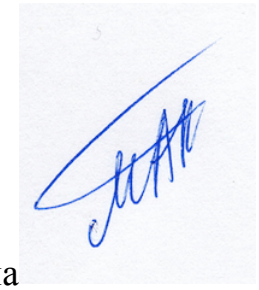
На правах рукописи

ПИГАЛЁВА Марина Алексеевна 

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ КАТИОННЫХ СОПОЛИМЕРОВ В РАСТВОРАХ УГОЛЬНОЙ КИСЛОТЫ И СОЗДАНИЕ НА ИХ ОСНОВЕ КОМПОЗИТОВ С МЕТАЛЛИЧЕСКИМИ НАНОЧАСТИЦАМИ

Специальность 02.00.06 — высокомолекулярные соединения

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата

физико-математических наук

Москва – 2015

Работа выполнена на кафедре физики полимеров и кристаллов физического факультета Московского Государственного Университета имени М. В. Ломоносова.

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук, Галлямов Марат Олегович,

Официальные оппоненты:
Цветков Николай Викторович, доктор физико-математических наук, профессор, Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет, заведующий кафедрой
Чалых Анатолий Евгеньевич, доктор химических наук, профессор, Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук, заведующий лабораторией

Ведущая организация: Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Защита состоится 17 декабря 2015 г в 15 час. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д 501.002.01 при Московском государственном университете имени М. В. Ломоносова по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 2, Физический факультет, аудитория ЮФА.

С диссертацией можно ознакомиться в Отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д.27)

Автореферат разослан ___ октября 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.002.01
кандидат физико-математических наук Лаптинская Т. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В настоящее время большой интерес в научном сообществе вызывает исследование свойств необычного растворителя – воды, насыщенной диоксидом углерода, особенно под высоким давлением. Общеизвестно, что вода при контакте с диоксидом углерода становится кислой средой вследствие формирования в ней и диссоциации молекул угольной кислоты. В литературе показано, что, при повышении давления насыщающего воду CO_2 до 300 атм, pH водной фазы понижается до значений 3 и даже немного ниже. Известны лишь единичные работы по растворению в такой среде полимеров, приобретающих в ней свойства поликатионов, благодаря низким значениям pH. Однако, закономерности их растворения в этой необычной системе, в том числе конформация или самоорганизация в подобных растворах, не были изучены, поэтому важной исследовательской задачей является восполнить данный пробел.

Важно подчеркнуть следующие аспекты: во-первых, из литературы известна антимикробная активность сред, насыщенных CO_2 под высоким давлением. Действительно, при высоком давлении, растворённые молекулы CO_2 проникают в бактерию, вирус, или спору, диспергированную в водной фазе, и биологически инактивируют её. Антимикробный эффект проявляется и при декомпрессии, инициирующей у микробов аналог «кессонной болезни». Во-вторых, при сбросе давления угольная кислота превращается в газ CO_2 и абсолютно биосовместимую воду, таким образом можно ожидать сохраняющейся высокой биосовместимости материалов медицинского назначения, модифицированных в таких растворах. Особый интерес к возможности растворить, например, такой востребованный биосовместимый полимер как хитозан в угольной кислоте вызывает тот факт, что получаемые растворы сочетают отмеченные выше важные и перспективные для биомедицинских приложений свойства.

Интерес к хитозану в научном сообществе стабильно весьма высок, особенно с точки зрения его применения в медицинских приложениях (таких, например, как создание защитных биосовместимых покрытий). Это обусловлено известными из обширных литературных данных свойствами данного биополимера, такими как нетоксичность, биосовместимость, антимикробная и гемостатическая активность.

Традиционно хитозан растворяют в обычных кислотах, кислотностью которых нельзя управлять приложенным давлением. Однако, как становится понятно из многих работ, посвященных этой теме, хитозановые цепочки в растворах обычных кислот как правило демонстрируют явную тенденцию к агрегации, вследствие чего, например, однородность адсорбированного покрытия может быть нарушена, особенно при переходе к ультратонкому режиму. Более того, в медицинской литературе известны единичные примеры выраженной гиперчувствительности человеческого организма даже к таким обыденным и распространенным химическим агентам, как уксусная кислота. Следовательно, было бы очень полезно найти кислую среду, которая была бы абсолютно биосовместимой и, в то же время, была способна растворять хитозан без формирования больших агрегатов, а также с возможностью изучить и описать макромолекулярную конформацию в такой среде. Всё это объясняет наш интерес к угольной кислоте, как к растворителю для хитозана.

Хитозан – это не единственный полимер, способный становиться поликатионом и растворяться в угольной кислоте. Другим примером подобного полимера является поли-4-винилпиридин (П4ВП). В настоящее время в литературе наблюдается большой интерес к формированию мицелл из блок-сополимера поли-4-винилпиридина и полистирола (ПС). Из литературных данных известно, что существует несколько общепринятых методов приготовления мицелл из ПС-*блок*-П4ВП. Однако, во всех этих подходах есть либо необходимость использовать органические растворители или предрастворители, от которых затем нужно отмывать конечный продукт, если планируется его применение, например, в каталитических реакциях; либо требуется повышать температуру, что на практике может быть нежелательно по экономическим или иным причинам. Более того, в большинстве случаев такие схемы получения мицелл достаточно сложны. Использование угольной кислоты в качестве растворителя полностью освободило бы от применения каких-либо органических предрастворителей, которые требуются в традиционных схемах для обеспечения растворимости обоих блоков. Таким образом, реакционная смесь не содержала бы никаких следов остаточного органического растворителя без какой-либо процедуры очистки. А благодаря известному из литературных данных пластифицирующему действию CO_2 под высоким давлением на ПС и П4ВП мы избавились бы от необходимости использовать повышенные температуры для

стимулирования растворения макромолекул. Таким образом, новый простой и эффективный одностадийный подход к созданию мицелл ПС-*блок*-П4ВП в растворах угольной кислоты может оказаться весьма востребованным.

В настоящее время наночастицы благородных металлов – благодаря их высокой функциональной активности (т.к. они малого размера и, следовательно, обладают высокой удельной поверхностью) – притягивают большое внимание в передовых наукоемких областях, таких как гетерогенный катализ, биомедицинские приложения и так далее. Важной проблемой в использовании наночастиц является их стабилизация с целью предотвращения агрегации и укрупнения. Существует несколько способов стабилизации металлических наночастиц: например, большой интерес в научном сообществе проявляется к использованию для этого мицелл, в том числе и из ПС-*блок*-П4ВП с их последующим эффективным применением в каталитических реакциях; а также литературные данные указывают на то, что локализация стабилизированных металлических наночастиц в матрице биополимера хитозана крайне перспективна с точки зрения медицинских приложений.

В силу рассмотренных выше особенностей растворов угольной кислоты, стабилизация металлических наночастиц с помощью поликатионов в таких растворах является перспективной с точки зрения как медицинских приложений, так и применения в катализе, однако данный подход не был реализован до наших работ.

Цель диссертационной работы

Целью настоящей работы являлось исследование поведения катионных сополимеров, в частности их организация в наноразмерные объекты различной морфологии («сигарообразные» агрегаты, мицеллы) в растворах угольной кислоты под высоким давлением насыщающего воду CO_2, а также стабилизация металлических наночастиц этими полимерами в таких растворах. Для достижения данной цели были поставлены и успешно решены следующие **задачи**:

1. Исследовать особенности конформационного поведения макромолекул хитозана в растворах угольной кислоты.
2. Выявить закономерности самоорганизации блок-сополимера ПС-*блок*-П4ВП в растворах угольной кислоты.
3. Изучить возможности стабилизации металлических наночастиц с помощью

хитозана или в короне мицелл ПС-*блок*-П4ВП в растворах угольной кислоты.

