

*На правах рукописи*



**Арасланова Диляра Ильдусовна**

**Конъюгаты полиуроновых кислот с  
ароматическими аминами и 4-аминоантипиринном**

02.00.03 – Органическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук**

21 АВГ 2014



Уфа - 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт нефтехимии и катализа Российской академии наук.

Научный руководитель: кандидат химических наук, доцент  
**Понеделькина Ирина Юрьевна**

Официальные оппоненты: доктор химических наук, доцент  
**Кондратенко Римма Минибаявна**  
ГБОУ ВПО «Башкирский государственный  
медицинский университет» Минздрава РФ (г. Уфа)

кандидат химических наук  
**Салихов Шамиль Мубараквич**  
научный сотрудник ФГБУН Институт  
органической химии УНЦ РАН (г. Уфа)

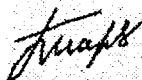
Ведущая организация: **Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт органической  
химии им. Н.Д. Зелинского РАН**

Защита диссертации состоится 16 сентября 2014 г. в «14<sup>00</sup>» часов на заседании диссертационного совета Д 002.062.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт нефтехимии и катализа Российской академии наук по адресу: 450075, Уфа, проспект Октября, 141. Тел./факс: (347)2842750, e-mail: ink@anrb.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института нефтехимии и катализа Российской академии наук. Автореферат размещен на сайтах ИНК РАН и ВАК Министерства образования и науки РФ.

Автореферат разослан «1» августа 2014 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор химических наук, профессор



Шарипов Г. Л.

### Общая характеристика работы

**Актуальность темы.** Полисахариды растительного происхождения – полиуроновые кислоты имеют большое значение в питании, медицине и других областях человеческой деятельности. Альгиновая (из бурых водорослей) и пектовая (из фруктов и овощей) кислоты являются природными полисахаридами, обладают противовоспалительными, противозвонными, антиканцерогенными, антиметастатическими свойствами, применяются для выведения тяжелых металлов из организма. Кислотным гидролизом альгиновой кислоты получают поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-L-гулуруновую и поли- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-маннуруновую кислоты, щелочной деэтерификацией пектина – поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-галактуруновую, региоселективным C(6)-окислением крахмала и целлюлозы – поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D- и поли- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-глюкуроновые кислоты. Природные и полусинтетические полиуроновые кислоты применяются в качестве полисахаридных носителей для биоактивных молекул. Несомненный интерес для медицины представляют конъюгаты полиуроновых кислот с фармакологически значимыми аминами. Их рассматривают как лекарственные препараты нового поколения с пролонгированным терапевтическим эффектом направленного действия. В этой связи синтез новых конъюгатов полиуроновых кислот с фармакозначимыми аминами, изучение их структуры и свойств представляется актуальной задачей.

Работа выполнена в соответствии с планом НИР Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института нефтехимии и катализа Российской академии наук по теме: «Направленные трансформации природных и синтетических токоферолов, тритерпеноидов, экистероидов и полисахаридов» № Гос. регистрации 01201168019.

**Цель и задачи исследования.** Целью исследования являлся синтез новых конъюгатов альгиновой, поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-L-гулуруновой, поли- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-маннуруновой, поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-галактуруновой и поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-глюкуроновой кислот с фармакозначимыми аминами, установление их структуры и биологической активности.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- получить полигулуруновую и полиманнуруновую кислоты кислотным гидролизом альгиновой кислоты, полиглюкуроновую кислоту – C(6)-окислением водорастворимого картофельного крахмала реагентом NaOCl-NaBr-2,2,6,6-тетраметилпиперидиний-1-оксил (ТЕМРО-окисление);
- синтезировать конъюгаты полиуроновых кислот с аминами;

- исследовать структуру конъюгатов методами одно- ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) и двумерной ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC) ЯМР спектроскопии;

- выявить биомедицинские свойства конъюгатов.

**Научная новизна.** Новые конъюгаты альгиновой, поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-L-гулурановой, поли- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-маннурановой, поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-галактуроновой и поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-глюкуроновой кислот с фармакозначимыми ароматическими аминами (*o*-аминофенол, *n*-аминофенол, 4-аминосалициловая, 5-аминосалициловая кислоты, *n*-аминобензойная, *o*-аминобензойная кислоты) и 1-фенил-2,3-диметил-4-аминопиразол-5-оном (4-аминоантипирин) синтезированы под действием 1-этил-3-[3-(диметиламино)пропил]карбодимид (КДИ) и охарактеризованы содержанием амидных звеньев. Показано, что конъюгаты полиглюкуроновой кислоты с аминами содержат изоурейдные звенья, образование которых удастся избежать или существенно снизить путем проведения конъюгации в присутствии КДИ и *N*-гидроксисбензотриазола (HOBT).

Нерегулярное распределение модифицированных (**B**) и немодифицированных (**A**) звеньев в конъюгатах полиуроновых кислот, проявляющееся в расщеплении сигналов их пиранозного цикла в  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрах, впервые предложено характеризовать последовательностью триад звеньев с центром **A** (**AAA**, **AAВ**, **ВАА**, **ВВВ**) и **B** (**ВВВ**, **АВА**, **АВВ**, **ВВА**).

При исследовании ТЕМПО-окисления водорастворимого крахмала гипохлоритом натрия установлено, что в отсутствие бромида натрия как сокатализатора образуются только продукты частичного окисления крахмала, тогда как полигулурановую кислоту в этих условиях получить не удастся. В продуктах окисления крахмала впервые идентифицированы альдегид-гидратные группы. С помощью спектров ЯМР структура частично окисленного крахмала, не содержащего звеньев **C**, охарактеризована содержанием триад: **ВВВ** (54% мольн.), **АВА** (20%), **ААВ+ВАА** (12%) и **ВВВ** (14%).

**Практическая значимость.** Выявлены анальгезирующая активность конъюгата альгиновой кислоты с 4-аминоантипириним и антирадикальные свойства конъюгатов полигулурановой, полиманнурановой и полигалактуроновой кислот с аминфенолами.

**Апробация работы.** Основные результаты исследований представлены на Международной конференции «Актуальные проблемы химии природных соединений» (Ташкент, 2009), XVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Москва, 2011), XIV Молодежной конференции по

органической химии (Екатеринбург, 2011), Всероссийской молодежной конференции «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений» (Уфа, 2012), Всероссийской научной конференции «Теоретические и экспериментальные исследования процессов синтеза, модификации и переработки полимеров» (Уфа, 2013) и VI Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальная математика и ее приложение в естествознании» (Уфа, 2013).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано две статьи и тезисы семи докладов на конференциях.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация включает введение, литературный обзор на тему «Химическая модификация растительных полиуронидов», обсуждение результатов, экспериментальную часть, выводы, приложение и список литературы из 133 ссылок. Работа изложена на 104 страницах и содержит 12 таблиц и 9 рисунков.

*Автор выражает глубокую благодарность заведующему лабораторией органического синтеза ИНК РАН доктору химических наук, профессору Виктору Николаевичу Одинокovu за научные консультации, внимание и помощь, оказанные на всех этапах выполнения работы.*

*Автор выражает благодарность заведующему лабораторией структурной химии ИНК РАН доктору химических наук, профессору Халилову Леонарду Мухибовичу за неоценимую помощь при идентификации полученных соединений.*

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

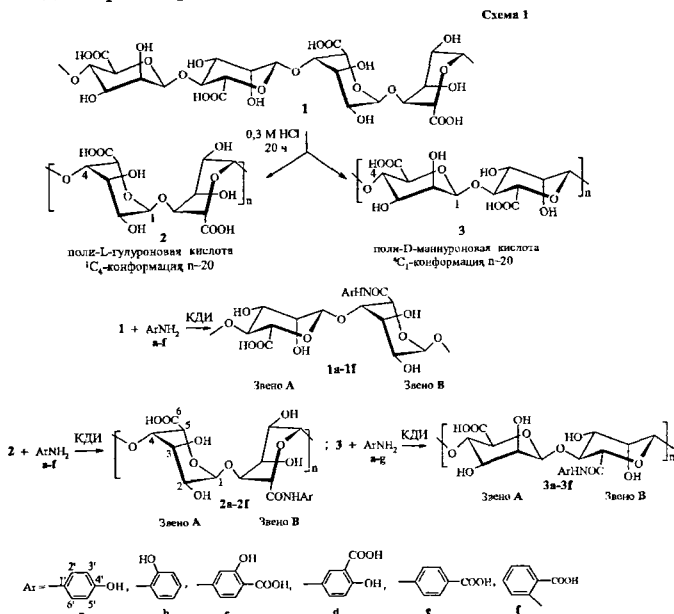
В работе использовали альгиновую кислоту (1), выделенную из бурых водорослей *Laminaria digitata*. Кислотным гидролизом альгиновой кислоты получали поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-L-гулуруоновую (2) и поли- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-маннуруоновую (3) кислоты; последняя содержала ~10% кислоты 2. Поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-глюкуроновую кислоту (6) получали C(6)-окислением водорастворимого крахмала 5 (ГОСТ 10163-76) реагентом NaOCl-NaBr-2,2,6,6-тетраметилпиперидиний-1-оксил (ТЕМРО) в водной среде (рН 10.2). Поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-галактууроноая кислота (4) (из цитрусового пектина), ТЕМРО, NaOCl, КДИ, *n*-аминофенол, 4- и 5-аминосалициловые кислоты – фирмы Acrus, остальные реактивы – *o*-аминофенол, *n*- и *o*-аминобензойные кислоты и 4-аминоантипирин – марки ч.д.а.

