

УДК 615.011.4:661.123:547.458:595.3

ТЕХНОЛОГИЯ И СВОЙСТВА ХИТОЗАНА ИЗ РАЧКА ГАММАРУС**Гартман О.Р., Воробьева В.М.***ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Барнаул, e-mail: olgagartman@mail.ru*

Хитозан является перспективным вспомогательным веществом в фармацевтической технологии благодаря широкому спектру формообразующих и функциональных свойств. Значительный резерв сырья для получения хитозана представляют запасы озерного рачка-бокоплава гаммаруса. Хитозан из рачка гаммарус получали по запатентованной технологии (Патент РФ № 2065447 C08B37/08) и изучали его физико-химические и технологические свойства с целью создания лекарственных препаратов на его основе. Сравнительная характеристика физико-химических свойств хитозана рачка гаммарус и хитозана крабообразных свидетельствует об их близкой химической природе и молекулярной структуре. Показатели вязкости раствора хитозана в уксусной кислоте растворе 2% и сорбционная способность по метиленовому синему характеризуют хитозан гаммаруса как перспективное вспомогательное вещество для получения лекарственных форм в виде гелей и матрицы-носителя в иммобилизованных лекарственных формах. Технологические показатели характеризуют хитозан гаммаруса как полиморфную систему с доминирующей фракцией частиц 0,25–2,5 мм, влагосодержанием не более 10%, с очень малой насыпной массой и плохой сыпучестью, что необходимо учитывать в процессе переработки и создания лекарственных форм.

Ключевые слова: хитозан, ИК-спектры, физико-химические свойства, вязкость, фракционный состав, насыпная масса, сыпучесть

TECHNOLOGY AND PROPERTIES OF CHITOSAN FROM THE GAMMARUS**Gartman O.R., Vorobyeva V.M.***Altai State Medical University, Barnaul, e-mail: olgagartman@mail.ru*

Chitosan is a perspective auxiliary substance in pharmaceutical technology due to a wide range of formal and functional properties. The considerable reserve of raw material to obtain the chitosan represents the lake freshwater shrimp (gammarus). The chitosan from gammarus was received by the patented technology (Patent RF № 2065447 C08B37/08) and its physico-chemical and technological properties were studied to develop medicines on its basis. The comparative characteristics of physico-chemical properties of gammarus chitosan and the crab-like chitosan prove their similar nature of the chemical and molecular structure. Indicators of viscosity solution of chitosan in acetic acid solution 2% and sorption capacity for methylene blue allow characterize gammarus chitosan as perspective auxiliary substance for the receipt of medicinal forms in the form of gels and matrix-carrier in the immobilized medicinal forms. The technological indicators characterize gammarus chitosan as polymorphous system with the dominant fraction of the particles of 0,25–2,5 mm, with the moisture content not more than 10%, a very low bulk mass and bad friability. All the factors should be considered during the processing and drug developing.

Keywords: chitosan, IR-spectra, physico-chemical properties, fractional composition, bulk weight, looseness

Возможности варьирования свойств полимеров и создания на их основе иммобилизованных соединений позволяют разрабатывать лекарственные препараты с регулируемым высвобождением лекарственных веществ. Особенно актуально использование в этом направлении гидрофильных набухающих полимеров, обладающих не только формообразующей способностью, но и спектром функциональных свойств и высокой биосовместимостью с тканями макроорганизма, таких как полисахариды и аминополисахариды, к которым относятся хитин и хитозан [2, 7, 12].

Хитозан – поли-(1-4)-2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкоза получают при удалении ацетильной группы из положения C2 в хитине в результате обработки его в жестких условиях раствором щелочи. Появление в каждом элементарном звене макромолекулы свободной аминогруппы придает хитозану свойства полиэлектролита, одним из которых является характерный для растворов полиэлектролитов эффект полиэлектролитного набухания – аномаль-

ного повышения вязкости разбавленных растворов при уменьшении концентрации полимера [1, 3, 6, 13].

