

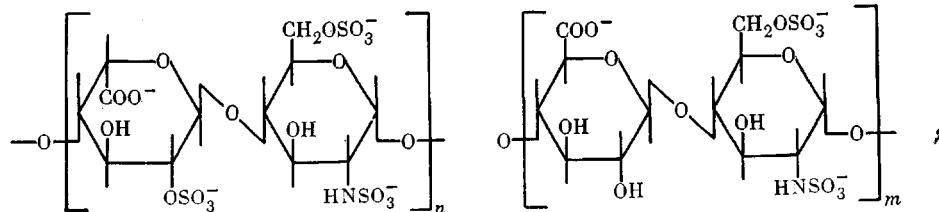
УДК 541.64:543.422

**ИССЛЕДОВАНИЕ СОЛЕЙ ГЕПАРИНА СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИМИ
МЕТОДАМИ**

Панов В. П., Овсепян А. М.

Методами ИК-спектроскопии водных сред и ЯМР ^{13}C исследована ионизация карбоксильных групп гепаринатов Li, Na, K, Rb, Cs, Mg, Ca, Zn и Cu при разных концентрациях и ионных силах раствора. На фоне сильного электростатического взаимодействия сульфогрупп ионизация карбоксильов дает незначительный вклад в электростатическую энергию отталкивания. Значение $pK_{a \rightarrow 0}$ карбоксильных групп гепаринатов определяется величиной экранирования групп OSO_3^- и NHSO_3^- , т. е. является функцией концентрации, ионной силы раствора, заряда, массы, потенциала ионизации противоиона, способности его к гидратации. Установлено, что с увеличением радиуса иона моновалентного металла ослабевает его взаимодействие с группой COO^- . Ионогенные группы гепарина обладают селективностью по отношению к связыванию определенных ионов металлов. Предполагается несколько типов солевых связей ионов дивалентных металлов с группами COO^- гепарина, на отбор которых влияет природа противоиона.

Гепарин обладает широким спектром действия в организме (предотвращение тромбоза и свертывания крови, антилипемическая, антиметастатическая активность и т. д.). С момента открытия (в 1916 г.) до настоящего времени он детально изучался разнообразными физическими, химическими и биологическими методами [1–3]. Однако многие аспекты стереохимии гепарина, технологии его выделения, функциональной связи строения, размера и конформаций макромолекул гепарина с физико-химическими свойствами, биологическим проявлением остались невыясненными. Наиболее исчерпывающее заключение о химическом и пространственном строении многих элементов структуры макромолекул гепарина дал метод ЯМР [4–7], под влиянием которого произошла ревизия представлений о химическом строении природного антикоагулянта крови. Вся совокупность структурной информации, накопленной к настоящему времени, не позволяет изобразить строение всего семейства гепаринов с помощью единой формулы. Ниже приведена динамическая формула, которая передает возможные вариации в составе полисахарида и описывает многие физико-химические свойства гепаринов.



где $n > m$, $n+m=10-20$.

Многочисленные данные последних лет свидетельствуют о том, что основной повторяющейся единицей неразветвленной цепи макромолекулы гепарина из легких крупного рогатого скота (тип В) является биозный фрагмент из остатков 2-сульфат- α -L-идопиранозилуроновой кислоты и 6-сульфат-2-дезокси-2-сульфоамино- α -D-глюкопиранозы, соединенных

1-4-гликозидными связями [5–8]. Гепарин из слизистой оболочки тонкого кишечника свиней (тип А), помимо указанных на схеме фрагментов, содержит остатки N-ацетилглюказамина, тогда как в гепарине из легких они практически отсутствуют [4, 7].

