

УДК 664.959(043.3)

Химическая и ферментативная деструкция хондроитина сульфата из северного ската

Ю. А. Кучина, И. Н. Коновалова*, В. Ю. Новиков, Н. В. Долгопятова, В. Я. Кузнецов

*Мурманский государственный технический университет, г. Мурманск, Россия;
e-mail: konovalovain@mstu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1116-0205>

Информация о статье Реферат

Поступила в редакцию
14.07.2021

Ключевые слова:

хондроитин сульфат,
северный скат,
деструкция,
ферменты,
молекулярная масса,
степень
кристалличности,
растворимость

Благодаря биосовместимости с тканями человека и животных, низкой токсичности, биodeградируемости хондроитина сульфат (ХС) представляет большой интерес для медицины. Поскольку ХС используется как фармацевтический препарат, то величина его молекулярной массы и растворимость определяют возможности его применения. Приведены результаты изучения химической и ферментативной деструкции макромолекул ХС и ее влияние на молекулярную массу, растворимость и степень кристалличности полисахарида. ХС получали из хрящевой ткани северного ската (*Amblyraja hyperborea*). На стадии ферментализации хрящевой ткани использовали ферменты панкреатин, гепатопанкреатин и протосубтилин. Идентификацию полученных образцов ХС выполняли методом ИК-спектроскопии. Ферментативную деструкцию гликозидных связей в макромолекулах ХС проводили 1%-м раствором фермента гепатопанкреатина, химическую деструкцию – перекисью водорода и хлороводородной кислотой. Содержание ХС в образцах определяли методом Дисхе. Химический состав образцов ХС оценивали стандартными методами. Среднемассовую молекулярную массу (ММ) определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и нефелометрическим методом; степень кристалличности (СК) – графической обработкой дифрактограмм, полученных рентгенофазовым анализом образцов ХС. Установлено, что под действием гепатопанкреатина и перекиси водорода происходит глубокая деструкция хондроитина сульфата, до образования низкомолекулярных и олигомерных фрагментов. В условиях кислотной деструкции в 0,5 н НСl в течение 20 мин ММ хондроитина сульфата снижается на 10 % по сравнению с исходной. Кислотная деструкция вызывает значительное уменьшение СК образцов ХС. Для не деструктированных в кислоте образцов ХС растворимость в дистиллированной воде увеличивается с уменьшением ММ и СК. Растворимость ХС после кислотной деструкции в диапазоне рН = 5–9 единиц составляет $99,0 \pm 0,5$ %. Высокая растворимость, по всей видимости, объясняется значительным содержанием в образцах аморфной фазы.

Для цитирования

Кучина Ю. А. и др. Химическая и ферментативная деструкция хондроитина сульфата из северного ската. Вестник МГТУ. 2021. Т. 24, № 3. С. 267–276. DOI: <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2021-24-3-267-276>.

Chemical and enzymatic destruction of chondroitin sulfate from Arctic skate

Yulia A. Kuchina, Irina N. Konovalova*, Vitaly Yu. Novikov,
Nataliya V. Dolgopyatova, Victor Ya. Kuznetsov

*Murmansk State Technical University, Murmansk, Russia;
e-mail: konovalovain@mstu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1116-0205>

Article info

Received
14.07.2021

Key words:

chondroitin sulfate,
Arctic skate,
destruction,
enzymes,
molecular weight,
crystallinity degree,
solubility

Abstract

Due to its biocompatibility with human and animal tissues, low toxicity, and biodegradability, chondroitin sulfate (CS) is of great interest for medicine. Since CS is used as a pharmaceutical preparation, its molecular weight and solubility determine the possibilities of its use. This work presents the results of studying the chemical and enzymatic destruction of CS macromolecules and its effect on the molecular weight, solubility and crystallinity degree of the polysaccharide. CS was obtained from the cartilaginous tissue of the Arctic skate (*Amblyraja hyperborea*). At the stage of cartilage tissue fermentolysis, the enzymes pancreatin, hepatopancreatin and protosubtil were used. The obtained CS samples were identified by IR spectroscopy. Enzymatic destruction of glycosidic bonds in cholesterol macromolecules was carried out with a 1 % solution of the enzyme hepatopancreatin, chemical destruction with hydrogen peroxide and hydrochloric acid. The CS content in the samples was determined by the Dische method. The chemical composition of CS samples was evaluated by standard methods. The average molecular weight (MW) was determined using high performance liquid chromatography and the nephelometric method. The crystallinity degree (CD) was determined by graphical processing of diffraction patterns obtained by X-ray phase analysis of CS samples. It was found that under the action of hepatopancreatin and hydrogen peroxide, deep destruction of chondroitin sulfate occurs, to the formation of low molecular weight and oligomeric fragments. Under conditions of acid destruction in 0.5 N HCl for 20 min the MW of chondroitin sulfate is reduced by 10 % compared to the initial one. Acid destruction causes a significant decrease in the CD of the CS samples. For CS samples not degraded in acid, the solubility in distilled water increases with decreasing MW and CD. The solubility of CS after acid destruction in the range of pH = 5–9 units is 99.0 ± 0.5 %. This high solubility is most likely explained by the significant content of the amorphous phase in the samples.

For citation

Kuchina, Yu. A. et al. 2021. Chemical and enzymatic destruction of chondroitin sulfate from Arctic skate. *Vestnik of MSTU*, 24(3), pp. 267–276. (In Russ.) DOI: <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2021-24-3-267-276>.

Введение

Из многообразия природных полимеров особого внимания заслуживают хондроитина сульфаты, уникальные свойства которых вызывают интерес большого числа специалистов различных отраслей промышленности.

Природный полисахарид хондроитина сульфат (ХС) представляет собой сульфатированный гликозаминогликан, макромолекулы которого состоят из чередующихся мономерных звеньев сульфатированного N-ацетил-D-галактозамина и D-глюкуроновой кислоты (рис. 1) (Hardingham, 1981).

