

УДК 541.64:547.995.1

ИЗУЧЕНИЕ ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА ХИТОЗАНА, ПОЛУЧЕННОГО ТВЕРДОФАЗНЫМ И СУСПЕНЗИОННЫМ МЕТОДАМИ¹

© 1996 г. Г. А. Вихорева*, С. З. Роговина**, Т. А. Акопова***,
С. Н. Зеленецкий***, Л. С. Гальбрайх*

* Московская государственная текстильная академия им. А.Н. Косыгина
117918 Москва, ул. М. Калужская, 1

** Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук
117977 Москва, ул. Косыгина, 4

*** Институт синтетических полимерных материалов Российской академии наук
117393 Москва, ул. Профсоюзная, 70

Поступила в редакцию 27.02.96 г.

Изучен фракционный состав образцов хитозана, полученных супензионным методом и твердофазным дезацетилированием хитина в условиях совместного воздействия высокого давления и сдвиговых деформаций. Анализ хитозана, полученного твердофазным способом, показал, что после отделения низко дезацетилированной и не растворимой в 2%-ной уксусной кислоте фракции продукта, выход которой составляет 5–15%, образуется хитозан со степенью дезацетилирования 0.8. Отличительной особенностью хитозана, полученного твердофазным дезацетилированием, по сравнению с хитозаном, полученным супензионным методом, является низкая ММ (до 10^5) и узкое ММР.

Ранее нами было показано, что в условиях сдвиговых деформаций в твердой фазе происходит дезацетилирование хитина с образованием хитозана [1]. Твердофазный способ получения хитозана, осуществляемый в двухшнековых экструдерах, характеризуется по сравнению с традиционным методом большей экономичностью и экологической чистотой, так как предполагает использование меньшего количества едкого натра и практически отсутствие жидкой среды, т.е. уменьшение объема сточных щелочных вод. Таким способом удается получать препараты высоко дезацетилированного хитозана со степенью дезацетилирования (СД) до 0.9, практически полностью растворимые в разбавленных кислотах и отличающиеся от хитозана, получаемого по традиционной технологии, значительно более низкой ММ (до 10^5). Пониженная ММ получаемого хитозана в ряде случаев практического использования, в частности в медицине, предпочтительна, поскольку обеспечивает лучшую всасываемость лекарственных препаратов на основе хитозана и облегчает процесс их метаболизма и выведения из организма. Вместе с тем фракционный состав, т.е. физическая и химическая неоднородность хитозана, является важной характеристикой, определяющей токсичность и, возможно, биологическую активность полимерных лекарственных

препаратов. Особенно важно знание этой характеристики для препаратов хитозана и его производных, получаемых в твердофазных условиях, априори предполагающих повышенную неоднородность продуктов. Цель настоящей работы – сравнительное изучение фракционного состава образцов хитозана, полученных твердофазным и обычным супензионным способами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали хитин криля (ГУ-6-09-05-141-79, "Севрыба", Мурманск), NaOH, CH₃COOH, CH₃COONa и изопропанол квалификации х. ч.

Получение хитозана твердофазным способом проводили в двухшнековом экструдере. Хитин, орошенный 40%-ным раствором NaOH, порциями подавали в экструдер, на выходе которого получали смесь хитозана, непрореагировавшей щелочи и CH₃COONa.

Супензионным способом хитозан получали в колбе в токе аргона при перемешивании супензии хитина в 50%-ном растворе NaOH [2]. Мольное соотношение компонентов реакционной смеси, температура и продолжительность реакции дезацетилирования приведены в табл. 1.

Из реакционной массы продукт выделяли путем промывок его водой от CH₃COONa и избытка NaOH, контролируя pH промывных вод. При 10-кратном массовом избытке воды и продолжи-

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 94-03-09542).

Таблица 1. Условия получения и характеристики образцов хитозана

Образец	Способ получения	Мольное соотношение хитозан : NaOH : H ₂ O	T, °C	Продолжительность реакции, ч	Растворимость*, %	СД фракции		[η], дL/g
						растворимой	неравстворимой	
1	Суспензионный	1 : 20 : 43	150	2.0	98	0.82	0.18	7.0
2	Твердофазный**	1 : 5.0 : 11	180	0.1	96	0.81	0.25	1.2
3	Твердофазный	1 : 4.3 : 13	150	0.1	86	0.78	0.22	1.2

* Растворимость в 2%-ной уксусной кислоте.

