

УДК 629.5.07 : 656.61.052 (043.3)

Совершенствование технологии получения глюкозамина из крабового хитина

Н.В. Долгопятова¹, В.Ю. Новиков¹, И.Н. Коновалова¹, Е.В. Шошина²,
К.В. Зотова¹

¹ Технологический факультет МГТУ, кафедра химии

² Биологический факультет МГТУ, кафедра биологии

Аннотация. Показано влияние предварительного ацетилирования хитина на выход D(+)-глюкозамина гидрохлорида. Предложены механизм деструкции хитина и математическая модель, адекватно описывающая процесс деструкции хитина. Усовершенствована технология получения глюкозамина гидрохлорида из предварительно ацетилированного крабового хитина.

Abstract. The influence of preliminary acetylated chitin on output of D(+)-Glucosamine hydrochloride has been shown. Mechanism of chitin degradation and the mathematical model adequately describing this process have been proposed. The technology of glucosamine hydrochloride production from preliminary acetylated crab chitin has been improved.

Ключевые слова: хитин, кислотный гидролиз, глюкозамин

Key words: chitin, acid hydrolysis, glucosamine

1. Введение

Одним из перспективных направлений мирового научно-технического прогресса в области изыскания новых материалов биологического происхождения за последние десятилетия является изучение свойств хитина и хитозана, а также способов их получения и переработки – с целью создания на их основе биологически активных и медицинских препаратов различного назначения.

Потенциальные источники хитина многообразны и широко распространены в природе. Хитин, входящий в состав панцирей ракообразных, рассеян в мировом океане, и его сбор в промышленных масштабах связан с утилизацией отходов переработки промысловых ракообразных. В России массовым источником хитинсодержащего сырья являются промысловые крабы на Дальнем Востоке, а также северная розовая креветка и акклиматизированный в Баренцевом море камчатский краб (Немцев, 2006).

Хитин является одним из основных источников промышленного получения ценного для медицинских целей вещества – D(+)-глюкозамина гидрохлорида (ГлА×HCl). 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×HCl была фирма ООО "НТЦ Экобиотек-Мурманск". После проведения клинических испытаний на эту субстанцию были получены фармакопейная статья (ВФС 42-3512-99) и разрешение для применения в России.

Одним из основных методов получения D(+)-глюкозамина гидрохлорида является химический кислотный гидролиз хитина. При полном гидролизе хитина в концентрированной хлороводородной кислоте образуется деацетилированный мономер ГлА×HCl, что обычно используют для его промышленного получения.

Целью данной работы является совершенствование технологии получения D(+)-глюкозамина гидрохлорида. Для повышения выхода D(+)-глюкозамина гидрохлорида было изучено влияние степени деацетилирования хитина на скорость и глубину кислотной деструкции этого полисахарида.

2. Объекты и методы исследования

Хитин и хитозан были получены по известной технологии (No, Meyers, 1995) из панцирьсодержащих отходов переработки камчатского краба *Paralithodes camtschaticus*.

Кислотный гидролиз хитина проводили в водных растворах хлороводородной (соляной) кислоты с концентрацией 0.5, 1.0, 2.0 и 11.7 моль/дм³ при температуре от 50 до 96 °С.

Молекулярную массу (ММ) образцов, полученных в процессе кислотного гидролиза, определяли вискозиметрически (Павлов, Селюнин, 1986). Предварительно образцы деацетилировали в стандартных

условиях (в 50 % NaOH, при температуре 98-99 °С, 1 ч). В работе (Чеботок и др., 2006) было установлено, что в условиях стандартного деацетилирования степень полимеризации хитина и хитозана практически не изменяется.

Содержание D(+)-глюкозамина гидрохлорида в гидролизатах определяли по методике Эльсона и Моргана (Rondle, Morgan, 1955).

Деацетилирование хитина и хитозана проводили в 50%-ном растворе NaOH при 100 °С. Образцы с разными степенями деацетилирования получали из хитина и хитозана повторными обработками 50%-ной NaOH при температуре 100 °С.

Хитин ацетилировали уксусным ангидридом. Для этого одну часть (100 г) хитина заливали десятью частями (1 л) 20 % раствора уксусного ангидрида в этаноле, тщательно перемешивали в течение 2-3 ч и оставляли при 4 °С в течение 24 ч при периодическом перемешивании. По окончании реакции в раствор добавляли 2 л воды, доводили раствор до pH 7 при помощи 1 н NaOH, фильтровали и несколько раз промывали ацетилированный хитин дистиллированной водой. Затем образцы сразу подвергали кислотному гидролизу или предварительно высушивали при температуре не выше 60 °С.

