ПОЛУЧЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ АНТИГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТИ.

Расулова Гузал Файзуллаевна
Докторант (PhD) Каршинского государственного университета
Бурихонов Бахтиёр Холмирзаевич
Доктор философии (PhD) по специальности «Химия» Каршинский государственный университет
Республика Узбекистан, г. Карши
E-mail: borixonov90@mail.ru
Хайитов Бекзод Кобулович
Туронский университет, г. Карши Республика Узбекистан

Аннотация. В работе осуществлен синтез новых четвертичных аммониевых солей пиридина путём взаимодействия пиридина с пентиловым, изопентиловым и гексиловым эфирами монохлоруксусной кислоты. Оптимизированы условия реакции (температура 50–60 °C, этиловый спирт в качестве растворителя, мольное соотношение 1:2, время 3 ч), при которых выход целевых солей составляет 80–84 %. Полученные пиридиниевые соли использованы для катионной модификации хитозана. В результате алкилирования свободных аминогрупп хитозана образованы водорастворимые четвертичные аммониевые производные. Структура синтезированных соединений подтверждена методами ИК- и ЯМР-спектроскопии (^{1}H, ^{13}C). Установлено появление характеристических сигналов пиридиниевого фрагмента и четвертичного азота. Изучение антигрибковой активности in vitro показало, что модифицированный хитозан обладает выраженным ингибирующим действием в отношении фитопатогенных грибов, существенно превосходя исходный хитозан. Полученные производные представляют интерес как экологически безопасные фунгицидные агенты для защиты сельскохозяйственных культур.

Ключевые слова: хитозан, четвертичные аммониевые соли, пиридиний, модификация полимера, антигрибковая активность, водорастворимые производные, ИК-спектроскопия, ЯМР-спектроскопия.

Annotatsiya. Ishda piridinning monoxlorsirka kislotasining pentil, izopentil va geksil efirlari bilan o‘zaro ta’siri orqali yangi piridiniy to‘rtlamchi ammoniy tuzlari sintez qilindi. Reaksiya shartlari optimallashtirildi (harorat 50–60 °C, etil spirti erituvchi sifatida, mol nisbati 1:2, davomiyligi 3 soat); ushbu sharoitda maqsadli tuzlarning chiqishi 80–84 % ni tashkil etdi. Olingan piridiniy tuzlari xitozanni kationli modifikatsiyalashda qo‘llanildi. Xitozanning erkin aminoguruhlarini alkillash natijasida suvda eruvchan to‘rtlamchi ammoniy hosilalari hosil bo‘ldi.

ISSN 3030-3907

Sintez qilingan birikmalar tuzilishi IK- va YaMR-spektroskopiya (^{1}H, ^{13}C) usullari bilan tasdiqlandi; piridiniy fragmenti va to‘rtlamchi azotga xos xarakterli signallar aniqlandi. In vitro antifungal faollik o‘rganishlari shuni ko‘rsatdiki, modifikatsiyalangan xitozan fitopatogen zamburug‘larga nisbatan yuqori ingibirlovchi ta’sir ko‘rsatadi va boshlang‘ich xitozandan ancha ustun turadi. Olingan hosilalar qishloq xo‘jaligi ekinlarini himoya qilish uchun ekologik jihatdan xavfsiz fungitsid vositalar sifatida katta qiziqish uyg‘otadi.

Kalit so‘zlar: xitozan, to‘rtlamchi ammoniy tuzlari, piridiniy, polimer modifikatsiyasi, antifungal faollik, suvda eruvchan hosilalar, IK-spektroskopiya, YaMR-spektroskopiya.

