

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

На правах рукописи

**Круппа Инна Сергеевна**

**Полисахаридные полимеры-носители  
для физиологически активных  
нафталъдегидов**

05.17.06 – Технология и переработка полимеров и композитов

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук,  
доцент В.А. Дятлов

**Москва – 2017 год**

**ОГЛАВЛЕНИЕ:**

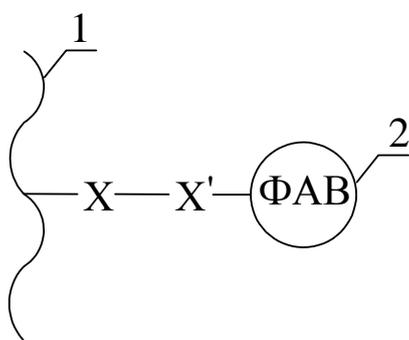
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	10
1.1 Полисахаридные носители физиологически активных соединений	10
1.1.1 Требования к полисахаридам используемым в качестве полимеров-носителей физиологически активных соединений	12
1.1.2 Окисление полисахаридов	14
1.2 Основные реакционные центры глюкозы	17
1.3 Основные реакционные центры целлюлозы и карбоксиметилцеллюлозы	19
1.4 Диальдегидкарбоксиметилцеллюлоза	23
1.5 Основные реакционные центры декстрана	25
1.6 Диальдегиддекстран	28
1.7 Физиологически активные вещества нафтальдегидного типа. Госсипол и его производные	30
1.8 Известные подходы к снижению токсичности госсипола путем его химической модификации	39
1.8.1 Образование Шиффовых оснований в качестве подхода к снижению токсичности госсипола	39
1.8.2 Гликозилирование госсипола в качестве подхода к снижению его токсичности	40
1.8.3 Снижение токсичности госсипола путем создания ФАП прививочного типа (принципы создания ФАП Х. Рингсдорфа)	42
2 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	46
2.1 Разработка способов определения основных физико-химических характеристик полимеров-носителей	46
2.1.1 Сравнительный анализ титрометрических методов определения степени окисления ДАД и ДАКМЦ	51

2.1.1.2	Определение степени окисления ДАКМЦ, полученной в гетерогенных условиях, оксимным методом	52
2.1.1.3	Молекулярно-массовые характеристики ДАКМЦ	56
2.1.1.4	Молекулярно-массовые характеристики ДАД	60
2.2	Основные физико-химические характеристики нафтальдегида госсипола	61
2.2.1	ИК-Фурье спектры госсипола	64
2.2.2	УФ-спектры госсипола в различных растворителях	65
2.2.2.1	Определение весового коэффициента экстинкции госсипола в боратном буфере	66
2.2.3	MASS MALDI спектры госсипола	68
2.3	Диальдегидполисахариды, содержащие ковалентно связанный нафтальдегид госсипол	69
2.3.1	Синтез ДАД ковалентно связанного с госсиполом	69
2.3.1.1	Спектры и химическая структура продуктов взаимодействия ДАД с нафтальдегидом госсиполом	70
2.3.2	Синтез ДАКМЦ ковалентно связанной с госсиполом	74
2.3.2.1	Химическое строение полимеров ДАКМЦ с ковалентно связанными с нафтальдегидом госсиполом, полученных в гомогенных условиях	75
2.3.2.2	Химическое строение полимеров ДАКМЦ ковалентно связанных с нафтальдегидом госсиполом, полученных в гетерогенных условиях	77
2.3.2.3	ИК-Фурье спектроскопия ДАКМЦ, содержащей ковалентно связанный госсипол, синтезированной в гомогенных условиях	80
2.3.2.4	Сравнительный анализ электронных спектров поглощения исходного госсипола и продукта присоединения госсипола к ДАКМЦ, полученного в гомогенных и гетерогенных условиях	81
2.3.3	Определение сайтов связывания нафтальдегида госсипола с диальдегидполисахаридами	84
2.3.3.1	Синтез модельных соединений	87
2.4	Кислотный гидролиз полимерных производных госсипола	99

2.5 Биологическая активность полимерных производных госсипола	108
3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	111
3.1 Характеристика исходных соединений	111
3.2 Методики синтезов	113
3.2.1 Синтез диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы	113
3.2.2 Синтез диальдегиддекстрана	114
3.2.3 Определение степени окисления диальдегидполисахаридов (ДАКМЦ, ДАД) методом обратного йодометрического титрования	115
3.2.4 Определение степени окисления диальдегидполисахаридов оксимным методом	116
3.2.5 Синтез ДАКМЦ ковалентно связанной с госсиполом	117
3.2.6 Синтез ДАД ковалентно связанного с госсиполом	117
3.2.7 Синтез модельных соединений госсипола ковалентно связанного с глюкозой в различных условиях	118
3.2.8 Кислотный гидролиз гликозидов госсипола в условиях моделирующих физиологические	119
3.3 Определение цитотоксических свойств госсипола, ковалентно связанного с диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой	120
3.4 Исследование <i>in vitro</i> противовирусного действия полимерных производных госсипола на разных штаммах вируса гриппа А	120
3.5 Методы анализов	121
ВЫВОДЫ	124
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	125
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	126

## ВВЕДЕНИЕ

Химия полимерных лекарственных препаратов, интенсивно развивающаяся область науки, позволившая осуществить прорыв в лечении наиболее опасных вирусных и онкологических заболеваний. В соответствии с классической теорией, предложенной Х. Рингсдорфом в середине 1980-х годов, физиологически активные полимеры (ФАП) прививочного типа синтезируют путем присоединения физиологически активного вещества (ФАВ) к инертному полимеру носителю гидролизуемой химической связью.



1 – полимер-носитель

2 - Физиологически активное вещество

X – Ковалентная связь между полимером-носителем и «спейсером»

X' – Ковалентная связь между «спейсером» и ФАВ

В условиях организма ФАВ выделяется в неизменном виде при гидролизе, а носитель, или продукты его деградации, выводится, в большинстве случаев через почки за счет клубочковой фильтрации. Этот подход помог решить множество задач в фармакологии включая значительное снижение токсичности ФАВ, позволил ввести в клиническую практику препараты на основе токсинов за счет медленного контролируемого выделения в организме и целевой доставки ФАВ в орган-мишень.

Диальдегидполисахариды - почти идеальные носители для создания ФАП прививочного типа. У них есть биodeградирующая основная цепь и альдегидные

группы способные связывать ФАВ с образованием временных ковалентных связей, гидролизуемых в организме без участия ферментов. Диальдегидполисахариды успешно применяют во всем мире для присоединения аминов, пептидов и ферментов. Однако проблема понижения токсичности особенно остро стоит не только для ФАВ пептидной природы, но и веществ, содержащих реакционноспособные альдегидные группы. К ним относится токсин хлопчатника госсипол – нафталальдегид с широким спектром физиологической активности. В последние годы на его основе созданы и введены в клиническую практику многочисленные ФАП с использованием диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы (ДАКМЦ) в качестве полимера-носителя. Однако, химическое строение ФАП и продуктов их биоразложения в физиологических условиях до сих пор остается предметом дискуссии. Главным остается вопрос – пригодны ли диальдегидполисахариды для использования в качестве носителей ФАВ нафталальдегидной природы и выполняются ли принципы Рингсдорфа в этом случае.

**Степень разработанности темы.** В научной литературе имеются данные по физиологической активности и токсичности полимерных производных госсипола, в которых он связан с носителем с образованием циклических фрагментов лактольного типа, однако отсутствуют данные спектральных исследований, позволяющие надежно определить химическое строение синтезированных продуктов, а кроме того они принципиально отличаются по химическому строению от полимеров, полученных в ходе настоящего исследования. Описаны О-гликозиды, полученные классическим способом взаимодействия глюкозгалогенидов с фенолями госсипола в органических растворителях. В этих продуктах нафтохинон ковалентно связан с вовлечением в реакцию фенольных гидроксильных групп и они не могут рассматриваться в качестве соединений моделирующих взаимодействие нафталальдегидов с диальдегидполисахаридами.

### **Цели и задачи настоящей диссертации:**

- изучение возможности использования диальдегидполисахаридных носителей для иммобилизации ФАВ альдегидной природы при синтезе ФАП прививочного типа;
- нахождение оптимальных условий синтеза диальдегидполисахаридов, позволяющих оптимизировать молекулярную массу и содержание альдегидных групп в полимере носителе;
- оптимизация условий синтеза и идентификация новых полимерных производных природного нафтальдегида госсипола ковалентно связанного с диальдегидполисахаридами: ДАКМЦ и диальдегиддекстраном (ДАД);
- изучение основных сайтов ковалентного связывания госсипола с основной цепью ДАКМЦ и ДАД, с учетом их разноразветвленности и с использованием низкомолекулярных моделей;
- идентификация основных продуктов гидролиза госсипол-содержащих ФАП прививочного типа в условиях моделирующих физиологические;
- определение типа ФАП, образующихся при ковалентном связывании нафтальдегидов с диальдегидполисахаридами, и их применимости в рамках модели ФАП прививочного типа Х. Рингсдорфа ;
- оценка токсичности синтезированных госсипол-содержащих ФАП прививочного типа в опытах *in vitro*.

**Научная новизна.** Синтезированы и охарактеризованы две группы неизвестных ранее госсипол-содержащих ФАП прививочного типа на основе ДАД и ДАКМЦ, отличающихся различной молекулярной массой, количеством окисленных звеньев и удельным содержанием госсипола.

Установлены основные сайты ковалентного связывания госсипола с макромолекулами диальдегидполисахаридов. Обнаружено, что присоединение с образованием полуацетальной связи протекает по окисленным звеньям и аномерному углеродному атому неокисленных гликозидных звеньев восстанавливающих концов макромолекул. При этом окисленные диальдегидные звенья ДАКМЦ и ДАД реагируют как монофункциональные. На квантово-

механической модели показано, что взаимодействие одного окисленного звена с двумя фрагментами молекулы госсипола не происходит по стерическим причинам, при этом в щелочной среде в боратном буфере альдегидная группа госсипола вступает в реакцию в кетольной форме.

Обнаружено, что при гидролизе полимерных производных в условиях моделирующих физиологические, свободный госсипол не выделяется. В продуктах гидролиза обнаружены нафтохиноны с элиминированными альдегидной и изопропильной группами, а также продукты их дальнейшего окисления.

Гликозилированием госсипола в спиртовой и водной щелочной средах получены модельные соединения, позволившие определить основные сайты связывания ароматических альдегидов с макромолекулами диальдегидполисахаридов, а также строение продуктов гидролиза ФАП. Идентифицировано 22 неописанных ранее гликозидов нафтохинонов и продуктов их вторичных превращений.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** На примере полимерных производных госсипола ковалентно связанного с ДАД и ДАКМЦ показано, что модель Х. Рингсдорфа для ФАП прививочного типа не является универсальной и не работает в случае использования диальдегидполисахаридов в качестве носителей ароматических альдегидов.

Обнаружен эффект существенного снижения токсичности *in vitro* при ковалентном связывании госсипола с полимерами-носителями. Синтезированные полимеры могут быть рекомендованы для дальнейших исследований в качестве перспективных противовирусных лекарственных препаратов.

По результатам исследования получено положительно решение на выдачу патента РФ.

**Методология и методы исследования.** В настоящей работе использованы следующие методы исследований:  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопия, MASS-MALDI-спектрометрия, гелпроникающая хроматография, ИК и УФ спектроскопии, ВЭЖХ и хроматомасс-спектрометрия.

**Личный вклад автора** состоит в формулировке целей и задач исследования, постановке химического эксперимента, обработке и интерпретации полученных результатов, формулировке научных выводов.

**Положения, выносимые на защиту:** разработка методов синтеза новых ФАП прививочного типа на основе ДАД, ДАКМЦ с ковалентно связанным госсиполом и новых гликозилированных производных госсипола в водных и неводных средах. Результаты исследований сайтов связывания диальдегидполисахаридов с ароматическим нафталальдегидом – госсиполом. Результаты исследования продуктов кислотного гидролиза госсипол содержащих полимеров в условиях, моделирующих физиологические. Результаты исследования химического состава продуктов превращения альдегидсодержащих полисахаридных полимеров носителей ДАД и ДАКМЦ в щелочной среде.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Отдельные результаты работы были доложены на VIII и X конференциях молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2012» и «МКХТ-2014» (Москва, Россия, 2012, 2014); V Всероссийская с международным участием конференция и школа для молодых ученых «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокompозиты» (Московская область, Истра, Россия, 2015); XII international research and practice conference «European Science and Technology» (Munich, Germany 2015).

По результатам работы опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и тезисы к 7 докладам на научных конференциях, получено положительное решение на выдачу патента РФ и подана заявка патента РСТ.

# 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1.1 Полисахаридные носители физиологически активных соединений

Полисахариды (полигликаны) — это оптически активные сложные высокомолекулярные углеводы, основная цепь которых состоит из моносахаридных звеньев альдегидного типа замкнутых в циклические полуацетали, которые соответственно соединены последовательно ацетальными связями (гликозидными связями) в линейные или разветвленные циклолинейные полимеры [1; 2]. Как правило, они являются аморфными полимерами, не растворимыми в спирте и неполярных растворителях, растворимы в апротонных растворителях: сероуглероде, формамиде, диметилсульфоксиде и концентрированных водных растворах роданидов. Их растворимость в воде зависит от молекулярной массы, типа гликозидных звеньев и способа их соединения. Большая часть полисахаридов растворяются в воде с образованием коллоидных растворов (амилоза, арабинан), так же они могут образовывать гели (пектины, альгиновые кислоты, агар-агар, каррагинан), истинные растворы (декстран, карбоксиметилцеллюлоза, оксиэтилкрахмал) или вообще не растворяться в воде (целлюлоза, хитин) [2].

Полисахариды отличаются друг от друга по нескольким параметрам:

1. природой составляющих их моносахаридных остатков;
2. порядком соединения звеньев (1-2; 1-3; 1-4; 1-6 полисахариды);
3. типом связи при аномерном углеродном атоме ( $\alpha$  (аксиальная позиция) ил  $\beta$  (экваториальная позиция));
4. длиной цепи;
5. степенью разветвленности цепей и типом разветвления.

Полисахариды подразделяются на гомополисахариды, содержащие остатки моносахарида одного вида (например, крахмал, целлюлоза, из животных полисахаридов – гликоген, хитин) и гетерополисахариды, если полимер составлен из двух или более видов моносахаридов, регулярно или нерегулярно

чередующихся в молекуле (например, гемицеллюлозы, инулин, пектин, гиалуроновая кислота, альгиновая кислота, карбоксиметилцеллюлоза, оксиэтилкрахмал с различной степенью химической модификации) [2-4].

В отличие от белков природные полисахариды обычно являются смесями полимеров с различной степенью полимеризации [1, 3, 5, 6]. Разнообразие в строении полисахаридов может быть обусловлено не только характером элементарных звеньев и способом их соединения, но также наличием тех или иных заместителей в моносахаридных фрагментах. Они могут быть метилированы, этерифицированы органическими и неорганическими кислотами (например, серной кислотой – агар-агар, каррагинаны); могут содержать аминогруппы (полиглюкозамин – хитозан, хитин – полиацетилглюкозамин, глюкозаминогликаны, гепарин); протоны карбоксильных групп могут быть замещены на ионы металлов (пектины, камеди) [4, 7].

В отличие от белков полисахариды нельзя характеризовать строго определенной молекулярной массой и их следует охарактеризовывать в терминах молекулярно-массового распределения, средечисловой и средневесовой молекулярными массами и полидисперсностью.

В живых организмах в зависимости от метаболических потребностей клеток моносахаридные остатки могут ферментативно присоединяться к полисахаридам или же отщепляться от них, выполняя функцию резервного запаса энергии и множество других функций [8-9]. Молекулярная масса полисахаридов колеблется от нескольких тысяч до нескольких миллионов дальтон [7, 10].

Химическая классификация полисахаридов основана на строении составляющих их моносахаридов - гексоз (глюкоза, галактоза, манноза), пентоз (арабиноза, ксилоза), а также аminosахаров (глюкозамин, галактозамин), дезоксисахаров (рамноза, фукоза), уроновых кислот и др.

Так же полисахариды классифицируют:

по кислотности:

- кислые;
- нейтральные;

по характеру скелета:

- разветвленные;
- линейные;

по происхождению:

- зоополисахариды (гликоген, хитин, гиалуроновая кислота, гепарин);
- полисахариды микроорганизмов (хитин-гликановый комплекс);
- фитополисахариды (крахмал, инулин, камеди, слизи, пектины, клетчатка, целлюлоза, агар-агар, каррагенан, декстран).

В зависимости от биологической функции полисахариды делятся на:

- энергетические (резервные, запасные) – гликоген, инулин, крахмал, слизи, альгиновые кислоты;
- каркасные (конструктивные) – хитин, клетчатка;
- защитные – слизи, камеди.

Химическая и физическая структура (тип спирали) полисахарида определяет в значительной степени их физико-химические свойства [8, 9, 11].

### **1.1.1 Требования к полисахаридам используемым в качестве полимеров-носителей физиологически активных соединений**

Полисахариды широко применяются в качестве носителей различных классов лекарственных веществ. Присоединение большинства типов физиологически активных веществ (ФАВ), как правило, требует предварительной функционализации основной цепи полимера-носителя. Одним из наиболее распространенных способов функционализации является периодатное окисление. Метод применим для полисахаридов, имеющих в составе повторяющегося звена вицинальные заместители. Наиболее популярными являются декстран и карбоксиметилцеллюлоза, имеющие вицинальные гидроксильные группы в ангидроглюкозных звеньях [4, 7, 12].

Кроме них и другие полисахариды применяются в качестве носителей ФАВ различных типов. Следует отметить крахмал, агарозу, а также сшитые полисахариды, набухающие в воде сефакрил, сефарозу и агарозу [13, 14, 15]. Большинство этих полимеров гидрофильны, растворимы или набухают в воде. Сшитые производные декстранов (сефадексы), карбоксиметилцеллюлозы и сефарозы - глюкозы сшитой эпихоргидрином образуют плотные гели и, являются полифункциональными высокомолекулярными соединениями, способными реагировать с лигандами различной химической природы [2, 16-22].

Общие требования к полимерам-носителям лекарственных средств:

- Полимер должен быть гидрофилен, растворяться или набухать в воде;
- Молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение должны обеспечивать необходимое время циркуляции полимера в кровяном русле и его последующий эндоцитоз соответствующими клетками;
- Основная цепь должна быть биодеструктурирующей и обеспечивать беспрепятственное выведение продуктов биodeградации носителя из организма в разумные сроки по окончании времени действия;
- Продукты биоразложения полимерного лекарства не должны быть токсичными, мутагенными или тератогенными;
- Приемлемой молекулярной массой считается  $M_w=20-80$  кДа для биодеструктурирующих и 30 кДа для небидеструктурирующих полимеров-носителей. Полимеры с такими характеристиками способны оставаться в кровяном русле более 24 часов без спонтанного проникновения через стенку капиллярных сосудов внутрь тканей;
- Носитель должен содержать функциональные группы пригодные для ковалентного или ионного присоединения ФАВ выбранного типа;

Полимер-носитель должен быть биосовместим с основными защитными системами организма:

- не взаимодействовать со свертывающей системой крови;
- не активировать систему комплимента;

- не взаимодействовать с иммунной системой (не быть антигенным) [15, 21, 22].

### 1.1.2 Окисление полисахаридов

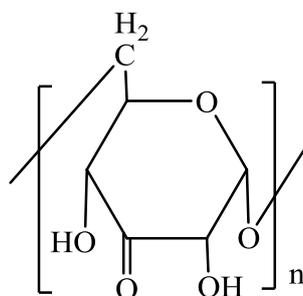
Так как большинство нативных полисахаридов химически инертны в реакциях с ФАВ, их использование в качестве полимеров-носителей требует обязательной химической модификации, чаще других применяют окисление. Одним из важнейших направлений развития химии полисахаридов за последнее десятилетие является поиск новых окислителей, с использованием которых можно было бы расширить круг карбонилсодержащих полисахаридов – носителей лекарственных средств. Разработка новых способов получения окисленных носителей и ковалентного или ионного связывания ФАВ с высоким выходом в реакции, минимальным количеством стадий и однозначностью химической структуры образующихся соединений по-прежнему остается актуальной задачей [4, 5, 7, 9, 11, 15, 23, 24].

Полисахариды обычно окисляют йодной кислотой или ее солями (метапериодатом натрия). Для этого используют два способа. Гомофазное окисление метапериодатом натрия в водном растворе, либо гетерофазное окисление при пропускании раствора полисахарида через анионообменную смолу в  $\text{IO}_4^-$  форме. Гомофазное окисление предпочтительно использовать в лабораторных условиях. Этот метод позволяет контролировать степень окисления, изменяя соотношение реагентов. Гетерофазный метод с использованием тетраацетата свинца в растворе ДМСО, чаще применим в заводских условиях, так как позволяет избежать дополнительной стадии очистки продукта от солей и остаточных количеств периодата [9].

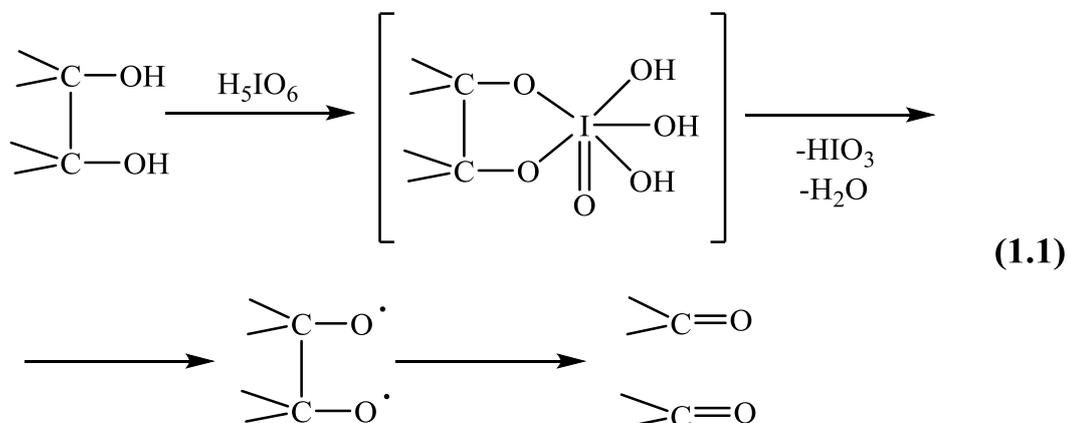
Скорость окисления тетраацетатом свинца в ДМСО значительно превышает скорость окисления полисахаридов периодатом натрия в водном растворе. Поэтому с помощью этого метода можно быстрее осуществить аналитическое

окисление образца. Главное достоинство метода заключается в легкости выделения продуктов окисления в препаративных опытах. Окисленные полисахариды можно выделить из реакционной массы непосредственным осаждением спиртом, при этом остальные компоненты смеси остаются в растворе.

У этого метода существуют и недостатки. Он пригоден лишь для окисления нейтральных полисахаридов, растворимых в ДМСО. Окисление кислых полисахаридов, даже если карбоксильные группы этерифицированы, приводит к аномальным результатам, а так же продуктами реакции являются кетоны (декстран окисляется до кетодекстрана). Не растворимые в ДМСО полисахариды, такие, как картофельный крахмал и хлопковый линтер, в этих условиях не окисляются [23, 24].



Обычно гомофазное окисление полисахарида по реакции Малапрада проводят йодной кислотой (ее дигидратом  $\text{H}_3\text{IO}_6$ ) либо ее солями (периодатами  $\text{KIO}_4$  и  $\text{K}_3\text{H}_2\text{IO}_6$ ) (схема 1.1) [12, 15, 25-29]. Гомофазное окисление позволяет тщательно контролировать степень окисления, изменяя соотношение реагентов с образованием продукта строго контролируемого химического строения [23].



Реакцию проводят при комнатной температуре или при охлаждении в слабокислых, нейтральных или слабощелочных водных и водно-органических растворах.

Скорость окисления зависит от различных условий: pH раствора, структуры и геометрической конфигурации соединений. Так, цис-изомеры производных пираноз окисляются значительно быстрее, чем транс-изомеры [30].

Так же муравьиная кислота является одним из продуктов периодатного окисления олиго- и полисахардов с 1-6 гликозидными связями, в то время как при окислении сахаров с 1-2, 1-3 и 1-4 связями она не образуется. По количеству выделившейся муравьиной кислоты можно судить о степени полимеризации полисахаридов с 1-2, 1-3 и 1-4 связями, так как при окислении каждой линейной цепи таких полисахаридов концевые моносахаридные остатки – невосстанавливающие и восстанавливающие дают соответственно одну и две молекулы кислоты. Аналогичным образом рассчитывают соотношение между числом концевых и неконцевых моносахаридных остатков в разветвленных полисахаридах с гликозидными 1-2, 1-3 и 1-4 связями. При определении этим методом длины полисахаридной цепи следует принимать во внимание присутствие концевых звеньев с 1-6 связями. Однако, если число таких звеньев велико, то точность анализа снижается [15, 24, 26-29].

Аналитический контроль Малапрада реакции осуществляется по определению не вошедшего в реакцию избытка IO<sub>4</sub>- и по количеству выделившейся кислоты. По этим данным можно получить информацию о числе первичных и вторичных вицинальных спиртовых групп и о количестве расщепленных C-C - связей окисленного полиола [15, 24, 25].

Выход продуктов периодатного окисления часто оказывается достаточно низким, вероятно, вследствие исключительной лабильности ацетальных связей, которые гидролизуются в процессе деионизации раствора. Последующий диализ (или осаждение) приводит к потере продуктов с низким молекулярным весом [24, 26-29].

## 1.2 Основные реакционные центры глюкозы

Глюкоза –  $C_6H_{12}O_6$  - бесцветные кристаллы или белый мелкокристаллический порошок без запаха, сладкого вкуса, хорошо растворимый в воде. Является наиболее распространенным моносахаридом из группы гексоз, имеющий альдегидную группу [31]. В природе образуется в результате реакции фотосинтеза вместе с другими углеводами. Также она является конечным продуктом гидролиза дисахаридов и полисахаридов. В промышленности её получают гидролизом крахмала и клетчатки.

Глюкоза встречается в свободном виде, в виде олигосахаридов, полисахаридов (целлюлоза, декстран), гликозидов и других производных. В несвязанном виде она содержится в плодах, цветах и других частях растений, а также в животных тканях и в организме человека в крови, лимфе, цереброспинальной жидкости, ткани головного мозга, в сердечной и скелетных мышцах [32].

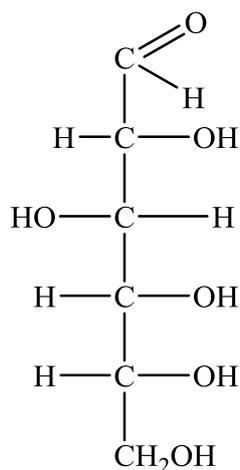
Глюкоза — абсолютно необходимая составная часть крови. В норме ее содержание в крови и тканях млекопитающих составляет около 0,1% по массе. Некоторое увеличение содержания моносахарида в организме не причиняет особого вреда, а ее уменьшение повышает возбудимость некоторых клеток головного мозга, так что они начинают реагировать на очень слабые стимулы. Импульсы, получаемые от этих клеток мышцами, могут вызвать судороги, привести к потере сознания и даже к смерти. Глюкоза необходима для метаболизма клеток головного мозга, и для того, чтобы обеспечить эти клетки глюкозой, требуется определенный уровень содержания ее в крови. Надлежащая концентрация глюкозы в крови поддерживается при помощи чрезвычайно сложного механизма, в котором участвуют нервная система, печень, поджелудочная железа, гипофиз и надпочечники [33].

Глюкоза применяется как общеукрепляющее средство при различных заболеваниях, сопровождающихся истощением. Является универсальным антитоксическим средством, т.к. стимулирует окислительно-восстановительные

процессы, способствует более интенсивному депонированию гликогена в печени, усиливая ее дезинтоксикационную способность. Обычно глюкоза используется в виде изотонических и гипертонических растворов. Изотонические растворы глюкозы (растворы, осмотическое давление которых совпадает с осмотическим давлением плазмы крови), т.е. 4,5—5% растворы глюкозы, применяют для восполнения потерь воды при обезвоживании организма и в качестве источника питания. Изотонические растворы глюкозы вводят подкожно, внутривенно и ректально. Гипертонические растворы глюкозы являются компонентами различных кровезамещающих и противошоковых жидкостей [34].

Так же ее применяют в кондитерской промышленности, как восстановитель и в фармакологии, для производства аскорбиновой и глюконовых кислот и т.д [35].

Глюкоза образует несколько форм. Первая форма – линейная она существует только в растворе и в незначительных количествах.



В твердом виде глюкоза существует в виде второй и третьей форм: циклической  $\alpha$ - (гидроксильные группы расположенные при первом и втором углеродном атомах расположены по одну сторону кольца молекулы (аксиально)) (рисунок 1, I) и  $\beta$ -форме (гидроксильные группы расположенные при первом и втором углеродном атомах расположены по разные стороны кольца молекулы (экваториально)) (рисунок 1, II). Эти формы существуют одновременно и могут переходить друг в друга [31-33].

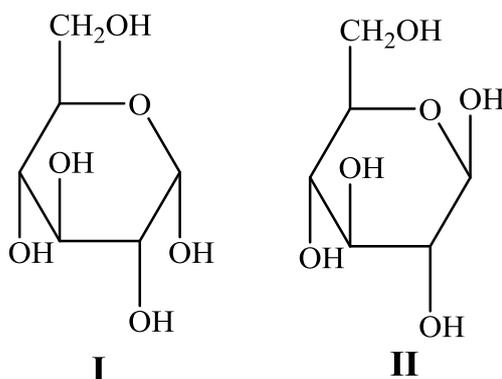


Рисунок 1 – Изомеры глюкозы: I –  $\alpha$ , II -  $\beta$

Глюкоза обладает химическими свойствами, характерными для спиртов и альдегидов, она может восстанавливаться в шестиатомный спирт, легко окисляется до карбоновой кислоты, восстанавливает серебро из аммиачного раствора окиси серебра и двухвалентную медь в одновалентную.

Для количественного определения глюкозы применяются calorиметрические, иодометрические и другие методы [34, 35].

### 1.3 Основные реакционные центры целлюлозы и карбоксиметилцеллюлозы

Целлюлоза  $(C_6H_{10}O_5)_n$  - это растительный полисахарид, состоящий из остатков  $\beta$ -глюкозы. Ее молекулы имеют линейное (полимерное) строение. В каждом остатке молекулы глюкозы содержатся три гидроксильные группы, поэтому она проявляет свойства многоатомного спирта [36].

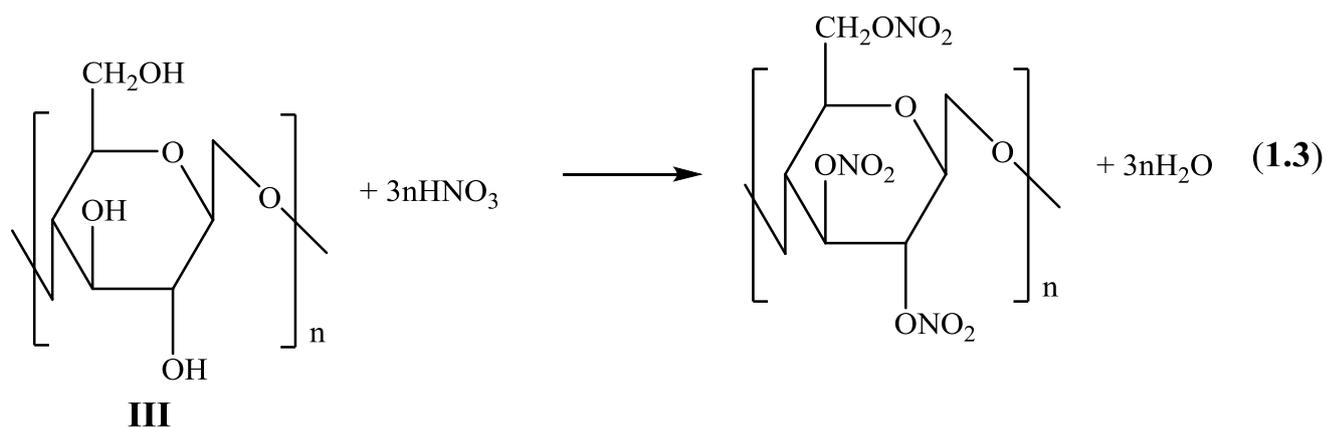
Химические свойства целлюлозы:

Целлюлоза подвергается гидролизу с образованием глюкозы (1.2) :

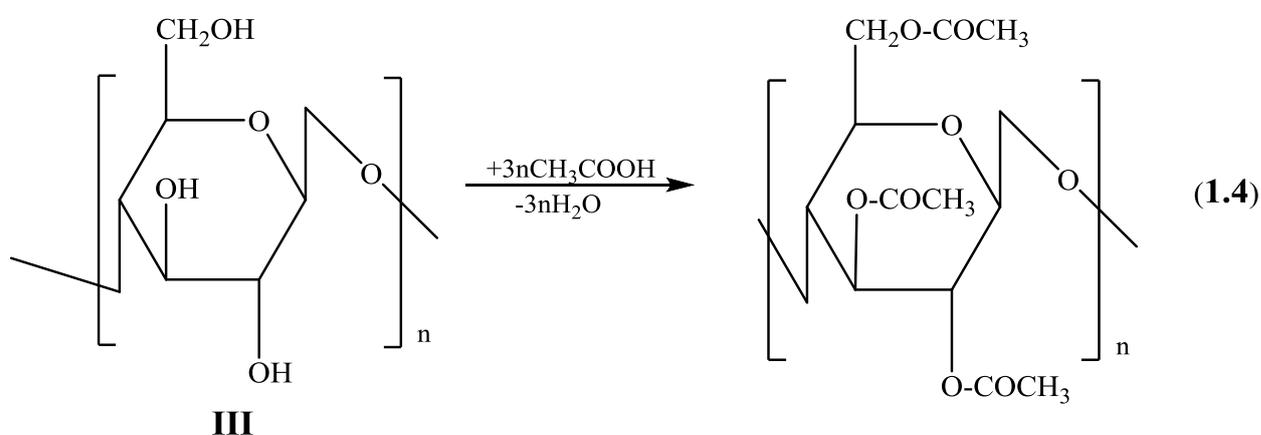


Серная кислота с йодом, благодаря гидролизу, окрашивают целлюлозу в синий цвет. Один же йод — только в коричневый.

При реакции с азотной кислотой образуется нитроцеллюлоза (1.3):



Целлюлоза, как многоатомный спирт, вступает в реакции этерификации с образованием сложных эфиров (1.4) [37, 38].



Этот биополимер обладает большой механической прочностью и выполняет роль опорного материала растений. В большом количестве целлюлоза содержится в тканях древесины (40-55%), в волокнах льна (60-85%) и хлопка (95-98%). Целлюлоза используется в производстве бумаги, искусственных волокон, пленок, пластмасс, лакокрасочных материалов, бездымного пороха, взрывчатки, твердого ракетного топлива, для получения гидролизного спирта, и др. [25; 32]. Выделенная из природных материалов целлюлоза представляет собой твердое волокнистое вещество, не растворяющееся ни в воде, ни в обычных органических растворителях [37, 38].

Нативная целлюлоза является химически инертным нерастворимым в воде полимером глюкозы. Для придания способности растворяться в воде целлюлозу подвергают химической модификации [39-41]. Наиболее распространенным способом является метилирование и дальнейшее карбоксилирование по 6-му

положению ангидроглюкозного звена с образованием карбоксиметилцеллюлозы [40-43].

Метилвые эфиры целлюлозы могут быть получены при реакции целлюлозы с различными алкилирующими реагентами диметилсульфатом, хлористым или йодистым и бромистым метилом, diaзoметаном, метиловым эфиром бензолсульфоновой кислоты. В промышленности для получения метилцеллюлозы чаще всего применяют метод, основанный на алкилировании щелочной целлюлозы хлористым метилом [41].

Низкозамещенную натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) получают при взаимодействии щелочной целлюлозы с монохлоруксусной кислотой в различных условиях. В связи с тем, что хлоруксусная кислота является твердым, кристаллическим веществом и для получения низкозамещенных продуктов она требуется в небольшом количестве по сравнению с целлюлозой, особенное значение имеет равномерное распределение реагирующих компонентов смеси [44-45].

При получении метилцеллюлозы в растворе исходная кристаллическая структура разрушается, а новая решетка при регенерации из раствора строится не сразу в специальных условиях, поэтому продукт получается аморфным и, следовательно, легче растворимым. Большое значение имеет различная доступность целлюлозы, благодаря чему получается смесь продуктов реакции, степень замещения которых различна.

Такая неоднородность приводит к уменьшению количества растворимого вещества [39, 44-47].

Для получения водорастворимого полимера, ангидроглюкозные звенья целлюлозы необходимо химически модифицировать более чем на 60 %. Такое соединение широко используется в медицине и в пищевой промышленности (рисунок 2).

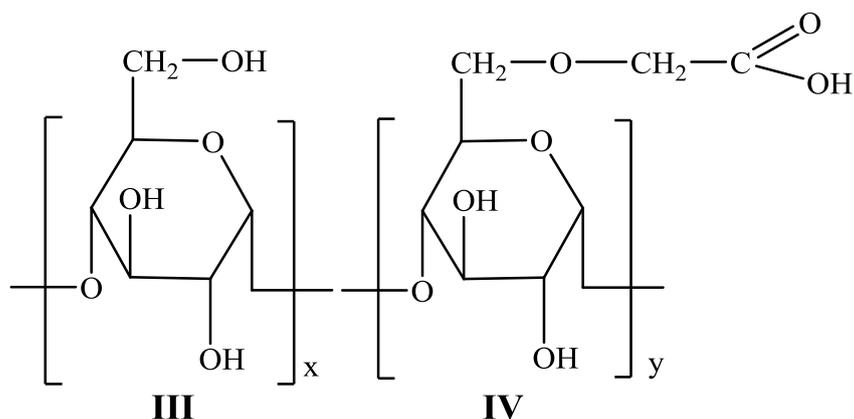
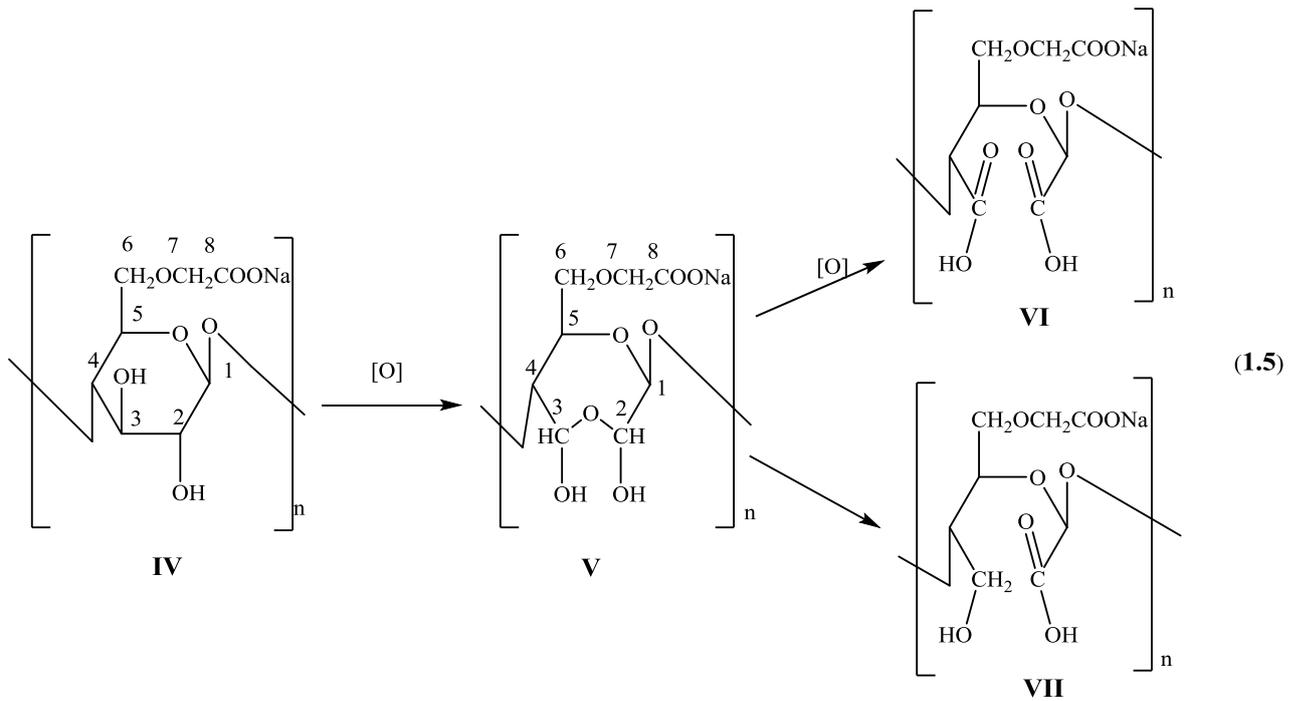


Рисунок 2 - Структура исходной КМЦ

Карбоксиметилцеллюлоза является слабой кислотой. В химической, пищевой и медицинской промышленности наиболее часто используется ее натриевая соль — натрий-карбоксиметилцеллюлоза (Na-карбоксиметилцеллюлоза), водные растворы которой вязки, обладают псевдопластичностью, а у некоторых сортов — тиксотропией [33, 48].

Na-карбоксиметилцеллюлоза применяется в качестве пластификатора и загустителя в бытовой химии, косметике и пищевой промышленности. Она входит в состав зубной пасты, шампуней, соусов, колбасных и макаронных изделий [41, 49].

Для получения более реакционно-способных производных КМЦ ее подвергают дальнейшей химической модификации. Чаще других используется периодатное окисление с образованием диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы (ДАКМЦ) [39, 50]. Побочными реакциями окисления карбоксиметилцеллюлозы является доокисление до дикарбоновой кислоты, а также диспропорционирование при выделении из щелочного раствора (схема 1.5) [15, 28, 51].



IV – исходная КМЦ;

V- Окисление с образованием ДАКМЦ;

VI - Окисление избытком периодата на свету с образованием дикислоты;

VII - Диспропорционирование при выделении из щелочного раствора.

