



УДК 547.458.6+661.185.223.2

И.Л.ОСТРОВСКАЯ, Т.Л.ЮРКШТОВИЧ, Ф.Н.КАПУЦКИЙ, Н.В.ГОЛУБ,
В.И.ТОРГАШОВ, А.Б.САМАЛЬ, Е.Н.ЛОЙКО

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НИТРОСУЛЬФОЭФИРОВ КРАХМАЛА

Water-soluble nitrosulphoesters of starch and amilopectin with a degree of nitro groups 0,6–1,4 and sulpho groups 0,5–0,8 with antiaggregate and anticoagulant activities have been synthesized.

An affect of preliminary treatment, quantity of nitro groups and sulphating mixtures composition sodium pyrosulphate – dimethyl sulphoxide, temperature and sulfating reaction time on a degree of sulphating mixed ethers of amilopectin and starch has been studied.

Биологические свойства полимеров опосредованы не только проявлениями высокомолекулярной природы (форма и тип макромолекулярной матрицы, степень полимеризации), но и особой ролью входящих в состав макромолекул функциональных групп: карбоксильные, сульфатные, аминные и др. При этом большое значение имеет количество и однородность распределения заместителей по цепи макромолекулы. С этой точки зрения можно предположить, что целенаправленное регулирование биологической активности может достигаться варьированием в составе полимера набора функциональных групп.

Известно, что сульфатная группа в составе полимеров определяет широкий спектр медико-биологического действия, включая антикоагулянтное и антиатеросклеротическое [1], например: гепарин, хондроитинсульфаты, сульфаты декстрана, маннана и др. В то же время в медицине широко применяются органические нитриты (соединения, содержащие группы $-O-N=O$) и нитраты (содержащие группы $-O-NO_2$) в качестве средств, улучшающих кровоснабжение и метаболизм миокарда [2]. Однако фармакологическое действие подобных препаратов кратковременно. Пролонгирование эффекта можно было бы ожидать при использовании нитратов полисахаридов, но этому препятствует их нерастворимость в жидких средах организма.

В статье представлены результаты изучения условий синтеза смешанных нитросульфатов крахмала и амилопектина и оценка влияния функционального состава на их некоторые физико-химические и биологические свойства. Выбор крахмала в качестве объекта химической модификации обусловлен доступностью и легкой биоусвояемостью. Данный биополимер представляет собой не индивидуальное вещество, а смесь двух структурно различных полисахаридов – амилозы и амилопектина. Для получения стабильных результатов нитрования и сульфатирования нами проведено сравнительное изучение реагирования крахмала, в том числе прогидролизованного, и амилопектина.

Экспериментальная часть

В работе использовали картофельный крахмал и амилопектин (ТУ 6-09-10-391-75). Кислотный гидролиз крахмала и амилопектина проводили в 0,1 н растворе серной кислоты в течение 6 ч при 328 К и постоянном перемешивании [3]. Гидролизированные крахмал и амилопектин высаждали ацетоном, отмывали смесью вода–ацетон (объемное соотношение 1:1), фильтровали и сушили при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния.

Для ферментативного гидролиза крахмала и амилопектина использовали 1%-ный раствор панкреатина [4]. Высаживание, отмывку и сушку гидролизованных продуктов осуществляли так же, как и в случае кислотного гидролиза. Нитрование крахмала и амилопектина осуществляли смесями азотной ($d=1,5$ г/г), фосфорной ($d=1,7$ г/г) кислот и фосфорного ангидрида при различных соотношениях ингредиентов. Процесс проводили в течение 1 ч при 293К [5]. В полученных нитроэфирах определяли содержание азота по методу Кьельдаля [6]. Сульфатирование полисахаридов пироксернокислым натрием в среде диметилсульфоксида проводили по методу [7]. Затем реакционную массу нейтрализовали насыщенным раствором карбоната натрия до pH~8–9. Водорастворимые продукты реакции очищали от низкомолекулярных примесей диализом на целлофановых мембранах и лиофильно сушили. Обменную емкость водорастворимых сульфопроизводных определяли методом потенциометрического титрования, нерастворимых – барий-ацетатным методом [8]. Степень замещения по нитро- и сульфогруппам в нитросульфэфирах рассчитывали на основании данных о процентном содержании в образцах азота (C_N) и серы (C_S) по формулам:

