

Сумський державний педагогічний університет імені А. С. Макаренка

Природничо – географічний факультет

Кафедра біології людини, хімії та методики навчання хімії

Діденко Анна Вікторівна

Синтез біоматеріалу на основі хітозану та неоміцин сульфату

Спеціальність: 014 Середня освіта (Хімія)

Галузь знань: 01 Освіта/Педагогіка

Кваліфікаційна робота на
здобуття освітнього ступеню магістра

Науковий керівник

_____ А.М. Скляр

доцент, кандидат хімічних наук

«__» _____ 2021 року

Виконавець

_____ А.В. Діденко

«__» _____ 2021 року

Суми 2021

ЗМІСТ

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ-----	5
1.1. Відкриття хітину(ХТ) і хітозану(ХТЗ) -----	5
класифікації органічних сполук -----	6
1.3. Джерела хітину і хітозану-----	14
1.4. Способи отримання хітину та його похідних -----	16
1.4.1 Виділенні із природних матеріалів -----	16
1.4.2 Деацетилювання хітину-----	18
1.5. Хітозан в медичній сфері-----	21
1.6 Загальні характеристики полімерів-----	22
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА -----	26
2.1. Виділення хітину з панцирів антарктичного криля та -----	28
одержання хітозану-----	28
2.2. Неоміцин сульфат -----	28
2.3. Синтез біологічно активного матеріалу на основі хітозану та -----	30
неоміцин сульфату -----	30
РОЗДІЛ 3. ОБГОВОРЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ-----	32
3.1. Результати експериментального дослідження-----	32
ВИСНОВКИ -----	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ -----	47

ВСТУП

Актуальність теми. Завдяки своїм унікальним властивостям хітозан без сумніву можна назвати біополімером XXI століття. Він успішно застосовується у медицині (бинти та губки, виробництво штучних кровоносних судин, підготовка хірургічних імплантатів, штучної шкіри, лікування опіків шкіри, виробництво очних лінз), паперовій промисловості (обробка поверхні, фотографічне виробництво паперу), косметології (пудра, лак для нігтів, зволожуючі лосьйони), біотехнології (розділення протеїнів, застосування у хроматографії), харчовій промисловості (вилучення кислот та барвників, як стабілізатор кольору, як харчові добавки), агропромисловості (обробка насіння, добрива) та як очисник води (вилучення йонів металів, амінокислот, барвників, фільтрація).

Завдяки високому вмісту функціональних аміно- та гідроксильних груп, хітозан є ефективним біoadсорбентом щодо деяких токсичних йонів, барвників та органічних забрудників. Систематичне вивчення фізикохімічних властивостей хітозану та його похідних дає перспективу створення нових ефективних сорбентів на їх основі.

Наукова дипломна робота є безумовно актуальною, оскільки в ній розроблена методика одержання нового біоматеріалу, досліджена його структура і рекомендовано на перспективу його використання в медичній сфері.

Мета дослідження. Розробити методику одержання біологічно активного матеріалу на основі хітозану та неоміцин сульфату та дослідити структуру одержаного матеріалу.

Завдання:

1. Проаналізувати наукову літературу в сфері робіт по одержанню біоматеріалів на основі хітозану.
2. Підготувати зразки хітозану для одержання біоматеріалів.
3. Розробити методіку одержання біоматеріалів.
4. Дослідити структуру отриманих зразків деякими фізико-хімічними методами.

Об'єкт дослідження. Хітозан антарктичного криля.

Предмет дослідження. Процес утворення біоматеріалу хітозану з неоміцин сульфат.

Методи дослідження:

- статистичні методи обробки результатів дослідження,
- теоретичний і системний аналіз літератури, узагальнення і систематизація виявлених даних для формулювання й обґрунтування висновків за результатами дослідження;
- рентгеноструктурний аналіз;
- мас-спектрометрія;
- електронна мікроскопія.

Структура роботи та обсяг роботи. Робота складається зі вступу, 3 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел.

Ключові слова: хітин, хітозан, неоміцин сульфат, біоматеріал..

Апробація результатів дослідження. Результати дослідження опубліковані у збірнику наукових праць.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Відкриття хітину(ХТ) і хітозану(ХТЗ)

«Сорбент ХХІ століття» хітозан ефективно зв'язує важкі метали та радіонукліди, має антиоксидантну дію, сприяє покращенню гематологічних показників. Використовувати хітозан почали в 1811 році, коли вперше був відкритий хітин професором природничих наук у Франції. За словами істориків, професор Браконот проводив дослідження грибів, виділивши те, що пізніше назвали хітином. Через двадцять років була опублікована стаття про комах, в якій зазначалося, що подібна речовина також є в структурі комах і деяких рослин. Автор назвав цю речовину «хітин».

Довгий час будова хітину залишалася загадкою, про склад його молекул велися дискусії. Розкрити це допоміг випадок. Майже через 70 років після відкриття хітину інший цікавий дослідник, цього разу студент Геттінгенського університету Г. Ледероз, помістив раковий кіготь у пробірку з хлоридною кислотою і прокип'ятив розчин, поки білий порошок не осяде на краю пробірки — сіль глюкозаміну. Запах оцтової кислоти видав її присутність у продуктах реакції. Стало зрозуміло, що до складу молекули хітину входять глюкозамін і оцтова кислота. Але було не зрозуміло, яка структурна формула хітину і як пов'язані між собою частини його молекули. На вирішення цього питання пішло майже п'ятдесят років. Після відкриття хітину з'явився хітозан. Вперше його виділив французький фізіолог Руже під час експерименту з хітином. Він помітив, що хітин можна змінювати шляхом хімічної та термічної обробки до стану розчину. У 1878 році німецький хірург Ледерхоз показав, що хітин складається із залишків глюкозаміну та оцтової кислоти.

У 1894 році німецький лікар і хімік Хоппе-Сайлер назвав цю речовину «хітозаном». Саме робота французького вченого Раммельберга в 1930-х роках показала структуру хітозану. Гідролізуючи хітин, експерти довели, що це полісахарид, отриманий з глюкозаміну.

На початку 1950-х років рентгенівський дифракційний аналіз розглядав хітозан у грибах.

1960-ті роки характеризуються дослідженням хітозану на здатність зв'язуватися з еритроцитами. Це показало, що дана речовина є гемостатичним агентом. Остання три десятиліття хітозан використовують на очисних спорудах для детоксикації води - поглинання жирів та інших потенційно токсичних речовини.

1.2. Будова, властивості хітину(ХТ) і хітозану(ХТЗ), їх місце в класифікації органічних сполук

Хітин - це полісахарид з хімічною назвою полі-N-ацетил-D-глюкозо-2-амін, що містить азот, в якому присутні мономери з глікозидно пов'язаними компонентами бета 1,4. Аналогічний до целюлози, проте в хітині гідроксильна група (—OH) мономеру замінена ацетиламіногрупою (CH_3CO або Ac). Міцніший водневий зв'язок між полімерами, що межують, робить хітин твердішим і стабільнішим, ніж целюлоза (рис. 1.1) [1, с. 7 - 23.].

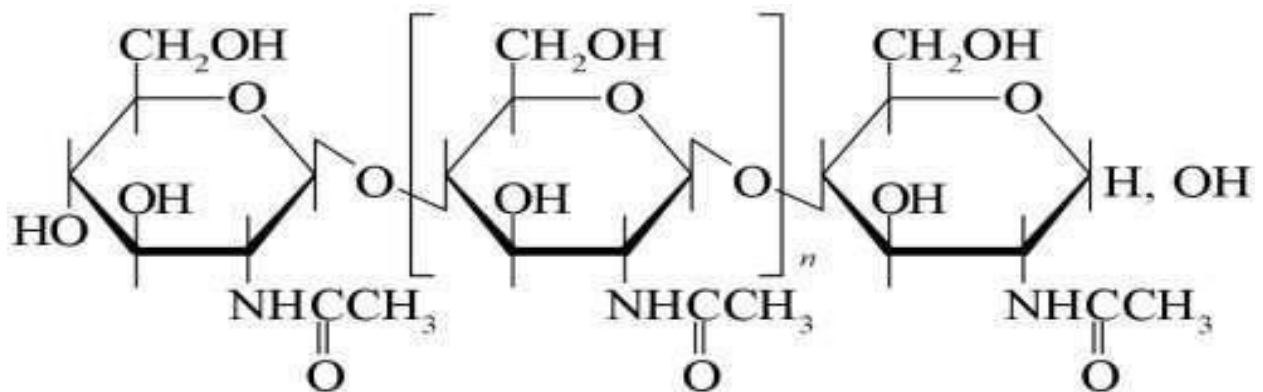


Рис. 1.1. Будова хітину

Відомо три форми хітину, а саме α -, β - та γ -хітин, однак структура α -хітину (панцир креветок та крабів), була досліджена більш детально, ніж структура β - або γ -форми (перо кальмарів та кутикула шлунку головоногих моллюсків, відповідно). Було проведено дуже мало досліджень γ -хітину, оскільки γ -хітин може бути спотвореною версією α - або β -хітину. Їх різниця спостерігається в

орієнтації мікрофібрил. Як зазначалося вище найпоширенішою формою хітину є α -хітин. Його елементарна клітина складається з двох одиниць N,N'-діацетилхітобіози, які утворюють два ланцюга в антипаралельному розташування.

β -хітин є менш поширеною формою хітину, в якій елементарна клітина є одиницею N,N'-діацетилхітобіози, що дає полімер, стабілізований у вигляді жорсткої стрічки. γ -хітин є третім аломорфом, який має змішану паралельну та антипаралельну орієнтації.

Хітин завжди з'єднаний з іншими структурними компонентами, за винятком β -хітину, що міститься в діатомових водоростях. Виявлено, що хітин ковалентно зв'язаний з глюканами в клітинних стінках грибів або через пептидні містки. Більше того, у комах та інших безхребетних хітин завжди пов'язаний зі специфічними білками, як ковалентним, так і нековалентним зв'язком.

Тож в залежності від типу хітину спостерігається паралельний, антипаралельний і послідовний розподіл полімерних ланцюгів. Після екстракції або розчинення полімеру кристалічність матеріалу змінюється, і різні типи кристалічних центрів хітину зникають.

Транс-розташування в елементарній ланці макромолекули хітину заміщувачів (ацетамідної і гідроксильної груп) у C(2) і C(3) обумовлює значну гідролітичну стійкість ацетамідних груп, в тому числі і в умовах лужного гідролізу. Тому відщеплення ацетамідних груп вдається здійснити лише в порівняно жорстких умовах — при обробці 40-49%-ним водним розчином NaOH при температурі 110-140⁰C протягом 4-6 годин.[2, с. 151-209.] Однак і в цих умовах ступінь деацетилювання (частка ацетамідних груп що відщепилися, в розрахунку на одну елементарну ланку) не досягає одиниці (тобто не забезпечується кількісне видалення цих груп), складаючи зазвичай 0,8-0,9.[2, с. 151 - 209.]

Одним з найважливіших властивостей полімерів, що визначають в багатьох випадках можливість їх переробки та застосування, є їх розчинність [3, с. 315 - 327.].

Однак через порівняно високу жорсткість полімерного ланцюга, значної інтенсивності міжмолекулярної взаємодії, хітин розчиняється в порівняно обмеженій кількості розчинників — концентрованих мінеральних кислотах (соляна, сірчана, азотна, фосфорна), безводній мурашиній кислоті, гексафторізопропанолі і гексафторацетоні, розчинах хлориду літію в диметилацетаміді.[2, с. 151 - 209.].

У більшості розчинників відбувається деструкція полімеру, що ускладнює визначення справжнього значення молекулярної маси і характеру молекулярно-масового розподілу.

У водному середовищі хітин проявляє хелатоутворюючі хімічні властивості, завдяки чому фільтри на основі хітину успішно використовуються для очищення стічних вод від аніонних забруднень і таких речовин, як ДДТ і поліхлорбензоли.

З хітину різного походження шляхом гідролізу можна отримати хітозан або його солі.

Хітозан - похідне лінійного полісахариду, макромолекули якого складаються з випадково пов'язаних β -(1-4) D-глюкозамінових ланок і N-ацетил-D-глюкозамін.

Як зазначалося раніше цей природний полісахарид лінійної напівкристалічної природи. Залишки D-глюкозаміну в макромолекулі хітозану виражають ступенем деацетилювання, найчастіше він становить 70-90% (рис. 1.2) [3, с. 315 - 327.].

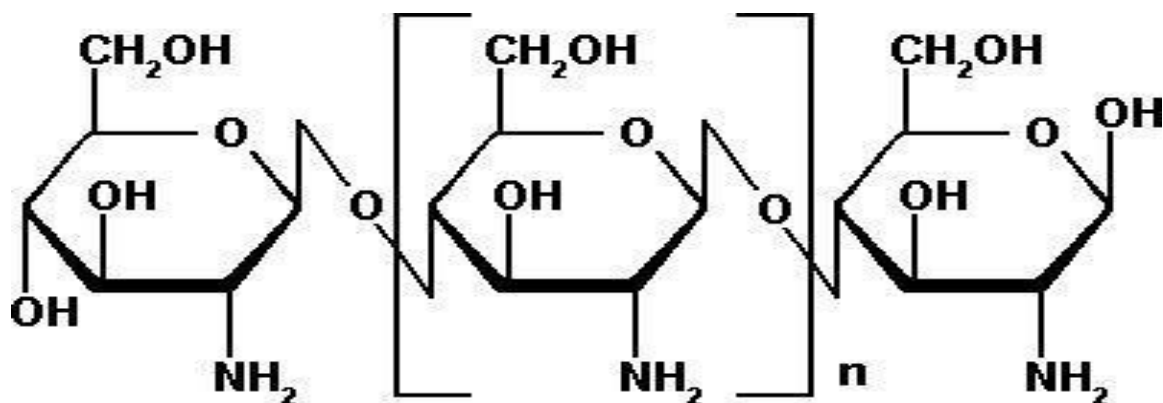


Рис. 1.2. - Будова хітозану

Отже, хітозан відрізняється від хітину наявністю вільних аміногруп, що обумовлює розчинність в розбавлених кислотах ($\text{pH} < 6$) та в утворенні комплексів з різними іонами, зокрема, металів.

Хітозан з протонуваними аміногрупами стає полікатионом, який згодом може утворювати іонні комплекси з широким розмаїттям природних або синтетичних аніонних речовин, таких як ліпіди, білки, ДНК і деякі негативно заряджені синтетичні полімери [4, с. 5 - 29.].

Структура хітозану впливає на його хімічні властивості. Велика кількість вільних аміногруп у молекулі хітозану визначає його властивість зв'язувати протони і набувати надлишковий позитивний заряд, що зумовлює його комплексотвірні та йонообмінні властивості. Завдяки цьому полімер здатен зв'язувати і міцно утримувати йони металів (зокрема радіоактивних ізотопів і токсичних елементів) за рахунок різноманітних електростатичних і донорно-акцепторних взаємодій. За даними біохіміків, до зламаної кістки збігаються макрофаги крові і пришвидшується процес дозрівання нових клітин кісткової тканини, що призводить до пришвидшеного загоєння пошкоджених кісток.[4, с.5-29.]. Частковий позитивний заряд аміногруп в молекулах хітозана, допомагає кровотворенню і перешкоджає рубцюванню ран, затримуючи вироблення фібрину. З допомогою хітинових пов'язок добре лікуються складні і важкі рани. Нанесеним на шкіру і волосся, хітозан, завдяки позитивному заряду, утворює тонку плівку, внаслідок чого креми на хітозановій основі знайшли застосування в косметичці.

