

На правах рукописи

УДК 629.5.07:656.61.052 (043.3)

ДОЛГОПЯТОВА НАТАЛИЯ ВЛАДИМИРОВНА

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ
D(+)-ГЛЮКОЗАМИНА НА ОСНОВАНИИ ИЗУЧЕНИЯ
КИНЕТИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ КИСЛОТНОГО
ГИДРОЛИЗА ХИТИНА**

05.18.04 – Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и
холодильных производств
02.00.04 – Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата технических наук

Мурманск – 2011

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Мурманский государственный технический университет»

Научные руководители:

кандидат химических наук Новиков Виталий Юрьевич;
доктор физико-математических наук,
профессор Путинцев Николай Михайлович

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор Слободов Александр Арсеньевич;
кандидат технических наук, доцент Петров Борис Федорович

Ведущая организация:

ОАО «Научно-исследовательский и проектно-конструкторский институт по развитию и эксплуатации флота (Гипрорыбфлот)» (С.-Петербург)

Защита диссертации состоится «03» ноября 2011 г. в 14 ч 00 мин на заседании диссертационного совета Д 307.009.02. в Мурманском государственном техническом университете по адресу: 183010, г.Мурманск, ул.Спортивная, д.13

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Мурманского государственного технического университета по адресу: 183010, г.Мурманск, ул. Спортивная, д.13

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 183010, г. Мурманск, ул.Спортивная, д.13, ФГБОУВПО «МГТУ»

Автореферат размещен на сайте www.mstu.edu.ru «26» сентября 2011г.
Автореферат разослан «__» сентября 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
канд. техн. наук, профессор

И. Н. Коновалова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Значительно возросший в последние годы интерес к полимерам природного происхождения – хитину и хитозану, их олигомерам и мономерам, обусловлен уникальным комплексом физико-химических свойств этих веществ, а так же присущим им широким спектром биологической активности (бактерицидной, противовирусной и др.). В России источником хитинсодержащего сырья являются промышленные крабы на Дальнем Востоке, северная креветка и акклиматизированный в Баренцевом море камчатский краб. Значительный вклад в исследования в области изучения хитина и хитозана из панциря ракообразных внесли ученые: Албулов А.И., Вихорева Г.А. Сафронова Т.М., Новиков В.Ю., Рогожин С.В., Гамзададе А.И., Варламов В.П., Феофилова Е.П., Маслова Г.В., Нудьга Л.А., Плиско Е.А., Немцев С.В. и др. Хитин является одним из основных источников промышленного получения ценного для медицинских целей вещества – D(+)-глюкозамина гидрохлорида (ГлА×НСl). Многие лекарственные препараты и биологически активные добавки содержат в своем составе этот моносахарид в качестве основы. До недавнего времени в России единственным лицензированным производителем субстанции ГлА×НСl была фирма ООО «НТЦ Экобиотек-Мурманск». В настоящее время D(+)-глюкозамина гидрохлорид на этой фирме не выпускают из-за нерентабельности его производства. Практически весь ГлА×НСl, содержащийся в лекарственных препаратах, закупается в странах Юго-Восточной Азии. Цена его низкая, качество препарата невысокое. В Мурманске продолжают исследования, направленные на дальнейшее совершенствование технологии получения ГлА×НСl для медицинских целей и поиск возможности возобновления его промышленного производства.

Химический кислотный гидролиз хитина является одним из основных методов получения хитоолигосахаридов и мономеров: D-глюкозамина (ГлА) и N-ацетил-D(+)-глюкозамина (АцГлА).

При полном гидролизе хитина в концентрированной хлороводородной кислоте образуется деацетилированный мономер ГлА×НСl, что обычно используют для его промышленного получения.

Изучение механизма кислотного гидролиза хитина с целью увеличения выхода мономеров и научно обоснованного совершенствования технологии их получения является актуальным.

Цель работы. Цель данной работы – совершенствование технологии получения ГлА×НСl на основании изучения кинетических закономерностей гидролиза хитина.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Изучение влияния степени деацетилирования и молекулярной массы хитина/хитозана на степень кристалличности этих полисахаридов.

2. Изучение кинетических закономерностей кислотного гидролиза хитина.

3. Изучение влияния степени деацетилирования на скорость кислотной деструкции хитина и выход $\text{ГлА} \times \text{НСІ}$.

4. Исследование кинетических закономерностей кислотного гидролиза мономера хитина АцГлА .

5. Определение параметров технологических процессов усовершенствованной технологии получения $\text{ГлА} \times \text{НСІ}$.

6. Апробация технологии $\text{ГлА} \times \text{НСІ}$, разработка нормативной документации, расчет экономической эффективности усовершенствованной технологии.

Научная новизна. Впервые изучено влияние степени ионизации и нуклеофильности кислот на кинетику гидролиза хитина и его мономера АцГлА .

Предложены математическая модель и механизм кислотного гидролиза хитина.

Рассчитаны константы скоростей элементарных реакций гидролиза хитина и АцГлА .

Показано, что предварительное ацетилирование промышленного хитина приводит к увеличению выхода $\text{ГлА} \times \text{НСІ}$.

Практическая значимость. Усовершенствована технология получения $\text{ГлА} \times \text{НСІ}$ из хитина на основе изучения кинетических закономерностей кислотного гидролиза хитина, определены близкие к оптимальным параметры технологического процесса.

На основании испытаний на базе учебно-экспериментального цеха ФГБОУВПО «МГТУ», (г.Мурманск) разработана и утверждена технологическая инструкция по получению $\text{ГлА} \times \text{НСІ}$ из предварительно ацетилированного хитина и технические условия на $\text{D}(+)$ -глюкозамина гидрохлорид (полуфабрикат), предназначенный для промышленной переработки и очистки в целях дальнейшего применения в химико-фармацевтической промышленности.

На базе учебно-экспериментального цеха ФГБОУВПО «МГТУ» выработана опытная партия $\text{ГлА} \times \text{НСІ}$, произведенная в соответствии с усовершенствованной технологией. Рассчитан ожидаемый экономический эффект от внедрения предложенной технологии.

Подана заявка на патент № 2010121186/04 (030079), дата подачи заявки (приоритет): 25.05.2010. Получено решение о выдаче патента 15.08.2011.

Основные положения работы, выносимые на защиту:

1. Усовершенствованная технология получения $\text{ГлА} \times \text{НСІ}$ из хитина.

2. Результаты изучения влияния степени деацетилирования и молекулярной массы на степень кристалличности хитина/хитозана.

3. Результаты изучения влияния степени ионизации и нуклеофильности кислот на кинетику гидролиза хитина.

4. Математическая модель и вероятный механизм процесса кислотного гидролиза хитина.

5. Результаты изучения кислотного гидролиза мономера хитина АцГлА.

6. Результаты изучения влияния предварительного ацетилирования промышленного хитина на выход ГлА×НСІ.

7. Производственная апробация усовершенствованной технологии получения ГлА×НСІ из хитина с использованием закономерностей кислотного гидролиза хитина.

8. Технологическая инструкция на усовершенствованную технологию и ТУ на ГлА×НСІ (полуфабрикат).

9. Ожидаемая экономическая эффективность усовершенствованной технологии.

Внедрение результатов исследований. На основании проведенных испытаний на базе учебно-экспериментального цеха ФГБОУВПО «МГТУ», (г.Мурманск) разработаны технологическая инструкция по получению ГлА×НСІ из хитина с использованием закономерностей кислотного гидролиза предварительно ацетилированного хитина и технические условия на D(+)-глюкозамина гидрохлорид (полуфабрикат). Результаты исследований, полученных в диссертационной работе, внедрены и используются в учебном процессе для студентов направления 020100.62 «Химия» и направления 260100.62 «Технология продуктов питания», специальности 260302.62 «Технология рыбы и рыбных продуктов» и аспирантов, обучающихся по специальности 02.00.04 «Физическая химия».

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы представлены на международных научно-технических конференциях профессорско-преподавательского состава, аспирантов, научных и инженерных работников МГТУ «Наука и образование» (г. Мурманск, 2008-2011г.), международной научно-практической конференции «Техника и технологии переработки гидробионтов и сельскохозяйственного сырья» МГТУ (г. Мурманск, 2008), 7-ой Международной научной конференции «Инновации в науке и образовании – 2009» КГТУ (г.Калининград), 10-ой международной конференции молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии» на базе Казанского государственного технологического университета (г.Казань, 2009), школе молодых ученых «Научно-прикладные проблемы химической технологии минерального сырья и гидробионтов Кольского региона» МГТУ (г.Мурманск, 2009), 10-ой Международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (РосХит 2010г. Нижний Новгород.), 10-ой Международной конференции Европейского Хитинового Общества (EUCHIS 2011, г. Санкт-Петербург).