$$C3_{No_2} = \frac{1296 \cdot C_N}{11200 - 360 \cdot C_N - 357 \cdot C_S};$$

$$C3_{so_3Na} = \frac{567 \cdot C_N}{11200 - 360 \cdot C_N - 357 \cdot C_S}.$$

Характеристическую вязкость нитросульфамилопектина и нитросульфокрахмала измеряли в 0,5 н растворе NaCl при 310К в вискозиметре Уббелюде с диаметром капилляра 0,54 [8]. Влияние сульфэфилов и нитросульфэфилов амилопектина и крахмала на свертывающую активность плазмы оценивали по изменению тромбинового времени. Тромбиновое время определяли по стандартной методике [9]. Ингибирующий эффект оценивали по изменению скорости агрегации относительно контроля, т.е. путем измерения скоростей АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в отсутствие соединений (V_0) и в присутствии сульфо- и нитросульфэфилов амилопектина и крахмала (V) с последующим определением отношения V/V_0 [10]. В контроле, а также в отсутствие ингибирования это соотношение равнялось 1.

Результаты и их обсуждение

Смешанные сложные эфиры крахмала и амилопектина, содержащие нитро- и сульфогруппы, имеют общую формулу:



Для их получения формально может существовать два пути: нитрование с последующим сульфатированием или сульфатирование, а затем нитрование сульфатов полисахаридов. Учитывая тот факт, что сульфэфиры полисахаридов нестабильны в кислых средах, этерификацию образцов осуществляли первым путем. Отсутствие в литературе необходимых сведений о синтезе сульфатированных нитроэфиров полисахаридов требует специального исследования влияния количества нитроэфирных групп в полисахариде и условий проведения реакции сульфатирования на состав смешанных нитросульфатов.

Для установления взаимосвязи между химическим составом полисахарида и его биологическим действием желательно иметь набор нитросульфатов с разными величинами молекул. В связи с этим в работе проведено сравнительное изучение условий нитрования и сульфатирования исходных и подвергнутых кислотному и ферментативному гидролизу амилопектина и крахмала. Из представленных в табл.1 результатов по нитрованию крахмала и амилопектина смесями, состоящими из азотной, фосфорной кислот и фосфорного ангидрида, где два последних компонента выполняют роль водоотнимающих агентов, видно, что при одинаковых условиях получения значения

$C3_{NO_2}$, для крахмала и амилопектина сопоставимы. Для обоих образцов содержание азота в смеси можно регулировать влажностью исходных образцов, содержанием азотной кислоты и фосфорного ангидрида. При фиксированных условиях процесса нитрования содержание нитрогрупп в нитроэфирах увеличивается при переходе от исходных и кислотномодифицированных к полисахаридам, обработанным 1%-ным раствором панкреатина. Более высокая $C3_{NO_2}$ ферментативно обработанных крахмала и амилопектина обусловлена в основном резким уменьшением длины цепей, что позволяет образцам диспергироваться в нитрующей смеси. В результате достигается более равномерное нитрование и повышение степени замещения.

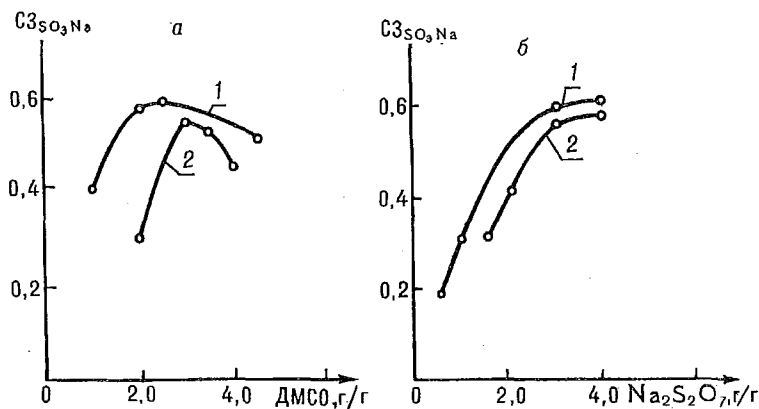
Таблица 1

Влияние состава нитрующей смеси, условий предварительной обработки и влажности полисахарида на содержание нитрогрупп

