

УДК 541.64:53.091

Механическая активация как способ получения водорастворимых форм хитина и хитозана в твердой фазе

Г. Л. ИВАЩЕНКО^{1, 3}, Т. П. ШАХТШНЕЙДЕР^{2, 3}, В. В. БОЛДЫРЕВ^{2, 3}, Н. Г. БАЗАРНОВА¹, А. В. ИВАНОВ⁴, О. Р. ГАРТМАН⁴

¹Алтайский государственный университет,
проспект Ленина, 61, Барнаул 656099 (Россия)

E-mail: galina@solid.nsc.ru

²Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения РАН,
ул. Кутателадзе, 18, Новосибирск 630128 (Россия)

³Научно-образовательный центр “Молекулярный дизайн и
экологически безопасные технологии” при НГУ,
ул. Пирогова, 2, Новосибирск 630090 (Россия)

⁴Алтайский государственный медицинский университет,
ул. Ленина, 42, Барнаул 656099 (Россия)

Аннотация

Изучено влияние механической обработки на хитин и хитозан, выделенные из рачка-бокоплава *Gammarus* алтайский. Получены водорастворимые карбоксиметилловые эфиры хитина и хитозана в твердой фазе с использованием механохимической активации в планетарно-центробежной мельнице АГО-2 и в вибрационной мельнице SPEX 8000. Полученные образцы охарактеризованы с помощью ИК-спектров, определены содержание карбоксиметильных групп, молекулярные массы, растворимость в воде, относительная вязкость щелочных растворов.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время активно развивается механохимия органических соединений. Особенно это касается фармации, где использование методов механической активации позволяет модифицировать лекарственные вещества, повышая их биодоступность, осуществлять синтез биологически активных веществ в отсутствие растворителей в экологически безопасных условиях [1–3].

Интерес к исследованию биополимеров, таких как хитин и хитозан, вызван их уникальными свойствами, позволяющими использовать их в различных областях человеческой деятельности: в фармации, косметике, сельском хозяйстве, пищевой промышленности. Хитин является полисахаридом, состоящим из неразветвленной цепи β-(1–4)-связанных остатков 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы (N-ацетил-*D*-глюкозамин). В природе

существуют три типа хитинов: α-, β- и γ-хитины, отличающиеся пространственным расположением цепей молекул и присутствием связанных молекул воды [4]. Перспективным производным хитина является дезацетилированный биополимер (*D*-глюкозамин) – хитозан. Наличие аминной группы обуславливает поликатионный характер полимера и расширяет возможности его модифицирования, в частности, получение N-производных [5].

Плохая растворимость биополимеров в воде ограничивает область их применения. В настоящее время получены различные водорастворимые формы хитина (X) и хитозана (XT) [5, 6]. Одним из перспективных направлений является получение карбоксиметилловых эфиров хитина (КМХ) и хитозана (КМХТ). Растворимость этих производных в воде, а также сохранение биологической активности, характерной для исходных соединений, расширяют возможности их применения [7].

Большинство из существующих способов получения КМХТ предполагают использование органических растворителей и являются дорогостоящими. Разработка твердофазного способа синтеза представляет интерес с точки зрения интенсификации процессов и создания экологически безопасных технологий производства этих полимеров.

Ранее было исследовано влияние размола в измельчительных аппаратах разного типа на структуру и свойства хитозана, полученного из панцирей криля, краба [8, 9]. Показано, что при размол в экструдере происходят более глубокие изменения структуры и свойств хитозана по сравнению с размолем в шаровой мельнице [8]. Экструзионным методом был осуществлен синтез карбоксиметилловых эфиров хитина и хитозана [7]. Процесс проводили в две стадии: на первой стадии из хитина и твердого едкого натра получали щелочной хитозан, на второй – в экструдер подавали его смесь с монохлорацетатом натрия в растворе или твердой фазе. Таким образом были получены образцы со степенью замещения карбоксиметильных групп в интервале 0.4–1.4, характеризующиеся, однако, меньшей растворимостью в воде (до 70 %) по сравнению с полученными суспензионным способом.