Экспериментальная часть работы выполнена в Мурманском государственном техническом университете в рамках научно-

исследовательской работы по госбюджетной теме «Химический и электрохимический гидролиз гидробионтов различной природы» (ГР 01200603803) и государственного контракта № П744.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 работ, из них 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, подана заявка на патент № 2010121186/04 (030079), приоритет от 25.05.2010. Получено решение о выдаче патента 15.08.2011.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, списка литературы (168 наименования) и 4 приложений. Работа изложена на 157 страницах, содержит 19 таблиц, 36 рисунков.

Содержание работы

Введение. Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цель исследования, научная новизна, защищаемые положения. Показана практическая значимость результатов работы.

В первой главе «Обзор литературы» приведен анализ отечественной и зарубежной литературы по вопросам, связанным со способами переработки хитинсодержащего сырья, получением хитина, хитозана и их мономеров – АцГлА и ГлА, строением и закономерностями химического гидролиза хитина, хитозана и их мономеров.

Во второй главе «Объекты и методы исследования» определены объекты исследования, методы анализа, описание усовершенствованной технологии получения ГлА×НСl, порядок статистической обработки экспериментальных данных.

В качестве объектов исследования были выбраны хитин, соответствующий ТУ 9228-001-04703997-93 и его мономеры – ГлА×НСl и АцГлА. ГлА×НСl получали по известной технологии с использованием хитина, соответствующего ТУ 9228-001-04703997-93 «Хитин из панциря крабов».

Анализ сырья и продуктов выполняли в лаборатории биохимии и технологии гидробионтов ПИНРО (г. Мурманск) по методикам, описанным в научной литературе и нормативных документах.

Степень деацетилирования (DD) хитина и хитозана определяли методами потенциометрического титрования и инфракрасной спектроскопии с использованием ИК-спектрофотометра IR-420 (Shimadzu, Япония).

Молекулярную массу (ММ) хитина и хитозана определяли вискозиметрическим методом и методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

ГлА×НСl получали гидролизом в НСl предварительно ацетилированного хитина. Соотношение масс ацетилированного хитина и НСl составляло 1:1,5, гидролиз проводили при температуре $82\pm 4^\circ\text{C}$ и постоянном перемешивании в течение 2 часов.

Количественное определение суммарного содержания восстанавливающих сахаров и АцГлА определяли спектрофотометрически на спектрофотометре UV-3101PC (Shimadzu, Япония). Содержание

ГлА×НСI рассчитывали по разнице между общим количеством восстанавливающих сахаров и содержанием АцГлА.

Изучение структурных свойств образцов хитина и хитозана проводили в ИХТРЭМС Кольского научного центра РАН на дифрактометре рентгеновском общего назначения ДРОН-2 (НПО «Буревестник») методом рентгеновского фазового анализа. Идентификацию фаз проводили по данным таблицы YCPDS.

Определение технологических параметров процесса, близких к оптимальным, было проведено с использованием метода планирования эксперимента. Расчеты выполнены с помощью программы STATISTICA Ver.8.0 (StatSoft., Inc.).

В третьей главе «Результаты и их обсуждение» приведены результаты исследований и их обсуждение; усовершенствованная технология получения ГлА×НСI из хитина с использованием закономерностей кислотного гидролиза хитина.

1. Влияние молекулярной массы и степени деацетилирования на степень кристалличности хитина/хитозана

С целью изучения влияния DD хитина на скорость, глубину кислотной деструкции и выхода ГлА×НСI предварительно было изучено влияние DD и MM хитина/хитозана на степень кристалличности ($\chi_{кр}$) этих полисахаридов. Результаты изучения влияния MM и DD хитина/хитозана на $\chi_{кр}$ исследованных образцов приведены в табл.1.

Таблица 1

Молекулярная масса, степень деацетилирования и степень кристалличности образцов хитина/хитозана

MM, Да	DD, %	$\chi_{кр}$, %
10650	62	69,89
10650	88	66,08
10650	91	72,41
50270	70	66,78
50270	84	73,19
50270	91	68,33
510650	60	64,34
510650	88	65,69
510650	91	57,96
400000	11	61

Из табл.1 следует, что $\chi_{кр}$ исследованных образцов при уменьшении MM незначительно увеличивается. Статистическая обработка экспериментальных данных показала достоверность увеличения степени

кристалличности исследованных образцов хитина/хитозана при уменьшении ММ образцов при доверительной вероятности 95 %.

Зависимость кристалличности от DD не была обнаружена (табл.1).

Из литературных данных известно, что $\chi_{кр}$ хитина практически не оказывает влияния на механизм реакции его щелочного деацетилирования, а особенность кинетической кривой объясняется сольватацией молекул хитина в водно-щелочной среде. По всей видимости, при изучении закономерностей кислотного гидролиза хитина, влияние степени кристалличности образцов хитина/хитозана на механизм деструкции и деполимеризации этих полисахаридов можно не учитывать.

2. Влияние степени ионизации и нуклеофильности кислот на кинетику гидролиза хитина и N-ацетил-D-глюкозамина

2.1. Влияние степени ионизации и нуклеофильности кислот на кинетику деструкции хитина

Результаты изучения кинетики деструкции хитина под действием кислот различной силы при $C_H=1,0$ моль/дм³ приведены на рис.1. Для HCl, HClO₄ и H₃PO₄ при $C_H=0,5$ и 2,0 моль/дм³ получены аналогичные результаты.

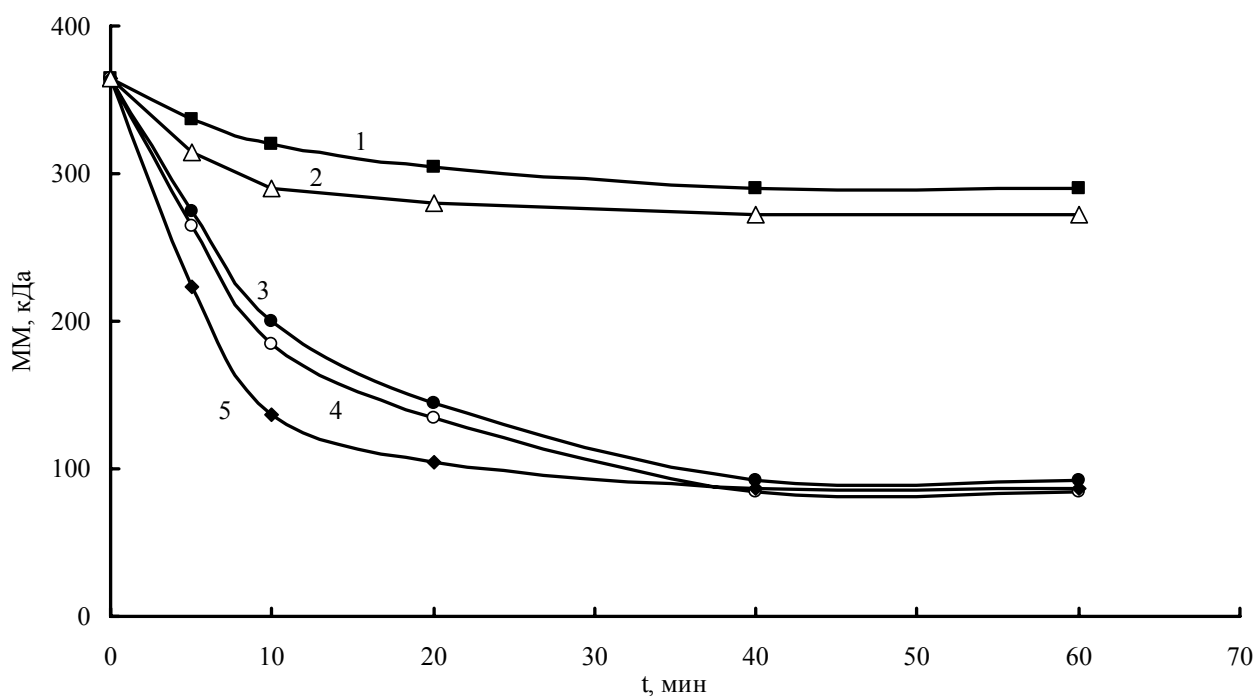


Рис.1. Кинетические кривые деструкции хитина в растворах HCl(1), H₂SO₄(2), HClO₄(3), H₃PO₄(4) и CH₃COOH(5) с $C_H=1$ моль/дм³ при 50°C. ММ – молекулярная масса (кДа), t – время (мин).