** Присутствие в реакционной смеси H_2O в количестве 10–13 моль на 1 моль хитина (~1 г/г) практически не изменяет твердофазного состояния системы.

Таблица 2. Характеристики фракций образцов 1 и 2, полученных при фракционировании в системе 0.1 М HCl—изопропиловый спирт

$\frac{V_{oc}^*}{V_p}$	Выход фракции, %	СД	[η], дл/г	$M \times 10^{-3}$
Образец 1				
0	—	0.82	7.0	343
0.5	20	0.82	8.0	402
0.8	55	0.81	7.5	372
1.0	3.0	0.82	6.6	320
1.5	2.0	0.81	6.2	297.5
2.0	5.0	0.83	5.5	258
2.5	8.0	0.83	5.2	242
3.0	4.0	0.82	4.6	209
Образец 2				
0	—	0.81	1.2	43.1
0.8	4.0	0.80	1.8	69.4
1.0	8.0	0.79	1.6	60.5
1.4	12.0	0.82	1.4	51.7
1.6	20.0	0.80	1.2	43.1
2.0	35.0	0.83	1.1	39.0
3.0	10.0	0.82	0.9	30.7

* Соотношение объемов осадителя и раствора.

тельности каждой промывки 0.5 ч число их равнялось 10 и 30 при твердофазном и суспензионных способах дезацетилирования соответственно. Отделение промывных вод осуществляли центрифугированием смеси при $(5-7) \times 10^3$ об/мин в течение 20 мин. Полученная в результате водная нейтральная суспензия хитозана содержала $9.2 \pm 0.5\%$ сухого вещества (определенено высушиванием при 105°C до постоянной массы).

Приготовление раствора для фракционирования проводили подкислением аликвоты суспензии (15 г) 1 M раствором HCl до pH 3.6 и доведением водой до объема 100 мл при перемешивании. Нерастворимую фракцию полимера отделяли центрифугированием, высушиванием ее до по-

стойкой массы определяли выход и рассчитывали концентрацию хитозана в растворе.

Фракционирование хитозана дробным осаждением изопропанолом проводили в соответствии с работой [3]. После добавления порции изопропанола осажденную фракцию отделяли центрифугированием, промывали смесью изопропанол-воды и сушили. Массовые потери хитозана не превышали 10% (табл. 2).

Для фракционирования хитозана изменением pH раствор постепенно нейтрализовали добавлением NaOH (0.5 моль/л), отделяя осажденную фракцию, как описано выше.

Степень дезацетилирования исходного хитозана и выделенных фракций рассчитывали из соотношения содержания аминного азота $[N]_{\text{ам}}$ и общего $[N]_{\text{общ}}$. Содержание $[N]_{\text{ам}}$ определяли методом потенциометрического титрования на автоматическом титраторе RTS 822 (фирма "Radiometer", Дания) солянокислого раствора полимера раствором NaOH. Типичная кривая титрования приведена на рис. 1, где обозначены величины pH, соответствующие началу ($\alpha = 1$) и окончанию ($\alpha = 0$) титрования групп $-\text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$ хитозана.

Расчет $[N]_{\text{ам}}$ проводили по формуле

$$[N]_{\text{ам}} = \frac{V[\text{NaOH}] \times 14}{q} \times 100\%,$$

где V – объем раствора NaOH, пошедшего на титрование групп $-\text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$, мл; $[\text{NaOH}]$ – концентрация титранта, моль/л; q – навеска хитозана, г.

Содержание $[N]_{\text{общ}}$ определяли на автоматическом анализаторе EA 1108 (фирма "Carlo Erba", Италия).

ММ хитозана рассчитывали по формуле [4]

$$[\eta] = 1.38 \times 10^{-4} M^{0.85}$$

Характеристическую вязкость $[\eta]$ определяли в вискозиметре Уббелоде ($d = 0.34$ мм) в смешанном растворителе 0.33 М CH_3COOH + 0.2М CH_3COONa при 25°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе были исследованы три образца хитозана: 1, полученный традиционным супензионным способом [2] и два образца хитозана (2 и 3), полученные экструзионным способом в условиях твердофазного дезацетилирования хитина. Условия получения и некоторые характеристики образцов хитозана приведены в табл. 1.