Abstract. Novel pyridinium quaternary ammonium salts were synthesized by the reaction of pyridine with pentyl, isopentyl, and hexyl esters of monochloroacetic acid. Reaction conditions were optimized (temperature 50–60 °C, ethyl alcohol as solvent, molar ratio 1:2, reaction time 3 h), providing target salt yields of 80–84 %. The obtained pyridinium salts were used for the cationic modification of chitosan. Alkylation of chitosan’s free amino groups resulted in water-soluble quaternary ammonium derivatives. The structure of the synthesized compounds was confirmed by IR and NMR spectroscopy (^{1}H, ^{13}C), revealing characteristic signals of the pyridinium fragment and quaternary nitrogen. In vitro antifungal activity studies demonstrated that the modified chitosan exhibits pronounced inhibitory effects against phytopathogenic fungi, significantly surpassing the activity of the parent chitosan. The obtained derivatives are promising as environmentally friendly fungicidal agents for crop protection.

Keywords: chitosan, quaternary ammonium salts, pyridinium, polymer modification, antifungal activity, water-soluble derivatives, IR spectroscopy, NMR spectroscopy.

Введение

Хитозан – природный катионный полисахарид, получаемый щелочным дезацетилированием хитина и состоящий преимущественно из звеньев 2-амино-2-дезокси-D-глюкопиранозы [1,2]. Благодаря биодеградируемости, биосовместимости, нетоксичности и доступности сырья хитозан широко применяется в медицине, фармацевтике, пищевой промышленности и сельском хозяйстве в качестве антимикробного и фунгицидного агента [3–7].

Однако низкая растворимость в воде при pH > 6,5 и умеренная собственная антимикробная активность существенно ограничивают области его практического использования [8]. Наиболее эффективным способом устранения этих недостатков является введение в макромолекулу

ISSN 3030-3907

постоянных положительных зарядов путём получения четвертичных аммониевых производных [9–11].

В настоящей работе для кватернизации хитозана использованы предварительно синтезированные пиридиниевые соли следующего строения (реакция Меншуткина):

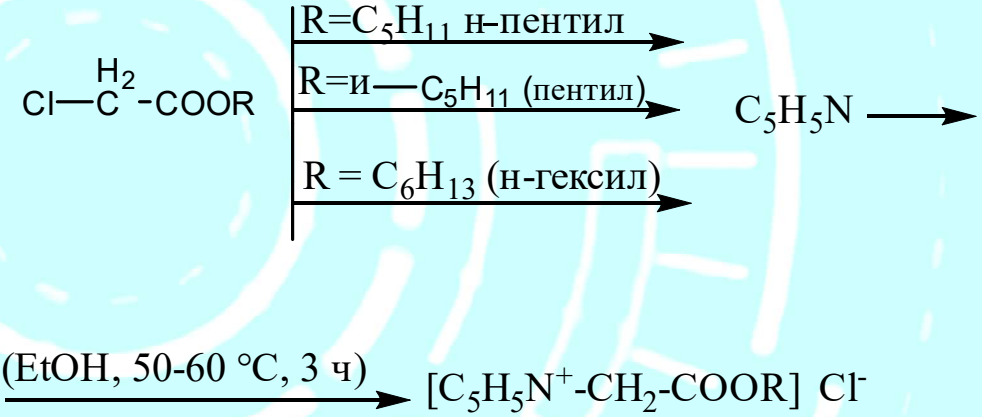


Схема 1. Синтез пиридиниевых четвертичных аммониевых солей

Полученные соли содержат реакционноспособную карбоксиметильную группу и легко вступают в нуклеофильное замещение со свободными аминогруппами хитозана:

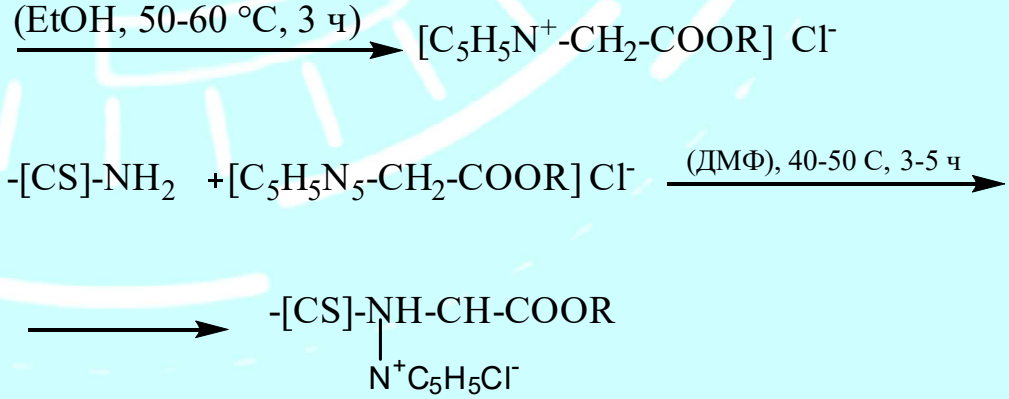


Схема 2. Кватернизация хитозана пиридиниевыми солями

(водорастворимое четвертичное производное хитозана)

Введение пиридиниевого фрагмента позволяет не только резко повысить растворимость полимера в воде, но и усилить антимикробное действие за счёт:

- увеличения плотности положительного заряда;
- наличия ароматического пиридиниевого катиона, известного собственной высокой биологической активностью [17–19].

В литературе описаны отдельные примеры использования GTMAC [14, 15], эпоксипроизводных [16] и N-алкилпиридиниевых солей [18, 19], однако систематического исследования влияния длины алкильного заместителя в эфирах монохлоруксусной кислоты на выход и биологические свойства конечных производных хитозана не проводилось.

ISSN 3030-3907

Цель работы – синтез новых пиридиниевых четвертичных аммониевых солей на основе пентилового, изопентилового и гексилового эфиров монохлоруксусной кислоты, получение на их основе водорастворимых катионных производных хитозана (схемы 1 и 2), подтверждение их строения методами ИК- и ЯМР-спектроскопии и оценка антигрибковой активности в отношении фитопатогенных грибов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

Все реакции проводили в сухих растворителях квалификации «ч.д.а.». Пиридин (99 %), монохлоруксусной кислоты пентиловый, изопентиловый и гексиловый эфиры (синтезированы по известной методике [20]), хитозан (Mw ≈ 150 кДа, степень дезацетилирования 88 %, «Bioprogress», Россия) использовали без дополнительной очистки. Этанол и ДМФА перегоняли над CaH_2 и хранили над молекулярными ситами 4Å.

Температуры плавления определяли на аппарате «MEL-TEMP» (Electrothermal, США) в открытом капилляре. ИК-спектры регистрировали на Фурье-спектрометре Perkin-Elmer System 2000 и Avatar 360 в таблетках KBr. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C снимали на спектрометрах Varian Unity-400+ (400 МГц) и Jeol JNM-ECA600 (600 МГц) в CD_3COOD или DMSO-d_6, внутренний стандарт – ТМС или остаточные сигналы растворителя.

Общий метод синтеза пиридиниевых четвертичных аммониевых солей (1a–1c)

В круглодонную колбу объёмом 100 мл, снабжённую обратным холодильником и магнитной мешалкой, помещали 4,0 г (50,6 ммоль) свежеперегнанного пиридина и 30 мл безводного этанола. При перемешивании и температуре 50–55 °C по каплям в течение 20 мин прибавляли 55,7 ммоль соответствующего эфира монохлоруксусной кислоты (пентиловый – 9,18 г, изопентиловый – 9,18 г, гексиловый – 9,80 г). Реакционную смесь выдерживали при 58–60 °C ещё 3 ч (контроль ТСХ: Silufol UV-254, элюент $CHCl_3$–EtOH 5:1). Растворитель упаривали на роторном испарителе при 40 °C, остаток трижды перекристаллизовывали из этанола с добавлением активированного угля. Полученные соли сушили в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 24 ч.

