

В. И. ТОРГАШОВ, Л. В. СОЛОВЬЕВА, О. В. ЗУБЕЦ, Ф. Н. КАПУЦКИЙ

ПОЛУЧЕНИЕ КСИЛАНА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО КАЧЕСТВА ИЗ ДРЕВЕСИНЫ БЕРЕЗЫ

Оптимальным сырьем для получения ксилана (гемицеллюлозы) фармацевтического качества является древесина березы возраста 15–25 лет. Сравнительный анализ ксилана, полученного из древесины березы, с продуктом, предлагаемым компанией Sigma, показал их практическую идентичность по составу и молекулярным массам. Проведен анализ деминерализованной воды и выделенного березового ксилана на содержание в них катионов тяжелых металлов. Установлено, что их содержание не превышает требований Государственной фармакопеи Республики Беларусь. Сделано заключение о более благоприятных условиях, создающихся при лиофильной сушке, которые приводят к получению аморфных, более реакционно-способных порошков ксилана.

Ключевые слова: ксилан; фармацевтическое качество; древесина березы; молекулярная масса; деминерализованная вода; катионы тяжелых металлов; пентозан; гемицеллюлоза; гидроксид натрия; инфракрасный спектр; Государственная фармакопея Республики Беларусь; высокоэффективная жидкостная хроматография; лиофильная сушка.

Optimum raw material for reception xylan (hemicellulose) of the pharmaceutical quality is the birch wood of 15–25 years age. The comparative analysis xylan, received of wood of a birch, with a product, offered by company Sigma has shown their practical identity on structure and molecular weights. The analysis is carried out on the contents of heavy metals cations in demineralized water and in allocated birch xylan. It is established, that their contents does not exceed requirements of Pharmacopoeia of Byelorussia. The conclusion is given about more favorable conditions created at freeze drying which result in reception amorphous, more reactionary capable xylan powders.

Key words: xylan; pharmaceutical quality; birch wood; molecular weight; demineralized water; heavy metals cations; phentosan; hemicelluloses; sodium hydroxide; infrared spectrum; Pharmacopoeia of Byelorussia; high effective liquid chromatography; freeze drying.

Ксилан – основной полисахарид гемицеллюлоз хлебных злаков и многих других видов растительного сырья. В большом количестве он содержится в пленках, оболочках и стеблях хлебных злаков, в меньшем количестве – в древесине. Изучение ксилана представляет разносторонний интерес, так как он наряду с целлюлозой является строительным материалом клеточных стенок и может быть использован для получения ксилозы, ксилита и других многоатомных спиртов, органических кислот, кормовых дрожжей и иных продуктов. Ксилан используют в пищевой, парфюмерной и фармацевтической промышленности в качестве безвредного загустителя, эмульгатора и стабилизатора [1, 2]. Белый или светло-кремовый порошок ксилана не имеет запаха, сильно набухает в воде, растворяясь в присутствии щелочи. Он нерастворим в спирте и органических растворителях, не восстанавливает фелинговой жидкости [3].

Кроме того, он представляет интерес как исходное сырье для получения биологически активных сульфатированных производных. В качестве сырьевого источника для получения ксилана потенциально пригодны многие растительные объекты: разные породы древесины, а также однолетние растения ввиду высокого содержания в них ксилана. Ксилан из древесины лиственных пород отличается линейным строением и меньшим содержанием кремния, чем ксилан из однолетних растений [3]. Известно применение древесины бука за рубежом [3] для получения фармакологической субстанции – сульфата ксилана (натрий-пентозанполисульфата по международной классификации). В данной работе проанализированы три вида сырья: древесина яблони (сорт Антоновка обыкновенная) и груши (сорт Бэра), занимающие первое и второе место по распространенности среди плодовых деревьев в Беларуси, а также древесина Березы пушистой (первое место по распространенности среди лиственных пород в Республике Беларусь) с целью поиска наиболее приемлемого источника ксилана, пригодного в качестве сырья для создания фармакологических субстанций на основе сульфата ксилана, используемых в лекарственных препаратах антикоагуляционного действия вместо гепарина.