Спектры ЯМР полиуроновых кислот и их конъюгатов регистрировали на спектрометре Bruker AVANCE 400 (рабочая частота для ЯМР  $^1\text{H}$  400.13 МГц, для ЯМР  $^{13}\text{C}$  100.62 МГц) для растворов в  $\text{D}_2\text{O}$ , внутренний стандарт – ацетон.

# 1. Конъюгаты альгиновой, полигулуруновой и полиманнуруновой кислот

Альгинаты представляют собой нерегулярные полисахариды, состоящие из остатков D-маннуровой и L-гулуруновой кислот, соединенных между собой  $\beta$ - и  $\alpha$ -гликозидными связями, соответственно.

Реакцией альгиновой кислоты **1** с фармакологически значимыми ароматическими аминами [*n*-аминофенолом (**a**), *o*-аминофенолом (**b**), 4-аминосалициловой (**c**), 5-аминосалициловой (**d**), *n*-аминобензойной (**e**), *o*-аминобензойной кислотами (**f**)] в водной среде, pH 4.75 под действием водорастворимого 1-этил-3-[3-(диметиламино)пропил]карбодимидом ( $\text{Me}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{N}=\text{C}=\text{NEt}$ , КДИ) получены соответствующие конъюгаты **1a-1f** (схема 1). Однако их анализ на содержание и распределение в полисахаридной цепи модифицированных звеньев был затруднен вследствие нерегулярности структуры альгиновой кислоты, а также низкой растворимости конъюгатов и высокой вязкости их водных растворов.



Кислотным гидролизом кислоты **1** были получены низкомолекулярные ( $n \sim 20$ ) поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-L-гулуруновая (**2**) и поли- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-маннуруновая (**3**) кислоты. Взаимодействием кислот **2** и **3** с эквимольным количеством соответствующего амина **a-f** в присутствии КДИ синтезированы их конъюгаты

**2a-2f** и **3a-3f** (схема 1). Спектральные характеристики кислоты **2** и ее конъюгатов **2a-2f** приведены в табл. 1, кислоты **3** и ее конъюгатов **3a-3f** – в табл. 2.

В спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР конъюгатов **2a** и **3a** с *n*-аминофенолом в области ароматических протонов присутствовало всего два сигнала, тогда как в спектрах конъюгатов с несимметрично замещенными ароматическими аминами наблюдалась более сложная картина (табл. 1, 2). Вместе с тем, в спектрах

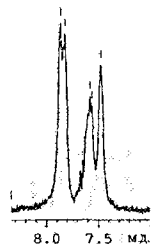
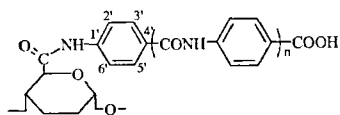


Рис. 1. Фрагмент  $^1\text{H}$  ЯМР спектра конъюгата **2e** с *n*-аминобензойной кислотой.



конъюгатов кислот **2** и **3** с *n*-аминобензойной кислотой в области ароматических протонов  $\delta$  7.57-7.93 м.д. (для **2e**) и 7.75-7.88 м.д. (для **3e**) вместо ожидаемых двух сигналов симметрично расположенных ароматических протонов (H-2', H-6') и (H-3', H-5') наблюдалось несколько сигналов различной интенсивности,

что обусловлено, по-видимому, присутствием продуктов самоконденсации остатков *n*-аминобензойной кислоты – *n*-карбоксо(олигофениламино)фениламидных групп (рис. 1).

В  $^1\text{H}$  ЯМР,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC спектрах конъюгатов **2a-2f** и **3a-3f** наблюдалось расщепление сигналов протона H-4. Сигналы в сильном поле были близки к сигналу исходной кислоты и отвечали звену **A**, тогда как сигналы в модифицированных звеньях **B** находились в более слабом поле (табл. 1,2). Содержание модифицированных звеньев **B** находили из ЯМР спектров по формуле  $V=I_B/I_A+I_B$  ( $I_A$  и  $I_B$  – интенсивность сигналов протонов, отнесенных к звеньям **A** и **B**). Для конъюгатов **2a-2f** использовали интенсивность сигнала аномерного протона H-1 в  $^1\text{H}$  ЯМР спектрах, а для конъюгатов **3a-3f** – интегральную интенсивность протонов в кросс-пиках H-4/C-4, найденную контурным интегрированием в  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC спектрах с помощью стандартной программы TOPSPIN 2.1 «Bruker». Результаты определения содержания звеньев **B** в конъюгатах **2a-2f** и **3a-3f** представлены в табл. 1 и 2. Более высокое содержание звеньев **B** в конъюгатах **2a-2f** свидетельствует о большей реакционной способности полигулуруновой кислоты **2** относительно полиманнуруновой кислоты **3**.

Таблица 1. Содержание звеньев В и спектры  $^1\text{H}$  ЯМР кислоты 2 и ее конъюгатов 2a-2f.

Кислота 2 и ее конъюгаты	Содержание звеньев В, %	Химические сдвиги, м.д.						
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	$\text{H}_{\text{Ar}}$	
2	-	4.97	3.84	3.93	4.05	4.39	-	
2a	50	4.97 5.13	3.88	3.98	A: 4.04 B: 4.14 4.19 4.25	4.51 4.70	6.85 (H-3', H-5') 7.25 (H-2', H-6')	
2b	44	5.01 5.16	3.90	3.97	A: 4.04 B: 4.17 4.29	4.43 4.70	6.92 (H-3', H-5') 7.15 (H-4') 7.47 (H-6')	
2c	50	5.03 5.21	3.89	3.96	A: 4.04 B: 4.14 4.18 4.24	4.52 4.70	7.02 (H-5') 7.29 (H-6') 7.79 (H-2')	
2d	70	5.00 5.13	3.89	3.95	A: 4.04 B: 4.13 4.17 4.26	4.42 4.70	6.86 (H-6') 7.41 (H-2') 7.71 (H-3')	
2e	Смесь продуктов	5.01- 5.21	3.82-4.70				7.57-7.93	
2f	40	4.97 5.15	3.89	3.95	A: 4.03 B: 4.15	4.39 4.70	7.15 (H-4') 7.42 (H-3') 7.79 (H-5') 8.17 (H-2')	

\*[2] = 0.045 ммоль/мл, 2:а-ф.КДИ = 1:1:0.75,  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 4.7-4.8, 20-25°C, 1 ч

Таблица 2. Содержание звеньев В и спектры  $^1\text{H}$  ЯМР кислоты 3 и ее конъюгатов 3a-3f.

