



УДК: 547.458.88: 547.495.9

Олий АХМЕДОВ,

PhD, ст. науч. сотр., Институт биоорганической
химии им. акад. А.С. Садыкова Академии наук Республики
Узбекистан
E-mail: akhmedov.oliy@gmail.com

Шавкат ШОМУРOTOB,

док. хим. наук, вед. науч. сотр., Институт биоорганической
химии им. акад. А.С. Садыкова Академии наук Республики
Узбекистан
E-mail: shsha@mail.ru

Аббасхан ТУРАЕВ,

док. хим. наук, акад., гл. науч. сотр., Институт биоорганической
химии им. акад. А.С. Садыкова Академии наук Республики
Узбекистан
E-mail: abbaskhan@mail.ru

Под редакцией д.х.н., проф. Ощепковой Ю.И.

ПРИСОЕДИНЕНИЕ ГУАНИДИНА К ПЕКТИНОВЫМ ПОЛИСАХАРИДАМ И НЕКОТОРЫМ ИХ ПРОИЗВОДНЫМ РАЗЛИЧНЫМ ТИПОМ ХИМИЧЕСКОЙ СВЯЗИ

Аннотация

Разработаны методы химического присоединения гуанидиновых фрагментов к макромолекулам пектиновых полисахаридов и их некоторых производных, содержащих реакционно-способные альдегидные группы. Найдены условия реакции, позволяющие синтезировать продукты, отличающиеся структурой, составом и другими характеристиками. Доказано, что химическое связывание гуанидина с полисахаридными молекулами может быть осуществлено посредством азометиновых, аминных и ионных связей.

Ключевые слова: полисахариды, пектин, гуанидин, азометиновые связи, химическое восстановление, комплекс.

TURLI KIMYOVIY BOG'LAR ORQALI GUANIDINNI PEKTIN POLISAHARIDLARI VA ULARNING BA'ZI HOSILALARIGA BIRIKTIRISH

Annotatsiya

Pektin polisaharidlari va ularning reaksiya-faol aldegid guruhlari tutgan hosilalari makromolekulariga guanidin fragmentini kimyoviy bog'lash usullari ishlab chiqildi. Strukturasi, tarkibi va boshqa xususiyatlari bilan farq qiladigan mahsulotlar sintez qilish sharoitlari aniqlandi. Guanidinni polisaharid molekulalariga kimyoviy bog'lashning azometin, amin va ion bog'lari orqali amalga oshirish mumkinligi isbotlandi.

Kalit so'zlar: polisaharidlar, pektin, guanidin, azometin bog'lari, kimyoviy qaytarilish, kompleks.

ADDITION OF GUANIDINE TO PECTIN POLYSACCHARIDES AND SOME OF THEIR DERIVATIVES BY VARIOUS TYPES OF CHEMICAL BONDS

Abstract

Methods for the chemical addition of guanidine fragments to macromolecules of pectin polysaccharides and some of their derivatives containing reactive aldehyde groups were developed. Reaction conditions were found that make it possible to synthesize products that differ in structure, composition, and other characteristics. It was proven that the chemical binding of guanidine to polysaccharide molecules could be carried out through azomethine, amine, and ionic bonds.

Key words: polysaccharides, pectin, guanidine, azomethine bonds, chemical reduction, complex.

Введение. Актуальной задачей химии высокомолекулярных соединений считается разработка и исследование новых макромолекулярных систем, предназначенных для применения в медицине и фармакологии. Среди различных классов высокомолекулярных соединений, синтезируемых для этих целей, в центре внимания находятся водорастворимые полимерные производные гуанидина, большинство из которых, как известно, обладают эффективными антимикробными свойствами и не относятся к разряду токсичных веществ [1,2]. На сегодняшний день трансформация гуанидина из низкомолекулярного в полимерное состояние осуществляется на основе реакции сополимеризации при участии диаминов [3-5]. В данном подходе синтеза такие свойства конечных продуктов, как молекулярная масса, плотность заряда, сродство к растворителю, строение, удастся регулировать путем изменения условий реакции или подбором длины исходного углеводородного радикала.

Несмотря на имеющийся громадный массив исследований, касающихся получения полигуанидиновых соединений, работы в области синтеза биологически активных производных полисахаридов, содержащих в структуре гуанидиновые группы, практически отсутствуют. Поэтому синтез и систематическое исследование таких макромолекулярных систем представляет определенную теоретическую и практическую ценность, как для развития химии физиологически активных полимеров, так и для создания новых малотоксичных лекарственных препаратов

широкого спектра антимикробного действия. Необходимо отметить, что введение в мономерные единицы полисахаридов гуанидиновых фрагментов может открыть возможность получения новых полимерных производных, обладающих физиологически активными свойствами.

