, сравнительные исследование их реологических характеристик целесообразно проводить после выдерживания в течение определенного времени.

Отмечено, что некоторые особенности реологических свойств растворов хитозана в исследованной области концентраций обусловлены полиэлектролитной природой полимера [44]. Методом вискозиметрии установлено существование конформационного перехода спираль–клубок макромолекул хитозана. Изменения конформации связаны с изменением степени протонирования аминогрупп хитозана [45].

При изучении вязкостных свойств разбавленных и умеренно-концентрированных растворов хитозана в водных растворах соляной и уксусной кислот выявлено существование такого соотношения кислота: хитозан, при котором вырождается аномалия вязкого течения (рисунок 11, линии 3 и 4) [46].

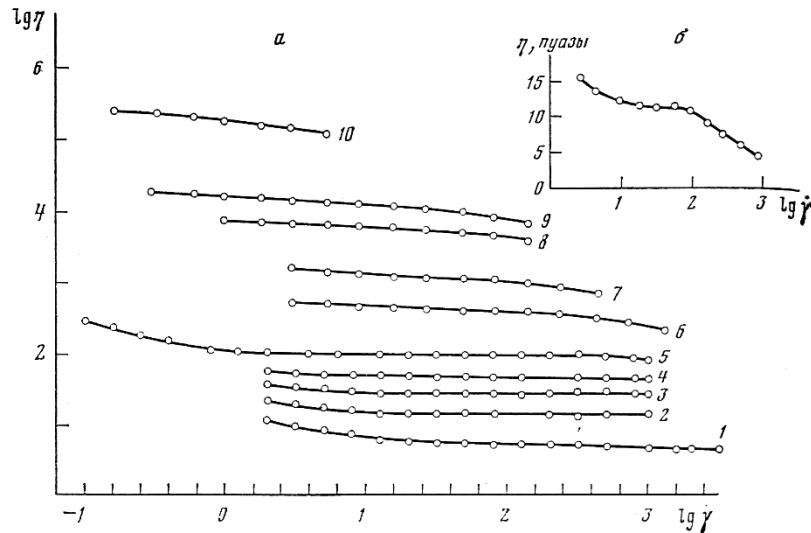


Рисунок 11 – Зависимость логарифма вязкости (а) и вязкости (б) растворов хитозана с характеристической вязкостью $[\eta] = 24 \text{ дЛ/г}$ в 2%-ой уксусной кислоте от логарифма скорости сдвига [45]

а – концентрация хитозана, вес. %: 1 – 0,1; 2 – 0,3; 3 – 0,5; 4 – 0,7; 5 – 1,0; 6 – 2,0; 7

– 3,0; 8 – 4,0; 9 – 5,0; 10 – 7,0; б – 3% - ый раствор хитозан; η , пуазы, $\dot{\gamma}$, с^{-1}

Несмотря на проведенные исследования, изучению зависимости реологических свойств (вязкости, степени структурирования, энергии активации вязкого течения) концентрированных растворов хитозана от жесткости макромолекул, распределения зарядов ионогенных групп, молекулярной массы не уделялось должного внимания. Авторами [47] показано, что причиной снижения динамической вязкости уксуснокислых растворов хитозана является деструкция полимера.

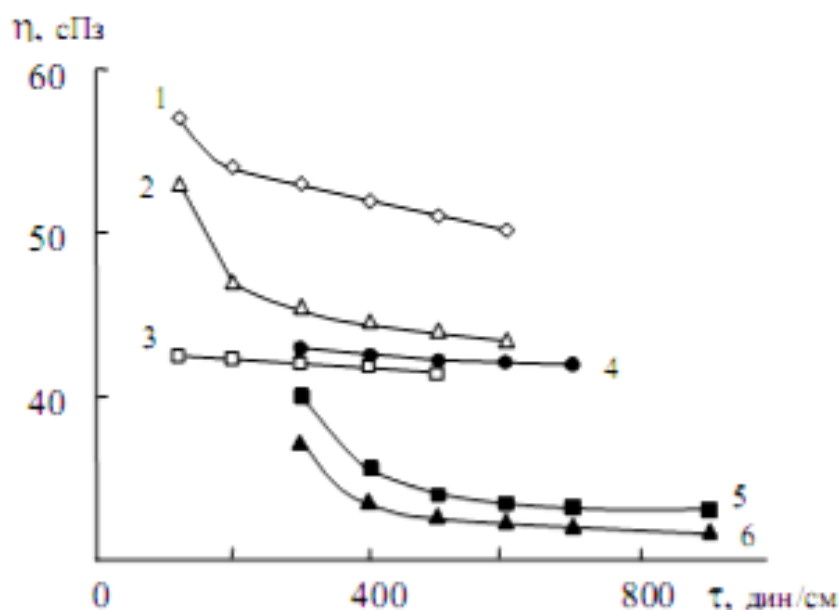


Рисунок 12 - Зависимость динамической вязкости от напряжения сдвига для 2%-ных растворов хитозана ($M_v = 8.3 \cdot 10^4$), степень деацетилирования 82% в водных растворах: CH_3COOH 0.75 – (1), 5 – (2), 4 мас. % – (3); HCl 0.1 – (4), 0.2 – (5), 0.3 н – (6). $T = 21^\circ \text{C}$ [44]

Следствием деструкции является снижение степени структурирования раствора и его вязкости, резкое в первые несколько суток и замедляющееся в течение более длительного времени (рисунок 13). Непродолжительное выдерживание уксуснокислых растворов хитозана можно использовать для снижения их вязкости и облегчения их переработки без существенного снижения молекулярной массы полимера и без ухудшения прочностных свойств пленок, гранул и других изделий из него.

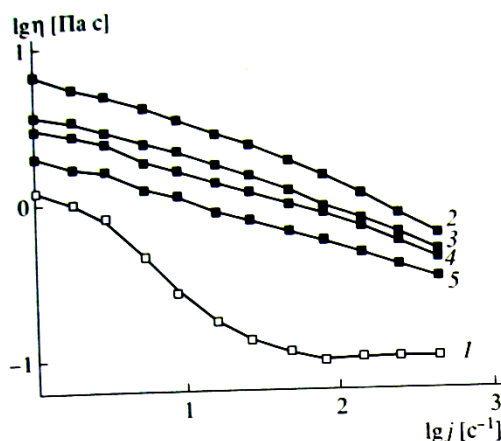


Рисунок 13 – Реологические кривые 2%-ых растворов хитозана с молекулярной массой 180 (1) и 400 кДа (2-5), выдержанных 1 (1, 2), 4 (3), 7 (4) и 10 суток (5) [37]

Однако авторы [48] считают, что неустойчивость разбавленных растворов хитозана во времени, выражающаяся в снижении их вязкости, обусловлена, главным образом, блочным строением полимера. Последнее может способствовать компактизации (сегрегации) макромолекул хитозана в растворе за счет образования внутримолекулярных водородных связей, в результате чего наблюдается понижение вязкости его растворов. Тот факт, что рассматриваемый эффект обусловлен структурной перестройкой и не связан с процессом деструкции подтверждается неизменностью в течение длительного времени вязкостных свойств растворов хитозана в присутствии соединений, изменяющих интенсивность водородных связей (мочевина, дихлоруксусная кислота).

На кривых течения растворов хитозана практически нет областей наибольшей и наименьшей ньютоновской вязкости. Для реологического поведения растворов хитозана характерно псевдопластичное течение, при котором падение вязкости происходит уже при малых напряжениях сдвига. Это обусловлено разрушением различных по устойчивости ассоциатов макромолекул хитозана с ацетильными блоками. Стабилизация вязкости растворов хитозана является результатом разрушения внутримолекулярных водородных связей, при этом повышается вязкость системы за счет межцепных контактов в полимере [48, 49].

Кроме указанных факторов, влияющих на свойства растворов хитозана, большое значение имеют природа и состав растворителя, порядок смешения компонентов, а также условия фильтрации и обезвоздушивания раствора. Эти показатели существенно влияют на параметры технологического процесса переработки полимера через раствор, а именно, на скорость испарения растворителя и отверждения полимера.

При переработке концентрированных растворов, структурные и механические особенности пленок определяются однородностью полимера, составом растворителя, концентрацией раствора, толщиной пленки [50]. Увеличение содержания низкомолекулярной фракции в образцах хитозана приводит к значительному снижению прочности пленок. Зависимость деформационно-прочностных характеристик пленок от степени дезацетилирования, а также состава растворителя обусловлена различиями в организации их надмолекулярной структуры и степени кристалличности. При формировании изделий по сухому методу определяющее значение для структуры получаемых материалов имеют два фактора: скорость удаления растворителя на заключительной стадии, где могут возникнуть большие внутренние напряжения, и состав растворяющей смеси. Этим объясняется влияние типа растворителя на проницаемость пленок.

Особо интересен случай фазового распада при неэквивалентном испарении растворителя и не растворителя. При этом процесс частично сходен с отверждением пленки в условиях мокрого (коагуляционного) формования, при котором диффузионные процессы в осадительной ванне, содержащей основание или органический осадитель, приводят к замене растворителя на осадитель. Система с точки зрения фазовых равновесий оказывается неустойчивой, в результате чего происходит ее застудневание и синергетическое отделение жидкой фазы [3].

Поэтому для получения из растворов хитозана пленок, гранул, волокон, отвечающих современным требованиям, необходимо подробно изучать влияние

различных факторов, в том числе состава растворителя, на физико- химические свойства и структурообразование в растворах хитозана.

2.1.6 Электроформование - технология получения нановолокнистых материалов

Среди промышленных методов получения полимерных волокон и волокнистых структур на их основе процесс электроформования занимает особое место, отличаясь аппаратурной простотой и гибкостью технологического процесса [50].

Электроформование (ЭФ) – это процесс, который приводит к формированию нановолокон в результате действия электростатических сил на электрически заряженную струю полимерного раствора или расплава (рисунок 14). Это комплексный процесс, включающий в себя электрогидродинамику слабопроводящих неньютоновских жидкостей и фазовые превращения – испарение растворителя и отвердевание полимерного волокна. В процессе электроформования струя полимерного раствора проходит три стадии – начального прямолинейного стационарного течения, нестабильного движения и окончательного формирования полимерного волокна с его осаждением на подложке [51, 52].

По своему характеру при использовании растворов полимеров этот процесс может быть отнесен к «сухому» методу формования химических волокон. В то же время, его принципиальное отличие заключается в том, что деформация исходного полимерного раствора, последующий перенос отвержденных после испарения растворителя волокон и формирование волокнистого слоя осуществляется исключительно электрическими силами.



Рисунок 14 - Схема получения нановолокон полимеров методом капиллярного электроформования [52]

На процесс электроформования из раствора влияет целый ряд параметров, изменение которых позволяет управлять процессом. Согласно [51], эти параметры могут быть разделены на три группы: определяемые свойствами раствора (молекулярная масса полимера, вязкость, электропроводность, поверхностное натяжение раствора, дипольный момент и диэлектрическая проницаемость), контролируемые параметры (напряжение, расстояние между электродами), и параметры, характеризующие состояние окружающей среды (влажность и скорость воздуха в электроформовочной камере) [53]. Общие зависимости между приложенным напряжением, расстоянием между электродами, диаметром и морфологией нановолокон отсутствуют [54]. Было установлено, что увеличение электропроводности раствора или напряженности заряда ведет к получению более равномерного волокна с меньшим количеством "бусин" [55].

В настоящее время все более широкое распространение находят промышленные установки бесфильтрного электроформования "Nanospider" (Elmarco, Чешская Республика). Этот инновационный принцип получения нановолокон был разработан и запатентован в Техническом университете г. Либерец [54]. Принципиальное отличие данного метода от традиционного

электроформования - отсутствие капилляров, при истечении из которых раствора образуется первичная струя (рисунок 15).



Рисунок 15 - Схема формовочной камеры Nanospider [54]

В аппаратах системы «Nanospider» при увеличении приложенного напряжения образование конусов Тэйлора (начало формирования струй) происходит из раствора полимера на поверхности вращающегося ролика, наполовину погруженного в раствор.

В отличие от капиллярного электроформования вертикальное движение струй и отвержденных нановолокон происходит снизу-вверх. Одновременное образование большого числа нановолокон обеспечивает при приеме их на подложку образование волокнистого слоя, поверхностная плотность которого зависит от скорости перемещения подложки.

Электроформование позволяет получать волокна диаметром от 1,5 нанометров до нескольких микрометров более чем из 200 различных полимеров [56]. Одними из главных достоинств метода являются его простота и относительная дешевизна по сравнению с большинством альтернативных технологий производства одномерных нанообъектов, а также то, что вдоль волокна форма его поперечного сечения меняется незначительно [57].

Методом электроформования могут быть переработаны как проводящие, так и диэлектрические растворы полимера [58]. С помощью коаксиального электроформования могут быть получены композиционные и полые нановолокна,

в том числе нановолокна, содержащие жидкости [59-61]. С помощью модифицирования удалось получить также непрерывные углеродные и керамические нановолокна [59, 61-63].

Чрезвычайно разнообразны области практического применения микро- и нановолокон, полученных методом электроформования – фильтры различного назначения, нанокомпозиты, биомедицинские материалы – клеточные каркасы и системы транспортировки лекарственных средств и т.д. [56].

2.1.7 Особенности получения нановолокон на основе хитозана методом электроформования

Протонирование хитозана в кислотных растворах, обусловленное его полиэлектролитной природой, приводит к возникновению в сильном электрическом поле при электроформовании сил отталкивания между ионизированными группами полимерных цепей, которые ограничивают образование непрерывных волокон и приводят к каплеобразованию [64]. Это осложняет определение параметров технологического процесса получения нановолокон на основе чистого хитозана.

Информация, посвященная процессу ЭФ нановолокон хитозана, в настоящее время очень обширна [38-41, 65-76]. В работах [69,72] рассмотрена возможность получения хитозановых НВ из уксуснокислотных растворов полимера и показано, что наиболее приемлемым растворителем является уксусная кислота (УК) с концентрацией 80-90%. При снижении концентрации УК до 70% диаметр НВ увеличивается со 140 до 285 нм [72].

В работе [77] показана возможность формования нановолокнистого материала на основе хитозана с использованием в качестве растворителя трифторуксусной кислоты (ТФК). При взаимодействии аминогрупп хитозана с ТФК происходит образование солей [78], что уменьшает межмолекулярное взаимодействие и тем самым облегчает процесс электроформования.

Важнейшим фактором, определяющим диаметр волокон, получаемых методом электроформования, и их морфологию, являются реологические свойства раствора (регулируемые путем изменения концентрации полимера). Отношения между вязкостью полимера и /или концентрацией полимера при получении волокон методом электроформования изучались для различных систем [79].

При получении хитозановых волокон увеличение концентрации хитозана в растворе ведет к изменению морфологии осажденного на подложку полимера от каплевидных частиц к волокнистой сетке [38]. Добавление дихлорметана (ДХМ) к раствору хитозана в ТФК улучшает однородность хитозановых нановолокон, не оказывая влияния на развитость волокнистой структуры. Оптимизация условий формования волокон хитозана из смесей данных растворителей позволила получить волокна диаметром 330 нм [80]. В работе [81] показано, что диаметр волокна и концентрация полимера в растворе имеют обратную связь.

Поверхностное натяжение – еще один из факторов, определяющих стабильность процесса ЭФ. Поскольку с повышением концентрации УК поверхностное натяжение растворов снижается (рисунок 16), это в сочетании с возрастанием плотности зарядов на макромолекуле хитозана способствует формированию струй [69]. Только при концентрации УК более 70% волокнообразование преобладает над процессом каплеобразования (рисунок 17) [41].

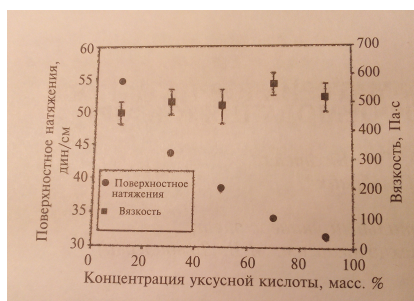


Рисунок 16- Влияние концентрации УК на поверхностное натяжение и вязкость 7%-ных растворов хитозана (ММ 106 кДа) [38, 69]

Получаемые нановолокнистые материалы на основе хитозана являются водорастворимыми из-за наличия в полимерных цепях аминогрупп в солевой форме. Традиционная нейтрализация с использованием водного щелочного раствора способна только частично перевести хитозан в нерастворимое состояние. В работе [41] была использована нейтрализация хитозанового нановолокнистого материала с использованием избыточного количества насыщенного раствора Na_2CO_3 . Полученные нановолокнистые материалы после нейтрализации были способны сохранять свою волокнистую структуру даже после выдерживания в физиологическом растворе ($\text{pH} = 7,4$) в течение 12 недель.

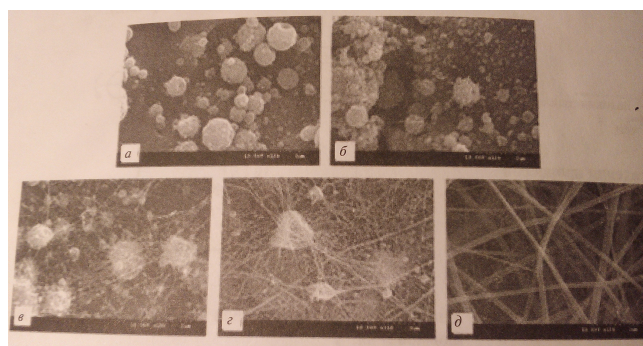


Рисунок 17 - Микрофотографии хитозановых волокон, сформированных при напряженности 4 кВ/см, конц. хитозана 7% и концентрация кислоты 10 (а), 30 (б), 50 (в), 70 (г), 90 (д) [38, 41]

Большое влияние на процесс ЭФ оказывают молекулярная масса (ММ) полимера и напряжение электрического поля. Существующая проблема высокой вязкости растворов хитозана, препятствующая получению нановолокон заданного диаметра, в большинстве случаев решается путем применения щелочного или кислотного гидролиза для уменьшения молекулярной массы (ММ) [82]. Выдерживание хитозана в водных 70-90%-ных уксуснокислотных растворах позволяет получить нановолокнистый материал, при этом уменьшение концентрации уксусной кислоты в гидролизующем растворе увеличивает средний диаметр волокон, а оптимальным является гидролиз хитозана в 90%-ной уксусной кислоте в течение 48 часов [38].

Точный диапазон ММ, напряжения электрического поля и его значения, при которых получается равномерное НВ, не найдены. Согласно [69, 83], ММ должна составлять около 100 кДа, около 300 [72] или около 200 кДа [83]; напряжение электрического поля 3-4.5 кВ/см [41] (рисунок 18), а согласно [72] - 17 кВ. Описано также [84] получение равномерного нановолокнистого материала из хитозана с ММ 1310, 1580 и 1800 кДа.

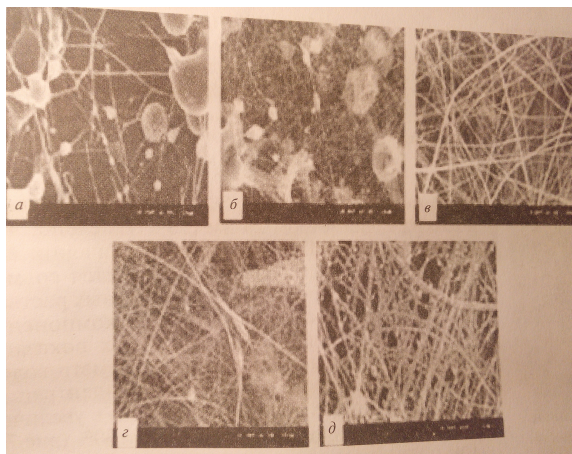


Рисунок 18 - Микрофотографии волокон, сформованных при 4 кВ/см из растворов хитозана с различной ММ в 90%-ной УК, полученные при увеличении 5000 (а-г) и 30000 (д) [38, 41]

Учитывая, что хитозан – жесткоцепной полимер, образующий высоковязкие растворы, трудно перерабатываемые в нити и волокна, в формовочные растворы часто вводят гибкоцепной ПЭО [80, 85-88] или ПВС [38, 55, 70, 89-90] в количестве от 5 до 90% (масс.). Показана возможность формирования нановолокон и из смешанных растворов хитозана с другими полимерами как природными – коллагеном [91], агарозой [73], целлюлозой [92], так и синтетическими – поликапроамидом [93] (рисунок 19).

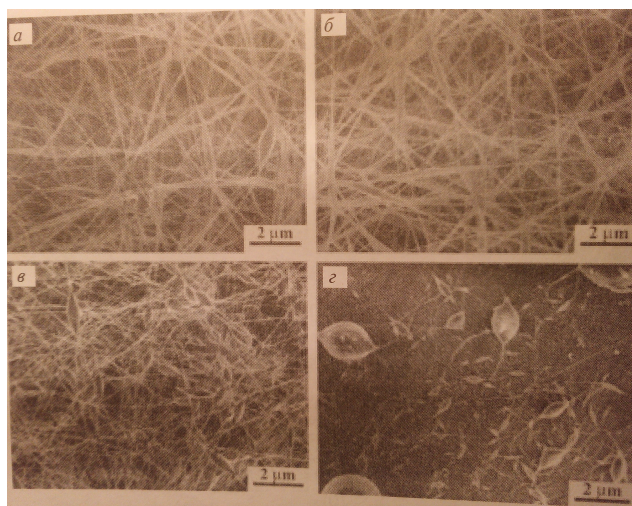


Рисунок 19 - Бикомпонентные нановолокна, сформованные из 6- (а,б), 4- (в) и 3%-ных (г) растворов с массовым соотношением хитозан /ПВС 11/89 (а), 17/83 (б), 25/75 (в) и 50/50 (г) [38, 55, 70, 89, 90, 41]

ПВС-хитозановые нановолокна диаметром 20 нм были получены из 3%-ных растворов в 2%-ной УК смеси хитозана с ПВС [70, 38]. Отмечено, что при снижении ММ хитозана и увеличении его степени дезацетилирования повышается совместимость полимеров в уксуснокислотных растворах и однородность получаемых бикомпонентных волокон. В этих работах показано влияние на морфологию и диаметр волокон соотношения ПВС/хитозан и концентрации раствора: волокна с меньшей дефектностью получаются при увеличении содержания ПВС до 90%, диаметр волокон снижается с увеличением содержания хитозана в смеси до 30% (рисунок 20). При большем содержании хитозана формирование непрерывных волокон не происходит.

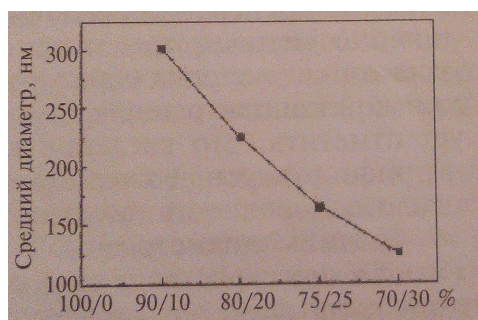


Рисунок 20 – Зависимость диаметра нановолокон от соотношения ПВС: хитозан [70, 38, 41].

Смешанные хитозано-агарозные волокна были сформованы из растворов в смешанном растворителе трифторуксусная кислота-дихлорметан [73]. Показано, что с увеличением содержания агарозы от нуля до 70% вязкость растворов снижается с 1358 до 2 сПз, а средний диаметр волокна уменьшается с 1760 до 140 нм (рисунок 21).

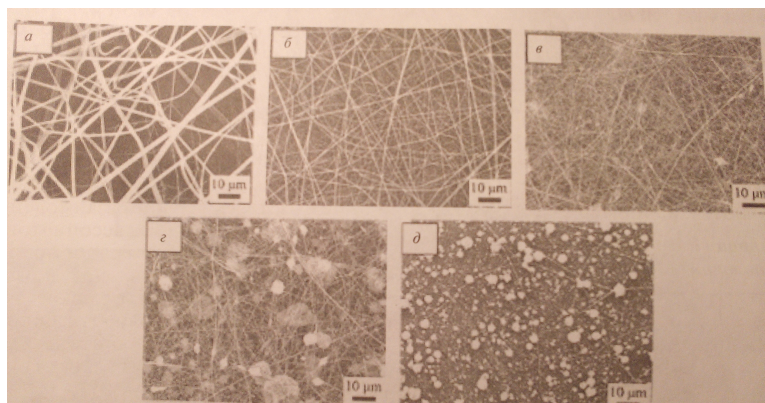


Рисунок 21 -. Микрофотографии хитозановых (а), хитозан/агарозных волокон (б-г), содержащих 30, 50 и 70% агарозы соответственно, и волокон из агарозы (д) [38, 73, 41]

Наиболее хорошо изучен и востребован для ЭФ, в том числе для облегчения формования трудно перерабатываемых в волокно полимеров – коллагена [94], альгината [95] и хитозана [39, 40, 96-98], водорастворимый биосовместимый ПЭО. Используемые в работе [96] высокомолекулярные образцы ПЭО (ММ 850 и 5000 кДа) образуют высоковязкие растворы, поэтому введение их даже в малых количествах значительно увеличивает вязкость хитозановых растворов (рисунок 22) и способствует образованию прочной сетки зацепления между молекулами этих двух полимеров.

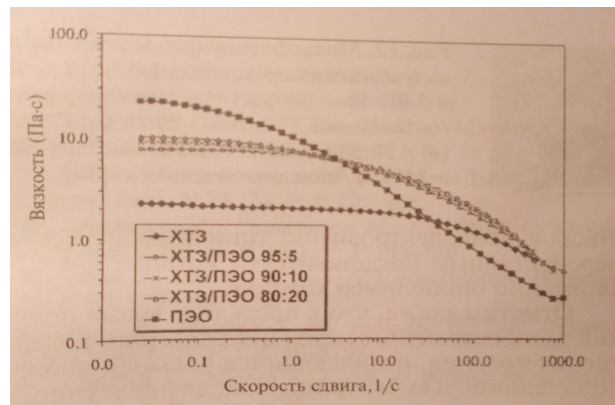


Рисунок 22- Зависимость вязкости растворов с различным соотношением ХТЗ-ПЭО от скорости сдвига [38, 96, 41]

Смешанные ХТЗ-ПЭО волокна формовали из 3%-ных растворов полимеров в УК и диметилсульфоксиде (10:1). Волокна с добавками ПЭО (ММ 5000 кДа) в количестве 20, 10 и 5% имели средний диаметр 102 ± 18 , 138 ± 15 и 114 ± 19 нм соответственно. При этом корреляция между размерами волокна и количеством добавки ПЭО отсутствовала [96]. Полученные НВ характеризовались морфологической однородностью (рисунок 23), в то время как при использовании ПЭО с ММ 850 кДа было получено неоднородное волокно с дефектами в виде бусинок (рисунок 23 а). Однако в [40, 97] описана возможность получения ПЭО-хитозановых нановолокон с использованием ПЭО с ММ 900 кДа и даже более низкомолекулярного – с ММ 300 кДа. В [97] показано существенное влияние на процесс ЭФ степени дезацетилирования хитозана, приведены данные о влиянии продолжительности выдерживания смешанных формовочных растворов на стабильность формования и диаметр волокон. Для предотвращения фазового разделения при ЭФ предложено в растворы хитозана и ПЭО вводить NaCl. Была отмечена [98] возможность упрочнения ПЭО-хитозанового нановолокнистого материала путем сшивки его глутаровым альдегидом.

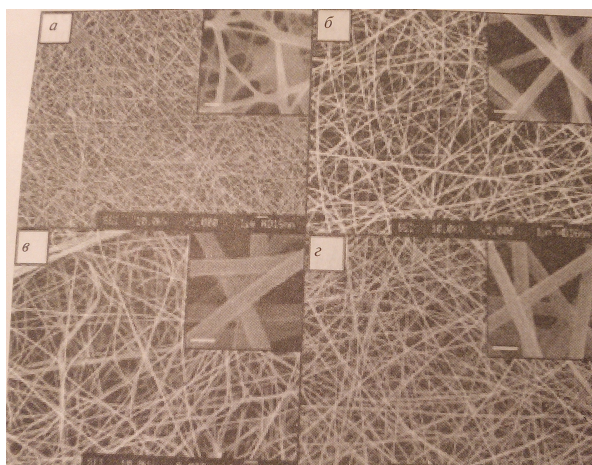


Рисунок 23 - Нановолокна с соотношением ХТЗ: ПЭО 80:20 (а, б), 90:10 (в) и 95:5 (г). ММ ПЭО 850 (а) и 5000 кДа (б, в, г) [38, 96, 41]

Сравнительные исследования закономерностей ЭФ хитозановых и ПЭО-хитозановых волокон показали [38, 40], что изменение в широких пределах ММ хитозана (1400-20 кДа), типа растворителя (10-90%-ная УК. 0.03-0.5 н. HCl и 50%-ная трифторуксусная кислота) и концентрации раствора (0.6-6%) не позволяет получать бездефектные хитозановые НВ. Вместе с тем добавка уже 10% ПЭО делает процесс возможным, и с увеличением содержания этого компонента в формовочном растворе повышается стабильность процесса и диаметр волокон (рисунок 24). Но и в случае смешанных растворов использование растворов высокомолекулярного хитозана с концентрацией менее 1 % приводит к электрораспылению, а более 2% — к слишком большой вязкости. Для низкомолекулярного хитозана оптимальным интервалом концентрации является 4-5%.

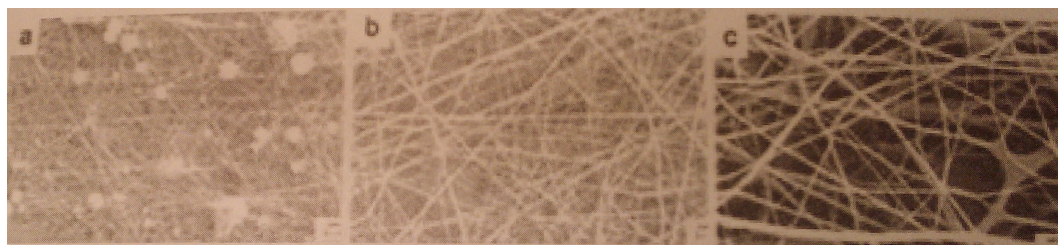


Рисунок 24 - Микрофотографии нановолокон, полученных из смешанных 1.3(а), 1.6(б) и 2.0%-ных (в) растворов при масс. соотношении ХТЗ-ПЭО 90:10 (а), 75:25(б) и 50:50 (в). ММ ПЭО и хитозана 900 и 1400 кДа соответственно [38, 40, 41]

2.1.8 Биологическая активность низкомолекулярного хитозана и материалов на его основе

Заживление ран представляет собой сложную запрограммированную последовательность клеточных и молекулярных процессов, включающих воспаление, миграцию клеток, регенерацию тканей, отложение коллагена и повторную эпителизацию, в регулировании которых участвуют перевязочные материалы.

Хитозан благодаря биосовместимости [99, 100], способности к разложению микроорганизмами [101], кровоостанавливающей способности [102, 103], антимикробной активности [104, 105], ранозаживляющей способности [106-108] является перспективным компонентом раневых покрытий нового поколения. N-ацетилглюкозамин – элементарное звено хитина и – при неполном дезацетилировании - хитозана является одним из основных компонентов кожной ткани и имеет важное значение для ее заживления [109]. Его положительный заряд на поверхности позволяет эффективно поддерживать рост клеток [110] и способствует свертываемости крови [111].

К настоящему времени установлено, что хитозан, различные продукты его химических превращений и материалы на его основе оказывают разнонаправленное влияние на механизмы регулирования клеточного и гуморального иммунного ответа, повышают эффективность доставки и лечебного действия различных препаратов, обладают гипополипидемической, гипополихолестеринемической, гепатопротекторной, антитоксической, радиопротекторной, иммуностимулирующей, антиоксидантной, антибактериальной, противовирусной активностями, они также регулируют кислотность желудочного сока, обладают противоязвенным действием, нормализуют микрофлору кишечника [112].

Эти соединения – как сам хитозан, так и его производные -представляют значительный интерес в качестве препаратов для профилактики и лечения заболеваний, вызванных различными нарушениями иммунной системы, острыми

или хроническими воспалительными процессами в организме [113].

Однако некоторые физико-химические свойства хитозана, такие, как нерастворимость и высокая вязкость нейтральных и щелочных водных растворов, плохая всасываемость из желудочно-кишечного тракта ограничивают его применение в медицине, что диктует необходимость поиска производных хитозана, лишенных этих недостатков [114]. До конца невыясненной остаётся взаимосвязь между химическим строением хитозана и эффективностью его воздействия на клетки микроорганизмов [115]. Установление подобной взаимосвязи осложняется тем, что препараты хитозана отличаются по молекулярной массе и полидисперсности, степени ацетилирования, расположению ацетилированных звеньев вдоль полимерной цепи, вязкости, значению pK_a [116, 117].

Биоцидная активность хитозана определяется, в первую очередь, его аминогруппами, положительный заряд которых обуславливает связывание полимера с поверхностными структурами клеток микроорганизмов. Поскольку положительный заряд аминогрупп определяется уровнем pH среды, то максимальную антибактериальную активность хитозан проявляет в кислой среде, а увеличение степени дезацетилирования хитозана усиливает его антибактериальную активность [118].

Показано, что биологическая активность хитозана непосредственно зависит от особенностей его строения, в частности, от молекулярной массы [119, 120]. Наиболее перспективными являются хитозаны низкой молекулярной массы и хитоолигосахариды, получаемые химической или ферментативной деструкцией исходного продукта. Низкомолекулярный хитозан обладает мощным липотропным действием – способностью связывать жиры, что является важнейшим фактором предупреждения атеросклероза и ожирения. Еще одно его важное качество – способность связывать радионуклиды, тяжелые металлы и токсины, а также нарушать целостность наружной оболочки болезнетворных

микроорганизмов и бактерий, что существенно снижает риск их развития в организме [119, 121]. Показано, что низкомолекулярный хитозан (25-50 кДа) проявляет гастропротекторную активность, носящую дозозависимый характер [122, 123].