Степень ацетилирования определяли методом ИК-спектрофотометрии (Чеботок и др., 2007).

Идентификацию и характеристику качества препарата D(+)-глюкозамина проводили в соответствии с фармакопейной статьей ВФС 42-3512-99 (Глюкозамина гидрохлорид. *Glucosamini hydrochloridum* (2-дезоксид-2-амино-β-D-глюкозы гидрохлорид).

В научной 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 (рис. 1) (Varum, 2001).

Данное явление объясняется тем, что аминогруппа у второго атома углерода, заряженная положительно в условиях кислотно-катализируемого гидролиза понижает электронную плотность на гликозидном центре, тем самым дестабилизирует образующиеся по механизму реакции промежуточные интермедиаты – карбокатионы и сдвигает равновесие в сторону негидролизованного продукта. С другой стороны, ацетилирование амингруппы у второго углеродного атома ускоряет гидролиз гликозидов за счет повышения электронной плотности на реакционном центре и за счет анхимерного содействия N-ацетильной группы (Varum, 2001).

В случае ацетамидной группы на кислородном атоме есть свободная пара электронов, которая может участвовать во взаимодействии с положительно заряженным гликозидным углеродным атомом, приводя к стабилизации карбокатиона, снижению вероятности смещения реакции в сторону исходных продуктов и, следовательно, к увеличению скорости прямой реакции гидролиза (Ганстон и др., 1986).

Следует отметить, что количественная характеристика этих процессов в рамках химической кинетики в литературе не обсуждается.

Из литературных данных известно, что скорость кислотной деструкции резко уменьшается с увеличением начальной степени деацетилирования хитина (Новиков, 2004). Это приводит к снижению выхода мономера D(+)-глюкозамина и увеличению выхода побочных продуктов.

С целью математического моделирования процесса деструкции был изучен гидролиз хитина при 50 °С в хлороводородной кислоте различной концентрации.

Механизм процесса деструкции хитина может быть описан следующими параллельно протекающими элементарными реакциями первого порядка с константами скоростей (k): 1 – гидролиз гликозидных связей у ацетилированного звена (константа реакции k_1); 2 – гидролиз гликозидных связей у деацетилированного звена (константа

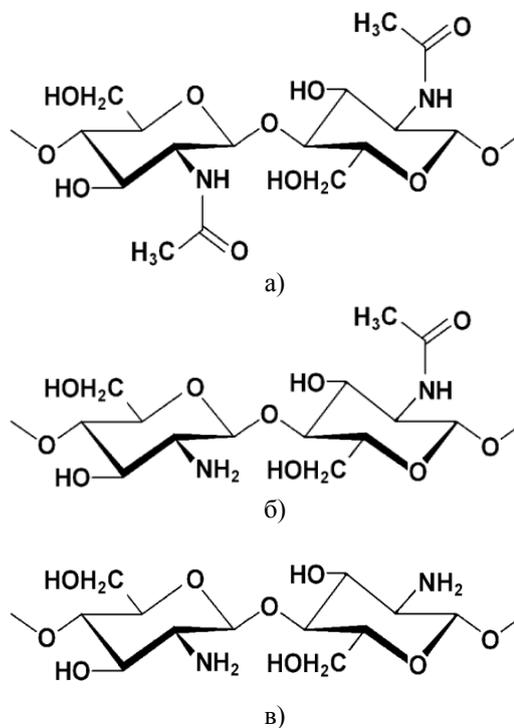


Рис. 1. Структурная формула хитина (а), частично деацетилированного хитина (б) и хитозана (в)

реакции k_2); 3 – реакция деацетилирования (константа реакции k_3).

Решение системы дифференциальных уравнений, описывающих предложенный механизм, позволило с помощью программы Maple 13 (Waterloo Maple Inc.) получить аналитическое выражение для кинетики деструкции, из которого мы оценили константы скоростей реакций (k_1 , k_2 и k_3) (табл. 1).

Таблица 1. Константы скорости реакций расщепления гликозидных связей и амидной связи в молекуле хитина, рассчитанные по модели

C (HCl), моль/л	k_1	k_2	k_3
0.5	0.0272	0.00077	0.0601
1	0.0829	0.00205	0.0160
2	0.1300	0.00214	0.0720

Используя полученные константы скорости элементарных реакций, были построены кинетические кривые деструкции хитина/хитозана с различной начальной степенью деацетилирования. В качестве примера на рис. 2 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).

