

Сумський державний педагогічний університет імені А. С. Макаренка

Природничо – географічний факультет

Кафедра хімії та методики навчання хімії

ЧИЧИКАЛО ДАР'Я ВОЛОДИМИРІВНА

**ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО МАТЕРІАЛУ НА ОСНОВІ
ХІТОЗАНУ ТА ФУКОРЦИНУ**

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

« ____ » _____ 2020 року

Виконавець

_____ Д.В.Чичикало

« ____ » _____ 2020 року

Суми 2020

Зміст

ВСТУП	3
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	5
1.1. Загальні відомості про полімери	5
1.2. Фізико – хімічні властивості хітину та хітозану	13
1.3. Методичний аспект дослідження хітину та хітозану	18
1.4. Сфери застосування хітозану	21
РОЗДІЛ II. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	26
2.1. Правила техніки безпеки під час роботи в лабораторії	26
2.2. Промислове виділення хітину з панцирів ракоподібних	29
2.3. Синтез хітозану та його очищення	31
2.3. Підготовка хітозану та методи одержання і дослідження біологічно активного матеріалу	34
2.3.1. Визначення молекулярної маси хітозану	34
2.3.2. Потенціометричне титрування та розрахунок СД хітозану	35
2.4. Методика одержання біологічно активного матеріалу	36
2.4.1. Методика одержання біологічно активного матеріалу хітозан йодиду з фукорцином	37
2.4.2. Ліофільне висушування	38
РОЗДІЛ III. ОБГОВОРЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	40
ВИСНОВКИ	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	47

ВСТУП

Актуальність теми. З часу появи живих істот целюлоза та хітин відіграють важливу роль і підтримують екологічну рівновагу. Минуло більше двох століть, як хітин був відкритий офіційно і вважався дуже важливим полімером з наукової та промислової точки зору, оскільки він має багато застосувань у багатьох різних сферах людського життя. Він успішно застосовується в медицині, паперовій промисловості, косметології, біотехнології, харчовій промисловості тощо.

Хітин - це тваринна версія целюлози, і він є другою найпоширенішою в природі сполукою, але професор М. Петро оскаржив це припущення, сказавши, що хітин, безумовно, є дуже рясним матеріалом.

Розвиток комерційних застосувань хітину, а особливо його похідного хітозану останніми роками значно прогресував. Першим відомим застосуванням хітозану була міцна, гнучка плівка, яка використовувалася як компонент лаку, нанесеного на скрипки Страдіварі. Проте нові потреби суспільства змінили своє ставлення до хітозану. Зараз увага вчених зосереджена на екологічно чистих технологіях, що стимулює інтерес до біополімерів, в цілому і хітозану зокрема, які є більш універсальними та набагато більше біодеградабельними полімерами, ніж їх синтетичні аналоги.

Мета дослідження. Розробити методику одержання біологічно активного матеріалу на основі хітозану та медичного засобу фукорцину і дослідити структуру вказаного матеріалу.

Завдання.

1. Проаналізувати наукову літературу в сфері робіт по одержанню біоматеріалів на основі хітозану.
2. Підготувати вихідні зразки хітозану певної молекулярної маси для одержання біоматеріалів.

3. Дослідити структуру одержаних продуктів методами рентгенівської дифракції та електронної мікроскопії .

Предмет дослідження. Хітин / хітозан антарктичного криля.

Об'єкт дослідження. Процес утворення композиційного матеріалу з хітозану та медичного засобу фукорцину.

Методи дослідження.

- Теоретичний і системний аналіз літератури, узагальнення і систематизація виявлених даних для формулювання та обґрунтування висновків за результатами дослідження;
- Рентгенівська дифракція;
- Електронна мікроскопія.
- Мас – спектроскопія.

Теоретична і практична значення роботи. Вище вказаний біоматеріал на основі природно біологічного матеріалу одержаний вперше. Дослідження його структури та властивостей, а в подальшому і біологічної активності, поповнить число подібних і вже відомих біоматеріалів на основі хітозану з одного боку, та поставить питання про можливість його використання в певній галузі медицини.

Апробація результатів дослідження. Результати дослідження опубліковані у збірнику наукових праць «Природничі науки», 2020.

РОЗДІЛ I

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1. Загальні відомості про полімери

Розвиток людства пройшов через декілька важливих епох, таких як: кам'яний, бронзовий, залізний та сталевий вік (промислова революція). Серед великої кількості різноманітних речовин, які ми зустрічаємо у повсякденному житті, є група сполук, яка відрізняється від інших своїми фізичними властивостями: високою деформацією, високою в'язкістю розчинів, здатністю утворювати плівки, волокна та гель. Природні та синтетичні каучуки, пластмаси, білки, крохмаль відносяться саме до цього класу. Вченими доведено, що всі ці речовини складаються з молекул – гігантів або макромолекул. Тому молекули речовин, які складаються з великої кількості повторюваних ланок і, які накопичуються зв'язуючи малі молекули, називаються полімерами [1].

Термін «полімер» у хімічній літературі з'явився завдяки шведському хіміку Й.Я. Берцеліусу у 1833 р.. Цей термін був введений для позначення певних ізомерів, де полімери розглядалися як сполуки одного складу, але різної молекулярної маси. Однак перші згадки про синтетичні полімери з'явилися ще у 1838 р. (полівінілхлорид) та у 1839 р. (полістирен).

Полімерна хімія як наука виникла в 60-х роках ХІХ ст. як складова хімічної будови органічних сполук О.Бутлерова, яка дозволила систематизувати величезний практичний матеріал, накопичений органічною хімією. Природу полімерів та способи їх отримання розглядали багато вчених, зокрема німецькі хіміки Штаудінгер, Фішер, Мейер та Френсіс [2].

Технологія полімерів на сучасному етапі розвитку науки є однією з найбільших галузей. Величезна кількість науковців працює у сфері синтезу,

дослідження властивостей і переробки полімерів. Це пов'язано з тим, що сьогодні полімери широко ввійшли в життя людини, а хіміки навчились синтезувати високомолекулярні сполуки (ВМС) з наперед заданими властивостями (полімерні композиційні матеріали, лаки і фарби, синтетичні волокна тощо). Виникнення самостійної науки про високомолекулярні сполуки припадає на початок ХХ століття, хоча довгий час існування великих ланцюгових молекул (макромолекул) взагалі заперечувалося більшістю хіміків. Тому 1920 – 1930 роки можна характеризувати періодом «великих суперечок» Г. Штаудінгера з хіміками – органіками та представниками колоїдної хімії за визнання існування макромолекул. Варто зауважити, що ця боротьба точилася навколо окремого класу полімерних сполук – тих, що мають саме молекулярну будову [3].

Хімічна галузь, як і наука про ВМС, розвивалась складним шляхом дослідження і встановлення структури природних біополімерів, а потім – пошуками синтетичних замінників цих матеріалів. Виникли нові галузі промисловості (синтетичного каучуку, штучних волокон, лаків і фарб, будівельних матеріалів), були синтезовані нові за властивостями ВМС і виникла галузь синтезу пластичних мас, елементоорганічних ВМС, синтетичних волокон з властивостями, яких не має у природних полімерів.

У залежності від маси молекули хімічні сполуки поділяються на низькомолекулярні з молекулярною масою 500 – 1000 Да¹, олігомери(смоли) та високомолекулярні сполуки (полімери) з молекулярною масою відповідно 1000 – 10000 та 1000 – 1000000 Да і вище. Всі вказані межі молекулярних мас є досить умовними [4].

Безумовно, що високомолекулярні сполуки існували задовго до пізнання їх структури і це природні полімери, утворені за допомогою бактерій, грибів, водоростей, рослин, тварин або в клітинах людського тіла. Яскравий приклад - целюлоза, яка є основною частиною рослин, а також крохмаль,

¹ Да – дальтон.

накопичений рослинами хітин, колаген, каучук, казеїн, – тощо. У кожному живому організмі полімери (біополімери), такі як ДНК, РНК, білки і полісахариди, виконують специфічні функції, які дозволяють організму виживати, рости і розмножуватися. Крім того, натуральні полімери, такі як бавовна, льон, джут, шовк і вовна, вже давно використовуються у виробництві одягу, мотузки, килимів, утеплювача і оббивки [5].

Перший повністю синтетичний матеріал був отриманий в 1909 році, який одержували на основі фенолоформальдегідних смол, названих бекелітами, які мали дуже хороші ізоляційні властивості. У 1912 році німецький хімік Фріц Клатте розробив промисловий спосіб отримання полівінілхлориду. Важливі досягнення у розвитку хімії синтетичних полімерів і матеріалів на їх основі мали місце в 30-х роках ХХ століття, які пов'язані з винайденням методів переробки нафтопродуктів.

Отже, полімери утворюють велику, природного та синтетичного походження групу речовин. Полімери класифікують за численною кількістю ознак. Так **за складом основного ланцюга розрізняють** гомоланцюгові - основний ланцюг з однакових атомів (наприклад, з Сульфуру $-S-S-S-$, Карбону $C-C-C-$, Фосфору $-P-P-P-$) і гетероланцюгові - основний ланцюг з різних атомів (наприклад $-C-O-$, $-Si-O-$, $-P=N-$).

Також **за походженням** полімери поділяються на синтетичні – одержані шляхом синтезу з мономерів (поліетилен, полістирен), натуральні(природні)– виділенні з природних матеріалів (целюлоза, натуральний каучук) та штучні – модифіковані природні полімери (нітроцелюлоза) [5].

Склад головного ланцюга може різнитися, тому **за хімічною природою полімери діляться на:**

- Органічні (біополімери): карболанцюгові, гетероланцюгові, гетероциклічні.
- Неорганічні: гомоланцюгові, гетероланцюгові.
- Елементоорганічні: неметалічні, металічні (металоорганічні), внутрікомплексні (хелатні, координаційні).

Залежно від характеру взаємного розміщення структурних ланок макромолекули поділяють (Рис. 1.1):

- а. Лінійні;
- б. Розгалужені;
- в. Гребневидневі ;
- г. Циклоланцюгої;
- д. Макроциклічні;
- е. Драбиноподібні;
- ж. Радіальні (зіркоподібні).

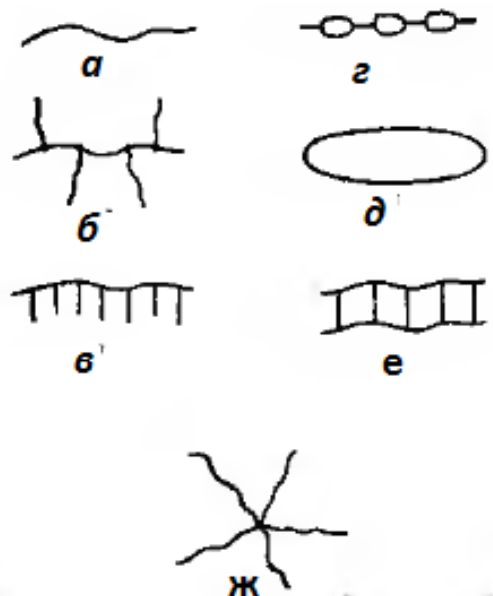


Рис 1.1. Схематичне зображення різних типів полімерів

Зазначені вище макромолекули полімерів є мікротілами, які характеризуються певною молекулярною масою, яка має першорядне значення в синтезі і застосуванні полімеру. Проте існує велика кількість полімерів, які з'єднуються між собою утворюючи просторові сітки, в яких поняття молекула чи макромолекула не є доречним. Ці полімери прийнято називати **“зшитими”** або **сітчастими**. Шматок будь – якого зшитого полімеру і є велетенською макромолекулою. Цей шматок можна розрізати на безліч маленьких частинок, і їх властивості при цьому будуть незмінними. Зшиті полімери, особливо

синтетичні, мають досить складну будову просторової сітки з значною кількістю різноманітних дефектів (Рис. 1.2).

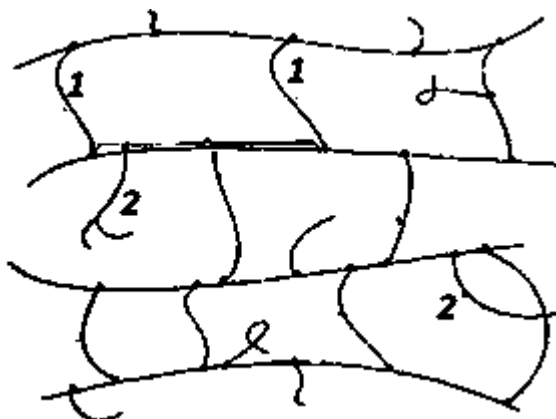


Рис. 1.2. Фрагмент сітки зшитого полімеру:

1 – активні ланцюги, 2 – неактивні ланцюги.

