

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038202**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.22

(21) Номер заявки
201900124

(22) Дата подачи заявки
2019.03.05

(51) Int. Cl. **C08B 37/08** (2006.01)
A61K 31/722 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61L 15/28 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИТОЗАНА, РАСТВОР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, ГЕМОСТАТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

(43) 2020.09.30

(96) 2019000010 (RU) 2019.03.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ИНМЕД" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Анфёрова Марьяна Сергеевна,
Бражникова Евгения Николаевна,
Внучкин Александр Васильевич,
Забивалова Наталья Михайловна,
Кривошеин Антон Евгеньевич,
Олифер Олеся Юрьевна (RU)**

(74) Представитель:
Кашина Н.И. (RU)

(56) PUSHPIKA KATUGAMPOLA et al. Rheological behavior and thermal stability of palmitoyl chitosan varying the degree of substitution. International Journal of Pharmaceutical Science Invention. ISSN (Online): 2319-6718, ISSN (Print): 2319-670X, Volume 3 Issue 11, November 2014, pp.24-32. Найдено в www.ijpsi.org., реферат, стр.24-25, схемы 1 и 2 Стр.25-26, раздел 2.2 Palmitoyl chitosan preparation
PUSHPIKA KATUGAMPOLA et al. Rheology and Thermal Studies of Stearoyl Chitosan Varying the Degree of Substitution. IOSR Journal of Polymer and Textile Engineering. e-ISSN: 2348-019X, p-ISSN: 2348-0181, Volume 4 Issue 1, Jan.-Feb. 2017, pp.22-29. Найдено в www.iosrjournals.org., реферат, стр.22, схема 1 Стр.24, раздел 2.3 Preparation of stearoyl chitosan
US-A1-20150151005
RU-C2-2172325
JPH-A-06237769
RU-C2-2487701
RU-C1-2522216

(57) Изобретение относится к области медицины, в частности к медицинским изделиям, содержащим хитозан, а именно к способу получения модифицированного хитозана, к раствору для получения гемостатического материала, а также к гемостатическому материалу на основе модифицированного хитозана и способу получения гемостатического материала. Технический результат заключается в повышении гемостатических свойств получаемого продукта.

B1

038202

038202 B1

Изобретение относится к области медицины, в частности к медицинским изделиям, содержащим хитозан, а именно к способу получения модифицированного хитозана, а также к гемостатическому средству в виде губки на основе модифицированного хитозана и способу получения гемостатического средства.

Известно гемостатическое средство на основе модифицированного хитозана [1], которое включает гемостатический агент О,О'-дипальмитоилхитозан или его соль и одно или несколько биоадгезивных нейтральных веществ.

Недостатком приведенного технического решения является относительно низкие гемостатические свойства. Это обусловлено высокой молекулярной массой полимера, которая приводит к значительному снижению его растворимости. Также к недостаткам способа можно отнести многостадийность процесса получения О,О'-дипальмитоилхитозана, так как О-ацилирование хитозана предполагает проведение предварительной стадии "защиты аминогрупп", далее осуществляется стадия О-ацилирования, что усложняет реализацию технологического процесса.

Известен способ получения ацилированных производных хитозана [2], в ходе которого 5 г хитозана растворяют в 0,12 М водном растворе уксусной кислоты при комнатной температуре. После полного растворения хитозана доводят рН раствора до значения 7,2 медленным добавлением 0,1 н раствора NaOH при интенсивном перемешивании, в результате чего образуется суспензия полимера в воде, а объем смеси возрастает до примерно 900 мл. Реакция N-ацилирования осуществляется за счет добавления пальмитоилхлорида к доведенному дистиллированной водой до объема 1 л раствору полимера в количестве 10-20 мл для получения различных степеней замещения. После 4-6 ч реакцию массу нейтрализуют до значений рН 6,8-7,0 и осаждают ацетоном. Осадок отфильтровывают и промывают три раза на фильтре избытком горячего метанола (50-60°C). В конце продукт высушивают чистым ацетоном для обеспечения надлежащего качества порошка полимера.

