

УДК 547.995.12

ВЯЗКОСТНЫЕ СВОЙСТВА РАСТВОРОВ ХИТОЗАНА И ЕГО РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ

© 2008 г.

Е.Н. Федосеева, Л.А. Смирнова, В.Б. Федосеев

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

enfedoseeva@front.ru

Поступила в редакцию 26.05.2008

Исследованы вязкостные свойства разбавленных и умеренно-концентрированных растворов хитозана в водных растворах уксусной и соляной кислот. Для этих растворов выявлено существование узкого интервала концентраций кислот, в котором вырождается аномалия вязкости. Методом вискозиметрии установлен конформационный переход спираль – клубок макромолекул хитозана при изменении концентрации кислоты. Показано, что конформация макромолекул оказывает существенное влияние на эффективность реакций с участием хитозана на примере получения его олигомеров радикальной деструкцией полиглюкозамина.

Ключевые слова: вязкостные свойства, конформация, хитозан.

Хитозан (поли β-1,4-2-дезоксиглюкопираноза) – продукт деацетилирования природного полисахарида хитина. В отличие от последнего хитозан легко растворим в водных растворах некоторых минеральных и органических кислот, что обеспечивается наличием в составе его мономерного звена аминогруппы. Известно [1, 2], что аминогруппы хитозана проявляют свойства слабых оснований. Ими обусловлены поведение хитозана в растворе как полиэлектролита и, соответственно, зависимость конформационного состояния макромолекул от степени протонирования в растворах с разной ионной силой. Другое характерное свойство хитозана – способность его функциональных групп к образованию водородных связей как внутримолекулярных, стабилизирующих конформационную структуру, так и межмолекулярных. В результате макромолекулы хитозана в растворе демонстрируют весьма сложное поведение. Следует отметить, что разными авторами рассматриваются в качестве вероятных различные конформационные состояния макромолекул хитозана в растворе – от глобулы до вытянутой цепи [1, 3, 4].

Так, авторы [1] на основании анализа данных по седиментации и вискозиметрии разбавленных растворов хитозана в 1%-ной уксусной кислоте с добавлением солей LiCl и NaCl, а также в абсолютной трифторуксусной кислоте, высказывают предположение о квазиглобулярной структуре макромолекул, уплотненной системой внутримолекулярных водородных связей. Следует отметить, что в этой работе использовались растворители, подавляющие полиэлектролитные эффекты.

Авторы [5] методами вискозиметрии и двойного лучепреломления в потоке исследовали уксуснокислые и солянокислые растворы хитозана как в отсутствие, так и с добавлением низкомолекулярного электролита при варьировании концентраций компонентов. Эти исследования привели к выводу, что макромолекулы хитозана имеют конформацию рыхлого клубка.

Наконец, в работе [3] макромолекулы хитозана описываются моделью частично протекаемой червеобразной цепи, для которой рассчитаны сегмент Куна, а также константы в уравнении Марка–Куна. Измерения выполнены методами диффузии, седиментации и вискозиметрии в водном растворе, содержащем $0.33 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH}$ и $0.3 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1} \text{ NaCl}$.

Ранее [6] нами выявлена корреляция между вязкостными свойствами растворов хитозана и реакционной способностью полимера при его деструкции под действием свободных радикалов в зависимости от содержания уксусной кислоты в растворах. Вопрос о причинах этого явления остался открытым. Цель данной работы – исследование вязкостных свойств уксуснокислых и солянокислых растворов хитозана при различных соотношениях компонентов в растворах, конформационного состояния макромолекул в них и влияния этих факторов на реакционную способность в процессе деструкции.

