

УДК 541(24+64):547.995.12

ИЗМЕРЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ОЛИГОМЕРОВ ХИТОЗАНА

© 2006 г. Е. И. Черкасова*, Л. А. Смирнова*, В. Ф. Смирнов**

Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского

Химический* и биологический** факультеты
603950 Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

Поступила в редакцию 02.02.2005 г.

Принята в печать 02.11.2005 г.

Молекулярная масса олигомеров хитозана в интервале $(2-5) \times 10^3$ измерена методами вискозиметрии и гель-хроматографии. При использовании вискозиметров с временем истечения не менее 108 с вискозиметрический метод (растворитель 0.33 М $\text{CH}_3\text{COOH} + 0.3$ М NaCl , 21°C, $[\eta] = 3.41 M^{1.02}$) пригоден для определения ММ олигомеров хитозана вплоть до величины 1.98×10^3 . При этом максимальное отклонение значений ММ олигомеров, определенных по данным вискозиметрии и гель-хроматографии, не превышает 4%.

В качестве основы для получения препаратов фармацевтического и медицинского назначения, а также биологически активных добавок на основе полисахаридов с заданными свойствами часто применяют олигомеры. Лидером среди них в последнее время можно назвать олигомеры хитозана (поли- $\beta,1 \rightarrow 4, D$ -глюкозамина). Это обусловлено комплексом уникальных свойств, присущих данному полисахариду – способности к биодеструкции, гипоаллергенности, совместимости с тканями живых организмов, высокой хелато- и комплексообразующей способности. Указанные свойства определяют широкое применение хитозана и его производных в косметической, медицинской, пищевой и агробиологической отраслях [1, 2]. Самой распространенной формой промышленно выпускаемых олигомеров хитозана являются их соли с различными органическими и неорганическими кислотами (соляной, уксусной, янтарной, молочной, аскорбиновой и т.д.) [2, 3].

К числу важнейших характеристик олигомеров наряду с массовым содержанием присоединенных кислот, растворимостью, влажностью, зольностью и динамической вязкостью относятся значения M_w и ММР. Молекулярно-массовое распределение олигомеров хитозана обычно определяют методами фракционирования (с последующим измерением ММ отдельных фракций методом осмометрии) и ГПХ [2, 4], однако первое

E-mail: oligopharm@sandy.ru (Черкасова Елена Игоревна).

трудоемко, а второе не является общедоступным. В связи с этим актуальной остается разработка вискозиметрических экспресс-методов определения ММ олигомеров хитозана.

В настоящей работе проведено исследование возможности применения для определения ММ олигомеров хитозана до значений порядка 2×10^3 уравнения Марка–Куна–Хаувинка с константами $K = 3.41$ и $\alpha = 1.02$ (растворитель 0.33 М $\text{CH}_3\text{COOH} + 0.3$ М NaCl , 21°C), ранее предложенными [5] для определения ММ хитозана в интервале $(1.3 \times 10^4)–(1.93 \times 10^5)$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали хитозан Закрытого акционерного общества “Сонат” (Москва) со степенью деацетилирования 87% и исходной $M_w = 1.6 \times 10^5$. Степень деацетилирования определяли потенциометрическим титрованием, а ММ – вискозиметрически в вискозиметре Уббелоде с временем истечения растворителя 103.2 с [5].

Олигомеры получали путем гидролиза хитозана в среде уксусной, аскорбиновой и янтарной кислот ферментным препаратом Chitosanaze L (*Bacillus* sp., “Lyven”, France), с содержанием белка в растворе 5 мас. % и активностью 250 единиц ферментативной активности/г. Условия гидролиза (рН среды, температура, время реакции) были различными для четырех образцов олигомеров.