Полімер має аморфно-кристалічну структуру та характеризується поліморфізмом, причому при переході від хітину до хітозану кількість структурних модифікацій збільшується до 6. Збереження при цьому розмірів кристалічних доменів хітозану уздовж осі макромолекули на рівні відповідної характеристики для хітину (103 нм) свідчить про те, що конформація макромолекул при переході від хітину до хітозану суттєво не змінюється. В той же час, в процесі деацетилювання хітину помітно зменшується загальна впорядкованість структури (ступінь кристалічності знижується до 40–50 %) [1, с. 7 - 23.].

Зниження ступеня кристалічності може бути обумовлено як аморфізацією структури внаслідок внутрішньокристалічного набухання при деацетилюванні, так і порушеннями регулярності будови полімерного ланцюга в разі неповного відщеплення N-ацетильних груп. Хоча хітин і хітозан складаються з глюкозамінових і ацетилглюкозамінових ланок, полімери відрізняються за здатністю до розчинності в кислих розчинах, що обумовлено ступенем деацетилювання [5,с.74-76.]. Оцінку ступеня деацетилювання можна проводити багатьма різними методами, але найбільш поширеними з них є інфрачервона спектроскопія і ЯМР-аналіз [8, с. 148].

Важливі зміни кристалічності полімеру також спостерігаються в результаті взаємодії хітозану з йонами металів або кислотами [9, с.168 -173.]. Кристалічність полімеру оцінюють методом рентгенівської дифракції

Хітозан розчиняється навіть у розбавлених органічних кислотах, наприклад у водному розчині оцтової кислоти. Розчинність хітозану є важливим параметром, який контролюється молекулярною масою полімеру, видом і концентрацією кислоти, що використовується для розчинення полімеру, та присутністю у розчині йонів металів, які можуть взаємодіяти з хітозаном, зшиваючи ланки полімерних ланцюгів, і, тим самим, зменшувати його розчинність.

При цьому для розчинів хітозану, як і інших полімерів, характерна істотна залежність в'язкості від концентрації (при збільшенні концентрації розчину

хітозану в 1-2%-ном розчині оцтової кислоти з 2 до 4% в'язкість розчину збільшується приблизно в 30 разів).[1, с. 7-23.].

Здатність хітозану утворювати велику кількість водневих зв'язків визначає його можливість зв'язувати органічні водорозчинні речовини, в тому числі бактеріальні токсини, які утворюються в товстому кишечнику в процесі травлення. З іншого боку, сильна взаємодія між молекулами хітозану призводить до його поганої розчинності у воді.

Хітозан також здатний зв'язувати насичені вуглеводні, в тому числі жири і жиророзчинні сполуки, за рахунок гідрофобних взаємодій і ефекту молекулярного сита. Розщеплення хітину і хітозану до N-ацетил-D-глюкозаміну та D-глюкозаміну відбувається під дією ферментів, тому ці полімери здатні до повної біодеградації і не забруднюють навколишнє середовище. Таким чином, хітозан є універсальним сорбентом, здатним зв'язувати широкий спектр речовин органічної та неорганічної природи, що визначає перспективні можливості його застосування. [6, с. 770-778.].

У кисло-водному середовищі відбувається гідратація хітозану з розширенням проміжків між макромолекулами через взаємодію аміних, гідроксильних та інших груп біополімеру з молекулами води. Повністю гідратовані основні ланцюги молекул хітозану можуть перетворюватися в кулясті утворення, які при високих значеннях рН розчину здатні трансформуватися в ниткоподібні молекули, причому спостерігається зростання в'язкості [1, с.7-23.].

Гнучкість зв'язків С-С в полісахаридах нижче гнучкості звичайної високомолекулярної структури, тому їх в'язкість є порівняно вищою. Крім впливу кількості аміногруп, в'язкість пов'язана з молекулярною масою полімеру, рН і природою середовища. З підвищенням температури змінюється текучість розчину полімеру за рахунок ослаблення водневих зв'язків між ланцюгами молекул. В'язкість знижується при зниженні рН середовища, коли відбувається протонування аміногруп хітозану.

Стійкість хітозану. Хітозан є відносно стійким полімером, проте під впливом часу в ньому може початися гідроліз, деякі групи дисоціюють, кільця глюкози можуть утворювати макрокільця. Гідроліз може відбуватися також під впливом деяких мікроорганізмів. Встановлено, що порошок хітозану може зберігатися без змін в умовах дотримання сухості (в щільно закритій ємності при постійній температурі) щонайменше три роки [10, с. 55 - 58.]. Однак при поглинанні вологи або при знаходженні в водному розчині в полімері може початися гідроліз, який з підвищенням температури прискорюється. Якщо зразок хітозану протримати при температурі 50⁰С протягом шести місяців, то його вага зменшиться на 30%. Під дією променів світла гідроліз хітозану розвивається так само, як і під впливом температури.

Довжиною хвилі, найбільш прийнятною для початку світлового гідролізу, є 200-240 нм. При збільшенні довжини хвилі реакція гідролізу затухає.[3, с. 315-327.].

Ще однією можливістю використання хітину, хітозану та їх похідних (карбоксиметилхітина, карбоксиметилхітозану, сукцинілхітозану) — створення біодеградабельних носіїв фармацевтичних препаратів (антибіотиків, антивірусних, протипухлинних та антиалергенних препаратів) у вигляді плівок (мембран). Застосування таких плівок створює умови для виділення лікарських засобів, забезпечуючи ефект пролонгування їх дії [4, с.5-29.].

Хітозан є непоганим природним адсорбентом для вилучення йонів металів з водних розчинів, оскільки має високу гідрофільність внаслідок наявності значного числа гідроксильних груп, певну кількість первинних аміногруп, що можуть виступати, як адсорбційні центри, гнучку структуру полімерного ланцюга, що забезпечує відповідну конфігурацію для комплексоутворення функціональних груп з йонами металів [13, с. 87-93.].

При цьому аміногрупи хітозану відіграють особливо важливу роль, хоча гідроксильні групи також можуть брати участь у процесах сорбції.

Кількість аміногруп, доступних для взаємодії з йонами металів, залежить від ступеня деацетилювання полімеру (аміногрупи хітозану мають вищу

реакційну здатність, ніж ацетамідні групи хітину) [15, с. 110-112.]. В нейтральних умовах, атоми нітрогену аміногруп надають вільні електрони, які взаємодіють з катіонами металу, що призводить до зв'язування металів в комплекси. [16, с. 129-136.].

Проведені дослідження механізмів сорбції дають змогу стверджувати, що саме аміногрупи є основними центрами при взаємодії з йонами металів, хоча гідроксильні групи (особливо при С-3) теж можуть сприяти сорбції.

Вказані функціональні групи можуть взаємодіяти з йонами металів за допомогою різних механізмів в залежності від металу, рН і розчинника.

Вільна пара електронів на нітрогені може зв'язувати катіони металів при рН, близьких до нейтрального або слабкокислих. З іншого боку, протонування аміногруп в кислих розчинах надає полімеру позитивний заряд, а, отже, є потенціал для вилучення аніонів металу [4, с. 5-29.].

Варто зазначити, що сорбція металів може включати в себе різні механізми в залежності від складу розчину, рН, оскільки ці параметри можуть вплинути на протонування полімеру (відштовхування катіонів металу) і на наявність тих чи інших йонних форм металів у розчині.

Полімерні комплексоутворювачі, в тому числі хітин, хітозан та їх похідні, наприклад карбоксиметиллові ефіри, можуть розглядатися як реальна альтернатива традиційним методам очищення стічних вод промислових підприємств від сполук металів, використовуваних для нанесення захисних покриттів (нікель, хром, цинк), а також від таких металів, як ртуть і кадмій, здатних акумулюватися живими організмами. Наявність електронодонорних аміно- і гідроксильних груп, широкі можливості введення різних іоногенних груп кислотного і основного характеру роблять похідні хітину і хітозану вельми перспективними для використання в хроматографії при поділі і очищенню біологічно активних сполук (нуклеїнових кислот і продуктів їх гідролізу, стероїдів, амінокислот) [20, с.24-25.] .

1.3. Джерела хітину і хітозану

Основними джерелами сировини для виробництва хітину є оболонка різних ракоподібних, переважно крабів і креветок. У ракоподібних або, точніше, молюсків, хітин зустрічається як складова складної мережі з білками, на які відкладається карбонат кальцію, утворюючи жорстку оболонку. Взаємодія між хітином і білком є дуже тісною, і існує також невелика частка білка, що бере участь у полісахаридно-білковому комплексі [1, с.7-23]. Таким чином, виділення хітину з молюсків вимагає видалення двох основних складових оболонки, білків шляхом депротейнізації та неорганічного карбонату кальцію шляхом демінералізації, разом з невеликою кількістю пігментів та ліпідів, які зазвичай видаляються під час двох попередніх кроків. У деяких випадках для видалення залишкових пігментів застосовується додатковий етап знебарвлення. Багато методів було запропоновано та використано протягом багатьох років для отримання чистого хітину; однак стандартний метод не був прийнятий. Як депротейнізація, так і демінералізація можуть бути здійснені за допомогою хімічної або ферментативної обробки. Порядок двох кроків, згаданих вище, можна змінити з певною користю, особливо якщо розглядається ферментативна обробка. Також використовується мікробне бродіння; в цьому випадку етапи депротейнізації та демінералізації обробляються одночасно.

Виділення хітину починається з виділення оболонок. Наприклад, для омарів і крабів вибір має важливе значення для подальшої якості кінцевого ізольованого матеріалу. В ідеалі вибирають мушлі однакового розміру і виду. У креветок стінка панцира тонша, тому виділення хітину легше, ніж від інших видів раковин. Відібрані шкаралупи потім очищають, сушать і подрібнюють на невеликі шматочки шкаралупи [2, с. 151-209].

У всіх організмах, які виробляють і використовують хітин, він знаходиться не в чистому вигляді, а в комплексі з іншими полісахаридами, і часто асоціюється з білками. У клітинній стінці грибів хітин входить до складу хітин-глюканового комплексу, оболочка комах побудована з хітинмеланінового комплексу, в оболонці ракоподібних хітин пов'язаний з білками і утворює хітин-

білковий комплекс (проте оболонка цих організмів має складнішу структуру - поверхневий шар більш менш чистий хітинкарбонат кальцію, тоді як внутрішні шари також містять білок) [2, с.151-209.].

Відомо, що основними масштабними сировинними джерелами при промисловому отриманні ХТЗ служать панцирі камчатських крабів.

Враховуючи цінність і якість цього, а також величезну сферу практичного використання, представляє актуальний пошук інших сировинних ресурсів ХТЗ для виробництва доступного продукту ХТЗ, здатного забезпечити його тоннажне виробництво та знайти нові області його застосування.

Через вирішення проблеми створення ефективної технології одержання хітозану з панцирів камчатських крабів і дослідження комплексу його фізико-хімічних характеристик є актуальною задачею.

Панцир краба і оболочка комах відіграють роль зовнішнього скелета і виконують захисні функції. Хітин, що входить до складу панцира ракоподібних, утворює волокнисту структуру, він пов'язаний з білками за допомогою пептидного зв'язку деацетілірованої аміногрупи з діаміномонокарбонівими амінокислотами неароматичних будови, маючи вигляд хітин-білкового комплексу (ХБК) [12].

Особливим чином змінюється хітин під дією ферментів в організмі морських крабів. У процесі линьки хітин панцира піддається значному руйнуванню і подальшого відновлення. Участь у цьому процесі специфічних ферментів сприяє протіканню синтезу і деградації хітину з виключно великою швидкістю. Хітинолітичні ферменти мають неоднаковий рівень активності в залежності від фізіологічного стану ракоподібних [13, с.87-93.].

У крабів, наприклад, хітиназа синтезується постійно, а синтез хітобіази посилюється перед линькою і знижується відразу після її линьки. У морських крабів відразу після линьки панцир м'який, еластичний, складається лише з ЦБК, але з часом зміцнюється мінералізацією структури ЦБК переважно карбонатом кальцію. Ця мінералізація відбувається більшою чи меншою мірою залежно від виду тварин.

Таким чином, панцир краба побудований з трьох основних елементів хітину, який виконує роль каркаса, мінеральної частини, що надає панцирі необхідної міцності, і білків, які роблять її живою тканиною. Шкаралупа також містить ліпіди, меланіни та інші пігменти. Пігментами панцира ракоподібних є, зокрема, такі каротиноїди, як астаксантин, астацин і криптоксантин. Хітин у грибів, як правило, асоціюється з іншими полісахаридами, наприклад β -1-3-глюканів, у членистоногих він пов'язаний з білками типу склеротинія і меланінами. [15, с.110-112.].

Для виділення хітину з панцирів крабів, омарів, криля (містять 20-25 % хітину і близько 70 % карбонату кальцію), проводять послідовні операції демінералізації і депротеїнізації, що включають обробку подрібнених панцирів розчинами соляної кислоти і їдкого натру з наступним промиванням водою, видаленням фарбувальних пігментів обробкою відбілюючими реагентами і ліпофільних речовин — промиванням спиртом і ефіром.[2, с.151-209.].

1.4. Способи отримання хітину та його похідних

1.4.1 Виділення із природних матеріалів

Доступними джерелами одержання хітину є відходи промислу морських безхребетних і міцеліїв нижчих грибів. Кількість хітину у грибах коливається від 0,2 до 60%. З панцирів крабів та омарів, що містять до 25%

Хітин одержують демінералізацією хлоридною кислотою, білки розчиняють у гарячому лузі, відбілювання проводять перекисом водню. Більш м'які умови виділення передбачають демінералізацію комплексонами та обробку окисниками при нейтральних рН. [13, с.87-93.].

Хітин як нерозчинний полімер не піддається виділенню з панцира безпосередньо. Для його отримання необхідно послідовно відокремити білкову і мінеральну складові панцира, тобто перевести їх у розчинний стан і видалити. Для отримання хітину і його модифікацій з відтворюваними характеристиками

необхідно вичерпне видалення білкової та мінеральної складових панцира. Всі відомі способи вилучення хітину з ПСС можна розділити на три основні групи:

- ✓ Хімічна обробка кислотами, лугами, комплексонами та ін;
- ✓ Методи біотехнології, застосування ферментних препаратів і протеолітичних бактерій;
- ✓ Електрохімічний спосіб.

Сьогодні промисловий видобуток хітину і отримання хітозану ведеться головним чином в США і Японії. Основним джерелом хітину служать відходи переробки креветок, крабів і омарів.

Найбільша кількість цих ракоподібних зосереджено біля узбережжя США, Індії, Таїланду, Філіппін, Південної Африки. За даними американських вчених, тільки з відходів переробки крабів і креветок можна отримати від п'яти до восьми тисяч тонн хітину в рік. [18, с.18-34.].

Для отримання хітозану необхідно спочатку отримати хітин. Потім він дезацетилюється (молекула ацетилу, яку він має у своїй структурі, видаляється), так що залишається лише аміногрупа.

Процес починається з отримання сировини, яка є екзоскелетом ракоподібних, особливо креветок.

