

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский государственный университет имени
А.Н.Косыгина» (Технологии. Дизайн. Искусство)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова»
Российской академии наук



На правах рукописи

Ульябаева Гульназ Ринатовна

**ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА КРИОГЕЛЕЙ
ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА, СОДЕРЖАЩИХ ХИТОЗАН**

Специальности: 05.17.06 – Технология и переработка
полимеров и композитов
02.00.06 – Высокмолекулярные соединения

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научные руководители:
Доктор химических наук, проф. Кильдеева Н.Р.
Кандидат технических наук, с.н.с Подорожко Е.А

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр
Введение	7
1. Литературный обзор	14
1.1. Криогели и принципы получения	14
1.2. Получение и свойства криогелей из поливинилового спирта (ПВС). Влияние различных факторов на свойства КГПВС:	20
1.2.1. Молекулярной массы и степени дезацетилирования	22
1.2.2. Концентрации раствора ПВС	23
1.2.3. Химической природы растворителей ПВС	24
1.2.4. Количества циклов замораживания – оттаивания	25
1.3. Получение и свойства композитных криогелей ПВС	26
1.3.1. Композитные криогели ПВС – целлюлоза	28
1.3.2. Композитные криогели ПВС-хитозан	30
1.3.2.1. Изучение возможности применения криогелей ПВС-хитозан в медицине	32
1.3.2.2. Изучение возможности использования криогелей ПВС-хитозан для сорбционных процессов	35
2. МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	42
2.1. Характеристика сырья и реактивов	42
2.2. Построение фазовой диаграммы системы ПВС – хлоргидрат хитозана – вода	43
2.3. Потенциометрическое титрование растворов хлоргидрата хитозана и поливинилового спирта	45
2.4. Изучение реологических свойств смешанных растворов поливинилового спирта и хлоргидрата хитозана	46
2.5. Получение комплексных и композитных криогелей поливинилового спирта (КГПВС)	46
2.6. Изучение физико-механических и термических свойств криогелей	47

поливинилового спирта и хитозана	
2.7. Изучение поверхности криогелей хитозана методом атомной силовой микроскопии	48
2.8. Изучение морфологии криогелей хитозана методом оптической микроскопии	48
2.9. Изучение комплексных и композитных КППВС методом ИК-Фурье-спектроскопии	50
2.10. Изучение процесса сорбции хитозансодержащими криогелями поливинилового спирта	50
2.11. Изучение цитотоксичности хитозан-содержащих криогелей	51
3. Результаты и обсуждение	53
3.1. Изучение фазовых состояний в системах ПВС – дисперсный хитозан с разной степенью протонирования аминогрупп хитозана	54
3.1.1. Потенциометрическое титрование растворов поливинилового спирта – хитозан (ХТЗ) при различной степени протонирования аминогрупп хитозана	54
3.1.2. Изучение влияния степени протонирования аминогрупп и заряда поверхности частиц хитозана на формирование коагуляционных контактов в дисперсиях хитозана и свойства пленок, полученных на их основе	58
3.1.3. Изучение реологических свойств растворов ПВС содержащих дисперсии хитозана	60
3.1.4. Изучение растворимости дисперсий хитозана в растворах ПВС с различной степенью ионизации аминогрупп хитозана	61
3.1.5. Влияние заряда поверхности частиц хитозана на структурообразование в дисперсии хитозана в растворе ПВС и свойства композитных криогелей	64
3.1.6. Изучение влияния особенностей микроструктуры композитных криогелей поливинилового спирта, получаемых в процессе	66

циклического замораживания–оттаивания и содержащих протонированную и депротонированную формы хитозана	
3.2. Изучение фазовых состояний в системах ПВС – хлоргидрат хитозана - вода	69
3.2.1. Изучение фазовой диаграммы систем ПВС-хлоргидрат хитозана - вода	69
3.2.2. Изучение реологических свойств смешанных растворов ПВС и хлоргидрата хитозана	72
3.2.3. Потенциометрическое титрование растворов хлоргидрата хитозана и поливинилового спирта	75
3.2.4. Физико-химические свойства комплексных криогелей, сформированных из смешанных водных растворов ПВС-ХГХ и ПВС-ХГХ-NaCl	77
3.2.5. Изучение поверхности дисков методом атомной силовой микроскопии	82
3.2.6. Изучение поверхности дисков криогелей хитозана методом оптической микроскопии	84
3.2.7. Исследование микроструктуры тонких срезов комплексных КГПВС-ХГХ	90
3.3. Получение и исследование композитных композитный криогелей ПВС-ХТО, формируемых трансформацией ХГХ в основную форму	93
3.3.1. Физико- механические свойства композитных криогелей ПВС, формируемых трансформацией ХГХ в ХТО в массе комплексных КГПВС	94
3.3.2. Исследование микроструктуры тонких срезов композитных криогелей ПВС-ХТО	97
3.3.3. Изучение структуры комплексных и композитных КГПВС	101

методом ИК- Фурье-спектроскопии	
3.3.4. Исследование микроструктуры сколов комплексных и композитных криогелей ПВС, содержащих включения, соответственно, ХГХ и ХТО	107
3.3.5. Влияние циклического замораживания–оттаивания на параметры жесткости ненаполненных и хитозансодержащих криогелей ПВС	109
3.3.6. Влияние низкомолекулярных компонентов комплексных криогелей ПВС, выделяющихся при переводе ХГХ в ХТО, на физико-механические свойства криогелей	110
3.3.7. Влияние циклического замораживания–оттаивания на микроструктуру ненаполненных и хитозансодержащих криогелей ПВС	116
3.4. Изучение возможностей использования хитозансодержащих криогелей ПВС	120
3.4.1. Изучение цитотоксичности хитозан-содержащих криогелей	121
3.4.2. Изучение процесса сорбции ионов Cu^{2+} хитозансодержащими криогелями поливинилового спирта из водных растворов сульфата меди	122
3.4.3. Изучение процесса сорбции сложных органических соединений хитозансодержащими криогелями поливинилового спирта	130
Основные выводы по работе	144
Список литературы	146

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПВС – Поливиниловый спирт

КГ – криогель

НЖМФ – незамерзшая микрофаза

КГПВС – криогель ПВС

ХТЗ – хитозан

КГПВС-ХТЗ – криогель поливинилового спирта и хитозана

ХГХ – хлоргидрат хитозана

КГПВС-ХГХ – криогель поливинилового спирта и хлоргидрата хитозана

ХТО – хитозан в основной форме (основания)

КГПВС-ХТО – криогель поливинилового спирта и хитозан основания

ККГПВС – композитный криогель поливинилового спирта

НКГПВС – некомпозитный криогель поливинилового спирта

АСМ – Атомно-силовая микроскопия

ГА – глутаровый альдегид

ГО - глиоксаль

КЖК – текстильный краситель Кислотный желтый К

КК2Ж- текстильный краситель Кислотный красный 2Ж

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Создание новых типов полимерных материалов направленных на решение задач реабилитации человека и окружающей среды является актуальным направлением химии и технологии полимеров. В последние десятилетия интенсивно развиваются исследования в области получения гидрогелей – высоконабухающих полимерных тел. Высокая пористость образующейся непрерывной сетки геля, обеспечивает прочность и свободную диффузию воды. Уникальные свойства гидрогелей позволяют разрабатывать на их основе новые сорбционные материалы, материалы биомедицинского (тканевая инженерия) назначения. Гидрогели, полученные при положительных температурах, при удалении растворителя вследствие релаксации пористой структуры и контракции пор теряют способность удерживать воду. Добиться стабилизации пористой структуры можно путем проведения процесса гелеобразования в криоусловиях, когда замороженный растворитель, выполняющий роль порогена, после оттаивания системы формирует в гидрогеле макропористую структуру с системой сообщающихся пор. Перспективным полимером для получения криогелей является биосовместимый, биоразлагаемый природный полисахарид хитозан, который обладает собственной биологической активностью и содержит сорбционно-активные и реакционноспособные аминогруппы. Однако без использования сшивающих реагентов до настоящего времени получить пористые криогели хитозана не представлялось возможным. В настоящей работе с этой целью предлагается использовать композиции хитозана и поливинилового спирта (ПВС), обладающего уникальной способностью к гелеобразованию при умеренно низких температурах без использования сшивающих реагентов за счет формирования системы физических (водородных) связей. Установление закономерностей формирования криогелей из смешанных растворов хитозана и поливинилового спирта в области отрицательных температур, а также изучение морфологии и свойств композитов является важной фундаментальной задачей.

Работа посвящена актуальной проблеме получения криогелей ПВС и хитозана с контролируемой пористостью, морфологией и сорбционной активностью и выполнялась в соответствии с приоритетными направлениями науки РФ при финансировании Российского фонда фундаментальных исследований проект №18-33-00324.

Объекты исследования – комплексные и композитные криогели ПВС содержащие полисахарид хитозан, смешанные растворы хитозана и поливинилового спирта, дисперсии хитозана в растворе ПВС.

Предмет исследования – структурообразование и фазовые переходы в смешанных растворах и дисперсиях ПВС и хитозана; закономерности получения крупнопористых композитных криогелей ПВС, определение перспектив их использования.

Целью работы является разработка процесса получения крупнопористых криогелей на основе хитозана и ПВС без использования сшивающих реагентов, перспективных для применения в качестве биосорбентов и материалов биомедицинского назначения.

В соответствии с поставленной целью в работе были решены следующие задачи:

- изучены свойства смешанных водных растворов поливинилового спирта и хлоргидрата хитозана (ХГХ), а также дисперсий хитозана с разной степенью протонирования аминогрупп;

- изучены фазовые равновесия в системе поливинилового спирта - ХГХ – вода, а также в системе поливинилового спирта – дисперсный хитозан с разной степенью протонирования аминогрупп;

- изучены процессы криотропного гелеобразования в смешанных растворах поливинилового спирта и ХГХ в отсутствие сшивающих реагентов;

- изучено влияние условий криотропного гелеобразования в растворах поливинилового спирта, содержащих хитозан, на структуру и физико-механические свойства полученных криогелей;

- установлены оптимальные технологические параметры процесса криотропного гелеобразования в растворах поливинилового спирта, содержащих хитозан при получении на их основе крупнопористых биосорбентов;

- изучены закономерности процессов сорбции химических загрязнителей из водных растворов.

- изучены сорбционные свойства композиционных криогелей ПВС-хитозан с разной степенью протонирования аминогрупп в отношении тяжелых металлов, красителей и цитотоксичность криогелей хитозана и ПВС.

Методы исследования и технические средства решения задач.

С целью определения физико-химических свойств растворов биополимеров применялись методы ротационной вискозиметрии. Фазовые состояния исследуемых систем изучали методом высокоскоростного разделения фаз и нефелометрии. Получение комплексных криогелей ПВС-ХГХ проводили методом криотропного гелеобразования, последующей щелочной обработкой которых получали композитные криогели ПВС-хитозан. Хитозан в таких криогелях в результате депротонирования аминогрупп становится полиоснованием, в дальнейшем основная форма хитозана обозначается ХТО, а содержащие его криогели ПВС-ХТО. С применением метода определения компрессионного модуля упругости и термомеханического анализа были изучены механические свойства криогелей. Изучение физико-химических свойств и морфологии криогелей и пленок проводили с помощью ИК- Фурье спектроскопии, атомно-силовой, оптической и электронной микроскопии. С применением спектрофотометрии были определены Сорбционные свойства криогелей исследованы спектрофотометрии. Методом тестирования экстрактов была определена цитотоксичность криогелей.

Исследования проводились на оборудовании кафедры химии и технологии полимерных материалов и нанокомпозитов Российского

государственного университета им. А.Н. Косыгина, лаборатории криохимии биополимеров ИНЭОС РАН им. А.Н. Несмеянова. Исследование фазового разделения смешанных растворов проводили в ИБХФ РАН им. Н.М. Эммануэля. Исследование цитотоксичности разработанных пористых гидрогелевых матриц проводилось в ИБХ РАН.

Научная новизна работы. Впервые:

- выявлены особенности криотропного гелеобразования смешанных растворов поливинилового спирта и хитозана без использования сшивающего реагента;

- установлено, что жидкофазное разделение в смешанных водных растворах ХГХ и ПВС, вызванное термодинамической несовместимостью макромолекул разной природы, наблюдается только при повышении ионной силы; получена фазовая диаграмма системы вода - ПВС – ХГХ в присутствии фонового электролита;

- установлено влияние степени протонирования аминогрупп и заряда поверхности частиц хитозана на формирование коагуляционных контактов в дисперсиях хитозана в растворе ПВС и их смешанных растворах: установлено снижение сродства к протону аминогрупп хитозана в присутствии ПВС независимо от соотношения компонентов;

- установлена взаимосвязь свойств смешанных растворов ХГХ и ПВС и физико-механических, физико-химических и морфологических свойств композитных криогелей ПВС, содержащих хитозан;

- с использованием техники криотропного гелеобразования разработан способ получения на основе ПВС, содержащего хитозан, нового биосорбента для удаления загрязнителей из питьевой воды и биологических жидкостей.

- установлено влияние физико-химических параметров процесса сорбции и состава криогеля на кинетику сорбции и равновесную адсорбцию.

Теоретическая значимость работы.

Установлены особенности формирования микроструктуры комплексных и композитных гидрогелевых материалов в присутствии

хитозана с разным зарядом макромолекулы в условиях фазового разделения в процессе криотропного гелеобразования в растворе ПВС. Разработан научно-обоснованный подход к получению хитозансодержащих криогелей без использования сшивающих реагентов, позволивший получить новые функционально активные материалы с контролируемыми физико-химическими, механическими свойствами и заданной морфологией.

Практическая значимость работы заключается в установлении оптимальных параметров процесса получения композитных криогелей на основе поливинилового спирта и функционально-активного полисахарида хитозана, которые могут служить эффективными сорбентами для очистки воды от химических загрязнителей: тяжелых металлов и красителей в процессах биосорбции, а также применяться в качестве пористых матриц для тканевой инженерии или материалов медицинского назначения. Показана возможность регенерации сорбента с помощью раствора сильного электролита и многократной сорбции без изменения сорбционной способности.

На защиту выносятся:

Упругие крупнопористые композитные хитозансодержащие криогели могут быть сформированы в среде поливинилового спирта без использования сшивающих реагентов.

Характеризующая фазовое состояние системы поливиниловый спирт – хитозан–вода зависимость критической степени протонирования аминогрупп хитозана от соотношения полимеров. Фазовая диаграмма системы вода - ПВС – ХГХ в присутствии фонового электролита

Особенности формирования микроструктуры комплексных и композитных криогелей, формируемой в присутствии хитозана с разным зарядом макромолекулы в условиях фазового разделения в процессе криотропного гелеобразования.

Оптимальные условия получения нового биосорбента на основе крупнопористого криогеля поливинилового спирта содержащего, микрочастицы хитозана.

Апробация и реализация результатов работы.

Результаты работы были доложены на *Международных научных конференциях*: Пятый междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии», Москва, Россия, 30 октября - 1 ноября 2019; 10th International conference “Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues”, Heraklion, Crete - Greece, Греция, 5-12 мая 2019; 14th International Saint Petersburg Conference of Young Scientists - Saint Petersburg . - November 12 – 14, 2018; Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2016»; Международная научно-техническая конференция «Дизайн, Технологии и Инновации в текстильной и легкой промышленности» ИННОВАЦИИ – 2016, 15-16 ноября 2016 г; Всероссийская конференция с международным участием «Химия элементоорганических соединений и полимеров 2019», Москва, Россия, 18-22 ноября 2019. *Всероссийских научных конференциях*: VII Всероссийская Каргинская конференция "Полимеры-2017", Москва, 13-17 июня 2017; Всероссийская студенческая практическая конференция «Экология-2017», Москва 2017; Всероссийская научная студенческая конференция «Инновационное развитие легкой и текстильной промышленности» (ИНТЕКС-2015), Россия, 14-16 апреля 2015.

Публикации. Основные положения диссертационной работы опубликованы в **20** печатных работах, 4 из которых – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Структура и объем работы. По своей структуре диссертационная работа состоит из введения, трех глав, выводов по работе, списка литературы, приложения. Работа изложена на 169 страницах машинописного

текста, содержит 50 рисунков, 20 таблиц. Список литературы включает 197 библиографических источника.

1. Литературный обзор

1.1 Криогели и принципы получения

Криотропные полимерные материалы или криогели – наноструктурированные макропористые гетерофазные студни, формируемые путем проведения последующих операций замораживания, выдерживания в замороженном состоянии и оттаивания концентрированных растворов полимеров или коллоидно-дисперсных систем, в которых имеются предпосылки для гелеобразования. Главным условием получения гидрогелей путем криоструктурирования является замораживание и образование поликристаллов основной массы низкомолекулярной жидкости (растворителя). После ее размораживания в массе образца остаются полости (поры), заполненные оттаявшей жидкостью, где непрерывная гелевая сетка образует стенки пор. Таким образом получают гетерогенные гелеобразные полимерные продукты, называемые криогелями или криоструктуратами, имеющие систему сообщающихся макропор. [1-5]

В зависимости от природы взаимодействия при образовании узлов пространственной сетки в криогелях, как и в случае обычных гелей, выделяют несколько различных типов гелеобразования: ковалентно сшитые (химически-сшитые материалы), координационно-ионные (ионотропные системы), нековалентные (термообратимые (физические) криогели) и совмещение данных видов межмолекулярных связей. [1-2, 5-10]

В последние десятилетия наблюдается активный рост исследований, посвященных получению и свойствам криогелей. В свою очередь изучение закономерностей криотропного гелеобразования является фундаментальной задачей криохимии полимеров. В результате этих исследований сложились определенные представления об основных механизмах процессов криотропного гелеобразования, специфических эффектах, характерных только для этого процесса, а также о влиянии различных параметров каждой из стадий криогенной обработки на свойства получаемых материалов. [6, 9 - 12]

Процесс формирования криогелей происходит следующим образом (рисунок 1): раствор полимера или коллодно-дисперсной системы, который может содержать низкомолекулярные соединения, например, сшивающие реагенты, подвергаются замораживанию при умеренно отрицательных температурах (-20 - -50°C) и выдерживанию при этой температуре в течение различного времени. В процессе замерзания происходит образование и рост поликристаллов растворителя.

Вымораживание растворителя приводит к концентрированию полимерного раствора. Такой рост концентрации приводит к понижению температуры его замерзания системы: образуется, так называемая, незамерзшая жидкая микрофаза (НЖМФ), которая после оттаивания формирует стенки криогеля. В НЖМФ концентрируются компоненты исходного раствора и продукты реакций. В условиях подобного криоконцентрирования в системе реализуются условия для изменения реакционной способности и ассоциации молекул растворенных веществ. В результате система образует макропористый криогель, который содержит взаимопроникающие поры разной величины и геометрии. Порообразователями в таких системах служат замерзшие кристаллы растворителя. Схема получения криогелей показана на рисунке 1. [6, 8]

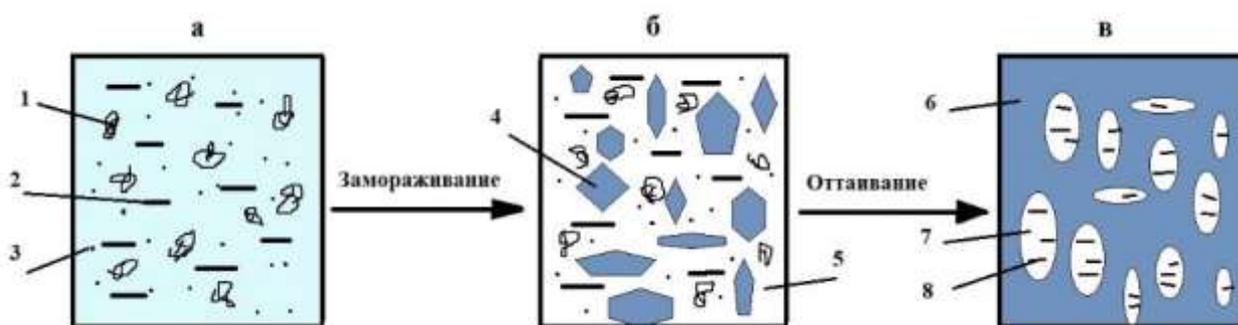


Рисунок 1- Принципиальная схема получения криогелей: а – исходная система; б – замороженная система; в – оттаявший криогель. 1– Высокомолекулярные предшественники; 2 – Растворитель; 3 – Предшественники или растворимые вещества; 4 – Поликристаллы замерзшего растворителя; 5 – Незамерзшая жидкая микрофаза; 6 -

Полимерный каркас криогеля (гелевые стенки макропор); 7 – Макропоры; 8 – Оттаявший растворитель.

В зависимости от реакционных особенностей системы, гелеобразование может происходить на одной из стадий криогенной обработки: либо во время замораживания системы, либо во время выдерживания при отрицательной температуре (чаще всего это относится к химически-сшитым гелям [13, 14]), либо в ходе оттаивания замороженных препаратов (характерно для нековалентного криотропного гелеобразования, например, водных растворов ПВС [6, 7, 15]). Варьируя характеристики используемого полимера, состав растворителя, природу добавок, а также режим криогенной обработки (температуру и продолжительность замораживания, скорость оттаивания, число циклов криогенного воздействия и др.) можно в широких пределах регулировать физико-химические, механические показатели конечных гелей, их макро- и микроструктуру. [2]. В таблице 1 приведены факторы, влияющие пористую структуру криогелей.

Таблица 1 – Факторы, влияющие на пористость криогелей. [16].

Степень и тип сшивки	Основные пути образования - химическая или физическая сшивка. Химически сшитые криогели, обычно обладают бóльшим размером пор. В качестве сшивающих агентов обычно используют бифункциональные низкомолекулярные соединения, которые реагируют с функциональными группами или неопределёнными связями гелеобразующего полимера. Однако реакция сшивки резко снижает способность полимеров к необратимым деформациям и набуханию. В свою очередь физические криогели обладают высокой влагоудерживающей способностью и термообратимостью. В то же время в физически сшитых криогелях отсутствуют
----------------------	---

	<p>непрореагировавшие сшивающие агенты, которые обладают высокой токсичностью. [8, 17-21]</p>
Состав раствора	<p>Низкомолекулярные полимеры ведут к образованию больших пор, по сравнению с растворами высокомолекулярных полимеров. Это связано с образованием более плотноупакованной структуры в высокомолекулярных полимерах. В случае изменения концентрации полимера в растворе, более высокие ее значения приводят к уменьшению среднего размера пор. [22-25]</p>
Температура гелеобразования	<p>При более низких температурах, растворитель кристаллизуется быстрее, в результате чего увеличивается рост числа более мелких кристаллов растворителя. Это приводит к образованию большого количества меньших по размеру пор. [23]</p>
Скорость замораживания	<p>Высокая скорость замораживания растворителя приводит к образованию мелких (менее упорядоченных) кристаллов льда. При низкой скорости замораживания образуются большие кристаллы льда, которые могут разрушить стенки пор. [25]</p>
Криоконцентрация	<p>Происходит «выталкивание» растворенного вещества в жидкую фазу, с постепенным уменьшением температуры замерзания. Она увеличивает скорость желирования, что делает более эффективным криотропное гелеобразование при оптимальных условиях [16]. В результате исходным растворам с более высокой концентрацией соответствует образование более мелких пор.</p>

Благодаря сочетанию такой пористости и благоприятных физико-механических и термофизических свойств криогели находят широкое применение в различных областях таких, как биотехнология, биомедицина [26-30], пищевая промышленность [31-34], экология (сорбенты [4, 17, 35, 36] и материалы «зеленого покрова» [37]). Эксплуатационные свойства криогелей, используемых для различных целей, могут различаться. Для целенаправленного регулирования морфологии и свойств криогелей используют различные методы модификации, которые могут быть физическими, химическими и физико-химическими. Простым и наиболее эффективным методом модификации полимерных материалов является введение в систему растворимых и/или нерастворимых добавок, которые благодаря собственной химической природе привносят специфичный набор свойств для композита. Полученные таким образом композиционные криогели в итоге совмещают в себе свойства всех введенных добавок. Например, можно получать криогели с комплексом заданных свойств: бактерицидностью, жесткостью, теплостойкостью, сорбционной активностью и др.

В ряде работ было отмечено, что при формировании криогелей могут быть использованы полимеры различной химической природы. Такой прием позволяет достичь нового сочетания полезных свойств гидрогелей. Так синтетические полимеры придают материалу жесткость и необходимую термостойкость, а биополимеры биосовместимость, гидрофильность, биодеградируемость. Например, криогели на основе поливинилового спирта и альгинат-оксида кальция были использованы для замещения костной ткани [38], а криогели натриевой соли карагинана и желатина открывают возможность использования в заместительной хирургии не только костей, но и кожи [39]. В свою очередь такие натуральные полисахариды как альгинат, агароза, коллаген, желатин, хитозан чаще всего находят применение в качестве скаффолдов и матриц в заместительной хирургии и клеточной инженерии [16, 39-43]. Среди природных полисахаридов наибольшее

распространение получили хитозан и целлюлоза. На их основе получены уникальные криогели для медицины и биоинженерии (депо для адресной доставки лекарственных соединений, [44-46] пористые носители для клеточной инженерии [3,47-54] и стоматологии [47, 54]), а также эффективные сорбционные материалы для очистки вод и биологических жидкостей от различных токсинов [55, 56], органических загрязнителей как красители [57-62], ионов металлов [17, 63-65] и радионуклеидов [66, 67].

Основным недостатком при разработке хитозансодержащих материалов является использование сшивающих агентов, поскольку данные полисахариды самостоятельно не формируют гидрогели. Получение криогелей без использования сшивающих реагентов возможно из растворов некоторых синтетических полимеров. [1-3, 41, 42,58, 68-77]. Пористые криогели и разнообразные композиты были получены на основе поливинилового спирта (ПВС). К примеру, известны криогели на основе поливинилового спирта, содержащие иммобилизованные дрожжи, для использования в биотехнологическом синтезе спирта [34, 78], при введении в криогель ПВС кетопрофена были получены противовоспалительные покрытия или импланты [79].

Для применения таких материалов в медицине и биотехнологии учитываются такие уникальные свойства композитных криогелей ПВС, как высоко развитая поверхность, обеспечивающая достаточную площадь для диффузии низкомолекулярных соединений (доставка лекарственных веществ, сорбция продуктов метаболизма и различных загрязнителей), для крепления и пролиферации клеток [46, 80-83], а широкопористая структура гелей обеспечивает прохождение реакций значительно быстрее, чем в непористых гидрогелях [84].

1.2. Получение и свойства криогелей из поливинилового спирта (ПВС). Влияние различных факторов на свойства КГПВС:

Среди всех полимеров, используемых для получения криогелей, наиболее широко применяемым и изученным является поливиниловый спирт (ПВС). Такой интерес обусловлен уникальными механическими, диффузионными и теплофизическими свойствами криогелей ПВС (КГ ПВС), доступностью самого полимера, его нетоксичностью, гидрофильностью, биосовместимостью и биоразлагаемостью [85-88] в тканях и жидкостях человека, а также относительно простой методикой получения геля (раствор ПВС просто подвергают замораживанию в течение некоторого времени, а затем оттаивают). Благодаря наличию большого количества гидроксильных групп в макромолекуле ПВС сетка криогеля стабилизирована за счет образования внутри- и межмолекулярных водородных связей.

Процессы криоструктурирования ПВС были подробно описаны в работах Пеппаса, Лозинского, Риккарди, Пазоса [2, 6, 10, 22-24, 26, 30, 88-100]. Общий характер изменения температуры во время криоструктурирования системы ПВС-растворитель изображен на рисунке 2. Термограмма описывается таким образом: первый этап – охлаждение образца от начальной температуры до температуры замерзания растворителя, которое соответствует участку А-В. Из-за высокой концентрации полимера, система имеет свойство переохлаждаться до температуры T_u . Второй этап сопровождается выделением скрытой теплоты кристаллизации, которое вызывает «плато кристаллизации», которое изображено на участке С-Д. Однако при высоких скоростях охлаждения ($v_c > 40$ град*мин⁻¹) это плато может и не наблюдаться. [94, 100]. Следующий этап – охлаждение системы до заданного экспериментом значения, соответствует участку между точками D и E. После выдерживания в замороженном состоянии, система подвергается размораживанию со скоростью, заданной условиями эксперимента.

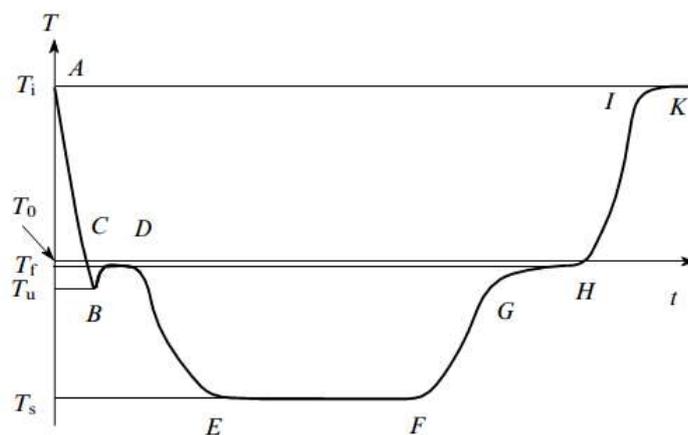


Рисунок 2 - Обобщенная термограмма процесса криотропного гелеобразования. T_i – начальная температура системы, T_o – температура замораживания чистого растворителя, T_f – температура замораживания системы, T_u – низшая температура переохлаждения, T_s – температура выдерживания образца в замороженном состоянии [94].

Сформированные таким образом криогели ПВС являются термообратимыми, они плавятся при нагревании. При этом результаты экспериментов [7] доказывают, что вязкости исходных растворов и растворов, получаемых из соответствующих криогелей после плавления последних, не отличаются, что указывает на отсутствие межмолекулярной сшивки. Таким образом, растворы ПВС образуют физические термообратимые гели. [6]

Однако, свойства таких материалов, полученных методом криотропного гелеобразования, зависят от всех факторов исходного раствора полимера. Меняя различные характеристики используемого полимера (молекулярную массу, молекулярно-массовое распределение, содержание остаточных О-ацетильных групп, стереорегулярность, концентрацию), состав растворителя и режим криогенной обработки (температуру и продолжительность замораживания, скорость оттаивания, число циклов замораживания-оттаивания и др.), можно менять физико-химические показатели конечных криогелей и их структуру. [6, 20, 25, 72, 80, 90, 101, 102]

1.2.1. Молекулярной массы и степени дезацетилирования

Одним из основных факторов, влияющих на способность образования криогелей ПВС, является молекулярная масса исходного полимера. Повышение молекулярного веса полимера может вызывать увеличение степени кристалличности в сетке криогеля [26, 91]. Однако, этот эффект ограничивает подвижность макромолекул полимеров из-за уменьшения свободного объема. [91] Учеными установлено [91], что для получения стабильных физико-химических и механических показателей, криогели надо формировать, используя ПВС с молекулярной массой $M > 50000$, в этом случае концентрированные растворы ПВС образуют мутные, упругие, высокоплавкие ($T_{пл} > 60-80^{\circ}\text{C}$) гетерогенные гели. Использование ПВС с $M < 50000$ приводит к образованию прозрачных низкоплавких ($T_{пл} < 30-40^{\circ}\text{C}$) и механически слабых гелей.

Так же важным аспектом получения стабильных упругих гелей является содержание в макромолекулах полимера остаточных О-ацетильных групп и стереорегулярность ОН- групп в полимере. Установлено, [103-106] что при степени дезацетилирования (СД) ниже 90% криогели ПВС не образуются ни в каких даже самых благоприятных условиях, а для формирования криогелей с «хорошими» упруго-прочностными свойствами необходимо использовать ПВС с содержанием остаточных О - ацетильных групп не более 3%. Межмолекулярные взаимодействия в макромолекулах ПВС в водном растворе образуются благодаря водородным связям между ОН-группами синдиотактических блоков ПВС, а внутримолекулярные – при участии ОН-групп изотактических фрагментов (рисунок 3).

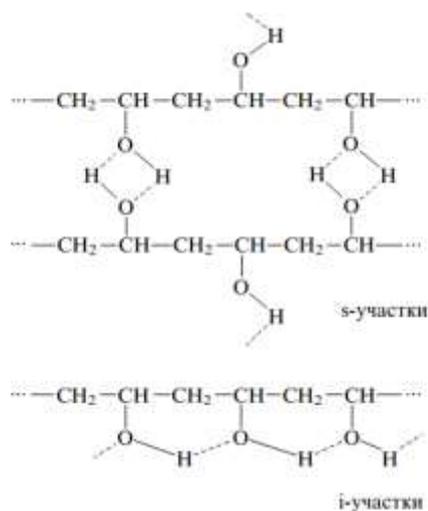


Рисунок 3 - Образование внутри- и межмолекулярных водородных связей в синдио(s)- и изо(i)тактических фракциях ПВС.

Криогели на основе ПВС, обогащенного синдиотактическими фрагментами, имеют более высокую степень кристалличности по сравнению с образцами на основе атактического полимера примерно той же молекулярной массы, что свидетельствует об образовании водородных связей между молекулами и при криотропном гелеобразовании этого полимера. [6, 15, 90, 92, 107]. Варьирование степени кристалличности ПВС за счет изменения его молекулярной массы является очень важным фактором для конструирования материалов биомедицинского назначения, поскольку это влияет на механические и диффузионные свойства криогелей. Такой подход был использован при получении гелей, имитирующих ткани сердечно-сосудистой ткани, кожи [108] или как имплантат для замены межпозвоночных дисков [109], где требуется повышенная прочность и жесткость.

1.2.2. Концентрации раствора ПВС

В литературе существует много работ, описывающих влияние тех или иных параметров на свойства формируемых криогелей ПВС. [21, 22, 24, 95] К одному из таких параметров относится и концентрация исходного раствора полимера. Так, в одной из ранних работ Триу и Кутубутдина [110] описано,

что более высокая концентрация исходного раствора ПВС позволяет получать криогели с меньшей пористостью. Это, в свою очередь, ведет к снижению показателей равновесного набухания. В результате возникает обратная зависимость: чем выше исходная концентрация полимера, тем меньше размер пор и, соответственно, влагоудерживающая способность (набухание).

Однако, в работах Лозинского с соавторами [90] выявлена другая закономерность: рост концентрации ПВС в исходном растворе ведет к увеличению жесткости и термостойкости криогелей. Это объясняется образованием большего количества межмолекулярных водородных связей между ОН-группами, количество которых увеличивается с ростом концентрации полимера.

Хики и Пеппас в своем исследовании варьировали концентрацию раствора ПВС и отмечали, что растворы с более высокой концентрацией приводят к более стабильным гелям, которые имеют более высокие степени кристалличности. [111].

1.2.3. Химической природы растворителей ПВС

Известно, что различные растворители в зависимости от их природы могут сильно влиять на свойства растворов полимеров и дисперсных систем. Такие показатели как полярность и кислотно-основные свойства могут вызывать диссоциацию веществ в растворе, реологические и температурные изменения. Варьирование химической природы растворителей при формировании криогелей ПВС может значительно изменить свойства конечных продуктов, что было детально изучено в работе Хасана и Пеппаса. [112]. Установлено, [113, 114] что такие органические растворители как диметилсульфоксид (ДМСО), этиленгликоль и пропиленгликоль обеспечивают отличные коэффициенты пропускания света для криогелей поливинилового спирта, а также их хорошую прочность на разрыв и высокое содержание воды. Формирование криогелей ПВС в присутствии этих

растворителей было использовано при разработке материалов для контактных линз или для замещения роговицы глаза.

Вода является наиболее часто используемым растворителем для поливинилового спирта для осуществления биомедицинских применений. Для изменения качества этого растворителя, особенно в условиях криогенного воздействия, вводят незначительное количество различных солей (электролитов), хаотропных или космотропных агентов, которые могут быть полезными в последующем использовании биоматериалов. Из-за содержания соли в растворе, происходит снижение температуры замерзания растворителя в результате повышения концентрации растворенных веществ, точка замораживания раствора ПВС снижается с добавлением солей. Однако, из-за диссоциации электролитов в растворе и увеличению количества растворенных веществ в системе, это оказывает отрицательное действие на способность ПВС к кристаллизации [115] и способствует к формированию более мелких пор, чем при формировании гелей без содержания электролита[116].

1.2.4. Количества циклов замораживания – оттаивания

Как описано выше, процесс гелеобразования сопровождается образованием аморфных и кристаллических областей между молекулами полимера, что позволяет формировать физически сшитую матрицу ПВС. При этом в аморфных областях (в незамерзшей жидкой микрофазе) остаются непрореагировавшие молекулы и звенья полимерной цепи. [6, 7, 117] Повторное замораживание-оттаивание таких криогелей ПВС позволяет инициировать эти непрореагировавшие участки к образованию новых связей. При этом из-за роста количества меж- и внутримолекулярных связей в матрице, гель может изменить свою микроструктуру и образовать материал с новыми свойствами. Это доказано работами, где с увеличением количества замораживания-оттаивания наблюдается увеличение размера микропор [22,

86, 91, 118] в полимерной матрице и увеличение механических свойств. [119, 120].

В работе Хассан и Пеппас[112] доказано, что количество растворимой золь-фракции в НЖМФ криогелей ПВС уменьшается по мере увеличения количества циклов замораживания-оттаивания. Это согласуется с результатами исследований других работ, где доказано, что каждый цикл замораживания-оттаивания вызывает значительное увеличение степени кристалличности матрицы [72, 92, 121].

В свою очередь, другие авторы [77,120, 122,123] обнаружили, что количество циклов замораживания-оттаивания влияет на механические свойства, при этом каждый цикл криогенной обработки вызывает увеличение показателей механических свойств, примерно в два раза. Максимальное количество циклов замораживания-оттаивания, после чего структура и свойства криогеля больше не меняются, было зафиксировано несколькими исследованиями и составляет шесть циклов. [119]. Такой рост показателей механических свойств криогелей ПВС объясняется образованием более уплотненной кристаллической структуры в криогеле.

Таким образом, криогели ПВС являются физическими гелями, обладающими уникальными механическими, диффузионными и теплофизическими свойствами. Меняя различные характеристики самого полимера и режимы криоструктурирования можно создавать материалы для различных областей применения с самыми разными свойствами при относительно простой технологии получения.

1.3. Получение и свойства композитных криогелей ПВС

Одним из наиболее приоритетных направлений в развитии современной химии высокомолекулярных соединений является разработка новых материалов биотехнологического и биомедицинского назначения. Как уже упоминалось ранее, криогели ПВС гидрофильные, прочные, биосовместимые и биоразлагаемые материалы, отличительной особенностью

которых является инертность и развитая пористая структура и морфология. Одним из самых распространенных способов улучшения эксплуатационных свойств полимерных материалов и криогелей ПВС в частности является модифицирование полимерами или низкомолекулярными соединениями. Путем смешения исходного раствора с различными добавками, можно получить полимерные композиции с новыми заданными свойствами и отличающимися от свойств исходных материалов – так называемые «умные» материалы. Например, формирование криогелей из растворов ПВС с ионогенной смолой позволило получить материал, в котором благодаря пористой структуре растворенные вещества могут свободно диффундировать, поскольку система сообщающихся пор в криогеле обеспечивала свободный доступ низкомолекулярных соединений [7, 124]. Путем наполнения полимерного геля различными антимикробными и лекарственными веществами были получены материалы пролонгированного действия, когда активный наполнитель в благоприятных условиях десорбировался из структуры геля благодаря осмотическому воздействию или активные ионы свободно диффундировали в пространственной сетке геля [3, 26, 79, 125].

В современных работах, посвященных разработке новых биоматериалов, всё чаще встречается использование технологии криотропного гелеобразования ПВС с различными полисахаридами. Такой большой интерес обусловлен тем, что в молекулах полисахаридов содержатся реакционноспособные гидроксильные, простые эфирные и аминокгруппы, за счет которых могут образовываться как внутри- так и межмолекулярные полимерные связи, к тому же большинство полисахаридов имеют биосовместимость с тканями человека и биологическими жидкостями и находят широкое применение в различных областях: от заместительной хирургии и клеточной инженерии до сорбционных материалов. При введении в криогель ПВС полисахаридов [3, 50, 70, 126] были сформированы матрицы, обеспечивающие рост и пролиферацию клеток. Самыми изученными и

распространенными полисахаридами для модификации криогелей ПВС являются хитозан и целлюлоза.

1.3.1. Композитные криогели ПВС-целлюлоза

Целлюлоза представляет собой линейный гомополимер остатков D-глюкозы, соединенных между собой β -гликозидной связью (рисунок 4). Самое широкое применение целлюлоза нашла в текстильной и бумажной промышленности. В фармацевтике используется как наполнитель для разных таблетированных форм. Для применения в биотехнологии используют его различные модификации, обеспечивающие необходимые свойства: водорастворимость, комплексообразование и др.

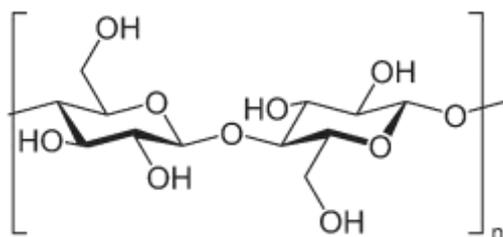


Рисунок 4 – Структурная формула целлюлозы

Существует большое количество различных модификаций целлюлозы. Выбор необходимой конфигурации и молекулярного строения диктуется той областью, в которой материал будет применяться. В работе [127] предложен метод формирования криогелей ПВС с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ). (Рисунок 5)

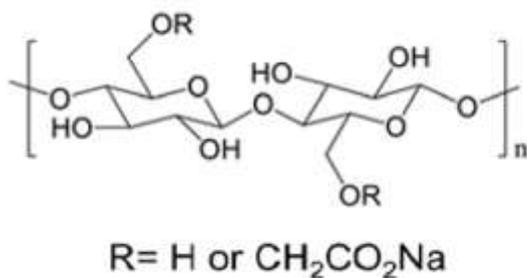


Рисунок 5 – Структурная формула карбоксиметилцеллюлозы

В отличие от других модификаций целлюлозы, КМЦ является водорастворимым, поэтому композит формировали из совместного раствора двух полимеров. Вода является общим растворителем для обоих полимеров.

В результате замораживания - оттаивания были получены композитные криогели ПВС-КМЦ с размерами пор от 30 до 100 мкм, размеры пор растут с увеличением содержания КМЦ в системе. Подготовленные гидрогели были использованы для адсорбции одного или несколько ионов металлов в растворе для оценки адсорбционного поведения в неконкурентоспособных и конкурентных условиях. Полученные гидрогели наибольшую сорбционную емкость и селективность показали по отношению к ионам Ag^+ . Равновесная сорбционная емкость по отношению к ионам серебра составила 8,4 мг/г гидрогеля. Данные криогели рекомендованы для удаления ионов тяжелых металлов и очистки сточных вод.

В другой работе под авторством Падуару и др. [128] изучена потенциальная возможность использования криогелей ПВС-микросталлическая целлюлоза (МКЦ) в качестве носителей биоактивных компонентов. В *invitro* исследованиях по высвобождению активного агента было установлено, что добавление целлюлозы в криогели вызывает увеличение количества максимально десорбированного агента с 25% в случае использования ненаполненного криогеля ПВС, до 45% для криогеля, содержащего 50 мас.% полисахарида. В то же время, период для десорбции агента ($t_{1/2}$) уменьшается в два раза при содержании целлюлозы 50% в криогеле и составляет 30 минут, тогда как высвобождение активного агента из криогеля ПВС составляет 70 мин.

В последние годы всё чаще используется новый биотехнологический метод получения целлюлозы. Бактериальная целлюлоза (БЦ) является продуктом метаболизма бактерий, обладает высокой кристалличностью, механической прочностью, способностью впитывать большое количество воды, и большой поверхностной площадью. БЦ представляет собой нановолокна диаметром порядка 50 нм [129]. Получение композитных материалов ПВС-БЦ открывает принципиально новые перспективы использования. В своей работе Мохаммади [130] обнаружили, что композитные материалы ПВС-БЦ обладает механическими свойствами,

которые обеспечивают их использование в тканях сердечно-сосудистой системы. БЦ и ПВС имитируют роль коллагена и эластина, соответственно, в мягких тканях, делая ПВС-БЦ хорошим кандидатом для возможного использования в заместительной хирургии [127, 128, 131]. Нанокompозит ПВС-БЦ способен обеспечить широкий спектр механических свойств, в зависимости от параметров обработки, выбранных для материалов. Незначительное увеличение процента БЦ (от 0 до 0,3%) приводит к значительному увеличению жесткости композиционного материала. [130].

В работе [132] показано, что композитный материал ПВС-БЦ обладает такими физико-химическими показателями, как гидратируемость, упругость, светопропускание очень близкими к показателям роговицы глаз человека, что успешно применяются в заместительной хирургии для восстановления зрения.

Полимерные композитные материалы на основе целлюлозы нашли широкое применение в биотехнологии и медицине. Постоянно растущий интерес в области разработки новых широкопристых материалов на его основе обусловлен высокой цито- и гемосовместимостью, высокой гидрофильностью и кристалличностью. Однако основным минусом целлюлозы является невозможность его ферментативного разложения в организме человека, поэтому его использование в качестве скаффолдов для тканевой инженерии ограничено, а для использования его в сорбционных материалах и материалах для адресной доставки лекарственных веществ ограничено его высококристаллической структурой.

