

Мурланова Т. В., Вакулук П. В., Бурбан А. Ф.

## ІММОБІЛІЗАЦІЯ ХІТОЗАНУ НА ПОВЕРХНІ ТРЕКОВИХ ПОЛІЕТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТНИХ МЕМБРАН

*Розроблено методику іммобілізації хітозану на поверхні треккових поліетилентерефталатних мембран із попереднім гідролізом їхньої поверхні у водному розчині гідроксиду натрію з наступною обробкою мембран хітозаном. Отримані мембрани мають стабільні у часі бактерицидні властивості.*

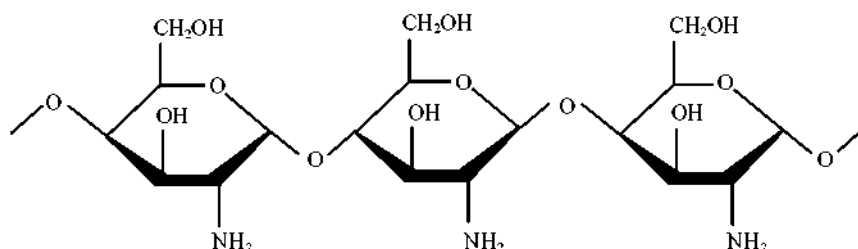
### Вступ

Незважаючи на те, що хітин та хітозан відомі вже досить давно (хітозан докладно описано в 1894 році), їх інтенсивне вивчення триває лише протягом двох останніх десятиліть.

Хітозан - це лінійний амінополісахарид 2-аміно-2-дезоксиглюкан, що утворюється шляхом деацетилювання хітину, основної

складової панцирів ракоподібних (до 85% маси панцира). Та зазвичай повного деацетилювання досягнути не вдається, тому до складу хітозану входить деяка кількість N-ацетилглюкозамінних ланок. За своєю структурою хітозан нагадує целюлозу, гідроксильні групи якої в положенні 2 заміщені на аміногрупи [1-4].

Наявність електродонорних аміно- та



гідроксильних груп зумовлює можливість утворення різних за силою зв'язків із біологічно активними сполуками [1, 2].

Для практичного застосування хітозану важливими є такі його властивості, як гідрофільність, розчинність, здатність до набрякання тощо [2].

Для похідних хітину характерні біосумісні, імуномодельючі та антимікробні властивості, здатність до біодеструкції. Завдяки унікальним фізіологічним та біологічним характеристикам, низькій токсичності хітозан знайшов широке застосування в біомедицинській технології [1, 2, 4].

Останнім часом інтенсивно ведуться дослідження іммобілізації хітозану на полімерних та неорганічних поверхнях. Особливої актуальності набувають питання іммобілізації хітозану на поверхні полімерних мембран із метою її функціоналізації [3, 5, 6]. Для цього може бути застосований недорогий, інертний, нетоксичний та легкодоступний поліетилентерефталат (ПЕТФ) [3, 5, 7-8]. Серед основних недоліків ПЕТФ – висока гідрофобність, низька змочуваність, відсутність реакційноздатних функціональних груп, що

ускладнюють іммобілізацію хітозану [3, 5]. Для усунення цих недоліків може бути ефективно застосовано низку фізико-хімічних методів активування поверхні ПЕТФ, у тому числі обробку плазмою [5, 9], радіаційне [10, 11, 12] і УФ-опромінювання [13, 14]. Однак ці методи потребують складного обладнання і чималих коштів. Відомим способом, що призводить до утворення реакційноздатних функціональних груп на поверхні ПЕТФ, є хімічна обробка [3, 7, 15]. Для цього часто застосовують лужний гідроліз [3, 7, 8], що сприяє появі на поверхні ПЕТФ активних гідроксильних та карбоксильних груп, здатних до взаємодії з NH<sub>2</sub>-групами хітозану. У працях досліджено методи гідролізу ПЕТФ у вигляді різних форм – плівок [7], волокон [15] та гранул [3, 5]. Однак на цей час не описано методику для безпосереднього прищеплення хітозану на гідролізовану поверхню ПЕТФ мембран, а лише опосередковану його іммобілізацію на попередньо прищепленому шарі поліакрилової кислоти [5].

У зв'язку з вищезазначеним, метою цієї праці

було отримання гідрофільних заряджених мембран із антибактеріальною активністю, шляхом прищеплення хітозану на гідролізовану поверхню поліетилентерефталатних трекових мембран.