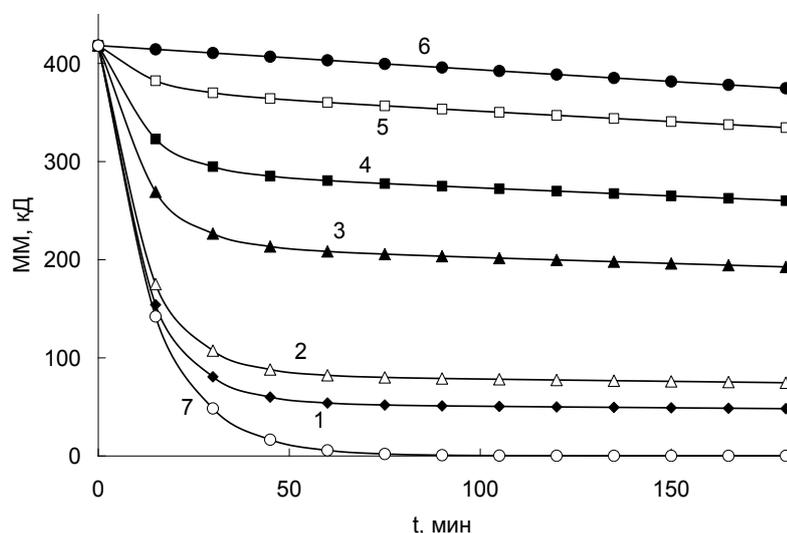


Рис. 2. Кинетические кривые деструкции хитина в 1 н. HCl при 50 °С, рассчитанные по математической модели. Начальная степень деацетилирования хитина: 0 % (1), 10 % (2), 50 % (3), 70 % (4), 90 % (5) и 100 % (6). Кинетическая кривая 7 описывает деструкцию хитина без учета реакции деацетилирования

Из данных, приведенных на рис. 2, 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.

Известные технологии получения D(+)-глюкозамина гидрохлорида заключаются в полной кислотной деполимеризации хитина, выделении полученного продукта из гидролизата и его очистки (Новиков, 1997; 1999).

В качестве сырья обычно используется хитин, полученный по технологии, включающей депротеинизацию горячим раствором щелочи (обычно 4%-ным раствором NaOH) и раствором минеральной кислоты (обычно 3.5-7%-ным раствором HCl) при комнатной температуре (No, Meyers, 1995).

Анализ образцов хитина и данные, приведенные в научной литературе, показали, что хитин, полученный известным в литературе способом, имеет исходную степень деацетилирования 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. Следует отметить, что в зависимости от свойств хитинсодержащего

сырья и режимов технологической обработки степень деацетилирования промышленных образцов хитина может достигать 30 %.

Различными способами (Новиков, Иванов, 1995; Казаков и др., 1995) был получен D(+)-глюкозамина гидрохлорид из исходного и предварительно ацетилированного хитина и рассчитан его выход.

Получение D(+)-глюкозамина гидрохлорида состояло из следующих основных операций:

– способ 1: гидролиз хитина в концентрированной хлороводородной кислоте, добавление активированного угля, фильтрование гидролизата, упаривание, промывка кристаллов D(+)-глюкозамина и сушка;

– способ 2: гидролиз хитина в HCl, охлаждение гидролизата и кристаллизация D(+)-глюкозамина гидрохлорида, фильтрование, растворение осадка в воде, добавление активированного угля, фильтрование, упаривание, промывка кристаллов, сушка;

– способ 3: гидролиз хитина в концентрированной HCl, охлаждение гидролизата и кристаллизация D(+)-глюкозамина гидрохлорида, фильтрование, промывка осадка этанолом, растворение в воде, фильтрование, упаривание, промывка, сушка;

– способ 4: влажный хитин гидролизовали раствором хлороводородной кислоты, насыщенной газообразным хлороводородом.

Выход D(+)-глюкозамина гидрохлорида, полученного различными способами из исходного и предварительно ацетилированного хитина, приведен в табл. 2.