Кислота 3 и ее конъюгаты	Содержание звеньев В, %	Химические сдвиги, м.д.					
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	$\text{H}_{\text{Ar}}$
3	-	4.55	3.94	3.67	3.80	3.65	-
3a	35	4.35 4.40	3.87	3.55	A: 3.65 B: 3.96	3.80 4.02	6.68 (H-3', H-5') 7.28 (H-2', H-6')
3b	20	4.37 4.46	3.90	3.63	A: 3.73 B: 4.00	3.82 4.00	7.67 (H-3', H-5') 8.00 (H-2', H-6')
3c	36	4.49 4.60	3.87	3.57	A: 3.69 B: 3.97	3.81 4.04	6.97 (H-5') 7.11 (H-6') 7.74 (H-2')
3d	45	4.55 4.60	3.86	3.61	A: 3.66 B: 3.95	3.78 4.01	6.82-6.87 (H-6') 7.23-7.40 (H-2') 7.68-7.75 (H-3')
3e	25	4.72	3.91	3.60	A: 3.70 B: 3.97	3.82 4.04	7.75-7.88
3f	35	4.55	3.87	3.61	A: 3.69 B: 3.96	3.78 4.02	7.27 (H-4') 7.46 (H-3') 7.86 (H-5') 8.17 (H-2')

\*[3] = 0.045 ммоль/мл, 3:а-ф.КДИ = 1:1:0.75,  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 4.7-4.8, 20-25°C, 1 ч

В спектрах конъюгатов 2a-2f и 3a-3f наблюдалось расщепление сигналов не только протона H-4, но и связанного с ним атома углерода C-4. Причиной расщепления сигналов H-4/C-4 являлось, по-видимому, нерегулярное



распределение в полисахаридной цепи звеньев **A** и **B**, которые могут образовывать гомогенные (**AAA** и **BBB**) и негомогенные (альтернативные) триадные последовательности с центром **A** (**VAA**, **AAV** и **VAV**) или **B** (**VBA**, **ABV** и **VBA**). Распределение триад звеньев в полисахаридной цепи определяет микроструктуру (конформацию) и поведение макромолекул в растворе, их физико-химические и биологические свойства. Типы и содержание триад являются структурной характеристикой нерегулярных полисахаридов. Их можно идентифицировать по сигналам в  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрах и определить содержание из относительной интенсивности характеристических сигналов центрального звена в триаде. При этом сумма всех триад с центром **B** (или **A**) должна соответствовать содержанию звеньев **B** (или **A**), а вероятности последовательностей, являющихся зеркальными отражениями одна другой, должны быть равны, т.е. **AAV=VAA**, **VBA=ABV** и **ABV=VBA**<sup>a</sup>. Примерами полисахаридов, композиционная гетерогенность которых охарактеризована триадными последовательностями звеньев с помощью метода ЯМР, являются альгиновая кислота<sup>b</sup> и пектин<sup>c</sup>. По отношению к конъюгатам полиуроновых кислот такая характеристика не применялась.

Для демонстрации возможности спектрально характеризовать композиционную неоднородность нами получены конъюгаты кислот **2** и **3** с 4-аминоантипирином (4-ААП) – **2g-2n** и **3g-3l** с различным содержанием модифицированных звеньев **B** (схема 2, табл. 3), которые были исследованы методами 1D ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ ) и 2D ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC) ЯМР спектроскопии.

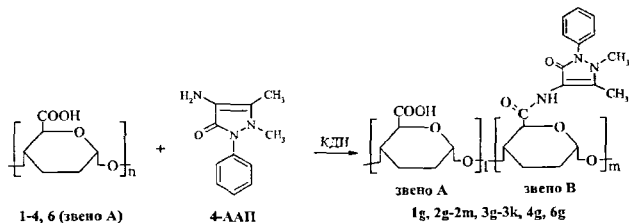


Схема 2

В качестве характеристичных сигналов в спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР были выбраны сигналы Н-4 и С-4 как наиболее чувствительные к изменениям в структуре конъюгатов. Каждый сигнал Н-4 звеньев **B** в спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР

<sup>a</sup> Математическое описание структуры сополимеров в терминах переходных вероятностей, отражающих микроструктуру цепи, приведено в книге Н. А. Платз, А.Д. Литманович, О. В. Ноа, *Макромолекулярные реакции*, М.:Химия, 1977, 256 с.

<sup>b</sup> А. И. Усов, *Успехи химии*, 1999, 68, 1051.

<sup>c</sup> Н. Grasdalen, О. Е. Bakoy, В. Larsen, *Carbohydr. Res.*, 1988, 184, 183.

находился в более слабом поле относительно соответствующего сигнала звеньев А. Смещение сигналов С-4 звеньев В в спектрах  $^{13}\text{C}$  ЯМР происходило в сильное поле (табл. 3). В спектрах HSQC конъюгатов 2g-2m и 3g-3k (табл. 3) кросс-пик Н-4/С-4 расщеплялся на несколько сигналов различной интенсивности. Контурным интегрированием находили интенсивность каждого из сигналов Н-4/С-4 в HSQC спектре и по формуле  $V=I_B/I_A+I_B$  рассчитывали содержание звеньев В в 2g-2m и 3g-3k.

На примере конъюгата 2k (55% звеньев В) продемонстрирована методика определения типа и содержания триад методом ЯМР. В HSQC спектре конъюгата 2k наблюдалось 7 кросс-пигов Н-4/С-4 (рис. 2).

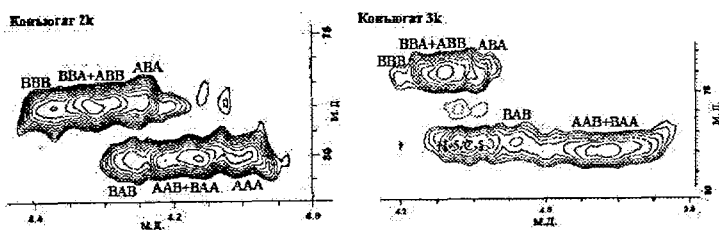


Рис. 2. Фрагменты спектров HSQC конъюгатов 2k и 3k в области сигнала Н-4/С-4.

Четыре сигнала Н-4 ( $\delta$  4.10, 4.17, 4.21 и 4.26 м.д.), коррелирующие с сигналом  $\delta$  80.2 м.д. С-4, были отнесены к триадам с центром А. Сигнал Н-4 ( $\delta$  4.10 м.д.), наиболее близкий к кросс-пику Н-4/С-4 звена А ( $\delta$  4.05/80.0 м.д.) в спектре интактной кислоты 2 (табл. 3), соответствовал триадам ААА. Следующие сигналы ( $\delta$  4.17/80.2 и 4.21/80.2) отвечали Н-4/С-4 центрального звена триад ВАА+ААВ. Последний сигнал ( $\delta$  4.26/80.2 м.д.) отнесен к триадам ВАВ. Подобным образом было сделано отнесение сигналов для триад с центром В:  $\delta$  4.25/77.9 м.д. – АВА,  $\delta$  4.32/78.1 м.д. – ВВА+АВВ и  $\delta$  4.37/78.1 м.д. – ВВВ. Содержание каждой из триад находили из отношения интенсивности каждого сигнала протонов в спектре HSQC к их суммарной интенсивности  $I_A+I_B$  (100%) (табл. 3). Сумма триад с центром В (49%) удовлетворительно отвечала содержанию звеньев В (55%). О достоверности полученных результатов свидетельствовало равенство вероятностей последовательностей АВ (0.48) и ВА (0.47), рассчитанных по формулам, приведенным в работе<sup>а</sup>.

<sup>а</sup> Н. А. Платз, А. Д. Литманович, О. В. Ноа, *Макромолекулярные реакции*, М.:Химия, 1977, 256 с.

В HSQC спектре конъюгата **3k** (56% звеньев **B**) сигнал H-4/C-4 расщеплялся на 6 сигналов (рис. 2). Их отнесение было выполнено по аналогии с конъюгатом **2k**. Однако точность распределения триад в конъюгате **3k** была ниже, что обусловлено, по-видимому, примесью (~10%) конъюгата **2k**.

Для остальных образцов конъюгатов типы триад и их содержание были рассчитаны аналогично образцу **2k** и приведены в таблице 3.

**Таблица 3.** Спектры  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР кислот **2** и **3** и их конъюгатов **2g-2n\***, **3g-3l\***, содержание звеньев **B** в конъюгатах (в расчете на 100 сахаридных звеньев)

