

# Высокомолекулярные соединения

## Серия Б

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, Серия Б, 2007, том 49, № 12, с. 2195–2199

УДК 541(64+24):535.5:547.595.12

### ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ НА ОПТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНА<sup>1</sup>

© 2007 г. А. Б. Шиповская\*, В. И. Фомина\*\*, О. Ф. Казмичева\*\*,  
Г. Н. Тимофеева\*\*, Б. А. Комаров\*\*\*

\*Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского  
410012 Саратов, Астраханская ул., 83

\*\*Научно-исследовательский институт естественных наук  
Саратовского государственного университета  
410012 Саратов, Астраханская ул., 83

\*\*\*Институт проблем химической физики Российской академии наук  
142432 Черноголовка Московской обл.,  
пр. Ак. Семенова, 1

Поступила в редакцию 31.01.2007 г.  
Принята в печать 09.07.2007 г.

Методом дисперсии оптического вращения исследована оптическая активность хитозана в широком диапазоне ММ, начиная от низкомолекулярных аналогов мономерного звена и олигомеров. В интервале длины волн 300–710 нм для всех образцов реализуются плавные кривые дисперсии оптического вращения, лежащие для полимера и олигомеров в области отрицательных значений удельного оптического вращения  $[\alpha]$ , а для моносахаридов – положительных. Высокомолекулярные образцы характеризуются максимальными, практически не зависящими от  $M$  значениями  $-[\alpha]$ . Для частично деполимеризованных образцов с  $M < 2 \times 10^5$  и олигомеров уменьшение  $-[\alpha]$  по абсолютной величине тем больше, чем меньше ММ образца. Переход к D-глюкозамину хлоргидрату и N-ацетил-D-глюкозамину характеризуется инверсией знака вращения с достижением больших значений  $+[\alpha]$ .

Аминополисахарид хитозан, продукт частичного деацетилирования хитина – дешевый, доступный и экологически чистый биополимер. Широкий спектр полезных свойств определяет его использование в медицине, сельском хозяйстве и в самых разнообразных отраслях промышленности, включая пищевую, косметическую, фармацевтическую и другие. Поэтому в литературе, посвященной исследованию хитина/хитозана, основное внимание уделяется процессам выде-

ления и очистки, получению производных, характеристике химического состава, свойств образцов и их растворов и т.д. в связи с перспективой практического использования этого материала [1, 2].

В то же время постоянно расширяются и фундаментальные исследования данного полимера, начавшиеся более 30 лет назад [1, 3]. В последние годы увеличилось число публикаций, в которых рассматривается взаимосвязь различных физико-химических параметров и свойств, в частности их зависимость от ММ и ММР [2, стр. 296, 4, 5].

Анализ литературы показал, что высокомолекулярный хитозан наиболее эффективен в качестве сорбентов разного назначения, комплексо-

<sup>1</sup> Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (коды проектов 03-03-33049а и 06-08-00892а).

E-mail: ShipovskayaAB@chem.sgu.ru (Шиповская Анна Борисовна).

образователя, флокулянта, ингибитора ряда микрорганизмов и вирусных инфекций и т.д. [1, 2]. Низкомолекулярные образцы и олигомеры хитозана проявляют не только противовирусный, антибактериальный, но и регенерирующий, иммуностимулирующий, антитоксический и т.д. эффекты [1, 2, 4]. Продукты полной деполимеризации хитина/хитозана – аминосахара амино-*D*-глюкозамин и N-ацетил-*D*-глюкозамин, используемые живым организмом для синтеза мукополисахаридов, обладают противовоспалительным и противоартрозным действием [6].

Несмотря на расширение направлений исследования хитозана, такое фундаментальное свойство, как его оптическая активность, изучено крайне мало. В работах [7, 8] способность вращать плоскость поляризации света используется для характеристики ЖК-дисперсий хитозана с нуклеиновыми кислотами. Отмечено, что специфика взаимодействия данных биополимеров зависит не только от ионной силы и pH раствора, но в значительной степени определяется ММ полисахарида.