В последнее время среди сырьевых источников получения хитина все большее значение приобретает рачок-бокоплав *Gammarus*, широко распространенный в озерах Западной Сибири. Сравнительная оценка химического состава гаммаруса и таких видов хитинсодержащего сырья, как крабы, креветки, криль, показала целесообразность его использования для выделения хитина [10].

Цель данной работы – осуществление твердофазного синтеза карбоксиметилловых эфиров хитина и хитозана, выделенных из гаммаруса алтайского, с использованием механической активации в высокоэнергонапряженных мельницах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Состав гаммаруса исследовали методами химического анализа. Хитин получали из гаммаруса алтайского традиционным кислотным

основным способом. Получение хитозана из хитина осуществляли высокотемпературной щелочной обработкой [11]. Полученный хитин представляет собой хлопья кремового цвета, растворимые в концентрированных неорганических кислотах, хитозан – белые жесткие хлопья, растворимые в разбавленных растворах кислот, в частности в 2%-й уксусной кислоте.

Рентгеновские исследования проводили на дифрактометре ДРОН-4 (CuK_α -излучение) в диапазоне $2\alpha = 4 - 40^\circ$. Чтобы исключить текстурирование образцов, рентгенофазовый анализ образцов хитина проводили с добавлением рентгеноаморфных веществ (вазелин, парафин; 1:1 по массе). Удельную поверхность образцов определяли методом тепловой десорбции аргона (метод БЭТ).

Синтез карбоксиметилловых эфиров хитина и хитозана проводили в мельницах двух видов: планетарно-центробежной мельнице АГО-2 (ИХТТМ СО РАН) (стальные барабаны с водяным охлаждением объемом 40 мл, $m_{\text{ш}} = 50$ г, $d_{\text{ш}} = 6$ мм) и вибрационно-шаровой SPEX 8000 (США) (стальной барабан объемом 50 мл, 15 шаров, $d_{\text{ш}} = 6$ мм). В качестве карбоксиметилирующих реагентов использовались натриевая соль монохлоруксусной кислоты (Na-МХУК) квалификации х.ч. и гидроксид натрия квалификации х.ч. В барабан загружали смесь хитина (хитозана), твердого едкого натра и алкилирующего реагента (Na-МХУК) с молярным соотношением компонентов в расчете на одну ОН-группу 1 : 1 : 1. Реакционная масса подвергалась механическим воздействиям с отбором проб через определенные промежутки времени. Полученные продукты тщательно отмывали от непрореагировавших реагентов последовательно этанолом, подкисленным уксусной кислотой (рН 5), и чистым этанолом.

Вискозиметрические измерения хитозана проводили в вискозиметре Уббелодде с диаметром капилляра 0.54 мм при 25 °С в 2%-м уксусном растворе, карбоксиметилловых продуктов – в 0.5 М NaOH. Молекулярную массу (M_w) образцов рассчитывали по характеристической вязкости растворов полимеров по уравнению $[\eta] = 1.38 \times 10^{-4} M_w^{0.74}$, предложенному в работе [12]. Степень деацетили-

ТАБЛИЦА 1
Химический состав сушеного гаммаруса

Сырье	Влага, %	Липиды, %	Общий азот, %	Минеральные вещества, %	Хитин, %
<i>Gammarus</i> [10]	10.8	7.7	7.8	26.0	7.0
Гаммарус алтайский	9.7	–	–	27.3	8.7

рования хитозана определяли титриметрически [13].

Содержание карбоксиметильных групп (КМГ) определяли кондуктометрически с помощью кондуктометра АНИОН-410 по методике, описанной в работе [14]. Растворимость образцов КМХ и КМХТ определяли, растворяя продукт в воде, с последующим фильтрованием раствора через стеклянный пористый фильтр ПОР/60 [13].

ИК-спектры исходных образцов и карбоксиметилированных продуктов записывали на спектрофотометре VECTOR 22 (Brucker).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что содержание хитина в сырье зависит не только от его вида, но и от среды обитания, возраста организмов [4]. В табл. 1 представлен состав использованного в работе гаммаруса в сравнении с литературными данными для сырья другого происхождения.

Из полученных данных видно, что бокоплав алтайский не уступает по составу гаммарусу других областей. В то же время большее содержание полимера в нем делает его перспективным источником для получения хитина, хитозана.

