

Міністерство освіти і науки України  
Національний університет "Львівська політехніка"



*На правах рукопису*

**НАГОРНЯК МИХАЙЛО ІГОРОВИЧ**

УДК 541.64; 544.773.432; 66.095.26-922.3

**Синтез та дослідження властивостей поліестерів на основі N-похідних  
глутамінової кислоти та полісахаридів**

*02.00.06 - хімія високомолекулярних сполук*

Дисертація на здобуття наукового ступеня  
кандидата хімічних наук

Науковий керівник –  
доктор хімічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Самарик В.Я.**

*Ідентичність всіх примірників дисертації*

ЗАСВІДЧУЮ:

**Секретар спеціалізованої  
вченої ради**



/О. Г. Будішевська/

Львів-2017

## Зміст

Перелік умовних скорочень .....	4
Розділ 1. Створення полімерів медичного призначення на основі структурованих полісахаридів (Літературний огляд).....	9
1.1. Полісахариди, як перспективні біоматеріали .....	9
1.2. Використання гідрогелів, як полімерних матеріалів медичного призначення .....	10
1.3. Гідрогелі із спеціальними властивостями .....	11
1.4. Методи формування мікрогідрогелів .....	13
1.5. Особливості вивільнення лікарських засобів з полімерних частинок та мікрогідрогелів.....	16
1.6. Огляд реакцій алкілування амінів .....	19
1.7. Методи одержання поліестерів природних амінокислот .....	24
1.7.1. Формування псевдо-поліамінокислот за рахунок реакцій естерифікації.....	27
Розділ 2. Методика експериментів .....	31
2.1. Вихідні речовини, матеріали та їх характеристики .....	31
2.2. Методики проведення синтезів та експериментів.....	33
2.2.1. Методика очистки глютамінової кислоти.....	33
2.2.2. Методика синтезу хлорангідриду стеароїлової/лауреїлової кислот.....	34
2.2.3. Методика синтезу N-стеароїл та N-лауреїлглютамінової кислот.....	34
2.2.4. Методика синтезу поліестерів на основі полісахаридів та моно/ дикарбонових кислот .....	35
2.2.5. Методика проведення взаємодії сахарози з карбоновими кислотами .....	36
2.2.6. Одержання N-заміщених похідних глютамінової кислоти, взаємодією гідрофільних естерів поліоксіетиленхлорацетатів з глютаміновою кислотою .....	37
2.3. Методики проведення аналізів .....	38
2.3.1. Методика визначення в'язкості .....	38
2.3.2. Гель-проникна хроматографія.....	39
2.3.3. Потенціометричний метод аналізу для визначення карбоксильних груп .....	39
2.3.4. Кондуктометричний метод аналізу .....	41
2.3.5. Визначення ангідридних груп .....	42
2.3.6. Визначення солюбілізації водонерозчинного барвника Судан III у дисперсіях синтезованих поліестерів .....	42

2.3.7. Визначення вивільнення солюбілізованого дисперсією поліестеру барвника Судан III у 1-октанол .....	43
2.3.8. Дослідження електрофоретичної рухливості дисперсій поліестерів з альбуміном .....	43
2.3.9. Визначення розмірів частинок дисперсій структурованих полімерів методом світлорозсіювання .....	45
2.3.10. Термогравіметричні дослідження.....	45
2.3.11. Визначення поверхневого натягу водних дисперсій ППАК та критичної концентрації міцелоутворення .....	46
2.3.12. Визначення розміру частинок дисперсної фази методом динамічного світлорозсіювання (DLS) .....	46
2.3.13. Трансмісійна електронна мікроскопія (ТЕМ) .....	46
2.3.14. Якісний аналіз на первинну аміногрупу (нінгідринова проба) .....	46
2.3.15. ІЧ-спектроскопія з перетворення Фур'є.....	47
2.3.16. ПМР-спектроскопія.....	47
<b>Розділ 3. Модифікація полісахаридів N-похідними глутамінової кислоти за реакцією Стегліха .....</b>	<b>48</b>
3.1. Обґрунтування використання реакції Стегліха для модифікації полісахаридів .....	48
3.2. Дослідження особливостей перебігу реакції Стегліха за участю гідроксильних груп сахарози з карбоновими кислотами .....	51
3.3. Особливості взаємодії N-похідних глутамінової кислоти з декстрином .....	61
3.3.1. Залежність часу гелеутворення реакційної суміші від умов проведення реакції .....	64
3.3.2. Дослідження впливу умов проведення процесу на вихід та склад продуктів реакції.....	69
3.3.3. Вплив природи реагентів на склад продуктів реакції.....	89
3.4. Динаміка перебігу реакції модифікації декстрину N-стеароїлглутаміновою кислотою за реакцією Стегліха.....	91
<b>Розділ 4. Одержання поліоксіетильованих N-похідних глутамінової кислоти та їх дослідження.....</b>	<b>95</b>
4.1. Розробка методу отримання N-поліоксіетиленових похідних глутамінової кислоти .....	96
4.1.1. Дослідження процесу одержання поліоксіетиленових естерів хлороцтової кислоти .....	96
4.1.2. Дослідження особливостей перебігу реакції N-алкілування глутамінової кислоти поліоксіетиленовими естерами хлороцтової кислоти.....	100

4.2. Особливості поліконденсації N-поліоксіетиленових похідних глютамінової кислоти .....	106
<b>Розділ 5. Дослідження властивостей поліестерів синтезованих на основі</b>	
<b>полісахаридів та двоосновних <math>\alpha</math>-амінокислот .....</b>	<b>109</b>
5.1. Дослідження поверхневої активності поліестерів на основі N-похідних глютамінової кислоти та полісахаридів.....	109
5.2. Термохімічні дослідження зразків золь- та гель-фракцій .....	116
5.3. Дослідження кількості “зв’язаної води” у продуктах взаємодії декстрину і N-стеароїлглютамінової кислоти.....	120
5.4. Дослідження розміру частинок дисперсної фази водних дисперсій поліестерів .....	123
5.5. Дослідження солюбілізації водонерозчинного барвника Судану (III) дисперсіями поліестерів .....	131
5.6. Сорбція альбуміну на частинки структурованого декстрину .....	135
<b>Розділ 6. Напрямки практичного застосування одержаних продуктів.....</b>	<b>142</b>
6.1. Створення препаратів мікронутрієнтів на основі водних дисперсій поліестерів .....	142
6.1.1. Дослідження цитотоксичності поліестерів одержаних на основі декстрину та Glu(St) .....	142
6.1.2. Використання поліестерів декстрину для транспорту йоду.....	144
6.1.3. Використання поліестерів декстрину для транспорту таурину .....	144
6.2. Формування препаратів есенціальних мікроелементів на основі поліестерів.....	146
6.2.1. Одержання комплексів мікроелементів з поліоксіетиленовими N-похідними глютамінової кислоти .....	147
6.2.2. Дослідження особливостей комплексоутворення поліоксіетиленових N-похідних глютамінової кислоти .....	149
6.2.3. Цитологічні дослідження комплексів металів отриманих на основі поліоксіетиленових N-похідних глютамінової кислоти .....	153
6.2.4. Дослідження фізіологічної активності комплексів металів на щурах .....	154
6.3. Створення системи пролонгованої доставки двовалентного заліза на основі модифікованого декстрину та N-похідних глютамінової кислоти.....	156
<b>Висновки .....</b>	<b>160</b>
<b>Список використаних джерел .....</b>	<b>162</b>

## Перелік умовних скорочень

Glu(St)	2-(N-гептадеканоїламіно)пентандіова кислота (N-стеароїлглутамінова кислота)
Glu(L)	2-(додеканоїламіно)пентадіова кислота (N-лауреїлглутамінова кислота)
DCC	N,N-дициклогексилкарбодимід
DCU	N,N-дициклогексилсечовина
DMAP	4-(N,N-диметиламіно)піридин
DMFA	N,N-диметилформамід
P	Ланка $\alpha$ -D-глюкопіраноза
OK	Оцтова кислота
C	Сахароза
PA	N-циклогексил-N- (циклогексилкарбомоїл) ацетамід

В роботі зразки синтезів зашифровані наступним чином:

Da L 6 Z – золь-фракція синтезу декстрану з N-лауреїлглутаміновою кислотою при співвідношенні функціональних груп 6 : 1 (ОН : COOH).

Відношення до фракції: Z – золь-фракція; H – гель-фракція;

Співвідношення між гідроксильними та карбоксильними групами (відповідає кількості гідроксильних груп на одну карбоксильну);

S та L, коли використовувались N-стеароїлглутамінова та N-лауреїлглутамінова кислоти, відповідно;

Синтез в якому використовували декстрин позначається буквою D, декстран – Da.

mGlu(PEGk) – N-поліоксіетиленова похідна глютамінової кислоти.

Поліоксіетиленгліколь, з молярною масою k (300, 400, 600, 1050, 1500);

Глутамінова кислота (2-амінопентандіова кислота);

m – монозаміщена похідна, d – дизаміщена похідна.

## Вступ

**Актуальність теми.** Дисертаційна робота присвячена модифікації полісахаридів за реакцією Стегліха та створенню їх нових похідних з розгалуженою та просторово-структурованою будовою макроланцюга. У зв'язку із збільшенням інтересу до відновлювальних джерел сировини хімія полісахаридів в останні десятиріччя набула особливої ваги в дослідженнях наукових груп різного профілю. Значна увага приділяється створенню полімерних матеріалів медичного та біомедичного призначення на основі полісахаридів природного та мікробіологічного походження через їх хімічну модифікацію. Створення нового методу модифікації полісахаридних ланцюгів з метою одержання полімерів з розгалуженою та/або просторово-структурованою природою макромолекул є актуальною задачею хімії високомолекулярних сполук. N-похідні глутамінової кислоти, як модифікуючі агенти дозволяють, одночасно із структуруванням полісахаридних ланцюгів надавати продуктам реакції необхідні, наперед визначені властивості. Зокрема, в літературі описано використання, як замісників, алкільних або поліоксіетиленових фрагментів, що дозволяє регулювати поверхнево-активні властивості та гідрофільно-ліпофільний баланс модифікатів і надавати їм здатність до утворення самостабілізованих водних дисперсій. Крім того, використання глутамінової кислоти та її похідних забезпечує відсутність токсичності продуктів модифікації і продуктів біодеструкції, що є важливою умовою створення полімерних матеріалів медичного призначення, які використовують у вигляді водних дисперсій.

**Мета та завдання роботи.** Метою даної роботи є синтез нових біосумісних та біодеградабельних поліестерів на основі N-похідних глутамінової кислоти та декстрину або декстрану з розгалуженою та просторово-структурованою будовою макроланцюга, дослідження їхніх властивостей та властивостей створених на їх основі водних дисперсій.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- дослідити особливості взаємодії N-похідних глутамінової кислоти різної природи з гідроксильними групами полісахаридів за реакцією Стегліха; встановити структуру та склад продуктів цієї реакції;

- створити методику одержання похідних декстрину та декстрану – поліестерів з розгалуженою та просторово-структурованою будовою макроланцюга, придатних до формування у водному середовищі самостабілізованих дисперсій та мікрогідрогелів;
- на основі досліджень колоїдно-хімічних властивостей одержаних полімерних матеріалів розробити методику одержання самостабілізованих водних дисперсій та дисперсій мікрогідрогелів;
- дослідити колоїдні та термохімічні властивості одержаних водних дисперсій та дисперсій мікрогідрогелів та оцінити можливість використання їх як полімерних матеріалів медичного та біомедичного призначення.

**Об'єкт дослідження.** Процеси одержання поліестерів на основі N-похідних глютамінової кислоти та полісахаридів за реакцією Стегліха, склад, структура та властивості продуктів даної реакції та створених на їх основі водних дисперсій та дисперсій мікрогідрогелів.

**Предмет дослідження.** Предметом дослідження є N-похідні глютамінової кислоти (N-стеароїл-, N-лауреїлглютамінова кислота, N-поліоксіетилензаміщена глютамінова кислота з поліоксіетиленовими фрагментами різної молекулярної маси), які виступають як кислотний компонент у реакції Стегліха; декстрин і декстран, що використовуються як спиртові компоненти та властивості естерних та поліестерних продуктів їх взаємодії.

**Методи дослідження.** ІЧ-, ПМР- та мас-спектрометрія, динамічне світлорозсіювання (DLS), фотоколориметрія, визначення поверхневого натягу, функціональний аналіз, елементний аналіз, термогравіметричний аналіз, диференційно-сканувальна калориметрія, рідинна та гель-проникна хроматографія, об'ємні методи аналізу, електро-хімічні та реологічні дослідження.

**Наукова новизна.** Основні наукові результати, висунуті на захист, полягають у тому, що:

- вперше досліджено модифікацію макроланцюгів полісахаридів дикарбоновими кислотами за реакцією Стегліха, досліджено склад та структуру одержаних продуктів;

- вперше показано, що в результаті модифікування макромолекул полісахаридів N-стеароїлглутаміною та N-лауреїлглутаміною кислотами одержано поліестери з розгалуженою будовою макроланцюга, які проявляють поверхнево-активні властивості, а також продукти модифікації з просторово-структурованою будовою макроланцюга, які формують у водних розчинах мікрогідрогелі;
- одержано водні самостабілізовані дисперсії на основі модифікованих полісахаридів з розгалуженою будовою макроланцюга та досліджено їх колоїдно-хімічні властивості, солюбілізацію нерозчинних у воді органічних сполук та сорбцію водорозчинних білків плазми крові;
- досліджено формування мікрогідрогелів на основі просторово-структурованих макромолекул полісахаридів з різним ступенем структурування;

**Практичне значення отриманих результатів.** В роботі показано можливість використання одержаних продуктів як полімерів медичного призначення. Це проілюстровано створенням на їх основі полімерних препаратів есенціальних мікроелементів, таурину, йоду. Проведено ряд токсикологічних та медико-біологічних досліджень які проказали їх ефективність та відсутність токсичності. На основі здійснених досліджень розроблені полімерні матеріали для формування препаратів мікронутрієнтів.

**Особистий внесок здобувача** полягає в аналізі літературних джерел, постановці та проведенні експериментів із синтезу розгалужених і просторовозшитих поліестерів та дослідженні їх властивостей. Обговорення, узагальнення експериментального матеріалу та формулювання висновків проводилось автором з д.х.н., с.н.с. Самариком В.Я., д.х.н., проф. Вороновим С.А. та д.х.н., с.н.с. Варваренком С.М. Біохімічні дослідження та оцінка цитотоксичної активності проводились в інституті біології тварин НААН та обговорювались з д.с-г.н., с.н.с. Остапівим Д.Д.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи доповідались на 3-ох вітчизняних та 8-и міжнародних конференціях



**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 6 статей у фахових виданнях України, у тому числі одна в журналі, що входить до наукометричних баз. Опубліковано 16 тез доповідей на українських та міжнародних конференціях, а також патент України на корисну модель.

## **Розділ 1. Створення полімерів медичного призначення на основі структурованих полісахаридів (Літературний огляд)**

### **1.1. Полісахариди, як перспективні біоматеріали**

Одним із актуальних завдань сьогодення є створення нових полімерних матеріалів на основі відновлювальної сировини. Слід думати, що з полімерних матеріалів першими почали використовуватись саме полісахариди. При тому, використання полісахаридів проникає практично у всі сфери життя. Звичайно, в першу чергу полісахариди є харчовим продуктом. Але цим далеко не обмежується. Для людини полісахариди стали і джерелом енергії, і конструктивним матеріалом. Цьому сприяло, як поширення полісахаридів, так ряд їх унікальних властивостей. Не зменшується роль полісахаридів і в сучасному житті. А в майбутньому їх роль може зрости. Останнє пов'язано з тим, що полісахариди є відновлювальною сировиною. Але є ще одна, дуже вагома властивість полісахаридів, яка робить їх такими привабливими для людини. Вони є толерантними до організму людини. Саме цим можна пояснити прагнення значної кількості дослідників сформувати на полісахаридній основі полімерні матеріали медичного та біомедичного призначення.

Ряд природних властивостей полісахаридів не дозволяють їх безпосереднє використання для зазначених цілей. Деякі особливості полісахаридів, такі як обмежена розчинність у водних та органічних середовищах, придатність до технологічної переробки, термостабільність вимагають їх модифікацію з метою покращення технологічних характеристик. Дуже часто ця модифікація проводиться шляхом регульованого зшивання макромолекул полісахаридів. Але при одержанні модифікатів не слід забувати переваги цього природного полімеру. Матеріали, що одержані шляхом модифікації, повинні залишатись полісахаридами та зберігати властивість бути толерантними до організму людини.

Дослідження по формуванню біоматеріалів на основі полісахаридів ведеться, в основному, у трьох напрямках. Це створення гідрогелів [1, 2], мікрогідрогелів [3] та систем доставки терапевтичних препаратів [4, 5]

## **1.2. Використання гідрогелів, як полімерних матеріалів медичного призначення**

Гідрогелі – в основному, перехресно-зшиті 3D сітки, отримані з гідрофільних полімерів, що здатні утримувати велику кількість води і залишатися нерозчинними через їх фізичну та/або хімічну зшивку. Так як їх ранній розвиток розпочався в 1960-і роки [6], на сьогодні існує безліч гідрогелів придатних для широкого спектру фармацевтичних застосувань [7]. Ці гідрогелі можуть бути отримані як з природних так і з синтетичних полімерів з використанням відповідних підходів до зшивки, з них синтезують гомополімери, кополімери та взаємнопроникні полімерні сітки (ВПС) [8, 9, 10].

Гідрогелі можуть утримувати велику кількість води та володіють м'якою сіткою, що нагадують ті з природних позаклітинних матриць, що мінімізують тканинне подразнення або злипання клітин [11]. За рахунок розгалуженої структури, поряд зі збереженням високого вмісту води, в 3D сітку гідрогелю можна помістити велику кількість водорозчинних терапевтично-активних білків, пептидів, міРНК, ДНК, вакцин і т.д.. На відміну від інших систем доставки (мікрочастинки, емульсії), де умови одержання іноді шкідливі для білків (наприклад, використання органічних розчинників та процеси денатурації білків, такі як гомогенізація, вплив інтерфейсу чи сил зсуву), при приготуванні гідрогелю зберігається стабільність білка, оскільки їх синтез проходить у м'яких умовах, таких як водний розчин середовища та кімнатна температура.

Гідрогелі можуть бути отримані з природних, а також синтетичних полімерів. Хімічно отримані сітки мають постійні зшивки, в той час як фізичні сітки мають тимчасові зшивки, які виникають або через згромадження полімерного ланцюга або через фізичні взаємодії, такі як іонні, виникнення водневих зв'язків або гідрофобних взаємодій. Фізичний зовнішній вигляд гідрогелю (матриця, плівка або мікросфери) залежить від методу полімеризації.

Сітка гідрогелю також характеризується електричним зарядом, який зветься неіонним (нейтральним), іонним (у тому числі аніонним або катіонним) та амфотерним електролітом (амфолітним) що містить як кислотні, так і основні групи. Природні полімери, що утворюють гідрогелі включають в себе білки, такі як

колаген, желатин та полісахариди, такі як крохмаль та його похідні, альгінат натрію, хітозан та агарози. Гідрогелі на основі гомополімерів складаються з одного мономера із зшитою скелетною будовою, в той час як гідрогелі на основі кополімерів формуються від двох або більше різних типів мономерів, в яких, по крайній мірі, є один гідрофільний компонент [12]. З іншого боку, ВПС створені з двох незалежно зшитих синтетичних та/або натуральних полімерів, в той час як в напів-ВПС гідрогелю один полімерний компонент зшивають, а інший ні. Такі структури зображені на рисунку 1.1.

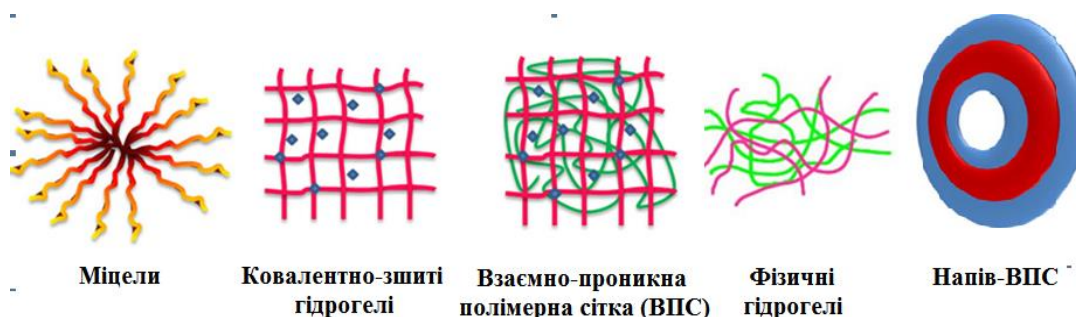


Рис.1.1 Типи гідрогелевих структур, які використовуються при макромолекулярній доставці лікарських засобів.

### 1.3. Гідрогелі із спеціальними властивостями

Більше двох десятиліть, значна увага приділяється до так званих «смагт-гідрогелів» (розумних) або стимул-реагуючих гідрогелів, які можуть піддаватися оборотним змінам і в той же час реагувати на різні зовнішні фізико-хімічні подразники, дані властивості створюють їм значний потенціал для технологічних і медично-біологічних застосувань [13, 14, 15, 16, 17]. Хімічні подразники, такі як зміна рН, метаболіти та іонні фактори, призводять до зміни молекулярних взаємодій між полімерними ланцюгами, або між полімерним ланцюгом і розчиненою речовиною, що присутня в системі. Фізичні подразники, такі як температура або електричний потенціал, можуть забезпечити джерело енергії для зміни молекулярних взаємодій. Ці взаємодії здатні змінювати властивості полімерних матеріалів, такі як розчинність, набрякання, конформаційної конфігурації, окислювально-відновний стан і кристалічно-аморфний перехід [18, 19, 20, 21, 22,

23]. Такі “розумні” гелі можуть використовуватися в біомедичних і фармацевтичних цілях [24, 25, 26, 27].

Смарт-гідрогелі дуже чутливі до змін у навколишньому середовищі, тому їх можна використовувати в якості біосенсорів [28, 29, 30, 31], полімерів із високою абсорбуючою здатністю [32, 33, 34], специфічних систем доставки лікарських засобів на конкретних ділянках [35, 36, 37, 38, 39, 40], нанорозмірних технологій [41, 42, 43] та тканинної інженерії [44, 45, 46, 47]. Чутливі гідрогелі є унікальними щодо багатьох різних механізмів вивільнення лікарського засобу, але в більшості випадків вивільнення лікарського засобу відбувається, коли гель сильно набряклий або набрякає, при цьому регуляція вивільнення відбувається за рахунок зміни швидкості набрякання, дифузії лікарського засобу або поєднання цих двох факторів.

Іншою цікавою характеристикою багатьох чутливих гідрогелів є те, що механізм, який викликає структурні зміни в сітці може бути повністю оборотним. Це поведінка зображена на рисунку 1.2 для рН- або температуро-чутливих гідрогелів. Здатність цих систем, у відповідь на зміни в умовах навколишнього середовища, проявляти швидкі зміни в їх набряканні і пористості структури, забезпечують цим матеріалам сприятливі характеристики, для застосування у якості носіїв для доставки біологічно активних агентів, в тому числі пептидів і білків.

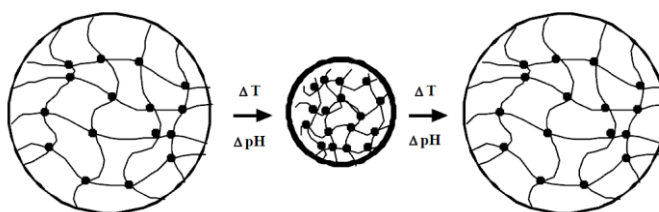


Рис. 1.2 Температуро- і рН-чутливих гідрогелів, адаптовано з [49].

Такий тип поведінки може дозволити цим матеріалам, використовуватись у вигляді саморегульованих або пульсуючих систем доставки лікарських засобів. Крім того, температуро- і рН-чутливі гідрогелі були найбільш широко вивчені, так як ці два чинники мають найбільше фізіологічне значення [48, 49]. Різні термочутливі гелі були описані в літературі, в тому числі, наприклад, кополімери акрилової кислоти з похідними N-ізопропілакриламиду [50, 51, 52, 53].

Останнім часом велика увага приділена біомедичним стимул-реагуючим полімерним гелям з унікальними властивостями, такими як біосумісність, біодеградабельність і біофункціональність. Вони можуть бути отримані шляхом об'єднання термочутливих полімерів з полімерами натурального походження [54, 55, 56, 57, 58]. У роботах [59, 60, 61] ряд полісахаридів було об'єднано з термочутливими матеріалами, включаючи хітозан, альгінат, целюлозу та декстран. Хітозан (полі [ $\beta(1-4)$ -2-аміно-2-дезоксид- $D$ -глюкопіраноза]), отримують шляхом  $N$ -деацетилювання хітину. Він володіє рН-чутливими властивостями через велику кількість аміногруп в його ланцюзі. Альгінат є рН-чутливим аніонним полісахаридом, що складається з  $\beta$ - $D$ -мануронової кислоти і  $\alpha$ - $L$ -гулууронової кислот, які пов'язані один з одним, в різних пропорціях, 1-4 зв'язками [62, 63]. Декстран також широко поширений в природі біополімер і він є відносно інертним та нетоксичним [64]. Ці полімери широко використовуються в біомедицині через їх біосумісність та біодеградабельність [65, 66, 67, 68, 69, 70, 71]. Целюлоза складається з полідисперсних полімерних ланцюгів глюкози, які утворюють супрамолекулярну структуру за рахунок утворення водневих зв'язків [72]. Поєднання цих полісахаридів з термочутливими матеріалами дають можливість створення нових гідрогелів, які одночасно проявляють властивості обох компонентів. Наприклад, використовуючи рН-чутливу властивість хітозану або альгінату, унаслідок комбінації цих двох полімерів з термо-чутливим матеріалом можна отримати подвійний стимул-чутливий полімерний гель, який можна використовувати в якості засобів доставки ліків, що відповідають локалізованим умовам рН і температури в людському організмі. Полімерні гелі, отримані прищепленням полісахаридів з термочутливими полімерами, та їх стимул-реакційні властивості ретельно вивчені. Було опубліковано декілька оглядових статей про стимул-реакційні синтетичні полімери [73, 74, 75].

#### **1.4. Методи формування мікрогідрогелів**

Гідрогелі на основі мікро/наночастинок є перспективними для макромолекулярної доставки ліків, оскільки вони мають певні переваги при пероральній доставці, якщо вони приготовані з розміром в діапазоні 1-10 мкм,

забезпечують правильну клітинно-опосередковану імунну реакцію та дозволяють транспортувати великі дози лікарського засобу.

До основних методів одержання мікрогідрогелів відносять мікромолдинг, фотолітографію, емульгування та крапельний метод [76] (рис. 1.3).

Одним з перспективних методів одержання мікрогідрогелів є мікромолдинг [77, 78, 79]. В більшості методів мікромолдингу використовують мікрошаблон для збереження відтворюваності зразків. Форма шаблону в такому методі визначає форму і розміри отриманого мікрогідрогелю. На сьогоднішній день методом

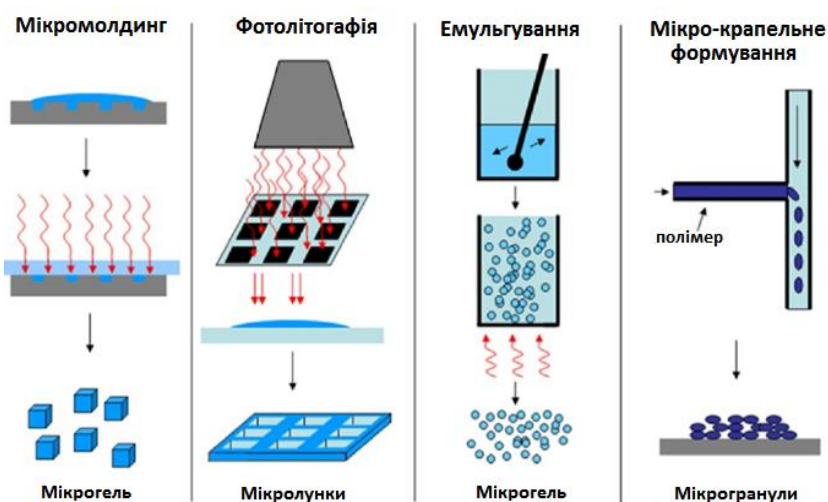


Рис. 1.3 Основні методи одержання мікрогідрогелів

мікромолдингу можна одержувати мікроструктури з розмірами меншими ніж 1мкм. Для одержання мікророзмірних гідрогелів мономер гідрогелю наносять на матрицю, яку виготовляють зі скла або силікону. Після цього матрицю піддають опроміненню і отримують таким чином мікрогідрогелі.

Поширеним методом для виготовлення мікрогідрогелів контрольованих розмірів і форм є фотолітографія. В цьому методі мономер майбутнього гідрогелю змішують з фотоініціатором, який при дії ультрафіолетового світла каталізує реакцію зшивання. В одному з методів фотолітографії тонку плівку мономера гідрогелю та фотоініціатора поміщають під фотошаблон, який містить непрозорі сегменти. Фотошаблон потім піддають дії ультрафіолетового світла, світло проникає до мономерів під шаблоном в місцях з прозорими сегментами і в цих місцях відбувається структурування. Цей метод може бути використаний для отримання

мікрогелів різних розмірів і форм, що залежить від особливостей фотошаблону. Фотолітографія на шаблоні для фотозшиваючих мономерів також може бути використана для локалізації клітин і генерування клітинно-навантажених мікроструктур. Цей метод також може бути використаний для генерування складних комплексів, комбінуючи декілька типів клітин в матриці гідрогелю [80, 81]. Незважаючи на переваги фотолітографії вона має і ряд недоліків. Для прикладу фотолітографією не можна контролювати вихід мікрогелів в межах однієї партії.

Емульгування є найбільш поширеним методом одержання мікрогідрогелів. В процесі емульгування, як правило, найчастіше використовують двохфазну систему шляхом змішування двох різних речовин, таких, як розчин форполімеру гідрофільного гідрогелю та олеофільної фази. Зміна в'язкості рідини і швидкості перемішування визначає розміри одержаних мікросфер гідрогелю. Мікросфери форполімеру пізніше можуть бути структуровані різними методами, такими як нагрівання або опромінення. Групою дослідників Reis та іншими були розроблені мікрогідрогелі на основі альгінату для доставки інсуліну [82]. Емульгування також може бути використане для капсулювання клітин в мікрогель [83].

Крапельне формування мікрогелю з мікрорідинними каналами всередині може бути використане для формування високомогогенних мікрогелів. В одній із технік крапельного формування розчин форполімера вводиться у великий мікрорідинний канал заповнений текучою рідиною в якій міститься зшиваючий агент. Мономери гелю подаються перпендикулярно до потоку зшивача і у великому каналі відбувається формування мікрогелю [84].

Комбінування методів одержання та методів зшивання визначає механічні, фізичні та хімічні властивості мікрогідрогелю.

Самостабілізовані наногідрогелі є особливо привабливими, тому що вони прості в приготуванні, є доступними і можуть ефективно включати біофармацевтичні речовини, як білки так і пептиди. Вивільнення вантажів з таких систем може бути скоректоване шляхом адаптації щільності поперечних зв'язків матриці. Інші стратегії вивільнення лікарського засобу з гідрогелю базуються на



оборотній взаємодії білок-полімер або інкапсуляції білка в системі другої доставки (наприклад, мікро/наночастинки і ліпосоми), дисперговані в матриці гідро гелю [85].

### **1.5. Особливості вивільнення лікарських засобів з полімерних частинок та мікрогідрогелів**

Контрольована доставка ліків може використовуватись для досягнення наступних цілей:

- Стала концентрація терапевтично-активних сполук в крові з мінімальними змінами;
- Контрольовані та відтворювані швидкості вивільнення протягом тривалого часу;
- Захист біологічно активних сполук, що мають дуже короткий період активності;
- Усунення побічних ефектів, відходів лікарського засобу та частих дозувань;
- Рішення проблем стійкості ліків.

Як прості, так і складні моделі були раніше розроблені для прогнозування вивільнення лікарського засобу з гідрогелю в залежності від часу. Ці моделі основані на швидкості лімітуючої стадії для контрольованого вивільнення і тому характеризовані наступним чином [86]:

Дифузійно-контрольовані системи:

- Матриця (монолітні системи);
- Резервуар (мембранні системи).

Контрольовано-набрякаючі системи:

- Системи, що активуються розчинником;
- Осмотично-контрольовані системи.

Хімічно-контрольовані системи:

- Біоерозійні та біодеградабельні системи;
- Системи залежного ланцюга.

Дифузійно-контрольовані системи найбільш широко застосовується для опису вивільнення лікарського засобу з гідрогелів. Ця властивість може бути описана законом Фіка відповідно до рівнянь (1) та (2) [87]

$$J = -D \left( \frac{dc}{dx} \right) \quad (1.1)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -D \left( \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \right) \quad (1.2)$$

Припускаючи бінарну систему змінних ( $t$ ,  $c$ ,  $J$ , та  $D$ ), що відповідають за час, концентрацію розчиненої речовини, масового потоку та дифузійно-взаємний диференційний коефіцієнт, відповідно. При резервуарних системах препарат міститься в ядрі, яке оточене полімерною мембраною, що регулює вивільнення. Транспорт лікарського засобу з ядра через полімерну мембрану відбувається за рахунок розчинення на поверхні з внутрішньої сторони мембрани та дифузії обумовленої градієнтом в термодинамічній активності. Транспорт лікарських засобів може бути описаний першим законом Фіка. Якщо активність препарату у ядрі залишається постійним та зберігаються умови безкінечного вивільнення, швидкість вивільнення лікарського засобу може бути як і раніше постійним та може бути передбачена, оскільки вона залежить від проникності мембрани і конфігурації молекули. Потім, вивільнення лікарського засобу буде залежати від часу і може бути досягнута кінетика нульового порядку. Коефіцієнти дифузії лікарського засобу, як правило, визначається емпірично або оцінені апіорі з використанням теорій вільного об'єму, гідродинаміки або абструкції [88].

Контрольовано-набрякаючі системи використовуються, коли дифузія препарату відбувається швидше, ніж набрякання гідрогелю. Моделювання цього механізму, як правило включає в себе переміщення граничних умов, де молекули вивільняються на границі розділу еластичної та склоподібної фаз набряклого гідрогелю [89]. Вивільнення лікарських засобів з невеликими молекулами зазвичай моделюється з використанням гідроксипропіл-метилцелюльозних гідрогелевих таблеток [90].

В контрольовано-набрякаючому гідрогелі, ліки можуть вивільнятися двома різними механізмами: дифузії та релаксації полімерного ланцюга, що присутні на межі розділу скло-еластичних фаз. Рідгер та Пепас [91, 92] запропонували просте рівняння для визначення відносної важливості дифузії та макромолекулярної релаксації на загальному процесі доставки лікарського засобу:

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = kt^n \quad (1.3)$$

$M_t$  і  $M_{\infty}$  є кількістю вивільненого лікарського засобу в момент часу  $t$  і в рівновазі, відповідно.  $k$  є константою пропорційності і  $n$  є дифузійною експонентою. Рідгер та Пепас ввели це рівняння для опису поведінки вивільнення лікарського засобу з полімерних матриць і було виконано аналіз дифузійних процесів, які підпорядковуються та не підпорядковуються закону Фіка, по відношенню до значення експоненти  $n$ .

Дифузійні значення показника ступеня для плоских, циліндричних і сферичних систем вивільнення лікарського засобу були пов'язані з механізмом доставки. Хімічно-контрольовані системи модельованого вивільнення використовуються для опису вивільнення лікарського засобу визначеними реакціями, що протікають всередині матриці. Найбільш поширені побічні реакції, які виникають в гідрогелевих системах доставки є розщеплення полімерних ланцюгів за допомогою гідролітичної або ферментативної деградації або оборотних/необоротних реакцій, що протікають між полімерною сіткою і лікарським засобом [93]. При певних умовах поверхневий або об'ємний розклад гідрогелю буде контролювати швидкість вивільнення лікарського засобу. В якості альтернативи, якщо фрагменти лікарського засобу включені в гідрогель, встановлення рівноваги може визначити швидкість вивільнення лікарського засобу.

Хімічно-контрольовані системи можуть бути додатково класифіковані залежно від типу хімічної реакції, що відбувається під час вивільнення лікарського засобу. Як правило, доставка інкапсульованих або зв'язаних лікарських засобів може статися через деградацію залежних ланцюгів або під час поверхневої біоерозії або об'ємної деградації полімерного ланцюга [94].

У системах залежних ланцюгів, препарат ковалентно приєднаний до основного ланцюга полімеру. Зв'язок між лікарським засобом і полімером є лабільним і може бути зруйнований в результаті гідролізу або ферментативного розкладання. В біоерозійних системах доставки лікарських засобів вивільнення лікарського засобу контролюється за рахунок розчинення або деградації полімеру.

На відміну від систем залежного ланцюга, препарат дифундує з біоеродуючої системи.

Залежно від того, чи швидкість вивільнення через дифузію або деградацію полімеру є контрольована, препарат вивільняється за наступними механізмами. Якщо біодеградація полімеру відбувається значно повільніше, ніж дифузія лікарського засобу через полімер, вивільнення лікарського засобу може розглядатися як процес з дифузійним контролем. Якщо дифузія лікарського засобу з полімерної матриці відбувається дуже повільно, то система контролюється біодеградацією полімеру.

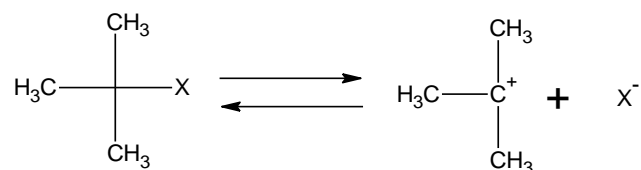
Є два різних типи біодеградації полімерів: гідрофільна і гідрофобна. Полімери, що біодеградують гідрофільно повністю взаємодіють з водою, і вони піддаються процесу біоерозії об'ємно. Розклад відбувається по всій полімерній матриці. Полімери, що руйнуються гідрофобно можуть вступати в об'ємну або поверхневу біоерозію. При об'ємній ерозії відбувається деградація по всьому об'єму полімеру і в цілому аналіз кінетики вивільнення лікарського засобу є складним, тому що він включає в себе розклад і дифузію.

### **1.6. Огляд реакцій алкілування амінів**

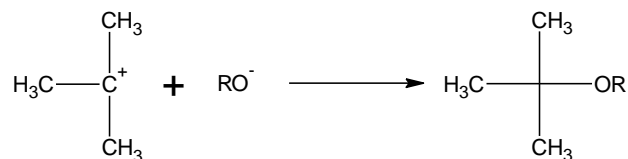
Алкілуванням називається реакція введення алкільної групи в молекули органічних сполук. Найбільш поширеними алкілюючими агентами є галоїдні алкіли, алкени, спирти і диалкілсульфати.

Здатність атома галогену в молекулах галоїдних алкілів до реакцій нуклеофільного заміщення робить ці сполуки незамінними алкілюючими агентами. Найлегше піддається обміну (більш рухливий) атом йоду, що пов'язано з його більшою поляризацією. Хлориди та броміди порівняно мало відрізняються за реакційною здатністю, алкілфториди для цілей алкілування непридатні, тому що атом фтору внаслідок малої поляризації занадто інертний. Швидкість реакції алкілування при застосуванні третинних галоїдних алкілів вище, ніж при використанні вторинних і первинних. Ця різниця зумовлена тим, що механізм реакцій за участю третинних, вторинних і первинних галоїдних алкілів різний.

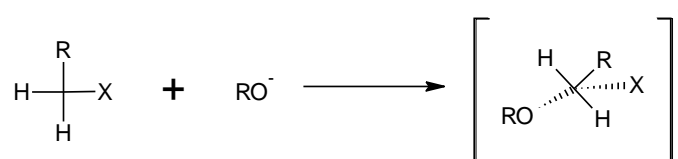
У разі застосування третинних галогенпохідних швидкість реакції визначається швидкістю його електролітичної дисоціації. Наприклад:



Карбокатион, який утворився (карбоновий катіон) швидко реагує з аніоном другого реагенту (мономолекулярне нуклеофільне заміщення, sn1):



Первинні і вторинні галоїдні алкіли реагують через перехідний стан (бімолекулярне нуклеофільне заміщення, sn2). Процес можна представити в такий спосіб:



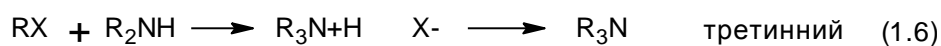
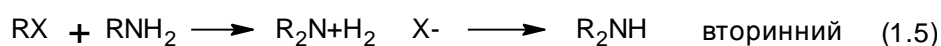
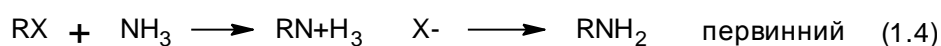
У перехідному стані аніон атакує атом вуглецю галоїдного алкілу з боку, протилежного до того, де розташований атом галогену. Для утворення перехідного стану потрібна певна енергія активації, при цьому швидкість реакції залежить від концентрації кожного реагенту.

Алкени також можуть бути використані для алкілювання різних органічних сполук. Алкілююча здатність олефінів обумовлена ненасиченістю їх молекул, схильністю вступати в реакції приєднання (найчастіше по електрофільному або гомолітичному механізмах).

Застосування алканів в якості алкілюючих засобів можливо в випадку розриву в їх молекулах зв'язку вуглець-кисень. Зазвичай для цього потрібна присутність сильних кислот [95].

Один з найпоширеніших методів синтезу амінів полягає в алкілюванні аміаку або іншого аміну дією алкілгалогеніду. Однак при проведенні цієї реакції можливе подальше алкілювання (1.4-1.7 рівняння реакцій)

Приймаючи до уваги відмінні властиві амінів в нуклеофільності, не можна чітко сказати, що ці реакції вдасться зупинити на будь-якій необхідній стадії, тому значення даного методу для лабораторної практики, в загальному, обмежене. Проте первинні або вторинні аміни у багатьох випадках досить успішно можуть бути отримані при використанні достатнього надлишку аміаку або первинного аміну, відповідно (звичайно, якщо це виправдано економічно і не викликає труднощів при подальшому виділенні продукту реакції).



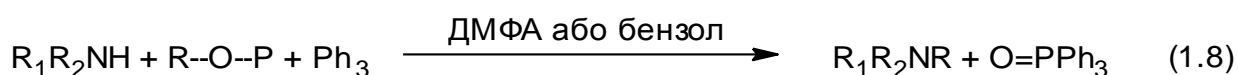
Використовуючи 1 екв алкілюючого агента в реакції з вторинними амінами, можна отримати третинні аміни з високим виходом. Найбільше значення серед реакцій даного типу має внутрішньо-молекулярне амінування заміщених алканів, в результаті якого отримують циклічні аміни.

Реакційна здатність алкілгалогенідів зменшується в ряді:



Введення в реакційну суміш йодид-іона ініціює обмін галогену і полегшує реакцію з іншими галогенідами. Реакційна здатність знижується при збільшенні ступеня заміщення в аміні або RX; цю властивість можна успішно використовувати, щоб зупинити наведені вище реакції на ранніх стадіях. Збільшення ступеня розгалуженості алкільного радикалу в RX призводить до більшої ймовірності протікання побічного процесу, що викликається амінами β-елімінування в з'єднаннях, що містять відповідним чином розташовані атоми водню. З потенційною можливістю елімінування слід рахуватися також і тоді, коли в якості нуклеофільного агента використовується іон  $R_2N^-$  - для того, щоб збільшити реакційну здатність відповідного аміну.

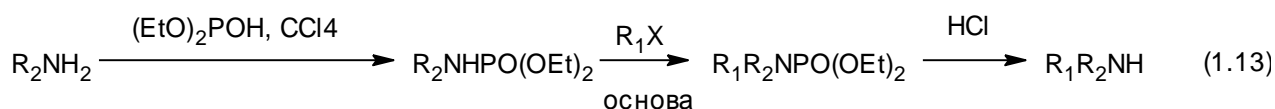
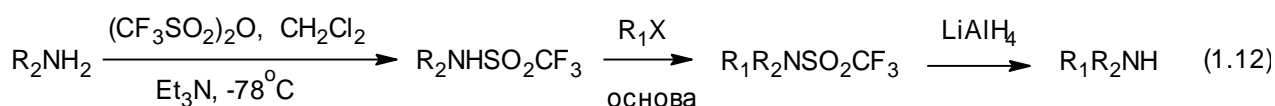
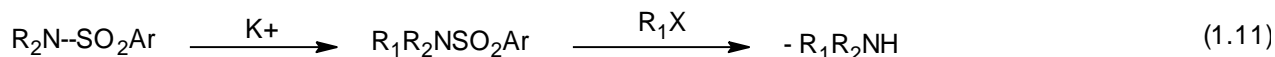
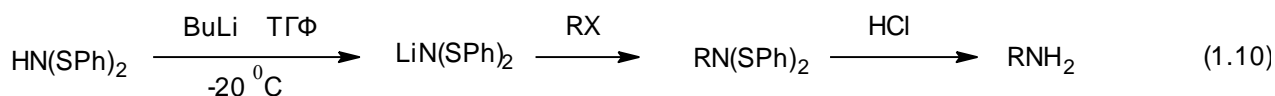
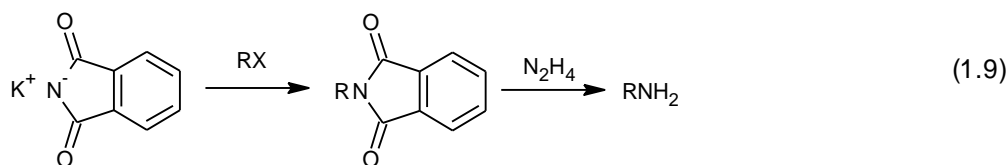
Рівняння 1.4 – 1.7 необмежені лише тими випадками, коли  $X =$  галоген. У промислових масштабах за допомогою відповідних каталізаторів може бути здійснено перетворення спиртів в аміни, а в лабораторії для отримання амінів здебільшого використовують складні ефіри. На практиці існує багато прикладів подібних перетворень, але в основному використовують ефіри сульфонових кислот (наприклад,  $X =$  *p*-толуолсульфонілокси), зокрема, для синтезу аміноцукрів і аміностероїдів, причому відповідно до  $sn2$ -реакції спостерігається стереоспецифічність заміщення. Одержанні із спиртів фосфонієві солі легко реагують з первинними та вторинними амінами, приводячи до високих виходів вторинних і третинних (рівняння 1.8).



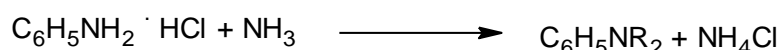
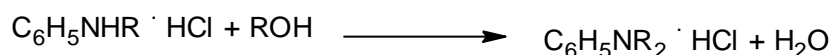
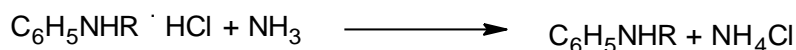
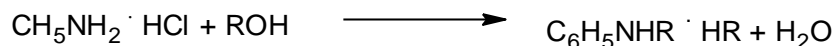
Однак спрямоване отримання конкретних первинних, вторинних або третинних амінів методом алкілування вимагає, як правило, прийомів, що дозволяють більшою мірою контролювати хід реакції. Вдалі способи синтезу амінів  $R_3-xNH_x$ , що мають біля азоту атоми водню ( $x = 0, 1, 2$ ), можна розділити на дві групи.

Під час синтезу первинних і вторинних амінів кілька зв'язків N-H (їх кількість відповідає значенню  $x$  попередньо можуть бути блоковані замісниками, з яких принаймні один знижує реакційну здатність аміну. Протон, який залишається біля азоту може бути вилучений за допомогою луку, і подальше моноалкілування не ускладнюється більш складнішим алкілуванням або конкурентним елімінуванням (в разі первинного або вторинного  $RX$ ). Синтез закінчується видаленням захисної групи (або груп).

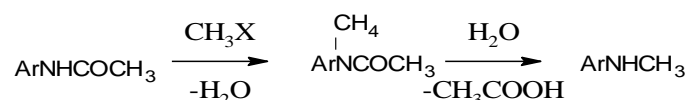
Нище наведені добре відомі синтези Габріеля – метод отримання первинних амінів з алкілгалогенідів (або інших галогенопохідних) реакцією із фталімідом калію (рівняння 1.9), і Гінзберга (рівняння 1.10) поряд з іншими реакціями (рівняння 1.11, 1.12, 1.13). Особливою перевагою останніх є проведення синтезу в м'яких умовах для видалення захисних груп на заключній стадії синтезу [96]



Алкилування ароматичних з'єднань спиртами в присутності кислот використовують у промисловості для отримання вторинних і третинних ароматичних амінів:

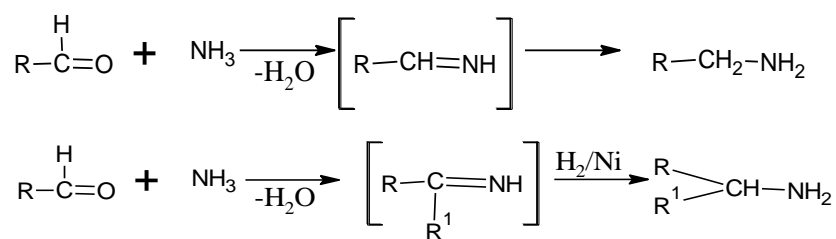


Чисті жирно-ароматичні аміни можна отримати алкилуванням ацетильованих похідних амінів з подальшим гідролізом:

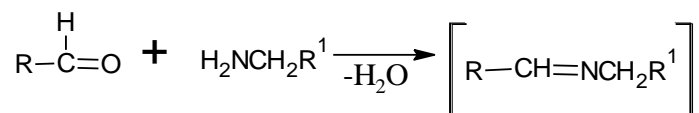


Багато альдегідів і кетонів перетворюються в аміни при обробці воднем і аміаком в присутності каталізатора (структурованого нікелю). Цей процес називають відновлюючим алкилуванням аміаку або амінів. Реакція, ймовірно, включає стадію гідрування амінів, які утворюються:





Відновлююче алкілювання можна провести і для первинних амінів:



В результаті утворюються вторинні аміни [97].

Проведений огляд дозволяє обґрунтувати метод N-алкілювання глутамінової кислоти.

### 1.7. Методи одержання поліестерів природних амінокислот

Впродовж останніх двадцяти років значна кількість досліджень присвячена розробці полімерних біоматеріалів. Зазвичай ці дослідження сфокусовано на ідентифікацію біологічно-інертних матеріалів, які б залишались стабільними у фізіологічних умовах. Останнім часом, увагу дослідників привертають біодеградабельні полімери, для короткотривалого застосування як системи доставки ліків, швів, здатних до розсмоктування, тимчасових судинних трансплантантів, та приладів для фіксації кісток [98]. При спробах створити біодеградабельні матеріали короткотривалого призначення, великі надії покладалися на використання білків як полімерних носіїв. Проте застосування білків часто обмежується необхідністю у кожному конкретному випадку детального вивчення їх імунологічних (антигенність, імуногенність), фармакологічних (стабільність, розчинність) і біофармакологічних (абсорбція, розповсюдження, метаболізм) властивостей [99].

Дослідження по використанню для різноманітних біомедичних цілей гомо і кополімерів амінокислот почались ще з 1970-тих років. Проте їх застосування супроводжується рядом проблем – висококристалічність, низька швидкість деградації, незадовільні механічні властивості і високоімуногенність.

Для уникнення таких небажаних фізико-хімічних та біологічних властивостей було створено ряд синтетичних полімерних похідних амінокислот (псевдо-полі(амінокислоти)). На відміну від традиційних поліамінокислот, які побудовані за

допомогою амідних зв'язків, псевдо-поліамінокислоти можуть містити такі хімічні зв'язки: уретанові, карбонатні, естерні, тіоестерні, імідазольні, ангідридні та ін. У псевдо-полі(амінокислотах) аміно чи карбоксильна групи можуть бути хімічно модифікованими, чи використаними як місця для ковалентного закріплення ліків або біологічно-активних молекул [100].

Останнім часом активно розвивається розробка псевдо-поліамінокислот як імунотолерантних носіїв лікарських засобів.

Особливість псевдо-поліамінокислот полягає у їхній будові, а саме те, що вони побудовані на основі амінокислот та діолів, діізоціанатів, діамінів, з'єднаних між собою не амідними зв'язками, що зумовлює відсутність реакції організму на чужорідний білок. Структуру псевдо-поліамінокислот наведено на рисунку 1.4.

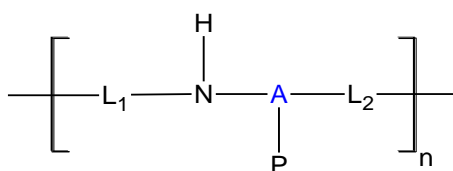


Рис. 1.4 Структура псевдо-поліамінокислот, де Н-N-A – амінокислота, L1 та L2 – прищеплені групи, Р – захисна група.

Найчастіше для синтезу псевдо-поліамінокислот на сьогоднішній день використовують такі амінокислоти: тирозин, лізин, гліцин, фенілаланін, лейцин, валін, ізолейцин, метіонін (рис. 1.5). Вибір амінокислоти в синтезі псевдо-поліамінокислот залежить від властивостей, які необхідно отримати, а саме олеофільності, статистичності, теплових характеристик, наявності бокових ланцюгів, здатних до зшивання або модифікації, тощо

Принципову схему одержання і модифікації псевдо-поліамінокислот наведено на схемі 1.1.

Для одержання псевдо-поліамінокислот олеофільної природи використовуються такі амінокислоти: фенілаланін, лізин та тирозин. Для естерифікації чудово підходять фенольні групи тирозину. Наявність двох термінальних аміногруп може бути використано для формування діізоціанатів [33].

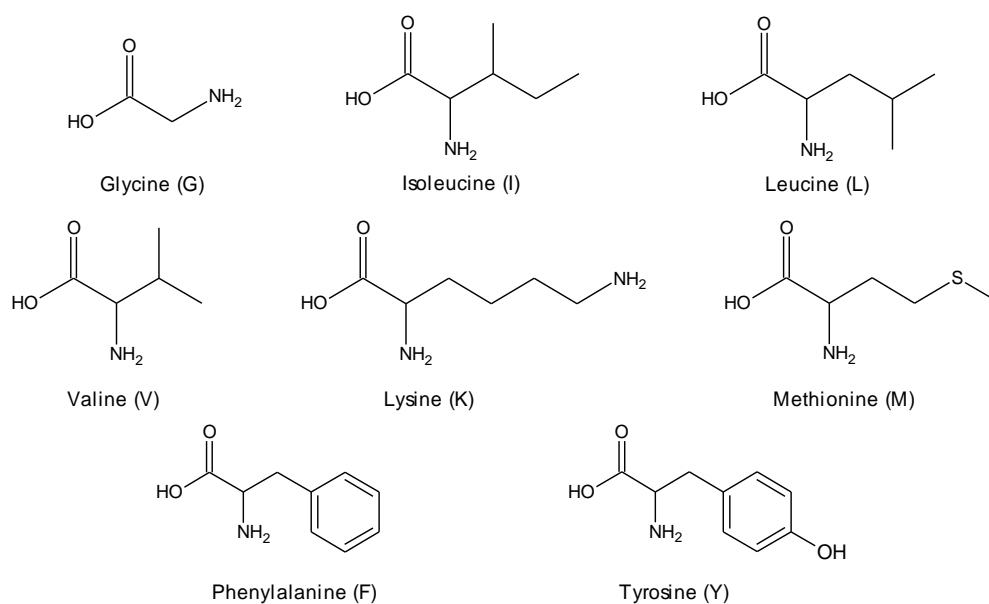


Рис. 1.5 Найпоширеніші амінокислоти, що використовуються для синтезу псевдо-поліамінокислот

Класифікація псевдо-поліамінокислот здійснюється по типу функціональної групи, яка утворюється між прищепленими групами L1 та L2. До цих функціональних груп належать: естерні, амідні, карбонатні, уретанові.

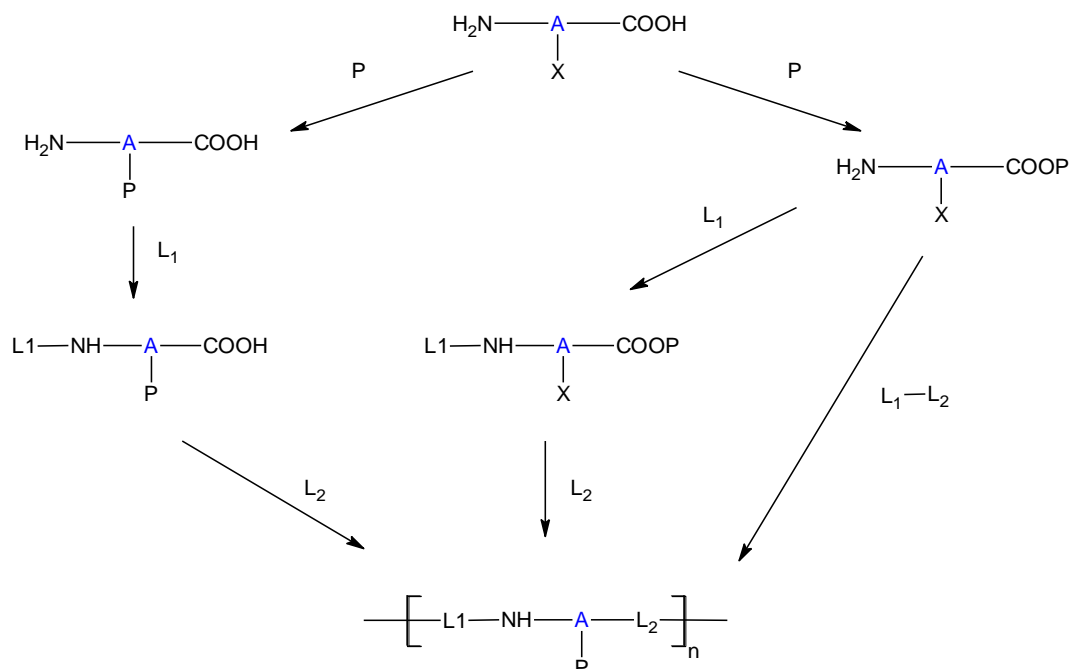


Схема 1.1. Отримання псевдо-поліамінокислот, де P – захисна група, L1 – діізоціанат, поліол або діамін, L2 – дикарбонова кислота, діізоціанат, L1 – L2 – форполімер.