Материал и методика

В литературных источниках [4, 5] указано, что без предварительной делигнификации ксилан можно извлекать только из древесины лиственных пород. Древесина хвойных пород непригодна для выделения ксилана, так как содержит другие полисахариды, например маннан. Поскольку извлекаемый ксилан предпочтителен в качестве исходного субстрата для синтеза фармакологической субстанции, то применение токсичных реактивов, по-видимому, нецелесообразно. Поэтому нами был выбран способ прямой экстракции 4 % раствором гидроксида натрия.

Гидроксид калия для извлечения ксилана не применялся из-за необходимости дополнительного контроля содержания ионов калия в препарате, полученном из предполагаемой фармакологической субстанции, так как основным реагентом в реакции сульфатирования ксилана является пиросульфат натрия [6].

После удаления коры древесина была измельчена в тонкую стружку менее 0,1 мм толщиной. Влажность стружек определяли по остаточной постоянной массе после их высушивания при 100 °С. Перед извлечением ксилана древесные стружки освобождали от жира-восковых веществ стандартным мето-

дом – путем экстракции кипящей водой в течение 1 ч при жидкостном модуле 1:40 г/мл. Воду сливали и к стружкам добавляли этиловый спирт, разведенный водой в объемной пропорции 1:1. Затем смесь нагревали в течение часа при кипячении с обратным холодильником при жидкостном модуле 1:40 г/мл. Стружки промывали водой и сушили до воздушно-сухого состояния.

Экстракцию ксилана 4 % раствором гидроксида натрия (х. ч.) проводили при жидкостном модуле 1:40 г/мл и постоянном времени экстракции 6 ч. Ксилан выделяли из щелочного раствора в несколько последовательных стадий. Вначале щелочной экстракт декантировали от стружек в отдельную емкость. Далее стружки несколько раз промывали на фильтре из хлопчатобумажной ткани деминерализованной водой для удаления адсорбированного ксилана. Полученный фильтрат и декантированный экстракт объединяли и нейтрализовали уксусной кислотой (х. ч.) до выпадения хлопьевидного осадка. Для ускорения формирования осадка и вымывания попутно извлекаемого небольшого количества адсорбированного лигнина в емкость с осадком ксилана добавляли 96 % этиловый спирт в объемном соотношении 1:1. После отделения фазы осадка ксилана путем отстаивания в течение суток водно-спиртовой экстракт лигнина декантировали, а к осадку ксилана вновь добавляли этанол. Эту операцию повторяли несколько раз до исчезновения желтого окрашивания спиртового экстракта. Затем влажный осадок ксилана, тонко распределенный по поверхности полиэтиленовой пленки (к стеклу ксилан имеет очень сильную адгезию), высушивали на воздухе. Параллельно применяли лиофильную сушку ксилана.

Анализ древесного сырья на содержание пентозанов проводили с использованием гидролитического расщепления ксилопиранозных звеньев хлористо-водородной кислотой с образованием фурфурола, который оценивали количественно. Навеску воздушно-сухих стружек массой 1 г помещали в колбу, добавляли пипеткой 20 мл 13 % раствора HCl, присоединяли дефлегматор, капельную воронку, холодильник и приемник, в гидравлический затвор которого наливали несколько капель 13 % раствора HCl. Колбу нагревали на воздушной бане таким образом, чтобы скорость перегонки составляла 1 мл дистиллята в минуту. По мере отгонки 5 мл дистиллята в колбу из капельной воронки добавляли 5 мл 13 % раствора HCl. Отгоняли примерно 50 мл дистиллята, проверяя конец отгонки фурфурола по цветной реакции с анилинацетатом. Отогнанный дистиллят переносили в мерную колбу на 100 мл, доводили объем до метки 13 % раствором HCl, закрывали мерную колбу притертой пробкой и тщательно перемешивали. После этого определяли в дистилляте фурфурол бромид-броматным методом. Для пересчета фурфурола на пентозаны полученный результат умножали на коэффициент пересчета 1,52 [7].