Сведения о влиянии молекулярной массы хитозана на его антимикробное действие остаются противоречивыми. Возможно, это связано с тем, что молекулы полимера, сильно различающиеся по степени полимеризации, имеют различные рН оптимумы для проявления максимальной антибактериальной активности. Так, высокомолекулярный хитозан обладает наибольшим антибактериальным эффектом в кислой среде, поскольку при значениях рН выше 6,0-6,5 его аминогруппы теряют заряд и полимер выпадает в осадок. В меньшей степени теряют эффективность антимикробного действия в среде с близким к нейтральному значению рН хитозаны с невысокой степенью полимеризации – так называемые низкомолекулярные водорастворимые хитозаны с молекулярной массой от 2 до 50 кДа. Полидисперсность по молекулярной массе оказывает влияние на биологическую активность хитозана, которая может определяться минорной долей молекул с молекулярной массой, значительно отличающейся от средней для данного образца величины [120].

В работе [124] было показано, что фракции хитозана с молекулярной массой 0-5, 5-10, 10-20 кДа обладают значительно меньшей (в 2-3 раза) токсичностью, чем более высокомолекулярные фракции (с ММ от 20 кДа и более). Было установлено, что низкомолекулярный хитозан (ММ 5-10 кДа) обладает профилактическим и лечебным эффектом при гамма-облучении, оказывает защитное действие при химическом поражении стенки толстой кишки [123].

Установленные факты антимикробной и антиоксидантной эффективности хитозана в пищевых средах позволяют использовать его для защиты продукции, выделяя его в сравнении с другими консервантами преимуществом подавлять условно патогенную микрофлору, не повреждая нормальный биоценоз [125, 126].

Для повышения эффективности биологического действия медицинских материалов на основе хитозана и направленного регулирования транспорта лекарств из шовных нитей, перевязочных и имплантируемых материалов используется принцип иммобилизации в структуре материала низкомолекулярных биологически активных соединений различных типов.

В качестве биологически активных компонентов, иммобилизованных в структуре нановолокнистых материалов, полученных методом электроформования, используют различные антибактериальные вещества: лизоцим, доксирубицин, гепарин [127-131]. Нановолокнистые материалы на основе хитозана, содержащие иммобилизованные биологически активные вещества, широко используют в тканевой инженерии, в качестве каркасов для искусственной кожи [132-133].

Одним из активно используемых в медицинской практике антибактериальных препаратов является мирамистин, первоначально предназначавшийся в качестве средства индивидуальной гигиены космонавтов на орбитальных станциях.

Мирамистин обладает выраженным антимикробным действием в отношении грамположительных и грамотрицательных, аэробных и анаэробных, спорообразующих и аспорогенных бактерий, оказывает противогрибковое действие на дрожжеподобные грибы, дерматофиты, аскомицеты и другие патогенные грибы. Под действием мирамистина снижается устойчивость бактерий и грибов к антибиотикам.

Изучение фармакодинамических свойств мирамистина показало, что наряду с антимикробным свойством он стимулирует репаративные процессы и обладает иммуномодулирующим действием. При комбинированном применении, отмечена способность мирамистина замедлять развитие резистентности микроорганизмов к антибиотикам.

Благодаря приведенным свойствам, подтвержденным результатами

многочисленных клинических испытаний в более чем в 20 лечебных центрах России и других стран СНГ, в том числе в Главном военном клиническом госпитале им. Н.Н. Бурденко, Центральном НИИ травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, НИИ хирургии им. А.В. Вишневского РАМН, Центральном научно-исследовательском кожно-венерологическом институте МЗ РФ, Медицинском центре Управления делами Президента РФ, Центральном госпитале МВД РФ, мирамистин внедрён в медицинскую практику в качестве антисептика широкого спектра действия [134].

Широкий спектр действия, устойчивость в системах с различным значением pH делают целесообразным изучение возможности иммобилизации мирамистина в материалах на основе низкомолекулярного хитозана.

2.2. Методический раздел

2.2.1 Характеристика сырья и реактивов

В работе были использованы следующее сырье и реактивы:

1. Хитозан: молекулярная масса 190 кДа (Х-190); размер частиц 0,3 мм (80 меш); растворимость 100%; степень дезацетилирования $0,86 \pm 0,01$; влажность 9% (Китай).
2. Поливиниловый спирт: молекулярная масса 140 кДа, степень омыления 99-99,8 %, размер частиц 1-3 мм, влажность 4,5 %.
3. Уксусная кислота «ХЧ» ГОСТ 61-75.
4. Вода дистиллированная ГОСТ 24902-81.
5. Этиловый спирт, 96%, $T_{\text{кип}} = 78,4^{\circ}\text{C}$, ПДК = 1000 мг/м³
6. Серная кислота «ХЧ» ГОСТ 4204-77.
7. Гидроксид натрия «Ч» ГОСТ 2263-79.
8. Ацетон «ХЧ» ГОСТ 2603-79.
9. Олигоэтиленсульфонат натрия «Огсафол» - водный раствор с $C=60$ г/л.
10. Ацетат натрия «Ч» ГОСТ 199-78.

2.2.2 Проведение кислотно-каталитической деструкции хитозана

Гомогенный кислотно-каталитический гидролиз

Кислотный гидролиз проводили в колбе с обратным холодильником, снабжённой лопастной мешалкой на песчаной бане. Процесс гидролиза включал следующие стадии: набухание хитозана в воде при температуре 22-25°C с последующим добавлением кислоты, нагрев смеси до заданной температуры при постоянном перемешивании, гомогенный гидролиз в заданных условиях, осаждение хитозана щелочным раствором, промывка осадка дистиллированной

водой до нейтральной среды, промывка спиртом, промывка ацетоном, сушка и измельчение.

Гетерогенный кислотно-каталитический этанолиз

Кислотный этанолиз проводили в колбе с обратным холодильником, снабжённой лопастной мешалкой на песчаной бане. Процесс этанолиза включал следующие стадии: набухание хитозана в спирте при температуре 22-25°C с последующим добавлением кислоты, нагрев смеси до заданной температуры при постоянном перемешивании, гетерогенный этанолиз в заданных условиях, обработка хитозана щелочным раствором, промывка хитозана дистиллированной водой до нейтральной среды, промывка спиртом, промывка ацетоном, сушка и измельчение.

2.2.3 Приготовление формовочного раствора

Приготовление формовочных растворов хитозана, ПВС и их смесей включало проведение следующих операций: набухание хитозана в воде с последующим добавлением УК и доведением системы до полного растворения, либо набухание хитозана в растворе УК с последующим добавлением раствора ацетата натрия, растворение ПВС в воде при температуре 100 °C, смешение растворов хитозана и ПВС в необходимых соотношениях. Расчет навески полимеров проводили, исходя из определенного объема и концентрации раствора с учетом их влажности.

После растворения хитозана в раствор вводили остывший раствор ПВС при постоянном перемешивании для гомогенизации раствора. Перед анализом и формованием раствор выдерживали при комнатной температуре в течение 20 - 24 часов для обезвоздушивания и стабилизации.

2.2.4 Формование пленок

Формование пленок проводили в чашках Петри путем испарения растворителя при комнатной температуре.

Массу формовочного раствора, необходимого для получения пленки с заданной толщиной ($h = 10^{-2}$ см) рассчитывали по формуле:

$$m = \frac{S * h * \rho}{C} \quad (1)$$

где m -масса формовочного раствора, г

S - площадь подложки, см²

ρ -плотность полимера, г/см³

C -концентрация раствора полимера, г/г

В чашку Петри наливали рассчитанную массу формовочного раствора. Пленки получали путем испарения растворителя. Чашку Петри оставляли на воздухе до полного испарения растворителя (до постоянной массы).

2.2.5 Формование нановолокон на установке Nanospider

Электроформование проводили на лабораторной установке Nanospider - NS LAB 200S (фирма Elmarco, Чехия), предназначенной для исследования процесса бескапиллярного электроформования из растворов полимеров и получения образцов нановолокнистых нетканых материалов. Во время выполнения операции электроформования установка становится закрытой системой, она обеспечена защитными компонентами для предотвращения несанкционированного доступа в область формования (рисунок 25).



Рис. 25 - Установка для производства нановолокон Nanospider

В отличие от традиционного способа подачи раствора через сопло (форсунку), формовочная головка Nanospider выглядит как цилиндр, и частично погружена в раствор полимера.

При вращении цилиндра полимерный раствор распределяется на нём тонким слоем, из которого вверх вытягиваются струи раствора волокна, и далее под действием электрического поля растягиваются и отверждаются за счет испарения растворителя до наноразмеров. Образующиеся волокна (нити) осаждаются на перемещающуюся полосу ткани, используемую в качестве подложки для создания тонкого непрерывного слоя нановолокон. Распределение нановолокнистого слоя по поверхности подложки происходит за счёт протягивания подложки цилиндрами, расположенными над прядильной камерой.

Высокое напряжение на прядильном элементе создается с помощью источника высокого напряжения, максимальное значение которого достигает 80 кВ. Максимальный ток (на источнике) – 1,87 мА.

Минимальное расстояние между волокнообразующим и собирательным электродом составляет 100 мм, максимальное - 190 мм.

Цилиндрический или струнный в зависимости от используемого раствора волокнообразующий электрод изготовлен из нержавеющей стали (скорость вращения составляет 1-16 об/мин). Заполняющий объем ванночки составляет от 180 до 220 мл для цилиндрического электрода и от 200 до 240 – для струнного.

Испаряющийся растворитель удаляется из короба приточно-вытяжной вентиляцией.

Оптимальные величины основных параметров волокнообразующих растворов следующие:

- поверхностное натяжение 0.05 Н/м;
- динамическая вязкость в интервале 4-5 Па·с
- концентрация полимеров в растворе 40%-ной уксусной кислоты – 6% (3% хитозана с ММ 25 кДа, 3% ПВС)

Оптимальные условия формирования нановолокон на установке следующие:

- напряжение на электродах 45-50 кВ.
- межэлектродное расстояние 170 мм.
- скорость вращения струнного электрода 7-10 об/мин.
- скорость перемещения принимающей подложки 200-250 мм/мин.

При эксплуатации установки «Nanospider» влажность воздуха должна быть в пределах 20-40 %, температура 18-30°C.

2.2.6 Определение молекулярной массы хитозана вискозиметрическим методом

Молекулярную массу определяли вискозиметрическим методом с использованием в качестве растворителя 0.2 М раствора ацетата натрия в 2 %-ной уксусной кислоте (для хитозана) и воды (для ПВС) в капиллярном вискозиметре Убеллоде с диаметром капилляра 0.54 мм.

На основании полученных данных строили графики концентрационной зависимости приведённой вязкости растворов $\eta_{\text{прив}} = f(C)$, по которым путём экстраполяции к нулевой концентрации находили значения характеристической вязкости. Приведенную вязкость рассчитывали, используя формулы 2-4.

$$\eta_{\text{отн}} = \frac{\tau_{p-pa}}{\tau_{p-ля}} \quad (2);$$

$$\eta_{\text{уд}} = \eta_{\text{отн}} - 1 \quad (3);$$

$$\eta_{\text{прив}} = \eta_{\text{уд}} / C \quad (4);$$

$[\eta] = 1,38 \cdot 10^{-4} \text{ М}^{0,85}$ - для хитозана, $t=25^\circ\text{C}$ [135];

$[\eta] = 5,95 \cdot 10^{-4} \text{ М}^{0,63}$ - для ПВС, растворитель вода, $t=25^\circ\text{C}$ [136];

Проводили несколько параллельных измерений, расхождение между которыми не превышало 3 %. За окончательный результат принимали среднее арифметическое.

2.2.7 Исследование реологических характеристик растворов

Вязкость растворов определяли в ротационном вискозиметре Rheotest – 2.0 в ячейке цилиндр-цилиндр при заданной температуре. Ротационный вискозиметр Rheotest – 2.0 (рисунок 9) состоит из двух основных узлов: из вискозиметра /1/ и

блока измерений /2/. Включение прибора производят нажатием кнопки /16/.

Порядок работы:

1. Закрепляют внутренний цилиндр /8/ на валу прибора /6/ (до щелчка).
2. Раствор полимера (в соответствии с выбранным цилиндром $S_1=25$ г, $S_2=30$ г) заливают во внешний цилиндр ячейки /9/ и укрепляют его с помощью закрепляющего устройства /11, 12/ поворотом последнего по часовой стрелке.
3. Аналогичным способом, используя кольцо /14/ и рычаг /15/, закрепляют термостатирующую рубашку /10/ и проверяют подачу в нее воды и работу термостата.
4. После термостатирования ячейки в течение 15 минут приступают к замерам показаний прибора (α) /18/ переходя последовательно от положения рычага /3/ 1, 2 (низкие скорости вращения внутри цилиндра) к 11,12 (высокие скорости). Показания прибора α снимают после 1- 2 минут работы прибора при данной скорости, нажимая кнопку /17/ и дождавшись установившегося отклонения стрелки. При необходимости (нажатие кнопки /17/) повторяют 3 – 4 раза. При зашкаливании стрелки в режиме I переходят в режим работы II /7/, при этом показания α необходимо умножить на 10.

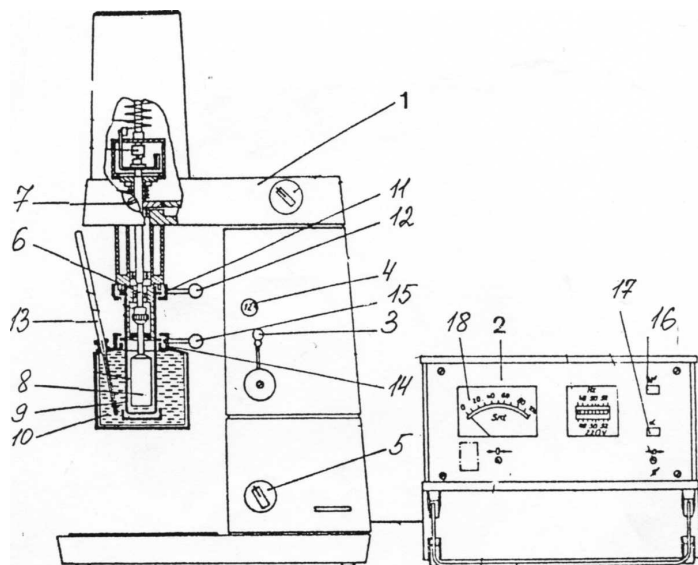


Рис. 26 – Схема прибора Rheotest – 2.0

1 - вискозиметр, 2 - блок измерений, 3 - рычаг переключения коробки передач, 4 - шкала числа оборотов, 5 - переключатель числа оборотов, 6 - измерительный вал (а—b), 7 - переключатель диапазона (I—II), 8 - внутренний цилиндр, 9 - внешний цилиндр, 10 - термостатирующая баня, 11, 14 - натяжное кольцо, 12, 15 - натяжной рычаг, 13 - термометр, 16 - выключатель (двигателя), 17 - выключатель (измерительного механизма), 18 - индикаторный прибор.

Расчет напряжения сдвига и вязкости проводят по формулам:

$$\tau = K \cdot \alpha, \quad (5);$$

$$\eta = \tau / j \quad (6)$$

где τ - напряжение сдвига, Па; K- постоянная цилиндра ($K_{S1}=0.588$, $K_{S2}=0.615$), Па/дел; α -показание прибора, дел; j-скорость сдвига, η -вязкость, Па·с.

Полученные данные можно представить графически: в виде кривых течения в координатах:

$$\lg \tau = f(\lg j) \quad (7);$$

$$\lg \eta = f(\lg j) \quad (8);$$

$$\lg \eta = f(\lg \tau) \quad (9)$$

Наибольшую неньютоновскую вязкость определяют экстраполяцией к $\tau=0$ или $j=0$.

2.2.8 Изучение поверхности материалов методом атомно-силовой микроскопии

Образцы хитозановых наночастиц и нановолокон исследовали на микроскопе NtegraPrima (NT-MDT). Измерения проводились в полуконтактном режиме работы с использованием зондового датчика CSG01 (размер - 3.4x1.6x0.3mm, радиус кончика иглы 10 нм, жесткость 0,03 Н/м).

2.2.9 Исследование структуры нанокристаллитов хитозана методом ядерного магнитного резонанса [137]

Времена спин-решеточной релаксации протонов воды, сорбированной в полимерных материалах и характеризующих степень упорядоченности их надмолекулярной структуры, определяли на ЯМР-анализаторе "Спин Трек" с резонансной частотой 42 МГц путем снятия кривой восстановления продольной намагниченности ("нуль-метод"). Исследования были проведены в Поволжском государственном технологическом университете на кафедре физики под руководством проф. Ю.Б. Грунина.

2.2.10 УФ – спектрофотометрическое определение скорости выделения мирамистина

Изучение скорости выделения мирамистина из пленок на основе хитозана в физиологический раствор (0,9% NaCl) проводили путем регистрации изменения оптической плотности раствора при длине волны $\lambda=210$ нм на спектрофотометре ThermoSpectronicGenesis 10UV. Определенную навеску пленки заливали физиологическим раствором (0,9% -ным раствором NaCl) и каждые 5 минут отбирали пробу раствора. По калибровочному графику определяли соответствующие концентрации мирамистина и строили зависимость, где C - концентрация биологически-активного вещества, выделившегося из пленки в физиологический раствор к моменту времени τ , C_{∞} - его максимально-возможная концентрация в физиологическом растворе.

2.2.11 Исследование продуктов гидролиза хитозана методом ИК-спектроскопии

Регистрацию спектров проводили на спектрометре Specord-M80 фирмы «Карл Цейсс» с запрессованных в вакууме таблеток, содержащих навеску исследуемого образца в количестве 1 – 2 мг, растертую с 400 – 600 мг KBr. Режим

записи ИК-спектров: область сканирования $4000\text{--}200\text{ см}^{-1}$, время интеграции 1 с, шаг сканирования 8 см^{-1} , ширина щели 8 см^{-1} . Для обработки и представления спектров использовали программу SoftSpectra 5.0. Отнесение полос и идентификация состава анализируемых образцов была выполнена по [138].

2.2.12 Исследование цитотоксичности хитозансодержащих нановолокон*

Для оценки цитотоксичности использовали метод тестирования экстрактов [139]. В качестве модельной использовали линию мышинных фибробластов L929. Клетки вели на питательной среде DMEM с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (FBS) в CO_2 -инкубаторе (содержание CO_2 в газовой среде 5%) при температуре 37°C .

В лунки 96-луночного планшета вносили 100 мкл суспензии клеток с концентрацией 2×10^5 кл/мл. Через 24 часа питательную среду заменяли на 100 мл экстрактов, полученных инкубированием нановолокон в питательной среде (из расчета 1 мл среды на 10 мг образца) без добавления FBS при температуре 37°C в течение 24 часов. В присутствии экстрактов клетки культивировали в течение 24 часов.

Для определения жизнеспособности клеток из лунок удаляли питательную среду, в каждую лунку добавляли по 100 мкл смеси среды DMEM без сыворотки и раствора МТТ (10:1) и инкубировали при температуре 37°C 1 час. Затем удаляли смесь среды с МТТ, добавляли 50 мкл ДМСО, инкубировали 15-20 минут и измеряли поглощение на многоканальном спектрофотометре (Flow Laboratories, США) на длинах волн 540/690 нм.

Цитотоксичность определяли методом МТТ [140]. МТТ-тест основан на способности митохондриальных и цитоплазматических дегидрогеназ клеток восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) с образованием нерастворимых в воде кристаллов формазана, количество которого можно измерять спектрофотометрически. Одной из ключевых особенностей этого

метода является то, что количество формазана прямо пропорционально количеству живых клеток. Раствор МТТ (5 мг/мл) готовили на фосфатном буфере (pH 7,4).

2.2.13 Определение антимикробной активности нановолокнистых материалов на основе хитозана^{}**

Проверка антимикробного действия образцов осуществлялась методом диффузии в агар [141] и в соответствии с Методическими Указаниями по лабораторной оценке антимикробной активности текстильных материалов, содержащих антимикробные препараты МЗ СССР (Москва, 1984 г.) по отношению к грамположительной микрофлоре *Staphylococcus aureus* и к грамотрицательной микрофлоре *Escherichia coli*.

Антимикробную активность образцов определяли по отношению к грамположительной микрофлоре *Staphylococcus aureus* методом диффузии в мясопептонный агар с добавлением 6% NaCl, а *Escherichia coli* только на мясопептонном агаре по зонам ингибирования роста тест-культур микроорганизмов.

* Исследование цитотоксичности проведено в лаборатории микробиологии ИБХ РАН

**Определение антимикробной активности проведено на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ

2.3 Основные результаты и их обсуждение

2.3.1 Исследование процесса кислотно-каталитического гидролиза хитозана [142, 143]

Основным методом получения наночастиц (нанокристаллитов) полисахаридов является их кислотный гидролиз, обеспечивающий снижение в зависимости от различных параметров, таких как природа кислоты, температура, время и т.п., молекулярной массы вплоть до образования олиго- и моносахаридов.

Как показано в литературном обзоре, существует большое количество коммерческих хитозанов, различающихся по молекулярной массе, степени дезацетилирования и степени кристалличности. Для получения нанокристаллитов хитозана необходимо в первую очередь снизить молекулярную массу полимера, однако в условиях жесткой кислотно-каталитической деструкции сложно сохранить изначальную кристаллическую структуру полимера. Таким образом, существует задача нахождения оптимальных параметров гидролиза, которые обеспечили бы эффективное снижение ММ хитозана и в то же время не приводили к разрушению исходной кристаллической структуры полимера.

В качестве исходного материала для исследования процесса гидролиза был использован хитозан с ММ 190 кДа, СД 0,86 и содержанием золы <0,5 %.

Для оценки скорости снижения ММ была исследована кинетика деструкции хитозана в 2-, 5-, 7%-ных растворах уксусной кислоты при 25°C [144]. Согласно полученным данным, снижение ММ происходит монотонно, и в принятых условиях в течение 5 часов ММ снижается на 31%, 39% и 42% соответственно (рисунок 27).

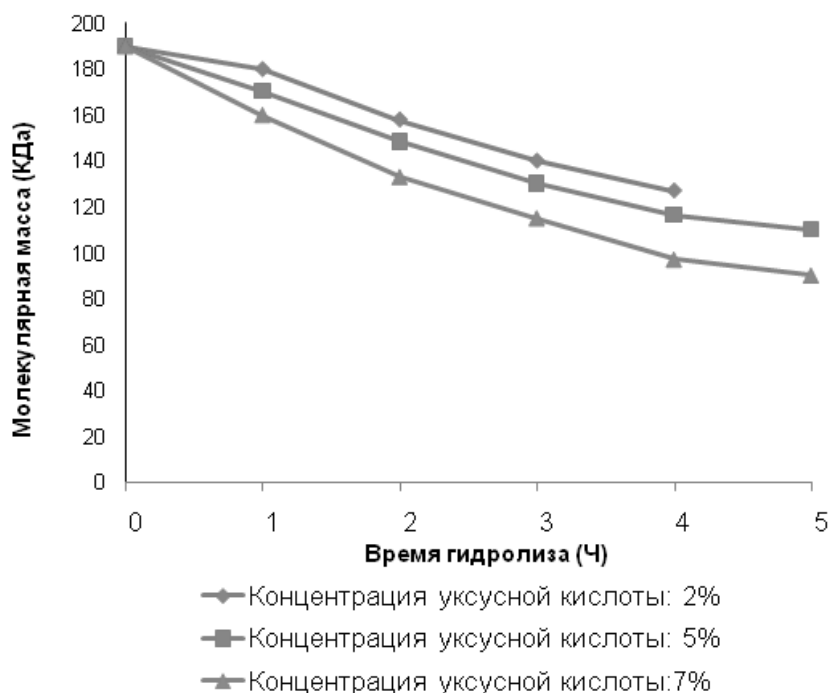


Рисунок 27 - Кинетика деструкции хитозана в уксусной кислоте

Достигнутая при максимальной продолжительности гидролиза хитозана минимальная степень полимеризации, равная 154, превышает величину, характерную для кристаллитов этого полимера [24]. Таким образом, очевидно, что при гидролизе в растворах слабой уксусной кислоты различной концентрации не удастся получить нанокристаллиты хитозана.

В качестве более сильного кислотного катализатора деструкции хитозана была применена серная кислота.

Было установлено, что в концентрационном диапазоне серной кислоты 9-17% при температуре выше 100°C хитозан переходит в раствор, в то время как при других концентрациях (больших или меньших) и температуре ниже 100°C хитозан не растворяется [145].

В литературе отсутствуют данные о возможности растворения хитозана в разбавленных растворах серной кислоты при повышенной температуре. Поэтому представляло интерес исследовать кинетику деструкции при гидролизе хитозана в 17%-ном растворе серной кислоты при температуре 115°C. Гидролиз в этих

условиях в гомогенной среде, не приведя к получению нанокристаллитов, может обеспечить получение низкомолекулярного хитозана с молекулярной массой, аналогичной молекулярной массе кристаллитов хитозана.

Было установлено, что при охлаждении раствора до комнатной температуры происходит осаждение продукта гидролиза хитозана в виде тонкодисперсной фракции. Неожиданной оказалась нерастворимость этого продукта как в буферных растворах, так и в концентрированных кислотах. Возможной причиной этого могло стать формирование сетки межмолекулярных 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 (рис. 3.2), согласно которым в спектре нерастворимого образца хитозана имеются характерные полосы: 1110 см^{-1} соответствующая соединению SO_2^{2-} или $\text{R-SO}_2\text{-R}$ и полоса амид II (1540 см^{-1}), соответствующая ковалентной связи с аминогруппой [138].

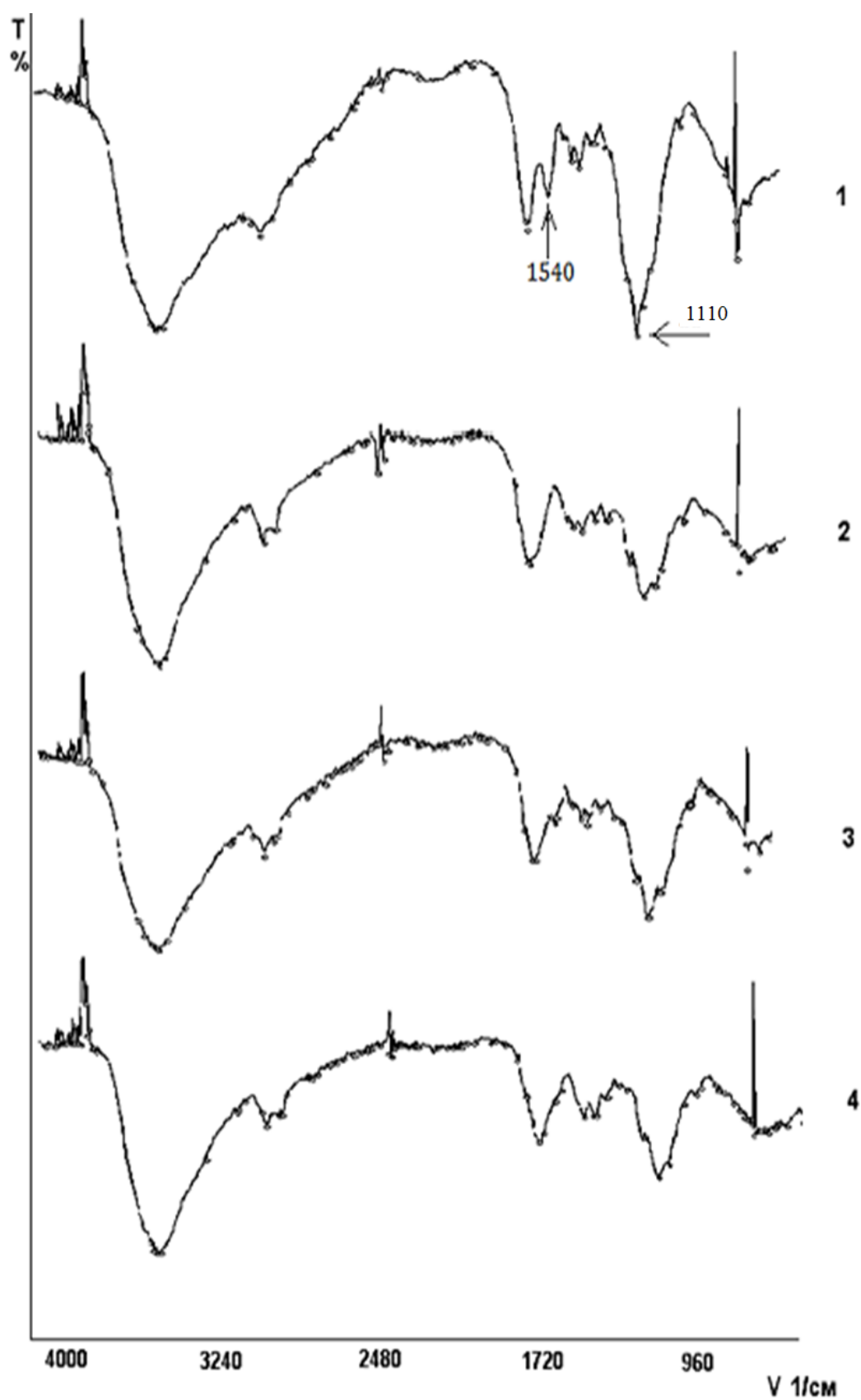


Рисунок 28 - ИК-спектры препаратов хитозана

1 - нерастворимый хитозан; 2 - растворимый хитозан после этанолиза; 3-
растворимый хитозан после гидролиза; 4-исходный хитозан

Растворимые образцы хитозана удалось получить при высаживании хитозана из сернокислого раствора 10%-ным раствором гидроксида натрия с доведением pH до 11, последующей промывке полученных препаратов до нейтральной среды дистиллированной водой, затем спиртом и ацетоном и сушке при комнатной температуре. Именно этот вариант (гидролиз с последующим осаждением щелочным реагентом) позволил исследовать кинетику кислотно-каталитической деструкции хитозана в гомогенной среде.

Согласно [24], получение нанокристаллитов полисахаридов может быть осуществлено при кислотно-каталитической деструкции в гетерогенной среде. В работе в качестве среды для проведения гетерогенной кислотно-каталитической деструкции хитозана был использован 20%-ный раствор серной кислоты в этаноле [146]. 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 29).

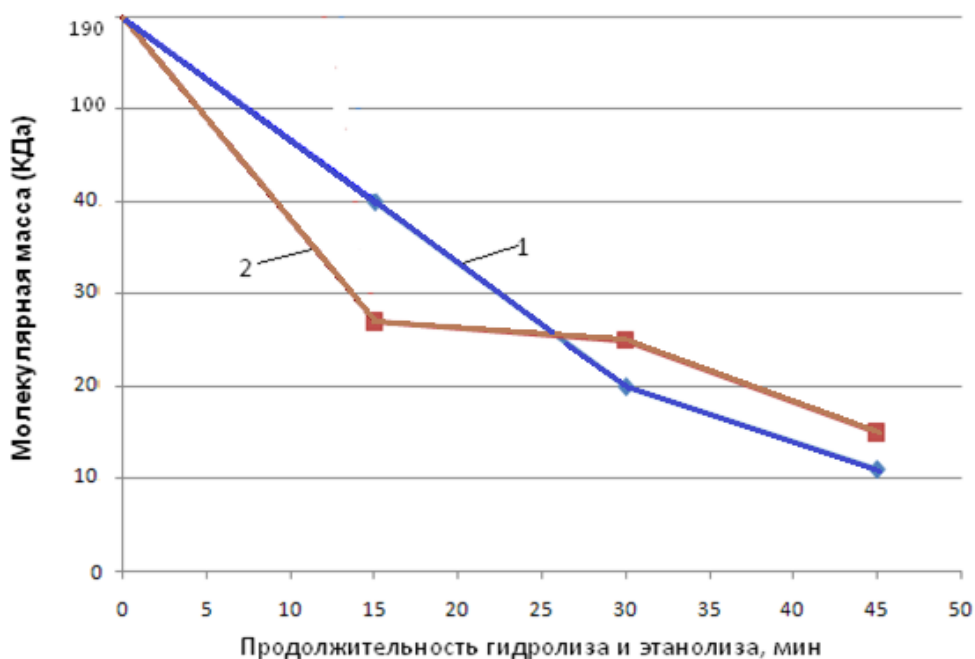


Рисунок 29 - Кинетика деструкции хитозана в условиях гидролиза (1) в 17%-ной H_2SO_4 и этанолиза (2) в 20%-ной H_2SO_4

Расчет константы скорости деструкции, проведенный по уравнению Фрейденберга (10) [24] показал, что различие в величине констант скорости достигает примерно 3,5 - кратного (таблица 1).

$$K = \frac{1}{t} \ln \frac{1 - \frac{m}{M}}{1 - \frac{m}{M_t}}, \quad (10)$$

где M , M_t и m – средняя молекулярная масса исходного хитозана, по истечении времени t и по окончании процесса соответственно.

Было показано (таблица 2), что при гомогенном гидролизе увеличение концентрации хитозана в растворе от 1 до 5% не влияет на скорость его деструкции, что согласуется с данными работы [29].