Экспериментальная часть

Использовали образцы хитозана с молекулярной массой $M_v = 8.3 \times 10^4$, степенью деацетилирования 82% фирмы «Сонат» (Москва);

$M_v = 8.3 \times 10^4$, 1.3×10^5 и 1.6×10^5 , степень деацетилирования 79% ЗАО «Биопрогресс» (п. Биокомбинат Московской обл., Щелковского р-на) без дополнительной очистки (массовая доля нерастворимых веществ – 0.25%, массовая доля сухого остатка после прокалывания – 0.3%). Для приготовления растворителей использовали ледяную уксусную кислоту марки «х. ч.», растворы HCl готовили из фиксаля. ММ образцов хитозана определяли с использованием вискозиметра Уббелоде, при температуре 21°C, в растворе уксусной кислоты с концентрацией $0.33 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ в дистиллированной воде, содержащей $0.3 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ NaCl. Средневязкостную ММ рассчитывали по уравнению Марка–Куна–Хаувинка $[\eta] = k \overline{M}_v^\alpha$, $k = 3.41 \times 10^{-5}$, а $\alpha = 1.02$ [3]. Вязкость растворов хитозана в растворах соляной или уксусной кислот различной концентрации измеряли на вискозиметре Уббелоде в случае разбавленных растворов и на приборе Реотест для умеренно концентрированных растворов. Степень деацетилирования хитозана определяли потенциометрическим титрованием его растворов в 0.1 н. растворе HCl раствором КОН (0.1 н.) с использованием иономера ЭВ-74.

Молекулярно-массовое распределение (ММР) хитозанов, деструктурированных по методу [7], определяли в Лаборатории физико-химии биотрансформации полимеров МГУ им. М.В. Ломоносова методом гель-проникающей хроматографии высокого разрешения. Использовали ВЭЖХ-систему *Bio-Rad* с рефрактометрическим детектором и системой компьютерной регистрации, колонку *Waters Protein Pak125* (7.5 · 300 мм). Образцы хитозана растворяли в фосфатном буфере: 0.1 М, pH 2.9 с добавлением 0.2 М NaCl.

Для характеристики конформационного состояния макромолекул в растворе использовали метод, описанный Ч. Тенфордом [8] для полиэлектролитов. Сущность метода заключается в определении параметра α в уравнении Марка–Куна–Хаувинка через измерение характеристической вязкости растворов полиэлектролита в отсутствие низкомолекулярного электролита. В данном случае были выполнены измерения $[\eta]$ для образцов хитозана с различной молекулярной массой, но одинаковой степенью деацетилирования. $[\eta]$ определяли в водных растворах уксусной кислоты различных концентраций. Разбавление проводили дистиллированной водой при сохранении постоянного соотношения хитозан: уксусная кислота. $[\eta]$ определяли экстраполяцией к нулевой концентрации хитозана c ($\text{г} \cdot \text{мл}^{-1}$) прямой в координатах $c/\eta_{sp} = f(c^{0.5})$.

Результаты и их обсуждение

Методом ротационной вискозиметрии исследованы вязкостные свойства уксусно- и солянокислых растворов хитозана в зависимости от напряжения сдвига в широком диапазоне концентраций кислоты в растворе (рис. 1). Падение вязкости с ростом напряжения сдвига (рис. 1, кривые 1, 2, 5, 6) характеризует растворы хитозана как неньютоновские жидкости. Неньютоновское поведение растворов хитозана отмечается многими авторами [9, 10]. Однако детальные исследования позволили выявить особенность в поведении его умеренно-концентрированных растворов. Она заключается в том, что при фиксированной концентрации хитозана существует такая концентрация кислоты в растворе, при которой аномалия вязкости в исследованном диапазоне напряжений сдвига исчезает (рис. 1, линии 3, 4), то есть растворы проявляют свойства ньютоновской жидкости. Установлено, что существование области с характерным отсутствием аномалии вязкого течения для растворов хитозана различных концентраций воспроизводится, если изменение концентрации хитозана сопровождается пропорциональным изменением концентрации кислоты, то есть при определенных соотношениях этих компонентов в растворе. Для использованного в работе образца хитозана с $M_v = 8.3 \times 10^4$ и степенью деацетилирования 82% эти соотношения составляют $v_{ук}/v_{хтз} = 5.3$ и $v_{HCl}/v_{хтз} = 0.8$, где $v_{ук}$ и v_{HCl} – число молей уксусной и соляной кислот соответственно, $v_{хтз}$ – число молей звеньев хитозана. Обращает на себя внимание,