### 1.7.1. Формування псевдо-поліамінокислот за рахунок реакцій естерифікації

Найбільш поширеними для синтезу псевдо-поліамінокислот є естерні групи, це зумовлено добре описаними методами поліконденсації та наявності безлічі активаторів та каталізаторів. В таблиці наведено типові псевдо-поліамінокислоти та групи дослідників, якими вони були одержані.

Наявність гідроксильних груп (серин, треонін, тирозин) є ідеальним для трьох типів реакцій по одержанню псевдо-поліамінокислот, наведених на схемі 1.1.

Таблиця 1.1 Псевдо-поліамінокислоти на основі естерних зв'язків [33]

Дослідник	Аміно-кислота (A)	Прищеплена група 1 (L <sub>1</sub> )	Прищеплена група 2 (L <sub>2</sub> )	Захисна група (P)
Щакенрад [101, 102]	Гліцин	Молочна кислота	-	-
Вон [103]	Феніл-аланін, лейцин, валін, ізолейцин або метіонін	1,3-пропандіол 1,4-бутандіол 1,6-гександіол	Адипіноїлхлорид або себацоїлхлорид	-
Малакпоур та Заратпішен [104, 105]	Валін, лейцин, тирозин або фенілаланін	Тримілітовий ангідрид	N,N`-(піромелітоїл)-біс-диметилестер тирозин	Метанол
Чу і Гоу [106]	фенілаланін	Сукцинат, адипінат або себацінат	Фумарат	-
Когн [107]	тирозин	Дезаміно-тирозин	Сукцинатна кислота, глутарова к-та, адипінова к-та, 3-метиладипінова к-та	Метанол, етанол, ізопропанол, бутанол, ізобутанол, октанол,
Сенгупта та Лопіна [108, 109]	Тирозин	Дезаміно-тирозин	Фосфат	Гексанол або етанол

Перші роботи, які стосуються одержання псевдо-поліамінокислот поліестерного типу, це роботи по синтезу поліестерів на основі серину. У цих

роботах синтез поліестерів на основі серину проводили полімеризацією в розчині N-Z-L серину та іншими методами [110, 111, 112, 113, 114]. Робота [112] показує, що реакція етерифікації серину не дозволяє отримати псевдо-поліамінокислоти з молекулярними масами вище 600 Да через перебіг реакції β-елімінування в боковому ланцюзі. Псевдо-поліамінокислоти з молекулярними масами 4000-16000 Да вдалося отримати реакцією з розкриттям циклу β-лактону N-Z-L-серину в розчині.

Група дослідників Barrea, Zylstra у 1993р. опублікувала роботу присвячену одержанню амінофункційних поліестерів на основі кополімерів похідних лізину з молочною кислотою. Синтез поліестерів здійснювали кополімеризацією з розкриттям циклів функційних лактидів.

Такі полімери було розроблено з метою створення нових матеріалів для тканинної інженерії з покращеною адгезією клітин [115]. Відомості про кополімери на основі лізину, аспарагінової, гліколевої та молочної кислот було опубліковано японськими авторами в 1997 році [116, 117]. Структурну будову мономерів та отриманих продуктів наведено на рисунку 1.6.

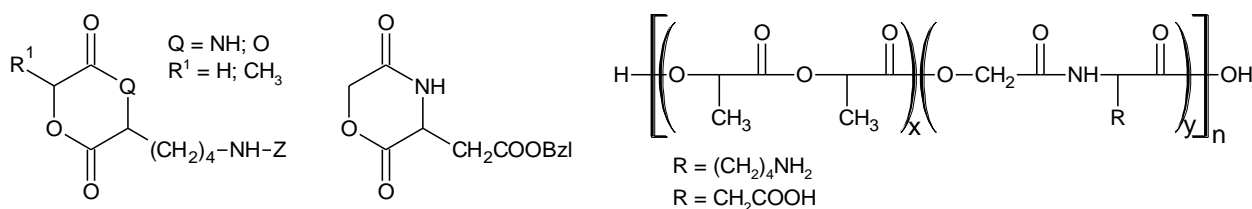


Рис. 1.6 Структура мономерів для синтезу функційних поліестерів та кінцевих продуктів на їх основі [52, 53, 125].

У роботі [52] описується, що поліестери на основі амінокислот та їх кополімери з молочною кислотою, краще піддаються гідролізу ніж гомополімер молочної кислоти. Цими ж авторами в роботі [53] показано можливість одержання біодеградабельних частинок з позитивно зарядженою поверхнею на основі блок кополімерів лізину та молочної кислоти.

Робота [118] описує метод синтезу біодеградабельних амфифільних триблок-кополімерів полі(молочна кислота)-ко-(гліколева кислота)-альт-(L-глутамінова кислота)-блок-полі (етиленгліколь)-блок-полі (молочна кислота)-ко-(гліколева

кислота)-альт-(L-глутамінова кислота) з термінальними карбоксильними групами кополімеризацією з відкриттям циклу L-лактиду з (3s)-(бензоксикарбонілетил)-морфолін-2,5-діоном у присутності дигідроксил-полі(етиленгліколю) як макроініціатора у об'ємі при 403 К та октоата стануму як каталізатора з подальшим каталітичним гідруванням. Такі кополімери формують міцели у водних розчинах з залежністю критичної концентрації міцелоутворення від складу кополімеру. Наявність термінальної карбоксильної групи у складі кополімеру дає можливість використовувати його для подальшої модифікації, залежно від кінцевого призначення (як носія лікарських засобів, інженерія тканин) [119].

Окрім цього на основі капролактону розроблені амінофункційні поліестери [120]. Дані полімери було синтезовано на основі нового мономера –  $\gamma$ -(бензил-карбамат)- $\epsilon$ -капролактону (схема 1.2).

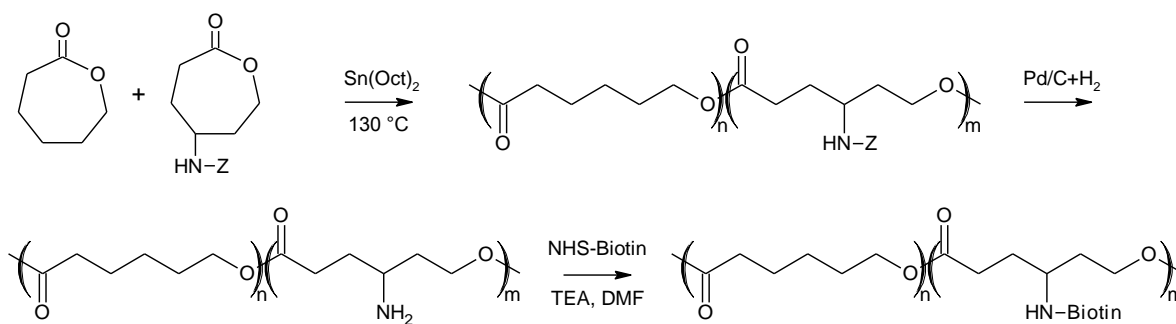


Схема 1.2 Синтез псевдо-поліамінокислот на основі N-захищеної аспарагінової кислоти

Карбоксибензильна група зі складу полімеру видалялась дією водню на паладієвій черні для одержання полімеру з вільними аміногрупами. До амінофункційного кополіестеру було прищеплено біотин в якості модельного об'єкта.

Одним з найчастіше використовуваних методів одержання естерів та тіоестерів є реакція Стегліха. Перша публікація по даній реакції 1978 року описує одержання естерів та тіоестерів в м'яких умовах на основі карбонових кислот та спиртів або тіолів [121]. В умовах реакції Стегліха використовували активатор карбоксильних груп – N,N'-дициклокарбодіімід та каталізатор – диметиламінопіридин, що підвищував швидкість прямої реакції та пригнічував утворення побічних продуктів. Реакція Стегліха була успішно використана для

одержання поліестерів на основі молочної кислоти [122, 123], полі(лактиду) [124], полі( $\epsilon$ -капролактону) [125], полі(гідроксибутирату) [126].

Таким чином реакцію Стегліха можна успішно використовувати для синтезу лінійних поліестерів. Процес естерифікації, з використанням в якості активатора DCC, передбачає утворення естерів у розчинах взаємодією карбоксильної та гідроксильної груп у м'яких умовах при температурах від 253 до 323 К. Перевагою такого активатора є те, що продукт перетворення N,N'-дициклокарбодиміду є N,N'-дициклогексилсечовина (DCU), це практично нерозчинна в більшості органічних

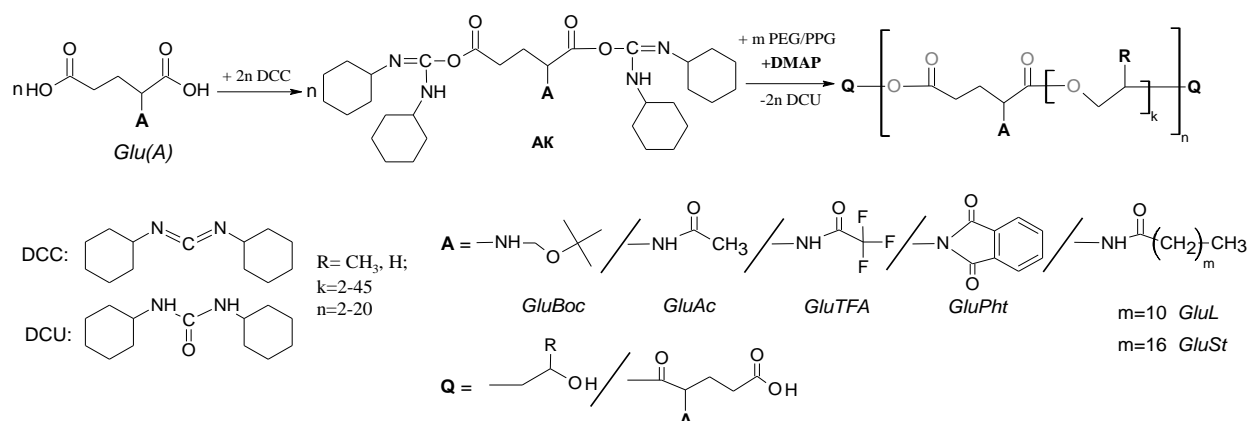


Схема 1.3 Одержання поліестерів на основі Glu(A) за реакцією Стегліха

розчинників речовина, яка легко виводиться з реакційної маси. Зауважимо, що кількісна оцінка виділеної з реакційної суміші дициклогексилсечовини є мірою протікання реакції естерифікації, тобто ступеня перетворення (конверсії) в такій системі. Дана реакція є однією з небагатьох, яка дозволяє отримати поліестери глютамінової кислоти з діолами поліоксіетиленового та поліоксіпропіленового рядів. Хімізм отримання поліестерів за реакцією Стегліха відображена схемою 1.3.

## Розділ 2. Методика експериментів

### 2.1. Вихідні речовини, матеріали та їх характеристики

*Сахароза* – білий, без запаху, кристалічний порошок, добре розчинний у воді, погано – в спиртах. Дисахарид, складається із залишків  $\alpha$ -D-глюкопіранози та  $\beta$ -D-фруктофуранози, сполучених між собою  $\alpha$ -1,2'-глікозидним зв'язком. Молярна маса – 342,30 г/моль; густина – 1,587 г/см<sup>3</sup>;  $T_{\text{пл}}$  – 459 К. Піддається гідролізу під дією кислот і ферменту сахарази. Дуже поширена у природі: синтезується в клітинах усіх зелених рослин і нагромаджується в стеблах, коренях, плодах.

*Декстрин* (Aldrich) – полісахарид з різним ступенем полімеризації. Декстрини – суміш продуктів часткового розкладу гомополісахаридів крохмалю, що складаються із глюкозидних залишків, з'єднаних  $\alpha$ -1,4 зв'язками, розкладаються при нагріванні до 498 К і легко розчинні у воді. Молярна маса у вищих декстринів – 6200-7000 г/моль, середніх – 3700 г/моль, нижчих – нижче 3700 г/моль. Вищі декстрини осаджуються етанолом із водних розчинів.

*Декстран* (Aldrich) – полісахарид, білі аморфні речовини. Декстрини – полісахариди, високомолекулярні вуглеводи (глюкони), синтезуються деякими мікроорганізмами, при культивуванні їх на розчинах, що містять сахарозу. Декстрини побудовані із залишків D-глюкози, з'єднаних переважно  $\alpha$ -1,6 та  $\alpha$ -1,3 зв'язками, зустрічаються також  $\alpha$ -1,4,  $\alpha$ -1,2 зв'язки. Розчиняються у воді та у N,N-диметилформаміді, у присутності LiCl при 373-383 К.

*Оцтова кислота* (Aldrich) – прозора рідина з різким подразнюючим запахом, змішується з водою і багатьма розчинниками, добре розчиняє органічні сполуки. Молярна маса 60,06 г/моль, густина – 1,0492 г/см<sup>3</sup>;  $T_{\text{пл}}$  – 289,6 К,  $T_{\text{кип}}$  – 390,8 К;  $n_D^{20}$  = 1,3715,  $pK_a$  = 4,76 (298 К, вода).

*Гептадеканова кислота* (S) – безбарвні кристали, погано розчинні у воді, при нагріванні розчиняються в спиртах та етерах. Молярна маса – 284,49 г/моль; густина – 0,848 г/см<sup>3</sup>;  $T_{\text{пл}}$  – 343 К,  $T_{\text{кип}}$  – 560 К. Використовували без додаткової очистки.

*Глутарова кислота* (пентандіова кислота) – безбарвні кристали, без запаху, добре розчинні у воді (63,9 г/100мл), також розчинні у спиртах, хлороформі, бензолі.



Молярна маса 132,11г/моль;  $T_{\text{пл}}$  – 368-371 К,  $T_{\text{кип}}$  – 473 К (при 20 мм.рт.ст); густина – 1,42г/см<sup>3</sup>.

*Глутамінова кислота (Glu)* (2-амінопентандіова кислота) – безбарвні кристали, погано розчинні у воді та етанолі, не розчинні в діетиловому етері. Молярна маса – 147,13 г/моль; густина – 1,46 г/см<sup>3</sup> (293 К). Для L-ізомеру  $T_{\text{пл}}$  – 520-522 К. При 298 К –  $pK_{a1}=2,19$ ,  $pK_{a2}=4,25$ ,  $pK_{b}=9,67$ . Глутамінова кислота широко поширена амінокислота, має велике значення в обміні речовин. Головний попередник глутаміну, проліну, агрініна і глутатіону. Є потенційним джерелом енергії.

*N,N-дициклогексилкарбодіімід (ДЦК або DCC)* (Aldrich) - білі (блідо-жовті) кристали, розчинні в бензолі, хлорованих вуглеводнях, не розчинні в ацетоні. Молярна маса – 206,33 г/моль,  $T_{\text{пл}}$  – 305-308 К,  $T_{\text{кип}}$  – 428 К (при 11 мм рт.ст.). Вміст основної речовини не менше 99,0%, використовувався без додаткового очищення.

*Дициклогексилсечовина (ДЦС або DCU)* – білі кристали, не розчинні в спирті, хлороформі, бензолі, діетиловому етері, мало розчинні в DMFA. Молярна маса – 224,34 г/моль;  $T_{\text{пл}}$  – 504-508 К.

*4-(N,N-диметиламіно) піридин (ДМАП або DMAP)*, 99% (Alfa Aesar), безбарвна кристалічна речовина з характерним запахом, розчинна у воді та багатьох органічних розчинниках. Молярна маса – 122,17 г/моль,  $T_{\text{пл}}$  – 386-387 К. Відомий під назвою «каталізатор Стегліха».

*Тіоніл хлорид* (Aldrich)– прозора рідина з характерним різким запахом; молярна маса – 118,97 г/моль,  $T_{\text{пл}}$  – 173,5 К,  $T_{\text{к}}$  – 348,6 К,  $d^{20}=1,638$  г/см<sup>3</sup>. Очищали перегонкою над соняшниковою олією [134].

*Монохлороцтова кислота* (Fluka)– безбарвні кристали, розчинні у воді, спиртах та діетиловому етері. Молярна маса – 94,50 г/моль; густина – 1,58 г/см<sup>3</sup>;  $T_{\text{пл}}$  – 334,2 К,  $T_{\text{кип}}$  – 462,3 К;  $pK_{a}$  – 2,87. Очищали перекристалізацією [134].

*Вітамін E* (Aldrich) – жиророзчинний вітамін, який чинить значну антиоксидантну і радіопротекторну дію, бере участь у біосинтезі гема і білків, проліферації клітин та інших найважливіших процесах клітинного метаболізму. Молярна маса – 472 г/моль.

*Таурин (2-аміноетансульфонова кислота)* – білий кристалічний порошок, добре розчинний у воді. Молярна маса – 125,14 г/моль; густина 1,734 г/моль;  $T_{пл}$  – 578 К,  $T_{кип}$  – 621,6 К. Сульфоамінокислота, що синтезується в організмі тварин та людини з амінокислоти цистеїну.

*Поліоксіетиленгліколі (Aldrich)* середньої молярної маси 300, 400, 1000, 1500, 2000 Да. В залежності від середньої молярної маси полімери – 300-1000 Да в'язкі рідини, 1500-2000 Да - пастоподібні або тверді речовини. Змішуються з водою. Розчинні в багатьох органічних розчинниках: бензолі, тетрахлорметані, хлороформі, N,N-диметилформаміді, ацетонітрилі.

Відповідність молекулярної маси функціональності перевіряли визначенням кількості функціональних груп модифікованим методом Огга, Портера [127].

Перед використанням поліоксіетиленгліколі осушували азеотропною відгонкою води з бензолом [129].

*N,N-Диметилформамід (DMFA)* – при стандартних умовах малов'язка прозора рідина. Молярна маса – 73,09 г/моль; густина – 0,9445 г/см<sup>3</sup>;  $T_{кип}$  – 426 К;  $T_{пл}$  – 334 К. Для очищення від води та інших домішок DMFA перемішували з КОН і переганяли у вакуумі над СаО,  $n_d^{25} = 1,4269$  [129].

Розчинники, крім вище зазначених, використовували марок "ХЧ", попередньо очищеними за методиками [128, 129].

## **2.2. Методики проведення синтезів та експериментів**

### **2.2.1. Методика очистки глютамінової кислоти**

Технічну глютамінову кислоту очищали перекристалізацією. У нагрітій до 323 К воді диспергували кислоту і доводили рН розчину до значення 4,5, добавляючи 2М розчин NaOH. При цьому утворювався прозорий розчин глютамату натрію. До розчину додавали приблизно 4% від маси глютамінової кислоти, активованого вугілля і перемішували протягом 30 хвилин при температурі 353 К. Розчин охолоджували і після фільтрування одержували прозорий, зеленуватий розчин. Додаючи розбавлену хлороводневу (10%) кислоту, встановлювали рН 3,2. Після цього з розчину упродовж доби при температурі 283-285 К виділявся осад чистої

глутамінової кислоти. Осад відфільтровували і промивали холодною водою. Отриману вологу кислоту сушили у вакуум ексикаторі спочатку над безводним кальцій хлоридом, а потім над фосфорним ангідридом до постійної маси.

### **2.2.2. Методика синтезу хлорангідриду стеароїлової/лауреїлової кислот**

У тригорлий реактор, оснащений мішалкою, зворотнім холодильником з хлоркальцієвою трубкою і крапельною лійкою, завантажували 0,03 моль кислоти (8,53 г стеаринової кислоти; 6,0 г лауреїлової кислоти; 1,8 г оцтової), розігрівали до 343 К, додавали 1 мл DMFA і з крапельної лійки додавали по краплях 3,93 г (0,033 моль) тіоніл хлориду протягом 40 хв. Температуру бані утримували при 358 К впродовж 2 год. Надлишок тіонілхлориду і DMFA з реакційної маси упарювали у вакуумі водоструминного насосу. При цьому отримували 9 г стеароїлхлориду ( $T_{пл.} = 296$  К,  $T_{кип} = 508$  К) (6,5 г лауреїлхлориду,  $T_{кип} = 409$  К). Отримані хлорангідриди використовували без додаткової очистки.

### **2.2.3. Методика синтезу N-стеароїл та N-лауреїлглутамінової кислот**

Синтез проводили в чотиригорлому реакторі ємністю 1л (1,5л), який оснащений механічною мішалкою, зворотнім холодильником і двома крапельними лійками об'ємом 100 і 150 мл.

В реактор вносили наважку глутамінової кислоти масою 41,05 г (0,279 моль), прибавляли 120 мл води і при перемішуванні додавали 279 мл 2М розчину NaOH. До розчину додавали 280 мл пропанон, температуру підіймали до 303 К і при перемішуванні добавляли по краплях одночасно 88 г (0,29 моль) стеароїлхлориду або 63,5 г (0,29 моль) лауреїлхлориду і 140 мл 2М розчину NaOH. При цьому контролювали рН реакційної маси, яке повинно бути в межах 10-11 і, при потребі, коректували швидкість дозування одного з реагентів.

Після повного добавлення краплями реагентів, реакційну масу перемішували ще протягом 4-ох годин. Реакційна маса може бути гетерогенною. Потім вміст реактора вивантажували в стакан і швидко закисляли до рН 1 (приблизно 30-33 г концентрованої HCl, рекомендовано розбавляти в 3 рази) і залишали щонайменше на 3 год. При цьому легко перемішували, щоб не подрібнити «сирі кристали» до малого розміру, так суміш легше фільтрувалась.

Після 3-х годин витримки підкислену реакційну масу фільтрували на фільтрі Бюхнера і промивали водним розчином HCl (pH 1), максимально відфільтровували. Отримували «вологі кристали».

Після додавання приблизно половини (70мл) 2М розчину NaOH, через горло реактора в реакційну масу додавали 100 мл пропанону.

Для очищення від непрореагованих вихідних речовин «вологі кристали» N-стеароїлглутамінової кислоти висушували до зменшення маси у 3 рази, додавали воду до загального об'єму 700 мл, диспергували кристали, після чого додавали 280 мл 2М розчину NaOH і протягом 10хв розчиняли N-лауреїл/N-стеароїлглутамінову кислоту. Після розчинення, реакційну суміш фільтрували на лійці Бюхнера через фільтрувальний папір. Ці дві процедури виконували швидко, для запобігання гідролізу. Фільтрат підкисляли до pH 1 і залишали на 8 годин.

Після витримки продукт фільтрували і промивали водою до pH фільтрату 2-3. Кристали висушували на вентиляторі до постійної маси.

Висушену N-лауреїл/N-стеароїлглутамінову кислоту очищали від домішки лауреїлової/стеаринової кислоти триразовим промиванням пропаномом (на 10 г продукту – 50÷70 мл пропанону). Промиту N-лауреїл/N-стеароїлглутамінову кислоту висушували у ексікаторі під вакуумом.

#### **2.2.4. Методика синтезу поліестерів на основі полісахаридів та моно/дикарбонових кислот**

В реактор, об'єднаний з атмосферою через зворотній холодильник із хлоркальцієвою трубкою, оснащений лійкою зі зворотом та магнітною мішалкою, поміщали моно/дикарбонову кислоту (St, GluSt, GluLa) та розчинник, концентрація кислоти у реакторі 12-18%. До суміші додавали розчин (5-8%) полісахариду (декстрану, декстрину). В синтезах з декстраном для його розчинення в DMFA додавали LiCl в пропорції 2г солі на 0,01 моль декстрану. Реактор поміщали у водяну баню з температурою 278-280 К та включали перемішування. Через лійку додавали каплями 2-5% розчин 4-диметиламінопіридину (DMAP) та 18-20% розчин N,N-дициклогексилкарбодіміду (DCC). Вихідні речовини брали у такому

мольному співвідношенні: R-COOH : DCC = 1 : 1,1; DCC : DMAP = 1 : 0,125. Як розчинник для усіх вихідних речовин використовували N,N-диметилформамід.

Після внесення DCC температуру суміші піднімали до 283-287 К та при перемішуванні проводили реакцію протягом 4-4,5 годин. По закінченні реакції від реакційної суміші відділяли фільтруванням утворений осад N,N-дициклогексилсечовини (DCU). Реакційну суміш упарювали у вакуумі водоструминного насосу до  $\frac{3}{4}$  об'єму DMFA. З концентрованої суміші метанолом, осаджували «зшитий» полісахарид який відцентрифугували. Фугат (розчин метанолу та DMFA) упарювали та виділяли золь-фракцію модифікованого полісахариду. Осад після центрифугування промивали водою та висушували в ексікаторі над водопоглинаючими речовинами.

### 2.2.5. Методика проведення взаємодії сахарози з карбоновими кислотами

Для проведення синтезу використовували двогорлий реактор із магнітним тілом обертання до якого приєднували лійку зі зворотом та зворотній холодильник, до якого приєднували хлоркальцієву трубку. В реактор вносили наважку сахарози та DMFA утворюючи 12÷15 % розчин. За допомогою лійки послідовно додавали краплями розчин кислоти (оцтової, стеаринової або глутарової), розчин DMAP та розчин DCC. Мольне співвідношення реагентів становило: сахарид : кислота : DMAP : DCC = 1 : (X) : (X·Y·1,1) : (X·Y·1,1·0,125), де X – моль кислоти, Y – кількість карбоксильних груп у відповідній кислоті. Всі вихідні речовини розчиняли використовуючи розчинник – DMFA. Під час синтезу використовували наступні умови:

- речовини при перемішуванні добавляли краплями при температурі 278÷280 К протягом 15÷20 хв;
- після додавання вихідних речовин температуру реакційної суміші підіймали до 285÷288 К та при перемішуванні термостатували протягом 3÷3,5 год.

По закінченні реакції з реакційної суміші відфільтровували DCU, а суміш упарювали від DMFA у вакуумі водоструминного насосу. Концентровану реакційну суміш осаджували ацетоном водою або метанолом. Після цього суміш відцентрифугували та відділяли осад, потім сушили у ексікаторі під вакуумом до

постійної маси. Фугат, після центрифугування упарювали у вакуумі водоструминного насосу до постійної маси.

## **2.2.6. Одержання N-заміщених похідних глютамінової кислоти, взаємодією гідрофільних естерів поліоксіетиленхлорацетатів з глютаміновою кислотою**

### **2.2.6.1 Одержання хлороацетилхлориду**

В тригорлий реактор завантажували хлороцтову кислоту та додавали бензен до утворення 30 % розчину. Для осушування суміші з реактора відганяли третину розчинника. До колби приєднували зворотній холодильник з газовідвідною трубкою та крапельну лійку. У лійку завантажували тіоніл хлористий, у мольному співвідношенні хлороцтової кислоти до  $\text{SOCl}_2$ , як 1 до 1,6. При температурі кипіння бензену (353,1 К) та перемішуванні додавали краплями хлористий тіоніл, спостерігали виділення газу. Термостатували при 353 К протягом 12 годин. Далі проводили відгонку бензолу. Одержаний ангідрид хлороцтової кислоти переганяли при температурі 376-380 К.

### **2.2.6.2 Одержання метиляту натрію**

В реактор із широким шліфом, оснащеним форштосом до якого приєднаний зворотній холодильник, завантажували надлишок зневодненого метанолу по відношенню до натрію. Колбу поміщали в льодяну баню та при переміщуванні додавали металічний натрій. Спостерігали виділення газу. Після додавання Na продовжували перемішування на протязі 2 годин. По закінченні реакції одержували розчин метиляту натрію в метанолі.

### **2.2.6.3 Одержання поліоксіетиленгліколяту натрію**

У двошійковий реактор завантажували 30% розчин ПЕГу в бензолі. Мольне співвідношення ПЕГ : метилят натрію – 2 до 1. Для осушування вихідних речовин відганяли третину бензену. Після осушування вихідних речовин приєднували зворотній холодильник та крапельну лійку. У крапельну лійку завантажували розчин метиляту натрію в метанолі. Колбу поміщали у водяну баню та при температурі 303 К при переміщуванні додавали краплями розчин метиляту натрію.

Далі з колби відганяли азеотропну суміш метанол - бензен при температурі 328-348 К.

#### **2.2.6.4 Синтез поліоксіетиленхлорацетату**

До попередньо одержаного поліоксіетиленгліколяту натрію через крапельну лійку додавали краплями розчин хлорацетилхлориду в бензені. Після додавання, суміш продовжували термостатувати при 303 К протягом півгодини. З реакційної суміші випарювали бензен та одержували кристалічну суміш, яка розплавляється при температурі вище 313 К. Суміш переносили у ділильну лійку та екстрагували продукт бутаном. Масове співвідношення суміш : бутанон = 1 : 2. Після чого у ділильну лійку додавали воду у кількості 0,4 частини від маси бутанону. Спостерігали розшарування суміші. Розділяли і водний шар ще раз промивали бутаном. Екстракцію повторяли ще двічі. Об'єднували органічні шари та відганяли 2/3 бутанону, залишки екстрагенту упарювали на вакуумі водоструминного насосу. Одержаний кристалічний продукт досушували в ексикаторі.

#### **2.2.6.5 Синтез N-похідних глутамінової кислоти**

В реактор, обладнаний зворотнім холодильником та магнітною мішалкою, завантажували поліоксіетиленхлорацетат та глутамінову кислоту у мольному співвідношенні 1:3. Додавали розчинник (DMFA) до утворення 20-25% розчину. Реактор поміщали в масляну баню та при температурі 353 К перемішували протягом 20-25 год.

По закінченні реакції відцентрифугували осад непрореагованої глутамінової кислоти та випарювали розчинник. Одержаний висушений продукт екстрагували бутаном аналогічно до методики 2.2.6.4.

### **2.3. Методики проведення аналізів**

#### **2.3.1. Методика визначення в'язкості**

Вимірювання динамічної в'язкості продуктів синтезів за точкою перколяції, проводили на ротаційному віскозиметрі Реотест-2. Виміри проводились в режимі коаксіальних циліндрів.

Значення швидкостей обертання вимірювального циліндра  $\omega$  (об/хв) при різних положеннях перемикача приведені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1. Значення швидкостей обертання вимірювального циліндра

передача	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$\omega$ , об/хв	0,56	1	1,7	3	5	9	15	27	45	81	135	245
$\gamma$ , $s^{-1}$	3	5,4	9	18,2	27	48,6	81	146	243	437	729	1312

У таблиці приведені значення швидкостей деформації зсуву  $\gamma$  в зазорі між циліндрами.

Значення динамічної в'язкості розраховували за формулою  $\eta = \tau \cdot f$

де  $f$  – таблична величина, яка залежить від режиму, в якому проводили вимірювання.

### 2.3.2. Гель-проникна хроматографія

Середню молекулярну масу поліестерів визначали методом гель-проникної хроматографії (ГПХ) з використанням хроматографа виробництва Laboratori pristroje, що включає наступні модулі: насос високого тиску High pressure pump HPP4001, датчик ультрафіолетового поглинання з набором світлофільтрів – UV VIS Detector LCD2563 та самописець Line recorder TZ4620. Як елюент використовували тетрагідрофуран з витратою 0,2 мл/хв. Лабораторним шприцом з приєднаним фільтром марки NALGENE і порами 0,45 мкм відбирали 1 мл розчину досліджуваного зразку у ТГФ концентрацією 0,3 мг/мл, пропускали 0,5 мл через кран вводу проби і вводили в колонку хроматографа 200 мкл розчину. Хроматографічна колонка складається з двох скляних трубок з розмірами 3x150мм, наповненими наповнювачем SX-3, виробництва Bio-RAD(USA). Калібрувальні криві молекулярної маси отримували по стандартах поліоксіпропіленгліколів. За допомогою відповідного програмного забезпечення отримували значення середньої молекулярної маси, ММ розподіл та коефіцієнт полідисперсності.

### 2.3.3. Потенціометричний метод аналізу для визначення карбоксильних груп

0,8 г полімеру зважували з точністю до 0,0001г і розчиняли у суміші 5 мл води і 5 мл метанолу. Титрували 0,4 Н розчином NaOH, фіксуючи зміни показів рН з використанням рН-метра Туг N517.



Вміст  $\alpha$ -карбоксільних груп визначали за формулою:

$$C_{\alpha\text{-карб.груп}} = \frac{V(\text{NaOH})_1 \cdot C(\text{NaOH}) \cdot k \cdot M}{m_{\text{нав}} \cdot 1000} \quad (2.1)$$

де  $C_{\alpha\text{-карб.груп}}$  – вміст  $\alpha$ -карбоксільних груп у полімері, моль  $\alpha$ -карбоксільних груп/моль полімеру

$V(\text{NaOH})_1$  – об'єм NaOH, що відповідає першому переходу потенціометричної кривої, мл (рис.2.1).

$C(\text{NaOH})$  – концентрація NaOH, моль/л

$k$  – поправочний коефіцієнт

$m_{\text{нав}}$  – маса наважки полімеру, який аналізували, г

$M$  – молярна маса полімеру, г/моль

Вміст  $\gamma$ -карбоксільних груп визначали за формулою:

$$C_{\gamma\text{-карб.груп}} = \frac{(V(\text{NaOH})_2 - V(\text{NaOH})_1) \cdot C(\text{NaOH}) \cdot k \cdot M}{m_{\text{нав}} \cdot 1000} \quad (2.2)$$

де  $C_{\gamma\text{-карб.груп}}$  – вміст  $\gamma$ -карбоксільних груп у полімері, моль  $\gamma$ -карбоксільних груп/моль полімеру

$V(\text{NaOH})_1$  – об'єм NaOH, що відповідає першому переходу потенціометричної кривої, мл (Рис. 2.1).

$V(\text{NaOH})_2$  – об'єм NaOH, що відповідає другому переходу потенціометричної кривої, мл (Рис. 2.1).

$C(\text{NaOH})$  – концентрація NaOH, моль/л

$k$  – поправочний коефіцієнт

$m_{\text{нав}}$  – маса наважки полімеру, який аналізували, г

$M$  – молярна маса полімеру, г/моль

Вміст аміногруп у полімері визначали за формулою:

$$C_{\text{аміногруп}} = \frac{(V(\text{NaOH})_3 - V(\text{NaOH})_2) \cdot C(\text{NaOH}) \cdot k \cdot M}{m_{\text{нав}} \cdot 1000} \quad (2.3)$$

де  $C_{\text{аміногруп}}$  – вміст аміногруп у полімері, моль аміногруп/моль полімеру

$V(\text{NaOH})_3$  – об'єм NaOH, що відповідає третьому переходу потенціометричної кривої, мл (Рис. 2.1).

$V(\text{NaOH})_2$  – об'єм NaOH, що відповідає другому переходу потенціометричної кривої, мл (Рис. 2.1).

$C(\text{NaOH})$  – концентрація NaOH, моль/л

$k$  – поправочний коефіцієнт

$m_{\text{нав}}$  – маса наважки полімеру, який аналізували, г

$M$  – молярна маса полімеру, г/моль

На рисунку 2.1 наведено типові криві сумісного потенціометричного та кондуктометричного аналізу.

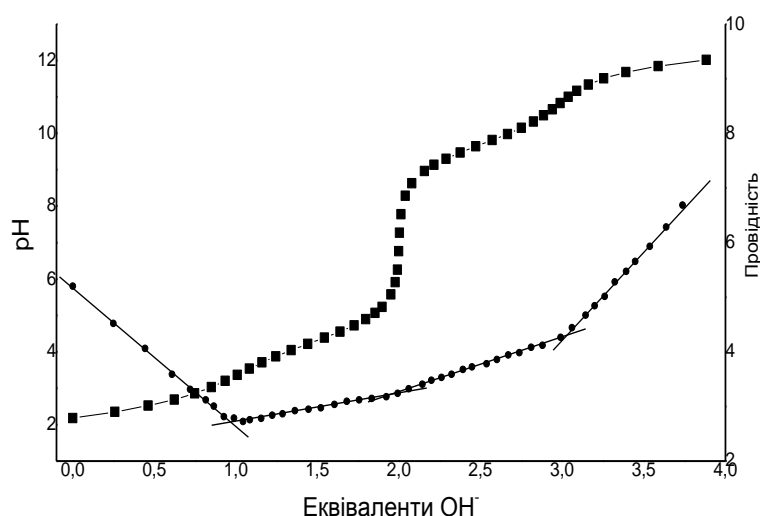


Рис. 2.1 Типова крива сумісного потенціометричного (-■-) та кондуктометричного (-●-) титрування 0,4N розчином лугу гідрохлориду глутамінової кислоти.

Після диференціювання отриманих кривих в середовищі програмного пакету для обробки і візуалізації експериментальних даних Origin 6.1., визначали точки еквівалентності.

#### 2.3.4. Кондуктометричний метод аналізу

0,8 г полімеру зважували з точністю до 0,0001 г і розчиняли у суміші 5 мл води і 5 мл метанолу. Титрували кондуктометрично 0,4N розчином NaOH з використанням кондуктометра N5721M (рис. 2.1).

Кількість карбоксильних груп, що брали участь у формуванні цвітер-йону визначали за формулою:

$$C_{\text{карб.груп}} = \frac{V(\text{NaOH}) \cdot C(\text{NaOH}) \cdot k \cdot M}{m_{\text{нав}} \cdot 1000} \quad (2.4)$$

де  $C_{\text{карб.груп}}$  – вміст карбоксильних груп у полімері, що приймають участь у формуванні цвітер-йона, моль карбоксильних груп/моль полімеру

$V(\text{NaOH})$  – об'єм NaOH, що відповідає переходу кондуктометричної кривої, мл

$C(\text{NaOH})$  – концентрація NaOH, моль/л

$k$  – поправочний коефіцієнт

$m_{\text{нав}}$  – маса наважки полімеру, який аналізували, г

$M$  – молярна маса полімеру, г/моль

### 2.3.5. Визначення ангідридних груп

Визначення ангідриду, який утворюється на початкових стадіях процесу поліконденсації з використанням активатора карбоксильної групи – DCC проводили згідно стандартної методики морфолінового аналізу [130].

### 2.3.6. Визначення солюбілізації водонерозчинного барвника Судан III у дисперсіях синтезованих поліестерів

Солюбілізацію водонерозчинного барвника Судан III у водних дисперсіях зшитих або розгалужених декстринів визначали спектрофотометричним методом за допомогою спектрофотометр «ЮНИКО 1201».

Для кількісної оцінки процесу розчинення барвника у водних розчинах полімерів будували калібрувальні залежності (калібрувальні криві) оптичної густини розчину барвника (Судану III) в пропаноні від його концентрації. Оптимальна довжина хвилі для даної системи становила  $\lambda=500$  нм, так як у цій області спостерігався максимальний абсорбанс.

Після цього до водних дисперсій декстринів з концентраціями  $\sim 0,001$  г/л додавали наважку барвника з постійною масою (близько 0,05 г), перемішували отримані системи при кімнатній температурі протягом доби. Встановлено, що через 24 год перемішування в такій системі встановлюється стан хімічної рівноваги, який характеризується постійним значенням оптичної густини.

Надлишок барвника двічі центрифугували, відбирали фугат. Одержані розчини декстринів, насичені солюбілізованим барвником, розводили ацетоном. На

фотоелектроколориметрі з використанням кювет товщиною 10,045 та 5,11 мм проводили вимірювання оптичної густини  $D$  одержаних водно-ацетонових розчинів, максимально наближених по оптичній густині до умов отримання калібрувальних прямих. З використанням одержаних калібрувальних залежностей, за попередньо встановленими значеннями оптичної густини водно-ацетонових розчинів декстринів, насичених барвником, визначали значення  $S$  (г/г), що показує масу барвника, яка солюбілізується 1 грамом полімеру у його розчині.

### **2.3.7. Визначення вивільнення солюбілізованого дисперсією поліестеру барвника Судан III у 1-октанол**

Вивільнення барвника у модельне ліофільне середовище 1-октанол визначали спектрофотометричним методом.

Водні дисперсії із солюбілізованим суданом III, одержували за методикою описаною вище (методика 2.3.6). До дисперсії із солюбілізованим барвником масою 5г додавали 1-октанол (модельна ліофільна фаза) у кількості 15 г. Суміш перемішували протягом встановленого часу, визначеного планом експерименту. З реакційної суміші відбирали проби через 2хв, 5хв, 10хв, 20хв, 60хв, 120 хв та добу від початку перемішування, розділяли 1-октанол і водну фазу, 1-октанол забирали на аналіз, після чого водну фазу повертали назад у суміш. Вміст судану III в зразках 1-октанолу визначали за методикою 2.3.6. Результати оформляли графічно, у вигляді графіку залежності кількості вивільненого Судану III від часу.

### **2.3.8. Дослідження електрофоретичної рухливості дисперсій поліестерів з альбуміном**

Для проведення електрофорезу готували пластини із двох різних за ступенем зшивки (концентруючого та розділяючого) поліакриламідних гелів. Для цього відважували 7,4 г акриламід, додавали 25мл дистильованої води та інтенсивно перемішували до повного розчинення акриламід. До розчину додавали 0,1г N,N-метиленбісакриламід та перемішували на магнітній мішалці до повного розчинення.

Для приготування розділяючого гелю брали 8,3мл розчину акриламід-бісакриламід; 5мл буферного розчину для розділяючого гелю рН=8,8; 6,6 мл

дистильованої води. Розчин поміщали у ексікатор і вакуумували на водоструминному насосі протягом 1 години. Опісля впускали всередину ексікатора аргон, діставали з нього розчин і поміщали в нього 24 мкл N,N,N',N'-тетраметилендіаміну та 160 мкл 10% водного розчину персульфату калію. Після цього композицію для розділяючого гелю заливали між склами пластини для електрофорезу і витримували в сушильній шафі при 313 К впродовж 30хв.

Для приготування концентруючого гелю брали 1мл розчину акриламід-бісакриламід; 1мл буферного розчину для концентруючого гелю, рН = 6,8; 3мл дистильованої води; 24мкл N,N,N',N'- тетраметилендіаміну; 160 мкл 10% водного розчину персульфату. Композицію перемішували та заливали в пластину для електрофорезу, встановлювали гребінку для формування лунок. Пластину поміщали в сушильну шафу на 1 год при температурі 313 К.

Приготування буферних розчинів:

- Буферний розчин для приготування концентруючого гелю, рН=6,8

У хімічний стакан на 50 мл відважували 1,893г гідроксиметил-амінометану (ТРІС), доливали туди 25 мл дистильованої води та перемішували до повного розчинення ТРІС. Після цього рН розчину доводили до значення 6,8 за допомогою концентрованої соляної кислоти на рН-метрі.

- Буферний розчин для приготування розділяючого гелю, рН = 8,8

У хімічний стакан на 100мл відважували 9,086г ТРІС, доливали туди 50 мл дистильованої води та перемішували на магнітній мішалці до повного розчинення ТРІС. Після цього рН розчину доводили до значення 8,8 за допомогою концентрованої соляної кислоти на рН – метрі.

- Електродний буфер, рН = 8,3

У хімічний стакан на 250 мл відважували 14,414г гліцину; 3,028г ТРІС та додавали туди 100 мл дистильованої води, інтенсивно перемішували до повного розчинення компонентів, вміст стакану переносили у мірну колбу на 1000 мл і доводили об'єм дистильованою водою до мітки.

Камеру для електрофорезу збирали таким чином, щоб з двох боків від пластини із сформованим гелем були відділення для внесення електродного буферу.

Досліджувані проби вносили в сформовані лунки і зверху нашаровували електродний буфер. Для формування проби до 0,1-1% водних дисперсій поліестерів вносили 150-250 мкг альбуміну. В лунки концентруючого гелю вносили 0,04-0,05мл проби.

В електродні камери додавали електродний буфер до такого рівня, щоб він забезпечував проходження струму через гель. Підготовлену таким чином електрофоретичну камеру підключали до джерела живлення. Під час проходження проби через концентруючий гель на пластину гелю подавали 25-30 mA; при проходженні проби через розділяючий гель 45-50 mA.

Електрофорез проводили при водяному охолодженні ( $T = 273-277$  K). Тривалість електрофорезу 90-120 хв. Після досягнення маркерного барвника (бромфенолового синього) краю гелю виключали джерело живлення, витягали пластину з гелем, відділяли гель від скляних стінок камери та фіксували розділення проб [131].

### **2.3.9. Визначення розмірів частинок дисперсій структурованих полімерів методом світлорозсіювання**

Визначення розмірів частинок дисперсій структурованих полімерів методом світлорозсіювання проводили на спектрофотометрі «ЮНИКО – 1201» при 5-ти різних довжинах хвилі ( $\lambda = 430; 535; 590; 610; 680$ ) з використанням кювети з довжиною оптичного шляху 10мм та розмірами (24×40мм). Порівнювали з дистильованою водою.

Для визначення розмірів частинок дисперсій структурованих полімерів готували 10г 0,1% дисперсії полімеру у воді.

Після цього будували графік в координатах  $\lg D - \lg \lambda$  і визначали показник  $n$  по куту нахилу отриманої кривої. Відповідно до цього показника підбирали показник  $Z$ , згідно табличних даних, та визначали розмір частинок дисперсної фази згідно рівняння Геллера [132].

### **2.3.10. Термогравіметричні дослідження**

Вимірювання (за кривою ТГ) проводили на приладі Дериватограф Q-1500D системи «Паулік-Паулік-Ердей», Угорщина.

Зразок золь-/гель- фракцій структурованого полісахариду, аналізували в динамічному режимі в атмосфері кисню або азоту. Маса зразка становила 30 мг, швидкість нагріву 3°/хв; чутливість за шкалою ТГ- 100 мг. Швидкість розкладу 0,4мг/хв. Шкала – 523 К.

### **2.3.11. Визначення поверхневого натягу водних дисперсій ППАК та критичної концентрації міцелоутворення**

Визначення поверхневого натягу речовин проводили за класичним методом відриву кільця на приладі Дю-Нуї. Цей метод ґрунтується на вимірюванні максимального зусилля (F) для відриву платиногового кільця з відомими геометричними параметрами від поверхні рідини. Величина поверхневого натягу та критична концентрація міцелоутворення речовин розраховується за методиками наведеними в [133].

### **2.3.12. Визначення розміру частинок дисперсної фази методом динамічного світлорозсіювання (DLS)**

Ефективний гідродинамічний радіус частинок дисперсної фази в дисперсіях поліестерів з концентрацією 0,01-0,5% визначали на приладі Particle Sizing Systems Nicomp 380, з роздільною здатністю 3 нм. Заряд частинок вимірювали на приладі Zeta Sizer Nano-ZS90 (Malvern).

### **2.3.13. Трансмійсна електронна мікроскопія (ТЕМ)**

ТЕМ мікрофотографії частинок дисперсій поліестерів у воді були отримані з використанням приладу JEOL JEM-2100. Для ТЕМ вимірювань на мідну сітку покриту тонкою плівкою з карбону наносили краплю міцелярного розчину і краплю 1% розчину фосфорновольфрамислової кислоти як контрастуючого агенту.

### **2.3.14. Якісний аналіз на первинну аміногрупу (нінгідрінова проба)**

На фільтрувальний папір наносили дві краплі 0,1%-го розчину нінгідрину в цитратному буфері (рН = 5) і висушували у шафі при 373 К. На суху пляму наносили дві краплі досліджуваного розчину і знову сушили при тій же температурі 5 ÷ 10 хв. У присутності амінокислот виникає синя, фіолетова або червона пляма або кільце. Реакцію дають всі  $\alpha$ -амінокислоти, крім проліну і гідроксіпроліну [134].

### **2.3.15. ІЧ-спектроскопія з перетворення Фур'є**

ІЧ спектри зразків модифікованого магнетиту та магнетиту з полімерною оболонкою отримані при застосуванні приладу Thermo Scientific Nicolet 8700. Зразки магнетиту змішували з подрібненим KBr у співвідношенні 1:10 і затискали у таблетку товщиною до 0,1 мм. Аналіз ІЧ-спектрів проводили за таблицями характерних частот поглинання [135, 136, 137].

### **2.3.16. ПМР-спектроскопія**

<sup>1</sup>H ЯМР спектри зразків мономерних фрагментів та структурованих полієстерів отримували у відповідному дейтерованому розчиннику (дейтеробензол, дейтерохлороформ, дейтерована вода) при застосуванні приладу JEOL's ECA Series Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometer при частоті 400 МГц в автоматичному режимі сканування. Аналіз ПМР-спектрів проводили за таблицями характерних хімічних зсувів, наведених у [138], а також програмою ChemBioDraw Ultra 11.0.1.



## **Розділ 3. Модифікація полісахаридів N-похідними глютамінової кислоти за реакцією Стегліха**

### **3.1. Обґрунтування використання реакції Стегліха для модифікації полісахаридів**

Завдяки унікальній структурі макромолекули в поєднанні з їх поліфункціональністю полісахариди мають здатність утворювати зшиті сітки, гелі та макропористі смоли [139, 140].

Зшиті полімери отримують в гомогенних або гетерогенних умовах з використанням бі- або поліфункціональних зшиваючих агентів таких, як епіхлоргідрин [141, 142, 143, 144, 145], етилен гліколь дигліцидиловий етер [146, 147, 148], глутаральдегід [149, 150, 151, 152, 153, 154], бензохінон [155], фосфорний оксихлорид [156], карбонові кислоти [157], малеїновий ангідрид [158] або ізоціанати [159,160]. Зшивання має місце, коли реагент (а саме, зшиваючий агент) утворює міжмолекулярні зв'язки і відбувається зшивання між макромолекулами полісахариду.

Два найбільш важливих фактори, що визначають властивості одержаних полісахаридних матеріалів на їх основі є гідрофільність полімеру та ступінь зшивання [161]. Коли ступінь зшивання висока, матеріал, в основному, аморфний [162].

Crini та колеги [163, 164] досліджували структуру, що утворюється при зшиванні циклодекстрину (CD) за допомогою епіхлоргідрину (EPI). Вони показали, що дана реакція може відбуватись двома шляхами: одержання зшитої структури, коли одна ланка епіхлоргідрину зшиває циклодекстрин (схема 3.1.A) та полімеризація епіхлоргідрину (схема 3.1.B), в такому випадку утворюються продукти, в яких молекули CD об'єднані полімерними ланцюгами EPI.

Значно складніші структури можуть утворюватись при взаємодії EPI з хітозаном, так як зшиваючий агент вступає в реакцію з аміногрупами сахариду. На рисунку 3.1 приведено можливі структури різних зшитих продуктів хітозану.

Вищеописані методи зшивки використовують зшиваючі агенти токсичність яких є неоднозначною. Неоднозначною є токсичність продуктів, що утворюються при біодеструкції таких зшитих полісахаридів в організмі людини. До полімерів

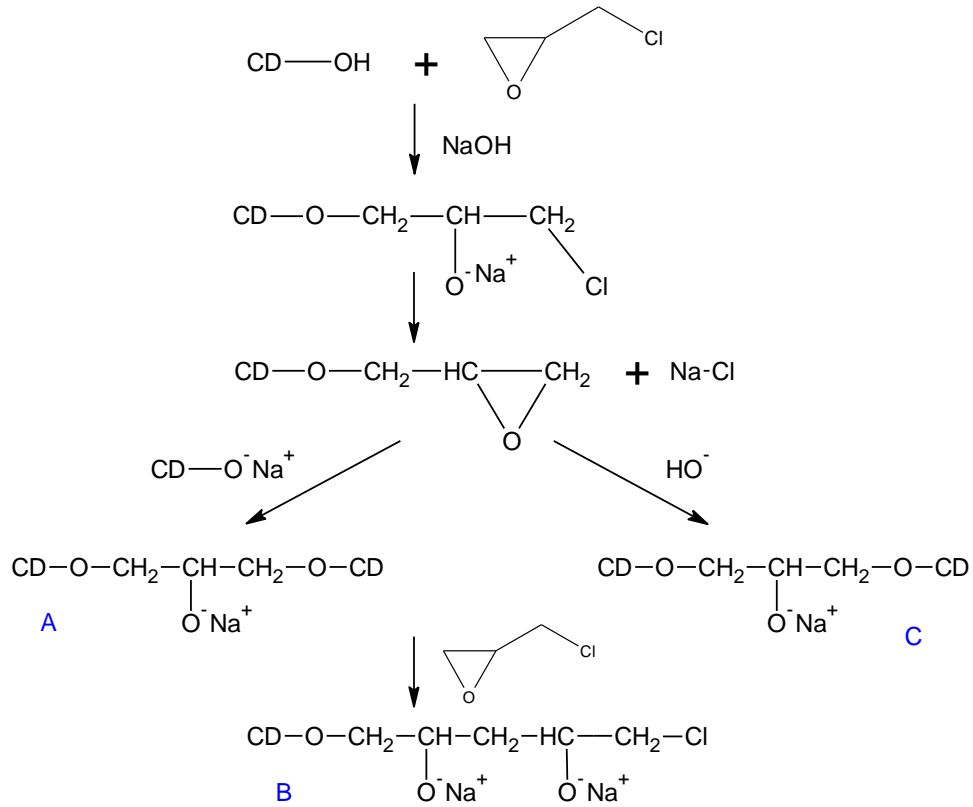


Схема 3.1 Хімізм реакції епіхлоргідрину (ЕПІ) з циклодекстрином. (А) – зшивання, (В) – полімеризація за допомогою зшиваючого агенту, (С) – гідроліз моноприщепленого ЕПІ.

медичного призначення на даний час висовуються високі вимоги щодо їхньої токсичності. Тому виникає необхідність розробити методи зшивки полісахаридів, структуруючі агенти, яких є притаманні організму.

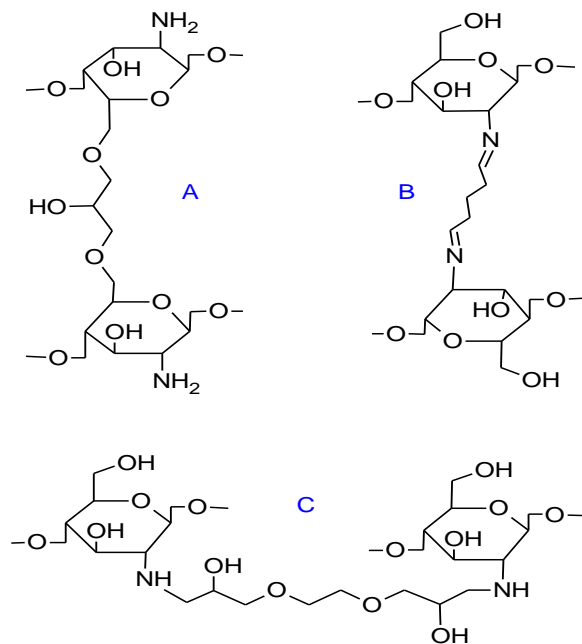


Рис. 3.1 Схематичне зображення зшитого хітозану: (А) хітозан-ЕПІ, (В) хітозан-пентандіол, (С) хітозан-етиленгліколь дигліцедиловий етер.

В даній роботі ми пропонуємо створювати сітки полісахаридів на основі дикарбонових  $\alpha$ -амінокислот за допомогою реакції Стегліха. Основною перевагою вибору такої системи є те, що реакція відбувається в м'яких умовах, а самі продукти є нетоксичні та біодеградабельні.

В роботах [165, 166, 167] було показано можливість одержання за реакцією Стегліха псевдо-поліамінокислот поліестерного типу за допомогою взаємодії *N*-похідних глютамінової кислоти та поліолів поліоксіетиленового та поліоксіпропіленового рядів. В результаті проведених досліджень встановлено, що реакція Стегліха забезпечує одержання поліестерів в м'яких умовах. Тому представляє інтерес дослідити структурування полісахаридів через одержання поліестерів за цією реакцією.

Одержання естерів у м'яких умовах за реакцією Стегліха можна описати схемою 3.2. За цією схемою, утворення естерного зв'язку є багатостадійним процесом. На першій стадії відбувається взаємодія карбоксильної групи з *N,N'*-дициклогексилкарбодімідом (DCC) з утворенням активованої форми карбоксильної групи (АК). На другій стадії, ця активована форма взаємодіє з супернуклеофілом 4-(*N,N*-диметиламіно)піридином (DMAP), що приводить до утворення проміжної речовини. Швидка взаємодія останньої з гідроксильною групою приводить до утворення естерного зв'язку та виділення *N,N*-дициклогексилсечовини (DCU).

