

УДК 547.99

ПОЛУЧЕНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

©2013 Б.Ц. Шагдарова, А.Н. Левов, В.П. Варламов

Центр «Биоинженерия» РАН, г. Москва

Поступила 21.06.2013

Методом кислотного гидролиза получена фракция хитозана с молекулярной массой 20 кДа, определены ее основные характеристики. Синтезирован ряд ацилированных производных низкомолекулярного хитозана, содержащих N-(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропильный фрагмент.

Ключевые слова: хитозан, ацилированные производные, кватернизированные производные.

Одним из достижений биотехнологического прогресса в области изыскания новых перспективных веществ за последние годы стало получение, изучение и внедрение в практику биополимеров хитина, хитозана и их производных. Природный полисахарид хитин, его дезацетилированное производное хитозан и продукты их химической модификации привлекают внимание исследователей благодаря комплексу уникальных физико-химических и биологических свойств, основными из которых являются – биodeградируемость, биосовместимость, низкая токсичность, а также широкий спектр антимикробного действия [1]. Хитин – линейный аминополисахарид, состоящий из N-ацетил-2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозных звеньев. Он служит основным структурным компонентом наружного скелета ракообразных и насекомых, а также входит в состав клеточных стенок грибов. Хитозан – обобщающее название частично (обычно на 70-90%) или полностью дезацетилированного хитина [2]. Хитин является полимером не растворимым в воде и большинстве органических растворителей, что существенно ограничивает его применение, в отличие от хитозана или его модификаций, которые растворимы в широком диапазоне pH и могут использоваться в различных областях.

Перспективным направлением использования хитозана и его производных является сфера охраны окружающей среды, а именно создание препаратов с радиопротекторными свойствами, сорбентов и композитов для выделения и концентрирования радионуклидов [3]. Также хитозан можно применять как флокулянт для водоподготовки, очистки промышленных стоков, содержащих ионы тяжелых металлов. При использовании его для очистки воды, значительно уменьшается мутность, химическая и биологическая потребность в кислороде [4]. Одной из проблем, возникающих на пути применения высокомолекулярного хитозана в экологии и биотехнологии является его плохая растворимость в воде. Для решения этой проблемы хитозан подвергается деполимеризации. Существует несколько

методов получения низкомолекулярного хитозана, например, ферментативный гидролиз с применением хитиназ, комплексов гепатопанкреаса краба или криля [5]. В данном исследовании был использован химический гидролиз, главными преимуществами которого являются низкая степень полидисперсности получаемых фракций, отсутствие в них белковых примесей и низкая стоимость используемых реактивов [6]. Хитозан обладает свободной реакционноспособной аминогруппой, которая может быть использована для присоединения дополнительных функциональных групп (карбоксиметил-, сукцинил-, сульфогрупп, а также четвертичных аммониевых солей) к молекуле хитозана, за счет чего увеличивается его растворимость и улучшаются биологические свойства.

Целью данной работы являлось получение низкомолекулярного хитозана путем кислотного гидролиза и синтез ряда водорастворимых производных на его основе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве исходного материала был использован крабовый высокомолекулярный хитозан с молекулярной массой 200 кДа, со степенью дезацетилирования 86% (СД) производства ЗАО "Биопрогресс" (Московская область). Далее методом химической деполимеризации соляной кислотой высокомолекулярного хитозана была получена фракция с молекулярной массой 20 кДа (ММ). СД по данным ¹H-ЯМР-спектроскопии (рис. 1) и кондуктометрического титрования составляет 98-100%. Увеличение СД объясняется тем, что происходит расщепление ацетамидных связей в процессе химического гидролиза хитозана. Молекулярную массу образцов определяли методом высокоэффективной гель-проникающей хроматографии (рис. 2) [7]. Полученная фракция хитозана была использована для синтеза ряда производных. Наиболее используемым и легким подходом придания полимеру сильных катионных свойств является кватернизация хитозана, так как реакция протекает в мягких условиях с высоким выходом продукта. Ацилирование проводилось с целью увеличения сродства к мембранам бактериальных клеток, так как полученные производные планируется использовать в качестве антибактериального агента.