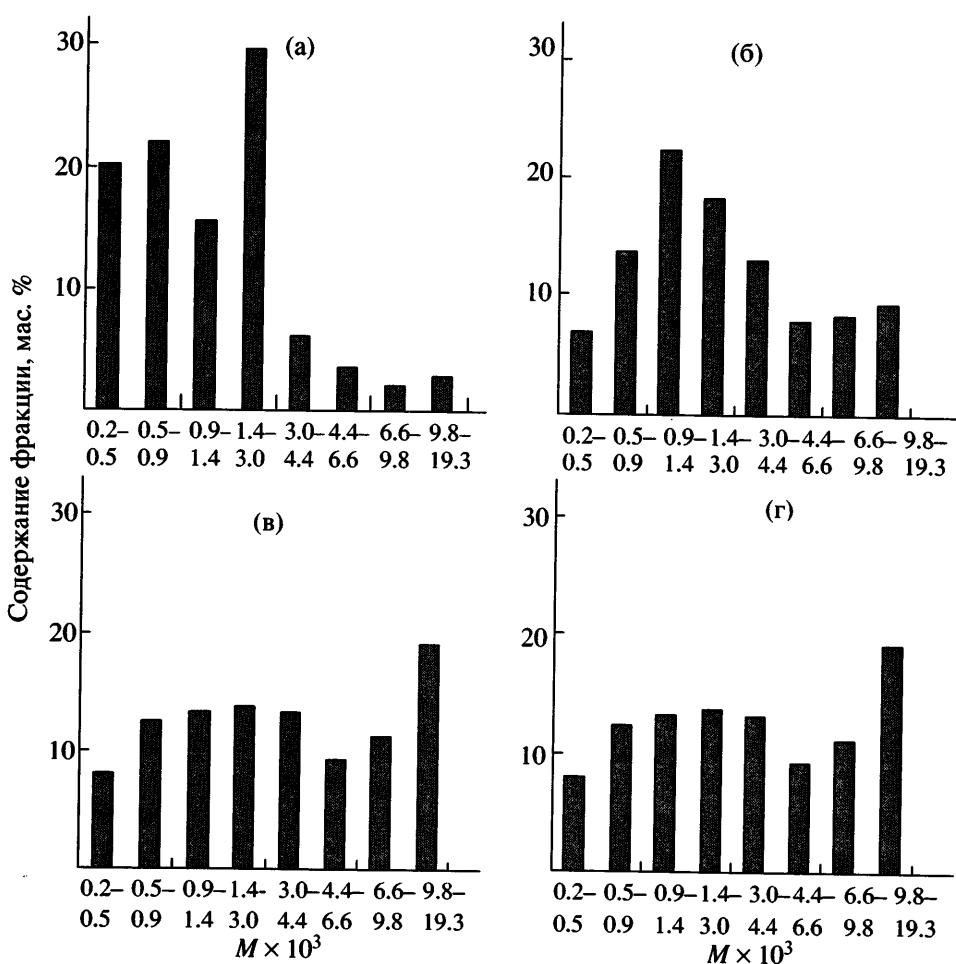


Рис. 1. MMP олигомеров хитозана с $M_w \times 10^{-3} = 1.98$ (а), 3.70 (б), 4.48 (в) и 5.08 (г).

Реакцию гидролиза останавливали прогреванием раствора при 70°C в течение 20 мин, что вызывало полную денатурацию фермента. Полученный раствор олигомеров высушивали при 60°C в течение 2 суток. Вследствие разных условий протекания гидролиза и массового содержания кислот в реакционной среде, ММ олигомеров в четырех образцах оказались различными.

Количество кислот в полученных сухих препаратах олигомеров хитозана определяли потенциометрическим титрованием. Для четырех различных образцов олигомеров процентное содержание кислотных остатков составило 17 мас. % уксусной кислоты, 45 и 55 мас. % аскорбиновой кислоты, а также 35 мас. % янтарной кислоты.

MMP полученных олигомеров определяли методом ГПХ высокого разрешения. Для хроматографического анализа использовали систему с рефрактометрическим детектором и компьютер-

ной регистрацией, колонка Tosohas TSK 30 SW_{XL} (7.5 × 300 мм). В качестве растворителя и элюента использовали фосфатный буфер (0.05 М, pH 2.7) с добавлением 0.5 М NaNO₃, концентрация навесок олигомеров составляла 10 мг/мл, скорость потока 1.0 мл/мин. Калибровку осуществляли по декстранам "Pharmacia Fine Chemicals" с известной ММ в диапазоне (0.5 × 10³)–(2.5 × 10⁵).

