

УДК 547.541.64.995.12

## ВЫДЕЛЕНИЕ D-ГЛЮКОЗАМИНА ИЗ ХИТИН-ГЛЮКАНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

© 2013 г. С. Д. Артамонова\*, Ф. Ф. Шарнина\*\*

\*Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071

\*\*Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, 424000

e-mail: svetlana.artamonova@gmail.com

Поступила в редакцию 13.03.2012 г.

Изучены особенности кислотного гидролиза хитин-глюкановых комплексов (ХГК) высших грибов и разработана технология выделения и очистки из гидролизата D(+)-глюкозамина гидрохлорида высокого качества. Состав, свойства и чистота продукта проанализированы с использованием комплекса физико-химических методов. Выход конечного продукта составил 20–60% в зависимости от содержания хитина в образцах ХГК. Полученный аминсахар представлял собой белый кристаллический порошок без запаха, легко растворимый в воде, малорастворимый в 95%-ном этиловом спирте, нерастворимый в хлороформе, в других органических растворителях и по основным показателям соответствовал качеству стандартного D(+)-глюкозамина гидрохлорида.

DOI: 10.7868/S0555109913030045

В настоящее время большое внимание уделяется синтезу лекарственных препаратов на основе природного сырья. Аминсахар D-глюкозамин (ДГА) – естественный компонент суставного хряща, присутствующий в организме человека. Он стимулирует синтез собственных гликозаминогликанов, нормализует метаболизм гиалиновой ткани, способствуя регенерации хрящевых поверхностей и суставной сумки. Поскольку ДГА при хранении на воздухе и даже в плотно закрытом сосуде быстро окисляется и разлагается, на практике обычно используют его хлоргидрат, 2-дезоксид-2-амино-β-D-глюкоза гидрохлорид [1, 2].

Солянокислый D-глюкозамин (ДГА • HCl) широко применяется в медицине в составе лекарственных препаратов хондропротекторного и противовоспалительного действия, в качестве иммуностимуляторов и компонентов пищевых добавок [3, 4]. Поэтому на сегодняшний день актуальными задачами являются как поиск новых источников получения ДГА, так и совершенствование способов выделения ДГА • HCl.

Технология препаративного выделения D(+)-глюкозамина гидрохлорида основана на полном кислотном гидролизе природного полисахарида хитина в концентрированной соляной кислоте с последующей очисткой гидролизата и перекристаллизацией продукта [2, 5–7]. При гидролизе (рис. 1) происходит расщепление ацетамидных и гликозидных связей, что приводит к процессам деацетилирования и деполимеризации [1].

В настоящее время основным сырьем для получения ДГА • HCl служит хитин ракообразных (креветка, краб, криль). В клеточной стенке грибов хитин содержится в виде хитин-глюканового комплекса (ХГК), который по своим показателям ни в чем не уступает хитину и является более дешевым и доступным сырьем для получения ДГА • HCl [6, 8, 9].

Данная работа посвящена разработке способа выделения ДГА • HCl из хитин-глюканового комплекса высших грибов. Исследован процесс кислотного гидролиза ХГК, выделения и очистки из гидролизата целевого продукта. Варьировались температурный режим, кислотность, продолжительность гидролиза и приемы отмывки от побочных продуктов кислотного гидролиза. На основании полученных результатов был разработан способ выделения ДГА • HCl из ХГК. Промывание целевого продукта проводилось холодной концентрированной соляной кислотой (от –10°C до –15°C). Выход аминсахара составил 20–60% от ХГК в зависимости от класса, вида и формы плодового тела высших грибов, из которого был выделен ХГК. Состав продукта и его химическая чистота исследовались методами элементного анализа, ТСХ, ИКС, <sup>1</sup>H-ЯМР (ПМР), определением удельного угла вращения, температуры плавления и доли основного вещества.

Цель работы – исследование кислотного гидролиза ХГК, выделение и очистка целевого продукта.

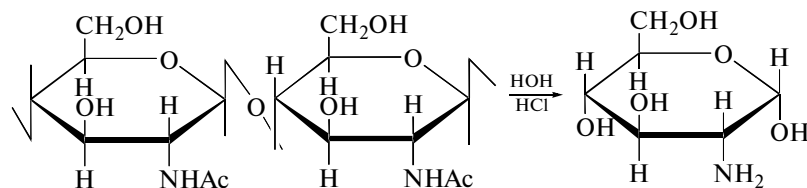


Рис. 1. Структурная формула фрагмента ДГА • HCl [1].