Таблица 1 - Константы скорости кислотной деструкции целлюлозы и хитозана

Гидролиз целлюлозы в 3%-ной H_2SO_4 [147]	Деструкция целлюлозы кислотой Льюиса $TiCl_4$ в гексане [148]	Гидролиз хитозана в 16,9%-ной H_2SO_4	Этанолиз хитозана в 20%-ной H_2SO_4
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. $2,15 \times 10^{-2}$

Таблица 2 – Зависимость молекулярной массы хитозана от продолжительности гомогенного гидролиза

Время гидролиза	Концентрация хитозана в растворе, %				
	1	2	3	4	5
	Молекулярная масса хитозана				
0	190000	190000	190000	190000	190000
15	27000	30000	32000	31000	29000
30	25000	26000	26000	25500	25000
45	15000	14000	18000	15000	15500

Представляло интерес сопоставление полученных данных о константах скорости деструкции хитозана с приведенными в литературе [26, 147, 148] для гидролиза целлюлозы, отличающейся от хитозана наличием у C(2) гидроксильной группы вместо аминогруппы. Как видно из представленных данных (таблица 1), константы скорости деструкции целлюлозы и хитозана в принятых для него условиях имеют одинаковый порядок. В то же время условия деструкции хитозана гораздо более жесткие (более высокие концентрация кислоты и температура), чем в случае целлюлозы. Это в свою очередь подтверждает мнение авторов работ [30, 149], что наличие в макромолекуле хитозана аминогруппы в альфа-положении к гликозидной связи обуславливает её повышенную устойчивость к действию гидролизующих реагентов кислотного характера.

Кинетические кривые, описывающие деструкцию хитозана при гидролизе и этанолизе, достаточно точно аппроксимируются по методу наименьших квадратов в соответствии с уравнением: $Y=CX^b$, где для гидролиза уравнение имеет вид $y = 15225x^{-1,77}$, а для этанолиза $y = 18197x^{-2,04}$ (рисунок 30).



Рисунок 30 - Кинетические кривые деструкции хитозана в условиях гидролиза (1) и этанолиза (2) и их аналоги, аппроксимированные по уравнениям: для гидролиза $y = 15225x^{-1,77}$, $R^2 = 0,909$ (3) и этанолиза $y = 18197x^{-2,04}$, $R^2 = 0,997$ (4)

Оценка возможности описания полученных кинетических зависимостей уравнением реакции первого порядка (11)

$$s = s_0 \cdot e^{-k\tau} = c_0 (p_0 - 1) \cdot e^{-k\tau} \quad (11)$$

где: s – концентрация гликозидных связей в макромолекуле целлюлозы;

s_0 – концентрация гликозидных связей в начальный момент времени;

p – средняя длина цепи полимера;

p_0 – средняя длина цепи в начальный момент времени;

c – концентрация молекул;

c_0 – концентрация макромолекул в начальный момент времени;

k – константа скорости;

τ – время.

была осуществлена в соответствии с [148].

Так как молекула из p звеньев содержит $(p - 1)$ связь, то общее число связей (s) равно:

$$S = c (p - 1) \quad (12)$$

В начальный момент времени число связей, концентрация полимера и средняя степень полимеризации соответственно равны: s_0 , c_0 , p_0 .

Наибольшее количество «активных» гликозидных связей, способных разорваться в результате деструкции хитозана до предельной СП, равно отношению числа исходных гликозидных связей $(p_0 - 1)$ к числу связей при предельной СП $(p_\infty - 1)$, уменьшенных на единицу:

$$s_0 = (p_0 - 1) / (p_\infty - 1) - 1 \quad (13)$$

или, учитывая большую величину степени полимеризации:

$$s_0 = p_0 / p_\infty - 1 \quad (14)$$

Число разорвавшихся гликозидных связей в любой момент времени τ будет равно:

$$s_\tau = p_0 / p_\tau - 1 \quad (15)$$

Степень превращения (доля прореагировавших «активных» гликозидных связей в любой момент времени) $\alpha = s_\tau / s_0$. Текущая концентрация «активных» гликозидных связей будет равна $C_x = 1 - \alpha$.

$$-\ln (s_\tau / s_0) = f(\tau) \quad (16)$$

При значении предельной СП хитозана, равной наименьшему в серии (86), и начальной СП=1173 соотношение s_τ / s_0 имеет вид:

$$s_{\tau} / s_0 = (1173 / p_{\tau} - 1) / (1173/86 - 1)$$

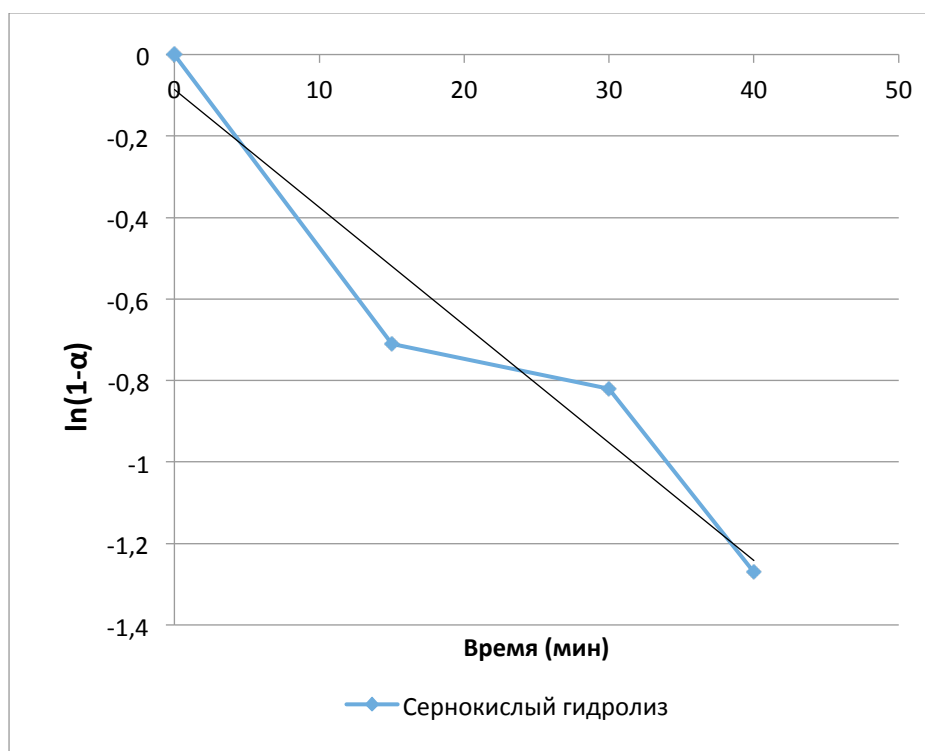
или

$$s_{\tau} / s_0 = (1173 / p_{\tau} - 1) / 12,64$$

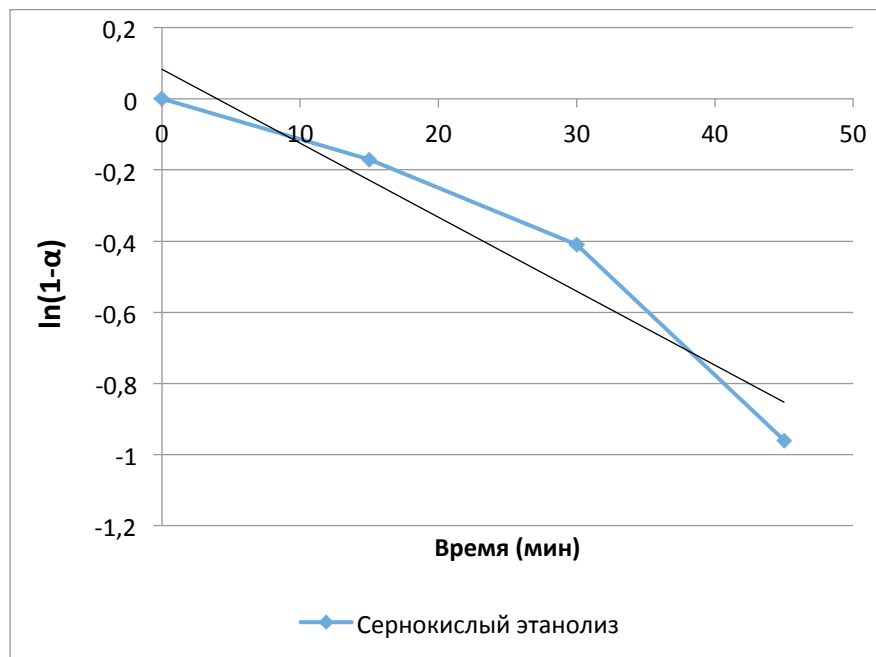
Кинетическое уравнение в полулогарифмических координатах будет иметь вид:

$$\ln [1 - (1173 / p_{\tau} - 1) / 12,64] = f(\tau) \quad (17)$$

Полулогарифмические анаморфозы кинетических кривых деструкции хитозана представлены на рисунке 31 а, б. Установленная линейная зависимость позволяет сделать вывод, что деструкция хитозана описывается уравнением реакции первого порядка.



а)



б)

Рисунок 31 - Полулогарифмические анаморфозы кинетических кривых деструкции хитозана, а-сернокислый гидролиз; б-сернокислый этанолиз

Сернокислый гомогенный гидролиз весьма эффективен в сравнении с другими методами деструкции хитозана. Так, по сравнению с уксуснокислотным гидролизом [16] продолжительность реакции до получения полимера с молекулярной массой 25-20 кДа сокращается с 1500 до 30 минут (рисунок 32), а использование при деструкции ультразвука, помимо разницы в скорости реакции, приводит к получению сильно аморфизованного продукта [22].

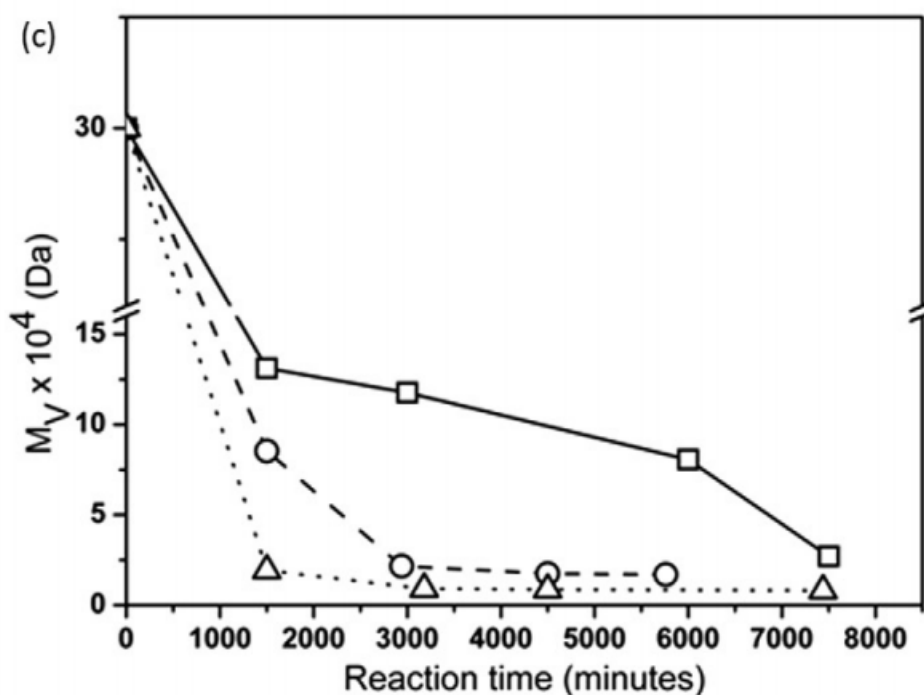


Рисунок 32 Гидролиз хитозана в УК при температуре 75°C, концентрация кислоты: □-6%, ○-9%, ▲-12% [16].

Проведенные исследования показывают, что гомогенный сернокислый гидролиз является эффективным методом снижения молекулярной массы коммерческих хитозанов. Кроме того, происходящие при осаждении продукта гидролиза процессы позволяют получить полимер, диспергированный до наноуровня [150]. Полученные результаты исследований послужили основой для разработки лабораторного регламента получения хитозана низкомолекулярного (см. Приложение).

2.3.2 Структура и свойства продуктов кислотно-каталитической деструкции хитозана [151]

Надмолекулярная структура продуктов кислотно-гидролитической деструкции хитозана была исследована методом ЯМР-спектроскопии*.

Для получения экспериментальных данных (рисунки 33-35) был использован ЯМР-релаксометр “SpinTrack” (ООО «Резонансные системы ЛТД», Россия) - современный прибор, поддерживающий большинство приложений ЯМР низкого разрешения, с возможностью программирования импульсных последовательностей. Диапазон частот электронного блока 2...60 МГц, позволяет исследовать образцы со временем спин-спиновой релаксации более 10 мкс. Регистрировать спад свободной индукции (ССИ) удавалось с периодом нечувствительности приемного тракта менее 8 мкс, что оказалось очень важным для анализа сигналов от протонов полисахаридов с временами спин-спиновой релаксации, не превышающими 20 мкс. Спады ССИ измерялись как отклики спиновой системы на одиночный 90° импульс длительностью 1.8 мкс. Поскольку спады ССИ использовались и для анализа формы временного спада, и для преобразования в спектральную линию, измерения проводились на частоте, отличной от резонансной на 100 кГц, с целью минимизации помех. Время регистрации ССИ составляло 2 миллисекунды с шагом выборки отсчетов квадратурного сигнала в 0.2 мкс, количество накоплений составляло 100, время повторения сканов при накоплении сигнала было равно 1000 мс.

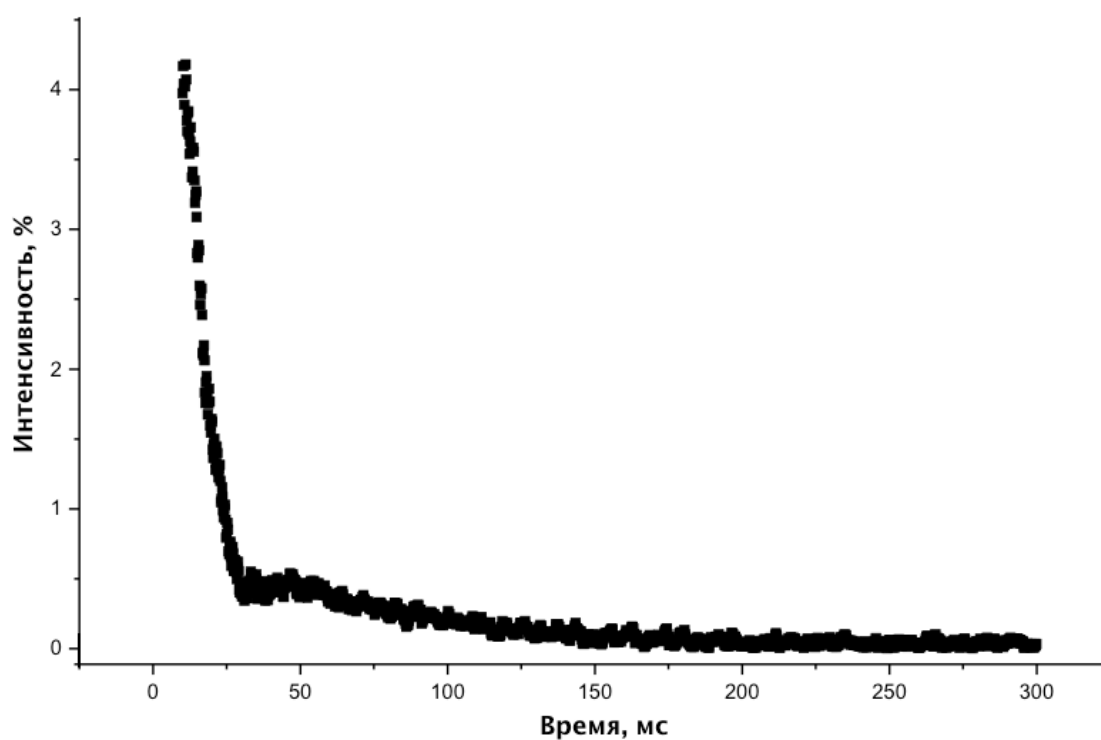
Спектр воздушно – сухих образцов хитозана и продуктов его кислотнo-катализируемой деструкции (гидролиза и этанолиза) состоит из трёх компонент:

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;

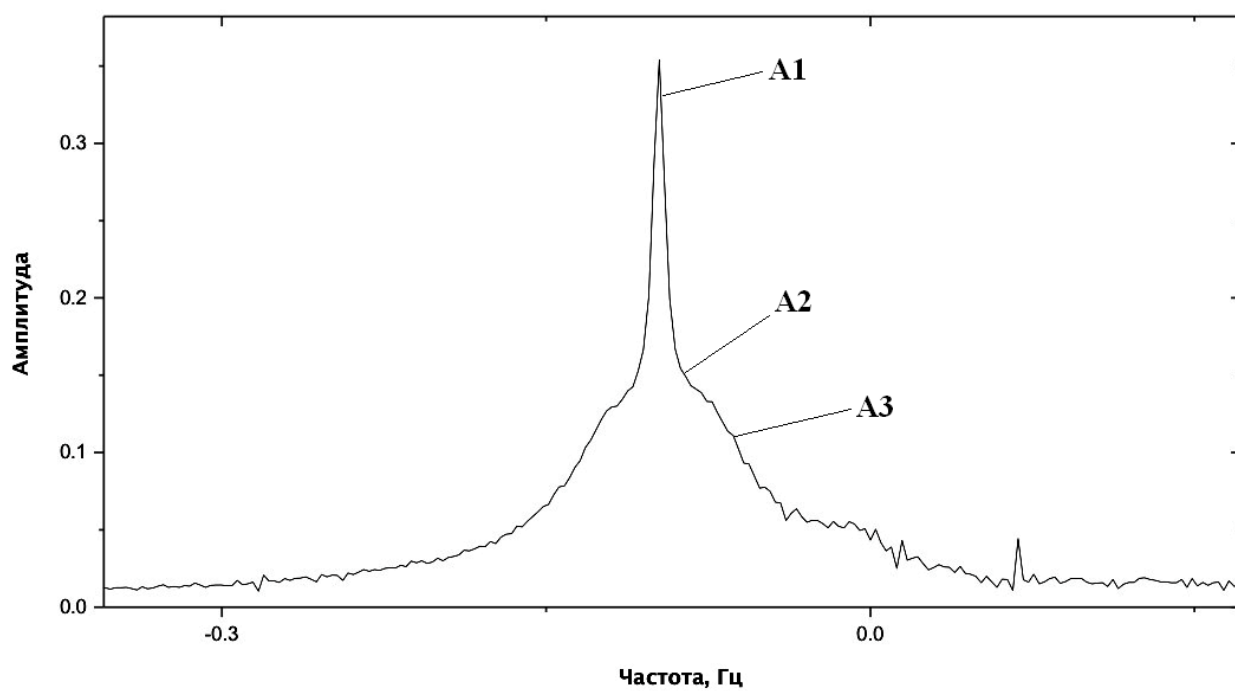
*) Исследования проведены на кафедре физики Поволжского государственного технологического университета под руководством проф. Ю.Б. Грунина.

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.

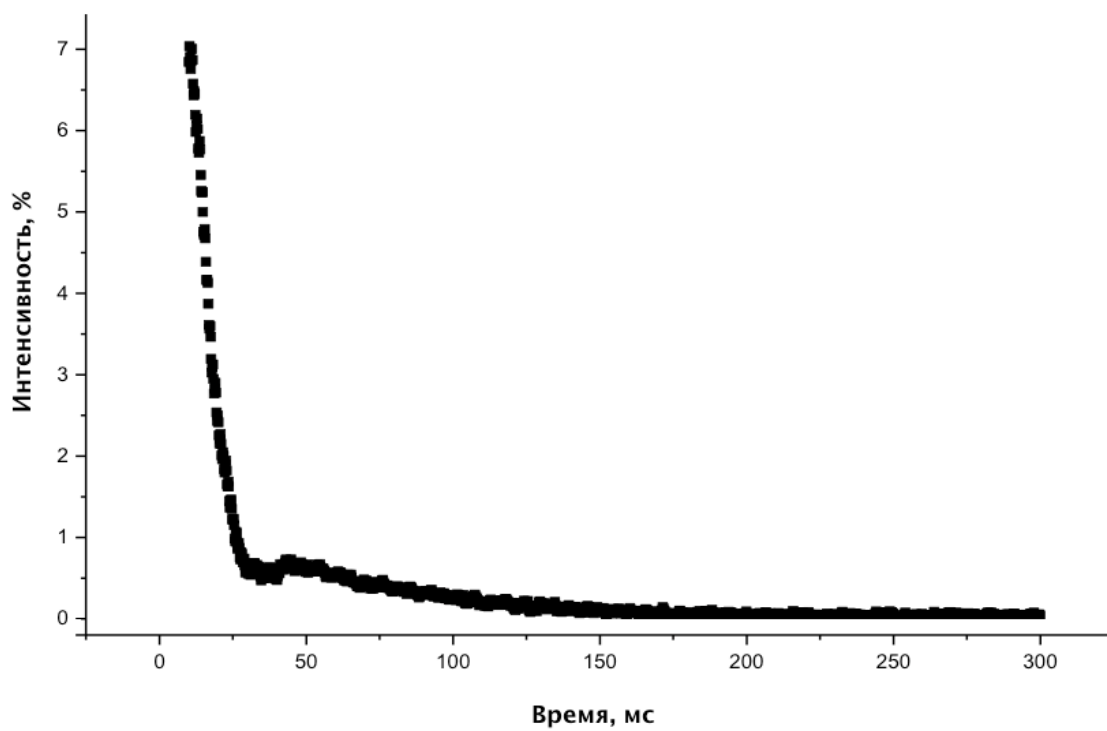


А)

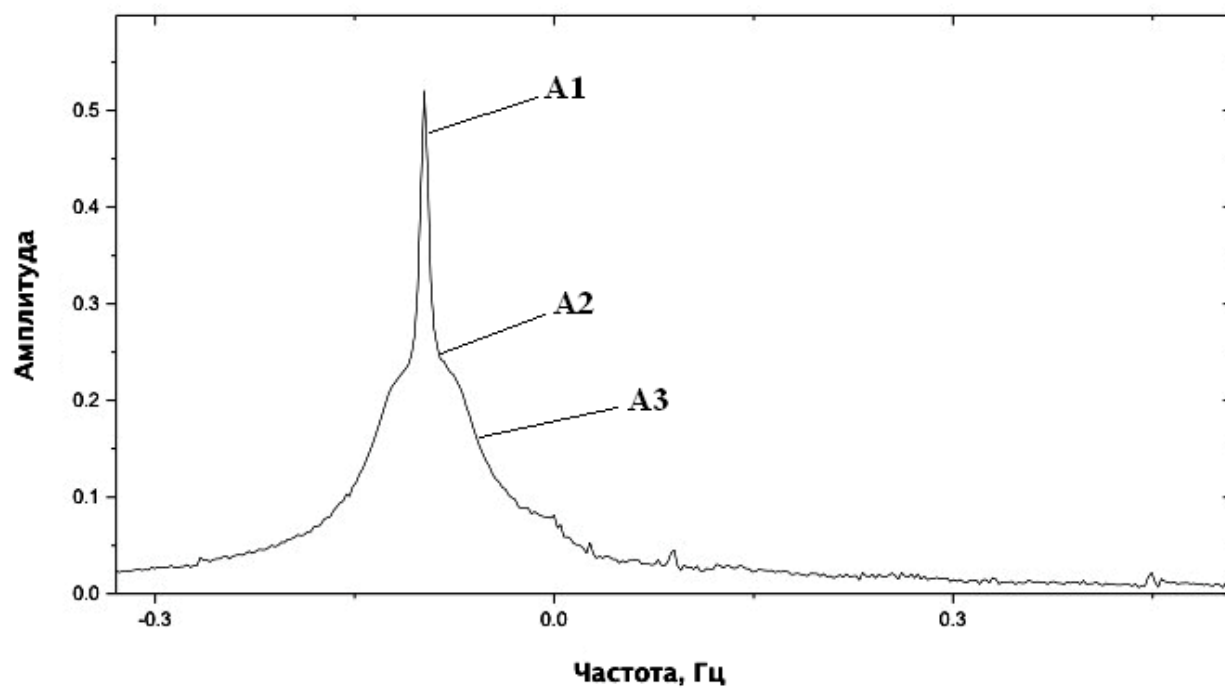


B)

Рисунок 33 - ССИ образца исходного хитозана (ММ 190 кДа) (А) и его Фурье-преобразование (В)

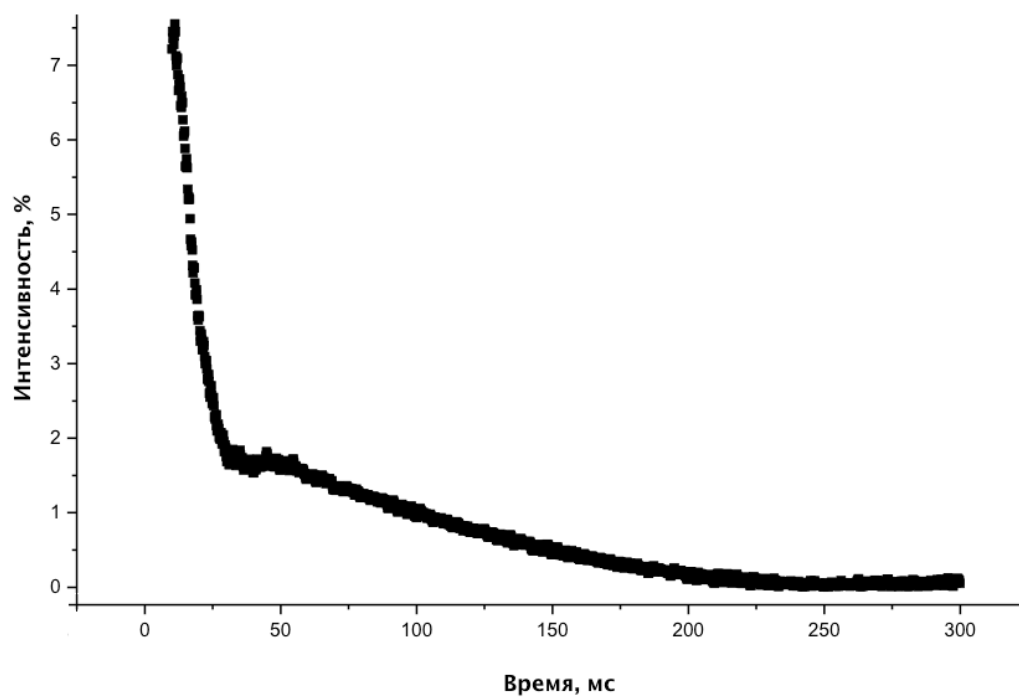


A)

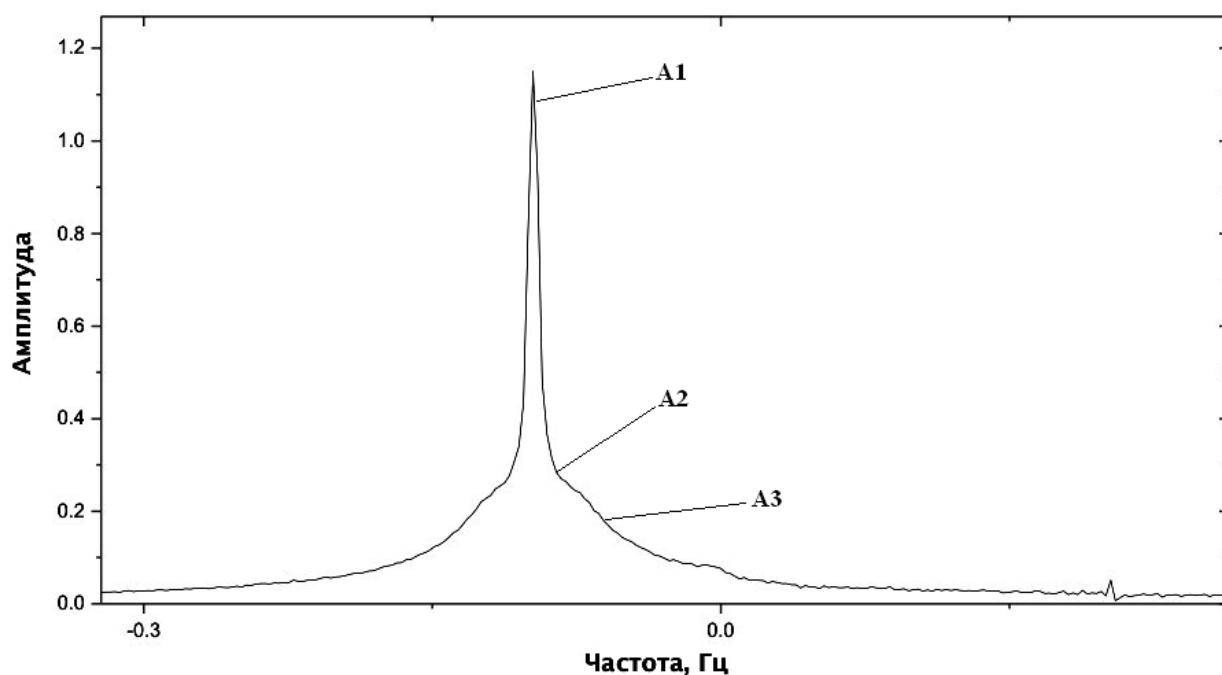


B)

Рисунок 34 - ССИ образца хитозана после гомогенного гидролиза в 17% серной кислоте (ММ 25 КДа (А) и его Фурье-преобразование (В))



A)



В)

Рисунок 35 - ССИ образца хитозана после гетерогенного этанолиза в 20% серной кислоте (ММ 20 КДа) (А) и его Фурье-преобразование (В)

Для обработки ЯМР - релаксационных сигналов была использована программа «FIDRelaxationAnalysis», позволяющая импортировать данные спадов сигнала свободной индукции (ССИ), производить преобразование Фурье и аппроксимировать временные затухания и частотные спектры при помощи функции сложной формы (уравнение 18)

$$FID(t) = A_1 \exp\left(-\left(\frac{t}{T_2^{(1)}}\right)^{b_1}\right) \cos \omega_1 t + A_2 \exp\left(-\left(\frac{t}{T_2^{(2)}}\right)^{b_2}\right) + A_3 \exp\left(-\left(\frac{t}{T_2^{(3)}}\right)^{b_3}\right), \quad (18)$$

где: $FID(t)$ – спад свободной индукции; $A_1, A_2, A_3, T_2^{(1)}, T_2^{(2)}, T_2^{(3)}$ – амплитуды компонент сигнала и их характеристические времена поперечной ЯМР- ^1H -релаксации соответственно; b_1, b_2, b_3 – коэффициенты, учитывающие распределение времен корреляции.

В работе [152, 153] экспериментально была подтверждена известная гипотеза об основном вкладе поверхностных молекулярных цепочек кристаллитов типичного представителя жесткоцепных биополимеров – целлюлозы в формирование так называемых “аморфных” областей, в то время как строго координированные цепочки внутренних областей формируют кристаллическую структуру микрофибрилл. Поскольку протонная населенность, дифференцированно принадлежащая молекулам поверхностных и внутренних участков полимера, соответственно пропорциональна содержанию самих молекул в этих участках, то это дает возможность определения степени кристалличности образца по соотношению амплитуды короткой компоненты A_1 к сумме амплитуд средней и короткой компонент ССИ ($A_2 + A_1$):

$$K = \frac{1}{1 + \frac{A_2}{A_1}}, \quad (19)$$

Значения A_1 и A_2 рассчитываются на основе уравнения (18), описывающего форму экспериментально наблюдаемого сигнала ССИ. Полученные в результате расчета данные о степени кристалличности исходного хитозана и продуктов его кислотнокаталитической деструкции приведены в таблице 3.

Таблица 3 - Параметры надмолекулярной структуры хитозана и продуктов его деструкции

Образец	СП	k, %	$S_{уд}$, м ² /г	d_K , Å
исходный хитозан	1172	72	109	80
хитозан после гомогенного гидролиза в 17%-ной серной кислоте (X25)	154	79	82	109
хитозан после гетерогенного этанолиза в 20%-ной серной кислоте (X20)	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

Интересным представляется результат оценки структуры препарата хитозана, полученного при гомогенном гидролизе. Несмотря на то, что гидролиз протекал в гомогенном растворе, очевидным является, что, согласно полученным данным, в процессе осаждения полимера из раствора прошел процесс кристаллизации. Сопоставление уровней степени полимеризации и степени кристалличности полученных образцов, а также сравнение этих характеристик с аналогичными характеристиками целлюлозы [154] свидетельствует о получении в принятых условиях нанокристаллитов хитозана [24]. 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 [155] по уравнению 20 [155, 156] был рассчитан средний поперечный размер кристаллических областей микрофибриллы.

$$d_K = \frac{1}{1-\sqrt{K}} \quad (20)$$

Согласно полученным данным (таблица 3), 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 36-39), 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°C и 8°C соответственно, а пики, соответствующие деполимеризации кристаллических областей [157], - на 71°C и 54 °C.