Недостатком вышеприведенного способа является высокая токсичность применяемых реагентов, а именно ацетона (взрывопожароопасен), используемого для осаждения реакционной массы, а также большого количества метанола (яд) для промывки осадка и удаления побочных продуктов реакции. Кроме того, неконтролируемые значения рН в ходе реакции приводят к низкой селективности реакции, так как большая часть пальмитоилхлорида гидролизует с образованием пальмитиновой кислоты, которую полностью удалить из полимера только после промывки большим избытком горячего метанола. Синтез направлен на получение модифицированного хитозана с высокими степенями ацилирования (от 28% и выше), что ведет к потере растворимости синтезированного продукта, что, в свою очередь, необходимо для получения из него таблетированных форм с контролируемым высвобождением лекарственных средств.

Известно гемостатическое средство на основе модифицированного хитозана и способ его получения [3]. В ходе способа 2 г хитозана растворяют в 100 мл 0,2 М уксусной кислоты и перемешивают в течение 30 мин. Затем раствор фильтруют с помощью вакуумного фильтра, после чего к раствору отфильтрованного хитозана добавляют 100 мл этанола. Далее к полученному раствору медленно добавляют раствор додекальдегида в этаноле. Затем к полученному раствору добавляют 780 мг цианборгидрида натрия, растворенного в 10 мл этанола. Раствор цианборгидрида натрия в этаноле добавляют еще дважды в течение 2 ч и затем полученную смесь перемешивают в течение 24 ч и затем осаждают полученный модифицированный хитозан путем добавления по каплям 0,2 М гидроксида натрия. Гемостатическое средство содержит хитозан и заместитель, связанный с полимерной цепью хитозана через аминогруппы вдоль основной макроцепи. В качестве заместителя может быть использован альдегид или кетон.

Недостатком данного способа является его сложность и высокая токсичность побочного продукта. Это обусловлено использованием цианборгидрида натрия (токсичен и пожароопасен), при реакции с которым образуется цианид натрия, требующий тщательного удаления из готового продукта и усложняющий утилизацию сточных вод. Кроме того, в данной реакции предусмотрено добавление цианборгидрида натрия в большом избытке по отношению к хитозану (1 моль хитозана к 3 молям цианборгидрида натрия) независимо от степени замещения продукта.

Известен раствор для получения материала на основе хитозана, способ получения гемостатического материала из этого раствора (варианты) и медицинское изделие с использованием волокон на основе хитозана [4]. Описан раствор для получения материала на основе хитозана, способы получения гемостатического материала из этого раствора и медицинское изделие с использованием волокон на основе хитозана. Раствор состоит из следующих компонентов в соотношении от общего количества раствора, мас. %: сухой хитозан (со степенью деацетилирования - не менее 80%) 4-8 по сухому веществу, водный раствор полимера или смеси полимеров 1-10 по сухому веществу, водный раствор органической кислоты или смесь органических кислот (в концентрации 50-80%) - остальное. Способ получения гемостатического материала из водно-кислотного раствора, состоящего из полиэлектролитного комплекса хитозана и водорастворимого полимера, включает электрохимическую обработку раствора хитозана в электрическом поле с токопроводящей подложкой. При электроформовании получают нановолокна с диаметром 80-120 нм за счет применения вязкотекучего раствора с характеристиками: вязкость - 1,4-2,5 Па·с, поверхностное натяжение - 31-35 мН/м и электропроводность - не более 2,3 мСм/см. Способ позволяет получить

более тонкое по диаметру хитозановое волокно. Кроме того, в приведенном документе раскрыта возможность получения гемостатической губки путем лиофильной сушки, которая в общем виде включает стадии приготовления раствора с его последующим охлаждением и подогрева полученных образцов [5].

Таким образом, вышеприведенные технические решения приняты за прототипы заявляемого способа модификации хитозана, раствора для получения гемостатического материала, способа получения гемостатического материала и гемостатического материала.

Недостатками прототипа являются относительно низкие гемостатические свойства полученного гемостатического материала. Это обусловлено использованием в качестве основного действующего вещества нативного хитозана, который обладает относительно низкими гемостатическими свойствами относительно модифицированных форм.

Техническая проблема заключалась в необходимости разработки технологии получения гемостатического материала с повышенными гемостатическими свойствами целевого продукта и низкой токсичностью побочных продуктов.

Технический результат заключается в повышении гемостатических свойств получаемого продукта.