Промивальна обробка проводиться для видалення всіх домішок, таких як залишки солі та мінералів, які можуть бути вбудовані в екзоскелет виду. Матеріал добре висушують, а потім подрібнюють до форми пластивців приблизно 1 мм.

Далі йде процес депігментації. Ця процедура є необов'язковою і проводиться з ацетоном (органічним розчинником, у якому хітозан нерозчинний), з ксилолом, етанолом або з перекисом водню.

Попередній процес супроводжується процесом декарбонізації; в яких використовується HCl. Після закінчення цього процесу продовжується депротейнізація, яка проводиться в основному середовищі з використанням NaOH. Його промивають великою кількістю води і остаточно фільтрують.

Отриманою сполукою є хітин. Це обробляють 50% NaOH при температурі приблизно 110 ° C протягом 3 годин.

Цей процес дозволяє видалити ацетильну групу зі структури хітину, щоб отримати хітозан. Для упаковки проводять зневоднення та подрібнення до тих пір, поки частинки не набудуть розміру 250 мкм.[8, с.148.].

1.4.2 Деацетилювання хітину

Хітозан відноситься до похідного хітину, отриманий деацетилюванням останнього. Фактично, в залежності від ступеня деацетилювання в макромолекулі хітозану має місце баланс між двома типами структурних ланок хітину (рис. 1.3) та хітозану (рис. 1.4).

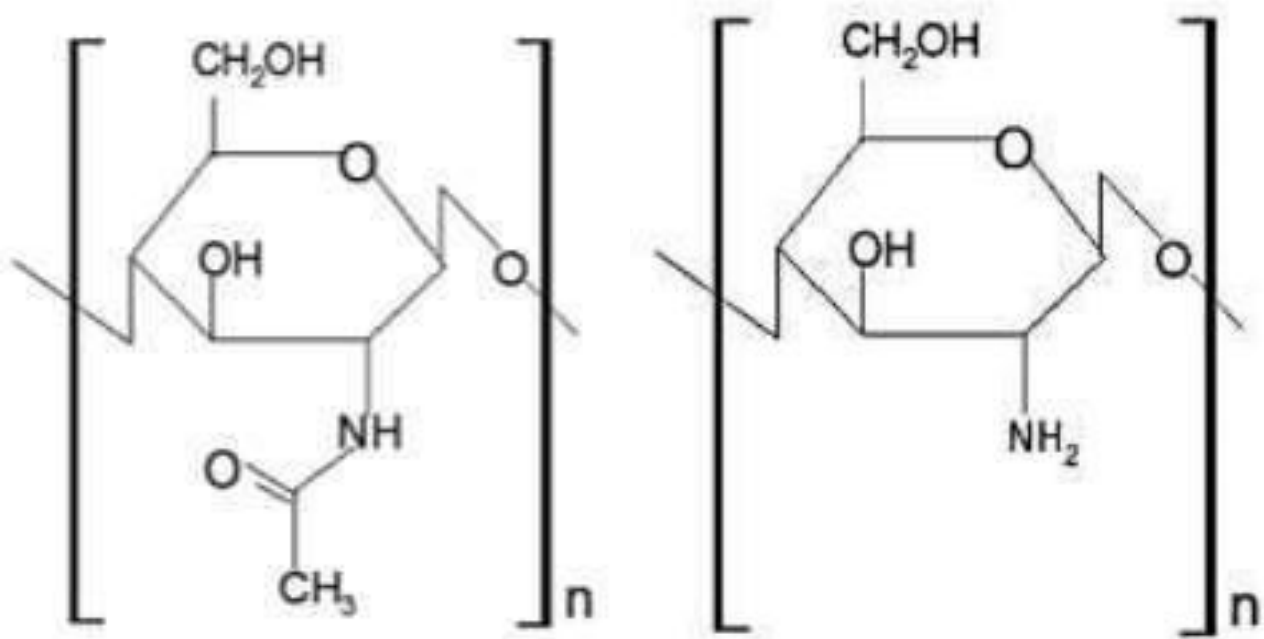


Рис. 1.3. -Структурна ланка хітину

Рис. 1.4. -Структурна ланка хітозану

Під час деацетилювання хітину методом лужного гідролізу, ацетильні групи видаляються не повністю, також відбувається реакція деполімеризації, на що вказує зменшення молекулярної маси хітозану. [4, с.5-29.].

Проте, хітин може бути перетворений в хітозан і ферментативним способом. Хімічний метод широко використовується з комерційною метою для

одержання хітозану, як більш дешевий і тому для більш масового виробництва цього полімеру.

З хімічної точки зору для *деацетилювання хітину* можуть бути використані як кислоти так і луки [10, с.55-58.]. Однак, глікозидні зв'язки макромолекули дуже сприйнятливі до кислот, тому лужне деацетилювання використовується частіше (рис. 1.5).

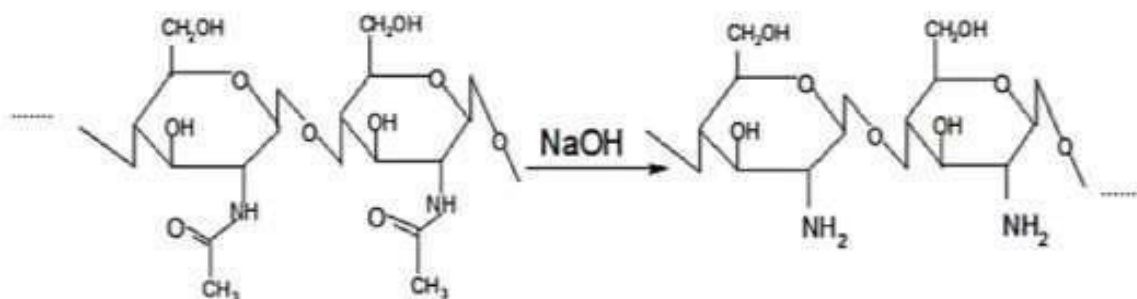


Рис. 1.5. Схема реакції деацетилювання хітину

N-деацетилювання хітину проводиться гетерогенно або гомогенно. Зазвичай, в гетерогенному методі хітин обробляють гарячим концентрованим розчином NaOH протягом декількох годин, а хітозан отримують у вигляді нерозчинного залишку, деацетильованного до ~ 85%-90%. Згідно гомогенного методу, хітин диспергують у концентрованому розчині натрієвого луку (W=40%) за 25°C протягом 3 годин або більше з наступним витриманням суміші за температурою близько 0°C. Цей метод дає розчинний хітозан із середнім ступенем деацетилювання 48-55%. Процес призводить до деацетилювання з ацетильними групами, рівномірно розподіленими по ланцюгах. [7, с.156-157.].

Розчинність одержаного хітозану може залежати не тільки від частки залишкових N-ацетамідних ланок в молекулі, але і від їх розподілу в ланцюгу. Реакція деацетилювання, що проводиться в гетерогенних умовах, дає нерегулярний розподіл N-ацетиламідних залишків з деяким блоковим розподілом уздовж полімерних ланцюгів. Таким чином, розчинність і ступінь

агрегації макромолекул хітозану може варіювати, що призводить до зміни вказаних середніх характеристик, які також відрізняються від тих же характеристик деацетилюваного хітозану, але отриманого в гомогенних умовах.

Крім того, спосіб одержання хітозану позначається і на зміні його молекулярної маси полімеру та в'язкості в розчинів [10, с.55-58.].

Фактично, багато чинників реакції хімічного деацетилювання можуть впливати на характеристики кінцевого хітозану. На молекулярну масу хітозану, в основному, впливають концентрація NaOH, час реакції та температура. Відносна молекулярна маса хітозану знижується з підвищенням температури і концентрації NaOH.

Хімічне деацетилювання має також і інші недоліки:

- споживання енергії;
- відходи концентрованого лужного розчину, що призводять до забруднення навколишнього середовища, широкого і неоднорідного асортименту розчинних і нерозчинних побічних продуктів [5, с.74-76.].

Щоб подолати недоліки хімічного деацетилювання, існує альтернативний *ферментативний метод*, в якому використовуються ферменти хітиндеацетилази, якіє глікопротеїнами за своєю природою. Використання хітиндеацетилаз для перетворення хітину в хітозан, на відміну від існуючого зараз хімічного методу, дає можливість уникнути деструктивних процесів і отримати хітозан з чітко визначеними характеристиками. Цей метод спеціально використовується для приготування хітозанових олігомерів. Хітиндеацетилаза каталізує гідроліз Нацетамідних зв'язків в хітині з утворенням хітозану. Наявність ферменту подібної активності, була зареєстрована у деяких грибів та видів комах. Крім того, всі ці ферменти демонструють чудову термостабільність за оптимальної температури 50°C. Проте, ці ферменти значно відрізняються за молекулярною масою і будовою вуглеводів, що входять до їх складу.

Використання ферментативного деацетилювання є привабливим альтернативним процесом, який дає можливість отримання нових хітозанових полімерів і, що більш цікаво, олігомерів [6, с. 770-778.].

1.5. Хітозан в медичній сфері

В останні роки хітозан також приділяв велику увагу в стоматології, офтальмології, біомедицині та біовізуалізації, гігієні та особистому догляді, ветеринарії. Тож хітин і його похідні застосовують при лікуванні тяжких запальних захворювань шлунково-кишкового тракту, гнійний перитоніт та деструктивна форма запалення підшлункової залози [20]. Хітозан зупиняє зростання патогенної мікрофлори, аглютинуює мікроби, стимулює функціональну активність макрофагів, індукує секрецію арахідонової кислоти. Хітозан збільшує виділення медіаторів імунної відповіді, фагоцитовані частинки хітину та хітозану посилюють утворення активних форм кисню в альвеолярних макрофагах у мишей.

У медичній сфері хітозан володіє протипухлинним, імуномодулюючим, антимікробним і антихолестеринемічним властивостям. Виявлено, що ці характеристики залежать від хімічної структури і молекулярної маси полімеру [17].

Хітозан використовується для лікування високого кров'яного тиску, високого рівня холестерину, ожиріння, загоєння ран та інших захворювань, але існує мало наукових доказів, які б підтверджували багато його застосування. [15, с. 110-112.].

Хітозан пришвидшує згортання крові. Його використовують у пов'язках як засіб з гіпоалергенними, антибактеріальними та знеболюючими властивостями завдяки чому, рани швидко загоюються

У спробі допомогти “донорській тканині” прижитися, пластичні хірурги іноді застосовують хітозан безпосередньо в тих місцях організму, звідки взяли тканину, для пересадки.

Деякі вчені дійшли до висновку, що для деяких тварин застосування хітозану та його похідних показало позитивні результати при виправленні дефектів кісток [17].

Було знайдено цікаве застосування хітозан-кальцій-фосфатного цементу. Хітозан гліцерофосфат змішували з кальцій фосфатом і лтмонною кислотою, при цьому утворювалась ін'єкційна самозастигаюча система для відговлення кісток.

Хітозан – це також новий біоматеріал для стоматологічних застосувань, починаючи від реставраційної стоматології та закінчуючи тканинними каркасами для альвеолярного відростка і комплексного лікування парадонту. Деякі люди застосовують хітозан безпосередньо для лікування ясен, щоб посбутися запалення, яке може привести до втрати зубів або жувати жувальну гумку, з хітозану, щоб запобігти карієсу [15, с. 110-112.]

Дуже поширеною хірургічною процедурою є лікування грижі з використанням звичайних протезів. Однак вони викликають утворення перитонеального інтерфейсу, що не зовсім бажано. Доведено, що нові біоматеріали є хітозаном є чудовими засобами з точки зору регенерації очеревини та сприяють швидкому відкладенню колагену, що має вирішальне значення для механічної поведінки регенованої тканини [13, с. 87-93.].

Тривалий час для лікування хвороби Паркінсона використовували психоделічний препарат, який викликає вивільнення лактатдегідрогенази. Пізніше вчені виявили, що вивільнення може бути зменшено хітозаном, що збільшує життєздатність клітин за рахунок пригнічення потенціалу мітохондріальної мембрани.

1.6 Загальні характеристики полімерів

Багато матеріалів, що зустрічаються в природі, є полімерами. Насправді основна молекулярна структура всіх рослин і тварин схожа на структуру

синтетичного полімеру. До природних полімерів належать такі матеріали, як шовк, шелак, бітум, гума, целюлоза. Однак більшість полімерів або пластмас, які використовуються для інженерного проектування, є синтетичними, і часто вони спеціально розроблені або «розроблені» хіміками чи інженерами-хіміками для досягнення певної мети. Тож *полімери* – це речовина або матеріал, що складається з дуже великих молекул або макромолекул, які в свою чергу складаються з багатьох повторюваних субодиниць.[6] Завдяки широкому спектру властивостей [7] як синтетичні, так і природні полімери відіграють важливу й повсюдну роль у повсякденному житті.[8] Органічні полімери відіграють вирішальну роль у живих істотах, забезпечуючи основними конструкційними матеріалами та беручи участь у життєво важливих життєвих процесах. Наприклад, тверді частини всіх рослин складаються з полімерів. До них відносяться целюлоза, лігнін і різні смоли. Целюлоза – це полісахарид, полімер, який складається з молекул цукру. Лігнін складається зі складної тривимірної сітки полімерів. Деревні смоли — це полімери простого вуглеводню ізопрену. Ще один знайомий ізопреновий полімер - каучук. [3, с.315-327]. Інші важливі природні полімери включають білки, які є полімерами амінокислот, і нуклеїнові кислоти, які є полімерами нуклеотидів — складні молекули, що складаються з азотовмісних основ, цукрів і фосфорної кислоти. Нуклеїнові кислоти несуть генетичну інформацію в клітині. Крохмалі, важливі джерела харчової енергії, отримані з рослин, є природними полімерами, що складаються з глюкози.

Багато неорганічних полімерів також зустрічаються в природі, включаючи алмаз і графіт. Обидва складаються з вуглецю. В алмазі атоми вуглецю з'єднані в тривимірну мережу, що надає матеріалу його твердість. У графіті, який використовується як мастило, і в «грильцях» олівця атоми вуглецю з'єднуються в площинах, які можуть ковзати один через одного.

Синтетичні полімери виробляються в різних типах реакцій. Багато простих вуглеводнів, таких як етилен і пропілен, можна перетворити на

полімери, додаючи один мономер за іншим до зростаючого ланцюга. Поліетилен, що складається з повторюваних мономерів етилену, є додатковим полімером. Він може мати до 10 000 мономерів, з'єднаних у довгі згорнуті ланцюги. Поліетилен кристалічний, напівпрозорий і термопластичний, тобто він розм'якшується при нагріванні. Використовується для покриттів, пакування, формованих деталей, а також для виготовлення пляшок і контейнерів. Поліпропілен також кристалічний і термопластичний, але твердіший, ніж поліетилен. Його молекули можуть складатися з від 50 000 до 200 000 мономерів. Ця суміш використовується в текстильній промисловості та для виготовлення формованих предметів.

В основу класифікації полімерів закладені різні ознаки: походження, склад, методи утворення, структура, галузь використання. За походженням полімери поділяються на:

1. Природні або натуральні, до яких відноситься велика група (білки, крохмаль, целюлоза, натуральний каучук, природний графіт).
2. Синтетичні – утворені синтезом з низькомолекулярних речовин – мономерів (поліетилен з етилену, полістирол із сиропу).
3. Штучні – утворюються з природних полімерів шляхом їхньої хімічної модифікації (наприклад, при взаємодії целюлози з азотною кислотою утворюється нітроцелюлоза)

Природні полімери утворюються в результаті життєдіяльності рослин і тварин й утримуються в деревині, вовні, шкірі. До природних полімерів відносять протеїн, целюлоза, крохмаль, шелак, лігнін, латекс.