#### 1.4 Диальдегидкарбоксиметилцеллюлоза

Диальдегидкарбоксиметилцеллюлоза, полученная периодатным окислением карбоксиметилцеллюлозы по реакции Малапрада, является широко распространенным полимером-носителем ФАВ (рисунок 3) [15, 26, 39, 40, 46-48]

Она относится к классу биодергадирующих носителей и более 30 лет успешно применяется в препаратах, вводимых перорально (внутрижелудочно) [49, 50]. Она выполняет ряд требований, предъявляемых к полимерам-носителям и обладает комплексом уникальных свойств, которые предопределили ее широкое использование в качестве полимера-носителя, пригодного для внутрижелудочного введения, и для создания имплантатов. Для параэнтерального (внутривенного) введения растворимых препаратов на основе ДАКМЦ

непригодно, это связано с наличием врожденного иммунитета у человека на целлюлозу и ее производные [50].

Чаще всего диальдегидкарбоксиметилцеллюлозу применяют для присоединения веществ, имеющих в своей структуре реакционную первичную аминную, альдегидную, спиртовую и фенольную группы [15]. В список ФАВ пригодных для химического связывания с ДАКМЦ входят белки, физиологически активные пептиды, гормоны, природные нафтальдегиды и высоко активные токсины. Результатом взаимодействия являются вещества, в которых молекулы ФАВ связаны с полисахаридом ковалентной связью. Возможны несколько вариантов связывания отличающиеся типом химической связи. К ним относятся альдиминовая связь, пиримидиновые циклы, вторичная и третичная аминная - продукт реакции Майяра и др. [51]. В случае иммобилизации ФАВ, содержащих альдегидные группы, продуктами реакции могут быть полуацетали или полные ацетали [52]. Прочность связывания ФАВ с ДАКМЦ определяется гидролитической стабильностью образующихся связей. Возможно образование как легко гидролизуемых альдиминовой и полуацетальной связей, так и практически не гидролизуемых в условиях организма вторичной аминной и полной ацетальной. Тип образовавшейся связи зависит как от условий получения ДАКМЦ, так и от условий формирования ковалентно-связанного продукта, и до настоящего времени является предметом острых дискуссий. Знание природы и реакционной способности окисленных звеньев ДАКМЦ, полученных разными способами, чрезвычайно важно [53]. Непрореагировавшие с ФАВ звенья входят в состав продукта реакции, они неотделимы от последнего, и звенья оказываются в организме вместе с полимерным лекарственным средством, при этом свободный полимер-носитель сохраняет свою реакционную способность. Таким образом, полимерное лекарство в целом оказывается реакционноспособным полимером, способным связываться с белками в органах желудочно-кишечного тракта, что является фактором повышенного риска [13, 54].

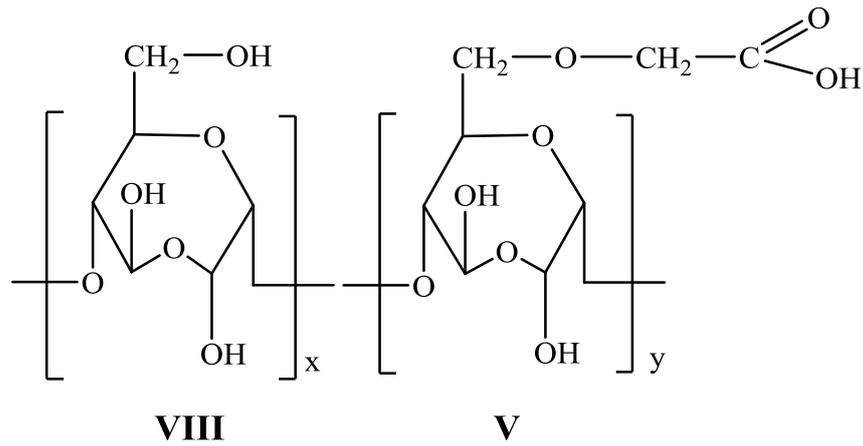


Рисунок 3 - Строение ДАКМЦ

### 1.5 Основные реакционные центры декстрана

Декстран – полисахарид бактериального происхождения, полимер глюкозы, его получают при культивировании на искусственной питательной среде микроорганизма рода *Leuconostoc mesenteroides*. Его молярная масса достигает 10 млн. Да. В линейной части молекулы декстрана (рисунок 4) содержатся остатки глюкозы соединенные связями между  $\alpha$  1-6 атомами углерода; ветвление обусловлено связями между  $\alpha$  1-4,  $\alpha$  1-3,  $\alpha$  1-2 атомами [1, 55]. Получены декстраны, молекулы которых являются практически неразветвленными, а элементарные звенья на 95% соединены  $\alpha$ -1,6-гликозидными связями [56].

Нативный декстран подвергают кислотному гидролизу, ферментативной деполимеризации, алкоголизу, термической деструкции, обработкой перекисью водорода, УФ и рентгеновскому облучению, действию ультразвука для получения полимера с заданным молекулярно-массовым распределением, не содержащего разветвлений, поскольку их присутствие вызывает появление у препарата пирогенных и токсических свойств. В промышленных условиях для указанной цели применяется кислотный гидролиз. Характер кислоты—  $\text{HCl}$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  — мало влияет на количественное соотношение продуктов гидролиза. Гидролиз и последующее фракционирование позволяет уменьшить величину коэффициента полидисперсности до 1,2—1,5. В результате кислотного

гидролиза происходит также уменьшение степени разветвленности макромолекул декстрана, что обусловлено относительно высокой устойчивостью к кислотному гидролизу  $\alpha$ -1,6-гликозидной связи [55, 57].

- I группа - низкомолекулярные декстраны (30-40 кДа);
- II группа - среднемoleкулярные декстраны (50-70 кДа).

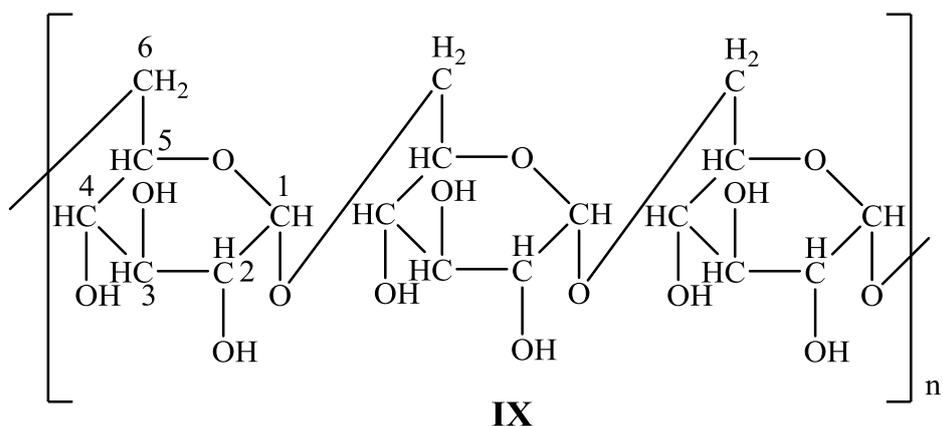


Рисунок 4 - Структура исходного декстрана

Водные растворы этого полимера с молекулярным весом 35-70 кДа и низкой степенью разветвленности являются эффективными заменителями плазмы крови. Препарат обеспечивает поддержание нормального осмотического давления, соответствующего осмотическому давлению крови на срок до 12 часов [15, 58, 59, 60].

Декстран, в отличие от карбоцепных полимеров, постепенно гидролизуеться в организме ферментами. Это исключает возможность накопления полимера в органах и облегчает выведение через почки, не блокируя систему фильтрации. Период полувыведения декстрана из организма зависит от молекулярной массы полимера. Для клинических препаратов узкого молекулярно массового распределения с  $M_w=60\pm 5$  кДа не превышает 5 часов [61].

Предметом исследования ряда работ, выполненных в последнее время, явилось взаимодействие макромолекул декстрана с растворителем. В работах показано, что макромолекулы некоторых препаратов нативных декстранов образуют структурные ассоциаты с растворителем. Возможность образования ассоциатов

рассмотрена с учетом спиральной структуры нативного декстрана, стабилизированной внутримолекулярными водородными связями, и характера водородных связей, образующихся в растворе. Присутствие в водных растворах декстрана других веществ влияет на форму макромолекул полимера и на вязкость растворов. Оказалось, что в водных растворах мочевины, глюкозы и в концентрированных растворах солей степень асимметрии макромолекул нативного декстрана больше, а в воднометанольном растворе — меньше, чем в воде [62].

При изучении реологических свойств водных растворов декстрана ( $M_w = 120$  кДа) в широком интервале концентраций было установлено, что резкое изменение этих свойств наблюдается при концентрации 40—43%. Это явление связано со строением гидратной оболочки макромолекул полимера: скачкообразное изменение вязкости раствора происходит тогда, когда его состав соответствует образованию 1,5 слоя молекул воды вокруг каждой макромолекулы декстрана [63].

Вискозиметрия как метод определения молекулярного веса декстрана имеет известные ограничения. В уравнении Куна-Марка-Хаувинка постоянные  $K$  и  $a$  различны для препаратов декстрана, отличающихся по степени разветвленности или по соотношению различных типов гликозидных связей в макромолекулах [64].

В последние годы выполнен также ряд работ, посвященных исследованию конформационных переходов макромолекул декстрана в растворе, определению вириальных коэффициентов, инкрементов показателей преломления водных растворов декстрана, теплоты и энтропии смешения декстрана с водой в широком диапазоне концентраций, изучению осмотического давления и рассеяния света в водных растворах декстрана [55].

Очень важным оказалось использование декстрана в качестве исходного вещества при получении водонабухающих сорбентов сефадексов, и диагностических онкологических препаратов на их основе [55, 63, 65].

6% водный раствор декстрана с молекулярной массой 60 кДа, называемый полюглюкин, применяется для восстановления и поддержания артериального давления, объема циркулирующей крови, улучшения сердечной деятельности. Его можно вводить внутривенно, внутриартериально, внутрикостно.

Декстран с молекулярной массой 60-80 кДа, содержащий соли катионов натрия, калия, кальция, магния, называемый полиглюсоль, применяется при различных видах шоковых состояний, коррекции электролитного дисбаланса [16, 66].

### 1.6 Диальдегиддекстран

Полное окисление клинического низкоразветвленного апиринового декстрана йодной кислотой по реакции Малапрада наряду с другими методами давно используется для изучения строения макромолекул декстрана. Влияние условий окисления декстрана йодной кислотой на содержание в водорастворимом продукте реакции альдегидных групп изучено в работе [55-58], где показано, что в гомогенной среде эта реакция протекает с высокой скоростью (при введении в реакцию 1 моля  $\text{HIO}_4$  на 1 элементарное звено окисление заканчивается за 25 минут). Строение продукта частичного окисления декстрана йодной кислотой может быть представлено на рисунке 5.

Диальдегиддекстран (ДАД) широко используется в качестве полимер-носителя лекарственных средств. Его биологические свойства, включая токсические и фармакокинетические очень хорошо изучены, однако химическое строение и свойства окисленного звена до настоящего времени остаются предметом дискуссий. Знания строения окисленного звена особенно важно учитывая, что и после присоединения ФАВ полимер-носитель сохраняет некоторую часть незамещенных активных групп [19, 59]. Альдегидные группы сохраняют способность вступать в химическое взаимодействие с белком даже после параэтерального (внутривенного) введения полимера в организм, при этом полимер-носитель не является полностью химически инертным, он способен

связываться с белками крови с образованием ковалентных соединений. Изучение возможной структуры этих соединений и их молекулярно массовых характеристик является крайне актуальной задачей [10, 20, 60, 67, 68].

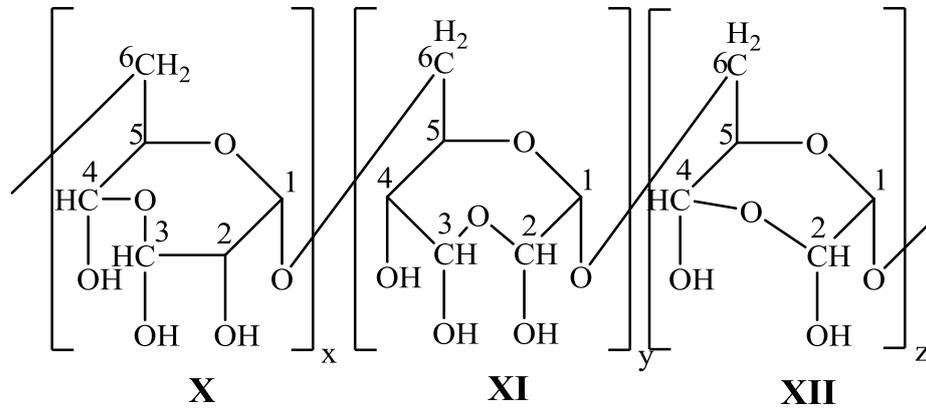


Рисунок 5 - Структура диальдегиддекстрана

Молекулярно-массовые характеристики любых полимеров-носителей являются ключевым параметром, подлежащим контролю при синтезе полимерных лекарственных средств. Периодатное окисление полисахаридов неизбежно приводит к изменениям длины макромолекулы и ее гидродинамических характеристик. Кроме этого не мало важной является проблемой фракционная неоднородность, полученных после периодатного окисления ДАКМЦ и ДАД. Фракционная неоднородность, то есть количество окисленных звеньев, приходящееся на макромолекулу в зависимости от ее длины, определяет дальнейшую плотность замещения макромолекулы ФАВ. После введения ФАВ большая его часть может содержаться в низкомолекулярной или высокомолекулярной фракции полимера в зависимости от фракционного состава исходного полимера. Поэтому изучение влияния распределения альдегидных групп по фракциям полимера-носителя лекарственных средств является крайне актуальной задачей как для ДАКМЦ так и для ДАД [25, 69-72].

## 1.7 Физиологически активные вещества нафталдегидного типа. Госсипол и его производные

Госсипол – природный полифенол - 7,7'-бис (1-формил-2,3,8-тригидрокси-4-изопропил-6-метил-нафталин) представляет собой желтое соединение, в виде симметричного бинафтил диальдегида, получаемого из хлопчатника (рисунок 6) [73, 74]. Он содержится в основном в пигментных железах хлопкового семени и составляет 20-40% веса железы, а так же около 0,4-1,7% от массы всего ядра. Помимо семян, железы с госсиполом были найдены в некоторых других частях хлопчатника: в коре корней растения, листьях, оболочке семян и цветках [75, 76].

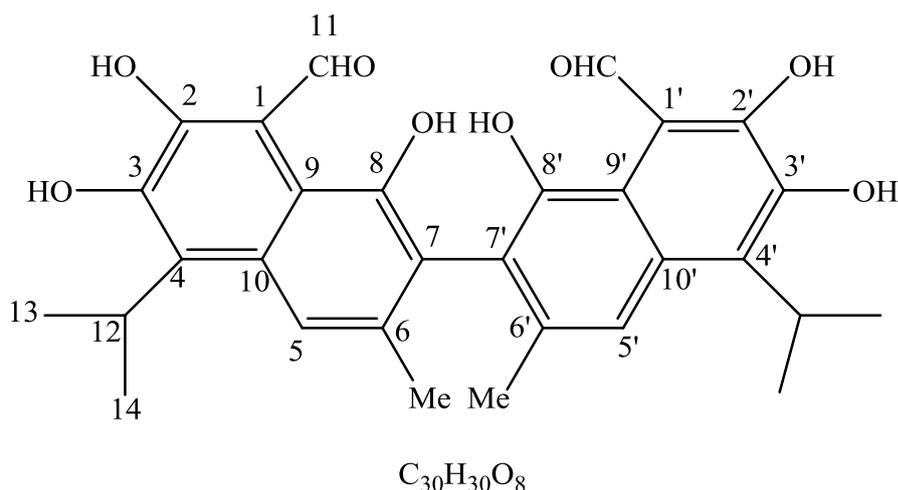


Рисунок 6 - Молекула госсипола

Госсипол привлек внимание, как противозачаточное средство в результате эпидемиологических исследований, он использовался в качестве перорального мужского контрацептива в Китае. Клинические исследования показали, что противозачаточный эффект препарата более 99%. Сперматозоиды обычно возвращаются к норме в течение 3 месяцев после окончания терапии. Однако, долгосрочные последующие исследования показывают, что ингибирование сперматогенеза может продолжаться после прекращения приема у 20% мужчин после 2 лет [77].

Хотя госсипол, как правило, считается мужским противозачаточным препаратом, он также эффективен при введении самкам животных. Внутримышечные инъекции госсипола самкам крыс тормозит имплантацию и поддержание нормальной беременности [78].

На некоторых экспериментальных моделях опухолей, было показано, что госсипол также может быть потенциальным противоопухолевым химиотерапевтическим средством. Он может ингибировать клеточную пролиферацию при низких концентрациях, а так же приводить к полному лизису клеток при более высоких концентрациях. Различные клеточные линии показали разную чувствительность к лекарству.

Госсипол высокоактивное соединение и обладает различными видами физиологической активности, такими как: противовирусная, интерферониндуцирующая, антифертильная, противоопухолевая, антиоксидантная, он проявляет противомикробное и противомаларийное действия, а так же эффективен в борьбе с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Однако госсипол высокотоксичен, он особенно ядовит для быстроделющихся клеток, цитотоксичен, вызывает недостаточность кровообращения, отек легких, симптомы недомогания и недоедания [79-84].

Молекула госсипола состоит из двух идентичных фрагментов, соединенных одинарной С-С связью и образуют двугранный угол  $\phi$  между плоскостями нафталиновых циклов в среднем близкий к  $90^{\circ}$ . Однако, вращение вокруг С-С связи затруднено стерически. Вследствие ограниченного вращения межнафталильной связи госсипол является хиральным соединением, которое имеет 2 энантиомерных формы (+)- и (-) - госсипол, проявляющих различный уровень биологической активности. Госсипол, при извлечении из хлопчатника, представляет собой рацемическую смесь (+) и (-) госсипола (рисунок 8). Причем (-) энантиомер госсипола превышает по своей активности и токсичности (+) энантиомер и рацемическую смесь [85, 86].

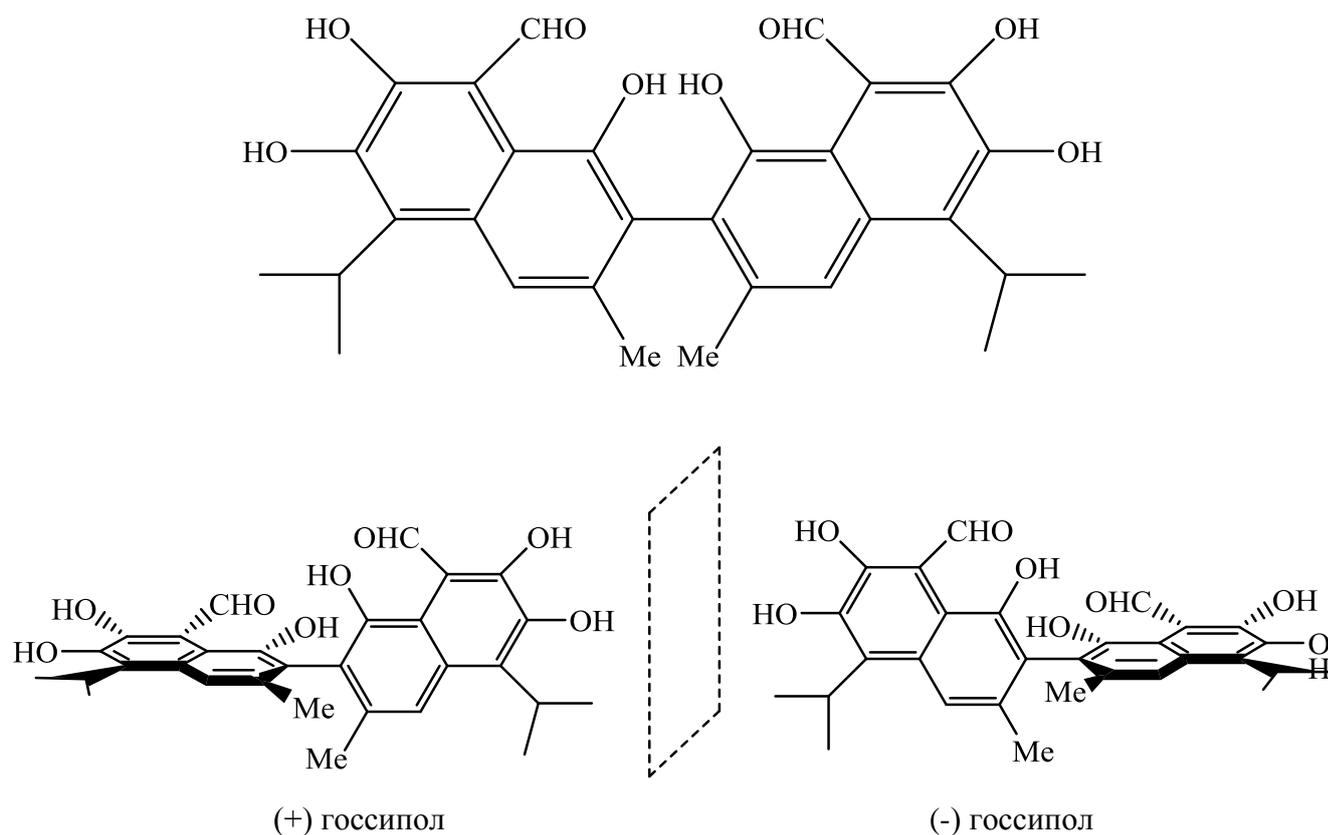


Рисунок 7 – Химическая и энантиомерная (+) и (-) структуры госсипола

Как показано на рисунке 7, госсипол содержит полярные группы - 6 гидроксильных и 2 альдегидные, что делает его растворимым в большинстве органических растворителей, таких как метанол, этанол, изопропанол, ацетон, хлороформ, бутанол, диоксан, четыреххлористый углерод, фенол, пиридин и т.д. Однако присутствие диалкилнафтильных групп делает его нерастворимым в воде – вещество в целом липофильно [86, 87].

Для госсипола характерна симметричная и ассиметричная таутомерия, т.е. в зависимости от растворителя он может находиться в трех различных формах: альдегидной (рисунок 8 XIIIa), лактольной (рисунок 8 XIIIb), и кетольной (рисунок 8 XIIIc), [88, 89].

На рисунке 8 показана симметричная таутомерия:

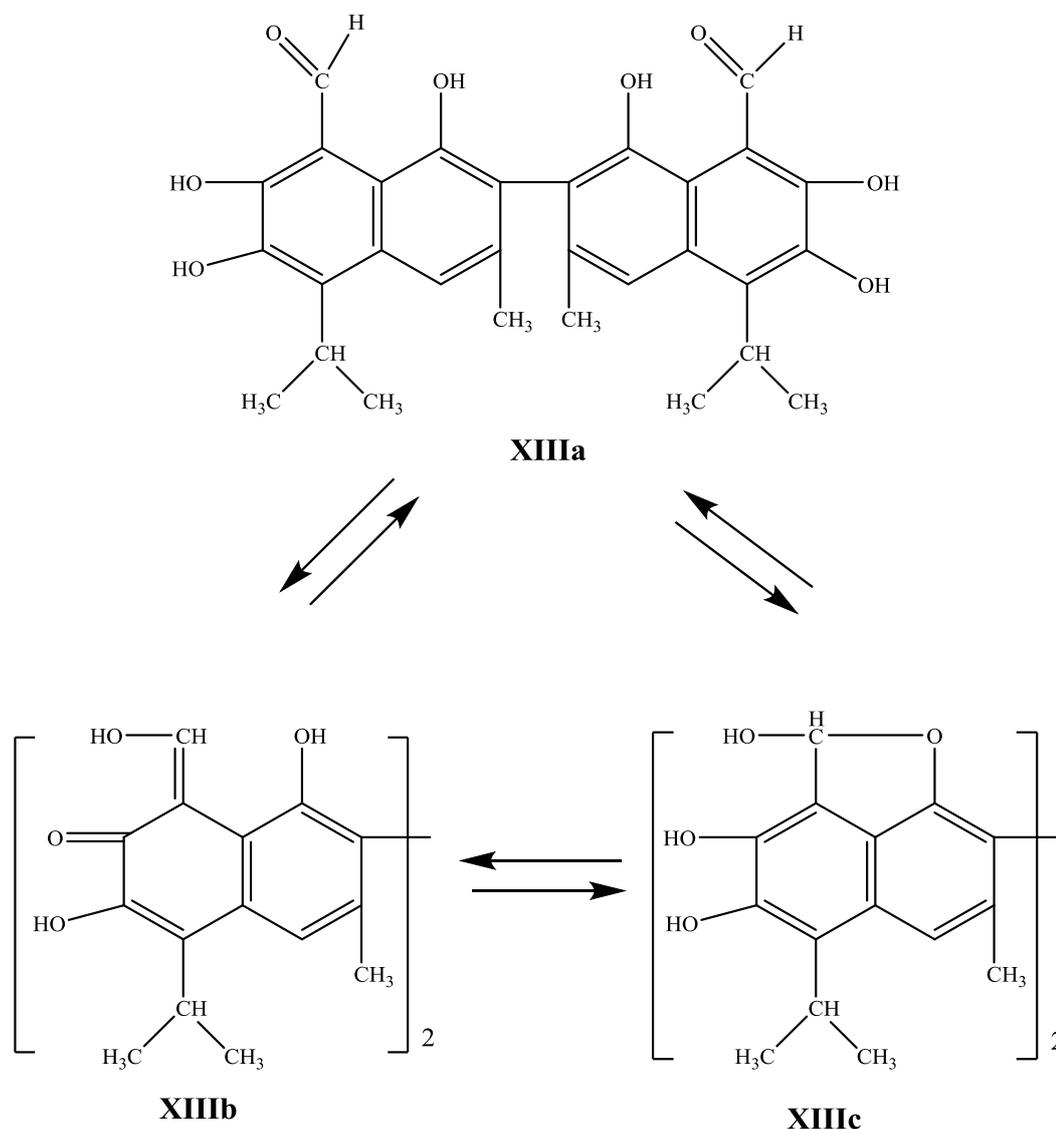


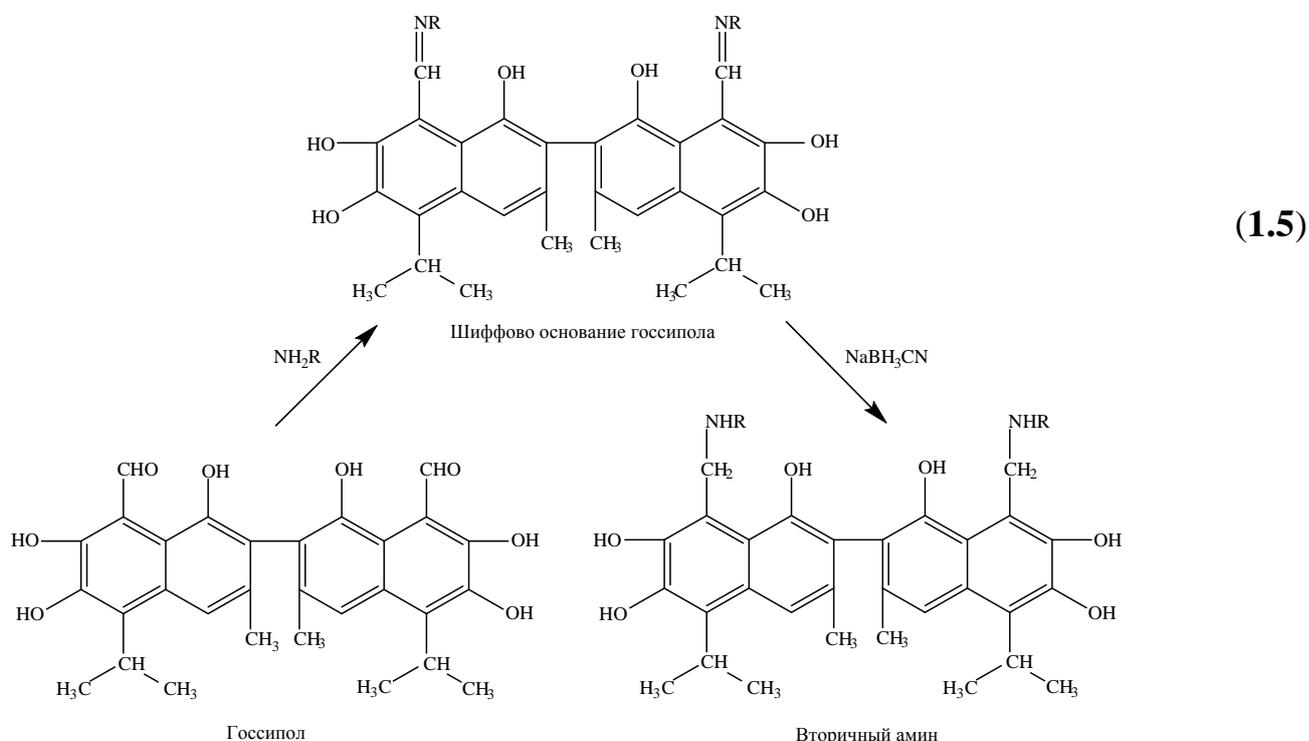
Рисунок 8 – Структура таутомеров молекулы госсипола

Альдегидная форма госсипола доминирует в нерастворенном твердом состоянии и неполярных растворителях, таких как хлороформ, бензол, диоксан и дихлорметан, а так же в кислотных средах. Кетольный таутомер присутствует в водных щелочных растворах и не стабилен в нейтральных и кислотных растворителях, где может переходить в альдегидную форму [89]. В полярных растворителях госсипол находится в равновесии между лактольной и альдегидной формами и смещается в сторону лактольного таутомера в случае повышения нуклеофильности растворителя, например в диметилсульфоксиде. Симметричный кетольный таутомер госсипола образует стабильные комплексы с ионами железа

двух и трех валентного и цинка, в то время как катионы никеля и меди смещают равновесие в сторону образования лактольной формы [88, 90, 91].

Некоторые экспериментальные данные доказывают, что большинство молекул госсипола существует в форме Шиффовых оснований, образующихся путем конденсации между альдегидными группами госсипола и аминогруппами белков во время обработки семян хлопчатника [92]. Однако данный химический комплекс не может полностью отвечать за все сложные механизмы поведения госсипола. Госсипол может образовывать хелатный комплекс с железом в продуктах из семян хлопчатника и формировать нерастворимые металлосодержащие комплексы в условиях окисления или формировать полимеры госсипола [93 - 96]. Кроме того, его фенольные группы могут вступать в реакцию с формированием простых и сложных эфиров с другими карбоксильными соединениями и фенолами в растениях хлопчатника.

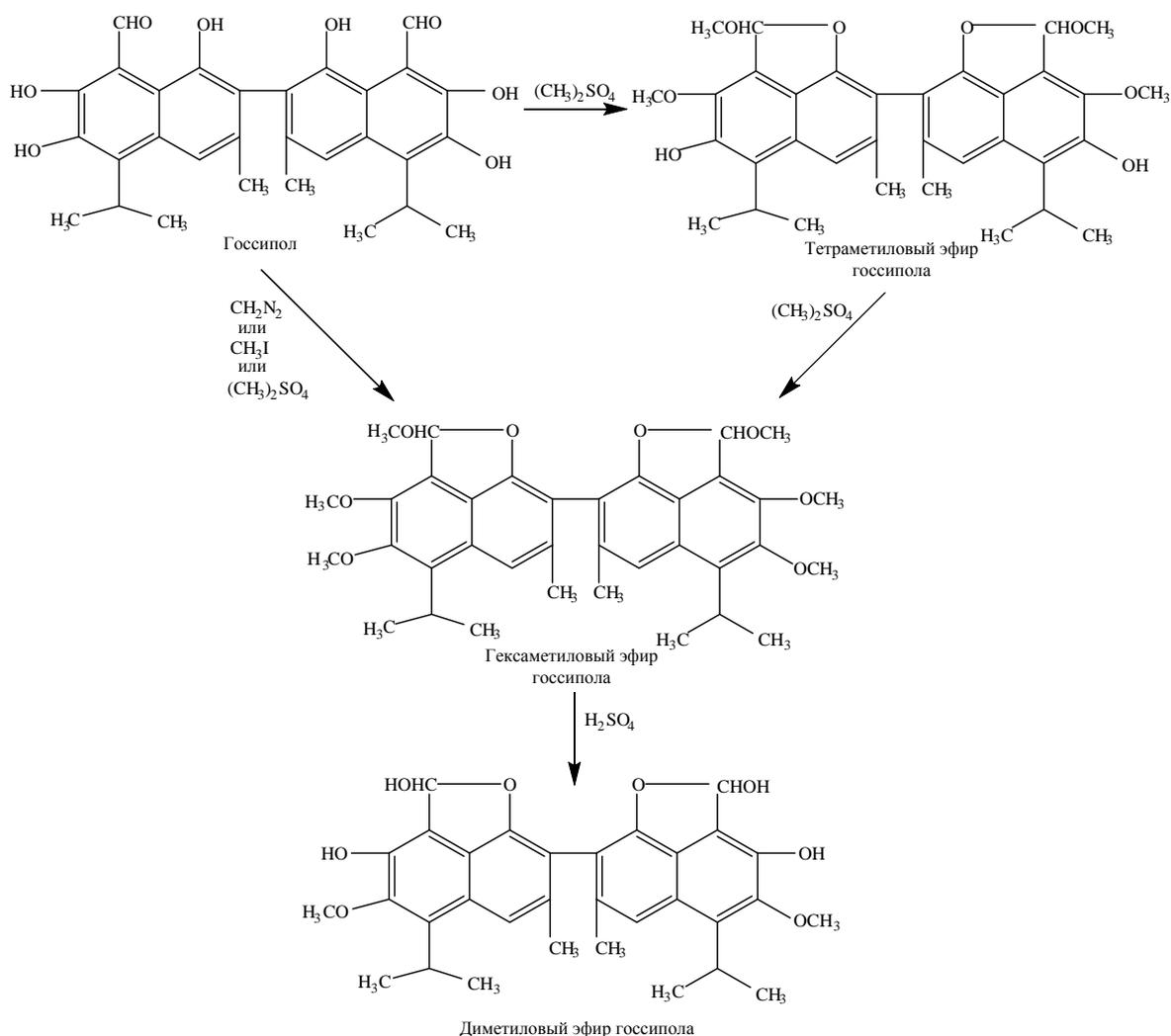
В последние несколько десятилетий было выполнено много работ по изучению реакций образования Шиффовых оснований между госсиполом и аминогруппами (схема 1.5).



Шиффово основание - относительно лабильная связь, которая легко обратима с помощью гидролиза водного раствора и может быть химически



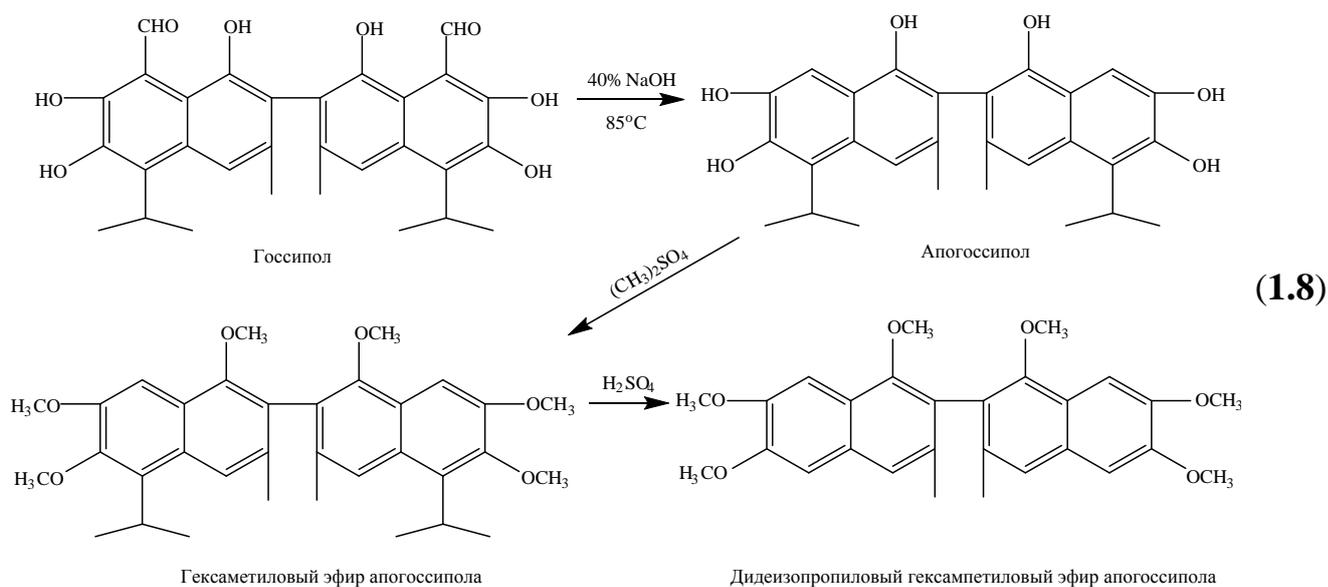
В отличие от госсипола его эфиры (схема 1.7) намного более стабильны. Гексаметиловые эфиры госсипола были получены с использованием 3 различных агентов для метилирования: диазометана в растворе эфира, метилйодида, а также диметилсульфата [88, 99, 100]. Гексаметиловый и тетраметиловый эфиры госсипола были получены в реакции между госсиполом и диметилсульфатом в метанольном каустическом поташе. Тетраметиловый эфир в дальнейшем был метилирован до гексаметилового эфира госсипола. Диметиловый эфир госсипола может быть приготовлен путем деметилирования гексаметилового эфира с помощью обработки раствором концентрированной серной кислоты в уксусной кислоте (схема 1.7) [88].



(1.7)

Апогоссипол – еще одно важное производное госсипола (схема 1.8). Это деальдегидный продукт реакции, протекающей между госсиполом и 40% водным раствором едкого натра при температуре 85 °С в атмосфере азота в течение 1,74

часа [88]. Апогоссилола чувствителен к окислению и склонен менять свой первоначальный желтый цвет на коричневый после кратковременного нахождения на воздухе, поэтому при необходимости его наработки реакцию следует проводить заново. В реакции с диметилсульфатом апогоссилол может быть превращен в гексаметиловый эфир апогоссилола, который на много более стабилен, чем апогоссилол. Для получения дидеизопропилового гексаметилового эфира апогоссилола его необходимо обработать концентрированной серной кислотой.



Госсилол также может подвергаться восстановлению под действием  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  или  $\text{H}_2$  (с использованием  $\text{Pt}$  в качестве катализатора). В ходе этих реакций альдегидные группы госсилола восстанавливаются до метильных и метанольных групп [88, 104].

Госсилол обладает уникальной способностью образовывать клатратные соединения, включения или комплексы хозяин-гость (клатрагенность). Клатраты, в которых между молекулами хозяина (H) и гостя (G) имеются специфические (например, H-связи, электростатические, диполь-дипольные и т.д.) взаимодействия, Вебер называет координатоклатратами (схема 1.8) [101, 102].

В кристаллическом состоянии молекулы госсилола формируют типичные для многих кристаллических форм centrosymmetric димеры.

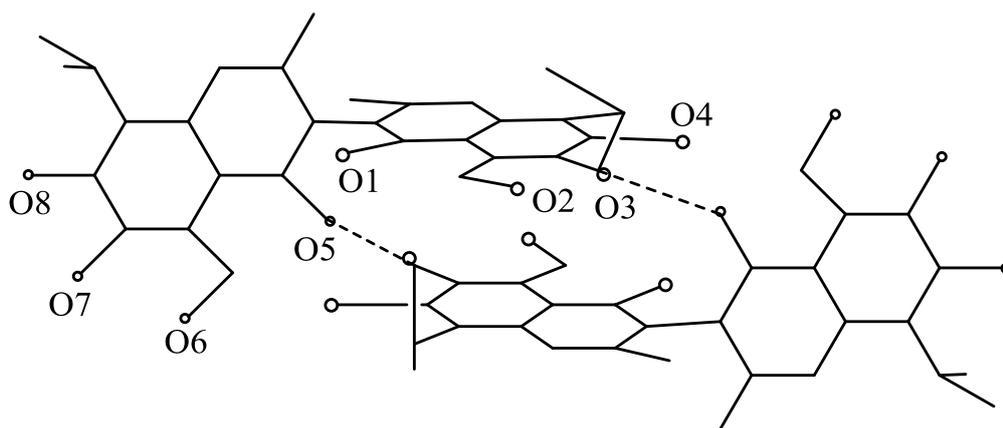


Рисунок 9 - Клатратные соединения госсипола

В молекуле госсипола существуют водородные связи двух типов: O-H...O и C-H...O-связи C=O...H замыкают шестичленные циклы E и E<sup>I</sup>, а H-связи

O-H...O-пятичленные циклы F и F<sup>I</sup> (рисунок 9). H-связи типа C-H...O образуются между одной из метильных групп изопропильной группы и гидроксильными группами O(4) и O(8), а так же между атомами кислорода перигидроксида и водорода альдегидной группы. За счет таких взаимодействий молекулы госсипола могут образовывать ассоциаты различной величины – протомеры (димеры, тримеры и т.д.) [103, 104].