Научная новизна результатов

Впервые было обнаружено (методом сканирующей силовой микроскопии – ССМ), что макромолекулы хитозана организуются в растворах угольной кислоты в вытянутые «сигарообразные» наноагрегаты, состоящие из нескольких макромолекул, специфическая форма которых может быть обусловлена вкладом дополнительного притяжения формирующихся в растворах угольной кислоты ионных пар.

Таким образом, было получено первое экспериментальное подтверждение известной в литературе модели «сигарообразной» конформации полиэлектролитных цепочек в плохом растворителе.

Впервые была продемонстрирована возможность формирования сферических мицелл из блок-сополимера ПС-*блок*-П4ВП с сопоставимыми длинами блоков в растворах угольной кислоты под высоким давлением при комнатной температуре.

Впервые были получены композитные хитозановые гели с наночастицами серебра в абсолютно биосовместимых растворах угольной кислоты, что исключает присутствие в таких гелях, обладающих важными для медицинских приложений свойствами (гемостатическая активность и антимикробность), каких-либо нежелательных в аллергенном отношении возможных следов реагентов.

Также, в работе впервые было показано, что корону мицелл ПС-*блок*-П4ВП, сформированных в растворах угольной кислоты, можно декорировать наночастицами металлов. Такие композитные мицеллы могут быть использованы в качестве эффективных и обеспечивающих простоту повторного использования катализаторов для задач органического синтеза.

Практическая значимость

Для того, чтобы разработать практические рекомендации по выбору наилучшего режима адсорбции хитозана на поверхность какого-либо медицинского изделия из биосовместимого растворителя угольной кислоты, представляется важным обнаружить и объяснить конформацию макромолекул в таком растворителе. Действительно, конформация полимерных цепей в растворителе может повлиять на стабильность и механические свойства потенциально формируемого хитозанового

покрытия на поверхности подобных изделий, типичным примером которых является биопротезный коллагеновый клапан сердца. Однако в литературе нет информации о конформации макромолекул хитозана в таком необычном растворителе как угольная кислота под высоким давлением. Восполнению этого пробела служит исследование, проведённое нами, результаты которого изложены в третьей главе.

Практическая значимость продемонстрированного в работе способа формирования сферических мицелл из сополимера ПС-*блок*-П4ВП в растворах угольной кислоты при комнатной температуре обусловлена тем, что при таком способе создания мицелл упрощается стандартная процедура их приготовления, известная в литературе. Действительно, во-первых, не требуется использование повышенных температур в силу пластифицирующего действия CO_2 под высоким давлением на полимеры обоих блоков, а во-вторых, исключается использование каких-либо органических предрастворителей, что освобождает от необходимости проводить требующие больших временных затрат постреакционные процедуры по отмывке такого предрастворителя. Разработанный нами подход является одностадийным, не требующим большого количества различных реагентов (необходима только вода и CO_2), с минимизацией отходов (не нужна нейтрализация кислоты до солей) и поэтому может найти применение в лабораторной и промышленной практике.

Предложенный способ декорирования короны мицелл ПС-*блок*-П4ВП наночастицами металлов в растворах угольной кислоты открывает перспективный путь к созданию эффективных и подходящих для многократного использования катализаторов для органического синтеза, в том числе в химической промышленности, в экологически чистой и самонейтрализующейся при декомпрессии среде, что минимизирует отходы. Важно, что простым замещением растворенного в воде CO_2 другим газом в реакционной смеси с последующим центрифугированием композитные каталитические мицеллы можно высадить отдельно от продукта реакции и использовать вновь.

Полученные композитные хитозановые гели с наночастицами серебра в растворах угольной кислоты могут быть использованы в биомедицинских приложениях, например, при приготовлении методом лиофильной сушки гемостатических губок с дополнительным антимикробным действием.

Действительно, хитозан – это биополимер, обладающий важными для медицинских приложений свойствами, такими как биосовместимость, антимикробность, гемостатическая активность. Наночастицы серебра имеют выраженную антимикробную активность. А угольная кислота – абсолютно биосовместимый растворитель, не оставляющий в готовом геле никаких токсичных или аллергенных остатков.

Достоверность результатов

Достоверность результатов диссертации обеспечивается воспроизводимостью экспериментальных данных при систематической постановке экспериментов с одинаковыми условиями, а также согласованностью полученных разными комплементарными методами исследования экспериментальных результатов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Хитозан организуется в растворах угольной кислоты под высоким давлением насыщающего воду CO_2 в «сигарообразные» наноагрегаты, состоящие из нескольких макромолекул, которые при адсорбции на модельную подложку – слюду – формируют однородный ультратонкий слой.
2. Блок-сополимер ПС-*блок*-П4ВП с сопоставимыми длинами блоков в растворах угольной кислоты под высоким давлением формирует сферические мицеллы, причем без необходимости применения предрастворителей или повышения температуры.
3. Корону мицелл ПС-*блок*-П4ВП в растворах угольной кислоты можно однородно декорировать монодисперсными наночастицами палладия и золота с использованием водорастворимых прекурсоров и газообразных восстановителей (CO, H_2), подмешиваемых к насыщающему воду CO_2 под высоким давлением.
4. При добавлении к растворенному хитозану в угольной кислоте соли серебра, формируются композитные хитозановые гели, со стабилизированными внутри наночастицами серебра.

Публикации

Всего по тематике, связанной с исследованиями в растворах на основе CO_2 под высоким давлением, включая угольную кислоту, а также по тематике изучения

поликатионов, включая хитозан и его медицинские приложения, автором опубликовано 7 статей, в том числе непосредственно по теме диссертации 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, а также 12 тезисов докладов на конференциях.

Апробация работы

Результаты различных частей работы докладывались лично автором и обсуждались на российских и международных конференциях:
Десятая конференция студентов и аспирантов Научно-образовательного центра по физике и химии полимеров (26 ноября 2010, Москва, Россия), Europolymer conference 2011 (EUPOC 2011) "Biobased polymers and related biomaterials" (29 мая – 3 июня 2011, Гарньяно, Италия), 7th International Symposium “Molecular mobility and order in polymer systems” (6 июня – 10 июня 2011, Санкт-Петербург, Россия), Одиннадцатая конференция студентов и аспирантов Научно-образовательного центра по физике и химии полимеров, Научно-образовательного центра по нанотехнологиям МГУ (9 декабря 2011, Москва, Россия), 9th International Symposium on Polyelectrolytes (9 июля – 12 июля 2012, Лозанна, Швейцария), Всероссийская конференция «Актуальные проблемы физики полимеров и биополимеров» (15 – 17 октября 2012 г., Москва, Россия), Congress of the European Polymer Federation EPF-2013 (16 июня – 21 июня 2013 г., Пиза, Италия), The XII international conference on Nanostructured Materials (13 июля – 18 июля 2014 г., Москва, Россия), International Conference on Scanning Probe Microscopy on Soft and Polymeric Materials (2 сентября – 6 сентября 2014 г., Торонто, Канада), The 4th International Solvothermal and Hydrothermal Association Conference ISHA2014 (26 октября – 29 октября 2014 г., Бордо, Франция), European Polymer Congress 2015 (21 июня – 26 июня 2015 г., Дрезден, Германия).