[18, с.18 -34.].

Зазвичай природні полімери піддаються операціям виділення очищення, модифікації, при яких структура основних ланцюгів залишається незмінною. Продуктом такої переробки є штучні полімери.

Природні та штучні полімери відіграють велику роль у сучасній техніці. Різке зростання виробництва та споживання органічних матеріалів відбулося за рахунок синтетичних полімерів – матеріалів, отриманих синтезом з низькомолекулярних речовин не природних аналогів. [15, с.110 - 112]. Без полімерів уже не може обійтися жодна галузь техніки, тим більше нової. За хімічною структурою полімери поділяються на лінійні, розгалуджені, сітчасті та просторові. Молекули лінійних полімерів хімічно інертні відносно одна одної. При нагріванні в'язкість таких полімерів зменшується і тоді вони здатні зворотно переходити спочатку у високоеластичний, а потім й у в'язкотекучий стан. Оскільки єдиним наслідком нагрівання є зміна пластичності, лінійні полімери називають термопластичними.

Фізичні властивості. До фізичних властивостей полімерів належать молекулярна маса, молярний об'єм, щільність, ступінь полімеризації, кристалічність матеріалу тощо. Полімери здебільшого аморфні речовини. Довгі ланцюжки та велика молекулярна маса не дозволяють полімерам переходити до рідкого стану. [13, с.87-93]. Фізичні властивості полімерів суттєво залежать від хімічного складу, просторової будови та взаємного розташування макромолекул, так званої надмолекулярної структури.

До основних властивостей варто віднести:

- ✓ Еластичність.
- ✓ Здатність утворювати плівки - пов'язана із здатністю розчинятися в різних розчинниках або плавитися без руйнування, переважно характерна для полімерів з лінійною структурою, наприклад, поліаміди (капрон), поліефіри (лавсан), тефлон та ін.
- ✓ Розчинення - протікає через стадію набухання. Набухання полімеру обумовлено руйнуванням надмолекулярних структур полімеру при дії розчинника. Лінійні полімери можуть утворювати із низькомолекулярною рідиною справжні розчини або колоїдні системи.

✓ Однією з особливостей розчинів високомолекулярних сполук є їхня висока в'язкість. В'язкість 1% полімерного розчину буде в 15-20 разів вище, ніж чистого розчинника. Це з тим, що молекули полімерів скручені в клубки, ці клубки рухаються обертаючись, у своїй відбувається тертя з молекулами розчинника.

✓ Гнучкість – здатність макромолекул без розриву зв'язків змінювати свою форму. Основним фактором, що регулює гнучкість, є наявність заступників. Крім того, суттєві зовнішні фактори, наприклад, температура. У цьому лінійна чи просторова структура полімеру залишається незмінною. Вважається, що причиною гнучкості полімерів є обертання сигма-зв'язків в макромолекулі. Гальмує обертання утворення водневих чи дипольних зв'язків між заступниками, а також великий розмір заступника. Присутність груп, здатних утворювати водневі зв'язки (-Н...О-) у молекулі капрону [-NH-(CH₂)₅-CO-], призводить до зменшення його гнучкості. Такі полімери називаються жорстколанцюгові, до них відносяться пластмаси, плівки, волокна. Гнучколанцюгові полімери виявляють свої властивості вже при ступені полімеризації 20-100, чим довше ланцюг і менше заступник, тим вище гнучкість і еластичність. Прикладами таких полімерів є каучуки та гуми. [11].

Застосування. Полімерні матеріали мають комплекс характеристик, які при вмілому їхньому використанні забезпечують ефективні експлуатаційні властивості виробів і рентабельність їхнього виробництва.

До основних переваг полімерів відносять:

1. Полімери більш стійкі до хімічних речовин, ніж їх металеві аналоги.
2. На відміну від металевих, полімерні деталі не вимагають фінішних зусиль після обробки.
3. Полімерні та композиційні матеріали до десяти разів легші за звичайні метали.
4. Полімерні матеріали справляються набагато краще, ніж метали в хімічно суворих середовищах. Це збільшує термін служби літака і дозволяє

уникнути дорогого ремонту, спричиненого корозією металевих компонентів

5. Полімери природно поглинають радар, а також тепло- та електроізолюють.
6. У медичних установах полімерні та композиційні матеріали легше чистити та стерилізувати, ніж металеві.
7. Полімерні матеріали дозволяють нафтогазовій промисловості досліджувати більш глибокі глибини, ніж будь-коли раніше, забезпечуючи зниження ваги інструменту без втрати міцності, а також матеріали, які забезпечують чудову герметизацію.

До основних недоліків полімерів відносять:

1. Не витримують дуже високу температуру, оскільки всі пластмаси дуже швидко плавляться в порівнянні з металами.
2. Відношення міцності до розміру полімеру менше, а у металів більше.
3. Не може бути легко оброблений і обмежена швидкість для обробки для нього.
4. Теплоємність полімеру дуже низька, тому його не можна використовувати в теплових сферах.
5. Полімером неможливо створити важку конструкцію, оскільки жорсткість конструкції дуже менша.
8. Утилізація стає проблемою, оскільки деякі полімери не можуть бути перероблені, але всі метали можуть бути перероблені.

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Виділення хітину з панцирів антарктичного криля та одержання хітозану

Хітин, як відомо, знаходиться в ракоподібних у комплексі з мінеральними солями найчастіше, карбонатами кальцію і магнію [1, с. 7-23.]. Панцирі вказаних організмів, крім того, містять залишки білків. Тому хітин виділяли за відомою і поширеною у промисловості методикою [3, с.315-327].

Остання включає обробку довільно взятої наважки панцирів послідовно розчином розбавленої хлоридної кислоти для видалення мінеральної частини, а потім, після висушування залишку, розбавленим розчином натрієвого луку у вказаних в [19, с.52-57.] масо - об'ємних співвідношеннях.

Ретельно промитий до рН = 7 водою та ацетоном висушували до сталої маси, після чого з нього одержували хітозан шляхом лужного гідролізу за методикою роботи [3, с. 315 - 327.].

Отриманий хітозан характеризували за молекулярною масою методом капілярної віскозиметрії за методикою [5, с. 74 - 76.].

Вона виявилась рівною 500 кДа., що відповідає досить високомолекулярному полімеру.

Одержаний вищевказаним способом хітозан використовували для синтезу біоматеріалів з антибіотиком неоміцин сульфатом.

2.2. Неоміцин сульфат

Неоміцин є комплексом антибіотиків (неоміцинів А, В, С), що утворюються в процесі життєдіяльності гриба (актиноміцину) *Streptomyces fradiac* або споріднених мікроорганізмів. [11].

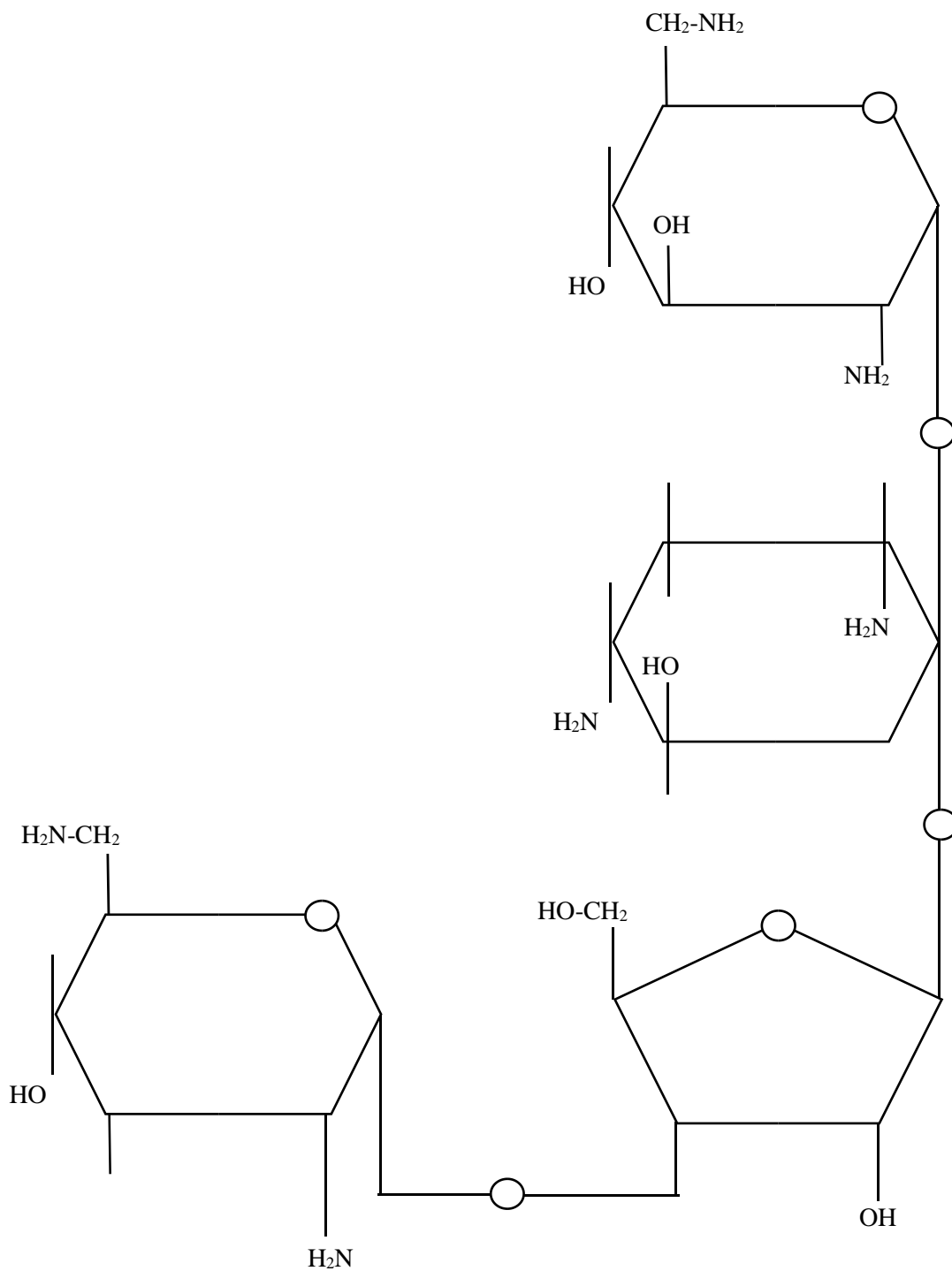


Рис. 1.7 Структура неоміцилу В

Неоміцин сульфат і є сумішшю сульфатів неоміцинів.

Фізичні властивості. Білий або жовтувато-білий порошок, майже без запаху, легко розчинений у воді і дуже мало в етиловому спирті [4, с. 5-29.] Теоретична активність 680 одиниць в 1 мг. Одна одиниця відповідає активності в 1мкг хімічно чистого неоміцину В (як основи).

Лікарські властивості. Неоміцин має широкий спектр антибактеріальної дії стосовно грамполозитивних (стафілококи, пневмококи та ін.) та грамнегативних (кишкова паличка, паличка дизентерії, протейо та ін.) бактерій [7, с. 156-157.].

Не діє на патогенні гриби, віруси та анаеробну флору.

Застосовують неоміцин сульфат внутрішньо при захворюваннях шлунково-кишкового тракту, якщо інші антибіотики малоефективні.

Місцево використовують при гнійних захворюваннях шкіри, кон'юктивітах та інших захворюваннях очей.

Форми застосування. Пігулки (по 0,1-0,2 г) внутрішньо, розчин або мазі зовнішньо.

Форми випуску. Пігулки по 0,1-0,25 г; флакони з 0,5 г (50000 одиниць); 0,5 і 2% -на мазь в тубах по 15 і 30 г; очні плівки з неоміцин сульфатом в упаковці по 30 шт.

Розчини його готують безпосередньо перед вживанням.

2.3. Синтез біологічно активного матеріалу на основі хітозану та неоміцин сульфату

Для одержання зразків біоматеріалів хітозан і неоміцин сульфат, важливим питанням було знайти такі умови, щоб отримана система була, за можливістю, найбільш гомогенною. Останнє важливо для ліофільного висушування рідкого біоматеріалу, який після цього перетворюється на

більш – менш однорідний порошкоподібний кінцевий продукт, в якому розподіл антибіотику в полімері повинен бути очікувано рівномірним. [22, с. 368.]

Пошуки оптимальних умов одержання вищевказаного біоматеріалу дозволило зупинитись на таких, найбільш прийнятних методиках.

Спосіб 1. Наважку хітозану з молекулярною масою 500 кДа і масою 1,5 г змішували в хімічному стакані на 150 мл з 30 мл дистильованої води і залишали після перемішування на 30 хв. для активації функціональних груп полімеру. Далі крапельно, при інтенсивному перемішуванні, додавали розчин концентрованої йодидної кислоти ($W = 50\%$) до досягнення розчином хітозану, що утворювався $pH = 4,5$.

Утворений розчин хітозан йодиду перемішували ще 10 хв. до гомогенізації.

Окремо в іншому хімічному стакані у 20 мл дистильованої води розчиняли неоміцин сульфат масою 0,25 г протягом 5 хв. (антибіотик дуже добре розчинний у воді).

Далі одержані розчини хітозан йодиду та неоміцин сульфату змішували між собою, отримавши 50 мл сумарного розчину, який за розрахунком 3% ний за полімером і 0,5% - ний за неоміцин сульфатом. Відмітимо, що титр неоміцин сульфату звідси дорівнює 0,005 г на 1 мл розчину, що відповідає його вмісту у відомих медпрепаратах.

Спосіб 2. Наважку хітозану масою 1,5 г активували в 40 мл дистильованої води, додавали розчин HI до $pH = 4,5$. Після активного перемішування розчину вже хітозан йодиду протягом 10 хв. додавали 0,25 г неоміцин сульфату і продовжували перемішування ще 20 хв. до отримання візуально прозорого розчину, об'єм якого доводили дистильованою водою до 50 мл і знову перемішували вже кінцевий розчин протягом 10 хвилин.

Обидва зразки під назвою ХТЗ – Нео – 1 і ХТЗ – Нео – 2 піддавали ліофільному висушуванню і готували до дослідження їх структури з допомогою деяких фізико-хімічних методів. Цікавим уявлялось питання,

який спосіб одержання біоматеріалу кращий з точки зору одержання більш якісного продукту.

РОЗДІЛ 3. ОБГОВОРЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1. Результати експериментального дослідження

Інтерес до хітину та хітозану зростає за рахунок загального розвитку хімії полісахаридів і їх похідних. У медицині для лікування і профілактики тромбозів використовується природний антикоагулянт крові — гепарин, за хімічною будовою є змішаним полісахаридом. [8, с.148.]. Найбільш близький його структурний аналог – сульфат хітозану також володіє антикоагулянтною активністю, зростаючою при збільшенні ступеня сульфатування. Можливість реалізації синергічного ефекту (посилення активності гепарину при введенні добавок сульфату хітозану) робить це з'єднання перспективним для створення лікарських препаратів антикоагулянтної і антисклеротичної дії.