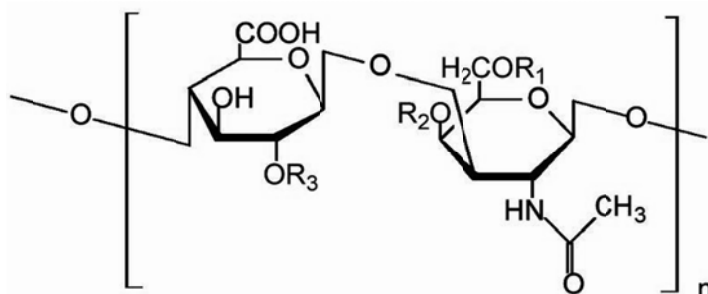


Рис. 1. Мономерное звено хондроитина сульфата

Fig. 1. Monomeric unit of chondroitin sulfate

Благодаря биосовместимости с тканями человека и животных, низкой токсичности, биodeградируемости этот полимер представляет большой интерес для медицины. Хондроитина сульфаты обладают противоядными, ранозаживляющими, иммуностимулирующими, общеукрепляющими, противомикробными свойствами. Хондроитин сульфат входит в состав многих лекарственных препаратов, применяемых при заболеваниях суставов (Буйлова, 2010). Такое широкое применение ХС в жизнедеятельности человека требует детального изучения его свойств.

Современные технологии получения хондроитина сульфата предполагают использование сырья из различных источников, однако в промышленных масштабах его получают главным образом из хрящевой ткани крупного рогатого скота, свиней, птицы (Li et al., 2016) и акульих хрящей (Salmon..., 2003a, б). С увеличением потребления в пищу ранее неиспользованных объектов рыбного промысла, таких как северный скат, возросло количество рыбных отходов, содержащих хрящевую ткань. В хрящевых тканях хондроитина сульфат присутствует в виде комплекса полисахарид-белок, т. е. протеогликана, где цепи полисахарида ковалентно связаны с белковым ядром (Слуцкий, 1969).

Технологии производства ХС представляют собой многостадийные процессы гидролиза хрящевых тканей с последующей очисткой. Основными стадиями получения хондроитина сульфата являются: подготовка сырья, гидролиз, выделение хондроитина сульфата из раствора, очистка препарата и сушка. Технологии производства постоянно совершенствуются, предлагаются новые виды сырья и способы переработки. Известно, что условия получения влияют на качество, чистоту и биологическую активность препаратов ХС. Возможные загрязняющие примеси препарата включают белок от исходной ткани, воду, связанную хондроитина сульфатом, органические растворители, используемые в некоторых процессах очистки, органические молекулы, попадающие в препарат в ходе процесса очистки.

Применение высокомолекулярных полисахаридов ограничено их высокой молекулярной массой, высокой кажущейся вязкостью, плохой растворимостью в воде, а также сложными структурами и конформациями. Низкомолекулярные полисахариды привлекают все большее внимание, особенно из-за их биологической активности. Гликозаминогликаны, в частности хондроитина сульфат, обладают антиоксидантной активностью, способностью ингибировать перекисное окисление липидов и нейропротекторными свойствами, связанными с их антиоксидантным и противовоспалительным действиями. Высокомолекулярный и низкомолекулярный хондроитина сульфат обладают различной или даже противоположной биологической активностью (McAlindon et al., 2000). Поскольку ХС используется как фармацевтический препарат, то величина его молекулярной массы определяет возможность его использования. Хондроитина сульфат по литературным данным имеет молекулярную массу от 50 до 100 кДа. Большинство фармацевтических препаратов содержат ХС с меньшей молекулярной массой ≈ 17 кДа. Низкомолекулярный хондроитина сульфат по данным исследований обладает более высокой скоростью усвоения, чем высокомолекулярный. Чем меньше молекулярная масса, тем лучше растворимость ХС и, следовательно, более широкий спектр лекарственных форм, например, можно получать таблетки, использовать растворы ХС для инъекций¹ (Adebowale et al., 2000).

¹ Bioibérica. Chondroitin sulfate. General Information. [Электронный ресурс] : Bioibérica. URL: <http://www.bioiberica.com/eng/mp/condroitin.htm>.

Применение низкомолекулярного хондроитина сульфата в качестве функционального пищевого ингредиента и пищевой добавки также является перспективным (Шокина и др., 2014; Щетинский и др., 2014).

В данной работе изучена химическая и ферментативная деструкция макромолекул хондроитина сульфата, полученного из хрящевой ткани северного ската, и ее влияние на физико-химические свойства полисахарида: молекулярную массу, растворимость и степень кристалличности.

Материалы и методы

Основные стадии получения хондроитина сульфата включают: обезжиривание сырья, щелочной и ферментативный гидролиз, выделение хондроитина сульфата из раствора, дополнительную очистку препарата, сушку (Lauder et al., 2000; Sugahara et al., 2003; 2007). За основу технологии выделения хондроитина сульфата был взят способ, приведенный в работах (Salmon..., 2003а, б) и усовершенствованный в работах (Порцель и др., 2015; Kuchina, 2017).

В качестве сырья при получении ХС использовали хрящевую ткань северного ската (*Amblyraja hyperborea*). Ферментативный гидролиз хрящевой ткани северного ската проводили под действием протеолитических ферментов – панкреатина, гепатопанкреатина (ферментный препарат, выделенный из гепатопанкреаса камчатского краба) и протосубтилина ГЗх – ферментный препарат микробного происхождения.

Измельченное сырье смешивали с 0,2 М раствором гидроксида натрия в массовом соотношении 1 : 2 и термостатировали при температуре 50 ± 1 °С в течение трех часов при постоянном перемешивании. Такие условия щелочного гидролиза позволяют провести растворение щелочерастворимых веществ и предотвратить разрушение хондроитина сульфата. После реакцию смесь нейтрализовали до $\text{pH} = 7,0 \pm 0,1$ ледяной уксусной кислотой, нерастворившийся осадок отделяли фильтрованием, фильтрат направляли на ферментативный гидролиз. Ферментативный гидролиз проводили при температуре 50 ± 1 °С в течение 6 часов при постоянном перемешивании. Концентрация ферментного препарата составляла 6 г на 1 кг сырья. Твердый осадок, полученный после ферментализации, отделяли с помощью фильтрации.