Молекулярную массу ксилана определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Данный метод является вариантом колоночной жидкостной хроматографии, в которой подвижная фаза – элюент проходит через заполняющий колонку сорбент [8].

Определение молекулярной массы проводилось на следующем оборудовании:

- 1) жидкостный хроматограф Waters W600 или Agilent 1200;
- 2) рефрактометрический детектор Waters W410 или Agilent 1200, температура ячейки рефрактометра 40 °С;
- 3) колонка размером 300 × 7,8 мм, заполненная сорбентом TSKgelG3000PW_{xl} с размером частиц 6 мкм или аналогичная, температура колонки комнатная;
- 4) подвижная фаза: 0,1 М раствор NaNO₃, скорость элюента 0,7 мл/мин;
- 5) стандарты – Dextran 1T. Концентрация 5 мг/мл, фирма Pharmacosmos standards;
- 6) объем пробы 10 мкл.

Содержание лигнина определяли сернокислотным методом в модификации Комарова [7].

Определение зольности образцов проводили сжиганием и прокаливанием в муфельной печи при стандартной температуре 575±25 °С. В фарфоровый тигель с крышкой помещали пробу древесины массой 2 г и озоляли в муфельной печи при заданной температуре в течение 4 ч (до полного удаления углерода, о чем свидетельствует отсутствие черных частичек). После охлаждения в эксикаторе (40 мин) тигель с золой взвешивали и продолжали прокаливание по 1 ч до достижения постоянной массы (разница двух взвешиваний не более 0,0002 г) [7].

ИК-спектры регистрировали на инфракрасном спектрофотометре Varian 3100 FT-IR. Препарирование образцов осуществляли методом отливания пленки на пластине KRS-5.

Элементный анализ проводили при помощи CHNS-анализатора Elementar Analysensysteme GmbH VarioEL.

Деминерализованную воду получали мембранной очисткой на приборе Elix-5 фирмы Millipore.

Результаты и их обсуждение

Древесина березы выгодно отличается меньшим содержанием лигнина по сравнению с яблоней и грушей. Среди близких по содержанию пентозанов проанализированных видов сырья древесина березы оказалась лучшей по количеству экстрагируемого основного вещества – ксилана. Этот факт

обусловлен ее меньшей плотностью по сравнению с древесиной яблони и груши и, как следствие, лучшей доступностью к проникновению реагента – 5 % гидроксида натрия и большим выходом ксилана при заданной концентрации реагента. Меньшая зольность древесины березы, очевидно, связана с условиями ее произрастания на менее окультуренных почвах (табл. 1).

Таблица 1

Состав древесины различных пород без учета целлюлозы

Сырье	Содержание пентозанов, %	Содержание лигнина, %	Экстрагированный ксилан, %	Зольность, %	Плотность древесины*, кг/м ³
Береза	26,0	22,5	19,6	0,39	650
Яблоня	21,7	23,8	5,8	0,65	690
Груша	20,4	28,4	10,1	0,81	730

* При 12 % влажности [11].

Выделенный ксилан для использования в дальнейших исследованиях – основной полисахарид гемицеллюлоз древесины березы. Главную часть молекулы ксилана составляют остатки D-ксилопиранозы, связанные 1–4 β-гликозидной связью [1, 2].

Известно, что количественное соотношение компонентов древесины (полисахаридов и др.) во многом определяется ее возрастом. В связи с этим представлялось актуальным определить зависимость выхода ксилана от возраста древесины березы. На рис. 1 указанная зависимость проиллюстрирована диаграммой. Как видно, выход ксилана из стволовой части древесины уменьшается с возрастом от 10 до 35 лет почти в 2 раза.

