

УДК 535.56 : [678.4 : 547.458.8]

Оптическая активность и спектрофотометрические характеристики растворов хитозана, полученного из камчатского краба и арктической креветки

К.В. Реут¹, Н.В. Долгопятова¹, В.Ю. Новиков², Н.М. Путинцев¹,
И.Н. Коновалова¹, Ю.А. Кучина¹

¹ Факультет пищевых технологий и биологии МГТУ, кафедра химии

² Полярный научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича (ПИНРО)

Аннотация. Показано, что величина удельного оптического вращения растворов хитозана зависит от нуклеофильности гидролизующего агента, растет по абсолютной величине с увеличением в растворе хитозана количества концевых гликозидных центров; степень деацетилирования хитозана практически не влияет на величину удельного оптического вращения. Для хитозана из хитина камчатского краба и арктической креветки получены одинаковые закономерности по влиянию молекулярной массы и степени деацетилирования на величину удельного оптического вращения. Установлено влияние фосфорной кислоты на конформационные превращения концевых гликозидных центров молекул хитозана.

Abstract. The size of specific optical rotation of chitosan solutions has been shown to depend on nucleophilicity of hydrolyzing agent, it grows in absolute value with increase of quantities of trailer glycosidic centers in chitosan solution; the chitosan deacetylation degree practically does not influence on the size of specific optical rotation. For chitosan from chitin of the Kamchatka crab and the Arctic shrimp identical laws of influence of molecular weight and deacetylation degree on the size of specific optical rotation have been obtained. Influence of phosphoric acid on conformational transformations trailer glycosidic centres of chitosan molecules has been defined.

Ключевые слова: хитин, хитозан, кислотный гидролиз, оптическая активность, молекулярная масса, степень деацетилирования, ультрафиолетовый спектр, конформационные превращения

Key words: chitin, chitosan, acid hydrolysis, optical activity, molecular weight, deacetylation degree, ultraviolet spectrum, conformational conversion

1. Введение

Из многообразия природных биополимеров особого внимания заслуживает хитин и его производное – хитозан. Хитин является практически единственным азотсодержащим биополимером, выпускаемым в промышленном масштабе. Хитин и его растворимое деацетилированное производное, хитозан, являются экологически безопасными биоразлагаемыми полимерами. Свойства хитина зависят от его происхождения, поэтому свойства хитозана из различных источников, такие как молекулярная масса, степень деацетилирования, оптическая активность могут быть различными.

Существует много различных направлений исследования физико-химических свойств хитозана, таких как поверхностная активность, реологические, эмульгирующие свойства и другие. Однако, его оптическая активность изучена недостаточно, хотя эта характеристика оказывает существенное влияние на свойства полисахарида. Так, например, было обнаружено, что бактерицидная активность пленочных образцов хитозана во многом определяется величиной и знаком удельного оптического вращения. В литературе имеются сведения о зависимости бактерицидной и оптической активности растворов хитозана от молекулярной массы (*Шиповская и др.*, 2007).

Изучение оптической активности вещества позволяет определить его состав, строение и свойства. Так, например, из величины удельного вращения полисахарида можно сделать некоторые выводы о конфигурации гликозидных связей входящих в него моносахаридных остатков. Величина удельного вращения плоскости поляризации плоско поляризованного света может быть использована в качестве доказательства механизма реакции нуклеофильного замещения, протекающей по смешанному типу ($S_N1 + S_N2$) (*Шабаров*, 2000).

2. Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали хитозан, полученный из хитина панциря камчатского краба, акклиматизированного в Баренцевом море, и арктической креветки. Хитин и хитозан получали в лабораторных условиях по известным методикам (Новиков, 2003; Новиков и др., 1990). Гидролиз хитина проводили в хлороводородной кислоте с молярной концентрацией эквивалента $C_n = 1 \div 5$ моль/дм³ и фосфорной кислоте с $C_n = 1$ моль/дм³ в течение 5-60 мин при температуре 50 °С. Хитозан получали из хитина стандартным деацетилизацией (Новиков и др., 2012).