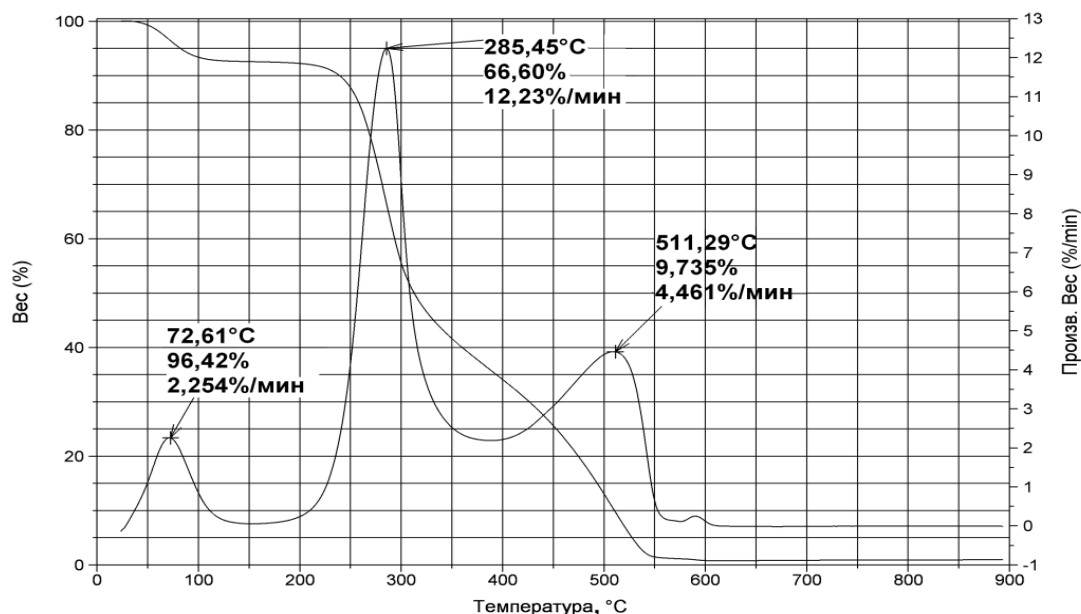


Рисунок 36 - Кривые ТГА исходного хитозана

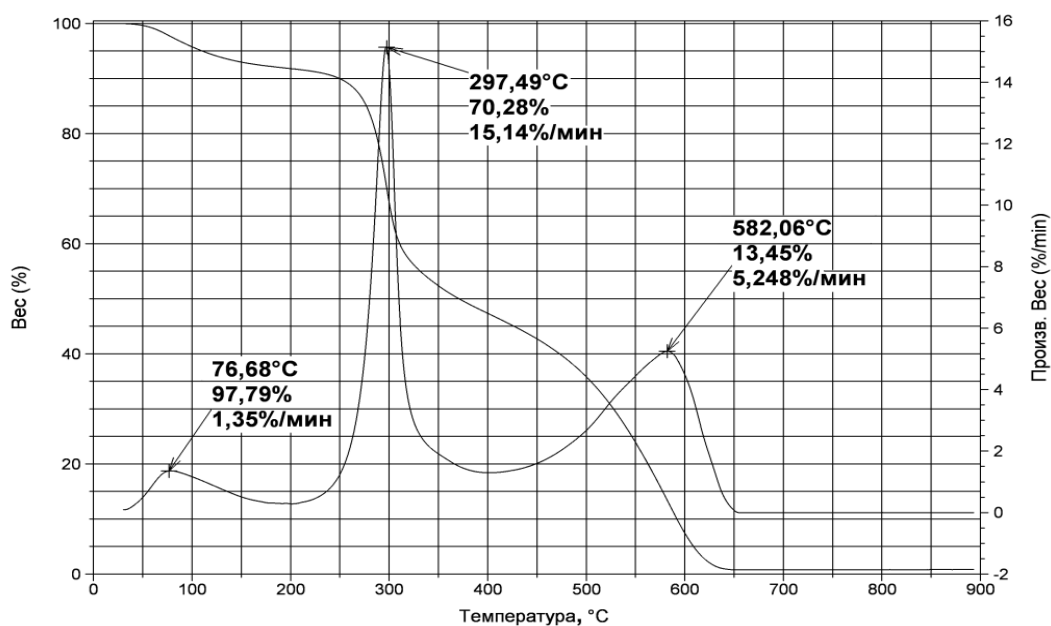


Рисунок 37 - Кривые ТГА продукта гидролиза хитозана

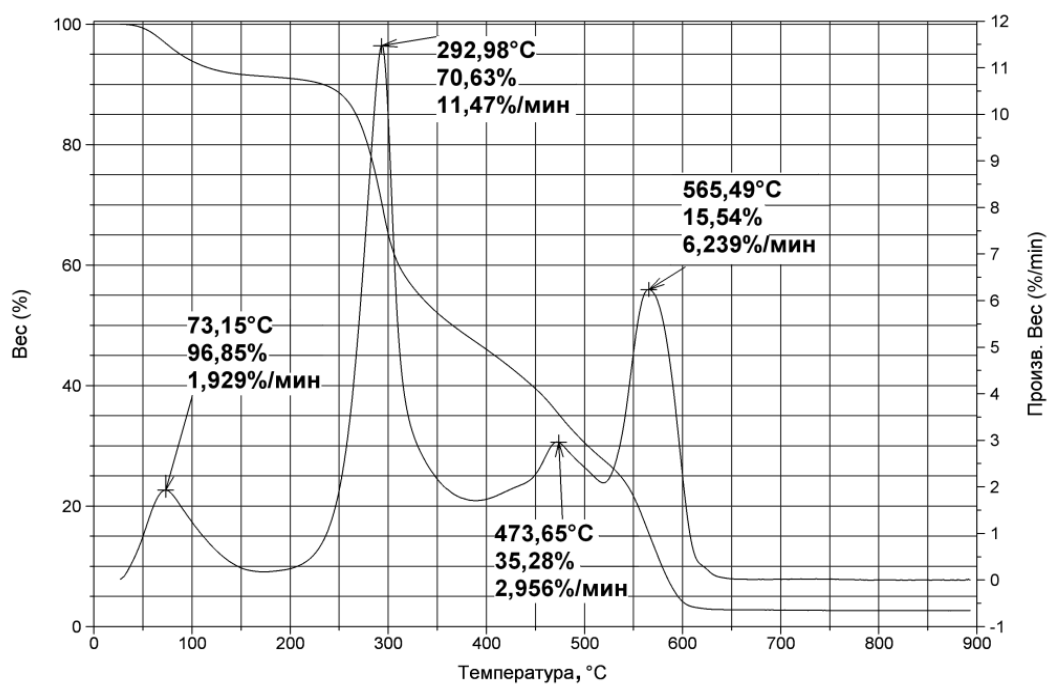


Рисунок 38 - Кривые ТГА продукта этанолиза хитозана

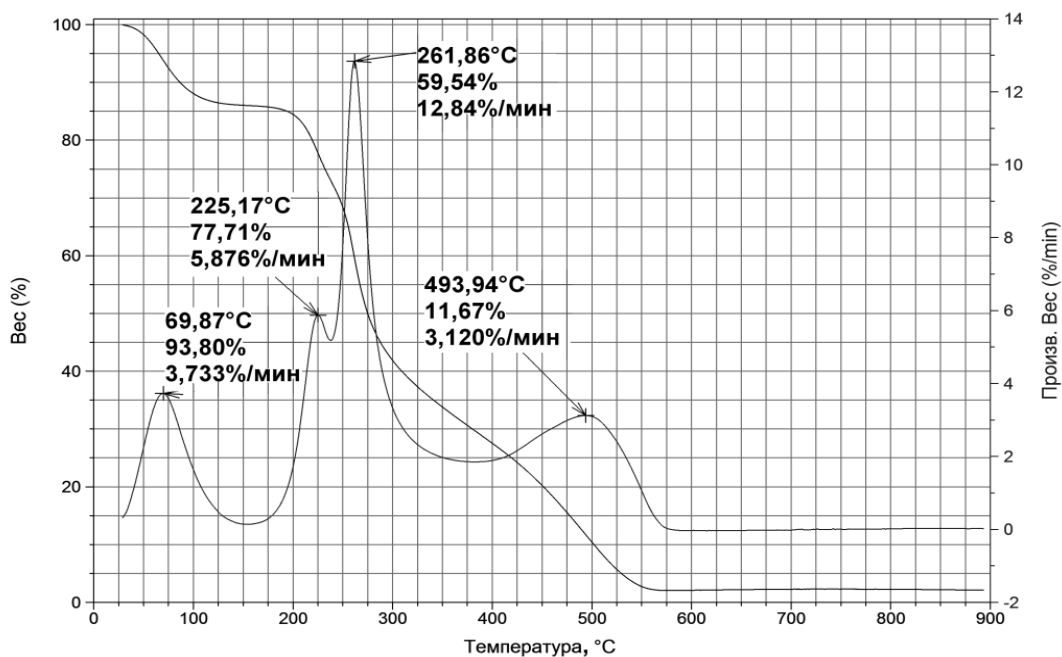


Рисунок 39 - Кривые ТГА нерастворимого продукта

Это показывает, что структура полученных низкомолекулярных препаратов хитозана более упорядочена и тем самым 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°C, 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.

Исследование методом АСМ морфологии полученных наночастиц хитозана позволило установить, что их средний размер составляет 100-200 нм (рисунки 40-42). С учетом данных о размерах кристаллитов (таблица 3) очевидно, что наночастицы представляют собой агрегаты, состоящие из 12-25 кристаллитов.

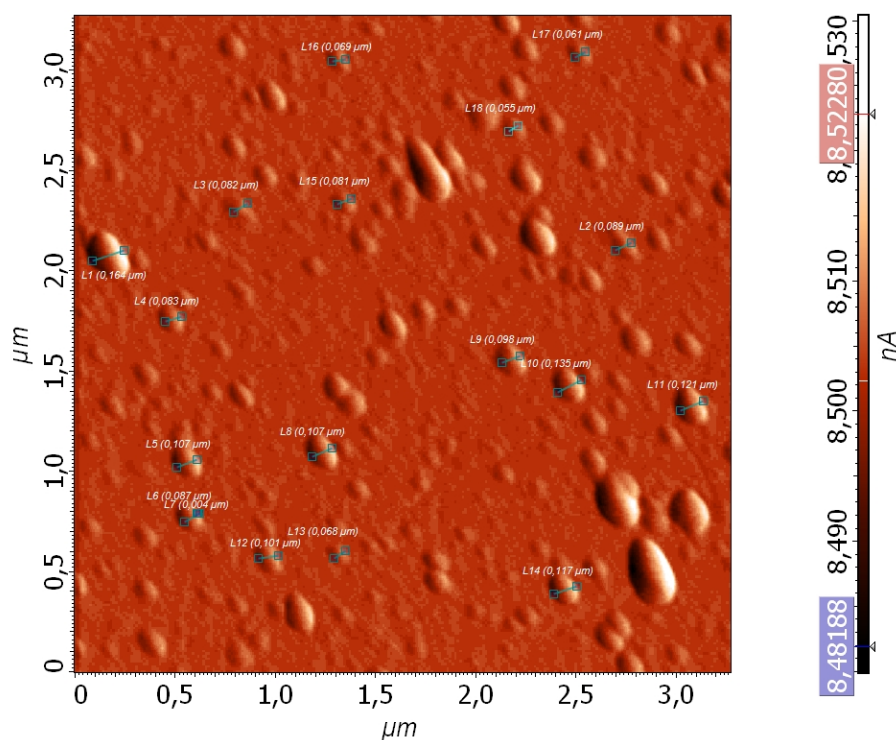


Рисунок 40 - Микрофотография наночастиц хитозана, полученных при гомогенном гидролизе

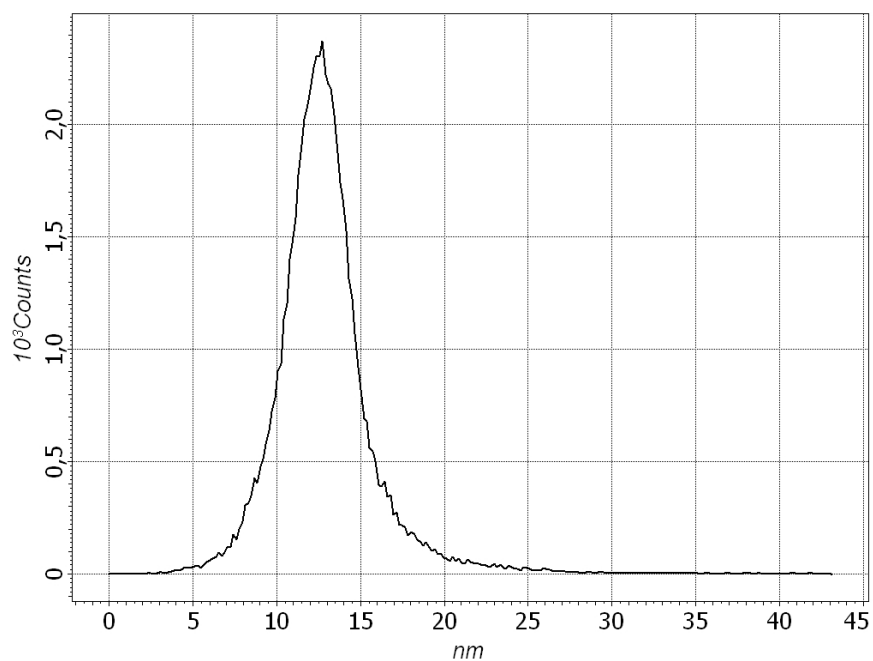


Рисунок 41 - Распределение по размеру наночастиц хитозана, полученных при гомогенном гидролизе,

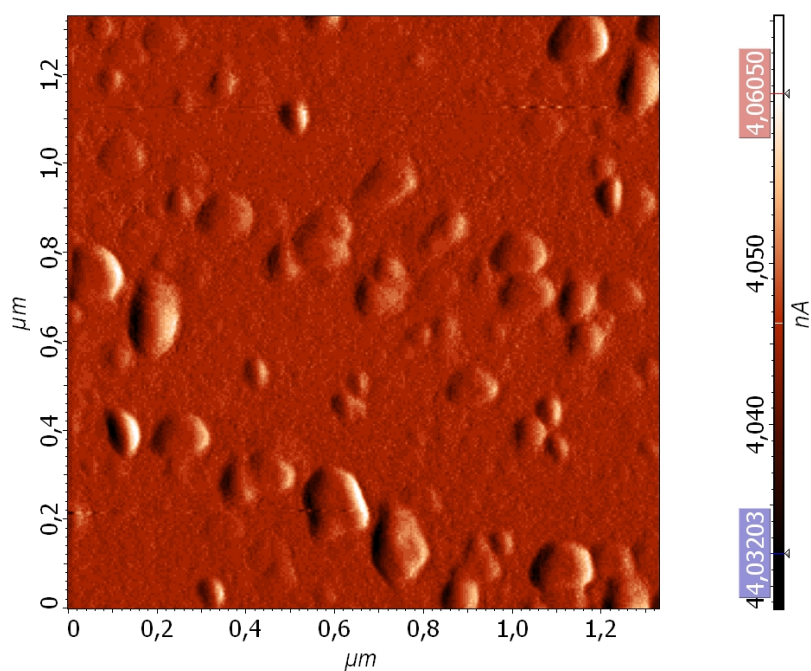


Рисунок 42 - Микрофотография наночастиц хитозана, полученных при гетерогенном этанолизе

Таким образом, можно сделать вывод о перспективности применения гомогенного сернокислотного гидролиза как метода получения

низкомолекулярного, нанодисперсного хитозана с высокой степенью кристалличности (нанокристаллитов хитозана) [150].

В работе [153] было показано, что степень кристалличности исследуемых образцов связана с емкостью адсорбционного монослоя воды соотношением 21:

$$K = 1 - 9w_m, \quad (21)$$

где: емкость монослоя воды, г/г.

Поскольку удельная поверхность биополимеров может быть определена через емкость монослоя соотношением 22 [152]:

$$S_{уд} = 3500w_m, \text{ м}^2/\text{г}, \quad (22)$$

Это позволяет установить связь удельной поверхности образца с его степенью кристалличности:

$$S_{уд} = 389(1 - K), \text{ м}^2/\text{г} \quad (23)$$

Проведенный расчет (таблица 3) 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 [153, 158]. 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.

Расчёт проводили с использованием уравнения БЭТ в линейной форме:

$$\frac{\frac{p}{p_s}}{a \cdot \left(1 - \left(\frac{p}{p_s}\right)\right)} = \frac{c-1}{a_m \cdot c} \cdot \frac{p}{p_s} + \frac{1}{a_m \cdot c}, \quad (24)$$

В данное уравнение входят следующие основные параметры:

относительная влажность воздуха $\frac{p}{p_s}$,

константа адсорбционного равновесия c ,

влажностное содержание образца a

емкость монослоя a_m

Поскольку данное уравнение является линейным, его упрощенно можно представить в виде:

$$f(x) = y = B \cdot x + A \rightarrow f\left(\frac{p}{p_s}\right) = \frac{\frac{p}{p_s}}{a \cdot \left(1 - \frac{p}{p_s}\right)}, \quad (25)$$

где: $x = \frac{p}{p_s}$ - относительная влажность воздуха; a - влажностное содержание образца; a_m - емкость монослоя; коэффициенты уравнения:

$$B = \frac{c - 1}{a_m \cdot c}, A = \frac{1}{a_m \cdot c}$$

На линейных участках изотерм с использованием специально разработанной компьютерной программы были определены коэффициенты A и B и рассчитаны константа адсорбционного равновесия

$$c = \frac{1}{a_m \cdot A} = 1 + \frac{B}{A} \text{ и емкость монослоя } a_m = \frac{1}{B + A}.$$

Анализ изотерм адсорбции паров воды образцами исходного (ХИ) и низкомолекулярного хитозана (Х25) и (Х20) (рисунок 43) показывает, что продукты гетерогенного этанолиза (Х20), и, в особенности, - гомогенного гидролиза (Х25), характеризуются пониженной гигроскопичностью.

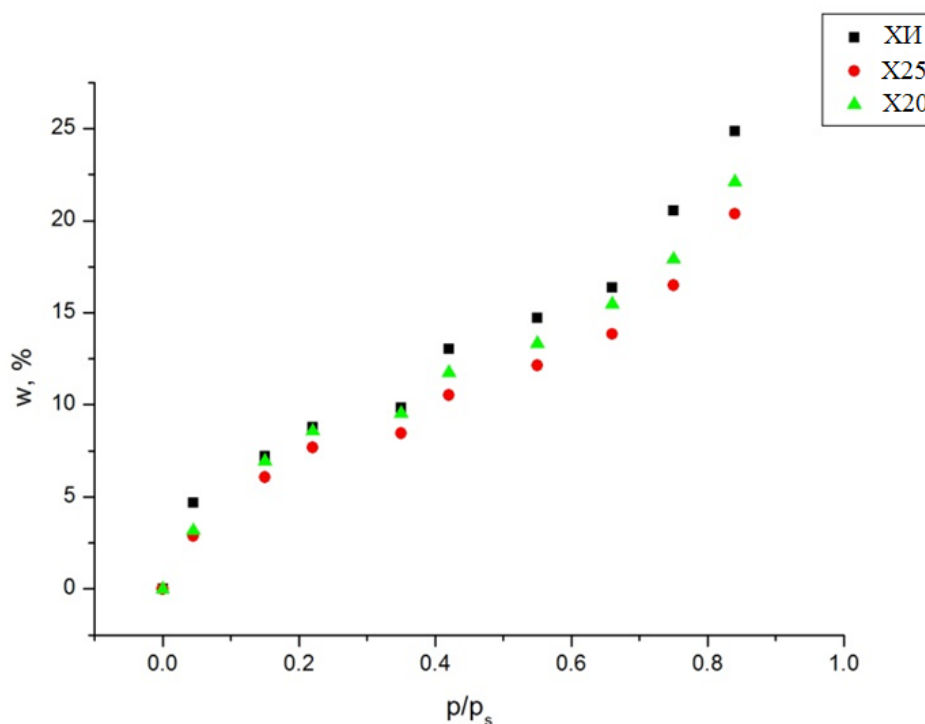


Рисунок 43 - Изотермы адсорбции

ХИ - исходный хитозан, ММ 190кДа; Х25 - хитозан после гомогенного гидролиза, ММ 25кДа; Х20 - хитозан после гетерогенного этанолиза, ММ 20кДа.

Как показывает расчет изотерм адсорбции, проведенный по уравнению БЭТ [159] с использованием специально разработанной компьютерной программы, 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 4).

Таблица 4. Сорбционные характеристики исходного хитозана и продуктов кислотно-каталитической деструкции

	ХИ	Х25	Х20
$w, \%$	7.47	6.41	7.18
$S_{уд}, (m^2/g)$	259	228	253
c	27.9	20	20.1

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 44).

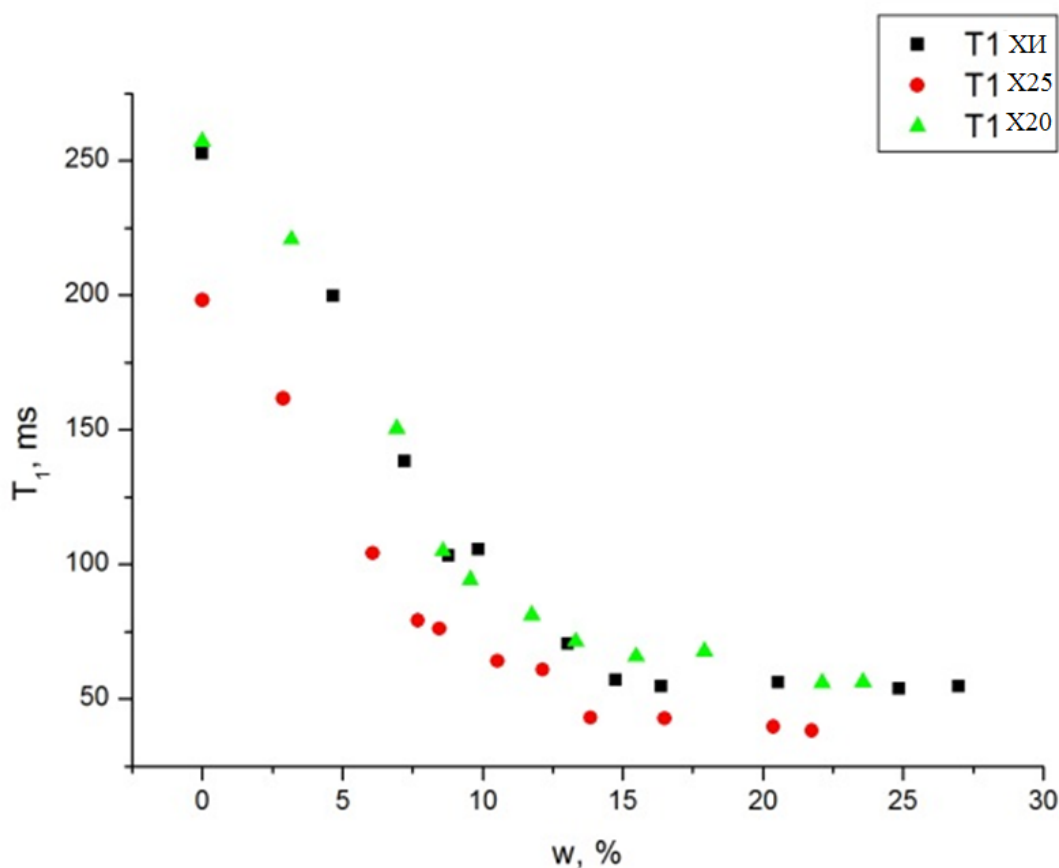
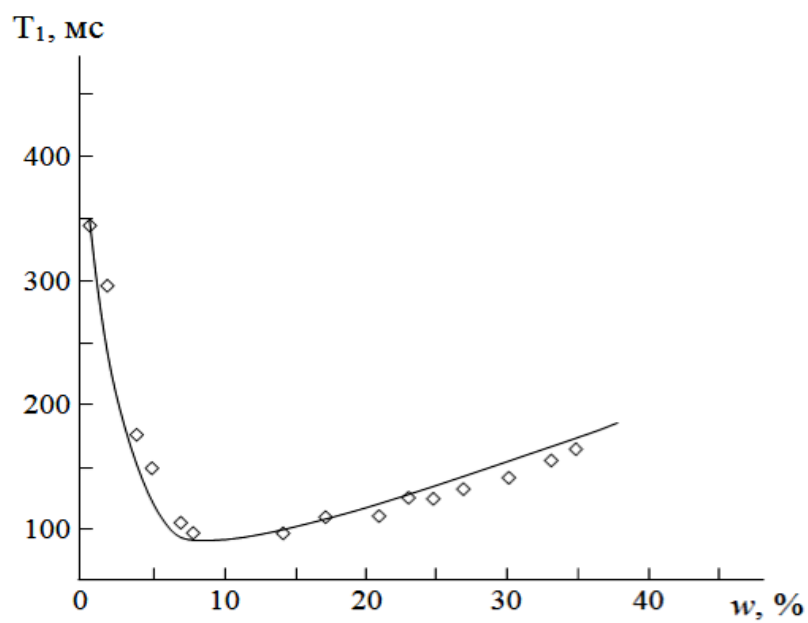
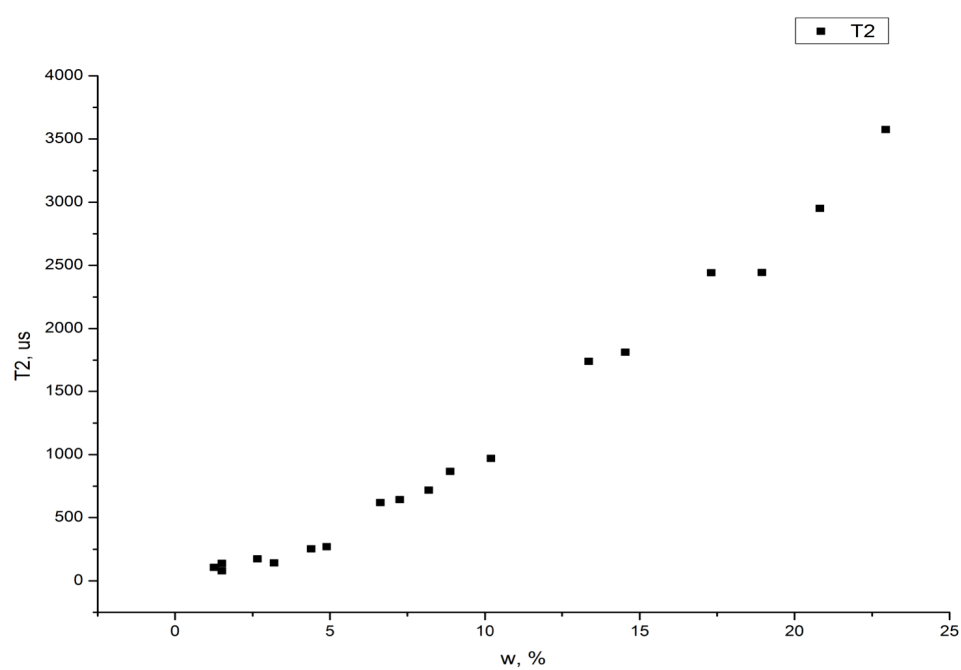


Рисунок 44 - Зависимость времени спин-решеточной релаксации от влагосодержания образцов хитозана

Наиболее заметно уменьшение T_1 для продукта гидролиза хитозана. При анализе представленных на рисунке 44 зависимостей $T_1=f(w)$ обращают на себя внимание невысокие значения времен T_1 для всех трех образцов, в несколько раз меньшие по сравнению с модельными образцами хлопковой целлюлозы в том же диапазоне влагосодержаний (рисунок 45 а)



а



б

Рисунок 45 - Зависимость времен спин-решеточной релаксации T1 «а» и спин-спиновой релаксации T2 «б» от влагосодержания w образца хлопковой целлюлозы (ГОСТ 595-79)

Это свидетельствует о сравнительно высокой скорости энергетического обмена спин-системы с окружающей ее «решеткой». Такой обмен обычно интенсифицируется в тонких внутримикрофибриллярных порах адсорбента под влиянием магнитного диполь-дипольного взаимодействия резонирующих атомных ядер, спиновой диффузии, переносящей протонную намагниченность от внутренних областей кристаллитов хитозана к их наружной поверхности, и наличия релаксационных центров, непосредственно обеспечивающих обмен магнитной энергией «спин-системы с «решеткой» за счет быстро вращающихся протонсодержащих поверхностных групп. При увлажнении образца в этих порах возникает расклинивающее давление со стороны тонкого слоя адсорбированной воды. В результате в микрофибриллах хитозана формируется дополнительная система микропор, на внутренней поверхности которых появляются новые центры релаксации – группы $-OH$, $-NH_2$, а также адсорбированные на поверхности полисахарида молекулы воды. В микропорах в области влагосодержания от 6,4% до 7,5% идет процесс мономолекулярной адсорбции, поэтому подвижность молекул воды в них очень мала. Влияние сильных электрических полей со стороны поверхностных активных центров и, прежде всего, групп $-NH_2$, сказывается и на уменьшении молекулярной подвижности в следующих, полимолекулярных адсорбционных слоях, в которых формируется специфическая аква-структура. Это находит свое отражение в стабилизации значений измеряемых времен спин-решеточной релаксации в области абсолютных влагосодержаний образцов, превышающих 12-15%.

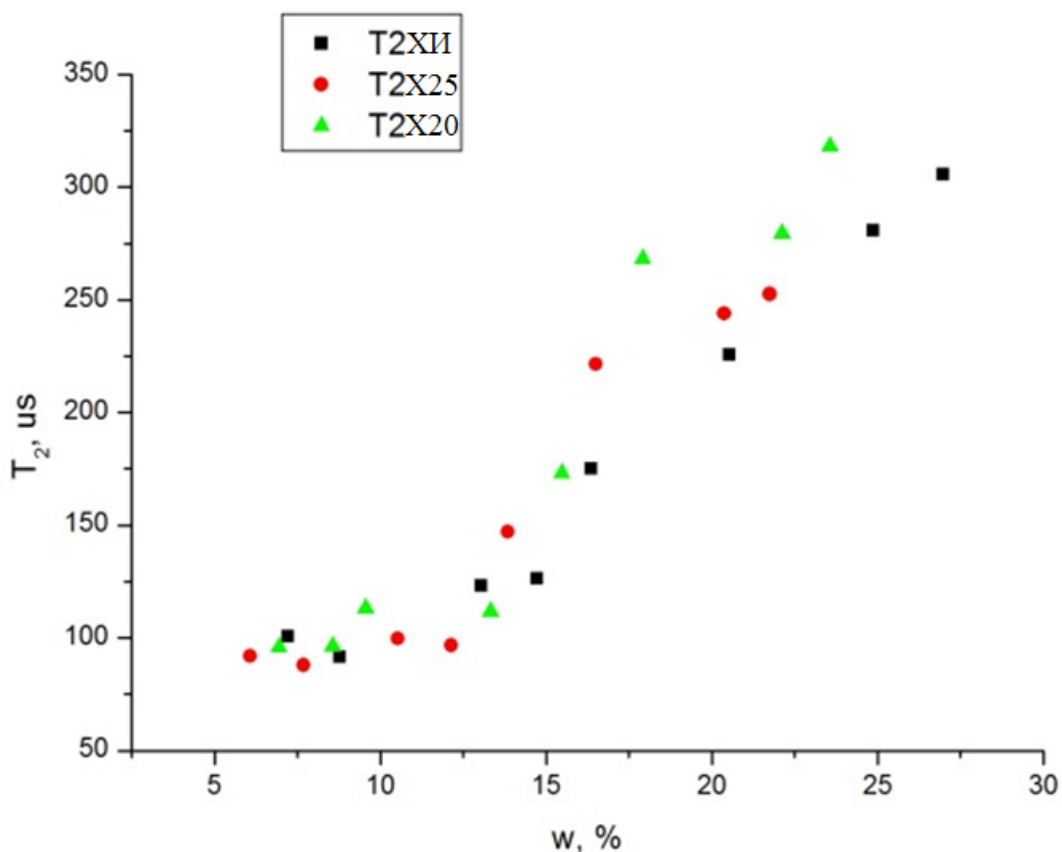


Рисунок 46 - Зависимость времени протонной спин-спиновой релаксации T_2 от влагосодержания w образцов хитозана

При определении зависимости спин-спиновой релаксации T_2 от влагосодержания w тех же образцов хитозана (рисунок 46) было установлено, что величины T_2 для всех образцов до уже отмеченных ранее 12-15% влажности близки к стабильным значениям. Это также свидетельствует о доминирующем влиянии поверхностных активных центров адсорбента на низкую подвижность молекул воды в микропорах. При превышении указанного влагосодержания общая молекулярная подвижность воды в порах усиливается, о чем говорит рост T_2 .

Времена T_2 для адсорбированной образцами хитозана воды имеют существенно меньшие значения по сравнению с водой, адсорбированной хлопковой целлюлозой (рисунок 45 б). Это является следствием более развитой,

по сравнению с образцами целлюлозы, микропористой системы хитозана и наличия на его внутренней поверхности более мощных энергетических центров, выполняющих адсорбционные и релаксационные функции.

Следует при этом отметить, что наибольшее влияние на состояние капиллярно-пористой системы и надмолекулярной структуры хитозана оказывает гидролиз, так как кривые зависимости $T_2=f(w)$, снятые для ХИ и Х20 относительно близки, но заметно отличаются от таковой для образца Х25. Общий анализ поведения представленных зависимостей $T_1=f(w)$ и $T_2=f(w)$ позволяет предположить, что в большей степени рассматриваемый диапазон влагосодержаний образцов хитозана характеризуется развитием числа его микропор, чем существенным увеличением их средних поперечных размеров. Полученные нами результаты ЯМР-измерений и анализ изотерм адсорбции однозначно 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 [158], 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 таблицы 4, все исследованные образцы обладают весьма высокими значениями удельной поверхности. Сопоставляя отмеченные выше зависимости времен T_1 и T_2 от влагосодержания с изотермами адсорбции (рисунок 43) 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. В этом случае, как

показывает расчет с использованием соотношения (18), учитывающего емкость монослоя адсорбированной воды (0,064-0,075 г/г) и эффективный диаметр ее молекулы (3 Å), поперечный размер $d_{\text{п}}$ таких пористых образований составляет 15-18 Å, что соответствует максимальному размеру микропор по классификации Дубинина [160].

$$\overline{d_{\text{п}}} = \frac{2w}{w_m} d_{\text{в}}, \quad (26)$$

где w - влагосодержание микропор, соответствующее значению $p/p_s=0.8$ на изотерме адсорбции (рисунок 43), а также минимуму T_1 на зависимости $T_1 = f(w)$ (рисунок 44), w_m -емкость адсорбированного монослоя воды.