Физико-химические и биологические свойства данного полимера и публикуемые результаты клинического применения позволяют рассматривать хитозан и его производные перспективными веществами для получения лекарственных препаратов с различным фармакотерапевтическим действием [1, 13]. Вместе с тем изучению функциональных и технологических показателей хитозана посвящено ограниченное число работ [8].

Лучшим видом сырья для получения хитина и хитозана считается крупка из панциря краба камчатского (*Paralithodes camtschaticus*), позволяющая получить хитозан высокого качества с большим выходом готового продукта. Другими источниками могут служить гладиус кальмара и сепион каракатицы, куколка шелкопряда, кутикула тараканов, биомасса микроорганизмов, диатомовые водоросли, пчелиный подмор, панцирь речного рака, отходы про-

мышленного производства вешенки обыкновенной [1, 3, 10, 13].

Значительный резерв сырья для получения хитозана представляют запасы озерного рачка-бокоплава гаммаруса (*Gammarus lacustris*), принадлежащего к типу членистоногих, подтипу ракообразных, который обитает в озерах Южного Урала, Западной Сибири и Казахстана. Благодаря высокой способности рачка гаммарус к размножению сырьем является возобновляемым и потенциально значимым в регионе для получения хитина и хитозана. Относительно высокое содержание (25–30%) и малая толщина (100–500 мкм) панциря облегчают процесс его диспергирования, необходимого при всех способах получения хитина [3, 13]. Все вышеизложенное позволяет рассматривать хитозан гаммаруса как перспективное вспомогательное вещество для производства лекарственных препаратов, что и определило направление наших исследований.

Цель работы – получение хитозана из гаммаруса и определение его физико-химических и технологических свойств для нормативной документации и определения направлений использования в фармацевтической технологии.

Материалы и методы исследования

Хитозан получали из рачка гаммарус по реакции дезацетилирования хитина согласно методике, описанной в патенте [11].

Спектрофотометрию в инфракрасной области проводили в лаборатории Алтайского центра контроля качества и сертификации ЛС на ИК-Фурье спектрометре «Infalum FT – 801». Подготовку образцов для исследования проводили по методике ОФС 42-0043-07 ГФ XII изд. [4]. Результаты исследования обрабатывали с использованием программы «ZaIR» для «Windows». Элементный состав (CHN) хитозана гаммаруса определяли по газообразным продуктам сгорания на хроматографе Thermo- Electron с программным обеспечением Eager 300, преобразующим результаты в процентное содержание азота, углерода и водорода в образце [3].

Степень дезацетилирования хитозана устанавливали колориметрическим способом по методике, описанной в работе [9], основанной на определении оптической плотности растворов нингидрина, в который вносили навески хитозана от 2 до 10 мг.

Вязкость растворов хитозана устанавливали вискозиметрически при температуре 25 °С в уксусной кислоты растворе водном 2% согласно методике, описанной в ОФС 42-0038-07 [4]. Определение характеристической вязкости образцов хитозана позволило рассчитать среднюю молекулярную массу [3], по уравнению: $[\eta] = 1,38 \cdot 10^{-4} M_w^{0,85}$.

Определение остаточного белка в хитозане проводили по методике ГФ XII, ч. 1, ОФС 42-0053-07 «Определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом» [4].

Удельную поверхность хитозана устанавливали по методике, описанной в [8], согласно которой вели-

чина адсорбции 45 мг метиленового синего соответствует примерно 700 м² поверхности.

Технологические свойства хитозана определяли по стандартным методикам. Ситовой анализ проводили по ОФС 42-0136-09, ГФ XII, ч. 2, используя набор сит с величиной отверстия 7,1; 5,6; 5,0; 4,5; 3,5; 3,0; 2,5; 1,0; 0,25 мм. Влаго содержание полимера определяли по ОФС 42-0087-08 «Потеря в массе при высушивании». Сыпучесть хитозана оценивали на приборе ВП-12А. Насыпной объем порошков определяли по методике ОФС 42-0137-09 на вибрационном уплотнителе порошков модели 545р-АК-3 ЖЗТО [5].