Технический результат достигается тем, что в способе получения модифицированного хитозана, в ходе которого к водному раствору хитозана добавляют уксусную кислоту, затем проводят осаждение хитозана раствором гидроксида натрия, после чего добавляют модифицирующий агент и осуществляют перемешивание реакционной массы, далее выполняют промывку реакционной массы водным раствором органического спирта и высушивают полученный осадок, согласно изобретению проводят высаживание раствором гидроксида натрия до получения значения pH образующейся суспензии 7,5-8,0, после чего добавляют ацилирующий агент и перемешивают реакционную смесь до окончания реакции и заканчивают реакцию при значениях pH 10,0-12,0, а в качестве ацилирующего агента используют хлорангидрид, включающий 10-18 атомов углерода, при этом используют хитозан с молекулярной массой 120-150 кДа.

Технический результат также достигается тем, что раствор для получения гемостатического материала, содержащий хитозан и растворитель, включающий смесь уксусной кислоты и воды, согласно изобретению содержит вышеприведенный модифицированный хитозан с молекулярной массой 120-150 кДа, который после модификации обладает степенью ацилирования от 2,5 до 7,5% и включает заместитель, связанный с полимерной цепью через аминогруппы вдоль основной макроцепи, который содержит углеводородный радикал жирной кислоты, включающий 10-18 атомов углерода, при следующем соотношении компонентов, мас. %:

модифицированный хитозан	0,5 – 3,5
уксусная кислота	0,5 – 3,0
вода	остальное

при этом раствор имеет удельную электропроводность (κ) от 1,5 до 2,8 мСм/см и динамическую вязкость при нулевом сдвиге (η) от 0,030 до 0,150 Па·с.

Технический результат также достигается тем, что в способе получения гемостатического материала, в ходе которого готовят раствор путем растворения модифицированного хитозана в растворителе, затем охлаждают раствор в кюветах и далее подогревают полученные образцы, согласно изобретению используют вышеприведенный раствор, который имеет удельную электропроводность (κ) от 1,5 до 2,8 мСм/см, динамическую вязкость при нулевом сдвиге (η) от 0,030 до 0,150 Па·с и pH от 3 до 5, который охлаждают при температуре (-45) - (-60)°С и давлении до 0,5 мБар, подогрев проводят до достижения образцами в кюветах температуры 20-30°С, кроме того, в растворе используют хитозан с молекулярной массой 120-150 кДа, который после модификации обладает степенью ацилирования от 2,5 до 7,5% и включает заместитель, связанный с полимерной цепью через аминогруппы вдоль основной макроцепи, где заместитель содержит углеводородный радикал жирной кислоты, включающий 10-18 атомов углерода.

Технический результат также достигается тем, что гемостатический материал, включающий модифицированный хитозан и выполненный в виде пористой губки, согласно изобретению получен вышеприведенным способом, при этом модифицированный хитозан обладает степенью ацилирования от 2,5 до 7,5% и содержит углеводородный радикал жирной кислоты, включающий 10-18 атомов углерода, связанный с полимерной цепью через аминогруппы вдоль основной макроцепи, при этом гемостатический материал обладает следующими свойствами: pH водной вытяжки - 5,0-6,5, пористость - 92-97%.

Согласно настоящему изобретению способ получения модифицированного хитозана, включает приготовление 1-3 мас.% раствора хитозана с молекулярной массой 120-150 кДа в 1-2 мас.% водном растворе уксусной кислоты с последующим высаживанием 0,1-0,5 н раствором гидроксида натрия и доведением значения pH образующейся суспензии до значения 7,5-8,0 на первой стадии процесса, смешение полученной на первой стадии суспензии хитозана с хлорангидридом жирной кислоты (количество молей хлорангидрида жирной кислоты варьируется в зависимости от необходимой степени ацилирования) и выдерживание реакционной массы в течение 2 ч при интенсивном перемешивании, доведение значения pH до 10-12, фильтрование полученного осадка, промывку водным раствором этанола, или н-пропанола, или изопропанола, или бутанола, или 2-бутанола, или изобутанола, или третичного бутилового спирта и

последующим фильтрованием на третьей стадии. Затем полимер высушивают под остаточным давлением до 10 мБар при температуре от 50 до 55°C в течение 10-16 ч. На основе полученного таким образом модифицированного хитозана со степенью ацилирования Сац от 2,0 до 10,0% могут быть изготовлены: губка, нетканый материал и другие формы гемостатических средств.

