

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра полимеров на базе ООО «АКРИПОЛ»

**Физико-химические свойства и биологическая активность
смесевых композиций хитозана и глюкоманнана**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 2 курса магистратуры 251 группы

направления 04.04.01 «Химия»

Института химии

Калиничевой Марины Антоновны

Научный руководитель

Заведующий кафедрой

д.х.н., профессор

А.Б. Шиповская

Саратов 2023

Введение

Актуальность работы. Биологически активный полужескоцепной полисахарид животного происхождения хитозан является биосовместимым, биodeградируемым, а также проявляет регенерирующее действие и антибактериальную активность [1]. Природный гибкоцепной полисахарид растительного происхождения глюкоманнан обладает гидрофильностью, гелеобразующей и сорбционной способностью, биологической активностью, стабилен в широком диапазоне рН среды [2]. Оба полисахарида имеют перспективы применения в медицине, фармакологии, косметологии и стоматологии [3]. В сочетании данные полимеры могут проявлять увеличенную биологическую и детоксицирующую активность, а также улучшение механических свойств [4]. В этой связи использование смесевых растворов хитозана с глюкоманнаном весьма перспективно для получения материалов, сочетающих в себе полезные для медицинской фармакологии качества обоих компонентов. При этом, одним из факторов, определяющим возможное взаимодействие смесей полимеров в едином растворителе, рассматривается гидродинамическое поведение компонентов в смесевых растворах.

В результате вышесказанного актуальным является использование смеси хитозана (производных хитозана) и глюкоманнана для создания гидрогелевых покрытий и пластырей при изыскании новых подходов к реализации процесса гелеобразования, включая быстрый процесс гелирования (менее 3-5 мин), при сохранении биологической активности гидрогелевой композиции.

Цель работы: оценка физико-химических свойств смесей хитозана и глюкоманнана для получения биологически активных гидрогелевых систем.

Задачи работы

1. Изучение вискозиметрических и кислотно-основных свойств растворов глюкоманнана, низко- и высокомолекулярного гидрохлорида хитозана и их смеси в широком диапазоне соотношений компонентов.

2. Получение золь-гель синтезом глицерогидрогелей-монолитов на основе смесей низко- и высокомолекулярного гидрохлорида хитозана с глюкоманнаном с использованием тетраглицеролата кремния в качестве прекурсора золь-гель реакции и добавок аминокaproновой кислоты.

3. Оценка влияния кислотности среды на время гелеобразования полисахаридсодержащей композиции.

4. Исследование дермо- и мукоадгезивных свойств, а также, ранозаживляющей активности наилучших образцов гидрогелей.

В качестве **объектов** исследования использовали водные растворы гидрохлорида хитозана разной молекулярной массы, глюкоманнана и их смеси. Также применяли органо-неорганические гидрогели на основе смеси хитозана и глюкоманнана, полученные в результате гидролиза и конденсации тетраглицеролата кремния ($\text{Si}(\text{OGly})_4$) в глицериновом растворе (золь-гель синтезом) при $20 \pm 2^\circ\text{C}$, в разных массовых соотношениях.

Структура и объем работы. Выпускная квалификационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов, приложения и списка используемых источников, включающего 34 наименования. Работа изложена на 56 листах машинописного текста, содержит 19 рисунков, 15 таблиц.

Основное содержание работы

1 Приготовление исходных растворов хитозана

Растворы гидрохлорида хитозана разной молекулярной массы готовили при концентрации полимера 0.06, 2.0 и 4.0 мас.%. Для получения водного раствора ХТЗ-38·НСl навеску порошка полимера растворяли в дистиллированной воде. Поскольку ХТЗ-200 находится в основной форме и растворяется только в кислой среде, то навеску порошка полимера растворяли в водном растворе 1Н НСl, тем самым получали солевую форму ХТЗ-200+НСl в мольном соотношении компонентов $\text{NH}_2^- : \text{НСl} = 1 : 1$. Степень протонирования была установлена в специальных опытах и составила ~90%. Для получения гомогенного раствора систему перемешивали на магнитной мешалке в течение 1 ч и выдерживали 1 сут при $20 \pm 2^\circ\text{C}$. В готовые растворы при необходимости добавляли расчетное количество аминокaproновой кислоты (АмК) в мольном соотношении компонентов ХТЗ : АмК = 1 : 1.

2 Приготовление водных растворов глюкоманнана

Для приготовления водного раствора глюкоманнана (ГМ) концентрации 0.06, 0.2 и 0.5 мас.% навеску полимера предварительно смачивали несколькими каплями этилового спирта, добавляли рассчитанное количество горячей воды (80°C) и нагревали в СВЧ-печи в течение 2 мин с интервалом перемешивания 30 сек.