Как видно, образец 2, полученный твердофазным способом, практически не отличается от образца 1, полученного традиционным супензионным способом дезацетилирования, по таким важным показателям как растворимость и степень дезацетилирования. Значение СД ~ 0.8 является достаточно высоким, хотя, безусловно, в литературе описаны и образцы со степенью дезацетилирования 0.99, полученные, например, многократным щелочным дезацетилированием, в том числе в растворе, и необходимые для специальных целей [5].

На рис. 2 представлены результаты исследования зависимости степени ионизации аминогрупп и вязкости солянокислых растворов образцов 1 и 2 от величины pH. Зависимости степени ионизации α от pH раствора (кривые 1 и 2) имеют абсолютно идентичный характер для обоих образцов. Из рассмотрения кривых изменения вязкости (кри-

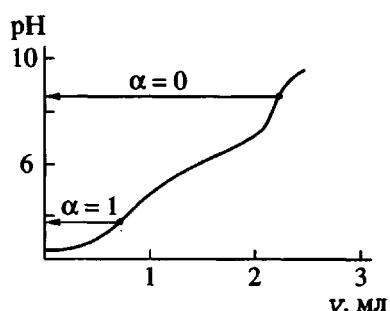


Рис. 1. Кривая титрования 0.05%-ного раствора образца 2 (5.5 мл) в HCl.

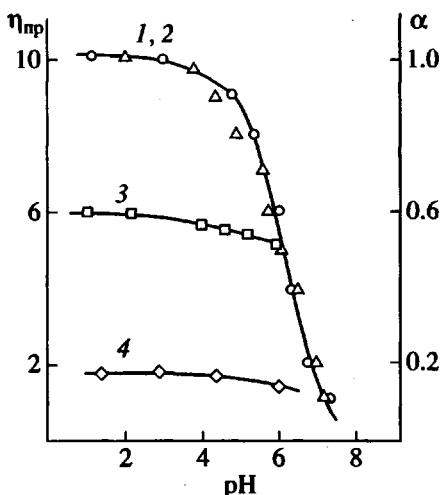


Рис. 2. Зависимость от pH степени ионизации (1, 2) и вязкости (3, 4) 0.05%-ных растворов образцов 1 (1, 3) и 2 (2, 4) в 0.1 M HCl.

вые 3 и 4) видно, что выпадение полимера в осадок в указанных образцах также происходит при одном и том же значении pH: при концентрации хитозана 0.05% и ионной силе ~0.1 моль/л этот показатель равен 6.1 ± 0.2 , что соответствует величине $\alpha = 0.5$. Вязкость растворов образца 2 значительно ниже, чем растворов образца 1, однако характер зависимости $[\eta]$ от pH у обоих образцов одинаков: в интервале pH 1–6 при изменении α от 1 до 0.5 падение вязкости растворов не превышает 10%, что обусловлено, очевидно, относительно высокой жесткостью макромолекул этого полимера [4, 6].

Фракционирование хитозана проводили методом дробного осаждения. При этом предполагали, что осаждение фракций добавлением органического осадителя позволит выделить фракции, различающиеся главным образом по ММ, а осаждение полимера путем изменения pH раствора позволит разделить продукт на фракции с различной СД. Позднее предположение основывалось на том, что фракции с меньшей степенью дезацетилирования и соответственно меньшей

Таблица 3. Характеристики фракций образца 3, выделенных изменением pH уксуснокислого раствора хитозана

Фракция, №	pH	Выход фракции, %	СД	$[\eta]$, дL/г	$M \times 10^{-4}$
1	6.3	16	0.69	1.3	4.7
2	6.7	28	0.75	1.25	4.5
3	7.0	38	0.82	1.2	4.3
4	7.5	15	0.80	1.21	4.3
5	8.5	3	0.88	1.3	4.7
Исходный		100	0.78	1.20	4.3

плотностью зарядов на макроионах должны характеризоваться и меньшей растворимостью при данной величине pH.

В табл. 2 и 3 приведены характеристики полученных фракций образцов 1–3, а на рис. 3 – кривые ММР этих образцов.

Как видно из табл. 2, различие в значениях СД выделенных фракций образцов 1 и 2 невелико и соизмеримо с погрешностью определения СД, поэтому можно считать, что проведенное фракционирование позволило выделить фракции, отличающиеся по ММ, и, следовательно, оценить ММР препаратов 1 и 2. Принципиальное их отличие заключается в том, что образец 1, полученный суспензионным способом, характеризуется бимодальным ММР, а образец 2, полученный твердофазным дезацетилированием – унимодальным (рис. 3). По-видимому, механодеструкция полимеров в условиях совместного давления и сдвиговых деформаций при переходе полимера в состояние пластического течения носит менее избирательный характер, что приводит к получению низкомолекулярного продукта с более узким ММР.