Полученный после щелочной и ферментативной обработки сырья гидролизат хрящевой ткани содержит продукты расщепления белков, соли, высокомолекулярные полисахариды. Гидролизат фильтровали, фильтрат направляли на осаждение ХС. В качестве осадителя использовали 96%-й этиловый спирт, соотношение гидролизат : осадитель = 1 : 2. Время осаждения составляло не менее 48 часов. Для отделения ХС взвесь центрифугировали, осадок промывали этанолом и сушили в лиофильной сушилке при температуре минус 53 °С и остаточном давлении 9,3 Па.

Ферментативную деструкцию гликозидных связей в ХС проводили 1%-м раствором фермента гепатопанкреатина. Для этого 1 г хондроитина сульфата растворяли в воде, при температуре 50 ± 2 °С и постоянном перемешивании с использованием магнитной мешалки. К раствору ХС добавляли 1 мл раствора фермента и проводили деструкцию в течение 30 минут при постоянной температуре. Далее для дезактивации фермента смесь кипятили, затем охлаждали. ХС осаждали избытком этанола.

Химическую деструкцию гликозидных связей в ХС проводили под действием перекиси водорода и хлороводородной кислоты. Концентрация раствора перекиси водорода составляла 1,5 %, концентрация хлороводородной кислоты была 0,1 и 0,5 н. Раствор перекиси или кислоты нагревали до 50 ± 2 °С, затем добавляли 1 г хондроитина сульфата. Деструкцию проводили в течение 20 и 30 минут при постоянном перемешивании. После кислотной деструкции смесь нейтрализовали 1 н NaOH до $\text{pH} \approx 7$.

После проведения процесса деструкции хондроитин сульфат осаждали избытком спирта и отстаивали 22–24 часа для осаждения.

Идентификацию полученных образцов хондроитина сульфата проводили методом ИК-спектроскопии (Silverstein et al., 2005).

ИК-Фурье спектры были получены с использованием ИК-Фурье-спектрометра IRTracer-100 (Shimadzu, Япония); в диапазоне частот от 4 000 до 800 см^{-1} и разрешении 2 см^{-1} (количество сканирований – 50). Образец для исследования представлял собой смесь хондроитина сульфата и КВг в массовом соотношении 1 : 100. Смесь растворяли в дистиллированной воде, затем сушили в лиофильной сушилке в течение 6–8 часов (Rabek, 1983). Для удаления остатков влаги смесь дополнительно выдерживали в сушильном шкафу при 55 ± 5 °С в течение 6 часов. Таблетки готовили из навески 250 мг смеси (диаметр таблетки составлял 13 мм), прессовали под давлением 650 кгс/см^2 в течение 1 мин при комнатной температуре. Спектры FTIR снимали сразу после прессования.

Химический состав образцов ХС определяли стандартными методами². Содержание влаги определяли после термостатирования в сушильном шкафу при 105 ± 5 °С до постоянной массы; содержание общего

² Association of Official Analytical Chemist AOAC. Official Methods of Analysis (20th ed.). New York, USA : AOAC International. 2016.

азота определяли методом Кьельдаля; минеральные вещества определяли методом сжигания в муфельной печи при 550 ± 10 °С.

Содержание ХС в образцах определяли методом Дише, который основан на цветной реакции уоновых кислот с карбазолом (*Dische, 1947; Jo et al., 2005*).

Рентгенофазовый анализ образцов хондроитина сульфатов проводили на дифрактометре LabXXRD-6000 (Shimadzu Corp., Япония). Излучение рентгеновской трубки – Cu-K α , использовался графитовый монохроматор, λ – длина волны монохроматического рентгеновского излучения 1.54178 Å. Получали дифрактограммы, с помощью которых определяли степень кристалличности. Степень кристалличности ($\chi_{кр}$) определяли по отношению интегральной интенсивности сигнала кристаллических областей на дифрактограмме к общему интегральному сигналу (*Новиков и др., 2012*).

Для вычисления сигнала, обусловленного наличием кристаллических областей в образцах, графически определили общую площадь под кривой дифракционной картины $S_{общ}$ и площадь аморфной составляющей $S_{аморф}$. Площади на дифрактограмме, соответствующие аморфной и кристаллической фазам, определяли с помощью компьютерной программы IpSquare.

Степень кристалличности $\chi_{кр}$ (%) рассчитывали по формуле

$$\chi_{кр} = \frac{S_{общ} - S_{аморф}}{S_{кр}} \times 100,$$

где $S_{общ}$ – общая площадь под кривой дифракционной картины в диапазоне 2θ от 6 до 36°; $S_{аморф}$ – площадь аморфной составляющей дифракционной картины; $S_{кр}$ – площадь кристаллической составляющей дифракционной картины.

Среднемассовую молекулярную массу хондроитина сульфата определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (*Новиков и др., 2012*) и нефелометрическим методом (*Mathews et al., 1958*).

При определении ММ методом ВЭЖХ регистрацию пиков выполняли на хромато-масс-спектрометре LCMS-QP8000 (Shimadzu, Япония) со спектрофотометрическим детектором (модель SPD – 10 AV_{VP}) при $\lambda = 205$ нм. Хроматографическое разделение проводили на колонке Tosoh TSKgel Alpha-4000 при 25 °С в изократическом режиме, скорость потока 0,8 мл/мин, элюент – водный раствор NaCl с концентрацией 0,15 моль/л, объем пробы 10 мкл. Для калибровки колонки использовали образцы с известной молекулярной массой, коэффициент корреляции составил 0,98.

Растворимость образцов ХС определяли при различных значениях pH. ХС смешивали с растворителем в массовом соотношении 1 : 100 и оставляли для набухания при постоянном перемешивании в течение 2 часов. Затем растворы выдерживали при температуре 20–25 °С в течение 22 часов. Не растворившуюся часть отфильтровывали с помощью фильтра Шотта, взвешенного до постоянной массы. Растворимость оценивали в процентах от исходной массы образца.

Результаты и обсуждение

Идентификацию полученных образцов хондритина сульфата проводили методом ИК-спектроскопии (рис. 2). В качестве образцов сравнения (рис. 2, кривые 1, 2) использовали стандартные препараты хондроитина сульфата фирмы Sigma-Aldrich. По литературным данным хондроитина сульфат, полученный из морских гидробионтов, должен иметь полосы поглощения на волновых числах 1 550, 1 350–1 300 и 1 160–1 120 см^{-1} (*Garnjanagoonchorn et al., 2007*).