Результаты исследования и их обсуждение

Рачок гаммарус содержит до 6% хитина, который выделяли путем последовательной обработки сырья 3% раствором пероксида водорода, раствором хлороводородной кислоты 0,6 моль/л, раствором натрия гидроксида 0,175 моль/л. Каждую стадию сопровождали промыванием сырья до нейтральной реакции промывных вод (рН = 7). Выделенный хитин промывали этанолом и ацетоном под вакуумом до полного извлечения пигментов и высушивали. Затем проводили дезацетилирование хитина натрия гидроксида раствором 50% при температуре 120–130 °С в течение одного часа в инертной среде. Для окончательной очистки хитозан промывали этанолом и ацетоном, высушивали на воздухе. Из 400 г исходного сырья (гаммарус) получили 25,13 г хитина, а после дезацетилирования 15,9 г хитозана. Выход хитозана по хитину составил 79,8% от теоретического.

Хитозан, полученный из гаммаруса, представлял собой светло-желтый мелкий порошок без запаха, не растворимый в воде очищенной, и натрия гидроксида растворе 10%, частично набухающий в названных растворителях с образованием на поверхности частиц полимера гелеобразной оболочки. Образец хитозана гаммаруса растворим в минеральных кислотах, легко растворим в органических кислотах.

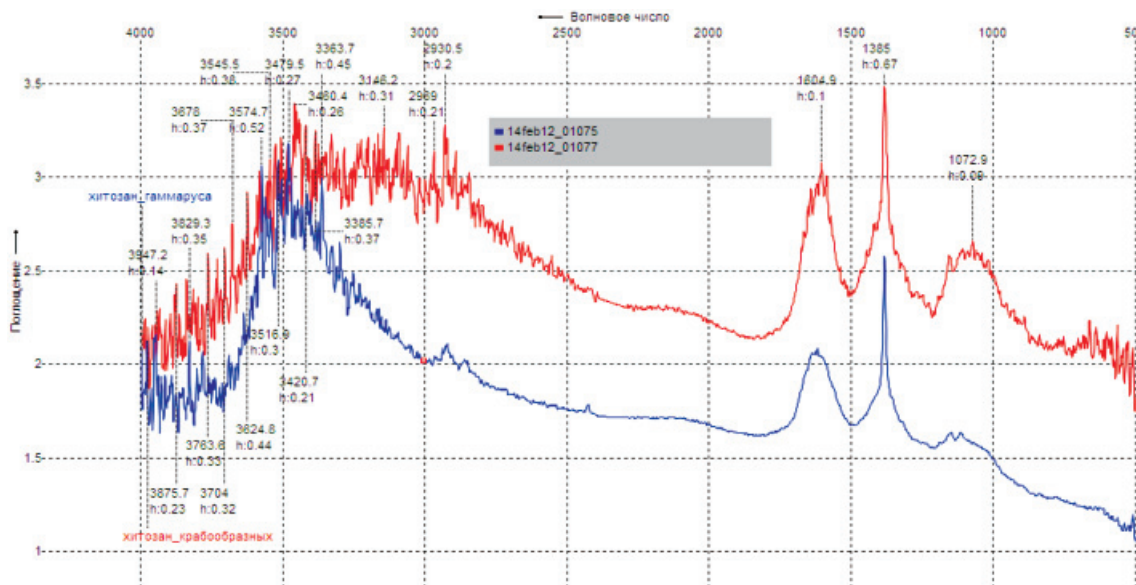
Идентификация хитозана гаммаруса проведена по элементному составу и ИК-спектрам. Элементный анализ (табл. 1) показал, что для хитозана, выделенного из рачка гаммарус, характерно такое же соотношение углерода, водорода и азота, как и для хитозана из краба камчатского, и оно близко к вычисленному по формуле хитозана соотношению названных элементов. Как известно, хитозан из морских ракообразных отличается от хитина более низким содержанием углерода и более высоким содержанием азота (в хитине содержание углерода – 47,3%; водорода – 6,4%; азота – 6,9%), данная особенность наблюдается и в хитозане из гаммаруса.