Кожна макромолекула має молекулярну масу, яка обумовлює безліч цікавих і часто унікальних властивостей полімерів. Проте для полімерів просторової будови це поняття немає сенсу. Основна ознака просторово зшитих полімерів це середній розмір ланцюга між вузлами зшивки, який відповідає молекулярній масі між вузлами сітки. Найбільш важливі механічні властивості полімерів також в значній мірі залежать від їх молекулярної маси.

Високою молекулярною масою обумовлено багато цікавих і часто унікальних властивостей полімерів. Найбільш важливі механічні властивості полімерів сильно залежать від їх молекулярної маси. Так наприклад, механічна міцність починає проявлятися тільки за молекулярної маси полімеру вище 5000 – 10 000 Да. Механічні властивості полімеру різко поліпшуються при збільшенні молекулярної маси і не залежать від нього тільки при дуже великих значеннях. У багатьох випадках існує певний інтервал молекулярних мас полімеру, відповідний його оптимальним властивостям. Можливість регулювання молекулярної маси має велике значення при практичному використанні різних методів синтезу полімерів.

Існують різні методи визначення середньої молекулярної маси полімеру. До них відносяться методи світлорозсіювання, віскозиметрії,

ультрацентрифугування і седиментації [6 – 8]. Молекулярна маса полімерів, визначена різними методами, як правило, не збігається. Деякі методи мало чутливі до молекул великого розміру, тоді як інші методами погано визначають невеликі молекули. У результаті отримана середня молекулярна маса не зовсім вірно відображає кількість великих чи малих молекул.

Ступінь полімеризації тісно пов'язаний з відносною молекулярною масою полімеру. Для полімерів вона визначається добутком відносної молекулярної маси елементарної ланки $M_{\text{ел}}$. На кількість таких ланок (ступінь полімеризації, n):

$$M_r = M_{\text{ел}} \cdot n$$

На відміну від низькомолекулярних сполук, у полімерів макромолекули не мають однакового ступеня полімеризації, а отже, й однакової відносної молекулярної маси. Явище, коли макромолекули полімеру відрізняються одна від одної ступенем полімеризації, називають полідисперсністю (полімолекулярністю).

Отже, полімер особливо синтетичний завжди полідисперсний і складається з макромолекул різної довжини і відповідно, молекулярної маси. Сукупність макромолекул однакової довжини в полімери утворюють фракції полімеру.

Розділити полімер на фракції можна методами осадження або дробного розчинення. Ці способи ґрунтуються на залежності розчинності полімеру від його молекулярної маси. Для цього використовують суміш двох рідин – розчинник і рідину, в якій полімер не розчиняється (осаджувач). Змінюючи їх співвідношення, досягають почергового осадження фракцій полімеру, різних за розчинністю в сумішах розчинника та осаджувача [6] .

Полімерний стан речовини характеризується і деякими іншими особливостями. За однакової хімічної будови низькомолекулярних сполук і полімерів останні характеризуються низкою особливостей своїх властивостей.

- ✓ Полімер існує тільки в конденсованому агрегатному стані; перехід у газоподібний відбувається тільки з розривом макромолекул.
- ✓ Розчини полімерів мають досить високу в'язкість, значно більшу, ніж в'язкість розчинів звичайних речовин.
- ✓ Швидкість розчинення полімерів суттєво менша, а розчиненню найчастіше передують набрякання; існують полімери, що взагалі не розчиняються, а лише набрякають.
- ✓ Під час вилучення розчинника з розчину полімер не утворює кристалів, як більшість низькомолекулярних сполук, а утворює плівку.
- ✓ Для деяких полімерів характерні великі деформації, набагато більші за деформації звичайних матеріалів.
- ✓ Хімічні реакції за участі полімерів відрізняються швидкістю і великою кількістю побічних реакцій порівняно з аналогічними реакціями низькомолекулярних речовин, а властивості полімерів різко змінюються під час уведення дуже невеликих кількостей певних реагентів у системи реагуючих полімерних речовин.

Хімічна будова полімерів визначає їх фізичні властивості. Проте зв'язок між фізичними властивостями і хімічною будовою є досить складним. Ланцюгові молекули полімерів характеризуються високою або низькою гнучкістю, тому просторові форми макромолекул визначають як порядок атомів, так і гнучкість макромолекул ланцюга. Гнучкість ланцюга – це його здатність змінювати форму під впливом теплового руху ланок чи дії зовнішнього поля, в якому розташований полімер. Основними факторами, що визначають гнучкість макромолекул є: величина потенціального бар'єру обертання, молекулярна маса полімеру, розмір замісників, частота просторової сітки та температура [6].

Розрізняють два види гнучкості ланцюга: термодинамічна (статична) і кінетична (динамічна). Кінетична – відображає швидкість переходу ланцюга із одного енергетичного стану в інший і визначається енергією активації. Термодинамічна є рівноважною, визначається хімічною будовою макромолекул і реалізується в наслідок теплових рухів відрізків ланцюга. Гнучкість обумовлена внутрішнім обертанням ланок або частин макромолекул відносно один одного. Молекула будь – якої речовини характеризується певним просторовим розташуванням атомів і наявністю певних зв'язків між ними. Це обумовлює хімічну будову (структуру, конфігурацію) молекули. При обертанні ланок макромолекула змінює свою форму. Форми макромолекули, що переходять один в одного без розриву хімічних зв'язків, називають конформаціями. Відомо багато типів конформацій макромолекул: конформація клубка, конформація витягнутої жорсткої палички, конформація спіралі, конформація глобули (найкомпактніший), складчаста конформація (зазвичай в кристалічних полімерах) Чим вища гнучкість, тим швидше змінюється конформація полімеру. Для оцінки гнучкості ланцюгових макромолекул користуються умовним поняттям сегмента. Сегмент являється мінімальна довжина ланцюга полімеру, положення якого в просторі майже не залежить від положення сусідніх ланок. Він є мірою кінетичної гнучкості ланцюга, якщо сегмент малий, то ланцюг гнучкий, якщо великий, то жорсткий [7].

Жорстколанцюгові полімери виявляють ряд характерних властивостей, більшість яких не притаманна гнучколанцюговим полімерам, а саме підвищена жорсткість ланцюга, як рівноважна, так і кінетична. Підвищення рівноважної жорсткості може бути зумовлено декількома механізмами:

- 1) взаємодією бічних замісників у ланцюгу;
- 2) циклізацією в основному ланцюгу;
- 3) спряження у ланцюгу.

Найбільш розповсюдженими представниками жорстколанцюгових високомолекулярних сполук є целюлоза та її похідні, а саме – її естери,

макромолекули ДНК і деякі дуже жорсткі полімери, тоді як полі – γ – бензил – L – глутамат, а також хітин і хітозан [6].

1.2. Фізико – хімічні властивості хітину та хітозану

Хітин і хітозан відомі вже приблизно 200 років. Хітин був відкритий в 1811 році, а хітозан – у 1859 році професором С. Роугеттом, хоча нинішню назву отримав в 1894 році. Основними джерелами хітину та хітозану є: комахи, ракоподібні (їхня шкарлупа), кальмари та гриби. Хоча хітин давно відомий і широко представлений в природі, він все ще мало вивчений. Інтерес до хітину зростає за рахунок загального розвитку хімії полісахаридів і синтетичних полімерів. Останнім часом з'являється ряд робіт, пов'язаних з практичними значеннями похідних хітину. Значно розширилися дослідження з вивчення властивостей деацетильованого хітину – хітозану [8].

Хітин - другий за поширеністю полісахарид у світі після целюлози. Хімічна структура хітину складається з залишків N - ацетилглюкозаміну сполучених 1,4 – β – глікозидними зв'язками (Рис. 1.3). А в макромолекулі целюлози замість ацетамідної групи (як у хітину) біля другого атома карбону - гідроксильна (рис 1.4). Результатом цього є, утворення більш міцного водневого зв'язку між сусідніми ланками, завдяки цьому хітин є жорсткішим і стабільнішим, ніж целюлоза [9].

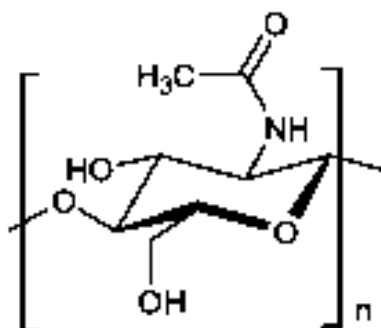


Рис. 1.3. Структурна ланка хітину

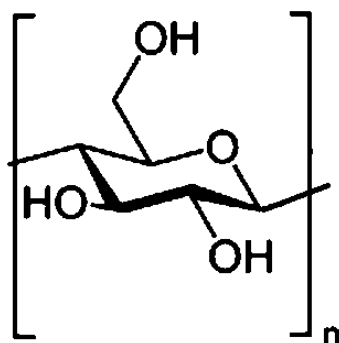


Рис. 1.4. Структурна формула целюлози

Природу Н – зв'язку молекули хітину може визначати різні поліморфні форми: α , β та γ хітину. У α – хітині (Рис. 1.5) висока кристалічність, ланцюги розташовані антипаралельно, характеризується найстабільнішим станом і здебільшого зустрічається у членистоногих та ракоподібних.

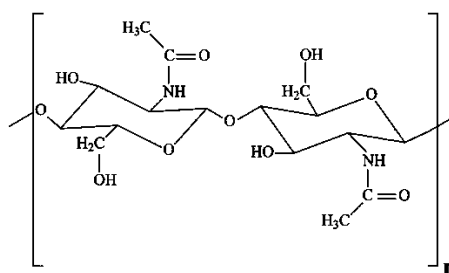


Рис. 1.5. Структурна формула α – хітину

У β – хітині (Рис.1.6) спостерігається паралельне розташування хітинового ланцюга, відносно нестійке, отримують з діатомових водоростей.

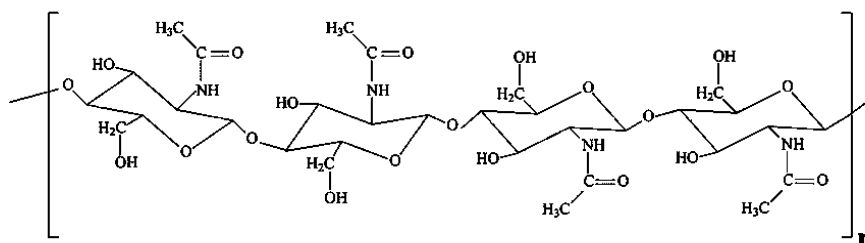


Рис. 1. 6. Структурна формула β – хітину

В γ – хітині (Рис. 1.7) розташування хітинового ланцюга складніше, де з кожних трьох хітинових ланцюгів два розташовуються паралельно, а третій - антипаралельно. Однак існування γ хітину викликає суперечки.

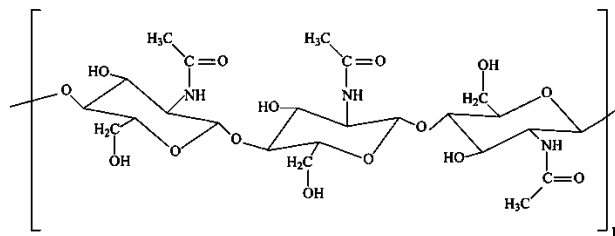


Рис. 1.7. Структурна формула γ – хітину

Спостерігається, що α – хітин є найбільш стійкою формою хітину, у той час як β – хітин легко перетворюється на α – хітин шляхом обробки літій тіоціанатом або осадженням мурашиною кислотою. Твердість, гнучкість і проникність оболонки визначаються співвідношенням α -хітину і β -хітину. Єгипетський дослідник припустив, що γ -хітин може бути комбінацією α – і β – структур, а не відмінною поліморфною модифікацією. α – хітин зазвичай отримують з екзоскелету ракоподібних, зокрема, креветок і крабів. β -хітин можна отримати з кальмарів, у той час як γ -хітин локалізується у грибів і дріжджів. Також α - хітин може бути отриманий перекристалізацією з розчину, біосинтезу в пробірці або внаслідок ферментативної полімеризації. У результаті численних досліджень вченими було виявлено, що будова хітину не є остаточною, тому що при подальшій обробці він перетворюється в хітозан. Хітин може бути розчинений у концентрованих кислотах: хлоридній, сульфатній або ортофосфатній кислоті, а також в трихлороцтовій та мурашиній кислотах [10]. Деацетилювання хітину, тобто відщеплення хутину залишків оцтової кислоти, стало першою модифікацією, внаслідок чого отриманий хітозан.

Хітозан складається щонайменше з 50% вільних аміногруп, має неоднорідну хімічну структуру, тобто поряд з вільними NH_2 – група в ланцюгу

кількість яких домінує, є і N – ацетильні залишки хітину, що не піддалися деацетилюванню.

Отже, за хімічною будовою хітозан є полімером D – глюкозааліту та N – ацетил – D – глюкозаміну.