Диссертационная работа была выполнена при поддержке грантов РФФИ (проектов № 13-03-00378 А, 14-03-31416 мол_а).

Личный вклад диссертанта

Постановка задач исследований, определение методов их решения и интерпретация результатов проводились совместно с научным руководителем. Экспериментальные данные, представленные в работе, получены либо лично автором, либо при его непосредственном участии. В частности, автором были

подготовлены все образцы, подлежавшие исследованию в рамках работы, а также проведена интерпретация всех полученных экспериментальных данных, выявлены и объяснены наблюдаемые закономерности. Автор лично провел все эксперименты по ССМ-визуализации, вискозиметрии, титрованию, оптической спектроскопии, динамическому рассеянию света (ДРС) и выполнил их последующую обработку. Эксперименты по визуализации методами просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и по гель-проникающей хроматографии (ГПХ) были проведены в рамках совместных работ при непосредственном участии автора. Подготовка к публикации полученных результатов выполнялась совместно с соавторами, причем вклад диссертанта был определяющим.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения и списка литературы (170 наименований) и содержит 170 страницы текста, включая 57 рисунков, 7 таблиц и 8 схем.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы работы.

В **первой главе** представлен обзор литературы по теме диссертации. Глава разделена на пять разделов. В первом разделе изложены основные свойства двухфазной системы H_2O/CO_2, закономерности формирования угольной кислоты, взаимные растворимости воды в CO_2 и наоборот, pH водной фазы и так далее. Второй раздел посвящен биополимеру хитозану, его растворимости и конформационному поведению в растворах. В третьем разделе описываются основные методики и принципы формирования мицелл из блок-сополимера ПС-*блок*-П4ВП. Четвертый раздел содержит анализ методик стабилизации металлических наночастиц с помощью полимеров, в том числе с помощью мицелл и биополимера хитозана. В пятом разделе находятся выводы из литературного обзора и постановка задачи исследования.

Вторая глава представляет собой изложение экспериментальных подходов и методов, применяемых в работе, включая работу с CO_2 под высоким давлением. В частности, изложены методики растворения хитозана в угольной кислоте, формирования композитных хитозановых гелей с наночастицами серебра в таких

растворах, исследования самоорганизации блок-сополимера ПС-*блок*-П4ВП в растворах угольной кислоты, а также локализации металлических наночастиц в короне таких мицелл.

Третья глава посвящена результатам исследования организации макромолекул хитозана в растворах угольной кислоты в необычные вытянутые наноразмерные агрегаты. Действительно, неожиданно оказалось, что макромолекулы хитозана принимают в растворах угольной кислоты нетипичную конформацию для полиэлектролитных цепочек, отличную от известной в экспериментальной литературе. На микрофотографиях ССМ можно видеть, что полимерные цепочки организуются в отдельные стержнеобразные персистентные наноструктуры (рис 1).

В то же время, плёнки, спонтанно адсорбированные на поверхность слюды из растворов хитозана в угольной кислоте и состоящие из таких нанообъектов, оказались достаточно однородными, нанометровой толщины. Этот факт оправдывает развитый нами подход для использования такой системы в медицинских приложениях, в которых требуется наносить ультратонкие защитные биосовместимые покрытия, например, на поверхность биопротезного коллагенового клапана сердца.

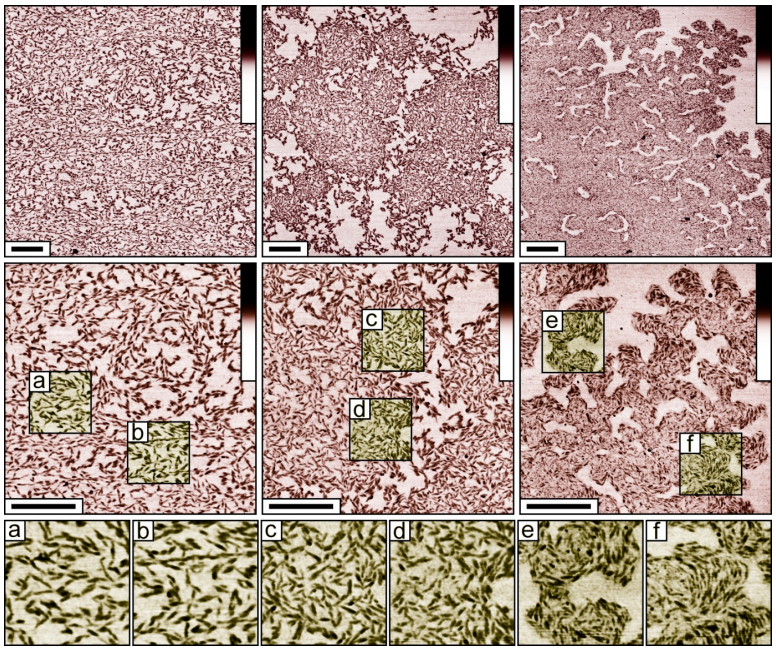


Рис. 1 Микроснимок хитозановых наноструктур (степень ацетилирования 15%, молекулярная масса 194 кг/моль) на поверхности слюды, адсорбированных из раствора в угольной кислоте при давлении CO_2 300 атм и температуре 25 °C, концентрация хитозана: 0,2 г/л. Размер кадра: верхний ряд: 4x4 мкм, средний ряд: 2x2 мкм, нижний ряд (a – f) – дополнительно увеличенный масштаб выделенных областей, шкала высот: 10 нм, масштабная линия: 500 нм.

Используя деконволюционную процедуру, и принимая во внимание измеренные высоты, длины и восстановленные ширины наблюдаемых на ССМ изображениях одиночных вытянутых наноструктур хитозана, а также значения их дисперсий, мы определили, что объем одиночной персистентной наноструктуры должен находиться в пределах от 300 до 1000 нм^3. Сравнив это значение с ожидаемым объемом одной макромолекулы (около 300 нм^3), мы пришли к выводу, что эти персистентные структуры могут быть составлены из 1 – 3 макромолекул. Принимая во внимание большую погрешность результатов процедуры деконволюции, были основания полагать, что визуализированные одиночные персистентные наноструктуры могут являться мономолекулярными.

Для проверки гипотезы о мономолекулярности наноструктур, полученных при адсорбции макромолекул хитозана на слюду из растворов в угольной кислоте, мы провели дополнительные систематические эксперименты по визуализации наноагрегатов шести различных образцов хитозана с различными молекулярными массами и степенями деацетилирования (см. Табл. 1), при тех же условиях экспозиции и адсорбции. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 2.