Параметры полученного хитозана представлены в табл. 2.

Из сравнения наших результатов с имеющимися в литературе данными [8] следует,

ТАБЛИЦА 2
Характеристики хитозана

Показатель	Значение
Степень дезацетилирования, %	97.0
Характеристическая вязкость, дл/г	26.3
M_w	1.6×10^6

что полученный в работе хитозан является высокомолекулярным с малой степенью ацетилирования. Образцы хитозана, полученные в аналогичных условиях из панцирей крыля и краба, имели меньшую средневесовую молекулярную массу и большую степень ацетилирования (11–18 %) [8].

Рентгенограммы исходных соединений и образцов, подвергшихся механической обработке, приведены на рис. 1 и 2. Наличие небольшого количества широких рефлексов указывает на малоупорядоченный тип структур с низкой степенью кристалличности. При этом исходный и механоактивированный образцы хитина, как и хитозана, имеют одинаковые наборы рефлексов, отличающиеся только их интенсивностью.

Известно, что интенсивные механические воздействия на полимеры способны вызывать

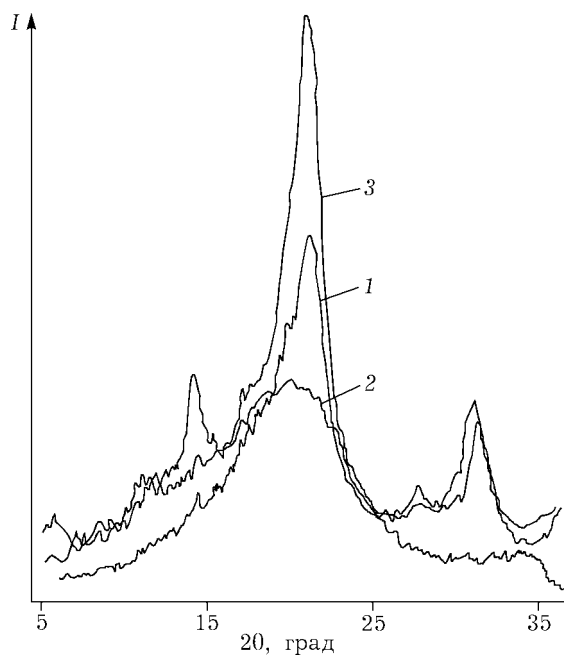


Рис. 1. Дифрактограммы образцов исходного хитина (1) и после механической обработки в АГО-2 в течение 8 (2) и 25 мин (3).

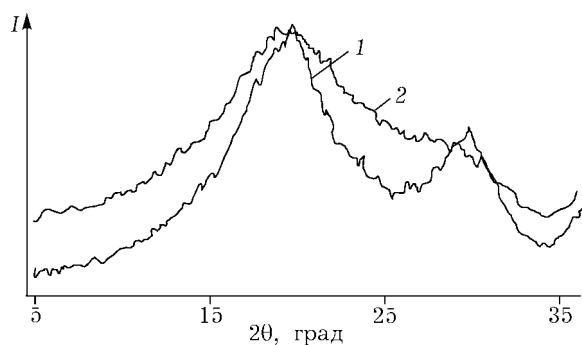


Рис. 2. Диффрактограммы образцов исходного хитозана (1) и после механической обработки в АГО-2 в течение 10 мин (2).

механокрекинг макромолекулярных цепей и перемещение отдельных элементов структуры [15, 16]. В результате происходят нарушение исходной упаковки цепей и потеря упорядоченности. В случае хитозана на диффрактограмме механоактивированного образца наблюдали уменьшение интенсивности и увеличение ширины пиков, характерные для аморфного продукта. При малой продолжительности механообработки (порядка 10–15 мин) аналогичное происходило и с образцом хитина. Однако наличие менее широкого и более интенсивного максимума при $2\theta = 19.5^\circ$ у механоактивированного хитина по сравнению с исходным полимером свидетельствует о частичной рекристаллизации аморфной фазы. Эффект не является следствием текстурирования образца, так как наблюдался и при съемке вещества с добавлением рентгеноаморфных вазелина или парафина. Это позволяет предположить, что при длительной механической обработке из-за большой подвижности фрагментов деструкции с малой молекулярной массой происходит перераспределение внутри- и межмолекулярных водородных связей с образованием новой упаковки цепей макромолекул. Рекристаллизацию образцов хитина наблюдали при обработке как в АГО-2, так и в SPEX 8000. При использовании планетарно-центробежной мельницы этот эффект наблюдали при меньшем времени обработки, что, вероятно, объясняется более интенсивным воздействием механических импульсов. В отличие от хитина, при длительной механической обработке образцов хитозана увеличения степени кристал-