Среди природных полимеров гепарин характеризуется наиболее высокой плотностью отрицательных зарядов, свойства которого в растворе должны быть чувствительны к изменению концентрации, ионной силы, pH. Высокое содержание отрицательно заряженных групп – необходимое, но не достаточное условие высокой антикоагулянтной активности биополимера [3]. Антикоагулянтная активность гепарина отражает комплекс структурных особенностей полисахарида: плотность и распределение зарядов, степень диссоциации, размер и форму макромолекул. Катионсвязывающие свойства гепарина подобны свойствам других отрицательно заряженных полиэлектролитов. Термодинамическая активность катионов солей металлов существенно снижается при их связывании отрицательно заряженными группами гепарина. Данстон [9] предложил следующий ряд сродства катионов металлов к макромолекуле гепарина: $\text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$. Взаимодействие гепарина с катионами изучали методами ЯМР ^1H , ^{13}C , ^{23}Na [6, 10, 11], ультрафильтрации [12], полярографии [13, 14], вискозиметрии [15], кругового диахроизма [15–17]. Отмечалось, что существенное влияние на катионсвязывающую способность гепарина оказывают карбоксильные группы гексуроновых остатков [6, 10, 13, 14]. В данной работе методами ИК-спектроскопии водных сред и ЯМР ^{13}C исследована ионизация карбоксильных групп гепаринатов Li, Na, K, Rb, Cs, Mg, Ca, Zn и Cu при разных концентрациях и ионных силах раствора.

Соли гепарина получали диализом натриевой соли гепарина из легких крупного рогатого скота (антикоагулянтная активность 130 ед/мг, $M_w = 12\,000$) в диализных мешочках марки 20/32 фирмы «Серва» при постоянном перемешивании в течение 48 ч против 0,02 M водных растворов хлоридов соответствующих металлов [18]. Содержание ионов металлов в гепаринатах определяли на атомно-абсорбционном спектрометре модели 403 фирмы «Перкин – Эльмер»; оно составляло 75–90% от значения рассчитанного исходя из биозной повторяющейся единицы гепарина типа В. Остаточное содержание ионов натрия во всех диализованных образцах не превышало 0,1%. Антикоагулянтная активность гепарината Na после диализа составила 140 ед/мг. Для приготовления растворов в пикнометры брали навески солей гепарина и сушили их до постоянного веса в вакууме над P_2O_5 в течение 24 ч. Растворение образцов в D_2O (изотопная чистота 99,9%) проводили в среде аргона, чтобы исключить обмен D–H с атмосферной влагой. Растворы гепаринатов с требуемым значением pD готовили путем добавления концентрированного раствора $\text{DCl}(\text{MeOD})$. Значения pD измеряли рН-метром РМ-84 фирмы «Радиометр» с использованием микрозлектродов. Показания рН-метра пересчитывали в значения pD по формуле $pD = pH + 0,41$ [19].

ИК-спектры регистрировали в разборных флюоритовых кюветах специальной конструкции [20] с толщиной поглащающего слоя 0,0038 и 0,0076 см. Толщины кювет измеряли интерферометрическим способом. Температуру кювет поддерживали постоянной при 20° с помощью терmostатирующего держателя. Степень компенсации поглощения молекул D_2O контролировали по поглощению при 3850 cm^{-1} , а HOD – при 3400 cm^{-1} . Для получения наилучшей компенсации значение pD тяжелой воды кюветы сравнивали с равным pD раствора. Принятые условия эксперимента гарантировали практически полный обмен подвижных атомов водорода молекулы гепарина на дейтерий. При обработке спектральных кривых в качестве базового было принято поглощение в областях 1900 и 1520 cm^{-1} . Разложение спектральных кривых на составляющие компоненты проводили путем обычного графического анализа и с помощью полуавтоматического анализатора кривых СР-2 [21]. Параметр контура f_G составлял 0,9 и 1, а соответствующие константы $k(f_G) = 1,065$ и $1,115$. Выделенные полосы характеризовали частотой в максимуме ($v, \text{ cm}^{-1}$), полушириной ($\Delta v_{1/2}, \text{ cm}^{-1}$), мольным коэффициентом поглощения в максимуме полосы ($\varepsilon_0, \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$), параметром контура f_G и мольным коэффициентом интегральной интенсивности ($B_0, \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-2}$). Значения коэффициента B вычисляли по формуле: $B = -2,3 \cdot k(f_G) \cdot \varepsilon_0 \cdot \Delta v_{1/2}$.

ИК-спектры растворов гепаринатов записывали на спектрофотометрах моделей 577 и 682 фирмы «Перкин – Эльмер» при спектральной ширине щели $<3\text{ cm}^{-1}$, скорости сканирования $23\text{ cm}^{-1}/\text{мин}$ и масштабе $5\text{ cm}^{-1}/1\text{ см}$. Для исключения влияния поглощения паров атмосферной влаги на измерения в области 1500 – 1800 cm^{-1} приборы продували осущенным воздухом.