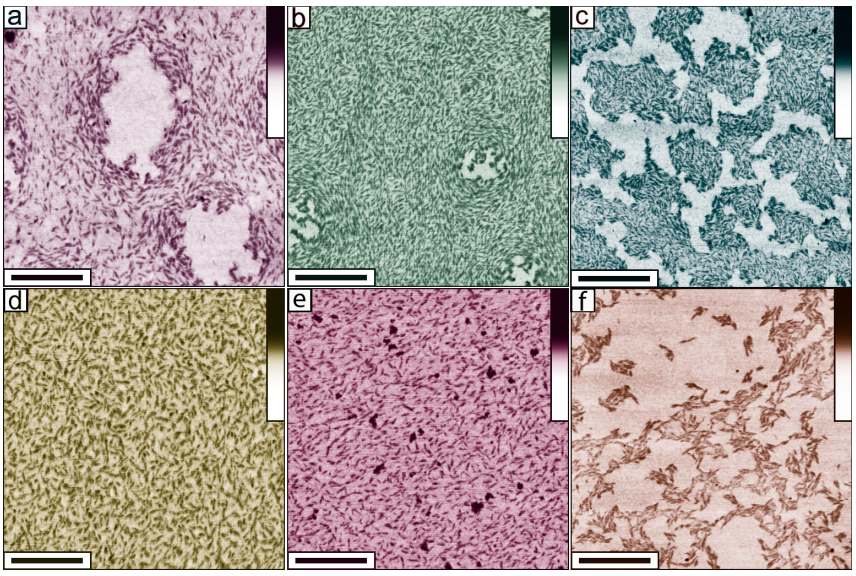


Рис. 2 Микроснимки хитозановых наноструктур на поверхности слюды, адсорбированных из раствора в угольной кислоте при давлении CO_2 300 атм и температуре 25 °C, концентрация хитозана: 0,2 г/л. Образцы различаются по молекулярной массе M_n и степени деацетилирования DD: a) 80 кг/моль, 84%, b) 130 кг/моль, 70%, c) 210 кг/моль, 70%, d) 240 кг/моль, 74%, e) 380 кг/моль, 67%, f) 680 кг/моль, 74%. Размер кадров 2x2 мкм, шкала высот: 10 нм, масштабная линия: 500 нм.

Табл. 1 Характеристики образцов хитозана производства Sigma-Aldrich: средневесовая Mw и среднечисловая Mn молекулярные массы, [кг/моль], получены методом ГПХ, средневязкостная Mη молекулярная масса, [кг/моль], – методом вискозиметрии, характерная длина l, [нм], и высота h, [нм], стержнеобразных структур – непосредственным измерением на микрофотографиях, полученных с помощью ССМ, степень деацетилирования DD, [%], – методом потенциометрического титрования.

Хитозан №	Mw, кг/моль	Mn, кг/моль	Mη, кг/моль	l, нм	H, нм	DD, %
448869	210	77	80	45	0,8	84
419419	1300	130	150	35	0,6	70
448877	1300	240	270	50	0,9	74
417963	990	210	320	35	0,7	70
c3646	1400	380	320	35	0,7	67
48165	2300	680	790	45	0,9	74

Из сопоставления полученных данных можно заключить, что длина протяженных стержнеобразных наноструктур, адсорбированных из растворов угольной кислоты на подложку, не зависит от молекулярной массы образцов хитозана. Таким образом, наблюдаемые в ССМ наноструктуры хитозана не являются мономолекулярными, и, следовательно, являются агрегатами из нескольких макромолекул. Однако можно заметить, что существует некоторая чувствительность размеров наноагрегатов хитозана к степени деацетилирования (т.е. степени заряженности макромолекулы в угольной кислоте). Для того, чтобы объяснить полученную закономерность, мы произвели следующие простые оценки.

Следуя подходу Кирквуда, мы оценили значение диэлектрической проницаемости для раствора угольной кислоты при давлении насыщающего воду CO_2 300 атм и температуре 25 °C и получили, что оно на несколько единиц меньше, чем для чистой воды. Далее можно рассчитать соответствующую длину Бьеррума для хитозановой макромолекулы в растворах угольной кислоты по формуле:

$$l_B = \frac{e^2}{\varepsilon_{H_2O+CO_2} k_B T} = 7{,}2 \text{ Å},$$

где e – элементарный электрический заряд, $\varepsilon_{H_2O+CO_2}$ – диэлектрическая постоянная растворителя, k_B – константа Больцмана, а T - температура.

Зная длину среднего мономерного звена хитозана (b = 5,2 Å) мы можем определить, что имеющиеся в наших экспериментах условия соответствуют области увеличенной Маннинговской конденсации противоионов ($\xi = \frac{l_B f}{b} \approx 1{,}4 > 1$).

Таким образом, многие противоионы для макромолекулы хитозана в угольной кислоте (HCO_3^-) могут формировать ионные пары с зарядами мономерных звеньев (NH_3^+). Известно, что ионные пары способствуют внутри- и межмолекулярной агрегации: в результате компенсации зарядов, цепочка хитозана может принимать более компактную конформацию, когда, помимо отталкивающих электростатических сил, существует притяжение между мономерными звеньями вследствие диполь-дипольного взаимодействия связанных ионных пар.

Мы считаем, что указанные выше закономерности объясняются эффектами, связанными с Маннинговской конденсацией и предлагаем следующую схему формирования наноагрегатов хитозана в растворах угольной кислоты (схема 1). Прежде всего, в таких растворах макромолекулы хитозана становятся протонированными; т.е. аминогруппы цепочек хитозана становятся положительно заряженными. Далее, отрицательно заряженные ионы HCO_3^- в растворе угольной кислоты подходят к положительно заряженными NH_3^+ группами макромолекул хитозана. В результате этого процесса происходит нейтрализация части зарядов вдоль цепи хитозана и может возникать диполь-дипольное притяжение между сформированными ионными парами, приводящее к агрегации макромолекул хитозана. Более того, присутствие гидрофобных групп вдоль полимерных цепей и способность макромолекул хитозана формировать водородные связи приводит к дополнительному притяжению и агрегации. Тем не менее, некоторые заряженные аминогруппы в хитозановых цепочках остаются не скомпенсированными. Следовательно, они отвечают за электростатическое отталкивание внутри и между макромолекулами, а также за стабилизацию размера наноагрегатов. В результате конкуренции эффектов, описанных выше, можно ожидать вытянутой «сигарообразной» формы наноагрегатов хитозана в растворах угольной кислоты, ранее теоретически предсказанной в литературе [Khokhlov // J. Phys. A: Math. Gen. 13 (1980) 979−987].

Схема 1. Предлагаемая схема «сигарообразного» наноагрегата, состоящего из нескольких макромолекул хитозана, в растворах угольной кислоты.

Таким образом, в третьей главе изложено, как был предложен и реализован перспективный способ растворения хитозана в угольной кислоте и адсорбции хитозановых покрытий из таких растворов. Мы обнаружили, что в ходе адсорбции на модельную подложку макромолекулы хитозана организуются в вытянутые стержнеобразные структуры. Было показано, что размер таких наностуктур не зависит от молекулярной массы образца хитозана. Поэтому мы заключили, что хитозановые макромолекулы формируют в растворах угольной кислоты наноагрегаты, составленные из нескольких макромолекул. Также была обнаружена некоторая чувствительность размеров наноагрегатов к степени деацетилирования образцов хитозана. Совокупность полученных данных позволила нам предположить, что притяжение, вызванное нерастворимыми гидрофобными группами, водородными связями и возможным формированием ионных пар, в сочетании с кулоновским отталкиванием нескомпенсированных заряженных групп хитозана играет важную роль в формировании наноагрегатов макромолекул хитозана в растворах угольной кислоты.

В **четвертой главе** обсуждается самоорганизация блок-сополимера ПС-*блок*-П4ВП в сферические мицеллы в растворах угольной кислоты.

Другой пример полимера, который также становится поликатионом и растворяется в угольной кислоте – это П4ВП. В этой части работы изучается блок-сополимер на его основе ПС-*блок*-П4ВП. Оказалось, что этот сополимер с сопоставимыми длинами блоков формирует сферические мицеллы в растворах угольной кислоты при комнатной температуре, которые можно видеть на

микрофотографиях ССМ (рис. 3). Можно заметить, что при всех исследуемых длинах блоков мицеллы имеют правильную сферическую геометрию.