Нитрующая смесь	Условия обработки перед нитрованием	Влажность, %	Амилопектин		Крахмал	
			% азота	$C3_{NO_2}$	% азота	$C3_{NO_2}$
$HNO_3:H_3PO_4:P_2O_5=49:50:1$	—	9	4,5	0,7	4,5	0,7
	—	0	5,1	0,7	5,7	0,8
	0,1н H_2SO_4	9	4,1	0,6	4,2	0,6
	0,1н H_2SO_4	0	5,7	0,8	—	—
	1%-ный р-р панкреатина	0	8,8	1,4	8,8	1,4
$HNO_3:H_3PO_4:P_2O_5=70:25:5$	—	0	7,9	1,2	—	—
	0,1н H_2SO_4	0	6,2	0,9	7,8	1,2
$HNO_3:H_3PO_4:P_2O_5=49:40:11$	—	0	8,8	1,4	7,3	1,1
	1%-ный р-р панкреатина	0	10,8	1,9	9,6	1,6

Примечание: * — за абсолютно сухой образец условно принят полисахарид, высушенный при 323К в вакуумном шкафу.

Для выбора оптимальных условий, обеспечивающих получение водорасстворимых высокозамещенных сульфатов нитрокрахмала и нитроамилопектина, было исследовано влияние состава сульфатирующей смеси, времени, температуры реакции, а также степени замещения по нитрогруппам.



Зависимость $C3$ при сульфатировании амилопектина (1) и нитроамилопектина (2) ($N=4,5\%$) пиросульфатом натрия ($3г/г$) от:
а — количества растворителя и б — серосодержащей соли при жидкостном модуле 3 г/г

На примере нитроамилопектина (рисунок) отражено влияние количественного состава сульфатирующей смеси на степень замещения по сульфогруппам (условия реакции: время — 6ч, температура — 333К). Очевидно, что количество сульфогрупп в нитроэфирах амилопектина (НАП) в зависимости от содержания соли и жидкостного модуля достигает максимальных значений

при соотношении $\text{НАП}:\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_7:\text{ДМСО} = 1:2,5-3,0:3$. Аналогичные результаты получены для амилопектина, нитроэфиров амилопектина и крахмала разного состава. Для этой оптимальной смеси выход водорастворимых нитросульфатов составлял 58–93%, степень замещения по сульфогруппам 0,5–0,8.

Результаты влияния температуры и времени реакции на содержание серы представлены в табл.2. Видно, что повышение температуры в интервале 303–333К, так же как и увеличение продолжительности процесса сульфатирования, не вызывает дальнейшего возрастания степени замещения по сульфогруппам нитросульфатов полисахаридов с разным содержанием азота. Однако для получения частично замещенных сульфозэфиров полисахаридов, обладающих наибольшей однородностью, реакцию сульфатирования целесообразно проводить не менее 5–6 ч при температуре 333К. Такие условия проведения процесса сульфатирования способствуют набуханию полисахаридов в растворителе и получению более однородных по своему составу нитросульфозэфиров. Показателем повышения однородности нитросульфозэфиров амилопектина и крахмала с увеличением времени и температуры реакции может служить полная растворимость смешанного эфира амилопектина и уменьшение мутности растворов нитросульфозэфиров крахмала, которая обусловлена загрязнением их мелкодисперсной незамещенной фракцией.

Таблица 2

Влияние температуры и продолжительности сульфатирования на степень замещения нитросульфозэфиров амилопектина и крахмала

$C_3\text{NO}_2$	Т,К	Продолжи- тельность, ч	Характеристика эфиров		Содержание нераство- римой фрак- ции, %	Выход, %
			Степень замещения			
			-NO ₂	-SO ₂ Na		