3 Золь-гель синтез гидрогелей

Водные растворы ХТЗ-38·НСl и ХТЗ-200+НСl без/с АмК смешивали с ГМ в соотношении 1:1 и 1:0.5 соответственно.

В отдельных экспериментах смеси вводили малые добавки NaOH для регулирования pH среды.

Далее для приготовления гидрогелей в смеси добавляли глицериновый раствор $\text{Si}(\text{OGly})_4$ и, при необходимости, глицериновый раствор тетрабората натрия (ТБН) и гомогенизировали в массовом соотношении от 0.25:1 до 6:1. Массу навески контролировали гравиметрически и выражали в мас.%. Для

характеристики компонентного состава концентрацию полимеров в смесевой композиции ($C_p = C_{ГМ} + C_{ХТЗ}$, мас.%) выражали с учетом концентрации кремния в системе C_p/C_{Si} . Смесевую композицию тщательно гомогенизировали в течение 1-2 мин стеклянной палочкой и оставляли при комнатной температуре для протекания золь-гель реакции. Фиксировали время гелеобразования по полной потери текучести системы методом «переворачивания колбы».

4 Вискозиметрические исследования хитозана, глюкоманнана и их смеси

На первом этапе проводили вискозиметрические исследования ГМ. Полученная концентрационная зависимость $\eta_{уд}/C$ для ГМ не прямолинейная и состоит из 2х участков, отличающиеся углом наклона кривой. Вероятно, что концентрация, равная 0.06 г/дл, является концентрацией кроссовера, начиная с которой происходит перекрывание макромолекулярных клубков.

Для определения молекулярной массы ГМ использовали только начальный участок зависимости при $C_{ГМ} < 0.06$ г/дл. Учитывая полученное значение $[\eta]$, которое составило ~ 20 дл/г, определили средневязкостную молекулярную массу. Она оказалась равной 1100 кДа. Можно констатировать, что глюкоманнан относится к классу гибкоцепных полимеров.

На втором этапе проводили вискозиметрические исследования индивидуального ХТЗ-38·НСl. Обнаружено, что макромолекулы ХТЗ-38·НСl проявляют свойства, типичные для полиэлектролита с частично компенсированным зарядом. Хранение раствора сопровождается уменьшением полиэлектролитного набухания макромолекулярного клубка.

Построение в координатах Хаггинса не дало линейной зависимости, поэтому была построена прямая в координатах Иржака-Баранова.

Далее исследовали смеси водных растворов ХТЗ-38·НСl и ГМ. При обозначении концентрации индекс у C отражал конкретный компонент ($C_{ГМ}$, $C_{ХТЗ}$). Общую концентрацию используемых веществ обозначали ($C_p = C_{ГМ} + C_{ХТЗ}$). Использование координат Хаггинса для смеси ХТЗ-38·НСl

с ГМ для нахождения корректного значения предельного числа вязкости было возможно только для соотношения 1:9. Для остальных соотношений были использованы координаты Иржака-Баранова.

Для нахождения предельного числа вязкости $[\eta]$ необходимо получить прямолинейную зависимость концентрационной кривой. Полученная концентрационная зависимость $\eta_{уд}/C$ не прямолинейна.

На третьем этапе проводили вискозиметрические исследования ХТЗ-200·НСI. Концентрационная зависимость водного раствора индивидуального ХТЗ-200·НСI проявляет не ярко выраженный полиэлектролитный эффект. Смеси водных растворов ХТЗ-200·НСI и ГМ также проявляют свойства полиэлектролитного набухания макромолекулярного клубка. Наиболее выражен полиэлектролитный эффект у смеси с наибольшим содержанием ХТЗ-200·НСI.

Известно, что значение предельного числа вязкости отражает размер макромолекулярного клубка полимеров ($[\eta] \sim$ размер клубка). Для оценки изменения размера клубков индивидуальных ХТЗ-38·НСI или ХТЗ-200·НСI и ГМ и их смеси, построена диаграмма, на которой нанесены найденные значения предельных чисел вязкости.

Значения предельных чисел вязкости смеси ниже аддитивных и свидетельствуют об уменьшении размера объединённых клубков ХТЗ-38·НСI или ХТЗ-200·НСI с ГМ. Можно сделать вывод о взаимодействии между полимерами и образовании уплотнённого смесевоего клубка двух полисахаридов. Причем, образец хитозана с более низкой \bar{M}_η образует более плотный смесевой клубок, чем высокомолекулярный образец. Исключением является лишь участок для смесей ХТЗ-200·НСI с ГМ с наибольшим содержанием ГМ (ХТЗ-200·НСI : ГМ \leq 2:8), где значения $[\eta]$ совпадают с аддитивными. Исходя из данных по предельному числу вязкости был рассчитан эффективный радиус макромолекулярного клубка.