Залежно від ефективності реакції деацетилювання виходять хітозани з різним ступенем деацетилювання – від 80 до 90%. Ступінь деацетилювання показує процентний вміст D – глюкозаміну в молекулі хітозану, тобто якщо мова йде про хітозан зі ступенем деацетилювання 85%, то це означає, що в молекулі хітозану в середньому міститься 85% D — глюкозаміновий залишків, а решта N – ацетил – D – глюкозамінових залишків.

Основна відмінність хітозану від хітину – це наявність аміногруп, що визначають в його розчинність в розведених кислотах (рН <6), та утворення комплексів [5; 6].

За зовнішнім виглядом хітозан — лусочки розміром менше 10 мм або порошок різного помолу, від білого до кремового кольору, часто з жовтуватим, сіруватим або рожевим відтінком, без запаху. За токсичністю хітозан відноситься до 4 — го класу і вважається безпечним.

Хімічні властивості хітозану залежать від його хімічної структури. Велика кількість вільних аміногруп в молекулі хітозану визначає його властивість зв'язувати іони гідрогену і набувати надлишкового позитивного заряду, тому хітозан є хорошим катіонітом. Крім того, вільні аміногрупи визначають хелатоутворювальні і комплексо — утворювальні властивості хітозану. Це пояснює здатність хітозану зв'язувати і міцно утримувати іони металів (зокрема радіоактивних ізотопів і токсичних елементів) за рахунок різноманітних хімічних і електростатичних взаємодій [11].

Велика кількість водневих зв'язків, до утворення яких здатний хітозан, визначає його здатність зв'язувати велику кількість органічних водорозчинних речовин, у тому числі бактеріальні токсини і токсини, що утворюються в товстому кишечнику в процесі травлення.

З іншого боку, велика кількість водневих зв'язків між молекулами хітозану обумовлює його практичну нерозчинність у воді, оскільки зв'язки між молекулами хітозану міцніші, ніж між молекулами хітозану і молекулами води. Крім того хітозан не розчинний в органічних розчинниках, проте добре набрякає і розчиняється в органічних кислотах, при цьому він здатний міцно утримувати у своїй структурі розчинник, а також розчинені і зважені в ньому речовини. Тому в розчинному стані хітозан має набагато більшу сорбційну здатність, ніж в нерозчинному [12;13].

Хітозан також здатний зв'язувати вуглеводні, жири і жиророзчинні речовини за рахунок гідрофобних взаємодій і ефекту молекулярного сита, що зближує його з асорбційними механізмом з циклодекстринами. Хітозан має низку унікальних фізичних властивостей: біосумісність, нетоксичність, антимікробну активність і інші.

Розщеплення хітину і хітозану до N — ацетил — D — глюкозаміну і D — глюкозаміну відповідно відбувається під дією мікробних ферментів - хітинази і хітобіаз, тому вони повністю біологічно розщеплювальні і не забруднюють навколишнє середовище.

Хітозан може бути отриманий в різних формах, а саме: у вигляді гідрогелю, ксерогелю, аерогелю, порошку, тонких плівок тощо. Таким чином, хітозан є універсальним сорбентом, здатним зв'язувати цілий спектр речовин органічної і неорганічної природи, що визначає найширші можливості його застосування в житті людини.

Хітозан також являється природним кополімером, який представляє собою групу гетерогенних речовин, що різняться молекулярною масою, ступенем деацетилювання, розташуванням ацетильованих ланок уздовж полімерного ланцюга. Кожен з цих параметрів може значно впливати на біологічні властивості полімера. Одним з важливих змінних параметрів хітозанового полімера є його ступінь полімеризації та молекулярна маса. Як вже було сказано, полімер розчинний в кислотах, і ця розчинність залежить від молекулярної маси та значенню рН розчину [14;38].

Залежність розчинності від рН дозволяє отримувати хітозан в різних формах: капсул, плівок, мембран, гелів, волокон. У слабокислих водних розчинах розчинність хітозану значно підвищується при зниженні молекулярної маси і підвищенню ступеня деацетилювання. Високомолекулярний хітозан зі ступенем - деацетилювання 70 – 80% погано розчинний в водних розчинах за рН = 6,0 – 7,0, що значно обмежує його можливості практичного застосування[15 – 20].

Фізичні властивості хітозану в розчині значно залежать від ступеня деацетилювання і розподілу залишкових ацетильних груп вздовж ланцюгів. Коли ступінь деацетилювання становить більше 50%, хітозан стає розчинним в кислих водних розчинах і веде себе як катіонний поліелектроліт про що вже говорилось вище. Було встановлено, що ступінь деацетилювання хітозану впливає на його фізико – хімічні властивості і біологічну активність.

Незважаючи на наявність величезної кількості літератури про зв'язок сорбційних властивостей хітозану з його хімічною структурою, не можна сказати, що дослідження в області хімії хітину / хітозану близькі до завершення. Постійно відкриваються нові властивості цієї речовини, зокрема, виявлена біологічна активність ще не отримала належного пояснення з точки зору хімічної структури. Наявні дані, про характер біологічної активності хітозану залежить від його молекулярної маси і ступеня деацетилювання, потребують подальшого вивчення та поглиблення [34 – 36].

1.3.Методичний аспект дослідження хітину та хітозану

Про розвиток хітозану свідчать декілька наукових праць останнього десятиліття у яких роглядається інтерес дослідників до використання хітозану з метою одержання біомедичних продуктів. Це видно збільшенні кількості публікацій протягом багатьох років. Так, на Рис 1.8 показано кількість публікацій, проіндексованих Scopus, з 1985 по червень 2015 року, пов'язаних з хітозаном та його похідними.

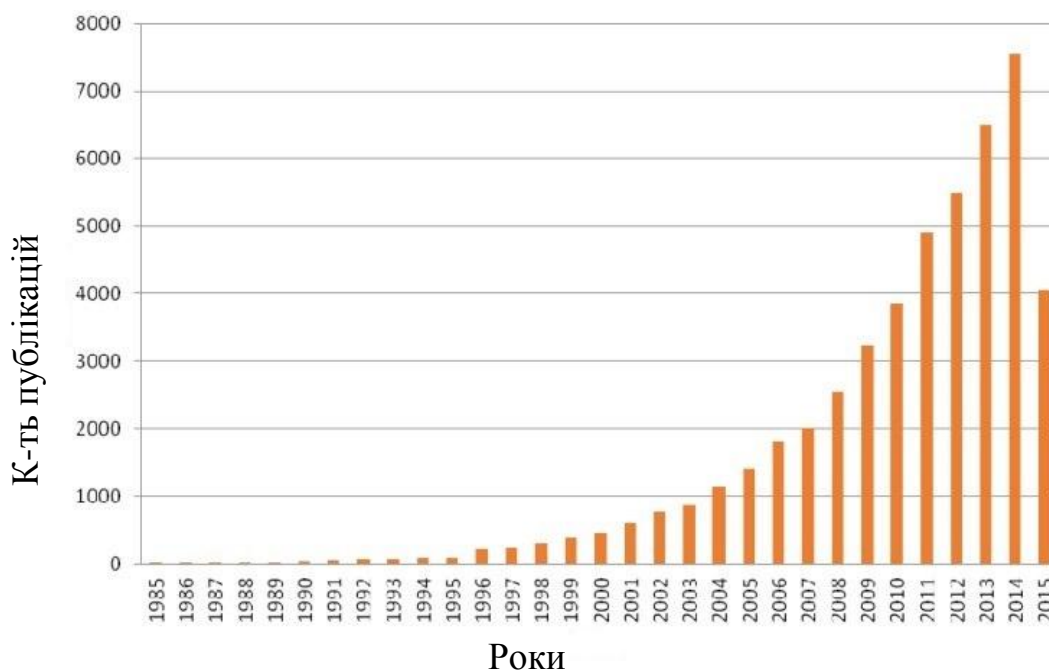


Рис. 1.8. Кількості публікацій, щодо вивчення хітозану в період 1985 – 2015 р.

На сьогодні дослідження хітозану та його похідних проходять в швидкому темпі та у різних країнах, в т.ч. в Україні. Зокрема, у творчій співдружності з інститутом прикладної фізики НАН України над цією тематикою працюють на кафедрі хімії та методики навчання хімії Сумського державного педагогічного університету імені А.С. Макаренка. Останні п'ять років на вказаній кафедрі під керівництвом доцента., кандидата хімічних наук Скляра А.М. досліджені властивості хітозану як компонента різних матеріалів біологічного призначення. Важливим результатом такого дослідження являється патент на винахід біоматеріалу гемостатичної дії.

Вказана робота показала, що хітозан може зв'язувати еритроцити залежно від його концентрації, і незалежно від його молекулярної маси. Крім того, матеріали на основі хітозану впливають вибірково на клітини людини. Склад хітозану з бавовняними матеріалами не змінює форму еритроцитів і не викликає їх аглютинації. Проте бавовняно - хітозанові матеріали мають більш високі адгезійні властивості до тромбоцитів і ці властивості не залежать від молекулярної маси та концентрації хітозану. Ці матеріали також змінюють форму тромбоцитів, що, ймовірно, є одним з найважливіших механізмів

гемостатичного ефекту. Дослідження *in vivo* показують високу ефективність марлево – хітозанових пов'язок під час травми великих судин [27].

Так в роботі [28] визначались структурно – механічні параметри модельних систем: желатин, желатин-агар, желатин – агар – хітозан, аналізувались ІЧ – спектри сухих плівок цих систем, розроблявся гідроколоїдний желатино – агар – хітозановий комплекс. Крім цього, був встановлений вплив на структуру желатинового гідроколоїду агару і хітозану. Розроблений комплекс гідроколоїдів за міцністю, еластичністю і температурою плавлення займає проміжне положення між желатином і желатиновим агаром та відповідає основним вимогам готового продукту.

У 2017 році досліджувалося формування антибактеріальних покриттів на хітозанові матриці методом магнітронного напилення. Біодеградабельні хітозанові матриці використовуються в якості матеріалу для біомедичних пристроїв, імплантатів, каркасів. Відносно недавно наночастинки міді були використані для надання антибактеріальних властивостей медичним товарам. Ці покриття і нанопорошки мають бактеріостатичні і бактерицидні властивості [29]. Метод магнетронного розпилення був використаний для модифікування каркасів з полімолочною кислотою в роботі. Розпилення тонких мідних плівок на поверхні матеріалу може дати додатковий антибактеріальний ефект хітозановим матеріалам, а також розширити сферу їх застосування. У хоті роботи було з'ясовано, що мідне розпилення не суттєво впливають на комплекс фізико-хімічних властивості плівок хітозану, але надає їм антибактеріальних властивостей, а такі плівки пригнічують ріст золотистого стафілококу.

У 2018 році з'явилися роботи [30], у яких говориться про одержання біоматеріалу з хітозану діамантового зеленого і йодидною кислотою. Дослідження властивостей такого хітозан – йодид – діамантово – зеленого комплексу проводили порівнянні зі зразком складу хітозан – аскорбінова кислота – діамантовий зелений. Ця робота показала, що хітозан – йодид – діамантовий зелений володіє кращими фізико – хімічними характеристиками, як з точки зору деградації, так і з точки зору набрякання в різних середовищах.

Йодовмісний біоматеріал може бути рекомендований для подальшого дослідження з метою його використання у фармакології.

У 2019 році одержані біоматеріали на основі хітозану та спектиноміцин дигідрохлоридом [31]. Сполучення цих двох речовин дає перспективу більш широкого застосування вказаного антибіотику.

Отже, вищенаведений огляд наукових праць з використанням хітозану свідчить, що цей полімер все вагомніше входить в практичну діяльність людини, зокрема, у медичну галузь.

1.4.Сфери застосування хітозану

Останніми роками значно інтенсифікувалися дослідження природних полімерів і розробки наукових основ їх практичного використання. Завдяки своїми унікальним властивостям хітозан, безперечно, можна назвати біополімером XXI століття, а завдяки багатьом його модифікатам вже відомо більше 200 областей застосування даного біополімеру.

За рахунок плівкоутворювальної здатності матеріали з хітозаном використовують у в парфумерно – косметичній промисловості в складі косметичних кремів, що знижують втрату води і підвищують ефективність УФ-фільтрів [16], а також в засобах за доглядом волосся (шампуні, бальзами, лосьйони) для поліпшення розчісуваності, зменшення статичного заряду, попередження появи лупи і посилення блиску волосся. Також хітозан виступає гелеутворювачем в рідких милах, гелевих зубних пастах, лаках з бактерицидними властивостями [2;17].

Унікальний спектр біологічної активності хітозану пов'язаний з цілим рядом функцій, серед яких найважливішими є такі, як:

- ✓ нормалізація фракцій тригліцеридів;
- ✓ нормалізація холестерину і жовчних кислот у організмах;
- ✓ зв'язування клітинного жиру ;
- ✓ нормалізація роботи ЖКТ;

- ✓ зниження концентрації сечової кислоти;
- ✓ прискорення загоювання ран і виразок;
- ✓ знеболююча дія;
- ✓ взаємодія з біологічно активним кальцієм;
- ✓ стабілізація кров'яного тиску;
- ✓ антимікробна і фунгіцидна дія.