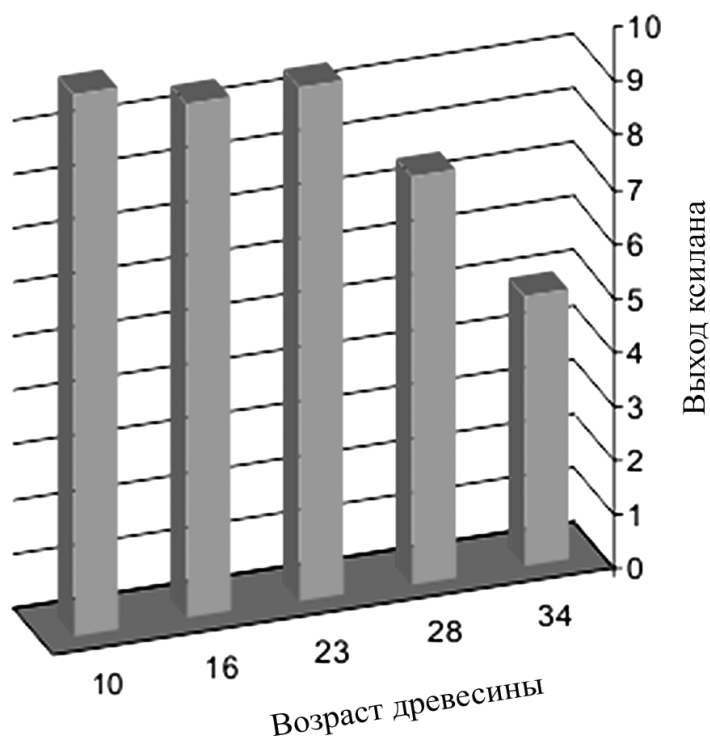


Рис. 1. Зависимость выхода ксилана от возраста березы

Установлено, что выход ксилана является функцией возраста древесины и что данная функция носит экстремальный характер. А именно, до 10-летнего возраста в стволовой части древесины увеличивается содержание ксилана, от 15 до 20 лет его содержание относительно стабильно, а к 35 годам уменьшается почти в 2 раза.

Нами выявлено, что лучшим способом подготовки сырья для экстракции является его использование в форме стружек, а не опилок. Это связано с тем, что, как оказалось, опилки сильно набухают и скорость сепарации фаз резко замедляется. Полнота извлечения ксилана щелочью зависит от вида щелочи, концентрации щелочного раствора, температуры и продолжительности обработки. В большинстве методов используются растворы гидроксидов натрия или калия. Концентрация растворов щелочей, применяемых для экстракции, изменяется от 2 до 16 %.