Авторы данного сообщения ранее методом дисперсии оптического вращения исследовали пространственную структуру высокомолекулярных образцов хитозана в среде минеральных и органических кислот, буферных систем [9, 10]. Было установлено, что величины удельного оптического вращения  $[\alpha]$  растворов образцов различных фирм с близкой степенью деацетилирования (~80–90 мол. %) и с  $M_{\eta} = (2–7) \times 10^5$  практически не различаются. Вопрос об оптической активности полимера с меньшей ММ и олигомеров хитозана оставался открытым.

Цель настоящей работы – исследование влияния ММ хитозана на его оптическую активность.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования использовали промышленный хитозан с  $M_{\eta} = 6.4 \times 10^5$  и степенью деацетилирования 82.6 мол. %, производства Закрытого акционерного общества “Биопрогресс” (г. Щелково); частично деполимеризованные образцы и олигохитозаны разной ММ, полученные окислительной деструкцией промышленного хитозана. Для сравнения использовали *D*-глюкозамин хлоргидрат (“Реахим”, Рос-

сия) и N-ацетил-*D*-глюкозамин (“Fluka Chemi AG”, Швейцария), являющиеся аналогами мономерных звеньев хитозана.

Деструкцию промышленного хитозана проводили в водной гетерогенной системе перекисью водорода в интервале 60–80°C двумя способами. По первому способу процесс вели в течение фиксированного времени, по второму процесс продолжался до достижения гомогенного раствора. Концентрацию  $H_2O_2$  в системе варьировали в пределах 0.1–3%.

Величину  $M_{\eta}$  полимеров определяли традиционным методом, используя вискозиметр Уббелоде с диаметром капилляра 0.54 мм. Константы уравнения Марка–Куна–Хаувинка были взяты из работы [11].  $M_w$  и  $M_w/M_n$  олигомеров измеряли методом эксклюзационной хроматографии на жидкостном хроматографе фирмы “Waters”, снабженном рефрактометрическим и УФ-детекторами. Степень деацетилирования определяли методом потенциометрии.

Дисперсию оптического вращения (ДОВ) растворов измеряли на автоматическом спектрополяриметре марки СПУ-Е с ртутной лампой высокого давления ДРШ-250 в диапазоне длины волн  $\lambda = 300–710$  нм при 20°C. Использовали стеклянные кюветы длиной 1 дм с кварцевыми окошками. Растворителем для промышленного и деполимеризованного хитозана служил ацетатный буфер (pH 4.5), а для олигохитозана – еще и дистиллированная вода. Концентрация растворов 0.2–0.5 г/дл. Предварительно показали, что в этом диапазоне зависимость величин  $[\alpha]$  от концентрации отсутствует, что позволяет исключить межмолекулярное взаимодействие цепей. Поскольку растворы хитозана характеризуются нестабильностью некоторых свойств во времени [10, 12, 13], все измерения проводили в одинаковых условиях со свежеприготовленными системами. Удельное оптическое вращение  $[\alpha]$  рассчитывали согласно методике [14]. Погрешность измерений углов вращения не превышала 0.002°. Кривые ДОВ строили из данных трех параллельных опытов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате деструкции промышленного хитозана была получена серия образцов деполиме-

