

TOMASZ JĘDRZEJCZYK, TOMASZ NOWICKI**Instytut Podstaw Chemii Żywności****Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności****Politechnika Łódzka**

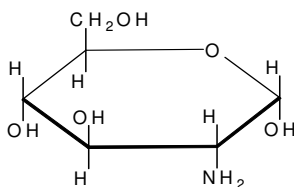
OTRZYMYWANIE CHLOROWODORKU D-GLUKOZAMINY I D-GLUKOZAMINY Z CHITOZANU

Recenzent: dr hab. Krzysztof Śmigielski, prof. PŁ

Tradycyjna metoda otrzymywania chlorowodorku D-glukozaminy i wolnej D-glukozaminy z chityny jest uciążliwa, długotrwała i powoduje powstawanie trudnych do usunięcia produktów ubocznych. W tej metodzie opracowano nowy sposób otrzymywania tych związków z chitozanu. Pozwala to na uniknięcie wszystkich niedogodności związanych z metodą tradycyjną, a zwłaszcza radykalnie skraca czas procesu.

1. Wstęp

D-glukozamina (2-amino-2-deoksy-D-glukoza) (rys. 1) stanowi jednostkę budowy – mer, naturalnych polimerów – chityny (rys. 2) i chitozanu (rys. 3) – zawierających wolne grupy aminowe lub acetyloaminowe [1, 2]. Glukozamina to aminocukier występujący w macierzy chrząstki stawowej w organizmie człowieka. Związek jest niezbędny do budowy glikozaminoglikanów. Glukozamina jest substancją o dużej biodostępności – przyjęta doustnie przez człowieka wchłania się w ok. 98% do krwi [3]. Związek odgrywa ważną rolę w tworzeniu błon komórkowych, kości, skóry, ścięgien, zastawek sercowych oraz naczyń krwionośnych.



Rys. 1. α -D-glukozaminopiranoza

Glukozamina jest składnikiem budulcowym proteoglikanów, odpowiedzialnym za kondycję i sprężystość chrząstek, stymuluje syntezę chrząstki przez chondrocyty, a także jest wskaźnikiem oceny efektów działania substancji chemicznych (benzen, jego pochodne) na organizm człowieka – biomarker [3]. Związek inhibituje wzrost nowotworów [4], ma zastosowania terapeutyczne w leczeniu objawów osteoartrozy – choroby zwyrodnieniowej stawów [5, 6], działa immunopresyjne [7], jest stosowany do syntezy dendrymerów – nośników leków w terapii genowej [8].

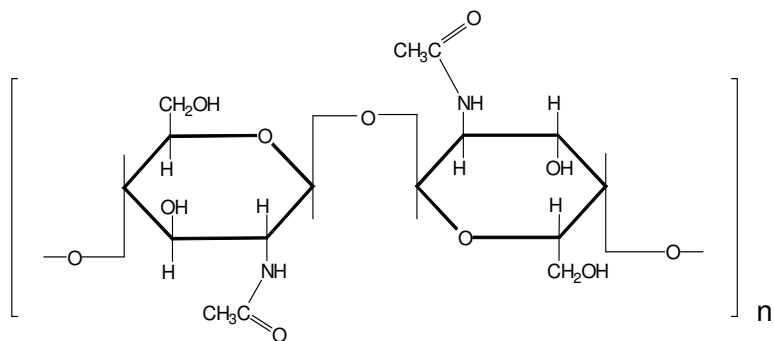
Najbogatsze źródło glukozaminy to raki, krewetki, homary, kraby i małże morskie. Jest źródłem węgla organicznego dla organizmów morskich [9].

D-glukozamina jest otrzymywana z chityny lub chitozanu.

Uzyskuje się ją poprzez hydrolizę chityny zawartej w pancerzach skorupiaków morskich – kraby, krewetki, kryl – w ciągu 8-10 godz. w stężonym kwasie solnym w temperaturze wrzenia po usunięciu pozostałości białek oraz węglanu wapnia.

Otrzymana brunatna zawiesina oprócz chlorowodoru D-glukozaminy zawiera duże ilości kwasu octowego i produktów reakcji ubocznych (estryfikacja grup hydroksylowych). Mieszaninę wytrząsa się z trietyloaminą (1-2 dni) w celu związania chlorowodoru od 2 do 3 powtórzeń. D-glukozaminę oczyszcza się przez krystalizację z etanolu.

W przedstawionej metodzie powstają trudne do usunięcia produkty uboczne: kwas octowy, jego estry i chlorowodorek trietyloaminy. Proces otrzymywania związku jest długotrwały i dość uciążliwy [10, 11].