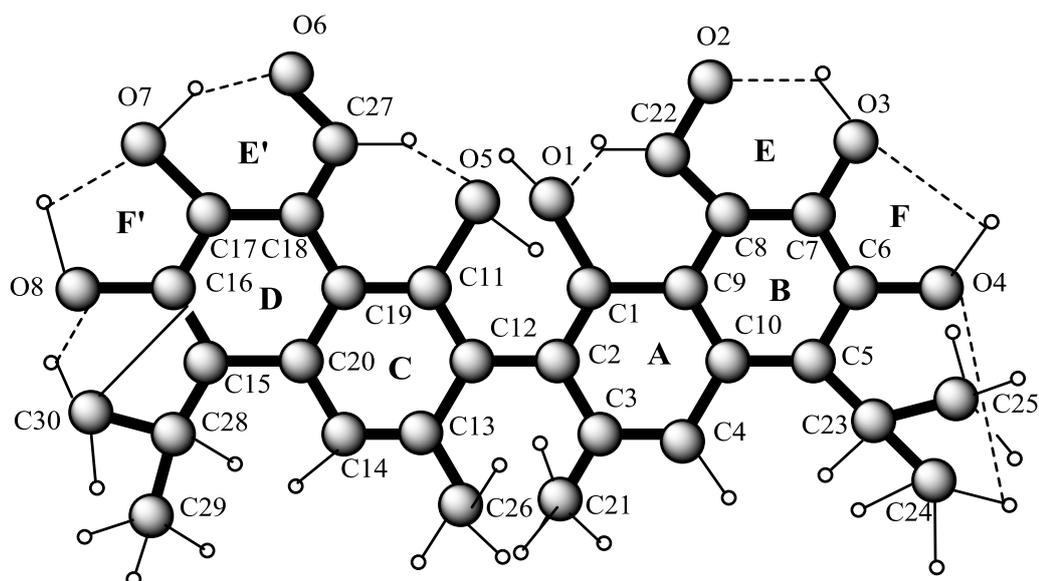


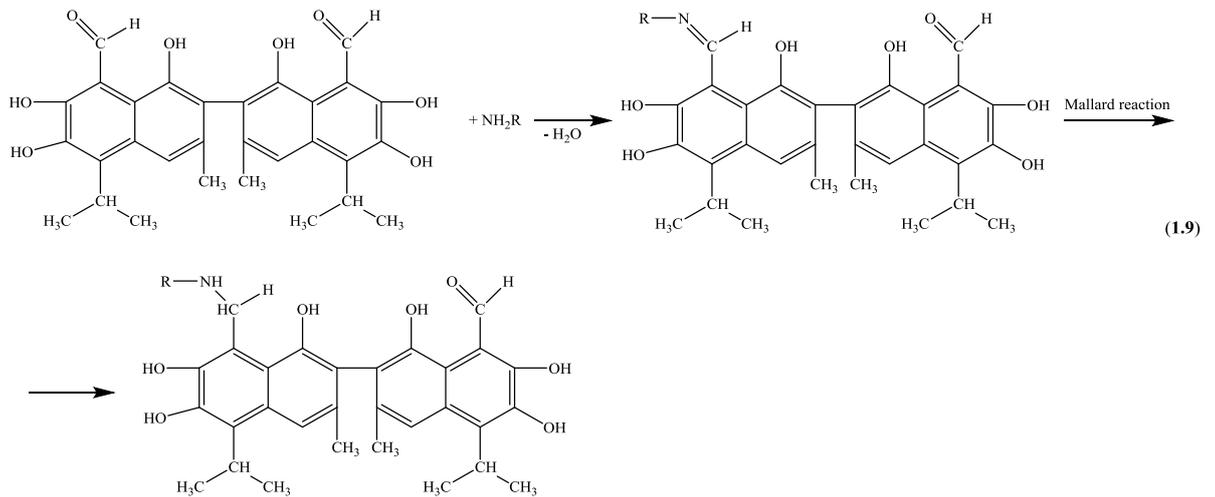
Рисунок 10 - Конформация и внутримолекулярные водородные связи молекулы госсипола

Специфической особенностью госсипола является типичность и высокая степень пространственного разделения гидрофобных и гидрофильных областей в кристаллических формах госсипола: в гидрофильных областях концентрируются полярные функциональные группы, в гидрофобных областях – фрагменты молекул, лишенные сколько-нибудь значительной локальной полярности. Уникальностью его строения и объясняется многообразие различных ассоциатов [105, 106].

## **1.8 Известные подходы к снижению токсичности госсипола путем его химической модификации**

### **1.8.1 Образование Шиффовых оснований в качестве подхода к снижению токсичности госсипола**

Основным методическим подходом к снижению токсичности госсипола широко использованным для получения лекарственных средств на его основе явился синтез многочисленных оснований Шиффа по схеме 1.5. В качестве аминов использовали многочисленные соединения, содержащие реакционно-способные аминогруппы, включая аминокислоты, короткие пептиды и высокомолекулярные белки (альбумин). Подробное изучение химической структуры, образовавшихся Шиффовых оснований подтвердило два направления химического взаимодействия госсипола с алифатическими аминами, приводящее к образованию не только оснований Шиффа, но и продуктов реакции Майяра в соответствии со схемой 1.9.



Не смотря на обилие публикаций и большое количество синтезированных соединений дать однозначную оценку эффективности вышеуказанного подхода не представляется возможным. В ряде публикаций описано снижение токсичности производных госсипола при образовании продуктов этого типа. Однако в большинстве случаев такая химическая модификация приводит к полной потере противовирусной активности. Особенно это касается продуктов реакции Майяра [88, 97].

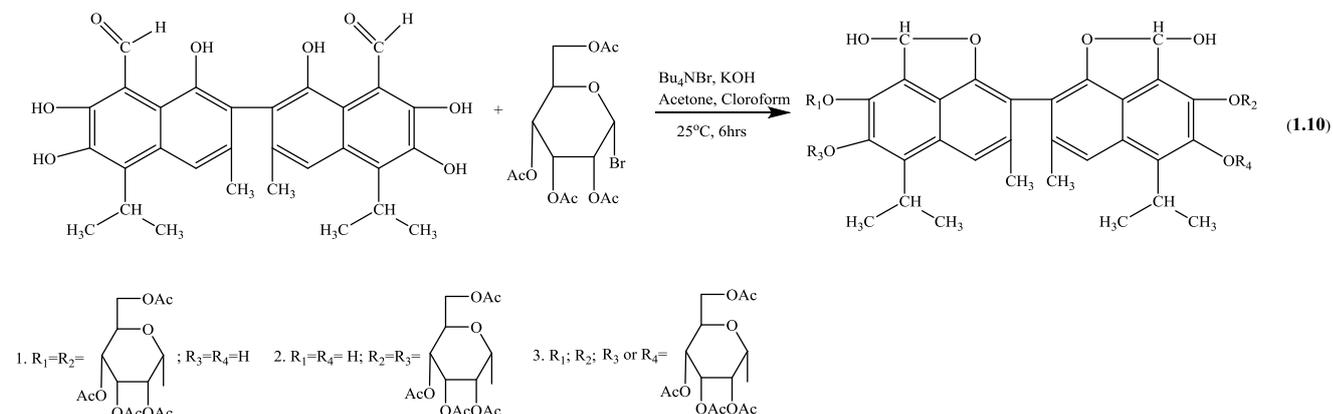
Так как госсипол является полифункциональным соединением с двумя альдегидными группами и обладает восстанавливающими действиями контроль за направлением реакции весьма осложнен, так как образующиеся на первой стадии Шиффово основание может быть восстановлено непрореагировавшими альдегидными группами с образованием вторичных аминогрупп по реакции Майяра. Неоднозначность протекающих процессов не позволяет использовать указанный подход для получения ФПА прививочного типа с использованием госсипола (нафталальдегида) в качестве ФАВ [105, 106].

### 1.8.2 Гликозилирование госсипола в качестве подхода к снижению его

#### ТОКСИЧНОСТИ

В литературе описано несколько классов противовирусных препаратов, созданных на основе О- и С-гликозидов растительного происхождения,

содержащих в качестве агликонов кумарины, хромоны и ксантоны природного происхождения. К ним относятся производные кверцетина и др. соединений. Наибольшая активность против вируса герпеса и вируса гриппа описано для С-гликозидов ксантонового типа – мангиферина, выделенного из плодов манго и травы копеечника. Обнаружено, что гликозилирование позволяет существенно расширить терапевтическую широту и улучшить растворимость в водных средах. Во всех этих соединениях противовирусная активность объясняется присутствием агликоновой части молекулы. Гликозидная же часть играет роли лиофилизующего фрагмента (по принципу Х. Рингсдорфа), обеспечивая снижение токсичности и улучшение гидрофильных свойств молекулы в целом [107]. По аналогии с производными ксантонов в многочисленных работах было исследовано влияние гликозилированного госсипола на его токсичность и противовирусную активность. По аналогии с флованоидами и мангиферином гликозилирование производили по фенольным гидроксилам ароматических фрагментов с образованием О-гликозидов. При этом использовали промежуточную защиту гидроксильных групп глюкозы ацетильными остатками с их последующим омылением в кислой среде (схема 1.10).



Альдегидную группу при этом в реакцию не вовлекали. Полученные производные обладали высокой противовирусной активностью и улучшенной растворимостью в воде, однако указанный способ не позволил существенно снизить токсичность.

Таким образом было гликозилировано около двух десятков гликозилированного госсипола и его производных с образованием соответствующих О-гликозидов [98].

### 1.8.3 Снижение токсичности госсипола путем создания ФАП прививочного типа (принципы создания ФАП Х. Рингсдорфа)

Наиболее эффективным подходом позволяющим существенно снизить токсичность большинства ФАВ, включая высокотоксичные противоопухолевые средства, является создание ФАП прививочного типа. При их синтезе используют основные принципы описанные впервые в работах Х. Рингсдорфа. В соответствии с этими принципами каждая макромолекула полимера сочетает в себе действующее начало - ФАВ и лекарственную форму, включающую различные дополнительные группы, участвующие в действии ФАВ, объединенные на молекулярном уровне (рисунок 11) [107, 108].

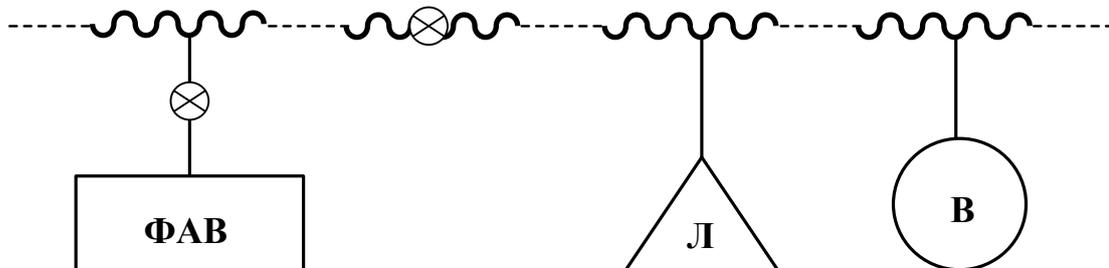


Рисунок 11 – Схематическое строение ФАП прививочного типа в соответствии с принципами Х. Рингсдорфа

ФАВ – физиологически активное вещество (действующее начало).

Л – лиофилизующий фрагмент ФАП, обеспечивающий тропность (средство) ФАП к той или иной ткани. Липофильность – тропность к жировой ткани; Гидрофильность – водорастворимость. Он изменяет, если требуется тропность (растворимость) ФАВ с липофильной на гидрофильную и наоборот.

В – вектор, обеспечивающий целевой транспорт в орган мишень, обычно антитело или сахаридный остаток тропный к гликокаликсу.

X – гидролизуемые вставки, обеспечивающие высвобождение ФАВ в органе (клетке) мишени, расщепление и выведение носителя из организма по окончании срока действия

В соответствии с принципами X. Рингсдорфа ФАП прививочного типа по механизму действия подразделяются на следующие типы:

1. ФАП действующие как единое целое без отщепления ФАВ («истинные» ФАП). К ним относятся полимерные производные белков, конъюгированные антигены и др. типы полимерных лекарств.
2. ФАП, отщепляющие ФАВ от носителя в неизменном виде.

В этом случае полимер-носитель выполняет транспортную функцию. При этом при пероральном введении обеспечивается отщепление ФАВ в заданном отделе желудочно-кишечного тракта с контролируемым постепенным выделением лекарства в течение 24 часов. Это позволяет сглаживать пиковые концентрации в крови, снижать за счет этого токсичность и увеличивать терапевтическую широту лекарственного препарата (рисунок 12) [107 - 110].

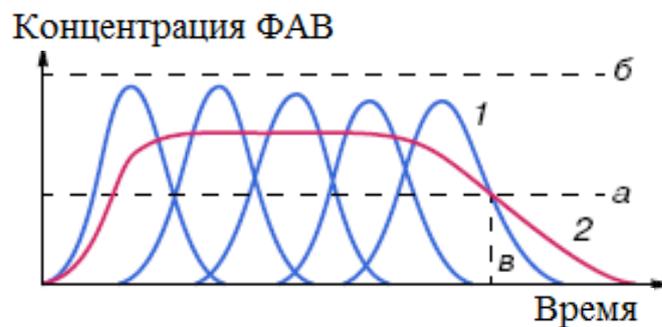


Рисунок 12 – Увеличение терапевтической широты (б-а) за счет снижения токсичности лекарственного препарата по принципам X. Рингсдорфа. а – минимальная действующая концентрация, б – токсическая концентрация. 1 – низкомолекулярный препарат, содержащий ФАВ, 2 – ФАП прививочного типа, содержащий ковалентно-связанное ФАВ

При парэнтеральном введении отщепление ФАВ от ФАП происходит в кровяном русле при контакте с целевыми клетками. Это обеспечивает не только

сглаживание пиковых концентраций и контролируемое по времени выделения, но и повышенную локальную концентрацию ФАВ в месте действия, а кроме того целевую доставку лекарственного вещества в клетку (орган) «мишень», а так же изменение места действия ФАВ за счет измененного перераспределения полимера-носителя по органам. Например, доставку ФАВ в центральную нервную систему, в которую не проникают низкомолекулярные гидрофильные лекарства [108 - 111].

Если отщепление ФАВ с полимера происходит вне клетки «мишени», то он выполняет только функцию «временного депо», однако чаще всего ФАП создают для того, чтобы отщепление происходило внутри клетки под действием лизосомальных ферментов либо в аппарате Гольджи. Такие полимеры не активны в кровяном русле и становятся активными только внутри клеток «мишеней» после распада в фагосомах. При этом, ФАП превращается в лекарство только внутри клетки. За счет этого увеличивается время его действия, снижаются побочные эффекты, токсичность, метаболизм в кровяном русле замедлен, увеличивается биодоступность, пиковые концентрации отсутствуют, снижается доза, повышается терапевтическая широта [112].

Таким образом, фармакокинетика ФАП прививочного типа координально отличается от низкомолекулярных ФАВ, которые они содержат, и может быть специально сконструирована в зависимости от специфических требований к конкретному лекарственному препарату и даже в зависимости от особенностей конкретного больного.

Х. Рингсдорф сформулировал три основных требования к ФАП прививочного типа [113 – 115]:

1. По окончании действия ФАП и его фрагменты должны быть полностью выведены из организма.

2. Скорость отщепления ФАВ от носителя не должна быть ниже скорости распада носителя и скорости его выведения из кровяного русла.

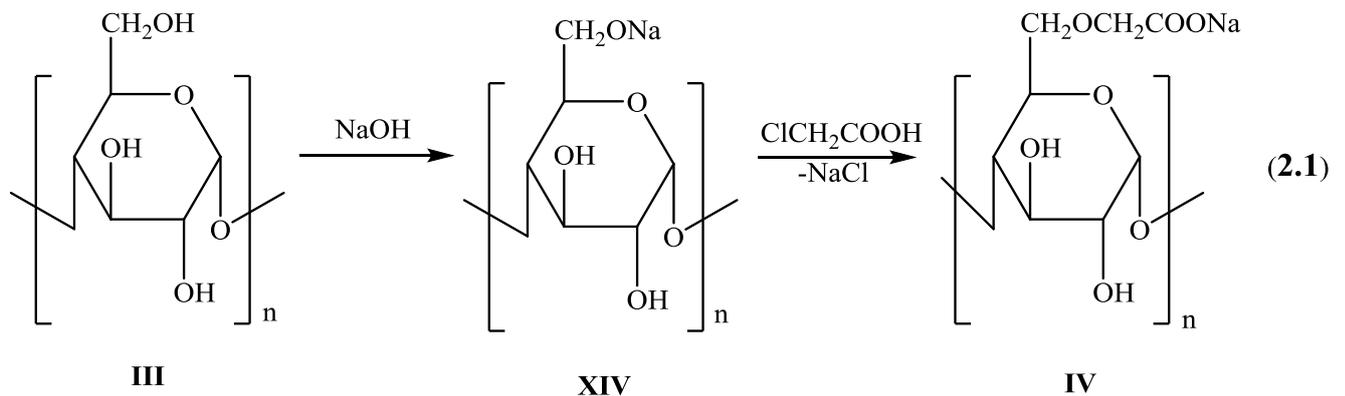
3. В результате распада ФАП в организме не должны образовываться соединения, содержащие ФАВ ковалентно-связанные с короткими фрагментами носителя, активность которых трудно предсказать [115].

## 2 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 2.1 Разработка способов определения основных физико-химических характеристик полимеров-носителей

КМЦ – 1,4- $\alpha$ -D-карбоксиметилглюкоза, является полусинтетическим полисахаридом. Она непригодна для внутривенного введения, однако широко используется в качестве компонента лекарственных форм для перорального применения.

КМЦ получают из хлопковой целлюлозы свободной от лигнина по реакции карбоксиметилирования натриевой соли целлюлозы в щелочной среде монохлоруксусной кислотой (схема 2.1).



Для использования в качестве носителя ФАВ при создании полимеров прививочного типа КМЦ химически модифицируют периодатным окислением в гомогенных или гетерогенных условиях. Гомогенное окисление проводят в лабораторных условиях при небольших наработках. Гетерогенные условия чаще используются в заводских условиях в полупромышленных установках. Это позволяет снизить расход растворителей, повысить концентрацию основного вещества в реакционной смеси и исключить дорогостоящую стадию очистки полимера диализом с последующей лиофилизацией.

Диальдегидкарбоксиметилцеллюлоза (ДАКМЦ), полученная в гомогенных условиях с использованием метапериодата натрия с последующей очисткой диализом, не содержит посторонних примесей и может быть выделена в химически чистом состоянии.

ДАКМЦ, полученная в гетерогенных условиях с использованием очистки многократными ацетоновыми промывками может содержать остатки примесей, образовавшихся при щелочном гидролизе основной цепи полимера. Небольшую примесь гликолевой кислоты, продукта ее димеризации – гликолида и муравьиной кислоты. По данным ГПХ продукта гетерогенного окисления КМЦ с последовательным двойным детектированием рефрактометрическим (РФ) (рисунок 14) и мультиволновым ультрафиолетовым (УФ) детекторами (рисунок 15) промышленная фармакологически чистая ДАКМЦ содержит трудноотделяемые примеси кислотного характера, основной из которых является гликолевая кислота (рисунок 13).

На гельхроматограмме ДАКМЦ, полученной в гетерогенных условиях (рисунок 14), имеются три пика: основной пик полимера – ДАКМЦ, и два пика низкомолекулярных примесей. Для выяснения их характера проводили наложение хроматограмм, полученных с использованием УФ детектора, чувствительного к веществам, содержащим хромофорные группы, на хроматограмму, полученную с помощью РФ детектора, чувствительного ко всем веществам независимо от их химического строения. Обычными примесями в продуктах, полученных из древесной целлюлозы, являются остатки лигнина и гемицеллюлозы. Однако более подробное исследование с использованием свидетелей показало, что первый низкомолекулярный пик не лигнину, а циклическому димеру гликолевой кислоты - гликолиду, а второй самой гликолевой кислоте. На ГПХ того же продукта в условиях детектирования массспецифичным РФ детектором пик гликолида трудно отличим, в то время как пик гликолевой кислоты сохраняет свою высокую интенсивность (рисунок 15). Это связано с огромной разницей в коэффициентах экстинкции гликолида и гликолевой кислоты, которая существенно хуже поглощает в УФ области.

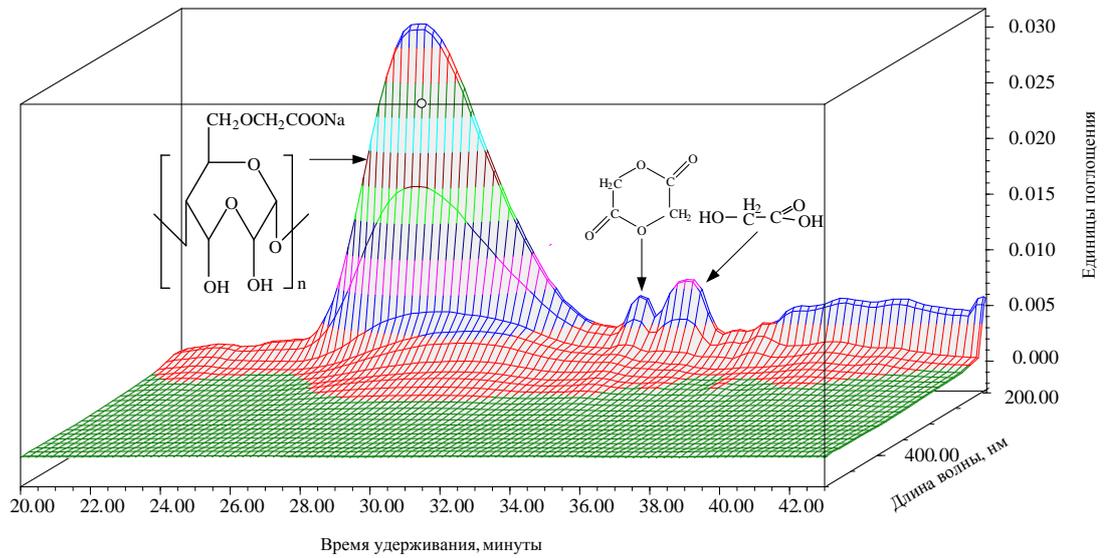


Рисунок 13 - Трехмерная гель-хроматограмма ДАКМЦ, полученной в гетерогенных условиях

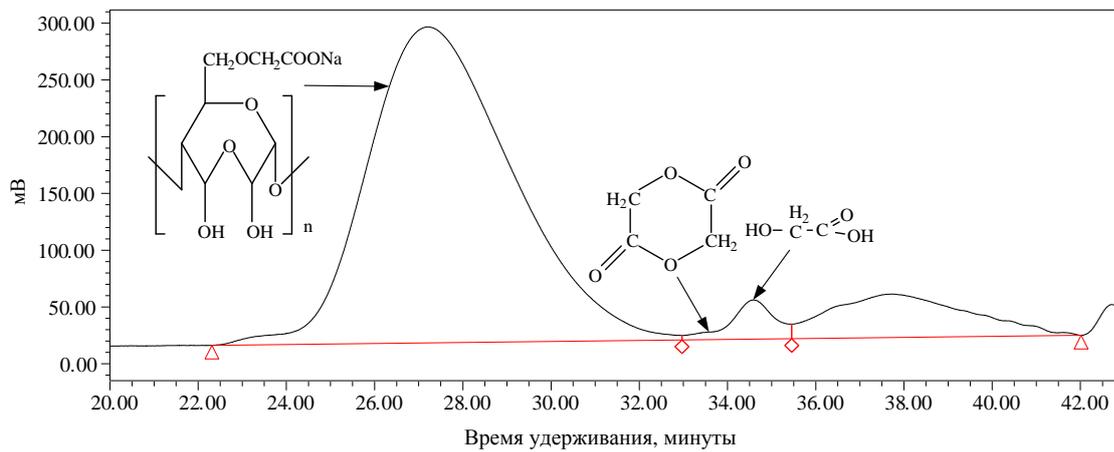


Рисунок 14 – Гель-хроматограмма ДАКМЦ, полученной в гетерогенных условиях, с использованием рефрактометрического детектора

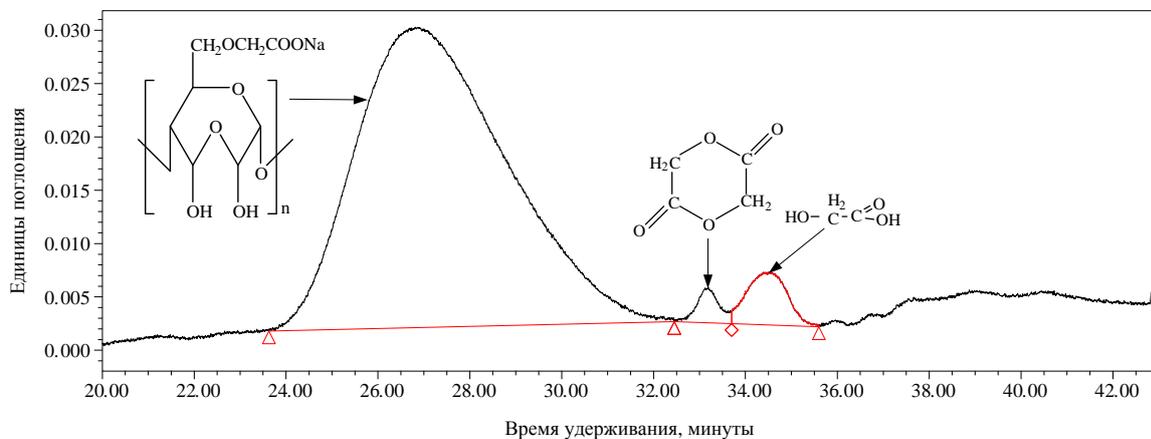


Рисунок 15 – Гель-хроматограмма ДАКМЦ, полученной в гетерогенных условиях, с использованием УФ детектора при длине волны 195 нм

В ЯМР  $^1\text{H}$  спектре (рисунок 16) смеси низкомолекулярных продуктов, выделенных с использованием диализных ячеек из ДАКМЦ, полученной гетерогенным способом, присутствует синглетный сигнал протонов  $\text{CH}_2$  группы циклического лактона гликолида в области 1,76 м.д., а также синглеты протонов  $\text{CH}_2$  группы гликолевой кислоты 3,85 м.д. и синглет протона муравьиной кислоты 8,35 м.д.

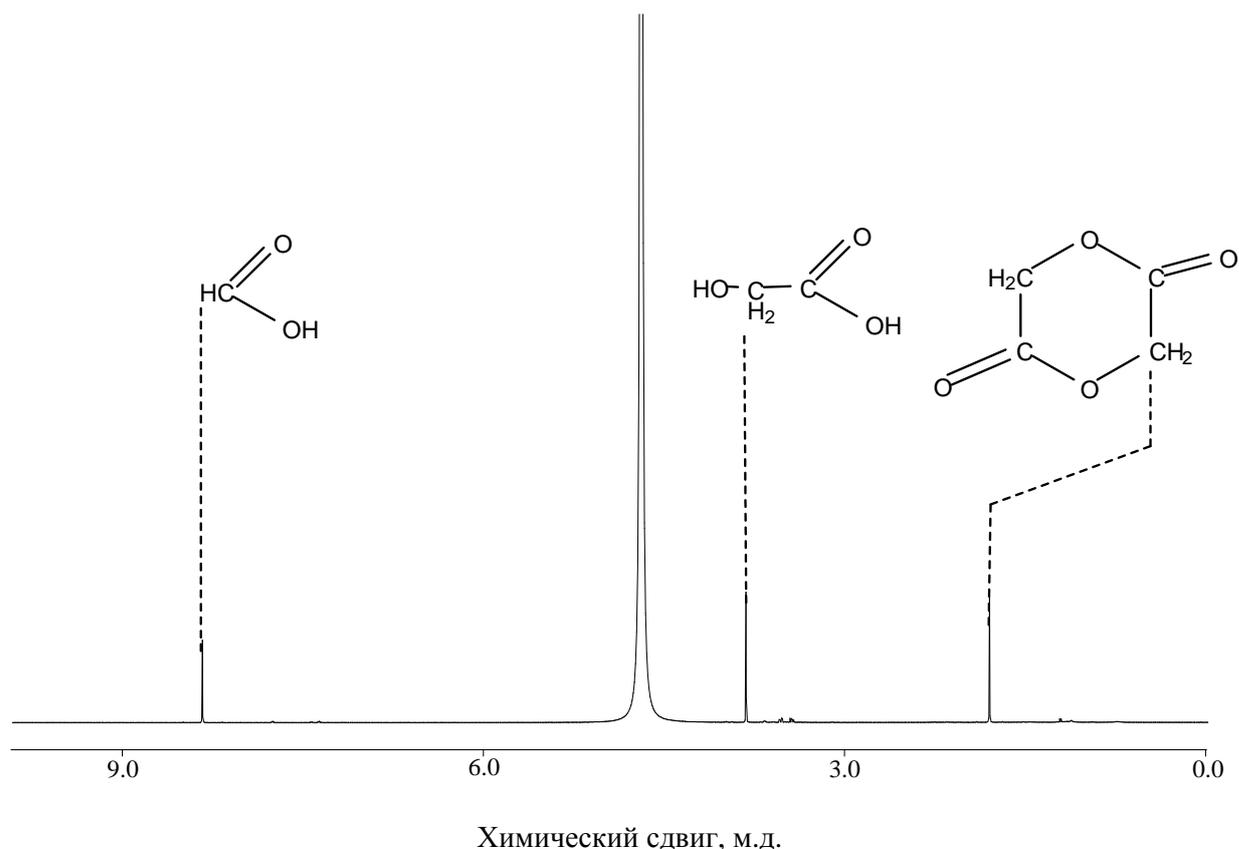


Рисунок 16 – Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  смеси побочных продуктов реакции окисления карбоксиметилцеллюлозы, выделенных диализом

В ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектре (рисунок 17) смеси побочных продуктов присутствуют сигналы атомов углерода карбонильных групп циклического лактона гликолида 171 м.д., карбонильной группы гликолевой кислоты 180 м.д. и муравьиной кислоты 163 м.д. В области сильного поля присутствуют сигналы углеродов  $\text{CH}_2$  групп циклического лактона гликолида 22 м.д. и гликолевой кислоты 61 м.д.

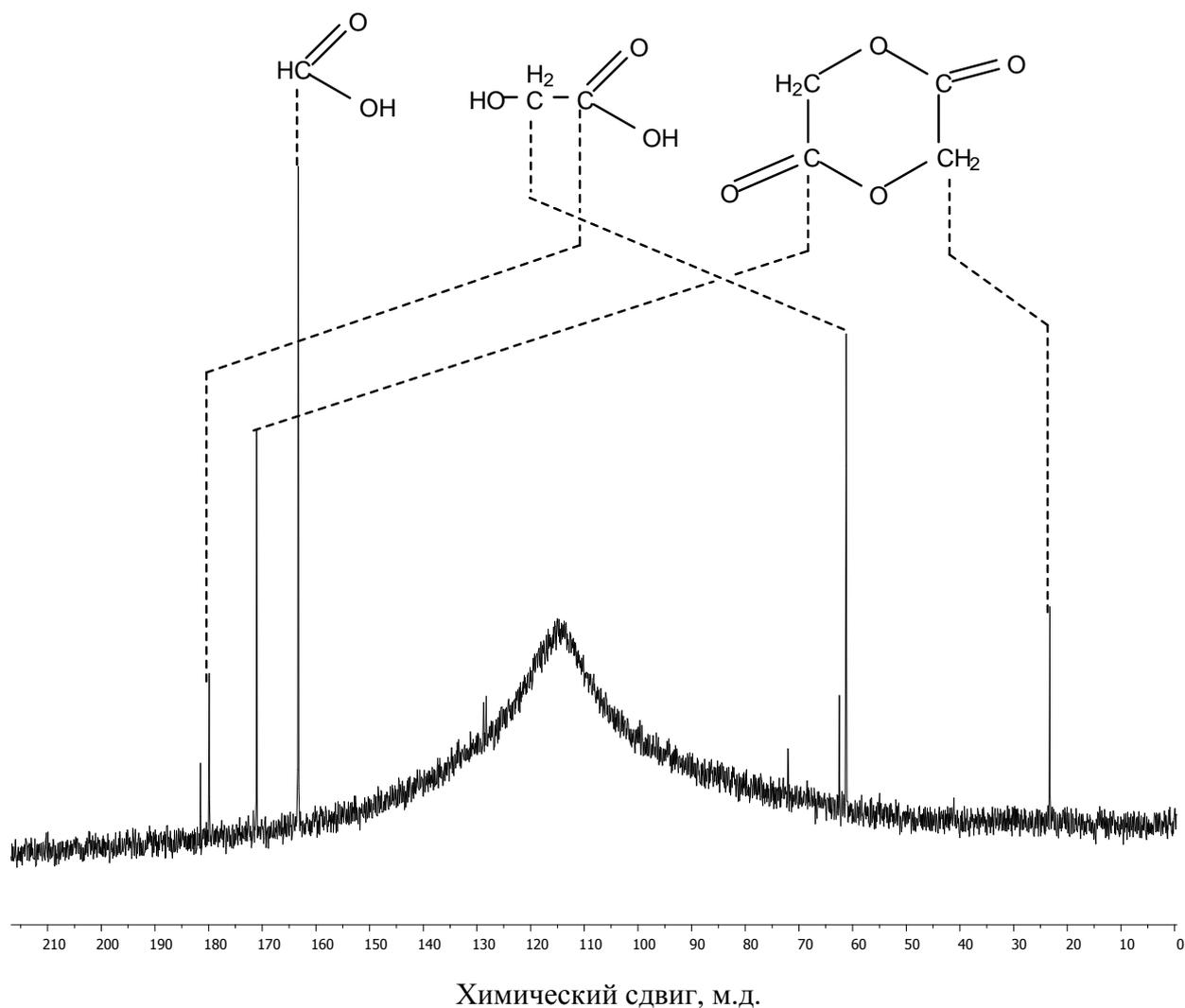


Рисунок 17 – Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  смеси побочных продуктов реакции окисления карбоксиметилцеллюлозы, выделенных диализом

Декстран – 1,6- $\alpha$ -полиглюкоза, является апиrogenным высокоочищенным клиническим противошоковым кровезаменителем и широко используется в качестве полимера-носителя лекарственных средств, предназначенных для внутривенного введения. Его также модифицировали периодатным окислением. Реакцию проводили только в гомогенных условиях, что обусловлено специфическими свойствами этого линейного полисахарида. В отличие от КМЦ декстран образует значительно менее вязкие водные растворы. Это позволяет проводить реакцию окисления в высококонцентрированных растворах, содержащих до 10% масс. полимера. Основным побочным продуктом, образующимся в процессе окисления, является муравьиная кислота, которую

затем удаляют при очистке диализом. Использование гетерогенного синтеза в этом случае не является критическим преимуществом. Образующийся после диализа высокоочищенный полимер практически не содержит низкомолекулярных примесей.

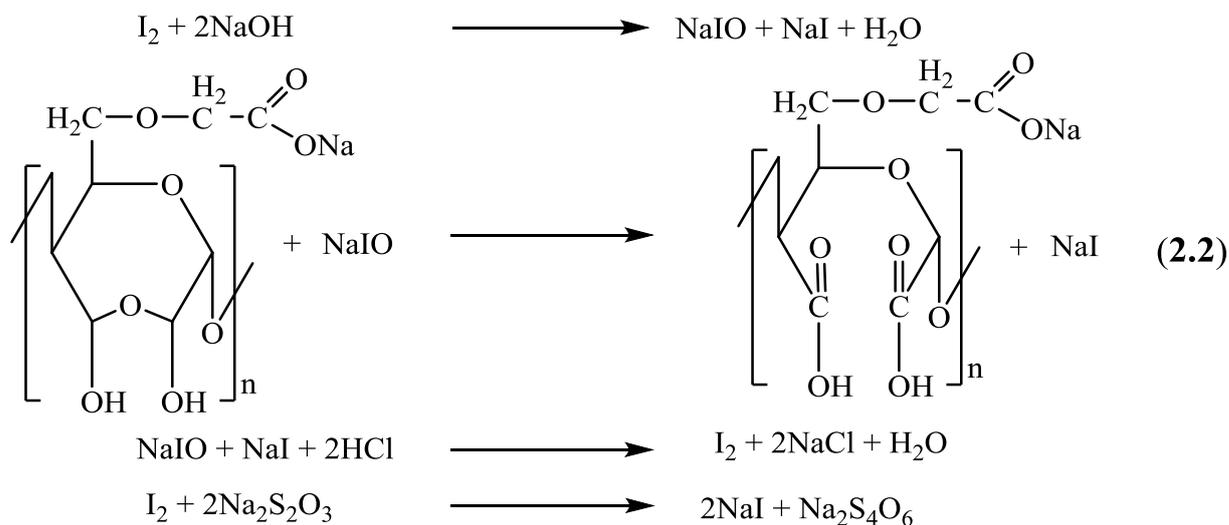
## **2.1.1 Сравнительный анализ титрометрических методов определения**

### **степени окисления ДАД и ДАКМЦ**

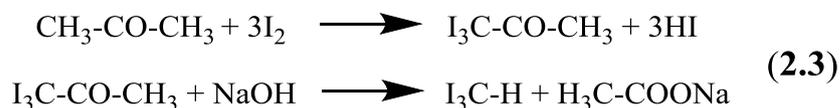
#### **2.1.1.1 Определение степени окисления ДАД и ДАКМЦ методом обратного**

##### **йодометрического титрования**

Этот метод определения основан на взаимодействии альдегидных групп с йодом в щелочных условиях. Йодат натрия, образующийся при диспропорционировании молекулярного йода в щелочной среде, окисляет альдегидную группу до карбоксильной. По окончании реакции в реакционную среду добавляют кислоту. В кислой среде избыток непрореагировавшего йодата вновь реагирует с йодидом и превращается в молекулярный йод, который оттитровывают тиосульфатом натрия. По разнице количества тиосульфата, пошедшего на титрование йода оставшегося после реакции с неокисленной карбоксиметилцеллюлозой и с диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой, определяют количество йода пошедшего на окисление альдегидных групп (схема 2.2).



Метод чувствителен ко всем типам альдегидов и полуацеталей, включая низкомолекулярные альдегидокислоты и другие низкомолекулярные примеси, содержащие альдегидные группы, образовавшиеся при окислении гликозидных звеньев периодатом. А также другие примеси способные окисляться и взаимодействовать с йодом в щелочной среде, включая остатки ацетона после многочисленных промывок, который поглощает йод с образованием иодоформа (схема 2.3).



Для того чтобы оценить и исключить влияние примесей, проводили сравнительный анализ очищенной диализом и неочищенной заводской ДАКМЦ, полученной осаждением в ацетон, а также очищенной и неочищенной исходной КМЦ (Бланозы) до периодатного окисления.

Результаты проведенных анализов представлены в таблице 1.

### 2.1.1.2 Определение степени окисления ДАКМЦ, полученной в гетерогенных условиях, оксимным методом

Этот метод определения основан на взаимодействии карбонильной группы альдегидов с гидросиламин гидрохлоридом. Выделяющуюся соляную кислоту



гидроксиламина с карбонильной группой, имеющейся в составе карбоксиметилированного звена основной цепи КМЦ.

Вторым важным моментом является определение точки эквивалентности, так как карбоксильная группа КМЦ обладает существенной буферной емкостью. Для этого провели потенциометрическое титрование гидроксиламина в присутствии неокисленной КМЦ (рисунок 18).

С учетом вышеизложенного разработана методика, приведенная ниже в главе экспериментальная часть. Методику валидировали с использованием метода периодатного окисления в качестве эталонного.

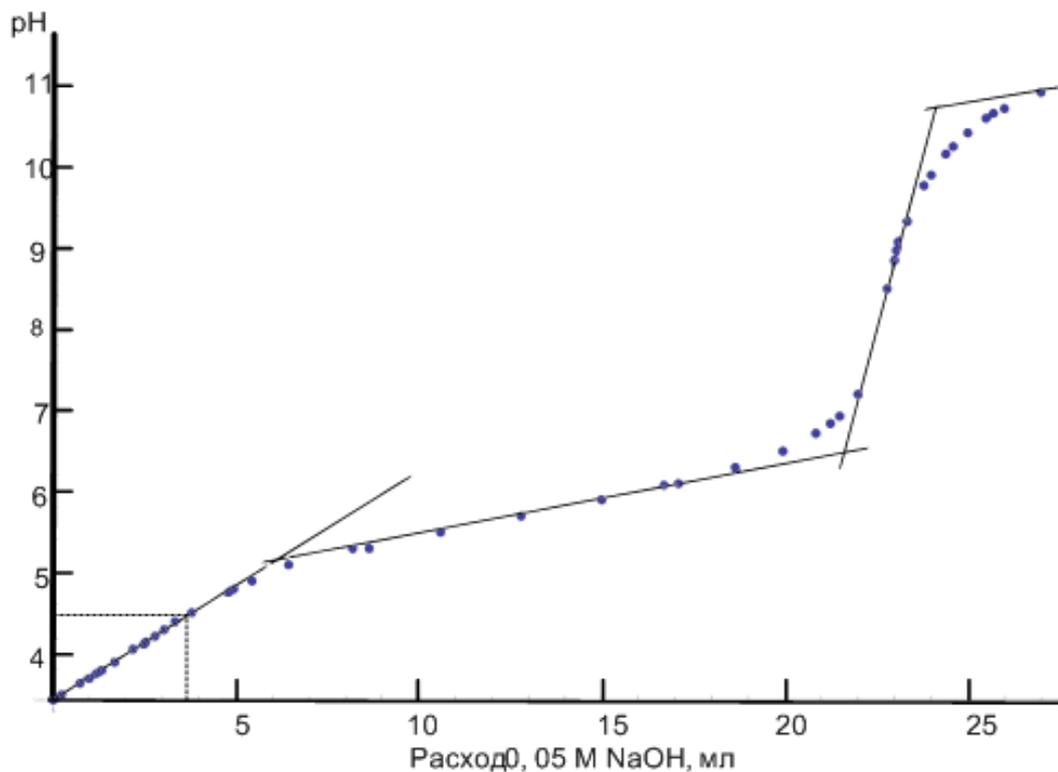


Рисунок 18 - Кривая потенциометрического титрования для определения точки эквивалентности

Таблица 1 - Результаты обратного йодометрического титрования и оксимного метода определения содержания альдегидных групп в очищенной и неочищенной заводской диальдегидкарбоксиметилцеллюлозе

Степень окисления заводских образцов ДАКМЦ, %			
Обратное йодометрическое титрование		Оксимный метод	
Неочищенные образцы диализом	Образцы после очистки диализом и лиофилизации	Неочищенные образцы диализом	Образцы после очистки диализом и лиофилизации
12,5	3,7	11,5	3,2

Таким образом,

- ✓ Йодометрический метод валидирован относительно образца сравнения «пустышка», не содержащего ни полисахаридов, ни низкомолекулярных примесей. Он не поглощает йод;
- ✓ Исходная КМЦ (как очищенная диализом с последующей лиофилизацией, так и неочищенная) не содержит примесей, окисляющихся йодом (не поглощает йод);
- ✓ Неочищенная ДАКМЦ содержит в 4 раза больше групп окисляющихся йодом (степень окисления 12,5%) по сравнению с очищенной (3,7%). Что может являться следствием:
  - Диспропорционирования и доокисления альдегидных групп на первой стадии диализа в щелочной среде;
  - Присутствия окисляющихся групп имеющих иную химическую природу (не являющихся альдегидными). Например, поглощение йода может быть обусловлено присутствием остатков ацетона;
  - Удаления низкомолекулярных альдегидов в результате диализа.
- ✓ Только 1 моль гидроксиламина гидрохлорида расходуется при взаимодействии с окисленным звеном ДАКМЦ, что является косвенным свидетельством образования полуацетальных и азотсодержащих циклических продуктов (схема 2.4);

- ✓ Раствор 1М гидроксиламина гидрохлорида имеет  $pH=2,8$ , что согласуется с литературными данными ( $pH=3,2$  для 0,2М раствора), поэтому в процессе титрования до  $pH$  близкой к 5 оттитровывается часть кислоты, содержащаяся в гидроксилаmine гидрохлориде. На титрование 5 мл раствора 1М гидроксиламина гидрохлорида до  $pH=5$  требуется 11 мл 0,05М NaOH;
- ✓ Дополнительная очистка гидроксиламина гидрохлорида (перекристаллизация) не влияет на результаты титрования до  $pH=5,00$ . Для титрования требуется 10,75 мл 0,05М NaOH.
- ✓ При взаимодействии с низкомолекулярными ациклическими примесями 1 моль гидроксиламина гидрохлорида взаимодействует с 1 молем альдегида; Точка эквивалентности в присутствии КМЦ является  $pH=4,4$ ;
- ✓ Время взаимодействия при определении не должно превышать 15 минут для предотвращения побочной реакции гидроксиламина гидрохлорида с КМЦ;
- ✓ Температуру реакции следует понизить до комнатной;
- ✓ Результаты определения содержания альдегидных групп гидроксиламиновым методом для очищенных и неочищенных образцов практически совпадают с результатами, полученными обратным йодометрическим титрованием. Что означает, что ни исходная КМЦ, ни ДАКМЦ не содержат окисляющихся примесей, мешающих определению обратным йодометрическим титрованием, а уменьшение содержания альдегидных групп после диализа обусловлено реакциями диспропорционирования либо связано с удалением низкомолекулярных альдегидов и кетонов.