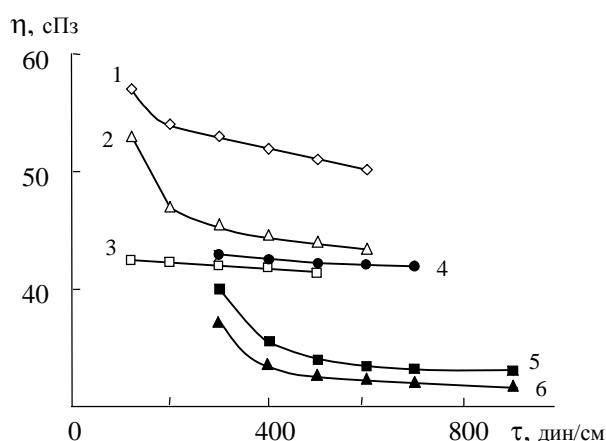


Рис. 1. Зависимость динамической вязкости от напряжения сдвига для 2%-ных растворов хитозана ($M_v = 8.3 \cdot 10^4$, степень деацетилирования 82%) в водных растворах: CH_3COOH 0.75 – (1), 5 – (2), 4 мас.% – (3); HCl 0.1 – (4), 0.2 – (5), 0.3 н – (6). $T = 21^\circ\text{C}$

что ньютоновские растворы характеризуются практически совпадающими значениями динамической вязкости вне зависимости от природы кислоты. Подобное поведение может означать, что в исследуемых растворах сведено к минимуму межцепное взаимодействие, а макромолекулы находятся в наименее деформируемой конформации. Возможность реализации такого состояния раствора для хитозанов ранее отмечена в работе [11].

Нами установлена корреляция между характером изменения вязкости при различных концентрациях кислоты (рис. 2) и глубиной деструкции макромолекул хитозана в этих растворах (рис. 3, кривые 2, 3) под воздействием пероксида водорода в составе окислительно-восстановительной системы. Показано, что наибольшая глубина деструкции цепей хитозана вплоть до образования водорастворимых олигомеров с $M_v \leq 4 \cdot 10^3$ достигается только в ньютоновском растворе вне зависимости от природы кислоты (рис. 3). Следует отметить, что экстремальный характер зависимости ММ деструктированного хитозана от концентрации соляной кислоты в растворе наблюдали авторы [12], изучавшие деструкцию хитозана при термическом разложении пероксида водорода. Характерно, что наименьшее значение ММ деструктированного хитозана, как и в настоящей работе, достигалось в разбавленных растворах соляной кислоты. Увеличение концентрации HCl в растворе приводило к резкому росту ММ продукта деструкции хитозана.

Полученный результат авторы [12] объясняют ингибирующим действием HCl. Наше исследование позволяет утверждать, что влияние состава растворителя (H_2O – кислота) на реакционную способность хитозана при деструкции и особенности вязкостного поведения растворов хитозана обусловлены различными конформационными состояниями макромолекул, которые определяются степенью протонирования аминогрупп полиглюкозамина. Степень протонирования увеличивается с ростом концентрации кислоты в растворе и константы диссоциации.

Известно, что хитозан имеет высокоупорядоченную структуру, образованную макромолекулами в конформации спирали [13]. Жесткость и стабильность этой структуры поддерживаются системой водородных связей, в образовании которых участвуют гидроксильные группы, атомы кислорода пиранозного кольца и гликозидной связи, а также аминогруппы. При низкой степени протонизации непротонированные аминогруппы будут оставаться связанными водородной связью, поддерживая жесткость и ис-

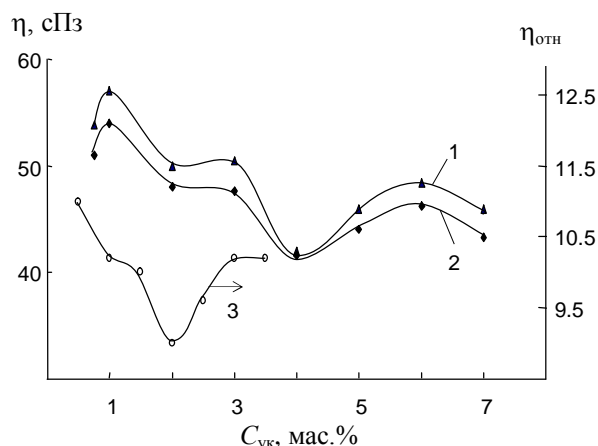


Рис. 2. Зависимость относительной вязкости 1%-ных (3) и динамической вязкости 2%-ных растворов хитозана ($M_v = 8.3 \cdot 10^4$, степень деацетилирования 82% при напряжении сдвига $200 \text{ дин} \cdot \text{см}^{-2}$ – (1), $500 \text{ дин} \cdot \text{см}^{-2}$ – (2) от концентрации уксусной кислоты в растворителе. $T = 21^\circ\text{C}$