Из рисунка 1 следует, что скорость гидролиза гликозидной связи в условиях эксперимента зависит от природы кислоты. Так, в слабой уксусной кислоте (константа диссоциации $K_d=1,8 \times 10^{-5}$) и фосфорной

кислоте (константа диссоциации по первой ступени $K_d=7,5 \times 10^{-3}$) скорость деструкции наименьшая (рис.1, кривые 5 и 4). В присутствии сильных кислот (HClO_4 , HCl и H_2SO_4) начальная скорость гидролиза хитина значительно выше, чем в CH_3COOH и H_3PO_4 (рис.1, кривые 1-3).

Анализ кинетических кривых гидролиза показал, что процесс деструкции хитина в кислой среде не может быть описан реакцией гидролиза гликозидных связей полисахарида, а значит и простым кинетическим уравнением первого (псевдопервого) порядка.

В соответствии с предполагаемым нами механизмом этот процесс может быть описан несколькими параллельными элементарными реакциями первого (псевдопервого) порядка:

- реакция гидролиза гликозидных связей у ацетилированного звена (А-звено, константа скорости реакции k_1);
- реакция гидролиза гликозидных связей у деацетилированного звена (D-звено, константа скорости реакции k_2);
- реакция деацетилирования (константа скорости реакции k_3).

Для расчета констант скоростей этих реакций было выполнено математическое моделирование механизма гидролиза.

Представим молекулу хитина состоящей из N_a ацетилированных и N_d деацетилированных звеньев. Пусть количество связей у первого углеродного атома (C1) ацетилированного звена (А-звена) равно n_a , количество таких же связей у деацетилированного звена (D-звена) – n_d , количество разорванных связей у ацетилированного и деацетилированного звеньев обозначим соответственно как L_a и L_d .

Тогда механизм деструкции можно описать следующей системой уравнений:



Если при деацетилировании изменится количество ацетилированных (деацетилированных) звеньев, то также изменится количество гликозидных связей у C1 атома.

Общее количество связей в молекуле равно

$$n = n_a + n_d, \quad (2)$$

общее количество звеньев в молекуле

$$N = N_a + N_d = n_a + n_d + 1. \quad (3)$$

В последнем равенстве одно звено на «правом» восстанавливающем конце молекулы является неопределенным (ацетилированное – А или деацетилированное – D).

Степень деацетилирования молекулы полисахарида:

$$d = N_d / (N_a + N_d) \sim n_a / (n_a + n_d), \quad (4)$$

где приближенное равенство определяется наличием именно того единственного «правого» неопределенного звена (А или D). При больших значениях ММ количество звеньев так же большое, поэтому приблизительно количество связей будет равно количеству звеньев.

Средняя молекулярная масса звена хитина/хитозана:

$$m = m_d \times d + m_a \times (1 - d), \quad (5)$$

где m_a – ММ ацетилированного звена (203 а.е.м.),

m_d – ММ деацетилированного звена (161 а.е.м.).

Среднюю ММ звена можно приравнять к массе неопределенного «правого» звена.

ММ хитина/хитозана в момент времени t будет равна:

$$MM(t) = m_a \times N_a + m_d \times N_d = m_a \times n_a + m_d \times n_d + m. \quad (6)$$

Исходя из этих представлений, система дифференциальных уравнений процесса деструкции будет иметь вид:

$$\begin{cases} \frac{dn_a(t)}{dt} = -(k_1 + k_2) \times n_a(t), \\ \frac{dn_d(t)}{dt} = k_3 \times n_a(t) - k_2 \times n_d(t), \\ \frac{dL(t)}{dt} = k_1 \times n_a(t) + k_2 \times n_d(t). \end{cases} \quad (7)$$

Здесь $L(t) = L_a(t) + L_d(t)$.

Начальные условия гидролиза определяли с учетом того факта, что хитин не является полностью ацетилированным полисахаридом и имеет некоторую начальную степень деацетилирования d_0 . С учетом этого получим:

$$d_0 \sim n_{d0} / (n_{a0} + n_{d0}), \quad (8)$$

$$m_0 = m_a \times (1 - d_0) + m_d \times d_0, \quad (9)$$

$$n_{d0} = n_{a0} \times d_0 / (1 - d_0), \quad (10)$$

тогда начальная ММ будет равна:

$$MM_0 = m_a \times n_{a0} + m_d \times n_{d0} + m_0, \quad (11)$$

$$MM_0 = m_a \times n_{a0} + m_d \times n_{a0} \times d_0 / (1 - d_0) + m_a - m_a \times d_0 + m_d \times d_0. \quad (12)$$

Преобразуем выражение и выразим n_{a0} :

$$n_{a0} = (1 - d_0) \times [MM_0 / (m_a - m_a \times d_0 + m_d \times d_0) - 1]. \quad (13)$$

Решение системы уравнений с учетом начальных условий гидролиза с помощью программы Maple 13 (Waterloo Maple Inc.) дает для $n_a(t)$ и $n_d(t)$ следующие выражения:

$$n_a(t) = (1 - d_0) \left(\frac{MM_0}{203 - 42 \cdot d_0} - 1 \right) \exp(-(k_1 + k_3)t) \quad (14)$$

$$n_d(t) = - \frac{(MM_0 - 203 + 42 \cdot d_0) \left((k_3 + k_1 d_0 - k_2 d_0) \exp(-k_2 t) - k_3 (1 - d_0) \exp(-(k_1 + k_3)t) \right)}{(k_1 + k_3 - k_2) (-203 + 42 \cdot d_0)} \quad (15)$$

где 42 – разность молекулярных масс ацетилированного и деацетилированного мономерных звеньев ($203 - 161 = 42$ а.е.м.).

Поскольку экспериментально определяли средневязкостную ММ после стандартного деацетилирования образцов хитина, (эта ММ близка к среднемассовой ММ), то при математическом моделировании процесса

гидролиза необходимо учесть уменьшение ММ образцов, вызванное потерей ацетильных групп полисахаридом после реакции стандартного деацетилирования (в 50 %-ной NaOH, при температуре 100 °С в течение 60 минут).

Если после деструкции ММ равна $MM(t)$, то после стандартного деацетилирования образца ММ будет равна $MM_{st}(t)$.

Экспериментальные данные по стандартному деацетилированию хитина были получены ранее (Новиков В.Ю), из которых выведена эмпирическая зависимость между начальной DD полисахарида и DD в момент времени t :

$$X(t) = \frac{d_i(t) - d_{i0}}{d_{lim} - d_{i0}}, \quad (16)$$

где $d_i(t)$ – DD в момент времени t , d_{i0} – начальная DD, d_{lim} – предельная DD, которую можно принять за 1.

При $t=60$ мин и температуре деацетилирования 100 °С, $X(t)=0,6813$. С учетом этих данных, после преобразования выражения (16) получим:

$$d_i(60) = 0,6813 - 0,3187 \times d_{i0}.$$

Тогда DD хитина после стандартного деацетилирования:

$$d_{st}(t) = 0,6813 + 0,3187 \times d(t), \quad (17)$$

ММ будет определяться по выражению:

$$\begin{aligned} MM_{st}(t) &= MM(t) \frac{m_a - (m_a - m_d) \times d_{st}(t)}{m_a - (m_a - m_d) \times d(t)} = \\ &= MM(t) \frac{203 - 42 \times (0,6813 + 0,3187 \times d(t))}{203 - 42 \times d(t)}. \end{aligned} \quad (18)$$

Начальную ММ хитина при d_0 , полученную в эксперименте с учетом реакции деацетилирования обозначим как MM_{st0} . Тогда начальная ММ исходного хитина будет равна:

$$MM_0 = MM_{st0} \frac{203 - 42 \times d_0}{203 - 42 \times (0,6813 + 0,3187 \times d_0)}. \quad (19)$$

С учетом вышеприведенных расчетов, допущений и подстановок было получено аналитическое уравнение для расчета $MM(t)$. Предложенная модель была оптимизирована методом наименьших квадратов с использованием пакета «Optimization» программы Maple 13 (Waterloo Maple Inc.). Для расчета использовали экспериментальные значения $MM(t)$ для изученных кислот при $C_H = 0,5, 1,0$ и $2,0$ моль/дм³. Полученные в результате оптимизации константы скоростей реакций (k_1, k_2 и k_3) приведены в табл.2.

