

Х И М И Я

УДК 547.995.12

СИНТЕЗ АМИДОКСИМА ХИТОЗАНА

© 2007 г.

Е.Н. Федосеева, Л.А. Смирнова, О.Н. Смирнова

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

enfedoseeva@front.ru

Поступила в редакцию 25.05.2007

Синтезированы амидоксими хитозана различной молекулярной массы полимераналогичными превращениями полиглюкозамина в реакции с акрилонитрилом и последующим взаимодействием продукта с гидроксиламином. Выявлено влияние молекулярной массы на степень замещения функциональных групп хитозана в реакциях нуклеофильного присоединения. Химический состав продуктов синтеза подтвержден методами потенциометрического титрования, ИК-спектроскопии, анализом на содержание азота по Кьельдалю. Выявлена высокая бактерицидность амидоксима хитозана на примере ряда бактерий.

Известно, что полиоксими – это класс соединений с широким спектром свойств: от высокой реакционной способности до ценных в практическом отношении характеристик [1]. Химическая активность оксимной группы проявляется в полимераналогичных превращениях полиоксимов [2], в ингибировании радикальной полимеризации виниловых мономеров в присутствии акролеиноксима [3]. Способность полимерных оксимов к образованию комплексов с металлами [4] используется при создании сорбентов избирательного действия и высокопрочных мембран [5], а оксиматы металлов, в свою очередь, эффективны как катализаторы [6]. Полимерные амидоксими, в частности полиакролеинамидоксим, отличаются высокой бактерицидной активностью [1].

Синтез полиоксимов осуществляется либо ионной полимеризацией оксимсодержащих мономеров, либо через полимераналогичные превращения – оксимированием карбонилсодержащих полимеров [1]. Однако набор исходных реагентов ограничен, поэтому актуальным является поиск новых источников и методов синтеза полиоксимов. Представляется перспективным получение полиамидоксима на базе природного полисахарида хитозана. Полимерная цепь хитозана состоит из β -1,4 связанных звеньев 2-дезоксид-2-амино-Д-глюкопиранозы и 2-де-зоксид-2-ацетиамидо-Д-глюкопиранозы в соотношении, определяемом

степенью деацетилирования. Функциональные группы хитозана обладают высокой реакционной способностью, что открывает возможность получения полиоксима полимераналогичными превращениями с их участием. Синтез оксима хитозана может преследовать двоякую цель. Во-первых, получение полимера, реакционная способность функциональных групп которого позволит проводить дальнейшее модифицирование, в частности реализовать привитую сополимеризацию. Во-вторых, использование самого амидоксима хитозана в областях, где традиционно применяются полиоксими – в качестве комплексообразователя, более эффективного, чем исходный хитозан, а также биодеградируемого бактерицидного препарата. Хитозан гипоаллергенен, легко подвергается деградации в природе под действием специфических ферментов, продукты деградации не загрязняют природу, то есть утилизация хитозана не наносит ущерба окружающей среде. Известно, что сами хитозаны различной молекулярной массы являются биологически активными веществами [7–11]. Однако, как отмечают авторы [7], их микробиологическая активность ниже, чем у известных синтетических бактерицидов. Поскольку биоактивность хитозана связывают с наличием в его составе аминогрупп, следует ожидать ее повышения при введении оксимной группы в звено макромолекулы.

Цель настоящей работы – синтез полиамидоксимов на основе хитозанов с различной молекулярной массой в двухстадийном процессе: через получение цианэтилхитозана по реакции с акрилонитрилом и взаимодействием его с солянокислым гидроксиламином по реакции Михаэля.

Экспериментальная часть

Использовали хитозан производства НПО «Биопрогресс» (Московская обл.) с молекулярной массой $M = 8.0 \times 10^4$ без предварительной очистки (степень деацетилирования 82%, сухой остаток после прокаливании 0.3%, нерастворимая фракция – не более 0.25%). Низкомолекулярный хитозан получали по методике, описанной в работе [12]. В качестве растворителя использовали растворы уксусной кислоты 1.5–6 мас.% в дистиллированной воде (CH_3COOH квалификации ч. д. а.). Акрилонитрил (АН) предварительно сушили в течение 4 часов едким натром и перегоняли при атмосферном давлении на установке с головкой полной конденсации, собирая фракцию с $T_{\text{кип}}=351.5 \text{ K}$ (содержание основного вещества 99.4%). Солянокислый гидроксилламин квалификации ч. д. а., метиловый спирт квалификации х. ч., едкий натр квалификации х. ч. использовали без дополнительной очистки.