На рис. 2 (кривая 3) приведен спектр образцов ХС, полученных с использованием на стадии ферментализации фермента протосубтилин. Для образцов ХС, полученных с использованием панкреатина и гепатопанкреатина, ИК-спектры были аналогичны. Для сравнения на рис. 2 (кривые 1, 2) приведены спектры хондроитина сульфата из морских гидробионтов, Европейский Фармстандарт (Sigma) – кривая 1 и хондроитина сульфата из хрящей акулы, Американский стандарт (Sigma) – кривая 2.

Анализ ИК-спектров показал, что полученные образцы хондроитина сульфата имеют пики поглощения на характерных для данного полисахарида волновых числах. Наличие пиков на этих волновых числах свидетельствует о том, что спектры полученных препаратов соответствуют спектрам хондроитина сульфата.

Из литературных данных известно, что об источнике получения ХС можно судить по специфическим полосам поглощения (*Garnjanagoonchorn et al., 2007*). Поглощение на волновом числе 850 см^{-1} (хондроитин-4-сульфат) свидетельствует о том, что ХС получен из ткани млекопитающих. Поглощение в диапазоне волновых чисел 825–820 см^{-1} (хондроитин-6-сульфат) характерно для хондроитина сульфатов из хрящевой ткани рыб.

ИК-спектры всех полученных нами образцов имеют полосу поглощения на частоте 822 см^{-1} , характерную для хондроитина сульфата из хрящевой ткани рыб.

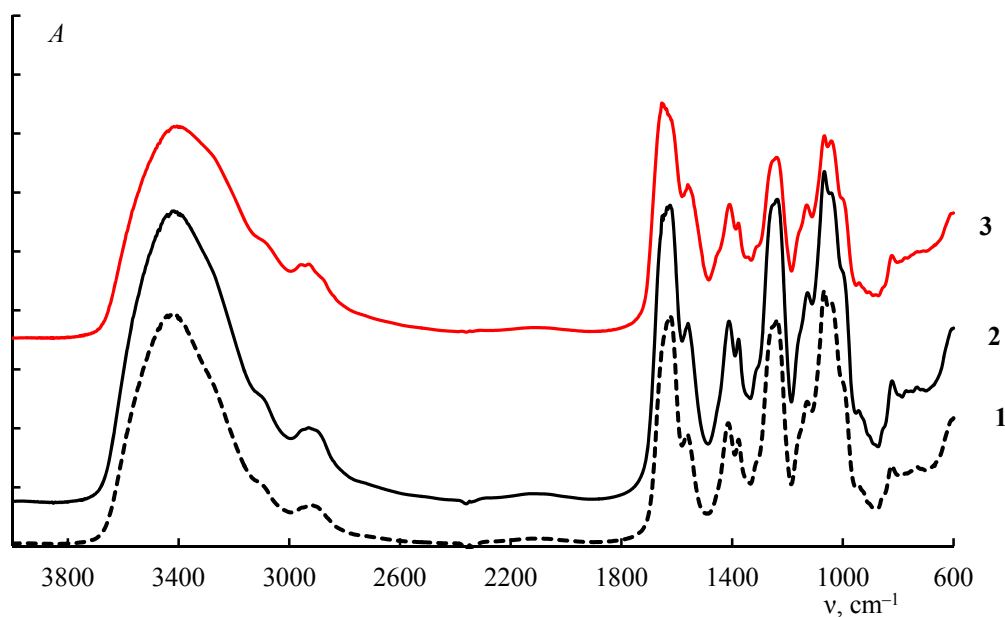


Рис. 2. Спектры поглощения: 1 – хондроитин сульфат из морских гидробионтов, Европейский Фармстандарт (Sigma); 2 – хондроитин сульфат из хрящей акулы, Американский стандарт (Sigma); 3 – ХС из хрящевой ткани северного ската
 Fig. 2. Absorption spectra: 1 – chondroitin sulfate from marine organisms, European Pharmstandard (Sigma); 2 – chondroitin sulfate from shark cartilage, American standard (Sigma); 3 – CS from the cartilaginous tissue of Arctic skate

Химический состав полученных образцов хондроитина сульфата приведен в табл. 1.

Таблица 1. Химический состав образцов хондроитина сульфата
 Table 1. Chemical composition of chondroitin sulfate samples

Влага, %	Содержание ХС, % (метод Дише)	Общий азот, %	Зольность, %
$7,6 \pm 0,1$	$82,5 \pm 0,5$	$3,9 \pm 0,1$	$16,4 \pm 0,3$

На рис. 3 приведены результаты влияния вида ферментного препарата на среднемассовую молекулярную массу хондроитина сульфата.

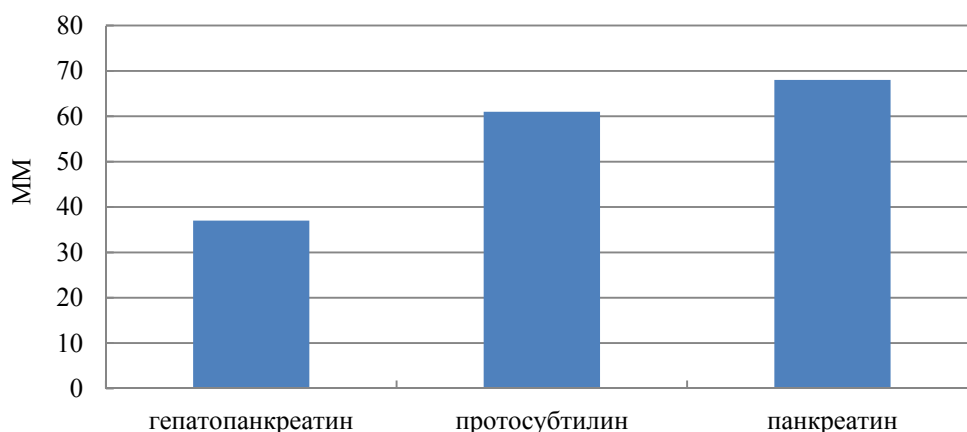


Рис. 3. Молекулярная масса образцов хондроитина сульфата, полученных с использованием различных ферментов на стадии ферментализации хрящевой ткани
 Fig. 3. Molecular weight of chondroitin sulfate samples obtained using various enzymes at the stage of cartilage tissue enzymolysis

Из данных, приведенных на рис. 3, следует, что среднемассовая молекулярная масса хондроитина сульфатов, полученных из хрящевой ткани северного ската, не превышает 70 кДа, что соответствует литературным данным³ (Adebowale *et al.*, 2000).