1.3.2. Композитные криогели ПВС-хитозан

Еще одним полисахаридом, получившим широкое распространение в разработке композитных криогелей ПВС является хитозан (ХТЗ). Хитозан – это аминополисахарид, состоящий из β -D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозамин, представляющий собой аморфно-кристаллический кислоторастворимый полимер. Источником хитозана является хитин –

второй по распространенности в природе полимер после целлюлозы, который содержится в панцирях ракообразных, насекомых, в мицеллах грибов и др. Хитозан обладает собственной биологической активностью и способностью к комплексообразованию, а направленная химическая модификация путем привитой сополимеризации и функционального замещения позволяет получать на его основе уникальные материалы, обладающие биосовместимостью и биodeградируемостью. [35]

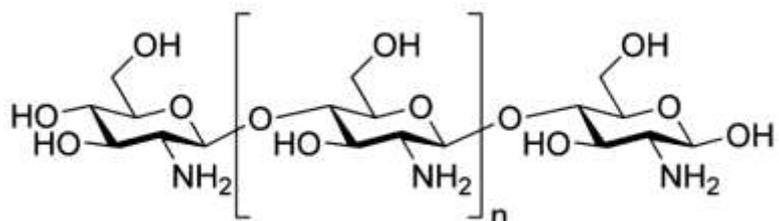


Рисунок 6 – Структурная формула хитозана

Получение криогелей на основе этого полисахарида не представляется возможным без использования сшивающего реагента, поскольку хитозан является негелеобразующим полимером [17, 18, 67, 71, 133]. Поэтому для формирования криогелей без использования сшивателей практикуют метод смешивания хитозана с другим гелеобразующим полимером, чаще всего ПВС [12, 21, 27, 29, 31, 46, 74, 80, 122, 125, 134-140]. Введение хитозана в криогель поливинилового спирта обычно осуществляют путем внесения дисперсных хитозановых частиц в исходный раствор ПВС или смешением двух растворов полимеров ПВС и хитозана. Получение новых материалов на основе криогелей ПВС-ХТЗ позволяют сформировать материалы с принципиально новыми свойствами: ПВС создает прочный каркас композита обеспечивающий свободную диффузию, а хитозан несет биологическую активность [141-145].

Благодаря наличию аминогрупп хитозан способен к комплексообразованию и сорбционной активности, поэтому часто его используют в качестве сорбционного материала – для извлечения ионов тяжелых металлов, радионуклеидов, красителей, биологического разделения белков. Например, сорбционная емкость по отношению к Cu (II) нативного

хитозана при степени дезацетилирования 63% составляет 0,81 ммоль/г [146], криогелей хитозана, сшитого глутаровым альдегидом, - 3,6 ммоль/г, криогелей хитозана, сшитых 5'-пиридоксальфосфатом, - 3,0 ммоль/г. При этом в макромолекулы хитозана связываются с ионами меди Cu (II) посредством комплексообразования:

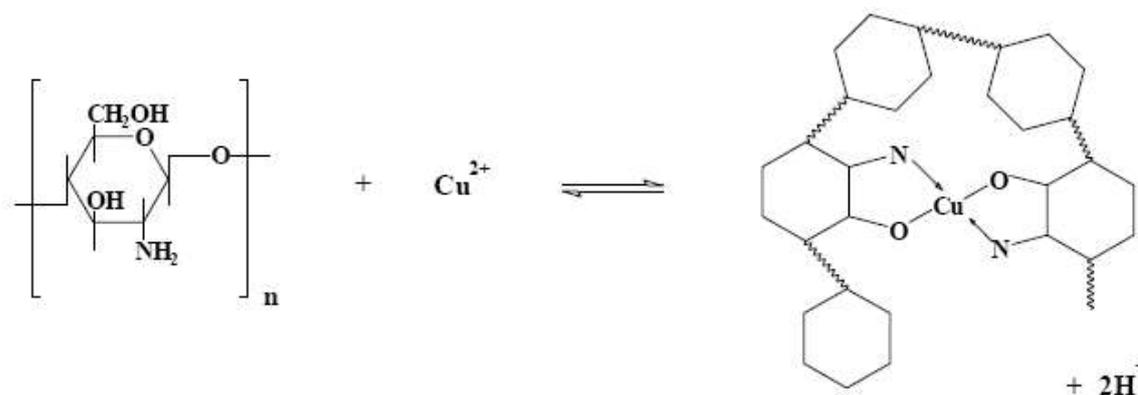


Рисунок 7 - Образование хелатных комплексов хитозана с Cu²⁺[147].

Для адресной доставки лекарственных веществ и как матрицу для роста клеток хитозан чаще всего используют в качестве скаффолдов с различными гелеобразующими полимерами. Например, криоструктураты хитозана с желатином применяют для заместительной хирургии хрящей, когда в структуру материала прорастают клетки аутологичных хондроцитов, при этом хитозан несет биологическую активность, а желатин выполняет функцию адгезива. [41]

Высокая биологическая активность хитозана позволяет разрабатывать на его основе материалы широкого назначения, но применение различных модификаций может расширить его области применения. Формирование криокомпозиатов может помочь реализовать новые свойства для полимерных материалов на основе хитозана.

1.3.2.1. Изучение возможности применения криогелей ПВС-хитозан в медицине

Создание полимерных материалов медицинского назначения сопровождается большим количеством требований к сырью, из которых они

формуруются. Хитозан обладает биосовместимостью с тканями человека, что позволяет создавать на его основе материалы медицинского назначения.

В работе [122, 148] Иранских ученых была рассмотрена способность криогелей ПВС-ХТЗ десорбировать содержащийся в его структуре антибиотик цефазолин с широким спектром активности в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий *Bacillus cereus*. Для этого в совместный раствор ПВС, хитозана, растворенного в уксусной кислоте, и цефазолина подвергали криоструктурированию. Кроме этого, в растворы перед замораживанием была добавлена сепиолитная наноглина для снижения степени набухания гидрогелей. Поскольку криогели ПВС-хитозан имеют высокую степень набухания, что приведет к быстрой десорбции цефазолина из структуры материала. Для пролонгированного высвобождения лекарственного вещества необходимо контролировать набухание и скорость десорбции, это доступно благодаря использованию сепиолитной наноглины. Схема получения криогелей приведена на рисунке 8.

Высвобождение цефазолина из нанокомпозитов оценивали в среде фосфатного буфера при pH 7,4 к количеству хитозана, содержащегося в криогеле. Показано, что количество десорбированного цефазолина растет с увеличением содержания хитозана в криогеле, а при использовании чистого криогеля ПВС высвобождение препарата минимальное.

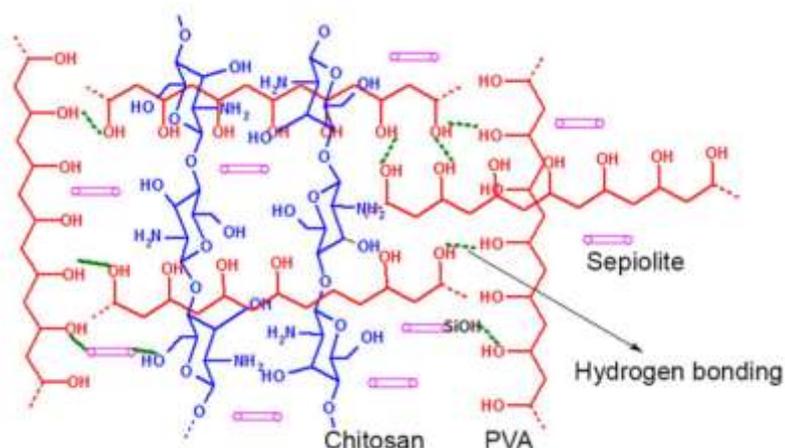


Рисунок 8 - Схематическое изображение структуры композитных криогелей [122]

В другой работе [149] для изучения способности к десорбции в криогели ПВС-ХТЗ был введен препарат ципрофлоксацина гидрохлорида, который обладает антимикробной активностью. Препараты готовили путем смешения растворов всех компонентов в различном соотношении полимеров и подвергали замораживанию-оттаиванию. Полученный таким образом препарат обладал рН-чувствительностью благодаря наличию в системе хитозана, поскольку он является кислоторастворимым полимером и его набухание зависит от кислотности окружающей среды. Механизм десорбции препарата зависит от количества введенного хитозана и скорость зависит от рН среды. В кислой среде (рН 4,5 и 5,5) лекарство высвобождается быстрее, чем в нейтральной (рН 7,4), что соответствует критической рН растворения как самого препарата, так и хитозана. Эти исследования предоставляют возможность использования таких материалов в качестве раневых покрытий, когда нейтральная рН покровных тканей может обеспечить долгое пролонгированное действие препарата.

Как уже упоминалось ранее (п.3.1 [131]) ПВС в заместительной хирургии имеет схожее действие, что и эластин в человеческом организме. Поэтому для модификации криогелей ПВС и получения на их основе новых эндопротезов сосудов, было предложено введение хитозана в систему [149]. В этой работе хитозан был добавлен в криогель ПВС для усиления контакта с гладкими мышцами сосудов и клетками. Поверхность криогелей ПВС-ХТЗ модифицировали коллагеном путем создания полимерного комплекса в коагуляционной ванне с КОН / Na₂SO₄. Затем полученные композиты были засеяны клетками бычьей аорты, гладких мышц сосудов и эндотелиальных клеток. Наличие хитозана приводило к лучшему прикреплению клеток к поверхности геля. Так же было показано, что прикрепление и пролиферация клеток увеличивается с увеличением количества циклов замораживания-оттаивания, это объясняется образованием более развитой морфологии криогелей.

В другой работе, [150, 151] посвященной исследованию механических и морфологических свойств композитных криогелей ПВС-ХТЗ, так же применяемых для замещения сердечных сосудов, было подтверждено, что наличие в криогеле хитозана увеличивает пролиферацию и рост клеток. Образцы криогелей как с хитозаном, так и без хитозана показали одинаковое упругое поведение и обеспечили хорошую механическую репликацию свиной аорты, однако добавление хитозана повлияло на макропористую структуру. Для изменения размера пор было проведено многократное замораживание-оттаивание. Показано, что значения механических показателей в ненаполненном криогеле ПВС с увеличением циклов замораживания-оттаивания размер пор менялись незначительно, тогда как в композитном криогеле наблюдалась прямая зависимость размера пор от количества циклов, а именно с увеличением количества циклов обработки размер пор увеличивается. Причем изменение размера пор в криогеле ПВС-ХТЗ заметно лишь после каждого второго цикла замораживания-оттаивания.

1.3.2.2. Изучение возможности использования криогелей ПВС-хитозан для сорбционных процессов

Несмотря на всё разнообразие возможных применений композитов на основе хитозана, наименее изученным является сорбционная активность криогелей ПВС-ХТЗ для удаления из вод различных ионов металлов, токсинов, органических веществ и даже биологических полимеров, как например белки. Как уже упоминалось ранее, хитозан является негелеобразующим полимером и формирование на его основе пористых материалов обязательно сопровождается применением сшивающих реагентов, которые взаимодействуют с функционально-активными группами молекул хитозана и являются токсичными и канцерогенными. Тем не менее исследования, направленные на получение новых композитных материалов на основе хитозана обоснованы, ведь наличие неподеленной электронной пары азота аминогруппы хитозана придает этому полимеру свойства

полилиганда и способность к образованию донорно-акцепторной связи при сорбции меди, кобальта и других элементов, имеющих вакантную орбиталь. В таблицах 2 и 3 приведены некоторые радионуклиды вместе с их активностью и влиянием на здоровье человека и некоторые текстильные красители и их ПДК в воде.

Таблица 2 - Некоторые радионуклиды вместе с их активностью и последствия для здоровья.

Радионуклид	Радиоактивность	Воздействие радионуклидов на здоровье
Уран-238	$3,3 \times 10^{-7}$ Ки/г	Тяжелый урон почечной системе
Торий-232	$1,1 \times 10^{-7}$ Ки/г	Опухоли и Лейкемия
Стронций-90	$1,5 \times 10^2$ Ки/г	Рак костей
Уран-233	$9,5 \times 10^{-3}$ Ки/г	Наносит ущерб почечной и ЦНС
Торий-234	$2,3 \times 10^4$ Ки/г	Рак легких и поджелудочной железы
Цезий-137	$8,8 \times 10^1$ Ки/г	Рак и ожоги
Европий-152	$1,9 \times 10^2$ Ки/г	Рак
Америций-241	3,2 Ки/г	Рак
Стронций-85	$2,4 \times 10^4$ Ки/г	Рак костей
Стронций-89	$2,9 \times 10^4$ Ки/г	Рак, влияет на плод у беременных
Кобальт-60	$1,1 \times 10^3$ Ки/г	Высокий риск развития рака
Марганец-54	$8,3 \times 10^{-3}$ Ки/г	Рак
Церий-141	$2,8 \times 10^4$ Ки/г	сердечно-сосудистый коллапс
Технеций-99	$1,7 \times 10^{-2}$ Ки/г	Загрязнение почвы и деградация
Йод-129	$1,6 \times 10^{-4}$ Ки/г	Влияет на щитовидную железу
Европий-154	$1,5 \times 10^2$ Ки/г	Рак
Никель-63	$4,6 \times 10$ Ки/г	Рак
Радий-226	$3,7 \times 10^{10}$ Ки/г	Лимфома, рак костей

Таблица 3 - Некоторые текстильные красители, их ПДК в воде и воздействие на здоровье человека.

Краситель	ПДК, мг/л	Воздействие на здоровье человека
Кислотный ярко-красный 4Ж	0,01	Канцероген, онкозаболевания, острая токсичность
Кислотный желтый К	0,01	Канцероген, онкозаболевания, острая токсичность
Кубовый ярко-зеленый	1,0	Канцероген, онкозаболевания, острая токсичность
Основной фиолетовый «К»	0,1	Канцероген, онкозаболевания, острая токсичность
Однохромовый оливковый	0,1	Канцероген, онкозаболевания, острая токсичность
Прямой голубой светопрочный	0,06	Канцероген, онкозаболевания, острая токсичность
Хромовый рубиновый С	0,03	Канцероген, онкозаболевания, острая токсичность
Флуоресцин	0,0025	Канцероген, онкозаболевания

Дополнительными лигандами при комплексообразовании ионов металлов в молекулах хитозана могут служить и депротонированные гидроксильные группы. Некоторые из возможных способов получения сорбционных материалов приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Некоторые способы формирования сорбционных материалов на основе хитозана и области их применения

Система	Метод формирования геля	Сорбаты	№
Хитозан	Уксуснокислый раствор хитозана коагулировали в 0,1N NaOH до полного осаждения	Кислотные азокрасители	152

Хитозан	Формировали гидрогели из раствора хитозана с использованием в качестве сшивающего реагента эпихлоргидрина	Cu (II) и Cr (VI)	153
Сульфэтилхитозан	Из раствора сульфэтилхитозана в присутствии сшивающего реагента глутарового альдегида формировали гранулы	Cu (II) и Ag (I)	154
Хитозан, модифицированный пиридоксальфосфатом	Криогели формировали в присутствии глутарового альдегида	233 UO ₂ (2+)	75
ПВС-Хитозан	Гидрогели готовили из смешанных растворов ПВС в воде и ХТЗ путем сшивания тиокарбоксихидратом	Cu (II), Pb (II) и Hg (II)	136
Поливиниламин - Хитозан	Криогели формировали из совместных растворов двойным поперечным сшиванием глутаровым альдегидом и диглицидиловым эфиром этиленгликоля	Cr (VI)	74
N,N-этиленбисакриламид-Хитозан	Гидрогель формировали из совместного раствора полимеров в присутствии сшивающего реагента этилендиаминтетрауксусной кислоты	Cd (II), Cu (II) и Pb (II)	63
ПВС-Хитозан	Гидрогели отливали из смешанных растворов ПВС в воде и ХТЗ в уксусной кислоте	Метилоранж	155
Целлюлоза-Хитозан	Совместный раствор полисахаридов в этилендиамина/тиоционате калия. Гидрогели формировали осаждением в метаноле	Cu (II), Pb (II) и Cd (II)	156

Целлюлоза-Хитозан	Криогели формировали из совместного раствора полисахаридов сшиванием в эпихлоргидрине	Анионные красители	58
Хитозан	Криогель хитозана сшитый пиридоксаль-5'-фосфатом	Eu (III)	75

Композитные материалы, в том числе криогели, нашли широкое применение в области разработок новых сорбционных материалов. Однако процесс получения таких гелей является очень трудоемким и формируемые гели, несмотря на большую степень набухания, оказываются хрупкими. Кроме того, процесс образования сшитых композитов основан на взаимодействии компонентов реакции с сорбционно-активными аминогруппами хитозана.

Получение комплексных криогелей ПВС-ХТЗ позволяет сформировать сорбенты с «хорошими» механическими свойствами и развитой пористой структурой, не применяя сшивающих реагентов для модификации. Это объясняется тем, что в процессе замораживания-оттаивания формируются физически сшитые гели, где макромолекулы образуют между собой водородные связи. [19, 157]. Криогели получают путем смешения водного раствора ПВС и хитозана, растворенного в кислоте (чаще всего уксусной). Введение хитозана в раствор ПВС в виде уксуснокислой соли обладает еще одним преимуществом: благодаря растворению сорбционно-активными оказываются все функциональные группы, в отличие от введения порошкового хитозана, где часть групп оказываются вовлеченными в кристаллическую структуру хитозана. [157]

Экспериментальные данные [157] ИК-спектроскопии, сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) показали, что поливиниловый спирт и хитозан хорошо смешиваются в широком интервале концентраций. Однако формирование

криогелей из таких смешанных растворов нарушает образование кристаллической структуры ПВС, поэтому введение хитозана в систему ограничено. Результаты по кинетике набухания композитных криогелей показали, что композитные гидрогели обладали хорошими рН-чувствительными свойствами к кислым средам, и с увеличением содержания хитозана в смеси одновременно увеличивались максимальная степень и скорость набухания, но это сопровождается растворением большего количества хитозана при рН 1,0. Кроме того, композитные гидрогели также демонстрируют хорошие обратимые свойства набухания при изменении значения рН среды от 1,0 до 7,4. Кроме того, увеличение количества циклов замораживания/оттаивания привело к снижению скорости набухания из-за образования в системе дополнительных водородных связей и, как следствие, образования более плотноупакованной структуры. Поэтому параметры набухания композитных криогелей можно регулировать, изменяя содержание хитозана и количество циклов замораживания-оттаивания. Благодаря наибольшей активности композитных криогелей ПВС-ХТЗ в кислых средах, открывается перспектива их использования для удаления токсинов из ЖКТ человека, принимая гидрогели пероральным путем.

В работе Чатурведи и др. [28] была исследована еще одна возможность применения криокомполитов ПВС-ХТЗ, для сорбции ионов Cu^{2+} из водных растворов сульфата меди с его последующем восстановлением. Восстановление ионов меди проводили путем обработки гидразингидратом. С помощью сканирующей электронной микроскопии было показано присутствие наночастиц меди по всему объему сетки геля, а также было обнаружено, что наночастицы меди имеют средний размер частиц около 20 нм. Такие композитные криогели, содержащие наночастицы меди, нашли применение в антимикробных раневых повязках.

Заключение

Формирование композитных материалов методом криотропного гелеобразования является перспективным направлением при получении новых материалов. Привлекательность этого метода состоит в том, что возможно структурирование полимеров из невысоко концентрированных растворов в присутствии или без модифицирующих добавок, наполнителей, сшивающих агентов, в результате которого получают высокопористые криогели. Наиболее подходящим для этой цели является поливиниловый спирт, из растворов которого при криогенном воздействии формируются физические криогели.

Одним из способов улучшения эксплуатационных свойств полимерных материалов на основе КГ ПВС является введение в систему различных модификаторов и наполнителей. Смешение двух полимеров позволяет сочетать в конечном продукте свойства обоих компонентов. Введение в систему такого полисахарида, как хитозан открывают перспективы создания новых широкопористых материалов для использования в медицинских целях (в качестве раневых покрытий, носителей лекарственных препаратов, матриц клеточной инженерии), а также для биотехнологии (например, для удаления из воды опасных загрязнений при создании биосорбентов с заданными транспортными свойствами или систем с контролируемым выделением лекарственных соединений). Исследования, проводимые в данной области, показывают, что композитные криогели на основе хитозана являются не только эффективными адсорбентами, но и обладают способностью к десорбции. Это открывает перспективы повторного использования хитозановых сорбентов, что так же может значительно снизить затраты на их производство.

2. МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

2.1. Характеристика сырья и реактивов

В работе без дополнительной очистки были использованы следующие вещества и препараты:

- Поливиниловый спирт (ПВС) с ММ 86 кДа и степенью дезацетилирования 100% (Acros Organics, США);
- Хитозан (ХТЗ) с ММ 190 кДа степенью дезацетилирования 93% (Sigma-Aldrich, США);
- Хлоргидрат хитозана (ХГХ) с молекулярной массой 45,6 кДа и степенью дезацетилирования 97%, полученный методом контролируемого кислотного гидролиза высокомолекулярного хитозана с молекулярной массой 340 кДа и степенью дезацетилирования 96% (Sigma-Aldrich, США) к.х.н. Тихоновым В.Е. (ИНЭОС РАН);
- Дистиллированная вода, ГОСТ 6709 – 72;
- Хлорид натрия (>99%) (Aldrich, США);
- Аммиак водный технический ГОСТ 9-92 – содержание основного вещества не менее 25% (Реахим, РФ);
- Уксусная кислота х.ч., ГОСТ 61 – 75 – содержание основного вещества не менее 98%; производитель «Реахим» (Ереванский завод химреактивов);
- 0,01 N NaOH;
- Спирт этиловый (ГОСТ 18300-87) чистота 95,8%, производитель ООО «Спирт Люкс» (Россия);
- Сульфат меди (CuSO₄) четырёхводный, производитель Ленреактив (Россия);
- Текстильный краситель кислотный желтый К (КЖК (CI 22910 Acid Yellow 42)), производитель КолорХим (Россия);
- Текстильный краситель кислотный красный 2Ж (КК2Ж (CI 27290 Acid Red 73)) производитель КолорХим (Россия);
- Краситель Конго красный, производитель Химмед (Россия);

Сшивающие реагенты:

- 25%-ный водный раствор глутарового альдегида производитель «Merck» (Германия);

- Глиоксаль 40% водный ТУ 2633-003-67017122-2011ООО «Новохим» (Россия)

Для приготовления исходного раствора ПВС сухой полимер диспергировали в расчетном объеме воды и оставляли для набухания на 18 ч при комнатной температуре. Далее набухшие препараты нагревали в течение 40-90 минут при постоянном перемешивании на кипящей водяной бане до образования гомогенного раствора. Образец взвешивали до и после нагревания, потери испарившейся воды компенсировали. Конечная концентрация ПВС в полученном растворе составляла 120 г/л.

Для приготовления смешанных растворов ПВС и хлоргидрата хитозана, в водном растворе ПВС суспендировали расчетное количество порошка сухого ХГХ, перемешивали и оставляли на 24 ч для полного его растворения. Полученную систему прогревали 5-10 минут на кипящей водяной бане, а затем для освобождения от пузырьков воздуха обрабатывали в течение 20 минут при комнатной температуре в ультразвуковой бане UNITRA (Unitra, Польша).

2.2 Построение фазовой диаграммы системы ПВС – хлоргидрат хитозана – вода

Исследование фазового разделения смешанных растворов ПВС и хлоргидрата хитозана проводили в ИБХФ РАН им. Н.М. Эммануэля. При получении жидких композиций, используемых затем для построения фазовых диаграмм и формирования криогелей, в водном растворе ПВС или в таком же растворе, дополнительно содержавшем NaCl в концентрации 0,15 моль/л, суспендировали расчетное количество порошка сухого ХГХ, перемешивали и оставляли на 24 ч для полного его растворения. Полученную систему прогревали 5-10 минут на кипящей водяной бане, а затем для

освобождения от пузырьков воздуха обрабатывали в течение 20 минут при комнатной температуре в ультразвуковой бане UNITRA (Unitra, Польша).

Для построения фазовой диаграммы систем состава 0,15М NaCl – ПВС – ХГХ их после приготовления для разделения сосуществующих фаз центрифугировали при 60000g в течение часа при 23°C (центрифуга J2-21, Beckman Coulter Inc., США). Схема построения фазовой диаграммы приведена на рис. 4; сама же процедура являлась модификацией методов, описанных ранее в литературе [158, 159]. По завершении центрифугирования измеряли объемы разделенных жидких фаз, откуда определяли величину VR – отношение объема фазы, обогащенной ХГХ, к общему объему системы. Точки переходов из однофазного состояния в двухфазное и затем из двухфазного в однофазное состояние (точки бинодали системы) определяли экстраполяцией соотношения:

$$VR = \frac{V(\text{ХГХ})}{V(\text{ПВС}) + V(\text{ХГХ})} = fC'_{\text{ХГХ}} / (C^0_{\text{ПВС}} + C'_{\text{ХГХ}}) \text{ к } VR = 0 \quad (1),$$

где $V_{\text{ХГХ}}$ и $V_{\text{ПВС}}$ – объемы фаз, обогащенных соответственно ХГХ и ПВС; $C^0_{\text{ПВС}}$ – концентрация ПВС в исходном растворе; $C'_{\text{ХГХ}}$ – концентрация ХГХ в системе 0,15М NaCl-ПВС-ХГХ.

Величина $VR = 0,5$ определяет положение середины линий связи. Повторяя эту процедуру для серии значений, можно определить серию точек, лежащих на бинодали, и точек, лежащих на середине линий связи составов сосуществующих фаз, т.е. построить фазовую диаграмму.

Составы фаз двухфазной системы были определены на основе материального баланса системы и положения бинодали на графике, используя известное [159] соотношение:

$$V_{\text{ХГХ}}/V_{\text{ПВС}} = d_{\text{ПВС}} \cdot X / d_{\text{ХГХ}} \cdot Y \quad (2),$$

где $d_{\text{ПВС}}$ и $d_{\text{ХГХ}}$ – плотности фаз, обогащенных ПВС и ХГХ, соответственно (меньше 1,05), X и Y – расстояния на графике между точками, отвечающими: (а) составу фазы, обогащенной ПВС, и составу

исходной смеси; (б) составу фазы, обогащенной ХГХ, и составу исходной смеси.

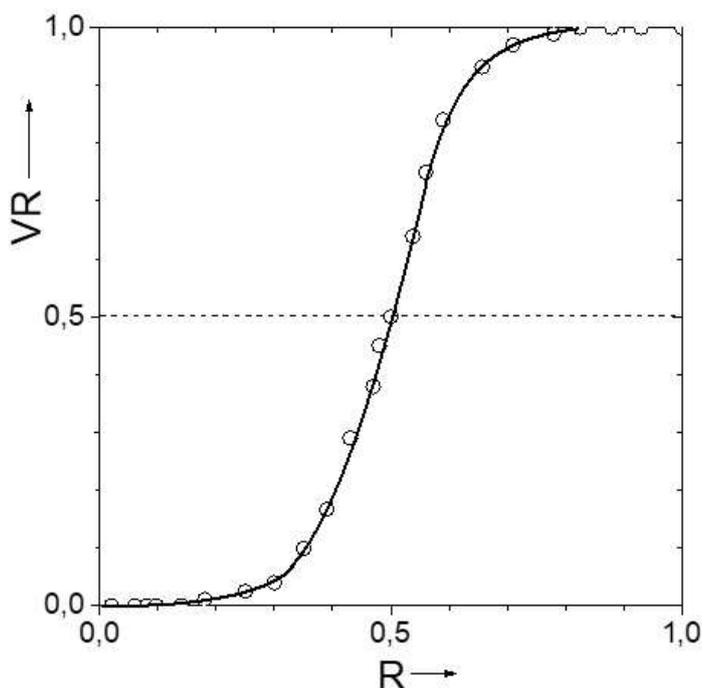


Рисунок 9 - Общая схема зависимости величины отношения объемов фазы, обогащенной ХГХ, к общему объему системы (VR) от концентрации ХГХ в системе (C_{XGX})

Совместимость ПВС и ХГХ характеризовали координатами пороговой ($C_{PВС}^*$; C_{XGX}^*) и критической ($C_{PВС}^{кр}$, $C_{XGX}^{кр}$) точек, отношением молярных концентраций ПВС и ХГХ в критической точке ($K_{CM} = m_{PВС}^{кр} / m_{XGX}^{кр}$), определяющим симметрию фазовой диаграммы [158], а также величиной максимальной растворимости ХГХ в концентрированном растворе ПВС – $C_{PВС}Lim$ (предел растворимости). Пороговая точка определялась как точка пересечения бинодали и линии с наклоном -1 . Суммарная концентрация ПВС и ХГХ в этой точке (C_t^*) является минимальной суммарной концентрацией полимеров, в которой система претерпевает фазовое разделение. Критическая точка системы определялась как точка, в которой бинодаль пересекает прямолинейный диаметр, т.е. линию, соединяющую середины линий связей составов сосуществующих фаз (Рисунок 9).

2.3. Потенциометрическое титрование растворов хлоргидрата хитозана и поливинилового спирта

Потенциометрическое титрование было выполнено на универсальном рН-метре-милливольтметре 673 М с использованием стеклянного и хлорсеребряного электродов.

Потенциометрическое титрование растворов ХГХ и ПВС проводилось в соляной кислоте раствором NaOH. Навеску полимера массой 0,20 г растворяли в 20 мл 0,1М раствора HCl. Титрование проводили при постоянном перемешивании при температуре 20°C 0,1М NaOH. По полученным данным строили кривые потенциометрического титрования, по которым определяли объём раствора щёлочи, пошедшей на титрование.

2.4. Изучение реологических свойств смешанных растворов поливинилового спирта и хлоргидрата хитозана

Для оценки реологических свойств полученных растворов ПВС, ПВС и ХГХ в воде использовался ротационный вискозиметр REOTEST-2. Измерения были проведены при температурах $T=20^{\circ}\text{C}$, 30°C , 40°C , 50°C с использованием системы «цилиндр в цилиндре». В работе использовался цилиндр S1 (скорость сдвига от 0,15 до 1310 c^{-1}). По снятым показаниям α рассчитывали напряжение сдвига:

$$\tau = \alpha * j, \quad (3)$$

где j – постоянная цилиндра (для S1 $j = 0,0576$).

По рассчитанным данным строился график зависимости $\lg\eta = f(\lg\dot{\gamma})$. Значение динамической вязкости η рассчитывалось по отношению:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}, \quad [\text{Па} * \text{с}] \quad (4)$$

2.5. Получение комплексных и композитных криогелей поливинилового спирта (КГПВС)

Формирование изученных в данной работе комплексных и композитных КГПВС для последующего измерения их физико-механических и теплофизических характеристик осуществляли в разъемных цилиндрических дуралюминовых контейнерах с внутренним диаметром 15 мм и высотой 10 мм. Криогенную обработку образцов проводили в камере прецизионного программируемого криостата FP 45 HP (Julabo, Германия), где препараты замораживали и инкубировали при -20°C в течение 12 ч, а затем оттаивали со скоростью $0,03^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, задаваемой микропроцессором криостата.

Для трансформации солевой формы хитозана, находящегося в составе комплексных криогелей, в основную форму образцы помещали на подставку в герметичном эксикаторе, на дно которого был налит концентрированный водный раствор аммиака, и выдерживали образцы там 24 ч при комнатной температуре, периодически переворачивая, чтобы экспонировать в атмосфере аммиака препараты со всех сторон. Далее образцы на 3 ч погружали в $0,01\text{N}$ раствор NaOH , а затем промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH промывной жидкости.

Для получения дисперсий хитозана в растворе ПВС с концентрацией $12,6$ г/дл диспергировали порошок хитозана (фракция 250 ± 100 мкм) в количестве 30 % от массы ПВС и добавляли раствор уксусной кислоты с концентрацией, обеспечивающей степень протонирования аминогрупп хитозана α 0,1, 0,2 и 0,3, рассчитанных на основании зависимостей $\alpha=f(\text{pH})$, полученных из потенциометрических кривых.

Полученные дисперсии использовали для получения криогелей описанным выше способом или для формования пленок методом полива с последующим испарением растворителя.

В целях модификации сформированных криогелей были применены методы химической сшивки и проведение многократных циклов замораживания – оттаивания. Для получения химически сшитых препаратов криогели, после их формирования обрабатывали различными сшивающими

реагентами, в частности были использованы диальдегиды (глиоксаль и глутаровый альдегид) и природный сшивающий реагент дженипин. Сшивку глиоксалем (ГО) проводили в 20% водном растворе сшивателя в течении трёх суток, при периодическом перемешивании. Сшивку глутаровым альдегидом (ГА) проводили в 10% растворе ГА в этиловом спирте в течении суток. Остатки сшивающего реагента смывали большим количеством воды в течении суток, при этом образцы, сшитые ГО сохраняли свой первоначальный внешний вид, а сшитые ГА стали твердыми коричневыми и хрупкими. Сшивку дженипином проводили в его водном растворе концентрацией 0,2% и 0,4% в течении суток. Образцы, изначально бледно-желтые, стали синими, что означало завершение процесса сшивки.

Модификация криогелей методом многократного замораживания оттаивания проводилась с целью увеличения пористости структуры геля. Для этого образцы криогелей подвергнутые однократному замораживанию – оттаиванию и прошедшие обработки парами аммиака и раствором щелочи, отмытые, замораживали еще четыре раза методом, описанным ранее.

2.6. Изучение физико-механических и термических свойств криогелей поливинилового спирта и хитозана

Компрессионный модуль Юнга ($E_{сж}$) комплексных и композитных КГПВС определяли с помощью автоматического анализатора текстуры TA-Plus (Lloyd Instruments Ltd., Великобритания) из прямолинейного участка зависимости напряжения от деформации при скорости одноосного приложения нагрузки 0.3 мм/мин. Измерения проводили до достижения 30%-ной деформации образца.

Температуру плавления полученных криогелей ПВС (T_f – fusion temperature) определяли следующим образом: на поверхности гелевого образца, находящегося в дуралюминевом контейнере, вырезали углубление (лунку), куда помещали металлический шарик диаметром 3.6 мм и весом 0.3 г. Контейнер устанавливали в водяную баню таким образом, чтобы вода не

достигала верхнего края контейнера; его накрывали стеклянным колпаком для термостатирования и изолирования от воздушной среды. Подъем температуры (не выше 90°C, чтобы предотвратить вскипание воды) осуществляли со скоростью 0.4 °C/мин. За точку плавления принимали температуру, при которой шарик исчезал из поля зрения, проходя через слой плавящегося геля и падая на дно контейнера.

Измерения модулей сдвига и температур плавления криогелей проводили для трех параллельных образцов, сами же препараты готовили в 3-5 независимых экспериментах. Полученные результаты усредняли.

2.7. Изучение поверхности криогелей хитозана методом атомной силовой микроскопии

Образцы криогелей, изготовленных в форме пленок (воздушно-сухие криогели, изготовленные в виде 1-мм дисков), исследовали на микроскопе NtegraPrima (NT-MDT). Для сравнительных анализов были так же изготовлены пленки ПВС-ХГХ, высушенные на воздухе. 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).

2.8. Изучение морфологии криогелей хитозана методом оптической микроскопии

Морфологию криогелей изучали с помощью оптического микроскопа Eclipse 55i (Nikon, Япония), снабженного системой цифровой записи изображений. Для исследований поверхностей криогелей (нижней, прилегающей к подложке, и верхней, находящейся в контакте с воздухом) по ранее описанной методике готовили криогели в чашках Петри в форме дисков.

Для исследования микроструктуры криогелей готовили образцы в дюралюминиевом контейнере, из которых делали тонкие (~10 мкм) срезы в

направлении, перпендикулярном оси цилиндрического образца, которые окрашивали водным раствором Конго красного. Препараты до исследований хранили при 4°C в герметичной таре не более трёх суток.

2.9. Изучение комплексных и композитных КГПВС методом ИК-Фурье-спектроскопии

ИК-спектроскопические исследования нижней и верхней поверхностей комплексных и композитных криогелей ПВС-хитозан проводили с помощью Фурье спектрометра Vertex 70 (Bruker, США). Спектры регистрировали при разрешении 2 или 4 см⁻¹ методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО), используя приставку GladiATR (Pike Technologies, США) и алмаз в качестве элемента внутреннего отражения (n=2,4; угол падения излучения 45 град.). Спектры анализировали в виде спектров поглощения. Регистрацию и все дальнейшие манипуляции со спектрами проводили с помощью пакета программ Bruker Opus (version 7.0).

2.10. Изучение процесса сорбции хитозансодержащими криогелями поливинилового спирта

При изучении сорбционных свойств композитных криогелей ПВС-ХТО их формировали в виде плоских дисков толщиной 3 мм, из которых затем нарезали параллелепипеды размером 2x2x3 мм и суспендировали такие частицы в водном растворе сорбата до установления равновесия. Для изучения сорбционных свойств криогелей по отношению к ионам тяжелых металлов образцы выдерживали в водном растворе сульфата меди (сульфат меди (II) (безводный, >99%) (Aldrich, США)) с концентрацией ионов Cu²⁺ от 5 до 100 ммоль/л при соотношении 120 мл раствора сорбата на 1 г хитозана, содержащегося в композитном криогеле. Определение концентрации ионов меди в растворе осуществляли фотометрически при 810 нм с использованием спектрофотометра Genesis 10S UV-VIS (Thermo Electron Corp., США) аналогично ранее описанной методике.

Для изучения сорбционных свойств композитных криогелей по отношению к красителям, были выбраны текстильные кислотные красители, которые используют при крашении белковых волокон из-за их сродства к аминогруппам, кислотный желтый К (КЖК (CI 22910 Acid Yellow 42)) и кислотный красный 2Ж (КК2Ж (CI 27290 Acid Red 73)) оба КолорХим, Россия. Сорбцию проводили в растворах красителей с концентрацией от 0,01 до 0,1 ммоль/л при постоянном перемешивании и соотношении 120 мл раствора на 1 г хитозана, содержащегося в криогеле. Концентрацию красителя в растворе определяли так же спектрофотометрически по величине оптического поглощения при длине волны 410 нм для Кислотного желтого К (КЖК) и 510 нм для Кислотного красного 2Ж (КК2Ж).

Величину адсорбции (A) вычисляли по формуле:

$$A = \frac{(C_0 - C_i) \cdot V}{m} \text{ (ммоль/г)}, \quad (5)$$

C_0 – концентрация сорбата в исходном растворе, ммоль/л;

C_i – концентрация сорбата в анализируемом растворе, ммоль/л;

V – объем анализируемого раствора, л;

m – масса ХТО, содержащегося в образце композитного криогеля, г.

Обработку проводили с помощью линейных форм уравнения Ленгмюра:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_\infty K C} + \frac{1}{A_\infty} \quad (6)$$

и Фрейндлиха:

$$\ln A = \ln K + \frac{1}{n} \ln C, \quad (7)$$

где C – равновесная концентрация сорбата в объеме раствора; K – константа сорбционного равновесия; A , A_∞ – равновесная и максимальная сорбция при данной температуре.

2.11. Изучение цитотоксичности хитозан-содержащих криогелей

Цитотоксичность криогелей изучали в Институте биоорганической

химии РАН методом тестирования экстрактов. Для этого суспензию клеток L929 (100 мкл, концентрация 1×10^5 кл./мл) вносили в каждую лунку 96-луночного планшета и культивировали в течение 24 ч. Затем заменяли среду в каждой лунке на 100 мкл экстрактов. Экстракты были получены следующим образом: к стерилизованным образцам криогелей добавляли среду, содержащую 10% сыворотки (1 мл среды на 100 мг образца) и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Затем экстракты отбирали и добавляли к монослою клеток. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые в среде без экстрактов. Жизнеспособность клеток оценивали через 24 ч культивирования клеток в присутствии экстрактов с помощью МТТ-теста, основанного на способности дегидрогеназ клеток восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) с образованием нерастворимых в воде кристаллов формазана, количество которого, прямо пропорциональное содержанию живых клеток, измеряют спектрофотометрически [160]. Для этого среду с экстрактами в каждой лунке заменяли на 100 мкл раствора МТТ (0,5 мг/мл) в DMEM и инкубировали в течение 2 ч при 37°C . Далее смесь среды с раствором МТТ декантировали, в лунки добавляли по 100 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана, инкубировали 15-20 мин и измеряли оптическую плотность (ОП) при длинах волн 540/690 нм на многоканальном планшетридере Multiscan («FlowLaboratories», США). Относительную жизнеспособность клеток рассчитывали по следующей формуле: Доля жизнеспособных клеток = (ОП в тестовых лунках/ОП в контрольных лунках) $\times 100\%$.

3. Результаты и обсуждение

В зависимости от фазового состояния хитозана в водном растворе ПВС криотропное гелеобразование может приводить к формированию либо композитного криогеля, наполненного частицами хитозана криогеля ПВС, либо комплексного криогеля, который формируется из совместных растворов поливинилового спирта и хитозана за счет фазового разделения и, как правило, представляют собой взаимопроникающие сетки.

Ранее в работе [161], проводимой на кафедре ХТПМиН РГУ им. А.Н. Косыгина совместно с ИНЭОС РАН были исследованы композитные криогели ПВС, содержащие дисперсии частиц хитозана. Введение дисперсного наполнителя приводило к увеличению модуля упругости и температуры плавления композитных криогелей. Однако, несмотря на мелкодисперсность, из-за сохранения в структуре хитозана кристаллических областей, сорбционная способность таких материалов мало отличалась от нативного хитозана. Для сравнения в нашей работе были изучены композитные КГПВС сформированные с добавлением дисперсных частиц хитозана (ХТЗ) с Мм 190 кДа с разной степенью протонирования аминогрупп хитозана.

В настоящей работе предложен новый метод формирования комплексных и композитных криогелей ПВС, содержащих хитозан. Комплексные КГПВС были сформированы после введения в раствор поливинилового спирта водорастворимого полимера – хлоргидрата хитозана (ХГХ) и далее подвергнутого криогенному воздействию (замораживанию, выдерживанию в замороженном состоянии и далее оттаиванию).

Далее солянокислая соль хитозана, иммобилизованная в матрицу криогеля ПВС была переведена в основное состояние путем двухступенчатого щелочного воздействия (1 - в парах аммиака, 2 - в 0,1N растворе щелочи, см. Методическую часть). Такая трансформация соли хитозана приводила к образованию нерастворимой формы хитозана

основания (ХТО), что присуще наполнителям и соответственно криогель становился композитным.

В работе были исследованы физико-химические свойства растворов ПВС, содержащих дисперсные частицы хитозана, а также свойства исходных смешанных растворов ПВС и хлоргидрата хитозана. Изучены процессы формирования криогелей из указанных систем и исследованы физико-химические, термические, механические и морфологические свойства формируемых криогелей. А также рассмотрены возможные области применения композитных криогелей ПВС-ХТО.

3.1. Изучение фазовых состояний в системах ПВС – дисперсный хитозан с разной степенью протонирования аминогрупп хитозана

В случае использования совместных растворов хитозана и поливинилового спирта тип формирующегося в результате криотропного гелеобразования криогеля не определен, так как фазовое состояние хитозана в растворе зависит от степени протонирования аминогрупп в биополимере. Степень протонирования аминогрупп хитозана определяет не только растворимость хитозана в водных растворах, но и ζ -потенциал поверхности частиц дисперсной фазы, а также характер межмолекулярных взаимодействий в смешанных растворах с ПВС. Поэтому изучение структурообразования и фазовых равновесий в системе раствор поливинилового спирта – хитозан в условиях неполного протонирования аминогрупп хитозана представляет важную научную задачу, которая лежит в основе технологии получения функционально-активных криогелей и пленок с заданной морфологией и сорбционной активностью.

3.1.1. Потенциометрическое титрование растворов поливинилового спирта – хитозан (ХТЗ) при различной степени протонирования аминогрупп хитозана

Если смешанные растворы, содержащие два или более компонентов, имеют относительно простую технологию оценки свойств, то растворы, содержащие дисперсные частицы, требуют иных технологически сложных методов исследования. Физико-химические свойства таких дисперсных растворов, как и материалов, формируемых на их основе, во многом зависят от термодинамических и ионных взаимодействий на границе раздела двух фаз. С целью выявления особенностей структурообразования в смешанных растворах ПВС и дисперсий хитозана с разной степенью ионизации аминогрупп была определена зависимость фазового состояния системы от степени ионизации аминогрупп хитозана.

Ионное состояние аминогрупп в аминоксодержащем полимере определяется их сродством к протону (которое характеризуется величиной термодинамической константы диссоциации протонированного основания K_a) и внешними параметрами, такими как pH, ионная сила раствора. На способность аминогруппы удерживать протон оказывает влияние микроокружение и его диэлектрические свойства. Для выявления характера взаимодействия двух полимеров на границе раздела фаз получены кривые потенциометрического и нефелометрического титрования смешанных растворов ПВС и хитозана. На рисунках 10-11 приведены кривые потенциометрического титрования и зависимость степени протонирования аминогрупп хитозана в растворах, приготовленных смешением водного раствора ПВС и уксуснокислого раствора ХТЗ в разных соотношениях.