Багато з цих властивостей вже знайшли своє застосування в медицині де дані біополімери використовуються у вигляді порошків, мазей, гелів, присипок, пов'язок, губок, штучної шкіри для лікування і усунення дефектів, уражень зубів і опіків слизової оболонки порожнини рота[18], репарації дефектів і регенерації кісткової тканини, а також для загоєння ран, забезпечуючи механічний захист і стимулюючи процеси регенерації пошкоджених тканин (забезпечується прискорення загоєння в 3 – 4 рази) [19]. У гранулярній і гелевій формі хітозановмісні матеріали забезпечують високу хімічну і біологічну активність препарату, високу проникність та гідрофільність. Гемостатичні властивості хітозану і його деяких похідних дозволяють швидко загущувати кров, а також зменшувати біль, блокуючи нервові закінчення. У пластичній хірургії хітозан використовують при пересадці шкіри. Відомо, що регенерація шкіри – це складний процес, який складається з чотирьох фаз, що перекриваються – гемостазу, запалення, проліферації та реконструкції тканин [20]. Іншими словами, регенерація шкіри – це динамічний процес, в якому беруть участь елементи крові, позаклітинні компоненти, розчинні фактори та клітини [21]. Тому лікування шкірних уражень вимагає перев'язування, яке не тільки забезпечує фізичний захист рани, але й посилює загоювання, забезпечує протимікробний захист та зменшує утворення рубців. Також препарати з хітозаном використовують при лікуванні важких запальних захворювань шлунково-кишкового тракту, таких як гнійний перитоніт і деструктивна форма запалення підшлункової залози [2]. Хітин попереджає зростання кишкової палички [13]. Хітозан зупиняє ріст патогенної мікрофлори, аглютинує мікроби, стимулює функціональну активність макрофагів, індукує секрецію арахідонової

кислоти за допомогою активації фосфоліпази A2. Волокна хітозану застосовуються, як хірургічні нитки, які розсмоктуються в організмі і не викликають алергічних ускладнень.

У фармацевтичному виробництві хітозан використовується як наповнювач в пігулках та як носій ліків з контрольованим вивільненням.

З іншого боку хітозан застосовують для зниження рівня холестерину у крові для боротьби з анемією і підвищення фізичної сили, покращення апетиту і сну у людей з нирковою недостатністю. За визнанням фахівців Державного Наукового Центру біофізики хітозан і на сьогодні залишається найефективнішим протипроменевого засобом. Численними дослідженнями доведено його протипухлинні властивості.

У поєднанні з іншими біологічно активними речовинами (лимонна і аскорбінова кислоти, вітаміни E, K, A тощо) хітозан підвищує імунний статус організму людини.

Нарешті, жувальні гумки і рідини для полоскання рота, що містять хітозан, можуть зменшити кількість бактерій в ротовій порожнині, що викликають карієс. Є, також дослідження, що показують ефективність лікування періодонтиту аскорбатом хітозану [36].

Одже, хітозан та його велика кількість композитів створюють широку палітру напрямів застосування у медичній галузі.

Хітозан може мати широкий спектр унікальних застосувань в харчовій промисловості, видалення кислот і барвників, як стабілізатор кольору, як харчова добавка, включаючи консервацію харчових продуктів, утворення біодеградуючих плівок і виділення матеріалу з харчових відходів. Крім того, він може діяти як харчове волокно і як функціональний харчовий інгредієнт. Він використовується як емульгатор простих і багатокомпонентних емульсій, стабілізатор гомогенних і гетерогенних систем у виробництві пудингів, мусів, желе і для фракціонування молочної сировини. Він застосовується як згущувач соусів, приправ, паштетів, паст. Він служить структуроутворювачем для

продуктів дієтичного харчування, що сприяють виведенню радіонуклідів з організму, а також для освітлення рідин у виробництві вин, пива, соків, молочної сироватки [2]. За рахунок бактерицидних властивостей продукти хітозану можуть застосовуватися консервантами з метою придушення патогенної і умовно-патогенної мікрофлори і підвищення біологічної цінності продуктів харчування, а також у виготовленні плівок для зберігання різних видів харчової продукції. Найбільш широко відома захисна дія плівок з хітозану, що наносяться на поверхню плодів і овочів - яблук, цитрусових, суниць, томатів, перцю. Ці плівки однорідні, гнучкі, не утворюють тріщин. Хітозанові плівки мають вибірккову проникність, тому на поверхні плодів і овочів відіграють роль мікробного фільтру. Вони регулюють склад газів як біля поверхні, так і в товщі тканин, впливаючи тим самим на активність і тип дихання, що в цілому сприяє продовженню термінів зберігання продуктів рослинного походження. Звичні продукти харчування в поєднанні з модифікатами хітозану, стають функціональними. Так спостерігаються такі ефекти, як відновлення суглобів, гепатопротекція, атеросклеротическое дія, корекція артеріального тиску, підвищення імунітету, поліпшення роботи шлунково-кишкового тракту, поліпшення засвоюваності поживних речовин, зниження вісцерального жиру т.б. ефекти, подібні тим, що спостерігаються після вживання деяких медичних препаратів [25;26].

З екологічною метою хітозан і хітин можуть використовуватися для очищення стічних вод від важких металів, радіонуклідів, білків, вуглеводнів, пестицидів, барвників і бактеріальних клітин.

Все більший інтерес спостерігається зростаючий інтерес до пошуку природних антиоксидантів, так як вони можуть захистити організм людини від вільних радикалів і гальмують розвиток багатьох хронічних захворювань. Численні дослідження показали наявність антиоксидантних властивостей у хітозану. Антиоксидантна здатність хітозану, головним чином, пов'язана з аміногрупами хітозану, які сприяють формуванню комплексу хітозану з

двовалентним ферумом. Використання хітозану антиоксидантом і антимікробним матеріалом широко описано в науковій літературі. Проте, ймовірно має хітозан значний потенціал для практичного використання.

У сільському господарстві хітозан також має перспективу широкого використання, зокрема елісітором, що викликає системну і тривалу хворобостійкість рослин до збудників різних захворювань (бактеріальних, грибкових, вірусних). При обробці пасивного насіння рослин в фазу розгалуження, забезпечується підвищення врожайності овочів на 25 – 40% [23] за рахунок біостимуляції. Хітозаном облагороджують ґрунти використовуючи композиції з органічними або мінеральними добривами [24], він служить для контролювання агрохімікатів, селективного очищення води тощо.

Цікаво, що хітозан застосовується і в паперовій промисловості (обробка паперової поверхні, виробництво фотопаперів, самокопіюючого папіру).

Нарешті, у біотехнології хітозаном іммобілізують ферменти, відділяють білки, застосовують у хроматографії.

РОЗДІЛ II

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Правила техніки безпеки під час роботи в лабораторії

1. Лабораторні заняття проводяться під керівництвом викладача та лаборанта. Перед початком лабораторних занять студенти проходять інструктаж з техніки безпеки, який оформлюється у спеціальному журналі. Крім того, під час кожної роботи вони одержують усний інструктаж від викладача.
2. Студенти несуть дисциплінарну відповідальність у разі недотримання вимог з охорони праці, техніки безпеки та протипожежної профілактики.
3. Працювати в лабораторії студенти повинні на постійному робочому місці тільки в халатах, застібнутих на всі гудзики. Волосся має бути підібране під косинку чи шапочку.
4. Під час виконання лабораторних робіт необхідно дотримуватися наступних правил роботи з хімічними реактивами:
 - a. уникати потрапляння цих речовин на руки, не торкатися ними обличчя та очей, після роботи руки слід ретельно вимити;
 - b. не пробувати хімічні реактиви на смак;
 - c. усі речовини слід нюхати дуже обережно, не нахиляючись над посудиною та не вдихаючи на повні груди, а спрямовуючи до себе пари чи газу рухом руки;
 - d. не користуватися невідомими реактивами (без написів і етикеток);
 - e. ніяких речовин з лабораторії не можна брати додому.
5. Реактиви для дослідів слід брати лише в тих кількостях, які зазначені в методиці. Сухі реактиви слід брати за допомогою шпателя, розчини – піпеткою, для кожного реактиву необхідно мати окремий шпатель або піпетку. Набирати отруйні та їдкі рідин в піпетки не ротом, а за

- допомогою гумової груші. Подрібнювати сухі луги можна лише в запобіжних окулярах. Брати твердий луг тільки пінцетом або щипцями.
6. Надлишок реактиву не виливати і не висипати назад в посуд, з якого вони взяті; поміщати в посуд для зливу або спускати із струмом води в каналізацію.
 7. Дотримуватися обережності в роботі з розчинами кислот, лугів й інших їдких рідин:
 - a. готуючи розчини сірчаної кислоти необхідно лити концентровану кислоту у воду, а не навпаки, оскільки, внаслідок сильного місцевого розігрівання, можливе розбризкування кислоти. Крім того необхідно користуватися тонкостінною склянкою або фарфоровим посудом;
 - b. у разі попадання кислоти на шкіру або слизові оболонки спочатку промити уражене місце великою кількістю води, а потім розчином соди (гідрокарбонату натрію);
 - c. у разі попадання лугу на шкіру або слизові оболонки спочатку промити уражене місце водою до тих пір, поки ділянка не перестане бути слизькою, а потім розчином оцтової кислоти.
 8. Проведення дослідів у брудному лабораторному посуді забороняється.
 9. Нагриваючи рідини, необхідно тримати пробірку отвором від себе і людей, що знаходяться поруч. Не нахилитися над посудом, в якому щось кипить чи в який наливається рідина, оскільки бризки можуть потрапити в очі.
 10. Категорично забороняється нагрівати або охолоджувати будь-які розчини у герметично закритих місткостях, а також закривати колби з гарячою рідиною.
 11. Переносити посуд з гарячою рідиною треба використовуючи рушник, тримаючи посудину обома руками: однією – за дно, іншою – за горловину. Великі хімічні стакани з рідиною потрібно піднімати лише

двома руками так, щоб відігнуті краї склянки опиралися на вказівні пальці.

12. Роботу з леткими речовинами (етером, бенzenом, ацетоном та ін.), концентрованими лугами та кислотами проводити акуратно і під витяжною шафою, не зливати їх в каналізацію без попереднього розведення.
13. Роботу з легкозаймистими рідинами вести під витяжною шафою та подалі від нагрівальних приладів. У разі загорання спирту, ефіру та інших легкозаймистих рідин не гасити полум'я водою, а скористатися піском.
14. Обережно працювати зі скляним лабораторним посудом, що легко б'ється. Рештки побитого лабораторного скляного посуду слід ретельно змісти у спеціальний збірник. Сировину чи напівфабрикати, у які могли потрапити скляні уламки, необхідно викинути у спеціальний збірник.
15. Негайно прибрати усе пролите, розбите і просипане на столах або на підлозі в лабораторії:
 - а. якщо кислота проллється на стіл або на підлогу, її слід нейтралізувати лугом або содою;
 - б. ртуть, пролитий в результаті поломки приладів або розбитті термометрів, збирають за допомогою амальгамованих пластинок з міді або білої жести.
16. У дослідах з використанням електроприладів необхідно переконатися в їх справності, правильності підключення до електромережі та контуру заземлення. Під час виконання роботи не можна переносити увімкнуті електроприлади та залишати їх без нагляду. У разі перерви в подачі електроенергії всі пристрої мають бути негайно вимкнуті.
17. Після закінчення роботи в лабораторії необхідно вимкнути всі електроприлади, якими користувалися, витягну шафу, воду, прибрати свої робочі місця та здати їх лаборантові або завідувачу лабораторії. Обов'язково ретельно вимити руки.

18. Про усі випадки відхилення від нормального ходу лабораторного зайняття, порушення даних правил, повідомляти передусім викладачеві, черговому лаборантові або завідувачеві лабораторією.

19.3 метою протипожежної безпеки хімічна лабораторія забезпечена вогнегасниками, ящиками з піском, ковдрами. Необхідно знати, де знаходяться протипожежні засоби і порядок термінової евакуації з лабораторії під час пожежі.

20. У хімічній лабораторії є аптечка. Кожен студент повинен вміти надати першу долікарську допомогу потерпілому[22].

2.2. Промислове виділення хітину з панцирів ракоподібних

Основна маса хітину комерційного виробництва хітину базується на виділенні його з «екзоскелету» креветок, крабів та інших ракоподібних. Це джерело містить високий відсоток неорганічного матеріалу, насамперед кальцій карбонату, а приблизний розрахунок вказує на те, що на кожен тону виробленого хітину в навколишнє середовище виділяється 0,8 т CO_2 . Зважаючи на існуючі проблеми щодо глобального потепління, це не можна вважати дійсно екологічним процесом [21]. Ще одне джерело хітину, більш екологічне, хоча і значно обмежене за обсягом, – це гладіус (недорозвинена мушля кальмара, яка є хітиновим пером). Його відходи містять дуже мало неорганічного компоненту, тому в процесі вилучення та очищення виділятиметься невелика кількість CO_2 . Ще одним і, можливо, більш стійким джерелом в довгостроковій перспективі є рослинний хітин, т.б. хітин грибів, який міститься в міцелії.