ТАБЛИЦА 3

Удельная поверхность исходных и механически активированных (м/а) образцов

Образец	$S_{уд}$, m^2/g
Хитозан	
исходный	0.83
м/а	2.63
Хитин	
исходный	7.23
м/а	11.48

Примечание. Механическая активация осуществлялась в АГО-2 (20 g) в течение 15 мин.

личности продукта не наблюдали, что может объясняться большей плотностью упаковки макромолекул образца.

Результаты измерения удельной поверхности образцов приведены в табл. 3. Механическая обработка полимеров приводит к увеличению удельной поверхности хитина в 1.7 раза и хитозана в 3 раза. При этом удельная поверхность хитозана гораздо меньше удельной поверхности хитина.

В табл. 4, 5 представлены свойства карбоксиметилловых эфиров хитина и хитозана, полученных при разной продолжительности механической активации. Из анализа данных следует, что в зависимости от времени механической обработки полученные образцы частично или практически полностью растворимы в воде и образуют растворы с невысокой относительной вязкостью. С увеличением продолжительности механической активации степень замещения функциональных групп в хитине и хитозане возрастает, что ведет к увеличению растворимости данных производных в воде.

Эффективность замещения функциональных групп в карбоксиметилированных образцах при обработке в АГО-2 и SPEX 8000 различна. Большее содержание карбоксиметильных групп у продуктов, полученных путем механической активации в АГО-2, связано, по-видимому, с более интенсивным воздействием сдвиговых деформаций.

Известно, что при неизбирательном карбоксиметилировании хитозана происходит образование как O-замещенного, так и N-замещенного либо O,N-замещенного в зависимости от условий синтеза. Соответственно

ТАБЛИЦА 4

Свойства карбоксиметилированного хитина при разной продолжительности синтеза (X : Na-MХУК : NaOH = 1:1:1 моль)

τ , мин	Карбокси-метильные группы, %	Степень замещения, %	Растворимость в воде, %	Относительная вязкость	$M_w \times 10^{-4}$
<i>АГО-2 (20 g)</i>					
2	12.2	33.5	–	–	–
5	17.1	47.0	74.3	1.55	2.43
8	19.6	53.8	81.7	1.47	0.73
10	21.7	59.6	89.5	1.42	0.56
15	24.7	63.2	91.2	1.34	0.48
<i>SPEX 8000</i>					
3	10.8	29.7	–	–	–
6	11.5	31.6	–	–	–
9	14.3	39.3	40.3	–	–
15	20.2	55.5	77.6	1.46	1.78
20	21.2	58.2	80.4	1.43	1.44

карбоксиметилирование хитина сопровождается образованием моно- или ди-О-замещенного. Исходя из общего содержания гидроксильных групп в хитине, равного 16.8 %, можно сказать, что максимальное содержание КМГ в карбоксиметилевоом эфире может составлять 36.4 %. Введенные в КМХ 24.7 % КМГ свидетельствуют о том, что реакция сопровождается образованием продукта, близкого к равномерному ди-О-замещенному.

Исходя из содержания OH- и NH₂-групп в хитозане, равного 21.1 и 9.96 % соответственно, можно посчитать, что максимальное содержание КМГ в данном образце будет составлять 51.9 % (из них 20.9 % – при замещении только OH-групп). Введение 24.8 % КМГ указывает на неравномерное замещение функциональных групп в продукте.