Кислота <b>2</b> и ее конъюгаты	Время реакции, сек	B, %	$\delta_{\text{H-4}}/\delta_{\text{C-4}}$ , м.д.	Триады (%)	Кислота <b>3</b> и ее конъюгаты	Время реакции, сек	B, %	$\delta_{\text{H-4}}/\delta_{\text{C-4}}$ , м.д.	Триады (%)
<b>2</b>	0	0	4.05 / 80.0	AAA (100)	<b>3</b>	0	0	3.80 / 78.0	AAA (100)
<b>2g</b>	20	6	4.07 / 80.2 4.22 / 79.6 4.31 / 78.0	AAA (80) AAB+BAA (14) ABA (6)	<b>3g</b>	40	14	3.88 / 77.9 3.94 / 78.0 4.0 / 77.8 4.09 / 74.1 4.14 / 74.0	AAA (70) AAB+BAA (11) BAB (5) ABA (5) BBA+ABB (9)
<b>2h</b>	40	15	4.10 / 80.0 4.24 / 80.1 4.25 / 77.8 4.30 / 77.7	AAA (71) BAB (13) ABA (6) BBA+ABB (10)	<b>3h</b>	80	22	3.87 / 77.9 3.96 / 77.8 4.10 / 73.8 4.13 / 73.9	AAA (69) BAB (14) ABA (7) BBA+ABB (10)
<b>2i</b>	60	29	4.07 / 80.0 4.20 / 80.0 4.25 / 77.6 4.30 / 77.7	AAA (66) BAB (14) ABA (7) BBA+ABB (13)	<b>3i</b>	165	35	3.88 / 78.0 4.10-4.13 / 74.1	AAB+BAA (70) ABA (30)
<b>2j</b>	150	40	4.08 / 80.2 4.16 / 79.9 4.26 / 78.2 4.37 / 78.3	AAA (32) AAB+BAA (28) BBA+ABB (28) BBB (12)	<b>3j</b>	345	46	3.89 / 78.0 4.12 / 74.0	BAB (52) ABA (48)
<b>2k</b>	360	55	4.10 / 80.2 4.17, 4.21 / 80.2 4.26 / 80.2 4.25 / 77.9 4.32 / 78.1 4.37 / 78.1	AAA (14) BAA+AAB (27) BAB (10) ABA (12) BBA+ABB (24) BBB (13)	<b>3k</b>	600	56	3.9-3.94 / 78.0 4.00 / 78.0 4.09 / 74.2 4.14 / 74.0 4.20 / 74.3	AAB+BAA (35) BAB (8) ABA (11) BBA+ABB (41) BBB (5)
<b>2l</b>	600	60	4.10 / 80.1 4.17 / 80.0 4.25 / 80.2 4.25 / 78.0 4.32 / 77.9 4.37 / 78.0	AAA (8) BAA+AAB (22) BAB (15) ABA (13) BBA+ABB (26) BBB (16)	<b>3l</b>	1200	100	4.09 / 74.0	BBB (100)
<b>2m</b>	900	80	4.24 / 80.0 4.26 / 78.3 4.35 / 78.0	BAB (13) BBA+ABB (23) BBB (64)					
<b>2n</b>	1200	100	4.27 / 78.3	BBB (100)					

\*[**2,3**] = 0.045 ммоль/мл, **2,3:4**-ААП:КДИ = 1:1.5:1.5, H<sub>2</sub>O, pH 4.7-4.8, 20-25°C, 1ч (для **2g-2m, 3g-3k**); **2,3:4**-ААП:КДИ = 1:4:2, H<sub>2</sub>O, pH 4.7-4.8, 20-25°C, 1ч (для **2n, 3l**)



**Рис. 3.** Экспериментальные вероятности (♦, •, Δ) частоты встречаемости А-центрированных триад в конъюгатах 2g-2n и рассчитанные по Бернулли (линии 1,2,3).

Для триад AAA: ♦, 1; для триад AAB+VAA: •, 2; для триад VAB: Δ, 3.

удовлетворительно совпали с рассчитанными по Бернулли (рис. 3), что свидетельствовало о случайном распределении звеньев в частично модифицированных конъюгатах 2g-2n.

Таким образом, конъюгаты полигулуруновой и полиманнуруновой кислот с 4-ААП впервые с помощью спектров HSQC охарактеризованы распределением триадных последовательностей звеньев в полисахаридной цепи (табл. 3). Из таблицы 3 также видно, что при одной и той же продолжительности реакции содержание звеньев В в соответствующих конъюгатах было практически одинаковым, что свидетельствует о близкой реакционной способности полигулуруновой 2 и полиманнуруновой 3 кислот в реакции с 4-ААП (в отличие от ароматических аминов).

## 2. Конъюгаты полигалактуруновой кислоты

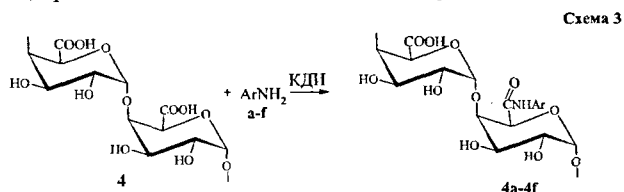
В последнее время проявился интерес к полигалактуруновой кислоте как биомедицинскому материалу. В литературе сообщалось о синтезе ее кватернизированных и сульфированных производных, а также кросс-сшитых с низкомолекулярной гиалуруновой кислотой гибридных полисахаридов, перспективных для контролируемой доставки лекарств<sup>a</sup> и профилактики спаечных процессов после хирургических операций<sup>b</sup>.

<sup>a</sup> I. Simkovic, R. Mendichi, I. Uhlirikova, *Carbohydr. Polym.*, 2008, 74, 611.

<sup>b</sup> H.-H. Peng, J.-W. Chen, T.-P. Yang, C.-F. Kuo, Y.-J. Wang, M.-W. Lee, *J. Bioact. Compat. Pol.*, 2011, 26, 552.

композиционно неоднородных полисахаридов можно применить статистическую модель Бернулли. Для образцов 2g-2n были построены зависимости экспериментальной вероятности ( $P$ ) встречаемости триад с центром А, а по Бернулли рассчитаны их вероятности для экспериментально найденного содержания звеньев В. Как видно, найденные экспериментально вероятности встречаемости А-центрированных триад

Конъюгацией полигалактурановой кислоты **4** с ароматическими аминами **a-f** нами получены соединения **4a-4f** (схема 3), от которых можно ожидать проявления антиоксидантных, противовоспалительных и анальгезирующих свойств.



Ar как в схеме 1

Содержание модифицированных звеньев **B** в конъюгатах **4a-4f** найдено из отношения интенсивностей приведенных к одному протону сигналов ароматических протонов ариламидных групп в области  $\delta$  6.77-8.24 м.д.  $^1\text{H}$  ЯМР и одного из протонов пиранозного цикла (H-2, H-3 или H-4) (табл. 4). Отнесение сигналов протонов выполнено с помощью  $^1\text{H}$  и  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC спектров.

Таблица 4. Содержание звеньев **B** и спектры  $^1\text{H}$  ЯМР кислоты **4** и ее конъюгатов **4a-4f**.

Кислота <b>4</b> и ее конъюгаты	Содержание звеньев <b>B</b> , %	Химические сдвиги, м.д.					
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H <sub>Ar</sub>
<b>4</b>	-	4.99	3.71	3.92	4.35	4.70	-
<b>4a</b>	41	4.98 5.11	3.72	3.95 4.08	A: 4.36 B: 4.44	4.70 4.98	6.83 (H-3'), H-5') 7.22 (H-2', H-6')
<b>4b</b>	46**	4.99 5.13	3.70	3.96 4.09	A: 4.35 B: 4.40 4.47 4.52 4.54	4.70 4.99	6.77 (H-3') 6.84 (H-5') 7.07 (H-4') 7.53 (H-6')
<b>4c</b>	47	5.00 5.10	3.73	3.93	A: 4.32 B: 4.38 4.42 4.49	4.70 5.00	6.93 (H-2') 7.04 (H-6') 7.70 (H-5')
<b>4d</b>	62**	5.01	3.77	3.99	A: 4.37 B: 4.47	4.70 5.01	6.88 (H-3') 7.41 (H-2') 7.71 (H-6')
<b>4e</b>	40	5.00 5.14	3.71	3.93	A: 4.35 B: 4.39 4.49 4.56	4.70 5.00	7.48-7.86
<b>4f</b>	53	5.00 5.15	3.71	3.94	A: 4.35 B: 4.43 4.50 4.54	4.70 5.00	7.20 (H-4') 7.48 (H-3') 7.87 (H-5') 8.24 (H-2')

\*[4] = 0.045 ммоль/мл, 4:a-f:KDI = 1:1:0.75, H<sub>2</sub>O, pH 4.7-4.8, 20-25°C, 1ч

\*\* Отнесения сигналов выполнены с помощью  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC спектров

По реакционной способности кислота **4** сопоставима с полигулурановой кислотой **2**. Растворимость конъюгатов **4a-4f** в воде была хуже, чем конъюгатов **2a-2f** и **3a-3f**.

Для демонстрации применимости разработанного на конъюгатах кислот **2** и **3** с 4-ААП метода определения структуры конъюгатов в терминах триадных последовательностей нами синтезирован конъюгат (**4g**) полигалактурановой кислоты с 4-ААП (75% остатков 4-ААП) (схема 2). По спектру HSQC (рис. 4) найдено содержание звеньев **B**, установлены типы и содержание триад для конъюгата **4g** (табл. 5). Протон Н-4 представлен четырьмя сигналами с  $\delta$  4.36, 4.43, 4.49 и 4.55 м.д. (табл. 5, рис. 4). Наиболее интенсивный из них ( $\delta$  4.55 м.д.) коррелировал с сигналом  $\delta_C$  75.6 м.д. (спектр HSQC) и принадлежал, очевидно, звеньям **B** в триадах **BBB** (их содержание 50% мольн.) (табл. 5). Сигнал ( $\delta$  4.49 м.д.), отвечал звену **B** в триадах **BBA+ABB**, суммарное содержание которых составило 23%. Сигнал  $\delta$  4.33 м.д. для звена **A** в последовательности **AAA** совпадал с сигналом Н-4 в спектре кислоты **4** ( $\delta$  4.35 м.д., табл. 4). Сигнал с  $\delta$  4.36 м.д. может быть отнесен к звену **A** в триадах **AAB+BAА**=16%, а сигнал с  $\delta$  4.43 м.д., вероятно, соответствует звеньям **A** и **B** в триадах **BAВ** и **ABA** (**BAВ**+**ABA**=11%). Содержание звеньев **B** определяется суммой всех триад с центром **B**:  $B=(BBA+ABB)+ABA+BBB$ .