Хімічний метод вилучення хітину з біомаси ракообразних включає в себе дві основні стадії:

I – демінералізацію – видалення неорганічного речовини (кальцій карбонату) в розведеною кислотному середовищі, як правило, здійснюється з використанням хлоридної кислоти.

II – депротейнування – екстрагування білкових речовин лужному середовищі. Депротейнування традиційно реалізується шляхом обробки вказаних панцирів водними розчинами натрій гідроксиду або калій гідроксиду. Ефективність лужної депротейнування залежить від температури процесу, концентрації лугу.

Однак, шлях хімічної обробки має багато недоліків:

- а. змінює фізико – хімічні властивості хітину і призводить до зменшення його молекулярної маси (\overline{M}_w) та збільшує ступінь деацетилювання (ДА) хітину.
- б. утворюються стічні води, що містять деякі хімічні сполуки;
- в. збільшується вартість процесів очищення хітину.

Отже, виділення хітину з панцирів ракоподібних вимагає видалення двох основних компонентів білків і кальцій карбонату разом з невеликими кількостями пігментів і ліпідів, які зазвичай видаляються впродовж двох вказаних стадій. У деяких випадках для видалення залишкових пігментів застосовується додаткова стадія знебарвлення [29 – 31].

Впродовж багатьох років були запропоновані і використовуються інші методики для отримання чистого хітину. Склад панцировмісної сировини також впливає на кількість процесів депротейнування і демінералізації. Ці процеси можна проводити хімічними або ферментативними методами. Порядок проведення цих двох процесів, може бути змінений, особливо при використанні ферментативної обробки. Також використовується і мікробна ферментація.

Як вже говорилося, демінералізація полягає у видаленні мінеральних солей з панцирів і раковин ракоподібних, перш за все кальцій карбонату. Для цього використовують крім хлоридної кислоти і інші кислоти, такі як нітратну, сульфатну, оцтову і мурашину [36]. Але серед цих кислот більш поширеним

реагентом є розбавлена хлоридна кислота. При демінералізації відбувається розкладання кальцій карбонату з виділенням вуглекислого газу:



Проте, слід пам'ятати, що при кислотній обробці хітиновмісної сировини може відбутися часткова деструкція і деацетилювання хітину, що знижує в'язкість розчинів хітозану, отриманого з такого хітину.

За наступного процесу депротейнування відбувається порушення хімічних зв'язків між хітином і білками та гідроліз останніх до амінокислот. Повне видалення білка сприяє зниженню алергенності хітозану, що особливо важливо для біомедичного застосування [10].

Отже, вищеописані процеси демінералізації та депротейнування дозволяють одержати і підготувати хітин для синтезу з нього аналога – хітозану.

2.3. Синтез хітозану та його очищення

Сировиною для виробництва хітозану є очищений (2.2) хітин. Процес одержання хітозану легший для оболонок креветок, які тонші. Хітозан найчастіше виробляється крабів та креветок. Їх оболонки містять 30 – 40% білків, 30 – 50% кальцій карбонату та 20 – 30% хітину. Проте не існує стандартного методу очищення панцирів, оскільки різні джерела хітину потребують різної процедури обробки через різноманітність їх структур. Але завжди переробка панцирів включає етапи демінералізації, депротейнізації та знебарвлення, які можна здійснити за допомогою хімічної або біологічної (ферментативної обробки або ферментації) обробки [13]. Кінцеві продукти потребують далі ретельного очищення, якщо їх потрібно використовувати для біомедичних або фармацевтичних цілей, оскільки залишкові білки, мінерали або пігменти можуть викликати серйозні побічні ефекти. Перетворення хітину в хітозан може бути досягнуто ферментативним або хімічним [15; 16] деацетилюванням. Хімічне деацетилювання частіше використовується для

комерційної підготовки через економічні проблеми та можливість масового виробництва. Незалежно від того, який метод застосовується, деполімеризація неминуха. Процеси, що беруть участь у хімічній та біологічній підготовці хітозану з ракоподібних оболонок, проілюстровані на схемі (Рис. 2.1), яка ілюструє повний цикл хімічного способу одержання хітозану з панцировмісної сировини [9].

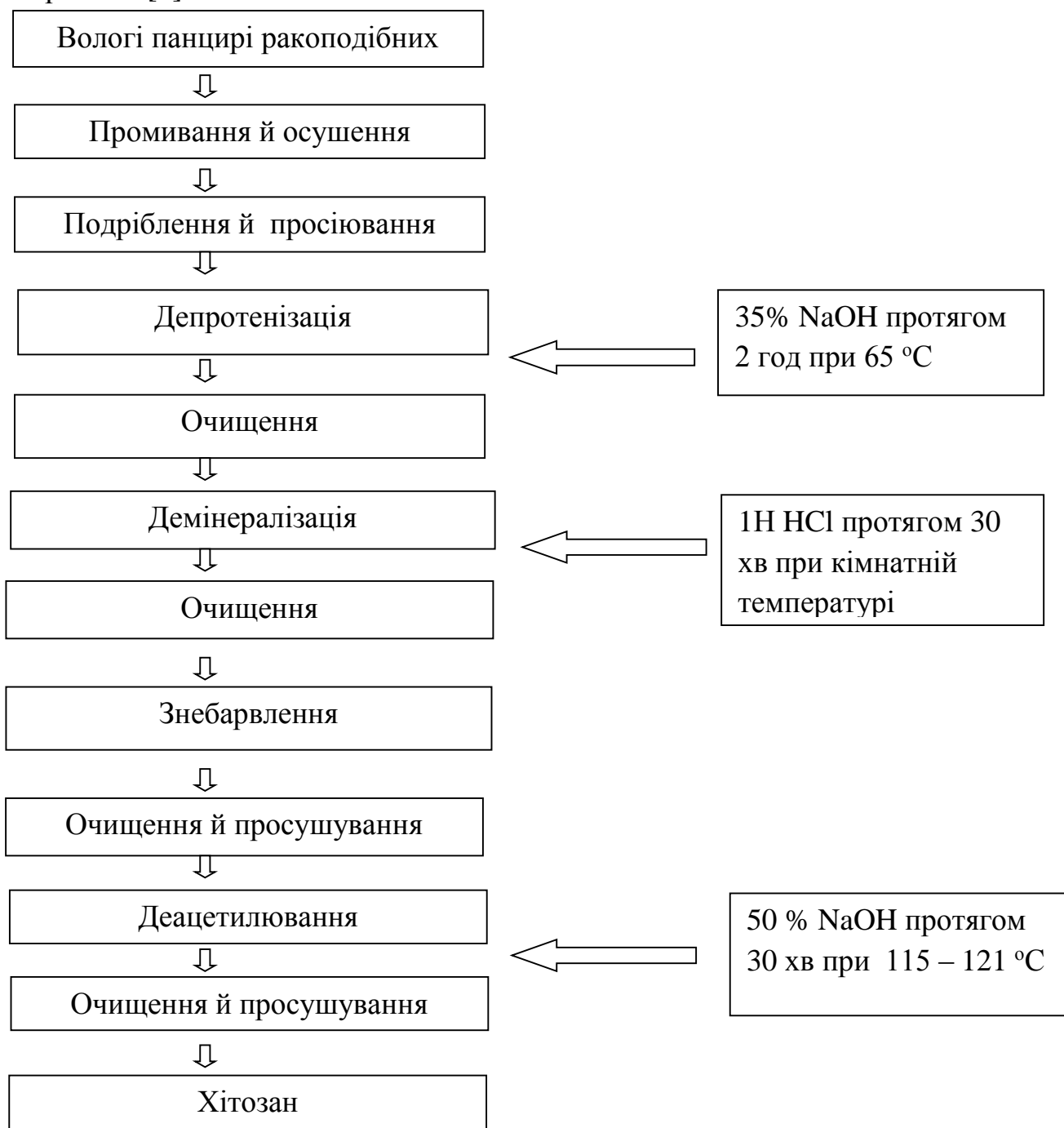


Рис.2.1. Схема хімічного способу одержання хітозану з панцировмісної сировини

Процес виробництва хітозану чинить великий вплив на властивості одержаного хітозану, оскільки ці процеси впливають на ступінь ацетилювання хітину, тобто на число вільних аміногруп, які надають утвореному хітозану властивостей поліоснови.

Основною реакцією перетворення хітину в хітозан в наведеній схемі є деацетилювання хітину. Деацетилювання стосується процесу відщеплення ацетильних груп з структурних ланок хітину та утворення реакційноздатних аміногруп (NH_2) внаслідок взаємодії концентрованих розчинів лугу (NaOH або KOH) з хітином за таким рівнянням реакції (Рис. 2.2):

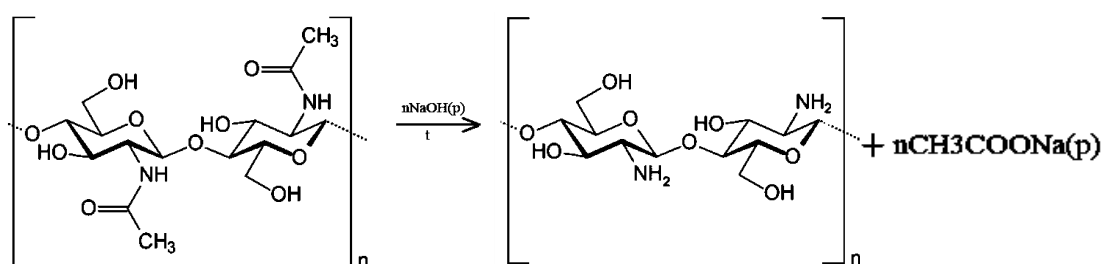


Рис.2.2. Схема хімічного процесу перетворення хітину в хітозан

Деацетилювання хітину відображує баланс між двома типами залишків хітинових і хітозанових і є помітною ознакою хітозану. Коли ступінь деацетилювання не нижче 50 %, продукт називають хітозаном і він є розчинним в кислих водних розчинах [28]. Під час деацетилювання ацетильні групи видаляються, але також відбувається реакція деполімеризації, що підтверджується змінами в середній молекулярній масі хітозану.

Хімічне деацетилювання хітину має певні недоліки: значне споживання енергії; об'ємні відходи концентрованого лужного розчину, і промислових вод, що збільшують забруднення навколишнього середовища; широкий діапазон розчинних і нерозчинних продуктів. Щоб подолати ці недоліки в процесі отримання хітозану, був вивчений альтернативний ферментативний метод, який використовує фермент хітин - деацетилазу.

2.3. Підготовка хітозану та методи одержання і дослідження біологічно активного матеріалу

2.3.1. Визначення молекулярної маси хітозану

Молекулярну масу хітозану визначали методом капілярної віскозиметрії за стандартною методикою [32]. Розчини готували розчиненням наважки порошку полімеру в ацетатному буфері (0,33 М CH_3COOH + 0,2 М CH_3COONa) протягом 20 хв. Вимірювання в'язкості розчину проводили при 25°C в капілярному віскозиметрі Уббелодє, а розрахунок молекулярної маси проводили за рівнянням Марка – Куна – Хаувінка² з константи $K\eta$ та α^3 з роботи [30]. Величину характеристичної в'язкості $[\eta]$ (Рис. 2.3), визначили графічним способом, після чого розраховували $[\eta]$ за вказаним рівнянням.

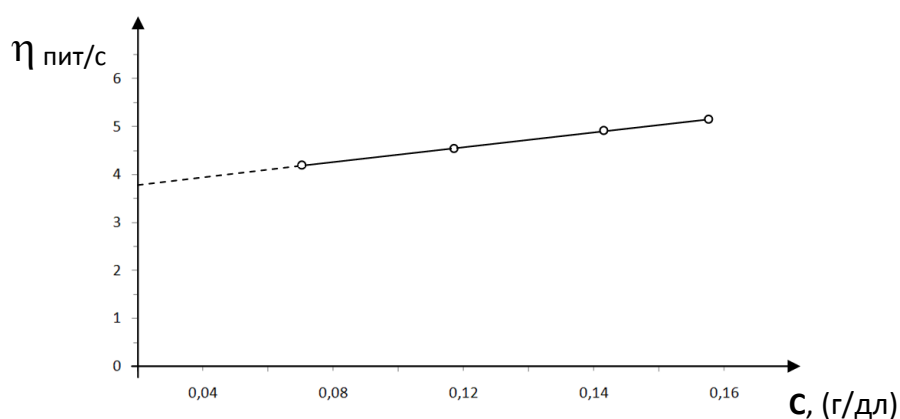


Рис.2.3 Характеристична в'язкість хітозану у 0,33 М ацетатній кислоті + 0,2 моль/л натрій ацетату.