5 Потенциометрическое титрование растворов хитозана в соляной кислоте без и с добавкой аминокaproновой кислоты

Для оценки возможного химического взаимодействия между хитозаном и аминокaproновой кислотой выполнили потенциометрическое титрование. В этих экспериментах оценивали взаимодействие низкомолекулярных кислот друг с другом и с растворами хитозана. На первом этапе работы выполнили потенциометрическое титрование соляной кислоты щелочью с образованием соли NaCl. Титрование показало, что интегральная и дифференциальная кривые имеют классический вид. Затем аналогичное титрование выполнили с системой слабая аминокaproновая кислота – вода. Ввиду низкой величины константы диссоциации аминокaproновой кислоты не было зафиксировано точки эквивалентности.

Далее оценивали взаимодействие слабой органической аминокислоты в присутствии сильной неорганической кислоты. Провели титрование раствора смеси этих двух кислот. Зависимость подобна такой же зависимости для исходной HCl – точка эквивалентности соответствует только соляной кислоте.

На втором этапе проводили потенциометрическое титрование водных растворов гидрохлорида хитозана разной молекулярной массы в индивидуальных кислотах и их смесях. Все графики получились однотипными, на всех имеется пик, отвечающий за нейтрализацию имеющихся в полимере кислотных групп.

По полученным результатам кривых титрования можно сделать вывод, что взаимодействия между аминокгруппами растворов низко- и высокомолекулярного гидрохлорида хитозана и аминокaproновой кислотой не происходит.

6 Влияние добавки аминокaproновой кислоты на золь-гель синтез гидрогелей смеси низкомолекулярного хитозана и глюкоманнана

В работе были проведены опыты по установлению времени гелеобразования глюкоманнана в смеси с низкомолекулярным гидрохлоридом хитозана без/с аминокaproновой кислотой. Варьировали не только

соотношение компонентов гелеобразующей системы, но и их концентрации в исходном растворе. Основным гелирующим фактором служил золь-гель синтез полисилаксановой сетки из тетраглицеролата кремния.

Время гелеобразования повышается с увеличением соотношения C_p/C_{Si} . Характер зависимости композиции ХТЗ-38·НСІ + ГМ в разных соотношениях компонентов идентичен – при массовом соотношении $C_p/C_{Si} < 0.8$ у всех есть точка минимума ($C_p/C_{Si} \sim 0.1 - 0.4$) и зависимость имеет нелинейный характер. Меньшее содержание полимера характеризуется меньшим временем гелеобразования. Добавка в смесевую композицию АмК несколько изменяет зависимость гелеобразования – время гелеобразования уменьшилось в среднем в 5-10 раз. У систем с добавлением АмК рН составляло ~ 5 , что близко к рК ХТЗ (рК ~ 5.5) подходит для возможного медицинского применения.

7 Влияние добавки аминокaproновой кислоты на золь-гель синтез гидрогелей смеси высокомолекулярного хитозана и глюкоманнана

При выполнении бакалаврской работы 2021 года были проведены опыты по установлению времени гелеобразования глюкоманнана в смеси с низкомолекулярным гидрохлоридом хитозана без/с аминокaproновой кислотой. При выполнении магистрской работы 2023 года варьировали не только соотношение компонентов гелеобразующей системы, но и их концентрации в исходном растворе. Основным гелирующим фактором служил золь-гель синтез полисилаксановой сетки из тетраглицеролата кремния.

Время гелеобразования повышается с увеличением соотношения C_p/C_{Si} . Характер зависимости композиции ХТЗ-38·НСІ + ГМ в разных соотношениях компонентов идентичен – при массовом соотношении $C_p/C_{Si} < 0.8$ у всех есть точка минимума ($C_p/C_{Si} \sim 0.1 - 0.4$) и зависимость имеет нелинейный характер. Меньшее содержание полимера характеризуется меньшим временем гелеобразования. Добавка в смесевую композицию АмК несколько изменяет зависимость гелеобразования – точка минимума стала менее выражена, время гелеобразования уменьшилось в среднем в 5-10 раз. У

систем с добавлением АмК рН составляло ~ 5 , что близко к рК ХТЗ (рК ~ 5.5) и подходит для возможного медицинского применения. Полученные гидрогели были формоустойчивые, визуально однородные. При выдерживании образцов в течении месяца разрушения, помутнения и синерезиса не наблюдалось. Например, состав 0.67% ХТЗ-38·НСl и 0.16% ГМ (в соотношении 1:1) с добавлением АмК хранился без видимых изменений при комнатной температуре 2 мес.