Спектры ЯМР ^{13}C водных растворов гепаринатов Li, Na, Cs, Zn и Mg (концентрация 18 об. %) регистрировали на спектрометре WP-80DS фирмы «Брукнер» с рабочей частотой 20,115 МГц в режиме полного шумового подавления C–H спин-спиновых взаимодействий [7].

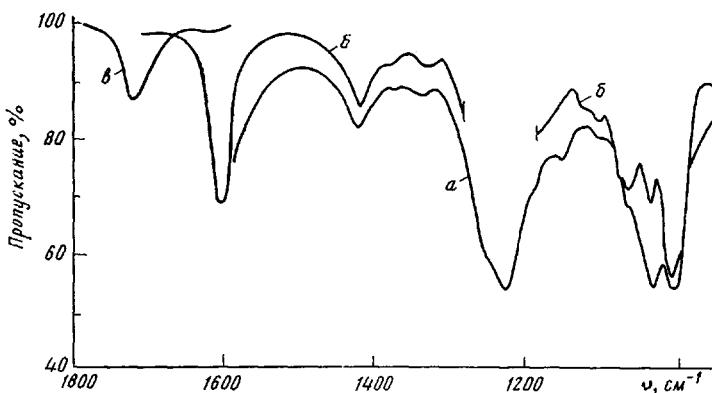


Рис. 1. ИК-спектры гепарината натрия в H_2O при $\text{pH} 7$ (а) и в D_2O при $\text{pD} 7$ (б) и 1,2 (в) ($c=7,8\%$, $l=0,0017 \text{ см}$)

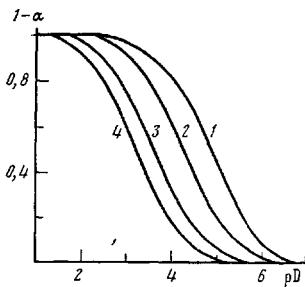


Рис. 2. Кривые титрования растворов гепарината натрия при концентрациях 1,0 (1), 5,6 (2), 18% (3), 18%+2 M NaCl (4). Здесь и далее концентрация поликислоты выражена в об. %

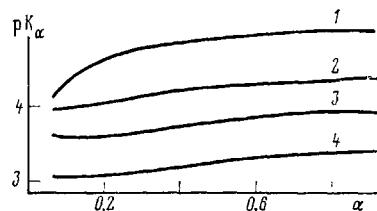


Рис. 3. Зависимость эффективного значения pK_α от степени ионизации карбоксильных групп гепарината Na при концентрации 1,0 (1), 5,6 (2), 18% (3) и 18%+2 M NaCl (4)

В связи с появлением современных спектрометров резко расширились возможности метода ИК-спектроскопии для исследования гепарина в водных растворах [3, 20–23], имеющего полосы поглощения функциональных групп в «окнах пропускания» H_2O и D_2O . В спектре гепарина в H_2O при $\text{pH} 7$ (рис. 1) присутствует широкая интенсивная полоса сложной структуры с основным максимумом $\sim 1240 \text{ см}^{-1}$, которая связана с асимметричными валентными колебаниями групп SO_3^- [22]. В ИК-спектре гепарината Na в D_2O при $\text{pD} 7$ наблюдается интенсивная полоса поглощения при 1610 см^{-1} . При подкислении раствора до $\text{pD} 1,2$ эта полоса исчезает и появляется менее интенсивная полоса с максимумом при 1725 см^{-1} . Изменения в спектрах позволяют однозначно отнести полосу 1610 см^{-1} к асимметричным валентным колебаниям ν_{as} соотв. карбоксилатионов, а полосу при 1725 см^{-1} — к валентным колебаниям $\nu_{c=0}$ протонированных карбоксильных групп. В области нейтральных значений pD карбоксильные группы всех исследованных солей гепарина полностью ионизованы.

Метод ИК-спектроскопии позволяет количественно оценить степень ионизации карбоксильных групп гепарина при разных значениях pD в зависимости от концентрации, ионной силы раствора, природы противоиона. Нами исследованы зависимости степени ионизации α карбоксильных групп гепаринатов моно- и дивалентных металлов от pD раствора. Степень ионизации карбоксильных групп рассчитывали по изменению пикиовых (D_s/D) и интегральных (B_s/B) интенсивностей полос поглощения ионизованных или неионизованных карбоксильных групп при титровании раствором DCl или NaOD . Кривые титрования по разным способам расчета α совпадают, носят обратимый характер. На рис. 2 приведены кривые титрования растворов гепарината Na в D_2O разной концентрации и с добавлением NaCl и без него.