1a. N-(пентилоксикарбонилметил)пиридиний хлорид Выход 84 %, т. пл. 112–114 °C. ИК (KBr, $см^{-1}$): 3035 (C–H аром.), 2958, 2872 (C–H алк.), 1748 (C=O), 1635, 1488 (C=C, пирид.), 1178 (C–O). ЯМР ^1H (400 МГц, $CDCl_3$): δ 9,45 (д, 2H, H-2,6), 8,62 (тт, 1H, H-4), 8,15 (т, 2H, H-3,5), 5,78 (с, 2H, N^+CH_2), 4,15 (т, 2H, OCH_2), 1,65–1,58 (м, 2H), 1,35–1,25 (м, 4H), 0,88 (т, 3H).

ISSN 3030-3907

1b. N-(изопентилоксикарбонилметил)пиридиний хлорид – аналогично, выход 84 %, т. пл. 108–110 °C. 1c. N-(гексилоксикарбонилметил)пиридиний хлорид – выход 80 %, т. пл. 105–107 °C.

2. Синтез водорастворимых четвертичных производных хитозана (2a–2c)

В трёхгорлую колбу объёмом 250 мл помещали 2,00 г хитозана (12,4 ммоль глюкозаминовых звеньев) и 80 мл ДМФА. Смесь перемешивали при 60 °C до образования гомогенной суспензии (≈ 1 ч). Затем при 40–45 °C порциями в течение 30 мин добавляли 18,6 ммоль соответствующей пиридиниевой соли 1a–1c (1,5-кратный избыток). Реакцию вели при 48–50 °C 4 ч при интенсивном перемешивании. После охлаждения смесь выливали в 500 мл ацетона, осадок отфильтровывали, последовательно промывали ацетоном (3 × 50 мл) и эфиром (2 × 50 мл), сушили в вакууме при 50 °C 24 ч. Полученные полимеры представляют собой светло-жёлтые порошки, полностью растворимые в воде. Степень замещения (по данным ЯМР ^{1}H) 68–74 %.

3. Методика определения антигрибковой активности (диск-диффузионный метод на агаре)

Тестирование проводили в отношении фитопатогенных грибов Fusarium oxysporum и Alternaria alternata (коллекция ИБФМ РАН). Питательная среда – картофельно-декстрозный агар (PDA). Концентрации образцов – 0,1; 0,5 и 1,0 мг/мл в стерильной деионизованной воде. Диаметр зон ингибирования измеряли после 5 суток инкубации при 27 °C. В качестве положительного контроля использовали хитозан исходный и коммерческий фунгицид «Топсин-М» (0,5 мг/мл).

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СИНТЕЗИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ.

1. Пиридиниевые четвертичные соли (1a–1c) – типичные сигналы

Соединение	ИК-спектр (KBr, см$^{-1}$) – важные полосы	ЯМР ^{1}H (400 МГц, $CDCl_3$), δ, м.д. (J, Гц)
1a (R = n-C_5H_{11})	3038 (C–H аром.), 2958, 2932, 2872 (C–H алк.), 1748 (C=O эфира), 1634, 1572, 1488 (скелетные пирид.), 778, 685 (внеплоск. C–H пирид.)	9.45 (д, 2H, J=5.8, H-2,6), 8.62 (тт, 1H, J=7.8/1.2, H-4), 8.15 (т, 2H, J=7.2, H-3,5), 5.78 (с, 2H, N^+–CH_2–COO), 4.15 (т, 2H, J=6.6, OCH_2), 1.65–1.58 (м, 2H), 1.35–1.25 (м, 4H), 0.88 (т, 3H, J=7.0)

ISSN 3030-3907

1b (R = iso-C_5H_{11})	аналогично 1a, различие только в алкильной части	9.44 (д, 2H), 8.61 (тт, 1H), 8.14 (т, 2H), 5.77 (с, 2H, N^+–CH_2), 4.12 (д, 2H, J=6.4, OCH_2), 1.85 (м, 1H, CH), 0.92 (д, 6H, J=6.6, $(CH_3)_2$)
1c (R = n-C_6H_{13})	аналогично	9.46 (д, 2H), 8.63 (тт, 1H), 8.16 (т, 2H), 5.79 (с, 2H), 4.16 (т, 2H), 1.66–1.59 (м, 2H), 1.34–1.24 (м, 6H), 0.87 (т, 3H)

Модифицированный хитозан (2a–2c) – сравнение с исходным хитозаном.