Константы скоростей реакций деструкции и деацетилирования хитина (k) при различной молярной концентрации эквивалента кислот (C_H). Начальная степень деацетилирования хитина $d_0 = 0,29$

$k \times 10^3, \text{ мин}^{-1}$	Кислота, значение pK_a				
	$\text{CH}_3\text{COOH},$ 4,7	$\text{H}_3\text{PO}_4,$ 2,12	$\text{H}_2\text{SO}_4,$ -5,6	$\text{HCl},$ -6,7	$\text{HClO}_4,$ -8,95
$C_H=0,5 \text{ моль/дм}^3$					
k_1		32,96		27,18	87,00
k_2		0,33		0,76	0,79
k_3		127,33		60,09	82,28
$C_H=1,0 \text{ моль/дм}^3$					
k_1	16,35	35,00	82,9	71,9	140,00
k_2	0,31	0,61	2,05	0,61	4,80
k_3	86,1	140,00	16,0	13,76	38,05
$C_H=2,0 \text{ моль/дм}^3$					
k_1		40,53		129,96	199,62
k_2		0,77		2,14	1,14
k_3		131,85		72,84	57,75

Из данных, приведенных в табл.2, следует, что константа скоростей реакций гидролиза гликозидных связей у ацетилированных звеньев (k_1) на порядок больше, чем у деацетилированных (k_2) для всех изученных кислот при всех концентрациях. Одновременно с реакцией деструкции с большой скоростью протекает реакция деацетилирования (k_3).

На рис.2 приведена зависимость констант скоростей реакций деструкции и деацетилирования от pK_a изученных кислот при $C_H=1,0 \text{ моль/дм}^3$. Аналогичные зависимости получены при концентрации кислот $C_H=0,5$ и $2,0 \text{ моль/дм}^3$. С увеличением степени ионизации кислот константы k_1 и k_2 возрастают. Наблюдается увеличение констант скорости гидролиза обеих гликозидных связей в ряду кислот: $\text{CH}_3\text{COOH} < \text{H}_3\text{PO}_4 < \text{HCl} < \text{H}_2\text{SO}_4 < \text{HClO}_4$. Эта зависимость согласуется с общим представлением о степени ионизации кислот и подтверждает протекание реакции гидролиза гликозидных связей по механизму S_N1 .

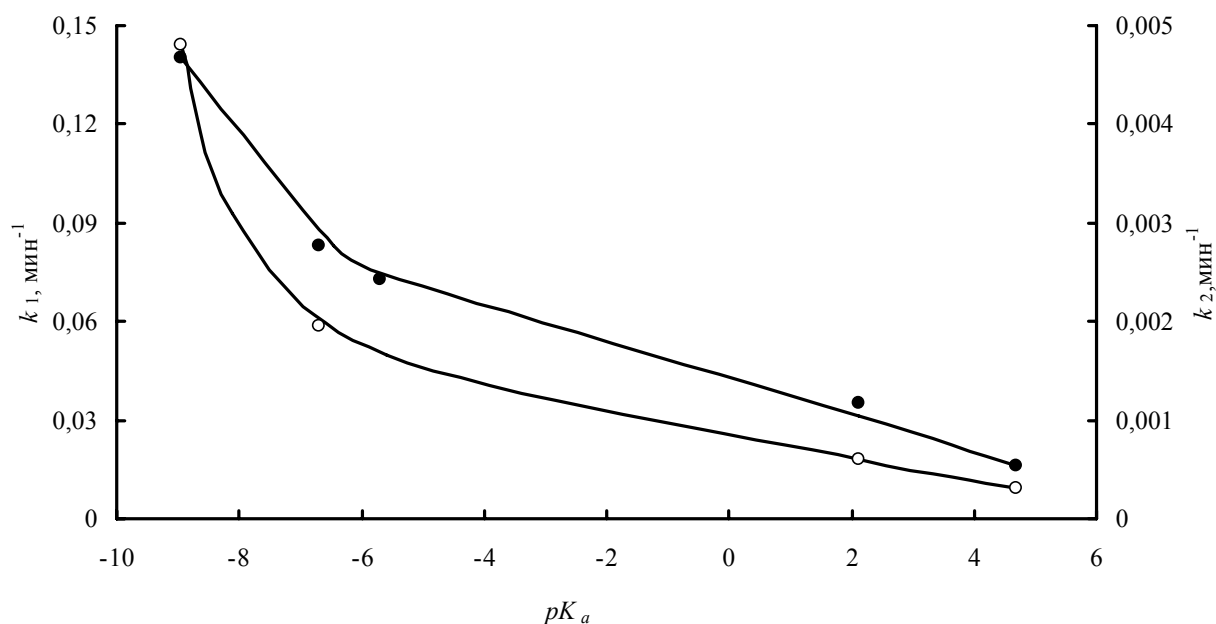


Рис.2. Зависимость констант скоростей реакций деструкции хитина от pK_a кислот. k_1 (1) и k_2 (2). $C_H=1,0$ моль/дм³.
 k –константа скорости реакции (мин⁻¹), pK_a – константа кислотной диссоциации.

Для константы реакции деацетилирования k_3 нет однозначной зависимости от степени ионизации кислот.

Известно, что скорость реакций, протекающих по механизму S_N1 не зависит от природы нуклеофила, так как он не принимает участия в лимитирующей стадии. На основе анализа зависимости нуклеофильности кислотных остатков от степени ионизации кислот, относительной электроотрицательности центрального атома, размеров аниона и сольватации, изученные анионы кислот можно расположить по уменьшению их нуклеофильности в следующий ряд: $PO_4^{-3} > CH_3COO^- > SO_4^{-2} \sim Cl^- \sim ClO_4^-$.

Рассчитанные константы k_1 и k_2 (табл.2, рис.2) не коррелируют с нуклеофильностью анионов изученных кислот. Напротив, константа скорости деацетилирования (k_3) находится в соответствии с нуклеофильностью анионов кислот. При концентрации кислот $C_H=1$ моль/дм³ Максимальные значения k_3 наблюдаются при гидролизе в фосфорной кислоте (сильный нуклеофил, $k_3 = 140 \times 10^{-3}$ мин⁻¹) и уксусной (сильный нуклеофил, $k_3 = 86 \times 10^{-3}$ мин⁻¹). В хлороводородной, хлорной и серной кислотах (слабые нуклеофилы) k_3 значительно ниже (табл.2).

Полученные данные согласуются с представлениями о протекании гидролиза гликозидных связей по механизму S_N1 , ацетамидных – по механизму S_N2 , в котором скорость реакции возрастает с увеличением нуклеофильности атакующего агента.

2.2. Влияние степени ионизации и нуклеофильности кислот на кинетику гидролиза *N*-ацетил-*D*-глюкозамина

Одним из основных направлений использования хитина является гидролиз его до мономеров. Полную деполимеризацию хитина обычно проводят в кислой среде под действием HCl при нагревании. В этих условиях расщепляются гликозидные связи в полисахариде с образованием мономеров- ГлА и АцГлА. Чаще всего в процессе кислотного гидролиза получают мономеры в виде солей соответствующих кислот, в присутствии которых проводится гидролиз.

Гидролиз АцГлА проводили в HCl и HClO₄ с концентрациями C_H от 1 до 12,2 моль/дм³ при температуре 80°C. Для H₃PO₄ гидролиз проводили при концентрациях C_H от 1 до 22 моль/дм³ при T=80 °C. Пример кинетических кривых гидролиза АцГлА в растворах HCl, HClO₄, H₃PO₄ при эквивалентной концентрации кислот C_H=6 моль/дм³ и T=80°C представлен на рис.3. Для других изученных концентраций кислот получены аналогичные закономерности.