²Рівняння Марка - Хаувінка – Куна

$$[\eta] = K \cdot M^\alpha$$

$[\eta]$ - характеристична в'язкість розчину, дл/г;

M – молекулярна маса полімеру, Да;

K і α – сталі, що характеризують систему «полімер - розчинник».

³ Були взяті з роботи [32] і дорівнюють $K_\eta = 1,38 \cdot 10^{-4}$ та $\alpha = 0,85$

Молекулярна маса отриманого в роботі хітозану становила 200000 Да або 200 кДа.

2.3.2. Потенціометричне титрування та розрахунок СД хітозану

Потенціометричне титрування виконували за допомогою універсального іонометра ЕВ – 74 з використанням скляного електроду. Точність вимірювання рН $\pm 0,1$. Перед роботою прилад налаштовували за стандартними буферним розчинам. Наважку хітозану 0,2 г розчинили в 20 мл 0,1 Н НСІ перемішуючи магнітною мішалкою протягом 1 год. Отриманий розчин титрували потенціометрично 0,05 Н розчином NaOH до рН близько 11. Перше перегинання кривої титрування відповідає надмірної кількості хлоридної кислоти, а друге - концентрації аміногруп в наважці хітозану (Рис.2.4).

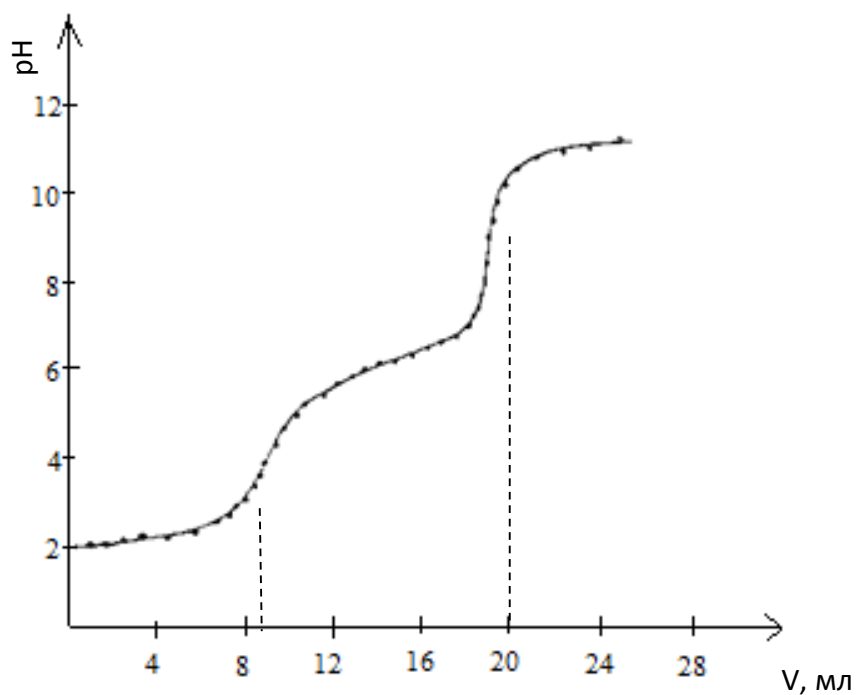


Рис.2.4. Крива потенціометричного титрування хітозану

Розрахунок ступеня деацетилювання проводили за емпіричною формулою⁴,

$$\text{яка показала, що } \text{СД} = \frac{203 \cdot 10,22 \cdot 0,1 \cdot 100}{210 + (203 - 161) \cdot 0,1 \cdot 9,8} = 83(\%)$$

2.4.Методика одержанні біологічно активного матеріалу

Виготовлення розчин хітозан йодиду.

Наважку полімеру масою 3,5 г з молекулярною масою 200 кДа заливали дистильованою водою об'ємом 80 мл у хімічному стакані на 150 мл, перемішували і залишали на 1 год для незначного набрякання і активації функціональних груп макромолекул хітозану. Далі, з допомогою крапельної воронки при активному перемішуванні додавали 55% - ний розчин йодидної кислоти, контролюючи рН утвореного розчину, поки величина водневого показника досягла 4,5. Утворився прозорий гомогенний розчин хітозану в йодидній кислоті середньої в'язкості.

Розчинення хітозану у вказаній кислоті відбувається за реакцією (Рис. 2.5):

$$^4 \text{СД} = \frac{M_{\text{ХТ}} \cdot V \cdot N \cdot 100}{P + (M_{\text{ХТ}} - M_{\text{ХТЗ}}) \cdot V \cdot N} (\%) , \text{ де}$$

$M_{\text{ХТ}}$ – молекулярна маса структурної ланки хітину;

$M_{\text{ХТЗ}}$ – молекулярна маса структурної ланки хітозану;

N – молярна концентрація еквівалента натрієвого лугу, моль/л;

V – об'єм розчину лугу, мл ;

P – наважка хітозану, мг.

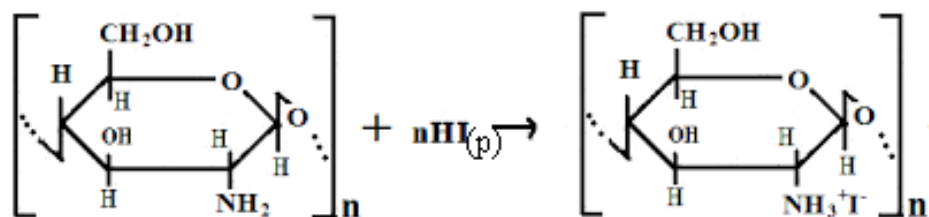


Рис.2.5. Схема розчинення хітозану в йодидній кислоті

Одержаний продукт добре розчинний у воді, якщо з отриманого розчину його виділити висушуванням останнього.

2.4.1. Методика одержання біологічно активного матеріалу хітозан йодиду з фукорцином

Склад препапату «Фукорцин»

– фуксин основний	4 мг	(0,004 г)
– ортоборатна кислота	8 мг	(0,008 г)
– фенол	39 мг	(0,039 г)
– ацетон	0,049 мл	
– резорцин	78 мг	(0,078 г)
– етанол (96% - ний)	0,095 мл	

Виготовлення розчину зразка біоматеріалу XI – 200 – 0,5Ф. До 80 мл розчину хітозан йодиду, виготовленого раніше додали 0,5 мл розчину фукорцину з допомогою градувальної піпетки при активному перемішування протягом 30 хв до утворення візуально гомогенного розчину. Після цього об'єм розчину доводили дистильованою водою до 100 мл.

Виготовлення розчину зразка біоматеріалу XI – 200 –1Ф. Даний розчин виготовили аналогічно попередньому лише з тією різницею, що розчину фукорцину додавали вдвічі більше, т.б. 1 мл.

Отримані розчини зразків біоматеріалів ліофільно висушували на спеціальній для цього установці промислового виробництва до утворення сухих біоматеріалів.

Висушені біоматеріали досліджували з допомогою рентгеноструктурного аналізу, методом електронної мікроскопії та мас – спектроскопії.

2.4.2. Ліофільне висушування

Ліофільне висушування (ліофілізація, кріодессікація) - це процес дегідратації, що часто використовується для того, щоб зберегти матеріал, який швидко псується або зробити його більш зручним для транспортування. Ліофілізація біологічних продуктів (білків, вакцин, мікроорганізмів) спрямована на збереження їх фізичної та біологічної їх цілісності після зберігання протягом декількох місяців або навіть років. Процес ліофілізації заснований на заморожуванні матеріалу з подальшим зменшенням зовнішнього тиску, що дозволяє воді переходити з твердого стану безпосередньо в газоподібний.

Препарати, висушені методом ліофільного висушування, мають хорошу розчинність і при додаванні до них води або фізіологічного розчину знову легко утворюють розчин.

Сучасна ліофілізація розроблена під час Другої світової війни для висушування сироватки крові. Новий метод дозволив зробити сироватку хімічно стабільною і життєздатною без необхідності її охолодження. З цього часу ліофілізацію використовують як метод консервації або обробки для широкого спектру речовин (харчових продуктів, фармпрепаратів, наборів для діагностики захворювань і тощо).

Процес ліофілізації поділяють на чотири етапи:

1. Попередня обробка;
2. Заморожування;

3. Первинна висушування;
4. Вторинна висушування;

Прилад для ліофільного висушування зображений на Рис.2.4. [34].

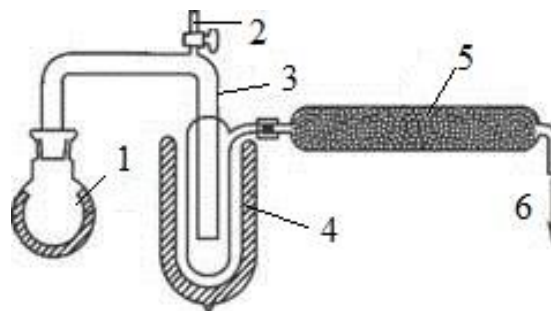


Рис. 2.5. Прилад для ліофільного висушування

1. Колба з розчином хітозану;
2. Кран для впуску повітря;
3. Охолоджувальна пастка для водяної пари;
4. Посудина Дьюара;
5. Хімічний поглинач вологи;
6. Відвід до вакуум - насосу.

Ознакою закінчення процесу є зникнення «інею» на зовнішній поверхні колби і набуття нею кімнатної температури.

Отриманий за вищеписаною методикою кінцевий продукт мав вигляд високопористої маси, пружної на дотик, яка легко подрібнюється з допомогою млина з утворенням пухкого аморфного порошку яскраво жовтого кольору, добре розчинному у воді.

РОЗДІЛ ІІІ

ОБГОВОРЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Бурхливий розвиток хімії хітину / хітозану з ІІ половини 20 ст. виявив цілий комплекс різноманітних властивостей цих біополімерів та означив десятки перспективних напрямів їх практичного використання. Поряд з цим, а особливо останніми роками, проводяться дослідження з розробки методів модифікування хітозану з різною метою: в одних випадках для посилення вже відомих властивостей цього полімеру, в інших – для одержання продуктів (модифікатів) з новими, часто заданими властивостями.

Особливе місце серед таких досліджень належить науковим роботам з розробки методик синтезу похідних хітозану, важливих та необхідних в медичній практиці.

Дана робота, якраз і є однією з таких досліджень, присвячена пошуку способу одержання композиційного біоматеріалу на основі хітозану з фукорцином.

Як відомо, медичний засіб фукорцин застосовують для лікування захворювань шкіри. Активні діючі речовини, що входять до його складу, забезпечують широкий спектр протимікробних ефектів при ураженнях шкіри інфекційними збудниками. Препарат виявляє також фунгіцидний ефект при грибкових ураженнях зовнішніх покривів. Подібним, але не дуже вираженими характеризується хітозан, що дозволяє використовувати його основою для створення нових біологічно активних матеріалів.

У процесі пошуку умов сполучення хітозану з фукорцином важливим і, напевно, визначальним моментом було знаходження таких співвідношень хітозан – фукорцин, щоб в отриманому композиційному матеріалі розподіл

фукорцину був максимально однорідним між макромолекулами матриці (т.б. хітозану)

Враховуючи розчинність хітозану в кислотних середовищах за основу була взята йодидна кислота, з якою хітозан як поліоснова утворює полімерну сіль за згаданою раніше схемою (Рис. 2.5).

Ця сіль була синтезована порівняно давно в роботі [29] і показала значно сильніші бактерицидні властивості ніж інші, хітозанові солі стосовно ран різного походження, ймовірно за рахунок вмісту йоду як в аніонній формі, так і в молекулярній. Адже, добре відома чутливість йодидів до кисню повітря, які легко ним окислюються.

При одержанні вихідної вищевказаної солі важливим було те, що утворений її розчин в НІ(р) мав середовище, близьке до рН шкіри (~5,5). А тому, щоб забезпечити даний рН з одного боку і одержати істинний розчин хітозану в йодидній кислоті, розчинення полімеру в цьому розчиннику здійснювали до досягнення рН, що дорівнював 4,5. Його підвищення до 5,5 супроводжується, по – перше, погіршенням розчинності хітозану, а значить, і гомогенності розчину утвореного хітозан йодиду. По – друге, ми враховували те, що введення фукорцину теж покращить розчинність хітозану, адже він містить компоненти дуже мало споріднені з амінополісахаридом хітозан – фенол, ацетон, етанол, хоча і в незначних кількостях.

З погляду на це, в розчин хітозан йодиду додавали невеликі об'єми фукорцину, в той же час слідкували за тим, що вони відрізнялись між собою як мінімум у два рази.

Унаслідок ліофільного висушування розчинів складу хітозан – фукорцин утворюються пористі матеріали губчастого характеру (Рис 3.1).