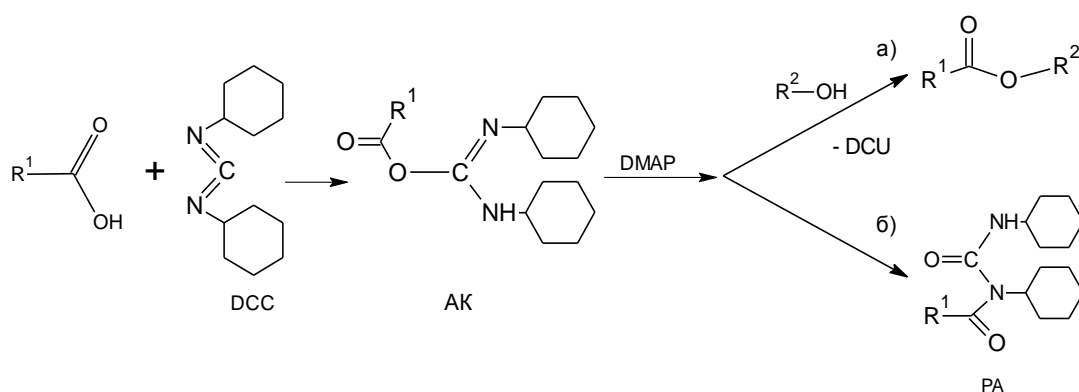


Схема 3.2. Хімізм реакції Стегліха.

Перебіг реакції Стегліха ускладнюється рядом непродуктивних перегрупувань АК. На схемі 3.2, маршрут б) відображає перетворення АК в пасивний амід (РА).

Важливо відмітити, що дане перегрупування не приводить до виділення DCU і зумовлює зниження виходу естеру.

В роботі [167], в ході дослідження утворення поліестерів при взаємодії N-похідних глютамінової кислоти з різними за природою діолами за реакцією Стегліха, у випадку саме глютамінової кислоти (Glu), обґрунтовано дещо інша схема перебігу реакції Стегліха (схема 3.3).

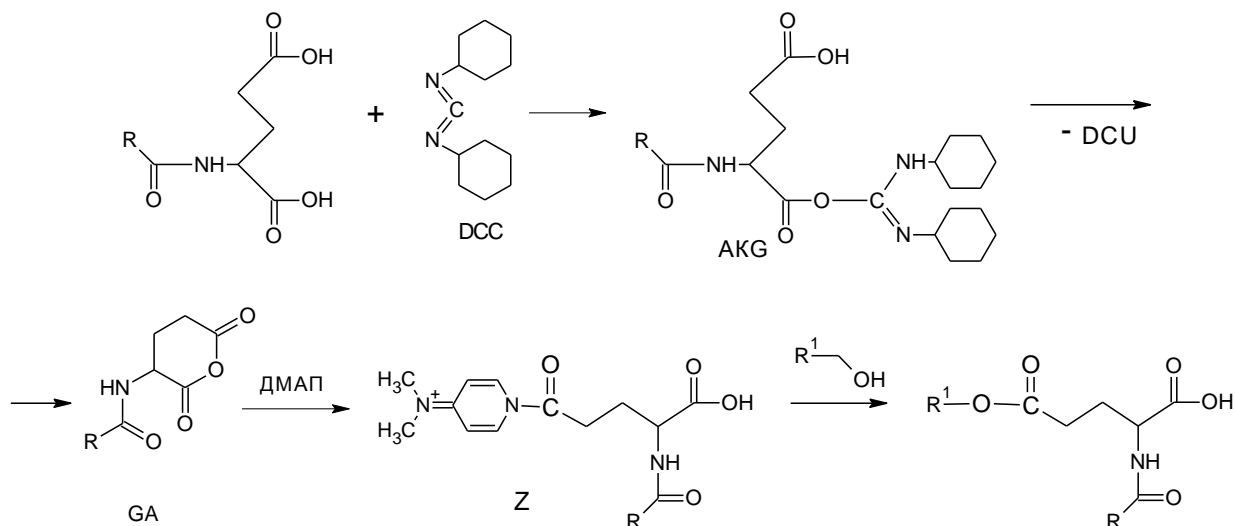


Схема 3.3 Схема перебігу реакції Стегліха через проміжне утворення ангідриду GA

За цією схемою, активована форма N-похідної глютамінової (AKG) перегрупується у внутрішній ангідрид (GA). Завдяки цьому зменшується ймовірність непродуктивного перегрупування АК в нереакційно-здатний амід.

З огляду на це в даному розділі будуть розглянуті результати дослідження взаємодії полісахаридів декстрану (Da), декстрину (D) з N-ацилпохідними глютамінової кислоти: N-стероїлглютамінової кислоти (Glu(St)) та N-лауреїлглютамінової кислоти (Glu(La)).

### 3.2. Дослідження особливостей перебігу реакції Стегліха за участю гідроксильних груп сахарози з карбоновими кислотами

Дослідження взаємодії полісахаридів з дикарбоновими кислотами за реакцією Стегліха ускладнено рядом процесів модифікації, розгалуження та перехресної зшивки макромолекул полісахаридів та утруднено дисперсністю молекулярної маси полісахаридів, що використовувались. У зв'язку з цим виникла необхідність в модельному дослідженні перебігу реакції Стегліха за участю гідроксильних груп

сахаридів. З цією метою було проведено ряд досліджень взаємодії гідроксильних груп сахарози (С) з оцтовою (ОК), стеариною (St) і глутаровою (Gl) кислотами [168].

Методика проведення експерименту із взаємодії між ОК з гідроксильними групами сахарози наведена в методиці 2.2.5. Реакцію проводили в середовищі N,N-диметилформаміду в температурному діапазоні 283÷288 К. Виділений з реакційного середовища продукт досліджували методами ПМР-спектроскопії та елементним аналізом. Висновок про повноту перебігу процесу робили за кількістю виділеної DCU гравіметричним методом. Основну увагу, в межах цього дослідження, приділялось впливу на процес співвідношення основних реагентів та температури.

Схематично взаємодію оцтової кислоти з гідроксильними групами сахарози

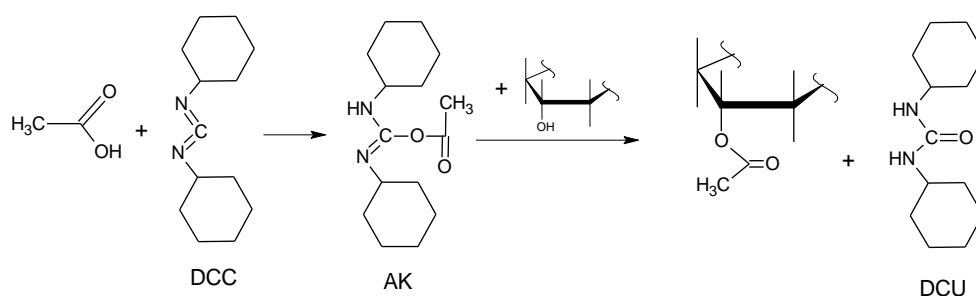


Схема 3.4. Взаємодія оцтової кислоти з гідроксильними групами сахарози за реакцією Стегліха.

відображено схемою 3.4.

На рис. 3.2 наведено ПМР-спектр зразка ацетильованої сахарози. Сигнали D, E зі зміщенням 1,9÷2,12 м.д. відповідають протонам метильної групи, група сигналів C зі зміщенням 2,8÷3,15 м.д. відповідають протонам гідроксильних груп сахарози, сигнали B (3,4÷4,3 м.д.) та A (5.3 м.д.) відповідають протонам глюкопіранозного і глюкофуранозного циклів. Оскільки ацилування відбувається не за строго визначеним гідроксилем, продукт реакції представляє собою суміш модифікованих молекул сахарози з різною ступеню ацилування в різні положення циклів. В результаті цього більшість сигналів є результатом накладення близьких по зміщенню сигналів від різних ізомерів, що не дозволяє проводити аналіз їх щеплення. Разом з тим, співвідношення інтенсивності сигналів дозволяє оцінити

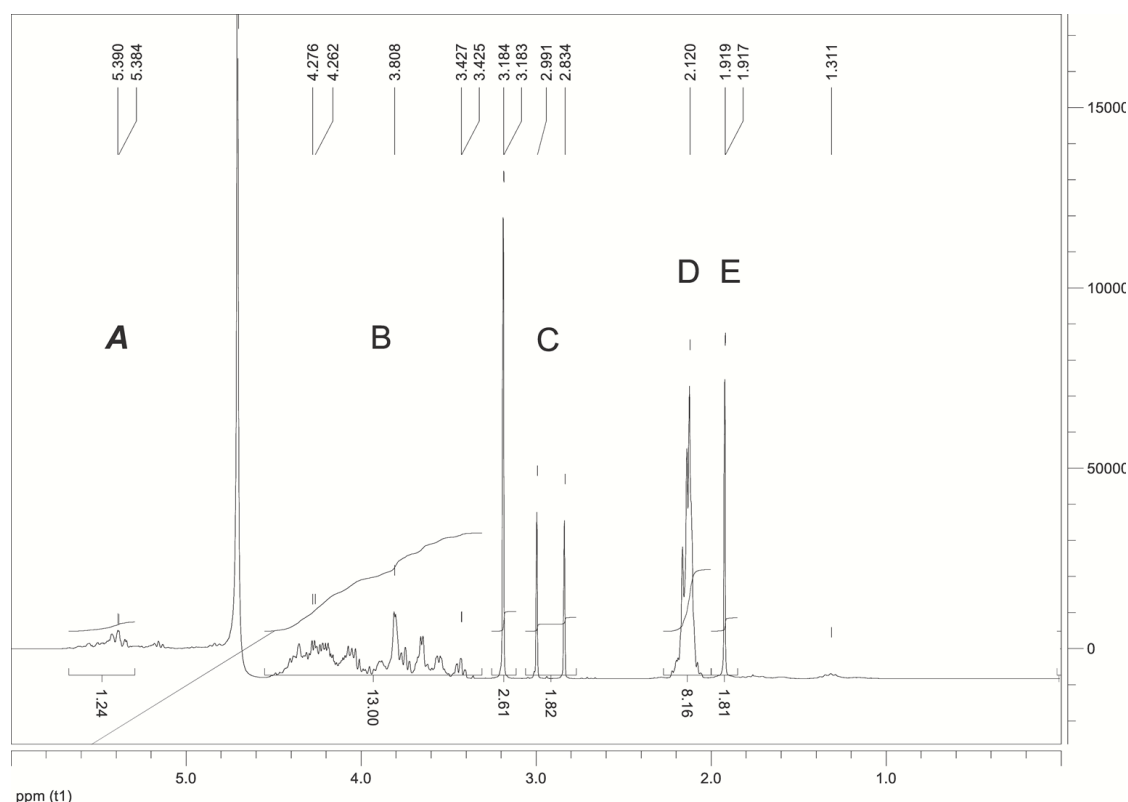


Рис. 3.2. ПМР- спектр ацетильованої сахарози при мольному співвідношенні сахароза : оцтова кислота = 1 : 4.

середній ступінь ацилування – середню кількість залишків оцтової кислоти, що приходить на одну молекулу сахарози. Так, якщо позначити інтенсивність сигналів метильної групи як  $I_{met}$ , сумарне значення інтенсивності сигналів від протонів гідроксильної групи як  $I_g$ , а значення сигналів протонів гідроксильних груп (як первинних так і вторинних) –  $I_h$ , та врахувати, що метильна група включає в свій склад 3 протони, початкова кількість протонів гідроксильних груп сахарози 8 (3 первинні і 5 вторинних), а загальна кількість протонів в кільцях – 14, то можна визначити ступені ацилування за формулами:

$$n_g = \frac{N_g \cdot I_{met}}{3I_g + I_{met}} \quad n_h = \frac{N_h \cdot I_{met}}{3I_h} \quad (3.1)$$

$$N_g = 8 \quad N_h = 14$$

де  $n_g$  – ступінь ацилування оцінена за співвідношенням сигналів протонів метильних та гідроксильних груп,  $n_h$  – ступінь ацилування оцінена за співвідношенням сигналів протонів метильних груп і протонів циклів,  $N_g$ ,  $N_h$  – кількість гідроксильних протонів в молекулі сахарози та кількість протонів циклу. Зрозуміло,

що при правильній інтерпретації спектрів ці дві оцінки повинні співпадати з точністю визначення інтегралів.

Для наведеного на рис. 3.2 спектру значення ступенів ацилування становить  $n_g=3.4$  та  $n_h=3.2$ . Розходження на 6% можна вважати задовільним співпадінням. Таким чином, у випадку проведення синтезу при мольному співвідношенні сахароза : оцтова кислота = 1:4 та температурі реакції 288 К в середньому з 8 гідроксильних груп ацилується 3,3 групи при теоретично можливих 4 (по завантаженню).

При аналізі ПМР-спектрів зразків ацетильованої сахарози протони метильної групи проявляються двома окремими сигналами: сигналом D ( $\delta=2.12$  м.д.) і сигналом E ( $\delta=1.92$  м.д.). Такий характер прояву сигналів від протонів метильної групи є характерним для всіх спектрів зразків (рис. 3.3). Дослідження спектрів ацетильованих сахаридів, описаних в літературних джерелах, дозволили зробити висновок, що сигнали E відповідають протонам залишків оцтової кислоти, які замістили водень первинної гідроксильної групи, а сигнали D відповідають заміщенню протонів вторинної гідроксильної групи. Співвідношення інтенсивності даних сигналів дозволяє оцінити співвідношення між заміщенням протонів первинної та вторинної гідроксильних груп. Зокрема, у випадку спектру, що наведений на рис. 3.2 така оцінка дозволяє стверджувати, що лише 28 % від всіх заміщень відбувалось біля первинних гідроксильних груп.

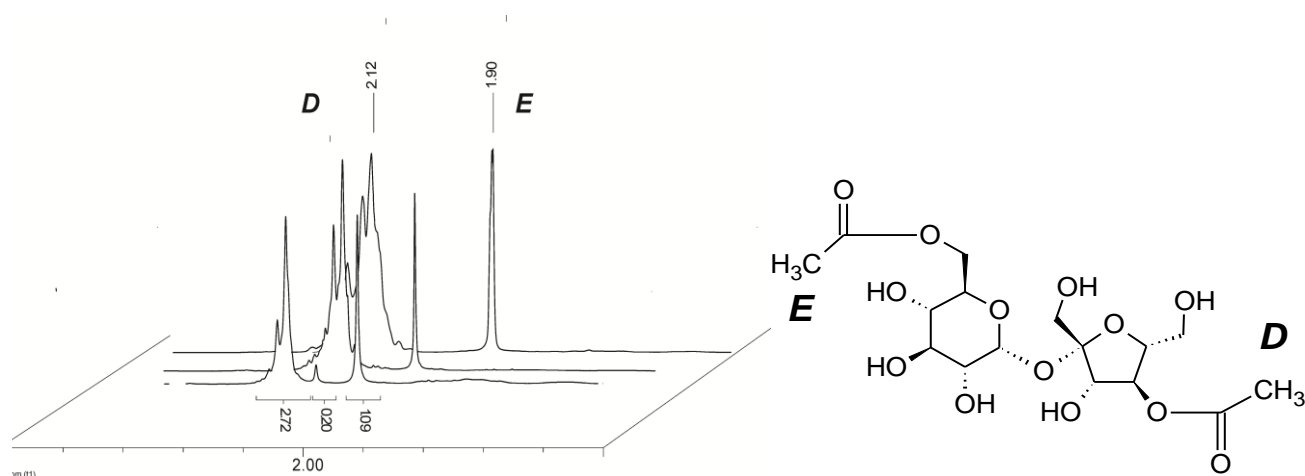


Рис. 3.3. Фрагменти ПМР спектрів в області метильних груп для різних зразків ацетильованої сахарози.

Крім ацетильованої сахарози, за розробленою методикою проведення синтезу, з реакційної маси був виділений побічний продукт N-циклогексил-N-(циклогексилкарбомоїл) ацетамід (РА, схема 3.5), що утворюється в результаті непродуктивного перегрупування активованої форми карбоксильної групи (схема 3.2 б). Структуру виділеного побічного продукту (схема 3.5) було підтверджено методом ПМР спектроскопії (рис. 3.4). Залежність виходу РА від умов проведення синтезу наведено у таблиці .

Проведені дослідження показали, що основними факторами, які визначають

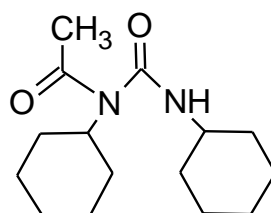


Схема 3.5. Структура побічного продукту (РА) взаємодії оцтової кислоти з сахарозою за реакцією Стегліха.

склад продуктів ацетилювання сахарози є співвідношення основних реагентів (оцтової кислоти (ОК) та сахарози (S)) та температури реакції. Результати цих досліджень приведені в таблиці . Зокрема, вихід DCU, який (в першому

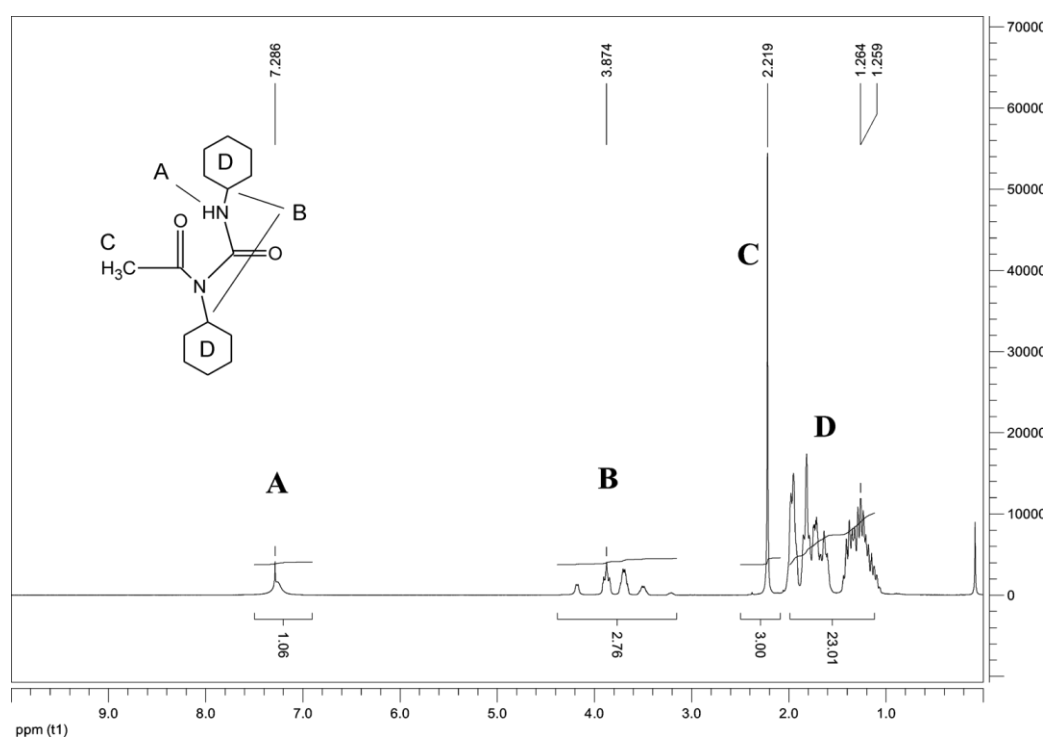


Рис. 3.4. ПМР спектр побічного продукту (РА) ацетилювання сахарози оцтовою кислотою за реакцією Стегліха.



приблизненні) можна вважати повнотою перебігу процесу і в більшості випадків він становить  $85 \div 92\%$ .

Таблиця 3.1. Характеристика перебігу процесу ацетилювання сахарози (С) оцтовою кислотою (ОК) за реакцією Стегліха і результати ПМР досліджень складу продуктів реакції. Мольне співвідношення ОК : DCC = 1 : 1,1.

Номер досліджу	Співвідношення		Температура, °C	Вихід DCU, %	Вихід РА на ОК, %	Вихід ацетильованої сахарози на С, %	Кількість ацетильованих залишків на молекулу С	Ефективність	Заміщення по первинних ОН, %
	С : ОК (мол.)	ОН : COOH							
1	2 : 1	16 : 1	12-15	--	--	33,4	1,3	0,82	27,2
2	1 : 2	4 : 1		92,1	13,5	76,0	2,0	0,80	17,5
3	1 : 4	2 : 1		93,6	11,1	83,5	3,2	0,84	13,7
4			30	87,1	18,5	65,0	2,4	0,56	
5			50	85,2	27,6	55,6	1,3	0,36	

В таблиці приведені виходи на виділені з реакційної маси продукти. Вихід DCU розрахований на завантажений DCC з врахуванням 10% надлишку, вихід РА розрахований на завантажену ОК, а вихід продукту на завантажену сахарозу.

При тому спостерігається значне пониження даної оцінки з підвищенням температури. Отримані значення в значній мірі є меншими ніж аналогічні, що приведені в роботах [166, 167] у випадку взаємодії N-похідних дикарбонових  $\alpha$ -амінокислот з діолами різної природи. Так в цих роботах приводиться вихід DCU  $97 \div 99\%$  при  $285 \div 288$  К проти  $92 \div 94\%$ , які наведені в таблиці. Пониження виходу супроводжується відносним збільшенням перебігу побічної реакції та нагромадження в реакційній масі РА.

Таким чином, в системі що досліджується в межах даної роботи, конверсія DCC є високою, але спостерігається більш інтенсивний перебіг побічної реакції, що і приводить до пониження виходу DCU. Поряд з тим, вихід ацетильованої сахарози (за виключенням досліджу 1, який був проведений при значній недостатці ОК) є достатньо високим –  $70 \div 80\%$ . Він практично не залежить від співвідношення реагентів (при умові  $1,2 \div 1,3$  мольному надлишку ОК) і це дозволяє стверджувати,

що реакцію Стегліха можна з успіхом використовувати для ацетилювання сахаридів в м'яких умовах.

Ці ж дані дозволяють відслідкувати вплив співвідношення реагентів на ступінь ацетилювання. Збільшення надлишку ОК приводить до логічного збільшення ступеня ацетилювання. При тому ацетильована сахароза із ступенем заміщення близьким до 1 отримується лише при мольній недостатці ОК (дослід 1) з пониженням виходу цільового продукту. При дворазовому надлишку ОК спостерігається отримання продукту із заміщенням близьким до 2. Подальше збільшення надлишку ОК приводить до відставання ступеня ацетилювання від прогнозованого до завантаження. Так при чотириразовому надлишку ступінь заміщення уже не перевищує 3,2. Збільшення надлишку ОК вище чотирьох приводить до певного підвищення заміщення, але воно починає суттєво відставати від прогнозованого по завантаженню.

Якщо під ефективністю заміщення розуміти відношення реального ступеню ацилювання сахарози до теоретично можливого з врахуванням перебігу побічної реакції, то дана величина, в межах точності проведених експериментів, не суттєво залежить від співвідношення реагентів і при проведенні реакції в температурному діапазоні 275 ÷ 288 К становить 80÷85%.

Стосовно оптимальної температури перебігу реакції. Одержані експериментальні дані добре узгоджуються з оптимальним температурним діапазоном проведення процесу, що приведений в роботі [166]. Оптимальною температурою слід вважати температурний діапазон 275÷288 К. Підвищення температури веде до пониження ефективності процесу прищеплення, суттєве пониження ступеню заміщення у порівнянні зі зразками одержаними в оптимальному температурному діапазоні, та збільшення виходу побічного продукту.

По серії проведених дослідів важливо відмітити також той факт, що не спостерігається домінування приєднання за первинною гідроксильною групою, яка повинна бути більш реакційно здатною в реакції нуклеофільного заміщення [169]. Так у випадку мольного співвідношення сахароза (С) : ОК = 2 : 1 (в таблиці), коли в реакційній масі є суттєвий надлишок гідроксильних груп до карбоксильних (16 : 1),

в тому числі надлишок первинних гідроксильних груп (6 : 1) кількість ацетильованих первинних груп від загальної кількості заміщених груп становить лише 27,2%. Це навіть менше ніж частка первинних гідроксильних груп, яких в сахарозі є 37,5% (три з восьми). Збільшення співвідношення основних реагентів в користь ОК приводить до зменшення частки заміщення гідрогену гідроксильної групи біля первинного карбону.

Таким чином, описані вище дослідження демонструють, що реакційна здатність вторинних гідроксильних груп зі складу сахарози є достатньо високою щоб забезпечити перебіг реакції Стегліха. Реакційна здатність карбоксильної групи та структура молекули кислоти мають певний вплив на особливості перебігу даної реакції. Оскільки одним із завдань даної роботи є одержання високомолекулярних модифікатів полісахаридів з амфіфільними властивостями, особливий інтерес представляє оцінка можливості перебігу процесу взаємодії молекул сахарози з вищими аліфатичними карбоновими кислотами.

На рис. 3.5 наведено ПМР спектр естеру стеаринової кислоти та сахарози, одержаному при мольному співвідношенні сахарози : стеаринової кислоти = 1 : 2. В

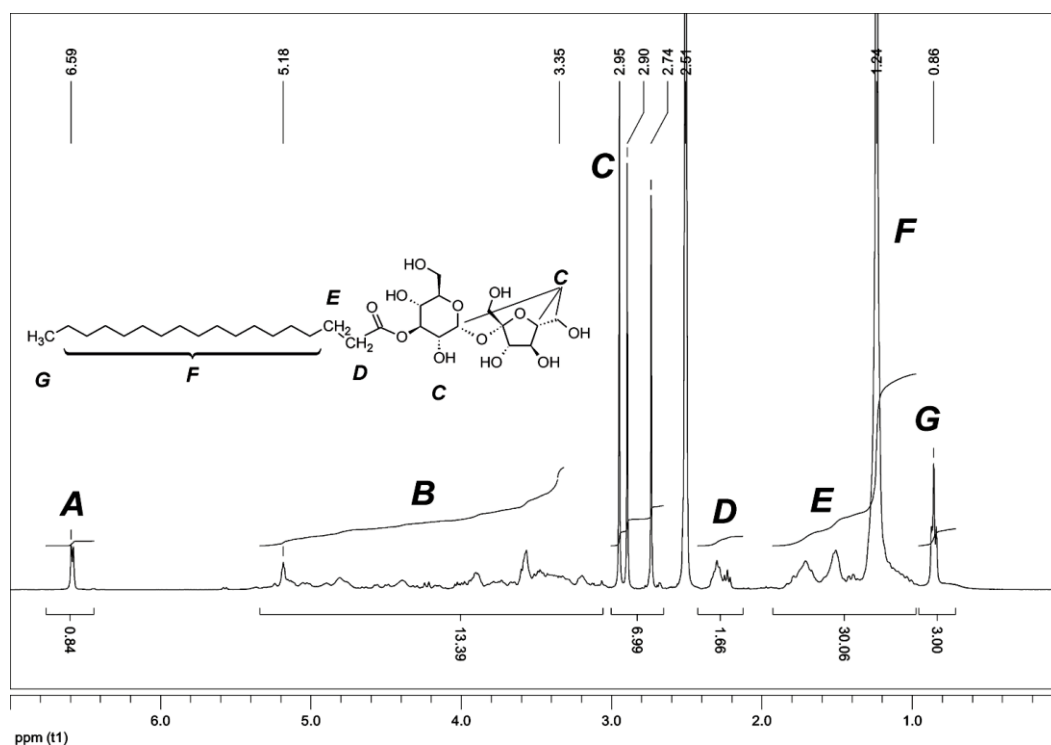


Рис. 3.5. ПМР спектр продукту взаємодії стеаринової кислоти з сахарозою при мольному співвідношенні стеаринова кислота : сахароза = 4 : 1

загальному даний спектр відповідає спектру взаємодії оцтової кислоти з сахарозою (рис. 3.2) з тією різницею, що фрагмент стеаринової кислоти в ПМР проявляється більш складною групою сигналів ніж фрагмент ОК. Зокрема, сигналам від стеаринової кислоти на спектрі відповідають сигнали G, F, E. Відношення інтенсивності цих сигналів добре узгоджуються з прогнозованими за структурною формулою, що підтверджує справедливість віднесення. Сигнали C відповідають протонам гідроксильних груп, а сигнали B і A протонам кільця. Як і у випадку взаємодії оцтової кислоти за рівнянням (3.1) можна розрахувати ступінь ацилування. За даними спектру (рис. 3.5) такий розрахунок приводить до значення 1,0 за оцінкою за протонами гідроксильних груп та 0,98 за протонами циклів сахарози. Близькі до цих значень заміщення (1,2 і 1,3) отримані при співвідношенні стеаринова кислота : сахароза = 4 : 1. Слід відмітити, що по даним таблиці при аналогічних співвідношеннях у випадку взаємодії сахарози і ОК значення ступеню ацилування становило 2,0 і 3,2, що є значно вищими. Таким чином можна стверджувати, що у випадку стеаринової кислоти реалізується значно менші ступені ацилування. Таке зменшення пов'язано не з пониженням реакційної здатності самої карбоксильної групи в стеариновій кислоті, оскільки реакція в обох випадках іде через одну і ту ж проміжну активовану форму, а через значні стеричні перешкоди спричинені аліфатичним фрагментом стеаринової кислоти.

На рисунку 3.6 приведено ПМР-спектр продукту взаємодії глутарової кислоти з сахарозою. Так як в межах даної роботи досліджуються особливості структурування полісахаридів N-похідними глутамінової кислоти, дослідження взаємодії глутарової кислоти з сахарозою можна розглядати як модельне дослідження полісахаридів з дикарбоновими кислотами. В загальному, спектр приведений на рис.3.6 повторює основні закономірності, що демонструвались на спектрах рис. 3.2 та 3.5. Разом з тим, спостерігаються дві особливості, що визначаються наявністю в молекулі двох карбоксильних груп. Зокрема, при співвідношенні глутарова кислота : сахароза = 2 : 1 за рівнянням аналогічним рівнянню(3.1), отримано ступінь ацилування 1,08 оцінений по протонах циклів та 1,25 по протонам гідроксильних груп.

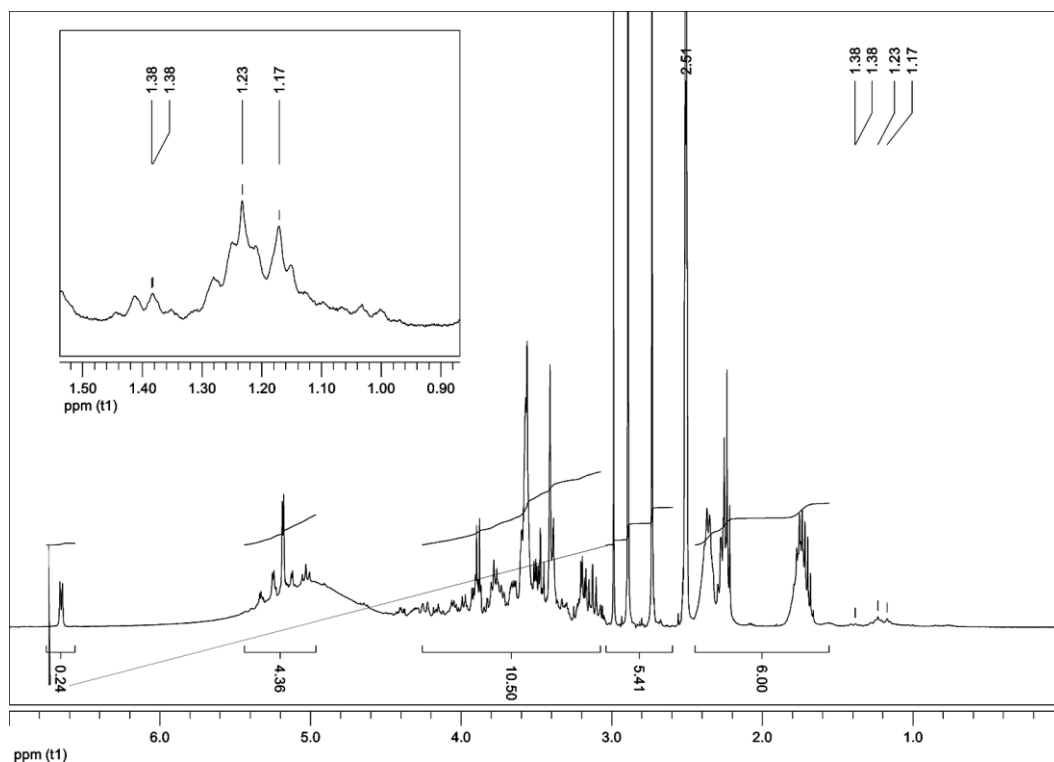


Рис. 3.6. ПМР спектр продукту взаємодії глутарової кислоти з сахарозою (при мольному співвідношенні глутарова кислота : сахароза = 2 : 1) за реакцією Стегліха.

Таке розходження між визначеними значеннями можна пояснити тим, що поряд з описаними вище продуктами, частково відбувається ацилування однією молекулою двох гідроксильних груп з утворенням циклічного дієстеру (схема 3.6.a). Це дозволяє пояснити розходження між визначеними ступенями ацилування. Якщо б утворювались лише циклічні естери, то ступінь заміщення становив би 1 і 2, відповідно.

Крім того, в спектрі рис. 3.6 в області зміщень 1,0 ÷ 1,5 м.д. проявляються

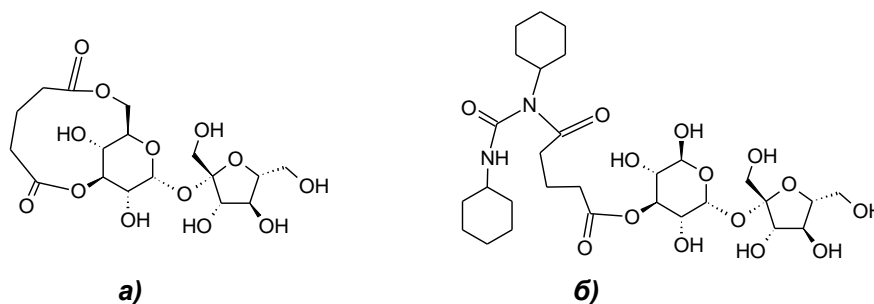


Схема 3.6. Приклади можливих структур продукту у випадку взаємодії глутарової кислоти з сахарозою за реакцією Стегліха.

сигнали аналогічні сигналам D ПМР-спектру побічного продукту (рис. 3.4) від протонів циклогексанових фрагментів в молекулі побічного продукту (схема 3.). У вище описаних спектрах такі сигнали не спостерігались, так як досліджувалась взаємодія з одноосновними карбоновими кислотами і утворений побічний продукт не входив у структуру молекули ацетильованої сахарози. У випадку дикарбонової кислоти можливе утворення ацильованої сахарози, структура якої приведена на схемі 3.6.б. За нею ацилювання відбувається за однією карбоксильною групою, а непродуктивне перегрупування активованої форми другої карбоксильної групи, приводить до утворення пасивного амідю, сигнали від протонів якого проявляються в спектрі в області 1,0 ÷ 1,5 м.д.

### 3.3. Особливості взаємодії N-похідних глутамінової кислоти з декстрином

В даній роботі досліджували взаємодію між полісахаридами та вищими алкільними N-похідними глутамінової кислоти. Як полісахариди використовували декстран та декстрин [170]. В якості N-похідних глутамінової кислоти використовували N-стеароїлглутамінову (Glu(St)) та N-лауреїлглутамінову кислоту (Glu(La)). Більшість досліджень проводили в середовищі N,N-диметилформамідю (DMFA), що обґрунтовувалось розчинністю реагентів. В межах проведених модельних досліджень було показано, що оптимальною для проведення даної реакції температурою є температурний діапазон 285 ÷ 288 К. Цей діапазон добре узгоджується з літературними даними [166, 167], в яких описані дослідження взаємодії N-похідних глутамінової та аспарагінової кислот з поліолами різної природи за реакцією Стегліха. Тому в ході досліджень цих реагентів з полісахаридами вплив температури проведення процесу не вивчалось.

Ґрунтуючись на проведених модельних дослідженнях, які викладені в попередньому розділі та літературних даних по структуруванню полісахаридів можна запропонувати наступні загальні схеми 3.8÷3.10 взаємодії полісахаридів з N-похідними глутамінової кислоти.

Зокрема, на першій стадії, відбувається ацилювання молекулою дикарбонової кислоти однією з гідроксильних груп полісахариду за схемою 3.8. В результаті такої взаємодії відбувається утворення полісахариду з введеною в його структуру

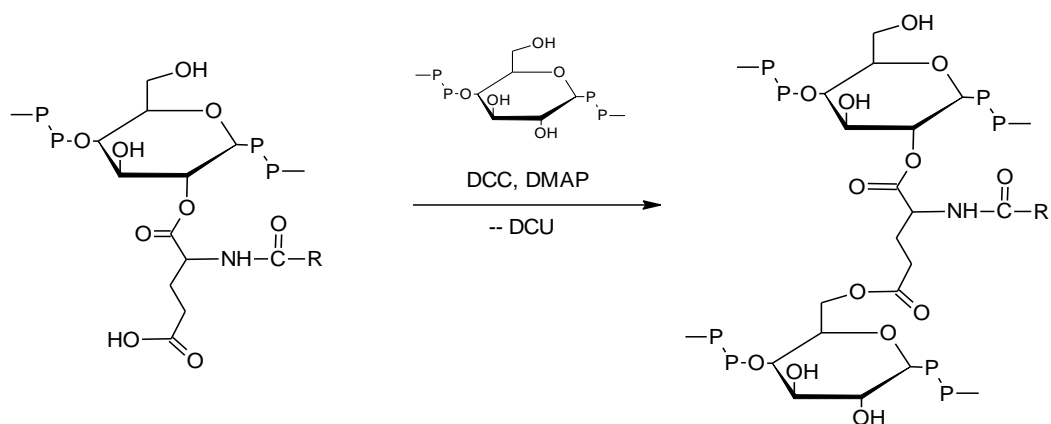


Схема 3.7. Взаємодія карбоксильної групи прищепленого до полісахаридного ланцюга залишку N-похідної глутамінової кислоти за реакцією Стегліха.

карбоксильною групою. Так як було показано, що в даній системі не спостерігається значної переваги в реакційній здатності первинних гідроксильних груп на схемах не акцентується окрема увага на положенні заміщення. В даній системі відбувається ацилування відбувається як первинними так і вторинними групами.

Подальші перетворення пов'язані з карбоксильними групами, що привиті до макромолекули полісахариду. Якщо карбоксильна група прийме участь в реакції Стегліха з гідроксильною групою іншої макромолекули полісахариду (схема 3.7) відбудеться перехресна зшивка двох макромолекул.

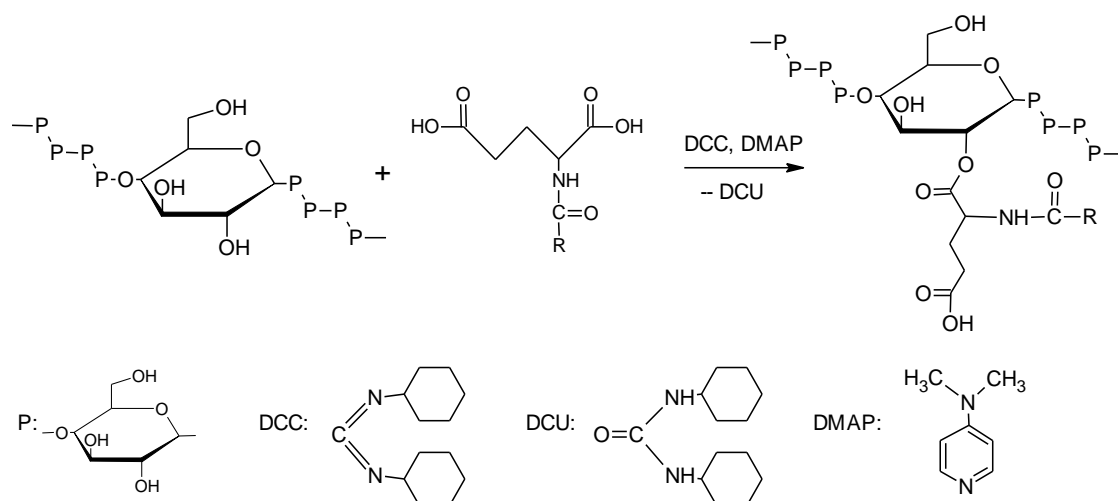


Схема 3.8. Взаємодія N-заміщеної похідної глутамінової кислоти з полісахаридом за реакцією Стегліха на першій стадії.

Оскільки на першій стадії до макромолекули полісахариду може прищепитись не одна, а декілька молекул дикарбонової кислоти, актів перехресної

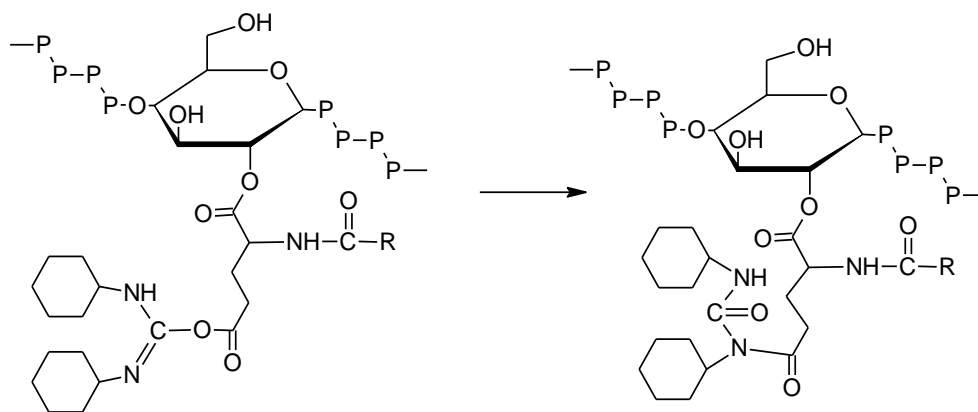


Схема 3.9. Перегрупування активованої форми карбоксильної групи залишку N-похідної глутамінової кислоти.

зшивки ланцюга за схемою 3.7 може бути більше одного. З другого боку, як показало модельне дослідження, не кожна прищеплена до макроланцюга полісахариду карбоксильна група буде брати участь в перехресній зшивці. Цьому процесу можуть не сприяти стеричні утруднення спричинені попередніми актами перехресної зшивки, а також, активована форма карбоксильної групи може непродуктивно перегрупуватись в пасивний амід за схемою 3.9. В результаті цього, процес перехресної зшивки за участю даного залишку дикарбонової кислоти не відбувається.

В загальному, маршрут утворення продукту схеми 3.9 може бути і іншим. Пасивування активованої карбоксильної групи вихідної дикарбонової кислоти може відбутися ще до її прищеплення до макромолекули. В такому випадку модифікований полісахарид уже утворюється завдяки атаці на нього дикарбонової кислоти з однією пасивованою карбоксильною групою. Проте, такий шлях слід вважати малоімовірним. Є достатньо, як експериментальних даних, одержаних в роботах [167], так і літературних підтверджень, що взаємодія глутамінової кислоти, або її N-похідних, відбувається через проміжне утворення внутрішнього ангідриду (схема 3.3). Перебіг першої стадії за цією схемою суттєво зменшує імовірність пасивування активованої форми карбоксильної групи до її прищеплення в ланцюгах. Тому слід вважати, що взаємодія за схемою 3.8 за участю N-похідних глутамінової кислоти відбувається з високим виходом.



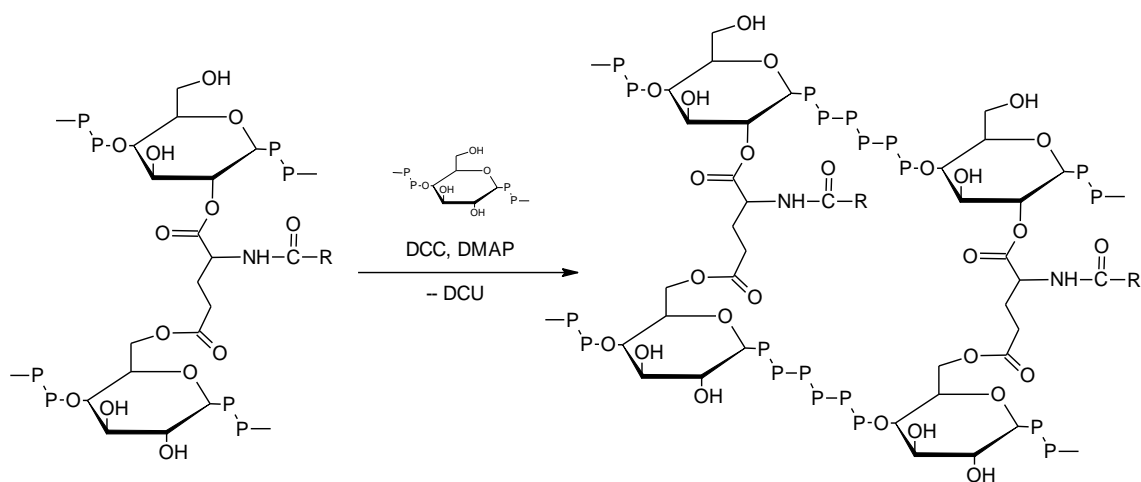


Схема 3.10. Взаємодія карбоксильної групи прищепленого до полісахаридного ланцюга залишку N-похідної глутамінової кислоти, що приводить до утворення просторово-структурованої будови макромолекули.

Нагромадження в реакційній масі перехресно зшитих макромолекул полісахаридів в структурі яких зберігаються карбоксильні групи приводить до повторних актів перехресної зшивки за схемою 3.10, та формування циклічних структур основного ланцюга (утворення просторово зшитого полімеру). Тобто, в реакційній масі повинні формуватись частинки мікротелю. Розвиток цього процесу приводить до суцільної гелезації реакційної суміші, основною ознакою чого є стрімке збільшення її в'язкості.

### 3.3.1. Залежність часу гелеутворення реакційної суміші від умов проведення реакції

Перебіг реакції за схемою 3.10, при забезпеченні певних умов, приводить до гелеутворення реакційної суміші – перетворення всієї маси в гелеподібну структуру у зв'язку з виникненням міжмолекулярної взаємодії через суттєве збільшення розміру просторово-структурованих макромолекул та їх кількості. Такий процес супроводжується стрімким, збільшенням динамічної в'язкості реакційної маси, що проілюстровано на рис. 3.7. Як можна побачити з приведеної залежності, до 1000 хвилин перебігу реакції спостерігалось рівномірне збільшення в'язкості реакційного середовища від 5÷10 сПз до 25÷30 сПз. Починаючи з 1050÷1080 хв. спостерігається стрімке збільшення в'язкості і при досягненні в'язкості 120 сПз реєстрація стає

неможливою. Точку перетину інтерполяційних прямих обох гілок кривої вважали часом гелеутворення.

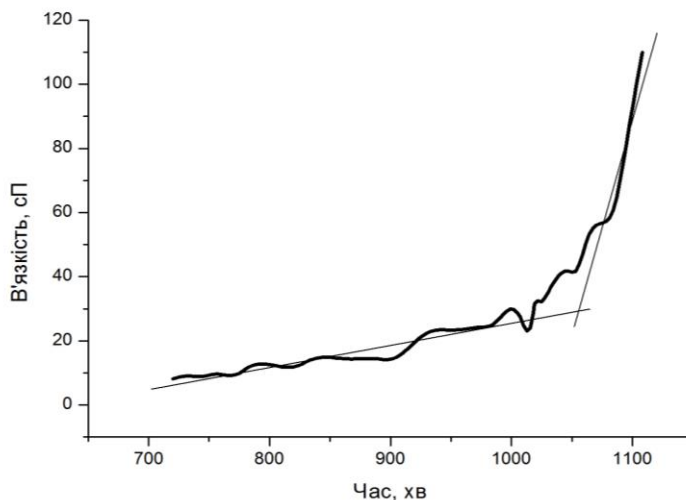


Рис. 3.7. Залежність в'язкості реакційної суміші від часу в ході взаємодії декстрину з Glu(St) при співвідношенні D : Glu(St) = 2: 1 при температурі 288 К та загальній концентрації реагентів 12 %.

Представляє певний інтерес дослідження залежності часу гелеутворення від умов проведення синтезу. Так як, в межах даного дослідження, температура проведення процесу обмежена вузьким температурним діапазоном 285÷291 К, то основними факторами, які можуть суттєво впливати на час гелеутворення є співвідношення між основними реагентами і їх загальна концентрація в реакційному середовищі.

Співвідношення між декстрином і Glu(St) можна змінювати в широкому діапазоні, а найбільш привабливим для досліджень діапазон загальної концентрації реагентів лежить від 5 ÷ 20%. При менших концентраціях реакційна маса є занадто розведеною, а при більш високих концентраціях початкова в'язкість реакційної суміші є занадто високою для якісного та швидкого перемішування всіх компонентів реакції. Тому залежність часу гелеутворення вивчали при співвідношенні функціональних груп декстрину : Glu(St) від 1 : 1 до 6 : 1 (ОН : COOH) при загальній концентрації реагентів в діапазоні 5 : 17,5 %. Попередні дослідження при загальній концентрації від 5 до 14% співвідношенні від 2 : 1 до 2,5 : 1 (ОН : COOH) показали відсутність гелеутворення протягом 28 годин.

За 21 годину, при даній температурі, конверсія реагентів досягає значень більше 95%. В такому випадку на 28 годину гелеутворення не відбудеться. Завдяки цьому, діапазони впливових факторів при дослідженні залежності часу гелеутворення були звужені. В таблиці 3.2 приведено ортогональний двофакторний план проведення експерименту по визначенню залежності часу гелезації від умов синтезу. Для зручності математичного опису в якості факторів в цьому плані вибрано загальну концентрацію ( $x_1$ ) та відношення кількості карбоксильних до гідроксильних груп ( $x_2$ ). Необхідність постановки двофакторного плану пов'язана з тим, що передбачався синергетичний вплив факторів.

Таблиця 3.2. Ортогональний план експерименту встановлення впливу загальної концентрації та співвідношення на час гелеутворення при взаємодії декстрину з Glu(St) за реакцією Стегліха при 288 К

План експерименту				Час гелеутворення, хв
В натуральних величинах		В координатах плану		
Концентрація, %	Співвідношення	Концентрація, %	Співвідношення	
C	s	$x_1$	$x_2$	$\tau_g$
15,00	0,4	-1	-1	1515
17,36	0,4	1	-1	1060
15,00	0,5	-1	1	865
17,36	0,5	1	1	1065
16,25	0,45	0	0	990
16,25	0,45	0	0	940
16,25	0,45	0	0	950

Стандартна обробка ортогонального плану дозволила описати залежність часу гелеутворення ( $\tau_g$ , хв.) від загальної концентрації реагентів та їх співвідношення в масштабі плану ( $x_1$  та  $x_2$  відповідно) наступним рівнянням:

$$\tau_g = 1130 \pm 50 - 60 \pm 20 \cdot x_1 - 160 \pm 30 \cdot x_2 + 160 \pm 30 \cdot x_1 \cdot x_2. \quad (3.2)$$

Дисперсія відтворюваності  $s_v^2$  становить 700 проти дисперсії адекватності  $s_a^2$  4543, оцінка емпіричного значення критерію Фішера становить  $s_a^2 / s_v^2 = 6,49$ .

На 95% довірчій ймовірності при даних степенях свободи критичне значення критерію Фішера становить 19,2. Оскільки емпіричне значення критерію є меншим за критичне, одержане рівняння слід вважати адекватним і немає необхідності, для його уточнення реалізувати композиційний план.

На рис. 3.8 приведена поверхня залежності часу гелеутворення від значення факторів, побудована за рівнянням (3.2). Така поверхня дозволяє наочно проаналізувати вплив факторів. За її характером можна прогнозувати, що збільшення співвідношення приводить до значимого зменшення часу гелеутворення. Вплив загальної концентрації є менш вагомим. При низьких значеннях співвідношення вплив загальної концентрації реагентів є очікуваним – збільшення загальної концентрації реагентів приводить до деякого зменшення часу гелеутворення. Збільшення загальної концентрації реагентів при високих значеннях співвідношення приводить до значимого збільшення часу гелеутворення. Даний експериментальний факт не має очевидного пояснення в межах цього дослідження. До певної міри цей факт пояснюється при аналізі структури одержаних

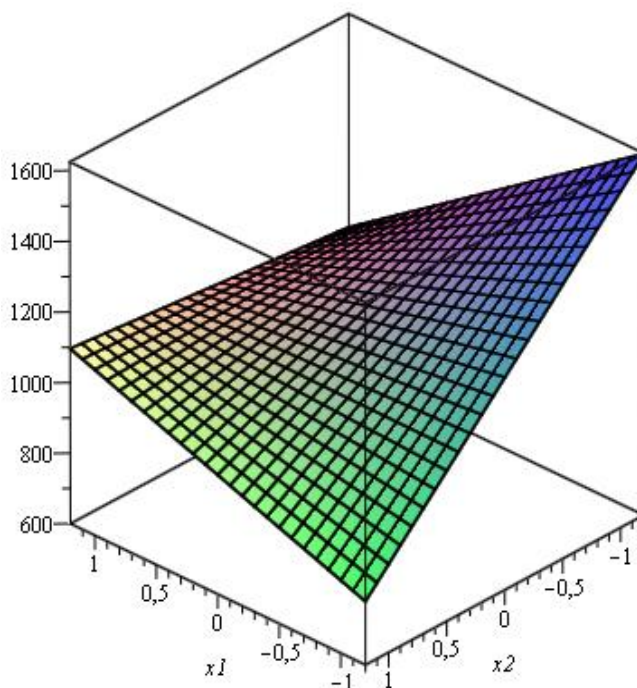


Рис. 3.8. Поверхня залежності часу гелеутворення від загальної концентрації ( $x_1$ ) та співвідношення реагентів ( $x_2$ ) в координатах ортогонального плану.

макромолекул за даними ПМР-спектроскопії. Як і очікувалось одночасне збільшення концентрації і співвідношення приводить до збільшення часу гелеутворення.

Рівняння (3.2), яке записане в координатах плану дозволяє відносно легко орієнтуватись в значимості факторів, але для більш детального аналізу його доцільно перетворити в натуральні одиниці:

$$\tau_g = 24500 \pm 170 - 1350 \pm 350 \cdot \%C - 50000 \pm 1000 \cdot s + 2800 \pm 600 \cdot \%C \cdot s \quad (3.3)$$

Отримане рівняння (3.3) задовільно прогнозує залежність часу гелеутворення в діапазоні концентрацій 12÷20 % та співвідношенні реагентів 0,35 ÷ 0,55 (COOH : OH). Але воно не враховує, що час гелеутворення не може бути більшим за 1600÷1700 хв, оскільки за цей час, вичерпуються реагенти в реакційній суміші. Іншими словами час гелеутворення не може бути більшим 1600 – 1700 хв. Накладання цієї умови на рівняння (3.3) дозволяє одержати реальну залежність часу гелеутворення від умов синтезу. Для зручності така залежність приведена на рисунку 3.9.

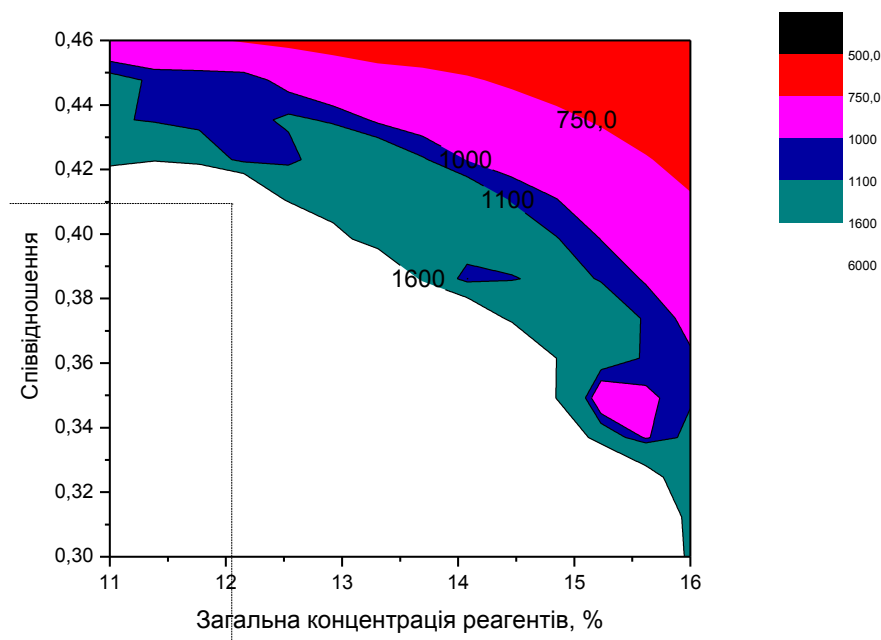


Рис. 3.9. Залежність часу гелеутворення від загальної концентрації реагентів та їх співвідношення при взаємодії декстрину з Glu(St) по реакції Стегліха при 288 К

Оскільки метою даної роботи є розробка методу одержання поліестерів придатних до формування водних само-стабілізованих дисперсій або дисперсій мікрогідрогелів, процес загальної гелезації реакційної суміші є небажаним по ряду причин. Отримана залежність дозволяє окреслити область умов проведення синтезів, при яких, на високих ступенях конверсії не спостерігається гелеутворення. Вільна зона на цьому рисунку відповідає умовам при яких не реалізується загальна гелезація реакційної маси. Таким чином основні дослідження по створенню полімерного матеріалу медичного призначення проводились при концентрації 12% і менше та при співвідношенні реагентів від 0,5 (що у співвідношенні функціональних груп становить  $\text{OH} : \text{COOH} = 2:1$ ).