Стоит отметить, что при осуществлении способа получения модифицированного хитозана поддержание значения pH реакционной смеси во время реакции 7,5-8,0 позволяет снизить гидролиз хлорангирида и повысить селективность реакции с повышением выхода и однородности целевого продукта. Доведение pH реакционной смеси по окончании реакции до значений 10,0-12,0 способствует проведению полного осаждения полимера. Использование в качестве ацилирующего агента хлорангирида, включающего 10-18 атомов углерода, позволяет повысить гемостатическую эффективность получаемого изделия. Так, использование в качестве заместителя углеводородного радикала жирной кислоты, включающего 10-18 атомов углерода, обусловлено высокими гидрофобными свойствами данного радикала и его сродством к мембранам клеток крови, что положительно влияет на эффективность гемостатического средства. Радикалы, включающие менее 10 атомов углерода, обладают низкой гидрофобностью и не способны внедряться в клеточные мембраны, что значительно снижает эффективность гемостатического средства [6, 7, 8]. При использовании радикала, включающего более 18 атомов углерода, резко снижается растворимость ацилированного хитозана и растет вязкость его растворов, что не позволяет получить гемостатическое средство.

Для получения гемостатического материала на основе модифицированного хитозана в виде пористой губки готовят раствор, который содержит модифицированный хитозан, органическую кислоту, воду и наночастицы. Для получения оптимального количественного состава раствора были приготовлены 5 растворов с различным содержанием основных компонентов и измерены их физико-химические свойства.

Таблица 1. Исследование влияния содержания компонентов раствора на физико-химические свойства раствора.

№ п/п	Модифицированный хитозан	Органическая кислота	Вода	Наночастицы	Динамическая вязкость, η_0	Удельная электропроводность, κ	Внешний вид губки
	мас. %	мас. %	мас. %	мас. %	Па·с	мСм/см	
1	0,25	1,25	98,5	10^{-3}	0,02	1,4	хрупкая
2	0,50	1,0	98,5	10^{-3}	0,03	1,5	эластичная
3	2,00	1,0	97,0	10^{-3}	0,09	1,8	эластичная
4	3,50	1,0	95,15	0,35	0,14	1,95	эластичная
5	4,00	1,0	94,6	0,4	0,25	1,98	жесткая, хрупкая

Результаты измерений показывают, что растворы под № 1 и 5 не пригодны для дальнейшего получения эффективного гемостатического материала в виде губки, так как при определенных физико-химических параметрах раствора, которые лежат вне перечисленных диапазонов состава растворов, губки теряют эластичность и становятся жесткими и хрупкими, что приводит к нарушению целостности губки (из-за недостаточной концентрации полимера или высокой вязкости раствора). При этом использование растворов под № 2, 3 и 4 обеспечивает получение гемостатического материала в виде эластичной пористой губки, что доказывают результаты измерений: динамической вязкости, удельной электропроводности, визуальной оценки губки.

При этом в способе получения гемостатического материала путем лиофильной сушки используется раствор, удельная электропроводность (κ) которого составляет 1,5-2,8 мСм/см при нулевой динамической вязкости (η) в диапазоне 0,030-0,150 Па·с.

В ходе способа получения гемостатического материала в виде пористой губки вышеприведенный раствор (удельная электропроводность (κ) 1,5-2,8 мСм/см, нулевая динамическая вязкость (η) 0,030-0,150 Па·с) готовили путем диспергирования полученного модифицированного хитозана в дистиллированной воде при перемешивании с последующим добавлением органической кислоты. Полученный раствор разливали в кюветы, которые далее загружали в сушильную камеру лиофилизатора для охлаждения раствора до (-45) - (-60)°C при давлении до 0,5 мБар. После этого растворы выдерживают около 24 ч. Затем подогревают полученные образцы в кюветах до 20-30°C.

Охлаждение раствора в кюветах до температуры (-45) - (-60)°C и давлении до 0,5 мБар, а также подогрев полученных образцов в кюветах до 20-30°C обеспечивает получение гемостатической губки с пористостью 92-97% и остаточным количеством воды 18-24%. В случае выхода за перечисленные температурные диапазоны гемостатический материал в виде пористой губки получается хрупким и непригодным для использования.

Полученный вышеприведенным способом гемостатический материал в виде пористой губки обладает следующими свойствами: pH водной вытяжки 5,0-6,5, пористость 92-97%. Значение pH водной вытяжки в диапазоне 5,0-6,5 является важным для получения эффективного гемостатического средства, так как обуславливает отсутствие раздражающего действия на рану и кожный покров вокруг раны.