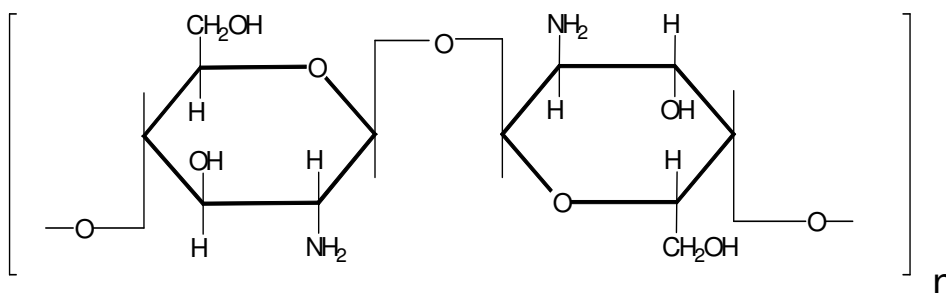


Rys. 2. Chityna ($n = 1000-4000$)

D-glukozamina otrzymywana jest również z chitozanu – produktu deacetylacji chityny, o wysokim stopniu deacetylacji (SD ok. 90%). Chitozany o wyższym SD można uzyskać w temperaturze powyżej 100°C i przy ciśnieniu powyżej 2 atm, jednakże prowadzi to do jednoczesnej degradacji łańcucha chitozanu (znacznie niższa masa cząsteczkowa)[12].

Inny sposób otrzymywania chitozanu to wydzielenie ze ścian komórkowych grzybów strzępkowych *Zygomycetes* (szczepy *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Gongronella*) poprzez alkaliczną separację frakcji nierozpuszczalnej w zasadach. Metoda jest przyjazna dla środowiska, gdyż nie wykorzystuje się w niej stężonych kwasów

mineralnych ani zasad, a otrzymywany produkt ma czystość chemiczną powyżej 99% [13].



Rys. 3. Chitozan ($n = 1000-4000$)

2. Część doświadczalna

Reagenty: chitozan ze ścian komórkowych grzybów o SD 99,8% – Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej, HCl, aceton, metanol, tlenek propylenu i etanol – POCh Gliwice, stopień czystości: cz.

2.1. Synteza chlorowodoru D-glukozaminy

20 g chitozanu w 150 cm³ stężonego (38%) kwasu solnego ogrzewano w 60°C pod chłodnicą zwrotną przez 5 godzin do uzyskania homogenicznego roztworu o barwie ciemnożółtej. Roztwór ochłodzono do temp. pokojowej i po dodaniu węgla aktywnego (pył) mieszano mechanicznie przez 1 godz. Zawiesinę przesączono na lejku Schotta – barwa słomkowożółta i zatężono do połowy objętości (80 cm³) na wyparce próżniowej pod zmniejszonym ciśnieniem (0,5 mmHg), a następnie dodano aceton (80 cm³). Wytrącony biały osad po odsączeniu krystalizowano z 50 cm³ roztworu metanol-aceton (1:1v/v). Otrzymano 19 g krystalicznego chlorowodoru D-glukozaminy (wydajność 95%) $t_{\text{topn.}} = 191-192^{\circ}\text{C}$ (191°C), $[\alpha_{\text{D}}]^{20} + 72^{\circ}$ ($+72^{\circ}$) po 24 godz. ($c = 1$ w H₂O), stopień czystości >99%. Porównano widma ¹H NMR związku i wzorca Merck [14].

2.2. Synteza D-glukozaminy

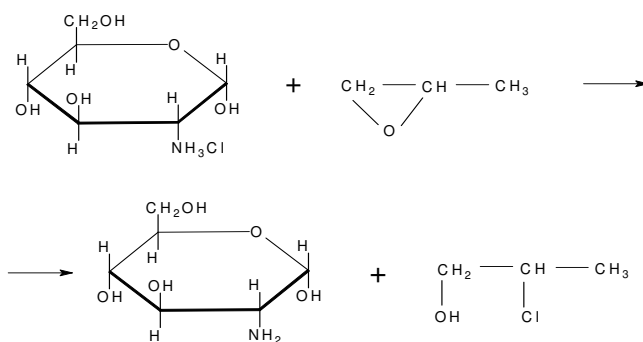
Do 5 g chlorowodoru D-glukozaminy w 30 cm³ bezwodnego metanolu [15] dodano 13,5 g tlenku propylenu i w temperaturze 40-50°C mieszano mieszadłem magnetycznym pod chłodnicą zwrotną w ciągu 8 godzin. Następnie metanol i inne lotne substancje (chlorohydrinę propylenu i nadmiar tlenku propylenu) odparowano na wyparce próżniowej pod zmniejszonym ciśnieniem (0,5 mmHg) i uzyskano biały osad. Osad krystalizowano z 20 cm³ 96% etanolu. Otrzymano 4,6 g D-glukozaminy; wydajność 92%; $t_{\text{topn.}} = 88-88,5^{\circ}\text{C}$ (88°C); $[\alpha_{\text{D}}]^{20} + 100^{\circ} \rightarrow +47^{\circ}$ ($[\alpha_{\text{D}}]^{20} + 100^{\circ} \rightarrow$

+47,5°) po 30 min. ($c = 1$ w H_2O), stopień czystości ok. 99%. Porównano widma 1H NMR związku i wzorca Merck [14].