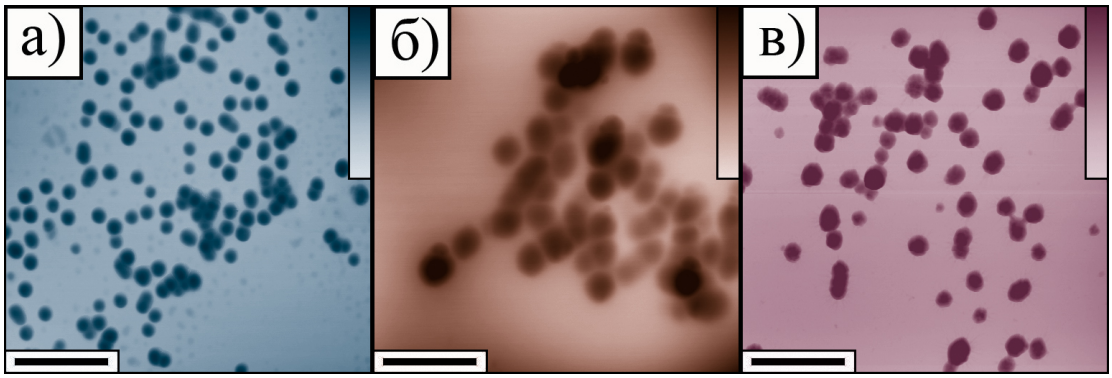


Рис. 3. ССМ микрофотографии мицелл ПС-*блок*-П4ВП на поверхности слюды, адсорбированные из растворов в угольной кислоте при давлении CO_2 300 атм и температуре 25 °С, концентрация сополимера: 0,1 г/л. Образцы различаются по молекулярной массе блоков: а) ПС – 16 кг/моль, П4ВП – 12 кг/ моль, б) ПС – 50 кг/моль, П4ВП – 22 кг/моль в) ПС – 50 кг/моль, П4ВП – 61 кг/моль. Размер кадров 2х2 мкм; масштабная линия 500 нм; шкала высот 100 нм.

По-видимому, в ходе процесса растворения в угольной кислоте, во-первых, происходит пластификация ПС блока под действием CO_2 под высоким давлением при комнатной температуре. Действительно, как подробно описано в литературном обзоре диссертации, CO_2, сжатый под высоким давлением с плотностью близкой к 1 мг/мл, является пластификатором для ПС. Пластификация П4ВП при таких условиях также может происходить. Эта пластификация обоих блоков способствует начальной растворимости сополимерного материала. Во-вторых, в кислой среде растворов угольной кислоты под высоким давлением (pH примерно 2,8) происходит протонирование и последующее растворение П4ВП. Основываясь на литературных данных, которые подробно обсуждаются в литературном обзоре данной диссертации, мы полагаем, что в ходе экспозиции в реакторе высокого давления в условиях высокомобильной смеси воды, растворенного CO_2 и пластифицированного на начальном этапе блок-сополимера, процесс самосборки сополимера в мицеллы происходит быстрее, чем в случае обычных растворителей при комнатной температуре. Очевидно, что мицеллы, сформированные в растворах угольной кислоты, имеют П4ВП корону и ПС ядро, в котором ПС пластифицирован в течение экспозиции в реакторе высокого давления. Однако после декомпрессии реактора CO_2 уходит из водной фазы и ПС ядро, по-видимому, претерпевает обратный процесс

застекловывания, что может служить фактором дополнительной стабилизации сформированных мицелл.

Поскольку каждый вид микроскопии обладает своими артефактами, для визуализации мицелл (помимо ССМ) мы использовали просвечивающую электронную микроскопию (ПЭМ) и сканирующую электронную микроскопию (СЭМ). Также мы сопоставили данные, полученные этими методами, с результатами исследований растворов мицелл с помощью динамического рассеяния света (ДРС). На рис. 4 представлены микрофотографии ПЭМ, а на рис. 5 микроснимки СЭМ тех же мицелл, адсорбированных на углеродную поверхность из растворов в угольной кислоте. Микрофотографии СЭМ дают нам информацию о том, что даже те единичные крупные агрегаты, которые присутствуют на поверхности углеродной подложки и морфологию которых нельзя просветить с помощью ПЭМ, представляют собой слипшиеся (по всей видимости, из-за влияния капиллярных сил, возникающих при высыхании капли растворителя) сферические мицеллы.

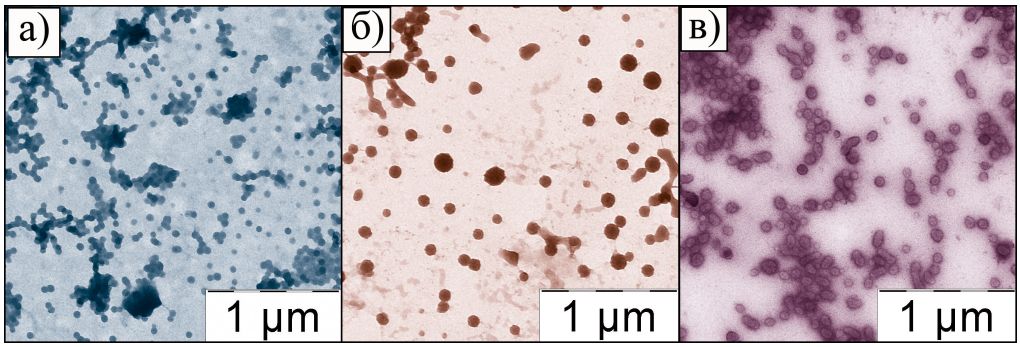


Рис. 4. ПЭМ микроснимки мицелл ПС-*блок*-П4ВП на поверхности углеродной подложки, адсорбированных из раствора в угольной кислоте при давлении CO_2 300 атм и температуре 25 °С, концентрация сополимера: 0,1 г/л. Образцы различаются по молекулярной массе блоков: а) ПС – 16 кг/моль, П4ВП – 12 кг/моль, б) ПС – 50 кг/моль, П4ВП – 22 кг/ моль, в) ПС – 50 кг/моль, П4ВП – 61 кг/моль. Масштабная линия 1 мкм. Микроснимки получены к.т.н. С.С. Абрамчуком при участии автора.

По результатам анализа полученных изображений были рассчитаны характерные радиусы мицелл (Табл. 2). Из приведенных данных можно сделать вывод, что размер мицелл, наблюдаемый с помощью различных видов микроскопии высокого разрешения, зависит главным образом от длины ПС блока, составляющего ядро мицеллы.