Для доклинического исследования эффективности заявляемого гемостатического материала (вари-

анты) выбраны полимеры с различной молекулярной массой (от 120 до 150 кДа) и степенью N-ацилирования (0-7,5%), полученные с помощью заявляемого способа (способ получения модифицированного хитозана). Исследование выполнено при использовании образцов следующего состава: хитозан с молекулярной массой от 30 до 150 кДа; модифицированный хитозан с молекулярной массой от 120 до 150 кДа и степенью ацилирования от 2,0 до 7,5%, полученный с помощью заявляемого способа.

Методом сублимации раствора полимера (хитозана) были изготовлены гемостатические средства в виде губок (образцы № 1-4). При этом образец № 1 в виде губки был изготовлен из немодифицированного хитозана, а остальные, соответственно, из N-ацилированного.

В качестве образца сравнения было взято гемостатическое средство "Тахокомб" (Такеда Австрия ГмбХ, Австрия).

Полный перечень экспериментальных групп приведен в табл. 2.

Таблица 2. Перечень экспериментальных групп для сравнительного изучения гемостатической активности на кроликах при паренхиматозном кровотечении

№ п/п	Название образца	Вариант исполнения	Состав образца
1	Образец №1	Губка	Хитозан, Сац=0%
2	Образец №2	Губка	N-ацилированный хитозан, Сац=2,5%
3	Образец №3	Губка	N-ацилированный хитозан, Сац=5,0%
4	Образец №4	Губка	N-ацилированный хитозан, Сац=7,5%
5	Тахокомб	Губка	Коллаген, фибриноген, тромбин
6	Медицинская марля	Тканый материал	Целлюлоза

Выполнение доклинического исследования осуществляли в соответствии с российским Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [9]. Исследование выполнялось на самцах кролика (вес 3,5-4 кг на момент операции). Для каждого образца изделия количество животных (кроликов) в группе составляет 6 особей (всего 78 особей). У наркотизированных тиопенталом натрия животных выполняли срединную лапаротомию для обеспечения доступа к печени. К печени плотно прижимали специальное приспособление - стальная ограничитель с круглым отверстием в центре, диаметром 13 мм, производили резекцию выступившей части печени хирургическими ножницами. Срезанный сегмент в вертикальной проекции имел вид круга или эллипса, его размеры и форма должны быть постоянны (площадь около 1,5 см², глубина около 0,3 см). Остановку развившегося капиллярно-паренхиматозного кровотечения выполняли путем нанесения на рану образца гемостатического изделия (линейные размеры не менее 2×2 см). Время остановки кровотечения определяли по секундомеру. На второй доле печени так же производили резекцию, остановку кровотечения проводили марлевым тампоном. В конце эксперимента измеряли массу излившейся крови (кровопотерю). Метод определения кровопотери основан на определении веса истеченной крови при экспериментальном моделировании кровоточащей раны. Полученные в результате исследования времени остановки кровотечения и объема кровопотери для различных гемостатических изделий приведены в табл. 3.

Таблица 3 - Время кровотечения и объем кровопотери при паренхиматозном печеночном кровотечении у кроликов.

№ группы	Название образца/группы	Время остановки кровотечения (образец), с	Объем кровопотери (образец), мл	Время остановки кровотечения (марля), с	Объем кровопотери (марля), мл
1 (n=6)	Образец № 1	112,0±30,8	1,30±0,66	207,0±30,2	2,97±0,61
2 (n=6)	Образец № 2	146,2±49,2	1,14±0,70 [!]	215,3±45,0	2,97±0,99
3 (n=6)	Образец №3	112,2±21,4	0,82±0,33 [!]	181,7±39,5	3,11±1,36
4 (n=6)	Образец №4	75,3±9,0 ^{**}	0,31±0,12 ^{*-!}	129,7±14,8	2,33±0,55
5 (n=6)	Тахокомб	164,7±21,8	1,21±0,45 [!]	196,7±25,6	2,34±0,47
6 (n=6)	Свободное кровотечение	167,8±43,1	3,90±0,93	141,0±22,1	3,23±0,81

Примечание

* - Достоверные отличия от группы "Марля" (p<0,05);

** - Достоверные отличия от группы "Тахокомб" (p<0,05);

! - Достоверные отличия от группы СК (p<0,05).