В табл. 3 приведены характеристики фракций образца 3, выделенные путем изменения pH раствора хитозана. Данные таблицы свидетельствуют о том, что выделенные в результате изменения pH раствора фракции хитозана существенно не различаются по величине ММ, однако наблюдается отчетливо выраженная тенденция увеличения СД фракций, осажденной при более высоких значениях pH. В то же время различия СД выделенных фракций не превышают 20%. Таким образом, хотя исходные компоненты являются твердыми веществами, реакция дезацетилирования хитина в условиях пластического течения позволяет получать относительно однородные в химическом отношении продукты. Следует, однако, отметить, что данные табл. 3 характеризуют химическую однородность растворимой фракции образца 3. В целом же образцы хитозана, полученные твердофазным экструзионным способом, характеризуются большим содержанием нерастворимой фракции с низкой СД. При получении образцов медицинского назначения стадия отделения нерастворимой фракции является, видимо, необходимой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

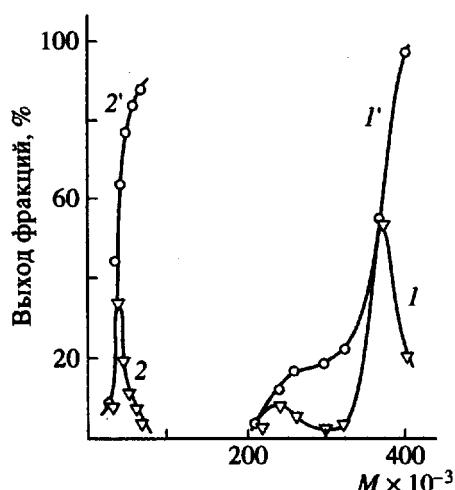


Рис. 3. Дифференциальные (1, 2) и интегральные (1', 2') кривые ММР образцов 1 (1, 1') и 2 (2, 2').

1. Акопова Т.А., Роговина С.З., Вихорева Г.А., Зеленецкий С.Н., Гальбрайх Л.С., Ениколов Н.С. // Высокомолек. соед. Б. 1991. Т. 33. № 10. С. 735.
2. Нудьга Л.А., Плиско Е.А., Данилов С.Н. // Журн. общей химии. 1971. Т. 41. С. 2555.
3. Polymer Fractionation / Ed. by Cantow M.J.R. New York; London: Acad. Press, 1967.
4. Gamzazade A.I., Shlimak V.M., Sklar A.M., Shtikova E.V., Pavlova S.-S.A., Rogojin S.V. // Acta Polymérica. 1985. V. 36. № 8. P. 420.
5. Mima S., Miya M., Iwamoto R., Yoshiwa S. // Proc. of the Second International Conf. "Chitin and Chitosan" // Ed. by Hirano S., Tokura S. Sapporo, 1982. P. 21.
6. Погодина Н.В., Павлов Г.М., Бушин С.В., Мельников А.Б., Лысенко Е.Б., Нудьга Л.А., Маршева В.Н., Марченко Г.Н., Цветков В.Н. // Высокомолек. соед. А. 1986. Т. 28. № 2. С. 232.

Fractional Composition of Chitosan Obtained by Solid-Phase and Suspension Methods

G. A. Vikhoreva*, S. Z. Rogovina**, T. A. Akopova***, S. N. Zelenetskii***, and L. S. Gal'braitkh*

* Kosygin State Textile Academy,
ul. M. Kaluzhskaya 1, Moscow, 117918 Russia

** Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
ul. Kosygina 4, Moscow, 117977 Russia

*** Institute of Synthetic Polymeric Materials, Russian Academy of Sciences,
ul. Profsoyuznaya 70, Moscow, 117393 Russia

Abstract—Fractional composition of chitosan prepared by suspension method and by solid-phase deacetylation of chitin under the conditions of combined action of pressure and shear strain was studied. The analysis of the product obtained in a solid-phase procedure revealed that chitosan with the degree of deacetylation equal to 0.8 was obtained after the separation of slightly deacetylated fraction insoluble in 2% acetic acid (the yield of this fraction is 5–15%). As compared to chitosan obtained by suspension method, the chitosan obtained by solid-phase deacetylation has a lower molecular mass (not greater than 10^5) and a narrow molecular mass distribution.