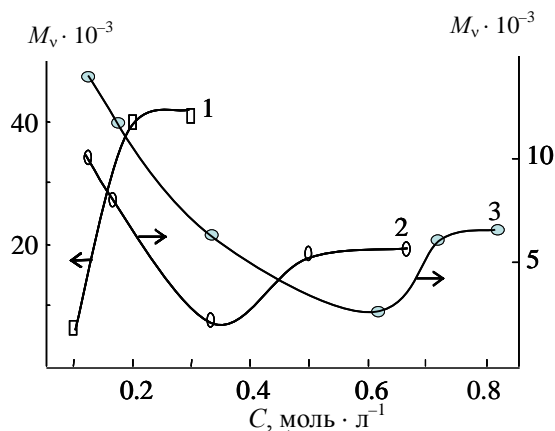


Рис. 3. Зависимость молекулярной массы деградированного хитозана от состава растворителя: водные растворы HCl – (1), CH_3COOH – (2, 3). Содержание хитозана в растворе: 1 мас.% – (1, 2), 2 мас.% – (3)

ходную спиральную конформацию макромолекулы хитозана. Это хорошо согласуется с литературными данными по конформационному поведению полипептидов с ионогенными группами при увеличении эффективного заряда макромолекул [14]. Макромолекулы полиэлектролитов способны оставаться вытянутыми, потеряв до 40% водородных связей [8]. Однако при некоторой «критической» степени протонирования наблюдается резкое изменение макропараметров растворов, связанное с превращением жесткой вытянутой макромолекулы в клубок. Этот процесс обусловлен кооперативным разрушением водородных связей [14] и сопровождается ростом гибкости макромолекулы и резким уменьшением величины сегмента.

Как отмечено выше [8, 14], конформационные состояния макромолекул полиэлектролитов, включая конформационный переход спираль – клубок, в растворах с разной ионной силой можно надежно установить из вискозиметрических измерений. С этой целью была изучена зависимость $[\eta]$ от молекулярной массы для хитозанов с M_v 8.3×10^4 , 1.3×10^5 и 1.6×10^5 и одинаковой степени деацетилирования. Измерения проводили в растворах с различной концентрацией уксусной кислоты без добавления низкомолекулярного электролита, то есть в условиях полиэлектролитного набухания. Экстраполяцию производили с помощью уравнения Фуосса–Страуса [8]:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = \frac{[\eta]}{1 + B\sqrt{c}}.$$

Полученные результаты (рис. 4) указывают на то, что при низкой ионной силе раствора ($c_{\text{кислоты}} < 2$ мас.%) $[\eta]$ пропорциональна $M_v^{1.5}$, в то время как в растворах с более высокой ионной силой ($c_{\text{кислоты}} = 4$ мас.%) для тех же самых образцов хитозана $[\eta] \sim M_v^{0.83}$. Согласно [15], показатель степени 1.5 соответствует форме макромолекулы, близкой к полностью вытянутой, а показатель степени от 0.5 до 1 характерен для полимеров с гибкими цепями, свернутыми в рыхлый клубок.

Таким образом, соотношение между зарядом макромолекул, зависящим от концентрации и силы кислоты в составе растворителя, а также числом сохранившихся нативных водородных связей, действительно обуславливает различные конформации макромолекул хитозана в растворах, а соответственно, вязкостные свойства последних.