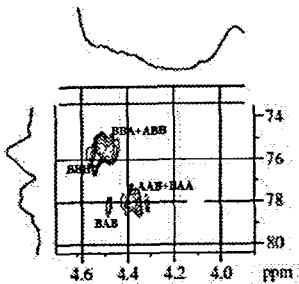


Рис. 4. Фрагмент спектра HSQC конъюгата **4g** в области сигнала Н-4/С-4.

Однако только сумма триад **BBB** и (**BBA+ABB**) ( $50\%+23\%=73\%$ ) наиболее близка к содержанию звеньев **B** (75%), найденному по интенсивности сигналов ароматических протонов. Из этого следует, что триады **ABA** в конъюгате **4g** отсутствуют. Таким образом, триады в конъюгате **4g** распределены следующим образом: 50% **BBB**, 23% (**BBA+ABB**), 11% **BAВ** и 16% (**AAB+BAА**) (табл. 5).

Содержание триад с центром **A** удовлетворительно совпало с рассчитанным по Бернулли (табл. 5), что свидетельствует в пользу случайного распределения звеньев **A** и **B** в конъюгате **4g**.

Таблица 5. Характеристические сигналы протона Н-4 и атома С-4, содержание и типы триадных последовательностей в конъюгате **4g**

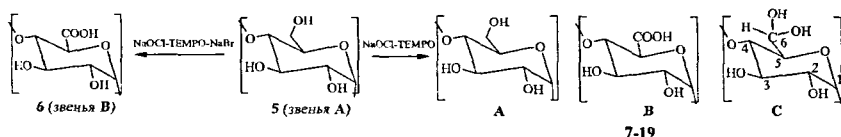
$\delta_{H-4} / \delta_{C-4}$ , м.д.	Типы триад	Содержание триад, % мольн.	Вероятности триад по Бернулли, %
4.36 / 78.0	AAB+BAА	16	14
4.43 / 77.8	BAВ	11	9
4.49 / 75.6	BBA+ABB	23	28
4.55 / 75.6	BBB	50	42

### 3. ТЕМПО-окисление картофельного крахмала

Селективное окисление полисахаридов гипохлоритом натрия в водной среде под действием нитроксильного радикала 2,2,6,6-тетраметилпиперидиний-1-оксида (ТЕМПО) и бромида натрия является наиболее эффективным методом получения полусинтетических полууроновых кислот, перспективных для практического применения. Этим методом были окислены как водорастворимые (крахмал, пуллулан, амилодекстрин), так и нерастворимые в воде полисахариды (целлюлоза, хитин).

Окислением реагентом NaOCl/NaBr/ТЕМПО при 5°C, pH 10 картофельный крахмал **5** превращен в поли- $\alpha$ -D-глюкуроновую кислоту<sup>a</sup> **6** (схема 4). Для выяснения необходимости применения бромида натрия при получении кислоты **6** нами исследовано окисление крахмала в отсутствие бромида. Установлено, что при различных соотношениях реагентов, 20-40 °C и pH 10.2 образуются только продукты частичного окисления крахмала **7-19**, содержащие звенья **A**, **B** и **C** (схема 4).

Схема 4



Содержание (%) звеньев **B** в образцах **7-19** после их обработки катионитом Dowex 50 и высушивания было определено кислотно-основным титрованием и рассчитано по формуле (1):

$$B = \frac{N_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \times 100}{(m - N_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \times M) / 162 + N_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}} \quad (1), \text{ где } N_{\text{NaOH}} - \text{титр NaOH (M/дм}^3\text{)}, V_{\text{NaOH}}$$

объем NaOH (дм<sup>3</sup>), пошедший на титрование образца,  $m$  – масса сухого образца (г), 162 молярная масса (г/моль) глюкозы (звено А);  $M$  – молярная масса звена **B**, равная 176.

При соотношении реагентов 5:NaOCl:ТЕМПО=1:(1.3-2.0):0.01, 20°C и концентрации крахмала 0.027-0.045 моль/л содержание звеньев **B** составило 7-20% (табл. 6). При увеличении NaOCl в три раза содержание звеньев **B** составило 30% (образец **12**). Увеличение времени, температуры реакции до 30-40°C и концентрации реагентов также способствовало увеличению образования звеньев **B**,

<sup>a</sup> А. Е. J. De Nooy, А. С. Besemer, Н. van Bekkum, *Carbohydr. Res.* 1995, 269, 89.

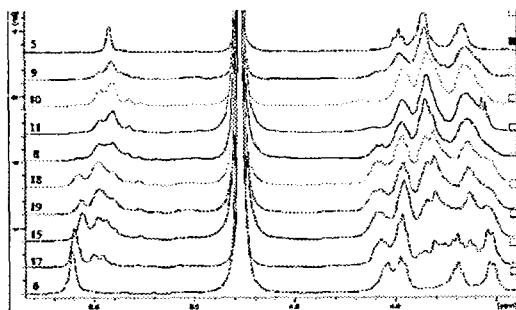
вплоть до 73% (табл. 6). Повышение температуры свыше 40°C и увеличение концентрации реагентов приводило к сильной деструкции крахмала и образованию побочных продуктов, тогда как полиглюкуронат **6** даже в этих условиях не был обнаружен в продуктах реакции.

**Таблица 6.** Условия окисления и характеристика образцов **7-19** частично-окисленного крахмала **5**.

Образцы	Конц. крахмала [моль/л]	Молярное соотношение реагентов 1:NaOCl:ТЕМРО	t [°C]	Время [min]	В [%], кислотно-основное титрование	С [%] <sup>а</sup>	Сумма В+С [%] <sup>б</sup>	В [%], (В+С) <sup>а</sup> -С <sup>а</sup>	А [%], 100-(В+С)
7	0.027	1:1.8:0.01	20	18	18	21	41	20	61
8	0.037	1:2.0:0.01	20	17	20	11	33	22	69
9	0.045	1:1.3:0.01	20	5	7	5	12	7	88
10	0.045	1:1.3:0.01	20	10	14	23	34	11	63
11	0.045	1:1.8:0.01	20	8	16	37	50	13	47
12	0.045	1:3.0:0.01	20	10	30	13	42	29	57
13	0.027	1:1.8:0.01	30	5	21	24	47	23	55
14	0.027	1:1.8:0.01	30	30	32	20	53	33	48
15	0.037	1:2.0:0.01	30	30	60	16	78	62	24
16	0.045	1:2.2:0.01	30	10	42	22	53	31	34
17	0.125	1:1.9:0.01	30	40	73	7	87	80	20
18	0.125	1:1.9:0.01	40	5	30	9	42	33	61
19	0.125	1:1.9:0.01	40	10	48	7	52	45	45

а) Найдено из интегральной интенсивности сигналов для Н-С(6) протонов при 5.26-5.33 м.д.

б) Найдено из интегральной интенсивности сигналов для Н-С(5) протонов при 4.07-4.17 м.д.



**Рис. 5.** <sup>1</sup>Н ЯМР спектры крахмала **5**, полиглюкуроната **6**, частично окисленных образцов **8-11, 15, 17-19**.

спектральные характеристики, а также спектры крахмала **5** и полиглюкуроната **6** [получен в присутствии бромида (схема 4)], представлены в табл. 7.