### Матеріали та методи

У роботі було використано трекові поліетилентерефталатні мембрани з діаметром пор 0,05 мкм (виробництво ОІЯД, м. Дубна, Росія).

Для надання мембранам бактерицидних властивостей використовували хітозан із ММ 400 кДа (Fluka).

Бактерицидну дію модифікованих мембран досліджували відносно грам-негативної бактерії *Escherichia coli* НВ 101 Української колекції мікроорганізмів (УКМ).

Для вивчення водопроникності мембран використовували стандартну циліндричну комірку непроточного типу Amicon 8200 (Millipore Corporation, США).

### Гідроліз мембран

Для підготовки поверхні до гідролізу ПЕТФ мембрани відмивалися етиловим спиртом при перемішуванні із застосуванням шейкера протягом 2 год. Після цього ПЕТФ мембрани витриму-

ували в 1 М розчині NaOH за 20–70 °С протягом 10–60 хв. Гідролізовані ПЕТФ мембрани промивали в дистильованій воді протягом доби за кімнатної температури, після чого висушували в сушильній шафі за 40 °С та використовували для подальших досліджень.

### Імобілізація хітозану

Розчин хітозану для іммобілізації готували шляхом розчинення 4 г хітозану в 200 мл 2 % розчину оцтової кислоти протягом 4 год за температури 60 °С. Гідролізовані ПЕТФ мембрани занурювали в розчин хітозану за кімнатної температури та витримували протягом 0,5–24 год, після чого промивали в дистильованій воді та висушували в сушильній шафі за 40 °С.

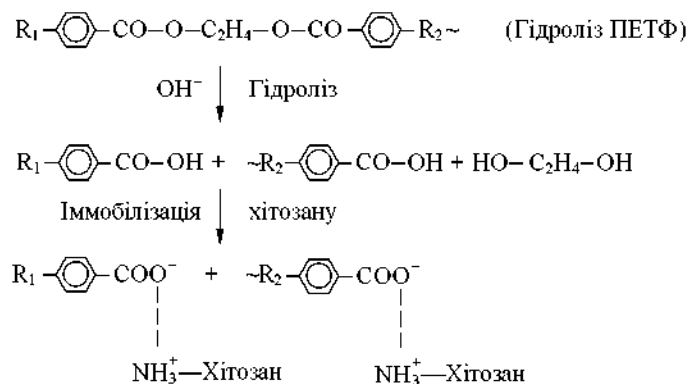


Схема 1. Імобілізація хітозану на поверхні ПЕТФ мембран

### Вимірювання крайових кутів змочування

Оцінку гідрофільності поверхні мембран проводили шляхом вимірювання крайових кутів змочування поверхні мембрани бідистильованою водою методом сидячої краплі. Значення контактних кутів змочування усереднювали вибіркою із 10 вимірювань, похибка вимірювання становила  $\pm 3^\circ$ .

### Вимірювання $\xi$ -потенціалу поверхні мембран

Вимірювання поверхневого заряду мембран проводили на електрокінетичному аналізаторі (ЕКА, Anton Paar GmbH). Вимірювання  $\xi$ -потенціалу проводили відносно розчину KCl концентрацією  $1 \cdot 10^{-3}$  М.

### Розрахунок ступеня прищеплення хітозану (СП)

Ступінь прищеплення хітозану вираховували за формулою:

$$\text{СП} = (M_{\text{модиф}} - M_0) / M_0 \cdot 100 \%,$$

де СП – ступінь прищеплення, %;  $M_0$  – маса вихідної мембрани, г;  $M_{\text{модиф}}$  – маса модифікованої мембрани, г.

### Методика визначення бактерицидних властивостей мембран

Бактерицидну активність мембран визначали суспензійним методом – фільтруванням суспензії культури бактерії *E. Coli* в 0,056 % фізіологічному розчині крізь досліджувану мембрану. Фільтрування проводили в установці непроточного типу при перемішуванні об'ємом 0,1 дм<sup>3</sup> і площею мембрани  $26,4 \cdot 10^{-4}$  м<sup>2</sup>. Робочий тиск становив 0,05 МПа. Робоча температура – 293 К. Культуру вирощували на середовищі МПА (Serva) та вносили у фізіологічний розчин концентрацією близько  $10^6$  клітин/дм<sup>3</sup>. Цю суспензію фільтрували через досліджувану мембрану до сухого залишку. Контролем слугувала

немодифікована мембрана. Після фільтрування мембрану інкубували на середовищі Ендо при 310 К протягом однієї доби. Бактерицидну активність визначали як відсоток колонієутворювальних одиниць (КУО/см<sup>3</sup>) на модифікованій мембрані до початкової (контроль).