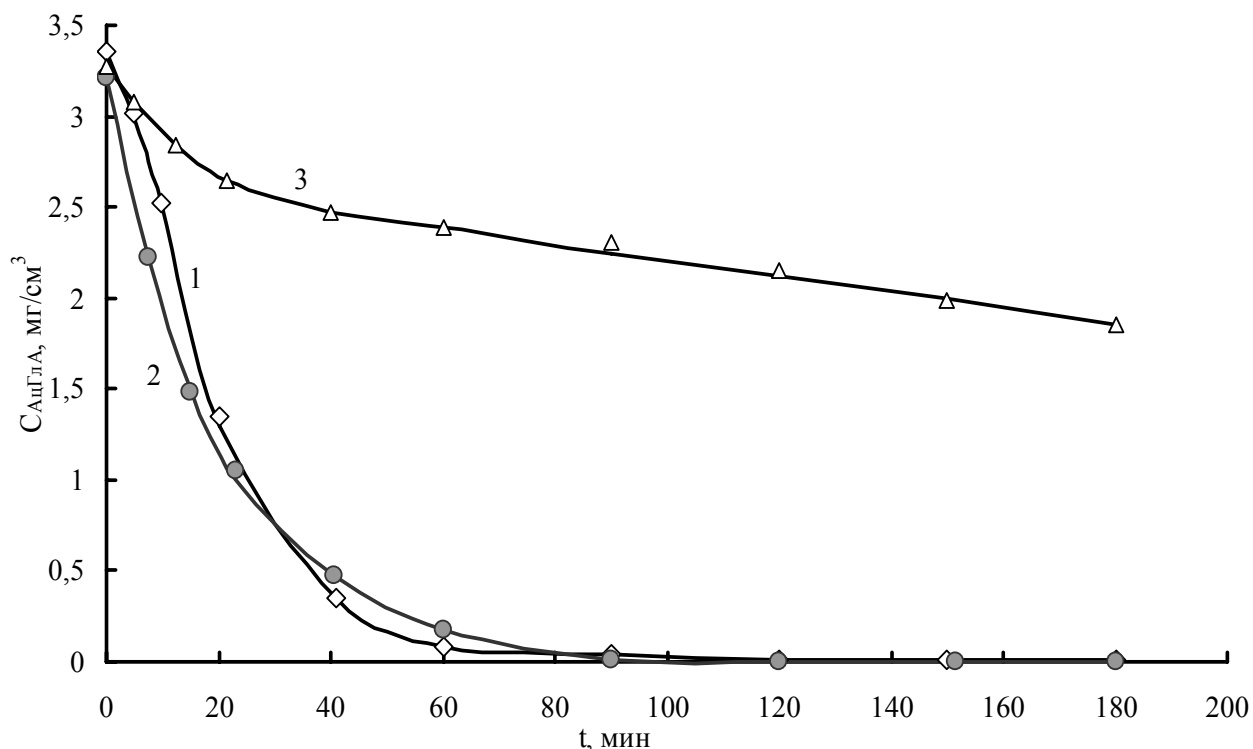


Рис.3. Кинетические кривые гидролиза АцГлА в HCl(1), HClO₄(2), H₃PO₄(3) при эквивалентной концентрации кислот 6 моль/ дм³.

Константы скорости реакции деацетилирования АцГлА в различных кислотах были рассчитаны с помощью уравнения для описания реакции первого (псевдопервого) порядка: $k_A = 1/t \ln (C_0/C)$.

Гидролиз ацетамидных связей в АцГлА можно отнести к реакциям специфического кислотного катализа. Гидролиз начинается с протонирования атома кислорода карбонильной группы с образованием карбокатиона, который затем нуклеофильно атакуется молекулами воды.

При этом образуется оксониевая структура, которая, претерпевая ряд превращений, распадается с образованием конечных продуктов гидролиза – уксусной кислоты и соли ГЛА. При протонировании ацетамидной группы по атому кислорода образуется карбокатион, в котором положительный заряд делокализован, что является энергетически выгодным процессом.

Константа скорости реакции гидролиза АцГЛА, рассчитанная в соответствии с этим механизмом, зависит от концентрации ионов водорода и гидролизующего агента-воды.

На рис.4 показана зависимость константы скорости реакции деацетилирования АцГЛА от концентрации кислот HCl, HClO₄, H₃PO₄.

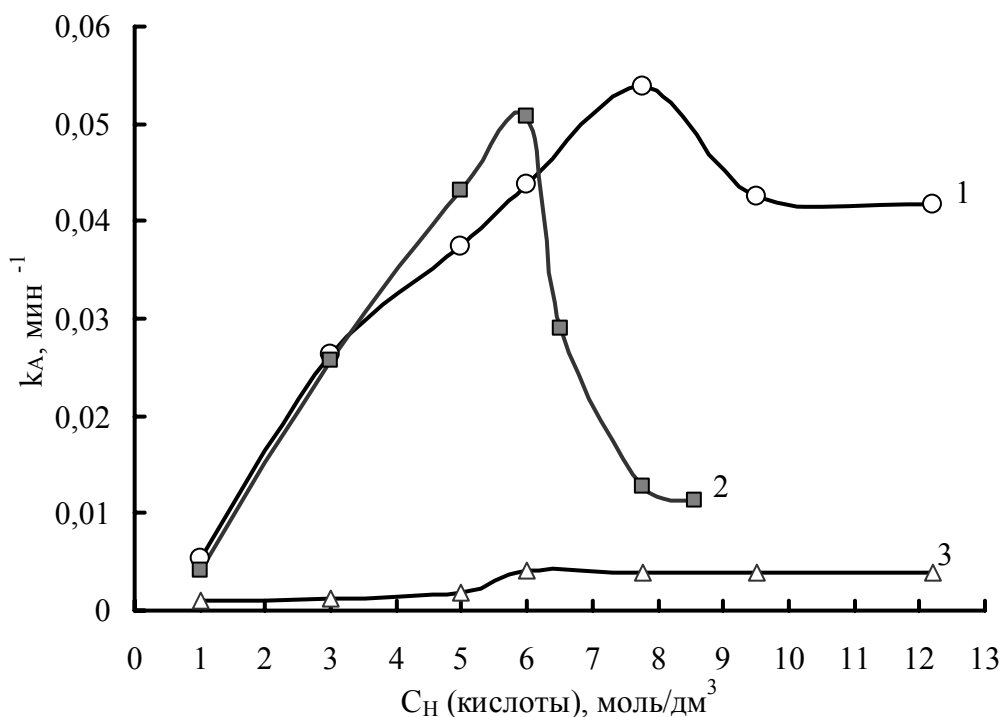


Рис.4. Зависимость константы скорости реакции деацетилирования АцГЛА от концентрации HCl(1), HClO₄(2) и H₃PO₄(3) при T=80°C.

Из рис.4 следует, что скорость реакции гидролиза АцГЛА зависит от природы изученных кислот и определяется степенью ионизации кислоты. Зависимость скорости реакции гидролиза АцГЛА от концентрации кислот носит экстремальный характер с максимумами при концентрациях 7,8 моль/дм³ для HCl и 6 моль/дм³ для HClO₄. Максимальные скорости реакции гидролиза ацетамидной связи в HCl и в HClO₄ при 80°C практически одинаковы. При дальнейшем увеличении концентрации этих кислот значения k_A уменьшаются вследствие уменьшения концентрации воды как основного гидролизующего агента. Резкое уменьшение скорости гидролиза после достижения максимальных значений k_A в случае HClO₄ можно так же объяснить тем, что она, являясь сильным окислителем, расходуется на процесс окисления моносахаридов.

Для H₃PO₄ увеличение скорости реакции гидролиза происходит при молярной концентрации эквивалента кислоты 20-22 моль/дм³.

2.3. Влияние степени деацетилирования на скорость кислотной деструкции и выход D-глюкозамина

С целью повышения выхода ГлА×HCl было изучено влияние степени деацетилирования хитина на скорость и глубину кислотной деструкции этого полисахарида.

В литературе обсуждается, что гликозидные связи у второго углеродного атома деацетилированного мономерного звена частично деацетилированного хитина (или хитозана) подвергаются кислотной деструкции с меньшей скоростью, чем такие же связи у ацетилированного звена. Следует отметить, что количественная характеристика этих процессов в рамках химической кинетики в литературе не обсуждается.