Как подчеркивалось выше, наибольшая глубина деструкции хитозана достигается только

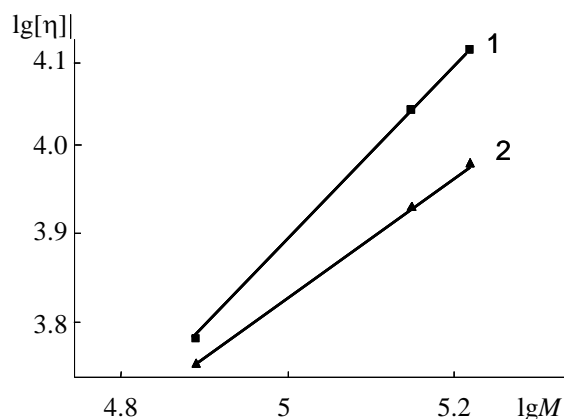


Рис. 4. Зависимость $\lg[\eta]$ от $\lg M$ для хитозанов со степенью деацетилирования 79%. Растворитель – водный раствор уксусной кислоты 1 мас.% – (1), 4 мас.% – (2). $T = 21^\circ\text{C}$

лишь в ньютоновских растворах, поэтому представляет интерес выявление конформационного состояния макромолекул в них. С этой целью были определены $[\eta]$ растворов хитозана с $v_{\text{ук}}/v_{\text{хтз}} = 5.3$ а также с большим и меньшим отношениями (таблица). Близость значений $[\eta]$ при низких концентрациях уксусной кислоты указывает на одинаковую конформацию макромолекул в этих растворах. Такие высокие значения $[\eta]$ свойственны растворам с жесткими вытянутыми макромолекулами [8], поэтому мы полагаем, что в умеренно-концентрированных растворах с $v_{\text{ук}}/v_{\text{хтз}} \leq 5$ макромолекулы хитозана сохраняют конформацию спирали. Различия в величинах динамической, а также относительной вязкостей для этих растворов (рис. 2) видимо объясняются склонностью к ассоциации вытянутых макромолекул, обладающих низким общим зарядом. Рост заряда на макромолекуле с ростом степени протонирования способствует отталкиванию макромолекул и разрушению ассоциатов в растворе. Этому состоянию отвечают левые ветви кривых на рис. 2. Наличие ассоциатов при низких концентрациях кислоты и исчезновение их с ростом общего заряда макромолекулы косвенно подтверждается отмеченным выше совпадением значений динамической вязкости ньютоновских растворов в разных растворителях (рис. 1). В области экстремума вязкости (рис. 2) происходит изменение конформации вплоть до перехода спираль – клубок. Правые ветви кривых на рис. 2 относятся к существованию макромолекул в конформации клубка.

Таблица

Зависимость характеристической вязкости растворов хитозана от концентрации уксусной кислоты в составе растворителя при $c_{0\text{хтз}} = 1$ мас.%

Концентрация кислоты, мас.%	0.75	2	4
$[\eta]$, дл·г ⁻¹	53	55	22

Итак, при увеличении степени протонирования аминокрупп хитозана макромолекулы из спиральной конформации переходят в клубок. В области перехода (ньютоновский раствор) реализуется состояние с наибольшей доступностью гликозидных связей вытянутых неассоциированных макромолекул воздействию деструктирующих реагентов, что ярко проявляется при деструкции хитозана в растворе. Как уже отмечалось, водорастворимый олигомер хитозана с $M_v \leq 4 \cdot 10^3$ образуется при дегградации высокомолекулярного хитозана ($M_v \sim 10^5$) в растворах, отвечающих состоянию ньютонов-

ской жидкости. Более того, это подтверждается и характером ММР олигохитозанов, полученных в различных условиях. При деструкции в ньютоновском растворе имеет место унимодальное распределение с преимущественным содержанием моно-, ди- и тримеров. При деструкции хитозана в растворах с аномалией вязкости получается образец с большим содержанием высокомолекулярной фракции (рис. 5). Это может быть связано с экранированием гликозидных связей, оказавшихся внутри клубка, от воздействия реагентов – деструкторов.

С ростом ионной силы раствора возрастает плотность клубка макромолекул хитозана, при этом доступность гликозидных связей хитозана деструктирующему действию свободных радикалов все более уменьшается. По нашему мнению, именно в этом заключается механизм ингибирования кислотами деструкции хитозана под действием пероксида водорода, а также радикалами *redox*-систем. Более резкий рост ММ деструктированного хитозана при увеличении концентрации соляной кислоты по сравнению с таковым для уксуснокислых растворов хитозана объясняется более резким ростом степени протонирования его аминогрупп при увеличении концентрации более сильной кислоты. Подобный характер зависимости степени протонирования от содержания и силы кислоты описан в работе [16].