### Результати і обговорення

Лужний гідроліз ПЕТФ мембран проводили згідно з методиками, описаними у працях [3, 7, 8]. Умови гідролізу підбирали виходячи з міркувань збереження механічних властивостей мембран та не надто тривалого часу модифікування (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив тривалості ( $\tau$ , хв) та температури ( $T$ , оС) гідролізу на величину кутів змочування мембран водою

$\tau$	Кути змочування, °			
	$T, ^\circ\text{C}$			
	20	40	60	70
0	59,3°	59,3°	59,1°	59,0°
5	58,7°	57,9°	56,2°	55,6°
10	55,7°	54,1°	51,5°	—
20	53,2°	50,3°	45,5°	—
40	53,1°	48,6°	43,6°	—
60	52,6°	46,4°	—	—

«—» — деструкція

Як видно з табл. 1, тривалий гідроліз мембран при температурі 60–70 °С призводить до деструкції ПЕТФ мембран. Зокрема, гідроліз ПЕТФ мембран за 70 °С в 1 М розчині NaOH призводить до її руйнування протягом 10 хв. Натомість гідроліз за 60 °С та тривалості 20–25 хвилин несуттєво впливає на водопроникність мембрани (рис. 1).

З рис. 1 видно, що зі збільшенням тривалості гідролізу зростає і водопроникність мембран,

що, ймовірно, відбувається за рахунок руйнування естерових зв'язків ПЕТФ (з утворенням реакційноздатних гідроксильних та карбоксильних груп).

Як показано в табл. 2, відбувається часткова втрата маси мембрани за рахунок деструкції ділянок полімеру внаслідок гідролізу.

Наступним кроком роботи було проведення імобілізації хітозану на гідролізовану поверхню поліетилентерефталатних мембран.

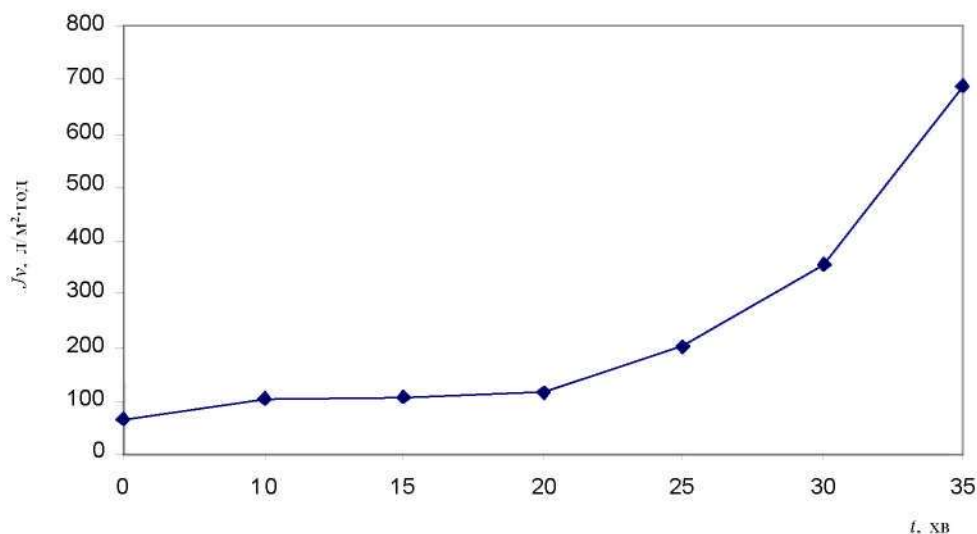
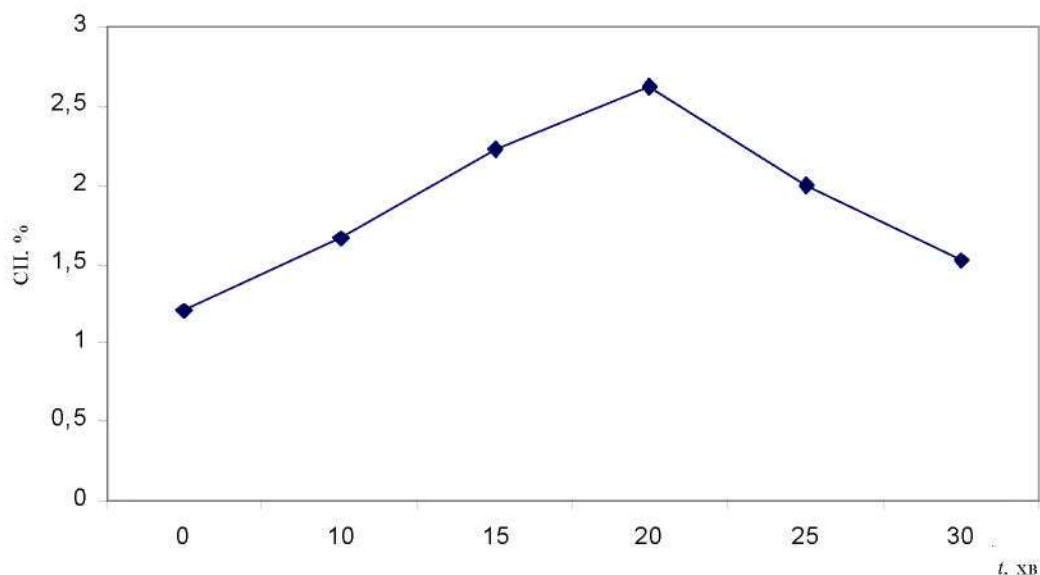