N-іО-сульфатовані похідні частково дезацетильованого карбоксиметилхітина не тільки перешкоджають згортанню крові завдяки селективній адсорбції антитромбіну, а й різко зменшують інтенсивність поділу ракових клітин. [10, с. 55-58.].

Ще однією можливістю використання хітину, хітозану та їх похідних (карбоксиметилхітина, карбоксиметилхітозану, сукцинілхітозану) – створення біодеградабельних носіїв фармацевтичних препаратів (антибіотиків, антивірусних, протипухлинних та антиалергенних препаратів) у вигляді плівок (мембран). [14.]. Застосування таких плівок створює умови для виділення лікарських засобів, забезпечуючи ефект пролонгування їх дії.

В роботі були описані знайдені оптимальні способи одержання біологічно активних матеріалів на основі хітозану та антибіотику неоміцин сульфату, який здавна активно використовується в медичній практиці.

Як відомо, переважна більшість полімерів перебувають у аморфному фазовому стані, в тому числі і хітозан [2, с. 151-209.]. Одержані останніми роками його модифіковані похідні виявились теж аморфними продуктами, що, ймовірно, свідчить про те, що процес модифікування хітозану, т.б. хімічної обробки макромолекул полімеру, не порушує надмолекулярної його аморфної структури. Проте, актуальність цього питання все ще залишається в силі, бо, по-перше, в процесі синтезу модифікатів може відбуватися переструктурування хітозану, викликане різними хімічними реагентами з утворенням, як мінімум, частково кристалічних фаз в модифікаті; по-друге, нова структура одержаного модифікату надасть йому нових властивостей, що буде важливим чинником у використанні біоматеріалу, зокрема як медпрепарату після клінічних досліджень. Наприклад, препарат у кристалічній та аморфній формах, очевидно, будуть застосовуватись за різною методикою.

Цим і була продиктована необхідність всебічного дослідження полімерного комплексу хітозан-неоміцин сульфат декількома сучасними фізико-хімічними методами, а саме рентгено-дифракційним, растрової електронної мікроскопії та температурно-програмованої десорбційної маспектрометрії, тим більше, що синтез біоматеріалів такого складу лише розпочався.

Як видно з рисунків графічних залежностей, структура вихідного хітозану залишилась подібною структурі синтезованого біоматеріалу, т.б. вона аморфна.

Метою даної роботи було дослідження структури і властивостей вище зазначених біоматеріалів поширеними на сьогодні деякими фізико-хімічними методами. Для цього були використані наступні методи. [2, с. 151-209.]. I. Рентгено-дифракційний метод.

Одержані дефрактограми на приладі ДРОН-4-07 з ліофілізованих зразків раніше синтезованих біоматеріалів з різним вмістом неоміцин сульфату показали, що вони мають аморфну структуру без виражених кристалічних фаз, що характерно для багатьох інших речовин, в тому числі і полімерів (рис. 3.1; 3.2; 3.3).

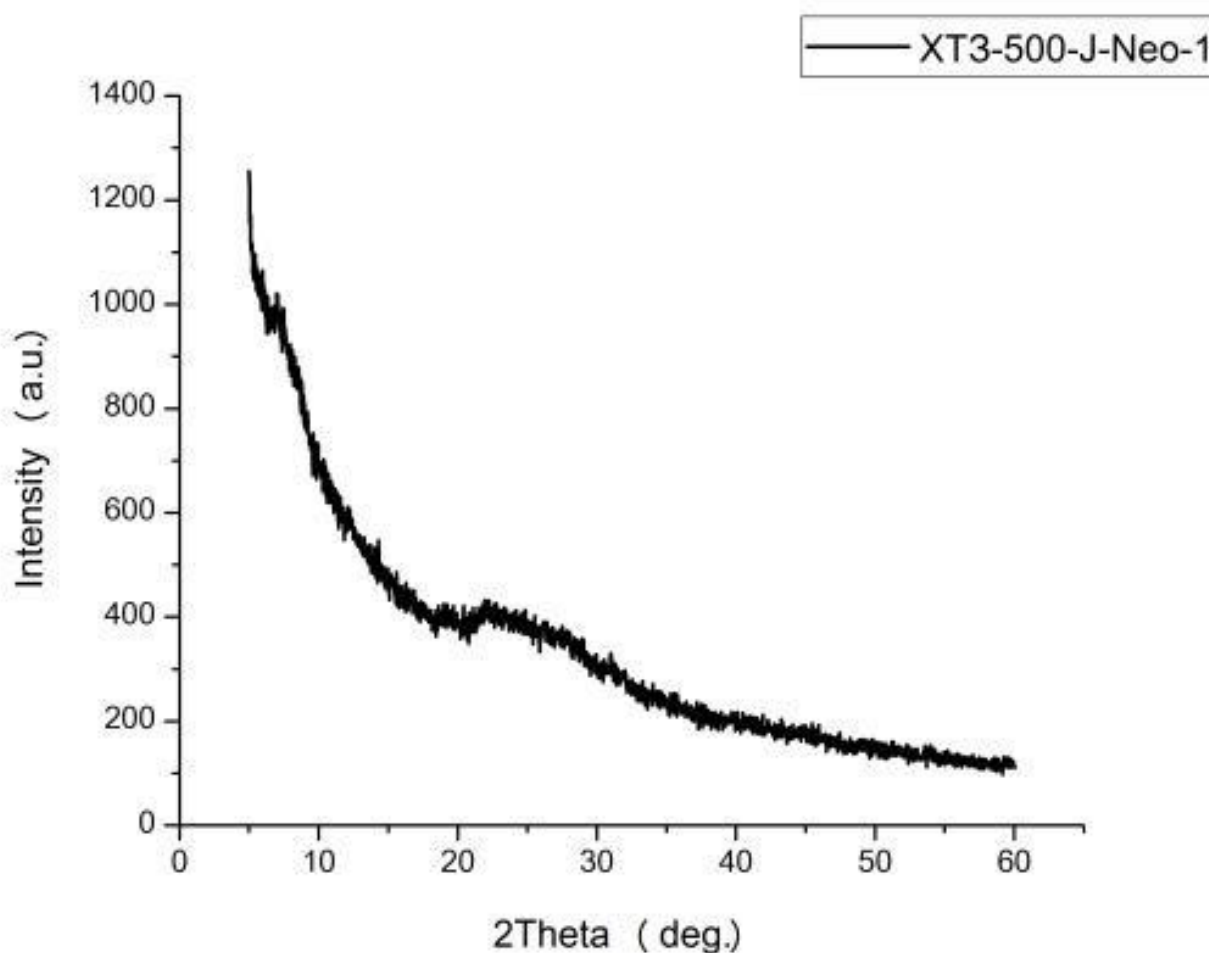


Рис. 3.1. Рентгенівська дифракція зразків з молекулярною масою 500кДа і різним вмістом неоміцин сульфату.

Рис. 3.2. Рентгенівська дифракція зразків з молекулярною масою 500кДа і різним вмістом неоміцин сульфату.

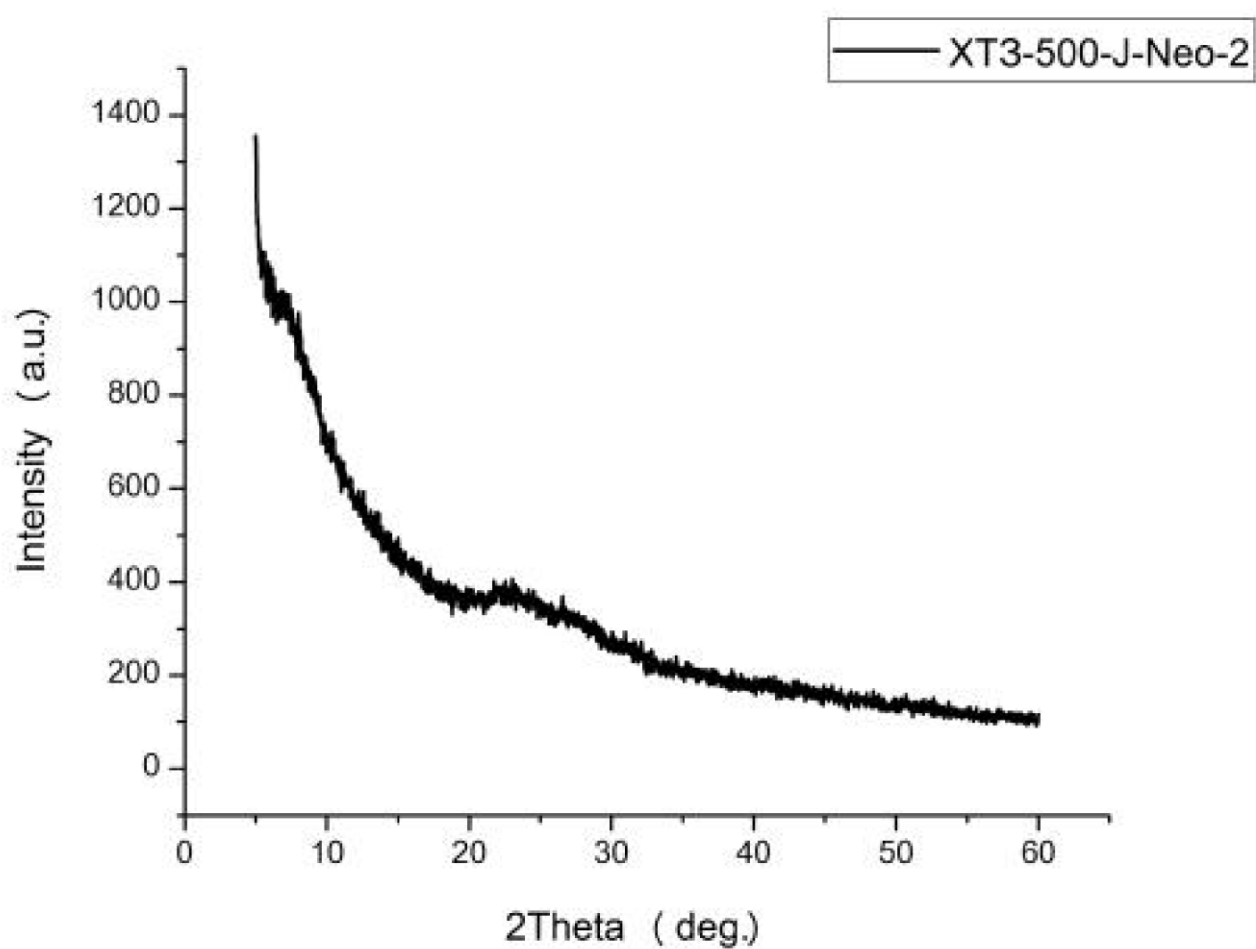
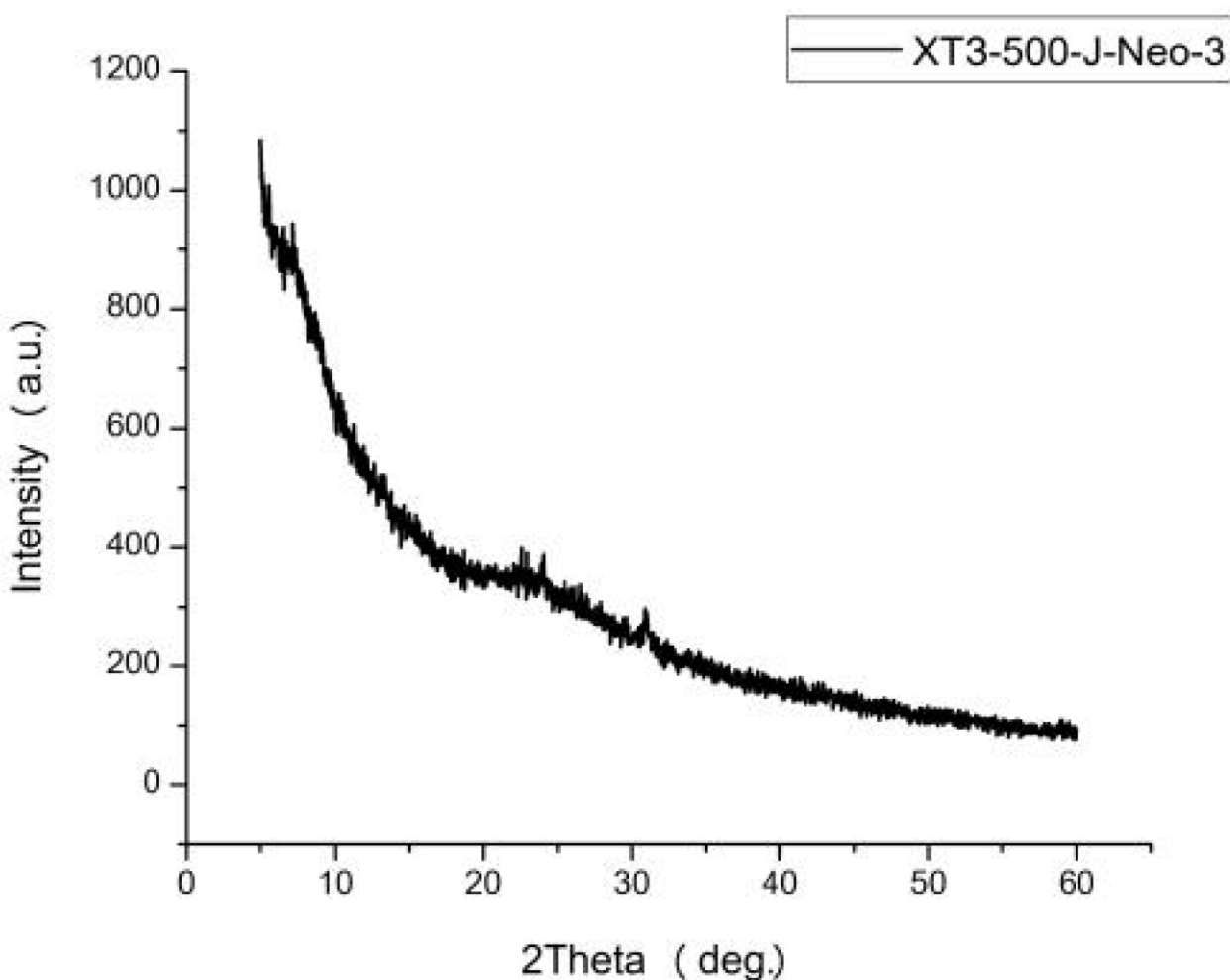


Рис. 3.3. Рентгенівська дифракція зразків з молекулярною масою 500кДа і різним вмістом неоміцин сульфату.

II. Растрова електронна мікроскопія.

На растровому електронному мікроскопі РЕММА-102 досліджені зразки виявили пористу регулярну структуру з розміром пор від 50 до 150 нм, про що свідчать мікрофотографії (рис. 3.4 і 3.5).