### 2.1.1.3 Молекулярно-массовые характеристики ДАКМЦ

Для определения молекулярных масс полимеров, полученных в водном растворе и гетерогенным способом в водно-органической среде, был разработан

вискозиметрический экспресс-метод с использованием уравнения Куна-Марка-Хаувинка. Для калибровки использовали полимеры с узким молекулярно-массовым распределением и известными молекулярно-массовыми характеристиками, определенные методом ГПХ.

Уравнение Куна-Марка-Хаувинка:

$$[\eta]=KM^\alpha \quad (1)$$

$K$  и  $\alpha$  - константы для данной системы полимер-растворитель при фиксированной температуре.

Для определения вязкости раствора полимера измеряли время истечения в секундах, равных объемам растворителя  $t_0$  и раствора  $t$  через капилляр вискозиметра Убеллоде при  $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . Концентрацию раствора ( $C$ ) выражали в граммах на 100 мл растворителя; для измерения вязкости использовали растворы с концентрацией  $0,5 < C < 1,0$  г/100мл.

Относительная вязкость ( $\eta_{\text{отн}}$ ) представляет собой отношение времени истечения раствора к времени истечения растворителя:

$$\eta_{\text{отн}} = t / t_0 \quad (2)$$

Произведение характеристической вязкости на концентрацию:

$$[\eta] * c = \frac{\left( \sqrt{\frac{2 - \ln 3}{\eta_{\text{отн}} - \ln \eta_{\text{отн}} - 1}} \right) * (\eta_{\text{отн}} - 1) - 2 * \left( \sqrt{\frac{\eta_{\text{отн}} - \ln \eta_{\text{отн}} - 1}{2 - \ln 3}} \right)}{\left( \sqrt{\frac{2 - \ln 3}{\eta_{\text{отн}} - \ln \eta_{\text{отн}} - 1}} \right) - 1} \quad (3)$$

где  $c$  выражали в г/дл

Из уравнения Куна-Марка-Хаувинка следует:

$$\lg[\eta] = \lg K + \alpha \lg M_\eta \quad (4)$$

Для нахождения  $K$  и  $\alpha$ , логарифмы значений характеристических вязкостей, определенных для узких фракций полимера, наносили на график как функции соответствующих молекулярных весов, определенных с помощью ГПХ.

Строят график зависимости  $\lg[\eta] = f(\lg M_\eta)$  (рисунок 19).

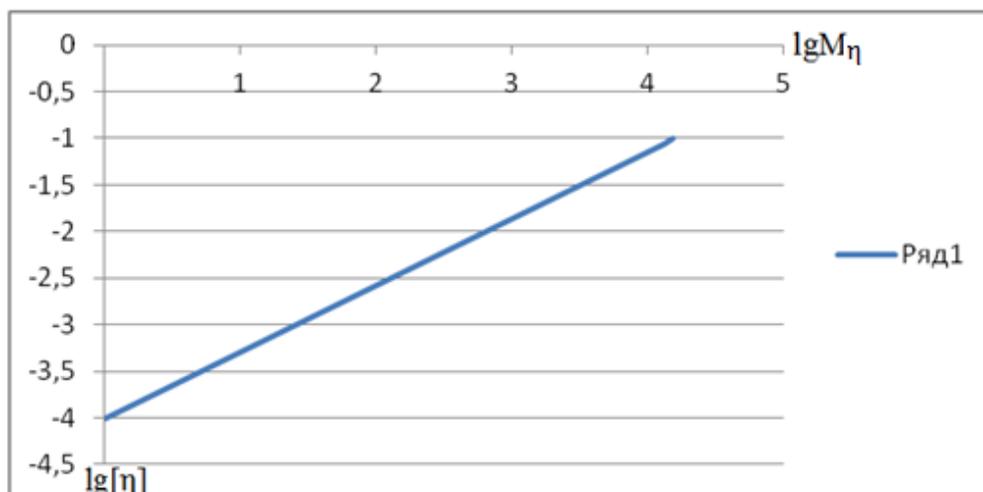


Рисунок 19 – График зависимостей логарифмов значений характеристических вязкостей от логарифмов соответствующих молекулярных весов

Тангенс угла наклона прямой равен  $\alpha$ . Отрезок, отсекаемый этой прямой на оси ординат, равен  $\lg K$ .  $\alpha = 0,69$  и  $\lg K = -4,0$

Для вычисления молекулярного веса использовали уравнение:

$$\lg[\eta] = \lg K + \alpha \lg M_{\eta} \quad (5)$$

Его удобно представить в виде:

$$\lg M_{\eta} = (\lg[\eta]) * (1/\alpha) - (\lg K/\alpha) = A \lg[\eta] - B \quad (6)$$

Таблица 2 – Значения молекулярных масс образцов

Название образца	$[\eta]$ , дл/г	$M_w$ (ГПХ), кДа	$M_{\eta}$ (вискозиметрия), кДа
ДАКМЦ $\gamma_{ок}=82,12\%$	0,0862	-	18,0
ДАКМЦ $\gamma_{ок}=73,5\%$	0,08635	13,3	18,0
ДАКМЦ $\gamma_{ок}=65,1\%$	0,10096	15,6	22,6
ДАКМЦ $\gamma_{ок}=37,14\%$	0,1153	25,0	27,4
ДАКМЦ $\gamma_{ок}=59,29\%$	0,1271	-	31,4
УПП 1,01*	0,1705	-	48,3
УПП 1,06*	0,1943	-	58,2
ДАКМЦ $\gamma_{ок}=27,82\%$	0,27819	-	98,1
ДАКМЦ $\gamma_{ок}=17,86\%$	0,27875	-	98,4

\* - образцы, полученные гетерофазным методом и охарактеризованные стандартизованным методом измерения удельного показателя поглощения [116].

Изучение молекулярно-массовых характеристик диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы показало, что при периодатном окислении сильно понижается молекулярная масса полимера, причем ее снижение пропорционально как времени реакции, так и концентрации периодата. Прямой зависимости молекулярной массы от степени окисления ДАКМЦ не обнаружено.

Таблица 3 – Изменение ММР ДАКМЦ в зависимости от степени окисления

Степень окисления ДАКМЦ ( $\gamma_{\text{ок}}$ ), %	Молекулярная масса образца, кДа			Коэффициент полидисперсности ( $M_w/M_n$ )
	Числовая ( $M_n$ )	Весовая ( $M_w$ )	Пиковая ( $M_p$ )	
0	1488,1	2297,3	2638,4	1,5
10,7	66,0	147,0	131,4	2,2
17,3	26,6	58,5	47,8	2,2
22,0	21,7	42,5	36,1	2,0
27,8	36,2	85,6	77,5	2,4
30,7	29,2	72,9	52,2	2,5
37,1	21,3	38,8	31,0	1,8
40,4	16,4	29,8	27,2	1,8
45,4	22,1	39,0	33,1	1,8
73,5	15,5	27,8	25,5	1,8
82,1	14,4	25,3	22,7	1,7

Результаты измерения молекулярно-массового распределения методом ГПХ указывают на отсутствие примеси высокомолекулярной фракции и межмолекулярных сшивок, образованных за счет реакции между альдегидными и гидроксильными группами двух соседних макромолекул. Такие сшивки приводили бы к резкому увеличению молекулярной массы, уширению ММР и появлению на хроматограмме пика с малым временем удерживания, чего не наблюдается.

### 2.1.1.4 Молекулярно-массовые характеристики ДАД

Для определения молекулярно-массовых характеристик ДАД, синтезированных гомофазным методом в водном растворе был использован метод ГПХ, с использованием пулуланов в качестве стандартов для калибровки колонки.

Таблица 3 – Изменение ММР ДАД в зависимости от степени окисления

Степень окисления ДАД ( $\gamma_{ок}$ ), %	Молекулярная масса образца, кДа			Коэффициент полидисперсности ( $M_w/M_n$ )
	Числовая ( $M_n$ )	Весовая ( $M_w$ )	Пиковая ( $M_p$ )	
0	24,8	56,1	23,4	2,3
13,2	25,3	48,2	37,7	1,9
69,4	11,6	21,7	14,5	1,9
71,1	12,7	21,4	17,1	1,7
75,4	5,0	7,3	7,4	1,5
96	2,0	6,3	7,6	3,1

Периодатное окисление диальдегиддекстарна в гомофазных условиях, как и в случае диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы, не приводит к образованию межмолекулярных сшивок в полисахариде, увеличения молекулярной массы и искажения ММР полимера не наблюдается. Сравнение хроматограмм, полученных с использованием мультиволнового УФ детектора при длине волны поглощения окисленного звена (225 нм) с хроматограммой, снятой в условиях детектирования РФ детектором показало, что не зависимо от степени окисления образующийся полимер (ДАД) фракционно однороден и удельное содержание окисленных звеньев не зависит от молекулярной массы фракции.

## 2.2 Основные физико-химические характеристики нафталальдегида госсипола

Химическое строение молекулы госсипола изучали методами ЯМР на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , ИК Фурье и УФ спектроскопии, MASS MALDI спектрометрии. Спектры регистрировали в различных растворителях, в которых молекула госсипола находится в своих основных таутомерных формах (альдегидной, кетольной и лактольной): в хлороформе, ацетоне, боратном буфере  $\text{pH}=8,5$  и в водном щелочном растворах.

По литературным данным на спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  госсипола, снятых в хлороформе, ТГФ и ацетоне, в которых госсипол находится в альдегидной форме, имеется сигнал протона альдегидной группы в области 11,1 м.д. На спектре снятом в водном щелочном растворе присутствуют сигналы протонов кетольной формы в области 9,58 м.д. (рисунок 20), что полностью согласуется с ранее проведенными исследованиями [76]. В целом спектр  $^1\text{H}$  малоинформативен и для определения структуры требуются дополнительные исследования методом  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектроскопии растворов госсипола в различных растворителях.

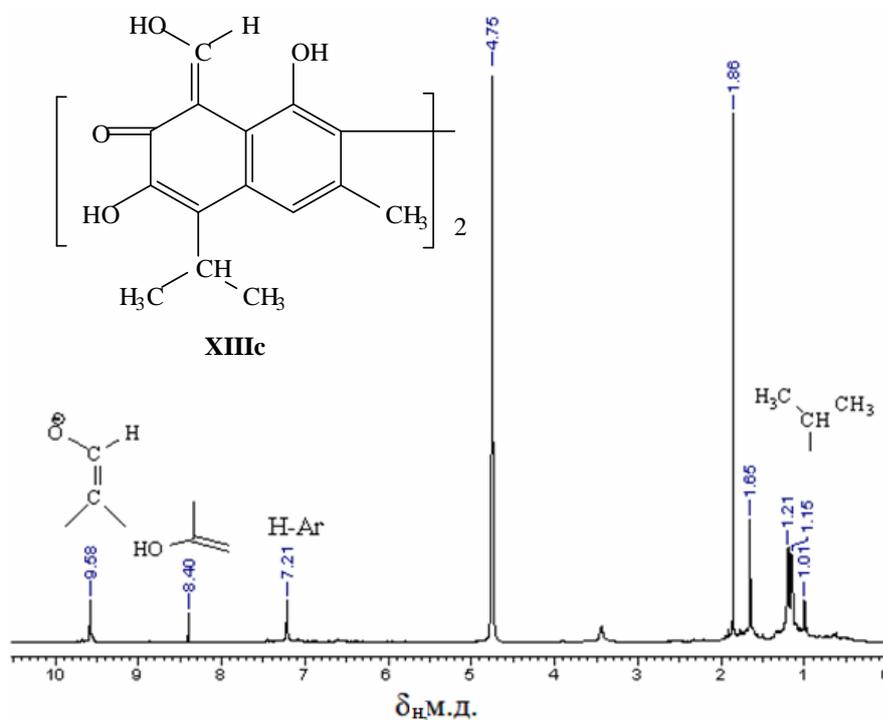


Рисунок 20 - Фрагмент спектра ЯМР  $^1\text{H}$  госсипол уксусной кислоты (ГУК) в щелочном растворе

На спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$  госсипола снятого в ацетоне (рисунок 21) присутствует сигнал углерода С(11) карбонильной группы альдегидной формы госсипола в области 204 м.д. На спектре снятом из щелочного раствора в  $\text{D}_2\text{O}$  (рисунок 22) наблюдается сдвиг сигнала углеродного атома С(11<sup>I</sup>) в область 176 м.д., что полностью подтверждает образование кетольной формы. Альдегидная форма госсипола отсутствует, продукт енолизуется нацело.

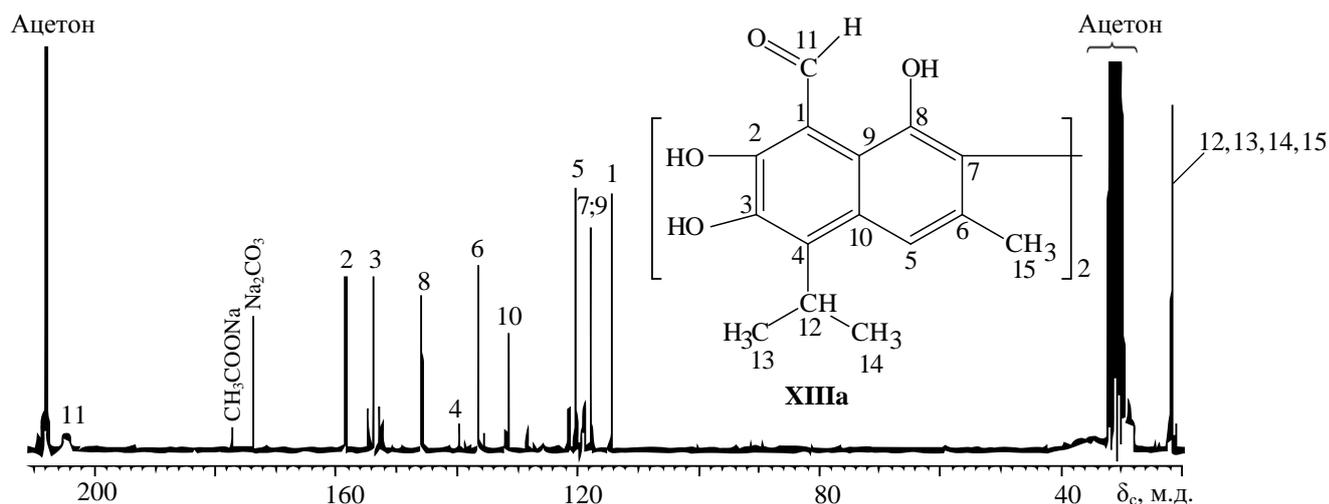


Рисунок 21 - Фрагмент спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$  ГУК, снятого из раствора в ацетоне

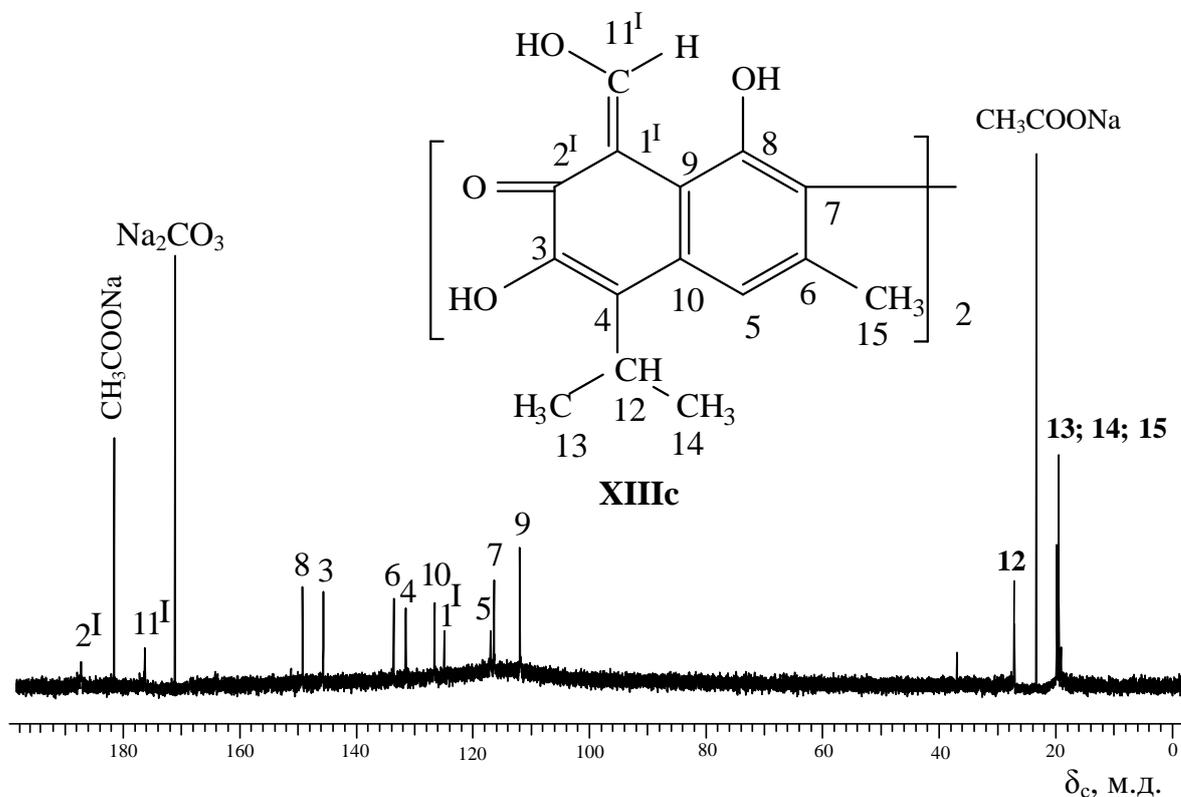


Рисунок 22 - Фрагмент спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$  ГУК, снятого из щелочного раствора в  $\text{D}_2\text{O}$

Таблица 4 - Отнесение сигналов атомов углерода госсипола в спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$ 

№ атома углерода	Госсипол					
	на ДАКМЦ	в ацетоне d6	в ацетоне [91]	в ацетоне [92]	в щелочи D <sub>2</sub> O	в CDCl <sub>3</sub> [93]
1	2	3	4	5	6	7
C 1	-	115,0	111,2	111,8	-	111,7
C 1 <sup>I</sup>	108,63	-	-	-	124,9	-
C 1 <sup>II</sup>	115,03	-	-	-	-	-
C 2	-	158,1	155,6	156,1	-	156,0
C 2 <sup>I</sup>	188,2	-	-	-	187,22	-
C 2 <sup>II</sup>	188,2	-	-	-	-	-
C 3	149,89	146,1	142,9	143,5	145,69	143,4
C 4	134,34	139,9	133,1	134,7	131,51	133,7
C 5	129,01	121,0	117,6	118,2	116,35	118,0
C 6	131,15	136,2	133,1	133,7	134,59	133,7
C 6 <sup>I</sup>	191,22	-	-	-	-	-
C 6 <sup>II</sup>	191,22	-	-	-	-	-
C 7	116,26	118,2	115,4	115,8	116,97	115,9
C 8	149,08	154,4	149,9	150,4	149,22	150,5
C 9	124,15	118,2	114,1	114,7	111,93	114,6
C 10	129,01	131,5	129,2	129,7	126,54	129,6
C 11	-	202	198,2	199,3	-	199,3
C 11 <sup>I</sup>	179,1	-	-	-	176,31	-
C 11 <sup>II</sup>	167,7	-	-	-	-	-
C 12	28,69	-	27,4	27,9	27,14	27,9
C13	19,72	-	19,8	20,5	19,46	20,3
C14	19,72	-	19,8	20,5	19,38	20,3
C 15	19.72	-	27,4	19,7	19,8	20,3

### 2.2.1 ИК-Фурье спектры госсипола

Методами инфракрасной спектроскопии было изучено химическое строение молекулы госсипола в твердой фазе, а так же произведено отнесение полос поглощения групп атомов в молекуле (таблица 5).

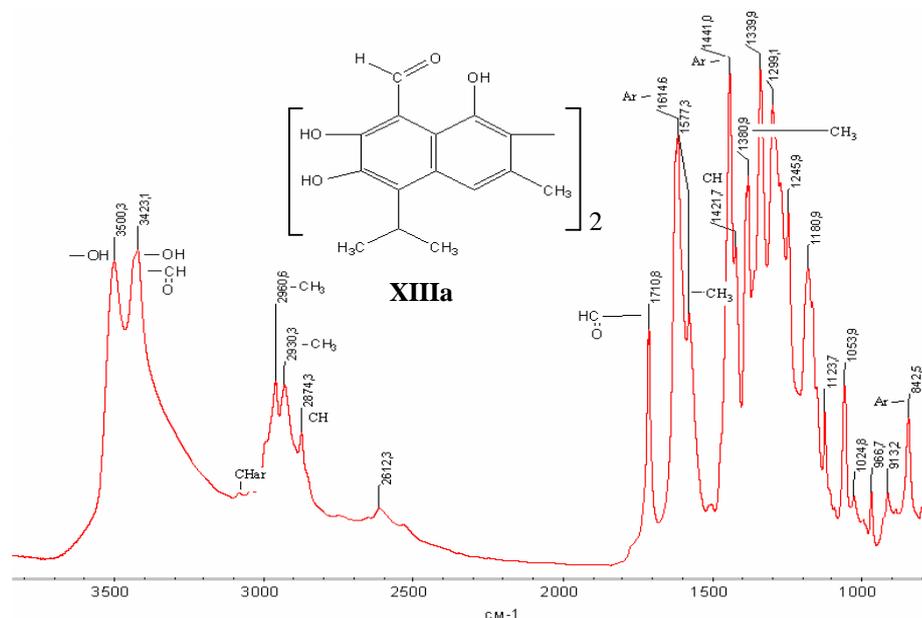


Рисунок 23 – ИК-Фурье спектр ГУК

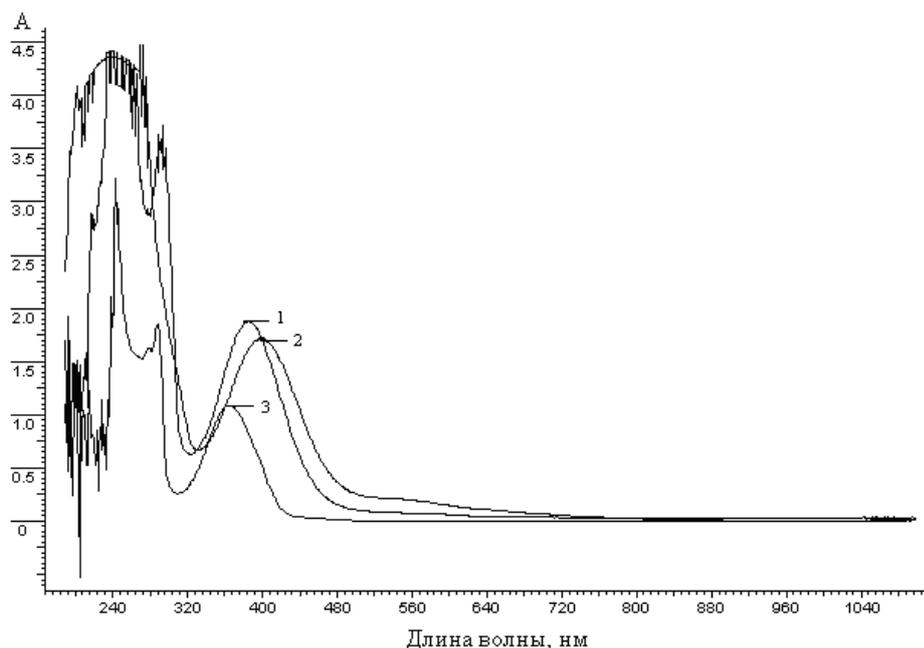
Таблица 5 – Положение сигналов в инфракрасном спектре в зависимости от волнового числа

Группы	Волновое число, см <sup>-1</sup>
1	2
-ОН-валентные	3500; 3423
-СО-альдегида наложенные на ОН	3423
-СО-альдегида валентные	1710
-СН <sub>3</sub> - ассиметричные валентные	3500
-СН <sub>3</sub> - симметричные валентные	3423
-СН <sub>3</sub> - деформационные	1577
-СН <sub>3</sub> - симметричные зонтичные	1380
-СН-кольца	3081
-СН-валентные	2874

Продолжение таблицы 5	
1	2
-СН-деформационные ножничные	1339
-СН-альдегида ножничные деформационные	1421
Симметричные деформационные кольца	1614
Боковые деформационные кольца	1441
Симметричные внеплоскостные заместители	842
Симметричные внеплоскостные кольца	690
Внеплоскостные кольца	772

### 2.2.2 УФ-спектры госсипола в различных растворителях

Изменение химической структуры и положение пиков поглощения молекулы госсипола в электронном спектре связано с енолизацией приводящей к изменению цепи сопряжения.



- Рисунок 24 - Электронный спектр поглощения госсипола: 1. относительно боратного буфера pH=8,5 (длина волны 385 нм; A=1,8777;  $\epsilon=29,34$  ед. погл.\*мл/(мг\*см));
2. относительно 0,1н NaOH (длина волны 401 нм; A=1,7205;  $\epsilon=27,352$  ед. погл.\*мл/(мг\*см));
3. относительно хлороформа (длина волны 365 нм; A=1,0849;  $\epsilon=33,904$  ед. погл.\*мл/(мг\*см))

В водной среде при изменении кислотности основные пики поглощения в спектре претерпевают батохромный сдвиг. Его величина зависит от pH раствора. Максимум поглощения госсипола в неполярном растворителе находится в области 401 нм.

Увеличение pH раствора с 8,5 до 12,5 приводит к смещению максимума поглощения на 16 нм, общий сдвиг с учетом спектра в неполярном растворителе составляет 36 нм. Этот эффект связан с возрастанием цепи сопряжения при потере ароматичности нафталиновой системы вследствие енолизации альдегидной группы в первом положении нафталинового кольца госсипола (рисунок 24).

### 2.2.2.1 Определение весового коэффициента экстинкции госсипола в

#### боратном буфере

Коэффициент экстинкции ГУК в боратном буфере определяли с использованием максимума поглощения при длине волны  $\lambda=385$  нм.

Определение проводили по калибровочному графику (рисунок 25). Каждую точку на прямой определяли как среднее значение из трех независимых определений.

По тангенсу наклона калибровочной прямой (рисунок 25) определяли весовой коэффициент экстинкции ГУК по формуле:

$$\varepsilon = A / (c * l) \quad (7)$$

где,

$\varepsilon$  – весовая экстинкция госсипола, ед. погл. \*мл/(мг\*см);

$\varepsilon_{385} = 28,97$  ед. погл. \*мл/(мг\*см)

A - оптическая плотность раствора;

c - концентрация раствора, мг/мл;

l - толщина слоя кюветы, l=1 см.

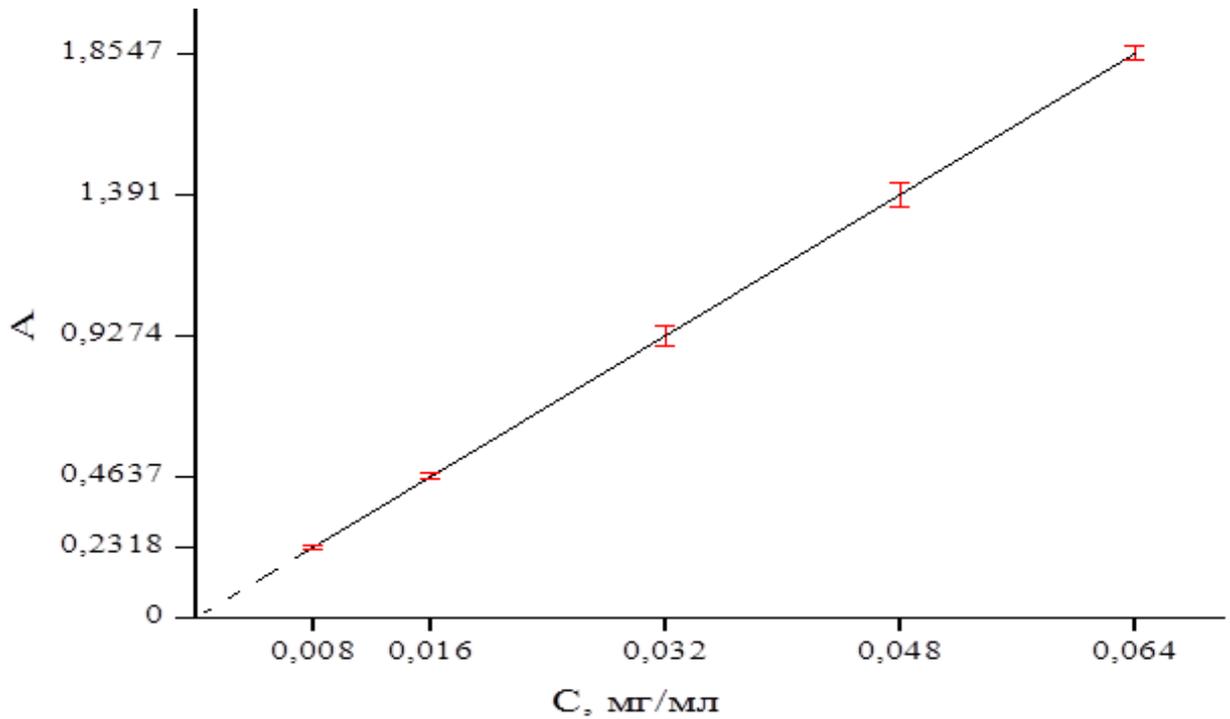


Рисунок 25 – Калибровочная прямая госсипол уксусной кислоты в боратном буфере

Коэффициент экстинкции госсипола в боратном буфере (pH=8,5), определенный по тангенсу угла наклона калибровочной прямой равен:

$$\varepsilon = A/c = 28,97 \text{ ед. погл.} \cdot \text{мл}/(\text{мг} \cdot \text{см})$$

где,

$\varepsilon$  – весовая экстинкция госсипола, ед. погл. \*мл/(мг\*см);

$A$  - оптическая плотность раствора;

$c$  - концентрация раствора, мг/мл;

для толщины аналитической кюветы и кюветы сравнения,  $l=1$  см.

Метод с построением калибровочного графика позволяет экстраполировать значение экстинкции в область низкого содержания ГУК в растворе и определять, таким образом, содержание ГУК в стандартной субстанции, в которых оно не превышает 1% весового.

### 2.2.3 MASS MALDI спектры госсипола

На MASS-MALDI-спектре госсипол уксусной кислоты снятом в режиме мономолекулярной массы из метанольного раствора, с использованием 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в качестве матрицы, имеются серии сигналов молекулярного иона госсипола с  $m/z=517,8$ , а также сигналы его производных: госсипола с отщепленной изопропильной группой в виде клатратов с уксусной кислотой  $m/z=540,8$  и ацетатом натрия  $m/z=556,8$ . Кроме этих сигналов в спектре имеется интенсивная группа сигналов дегидратированного госсипола  $m/z=500,8$ , а также продукта, образовавшегося при отщеплении одной альдегидной группы  $m/z=486,2$  (рисунок 26).

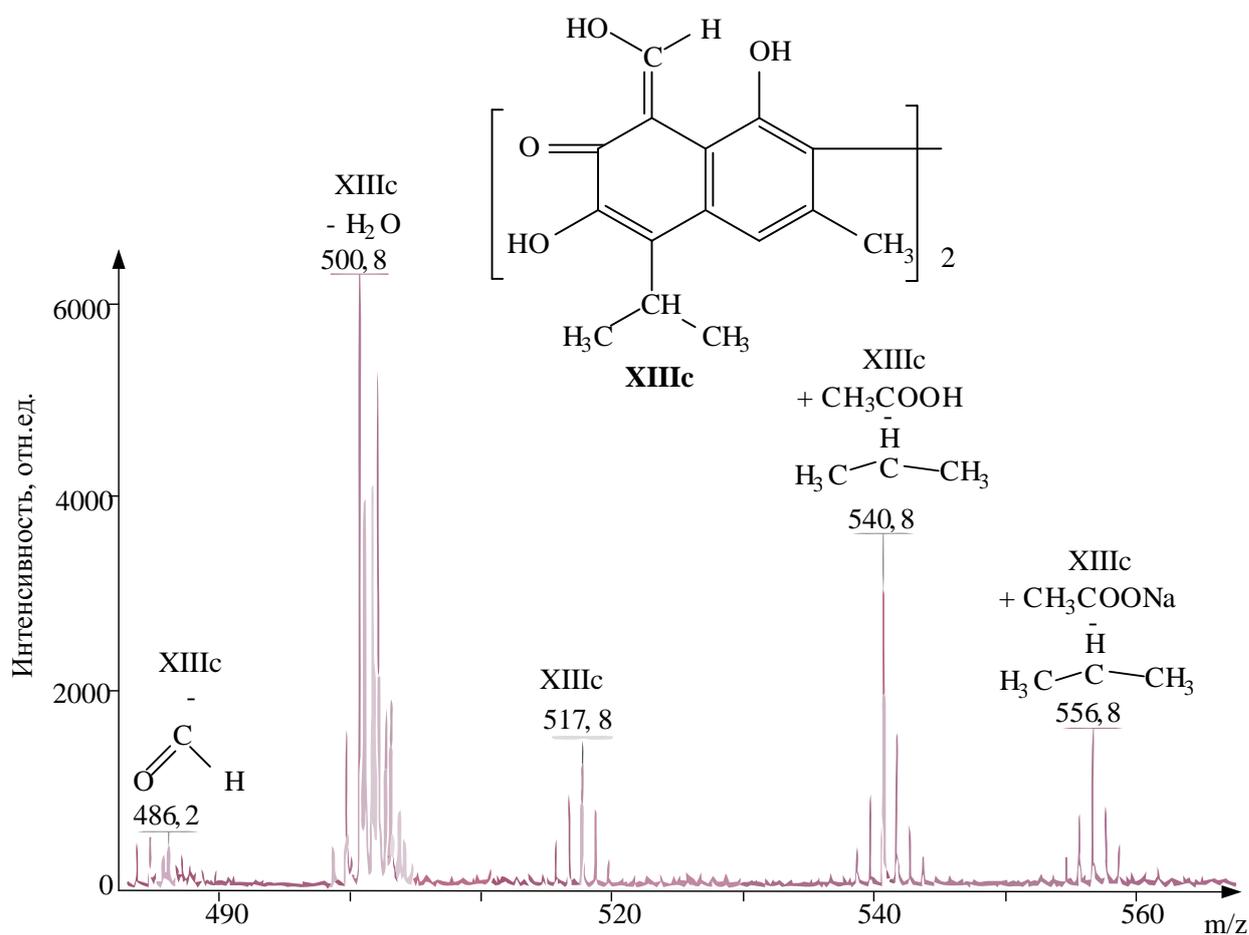


Рисунок 26 – MASS MALDI спектр госсипол уксусной кислоты

Таким образом, в условиях снятия спектра, молекула госсипола легко претерпевает следующие изменения: она может отщеплять молекулу воды с

образованием конденсированных структур лактольного типа, второй тип превращений связан с отщеплением альдегидной группы и, наконец, третий с отщеплением изопропильного радикала. Все три типа превращений можно наблюдать в масс-спектре госсипол уксусной кислоты.

## **2.3 Диальдегидполисахариды, содержащие ковалентно связанный**

### **нафтальдегид госсипол**

Госсипол является цитотоксичным веществом и для снижения токсичности с сохранением активности его ковалентно связывали с диальдегидполисахаридами.

#### **2.3.1 Синтез ДАД ковалентно связанного с госсиполом**

Присоединение госсипола к ДАД проводили в щелочном водном растворе. В качестве растворителя использовали боратный буфер  $pH=8,5$ , в котором удается избежать интенсивного гидролиза в процессе реакции. Такая система является одним из немногих общих растворителей для обоих реагентов. ГУК растворяли в  $0,1n NaOH$ , к раствору добавляли избыток боратного буфера. При закислении среды ГУК выпадает из раствора, это определяет порядок прибавления реагентов, при котором раствор ДАД медленно прибавляют к щелочному раствору госсипола. В таких условиях госсипол в процессе реакции находится в избытке. При этом происходит взаимодействие госсипола в кетольной форме с ДАД, окисленные звенья которого практически полностью находятся в виде циклических полуацеталей (рисунок 27).

Синтез ДАД ковалентно связанного с госсиполом проводили в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6 – Загрузки компонентов для синтеза ДАД ковалентно связанного с госсиполом

Соотношение госсипол: ДАД моль: осново-моль	ДАД		Масса госсипола, г.
	Степень окисления ( $\gamma_{ок}$ ), %	Масса, г.	
1:1	71,0	0,22	0,52
1:1	71,0	0,22	0,52
1:1	96,0	0,15	0,52

### 2.3.1.1 Спектры и химическая структура продуктов взаимодействия ДАД с нафталдегидом госсиполом

Изучение химического строения продуктов взаимодействия госсипола с диальдегиддекстраном проводили с помощью методов ЯМР  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , УФ и ИК спектроскопии с Фурье преобразованием.

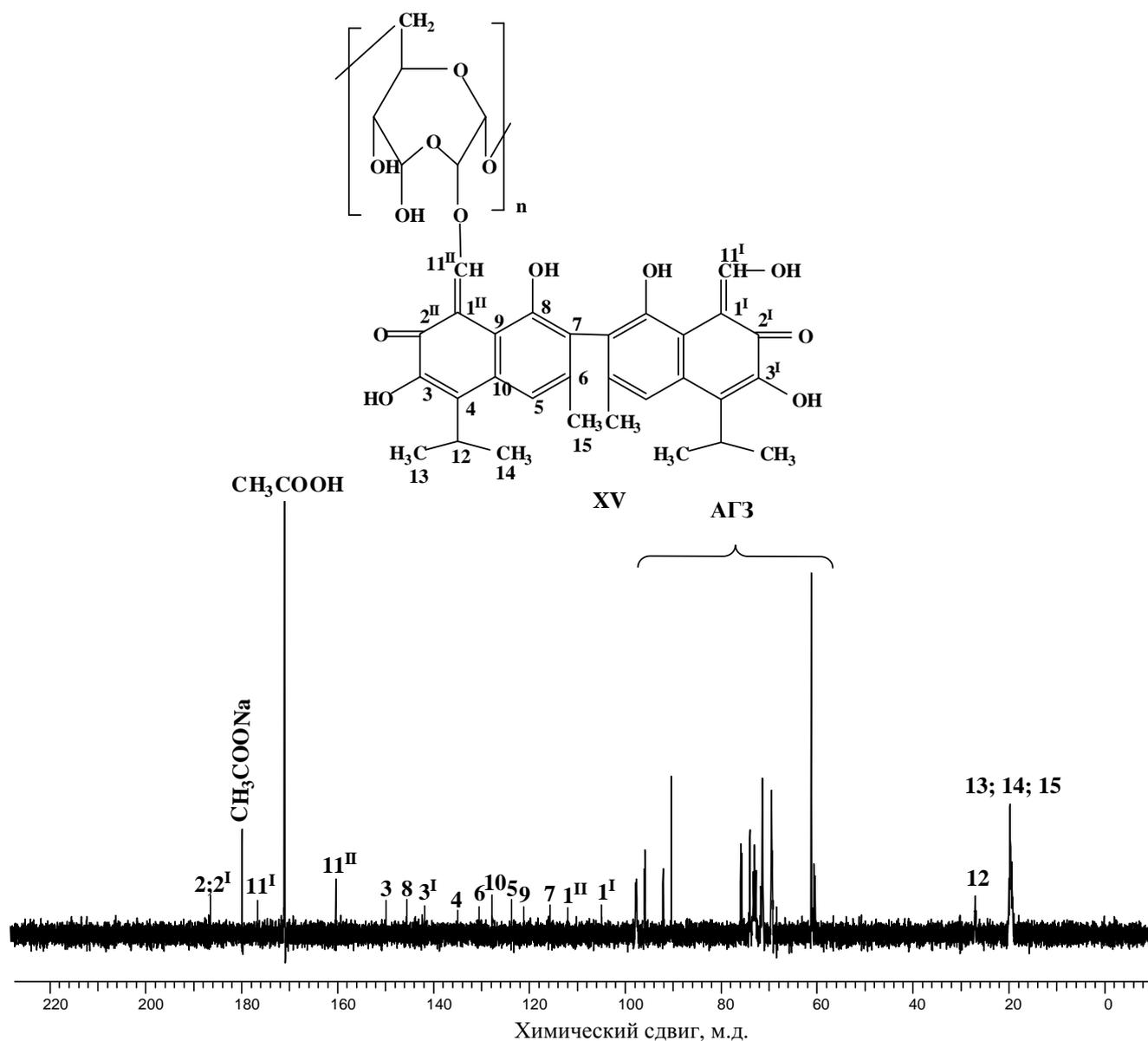


Рисунок 27 – Фрагмент спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$  ДАД ковалентно связанного с госсиполом в щелочном растворе  $\text{D}_2\text{O}$

В спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  продукта (рисунок 27), полученного в условиях избытка ГУК в реакции, присутствуют сигналы углеродов ароматических колец госсипола в области 120-170 м.д. и сигналы ДАД в области 55-110 м.д. Сигнал в области 162 м.д. принадлежит углероду  $\text{C}(11^{\text{II}})$  альдегидной группы в енольной форме замещенной молекулы госсипола. В монозамещенном продукте присутствуют сигналы  $\text{C}(3^{\text{I}})$  молекулы госсипола содержащую одну из альдегидных групп в виде незамещенного енола 146 м.д. В продукте присутствуют как моно-  $\text{C}(11^{\text{I}})$  177

м.д., так и дизамещенное  $C(11^{II})$  162 м.д. производные госсипола. Рассчитать их относительное содержание не представляется возможным.