Средневязкостную молекулярную массу хитозана (ММ) определяли по методике (Новиков и др., 2012). Молекулярную массу в Дальтонах (Да) рассчитывали по формуле Марка-Хаувинка-Куна:

$$MM = 2,4 \times 10^4 \times [\eta]^{0,98},$$

где $[\eta]$ – характеристическая вязкость, дл/г; 2,4 и 0,98 – пересчетные коэффициенты.

Значения пересчетных коэффициентов в уравнении Марка-Хаувинка-Куна опубликованы в работе (Павлов, Селюнин, 1986).

Определение степени деацетилирования хитозана проводили обратным потенциометрическим титрованием хлороводорода, связанного с аминогруппами молекул хитозана. Титрование выполняли с использованием рН-метра "Иономер – Эксперт-001".

Угол вращения плоскости поляризации поляризованного света растворов хитозана измеряли на круговом поляриметре СМ-3, построенном по принципу полутеневых приборов. Угол вращения измеряли при длине волны $\lambda = 589$ нм и длине кюветы 1 дм.

Растворы хитозана готовили в ацетатном буфере с рН 4,86. Концентрация растворов составляла 0,005 г/см³.

Удельное вращение плоскости поляризации $[\alpha]_{\lambda}^t$ вычисляли по формуле (Государственная..., 1987):

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \varphi / l \cdot c,$$

где φ – угол вращения плоскости поляризации, град.; l – толщина слоя раствора оптически активного вещества, $l = 1$ дм; c – концентрация раствора, г/см³.

Спектрофотометрический анализ проводили на спектрофотометре T70 UV/VIS Spectrometer в диапазоне длин волн 190-1100 нм с рабочей длиной кюветы 10 мм. Готовили растворы хитозана с концентрацией 1 %, в качестве растворителя использовали раствор хлороводородной кислоты с концентрацией 0,1 моль/дм³.

3. Результаты и их обсуждение

В литературе имеются сведения о зависимости оптической активности хитозана от молекулярной массы (Шиповская и др., 2007). Авторы этой работы показали, что зависимость величины удельного вращения $[\alpha]_{\lambda}^t$ от $\lg(MM)$ имеет различный характер для свежеприготовленных растворов высокомолекулярного хитозана и его олигомеров. В работе установлено, что $[\alpha]_{\lambda}^t$ по абсолютной величине тем больше, чем меньше ММ хитозана. Авторы этой работы не приводят объяснение полученным результатам.

В данной работе изучено влияние на величину удельного оптического вращения растворов хитозана природы кислоты, молекулярной массы и степени деацетилирования хитозана, полученного гидролизом хитина из камчатского краба и арктической креветки. Результаты изучения влияния этих факторов на $[\alpha]_{\lambda}^t$ приведены в табл. 1, 2.

Из данных, представленных в табл. 1, следует, что при гидролизе полисахарида в хлороводородной кислоте в условиях эксперимента ММ хитозана из краба и креветки уменьшается с 58,3 кДа до 11,6 кДа, при этом величина $[\alpha]_{\lambda}^t$ растворов возрастает по абсолютной величине с $-18 \div -28$. Известно, что наибольший вклад в величину $[\alpha]_{\lambda}^t$ вносят гликозидные центры полисахаридов (Бочков и др., 1980). По всей видимости, с уменьшением молекулярной массы, при одинаковой концентрации хитозана в растворе, увеличивается общее количество концевых гликозидных центров. Кроме того, величина удельного вращения зависит от типа конфигурации гликозидных центров в молекуле полисахарида (Бочков и др., 1980). По величине удельного вращения полисахарида можно сделать вывод о конфигурации гликозидных связей входящих в него моносахаридных остатков. В величину $[\alpha]_{\lambda}^t$ вносит аддитивный вклад каждый из имеющихся в полисахариде ассиметрических центров, но наиболее значителен вклад концевого гликозидного центра, который возникает из карбонильной группы в результате таутомерных превращений (Бочков и др., 1980). На рис. 1 приведена структура мономерного звена хитозана, в которой гликозидный центр (атом углерода 1) находится в β -конфигурации.