Рис. 1. Вплив тривалості гідролізу ( $t$ , хв) на водопроникність ( $J_v$ , л/м<sup>2</sup>·год) мембран ( $t$  °С = 60 °С)

Таблиця 2. Вплив тривалості гідролізу ( $\tau$ , хв) на зміну маси ( $\Delta M_{\text{гідр}}$ , %) мембрани

$\tau$ , хв	10	15	20	25	30	35
$\Delta M_{\text{гідр}}$ , %	-1,40	-4,01	-5,02	-7,69	-9,66	-12,96

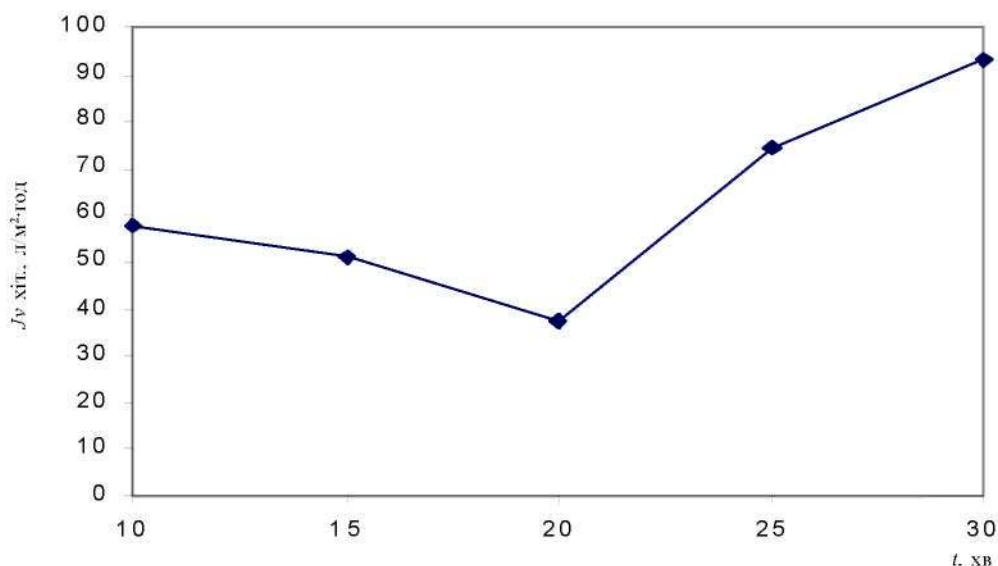
Рис. 2. Вплив тривалості гідролізу ( $\tau$ , хв) на ступінь прищеплення (СП, %) хітозану ( $t_{\text{гідр}}$ , °C = 60 °C,  $C_{\text{NaOH}}$  = 1 моль, витримування в розчині хітозану 120 хв)

Як видно з рис. 2, на ПЕТФ мембранах, гідролізованих за 60 °C протягом 20 хв, спостерігається найвищий ступінь прищеплення хітозану в поєднанні зі збереженням механічних властивостей ПЕТФ мембран. Тому оптимальними умовами для гідролізу ПЕТФ мембран було обрано температуру 60 °C та 1 М розчин NaOH.