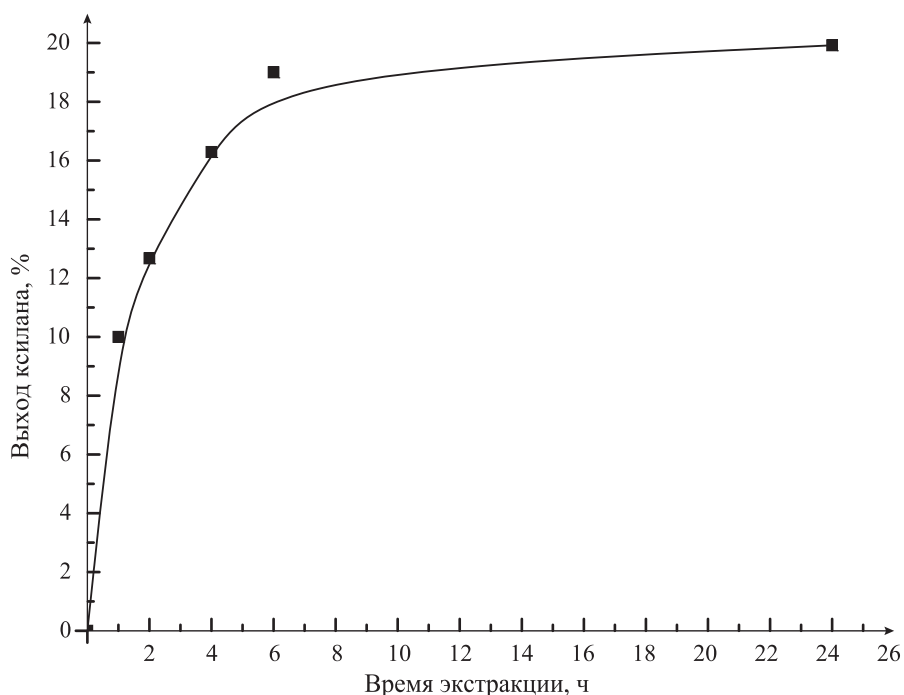


Рис. 2. Влияние продолжительности экстракции на выход ксилана

Установлено, что наилучшим экстрагентом ксилана из стружек березы является 4–5 % водный раствор гидроксида натрия. При соблюдении этих условий, а также температуры процесса 18 °С и продолжительности 6 ч обеспечивается наилучшая чистота ксилана при приемлемом его выходе. Дальнейшее увеличение выхода или повышение температуры экстракции нецелесообразно ввиду прогрессирующего загрязнения лигнином.

После окончательной промывки 96 % этанолом на вакуумном фильтре ксилан взмучивали с водой, водную взвесь замораживали, а затем лиофильно сушили до постоянной массы. После лиофильной сушки ксилан представлял собой белый пушистый порошок.

Кроме того, было использовано обычное высушивание ксилана после спиртовой экстракции на поверхности полиэтиленовой пленки. В данном случае готовый продукт представлял собой хрупкую, легко дробящуюся прозрачную пленку.

На основании данных рентгенофазового анализа выявлена заметная тенденция ксилана к структурной упорядоченности при упаривании его водных растворов. В результате резко снижается реакционная способность гидроксильных групп в элементарном звене макромолекулы ксилана, например в реакции сульфатирования. Напротив, лиофильная сушка обеспечивает большую реакционную способность полисахаридов. Поэтому среди выбранных методов сушки ксилана лиофильная предпочтительнее.

Методом ВЭЖХ показано, что ксилан, извлеченный из березы, состоит из двух фракций. Полученный нами березовый ксилан практически идентичен ксилану фирмы Sigma [9], обычно привлекаемому в исследованиях в качестве стандарта, по молекулярной массе (рис. 3, а, б). Первая фракция имеет M_w (среднемассовую молекулярную массу), равную 67 049 Да, полидисперсность – 1,61. Вторая фракция – 1 154 207 Да, полидисперсность – 1,11.

В березовом ксилане фракция с молекулярной массой свыше 1 млн Да относится к фракции с молекулярной массой ниже ста тысяч как 69 : 31 (в %).

Анализ на присутствие катионов тяжелых металлов в березовом ксилане (после его извлечения 5 % раствором натриевой щелочи) по сравнению с очищенной водой, используемой для приготовления указанного раствора, показал увеличение содержания катионов свинца, железа, марганца и хрома (табл. 2). Вероятно, это обусловлено зольностью используемой для экстракции ксилана древесины. Тем не менее эти показатели находятся в пределах требований Государственной фармакопеи Республики Беларусь и березовый ксилан может быть применен в качестве исходного продукта с целью получения высокочистой фармацевтической субстанции.