Целью работы являлась разработка методов химического присоединения гуанидиновых фрагментов к макромолекулам пектиновых полисахаридов и их некоторых производных.

Материалы и методы. В работе использованы: коммерческий цитрусовый пектин со степенью этерификации $>55\%$ и средней молекулярной массой 162 кДа; гуанидин углекислый квалификации х.ч.; гуанидин гидрохлорид квалификации х.ч.; боргидрид натрия (Sigma-Aldrich) - белый кристаллический порошок с массовой долей основного вещества $\geq 99\%$; натрий йоднокислый мета (ТУ 6-09-02-54-74) квалификации ч.д.а.

Периодатное окисление цитрусового пектина. 0.01 моль цитрусового пектина растворяли в 100 мл воды. После растворения полисахарида добавляли 200 мл ацетатного буфера (pH 4.25) и 0.2 н раствора NaIO_4 при молярном соотношении пектин: $\text{IO}_4^- = 1:1.5$. Смесь оставляли перемешиваться на 1-4 ч при комнатной температуре. Реакцию периодатного окисления завершали добавлением 15 мл этиленгликоля. По окончании реакции смесь диализовали против дистиллированной воды до отрицательной реакции на ионы IO_4^- и IO_3^- . Конечные продукты, выделенные сублимационной сушкой, анализировали методом йодометрического титрования [6]. Степень окисления диальдегидпектина (ДАП), найденная титрованием, составила 18-47 моль%.

Химическая модификация гуанидина с ДАП. В стакан объемом 250 мл помещали 0.01 моль ДАП со степенью окисления 18-47 моль%, затем добавляли 100-150 мл воды, после растворения ДАП, при постоянном перемешивании на магнитной мешалке, вливали раствор, содержащий 0.1-0.35 моль $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{NH} \times 1/2 \text{H}_2\text{CO}_3$. Реакция конденсации протекала при 20°C в течение 1 ч и pH 6.0-11.0. В конце добавляли 0.5 М раствор HCl и доводили pH реакционной среды до 6.5-6.7. Образовавшиеся продукты выделяли путем сублимации воды из предварительно замороженного диализованного водного раствора в мешках с пределом пропускания по белку 5000 Да. Количество гуанидина в образцах определяли методом ацидиметрического титрования [7].

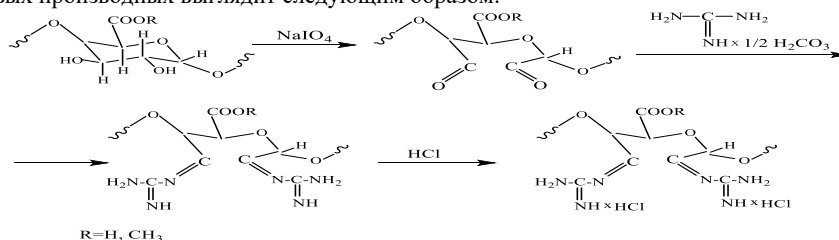
Химическое восстановление азометиновых связей гуанидинсодержащих производных пектина. Трансформацию азометиновых связей в гуанидинсодержащих производных пектина проводили следующим образом: 1 г образца растворяли в 50 мл воды и добавляли фосфатный буфер с pH 8.5. Далее в реакционную смесь вводили свежеприготовленный водный раствор NaBH_4 , восстанавливающего реагента брали в 2-кратном молярном избытке (0.25 г) в расчете на 1 моль гуанидинсодержащего элементарного звена полисахарида. Реакция восстановления продолжалась 5 ч, при $t=20^\circ\text{C}$ и постоянном перемешивании. В конце добавляли 0.5 М раствор HCl и доводили pH раствора до 6.2-6.5. Полученный раствор диализовали против дистиллированной воды в течение 24 ч (с трехкратной сменой диализной воды). Диализат подвергали сублимационной сушке, затем анализировали на содержание азота. Для обоснования прохождения реакции восстановления лабильных азометиновых связей до прочных $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ связей, образец подвергали гидролизу в течение 24 ч при значении pH 8.5.