Прищеплення хітозану до поверхні ПЕТФ мембран призводить до зменшення їх водопрони-

кності (рис. 3) за рахунок часткового перекривання пор. Однак на певному етапі внесок перекривання пор у падіння водопроницкості мембран стає менш суттєвим, порівняно з її зростанням внаслідок гідролізу та часткової деструкції мембран.

Найбільше падіння водопроницкості при іммобілізації хітозану спостерігається для зразків, гідролізованих протягом 20 хв (рис. 3), що

Рис. 3. Вплив тривалості гідролізу ( $\tau$ , хв) на водопроницкість ( $J_v$ , л/м²·год) мембран (витримка в розчині хітозану 120 хв)

відповідає найбільшому ступеню прищеплення хітозану (рис. 2).

Враховуючи викладене, для імобілізації хітозану на поверхні ПЕТФ мембран оптимальними було обрано такі умови гідролізу: температура 60 оС, 1 М розчин NaOH, тривалість гідролізу 20 хв.

Гідролізовані за таких умов ПЕТФ мембрани було використано для вивчення процесу імобілізації хітозану. Взаємодія речовин із протилежним зарядом на поверхні мембран призводить до суттєвих змін  $\xi$ -потенціалу поверхні, аж до її перезарядки. У зв'язку з цим вивчення змін  $\xi$ -потенціалу може свідчити про ефективність модифікування мембран хітозаном.

З даних (табл. 3), одержаних у результаті вимірювання  $\xi$ -потенціалу поверхні модифікованих та немодифікованих мембран, видно, що внаслідок модифікування трекових поліетилентерефталатних мембран хітозаном відбувається зміна електроповерхневих властивостей початкових мембран, що мають слабкий поверхневий негативний заряд. Уже через 30 хв контакту гідролі-

зованої мембрани з розчином хітозану відбувається перезарядка поверхні, тобто заряд немодифікованої мембрани  $-9,89 \pm 0,75$  змінюється до  $+8,22 \pm 0,63$ . Зі збільшенням тривалості модифікування поверхневий заряд із часом виходить на асимптоту. Це може свідчити про те, що відбувається повне адсорбційне насичення зовнішньої поверхні та пор мембрани хітозаном, і подальша сорбція його вже більше не відбувається.

На модифікованих ПЕТФ мембранах було досліджено бактерицидні властивості щодо грам-негативної бактерії *Escherichia coli* НВ.

Показано (табл. 4), що при витримуванні мембран у розчині хітозану протягом 120 хв бактерицидність мембрани досягає 100 % і залишається стабільною при збільшенні часу контакту з хітозаном.

Бактерицидні властивості отриманих мембран залежно від терміну їх експлуатації подано в таблиці 5. Тривалість модифікування - 120 хв.

Таким чином (табл. 5), бактерицидні властивості отриманих мембран залежно від терміну експлуатації залишаються стабільними понад 20 діб.

Таблиця 3.  $\xi$ -потенціал поверхні мембран залежно від тривалості імобілізації хітозану

$\tau$ , хв	$\xi$ , мВ
0	$-9,89 \pm 0,75$
30	$+8,22 \pm 0,63$
60	$+18,85 \pm 0,38$
120	$+28,85 \pm 0,13$
180	$+28,95 \pm 0,24$
24 год	$+29,15 \pm 0,45$

Таблиця 5. Бактерицидні властивості отриманих мембран залежно від терміну їх експлуатації

$\tau$ , хв	Бактерицидність, %
0	100
3	100
10	100
20	100
30	99

Таблиця 4. Бактерицидність залежно від тривалості витримування в розчині хітозану

$\tau$ , хв	Бактерицидність, %
0	0
60	65
120	100
180	100

### Висновки

Розроблено методику гідролізу трекових ПЕТФ мембран, що призводить до гідрофілізації поверхні зі зменшенням кута змочування від  $59,3^\circ$  до  $43,6^\circ$  за рахунок створення реакційно-здатних гідроксильних та карбоксильних груп. Установлено, що оптимальними умовами гідролізу ПЕТФ мембран є 1 М водний розчин NaOH,  $T = 60^\circ\text{C}$ ,  $t = 20$  хв.