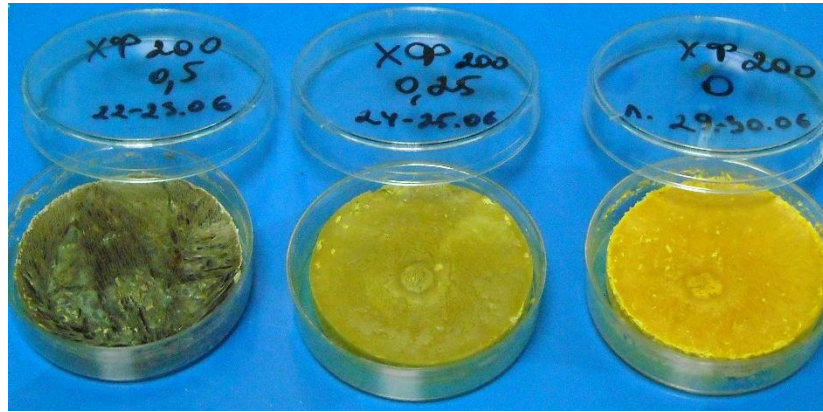


Рис. 3.1. Пористі губки ХФ 200 з різним вмістом фукоцианіну

Дані біоматеріали в розчинній формі, досліджені трьома фізико – хімічними методами показали певну, хоч і незначну різницю в їх структурі. На Рис.3.2. представлена дифракційна картина досліджених цим методом зразків у порівнянні біоматеріалом, що не містить фукоцианіну.

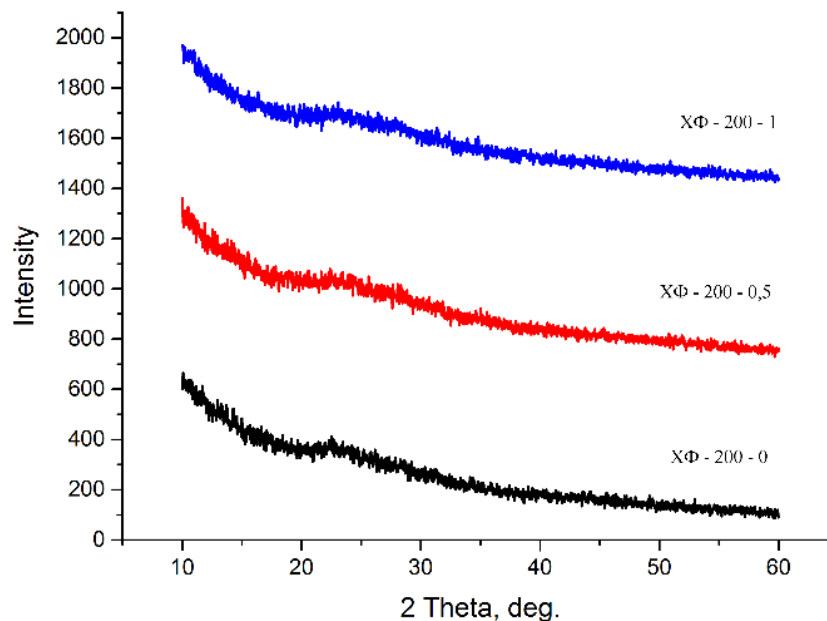


Рис. 3.2. Рентгенівська дифракція зразків ХФ з різним вмістом фукоцианіну

Ліофілізовані зразки та зразки без фукоцианіну, одержані з усіх трьох розчинів, мають схожу досить пористу регулярну структуру з розміром пор порядку 50 - 150 мікрометрів. Мікрофотографії електронної мікроскопії зразків

робили з різними збільшеннями і великої різниці в морфології не спостерігали (Рис.3.3, Рис 3.4, Рис 3.5).

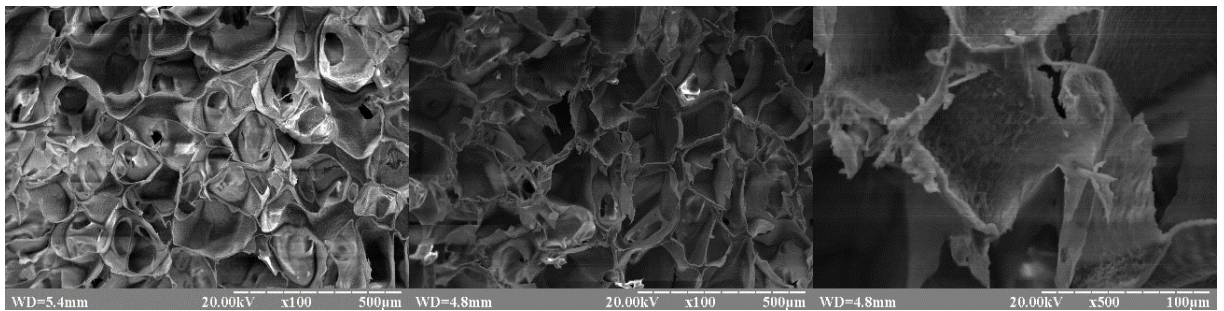


Рис. 3.3. Мікрофотографії електронної мікроскопії зразків ХФ 200 – 0

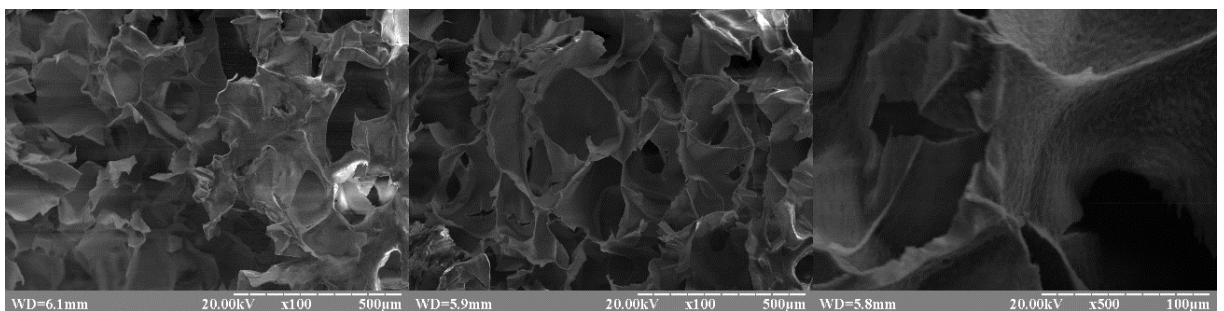


Рис. 3.4. Мікрофотографії електронної мікроскопії зразків ХФ 200 – 0,5

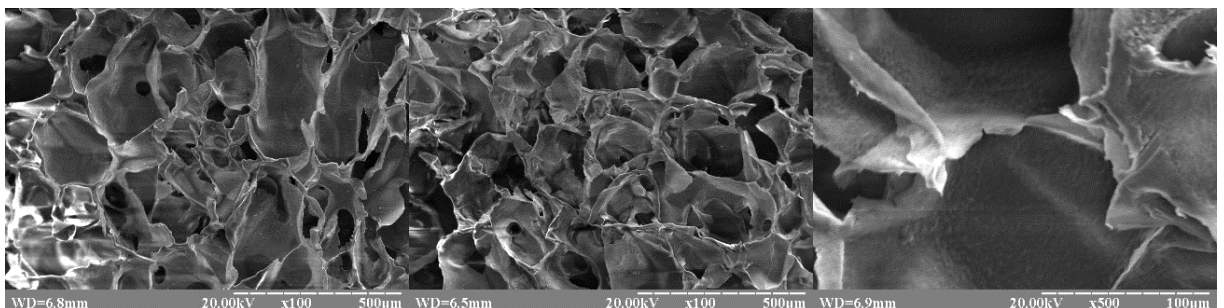


Рис. 3.5. Мікрофотографії електронної мікроскопії зразків ХФ 200 – 1

Як відомо мас – спектрометрія є одним з найбільш ефективних експресних методів аналізу для становлення будови як синтетичних так і природних сполук та їхніх сумішей. Тому щоб підтвердити дані електронної мікроскопії одержаних в роботі біоматеріалів був використаний і цей сучасний метод дослідження. Таким чином методом мас-спектрометрії встановлено, що характер виходу води і йонів, що містять йод, значно відрізняється у зразків, у яких присутній фукоцин (Рис. 3.6 і Рис. 3.7). Це свідчить про суттєву різницю в хімічній структурі зразків, і, очевидно, потребує подальших досліджень. У

зразках, які містять в своєму складі фукорцин спостерігається один пік виходу води у районі 200 градусів Цельсію, тоді як у зразку без фукорцину вода виходить при 200⁰ і 350⁰ С, тобто зразок містить зв'язану воду. У той же час, у зразку без фукорцину йод виходить при 200⁰ С, причому в мас - спектрах спостерігаються йони з масою 127 ([I]⁺) та 143([IO]⁺). У зразках, що містять фукорцин, є другий, високотемпературний максимум виходу йоду при 600⁰ С, при в цьому випадку у мас - спектрах спостерігаються йони 128 ([IH]⁺) та 143([IO]⁺). Отже, можемо припустити що, це пов'язано зі складовими фукорцину (зокрема, борна кислота) або особливостями синтезу .

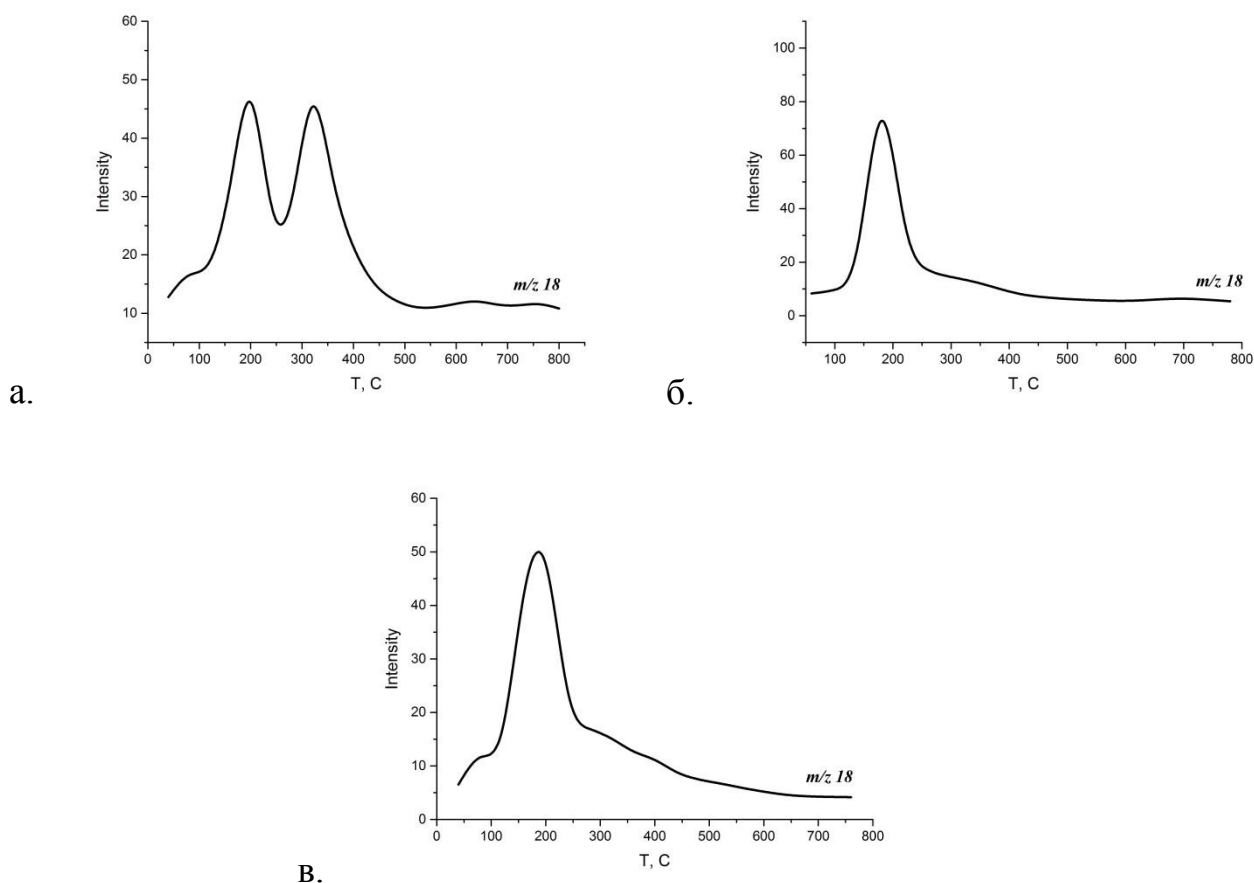


Рис.3.6. Крива температурного виходу йонів m/z 18 (вода) зі зразка

а)ХФ 200 0, б)ХФ 200 0,5Ф, в) ХФ 200 1Ф.