Исходя из механизма деструкции, описанного системой уравнений (1) и (7), и рассчитанных на основе модели констант скоростей элементарных реакций деструкции и деацетилирования хитина (раздел 2.1. табл.2), построены кинетические кривые деструкции хитина и хитозана с различной начальной DD. В качестве примера на рис.5 приведены кинетические кривые деструкции хитина в хлороводородной кислоте с концентрацией 1,0 моль/дм³ (для концентраций кислоты 0,5 моль/дм³ и 2,0 моль/дм³ получены аналогичные зависимости). Из данных, приведенных на рис.5, следует, что деацетилирование хитина в процессе кислотного гидролиза ведет к заметному уменьшению скорости деструкции. Как показывают расчеты, даже при степени деацетилирования 10 % после гидролиза остаются фрагменты олигосахаридов с молекулярной массой около 50 кДа.

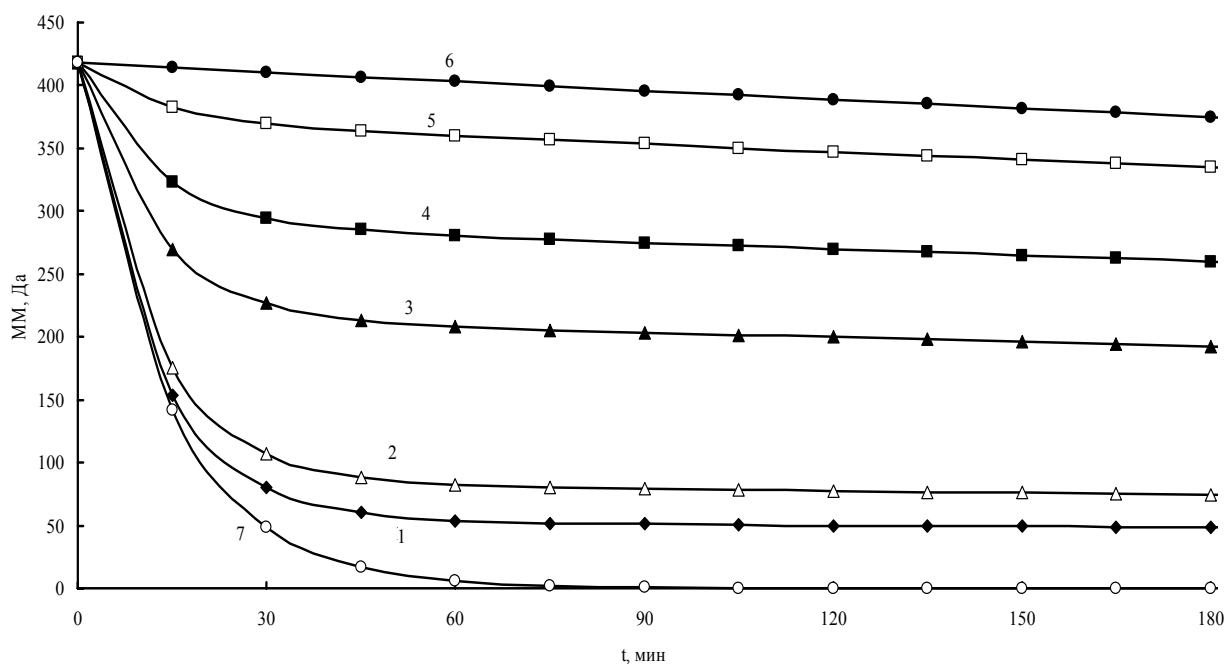


Рис.5. Кинетические кривые деструкции хитина в HCl с $C_H=1,0$ моль/дм³ при 50°C, рассчитанные с помощью математической модели. DD₀ хитина: 0(1), 10(2), 50(3), 70(4), 90(5) и 100%(6). Кривая 7 описывает деструкцию хитина без учета реакции деацетилирования. ММ – молекулярная масса (кДа), t – время (мин).

Известные технологии получения ГлА×НСl заключаются в полной кислотной деполимеризации хитина, выделении полученного продукта из гидролизата и его очистки

В качестве сырья обычно используется хитин, полученный по технологии, включающей депротеинизацию горячим раствором щелочи и раствором минеральной кислоты при комнатной температуре. Хитин полученный таким способом имеет исходную DD около 15%. Это объясняется тем, что в процессе получения хитина как при щелочной обработке, так и при кислотной, происходит гидролиз ацетамидных связей, вызывающий повышение степени деацетилирования полисахарида. В зависимости от свойств хитинсодержащего сырья и режимов технологической обработки, степень деацетилирования промышленных образцов хитина может достигать 30%.

Для увеличения выхода ГлА×НСl можно предложить два способа: 1– подавить реакцию деацетилирования; 2–увеличить начальную степень ацетилирования хитина.

Первый способ практически невозможен в кислой среде, поскольку ацетамидные связи легко гидролизуются в присутствии протонов (кислотный катализ).

Поэтому для увеличения выхода ГлА×НСl было проведено предварительное ацетилирование хитина перед его кислотной деструкцией. После ацетилирования степень деацетилирования исследованных образцов хитина составила 1-3 %.

Кинетические кривые образования ГлА×НСl при кислотном гидролизе исходного и предварительно ацетилированного хитина приведены на рис.6.

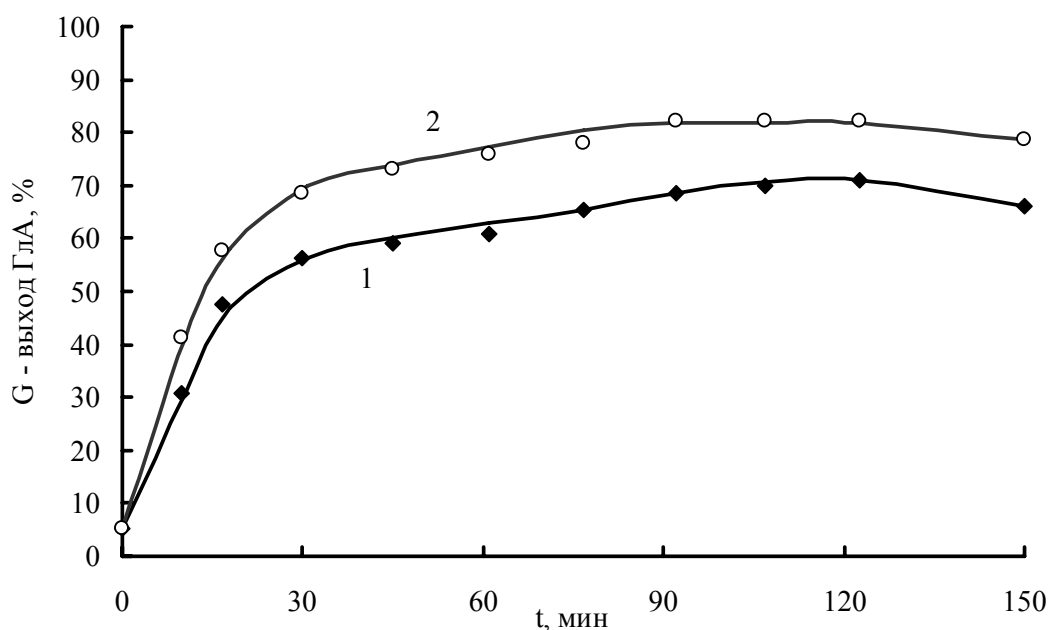


Рис.6. Кинетические кривые образования ГлА×НСl при кислотном гидролизе исходного (1) и ацетилированного хитина (2). $C_H(HCl)=11,7$ моль/дм³, температура $90\pm 2^\circ C$. G – выход D(+)-глюкозамина гидрохлорида (%), t – время (мин).

Полученные кинетические кривые подтвердили предположение о том, что для практически полностью ацелированного хитина увеличиваются скорость его кислотного гидролиза, скорость образования и выход мономера.

Выход $\text{ГлА} \times \text{HCl}$, полученного из исходного и предварительно ацелированного хитина, соответственно, составил 69,0 и 81,0%. Таким образом, ацелирование можно использовать для предварительной подготовки хитина перед кислотным гидролизом. Это особенно важно в том случае, если используется хитин различного происхождения, который может содержать партии полисахарида с различной исходной DD.

В четвертой главе «Совершенствование технологии получения D(+)-глюкозамина гидрохлорида» определены близкие к оптимальным технологические параметры процесса, приведена усовершенствованная технология получения $\text{ГлА} \times \text{HCl}$ из предварительно ацелированного хитина, рассчитан экономический эффект.