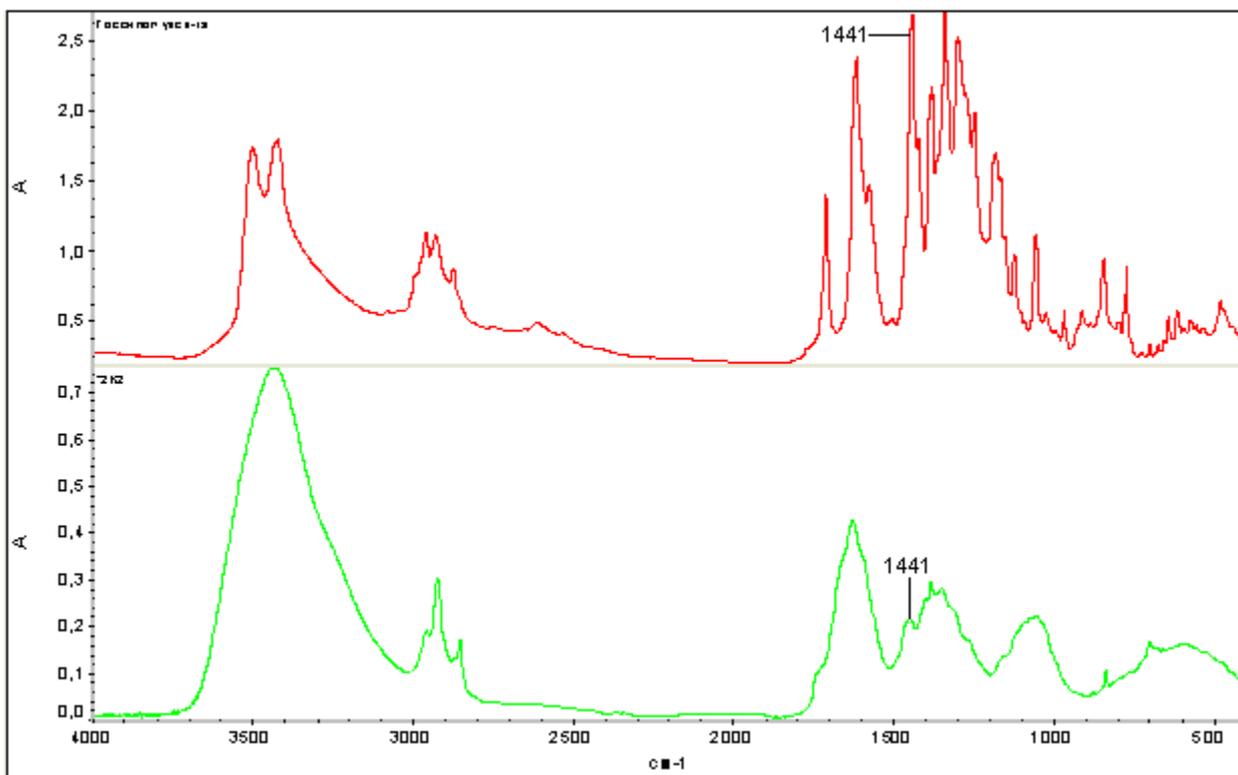


Рисунок 28 – ИК спектры: ГУК (верхний) и ДАД ковалентно связанного с госсиполом (нижний)

Содержание связанного госсипола в полимере прививочного типа на основе ДАД ковалентно связанного с госсиполом, полученном без использования ацетона в качестве осадителя, можно определить с помощью метода ИК спектроскопии, так как аналитический пик в области  $1441\text{ см}^{-1}$  не перекрывается с полосами поглощения, имеющимися в спектре ДАД (рисунок 28). В случае если продукт осажден в ацетон, область сигналов карбонильных групп может быть закрыта сигналом карбонильной группы остатков ацетона.

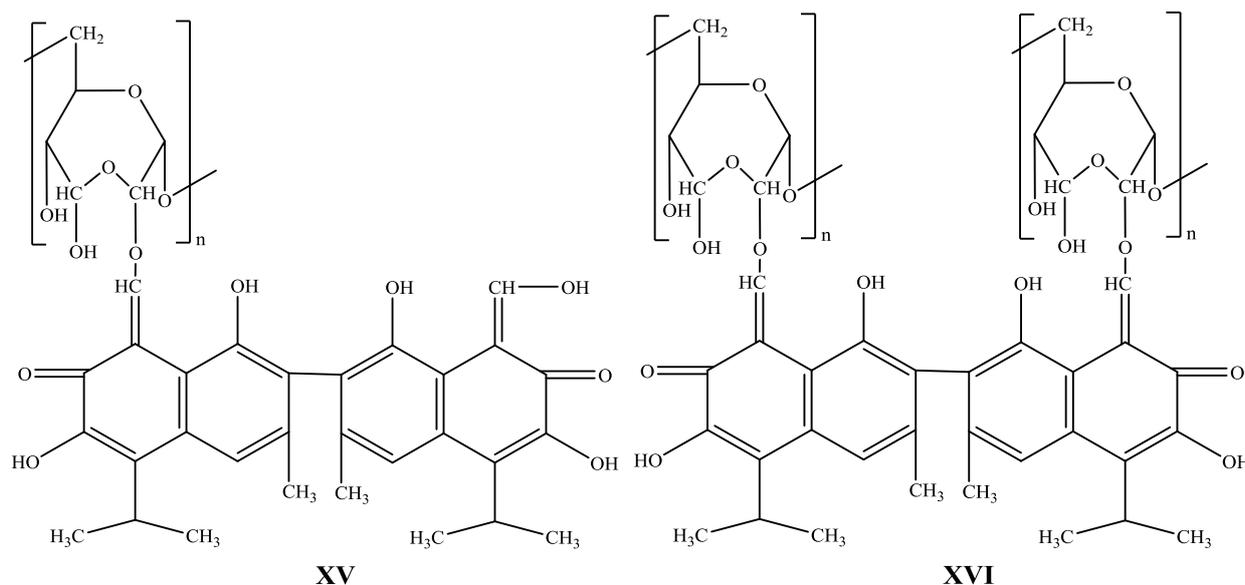


Рисунок 29 - Продукты моно- (XV) и дизамещения (XVI) госсипола фрагментами ДАД, полученные в условиях избытка нафталъдегида и ДАД соответственно

Госсипол к ДАД присоединяется ковалентной связью, причем в реакции участвует нафталъдегид в кетольной форме. Образующаяся связь значительно более устойчива к гидролизу по сравнению с обычной полуацетальной.

Несмотря на наличие двух альдегидных групп в окисленном звене ДАД, в реакции присоединения принимает участие только одна из них. ДАД, так же как и ДАКМЦ, является монофункциональным соединением в этой реакции.

Продукт присоединения можно представить как смесь двух основных полимеров. Первый содержит полностью замещенный госсипол, у которого обе альдегидные группы замещены остатками окисленных звеньев ДАД (рисунок 29, структура XVI). Второй полимер прививочного типа содержит остатки госсипола, присоединенные к ДАД только одной альдегидной группой (рисунок 29, структура XV). Вторая остается незамещенной и существует в кетольной форме.

Соотношение продуктов моно- и дизамещения госсипола рассчитать не представляется возможным.

### 2.3.2 Синтез ДАКМЦ ковалентно связанной с госсиполом

Присоединение госсипола к ДАКМЦ проводили как в гомогенных условиях в щелочном водном растворе, так и в гетерогенных условиях. В первом случае в качестве растворителя использовали боратный буфер pH=8,5, в котором удается избежать гидролиза в процессе реакции. Так же как и в случае с ДАД, такая система является единственным общим растворителем для обоих реагентов. Присоединение проводили аналогично реакции нафталъдегида с ДАД в гомогенных условиях без промывки ацетоном. Результаты синтеза полимеров ДАКМЦ ковалентно связанного с нафталъдегидом госсиполом представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Полимеры ДАКМЦ с ковалентно связанная с нафталъдегидом госсиполом

Соотношение госсипол: ДАКМЦ моль: осново-моль	ДАКМЦ			ДАКМЦ ковалентно связанная с госсиполом	
	$\gamma_{ок}$ , %	$[\eta]$ , дл/г	$M_n$ , кДа	$M_w$ , кДа	Содержание связанного госсипола, ч./млн.
Синтез в условиях избытка госсипола					
2.4:1	40	-	-	-	750000
1.2:1	40	0,121	32	11,3	102200
Синтез в условиях равномольного соотношения госсипол : осново-моль ДАКМЦ					
1:1	74	0,086	18	-	-
1:1	27	0,278	98	-	-
Синтез в условиях избытка ДАКМЦ					
1:1.34	22	0,127	31	-	-
1:1.34	22	0,127	31	-	-
0.5:1	40	0,121	32	12,1	6700
0.1:1	82	0,086	18	-	-
0.1:1	40	-	32	12,4	2200
0.1:1	11	-	157	67,1	580
0.01:1	11	-	157	-	12

### 2.3.2.1 Химическое строение полимеров ДАКМЦ с ковалентно связанных с нафталъдегидом госсиполом, полученных в гомогенных условиях

Изучение химического строения продуктов взаимодействия госсипола с диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой в гомогенных условиях, проводили с помощью методов ЯМР  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , УФ и ИК спектроскопии с Фурье преобразованием.

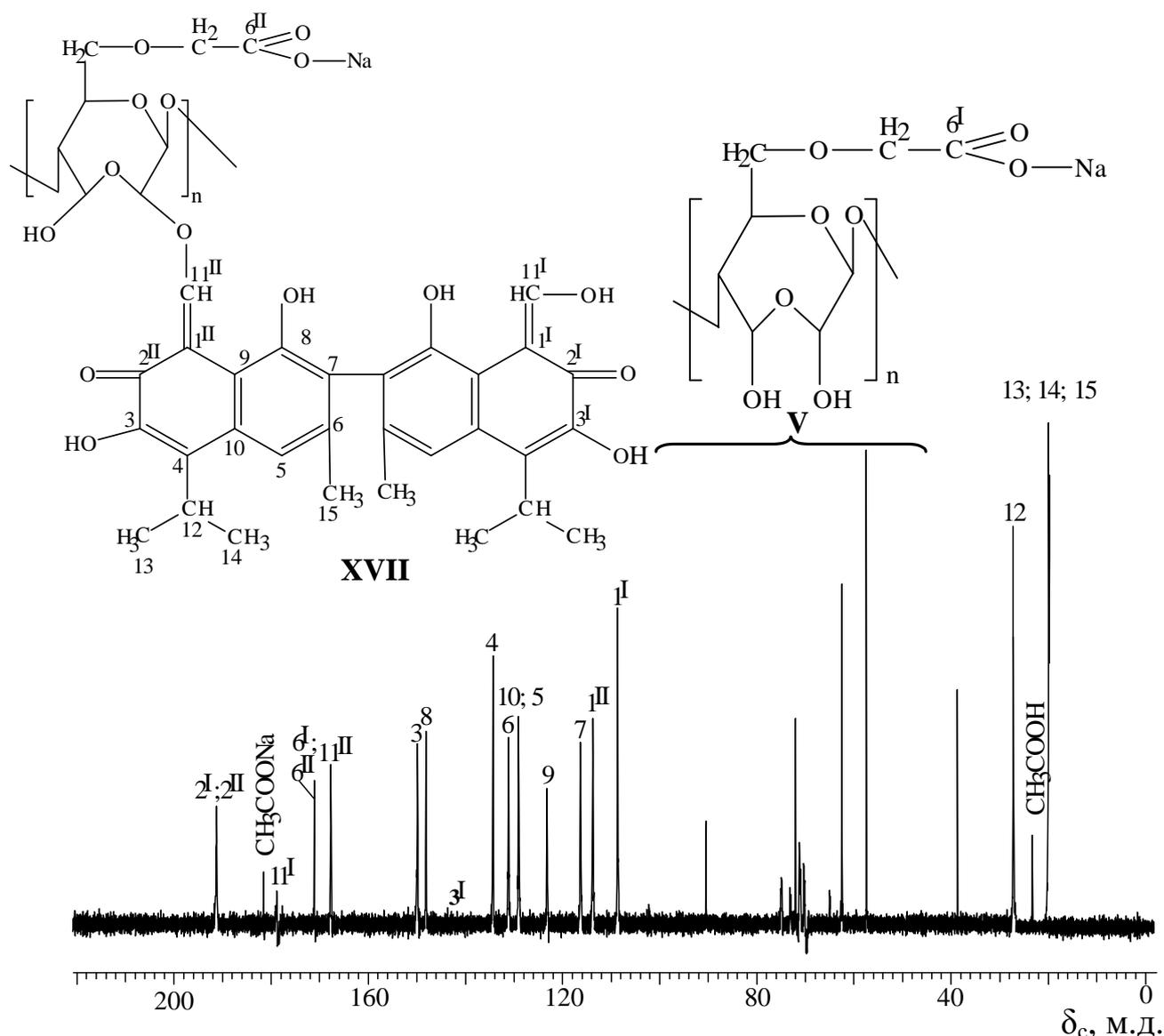


Рисунок 30 - Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  в  $\text{D}_2\text{O}$  ДАКМЦ ковалентно связанной с нафталъдегидом, полученной в гомогенных условиях в условиях избытка госсипола в реакции

В спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  продукта (рисунок 30) присутствуют сигналы углеродов ароматических колец нафталальдегида в области 120-170 м.д., сигналы основной цепи ДАКМЦ в области 55-110 м.д. и сигнал углерода карбоксильной группы 190 м.д. Сигнал в области 169 м.д. принадлежит углероду  $\text{C}(11^{\text{II}})$  альдегидной группы енольной формы замещенной молекулы госсипола. Сигнал углерода  $\text{C}(3^{\text{I}})$  в незамещенном фрагменте молекулы госсипола в области 146 м.д. имеет низкую интенсивность и его трудно использовать для оценки относительного содержания моно- и дизамещенного госсипола в продукте, однако для этого можно использовать соотношение сигналов  $\text{C}(11^{\text{II}})$  и  $\text{C}(11^{\text{I}})$ . Интегральная интенсивность суммы сигналов  $\text{C}(11^{\text{II}})$  и  $\text{C}(11^{\text{I}})$  – 30 единиц соответствует двум углеродам альдегидных групп в разных формах: замещенной и незамещенной. Соотношение сигналов 22:8 позволяет предположить, что продукт содержит приблизительно равномольную смесь моно- и дизамещенного госсипола.

Ковалентное присоединение нафталальдегида к ДАКМЦ осуществляется с образованием прочной, трудногидролизуемой ацетальной связи.

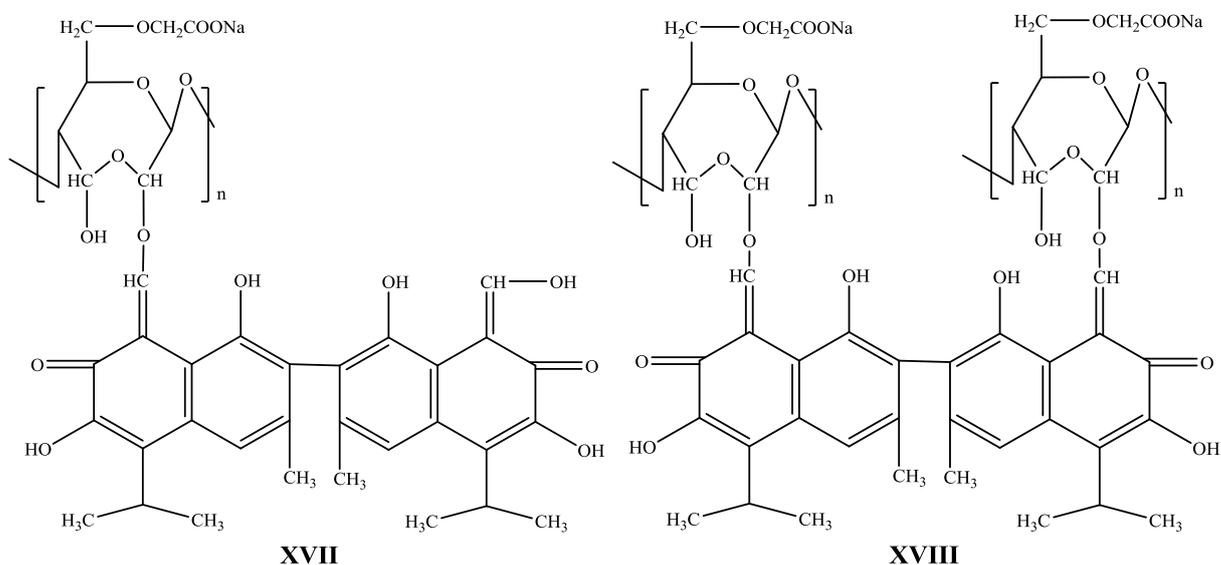


Рисунок 31 – Продукты моно- (XVII) и дизамещения (XVIII) госсипола окисленными циклами основной цепи, синтезированные в условиях избытка нафталальдегида и ДАКМЦ соответственно

ДАКМЦ ковалентно связанная с нафталальдегидом, полученная в условиях избытка госсипола, содержит смесь продуктов моно- и дизамещения. Монозамещенный госсипол присоединенный к полимеру-носителю одной альдегидной группой содержит вторую свободную, присутствие которой обуславливает высокую общую токсичность полимера. Продукт дизамещения не вносит существенного вклада в цитотоксичность, вследствие чего в целом она существенно меньше, чем у низкомолекулярного немодифицированного госсипола.

В структуре полимера прививочного типа, содержащего нафталальдегид ковалентно связанный с ДАКМЦ, полученного в условиях избытка полисахарида, госсипол содержится в двоевязанном состоянии и не содержит свободных кетольных групп. Это соединение не токсично. Равновероятно взаимодействие молекулы госсипола со звеньями ДАКМЦ одной и той же макромолекулы или двух соседних цепей.

При равномольном соотношении полисахарида и госсипола образуется полимер, содержащий смесь моно- и дизамещенных молекул госсипола в соотношении 1:1. Соотношение можно менять, изменяя порядок прибавления и условия синтеза. Избыток несвязанного госсипола удаляется из продукта при его очистке.

### **2.3.2.2 Химическое строение полимеров ДАКМЦ ковалентно связанных с нафталальдегидом госсиполом, полученных в гетерогенных условиях**

Гетерогенные условия синтеза используются в промышленности, так как больше подходят для масштабирования уже на уровне опытного производства. Высокая вязкость истинных растворов КМЦ и ДАКМЦ не позволяет проводить эффективное перемешивание реакционной массы с концентрацией полимера больше 5% мас. При гетерогенном процессе реакцию проводят в суспензии

набухших частиц полимера, отделенных друг от друга без взаимного проникновения клубов макромолекул по принципу формирования пластиката. Это позволяет существенно повысить концентрацию продукта, снизить модуль ванны и проводить эффективное перемешивание суспензии. Такой способ известен и широко применяется в промышленности при химической модификации и переработке пластикатов поливинилхлорида. В случае КМЦ и ДАКМЦ для образования суспензии использовали смесь вода – ацетон при различных соотношениях растворителя и осадителя.

Изучение химического строения заводских образцов, полученных в гетерогенных условиях проводили с помощью методов ЯМР  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , УФ и ИК спектроскопии с Фурье преобразованием.

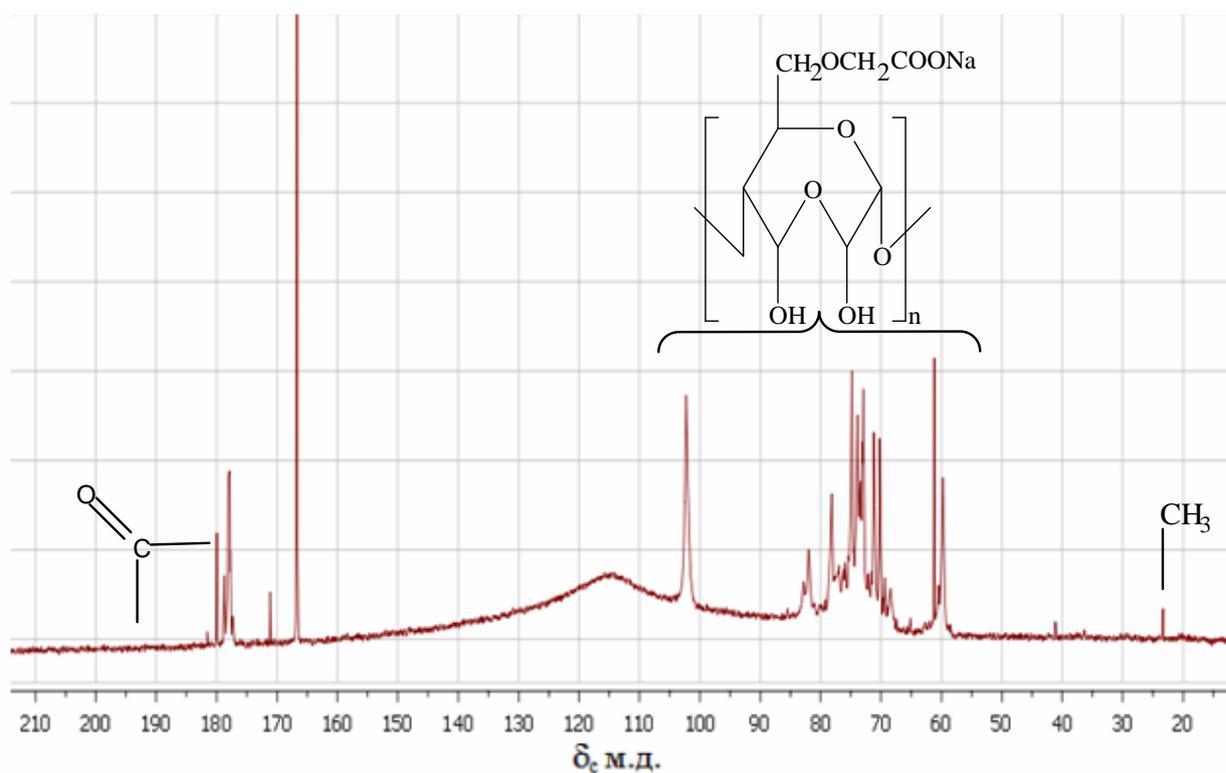


Рисунок 32 – Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  продукта, полученного в гетерогенных условиях, с удельным показателем поглощения 1,2 (УПП) в  $\text{D}_2\text{O}$

В спектре образцов ДАКМЦ содержащего ковалентно связанный госсипол с УПП=1,2 (рисунок 32), который по описанию должен содержать около 3% мол. госсипола, не обнаружено сигналов, которые можно было бы отнести к углеродам

нафталиновых колец в области 120-170 м.д. В условиях съемки спектра наиболее интенсивными являются сигналы углеродов  $\text{CH}_3$  групп изопропильного заместителя, в спектре продукта обнаружены эти сигналы в области 24 м.д. Таким образом, содержание госсипола в продукте не превышает 3 % мол. Делать выводы о структуре присоединенного вещества не представляется возможным.

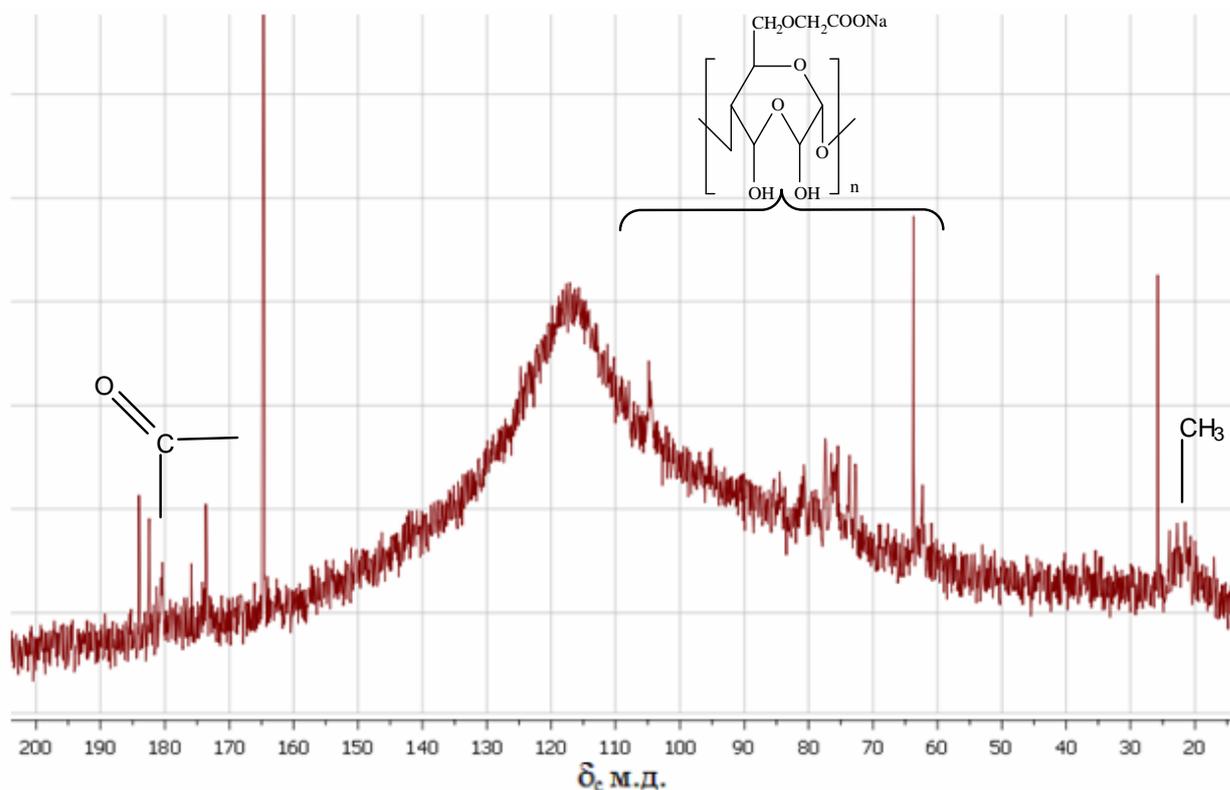


Рисунок 33 – Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  продукта, полученного в гетерогенных условиях, с удельным показателем поглощения 15,8 (УПП) в  $\text{D}_2\text{O}$

В спектре образца с УПП=15,8 (рисунок 33) обнаружены сигналы в области 70-80 м.д. относящиеся к ангидроглюкозным звеньям (АГЗ) и в области 180 м.д. сигналы карбоксильных углеродов ДАКМЦ, карбоната и ацетата натрия, а также группы сигналов в области 24 м.д., которые, предположительно, могут относиться к фрагментам госсипола или его производных.

### 2.3.2.3 ИК-Фурье спектроскопия ДАКМЦ, содержащей ковалентно связанный госсипол, синтезированной в гомогенных условиях

В ИК спектре исходного госсипола присутствует характеристическая полоса поглощения валентных колебаний карбонила альдегидной группы в области  $1710\text{ см}^{-1}$ , однако использовать эту полосу для количественного определения госсипола в полимере не представляется возможным, так как она накладывается на полосу поглощения карбоксильной группы полимера-носителя (ДАКМЦ) (рисунок 34).

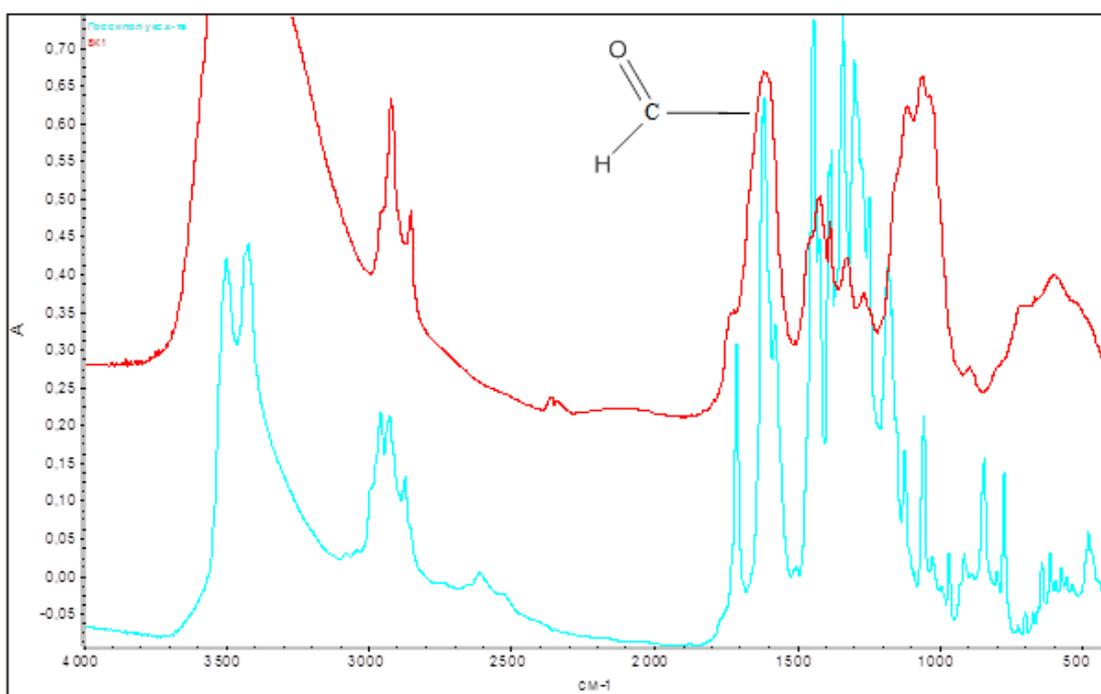


Рисунок 34 – Сравнение ИК спектров ДАКМЦ (верхний) и ГУК (нижний)

В результате анализа спектров были выбраны в качестве аналитических полос пик  $1441\text{ см}^{-1}$ , относящиеся к колебаниям нафталинового кольца госсипола, а так же полоса поглощения СН группы в изопропильном радикале  $1339\text{ см}^{-1}$  (рисунок 23). С увеличением содержания госсипола в смеси закономерно меняется характер спектра (рисунок 35).

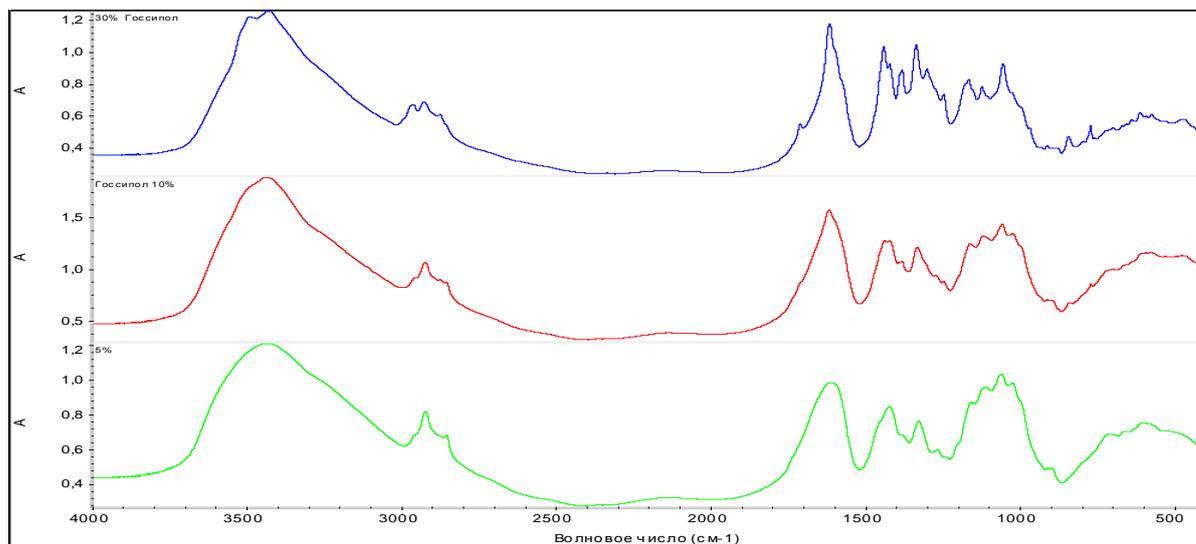


Рисунок 35 – ИК спектры КМЦ с различным содержанием госсипола, механически добавленного в смесь – 5% (нижний); 10% (средний); 30% (верхний)

Чувствительность метода количественного определения госсипола в полимере с использованием ИК спектроскопии невелика. С уверенностью можно анализировать только образцы, содержащие более 10% вес. госсипола (рисунок 35).

#### 2.3.2.4 Сравнительный анализ электронных спектров поглощения исходного

**госсипола и продукта присоединения госсипола к ДАКМЦ, полученного в**

#### **гомогенных и гетерогенных условиях**

В спектрах продуктов присоединения госсипола к ДАКМЦ, полученных в гетерогенных условиях с использованием ацетона в качестве осадителя, во всех образцах, имеется два основных пика поглощения:  $\lambda_1 = 217$  нм и  $\lambda_2 = 312-324$  нм. Наличие этих пиков в спектре объясняет желто-коричневую окраску образцов с высоким значением УПП (удельного показателя поглощения). ГУК, как в

свободном, так и в ковалентно связанном состоянии, в спектре имеет три пика поглощения:  $\lambda_1=240$  нм,  $\lambda_2=290$  нм и  $\lambda_3=385$  нм (рисунок 36).

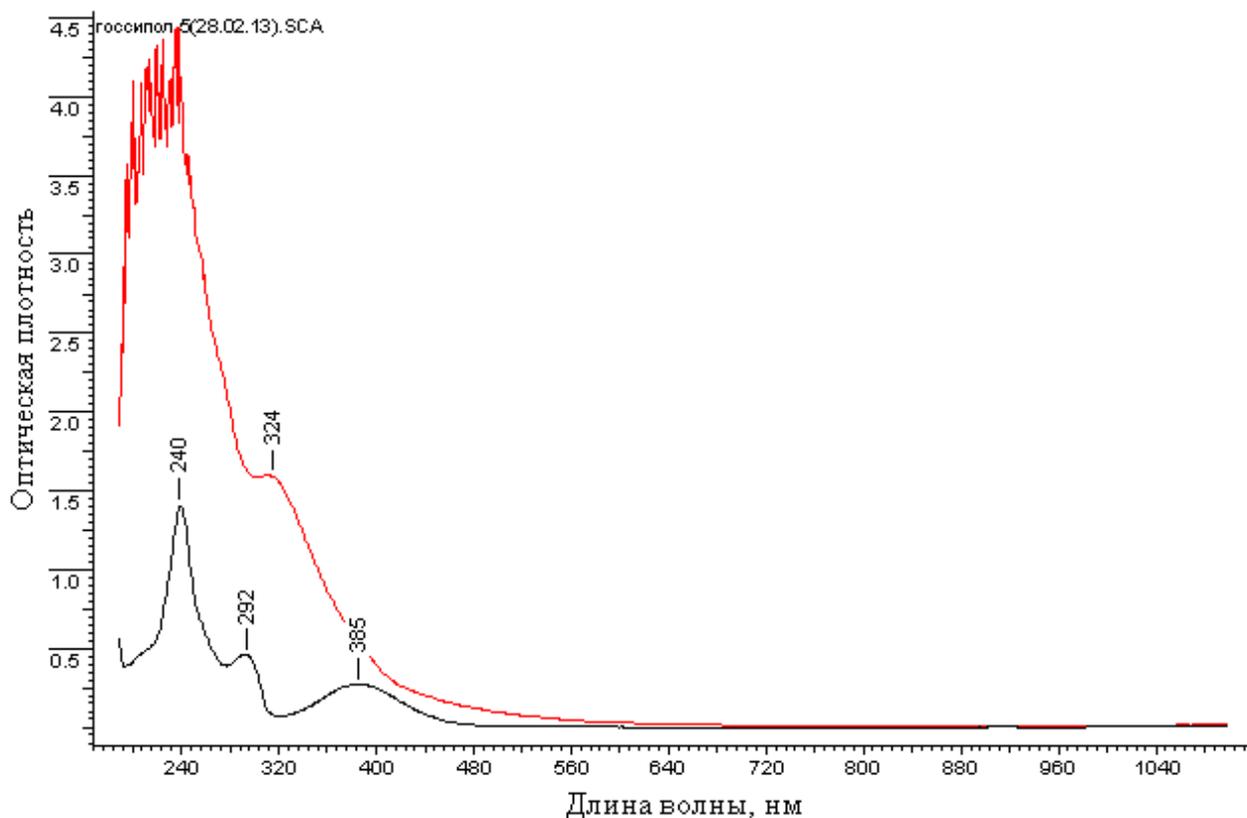


Рисунок 36 – Электронный спектр поглощения госсипола (нижний) и продукт присоединения госсипола к ДАКМЦ, полученный в гетерогенных условиях с использованием ацетона в качестве осадителя, УПП=15,8 (верхний)

Оба пика поглощения ( $\lambda_1=217$  нм и  $\lambda_2=312-324$  нм) в образцах, полученных гетерогенным способом, не относятся к ковалентно связанному госсиполу. Продукт холостого опыта, в который не добавляли ГУК, так же имеет эти пики поглощения. В области 385 нм, в которой поглощает ковалентно связанный госсипол, в спектре образца имеется плечо, которое можно обработать при помощи программы ACD labs и перевести в аналитически пригодный вид методом коррекции базовой линии (рисунок 37).

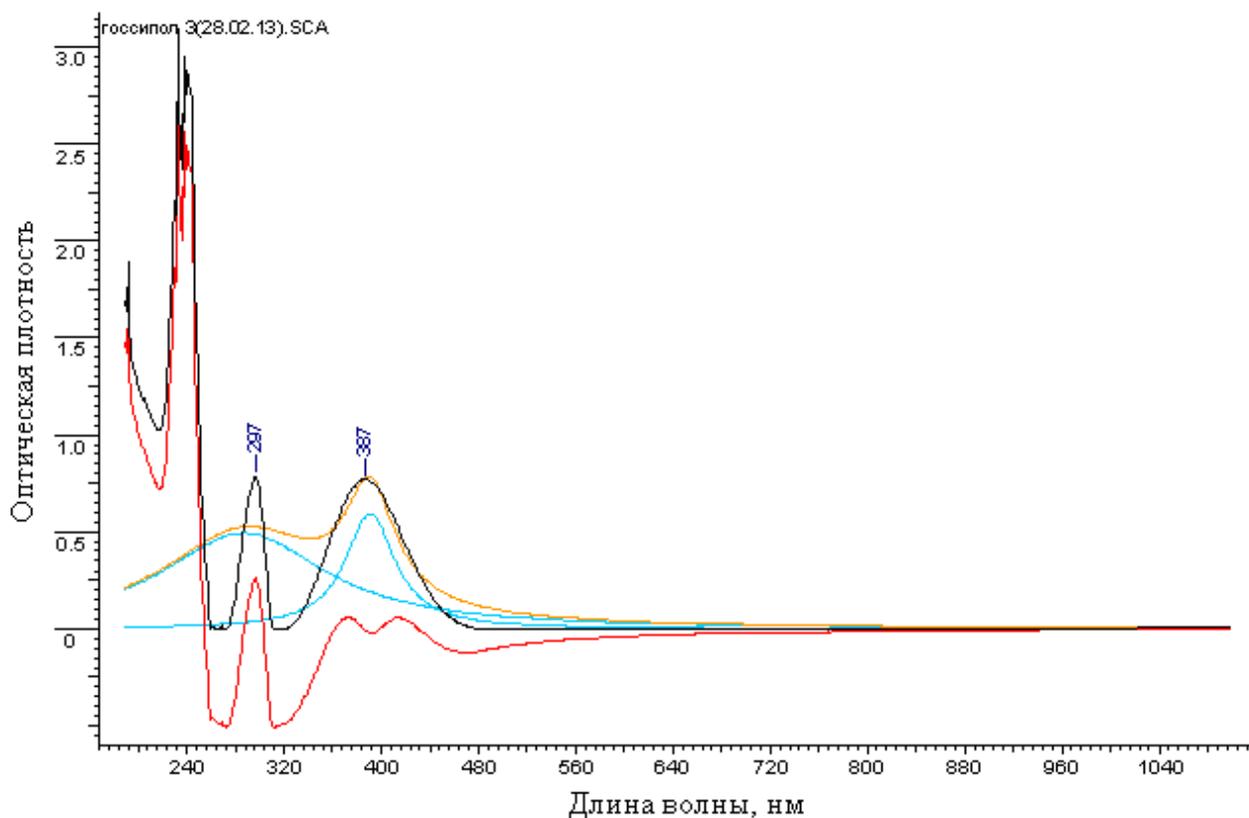


Рисунок 37 – Электронный спектр поглощения исходного ГУК и ковалентно связанного ГУК с коррекцией базовой линии

Это позволяет разработать метод количественного определения следовых количеств ковалентно связанного ГУК в образцах, полученных гетерогенным способом, с УПП от 1 до 26,8 (таблица 7). Погрешность метода составляет около 0,015% госсипола. Погрешность была определена как интенсивность сигнала в электронном спектре поглощения холостого опыта, пересчитанная по методике определения содержания ковалентно связанного госсипола с коррекцией базовой линии. Примерное соотношение величины значения УПП и содержания госсипола определенное классическим методом составляет 10:1, т.е. изоконцентрационный метод позволяет увеличить чувствительность определения в 10 раз, однако не является количественным, поскольку не подчиняется закону Ламберта-Бугера-Беера.