АМИЛОПЕКТИН						
0	303	6	0	0,6	0	93
	318	6	0	0,6	0	91
	333	0,5	0	0,6	0	90
	333	1	0	0,6	0	90
	333	6	0	0,6	0	90
0,7	308	6	0,7	0,5	16	64
	318	6	0,7	0,7	10	63
	333	0,5	0,7	0,5	15	65
	333	1,5	0,7	0,6	3	67
	333	3	0,7	0,6	2	90
	333	6	0,7	0,6	0	70
1,2	308	6	1,2	0,6	24	34
	318	6	1,0	0,6	0	73
	333	6	1,2	0,6	0	58

КРАХМАЛ						
0	333	6	0	0	100	0
0,8	308	6	0,8	0,6	2	66
	318	6	0,8	0,7	0	70
	333	0,5	0,8	0,5	2	63
	333	1,5	0,7	0,6	0	65
	333	3,0	0,8	0,6	0	61
	333	6	0,7	0,6	0	90
1,1	318	6	1,1	0,7	0	74
	333	6	0,7	0,6	0	80

При всех изученных условиях проведения процесса сульфатирования для всех нитроэфиров амилопектина и крахмала со $C_3\text{No}_2 < 1,4$ содержание нитроэфирного азота в ходе реакции не изменялось. Более высокозамещенные азотнокислые эфиры ($C_3\text{No}_2 - 1,4-1,9$) в сульфатирующей среде

при 333К денитруются, и в данной работе не удалось получить нитросульфозэфиры крахмала и амилопектина со $C3_{NO_2} > 1,5$ (табл.3).

Таблица 3

Влияние предварительной обработки амилопектина
и крахмала на состав их нитросульфозэфиров

C3 _{NO₂}	Условия гидролиза	Характеристика эфиров				[η], дл/г	Содержание нераствори- мой фрак- ции, %	Выход, %
		содержание, %		C3				
		азот	сера	-NO ₂	-SO ₂ Na			
АМИЛОПЕКТИН								
0	—	0	8,5	0	0,6	0,09	0	51
	0,1н H ₂ SO ₄	0	4,4	0	0,3	—	15	60
	1%-ный панкреатин	0	9,4	0	0,7	0,05	0	52
1,2	—	6,7	6,3	1,2	0,5	0,05	0	91
1,1	0,1н H ₂ SO ₄	5,1	6,9	1,0	0,6	0,04	16	61
1,4	1%-ный панкреатин	4,8	7,3	0,9	0,6	0,01	0	30
1,9	1%-ный панкреатин	7,1	6,8	1,5	0,6	0,007	0	25
КРАХМАЛ								
0	—	0	0	0	0	—	100	0
	0,1н H ₂ SO ₄	0	0	—	0	—	100	0
	1%-ный панкреатин	0	10,4	0	0,8	0,04	14	72
1,1	—	3,6	7,6	0,6	0,7	0,06	0	75
1,2	0,1н H ₂ SO ₄	5,2	7,6	1,0	0,7	0,06	0	71
1,4	1%-ный панкреатин	3,8	8,2	0,7	0,7	0,05	0	50
1,7	1%-ный панкреатин	5,8	8,5	1,3	0,8	0,03	0	50

Примечание: температура сульфатирования 333К, продолжительность — 6 часов.

Предварительный гидролиз полисахаридов кислотой или ферментом (см. табл.3) не влияет на реакционную способность их нитроэфиров в процессе сульфатирования, т.е. при фиксированных условиях количество сульфогрупп в нитросульфозэфирах исходных и гидролизованных амилопектина и крахмала примерно одинаково (0,5–0,8). Однако обработка амилопектина и крахмала раствором панкреатина способствует понижению выхода смешанного эфира, характеристической вязкости их растворов, что свидетельствует об образовании наиболее низкомолекулярных смешанных эфиров.