## МЕТОДИКА

**Материалы.** В качестве сырья для выделения D(+)-глюкозамин гидрохлорида использовали ХГК из высших грибов (Марий Эл), *Armillariella mellea* (опенок настоящий), *Morchella esculenta* (сморчок настоящий), *Cantharellus cibarius* (лисичка настоящая), *Lactarius rufus* (груздь горький), *Amanita muscaria* (мухомор красный), *Macrolepiota excoriata* (гриб-зонтик белый), *Suillus bovinus* (козляк, решетник). Выделение ХГК из высших грибов проводили по разработанной нами четырехстадийной методике, описанной в работах [8, 9]. Данная методика предусматривает поэтапное удаление из биомассы грибов сопутствующих хитину веществ – протеинов, липидов, пигментов (в том числе и меланинов), жиров, минеральных веществ. В результате выделяются чистые образцы в виде порошка (ХГК грибов), имеющие цвет от светло-бежевого до белого, нерастворимые в щелочах, в разбавленных кислотах, в органических растворителях, в воде и сильно набухающие в ней. Характеристики ХГК грибов сопоставимы с характеристиками стандартного хитина из ракообразных (Arthropoda) и отвечают техническим требованиям (ТУ 15-02-538-89 и 15-01-472-87).

**Получение D(+)-глюкозамина гидрохлорида.** В трехгорловую колбу, снабженную электромешалкой, обратным холодильником и термометром, помещали 10 г сухого (с учетом влажности) измельченного ХГК, добавляли 100 мл концентрированной HCl ( $\rho = 1.19 \text{ г/см}^3$ ) и при непрерывном перемешивании нагревали на водяной бане при 70–75°C в течение 3.5–4 ч. Затем колбу с реакционной смесью охлаждали, добавляли 100 мл дистиллированной воды и 2.5–3 г активированного угля. Реакционную массу продолжали нагревать при 50°C еще в течение 1–1.5 ч при непрерывном перемешивании. Охлажденную реакционную смесь черного цвета отфильтровывали на воронке Шотта или на воронке Бюхнера через плотный капрон в четыре слоя. Фильтрат светло-желтого оттенка упаривали с помощью водоструйного насоса (можно использовать водяную баню при 40°C) до объема 10–15 мл. После охлаждения выпавшие кристаллы ДГА • HCl отделяли от жидкости с помощью стеклянного фильтра или воронки Бюхнера через капроновую ткань в четыре слоя.

Кристаллы промывали на воронке Бюхнера холодной концентрированной HCl (от –10 до –15°C), далее поочередно этиловым спиртом и диэтиловым эфиром. Полученные кристаллы ДГА • HCl белого цвета сушили на воздухе до постоянной массы.

**Методы исследования.** В качестве стандартных образцов сравнения применяли: D(+)-глюкозамин гидрохлорид субстанция (ФСП 42-0314-1478-01, Научно-технический центр “ЭКОБИО-ТЕК” г. Мурманск, Россия), D(+)-глюкозу (ч.д.а., ГОСТ 6038-74), D(-)-фруктозу (ч., ТУ 6-09-1979-77) и D(+)-маннозу (ч., ТУ 6-09-07-666-76), технический хитин ракообразных – Arthropoda (ГОСТ 7630-87, Россия).

Анализ и степень чистоты ДГА • HCl из ХГК высших грибов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагельсодержащих пластинках Silufol-R и Silufol-UV 254 (“Avallier”, ЧССР) в сравнении со стандартами (D(+)-глюкозамин гидрохлорид субстанция, глюкоза, фруктоза, манноза). С целью исключения ошибок контроль процесса отделения ДГА • HCl от нейтральных сахаров осуществляли методом ТСХ в нескольких подобранных нами системах растворителей: 1) этанол–ацетон (3 : 2); 2) изопропанол–ацетон – 0.2 М молочная кислота (6 : 3 : 1); 3) этанол–ацетон–гексан (2 : 2 : 1), и по данным эксперимента определяли  $R_f$ .

Проявление хроматограмм осуществляли в парах йода или путем опрыскивания (0.25 мл свежеперегнанного анилина + 0.25 г дифениламина в 25 мл ацетона + 1 мл ортофосфорной кислоты) с дальнейшим нагреванием хроматографических пластинок в сушильном шкафу при температуре не более 70°C.