Характер правой ветви зависимости T_1 от влагосодержания коррелирует с наблюдаемым ростом времен спин-спиновой релаксации T_2 в указанном диапазоне влагосодержаний образцов хитозана (рисунок 46). Этот рост, обусловлен усилением флуктуаций локальных магнитных полей со стороны соседних молекул сорбированной воды, получающих большую свободу трансляционных и вращательных движений в сравнительно широких мезопорах, что усредняет вклад прямых спин-спиновых взаимодействий по сравнению с менее подвижными протонами воды в микропорах. На основе анализа полученных зависимостей времен T_1 и T_2 от содержания влаги в образцах хитозана можно прийти к выводу, что молекулярный обмен между адсорбатом микропор и мезопор относится скорее всего к категории промежуточного или медленного, поскольку условия быстрого обмена между ними в большинстве случаев не выполняются [158]. Очевидно, специфика взаимного расположения указанных пор в структуре этого полисахарида создает определенные препятствия для эффективного диффузионного молекулярного обмена адсорбатом между ними. В то же время, согласно литературным данным [161], межслоевой автономный молекулярный обмен как внутри микропор, так и внутри мезопор явно относится к категории быстрого.

Учитывая экспериментально найденные значения емкости монослоя адсорбированной воды на образцах хитозана и его степень кристалличности k , представляло интерес определить γ – соотношение количества моноадсорбированных молекул воды ($N_{\text{м.в.}}$) к числу поверхностных молекул полимера ($N_{\text{мх}}$). Содержание первых можно найти из соотношения:

$$N_{\text{м.в.}} = \frac{w_m N_A}{\mu_{H_2O}}, \quad (27)$$

где w_m – емкость монослоя; масса моля воды: $\mu_{H_2O} = 18 \frac{\text{г}}{\text{моль}}$; N_A – число Авогадро.

Число поверхностных молекул хитозана при степени кристалличности k определяется соотношением 28:

$$N_{M_X} = (1 - k) \frac{M_X}{\mu_X} N_A, \quad (28)$$

где M_X – масса хитозана = 1 г, μ_X – масса моля хитозана (161 г/моль).

Получаем для γ следующее выражение:

$$\gamma = 9 \cdot \frac{w_m}{1-k}. \quad (29)$$

При этом степень кристалличности k определяется уравнением:

$$k = 1 - \frac{S_{\text{уд}}}{390}. \quad (30)$$

На основе полученных данных были рассчитаны степени кристалличности и коэффициенты γ для всех образцов хитозана (таблица 5).

Таблица 5 – Зависимость степени кристалличности и γ от предыстории образцов хитозана

	ХИ	X25	X20
k	0.34	0.42	0.35
γ	1.02	0.99	0.99

Результаты свидетельствуют о том, что наибольшая степень кристалличности характерна для продукта гидролиза. Кроме того, данные позволяют утверждать, что в среднем на одну поверхностную молекулу хитозана приходится одна молекула воды.

Представленные в таблицах 3 и 5 данные о степенях кристалличности были получены для образцов с различным влагосодержанием. Величина $k=0,79$ получена для абсолютно сухого образца по соотношению амплитуд ССИ, характеризующих содержание внутренних протонов образца к общему количеству протонов в образце. Значение $k=0,43$ было получено для увлажненного образца с использованием уравнения БЭТ.

Основная причина различия состоит в сильном диспергировании кристаллической части образца с соответствующим увеличением числа поверхностных протонов и уменьшением внутренних протонов в хитозане. Другими словами, увлажнение образцов хитозана, как и указывалось, приводит к серьёзному изменению в его надмолекулярной структуре. Это отражается в снижении степени кристалличности образцов и росте удельной поверхности.

2.3.3 Исследование реологических характеристик растворов хитозана и его смесей с поливиниловым спиртом

Изучение растворения и свойств растворов волокно- и плёнообразующих полимеров является важным направлением в науке, определяющим исходные технологические параметры их переработки через растворы. Проведенными ранее исследованиями вязкостных свойств растворов хитозана в широком интервале концентраций полимера было показано, что растворы с сравнительно низкой концентрацией хитозана (1%) и умеренно концентрированные и концентрированные растворы хитозана – типичные неньютоновские жидкости [43]. 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 хитозана с ММ 25 кДа (Х 25) и 190 кДа (ХИ) с концентрациями от 0,5 до 20%, ПВС с концентрацией 3-10% и растворы смесей этих полимеров. В качестве растворителя использовали буферный раствор и 4%-ный раствор УК [162].

Эффективная вязкость растворов хитозана закономерно увеличивается с увеличением концентрации полимера (рисунок 47). Однако для Х-25 появляется возможность получения растворов с концентрацией до 24%, в то время как концентрация растворов высокомолекулярного хитозана ограничивается областью 9-10%.

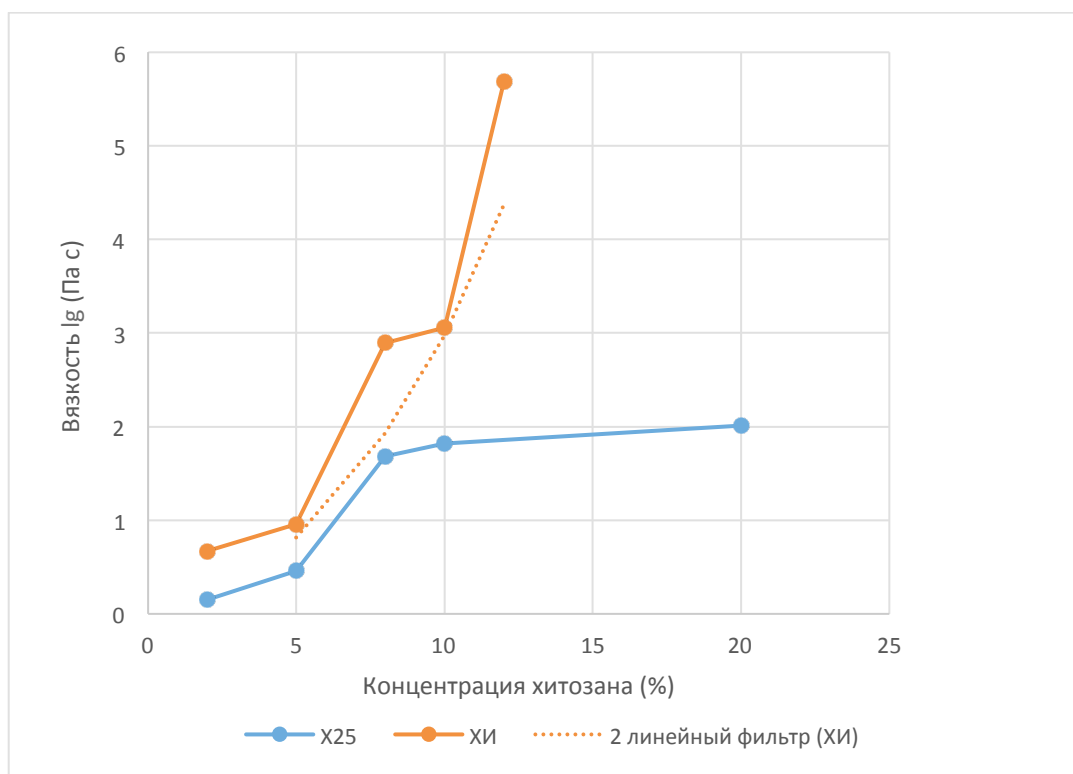


Рисунок 47 - Зависимость динамической вязкости растворов хитозана в ацетатном буфере от концентрации

Для описания течения растворов хитозана и его смесей с поливиниловым спиртом использовали полученные в условиях сдвигового течения логарифмические зависимости эффективной вязкости η от скорости сдвига $\lg \eta = f(\lg j)$.

Как и следовало ожидать, кривые течения 5%-ных растворов хитозана, ПВС и их смесей при температуре 25°C в областях скоростей сдвига 1,11-2480 с^{-1} представляют собой типичные для полимерных систем неполные кривые течения неньютоновских жидкостей.

При этом имеются существенные различия в характере концентрационной зависимости вязкости растворов смесей хитозана различной молекулярной массы с ПВС. В случае растворов, содержащих исходный высокомолекулярный хитозан, эффективная вязкость монотонно повышается при увеличении концентрации хитозана (рисунок 48).

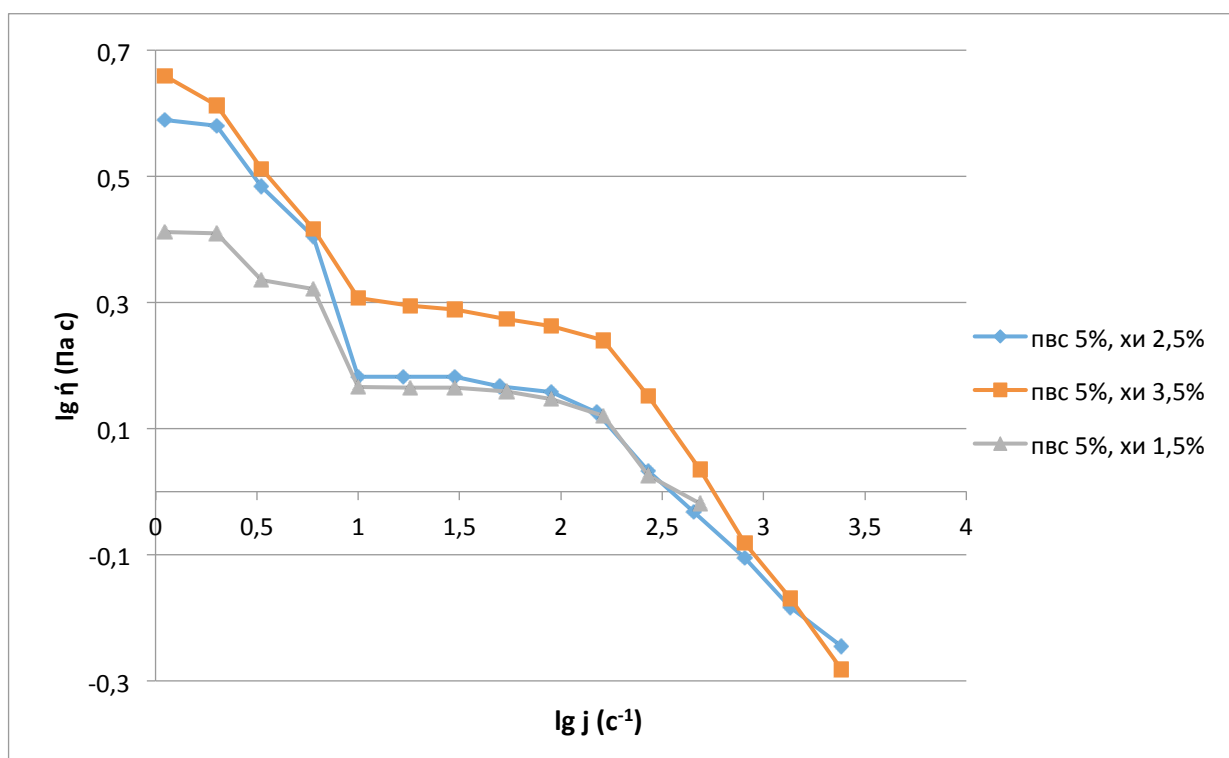


Рисунок 48 - Кривые течения растворов ХИ-ПВС с различной концентрацией хитозана в ацетатном буфере

В то же время вязкостные характеристики растворов, содержащих Х-25, имеют сложную зависимость от концентрации хитозана в растворе.

Согласно полученным данным, 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.

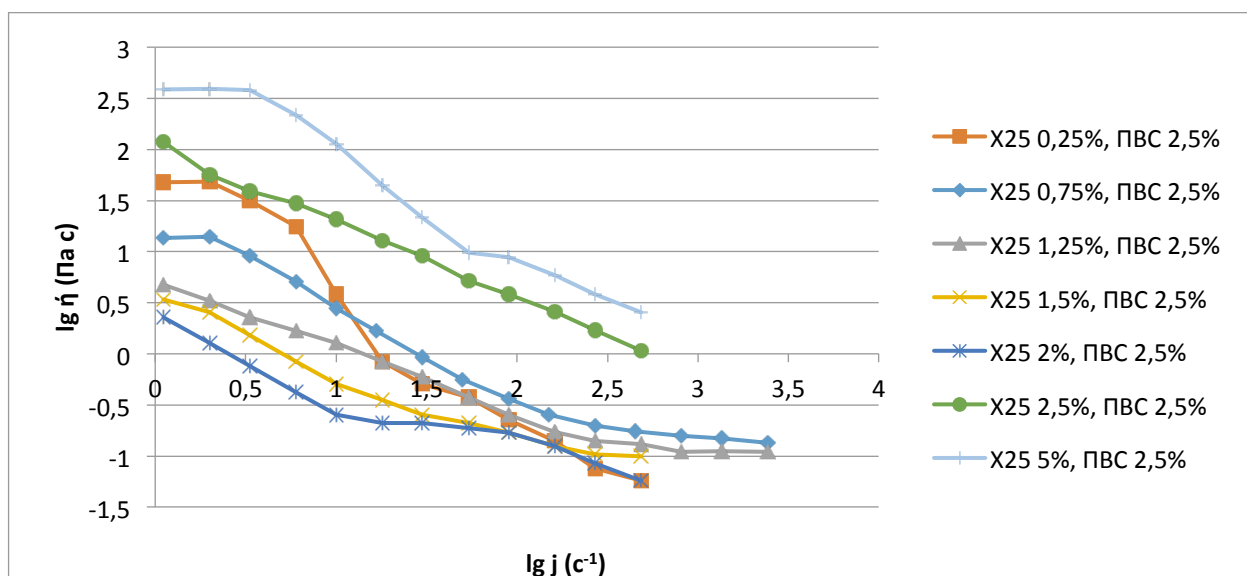


Рисунок 49 - Кривые течения растворов в ацетатном буфере смеси Х-25-ПВС с различной концентрацией хитозана

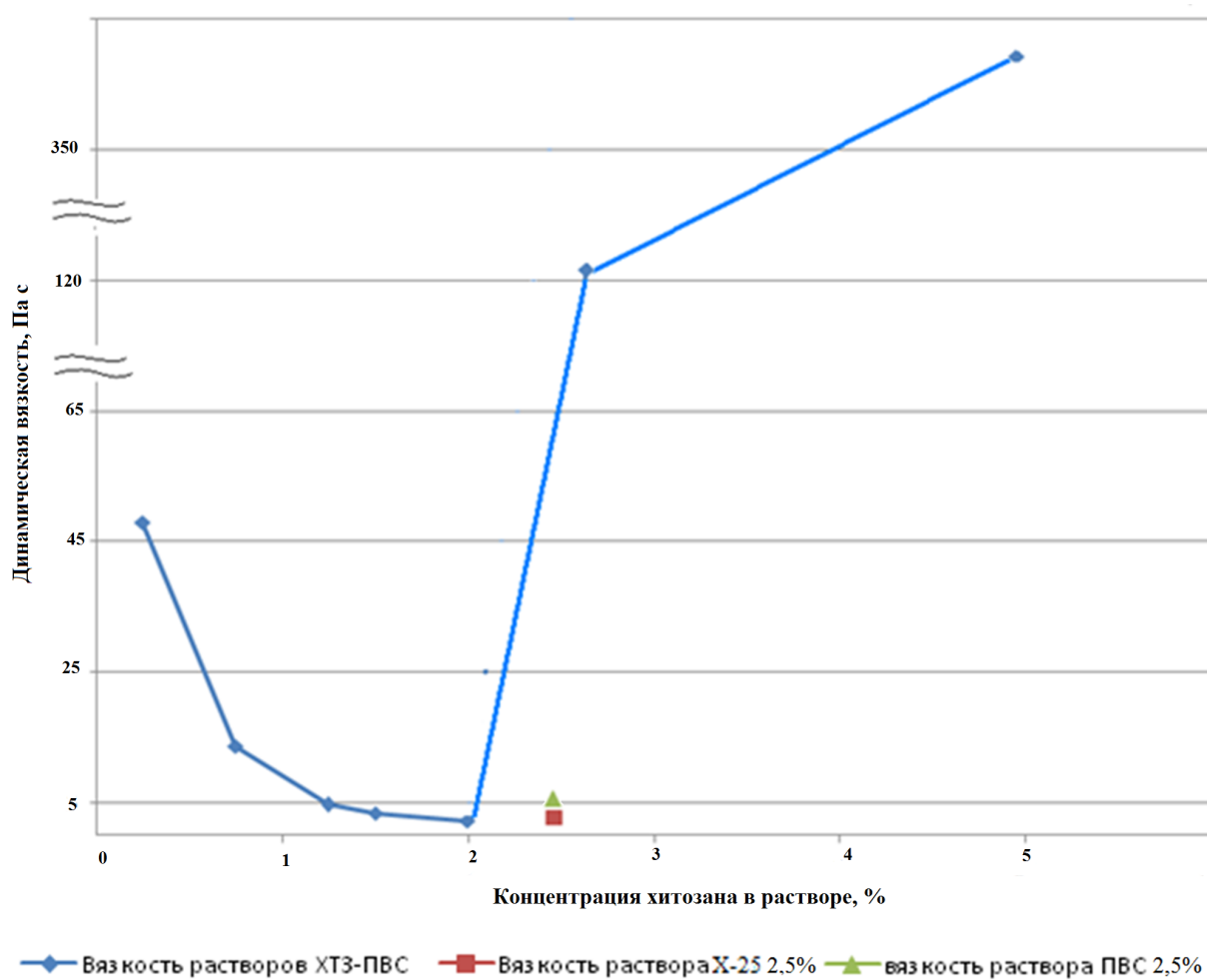


Рисунок 50 - Зависимость динамической вязкости растворов Х-25-ПВС в ацетатном буфере от концентрации хитозана при концентрации ПВС – 2,5%

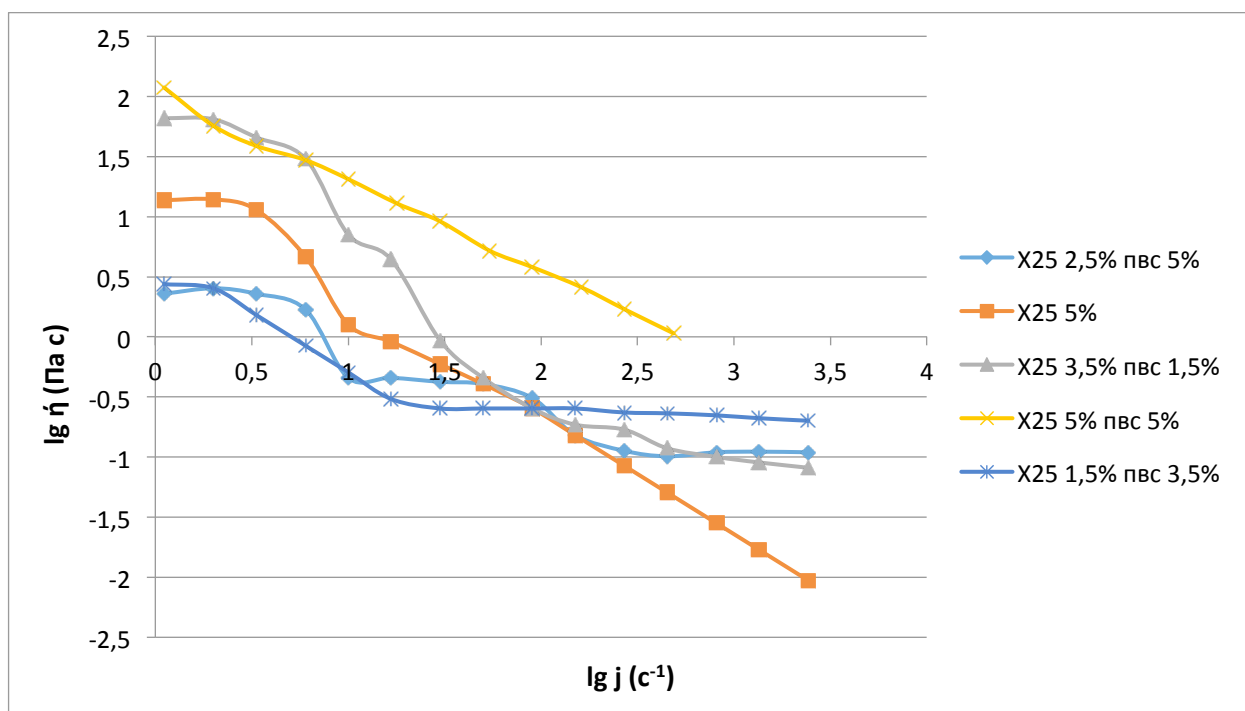


Рисунок 51 - Кривые течения растворов X-25-ПВС в ацетатном буфере при различных концентрациях хитозана и поливинилового спирта

Это может свидетельствовать о протекании процесса микрофазового расслоения системы, в которой фаза низкомолекулярного хитозана выступает в качестве пластифицирующей добавки. Повышение концентрации хитозана в смеси до эквимассового соотношения с ПВС 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.

О сложности процессов структурообразования в системах различного состава свидетельствует характер реологических кривых растворов X25 и смеси 2,5% X25 и 5% ПВС: наличие при небольших значениях градиента скорости сдвига области сохранения постоянной вязкости, в то время как вязкость раствора с эквимассовым соотношением компонентов снижается монотонно во всей изученной области, а структура раствора, содержащего 1,5% X25 и 3,5% ПВС, не изменяется при увеличении градиента скорости сдвига с $16,67 \text{ с}^{-1}$ до 2430 с^{-1} .

Поскольку использование уксусной кислоты в реальных технологических процессах сопряжено с негативным влиянием на окружающую среду и усложнением производства ввиду необходимости установки специального оборудования для улавливания паров УК, представляло интерес исследовать реологические характеристики хитозана в нетоксичном растворителе. В качестве такого растворителя был использован водный раствор олигоэтиленсульфокислоты* с концентрацией 60 г/л.

Согласно полученным данным (рисунки 52, 53), вязкость растворов хитозана в растворе Огсафола находится на одном уровне с вязкостью растворов в уксусной кислоте и ацетатном буфере. Следует отметить, что применение раствора Огсафола в качестве растворителя позволяет получить растворы хитозана, концентрация которых ограничена 4% (в растворе Огсафола с концентрацией 60 г/л) и 6% (в растворе Огсафола с концентрацией 60 г/л с добавлением 2% УК).

Поскольку вязкостные свойства растворов полиэлектролитов зависят от степени ионизации ионогенных групп, для ответа на вопрос об интенсивности взаимодействия аминок групп хитозана и сульфогрупп Огсафола было исследовано влияние УК на реологические характеристики 4%-ных растворов хитозана в Огсафоле (рисунок 52). Из кривых течения видно, что УК практически не влияет на вязкость растворов хитозана, что свидетельствует о достаточном протонировании хитозана Огсафолом.

* Далее в тексте будет использовано техническое название исходного олигомера - Огсафол

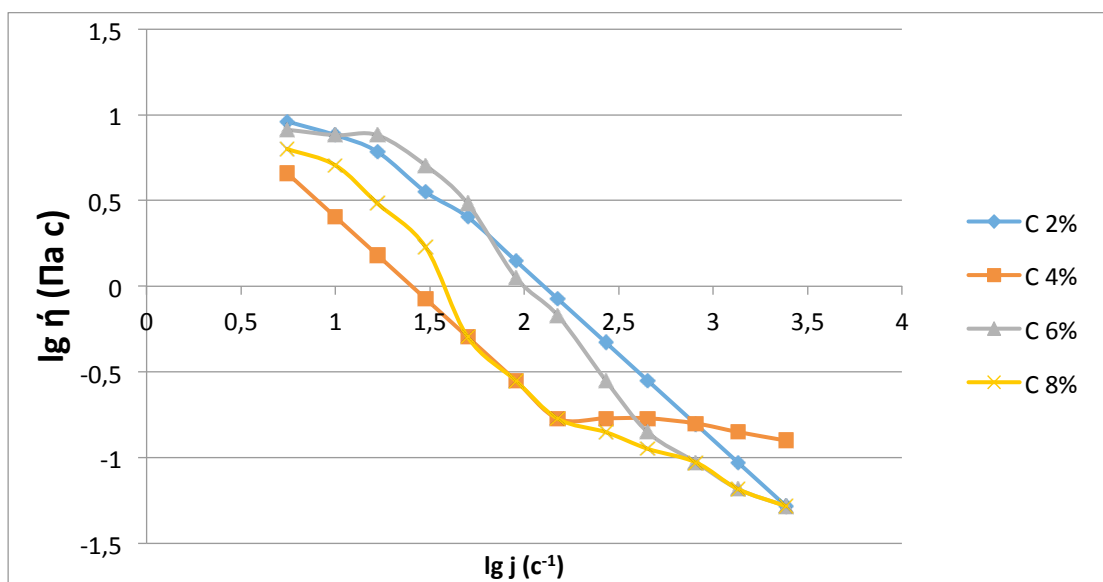


Рисунок 52 - Кривые течения 4%-ных растворов хитозана в Огсафоле при различной концентрации УК

Как видно из кривых течения (рисунок 53), вязкость растворов низкомолекулярного хитозана закономерно увеличивается с увеличением его концентрации.

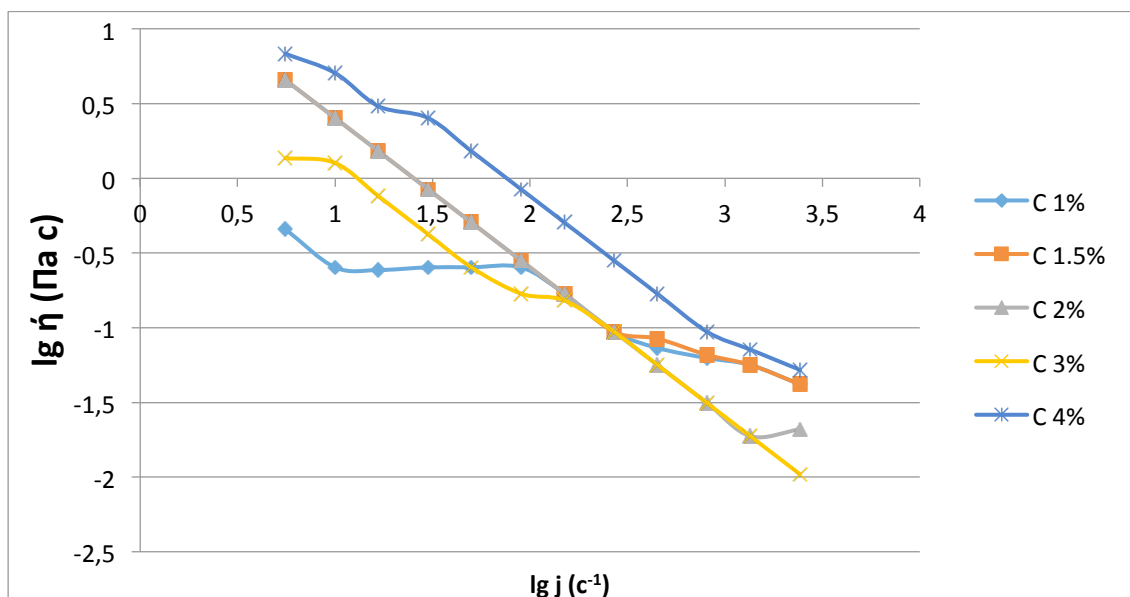


Рисунок 53 - Кривые течения растворов хитозана различной концентрации в Огсафоле с добавлением 2% УК.

Поскольку ранее было показано, что низкомолекулярный хитозан не способен к самостоятельному волокну- и пленкообразованию [163], с целью

определения соотношения компонентов, обеспечивающего возможность использования растворов для электроформования, были исследованы реологические характеристики смесей растворов низкомолекулярного хитозана и ПВС (рисунок 54).

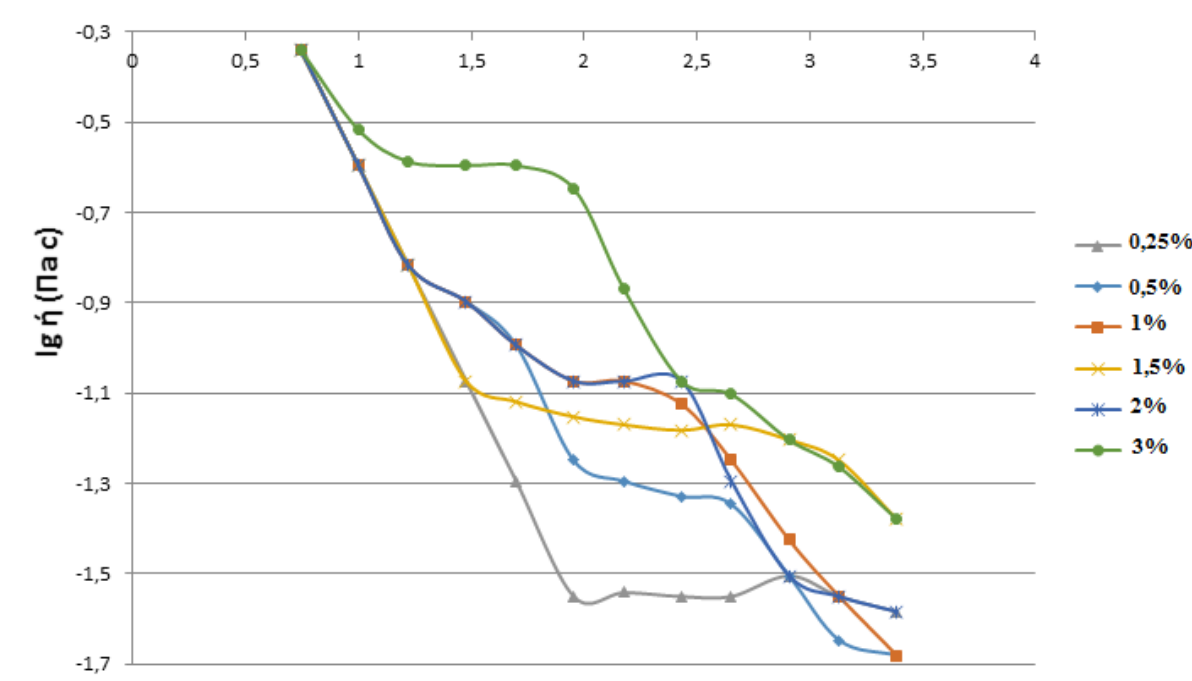


Рисунок 54 - Кривые течения 0,25-3%-ных растворов низкомолекулярного хитозана, содержащих 3% ПВС (растворитель— водный раствор, содержащий 60г/л олигоэтиленоксидсульфокислоты и 2%УК)

Как видно из кривых течения, наибольшей вязкостью обладает раствор с содержанием хитозана 3%, что согласуется с ранее полученными данными для уксуснокислотных растворов [163]. Необходимо отметить, что введение ПВС резко снижает структурированность системы, что указывает на несовместимость ПВС с Огсафолом. Это подтверждается кривыми, характеризующиеся увеличением концентрации хитозана, где происходит заметное смещение области стабильной вязкости.

2.3.4 Исследование возможности формирования нановолокон из смеси хитозан – поливиниловый спирт

В настоящее время для получения ультратонких волокон с высокой величиной удельной поверхности все более активно используется процесс бескапиллярного электроформования [164]. Но, как было отмечено [38,71], электроформование хитозана – это сложный процесс, требующий в каждом конкретном случае, в том числе и для получения хитозансодержащего нановолокнистого материала, определения основных его характеристик.

При определении состава формовочного раствора с технологической точки зрения важной является зависимость вязкости концентрированных растворов хитозана от концентрации кислоты (соотношения кислота/ NH_2), которая носит немонотонный характер со слабо выраженным минимумом при соотношении кислота/ NH_2 4:1,5 [46]. При этом при увеличении мольного соотношения до 2 вязкость резко падает, поскольку увеличивается степень протонирования аминогрупп, изначально недоступных, находящихся в микро- и нанокристаллитах, и разрушение последних. Последующее увеличение концентрации кислоты до 70% приводит к небольшому росту динамической вязкости. В работе [43] при исследовании влияния концентрации УК на вязкость 2%-ного раствора хитозана также показан немонотонный характер этой зависимости, при этом в 75-80%-ной кислоте авторы наблюдали второй экстремум, после которого вязкость снижается. Учитывая, что 77%-ная УК с эквимольным содержанием кислоты и воды имеет наибольшую степень ассоциации и вязкости, повышение вязкости хитозановых растворов в ней, очевидно, связано с ростом структурированности и самого растворителя.

Суммируя сказанное о влиянии концентрации УК на растворимость хитозана и вязкость его растворов, можно сделать вывод о том, что для приготовления, например, 5%-ного раствора полимера нужна как минимум 8%-ная УК. Однако разбавленные растворы УК характеризуются высокими значениями

электропроводности (κ) и поверхностного натяжения (σ) ($\sim 0,16$ См/м, ~ 56 мН/м, соответственно), которые в сочетании с высокой вязкостью растворов хитозана являются неблагоприятными факторами для процесса ЭФ. Поэтому чисто хитозановые нановолокна в настоящее время удалось сформовать только из растворов полимера в концентрированной (70-90%-ной) [165, 166] УК, с низкими величинами κ и σ 1,0-0,4 сСм/м и ~ 30 мН/м, соответственно.

В литературном обзоре показано, что проблема получения композитных хитозан содержащих нановолокнистых материалов решается путем переработки смесей его растворов с другими волокнообразующими полимерами неионогенными и/или гибкоцепными [38, 39, 71]. Так, введением менее жесткоцепных полиэтиленоксида (ПЭО) или поливинилового спирта (ПВС) достигается требуемое снижение вязкости формовочных растворов хитозана и образование в них эластично деформируемой сетки зацепления. Дифильная природа ПЭО и ПВС и отсутствие в них ионогенных групп позволяет также частично снизить показатели поверхностного натяжения и электропроводности формовочных растворов, дополнительное уменьшение которых достигается использованием в качестве растворителя высококонцентрированной 70-80%-ной УК.