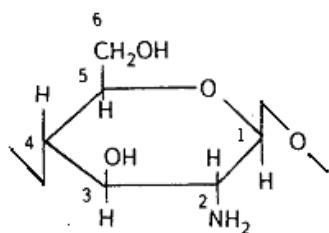


Рис. 1. Структурная формула мономерного звена хитозана

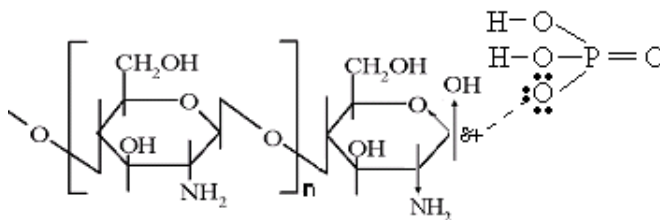


Рис. 2. Образование комплекса хитозана с фосфорной кислотой

Величину удельного вращения $[\alpha]_{\lambda}^t$ измеряли через сутки после приготовления растворов хитозана. В течение этого времени в растворе устанавливается таутомерное равновесие между различными формами концевых гликозидных центров – полуацетальных (α и β) и оксикарбонильных. Каждой форме присущ свой угол вращения плоскости поляризации. В состоянии равновесия раствора он равен алгебраической сумме углов вращения всех таутомерных форм (Петров и др., 2002). По всей видимости, при уменьшении молекулярной массы хитозана в растворе накапливаются конформации, для которых величина удельного оптического вращения увеличивается по абсолютной величине.

При гидролизе полисахарида в фосфорной кислоте в условиях эксперимента ММ изменяется незначительно ($58,3 \div 48,3$ кДа), однако величина $[\alpha]_{\lambda}^t$ в большей степени, по сравнению с гидролизом в хлороводородной кислоте, сдвигается в сторону положительных значений (до -4). В работе (Долгопятова и др., 2011) было показано, что кислотный гидролиз гликозидных связей в хитине является реакцией нуклеофильного замещения второго порядка (S_{N2}), скорость которой зависит от нуклеофильности кислоты. В изучаемых кислотах хлорид-ион является слабым нуклеофилом, анион фосфорной кислоты – сильным. По всей видимости, фосфорная кислота, как сильный нуклеофил, может оказывать влияние на положение ОН-групп, связанных с концевым гликозидным центром молекулы хитозана. Вероятно, анион фосфорной кислоты может образовывать с концевым гликозидным центром хитозана устойчивый комплекс. В этом комплексе положение ОН-группы фиксируется в конфигурации, которая вносит наибольший вклад в величину удельного вращения. На рис. 2 показан комплекс аниона $H_2PO_4^-$ с гликозидным центром хитозана. В этом комплексе ОН-группа находится в β -конфигурации.

Таблица 1. Влияние природы кислоты и молекулярной массы хитозана (ММ) на величину удельного оптического вращения раствора хитозана $[\alpha]_{\lambda}^t$

Условия гидролиза (концентрация кислоты, C_n моль/дм ³ , время гидролиза, мин)	ММ, Да	$[\alpha]_{\lambda}^t$
Хитозан из камчатского краба		
1н HCl, 5 мин	53300	-22
1н HCl, 20 мин	46700	-22
1н HCl, 30 мин	45100	-20
1н HCl, 40 мин	45000	-20
1н HCl, 60 мин	40000	-18
1н H ₃ PO ₄ , 5 мин	56000	-12
1н H ₃ PO ₄ , 10 мин	55800	-10
1н H ₃ PO ₄ , 20 мин	54320	-10
1н H ₃ PO ₄ , 30 мин	52081	-9
1н H ₃ PO ₄ , 40 мин	50034	-6
1н H ₃ PO ₄ , 60 мин	48382	-4
Хитозан из арктической креветки		
1н HCl, 60 мин	28130	-26
3н HCl, 60 мин	15830	-24
5н HCl, 30 мин	12000	-22
5н HCl, 60 мин	11600	-18

Концентрации растворов хитозана – 0,005 г/см³, степень деацетилирования хитозана из камчатского краба – 79-80 %, степень деацетилирования хитозана из арктической креветки – 69-70 %.