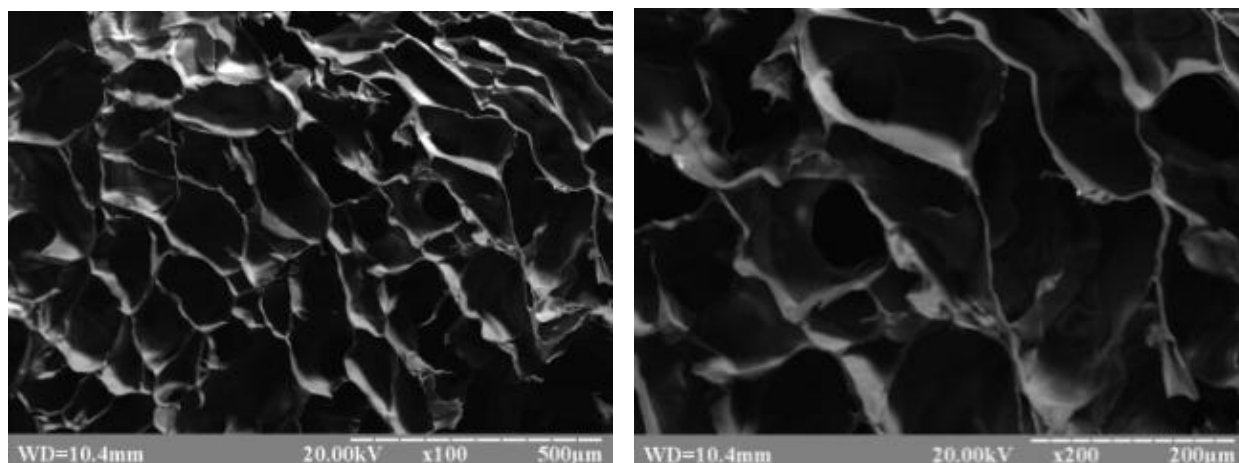


Рис. 3.4. XT3-500-J-Neo-1

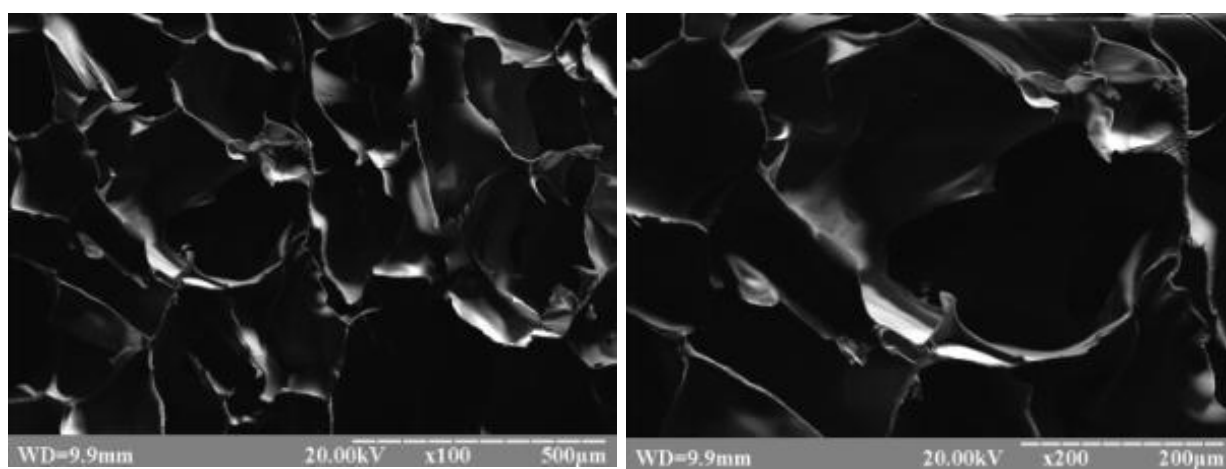


Рис. 3.5 XT3-500-J-Neo-2

III. Температурно-програмована десорбційна мас-спектрометрія.

На мас-спектрометрі МХ-7304 з вакуумною програмованою піччю були встановлені температурні профілі виходу йонів та води з досліджених зразків біоматеріалів, а одержані результати ілюструють графіки на рис. (3.6, 3.7 і 3.8.); (3.9, 3.10 і 3.11); (3.12, 3.13 і 3.14).

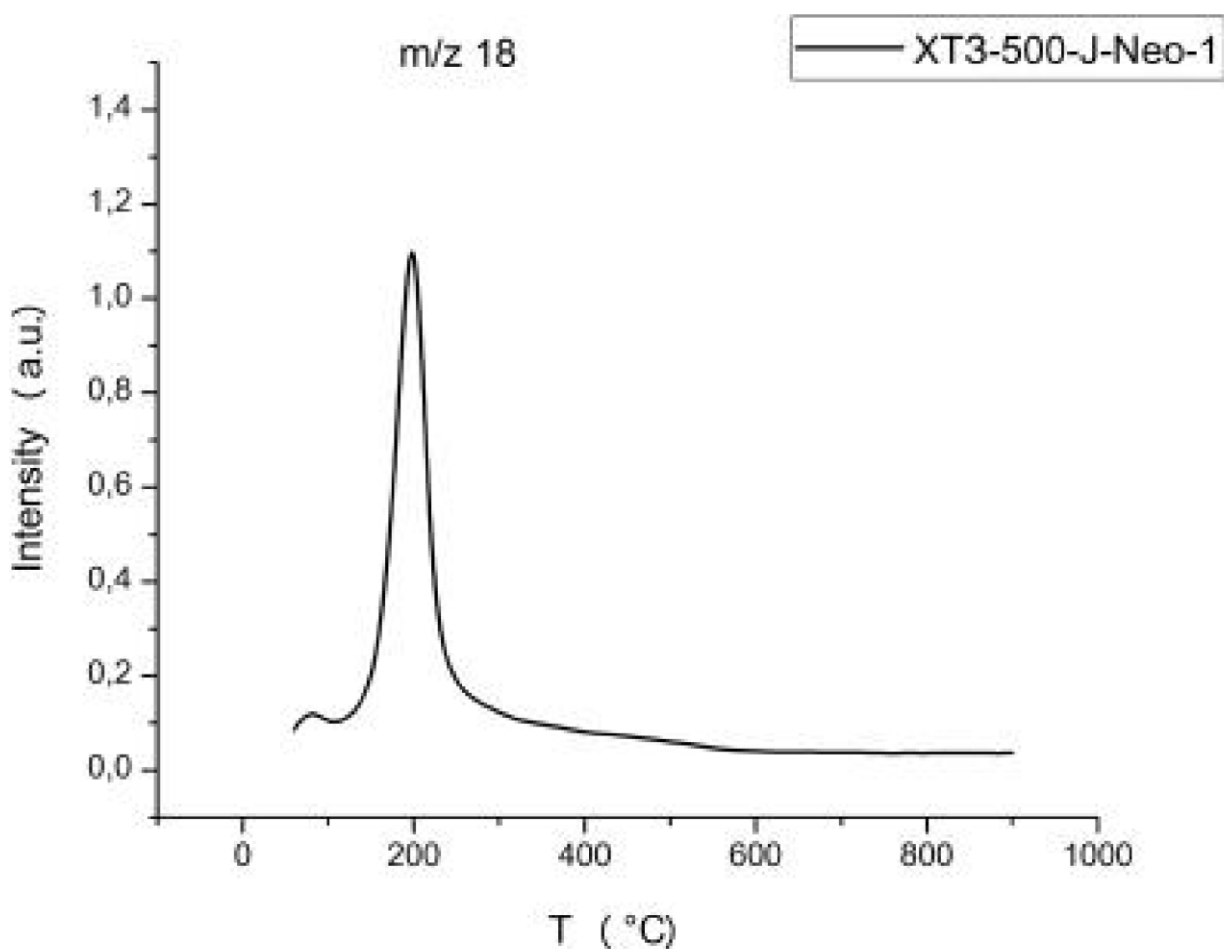
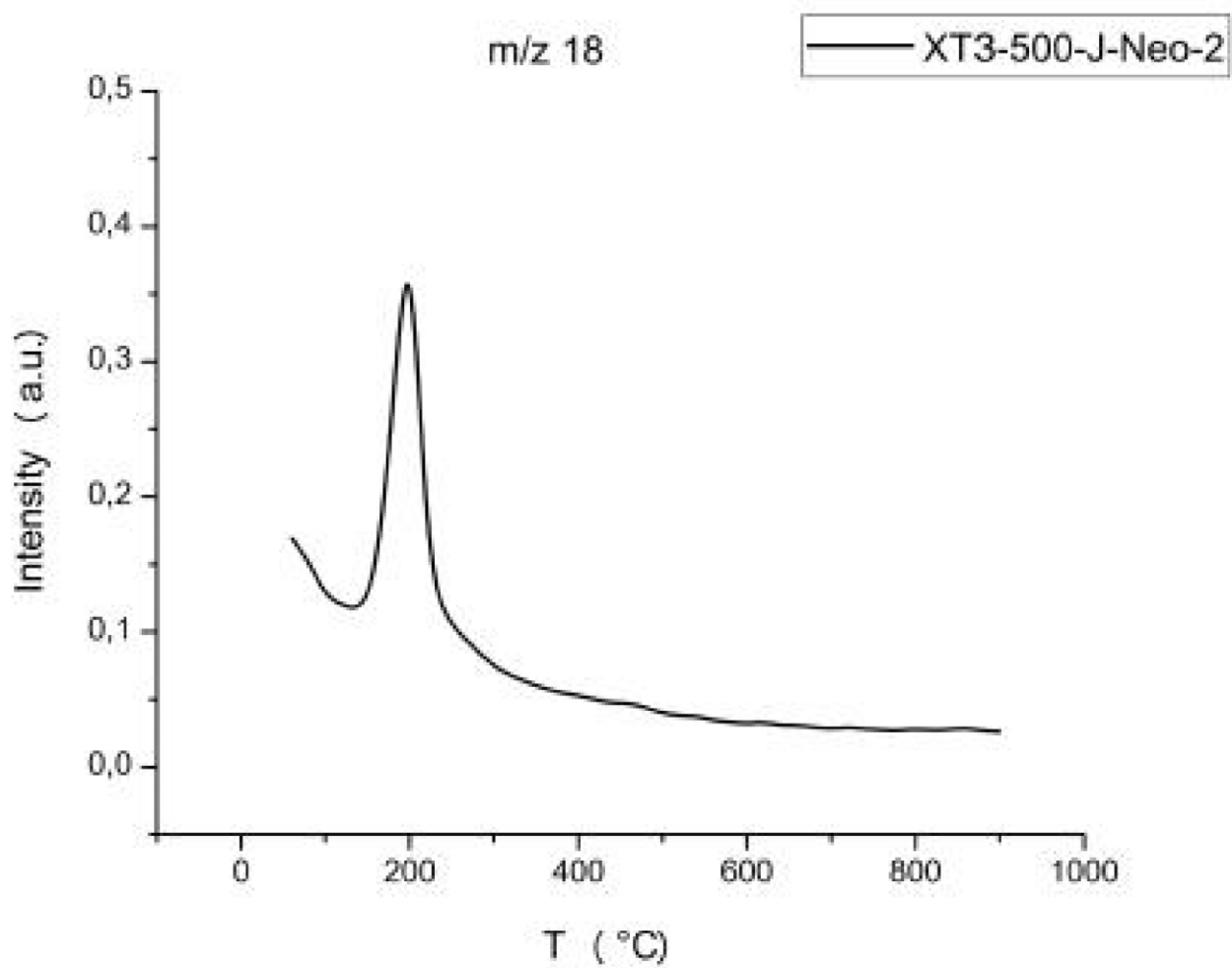


Рис. 3.6 Температурний профіль виходу йонів m/z 18 (вода) зі зразків.

Рис. 3.7 Температурний профіль виходу іонів m/z 18 (вода) зі зразків.

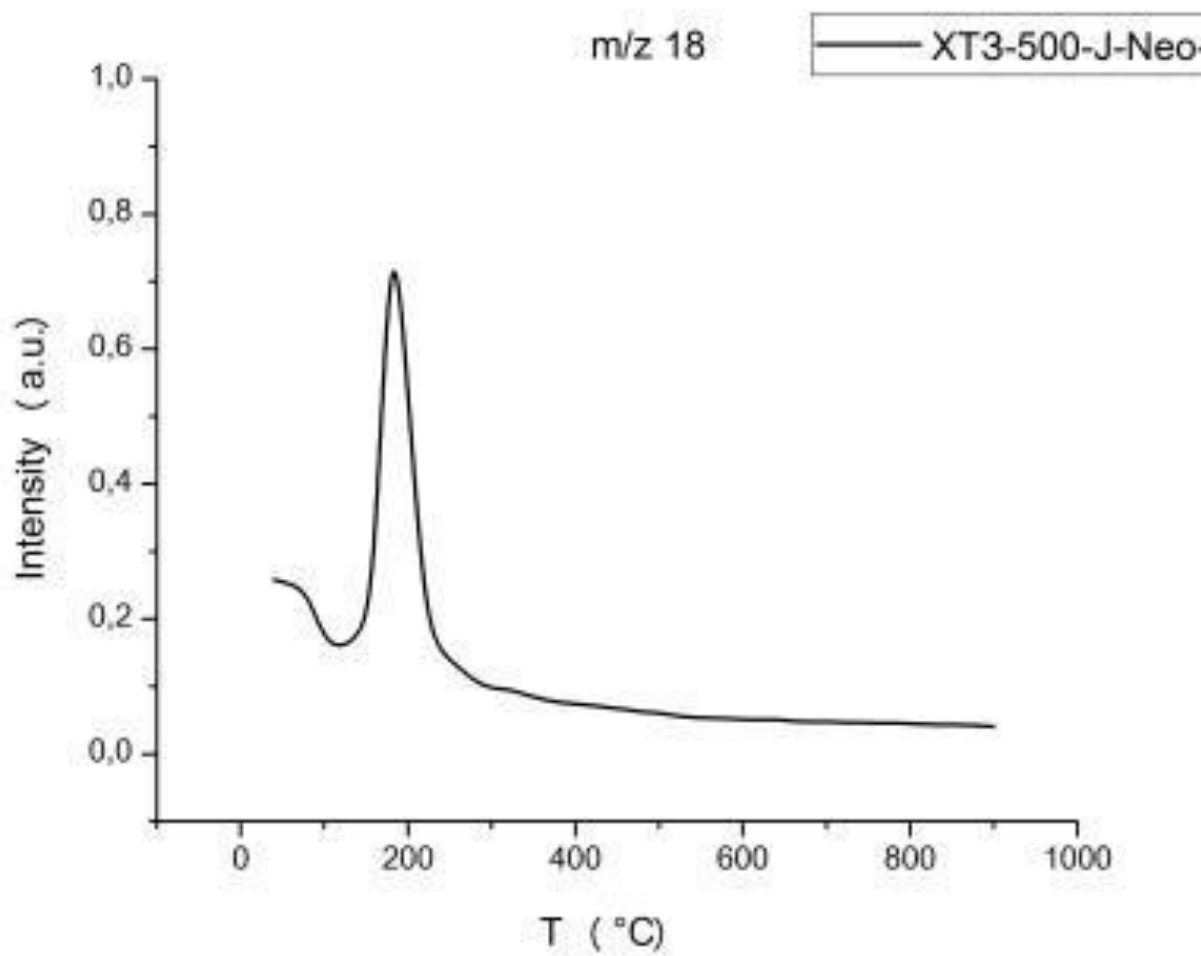


Рис. 3.8 Температурний профіль виходу іонів m/z 18 (вода) зі зразків.