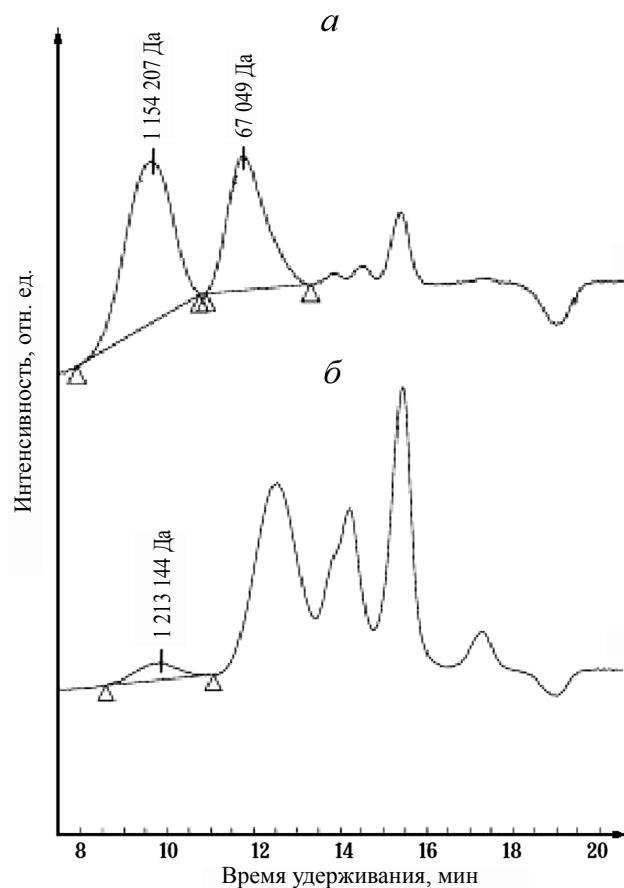


Рис. 3. Хроматограммы: ксилана, выделенного из березы (а); стандартного ксилана Sigma (б)

Таблица 2

Концентрация тяжелых металлов в очищенной воде, используемой при извлечении ксилана из древесины березы и в высушенном ксилане

Металлы	Концентрация металлов	
	в воде, ppm	в ксилане, ppm
Свинец	0,035	0,39
Железо	—	2,9
Хром	0,005	0,17
Марганец	0,002	0,06
Кадмий	0,001	4,7
Сурьма	—	—
Кобальт	—	—

При извлечении ксилана из древесины березы водным раствором щелочи имеет место ряд побочных реакций: отщепление ацетильных групп, деполимеризация макромолекулы полисахарида. Эти реакции приводят к снижению степени полимеризации и химическому изменению ксилана – появлению новых карбонильных и карбоксильных групп, что подтверждает молекулярная формула извлеченного нами березового ксилана, вычисленная по результатам элементного анализа: $C_5H_{12,8}O_{4,4}$.

Ее отличие от молекулярной формулы ксилопиранозного остатка – $C_5H_8O_4$ указывает на присутствие ацетильных групп в главной цепи макромолекулы. Этот вывод подтверждается ИК-спектроскопическим анализом, показавшим наличие среди углеводородных групп CH и CH_2 групп CH_3 в составе CH_3CO [10].

ИК-спектр исходного березового сырья имеет набор полос, типичный для древесины. В нем присутствует ярко выраженная полоса при 1745 см^{-1} , что свидетельствует о присутствии ацетильных групп. После спиртовой экстракции жирно-восковых веществ из древесной стружки ее ИК-спектр практически не изменяется, что свидетельствует об их малом количестве (до 4 %) и отсутствии проникновения этилового спирта в клеточные структуры древесины. После щелочной экстракции в ИК-спектре древесины исчезает полоса при 1745 см^{-1} , наблюдается смещение валентных колебаний ОН- и СН-групп к более низким частотам (область $3800\text{--}2600\text{ см}^{-1}$).

При сравнении ИК-спектра стандартного ксилана Sigma с березовым ксиланом, выделенным нами, в ИК-спектре стандартного ксилана Sigma обнаружены отличия, свидетельствующие о присутствии в нем большего количества лигнина по отношению к березовому ксилану (полоса при 1645 см^{-1} – валентные колебания $\text{C}=\text{C}$ и полосы 1662 , 1341 и 1324 см^{-1} , обусловленные скелетными колебаниями колец фенолов [10]). Эти отличия свидетельствуют в пользу опробованных нами методик выделения и очистки березового ксилана.