Таблица 2. Влияние способа получения на выход D(+)-глюкозамина гидрохлорида

№ способа	Выход D(+)-глюкозамина гидрохлорида, %	
	из исходного хитина	из предварительно ацетилированного хитина
1	69	81
2	74	86
3	76	87
4	72	82

Из табл. 2 следует, что при предварительном ацетилировании исходного хитина перед кислотным гидролизом выход D(+)-глюкозамина гидрохлорида увеличивается по сравнению с неацетилированным хитином на 10-12 %. Это позволяет сделать вывод о том, что ацетилирование можно использовать для предварительной подготовки хитина перед кислотным гидролизом. Особенно это важно в том случае, если используется хитин различного происхождения, который может содержать партии полисахарида с различной исходной степенью деацетилирования.

Использование влажного ацетилированного хитина для получения глюкозамина гидрохлорида по способу 4, затруднено наличием в нем после фильтрования около 70 % воды, что ведет к уменьшению выхода готового продукта почти на 10 %. В этом способе практически теряется выигрыш в выходе продукта за счет ацетилирования исходного хитина.

Усовершенствованная технология получения $\text{GlA} \times \text{HCl}$ из предварительно ацетилированного хитина заключается в следующем. В реактор загружали 20%-й 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 ч и оставляли при температуре $4 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ч 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 ± 0.5 . Смесь фильтровали на закрытом нутч-филт্রে через 2-3 слоя фильтровальной бумаги. Далее ацетилированный хитин обрабатывали в соответствии с известной технологией.

D(+)-глюкозамина гидрохлорид, полученный из предварительно ацетилированного хитина, представляет собой белый кристаллический порошок без запаха, не гигроскопичный, остаточная влажность 0.5 % зольный остаток менее 0.1 %. Температура разложения (почернения пробы) $195-200^\circ\text{C}$, pH 3.5-4.5 водного 20%-ного раствора при 20°C . Массовая доля D(+)-глюкозамина гидрохлорида в продукте, полученном из предварительно ацетилированного хитина, составляет 99.5-99.9 %.

Для характеристики D(+)-глюкозамина гидрохлорида в качестве стандарта использовали препарат по ТУ 6-09-05-936-78 (D(+)-глюкозамина гидрохлорид квалификации "чистый") и препарат,

полученный по фармакопейной статье ВФС 42-3512-99 (Глюкозамина гидрохлорид. *Glucosamini hydrochloridum* (2-дезоксид-2-амино-β-D-глюкозы гидрохлорид)).

Определение оптимальных технологических параметров процесса получения глюкозамина из предварительно ацелированного хитина было проведено с использованием метода планирования эксперимента. В качестве функции отклика *V* был выбран выход D(+)-глюкозамина гидрохлорида, в качестве влияющих факторов – концентрация кислоты (*C*) и степень деацелирования хитина (*DD*). Математическая модель, описывающая процесс гидролиза D(+)-глюкозамина гидрохлорида, была получена с помощью компьютерной программы STATISTICA Ver. 8.0 (StatSoft., Inc.), позволяющей получить уравнение регрессии, связывающее функцию отклика с выбранным количеством влияющих факторов.

В результате расчетов получено следующее уравнение регрессии процесса кислотного гидролиза хитина с целью получения D(+)-глюкозамина гидрохлорида:

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

Поверхность функции отклика *V* в зависимости от влияющих факторов представлена на рис. 3.

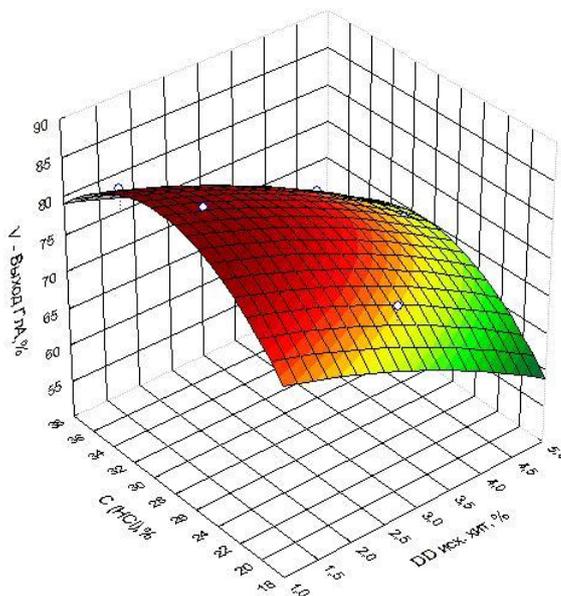


Рис. 3. Поверхность функции отклика в зависимости от влияющих факторов.