Долю основного вещества в ДГА • HCl определяли фотометрическим методом по Эльсону–Моргану. Элементный анализ по азоту, углероду и водороду проводили на автоматическом анализаторе C H N S/O Analyzer 2400 (“Perkin Elmer”, США). Удельное вращение образцов ДГА • HCl измеряли на поляриметре СМ-3 УХЛ 4.2 до и после установления равновесия  $\alpha$ - и  $\beta$ -форм в течение 1 сут. ИК-спектры снимали на ИК-фурье-спектрофотометре VECTOR 22 (“Bruker”, Германия). ПМР-спектры получали на ЯМР спектрометре AVANCE 300 (“Bruker”, Германия). Температуру плавления образцов ДГА • HCl и смешанного

**Таблица 1.** Характеристика образцов солянокислого D-глюкозамина

ДГА • HCl	Выход, %	$T_{пл}$ , °C	$[\alpha_D^{20}]$ , ° в воде	$R_f$	Основное вещество, %
ДГА • HCl (станд.)	—	210–211	+72.5	0.52	98.0
<i>C. cibarius</i>	57.8	210	+72.5	0.52	97.9
<i>A. mellea</i>	50.5	210	+72.5	0.52	97.8
<i>M. excoriate</i>	46.8	210–211	+72.0	0.53	97.6
<i>L. rufus</i>	42.4	210–211	+72.5	0.52	97.5
<i>A. muscaria</i>	43.7	209–210	+72.0	0.51	97.5
<i>S. bovinus</i>	40.3	210–212	+72.0	0.51	97.2
<i>M. esculenta</i>	23.8	209–210	+72.5	0.52	97.9

плавления фиксировали на столике Кофлера (“Voëtius”, Германия). Влажность и зольность образцов оценивали гравиметрическим методом по ТУ 15-02 538-89. Подлинность продуктов устанавливали по качественной реакции с реактивом Эрлиха [10, 11].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения ДГА • HCl детально исследовались условия кислотного гидролиза ХГК гриба вида *A. mellea* (кислотность, соотношение хитин/кислота, время, температура) и способы очистки материала от побочных продуктов. На основании результатов исследования различных факторов была разработана технология получения солянокислой соли природного аминсахара.

Трудность выделения ДГА • HCl из ХГК заключалась в том, что в гидролизате ХГК присутствовал не только ДГА • HCl, но и достаточное количество глюкозы, фруктозы и даже маннозы, хорошо растворимых в воде и нерастворимых ни в одном из органических растворителей, что затрудняло их разделение. Большая часть примесей оставалась в растворе, а часть выпадала в осадок вместе с целевым продуктом. Данные сахара можно разделить методом перекристаллизации в разбавленном растворе этилового спирта [8], но это приводит к сильному снижению выхода целевого продукта. Применение для данной цели разных хроматографических колонок неперспективно, так как в случае промышленного синтеза препарата можно столкнуться как с проблемами материального характера, так и с трудностями в подборе оборудования. Было установлено, что солянокислый D-глюкозамин плохо растворим, а нейтральные сахара (глюкоза, фруктоза, манноза) прекрасно растворяются в холодной концентрированной соляной кислоте. Поэтому данная проблема была решена путем промывания осадка ДГА • HCl холодной (от –10 до –15°C) концентрированной HCl (контроль осуществляли методом ТСХ).

Таким образом, из гидролизата ХГК гриба вида *A. mellea* препаративно был выделен ДГА • HCl с использованием описанного выше метода. Выход целевого продукта составил 50% от ХГК (табл. 1). Полученный ДГА • HCl гриба *A. mellea* по основным показателям соответствовал качеству стандартного ДГА • HCl субстанции (ФСП 42-0314-1478-01) и представлял собой белый кристаллический порошок без запаха, легко растворимый в воде, мало растворимый в 95%-ном этиловом спирте и нерастворимый в хлороформе и в других органических растворителях. Реакция с реактивом Эрлиха была положительной, температура плавления 210°C с разложением, значение удельного вращения после установления равновесия  $\alpha$ - и  $\beta$ -форм в течение 1 сут  $[\alpha_D^{20}] = 72.5^\circ$  (табл. 1), что соответствует данным литературы [2, 5].