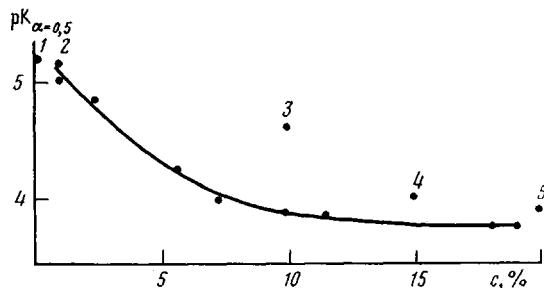


Рис. 4. Зависимость эффективного значения $pK_{\alpha=0.5}$ карбоксильных групп гепарината Na от его концентрации в D_2O (1 – значение $pK_{\alpha=0.5}$ по данным кругового дихроизма, 2 и 3 – по данным ЯМР 1H [25], 4 – по данным ИК-спектроскопии [23], 5 – по данным ЯМР ^{13}C [25])

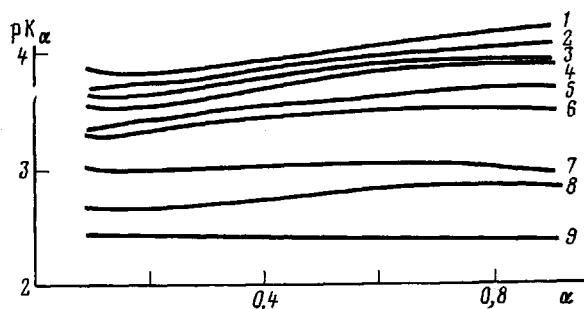


Рис. 5. Зависимость pK_{α} от степени ионизации карбоксильных групп гепаринатов Cs (1), Rb (2), K (3), Na (4), Li (5), Mg (6), Ca (7), Zn (8) и Cu (9) ($c=18\%$)

В поликислотах [24] ионизация каждой последующей группы сопровождается увеличением электростатического отталкивания одноименно заряженных групп цепи. В гепарине ионогенные группы расположены близко друг от друга, поэтому легкость ионизации каждой группы будет зависеть от состояния ионизации соседних. Ионизация COOH-групп начинается и проходит на фоне втрое большего числа полностью ионизированных групп OSO_3^- и $NHSO_3^-$. COOH-группы находятся в их окружении, значительно отделены друг от друга (0,8–1 нм), поэтому возрастание электростатической составляющей свободной энергии полиона F_{el} при увеличении его заряда вследствие ионизации COOH-групп будет определяться прежде всего электростатическим отталкиванием групп COO^- от SO_3^- . Как следует из рис. 3, ионизация COOH-групп гепарина дает слабый вклад в электростатическую энергию отталкивания.

На рис. 4 показана зависимость эффективного значения $pK_{\alpha=0.5}$ карбоксильных групп от концентрации гепарината Na. Из-за полизелектролитных эффектов с ростом концентрации гепарината значение $pK_{\alpha=0.5}$ уменьшается и при $c \geq 10\%$ практически остается неизменным. Значения $pK_{\alpha=0.5}$ находятся в удовлетворительном согласии с данными других методов [25]. При добавлении NaCl эффективное значение pK_{α} уменьшается, т. е. свободная электростатическая энергия ионизации снижается. Учитывая, что макромолекула гепарина содержит группы, резко отличающиеся по способности к диссоциации, зависимость pK_{α} от степени ионизации COOH-групп можно выразить в виде

$$pD = pK_0 + \lg \frac{\alpha}{1-\alpha} + \frac{\partial F_{el}(\alpha)}{\partial \alpha}$$

где pK_0 – значение pK COOH-групп при $\alpha \rightarrow 0$ на фоне сильного электростатического отталкивания сульфогрупп (оно является функцией концентрации, ионной силы раствора, заряда, массы, потенциала ионизации

Параметры полос $\nu_{as} COO^-$ (pD 7) и $\nu_{C=O}$ (pD 1,2) в ИК-спектрах растворов гепаринатов и $pK_{\alpha=0,5}$ карбоксильных групп ($c = 18\%$)