Определение технологических параметров процесса, близких к оптимальным, было проведено с использованием метода планирования эксперимента. В качестве функции отклика V был выбран выход глюкозамина, в качестве влияющих факторов: концентрация кислоты и DD хитина. Математическая модель, описывающая процесс гидролиза $\text{ГлА} \times \text{HCl}$, была получена с помощью компьютерной программы STATISTICA Ver.8.0 (StatSoft., Inc.), позволяющей получить уравнение регрессии, связывающее функцию отклика с выбранным количеством влияющих факторов.

Поверхность функции отклика приведена на рис.7. Анализ поверхности функции отклика показал, что оптимальное значение DD – менее 3%, концентрации HCl – 28-29%.

В результате расчетов получено следующее уравнение регрессии:

$$V = 11,85 - 1,89 \times DD - 0,37 \times DD^2 + 5,29 \times C - 0,09 \times C^2$$

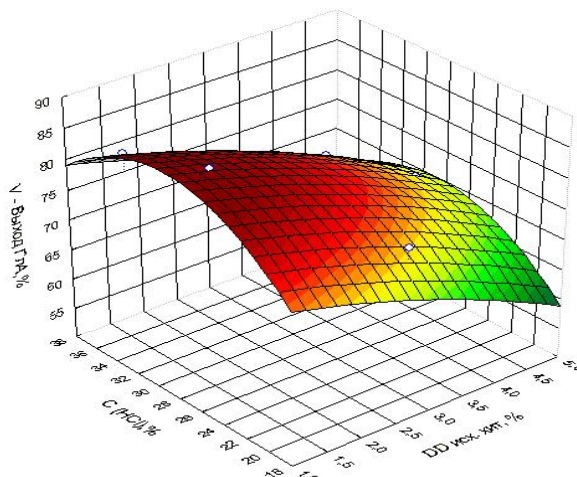


Рис.7. Поверхность функции отклика V – выход $\text{ГлА} \times \text{HCl}$ на концентрацию кислоты и степень деацелирования хитина.

Усовершенствованная технология получения $\text{ГлА} \times \text{НСI}$ из предварительно ацетилированного хитина заключается в следующем. В реактор загружали 20% раствор ацетилирующего агента в этаноле. Раствор охлаждали до температуры $4 \pm 1^\circ\text{C}$, затем в раствор загружали при перемешивании исходный хитин, соответствующий ТУ 9228-001-04703997-93 «Хитин из панциря крабов». Соотношение масс хитина и ацетилирующего агента 1:10. Смесь тщательно перемешивали в течение 2-3 часов и оставляли при температуре $4 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 часов при периодическом перемешивании.

По окончании процесса ацетилирования в реакционную смесь добавляли дистиллированную воду (соотношение масс хитина и воды 1:20) и нейтрализовали раствор 4%-ным раствором гидроксида натрия до pH реакционной среды $7 \pm 0,5$. Смесь фильтровали на закрытом нутч-фильтре через 2-3 слоя фильтровальной бумаги. Далее ацетилированный хитин обрабатывали в соответствии с технологической схемой, приведенной на рис.8.

В табл.3 приведена характеристика $\text{ГлА} \times \text{НСI}$ на соответствие требованиям ТУ 6-09-05-936-78 (D(+)-глюкозамина гидрохлорид квалификации «чистый»).

Для характеристики $\text{ГлА} \times \text{НСI}$ в качестве стандарта использовали препарат по ТУ 6-09-05-936-78 (D(+)-глюкозамин гидрохлорид квалификации «чистый») и препарат, полученный по фармокопейной статье ВФС 42-3512-99.

Таблица 3

Физико-химические показатели D (+)-глюкозамина гидрохлорида

Наименование показателя (характеристика)	Требование ТУ	$\text{ГлА} \times \text{НСI}$, полученный из предварительно ацетилированного хитина
Внешний вид	Порошок кристаллический, однородный, без плотных комков	Порошок кристаллический, однородный, без плотных комков
Цвет	белый	белый
Массовая доля воды, % не более:	0,5	0,5
Массовая доля сульфатной золы, % не более	0,5	менее 0,1
Массовая доля основного вещества, % не менее	99,0	не менее 99,0

Экономический эффект был рассчитан по ценам на 2011 год и составил 90 тыс.руб. в год.

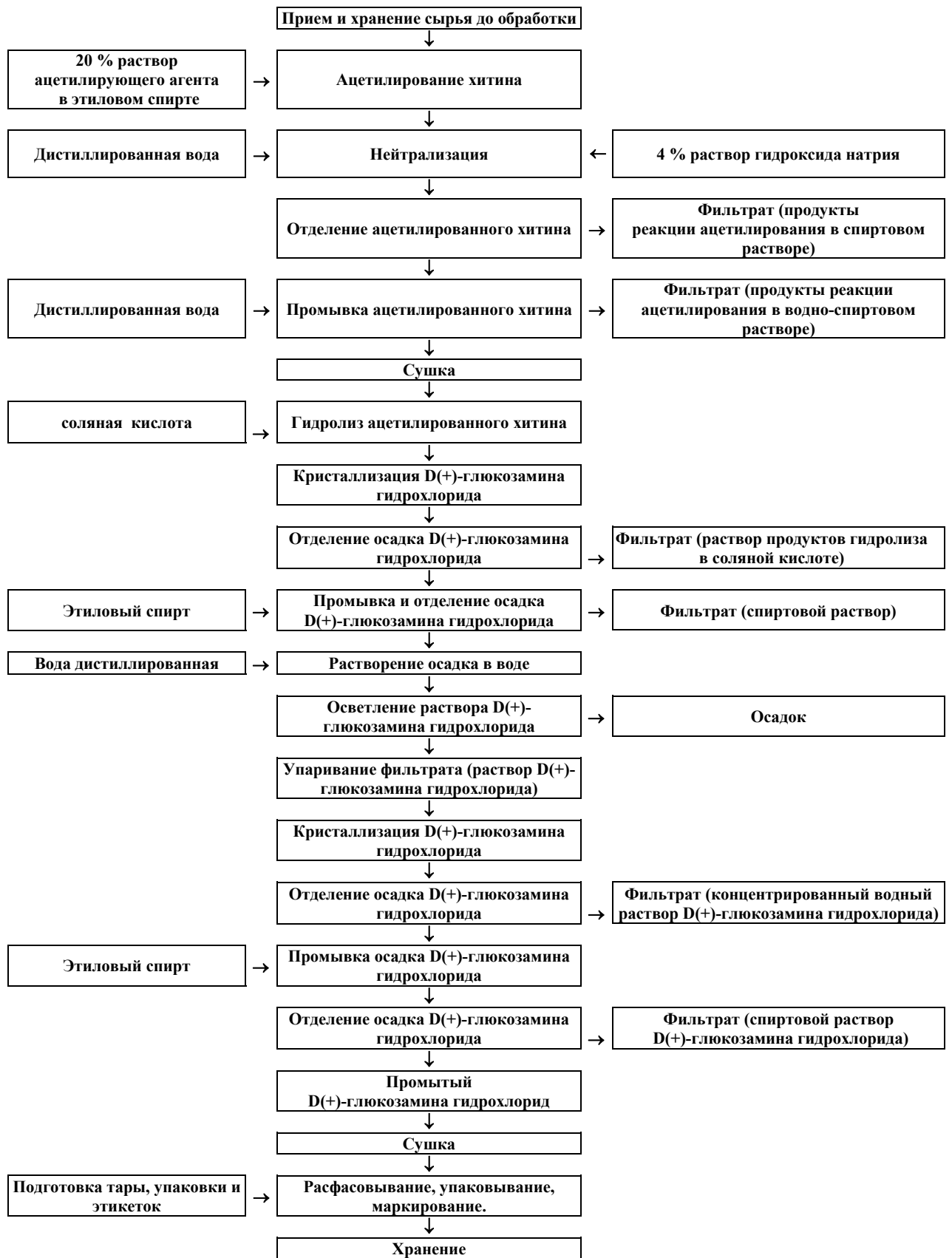


Рис.8. Технологическая схема получения ГлА×HCl.

ВЫВОДЫ

1. Впервые изучено влияние степени ионизации и нуклеофильности кислот на кинетику деструкции хитина. Показано, что с увеличением степени ионизации кислот, константы скоростей реакций гидролиза гликозидных связей возрастают: наблюдается увеличение констант скорости гидролиза обеих гликозидных связей в ряду кислот: $\text{CH}_3\text{COOH} < \text{H}_3\text{PO}_4 < \text{HCl} < \text{H}_2\text{SO}_4 < \text{HClO}_4$. Константа скорости деацетилирования находится в соответствии с нуклеофильностью анионов кислот.