Для всех продуктов окисления **7-19** были зарегистрированы протонные спектры, некоторые из которых показаны на рис. 5. В качестве модельных выбраны образцы **15** и **17** с наиболее разрешенными спектрами <sup>1</sup>Н ЯМР и охарактеризованы с помощью 1D и 2D ЯМР спектроскопии (<sup>1</sup>Н-<sup>1</sup>Н COSY, <sup>1</sup>Н-<sup>13</sup>С HMQC). Их



**Таблица 7.** Отнесения сигналов в  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрах крахмала **5**, полиглюкуроната **6** и образцах частично окисленных крахмалах **15** и **17**

НОМЕР АТОМА	Соединения							
	5		6		15		17	
	Химические сдвиги, м.д.							
	H	C	H	C	H	C	H	C
1	5.40	100.4	5.60	97.6	5.40, 5.45 (A) 5.49, 5.56 (B)	97.7, 98.1 (B) 99.1-99.3 (A)	5.39, 5.45 (A), 5.51, 5.60 (B)	97.1, 97.8 (B) 99.3 (A)
2	3.65	72.2	3.52	72.5	3.63 (A) 3.56 (B)	71.7	3.56-3.58	71.7
3	3.96	74.0	3.98	73.7	3.96	73.3	4.00	72.9
4	3.65	77.4	3.69	76.2	3.65-3.70	75-7-76.2	3.65-3.72	76.0 (B), 76.4-76.6 (A)
5	3.84	72.2	4.04	73.0	3.84 (A), 4.04-4.10 (B)	70.3(A), 73.0 (B+C)	3.84 (A), 4.10 (B)	70.3 (A), 72.0-72.5 (B)
6	3.80 (b) 3.88 (a)	61.1	-	176.6	3.78-3.86 (a,b, A), 5.28, 5.33 (C)	60.8-61.3 (A) 87.6 (C), 175.6-176.5 (B)	3.78-3.80 (a,b, A), 5.26, 5.31 (C)	60.2 (A), 176.1 (B)

В аномерной области ( $\delta$  5.26-5.60 м.д.)  $^1\text{H}$  ЯМР спектров образцов **15** и **17** наблюдался набор сигналов (рис. 5). Два из них (область 5.26-5.33 м.д.) коррелировали с сигналами атомов углерода ( $\delta$  ~87 м.д.) и, следовательно, принадлежали Н-С(6) протонам альдегид-гидратных групп (6,6-дигидроксиметиновых групп, звенья С) (схема 4). Сигналы свободных альдегидных групп в области  $\delta$  ~200 м.д. в  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрах отсутствовали. Дополнительные к аномерным сигналам с  $\delta$  5.40 (для крахмала **5**) и 5.60 м.д. (для полиглюкуроната **6**), сигналы с  $\delta$  5.45, 5.49, 5.51, 5.56 м.д. в  $^1\text{H}$  ЯМР спектрах образцов **15** и **17** в  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY спектрах имели кросс-пики с сигналами в области  $\delta$  3.46-3.56 м.д., принадлежащими протонам Н-2, и их следует отнести к протонам Н-1 в каждом из звеньев А, В и С образцов **15** и **17**. Ранее сигналы ( $\delta$  5.45, 5.49, 5.51, 5.56 м.д.) относили к Н-6 протонам альдегид-гидратных или гемиацетальных групп, образующихся в реакции альдегидных групп со спиртовыми группами крахмала<sup>а</sup>. Однако в спектрах COSY ни один из этих сигналов не коррелировал с Н-5 протонами, что свидетельствовало об отсутствии гемиацетальных групп в **15,17**. Таким образом, впервые сделано правильное отнесение аномерных сигналов Н-1 в спектрах частично окисленных продуктов крахмала.

Из отношения интенсивностей сигналов ( $\delta$  5.26-5.33 м.д.) и сигналов аномерных протонов (Н-1) ( $\delta$  5.39-5.60 м.д.) в образцах **7-19** найдено содержание альдегид-гидратных звеньев С (табл. 6). Высокое содержание звеньев С наблюдалось в образцах, полученных при низкой концентрации реагентов (0.037-

<sup>а</sup> Y. Kato, R. Matsuo, A. Isogai. *Carbohydr. Polym.* 2003, 51, 69.

0.045 моль/л) и непродолжительном времени окисления. При более высокой концентрации реагентов (0.125 моль/л) содержание звеньев С не превысило 7-9%.

Таким образом, в отсутствие бромидов достигается только частичное окисление крахмала, и в продуктах окисления наряду с карбоксильными звеньями образуются альдегид-гидратные звенья, присутствие которых снижает вязкость растворов модифицированного крахмала, увеличивает растворимость и прозрачность растворов. Имеются сведения об улучшении пленкообразующих и когезионных свойств такого модифицированного крахмала, что востребовано в текстильной, бумажной и строительной промышленности. Действием аминов на частично окисленный крахмал можно ввести *N*-алкиламинные группы, а под действием диаминов получить кросс-сшитые полисахариды.

Для определения в образцах частично окисленного крахмала содержания звеньев В наряду с кислотно-основным титрованием нами был также использован метод ЯМР. Интенсивность уширенного сигнала в области 4.07-4.17 м.д. отвечала суммарному содержанию звеньев В+С, а звенья С определены из интенсивности протонов Н-6 в области 5.26-5.33 м.д. За вычетом из В+С содержания звеньев С получали содержание звеньев В, которое удовлетворительно совпало с результатами кислотно-основного титрования (табл. 6). Содержание неокисленных звеньев А следовало из разности 100-(В+С) (табл. 6).

Для образца 17, содержащего наименьшее количество звеньев С (7%, табл. 6) с использованием метода ЯМР была определена его композиционная неоднородность.

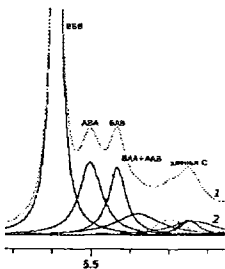


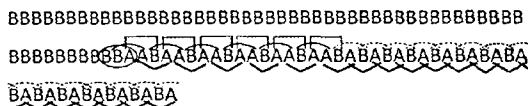
Рис. 6. 1 – Фрагмент  $^1\text{H}$  ЯМР спектра образца 17 в области аномерных протонов; 2 – пики деконволюции.

Для определения типа и содержания триад была использована аномерная область  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектров 17. В  $^1\text{H}$  ЯМР спектре наблюдалось четыре сигнала для протонов Н-С(1): 5.39, 5.45, 5.51 и 5.60 м.д. (рис. 6) с относительной интенсивностью 12, 14, 20 и 54% соответственно. Наиболее интенсивный сигнал при 5.60 м.д., коррелирующий с  $\delta_{\text{C}}$  97.1 м.д., совпадал с химсдвигом полиглюкуроната 6 (табл. 7) и был отнесен к звеньям В в гомогенной триаде ВВВ (54%); соседний сигнал ( $\delta$  5.51 м.д.,  $\delta_{\text{C}}$  97.8

м.д.) с интенсивностью 20% был также отнесен к звеньям **B**, поскольку суммарная интенсивность этих двух сигналов (74%) была близка к содержанию звеньев **B** (73%), найденного кислотнo-основным титрованием (табл. 6).

Сигнал с  $\delta$  5.51 м.д. был идентифицирован после определения содержания триад с центром **A**. Триады **AAA** в образце **17** отсутствовали, поскольку в его спектре  $^{13}\text{C}$  ЯМР не обнаружен сигнал при 100.4 м.д. Уширенный сигнал при 5.39 м.д. в  $^1\text{H}$  ЯМР спектре с интенсивностью 12% может быть отнесен к **ААВ+ВАА** триадам. Оставшийся сигнал при 5.45 м.д. с интенсивностью 14% следует отнести к **ВАВ** триадам (рис. 6). В  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектре плохо разрешенный сигнал при 99.3 м.д. отвечал всем триадам с центром **A**. Определив содержание триад с центром **A**, сигнал при 5.51 м.д. с интенсивностью 20% мы отнесли к триадам **АВА**, поскольку только при этом условии, как было сказано выше (стр.9), выполнялось равенство вероятностей **АВ=ВА**.

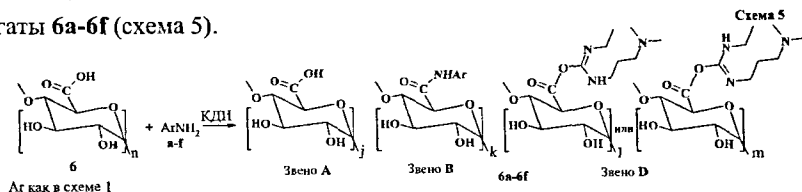
Таким образом, на 100 сахаридных звеньев образца **17** приходится 54% триад **ВВВ**, 20% **АВА**, 12% (**ААВ+ВАА**) и 14% **ВАВ**. Его структуру можно представить следующей формулой:



#### 4. Конъюгаты полиглюкуроновой кислоты

Ранее сообщалось о модификации аминами (бензиламином, *n*-гексиламином, *n*-додециламином) поли- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-глюкуроновой кислоты, полученной ТЕМРО-окислением целлюлозы, тогда как модификация поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-глюкуроновой кислоты **6**, получаемой ТЕМРО-окислением крахмала, до наших исследований не проводилась.

Взаимодействием кислоты **6** с аминами **a-f** под действием КДИ получены конъюгаты **6a-6f** (схема 5).