Хондроитина сульфат, осажденный из гидролизата (получен под действием гепатопанкреатина), характеризуется более низкой среднемассовой молекулярной массой ($MM_{cp} = 37 \pm 3$ кДа). По всей видимости, гепатопанкреатин вызывает деструкцию гликозидных связей в хондроитина сульфате уже на стадии ферментализации хрящевой ткани.

С целью уменьшения молекулярной массы полисахарида были изучены условия деструкции гликозидных связей в макромолекулах хондроитина сульфата ферментом гепатопанкреатином, перекисью водорода и соляной кислотой.

В результате деструкции ХС под действием перекиси водорода и гепатопанкреатина в условиях эксперимента образовались устойчивые дисперсии, из которых выделить ХС осаждением не удалось. Вероятно, в этих условиях протекает глубокая деструкция ХС до образования низкомолекулярных фрагментов или олигомеров.

Молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение образцов ХС после кислотной деструкции приведены на рис. 4 и в табл. 2.

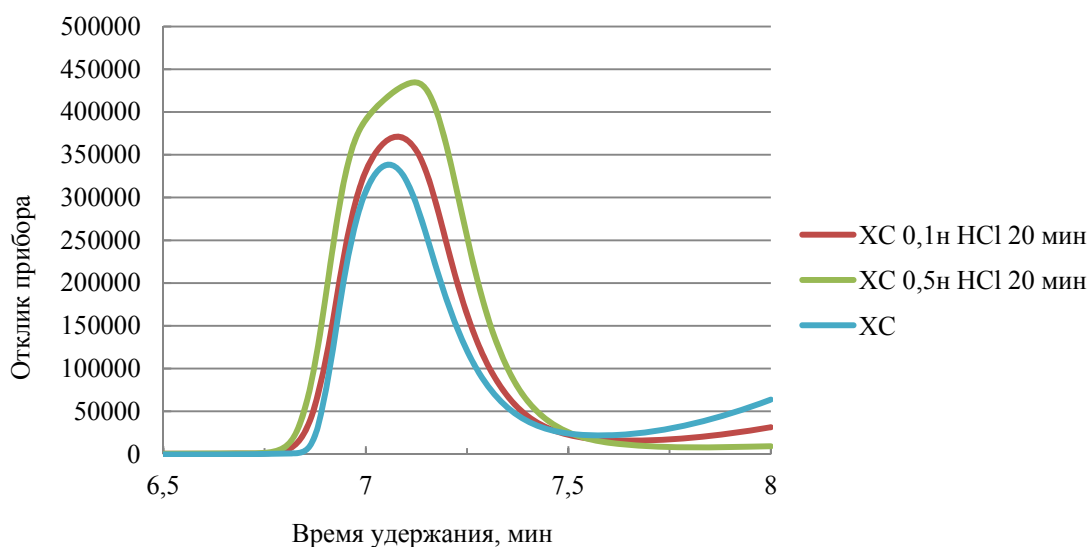


Рис. 4. Молекулярно-массовое распределение образцов хондроитина сульфата:
1 – ХС, гидролизированный в 0,1 н HCl в течение 20 мин; 2 – ХС, гидролизированный в 0,5 н HCl в течение 20 мин; 3 – негидролизированный ХС

Fig. 4. Molecular weight distribution of chondroitin sulfate samples:
1 – CS hydrolyzed in 0.1 N HCl for 20 min; 2 – CS hydrolyzed in 0.5 N HCl for 20 min;
3 – non-hydrolyzed CS

Таблица 2. Условия деструкции и среднемассовая молекулярная масса хондроитина сульфата (ММ, кДа), фермент протосубтилин

Table 2. Conditions of destruction and weight-average molecular weight of chondroitin sulfate (MW, kDa), enzyme protosubtilin

Условия деструкции	ММ, кДа
Хондроитина сульфат	61 ± 3
Хондроитина сульфат, гидролизированный в 0,1 н HCl в течение 20 мин	59 ± 3
Хондроитина сульфат, гидролизированный в 0,5 н HCl в течение 20 мин	54 ± 3

В условиях эксперимента кислотная деструкция ХС в 0,1 н HCl в течение 20 мин не приводит к уменьшению молекулярной массы. При увеличении концентрации хлороводородной кислоты до 0,5 н молекулярная масса ХС снижается на 10 % по сравнению с ММ негидролизованного образца. По всей видимости, в условиях кислотной деструкции хондроитина сульфата происходит постепенное отщепление от концов макромолекул мономерных или олигомерных фрагментов.

³ Bioibérica. Chondroitin sulfate. General Information. [Электронный ресурс] : Bioibérica. URL: <http://www.bioiberica.com/eng/mp/condroitin.htm>.

Результаты рентгенофазового анализа свидетельствуют о том, что полученные образцы ХС содержат как кристаллическую, так и аморфную фазы (рис. 5, табл. 3). Дифрактограмма (кривая зависимости интенсивности дифракционной картины от угла отражения – рентгенодифракционный спектр) образца, содержащего аморфную фазу имеет характерный вид – это пики с широкой линией (галло) с угловой шириной $2\Theta = 10\text{--}20^\circ$. Возникают такие отражения за счет существования ближнего порядка в расположении атомов аморфной фазы (Васильев и др., 1986; Кузнецова, 2005).

Полученные нами дифрактограммы образцов ХС содержат пики, имеющие в основании широкую линию (галло) с угловой шириной $2\Theta = 15\text{--}30^\circ$, что свидетельствует о значительном содержании в образцах аморфной фазы.