Результаты ТСХ во всех трех системах растворителей свидетельствовали о наличии в полученном продукте одного вещества – ДГА • HCl. На хроматографических пластинках наблюдалось по одному пятну красно-бурого цвета, что подтверждает достаточную степень чистоты соли глюкозамина. Значения  $R_f$  для ДГА • HCl гриба *A. mellea* во всех трех системах растворителей идентичны с

**Таблица 2.** Элементный анализ образцов солянокислого D-глюкозамина

ДГА • HCl	Содержание, %		
	С	Н	N
ДГА • HCl (теор. расч.)	33.41	6.49	6.49
ДГА • HCl (стандарт)	33.44	6.96	6.39
<i>A. mellea</i>	33.42	6.83	6.39
<i>C. cibarius</i>	33.40	6.67	6.39
<i>A. muscaria</i>	33.44	6.82	6.47
<i>M. esculenta</i>	33.43	6.67	6.45

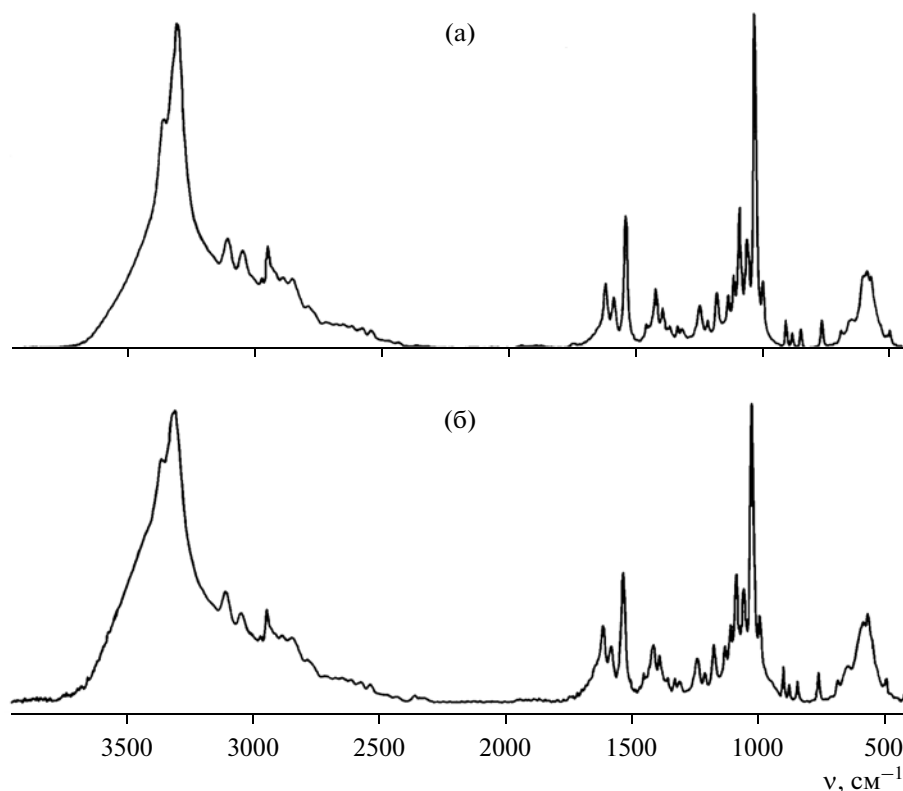


Рис. 2. ИК-спектры ДГА·НСІ из гриба *A. mellea* (а) и стандарта ДГА·НСІ (б).

$R_f$  стандартного образца ДГА·НСІ (ФСП 42-0314-1478-01) и равны 0.52 (табл. 1).

Данные элементного анализа по азоту, углероду и водороду ДГА·НСІ гриба *A. mellea* и стандарта ДГА·НСІ (табл. 2) одного порядка и хорошо согласуются с теоретически рассчитанными значениями.

Строение ДГА·НСІ гриба *A. mellea* подтверждено методом ИК-спектроскопии (рис. 2) и ПМР (рис. 3) в сравнении со стандартным ДГА·НСІ. Сравнение основных характеристических полос поглощения образца ДГА·НСІ гриба

*A. mellea* и стандартного образца показало идентичность препаратов (табл. 3).

Разработанная методика выделения ДГА·НСІ из ХГК *A. mellea* была применена для кислотного гидролиза ХГК ряда видов высших грибов.