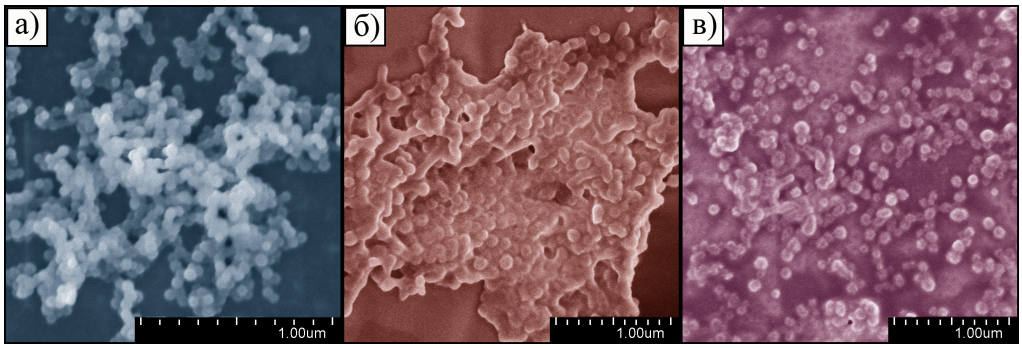


Рис. 5. СЭМ микроснимки мицелл ПС-*блок*-П4ВП на поверхности углеродной подложки, адсорбированных из раствора в угольной кислоте при давлении CO_2 300 атм и температуре 25 °С, концентрация сополимера: 0,1 г/л. Образцы различаются по молекулярной массе блоков: а) ПС – 16 кг/моль, П4ВП – 12 кг/моль, б) ПС – 50 кг/моль, П4ВП – 22 кг/ моль, в) ПС – 50 кг/моль, П4ВП – 61 кг/моль. Масштабная линия 1 мкм. Микроснимки получены к.х.н. А.С. Кашиным при участии автора.

Таблица 2. Радиусы мицелл ПС-*блок*-П4ВП, полученные разными методами.

Соотношение длин звеньев ПС/П4ВП	ССМ, измерение ширины	ССМ, измерение высоты	ПЭМ	СЭМ	ДРС	Теоретические вычисления*
150/110	41 ± 5	22 ± 2	24 ± 3	28 ± 3	48 ± 5	22
480/210	71 ± 9	30 ± 7	33 ± 5	48 ± 6	88 ± 11	49
510/580	50 ± 8	35 ± 8	32 ± 5	45 ± 7	97 ± 9	51

* рассчитанные радиусы ядра

Все полученные значения радиусов мицелл коррелируют друг с другом, что подтверждает достоверность результатов. Значения радиусов, полученные с помощью ССМ измерением ширины адсорбированных объектов были систематически несколько больше, по сравнению с результатами ЭМ. Мы предполагаем, что они могут быть завышены из-за известного эффекта уширения, возникающего из-за неидеальности геометрии зонда. Значения радиусов, полученные с помощью ПЭМ и ССМ (при измерении высоты адсорбированных мицелл) были несколько меньше, чем полученные с помощью СЭМ. Возможно, это связано с более низким контрастом изображений СЭМ. Радиусы мицелл, наблюдаемые с помощью трёх видов микроскопии высокого разрешения, оказались меньше, чем радиусы, полученные с помощью ДРС (Табл. 2). Это может быть объяснено тем, что радиусы мицелл, определенные с помощью ДРС, представляют собой полный гидродинамический радиус, т.е. радиус мицелл с набухшей П4ВП короной. Тогда как радиусы мицелл,

полученные методами микроскопии относятся к ядру и высушенной и сколапсированной короне после испарения воды. Теоретически рассчитанные нами значения радиусов ядер мицелл с различными длинами блоков на основе модели из работы [Shusharina et al.// Macromolecules 29 (1996) 3167-3174] приведены в Табл. 2. Из сопоставления можно заключить, что экспериментально детектируемые размеры мицелл коррелируют с теоретически предсказанными значениями для радиуса ядра мицелл.

Таким образом, в четвертой главе было показано, что блок-сополимер ПС-*блок*-П4ВП самоорганизуется в растворах угольной кислоты в сферические мицеллы, имеющие ПС ядро и П4ВП корону, при комнатной температуре и без использования органических растворителей. Главными факторами, способствующими мицеллообразованию являются: (а) протонирование П4ВП блока в растворах угольной кислоты, (б) пластифицирующее действие CO_2 под высоким давлением на ПС и П4ВП. Были проанализированы различия в характерных размерах мицелл, полученных с помощью таких методов, как ССМ, ПЭМ, СЭМ, ДРС, а также они были сопоставлены с теоретически вычисленными радиусами. Оказалось, что все экспериментально полученные значения радиусов мицелл коррелируют друг с другом и с теоретически вычисленными.

В **пятой главе** изложены результаты стабилизации металлических наночастиц хитозаном и мицеллами ПС-*блок*-П4ВП в растворах угольной кислоты.

Ранее было показано, что хитозан растворяется в угольной кислоте. Поэтому мы предложили биосовместимый подход к созданию наночастиц серебра, обладающих антимикробными свойствами, который заключается в стабилизации наночастиц серебра хитозаном, растворенным в угольной кислоте. Оказалось, что в угольной кислоте при добавлении к растворенному хитозану соли серебра, может формироваться достаточно стабильный хитозановый гель. Мы считаем, что ионы или атомы серебра могут выступать в качестве сшивок между цепочками хитозана в таком геле, координируясь на аминогруппах соседних макромолекул.

При обычном высушивании композитные гели образуют сколлапсировавшие плёнки, которые можно порезать ультрамикротомом и исследовать с помощью ПЭМ на предмет наличия в них наночастиц серебра. В результате оказалось, что в гелях однородно распределены наночастицы серебра, которые на микрофотографиях

выглядят как тёмные точки (рис. 6). Было обнаружено, что их диаметр варьируется в зависимости от мольного соотношения серебра и хитозана (Табл. 3). Причем чем меньше концентрация серебра по отношению к концентрации хитозана в растворе угольной кислоты – тем меньше диаметр наночастиц. Это может быть объяснено тем, что чем больше звеньев хитозана с аминогруппами приходится на один ион серебра – тем эффективнее его стабилизация. Таким образом, подбирая концентрацию хитозана и серебра в растворе, можно контролировать размер получаемых наночастиц. Было показано, что данные гели могут быть лиофильно высушены с формированием высокопористых композитов волокнистой структуры.

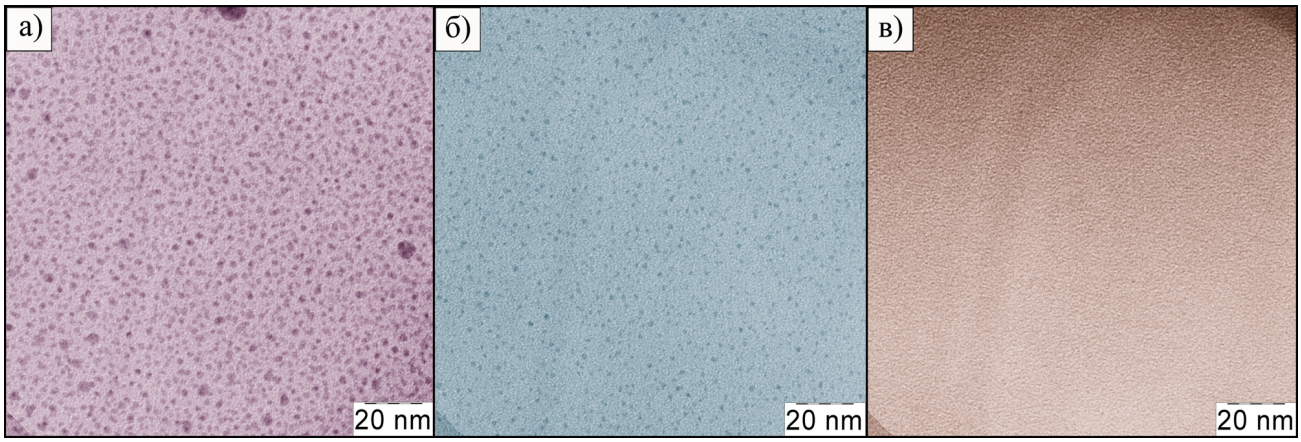


Рис. 6 Микрофотографии ПЭМ срезов плёнок из высушенных гелей хитозана с серебром, получаемых в растворах угольной кислоты. Схит = 10 г/л, мольное отношение Хитозан/$AgNO_3$: а) 1/1, б) 1/5, в) 1/10.