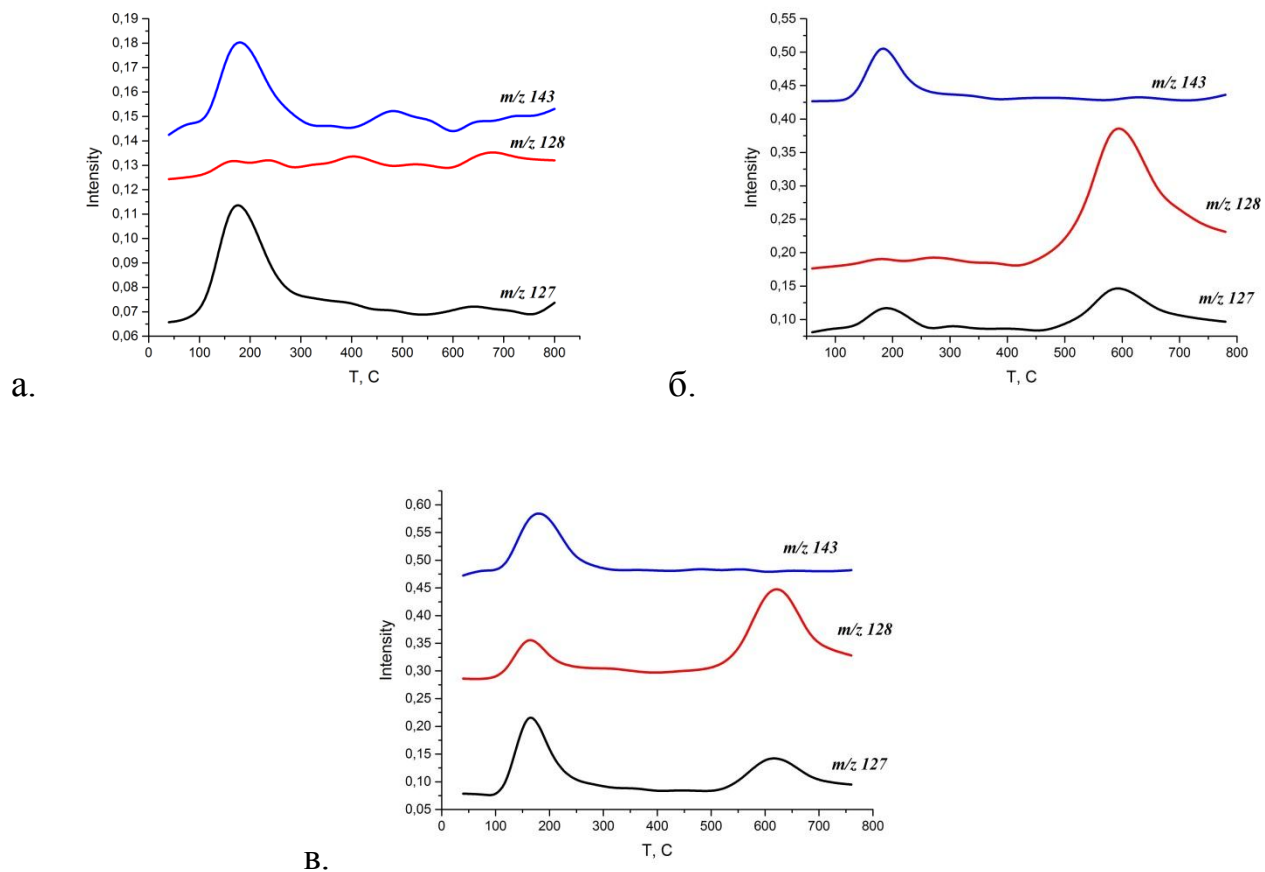


Рис. 3.7. Крива температурного виходу йонів m/z 127 ($[I]^+$), 128 ($[IH]^+$) та 143 ($[IO]^+$) зі зразка а) ХФ 200 0, б) ХФ 200 0,5Ф, в) ХФ 200 1Ф.

ВИСНОВКИ

1. Розроблена методика одержання полімерних матеріалів на основі хітозан – йодиду та фукорцину з різним вмістом останнього в рідкому та твердому стані.
2. Досліджена структура отриманих продуктів сучасними фізико – хімічними методами і виявлена їх аморфність з певним ступенем однорідності.
3. Синтезовані в роботі біоматеріали на основі хітозан йодиду з фукорцином за створеною вперше методикою можуть бути рекомендовані для клінічних досліджень з метою висновку про їх більшу ефективність у порівнянні з фукорцином.
4. У випадку позитивного результату досліджень згідно п.3 синтезовані біоматеріали можуть поповнити кількість існуючих медичних засобів бактерицидної дії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Анохін В. В. Хімія і фізико-хімія полімерів : підручник для хім.-технол. і технол. фак. та вузів / В.В. Анохін. – Київ : Вища школа, 1971. – 370 с.
2. Стрепихеев А. А., Деревицкая В.А. Основы химии высокомолекулярных соединений. 3 – е изд. перераб. и доп. – М.:Химия, 1976. 440с.
3. Шур А.М. Высокомолекулярные соединения. 3– е изд., перераб. и доп.- М.:Высшая школа, 1981. – 650с
4. Стельмах Г.І., Микитин І.М., Курта С.А., Лясковська М.Р. Методичні вказівки до лабораторних та практичних робіт з курсу «Хімія ВМС». / Факультет природничих наук; ДВНЗ “Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника”. – Івано – Франківськ, 2019. – 92 с.
5. Хорошилова Т. І. Високомолекулярні сполуки: підручник /. Т.І. Хорошилова, В. О. Хромишев, С.В. Рябов. – Мелітополь: видав- ництво Мелітопольського державного педагогічного ун-ту ім. Б. Хмельницького, 2013. – 178 с.
6. Шур А.М. Высокомолекулярные Соединения – М.: Радянська школа, 1988. – 176с.
7. Тагер А.А. Физико – химия полимеров. Издательство « Химия». М., 1968 г. 536
8. Скрыбина Г. К., Вихоровой Г. А., Варламова В. Н. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение/ Под ред.. - М.: Наука,2002.
9. Челябієва В.М., Сиза О.І., Савченко О.М. Технології полісахаридів та їх застосування в харчовій промисловості. Конспект лекцій для студентів спеціальності 181 / Челябієва В.М., Сиза О.І., Савченко О.М.// – Чернігів: ЧНТУ, 2018. – 123 с.
10. Михайлов Г. М. Биополимеры: целлюлоза, хитин, хитозан. — СПб. : Нестор — История, 2014. — 128 с.

11. Elson S. A. Characterization and Properties of Chitosan [Электронный ресурс] / Santiago Alvarenga Elson – Режим доступа до ресурсу: https://www.researchgate.net/publication/221913056_Characterization_and_Properties_of_Chitosan (дата звернення 16.05.2020) .
12. Быкова В.М. Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана / В.М. Быкова, С.В. Немцев//Хитин и хитозан: получение, свойства и применение под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – М. : Наука. –2002. – С. 7–78
13. Головки М. П., Кузнецова Т. О., Головки Т. М., Скляр А. О. Вивчення комплексу гідроколоїдів і встановлення їх взаємного впливу на утворену структуру драглів.
14. Гальбрайт Л.С. Хитин и хитозан. Строение, свойства, применение, / Л.С. Гальбрайт // Сороковский образовательный журнал. — 2001. — №7(1).
15. Семчиков Ю. Д. Высокомолекулярные соединения – Учеб. для вузов / Н. Новгород: Издательство Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского; М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 368 с.
16. Тагер Анна Александровна. Физико – химия полимеров. Издательство «Химия». М., 1968 г. 536 с. 88
17. Анохин В.В. Химия и физика полимеров. – К.: Высшая школа, 1987. – 399с.
18. Нижник В.В., Нижник Т.Ю. Фізична хімія полімерів. Підручник. – К.: Фітосоціоцентр, 2009. – 424 с.
19. Стрепихеев А.А., Деревицкая В.А. Основы химии высокомолекулярных соединений. Издания после 1975 года
20. Скрябин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. Г.К. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.Н. Варламова. – М.: Наука, 2002. – 368 с.

21. Данилов С.Н. Изучение хитина. I. Действие на хитин кислот и щелочей/ С.Н. Данилов, Е. А Плиско // Журнал общей химии. – 1954. – Т.24. – С. 1761 – 1769.
22. Гуменюк О. Л. Харчова хімія : методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів напряму підготовки 6.051701 «Харчові технології та інженерія» [Електронний ресурс] / О. Л. Гуменюк // – Чернігів: ЧДТУ. – 2013. – Режим доступу до ресурсу: http://ir.stu.cn.ua/bitstream/handle/123456789/16062/%d0%93%d1%83%d0%bc%d0%b5%d0%bd%d1%8e%d0%ba_%d0%a5%d0%b0%d1%80%d1%87%d0%be%d0%b2%d0%b0%20%d1%85%d1%96%d0%bc%d1%96%d1%8f%20_%d0%9b%d0%b0%d0%b1.%d0%bf%d1%80..pdf?sequence=1&isAllowed=y (дата звернення 14.05.2020).
23. Чирков, С.Н. Противовирусные свойства хитозана: Хитин, его строение и свойства / С.Н. Чирков // Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. – М.: Наука, 2002. – С.327-338.
24. Пат. 2087483 РФ, МПК 6 С 08 В37/08. Способ получения хитозана/ В.В. Сова, Д.Б. Фрайманд, В.В. Банников, Ф.И. Львович. №93055356/25; Заявлено 21.12.93; Опубл. 20.08.97 // Изобретения. - 1997. –№23. – С.92.
25. Быкова, В.М. Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана: Хитин, его строение и свойства / В.М. Быкова, С.В. Немцев // Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. – М.: Наука, 2002. – С.7 – 23.
26. Pogorielov M., Kalinkevich O., Deineka V., Garbuzova V., Solodovnik A., Kalinkevich A, Kalinichenko T., Gapchenko A., Sklyar A., and Danilchenko S. Haemostatic chitosan coated gauze: in vitro interaction with human blood and in-vivo effectiveness [Електронний ресурс] / Pogorielov M., Kalinkevich O., Deineka V., Garbuzova V., Solodovnik A., Kalinkevich A, Kalinichenko T., Gapchenko A., Sklyar A., and Danilchenko S. // Biomater Res.. –

2015. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4629397>(дата звернення 15.05.2020).
27. Головка М. П., Кузнецова Т. О., Головка Т. М., Скляр А.М. Вивчення комплексу гідроколоїдів і встановлення їх взаємного впливу на утворену структуру драглів // Наукові праці НУХТ. – 2016. – С. 222 – 230.
28. Kalinkevich O. V., Karpenko O.Yu., Trofimenko Ya.V., Sklyar A.M., Illiashenko V.Yu., Kalinkevich A.N., Baturin V.A., Danilchenko S.N.. Formation of antibacterial coatings on chitosan matrices by magnetron sputtering / Chemistry, Physics and Technology of Surface. – 2017. – P. 410 – 415
29. Природничі науки: збірник наукових праць. Вип. 10 / М-во освіти і науки України, Сумський держ. пед. ун - т ім. А.С. Макаренка: [редкол.: А.П.Вакала (відп.ред.), Ю.І. Литвиненко, Г.Я. Касьяненко та ін.]. – Суми: Вид – во СумДПУ імені А.С. Макаренка, 2013. – 217с.
30. Природничі науки [Текст]: Prirodnicі nauki:збірник наукових праць Вип. 16. / Міністерство освіти і науки України , Сумський державний педагогічний університет імені А.С. Макаренка: [редкол.: В. І. Шейко, Г.Я. Касьяненко, Ю.І. Литвиненко та ін.]. – Суми : СумДПУ імені А. С. Макаренка, 2019. — С. 84 – 86.
31. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – М: Наука, 2002. – С. 217 – 246.
32. Скляр А.М., Чичикало Д.В. Одержання біологічно активного матеріалу на основі хітозану та бісмут (III) дигідроксид нітрату. Сумський державний педагогічний університет імені А. С. Макаренка, 2019

33. Черных В.П., Зименковский Б.С., Гриценко И. С. Органическая химия: Учебник для студ. вузов. / Под общ. ред. В.П.Черных. – 2-е изд., испр. и доп. Х.: Изд-во НФаУ., Оригинал, 2007. – 776 с.
34. Grubal E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review // *Sep. Purif. Technol.* – 2004. – V. 38. – P. 43–74.
35. Varma A. J., Deshpande S. V., Kennedy J. F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review // *Carbohydr. Polym.* – 2004. – V. 55. – P. 77–93.
36. Kolodynska D. Adsorption characteristics of chitosan modified by chelating agents of a new generation // *Chem. Eng. J.* – 2012. – V. 179. – P. 33 – 43.
37. Камская В.Е. Хитозан: структура, свойства и использование // Научное обозрение. Биологические науки. – 2016. – № 6. – С. 36-42; [Электронный ресурс] / Камская В.Е. – Режим доступа до ресурсу: <https://science-biology.ru/ru/article/view?id=1020> (дата звернения 14.05.2020).