3. Podsumowanie

W pracy przedstawiono metodę otrzymywania D-glukozyminy z chitozanu, której pierwszy etap – hydroliza w kwasie solnym, przebiega szybciej i w łagodniejszych warunkach niż dla chityny. W tym etapie, ze względu na wysoki SD, unika się powstawania dużych ilości kwasu octowego i jego estrów. Otrzymano osad – chlorowodorek D-glukozyminy – po odsączeniu poddawany krystalizacji z roztworu aceton-metanol.

Kolejny etap – odchlorowodorowanie – przeprowadzono w bezwodnym metanolu poprzez wiązanie chlorowodoru tlenkiem propylenu (rys. 4):



Rys. 4. Otrzymywanie D-glukozyminy z chlorowodoru D-glukozyminy i tlenku propylenu

Przedstawiony sposób jest stosowany do otrzymywania aminokwasów z chlorowodoroków [16].

Surową D-glukozyminę otrzymano po odparowaniu lotnych substancji: metanolu, chlorohydriny propylenu i nadmiaru tlenku propylenu. W produkcie nie stwierdzono obecności jonów chlorkowych (próba z azotanem(V) srebra).

Zastosowanie chitozanu zamiast chityny do syntezy D-glukozyminy wyeliminowało powstawanie uciążliwych do usunięcia produktów ubocznych i ułatwiło wydzielenie produktu. W opisanym sposobie uproszczono sposób wyodrębniania D-glukozyminy i skrócono czas syntezy.

Literatura

- [1] **Muzarelli R.A.A.:** Natural Chelating Polymers of Alginic Acid: Chitin and Chitosan, Pergamon Press, Budapest, 144-226, (1973).
- [2] **Roberts G.A.F.:** Chitin chemistry, The Macmillan Press, London (1992).
- [3] **Stryer L.,** Biochemia, PWN, Warszawa (2001).

- [4] **Quastel J. H., Cantero A.:** Inhibition of tumor growth by D-glucosamine. *Nature*, **171**, 252-254, (1953).
- [5] **Pavelka K., Gatterova J., Olejarova M., Machacek S., Giacobelli G., Rovati L.C.:** Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study, *Arch. Int. Med.*, **162(18)**, 2113-2123, (2002).
- [6] **Reginster J.Y., Deroisy R., Rovati L.C., Lee R.L., Lejeune E., Bruyere O., Giacobelli G., Henrotin Y., Dacre J.E., Gossett C.:** Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial, *Lancet*, **357(9252)**, 251-256, (2001).
- [7] **Ma L.L., Rudert W.A., Harnaha J., Wright M., Machen J., Lakomy R., Qian S., Lu L., Robbins P.D., Trucco M., Giannoukakis N.:** Immunosuppressive Effects of Glucosamine, *J. Biol. Chem.*, **277(42)**, 39343-39349, (2002).
- [8] **Shaunak S., Thomas S., Gianasi E., Godwin A., Jones E., Teo I., Mireskandari K., Luthert P., Duncan R., Patterson S., Khaw P., Brocchini S.,** Polyvalent dendrimer glucosamine conjugates prevent scar tissue formation, *Nat. Biotech.*, **22(8)**, 979-984, (2004).
- [9] **Benner R., Kaiser K.,** Abundance of amino sugars and peptidoglycan in marine particulate and dissolved organic matter, *Limnol. Oceanogr.*, **48(1)**, 118-128, 2003.
- [10] **Purchase E.R., Braun C.E.,** D-Glucosamine hydrochloride, *Org. Synthese*, **26**, 36-37, (1946).
- [11] **Gandhi N., Laidler J. K.,** Preparation of glucosamine hydrochloride from chitin, U.S. Patent, 6486307, 6 pp., (2002).
- [12] kbn.icm.edu.pl
- [13] **Davis L. L., Bartnicki-Garcia S.,** The co-ordination of chitosan and chitin synthesis in *Mucor rouxii*, *J. Gen. Microbiol.*, **130(8)**, 2095-2102, (1984).
- [14] The Merck Index, Merck & CO. INC., wyd. 12, New York (1996).
- [15] **Vogel A.I.,** Preparatyka organiczna, WNT, Warszawa (2006).
- [16] **Jakubke H.S., Jeschkeit H.,** Aminokwasy, peptydy, białka, PWN, Warszawa 1989.

THE PREPARATION OF D-GLUCOSAMINE HYDROCHLORIDE AND D-GLUCOSAMINE FROM CHITOSAN

Summary

The conventional method for the preparation of D-glucosamine hydrochloride and free D-glucosamine from chitin is laborious, timeconsuming and accompanied by the formation of by products which are difficult to remove. In this study, a process was developed for the preparation of these compounds from chitosan, allowing one to avoid all these inconveniences and to considerably shorten the process duration.

Institute of General Food Chemistry
Technical University of Lodz