Метод получения пектата натрия. 50 г цитрусового пектина растворяли в 1 л воды. Далее в образовавшийся раствор медленно добавляли 1% раствор NaOH до значения pH 8.8-9.0 и выдерживали 2 ч при $55-60^\circ\text{C}$. Полученный пектат натрия осаждали ацетоном, многократно промывали 75% этанолом и сушили при $45-50^\circ\text{C}$ [8]. Контроль за состоянием карбоксильных функциональных групп при получении пектата натрия проводился методом ИК-спектроскопии в области валентных колебаний группы $-\text{COO}^-$ ($1600-1800 \text{ см}^{-1}$).

Получение комплексов гуанидина с пектатом натрия. Для установления предельного связывания гуанидина проведена серия экспериментов с различным соотношением пектата натрия и низкомолекулярного агента. Полимерные соли гуанидина синтезировали в водной среде по методике, которая состояла в следующем: к водному раствору пектиновой соли добавляли гуанидин гидрохлорид при молярном соотношении $-\text{COONa}:(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{NH}=1:0.5-4$ моль. Раствор оставляли перемешиваться на 0.25-5 ч при комнатной температуре. Далее целевой раствор подвергали диализу в течение 24 ч (с трехкратной сменой диализной воды) в мешках с пределом пропускания по белку 5000 Да. Продукты реакции отделяли путем сублимационной сушки. Характеристическую вязкость пектата натрия и полученных комплексов определяли путем измерения времени течения растворов в вискозиметре Уббелюде [9]. В качестве растворителя использовали 1% раствор NaCl . Время течения растворов для каждого образца измерялось трижды. Количественное содержание гуанидина вычисляли методом УФ-спектроскопии при $\lambda_{\text{max}}=195 \text{ нм}$ [10].

ИК-спектры всех синтезированных соединений снимали на ИК-спектрометре Vector-22 в области длин волн $400-4000 \text{ см}^{-1}$ в таблетках KBr (3 мг образца/300 мг KBr). Количество азота во всех образцах вычисляли на элементном анализаторе марки Eura EA (Italy).

Результаты и обсуждение. Химическое присоединение гуанидина к макромолекулам окисленного пектина происходит через реакцию нуклеофильного замещения. В конечном счете после завершения реакции должны образоваться продукты, в которых первичные аминогруппы гуанидина связаны с электрофильными альдегидными группами модифицированного пектина посредством легко гидролизующихся азометиновых связей ($-\text{C}=\text{N}-$). Полная схема синтеза азометиновых производных выглядит следующим образом:



Для определения оптимальных условий реакции и предельного количества гуанидина, приходящегося на единицу мономерного звена диальдегидпектина, нами была проведена серия экспериментов, результаты которых представлены в таблице 1.

Таблица 1

Влияние условий проведения реакции на состав продуктов взаимодействия ДАП с гуанидином ($\tau=1$ ч; $t=20^\circ\text{C}$)

№	Степень окисления ДАП, моль%	Молярное соотношение ДАП:(H_2N) $_2\text{C}=\text{NH}$	pH среды	Содержание азота, %	Степень замещения, моль%	Содержание гуанидина, %
1	18	1:2	11.0	4.1 $\pm$ 0.64	18.5 $\pm$ 2.6	4.6 $\pm$ 1.1
2	18	1:2	9.5	5.8 $\pm$ 0.75	27 $\pm$ 4.0	6.8 $\pm$ 1.0
3	18	1:2	9.0	7.0 $\pm$ 0.48	31 $\pm$ 3.3	8.5 $\pm$ 0.8
4	18	1:3	9.0	9.1 $\pm$ 0.67	44 $\pm$ 3.5	11.2 $\pm$ 0.9
5	33	1:2	9.5	11.0 $\pm$ 0.45	53 $\pm$ 2.7	14.1 $\pm$ 1.2
6	33	1:3	8.0	8.7 $\pm$ 0.53	41 $\pm$ 3.0	10.2 $\pm$ 0.7
7	47	1:3	9.0	20.6 $\pm$ 1.5	113 $\pm$ 6.0	30.8 $\pm$ 2.3
8	47	1:4	9.0	21.4 $\pm$ 2.0	115 $\pm$ 5.0	32.0 $\pm$ 1.6
9	47	1:3	7.5	8.1 $\pm$ 2.6	39 $\pm$ 4.0	9.5 $\pm$ 1.0
10	47	1:3	6.0	5.2 $\pm$ 0.58	25 $\pm$ 3.1	6.4 $\pm$ 0.8

Исходя из сравнительных данных, представленных в таблице 1, можно сделать следующие заключения:

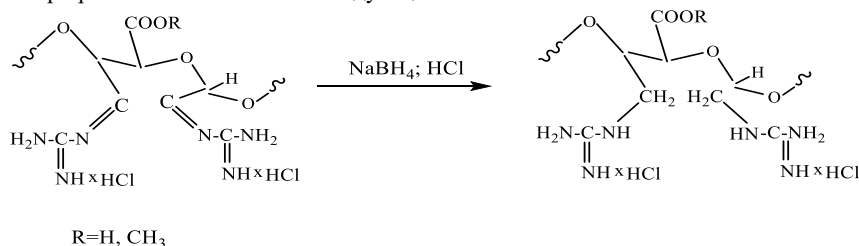
-количественное содержание гуанидина в продуктах реакции и степень замещения альдегидных групп молекулами гуанидина зависит от pH среды. При этом наиболее оптимальной средой для химической фиксации гуанидина к макромолекулам окисленного пектина является pH 9.0;

-число альдегидных групп в окисленном пектине оказывает непосредственное влияние на состав конечных продуктов. Соответственно, с увеличением содержания -CHO групп в модифицированном пектине возрастает степень замещения и содержание гуанидина в конечных продуктах;

-предельное связывание гуанидина с мономерной единицей окисленного пектина происходит при молярном соотношении ДАП:(H_2N) $_2\text{C}=\text{NH} \times 1/2\text{H}_2\text{CO}_3=1:3$. Дальнейшее увеличение концентрации гуанидина в реакционной среде незначительно влияет на состав продуктов реакции.

ИК-спектр гуанидинпектина содержал полосы максимума в областях 3354 и 3168 cm^{-1} (-OH), 1660 cm^{-1} (-C=N-), 1560 cm^{-1} деформационное колебание (-NH $_3^+$), 1442 cm^{-1} $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)_\text{E}$ и 1367 cm^{-1} $\delta_\text{s}(\text{CH}_3)_\text{E}$.

Образовавшиеся лабильные азометиновые связи между гуанидином и альдегидными группами ДАП могут быть стабилизированы в щелочной среде в присутствии боргидрида натрия. При таких условиях следует учитывать тот факт, что восстановление азометиновых связей в щелочной среде может сопровождаться одновременным их расщеплением и снижением начальной степени замещения образца. В связи с этим нами проведено химическое восстановление азометиновых связей при pH 8.5 в течение 5 ч по следующей схеме:



Результаты исследования показали, что при химическом восстановлении азометиновых связей при значении pH 8.5 и продолжительности 5 ч происходит уменьшение исходной степени замещения образца с 113 $\pm$ 6.0 до 92 $\pm$ 3.5 моль%. При этом нужно отметить, что при проведении химического восстановления в течение 5 ч происходит глубокая трансформация азометиновых связей в прочие аминные связи. Поскольку конечная степень замещения образца, прошедшего химическое восстановление, согласно результатам гидролиза, составляет 85 $\pm$ 2.3 моль%.

Присутствие комплексообразующих -COO $^-$ групп в пектиновых полисахаридах, а также наличие аминных групп в структуре гуанидина предопределяет возможность фиксации низкомолекулярного фрагмента к макромолекулярной цепи посредством ионных связей. Исходя из этих особенностей, нами были получены комплексы гуанидина с пектиновыми полисахаридами. Результаты этой части исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2

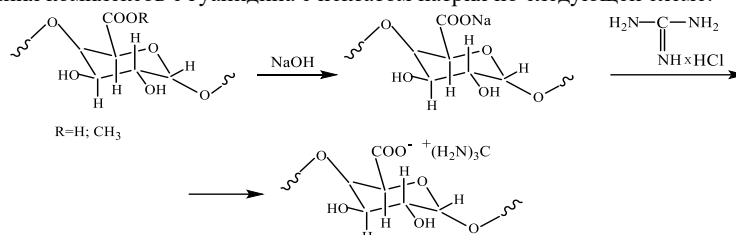
Влияние молярного соотношения гуанидина на его содержание в составе продуктов реакции ($\tau=5$ ч; $t=20^\circ\text{C}$)

№	Молярное соотношение -COONa:(H_2N) $_2\text{C}=\text{NH} \times \text{HCl}$	Содержание азота, %	Степень замещения, моль%	Содержание гуанидина, %	$[\eta]$, дл/г
1	1:0.5	2.8 $\pm$ 0.73	13.7 $\pm$ 3.4	3.8 $\pm$ 1.0	3.10 $\pm$ 0.12
2	1:1	5.2 $\pm$ 0.80	26.4 $\pm$ 4.5	6.7 $\pm$ 1.15	2.85 $\pm$ 0.10
3	1:2	7.8 $\pm$ 1.06	41.1 $\pm$ 3.2	10.3 $\pm$ 1.42	2.54 $\pm$ 0.09
4	1:4	10.2 $\pm$ 0.93	53.0 $\pm$ 4.4	13.8 $\pm$ 1.26	2.48 $\pm$ 0.10