Таблица 2. Влияние степени деацетилирования (DD, %) на величину удельного оптического вращения растворов хитозана $[\alpha]_{\lambda}^t$

Хитозан из камчатского краба			Хитозан из арктической креветки		
ММ, Да	DD, %	$[\alpha]_{\lambda}^t$	ММ, Да	DD, %	$[\alpha]_{\lambda}^t$
58320	83,8	-28	56380	84,0	-30
58320	70,7	-28	56380	70,5	-28

В табл. 2 приведены результаты по изучению влияния степени деацетилирования на величину $[\alpha]_{\lambda}^t$ растворов хитозана из камчатского краба и арктической креветки. Из данных таблицы следует, что величина удельного оптического вращения $[\alpha]_{\lambda}^t$ практически не зависит от степени деацетилирования хитозана. Для хитозана из краба и креветки со степенью деацетилирования 70,7 и 83,8 величина $[\alpha]_{\lambda}^t$ соответственно составляет $-28 \div -30$. По всей видимости, это можно объяснить тем, что в условиях стандартного щелочного деацетилирования хитина его макромолекула практически не подвергается деструкции, при этом не изменяется молекулярная масса полисахарида и, следовательно, количество концевых гликозидных центров (Чеботок и др., 2006).

Результаты спектрофотометрического анализа растворов хитозана в УФ-области спектра приведены на рис. 3, 4, 6.

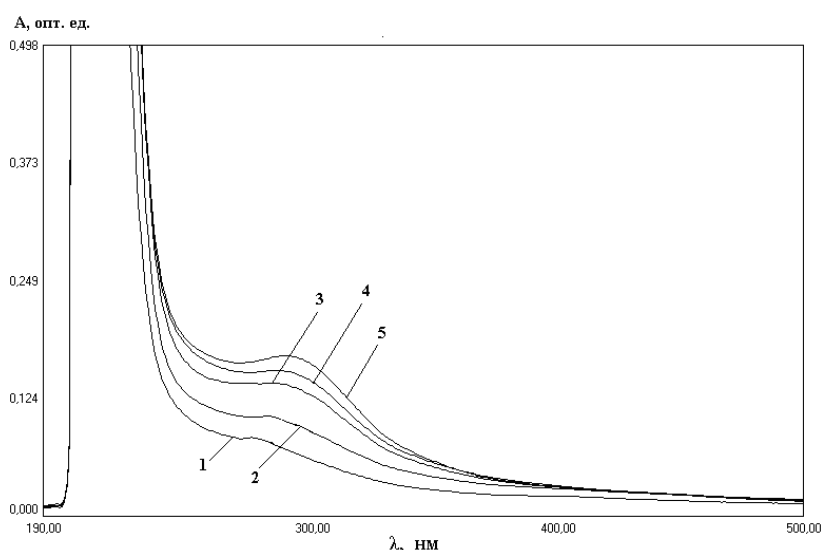


Рис. 3. Спектры поглощения растворов хитозана с различной молекулярной массой: 1 – ММ = 55000 Да; 2 – ММ = 28130 Да; 3 – ММ = 15830 Да; 4 – ММ = 12000 Да; 5 – ММ = 11600 Да

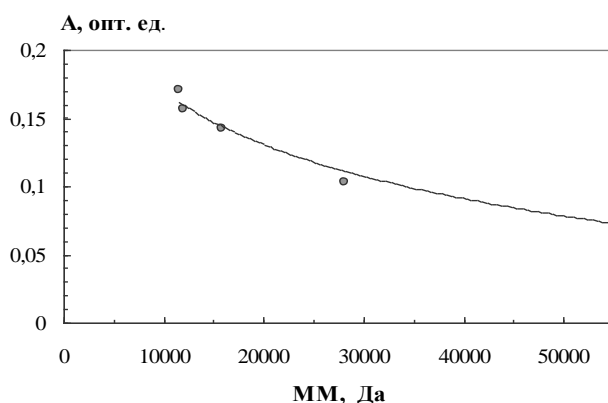


Рис. 4. Зависимость оптической плотности растворов от молекулярной массы хитозана