Отнесения сигналов конъюгатов **6a-6f** выполнены с помощью 1D и 2D спектров и представлены в табл. 8. Содержание ариламидных звеньев **B** в

конъюгатах **6a-6f** (табл. 8) найдено из соотношения приведенных к одному протону интенсивностей сигналов ароматических протонов в области  $\delta$  6.35-7.88 м.д. и сигналов аномерных протонов в области  $\delta$  5.12-5.58 м.д. В отличие от конъюгатов кислот **1-4**, в конъюгатах **6a-6f** наряду с ариламидными наблюдались изоурейдные звенья **D** как результат присоединения КДИ по карбоксигруппам **6** (схема 5).

При проведении реакции кислоты **6** с КДИ и НОВт в отсутствие амина нами обнаружено, что *N*-гидроксibenзотриазол (НОВт) предотвращает образование *O*-ацилизоурейдин. Это позволило в ряде случаев снизить содержание изоурейдных звеньев **D**, однако при этом уменьшалось и содержание звеньев **B** (конъюгат **6c** в табл. 8).

**Таблица 8.** Содержание звеньев **B**, звеньев **D** и спектры  $^1\text{H}$  ЯМР кислоты **6** и ее конъюгатов **6a-6f**

Кислота <b>6</b> и ее конъюгаты	Содержани е звеньев <b>B</b> , %	Содержани е звеньев <b>D</b> , %	Химические сдвиги, м.д.					
			<b>H-1</b>	<b>H-2</b>	<b>H-3</b>	<b>H-4</b>	<b>H-5</b>	<b>H<sub>ar</sub></b>
<b>6</b>	-	-	5.59	3.51	3.95	3.67	4.02	-
<b>6a</b>	64	11	5.12-5.56	3.60	3.94	3.70-3.87	4.05-4.56	6.35-6.55 (H-3, H-5) 6.78-7.52 (H-2, H-6)
<b>6b</b>	88	10	5.26-5.55	3.46	3.94	3.60-3.70	4.06-4.36	6.50 (H-3) 6.63 (H-5) 6.94 (H-4) 7.62 (H-6)
<b>6c</b>	58	40	5.15-5.55	3.53	3.94	3.55-3.85	4.05-4.35	7.07 (H-2) 7.23 (H-6) 7.76 (H-5)
	35 <sup>b</sup>	25						
<b>6d</b>	53	8	5.27-5.57	3.54	3.94	3.55-3.78	4.06-4.36	7.17 (H-3) 7.24 (H-2) 7.78 (H-6)
	43 <sup>c</sup>	6						
	53 <sup>d</sup>	10						
<b>6e</b>	38 <sup>e</sup>	30	5.25-5.55	3.52	3.94	3.65-3.87	4.05-4.35	7.67 (H-3, H-5) 7.87 (H-2, H-6)
<b>6f</b>	46	5	5.35-5.57	3.46	3.95	3.62-3.71	4.06-4.32	7.21 (H-3) 7.46 (H-5) 7.65 (H-4) 7.88 (H-6)

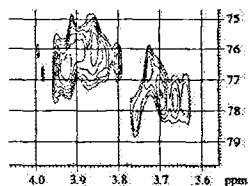
*a.* найдено из соотношения приведенных к одному протону интенсивностей сигналов в области  $\delta$  2.75 м.д. и сигналов аномерных протонов в области  $\delta$  5.12-5.74 м.д.; *b.* конъюгат получен при соотношении **6:c**:КДИ:НОВт = 1:1:0.75:0.75; *c.* конъюгат получен при соотношении **6:d**:КДИ:НОВт = 1:1:0.75:0.75; *d.* конъюгат получен при соотношении **6:d**:КДИ:НОВт = 1:1:0.75:0.75, pH=6.0; *e.* конъюгат получен в присутствии НОВт (**6:e**:КДИ:НОВт = 1:1:0.75:0.75).

В отличие от конъюгатов **6a-6f** с ароматическими аминами конъюгат (**6g**) с 4-ААП (схема 2) не содержал звеньев **D** (табл. 8). Характеристический сигнал H-4/C-4 в спектре HSQC **6g** расщеплялся на шесть сигналов, что свидетельствовало о неоднородности конъюгата **6g** (рис. 7). Согласно разработанному на конъюгатах полигулурановой кислоты **2** спектральному определению структуры

полисахаридной цепи, с помощью HSQC ЯМР спектров было установлено распределение модифицированных (**B**) и немодифицированных (**A**) звеньев в полисахаридной цепи конъюгата **6g** в виде триад с центрами **A** и **B** (табл. 9).

**Таблица 9.** Характеристические сигналы конъюгата **6g** и характеристика триадных последовательностей в конъюгате **6g**

$\delta_{H-4} / \delta_{C-4}$ , м.д.	Тип триад	Содержание триад, % мольн.	Вероятности триад по Бернулли, %
3.66 / 77.7	AAA	7	6
3.70 / 77.4	AAB+BAA	15	19
3.73 / 76.6	VAB	9	14
3.80 / 76.4	ABA	7	10
3.86 / 76.0	VBA+ABV	20	29
3.90 / 76.7	BVV	43	22



**Рис. 7.** Фрагмент HSQC спектра **6g**

Как видно из табл. 9, содержание триад с центром **A** в конъюгате **6g** удовлетворительно совпало с рассчитанным по Бернулли, что свидетельствует об их случайном распределении. Содержание триад с центром **B** не совпадало с рассчитанным по Бернулли, возможно, из-за большей погрешности интегрирования сигналов H-4/C-4, относящихся к звеньям **B**.

### 5. Анальгезирующие свойства конъюгата альгиновой кислоты с 4-аминоантипиринном

Известно, что конъюгаты гликозаминогликанов (гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфата) с 4-ААП обладают анальгезирующими свойствами<sup>а</sup>. Нами получен конъюгат (**1g**) альгиновой кислоты с 4-ААП (см. схему 2), содержащий 100% мольн. звеньев **B** (или 56% масс. остатков 4-ААП).

Острая токсичность конъюгата **1g** была исследована на мышах в дозе >5000 мг/кг, введенной порциями внутрижелудочно. Никаких отклонений от нормального состояния животных за время наблюдения обнаружено не было. Эти результаты свидетельствуют, что конъюгат **1g** является нетоксичным и оно пригодно для клинического применения.

Конъюгат **1g** испытали на анальгезирующую активность в сравнении с анальгином при внутрижелудочном и внутрибрюшинном способах введения. Исследование проводили на модели "уксусных корчей", вызванных внутрибрюшным введением ~1%-ной уксусной кислоты (1 мл) мышам массой 20-25 г. Регистрировали время наступления "уксусных корчей" (сокращения брюшины животных) и подсчитывали их количество в течение 15 минут. Конъюгат в дозе 40

<sup>а</sup> И. Ю. Понеделькина, Е. С. Лукина, Р. Ш. Суфиярова, В. Н. Одинокоев. Химия природн. соед., 2012, 4, 583.

мг/кг массы вводили за 1, 3, 6 и 24 ч до введения мышам уксусной кислоты. В качестве препарата сравнения использовали анальгин в дозе 20 мг/кг.

**Таблица 10.** Анальгезирующая активность конъюгата **1g**

Вещество	Время, ч	Количество укусных корчей в течение 30 минут после введения (Время наступления укусных корчей, сек)		% ингибирования по отношению к контролю	
		Внутрижелудочное	Внутрибрюшинное	Внутрижелудочное	Внутрибрюшинное
Контроль		29.3±4.4 (271.3±39.1)	29.3±4.4 (271.3±39.1)	-	-
Анальгин	1	11.5±4.2 (456.7±68.9)	12.3±4.8 (478.3±145.3)	60.8	58.0
	3	13.5±1.4 (420.0±60.7)	12.8±2.5 (338.3±100.9)	53.9	56.3
	6	10.8±2.3 (313.3±53.5)	10.2±2.1 (401.7±72.5)	63.1	65.2
	24	13.4±4.9 (406.0±119.3)	-	54.3	-
<b>1g</b>	1	13.2±2.0 (350.0±55.5)	8.5±2.8 (396.7±85.7)	54.9	71.0
	3	9.3±2.2 (520.0±76.2)	9.0±1.9 (395.0±105.2)	68.3	69.3
	6	15.5±4.0 (298.3±85.9)	11.2±1.5 (361.7±102.1)	48.1	61.8
	24	20.2±5.9 (418.0±33.6)	-	31.1	-

Испытания показали, что при внутрибрюшинном введении раствора за 1 и 3 часа до введения животным уксусной кислоты конъюгат **1g** оказывал обезболивающее действие более эффективно, чем анальгин. Ингибирование корчей на 69-71% было эффективней по сравнению с контролем (табл. 10).