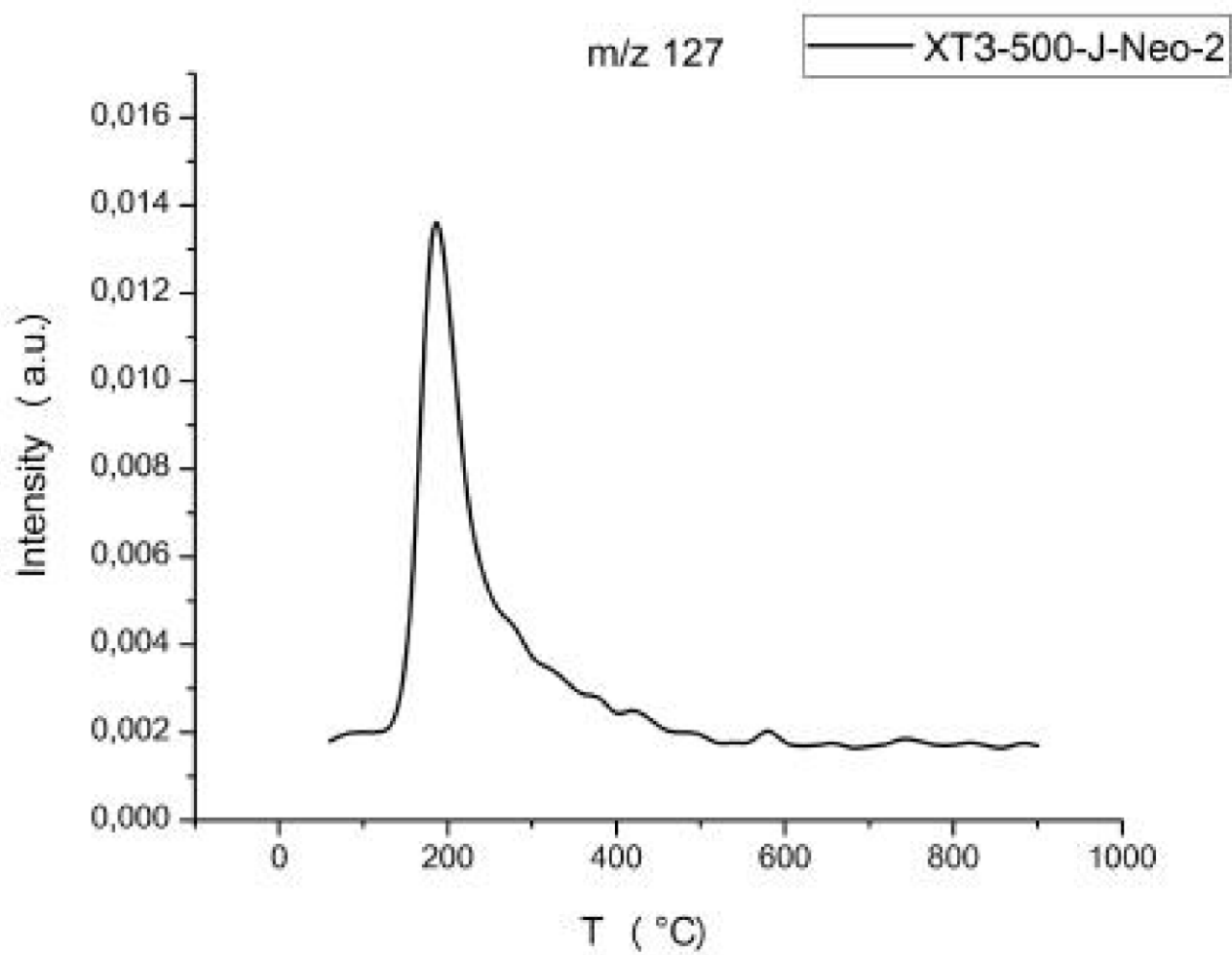
Рис. 3.9. Температурний профіль виходу іонів m/z 127 (йод) зі зразків.

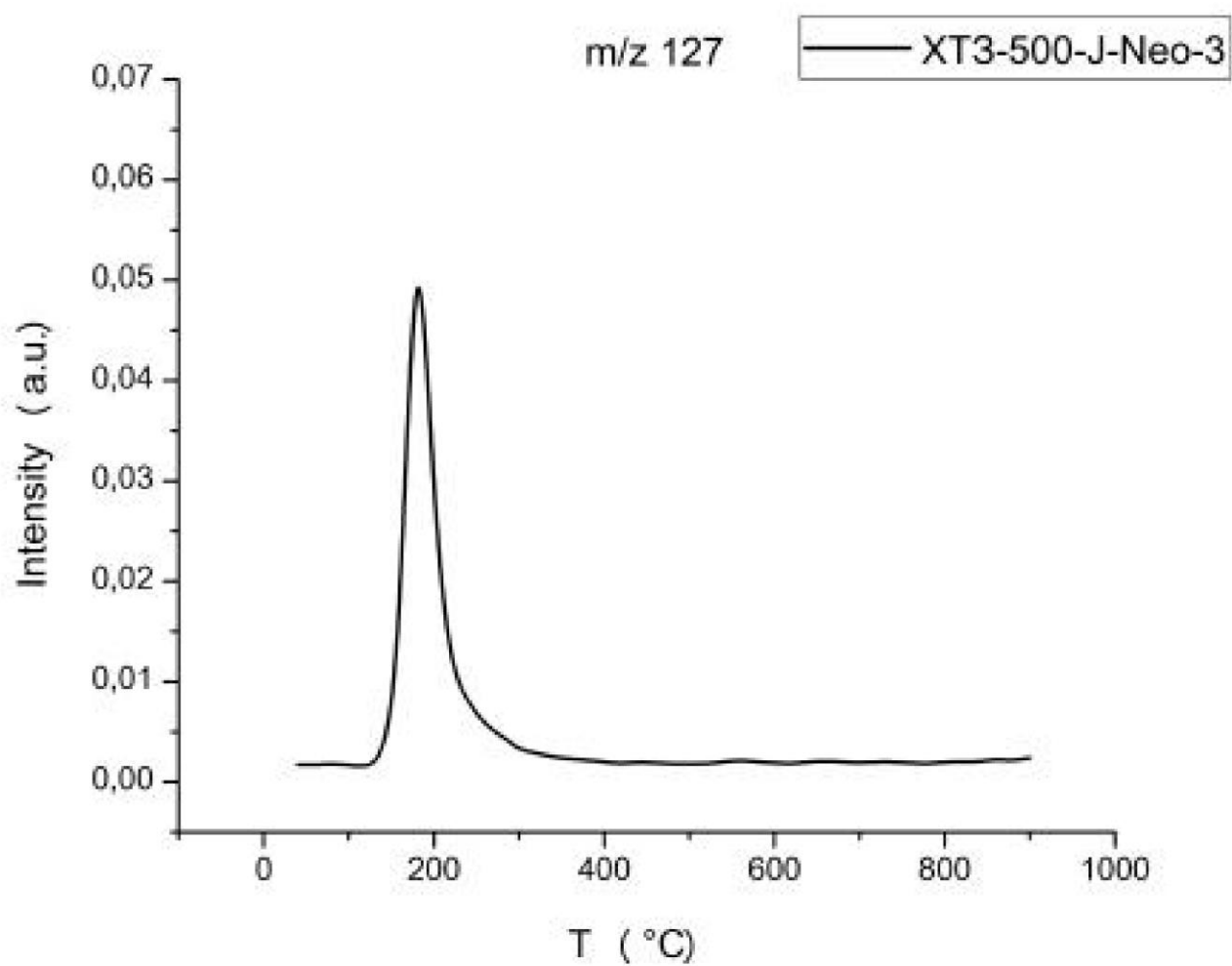
Рис. 3.10. Температурний профіль виходу іонів m/z 127 (йод) зі зразків.

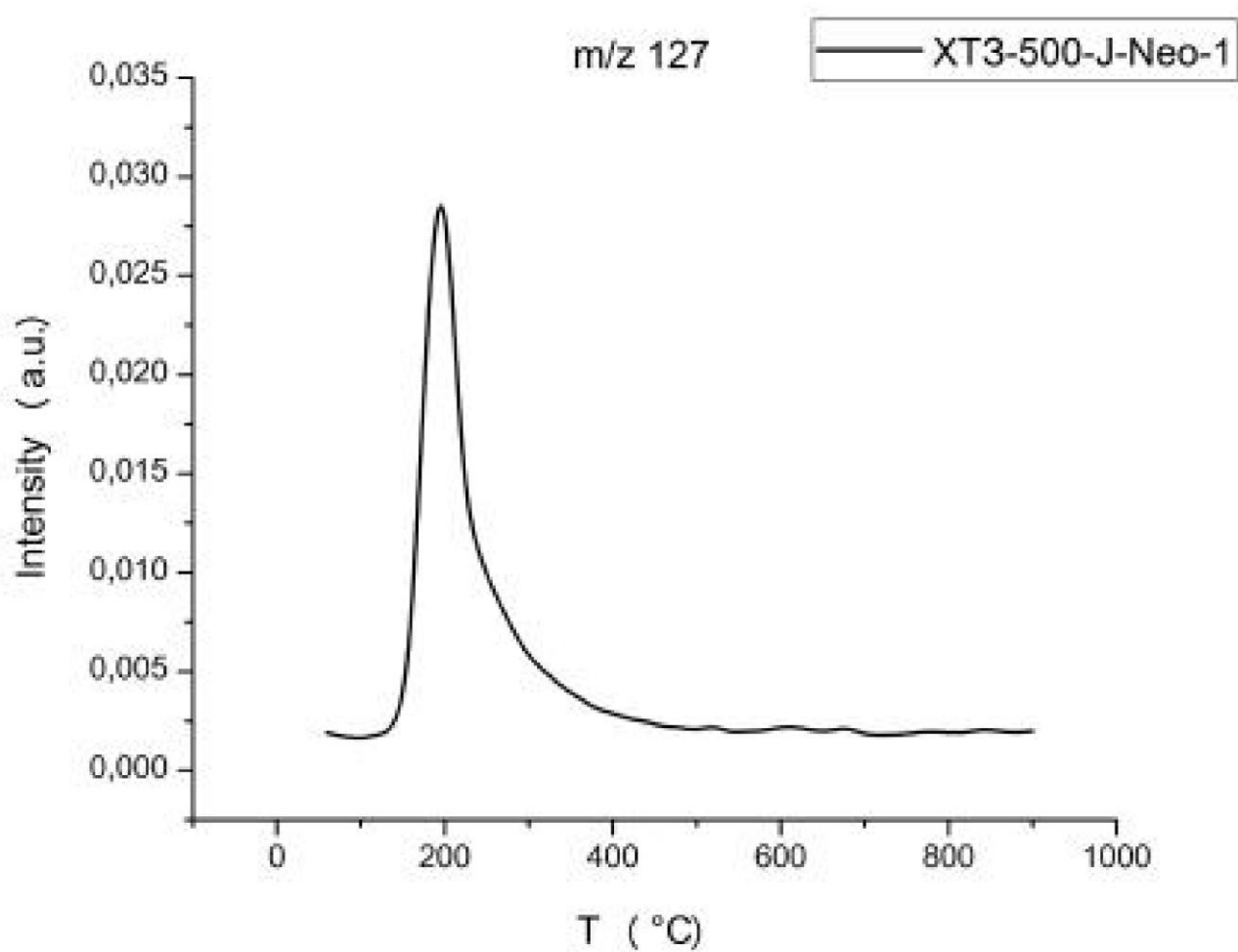
Рис. 3.11. Температурний профіль виходу іонів m/z 127 (йод) зі зразків.

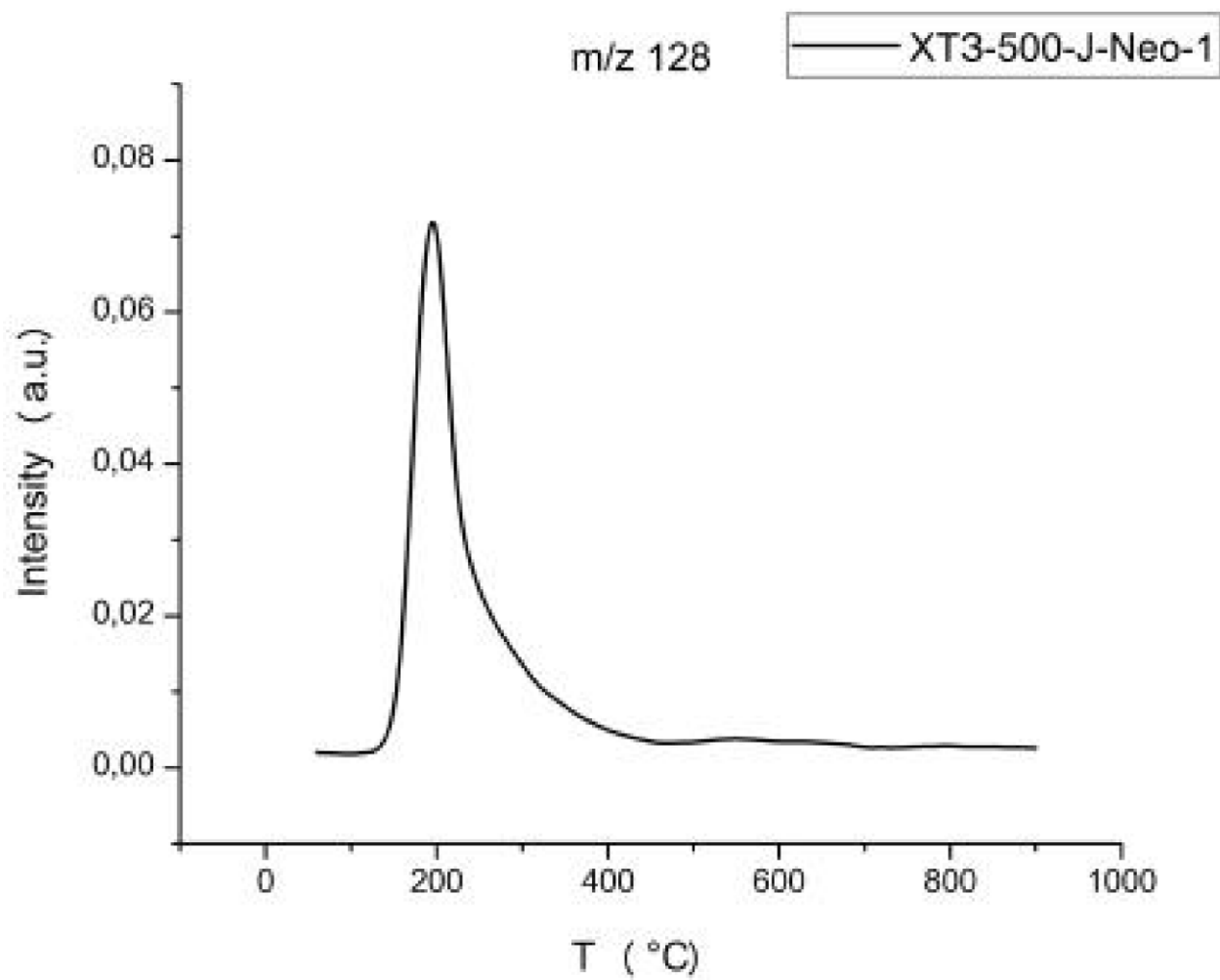
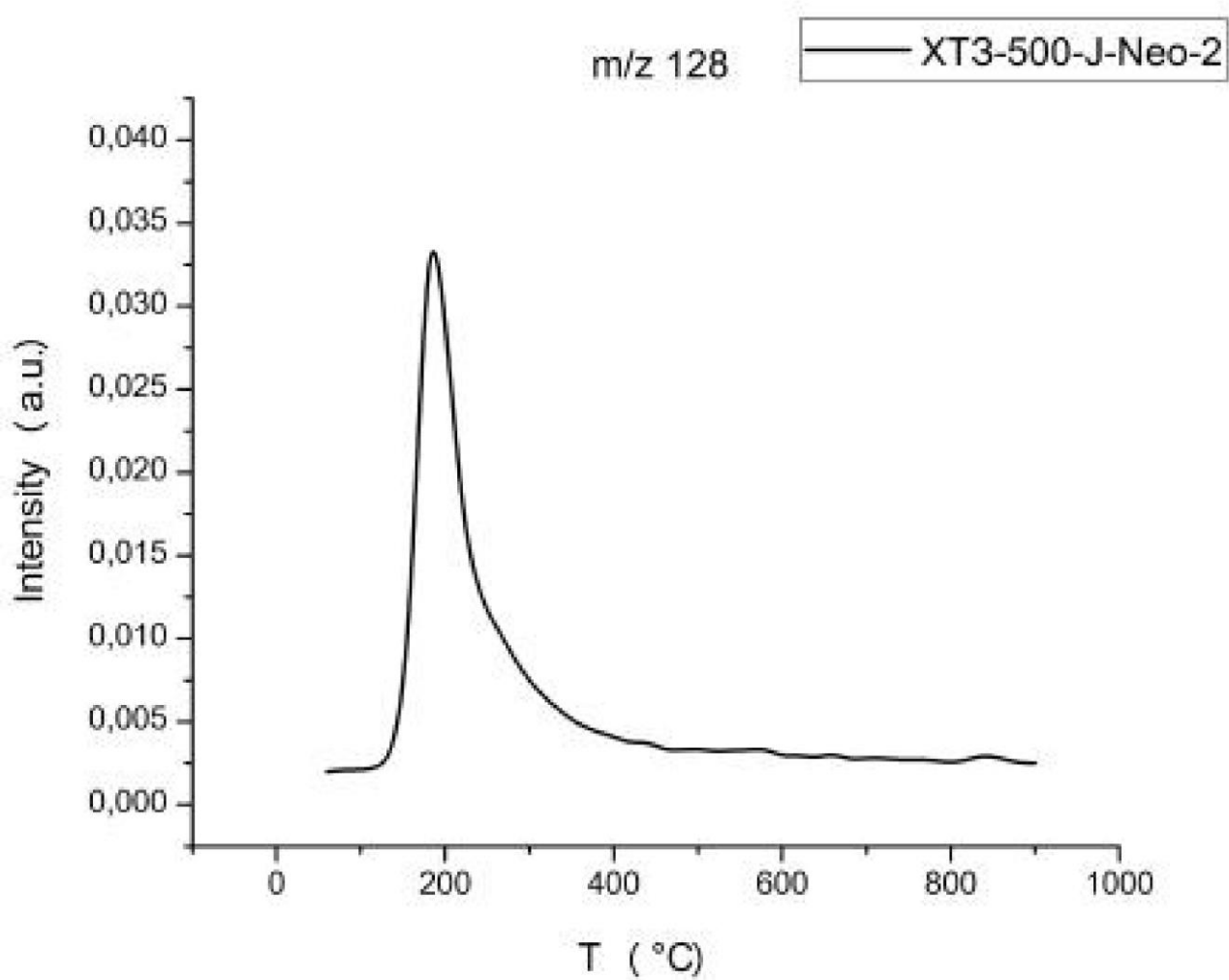
Рис. 3.12 Температурний профіль виходу іонів m/z 128 ($[H]^+$) зі зразків.