Характеристика и элементный состав солянокислого D-глюкозамина, выделенного из ХГК различных грибов, представлены в табл. 1 и 2. Выход конечного продукта составил 20–60% от ХГК в зависимости от вида, класса и формы плодового тела гриба, что связано с различным содержанием хитина в ХГК. Обращает на себя внимание наи-

Таблица 3. Данные ИК-спектра образцов D-глюкозамин хлоргидрата ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ )

Характеристические полосы поглощения	ДГА·НСІ стандарт	<i>A. mellea</i>	<i>C. cibarius</i>	<i>M. esculenta</i>
ОН...О (связ.)	3300 ш.	3301 ш.	3301 ш.	3299
NH (связ.)	3041 сл.	3042 сл.	3042 сл.	3039
NH (дефор.)	1583 с.	1583 с.	1583 с.	1584
С–О–Н	1419 ср.	1418 ср.	1418 ср.	1421
С–N (вал.)	1247 с.	1247 с.	1247 с.	1249
С–О	1094	1094	1094	1094
С–О–С	1066	1066	1066	1066

Примечание: ш. – широкая, сл. – слабая, ср. – средняя, с. – сильная.

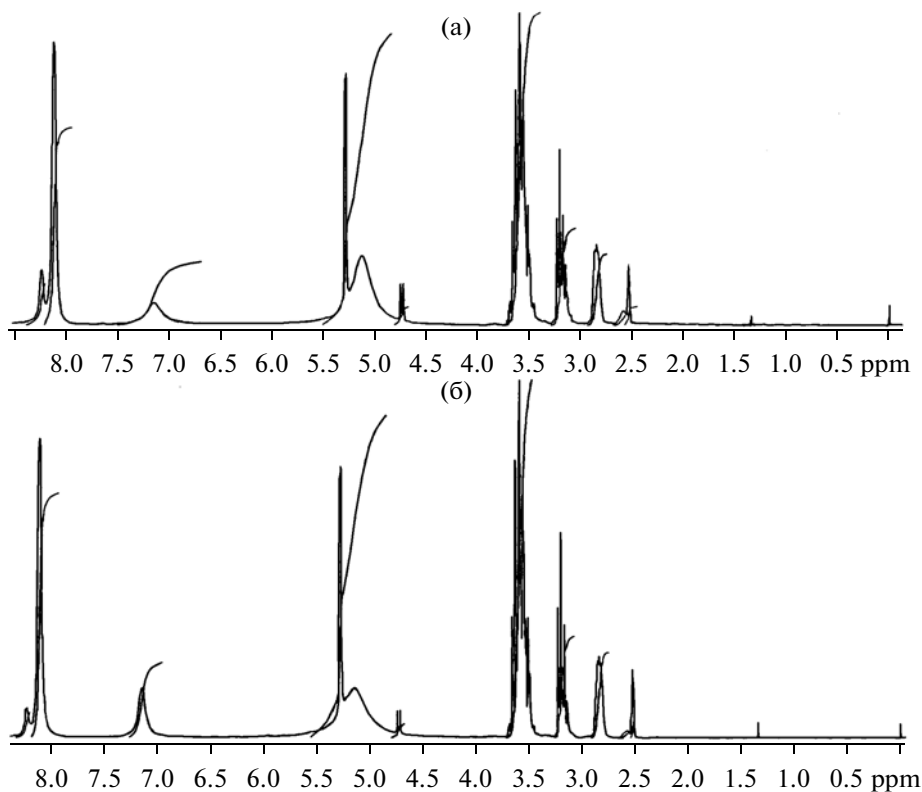


Рис. 3. ПМР-спектры ДГА • НСl из ХГК из гриба *A. mellea* (а) и стандарта ДГА • НСl (б).

меньший процентный выход (23.8%) солянокислого D-глюкозамина из ХГК гриба вида *M. esculenta* (сморчок настоящий). Это можно объяснить тем, что данный вид гриба относится к классу Ascomycetes, тогда как остальные вышеприведенные виды грибов относятся к классу Basidiomycetes.

Исследования показали, что температура плавления с разложением, удельное вращение и содержание основного вещества в образцах соответствуют данным литературы [2, 5].

Степень чистоты образцов ДГА • НСl различного происхождения также контролировалась методом ТСХ на пластинках Silufol-UV 254 в элюенте изопропанол – ацетон – 0.2 М молочная кислота (6 : 3 : 1). Результаты анализа свидетельствуют о наличии на хроматографических пластинках по одному пятну для каждого образца ДГА • НСl, выделенных из ХГК различных видов грибов. Значение  $R_f$  для всех образцов практически одинаково и колеблется в пределах нормы (от 0.51 до 0.53), что указывает на высокую степень чистоты и качества ДГА • НСl различного происхождения (табл. 1).