Полученные из вискозиметрии данные и сделанные на их основании выводы имеют два принципиальных следствия. Первое связано с пониманием зависимости реакционной способности хитозана от состава растворителя, а точнее от конформационного состояния макромолекул. Второе – это возможность примирения

разных точек зрения в дискуссии о конформации макромолекул хитозана в растворах.

Существование конформационного перехода спираль – клубок позволяет объяснить несовпадение параметров в уравнениях Марка–Куна–Хаувинка, предлагаемых разными авторами. На основе полученных в настоящей работе результатов следует считать естественным существование разных зависимостей характеристической вязкости и молекулярной массы в случае использования разных растворителей. Проведенный нами анализ экспериментальных данных авторов [5] показывает, что в выбранном диапазоне соотношений кислота : хитозан последний действительно должен был иметь конформацию клубка. Все исследованные растворы можно отнести к правой ветви кривой зависимости вязкости от концентрации кислоты в составе растворителя. Что касается работы [3] тех же авторов, то анализ ее затруднен неполным описанием переменных в использованных авторами формулах, но, очевидно, модель червеобразной частично протекаемой цепи не противоречит предложенной ими ранее модели клубка, определяясь только выбранными условиями приготовления исследуемых растворов.

В заключение следует отметить, что существенное влияние на поведение макромолекул хитозана в растворах оказывает степень деацетилирования. Так, для образцов с одинаковой ММ ($8.3 \cdot 10^4$) изменение степени деацетилирования всего лишь с 79% до 82% приводит к падению характеристической вязкости с 98 до 53 $\text{дл} \cdot \text{г}^{-1}$ в области существования жестких макромолекул и еще более существенному – с 76 до 22 $\text{дл} \cdot \text{г}^{-1}$ – в области клубков. Тенденция к снижению $[\eta]$ растворов хитозана при увеличении

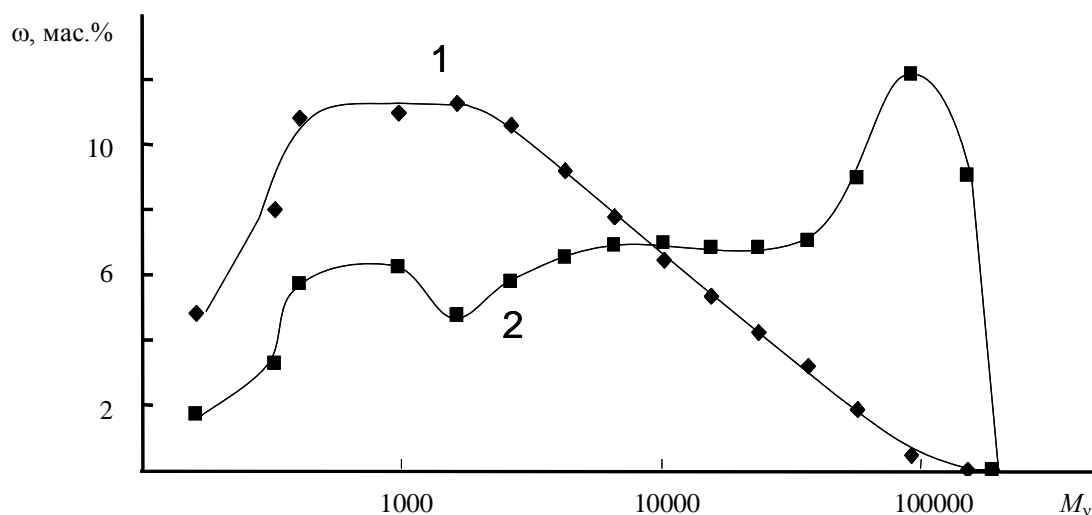


Рис. 5. ММР хитозана, подвергнутого деструкции в уксуснокислом растворе действием *redox*-системы H_2O_2 – аскорбиновая кислота. $v_{yk}/v_{xT3} = 5.3$, $c_{xT3} : 1 \text{ мас. \%} - (1), 10 \text{ мас. \%} - (2)$

степени деацетилирования сохраняется и в присутствии низкомолекулярного электролита [17]. Возможно, именно это объясняет аномально низкое значение параметра α в уравнении Марка–Куна, полученного в работе [1], где при определении зависимости $\lg[\eta]$ от $\lg M_v$ использованы хитозаны с разной степенью деацетилирования.