Примечание. Характеристическая вязкость $[\eta]$ пектата натрия составила 3.47 $\pm$ 0.10 дл/г

Как следует из результатов, представленных в таблице 2, при увеличении количества гуанидина от 0.5 до 2 моль на моль функциональных групп пектата натрия происходит значительное возрастание степени замещения и количественного содержания гуанидина в продуктах реакции. При дальнейшем увеличении молярного количества гуанидина от 2 до 4 моль на моль -COONa групп показатели состава полученных комплексов изменяются незначительным образом. К полученным данным следует добавить, что с увеличением содержания гуанидиновых молекул в полисахаридной цепи наблюдается снижение характеристической вязкости полученных комплексов. По

нашему мнению, такое явление может быть связано с происходящей компактизацией макромолекул полисахаридной матрицы после образования комплексов с гуанидина с пектатом натрия по следующей схеме:



В ИК-спектрах исследованных образцов с различным содержанием гуанидина по сравнению с исходным полисахаридом наблюдалось смещение полос поглощения, относящихся к валентным колебаниям $-COO^-$ групп пектата натрия. ИК-спектры полученных комплексов содержали колебание ионизированной группы $-COO^-$ в области $1630-1642\text{ см}^{-1}$. Тогда как колебание $-COO^-$ группы в пектате натрия соответствовало полосе поглощения при 1623 см^{-1} . Разница в интенсивности полос поглощения являлась доказательством о произошедшем комплексообразовании.

Вывод. Таким образом, в результате проведенных исследований впервые разработаны методы присоединения гуанидиновых фрагментов к макромолекулам пектиновых полисахаридов и их реакционно-способных производных различным типом химической связи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Qian L., Guan Y., He B., Xiao H. Modified guanidine polymers: Synthesis and antimicrobial mechanism revealed by AFM. *Polymer*. 2008. V.49(10). P.2471-2475.
2. Gilbert P., Moore L.E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet (A Review) // *Journal of Applied Microbiology*. 2005. V.99(4). P.703-715.
3. Григорьева М.Н., Стельмах С.А., Астахова С.А., Центер И.М., Базарон Л.У., Батоев В.Б., Могнонов Д.М. Синтез сополимеров гидрохлоридов полиалкилгуанидинов и их антибактериальная активность в отношении условно-патогенных микроорганизмов *Escherichia coli* и *Bacillus cereus* // *Химико-фармацевтический журнал*. 2015. Т.49. №2. С.29-33.
4. Стельмах С.А., Базарон Л.У., Могнонов Д.М. О механизме поликонденсации гексаметилендиамина и гуанидин гидрохлорида // *Журнал прикладной химии*. 2010. Т.83. Вып.2. С.244-246.
5. Zhang Y., Jiang J., Chen Y. Synthesis and antimicrobial activity of polymeric guanidine and biguanidine salts // *Polymer*. 1999. V.40(22). P.6189-6198.
6. Туник Т.В., Немченко У.М., Ганенко Т.В., Юринова Г.В., Джоисов Ю.П., Сухов Б.Г., Злобин В.И., Трофимов Б.А. Синтез и спектральная охарактеризация новых биоразлагаемых производных арабиногалактана для диагностики и терапии // *Известия РАН. Серия физическая*. 2019. Т.83(3). С. 408-414.
7. Губен-Вейль. Методы органической химии. М., 1967. Т.2. 1032 с.
8. Minzanova S.T., Mironov V.F., Mironova L.G., Nizameev I.R., Kholin K.V., Voloshina A.D., Kulik N.V., Nazarov N.G., Milyukov V. A. Synthesis, Properties, and Antimicrobial Activity of Pectin Complexes with Cobalt and Nickel // *Chemistry of Natural Compounds*. 2016. V.52. P.26-31.
9. Muhidinov Z.K., Fishman M.L., Avloev K.K., Norova M.T., Nasriddinov A. S., Khalikov D.K. *Polymer Science Series A*. 2010. V.52(12). P.1257-1263.
10. Шаталов Д.О. Разработка и стандартизация методов контроля качества, разветвленного олигогексаметиленгуанидин гидрохлорида: дисс. канд. фарм. наук. М., 2015. 137 с.