Таблица 1

Содержание углерода, водорода и азота в хитозане

Источник хитозана	Углерод, %	Водород, %	Азот, %
Вычислено по формуле	44,7	6,9	8,7
Краб камчатский	43,7	6,4	7,4
Рачок гаммарус	43,8	6,3	7,3

Для сравнительной характеристики хитозана гаммаруса и крабообразных, структуры полимера снимали ИК-спектр предоставленный ЗАО «Эвалар» (рисунок).



ИК-спектр хитозана гаммаруса (1) и хитозана крабообразных (2)

В ИК-спектре хитозана наблюдаются характерные полосы поглощения в областях 3500–3300 см⁻¹ и 1390–1000 см⁻¹, которые свидетельствуют о присутствии NH₂-группы. При этом поглощение в области 3500–3300 см⁻¹ вызвано колебанием связи N–H, а в области 1360–1000 см⁻¹ у всех типов аминов появляются полосы поглощения, вызванные участием C–N связи в скелетных колебаниях молекулы. В образце хитозана гаммаруса зарегистрированы полосы с максимумами при 1433 см⁻¹ деформационного колебания CH₂-

и CH₃-групп, 1373 см⁻¹ (перегиб) деформационного колебания OH-связи. В образце хитозана крабообразных наблюдается широкая полоса средней интенсивности в области 1320–1387 см⁻¹, соответствующая колебанию OH-связи [3,11].

Анализ ИК-спектров показал идентичность химического строения обоих образцов хитозана. Относительно широкий разброс характеристических полос по волновым числам может быть обусловлен структурно-молекулярной неоднородностью исследуемых материалов.

Таблица 2

Сравнительная характеристика физико-химических свойств хитозана рачка гаммарус и хитозана крабообразных

Физико-химические характеристики	Допустимый интервал	Хитозан гаммаруса	Хитозан крабообразных
Степень дезацетилирования, %	Не менее 75	89,5 ± 0,15	70,0 ± 0,20
Вязкость растворов в 2% уксусной кислоте, Дл/г	4–30	17,9	12,0
Удельная поверхность, м ² /г	1–200	21,6 ± 0,50	7,88 ± 0,23
Минеральный остаток (зольность), %	Не более 0,5	0,69 ± 0,038	0,36 ± 0,063
Остаточный белок, %	Не более 0,1	0,05 ± 0,025	0,49 ± 0,038
Средняя молекулярная масса	1,0 · 10 ⁶ –1,4 · 10 ⁶	1,38 · 10 ⁶	1,29 · 10 ⁶
Уровень кислотности, pH	6,8–7,3	7,1 ± 0,25	7,3 ± 0,25

Хитозан из рачка гаммарус обладает физико-химическими свойствами, характерными для хитозана крабообразных (табл. 2), при этом образует в уксусной кислоте растворе 2% более вязкие растворы (17,9 и 12,0 Дл/г соответственно), обладает выраженными сорбционными свойствами по отношению к метиленовому синему – маркеру низко- и среднемоле-

кулярных токсинов, модели лекарственных средств ($21,6 \pm 0,50 \text{ м}^2/\text{г}$). Данные функциональные свойства хитозана гаммаруса позволяют рассматривать его как перспективное вспомогательное вещество для получения лекарственных форм в виде гелей, а также матрицы-носителя лекарственных веществ в иммобилизованных лекарственных формах.

