

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ N-РЕАЦЕТИЛИРОВАННЫЕ ХИТОЗАНЫ

А.И. Гамзазаде, С.М. Насибов

Институт элементоорганических соединений А.Н.Несмеянова РАН, Москва,
E-mail: agamzazade@ineos.ac.ru

WATER SOLUBLE N-REACYLATED CHITOSANS

A.I. Gamzazade, S.M. Nasibov

Institute of Organo-element Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow,
E-mail: agamzazade@ineos.ac.ru

ABSTRACT

The homogeneous way for preparation of water soluble chitosans with N-reacetylation was investigated. It is shown, that partially N-acetylated chitosans were subjected to biodecomposition under action of lysozyme *in vitro*.

Частично N-реацетилированные хитозаны подвергаются гидролитическому разложению под действием лизоцима со скоростью, зависящей от степени ацетилирования (СА), что дает основание для использования их в качестве биодegradуемого материала в медицине и биотехнологии [1].

Сравнение стабильности водных растворов хитозана, полученных N-реацетилированием и частичным деацетилированием хитина, при различных рН показало, что в первом случае образуется хаотично замещенный полимер, в то время как во втором случае – блоксополимер. Растворы беспорядочно замещенного хитозана гомогенны в нейтральной и щелочной области рН [2].

Цель настоящей работы – исследование условий контролируемого N-ацетилирования хитозана для получения различных N-замещенных продуктов, способных к биоразложению в нейтральных средах. Постановка подобной задачи обусловлена тем, что продукты гидролиза хитозана обладают большей биодоступностью, что важно для всасывания из кишечной полости в кровь и, следовательно, участия в различных биохимических превращениях клеточных структур.

Экспериментальная часть

Способ получения N-ацетилированных производных хитозана в большинстве случаев сводится к обработке растворов хитозана в уксусной кислоте в присутствии метанола уксусным ангидридом при комнатной температуре. При этом достигается высокая селективность, однако известные способы не приспособлены для ступенчатого контролирования степени замещения хитозана.

0,3 г хитозана с молекулярной массой 200 кДа и остаточной степенью ацетилирования, равной 2%, растворяли в 30 мл 1%-ного раствора уксусной кислоты, затем раствор нейтрализовали 0,5N NaOH до pH 5,0 и добавляли половину рассчитанного количества уксусного ангидрида в метаноле, что соответствует мольному соотношению хитозан:уксусной ангидрид (ХТ :Ac₂O) 1:0,25. Реакцию проводили в течение 0,5 ч до постоянного значения pH при комнатной температуре, затем раствор нейтрализовали 0,5N NaOH до pH 7,0 и добавляли вторую половину расчетного уксусного ангидрида в метаноле. Далее раствор выдерживали в течение 3 ч, pH среды довели до pH 8,0, диализовали против дистиллированной воды и сушили лиофильно.

Степень замещения определяли методом ¹H-ПМР с использованием 2% хитозана в D₂O или D₂O с трифторуксусной кислотой, а также колориметрически с помощью тринитробензосульфокислоты (ТНБС).

К 0,5 мл 0,1%-ного раствора образца хитозана в 0,1 М растворе тетрабората натрия добавляли 0,5 мл 0,6М боратного буфера, pH 8,5, 0,5 мл 0,1%-ного раствора ТНБС в деионизованной воде. Полученную смесь выдерживали в водяной бане при 40°C в течение 30 мин. По окончании реакции к реакционной смеси добавляли 0,5 мл 1М раствора HCl. После охлаждения реакционной массы до комнатной температуры измеряли интенсивность поглощения окрашенного в желтый цвет раствора при длине волны 367 нм. По оптической плотности испытуемого раствора находили содержание аминогрупп по калибровочному графику, построенному по D-глюкозамину.

Степень разложения модифицированных хитозанов лизоцимом определяли по данным измерения характеристической вязкости в 0,2М ацетатном буфере, pH 5,0.

Обсуждение результатов

Реакция уксусного ангидрида с хитозаном при pH 3,0, очевидно, протекает преимущественно с остаточными непротонированными аминогруппами, количество которых не превышает 15–20%. При повышении pH раствора хитозана до 5,0 доля незаряженных групп увеличивается, следовательно, в этом случае можно ввести в реакцию практически эквимольное к непротонированным аминогруппам количество ацильных остатков. При этом не происходит модификации OH-групп, о чем свидетельствует отсутствие колебаний эфирного карбонила при 1740 см⁻¹.

Частичное ацилирование хитозана позволяет в дальнейшем повысить pH раствора выше 6,5 и, значит, количество непротонированных аминогрупп и соответственно степень замещения. Таким образом, важной особенностью предложенного способа является возможность ступенчатого повышения степени замещения путем постепенного повышения pH раствора полимера или доли непротонированных аминогрупп.

Селективное N-замещение при частичном ацилировании хитозана подтверждается данными ¹H-ПМР-спектров, о чем свидетельствует наличие сигнала в области 1,9 м.д. Важно отметить, что внесенный в реакцию уксусный ангидрид практически мало подвержен гидролизу, т.к. теоретически рассчитанное количество последнего удовлетворительно согласуется со степенью замещения хитозана по данным колориметрического определения и ¹H-ПМР-спектров. Выход конечного продукта соответственно высок и составляет около 90%.

Степень замещения и растворимость образцов хитозана при N-реацетилировании уксусным ангидридом

Образец	Мольное соотношение $Ac_2O:XТ$	Степень замещения		Растворимость	
		по ^1H-NMP	по ТНБС	в NaOH	в воде (pH 7,5)
Хт-25	0,25	0,20	0,22	р.	п.р.
Хт-35	0,35	0,30	0,30	х.р.	х.р.
Хт-50	0,50	0,47	0,52	х.р.	х.р.
Хт-60	0,60	0,56	0,55	х.р.	х.р.
Хт-75	0,75	0,70	0,6	х.р.	р.
Хт-80	0,80	0,83	-	р.	п.р.
Хт-100	1,00	0,95	-	п.р.	п.р.

Примечание. х.р. – хорошо растворим, р. – растворим, п.р. – плохо растворим.

При повышении мольной доли ацетилирующего агента ($Ac_2O:хитозан > 1:0,75$) появляются О-ацетильные группы в структуре полимера. В ^1H-NMP спектре обнаруживается новый сигнал с химическим сдвигом $\delta = 2,1$ м.д., который можно отнести к О-ацетильному остатку в положении С-3 пиранозного кольца. При этом из-за большей гидрофобизации полученных продуктов происходит ухудшение их растворимости в воде.

Для выяснения чувствительности частично N-реацетилированных производных хитозана к ферментативному гидролизу полученные образцы были подвергнуты *in vitro* действию лизоцима. В результате инкубирования исходный хитозан практически не подвергается расщеплению лизоцимом, в то же время по мере увеличения степени ацетилирования хитозана увеличивается степень его деструкции.

Таким образом, полученные N-ацетилхитозаны, растворимые в физиологических условиях, могут явиться качественно новыми метаболически активными продуктами, способными к последующей биологической трансформации в организме (деградация, всасывание и т.д.). Эти соединения в виде сферических микрочастиц могут быть перспективными биоматериалами в качестве мишеней для фагоцитирующих макрофагов в кишечнике, вызывая тем самым системную иммуностимуляцию организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hirano S., Tshida H., Nagao H. // Biomaterials. 1989. V. 10. N. 8. P. 574-576.
2. Aiba S.I. // Int.J.Biol.Makromol. 1989. V. 11. N. 4. P. 249-252.