Табл. 3 Характерные размеры наночастиц серебра, стабилизированных хитозаном в растворах угольной кислоты.

Отношение количества моль хитозана к количеству моль $AgNO_3$	1/1	5/1	10/1
Диаметр, нм	2,1 ± 0,3	1,4 ± 0,3	< 1

Из возможных восстанавливающих агентов для серебра мы выбрали газ водород, подмешиваемый к CO_2, так как по завершении процесса восстановления он покидает готовый продукт, обеспечивая сохранение его биосовместимости. На рис. 7

представлены микрофотографии ПЭМ наночастиц серебра, стабилизированных хитозаном и восстановленных водородом. Видно, что при восстановлении наночастицы агрегируют и, соответственно, их размер увеличивается (см. рис. 7, Табл. 4). Мы связываем этот эффект с влиянием H_2 на степень восстановленности серебра, при возможном влиянии также на структуру или конформацию хитозана. Данные рентгенофазового анализа и измерения поверхностного плазмонного резонанса подтверждают металлическую природу сформированных наночастиц.

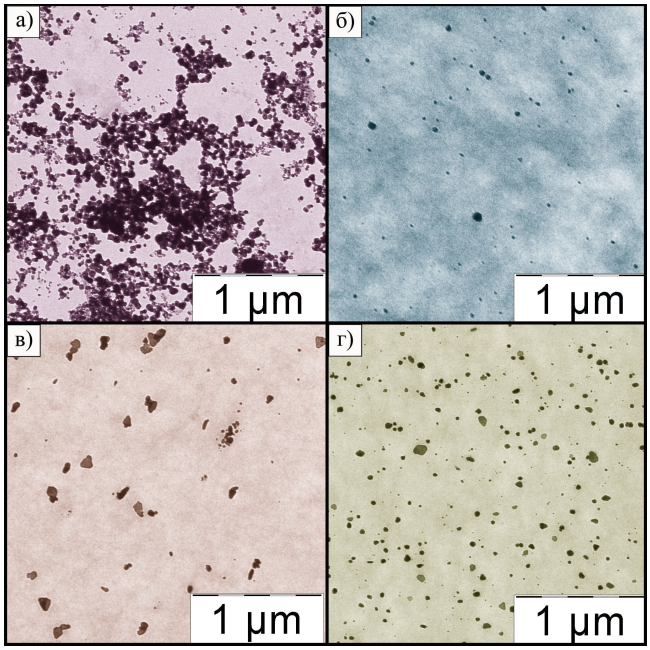


Рис. 7 Микрофотографии ПЭМ срезов плёнок, политых из растворов в угольной кислоте хитозана с наночастицами серебра после их восстановления H_2. а-в) Схит = 10 г/л, мольное отношение Хитозан/$AgNO_3$: а) 1/1, б) 1/5, в) 1/10, г) Схит = 20 г/л, мольное отношение Хитозан/$AgNO_3$ = 1/5.

Табл. 4 Характерные размеры наночастиц серебра, стабилизированных хитозаном в растворах в угольной кислоте и восстановленных H_2.

Отношение количества моль хитозана к количеству моль $AgNO_3$	1/1	5/1	10/1	5/1, концентрация хитозана в два раза выше
Диаметр, нм	33,7 ± 8,7	30,1 ± 6,4	43,4 ± 10,7	23,9 ± 5,7

Принимая во внимание полученные данные, можно заключить, что чем больше концентрация хитозана при неизменном мольном отношении хитозана к серебру, тем лучше хитозан стабилизирует наночастицы уже после их восстановления водородом.

В результате, в пятой главе была показана возможность формирования композитных хитозановых гелей с наночастицами серебра в растворах угольной кислоты. Известно, что присутствие наночастиц серебра придаёт композиту антимикробную активность. Таким образом, можно ожидать, что полученные композитные гели из хитозана и наночастиц серебра (в лиофильно высушенной форме) могут применяться в качестве гемостатического материала с пролонгированным антимикробным действием. Также было показано, что хитозан, растворенный в угольной кислоте, способен стабилизировать наночастицы серебра, восстанавливаемые H_2. Этот подход может быть применен и для создания плёнок типа искуственной кожи, обладающих антимикробным и заживляющим действием.

В главе 4 было показано, что блок-сополимер ПС-*блок*-П4ВП самоорганизуется в растворах угольной кислоты в сферические мицеллы. В литературном обзоре данной диссертации подробно обсуждается, что мицеллы являются хорошими стабилизирующими агентами для различных металлических наночастиц. Таким образом, мы посчитали перспективной к реализации известную в литературе процедуру использования таких мицелл в качестве основы для иммобилизации и стабилизации металлических наночастиц.

В качестве металлических прекурсоров мы выбрали ацетат палладия и золотохлористоводородную кислоту. Они растворимы в водной среде угольной кислоты и формируют комплексы с П4ВП блоком в короне мицелл. На следующем шаге эти прекурсоры были восстановлены во время процесса насыщения реактора моноксидом углерода или водородом, подмешиваемых к CO_2, соответственно. Оказалось, что наночастицы палладия и золота, локализуются в короне мицелл (на микрофотографиях ПЭМ на рис. 8 наночастицы выглядят как тёмные точки внутри круглых мицелл), поэтому доступ к реагентам и удаление продуктов реакции не затруднены, причем их распределение по носителю достаточно однородно, что должно давать преимущества при использовании таких композитов в каталитических реакциях. В то же время, стерическое отталкивание корон различных мицелл, сформированных растворимым в угольной кислоте П4ВП блоком, предотвращает

наночастицы от агрегации и выпадения в осадок. Средний диаметр наночастиц палладия и золота, стабилизированных в короне мицелл, оказался равным примерно 2,5 нм. Наночастицы являются металлическими (восстановленными), о чём свидетельствуют данные дифракции электронов, см. рис. 8, врезки. Благодаря малым размерам и, соответственно, высокой удельной поверхности полученных металлических наночастиц, можно ожидать, что они будут высокоактивными катализаторами для органического синтеза.

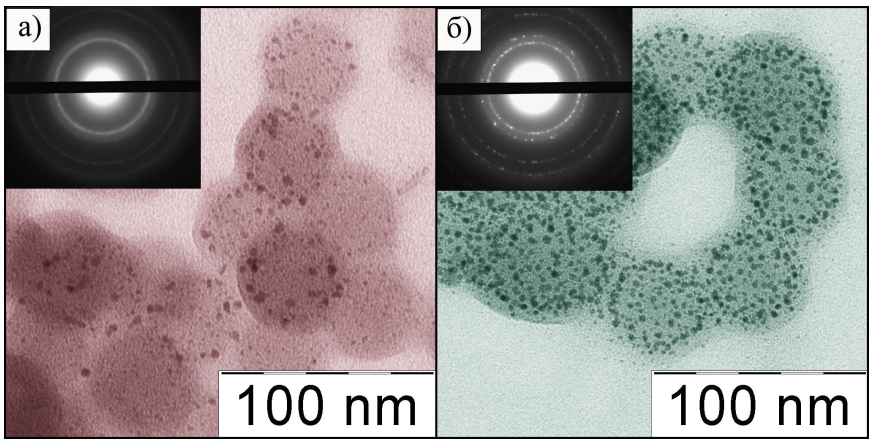


Рис. 8 Микрофотографии мицелл ПС-*блок*-П4ВП (ПС– 16 кг/моль, П4ВП– 12 кг/моль) с локализированными в короне наночастицами и электронные дифрактограммы с рефлексами, соответствующими металлическому а) Pd и б) Au. Мицеллы адсорбированы на поверхность углеродной плёнки-подложки из растворов в угольной кислоте.