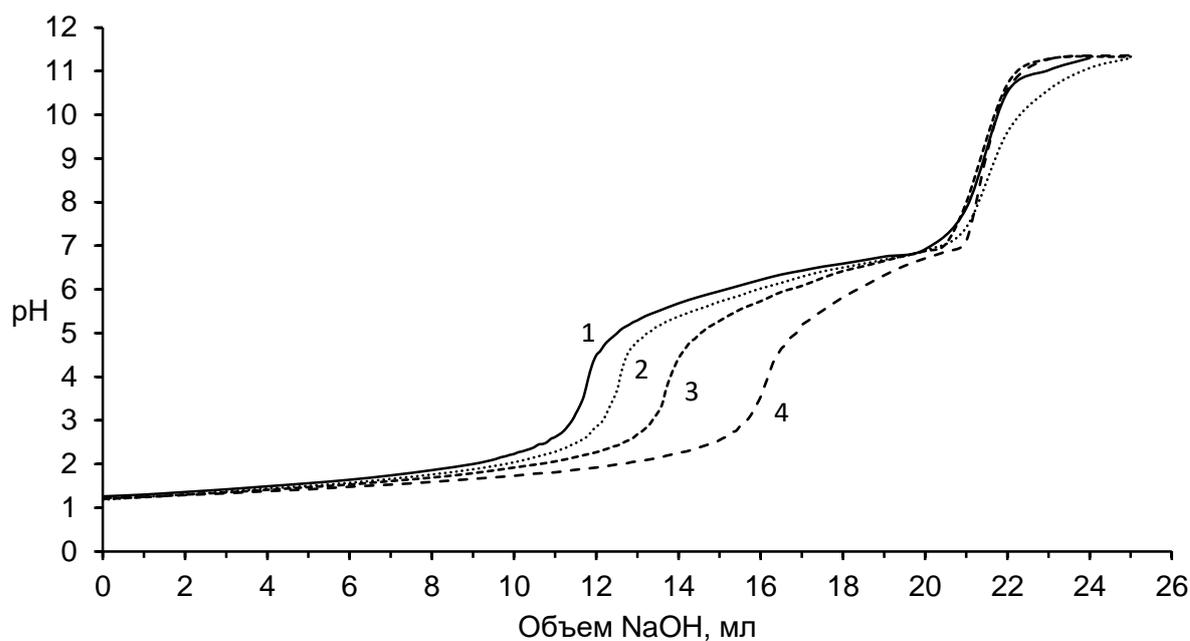


Рисунок 10 - Кривые потенциометрического титрования растворов поливинилового спирта и хитозана 0,1М раствором NaOH при различном соотношении компонентов ПВС:ХТЗ соответственно: 1 - ПВС:ХТЗ=0:100, 2 - ПВС:ХТЗ=10:90, 3 - ПВС:ХТЗ=25:75, 4 - ПВС:ХТЗ=50:50.

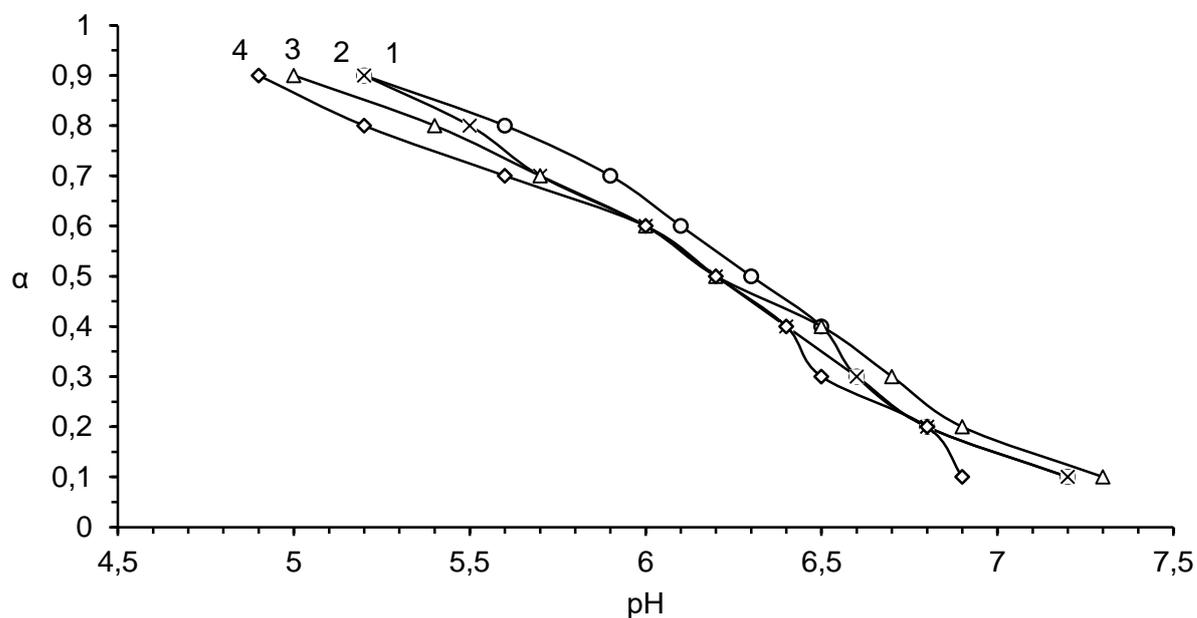


Рисунок 11 - Зависимость степени протонирования аминогрупп хитозана (α) от pH при различном соотношении компонентов ПВС:ХТЗ соответственно: 1 - ПВС:ХТЗ=0:100, 2 - ПВС:ХТЗ=10:90, 3 - ПВС:ХТЗ=25:75, 4 - ПВС:ХТЗ=50:50.

На основании результатов потенциометрического титрования смешанных растворов ПВС и ХТЗ состава ПВС:ХТЗ = 50:50, 25:75, 10:90 и исходного хитозана в 0,1М соляной кислоте 0,1М раствором NaOH были рассчитаны значения степени протонирования аминогрупп α , которая изменялась от 0 до 1 в интервале от точки эквивалентности первого скачка до точки эквивалентности второго скачка, а также значения pK_a . Сравнение кривых $\alpha=f(pH)$ для хитозана и его смеси с ПВС показало одинаковый характер зависимостей, однако введение даже 10% поливинилового спирта привели к увеличению pK_a аминогрупп хитозана, что свидетельствует о некотором снижении сродства к протону аминогрупп хитозана в присутствии ПВС независимо от соотношения компонентов.

Введение хитозана в раствор ПВС в выбранном диапазоне концентраций и соотношения полимеров не приводит к помутнению раствора, однако при снижении степени протонирования аминогрупп хитозана в системе реализуются условия для фазового разделения. Были определены значения pH точки помутнения в системе ПВС-ХТЗ и соответствующие им значения степени протонирования аминогрупп хитозана и получена зависимость критической степени протонирования от состава системы ПВС-ХТЗ, характеризующая фазовое состояние системы поливиниловый спирт – хитозан при различной степени протонирования аминогрупп хитозана в водном растворе (рисунок 12, таблица 5).

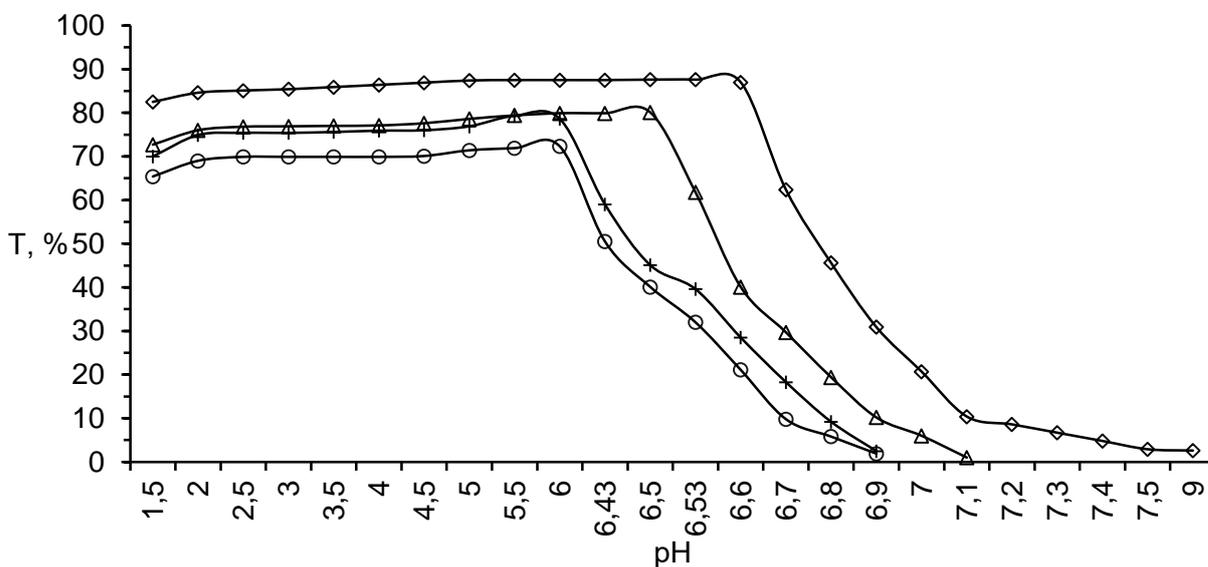


Рисунок 12- Зависимость светопропускания (T , %) смешанных растворов хитозана и ПВС при длине волны 450 нм от рН при различном соотношении компонентов ПВС:ХТЗ соответственно: 1 - ПВС:ХТЗ=0:100, 2 - ПВС:ХТЗ=10:90, 3 - ПВС:ХТЗ=25:75, 4 - ПВС:ХТЗ=50:50.

Таблица 5 – Основные параметры и значения потенциометрического титрования водных растворов ПВС-ХТЗ от соотношения компонентов в системе.

Соотношение компонентов	ПВС:ХТЗ=0:100	ПВС:ХТЗ=10:90	ПВС:ХТЗ=25:75	ПВС:ХТЗ=50:50
рН точки помутнения	6,43	6,43	6,53	6,71
α в точке помутнения	0,43	0,42	0,38	0,25
pK_a	6,3	6,2	6,2	6,2

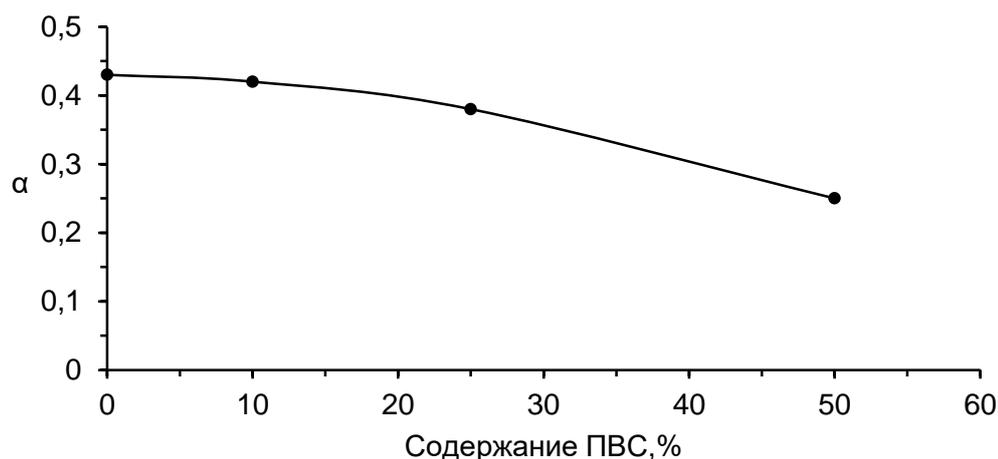


Рисунок 13 - Зависимость критической степени протонирования аминогрупп хитозана в водном растворе от содержания ПВС в системе ПВС-ХТЗ.

Показано, что в системе ПВС-ХТЗ при изменении рН среды реализуются условия для фазового разделения. При этом с увеличением количества хитозана в системе, фазовое разделение наступает при большем значении рН (рисунок 12). Такой эффект обусловлен тем, что увеличение объемной концентрации ПВС ведет к снижению критической степени протонирования аминогрупп хитозана (рисунок 13). Это может быть вызвано

ростом вязкости системы за счет высокой концентрации. В свою очередь степень ионизации (протонирования) аминогрупп хитозана может оказать большое влияние при формировании материалов из систем ПВС-ХТЗ с различной рН.

3.1.2. Изучение влияния степени протонирования аминогрупп и заряда поверхности частиц хитозана на формирование коагуляционных контактов в дисперсиях хитозана и свойства пленок, полученных на их основе

Степень протонирования хитозана оказывает влияние не только на фазовое состояние и свойства смешанных растворов хитозана и ПВС, но определяет заряд поверхности его частиц в дисперсиях хитозана и свойства полимерных пленок полученных на основе дисперсий хитозана в растворе ПВС, которые используются для получения композитных КГПВС.

Исследование электрокинетического потенциала, проведенные на приборе Zetatrac (Microtrac, США) позволило определить дзета-потенциал поверхности частиц хитозана с разной степенью протонирования аминогрупп и установить зависимость от α электропроводности системы и подвижности частиц дисперсной фазы (таблица 6).

Таблица 6 - Влияние степени протонирования аминогрупп хитозана на электрокинетические свойства дисперсий хитозана в растворе ПВС.

	Степень протонирования аминогрупп хитозана			
	$\alpha=0$	$\alpha=0,1$	$\alpha=0,2$	$\alpha=0,3$
Дзета-потенциал, мВ	0,74	0,98	97,87	137,17
Электропроводность, мкСм/см	0,987	1,001	1,343	1,67
Подвижность частиц, см ² *с/В	0,06	0,08	6,27	10,79

Показано, что рост электрокинетического потенциала начинается при степени протонирования аминогрупп хитозана 0,2. Аналогично изменяется

электропроводность системы и подвижность диспергированных частиц хитозана.

Аналогичная тенденция в зависимости изменения свойств полимерных материалов от заряда межфазовой поверхности сохраняется и при исследовании степени набухания пленок, полученных из дисперсий ПВС-ХТЗ с различной степенью протонирования аминогрупп хитозана (рисунок 14).

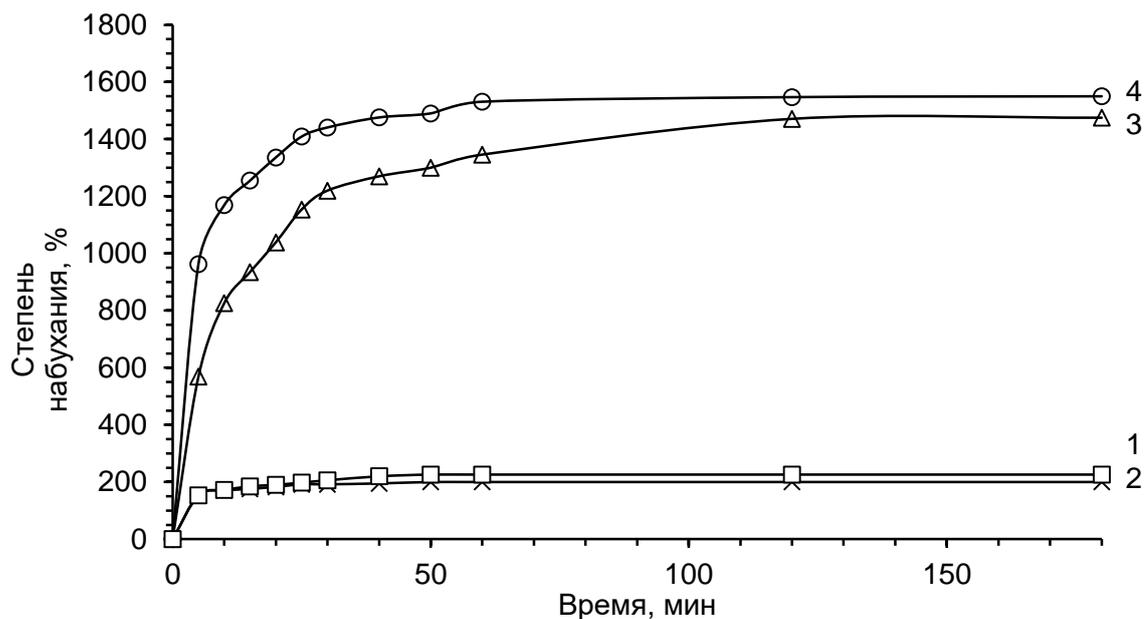


Рисунок 14 – Зависимость степени набухания пленок с соотношением компонентов ПВС:ХТЗ=50:50, полученных из растворов с различной степенью протонирования хитозана: 1 - $\alpha=0$; 2 - $\alpha=0,1$; 3 - $\alpha=0,2$; 4 - $\alpha=0,3$.

Степень набухания пленок достигает ~1500% при степени протонирования аминогрупп хитозана $\alpha=0,2$ и $\alpha=0,3$ и всего 200% при степени протонирования $\alpha=0$ и $\alpha=0,1$.

3.1.3. Изучение реологических свойств растворов ПВС, содержащий дисперсии хитозана

Формирование коагуляционных контактов в дисперсиях полимеров проявляется в изменении структурно-механических свойств и увеличении вязкости дисперсной системы по сравнению с вязкостью дисперсионной среды. Поэтому, были исследованы реологические свойства полимерных

композиций на основе раствора поливинилового спирта, содержащего порошкообразный хитозан при разном заряде поверхности и степени протонирования аминогрупп (рисунок 15).

Для оценки реологических свойств раствора ПВС и растворов ПВС, содержащих хитозан, использовали ротационный вискозиметр Rheotest 2. Результаты представляли в виде зависимостей вязкости $\eta = f(\log \dot{\gamma})$. За начальную эффективную динамическую вязкость принималась вязкость при $\dot{\gamma} = 0$.

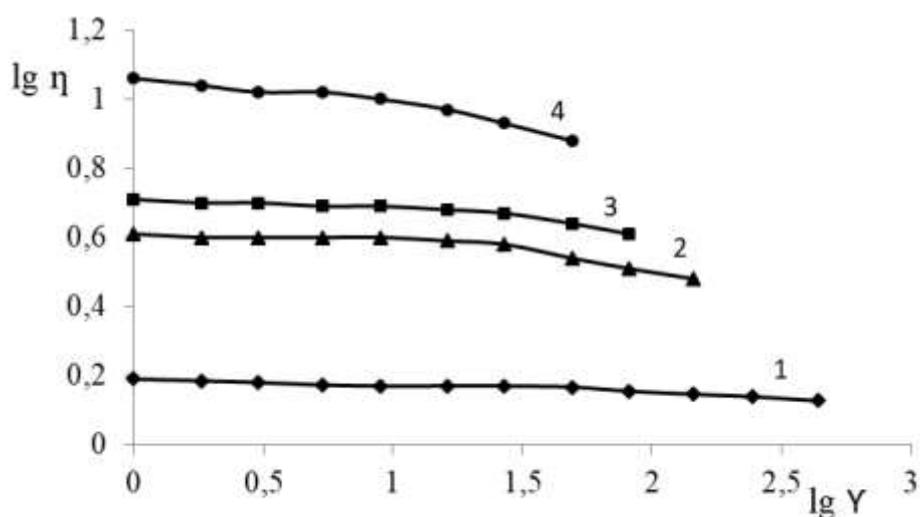


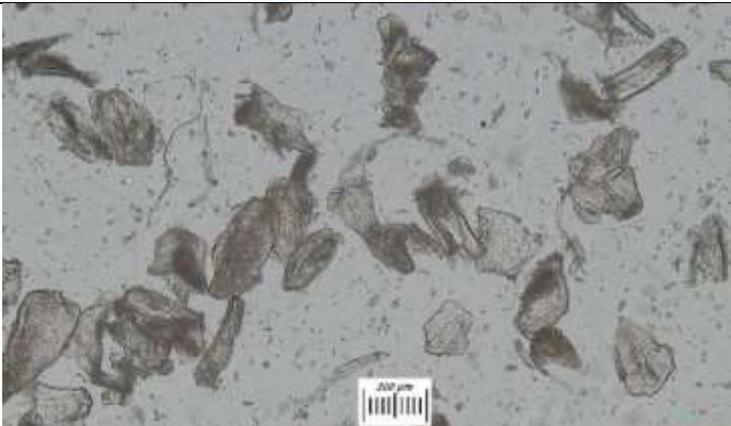
Рисунок 15 - Реологические кривые раствора ПВС (1) и растворов ПВС, содержащих хитозан со степенью протонирования аминогрупп 10 % (2), 20 % (3) и 30 % (4). Концентрация растворов 12 г/дл. Степень наполнения хитозаном 30 % (от ПВС).

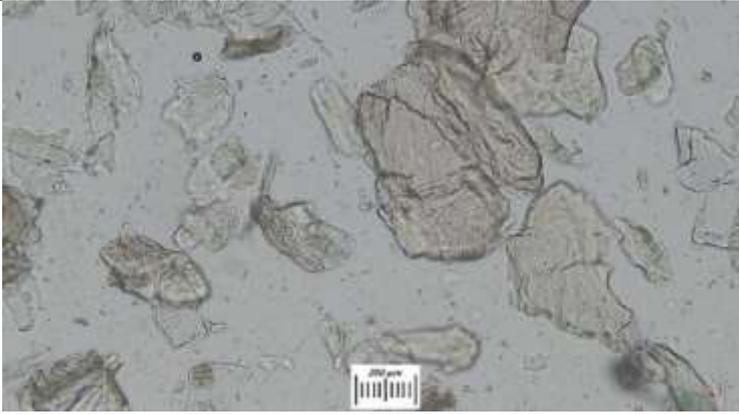
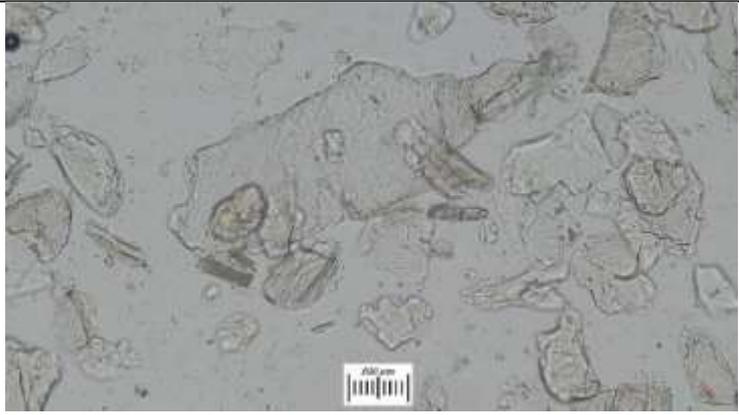
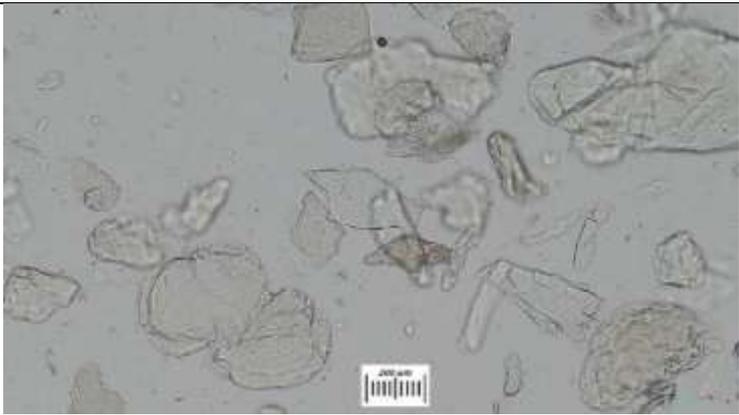
С ростом степени протонирования аминогрупп хитозана, несмотря на рост заряда поверхности частиц дисперсной фазы, наблюдается увеличение эффективной динамической вязкости дисперсии, вероятно вызванное увеличением степени набухания протонированной формы хитозана и, вследствие этого, увеличением эффективной объемной доли дисперсной фазы. Это приводит к формированию в системах с одинаковым содержанием хитозана, более крупных частиц и увеличению числа коагуляционных контактов, повышающих сопротивление сдвиговым деформациям, что проявилось в увеличении вязкости системы и росту аномалии вязкости.

3.1.4. Изучение растворимости дисперсий хитозана в растворах ПВС с различной степенью ионизации аминогрупп хитозана

Учитывая, что хитозан – это аморфно-кристаллический полисахарид, хорошо растворимый в водном растворе уксусной кислоты, содержание которой обеспечивает хитозану необходимую для растворения в воде степень протонирования. Полидисперсность образцов хитозана и неравномерное распределение протонированных аминогрупп создает возможность перехода низкомолекулярных и аморфных фракций полимера в раствор, что так же подтверждается оптическими фотографиями растворов, где видно, что размер частиц уменьшается и образуются более сглаженные и полупрозрачные частицы дисперсии. Тот факт, что растворитель легче всего проникает в аморфные участки полимера и его недостаток в системе для полного растворения полимерной фазы хитозана, указывает на растворение именно аморфных участков дисперсии хитозана (таблица 7).

Таблица 7 – Оптические микрофотографии растворов ПВС – хитозан с различной степенью протонирования

Степень протонирования аминогрупп хитозана, диспергированного в растворе ПВС.	Микрофотографии
0	

0,1	
0,2	
0,3	

Поэтому, для исключения влияния этого фактора, дисперсии ПВС – хитозан, содержащие раствор уксусной кислоты с концентрацией, обеспечивающей степень протонирования аминогрупп хитозана α 0,1, 0,2 и 0,3, были изучены на наличие растворенной фракции хитозана, то есть определили количества хитозана, которое перешло в раствор. Для этого расчетное количество сухого порошка хитозана суспендировали в водном растворе уксусной кислоты, перемешивали и оставляли на 24 ч. Полученную систему для разделения сосуществующих фаз центрифугировали при 8000

об/мин в течение 30 минут. Осадок промывали водой и сушили до постоянного веса. Остаточный вес хитозана после растворения определяли в массовых процентах по отношению к весу первоначальной фракции. Результаты эксперимента приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Содержание нерастворимой фракции хитозана в системах с разной степенью протонирования аминогрупп хитозана

Степень протонирования α	Нерастворимая в воде фракция хитозана, ω , %
0	100,0
0,1	94,0
0,2	85,2
0,3	72,7

Показано, что с повышением степени протонирования хитозана количество растворимой фракции увеличивается.

3.1.5. Влияние заряда поверхности частиц хитозана на структурообразование в дисперсии хитозана в растворе ПВС и свойства композитных криогелей

Композитные криогели ПВС, которые содержали в себе хитозан в виде дисперсных частиц с разной степенью ионизации аминогрупп хитозана, были получены методом замораживания при -20°C , выдерживания в замороженном состоянии в течении 12 ч и последующим оттаиванием. Сформированные таким образом криогели ПВС-ХТЗсодержали гелеобразующий полимер ПВС как каркас, и хитозан в виде частиц нерастворимой дисперсии, так и уксуснокислую соль, количество которой повышается с ростом степени протонирования хитозана. В таблице 9 приведены значения компрессионного модуля упругости криогелей ПВС-ХТЗ с различной степенью протонирования аминогрупп хитозана.

Таблица 9 - Значения компрессионного модуля упругости Юнга криогелей ПВС-ХТЗ с различной степенью протонирования аминогрупп хитозана.

Образец	КГПВС	КГПВС – ХТЗ, Степень протонирования аминогрупп хитозана			
		$\alpha = 0$	$\alpha = 0,1$	$\alpha = 0,2$	$\alpha = 0,3$
Есж, кПа	12,4±0,3	13,9±0,7	27,3±0,2	22,2±0,8	20,6±0,4

Показано, что введение дисперсных частиц хитозана в криогель ПВС оказывает незначительное изменение модуля упругости. Однако с увеличением степени протонирования параметры жесткости проходят через выраженный максимум при $\alpha = 0,1$, дальнейшее повышение степени ионизации аминогрупп хитозана ведет к монотонному снижению модуля упругости. Вероятно, такой характер изменения показателей модуля упругости вызван снижением объемной доли дисперсного наполнителя при его частичном растворении в системе, тогда как хитозан, содержащий непротонированные аминогруппы, играет роль неактивного наполнителя.

Известно, что одним из способов улучшения эксплуатационных свойств криогелей ПВС является проведение многократных циклов замораживания-оттаивания [3, 10, 22, 25, 27, 29, 30, 46, 77, 80, 81, 86]. На рисунке 16 приведены зависимости компрессионного модуля упругости композитных криогелей ПВС-ХТЗ (образца с разной степенью протонирования полиаминосахарида) от числа циклов криогенной обработки.

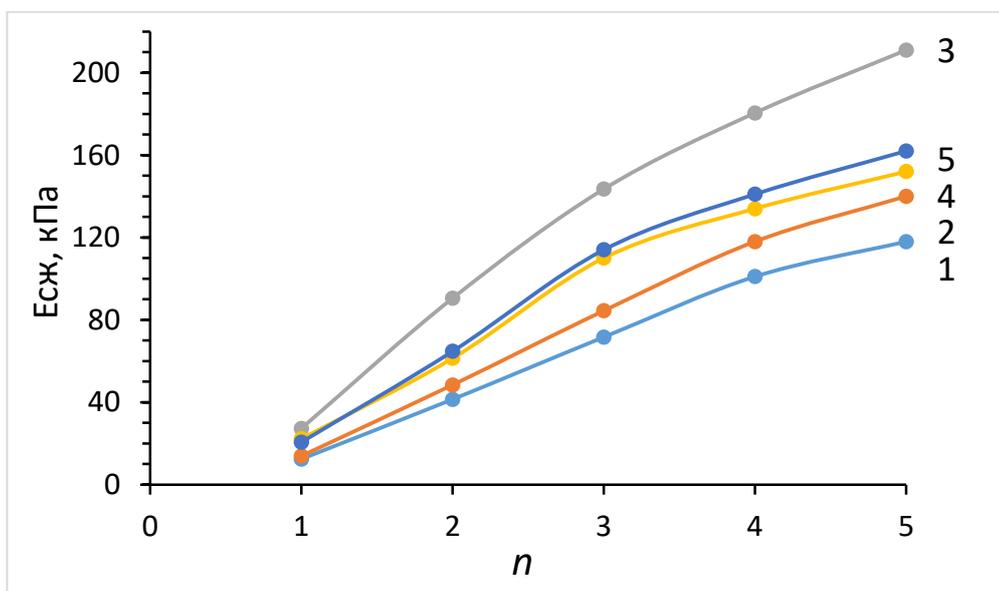


Рисунок 16 – Зависимость компрессионного модуля упругости ($E_{сж}$) от числа циклов замораживания-оттаивания (n) криогелей ПВС (1) и ПВС–хитозан (степень протонирования хитозана α : 0 (2); 0,1 (3); 0,2 (4); 0,3 (5)).

Однако при таких условиях получения комплексных криогелей ПВС из образцов вымывалась уксуснокислая соль хитозана в водных средах. Чтобы исключить диффузию из криогеля водорастворимой формы хитозана, необходимо перевести ее в нерастворимую основную (ХТО). Для трансформации солевой формы хитозана, находящегося в составе криогелей, в основную форму образцы после первого цикла замораживания-оттаивания выдерживали в течение 24 ч в парах аммиака в герметичном эксикаторе, содержащем концентрированный водный раствор аммиака, периодически переворачивая, чтобы экспонировать в атмосфере аммиака препараты со всех сторон. Далее образцы на 3 ч погружали в 0,01N раствор NaOH, промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH промывной жидкости. Для криогелей после такой щелочной обработки также были измерены показатели модуля упругости. (Рисунок 17)

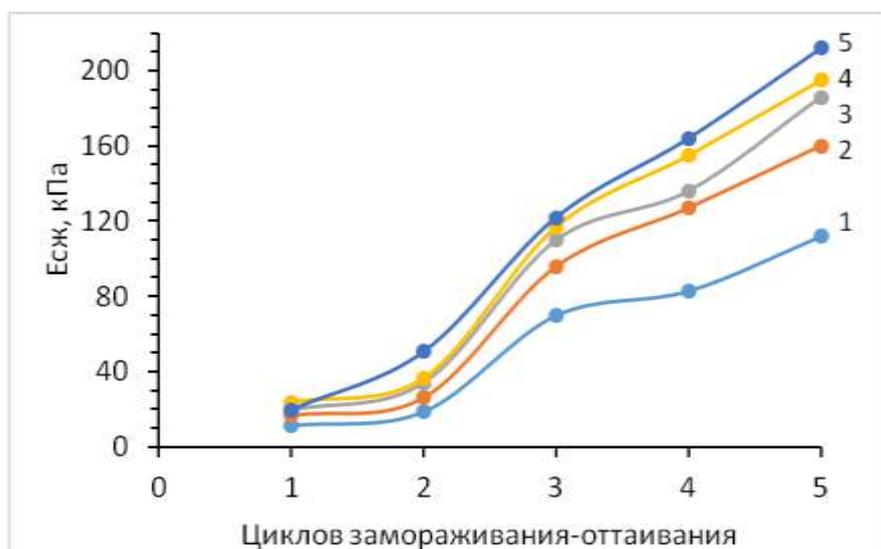


Рисунок 17 – Зависимость компрессионного модуля упругости ($E_{сж}$) от числа циклов замораживания-оттаивания (n) криогелей ПВС (1) и ПВС–хитозан после щелочной обработки (степень протонирования хитозана α : 0 (2); 0,1 (3); 0,2 (4); 0,3 (5)).

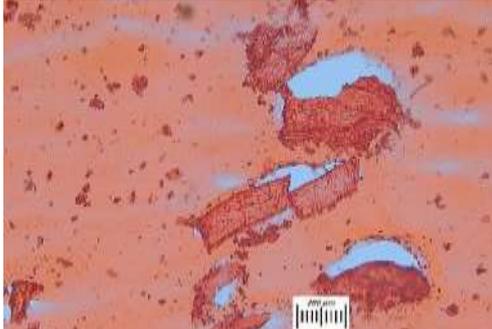
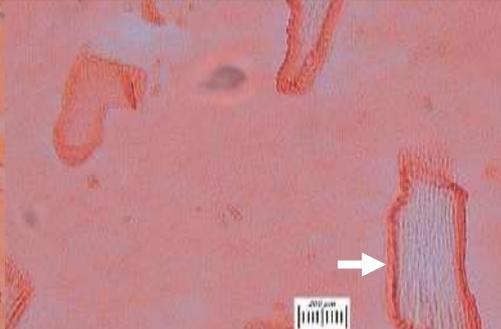
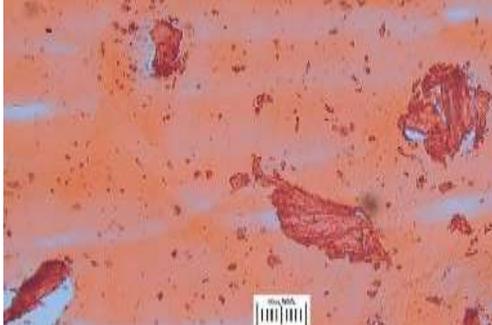
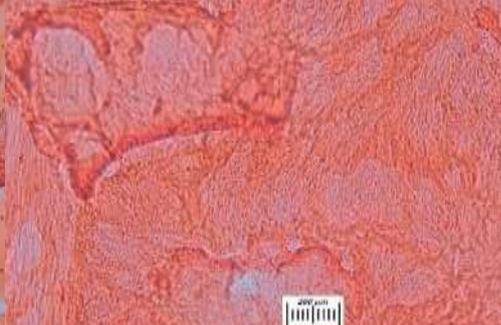
Установлено, что более высокая степень протонирования в момент получения криогеля обеспечивает после трансформации солевой формы хитозана в основную формирование более упругих композитных криогелей в процессе многократного замораживания-оттаивания. Изменение физико-механических свойства криогелей не подвергавшихся щелочной обработке, содержащих солевую форму хитозана, происходит не столь однозначно (Рисунок 16). Это может объясняться тем, что при степени протонирования хитозана 0,3 наблюдается наибольшая степень его растворения по сравнению с другими рассматриваемыми здесь случаями. С одной стороны, это приводит к уменьшению размеров дисперсных частиц хитозана, а с другой – изменению характера взаимодействий криогель – наполнитель.

3.1.6. Изучение влияния особенностей микроструктуры композитных криогелей поливинилового спирта, получаемых в процессе циклического замораживания–оттаивания и содержащих протонированную и депротонированную формы хитозана

Криотропное гелеобразование – метод получения макропористых гетерофазных полимерных гелей, основанный на замораживании, выдерживании в замороженном состоянии и последующем оттаивании гелеобразующей полимерной системы с образованием взаимопроникающих пор. Варьируя условия формирования криогелей, таких как концентрация полимера, тип растворителя, температура замораживания, скорость оттаивания и др., можно направленно регулировать размер пор, а также менять свойства исходного КГ, вводя в систему различные добавки. Например, введение хитозана в КГ ПВС, благодаря наличию в его структуре функционально-активных аминогрупп, может позволить получить новые медико-биологические и сорбционные материалы. Введение в систему мелкодисперсного кристаллического хитозанового биополимера вероятно должно влиять на формирование пористой морфологии криогеля ПВС. Для

изучения этого были получены микрофотографии тонких срезов соответствующих препаратов. Морфологию криогелей изучали с помощью оптического микроскопа Eclipse 55i (Nikon, Япония), снабженного системой цифровой записи изображений. Для исследований готовили тонкие (~10 мкм) срезы, которые окрашивали водным раствором Конго красного. Результаты этих экспериментов приведены в таблице 10.

Таблица 10 - Оптические микрофотографии тонких срезов криогелей ПВС – хитозан со степенью протонирования аминогрупп хитозана 0 и 0,3.

Циклов замораживания-оттаивания	КГ ПВС-ХТ ($\alpha=0$)	КГ ПВС-ХТ ($\alpha=0,3$)
1		
5		

Показано, что в криогелях, включающих дисперсные частицы непротонированного хитозана, содержатся частицы плотные и жесткие, о чем свидетельствуют разрывы в массе геля по краям частиц наполнителя, возникшие в процессе выполнения срезов. На микрофотографиях препаратов композитных криогелей, полученных замораживанием-оттаиванием дисперсий частично протонированного хитозана в растворе ПВС с последующей щелочной обработкой образцов, видны четкие межфазные

слои на поверхности крупных частиц наполнителя (указано белой стрелкой), что свидетельствует о хорошем взаимодействии между полимером и наполнителем. Также в межчастичном пространстве в отмечена фаза из дисперсных микрочастиц хитозана, образовавшихся в результате щелочной трансформации ацетата хитозана (уксуснокислой соли) в основную форму. В результате многократной криогенной обработки более крупные частицы и дисперсные микрочастицы хитозана оказываются включенными в уплотненные стенки криогеля поливинилового спирта. Последнее приводит к значительному повышению жесткости композитного криогеля по сравнению с ненаполненным криогелем ПВС и криогелем, содержащем непротонированные частицы хитозана (данные были приведены выше).

Проведенные исследования показывают, что частичное протонирование аминогрупп хитозана в криогелях ПВС позволяет получать композиты с более развитой и равномерной структурой. Присутствующие в системе уксуснокислые соли хитозана включаются в полимерную матрицу криогеля ПВС и при проведении щелочной обработки образуют микрочастицы, которые играют роль активного наполнителя. Поэтому дальнейшим этапом исследования было изучение влияния введения в криогель ПВС хитозана со степенью протонирования аминогрупп 99-100% - солянокислой соли хитозана (хлоргидрата хитозана (ХГХ)).

3.2. Изучение фазовых состояний в системах ПВС – хлоргидрат хитозана

3.2.1. Изучение фазовой диаграммы систем ПВС-хлоргидрат хитозана

Использованный в работе препарат ХГХ обладал пониженной вязкостью и хорошей растворимостью в воде (10 и более масс.%), что обусловлено специально подобранной для целей данного исследования молекулярной массой полимера (~46 кДа) и незначительным содержанием в нем остаточных N-ацетильных групп. Благодаря этому ХГХ хорошо

совмещался с концентрированным водным раствором ПВС, что позволило в широких пределах варьировать содержание «второго» полимера в получаемых комплексных КГПВС. Также вследствие хорошей растворимости ХГХ оказалось возможным вводить его в водный раствор ПВС просто в виде сухого порошка, который там полностью растворялся. При концентрации ПВС 120 г/л можно было приготовить смешанные полимерные растворы с содержанием солянокислой соли хитозана около 135 г/л (или 10,7 масс.%) и выше. При более высоком, чем указанное, содержании ХГХ уже сильно возрастала вязкость полученных растворов, что затрудняло манипуляции с ними. Однако и тогда система оставалась однофазной, и ее расслоения на две жидкие фазы – обогащенную, соответственно, ХГХ и ПВС, происходило лишь в результате дополнительного введения низкомолекулярного электролита (0,15М NaCl в нашем случае) в исходный смешанный раствор этих двух полимеров.

Фазовая диаграмма системы 0,15М раствор NaCl– ПВС – ХГХ и ее основные параметры приведены на рисунке 18 и в таблице 11, соответственно. Из полученных данных следует, что для ПВС и ХГХ характерен высокий уровень термодинамической совместимости в среде 0,15МNaCl. Так, минимальная суммарная концентрация полимеров, отвечающая переходу из однофазного в двухфазное состояние C_t^* , равна 236,9 г/л. Эта величина намного выше значения C_t^* (70-89 г/л) для водной системы, содержащей, например, ПВС и гуммиарабик, а также большой серии известных водных систем полисахарид-1 – полисахарид-2 [162]. Другими словами, совместимость ПВС и ХГХ является крайне высокой в срединной части диаграммы при небольшом избытке одного из полимерных компонентов. Особенно выраженной является разница в величине предела растворимости ХГХ в концентрированном растворе ПВС, т.е. значение $C_{ПВСLim} = 110,9$ г/л, в сравнении с показателем предела растворимости других природных и синтетических полимеров в концентрированном растворе ПВС, а также в концентрированных растворах полисахаридов (1-10

г/л). Столь сильное различие в термодинамической совместимости ХГХ с ПВС по сравнению с другими полимерными системами, а также отсутствие области двухфазного состояния для смесей ХГС с ПВС в воде без добавок низкомолекулярной соли, можно объяснить наличием слабого взаимодействия электростатической природы между этими полимерами, подавляемого такой солью.

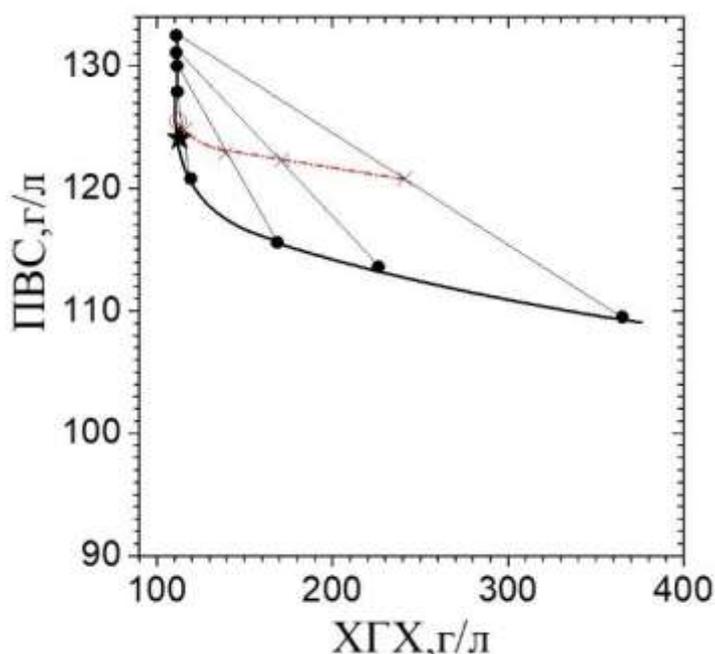


Рисунок 18 - Фазовая диаграмма системы 0,15M NaCl– ПВС – ХГХ ($t^{\circ}20^{\circ}C$). (жирная сплошная линия – бинадаль; тонкая сплошная линия – линия связи составов сосуществующих фаз; штрих-пунктирная линия – середины линий связи; ● – составы фаз; ○ – положение критической точки; ★– положение пороговой точки.

Таблица 11 - Координаты критических точек и критерий симметрии фазовой диаграммы системы 0,15M NaCl – ПВС – ХГХ.

$C_{\text{ПВС}}^{\text{кр}}$	$C_{\text{ХГХ}}^{\text{кр}}$	$C_t^{\text{кр}}$	$C_{\text{ПВС}}^*$	$C_{\text{ХГХ}}^*$	C_t^*	10^3	10^3	$КС_M$	$C_{\text{ПВСLim}}$
г/л	г/л	г/л	г/л	г/л	%	мПВС ^{кр}	мХГХ ^{кр}		г/л
125,5	112,0	237,5	124,0	112,8	236,9	1,45	2,39	0,606	110,9

Оказалось, что полученной фазовой диаграмме (рисунок 18) свойственна низкая степень асимметрии по весовой шкале концентраций

(концентрация полимеров в критической точке различаются незначительно). Характер этой фазовой диаграммы, а именно, резкое уменьшение угла наклона линий связей, соединяющих составы сосуществующих фаз при возрастании концентрации ХГХ в тройной смеси, а также резкое возрастание вязкости и уменьшение текучести обогащенной ПВС фазы с ростом концентрации ХГХ, указывает на приближение состава этой фазы к критической концентрации лиотропного гелеобразования [163].

Таким образом, на основании изучения фазовых состояний в системе вода-ПВС-ХГХ было установлено, что в диапазоне концентраций ХГХ в его смешанных растворах, содержащих ПВС в количестве 120 г/л, которые затем использовались для формирования комплексных криогелей, криогенной обработке подвергались однофазные системы. В случае же смешанных растворов этих полимеров, дополнительно включавших 0,15М NaCl, при указанной «фиксированной» концентрации ПВС введение около 120 г/л ХГХ, приводит к формированию двухфазных жидких систем, одна из которых была обогащена гелеобразующим полимером, а другая – негелеобразующим.

Реологические свойства концентрированных растворов полимеров так же является одним из основных параметров для характеристики системы. В зависимости от методов формования готовых продуктов к полимерным растворам предъявляются различные требования. Поэтому изучение реологических свойств системы ПВС-ХГХ является важной задачей.