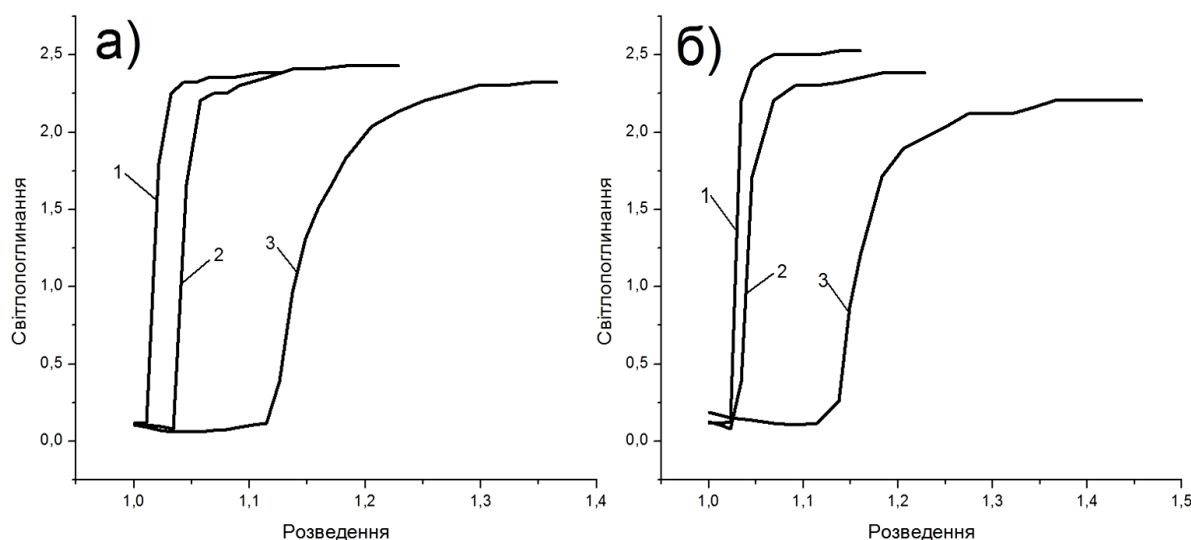


Рис. 3.10. Турбідиметричні криві титрування реакційної суміші а ) метанолом, б) водою після відділення з неї осаду DCU. Синтези проводились при різних співвідношеннях гідроксильних до карбоксильних груп 1) 2,5:1; 2) 3:1; 3) 6:1.

### 3.3.2. Дослідження впливу умов проведення процесу на вихід та склад продуктів реакції

Дослідження залежності часу гелеутворення продемонстрував, що співвідношення реагентів є вагомим фактором впливу на перебіг реакції, що досліджується. Про вагомність даного чинника можна судити за даними турбідиметричного титрування реакційної суміші, одержаної при різному співвідношенні реагентів після проведення реакції, метиловим спиртом та водою (рис. 3.10).

Збільшення співвідношення між декстрином і Glu(St) приводить до суттєвого збільшення розведення при якому відбувається осадження продукту реакції. В загальному, така залежність повинна свідчити про збільшення середньої молярної маси полімерного продукту реакції. Але, в даному дослідженні, таке твердження не може бути однозначним, тому що зі зміною співвідношення суттєво змінюється природа отриманого полімеру через різну ступінь модифікації (схема 3.8). Крім того, збільшення молярної маси полімеру в системі, яка досліджується в межах даної роботи, відбувається як за рахунок полімер-аналогічних перетворень – модифікації полісахаридного ланцюга так і за рахунок перехресної зшивки за схемою 3.7 та об'ємного структурування за схемою 3.10. В результаті перебігу цих процесів утворюється або полімерний матеріал з розгалуженою структурою основного ланцюга, або структурований в об'ємі полімерний матеріал. Відомо [171], що настільки суттєва зміна в структурі макромолекул не може бути однозначно інтерпретована в таких аналізах як турбідиметричне титрування та гель-проникна хроматографія.

Разом з тим, турбідиметричне титрування в сукупності з гравіметричним дослідженням осаджених фракцій та ПМР-дослідження їх структурі дозволили розробити методику розділення реакційної суміші на дві основні фракції. Було показано, що осадження метанолом приводить до виділення фракцій полімеру, полімерний ланцюг яких просторово-структурований. Для простоти обговорення результатів фракцію, осаджену метанолом, будемо називати “гель-фракцією”. В розчині, при осадженні метанолом, залишається фракція, яка в основному складається з модифікованих молекул полімеру (схема 3.7) та розгалуженою структурою макромолекул (схема 3.10). В подальшому фракція полімеру, що залишається в розчині, після осадження гель-фракції метанолом будемо називати “золь-фракцією”.

При осадженні водою (рис 3.10 б) з реакційної маси осаджуються одночасно як золь- так і гель-фракції. В розчині, при осадженні з реакційної маси водою в основному залишається полісахарид, що не вступив в реакцію, якщо такий присутній в реакційному середовищі.

На основі вищеописаних досліджень та гравіметричних оцінок кількості фракцій було розроблено методику розділення реакційної суміші. Дана методика приведена в розділі 2.2.4 і при подальшому обговоренні наводяться виходи різних фракцій відповідно цій методикою.

Результати досліджень впливу співвідношення реагентів на вихід золь- та гель-фракцій та деякі їх властивості приведені в таблиці 3.3. З наведених даних можна побачити, що у всіх проведених синтезах було одержано високий вихід DCU. В межах системи реакцій, яка досліджується, високий вихід DCU означає досягнення значної загальної конверсії процесу.

Таблиця 3.3. Умови проведення синтезу, значення виходу DCU, гель- та золь-фракцій, окремі характеристики одержаних продуктів. Температура 288 К. Загальна концентрація реагентів 12%. Час реакції 22÷24 годин.

Зразок	Співвідношення ОН : COOH груп	Кількість реагентів на моль декстину, моль		Вихід, %			Характеристика		
		Кислота	DCC	DCU	Гель-фракція	Золь-фракція	Гель-фракція		Золь-фракція
							Максимальн а ступінь набрякання в воді*, %	Йодна проба	Йодна проба
DS2**	2:1	0,75	1,65	102	81,8	18,2	нз	-	
DS3	3:1	0,5	1,1	96	66,7	33,3	нз	-	+
DS4	4:1	0,375	0,825	111	66,0	34,1	нз	-	+
DS6	6:1	0,25	0,55	92	70,6	29,4	нз	-	+
DS8	8:1	0,188	0,413	97	69,7	30,3	нз	-	+
DS10	10:1	0,15	0,33	82	73,3	26,7	<5	-	+
DS15	15:1	0,1	0,22	87	82,1	17,9	382	+/-	+
DS20	20:1	0,075	0,165	80	65,1	13,9	~700/д	+	+
DS30	30:1	0,05	0,11	115	55,7	12,4	д	+	+
DS40	40:1	0,038	0,083	110	42,1	9,1	д	+	+
DS6***	6:1	0,25	0,275	95,1	28,0	71,5	д	+	--

\* нз – гідрофобний, не змочується водою, д – диспергується в воді; \*\* – дослід поставлений в умовах, коли можливе загальне гелювання реакційної суміші, \*\*\* – дослід поставлено в умовах половинної недостаті DCC.

У всьому діапазоні досліджень при ацилуванні Glu(St) декстину з реакційній суміші виділяється як золь- так і гель-фракції в значимих кількостях. На рисунку



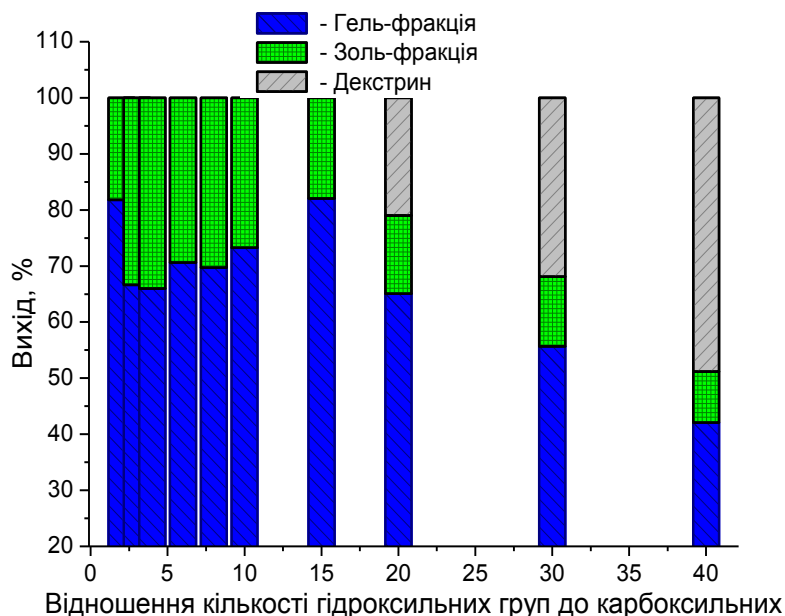


Рис. 3.11. Залежність виходу продуктів реакції та кількість непрореагованого декстрину при його взаємодії з Glu(St) за даними таблиці 3.3.

3.11 приведена залежність цих фракцій графічно. Спостерігається найвищий вихід гель-фракції (82 %) при співвідношенні 15 : 1 (ОН : СООН). Як збільшення цього співвідношення так і зменшення приводить до значного зменшення гель-фракції. Кількість золь-фракції до співвідношення 10 : 1 є приблизно постійною і становить ~ 30 %. Далше її кількість стрімко зменшується. Сумарний вихід золь- і гель-фракцій до співвідношення 15 : 1 (ОН : СООН) близький 100 %, що свідчить про практично повну конверсію декстрину. Подальше збільшення кількості декстрину по відношенню до Glu(St) приводить до появи декстрину, що не вступив у реакцію або його ступінь модифікації була настільки незначною, що він не втратив здатність розчинятись у воді. При співвідношенні більше 40 : 1 (ОН : СООН) кількість такого декстрину може становити вище 45 %. Тому проводити процес при співвідношеннях більше 30 : 1 (ОН : СООН) при якому сумарний вихід золь- і гель-фракцій становить 68 – 70 % не доцільно.

З цієї закономірності випадає лише дослід, який в таблиці 3.3 представлений зразком DS2. В цьому досліді незаконірно високий вихід гель-фракції при відносно малому виході золь-фракції. Слід зауважити, що даний дослід отриманий

при співвідношенні 2 : 1 (ОН : COOH). Це єдиний зразок, що включений в таблицю, умови одержання якого, за даними рис. 3.9, можуть привести до загальної гелезації реакційної суміші. Для отримання зразків гель- та золь-фракцій в даному експерименті, реакція була перервана перед загальним гелюванням. Включення цього зразка в загальний ряд показує, що подальше зменшення співвідношення в користь карбоксильних груп приводить до збільшення кількості гель-фракції. Із вище сказаного виходить, що збільшення співвідношення як в користь кислоти так і в користь декстрину веде до збільшення виходу гель-фракції, і при співвідношенні гідроксильних груп до карбоксильних в області (3÷5) до 1 спостерігається мінімум виходу гель-фракції. Але слід розглядати два, в принципі близьких, але все-таки різних процеси. При збільшенні співвідношення в користь кислотних груп відбувається загальна гелезація реакційної суміші, дослідження границі перебігу якої описано в попередньому розділі.

При тому, не слід розуміти це таким чином, що загальна гелезація це 100% вихід гель-фракції. Просто, у такому випадку відбувається утворення макрогелю. В макрогелі в значній кількості може бути присутня золь-фракція. Для виявлення кількості в ній золь-фракції слід змінити методику її виділення. Наприклад, виділяти її метанолом в екстракторах проточного типу. Але вміст золь-фракції в гелезованій реакційній суміші не досліджувався в межах даної роботи.

Зміщення ж співвідношення в користь гідроксильних груп приводить до утворення в реакційній суміші, як буде обґрунтовано далі, частинок мікрогелю, які в межах даного дослідження називаються гель-фракцією. При тому, як демонструє матеріал попереднього розділу, розвиток даного процесу у вибраних умовах не приводить до загального гелювання реакційної суміші.

Таким чином, за обраною методикою проведення експерименту, розглядається два основних продукти реакції взаємодії N-похідної глутамінової кислоти з декстрином, які принципово відрізняються один від одного. Це гель- та золь-фракції одержаного полімерного матеріалу. Принципова відмінність полягає в їх відношенні до метанолу. Золь-фракція необмежено набрякає в метанолі і утворює в ньому розчини, які за своїми властивостями можуть утворювати розчини близькі до

істинних. Гель-фракція осаджується метанолом з органічних розчинників. Вона доволі сильно, але все таки, обмежено набрякає в таких розчинниках, як N,N-диметилформаїд та диметилсульфоксид. Відношення до води у цих двох продуктів також різне. Золь-фракція, що одержана практично при всіх співвідношеннях реагентів на стадії її одержання необмежено набрякає у воді і утворює самостабілізовані колоїдні розчини, про що буде іти мова в наступних розділах. Відношення гель-фракції до води не є однозначним. Зразки гель-фракції, які одержані до співвідношення гідроксильних до карбоксильних груп як 8 : 1 (таблиця 3.3) представляють собою сильно гідрофобні порошки. Зразок, що одержаний при співвідношенні  $\text{OH} : \text{COOH} = 10 : 1$  (DS10H), має проміжні властивості – він змочується водою, але його набрякання у воді сильно обмежене. Зразки до співвідношення 20 : 1 ( $\text{OH} : \text{COOH}$ ) набрякають у воді з різною максимальною ступеню набрякання, але при тому не диспергуються в ній. Для зразка, DS20H ступінь набрякання на приборі Догадкіна вдалось поміряти до 700. Але це не можна рахувати максимальним ступенем набрякання, тому що даний зразок, після набрякання, просто диспергувався з утворенням грубої але доволі агрегатно-стійкої дисперсії. Подальше збільшення співвідношення в користь гідроксильних груп приводиться до утворення зразків гель-фракції які швидко набрякають у воді і утворюють в ній дисперсії. При тому, на відміну від зразків золь-фракції, набрякання у воді в них залишається обмеженим.

Подібна залежність властивостей гель-фракції спостерігається і у відношенні до проби на йод (таблиця 3.3). Якщо полімерний матеріал золь-фракції, при поміщенні його в спиртовий розчин йоду, дає характерне для декстрину забарвлення, то відповідне забарвлення полімерного матеріалу гель-фракції утворюється лише якщо синтез проводився при співвідношенні 15 : 1 ( $\text{OH} : \text{COOH}$ ) і більше.

Узагальнюючи одержані експериментальні дані, можна стверджувати, що полімерний матеріал золь-фракції це макромолекули декстрину, модифікація яких, з певних причин, завершилась на стадії, що відображені схемами 3.8 та 3.7. В результаті чого в цих зразках домінують модифіковані макромолекули з

розгалуженою структурою макроланцюга. У випадку макромолекул гель-фракції процес модифікації реалізувався, в тому числі, і за схемою 3.10. Завдяки цьому в зразках гель-фракції домінують макромолекули з просторово-структурованою структурою – полімерні об'ємні сітки.

Звичайно, співвідношення між цими двома формами продукту модифікації визначає ступінь модифікації та глибина перетворення, що досягається в ході хімічного процесу. Але уже на невисоких ступенях перетворення спостерігається як утворення гель- так і золь-фракцій. В ході перебігу процесу змінюється співвідношення між ними та властивості гель-фракції. Це добре ілюструє зразок DS6\*\*\*, який отриманий у тому ж співвідношенні, що і зразок DS6 але у половинному до еквіваленту завантаженні DCC. Можна б було очікувати, що при такому завантаженні, процес зупиниться на стадії модифікації полісахариду за схемою 3.8. Експериментально це не спостерігається. З реакційної суміші було виділено як золь- так і гель-фракції. Змінилися лише співвідношення виходів в користь золь- фракції та властивості гель-фракції у порівнянні із зразком DS6.

Слід вважати, що виходи золь- та гель-фракцій та їх властивості визначаються ступенем модифікації і ступенем структурування макромолекул полісахариду. Тому доцільним є дослідження структури одержаних продуктів.

### **3.3.2.1 ПМР дослідження складу продуктів реакції**

Як було показано при обговоренні результатів модельного дослідження (розділ 3.2) взаємодії оцтової кислоти з сахарозою, ПМР-спектроскопія дозволяє отримати значну кількість інформації про склад і структуру одержаного продукту.

На рис. 3.12 наведено ПМР-спектри зразків золь-фракції DS20Z (а) та DS2Z (б). Віднесення протонів даних спектрів приведено на схемі 3.11. Від спектрів модельного дослідження приведені спектри, в першу чергу відрізняються протонами зі складу залишку Glu(St). Зокрема сигналами протонів метильної групи алкільного фрагменту (А) зі зміщенням 0,859 м.д., метиленових груп цього ж фрагменту молекули (В та С) зі зміщенням 1,24 м.д., а також протонами глютамінової кислоти (D і E). Наявність цих сигналів, в першу чергу, підтверджує перебіг реакції за схемами 3.8 ÷ 3.10.

Аналіз інтенсивності сигналів в спектрі рис.3.2.а добре узгоджуються з структурою молекули з врахуванням ступеню заміщення. Таким чином даний ПМР-спектр, як і у випадку модельного дослідження, добре узгоджується зі структурою поліестеру і дозволяє оцінити його склад і ступінь заміщення за рівнянням (3.1) для оцінки ступеню заміщення при значеннях  $N_g=3$  та  $N_h=6$ .

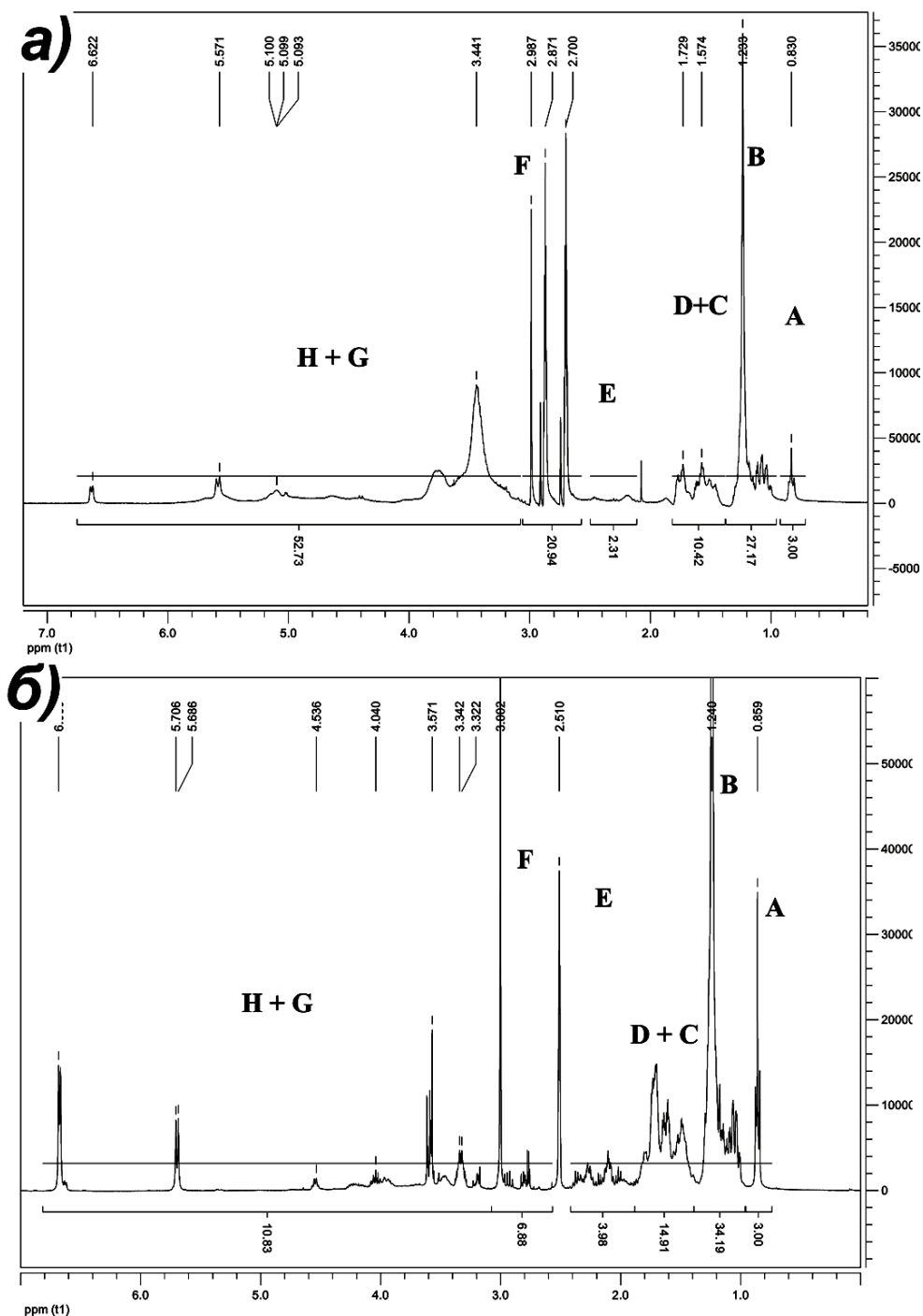


Рис. 3.12. ПМР спектри зразків золь-фракції зразків а) DS20Z та б) DS2Z.

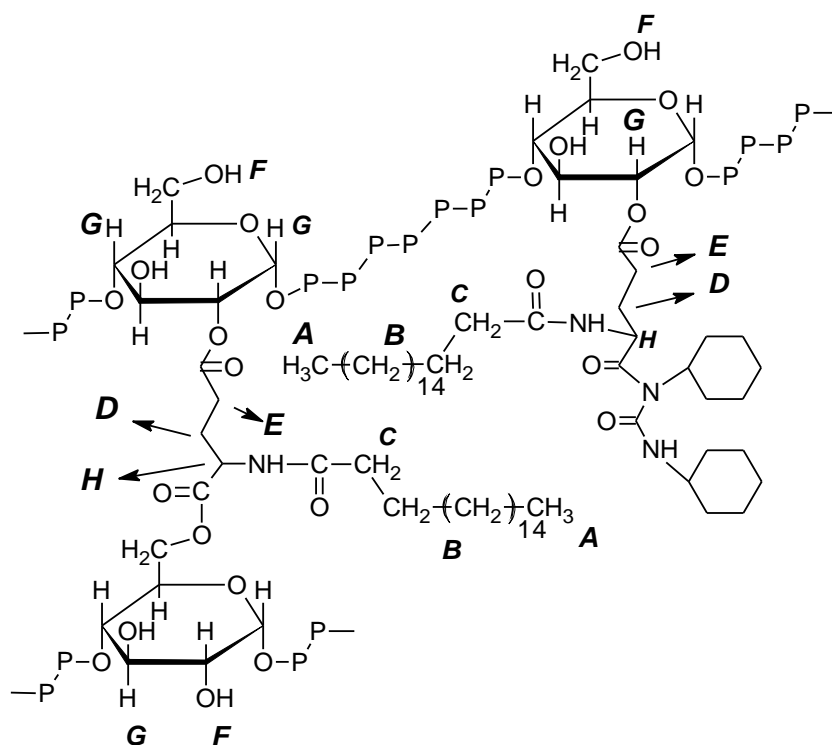


Схема 3.11 Віднесення сигналів протонів для спектрів DS20Z та DS2Z

В противагу до спектра для зразка DS20Z у спектрі зразка DS2Z (рис. 3.12.6) немає повного узгодження між сигналами. Спостерігається добре узгодження між інтенсивностями сигналів від протонів метильної групи (A), протонами гідроксильних груп (F) та протонами воднів глюкопіранозних залишків (G). Таке узгодження дозволяє використовувати рівняння (3.1) для розрахунку ступеня заміщення. Але інтенсивність сигналів від протонів B, D і C сильно завищена у порівнянні з інтенсивністю сигналів A. Таке завищення інтенсивності сигналів особливо помітне для спектрів зразків, що одержані з великою кількістю дикарбонової кислоти. Так, якщо для спектру зразка DS20Z це завищення становить  $8 \div 10\%$  і ще може бути пояснене похибкою запису спектру, то у випадку спектру зразка DS2Z відхилення інтенсивності досягає  $45 \div 50\%$ , і уже не може бути пояснене жодними приладними похибками. Тим більше що спостерігається систематичне збільшення цього типу відхилення при зростанні вмісту кислоти в реакційній масі.

Результати одержані в ході модельного дослідження по виділенню та ідентифікації продукту непродуктивного перегрупування активованої форми

кислоти (схема 3.2, схема 3.5, ПМР спектр рис. 3.4) дозволяють пояснити відхилення в спектрах, що спостерігаються. Зокрема, перегрупування приводить до утворення пасивного амідів в структуру якого входить два циклогексанових кільця що містять 20 протонів. На ПМР спектрі (рис. 3.4) ці протони проявляються складним сигналом в діапазоні зміщення  $1,0 \div 2,0$  м.д.

У випадку взаємодії декстрину з Glu(St) найбільш вірогідніша реакція пасивування активованої форми карбоксильної групи протікає по схемі 3.9 і, як результат, протони циклогексанових циклів включаються в молекулу поліестеру. Оскільки одне таке включення приводить до появи 20 протонів, то навіть перегрупування відносно незначної частки карбоксильних груп в пасивний амід, приводить до суттєвого спотворення інтенсивності сигналів в області зміщень  $1,0 \div 2,0$  м.д., що і спостерігається. За даними модельного дослідження, при високих співвідношеннях в користь кислоти (таблиця 3.1), до  $10 \div 14\%$  карбоксильних груп можуть піддатися непродуктивному перегрупуванню при температурі проведення процесу 288 К.

Для процесу, який досліджується в межах даної роботи, це має доволі важливе значення, так як непродуктивне перегрупування активованої форми карбоксильної групи блокує перебіг процесу перехресного структурування молекул полісахаридів за схемами 3.7 та 3.10. В результаті цього, замість одержання продуктів структурування полісахаридних ланцюгів, в реакційному середовищі нагромаджуються продукти їх модифікації. Оскільки спотворення інтенсивності сигналів в спектрах продуктів взаємодії спричинено непродуктивним перегрупуванням, цей факт може бути використаний для кількісної оцінки його частки. Якщо надлишок інтенсивності сигналів в області зміщень  $1,0 \div 2,0$  м.д. рахувати як прояв складного сигналу від 20 протонів циклогексанових фрагментів, що накладаються на сигнали від залишку Glu(St) (крім сигналів від 3 протонів метильної групи алкільного ланцюга стеаринової кислоти зі зміщенням 0,84 м.д.) тоді частка залишків молекули Glu(St) з однією пасивованою карбоксильною групою від загальної кількості прищеплених молекул Glu(St) до полісахаридних ланцюгів можна оцінити за формулою:

$$\nu_p = \left( \frac{3 \cdot I_\Sigma}{I_{met}} - N_\Sigma \right) \cdot \frac{3}{20 \cdot I_{met}}, \quad (4.4)$$

де  $I_\Sigma$  – сумарна інтенсивність сигналів в області зміщень 1,0÷2,0 м.д. (сумарна інтенсивність сигналів В, С, D, E),  $N_\Sigma$  – кількість протонів в кислотному залишку (крім трьох протонів метильної групи, сигнал А), у випадку Glu(St)  $N_\Sigma = 36$ ,  $I_{met}$  – інтенсивність сигналу від протонів метильної групи. В таблиці 3.4 наведені результати розрахунку за даною формулою.

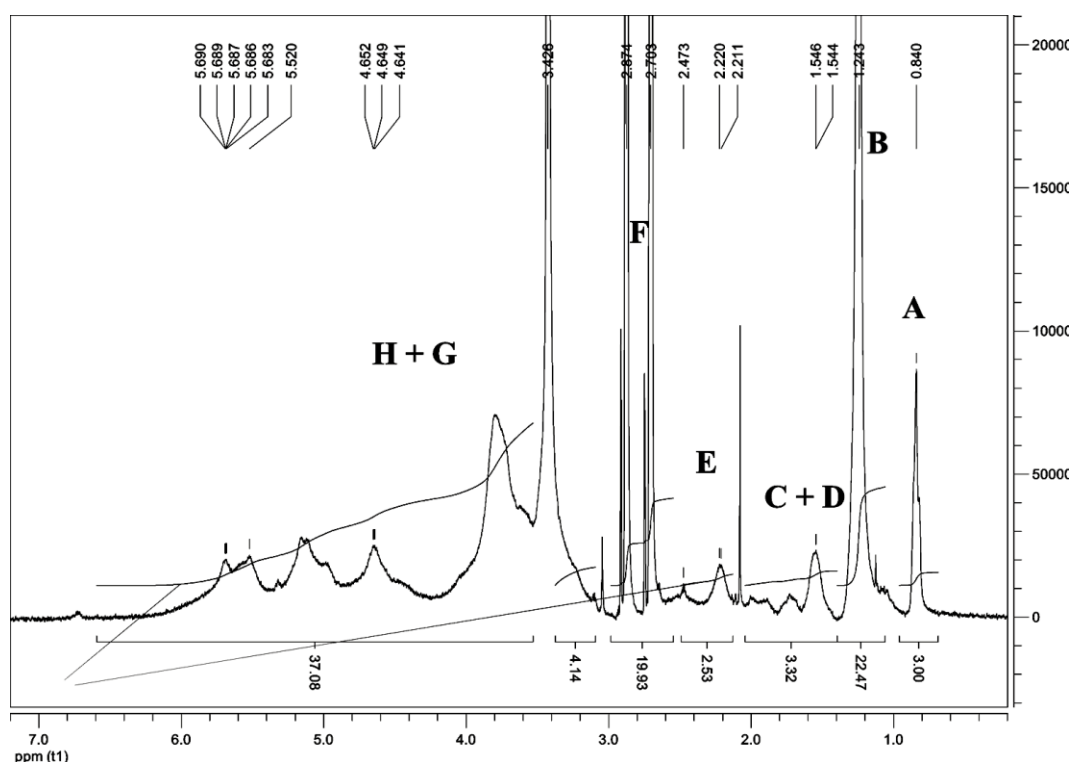


Рис. 3.13. ПМР-спектр зразка гель-фракції DS10H.

На рис. 3.13 наведено ПМР-спектр зразка гель-фракції, що отриманий в результаті взаємодії декстрину з Glu(St) при співвідношенні гідроксильних до карбоксильних груп 10 : 1. Аналіз цього спектру, в порівнянні з спектрами, що наведені на рис. 3.12, дозволяє зробити висновок, що зразки гель-фракції за якісним складом не відрізняється від зразків золь-фракції. Кількісний склад зразків фракцій дещо відрізняються і дану різницю можна відслідкувати в тому випадку, коли вдається отримати ПМР-спектр гель- фракції без спотворень. Слід відмітити, що одержання якісних спектрів зразків гель-фракції є утрудненим через їх сітчасту



структуру, втрату здатності до розчинення в органічних розчинниках, що спричиняє внутрішньомолекулярне екранування та спотворення співвідношення сигналів.

В таблиці 3.4 за рівняннями (3.1) та (3.4) по даним ПМР-спектроскопії та балансовим розрахункам по даним виходів золь- та гель- фракцій (таблиця 3.3) наведено ряд оцінок ефективності модифікації та зшивки молекул декстрину Glu(St).

Таблиця 3.4. Оцінки ефективності модифікації декстрину Glu(St) при температурі 288 К та загальній концентрації реагентів 12% за даними ПМР-спектроскопії та балансових розрахунків.

Зразок	Співвідношення при завантаженні		Золь-фракція				Гель-фракція			Ефективність*, %	
			Кількість прищеплених молекул Glu(St) до молекул D		Відсоток прищеплених Glu(St) за двома групами	Оцінена молярна маса, кДа	Кількість прищеплених молекул Glu(St) до молекули D				
	ОН : COOH	Glu(St):D	Загальна	За двома групами			Загальна (за даними ПМР спектроскопії)	Оцінено за балансом			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DS20	20:1	3,24	5,7	4,3	75,4	37		3,8	2,8	94,9	81,6
DS10	10:1	6,48	8,7	7,7	88,5	61	6,5	5,7	5,0	94,3	88,5
DS6	6:1	10,8	12,2	11,1	91,2	84	9,2	10,2	9,3	95,6	91,2
DS3	3:1	21,6	8,5	1,3	14,9	16		28,2	4,2	57,4	14,9
DS2	2:1	32,4	16,5	2,4	14,5	23		35,9	5,2	57,3	14,5

\* відсоток прищеплених карбоксильних груп від загальної кількості за двома фракціями

Зокрема, в колонці 3 приведено значення кількості молів Glu(St) на один моль декстрину по завантаженню. Таке представлення співвідношення між реагентами є більш корисним ніж співвідношення між реакційними групами (стовпчик 2) для обговорення ступеня структурування. В колонці 4 та 8 приведено загальну кількість фрагментів, що приєднані до однієї молекули декстрину. Ці дані оцінки одержані за рівнянням (3.1) за даними ПМР-спектроскопії. Значення, що наведені в колонці 5

одержані також за даними ПМР-спектрів з використанням рівняння (3.4). Оскільки ПМР неможливо було одержати для всіх зразків, дані колонок 9 і 10 одержані за рівняннями балансу з використанням значень колонок 4, 6. Добре співпадіння між експериментально одержаними даними (колонка 7) з розрахунковими (колонка 8) підтверджує справедливість останніх.

В колонках 11 та 12 приведена загальна ефективність заміщення (хоча б за однією карбоксильною групою) та ефективність за двома групами. При співвідношеннях 6 : 1 (ОН : COOH) і більше спостерігається доволі висока ефективність заміщення (до 95 %), що не залежить від співвідношення. Таке значення ефективності є навіть більшим за відповідне значення отримане при дослідженні ацетилювання сахарози оцтовою кислотою (80÷84 %, таб. ). Слід вважати, що підвищення ефективності ацилювання може бути у випадку Glu(St) пояснене перебігом реакції Стегліха через проміжне утворення ангідриду за схемою 3.3, що за даними роботи [167] запобігає перебігу реакції непродуктивної витрати активованої форми кислоти. Але така висока ефективність спостерігається лише при співвідношенні реагентів при якому на одну ланку полісахариду припадає не більше 0,25 молекул Glu(St). При спробі провести процес при співвідношеннях менших за 3 : 1 (ОН : COOH), при яких на одну ланку полісахариду припадає 0,5 і більше молекул Glu(St) ефективність різко падає. Слід вважати, що спроби модифікувати більше ніж кожну четверту ланку макроланцюга суттєво ускладнюється за рахунок стеричних утруднень, як це спостерігалось при ацетилюванні сахарози стеариноювою кислотою. Аналогічна закономірність спостерігається при аналізі значень ефективності заміщення за двома групами. Якщо до співвідношення 6 : 1 (ОН : COOH) спостерігається доволі висока ефективність за двома групами, яка не є суттєво нижчою від загальної, то при співвідношеннях менше 3 : 1 (ОН : COOH) ефективність падає до 15 %.

Для аналізу ефективності прищеплення за фракціями на рис. 3.14Рис. 3.14 за даними таблиці 3.4, наведено залежність відношення кількості прищеплених залишків кислоти до кількості завантаженої в розрахунку на один моль декстрину. Для гель-фракції дане відношення у всьому діапазоні близьке до одиниці і слабо

залежить від співвідношення. Це означає що полімер гель-фракції формується завжди з високою загальною ефективністю прищеплення, чого не можна стверджувати про ефективність прищеплення за двома групами. Ефективність прищеплення за двома групами у гель-фракції при низьких співвідношеннях реагентів різко падає. При тому не можна стверджувати, що при співвідношеннях менших за 3 : 1 (ОН : COOH) спостерігається замала кількість розгалужень макроланцюга для формування просторово-структурованої полімерної сітки. За даними таблиці 3.4 на одну молекулу декстрину припадає 4÷5 заміщень за двома групами, що є цілком достатнім для формування такої сітки. Просто крім цих заміщень, ефективних за двома групами спостерігається від 24÷30 заміщень за однією карбоксильною групою (схема 3.9). Таке заміщення не приводить до розгалуження макроланцюга але вносить в структуру макромолекули сильно гідрофобний фрагмент. Саме цим пояснюється той факт, що гель-фракція, одержана в даних умовах, представляє собою гідрофобний полімер нездатний набрякати у воді (таб. 3.4).

Для золь-фракції відношення кількості прищеплених залишків кислоти до кількості завантаженої в розрахунку на один моль декстрину (рис. 3.14.б) має зовсім інший характер – із збільшенням кількості молекул Glu(St) на одну молекулу декстрину спостерігається постійне зменшення як загальної ефективності прищеплення так і ефективності прищеплення за двома групами. При тому при співвідношеннях більших за 6 : 1 (ОН : COOH), що відповідає менше ніж 11 молекул Glu(St) на одну молекулу декстрину спостерігається значиме перевищення кількості прищеплень на одну молекулу декстрину над кількістю завантажених Glu(St). Це стосується як прищеплених за однією так і за двома групами. А це означає, що на одну молекулу декстрину припадає 4÷11 зшивок і макромолекули золь-фракції є сильно розгалуженими. При тому кількість сформованих циклів є незначною, оскільки полімер не втрачає здатності до безмежного набрякання як у воді так і у органічних розчинниках.

При співвідношеннях менших 3 : 1 (ОН : COOH) що відповідає 22 і більше молекулам Glu(St) на молекулу декстрину це відношення різко падає до 0,4÷0,5 за

загальною кількістю прищеплення і менше 0,1 при прищепленні за двома групами. Така ситуація призводить до формування принципово різного полімеру золь-фракції. Якщо при співвідношеннях більших за 6 : 1 макромолекули полімеру золь-фракції є сильно розгалуженими з високим ступенем структурування при тому з незначною кількістю неефективно прищеплених залишків Glu(St), то при співвідношеннях менших за співвідношення 3 : 1 (ОН : COОН) макромолекули золь-фракції складаються із перехресно зшитих 2÷3 макромолекул декстрину з доволі значною кількістю прищеплених залишків кислоти.

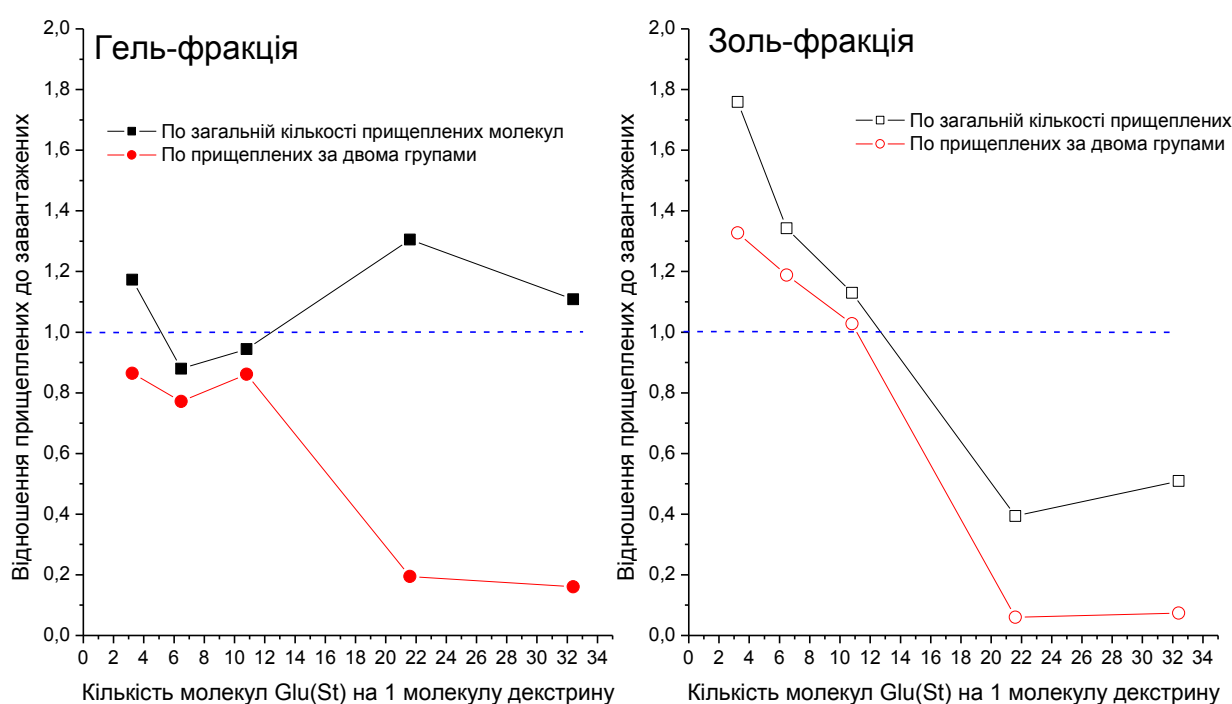


Рис. 3.14. Залежність ефективності заміщення Glu(St) за однією або двома карбоксильними групами для золь- та гель-фракцій.

Тут слід відмітити, що неможна стверджувати, що певна кількість розгалужень однозначно гарантує утворення просторової сітки. Показовим є зразок одержаний при співвідношенні 10÷11 молекул Glu(St) на 1 молекулу декстрину. Склад цього зразка доволі рівномірний як у гель- так і у золь-фракції. У нього спостерігається найвищий відсоток залишків прищеплених за обома групами від загальної кількості прищеплених. Зокрема, в цього зразка близько 9÷11 розгалужень на одну молекулу декстрину як у золь- так і у гель-фракції. При тому властивості цих

двох фракцій відрізняються: золь фракція необмежено набрякає в метанолі, диспергується у воді, дає пробу на йод, хроматографується в умовах гель-проникної хроматографії; гель фракція – осаджується метанолом, не змочується водою, не дає йодної проби, не елююється на гель-фазі. Як буде показано нижче, у цих фракцій суттєво різні термічні властивості. Подібна ситуація спостерігається і у випадку 6÷7 молекул на одну молекулу декстрину. Структура гель- і золь-фракцій забезпечуються приблизно однаковою кількістю розгалужень на одну молекулу декстрину. В цьому діапазоні золь-фракція реалізується в тому випадку коли, чисто статистично, частина груп пасивується. Гель-фракція формується в тому випадку, коли, статистично кількість розгалужень практично повністю співпадають з кількістю прищеплень. Дане припущення сильно підсилюється тим фактом, що в даному діапазоні загальна ефективність прищеплення (колонка 11 таблиця 3.4) є високою.

Доволі складні залежності, що були описані вище, мають, на рівні хімізму реакції, доволі просте і очевидне пояснення. Збільшення співвідношення між реагентами в користь гідроксильних груп приводить до збільшення ефективності реакції утворення естерного зв'язку (таблиця 3.4) та подавлення перебігу реакції пасивування активної форми карбоксильної групи (схема 3.9). Надлишок спиртової компоненти є загально прийнятим засобом збільшення виходу реакції Стегліха в ході одержання низькомолекулярних естерів. В роботі [167] повідомлялось, що проведення реакції поліконденсації при допустимому надлишку спиртової компоненти в ході поліконденсації за реакцією Стегліха N-похідних глютамінової кислоти з поліолами приводить до вищого ступеню поліконденсації ніж проведення реакції в умовах того ж надлишку кислотної компоненти. Якщо перебіг першого етапу реакції з високою ефективністю може бути пояснений його перебігом за схемою через внутрішній ангідрид N-похідної (схема 3.3), то на другій стадії (схеми 3.7 і 3.10) надлишок гідроксильних груп є вагомим фактором для подавлення перебігу реакції пасивування активованої форми карбоксильної групи.

### 3.3.2.2 Гель-хроматографічні дослідження зразків золь-фракції

Визначення молекулярної маси полімерів з розгалуженою та перехресно-зшитою структурою основного ланцюга є доволі складною та неоднозначною задачею. Найбільш ефективним методом є аналіз по складу полімерів, наприклад, визначення кількості кінцевих груп. Такий аналіз є складним і не завжди вдається його реалізувати. В межах даної роботи представляє певний інтерес одержати залежність молекулярної маси продуктів реакції від умов синтезу, зокрема від співвідношення реагентів. До певної міри вирішити цю задачу можна за допомогою гель-проникної хроматографії. Для цього було проведено ряд досліджень по можливості застосування гель-хроматографічного аналізу до одержаних продуктів.

Є неоднозначним гель-хроматографічний аналіз, і взагалі жоден аналіз полімерного матеріалу гель-фракції. Мікрогідрогель не може елююватись через колонку заповнену набряклим гелем і формувати сигнал на виході колонки. Разом з тим, було проведено ряд спроб ввести проби гель-фракції, сильно набряклі в N,N-диметилформаміді, на старт хроматографічної колонки HPLC (високоєфективна рідинна хроматографія) в надії одержати сигнал від більш низькомолекулярних полімерних молекул, що були осадженні разом з гель-фракцією. В даній серії досліджень не було отримано сигнали проходження через колонку частини від гель-фракції. Це дозволило вважати, що розроблена методика очистки достатньо ефективно розділяє гель- та золь-фракції.

Хроматографування зразків золь-фракції приводило до формування чітких сигналів. Але, для інтерпритації молекулярно-масового розподілу та встановлення значення молекулярної маси необхідне калібрування колонки гель-проникної хроматографії за відповідними стандартами. Загально прийнятий полістирольний стандарт та стандарт за поліоксіетиленгліколями в даному випадку не підходить оскільки лінійна структура їх макромолекул не є адекватною до розгалужених полімерів гель-фракції і калібрування за цими стандартами приводить до абсурдних результатів.

Для подолання цієї неоднозначності в якості зразків для калібрування гель-хроматографічної колонки були взяті ті зразки золь-фракції для яких молярну масу

можна було визначити з даних ПМР-спектроскопії виходячи з середньої молекулярної маси декстрину ( $M_n = 7000$  Да) та кількості прищеплених фрагментів Glu(St) з врахуванням ефективності прищеплення за двома карбоксильними групами. Таким чином одержані оцінки середньо чисельної молекулярної маси приведені в таблиці 3.4, а приклад гель-проникних хроматограм в порівнянні, відображені на рис. 3.16. Таким чином одержані оцінки середньочисельної молекулярної маси приведені в таблиці 3.4 (колонка 8), а приклад гель-проникних хроматограми, відображені на рис. 3.16. Оскільки калібрування хроматографічної колонки проводилось за даними молекулярних мас отриманих з цих же зразків (DS10Z, DS6Z), оцінки  $M_n$  по хроматограмі співпадають з оціненими за кількістю розгалужень в декстриновому ланцюгу. Важливим для даної роботи в цьому дослідженні є те, що зразки DS8Z, DS15Z, для яких не було зроблено оцінок по молярній масі за даними ПМР-спектроскопії, також задовільно лягли в ряд даних визначених хроматографічно. Таким чином можна стверджувати, що в діапазоні співвідношень реагентів (6÷15) : 1 (ОН : COOH) молярна маса зразків золь-фракції в основному визначається кількістю залишків Glu(St), що приєднані за двома карбоксильними групами. Такий висновок підтверджує, що золь-фракція, в основному, складається з полімерів із розгалуженою будовою макроланцюга, а кількість внутрішніх циклів є незначною.

Радикальне неспівпадіння спостерігається лише для зразка одержаного при співвідношенні 3 : 1. Прогнозована молекулярна маса для цього зразка за кількістю перехресних зшивок становить 16 кДа. Хроматографічний аналіз приводить до значень - 90÷80 кДа. Така невідповідність може бути пояснена тим, що зразки полімеру золь-фракції, що одержані до співвідношення 3 : 1 мають іншу природу від решти. При обговоренні структури полімеру золь-фракції за даними спектроскопії уже відмічалось, що в структурі полімеру цих зразків значно переважають залишки Glu(St), що прищепились за однією карбоксильною групою над тими залишками, які привели до перехресної зшивки між макроланцюгами декстрину (таблиця 3.4). Особливість цих зразків відмічалась при обговоренні виходу золь- та гель-фракцій (рисунок 3.11). Така відмінність може бути причиною невірною прогнозу

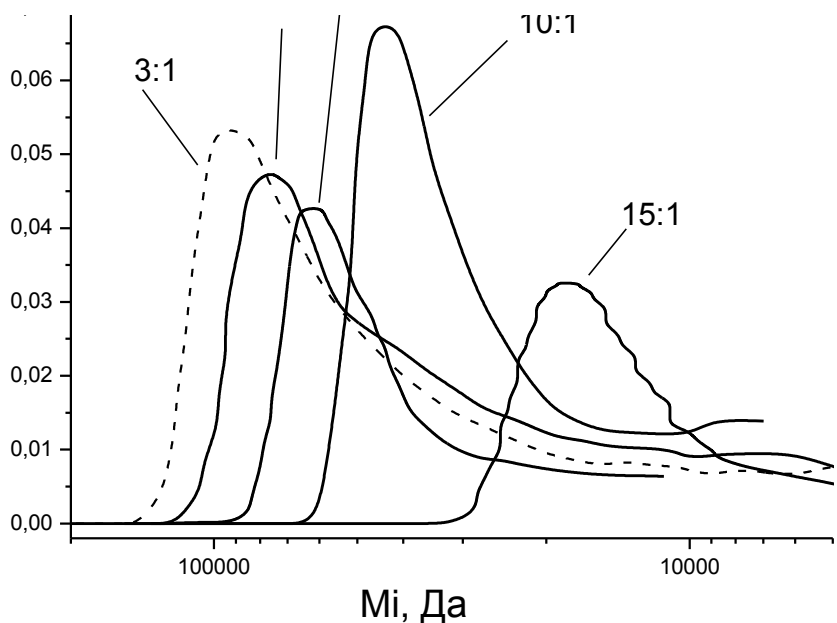


Рис. 3.16. Гель-проникні хроматограми зразків золь-фракції одержаних при різних співвідношеннях гіроксильних до карбоксильних груп декстрину та Glu(St).

молекулярної маси за даними гель-проникної хроматографії у тому випадку, коли калібрування колонки проводилось по інших, за структурою ланцюга, калібрувальними сполуками.

Не попадає в загальну закономірність і зразок отриманий при співвідношеннях

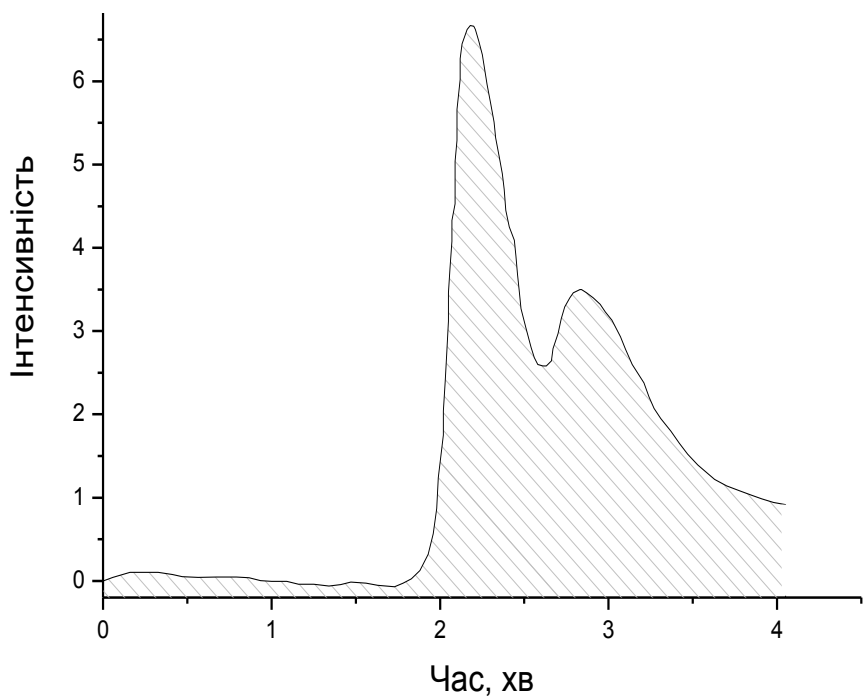


Рис. 3.15. Гель-проникна хроматограма полімерного зразка золь-фракції DS20Z.



20 : 1 (ОН : COOH). Її гель-хроматограма, без обробки по молекулярній масі, приведена на рис. 3.15. Вона демонструє, що молекулярно-масовий розподіл має, яскраво проявлений, бімодальний характер, чого не спостерігалось в жодному зразку, які одержані при менших співвідношеннях. Як раніше повідомлялось (обговорення даних таблиці 3.3 і 3.4) при цьому співвідношенні і більше, також спостерігається зміна особливостей перебігу процесу, спричинена недостатком карбоксильних груп. Нагадуємо, в цьому діапазоні співвідношень, спостерігається поява непрореагованого декстрину, зменшується кількість перехресних зшивок, що припадає на одну макромолекулу декстрину. Приведена хроматограма підтверджує, що при цих співвідношеннях формується неоднорідний за структурою полімерний матеріал золь-фракції. Можна припустити, що мода з високим значенням молекулярної маси, це уже не полімер з розгалуженою структурою макроланцюга, а полімер з просторовою структурою, але дуже рідкою зшивкою. При тому з реакційної маси одержаної в даних умовах вдається виділити полімерний матеріал з властивостями полімеру гель-фракції, але з меншим виходом (таблиця 3.3).

Таким чином можна стверджувати, що однорідний за властивостями полімер,

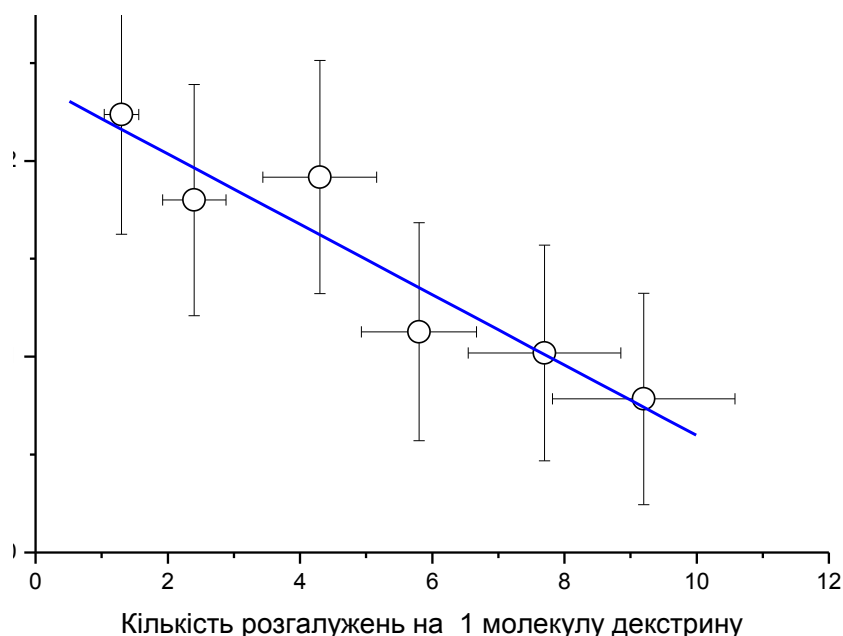


Рис. 3.17. Залежність коефіцієнту полідисперсності зразків полімеру золь-фракції поліестеру, одержаного при взаємодії декстрину та Glu(St) від співвідношення реагентів.

але з різною ступеню розгалуження, а, відповідно, з різною молекулярною масою, утворюється в діапазоні відношення реагентів від  $4\div 6$  до  $15\div 20$  гідроксильних груп, що приходяться на одну карбоксильну групу.

Окремо слід відмітити виявлену залежність коефіцієнту полідисперсності зразків полімерів, що одержані в межах цього діапазону умов синтезу (рис. 3.17) від кількості розгалужень, що припадають на одну макромолекулу. З наведеної на рисунку залежності можна зробити висновок що ці дві незалежні між собою, експериментально отримані величини зв'язані добре визначеною обернено-пропорційною залежністю. Звідси слідує, що збільшення середньої кількості розгалужень що припадають на одну молекулу полісахариду приводить до зменшення коефіцієнту полідисперсності.

### 3.3.3. Вплив природи реагентів на склад продуктів реакції

Результати досліджень, що викладені в попередніх розділах, були одержані з використанням декстрину – лінійного полісахариду, макроланцюг якого складається з глюкопіранозних ланок. Молярна маса декстрину, що використовувався в межах даної роботи, становила  $6800\div 7200$  Да. Представляє інтерес перевірити основні одержані закономірності протікання реакції з використанням іншого полісахариду. В якості такого полісахариду був вибраний декстрин – полісахарид бактеріального походження макроланцюг якого складається також з глюкопіранозних ланок. Відмінністю, яка представляє інтерес для даної роботи є те, що в макромолекулі декстрину ланцюг побудований лише через  $\alpha$ -1,4 глікозидні зв'язки, а макромолекули декстрану сформовані завдяки  $\alpha$ -1,3 та  $\alpha$ -1,6 глікозидними зв'язками. Завдяки цьому макромолекули декстрану уже мають розгалужену структуру макроланцюга.

Досліджувався декстран з молярною масою 10 500 Да, який є найближчим промислово доступним до молекулярної маси декстрину, що використовувався. Проведені дослідження показали, що більшість одержаних на декстрині закономірностей повністю відтворюються в дослідах з декстраном. Вагомою відмінністю, що була виявлена при використанні декстрану, це інше співвідношення між гель- та золь-фракціями, що утворювались в ході реакції. В цьому можна

переконатись співставляючи дані наведені в таб. 3.5 для реакції з декстраном та таб. 3.3, де приведені відповідні дані декстрину. Так у випадку декстрину, основним продуктом реакції можна вважати гель-фракцію. Вихід золь-фракції в загальному становить 10÷20% і, в окремих випадках досягає 35%. У випадку використання декстрану, практично при всіх співвідношеннях, домінує золь-фракція, вихід якої може досягати 90%. При тому властивості золь- та гель-фракцій декстрину та декстрану між собою подібні.