На рис. 3 приведена оптическая плотность растворов хитозана с различной молекулярной массой. Хитозан был получен гидролизом крабового хитина в хлороводородной кислоте. После стандартного деацетилирования DD хитозана составляла 79-82 %. В полученных спектрах максимумы светопоглощения наблюдаются в интервале длин волн 250-300 нм.

С уменьшением молекулярной массы хитозана (от 55 кДа до 11,6 кДа) оптическая плотность растворов увеличивается (рис. 4).

Известно, что в интервале длин волн 250-300 нм максимумы поглощения характерны для органических молекул, в которых присутствует хромофорная карбонильная группа $C=O$ (Карнаухова, Тупицин, 2002).

Присутствие карбонильных групп в спектрах растворов хитозана можно объяснить таутомерными превращениями концевых гликозидных центров молекул хитозана из полуацетальных в окси-карбонильную форму (рис. 5) (Петров и др., 2002). С уменьшением молекулярной массы хитозана при одинаковой концентрации полисахарида в растворе общее количество концевых гликозидных центров возрастает, что приводит к увеличению оптической плотности.

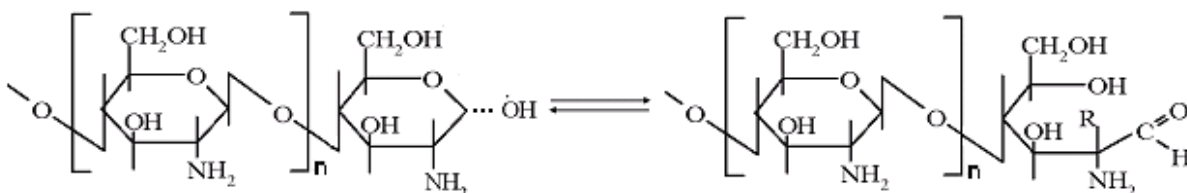


Рис. 5. Таутомерные превращения концевых гликозидных центров макромолекулы хитозана

На рис. 6 приведены спектры поглощения растворов хитозана, полученного из крабового хитина, гидролизованного в хлороводородной и фосфорной кислотах. В спектрах наблюдаются максимумы оптической плотности в интервале длин волн 250-300 нм, причем в случае H_3PO_4 более интенсивные.

По всей видимости, образование устойчивых комплексов хитозана с фосфорной кислотой влияет не только на величину удельного оптического вращения растворов хитозана, но и на их спектральные характеристики.