Результаты определения молекулярной массы образцов свидетельствуют о том, что

ТАБЛИЦА 5

Свойства карбоксиметилированного хитозана при разной продолжительности синтеза (ХТ : Na-MХУК : NaOH = 1:1:1)

τ , мин	Карбокси-метильные группы, %	Степень замещения, %	Растворимость в воде, %	Относительная вязкость	$M_w \times 10^{-4}$
<i>АГО-2 (20 g)</i>					
5	13.1	25.2	22.3	–	–
10	24.4	47.8	90.5	1.36	0.45
15	26.4	50.9	91.4	1.30	0.24
<i>SPEX 8000</i>					
5	12.3	23.7	–	–	–
10	17.6	33.9	41.8	–	–
15	19.3	37.2	67.6	1.38	4.88
20	21.6	41.6	77.4	1.35	3.56

наиболее интенсивно процессы деструкции идут в первые минуты синтеза. Близкие значения молекулярных масс карбоксиметильных эфиров хитина и хитозана, полученных в АГО-2 через 10 и 15 мин синтеза, вероятно, объясняются явлением, типичным для измельчения полимеров, – пределом деструкции, который не может быть превышен, как бы ни проводилась обработка. Считается, что подвижность макромолекул в области предельной деструкции очень велика, и сообщаемая твердому веществу механическая энергия тратится на межмолекулярное перемещение макромолекулярных цепей [15, 16].

Проведение ИК-спектроскопических исследований показало, что с возрастанием степени карбоксиметилирования интенсивность полосы в области $3445\text{--}3400\text{ см}^{-1}$, соответствующей валентным колебаниям ОН-групп, заметно снижается (рис. 3, 4). Появление новой полосы при 1611 см^{-1} в спектрах карбоксиметилированных образцов связано с колебаниями карбонильной группировки в карбоксиметильной группе. Уменьшение интенсивности полосы в спектре КМХ в области $3270\text{--}3300\text{ см}^{-1}$, соответствующей валентным колебаниям NH-групп, указывает на частичное дезацетилирование хитина при механоактивации в щелочной среде.