2. На основании разработанной математической модели механизма кислотной деструкции хитина, впервые рассчитаны константы скоростей элементарных реакций, которые подтверждают, что гидролиз гликозидных связей протекает по механизму S_N1 , ацетамидных – по механизму S_N2 . С помощью рассчитанных констант построены кинетические кривые деструкции хитина, анализ которых показал, что деацетилирование хитина в процессе кислотного гидролиза ведет к снижению скорости деструкции.

3. Показано, что предварительное ацетилирование хитина до 96-97% увеличивает скорость его кислотного гидролиза, скорость образования и выход мономера $\text{ГлА} \times \text{HCl}$ на 10-12%. Экспериментально подтверждено, что скорость деструкции и полной деполимеризации хитина и хитозана возрастает с уменьшением степени деацетилирования.

4. Рассчитаны эффективные константы скорости реакции гидролиза АцГлА в хлороводородной, хлорной и фосфорной кислотах. Показано, что зависимость скорости реакции гидролиза АцГлА от концентрации кислот носит экстремальный характер. Максимальные скорости реакции гидролиза ацетамидной связи в HCl и в HClO_4 при 80°C практически одинаковы.

5. Показано, что степень деацетилирования исследованных образцов хитина/хитозана практически не оказывает влияния на степень кристалличности этих полисахаридов. При уменьшении ММ хитина/хитозана в процессе кислотного гидролиза степень кристалличности незначительно увеличивается.

6. Разработана математическая модель, адекватно описывающая процесс гидролиза предварительно ацетилированного хитина. Определены близкие к оптимальным условия производства $\text{ГлА} \times \text{HCl}$ из предварительно ацетилированного хитина.

7. Разработана технологическая инструкция для получения $\text{ГлА} \times \text{HCl}$ из предварительно ацетилированного хитина и технические условия на D(+)-глюкозамин гидрохлорид (полуфабрикат), предназначенный для промышленной переработки и очистки в целях дальнейшего применения в химико-фармацевтической промышленности.

8. Рассчитан ожидаемый экономический эффект усовершенствованной технологии.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Долгопятова, Н. В.** Влияние кислот различной природы на деполимеризацию макромолекул хитина и хитозана / Н. В. Долгопятова, В. Ю. Новиков, Н. М. Путинцев // Рыб. хоз-во. – 2009. – № 4. – С. 118-120.
2. Деструкция хитина и хитозана при химическом гидролизе / В. Ю. Новиков, **Н. В. Долгопятова**, Е. Н. Рипачева, И. Н. Коновалова, Н. М. Путинцев // РЫБПРОМ. – 2010. – № 2. – С. 53-57.
3. Влияние природы нуклеофилов на гидролиз гликозидных связей в крабовом хитине / **Н. В. Долгопятова**, Е. Н. Рипачева, В. Ю. Новиков, И. Н. Коновалова // Изв. ВУЗов. Химия и химическая технология. – 2010. – Т. 53, №. 8. – С. 88-91.
4. Кислотная деструкция и деполимеризация хитина / **Н. В. Долгопятова**, В. Ю. Новиков, И. Н. Коновалова, Н. М. Путинцев // Рыб. хоз-во. – 2011. – № 2. – С. 107-109.
5. Влияние степени ионизации и нуклеофильности кислот на кинетику деструкции хитина / **Н. В. Долгопятова**, В. Ю. Новиков, И. Н. Коновалова, Н. М. Путинцев // Журн. приклад. химии. – 2011. – Т. 84, №. 6. – С. 1004-1009.

Статьи в журналах и материалы конференций:

1. **Долгопятова, Н. В.** Применение метода ИК-спектроскопии для определения степени деацетилирования хитозана / Н. В. Долгопятова, В. Ю. Новиков, Н. М. Путинцев // Наука и образование – 2008 [Электронный ресурс] : междунар. науч.-техн. конф., Мурманск, 2-10 апреля 2008 г. / Мурман. гос. техн. ун-т. – Электрон. текст. дан. (20 Мб). – Мурманск : МГТУ, 2008. – С. 285-289. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – НТЦ «Информрегистр» 0320800238 от 21.01.08 г.
2. **Долгопятова, Н. В.** Совершенствование определения степени деацетилирования хитозана методом инфракрасной спектрофотометрии / Н. В. Долгопятова, В. Ю. Новиков, Н. М. Путинцев // Техника и технология переработки гидробионтов и сельскохозяйственного сырья, посвящ. памяти проф. Н. Н. Рулева : Материалы Междунар. науч.-прак. конф., Мурманск, 24-25 апреля 2008 г. / Мурман. гос. техн. ун-т. - Мурманск, 2008. – С. 59-62.
3. Химический гидролиз крабового хитина / Е. Н. Рипачева, **Н. В. Долгопятова**, В. Ю. Новиков, Н. В. Степанова, Н. М. Путинцев // Пищевые технологии и биотехнологии : Материалы 10-й междунар. конф. молодых ученых, Казань, 12-15 мая 2009 г. / Казан. гос. технолог. ун-т. – Казань, 2009. – С. 93.

4. **Долгопятова, Н. В.** Кислотная деполимеризация хитина / Н. В. Долгопятова, В. Ю. Новиков, Н. М. Путинцев // Инновации в науке и образовании – 2009 : Труды 7-ой междунар. науч. конф., Калининград, 20-22 октября 2009 г. / КГТУ. – Калининград, 2009. – С. 243-244.

5. Порцель, М. Н. Кинетика химического гидролиза полисахаридов, полученных из гидробионтов / М. Н. Порцель, **Н. В. Долгопятова** // Научно-прикладные проблемы химической технологии минерального сырья и гидробионтов Кольского региона : материалы докл. Школы молодых ученых, Мурманск, 27 октября 2009 г. / Мурман. гос. техн. ун-т. – Мурманск, 2009. – С. 61-66.

6. **Долгопятова, Н. В.** Расщепление гликозидных связей хитина в кислой среде / Н. В. Долгопятова // Наука и образование – 2010 [Электронный ресурс] : юбилейн. междунар. науч.-техн. конф., посвящ. 60-летию МГТУ, Мурманск, 5-9 апреля 2010 г. / Мурман. гос. техн. ун-т. – Электрон. текст. дан. (181 Мб). – Мурманск : МГТУ, 2010. – С. 486-488. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). - Гос. рег. НТЦ «Информрегистр» № 0321000362.

7. Исследование механизма кислотного гидролиза хитина/хитозана / В. Ю. Новиков, **Н. В. Долгопятова**, И. Н. Коновалова, Н. М. Путинцев // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана (РосХит 2010) : Материалы 10-й Междунар. конф., Нижний Новгород, 29 июня – 2 июля 2010 г. / ННГУ. – Нижний Новгород, 2010. – С. 50-53.

8. Гидролиз N-ацетилглюкозамина в кислотах различной природы / **Н. В. Долгопятова**, В. Ю. Новиков, И. Н. Коновалова, Н. М. Путинцев // Наука и образование – 2011 [Электронный ресурс] : материалы междунар. науч.-техн. конф., Мурманск, 4-8 апреля 2011 г. / Мурман. гос. техн. ун-т. – Электрон. текст. дан. (43 Мб). – Мурманск, 2011. - С. 341. – Гос. рег. НТЦ «Информрегистр» № 0321100504.

9. **Dolgopyatova, N. V.** The study of laws of N-acetyl-D-glucosamine acid hydrolysis / N. V. Dolgopyatova, V. Yu. Novikov, N. M. Putintsev // Advances in Chitin Science. Vol. XI : Proceedings of the 10-th Int. Conf. of the European Chitin Society (EUCHIS'11), Saint-Petersburg, Russia, May 20-24 2011 / Ed. by V. Varlamov, S. Bratskaya, I. Yakovleva, S. Senel. – Saint-Petersburg, 2011. – P. 67-70.

Автор благодарит сотрудников лаборатории биохимии и технологии Полярного научно-исследовательского института морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича и лаборатории физико-химических методов анализа Института химии и технологии редкоземельных элементов (ИХТРЭМС) Кольского научного центра РАН за помощь в проведении физико-химических анализов.