При оценке гемостатической активности образцов установлено, что все материалы обладают хорошей адгезионной способностью, а образцы № 1-4 дополнительно обладают высокой гигроскопичностью. При оценке объема кровопотери отмечено, что образцы 1-4 значительно уменьшали объем кровопотери в сравнении с объемом спонтанно останавливающегося кровотечения - группа № 6 (далее - СК). Так, объем кровопотери при использовании образцов № 1-4 составил 0,31±0,12 - 1,30±0,66 мл, что соответствовало 8-33% и статистически значимо отличалось от величины СК (3,90±0,93 мл).

Препарат сравнения "Тахокомб" был сопоставим по интенсивности кровотечения (1,21±0,45 мл) с

образцами гемостатического материала и статистически значимо отличался от СК. Сравнительный анализ показал, что объем кровопотери для образцов был наименьшим у образца № 4 - $0,31 \pm 0,12$ мл и статистически значимо отличался на 87% от объема кровопотери при наложении марли и на 92% от СК. Время кровотечения при использовании в качестве гемостатического материала образцов № 1-4 было сопоставимо с препаратом сравнения "Тахокомб" ($75,3 \pm 9,0$ - $188,0 \pm 44,3$ и $164,7 \pm 21,8$ с соответственно). У образца № 4 минимальное время контакта ($75,3 \pm 9,0$ с) было статистически достоверно ниже на 55% чем у "Тахокомба" и СК ($p < 0,05$).

Таким образом, проведенные исследования показали, что исследуемые образцы № 1-4 обладают выраженной гемостатической активностью, значительно уменьшая время кровотечения и объем кровопотери при моделировании раны паренхиматозного органа. Гемостатическая активность исследуемых образцов изделий местных гемостатических материалов сопоставима с образцом сравнения "Тахокомб". Сравнительная оценка гемостатической активности показала, что образец № 4 (вариант исполнения в виде губки, Сац 7,5%) обладающий наибольшей степенью ацилирования среди образцов № 1-4 наиболее эффективен по всем исследованным показателям.

Заявляемое изобретение поясняется примерами.

Пример 1.

10 г хитозана (молекулярная масса 120-150 кДа) диспергировали в 992 мл дистиллированной воды при перемешивании верхнеприводной мешалкой (500-600 об/мин). К полученной суспензии добавляли 9,5 мл ледяной уксусной кислоты и оставляли перемешиваться в течение 2 ч до полного растворения хитозана. К полученному раствору по каплям приливали 600 мл 0,2 н раствора NaOH в течение 30 мин. Затем доводили pH получившейся суспензии хитозана до значения 7,9, приливая 0,2 н раствор NaOH. Далее добавляли в реакционную массу 0,92 г пальмитилхлорида ($C_{16}H_{31}OCl$), растворенного в 10 мл хлористого метилена.

Значение pH реакционной массы поддерживали в интервале 7,5-8,0, периодически прикапывая 0,2 н раствора NaOH.

Через два часа реакция была закончена. Значение pH реакционной массы доводили до 10 для полного высаживания хитозана. Полученный полимер отфильтровывали на бумажном фильтре, промывая дистиллированной водой до нейтрального значения pH. Затем промывали полимер раствором этанола для удаления остатков жирных кислот.

Полученный таким образом модифицированный хитозан высушивали под остаточным давлением 4 мБар, при температуре $50^{\circ}C$ в течение 12 ч. Степень замещения составляла 2,5%.

Пример 2.

Навеску 2,17 г хитозана (молекулярная масса 120-150 кДа) растворяли при перемешивании в 0,1 М растворе уксусной кислоты в течение часа при перемешивании. Далее по каплям добавляли 120 мл 0,2 н раствора NaOH. Затем доводили pH получившейся суспензии до значения 8,0. Добавляли в реакционную массу 0,142 г миристилхлорида ($C_{14}H_{27}ClO$), растворенного в 15 мл хлористого метилена. Значение pH реакционной массы поддерживали в интервале 7,5-8,0 периодически прикапывая 0,2 н раствора NaOH.

Через 2 ч реакция была закончена. Значение pH реакционной массы доводили до 11 для полного высаживания хитозана. Полимер промывали несколько раз растворами этанола объемом 100 мл каждый для удаления остатков жирных кислот. Полученный осадок модифицированного хитозана высушивали в шкафу при температуре $55^{\circ}C$, давление 5 мБар в течение 16 ч. Степень замещения составляла 5,0%.