3.2.2. Изучение реологических свойств смешанных растворов ПВС и хлоргидрата хитозана

В качестве исходных растворов для получения криогелей хитозана были использованы растворы ПВС с концентрацией 120 г/л, содержащие различные количества ХГХ. Реологические исследования проводили на ротационном вискозиметре Rheotest 2 (Германия). Реологические кривые представляли в виде зависимостей динамической вязкости от градиента

скорости сдвига $\lg \eta = f(\lg \dot{\gamma})$. За начальную вязкость принимали значение вязкости при градиенте скорости сдвига $\dot{\gamma} = 1 \text{ с}^{-1}$. На рисунке 19 приведены реологические кривые зависимости смешанных растворов ПВС и ХГХ в воде. Реологические кривые имеют вид, типичный для псевдопластических жидкостей, характеризующихся наличием коагуляционных контактов, разрушающихся в процессе течения под воздействием сдвиговых деформаций. Рост градиента скорости и напряжений сдвига очевидно вызывает в исследованных системах разрушение структур, обусловленных многоточечными взаимодействиями между макромолекулами полимеров и их ориентацию вдоль оси течения. Об этих процессах свидетельствует падение эффективной вязкости, которое обнаруживается под влиянием сдвига в большей степени у дисперсных систем с относительно высоким содержанием хитозана.

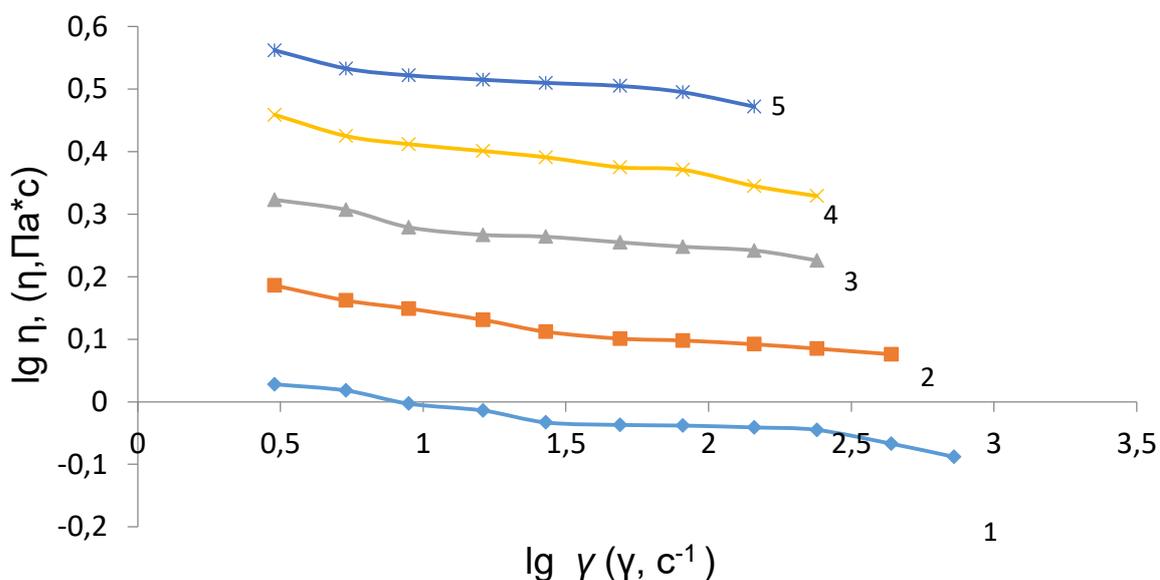


Рисунок 19 - Реологические кривые раствора ПВС с концентрацией 120 г/дл (1) и смешанных растворов ПВС и ХГХ (2-5). Содержание ХГХ в растворе ПВС 2,5% (2), 5% (3), 7,5% (4), 10% (5).

Изменение реологических свойств системы при введении в раствор ПВС ХГХ свидетельствует о заметных структурных изменениях, обусловленных присутствием второго полимера: начальная вязкость

раствора увеличивается более, чем в 3 раза (с 1,12 до 3,98 Па·с) (рисунок 20). Этот факт может быть обусловлен только аддитивным ростом вязкости при увеличении суммарной концентрации раствора или связан с изменением характера межмолекулярных взаимодействий, вызванного присутствием второго полимера.

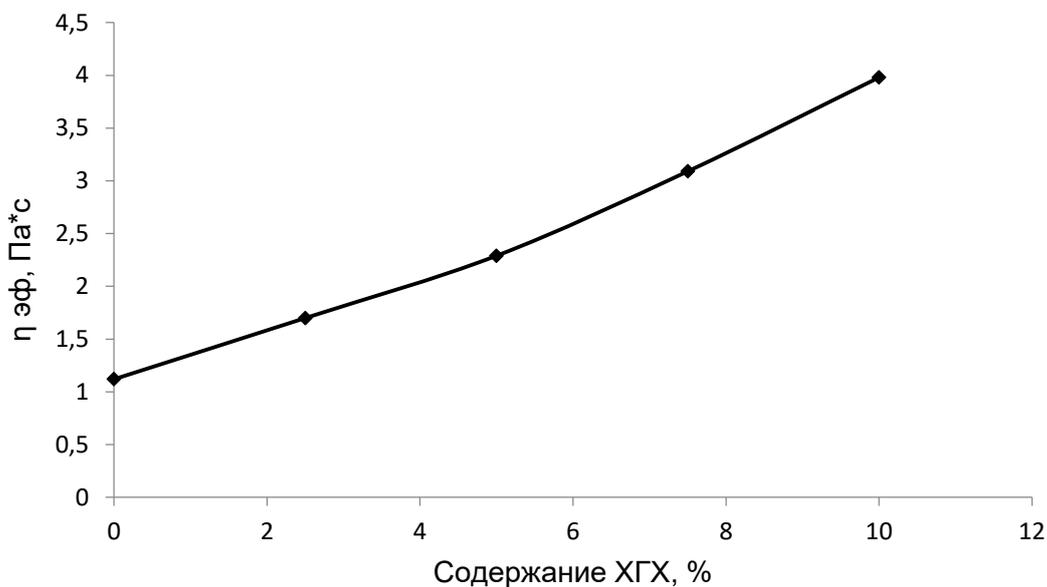


Рисунок 20 - Зависимость начальной вязкости смешанных растворов ПВС и ХГХ от содержания ХГХ.

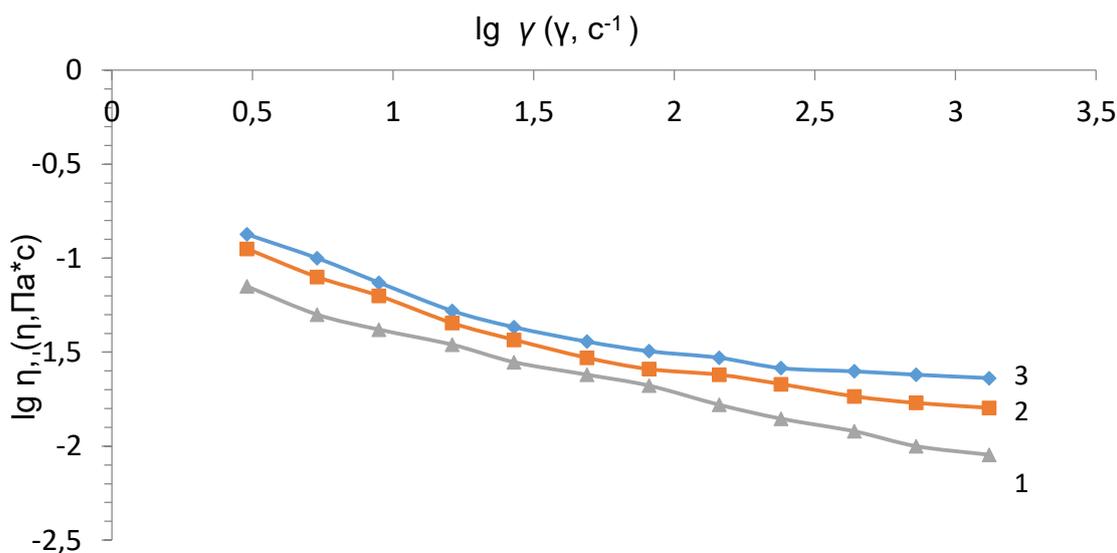


Рисунок 21 - Реологические кривые водных растворов ХГХ. Концентрация раствора 5% (1), 7,5% (2) и 10% (3).

Были получены реологические кривые водных растворов ХГХ (рисунок 21) с концентрацией, аналогичной содержанию хитозана в смешанных растворах ПВС: 5,0, 7,5 и 10%. Вязкость растворов ХГХ была значительно более низкой по сравнению со смешанными растворами ПВС. Была отмечена слабая зависимость вязкости растворов от концентрации: при переходе от 5% раствора ХГХ к 10%-му вязкость системы меняется от 0,06 до 0,19 Па·с. Добавление к раствору ПВС соответствующих концентраций ХГХ вызывает существенно более значительное изменение эффективной начальной вязкости - на 1,7 Па·с (с 2,29 до 3,98 Па·с). Макромолекулы хитозана также, как и ПВС, содержат в своем составе функциональные группы, способные к образованию водородных связей. По-видимому, сетка зацеплений в растворах ПВС, содержащих ХГХ характеризуется более прочными контактами, вследствие этого смешанные растворы ПВС и ХГХ обладают большей способностью к сопротивлению сдвиговым воздействиям по сравнению с раствором ПВС.

Таким образом, введение в раствор ПВС водорастворимого ХГХ ведет к значительному увеличению вязкости системы, такой рост обусловлен не только аддитивным ростом вязкости при увеличении суммарной концентрации раствора, но и вызван образованием межмолекулярных водородных связей между ПВС и ХГХ.

3.2.3. Потенциометрическое титрование растворов хлоргидрата хитозана и поливинилового спирта

Ионное состояние аминогрупп в аминоксодержащем полимере определяется их сродством к протону (которое характеризуется величиной термодинамической константы диссоциации протонированного основания K_a) и внешними параметрами, такими как рН, ионная сила раствора. На способность аминогруппы удерживать протон оказывает влияние микроокружение и его диэлектрические свойства.

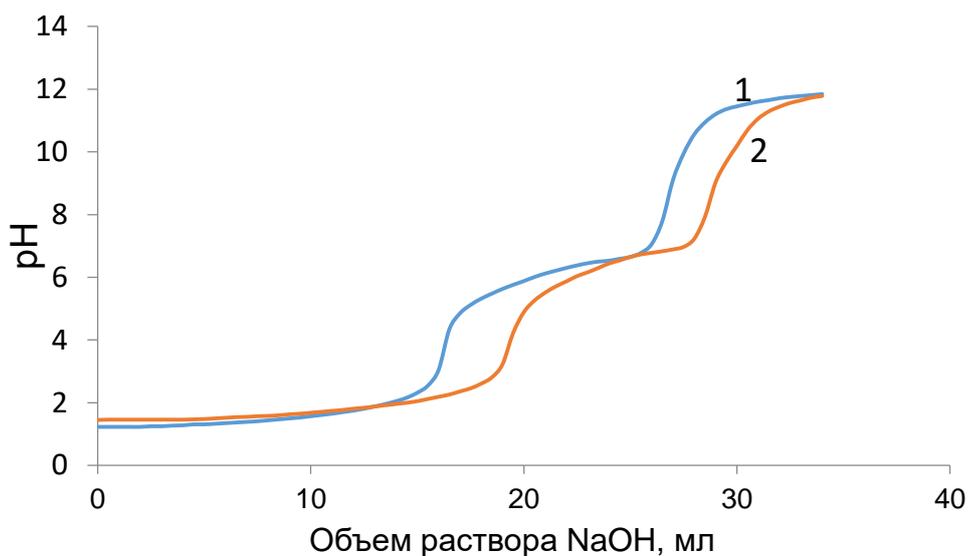


Рисунок 22 - Кривые потенциметрического титрования растворов ХГХ (1) и его смеси с ПВС 1:1 (2) 0,1М раствором NaOH.

На основании результатов потенциметрического титрования растворов ХГХ и его смеси 1:1 в 0,1М соляной кислоте 0,1М раствором NaOH (рисунок 22) были рассчитаны значения степени протонирования аминогрупп α , которая изменяется от 0 до 1 в интервале от точки эквивалентности первого скачка до точки эквивалентности второго скачка, и pK_a . Сравнение зависимостей $\alpha=f(pH)$ (рисунок 23) для хитозана и его смеси с ПВС показывает, что депротонирование аминогрупп хитозана в присутствии ПВС начинается при больших значениях pH. pK_a аминогрупп хитозана в смеси с ПВС составляет 6,37 ед. pH, а хитозана 6,23 ед. pH (рисунок 16).

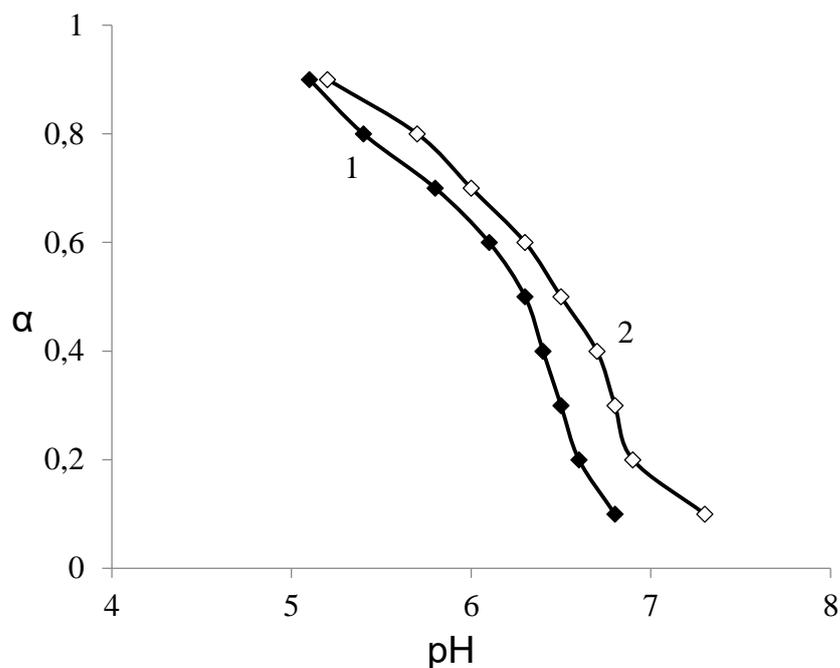


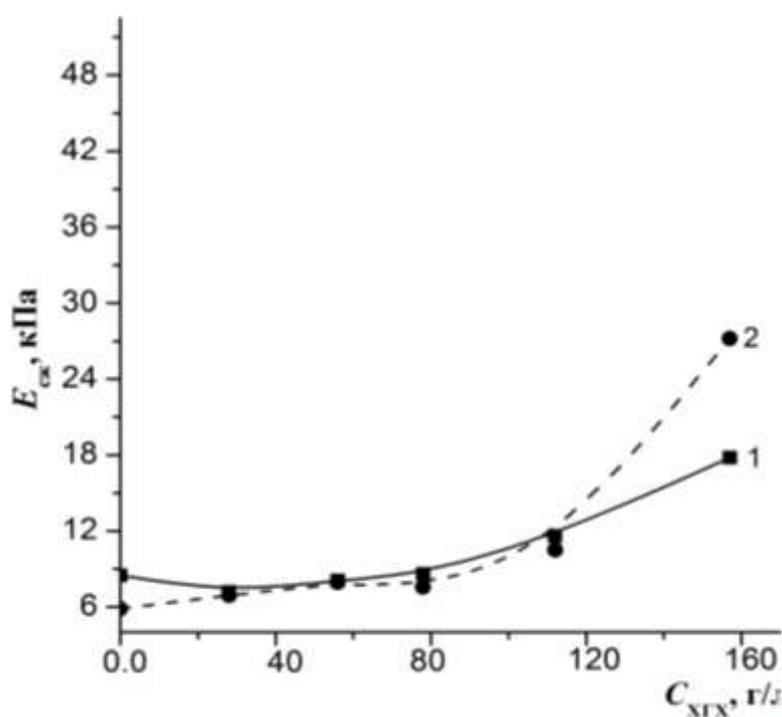
Рисунок 23 - Зависимость степени протонирования аминогрупп хитозана(α) от pH: 1 – для хитозана, 2 – для смеси хитозана и ПВС (1:1).

Таким образом, в присутствии ПВС сродство к протону аминогрупп хитозана увеличивается. Введение хитозана в раствор ПВС в выбранном диапазоне концентраций и соотношения полимеров не приводит к помутнению раствора, однако в процессе удаления растворителя в системе могут реализоваться условия для фазового разделения.

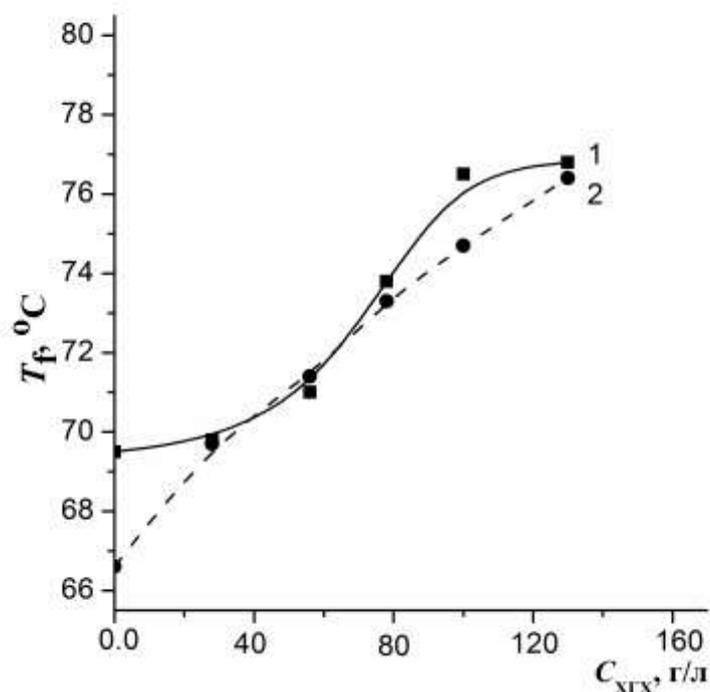
3.2.4. Физико-химические свойства комплексных криогелей, сформированных из смешанных водных растворов ПВС-ХГХ и ПВС-ХГХ-NaCl

Прежде всего, необходимо отметить, что криогенная обработка водных растворов ХГХ не приводила к какому-либо гелеобразованию. После замораживания таких растворов, их выдерживания в замороженном состоянии и оттаивания в тех же режимах, какие использовались при формировании комплексных КППВС, система всегда оказывалась жидкой. Это наглядно демонстрирует, что ХГХ в отсутствие дополнительных сшивающих агентов не образует криогелей, а в смешанных с ПВС растворах является негелеобразующим компонентом.

Ранее, при построении фазовой диаграммы, было установлено, что в присутствии низкомолекулярного электролита в растворах ПВС-ХГХ реализуются условия для фазового разделения. Для изучения влияния этой добавки на физико-химические свойства и морфологию криогелей были получены криогели содержащие и не содержащие 0,15М NaCl. На графиках рисунка 24 приведены зависимости компрессионного модуля упругости ($E_{сж}$) и температуры плавления (T_f) комплексных криогелей состава вода – ПВС – ХГХ (кривые 1) и 0,15М NaCl – ПВС – ХГХ (кривые 2), сформированных замораживанием исходных смешанных растворов при -20°C , от концентрации солевой формы хитозана.



a)



б)

Рисунок 24 - Зависимость компрессионного модуля Юнга (а) и температуры плавления (б) комплексных криогелей поливинилового спирта от исходной концентрации солянокислой соли хитозана в растворах состава: вода – ПВС – ХГХ (1) и 0,15М NaCl– ПВС – ХГХ (2).

В обоих случаях, т.е. и без низкомолекулярной соли, и в ее присутствии, общий характер влияния добавок ХГХ одинаков: до некоторого уровня содержания солевой формы хитозана жесткость комплексных криогелей меняется незначительно и даже проходит через слабо выраженный минимум, но выше $[XGX] > 100-110$ г/л уже заметно возрастает (рисунок 24а), В то же время, теплостойкость таких КГПВС монотонно повышается с ростом концентрации добавки (рисунок 24б). Эти эффекты по своей направленности очень близки зависимостям физико-механических показателей и температуры плавления криогелей ПВС от концентрации добавок низкомолекулярных электролитов, в частности, ряда хлоридов щелочных металлов (NaCl, KCl, CsCl), в присутствии которых формировались соответствующие КГПВС [164, 165]. Аналогично влиянию таких солей вид зависимостей на рисунке 24а в отношении величин модуля

упругости комплексных КГПВС указывает на конкуренцию противоположно действующих факторов. В частности, рост концентрации сильно сольватированных ионов, т.е. $-\text{NH}_3^+$ (протонированные аминогруппы цепей хитозана) и Cl^- -противоионов, привносимых в систему добавками ХГХ, увеличивает объем остающихся при умеренных отрицательных температурах жидкими областей макроскопически замороженной системы – так называемой незамерзшей жидкой микрофазы [6], что понижает в ней общую концентрацию гелеобразователя – ПВС. Это должно приводить к образованию менее жестких криогелей по сравнению с эквипонцированными по полимеру вариантами без добавок электролитов [6, 166-171]. С другой стороны, повышение концентрации ионов вследствие высаливающих эффектов в отношении незаряженного полимера (в данном случае ПВС [172]) должно промотировать межцепные ассоциативные процессы и в результате способствовать возрастанию жесткости получаемых КГПВС [171, 173, 174]. Поскольку заметное высаливающее действие солей обычно начинает проявляться, начиная с некоторых пороговых концентраций [172], то при невысоком содержании заряженных компонентов в исходном смешанном с ПВС растворе их положительное влияние на жесткость получаемых комплексных криогелей «преодолевают» разбавляющий эффект тоже по достижении определенной концентрации (рисунок 24а и 24б). При этом, из-за присутствия добавок низкомолекулярного электролита такой высаливающий эффект должен быть сильнее выражен для комплексных криогелей состава ПВС-ХГХ- NaCl . Вследствие, по-видимому, чего жесткость образцов КГПВС, сформированных из смешанных полимерных растворов с добавками NaCl (2, рисунок 24а), выше по сравнению с криогелями, содержащими одинаковое количество ХГХ, но приготовленными на основе систем вода-ПВС-ХГХ (1, рисунок 24а).

В то же самое время, влияние роста концентрации ХГХ на повышение теплостойкости комплексных КГПВС проявлялось даже при небольшом

содержании заряженного полимера в системе (рисунок 24б). При этом абсолютные значения T_f для эквиконцентрированных в отношении ХГХ образцов без добавок NaCl и с его добавками в пределах ошибки эксперимента были близки. Поскольку повышение ионной силы в растворах ПВС способствует не только интенсификации межмолекулярных взаимодействий за счет водородного связывания ОН-групп соседних цепей этого полимера, но усиливает и гидрофобные взаимодействия их углеводородного остова, то для плавления получающихся в результате криогелей необходимы бóльшие энергозатраты, если, конечно, добавляемый электролит не обладает хаотропным действием. Вместе с тем, нельзя исключить и определенного вклада в теплостойкость КГПВС эффектов формирования интерполимерных комплексов за счет дополнительного, помимо ПВС-ПВС, водородного связывания ПВС и ХГХ, что должно приводить к еще некоторому повышению температуры плавления криогелей. О подобного рода комплексообразовании имеются данные в литературе, например, для КГПВС, получаемых из смесей ПВС с заряженными полимерами, например, полиакриловой кислотой или гуммиарабиком.

Приведенные на рисунке 24 зависимости жесткости и теплостойкости комплексных криогелей ПВС отвечают образцам, сформированным замораживанием исходных смешанных растворов при -20°C , т.е. в температурном режиме, известном как оптимальный для формирования КГПВС без водорастворимых добавок [6, 56]. Было найдено, что при более высоких минусовых температурах, например, при -10°C , исходные растворы ПВС с добавками ХГХ или ХГХ+NaCl часто вовсе не замерзали, а различия в свойствах, полученных замораживанием при -20 и -30°C комплексных (ПВС-ХГХ или ПВС-ХГХ-NaCl) криогелей одинакового состава невелики (рисунок 25), т.е. применявшаяся в данной работе температура криогенной обработки близка к оптимальной и для этих систем.

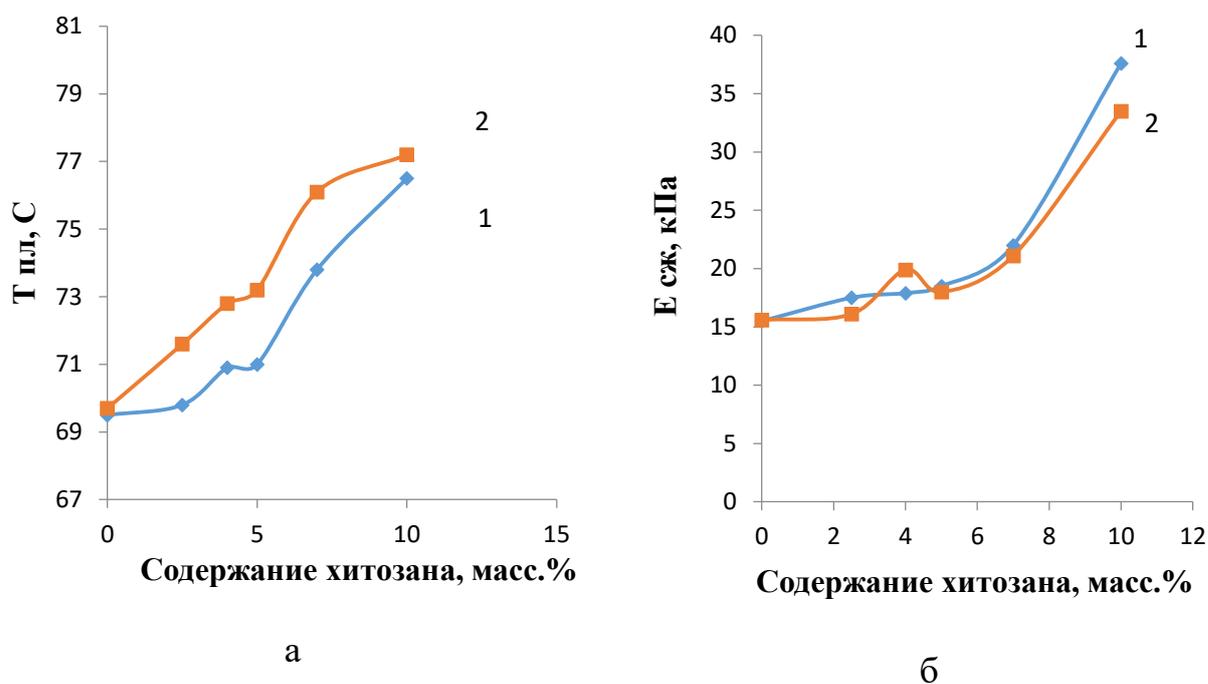


Рисунок 25 - Зависимость температуры плавления (а) и компрессионного модуля Юнга комплексных криогелей ПВС-ХГХ от содержания хитозана; кривые 1 - криогели, замороженные при -20°C -и 2 – при -30°C .

3.2.5. Изучение поверхности криогелей хитозана методом атомной силовой микроскопии

Криогели ПВС в зависимости от назначения или в связи с требованиями к подготовке образцов могут быть получены в виде образцов разного размера и формы. Для исследований морфологии поверхности комплексных криогелей были получены 1-мм-пленки (см. Методическую часть).

Поверхность криогелей разного состава, сформированных в виде пленок, без их дополнительной обработки была исследована методом атомно-силовой микроскопии. В таблице 10 результаты АСМ-микроскопии получены в полуконтактном режиме. Изображения - топография и "рассогласование" отличаются способом представления: в одном Z-

координата представлена так же, как X и Y - в единицах длины (мкм или нм), а в другом - силы тока на регистрирующем элементе (мА).

Следует отметить, что просканировать исходные образцы набухших в воде криогелей не представляется возможным - кантилевер (зонд) даже в полуконтактном режиме разрушает столь мягкие образцы. Поэтому в таблице 12 приведены АСМ-изображения воздушно-сухих пленок криогелей.

Таблица 12 - АСМ-изображения криогелей из ПВС и его смесей с хитозаном.

Содержание ХГХ, %	Топография поверхности	3D-изображение	Поверхность в режиме «рассогласование»*
0			
2,5			
5			
7,5			

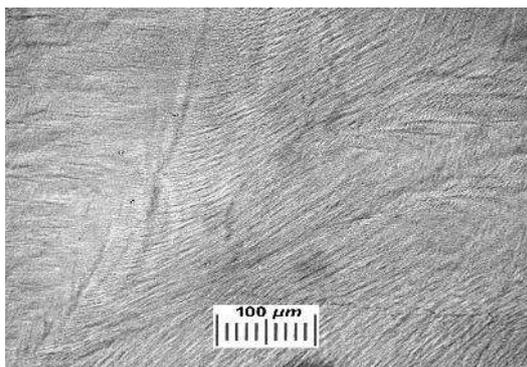
Как видно из полученных изображений, наблюдаются явные различия в топографии поверхности образцов криогеля из ПВС и криогелей, полученных из совместных растворов с разным соотношением полимеров. Поверхность криогеля ПВС состоит из ориентированных параллельно подложке борозд глубиной около 300 нм, которые, отражают элементы структуры, сформированной растущими кристаллами льда. Изменения, происходящие в криогеле в процессе вымораживания растворителя из растворов, содержащих ХГХ (изменение ориентации и формирование более мелких элементов структуры), могут быть результатом как криоструктурирования в растворах полимеров разного состава, так и разных условий роста кристаллов льда в растворах, сильно различающихся по вязкости. В результате формируется структура с элементами, размер и форма которых определяется составом смеси. Для достоверной интерпретации полученных данных были необходимы более подробные структурные исследования с учетом процесса фазового разделения при щелочной обработке полученных криогелей.

3.2.6. Изучение поверхности криогелей хитозана методом оптической микроскопии

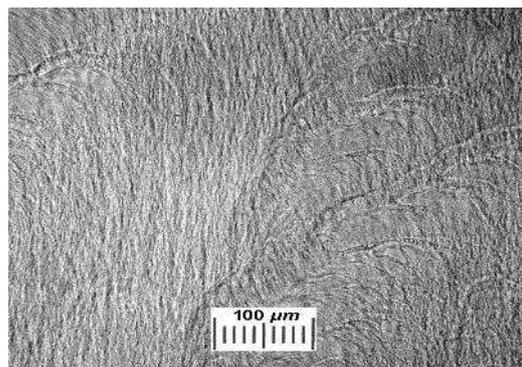
Микрофотографии на рисунках 26 и 27 показывают, как изменяется морфология нижней и верхней поверхностей серии криогелей, приготовленных в виде 1-мм-пленок из растворов состава вода-ПВС-хлоргидрат хитозана (рисунок 26) и вода-NaCl-ПВС-хлоргидрат хитозана (рисунок 27) по мере повышения от 56 до 112 и 156 г/л концентрации гелеобразующего полимера – хлоргидрат хитозана в исходном растворе гелеобразующего полимера (ПВС). Поскольку при замораживании таких растворов в пластиковых чашках Петри, помещенных на охлаждаемую плиту, градиент понижения температуры направлен снизу вверх, то рост кристаллов льда происходит в том же направлении, что, в принципе, должно приводить к определенной вертикальной ориентации макропор в

образующемся криогеле. В частности, этот эффект имел место при криоструктурировании систем вода-агароза [185-187]. Но оказалось, что в случае образцов без добавок хлоргидрата хитозана видимых различий в пористой морфологии нижних и верхних поверхностей 1-мм дисков при использованных нами увеличениях микроскопа не наблюдалось (рисунок 26а-б и 27а-б). Скорее всего, это было следствием довольно малой толщины замораживаемого слоя раствора полимера, быстро преодолеваемого фронтом кристаллизации льда, частицы которого просто еще «не успевали» в существенной степени изменить свою геометрию, что обычно имеет место в более толстых слоях из-за неодинаковой скорости роста разных граней таких кристаллов.

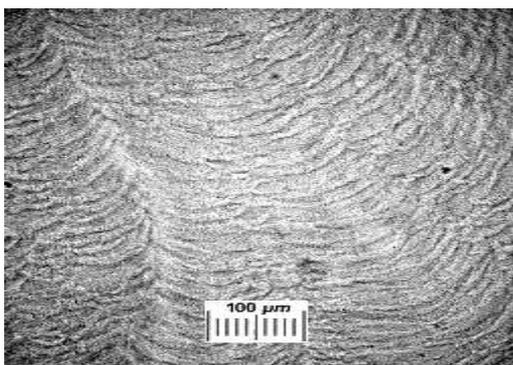
а (0-низ)



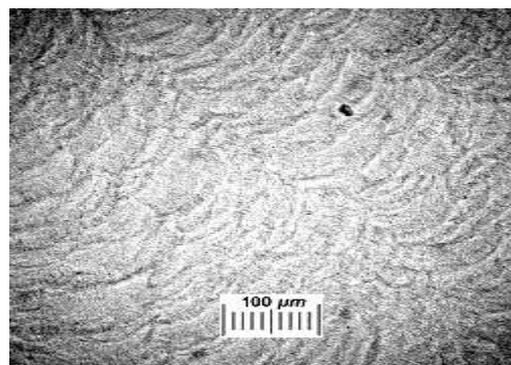
б (0-верх)



в (56-низ)



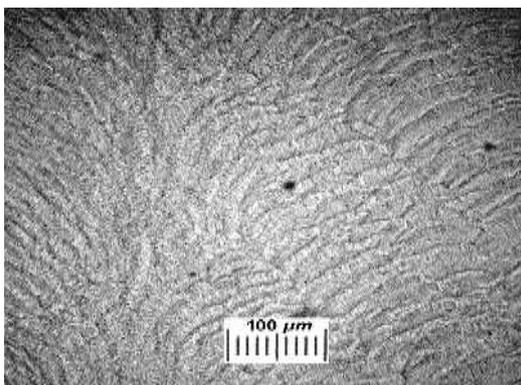
г (56-верх)



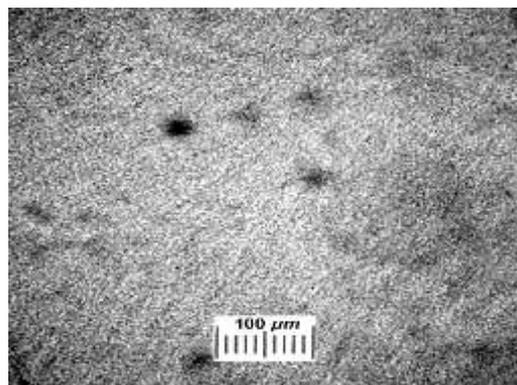
д (112-низ)



е (112-верх)



ж (156-низ)



з (156-верх)

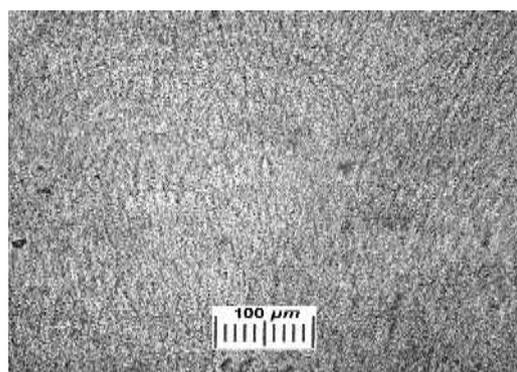
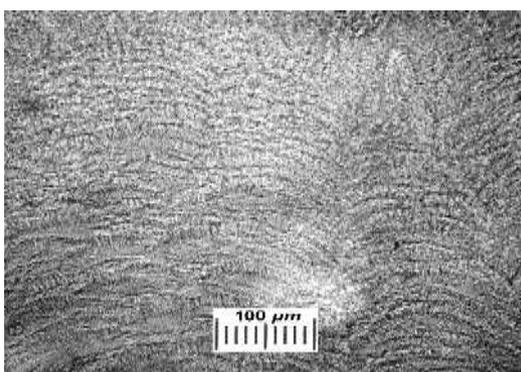
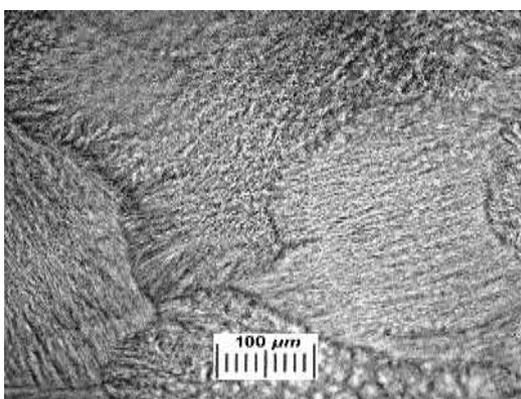


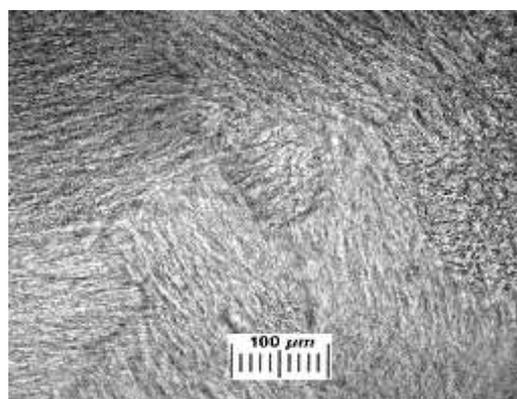
Рисунок 26 - Микрофотографии нижней (а, в, д, ж) и верхней (б, г, е, з) поверхностей 1-мм дисков криогелей ПВС и комплексных криогелей, сформированных из водных смесей ПВС и хлоргидрата хитозана. Исходные концентрации ПВС и хлоргидрата хитозана, соответственно, 120 г/л и 0 г/л (а, б), 120 г/л и 56 г/л (в, г), 120 г/л и 112 г/л (д, е), 120 г/л и 156 г/л (ж, з).

а (0-низ-соль)

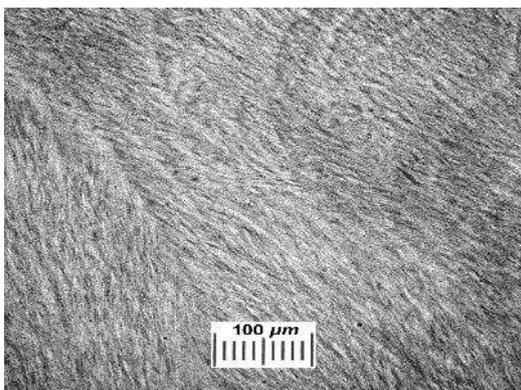
б (0-верх-соль)



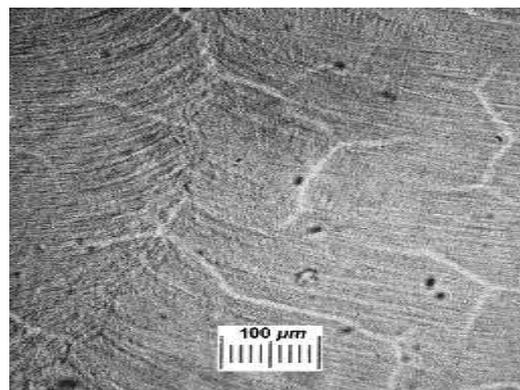
в (56-низ-соль)



г (56-верх-соль)



д (112-низ-соль)



е (112-верх-соль)

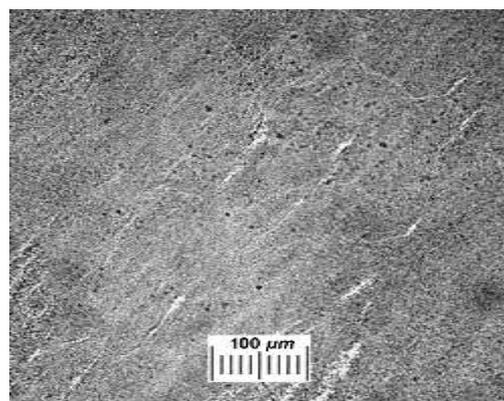
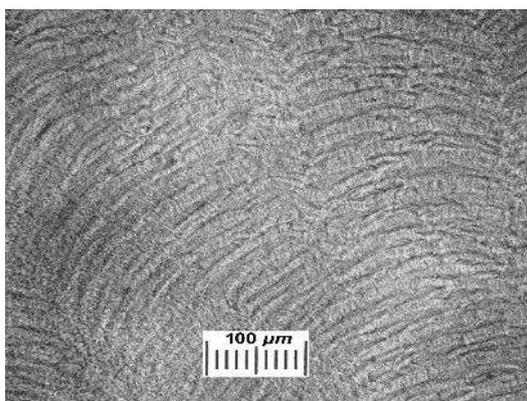


Рисунок 27 - Микрофотографии нижней (а, в, д) и верхней (б, г, е) поверхностей 1-мм дисков криогелей ПВС и комплексных криогелей, сформированных из водных растворов смесей состава вода-NaCl(0,15M)-ПВС-хлоргидрат хитозана. Исходные концентрации ПВС и хлоргидрата хитозана, соответственно, 120 г/л и 0 г/л (а, б), 120 г/л и 56 г/л (в, г), 120 г/л и 112 г/л (д, е)

Так как движение фронта кристаллизации льда при замораживании исходных растворов в данном случае происходил снизу вверх, то на рисунок 26 и 27 микрофотографии располагаются в той же «последовательности»: сначала в левой колонке приведены изображения нижних поверхностей дисков криогелей ПВС, а затем в правой колонке – микрофотографии верхних слоев соответствующих образцов. Поскольку после формирования 1-мм дисков комплексных криогелей они промывались водой от растворимых компонентов (хлоргидрат хитозана, NaCl и золь-фракция ПВС, не встроившегося в надмолекулярную сетку из-за ниже количественного

выхода процесса криотропного гелеобразования этого полимера [6]), то микрофотографии рисунков 26 и 27 демонстрируют макропористую морфологию нижних и верхних областей именно фазы ПВС, окрашенной Конго красным.

При сравнении изображений образцов, сформированных из растворов ПВС в присутствии и отсутствии соли и добавок хлоргидрата хитозана, с образцами, полученными из растворов смесей гелеобразующего и негелеобразующего полимеров, был выявлен ряд специфических эффектов.

Так, в случае криогелей ПВС, приготовленных из растворов вода-ПВС-хлоргидрат хитозана, наиболее выраженные изменения микроструктуры образцов по мере повышения исходной концентрации негелеобразующего полимера наблюдались для верхних поверхностей гелевых дисков (рисунок 26б-26з), в то время как общий характер морфологии нижних поверхностей тех же препаратов (рисунок 27в-27ж) отличался незначительно. Уже при введении небольшого (56 г/л) количества хлоргидрат хитозана в исходную систему увеличивалось поперечное сечение пор и нижней, и верхней поверхностей, образующихся криогеля ПВС по сравнению с образцами криогелей без этой полимерной добавки (сравнение рисунок 26а-б и 26в-г). Однако, повышение концентрации хлоргидрата хитозана до 112 г/л и далее 156 г/л приводило к уменьшению размеров таких пор. В наибольшей мере подобные изменения пористой морфологии наблюдались для верхних поверхностей дисков комплексных криогелей ПВС (рисунок 26е и 26з), т.е. в ходе замерзания даже всего 1-мм слоя смешанных растворов ПВС и хлоргидрат хитозана возникала явная анизотропия геометрии частиц порога – микрокристаллов льда. Причем, чем выше было содержание хлоргидрата хитозана в замораживаемой системе, тем такая анизотропия была сильнее выражена и тем меньше оказывался размер макропор у верхней поверхности диска соответствующего криогеля. Наблюдаемый характер влияния добавок хлоргидрата хитозана на микроструктуру криогелей указывает на определенное противодействие растворенной полимерной соли

(хлоргидрат хитозана) росту кристаллов льда, которые при этом вытесняют еще незамерзшую часть жидкости в межкристаллическое пространство и в область, находящуюся над фронтом кристаллизации.

Микроструктура препаратов, сформированных в виде 1-мм дисков из растворов предшественников вода-NaCl-ПВС и вода-NaCl-ПВС-хлоргидрат хитозана (рисунок 27), несколько отличалась от аналогичных по содержанию ПВС и хлоргидрат хитозана образцов без добавок низкомолекулярной соли (рисунок 26). Прежде всего, отметим, что из NaCl-содержащего раствор полимеров с самым высоким содержанием ХГХ (156 г/л) нам не удалось получить препараты комплексного криогеля того качества, которое было необходимо для микроскопического исследования соответствующего образца. После промывки таких криогелей от золь-фракции они не сохраняли свою форму. Поэтому на рисунке 27в-е приведены изображения нижней и верхней поверхностей дисков, полученных криогенной обработкой растворов с содержанием хлоргидрат хитозана только 56 и 112 г/л. Аналогично образцам без добавок NaCl (рисунок 26) изменения макропористой морфологии криогелей ПВС, вызываемые присутствием хлоргидрата хитозана в замораживаемом растворе предшественников, в большей степени проявлялись в случае верхних поверхностей гелевых дисков (рисунок 27г и 27е) по сравнению с нижними поверхностями (рисунок 27в и 27д). При повышении исходной концентрации хитозана сечение макропор в верхней части дисков заметно уменьшалось (сравнение рисунок 27г и 27е), и даже наблюдались «разрывы» структуры – светлые протяженные образования, напоминающие трещины. Ранее было найдено [180], что используемые нами образцы ПВС и хлоргидрат хитозана совместимы в общем растворителе в широком диапазоне концентраций обоих полимеров. В свою очередь, при определенной концентрации полимеров в системе вода-NaCl(0,15M)-ПВС-хлоргидрат хитозана может происходить фазовое расслоение с образованием двух жидких фаз, одна из которых обогащена гелеобразующим (в случае криогенной обработки) ПВС, а вторая негелеобразующим хлоргидратом

хитозана. Поэтому обсуждаемые особенности макропористой морфологии криогелей, микрофотографии которых демонстрируют рисунок 27в-27е, могут быть обусловлены и процессами жидкофазного расслоения дополнительно к уже обсужденному влиянию ХГХ на рост частиц порогена – кристалликов льда.