На рис. 5 в качестве примера приведена дифрактограмма ХС, полученного с использованием на стадии ферментализации протосубтилина.

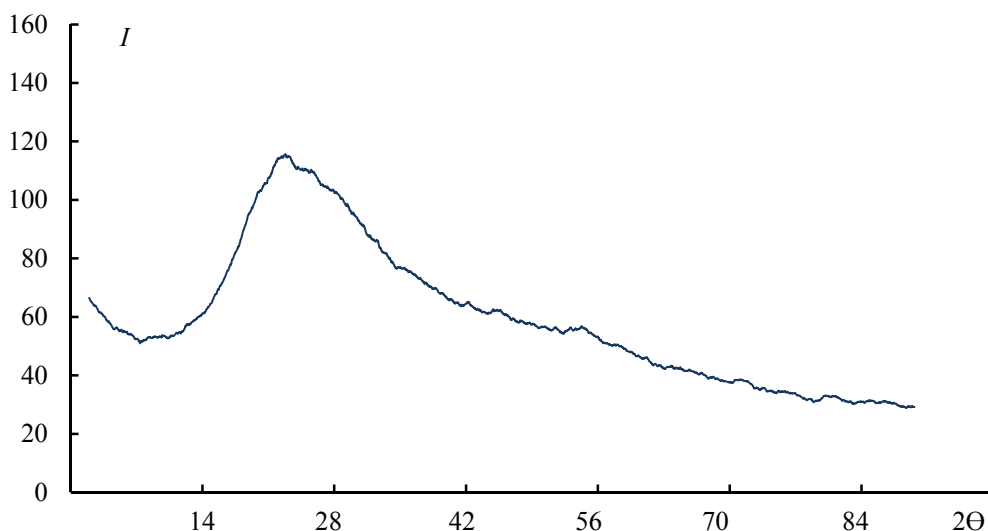


Рис. 5. Дифрактограмма ХС, полученного с использованием протосубтилина на стадии ферментализации
 Fig. 5. Diffraction pattern of CS obtained using protosubtilin at the stage of enzymatic lysis

Из данных, приведенных в табл. 3, следует, что наиболее аморфным является образец, полученный с использованием на стадии ферментализации гепатопанкреатина. Степень кристалличности этого образца составляет $34 \pm 2\%$.

Кислотная деструкция вызывает значительную аморфизацию образцов. Так, степень кристалличности образца ХС после деструкции гликозидных связей хондроитина сульфата в 0,1 н HCl составляет $41 \pm 2\%$, после деструкции в 0,5 н HCl – $21 \pm 2\%$. Эти образцы характеризуются более низкой ММ по сравнению с исходными (табл. 3). По всей видимости, молекулярная масса хондроитина сульфата может оказывать влияние на степень кристалличности.

Результаты изучения влияния молекулярной массы и степени кристалличности на растворимость в дистиллированной воде образцов хондроитина сульфата, полученных с использованием на стадии ферментализации различных ферментов, приведены в табл. 3.

Таблица 3. Влияние ММ и СК на растворимость ХС в дистиллированной воде
 Table 3. Influence of MW and CD on the CS solubility in distilled water

Ферментный препарат	ММ, кДа	СК, %	Растворимость, %
панкреатин	68 ± 3	42 ± 2	72 ± 2
протосубтилин	61 ± 3	$59,6 \pm 2$	75 ± 2
гепатопанкреатин	37 ± 3	34 ± 2	80 ± 2

Из данных, приведенных в табл. 3, следует, что для не деструктированных в кислоте образцов ХС растворимость в дистиллированной воде увеличивается с уменьшением ММ и СК.

Увеличение pH раствора способствует ионизации кислотных групп ХС, поэтому растворимость образцов увеличивается в 0,1 н NaOH (pH = 11,9) и в 0,1 н NaHCO₃ (pH = 8,1), составляет $90\text{--}98 \pm 1\%$ и не зависит от ММ и СК полисахарида.

Растворимость образцов ХС после кислотной деструкции в диапазоне pH = 5–9 единиц составляет $99,0 \pm 0,5\%$. Такая высокая растворимость, по всей видимости, объясняется значительным содержанием в образцах аморфной фазы.

Заключение

Получены образцы хондроитина сульфата, имеющие пики поглощения на характерных для данного полисахарида волновых числах.

Фермент гепатопанкреатин вызывает деструкцию гликозидных связей в хондроитина сульфате на стадии ферментализации хрящевой ткани. В результате деструкции ХС под действием перекиси водорода и гепатопанкреатина в условиях эксперимента протекает разрушение гликозидных связей в макромолекулах ХС до образования низкомолекулярных фрагментов или олигомеров.

Кислотная деструкция ХС в 0,5 н НСІ в течение 20 мин приводит к уменьшению молекулярной массы на 10 % по сравнению с ММ негидролизованного образца.

Дифрактограммы образцов ХС содержат пики, имеющие в основании широкую линию (галло) с угловой шириной $2\theta = 15\text{--}30^\circ$, что свидетельствует о значительном содержании в ХС аморфной фазы. Кислотная деструкция вызывает значительную аморфизацию образцов: степень кристалличности образца ХС после обработки в 0,1 н НСІ составляет $41 \pm 2\%$, после обработки в 0,5 н НСІ – $21 \pm 2\%$.

Для не деструктированных в кислоте образцов ХС растворимость в дистиллированной воде увеличивается с уменьшением ММ и СК. Растворимость ХС после кислотной деструкции в диапазоне рН = 5–9 единиц составляет $99,0 \pm 0,5\%$. Такая высокая растворимость, по всей видимости, объясняется значительным содержанием в образцах аморфной фазы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Библиографический список