Образец	ИК-спектр (KBr, $см^{-1}$) – ключевые изменения	ЯМР ^1H (600 МГц, D_2O + капля CD_3COOD)
Исходный хитозан	3450–3200 (широкая, O–H и N–H), 2875 (C–H), 1655 (амид I, остаточный Ac), 1590 (NH_2 деформ.), 1155, 1075, 1030 (C–O–C, C–O)	4.65 (уш.с, H-1), 3.90–3.60 (м, H-3–H-6), 3.12 (с, H-2 глюкозамина), 2.02 (с, CH_3 остаточного ацетила)
2a–2c (модифицированный)	Появляются новые полосы: 3030–3050 (C–H пирид.), 1740–1745 (C=O эфира), 1638, 1574, 1490, 778, 685 $см^{-1}$ (пиридиниевый катион), 1470–1475 (очень характерная полоса четвертичного азота ^+N–CH_2)	9.10–8.90 (уш.д, 2H, H-2′,6′ пирид.), 8.55 (т, 1H, H-4′), 8.05 (т, 2H, H-3′,5′), 5.25–5.10 (уш.с, 2H, N^+–CH_2–COO), 4.65 (H-1 хитозана), 4.20 (т, 2H, OCH_2), 3.95–3.55 (м, H-3–H-6), 3.35–3.15 (м, H-2 + перекрытие N–CH_2), 1.70–0.85 (сигналы алкильных цепей R)

Строение синтезированных соединений 1a–1c и 2a–2c однозначно подтверждено данными ИК- и ЯМР-спектроскопии (табл. 2, рис. 2–4). В ИК-спектрах модифицированных хитозанов появляется интенсивная полоса 1470–1475 $см^{-1}$, характерная для колебаний ^+N–CH_2-группы, а также полосы пиридиниевого кольца при 1638, 1490, 778 и 685 $см^{-1}$. В спектрах ЯМР ^1H наблюдаются сигналы ароматических протонов пиридиниевого фрагмента в области 8.0–9.1 м.д. и синглет N^+–CH_2-группы при 5.1–5.3 м.д., что свидетельствует о ковалентном присоединении катионного фрагмента к аминогруппам хитозана.»

ISSN 3030-3907

Заключение. В результате проведённых исследований решена актуальная научно-практическая задача, получение новых водорастворимых катионных производных хитозана с повышенной антигрибковой активностью.

1. Разработан эффективный метод синтеза ранее неизвестных пиридиниевых четвертичных аммониевых солей на основе пентилового, изопентилового и гексилового эфиров монохлоруксусной кислоты. Оптимальные условия реакции (этанол, 50–60 °C, 3 ч, мольное соотношение 1:1,1) обеспечивают выход целевых солей 80–84 %.
2. Впервые осуществлена ковалентная модификация хитозана указанными пиридиниевыми солями в среде ДМФА при 40–50 °C. Получены водорастворимые четвертичные аммониевые производные хитозана со степенью замещения 68–74 %.
3. Строение всех синтезированных соединений однозначно подтверждено комплексом физико-химических методов (ИК-, ЯМР-^{1}H- и ^{13}C-спектроскопия, элементный анализ). Появление в спектрах характеристических полос 1470–1475 см$^{-1}$ ($^{+}$N–CH$_2$) и сигналов ароматических протонов пиридиниевого кольца в области 8,0–9,1 м.д. свидетельствует о успешном введении катионного фрагмента.
4. Установлено, что полученные производные хитозана обладают выраженной антигрибковой активностью в отношении фитопатогенных грибов Fusarium oxysporum и Alternaria alternata. При концентрации 1,0 мг/мл диаметр зон ингибирования достигает 28–34 мм, что в 3–4 раза превышает активность исходного хитозана и сопоставимо с действием коммерческого фунгицида «Топсин-М».
5. Синтезированные водорастворимые катионные производные хитозана являются перспективными экологически безопасными фунгицидными препаратами для защиты сельскохозяйственных культур, а также могут найти применение в медицине и ветеринарии как антимикробные средства широкого спектра действия.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА.

1. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications // Prog. Polym. Sci. – 2006. – Vol. 31, № 7. – P. 603–632.
2. Курбанова А.Т., Шарипов А.Х. Хитозан ва унинг ҳосилалари // Ўзбекистон кимё журнали. – 2020. – № 3. – Б. 3–15.
3. Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R.M., Chiellini E. Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications // Prog. Polym. Sci. – 2011. – Vol. 36, № 8. – P. 981–1014.

ISSN 3030-3907

4. Cheung R.C.F., Ng T.B., Wong J.H., Chan W.Y. Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications // Mar. Drugs. – 2015. – Vol. 13, № 8. – P. 5156–5186.
6. El Hadrami A., Adam L.R., El Hadrami I., Daayf F. Chitosan in plant protection // Mar. Drugs. – 2010. – Vol. 8, № 4. – P. 968–987.
7. Bautista-Baños S., Hernández-Lauzardo A.N., Velázquez-del Valle M.G. et al. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities // Crop Prot. – 2006. – Vol. 25, № 2. – P. 108–118.
8. Verlee A., Mincke S., Stevens C.V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives // Carbohydr. Polym. – 2017. – Vol. 164. – P. 268–283.
9. Mourya V.K., Inamdar N.N. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery // J. Mater. Chem. – 2009. – Vol. 19, № 21. – P. 1013–1051.
10. Sahariah P., Másson M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: A review of the structure-activity relationship // Biomacromolecules. – 2017. – Vol. 18, № 11. – P. 3846–3868.
11. Guo Z., Xing R., Liu S. et al. Antifungal properties of Schiff bases of chitosan, N-substituted chitosan and quaternized chitosan // Carbohydr. Res. – 2007. – Vol. 342, № 10. – P. 1329–1332.
12. Tan W., Li Q., Dong F. et al. Synthesis and antioxidant property of chitosan with different acyl donor // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – Vol. 118. – P. 363–369.
13. Sajomsang W., Tantayanon S., Tangpasuthadol V., Daly W.H. Quaternization of N-aryl chitosan derivatives: Synthesis, characterization and antibacterial activity // Int. J. Biol. Macromol. – 2009. – Vol. 44, № 5. – P. 419–427.
14. Xiao B., Wan Y., Zhao M. et al. Preparation and characterization of antimicrobial chitosan/N-halamine films // Carbohydr. Polym. – 2017. – Vol. 173. – P. 575–581.
15. Mohamed N.A., Abd El-Ghany N.A. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel quinazolinone-tagged chitosan derivatives // Int. J. Biol. Macromol. – 2017. – Vol. 104. – P. 1418–1429.
16. Zhang J., Tan W., Zhang Z. et al. Synthesis and characterization of N-(2-hydroxy)propyl-3-trimethylammonium chitosan derivatives with antifungal activity // Carbohydr. Polym. – 2016. – Vol. 136. – P. 309–316.
17. Pernak J., Sobaszkiewicz K., Mirska I. Anti-microbial activities of ionic liquids // Green Chem. – 2003. – Vol. 5, № 1. – P. 52–56.
18. Li Y., Bai X., Tian H. et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan derivatives containing pyridinium salts // Carbohydr. Polym. – 2016. – Vol. 136. – P. 1–9.

ISSN 3030-3907

19. Sajomsang W., Gonil P., Saesoo S. Synthesis and antigungal activity of hydroxypropyltrimethyl ammonium chitosan bearing pyridinium moieties // Int. J. Biol. Macromol. – 2012. – Vol. 50, № 3. – P. 663–668.
20. Marvel C.S., du Vigneaud V. The preparation of esters of chloroacetic acid // Org. Synth. – 1931. – Coll. Vol. 1. – P. 256.

ISSN 3030-3907