Шагдарова Бальжима Цырендоржиевна, аспирант, e-mail: shagdarova.bal@gmail.com; Левов Александр Николаевич, к.х.н., старший научный сотрудник; Варламов Валерий Петрович, д.х.н., проф., руководитель лаборатории

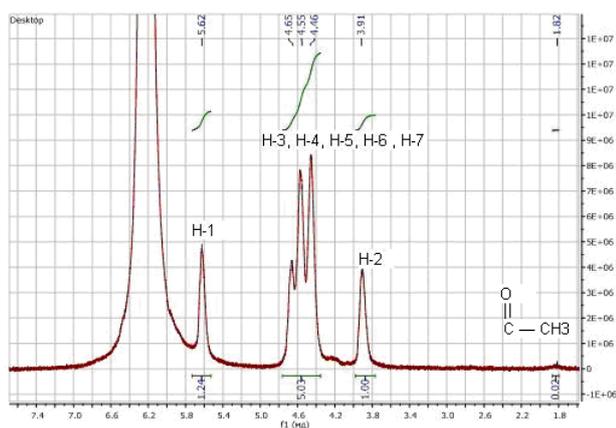


Рис. 1. ¹H-ЯМР спектр хитозана СД=98%

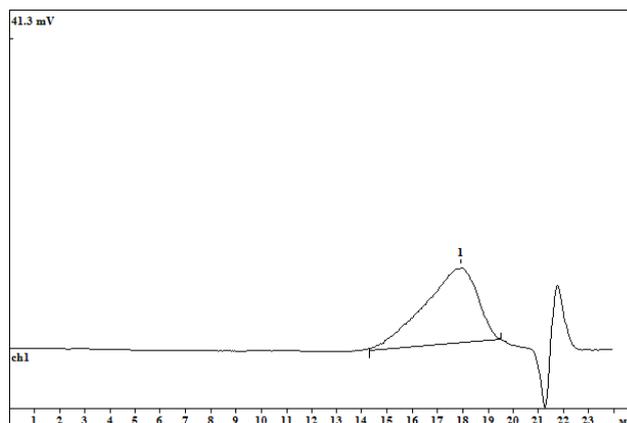


Рис. 2. Хроматограмма образца хитозана. Хроматограф: S 2100 (Sykam, Германия), колонка (7,8×300 мм), сорбент Ultrahydrogel-250 (Waters, США) предколонка (4×3 мм) GFC-4000 (Phenomenex, USA) при элюировании раствором 0,05 М СНЗСООН, 0,15 М СНЗСООНН4 (рН 5,1), с расходом 0,5 мл/мин при температуре 30°С

Синтез производных проводился в две стадии:

1) Реакция ацилирования. Взаимодействие хитозана с капроновым, масляным и уксусным ангидридами в среде 1% уксусной кислоты и метанола при 20°С, время реакции 5 мин (получены производные с длиной жирнокислотного остатка 6, 4, 2

атомов углерода, соответственно) [5];

2) Реакция кватернизации. Исчерпывающее алкилирование первичных аминогрупп хитозана и ацилированных производных глицидилтриметиламмоний хлоридом проводилось в водной среде при температуре 85°С в течение 5 ч [8].

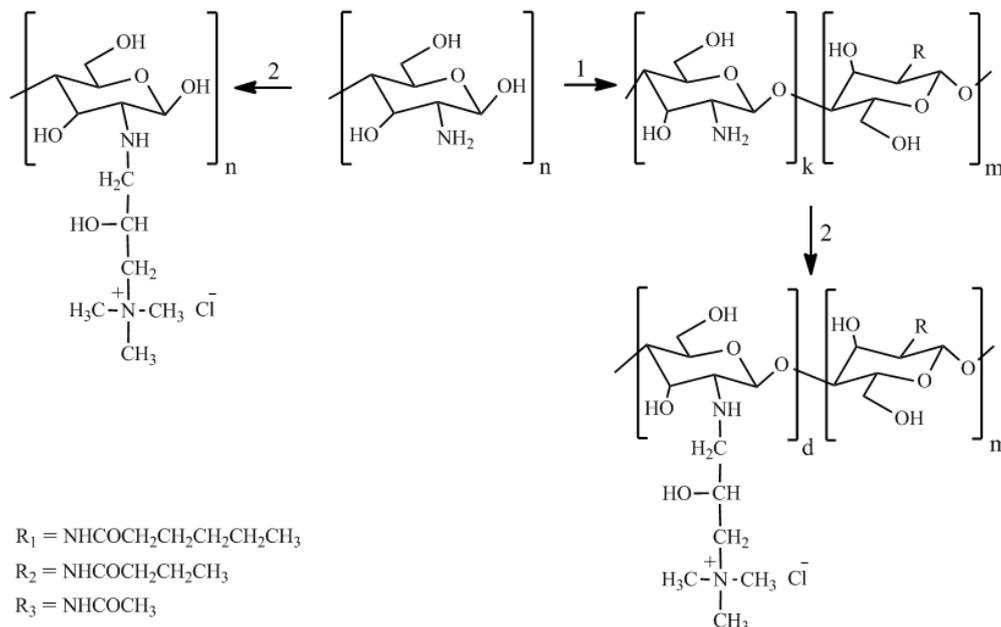


Рис. 3. Схема химической модификации хитозана: 1 – реакция ацилирования, 2 – реакция кватернизации

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате были получены производные, представленные на рис. 4.