Молекулярную массу образцов определяли методом вискозиметрии с использованием вискозиметра Уббелодде при температуре 21°C в растворе уксусной кислоты с концентрацией 0.33 моль/л в дистиллированной воде, содержащей также 0.3 моль/л NaCl . Средневязкостную молекулярную массу рассчитывали по уравнению Марка – Хаувинка $[\eta] = k \bar{M}_n^a$, где $k=3.41 \times 10^{-5}$, $a=1.01$ [13].

Идентификацию состава промежуточного и конечного продукта проводили с использованием методов ИК-спектроскопии (ИК-спектрофотометр UR-2), потенциометрического титрования (рН метр – рН 410 Аквилон), а также анализа на содержание азота по методу Кьельдаля [14].

Реакции проводили в трёхгорлой колбе, снабженной мешалкой и обратным холодильником. На первой стадии вносили расчетное количество АН в раствор хитозана. Реакционную систему выдерживали при 0°C в течение 2 часов. Концентрацию хитозана в растворе варьировали от 1 до 3 мас.%, концентрация АН

не превышала предела растворимости его в воде – 7.3 % при 293 K . По окончании цианэтилирования отбирали пробу на анализ.

Оксимирование проводили, не выделяя промежуточного продукта из раствора. В 100 мл раствора цианэтилированного хитозана вносили 7 г солянокислого гидроксиламина, растворённого в 7 мл 4% NaOH и 3 мл воды. Процесс осуществляли при 75°C в течение 4 часов. Полимер по окончании реакции высаживали из раствора метанолом, сушили без нагревания до постоянной массы.

Полноту присоединения соответствующего реагента (АН или гидроксиламина) к хитозану на обеих стадиях характеризовали степенью замещения (СЗ) функциональных групп, то есть числом молей АН или гидроксиламина, присоединившихся к мономерному звену хитозана.

Исследование антибактериальной активности полиамидоксима хитозана проводили по стандартной методике [15]: бактерицидную активность определяли по величине диаметра зоны ингибирования роста микроорганизмов.

В качестве тест-культур использовали бактерии *Echerichia coli*, *Pseudomonas acruginosa*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus*.

Результаты и их обсуждение

Как отмечено в литературном обзоре, реакция оксимирования используется обычно применительно к карбонилсодержащим полимерам [1]. Однако известен способ превращения полиакрилонитрила в полиакриламидоксим нуклеофильным присоединением к нитрильным группам гидроксиламина [16]. В настоящей работе с целью получения амидоксима хитозана было проведено цианэтилирование хитозанов различной молекулярной массы в реакции с акрилонитрилом по методике [17] и оксимирование цианэтилхитозанов по методике [16]. Известно, что реакция Михаэля – это нуклеофильное присоединение соединений с подвижным атомом водорода к поляризованной двойной связи. При проведении реакции в слабых растворах (рН~5.5) нуклеофильными свойствами могут обладать гидроксильные группы хитозана, а также оставшиеся непротонированными аминогруппы. Следовательно, цианэтилирование, а соответственно, и дальнейшее оксимирование могут идти по

Схема 1 – реакция цианэтилирования:

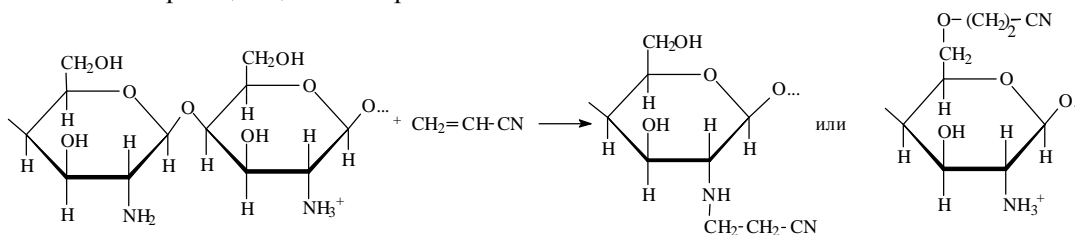


Схема 2 – реакция оксимирования:

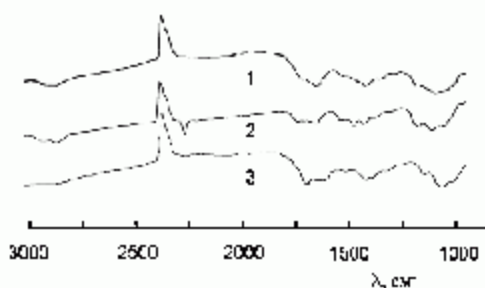
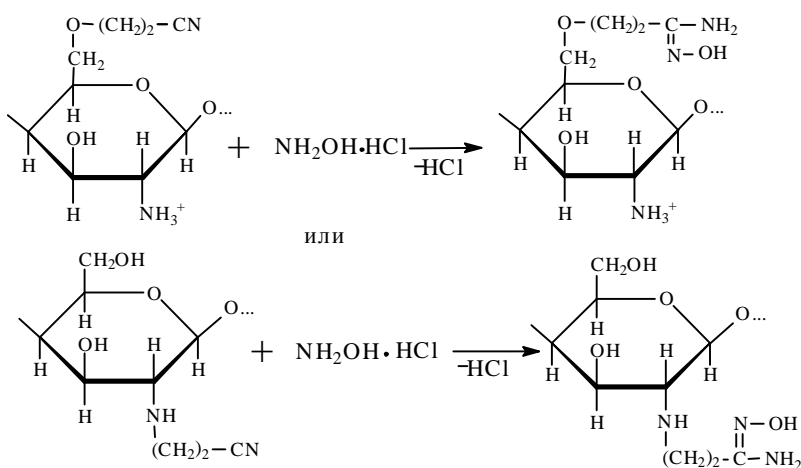


Рис. 1. ИК-спектры исходного хитозана с $M=1 \times 10^4$ – 1, его цианэтилированного производного – 2, амидоксима хитозана – 3

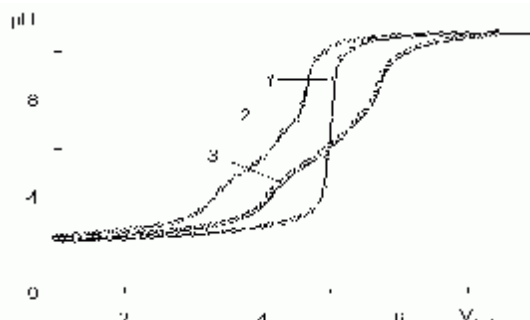


Рис. 2. Кривые потенциометрического титрования раствором NaOH 0.1 н. раствора HCl – 1, цианэтилированного производного хитозана – 2, хитозана с $M=1 \times 10^4$ – 3

разным направлениям. В результате любого из реализуемых путей мономерное звено модифицированного хитозана приобретает еще одну аминогруппу, первичную или вторичную (схема 2).

Метод инфракрасной спектроскопии подтверждает образование на первой стадии цианэтилированного производного хитозана: в спектре продукта появляется новая полоса поглощения 2260 см^{-1} , отсутствующая в исходном хитозане (рис. 1, линии 1 и 2). Эта полоса соответствует валентным колебаниям цианогруппы [18]. В спектре продукта второй стадии (рис. 1, линия 3) данная полоса полностью исчезает. Наблюдаемое изменение

интенсивности пиков при 1600 и 1700 см^{-1} (абсолютная величина первого падает, а второго возрастает по сравнению со спектром исходного хитозана) мы связываем с увеличением содержания NH-групп. Отмечено также появление полосы поглощения при 1675 см^{-1} , которую мы относили к валентным колебаниям группы C=N, имеющим, согласно [18], характеристическое значение 1673 см^{-1} .

Сравнение кривых титрования солянокислых растворов исходного хитозана и его цианэтилового производного с $M=1 \times 10^4$ (рис. 2) показывает, что последний отличается двухступенчатой кривой титрования. Такой характер кривой свидетельствует о том, что

аминогруппа хитозана вступает в реакцию с акрилонитрилом, а значения рК NH₂- и образующихся в результате цианэтилирования NH-групп отличаются. Однако СЗ, рассчитанная по результатам титрования, меньше значения, полученного по содержанию азота в полимере (табл. 1). Это должно означать, что цианэтилирование идет по обоим возможным направлениям. Следовательно, конечный продукт – амидоксим хитозана – содержит мономерные звенья с О- и N-заместителями.