Розгалужена структура макромолекул декстрану є причиною пониження виходу гель-фракції при реакції з Glu(St), так як це єдина суттєва відмінність цих двох сполук. Таким чином можна стверджувати, що у випадку декстрану процес в основному реалізується за рахунок перебігу по схемі 3.8. Перебіг процесу по схемі 3.7 утруднений первинною розгалуженістю макромолекул декстрану. Але в такому випадку, слід признати, що передумови перебігу реакції просторового структурування декстрину по схемі 3.10 повинні бути забезпечені уже на першій стадії (схема 3.8) взаємодії. В протилежному випадку, розгалуження ланцюга декстрину також повинно заблокувати перебіг реакції просторового структурування, а цього експериментально не спостерігається.

Таблиця 3.5. Вихід золь- та гель-фракцій при взаємодії декстрину з Glu(L) та декстрану з Glu(St) . Температура 288 К. Загальна концентрація реагентів 12%. Час реакції 22÷24 годин.

Вихідні реагенти		Зразок	Співвідношення OH : COOH	Вихід DCU, %	Вихід золь-фракції	Вихід гель-фракції
Полісахарид	Кислота					
Декстран	Glu(St)	DaS3	3 : 1	98,8	54,2	45,8
		DaS4	4 : 1	95,6	79,3	20,7
		DaS6	6 : 1	99,5	88,3	11,7
Декстрин	Glu(L)	DL3	3 : 1	104,5	95,2	4,8
		DL4	4 : 1	90,4	95,4	4,6
		DL6	6 : 1	97,8	75,2	24,8

Блокування перебігу процесу просторового структурування макромолекул декстрину спостерігається лише у випадку використання в якості агента структурування Glu(St).

В таб. 3.5 приведено значення виходів золь- та гель-фракцій при взаємодії декстрину з N-лауреїлглутаміною кислотою (Glu(L)). При використанні Glu(L), яка відрізняється від Glu(St) лише довжиною алкільного радикалу, спостерігається повне домінування в продуктах реакції золь-фракції, вихід якої може досягати 95%, що є значно більше ніж вихід золь-фракції у випадку реакції декстрину з Glu(St) та помітно більше ніж у випадку взаємодії декстрану з цим же структуруючим агентом. Таким чином, можна стверджувати, що саме довжина алкільного хвоста N-замісника в глутаміновій кислоті є визначальним фактором сприяння перебігу реакції просторового структурування по схемі 3.10.

Проведені дослідження демонструють, що вибір реагентів визначається метою синтезу. Якщо метою є просторово-структурований полісахарид доцільно використовувати декстрин і Glu(St). В тому випадку коли задачею синтезу є модифікований полісахарид з розгалуженою будовою макроланцюга доцільно використовувати декстрин та Glu(L) або декстран.

#### **3.4. Динаміка перебігу реакції модифікації декстрину N-стеароїлглутаміною кислотою за реакцією Стегліха**

Важливим фактором, що визначає склад продуктів взаємодії полісахаридів з N-похідними глутамінової кислоти, є ступінь перетворення вихідних речовин. Вище описані дослідження складу та структури одержаних продуктів були приведені при глибині перетворення вихідних продуктів не менше 94 %. Завдяки тому, що DCU є слабозрчинною сполукою в більшості органічних розчинників та воді, про ступінь перетворення вихідних речовин зручно відслідковувати по його кількості, що виділяється у вигляді осаду. Тому, в таблицях 3.3 та 3.5 в якості характеристики глибини перетворення приводилось значення виходу DCU. Динаміку виділення DCU можна реєструвати за помутнінням реакційного середовища за методикою розробленою в роботі [166]. Показано, що оптична густина пропорційна кількості дисперсії DCU, що нагромаджена в реакційній суміші. Криві залежності оптичної густини реакційних сумішей від часу за цією методикою приведені на рис. 3.18. Криві, що приведені на цих рисунках мають s-подібний характер, аналогічний до

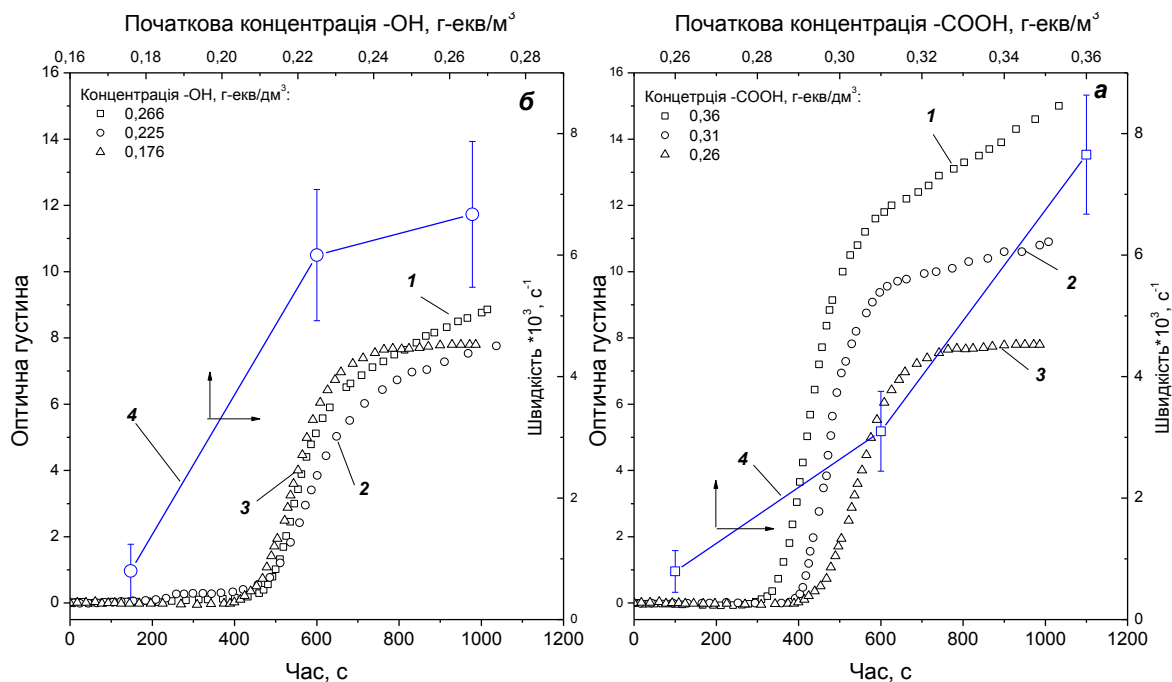


Рис. 3.18 Залежність оптичної густини від часу реакційних сумішей одержаних при (а) концентрації гідроксильних груп 0,176 г-екв/м<sup>3</sup> і різній початковій концентрації карбоксильних груп криві 1÷3 та (б) при початковій концентрації карбоксильних груп 0,260 г-екв/м<sup>3</sup>. Криві 4 на кожному малюнку визначають швидкість зміни оптичної густини на кінцевих участках кривих 1-3.

кривих описах в роботах [165, 166] у випадку поліконденсації N-глутамінової кислоти з поліолами різної природи за реакцією Стегліха.

Відсутність протягом певного часу зміни оптичної густини (рис. 3.18) пояснюється нагромадженням в реакційній суміші активованої форми кислоти за реакцією, що наведена на схемі 3.3. Інтенсивне помутніння (збільшення оптичної густини) пов'язана з етапом швидкого виділення DCU. Важливо відмітити, що швидкість виділення DCU на цьому, етапі суттєво залежить від початкової концентрації карбоксильних груп. Цей висновок можна зробити за закономірною залежністю форми кривих на рис.3.18.а, де наведені криві одержані при однаковій початковій концентрації гідроксильних груп і різних початкових концентраціях карбоксильних груп. Аналіз кривих, які наведені на рис. 3.18.б, які одержані при однаковій початковій концентрації карбоксильних груп та різній концентрації гідроксильних приводить до протилежного висновку. В межах точності проведеного експерименту швидкість виділення DCU на швидкій стадії практично не залежать

від початкової концентрації гідроксильних груп. Дані висновки повністю співпадають з висновками для швидкості швидкої стадії у вище зазначених роботах. Відсутність в них залежності швидкості виділення DCU на даній стадії пояснюється перебігом реакції через утворення внутрішнього ангідриду N-похідної глутамінової кислоти (схема 3.3). Слід думати, що в системі яка досліджується в межах даної роботи також реалізується даний механізм перебігу реакції. За цією схемою DCU виділяється в ході утворення ангідридної групи і концентрація гідроксильних груп на даний процес не впливає.

Разом з тим, слід вважати, що перебіг реакції Стегліха через утворення ангідриду є характерна для N-похідних глутамінової кислоти. Цим можна пояснити суттєво вищу ефективність заміщення, що спостерігається за їх участю (таб. 3.4) у порівнянні з ефективністю ацетилювання (таб. 3.1), яка була описана в ході модельного дослідження.

Суттєвою відмінністю, між дослідженнями динаміки виділення DCU одержаними в межах даної роботи і вище згаданих досліджень, це його кількість, яка виділяється на швидкій стадії. Гравіметричний аналіз показав, що для кривої 3 рис. 3.18. а і кривих рис. 3.18.б до завершення швидкої стадії виділяється 28÷33% від загальної кількості DCU. Для кривих 1 та 2 це значення зростає до 36÷38% та 42÷45% відповідно. Це суттєво менше ніж кількість DCU, як реєструвалась у випадку поліконденсації N-похідних глутамінової кислоти. З цього можна зробити висновок що, через ангідрид реалізується лише перша стадія (схема 3.3). Цей висновок підтверджується тим, що швидкість виділення DCU на завершальних стадіях реакції (схема 3.7 та 3.10) уже визначається як концентрацією карбоксильних так і гідроксильних груп. Про це свідчить залежність швидкості виділення DCU на цій стадії, що відображена кривими 4 на рис. 3.18.а і рис. 3.18.б для залежності від концентрації карбоксильних та гідроксильних груп відповідно. З цього можна зробити висновок, що на цих стадіях реакція виділення DCU визначається концентрацією як карбоксильних так і гідроксильних груп. Такою стадією може бути нуклеофільна атака гідроксильної групи по активованій формі кислоти.

Слід також відмітити, що за тривалістю остання стадія є найдовшою. Якщо швидка стадія завершується, для всього діапазону умов за 8÷12 хвилин при температурі 288 К, то тривалість завершальної стадії доходить до 20÷22 годин. При тому час завершення реакції, при цій температурі суттєво не залежить уже від концентрації реагентів.

## Розділ 4. Одержання поліоксіетильованих N-похідних глутамінової кислоти та їх дослідження

В попередньому розділі було описано експериментальні дослідження по взаємодії N-похідних глутамінової кислоти з полісахаридами. В результаті проведених досліджень показано, що одним з продуктів реакції є просторово-структурований полімерний матеріал (гель-фракція). Густину перехресної зшивки макромолекул гель-фракції можна регулювати умовами одержання, зокрема, співвідношенням реагентів на стадії синтезу. В результаті частина зразків, у яких значна густина зшивки і відносно високий вміст залишків Glu(St) або Glu(La), являє собою полімер, що нездатний утворювати у водних середовищах самостабілізовані дисперсії, як це буде показано нижче. Для одержання більш гідрофільних полімерних матеріалів можна ввести, на стадії структурування, гідрофільний мономер, або модифікувати, уже одержану просторову сітку цим же гідрофільним мономером. Для вирішення даної задачі необхідний гідрофільний мономер, здатний до реакції поліконденсації. Необхідність вирішувати задачу через взаємодію гідроксильних груп полісахаридів з N-похідними глутамінової кислоти, привело до пропозиції в якості гідрофільного мономеру використовувати поліоксіетиленові N-похідні глутамінової кислоти (mGlu(PEGk)), загальна структурна формула, яких приведена на схемі 4.1. Крім вирішення задач, що виникли в межах даної роботи, наявність такого мономеру може бути корисним при вирішенні регулювання

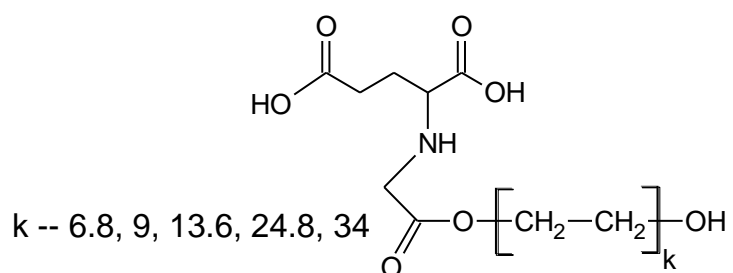


Схема 4.1. Загальна структурна формула N-монозаміщених поліоксіпохідних глутамінової кислоти

гідрофільно-олеофільного балансу псевдо-поліамінокислот поліестерного типу, що одержуються шляхом взаємодії N-похідних глутамінової кислоти поліконденсацією за реакцією Стегліха з полідіолами різної природи. Введення такого мономеру веде



до входження в основний ланцюг поліестеру ланки з гідрофільною властивістю в боковому ланцюзі, яка завершується реакційно-здатною гідроксильною групою.

З огляду на вище сказане, було проведено ряд досліджень по створенню методики одержання відповідних гідрофільних мономерів та встановленню їх деяких властивостей. Матеріал даного розділу присвячений висвітленню цих досліджень.

#### 4.1. Розробка методу отримання N-поліоксіетиленових похідних глютамінової кислоти

За даними, що наведені в розділі 1.6, найбільш привабливим шляхом одержання гідрофільного мономера, структурна формула якого відображена на схемі 4.1, є алкілування аміногрупи глютамінової кислоти похідними поліоксіетиленовими естерами хлороцтової кислоти, за реакцією N-алкілування, що наведена на схемі 4.2. Опису, як особливостей перебігу даної реакції, так і методу одержання та очистки поліоксіетиленових естерів хлороцтової кислоти не було знайдено.

##### 4.1.1. Дослідження процесу одержання поліоксіетиленових естерів хлороцтової кислоти

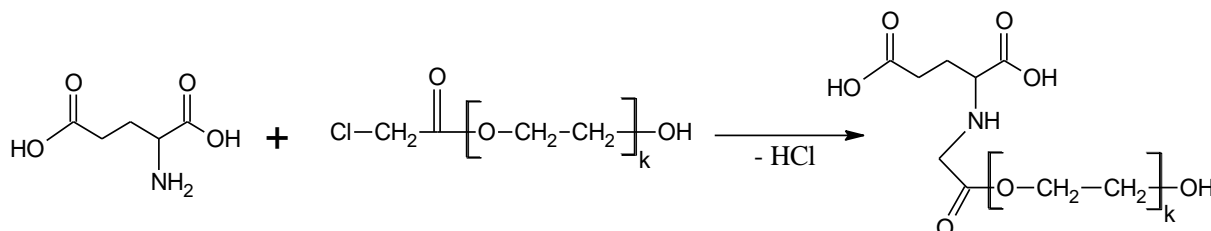


Схема 4.2. Реакція N-алкілування глютамінової кислоти поліоксіетиленовими естерами хлороцтової кислоти.

Поліоксіетиленові естери хлороцтової кислоти одержували взаємодією, в сухому бензолі, хлорангідриду хлороцтової кислоти з відповідними моноалкоголятами поліоксіетиленгліколів за реакцією, що приведена на схемі 4.3.

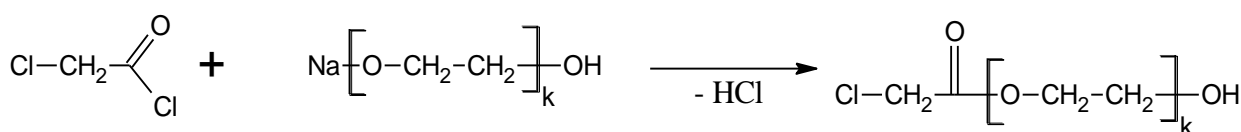


Схема 4.3. Одержання поліоксіетиленових естерів хлороцтової кислоти

Методика проведення синтезу наведена в розділі 2.2.6, де також приведено методику отримання хлорангідриду моноалкоголяту поліоксіетиленгліколів різної молекулярної маси.

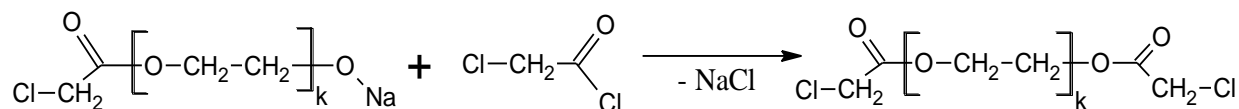


Схема 4.4. Утворення діестеру поліоксіетиленгліколю.

Перебіг даної реакції ускладнюється можливістю перебігу реакції одержання діестерів поліоксіетиленгліколю за реакцією, що наведена на схемі 4.4. Пригнічення перебігу даної реакції досягали використанням надлишку поліоксіетиленгліколю. Надлишок поліоксіетиленгліколю створювали на стадії одержання його алкоголяту. Але, як показали проведені експерименти, створення значного надлишку поліоксіетиленгліколю суттєво ускладнює стадію виділення цільового продукту екстракцією з водного середовища бутаном з відповідним пониженням виходу. Тому, приймаючи за критерій оптимальності збільшення виходу продукту при мінімальному вмісті в ньому діестеру, оптимальним було вибрано 4-ох кратний надлишок поліоксіетиленгліколю.

Структуру одержаних естерів підтверджували методами ПМР-спектроскопії. Для прикладу на рис. 4.1 приведений ПМР-спектр естеру одержаного на основі PEG-1500. Зрозуміло, що в даному спектрі домінують сигнали від протонів поліоксіетиленового ланцюга. Разом з тим сигнали від моноклороцтової кислоти прописані достатньо добре (на спектрі область цих сигналів приведена на додатковому фрагменті) і їх зміщення добре узгоджуються з запропонованою структурою. Так сигнали із зміщенням в області 3,4÷3,5 м.д. однозначно від протонів поліоксіетиленового ланцюга. Сигнал С із зміщенням 4,24 м.д., також відповідає протонам поліоксіетиленового ланцюга та належить протонам гідрогену біля вуглецю в  $\alpha$ -положенні до естерної групи. Наявність цього сигналу підтверджує проходження реакції утворення естеру. Зміщення сигналу В (4,4 м.д.) добре узгоджується з сигналом протону від гідроксильної групи, а сигнал А зі зміщенням 4,6 м.д. добре узгоджується з сигналами метиліденової групи кислотного залишку.

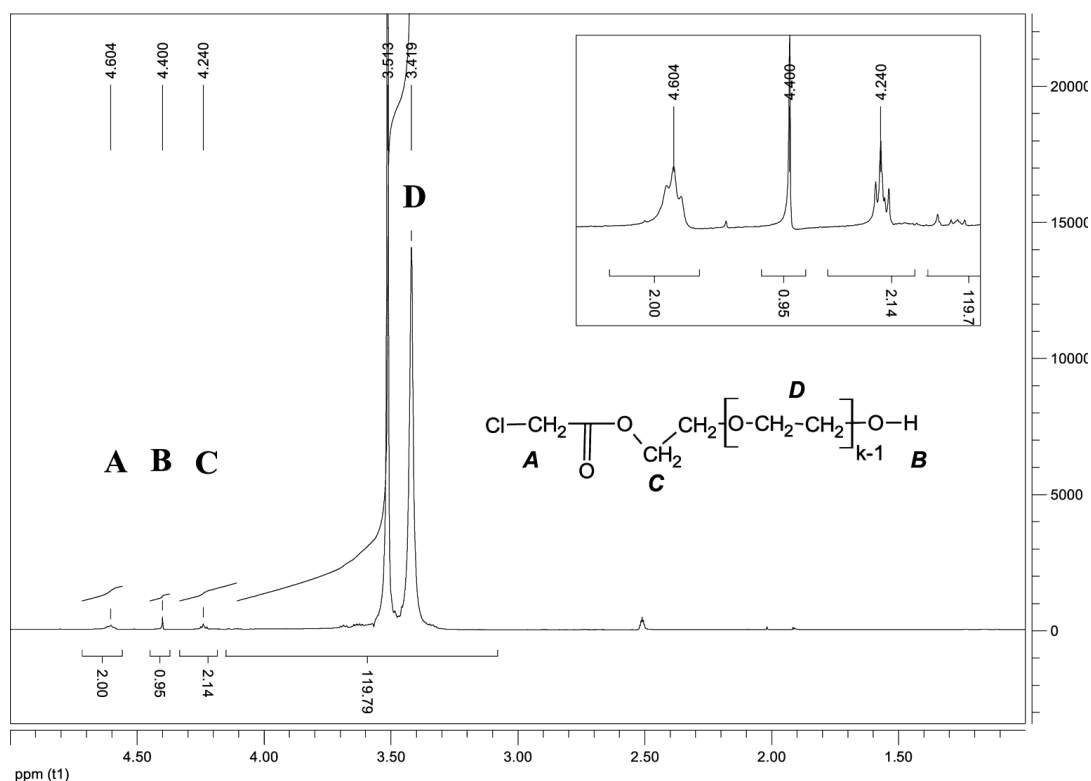


Рис. 4.1. ПМР-спектр моноестеру хлороцтової кислоти з PEG-1500.

Але при аналізі інтенсивності сигналів було виявлено певне розходження, яке не може бути пояснене помилкою запису спектру та присутнє практично серед всіх сигналів. Так якщо інтенсивність сигналу С становить 2,05 і він спричинений двома протонами, тоді інтенсивність сигналів D від протонів поліоксіетиленового ланцюга з молекулярною масою 1500 Да повинна бути 167, але становить 120. Приблизно така ж пропорція невідповідності між сигналами А і D: при інтенсивності сигналу А – 2, інтенсивність сигналу D повинна становити 134. Пояснити розходження сигналів в спектрах можна тим фактом, що у виділеному поліестері (схема 4.1) є домішка діестеру, що утворюється в побічній реакції (схема 4.4). Зрозуміло, що домішка такого діестеру не змінює, ні кількості сигналів в спектрі, ні їх зміщення. Вона лише впливає на співвідношення сигналів. На цьому факті можна побудувати метод визначення вмісту моноестеру в суміші. Якщо через  $X_{me}$  позначити частку моноестеру в суміші, тоді за даними ПМР спектроскопії цю величину можна оцінити за рівнянням:

$$X_{me} = \frac{4 \cdot I_D - I_A \cdot n_D}{2 \cdot I_D} \quad (4.1)$$

де  $I_D$  і  $I_A$  – інтенсивність, відповідно сигналів D та A, а  $n_D$  – кількість протонів, які формують сигнал D, у випадку PEG-1500 це 134.

Оцінка вмісту моноестеру PEG-1500 хлороцтової кислоти в суміші за даними спектру становить  $89 \pm 3\%$ . Таким чином в суміші максимальний вміст моноестеру становить 14%.

Подібну ситуацію можна спостерігати практично для всіх синтезованих, поліоксіетиленових естерів хлороцтової кислоти, але для поліоксіетиленгліколів з меншою молекулярною масою це проявляється в меншій мірі, і вміст діестеру не перевищує 5÷8%. Вище описаний аналіз проводився на прикладі спектру естеру на основі PEG-1500, так як для цього зразка розходження між прогнозованими значеннями інтенсивностей сигналів є найбільша.

Таблиця 4.1. Склад виділених з реакційної маси зразків моноестерів хлороцтової кислоти з поліоксіетиленгліколями різної молекулярної маси.

М.М. PEG	Вихід, %	Склад виділеного продукту				
		Естерне число	МХОК	Моно-естер	Діестер	PEG
		ммоль/г	%	%	%	%
300	75,3	2,67	2,95	95	<5	2
400	70,2	1,94	1,83	92	5	3
600	68,3	1,38	1,24	93	6	1
1050	52,3	1,40	0,84	89		
1500	48,1	0,55	0,53	77	10	13

В таблиці 4.1 приведено вихід естерів хлороцтової кислоти на виділений продукт та його склад в синтезах проведених за методикою, яка описана в розділі 2.2.6 без додаткової очистки. З одержаних даних, можна побачити, що зі збільшенням молекулярної маси поліоксіетиленгліколю якість виділеного продукту погіршується, а вихід зменшується. При тому зменшується вихід, і у випадку використання більшого надлишку поліоксіетиленгліколю на стадії одержання метилату, як повідомлялось вище. У виділеному продукті збільшується кількість, як вихідного поліоксіетиленгліколю, так і кількість діестеру. Проведені дослідження

показали, що основні проблеми пов'язані з низькою ефективністю стадії розділення реакційної суміші екстрацією бутаном у випадку високомолекулярних поліоксіетиленгліколів. Аналізуючи вище наведені дані можна стверджувати, що розроблена методика є ефективною для одержання моноестерів поліоксіетиленгліколів хлороцтової кислоти із поліоксіетиленгліколів з молекулярною масою менше 1000 Да. Для поліоксіетиленгліколів з вищою молекулярною масою продукт вимагає додаткової очистки, а це приводить до пониження виходу. В окремих випадках вихід очищеного продукту може понижатись до 20%.

#### 4.1.2. Дослідження особливостей перебігу реакції N-алкілювання глутамінової кислоти поліоксіетиленовими естерами хлороцтової кислоти

Реакцію, за якою проводили N-алкілювання глутамінової кислоти, відображено на схемі 4.2. Перебіг даної реакції ускладнений рядом факторів. В розділі 1.6, де проведено огляд закономірностей перебігу реакцій N-алкілювання галогенопохідними, показано, що дана реакція рідко зупиняється на стадії монозаміщення. Переважно, зразу ж реалізується друга стадія – заміщення другого водню біля атома азоту. До певної міри зупинити процес дизаміщення можна використанням надлишку аміну. Проте, в даному дослідженні, цей прийом не може бути реалізований через обмежену розчинність глутамінової кислоти в більшості органічних розчинниках.

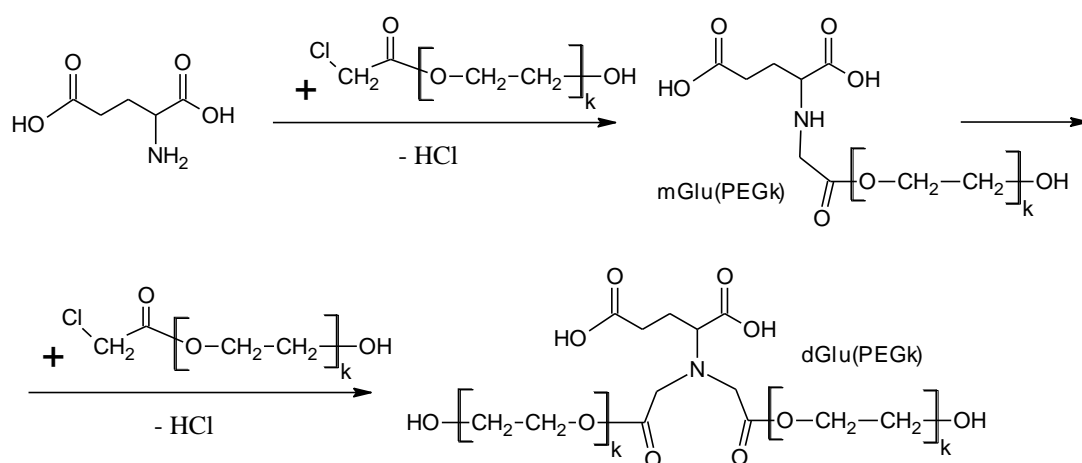


Схема 4.5 Реакція N-алкілювання, що приводить до утворення дизаміщеної N-похідної

Для проведення реакції, в якості розчинника, використовували N,N-диметилформамід, в якому глютамінова кислота (в температурному діапазоні 343 ÷ 393 K) є хоча б, обмежено розчинна. Через це, в межах даної роботи, досліджувався перебіг реакції N-алкілювання, в якому поряд з реакцією моно- заміщення за схемою 4.2 реалізувалась реакція дизаміщення по схемі 4.5. Слід відмітити, що для вирішень основних задач даного дослідження – отримання полімерних матеріалів медичного та біомедичного призначення здатних до формування в водних середовищах самостабілізованих дисперсій та дисперсій мікрогідрогелів, в однаковій мірі, може представляти інтерес, як монозаміщена так і дизаміщена N-похідна глютамінової кислоти, тому при дослідженні процесу N-алкілювання, процес оптимізувався на максимальний вихід сумарного кислотного числа продукту реакції з акцентуванням уваги на розділенні реакційної суміші з виділенням, як монозаміщеної так і дизаміщеної похідних з подальшим їх дослідженням.

Окремо слід відмітити, що роль розкислювача в даній реакції відіграла сама глютамінова кислота. Це забезпечувалось тим фактом, що основність глютамінової кислоти є значно вища ніж основність одержаних продуктів реакції. Попри те, що розчинність самої глютамінової кислоти в DMFA є невисокою, розчинність її солянокислої форми є ще меншою. Тому, соляна кислота, яка виділялась в ході реакції взаємодіяла з глютаміновою кислотою, а утворена, в ході даної взаємодії сіль, випадала з розчину. Натомість, глютамінова кислота, яка завжди бралась в надлишку, з осаду розчинялась в реакційній масі. Для підтвердження даного факту, декілька разів, за різних умов проведення синтезу, як по ходу реакції, так і по її завершенні, від реакційної суміші відділявся осад для аналізу. Проводили потенціометричне визначення кислотності осаду, гравіметричне визначення його кількості та, в окремих випадках, дослідження його структури методом ПМР-спектроскопії. Всі одержані дані підтверджували, що в осаді реакційної суміші знаходилась глютамінова кислота, яка не вступила в реакцію (або через невисоку конверсію, якщо проба відбиралась на протязі проведення процесу, або завдяки завантаженню глютамінової кислоти в надлишку) та її солянокисла форма, що утворилась за рахунок нейтралізації. Для оптимізації проведення процесу, важливо,

відмітити, що основних продуктів реакції в осаді, або спостерігалось в аналітично незначній кількості, або взагалі не було виявлено.

Разом з визначенням кислотного числа продукту реакції, за складом реакційної суміші слідкували за допомогою тонкошарової хроматографії. Крім дита монозаміщеного продуктів реакції, за даними тонкошарової хроматографії, з часом, особливо при підвищених температурах, в реакційній суміші нагромаджувався третій продукт реакції. Дослідження структури даного продукту, в межах даної роботи, не проводилось. Його вважали побічним продуктом реакції, що утворюється в результаті перегрупування основних реагентів. Тому, в ході оптимізації умов проведення реакції, з огляду на складність розділення реакційної суміші, більш привабливими вважали ті умови проведення, при яких, по даним тонкошарової хроматографії, даний побічний продукт, або взагалі не спостерігався, або спостерігався в незначних кількостях.

В таблиці 4.2 наведено значення кислотного числа продуктів, виділених з реакційної суміші, але не розділених, від умов синтезу.

Таблиця 4.2. Залежність кислотного числа продуктів реакції від умов проведення процесу

Порядковий номер синтезу	Співвідношення, моль Glu на 1 моль	Температура, °C	Час, год	Кислотне число, ммоль/г	Примітка
1	10	100	17	8,71	Нагромаджуються побічні продукти
2	10	100	4	0,25	
3	1,6	100	20	3,91	Нагромаджуються побічні продукти
4	1,6	100	22	2,58	
5	10	90	20	2,63	
6	1,6	80	20	7,85	Слідові кількості побічних продуктів
7	1,6	80	12	2,54	
8	10	80	34	3,50	Нагромаджуються побічні продукти
9	1,6	80	35	4,53	
10	10	80	35	3,49	
11	3	80	22	8,20	Слідові кількості побічних продуктів

Основними чинниками, що впливають на вихід продуктів реакції вважали температуру та час проведення реакції, а також співвідношення між кількістю глутамінової кислоти та поліоксіетиленовим естером хлороцтової кислоти. Літературні дані та попередні дослідження дозволили звужити температурний діапазон до  $353 \div 373$  К. При більш високих температурах в реакційній масі нагромаджувався побічний продукт реакції, що підтверджувалось тонкошаровою хроматографією. Крім того, це супроводжувалось потемнінням реакційної суміші з яскравими ознаками перебігу процесів осмолення.

Попри те, що глутамінова кислота при будь-яких співвідношеннях повністю не розчинялась в реакційній суміші, але, враховуючи той факт, що вона відіграє також роль розкислювача, суттєвим її надлишком інтенсифікували процеси обміну між фазами, досліджували вплив надлишку кислоти до співвідношення 10.

За даними таблиці 4.2 можна побачити, що при температурі більше 363 К в реакційній суміші нагромаджуються побічні продукти, і попри те, що при 373 К (зразок 1, таблиця 4.2) спостерігається найбільше значення кислотного числа, дещо більше за кислотне число зразка 6 і 11, температуру вище 353 К вважали не оптимальною. При температурі 353 К реалізуються достатньо високі значення кислотного числа, але в реакційній суміші до 20÷25 годин побічні продукти або не нагромаджуються, або нагромаджуються в незначній кількості. Більш тривалий перебіг реакції приводить до помітного нагромадження побічного продукту реакції, що навіть супроводжується пониженням кислотного числа. Переваг від використання надлишку глутамінової кислоти більше 3 не спостерігали, але нижче даного співвідношення відносно понижається кислотне число. Тому більшість синтезів проводили при мольному надлишку 3. Відповідно, оптимальним часом проведення реакції слід вважати 20÷25 годин.

За рекомендаціями літературних даних, було розроблено методику розділення реакційної суміші з виділенням з неї моно- та дизаміщених поліоксіетиленових N-похідних глутамінової кислоти. Методика проведення синтезу та розділення реакційної суміші приведена в розділі 2.2.6.



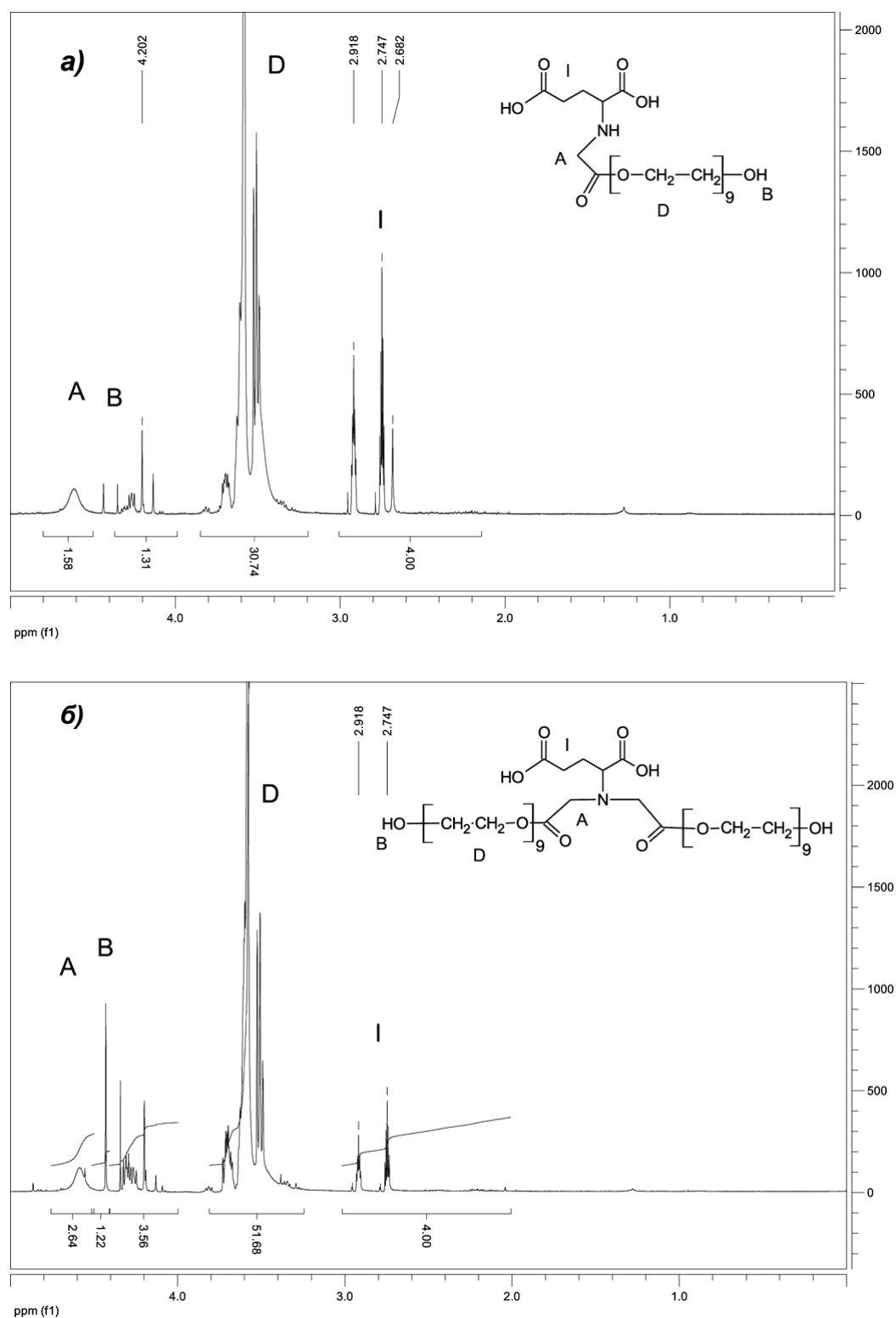


Рис. 4.2. ПМР спектри зразків а) монозаміщеної похідної mGlu(PEG400) виділеної з органічного шару та б) дизаміщеної похідної dGlu(PEG400) виділеної з водної фази при розділенні реакційної суміші.

Про ефективність методики розділення можна робити висновок за даними ПМР-спектроскопії, як монозаміщеної похідної, що виділялась з органічного шару в ході екстракції реакційної суміші бутаноном, так і дизаміщеної похідної, що

виділялась з водної фази. Для прикладу, на рис. 4.2 приведено спектри обох продуктів з віднесеннями сигналів. Очікувано, що одержанні спектри за кількістю сигналів та їх віднесеннями співпадають з сигналами і віднесенням спектрів відповідних естерів хлороцтової кислоти (рис. 4.1). Суттєвою відмінністю є лише сигнали **I** від протонів глютамінової кислоти. Наявність цих протонів підтверджує проходження реакції заміщення.

Спектри відрізняються співвідношенням сигналів. Зокрема, відношення сигналів протонів поліоксіетиленового ланцюга до протонів залишку глютамінової кислоти в спектрі а) для монозаміщеної похідної становить 7,68 проти теоретичного значення 6,82. Аналогічне відношення у випадку дизаміщеної похідної (спектр б) є 12,92 проти 13,63. Певне відхилення у співвідношеннях можна пояснити з одного боку невідповідністю молекулярних мас поліоксіетиленових фрагментів, їх декларованим молекулярним масам після двох стадій перетворення (залишається можливість того, що в ході реакцій відбувалось певне зміщення середньої молекулярної маси фрагменту за рахунок значної полідисперсності вихідних зразків поліоксіетиленів), а з іншого, присутністю в зразках домішок непрореагованих вихідних поліоксіетиленових естерів хлороцтової кислоти. Дані, що отримані в ході ПМР-спектроскопії дозволяють оцінити вміст основної речовини в зразку. Ці дані, разом з даними про вихід продуктів реакції наведені в таблиці 4.3.

Таблиця 4.3 Залежність виходу моно- та дизаміщеної поліоксіетиленових N-похідних глютамінової кислоти в залежності від молекулярної маси поліоксіетиленового фрагменту.

М.М. PEG	Загальний вихід продуктів, %	Монозаміщений		Дизаміщений	
		Відсоток в суміші, %	Вміст, %	Відсоток в суміші, %	Вміст, %
300	67,1	70,9	95,6	29,1	89,5
400	83,1	40,0	96,2	60,0	90,4
600	97,1	16,0	90,3	84,0	92,1
1050	95,4	20,8	92,1	79,2	90,1
1500	94,6	26,1	89,1	73,9	85,1

За значеннями таблиці загальний вихід продуктів зростає зі збільшенням молекулярної маси поліоксіетиленового фрагменту. Можна допустити, що збільшення поліоксіетиленового фрагменту приводить до певного сповільнення

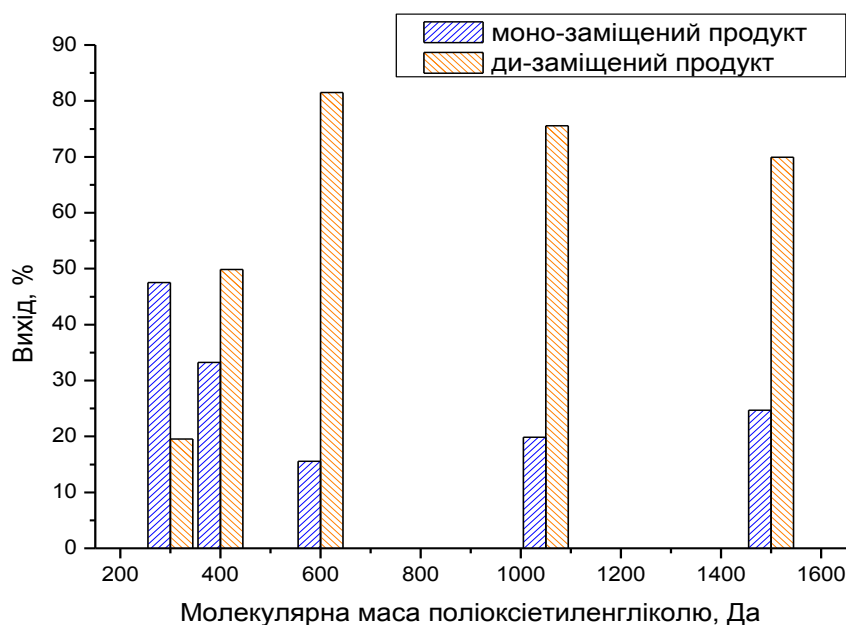


Рис. 4.3 Залежність виходів моно- та дизаміщених продуктів в залежності від довжини ланцюга поліоксіетиленгліколю.

перебігу реакції утворення побічного продукту. Крім того, наведені дані дозволяють побачити, що вміст в суміші моно- та дизаміщених похідних, також доволі вагомо залежить від довжини поліоксіетиленового фрагменту. Більш однозначно це можна оцінити за даними діаграми, яка наведена на рис. 4.3. Ця діаграма демонструє, що збільшення поліоксіетиленового фрагменту збільшує вихід дизаміщеного продукту.

#### 4.2. Особливості поліконденсації N-поліоксіетиленових похідних глютамінової кислоти

Було проведено ряд досліджень по вивченню здатності вступати в реакцію поліконденсації одержаних за розробленою методикою N-поліоксіетильованих похідних глютамінової кислоти (Glu(PEGk)).

Враховуючи те, що mGlu(PEGk) є поліконденсаційним мономером, який в своїй молекулі містить одночасно, як карбоксильну, так і гідроксильну групи, в першу чергу було перевірено його спроможність до конденсації за реакцією Стегліха з участю цих груп. Для цього було проведено ряд синтезів в яких використовували Glu(PEG) з різною молярною масою поліоксіетиленового

фрагменту. До розчину цього мономеру в DMFA добавляли DCC в еквімолярній кількості і ДМАП в кількості 0,126 моль на моль DCC. Реакцію проводили при температурі 285÷291 К. Про перебіг реакції робили висновок за кількістю виділеної DCU. Зокрема було встановлено, що в ході реакції вихід DCU не залежав від молекулярної маси поліоксіетиленового фрагменту та становив від 75÷80 %. Продукт реакції, після відділення осаду DCU, з реакційної суміші виділяли осадженням гексаном з DMFA та промивали одержаний полімер діетиловим ефіром.

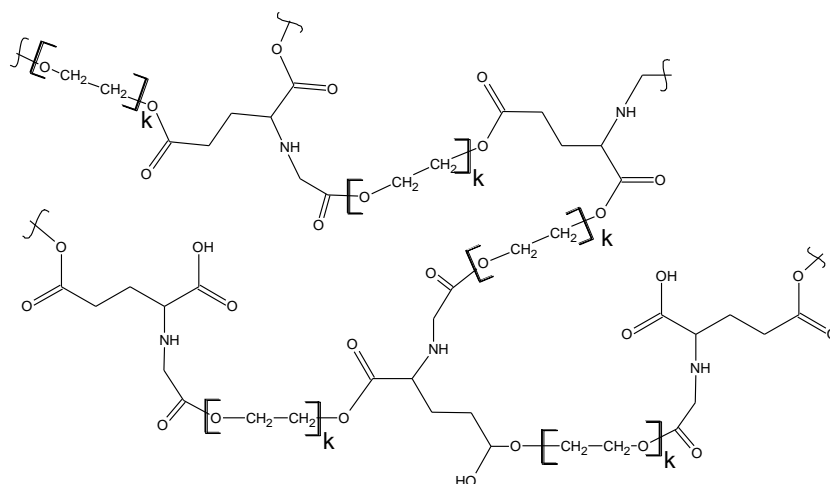


Схема 4.6 Продукт оліконденсації N-поліоксіетиленових похідних глютамінової кислоти за реакцією Стегліха

Виділений таким чином продукт був розчинний у метанолі та воді. Передбачувана структурна формула приведена на схемі 4.7.

Вище описані дослідження дозволили стверджувати, що одержані поліоксіетиленові N-похідні глютамінової кислоти володіють здатністю вступати в реакцію Стегліха. Ця їхня властивість була використана для модифікації частинок гель-фракції, яку одержували при взаємодії декстрину з Glu(St) при співвідношенні 3 : 1 (ОН : COOH).

За даними таблиці 3.3 цього типу гель-фракції проявляють сильно гідрофобні властивості і як буде показано в розділі 5, не формують у водному середовищі агрегатно-стабільних водних дисперсій.

Стабілізувати у водному середовищі частинки даної гель-фракції можна за рахунок формування навколо неї гідрофільної оболонки. Для цього висушений полімер гель-фракції на колоїдному млині механічно подрібнювали в середовищі

DMFA, в якому він частково набрякає, в результаті чого утворювалась стабільна дисперсія. До одержаної дисперсії додавали mGlu(PEG1500) в DMFA після чого прибавляли DCC та ДМАП в кількості 50 % до маси гель-фракції. Реакційну суміш витримували протягом 25 годин при температурі 291÷293 К. В ході реакції виділялось 70÷75 % від теоретично можливого DCU, який був виділений з реакційної суміші центрифугуванням. Полімер, осаджували метанолом після часткового упарювання DMFA, промивали диетиловим ефіром і сушили. Приріст маси полімеру становить 38 %, що є 76 % від теоретично можливого. Даний факт свідчить про формування нового гідрофобного ядра гель-фракції – гідрофільної оболонки, структуру якої можна відобразити на схемі 4.7.

В розділі 6 буде описано дослідження в яких висвітлена вище методика

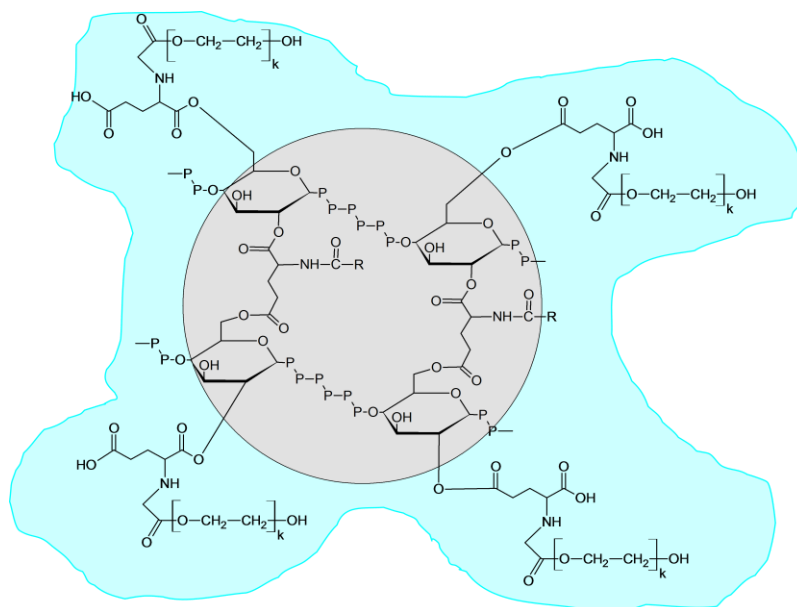


Схема 4.7 Формування гідрофільної оболонки навколо частинок гель-фракції зразка DS6H.

використовувалась для формування препаратів пролонгованої доставки  $Fe^{2+}$  в організм тварини.

## **Розділ 5. Дослідження властивостей поліестерів синтезованих на основі полісахаридів та двоосновних $\alpha$ -амінокислот**

Продукти взаємодії декстрину та декстрану з N-стеароїл- чи N-лауреїлглутаміновими кислотами (Glu(St) чи Glu(L)) за реакцією Стегліха в тій чи іншій мірі, здатні формувати у водному середовищі самостабілізовані дисперсії. Властивості одержаних дисперсій, їх стабільність та морфологія дисперсної фази в значній мірі залежить від умов одержання продуктів реакції та їх структури, про що повідомлялось у розділі 3.

В роботах [165, 166], показано що частинки дисперсної фази псевдо-поліамінокислот поліестерного типу, які були одержані поліконденсацією N-стеароїлглутамінової кислоти та полідіолів поліоксіетиленового та поліоксіпропіленового рядів формують самостабілізовану дисперсну фазу у водних середовищах з стабілізацією їх поверхні за рахунок формування структурно-механічного бар'єру за участю гідратованих ланцюгів поліоксіетилену. Відомо, що формування такого структурно-механічного бар'єру визначається поверхнево-активними властивостями полімеру дисперсної фази та його здатністю до сольватаційної взаємодії з водою.

В розділі 3 було показано, що найбільш вагомим фактором, який визначає структуру макромолекул продуктів взаємодії, є співвідношення реагентів. Крім співвідношення на стадії синтезу визначальним фактором є спосіб виділення продукту взаємодії, зокрема розділення на дві фракції, які умовно називають золь- та гель-фракціями. З огляду на це, при вивченні колоїдно-хімічних властивостей основну увагу приділяли дослідженню впливу цих факторів – співвідношення на стадії синтезу та способу виділення.

### **5.1. Дослідження поверхневої активності поліестерів на основі N-похідних глутамінової кислоти та полісахаридів**

Для встановлення залежності поверхнево-активних властивостей зразків золь-фракції від їх структури та умов одержання досліджувались зразки зі співвідношенням гідроксильних до карбоксильних груп – 4:1, 8:1, 15:1, 40:1 (DS4Z, DS8Z, DS15Z, DS40Z, відповідно). За даними таблиці 3.4 можна стверджувати, що у зразка DS4Z, кількість прищеплених фрагментів Glu(St) становить  $9 \div 10$  на одну

молекулу декстрину. Прищеплених залишків Glu(St), за двома карбоксильними групами (реакція за схемою 3.10) не більше половини. Таким чином даний зразок представляє собою перехресно-зшитий декстрин з молекулярною масою  $38\div 43$  кДа, у якого значна кількість залишків Glu(St) не приймає участі в розгалуженні ланцюга. У зразка DS8Z загальна кількість прищеплених фрагментів така ж як у зразка DS4Z, але більшість з них провзаємодіяла за обома групами, тобто прийняла участь у структуруванні макромолекул декстрину. Молярна маса такого зразка становить  $60\div 63$  кДа (за даними рис. 3.16) у якого практично всі фрагменти Glu(St) приймають участь в розгалуженні ланцюга. Молярна маса зразка золь-фракції, що отриманий при співвідношенні 15 : 1 (DS15Z) знаходиться в діапазоні від  $17\div 20$  кДа (за даними гель-проникної хроматографії) до  $22\div 25$  кДа (за даними ПМР-спектроскопії) у якого практично всі залишки Glu(St) прийняли участь в структуруванні. Таким чином зразок DS15Z, по своїй структурі близький до зразка DS8Z. Вони відрізняються лише ступенем структурування, що проявляється в меншій молекулярній масі, через зниження ступеню модифікації та розгалуження. Зразок золь-фракції DS40Z одержаний в умовах незначного структурування макромолекул. Дані гель-проникної хроматографії показують (рис. 3.15), що одержані зразки мають складний молекулярно-масовий розподіл, а дані рис. 3.17 дозволяють прогнозувати значну полідисперсність молекулярної маси.

На рис. 5.1 приведено ізотерми поверхневого натягу для цих зразків. З наведених ізотерм можна побачити, що полімери володіють доволі значними поверхнево-активними властивостями. При концентраціях дисперсної фази більших за 0,1%, поверхневий натяг понижається до  $43\div 46$  мН/м. Це власне, забезпечує їх здатність до формування самостабілізованих частинок дисперсної фази у водному середовищі. Більшість ізотерм мають характерний для поверхнево-активних сполук злам, по якому можна визначити критичну концентрацію міцелоутворення (ККМ). Лише у кривій, яка одержана для зразка DS40Z, цей злам є слабо проявленим. Причиною цього є молекулярна неоднорідність даного зразка. З цієї причини точність визначення значення ККМ є значно меншою у порівнянні з іншими зразками.

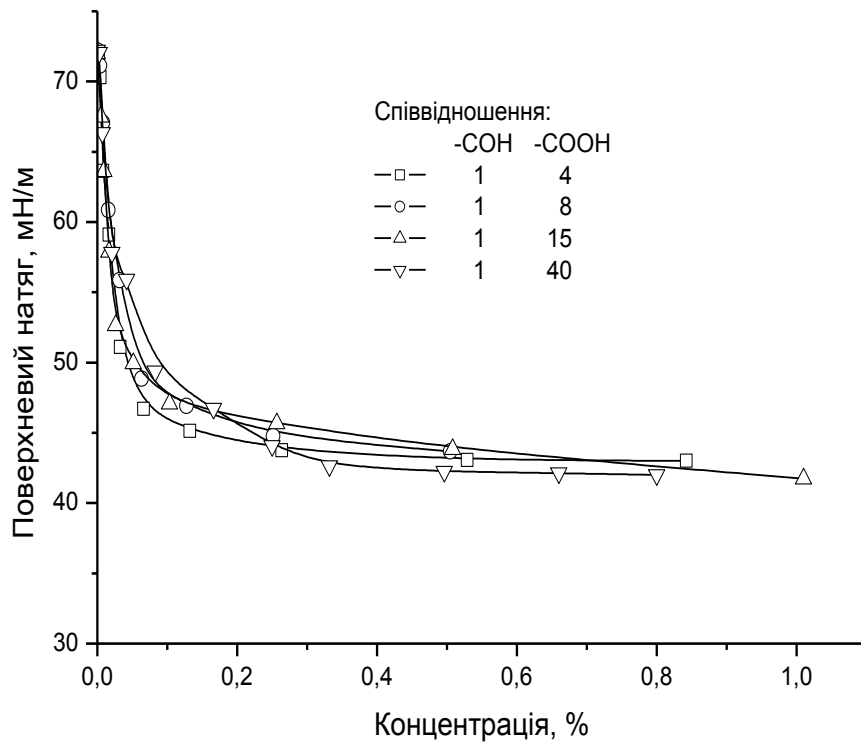


Рис. 5.1. Ізотерми поверхневого натягу для зразків золь-фракції, які одержані при різному співвідношенні між реагентами на стадії одержання.

Залежність значень ККМ від співвідношення реагентів приведені на рис. 5.2. Крім вагомій відмінності в структурі макромолекул (зразки одержані при співвідношенні 4 : 1 (ОН : СООН)) та значну різницю в молярній масі (зразки DS8Z

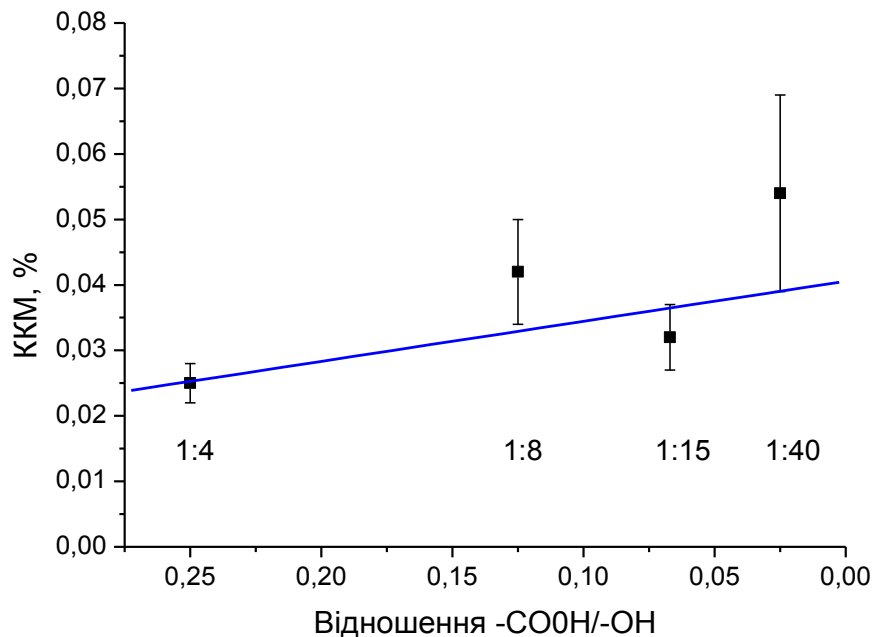


Рис. 5.2. Залежність ККМ від співвідношення реагентів на стадії одержання.