Дополнительная информация об особенностях морфологии дисков криогелей ПВС – ХГХ приведена в главе 3.3.3 на основании данных о составе их поверхности, полученных методом ИК-спектроскопии.

3.2.7. Исследование микроструктуры тонких срезов комплексных КГПВС-ХГХ

Как отмечалось ранее, при изучении свойств хитозан-содержащих комплексных КГПВС, физико-механические и теплофизические показатели в основном определяются такими факторами, как концентрация ХГХ в исходном растворе и присутствие или отсутствие там низкомолекулярной соли (NaCl). Влияние этих добавок на микроструктуру таких комплексных гелей изучались более подробно. Результаты обсуждаются ниже.

На рисунке 28 приведены микрофотографии тонких срезов криогелей ПВС, полученных без и с добавками соли NaCl, а также комплексных криогелей с содержанием хлоргидрата хитозана. Собственно, препараты для данных микроскопических исследований готовились вырезанием с помощью микротомы из средней части образцов цилиндрических криогелей высотой 10 мм и диаметром 15 мм. На черно-белых изображениях темные участки – полимерная фаза, т.е. гелевые стенки макропор, окрашенные Конго красным, а светлые области – макропоры в гетерофазном материале, заполненные водой.

Как известно [188], введение NaCl в растворы ПВС, используемые для формирования криогеля ПВС, приводит к модификации микротекстуры и, соответственно, параметров пористости, образующихся криогелей. Аналогичный на качественно уровне эффект наблюдается и в настоящем

исследовании, а именно, характер морфологии препарата состава вода-NaCl-ПВС (рисунок 28б) несколько изменялся по сравнению с образцом без соли (рисунок 28а), размер поперечного сечения макропор уменьшался от 4-5 до 1-3 мкм, текстура становилась более диффузной. Причинами таких изменений являются влияние солей на формирование льда, пространственную геометрию и размеры его кристаллов [6], играющих роль порогена при криотропном гелеобразовании [1], и, по-видимому, высаливающее действие NaCl на ПВС в объеме так называемой незамерзшей жидкой микрофазы (НЖМФ) [1], где концентрируются оба этих компонента системы, замороженной макроскопически.

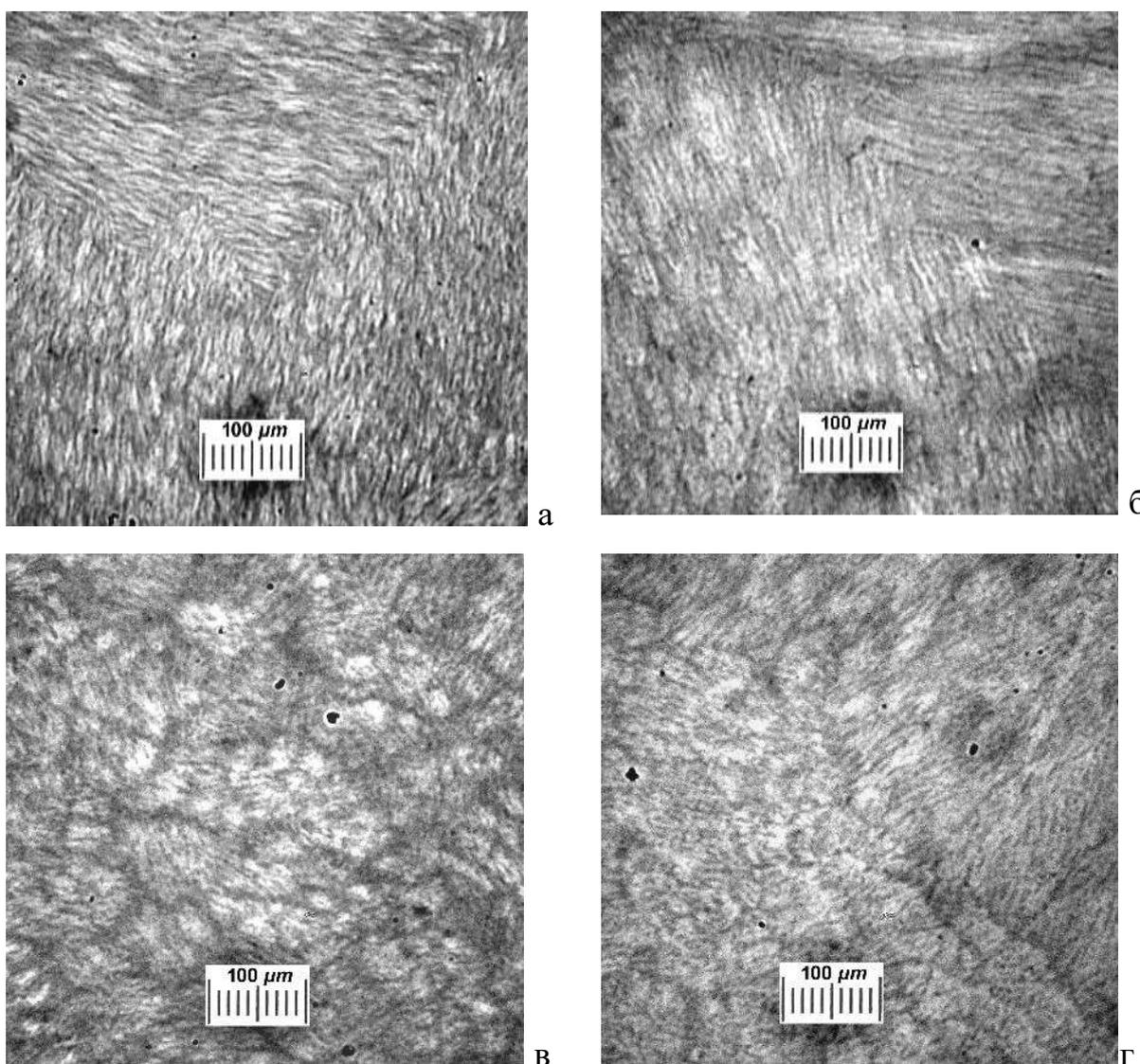


Рисунок 28 - Микрофотографии тонких срезов препаратов криогелей ПВС (срезы перпендикулярно оси цилиндрических образцов): а - криогель,

сформированных из водного раствора ПВС; б - криогель, сформированных из водного раствора ПВС в присутствии 0,15 моль/л NaCl; в - комплексный криогель, сформированный из смешанного водного раствора ПВС и хлоргидрат хитозана; г - комплексный криогель, сформированный из смешанного водного раствора ПВС и хлоргидрат хитозана в присутствии 0,15 моль/л NaCl.

В свою очередь, комплексные криогели ПВС, полученные замораживанием-оттаиванием смешанных растворов вода-ПВС-хлоргидрат хитозана или вода-NaCl-ПВС-хлоргидрат хитозана, по своей микроструктуре отличалась от соответствующих образцов без добавок полимерного электролита (т.е. хлоргидрата хитозана). В частности, у криогеля состава вода-ПВС-хлоргидрат хитозана макропоры приобретали округлую форму (сравнение рисунок 28а и 28в), а в структуре криогеля состава вода-NaCl-ПВС-хлоргидрат хитозана обнаруживались четкие зоны с повышенной плотностью ПВС (темные тяжи на рисунок 28г). Подобные изменения макропористой морфологии этих комплексных криогелей являлись результатом одновременного «участия» целого ряда процессов в формировании структуры данных криогелей. Так, добавки полимерного электролита (хлоргидрат хитозана не является гелеобразующим полимером [180]) повышают ионную силу в системе, т.е. способствуют эффектам высаливания гелеобразующего полимера, что может быть одной из причин формирования вышеуказанных зон уплотнения фазы, содержащей ПВС (рисунок 28г). Уже само наличие различных ионов в замораживаемой системе влияет, как отмечалось, на форму и размеры кристаллов льда, что отражается на геометрии макропор в криогеле, образующемся после оттаивания. Также кристаллизация воды при замораживании растворов смеси ПВС с хлоргидратом хитозана и, как результат, их концентрирование в НЖМФ вызывает, особенно в присутствии NaCl, расслоение раствора на две жидкие фазы: а) обогащенную ПВС, где собственно и протекает гелеобразование, и б) обогащенную хлоргидратом хитозана, раствор

которого заполняет поры криогеля при оттаивании образцов и затем вымывается из них в ходе приготовления тонких срезов для микроскопии.

Известно [189-191], что эффекты индуцированного криоконцентрированием жидкофазного расслоения могут существенным образом модифицировать текстуру криогелей ПВС вплоть до образования там очень крупных пор, что, конечно, определяется химической природой, молекулярно-массовыми характеристиками, а также исходными концентрациями гелеобразующего и негелеобразующего полимеров в общем растворителе. Мы полагаем, что крупные поры сечением 10-50 мкм, наблюдаемые на микрофотографиях рисунков 28в и 28г, как раз и являются «репликами» фазы, обогащенной негелеобразующим хлоргидрата хитозана, а затем отмытой водой из тонких срезов этих препаратов (смотри методическую часть). Также следует отметить, что, как и в случае криогеля ПВС без добавок хлоргидрата хитозана (рисунок 28а и 28б), присутствие низкомолекулярной соли в комплексном криогеле состава вода-NaCl-ПВС-хлоргидрат хитозана приводило к уменьшению сечения макропор и более диффузной морфологии таких образцов (рисунок 28г) по сравнению с также комплексным криогелем, но состава вода-ПВС-хлоргидрат хитозана (рисунок 28в).

Формирование комплексных КГПВС-ХГХ является перспективным методом создания новых полимерных материалов. Хорошая совместимость двух полимеров в широком диапазоне концентраций в общем растворителе облегчает метод получения комплексных криогелей. Однако, содержание в системе водорастворимого наполнителя не предполагает использование таких материалов в водных средах, поскольку активный наполнитель десорбируется в окружающую водную среду. Для улучшения эксплуатационных свойств хитозан-содержащих криогелей и предотвращения его вымывания из системы, был предложен метод трансформации водорастворимого ХГХ в нерастворимый в воде хитозан основание (ХТО).

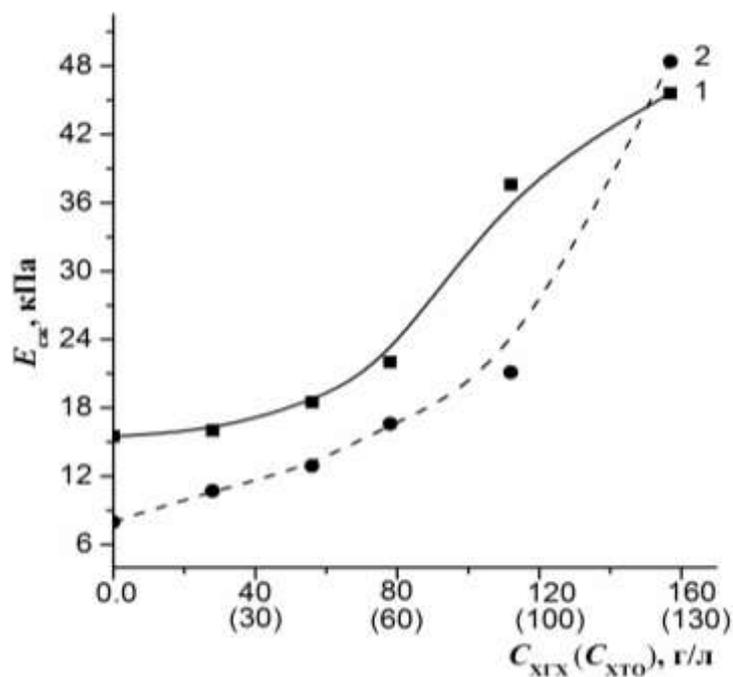
3.3. Получение и исследование композитных криогелей ПВС-ХТО, формируемых трансформацией ХГХ в основную форму

Как известно, ХТО за исключением его олигомеров, практически нерастворим в водных средах при щелочных и нейтральных значениях рН [175]. Поэтому трансформацию водорастворимых солевых форм хитозана в его основную форму обычно проводят в щелочных средах, иногда с применением коагулирующих добавок (в частности, Na_2SO_4), как, например, в случае преципитации уксуснокислой соли низкомолекулярного хитозана в объеме КГПВС [176, 177]. Однако оказалось, что при помещении наших препаратов комплексных криогелей ПВС-ХГХ или ПВС-ХГХ- NaCl в водный щелочной раствор сначала происходило частичное вымывание негелеобразующего полимера из периферийных областей гелевого препарата, наблюдаемое даже визуально как образование мелкого осадка хитозана-основания во внешней жидкой фазе. Поэтому для перевода ХГХ в ХТО нами была использована двухстадийная схема, включающая первоначальную инкубацию образцов комплексных криогелей в атмосфере газообразного аммиака, и только затем их обработку водной щелочью (см. Методическую часть). В этом случае депротонированный ХТО сначала осаждался в периферийных зонах криогеля и на некоторую глубину во внутренних областях, а последующая инкубация образцов в щелочном растворе довершала трансформацию ХГХ в водонерастворимую основную форму. При этом комплексный КГПВС превращался в композитный материал, в непрерывной гелевой фазе которого образовавшиеся частицы ХТО играли роль дисперсного наполнителя.

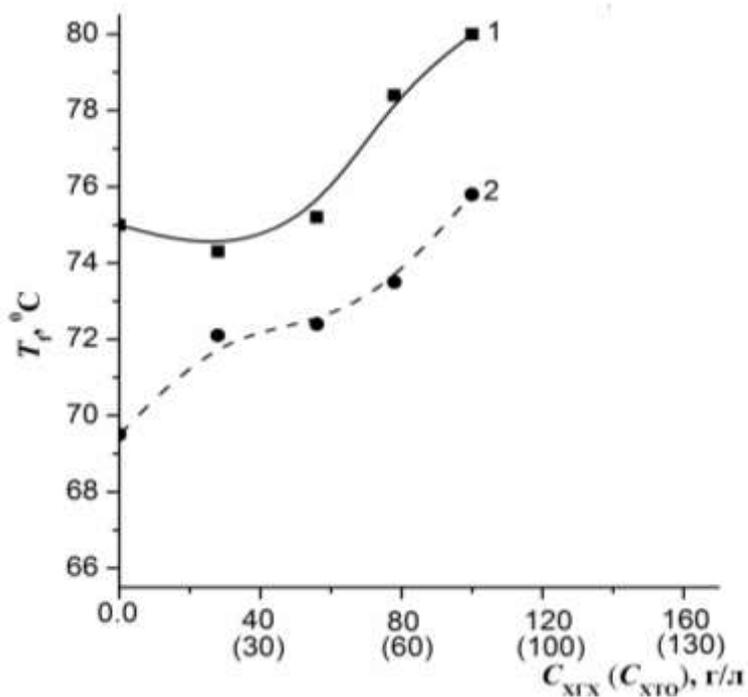
3.3.1. Физико-механические свойства композитных криогелей ПВС, формируемых трансформацией ХГХ в ХТО в массе комплексных КГПВС

Такая трансформация негелеобразующего полимера заметно сказывалась на физико-механических и теплофизических свойствах

материала в целом. В частности, на графиках рисунка 29 приведены зависимости, соответственно, модуля упругости композитных КГПВС и температуры их плавления от концентрации хитозана в исследованных образцах. Для удобства сравнения с аналогичными характеристиками комплексных криогелей (рисунок 24) шкала абсцисс на рисунок 29 дана в двух масштабах – и как концентрация ХГХ в исходном смешанном с ПВС растворе, и как содержание ХТО в композитах (цифры в скобках).



а



б

Рисунок 29 - Зависимость компрессионного модуля Юнга (а) и теплостойкости (б) композитных криогелей поливинилового спирта от исходной концентрации хлоргидрата хитозана (цифры в скобках по оси абсцисс – в пересчете на концентрацию хитозана-основания) в растворах состава: вода – ПВС – ХГХ (1) и 0,15М NaCl– ПВС – ХГХ (2).

Было найдено, что композитные криогели обладали более высокими жесткостью и теплостойкостью, чем эквиконцентрированные в отношении содержания хитозана образцы комплексных криогелей. Эта тенденция была одинаковой для КГПВС, приготовленных и из смешанных растворов состава вода – ПВС – ХГХ (1, рисунок 29), и состава 0,15М NaCl – ПВС – ХГХ (2, рисунок 29). Например, для первого типа указанных систем при исходном содержании ХГХ 112 г/л после трансформации ХГХ в ХТО компрессионный модуль Юнга образцов возрастал с 10,5 (1, рисунок 24а) до 37,6 кПа (1, рисунок 29а), т.е. примерно в 3,6 раза, а температура плавления образцов повышалась на 3,8°С – с 76,5 (1, рисунок 24б) до 80,3°С (1, рисунок 29б). В случае криогелей, полученных в аналогичных условиях, но с добавками NaCl, тенденция в изменении этих показателей была той же: после депротонирования соли хитозана модуль упругости композитов по сравнению с эквиконцентрированными комплексными КГПВС возрастал с 10,4 (2, рис. 24а) до 21,1 кПа (2, рисунок 29а), т.е. в ~2 раза, а температура плавления повышалась на 1,1°С – с 74,7 (2, рисунок 24б) до 75,8°С (2, рисунок 29б). Иными словами, коагулят ХТО, диспергированный в непрерывной фазе макропористого криогеля ПВС проявлял свойства так называемого «активного» дисперсного наполнителя [178, 179].

Необходимо отметить, что в случае композитных криогелей, сформированных из смешанных полимерных растворов с содержанием хитозана выше 112-115 г/л, не удавалось измерить температуру плавления образцов использованным в работе методом (см. Методическую часть), поскольку при нагревании таких КГПВС даже до ~90°С через образовавшуюся очень высоковязкую суспензию металлический шарик

седиментировал слишком медленно, чтобы можно было надежно определить значения T_f .

Также характерной особенностью зависимостей физико-химических свойств, изученных композитных КГПВС от содержания в них хитозана являлась меньшая жесткость (рисунок 29а) и теплостойкость (рисунок 29б) образцов, приготовленных из смешанных растворов с добавками низкомолекулярной соли, по сравнению с эквиконцентрированными по полимерным компонентам криогелями без таких добавок. В принципе, такой эффект мог быть обусловлен как уже обсуждавшимся выше «разбавляющим» действием NaCl в отношении концентрации ПВС в незамерзшей жидкой микрофазе макроскопически замороженных образцов, так и, в случае сопоставления физико-механических характеристик этих двух типов композитных КГПВС, различиями в морфологии (микроструктуре) их гелевой фазы.

Например, одной из причин, ответственных за подобные различия, могло быть жидкофазное расслоение водного раствора 0,15М NaCl – ПВС – ХГХ в ходе его замерзания. Поскольку по мере образования льда резко повышается концентрация растворенных веществ в образующейся жидкой микрофазе, то ее состав смещается в область термодинамической несовместимости макромолекулярных компонентов в общем растворителе. Это, согласно диаграмме на рисунке 18, должно приводить к возникновению двух жидких фаз, одна из которых обогащена гелеобразующим полимером, т.е. ПВС, а другая – негелеобразующим ХГХ. В результате, существенно изменяется микроструктура формируемого криогеля ПВС.

3.3.2. Исследование микроструктуры тонких срезов композитных криогелей ПВС-ХТО

Характер структурных изменений, произошедших в результате трансформации комплексного криогеля в композитный, хорошо прослеживается на микрофотографиях тонких срезов соответствующих

образцов. В качестве примера на рисунке 30 приведены полученные с помощью оптического микроскопа изображения тонких срезов КГПВС, приготовленных без добавок NaCl

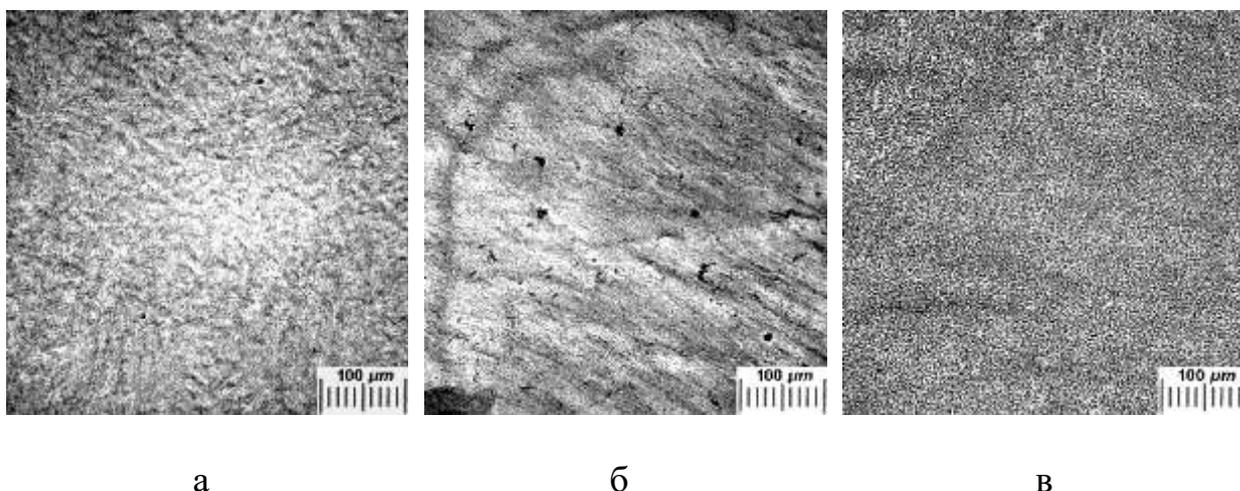


Рисунок 30 - Микрофотографии тонких срезов образцов КГПВС: а) криогель, сформированный из водного раствора ПВС (120 г/л); б) комплексный криогель, сформированный из смешанного водного раствора ПВС (120 г/л) и ХГХ (112 г/л); в) композитный криогель, полученный щелочной обработкой препарата состава «б».

В целом главные элементы микроструктуры образцов, сформированных как из просто водного раствора ПВС (рисунок 30а), так и из смешанного раствора ПВС-ХГХ (рисунок 30б), похожи и включают чередующиеся темные участки (на черно-белых изображениях это – окрашенная Конго красным гелевая фаза) и светлые области (пространство макропор, заполненных водой). Различия в основном наблюдаются относительно формы и размеров этих элементов. В случае же композитного КГПВС (рисунок 30в) отчетливо видны дисперсные частицы коагулята ХТО, достаточно равномерно распределенные как наполнитель в пористой матрице непрерывной фазы. Размер этих частиц не превышает 2-5 мкм, а их количество закономерно увеличивается с повышением концентрации ХГХ в смешанном полимерном растворе, из которого соответствующий комплексный криогель был сформирован.

Депротонирование солянокислой соли хитозана переводит его в нерастворимую форму. Причем, даже при высоком исходном содержании ХГХ мы не наблюдали образования ХТО в виде какой-либо непрерывной фазы, например, связанных друг с другом тонких волокнистых структур; по крайней мере, в той области концентраций негелеобразующего полимера, которая использовалась нами в этой работе, ХТО всегда представлял собой мелкие частицы дискретной фазы, распределенные в объеме непрерывной фазы криогеля ПВС. На рисунке 31 приведены микрофотографии тонких срезов таких композитных криогелей, сформированных из исходных растворов ПВС и хлоргидрат хитозана в зависимости от количества введенного наполнителя. Обращает на себя внимание различия изображений поперечного (рисунок 31а, 31б) и продольного (рисунок 31в и 31г) срезов. В первом случае частицы хитозана в основном равномерно распределены в поле кадра, хотя все же можно видеть и участки с не совсем одинаковой плотностью наполнителя. Разница между изображениями на рис. 31а и 31б состоит в количестве этих частиц: при более высокой исходной концентрации соли хитозана ожидаемо большее число микрошариков хитозана оказывается включенным в непрерывную фазу криогеля. В свою очередь, на продольных срезах композитных криогелей ПВС хорошо просматриваются (особенно на рисунок 31в) ориентированные в одном направлении области с различной плотностью дисперсного наполнителя.

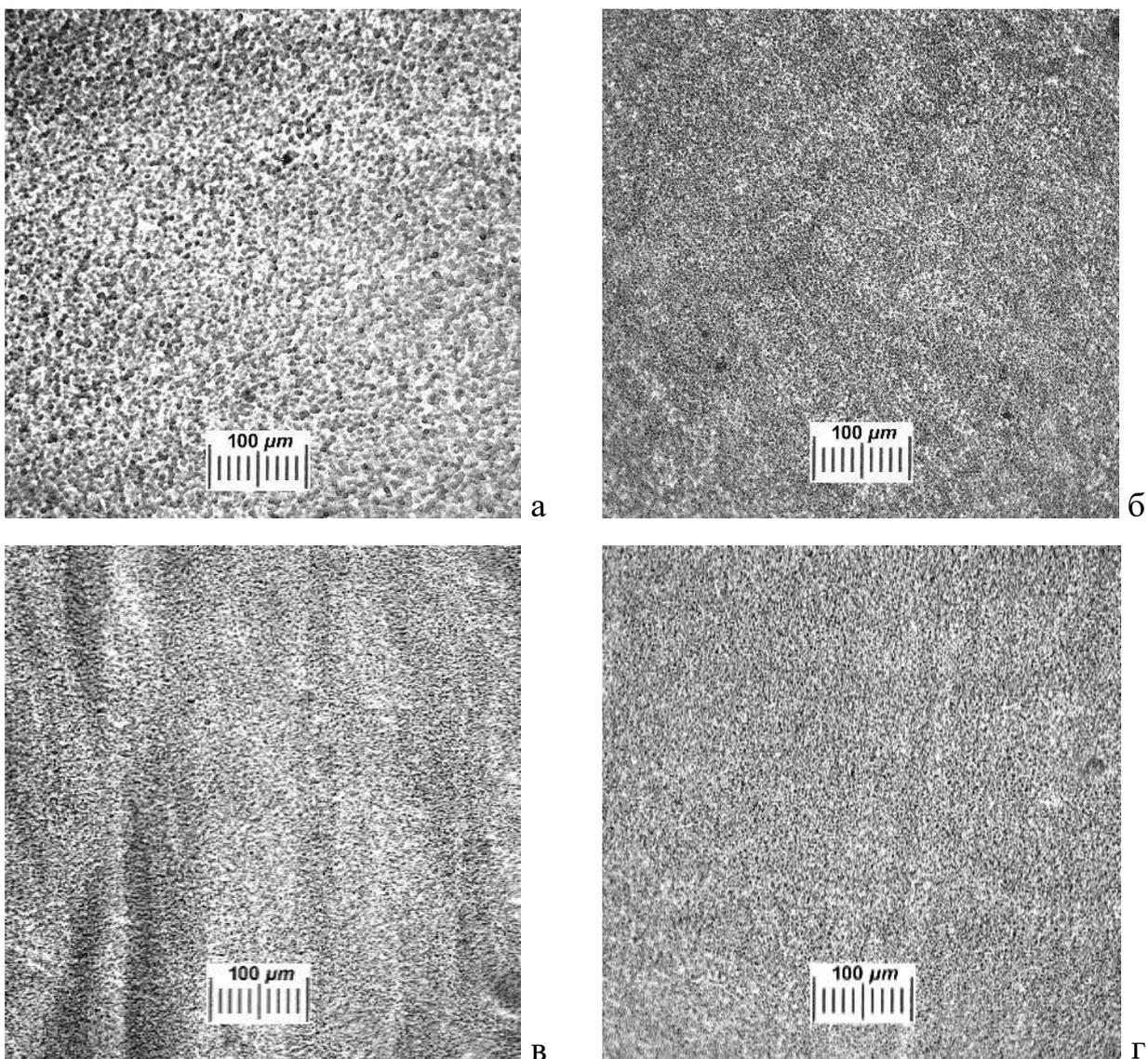


Рисунок 31 - Микрофотографии тонких срезов композитных криогелей ПВС перпендикулярно (а, б) и вдоль (в, г) оси цилиндрических образцов, сформированных из водных растворов смесей ПВС и хлоргидрат хитозана с последующей трансформацией соли хлоргидрата хитозана в хитозан-основание.

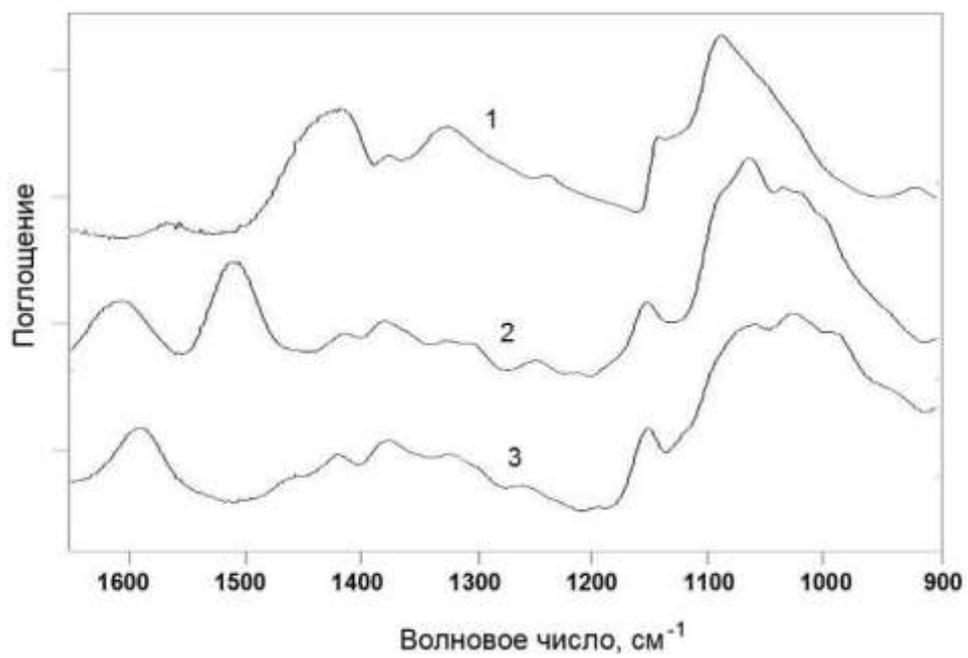
Поскольку такие тонкие срезы готовились из цилиндрических образцов криогелей ПВС, сформированных замораживанием исходных растворов, находящихся в металлических контейнерах (смотри методическую часть), которые для замораживания образцов были помещены на охлаждаемую горизонтальную плиту в камере криостата, то градиент отвода тепла в этих препаратах был вдоль оси цилиндра. Поэтому и движение фронта кристаллизации льда при замерзании раствора происходило

преимущественно в том же направлении. Как следствие, криоконцентрирование ПВС и хлоргидрата хитозана в объеме НЖМФ, а также уже обсуждавшееся нами жидкофазное расслоение, происходящее в межкристаллическом пространстве, «ориентировались» вдоль оси цилиндра. Далее протекающее в системе криотропное гелеобразование превращало обогащенную ПВС жидкую фазу в гель, а последующая щелочная обработка комплексных криогелей для трансформации хлоргидрата хитозана в хитозан-основание фиксировала ориентацию сегрегированных фаз преимущественно в направлении роста кристаллов льда. Вероятно поэтому, неодинаковая плотность распределения частиц наполнителя лучше видна на продольных срезах композитных криогелей (рисунок 31в и 31г), чем на поперечных срезах тех же образцов (рисунок 31а и 31б).

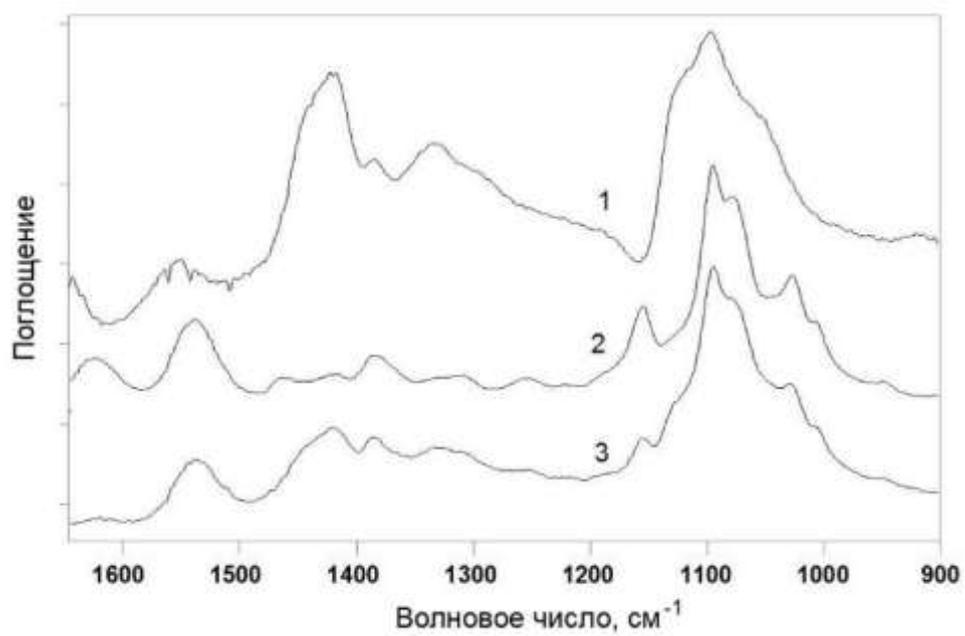
Приведенные на рисунках 30 и 31 микрофотографии показывают макропористую морфологию образцов криогелей в виде тонких (~ 10 мкм) срезов, приготовленных с помощью замораживающего микротомы, т.е. гелевый материал подвергался определенным дополнительным физическим воздействиям в ходе его замораживания и затем разрезания. В этом контексте методикой, потенциально более «щадящей» микроструктуру образцов, является формирование криогелей ПВС в виде пластин или дисков такой небольшой толщины, чтобы можно было осуществлять исследование препаратов с помощью оптической микроскопии в просвечивающем режиме. Предварительные опыты показали, что для рассматриваемых в данной работе комплексных криогелей ПВС эта величина должна быть не более 1 мм. Однако, образцы композитных криогелей той же толщины, к сожалению, оказались слишком мутными и поэтому для них мы ограничились исследованием только тонких срезов, приведенных на рисунок 31.

3.3.3. Изучение структуры комплексных и композитных КГПВС методом ИК- Фурье-спектроскопии

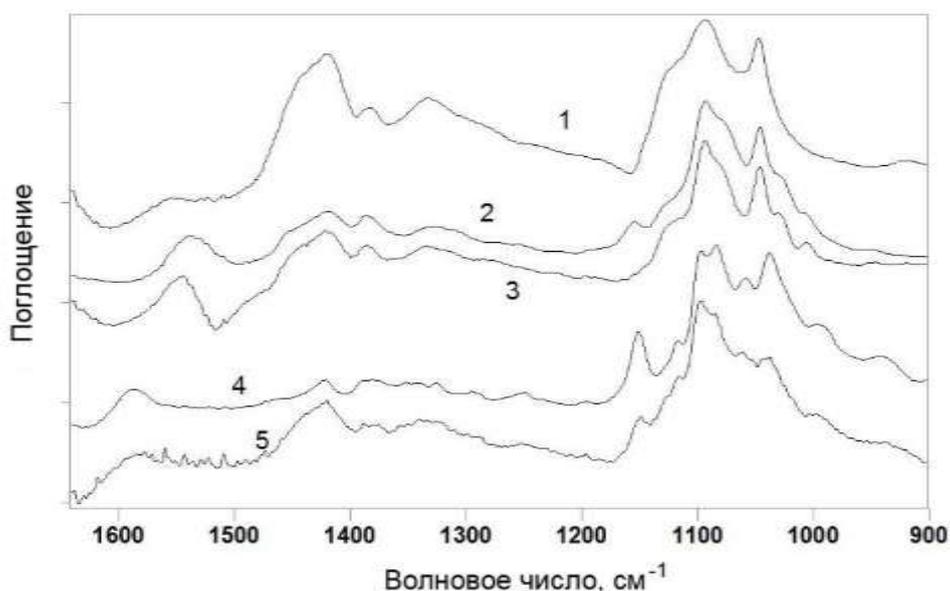
ИК-спектры, полученные для сухих порошков индивидуальных полимерных компонентов, т.е. ПВС, хлоргидрат хитозана и хитозан-основание, входящих в состав исследуемых комплексных и композитных криогелей ПВС, приведены на рисунке 32а. Спектры этих веществ достаточно подробно описаны в литературе, в частности, для ПВС [183]; хлоргидрат хитозана [184]; хитозан-основание [183]. Поскольку криогели содержат значительное количество воды, для облегчения последующей интерпретации спектральных данных в качестве аналитических полос были выбраны самые интенсивные полосы ПВС и хитозана. Для ПВС – это полоса 1420 см^{-1} деформационных (вверных) колебаний CH_2 -групп, 1328 см^{-1} – полоса смешанных по частоте и форме деформационных колебаний $\text{CH}+\text{OH}$ и уширенная в сторону низких частот полоса 1090 см^{-1} валентных колебаний $\text{C}-\text{O}$ связей. По полосе 1142 см^{-1} , также относящейся к колебаниям $\text{C}-\text{O}$, судят о степени кристалличности ПВС. Низкая интенсивность этой полосы (1, рисунок 32а) свидетельствует о том, что, степень кристалличности исходного сухого ПВС невысока [183]. Для хлоргидрата хитозана характеристическими являются полосы асимметричных и симметричных колебаний NH_3^+ -групп, интенсивная полоса с максимумом при 1063 см^{-1} , состоящая из ряда перекрывающихся полос $1086, 1034, 1015\text{ см}^{-1}$, относящихся к колебаниям $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ и/или $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ связей. Отдельно следует отметить полосу 1154 см^{-1} колебаний $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ гликозидного мостика [183]. Близость частот 1154 см^{-1} спектра хлоргидрата хитозана и 1142 см^{-1} спектра ПВС сильно затрудняет оценку кристалличности последнего в его композициях с хлоргидратом хитозана. В спектре хитозана-основания деформационным колебаниям NH_2 -групп соответствует поглощение в области 1585 см^{-1} , а валентным колебаниям $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ гликозидного мостика – полоса при 1150 см^{-1} . Максимумы поглощения при 1065 и 1021 см^{-1} соответствуют симметричным и асимметричным колебаниям $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ пиранозного цикла, смешанным по частоте с валентными колебаниями $\text{C}-\text{O}(\text{H})$ групп [183].



а



б



В

Рисунок 32 – ИК-Фурье-спектры объектов исследования. а) Спектры сухих порошков индивидуальных полимерных компонентов, входящих в состав комплексных и композитных криогелей ПВС: 1 – ПВС, 2 – хлоргидрат хитозана, 3 – хитозан основание; б) Спектры водных растворов (после вычитания спектрального вклада воды) полимерных компонентов, входящих в состав комплексных криогелей ПВС: 1 – ПВС (120 г/л), 2 – хлоргидрат хитозана (112 г/л), 3 – ПВС+хлоргидрата хитозана (120+112 г/л); в) Спектры криогелей (после вычитания спектрального вклада воды): 1 – криогель ПВС (120 г/л) без добавок; 2 – верхняя поверхность 1-мм диска комплексного криогеля, содержащего ПВС (120 г/л) и хлоргидрат хитозана (112 г/л); 3 – нижняя поверхность диска того же комплексного криогеля ПВС; 4 – верхняя поверхность композитного криогеля состава вода-ПВС-хитозан-основание, полученного щелочной обработкой комплексного криогеля состава аналогичного образцу, которому отвечают спектры 2 и 3; 5 – нижняя поверхность того же композитного криогеля.

С целью выявления эффектов, связанных с сольватацией полимеров и ее вкладом в спектральную информацию о структуре криогелей, были получены спектры (рисунок 32б) растворов ПВС (120 г/л) и хлоргидрата хитозана (112 г/л), а также их смешанного раствора, соответствующего

содержанию воды в комплексном криогеле. Поскольку в исходных спектрах интенсивность даже наиболее сильных полос оказалась весьма низкой, на рисунке 32б приведены фрагменты разностных спектров, полученные путём вычитания спектра воды. Как и следовало ожидать, переход от твёрдого состояния (порошки) к водным растворам сопровождается двумя типами эффектов, обусловленных сольватацией:

Во-первых, происходило сужение и сдвиги большинства полос. В результате некоторые из перекрывающихся полос (например, сложный контур огибающих полос в области $1200-900\text{ см}^{-1}$) спектра ХГХ (2, рисунок 32а) разрешались в отдельные пики (2 рисунок 32б). Также появились дополнительные полосы (или плечи полос), замаскированные перекрыванием уширенных полос, характерных для твёрдого состояния веществ. Описанные эффекты обсуждались в литературе [184] и они отчётливо наблюдаются при сопоставлении спектров на рисунок 32а и 32б.

Во-вторых, взаимодействие с водой приводит к образованию водородных связей полимер-вода, что выражается в сдвигах, изменении относительной интенсивности и формы контура спектральных полос, относящихся к группам, образующим с водой комплексы за счет водородного связывания (Рисунок 32б). Следует отметить, однако, что указанные изменения спектров относительно невелики. Известно, например, что полосы деформационных колебаний NH_2 - и/или NH_3^+ -групп при образовании водородных связей сдвигаются в область более высоких частот в среднем на $5-20\text{ см}^{-1}$, причём, полосы асимметричных колебаний N-H реагируют на образование водородных связей несколько сильнее [184]. В данном исследовании сдвиг в высокочастотную область полосы асимметричных колебаний группировок NH_3^+ в разностном спектре водного раствора смеси хлоргидрата хитозана и ПВС (3, рисунок 32б) приводил к практически полному исчезновению этой полосы (область 1620 см^{-1}). В оригинальном спектре (до вычитания спектрального вклада воды) полоса ν_{as} для NH_3^+ -групп проявлялась как слабое плечо при 1590 см^{-1} низкочастотного

крыла широкой полосы деформационных колебаний воды с максимумом 1638 см^{-1} . Скорее всего этот эффект являлся артефактом вычитания спектров, поскольку ни относительная интенсивность, ни положение, ни форма контура полосы $\nu_{\text{as}}\text{NH}_3^+$ практически не изменялись.

Как и ожидалось, обнаруженные в ИК-Фурье спектрах растворов ПВС и хлоргидрата хитозана (рисунок 32б) эффекты проявлялись и в спектрах криогелей.

ИК-спектроскопические исследования нижней и верхней поверхностей комплексных и композитных криогелей ПВС-хитозан проводили с помощью Фурье спектрометра Vertex 70 (Bruker, США). Спектры регистрировали при разрешении 2 или 4 см^{-1} методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). На рисунок 32в приведены спектры 1-мм дисков криогеля ПВС без добавок растворимой соли хитозана (1), верхней и нижней поверхностей комплексного криогеля состава вода-ПВС-хлоргидрат хитозана (спектры 2 и 3, соответственно), а также верхней и нижней поверхностей (спектры 4 и 5, соответственно) композитного криогеля состава вода-ПВС-хитозан-основание, полученного из комплексного препарата щелочной обработкой для трансформации хлоргидрата хитозана в хитозан-основание.

В спектрах этих криогелей наблюдались многочисленные эффекты: сдвиги полос, изменения формы контура и относительной интенсивности полос, часть которых уже обсуждалась выше и связана с образованием водородных связей функциональных групп полимеров с растворителем. Полный анализ вышеперечисленных изменений потребовал бы отдельного специализированного спектроскопического исследования. Тем не менее, из ИК-Фурье-спектров, приведенных на рисунок 32в, можно сделать ряд выводов, важных для понимания особенностей микроструктуры, обсуждаемых криогелей ПВС.

Прежде всего, оказалось, что спектры верхней и нижней поверхностей комплексных криогелей (спектры 2 и 3, соответственно; рисунок 32в) почти одинаковы за исключением небольшого пика с максимумом при 1154 см^{-1} ,

относящегося, как уже отмечалось ранее, к колебаниям С-О-С гликозидного мостика пиранозных циклов хитозана (точнее – его солевой формы), который присутствовал в спектре верхней поверхности криогеля и отсутствовал в спектре нижней поверхности.

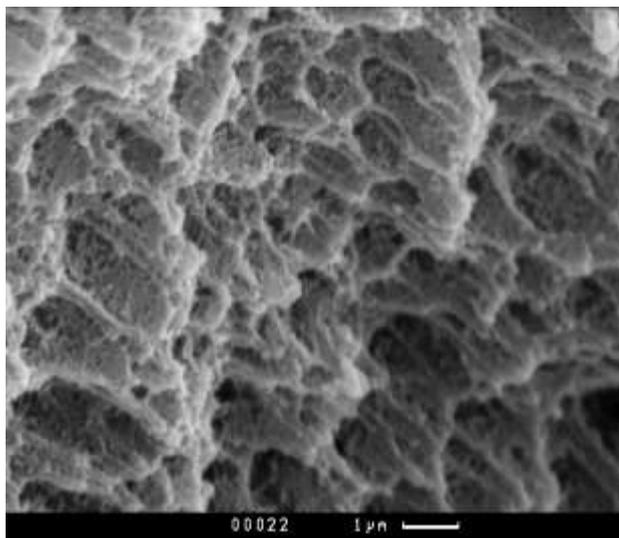
Напротив, в случае композитного криогеля, полученного депротонированием хлоргидрата хитозана в составе комплексного криогеля, различия в спектральных характеристиках верхней и нижней поверхностей диска 1-мм толщины проявились существенным образом. Так, в спектре верхней поверхности такого композитного криогеля (спектр 4, рисунок 32в) имеется хорошо разрешенная широкая полоса деформационных колебаний NH_2 -групп с максимумом при 1585 см^{-1} , а также группа полос в области $1200\text{-}900 \text{ см}^{-1}$, характерная для пиранозного цикла, тогда как в спектре нижней поверхности образца (спектр 5, рисунок 32в) указанные полосы выражены очень слабо. В то же время этот ИК-спектр содержит полосы, в основном характерные для ПВС (сравн. со спектром 1, рисунок 32а). Это – пики при 1420 , 1328 и 1090 см^{-1} . Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии градиента концентраций компонентов в композитном криогеле состава вода-ПВС-хитозан-основание даже при толщине препарата всего в 1 мм, т.е. его нижняя поверхность обогащена ПВС, а верхняя – хитозаном.