В таблице 1 представлены результаты

Микробиологическую активность хитозана связывают с наличием в его составе аминогрупп. Косвенно это подтверждается тем фактом, что хитозаны с разной степенью деацетилирования обладают бактерицидностью в разной степени. Из литературных источников известно [1, 2], что оксимы, полученные на основе полиакролеина, также обладают бактерицидными свойствами вследствие наличия в макромолекуле аминогрупп. Мы полагали, что введение дополнительных аминогрупп в звено хитозана приведет к

Таблица 1

Результаты анализа продуктов реакции хитозана на содержание азота в них по методу Кьельдаля

Молекулярная масса образца $\times 10^{-3}$	Содержание элементарного азота в полимере, мас.%. Цианэтилированный хитозан		Степень замещения
	Цианэтилированный хитозан	Амидоксим хитозана	
7	12	15.4	0.70
10	12.5	15.8	0.83
14	12.8	16.3	0.90
19	13.1	16.9	1.00
144	14.5	–	1.6

определения содержания азота в продуктах обеих изучаемых реакций. Исходя из этих данных, рассчитывали СЗ функциональных групп по следующим формулам:

$$\%N = \frac{100 \times 14(CZ_{АН} + 1)}{161 + 53 \times CZ_{АН}},$$

$$\%N = \frac{100 \times 14(CZ_{АН} + CZ_{NH_2OH} + 1)}{161 + 53 \times CZ_{АН} + 37 \times CZ_{NH_2OH}},$$

где %N – содержание азота, определяемое анализом по методу Кьельдаля для цианэтилхитозана и для амидоксим хитозана соответственно. Данные таблицы показывают, что низкомолекулярные амидоксимы имеют СЗ функциональных групп в хитозане от 0.7 до 1. Для высокомолекулярного хитозана в тех же условиях достигается более высокая СЗ. Таким образом, доказано, что при использовании предлагаемого метода модифицирования каждое мономерное звено хитозана в среднем приобретает дополнительную аминогруппу, причём присоединение гидросиламина к цианэтилхитозану происходит количественно.

Авторы отметили изменение реакционной способности хитозана в реакции цианэтилирования при уменьшении его молекулярной массы, проявляющееся в снижении СЗ. Наблюдаемая закономерность, возможно, объясняется увеличением содержания протонированных аминогрупп, приходящихся на одну молекулу у хитозанов с меньшей молекулярной массой.

усилению его микробиологической активности. Амидоксим хитозана с молекулярной массой 1×10^4 исследовали в качестве бактерицидного вещества, изучая его биоактивность по отношению к четырём наиболее распространенным бактериям: *Echerichia coli* (кишечная палочка), *Pseudomonas acruginosa* (синегнойная палочка), *Streptococcus salivarius* (стрептококки), *Staphylococcus aureus* (стафилококки). Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты исследований амидоксима хитозана ($M=1 \times 10^4$) на бактерицидность

Вид бактерий	Зона задержки роста, мм
<i>Echerichia coli</i>	16.0
<i>Pseudomonas acruginosa</i>	14.0
<i>Streptococcus salivarius</i>	13.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	14.0

Из таблицы 2 видно, что амидоксим хитозана обладает высокой бактерицидностью по отношению к изученным видам бактерий. В специальных опытах было показано, что низкомолекулярный хитозан не обладает выраженной активностью к данным бактериям.

Реакционную способность оксимных групп доказывали, проводя реакцию восстановления золота из раствора золотохлористоводородной кислоты раствором амидоксим хитозана. При этом получили устойчивую дисперсию коллоидного золота. Следовательно, химическая модификация хитозана по

предлагаемому методу открывает возможности практического использования его в качестве восстанавливающего агента, а также антибактериального средства нового поколения, созданного на основе природного полисахарида, имеющего низкую аллергизирующую способность. Важно, что проблема с утилизацией амидоксима хитозана в природе легко решается: в работе [17] показано, что существует несколько видов микромицетов, способных разрушать данное вещество.