3.2.3 Влияние добавки аминокaproновой кислоты на золь-гель синтез гидрогелей смеси высокомолекулярного хитозана и глюкоманнана

На следующем этапе были изучены аналогичные процессы, но с использованием высокомолекулярного хитозана. Был проведен сравнительный анализ зависимости времени гелеобразования систем на основе 1.0% ХТЗ-200+НСl и 0.25% ГМ без и с добавкой АмК от массового соотношения компонентов.

Исходя из полученных данных и предыдущих опытов был сделан вывод, что на время гелеобразования влияет соотношение компонентов: с увеличением концентрации Si в системе время гелирования сокращается, но при этом снижается формоустойчивость гидрогелей. Также было замечено, что при добавлении АмК увеличивается рН растворов и сокращается время формирования гидрогелей. Поэтому целью следующего этапа было регулирование рН растворов без изменения состава растворов жестким нейтрализующим реагентом – щелочью.

Были выбраны системы состава 0.67% ХТЗ-200+НСl + 0.16% ГМ без/с АмК и 0.67% ХТЗ-38+НСl + 0.16% ГМ без/с АмК и с добавлением 0.1Н NaOH. В системах диапазон рН растворов ограничили 5.5, что соответствует рК аминокроп групп хитозана, для избежания осаждения ХТЗ-200+НСl в системе.

АмК и NaOH в наших системах являются регуляторами рН растворов, однако в смеси действуют они по-разному. В области $C_{\text{NaOH}} \leq 0.05$ г/мл добавление щелочи в системы без АмК дает ярко выраженную зависимость

уменьшения времени гелеобразования. В смесевой композиции с добавкой АмК реализуется более плавная зависимость времени гелеобразования от C_{NaOH} , вероятно, из-за более высокого рН исходной композиции. В области $C_{\text{NaOH}} \geq 0.05-0.06$ г/мл зависимость для всех систем идентична. С увеличением содержания щелочи, время гелеобразования систем уменьшается в среднем до 3-х минут.

Таким образом, установлено, что время гелеобразования исследуемых композиций можно значимо регулировать введением АмК и NaOH.

Заключение

В ходе выполнения работы методом вискозиметрии исследованы гидродинамические свойства водных растворов глюкоманнана, гидрохлорида хитозана (молекулярной массы 38 и 200 кДа) и их смеси в широком диапазоне компонентов. Построены зависимости предельного числа вязкости от концентрации полимера и соотношения компонентов в смесевой композиции.

Получены органо-неорганические глицерогидрогели на основе водных растворов глюкоманнана и гидрохлорида хитозана в композиции с глицериновым раствором тетраглицеролата кремния без/с аминокaproновой кислотой в различных массовых соотношениях. Проведен сравнительный анализ влияния молекулярной массы хитозана на время гелирования органо-неорганических полисахаридсодержащих глицерогидрогелей. Установлено, что высокомолекулярный хитозан уменьшает скорость золь-гель реакции.

Изучено влияние добавки аминокaproновой кислоты и щелочи на кинетику гелеобразования полисахаридсодержащих глицерогидрогелей. Обнаружено, что при прочих равных условиях (температура, концентрационный состав) время гелеобразования исследуемой системы в присутствии аминокислоты и NaOH значительно уменьшается. Установлено, что в щелочной среде время гелирования систем снижается до 3-х минут.

Исследована ранозаживляющая способность наилучших образцов гидрогелей на модели резаной раны у лабораторных крыс. Проведена оценка муко- и дермоадгезионных свойств. Обнаружено, что гидрогели проявляют хорошие муко- и дермоадгезионные свойства, а также характеризуются высокой ранозаживляющей активностью.

Список используемых источников

1. Павлюченко В. Н. Композиционные полимерные гидрогели / В. Н. Павлюченко, С. С. Иванчев // Высокомолек. соед. - 2009. - Т. 51, № 7. - С. 1075 - 1095.
2. Du X. Z. Effect of degree of deacetylation on physicochemical and gelation properties of konjac glucomannan / X. Z. Du, J. Li, J. Chen, B. Li // Int. Food Res. J. - 2012. - Vol. 46, No. 1. - P. 270 - 278.
3. Slaughter B. V. Hydrogels in regenerative medicine / B. V. Slaughter, S. S. Khurshid, O. Z. Fisher // Adv. Mater. - 2009. - Vol. 21, No. 32-33. - P. 3307-3329.
4. Местечкина Н. М. Влияние полисахаридов на биологическую активность лактоферрина человека / Н. М. Местечкина // Прикладная биохимия и микробиология. - 2011. - Т. 47, №. 6. - С. 699 - 706.