Таблица 7 – Значения концентрации ковалентно связанного госсипола в образцах, полученных гомофазным и гетерофазным способами

Название образца	Концентрация связанного госсипола, %	Концентрация свободного госсипола (оптическая плотность экстракта хлороформом)
ГКМЦ УПП=1,18	0,1	менее 0,02
ГКМЦ УПП=1,15	0,15	менее 0,02
ГКМЦ УПП=1,10	0,04	менее 0,02
ГКМЦ УПП=1,02	0,12	менее 0,02
ГКМЦ УПП=1,01	0,13	менее 0,02
ГКМЦ УПП=1,2	0,05	менее 0,02
Холостой опыт	0,015	менее 0,02
1К5	0,67	менее 0,02
1К6	0,22	менее 0,02
1К7	10,22	менее 0,02
1К8	0,06	менее 0,02

### 2.3.3 Определение сайтов связывания нафталъдегида госсипола с

#### диальдегидполисахаридами

Определение ключевых сайтов для ковалентного связывания нафталъдегидов, к которым относится госсипол, с диальдегидполисахаридами является предметом острой дискуссии.

Окисленные полисахариды имеют несколько потенциальных сайтов для связывания активного вещества, содержащего ароматическую альдегидную группу.

Первый – это окисленное глюкозное кольцо существующее в виде циклических полуацеталей (рисунок 38, сайты d, g).

Второй потенциальный сайт - остатки неокисленных ангидроглюкозных звеньев. Этот сайт имеет особое значение для полимеров с высокой молекулярной массой, содержащих относительно небольшое количество окисленных звеньев. Конденсация может протекать с вовлечением первичных (C6) и вторичных (C2-C5) спиртовых OH групп (рисунок 38, сайты a, b, e).

Третий сайт – полуацетальные OH группы восстанавливающих концов макромолекул (C1). Этот сайт имеет особое значение для низкомолекулярных полисахаридов, которые могут содержать до 1-2 мол.% (рисунок 38, сайты c, f).

Конденсация госсипола с сайтами первого типа была изучена с использованием полисахаридов содержащих не менее 60% окисленных звеньев, в то время как взаимодействие с сайтами второго и третьего типов было изучено с использованием модельной реакции нафталальдегида с глюкозой.

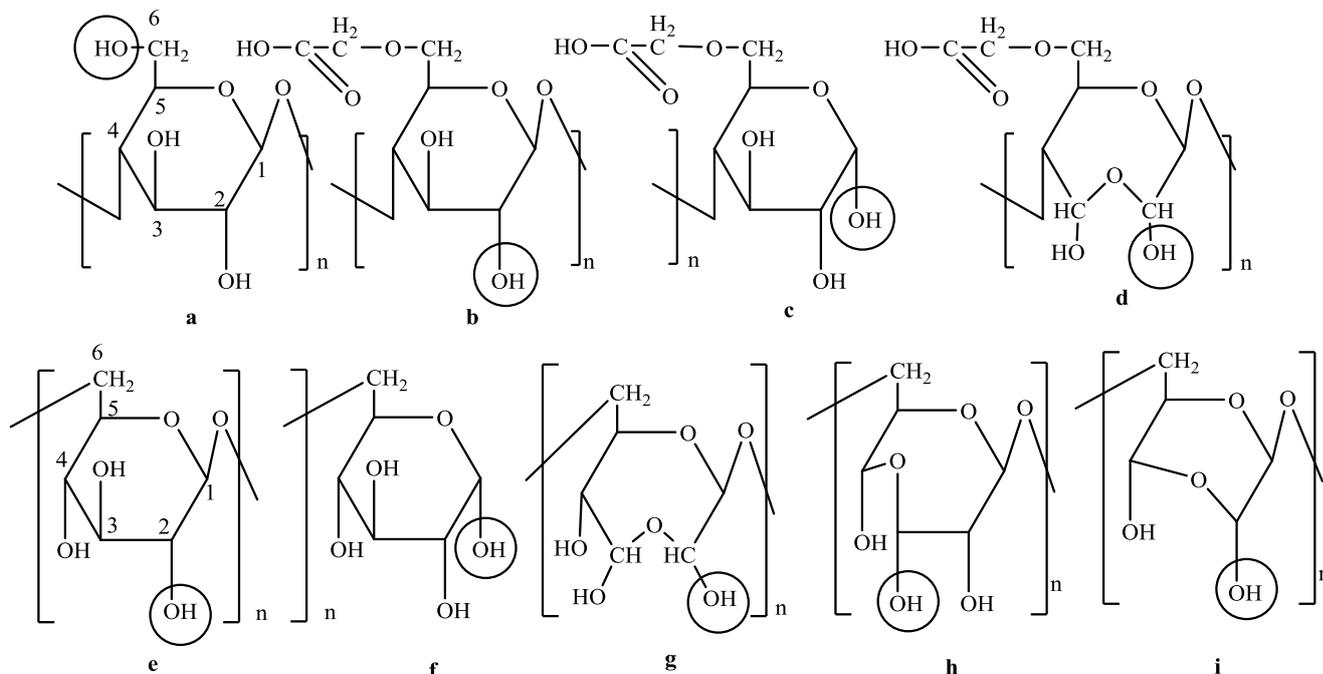


Рисунок 38 - Потенциальные сайты для присоединения госсипола к ДАКМЦ и ДАД

ДАКМЦ содержит единственный тип окисленных звеньев замкнутых в полуацетальные циклы, способные вступать в реакцию с функциональными группами нафталальдегидов, в то время как ДАД имеет три типа окисленных звеньев (рисунок 38, сайты g, h, i)).

Следует отметить, что окисленные глюкозные звенья ДАКМЦ реагируют как монофункциональные соединения. Взаимодействие с двумя фрагментами молекулы госсипола не происходит по стерическим причинам. Бифункциональная молекула госсипола может взаимодействовать с окисленными звеньями одной и той же или разных макромолекул носителя, однако спектральные исследования не позволяют определить разницу и это остается вне сферы данного исследования.

Взаимодействие госсипола в кетольной форме с ДАД в водных условиях приводит к образованию продукта весьма схожего по химическому строению с продуктом взаимодействия нафталальдегида с ДАКМЦ. Все типы окисленных звеньев ДАД реагируют как монофункциональные соединения. Не наблюдается зависимость функциональности ни от содержания таких звеньев в макромолекуле, ни от молярного соотношения окисленных звеньев и альдегидных групп госсипола.

Данные спектральных исследований дают некоторое представление о химической структуре полученных продуктов. Ключевые сигналы атомов углеродов C1 и C11 в ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектре претерпевают сдвиги аналогичные продукту присоединения госсипола к ДАКМЦ, упомянутому выше (рисунок 30), однако спектральные данные не позволяют идентифицировать сайты присоединения госсипола к неокисленным звеньям макромолекул диальдегидполисахаридов. Дальнейшее исследование было проведено с использованием модельных соединений.

### 2.3.3.1 Синтез модельных соединений

Для изучения возможных сайтов присоединения нафталъдегидов к неокисленным звеньям полимеров-носителей и гликозидным звеньям восстанавливающих концов макромолекул в качестве низкомолекулярных моделей использовали продукты гликозилирования госсипола в водной и спиртовой средах.

#### Гликозилирование госсипола в водных условиях

Взаимодействие госсипола с глюкозой использовали в качестве модельной реакции. Ее проводили в водных условиях при нейтральных и щелочных значениях  $pH=8,5$ . Взаимодействие нафталъдегида возможно с двумя сайтами глюкозы: с ОН группой при С1 аномальном атоме ацетального цикла и со спиртовыми группами при С2, С3, С4 и С6. Направление реакции присоединения контролировали с помощью ориентационного эффекта комплекса Безекена, образующегося в борат содержащей водной среде. Комплекс Безекена закрывает ОН группы глюкозных циклов полисахаридов направленные в одну сторону, обеспечивая регоселективность реакции присоединения. Так как в макромолекулах декстрана гидроксильная группа при С-6 участвует в образовании ацетальной связи, при проведении модельной реакции глюкозы с нафталъдегидом свободную гидроксильную группу глюкозы при С-6 закрывали по методу Безекена. При этом образуется комплекс с борной кислотой, с вовлечением гидроксильных групп при глюкозы кроме находящихся в аксиальном положении при С1  $\alpha$ -глюкозы (рисунок 39). Следует заметить, что остаточные глюкозные звенья ДАКМЦ не вступившие в реакцию так же могут образовывать комплекс с вовлечением ОН групп при атомах С3 и С6, без участия гидроксила при атоме С4 [117]. Таким образом, ДАД и ДАКМЦ имеют вторичную спиртовую группу, способную вступать в реакцию с нафталъдегидом

госсиполом, в борат-содержащей водной среде, что упрощает интерпретацию спектров на основе информации, полученной из исследования модельной реакции с глюкозой.

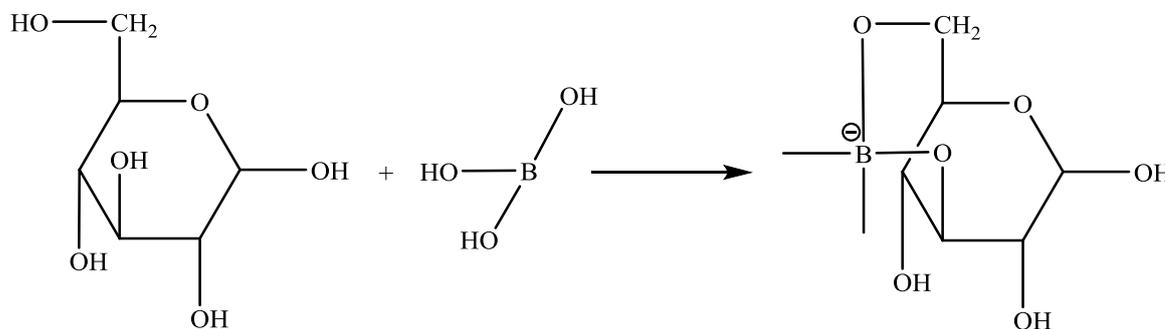


Рисунок 39 - Образование боратного комплекса Безекена с глюкозой

В результате анализа полученных спектральных данных обнаружено, что в боратном буфере конденсация нафталальдегида с глюкозой протекает с вовлечением ОН группы при С1 аномерном атоме углерода. Вторичные спиртовые группы глюкозы при С2, С3, С4 в реакцию не вступают. Продуктом присоединения является смесь, содержащая три типа гликозидов (рисунок 42, структуры XIX, XX, XXI), которые могут быть выделены в виде боратных комплексов. Как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -изомеры глюкозы вступают в реакцию присоединения с альдегидной группой нафталальдегида госсипола в кетольной форме. Полученные гликозиды гидролитически устойчивы в нейтральной и щелочной средах.

В реакции конденсации с глюкозой в щелочной среде в боратном буфере присоединение происходит с участием альдегидной группы молекулы госсипола в кетольной форме по атому углерода С(1<sup>II</sup>). Глюкоза же в виде димера, присоединенного по связи С(1) – С(4), вступает в реакцию с госсиполом по гидроксильной группе при С(1) аномерном атоме углерода, находящейся в аксиальном или экваториальном положении ( $\alpha$  или  $\beta$  соответственно). Оба сайта присоединения равноценны. Фрагменты димера глюкозы связаны в боратные комплексы с борной кислотой. Димер глюкозы связан в боратный комплекс с двумя молекулами борной кислоты. Комплекс с борной кислотой образуется по

оксигруппам при C(3) и C(6), находящимся в аксиальном положении относительно друг друга.

Помимо основной реакции обнаружено протекание реакции олигомеризации глюкозы. В масс-спектре MALDI TOF продуктов олигомеризации, снятом с добавлением метанола для увеличения летучести, имеется ключевой сигнал гидратированного димера с отношением массы к заряду  $m/z=361$ . Следующая группа пиков с отношением массы к заряду  $m/z=537$  соответствует метилированному тримеру глюкозы. В дальнейшем группы пиков чередуются с периодом  $m/z=176$  и  $m/z=162$  со снижением интенсивности, что соответствует последовательному присоединению метилированной и неметилированной глюкозы соответственно (рисунок 40). Следует отметить, что боратный комплекс разрушается в присутствии метанола.

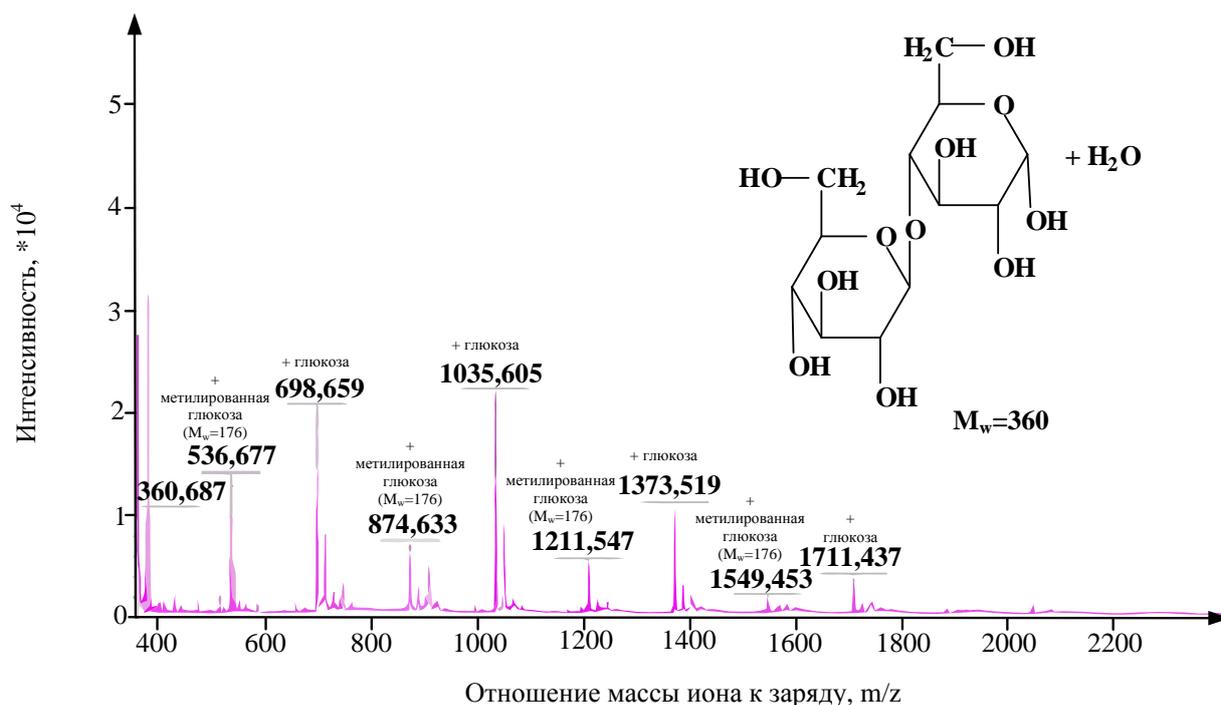


Рисунок 40 – MASS MALDI спектр продуктов олигомеризации глюкозы

Таким образом, обработка глюкозы в щелочной среде приводит к ее частичной конденсации с образованием олигомеров. Наличие в растворе боратного буфера обеспечивает регоселективность конденсации с образованием полуацеталей соединенных связями C(1)-C(4) β, так как в образовании комплекса

с бурой принимают участие соседние гидроксильные группы. Находящиеся при C(1), C(2)  $\alpha$  и C(3), C(6), свободными остаются только связи C(1)  $\beta$  и C(4). В отсутствие борной кислоты в растворе в щелочной среде олигомеризация так же протекает, однако присоединение не является региоселективным и носит случайный характер (рисунок 41).

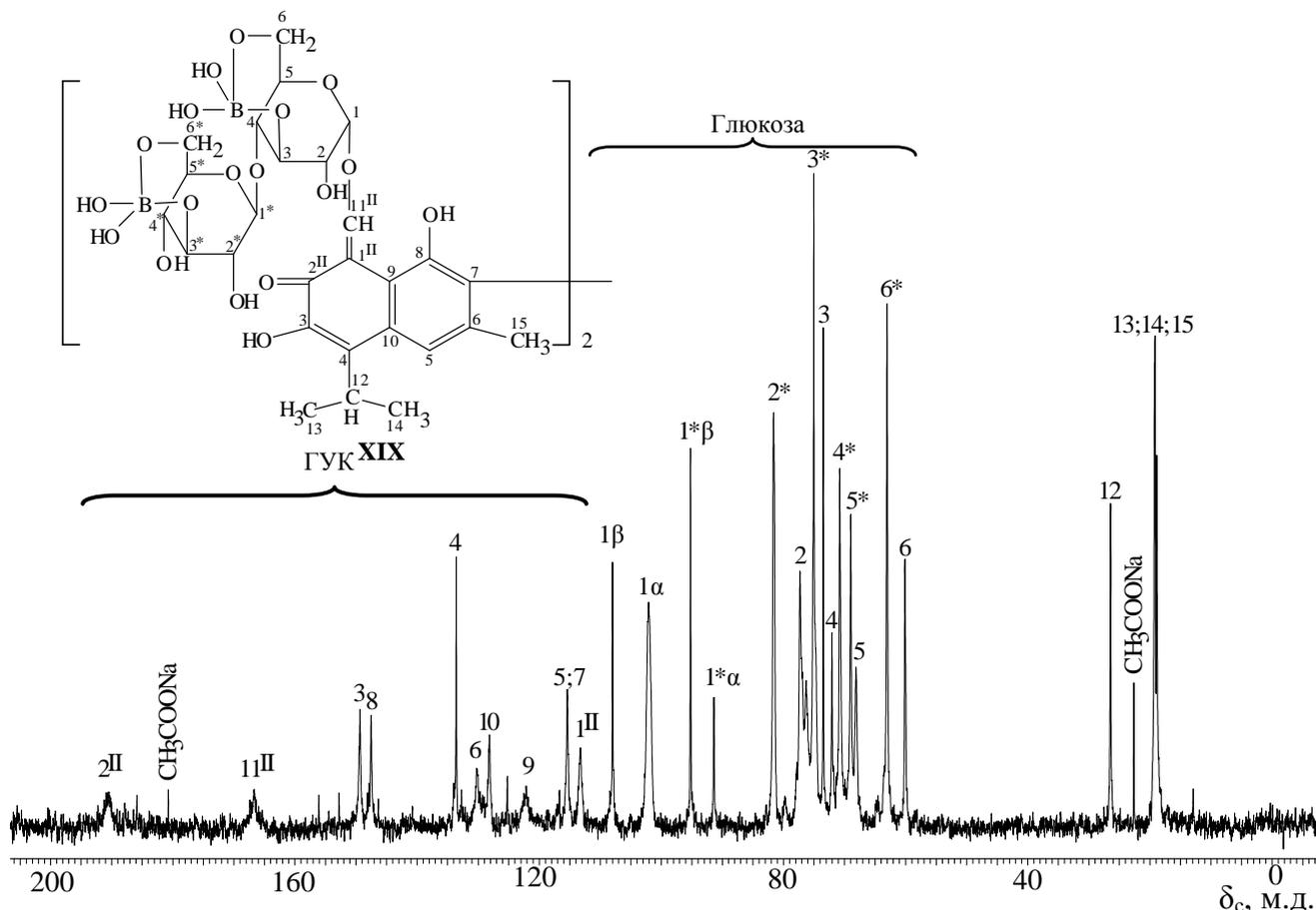


Рисунок 41 – ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектр продукта гликозилирования госсипола боратным комплексом глюкозы

В спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  продукта присоединения госсипола с глюкозой в щелочной среде в боратном буфере присутствуют сигналы госсипола: в сильном поле в области 19,10-26,48 сигналы изопропильного и метильных заместителей: 19,19 м.д. сигнал принадлежит атомам углерода C(13), C(14), C(15), сигнал в области 26,48 м.д. относится к углероду C(12), а также сигналы относящиеся к нафталиновым фрагментам молекулы госсипола: 113,32 м.д. C(1<sup>II</sup>), 115,42 м.д.

C(7), 122,31 м.д. C(9), 115,42 м.д. C(5), 128,16 м.д. C(10), 133,59 м.д. C(4), 147,54 м.д. м.д. C(8), 149,37 м.д. C(3), 166,68 м.д. C(11<sup>II</sup>), 190,47 м.д. C(2<sup>II</sup>).

В спектре также имеются сигналы димера глюкозы связанного в боратный комплекс и присоединенного к молекуле госсипола: 60,15 м.д. C(6), 63,07 м.д. C(6\*), 68,00 м.д. C(5), 69,00 м.д. C(5\*), 70,81 м.д. C(4\*), 71,51 м.д. C(4), 73,51 м.д. C(3), 75,06 м.д. C(3\*), 77,32 м.д. C(2), 81,65 м.д. C(2\*). Сигналы остатков незамещенной молекулы глюкозы госсиполом 91,41 м.д. и 95,24 м.д. C(1) $\alpha$  и C(1) $\beta$  соответственно, а также сигналы замещенной молекулы глюкозы 102,1 м.д. и 108,01 м.д. C(1) $\alpha$  и C(1) $\beta$  соответственно.

В углеродном спектре отсутствуют сигналы незамещенных фрагментов госсипола. Учитывая стерические затруднения и невозможность образования дизамещенной формы, содержащей две молекулы  $\beta$ -глюкозы, следует предположить, что образуется продукт, в котором как минимум одна альдегидная группа содержит  $\alpha$ -C-1 олигогликозидный остаток, в то время как вторая может содержать как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -C-1 заместитель. При этом вторичные спиртовые группы при атомах C-2, C-3 и C-4 в реакции не участвуют.

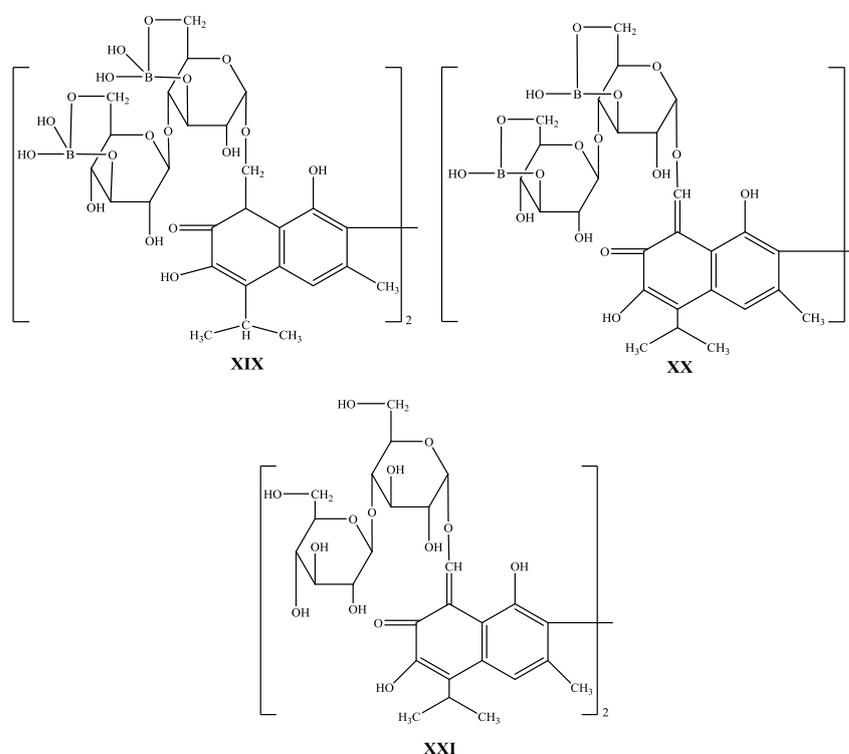


Рисунок 42 - Продукты присоединения боратных комплексов димеров глюкозы к госсиполу в водной борат-содержащей среде (XIX, XX, XXI)

В MALDI TOF спектре продуктов гликозирования госсипола, снятом в режиме моноизотопной массы, имеются интенсивные сигналы молекулярных ионов продуктов гликозирования госсипола по альдегидной группе и их последующей фрагментации (рисунок 43). Соединения XXIII и XXIV не имеют молекулярного иона, однако в спектре имеется сигнал продукта частичного деалкилирования гликозида без одной изопропильной группы  $m/z=800$ . Оба соединения находятся в равновесии и представляют собой ацетальную и лактольную формы одного и того же продукта. Кроме того к продуктам дериватизации относится сигнал комплекса с двумя молекулами борной кислоты XXVII, имеющий  $m/z=887$ . При этом сигналу с  $m/z=791$  соответствует дигликозид XXII, у которого элиминированы обе изопропильные группы с последующим окислением и образованием госсиполон, а сигналу  $m/z=1268$  - комплекс тетрагликозида с четырьмя атомами бора XXVIII (рисунок 43, 44).

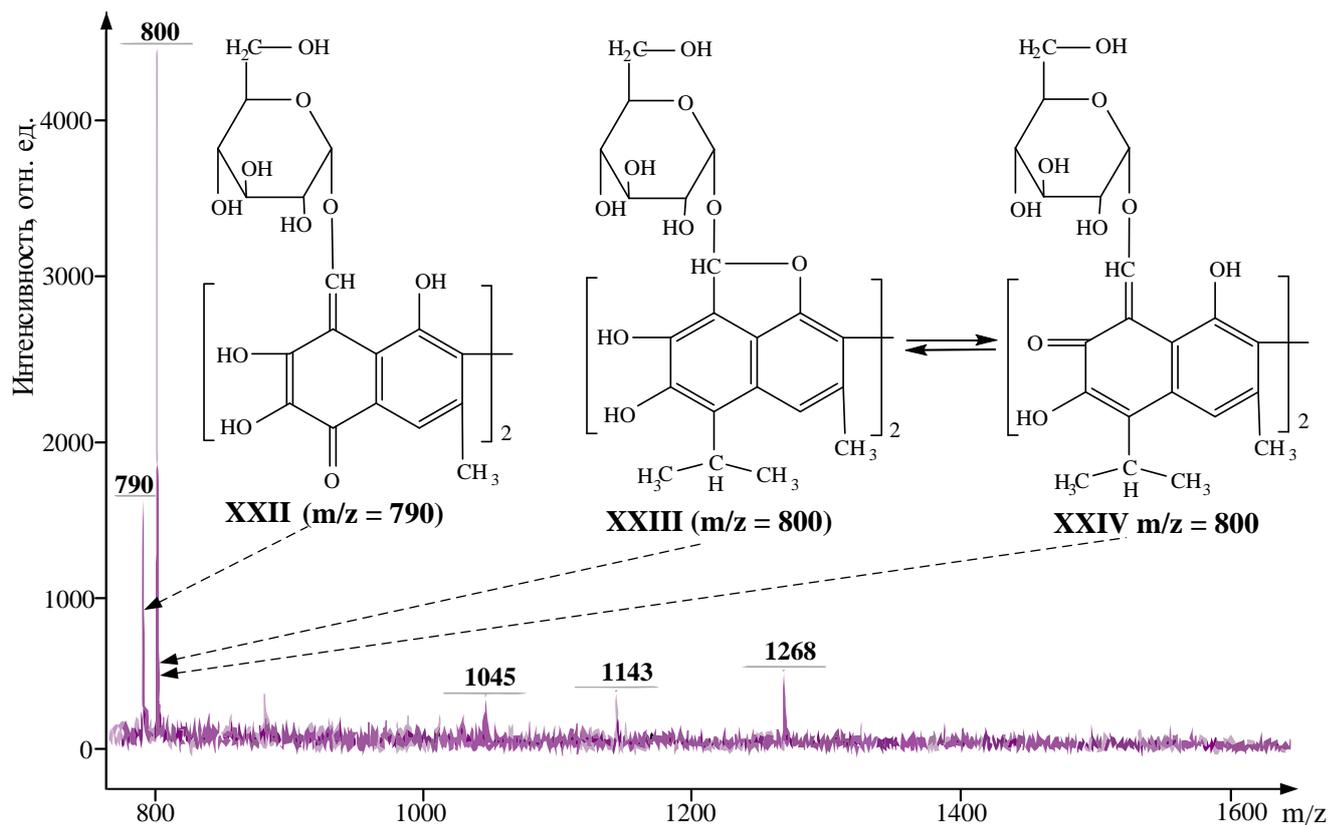


Рисунок 43 – MASS MALDI спектр гликозидов госсипола

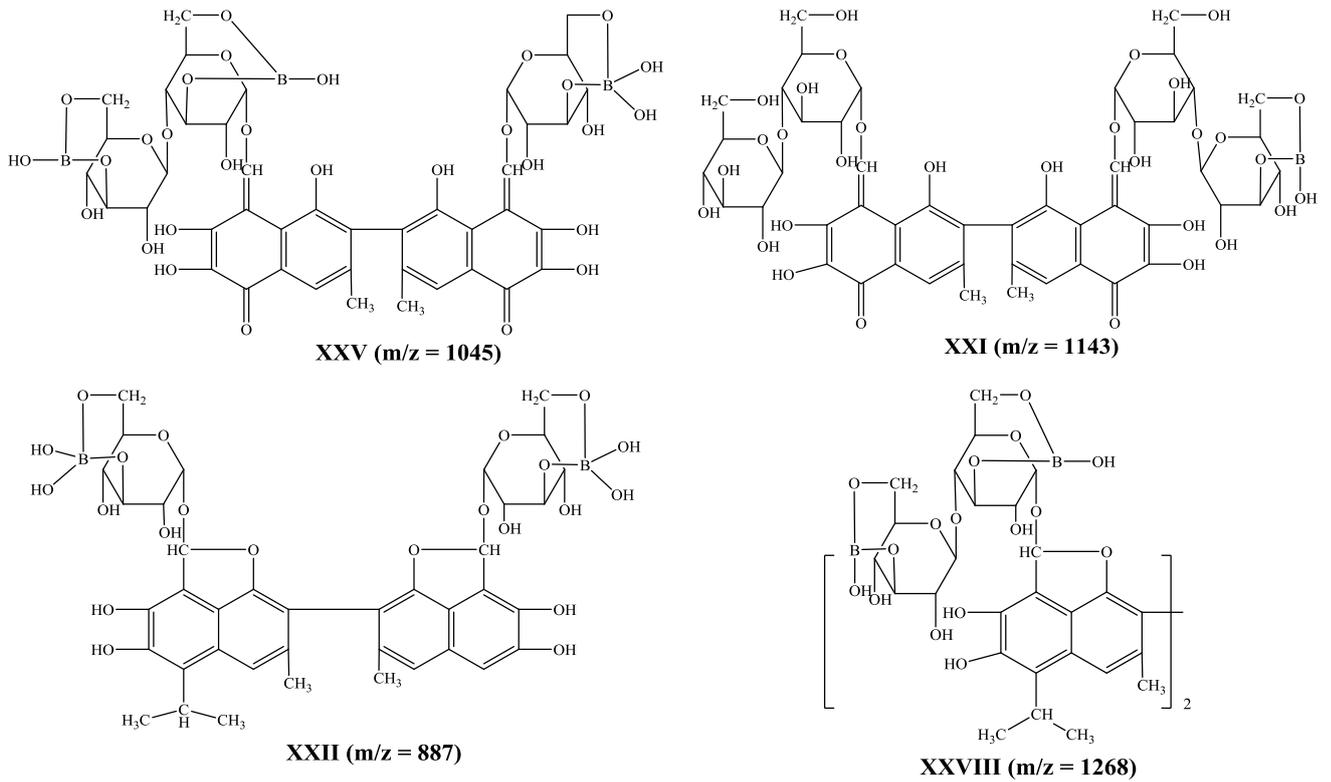


Рисунок 44 - Продукты фрагментации боратных комплексов, образовавшихся при присоединении глюкозы (XXV, XXVII) и ее димеров к госсиполу (XXV, XXVI, XXVIII)

В спектре имеются сигналы продуктов конденсации госсипола с димерами глюкозы и их комплекса с борной кислотой  $m/z=1045$  и  $m/z=1143$  структуры XXV и XXVI соответственно.

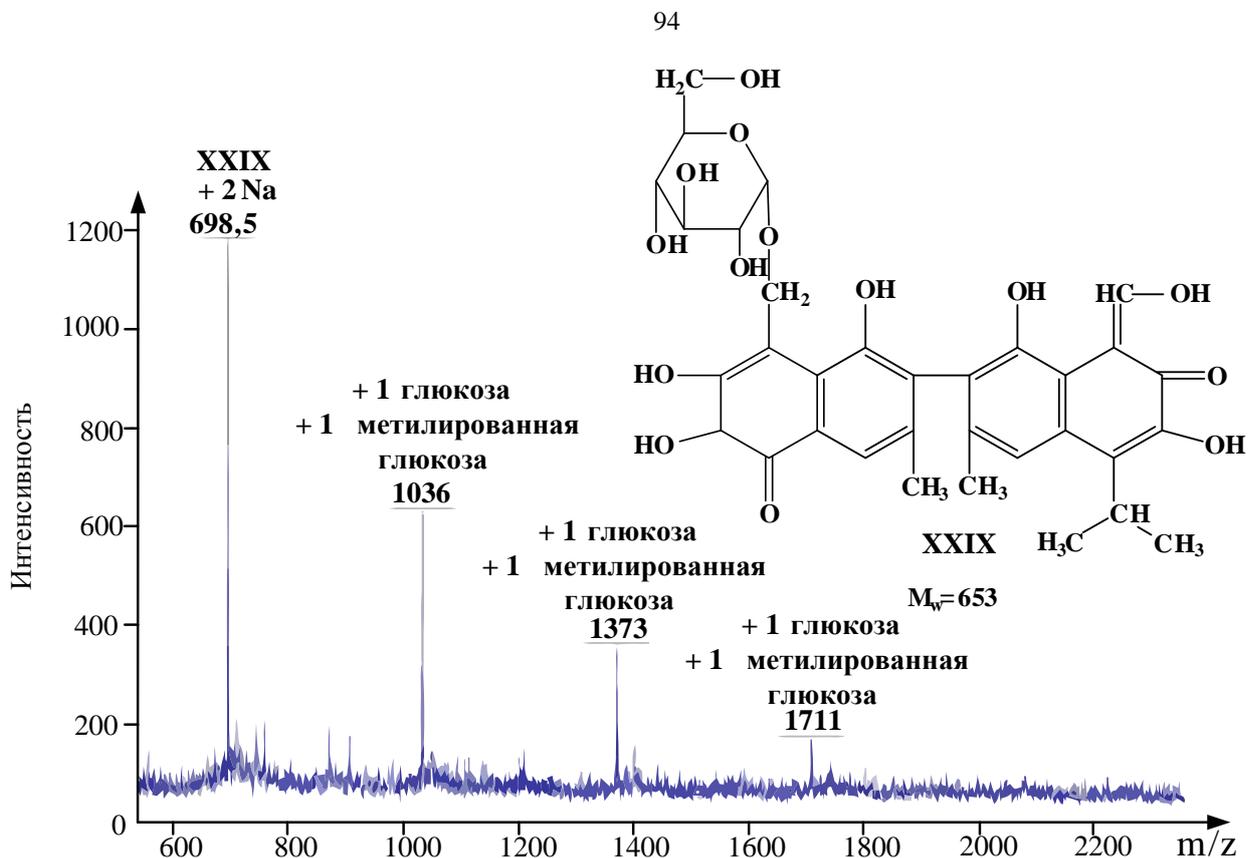


Рисунок 45 – MASS MALDI спектр гликозида госсипола, полученного в сильнощелочной среде

В MASS MALDI-спектре продукта конденсации госсипола с глюкозой в сильнощелочной среде (pH=12), снятом из метанольного раствора, сигнал с  $m/z=698,5$  принадлежит клатрату двух ионов натрия с моногликозидом госсипола, в котором одна альдегидная группа остается незамещенной, а также одна из изопропильных групп отщеплена и окислена, а вторая не претерпевает никаких изменений. Пики с большим отношением массы иона к заряду  $m/z=1036$  принадлежат гликозидам госсипола, в которых замещены две альдегидные группы. Реакция конденсации протекает с участием незамещенной альдегидной группой госсипола и метилированной и неметилированной глюкозой. Дальнейшее увеличение  $m/z=1373$  и  $m/z=1711$  связано с увеличением длины цепи олигомера глюкозы на одно звено метилированной и неметилированной глюкозы и на два звена соответственно (рисунок 45).

Таким образом, в сильнощелочных условиях образуется гликозид госсипола с двумя замещенными альдегидными группами. В случае взаимодействия нафталальдегида с диальдегидполисахаридами альдегидные группы госсипола взаимодействуют с гликозидными фрагментами относящимся к двум разным макромолекулам. В условиях съемки масс-спектра из метального раствора гликозидов нафталальдегидов происходит отщепление боратных фрагментов с образованием частично метилированных производных с большей летучестью, именно их присутствие регистрируется на MASS MALDI-спектре.

### **Гликозилирование госсипола в спиртовых условиях**

Для подтверждения стерических затруднений образования дизамещенного нафталальдегида изучена реакция присоединения госсипола с глюкозой в спиртовых условиях. Конденсация с вовлечением сайта C1 достаточно высоко стерео- и региоселективна. Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  продукта конденсации демонстрирует существенные изменения в положении ключевых сигналов.

В спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$  (рисунок 47) продуктов реакции присутствуют три группы сигналов. В сильном поле присутствуют сигналы углеродных атомов метильных групп изопропильного радикала и метильного заместителя ароматического кольца госсипола 19,52 м.д., а также сигнал третичного углерода СН изопропильного заместителя 26,28 м.д. В области гликозидных углеродов присутствуют сигналы гликозидного заместителя 61,46 – 101,22 м.д. В сильном поле присутствуют сигналы углеродов нафталиновых колец госсипола 113,89 – 198,07 м.д. Кроме сигналов, относящихся к продукту реакции, имеются сигналы примеси метильной группы ацетата натрия 20,54 м.д., остатков этанола 17,00 м.д. и 57,55 м.д. и примеси уксусной кислоты 171,29, м.д.

В спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  (рисунок 46) продукта присоединения госсипола к глюкозе в спиртовых условиях присутствуют сигналы углеродов нафталиновых колец госсипола в области 113,89 – 198,07 м.д.: 113,89 м.д.-C(11Ш) и C(1Ш);

117,07 м.д.-C(7), C(5); 115,17 м.д. - C(9); 123,39 м.д.- C(1I); 128,90 м.д.- C(10); 131,98 м.д.-C(4); 133,58 м.д.-C(6); 149,22 м.д.- C(3), C(8); 155,13 м.д.- C(2III), 184,18 м.д.- C(2II).

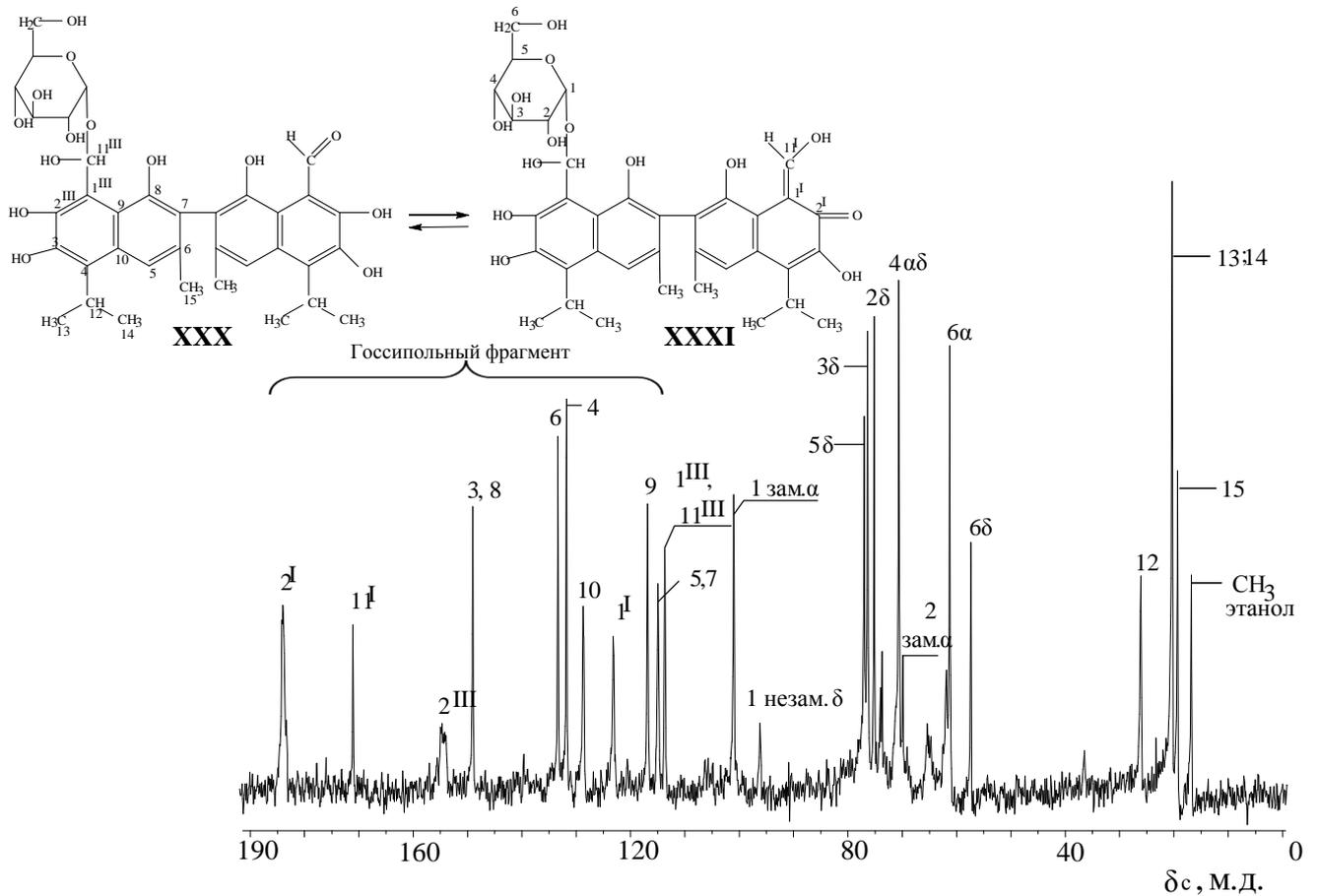


Рисунок 46 - Фрагмент спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$  продукта присоединения госсипола к глюкозе в спиртовых условиях

Также присутствуют сигналы углеродных атомов гликозидных колец (рисунок 28): 61,46 м.д.  $\alpha\text{C}(6)$ ; 61,49 м.д.  $\beta\text{C}(6)$ ; 70,1 м.д.  $\beta\text{C}(4)$ ; 70,84 м.д.  $\alpha\text{C}(4)$ ; 73,89 м.д.  $\beta\text{C}(2)$ ; 75,34 м.д.  $\alpha\text{C}(5)$ ; 76,55 м.д.  $\alpha\text{C}(3)$ ; 77,19 м.д.  $\alpha\text{C}(2)$ .