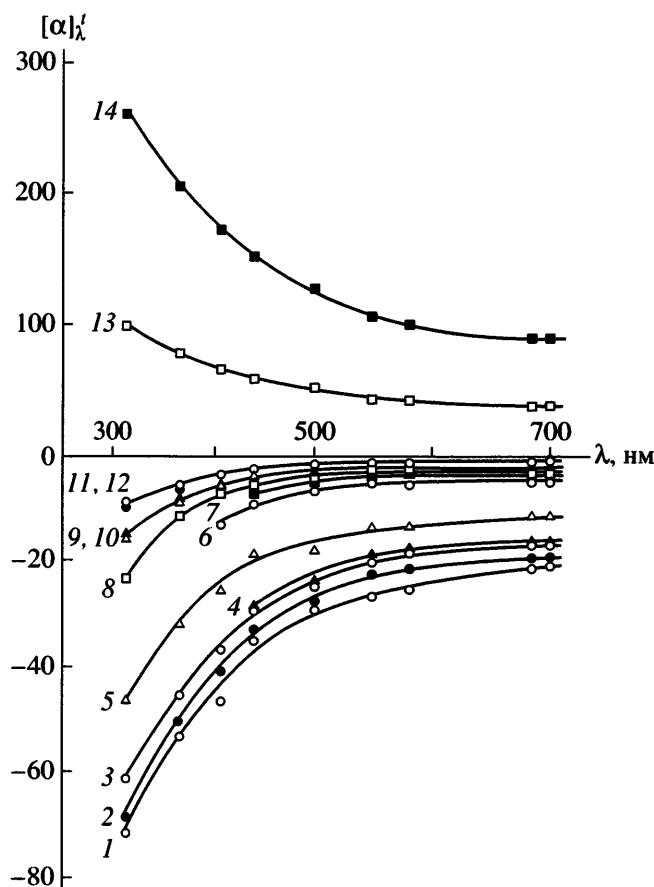


Рис. 1. Кривые ДОВ растворов хитозана с  $M \times 10^{-3} = 640$  (1), 150 (2), 35 (3), 7.8 (4), 3.3 (5), 1.2 (6), 0.85 (7), 0.7 (8), 0.68 (9, 10), 0.67 (11) и 0.66 (12), а также N-ацетил-D-глюкозамина (13) и D-глюкозамина хлоргидрата (14). Растворитель – ацетатный буфер.

ризованного хитозана и олигохитозана с различной ММ. Молекулярные характеристики этих образцов будут указаны в подписи к рис. 1. Особо отметим, что олигомеры характеризуются низкой степенью полидисперсности (менее 1.03).

На рис. 1 приведены кривые ДОВ растворов исходного промышленного хитозана (кривая 1), полученных из него деполимеризованных образцов (кривые 2–5) и олигохитозана (кривые 6–12), а также мономеров D-глюкозамина хлоргидрата и N-ацетил-D-глюкозамина (кривые 13 и 14) в ацетатном буфере. Для всех образцов хитозана наблюдаются плавные кривые ДОВ, лежащие в области отрицательных значений  $[\alpha]$ .

Раствор промышленного хитозана во всем интервале длины волн характеризуется наибольшими значениями  $-[\alpha]$ . Как упоминалось, величины

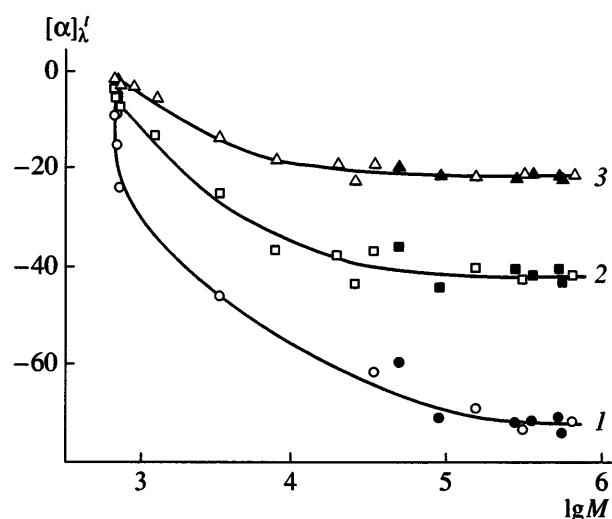


Рис. 2. Зависимость удельного оптического вращения растворов хитозана в ацетатном буфере от ММ при  $\lambda = 313$  (1), 405 (2) и 578 нм (3). Пояснение в тексте.