Следует отметить, что водный раствор конъюгата **1g** стабилен по консистенции и цветности в течение 1 месяца, тогда как водный раствор анальгина желтел через 4-6 ч.

#### **6. Антирадикальная активность конъюгатов полигулуруновой и полигалактуруновой кислот**

Фенольным соединениям свойственна антирадикальная активность, поэтому конъюгаты полигулуруновой, полиманнуруновой и полигалактуруновой кислот, содержащие гидроксифениламидные группы, были изучены в качестве ловушек радикалов.

Антирадикальную активность измеряли по способности взаимодействовать со стабильным радикаломДФПГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) (схема 6) и характеризовали показателем  $IC_{50}$  (концентрация вещества, при котором гибнет 50% радикала).

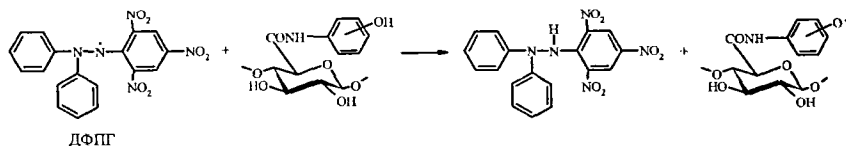


Таблица 11. Антирадикальная активность конъюгатов

Амин	$IC_{50}$ для конъюгатов полигулурановой к-ты 2, мкмоль звена В/мл (доля от $IC_{50}$ для ионола)	$IC_{50}$ для конъюгатов полиманнурановой к-ты 3, мкмоль звена В/мл (доля от $IC_{50}$ для ионола)	$IC_{50}$ для конъюгатов полигалактурановой к-ты 4, мкмоль звена В/мл (доля от $IC_{50}$ для ионола)
a	0.07 (1/3)	0.26 (1/11)	0.41 (1/17)
b	0.32 (1/14)	не проявлял антирадикальных свойств	0.33 (1/14)
% ингибирования, [C] = 330мкг/мл			
c	7	19	9
d	17	21	11
4-ААП	4	4	5

$IC_{50}$  для ионола = 0.023 мкмоль/мл

Наиболее эффективной ловушкой радикалов оказался конъюгат **2a** полигулурановой кислоты с *n*-аминофенолом, конъюгаты с салициловыми кислотами и 4-аминоантипирином были малоактивными (табл. 11).

## Выводы

1. Впервые синтезированы конъюгаты альгиновой, поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-L-гулурановой, поли- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-маннурановой, поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-галактурановой и поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-глюкуроновой кислот с биологически активными ароматическими аминами (*o*- и *n*-аминофенолами, 4- и 5-аминосалициловыми, *o*- и *n*-аминобензойными кислотами) и 1-фенил-2,3-диметил-4-аминопиразол-5-оном (4-аминоантипирином) в водной среде под действием водорастворимого 1-этил-3-[3-(диметиламино)пропил]карбодимидида.

2. Методами спектроскопии ЯМР  $^1H$  и  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC найдено, что в зависимости от условий реакции содержание модифицированных звеньев в синтезированных конъюгатах составляет от 5 до 100%. Конъюгаты с *n*-аминобензойной кислотой включают звенья с олигомерными фениламидными группами, а конъюгаты полиглюкуроновой кислоты с ароматическими аминами наряду с ариламидными содержат изоурендоэфирные звенья, образование которых

обусловлено взаимодействием карбоксильных групп субстрата с карбодиимидом. Их содержание снижается при проведении реакции конъюгации в присутствии *N*-гидроксисбензотриазола.

3. На основании анализа спектров ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC установлено, что модифицированные звенья (звенья **B**) в конъюгатах полиуроновых кислот нерегулярно распределены в полисахаридной цепи. На примере конъюгатов с 4-аминоантипирином впервые показано, что нерегулярность их структуры может быть охарактеризована содержанием триадных последовательностей звеньев из модифицированных (**B**) и немодифицированных (**A**) звеньев с центральным звеном **B** (**BVB**, **ABA**, **ABB**, **BBA**) и звеном **A** (**AAA**, **AAB**, **VAA**, **VAB**).

4. Каталитическим региоселективным С6-окислением водорастворимого картофельного крахмала реагентом NaOCl-2,2,6,6-тетраметилпиперидиний-1-оксил (TEMPO) в водно-щелочной среде в присутствии NaBr как сокатализатора получена поли- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-глюкуроновая кислота. Показано, что в отсутствие бромида продуктом является частично окисленный крахмал, содержащий звенья с непрореагировавшими 6-гидроксиметильными, 6-карбоксильными, 6,6-дигидроксиметиновыми (альдегид-гидратными) группами. Содержание последних возрастает при окислении разбавленных ( $\leq 0.04$  моль/л) растворов крахмала. С помощью двумерных  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC и  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ЯМР спектров впервые сделано отнесение сигналов аномерных протонов частично окисленного крахмала.

5. Выявлены анальгезирующая активность конъюгата альгиновой кислоты с 4-аминоантипирином в дозе 40 мг/кг (на модели «уксусных корчей», вызванных у мышей) и антирадикальная активность конъюгатов полигулурановой, полиманнурановой и полигалактуроновой кислот с аминифенолами.

#### **Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:**

1. Д. И. Арасланова, И. Ю. Понеделькина, Т. В. Тюмкина, В. Н. Одинокоев. Конъюгаты полигулурановой и полиманнурановой кислот с 4-аминоантипирином: определение с помощью спектров  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC триад звеньев и их распределение в полисахаридной цепи. // *Химия природных соединений*. – 2014. – №2. – С. 197-200.
2. I. Yu. Ponedel'kina, D. I. Araslanova, T. V. Tyumkina, E. S. Lukina, V. N. Odinokov. Partially Oxidized Potato Starches from Bromide-Free TEMPO-Mediated Reaction: Characterization of Monosaccharide Composition. // *Starch*. – 2014. – V.66. – №5-6. – P. 444-449.



3. **Д. И. Тимофеева\***, И. Ю. Понеделькина, Л. М. Халилов. Карбодимидная конъюгация полигалактуроновой кислоты с аминами. // *Международная конференция «Актуальные проблемы химии природных соединений»*.- Ташкент. – 2009. С. 242.
4. **Д. И. Тимофеева\***. Окисление растительных полисахаридов реагентом NaOCl–2,2,6,6-тетраметилпиперидиний-1-оксид (ТЕМРО). Исследование моносахаридного состава продуктов. // *XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых*. – Москва. – 2011. С. 169.
5. **Д. И. Тимофеева\***, И. Ю. Понеделькина. Конъюгаты полигалактуроновой кислоты с фармакозначимыми аминами. // *XIV Молодежная конференция по органической химии*. – Екатеринбург. – 2011. С. 228.
6. Е. С. Луккина, **Д. И. Тимофеева\***, И. Ю. Понеделькина. Исследование продуктов ТЕМРО-окисления крахмала. // *XIV Молодежная конференция по органической химии*. – Екатеринбург. – 2011. С. 163.
7. **Арасланова Д. И.**, Понеделькина И. Ю. Модифицированные полигалактуронаты: особенности ЯМР спектров, применимые для определения триадных последовательностей звеньев в полисахаридной цепи // *Всероссийская молодежная конференция «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений»*. – Уфа. – 2012. С. 81.
8. **Арасланова Д.И.**, Богданова М.А., Ромадова И.В., Понеделькина И.Ю., Губайдуллин И.М. Конъюгаты полигулуруоновой и полиманнуруоновой кислот с 4-аминоантипирином: распределение звеньев в полисахаридной цепи // *Всероссийская научная конференция «Теоретические и экспериментальные исследования процессов синтеза, модификации и переработки полимеров»*. – Уфа. – 2013. С. 3.
9. Богданова М.А., **Арасланова Д.И.**, Понеделькина И.Ю., Губайдуллин И.М., Сафин Р.Р. Определенне типа распределения триадных последовательностей звеньев в полисахаридной цепи // *VI Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальная математика и ее приложение в естествознании»*. – Уфа. – 2013. С. 281.

---

\* Тимофеева Д.И. сменила фамилию на Арасланову Д. И.

Лицензия №0177 от 10.06.96 г.  
Подписано в печать 21.07.2014 г.  
Бумага офсетная. Отпечатано методом ризографии.  
Формат 60x84 1/16. Усл.печ.л. 1,5. Уч.-изд.л.1,5.  
Тираж 130 экз. Заказ №116

Типография ГОУ ВПО  
«Башгосмедуниверситет РОСЗДРАВА»  
450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3