Изменения в положении сигналов ключевых углеродов смещающиеся при замещении следующие:

1. Сигнал анамерного атома углерода C(1) незамещенного  $\alpha$ -гликозидного кольца 93,6 м.д. в спектре отсутствует, в спектре присутствует сигнал 96,4 м.д.

малой интенсивности анамерного углерода C(1) β-глюкозы, не вступающей в реакцию;

2. В спектре присутствует сигнал 101,22 м.д. замещенного анамерного атома углерода C(1) α-гликозидного кольца, вступившего в реакцию с госсиполом.

При конденсации ГУК с глюкозой в спиртовом растворе в реакцию вступает только α-изомер глюкозы, при этом в реакцию конденсации вступает аксиальный полуацетальный гидроксил при анамерном атоме углерода C(1).

Неожиданно высокая регио- и стереоспецифичность реакции обусловлена стерическими затруднениями при гликозилировании двух альдегидных групп молекулы госсипола. Присоединение двух молекул α-глюкозы, имеющей OH группу при анамерном углеродном атоме в аксиальном положении не вызывает сильных стерических затруднений, в то время как замещение госсиполом экваториальной OH-группы β-глюкозы стерически невозможно. 3D изображение созданное на основе квантово-механических расчетов демонстрируют затрудненное вращение остатков глюкозы. В результате в условиях избытка глюкозы в реакции образуется смесь моно- и дизамещенного продуктов в мольном соотношении 1:3. При равномольном соотношении и в условиях избытка госсипола образуется продукт моногликозилирования (рисунок 47, структуры XXX, XXXI).

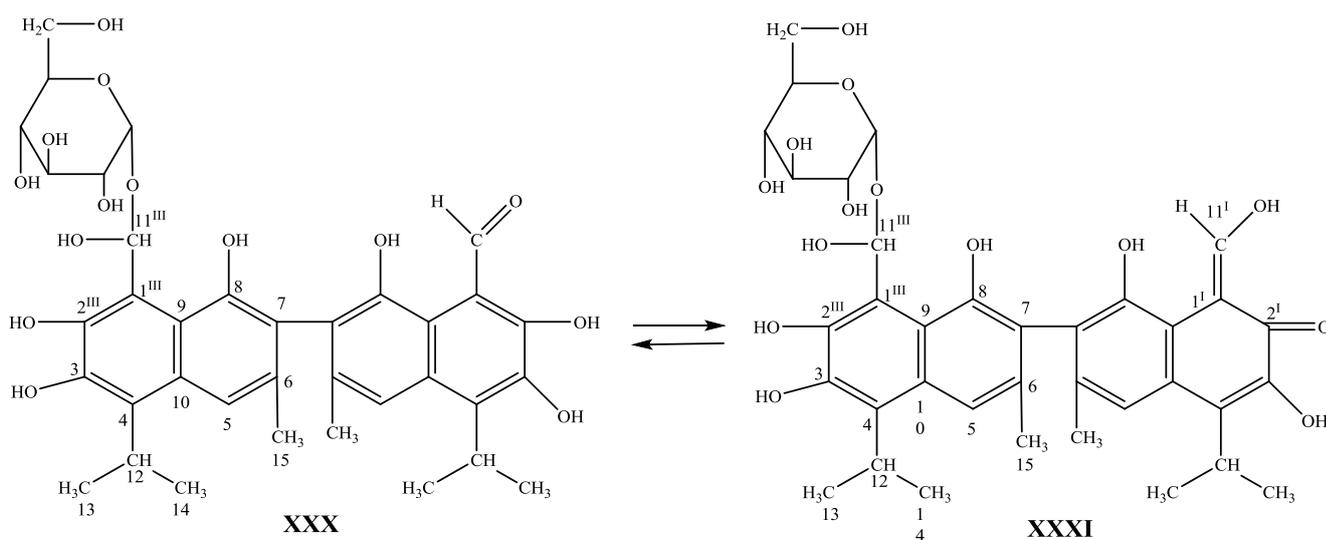


Рисунок 47 - Моногликозиды госсипола, полученные в спиртовой среде в условиях избытка госсипола

Таблица 8 - Значения химических сдвигов в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  продуктов конденсации госсипола с глюкозой, полученного в спиртовой среде и в водных борат-содержащих растворах

Гликозилирование в спиртовых условиях (рисунок 46)		Гликозилирование в водной среде (рисунок 41)	
Номер атом углерода	$\delta_c$ , ppm.	Номер атом углерода	$\delta_c$ , ppm.
Атомы углерода госсипола ковалентно связанного с глюкозой			
C-1 <sup>I</sup>	123.39	C-1 <sup>II</sup>	113.32
C-1 <sup>III</sup> , C-11 <sup>III</sup>	113.89	C-2 <sup>II</sup>	190.42
C-2 <sup>I</sup> , C-2 <sup>II</sup>	184.18	C-3	149.37
C-2 <sup>III</sup>	155.13	C-4	133.59
C-3, C-8	149.22	C-5, C-7	115.42
C-4	131.98	C-6	128.18
C-5, C-7	117.07	C-8	147.54
C-6	133.58	C-9	122.31
C-9	115.179	C-10	128.16
C-10	128.90	C-11 <sup>II</sup>	166.68
C-11 <sup>I</sup>	172.5	C-12	26.48
C-12	26.28	C-13, C-14, C-15	19.19
C-13, C-14, C-15	19.52		
Атомы углерода глюкозы ковалентно связанной с госсиполом			
$\alpha\text{C-1}$	101.22	$\alpha\text{C-1}$	102.10
$\alpha\text{C-2}$	77.19	$\beta\text{C-1}$	108.01
$\beta\text{C-2}$	73.89	C-2	77.32
$\alpha, \beta\text{C-3}$	76.55	C-2*	81.65
$\alpha\text{C-4}$	70.84	C-3	73.51
$\beta\text{C-4}$	70.1	C-3*	75.06
$\alpha, \beta\text{C-5}$	75.34	C-4*	70.81
$\alpha\text{C-6}$	61.46	C-4	71.51
$\beta\text{C-6}$	61.49	C-5	68.00
		C-5*	69.00
		C-6	60.15
		C-6*	63.07

В масс-спектре моногликозида снятом в режиме моноизотопной массы, имеется сигнал молекулярного иона XXX с отношением массы к заряду  $m/z=680$ , а так же сигнал продукта его фрагментации с отщеплением изопропильной группы  $m/z=637$ . В спектре также имеются сигналы молекулярных ионов продуктов фрагментации молекулы госсипола, а так же клатратных соединений с ацетатом натрия, образующихся в условиях снятия спектра под действием лазерного излучения (рисунок 48).

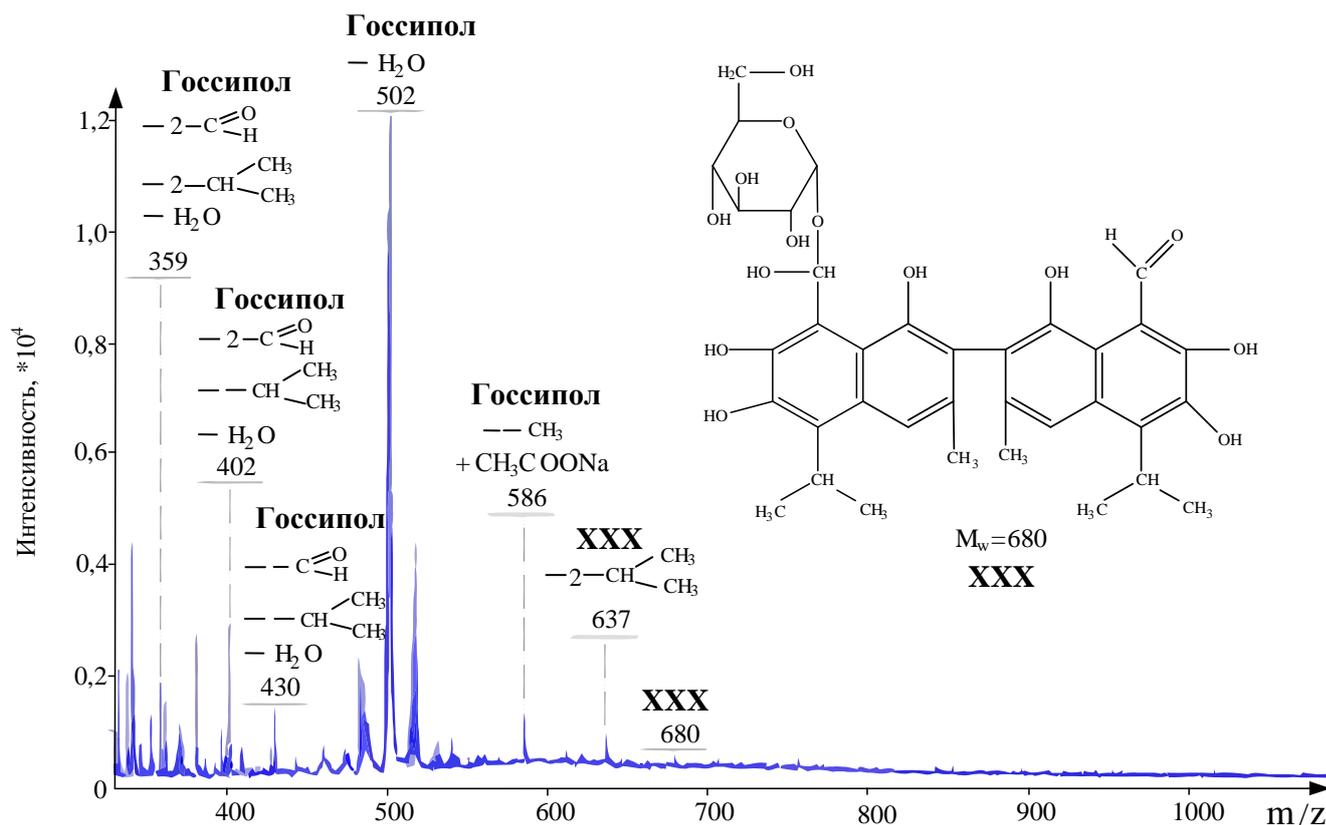


Рисунок 48 – MASS MALDI спектр моногликозида госсипола, полученный в спиртовом растворе

## 2.4 Кислотный гидролиз полимерных производных госсипола

Высокая цитотоксичность госсипола обусловлена наличием двух альдегидных групп, способных сшивать белки и нуклеиновые кислоты (XIIIa). Продукты его декарбонирования: - апогоссипол и окисленные нафтохиноны, значительно менее ядовиты. Явление снижения токсичности госсипола при иммобилизации на носитель наиболее подробно описано на примере

физиологически активных полимеров прививочного типа, в которых он ковалентно связан с полисахаридами с вовлечением в реакцию обеих альдегидных групп молекулы. Эти препараты, предназначены для перорального введения и подвергаются воздействию кислой среды желудка до поступления лекарственного вещества в кровоток.

В полимерных производных, полученных на основе ДАКМЦ и ДАД, госсипол связан с носителем за счет конденсации альдегидных групп нафталальдегидных фрагментов с гидроксилами ацетальных циклов, в которые замкнуты окисленные звенья диальдегидполисахаридов (схема 2.5). Образующаяся химическая связь достаточно устойчива в щелочной среде в условиях реакции присоединения нафталальдегида к полимеру. Гидролиз полимерного препарата в условиях кислой среды желудка может протекать с образованием продуктов трех типов (схема 2.5):

I. Разрыв связи госсипола с ацетальным циклом может приводить к выделению нафталальдегида с сохранением обеих альдегидных функциональных групп. В этом случае полимерный препарат является временным депо, выделяющим при гидролизе физиологически активное вещество в кровь в неизменном виде.

II. Выделение активного вещества может сопровождаться декарбонилированием нафталальдегида. В этом случае полимерный препарат прививочного типа является пролекарством, выделяющим при гидролизе низкомолекулярное действующее начало в химически измененном виде. В конкретном случае действующим началом является нафтохинон.

III. В случае если первой гидролизуется основная цепь полимера, реакция сопровождается выделением смеси химически модифицированных нафталальдегидов содержащих гликозидные заместители различной длины.

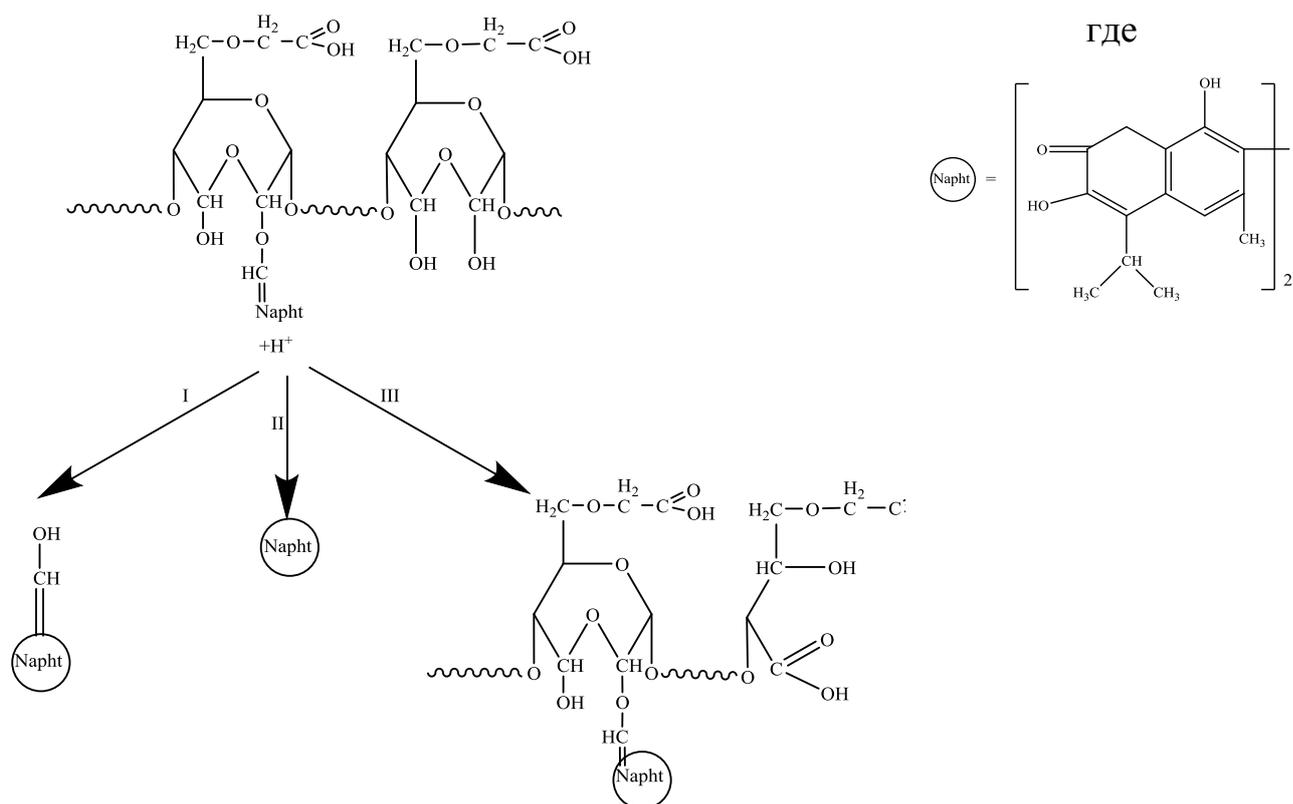


Схема 2.5 - Возможные направления кислотного гидролиза госсипола ковалентно связанного с диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой

От химического строения выделившегося низкомолекулярного физиологически активного вещества зависит тип полимерного препарата, при этом, устойчивость к кислотному гидролизу соответствующих химических связей определяет какой именно из трех процессов является преобладающим. Кроме того, полимерный препарат может обладать собственной активностью и всасываться в кровь из кишечника в неизменном виде без предварительного гидролиза. В этом случае из продукта не должны выделяться низкомолекулярные производные нафтохинона в условиях моделирующих среду желудка.

Основными сайтами связывания госсипола с носителем являются как окисленные звенья (схема 2.5), так и восстанавливающие концы макромолекул, относительное содержание которых резко уменьшается с ростом молекулярной массы полимера. Низкомолекулярной моделью присоединения госсипола к

полуацетальным циклам всех типов является его взаимодействие с глюкозой в щелочной среде в условиях аналогичных реакции присоединения к диальдегиддекстрану и диальдегидкарбоксиметилцеллюлозе [11, 12].

По данным ГПХ молекулярная масса полимерных производных находится в интервале от 11 до 67 кДа, причем она уменьшается более чем вдвое в процессе синтеза из-за деструкции основной цепи полимера. Её уменьшение в щелочных условиях столь существенно, что конечное значение не зависит от количества добавленного бифункционального альдегида – госсипола (таблица 9).

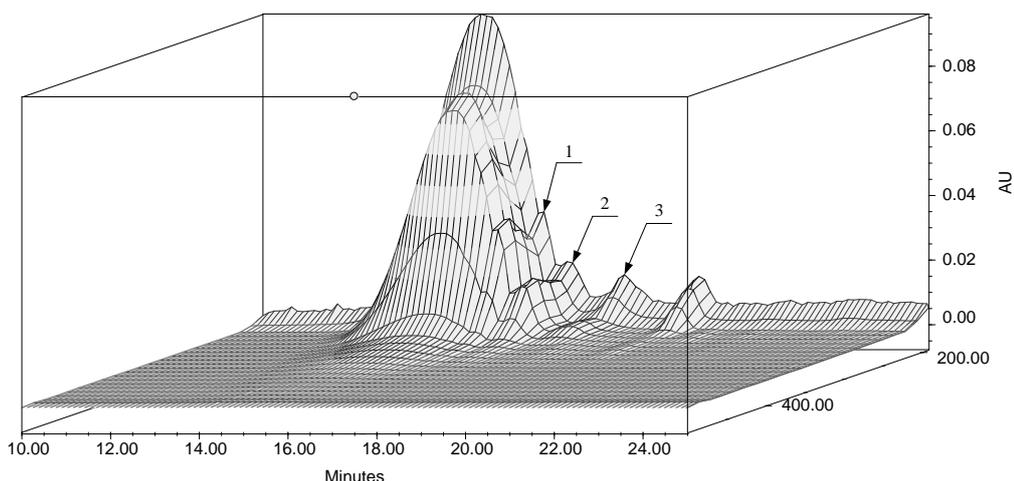
Таблица 9 - Синтез госсипола ковалентно связанного с ДАКМЦ

Характеристика ДАКМЦ	Мольное соотношение ДАКМЦ: ГУК осново-моль:моль	Время реакции, мин.	Характеристика ГУК-ДАКМЦ			Содержание связанного госсипола	Содержание свободного госсипола (ОП)
			$M_n$ , кДа	$M_w$ , кДа	MP, кДа		
$\gamma_{ок}=40,44\%$ $M_n= 16,4кДа$ $M_w= 29,8кДа$ $MP=27,2кДа$	1:0,1	160	11,9	15,2	12,8	$2,209 \cdot 10^{-3}$ мг/мл 0,22%	0,02
$\gamma_{ок}=40,44\%$ $M_n= 16,4кДа$ $M_w= 29,8кДа$ $MP=27,2кДа$	1:0,5	160	11,1	14,0	11,5	$6,766 \cdot 10^{-3}$ мг/мл 0,67%	0,02
$\gamma_{ок}=40,44\%$ $M_n= 16,4кДа$ $M_w= 29,8кДа$ $MP=27,2кДа$	1,2:1	195	10,0	12,2	10,3	0,0204 мг/мл 10,22%	0,02
$\gamma_{ок}=10,66\%$ $M_n= 66,0кДа$ $M_w= 147,0кДа$ $MP=131,4кДа$	1:0,2	195	31,5	44,7	48,5	$5,868 \cdot 10^{-4}$ мг/мл 0,058%	0,02

В образцах имеется незначительное количество трех олигомерных производных имеющих нафтохиноновые хромофорные группы с максимумом поглощения при  $\lambda=235$  нм, (рисунок 49). Их объем элюции и длина волны поглощения совпадают с продуктами гликозилирования госсипола. Их точная

молекулярная масса была определена методом MASS MALDI - спектрометрии. В условиях хроматографии госсипол, несвязанный с полимером, взаимодействует с материалом колонки и имеет объем элюции больше полного объема колонки  $V_{\text{полн}}$ . Таких сигналов на хроматограммах нет. Синтезированные полимеры не содержат остатков исходного низкомолекулярного госсипола.

(a)



(б)

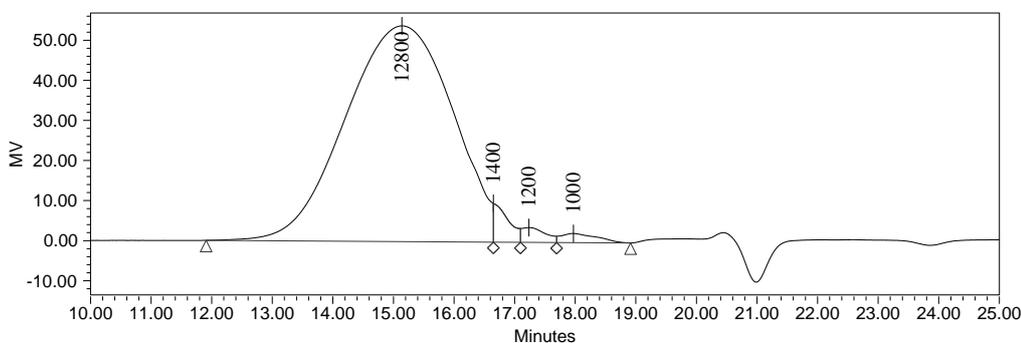


Рисунок 49 - Трехмерная (а) и обычная (б) хроматограмма госсипола ковалентно связанного с ДАКМЦ: а – комбинация рефрактометрического и УФ детекторов; б – рефрактометрический детектор

Исходная ДАКМЦ не имеет ароматических хромофорных групп и не поглощает в УФ области спектра при длине волны более  $\lambda=250$  нм, однако имеет отчетливый сигнал при детектировании рефрактометрическим детектором. Хроматография с двойным детектированием УФ и РФ детекторами,

соединенными последовательно, позволяет изучать фракционную неоднородность продуктов ковалентного связывания госсипола с диальдегидполисахаридами, то есть позволяет анализировать распределение ароматических хромофорных групп по фракциям полимера с различной молекулярной массой. В полученных соединениях такая зависимость не обнаружена (рисунок 49).

Кислотный гидролиз полимеров и модельных гликозидов проводили при 36°C в буферных растворах, содержащих соляную и уксусную кислоты при pH=3,2 и pH=1,0. Состав образующихся низкомолекулярных и продуктов не зависит от условий гидролиза. В качестве модельных соединений при анализе использовали низкомолекулярные продукты конденсации госсипола с глюкозой в щелочной среде, полученные в боратном буфере. Они представляют собой смесь ди- (XXXII), три- (XXXIII) и тетра-гликозидов (XXXIV) в виде комплексов с борной кислотой [12].

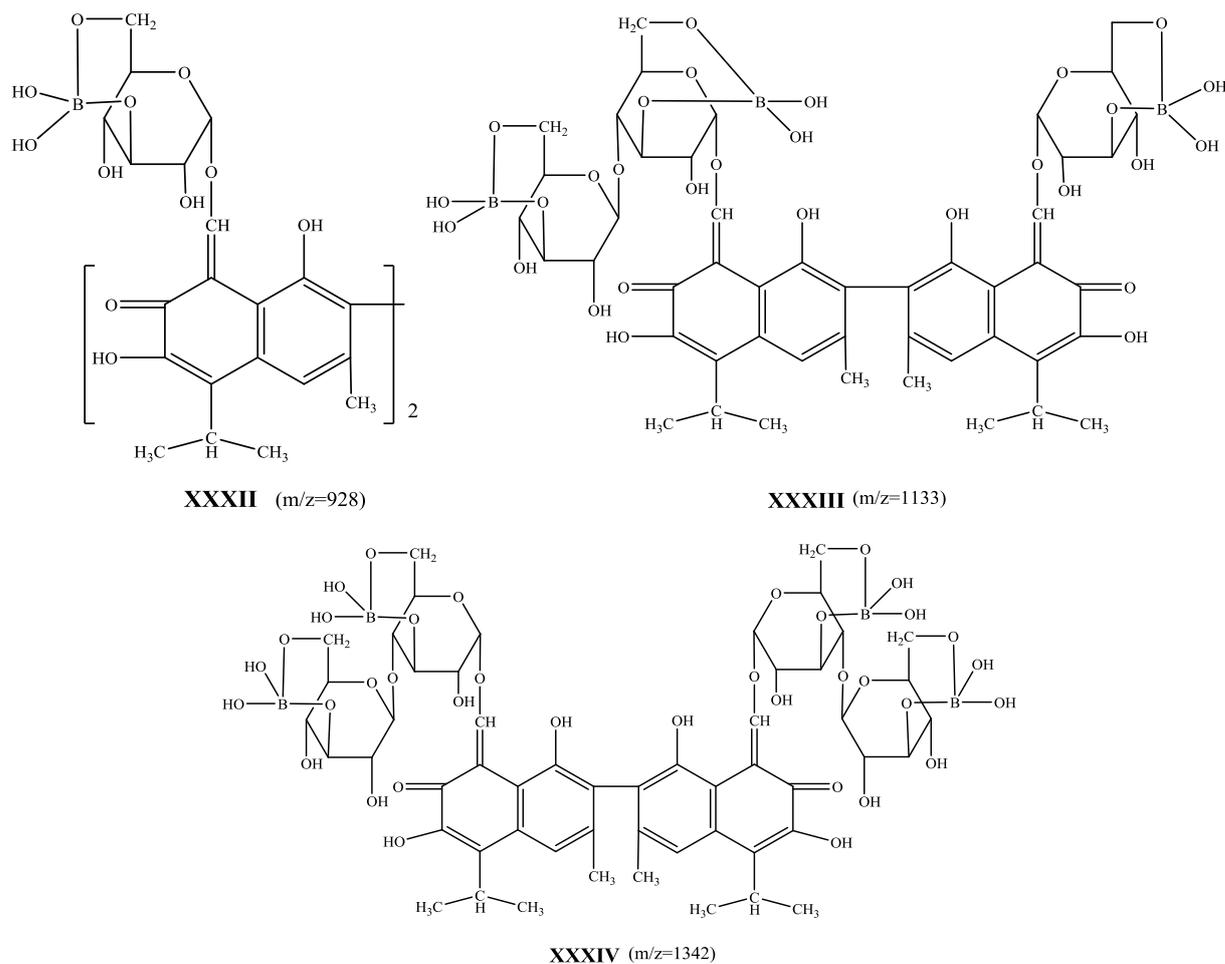


Рисунок 50 - Ди (XXXII)–, три (XXXIII) - и тетра (XXXIV)– гликозиды госсипола

Гидролиз полимеров с  $M_w=67,1$  кДа приводит к полному исчезновению высокомолекулярного пика и появлению на хроматограммах интенсивных сигналов низкомолекулярных веществ с массой менее 1 кДа. Гидролиз модельных низкомолекулярных гликозидов XXXII, XXXIII, XXXIV приводит к образованию сходной смеси продуктов. Все эти вещества имеют нафтильные хромофорные группы с характерным двойным максимумом поглощения в районе  $\lambda=350$  нм, однако их объем элюции значительно меньше, чем у свободного госсипола, который использовали в качестве свидетеля. Исследования химической структуры показали, что увеличенный объем элюции связан с отсутствием в молекулах альдегидных групп, способных взаимодействовать с материалом колонки.

В ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектрах низкомолекулярных продуктов гидролиза отсутствуют сигналы гликозидных фрагментов в области 50 - 90 м.д., а так же сигналы углеродных атомов альдегидной группы госсипола в форме полуацетали. Фактически смесь содержит только апогоссипол (XXXV) и продукты его окисления (XXXVI) (рисунок 51). В MASS MALDI спектрах (рисунок 52) также присутствуют только пики молекулярных ионов продукта полного декарбонилирования госсипола, и окисленных соединений XXXVI, XXXVII. В условиях снятия спектра эти вещества претерпевают частичную фрагментацию, отщепляя один или оба изопропильных радикала.

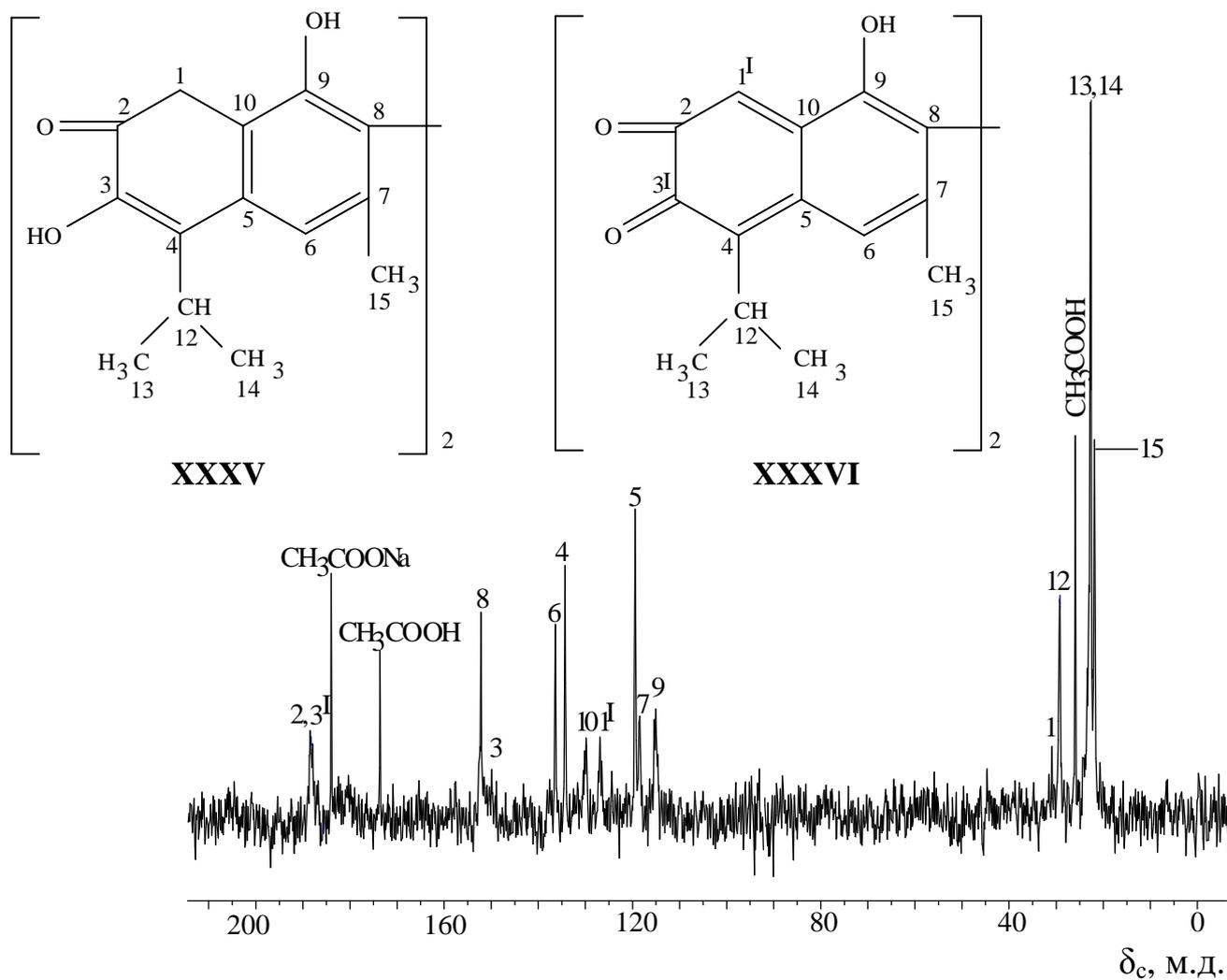


Рисунок 51 - Фрагмент спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$  продукта гидролиза гликозилированного госсипола

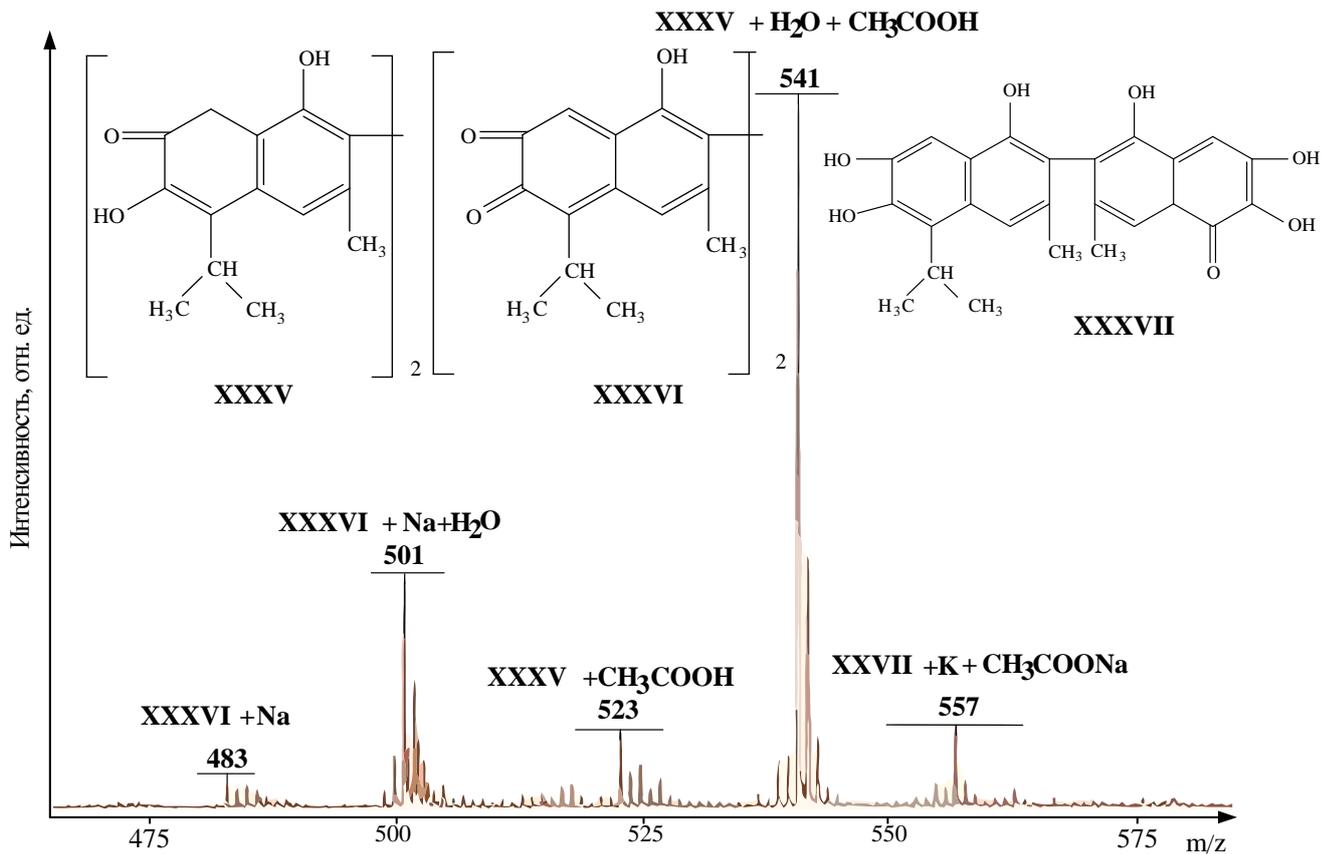


Рисунок 52 - MASS MALDI спектр продуктов гидролиза гликозилированного госсипола

Таким образом, при кислотном гидролизе полимерных производных госсипола полученных его взаимодействием с диальдегидполисахаридами происходит отщепление от полимера-носителя производных с элиминированной альдегидной группой, а так же продуктов их последующих превращений. В результате вторичных реакций dealкилирования и окисления из них образуются нафтохиноны (V, VI, VII), при этом не наблюдается выделения свободного госсипола. Гидролиз полимера сопровождается резким понижением молекулярной массы и деструкцией основной цепи. Однако не обнаружены продукты, в которых фрагменты молекулы носителя ковалентно связаны с нафталальдегидом, и которые можно было бы рассматривать в качестве самостоятельных физиологически активных соединений, образовавшихся при химической модификации нафтохинонов по альдегидной группе. С высокой степенью вероятности можно полагать, что полимерные производные не являются

физиологически активными полимерами с собственной активностью, также не представляют собой систему контролируемого выделения низкомолекулярного госсипола. Их следует классифицировать как полимерное про-лекарство, выделяющее при гидролизе нафтахиноны с элиминированной альдегидной группой, чем и обусловлен эффект снижения токсичности при присоединении нафталальдегида к полимеру-носителю.

## 2.5 Биологическая активность полимерных производных госсипола

### Определение цитотоксических свойств госсипола, ковалентно связанного с диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой

Цитотоксические свойства оценивали по определению максимальной концентрации препарата, при которой выживает 50% клеток в эксперименте *in vitro*. Оказалось, что цитотоксические свойства сильно зависят от содержания в полимере монозамещенного нафталальдегида, имеющего в своей структуре незамещенную альдегидную группу. Результаты испытания представлены в таблице.

Таблица 10 - Определение цитотоксичности ( $CC_{50}$ ) препаратов с различным содержанием монозамещенного госсипола на клеточной линии A549\*

Содержание госсипола в препарате в пересчете на госсипол уксусную кислоту, вес.%	Доля незамещенных альдегидных групп, %	$CC_{50}$ , мг/мл
100,0	100	0,01
0,06	0	>50,00
0,22	0-5	8,49
0,67	0-10	3,36
10,22	25-50	0,25

## **Исследование *in vitro* противовирусного действия полимерных производных госсипола на разных штаммах вируса гриппа А**

Вследствие того, что как цитопатогенное действие вируса, так и цитотоксическое действие противовирусного препарата оба приводят к гибели клеток в клеточной культуре, в исследовании оценивалась терапевтическая широта полимерных производных госсипола, т.е. разница между цитотоксической и эффективной противовирусной концентрациями именуемая дальше химиотерапевтическим индексом (ХТИ).

Использовали следующие сокращения, которые приведены для удобства интерпретации полученных результатов.

список сокращений:

ТЦД50 - тканевая цитопатогенная доза вируса, вызывающая гибель 50% клеток монослоя

ЦПД - цитопатическое действие – действие вируса, при котором прекращается развитие клеточной культуры

ТК50 - токсическая доза препарата, вызывающая гибель 50% клеток монослоя

ЭК50 - эффективная доза препарата, при которой выживает 50% клеток монослоя

Химиотерапевтический индекс рассчитывали по формуле

$ХТИ = ТК50/ЭК50$ .

Таблица 11 - Определение ХТИ и жизнеспособности клеток препаратов с различным содержанием госсипола

Штамм вируса	Соотношение госсипол : ДАКМЦ, моль: осново-моль	ЭК50 [мг/мл]	ХТИ	Жизнеспособность клеток [%]*
H3N2 A/Aichi/1/68	1:1	0,0064	327,9	100
	1:10	0,002	333,6	100
H1N1 A/Brisbane/59/07	1:1	0,0031	670	100
	1:10	<ЭК50**	-***	42
H3N2 A/Pert/16/09	1:1	<ЭК50	-	47
	1:10	0,0125	53,16	56
H3N2 A/Brisbane/10/07	1:1	~0,01	209,7	100
	1:10	<ЭК50	-	32
H1N1 A/Moscow/01/09	1:1	~0,013	161,3	69
	1:10	<ЭК50	-	31

\* - максимальная выживаемость клеток, достигнутая для каждого вещества и соответствующего штамма вируса гриппа

\*\* - не достигнуто значение 50% выживаемости клеток

\*\*\* - индекс отсутствует, поскольку нет значения ЭК50

В результате проведенных экспериментов было установлено различие в специфической противовирусной активности исследуемых полимерных производных, зависящей от штамма вируса, которая обусловлена соотношением химически связанного нафталдегида и окисленных звеньев в полимерном производном. Использование смеси полимерных производных приводит к расширению спектра противовирусной активности. Таким образом, установлено, что присутствие в препарате фрагментов госсипола с одной свободной альдегидной группой увеличивает токсичность препарата в целом при сохранении его противовирусной активности. Изменяя соотношение нафталдегида и окисленных звеньев в препарате можно контролировать специфическую противовирусную активность и значительно расширить арсенал противовирусных средств.

### 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### 3.1 Характеристика исходных соединений

**Na-Карбоксиметилцеллюлоза** – продукт фирмы Ashland (US). Марка “Blanose” 7MF, партия 070411/2. Линейный полимер, производное целлюлозы. Степень карбоксиметилирования - 65%,  $M_w = 712$  кДа. Порошок светло-желтого цвета. Использовали без дополнительной очистки.

**Стандартный кровезаменитель «Полиглюкин»** - продукт фирмы ОАО «КРАСФАРМА». Раствор для инфузий, 400 мл 6 % раствор декстрана с  $M_w = 50 \div 70$  кДа в изотоническом 0,9 % растворе NaCl. Прозрачный раствор. Использовали без дополнительной очистки. От соли очищали диализом против дистиллированной воды с последующей лиофилизацией.

**Диальдегиддекстран** - получен гомофазным периодатным окислением из стандартного кровезаменителя Полиглюкин. Представляет собой порошок белого цвета. Использовали без дополнительной очистки.

**Госсиполуксусная кислота** – продукт фирмы «O’ZATANDART» агенство «АХВОРОТ-МА’LUMOT VARKAZ» UNITAR предприятие (Узбекистан). Мелкокристаллический порошок однородной структуры от светло-желтого до темно-желтого цвета с зеленоватым оттенком. Использовали без дополнительной очистки. Молекулярная масса 518 г/моль, плотность 1,4 г/см<sup>3</sup>,  $T_{пл} = 177-182$  °C,  $T_{кип} = 707$  °C.

**Натрий йоднокислый мета** – продукт фирмы ООО «Вектон». Реактив для медицинского применения. Массовая доля основного вещества – не менее 98%. Химическая формула: NaIO<sub>4</sub>. Белый кристаллический порошок. Использовали без дополнительной очистки.