V – выход D (+)-глюкозамина гидрохлорида, *C* – концентрация кислоты,
DD – степень диацелирования хитина

Анализ поверхности функции отклика показал, что оптимальное значение степени деацелирования исходного хитина (*DD*) – менее 3 %, концентрации HCl (*C*) – 28-29 %.

Были получены значения влияющих факторов, соответствующие максимальному выходу D(+)-глюкозамина гидрохлорида. В точке оптимума был поставлен контрольный опыт, который подтвердил хорошую сходимость расчетного значения функции отклика с экспериментальным значением. Расчетное значение функции отклика, соответствующее найденным оптимальным значениям влияющих факторов, составляет 85.74 %. Экспериментальное значение – 86 %, что хорошо совпадает с расчетным, подтверждая адекватность модели.

3. Выводы

1. Показано, что предварительное ацелирование хитина до 96-97 % увеличивает скорость его кислотного гидролиза, скорость образования и выход мономера ГлА×HCl на 10-12 %. Экспериментально подтверждено, что скорость деструкции и полной деполимеризации хитина и хитозана возрастает с уменьшением степени деацелирования.

2. Разработана математическая модель, адекватно описывающая процесс гидролиза предварительно ацелированного хитина. Определены близкие к оптимальным условия производства ГлА×HCl из предварительно ацелированного хитина.

Научно-исследовательская работа выполнена в рамках реализации ФПЦ "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы".

Литература

- No H.K., Meyers S.P.** Preparation and characterization of chitin and chitosan – a review. *Journal of aquatic food product technology*, v.4, N 2, p.27-52, 1995.
- Rondle C.J.M., Morgan W.T.J.** The determination of glucosamine and galactosamine. *Biochemical Journal*, v.61, Pt. 4, p.586-589, 1955.
- Varum K.M., Ottoy M.H., Smidsrod O.** Acid hydrolysis of chitosans. *Carbohydrate Polymers*, v.46, N 1, p.89-98, 2001.
- Ганстон Ф.Д., Ноулс П.Ф., Хаф Л.** Липиды, углеводы, макромолекулы, биосинтез. В кн.: *Общая органическая химия. В 12 т. М., Химия*, т.11, 734 с., 1986.
- Казakov А.Л., Самокиш И.И., Компанцев В.А., Лобова Е.И., Новиков В.Ю., Орлова Т.А.** Способ получения гидрохлорида D(+)-глюкозамина, обладающего противоартрозной активностью. Пат. 2038095 Рос. Федерация: МПК 7; заявители и патентообладатели: Пятигорский фармацевтический институт; Научно-производственное объединение "Севертехцентр", Мурманск. № 5037787/14; заявл. 05.09.1991; опубл. 27.06.95, 1995.
- Немцев С.В.** Комплексная технология хитина и хитозана из панциря ракообразных. М., ВНИРО, 134 с., 2006.
- Новиков В.Ю., Иванов А.Л.** Способ получения гидрохлорида D(+)-глюкозамина. Пат. 2042685 Рос. Федерация: МКИ⁶ C07H5/06, C08B37/08; заявитель и патентообладатель Фирма "Атлант-СИМ-Виктор". № 92003453/04 заявл. 02.11.92; опубл. 27.08.95, Бюл. № 24/95, 1995.
- Новиков В.Ю.** Кинетика реакции образования D(+)-глюкозамина при кислотном гидролизе хитина. *Журн. приклад. химии*, т.72, № 1, с.147-152, 1999.
- Новиков В.Ю.** Кислотный гидролиз хитина и хитозана. *Журн. приклад. химии*, т.77, № 3, с.490-493, 2004.
- Новиков В.Ю.** Способ получения гидрохлорида D(+)-глюкозамина. *Журн. приклад. химии*, т.70, № 9, с.1543-1547, 1997.
- Павлов Г.М., Селюнин С.Г.** Скоростная седиментация, молекулярная масса и конформационные параметры некоторых растворимых производных хитина. *Высокомолек. соединения*, т.28, № 8, с.1727-1731, 1986.
- Чеботок Е.Н., Новиков В.Ю., Коновалова И.Н.** Влияние кристалличности хитина и хитозана на кинетику щелочного деацетилирования. *Журн. прикл. химии*, т.80, № 10, с.1724-1729, 2007.
- Чеботок Е.Н., Новиков В.Ю., Коновалова И.Н.** Деполимеризация хитина и хитозана при щелочном деацетилировании. *Журн. прикл. химии*, т.79, № 7, с.1172-1176, 2006.