Совокупность данных изучения соответствующих 1-мм дисков криогелей с помощью ИК-спектроскопии (рисунок 32в) позволяет сделать заключение не только о различиях в размерах макропор верхней и нижней поверхностей образцов, но и о градиентном распределении ПВС и хлоргидрата хитозана по толщине таких гелевых препаратов, индуцируемом фазовым расслоением системы при замерзании и вытеснении более растворимых компонентов в области перед фронтом кристаллизации льда. Вследствие этого образующийся криогель в верхней части образца обогащается хлоргидратом хитозана (или хитозан-основанием после

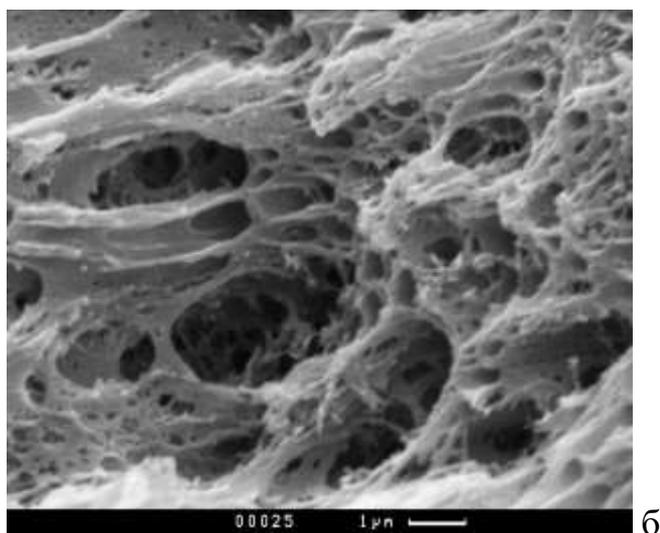
щелочной обработки), а для нижних областей характерна более высокая концентрация ПВС.

3.3.4. Исследование микроструктуры сколов комплексных и композитных криогелей ПВС, содержащих включения, соответственно, ХГХ и ХТО

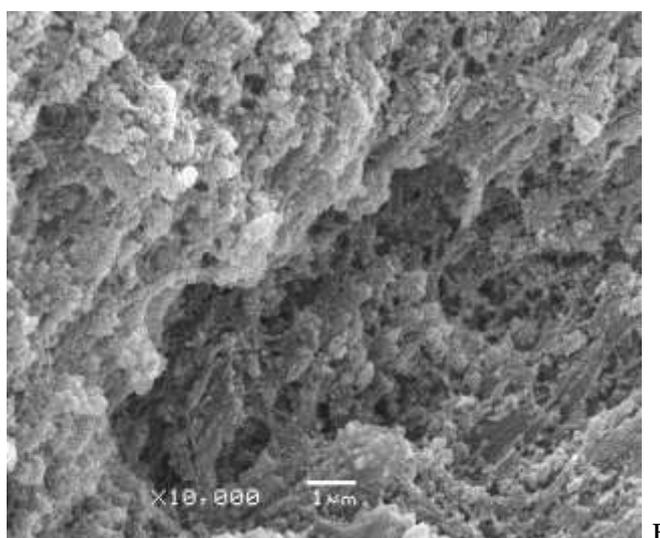
Микроструктура комплексных и композитных криогелей, сформированных из исходных растворов ПВС и хлоргидрат хитозана, была изучена с помощью электронной микроскопии сколов высушенных криогелей. Результаты приведены на рисунке 33. На этих кадрах обращает на себя внимание различия изображений пористой структуры криогелей. В случае криогелей ПВС без наполнителя наблюдается равномерное расположение пор с размерами 1-2 мкм. В случае введения в систему хитозана в криогеле образуется более рыхлая структура с размерами пор 1,5-3 мкм. При трансформации водорастворимого ХГХ в нерастворимый ХТО видно, частицы хитозана в основном равномерно распределены в массе криогеля, хотя наполнитель распределен на поверхностях стенок пор.



а



б



в

Рисунок 33 - Электронная микроскопия сколов криогелей ПВС (а), комплексных криогелей ПВС-ХГХ (б) и композитных криогелей ПВС-ХТО (в) при увеличении в 10000 раз.

3.3.5. Влияние циклического замораживания–оттаивания на параметры жесткости ненаполненных и хитозансодержащих криогелей ПВС

Как описывалось ранее (см. Лит. Обзор) многократная криогенная обработка физических криогелей ПВС приводит, к существенному возрастанию их прочностных показателей. Циклическое замораживание-оттаивание (З-О) позволяет формировать более плотные и крупнопористые криогели ПВС. Для исследования такого метода модификации, композитные

КГПВС-ХТО так же подвергали многократному замораживанию оттаиванию. Результаты приведены на рисунке 34

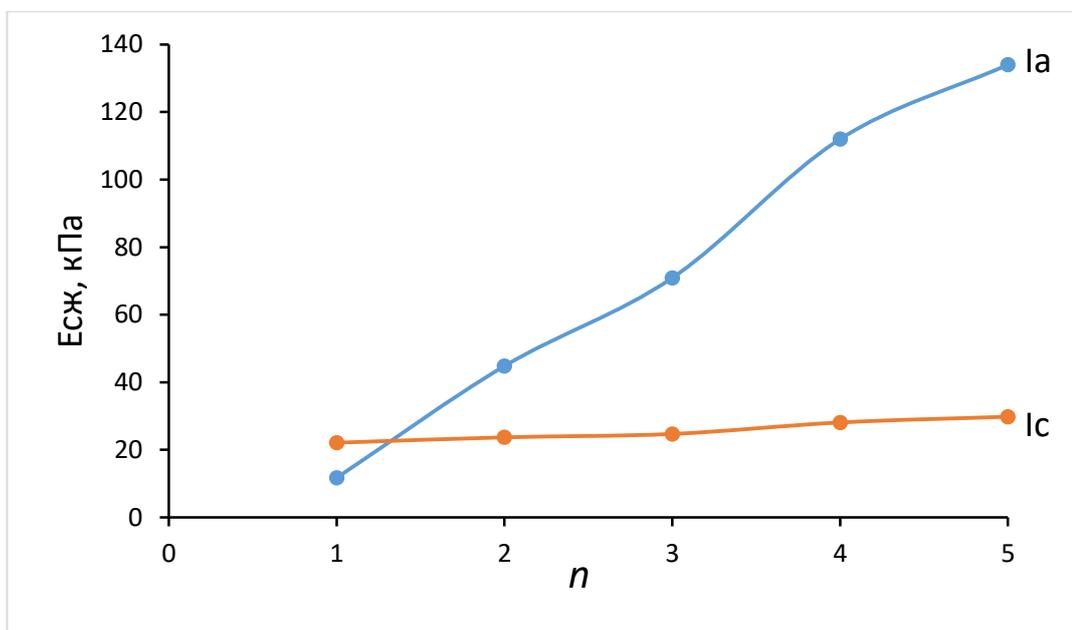


Рисунок34 - Зависимости значений компрессионного модуля упругости (Есж) КГПВС (1) и композитных КГПВС-ХТО (2) от числа циклов замораживания–оттаивания (n).

В рамках данного исследования было установлено, что характер изменения модуля упругости наполненных образцов под действием повторных циклов замораживания–оттаивания существенно отличался от поведения ненаполненных криогелей ПВС. Жесткость КГПВС систематически возрастала с каждым последующим (вплоть до пятого) циклом криогенной обработки, что является хорошо известным фактом для этой гелеобразующей системы [22, 86, 91, 118, 119, 120]. В случае же ХТО-содержащих композитов подобного роста не наблюдалось. Для выявления особенностей такого «аномального» поведения КГПВС-ХТО было проведено дополнительное исследование таких препаратов.

3.3.6. Влияние низкомолекулярных компонентов комплексных криогелей ПВС, выделяющихся при переводе ХГХ в ХТО, на физико-механические свойства криогелей

«Аномальный» характер изменения жесткости композитных КГПВС-ХТО может быть вызван методом формирования таких композитов. Для детального изучения данного вопроса были рассмотрены влияния низкомолекулярных компонентов, выделяющихся при трансформации ХГХ в ХТО. Общая схема формирования композитных КГПВС-ХТО и образование сопутствующих низкомолекулярных соединений приведена на рисунке 35.

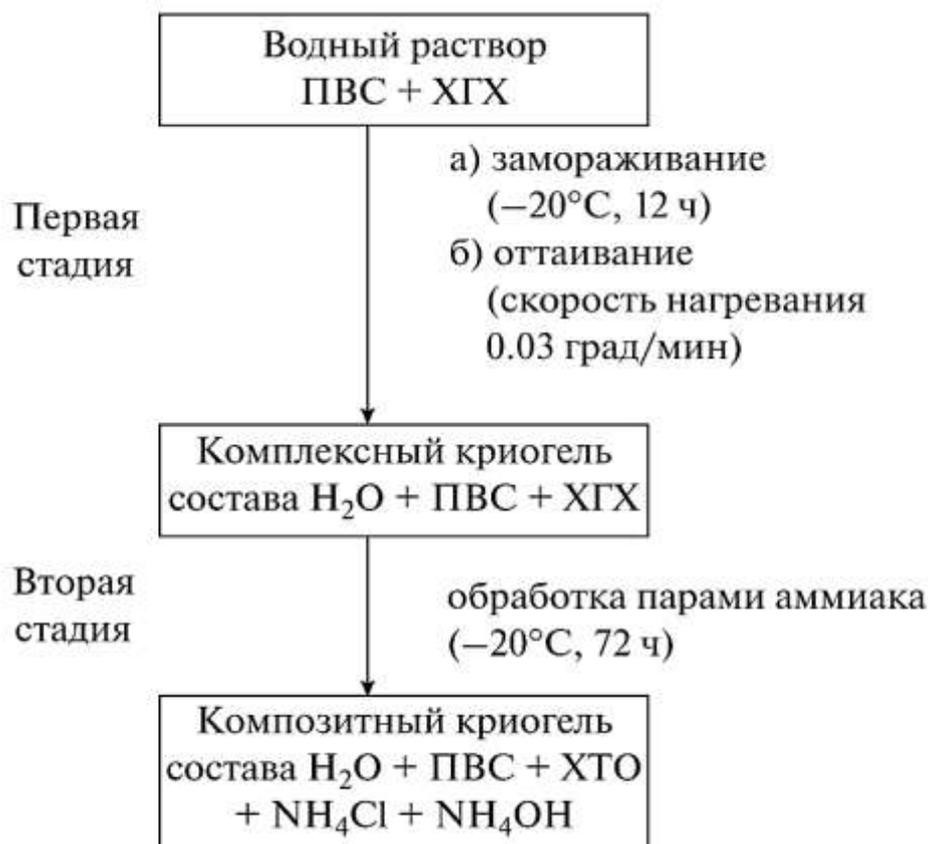


Рисунок 35 - Общая схема формирования хитозансодержащих ККГПВС и состав образцов на разных этапах процесса.

Поскольку при формировании КГПВС по схеме рисунок 35 изменяется химический состав системы (в частности, на второй стадии процесса), то сначала необходимо было выяснить, как присутствие каждого из компонентов в отдельности влияет на свойства криогелей, приготовленных замораживанием–оттаиванием растворов ПВС с добавками таких веществ. Результаты соответствующих экспериментов суммированы в таблице 13, где протестированные криогели подразделены на три группы:

I – образцы, сформированные по схеме рисунка 35, а именно (a) КГПВС, (b) комплексный криогель ПВС; (c) композитный криогель после трансформации ХГХ в ХТО, (d) ККГПВС после удаления растворимых компонентов из препарата Ic промывкой водой;

II – криогели ПВС, сформированные из растворов или суспензий, содержащих индивидуальные компоненты или их смеси, присутствующие в композитном криогеле Ic, при этом в систему вводили дисперсию предварительно полученного ХТО (Водный раствор ХГХ титровали аммиаком при интенсивном перемешивании до pH 10-11, затем выпавший осадок центрифугировали при скорости 8000 об/мин и промывали осадок до нейтральных значений pH);

III – образцы, приготовленные однократной криогенной обработкой водного раствора ПВС с последующим введением NH_4OH (a), NH_4Cl (b) или их смеси (c) в объем гелевой матрицы (см. примечание к таблице 13).

В экспериментах по получению криогелей группы II, содержащих гидроксид аммония (IIa и IIc, таблица 13), pH исходного раствора ПВС доводили с помощью концентрированного раствора аммиака до значения, равного примерно 11. Для получения образцов IIb и IIc хлорид аммония вносили в раствор полимера в концентрации, соответствующей содержанию аминогрупп в том количестве хитозана, которое вводилось в систему для получения композита Ic. При формировании композитного криогеля IId, включавшего в качестве наполнителя частицы, предварительно приготовленного ХТО, количество хитозана в образцах лимитировалось содержанием воды в дисперсии: получить воспроизводимые образцы оказалось возможным только при концентрации такого ХТО в исходной системе не выше примерно 25 г/л.

Таблица 13 - Модуль упругости ненаполненных, комплексных и композитных криогелей ПВС, сформированных в результате одного и пяти циклов замораживания–оттаивания.

Тип	Образец	Состав		1 цикл 3-О	5 циклов 3-О
		компонент	Содержание	Е сж, кПа	Е сж, кПа
Ia	Вода/ПВС	ПВС	120 г	11,7 ± 0,3	112,2 ± 3,2
Ib	Вода/ПВС/ХГХ	ПВС ХГХ	120 г 112 г	13,5 ± 0,3	90,1 ± 5,3
Ic	Вода/ПВС/ХТО /NH ₄ Cl/NH ₄ OH	ПВС ХТО NH ₄ Cl NH ₄ OH	120 г 91,5 г 0,5 моль до pH ≈ 11	52,6 ± 2,0	62,3 ± 5,6
Id	Вода/ПВС/ХТО	ПВС ХТО	120 г 91,5 г	34,0 ± 1,2	125,0 ± 2,0
IIa	Вода/ПВС/ NH ₄ OH	ПВС NH ₄ OH	120 г до pH ~11	Бесформен ный желеподоб ный образец	31,3 ± 1,9
IIb	Вода/ПВС/ NH ₄ Cl	ПВС NH ₄ Cl	120 г 0.5 моль	4,1 ± 0,1	54,0 ± 1,8
IIc	Вода/ПВС/ NH ₄ Cl/NH ₄ OH	ПВС NH ₄ Cl NH ₄ OH	120 г 0.5 моль до pH ~11	Бесформен ный желеподоб ный образец	100,0 ± 0,0
IIId	Вода/ПВС/ХТО	ПВС ХТО	120 г 25.3 г	22,0 ± 2,0	29,8
IIIa	КГПВС/NH ₄ OH	ПВС NH ₄ OH	120 г до pH ~11	12,8 ± 0,2	88,0 ± 6,5
IIIb	КГПВС/NH ₄ Cl	ПВС NH ₄ Cl	120 г 0,5 моль	19,0 ± 3,0	60,5 ± 5,3
IIIc	КГПВС/NH ₄ Cl/N H ₄ OH	ПВС NH ₄ Cl NH ₄ OH	120 г 0,5 моль до pH ~11	13,3 ± 0,5	31,3 ± 1,9

Для получения криогелей, относящихся к группе III, сначала формировали НКГПВС состава Ia, а затем образцы выдерживали либо в атмосфере аммиака (IIIa), либо в избытке 0,5 М раствора хлорида аммония

(Шб), либо в таком же растворе NH_4Cl , подтитрованном водным раствором аммиака до $\text{pH} \approx 11$ (Шс).

Анализ данных таблицы 8 позволяет сделать следующие выводы.

Во-первых, подтвержден ранее наблюдавшийся эффект [180] существенного повышения жесткости хитозансодержащих комплексного (Ib) и композитных (Ic и Id) криогелей по сравнению с эквипонцентрированным по ПВС ненаполненным криогелем Ia, сформированным в одинаковых условиях замораживания–оттаивания.

Во-вторых, введение в состав исходного раствора ПВС добавок гидроксида (IIa) или хлорида (IIb) аммония и их смеси (IIc) в той или иной степени препятствует криотропному гелеобразованию ПВС. В результате после криогенной обработки получают низкомолекулярные образцы или даже, как в случаях IIa и IIc, вязкая бесформенная желеобразная масса. Хорошо известно [6, 90, 101], что движущей силой образования физических криогелей ПВС является межмолекулярное водородное связывание с участием ОН-групп цепей полимера. Поскольку хлорид аммония относится к так называемым “всаливающим” электролитам [181] и в лиотропном ряду Гофмейстера катион располагается рядом с эффективно препятствующим водородному связыванию катионом Li^+ , то ингибирование криотропного гелеобразования ПВС в присутствии NH_4Cl вполне объяснимо. В свою очередь, механизм влияния небольших добавок гидроксида аммония (при $\text{pH} \approx 11$ [NH_4OH] ≈ 1 ммоль/л) на процесс формирования криогелей ПВС иной. Мы полагаем, что в этом случае ингибирующий эффект обусловлен депротонированием гидроксильных групп макромолекул ПВС ОН – -ионами в результате криоконцентрирования последних в незамерзшей жидкой микрофазе. Так как значение pK_a ОН-групп вторичных спиртов в водной среде равно 13–14, то и гидроксильные группы ПВС частично ионизируются в щелочных средах [15], в результате чего на цепях полимера появляются одноименные заряды, электростатическое отталкивание которых должно препятствовать межмолекулярному связыванию. Что же касается

“индивидуального” влияния нерастворимого компонента (т.е. ХТО) в составе ККГПВС Ic на криотропное гелеобразование ПВС, то после замораживания – оттаивания суспендированных в его растворе даже в невысокой концентрации частиц промытого коагулята хитозана (ХТО), получается композит IIд, модуль упругости которого (22,0 кПа) практически вдвое выше, чем у образца сравнения – ненаполненного криогеля Ia (11,7 кПа). Отсюда следует, что собственно частицы коагулята ХТО не препятствуют криотропному гелеобразованию ПВС.

В-третьих, введение NH_4OH , NH_4Cl или их смеси в объем уже сформированного КГПВС- NH_4^+ сказывается на жесткости соответствующих образцов. Их модуль упругости повышается по сравнению с криогелем без добавок (Ia) вследствие некоторого дополнительного набухания полимерной фазы в присутствии этих электролитов, поэтому сжатию таких образцов при измерении $E_{\text{сж}}$ противодействует еще и давление набухания, проявляющееся для криогелей ПВС в растворах солей-хаотропов и при щелочных значениях pH среды [182]. В наибольшей степени этот эффект свойственен образцу IIIб (КГПВС/0,5 М NH_4Cl), в наименьшей – криогелю IIIа (КГПВС/1М NH_4OH), а в случае криогеля, уравновешенного с раствором смеси хлорида и гидроксида аммония (IIIс), эффект имел промежуточное значение.

Таким образом, совокупность полученных данных (таблице 13) указывает на то, что формирование композитных криогелей ПВС-ХТО приготовленных согласно схеме, на рисунке 35 ККГПВС Ic, приводит к образованию материалов с высокими показателями механических свойств и присутствие, прежде всего, хлорида и гидроксида аммония могло оказывать значимое влияние на характер изменения их свойств, в частности жесткости, при многократной криогенной обработке.

В данной связи необходимо упомянуть также о влиянии циклического замораживания – оттаивания на комплексные криогели Ib состава вода/ПВС/ХГХ (таблица 13). Оказалось, что при таком воздействии наблюдается заметное уменьшение размера образцов и отделение из них

жидкости (синерезис), содержащей водорастворимый ХГХ, т.е. от цикла к циклу изменялись состав и концентрация компонентов в объеме этих комплексных криогелей.

В этой связи важно было сравнить характеристики именно наполненных систем после каждого из циклов замораживания – оттаивания, т.е. провести сопоставление “отклика” разных композитов на повторяющееся криогенное воздействие. Такое сравнение было проведено для криогелей, содержащих в качестве наполнителя частицы ХТО как вместе с хлоридом и гидроксидом аммония (Ic, таблица 13), так и отмытых от растворимых компонентов (криогели Id, таблица 13), или образцов, сформированных из суспензий в растворе ПВС частиц отдельно полученного ХТО (композиты IIд, таблица 13).

Результаты проведенных экспериментов показали следующее. Во-первых, если после трансформации ХГХ в ХТО непосредственно в матрице криогеля ПВС отмыть водорастворимые вещества, то при последующих циклах замораживания–оттаивания эффект повышения жесткости образцов (Id) проявляется, но в существенно меньшей степени, чем в случае композитов состава вода/ПВС/ХТО/ NH_4Cl / NH_4OH .

Во-вторых, даже при значительно меньшем по сравнению с образцами Ic и Id содержании дисперсного наполнителя в композите IIд, приготовленном с использованием отдельно сформированного ХТО, многократная криогенная обработка приводила к возрастанию относительной жесткости такого КГПВС вплоть до примерно 600% после 5 циклов. Отсюда следует, что само по себе наличие в этих композитах таких дисперсных наполнителей как ХТО скорее всего, не является значимой причиной подавления роста значений $E_{сж}$, вызываемого циклическим замораживанием – оттаиванием. По крайней мере, влияние данного наполнителя во много раз слабее, чем всаливающее действие NH_4Cl и частичная ионизация (депротонирование) ОН-групп ПВС в присутствии NH_4OH (таблица 13).

Подтверждением такому выводу также могут служить данные о влиянии этих низкомолекулярных электролитов на характер изменения физико-механических свойств ненаполненных криогелей ПВС, сначала сформированных из водного раствора полимера, а затем “нагруженных” NH_4Cl , NH_4OH или их комбинацией (группа III в таблица 13) и далее подвергнутых циклическому замораживанию – оттаиванию.

По методике получения и составу растворимых компонентов среди этих криогелей “модельный” НКГПВС IIIc наиболее близок к композитам Ic, для которых и обнаружен эффект подавления роста модуля упругости, вызываемого многократным замораживанием – оттаиванием. В обоих случаях сначала был сформирован первичный криогель, а уже затем в него вводили низкомолекулярные электролиты. Данные показывают, что наиболее сильное ингибирующее воздействие на систему оказывало совместное присутствие в образцах хлорида и гидроксида аммония (IIIc), в несколько меньшей степени это было свойственно добавкам только NH_4OH (IIIb) или NH_4Cl (IIIa). Таким образом, эти результаты также свидетельствуют об уже отмечавшемся синергизме “негативного” влияния данных электролитов как на собственно криотропное гелеобразование ПВС (Ic, таблица 13), так и на возможность упрочнения полимерной фазы макропористой гелевой матрицы в ходе ее циклической криогенной обработки.

3.3.7. Влияние циклического замораживания–оттаивания на микроструктуру ненаполненных и хитозансодержащих криогелей ПВС

Поскольку полимерные криогели вообще и криогели ПВС в частности имеют макропористую морфологию, то их физико-механические свойства зависят не только от жесткости собственно полимерной фазы, т.е. стенок макропор, но и от количества, размера, а также пространственной архитектуры крупных и мелких пор в объеме гелевой системы [22, 86, 91, 118]. При включении же частиц дисперсных наполнителей в непрерывную фазу криогелей гетерогенность их структуры еще более возрастает [7, 124]. В

этой связи представлялось важным проследить за вызываемым повторными циклами криогенной обработки изменением макропористой морфологии рассматриваемых в этой работе гелевых матриц. В этих экспериментах исследовали следующие криогели, сформированные однократным замораживанием – оттаиванием, а затем подвергнутые еще 4-м циклам криогенной обработки (таблица 13):

- Ia – криогели без добавок,
- Ic – композиты, содержащие ХТО, NH_4Cl и NH_4OH ,
- IIIc – НКГПВС, насыщенные смесью NH_4Cl + NH_4OH после первого цикла формирования криогеля из водного раствора полимера без добавок.

Структура тонких срезов указанных препаратов приведена на микрофотографиях рисунка 36, полученных с помощью оптического микроскопа по методике, ранее успешно использовавшейся при изучении различных ненаполненных и композитных криогелей ПВХ (см., например [192]). Темные участки на этих черно-белых изображениях – окрашенная Конго красным полимерная фаза, светлые области – заполненные водой макропоры.

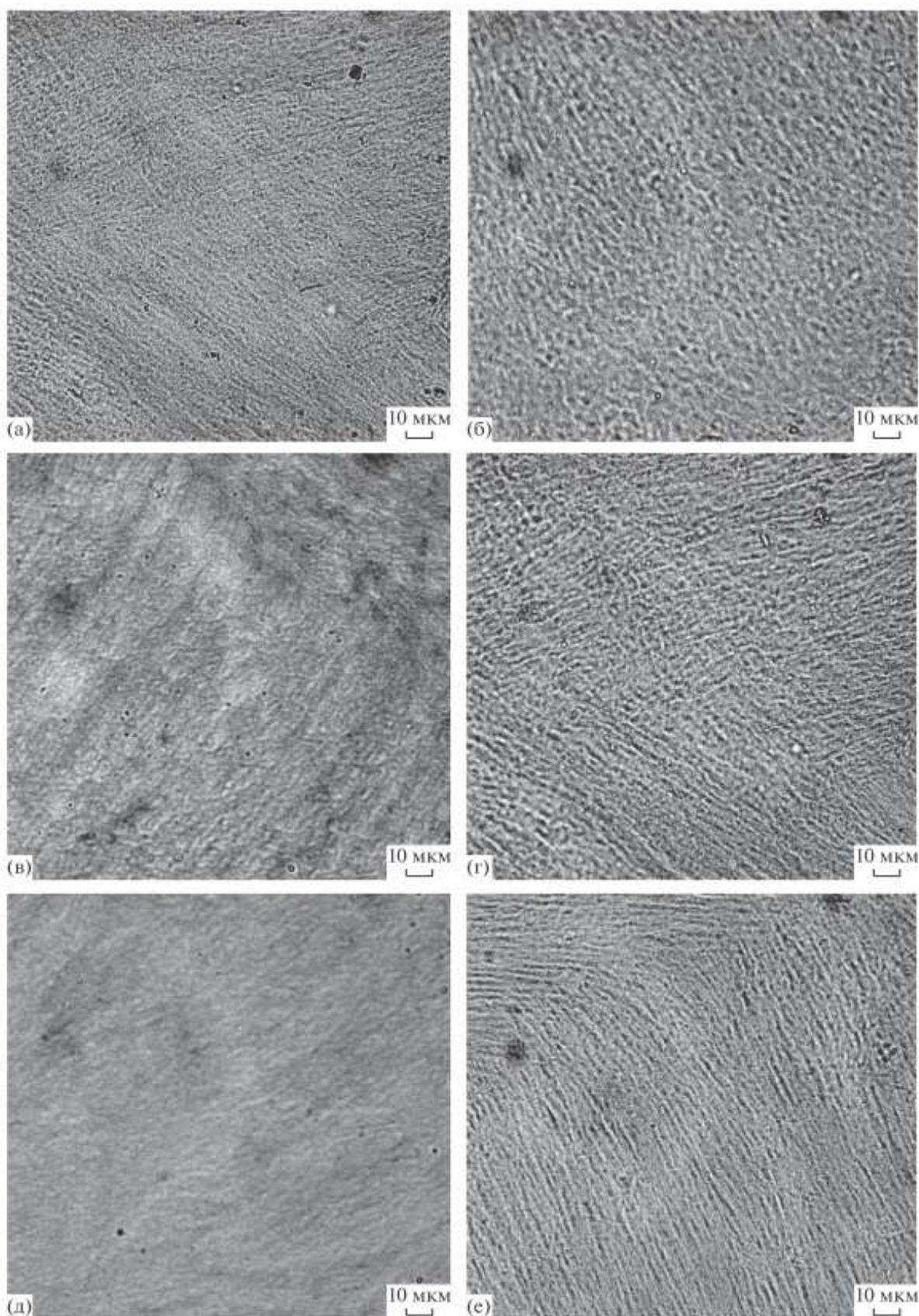


Рисунок 36- Микрофотографии тонких срезов криогелей Ia (а, б), Ic (в, г) и IIIc (д, е), сформировавшихся в результате 1 (а, в, д) и 5 (б, г, е) циклов криогенной обработки (обозначения образцов и их состав см. в табл. 8).

Анализ полученных изображений показал, что наиболее гетерогенная микроструктура криогелей, которые были сформированы однократным замораживанием – оттаиванием, свойственна композиту IIIc (рисунок 36в), скорее всего, из-за присутствия в нем частиц ХТО. При этом именно в системе состава ПВС/ХТО/ NH_4Cl / NH_4OH такой дисперсный наполнитель не удалось отконтрастировать, поскольку компоненты золь-фракции (скорее всего, гидроксид аммония) препятствовали эффективному связыванию красителя. В то же время, если подобный композитный криогель отмыть от водорастворимых веществ, то, как было показано ранее, близкие к сферическим частицы ХТО размером 2–5 мкм хорошо видны на микрофотографиях тонких срезов.

Отдельно необходимо отметить, что известный для криогелей ПВС без добавок (т.е. Ia) эффект увеличения размера макропор в результате повторения циклов замораживания – оттаивания [22, 86, 91, 118] проявляется и в случае композитов Ic, содержащих компоненты, препятствующие росту жесткости образцов при многократной криогенной обработке, и для ненаполненных криогелей IIIc, в состав которых “ингибирующие” низкомолекулярные электролиты были введены уже после формирования первичного криогеля. В результате дополнительных 4-х циклов замораживания – оттаивания увеличение размера (поперечного сечения) макропор в этих системах по сравнению с образцами, сформированными однократной криогенной обработкой, было следующим: для криогелей Ia – от 0,8–1,5 до 1,6–2,8 мкм (рисунок 36а и 36б), для композитов Ic – от 1,2–2,0 до 1,8–2,9 мкм (рисунок 36в и 36г), для криогелей IIIc – от 1,0–1,4 до 2,0–3,2 мкм (рисунок 36д и 36е). Таким образом, во всех этих случаях наблюдалось примерно двукратное увеличение размера макропор, и при этом четкость самих изображений повышалась вследствие уплотнения стенок макропор, более интенсивно поэтому окрашиваемых Конго красным. Как известно [6, 119, 120], такое повышение плотности стенок макропор гетерофазных криогелей ПВС является одной из причин обычного роста их жесткости,

индуцируемого многократным замораживанием – оттаиванием. Тем не менее, несмотря на то, что для композитных криогелей Ic такое уплотнение гелевой фазы явно наблюдалось (сравните рисунки 3бд и 3бе), значимого повышения их модуля упругости не происходило. Отсюда, по-видимому, следует, что “противодействующие” эффекты, связанные с присутствием в этой гелевой системе таких низкомолекулярных электролитов как хлорид и гидроксид аммония, влияют на ее интегральные физико-механические свойства существенно сильнее, чем некоторое уплотнение стенок макропор композитов Ic вследствие многократной криогенной обработки. Несомненно, что для выяснения тонких механизмов конкуренции подобных разнонаправленных факторов необходимы дополнительные исследования.

3.4. Изучение возможностей использования хитозансодержащих криогелей ПВС

Перспективы использования хитозан-содержащих криогелей определяются биосовместимостью хитозана, пористой структурой криогеля и наличием в структуре полимера первичной аминогруппы. Биосовместимость природного полисахарида позволяет создавать на его основе полимерные материалы с контролируемым выделением лекарственных соединений, а в сочетании с комплексообразующими свойствами - биосорбенты для очищения организма от солей тяжелых металлов. Пористая структура криогеля обеспечивает пространство для роста и пролиферации клеток при использовании материала в качестве биосовместимой матрицы для тканевой инженерии. В данном разделе исследована цитотоксичность криогелей ПВС и хитозана, определяющая толерантность клеток к полученному материалу, а также сорбционные свойства криогелей ПВС-ХТО по отношению к ионам меди и текстильным красителям.

3.4.1. Изучение цитотоксичности хитозан-содержащих криогелей

Основные требования, которые предъявляются к полимерным матриксам для тканевой инженерии – это биологическая совместимость, крупнопористая морфологическая структура, поддерживающая миграцию, заселение (адгезию) и последующую жизнедеятельность клеток, а также комплекс необходимых механических и физико-химических свойств (упругость, атравматичность, способность к набуханию в воде, адгезионные характеристики). Исследования показывают, что хитозан имеет отличный потенциал как основа для получения разнообразных систем для тканевой инженерии [131, 148-151]. Наиболее распространенные сшивающие реагенты, используемые для сшивки хитозана, это диальдегиды, в частности глутаровый альдегид (ГА) [18]. ГА является наиболее эффективным бифункциональным соединением при получении гидрогелей хитозана, однако, есть сведения о токсичности продуктов его взаимодействия с хитозаном, поэтому для получения образцов сшитых криогелей хитозана был использован сшивающий реагент природного происхождения дженипин [193]. (Сшивку проводили в водном растворе дженипина с концентрацией 0,2% и 0,4%. Криогели ПВС-ХТО в виде дисков опускали в раствор на 24 ч. Образцы, изначально бледно-желтые, стали синими, что означало завершение процесса сшивки).

Цитотоксичность матриксов на основе хитозансодержащих криогелей ПВС изучали методом тестирования экстрактов, а в качестве модельной использовали линию мышинных фибробластов L929. Принцип «экстракт–теста» заключался в том, что среду для культивирования клеток заменяли на экстракты, полученные после инкубации образцов гидрогелей в среде культивирования, и анализировали жизнеспособность клеток в этих экстрактах с помощью МТТ-теста через 72 часа культивирования в присутствии экстрактов. Результаты «экстракт–теста», представленные на рисунке 37, показали высокую выживаемость клеток на экстрактах образцов

криогеля. Экстракты не снижали жизнеспособности клеток после 72 часов культивирования.

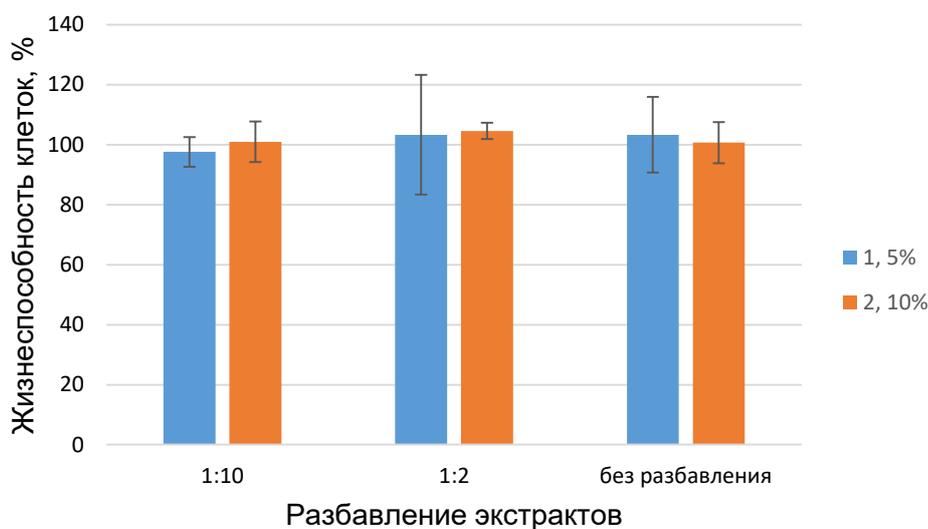


Рисунок 37- Жизнеспособность клеток L929 после 72 ч инкубации с экстрактами. Результаты МТТ теста представлены для неразбавленных экстрактов и разбавленных в 2 и 10 раз. Контроль (100%) – монослой клеток, культивируемый без добавления экстрактов

Изучение влияния экстрагируемых из матрикса веществ на жизнеспособность клеток показало, что экстракты от всех образцов не были токсичны для клеток, что открывает перспективы использования разработанных криогелей ПВС-хитозан для тканевой инженерии.

3.4.2. Изучение процесса сорбции ионов Cu^{2+} хитозансодержащими криогелями поливинилового спирта из водных растворов сульфата меди

Неподеленная электронная пара азота аминогруппы хитозана придает этому полимеру свойства полилиганда при сорбции меди, кобальта и других элементов, имеющих вакантную орбиталь [146, 147, 153-156]. Сочетание в молекуле хитозана первичной аминогруппы у С2 и гидроксильных групп у С3 и С6 обуславливает способность образовывать хелатные комплексы. Крупнопористая структура криогелей хитозана, их развитая поверхность являются предпосылками для улучшения кинетических свойств сорбентов. В работе [18] были исследованы сорбционные свойства криогелей хитозана,

полученных в присутствии глутарового альдегида в качестве сшивающего реагента. Показано, что криогели хитозана обладают высокой сорбционной активностью и скоростью достижения сорбционного равновесия. Значение предельной адсорбции A_{∞} составило 3,6 ммоль/г криогеля, что, однако, ниже значения, рассчитанного исходя из содержания аминогрупп в хитозане, которое в зависимости от степени дезацетилирования исходного хитина составляет 5,3 – 5,6 ммоль/г хитозана. Это связано с тем, что сшивка диальдегидом происходит преимущественно по аминогруппам, которые являются центрами специфической сорбции Cu^{2+} , а в результате такой модификации их количество уменьшается. Соответственно снижается сорбционная способность криогеля, так как в процесс комплексообразования вовлечены именно свободные аминогруппы.

Механизм сорбции хитозаном ионов меди заключается в координировании с аминогруппами хитозана. Электронная пара азота аминогрупп участвует в образовании донорно-акцепторной связи с ионом меди, в результате образуется комплексное соединение.

В данной работе были получены криогели на основе смеси ПВС и хитозана, путем криоструктурирования из общего раствора полимеров в отсутствие сшивающих реагентов, поэтому все аминогруппы хитозана потенциально способны к образованию координационных связей. Еще одним способом получения криогелей ПВС-ХТО является проведение криоструктурирования в грануляторе (Приложение), когда в результате замораживания капель смешанного раствора полимеров ПВС-ХГХ образуются гранулы (шарики). Путем проведения щелочной обработки (см. Методическую часть) таких гранул образуются криогели ПВС-ХТО. Скорость образования капель при гранулировании зависит от экспериментально заданных размеров шариков и составляет 0,01 -50 мл/мин при размерах гранул от 0,15 до 2,00 мм.

Для изучения сорбционных свойств использовали криогели с соотношением компонентов ПВС:ХТО = 120:112 и 120:56 г/л и

влажностисодержанием 800%. Процесс сорбции проводили из растворов CuSO_4 при концентрациях 0,01 – 0,1 моль/л и гидромодуле 150 мл/г. Определение изменения концентрации ионов меди в растворе процессе сорбции проводилось спектрофотометрическим методом в видимой области света при длине волны $\lambda=810$ нм (смотри методическую часть). На основании известных данных были рассчитаны значения концентраций и построены кинетические кривые процесса сорбции из растворов CuSO_4 разной концентрации. Значения адсорбции рассчитывали как число ммоль ионов Cu^{2+} на 1 г хитозана, содержащегося в криогеле, а также на 1 г криогеля ПВС-ХТО (таблица 14). Скорости сорбции находили по тангенсу угла наклона касательных к начальным участкам кинетических кривых адсорбции из растворов CuSO_4 разной концентрации.

На рисунке 38 и 39 приведены кинетические кривые сорбции ионов Cu^{2+} из растворов CuSO_4 с различными концентрациями криогелями ПВС-хитозан.

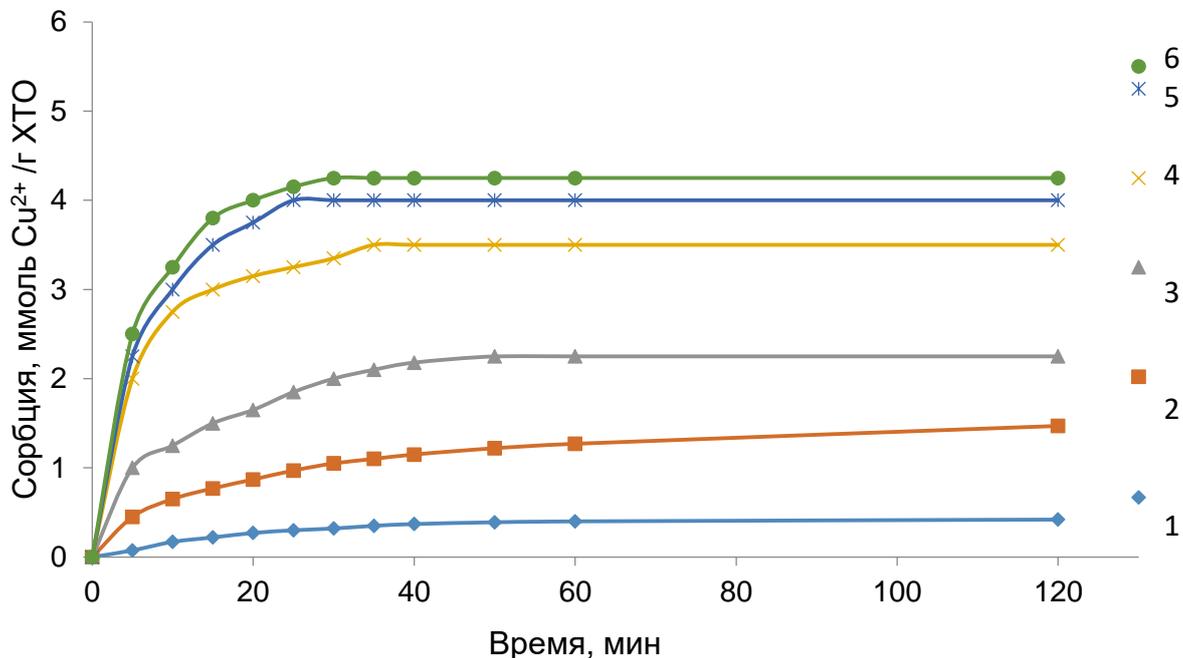


Рисунок 38 - Кинетические кривые сорбции ионов Cu^{2+} криогелями ПВС-ХТЗ из растворов CuSO_4 : 1 – 0,005 моль/л; 2 – 0,010 моль/л; 3 – 0,020 моль/л; 4 – 0,05; 5 – 0,075 моль/л; 6 – 0,100 моль/л. Исходные концентрации ПВС и хитозана, соответственно 120г/л и 112г/л.

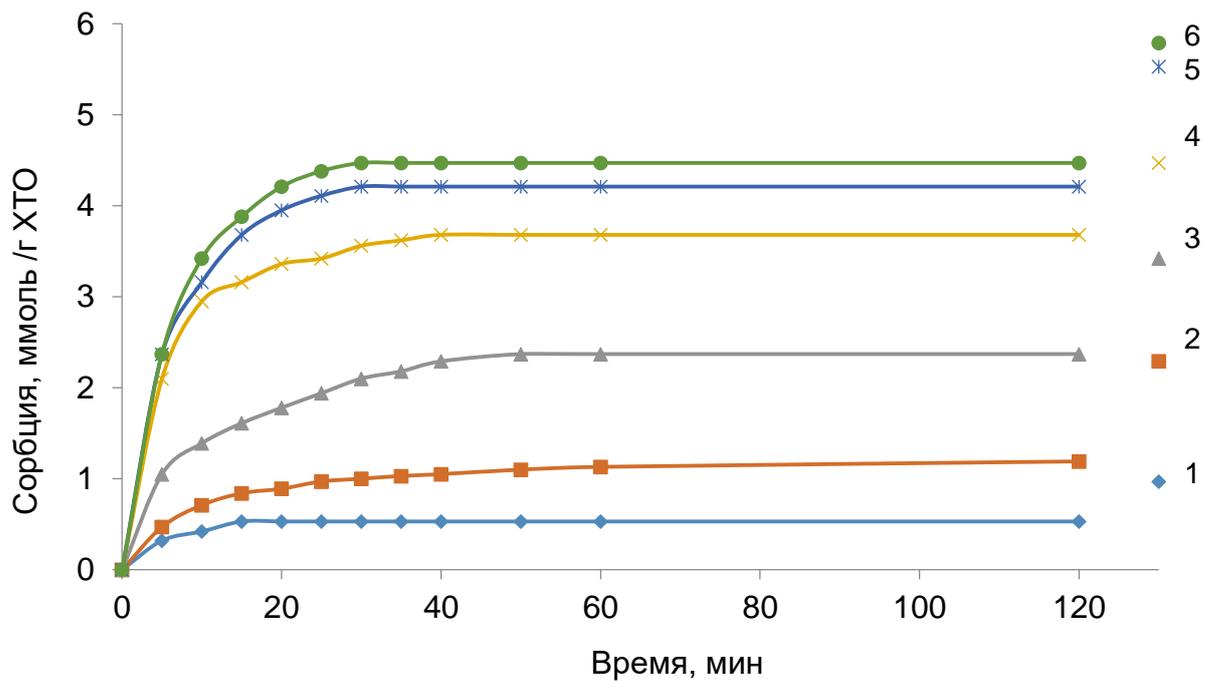


Рисунок 39 - Кинетические кривые сорбции ионов Si^{2+} криогелями ПВС-ХТО из растворов SiSO_4 : 1 – 0,005 моль/л; 2 – 0,010 моль/л; 3 – 0,002 моль/л; 4 – 0,05; 5 – 0,075 моль/л; 6 – 0,100 моль/л. Исходные концентрации ПВС и хитозана, соответственно 120 г/л и 56 г/л.