- Буйлова Т. В. Открытое рандомизированное исследование эффективности и безопасности препарата Хондроксид® в комплексном лечении больных с хронической вертеброгенной люмбаишалгией // РМЖ : Русский медицинский журнал. 2010. Т. 18, № 27. С. 1678–1685.
- Васильев Е. К., Нахмансон М. М. Качественный рентгенофазовый анализ. Новосибирск : Наука : Сиб. отд-ние, 1986. 199 с.
- Кузнецова Г. А. Качественный рентгенофазовый анализ. Иркутск : ИГУ, 2005. 28 с.
- Новиков В. Ю., Коновалова И. Н., Долгопятова Н. В. Химические основы технологии получения хитина и его производных из панциря ракообразных. СПб. : ГИОРД, 2012. 208 с.
- Порцель М. Н., Новиков В. Ю., Коновалова И. Н., Долгопятова Н. В. Применение процесса электрохимического осаждения для очистки хондроитина сульфатов, выделенных из морских гидробионтов // Известия высших учебных заведений. Сер. Химия и химическая технология. 2015. Т. 58, № 10. Р. 66–70.
- Слущкий, Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л. : Медицина, 1969. 375 с.
- Шокина Ю. В., Щетинский В. В., Павлова В. В., Саенкова И. В. Обоснование режимов тепловой обработки полуфабриката из ската звездчатого при производстве рыбной кулинарной продукции функционального назначения // Вестник ВГУИТ. Серия: пищевая биотехнология : труды Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2014. № 1(59). С. 102–107.
- Щетинский В. В., Шокина Ю. В. Разработка неинструментальной методики контроля содержания мочевины (карбамида) в рыбных полуфабрикатах и рыбной пищевой продукции, изготовленной с использованием мяса хрящевых рыб // Техника и технология пищевых производств : тезисы докладов IX Междунар. науч. конф. студентов и аспирантов (в двух частях). Ч. 1, Могилев, 24–25 апреля 2014 г. Могилев : Могилевский государственный университет продовольствия. 2014. С. 57.
- Adebowale A., Cox D. S., Liang Z., Eddington N. D. Analysis of glucosamine and chondroitin sulfate content in marketed products and the Caco-2 permeability of chondroitin sulfate raw materials // The Journal of the American Nutraceutical Association. 2000. N 3. P. 37–44.
- Dische Z. A new specific color reaction of hexuronic acids // Journal of Biological Chemistry. 1947. Vol. 167, Iss. 1. P. 189–198.
- Garnjanagoonchorn W., Wongekalak L., Engkagul A. Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage // Chemical Engineering and Processing. 2007. Vol. 46, Iss. 5. P. 465–471. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.05.019>.
- Hardingham T. E. Proteoglycans: Their structure, interactions and molecular organization in cartilage // Biochemical Society Transactions. 1981. N 9. P. 489–497.
- Jo J.-H. [et al.]. Optimization of shark (*Squatina oculata*) cartilage hydrolysis for the preparation of chondroitin sulfate // Food Science and Biotechnology. 2005. Vol. 14, Iss. 5. P. 651–655.
- Kuchina Y. Properties of chondroitin sulfate from marine hydrobionts // X All-Russian Scientific Conference and School of Young Scientists "Chemistry and Technology of Plant Substances". Abstracts. KazSCRAS, 2017. P. 61–62.

- Lauder R. M., Huckerby T. N., Nieduszynski I. A. A fingerprinting method for chondroitin/dermatan sulfate and hyaluronan oligosaccharides // *Glycobiology*. 2000. Vol. 10, Iss. 4. P. 393–401. DOI: <https://doi.org/10.1093/glycob/10.4.393>.
- Li L., Li Y., Feng D., Xu L. [et al.]. Preparation of low molecular weight chondroitin sulfates, screening of a high anti-complement capacity of low molecular weight chondroitin sulfate and its biological activity studies in attenuating osteoarthritis // *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. Vol. 17, Iss. 10. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17101685>.
- Mathews M. B., Lozaityte I. Sodium chondroitin sulfate-protein complexes of cartilage. I. Molecular weight and shape // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1958. Vol. 74, Iss. 1. P. 158–174. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(58\)90210-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(58)90210-8).
- McAlindon T. E., LaValley M. P., Gulin J. P., Felson D. T. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis // *JAMA*. 2000. Vol. 283, Iss. 11. P. 1469–1475. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.283.11.1469>.
- Rabek J. F. Experimental methods in polymer chemistry. John Wiley & Sons: New York, 1983.
- Salmon-origin chondroitin sulfate : European Patent EP 1270599. МПК А61К 31/737 / Takai M., Kono H. Заявл. 15.12.2000; № EP 20000981747; Оpubл. 02.01.2003a.
- Salmon-origin chondroitin sulfate : Patent US 20030162744. МПК А61К 031/737. C08B 037/00 / Takai M., Kono H. № 220539; Заявл. 17.12.2002; Оpubл. 28.08.2003b.
- Silverstein R., Webster F. X., Kiemle D. J. Spectrometric identification of organic compounds // *Microchemical Journal*. 2005. Vol. 21, Iss. 1.
- Sugahara K., Mikami T. Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system // *Current Opinion in Structural Biology*. 2007. Vol. 17, Iss. 5. P. 536–545. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.08.015>.
- Sugahara K., Mikami T., Uyama T., Mizuguchi S. [et al.]. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate // *Current Opinion in Structural Biology*. 2003. Vol. 13, Iss. 5. P. 612–620. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.09.011>.