удельного вращения и зависимость  $[\alpha]-f(\lambda)$  растворов высокомолекулярных образцов практически не зависят от ММ полимера. Изменение величин оптического вращения начинается с  $M_n < 2 \times 10^5$ . По мере снижения степени полимеризации значение  $-[\alpha]$  закономерно уменьшается по абсолютной величине, характер дисперсионных кривых при этом не изменяется.

Олигомеры имеют небольшие величины  $-[\alpha]$ . По мере понижения ММ крутизна кривых ДОВ снижается, значения  $[\alpha]$  в интервале  $\lambda \approx 550$ –710 нм приближаются к оси абсцисс. Поскольку олигохитозаны растворимы в воде, в отдельных опытах было показано, что кривые ДОВ для растворов олигомеров в воде и ацетатном буфере совпадают.

Наиболее наглядно влияние ММ полимеров и олигомеров хитозана на удельное оптическое вращение растворов демонстрирует рис. 2. Здесь также приведены величины  $[\alpha]$  для других хитозанов (таблица). Они показаны темными точками. Из сравнения  $-[\alpha]$  при одном из значений длины волн спектра отчетливо прослеживается различный характер изменения величин вращения с уменьшением ММ. На зависимости  $[\alpha]-f(\lg M)$  четко различаются три области: постоянство  $-[\alpha]$  для высокомолекулярных образцов хитозана, плавное изменение для низкомолекулярных и

## Образцы хитозана разных фирм

Источник сырья	Производитель	Область применения	$M_\eta \times 10^{-3}$	Степень деацетилирования, мол. %
Панцирь краба	Закрытое акционерное общество "Биопрогресс", Щелково	Пищевая	550	88.0
Панцирь креветки	Нижний Новгород	»	520	83.0
Панцирь рака	Лабораторный образец, Саратов	»	350	86.1
Панцирь краба	Закрытое акционерное общество "Сонат", Москва	»	280	80.8
	Япония	Медицина	90	95.0
	Лабораторный образец, Черноголовка	Медицина, фармакология	50	88.1

резкое – для олигомеров, по крайней мере при  $\lambda \approx 300\text{--}450$  нм.

Для сравнения была исследована оптическая активность низкомолекулярных аналогов мономерных звеньев (далее мономер) цепи хитозана. Кривые ДОВ моносахаров приведены на рис. 1. Обращает на себя внимание совершенно иное поведение этих образцов. Как N-ацетил-D-глюказамин, так и D-глюказамин хлоргидрат в отличие от рассмотренных выше образцов врашают плоскость поляризации в противоположном направлении. Кривые ДОВ лежат уже не в отрицательной, а в положительной области  $[\alpha]$ . Несмотря на идентичность характера дисперсионных кривых, значение  $[\alpha]$  с уменьшением длины волны резко возрастает, достигая больших величин.

Таким образом, во всем исследуемом диапазоне длины волн величины удельного оптического вращения убывают в ряду мономер–олигомер–полимер. Вероятно, что где-то на этапе между мономером и тетramerом претерпевает инверсию знак вращения, и убывающая зависимость  $[\alpha] = f(\lg \lambda)$  становится возрастающей. Для экспериментального подтверждения этого предположения необходимо получить димер и тример D-глюказамина, что представляет собой отдельную задачу.

Итак, на основе изучения широкого спектра образцов хитозана с различной ММ был установлен неизвестный до настоящего времени факт зависимости величин и знака оптической активности от ММ полисахарида. Для низкомолекулярных образцов, и особенно для олигомеров, даже

незначительное варьирование длины молекулярной цепи приводит к существенному изменению отрицательных величин удельного вращения. Переход к мономеру характеризуется инверсией знака вращения с реализацией больших по абсолютной величине значений  $[\alpha]$ .