В работе для получения нановолокнистого материала методом бесфильтрного электроформования были использованы растворы смесей низкомолекулярного хитозана с ПВС, получаемые путем смешения раствора хитозана в 80%-ной уксусной кислоте с раствором ПВС в воде в массовом соотношении 1:1. Таким образом, содержание в формовочном растворе уксусной кислоты составляло 40%. Содержание каждого компонента в готовых растворах уточняли расчетом [167].

Как было показано выше (рисунок 50), вязкость растворов хитозан - ПВС в ацетатном буфере имеет экстремальную зависимость от содержания хитозана в смеси. Аналогичный характер имеет эта зависимость и для формовочных растворов смеси хитозана с ПВС в 40%-ной УК (рисунок 55).

При этом при уменьшении концентрации ПВС происходит смещение минимума вязкости в область меньших концентраций, также изменяется значение вязкости растворов с изменением концентрации хитозана.

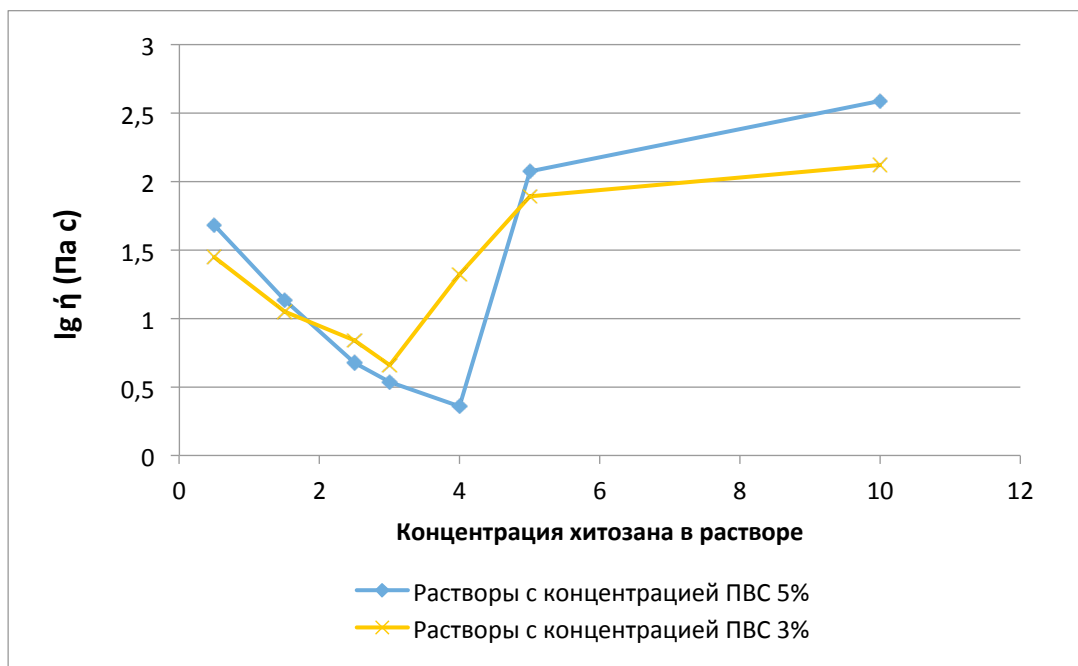


Рис. 55 - Зависимость логарифма динамической вязкости растворов

X25-ПВС в 40% УК от концентрации X25 в растворе

Для смесей растворов X-25 - ПВС наблюдается падение динамической вязкости при увеличении концентрации УК (рисунок 56).

Экспериментальным путем были определены параметры раствора для бескапиллярного электроформования на лабораторной установке «Nanospider» NSLAB 200S: концентрация хитозана (3%), концентрация ПВС (3%) в 40%-ной уксусной кислоте. Начальная динамическая вязкость раствора, равная 4,56 Па·с, линейно снижается при увеличении скорости сдвига (рисунок 57).

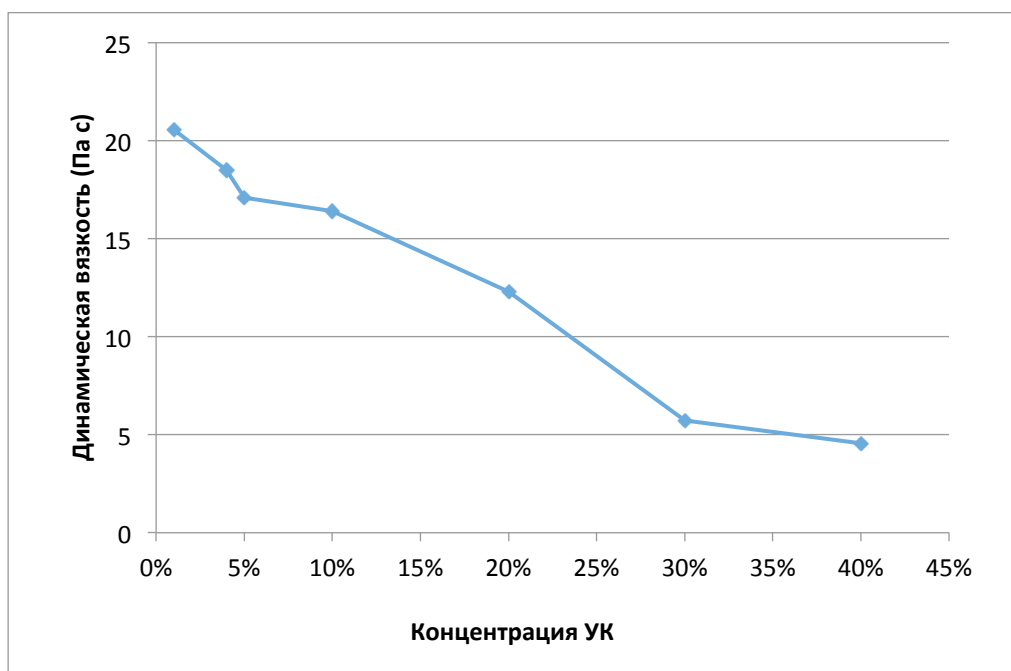


Рис. 56 - Зависимость динамической вязкости растворов Х-25-ПВС от концентрации УК (концентрация полимеров: Х25-3%, ПВС-3%)

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

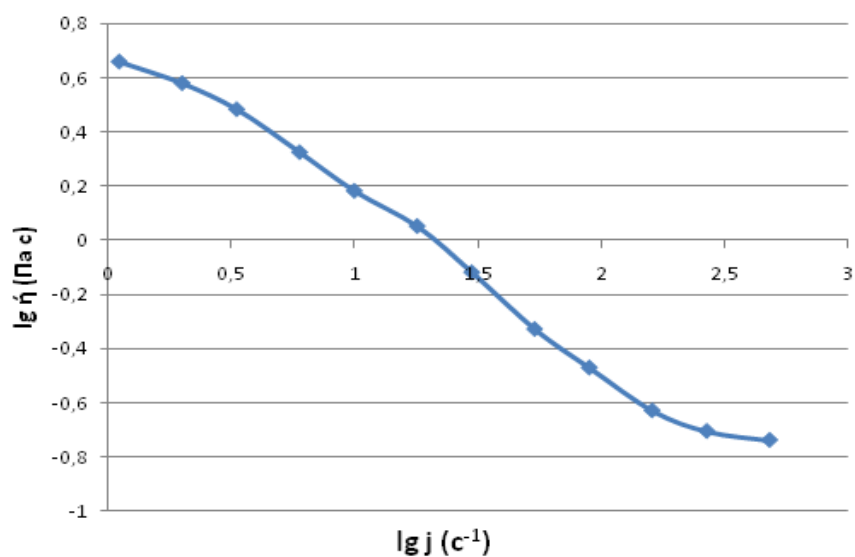


Рисунок 57 - Реологическая кривая течения раствора Х-25 (3%) – ПВС (3%) в 40%-ной УК

При таком соотношении компонентов в растворе происходит формирование сетки зацеплений, которая деформируется под действием магнитного поля мощностью 40 кВ с устойчивым образованием нитей. Несмотря на то, что, согласно литературным данным [38], устойчивое формирование нановолокнистого материала из смеси хитозан-ПВС может быть осуществлено только из растворов УК с концентрацией 70-80%, использование низкомолекулярного хитозана позволяет её снизить вдвое, поскольку такие растворы обладают меньшим поверхностным натяжением. Диаметр нановолокон, полученных при межэлектродном расстоянии 165 мм, составляет 300 – 400 нм (рисунок 58).

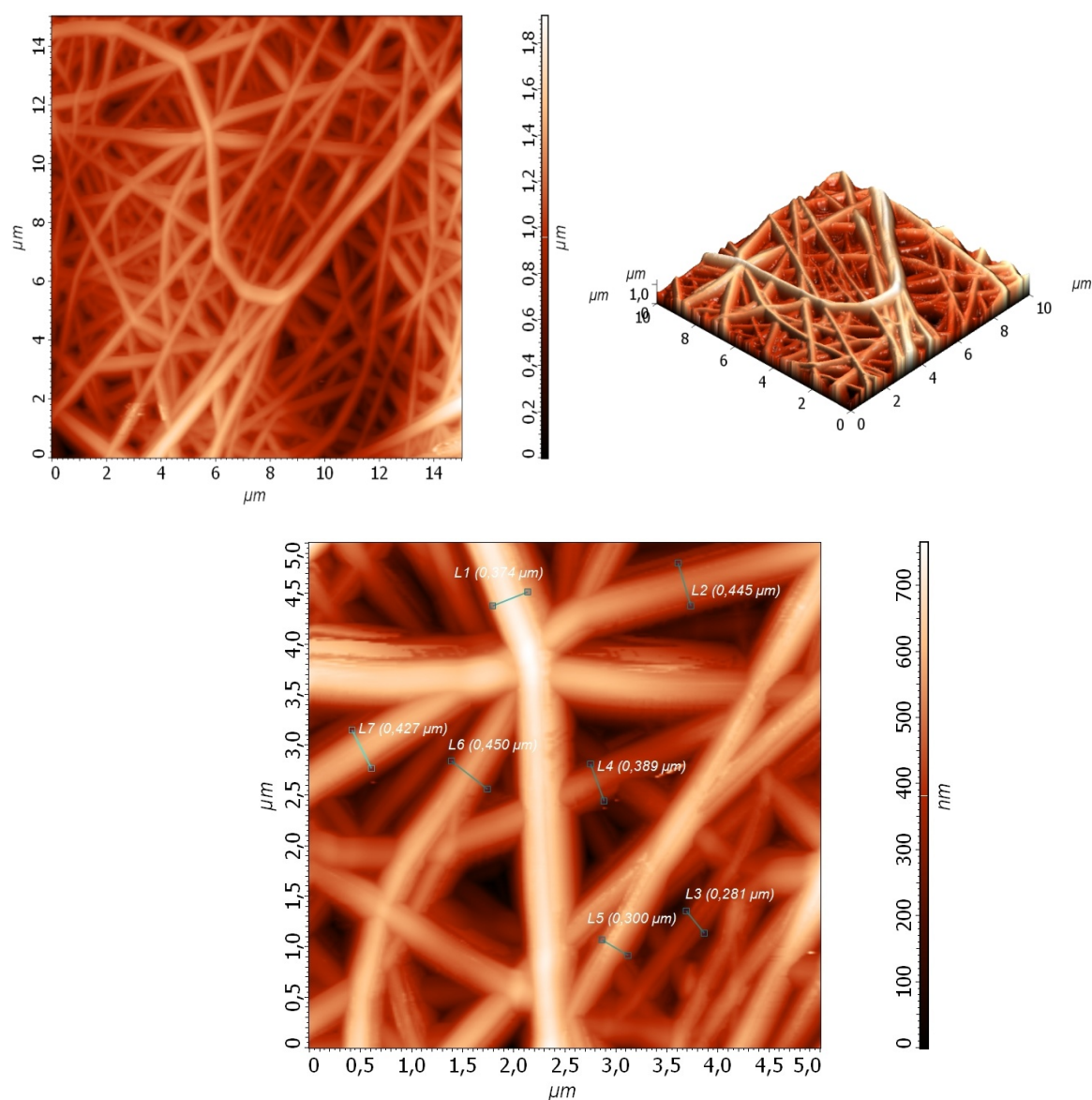


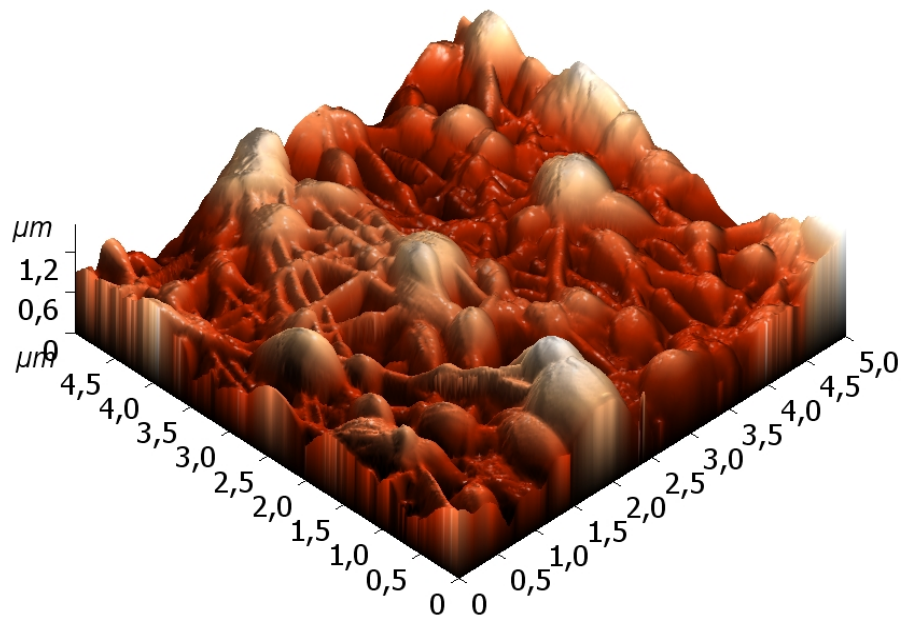
Рисунок 58 – Микрофотографии АСМ нановолокон Х-25 - ПВС

Увеличение напряжения при постоянном межэлектродном расстоянии приводило к уменьшению диаметра формирующихся волокон, поэтому при любом отклонении от вышеуказанных значений наблюдалось появление дефектов нановолокон в виде капель и утолщений, возникающих из-за частичного распыления раствора, а также неполного высыхания и отверждения восходящей струи и склеивания волоконца на приемной подложке.

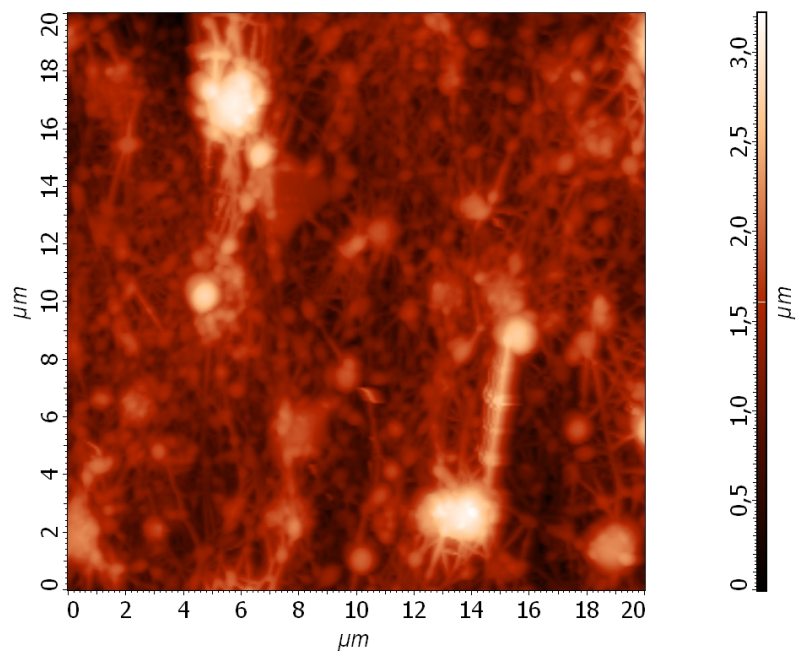
Как было показано (рисунки 52, 53), вязкостные характеристики растворов низкомолекулярного хитозана и его смесей с ПВС в водном растворе Огсафола близки к аналогичным показателям растворов в УК, что создает принципиальную возможность формирования из этих растворов волокнистых и пленочных материалов. При этом наличие объемных гибкоцепных олигооксидных заместителей может быть предпосылкой улучшения их эластических свойств.

Была предпринята попытка осуществить электроформование нановолокнистого материала из раствора в водном растворе Огсафола, содержащем 2% УК, смеси 3% Х25 и 3% ПВС. Формование проводили при напряжении 50 кВ и межэлектродном расстоянии 170 мм.

Исследование морфологии поверхности полученного материала показало (рисунок 59), 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 Х25-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.



(a)



(б)

Рисунок 59 Микрофотография (а) и трёхмерное изображение поверхности (б) материала, полученного электроформованием из раствора смеси 3% Х25 и 3% ПВС в водном растворе Огсафола, содержащем 2% УК

2.3.5 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 [168, 169].

Известно, что на скорость выделения антибактериальных веществ и других медицинских препаратов, инклюдированных в полимерную матрицу, оказывает влияние природа полимеров, их соотношение, тип растворителя, метод формования и различные способы модификации [164]. Это делает необходимым для предварительной характеристики потенциальной биологической активности полимерного материала из смеси низкомолекулярного хитозана и поливинилового спирта исследовать скорость выделения антибактериального вещества — мирамистина, иммобилизованного в его структуре. 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%. Для оценки скорости выделения мирамистина в физиологический раствор был использован метод УФ – спектрофотометрии.

Согласно полученным данным (рисунок 60), 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.

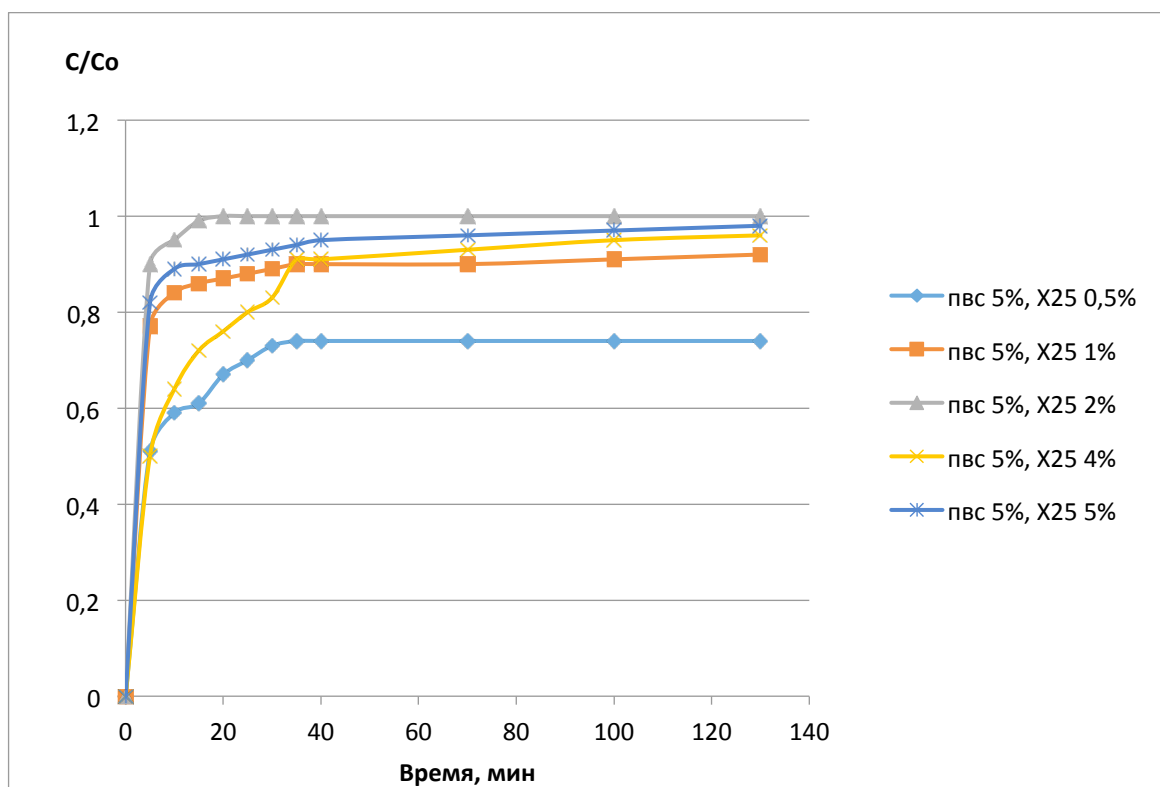


Рисунок 60 - Зависимость скорости выделения мирамистина от концентрации хитозана в формовочном растворе.

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

Для решения этой задачи были сформованы пленки хитозан – ПВС при комнатной и повышенной температуре, подвергнутые последующей термообработке. Согласно полученным данным (рисунок 61), скорость выделения мирамистина зависит не только от температуры формования, 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°C, характерна несколько более высокая скорость

выделения мирамистина. Можно предположить, что в этих условиях происходит формирование более дефектной структуры, заметно не изменяющееся при последующей термообработке.

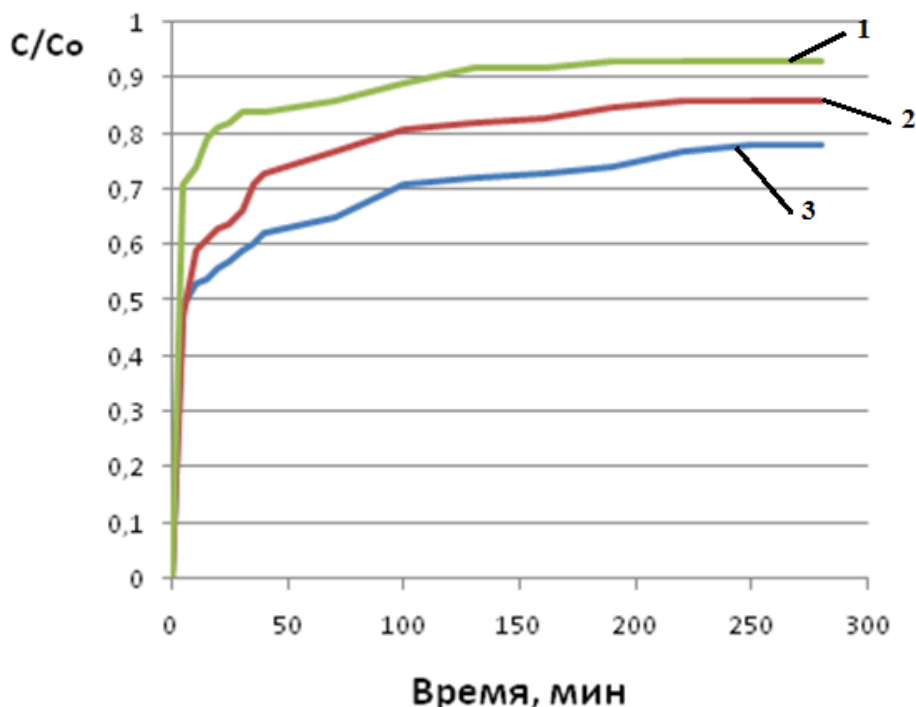


Рисунок 61 - Зависимость скорости выделения мирамистина от условий формирования структуры пленки

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

Для пленки, сформованной при повышенной температуре из раствора хитозана в 70%-ной уксусной кислоте имеет место максимальная скорость выделения мирамистина, вследствие чего уже по истечении 120-130 минут в пленке сохраняется всего около 9% исходного количества мирамистина.

Такое различие в кинетике выделения мирамистина можно объяснить тем, что в растворах уксусной кислоты имеет место сильное электростатическое отталкивание заряженных молекул хитозана, усиливающее межфазное расслоение, что приводит к формированию рыхлой неоднородной структуры. В

буферном растворе отсутствует электростатическое отталкивание, поэтому при отверждении раствора происходит формирование более упорядоченной структуры.

2.3.6 Исследование цитотоксичности и антимикробной активности нановолокнистого материала на основе смеси низкомолекулярный хитозан-поливиниловый спирт

Поскольку, как показано в литературном обзоре [121], низкомолекулярный хитозан обладает ранозаживляющими и антимикробными свойствами, нановолокнистый материал, полученный при электроформовании из раствора смеси низкомолекулярного хитозана и ПВС, может быть перспективным для применения в качестве аппликативного покрытия для гнойных, ожоговых и послеоперационных ран. Важными первоначальными характеристиками таких материалов является их цитотоксичность и антимикробная активность [170]. Оценка этих характеристик была дана для нановолокнистого материала из смеси низкомолекулярный хитозан-поливиниловый спирт, содержащего 0,5% от массы волокна антибактериального препарата – мирамистина*.

Оценка цитотоксичности была проведена в соответствии с [139]. Согласно полученным данным, культивирование клеток в присутствии экстрактов не снижает жизнеспособность клеток (рисунок 62) и не влияет на их морфологию (рисунок 63).

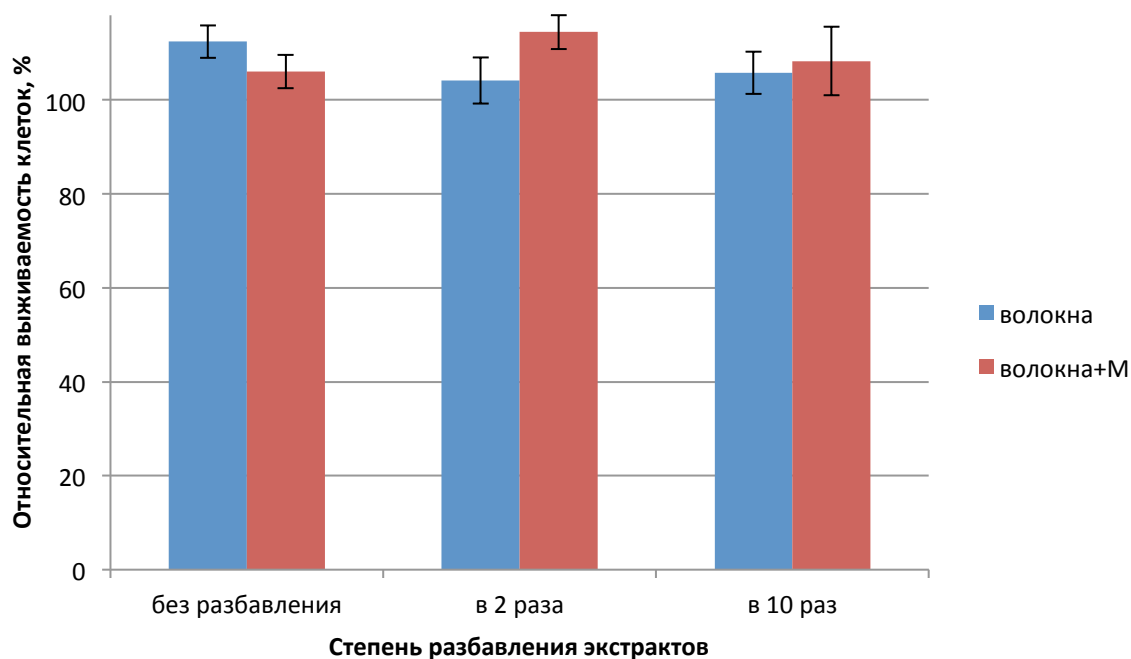
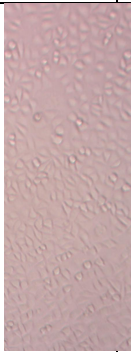
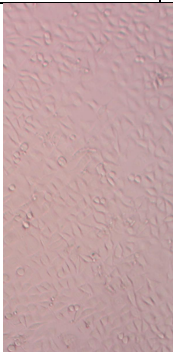
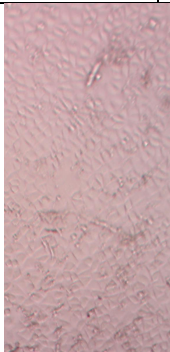


Рисунок 62 – Выживаемость клеток линии мышечных фибробластов L929 после 24 часов инкубирования с экстрактами (контроль (100%) – клетки, культивируемые в среде без добавления экстрактов)

	Концентрация экстракта нановолокон в питательной среде			
	0 (контроль)	10	50	100
Нановолокна				

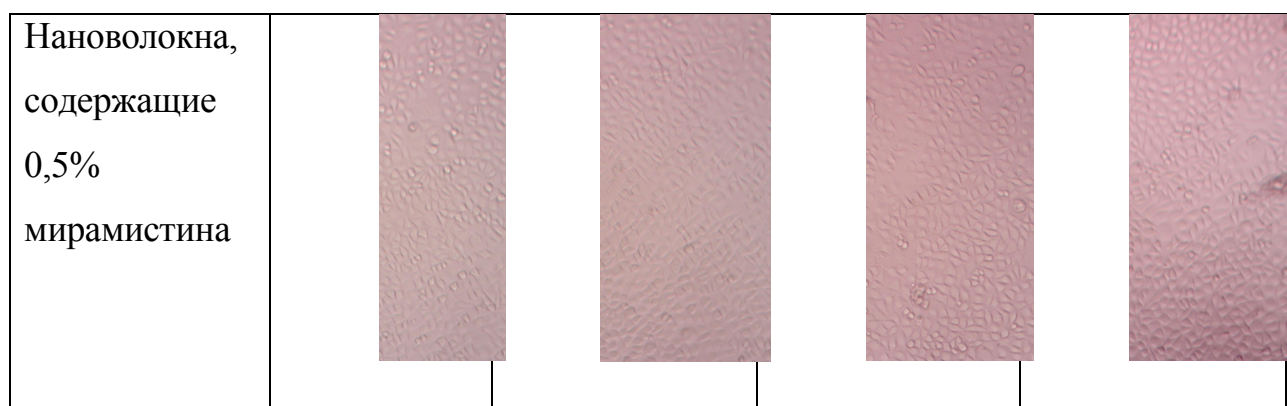


Рисунок 63 – Микрофотографии клеток линии L929 после культивирования с экстрактами в различных концентрациях в течение 24 часов.

Антимикробную активность полученных нановолокнистых материалов определяли по отношению к грамположительной микрофлоре *Staphylococcus aureus* и к грамотрицательной микрофлоре *Escherichia coli* (таблица 6).

Таблица 6 - Результаты испытаний образцов

Образец	Размер образца, мм ²	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 без мирамистина, добавление 1 капли 0,5% 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 материалов, содержащих 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 выявление собственной антимикробной активности мирамистина.

3 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 эквимассовой 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АСМ – атомно-силовая микроскопия

БЭТ - метод математического описания физической адсорбции

ДМСО – диметилсульфоксид

ДХМ – дихлорметан

ИК – инфракрасный

ММ – молекулярная масса

НВ – нановолокно

ПВС – поливиниловый спирт

ПДК – предельно допустимая концентрация

ПЭО – полиэтиленоксид

СД – степень дезацетилирования

ССИ – спад свободной индукции

СП – степень полимеризации

ТГА – термогравиметрический анализ

ТФК – трифторуксусная кислота

УК – уксусная кислота

УФ – ультрафиолет

ХИ – хитозан исходный

Х25 – хитозан, полученный при гомогенном гидролизе

Х20 – хитозан полученный при гетерогенном этанолизе

ЭФ - электроформование

4 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллин, В.Ф. Свойства хитозана из разного сырья [Текст] / В.Ф. Абдуллин, С.Е. Артеменко, Г.П. Овчинникова // Материалы восьмой межд. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». – Казань, 2006. – М.: ВНИРО. – С.7-10.
2. Абдуллин, В.Ф. Технология и свойства хитозана из панциря речного рака [Текст] / В.Ф. Абдуллин, С.Е. Артеменко, Г.Е. Овчинникова // Вестник Саратовского государственного технического университета. – 2006. – №4. – Выпуск 1. – С. 37-43.
3. Ильина, А.В. Хитозан – полимер для формирования наночастиц [Текст] / А.В. Ильина, В.П. Варламов, Ю.А. Ермаков // Доклад Академии наук. – 2008. – №2. – Т.421. – С. 199-201.
4. Скрябин, К.Г. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение [Текст] / К.Г. Скрябин, Г.А. Вихорева, В.П. Варламова. – М. : Наука, 2002. – 368 с.
5. Aslak, E. Characterisation of Chitin and a Study of its Acid-Catalysed Hydrolysis: Thesis for the degree of philosophiae doctor [Текст] / Aslak Einbu. – Trondheim, 2007. – 68 P.
6. Janes, K.A. Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: preparation and characterization [Текст] / K.A. Janes, M.J. Alonso // J. Appl. Pol. Sci. – 2003. – V 88. – №12. – 2769–2776 pp.
7. Фролов, В.Г. Инвестиционный проект: Производство хитина, хитозана, их производных и конечной продукции на их основе [Текст] / В.Г. Фролов // Биотехнология, Нижний Новгород. – 2006 г.
8. Kozo, O. Three D structures of chitosan. [Текст] / O. Kozo, Y. Toshifumi, O. Kenji // Int. J. Biol. Macromol. – 2004. – V. 34. - p. 1–8
9. Пат. 2286352 Российская Федерация, МПК C08B 37/08. Способ выделения очищенного хитозана из реакционной смеси [Текст] / Чернышенко А. О., Вихорева Г. А., Гальбрайт Л.С.; Заявитель и патентообладатель МГТУ им. Косыгина. - №2005113211 / 15; заявл. 03.05.2005; опубл. 27.10.2006.
10. Чеботок, Е.Н. Влияние кристалличности хитина и хитозана на кинетику щелочного дезацетилирования [Текст] / Е.Н. Чеботок, В.Ю. Новиков, И.Н. Коновалова // Журнал прикладной химии. – 2007. – т. 80. – №10. – С. 1724 – 1729.
11. Новиков, В.Ю. Изучение механизма щелочного дезацетилирования хитина и хитозана [Текст] / В.Ю. Новиков, Е.Н. Чеботок, , И.Н. Коновалова // Материалы девятой межд. конф.- «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». Ставрополь, 2008. – М.: ВНИРО, 2008. – С. 39 – 41.