та DS15Z) значення ККМ доволі близькі між собою і проявляють слабку, на границі статистичної значимості, залежність від співвідношення функціональних груп. Відсутність суттєвої зміни значення ККМ напевне можна пояснити антибатністю впливу на значення ККМ молярної маси і ступеню модифікації. Збільшення молярної маси приводить до збільшення значення ККМ, а ступінь заміщення – до зменшення. Оскільки молярна маса зразків і ступінь заміщення у золь-фракції в діапазоні, що досліджується, є закорельовані, це спричиняє взаємну компенсацію їх впливу на значення ККМ. Так як зразки золь-фракції є розчинною в спирті, фракцією модифікованого декстрину, то вплив на його склад і структуру є обмеженим і отримати зразки з суттєво іншим значенням заміщення при тому ж значенню ступеню структурування утруднено. З цієї причини однозначно експериментально підтвердити цей висновок є складно.

Важливим є те, що навіть при співвідношенні 40 : 1 (ОН : COOH), при якому, за даними розділу 3, на одну молекулу декстрину (з молекулярною масою 7000 Да і яка складається з ~ 43 глюкопіранозидних залишків) прищеплюється не більше 2÷3 залишки Glu(St), спостерігається суттєвий вплив модифікації на природу макромолекули, проявляється поверхнева активність та формується дисперсна фаза у воді. Слід відмітити, що немодифікований декстрин є водорозчинним та не володіє поверхнево-активними властивостями.

Певний вплив на поверхнево-активні властивості зразків золь-фракції має молярна маса алкільного залишку N-замісника глутамінової кислоти. Для ілюстрації цього впливу на рис. 5.3 приведена ізотерма поверхневого натягу зразка DL6Z (крива 1), в якості структуруючого агенту, в якому, була використана Glu(L). Дана ізотерма наведена у порівнянні з ізотермою поверхневого натягу дисперсії DS8Z, у якого в якості структуруючого агенту використовувалась Glu(St), поверхнево-активні властивості якого були обговорені вище. Проведене порівняння демонструє, що у зразку DL6Z дещо вищі поверхнево-активні властивості. Спостерігається статистично значимо менше значення ККМ – 0,01% проти 0,025÷0,03% у відповідних зразків, які одержані на основі Glu(St) і суттєво менше значення максимального пониження поверхневого натягу – 38÷40 мН/м проти 43÷46.

Тенденція до підвищення поверхнево-активних властивостей при зменшенні практично на 30% молярної маси сильно олеофільного ланцюга при умові домінуючого гідрофільного оточення може бути пояснене більшою конформаційною рухливістю останнього, в умовах розгалуженого полімерного ланцюга, що полегшує реалізацію як міжмолекулярної так і внутрішньо-молекулярної гідрофобно-гідрофобної взаємодії.

Описані вище дослідження продемонстрували, що полімерний матеріал золь-фракції володіє значними поверхнево-активними властивостями. В протипагу до

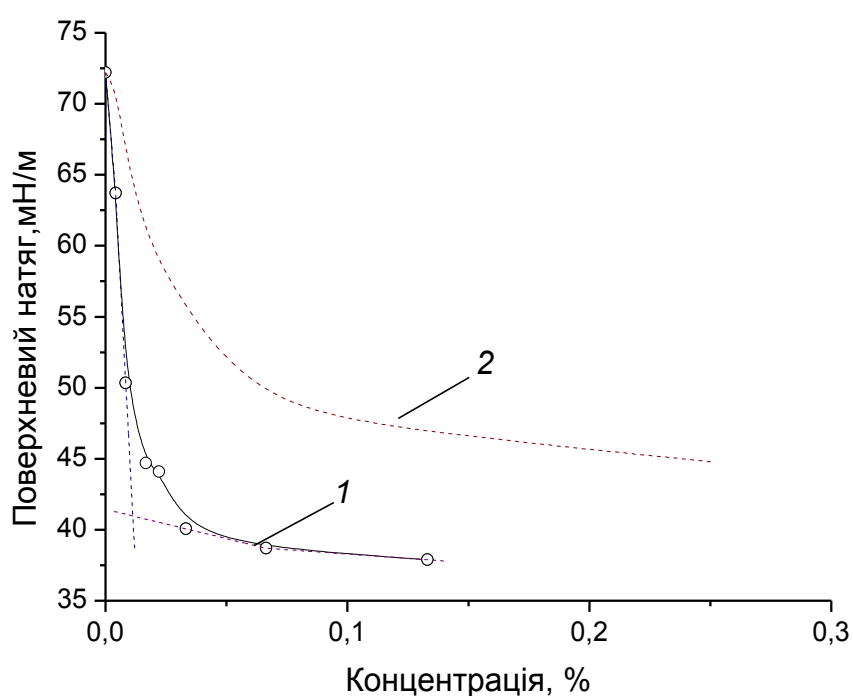


Рис. 5.3. Ізотерма поверхневого натягу зразка золь-фракції DL6Z (1) у порівнянні з порівнянні зі зразком DS8Z (2).

цього, поверхнево-активні властивості полімеру гель-фракції є значно меншими або не проявляються взагалі. Про це можна зробити висновок з даних рис. 5.4, на якому приведена ізотерма поверхневого натягу зразка гель-фракції із співвідношенням карбоксильних груп до гідроксильних 20 : 1. Крива дозволяє стверджувати, що зразок володіє певною, доволі незначною поверхневою активністю – максимально поверхневий натяг, при високих концентраціях, знижується до 58 мН/м. При тому на кривій не спостерігається однозначно проявленого зламу, який би дозволяв стверджувати, різку зміну поверхневої активності. На цьому ж рисунку, барями

представлено поверхневий натяг для зразків гель-фракції, що одержані при інших співвідношеннях. Можна побачити, що незначне, у порівнянні із золь-фракцією, пониження поверхневого натягу спостерігається для зразків, які одержані при співвідношенні 10 : 1 (ОН : COOH) і більше. Пониження поверхневого натягу у зразків, які отримані при менших співвідношеннях, взагалі не спостерігається. Ці дослідження добре корелюються з дослідженнями по здатності зразків гель-фракції набрякати у воді (таблиця 3.3), які демонструють, що набрякання і проявлення йодної проби декстрину, у зразків гель-фракції, появляється при співвідношеннях більших за 10 : 1 (ОН : COOH).

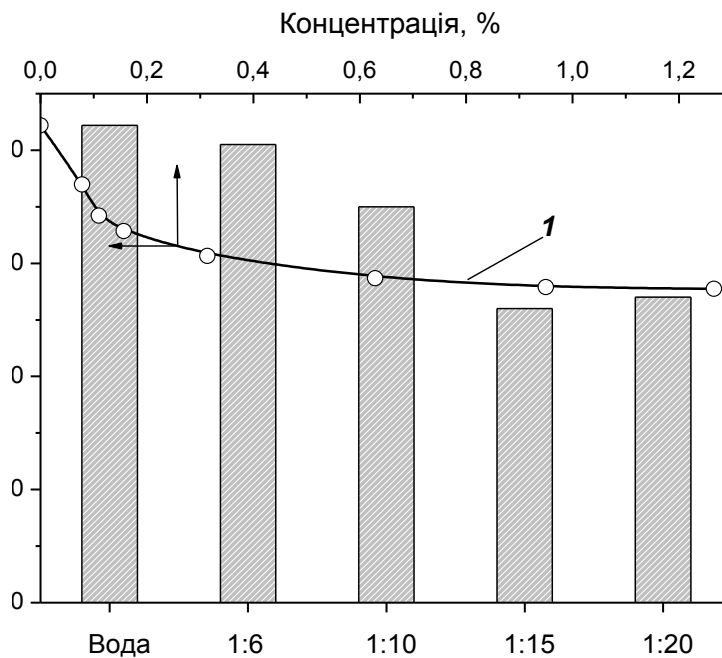


Рис. 5.4. Ізотерма поверхневого натягу водної дисперсії зразка гель-фракції, зразка DS20H (крива 1) та значення поверхневого натягу для зразків з різним співвідношенням при концентрації більшій за 0,8% у порівнянні з поверхневим натягом води.

В розділі 3, на основі аналізу властивостей полімерів гель- та золь-фракцій, приводилось трактування, що полімери золь-фракції в основному складаються з полімерних молекул розгалуженої будови за рахунок перехресної зшивки макромолекул декстрину. В протипагу до цього, гель-фракція представлена сітчастими полімерами з просторово-структурованою будовою макромолекул. З огляду на це, одержані результати поверхневої активності слід вважати

закономірними – розгалужені полімерні молекули золь-фракції здатні до локалізації на міжфазній границі з орієнтацією алкільних фрагментів (Glu(St) чи Glu(L)) в інтерфазу, а просторово-структуровані макромолекули гель-фракції такої можливості позбавлені. Через це полімерний матеріал золь-фракції проявляє доволі значну поверхнево-активну властивість, а полімерний матеріал гель-фракції такої активності не проявляє.

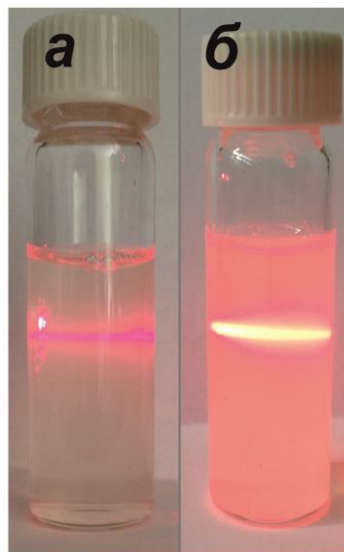


Рис. 5.5 Фотографії дисперсій золь- (а) та гель- (б) фракцій синтезу DS15, підсвічених променем червоного лазера

Поверхнево-активні властивості зразків золь-фракції дозволяють їм формувати в водному середовищі самостабілізовані водні дисперсії (рис. 5.5.а). Одержували такі дисперсії шляхом диспергування висушених зразків полімеру золь-фракції у воді при перемішуванні на магнітній мішалці протягом 3 ÷ 6 годин. Час приготування дисперсії можна скоротити нагріванням протягом 5 ÷ 15 хвилин до температури 343 ÷ 353 К. Агрегатна стабільність одержаних таким чином дисперсій з концентрацією дисперсної фази до 5% спостерігалась протягом 3 місяців при їх зберіганні при кімнатній температурі.

Попри те що зразки гель-фракції не володіють значною поверхневою активністю, на основі них також було одержано водні дисперсії (рис. 5.5 б) мікрогідрогелів у воді. Для їх одержання, ксерогелю давали можливість набрякнути у воді протягом 1 години, після чого розчин активували. Активацію можна

проводити перемішуванням на магнітній мішалці, але цей процес проходить значно швидше, якщо її реалізувати в полі ультразвукових хвиль при нагріванні. В такому випадку дисперсію можна приготувати протягом 15÷20 хвилин. Агрегатно-стабільними були лише дисперсії на основі полімерних зразків гель-фракції, що були одержані при співвідношенні реагентів на стадії синтезу більше ніж 15:1 (ОН : COOH). Зразки гель-фракції, які були одержані при співвідношенні 4÷10 до одного вдавалось редеспергувати у воді, але протягом 0,5÷2 годин вони розшаровувались. Зразки гель-фракції, що одержані при співвідношенні до 4 : 1 є гідрофобними (таблиця Таблиця 3.3) і не диспергувались у воді. Підвищити стабілізацію дисперсної фази у воді останніх вдається тільки після прищеплення до їхньої поверхні гідрофільної оболонки шляхом прищеплення N-поліоксіетильованих похідних глютамінової кислоти (розділ 4.2). Також можна стверджувати, що стабілізація частинок гель-фракції забезпечується набряканням частинок гель-фракції у воді, що призводить до зменшення їх седиментаційної здатності.

## **5.2. Термохімічні дослідження зразків золь- та гель-фракцій**

З літературних джерел відомо, що естери глютамінової кислоти, проявляють значну термолабільність. Видається малоімовірним можливість їх одержання при температурах реакційного середовища вищих за 393÷413 К. Власне це є одним з основних факторів, що спонукає проводити дослідження можливості формування як самих естерів глютамінової кислоти, так і полімерів за участю естерних груп глютамінової кислоти, в температурних діапазонах нижчих за 293 К. З огляду на це, реакція Стегліха є дуже привабливою оскільки дозволяє проводити процес в температурному діапазоні близькому до нормальних умов за відносно короткий час.

Оскільки термічна стабільність естерної групи, що сформована за участю карбоксильних груп глютамінової кислоти є пониженою, представляють певний інтерес дослідження термолабільності продуктів, що одержані в ході даного дослідження. Зокрема це важливо з точки зору придатності їх до стерилізації, так як передбачається використання одержаних полімерів як полімерів медичного призначення.

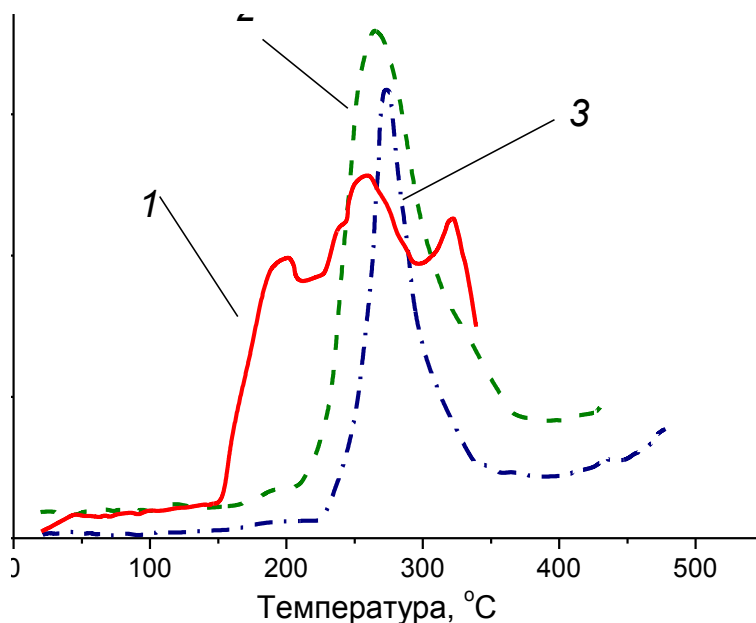


Рис. 5.6. Криві DTG дереватограми зразків золь фракції 1) DS3Z та зразків гель-фракції 2) DS2H та 3) DS6H.

На рис. 5.6 приведені характерні DTG криві дереватограм зразка золь-фракції (1), одержаної при співвідношенні гідроксильних груп до карбоксильних 3 : 1, та зразків гель-фракції, що одержані при співвідношеннях (2) – 2 : 1 та (3) – 6 : 1. Приведені криві в першу чергу демонструють значну різницю по термічній стабільності зразків золь- та гель-фракцій. Початок втрати маси для золь-фракції припадає на 423 К, а у зразків гель-фракції в області 478 ÷ 493 К. Для обох фракцій втрата маси супроводжується ендотермічним тепловим ефектом. Різниця в 50 ÷ 70° є вагомою для того, щоб стверджувати про значну вищу термостійкість зразків золь-фракції. Максимуми швидкості втрати маси для обох фракцій приблизно співпадають і знаходяться в області 533 ÷ 548 К, але крива для зразка золь-фракції має складний характер з достатньо значимо вираженими кількома максимумами. Це може означати, що процес термічної деструкції полімеру золь-фракції є постадійним.

Оскільки якісний склад золь- та гель-фракцій не мають настільки принципової різниці і пояснення значної відмінності їх термічної стабільності слід шукати у відмінності структури їх макромолекул. В межах даної роботи

тракується, що макромолекули золь-фракції мають розгалужену структуру макроланцюгів, вузли розгалуження в яких сформовані поліестерними зв'язками глутамінової кислоти, а полімер гель-фракції, по своїй природі є просторово-структурованою сіткою, вузли якої також організовані тим же типом зв'язків. Відомо, що просторово-структуровані полімерні молекули відрізняються більшою термостабільністю, оскільки для експериментально помітної втрати маси необхідно розрив більшої кількості зв'язків. Слід вважати, що в системі, яка досліджується, таке пояснення також може мати місце, а виявлена різниця в термічній стабільності може слугувати додатковим підтвердженням різниці структури макромолекул золь-та гель-фракцій.

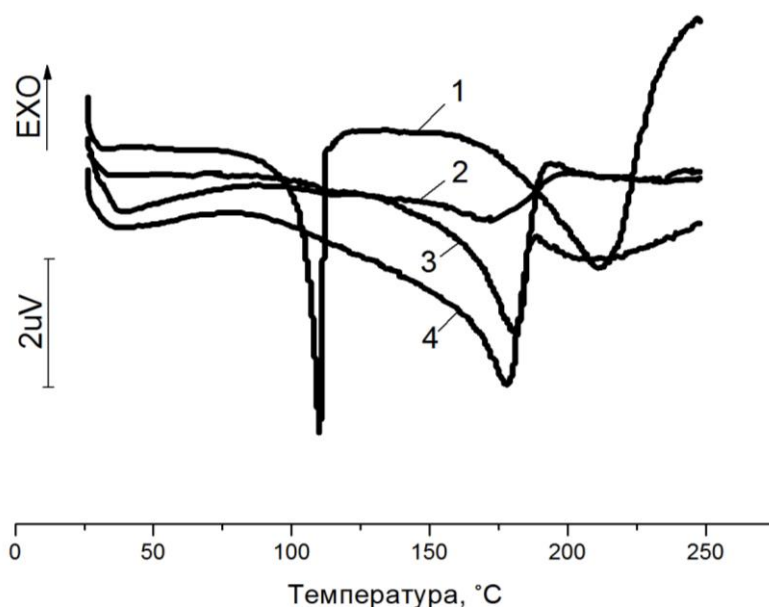


Рис. 5.7. Термограми диференційно-скануючої калориметрії для зразків золь фракції 2) DS3Z, 3) DS40Z, 4) DS15Z, 1) термограма Glu(St).

Стадію деструкції, що відображається першим максимумом, можна інтерпретувати, як процеси деструкції пов'язані з термолізом естерних зв'язків глутамінової кислоти. Даний процес може дати додаткову інформацію про структуру макромолекул. Для цього було проведено ряд калориметричних досліджень зразків золь-фракції на диференційно-скануючому калориметрі в неізотермічному режимі у порівнянні з термограмою для Glu(St). Результати даних досліджень приведені на рис. 5.7.

На даному рисунку приведено термограма для Glu(St). Перший пік цієї термограми відповідає фазовому переходу другого роду, що є характерним для Glu(St) і пояснюється порушенням взаємодії між алкільними фрагментами молекули. Другий сигнал відповідає температурі плавлення Glu(St). З наведених на цьому ж рисунку термограм зразків золь-фракції можна побачити, що відповідного переходу другого роду на них немає. Це означає, що структура молекул золь-фракції не дозволяє організуватись гідрофобно-гідрофобній взаємодії між алкільними фрагментами. Співставляючи дані рис. 5.6 і 5.7 можна зробити висновок, що сигнал на термограмах ДСК відповідає деструкції полімерів золь-фракції.

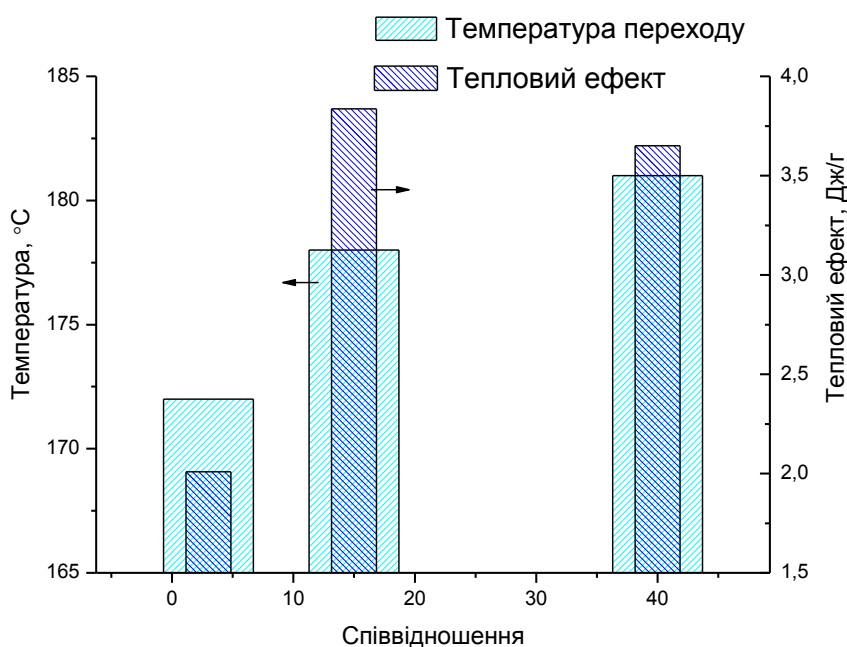


Рис. 5.8 Залежність температури та теплового ефекту деструкції зразків золь-фракції від співвідношення реагентів на стадії синтезу. Оцінки провдені за даними рис. 5.7.

Важливо відмітити, що температура максимуму даних сигналів корелюється з співвідношенням, при якому були одержані ці зразки (рис. 5.8). Цю залежність можна пояснити пониженням температури деструкції із збільшенням кількості прищеплених до полісахаридного ланцюга фрагментів Glu(St). Залежність теплового ефекту має дещо інший характер. За наведеними даними можна стверджувати, що тепловий ефект при високих значення співвідношення є суттєво більшим. Це може бути пояснено структурою макромолекули. Раніше було



показано, що при співвідношенні до 6:1 (ОН:COOH) в структурі макромолекул поліестеру домінують фрагменти Glu(St), що прореагували по одній групі. Слід думати, що тепловий ефект деструкції таких фрагментів є меншим ніж фрагментів, що Glu(St), які заміщені по двом групам.

### 5.3. Дослідження кількості «зв'язаної води» у продуктах взаємодії декстрину і N-стеароїлглутамінової кислоти

Дослідження кількості «зв'язаної води» проводили за допомогою дериватографа з використанням концентрованих дисперсій зразків золь- та гель-фракцій одержаних при різних співвідношеннях за методикою описаною в розділі 2.3.10. Характерні гравіметричні криві для зразків золь-фракції приведені на рисунку 5.9. Криві, що наведені на даному рисунку мають яскраво виражені два перегини, що відповідають втраті маси зразками в різних температурних діапазонах. Перший перегин спостерігається в діапазоні температур від 358 ÷ 371 К і зумовлений втратою основної кількості води з дисперсії. Співставлення цього діапазону кривої з кривою 1 даного рисунку, яка одержана при завантаженні в комірку дериватографа чистої води, дозволяє зробити висновок, що перший перегин відповідає випаровуванню вільної води, води яка не приймає участі у сольватній взаємодії з полісахаридними фрагментами зразків полімерів.

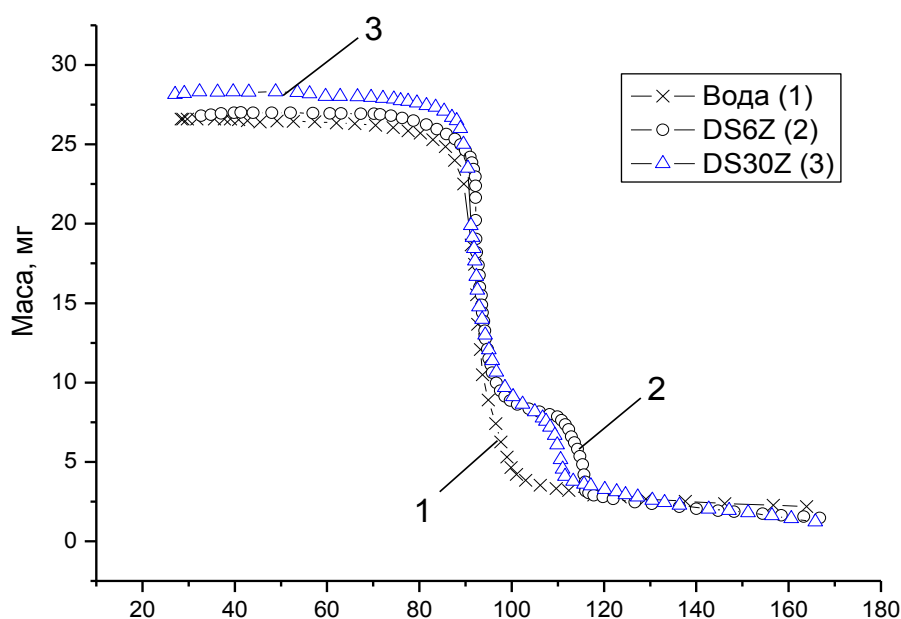


Рис. 5.9 Характерні гравіметричні криві золь-фракції.

Другий перегин спостерігається в температурному діапазоні 383 ÷ 393 К. Як було показано в розділі 5.2 в цьому температурному діапазоні термодеструкція одержаних зразків ще не спостерігається. Це дозволяє інтерпретувати втрату маси зразка в даному температурному діапазоні як втрату маси за рахунок випаровування води, молекули якої сольватно-зв'язані з полісахаридними фрагментами макромолекули. Результати розрахунків частки зв'язаної води від кількості полімеру приведені в таблиці 5.1. З даних цієї таблиці можна побачити, що макромолекули золь-фракції сольватують приблизно однакову кількість води в широкому діапазоні співвідношення між реагентами на стадії синтезу зразків. При тому, з точністю виконаного експерименту, ця кількість становить 82÷94% від кількості яку сольватує модифікований декстрин. Це дозволяє зробити висновок, що у полімерних молекул золь-фракції у водному середовищі практично всі ланки полісахаридних фрагментів доступні до сольватної взаємодії з водою. Даний факт добре узгоджується із запропонованою структурою макромолекул золь-фракції як полімерного матеріалу з розгалуженою структурою макромолекули. Така структура не спричиняє значних утруднень гідратації полісахаридних фрагментів.

В протипагу до цього, у полімерного матеріалу гель-фракції не всі фрагменти полісахаридного ланцюга є доступними до гідратації. В цьому можна переконатись з дериватограм водних концентрованих дисперсій зразків полімерів гель-фракції, що одержані при різних співвідношеннях реагентів на стадії синтезу (рис.5.10).

Таблиця 5.1 Значення кількості “зв'язаної води” від будови макромолекул поліестеру

Зразок	Золь-фракція (Z)	Гель-фракція (H)		
	Частка зв'язаної води, г/г	Відсоток до максимального, %	Частка зв'язаної води, г/г	Відсоток до максимального, %
DS3	-	-	0	0
DS6	0,207	94,0	0	0
DS8	-	-	0	0
DS15	0,198	90,2	0,120	54,7
DS30	0,180	82,0	0,185	84,3

\* Кількість зв'язаної води на 1 г полімеру

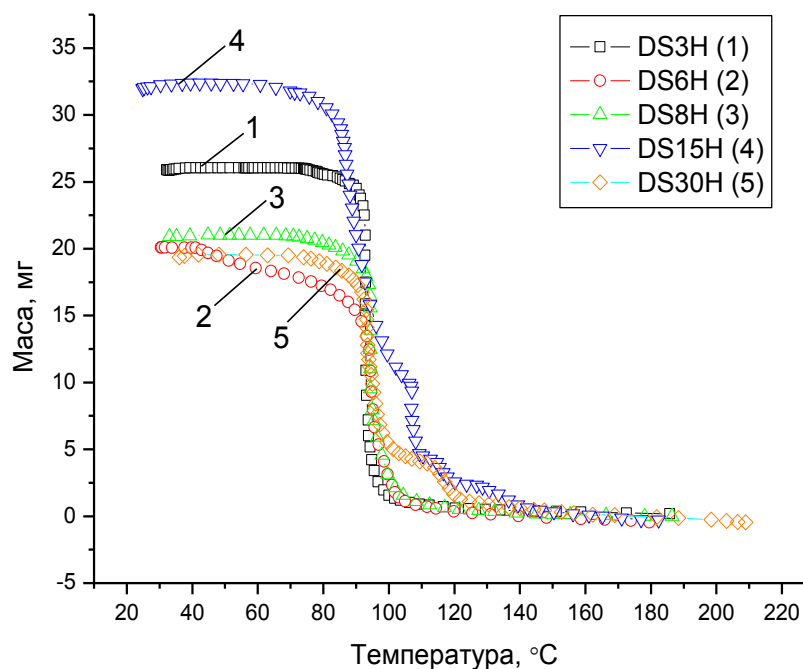


Рис. 5.10 Характерні гравіметричні криві гель-фракцій зразків поліестеру одержаних при різному співвідношенні реагентів.

З приведених кривих можна побачити, що на дериватограмах зразків які одержані при співвідношенні 3 : 1 та 6 : 1 (ОН : COOH) взагалі не спостерігається другого перегику. З цього можна зробити висновок, що у даних зразків відсутні сольватно-зв'язані молекули води. Причиною цього – висока ступінь модифікації, яка призводить до значного структурування макромолекул та введення в неї значної кількості гідрофобних фрагментів із залишками Glu(St). Слід відмітити, що ці дані добре узгоджуються з дослідженнями по набряканню зразків гель-фракції (таблиця 3.3) та дослідженнями поверхневої-активності. У зразків полімеру гель-фракції, DS15H та DS30H характер дериватограм, які приведені на тому ж рисунку, інший.

На них присутній другий перегинок, який, в межах даної роботи інтерпретується як випаровування сольватно-зв'язаної води. Кількісні оцінки частки сольватно-зв'язаної води від кількості полімеру приведені в таблиці 5.1 у порівнянні з відповідними даними для зразків полімеру золь-фракції. З цих оцінок можна побачити, що у зразка полімеру гель-фракції, який одержаний у співвідношенні 15 : 1 кількість сольватно-зв'язаної води становить не більше 55%. З цього можна

зробити висновок, що при ступені структурування цього зразка, ще залишаються ділянки фрагментів полісахариду недоступних для гідратації. При тому, така ступінь структурування уже дозволяє значне набрякання зразка полімеру у воді (таблиця Таблиця 3.3).

Подальше пониження ступеню структурування приводить до зменшення частки ланок, що недоступні для сольватації. Як результат, у зразку DS15H частка сольватованої води досягає 84% від її кількості на немодифікованому декстрині. А це означає, що починаючи з цього співвідношення у молекул гель-фракції практично всі фрагменти полісахаридних ланцюгів є доступними до сольватації, як і у випадку полімерних молекул золь-фракції. Власне цей факт слід вважати причиною того, що за розробленою методикою золь- і гель-фракцій, спостерігається погіршення їх розділення при співвідношеннях на стадії синтезу рівних і більших за 20 : 1 (ОН : COOH). В результаті чого частина гель-фракції потрапляє в золь-фракцію (хроматограма на рисунку 3.15).

#### **5.4. Дослідження розміру частинок дисперсної фази водних дисперсій поліестерів**

Як було показано в попередніх розділах, частина продуктів взаємодії декстрину з N-похідними глутамінової кислоти володіють поверхнево-активними властивостями та здатні до сольватаційної взаємодії з молекулами води. Це створює передумови до формування у водному середовищі самостабілізованих водних дисперсій, поверхня яких стабілізована за рахунок структурно-механічного бар'єру.

Залежність розміру частинок дисперсної фази від умов синтезу та умов формування дисперсії найбільш зручно дослідити методом динамічного світлорозсіювання (за методикою 2.3.12). В даних дослідженнях використовували зразки золь-фракції, які були одержані в широкому діапазоні співвідношення реагентів на стадії синтезу. Це дозволило відслідкувати особливість формування дисперсій від ступеню структурування та особливостей будови макромолекули. А також дослідити як змінюється залежність розміру частинок дисперсної фази від її концентрації, особливо, якщо порівнювати цей параметр для частинок дисперсної фази з концентрацією меншою та більшою за ККМ.

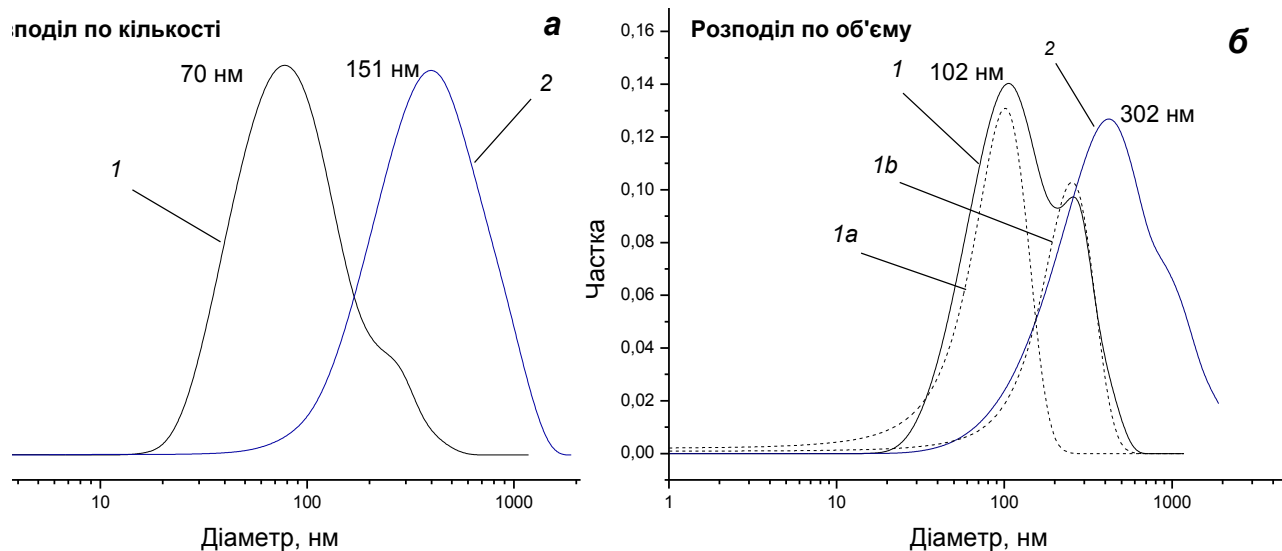


Рис. 5.11. Розподіл а) по кількості і б) по об'єму частинок водної дисперсії зразка золь-фракції синтезу DS4. Концентрація дисперсної фази 1 – 0,01%, 2 – 0,5%.

Для ілюстрації цього факту на рисунку 5.11 наведені розподіли за розміром (а – по кількості, б – по об'єму) дисперсної фази зразка золь-фракції, який був одержаний при співвідношенні гідроксильних до карбоксильних груп 4 : 1 при концентрації до ККМ (крива 1) та після неї (крива 2). Як можна побачити з наведених діаграм полімер золь-фракції формує самостабілізовані частинки при концентраціях як менших так і більших за ККМ. Відмінність полягає в тому, що при концентраціях суттєво менших за ККМ формуються частинки зі значно меншим значенням гідродинамічного діаметру (70 нм). При концентраціях, суттєво більших за ККМ частинки дисперсної фази мають більший діаметру (151 нм). Поява на ізотермі поверхневого натягу зламу для цього зразка спричинено масовою перебудовою частинок дисперсної фази з діаметром 70 нм в частинки діаметром 151 нм. Цей висновок підсилюється і тим фактом, що крива 1, яка відображає розподіл частинок до ККМ має бімодальний характер (більш яскраво це проявляється на розподілі по об'єму). Це означає, що до ККМ певна кількість частинок уже перегрупована в частинки з більшим діаметром. А при концентрації, що відповідає ККМ, даний процес набуває масового характеру. Для наочності, даний факт проілюстровано розкладом кривої розподілу по об'єму на складові (на рисунку криві 1а і 1б проведені пунктиром). Можна побачити, що при концентраціях

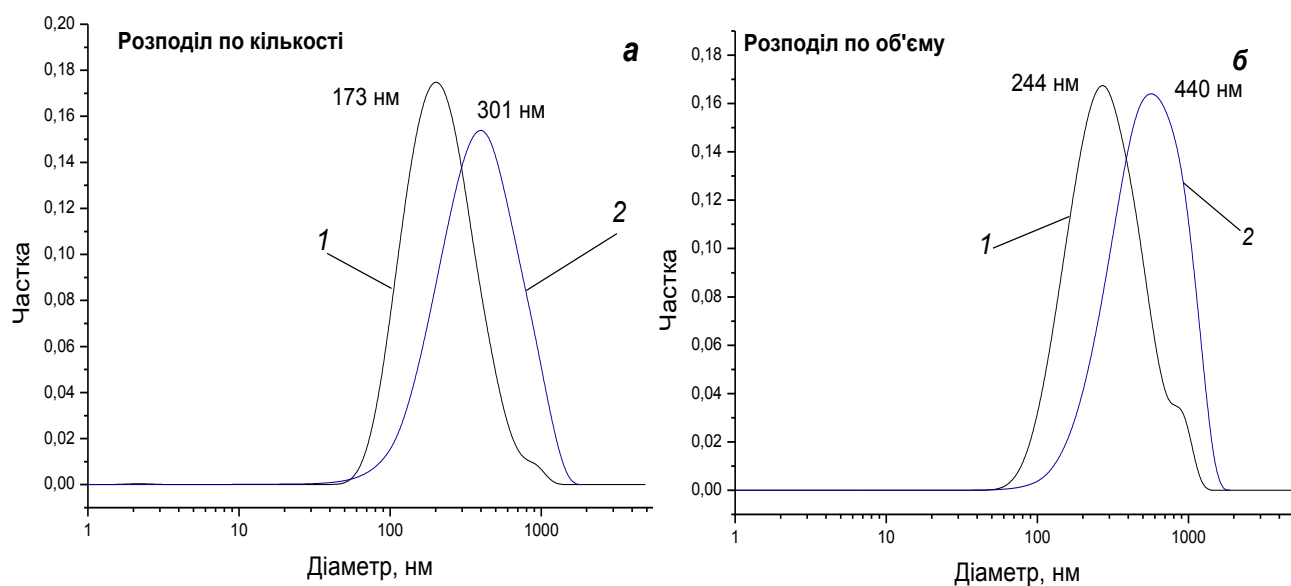


Рис. 5.12. Розподіл а) по кількості і б) по об'єму частинок водної дисперсії зразка золь-фракції DS3Z. Концентрація дисперсної фази 1 – 0,01%; 2 – 0,5%.

менших за ККМ уже присутня певна, статистичнозначима кількість частинок з розміром, який характерний для дисперсної фази з високою концентрацією. Реалізація процесу перебудови в доволі широкому діапазоні концентраціях, до ККМ і після нього, є причиною того, що на ізотермах поверхневого натягу (рис. 5.1) злам є слабо проявлений.

Аналогічна закономірність спостерігається для зразків золь-фракції, що отримані при співвідношенні 3 : 1 (DS3Z). В цьому можна переконатись за даними рисунку 5.12 на якому, аналогічно до рисунку. 5.11, наведені відповідні розподіли. Порівнюючи їх для цих двох зразків золь-фракції можна стверджувати що вони відрізняються лише тим, що зразок DS3Z формує частинки зі значно більшим діаметром ніж зразок DS4Z. Можливим поясненням даного факту може бути відмінність в структурі зразка DS3Z (таблиця 3.4) від решти – попри значне заміщення залишками Glu(St) приєднання за обома групами є невисоким (не більше двох). В результаті макромолекули цього зразка золь-фракції є слабо розгалуженими зі значним вмістом прищеплених залишків Glu(St). Вони можуть вступати між собою в міжмолекулярну гідрофобно-гідрофобну взаємодію, що приводить до формування частинок більшого розміру. Слід відмітити, що прояв особливостей структури цього зразка уже обговорювався при викладенні результатів гел-

проникної хроматографії (рис. 3.16). Починаючи із співвідношення 4 : 1 (ОН : COOH) і більше, в макромолекулах золь-фракції уже спостерігається більш висока ефективність прищеплення за двома групами, що приводить до значного розгалуження макромолекули, значного збільшення молекулярної маси і зменшення доступності алкільних фрагментів до міжмолекулярної взаємодії гідрофобних залишків, про що повідомлялося при обговоренні результатів ДСК. Слід вважати, що значна кількість прищеплених до полісахаридних ланцюгів по одній карбоксильній групі залишків Glu(St) як у зразків гель- так і золь-фракцій при співвідношеннях менших за 3 : 1 (ОН : COOH) є причиною загального гелювання реакційної суміші при відносно невисокій концентрації реагентів в ній (рисунок 3.9).

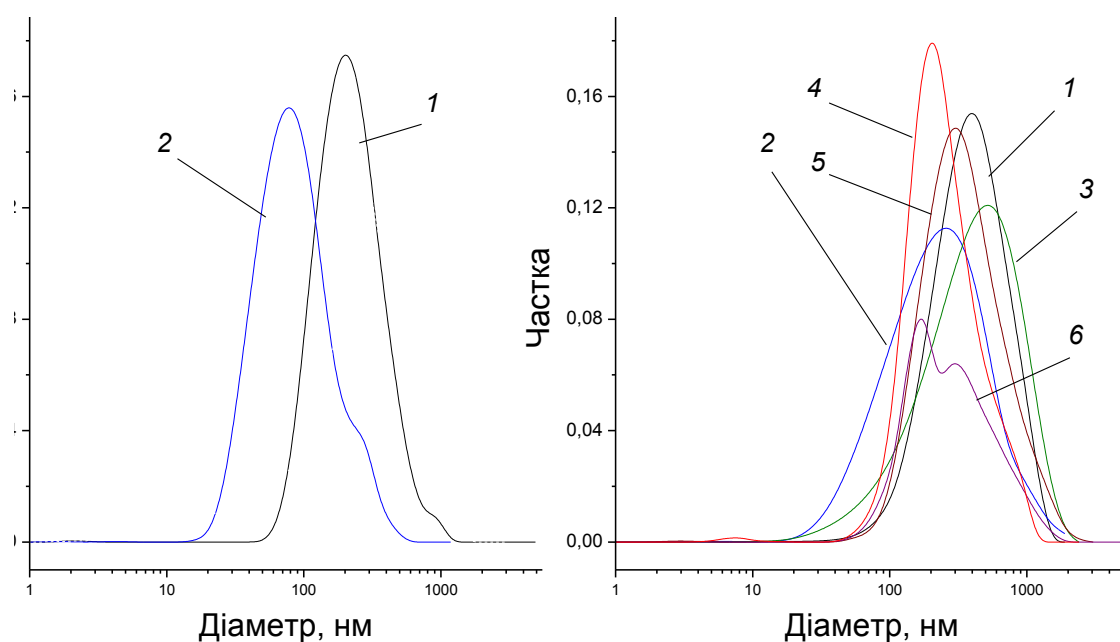


Рис. 5.13 Розподіл розмірів частинок дисперсної фази золь- фракції. а) - розподіли за розміром для зразків, що формують частинки дисперсної фази до ККМ; б) - розподіл розмірів частинок за кількістю при концентраціях більших за ККМ (1 – DS3Z, 2 – DS4Z, 3 – DS6Z, 4 – DS8Z, 5 – DS10Z, 6 – DS20Z)

Наявність уже сформованих частинок дисперсної фази до ККМ заставляє визнати, що злам на ізотермах поверхневого натягу для цих зразків критичною концентрацією міцело утворення можна рахувати лише умовно. При даній концентрації відбувається не формування частинок дисперсної фази, а лише їх

перебудова. Подібну закономірність в формуванні дисперсної фази описувалось в ряді робіт, зокрема в роботах [166, 167] такий ефект спостерігався для поліестерів, що одержувались поліконденсацією Glu(St) або Glu(L) з поліолами поліоксіетиленового та/або поліоксіпропіленових рядів.

Разом з тим, вище описана закономірність є непритаманною для всіх зразків золь-фракції, які досліджуються в межах даної роботи. Так на рис. 5.14 приведена спроба виявити частинки дисперсної фази для зразка DS8Z при концентрації дисперсної фази 0,01%, що по даним рисунку 5.3 знаходиться до ККМ. Візуально, розчин при даній концентрації не мав характерних ознак колоїдного. На даному рисунку наведено 9 спроб одержати розподіл частинок дисперсної фази методом динамічного світлорозсіювання. Як можна побачити з рисунку, жодна з кривих не відтворилась, а розсіювання спостерігалось на рівні шуму. Таким чином, можна зробити висновок, що в цього зразка (DS8Z), до концентрації 0,04% дисперсна фаза не формується, а розчин можна вважати істинним, в тій мірі наскільки цей термін можна використовувати до розбавлених розчинів полімерів.

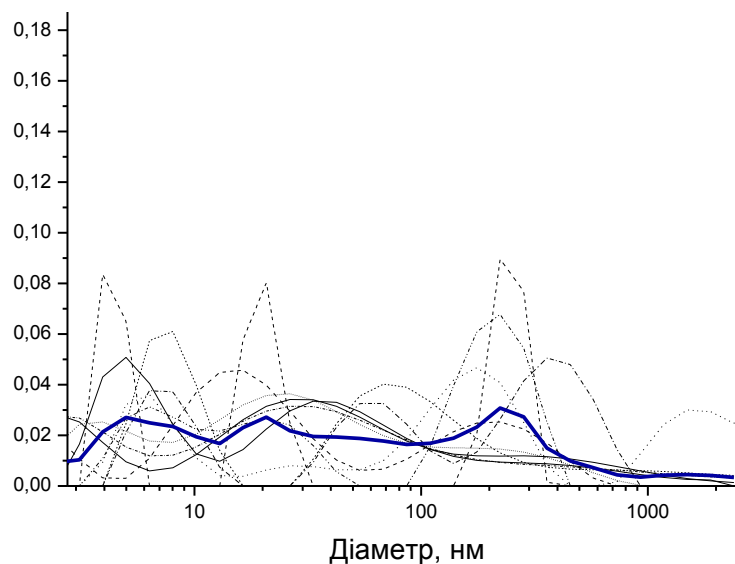


Рис. 5.14 Криві DLS водної дисперсії зразка золь-фракції DS8Z, при концентрації 0,01%

Аналогічна ситуація спостерігається і для зразків, що отримані при співвідношеннях більших за 8 : 1 (ОН : COOH). Для цих зразків (DS10Z, DS15Z, DS20Z) також частинок дисперсної фази до ККМ, методом DLS, виявлено не було.



При концентраціях більших за ККМ для цих же зразків у водному середовищі, навіть візуально, спостерігається наявність частинок дисперсної фази (рис. 5.5). На рис. 5.13.б приведено розподіли розмірів частинок дисперсної фази по числу для зразків золь-фракції при концентраціях більших за ККМ в усьому діапазоні співвідношень, що досліджувався. Для порівняння на рис. 5.13.а повторені розподіли за розміром для тих зразків, що формують частинки дисперсної фази до ККМ. З наведених кривих можна побачити, що розміри частинок дисперсної фази, які одержані після ККМ завжди більші від розмірів, що одержані до ККМ. При тому, незалежно чи даний зразок формує дисперсну фазу до ККМ чи ні, частинки після ККМ локалізуються в діапазоні від 160÷500 нм. Можна стверджувати, нижню частину діапазону займають зразки, що були одержані при співвідношенні більшому за 8 : 1 (ОН : COOH). Тобто, ті зразки, які не формують дисперсної фази до ККМ.

Аналогічні закономірності по формуванню дисперсної фази мають зразки поліестерів одержаних з використанням Glu(L). Проведені DLS дослідження показали, що до співвідношення 6 : 1 (ОН : COOH) у водному середовищі зразки золь-фракції формують частинки дисперсної фази як до ККМ так і після нього. При тому середнє значення розміру частинок дисперсної фази до ККМ є значно меншими ніж після ККМ і їх середньо-чисельний гідродинамічний діаметр знаходиться в діапазоні від 60÷120 нм. Що незначимо відрізняється від середньо-чисельного діаметру частинок дисперсної фази зразків, що були описані вище. Не виявлено значної відмінності в розмірі частинок дисперсної фази при концентраціях вищих за ККМ (рисунок 5.15). Значення також попадає в діапазон, який характерний для частинок дисперсної фази зразків золь-фракції, що одержані з використанням в якості структуруючого агенту – Glu(St). В ході проведених досліджень була виявлена лише одна відмінність для цих двох рядів зразків. Вона полягає в тому, що у випадку використання в якості агенту структурування Glu(St) відсутність формування частинок дисперсної фази при концентраціях менших за ККМ спостерігається для зразків із співвідношенням функціональних груп більше за 8 : 1 (ОН : COOH), то у випадку використання Glu(L) у зразка DL6Z, який був одержаний при співвідношенні 6 : 1 (ОН : COOH), уже не спостерігали частинок

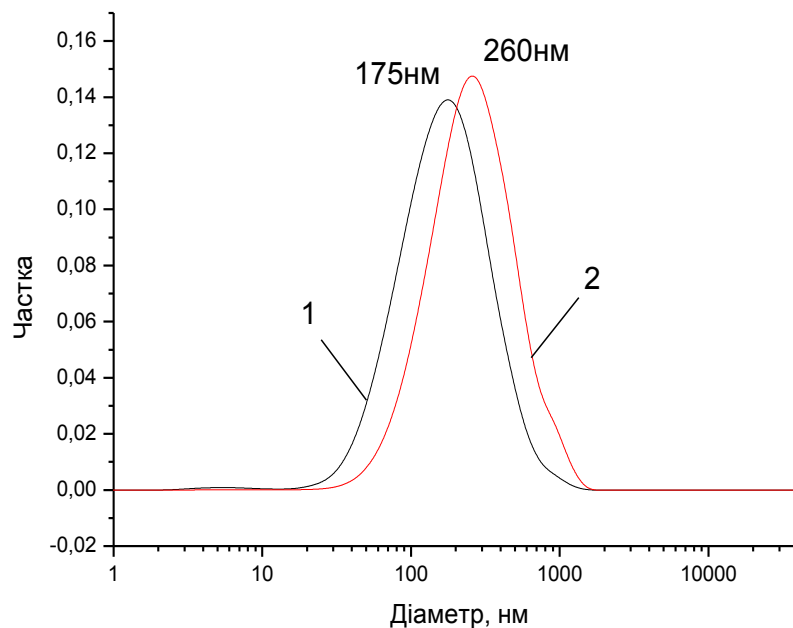


Рис.5.15. Розподіл по розміру по кількості (1) та по об'єму (2) частинок водної дисперсії зразка DL6Z з концентрацією дисперсної фази 0,5%.

дисперсної фази при його концентрації до ККМ. У зразків цього ряду дещо вищі поверхнево-активні властивості у порівнянні із зразками, в якості агенту структурування у яких було використано Glu(St) (рисунок 5.3). Таке збільшення поверхнево-активних властивостей є причиною певного пониження границі співвідношення, при яких зразки не формують частинок дисперсної фази при малих концентраціях.

Як було показано вище (рисунок 5.4) гель-фракції продукту взаємодії Glu(St) з декстрином практично не володіють поверхнево-активними властивостями. Якщо при їх одержанні співвідношення між реагентами було менше 10 : 1 тоді не спостерігається набрякання (таблиця 3.3) та сольватаційна взаємодія їх макромолекул з водою (рисунок 5.10). Природа фрагментів декстрину в цих зразках настільки змінена, що, згідно даних цієї ж таблиці, вони не проявляють характерної для декстрину проби на йод. Зрозуміло, що ці зразки не можуть утворювати навіть більш-менш стійкої дисперсії при їх диспергуванні у водному середовищі.

Зразки гель-фракції, які були одержані при співвідношеннях більших за 10:1 уже мають дещо інші властивості. Їх декстринові фрагменти уже вступають в сольватаційну взаємодію з водою, вони дають позитивну реакцію на йод, та

обмежено набрякають у воді. І попри те, що їх поверхнево-активні властивості також є невисокими, їх диспергування у воді призводить до утворення агрегатно-стійких водних дисперсій (рисунок 5.5). Так як було показано, що полімери гель-фракції представляють собою об'ємно-структуровані макромолекули, які одержані в результаті перехресної зшивки макроланцюгів декстрину похідними глютамінової кислоти та які здатні до значного набрякання у воді (таблиця 3.3) і сольватаційної взаємодії з її молекулами, їх дисперсія у воді представляє собою мікрогідрогель.

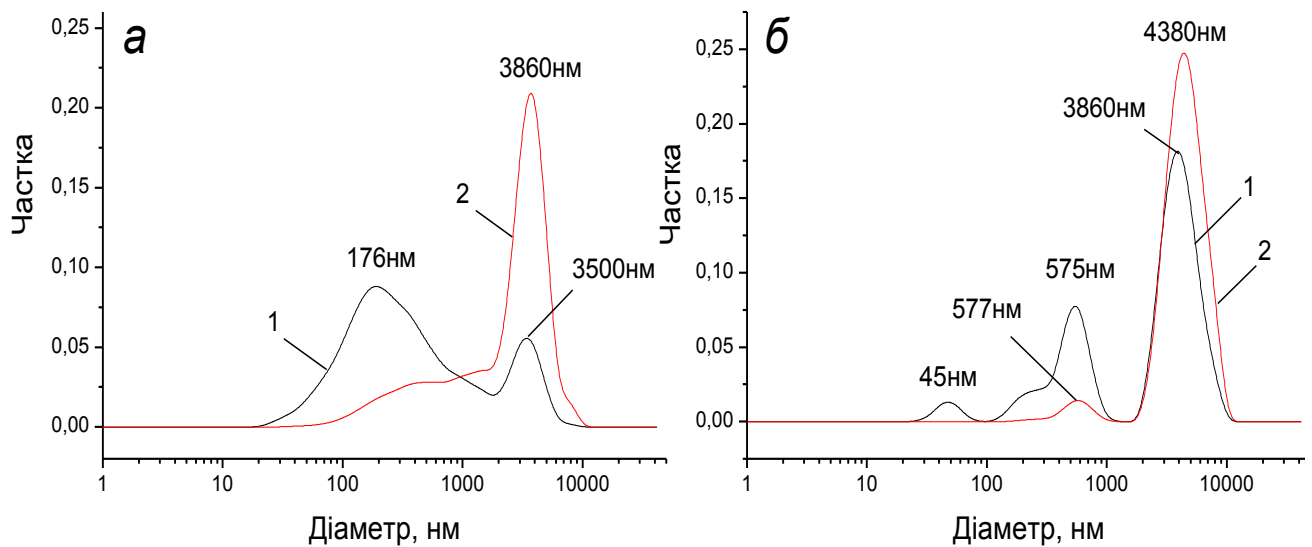


Рис. 5.16. Розподіл за розміром та за об'ємом частинок дисперсної фази в водному середовищі зразків DS20H (а) та DS15H (б).

На рисунку 5.16 наведено гістограму розподілу частинок дисперсної фази зразків DS20H (а) та DS15H (б) за розміром. Аналіз цього розподілу дозволяє зробити висновок, що основна частина (83,88% для DS20G та 95,98% для DS15G) маси знаходиться в дисперсійній фазі з розміром від 4 до 20 мкм для обох зразків. Частинок дисперсної фази з таким розміром легко спостерігаються в полі оптичного мікроскопа, в чому можна переконатись по мікрофотографії, що наведена на рисунку 5.17.б.

Описана вище дисперсія одержується диспергуванням висушеного полімеру золь-фракції (рисунок 5.17.а) у воді в полі ультразвукових хвиль. Проведені дослідження показали, що процедуру висушування (одержання ксерогелю) з повторним редиспергуванням можна повторювати циклічно.

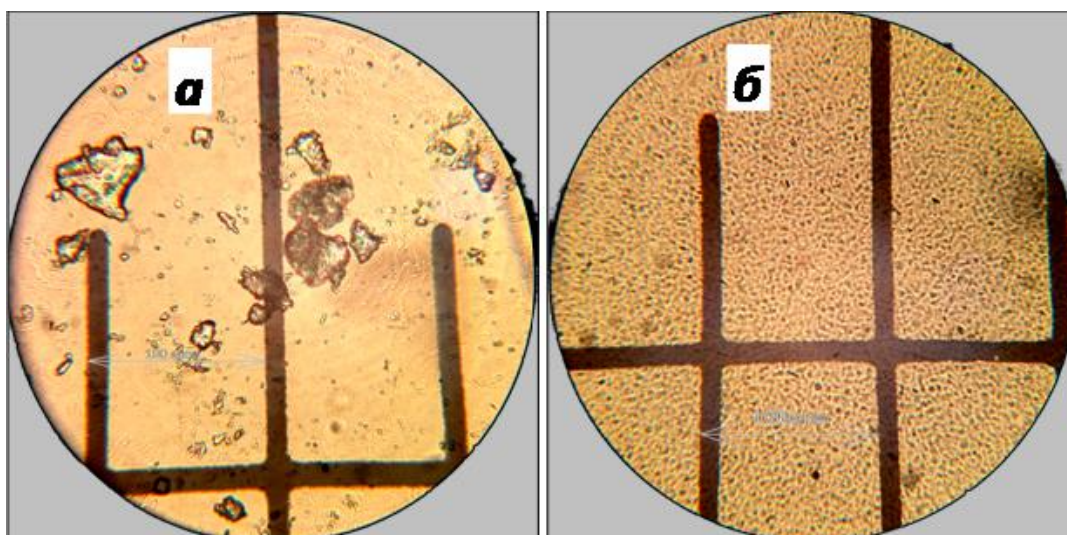


Рис. 5.17. Мікрофотографії а) ксерогелю зразка гель-фракції DS15G та б) його дисперсії воді.

Разом з тим, криві, що приведені на рис. 5.16 демонструють, що розподіл має складний характер, є полімодальним. Якщо у випадку зразка DS15H полідисперсність можна пояснити неоднорідністю диспергування, то у випадку зразка DS20H є всі підстави вважати, що гель-фракція доволі суттєво забруднена відповідною золь-фракцією. Цей висновок підсилює те, що моди меншого розміру відповідають за розмір частинок дисперсної фази золь-фракції. Крім того, вище неодноразово показувалось, що зразки золь-фракції при цьому співвідношенні містять в собі статистично значиму частку гель-фракції.