Таблица 3

Фракционный состав хитозана гаммаруса

Размер частиц, мм	Содержание, %					Размер частиц, мм	Содержание, %				
	Серия						Серия				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
> 7,1	5	5	8	6	-	> 3,0 < 3,5	3	4	5	3	6
> 5,6 < 7,1	8	7	10	3	-	> 2,5 < 3,0	6	7	8	2	11
> 5,0 < 5,6	8	8	8	4	1	> 1,0 < 2,5	35	38	20	35	53
> 4,5 < 5,0	3	3	5	1	1	> 0,25 < 1,0	18	20	16	40	21
> 3,5 < 4,5	4	2	5	3	1	< 0,25	10	6	15	3	2

Таблица 4

Технологические свойства хитозана гаммаруса

Серии хитозана	Насыпной объем, кг/м ³	Сыпучесть, г/с	Потеря в массе при высушивании, %
Серия 1	80,45 ± 0,460	0,372 ± 0,006	6,52 ± 0,76
Серия 2	108,11 ± 1,028	0,466 ± 0,027	6,87 ± 0,16
Серия 3	89,69 ± 0,500	0,234 ± 0,005	5,29 ± 0,08
Серия 4	96,91 ± 2,137	0,420 ± 0,020	8,43 ± 0,29
Серия 5	146,64 ± 2,043	1,040 ± 0,060	8,26 ± 0,28

Изучение технологических свойств хитозана гаммаруса показало, что он имеет неоднородный состав с доминирующей фракцией частиц 0,25–2,5 мм, влажосодержанием от $5,29 \pm 0,08$ до $8,43 \pm 0,29\%$, с очень малой насыпной массой от $80,45 \pm 0,460$ до $146,64 \pm 2,043 \text{ кг/м}^3$ и плохой сыпучестью менее 1,0 г/с.

Заключение

Сравнительная характеристика физико-химических свойств хитозана рачка гаммарус и хитозана крабообразных свидетельствует об их близкой химической природе и молекулярной структуре. Показатели вязкости раствора хитозана в уксусной кислоте растворе 2% и сорбционная способность по метиленовому синему позволяют рассматривать хитозан гаммаруса как перспективное вспомогательное вещество для получения лекарственных форм в виде гелей и матрицы-носителя в иммобилизованных лекарственных формах. Технологические показатели характеризуют хитозан гаммаруса как полиморфную систему с доминирующей фракцией частиц 0,25–2,5 мм, влажосодержанием не более 10%, с очень

малой насыпной массой и плохой сыпучестью, что необходимо учитывать в процессе переработки и создания лекарственных форм.

Список литературы

1. Абдуллин В.Ф., Артёменко С.Е., Овчинникова Г.П. Технология и свойства хитозана из панциря речного рака // Вестник СГТУ. – 2006. – № 4 (16). – Вып. 1. – С. 18–24.
2. Воробьева В.М., Турецкова В.Ф. Методологические основы разработки лекарственных препаратов на основе полимеров // Фундаментальные исследования. – 2004. – № 2. – С. 45–46.
3. Гартман О.Р. Способ и термодинамика получения хитина и хитозана: дис. ... канд. хим. наук. – Барнаул: АГУ, 1998. – 115 с.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации XII, ч.1 – М.: Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704 с: ил.
5. Государственная фармакопея Российской Федерации XI, ч.2 / Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2010 // farmakopeya12.ru.
6. Григорьева Е.В. Обоснование переработки гаммаруса Балтийского моря (*Gammarus lacustris*) методами биотехнологии: автореф. дис. ... канд. хим. наук. – М.: ВНИРО, 2008. – 24 с.
7. Дубинская А.М., Добротворский А.Е.. Применение хитина и его производных в фармации (обзор) // Хим.-фармац. журнал. – 1989. – Т. 23. – № 5. – С. 623–628.

8. Леваньков С.В., Якушев Е.В. Удельная поверхность хитозана и способ ее определения // Известия Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра. – 2001. – Т. 129. – С. 109–115.

9. Лопатин С.А., Немцев С.В., Варламов В.П. Новый колориметрический метод определения хитозана // Новые достижения в исследовании хитина и хитозана: материалы VI международной конференции. – М.: ВНИРО, 2001. – С. 298–299.

10. Раевских В.М. Разработка химических основ рационального использования гриба вешенка обыкновенная: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Барнаул, 2002. – 16 с.