Выражаем благодарность Г.А. Эстриной и Г.С. Заспинок за определение ММ образцов олигohитозана.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. Скрябина К.Г., Вихоревой Г.А., Варламова В.П. М.: Наука, 2002.
- Матер. VIII Междунар. конф. "Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: Изд-во Всерос. науч.-исслед. ин-та рыбного хоз-ва и океанографии, 2006.
- Muzzarelli R.A.A. Chitin. Oxford: Pergamon Press, 1977.
- Куликов С.Н., Чирков С.Н., Ильина А.В., Лопатин С.А., Варламов В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 2. С. 224.
- Holme H.K., Hagen A., Dornish M. // Chitosan Per os: from Dietary Supplement to Drug Carrier. Grottammare: Atec, 2001. Р. 153.
- Временная фармакопейная статья ФСП 42-0314-1478-01. Рег. удостоверение № Р000913/01-2001.
- Евдокимов Ю.М., Салянов В.И., Семенов С.В., Ильина А.В., Варламов В.П. // Молек. биология. 2002. Т. 36. № 3. С. 532.

8. Евдокимов Ю.М. // Вестн. РАН. 2003. Т. 73. № 8. С. 712.
9. Шиповская А.Б., Казмичева О.Ф., Тимофеева Г.Н. // Структура и динамика молекулярных систем. Уфа: Изд-во института физики молекул и кристаллов УНЦ РАН, 2002. Вып. IX. Т. 2. С. 293.
10. Фомина В.И., Солонина Н.А., Казмичева О.Ф., Комаров Б.А., Шиповская А.Б. // Матер. VII Междунар. конф. "Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана". М.: Изд-во Всерос. науч.-исслед. ин-та рыбного хоз. и океанографии, 2003. С. 367.
11. Gamzazade A.I., Shlimak V.M., Sklar A.M., Shtikova E.V., Pavlova S.-S.A., Rogojin S.V. // Acta Polymerica. B. 1985. V. 36. № 8. P. 420.
12. Скляр А.М., Гамзазаде А.И., Роговина Л.З., Тимкова Л.В., Павлова С.-С.А., Рогожин С.В., Слонимский Г.Л. // Высокомолек. соед. А. 1981. Т. 23. № 6. С. 1396.
13. Нудьга Л.А., Петрова В.А., Бочек А.М., Калистов О.В., Петрова С.Ф., Петропавловский Г.А. // Высокомолек. соед. Б. 1997. Т. 39. № 7. С. 1232.
14. Kettering Ch.F. Newer Methods of Polymer Characterization. New York; London; Sydney: Wiley, 1964.

## Effect of Molecular Mass on the Optical Activity of Chitosan

A. B. Shipovskaya<sup>a</sup>, V. I. Fomina<sup>b</sup>, O. F. Kazmicheva<sup>b</sup>,  
G. N. Timofeeva<sup>b</sup>, and B. A. Komarov<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Chernyshevskii State University,  
Astrakhanskaya ul. 83, Saratov, 410012 Russia

<sup>b</sup> Research Institute of Natural Sciences, Chernyshevskii State University,  
Astrakhanskaya ul. 83, Saratov, 410012 Russia

<sup>c</sup> Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,  
pr. Akademika Semenova 1, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia

e-mail: ShipovskayaAB@chem.sgu.ru

**Abstract**—The optical activity of chitosan has been examined by the optical rotary dispersion method in a wide molecular mass range beginning from low-molecular analogs of the monomer unit and oligomers. In the spectral range from 300 to 710 nm, all samples demonstrate smooth curves of the optical rotary dispersion. For the polymers and oligomers, these curves lie in the region of negative values of specific optical rotation  $[\alpha]$ , while for monosaccharides, these curves are in the positive region. High-molecular-mass samples are characterized by maximal  $-[\alpha]$  values that are practically independent of molecular mass. For partially depolymerized samples with  $M < 2 \times 10^5$  and for oligomers, the smaller the molecular mass of the sample, the greater the decrease in the modulus of  $-[\alpha]$ . The passage to D-glucosamine chlorohydrate and to N-acetyl-D-glucosamine is characterized by inversion of the sign of rotation and achievement of high  $+[\alpha]$  values.