### **5.5. Дослідження солюбілізації водонерозчинного барвника Судану (III) дисперсіями поліестерів**

В межах проведеної роботи було досліджено залежність солюбілізації Судану (III) від співвідношення реагентів на стадії синтезу зразків золь- та гель-фракцій.

На рисунку 5.18 наведено залежність солюбілізаційної здатності зразків золь-фракції в широкому діапазоні співвідношень гідроксильних груп до карбоксильних на стадії синтезу зразків. Дана залежність має складний характер. Зі збільшенням співвідношення спочатку спадає, проявляє яскраво виражений мінімум при співвідношенні функціональних груп 5÷6 до 1 (ОН : COOH). Подальше збільшення співвідношення знову приводить до збільшення солюбілізаційної здатності. Попри

складність цієї залежності вона добре корелює з особливостями структури макромолекул золь-фракції, яка описувалась раніше.

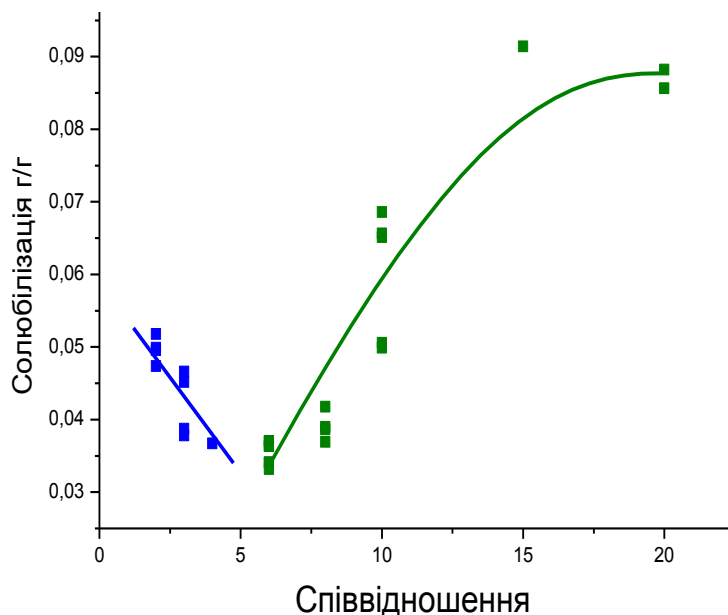


Рис. 5.18 Залежність кількості солюбілізованого Судану (III) частинками дисперсної фази золь-фракції від співвідношення реагентів на стадії синтезу.

Концентрація дисперсної фази  $0,8 \div 1,1\%$ .

Зокрема, при співвідношенні 6 : 1 (ОН : COOH) спостерігається зміна особливостей формування макромолекул золь-фракції (таб. 3.4). До цього співвідношення при модифікації переважає прищеплення залишків Glu(St) по одній карбоксильній групі, що не приводить до формування розгалужень, а лише до модифікації макроланцюга сильно олеофільними фрагментами по схемі 3.7. В даному випадку в макромолекулі значна кількість фрагментів Glu(St) сформована за схемою 3.9. Слід думати, що такі фрагменти сприяють солюбілізації водонерозчинних молекул Судану (III). Збільшення співвідношення до 6 : 1 приводить до зменшення частки таких фрагментів та збільшення ступеню розгалуження. Обидва факторів не сприяють солюбілізації, що і приводить до її зменшення. Подальше збільшення співвідношення (більше 6 : 1 (ОН : COOH)) призводить до зменшення ступеня розгалуження, що супроводжується певним зростанням солюбілізаційної здатності.

Важливою є залежність солюбілізаційної здатності частинками дисперсії золь-фракції від концентрації дисперсної фази. Експериментально показано, що частинки

дисперсної фази зразків отриманих при співвідношенні 6 : 1 (ОН : СООН) і менше при концентрації в районі 0,8 ÷ 1,1% солюбілізують 0,03 ÷ 0,055 г Судану III на грам полімеру (рис. 5.19). Використання більш розбавлених розчинів (0,03 ÷ 0,1%) для цих зразків приводить до збільшення солюбілізаційної здатності до 0,15 ÷ 0,32 г/г. Таке збільшення пов'язане з розміром частинок дисперсної фази. Раніше (розділ 5.1 і 5.4) було показано, що до ККМ частинки дисперсної фази даних зразків мають менший розмір. Слід думати, що зменшення розміру частинок дисперсної фази сприяє збільшенню солюбілізаційної здатності. Залежність солюбілізаційної здатності частинок дисперсної фази зразків золь-фракції, які були одержані при співвідношенні 10 : 1 (ОН : СООН) і більше протилежна. Якщо при концентраціях дисперсної фази 0,8 ÷ 1,1% вони показують відносно високу солюбілізаційну здатність – 0,07 ÷ 0,1%, то пониження концентрації до концентрації близької до ККМ приводить до зменшення солюбілізаційної здатності до 0,008 ÷ 0,012 г/г. В ході досліджень залежності розміру частинок дисперсної фази від концентрації було показано, що ці зразки до ККМ не формують частинок дисперсної фази, на відміну від зразків, які отримували при співвідношенні до 8 : 1. Даний факт дозволяє стверджувати, що здатність до солюбілізації в одержаних поліестерів пов'язана зі здатністю формувати дисперсну фазу. Даний факт підтверджується і тим, що не модифікований декстрин в водних розчинах не формує дисперсної фази і здатність його розбавлених розчинів до солюбілізації Судану III, за результатами одержаними в межах даної роботи не перевищує 0,004 ÷ 0,009 г/г.

Залежність солюбілізаційної здатності частинок гель-фракції має дещо простішу залежність (рис. 5.19). При співвідношеннях до 6 : 1 (ОН : СООН) спостерігається практична відсутність залежності солюбілізаційної здатності від співвідношення з подальшим стрімким її зростанням зі збільшенням надлишку гідроксильних груп зі складу макромолекул декстрину. Як і в попередньому випадку, дана залежність добре корелюється зі структурою одержаного продукту. Раніше, в таблиці 3.3, показано, що до співвідношення 6 : 1 макромолекули гель-фракції по своїй структурі представляють собою дуже густу сильно гідрофобізовану

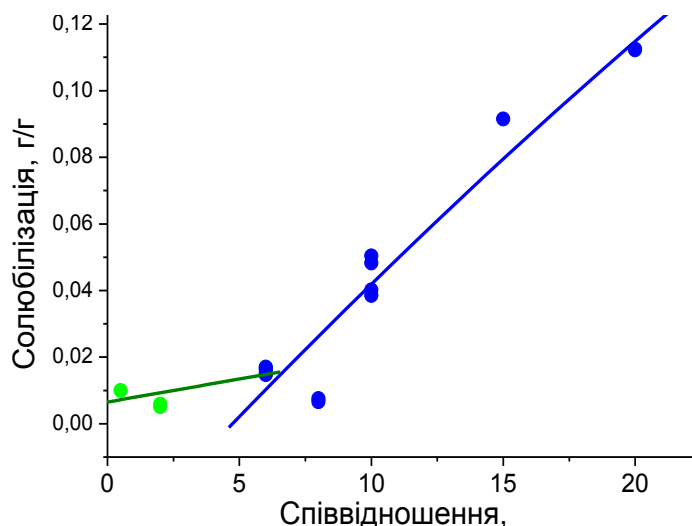


Рис. 5.19 Залежність кількості солюбілізованого Судану (III) частинками дисперсної фази гель-фракції зразків із різним співвідношенням функціональних груп на стадії синтезу.

просторову сітку. В результаті вони практично не набрякають у воді, і як результат, низька солюбілізаційна здатність та відсутність її залежності від структури. Подальше збільшення співвідношення призводить до утворення просторово-структурованої сітки, що здатна набрякати у воді. Симбатно з цією властивістю спостерігається і збільшення здатності до солюбілізації.

Важливою характеристикою при дослідженні солюбілізаційної здатності водними дисперсіями водонерозчинних сполук є їх здатність до вивільнення солюбілізованої сполуки в ліофільне середовище. Для виявлення здатності дисперсної фази золь-фракції вивільняти солюбілізований Судан (III) було проведено експеримент в якому досліджувалась залежність концентрації Судану (III) в октанолі-1 при його інтенсивному перемішуванні з рівним об'ємом водної дисперсії зразка DS20Z з попередньо солюбілізованим Суданом (III) (рис 5.20).

Разом з тим, дисперсії, що сформовані на основі гель-фракції, так і дисперсії, що сформовані на основі золь-фракції, проявляють доволі низьку солюбілізуючу здатність. В роботах [166, 167], в яких описано солюбілізуючу здатність лінійних поліестерів одержаних шляхом кополімеризації Glu(St)/Glu(L) з полідіоалами поліоксіетиленового та поліоксіпропіленового рядів показано, що солюбілізуюча

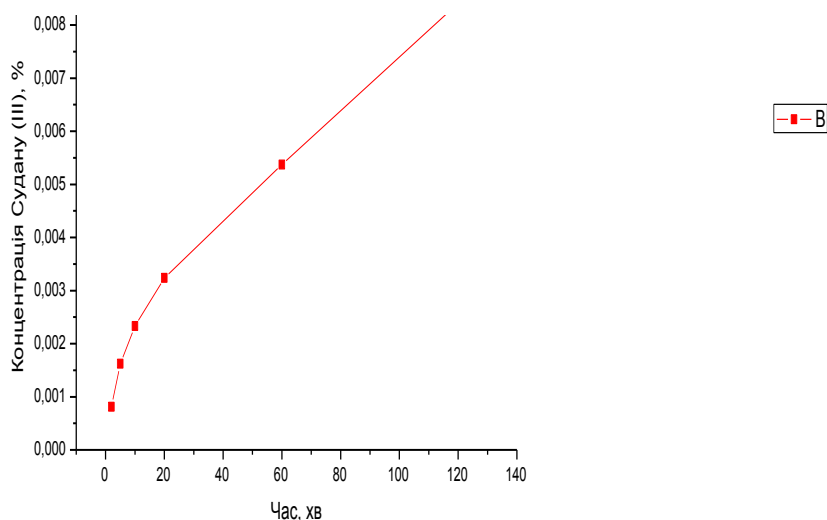


Рис. 5.20 Крива динаміки вивільнення Судану (III), солюбілізованого частинками водної дисперсії зарзка DS20Z, в рівний об'єм 1-октанолу.

Концентрація дисперсії – 3 %

здатність таких поліестерів може становити  $3 \div 3,5$  г на грам поліестеру. В цих же роботах показано, що, описані лінійні поліестери формують в водних середовищах частинки дисперсної фази типу ядро-оболонка. Олеофільне ядро яких формуються за рахунок гідрофобно-гідрофобної взаємодії алкільних фрагментів ланок Glu(St)/Glu(L). Саме наявністю таких олеофільних зон в частинках дисперсної фази є причиною значної солюбілізуючої здатності. Слід вважати, що при структуруванні макромолекул полісахаридів молекулами Glu(St) формування олеофільних зон за рахунок гідрофобно-гідрофобної взаємодії алкільних фрагментів є незначною, що є причиною невисокої солюбілізуючої здатності.

### 5.6. Сорбція альбуміну на частинки структурованого декстрину

Важливою властивістю полімерних матеріалів медичного та біо-медичного призначення є їх здатність до взаємодії з білками плазми крові, зокрема альбуміном. При наявності такої взаємодії дані полімери можна віднести, наприклад, до перспективних систем доставки ліків білкового походження і формування вакцин.

Для виявлення здатності синтезованих поліестерів зв'язувати альбумін було проведено електрофоретичні дослідження рухливості альбуміну в присутності частинок дисперсної фази у поліакриламідному гелі (за методикою 2.3.8).



На старт електрофореграми наносився розчин альбуміну (контроль) та альбумін з різною кількістю дисперсії. Частинки дисперсної фази золь- та гель-фракцій не мають суттєвого заряду, тому не володіють електрофоретичною рухливістю і залишаються на старті пластинки. В результаті цього, сорбований на частинках альбумін втрачає свою рухливість. Переміщатись по гідрогелевій пластині такий альбумін може лише після десорбції з частинок. Через це час проходження у десорбованого альбуміну є значно більшим за вільний альбумін. На електрофореграмі рис. 5.21 положення в гелі альбуміну проявлено амідочорним 10Б. У тому випадку коли альбумін на частинках дисперсної фази сорбований незворотно, тоді він залишається на старті разом з частинками дисперсної фази і там проявляється барвником. Цей факт спостерігається на приведеній електрофореграмі як для дисперсії гель- так і золь-фракцій (для зручності фрагмент старту електрофореграми на рисунку збільшено). Таким чином можна стверджувати, що певна частка водорозчинного білка сорбується одержаними поліестерами незворотно.

Альбумін, який був сорбований на частинці дисперсної фази і був десорбований в ході проведення аналізу, проявляється у вигляді «хвоста» на відміну від альбуміну, що вносився на старт без дисперсії. «Хвіст» значної

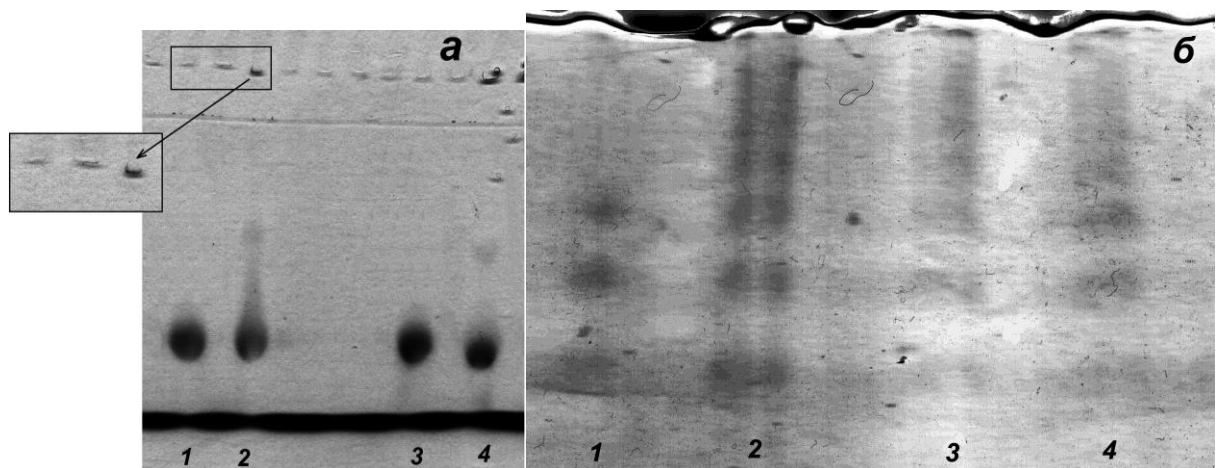


Рис. 5.21 Електрофореграми гель- та золь-фракцій синтезу DS15

- а) 1 – альбумін; 2 – гель-фракція з альбуміном; 3 – альбумін; 4 – золь-фракція з альбуміном;
- б) 1 – альбумін; 2 – гель-фракція  $C=0,5\%$  з альбуміном; 3 – гель-фракція  $C=0,25\%$  з альбуміном; 4 – гель-фракція  $C=0,125\%$  з альбуміном.

інтенсивності на елелектрофореграмі рис. 5.21 (2) демонструє вагому здатність частинок дисперсної фази гель-фракції рівноважно сорбувати альбумін. У випадку водної дисперсії «хвіст» золь-фракції є значно слабший по інтенсивності.

Щоб підтвердити взаємодію білка із золь-фракцією на рисунку 5.22 зображено спектр за інтенсивністю забарвлення доріжки 4. При аналізі спектру, піки 1-5 можна віднести зв'язаному альбуміну, а пік 6 на 10% (за даними розрахунку програми TotalLab13) має менш інтенсивне забарвлення у порівнянні із спектром вільного білка, що свідчить про розподілення альбуміну по доріжці, тобто про його сорбцію частинками.

На рисунку 5.21 б приведено електрофореграми, що отримані при різній кількості поліестеру гель- фракції на старті. Як видно із рисунку 1 – відповідає альбуміну нанесеному без полімеру; 2,3,4 – відповідають електрофореграмам зразків у яких зменшувалась концентрація частинок (0,5%; 0,25%; 0,125%, відповідно). Залежність інтенсивності «хвоста» дозволяє зробити висновок, що кількість сорбованого альбуміну визначається кількістю дисперсної фази на старті електрофореграми.

Результати електрофоретичного дослідження дають підстави до кількісної

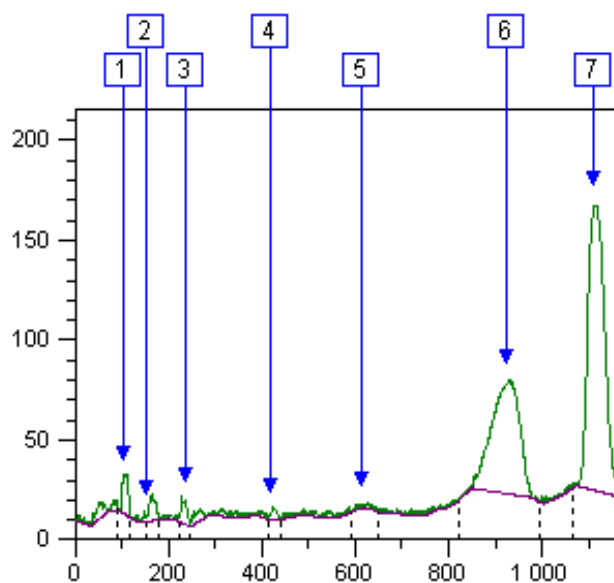


Рис. 5.22 Спектр інтенсивності забарвлення доріжки (4) електрофореграми рис.5.21.а.

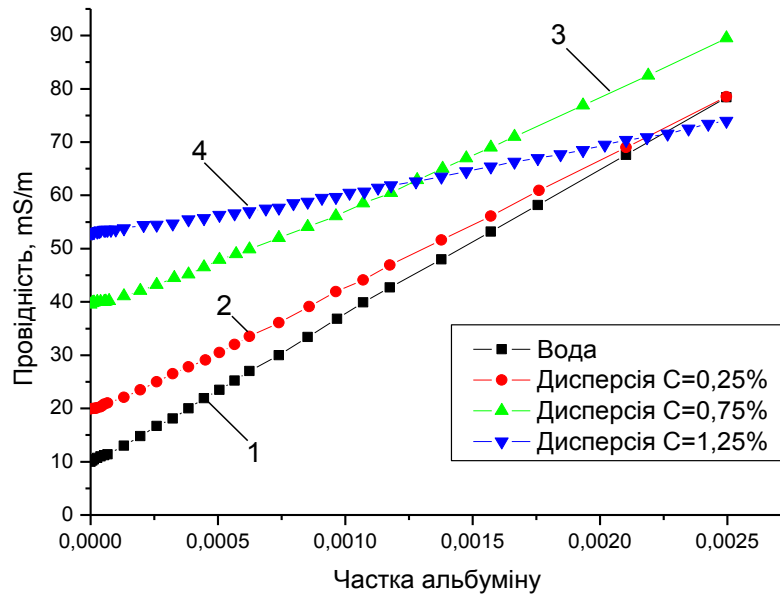


Рис. 5.23. Криві залежності провідності альбуміну в присутності частинок гелі-фракції зразка DS15G.

оцінки сорбованого альбуміну. Для цього однакові об'єми водних дисперсій поліестерів з різною концентрацією титрували 1% водним розчином альбуміну. Криві залежності провідності від частки альбуміну в розчині зображені на рисунку 5.23. Крива 1 відповідає холостій пробі (проба без полімерної дисперсії), криві 2,3,4 кривим титрування водних дисперсій зразка DS15G з концентраціями 0,25%; 0,75%; 1,25% відповідно. На приведених кривих помітна залежність кута їх нахилу від кількості частинок поліестеру в досліджуваному розчині.

Зменшення кута нахилу приведених на рисунку кривих відносно кривої титрування холостої проби пояснюється зв'язуванням частини альбуміну частинками дисперсної фази. Сорбований білок втрачає свою рухливість, а це веде до зменшення електропровідності розчину у порівнянні з розчином у якому весь альбумін знаходився б в розчиненому вигляді.

Оскільки у кривих титрування спостерігається постійний кут нахилу у всьому досліджуваному діапазоні концентрацій альбуміну, можна стверджувати, що відбувається рівноважна сорбція альбуміну, тобто кількість білка, що зв'язується пропорційна кількості вільного альбуміну в розчині і в межах концентрацій, яка створювалась при титруванні, не було досягнуто максимально можливої сорбції

частинками альбуміну. Завдяки цьому криві можна інтерполювати прямими. У таблиці 5.2 приведені коефіцієнти лінійної інтерполяції.

Прямопропорційна залежність коефіцієнтів лінійної інтерполяції від кількості дисперсної фази в пробі (рис. 5.24) дозволяє стверджувати, що провідність в системі визначається лише кількістю дисперсної фази та концентрацією розчиненого альбуміну. Вклад в провідність дисперсної фази є постійною при незмінній кількості її кількості в пробі. Вклад провідності альбуміну прямопропорційний його кількості.

Таблиця 5.2 Значення коефіцієнтів інтерполяції кривих приведених на рис. 5.22 та рис. 5.25.

Зразок	Концентрація, дисперсної фази, %	Кількість поліестеру в розчині, г	Коефіцієнти лінійної інтерполяції	
			Тангенс кута нахилу, $b_i$	Вільний член, $a_i$
DS15H	0	-	27624	9,73
	0,25	0,0375	23483	19,17
	0,75	0,1125	16585	38,82
	1,25	0,1875	6756	52,95
DS15Z	0	-	26728	9,57
	0,17	0,0255	25722	15,35
	0,51	0,0764	24054	22,63

Перераховані спостереження дозволяють використовувати адитивні схему для виведення рівняння коефіцієнту перерозподілу  $K$  альбуміну між дисперсною фазою та дисперсійним середовищем:

$$K = \left(1 - \frac{b_0}{b_i}\right) \cdot \frac{V}{m}, \text{ де} \quad (5.1)$$

$V$  – об’єм досліджуваного розчину, мл;  $m$  – маса частинок поліестеру у досліджуваному розчині, г,  $b_0$ ,  $b_i$  – тангенс кута нахилу інтерполяційної прямої для кривої альбуміну без дисперсії та кривої одержаної при наважці дисперсії  $m_i$ . Адекватність даного рівняння підтверджується прямопропорційною залежністю значення  $(1-b_0/b_i)$  від концентрації дисперсної фази (рис. 5.24).

Тангенс кута нахилу визначає числове значення коефіцієнту перерозподілу. Для зразка DS15H це значення становить 57,9, що означає значне перевищення концентрації альбуміну в частинках дисперсної фази над концентрацією розчиненого альбуміну в дисперсійному середовищі.

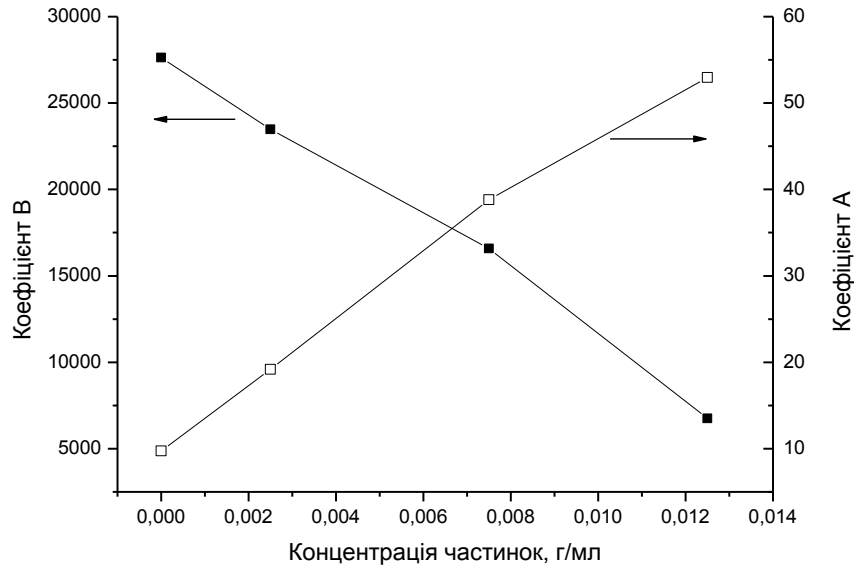


Рис. 5.24 Залежності коефіцієнтів рівнянь інтерполяції кривих кондуктометричного титрування від концентрації частинок поліестеру

Аналогічне дослідження було проведено з використанням водної дисперсії зразка полімеру золь-фракції DS15Z. Криві залежності провідності від концентрації

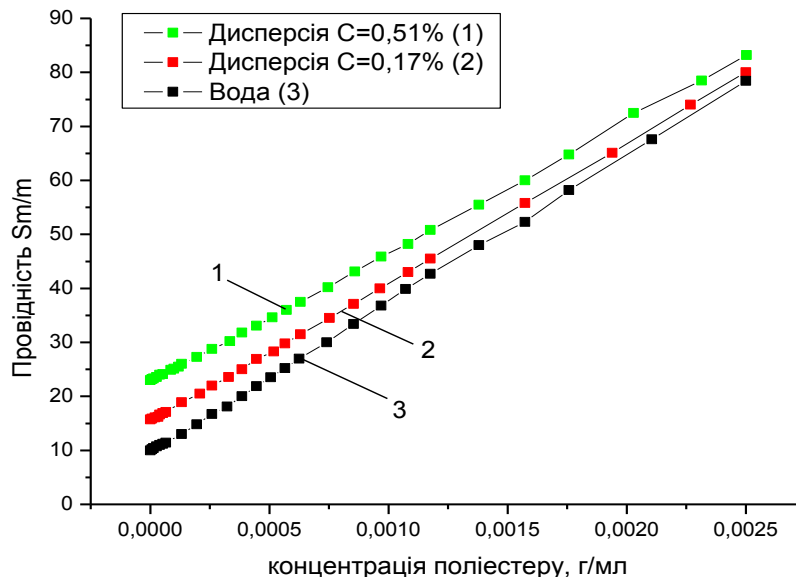


Рис. 5.25. Криві залежності провідності альбуміну в присутності частинок гель-фракції зразка DS15H.

альбуміну в пробі при різній кількості дисперсної фази, приведені на рис. 5.25.

Візуальний аналіз цих кривих демонструє, що сорбція альбуміну частинками дисперсної фази золь-фракції є суттєво меншою за сорбцію частинками гель-фракції. Результати обробки даних кривих наведено в таб. 5.2. Значення коефіцієнту розподілу, оцінене по рівнянню (5.1) становить 21,2. Таке значення дозволяє зробити висновок, що золь-фракція зразка DS15Z проявляє практично в три рази меншу здатність до сорбції альбуміну ніж його гель-фракція. Якщо врахувати, що площа частинок дисперсної фази золь-фракції є значно більша, так розмір є меншим, а сорбційна здатність менша, то можна зробити висновок, що основна маса альбуміну абсорбується об'ємом частинок гель- фракції. Можна припустити, що у випадку золь- фракції домінує адсорбція альбуміну.

## **Розділ 6. Напрямки практичного застосування одержаних продуктів**

Розроблені в межах даної роботи водні дисперсії модифікованих полісахаридів та дисперсій мікрогідрогелів передбачається використовувати, як полімерні основи препаратів медичного та біомедичного призначення. В даному розділі викладено результати попередніх досліджень ряду таких препаратів.

### **6.1. Створення препаратів мікронутрієнтів на основі водних дисперсій поліестерів**

#### **6.1.1. Дослідження цитотоксичності поліестерів одержаних на основі декстрину та Glu(St)**

Однією з основних вимог, що пред'являються до полімерів медичного призначення є відсутність їх токсичності, апірогенність та відсутність токсичної дії продуктів їх біодеструкції. Тому при попередніх дослідженнях препаратів біологічно-активних речовин, що розробляються, крім їх фізіологічної активності основна увага приділялася дослідженням їх цитотоксичності.

Для дослідження цитотоксичності продуктів модифікації декстрину вивчали їх вплив на виживання сперміїв бугаїв. Як правило, показник виживання сперміїв фіксується на досить тривалих часових відрізках, а саме 2-10 діб [172]. В межах даної роботи для встановлення цитотоксичності готували 10% водну дисперсію поліестеру DS6Z (золь-фракція із синтезу, при мольному співвідношенні полісахариду до кислоти 6 до 1, відповідно). Дослідження по цитології проводились спільно з Інститутом біології тварин НААН.

Для досліджень 10% дисперсію розбавляли в 10 разів і вносили її до попередньо розбавлених сперміїв бугаїв в цитратно-жовткових розріджувачах (ЦЖР) в співвідношенні 1:62,8%. На 1мл розбавлених сперміїв для дослідження вносили 10, 25, 50 мкл 1% дисперсії полімеру та фіксували виживання в порівнянні з контрольним зразком спермії. В таблиці 6.1 наведено результати спостережень живучості сперміїв.

Як видно з таблиці внесення структурованих полімерів, в широкому діапазоні концентрацій внесення дисперсій поліестеру, не пригнічує виживання сперміїв, а в

деяких випадках навіть продовжує його, що дозволяє зробити висновок про відсутню цитотоксичність структурованих полімерів на живі клітини.

Таблиця 6.1 Залежність часу виживання клітин від кількості дисперсної фази поліестеру DS6Z.

№ зразка	Vдисп., мкл. або контроль (к)	Час виживання, год.	% виживання від контролю
1	к	120	100
2	10	96	80
3	25	144	120
4	50	168	140
5	к	96	100
6	10	96	100
7	25	120	125
8	50	96	100
9	к	120	100
10	10	168	140
11	25	168	140
12	50	168	140
13	к	120	100
14	10	144	120
15	25	120	100
16	50	96	80

Крім токсичності, важливою характеристикою полімерних матеріалів медичного призначення є їх здатність до взаємодії з білками плазми крові, зокрема альбуміном. Цю взаємодію показано на вертикальному гелі електрофорезі (розділ 5.6), що однозначно підтвердив взаємодію синтезованих поліестерів із альбуміном.

Таким чином, викладені в даному розділі результати досліджень цитотоксичності та здатності одержаних поліестерів зв'язувати альбумін дозволяють зробити висновок, про можливість використання одержаних поліестерів в якості полімерних матеріалів медичного та біомедичного застосування. Зокрема, в якості полімерної основи дисперсних систем доставки терапевтичних препаратів.



### 6.1.2. Використання поліестерів декстрину для транспорту йоду

Для приготування препарату з йодом використовувалась гель фракція із синтезу DS30H. Даний продукт синтезу набрякали у воді (створюючи 0,8% водний розчин), після чого до нього добавляли 1% етанольний розчин йоду. Після змішування спирт випарювали у вакуумі водоструминного насосу. Йодометричним аналізом (з реєстрацією точки еквівалентності амперометрично з двома поляризованими електродами) було встановлено, що за даною методикою вдається наситити поліестер в кількості від 2,5 до 3,8 ммоль йоду на грам поліестеру.

В таблиці 6.2 приведено результати дослідження приготовленого препарату йоду на цитотоксичність та фізіологічну активність.

Таблиця 6.2 Час виживання клітин та фізіологічна активність в присутності різної кількості препарату йоду.

Дози полімеру	n	Концентрація, 10 <sup>9</sup> клітин/мл	Виживання, год	Дихальна активність O/хв×0,1 мл СК	Відновна здатність mv/хв×0,1мл СК	СДГ, од	ЦХО, од
К	3	1,17 ±0,00	176,0±23,55	1,18±0,22	0,05±0,03	20,0±4,71	48,3±8,92
0,01			176,0±28,47	0,79±0,22	0,04±0,01	28,3±4,91	43,3±10,89
0,05			200,0±17,28	0,42±0,14	0,03±0,01	26,7±7,58	40,0±8,16
0,1			168,0±0,0	0,30±0,09	0,01±0,01	28,3±8,92	30,0±8,16

За даними таблиці можна зробити висновок, аналізований препарат йоду не проявляє цитотоксичності та забезпечує у використаних дозах фізіологічну активність. Зокрема він ефективно регулює дихальну активність клітин через регулювання каскаду реакцій вільно-радикального окислення в клітині, про що можна зробити висновок за зміною активності ферменту цитохромоксидази (ЦХО). Статистично значиме зменшення її активності в даному дослідженні означає більш економне використання субстрату на кінцевій стадії дихального ланцюга.

### 6.1.3. Використання поліестерів декстрину для транспорту таурину

В розділі 5.6 було показано, що одержані поліестери володіють значною здатністю до перерозподілу у водному середовищі розчинних у воді сполук (зокрема

альбуміну). Там же показано здатність вивільняти солюбілізовані сполуки в олеофазу. Ці властивості одержаних дисперсій було використано для створення препарату таурину для покращення його транспорту з водного середовища в клітину. Для приготування цього препарату використовувалась золь-фракція із синтезу DS2Z. Даний зразок диспергували у воді з утворенням 0,8% водної дисперсії. При перемішуванні до дисперсії повільно додавали таурин з розрахунку 8г таурину на один грам полімеру. Таким чином одержаний препарат таурину досліджували на цитотоксичність використовуючи спермії бугаїв, результати досліджень приведені в таблиці 6.3.

Таблиця 6.3. Виживання сперміїв та активність сукцинатдегідрогенази за додавання таурину в середовище розрідження еякулятів бугаїв.

Дози препарату таурину (мл) у 100 мл розріджувача	n	Виживання, год	n	СДГ, од/год ×0,1 мл сперми
10,0	8	174,0±13,91	4	70,0±7,91*
5,0	8	174,0±13,25	4	60,0±3,54*
1,0	8	165,0±13,71	4	65,0±7,50*
Контроль	8	140,4±12,88	4	39,0±6,12

Різниця статистично вірогідна порівняно з контролем: \*  $p < 0,05$

З приведених табличних даних можна зробити висновок, що в присутності препарату таурину клітини (спермії бугаїв) у порівнянні з контрольною групою характеризуються підвищенням виживання клітин, зокрема, за 1,0 мл препарату таурину у 100 мл розріджувача фізіологічний показник якості сперміїв зростає на 18 % і становить – 165 год. При підвищенні дози препарату до 5 мл у складі 100 мл розріджувача виживання сперміїв на 25 % є вищим і становить 174,0 год, а за максимальної дози (10 мл / 100 мл розріджувача) — не змінюється (174,0±13,91 год).

При аналізі результатів активності ензиму-маркеру запліднювальної здатності сперміїв сукцинатдегідрогенази встановлено, що додавання мінімальної дози препарату таурину (1 мл /100 мл розріджувача) активність ензиму зростає на 40,0 % ( $p < 0,05$ ). Збільшення дози препарату до 5 мл / 100 мл розріджувача не змінює активність ензиму, що становить 60,0±3,54 од/год×0,1 мл сперми. За максимальної дози таурин (10 мл / 100 мл розріджувача) характеризує вищу на 44,3 % активність

ензиму-маркера запліднювальної здатності сперміїв, порівняно з контролем. На основі цих досліджень подана заявка на винахід «Спосіб підвищення якості та запліднювальної здатності сперміїв бугаїв».

## **6.2. Формування препаратів есенціальних мікроелементів на основі поліестерів**

Комбікормова промисловість України потребує значної уваги, так як ця галузь є одним із основних факторів розвитку птахівництва та тваринництва. За часи незалежності України загальний рівень виробництва комбікормів значно знизився, були зруйновані зв'язки з колишніми республіками, що призвело до негативних наслідків в експортній та імпорتنій можливостях комбікормової промисловості. В свою чергу низький рівень прибутковості галузі, обмеженість обігових коштів і доступу до кредитних ресурсів зумовили істотне скорочення поголів'я тварин та птиці у сільськогосподарських підприємствах [173]. Разом з тим, аналіз діяльності комбікормової промисловості показує, що існує постійна тенденція до росту комбікормової промисловості.

У статті [173] автори Кулаковська Т.А. і Колесник Е.В. зазначили, що на даний час на ринку України працює близько 120 виробників комбікормів, виробничі потужності яких дозволяють випускати 12-15 млн. тонн продукції на рік. Але значна їх кількість виробляє корми пониженої якості, через відсутність у них необхідних компонентів та незбалансований склад основних поживних і мінеральних речовин, що не відповідає рекомендаціям стандартів ЄС. Через відсутність необхідних компонентів комбікорми не збалансовані за основними поживними і біологічно-активними речовинами.

Серед речовин, які відіграють важливу роль в харчуванні тварин, значне місце займають мікроелементи, необхідні для росту і розмноження. Вони впливають на функції кровотворення, ендокринних залоз, захисних реакцій організму, мікрофлору травного тракту, регулюють обмін речовин, беруть участь в біосинтезі білка, проникності клітинних мембран і т.д.

Основне джерело мікроелементів для тварин – корми. Перехід на інтенсивне тваринництво призвело до того, що тварини вживають висококалорійну їжу, але

бідну на мікроелементи мінерального походження. Мінеральний склад останніх залежить від типу ґрунтів, кліматичних умов, виду рослин, фази вегетації, агрохімічних заходів, технології збирання, зберігання та підготовки до згодовування та інших факторів. У зв'язку з цим нерідко спостерігається нестача одних і надлишок інших елементів, що призводить до виникнення захворювань, зниження продуктивності, плодючості, погіршення якості продукції та ефективності використання корму. Щоб не допустити цього, використовують різні сполуки для корекції кормів, проте їх біологічна доступність неоднакова. Крім того, технологічні властивості солей мікроелементів суттєво впливають на якість преміксів і комбікормів.

На даному етапі для цього використовуються в основному мінеральні речовини, проте проблема їх використання полягає в низькій засвоюваності в організмі. Відомо, що лише близько 10% від загальної кількості засвоюється, а решта проходить через організм транзитом.

В результаті цього в організмі, або не створюється для його нормального функціонування необхідна кількість мікроелементів, або доводиться вводити їх в раціон у суттєво завищених від необхідного кількостях, що призводить до токсикації організму та проблем екологічного характеру.

### **6.2.1. Одержання комплексів мікроелементів з поліоксіетиленовими N-похідними глютамінової кислоти**

Комплекси мікроелементів готували на основі N-похідних глютамінової кислоти, закономірності одержання яких описано в розділі 4.1. Для одержання препаратів мікроелементів використовували поліоксіетиленові N-похідні глютамінової кислоти з молекулярною масою поліоксіетиленового фрагменту 400, 600 та 1500 Да.

Для одержання комплексних солей до водного розчину солі ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), концентрацію якого витримували в діапазоні 1-2%, додавали розчин гідроксиду натрію у співвідношенні 1:1,05 по еквіваленту. В результаті чого виділявся осад гідроксиду металів. Осад відділяли центрифугуванням, декантували розчин та промивали його дистильованою водою.

Промивання осаду проводили дистильованою водою до досягнення водневого показника промивних вод рівного 8. В результаті цієї процедури одержували вологий осад, який містив 80-90% вологи.

Попередньо готували 15-25 % розчин ліганду (N-заміщеної поліоксіетиленової похідної глютамінової кислоти) в N,N-диметилформаміді. Змішували одержаний розчин із осадом гідроксиду металу при мольному співвідношенні від 0,5 до 1,5 ліганду на 1 моль гідроксиду металу. Перемішували отриману суміш протягом 1 год. При кімнатній температурі, після чого розчинник видаляли вакуумною відгонкою. При змішуванні розчину mGlu(PEGk) в N,N-диметилформаміді з концентрованою водною дисперсією гідроксидів металів (заліза II, цинку, міді та марганцю) відбувається реакція нейтралізації (схема 6.1). В результаті реакції утворюється сіль, що розчинна в DMFA. З розчину вона може бути виділена упарюванням у вакуумі водоструминного насосу. В залежності від молекулярної маси поліоксіетиленового фрагменту в mGlu(PEGk) виділена сіль є в'язкою рідиною або пастоподібною з характерним для відповідного металу забарвленням. Вихід солей за даною реакцією при взаємодії з mGlu(PEGk) мало залежить від елемента металу і становить 75÷82 %. Пониження виходу, від кількісного, в основному зв'язано з втратами гідроксидів металів на стадії їх промивки від солей.

Розчинність одержаних солей у воді визначається довжиною поліоксіетиленового фрагменту в mGlu(PEGk). У випадку використання для синтезу поліетиленглікою з молекулярною масою 1500 Да практично всі одержані солі добре розчинні у воді. У випадку використання поліоксіетиленгліколевих

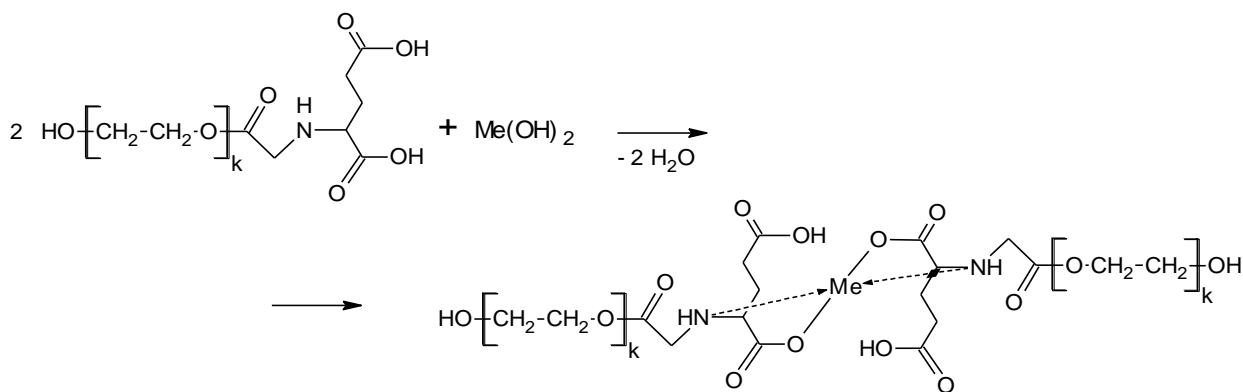


Схема 6.1 Реакція нейтралізації mGlu(PEGk) гідроксидами металів.

фрагментів розчинність до певної міри залежить від природи металу. Так, у випадку використання поліоксіетиленових фрагментів з молекулярною масою 400÷600 Да, солі міді та заліза добре розчинні у воді, а солі цинку та марганцю проявляють обмежену розчинність.

### 6.2.2. Дослідження особливостей комплексоутворення поліоксіетиленових N-похідних глютамінової кислоти

Проведені дослідження показали, що одержані солі на основі mPEGGlu проявляють яскраво виражену природу комплексних солей. В цьому можна переконатись по характерному зсуву в червону область полоси поглинання міді на УФ- спектрі. На рисунку 6.1 приведено фрагмент спектру солі міді в воді (крива 1), що одержана при взаємодії її гідроксиду з mPEG400Glu в порівнянні з відповідною половою поглинання іонів міді лігандованих молекулами води (крива 3).

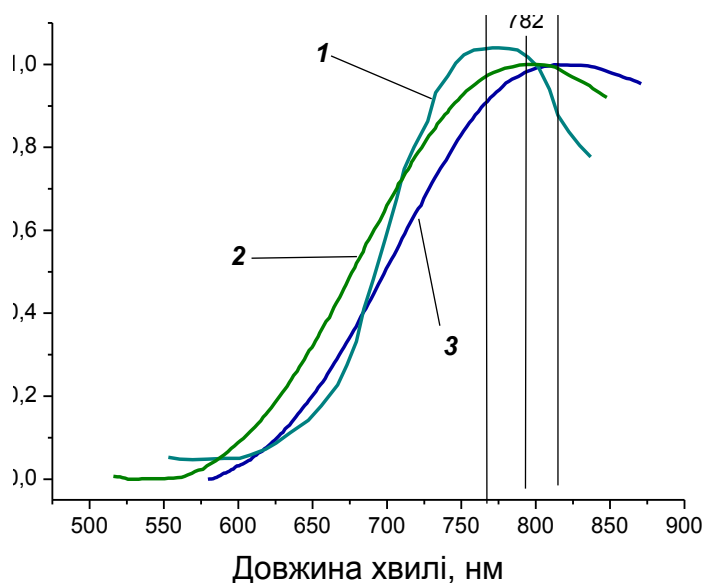


Рис. 6.1. Фрагмент полоси поглинання комплексної солі  $\text{Cu}^{2+}$  у видимій області спектра, лігандованої mGlu(PEG400).

В наведеному спектрі, спостерігається значний зсув максимуму поглинання з області 812÷805 нм, яка є характерна для іонів міді лігандованих водою, в область 764 нм. Слід відмітити, що, за даними [174], такий же максимум поглинання спостерігається для комплексної солі міді лігандованої EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота). Таким чином можна допустити, що

лігандування одержаної солі в нашому випадку відбувається також за участю атома азоту зі складу mGlu(PEG400), як це відображено на схемі 6.1.

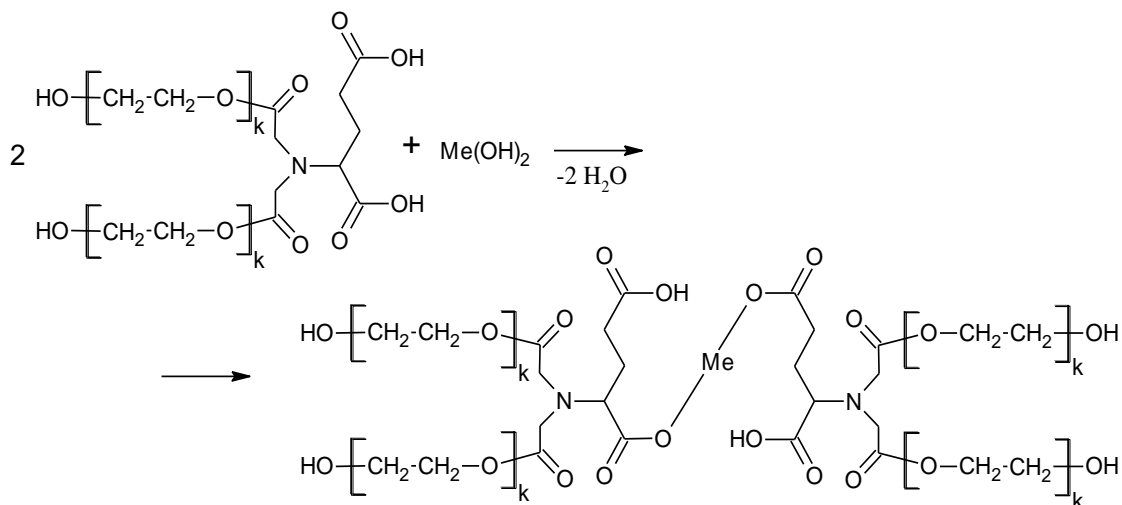


Схема 6.2 Схема нейтралізації двозаміщених N-похідних глютамінової кислоти dGlu(PEGk).

У випадку використання N-двозаміщених поліоксіетиленових N-похідних глютамінової кислоти dPEGGlu, реакція нейтралізації якої приведена на схемі 6.2 зміщення максимуму поглинання на УФ-спектрі має значно менше значення ніж у випадку використання mPEGGlu (крива 2 рис. 6.1). Максимум спостерігається при 782 нм проти 764 нм у випадку одно-заміщеної похідної. Слід вважати, що в цьому випадку комплексний зв'язок не зумовлений атомом азоту. Це можна пояснити, виходячи із заряду на азоті в одно- та ди- заміщеної похідної. У випадку одно-заміщеної похідної заряд на азоті не значно відрізняється від відповідного заряду у молекулі Glu (за оцінкою програмного пакету квантово-механічних розрахунків програми HyperChem 8) . Тому монозаміщена похідна здатна формувати донорно-акцепторний зв'язок за рахунок неподіленої пари електронів азоту.

У N-двозаміщеної похідної глютамінової кислоти заряд на атомі азоту є незначний, що означає суттєве збіднення електронної густини навколо нього та втрату здатності надавати свою пару електронів для формування координаційного зв'язку. Разом з тим спостерігається певний зсув сигналу в УФ-спектрі.

У випадку двозаміщеної похідної лігандування атомів металу здійснюється за рахунок неподіленої пари електронів атомів кисню поліоксіетиленових фрагментів. Звідки можна зробити висновок, що стійкість одержаних комплексів є значно меншою. Тому було проведено ряд досліджень щодо встановлення умов одержання солей з двозаміщеними похідними. Зокрема, на рис. 6.2 приведені УФ-спекри відповідних комплексів, які одержані при різному співвідношенні.

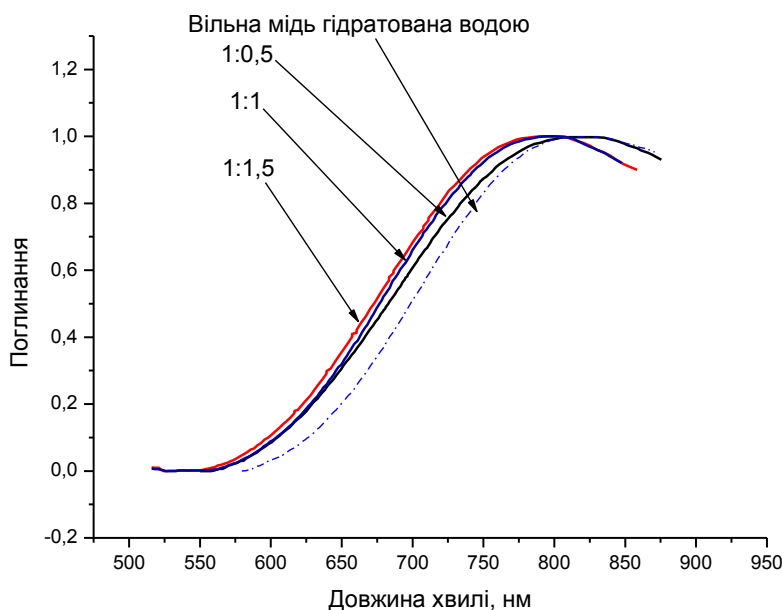


Рис. 6.2. Полоси поглинання комплексної солі  $\text{Cu}^{2+}$  у видимій області спектра, лігандованої dGlu(PEG400), при різному мольному співвідношенні між іонами  $\text{Cu}^{2+}$  та ліганду на стадії одержання солі.

З наведених кривих можна побачити що зразок, який одержаний при мольному співвідношенні 0,5 ліганду до 1 міді, суттєво відрізняється від решти кривих і наближається до кривої нелігандованої міді. Це може означати, що при даному співвідношенні не забезпечується необхідна кількість ліганду і частина міді залишається лігандованою. Таким чином сигнал одержаний для цього зразка можна вважати складним, який складається з сигналу від лігандованого та нелігандованого іонів міді. Це дозволяє розкласти сигнал на складові і оцінити частку лігандованих іонів. Проведений таким чином аналіз показав, що у випадку співвідношення 0,5 : 1 частка лігандованої міді не перевищує 42 %, у випадку співвідношення 1 : 1 вона



уже є близькою до 100 %, а у випадку співвідношення 1:1,5 всі іони міді є лігандованими.

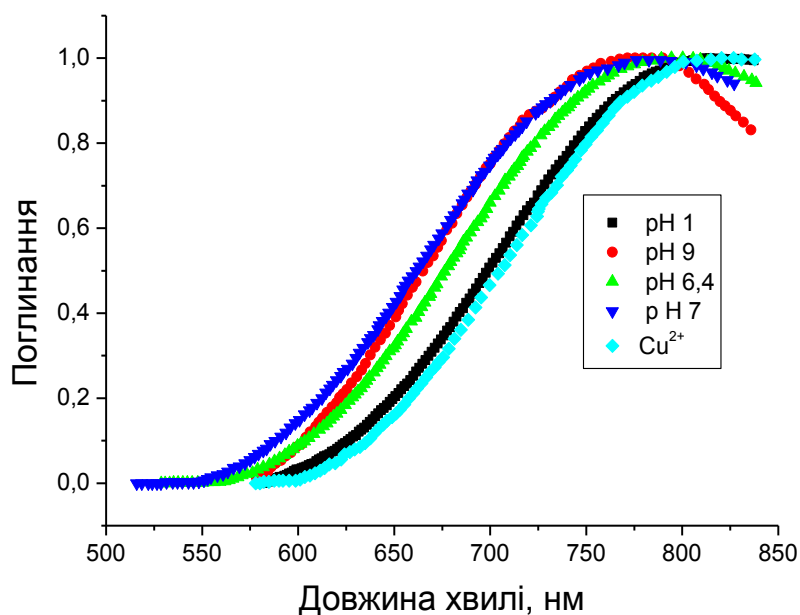


Рис. 6.4. Полоси поглинання комплексної солі  $\text{Cu}^{2+}$ , лігандованої  $\text{mGlu(PEG400)}$  у видимій області спектра, при різному значенні рН-середовища.

Крім співвідношення, важливим чинником, який суттєво впливає на частку лігандованих іонів міді є водневий показник середовища. На рис. 6.4 приведено серія полос уф-поглинання іонів міді, що одержана при різних значеннях водневого показника.

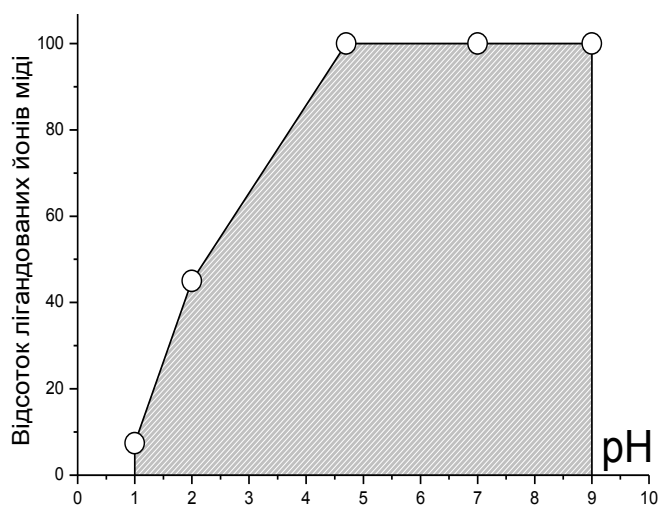


Рис. 6.3 Частка лігандованих іонів  $\text{Cu}^{2+}$  в залежності значення водневого показника середовища.

Аналіз, аналогічний до попереднього дозволив оцінити частку лігандованих іонів за різних його значень. Результати цих розрахунків приведені на діаграмі рис. 6.3. З них можна побачити, що комплекс міді лігандований дизаміщеною похідною є стійким від рН 9 до значень рН 2÷2.5. В більш кислому середовищі спостерігається швидке руйнування комплексу.

### **6.2.3. Цитологічні дослідження комплексів металів отриманих на основі поліоксіетиленових N-похідних глютамінової кислоти**

На препараті N-похідної глютамінової кислоти з йоном металу проводили ряд токсикологічних досліджень в Інституті сільського господарства Карпатського регіону НААН та ЛНВЦ «Західплемресурси». Для оцінювання цитотоксичності мікроелементів у комплексі з N- похідними глютамінової кислоти, було вибрано N-похідну глютамінової кислоти на основі поліоксіетиленгліколю з молекулярною масою 600 г/моль. Дослідження проводились на еякулятах бугаїв. Для цього відбирали проби еякулятів об'ємом 2 – 6 мл з концентрацією - 0,6 -  $1,5 \times 10^9$  клітин/мл та активністю 7,5 – 8,0 бала. Сперму, розріджену лактозо-жовтково-гліцериним розріджувачем, ділили на частини: контрольну – без додавання та дослідні - з додаванням мікроелементів у вигляді водного розчину, 1 г якого містив:  $Zn^{+2}$  – 0,0319 ммоль;  $Cu^{+2}$  – 0,0222 ммоль;  $Mn^{+2}$  – 0,0359 ммоль;  $Fe^{+2/+3}$  – 0.03 ÷ 0.05 ммоль. В дослідні зразки сперми додавали 0,01, 0,05 і 0,1 мл вихідних розчинів мікроелементів у 1 мл розрідженої сперми.

У контрольних і дослідних зразках розрідженої сперми визначали виживання сперміїв (год.) за температури 275÷277 К до припинення прямолінійного їх поступального руху та споживання кисню. Споживання кисню визначали полярографічно (нг-атом O/хв×0,1 мл сперми; С) за температури 38,5°С, а відновну здатність – потенціометрично (mV/ хв × 0,1мл С) з використанням системи відкритих мікроелектродів [175176]. Крім того слідували за активністю сукцинатдегідрогенази (СДГ, од/год × 0,1 мл С)[2]. Дослідження інтенсивності дихання і відновну здатність сперміїв проводили у фосфатно – сольовому буфері (ФСБ; NaCl–0,8 г, KCl–0,02 г,  $Na_2HPO_4$ –0,11 г,  $KH_2PO_4$ –0,02 г,  $MgCl_2$ –0,01 г,  $H_2O$  до 100 мл).