Рис. 3.13 Температурний профіль виходу іонів m/z 128 ($[H]^+$) зі зразків.

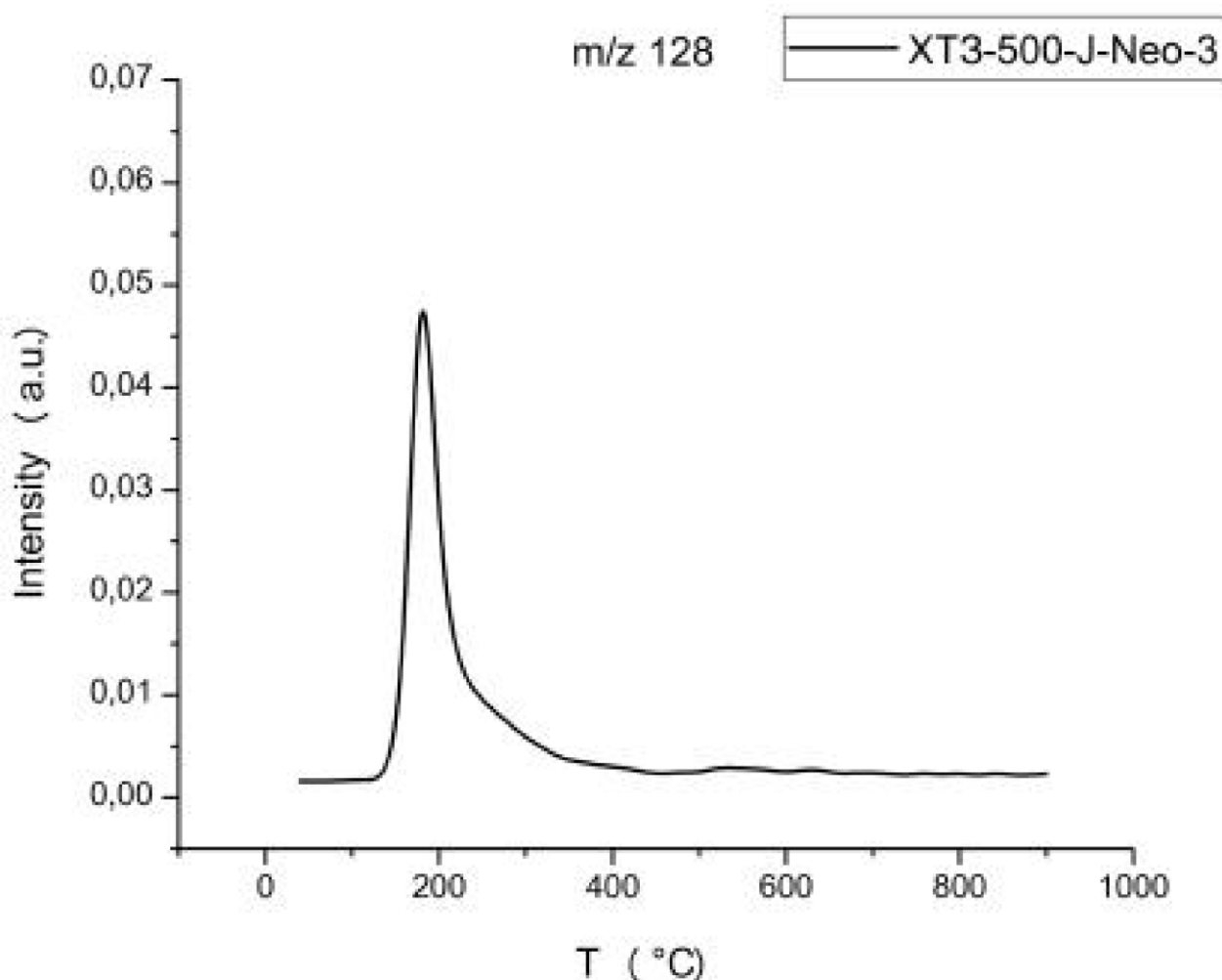
Рис. 3.14 Температурний профіль виходу іонів m/z 128 ($[H]^+$) зі зразків.



Як видно з графіків, характер наведених профілів – однотипний, що підтверджує практично однакову структуру синтезованих біоматеріалів на основі хітозану з вмістом неоміцин сульфату та йоду розчинника.

ВИСНОВКИ

1. Проведено огляд наукової літератури, близької темі дослідження.



2. Знайдені оптимальні умови синтезу біологічно активних зразків на основі хітозану з молекулярною масою 500 кДа, йодидної кислоти та антибіотику неоміцин сульфату.

3. За різною методикою отримані зразки біоматеріалів XT3-NeO-1 та XT3-NeO-2 в гелеподібній та ліофілізованій формі.

4. Досліджена структура ліофілізованих зразків методами:

- рентгено-дифракційний метод
- растрова електронна мікроскопія
- температурно-програмована десорбційна мас-спектрометрія.

5. Показано, що одержані біоматеріали мають аморфну структуру, незалежно від методики їх одержання, з однотипною поведінкою в процесі дослідження.

6. Отримані біоматеріали можуть бути рекомендовані як нова лікарська форма неоміцин сульфату, яка після відповідних клінічних випробувань може використовуватися в дерматології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Сировинні джерела і способи отримання хітину та хітозану / за ред. К. Г. Скрябина, Г. А. Вихревой, В. П. Варламова. Москва: Наука, 2002. С. 7–23.
2. Muzzarelli R. A. Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Science. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. 2004. Vol. 104, № 186. P. 151–209.
3. Хитозан и его производные в биоинкапсулировании. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение / под ред. К. Г. Скрябина, Г. А. Вихревой, В. П. Варламова. Москва: Наука, 2006. С. 315–327.
4. Шелковский В. С. Использование окислительно-восстановительных и агрегационных свойств красителя метиленового синего в нанобиофизических исследованиях. Вестник физико-технического института низких температур им. Б.И. Веркина. Биофизика. 2015. Вып. 33. С. 5–29.

5. Голубнича В.М., Трофименко Я. В., Калінкевич О.В., Корнієнко В.В., Скляр А.М. Антибактеріальна дія комплексних препаратів на основі хітозану та наночастинок міді. – *Biomedical and biosocial anthropology*, 2016, №26, 74 – 76.
6. I. Petrov, O. Kalinkevich, M. Pogorielov, A. Kalinkevich, A. Stanislavov, A. Sklyar, S. Danilchenko, T. Yovcheva. Dielectric and electric properties of new chitosan – hydroxyapatite materials for biomedical application: Dielectric spectroscopy and corona treatment. – *Carbohydrate Polymers* 151, 2016, 770 – 778.
7. Sklyar A.M. Vysotsky I. Yu. Kachanova A.A. Lyubchak I. V. Peculiarities of chitosan modification in order to use as antidotetherapeutic agent. – Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини: збірник тез доповідей V Міжнародної науково – практичної конференції студентів та молодих вчених, м. Суми, 20 – 21 квітня 2017 р./ Відп. за вип. М.В. Погорєлов. – Суми : СумДУ, 2017. – Р. 156 – 157.
8. A.M. Sklyar, O.V. Kalinkevich, V.D. Chivanov, S.V. Novikov, A.G. Ryabyshev, A.N. Kalinkevich, S.N. Danilchenko. Characterization of chitosan iodide by temperature – programmed desorption mass spectrometry method. Ukrainian Conference with International participation chemistry, physics and technology of surface and Workshop nanostructured biocompatible/ bioactive materials. 24 – 25 травня 2017 р. – С.148.
9. Калінкевич О.В., Скляр А.М., Ткач Г.Ф., Калінкевич О.М., Данильченко С.М., Використання хітинвмісних відходів для одержання біоматеріалів медичного призначення та сорбентів.// Матеріали VII Міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми дослідження довкілля», 12-14 жовтня 2017, м. Суми., 168-173.
10. Біоматеріали на основі хітозану для реконструктивно-відновлювальної хірургії та тканинної інженерії. Калінкевич О.В., Калінкевич О.М., Данильченко С.М., Погорєлов М.В., Дейнека В.М., Васильєв Р.Г., Скляр А.М.// Матеріали першої міжуніверситетської науково-

- практичної конференції, 26-27 квітня 2017р., м. Київ. – Науково-практичний журнал «Біомедична інженерія», №4, с.55 – 58.
11. A.M. Sklyar, O.V. Kalinkevich, V.D. Chivanov, S.V. Novikov, A.G. Ryabyshev, A.N. Kalinkevich, S.N. Danilchenko. Characterization of chitosan iodide by temperature programmed desorption-mass spectrometry metod // Збірник матеріалів. Ukrainian conference with International participation Chemistry, Physics and technology of surface, 24-25 травня 2017, Київ.
 12. A.M.Sklyar, I.Yu.Vysotsky, A.A.Kachanova, I.V.Iyubchak. Features of restructuring of biomaterials based on alginate-orthophosphas ceramics in bone.// Збірник тез доповідей V Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених. Суми, 20-21 квітня, 2017.
 13. Dodgson, J. L. Comparison of effects of chitin and chitosan for control of *Colletotrichum* sp. on cucumbers. *Microbiology*. 2017. № 11. P. 87–93.
 14. Chitosan iodide: its obtaining, characterization and thermal behavior. A. Sklyar, V.D. Chivanov, A.G.Ryabyshev, O.Kalinkevich, S.Danilchenko. *Известия Уфимского научного центра РАН. ДокХут – 2018* (г. Севастополь)
 15. Біоматеріали на основі хітозану для медицини: синтез та характеристика. С.І. Зінченко, О.В. Коченко, О.В. Калінкевич, А.М. Скляр, О.М. Калінкевич, С.М. Данильченко, XIV Українська конференція з високомолекулярних сполук. Тези доповідей. Київ, 15-18 жовтня 2018, с. 110-112.
 16. Полюдова Т. В., Шагдарова Б. Ц., Коробов В. П., Варламов В. П. Бактериальная адгезия и образование биопленок в присутствии хитозана и его производных. *Микробиология*. 2018. № 2. С. 129–136.

17. Погорєлов М.В., Дейнека В.М., Калінкевич О.В., Калінкевич О.М., Данильченко С.М., Олешко О.М., Любчак І.В., Скляр А.М., Спосіб отримання місцевого гемостатичного матеріалу для зупинки кровотечі з паренхіматозних органів. // Патент на корисну модель №129 196, 25 жовтня 2018, бюл. №20, м. Київ.
18. Чернышова Е. Б. Модификация пленочных материалов на основе хитозана низкомолекулярными и полимерными альдегидами: автореф. дис. на получение науч. степени канд. хим. наук: 02.00.06. Волгоград, 2018. С. 18 - 34.
19. Степура Н. О., Скляр А. М. Одержання біоматеріалів на основі хітозану та аргенум (I) нітрату. Збірник Сумського державного педагогічного університету ім. А. С. Макаренка. Природничі науки. 2018. Вип. 15. С. 52–57.
20. Калінкевич О.В., Скляр А.М., Калінкевич О.М., Зінченко Є.І., Данильченко С.М. Сорбенти на основі хітозану для вирішення екологічних та біомедичних проблем. // Матеріали VIII Міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми дослідження довкілля», 2425 травня 2019, м. Суми.
21. Anthonsen L. T. Chitin and Chitosan: Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application. Chitin and chitosan. 1990. № 31. P. 1146–1147. URL: <https://drgudinho.files.wordpress.com/2017/04/rinaudo2006-chitin-and-chitosanproperties-and-applications.pdf> (дата обращения 1.11.2020).
22. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. Г. К. Скрыбина, Г.А. Вихоревой, В.Н. Варламова. М.: Наука, 2002. 368 с.