References

- Builova, T. V. 2010. An open randomized study of the efficacy and safety of the drug Chondroxide® in the complex treatment of patients with chronic vertebrogenic lumbosialgia. *RMJ* (Russian Medical Journal), 17, pp. 1678–1686. (In Russ.)
- Vasiliev, E. K., Nakhmanson, M. M. 1986. Qualitative X-ray phase analysis. Novosibirsk. (In Russ.)
- Kuznetsova, G. A. 2005. Qualitative X-ray phase analysis. Irkutsk. (In Russ.)
- Novikov, V. Yu., Konovalova, I. N., Dolgopyatova, N. V. 2012. Chemical bases of production technology. chitin and its derivatives from the shell of crustaceans. Saint Petersburg. (In Russ.)
- Portsel, M. N., Novikov, V. Yu., Konovalova, I. N., Dolgoyatova, N. V. 2015. Application of electro-chemical deposition for purification of chondroitin sulphate extracted from sea hydrocoles. *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii. Seriya Khimiya i Khimicheskaya Tekhnologiya*, 58(10), pp. 66–70. (In Russ.)
- Slutsky, L. I. 1969. Biochemistry of normal and pathologically altered connective tissue. Leningrad. (In Russ.)
- Shokina, Yu. V., Schetinsky, V. V., Pavlova, V. V., Saenkova, I. V. 2014. Substantiation of the modes of heat treatment of semi-finished product from stellate stingray in the production of fish culinary products for functional purposes. *Vestnik VSUIT. Series: Food Biotechnology: Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*, 1(59), pp. 102–107. (In Russ.)
- Schetinsky, V. V., Shokina, Yu. V. 2014. Development of a non-instrumental technique for controlling the content of urea (carbamide) in fish semi-finished products and fish food products made with the use of cartilaginous fish meat. *Technics and technology of food production: Abstracts of the IX International Scientific Conference of Students and Postgraduates* (in two parts). Part 1. Mogilev, p. 57. (In Russ.)
- Adebowale, A., Cox, D. S., Liang, Z., Eddington, N. D. 2000. Analysis of glucosamine and chondroitin sulfate content in marketed products and the Caco-2 permeability of chondroitin sulfate raw materials. *The Journal of the American Nutraceutical Association*, 3, pp. 37–44.
- Dische, Z. 1947. A new specific color reaction of hexuronic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 167(1), pp. 189–198.
- Garnjanagoonchorn, W., Wongekalak, L., Engkagul, A. 2007. Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage. *Chemical Engineering and Processing*, 46(5), pp. 465–471. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.05.019>.
- Hardingham, T. E. 1981. Proteoglycans: Their structure, interactions and molecular organization in cartilage. *Biochemical Society Transactions*, 9, pp. 489–497.
- Jo, J.-H. et al. 2005. Optimization of shark (*Squatina oculata*) cartilage hydrolysis for the preparation of chondroitin sulfate. *Food Science and Biotechnology*, 14(5), pp. 651–655.
- Kuchina, Y. 2017. Properties of chondroitin sulfate from marine hydrobionts. *Chemistry and Technology of Plant Substances: Abstracts of the X All-Russian Scientific Conference and School of Young Scientists. KazSCRAS*, pp. 61–62.

- Lauder, R. M., Huckerby, T. N., Nieduszynski, I. A. 2000. A fingerprinting method for chondroitin/dermatan sulfate and hyaluronan oligosaccharides. *Glycobiology*, 10(4), pp. 393–401. DOI: <https://doi.org/10.1093/glycob/10.4.393>.
- Li, L., Li, Y., Feng, D., Xu, L. et al. 2016. Preparation of low molecular weight chondroitin sulfates, screening of a high anti-complement capacity of low molecular weight chondroitin sulfate and its biological activity studies in attenuating osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10). DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17101685>.
- Mathews, M. B., Lozaityte, I. 1958. Sodium chondroitin sulfate-protein complexes of cartilage. I. Molecular weight and shape. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 74(1), pp. 158–174. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(58\)90210-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(58)90210-8).
- McAlindon, T. E., LaValley, M. P., Gulin, J. P., Felson, D. T. 2000. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis. *JAMA*, 283(11), pp. 1469–1475. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.283.11.1469>.
- Rabek, J. F. 1983. Experimental methods in polymer chemistry. New York.
- Takai, M., Kono, H. 2003a. Salmon-origin chondroitin sulfate : European Patent EP 1270599-B1.
- Takai, M., Kono, H. 2003b. Salmon-origin chondroitin sulfate : Patent US 20030162744.
- Silverstein, R., Webster, F. X., Kiemle, D. J. 2005. Spectrometric identification of organic compounds. *Microchemical Journal*, 21(1).
- Sugahara, K., Mikami, T. 2007. Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(5), pp. 536–545. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.08.015>.
- Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S. et al. 2003. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(5), pp. 612–620. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.09.011>.

Сведения об авторах

Кучина Юлия Анатольевна – ул. Спортивная, 13, г. Мурманск, Россия, 183010; Мурманский государственный технический университет, канд. техн. наук, ст. науч. сотрудник; e-mail: kuchinayua@mstu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3419-1442>

Yuliya A. Kuchina – 13 Sportivnaya Str., Murmansk, Russia, 183010; Murmansk State Technical University, Cand. Sci. (Engineering), Research Scientist; e-mail: kuchinayua@mstu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3419-1442>

Коновалова Ирина Никандровна – ул. Спортивная, 13, г. Мурманск, Россия, 183010; Мурманский государственный технический университет, канд. техн. наук, профессор; e-mail: konovalovain@mstu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1116-0205>

Irina N. Konovalova – 13 Sportivnaya Str., Murmansk, Russia, 183010; Murmansk State Technical University, Cand. Sci. (Engineering), Professor; e-mail: konovalovain@mstu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1116-0205>

Новиков Виталий Юрьевич – ул. Академика Книповича, 6, г. Мурманск, Россия, 183038; Полярный филиал Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии ("ПИНРО" им. Н. М. Книповича), канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник; e-mail: nowitaly@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1733-5838>

Vitaly Yu. Novikov – 6 Academician Knipovich Str., Murmansk, Russia, 183038; Polar Branch of All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography ("PINRO" named after N. M. Knipovich), Cand. Sci. (Chemistry), Leading Researcher; e-mail: nowitaly@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1733-5838>

Долгопятова Наталия Владимировна – ул. Спортивная, 13, г. Мурманск, Россия, 183010; Мурманский государственный технический университет, канд. техн. наук, доцент; e-mail: dolgopyatovanv@mstu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8124-9788>

Nataliya V. Dolgopyatova – 13 Sportivnaya Str., Murmansk, Russia, 183010; Murmansk State Technical University, Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor; e-mail: dolgopyatovanv@mstu.edu.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8124-9788>

Кузнецов Виктор Яковлевич – Академгородок, 26а, Апатиты, Мурманская обл., Россия, 184209; Институт химии и технологии редких элементов и минерального сырья им. И. В. Тананаева (ИХТРЭМС КНЦ РАН), вед. инженер; e-mail: v.kuznetsov@ksc.ru

Victor Ya. Kuznetsov – 26a Akademgorodok, Apatity, Murmansk region, 184209; I. V. Tananaev Institute of Chemistry and Technology of Rare Elements and Minerals KSC RAS, Leading Engineer; e-mail: v.kuznetsov@ksc.ru