Исследование влияния количества нитрогрупп в нитросульфополисахаридах на биологическую активность выявило следующие особенности (табл.4): во-первых, в результате введения сульфогрупп в нитрополисахариды получены водорастворимые смешанные эфиры с комбинированным антиагрегантным и антикоагулянтным действием. Антиагрегантная активность непосредственно связана с концентрацией растворов смешанных эфиров, количеством нитрогрупп в их составе и в зависимости от степени замещения

по нитрогруппам достигает максимальной величины при значениях 0,9–1,0. Для крахмала и амилопектина величины антиагрегантного эффекта примерно одинаковы. Во-вторых, для амилопектина антикоагулянтная активность нитросульфозфиров выше, чем у сульфатов, для крахмала наблюдается обратная зависимость. Такая различная последовательность изменения антикоагулянтной активности у смешанных эфиров полисахаридов может свидетельствовать о значительном влиянии на нее степени полимеризации. И в-третьих, наилучшим антиагрегантным действием при сравнительно высоком антикоагулянтном эффекте обладают нитросульфозфиров крахмала, имеющие степень замещения по нитрогруппам – 1,0, сульфогруппам – 0,7 и характеристическую вязкость – 0,06. Из табл.4 следует, что предварительный ферментативный и кислотный гидролиз полисахаридов перед нитрованием и сульфатированием не только не влияет на содержание сульфогрупп, но и не повышает биологическую активность смешанных эфиров.

Таблица 4

Антиагрегантная и антикоагулянтная активность сульфатов и нитросульфатов амилопектина и крахмала

Полисахарид	Условия обработки	Характеристика сульфатов			Концентрация, мг/мл				
		C_{3NO_2}	C_{3SO_3Na}	η_{sp} , дп/г	1,0	3,0	6,0	0,085	0,13
					Скорость агрегации, отн.ед V/Vc			Тромбиновое время, с	
Амилопектин	—	0	0,6	0,09	1	1	1	21±1	25±1
	1%-ный панкреатин	0	0,7	0,05	1	1	1	—	—
	1%-ный панкреатин	0,9	0,6	0,01	0,38	0,25	0	45±4	98±3
	0,1н H ₂ SO ₄	0,9	0,6	0,06	0,28	0	0	37±1	58±1
	—	1,0	0,5	0,04	0,24	0,14	0	48±5	61±1
	1%-ный панкреатин	1,5	0,6	0,01	0,29	0,24	0,09	42±2	61±6
Крахмал	1%-ный панкреатин	0	0,08	0,04	1	1	1	75±5	143±4
	0,1н H ₂ SO ₄	0,7	0,5	0,1	0,7	0,65	0,34	43±3	67±3
	1%-ный панкреатин	0,7	0,7	0,05	0,24	0,14	0	21±2	31±2
	—	1,0	0,7	0,06	0,09	0	0	70±6	80±5
	1%-ный панкреатин	1,3	0,8	0,03	0,20	0,13	0	34±3	64±1
	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание: тромбиновое время в контроле –12±1 с.

Таким образом, сульфатирование нитрозэфиров крахмала и амилопектина Na₂S₂O₇ в ДМСО приводит к образованию смешанных эфиров со степенью замещения по нитро 0,6–1,4 и сульфогруппам 0,5–0,8. Равновесная степень замещения по сульфогруппам нитросульфополисахаридов определяется составом сульфатирующей смеси и содержанием нитрогрупп в крахмале и амилопектине. Полученные смешанные эфиры обладают комбинированным антиагрегантным и антикоагулянтным действием.

1. Пат. 0475383 Японии, С 08В, 37/00, А 61К 31/715, 1992.
2. Машковский М. Д. Лекарственные средства. Вильнюс, 1994. Ч.1. С.359.
3. Химия и технология крахмала. М., 1975. С.359.
4. Успехи химии целлюлозы и крахмала. М., 1962. С.431.
5. Сарыбаева Р. И., Щелохова Л. С. Химия азотнокислых эфиров целлюлозы. Фрунзе, 1967. С.164.
6. Губен-Вейль. Методы органической химии. М., 1967. С.1032.
7. Торгашов В. И., Герт Е. В., Капуцкий Ф. Н., Бильдюкевич А. В. // Докл. АН БССР. 1989. Т.33. №11. С.1017.
8. Петропавловский Г. А. Гидрофильные частично замещенные эфиры целлюлозы и их модификация путем химического сшивания. Л., 1988. С.298.
9. Лабораторные методы исследования в клинике (Справ.). М., 1987.
10. Самаль А. Б., Черенкевич С. Н., Хмара Н. Ф. Агрегация тромбоцитов: методы изучения и механизмы. М., 1990. С.80.

Поступила в редакцию 02.04.98.