Пример 3.

10 грамм порошкообразного хитозана, модифицированного по примеру 1 диспергировали в 939 мл дистиллированной воды при перемешивании верхнеприводной мешалкой (500-600 об/мин). Снижали обороты мешалки до 200-300 об/мин, к полученной суспензии приливали 9,4 мл химически чистой ледяной уксусной кислоты и оставляли перемешиваться в течение 2 ч до полного растворения хитозана.

Получен раствор со следующим содержанием компонентов, мас. %:

Модифицированный хитозан	1,04
Органическая кислота	1,0
Вода	остальное

Раствор разливали в кюветы. Кюветы загружали в сушильную камеру лиофилизатора, предварительно охлажденную до $-55^{\circ}C$. Процесс вели в течение 24 ч до достижения лиофилизируемыми образцами температуры $20^{\circ}C$.

Полученные таким образом гемостатические губки имели следующие характеристики: Сац - 2,5%, пористость - 95%, влажность - 18%, pH водной вытяжки - 5,4.

Пример 4.

10 грамм порошкообразного хитозана, модифицированного по примеру 2 диспергировали в 990,6 мл дистиллированной воды при перемешивании верхнеприводной мешалкой (500-600 об/мин). Снижали обороты мешалки до 200-300 об/мин, к полученной суспензии приливали 9,4 мл химически чистой ледяной уксусной кислоты и оставляли перемешиваться в течение 2 ч до полного растворения хитозана.

Получен раствор со следующим содержанием компонентов, мас. %:

Модифицированный хитозан	0,98
Органическая кислота	0,93
Вода	остальное

Раствор разливали в кюветы. Кюветы загружали в сушильную камеру лиофилизатора предварительно охлажденную до -60°C . Процесс вели в течение 24 ч до достижения лиофилизируемыми образцами температуры 20°C .

Полученные таким образом гемостатические губки имели следующие характеристики: Сац - 5,0%, пористость - 97%, влажность - 16%, рН водной вытяжки - 5,2.

Пример 5.

10 грамм порошкообразного хитозана, модифицированного по примеру 1 диспергировали в 939 мл дистиллированной воды при перемешивании верхнеприводной мешалкой (500-600 об/мин). Снижали обороты мешалки до 200-300 об/мин, к полученной суспензии приливали 9,4 мл химически чистой ледяной уксусной кислоты и оставляли перемешиваться в течение 2 ч до полного растворения хитозана.

В раствор хитозана при перемешивании (500-600 об/мин) одновременно вводили 50 мл 2 мас.% раствора наночастиц хитина (нановискеров). Полученный раствор оставляли перемешиваться в течение 30 мин.

Получен раствор со следующим содержанием компонентов, мас. %:

Модифицированный хитозан	0,99
Органическая кислота	0,93
Наночастицы	0,1
Вода	остальное

Раствор разливали в кюветы, которые загружали в сушильную камеру лиофилизатора, предварительно охлажденную до -60°C . Процесс вели в течение 26 ч до достижения лиофилизируемыми образцами температуры 30°C .

Полученные таким образом гемостатические губки имели следующие характеристики: Сац - 2,5, пористость - 92%, влажность - 18%, рН водной вытяжки - 5,2.

Список источников.

1. Гемостатический материал, гемостатическое средство и перевязочный материал на его основе: патент № 2635465, Российская Федерация, заявка № RU2016133016, заявл. 10.08.2016, опубл. 13.11.2017.
2. Canh Le Tien N-acylated chitosan[^] hydrophobic matrices for controlled drug release / Canh Le Tien et al // Journal of Controlled Release. – 2003. – 93. – PP 81-93.
3. Многофункциональная биосовместимая полимерная матрица, используемая в качестве кровоостанавливающего средства и системы для поврежденных тканей и клеток: патент № 8932560, Соединенные Штаты Америки, заявка № US20090062849, заявл. 04.09.2007, опубл. 05.03.2009.

4. Раствор для получения материала на основе хитозана, способ получения гемостатического материала из этого раствора (варианты) и медицинское изделие с использованием волокон на основе хитозана: патент 2487701, Российская Федерация: заявка № RU2011131959, заявл. 26.07.2011, опубл. 20.07.2013.