**Стандарт-титр йод 0,1н** – продукт фирмы ООО «Баум-Люкс». Изготовлен согласно ТУ 2642-001-33813273-97. Партия №22. Дата изготовления 07.2011. Использовали без дополнительной очистки.

**Борная кислота** – продукт фирмы ООО «Русхим». Квалификация: х.ч. Реактив изготовлен согласно ГОСТ 9656-75, партия 59, Дата изготовления 06.2011. Белый кристаллический порошок. Использовали без дополнительной очистки.

**Натрий тетраборнокислый** – продукт фирмы ООО «Русхим». Квалификация: ч. Изготовлен согласно ГОСТ 4199-76 изм 1-2, партия 64, дата изготовления 06.2011. Белый кристаллический порошок. Использовали без дополнительной очистки.

**Натрия боргидрид**– продукт фирмы Acros Organics. Бесцветные кристаллы, хорошо растворимые в воде и полярных органических растворителях. Использовали без дополнительной очистки.

**Диметилсульфоксид** – продукт фирмы ООО «Лаверна». Квалификация: х.ч. Изготовлен согласно ТУ 6-09-3818-89, партия 10, дата изготовления 06.2011.  $T_{\text{кип}} = 189^{\circ}\text{C}$  (760 мм.рт.ст).  $T_{\text{пл.}} = 18,5^{\circ}\text{C}$ . Очищали перегонкой в вакууме водоструйного насоса.

**Диметилсульфоксид-d<sub>6</sub>** – продукт фирмы ООО «Реахим». Квалификация: ч.д.а. Представляет вязкую бесцветную жидкость, почти без запаха. Апротонный растворитель. Является удобным растворителем для ЯМР спектроскопии благодаря высокой растворяющей способности, простоте собственного спектра, а также стабильности в области высоких температур.  $T_{\text{кип}} = 189^{\circ}\text{C}$  (760 мм.рт.ст.);  $n^{20} = 1,1004$ . Использовали без дополнительной очистки.

**Гидроксид натрия** – продукт фирмы ООО «Лаверна». Квалификация: ч.д.а.  $T_{\text{пл}} = 400^{\circ}\text{C}$ ;  $n_d^{20} = 2,12$ . Использовали без дополнительной очистки.

**Крахмал картофельный** – продукт фирмы ООО «РЕАХИМ». ГОСТ 7699-78. Белый порошок. Использовали без дополнительной очистки.

**Калий бромистый** – продукт фирмы Merck (Germany). Для ИК спектроскопии, серия ВО 373307 931 – бесцветное кристаллическое вещество. Бромид калия не поглощает ИК-излучение в достаточно широком интервале длин волн (от 0,25 мкм до 25 мкм). Использовали при изготовлении таблеток для инфракрасной спектроскопии.  $T_{\text{пл}} = 748^{\circ}\text{C}$ .

**Дейтерированная вода** – продукт фирмы ООО «Астрахим», МДОВ-99.93. Дата изготовления: февраль 2010 г.  $T_{пл} = 3,81^{\circ}\text{C}$  (276,97 К),  $T_{кип} = 101,43^{\circ}\text{C}$  (374,55 К),  $\eta = 0,00125$  Па·с (0,0125 пз) при  $20^{\circ}\text{C}$ . Прозрачная жидкость без цвета и запаха. Растворитель для ЯМР спектроскопии. Использовали без дополнительной очистки.

**Глюкоза** – продукт фирмы ГУП «Столичные аптеки». Порошок белого цвета из микрокристаллов, не имеет запаха, на вкус сладкий. Циклический моносахарид. Молекулярный вес 180,16 Да.  $T_{пл}(\alpha\text{-D-глюкоза})=146$  оС,  $T_{пл}(\beta\text{-D-глюкоза})=146$  оС. Использовали без дополнительной очистки.

**Соляная кислота (HCl)** – продукт марки Ч (36 % раствор в воде).

**Уксусная кислота ледяная** – продукт марки ХЧ. Использовали без очистки.  $t_{пл} = 16,75^{\circ}\text{C}$ ,  $t_{кип} = 118,1^{\circ}\text{C}$ ,  $d_4^{20} = 1,049$ .

**Ацетон** - продукт фирмы ООО «Русхим». Квалификация: хч. Изготовлен согласно ГОСТ 2603-79 изм 1-2, партия 64, дата изготовления 06.2011. Летучая бесцветная жидкость с характерным запахом.  $t_{кип} = 56,1^{\circ}\text{C}$ ,  $d_4^{20} = 0,792$ . Использовали без дополнительной очистки.

**Растворители**, высушенные по стандартным методикам, использовали в свежеперегнанном виде. Константы растворителей отвечали данным, приведенным в литературе [118].

## 3.2 Методики синтезов

### 3.2.1 Синтез диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы

К раствору, содержащему 4,00 г натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) (таблица 12) в 400 мл дистиллированной воды, добавляли раствор, содержащий 4,28 г  $\text{NaIO}_4$  в 200 мл воды. Раствор оставляли при комнатной температуре, в темном месте в колбе с открытым горлом при перемешивании. По

окончании реакции смесь диализовали против дистиллированной воды четверо суток с четырехкратной сменой диализной воды до отрицательной реакции диализата на ион  $\text{IO}_3^-$  по йодкрахмальной бумаге. Полученный продукт лиофилизировали.

Таблица 12 - Загрузки для синтеза ДАКМЦ

№ синтеза	Масса натриевой соли КМЦ, г	Масса $\text{NaIO}_4$ , г	Время окисления, ч.	Степень окисления ДАКМЦ ( $\gamma_{\text{ок}}$ ), %
1	4,00	4,28	24	22
2	4,00	4,28	3	28
3	4,00	3,54	96	82
4	4,00	0,35	67	11
5	4,00	4,28	6	45
6	10,00	10,70	6	30
7	10,00	8,84	68,5	40
8	2,00	0,53	96	37

### 3.2.2 Синтез диальдегиддекстрана

К 200 мл раствора «Полиглюкин», содержащего 12,0 г декстрана, приливали раствор, содержащий 1,90 г  $\text{NaIO}_4$  в 10 мл воды. Раствор оставили при комнатной температуре, в темном месте в колбе с открытым горлом при перемешивании на 24 часа (таблица 13). По окончании реакции смесь диализовали против дистиллированной воды четверо суток с четырехкратной сменой диализной воды до отрицательной реакции диализата на ион  $\text{IO}_3^-$  по йодкрахмальной бумаге. Полученный продукт лиофилизировали.

Таблица 13 - Загрузки для синтеза ДАД

№ синтеза	Масса декстрана, г	Масса NaIO <sub>4</sub> , г	Время окисления, ч.	Степень окисления ДАД ( $\gamma_{ок}$ ), %
1	12,00	32	24	75
2	12,00	32	24	96
3	12,00	16	24	71
4	12,00	16	24	69
5	12,00	2	24	13

### 3.2.3 Определение степени окисления диальдегидполисахаридов (ДАКМЦ, ДАД) методом обратного йодометрического титрования

В четыре плоскодонные колбы, объемом 50 мл каждая, помещали 4 навески диальдегиддекстрана (диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы) по 20,0 мг взвешенные с точностью до 0,1 мг. К каждой навеске приливали 10 мл 0,1н NaOH, перемешивали 5 минут; приливали 20 мл 0,01 н I<sub>2</sub>, перемешивали 0,5 часа. Затем, к каждой пробе приливали 12 мл 0,1н HCl и титровали раствором 0,01н Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, используя крахмал в качестве индикатора. Одновременно делали холостой опыт, где вместо диальдегиддекстрана (диальдегидккарбоксиметилцеллюлозы) использовали неокисленный декстран (карбоксиметилцеллюлозу).

Степень окисления рассчитывали по (1):

$$\gamma_{ок} = \frac{V(Na_2S_2O_3) \cdot N'(Na_2S_2O_3) \cdot M(100AГЗ)}{2g}, \quad (1)$$

где, 
$$N' = \frac{V(I_2) \cdot N(Na_2S_2O_3)}{V'(Na_2S_2O_3)_{контр.}}, \quad (2)$$

$V'(Na_2S_2O_3)_{контр.}$  – поправочный коэффициент, полученный путем титрования тиосульфата натрия йодом.

$$V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)_{\text{хол.}} - V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)_{\text{контр.}} \quad (3)$$

$V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)_{\text{хол.}}$  - объем, пошедший на титрование декстрана (карбоксиметилцеллюлозы) тиосульфатом натрия;

$V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)_{\text{контр.}}$  - объем, пошедший на титрование диальдегиддекстрана (диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы) тиосульфатом натрия.

$g$  – навеска полимера, в мг,

$M(100 \text{ АГЗ}) = 16200$  – для низкоокисленного ДАДа,

$M(100 \text{ АГЗ}) = 14700$  – для среднеокисленного ДАДа,

$M(100 \text{ АГЗ}) = 13200$  – для высокоокисленного ДАДа,

$M(100 \text{ АГЗ}) = 24700$  – для ДАКМЦ.

### 3.2.4 Определение степени окисления диальдегидполисахаридов оксимным

#### методом

В четыре плоскодонные колбы с притертой пробкой, объемом 100 мл каждая, помещали 4 навески диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы по 100,0 мг взвешенные с точностью до 0,1 мг. К каждой навеске приливали 25 мл 0,1М NaOH. Перемешивали смесь на магнитной мешалке до полного растворения вещества. Нейтрализовывали раствор с помощью 0,1 М раствора соляной кислоты до заданного значения pH (см. табл. 5). Затем добавляли заданное количество 1М раствора гидросиламина гидрохлорида ( $\text{H}_2\text{NOH}\cdot\text{HCl}$ ) (см. табл. 5). Смесь перемешивали и затем оттитровали высвободившуюся соляную кислоту 0,05М NaOH. Расход раствора NaOH в литрах обозначали  $V_c$ . Такую же концентрацию КМЦ с заданным значением pH использовали в качестве бланка и расход раствора щелочи в литрах на него обозначали как  $V_b$ . Также оттитровывали 10 мл 1М гидросиламина гидрохлорида до заданного значения pH 0,05М NaOH.

Содержание альдегидных групп (АС) в ДАКМЦ рассчитывали по формуле:

$$AC_1 (\%) = (M(\text{NaOH}) \cdot (V_c - V_b) \cdot 100\%) / (m / 211)$$

где  $M(\text{NaOH}) = 0,05$  моль/л,

$m$  - сухая масса навески ДАКМЦ в г,

211 – примерная молекулярная масса повторяющегося фрагмента в ДАКМЦ.

Каждое измерение проводить до трех сходящихся результатов.

### 3.2.5 Синтез ДАКМЦ ковалентно связанной с госсиполом

В плоскодонную колбу объемом 50 мл помещали 150 мг ДАКМЦ (0,5 осново-ммоль-экв) со степенью окисления 73,5% ( $\gamma_{\text{ок}} = 73,5\%$ ) и характеристической вязкостью 0,08635 дл/г ( $[\eta] = 0,08635$  дл/г). В колбу добавляли 5 мл боратного буфера (рН=8,5), оставляли перемешиваться на магнитной мешалке до полного растворения.

Госсипол массой 259 мг (0,5ммоль-экв) помещали в коническую колбу объемом 50 мл и растворяли в 6,0 мл 0,1н NaOH с перемешиванием на магнитной мешалке до полного растворения. В полученный раствор медленно с помощью бюретки при перемешивании добавляли боратный буфер (рН=8,5) объемом 24 мл. Проверяли рН при помощи лакмусовой бумаги (рН=8).

К раствору госсипола приливали раствор ДАКМЦ, оставляли на 48 часов при комнатной температуре при перемешивании на магнитной мешалке. По окончании реакции продукт помещали в диализный мешок. Продукт диализовали против боратного буфера до обесцвечивания промывных вод, затем четыре раза против дистиллированной воды.

### 3.2.6 Синтез ДАД ковалентно связанного с госсиполом

В плоскодонную колбу объемом 50 мл помещали 0,2154 г ДАД (1 ммоль-экв) со степенью окисления 71,05% ( $\gamma_{\text{ок}} = 71,05\%$ ) и характеристической вязкостью

0,0858 дл/г ( $[\eta]=0,0858$  дл/г). В колбу добавляли 5 мл боратного буфера (pH=8,5), оставляли перемешиваться на магнитной мешалке до полного растворения.

Госсипол массой 0,518 г (1 ммоль-экв) помещали в коническую колбу объемом 50 мл и растворяли в 0,1н NaOH объемом 5,0 мл с перемешиванием на магнитной мешалке до полного растворения. В полученный раствор с помощью бюретки при перемешивании добавляли боратный буфер (pH=8,5) объемом 20 мл. Проверяли pH при помощи лакмусовой бумаги (pH=8).

К раствору госсипола приливали раствор ДАД, оставляли на 24 часа при комнатной температуре при перемешивании на магнитной мешалке и по окончании реакции раствор помещали в диализный мешок. Продукт очищали диализом с последующей лиофилизацией.

### **3.2.7 Синтез модельных соединений госсипола ковалентно связанного с**

#### **глюкозой в различных условиях**

#### **Синтез модельных соединений госсипола ковалентно связанного с глюкозой**

##### **в водных условиях**

В трехгорлую колбу, снабженную механической мешалкой, обратным холодильником и устройством для ввода и вывода аргона помещали 70 мл 0.1 н боратного буфера pH=8.5. Через раствор пропускали аргон в течение 30 минут, затем добавляли при перемешивании 2 г глюкозы. Аналогично готовили раствор 0.5 г госсипола в 60 мл 0.1 н NaOH в условиях отсутствия растворенного кислорода. Раствор госсипола медленно прибавляли к раствору глюкозы при интенсивном перемешивании. Реакцию вели в токе аргона при комнатной температуре 48 часов. Раствор упаривали, очищали промывкой хлороформом от остатка госсипола, осадок растворяли в дистиллированной воде и осаждали в 10-

ти кратном избытке ацетона, удаляли выпавший избыток глюкозы фильтрованием, фильтрат упаривали в вакууме. Выход 86%.

### **Синтез модельных соединений госсипола ковалентно связанного с глюкозой**

#### **в спиртовых условиях**

Ковалентное связывание госсипола с глюкозой в спиртовых условиях: в трехгорлую колбу, снабженную механической мешалкой, обратным холодильником и устройством для ввода и вывода аргона помещали 100 мл этанола, растворитель нагревали до кипения, при непрерывном пропускании аргона, затем добавляли при перемешивании 2 г глюкозы и 0.5 г госсипола. Реакцию вели в токе аргона при кипячении 8 часов, затем охлаждали, раствор сливали с осадка выпавшего избытка глюкозы и упаривали в вакууме. Осадок дополнительно очищали от непрореагировавшего госсипола экстракцией холодным хлороформом. Выход 51.5%.

### **3.2.8 Кислотный гидролиз гликозидов госсипола в условиях моделирующих**

#### **физиологические**

Кислотный гидролиз полимеров и модельных гликозидов проводили при 36°C в буферных растворах, содержащих соляную и уксусную кислоты при рН=1,0 и рН=3,2. Образовавшийся нерастворимый в воде агликон отделяли центрифугированием и упаривали в вакууме. Выход 30%.

### **3.3 Определение цитотоксических свойств госсипола, ковалентно связанного с диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой**

В 96-луночные плоскодонные тест-планшеты помещают клетки в количестве 10000 клеток на лунку в объеме 100 мкл полной среды, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Клетки культивируют в течение суток в ламинарном шкафу в темноте. Затем из лунок тест-планшетов удаляют жидкую среду пипеткой оставляя иммобилизованные живые клетки. Взамен жидкой среды в лунки вносят по 100 мкл разведений тестируемых препаратов, приготовленных на полной среде. Каждое разведение дублируют в 3-4 повторностях. На планшете готовят 4 контрольные лунки, в которые добавляют по 100 мкл свежей полной среды не содержащей тестируемых препаратов. Планшет помещают в ламинарный шкаф и клетки культивируют в течение 3 сут. Затем из лунок удаляют жидкое содержимое, вносят по 100 мкл полной среды и по 20 мкл ЭТС, перемешивают в насадке пипетки и инкубируют 3,5 часа в ламинарном шкафу в темноте, после чего на спектрофотометре ТЕСАН измеряют относительную оптическую плотность раствора в каждой лунке при 492 нм относительно его поглощения при длине волны сравнения 620 нм. Цитотоксичность  $CC_{50}$  рассчитывают по стандартной методике описанной Л. Терри и соав. [119].

### **3.4 Исследование *in vitro* противовирусного действия полимерных производных госсипола на разных штаммах вируса гриппа А**

К клеткам MDCK, достигшим монослоя на 96-луночных культуральных планшетах, добавляли исследуемые препараты в серийных разведениях. После этого клетки заражали вирусом гриппа в дозе 10ТЦД<sub>50</sub>/лунку. Для определения ТК<sub>50</sub> клетки с теми же концентрациями препаратов заражены не были.

Инфицированные клетки инкубировали в течение 72 часов, при этом в контроле ЦПД достигает 100%. После этого клетки окрашивали красителем MTS, оптическую плотность считывали на планшетном ридере.

### **3.5 Методы анализов**

#### **Спектральные методы**

Спектроскопию ядерного магнитного резонанса на ядрах  $^{13}\text{C}$  использовали для исследования химического строения синтезированных полимеров.

Образцы готовили в виде растворов в ДМСО- $d_6$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  и  $\text{D}_2\text{O}$  с добавлением NaOH. Спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  записывали в режиме подавления расщепления на протонах со стробируемой развязкой, а так же с использованием режима DEPT на приборах Bruker СХР-200 с рабочей частотой 50,32 МГц при температуре 297 К.

Так же спектры снимали на приборе Bruker Avance-600 с рабочей частотой 150,94 МГц при температуре 297 К в тех же режимах.

Спектры регистрировали в лаборатории ядерного магнитного резонанса ИНЭОС РАН.

#### **Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием**

Инфракрасную спектроскопию с Фурье-преобразованием использовали для исследования химического строения окисленных звеньев в образцах диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы, ГУК, а так же конъюгата ГУК-ДАКМЦ и конъюгата ГУК-ДАД. ИК-спектры снимали на приборе Nicolet 380 в области от 400 до 4000  $\text{cm}^{-1}$  с разрешением 2  $\text{cm}^{-1}$  при комнатной температуре из таблеток с KBr. Для обработки спектров использовали программное обеспечение “OMNIC” компании “Thermo Scientific” и “ACD labs” 10,0. Для увеличения чувствительности использовали метод деконволюции пиков с аппроксимацией гауссовыми и лоренцевыми кривыми.

### **Ультрафиолетовая спектрофотометрия**

Ультрафиолетовую спектроскопию использовали для контроля процесса и изучения кинетики периодатного окисления карбоксиметилцеллюлозы, декстрана и разработки метода количественного определения госсипола в субстанции. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре СПЕКС ССП - 715 в ультрафиолетовой области спектра 190-1050 нм. Результаты обрабатывали с использованием программного обеспечения UV-Vis analyst и ACD/SpecManager.

### **Гель-проникающая хроматография**

Гель-проникающую хроматографию использовали для определения молекулярно-массового распределения исходной карбоксиметилцеллюлозы и полученных образцов диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы. Анализы проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1200, снабженном двумя детекторами, соединенными последовательно: рефрактометрическим детектором и ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны.

Анализ проводили на колонках Yedrogel 2000, 1000, 500 фирмы "Waters", при температуре колонок – 25°C с водяным термостатированием. Элюент – 0,2М ацетатно-аммонийный буфер pH=8,4, скорость потока 0,5 мл/мин. В качестве стандартов для калибровки колонки использовали стандартные полиакриламиды и полиэтиленоксиды узкого молекулярно-массового распределения. Калибровочные кривые аппроксимировали полиномом 3<sup>ей</sup> степени.

Расчет молекулярно-массовых характеристик полимера проводили с использованием универсальной калибровки и программного обеспечения "Millenium".

### **MASS MALDI TOF спектрометрия**

Спектры MASS MALDI - TOF снимали с использованием времяпролетного масс-спектрометра Ultraflex TOF фирмы Bruker Daltonics в отражательном и в линейном режиме в соответствующем диапазоне масс. В качестве матрицы использовали раствор 2,5-дигидроксибензойной кислоты. Спектры

регистрировали в лаборатории протеомики ИБХ им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

## ВЫВОДЫ

1. Взаимодействием нафталальдегида госсипола с диальдегидполисахаридами: диальдегидкарбоксиметилцеллюлозой и диальдегиддекстраном синтезированы и охарактеризованы ряд новых физиологически активных полимеров прививочного типа, проявляющие противовирусную активность против различных штаммов вируса гриппа А в опытах *in vitro*.

2. Обнаружено, что в условиях реакции нафтахинон присоединяется как к окисленным звеньям, так и к гидроксильным группам восстанавливающих концов полисахаридов с образованием полуацетальных связей.

3. Установлено, что полимерные производные не являются физиологически активными полимерами с собственной активностью, также не представляют собой систему контролируемого выделения низкомолекулярного госсипола и они противоречат модели Х. Рингсдорфа. Их следует классифицировать как полимерное про-лекарство, выделяющее при гидролизе нафтохиноны с удаленной альдегидной группой, чем и обусловлен эффект снижения токсичности при присоединении нафталальдегида к полимеру-носителю.

4. С использованием синтезированных низкомолекулярных моделей, представляющих собой гликозилированный госсипол, определено химическое строение продуктов, образующихся при кислотном гидролизе госсипол-содержащих физиологически активных полимеров в условиях грубо моделирующих физиологические. Образующиеся соединения относятся к классу окисленных нафтохинонов.

5. Найдены условия региоселективного гликозилирования госсипола с использованием борат-анионов в качестве ориентантов.

6. Выявлена возможность использования диальдегидполисахаридов диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы и диальдегиддекстрана в качестве полимеров-носителей для создания полимерных про-лекарств на основе нафталальдегидов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АГЕ – ангидроглюкозная единица;

АГЗ – ангидроглюкозное звено;

ГКМЦ – диальдегидкарбоксиметилцеллюлоза ковалентно связанная с госсиполом, полученная гетерофазным методом;

ГУК – госсипол уксусная кислота;

ГПХ – гельпроникающая хроматография;

ДАД – диальдегиддекстран;

ДАКМЦ – диальдегидкарбоксиметилцеллюлоза;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ИК – инфракрасная спектроскопия;

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза;

ММР – молекулярно-массовое распределение;

РФ – рефрактометрический детектор;

ОП – оптическая плотность;

УПП – удельный показатель поглощения;

УФ – ультрафиолетовая спектроскопия;

ФАВ – физиологически активное вещество;

ФАП – физиологически активный полимер;

ЯМР – спектроскопия ядерного магнитного резонанса.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Большая советская энциклопедия. В 30-ти томах, том 3, 1969—1978. С. 89-120;
2. Sandra Klein. Polysaccharides in Oral Drug Delivery – Recent Applications and Future Perspectives // Polysaccharide Materials: Performance by Design; Edgar K., et al.: ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington DC. 2010.
3. Козлов В.С. Углеводы. Том 2, 1992. С. 20;
4. Дженкинс М. Полимеры в биологии и медицине // М: Научный мир. 2011.
5. Травень В.Ф. Органическая химия. В 2-х томах, том 2, С. 494;
6. Мусатов П.П., Михайлов Д.А., Рогинский В.А. Сб. // Материалов конф. "Биоантиоксидант". Москва, 1993. ч. I. С. 210.
7. Коршак В.В., Штильман М.И. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений // М., издательство «Наука», 1984. С. 261;
8. Государственная Фармакопея СССР XI издания – выпуск 1 // "Общие методы анализа" издательство "Медицина" Москва, 1987. С
9. Куркин В.А. "Фармакогнозия" второе издание Учебник для студентов фармацевтических вузов // Самара: ООО "Офорт", ГОУВПО "СамГМУ", 2007. С. 78;
10. Штильман М.И. Полимеры медико-биологического назначения// Высокомолекулярные соединения. 2010. Т.52.№9.С.880-899;
11. Кочетков Н.К. и др. Химия углеводов, М.,1967. С. 26-47;
12. Дудкин М.С. «Гемицеллюлозы», 2005. С. 65-70;

13. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И., Миронов П.В. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии // Красноярск: ИПК СФУ, 2009. С. 262.
14. Большая советская энциклопедия В 30-ти томах, том 3, 1969—1978. С. 256-258;
15. Гумникова В.И. Дис. ... канд. хим. наук. М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2014. 137с.
16. Видаль, Справочник лекарственных средств, 2010 г, С. 325;
17. Закусов В.В. Фармакология, 2 изд., М., 1966 С. 36-45;
18. Машковский М.Д. Лекарственные средства, 7 изд., ч. 1, М., 1972 С. 71-82;
19. Ленинджер А. Основы биохимии: в 3 т. Т. 1. Пер с англ. // М.: Мир, 1985. С. 367;
20. Биосовместимые материалы для создания микро наносистем, содержащие био активные молекулы. Часть 2. С. 23;
21. Плате Н.А., Васильев А.Е. Физиологически активные полимеры. М.: Химия. 1986. С. 296.
22. Лаврухин Б.Д. и соавт. // Высокомогл. соединения. Т. 32 Б. С. 55. 1990.
23. Hongli Li, Bo Wu, Changdao Mu, Wei Lin // Concomitant degradation in periodate oxidation of carboxymethyl cellulose. Carbohydrate Polymers 84, 2011. P.881-886;
24. Несмеянов В.А. «Методы исследования углеводов»
25. <http://www.ngpedia.ru/cgi-bin/getpage.exe?cn=194&uid=0.798909546341747&inte=3> от 05.04.2014
26. Круппа И.С., Чапала П.П., Дятлов В.А., Долгова А.А., Гумникова В.И. Влияние периодатного окисления на молекулярно-массовые характеристики

- диальдегидполисахаридов, 2012. // Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия;
27. Calvini P., Conio G., Lorenzoni M., Pedemonte E. // Viscometric Determination of dialdehyde content in periodate oxycellulose Part I. Methodology. Cellulose;
  28. Kaminsky R., Zwegarth E Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherland, 2004. P. 99-107;
  29. Чапала П.П., Долгова А.А., Круппа И. С., Гумникова В.И., Дятлов В.А. Особенности химического строения продуктов гомогенного периодатного окисления карбоксиметилцеллюлозы. 2012. // Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия;
  30. New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body // Ledl and Schleicher Angewandte Chemie 1990. 29. 6. 565-594.
  31. Берка А., Вултерин Я., Зыка Я., Новые редокс-методы в аналитической химии. Пер. с чеш. // М., 1968. С. 27-114.
  32. Химический энциклопедический словарь, 1983. С. 313;
  33. Энциклопедия Кольера, 1978. С. 62;
  34. Химическая энциклопедия, 1972 г. С. 543;
  35. Мецлер Д.Б. Биохимия, пер. с англ., Т.1 ., 1980. С. 134-165;
  36. Племенков В.В. Введение в химию природных соединений. Казань. 2001. С. 376
  37. <http://biofile.ru/bio/19877.html> от 06.07.2016
  38. Глинка Н.Л. Общая химия. 22 изд., Л.: Химия, С. 719-1977.
  39. Ignatyev Igor; Charlie Van Doorslaer, Pascal G.N. Mertens, Koen Binnemans, Dirk. E. de Vos // Synthesis of glucose esters from cellulose in ionic liquids. Holzforschung 66 (4). 2011. 417-425.

40. Calvini Paolo, Conio Giuseppina, Princi Elisa, Vicini Silvia, Pedemonte Enrico // Viscometric Determination of dialdehyde content in periodate oxycellulose Part I. Topochemistry of oxidation. Springer 2006;
41. Calvini Paolo, Conio Giuseppina, Princi Elisa, Vicini Silvia, Pedemonte Enrico // Viscometric Determination of dialdehyde content in periodate oxycellulose Part II. Topochemistry of oxidation. Springer 2006;
42. Strlic Matija, Kolar Janna, Zigon Majda, Pihlar Boris // Evaluation of size-exclusion chromatography and viscometry for the determination of molecular masses of oxidised. Journal of Chromatography A. 805 1988, С.93-99;
43. Николаев А.Ф., Охрименко Г.И. Водорастворимые полимеры. Л.: Химия. 1979. С. 144.
44. Скурихин И.М. «Все о пище с точки зрения химика».- М.: Наука, 1991. С. 234;
45. Бочков А.Ф., Афанасьев В.А., Заиков Г.Е. Углеводы. М.: Наука. 1980. С.176.
46. Роговин З. А. Химия целлюлозы, М. 1972. С. 520.
47. Азаров В.И. Химия древесины и синтетических полимеров, 1999. С. 629.
48. Манушин В.И. Целлюлоза, сложные эфиры целлюлозы и пластические массы на их основе. 2002. С. 107.
49. Феттес Е.Н. Химические реакции полимеров том 2. 1967. С. 536.
50. Долгова А.А. Дятлов В.А, Чапала П.П., Гумникова В.И Таутомерия в окисленных звеньях диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы 2012 // Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия;
51. Сюткин В.Н., Николаев А.Г., Сажин С.А., Попов В.М., Заморянский А.А. Азотсодержащие производные диальдегидцеллюлозы. 1.

- Диальдегидцеллюлоза высокой степени окисления // Химия растительного сырья. 1999. №2. С. 91–102.
52. Sara I.F.S. Martins\*, Wim M.F. Jongen and Martinus A.J.S. van Boekel. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modeling // Trends in Food Science & Technology. 11. 2001. 364–373
  53. Страйер Л., Биохимия: Пер. с англ. // М.: Мир, 1984. С. 232
  54. Food Chemistry by Belitz, Grosch, and Schieberle. 4th edition. Springer. 2009.
  55. Вирник А.Д., Хомяков К.П., Скокова И.Ф. Декстран и его производные // Успехи химии. 1975. Т.44№7. С.1278-1308;
  56. Хомяков К.П., Вирник А.Д., Ушаков С.Н., Роговин З.А. // Синтез полимерных лекарственных соединений на основе производных декстрана. Высокомолек. соед. 1965. Т.7, N 6. С. 1035-1040
  57. Мелентьева Г.А., Антонова Л.А. «Фармацевтическая химия». Москва, 1985 г. С. 111-117;
  58. Гумникова В.И., Дятлов В.А., Гребенева Т.А., Круппа И.С., Киреев В.В., Бахмутов В.И., Изучение химического строения диальдегиддекстранов, полученных периодатным окислением в различных условиях // Журнал Пластические массы. 2012 г;
  59. Долгова А.А., Чапала П.П., Круппа И. С., Дятлов В.А., Химическое строение диальдегиддекстранов, полученных периодатным окислением в различных условиях // 2012. Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия;
  60. Гумникова В.И., Дятлов В.А., Чапала П.П., Долгова А.А., Структура окисленных звеньев продуктов периодатного окисления клинического декстрана «Полиглюкин» // 2012. Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия;

61. Розенфельд Е.Л. Декстран, его особенности и значение как заменителя плазмы крови // Усп. Биол. Химии. 1958. № 3. С. 366-387.
62. Федоров Н.А., Козинер В.Б. Механизм действия полиглюкина. М.: Медицина. 1974.
63. Декстраны и декстраназы // Успехи биологической химии, т. 16, М., 1975. С. 214-35.
64. Dextran bibliography, ed. by A. Jeanes, Wash. 1978.
65. Walker G.J., "Internet Rev. of Biochem" // Biochemistry of Carbohydrate, v. 16, Balt. 1978. P. 75-126.
66. Molteni L. Dextran and Inulin Conjugates as Drug Carriers // Meth. Enzymol. 1985. V.112. Pt. A. P. 285-297.
67. Смит В., Вочков А., Кейпл Р. Органический синтез. Наука и искусство. 2001. С. 263, 292
68. В.Г. Жиряков «Органическая химия». – Москва – 1986 г. С. 56;
69. Хомяков К.П., Пененжик М.А., Вирник А.Д., Роговин З.А. // Синтез диальдегид- и дикарбоксилдекстрана. - Высокомолек. соед. 1965. Т.7. № 6. С.1030-1034.
70. Гибиетис Я.Л., Зицманис А.Х., Спинце Б.А. // Способ получения диальдегиддекстрана. - Авт. свид. N 1530630.
71. Лившиц В.С., Заиков Г.Е. Лекарственные формы на основе биодеструктурирующихся полимеров // Хим. фарм. ж. 1991. № 1. С.15-25.
72. Kenar J.A. Reaction Chemistry of Gossypol and Its Derivatives // Cereal Products and Food Science Research. 2007. P. 306;
73. N.S. Ilkevych, B. Brzezinski, G. Schroeder, V.I. Rybachenko V.I., C.Ju. Chotiy, R.A. Makarova and A.F. Dmitruk. The structure and physicochemical properties of

- gossypol and its imine derivatives // Functionalized molecules - synthesis, properties and application” Edited by V.I. Rybachenko. Donetsk. 2010. P. 9-43.
74. Иванченко В.А., Зацепин В.М., Иванченко И.В. и др. Информационно-аналитическое обеспечение научных исследований по проблемам химической безопасности // Химическая и биологическая безопасность, 2008, №5-6. С. 24-35.
75. Интегральная информационно-аналитическая система по химическим веществам: база данных // Свидетельство о гос. регистрации № 2006620346 от 02.11.2006г. М.: Роспатент, 2006.
76. Opin E. Investigations on gossypol: past and present developments // Invest. Drugs. 2005. Vol. 14. № 11. P. 456 – 474;
77. Ибрагимов Б.Т., Таллипов С.А. Способы супрамолекулярной ассоциации госсипола в кристаллическом состоянии // Журнал структурной химии. 1999. Т. 40. № 5. С. 287 – 301;
78. Painter T. J. Gossypol as underirable substance in animal feed Scientific Opinion of the Panel on Contaminats in the Food Chain // The EFSA Journal. 2008. P. 1-55;
79. Азизова М. А., Сарымсаков А.А., Рашидова С.Ш.. Полимерная форма индуктора интерферона с противовирусной активностью // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: Тез. докл. Всероссийской конференции. Барнаул. 2005. Т. 1. С. 15-18.
80. Йулчиев А.Б., Абдурахимов С.А., Серкаев К.П., Абдиева Г.М.. СВЧ – обработка хлопковой мятки с целью максимального выведения госсипола в масло // Ресурсосберегающие и энергоэффективные технологии химической и нефтехимической промышленности: Тез. докл. III Международно конференции российского химического общества имени Д.И. Менделеева. Москва. 2011. Т. 1. С.166-167.

81. Справочно-аналитическая система по токсичным веществам: база данных // Свидетельство о гос. регистрации № 2006620347 от 02.11.2006г. М.: Роспатент, 2006.
82. Глушенкова А.И.. Госсипол, его производные и их использование // Известия вузов. Пищевая технология. 1994. №5-6. С. 7-9.
83. Хаитбаев А.Х. Синтез и биологическая активность некоторых алифатических производных госсипола // *Universum: Химия и биология: электрон. научн. журн.* 2015. № 7 (15).
84. Илькевич Н.С., Рыбаченко В.И., Шредер Г., Дмитрук А.Ф., Чотий К.Ю. Антиоксидантные свойства госсипола и его некоторых иминопроизводных. 1999. Т. 53. С. 113-118;
85. Табиляев К.З., Камаев Ф.Г., Выпова Н.Л., Юлдашев А.М., Ибрагимов Б.Т., Талипов С.А. Синтез, структура и «острая» токсичность несимметричных альдегидных производных госсипола // *Биоорганическая химия.* 2010. Т. 36. № 3. С. 423-428;
86. Sampath D.S., Balaram P.. Resolution of racemic gossypol and interaction of individual enantiomers with serum albumins and model peptides // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1986 (882). – P. 183-186.
87. Xi Wang, Cheryl Page Howell, Feng Chen, Juanjuan Yin, and Yueming Jiang. Gossypol-A Polyphenolic Compound from Cotton Plant // *Advances in Food and Nutrition Research.* -2009. – Vol. 58. – P. 215-263.
88. Stipanovich R.D., Bell A.A. and Howell C.R. Spectral Identification of the Ketol Tautomer of Gossypol // *National Cotton Pathology Research.* – 1973. – Vol. November. – P. 462-463.
89. Kenar J. A. Reaction Chemistry of Gossypol and Its Derivatives // *Cereal Products and Food Science Research.* 2001. Т. 39. P. 225-230;

90. Joseph A.E.A., Matlin S.A., Knox P. Cytotoxicity of enantiomers of gossypol // Br. J. Cancer. 1986. Vol. 54. P. 511-513;
91. Sarymsakov A. A., Nadzhimutdidov Sh., Tashpulatov Yu. T. Chemical transformations of gossypol // Journal of the American oil chemistry society 1973. Strom-Hansen T, Cornett C, Jaroszewski J.W. Vol. 50. № 11. P. 462-463;
92. Marcinak B., Schroeder G., Kozubek H., Brzezinski B. Perkin Transactions // Journal of Chemical Society. 1991. Vol. 2. № 8 p.110-118;
93. Magn A. Antioxidant properties of gossypol // Chemistry of Natural Compounds. 2004. Vol. 3. P. 17-29;
94. Yannai S., Bensal D. Gossypol in cottonseed products: Toxicology and inactivation. Toxicology in the use, misuse and abuse of food, drugs and chemicals // Arch. Toxicol. Suppl. - 1983. - Vol. 6. - P. 167-174;
95. Богоявленский А.П., Турмагамбетова А.С., Березин В.Э. Противовирусные препараты растительного происхождения // Биологические науки. Фундаментальные исследования. 2013. №6. С. 1141-1145.
96. Yu Y., Deck J.A., Hunsaker LA. et al. Selective active site inhibitors of human lactate dehydrogenases A4, B4, and C4 // Biochem. Pharmacol. - 2001. - Vol. 62. - P. 81-89;
97. Zhang M., Liu H., Guo R. et al. Molecular mechanism of gossypol-induced cell growth inhibition and cell death of HT-29 human colon carcinoma cells // Biochem. Pharmacol. - 2003. - Vol. 66. - P. 93-103.;
98. Juanjuan Yin. Дис. ... канд. хим. наук. М: Clemson University, 2010. 156 p.
99. Zhang H.P., Wang X., Chen F. et al. Anticancer activity of limonoid from *Khaya senegalensis* // Phytother. Res. - 2007a. - Vol. 21. - P- 731-734;

100. Whaley K.J., Sampath D.S., Balaram P. Optically active gossypol as a circular dichroism probe of interactions with serum albumins I I *Biochim. Biophys. Acta.* - 1984b. - Vol. 801. - P. 127-130;
101. Талипов С.А., Ибрагимов Б.Т.. Клатраты госсипола. Структура комплекса госсипола с изобутилацетатом // *Журнал структурной химии.* 2002. Т.43. №3. Май-июнь. С. 534-539.
102. Wang J., Wang X., Chen F. et al. Development of direct competitive ELISA for gossypol analysis // *J. Agric. Food Chem.* - 2005. - Vol. 53. - P. 5513-5517;
103. Gossypol as undesirable substance in animal feed. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain // *The EFSA Journal.* – 2008 (908). -P. 1-55.
104. Zhang M., Liu H., Tian Z. et al. Differential growth inhibition and induction of apoptosis by gossypol between HCT116 and HCT116/Bax (+/-) colorectal cancer cells // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* - 2007b. - Vol. 34. - P. 230-237.
105. Luna J. S., Bento E. S., Sant'Ana A. E. G.. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Experiments and Chemical Shifts Calculations on Gossypol: a Compound Extracted from Cottonseeds // *Ann. Magn. Reson.* 2004. - Vol. 3.- Issues 1/2. – P. 17-19.
106. Хаитбаев А.Х. Синтез производных госсипола с гетероциклическими аминами // *Химия растительного сырья.* 2014. №1. С. 105–108.
107. Ringsdorf H. Structure and properties of pharmacologically active polymers // *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia.* 1975. - Vol.51. – Issue 1. – P. 135-153.
108. Finkelman H., Happ M., Portugal M., Ringsdorf H. Liquid crystalline polymers with biphenyl-moieties as mesogenic group // *Macromolecular Chemistry and Physics.* 1978/ - Vol. 179. – Issue 10. – P. 2541-2544.

109. Hub H., Hupfer B., Koch H., Ringsdorf H. Polymerizable Phospholipid Analogues – New Stable Biomembrane and Cell Models // *Angewandte Chemie International Edition*. 1980. – Vol. 19. – Issue 11. – P. 938-940.
110. Gros L., Ringsdorf H., Schupp H. Polymeric Antitumor Agents on a Molecular and on a Cellular Level? // *Angewandte Chemie International Edition*. 1981. – Vol. 20. – Issue 4. – P. 305-325.
111. Eich M., Wendorff J., Reck B., Ringsdorf H. Reversible digital and holographic optical storage in polymeric liquid crystals // *Macromolecular Rapid Communications*. 1987. – Vol. 8. – Issue 1. – P. 59-63.
112. Finkelman H., Ringsdorf H., Wendorff J. Model considerations and examples of enantiotropic liquid crystalline polymers. *Polyreactions in ordered systems*, 14 // *Macromolecular Chemistry and Physics*. 1978/ - Vol. 179. – Issue 1. – P. 273-276.
113. Portugall M., Ringsdorf H., Zentel R. Synthesis and phase behavior of liquid crystalline polyacrylates // *Macromolecular Chemistry and Physics*. 1982. - Vol. 183. – Issue 10. – P. 2311-2321.
114. Bader H., Ringsdorf H., Schmidt B. Watersoluble polymers in medicine // *Macromolecular materials and Engineering*. 1984. - Vol. 123. – Issue 1. – P. 457-485.
115. <http://lib.muotr.ru/> от 05.02.2017
116. Киселева И.В., Рудой Б.А., Пирогов А.В., Толмачева Н.Г. Валидация ВЭЖХ-методики определения госсипола в субстанции «Кагоцел» // *Фармацевтическая химия и фармакогнозия*. 2016. – Т. 65. - №8. – С. 18-24.
117. Справочник. Именные реакции в органической химии / Вацуро К.В., Мищенко Г.Л. М.: Изд-во Химия, 1976. 53с.
118. Органические растворители. Физические свойства и методы очистки / А. Вайсберг [ и др.]. М.: Изд-во Иностран. лит., 1958. 520с.

119. Terry L. Riss and Richard A. Moravec Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays // *ASSAY and Drug Development Technologies* Volume 2, Number 1, 2004 p.51-62.