Структура и степень замещения производных подтверждена с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии.

Таким образом, был получен ряд производных хитозана, которые за счет введенных функциональных групп имеют не только большую по сравнению с хитозаном растворимость в воде, а также будут обладать повышенными антибактериальными

свойствами. Перспективным является применение данных производных для использования в области биотехнологии и экологии. Возможно их использование в виде суспензий для защиты растений от болезней и стрессов, а также в качестве компонентов биodeградируемых материалов и защитных покрытий для пищевых продуктов.

На данный момент ведутся работы по изучению антибактериальных свойств полученных производных.

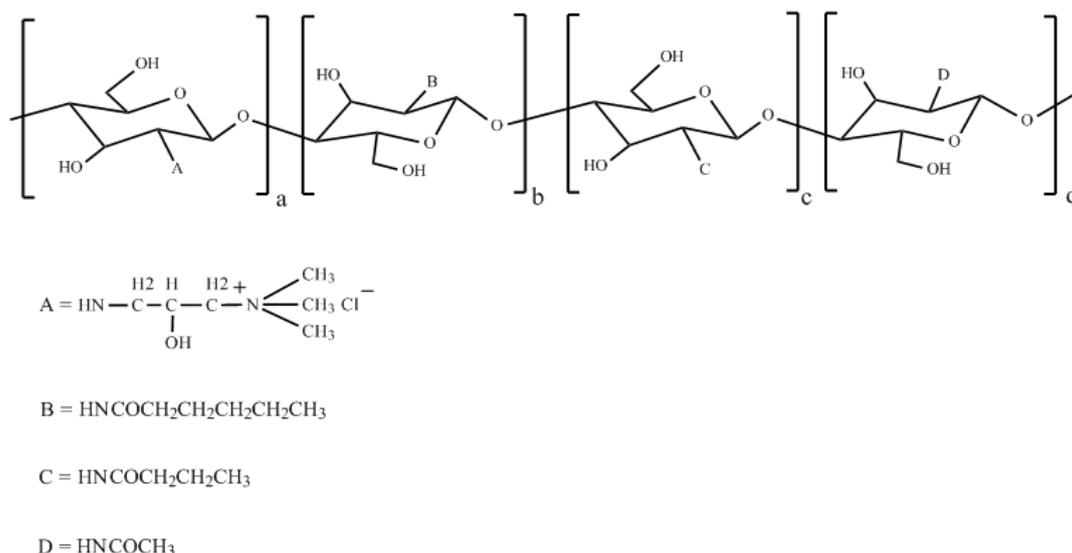


Рис. 4. Структурная формула полученных производных хитозана
 I. N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид a=100%
 II. N-гексаноилхитозан кватернизированный a=90%, b=10%
 III. N-бутаноилхитозан кватернизированный a=90%, c=10%
 IV. N-этанойлхитозан кватернизированный a=90%, d=10%

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука, 2002. 386 с.
2. Хитин и хитозан: Природа, получение и применение / Пер. с исп., под ред. В.П. Варламова, С.В. Немцева, В.Е. Тихонова. С. 292.
3. Велешко И.Е. Перспективы применения хитозана для выделения и концентрирования радионуклидов в растворах // Рыбпром: технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов. 2010. № 2. С. 53-57.
4. Братская С.Ю., Червонецкий Д.В., Перфильев А.В., Юдаков А.А., Авраменко В.А. Применение хитозана и его производных в питьевом водоснабжении и переработке сточных вод различного состава // Рыбпром: технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов. 2010. № 2. С. 58-63.
5. Ильина А.В., Варламов В.П. Влияние степени ацетилирования на ферментативный гидролиз хитозана препаратом Целловиридин Г20Х // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 3. С. 273-277.
6. Новиков В.Ю., Долгопятова Н.В., Рипачева Е.Н., Коновалова И.Н., Путинцев Н.М. Деструкция хитина и хитозана при химическом гидролизе // Рыбпром: технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов. 2010. № 2. С. 64-68.
7. Лопатин С.А. Проблемы определения молекулярно-массовых характеристик хитозана // Рыбпром: технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов. 2010. № 2. С. 82-85.
8. Sang-Hoon Lim, Samuel M. Hudson. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group // Carbohydrate Research. 2004. V. 339. Iss. 2. P. 313-319.

PREPARATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT CHITOSAN AND ITS DERIVATIVES

©2013 B.Ts. Shagdarova, A.N. Levov, V.P. Varlamov

Centre «Bioengineering» of RAS, Moscow

Method by acid hydrolysis was obtained low molecular weight chitosan fraction of 20 kDa, its main characteristics were determined. A series of acylated derivatives containing N-(2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl fragment were synthesized from low molecular weight chitosan.

Keywords: chitosan, acylated derivatives, quaternized derivatives.