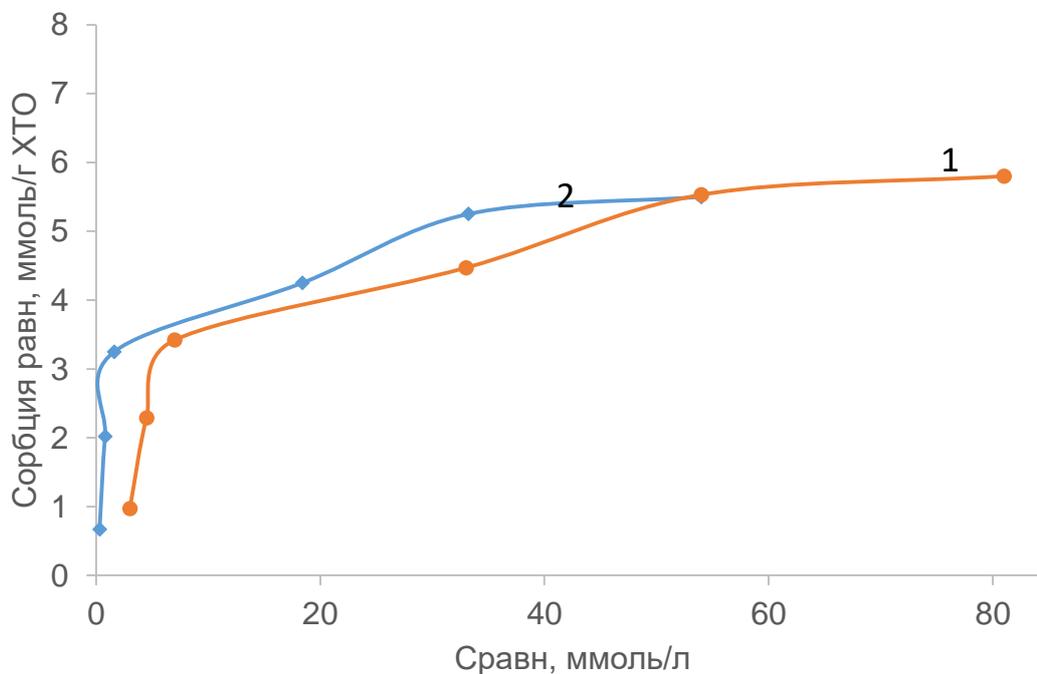


Рисунок 40 - Изотермы сорбции Si^{2+} криогелями ПВС:ХТО=120:56 (1), ПВС:ХТО=120:112 (2)

Таблица 14 – Сорбционные характеристики криогелей ПВС:ХТО=120:56 по отношению к ионам Cu^{2+} в процессе сорбции из растворов CuSO_4 .

Концентрация раствора CuSO_4 , ммоль/л	Равновесная концентрация Cu^{2+} в растворе $C_{\text{равн}}$, ммоль/л	Равновесная адсорбция $A_{\text{равн}}$		Скорость сорбции, $V_0 \cdot 10^3$, моль/мин*г ХТО
		ммоль/г криогеля	ммоль/г ХТО	
5	3	0,16	0,97	70
10	4,5	0,44	2,29	100
20	7	1,03	3,42	237
50	36	1,11	4,47	440
75	60	1,19	5,53	510
100	81	1,75	5,77	510

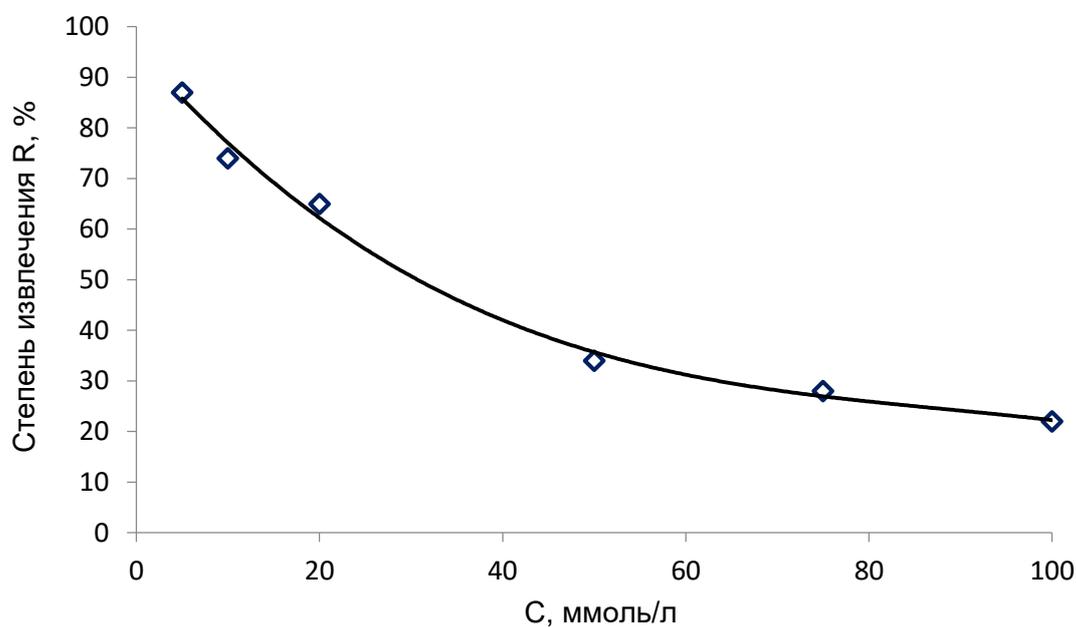


Рисунок 41 - Зависимость степени извлечения ионов меди криогелем ПВС:ХТО=120:56 от концентрации растворов CuSO_4 .

Как видно из приведенных кинетических кривых (рисунок 38, 39), равновесные значения сорбционной емкости увеличиваются с увеличением

концентрации раствора CuSO_4 , а значения степени извлечения (R , %) ионов Cu^{2+} падают (рисунки 40, 41). Время достижения сорбционного равновесия также сильно зависит от концентрации раствора и изменяется от 30 минут при 5 ммоль/л до 5-ти часов при концентрации раствора CuSO_4 100 ммоль/л. При этом сорбционная емкость увеличивается при меньшем содержании хитозана в системе. Поэтому для дальнейших работ было решено использовать криогели с содержанием компонентов ПВС:ХТО = 120:56 г/л.

Регенерация хитозансодержащего сорбента предусматривает обработку раствором кислоты, но хитозан растворяется в водных растворах кислот, поэтому в отсутствие сшивки повторное использование сорбента невозможно. И хотя использование биосорбентов не предполагает их регенерацию, были получены образцы криогелей, модифицированные сшивкой глутаровым альдегидом и глиоксалем, которые были испытаны в нескольких циклах сорбции из растворов CuSO_4 .

Сорбция криогелями ПВС-ХТО проводилась по методике, описанной выше при постоянном перемешивании. После первого цикла сорбции криогели промывались $0,05\text{M H}_2\text{SO}_4$, после чего повторно была исследована сорбция. Такую операцию проводили три раза, в результате чего было установлено, что после каждой «ступени сорбции» криогель теряет свою сорбционную емкость в ≈ 2 раза (рисунок 42).

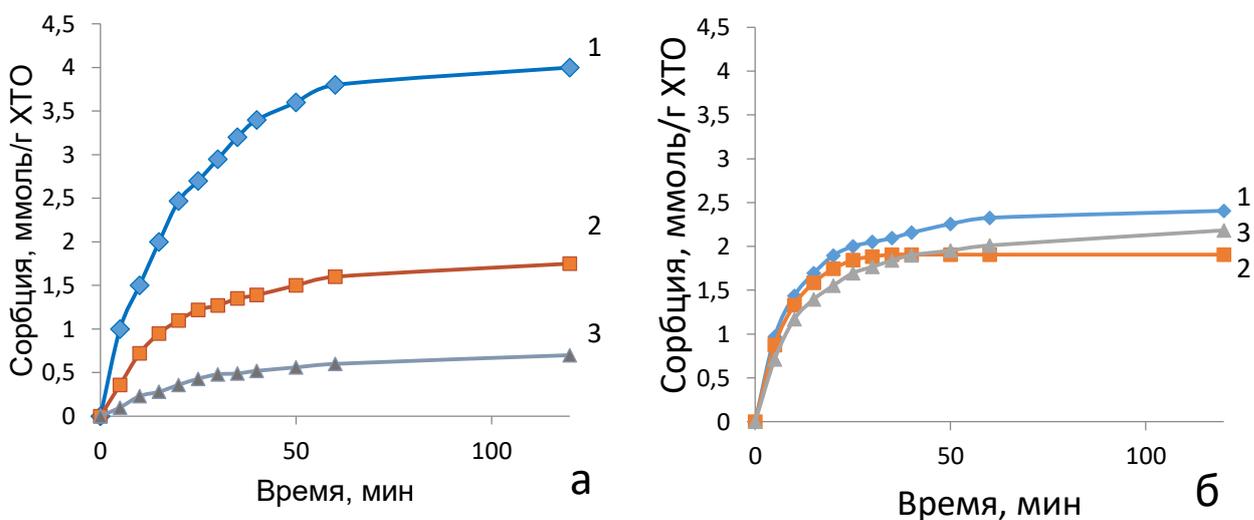


Рисунок 42 - Кинетические кривые трехкратной сорбции ионов Cu^{2+} криогелями ПВС-ХТО, сшитыми: а - глутаровым альдегидом, б – глиоксалем, из раствора CuSO_4 концентрацией 0,1 моль/л соответственно 1, 2 и 3 ступени сорбции. Исходные концентрации ПВС и хлоргидрата хитозана, соответственно 120г/л и 56г/л.

Такое снижение сорбционной активности мы связываем с частичным вымыванием хитозана из структуры криогеля в процессе обработки кислотой. При переводе хлоргидрата хитозана в хитозан-основание происходит частичное микрокоагулирование (шарики сферической формы на оптических фотографиях рис. 31), вследствие чего сшивающий агент не может полностью проникнуть в структуру криогеля, однако небольшие молекулы кислоты могут с легкостью диффундировать в объеме криогеля, при этом частично растворяя несшитую фракцию хитозана. На рисунке 43 приведены фотографии гранул криогелей ПВС-ХТО до и после сорбции ионов Cu^{2+} . Размер гранул составляет 1,9-2,1 мм.



Рисунок 43 - Фотографии гранул криогелей ПВС-ХТО до и после сорбции ионов Cu^{2+} .

Проведение многократной криогенной обработки, вследствие образования более крупнопористой и развитой структуры, могло бы обеспечить увеличение сорбционной емкости композитных криогелей, а также повлиять на скорость диффузии сорбата в криогеле. Однако исследования показывают, что несмотря на рост показателей физико-

механических свойств в зависимости от количества циклов замораживания-оттаивания, сорбционная способность криогелей снижается (рисунок 44), а так же сорбция такими криогелями характеризуется более низкой скоростью диффузии сорбата в образцах, соответственно снижением скорости сорбции (таблица 15). Это может объясняться более плотноупакованной структурой, которая образуется в стенках пор криогеля, что препятствует свободной диффузии ионов меди.

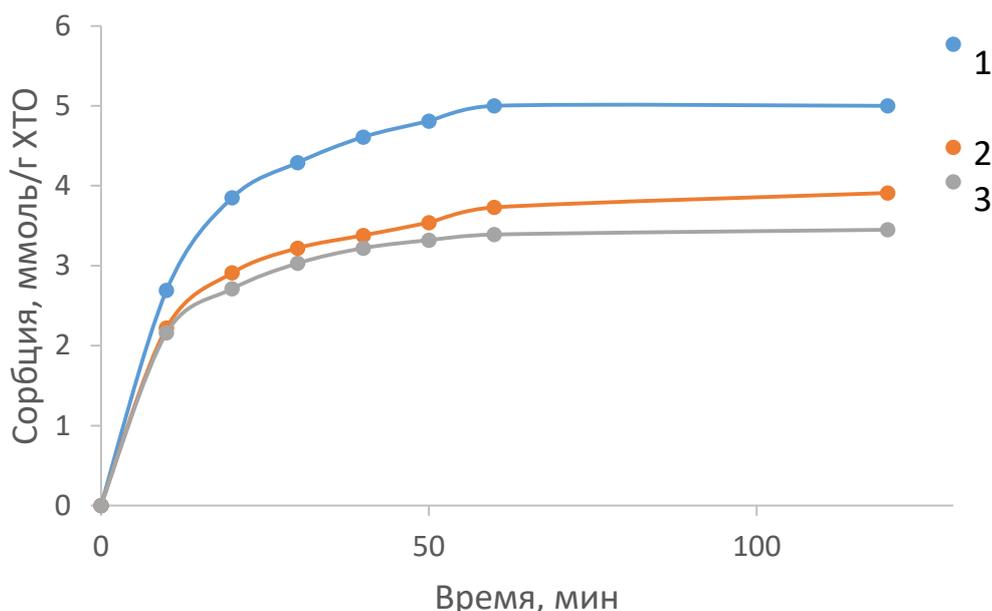


Рисунок 44 - Кинетические кривые сорбции ионов Cu^{2+} криогелями ПВС-ХТО, сформированных одно- (1) , трёх- (2) и пятикратным замораживанием-оттаиванием, из растворов $CuSO_4$ 0,100 моль/л. Исходные концентрации ПВС и хитозана, соответственно 120г/л и 56г/л.

Таблица 15 – Сорбционные характеристики криогелей ПВС:ХТО=120:56, полученных многократным замораживанием-оттаиванием, по отношению к ионам Cu^{2+} в процессе сорбции из растворов $CuSO_4$.

Количество циклов замораживания-оттаивания	Сорбция, ммоль/г ХТО	Сорбция, г/г ХТО	Сорбция, ммоль/моль ХТО	Скорость сорбции, $V_0 \cdot 10^3$, моль/мин*г
1	5.0	5.0	5.0	0.083
2	3.9	3.9	3.9	0.065
3	3.4	3.4	3.4	0.057

криогелей ПВС:ХТО=120:56				ХТО
1	5,77	0,9232	0,9290	510
3	4,480	0,7168	0,7213	460
5	4,850	0,7760	0,7809	420

Таким образом, изучение сорбционных свойств криогелей ПВС-ХТО показало, что криогели могут быть эффективными сорбентами при извлечении ионов меди из водных растворов, но только одноразового использования, например, в качестве биосорбента ионов тяжелых металлов

3.4.3. Изучение процесса сорбции сложных органических соединений хитозансодержащими криогелями поливинилового спирта

Синтетические красители имеют сложную ароматическую структуру и представляют собой небiorазлагаемые вещества, которые остаются стабильными в различных условиях. Многие красители являются высокотоксичными и канцерогенными соединениями, и это представляет серьезную опасность для водных живых организмов и человека. Существующие методы очистки воды от красителей имеют ограничения, некоторые из них не подходят для использования в процессах очистки питьевой воды и воды, используемой в производстве фармацевтических препаратов или других особо чистых продуктов [195]. Поиск более эффективных методов удаления красителей из природных вод привел в качестве альтернативы к изучению биосорбции. [195-197]. Биосорбенты и их производные содержат различные функциональные группы, которые могут формировать комплексы с красителями. Биосорбенты обладают большей селективностью по сравнению с традиционными ионообменными смолами или коммерческими активированными углями и способны уменьшить концентрацию красителей в водных растворах значительно ниже уровня предельно допустимой. Способность хитозана к биодegradации обеспечит

компактизацию загрязнений и облегчит их последующую утилизацию. Наличие функционально-активных аминогрупп в хитозане открывает возможность использования материалов на основе этого уникального биосовместимого полисахарида в качестве биосорбентов в процессах сорбции неорганических и сложных органических соединений (ионы металлов, красители, токсические соединения) с разным размером молекул, а высоко развитая и широкопористая структура криогелей ПВС-ХТО обеспечивают оптимальную кинетику сорбции.

Для изучения сорбционных свойств измельченные образцы композитных криогелей выдерживали в водных растворах кислотных текстильных красителей с разной концентрацией, используемых для крашения белковых волокон, кислотный желтый К (рисунок 45) и кислотный красный 2Ж (рисунок 46). В отличие от ранее полученных данных по сорбции ионов меди и независимо от содержания хитозана в криогеле время установления сорбционного равновесия в случае крупных молекул красителя превышало 2ч. Вероятно, кинетика сорбции лежит в диффузионной области и определяется пористой структурой криогеля, заданной условиями криотропного гелеобразования, в то время как равновесная адсорбция, рассчитанная на единицу массы хитозана, зависит от размера частиц хитозана в криогеле и соответственно состава системы, в которой происходит выделение фазы хитозана: в системе с меньшим содержанием хитозана и более мелкими его частицами равновесная адсорбция в расчете на 1 г хитозана при любой концентрации раствора красителя в 2 раза выше, чем при соотношении полимеров 120:112 г/л.

В качестве сравнения так же был исследован композитный криогель ПВС содержащий дисперсные частицы хитозана с разной степенью протонирования аминогрупп хитозана в процессе получения криогеля, который так же подвергался щелочной обработке как было описано ранее.

Концентрацию красителя в растворе определяли спектрофотометрически с помощью спектрофотометра «Genesis 10S UV Vis»

(«Thermo Electron Corp.», США) по величине оптического поглощения при длине волны 410 нм для желтого и 512 нм для красного красителя. Через определенные промежутки времени определяли оптическую плотность и рассчитывали концентрацию красителя с использованием калибровочных кривых, построенных в день эксперимента.

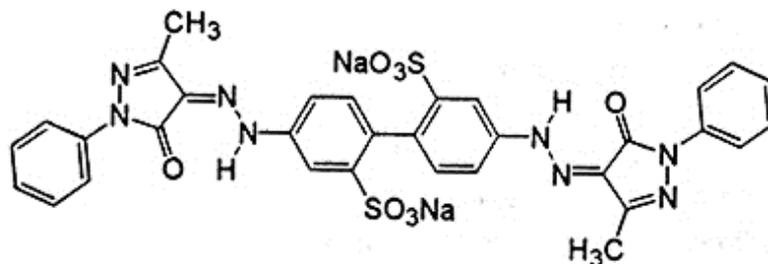


Рисунок 45– Краситель кислотный желтый К (КЖК)

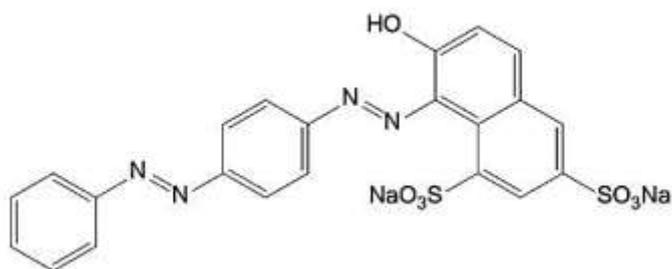


Рисунок 46 – Краситель кислотный красный 2Ж (КК2Ж)

На рисунке 47 приведены кинетические кривые сорбции красителя КЖК из водных растворов разной концентрации. Данные по сорбционным свойствам приведены в таблице 16.

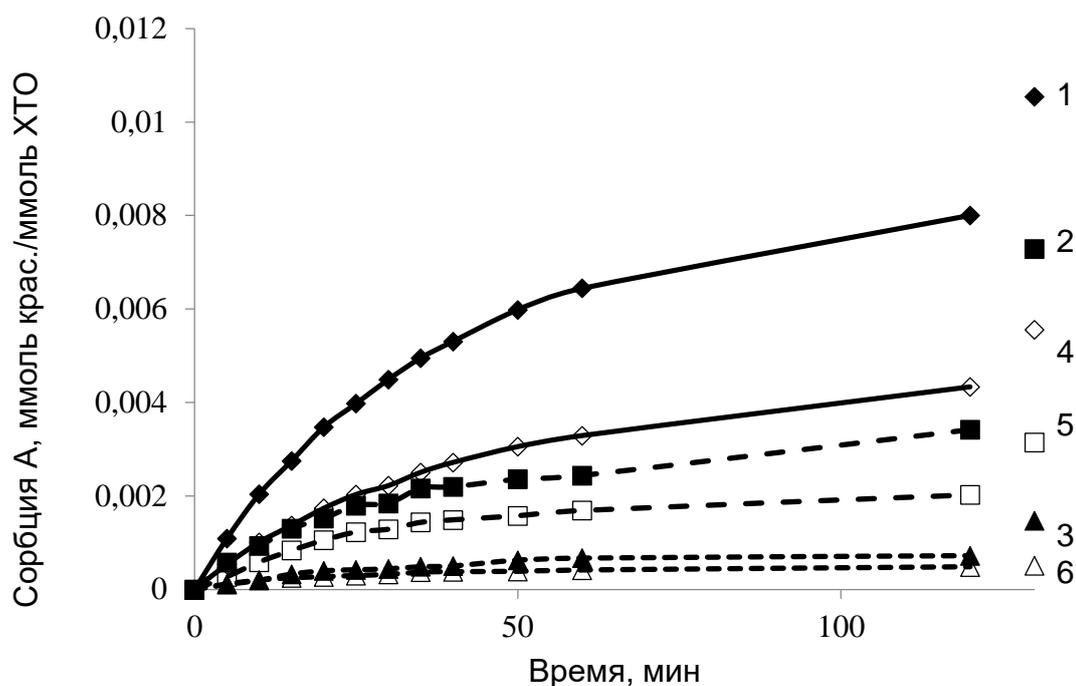


Рисунок 47 – Кинетические кривые сорбции красителя КЖК композитными криогелями ПВС-ХТО с содержанием ПВС:ХТО=120:56 г/л (1, 2, 3) и ПВС:ХТО=120:112 г/л (4, 5, 6) из водных растворов с разной концентрацией сорбата: 1, 4 – 0,1 ммоль/л; 2, 5 – 0,05 ммоль/л; 3, 6 – 0,01 ммоль/л.

Таблица 16 - Сорбционные свойства криогелей ПВС-ХТО.

Соотношение ПВС:ХТО	Концентрация красителя		Равновесная сорбция Аравн		
	мг/л	ммоль/л	мг/г сорбента	мг/г хитозана	ммоль/г хитозана
120:56	82.4	0.1	11.9	49.6	0.0655
	41.2	0.05	8.19	34.3	0.0452
	8.24	0.01	1.65	6.92	0.0091
120:112	82.4	0.1	10.2	26.2	0.0345
	41.2	0.05	5.76	14.8	0.0195
	8.24	0.01	1.22	2.39	0.0032

На основании значений адсорбции, полученных через сутки после начала процесса (крайние правые точки на координатной плоскости рисунок 45), были построены изотермы сорбции (рисунок 48).

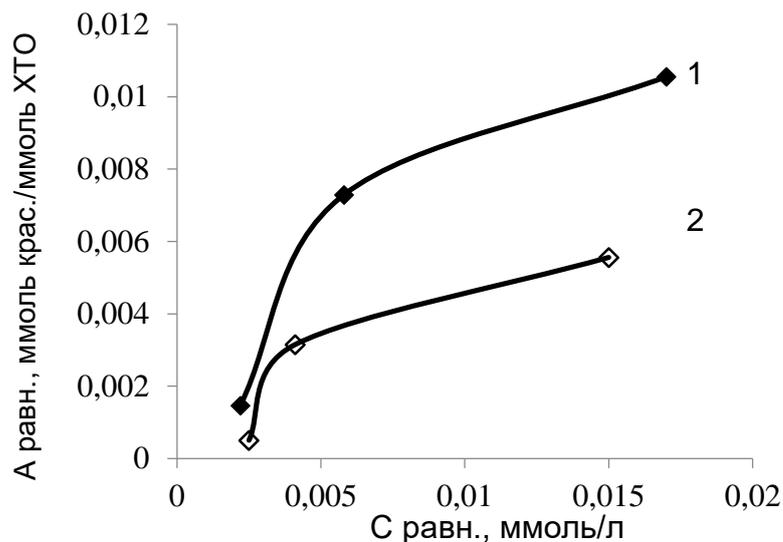


Рисунок 48 - Изотермы сорбции красителя КЖК композитными криогелями ПВС-ХТО с содержанием ПВС:ХТО=120:56 г/л (1) и ПВС:ХТО=120:112 г/л (2)

При анализе данных (рис.48) следует учитывать, что изотермы 1 и 2 были получены при одинаковом объеме сорбата на 1 г сорбента, но разном соотношении объема сорбата и массы хитозана в образце криогеля. Поскольку сорбционно-активными в криогеле являются аминогруппы хитозана, различие в изотермах сорбции характеризует влияние гидромодуля на равновесную сорбцию. Изотерма сорбции красителя криогелем с меньшим содержанием хитозана действительно располагается выше изотермы сорбции криогелем с одинаковым соотношением полимеров во всем исследованном диапазоне концентраций сорбата. То есть при одинаковой концентрации красителя и одинаковом содержании твердого адсорбента равновесная сорбция в расчете на 1 г сорбционно-активного полимера повышается при уменьшении его содержания в криогеле (таблица 16).

В изученном диапазоне концентраций КЖК при снижении содержания красителя от 0.1 до 0.01 ммоль/л (от 0.8 до 8%) возрастает степень извлечения красителя R из водного раствора от 86 до 91%. Следует отметить, что выбор концентрации сделан для характеристики сорбционной способности криогелей и соответствует даже более высокой концентрации

технологических растворов кислотных красителей в отделочном производстве. В сточных водах содержание красителей на порядок ниже. Нами установлено, что при концентрации КЖК ниже 0.2% композитный криогель ПВС-ХТО извлекает из воды практически 100% растворенного красителя. Таким образом, разработанный сорбент может быть эффективно использован для удаления красителей не только из природной воды, но и из сточных вод.

Для многократного использования криогелей в процессах удаления красителей из водных сред был предложен способ регенерации сорбента его обработкой водным раствором хлорида натрия. Для этого после достижения равновесной сорбции композитные криогели помещали в 5%-ный раствор NaCl. Процесс десорбции красителя проводили в течение суток при постоянном перемешивании. Десорбция красителя достигала 98-100%. После десорбции образцы промывали дистиллированной водой и использовали для повторной сорбции. В таблице 17 приведены данные многократной сорбции кислотных красителей криогелями с разным содержанием хитозана из растворов с концентрацией 0,1 ммоль/л. Видно, что максимальная сорбционная емкость криогеля независимо от содержания хитозана практически не изменяется в течение 5 циклов сорбции – десорбции.

Таблица 17 - Значения максимальной сорбционной емкости криогелей ПВС-ХТО при проведении многократных циклов сорбции – десорбции для красителя КЖК.

Соотношение ПВС:ХТО	A _{равн} , мг красителя/ г сорбента, после сорбции				
	1 цикл	2 цикл	3 цикл	4 цикл	5 цикл
120:56	11.9	11.5	11.7	11.4	11.6
120:112	10.2	9.6	9.2	9.9	10.0

Для сравнительной характеристики были изучены так же сорбционные свойства криогелей ПВС, содержащих хитозан с разной степенью протонирования. В таблице 18 приведены данные сорбционной емкости

композитных криогелей ПВС–хитозан, полученных однократным замораживанием-оттаиванием.

Таблица 18 – Сорбционная емкость композитных криогелей ПВС – хитозан после однократного замораживания-оттаивания

Краситель	КГ ПВС-ХТ	Концентрация красителя, ммоль/л		Равновесная сорбция $A_{равн}$		
		$C_{начальная}$	$C_{равновесная}$	мг/г хитозана	ммоль/г хитозана	ммоль/ммоль хитозана
КЖК	КГ ПВС-ХТО	0,1	0,0170	49,6	0,0655	0,0105
	$\alpha=0$	0,1	0,0256	24,2	0,0319	0,0051
	$\alpha=0,1$	0,1	0,0096	28,3	0,0374	0,0060
	$\alpha=0,2$	0,1	0,0199	26,3	0,0347	0,0056
	$\alpha=0,3$	0,1	0,0097	29,8	0,0393	0,0063
КК2Ж	КГ ПВС-ХТО	0,1	0,0341	31,4	0,0614	0,0099

Показано, что возрастание степени протонирования аминогрупп хитозана ведет к повышению сорбционной емкости и достигает своего максимума в случае введения в криогель полностью растворимой соли хитозана. Это может объясняться увеличением положительного заряда поверхности криогеля и большей доступностью сорбционно-активных аминогрупп, вследствие увеличения аморфных участков в хитозане за счет разрыхления структуры его частиц.

Выбор концентрации сорбатов был сделан таковым для характеристики сорбционной способности криогелей, что отвечало даже более высокой концентрации технологических растворов кислотных красителей в отделочном производстве. В сточных водах содержание красителей на порядки ниже. Нами установлено, что при концентрации КЖК ниже 0.2% композитный криогель ПВС-ХТ извлекает из воды практически 100% растворенного красителя. Таким образом, разработанный сорбент может быть эффективно использован для удаления красителей не только из

природной воды, но и из сточных вод. Так же установлено, что повышение степени протонирования аминогрупп хитозана независимо от строения кислотного красителя приводит к увеличению сорбционной емкости криогеля, содержащего диспергированный хитозан. Об этом свидетельствуют кинетические кривые приведенные на рисунке 49.

Для композитных криогелей были изучены сорбционные свойства при концентрациях красителей 0,1 и 0,05 ммоль/л. Оказалось, что при низкой концентрации сорбата, количество сорбируемых веществ в разы меньше, чем при сорбции из более концентрированных растворов. Также, несмотря на то, что многократное замораживание-оттаивание обеспечивает более крупнопористую структуру и равномерное распределение хитозана в объеме геля, сорбционная емкость таких материалов оказалась очень мала. Можно предположить, что это связано с более плотно упакованной структурой микрочастиц хитозана.

На основании значений адсорбции, полученных через сутки после начала процесса (крайние правые точки на координатной плоскости рисунок 47), были построены изотермы сорбции (рисунок 48).

При анализе данных рисунка 48 следует учитывать, что изотермы 1 и 2 были получены при одинаковом объеме сорбата на 1 г сорбента, но разном соотношении объема сорбата и массы хитозана в образце криогеля. Поскольку сорбционно-активными в криогеле являются аминогруппы хитозана, различие в изотермах сорбции характеризует влияние гидромодуля на равновесную сорбцию. Изотерма сорбции красителя криогелем с меньшим содержанием хитозана действительно располагается выше изотермы сорбции криогелем с одинаковым соотношением полимеров во всем исследованном диапазоне концентраций сорбата. То есть при одинаковой концентрации красителя и одинаковом содержании твердого адсорбента равновесная сорбция в расчете на 1 г сорбционно-активного полимера повышается при уменьшении его содержания в криогеле.

Как упоминалось ранее, для проницаемости матрицы криогелей также применяется метод многократного замораживания-оттаивания, поскольку такая манипуляция позволяет получить более широкие поры в сетке геля, что обеспечивает более легкую диффузию жидкостей, в данном случае раствора сорбата. На рисунке 49 показаны кинетические кривые сорбции для некоторых образцов композитов ПВС-хитозан, полученных в результате однократного или пятикратного замораживания-оттаивания.

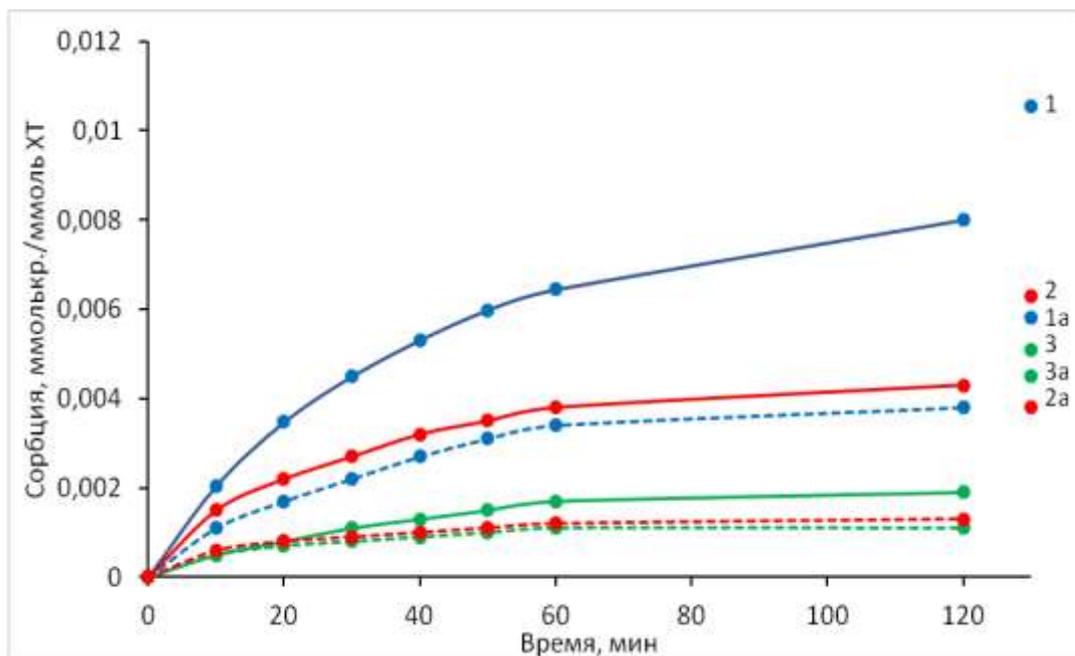


Рисунок 49 - Кинетические кривые сорбции из растворов красителя КЖК с концентрацией 0,1 ммоль/л композитными криогелями ПВС=ХТО (1, 1а), ПВС-ХТ с степенью протонирования хитозана α : 0 (3, 3а), 0,3 (2, 2а) после первого (1, 2, 3 – сплошные линии) и пятого (1а, 2а, 3а – пунктирные линии) циклов замораживания-оттаивания.

Показано, что увеличение количества циклов замораживания-оттаивания не ведет к росту скорости сорбции, а наоборот снижает её. Это видно по углу наклона прямолинейных участков кривых в начальный момент времени. Такой эффект может быть объяснен образованием более плотной структуры стенок криогеля ПВС, а хитозан оказывается включенным в эту сетку, как отмечалось ранее.

Для сравнительного анализа сорбционных свойств изучаемых композитных криогелей на рисунке 50 приведены диаграммы сорбционной емкости криогелей после первого и пятого циклов замораживания-оттаивания с разной степенью протонирования хитозана в процессе получения и для разных красителей.

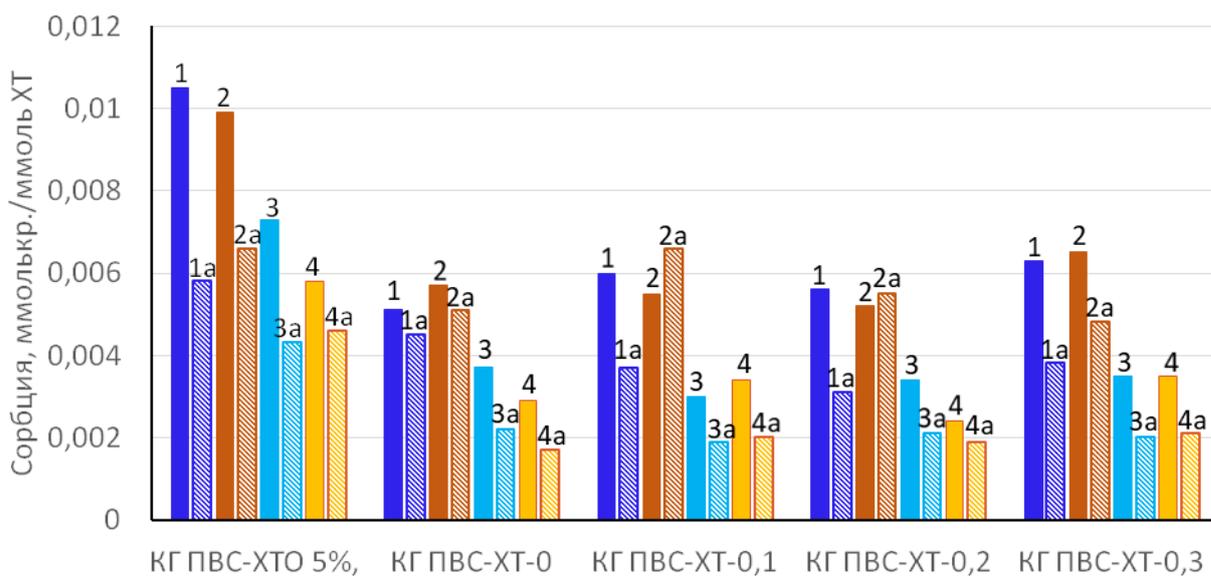


Рисунок 50 - Сорбционная емкость криогелей после первого (1, 2, 3, 4 – однотонные столбцы) и пятого (1а, 2а, 3а, 4а – заштрихованные столбцы) циклов замораживания-оттаивания при сорбции из растворов красителей с концентрацией 0,1 ммоль/л КЖК (1, 1а) и КК2Ж (2, 2а), 0,05 ммоль/л КЖК (3, 3а) и КК2Ж 0,05(4, 4а) (цифры под каждой группой колонок диаграмм указывают значения степени протонирования (α) хитозана).

В ходе выполнения исследований, установлено, то композитные криогели ПВС-ХТО могут быть эффективно использованы как биосорбенты многократного использования для очистки сточных и доочистки питьевых вод от примесей органических соединений, в частности текстильных красителей. Однако, содержание в криогелях ПВС дисперсных частиц хитозана, даже при увеличении степени протонирования последнего, не позволяют получать материалы с высокой сорбционной ёмкостью. Это может объясняться наличием в дисперсных частицах хитозана кристаллических участков,

которые мешают свободной диффузии жидкости в структуре геля, тогда как композитные криогели, сформированные переводением водорастворимой соли хитозана в нерастворимую основную форму непосредственно в структуре криогеля, позволяют получить крупнопористые матрицы с развитой морфологией. Полученные результаты указывают на отсутствие необходимости для повышения сорбционной емкости в дополнительном воздействии на структуру композитного геля путем многократного замораживания-оттаивания образца, которое, как нами было показано [194], может быть использовано для формирования крупнопористой структуры хитозансодержащего композитного криогеля ПВС.

Сравнительная характеристика методов получения и свойств разработанных композитных криогелей ПВС-хитозан и биосорбентов на их основе приведена в сводных таблицах 19 и 20.

Таблица 19 – Сравнительная характеристика методов получения и свойств композитных криогелей ПВС-хитозан

№ образца криогеля	Композиция для получения криогеля	Состав композиции		Метод получения композитного криогеля ПВС-ХТО	Размер частиц ХТО в криогеле ПВС, мкм	Модуль упругости криогеля Е, кПа	
		Содержание хитозана, г/л	Соотношение хитозан:ПВС			Исходного	После 5-ти циклов замораживания оттаивания
1	Водный раствор ПВС и ХГХ	56	1:2,14	Криотропное гелеобразование с переводом хитозана в форму ХТО	1-5	22,1	29,8
2		112	1:1,07		1-5	34,0	62,3
3	Дисперсия переосажденного хитозана в водном растворе ПВС	56	1:2,14	Криотропное гелеобразование	1-5	30,9	151
4		112	1:1,07		1-5	59,2	213
5	Дисперсия исходного порошка хитозана в растворе ПВС	36	1:3,33	Криотропное гелеобразование	250±100	17,0	160

Таблица 20 – Сравнительная характеристика биосорбентов на основе композитных криогелей ПВС-хитозан

Метод получения композитного криогеля	Характеристика криогеля		Сорбционные свойства композитных криогелей					Степень извлечения КЖК, %
	Содержание хитозана, г/л	Размер частиц ХТО в криогеле ПВС, мкм	Начальная скорость сорбции $V_0 \cdot 10^3$, моль $\text{Cu}^{2+}/\text{мин} \cdot \text{г}$	Максимальная равновесная сорбция, Γ_{max}		Начальная скорость сорбции $V_0 \cdot 10^3$, моль КЖК /мин · г	Максимальная равновесная сорбция, Γ_{max} , мг КЖК/г	
				ммоль $\text{Cu}^{2+}/\text{г}$	мг $\text{Cu}^{2+}/\text{г}$			
Криотропное гелеобразование раствора ПВС и ХГХ с последующим переводом хитозана в форму ХТО	56	1-5	510	5,77	923,2	0,161	49,6	86
Криотропное гелеобразование дисперсии переосажденного хитозана в растворе ПВС	112	1-5	500	6,1	976,0	0,25	31,9	92
Криотропное гелеобразование дисперсии исходного порошка хитозана в растворе ПВС	36	250±100	62,5	3,54	566,4	0,125	24,9	74

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ ПО РАБОТЕ

1) Разработан процесс и установлены оптимальные условия получения широкопористых криогелей на основе водорастворимого хитозана и ПВС без использования сшивающих реагентов и определены перспективны их применения в качестве биосорбентов и материалов биомедицинского назначения.

2) Исследованы фазовые равновесия в системе ПВС-хлоргидрат хитозана-вода и свойств смешанных растворов ПВС и ХГХ и показана высокая степень совместимости этих полимеров в общем растворителе при низкой ионной силе. Жидкофазное расслоение таких систем, вызванное термодинамической несовместимостью полимеров разной природы, наблюдается лишь при повышении ионной силы, например, при добавлении 0,15 М NaCl.

3) Методом криотропного гелеобразования были получены комплексные криогели ПВС-солевая форма хитозана (ХГХ), последующая щелочная обработка хитозана приводила к трансформации в нерастворимую основную форму (ХТО). Было установлено, что хитозан-основание равномерно распределен в объеме криогеля ПВС в виде дисперсных частиц размером 1-5 мкм, проявляя свойства «активного» наполнителя, что вызывает повышение жесткости и теплостойкости криогеля ПВС в сочетании с высокой сорбционной активностью.

4) Установлено влияние степени протонирования аминогрупп дисперсного хитозана в растворе ПВС на электрокинетический потенциал поверхности, коагуляционные взаимодействия полимеров и на свойства композитных криогелей ПВС-хитозан. В случае введения в криогель поливинилового спирата дисперсных частиц хитозана с разной степенью протонирования аминогрупп показатели механических свойств композита растут с увеличением степени ионизации аминополисахарида.

5) Показано, что криогели ПВС-хитозан могут быть использованы для эффективного удаления ионов Cu^{2+} из растворов сульфата меди и

кислотных текстильных красителей из их водных растворов. При концентрации CuSO_4 менее 5 ммоль/л (на 2 порядка выше ПДК) достигается практически полная степень извлечения ионов меди. Также полное поглощение красителей достигается уже при концентрации более, чем на 3 порядка превышающей ПДК, а при концентрации красителя на порядок превышающей ПДК 1 г биосорбента способен очистить 1000 л воды.

6) Показана возможность регенерации сорбента путем выдерживания в 5%-ном растворе NaCl , а сорбционная емкость криогеля сохранялась при 5 последовательных циклах сорбции – десорбции.

7) Изучение влияния экстрагируемых из матрикса веществ на жизнеспособность клеток показало отсутствие цитотоксичности всех исследуемых образцов, это открывает перспективы использования разработанных пористых криогелей для регенеративной медицины и тканевой инженерии.

Список литературы

1. Henderson T.M.A., Ladewig K., Haylock D.N., McLean K.M., O'Connor A.J. Cryogels for biomedical applications // *J. Mater. Chem. B.* – 2013. – № 1. – P. 2682–2695.
2. Лозинский В.И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения. // *Успехи химии.* – 2002. – Т. 71. – №. 6. – С. 559-585.
3. Nixon K.R., Lu T., Sell S.A. A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering Applications // *Acta Biomaterialia.* – 2017. – № 62. – P. 29–41.
4. Erdem A., Ngwabebhoh F.A., Yildiz U. Novel macroporous cryogels with enhanced adsorption capability for the removal of Cu(II) ions from aqueous phase: Modelling, kinetics and recovery studies // *Journal of Environmental Chemical Engineering.* – 2017. – V. 5. – № 1. – P. 1269-1280.
5. Lozinsky V.I. A Brief History of Polymeric Cryogels. // *Polymeric Cryogels.* – V. 263. – P. 1-48
6. Лозинский В.И. Криотропное гелеобразование растворов поливинилового спирта // *Успехи химии.* – 1998. – №67 (7). – С. 641-655.
7. Lozinsky V.I., Zubov A.L., Savina I.N., Plieva F.M. Study of Cryostructuration of Polymer Systems. XIV. Poly(vinyl alcohol) Cryogels: Apparent Yield of the Freeze–Thaw-Induced Gelation of Concentrated Aqueous Solutions of the Polymer // *Journal of Applied Polymer Science.* – 2000. – V. 77. – P.1822–1831.
8. Ma S., Wang S., Li Q., Leng Y., Wang L. and Hu G.H. A novel method for preparing poly (vinyl alcohol) hydrogels: preparation, characterization, and application // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 2017. – V.56. – P. 7971-7976.
9. Baimenov A., Berillo D.A., Pouloupoulos S.G., Inglezakis V.J. A review of cryogels synthesis, characterization and applications on the removal of

heavy metals from aqueous solutions // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2020. – V. 276. – P. 102088.

10. Santos A.M.N., Moreira A.P.D., Carvalho C.W.P., Luchese R., Ribeiro E., McGuinness G.B., Mendes M.F. and Oliveira R.N. Physically Cross-Linked Gels of PVA with Natural Polymers as Matrices for Manuka Honey Release in Wound-Care Applications // *Materials*. – 2019. – V. 12. – №. 4. – P. 559.

11. Mikhailov S.N., Zakharova A.N., Drenichev M.S., Ershov A.V., Kasatkina M.A., Vladimirov L.V., Novikov V.V. & Kildeeva N.R. Crosslinking of Chitosan with Dialdehyde Derivatives of Nucleosides and Nucleotides. Mechanism and Comparison with Glutaraldehyde // *Nucleosides, nucleotides and nucleic acids*. – 2016. – V. 35. – №. 3. – P. 114-129.

12. Tam R.Y, Fisher S.A., Baker A.E.G. and Shoichet M.S. Transparent Porous Polysaccharide Cryogels Provide Biochemically Defined, Biomimetic Matrices for Tunable 3D Cell Culture // *Chemistry of Materials* . – 2016. – V. 28. – №. 11. – P. 3762-3770.

13. Narayanan K.B., Han S.S. Dual-crosslinked poly(vinyl alcohol)/sodium alginate/silver nanocomposite beads – A promising antimicrobial material // *Food Chemistry* – 2017. – V. 234. – P. 103-110.