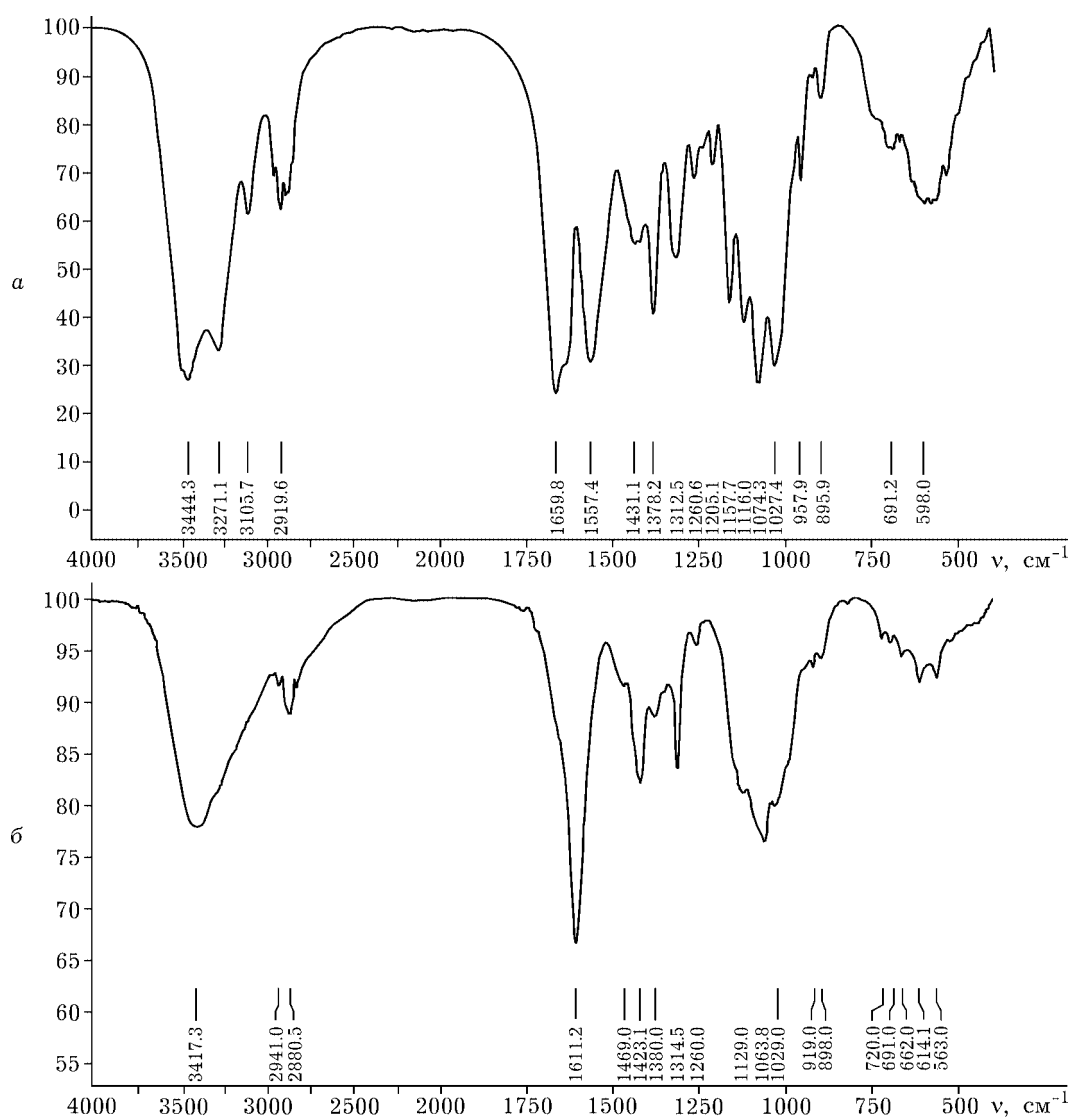


Рис. 3. ИК-спектры образцов исходного (а) и карбоксиметилированного (б) хитина, полученного механической обработкой в АГО-2 в течение 15 мин.