Анализ ИК-спектров образцов ДГА • НСl из ХГК различных видов грибов (табл. 3) показал, что полосы поглощения полученных целевых продуктов идентичны полосам поглощения стандарта ДГА • НСl и соответствуют данным литературы

[12]. Полоса в области  $3300\text{ см}^{-1}$  для ДГА • НСl относится к валентным колебаниям ОН-группы (межмолекулярные водородные связи полиассоциатов). В ИК-спектрах соединений обнаружены интенсивные полосы в областях  $3080\text{--}3010\text{ см}^{-1}$ ,  $1690\text{--}1640\text{ см}^{-1}$ ,  $1590\text{--}1520\text{ см}^{-1}$ , относящиеся к колебаниям группы NH. В спектрах наблюдаются также полосы поглощения, относящиеся к группам С–О–Н и С–О–С, что также подтверждает структуру соединения [12].

Кроме того, для подтверждения чистоты и качества продуктов были сняты ПМР-спектры всех образцов ДГА • НСl, выделенных из хитина различного происхождения, сопоставление которых с ПМР-спектром стандартного образца ДГА • НСl показало полную их идентичность.

Таким образом, учитывая химические и физико-химические показатели достоверности полученных нами образцов солянокислого D-глюкозамина, можно сделать заключение о принципиальной возможности препаративного получения солянокислого D-глюкозамина высокого качества с достаточно высоким выходом из хитина высших грибов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кочетков Н.К., Бочков А.Ф., Дмитриев Б.А. Химия углеводов. М.: Химия, 1967. 671 с.
2. Лазурьевский Г.В., Терентьева И.В., Шамируин А.А. Практические работы по химии природных соединений. М.: Высшая школа, 1961. 192 с.
3. Verbuggen G., Goemaere S., Veys E.M. // Clin. Rheum. 2002. V. 21. P. 231–243.
4. Вергейчик Е.Н., Афиногенов Г.Е., Корнилов Н.В., Компанцев В.А., Анисимова Л.О., Нетьлько Г.И., Редько К.Г., Афиногенова А.Г. // Травматология и ортопедия России. 2003. № 3. С. 21–23.
5. Гаттерман Л., Виланд Г. Практические работы по органической химии / Ред. В.М. Родионов. М.-Л.: Госхимиздат, 1948. 516 с.
6. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С. // Микробиология. 1995. Т. 64. № 1. С. 27–31.
7. Марков. С. // Фармация (Бълг.). 1964. Т. 14. № 2. С. 30–32.
8. Ившин В.П., Артамонова С.Д., Ившина Т.Н., Шарнина Ф.Ф. // Высокомолек. соед. Б. 2007. Т. 49. № 12. С. 2215–2222.
9. Ившина Т.Н., Артамонова С.Д., Ившин В.П., Шарнина Ф.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 3. С. 348–353.
10. Методы химии углеводов / Ред. Н.К. Кочетков. М.: Мир, 1967. 512 с.
11. Elson L.A., Morgan W.T. // J. Biochem. 1933. V. 27. P. 1824–1828.
12. Казыцына Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. М.: Высшая школа, 1971. 264 с.

## Isolation of D-Glucosamine from Chitin–Glucan Complexes

S. D. Artamonova<sup>a</sup> and F. F. Sharnina<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>b</sup> *Mari State University, Yoshkar-Ola, 424000 Russia*

*e-mail: svetlana.artamonova@gmail.com*

Received March 13, 2012

**Abstract**—The peculiarities of the acidic hydrolysis of chitin–glucan complexes (CGCs) of higher fungi were studied, and the technology for the isolation and purification of D-(+)-glucosamine hydrochloride of high purity from hydrolysate was developed. The composition, properties, and purity of the product were analyzed by a combination of physicochemical methods. The yield of the final product was 20–60%, depending on the chitin content in CGC samples. The amino sugar obtained was a white crystalline odorless powder readily soluble in water, slightly soluble in 95% ethanol, and insoluble in chloroform and other organic solvents. It corresponds to the standard D-(+)-glucosamine hydrochloride in the main qualitative indicators.