12. Могилевская, Е.А. О кристаллической структуре хитина и хитозана [Текст] / Е.А. Могилевская, Т.А. Акапова, А.Н. Зеленецкий, А.Н. Озерин // *Высокомолекулярные соединения*. – 2006. – Т.48. - №2. – С. 216-226.
13. Рогожин, С.В. Частичный кислотный гидролиз хитозана [Текст] / С.В. Рогожин, А.И. Гамзазаде, М.А. Членов, Е.Ю. Леонова, А.М. Скляр, С.Х. Дотдаев // *Высокомолекулярные соединения*. – 1988. – Т. 30. - №3. – С. 610-616.
14. Huang, Kuo-Shien. Preparation and properties of nanochitosan [Текст] / Kuo-Shien Huang, Yea-Ru Sheu, In-Chun Chao // *Polymer-Plastics Technology and Engineering*. – 2009. - № 48. – P. 1239–1243.
15. Czechowska-Biskupa, R. Plasma Depolymerization of Chitosan in the Presence of Hydrogen Peroxide [Текст] / R. Czechowska-Biskupa, B. Rokitaa, S. Lotfyb, P. Ulanskia, Janusz M. Rosiaka // *J. Carbohydrate Polym.* – 2005. - № 60. – P. 175–184.
16. Tsao, Ching Ting. Kinetic Study of Acid Depolymerization of Chitosan and Effects of Low Molecular Weight Chitosan on Erythrocyte Rouleaux Formation [Текст] / Ching Ting Tsao, Chih Hao Chang, Yu Yung Lin, Ming Fung Wu, Jin Lin Han, Kuo Huang Hsieh // *Carbohydrate Research*. – 2011. - № 346. – P. 94–102.
17. Бочков, А.Ф. Образование и расщепление гликозидных связей [Текст]: монография / А.Ф. Бочков, В.А. Афанасьев, Г.Е. Заиков. – МОСКВА : НАУКА, 1978. – 55 с.
18. Ильина, А.В. Демполимеризация высокомолекулярного хитозана ферментным препаратом Целловиридин Г20х [Текст] / А.В. Ильина, Ю.В. Ткачева, В.П. Варламов // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2002. – Т.38. - № 2. – С.132-135.
19. Tang, Zhen-Xing. Characterizations of immobilized neutral proteinase on chitosan nano-particles [Текст] / Zhen-Xing Tang, Jun-Qing Qian, Lu-E Shi // *J. Process Biochemistry*. – 2006. –V. 41. – P. 1193–1197.
20. Чернова, В.В. Деструкция хитозана под действием некоторых ферментных препаратов медицинского назначения [Текст]: автореф. дисс. на соиск. учен. степ. канд. хим. наук / Чернова Валентина Витальевна; ФГБОУ ВПО "Башкирский государственный университет". – Уфа, 2011. – 23 с.
21. Guillaume, P. Enzymatic degradation and bioactivity evaluation of C-6 oxidized chitosan [Текст] / P.Guillaume, S.Rym, G.Christine, T.Mounir, P. Emmanuel, D. Anne-Marie, M. Nabil, M. M. Farida, M. Philippe // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2013. –V. 60. – P. 383–392
22. Li, Jin. Effect of Sonolysis on Kinetics and Physicochemical Properties of Treated Chitosan [Текст] / Jin Li, Jun Cai, Lihong Fan // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2008. – V. 109. – P. 2417–2425.

23. Prasertsung, I. Degradation of β -chitosan by solution plasma process (SPP) [Текст] / I. Prasertsung, S. Damrongsakkul, N. Saito // J. Polymer Degradation and Stability. – 2013. – V. 98. – P. 2089-2093
24. Шорыгин, П. П. Химия целлюлозы [Текст]: учебное пособие для вузов / П. П. Шорыгин. – М.: Главная редакция химической литературы, 1936. – 419 с.
25. Norbert, M. B. Cellulose and cellulose derivatives [Текст] / M. B Norbert, S. Leon // Interscience I New York. – 1971. – V. 5. – Part 5. – P. 719-1411.
26. Усков, Ю.Н. Влияние серной кислоты на механо химическую деструкцию полисахаридов растительных материалов [Текст] / Ю.Н. Усков, Н.Н. Блинова // Химия древесины. – 1978. - №6. – С. 32-35.
27. Новиков, В.Ю. Разработка и совершенствование технологии хитина и хитозана в Мурманске [Текст] / В.Ю. Новиков, Ю.Б. Рипак // Мат. Восьмой междуна. конф. «Современ. перепек, в исслед. хитина и хитозана». – М.: Изд-во ВНИРО. – 2006. – С.46-50.
28. Будовская, К.Э. Применение новых способов выделения сульфата хитозана для упрощения технологического процесса его получения [Текст] / К.Э. Будовская и др // Химические волокна. – 1995. - №5. – С.31-34.
29. Конкин, А.А. Исследование сравнительной устойчивости ацетальной связи в целлюлозе и других полисахаридах к действию гидролизующих реагентов [Текст]: дис....д-ра хим. наук / Конкин Александр Арсеньевич. – Москва, 1957.
30. Garner, H.K. Preparation and Hydrolysis of Some Acetals and Esters of D-(-)-2,3-Butanediol [Текст] / H.K. Garner, H.J. Loucas // J. Am. Chem. Soc. – 1950. – V. 72. – P. 5497.
31. Базт, М.Р. Свойства разбавленных растворов карбоксиметилового эфира хитозана [Текст] / М.Р. Базт и др // Высокомолекулярные соединения. – 1990. – Т.32А. - №4. – С.805-809.
32. Виноградова, З.А. О химическом составе беспозвоночных Черного моря и его изменениях [Текст]: Труды Карадагской биологической станции / З.А. Виноградова. – Крым: Издательство Академии наук УССР, 1949. – Выпуск 7. – 3-50с.
33. Данилов, С.Н. Изучение хитина. Действие на хитин кислот и щелочей [Текст] / С.Н. Данилов, Е.А. Плиско // Журнал общей химии. – 1954. –т.24. – С. 1761-1769.
34. Енгибарян, Л.Г. Получение новых водорастворимых производных хитозана [Текст] / Л.Г. Енгибарян и др. // Химические волокна. – 2005. - №4. – С.41-44.
35. Вихорева, Г.А. Основы реологии полимерных систем [Текст] / Г.А. Вихорева, Л.С. Гальбрайт. – М.: МГТУ, 2007. – 31 с.

36. Серверс, Э.Т. Реология полимеров [Текст] / Э.Т. Серверс. – М.: Химия, 1966. – 200 с.
37. Малкин, А.Я. Современное состояние реологии полимеров. Достижения и проблемы [Текст] / А.Я. Малкин // Высокомолекулярные соединения. – 2009. - №1 – С. 106 – 136.
38. Сони́на, А.Н. Получение нановолокнистых материалов на основе хитозана методом электроформования [Текст] / А.Н. Сони́на, Г.А. Вихорева, Ю.Н. Филатов, Л.С. Гальбрайт // Химические волокна. – 2010. - № 6. – С.11-17.
39. Ojha, S.S. Fabrication and Characterization of Electrospun Chitosan Nanofibers Formed via Templating with Polyethylene Oxide [Текст] / S.S. Ojha D.R. Stevens // Biomacromolecules. – 2008. –V.9. – P.2523-2529.
40. Desai, K. Morphological and Surface Properties of Electrospun Chitosan Nanofibers [Текст] / K. Desai, K. Kit // Biomacromolecules. – 2008. – V.9. – P.1000-1006.
41. Haider, S. Preparation of the electrospun chitosan nanofibers and their applications to the adsorption of Cu (II) and Pb (II) ions from an aqueous solution [Текст] / S. Haider, S.-Y. Park // J. Membrane Sci. – 2009. –V. 328. – P. 90-96
42. Суворова, А.И. Реологические свойства смесей тройного сополиамида с хитозаном [Текст] / А.И. Суворова, И.С. Тюкова, Е.А. Смирнова // Журнал прикладной химии. – 2005. – т. 78. - №6. – С. 989 – 992.
43. Вихорева, Г.А. Фазовое состояние и реологические свойства системы хитозан — уксусная кислота – вода [Текст] / Г. А. Вихорева, С. З. Роговина, О.М. Пчелко, Л. С. Гальбрайт // Высокомолекулярные соединения. – 2001. – Т.43. - №6. – С. 1079 - 1084.
44. Краюхина, М.А. Полиэлектролитные комплексы хитозана. Формирование, свойства и применение [Текст] / М.А. Краюхина, Н.А. Самойлова, И.А. Ямсков // Успехи химии. – 2008. – выпуск 9. – С. 854.
45. Федосеева, Е.Н. Вязкостные свойства растворов хитозана, и его реакционная способность [Текст] / Е.Н. Федосеева, Л.А. Смирнова, В.Б. Федосеев // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. – 2008. - №4. – С. 59 – 64.
46. Скляр, А.М. Исследование реологических свойств, разбавленных и умеренно - концентрированных растворов хитозана [Текст] / А.М. Скляр, А.И. Гамзаде, Л.З. Роговина, Л.В. Титкова, С.-С.А. Павлова, С.В. Рогожин, Г.Л. Слонимский // Высокомолекулярные соединения. – 1981. –Т.23. - №6. –С.1396 – 1402.
47. Миронов, А.В. Причины нестабильности вязкостных свойств уксуснокислых растворов хитозана [Текст] / А.В. Миронов, Г.А. Вихорева, Н.Р.

Кильдеева, С.А. Успенский // Высокомолекулярные соединения. – 2007. – т. 49. – №1. – С. 136 -138.

48. Lamaque, G. Physicochemical Behavior of Homogeneous Series of Acetylated Chitosans in Aqueous Solution: Role of Various Structural Parameters [Текст] / G. Lamaque, J. – M. Lucas, C.Viton, A. Domard // Biomacromolecules. – 2005. - №6. – P. 131 – 141.

49. Абдуллин, В.Ф. Физико химические свойства хитозана из разных источников сырья [Текст] / В.Ф. Абдуллин, А.Б. Шиповская, В.И. Фомина, С.Е. Артеменко и др. // Химические волокна. – 2008. - №1. – С. 33 – 36.

50. Филатов, Ю.Н. Электроформование микро- и нановолокнистых материалов ФП [Текст] / Ю.Н. Филатов // Заседание в «синем зале» Президума РАН. – 2007. – С.85-101.

51. Dzenis, Y. Modeling-Based Nanomanufacturing of Novel Continuous Nanocrystalline Ceramic Nanofibers with Superior Mechanical Properties [Текст] / Y. Dzenis, Y. Feng, G. Larsen, J. Turner, X. Zeng // NSF Nanoscale Science and Engineering Conference. – 2003. – V.12. – P. 215-233.

52. Сальковский, Ю.Е. Моделирование испаряющейся стационарной струи полимерного раствора при электроформовании волокон [Текст] / Ю.Е. Сальковский // Вестник ЧПГУ имени И.Я. Яковлева Механика предельного состояния. – 2008.- №2. – С. 145-154.

53. Doshi, J. Electrospinning process and applications of electrospun fibers [Текст] / J.Doshi, D.H. Reneker // J. Electrostat. – 2005. - №35. – P. 151

54. Quynh, P. Pham. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review [Текст] / P. Pham Quynh, Sharma Upma, D.Ph., G. Mikos Antonios // Tissue Engineering. – 2006. – V. 12. - № 5. –P. 1197-1211.

55. Zong, X.H. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes [Текст] / X.H. Zong, K. Kim, D.F. Fang, S.F. Ran, B.S. Hsiao, B. Chu // Polymer. – 2002. - №43. – P. 10.

56. Гуляев, А.И. Исследование электроформования ультратонких волокон из полидифениленфталида [Текст] / А.И. Гуляев, Ю.Н. Филатов, Т.Х Тенчурин // Вестник МИТХТ. – 2009. – Т.4. - №5. – С.80-84

57. Матвеев, А.Т. Получение нановолокон методом электроформования [Электронный ресурс]: учебное пособие для студентов по специальности «Композиционные наноматериалы» / А.Т. Матвеев, И.М. Афанасов // МГУ имени М.В.Ломоносова. – 2010. – Режим доступа: <http://nano.msu.ru/files/master/I/materials/electromolding.pdf>

58. Dzenis, Y. Nanomanufacturing of Continuous Polymer Nanofibers by Electrospinning: A Review [Текст] / Y. Dzenis // Progress in Polymer Science. –2005. – P. 289-301.
59. Larrondo, L. Electrostatic fiber spinning from polymer melts [Текст] / L. Larrondo, R. Manley // Polymer Science: Polymer Physics Edition. 2006. – V.19. – P. 909- 933.
60. Fennessey, S.F. Electrospinning: Mechanical behavior of twisted and drawn polyacrylonitrile nanofiber [Текст] / S.F. Fennessey, R.J. Farris // Abstracts of Papers of the American Chemical Society. – 2004. – V. 228. – P.507–527.
61. Loscertales, I.G. Electrically forced coaxial nanojets for one-step hollow nanofiber design [Текст] / I.G. Loscertales, A. Barrero, M. Márquez, R. Spretz, R. Velarde-Ortiz, G. Larsen // Journal of the American Chemical Society. – 2004. – V. 126. – P. 5376–5377.
62. Kim, K. Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly(D,L-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications [Текст] / K. Kim, M. Yu, X.H. Zong, J. Chiu, D.F. Fang, Y.S. Seo, B.S. Hsiao, B. Chu, M. Hadjiargyrou // Biomaterials. – 2003. – V. 24(27). – P. 4977–4985.
63. Dzenis, Y. Continuous carbon nanofibers for nanofiber composites [Текст] / Y. Dzenis, Y.K. Wen // MRS Proceedings. – 2001. – V. 702. – P. 4748- 4756.
64. Min, B. M. Chitin and chitosan nano - fibers: Electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers [Текст] / B. M. Min, S. W. Lee, J. N. Lim, Y. You, T. S. Lee, P. H. Kang, W. H. Park // Polymer. – 2004. – V. 45, P. 7137–7142.
65. Козырева, Е.В. Способ получения прядильного раствора хитозана для электроформования нановолокон [Текст] / Е.В. Козырева, А.Ю. Абрамов и др. // Всерос. молодежная выставка-конкурс прикладных исследований, изобретений и инноваций. — Саратов: Изд-во Саратов. университета. – 2009. – С.111.
66. Zeng, J. Biodegradable electrospun fibers for drug delivery [Текст] / J. Zeng, X. Xu // J. Controlled Release. – 2003. – V.92. - № 3. – P.227-231.
67. Byung-Moo, M. Chitin and chitosan nanofibers: electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers [Текст] / M. Byung-Moo, L.S. Won // Polymer. – 2004. – V.45. - №21. – P.7137-7142.
68. Park, W. H. Effect of chitosan on morphology and conformation of electrospun silk fibroin nanofibers [Текст] / W. H. Park, L. Jeong // Polymer. – 2004. – V.45. - № 21. – P.7151-7157.
69. Geng, X. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution [Текст] / X. Geng, O.-H. Kwon, J. Jang // Biomaterials. – 2005. –V.26. - № 27. – P.5427-5432.

- 70 Li, L. Chitosan bicomponent nanofibers and nanoporous fibers [Текст] / L. Li, Y.-L. Hsieh // Carbohydrate Res. – 2006. – V.341. - №3. – P.374-381.
- 71 Ignatova, M. Electrospun nano-fibre mats with antibacterial properties from quaternised chitosan and poly(vinyl alcohol) [Текст] / M. Ignatova, K. Starbova // Carbohydrate Res. – 2006. –V.341. - № 12. – P.2098-2107.
- 72 Homayoni, H. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization [Текст] / H. Homayoni, H. Abdolkarim // Carbohydrate Polymers. – 2009. – V.77. - №3. — P.656-661.
- 73 Teng, S.-H. Blend fibers of chitosan–agarose by electrospinning [Текст] / S.-H. Teng, P. Wang, H.-E. Kim // Materials Letters. – 2009. – V.63. - № 28. – P.2510-2512.
74. Pillai, C.K.S. Electrospinning of Chitin and Chitosan Nanofibres [Текст] / C.K.S. Pillai, C.P. Sharma // Trends Biomater. Artif. Organs. – 2009. – V.22 (3). – P.179-201.
75. Jayakumar, R. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications [Текст] / R. Jayakumar, M. Prabakaran // Biotechnology Advances. – 2010. – V.28. - № 1. – P.142-150.
76. Hana, J. Electrospinning of methoxy poly(ethylene glycol)-grafted chitosan and poly(ethylene oxide) blend aqueous solution [Текст] / J. Hana, J. Zhanga // Carbohydrate Polymers. – 2011. –V. 83. – P.270-276.
77. Ohkawa, K. Electrospinning of chitosan [Текст] / K. Ohkawa, D. Cha, H. Kim, A. Nishida, H. Yamamoto // Macromolecular Rapid Communications. – 2004. – V. 25. – P. 1600–1605.
78. Hasegawa, M. Dissolving states of cellulose and chitosan in trifluoroacetic acid [Текст] / M. Hasegawa, A. Isogai, F. Onabe, M. Usuda // Journal of Applied Polymer Science. – 1992. –V.45. – P. 1857–1863.
79. Luca, L. Injectable rh BMP 2 loaded chitosan hydrogel composite: Osteoinduction at ectopic site and in segmental long bone defect [Текст] / L. Luca, A.L. Rougemont, B.H. Walpoth, L. Boure, A. Tami, J.M. Anderson, O. Jordan, R. Gurny // Journal of Biomedical Materials Research. – 2011. –V. 96. – P. 66-74.
80. Aliabadi, M. Electrospun nanofiber membrane of PEO/Chitosan for the adsorption of nickel, cadmium, lead and copper ions from aqueous solution [Текст] / M. Aliabadi, M. Irani, J. Ismaeili, H. Piri, M. J. Parnian // Chemical Engineering Journal. – 2013. – V. 220 . – P. 237–243
81. Sangsanoh, P. In vitro biocompatibility of electrospun and solvent-cast chitosan substrata towards Schwann, osteoblast, keratinocyte and fibroblast cells [Текст] / P. Sangsanoh, O. Suwantong, A. Neamnark, P. Cheepsunthorn, P. Pavasant, P. Supaphola // European Polymer Journal. – 2010. – V.46. – P.428–440.

82. Gudjónsdóttir, M. Effects of electrospun chitosan wrapping for dry-ageing of beef, as studied by microbiological, physicochemical and low-field nuclear magnetic resonance analysis [Текст] / M. Gudjónsdóttir, M. D. Gacutan Jr., A. C. Mendes, S. C. Ioannis, L. Jespersen, A. H. Karlsson // Food Chemistry. – 2015. – V. 184. – P. 167–175.
83. Yu, J.H. The Role of Elasticity in the Formation of Electrospun Fibers [Текст] / J.H. Yu, S.V. Fridrikh, G.C. Rutledge // Polymer. – 2006. – V. 47 (13). – P. 4789-4797.
84. Ohkawa, K. Chitosan Nanofiber [Текст] / K. Ohkawa, K.-I. to Mina // Biomacromolecules. – 2006. – V. 7. – P. 3291-3294.
85. Mckee, M.G. Correlations of Solution Rheology with Electrospun Fiber Formation of Linear and Branched Polyesters [Текст] / M.G. Mckee, G.L. Wilkes // Macromolecules. – 2004. – V. 37. – P. 1760-1767.
86. Spasova, M. Preparation of chitosan-containing nanofibers by electrospinning of chitosan/poly (ethylene oxide) blend solutions [Текст] / M. Spasova, N. Manolova // e-Polymers. – 2004. – V. 56. – P. 1-12.
87. Duan, B. Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide) [Текст] / B. Duan, C. Don // J. Biomater Sci. Polymer Ed. – 2004. – V. 15 (6). – P. 797-811.
88. Lou C-W. Preparation of polyethylene oxide/chitosan fiber membranes by electrospinning and the evaluation of biocompatibility [Текст] / C-W. Lou, J-H. Lin // Text. Res. J. – 2008. – V. 78 (3). – P. 254-257.
89. Zhang Y. Preparation of electrospun chitosan/poly (vinyl alcohol) membranes [Текст] / Zhang Y., Huang X. e.a. // Colloid. Polymer Sci. 2007. V. 285 (8). - P. 855-863.
90. Jung K-H., Huh., Meng M-W. Preparation and Antibacterial Activity of PET/Chitosan Nanofibrous Mats Using an Electrospinning Technique. // J. Appl. Polymer Sci. 2007. V. 105 (5). - P. 2816-2823.
91. Chen, Z. Intermolecular interactions in electrospun collagen–chitosan complex nanofibers / Z. Chena, X. Moa, C. Hea, H. Wanga // Carbohydr. Polymer. 2008. V. 72 (3). - P. 410-418.
92. Du J. Nanofibrous membranes from aqueous electrospinning of carboxymethyl chitosan [Текст] / Du J., Hsieh Y-L. // Cellulose. 2008. - P. 1-14.
93. Prabhakaran M.P. Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering [Текст] / Prabhakaran M.P., Venugopal J.R. // Tissue Eng. - Part A. - 2008. - V. 14 (11). - P. 1787-1797.
94. Huang L. Engineered collagen-PEO nanofibers and fabrics. [Текст] / Huang L., Nagapudi K. // Polymer Ed. - 2001. - V. 12. - № 9. - P. 979-993.

95. Bhattarai, N. Alginate-Based Nanofibrous Scaffolds: Structural, Mechanical and Biological Properties [Текст] / N. Bhattarai, Z. Li, D. Edmondson, M. Zhang // *Advanced Materials* 18 (11). – 2006. – P.1463-1467.
96. Zhang, Y.Z. Chitosan Nanofibers from an Easily Electrospinnable UHMWPEO-Doped Chitosan Solution System [Текст] / Zhang Y.Z., Su B. S. Ramakrishna // *Biomacromolecules*. - 2008. - V.9. - № 1. - P.136-141.
97. Klossner, R.R. Correlation of Chitosan's Rheological Properties and Its Ability to Electrospin [Текст] / R. R. Klossner, H. A. Queen, A. J. Coughlin, W. E. Krause // *Biomacromolecules*. - 2008. - V.9 (10). - P.2947-2953.
98. Vondran, J.L. Crosslinked, electrospun chitosan–poly(ethylene oxide) nanofiber mats [Текст] / Vondran J.L., Sun W., Schauer C.L. // *J. Appl. Polymer Sci.* 2008. - V.109 (2). - P.968-975
99. Madhumathi, K. Wet chemical synthesis of chitosan hydrogel–hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications [Текст] / K. Madhumathi, K.T. Shalumon, V.V. Divya Rani, H. Tamura, T. Furuike, N. Selvamurugan, S.V. Nair, R. Jayakumar // *International Journal of Biological Macromolecules*. - 2009. - V.45. P. - 12–15.
- 100 Jayakumar, R. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review [Текст] / R. Jayakumar, Deepthy Menon, K. Manzoor, S. V. Nair, H. Tamura // *Carbohydrate Polymers*. - 2010. - V.82. - P. - 227–232.
- 101 Singh, J. Preparation, circular dichroism induced helical conformation and optical property of chitosan acid salt complexes for biomedical applications [Текст] / J. Singh, P.K. Dutta // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2009. – V.45. – P. 384–392.
102. A.A.A. Queiroz. Development of new hydroactive dressings based on chitosan membranes: Characterization and *in vivo* behavior [Текст] / Queiroz A.A.A, Ferraz H.G., Abraham G.A., Fernandez M.M., Bravo A.L., Roman J.S. // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 2003. – 64A. – P.147–154.
103. X. Li. Cytotoxicity and biocompatibility evaluation of N,O-carboxymethyl chitosan/oxidized alginate hydrogel for drug delivery application [Текст] / Li X, Kong X., Zhang Z., Nan K., Li L.L., Wang X.H., Chen H.// *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2012. – V.50 . – P.1299–1305.
104. D.Archana. Chitosan–pectin–titanium dioxide nano-composite film: An investigation for wound healing applications [Текст] / Archana,D.,Dutta,J.,&Dutta,P.K // *Asian Chitin Journal*. – 2010 – №6. – P.45–46.
105. Wipada, S. Mucoadhesive electrospun chitosan-based nanofibre mats for dental caries prevention [Текст] / S. Wipada, K. Ruchadaporn, S. Monrudee, R.Theerasak, N. Tanasait, O. Praneet // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – V. 117. – №6

. – P. 933–940.

106. Alsarra, A.I. Chitosan Topical Gel Formulation in the Management of Burn Wounds [Текст] / A.I. Alsarra // International Journal of Biological Macromolecules. –2009. –V.45 (1). – P.16-21.

107. Xu, H. Chitosan-hyaluronic acid hybrid film as a novel wound dressing: in vitro and in vivo studies [Текст] / H. Xu, I. Ma, H. Shi, C. Gao, C. Han // Polymers for Advanced Technologies. – 2007. – V.18. – P.869–875.

108. Sudheesh Kumar, P.T. Flexible and Microporous Chitosan Hydrogel/Nano ZnO Composite Bandages for Wound Dressing: In Vitro and In Vivo Evaluation [Текст] / P.T. Sudheesh Kumar, Vinoth K. Lakshmanan, T.V. Anilkumar, C. Ramya, P.Reshmi, A.G. Unnikrishnan, S.V. Nair, R. Jayakumar // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2012. – V.4. – P.2618–2629.

109. Singh, D.K. Biomedical applications of chitin, chitosan, and their derivatives [Текст] / D.K. Singh, A. Ray // Journal of Macromolecular Science Polymer Reviews. – 2000. –V.40. – P.69–83.

110. Zileinski, B.A. Chitosan as a matrix for mammalian cell encapsulation [Текст] / B.A. Zileinski, P. Acbischer // Biomaterials. –1994. – V.15. – P.1049–1056.

111. Amiji, M.M. Permeability and blood compatibility properties of chitosan-poly (ethylene oxide) blend membranes for haemodialysis [Текст] / M.M. Amiji // Biomaterials.–1995.–V.16.–P.593–599.

112. Muzzarelli, R.A.A. Chitin [Текст] / R.A.A. Muzzarelli // Oxford: Pergamon Press. – 1977. – P. 309.

113. Калитник, А. А. Противовоспалительная активность хитозана и его низкомолекулярного производного [Текст] / А. А. Калитник, П. А. Марков, А. В. Володько // Медицинский академический журнал. – 2012. – Т. 12. - № 3. – С. 60-61.

114. Харланов А.В. Влияние хитозана с различной степенью ацетилирования на антителообразование у мышей // Мед. иммунология. – 2005. – Т. 7, No 2-3. – С. 329.

115. Харланов, А.В. Влияние хитозана с различной степенью ацетилирования на антителообразование у мышей [Текст] / А.В. Харланов // Мед. иммунология. – 2005. – Т. 7. – № 2-3. – С. 329.

116. Singla, A.K. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update [Текст] / A.K. Singla, M. Chawla // J. Pharm. Pharmacol. – 2001. – V. 53. – P. 1047-1067.

117. Tharanathan, R.N. Chitin – the undisputed biomolecule of great potential [Текст] / R.N.Tharanathan, F.S. Kittur // Crit. Rev. Nutr. – 2003. – V. 43. – P. 61-87.

118. Liu, X.F. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan [Текст] / X.F. Liu, Y.L. Guan, D.Z. Yang, Z. Li, K.D. Yao // J. Appl. Polym. Sci. – 2001. – V. 79. – P.1324-1335.

119. Zhang, H. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylations [Текст] / H. Zhang, S.H. Neau // Biomaterials. – 2001. – Vol. 22. – №12. – P. 1653–1658.

120. Куликов, С.Н. Влияние молекулярной массы хитозана на его противовирусную активность в растениях [Текст] / С.Н. Куликов, С.Н. Чирков, А.В. Ильина, С.А. Лопатин, В.П. Варламов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – V. 42. – № 2. – С. 224–228.

121. Vishu Kumar, A.B. Low molecular weight chitosans: preparations with the aid of papain and characterization [Текст] / A.B. Vishu Kumar, M.C. Varadaraj, R.G. Lalitha, R.N. Tharanathan // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. V. 1670. – №2. – P.137–146.

122. Ito, M. Anti-ulcer effects of chitin and chitosan, healthy foods, in rats [Текст] / M. Ito, A.Ban, M. Ishihara // Jpn. J. Pharmacol. – 2000. V. 82. – №3. – P. 218–225.

123. Ahmed, J. H. Evaluation of the gastroprotective effect of misoprostol, chitosan and their combination on indomethacin induced gastric ulcer in rats [Текст] / J. H. Ahmed, J. A. S. Al-Ahmed, E. A. Al-Masoodi / MJBUR. – 2011. – V. 29. – № 1-2. – P.1-8.

124. Максимова, С. Н. Хитозан как антимикробное и антиоксидантное средство в технологии продуктов из гидробионтов [Текст] / С. Н. Максимова // Известия ТИНРО (Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра). Владивосток. – 2012. – Т.170. – С. 283-290

125. Chung, Y. C. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan [Текст] / Y. C.Chung, C. Y. Chen // Bioresource Technol. – 2008. – Vol. 99. – N 8. – P. 2806–2814

126. Куликов, С.Н. Антибактериальная активность хитозана и его производных [Текст] / С.Н. Куликов, Ю.А. Тюрин, А.В. Ильина, А.Н. Левов, С.А. Лопатин, В.П.Варламов. // Материалы Девятой Международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (РосХит 2008). – 2008. - с. 95-100.

127. Wipada S., Mucoadhesive electrospun chitosan-based nanofibre mats for dental caries [Текст] / S. Wipada, K. Ruchadaporn, S. Monrudee, R. Theerasak, N. Tanasait, O. Praneet. // Carbohydrate Polymers. – 2015. – V. 117. – №6, P. 933-940

128. Natthan, C. Lysozyme-loaded, electrospun chitosan-based nanofiber mats for wound healing [Текст] / C. Natthan, O. Praneet, R. Theerasak, N. Tanasait // International Journal of Pharmaceutics. – 2012. – V 427. – Issue 2. – P. 379-384.

129. Volpato, F., Preservation of FGF-2 bioactivity using heparin-based nanoparticles, and their delivery from electrospun chitosan fibers [Текст] / F. Volpato, J. Almodóvar, K. Erickson, K. C. Popat, C. Migliaresi, M. J. Kipper // Acta Biomaterialia. 2012. – V 8. – Issue 4. – P. 1551-1559.

130. Behnaz, A., Controlled release of doxorubicin from electrospun PEO/chitosan/graphene oxide nanocomposite nanofibrous scaffolds [Текст] / A. Behnaz, A.A Nadia, I. Mohammad, R.R. Leila, S. Soodeh // Materials Science and Engineering: C. – 2015. – V 48. – P 384-390.

131. Jae-Min P., Immobilization of lysozyme-CLEA onto electrospun chitosan nanofiber for effective antibacterial applications [Текст] / P. Jae-Min, K. Mina, P. Hyun-Sung, J. Am, M. Jiho, K. Yang-Hoon // International Journal of Biological Macromolecules. 2013. – V 54. – P. 37-43.

132. Gomes, S.R., *In vitro* and *in vivo* evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study [Текст] / S.R. Gomes, G. Rodrigues, G.G. Martins, M.A. Roberto, M. Mafra, C.M.R. Henriques, J.C. Silva // Materials Science and Engineering: C. 2015. – V 46. – P. 348-358

133. Neamnark, A. *In vitro* biocompatibility of electrospun hexanoyl chitosan fibrous scaffolds towards human keratinocytes and fibroblasts [Текст] / A. Neamnark, N. Sanchavanakit, P. Pavasant, R. Rujiravanit, P. Supaphol // European Polymer Journal. – 2008. – V 44. – I 7. – P. 2060–2067.

134. Отчет о доклинических исследованиях препарата Мирамистин® раствор для местного применения 0,01%. // Закрытое акционерное общество «ИНФАМЕД» ©.

135. Козырева Е.В., Юкина О.В., Шиповская А.Б. Поверхностное натяжение растворов хитозана // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 4

136. Нестеров, А. Е. Справочник по физической химии полимеров / А. Е. Нестеров, Ю. С. Липатов // Киев: Наукова думка, 1984. – Т. 1. – 376 с.

137. 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

138. Тарасевич Б. Н. ИК спектры основных классов органических соединений: справочные материалы [Электронный ресурс] / Б.Н. Тарасевич // МГУ имени М.В. Ломоносова – 2012. – Режим доступа: http://www.chem.msu.ru/rus/teaching/tarasevich/Tarasevich_IR_tables_29-02-2012.pdf

139. ГОСТ Р ИСО 10993-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы in vitro.

140. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2) p. 55-63.

141. ГФ СССР, XI изд., вып.2. – М., 1990, с.210-225

142. 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

143. Levitin S.V. Acid-catalyzed destruction of chitosan in H₂SO₄ solution [Текст] // Levitin S.V., Gal'braikh L.S., Istomin A.V., Chupina A.A. // *Fibre Chemistry* – 2014. - V. 45. - № 6. – P. 350-355

144. 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

145. 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

146. 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 века». – Москва: МГУДТ. – 2013. - С. 99

147. Шишко, А.М. Кинетика кислотного гидролиза доступных областей целлюлозы [Текст] / А.М.Шишко, С.М. Волкович, А.И. Скриган // *Химия древесины*. – 1977. -№3. – С. 69-73.