Полученные растворы мицелл, декорированные мелкими и монодисперсными металлическими наночастицами, благодаря их высокой удельной поверхности, могут служить в качестве активных, стабильных и многократно используемых катализаторов для химических реакций, поскольку мы показали, что можно выделить мицеллы из раствора простой обработкой азотом (с целью вытеснить растворенный CO_2), отделить их от предполагаемого синтезированного продукта и снова диспергировать в угольной кислоте для последующего синтеза. Важное преимущество данной системы – это возможность спонтанного распада угольной кислоты на CO_2 и H_2O при снижении давления, так как вследствие этого не требуется проводить нейтрализацию или отмывку синтезированного продукта от каких-либо солей или кислот.

Таким образом, была продемонстрирована возможность декорирования короны мицелл ПС-*блок*-П4ВП металлическими наночастицами палладия и золота в растворах в угольной кислоте. Ожидается, что такие композитные мицеллы могут быть использованы как эффективные и обеспечивающие простоту повторного использования катализаторы для органического синтеза.

Выводы диссертационной работы

1. Было установлено, что хитозан из растворов угольной кислоты адсорбируется на поверхность слюды однородным нанометровым покрытием, которое состоит из стержнеобразных наноструктур.

2. На основании систематического анализа характерных размеров одиночных наноструктур, сформированных макромолекулами хитозана различной молекулярной массы и степени деацетилирования, было доказано, что данные объекты не являются мономолекулярными, а составлены из нескольких макромолекул. Формирование таких нетипичных, но ранее предсказанных теоретически, наноагрегатов хитозана в растворах угольной кислоты может быть объяснено в рамках концепции учёта притяжения ионных пар, возникающих в результате Маннинговской конденсации противоионов.

3. Было обнаружено, что в растворах угольной кислоты из блок-сополимера полистирол-*блок*-поли-4-винилпиридина можно сравнительно легко формировать мицеллы, без применения органических предрастворителей, или нагрева, в силу пластифицирующего действия CO_2 под высоким давлением на полимеры, способствующего начальной растворимости материала. Было показано, что из растворов угольной кислоты можно адсорбировать в том числе и одиночные изолированные мицеллы, причём на подложки различной химической природы для последующей визуализации методами микроскопии высокого разрешения.

4. Было продемонстрировано, что радиусы мицелл, полученные посредством анализа данных таких различных методов характеризации размеров и формы нанообъектов, как сканирующая силовая микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия и

динамическое рассеяние света коррелируют как между собой, так и с теоретически рассчитанными значениями.

5. Была разработана процедура локализации в короне таких мицелл монодисперсных наночастиц палладия и золота в растворах угольной кислоты, которая позволяла достигать высокой степени однородности их распределения по носителю. Было показано, что нагруженные наночастицами мицеллы могут быть легко отделены для последующего повторного использования в катализе от продукта реакции простой вариацией pH водной фазы за счет вытеснения растворённого CO_2 азотом.

6. Была продемонстрирована возможность формирования композитных хитозановых гелей с наночастицами серебра в растворах угольной кислоты. Было показано, что хитозан в растворах угольной кислоты способен стабилизировать наночастицы серебра, восстанавливаемые до металла водородом.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. M.A. Khokhlova. Chitosan nanostructures deposited from solutions in carbonic acid on a model substrate as resolved by AFM [Текст] / M.A. Khokhlova, M.O. Gallyamov, A.R. Khokhlov // Colloid and Polymer Science – 2012. – V. 290. – P. 1471-1480.

2. M.A. Pigaleva. Stabilization of chitosan aggregates at the nanoscale in solutions in carbonic acid [Текст] / M.A. Pigaleva, I.V. Portnov, A.A. Rudov, I.V. Blagodatskikh, T.E. Grigoriev, M.O. Gallyamov, I.I. Potemkin // Macromolecules – 2014. – V. 47. – P. 5749–5758.

3. M.A. Pigaleva. Formation of Easy-to-Recover Polystyrene-block-Poly(4-vinylpyridine) Micelles Decorated with Pd Nanoparticles in Solutions of Self-Neutralizing Carbonic Acid [Текст] / M.A. Pigaleva, M.V. Bulat, G.N. Bondarenko, S.S. Abramchuk, T.V. Laptinskaya, M.O. Gallyamov, I.P. Beletskaya, M. Möller // ACS Macro Letters – 2015. – V. 4. – P. 661–664.

4. M.A. Pigaleva. Formation of metal nanoparticles stabilized by polycations in an advanced solvent carbonic acid [Текст] / M.A. Pigaleva, M.V. Bulat, G.N. Bondarenko, M.O. Gallyamov, M. Möller, I.P. Beletskaya // European Polymer Congress 2015, Dresden, Germany. Book of abstracts. – 2015. – P. 106.

5. I.V. Novikov. The formation of biocompatible chitosan gels in carbonic acid [Текст] / I.V. Novikov, M.A. Pigaleva, M.O. Gallyamov // 12th International Conference of the European Chitin Society/13th International Conference on Chitin and Chitosan, Münster, Germany. Book of abstracts. – 2015. – P. 151.

Список публикаций, близких к теме диссертации

(касающихся растворов, содержащих CO_2 под высоким давлением, исследований свойств полисахаридов в растворах, синтеза в растворах угольной кислоты и медицинских приложений хитозана)

1. M.A. Khokhlova. Chitosan Macromolecules on a Substrate: Deposition from Solutions in sc CO_2 and Reorganisation in Vapours [Текст] / M.A. Khokhlova, I.S. Chaschin, T.E. Grigorev, M.O. Gallyamov // Macromolecular Symposia – 2010. – V. 296(1). – P. 531–540.

2. R. Nervo. Colloid Stabilization by an Oppositely Charged Polysaccharide: Mechanism of Interaction and Interface Studied with Synchrotron X-Rays resolved by AFM [Текст] / R. Nervo, M.A. Khokhlova, O. Konovalov, M. Rinaudo // International Journal of Polymer Analysis and Characterization – 2014. – V. 19:1. – P. 1-9.

3. M.O. Gallyamov. Collagen tissue treated with chitosan solutions in carbonic acid for improved biological prosthetic heart valves [Текст] / M.O. Gallyamov, I.S. Chaschin, M.A. Khokhlova, T.E. Grigorev, N.P. Bakuleva, I.G. Lyutova, J.E. Kondratenko, G.A. Badun, M.G. Chernysheva, A.R. Khokhlov // Materials Science and Engineering: C – 2014. – V. 37 – P. 127–140.

4. A.A. Kalinina. Hydrolytic polycondensation of diethoxydimethylsilane in carbonic acid [Текст] / A.A. Kalinina, I.V. Elmanovich, M.N. Temnikov, M.A. Pigaleva, A.S. Zhiltsov, M.O. Gallyamov, A.M. Muzafarov // RSC Advances – 2015. – V. 5 – V. 5664-5666.