Розроблено метод імобілізації хітозану на поверхні гідролізованих ПЕТФ мембран та отримано мембрани зі ступенем прищеплення хітозану 2,62 %.

У результаті виконаної роботи отримано мембрани з бактерицидною активністю, що становить 100 %.

Роботу виконано за фінансового сприяння гранту Президента України для підтримки наукових досліджень молодих учених № GP/F013/51.

1. Гальбрайх Л. С. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение // Химия.— 2001.— Т. 7, № 1.— С. 51–56.
2. Цыган В. Н., Жоголев К. Д., Никитин В. Ю. Хитозан как парафармацевтик // Рынок БАД.— 2002.— № 2(4).— апрель–май.
3. Zhang X., Bai R. Immobilization of Chitosan on Nylon 6,6 and PET Granules Through Hydrolysis Pretreatment // Journal of Applied Polymer Sci.— 2003, Vol. 90, 3973–3979.
4. Brine C. J., Sanford P. A. and Zikakis J. P. (Ed.). An economical technique for producing chitosan. In Advances in Chitin and Chitosan, Alimuniar and Zainuddin. 1992, p. 627. Elsevier Applied Science, Essex, UK.
5. Man Woo Huh, Inn-Kyu Kang, Du Hyun Lee, Woo Sik Kim, Dong Ho Lee, Lee Soon Park, Kyung Eun Min, Kwan Ho Seo Surface Characterization and Antibacterial Activity of Chitosan-Grafted Poly(ethylene terephthalate) Prepared by Plasma Glow Discharge // Journal of Applied Polymer Science.— 2001, Vol. 81, 2769–2778.
6. Bratskaya S., Marinin D., Nitschke M., Pleul D., Schwarz S., Simon F. Polypropylene Surface Functionalization with Chitosan, J. Adhesion Sci. Technol.— 2004, Vol. 18, No. 10, 1173–1186.
7. Jun Li, Yasunari Maekawa, Tetsuya Yamaki, Masaru Yoshida. Chemical Modification of a Poly(ethylene terephthalate) Surface by the Selective Alkylation of Acid Action // Macromol. Chem. Phys.— 2002, 203, No. 17, 2470–2474.
8. Launay A., Thominet F., Verdu J. Hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate): a Kinetic Study, Polymer Degradation and Stability 1994, 46, 319–324.
9. Zou X. P., Kang E. T., Neoh K. G. Plasma-induced graft polymerization of poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate on poly(tetrafluoroethylene) films for reduction in protein adsorption // Surface and Coatings Technology.— 2002.— Vol. 149, № 1.— P. 119–128.
10. Bucio E., Cedillo G. Radiation-induced grafting of functional acrylic monomers onto polyethylene and polypropylene films using acryloyl chloride // Polymer Bulletin.— 2001. — Vol. 46, № 1.— P. 115–121.
11. Shtanko N. I., Kabanov V. Ya. The use of radiation-induced graft polymerization for modification of polymer track membranes // Beam Interactions with Materials and Atoms.— 1999.— Vol. 151, № 2.— P. 416–422.
12. Sidorova L. P., Aliev A. D. Modification of polyethylene by radiation-induced graft polymerization of acrylic acid // Radiation Physics and Chemistry.— 1986.— Vol. 28, № 2.— P. 407–413.
13. Yan W., Yang P., Wang Y. UV-radiation grafting of acrylamide onto cellulose acetate reverse osmosis membrane // Shuichuli Jishu.— 1988.— Vol. 14.— P. 213–222.
14. Uchida E., Ikada Y. Topography of Polymer Chains Grafted on a Polymer Surface // Macromolecules.— 1997.— Vol. 30.— P. 5464–5469.
15. Bendak A., El-Marsafi S. M. Effects of Chemical Modifications on Polyester Fibres // Journal of Islamic Academy of Sciences.— 1991.— P. 275–284.

*T. Murlanova, P. Vakuliuk, A. Burban*

### **CHITOSAN IMMOBILIZATION ON THE SURFACE OF TRACK-ETCHED POLY (ETHYLENE TEREPHTHALATE) MEMBRANES**

*The method for chitosan immobilization at the surface of track-etched poly(ethylene terephthalate) membranes with preliminary hydrolysis of this surface in the water solution of sodium hydroxide with the further membrane processing with chitosan. The obtained membranes have bactericidal action, which is stable in time.*