148. Фролова, С.В. Деструкция лиственной сульфатной целлюлозы кислотами Льюиса [Текст]: автореф. дисс. на соиск. учен. степ. канд. хим. наук / Фролова Светлана Валерьевна; АГТУ. – Архангельск, 2008. – 20с.

149. Moggridge, R.C.G. Methylglucosaminide: Its Structure, and the Kinetics of its hydrolysis by acids [Текст]/ R.C.G. Moggridge, A. Neuberger // *J. Chem. Soc.* – 1938. – P. 745-795.

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

151. 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 Chemisry – 2014. - V. 46. - № 4. – P. 147-150

152. Грунин, Ю.Б. Анализ системы целлюлоза-вода модифицированными методами протонного магнитного резонанса [Текст]: дис.д-ра хим. наук / Грунин Юрий Борисович; ИХД АН Латвии. – Рига, 1989. – 448с.

153. Грунин Ю. Б. Микроструктура целлюлозы и ее изучение методом релаксации ЯМР [Текст] / Ю. Б. Грунин, Л. Ю. Грунин, Е. А. Никольская, В. И. Таланцев // Высокомол. соед. СерияА. – 2012. – Т. 54. - №3. – С. 397-405

154. Грунин Ю.Б. Возможности ЯМР в анализе структурных и сорбционных свойств биополимеров [Текст] / Ю.Б. Грунин, Т.В. Смотрина, Л.Ю. Грунин, М.М. Лежнина, Г.Ш. Гогелашвили, Н.Г. Грунина, С.В. Красильникова // Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения. – 2001. - №4.

155. Nishiyama, Y. Neutron Crystallography, Molecular Dynamics, and Quantum Mechanics Studies of the Nature of Hydrogen Bonding in Cellulose I beta [Текст] / Y. Nishiyama, G.P. Johnson, A.D. French, T. Forsyth, P. Langans // Biomacromolecules. 9. – 2008. – P.3133-3140.

156. Li ,Q. Supramolecular structure characterization of molecularly thin cellulose I nanoparticles [Текст] /Q. Li, S. Reneckar // Biomacromolecules. –2011. – V.12. –№12. – P. 650-659.

157. Т.В. Смотрина «Изменение химической и надмолекулярной структуры целлюлозы в процессе термической деструкции» [Текст] / Т.В. Смотрина, М.М. Лежнина, Ю.Б. Грунин // Химия и химическая технология. 2002. - Т. 45. – С. 23-35.

158. Николаев В.П. Изопиестический метод анализа [Текст] / В.П.Николаев, А.А. Агеев, Ю.Г. Фролов // Труды МХТИ им. Д.И. Менделеева. – 1978. - №101. – С. 84-101.

159. Грек С. «Адсорбция, удельная поверхность, пористость» [Текст] / Грек С., Синг К. // М.: Мир, 1984. - 306 с.

160. Дубинин М.М. «Новое в области физической адсорбции паров микропорами адсорбентов» [Текст] //Журнал физической химии. 1987.№5. С.1301-1305.

161. Грунин Ю.Б., «Импульсный метод ЯМР для определения термодинамических характеристик адсорбционных процессов в биополимерах» Грунин Ю.Б., Грунин Л.Ю., Никольская Е.А. // Журн. физ. химии, 2007. - Т.81. - №7. - С. 1324-1328

162. Левитин С.В. Реология растворов низкомолекулярного хитозана и его смесей с поливиниловым спиртом [Текст] / Левитин С.В., Гальбрайх 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

163. Левитин С.В. «О влиянии молекулярной массы хитозана на реологические свойства растворов его смесей с поливиниловым спиртом» [Электронный носитель] / Левитин С.В., Чупина А.А., Гальбрайх Л.С. // 6-я всероссийская Каргинская конференция «Полимеры-2014» Москва. МГУ. CD-ROM

164. Симаненкова, Л. Особенности получения и свойства полимерных материалов из смесей биосовместимых аминоксодержащих полимеров [Текст]: дис. канд. хим. наук / Симаненкова Лина Михайловна; МГУДТ. – Москва, 2013.

165. Дмитриев, Ю.А. Технология электроформования волокнистых материалов на основе хитозана [Текст]: дисс. на соискание учёной степени канд. техн. наук / Дмитриев Юрий Александрович; Моск. Гос. Ун-т тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова. – Саратов, 2011. – 144 с.

166. Pillai, C.K.S. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation [Текст] / C.K.S. Pillai, W. Paul, C.P. Sharma // Progress in Polym. Scie. – 2009. – V.34. - №7. – P. 641-678.

167. Левитин С.В. Исследование возможности получения нановолокнистого материала из смеси биосовместимых полимеров, содержащего антибактериальное вещество [Текст] / Левитин С.В., Гальбрайх 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

168. Олтаржевская Н.Д. “Текстиль и медицина. Перевязочные материалы с пролонгированным лечебным действием” [Текст] / Н. Д. Олтаржевская, М. А. Коровина, Л. Б. Савилова // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). – 2002, т. – XLVI. - №1. – С. 133-141

169. Н.Д. Олтаржевская «Способ местного лечения огнестрельных ран и профилактики послеоперационных осложнений с применением многослойного перевязочного материала «Колетекс»» [Текст] / Васильев А.Ю., Егорова Е.А.,

Олтаржевская Н.Д., Моисеева А.А., Гурбатова Т.Ю., Зимина З.М. // Медицинская помощь, 2004. -N 3. -С.33-37

170. Олтаржевская Н.Д. Теоретические основы и технология получения текстильных медицинских материалов с заданными свойствами [Текст]: автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра техн. наук: 05.19.03 / Н.Д. Олтаржевская // Санкт-Петербург. гос. ун-т технологии и дизайна. - Санкт-Петербург, 1994. - 44 с

УТВЕРЖДАЮ
Проректор ФГБОУ ВПО МГУДТ
по науке и инновациям

М.Г.Балыхин

« » 2015 г.

СОГЛАСОВАНО
Зав. кафедрой
технологии
химических волокон и наноматериалов

Л.С.Гальбрайх

« » 2015 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство хитозана низкомолекулярного

Срок действия регламента до "20" марта 2018 г.

Оглавление

1 Информационные материалы.....	3
2 Характеристика конечной продукции производства.....	4
3 Химическая схема производства.....	4
4 Технологическая схема производства.....	5
5 Аппаратурная схема производства.....	6
6 Характеристика сырья, материалов и полупродуктов.....	8
7 Описание технологического процесса.....	9
8 Материальный баланс.....	15
9 Контроль производства и управление технологическим процессом.....	16
10 Охрана труда и техники безопасности, пожарная безопасность, производственная санитария и условия труда работников.....	16
11 Перечень производственных инструкций.....	17
Список использованных источников.....	19

1 Информационные материалы

Регламент является основным технологическим документом, устанавливающим технологические методы, технологические средства, нормы и нормативы для осуществления процесса производства определенной продукции, обеспечивающим безопасность работ и достижение оптимальных технико-экономических показателей.

В зависимости от стадии разработки продукции, степени освоения ее технологии производства или целей осуществляемых работ технологические регламенты подразделяются на следующие типы:

- лабораторные;
- опытно-промышленные;
- пусковые;
- промышленные;
- типовые промышленные.

Лабораторный регламент является технологическим документом, которым завершаются научные исследования в лабораторных условиях при разработке технологии производства нового вида продукции или нового технологического метода производства серийно выпускаемой продукции.

Наработка партий (образцов) нового вещества или продукции для экспериментальных или исследовательских испытаний осуществляются по лабораторному регламенту.

Лабораторный технологический регламент является основой для разработки опытно-промышленного регламента и составления исходных данных на проектирование опытно-промышленной установки, контрольно-измерительного и испытательного оборудования.

2 Характеристика конечной продукции производства

Хитозан с ММ 25 кДа

Характеристика готового продукта: мелкодисперсный порошок от белого до кремового цвета без запаха.

Упаковка: выпускается в герметичных пакетах массой 0,5 кг.

Хранение: в проветриваемом помещении, без доступа света.

Применение: полимер предназначен в качестве армирующей добавки в бумагах и картонах, а также в качестве компонента для производства нановолокнистого материала медицинского назначения.

Состав: Хитозан

3 Химическая схема производства

В основе процесса производства лежит реакция кислотного-каталитической деструкции хитозана до заданной молекулярной массы.

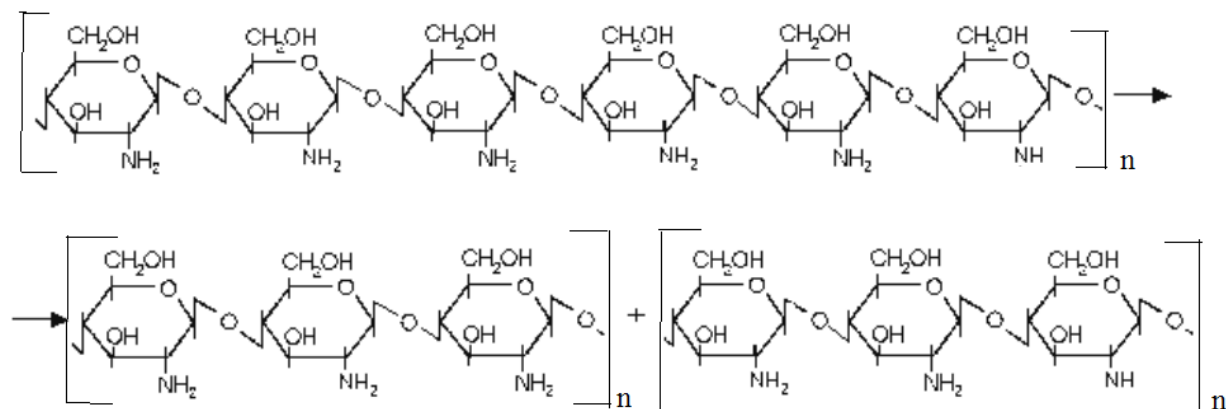
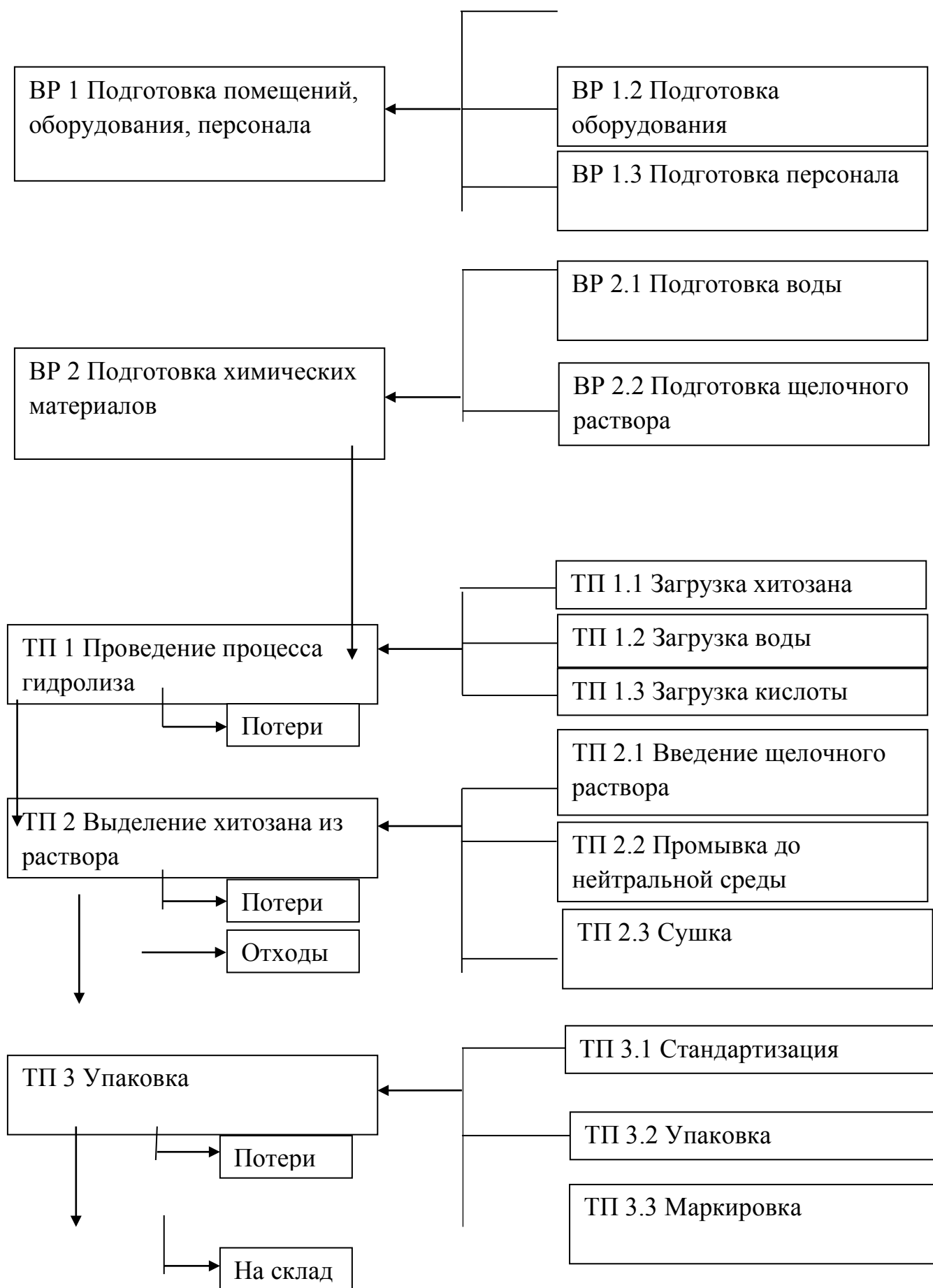


Схема кислотного-каталитического деструкции хитозана

4 Технологическая схема производства



5 Аппаратурная схема производства



Рисунок 1 - Схема универсального лабораторного реактора SELECTA RV-12

1 – Стандартная подставка; 2 – Зажим с опорным кольцом для реактора; 3 – Реактор из нерж. стали AISI 316, объем 30 л, со сливным краном. Наружные размеры: Высота 38 см х 25 см Ø. Вес: 4,5 кг; 4 – Зажим для закрепления стандартных плоских прокладок для реактора “RV-12”; 5 – Мешалка RZR-1 с регулируемой скоростью; 6 – Двойной винтовой зажим; 7 – Гибкий держатель для стержня мешалки Ø 8 мм; 8 – Лопасть мешалки в форме полумесяца, 8 мм Ø, нерж. сталь AISI 304 (длина 90 х ширина лопасти 12 см); 9 – Лопасть мешалки в

форме спирали, 8 мм Ø, нерж. сталь AISI 304, лопасть из ПТФЭ (длина 90 х ширина лопасти 4 см); 10 – Электронный регулятор ЭЛЕКТЕМП с разъемом, для регулировки температуры при использовании колбонагревателя; 11 – Опора с винтовым зажимом для регулятора «Электемп»; 12 – Датчик Pt100, длина 200 мм, Ø 4 мм, с кабелем для соединения с регулятором «Электемп»; 13 – Держатель для кольца с двойным винтовым зажимом, для колбонагревателя; 14 – Колбонагреватель с двойными нагревательными элементами, температура до 400 °С. Потребляемая мощность 1400 Вт.

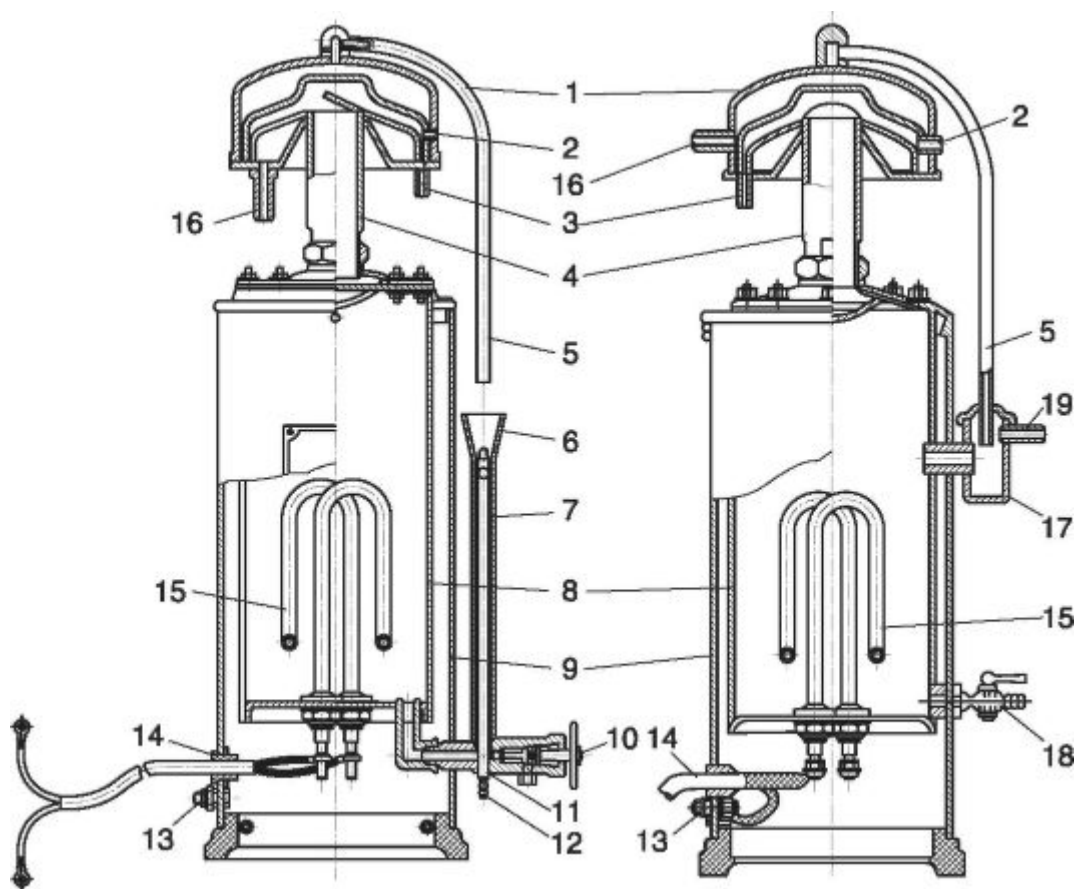
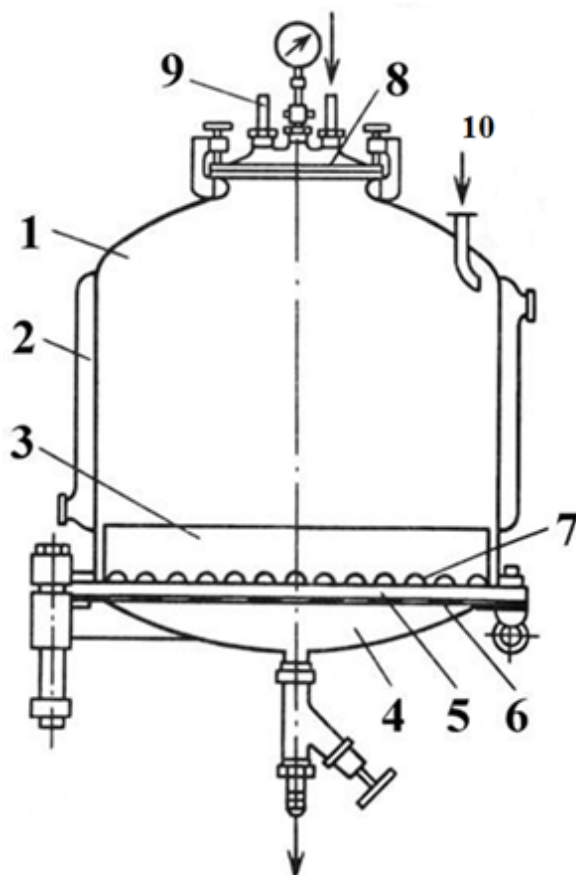


Рисунок 2 – Схема аквадистиллятора ДЭ-10

1 - конденсатор; 2 - отверстие; 3 - ниппель; 4 - патрубок; 5 - сливная трубка; 6 - воронка; 7 - уравниватель; 8 - испаритель; 9 - кожух; 10 - кран; 11 - крестовина; 12 - отверстие в ниппеле; 13 - болт заземления; 14 - провод; 15 - ТЭН; 16 - ниппель; 17 - бачок уравнивателя; 18 - сливной кран; 19 - штуцер отвода воды.



а)



б)

Рисунок 3– Принципиальная схема (а) и изображение вакуумного Нутч-филтра Radleys DN-200 (б)

1 – корпус; 2 – рубашка; 3 – кольцевая перегородка; 4 – откидывающееся дно; 5 – фильтровальная перегородка; 6 – опорная решетка; 7 – сетка; 8 – съёмная крышка; 9 – предохранительный клапан; 10 – подача промывной воды.

6 Характеристика сырья, материалов и полупродуктов

1. Хитозан: молекулярная масса 190 кДа или выше; размер частиц 0,3 мм (80 меш); растворимость 100%; степень дезацетилирования 0,72 - 0,91±0,01; влажность 9%.
2. Вода дистиллированная ГОСТ 24902-81.
3. Серная кислота «ХЧ» ГОСТ 4204-77.
4. Гидроксид натрия «Ч» ГОСТ 2263-79.
5. Ацетон «ХЧ» ГОСТ 2603-79.

7 Описание технологического процесса

ВР 1.1 Подготовка помещений

Производство низкомолекулярного хитозана допускается в химических лабораториях, оснащенных вытяжными системами (вытяжными шкафами), обеспечивающие непрерывный отток воздуха из зоны нахождения химического реактора и вакуум-фильтра.

В помещении должен быть установлен несгораемый шкаф для хранения химических реактивов.

В помещение должны быть подведены водопровод с горячей и холодной водой, и электроэнергия 220 В, 50 Гц.

Для питания электроприборов должны быть установлены розетки с защитой от влаги класса IP 55. На центральной подводке перед распределительной коробкой должен стоять двухполюсный автомат на 50 А.

ВР 1.2 Подготовка оборудования

Конструкция, установка и расположение оборудования, мест соединения и зон обслуживания должны предусматривать возможность работы с оборудованием, его техническое обслуживание и ремонт.

Получение воды требуемого качества должно гарантироваться проектом, конструкцией, монтажом и техническим обслуживанием систем подготовки и распределения воды.

Не допускается эксплуатация оборудования подготовки воды сверх проектной мощности. Приготовление, хранение и распределение воды следует выполнять так, чтобы исключить её простой свыше 3 суток.

Оборудование для подготовки и фильтрации воздуха подлежат аттестации (валидации) и плановому техническому обслуживанию. Их повторный ввод в действие должен быть разрешен в установленном порядке.

ВР 1.3 Подготовка персонала

Для работы в лаборатории допускается персонал, имеющий допуск к работе на химическом оборудовании и прошедший специальный инструктаж.

Весь персонал должен проходить систематическое обучение по вопросам производства.

Персонал должен быть обеспечен средствами индивидуальной защиты рук и органов зрения.

ВР 2.1 Подготовка воды

Вода, используемая при гидролизе хитозана, а также для приготовления щелочного раствора и промывки осадка, перед использованием должна быть деминерализована.

Вода для технологических процессов получается методом перегонки питьевой воды в аквадистилляторах. Основными узлами аквадистилляторов являются испаритель, конденсатор и сборник.

Для получения воды применяют различные аппараты. Можно использовать аквадистиллятор серии ДЭ (рисунок 3). Питание данного аппарата осуществляется водопроводной водой.

Получение воды очищенной с помощью аквадистилляторов или других разрешенных для этой цели установок и ее хранение должны производиться в специально оборудованном для этой цели помещении.

При получении воды с помощью аквадистиллятора ежедневно перед началом работы:

- в течение 10-15 мин проводят пропаривание дистиллятора и трубопроводов при закрытых вентилях подачи воды в конденсатор;
- в течение 15-20 мин отбрасывают первые порции воды.

Полученную воду собирают в чистые стеклянные баллоны. Баллоны должны иметь четкую надпись: «Вода дистиллированная». На баллоне прикрепляется бирка с указанием даты ее получения. Если одновременно используют несколько сборников, их нумеруют.

Стеклянные сборники плотно закрывают пробками с 2 отверстиями: одно - для трубки, по которой поступает вода, другое - для стеклянной трубки, в которую засыпают оксид кальция или карбонат калия и закрывают его ватным тампоном. Воду используют свежеприготовленной или хранят в закрытых емкостях не более 3 сут.

ВР 2.3 Подготовка щелочного раствора

Раствор NaOH 10%-ный готовят путём растворения навески сухой щёлочи в дистиллированной воде. Раствор готовят в стеклянных колбах соответствующего объёма. Хранение раствора осуществляют в стеклянных баллонах. На ёмкости для хранения должна быть нанесена чёткая надпись «Раствор NaOH 10%». На баллоне прикрепляется бирка с указанием даты ее получения. Если одновременно используют несколько сборников, их нумеруют.

Запрещается приготовление раствора свыше проектной мощности. Полученный раствор хранят не более 3 суток.

ТП 1.1 Загрузка хитозана

В чистый сухой реактор, подготовленный к процессу, при комнатной температуре загружают навеску хитозана, закрывают и включают мешалку со скоростью 20-25 об/мин.

ТП 1.2 Загрузка воды

В реактор с хитозаном при постоянном перемешивании подают необходимый объём воды. Перемешивание при комнатной температуре проводят 10 минут, далее включают нагрев и выставляют рабочую температуру 115 °С.

ТП 1.3 Загрузка кислоты

При достижении температуры 90-95°С в реактор вводят серную кислоту и нагрев продолжают до рабочей температуры, при этом скорость перемешивания увеличивают до 60-70 об/мин.

Отсчёт времени гидролиза начинают с момента окончания загрузки кислоты. Гидролиз проводят в течение 30 минут (и более, в зависимости от ММ исходного хитозана).

ТП 2.1 Введение щелочного раствора

По истечении времени гидролиза скорость вращения мешалки увеличивают до 80-90 об/мин, нагрев реактора отключают и, не ожидая снижения температуры, вводят заданный объём щелочного раствора. По окончании загрузки щелочного раствора отбирают пробу в объёме 1-2 мл через штуцер слива реактора и индикаторной бумагой проверяют pH среды, который должен соответствовать 10-11. Если pH не соответствует указанному значению, добавляют щелочной раствор и повторяют отбор пробы.

ТП 2.2 Промывка до нейтральной среды

Промывку до нейтральной среды осуществляют на нутч-филтре с двумя фильтрующими элементами – мелкой сеткой и фильтром Шотта с пористостью класса 2.

Суспензию, получаемую при гидролизе, загружают через верхнюю крышку фильтра, в нижней части фильтра создаётся разрежение посредством вакуумного насоса. Через штуцер в фильтр подаётся дистиллированная вода, при этом суспензия постоянно перемешивается. В нижней части фильтра ведут отбор промывной воды, фильтрация заканчивается, когда реакция промывных вод станет нейтральной. После этого промывной воде дают стечь полностью из фильтрующей камеры, нижнюю часть фильтра меняют на чистую и сухую, создают разрежение и в фильтр подают ацетон, при этом продолжается перемешивание продукта гидролиза. После прохождения всего ацетона через фильтрующий элемент промывка считается оконченной.

ТП 2.3 Сушка

Сушка хитозана осуществляется в открытой плоскодонной ёмкости ровным тонким слоем при комнатной температуре в течение 2 часов. При этом первые 15 минут необходимо шпателем или скребком разравнивать и дробить слой во избежание комкования частиц и агрегатов.

ТП 3.1 Стандартизация

Определение молекулярной массы

ММ определяют вискозиметрическим методом с использованием в качестве растворителя 0.2 М раствора ацетата натрия в 2 %-ной уксусной кислоте в капиллярном вискозиметре Уббелодде с диаметром капилляра 0.54 мм.

На основании полученных данных строят графики концентрационной зависимости приведённой вязкости растворов $\eta_{\text{прив}} = f(C)$, по которым путём экстраполяции к нулевой концентрации находят значения характеристической вязкости. Приведенную вязкость рассчитывают, используя формулы 1-3, ММ - используя формулу 4.

$$\eta_{отн} = \frac{\tau_{p-pa}}{\tau_{p-ля}} \quad (1);$$

$$\eta_{уд} = \eta_{отн} - 1 \quad (2);$$

$$\eta_{прис} = \eta_{уд} / C \quad (3);$$

$$[\eta] = KM^{\alpha} \quad (4)$$

$K = 1,38 \cdot 10^{-4}$, $\alpha = 0,85$ - для хитозана в ацетатном буфере, $t=25^{\circ}\text{C}$;

Проводят несколько параллельных измерений, расхождение между которыми не должно превышать 3%. За окончательный результат принимают среднее арифметическое.

ТП 3.2 Упаковка, маркировка

Хитозан упаковывают в полиэтиленовые или полипропиленовые прозрачные пакеты вручную, которые запечатывают методом термозапайки.

ТП 3.3 Эtiquетирование

Эtiquетирование производят вручную с использованием самоклеящейся бумаги. На этикетку наносят следующие данные: номер партии, дата изготовления партии, средняя молекулярная масса полимера.

8 Материальный баланс

Таблица 1 – Состав материалов

Наименование	Состав на 1 партию:
Хитозан исходный	500 г
Вода дистиллированная для гидролиза	9000 мл
Кислота серная конц.	1000 мл
Вода дистиллированная для раствора NaOH	15300 мл
Гидроксид натрия	1,7 кг
Ацетон	500 мл

Материальные потери на различных стадиях производства:

Проведение гидролиза 10%

Осаждение из раствора 0,20%

Промывка до нейтральной среды 0,30%

Сушка 0,5%

Контроль качества 0,10%

9 Контроль производства и управление технологическим процессом

Низкомолекулярный хитозан должен вырабатываться при соблюдении всех правил химического производства. Низкомолекулярный хитозан должен быть без посторонних примесей и иметь влажность не более 10%, а также выдерживать испытания по стандартизации.

10 Охрана труда и техники безопасности, пожарная безопасность, производственная санитария и условия труда работников

Общие требования к безопасному ведению технологического процесса должны обеспечиваться, в соответствии со стандартами системы безопасности труда (ССБТ): ГОСТ 12.1.007-76, ГОСТ 12.4.011-89, «Правилами устройства электроустановок» (ПУЭ), «Правилами техники безопасности при эксплуатации электроустановок потребителей (ПТБ), «Санитарными правилами организации технологических процессов и гигиеническими требованиями к производственному оборудованию» (СанПин 2.2.2.1327-03), «Санитарными нормами микроклимата производственных помещений» (СанПин 2.2.4.548-96), «Перечнем регламентированных в воздухе рабочей зоны вредных веществ» (ГН 2.2.5.1313-03), и инструкциями по охране труда и рабочими инструкциями для производства.

К работе допускаются лица, достигшие 18 лет, не имеющие медицинских противопоказаний, прошедшие обучение безопасным методам работы в соответствии с «Положением об обучении, инструктаже и проверке знаний по вопросам охраны труда», и сдавшие экзамен на допуск к самостоятельной работе. Все работники лаборатории должны проходить медицинское освидетельствование в установленные сроки.

Производственный персонал допускается к работе только в спецодежде и средствах индивидуальной защиты. Технологический процесс производственный персонал обязан вести в соответствии с действующим регламентом.

На рабочем месте должны быть запасы сырья и материалов, не превышающие сменную потребность. Необходимо знать специфические свойства применяемых веществ и соблюдать установленные правила работы с ними.

Производственный процесс должен быть организован так, чтобы не допускать выделения в воздух рабочей зоны пыли и вредных веществ. Помещение опытно-производственной лаборатории, где возможно выделение пыли, оборудуется соответствующими проекту системами вентиляции.

Все эксплуатируемые электроустановки должны соответствовать требованиям «Правил технической эксплуатации электроустановок потребителей» - ГОСТ Р 50571.2-94. Эксплуатация электрооборудования без заземления не допускается. Помещения опытно-производственной лаборатории обеспечиваются первичными средствами пожаротушения согласно действующим нормам ГОСТ Р 12.3.047-2012. Все работники должны уметь пользоваться средствами пожаротушения и уметь оказывать первую помощь при несчастном случае.

Не допускается загромождения рабочих мест, проходов, выходов из помещений и здания, доступа к противопожарному оборудованию.

11 Перечень производственных инструкций

1. Технологические инструкции по рабочим местам:

- технологическая инструкция по приготовлению моющих средств;
- технологическая инструкция по взвешиванию веществ;
- технологическая инструкция по получению низкомолекулярного хитозана;
- технологическая инструкция по сушке и фасовке готового низкомолекулярного хитозана;
- технологическая инструкция по контролю качества получаемой продукции и её стандартизации.

2. Инструкции по технике безопасности, производственной санитарии и пожарной безопасности производства.

3. План локализации аварийных ситуаций и аварий.
4. Инструкция по подготовке оборудования к ремонту и приему оборудования из ремонта.
5. Инструкция по эксплуатации оборудования, средств измерений и средств автоматизации.

Список использованных источников

1. ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. М.: Стандартинформ, 2007. – 7 с.
2. ГОСТ 12.4.011-89 Система стандартов безопасности труда. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация М.: ИПК Издательство стандартов, 2004. – 8 с.
3. ГОСТ Р 50571.2-94 Электроустановки зданий ч. 3. М.: Стандартинформ, 1995. – 43 с.
4. ГОСТ Р 12.3.047-2012 ССБТ. Пожарная безопасность технологических процессов. Общие требования. Методы контроля. М.: Стандартинформ, 2014. – 46 с.
5. Положение о технологических регламентах производства продукции на предприятиях химического комплекса : [Утверждено: Заместителем Министра Экономики Российской Федерации Н.Г. Шамраевым 6 мая 2000 г.]. М.: Стандартинформ, 2001. – 37 с.