5. Способ лиофильной сушки биопрепарата: патент 2111426, Российская Федерация: заявка № RU 95118775, заявл. 03.11.1995, опубл. 20.05.1998.

6. A self-assembling hydrophobically modified chitosan capable of reversible hemostatic action / Matthew B. Dowling, Rakesh Kumar, Mark A. Keibler [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – P. 3351-3357;

7. Hydrophobically-modified chitosan foam: description and hemostatic efficacy / Matthew B. Dowling, William Smith, Peter Balogh [et al.] // *Journal of surgical research*. – 2015. – Vol. 193. – P. 316-323.

8. Determination of efficacy of novel modified chitosan sponge dressing in a lethal arterial injury model in swine / Gerard P. De Castro, Matthew B. Dowling, Michael Kilbourne [et al.] // *J Trauma*. – 2011. – Vol. 72. – P. 899-907;

9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения модифицированного хитозана, в ходе которого к водному раствору хитозана добавляют уксусную кислоту, затем проводят осаждение хитозана раствором гидроксида натрия, после чего добавляют модифицирующий агент и осуществляют перемешивание реакционной массы, далее выполняют промывку реакционной массы водным раствором органического спирта и высушивают полученный осадок, отличающийся тем, что проводят высаживание раствором гидроксида натрия до получения значения pH образующейся суспензии 7,5-8,0, после чего добавляют ацилирующий агент и перемешивают реакционную смесь до окончания реакции и заканчивают реакцию при значениях pH 10,0-12,0, а в качестве ацилирующего агента используют хлорангидрид, включающий 10-18 атомов углерода, при этом используют хитозан с молекулярной массой 120-150 кДа, а полученный модифицированный хитозан обладает степенью ацилирования от 2,5 до 7,5%.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что полученный осадок высушивают при температуре 50-55°C.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что полученный осадок высушивают при давлении не выше 10 мБар.

4. Раствор для получения гемостатического материала, содержащий хитозан и растворитель, включающий смесь уксусной кислоты и воды, отличающийся тем, что содержит модифицированный хитозан, полученный способом по п.1 с использованием хитозана с молекулярной массой 120-150 кДа, который после модификации обладает степенью ацилирования от 2,5 до 7,5% и включает заместитель, связанный с полимерной цепью через аминокгруппы вдоль основной макроцепи, который содержит углеводородный радикал жирной кислоты, включающий 10-18 атомов углерода, при следующем соотношении компонентов, мас. %:

модифицированный хитозан - 0,5-3,5;

уксусная кислота - 0,5-3,0;

вода - остальное,

при этом раствор имеет удельную электропроводность (σ) от 1,5 до 2,8 мСм/см и динамическую вязкость при нулевом сдвиге (η) от 0,030 до 0,150 Па·с.

5. Раствор по п.4, отличающийся тем, что дополнительно содержит наночастицы хитина.

6. Способ получения гемостатического материала, в ходе которого готовят раствор путем растворения модифицированного хитозана в растворителе, затем охлаждают раствор в кюветах и далее подогревают полученные образцы, отличающийся тем, что используют раствор по п.4, который имеет удельную электропроводность (σ) от 1,5 до 2,8 мСм/см, динамическую вязкость при нулевом сдвиге (η) от 0,030 до 0,150 Па·с и pH от 3 до 5, который охлаждают при температуре (-45) - (-60)°C и давлении до 0,5 мБар, подогрев проводят до достижения образцами в кюветах температуры 20-30°C, кроме того, в растворе используют хитозан с молекулярной массой 120-150 кДа, который после модификации обладает степенью ацилирования от 2,5 до 7,5% и включает заместитель, связанный с полимерной цепью через амино-

группы вдоль основной макроцепи, где заместитель содержит углеводородный радикал жирной кислоты, включающий 10-18 атомов углерода.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что полученные образцы представляют собой гемостатический материал в виде пористой губки.

8. Гемостатический материал, включающий модифицированный хитозан и выполненный в виде пористой губки, отличающийся тем, что получен способом по п.7, при этом модифицированный хитозан обладает степенью ацилирования от 2,5 до 7,5% и содержит углеводородный радикал жирной кислоты, включающий 10-18 атомов углерода, связанный с полимерной цепью через аминогруппы вдоль основной макроцепи, при этом гемостатический материал обладает следующими свойствами: рН водной вытяжки 5,0-6,5, пористость 92-97%.