Таким образом, исследование вязкостных свойств разбавленных и умеренно-концентрированных растворов хитозана в водных растворах соляной и уксусной кислот различных концентраций выявило существование такого соотношения кислота : хитозан, при котором вырождается аномалия вязкого течения. Методом вискозиметрии установлено существование конформационного переход спираль – клубок макромолекул хитозана. Изменения конформации связаны с изменением степени протонирования аминогрупп хитозана. В области конформационного перехода гликозидные связи хитозана наиболее доступны для химических превращений.

Список литературы

1. Беркович Л.А., Тимофеева Г.И., Цюрупа М.П., Даванков В.А. // *Высокомолек. соед. А.* 1980. Т. 22. № 8. С. 1834–1841.
2. Гамзазаде А.И., Скляр А.М., Павлова С.А., Рогожин С.В. // *Высокомолек. соед. А.* 1981. Т. 23. № 3. С. 594–597.
3. Погодина Н.В., Павлов Г.М., Бушин С.В. и др. // *Высокомолек. соед. А.* 1986. Т. 28. № 2. С. 232–239.
4. Погодина Н.В., Евлампиева Н.П., Хрусталев А.З. и др. // *Высокомолек. соед. А.* 1986. Т. 28. № 2. С. 240–244.

5. Любина С.Я., Стрелина И.А., Нудьга Л.А. и др. // *Высокомолек. соед. А.* 1983. Т. 25. № 7. С. 1467–1472.
6. Федосеева Е.Н., Семчиков Ю.Д., Смирнова Л.А. // *Высокомолек. соед. Б.* 2006. Т. 48. № 10. С. 1930–1935.
7. Федосеева Е.Н., Смирнова Л.А., Сорокина М.А., Пастухов М.О. // *Журн. прикл. химии.* 2006. Т. 79. Вып. 5. С. 857–861.
8. Тенфорд Ч. *Физическая химия полимеров.* М.: Химия, 1965. 772 с.
9. Вихорева Г.А., Роговина С.З., Пчелко О.М., Гальбрайт Л.С. // *Высокомолек. соед. Б.* 2001. Т. 43. № 6. С. 1079–1084.
10. Миронов А.В., Вихорева Г.А., Кильдеева Н.Р., Успенский С.А. // *Высокомолек. соед. Б.* 2007. Т. 49. № 1. С. 136–138.
11. Немцев С.В. Автореферат дис. ... д-ра техн. наук. М.: ВНИРО, 2006.
12. . Qin C.Q, Du Y.M., Xiao L. // *Polymer Degradation and Stability.* 2002. V. 76. P. 211–218.
13. Горбачева И.Н., Овчинников Ю.К., Гальбрайт Л.С. и др. // *Высокомолек. соед. А.* 1988. Т. 30. № 12. С. 2512–2515.
14. Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я. *Структура макромолекул в растворах.* М.: Наука, 1964. 720 с.
15. Рафиков С.Р., Павлова С.А., Твердохлебова И.И. *Методы определения молекулярных весов и полидисперсности высокомолекулярных соединений.* М.: Изд-во Академии наук, 1963. 336 с.
16. Rinaudo J.D.M., Pavlov G. // *Polymer.* 1999. V. 40. P. 7029–7032.
17. Lamarque G., Lucas J.-M., Viton C., Domard A. // *Biomacromolecules.* 2005. № 6. P. 131–142.

VISCOUS PROPERTIES OF CHITOSAN SOLUTIONS AND ITS REACTIVITY

E.N. Fedoseeva, L.A. Smirnova, V.B. Fedoseev

The viscosity properties of diluted and moderately concentrated chitosan solutions in water solutions of acetic and hydrochloric acids have been investigated. It has been found that there exists a narrow interval of acid concentrations where the viscosity anomaly degenerates. By using viscosimetry, a helix-coil conformational transition of chitosan macromolecules at the change of acid concentration has been established. It has been shown that the conformation of macromolecules makes an essential impact on the efficiency of reactions with chitosan, as exemplified by the production of its oligomers by means of polyglucosamine radical destruction.