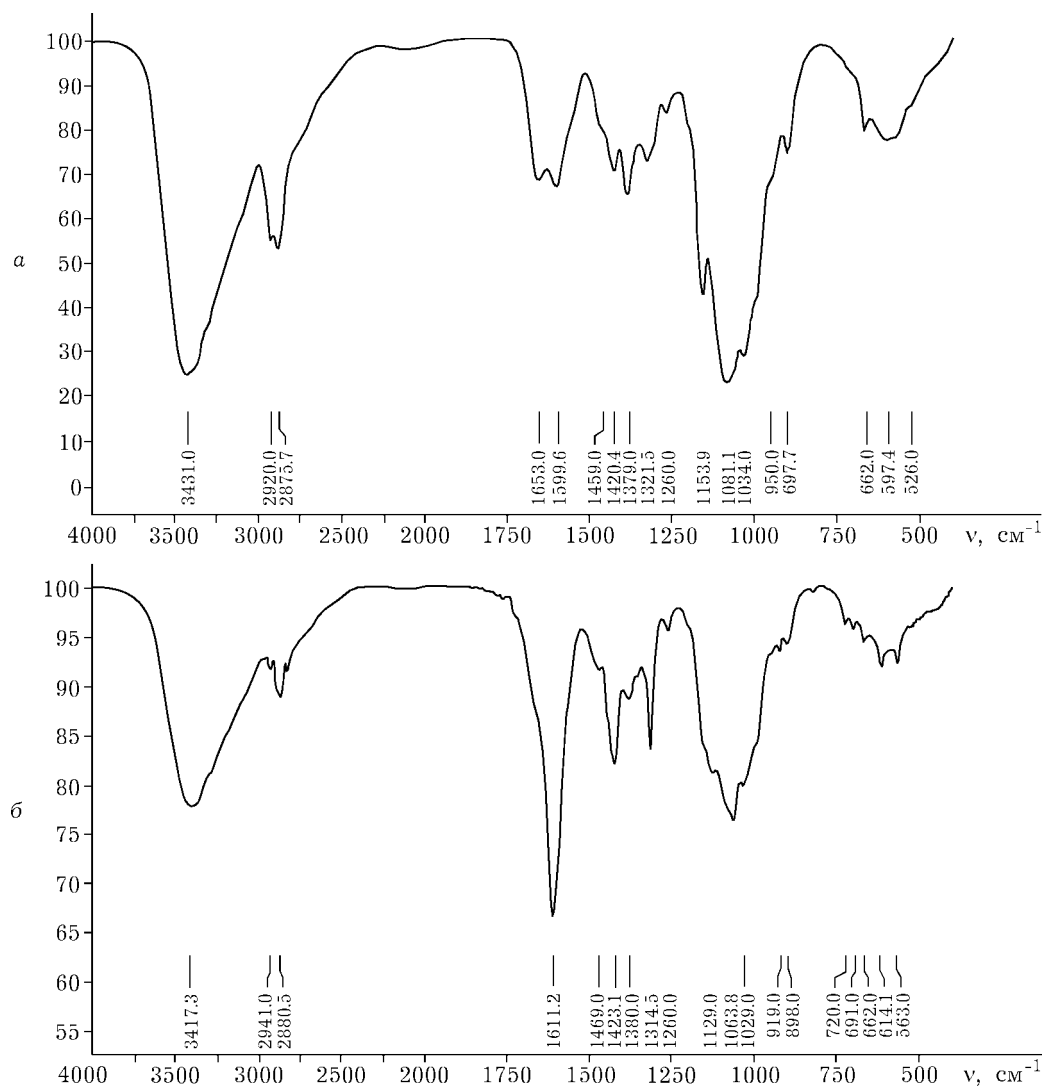


Рис. 4. ИК-спектры образцов исходного (а) и карбоксиметилированного (б) хитозана, полученного механической обработкой в АГО-2 в течение 15 мин.

ВЫВОДЫ

1. Показана возможность использования алтайского гаммаруса в качестве хитинсодержащего сырья. Хитозан, полученный из бокоплава алтайского, является более высокомолекулярным и имеет структуру, схожую с образцами биополимера, полученными из других видов сырья.

2. Осуществлен твердофазный синтез водорастворимых карбоксиметилвых эфиров хитина и хитозана с помощью механической обработки в планетарно-центрибежной и вибрационной мельницах. Показано, что проведение процесса в планетарной мельнице сопровождается образованием продуктов с наи-

большим содержанием карбоксиметильных групп, образующих растворы с меньшей относительной вязкостью.

Работа выполнена при поддержке гранта Американского фонда гражданских исследований и развития (CRDF) REC-008, гранта РФФИ № 99-03-32482 и грантов Министерства образования РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 А. М. Дубинская, *Хим.-фарм. журн.*, 23 (1989) 755.
- 2 А. М. Дубинская, *Успехи химии*, 68 (1999) 708.
- 3 Т. Р. Shakhtshneider and V. V. Boldyrev, in E. Boldyreva and V. Boldyrev (Eds.), *Reactivity of Molecular Solids*, Wiley, Chichester, 1999, p. 271.
- 4 Е. П. Феофилова, *Биологические науки*, 6 (1981) 5.

- 5 Е. А. Плиско, Л. А. Нудьга, С. Н. Данилов, *Журн. общ. химии*, 43 (1972) 1243.
- 6 Е. А. Плиско, Л. А. Нудьга, С. Н. Данилов, *Успехи химии*, 46 (1977) 1470.
- 7 Т. А. Аكوпова, С. З. Роговина, Г. А. Вихорева, С. Н. Зеленецкий, *Высокомолекуляр. соединения*, 37 (1995) 1797.
- 8 Т. А. Аكوпова, С. З. Роговина, И. Н. Горбачева и др., Там же, 38 (1996) 263.
- 9 А. И. Гамзазаде, Н. А. Голиков, В. П. Савченко и др., *Материалы V Междунар. конф. "Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана"*, Москва, 1997, с. 29.
- 10 R. A. Muzzarelli, *Chitin*, Pergamon Press, Oxford, 1977.
- 11 Пат. 2117673 РФ, 1996.
- 12 W. Brown and D. Henly, *Makromol. Chem.*, 79 (1964) 68.
- 13 А. В. Оболенская, В. П. Щеголев, Е. П. Аким и др., *Практические работы по химии древесины и целлюлозы*, Лесн. пром-сть, Москва, 1965.
- 14 Натрий-карбоксиметилцеллюлоза, ТУ 6-55-40-90.
- 15 К. Симионеску, К. Опра, *Механохимия высокомолекулярных соединений*, Мир, Москва, 1970.
- 16 Н. К. Барамбойм, *Механохимия полимеров*, Мир, Москва, 1961.