Дослідження проводили зі зростаючою кількістю розчину мікроелементів, та реєстрували час виживання клітин. Було встановлено, що збільшення кількості введених комплексних солей мікроелементів при малих дозах (до 0,01 мл розчину на 1 мл середовища) позитивно впливала на час виживання та фізіологічні параметри життєдіяльності клітин. При перевищенні дози більше 0,05 мл розчину на 1 мл середовища спостерігали токсичну дію препаратів. Про це можна було робити висновок через суттєве зменшення часу виживання та порушення дихальної активності клітин, що є однозначною ознакою перевищення необхідної кількості мікроелементів, які засвоєлись клітинами. Таким чином було встановлено, що достатня концентрація мікроелементів, яка не викликає токсичної дії та забезпечує нормальні біохімічні показники функціонування клітин, в середовищі становить  $Zn^{+2} - 0,003$  ммоль/мл;  $Cu^{+2} - 0,0018$  ммоль/мл;  $Mn^{+2} - 0,0036$  ммоль/мл;  $Fe^{+2/+3} - 0,003 \div 0,005$  ммоль на мілілітр. Слід відмітити що використання цих же мікроелементів у вигляді мінеральних солей вимагає створення їх концентрації що перевищує вище зазначені в 10-50 раз. Цей факт дозволяє стверджувати про високу ефективність розроблених комплексних препаратів мікроелементів. Вони забезпечують нормальне функціонування клітин при нижчих концентраціях. Цей ефект досягається за рахунок підвищеної засвоюваності мікроелементів лігандованих N-поліоксіетиленовими похідними глютамінової кислоти.

#### **6.2.4. Дослідження фізіологічної активності комплексів металів на щурах**

Для проведення даних досліджень використовували корм для щурів “Вака High Quality” (виробництва Біосфера), на який методом розпилювання наносили визначену кількість розчинів комплексних солей металів (купруму, феруму(II), цинку, марганцю). На одну одиницю меленого корму наносили  $5,5 \cdot 10^{-6} \div 19,5 \cdot 10^{-6}$  моль відповідного мікроелементу на 1 грам корму. Одержаний корм згодовували дорослим щурам протягом двох місяців, після чого їх загальний стан порівнювали із контрольною групою, що харчувалась збалансованим по мікроелементах кормом промислового виробництва.

На рисунку 6.5 приведена діаграма зміни маси щурів протягом тестування. З наведених даних можна побачити, що маса дорослих щурів залишалась на рівні

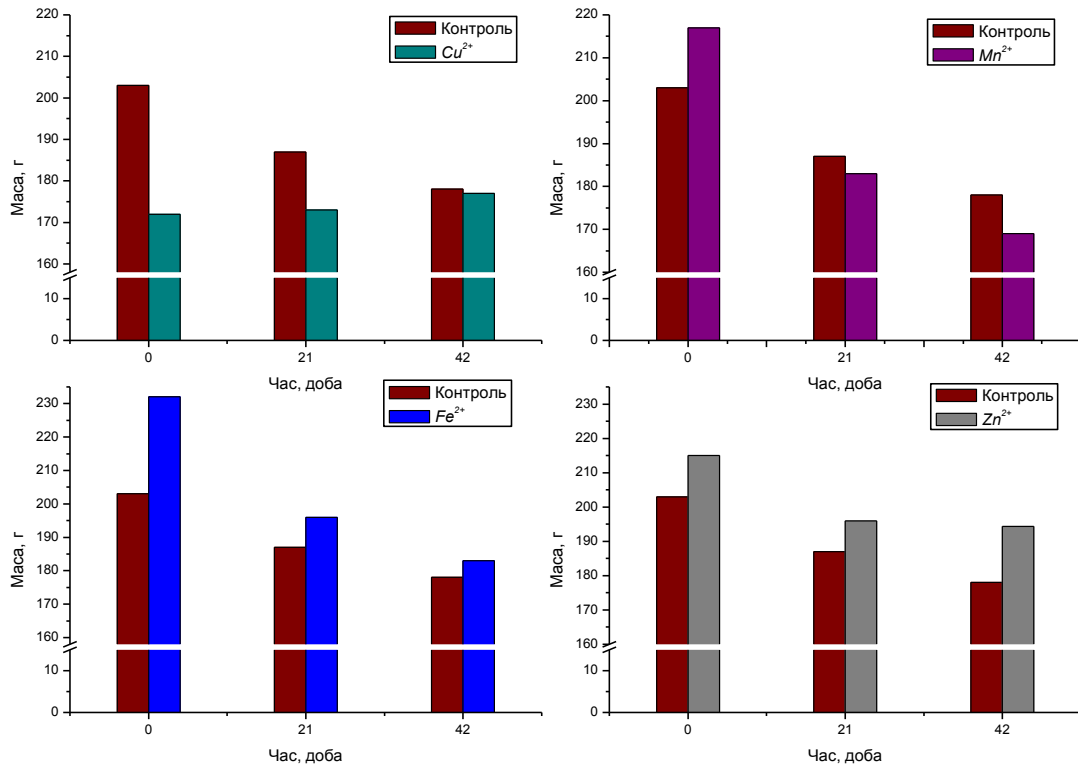


Рис. 6.5. Контроль за вагою щурів при їх вигодовуванні кормами, що містили експериментальні препарати мікроелементів.

контрольних, не дивлячись на те, що в кормах кількість мікроелементів становила в середньому десяту частину від їх вмісту в кормі контрольної групи.

При дослідженні піддослідних щурів було виявлено загальне покращення стану організму, що підтверджується зменшенням вмісту холестерину в крові у порівнянні із гризунами, яким згодувався звичайний корм. Дана залежність зображена на рисунку 6.6.

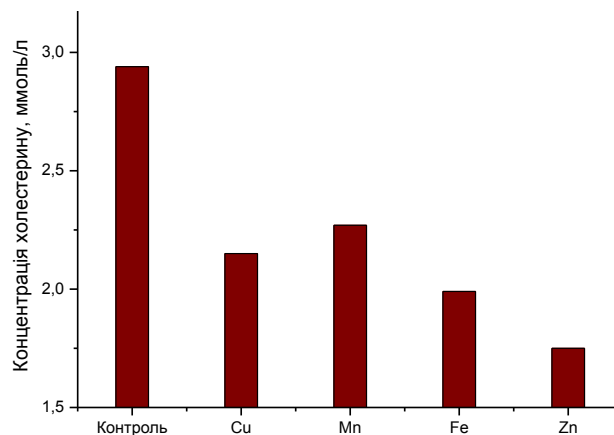


Рис. 6.6 Зменшення вмісту холестерину в щурів при згодовуванні їм корму насиченого мікроелементами

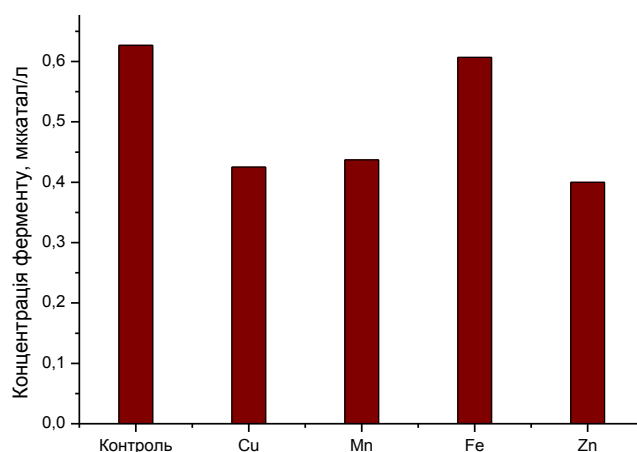


Рис. 6.7 Залежність вмісту гамаглутамілтрасамілази (ГГТ) у крові щурів при їх вигодовуванні кормами з експериментальними препаратами мікроелементів.

На рисунку 6.7 приведено залежність вмісту у нирках щурів гамаглутамілтрасамілази (ГГТ) - ферменту печінки. Зниження ГГТ свідчить про покращення видільної системи нирок.

У тварин також фіксували вміст лужної фосфатази (фермент, що впливає на процес відкладення кальцію в кістковій тканині, а також на транспорт і обмін ліпідів), креатиніну (кінцевий продукт обміну білків в організмі, бере участь в енергетичному обміні м'язової та інших тканин), прямого та загального білірубіну (головний з жовчних пігментів). Дані дослідження показали, що у піддослідних щурів вміст цих речовин не відрізнявся від вмісту в організмі щурів контрольної групи.

Таким чином, проведені дослідження показали, що одержані препарати есенціальних мікроелементів забезпечують ефективне функціонування організму при дозах в кормах, що практично на порядок менші за дози в яких використовуються промислові препарати.

### **6.3. Створення системи пролонгованої доставки двовалентного заліза на основі модифікованого декстину та N-похідних глютамінової кислоти**

При приготуванні системи пролонгованої доставки  $Fe^{2+}$  використовувалась гельфракція із синтезу DS6 та N-похідна глютамінової кислоти (на основі полуксіетиленгліколю з молекулярною масою 1500 Да).

Для його приготування комплекс заліза змішували з попередньо приготовленим 6 % розчином гель-фракції синтезу DS6H у розчині DMFA, при

мольному співвідношенні сполук – 1 : 1. Утворену суміш перемішували протягом доби. По завершенні перемішування розчинник випарювали у вакуумі водоструминного насосу до постійної маси. Всі процеси проводили у атмосфері аргону. На схемі 6.3 представлено схематичне зображення утвореного продукту. Пояснити утворену структуру можна наступним чином: гель-фракція модифікованого декстрину, яка за даними досліджень, що викладені в розділі 3.2 являє собою просторово-структуровані ланцюги декстрину, набрякає у DMFA, при додаванні комплексу заліза з N-похідною глютамінової кислоти, він розпроділяється в набряклій сітці. При видаленні розчинника, сітка колапсує захоплюючи комплекс заліза. В таблиці 3.3 показано, що даний зразок гель-фракції є гідрофобним, в таблиці 3.4 показано, що у використаного зразка гель-фракції є найбільший ступінь структурування. Завдяки цьому комплекс, що локалізований в сітці за рахунок сегментальних утруднень не здатний дифундувати у воду.

Таблиця 6.4 Вплив препарату пролонгованої доставки іонів заліза на час виживання клітин спермії бугая

Дози полімеру	n	Концентрація	n	Вживання, год	n	Дихальна активність O/хв×0,1 мл СК	n	Відновна здатність mv/хв×0,1мл СК	n	СДГ
1%										
0,10		0,49 ±0,06	6	200,0±13,47	4	0,09±0,02	4	0,01±0,00	6	66,7±4,51
0,05			6	188,0±11,89	4	0,18±0,01	4	0,02±0,01	6	45,0±11,3
0,01			6	196,0±11,89	4	0,42±0,12	4	0,01±0,01	6	57,5±7,97
К	6		12	168,0±5,34	8	0,72±0,12	8	0,06±0,02	12	48,3±5,58
η			0,465		0,737		0,544		0,377	
2%										
0,10		0,49 ±0,06	6	188,0±10,46	4	0,15±0,04	4	0,01±0,01	6	56,7±9,91
0,05			6	188,0±11,89	4	0,24±0,02	4	0,01±0,00	6	55,8±10,57
0,01			6	176,0±10,83	4	1,51±1,02	4	0,01±0,00	6	63,3±6,09
К	6		12	168,0±5,34	8	0,72±0,12	8	0,06±0,02	12	48,3±5,58
η			0,356		0,458		0,6		0,266	

Разом з тим, в розділі 5 було показано, що зразок гель-фракції на якому був приготовлений препарат не утворює агрегатно-стабільної дисперсії у водному

середовищі, що суттєво ускладнює його введення в м'язову тканину тварин. Тому додаткову стабілізацію було надано за методикою описаною в розділі 4.2, шляхом прищеплення до поверхні N-поліоксіетильованих похідних глютамінової кислоти з молярною масою поліоксіетильованого фрагменту 1500 Да. Завдяки цій процедурі досягали достатню стабільність водних дисперсій препарату, структуру якого схематично відображає схема 6.3.

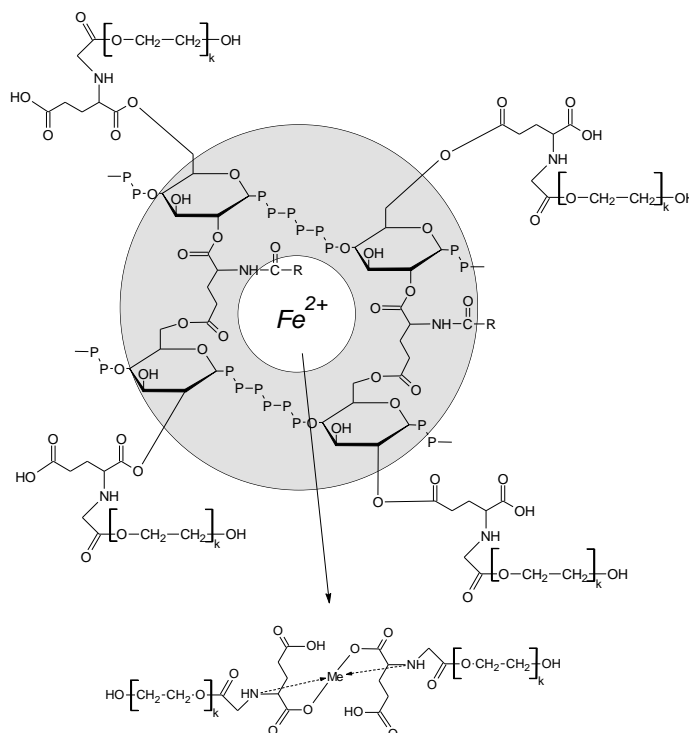


Схема 6.3 Схематичне зображення системи пролонгованої доставки  $Fe^{2+}$  на основі модифікованого декстрину та N-похідної глютамінової кислоти.

Пролонгованість дії даного препарату забезпечується тим, що після введення препарату інекційно, в м'язеву тканину, частинки дисперсної фази попадають в біологічне середовище. В біологічному середовищі відбувається його біодеструкція. В результаті цього руйнується просторова сітка, що знімає сегментальні ускладнення і забезпечує пролонговане поширення лігандованого препарату заліза в організм.

Одержаний препарат пройшов дослідження на цитотоксичність та фізіологічну активність металу в його складі. Результати цих досліджень приведені в таблиці 6.4. З наведених в таблиці даних можна побачити, що введення препарату

збільшує час виживання сперміїв бугая практично при всіх використаних дозах. Це підтверджує відсутність цитотоксичності препарату.

Аналіз дихальної активності і активності СДГ демонструє, що вивільнене в ході біодеструкції залізо включається в активні центри каталази, що приводить до руйнування в клітині перекису водню, завдяки чому вповільнюються радикальні процеси.

Сукупність відсутності токсичної дії одержаного препарату, забезпечення його фізіологічної активності дає підстави до проведення більш розширених досліджень його в якості ефективного засобу проланогованої доставки препаратів заліза. Це особливо важливо в процесі вирощування молодняка свиней, у якого спостерігається дефіцит заліза при інтенсивній відгодівлі.



## Висновки

У дисертаційній роботі вирішено наступні науково-практичні завдання:

- Показано, що в результаті модифікації декстрану та декстрину N-похідними глутамінової кислоти за реакцією Стегліха в м'яких умовах утворюються поліестери з розгалуженою та просторово-структурованою природою макроланцюга.
- Встановлено, що співвідношення кількості поліестерів з розгалуженою та просторово-структурованою будовою макроланцюга, визначається природою полісахариду та молекулярною масою алкільного фрагменту в N-заміщеній глутаміновій кислоті та співвідношенням реагентів. Використання в синтезі декстрану та N-лауреїлглутамінової кислоти сприяє утворенню поліестерів з розгалуженою структурою макромолекули, вихід яких становить 80÷95%, використання в синтезі декстрину та N-стеароїлглутамінової кислоти сприяє утворенню поліестерів з перехресно-структурованою природою макроланцюга, вихід якого становить 60÷70%.
- Досліджено особливості перебігу реакції Стегліха за участю гідроксильних груп у складі цукрів. На основі модельних синтезів показано, що вторинні гідроксильні групи у глюкопіранозному фрагменті мають співрозмірну з первинними реакційну здатність в реакції Стегліха. Досліджено ефективність перебігу реакції і показано, що основним чинником, що її визначає є співвідношення реагентів.
- Показано, що продукти модифікації полісахаридів N-стеароїл- та N-лауреїлглутаміновими кислотами з розгалуженою будовою макроланцюга мають поверхнево-активні властивості та здатні до формування самостабілізованих водних дисперсій. Досліджено залежність розміру дисперсної фази від складу полімеру та умов одержання дисперсії.
- Показано, що поліестери з перехресно-структурованою природою макромолекул не мають поверхнево-активних властивостей, але, при визначеному ступені структуровання, здатні до набрякання у воді та формувати у водному середовищі агрегатно-стійкі дисперсії мікрогідрогелів.

- Показано, що водні дисперсії поліестерів здатні до сорбції водорозчинних білків плазми крові, встановлено що у випадку бичачого сировоткового альбуміну коефіцієнт перерозподілу в залежності від структури макромолекули становить від 60 до 20; досліджено здатність до сольобілізації нерозчинних в воді органічних речовин.
- На основі досліджень впливу одержаних дисперсій на виживання клітин спермії бугаїв показана відсутність їх токсичної дії.
- Біохімічні дослідження на живих клітинах та фізіологічні дослідження на тваринах (лабораторних щурах) показали, що одержані продукти з успіхом можуть бути використані як полімерні основи препаратів мікронутрієнтів.

## Список використаних джерел

---

1. Prabakaran M. Stimuli-responsive hydrogels based on polysaccharides incorporated with thermo-responsive polymers as novel biomaterials / M Prabakaran, JF Mano // *Macromolecular bioscience*. – 2006. – Vol.6. – No.12. – P. 991-1008.
2. Cascone M. G. Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides./ M. G. Cascone, N. Barbani, C. Cristallini, P.Giusti // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2002. – Vol.12 – No.3. – P. 267-281
3. Ganguly K. Polysaccharide-based micro/nanohydrogels for delivering macromolecular therapeutics / K Ganguly, K Chaturvedi, U. A. More, M. N. Nadagouda // *Journal of Controlled Release*. – 2014. – No.193. – P.162-173.
4. Kalpana R. Biodegradable hydrogels in drug delivery / R. Kalpana , K. Park // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1993 – No. 11. – P.59-71
5. Han D.H. A chitosan hydrogel-based cancer drug delivery system exhibits synergistic antitumor effects by combining with a vaccinia viral vaccine / D.H Han., C.K. Song, Y.S. Park, K.H.Noh, et al. // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2008. – Vol.350. – No.2. – P. 27-34.
6. Wichterle O. Hydrophilic gels for biological use / O. Wichterle, D. Lim // *Nature*. – 1960. – No.185. – P.117-118.
7. Kim J.I. Long-term theranostic hydrogel system for solid tumors / J.I.Kim, B.S. Lee, C. Chun, J.K. Cho // *Biomaterials*. – 2012. – Vol.33. – No.7. – P2251-2259.
8. Hamidi M. Hydrogel nanoparticles in drug delivery / M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2008. – No.60. – P1638-1649.
9. Moya M.D. Cyclodextrin-based nanogels for pharmaceutical and biomedical applications / M.D. Moya, C. Alvarez // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2012. – No.428. – P.152-163.
10. Ganguly K. Colon targeting of 5-Fluorouracil using polyethylene glycol crosslinked chitosan microspheres enteric coated with cellulose acetate phthalate / K. Ganguly, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2011. – Vol.50. – No.21. – P 11797-11807.
11. Hathaway B.J. The electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of the copper(II) ion / B.J. Hathaway, D.E. Billing // *Coordination Chemistry Reviews*. – 1970. – Val.5. – No.2. – P.143-207.
12. Munk P. Introduction to macromolecular science / P. Munk, T.M. Aminabhavi; New York: John Wiley & Sons, 2nd edition, 2002. – 544 p.
13. Serizawa T. Rapid Deswelling of Porous Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogels Prepared by Incorporation of Silica Particles / T. Serizawa , K. Wakita , M. Akashi // *Macromolecules*. – 2002. – No.35. – P.10-15.
14. Schilli C. M. A New Double-Responsive Block Copolymer Synthesized via RAFT Polymerization: Poly (N-isopropylacrylamide)-b lock-poly (acrylic acid) / C.M.Schilli, M.Zhang, E.Rizzardo, S.H.Thang // *Macromolecules*. – 2004. – Vol.37. – No.21. – P.7861-7866.

- 
15. Plunkett K. N. Chymotrypsin responsive hydrogel: application of a disulfide exchange protocol for the preparation of methacrylamide containing peptides. / K.N.Plunkett, K.L.Berkowski, J.S.Moore // *Biomacromolecules*. – 2005. – Vol.6. – No. – 2. – P.632-639.
  16. Bhattarai N. PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. / N. Bhattarai, H.R.Ramay, J.Gunn, F.A.Matsen. // *J. Controlled Release*. – 2005. – Vol.103. – No.3. – P.609-633.
  17. Alarcon C. D. L. Stimuli responsive polymers for biomedical applications. / C. D. L.Alarcon, S.Pennadam, C.Alexander // *Chem Soc Rev*. – 2005. – Vol.34. – No.3. – P.276-361.
  18. Bae Y. H. *Controlled Drug Delivery, Challenge and Strategies* / Y. H. Bae American Chemical Society, Washington, 1997. – 629p.
  19. Dong L.C. A novel approach for preparation of pH-sensitive hydrogels for enteric drug delivery / L.C.Dong, A.S.Hoffman // *J. Controlled Release*. – 1991. – Vol.15. – No.2. – P.141-152.
  20. Dong L.C. Thermally reversible hydrogels: III. Immobilization of enzymes for feedback reaction control / L.C.Dong, A.S.Hoffman // *J. Controlled Release*. – 1986. – Vol.4. – No.3. – P.223-227.
  21. Khare A.R. Swelling/deswelling of anionic copolymer gels. / A.R.Khare, N.A.Peppas // *Biomaterials*. – 1995. – Vol.16. – No.7. – P.559-626.
  22. Ulbrich K. Synthesis of novel hydrolytically degradable hydrogels for controlled drug release / K.Ulbrich, V.Subr, P.Podperova, M.Buresova // *J. Controlled Release*. – 1995. – Vol.34. – No.2. – P.155-165.
  23. Beltran S. Swelling equilibria for ionized temperature-sensitive gels in water and in aqueous salt solutions / S. Beltran, H. H. Hooper, H. W. Blanch, J. M. Prausnitz // *J. Chem. Phys.* – 1990. – No.92. – P.2061-2067.
  24. Zhang J. Synthesis and Characterization of pH- and Temperature-Sensitive Poly(methacrylic acid)/Poly(N-isopropylacrylamide) Interpenetrating Polymeric Networks / J.Zhang, N.A.Peppas // *Macromolecules*. – 2000. – Vol.33. – No.1. – P.102-107.
  25. Nishi S. Complex-Forming Polyoxyethylene: Poly(acrylic acid) Interpenetrating Polymer Networks III. Swelling and Mechanochemical Behavior / S. Nishi, T. Kotaka // *Polym. J.* – 1989. – No.21. – P.393-402.
  26. Qiu Y. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery / Y.Qiu, K.Park // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2001. – Vol.53. – No.3. – P.321-360.
  27. Sershen S Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery / S. Sershen, J. West // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2002. – Vol.54. – No.9. – P.1225-1260.
  28. Mart R. J., *Peptide-Based Stimuli-Responsive Biomaterials* / R.J.Mart, R.D.Osborne, M.M.Stevens, R.V Ulijn // *Soft Matter*. – 2006. – Vol. 2. – No.10. – P.822-835.
  29. Hoffman S. Conjugates of Stimuli- Responsive Polymers and Proteins / S. Hoffman, P. S. Stayton // *Progress in Polymer Science*. – 2007. – Vol.32. – No.8-9. – P. 922-932.
  30. Alarcon C.H. *Stimuli Responsive Polymers for Biomedical Applications* / C. H. Alarcon, S.Pennadam, C.Alexander // *Chemical Society Reviews*. – 2005. – Vol.34. – No.3. – P.276- 285.

- 
31. Galaev I. Y. Smart' Polymers and What They Could Do in Biotechnology and Medicine / I.Y.Galaev, B.Mattiasson // Trends in Biotechnology. – 1999. – Vol.17. – No.8. – P.335-340.
  32. Zhang J. Preparation and Properties of Polyacrylate/Bentonite Superabsorbent Hybrid via Intercalated Polymerization / J.Zhang, K.Yuan, Y.P.Wang, S.J.Gu, S.T.Zhang // Materials Letters. – 2007. – Vol.61. – No.2. – P316-320.
  33. Chen J. Synthesis and Characterization of Superporous Hydrogel Composites / J.Chen, K.Park // Journal of Controlled Release. – 2000. – Vol.65. – No.1-2. – P.73-82.
  34. Ali P. Synthesis and Evaluation of pH and Thermosensitive Pectin-Based Superabsorbent Hydrogel for Oral Drug Delivery Systems / P.Ali, B.Shahram // Starch-Stärk. – 2009. – Vol.61. – No.3-4. – P161-172.
  35. Mahajan A. Smart polymers: innovations in novel drug delivery / A.Mahajan, G.Aggarwal // International Journal of Drug Development and Research. – 2011. – Vol.3. – No.3. – P.16-30.
  36. Zhou J. Viscoelastic Behavior and in Vivo Release Study of Microgel Dispersions with Inverse Thermoreversible Gelation / J.Zhou, G.Wang, L.Zou, L.Tang, M.Marquez // Biomacromolecules. – 2008. – Vol.9. – No.1. – P.142-148.
  37. Wheeldon I.R. Bio-active Proteinaceous Hydrogels from Designed Bifunctional Building Blocks / I.R.Wheeldon, S.C.Barton, S.Banta // Biomacromolecules. – 2007. – Vol.8. – No.10. – P.2990-2994.
  38. Thornton P. D. Enzyme- Responsive Polymer Hydrogel Particles for Controlled Release / P.D.Thornton, R.J.Mart, R.V.Ulijn // Advanced Materials. – 2007. – Vol.19. – No.9. – P.1252-1256.
  39. Gu J. Programmable Delivery of Hydrophilic Drug Using Dually Responsive Hydrogel Cages / J.Gu, F.Xia, Y.Wu, X.Qu, Z.Yang // Journal of Controlled Release. – 2007. – Vol.117. – No.3. – P.396-402.
  40. Geest B.G. Self-Rupturing Microcapsules / B.G.Geest, C.Déjugnat, G.B.Sukhorukov, K.Braeckmans, S.C.De Smedt, J.Demeester // Advanced Materials. – 2005. – Vol.17. – No.19. – P.2357-2361.
  41. Gan D. Synthesis and Protein Adsorption Resistance of PEG-Modified Poly(N-Isopropylacrylamide) Core/Shell Microgels / D.Gan, L.A.Lyon // Macromolecules. – 2002. – Vol.35. – No.26. – P.9634-9639.
  42. Singh N. Covalent Tethering of Functional Microgel Films onto Poly(Ethylene Terephthalate) Surfaces / N.Singh, A.W.Bridges, A.J.Garcia, L.A.Lyon // Biomacromolecules. – 2007. – Vol.8. – No.10. – P.3271-3275.
  43. Cong H. Non-Adhesive PEG Hydrogel Nanostructures for Self-Assembly of Highly Ordered Colloids / H.Cong, A.Revzin and T.Pan // Nanotechnology. – 2009. – Vol.20. – No.7. – P.53-60.
  44. Wang H.J. Applications and Degradation of Proteins Used as Tissue Engineering Materials / H.J.Wang, L.Di, Q.S.Ren, J.Y.Wang // Materials. – 2009. – Vol.2. – No.2. – P.613-635.
  45. Schwall C. Micro- and Nanoscale Hydrogel Systems for Drug Delivery and Tissue Engineering / C.Schwall, I.Banerjee // Materials. – 2009. – Vol.2. – No.2. – P.577-612.
  46. Suh K.Y. Capillary Force Lithography: A Versatile Tool for Structured Biomaterials Interface towards Cell and Tissue Engineering / K.Y.Suh, M.C.Park, P.Kim // Advanced Functional Materials. – 2009. – Vol.19. – No.17. – P.2699-2712.

- 
47. Chung C. Engineering Cartilage Tissue / C.Chung, J.A.Burdick // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2008. – Vol.60. – No.2. – P.243-262.
48. Chilkoti A. Targeted drug delivery by thermally responsive polymers / A.Chilkoti, M. R.Dreher, D.E.Meyer, D.Raucher // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2002. – Vol.54. – No.5. – P.613-643.
49. Tanaka Y. Thermoreversible Transition of Tensile Modulus of Hydrogel with Ordered Aggregates / Y. Tanaka, Y. Kagami, A. Matsuda, Y. Osada // *Macromolecules*. – 1995. – Vol.28. – No.7. – P.2574-2576.
50. Han C.K. Extracellular matrix for a rechargeable cell delivery system / C.K.Han , Y.H.Bae , B.Vernon, S.W.Kim // *J Control Release*. – 1998. – Vol.53. – No.1-3. – P.249-307.
51. Vernon B. Insulin release from islets of Langerhans entrapped in a poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) polymer gel / B. Vernon, S.W.Kim, Y.H.Bae // *J Biomater Sci Polym Ed.* – 1999. – Vol.10. – No.2. – P.183-281.
52. Topp M. D. C. Thermosensitive Micelle-Forming Block Copolymers of Poly(ethylene glycol) and Poly(N-isopropylacrylamide) / M. D. C. Topp, P. J. Dijkstra, H. Talsma, J. Feijen // *Macromolecules*. – 1997. – Vol.30. – No.26. – P.8518-8520.
53. Aoyagi T. Novel bifunctional polymer with reactivity and temperature sensitivity / T.Aoyagi, M.Ebara, K.Sakai, Y.Sakurai, T.Okano // *J Biomater Sci Polym Ed.* – 2000. – Vol.11. – No.1. – P.101-111.
54. Bokias G. Synthesis and characterization of positively charged amphiphilic water soluble polymers based on poly(N-isopropylacrylamide) / G. Bokias, D. Hourdet // *Polymer*. – 2001. – Vol.42. – No.15. – P.6329-6337.
55. Lowman A.M. Solute transport analysis in pH-responsive, complexing hydrogels of poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol) / A.M.Lowman, N.A.Peppas, J.Biomater // *J Biomater Sci Polym Ed.* – 1999. – Vol.10. – No.9. – P.999-1009.
56. Kubota N. Temperature-responsive properties of poly(acrylic acid-co-acrylamide)-graft-oligo(ethylene glycol) hydrogels / N. Kubota, N. Tasumoto, T. Sano, Y. Matsukawa // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2001. – Vol.80. – No.5. – P.798-805.
57. Zhang J. Morphology of poly(methacrylic acid)/poly(N-isopropyl acrylamide) interpenetrating polymeric networks / J. Zhang, N. A. Peppas // *J Biomater Sci Polym Ed.* – 2002. – Vol.13. – No.5. – P.511-536.
58. Peniche C. Self-curing membranes of chitosan/PAA IPNs obtained by radical polymerization: preparation, characterization and interpolymer complexation / C.Peniche, W.A.Monal, N.Davidenko, R.Sastre, A.Gallardo, J.San Roman // *Biomaterials*. – 1999. – Vol.20. – No.20. – P.1869-1947.
59. Denuziere A. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical aspects / A. Denuziere, D. Ferrrier, A. Domard // *Carbohydrate Polymers*. – 1996. – Vol.29. – No.4. – P.317-323.
60. Lee K.Y. Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules / K.Y.Lee, W.H.Park, W.S.Ha // *J. Appl. Polym.* – 1997. – Vol.63. – No.4. – P.425-432.

- 
61. Prabakaran M. Liquid Crystalline Behaviour of Chitosan in Formic, Acetic, and Monochloroacetic Acid Solutions / M. Prabakaran, J.P.Borges, M.H.Godinho, J.F.Mano // *Materials Science Forum.* – 2006. – Vols.514-516. – P.1010-1014.
62. Pillay V. In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. II. Physicochemical characterization of calcium-alginate, calcium-pectinate and calcium-alginate-pectinate pellets / V. Pillay, R. Fassihi // *J Control Release.* – 1999. – Vol.59. – No.2. – P.243-299.
63. Kim S.R. A semi-interpenetrating network system for a polymer membrane / S.R.Kim, S.H.Yuk, M.S.Jhon // *European Polymer Journal.* – 1997. – Vol.33. – No.7. – P.1009-1014.
64. De Groot C. J. In vitro biocompatibility of biodegradable dextran-based hydrogels tested with human fibroblasts / C.J.De Groot, M.J.A. an Luyn, W.N.E.Van Dijk-Wolthuis, J.A.Cadee, J.A.Plantinga, W.D.Otter // *Biomaterials.* – 2001. – Vol.22. – No.11. – P.1197-1400.
65. Prabakaran M. Chitosan derivatives bearing cyclodextrin cavities as novel adsorbent matrices / M. Prabakaran, J. F. Mano // *Carbohydr. Polym.* – 2006. – Vol.63. – No.2. – P.153-298.
66. Jayakumar R. Graft copolymerized chitosan—present status and applications / R.Jayakumar, M.Prabakaran, R. L.Reis, J.F.Mano // *Carbohydr. Polym.* – 2005. – Vol.62. – No.2. – P.142-158.
67. Prabakaran M. Hydroxypropyl chitosan bearing beta-cyclodextrin cavities: synthesis and slow release of its inclusion complex with a model hydrophobic drug / M.Prabakaran, J.F.Mano // *Macromol. Biosci.* – 2005. – Vol.5. – No.10. – P.965-1038.
68. Cho Y. W. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator / Y.W.Cho, Y.N.Cho, S.H.Cheng, G.Yoo, S.W.Ko // *Biomaterials.* – 1999. – Vol.20. – No.22. – P.2139-2184.
69. Prabakaran M. Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems / M.Prabakaran, J.F.Mano // *Drug Delivery.* – 2005. – Vol.12. – No.1. – P.41-98.
70. Ma J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts / J.Ma, H.Wang, B.He, J.Chen // *Biomaterials.* – 2001. – Vol.22. – No.4. – P.331-337.
71. Stokke B.T. Small-angle x-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 1. Ca-alginate gels / B.T.Stokke, K.I.Draget, O.Smidsrød, Y.Yuguchi, H.Urakawa, K.Kajiwara // *Macromolecules.* – 2000. – Vol.33. – No.5. – P.1853-1863.
72. Finkenstadt V.L. Crystal Structure of Valonia Cellulose I $\beta$  / V. L. Finkenstadt, R. P. Mellane // *Macromolecules.* – 1998. – Vol.31. – No.22. – P.7776-7783.
73. Garipey E.R. In situ-forming hydrogels--review of temperature-sensitive systems / E.R.Garipey, J.C.Leroux // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2004. – Vol.58. – No.2. – P.409-435.
74. Kono K. Thermosensitive polymer-modified liposomes / K. Kono *Adv. Drug Del. Rev.* – 2001. – Vol.53. – No.3. – P.307-319.
75. Cho J.H. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using a thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) and water-soluble chitosan copolymer / J.H.Cho, S.H.Kim, K.D.Park,

- 
- M.C.Jung, W.I.Yang, S.W.Han, J.Y.Noh, J.W.Lee // *Biomaterials*. – 2004. – Vol.25. – No.26. – P.5743-5794.
76. Soppimath K.S. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices / K.S.Soppimath, T.M.Aminabhavi, A.R.Kulkarni, W.E.Rudzinski // *J. Control. Release*. – 2001. – Vol.70. – No.1. – P.20-25.
77. Khademhosseini A. Micromolding of photocrosslinkable hyaluronic acid for cell encapsulation and entrapment / Ali Khademhosseini // *Journal of biomedical Materials*. – 2006. – Vol.79. – No3. – P.522-532.
78. Kwon Oh J. Biopolymers – based microgels nanogels for drug delivery applications / Jung Kwon Oh, // *Progress in polymer science*. – 2009. – No.34. – P.1261-1282.
79. Nichd J. W. Cell-Laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels / Jason W.Nichd // *Biomaterials*. – 2010. – No.31. – P.5536-5544.
80. Koh W.G. Molding of hydrogel multiphenotype cell microstructures to create microarrays / W.G. Kohn, L.G.Itle // *Anal.Chem*. – 1993. – Vol.75. – No.21. – P.5783-5789.
81. Panda P. Stop-flow lithography to generate cell-laden microgel particles / Priyadarshi Panda // *Lab. Chip*. – 2008. – No.8. – P. 1056-1061.
82. Reis C.P. Alginate microparticles as novel carriers for oral insulin delivery / Catarina Pinto Reis // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2006. – Vol.31. – No.2. – P.236-245.
83. Dang S. Scalable production of embryonic stem cell-derived cells. / S.Dang, P.Zandstra // *Meth. Mol. Biol*. – 2005. – No.290. –P.353-364.
84. Litzenberger A. L. A Microfluidic method to measure diffusion in hydrogels / Andrew Lee Litzenberger // *Master`s Theses*. Bucknell University. – 2010. – P.1-160.
85. Gaharwar A. K. Nanocomposite hydrogels for biomedical applications / A.K.Gaharwar, N.A.Peppas, A. Khademhosseini // *Biotechnol. Bioeng*. – 2014. – No.111. – P.441–453.
86. Bajpai A.K. Responsive Polymers in Controlled Drug Delivery / A.K.Bajpai, S.K.Shukla, S.Bhanu, S.Kankane // *Progress in Polymer Science*. – 2008. – Vol. 33. – No.11. – P.1088-1118.
87. Burnette R. R. Theory of Mass Transfer / R.R.BurnetteJ, R.Robinson and V.H.L.Lee // *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, Marcel Dekker, New York. – 1987. – P.95-138.
88. Amsden B. Solute Diffusion within Hydrogels. Mechanisms and Models / B. Amsden // *Macromolecules*. 1998. – Vol. 31. – No.23. – P.8382-8395.
89. Siepmann J. Modeling of Drug Release from Delivery Systems Based on Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) / J. Siepmann, N. A. Peppas // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2001. – Vol.48. – No.2-3 – P.139-157.
90. Bettini R. Swelling and Drug Release in Hydrogel Matrices: Polymer Viscosity and Matrix Porosity Effects / R. Bettini, P. Colombo, G. Massimo, P. L. Catellani, T. Vitali // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 1994. – Vol.2. – No.3. – P.213-219.
91. Peppas N.A. Analysis of Fickian and non-Fickian Drug Release from Polymers,” *Pharmaceutica Acta Helveticae*, Vol. 60, No. 4, 1985, pp. 110-111.



- 
92. Ritger P.L. A Simple Equation for Description of Solute Release I. Fickian and Non-Fickian Release from Non-Swellable Devices in the Form of Slabs, Spheres, Cylinders or Discs / P.L.Ritger, N.A.Peppas. // *Journal of Controlled Release*. – 1987. – Vol.5. – No.1. – P.23-36.
93. Kanjickal D.G. Modeling of Drug Release from Polymeric Delivery Systems—A Review / D.G.Kanjickal, S. T.Lopina // *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. – 2004. – Vol.21. – No.5. – P.345-386.
94. Lin C.C. Hydrogels in Controlled Release Formulations: Network Design and Mathematical Modeling / C.C.Lin, A.T.Metters // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2006. – Vol.58. – No.12-13. – P. 1379-1408.
95. Коптева Н.И. Методы органического синтеза: алкилирование, ацилирование / Н.И. Коптева, С.М. Медведева, Учебно-методическое пособие для вузов, Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета. – 2008. – 34с.
96. Бартон Д. Общая органическая химия. Том 3 / Д.Бартон, У.Д.Оллис – М.: Химия, 1986. – 736с.
97. Смит В. Органический синтез: наука и искусство / В. Смит, А. Бочков—М.: Мир, 2001.— 573 с
98. Kohn J. A new approach to the development of bioerodible polymers for controlled release applications employing naturally occurring aminoacids / J.Kohn, R. Langer // *Polymeric materials, science and engineering* – Washington, DC, American Chemical Society. – 1984. – vol.51 – P.119-121.
99. Валуев Иван Львович. Химическая модификация макромолекул для создания полимерных систем направленного транспорта биологически активных соединений // Диссертация доктора химических наук : 02.00.06. – Москва, 2007.
100. Varvarenko S. Synthesis and colloidal properties of polyesters based on glutamic acids and glycols of different nature / Varvarenko S., Tarnavchyk I., Voronov A. // *Chemistry and Chemical Technology*. – 2013. – Vol.7. – No.2. – P.164-168.
101. Schakenraad J. M. Biocompatibility of poly (d l-lactic acid / glycine) copolymers / J. M. Schakenraad, P. J. Dijkstra // *Clin. Mater.* – 1991. – No.7. – P.253-269.
102. Schakenraad J. M. In vivo and in vitro degradation of glycine /dl-lactic acid copolymers / Schakenraad J. M. et al. // *Mater. Res.* – 1989. – No.23. –P.1271-1288.
103. Katsarava R. Amino acid-based bioanalogous polymers . Synthesis and Study of regular poly (ester amide) based on bis (a-amino acid)s,  $\alpha,\omega$ -alkylene diesters and aliphatic dicarboxylic acids / R. Katsarava et al. // *Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* – 1999. – No.37. – P.397-401.
104. Mallakpour S. Pseudo-poly(amino acid)s: study on construction and characterization of novel chiral and thermally stable nanostructured poly(ester imide)s containing different trimellytylimido – amino acid – based diacids and piromellitoyl – tyrosine based diol. / S. Mallakpour, F. Zeraatpisheh // *Colloid Polym. Sci.* – 2011. – No.289. – P.1056-1064.
105. Mallakpour S. The nanocomposite of zinc oxide / l-amino acid based chiral poly (ester-imide) via an ultrasonic noubе: synthesis, characterization, and thermal properties / S. Mallakpour, F. Zeraatpisheh // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2012. – No.289. – P.1055-1064.

- 
106. Guo K. Copolymers of unsaturated and saturated poly (ether ester amide)s : synthesis, characterization and biodegradation / K. Guo, C. Chu // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2008. – No.110. –P.1858-1869.
107. Brocchini S. Structure propertie correlations in a combinational library of a degradable biomaterials / S. Brocchini, K. James // *Biomed. Mater.* – 1998. – No.42. –P.66-75.
108. Sengupta A. Propertise of l-tyrosine based polyphosphates pertinent to biomedical applications / A. Sengupta, S. T. Lopina // *Polymer.* – 2005. – No.46. – P.2133-2140.
109. Sengupta A. Synthesis and characterization of l-tyrosine based novel polyphosphates for potential biomedical applicationms. / A. Sengupta, S. T. Lopina // *Polymer.* – 2004. – No.45. – P.4653-4662.
110. Zohou Q. X. Preparation of Poly(L-Serine ester): A Structural Analogue of Conventional Poly(L-serine) / Q. X. Zhou, J. Kohn // *Macromolecules.* – 1990. – No.23. – P.3399-3406.
111. Fietier I. Synthesis of functional polyesters derived from serine / I. Fietier, A.Borgne, N. Spassky // *Polymer Bulletin.* – 1990. – No.24. – P.349-353.
112. Kohn J. Polymerization Reactions Involving the side chains of L-amino acids / J. Kohn, R. Langer // *Journal of the American Chemical Society.* – 1987. – Vol.109. – No.3. – P.817-820.
113. Rossignol H. Synthetic poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoates) with carboxylic acid or primary amine pendent groups and their complexes / H. Rossignol, M. Boussta. M. Vert // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 1999. – No.25. –P.225-264.
114. Jelbin M. E. Synthesis and Polymerization of N-Z-L-serine- $\beta$ -lactone ans Serine hydroxybenzotriazole active esters / M. E. Gelbin, J. Kohn // *Journal pf the American Chemical Society.* – 1992. – No.114. – P.3962-3965.
115. Barrea D.A. Synthesis and RGD peptide modification of a new biodegradable copolymer poly(lactide acid-co-lysine) / D.A.Barrel, E.Zylstra, P.T.Lansbury // *Journal of the American Chemical Society.* – 1993. – No.5. – P.11010-11011.
116. Ouchi T. Synthesis and enzymatic hydrolysis of lactic acid-deipeptide copolymers with functionalized pendant groups / T. Ouchi, T. Nozaki, A. Ishikawa // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemitry.* – 1997. – No.35. – P.337-383.
117. Ouchi T. Preparation of poly (L-lactide)-based microspheres having cationic or anionic surface using biodegradable surfactants. / T. Ouchi, M. Toyohara, H. Arimura // *Biomacromolecules.* – 2002. – No.3. – P. 885-888.
118. Guan H. Synthesis and characterization of biodegradable amphiphilic triblock copolymers containing L-glutamic acid units / H. Guan, Z. Xie, P. Zhang // *Biomacromolecules.* – 2005. – Vol.6. – No.4. – P.1954-1960.
119. Hie Z. A novel polymer-paclitaxel conjugate based on amphiphilic triblock copolymer / Z. Hie, X. Chen // *Journal of Controlled Release.* – 2007. – Vol.117 – No.2. – P.210-216.
120. Yan J. Novel poly( $\epsilon$ -caprolactone)s bearing amino groups: Synthesis characterization and biotynylation / J. Yan, Y. Zhang, Y. Xiao // *Reactive and Functionalized Polymers.* – 2010. – Vol.70. – No.7. – P.400-407.

- 
121. Neises B. Simple Method for the Esterification of Carboxylic acid / B. Neises, W. Steglich // *Angewandte chemie International Edition*. – 1978. – No.17. – P.552-554.
122. Huh K. M. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol)poly(l-lactic acid) alternating multiblock copolymers / K. M. Huh, Y. H. Bae // *Polymer*. – 1999. – No.40. – P.6147-6155.
123. Akutsu F. Syntesis of poly(lactic acid) bydirect polycondensation of lactic acid using 1,1`-carbonylimidazole, N,N,N`,N`-tetramethylchloroformamidiniumchloride and N,N`-dicyclohexylcarbodiimide as condensing agent / F. Akutsu, M. Inoki, H, Uei // *Polymer Journal*. – 1988. – Vol.30. – No.5. – P.421-423.
124. Chen W. Synthesis and Properties of poly(L-lactic acid)-poly(ethyleneglycols) multiblock copolymers by coupling triblock copolymers / W. Chen, W. Luo, S. Wang // *Polymers for Advanced Technologies*. – 2003. – No.14. – P.245-253.
125. Petrova Ts. Synthesis and characterization of poly(oxyethylene)-poly(caprolactone) multiblock copolymers / Ts. Petrova, M. Manolova, I. Rashkov [et al.] // *Polymer International*. – 1988. – No.45. – P.419-426.
126. Li X. Synthesis, characterization and morphology studies of biodegradable amphiphilic poly[(R)-3-hydroxybutyrate]-alt-poly(ethylene glycol) multiblock copolymers / X. Li, K. Liu, J. Li // *Biomacromolecules*. – 2006. – No.7. – P.3112-3119.
127. Сиггия С. Количественный органический анализ по функциональным группам / С. Сиггия, Дж. Г. Ханна // – Москва : Химия, 1983. – 672 с.
128. Вайсберг А. Органические растворители / А. Вайсберг, Э.Проскауэр, Д. Риддис,– Москва : Иностранная литература, 1976. – 541 с.
129. Гордон А. Спутник химика / А. Гордон, Э. Форд. – М.: Мир, 1976. – 541 с.
130. Полюдек-Фабини Р. Органический анализ / Р.Полюдек-Фабини, Т.Бейрих, – Л.: Химия, 1981. – 624 с.
131. Dhawan V.C. Textbook of Electrophoresis / V.C. Dhawan, – Pearl Books, 2008. – 232 p.
132. Круглицкий Н.Н. Очерки по физико-химической механике / Н.Н.Круглицкий.- Киев: Наукова Думка, 1988.- 194 с
133. Торопцева А. М. Лабораторный практикум по химии и технологии высокомолекулярных соединений / А. М. Торопцева, К. В. Белгородская, В. М. Бондаренко – Л.: Химия, 1976. – 415с.
134. Гиттис С.С. Практикум по органической химии / С.С. Гиттис, А.И. Глаз, А.В. Иванов – М.: Высшая школа, 1991. – 303 с.
135. Казицина Л.А. Применение УФ-, ИК-, ЯМР- спектроскопии в органической химии / Л.А. Казицина, Н.Б. Куплетская. – Москва : Высшая школа, 1971. – 264 с.
136. Белами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул./ Белами Л. пер. с английского Акимова В.М., Пентина Ю.А., Тетерина Ю.Г. под ред. Пентина Ю.А. – Москва : Издательство иностранной литературы, 1963 – 590 с.
137. Workman J. Handbook of Organic Compounds. Ni, IR, Raman, and UV-Vis Spectra Featuring Polymers and Surficants / J. Workman. – San Diego: Buckram Pablisher. Academic Press, 2001 – 428 p.

- 
138. Сильверстейн Р. Спектрометрическая идентификация органических соединений / Сильверстейн Р., Басслер Г., Моррил Т. – М.: Мир, 1977. – 592с
139. Crini G.. Synthesis and applications of adsorbents containing cyclodextrins / G. Crini, M. Morcellet. // *J Sep Sci.* – 2002. – No.25. – P.789–813.
140. Mocanu G. Cyclodextrin polymers / G.Mocanu, D .Vizitiu, A.Carpov. // *J Bioactive Compatible Polym.* – 2001. – No.16. – P.315–357.
141. Chiou M.S. Adsorption of anionic dyes in acid solutions using chemically cross-linked chitosan beads / M.S.Chiou, P.Y.Ho, H.Y.Li // *Dyes Pigments.* – 2004. – No.60. – P.69–84.
142. Chiou M.S. Equilibrium and kinetic modeling of adsorption of reactive dye on cross-linked chitosan beads / M.S.Chiou, H.Y.Li // *J Hazardous Mat.* – 2002. – No.93. – P.233–281.
143. Wan Ngah W.S. Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads / W.S.Wan Ngah, C.S.Endud, R.Mayanar. // *React Funct Polym.* – 2002. – No.50. – P.181–271.
144. Delval F. Starch-modified filters used for the removal of dyes from waste water / F.Delval, G.Crini, J .Vebrel, M.Knorr, G.Sauvin,E. Conte // *Macromol Symp.* – 2003. – No.203. – P.165–236.
145. Delval F. Sorption properties toward aromatic compounds of insoluble crosslinked polymer containing starch derivatives / F .Delval, J .Vebrel, P.Pont, M .Morcellet, L .Janus, G.Crini // *Polym Recycl.* – 2000. – No.5. – P.37–43
146. Chiou M.S. Adsorption behavior of reactive dye in aqueous solution on chemical cross-linked chitosan beads / M.S.Chiou, H.Y. Li // *Chemosphere.* – 2003. – No.50. – P.1095–1200.
147. Mi FL, Shyu SS, Chen CT, Lai JY. Adsorption of indomethacin onto chemically modified chitosan beads. *Polymer* 2002;43:757–65.
148. Zeng X. Cross-linked macroporous chitosan anion-exchange membranes for protein separations / Zeng X, Ruckenstein E. // *J Membr Sci.* – 1998. – No.148. – P.195–205.
149. Arrascue M.L. Gold sorption on chitosan derivatives / M.L.Arrascue, H.M.Garcia, O.Horna, E.Guibal // *Hydrometallurgy.* – 2003. – No.71. – P.191–200.
150. Jeon C. Chemical modification of chitosan and equilibrium study for mercury ion removal / C.Jeon, W.H.Ho II // *Water Res.* – 2003. – No.37. – P.4770–4850.
151. Chen C.Y. Competitive biosorption of azo dyes from aqueous solution on the templated crosslinked-chitosan nanoparticles / C.Y.Chen, J.C.Chang, A.H.Chen // *Journal of Hazardous Materials.* – 2011. – No.185. – P.430-441.
152. Juang R.S. A simplified equilibrium model for sorption of heavy metal ions from aqueous solutions on chitosan / R.S.Juang, H.J.Shao // *Water Res.* – 2002. – No.36. – P.2999–3008.
153. Guibal E. Sulfur derivatives of chitosan for palladium sorption / E .Guibal,N.Von Offenber Sweeney,T.Vincent, J.M.Tobin // *React Funct Polym.* – 2002. – No.50. – P.149–212.
154. Dzul Erosa M.S. Cadmium sorption on chitosan sorbents: kinetic and equilibrium studies / M.S.Dzul Erosa, T.I.Saucedo Medina, R.Navarro Mendoza, M.Avila Rodriguez, E.Guibal // *Hydrometallurgy.* – 2001. – No.61. – P.157–214.

- 
155. McAfee B.J. Biosorption of metal ions using chitosan, chitin, and biomass of *Rhizopus oryzae* / B.J. McAfee, W.D. Gould, J.C. Nadeau, A.C.A. Da Costa // *Sep Sci Technol.* – 2001. – No.36. – P.3207–3229.
156. Kim B.S. Removal of heavy metal ions from water by cross-linked carboxymethyl corn starch / B.S.Kim, S.T.Lim // *Carbohydr Polym.* – 1999. – No.39. – P.217-240.
157. Seidel C. Influence of the cross-linking agent on the gel structure of starch derivatives / C. Seidel, W.M. Kulicke, C. Heb, B. Hartmann, M.D.Lechner, W.Lazik // *Starch/Starke.* – 2001. – No.53. – P. 305–315.
158. Girek T. Polymerization of  $\beta$ -cyclodextrin with maleic anhydride and structural characterization of the polymers / T.Girek, D.H.Shin, S.T.Lim // *Carbohydr Polym.* – 2000. – No.42. – P.59–63.
159. Lee K.P. Preparation and characterization of cyclodextrin polymer and its high-performance liquid-chromatography stationary phase / K.P.Lee, S.H.Choi, E.N.Ryu, J.J.Ryoo, J.H.Park, Y.Kim // *Anal Sci.* – 2002. – No.18. – P.31-35.
160. Mocanu G. Cyclodextrin polymers / G.Mocanu, D .Vizitiu, A.Carpov // *J Bioactive Compatible Polym.* – 2001. – No.16. – P.315–357.
161. Guven O. A review on the radiation synthesis of copolymeric hydrogels for adsorption and separation purposes / O.Guven, M.Sen, E.Karadag, D.Saraydin // *Radiat Phys Chem.* – 1999. – No.56. – P.381-387.
162. Shiftan D. Change in the V/B polymorph ratio and T1 relaxation of epichlorohydrin crosslinked high amylose starch excipient / D.Shiftan, F.Ravenelle, M.A.Mateescu, R.H.Marchessault // *Starch/Starke.* – 2000. – No.52. – P.186-281.
163. Crini G. Adsorption de be'ta-naphtol sur des gels de cyclodextrine-carboxyme'thylcellulose re'ticule's / G.Crini, N.Morin, J.C.Rouland, L.Janus, M .Morcellet, S.Bertini // *Eur Polym J.* – 2002. – No.38. – P.1095–1198.
164. Crini G. Solid-state NMR characterization of cyclomaltoheptaose ( $\beta$ -cyclodextrin) polymers using highresolution magic angle spinning with gradients / G.Crini, M.Bourdonneau, B.Martel, M.Piotto, M.Morcellet, T.Richert // *J Appl Polym Sci.* – 2000. – No.75. – P.1288-1383.
165. Тарас Р.С. Синтез псевдополіамінокислот розгалуженої будови та формування водних нанорозмірних дисперсій / Тарас Роман Степанович // Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук. НУ «ЛП», Львів.-2016.
166. Фігурка Н. В. Поверхнево-активні псевдо-полі(амінокислоти) на основі дикарбонових А-амінокислот та їх колоїдно-хімічні властивості / Фігурка Наталія Володимирівна // Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук. НУ «ЛП», Львів.-2013.
167. Варваренко С.М. Амінофункційні поліестери природніх двоосновних амінокислот і поліетердіолів / Варваренко Сергій Миколайович // Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня доктора хімічних наук. НУ «ЛП», Львів-2014.
168. Нагорняк М.І. Реакційна здатність гідроксильних груп зі складу сахарози в реакції Стегліха / М.І. Нагорняк, В.Я.Самарик, М.В. Ференс, І.А. Дронець, С.А. Воронов // *Вісник Національного*

---

університету «Львівська політехніка», серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування» - 2015. – №812. – с. 69-73.

169. Бетанели В.И. Общая органическая химия. Том 10 / В.И. Бетанели, А.А. Коста, С.Н.Кочеткова. – М.:Химия, 1986. – 704с.

170. Nagornyak M. Modification of polysaccharides by N-derivates of glutamic acid using Steglich reaction / M. Nagornyak, N. Figurka, V. Samaryk, S. Varvarenko, M. Ferens, V. Oleksa //Chemisty and Chemical Technology. – 2016. – Vol.10. – No.4. – p.23-27.

171. Ван Кревелен Д.В. Свойства и химическое строение полимеров / Ван Кревелен Д.В. (пер. с англ). – М.: Химия, 1976. – 416 с.

172. Музика В.П. До оцінювання цитотоксичної дії полімерних виробів з використанням тест-об'єкту – сперміїв бугаїв. / В.П.Музика, І.С.Атаманюк, Д.Д. Остапів // Біологія тварин. – 2011. – т.13. – №1-2. – 168с.

173. Кулаковська Т.А. Огляд ситуації на ринку комбікормів в Україні / Т.А.Кулаковська, Е.В.Колесник // Економіка харчової промисловості. – 2015. – т.26. – №2. – С.235-239

174. Hathaway В.Ј. The electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of the copper(II) ion / В.Ј. Hathaway, D.E. Billing // Coordination Chemistry Reviews. – 1970. – Val.5. – No.2. – P.143-207.

175 . Петросян А.Б. Природа биодоступности микроэлементов / Петросян А.Б.// Журнал Птица и птицепродукты. – 2010. – №1. – С.36-38.

176. Штольц К.Ф. Амперометрическое определение ферроцианида в присутствии субклеточных структур / К.Ф. Штольц, И.М. Мосолова, Л.А. Дронова. Биохимические методы. – М.: Наука, 1980. – С. 147 – 150.