Таким образом, в работе получены и охарактеризованы амидоксимы хитозана различной молекулярной массы двухстадийным методом – по реакции нуклеофильного присоединения хитозана к акрилонитрилу с последующим взаимодействием цианэтилового производного с гидроксиламином солянокислым (реакция Михаэля). Реакционная способность хитозанов зависит от их молекулярной массы. Амидоксим хитозана с молекулярной массой 1×10^4 обладает ярко выраженной бактерицидной активностью по отношению к наиболее распространенным видам бактерий.

Список литературы

1. Антоник Л.М., Хабибуллина А.Г. // Высокомолекуляр. соединения. – 2004. – Т. 46, № 12. – С. 2172–2186.
2. Хабибуллина А.Г., Антоник Л.М., Вакульская Т.И., Воронков М.Г. // Доклады Академии наук. – 2002. – Т. 385, № 5. – С. 641–643.
3. Tanaka M., Masuda M., Ota T. // Kobunshi Ronbunshu. – 1979. – V. 36, № 12. – P. 821.
4. Хабибуллина А.Г., Антоник Л.М., Воронков М.Г. // Наука производству. – 2003. – № 6. – С. 62.
5. Kim S.J., Takizava T. // Makromol. Chem. – 1975. – V. 176, № 4. – P. 1217.
6. Пешкова В.М., Савостина В.М., Иванова Е.К. Оксимы. – М.: Наука, 1977. – С. 54.
7. Zhang M., Tianwei T., Huizhu Y. and Changhui R. // Journal of Bioactive and Compatible Polymers. – 2003. – Vol. 18. September. – P. 391–400.
8. Ахметова И.Э. Физиологические особенности формирования защитных реакций пшеницы при действии хитоолигосахаридов: Автореферат дис. ... канд. биол. наук. – Уфа: Институт биохимии и генетики РАН, 2000. – 28 с.
9. Васюкова Н.И., Зиновьева С.В., Ильинская Л.И. и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37, № 1. – С. 115–122.
10. Nemtsev S.V., Varlamov V.P., Skryabin K.G. // Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives / Ed. H. Struszczyk. – Poland: Lodz, 2002. – V. 8. – P. 125–132.
11. Surguchova N.A., Varitsev Yu.A., Chirkov S.N. // J. Russ. Phytopathol. Soc. – 2000. – V. 1, № 1. – P. 59–62.
12. Федосеева Е.Н., Смирнова Л.А., Сорокина М.А., Пастухов М.О. // Журн. прикладной химии. – 2006. – Т. 79. – Вып. 5. – С. 857–861.
13. Погодина Н.В., Павлов Г.М., Мельников А.В. и др. // Высокомолекуляр. соединения. – 1982. – Т. 28, № 2. – С. 232–239.
14. Баландина В.А., Гурвич Д.Б., Клещева М.С. и др. Анализ полимеризационных пластмасс. Практическое руководство / Под ред. В.Д. Безуглого. – М.–Л.: Химия, 1965. – С. 389–391.
15. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. – М.: Медицина, 1982. – 464 с.
16. Серенсон У., Кемпбел Т. Препаративные методы химии полимеров. – М.: Издательство иностранной литературы, 1963. – С. 211–212.
17. Андриянова Н.А. Модификация хитозана акрилонитрилом – блок- и привитая сополимеризация, полимераналогичные превращения: Автореферат дис. ... канд. хим. наук. – Нижний Новгород: ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 2005. – 28 с.

18. Беллами Л. Новые данные по ИК-спектрам сложных молекул / Под ред. Ю.А. Пентина. – М.: Мир, 1971.

SYNTHESIS OF CHITOSAN AMIDOXIME

E.N. Fedoseeva, L.A. Smirnova, O.N. Smirnova

We synthesize chitosan amidoximes of various molecular weight by polymer-like transformation of β -glucosamine in reaction with acrylonitrile and then with hydroxylamine. The effect of the molecular weight on degree of substitution of chitosan functional groups in the reactions of nucleophilic addition is revealed. Chemical structure of synthesis products is verified by potentiometric titration, IR spectroscopy, and Kjeldahl analysis nitrogen content. By using several types of bacteria, strong bactericidal action of chitosan amidoxime is demonstrated.