Растворы для вискозиметрических измерений ММ олигомеров готовили стандартным способом [6]. Сначала навески олигомеров растворяли в 0.33 М CH₃COOH, а затем добавляли NaCl до концентрации 0.3 моль/л для подавления политечнролитного эффекта. Время истечения растворов олигомеров измеряли в вискозиметрах Уббелоде и ВПЖ, с временем истечения растворителя не менее 100 с, чему соответствовал интервал отношений измеряемых значений характеристической вязкости от 1.1 до 1.6. Это отноше-

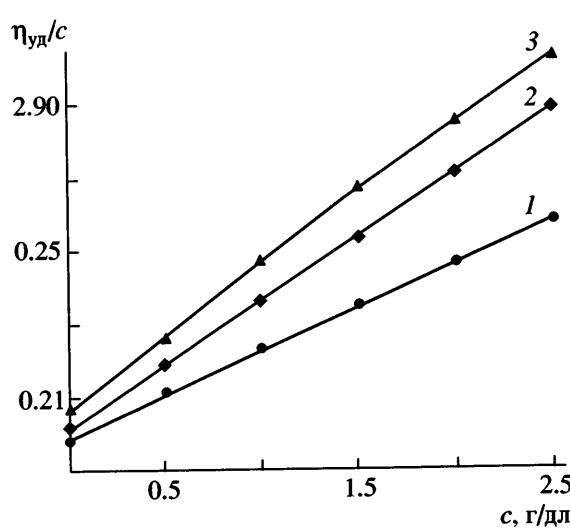


Рис. 2. Зависимость приведенной вязкости от концентрации для образца 4 с $M_w = 5.08 \times 10^{-3}$ (по данным ГПХ). Время истечения растворителя 103.2 (1), 105.4 (2), 108.6 (3).

ние достигалось при концентрации олигомеров 2.6–3.0 г/дл.

Вязкость 5%-ных растворов олигомеров определяли на вискозиметре Геппнера при 21°C.

Полученные олигомеры хитозана перед вискозиметрическими измерениями переводили в свободную от кислоты форму подщелачиванием их 10%-ных водных растворов раствором аммиака с концентрацией 12 мас. % до pH 10. Осадок отделяли центрифugированием при скорости вращения 5000 об/мин в течение 30 мин. Для полностью выделения олигомеров надосадочную жидкость заливали 96%-ным этианолом, выпавший осадок вновь отделяли от раствора в тех же условиях. Процедуру повторяли до тех пор, пока при добавлении новой порции спирта не наблюдали образования осадка. Все выделенные осадки объединяли и промывали в аппарате Сокслета

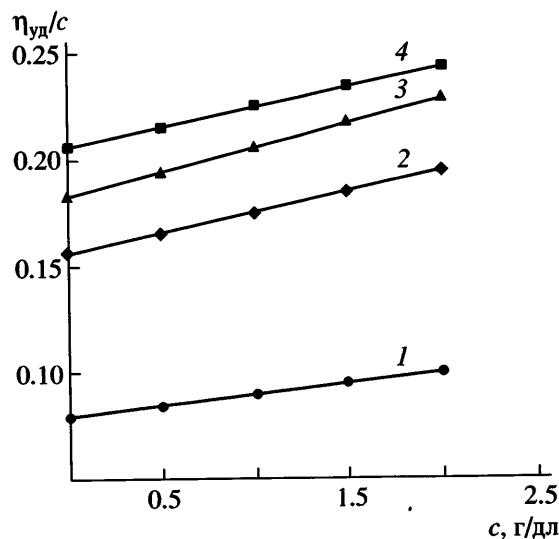


Рис. 3. Зависимость приведенной вязкости от концентрации для образцов 1–4 (прямые 1–4 соответственно).

этиловым спиртом для полного удаления солей аммиака. Возможные потери низкомолекулярных фракций оценивали модифицированным нингидриновым методом [7] (в качестве контроля использовали раствор аммиака той же концентрации, что и в исследуемой пробе) и по массе сухого вещества при высушивании аликовотных проб раствора. Потери низкомолекулярных фракций во всех образцах в результате многостадийной обработки не превышали 4 мас. %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Были проанализированы четыре образца олигомеров, полученных в результате ферментативного гидролиза, с заранее различной ММ. Для этих образцов методом ГПХ были определены три характеристики – ММР, M_w и M_n ; характеристическая вязкость $[\eta]$ и вязкость 5%-ного раствора.