11. Способ получения хитозана: патент РФ № 2065447 C08B37/08 / В.П. Голицин, В.Г. Цветков, А.В. Иванов, О.Р. Гартман; заявл. 30.11.92., опубл. 20.08.96. Бюллетень изобретений. – 1996. – № 23. – С. 164.

12. Современные биофармацевтические аспекты вспомогательных веществ / А.И. Тенцова, О.И. Терёшкина, И.П. Рудакова, И.А. Самылина, Т.А. Гуськова // Фармация. – 2012. – № 7. – С. 3–6.

13. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – М.: Наука, 2002. – 368 с.

References

1. Abdullin V.F., Artjomenko S.E., Ovchinnikova G.P. Tehnologija i svojstva hitozana iz pancirja rechnogo raka // Vestnik SGTU. 2006. no. 4(16). Vyp. 1. pp. 18–24.

2. Vorobyeva V.M., Tureckova V.F. Metodologicheskie osnovy razrabotki lekarstvennyh preparatov na osnove polimerov // Scientific Journal "Fundamental research" (Fundamentalnie issledovaniâ). 2004. no. 2. pp. 45–46.

3. Gartman O.R. Sposob i termodinamika poluchenija hitina i hitozana: dissertation of candidate of chemical Sciences (ASU, Barnaul. 1998), 115 p.

4. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii XII, ch.1. Izd-vo «Nauchnyj centr jekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya», 2008. 704 p.

5. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii XI, ch.2. Izd-vo «Nauchnyj centr jekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya», 2010 // farmakopeya12.ru.

6. Grigor'eva E. V. Obosnovanie pererabotki gammarusa Baltijskogo morja (Gammarus lacustris) metodami biotehnologii: author's abstract of the dissertation of candidate of chemical Sciences (Moscow: 2008). 24 p.

7. Dubinskaja A.M., Dobrotvorskij A.E.. Primenenie hitina i ego proizvodnyh v farmacii (obzor) // Chemical-pharmaceutical journal. 1989. Vol. 23. no. 5. pp. 623–628.

8. Levan'kov S.V., Jakushev E.V. Udel'naja poverhnost' hitozana i sposob ee opredelenija. Izvestija Tihookeanskogo nauchno-issledovatel'skogo rybohozajstvennogo centra (News of the Pacific research fisheries centre), 2001. T. 129. pp. 109–115.

9. Lopatin S.A., Nemcev S.V., Varlamov V.P. Novyj kolorimetriceskij metod opredelenija hitozana // Novye dostizhenija v issledovanii hitina i hitozana: materialy VI mezhdunarodnoj konferencii (New developments in the study of chitin and chitosan). M.: VNIRO, 2001. pp. 298–299.

10. Raevskih V.M. Razrabotka himicheskih osnov racional'nogo ispol'zovanija griba veshenka obyknovennaja: author's abstract of the dissertation of candidate of biological Sciences (ASU, Barnaul, 2002). 16 p.

11. Sposob poluchenija hitozana: patent RF № 2065447 S08B37/08 / V.P. Golitsin, V.G. Cvetkov, A.V. Ivanov, O.R. Gartman; zajavl. 30.11.92., opubl. 20.08.96. Bjulleten' izobretenij. 1996. no. 23. pp. 164.

12. Tencova A.I., Terjoshkina O.I., Rudakova I.P., Samylina I.A., Gus'kova T.A. Sovremennye biofarmaceuticheskie aspekty vspomogatel'nyh veshhestv // Farmacija (Pharmacy). 2012. no. 7. pp. 3–6.

13. Hitin i hitozan: Poluchenie, svojstva i primenenie / pod red. K.G. Skrjabina, G.A. Vihorevoj, V.P. Varlamova. M.: Nauka, 2002. 368 p.

Рецензенты:

Новоженков В.А., д.х.н., профессор, зав. кафедрой неорганической химии, ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный университет» Министерства образования и науки России, г. Барнаул;

Федосеева Л.М., д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии с курсом органической и токсикологической химии, ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Барнаул.

Работа поступила в редакцию 08.05.2013.