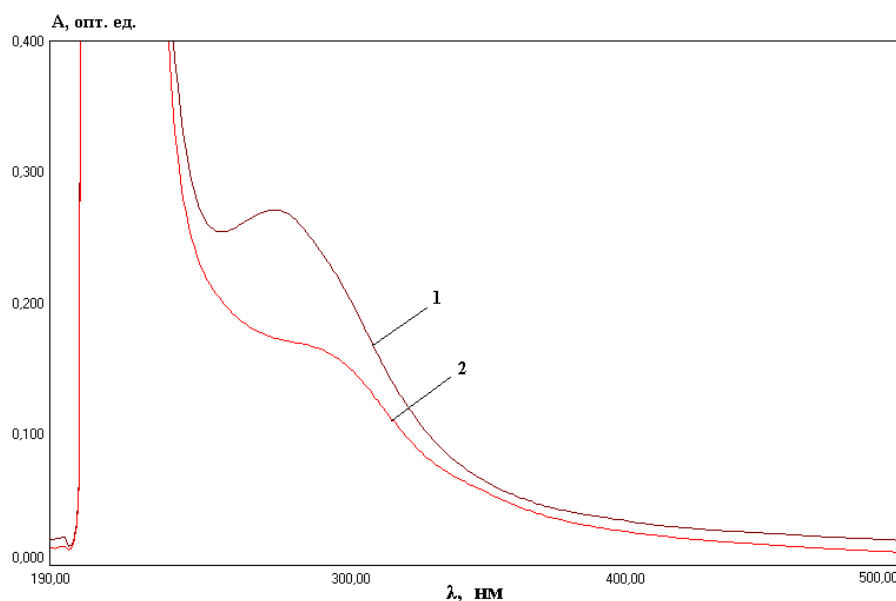


Рис. 6. Спектры поглощения растворов хитозана:

- 1 – хитозан гидролизован в H_3PO_4 ($C_{\text{кислоты}} = 1$ моль/дм³, время гидролиза – 60 мин), ММ = 48 кДа;
 2 – хитозан гидролизован в HCl ($C_{\text{кислоты}} = 1$ моль/дм³, время гидролиза – 60 мин), ММ = 40 кДа

4. Заключение

Показано, что величина удельного оптического вращения растворов хитозана зависит от нуклеофильности гидролизующего агента, растет с увеличением в растворе хитозана количества концевых гликозидных центров; степень деацетилирования хитозана практически не влияет на величину удельного оптического вращения. Для хитозана из хитина камчатского краба и арктической креветки получены одинаковые закономерности по влиянию молекулярной массы и степени деацетилирования на величину удельного оптического вращения. Установлено влияние фосфорной кислоты на конформационные превращения концевых гликозидных центров молекул хитозана.

Литература

- Бочков А.Н., Афанасьев В.А., Зайков Г.Е.** Углеводы. М., Наука, 176 с., 1980.
Государственная фармакопея СССР. Издание 11: Вып. 1. Общие методы анализа. М., Медицина, 335 с., 1987.
- Долгопятова Н.В., Новиков В.Ю., Коновалова И.Н., Путинцев Н.М.** Влияние степени ионизации и нуклеофильности кислот на кинетику деструкции хитина. *Журн. приклад. химии*, т. 84, № 6, с. 1004-1009, 2011.
- Карнаухова Л.И., Тупицин Е.Н.** УФ-спектроскопия биологических макромолекул. Учебно-методическое пособие. Саратов, Изд-во Саратовского Гос. Ун-та, 25 с., 2002.
- Новиков В.Ю., Орлова Т.А., Воронина И.В.** Кинетика реакции деацетилирования хитина и хитозана. *Изд. вузов. Сер. Пищевая технология*, № 5, с. 64-67, 1990.
- Новиков В.Ю.** Химический гидролиз хитина и хитозана. *Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана: VII междунар. конф.*, Санкт-Петербург, М., ВНИРО, с. 38-43, 2003.
- Новиков В.Ю., Коновалова И.Н., Долгопятова Н.В.** Химические основы технологии получения хитина и его производных из панциря ракообразных. *СПб., ГИОРД*, 208 с., 2012.
- Павлов Г.М., Селюнин С.Г.** Скоростная седиментация, молекулярная масса и конформационные параметры некоторых растворимых производных хитина. *Высокомолекулярные соединения, Серия А*, т. 28, № 8, с. 1727-1731, 1986.
- Петров А.А., Петров А.А., Бальян Х.В., Трощенко А.Т.** Органическая химия. *СПб., Изд-во "Иван Федоров"*, 622 с., 2002.
- Чеботок Е.Н., Новиков В.Ю., Коновалова И.Н.** Деполимеризация хитина и хитозана при щелочном деацетилировании. *Журнал прикладной химии*, т. 79, № 7, с. 1172-1176, 2006.
- Шабаров Ю.С.** Органическая химия. Учебник для вузов. М., Химия, 848 с., 2000.
- Шиповская А.Б., Фомина В.И., Казмичева О.Ф. и др.** Влияние молекулярной массы на оптическую активность хитозана. *Высокомолекулярные соединения, Серия Б*, т. 49, № 12, с. 2195-2199, 2007.