Контуры полос, положение их максимумов, их полуширины в ИК-спектрах ксиланов Sigma и березового в областях частот $3700\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ и $1200\text{--}1000\text{ см}^{-1}$ совпадают, что свидетельствует о подобии структур ксиланов. В спектрах обоих ксиланов присутствуют полосы с максимумами поглощения при 1612 и 1414 см^{-1} соответственно, валентные асимметричные и симметричные колебания карбоксилатных ионов, не образующих сложноэфирных связей ввиду их участия в солеобразовании с ионами натрия при щелочной экстракции ксилана.

Таким образом, проведенные исследования показали влияние концентрации, жидкостного модуля, температуры и продолжительности обработки водными растворами гидроксида натрия на эффективность экстракции ксилана из различных видов растительного сырья (яблоня, груша, береза). Оптимальным сырьем для получения ксилана (гемицеллюлозы) является древесина березы возраста 15–25 лет. В результате сравнительного анализа ксилана, полученного из древесины березы, с продуктом, предлагаемым компанией Sigma, установлена их практическая идентичность по составу и молекулярным массам. Анализ деминерализованной воды и выделенного березового ксилана на содержание в них катионов тяжелых металлов показал соответствие их количества требованиям Государственной фармакопеи Республики Беларусь. Полученные данные позволяют сделать заключение о предпочтительных условиях, создающихся при лиофильной сушке, которые приводят к получению аморфных, реакционно-способных порошков ксилана.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Роговин З. А. Химия целлюлозы. М., 1972.
2. Никитин В. М., Оболенская А. В., Щеголев В. П. Химия древесины и целлюлозы. М., 1978.
3. Фенгел Д., Вегенер Г. Древесина: химия, ультраструктура, реакции. М., 1988.
4. Дудкин М. С. Ксилан // Успехи химии. 1962. Т. 31, вып. 10. С. 1179–1191.
5. Дудкин М. С., Громов В. С., Ведерников Н. А., Каткевич Р. Г., Черно Н. К. Гемицеллюлозы. Рига, 1991.
6. Капуцкий Ф. Н., Торгашов В. И., Юркштович Т. Л., Голуб Н. В., Островская И. Л., Алиновская В. А. Исследование процесса сульфатирования полисахаридов пиросульфатом натрия в среде диметилсульфоксида // Журн. прикл. химии. 2007. Т. 80, вып. 10. С. 1716.
7. Yan W. W., Kirkland I. I. Characterization of Xylansulfate by SizeExclusion Chromatography // J. of Liquid Chromatography and Related Technologies. 1986. Vol. 9. P. 1549–1561.
8. Оболенская А. В., Ельницкая З. П., Леонович А. А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. М., 1991.
9. Catalogue Handbook of Fine Chemicals «Sigma-Aldrich» (USA) 1999–2000. P. 1793.
10. Базарнова Н. Г., Карпова Е. В., Катраков И. Б., Маркин В. И., Микушина И. В., Ольхов Ю. А., Худенко С. В. Методы исследования древесины и ее производных. Барнаул, 2002.
11. Полубояринов О. И. Плотность древесины. М., 1976.

Поступила в редакцию 23.04.2013.

Вадим Иванович Торгашов – научный сотрудник лаборатории физической химии целлюлозы НИИ ФХП БГУ.

Любовь Васильевна Соловьева – научный сотрудник лаборатории физической химии целлюлозы НИИ ФХП БГУ.

Олег Владимирович Зубец – научный сотрудник лаборатории физической химии целлюлозы НИИ ФХП БГУ.

Федор Николаевич Капуцкий – академик НАН Беларуси, доктор химических наук, профессор, заведующий отделом физической химии полисахаридов НИИ ФХП БГУ.