14. Jabli M., Baouab M.H.V., Sintès-Zydowicz N., Hassine B.B. Dye Molecules/Copper(II)/Macroporous Glutaraldehyde-Chitosan. Microspheres Complex: Surface Characterization, Kinetic, and Thermodynamic Investigations // *Journal of Applied Polymer Science* – 2012. – V. 123. – №. 6. – P. 3412-3424.

15. Труфакина Л.М., Петренко Т.В. Влияние температуры и наполнителя на свойства полимерных композиций на водной основе. // *Известия Томского политехнического университета* - 2010. - Т. 317. - № 3 – С. 131.

16. Bakhshpour M., Idil N., Percin I., Denizli A. Biomedical Applications of Polymeric Cryogels. // *Appl. Sci.* – 2019. –V. 9. - №3 – 553.

17. Велешко А.Н., Румянцева Е.В., Велешко И.Е. Исследование сорбционных свойств ковалентно-сшитого криогеля хитозана для извлечения 90 SR из солевых растворов // Экологические системы и приборы. – 2015. – №. 7. – С. 12-19.
18. Никоноров В.В., Иванов Р.В., Кильдеева Н.Р., Булатникова Л.Н., Лозинский В.И. Синтез и свойства криогелей хитозана, сшитого глутаровым альдегидом // Высокмолекулярные соединения. Серия А. – 2010. – Т. 52. – №. 8. – С. 1436-1443.
19. Hassan C.M., Peppas N.A. Cellular PVA Hydrogels Produced by Freeze/Thawing // Journal of Applied Polymer Science . – 2000. – V. 76. – №. 14. – P. 2075-2079.
20. Ceylan S., Göktürk D. and Bölgen N. Effect of crosslinking methods on the structure and biocompatibility of polyvinyl alcohol/gelatin cryogels // Bio-Medical Materials and Engineering. – 2016. – V. 27. – №. 4. – P. 327-340.
21. Laochai T., Mooltongchun M., Teepoo S. Design and construction of magnetic nanoparticles incorporated with a chitosan and poly (vinyl) alcohol cryogel and its application for immobilization of horseradish peroxidase // Energy Procedia. – 2016. – V. 89. – P. 248-254.
22. Lozinsky V.I., Damshkaln L.G., Kurochkin I.N., Kurochkin I.I. Study of Cryostructuring of Polymer Systems: 28. Physicochemical Properties and Morphology of Poly(vinyl alcohol) Cryogels Formed by Multiple Freezing–Thawing // Colloid Journal – 2008. – Т. 70. – №. 2. – С. 189-198.
23. Trieu H., Qutubuddin S. Poly (vinyl alcohol) hydrogels: 2. Effects of processing parameters on structure and properties // Polymer. – 1995. – V. 36. – №. 13. – P. 2531-2539.
24. Бакеева И.В., Орлова М.А., Лозинский В.И. Криогели поливинилового спирта, сформированные из растворов полимера в диметилсульфоксиде с добавками тетраметоксисилана // Тонкие химические технологии. – 2019. – Т. 14. – №. 2. – С. 41-50.

25. Pazos V., Mongrain R., Tardif J. C. Polyvinyl alcohol cryogel: optimizing the parameters of cryogenic treatment using hyperelastic models // Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. – 2009. – V. 2. – №. 5. – P. 542-549.
26. Wan W., Bannerman A.D., Yang L. and Mak H. Poly(Vinyl Alcohol) Cryogels for Biomedical Applications // Polymeric Cryogels. – 2014. – P. 283-321.
27. Abdel-Mohsen A.M., Aly A.S., Hrdina R., Montaser A.S., Hebeish A. Eco-Synthesis of PVA/Chitosan Hydrogels for Biomedical Application // Journal of Polymers and the Environment. – 2011. – V. 19. – №. 4. – P. 1005-1012.
28. Chaturvedi A., Bajpai A.K., Bajpai J. & Sharma A. Antimicrobial poly(vinyl alcohol) cryogel–copper nanocomposites for possible applications in biomedical fields // Designed Monomers and Polymers. – 2015. – V. 18. – №. 4. – P. 385-400.
29. Chhatri A., Bajpai J., Bajpai A.K. Designing polysaccharide-based antibacterial biomaterials for wound healing applications // Biomatter. – 2011. – V. 1. – №. 2. – P. 189-197.
30. Marin E., Rojas J. and Ciro Y. A review of polyvinyl alcohol derivatives: Promising materials for pharmaceutical and biomedical applications // African Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2014. – V. 8. – №. 24. – P. 674-684.
31. Butnaru E., Cheaburu C.N., Yilmaz O., Pricope G.M. and Vasile C. Poly(vinyl alcohol)/chitosan/ montmorillonite nanocomposites for food packaging applications: Influence of montmorillonite content // High Performance Polymers. – 2016. – V. 28. – №. 10. – P. 1124-1138.
32. Максимова С.Н. Хитозан как антимикробное и антиоксидантное средство в технологии продуктовиз гидробионтов // Известия ТИПРО (Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра). – 2012. – Т. 170.

33. Thomas J., Gomes K., Lowman A., Marcolongo M. The Effect of Dehydration History on PVA/PVP Hydrogels for Nucleus Pulposus Replacement // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* – 2004. – V. 69. – №. 2. – P. 135-140.
34. Stepanov N., Efremenko E. Immobilised cells of *Pachysolen tannophilus* yeast for ethanol production from crude glycerol // *New biotechnology.* – 2017. – V. 34. – P. 54-58.
35. Arcos-Arevalo A.J., Zavala-Arce R.E., Avila-Perez P., Garcia-Gaitan B., Garcia-Rivas J.L., Jiménez-Núñez M.L. Removal of Fluoride from Aqueous Solutions Using Chitosan Cryogels. // *Journal of Chemistry.* – V. 2016. – P. 13.
36. Chen Y., Ru J., Geng B., Wang H., Tong C., Du C., Wu S., Liu H. Charge-functionalized and mechanically durable composite cryogels from Q-NFC and CS for highly selective removal of anionic dyes. // *Carbohydrate polymers.* – 2017. – V. 174. – P. 841-848.
37. Алтунина Л.К., Сваровская Л.И., Ган-Эрдэнэ Т., Фуфаева М.С., Филатов Д.А., Батжаргал Ч., Баяржаргал М. Стабилизация выветриваемых почв и создание зеленого покрова из многолетних трав методом криоструктурирования // *Proceedings of the Mongolian Academy of Sciences.* – 2012. – V. 52. – №. 04. – P. 204.
38. Mishra R., Goel S.K., Gupta K.C., Kumar A. Biocomposite cryogels as tissue engineered biomaterials for regeneration of critical-sized cranial bone defects // *Tissue Engineering Part A.* – 2014. – V. 20. – №. 3-4. – P. 751-762.
39. Katsen-Globa A., Meiser I., Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I., Zimmermann H., Petrenko A.Y. Towards ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate–gelatin cryogel scaffolds // *J Mater Sci: Mater Med.* – 2014. – V. 25. – №. 3. – P. 857-871.

40. Konovalova M.V., Markov P.A., Durnev E.A., Kurek D.V., Popov S.V., Varlamov V.P. Preparation and biocompatibility evaluation of pectin and chitosan cryogels for biomedical application // *J Biomed Mater Res.* – 2017. - V. 105. - P 547–556.

41. Xia W., Liu W., Cui L., Liu Y., Zhong W., Liu D., Wu J., Chua K., Cao Y. Tissue Engineering of Cartilage with the Use of Chitosan-Gelatin Complex Scaffolds // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* – 2004. – V. 71. – №. 2. – P. 373-380.

42. Alisa Katsen-Globa, Ina Meiser. Yuriy A. Petrenko, Roman V. Ivanov, Vladimir I. Lozinsky, Heiko Zimmermann • Alexander Yu. Petrenko. Towards ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate–gelatin cryogel scaffolds // *J Mater Sci: Mater Med.* - (2014) 25:857–871
повтор №39

43. Yu X., Qian G., Chen S., Xu D., Zhao X., Du C. A tracheal scaffold of gelatin-chondroitin sulfate-hyaluronan-polyvinyl alcohol with orientated porous structure // *Carbohydrate polymers.* – 2017. – V. 159. – P. 20-28.

44. Bhattarai N., Gunn J., Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery // *Advanced drug delivery reviews.* – 2010. – V. 62. – №. 1. – P. 83-99.

45. Bordelon H., Biris A.S., Sabliov C.M. and Monroe W.T. Characterization of Plasmid DNA Location within Chitosan/PLGA/pDNA Nanoparticle Complexes Designed for Gene Delivery // *Journal of Nanomaterials.* – 2011. – T. 2011.

46. Parsa P., Paydayesh A., Davachi S.M. Investigating the effect of tetracycline addition on nanocomposite hydrogels based on polyvinyl alcohol and chitosan nanoparticles for specific medical applications // *International journal of biological macromolecules.* – 2019. – V. 121. – P. 1061-1069.

47. Senel S., Aksoy E.A. and Akca G. Application of Chitosan Based Scaffolds for Drug Delivery and Tissue Engineering in Dentistry // Marine-Derived Biomaterials for Tissue Engineering Applications. – Springer, Singapore. – 2019. – P. 157-178.
48. Prusty K. and Swain S.K. Chitosan-Based Nanobiocomposites for Wound-Healing Applications // Nanostructured Polymer Composites for Biomedical Applications. – Elsevier. – 2019. – P. 295-314.
49. Ahmed S., Ikram S. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing // Achievements in the life sciences. – 2016. – V. 10. – №. 1. – P. 27-37.
50. Xu H., Huang S., Wang J., Lan Y., Feng L., Zhu M., Xiao Y., Cheng B., Xue W., Guo R. Enhanced cutaneous wound healing by functional injectable thermo-sensitive chitosan-based hydrogel encapsulated human umbilical cord-mesenchymal stem cells // International journal of biological macromolecules. – 2019. – V. 137. – P. 433-441.
51. Hashimoto M., Morimoto M., Saimoto H., Shigemasa Y., Yanagie H., Eriguchi M., Sato T. Gene transfer by DNA/mannosylated chitosan complexes into mouse peritoneal macrophages // Biotechnology letters. – 2006. – T. 28. – №. 11. – C. 815-821.
52. Hashimoto M., Morimoto M., Saimoto H., Shigemasa Y. and Sato T. Lactosylated Chitosan for DNA Delivery into Hepatocytes: The Effect of Lactosylation on the Physicochemical Properties and Intracellular Trafficking of pDNA/Chitosan Complexes // Bioconjugate chemistry. – 2006. – V. 17. – №. 2. – P. 309-316.
53. Liu L., Gao Q., Lu X., Zhou H. In-situ forming hydrogels based on chitosan for drug delivery and tissue regeneration // Asian journal of pharmaceutical sciences. – 2016. – V. 11. – №. 6. – P. 673-683.
54. Pistone A., Iannazzo D., Celesti C., Piperopoulos E., Ashok D., Cembran A., Tricoli A. and Nisbet D. Engineering of Chitosan-Hydroxyapatite-

Magnetite Hierarchical Scaffolds for Guided Bone Growth // *Materials*. – 2019. – V. 12. – №. 14. – P. 2321.

55. Konovalova M.V., Markov P.A., Durnev E.A., Kurek D.V., Popov S.V., Varlamov V.P. Preparation and biocompatibility evaluation of pectin and chitosan cryogels for biomedical application // *J Biomed Mater Res*. - 2017 – V. 105. - №2. – P. 547–556.

56. Королева В.А., Холявка М.Г., Сазыкина С.М., Ольшанникова С.С., Артюхов В.Г. Исследование сорбционной емкости кислоторастворимых хитозанов по отношению к бычьему сывороточному альбумину // *Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация*. – 2015 – № 4 – С. 85

57. Pakdel P.M., Peighambaroust S.J. Review on recent progress in chitosan-based hydrogels for wastewater treatment application // *Carbohydrate polymers*. – 2018. – V. 201. – P. 264-279.

58. Xue X., Li L., He J. The performances of carboxymethyl chitosan in wash-off reactive dyeings // *Carbohydrate Polymers*. – 2009. – V. 75. – №. 2. – P. 203-207.

59. Липатова И.М., Мезина Е.А., Юсова А.А. Спектрофотометрическое исследование комплексообразования хитозана с фталоцианиновыми красителями. // *Известия Уфимского научного центра РАН*. – 2016. – №. 3-1. – С. 53-55.

60. Кузнецов В.В., Михеева Е.Н., Ляшенко С.Е., Колесников А.В. Электрохимическое окисление сточных вод анилинокрасочной промышленности на примере удаления из них красителя прямого оранжевого 2Ж // *Вода: химия и экология*. – 2013. – №. 3. – С. 33-36.

61. Vakili M., Rafatullah M., Salamatinia B., Abdullah A.Z., Ibrahim M.H., Tan K.B., Gholami Z., Amouzgar P. Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dyeremoval from water and wastewater: A Review // *Carbohydrate polymers*. – 2014. – Т. 113. – С. 115-130.

62. Ranjha N.M., Khan S. Chitosan/Poly (vinyl alcohol) Based Hydrogels for Biomedical Applications: A Review // *J. Pharm. Altern. Med.* – 2013. – V. 2. – №. 1. – P. 30-41.
63. Ma J., Zhou G., Chu L., Liu Y., Liu C., Luo S. and Wei Y. Efficient Removal of Heavy Metal Ions with An EDTA Functionalized Chitosan/Polyacrylamide Double Network Hydrogel // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering.* – 2017. – V. 5. – №. 1. – P. 843-851.
64. Perumal S., Atchudan R., Yoon D.H., Joo J. and Cheong I.W. Spherical Chitosan/Gelatin Hydrogel Particles for Removal of Multiple Heavy Metal Ions from Wastewater // *Industrial & Engineering Chemistry Research.* – 2019. – V. 58. – №. 23. – P. 9900-9907.
65. Jin L. and Bai R. Mechanisms of Lead Adsorption on Chitosan/PVA Hydrogel Beads. // *Langmuir.* – 2002. – V. 18. – №. 25. – P. 9765-9770.
66. Wang J., Chen C. Chitosan-based biosorbents: Modification and application for biosorption of heavy metals and radionuclides // *Bioresource Technology.* – 2014. – V. 160. – P. 129-141.
67. Veleshko I.E., Nikonorov V.V., Veleshko A.N., Rumyantseva E.V., Mikhailov S.N., Lozinskii V.I., Ivanov R.V., Gal'braikh L.S. and Kil'deeva N.R. Sorption of Eu(III) from solutions of covalently cross-linked chitosan cryogels // *Fibre Chemistry.* – 2011. – V. 42. – №. 6. – P. 364.
68. Lozinsky V.I., Plieva F.M., Galaev I.Y., Mattiasson B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation // *Bioseparation.* – 2001. – V. 10. – №. 4. – P. 163-188.
69. Lozinsky V.I., Zubov A.L., Savina I.N., Plieva F.M. Study of Cryostructuration of Polymer Systems. XIV. Poly(vinyl alcohol) Cryogels: Apparent Yield of the Freeze–Thaw-Induced Gelation of Concentrated Aqueous Solutions of the Polymer // *Journal of applied polymer science.* – 2000. – V. 77. – №. 8. – P. 1822-1831.
70. Thönes S., Kutz L.M., Oehmichen S., Becher J., Heymann K., Saalbach A., Knolle W., Schnabelrauch M., Reichelt S., Anderegg U. New E-

beam-initiated hyaluronan acrylate cryogels support growth and matrix deposition by dermal fibroblasts // International journal of biological macromolecules. – 2017. – V. 94. – P. 611-620.

71. Dinu M.V., Dinu I.A., Lazar M.M., Dragan E.S. Chitosan-based ion-imprinted cryo-composites with excellent selectivity for copper ions // Carbohydrate polymers. – 2018. – V. 186. – P. 140-149.

72. Thomas J., Lowman A., Marcolongo M. Novel associated hydrogels for nucleus pulposus Replacement. // Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2003. – V. 67. – №. 4. – P. 1329-1337.

73. Никоноров В.В., Иванов Р.В., Кильдеева Н.Р., Булатникова Л.Н., Лозинский В.И. Синтез и свойства криогелей хитозана, сшитого глутаровым альдегидом. // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2010. – V. 52. – №. 8. – P. 1436-1443.

74. Dragan E.S., Humelnicu D., Dinu M.V., Olariu R.I. Kinetics, equilibrium modeling, and thermodynamics on removal of Cr(VI) ions from aqueous solution using novel composites with strong base anion exchanger microspheres embedded into chitosan/poly(vinyl amine) cryogels // Chemical Engineering Journal. – 2017. – V. 330. – P. 675-691.

75. Kil'deeva N.R., Veleshko I.E., Vladimirov L.V., Nikonorov V.V., Lozinskii V.I., Ivanov R.V., Perminov P.A. and Mikhailov S.N. Modification of chitosan cryogels by pyridoxal phosphate to improve sorption capacity // Fibre Chemistry. – 2012. – V. 43. – №. 6. – P. 426-432.

76. Сафронова Т.М., Максимова С.Н., Быканова О.Н., Шкрёба Е.Н. Влияние температурных параметров на лечебно-профилактические свойства хитозана // Научные труды Дальрыбвтуза. – 2007. – Т. 19.

77. Niknia N., Kadkhodae R. Factors affecting microstructure, physicochemical and textural properties of a novel Gum tragacanth-PVA blend cryogel // Carbohydrate polymers. – 2017. – V. 155. – P. 475-482.

78. Savina I.N., Hanora A., Plieva F.M., Galaev I.Y., Mattiasson B., Lozinsky V.I. Cryostructuration of polymer systems. XXIV. Poly(vinyl alcohol) cryogels filled with particles of a strong anion exchanger: properties of the composite materials and potential applications // *Journal of applied polymer science*. – 2005. – T. 95. – №. 3. – C. 529-538.
79. Stamate M.I., Ochiuz L., Timofte D., Ciuntu B., Ghiciuc C., Gherman S., Stefanache A., Stamate C. Preparation and pharmaco-mechanical characterization of ketoprofen - polyvinyl alcohol cryogel for medical applications // *REVISTA DE CHIMIE*. – 2019. – V. 70. – №. 3. – P. 848-852.
80. Vrana N.E., Liu Y., McGuinness G.B., Cahill P.A. Characterization of Poly(vinyl alcohol)/Chitosan hydrogels as vascular tissue engineering scaffolds // *Macromolecular symposia*. – Weinheim : WILEY-VCH Verlag. – 2008. – V. 269. – №. 1. – P. 106-110.
81. Farzinfar E; Paydayesh A. Investigation of polyvinyl alcohol nanocomposite hydrogels containing chitosan nanoparticles as wound dressing // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. – 2019. – V. 68. – №. 11. – P. 628-638.
82. Mathews D.T., Birney Y.A., Cahill P.A., McGuinness G.B. Vascular cell viability on polyvinyl alcohol hydrogels modified with water-soluble and -insoluble chitosan // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2008. – V. 84. – №. 2. – P. 531-540.
83. E. A. Phelps, A. J. García, Engineering more than a cell: vascularization strategies in tissue engineering // *Current opinion in biotechnology*. – 2010. – V. 21. – №. 5. – P. 704-709.
84. Dainiak M.B., Kumar A., Galaev I.Y. and Mattiasson B., Detachment of affinity-captured bioparticles by deformation macroporous hydrogel // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – V. 103. – №. 4. – P. 849-854.

85. Savina I.N., Hanora A., Plieva F.M., Galaev I.Y., Lozinsky V.I. Mattiasson B. Cryostructuring of polymer systems. XXIV. Poly(vinyl alcohol) cryogels filled with particles of a strong anion Exchanger: Properties of the Composite Materials and Potential Applications // Journal of applied polymer science. – 2005. – V. 95. – №. 3. – P. 529-538.
86. Ricciardi R., Auriemma F., Rosa C.D. and Laupretre F. X-ray diffraction analysis of poly(vinyl alcohol) hydrogels, obtained by freezing and thawing techniques // Macromolecules. – 2004. – Т. 37. – №. 5. – С. 1921-1927.
87. Кулиш Е.И., Чернова В.В., Володина В.П., Колесов С.В. Ферментативное разложение пленочных покрытий на основе хитозана // Материаловедение. – 2008. – №. 7. – С. 36-40.
88. Thomas J., Gomes K., Lowman A., Marcolongo M. The effect of dehydration history on PVA/PVP hydrogels for nucleus pulposus replacement // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2004. – V. 69. – №. 2. – P. 135-140.
89. Lozinsky V.I., Zubov A.L., Savina I.N., Plieva F.M. Study of cryostructuring of polymer systems. XIV. Poly(vinyl alcohol) cryogels: apparent yield of the freeze–thaw-induced gelation of concentrated aqueous solutions of the polymer // Journal of applied polymer science. – 2000. – V. 77. – №. 8. – P. 1822-1831.
90. Lozinsky V.I., Damshkaln L.G., Shaskol'skii B.L., Babushkina T.A., Kurochkin I.N., Kurochkin I.I. Study of cryostructuring of polymer systems: 27. Physicochemical properties of Poly(vinyl alcohol) cryogels and specific features of their macroporous morphology // Colloid Journal. – 2007. – V. 69. – №. 6. – P. 747-764.
91. Hassan C.M. and Peppas N.A. Structure and morphology of freeze/thawed PVA hydrogels // Macromolecules. – 2000. – V. 33. – №. 7. – P. 2472-2479.

92. Ricciardi R., Auriemma F., De Rosa C., Lauprêtre F. X-ray Diffraction Analysis of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels, Obtained by Freezing and Thawing Techniques // *Macromolecules*. – 2004. – V. 37. – №. 5. – P. 1921-1927.
93. Ricciardi R., Auriemma F., Gaillet C., De Rosa C., Lauprêtre F. Investigation of the Crystallinity of Freeze/Thaw Poly(vinyl alcohol) Hydrogels by Different Techniques // *Macromolecules*. – 2004. – V. 37. – №. 25. – P. 9510-9516.
94. Лозинский В.И. Криотропное гелеобразование растворов поливинилового спирта // *Успехи химии*. – 1998. – Т. 67. – №. 7. – С. 641-655.
95. Pazosa V., Mongrain R., Tardif J.C. Polyvinyl alcohol cryogel: Optimizing the parameters of cryogenic treatment using hyperelastic models // *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. – 2009. – V. 2. – №. 5. – P. 542-549.
96. Arteaga-Marrero N., Villa E., González-Fernández J., Martín Y., Ruiz-Alzola J. Polyvinyl alcohol cryogel phantoms of biological tissues for wideband operation at microwave frequencies // *Plos one*. – 2019. – V. 14. – №. 7. – P. e0219997.
97. Choodum A., Kanatharana P., Wongniramaikul W., NicDaeid N. Poly vinyl alcohol cryogel as a elective test kit for pre and post blasttrinitrotoluene // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2016. – V. 222. – P. 654-662.
98. Hixon K.R., Lu T., Sell S.A.. A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering Applications // *Acta biomaterialia*. – 2017. – V. 62. – P. 29-41.
99. Baimenov A., Berillo D.A., Pouloupoulos S.G., Inglezakis, V.J. A review of cryogels synthesis, characterization and applications on the removal of heavy metals from aqueous solutions // *Advances in colloid and interface science*. – 2020. – V. 276. – P. 102088.

100. Пушкаръ Н.С., Белоус А.М., Иткин Ю.А., Вишнеvский В.И., Розанов Л.Ф. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах // К.: Наук, думка. – 1997.

101. Lozinsky V.I., Damshkaln L.G., Kurochkin I.N., Kurochkin I.I. Study of Cryostructuring of Polymer Systems: 28. Physicochemical Properties and Morphology of Poly(vinyl alcohol) Cryogels Formed by Multiple Freezing–Thawing // Colloid journal. – 2008. – Т. 70. – №. 2. – С. 189-198.

102. Trieu H., Qutubuddin S. Poly(vinyl alcohol) hydrogels: 2. Effects of processing parameters on structure and properties // Polymer. – 1995. – Т. 36. – №. 13. – С. 2531-2539.

103. Watase M. // Nippon Kagaku Kaisi – 1983 – №7. – P. 973 [цитируется по 94].

104. Watase M. // Nippon Kagaku Kaisi – 1983 – №9. – P. 1254 [цитируется по 94].

105. Watase M., Nishinari. // Makromol. Chem. – 1989–V.190– P.155 [цитируется по 94].

106. Пат. 58-215424. // Chem. Abstr. – Япония -1984 – 100 – 109154 [цитируется по 94].

107. Гуль В.Е., Булатникова Л.И., Беvляцкая О.Н., Ермакова Е.В., Лыкова Л.Б. Влияние криолиза на структуру жесткоцепных полимеров // Высокомол. Соединения. – 1976. – №18А – С. 118-121.

108. Wan W.K., Campbell G., Zhang Z.F., Hui A.J., Boughner D.R. Optimizing the tensile properties of polyvinyl alcohol hydrogel for the construction of a bioprosthetic heart valve stent // Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of the Society for Biomaterials, the Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2002. – V. 63. – №. 6. – P. 854-861.

109. Thomas J., Lowman A., Marcolongo M. Novel associated hydrogels for nucleus pulposus replacement // Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese

Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2003. – V. 67. – №. 4. – P. 1329-1337.

110. Trieu H., Qutubuddin S. Poly (vinyl alcohol) hydrogels: 2. Effects of processing parameters on structure and properties //Polymer. – 1995. – V. 36. – №. 13. – P. 2531-2539.

111. Hassan C.M., Peppas N.A. Structure and morphology of freeze/thawed PVA hydrogels //Macromolecules. – 2000. – V. 33. – №. 7. – P. 2472-2479.

112. Hassan C.M., Peppas N.A. Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods //Biopolymers: PVA hydrogels, anionic polymerisation nanocomposites. – 2000. – P. 37-65.

113. Hyon S.H., Ikada Y. Porous and transparent poly (vinyl alcohol) gel and method of manufacturing the same : пат. 4663358 США. – 1987.

114. Wang J., Gao C., Zhang Y., Wan Y. Preparation and in vitro characterization of BC/PVA hydrogel composite for its potential use as artificial cornea biomaterial // Materials Science and Engineering: C. – 2010. – V. 30. – №. 1. – P. 214-218.

115. Briscoe B., Luckham P., Zhu S. The effects of hydrogen bonding upon the viscosity of aqueous poly (vinyl alcohol) solutions // Polymer. – 2000. – V. 41. – №. 10. – P. 3851-3860.

116. Nugent M, Hanley A, Tomkins P, Higginbotham C. Investigation of a novel freeze-thaw process for the production of drug delivery hydrogels // Journal of materials science: materials in medicine. – 2005. – V. 16. – №. 12. – P. 1149-1158.

117. Бакеева И.В., Орлова М.А., Лозинский В.И. Криогели поливинилового спирта, сформированные из растворов полимера в диметилсульфоксиде с добавками тетраметоксисилана // Тонкие химические технологии. – 2019. – Т. 14. – №. 2. – С. 41-50.

118. Hixon K.R., Lu T., Sell S.A. A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications // *Acta biomaterialia*. – 2017. – V. 62. – P. 29-41.

119. Yokoyama F., Masada I., Shimamura K., Ikawa T., Monobe K. Morphology and structure of highly elastic poly (vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting // *Colloid and Polymer Science*. – 1986. – V. 264. – №. 7. – P. 595-601.

120. Lozinsky V.I., Damshkaln L.G., Kurochkin I.N., Kurochkin I.I. Study of cryostructuring of polymer systems: 28. Physicochemical properties and morphology of poly (vinyl alcohol) cryogels formed by multiple freezing-thawing // *Colloid journal*. – 2008. – V. 70. – №. 2. – P. 189-198.

121. Ricciardi R., Auriemma F., De Rosa C., Lauprêtre F. X-ray diffraction analysis of poly (vinyl alcohol) hydrogels, obtained by freezing and thawing techniques // *Macromolecules*. – 2004. – V. 37. – №. 5. – P. 1921-1927.

122. Mahdavinia G.R., Hosseini R., Darvishi F., Sabzi M. The release of cefazolin from chitosan/polyvinyl alcohol/sepiolite nanocomposite hydrogel films // *Iranian Polymer Journal*. – 2016. – V. 25. – №. 11. – P. 933-943.

123. Thomas J., Lowman A., Marcolongo M. Novel associated hydrogels for nucleus pulposus replacement // *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2003. – V. 67. – №. 4. – P. 1329-1337.

124. Savina I.N., Lozinskii V.I. Study of cryostructuring of polymer systems: 23. composite poly (vinyl alcohol) cryogels filled with dispersed particles containing ionogenic groups // *Colloid Journal*. – 2004. – V. 66. – №. 3. – P. 343-350.

125. Yu H., Xu X., Chen X., Hao J., Jing X. Medicated wound dressings based on poly (vinyl alcohol)/poly (N-vinyl pyrrolidone)/chitosan hydrogels // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2006. – V. 101. – №. 4. – P. 2453-2463.

126. Труфакина Л. М. Свойства полимерных композитов на основе поливинилового спирта // Известия Томского политехнического университета. Инжиниринг георесурсов. – 2014. – Т. 325. – №. 3.

127. Wang L.Y., Wang M.J. Removal of heavy metal ions by poly (vinyl alcohol) and carboxymethyl cellulose composite hydrogels prepared by a freeze–thaw method // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. – 2016. – V. 4. – №. 5. – P. 2830-2837.

128. Păduraru O.M., Ciolacu D., Darie R.N., Vasile C. Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol/cellulose cryogels and their testing as carriers for a bioactive component // Materials Science and Engineering: C. – 2012. – V. 32. – №. 8. – P. 2508-2515.

129. Guhadós G., Wan W., Hutter J. L. Measurement of the elastic modulus of single bacterial cellulose fibers using atomic force microscopy // Langmuir. – 2005. – V. 21. – №. 14. – P. 6642-6646.

130. Wan W., Bannerman A.D., Yang L., Mak H. Poly (vinyl alcohol) cryogels for biomedical applications // Polymeric Cryogels. – 2014. – P. 283-321.

131. Millon L. E., Wan W. K. The polyvinyl alcohol–bacterial cellulose system as a new nanocomposite for biomedical applications // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2006. – V. 79. – №. 2. – P. 245-253.

132. Wang J., Gao C., Zhang Y., Wan Y. Preparation and in vitro characterization of BC/PVA hydrogel composite for its potential use as artificial cornea biomaterial // Materials Science and Engineering: C. – 2010. – V. 30. – №. 1. – P. 214-218.

133. Kil'deeva N.R., Veleshko I.E., Vladimirov L.V., Nikonorov V.V., Lozinskii V.I., Ivanov R.V., Perminov P.A., Mikhailov S.N. Modification of chitosan cryogels by pyridoxal phosphate to improve sorption capacity // Fibre Chemistry. – 2012. – V. 43. – №. 6. – P. 426-432.

134. Цветкова Е.А., Ухарцева И.Ю., Зотов С.В., Овчинников К.В., Гольдаде В.А., Кадолич Ж.В. Материал для эндопротеза кровеносного сосуда на основе высокомолекулярных соединений // Вестник Казанского технологического университета. – 2016. – Т. 19. – №. 20.
135. Xiao C., Gao F., Gao Y. Controlled preparation of physically crosslinked chitosan-g-poly (vinyl alcohol) hydrogel // Journal of applied polymer science. – 2010. – V. 117. – №. 5. – P. 2946-2950.
136. Ahmad M., Manzoor K., Chaudhuri R.R., Ikram S. Thiocarbonyl cross-linked oxidized chitosan and poly (vinyl alcohol): a green framework as efficient Cu (II), Pb (II), and Hg (II) adsorbent // Journal of Chemical & Engineering Data. – 2017. – V. 62. – №. 7. – P. 2044-2055.
137. Yu H., Xu X., Chen X., Hao J., Jing X. Medicated wound dressings based on poly (vinyl alcohol)/poly (N-vinyl pyrrolidone)/chitosan hydrogels // Journal of Applied Polymer Science. – 2006. – V. 101. – №. 4. – P. 2453-2463.
138. Duarte M. S. N. Cryogel composites for cadmium removal: evaluating combinations and adsorption by molecularly imprinted polymers. – 2012.
139. Figueroa-Pizano M.D., Vélaz I., Penas F.J., Zavala-Rivera P., Rosas-Durazo A.J., Maldonado-Arce A.D., Martínez-Barbosa M.E. Effect of freeze-thawing conditions for preparation of chitosan-poly (vinylalcohol) hydrogels and drug release studies // Carbohydrate polymers. – 2018. – V. 195. – P. 476-485.
140. Pamfil D., Butnaru E., Vasile C. Poly (vinyl alcohol)/chitosan cryogels as PH responsive ciprofloxacin carriers // Journal of Polymer Research. – 2016. – V. 23. – №. 8. – P. 1-14.
141. Croisier F., Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering // European polymer journal. – 2013. – V. 49. – №. 4. – P. 780-792.
142. Bisen D.S., Bhatt R., Bajpai A.K., Bajpai R., Katare R. Reverse indentation size effects in gamma irradiated blood compatible blend films of chitosan-poly (vinyl alcohol) for possible medical applications // Materials Science and Engineering: C. – 2017. – V. 71. – P. 982-993.

143. Бузинова Д. А., Шиповская А. Б. Сорбционные и бактерицидные свойства пленок хитозана // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2008. – Т. 8. – №. 2.
144. Croisier F., Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering // European polymer journal. – 2013. – V. 49. – №. 4. – P. 780-792.
145. Ahmed S., Ikram S. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing // Achievements in the life sciences. – 2016. – V. 10. – №. 1. – P. 27-37.
146. Julkapli N. M., Ahmad Z., Akil H. M. Preparation and characterization of 1, 2, 4, 5-benzenetetra carboxylic-chitosan // e-Polymers. – 2010. – V. 10. – №. 1. – P. 077.
147. Kamiński W., Modrzejewska Z. Application of chitosan membranes in separation of heavy metal ions // Separation science and technology. – 1997. – V. 32. – №. 16. – P. 2659-2668.
148. Mahdavinia G.R., Hosseini R., Darvishi F., Sabzi M. The release of cefazolin from chitosan/polyvinyl alcohol/sepiolite nanocomposite hydrogel films // Iranian Polymer Journal. – 2016. – V. 25. – №. 11. – P. 933-943.
149. Vrana N.E., Liu Y., McGuinness G.B., Cahill P.A. Characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan hydrogels as vascular tissue engineering scaffolds // Macromolecular symposia. – Weinheim : WILEY-VCH Verlag. – 2008. – V. 269. – №. 1. – P. 106-110.
150. Muhd Julkapli N., Akil H. M., Ahmad Z. Preparation, properties and applications of chitosan-based biocomposites/blend materials: a review // Composite Interfaces. – 2011. – V. 18. – №. 6. – P. 449-507.
151. Ranjha N. M., Khan S. Chitosan/poly (vinyl alcohol) based hydrogels for biomedical applications: a review // J. Pharm. Altern. Med. – 2013. – V. 2. – №. 1. – P. 30-41.
152. Ranjha N. M., Khan S. Chitosan/poly (vinyl alcohol) based hydrogels for biomedical applications: a review // J. Pharm. Altern. Med. – 2013. – V. 2. – №. 1. – P. 30-41.

153. Schmuhl R., Krieg H.M., Keizer K. Adsorption of Cu (II) and Cr (VI) ions by chitosan: Kinetics and equilibrium studies // *Water Sa.* – 2001. – V. 27. – №. 1. – P. 1-8.

154. Petrova Y.S., Pestov A.V., Neudachina L.K. Dynamics of the sorption of copper (II) and silver (I) by materials based on sulfoethylchitosan with various degrees of crosslinking // *Russian Journal of Physical Chemistry A.* – 2017. – V. 91. – №. 4. – P. 766-770.

155. Habiba U., Joo T.C., Siddique T.A., Salleh A., Ang B.C., Afifi A.M. Effect of degree of deacetylation of chitosan on adsorption capacity and reusability of chitosan/polyvinyl alcohol/TiO₂ nano composite // *International journal of biological macromolecules.* – 2017. – V. 104. – P. 1133-1142.

156. Xiao M., Hu J. Cellulose/chitosan composites prepared in ethylene diamine/potassium thiocyanate for adsorption of heavy metal ions // *Cellulose.* – 2017. – V. 24. – №. 6. – P. 2545-2557.

157. He G., Zheng H., Xiong F. Preparation and swelling behavior of physically crosslinked hydrogels composed of poly (vinyl alcohol) and chitosan // *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* – 2008. – V. 23. – №. 6. – P. 816-820.

158. Koningsveld R. Phase equilibria and phase separation proceedings of the 5th polymer meeting point at the university of Essex. Phase equilibria and phase separation // *J. Polym. Int.* – 1975. – V. 7. - №6 – P. 435-458.

159. Polyakov V.I., Grinberg V.Ya., Tolstoguzov V.B. Application of phase-volume-ratio method for determining the phase diagram of water-casein-soybean globulins system // *Polym. Bull.* - 1980. - V. 2. - P. 757-760.

160. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия. // пер с англ. М.: Мир. - 1982. – С. 329. [Smith A. Applied Infrared Spectroscopy. // N.Y.: Wiley. - 1967. – P. 341.]

161. Podorozhko E.A., Lunev I.A., Ryabev A.N., Kil'deeva N.R., Lozinsky V.I. A study of cryostructuring of a polymer system. 39. Poly(vinyl

alcohol) composite cryogels filled with chitosan microparticles. // *Colloid Journal*. – 2015. – V. 77. – P. 186–195.

162. Lozinsky V.I., Damshkahn L.G., Ezernitskaya M.G., Glotovab Y.K. and Antonov Y.A. Cryostructuring of polymer systems. Wide pore poly(vinyl alcohol) cryogels prepared using a combination of liquid–liquid phase separation and cryotropic gel-formation processes. // *Soft Matter*, 2012,8, 8493-8504

163. Antonov Y.A., Grinberg V.Y., Tolstoguzov V.B. Phasengleichgewichte in Wasser/Eiweiß/Polysaccharid-Systemen. 1. Systeme Wasser/Casein/saures Polysaccharid // *Starch – Stärke*. - 1975. - V. 27. - P. 424.

164. Jegal J., Lee K.H. Nanofiltration membranes based on poly(vinyl alcohol) and ionic polymers. // *J. Appl. Polym. Sci.* – 1999 - №72 – P. 1755–1762.

165. Haijun Y., Xiaoyi X., Xuesi C., Jingquan H., Xiabin J. Medicated Wound Dressings Based on Poly(vinyl alcohol) / Poly (N-vinyl pyrrolidone) / Chitosan Hydrogels // *Journal of Applied Polymer Science* – 2006 - V. 101 – P. 2453-2463.

166. Лозинский В.И., Вакула А.С., Зубов А.Л. Применение криогелей поливинилового спирта в биотехнологии. IV. Обзор литературных данных // *Биотехнология*. – 1992. – №. 4. – С. 5-14.

167. Lozinsky V. I., Plieva F. M. Poly (vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments // *Enzyme and microbial technology*. – 1998. – V. 23. – №. 3-4. – P. 227-242.

168. Bacheva A.V., Plieva F.M., Lysogorskaya E.N., Filippova I.Y., Lozinsky V.I. Peptide synthesis in organic media with subtilisin 72 immobilized on poly (vinyl alcohol)-cryogel carrier // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2001. – V. 11. – №. 8. – P. 1005-1008.

169. Wan W., Bannerman A.D., Yang, L., Mak, H. Poly (vinyl alcohol) cryogels for biomedical applications // *Polymeric Cryogels*. – 2014. – P. 283-321.

170. Surry K.J.M., Austin H.J.B., Fenster A., Peters T.M. Poly (vinyl alcohol) cryogel phantoms for use in ultrasound and MR imaging // *Physics in Medicine & Biology*. – 2004. – V. 49. – №. 24. – P. 5529.
171. Watase M., Nishinari // *Makromol. Chem.* – 1989–V. 190– P.155 [по 1]
172. Khalid M.N., Ho L., Agnely F., Grossiord J.L., Couarraze G. Swelling properties and mechanical characterization of a semi-interpenetrating chitosan/polyethylene oxide network: comparison with a chitosan reference gel // *STP pharma sciences*. – 1999. – V. 9. – №. 4. – P. 359-364.
173. Watase M. // *Nippon Kagaku Kaisi* – 1983 – P. 1254 [по 1].
174. Wang M.Z., Qiang J.C., Fangm Y., Hu D.D., Cui Y.L., Fu X.G. Preparation and properties of chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) semi-IPN hydrogels // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* – 2000. – №38 – P. 474–481.
175. Кильдеева Н.Р., Михайлов С.Н. Хитозан // Ред. К.Г. Скрыбин, С.Н. Михайлов, В.П. Варламов. М.: Центр «Биоинженерия» РАН – 2013. – С. 271-307.
176. Румянцева Е.В., Вихорева Г.А., Кильдеева Н.Р., Неборако А.А., Сараева Е.Ю., Гальбрайт Л.С. Сорбция ионов меди гранулированным хитозаном // *Химические волокна*. – 2006 – №2 – С. 126-130.
177. He P., Davis S.S., Illum L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres // *Int. J. Pharm.* – 1998 - №. 166 – P. 75–88.
178. Подорожко Е.А., Ульябаева Г.Р., Кильдеева Н.Р., Тихонов В.Е., Лозинский В.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. Комплексные и композитные криогели поливинилового спирта, содержащие соответственно, растворимую и нерастворимую формы хитозана // *Колл. ж.* – 2016. – Т. 78. – №. 1. – С. 75.
179. Никоноров В.В., Иванов Р.В., Кильдеева Н.Р., Булатникова Л.Н., Лозинский В.И. Синтез криогелей хитозана, сшитого глутаровым альдегидом, и изучение их свойств // *Высокомолек. соед. Серия А*. – 2009 – Т. 52 – №. 8 – С. 1436-1443.

180. Подорошко Е.А., Ульябаева Г.Р., Кильдеева Н.Р., Тихонов В.Е., Антонов Ю.А., Журавлева И.Л., Лозинский В.И. // Колл. ж. – 2016. – Т. 78. – С. 75.
181. Von Hippel P., Schleich T. In Structure and Stability of Biological Macromolecules. SN Timasheff and G // Marcel Dekker. – 1969. – P. 417.
182. Lozinsky V. I., Zubov A. L., Titova E. F. Swelling behavior of poly (vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization // Enzyme and microbial technology. – 1996. – V. 18. – №. 8. – P. 561-569.
183. Дехант И., Данц Р., Киммер В., Шмольке Р. Инфракрасная спектроскопия полимеров: Пер. с нем. – Химия, 1976. [Dechant, J., Danz, R., Kimmer, W., Schmolke, R. // Ultrarotspektroskopische Untersuchungen an Polymeren. Berlin: Akademie-Verlag, 1972, 516.
184. Смит А., Тарасевич Б.Н. Прикладная ИК-спектроскопия: Основы, техника, аналитическое применение: Пер. с англ. – Мир, 1982. [Smith A. // Applied Infrared Spectroscopy, N.Y.: Wiley. 1967. 341 p.].
185. Wang H.F., Li W., Lu Y., Wang Z. Studies on chitosan and poly(acrylic acid) interpolymers. I. Preparation, structure, pH-sensitivity and salt sensitivity of complex-forming poly(acrylic acid): chitosan semi-interpenetrating polymer network // J. Appl. Polym. Sci. – 1997. – №. 65. – P. 1445–1450.
186. Manero J., Filbey J., Boderke P. Nanoparticles, method for their preparation and their use for applying bioactive materials. - Patent DE -1999 - 19810965.
187. Kim J.H., Kim J.Y., Lee M.Y., Kim K.Y. Properties and swelling characteristics of cross-linked poly(vinyl alcohol)/chitosan blend membrane // J. Appl. Polym. Sci. – 1992. – №. 45. – P. 1711–1717.
188. Bellamy L. The infra-red spectra of complex molecules. – Springer Science & Business Media, 2013.
189. Pritchard J. G. Poly (vinyl alcohol): basic properties and uses. – Gordon and Breach. – 1970.

190. Lee S.J., Kim S.S., Lee Y.M. Interpenetrating polymer network hydrogels based on poly(ethylene glycol) macromer and chitosan // *Carbohydr. Polym.* – 2000. – №. 41. – P. 197–205.
191. Shahabeddin L., Damour O., Berthod F., Rousselle P., Saintigny G., Collombel C. Reconstructed skin from co-cultured human keratinocytes and fibroblasts on chitosan crosslinked collagen-GAG matrix // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 1991. – №. 2. – P. 222–226.
192. Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Домотенко Л.В., Блюменфельд А.Л., Рогов В.В., Барковская Е.Н., Рогожин С.В. // *Коллоид. журн.* – 1989. – Т. 51. – С. 685.
193. Подорошко Е.А., Ульябаева Г.Р., Тихонов В.Е., Кильдеева Н.Р., Лозинский В.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 53." аномальный" характер изменения свойств хитозансодержащих композитных криогелей поливинилового спирта в результате многократного замораживания–оттаивания // *Коллоидный журнал.* – 2020. – Т. 82. – №. 1. – С. 47-60.
194. Muzzarelli R.A.A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids // *Carbohydrate Polymers.* – 2009. – V. 77. – №. 1. – P. 1-9.
195. Crini G. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review. // *Bioresource technology.* - 2006. - V.97. - №. 9. – P.1061-1085.
196. Robinson T., Chandran B., Nigam P. Removal of dyes from a synthetic textile dye effluent by biosorption on apple pomace and wheat straw. // *Water research.* - 2002. - V.36. - №. 11. – P.2824-2830.
197. Bhullar N., Kumari K., Sud D. A biopolymer-based composite hydrogel for rhodamine 6G dye removal: its synthesis, adsorption isotherms and kinetics. // *Iranian Polymer J.* - 2018. - V.27. - №. 7. – P.527-535.