Таблица 1. Характеристики образцов олигомеров хитозана

Образец, №	Кислота, используемая при растворении хитозана	Вязкость 5%-ного водного раствора, сП	$M_w \times 10^{-3}$	$M_n \times 10^{-3}$	M_w/M_n
			ГПХ		
1	Уксусная	1.47	1.98	0.84	2.36
2	Аскорбиновая	1.80	3.70	1.40	2.57
3	»	1.94	4.48	1.83	2.39
4	Янтарная	1.97	5.08	1.60	3.18

Таблица 2. Сопоставление значений ММ олигомеров хитозана, определенных методами ГПХ и вискозиметрии

Образец, №	[η], дл/г	$M_\eta \times 10^{-3}$ (вискозиметрия)	$M_w \times 10^{-3}$ (ГПХ)
1	0.078	1.96	1.98
2	0.156	3.86	3.70
3	0.183	4.52	4.48
4	0.206	5.09	5.08

Результаты измерений ММР, полученные методом ГПХ, представлены на рис. 1. Видно, что ММР изученных олигомеров сильно отличаются. Это приводит к различиям как средних значений M_w и M_n , так и индекса полидисперсности M_w/M_n (табл. 1).

Опыты показали, что несмотря на значительные различия ММ образцов, значения вязкости 5%-ного раствора оказались приблизительно одинаковыми, порядка 1.5–2.0 сП. Таким образом, недостаточная чувствительность этого метода измерения вязкости делает его непригодным для характеристики ММ олигомеров.

Далее было проведено исследование применимости уравнения $[\eta] = 3.41 \times 10^{-3} M^{1.02}$ для определения ММ олигомеров хитозана в интервале $(2 \times 10^3)–(6 \times 10^3)$.

Оказалось, что при использовании вискозиметров с временем истечения растворителя порядка 100 с, несмотря на линейность зависимости в координатах η_{ud}/c – c , значения ММ, рассчитанные по приведенному выше уравнению, были занижены. Кроме того, была выявлена зависимость $[\eta]$ от времени истечения растворителя (рис. 2). Установлено, что при использовании вискозиметров Уббелоде с временем истечения растворителя не менее 108.6 с (или вискозиметров ВПЖ с $d \leq 0.56$ мм),

значения ММ олигомеров, определенные по данным вискозиметрии и ГПХ, практически совпадают (рис. 3, табл. 2). При этом максимальное расхождение не превышает 4%.

Таким образом, вискозиметрический метод определения ММ хитозана с константами $K = 3.41$ и $\alpha = 1.02$, предложенный в работе [5], пригоден также для определения ММ его олигомеров вплоть до значений 1.98×10^3 . При этом необходимо соблюдение следующих условий измерения: время истечения растворителя не менее 108 с и полное удаление посторонних кислотных остатков из исследуемых образцов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Хитозан рег os / Под ред. Мущарелли Р.А.А. Н. Новгород: Вектор ТиС, 2001.
- Хитин и хитозан. Свойства, получение, применение / Под ред. Скрябина К.Г., Варламова В.П., Вихорева Г.А. М.: Наука, 2002.
- Самуиленко А.Я., Албулов А.И., Еремец В.И., Ершов П.Б. // Матер. VII Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М.: Всесоюзный научный ин-т рыболовства и океанографии, 2001. С. 271.
- Нудьга Л.А., Плиско Е.А., Данилов С.Н. // Журн. общ. химии. 1973. Т. 43. С. 2555.
- 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.
- Rabek J. Experimental Methods in Polymer Chemistry. Chichester; New York; Brisbane; Toronto: Wiley, 1980.
- Лопатин С.А., Немцев С.В., Варламов В.П. // Матер. VII Междунар. конф. "Новые достижения в исследовании хитина и хитозана". М.: Всесоюзный научный ин-т рыболовства и океанографии, 2001. С. 298.

Measurement of Molecular Mass of Chitosan Oligomers

E. I. Cherkasova*, L. A. Smirnova*, and V. F. Smirnov**

*Faculty of Chemistry, Nizhni Novgorod State University,
pr. Gagarina 23, Nizhni Novgorod, 603950 Russia

**Faculty of Biology, Nizhni Novgorod State University,
pr. Gagarina 23, Nizhni Novgorod, 603950 Russia

Abstract—The molecular mass of chitosan oligomers in the range of $(2–5) \times 10^3$ was measured using viscometry and gel permeation chromatography. The use of viscometers with a flow time of at least 108 s (0.33 M $\text{CH}_3\text{COOH} + 0.3$ M NaCl as a solvent, 21°C , $[\eta] = 3.41 M^{1.02}$) makes it possible to determine the molecular mass of chitosan oligomers up to 1.98×10^3 . In this case, the maximum divergence in the molecular mass values of oligomers determined by viscometry and gel permeation chromatography does not exceed 4%.