Противоион	Электролит	Параметры полосы $\nu_{as} COO^-$				Параметры полосы $\nu_{C=O}$				$pK_{\alpha} = 0,5$
		$\nu, \text{см}^{-1}$	$\Delta\nu_{1/2}, \text{см}^{-1}$	$\varepsilon_0, \text{л.} \cdot \text{МОЛЬ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$B \cdot 10^{-1}, \text{л.} \cdot \text{МОЛЬ}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$	$\nu, \text{см}^{-1}$	$\Delta\nu_{1/2}, \text{см}^{-1}$	$\varepsilon_0, \text{л.} \cdot \text{МОЛЬ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	$B \cdot 10^{-1}, \text{л.} \cdot \text{МОЛЬ}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$	
Li ⁺	0,02 M LiCl	1611	33	690	5,8	1726	40	255	2,6	3,55
Na ⁺	0,02 M NaCl	1610	30	770	5,9	1727	38,5	274	2,7	3,6
Na ⁺	2 M NaCl	1612	30	760	5,8	1727	38,5	266	2,6	3,2
K ⁺	0,02 M KCl	1609	28	820	5,9	1725	36	284	2,6	3,8
Rb ⁺	0,02 M RbCl	1608	28	800	5,7	1727	38	287	2,8	3,90
Cs ⁺	0,02 M CsCl	1608	28	820	5,9	1727	39	270	2,7	4,00
Mg ²⁺	0,01 M MgCl ₂	1605	30	650	5,0	1726	39	270	2,7	3,45
		1633	24	120	0,7	—	—	—	—	—
Ca ²⁺	0,01 M CaCl ₂	1598	26	190	1,2	1727	39	270	2,7	3,30
		1618	29	645	4,6	—	—	—	—	—
Cu ²⁺	0,01 M CuCl ₂	1602	26	125	0,8	1726	39	270	2,7	2,80
		1620	35	560	4,8	—	—	—	—	—
Zn ²⁺	0,01 M ZnCl ₂	1600	25	264	1,7	1727	40	264	2,7	2,35
		1623	32	495	4,1	—	—	—	—	—
Zn ²⁺	1 M ZnCl ₂	1600	24	270	1,7	1727	39	265	2,7	2,40
		1623	30	540	4,1	—	—	—	—	—

противоиона, его способности к гидратации). При изменении pD раствора величина $\partial F_{\text{эл}}(\alpha)/\partial \alpha$ отражает в основном влияние на кривую титрования взаимодействия COO^- -групп с сульфогруппами, которые частично экранированы противоионами. Нами получены кривые титрования карбоксильных групп гепаринатов моно- и дивалентных металлов, когда содержание поликислоты в растворе не влияло на эффективное значение pK_{α} (рис. 5). Зависимости $pK_{\alpha}=f(\alpha)$ для всех исследованных гепаринатов пологи, носят характер, близкий к прямолинейному. Эффективные значения $pK_{\alpha=0,5}$ даны в таблице. В случае гепаринатов моновалентных металлов значение $pK_{\alpha=0,5}$ увеличивается пропорционально радиусу противоиона (рис. 6), а потенциал ионизации Me отражает сродство соответствующего иона к группе COO^- . Эффективное значение $pK_{\alpha=0,5}$ $COOH$ -групп возрастает от Li к Cs, антибатно падает потенциал ионизации.

Способность катиона изменять заряд поликислоты зависит от его радиуса, степени гидратации, поляризуемости отрицательно заряженных групп поликислоты относительно воды [12, 28]. Ионы COO^- сильнее поляризуются, чем молекулы воды, в этом случае связывание катиона группой COO^- гепарина определяется размером катиона и будет падать от Li⁺ к Cs⁺, что согласуется с данными по титрованию. Напротив, поляризуемость групп OSO_3^- и $NHSO_3^-$ меньше, чем молекул воды, т. е. этим группам энергетически невыгодно замещать воду вокруг катиона [12, 28, 29], и наименее гидратированный ион будет связан болееочно. Так, ион K⁺ с меньшим диаметром гидратной оболочки, чем Na⁺, будет связываться сильнее. Таким образом катионсвязывающие свойства гепарина во многом будут определяться конкурентным характером связывания гидратированных катионов группами COO^- и SO_3^- . В соответствии с этой концепцией гепарин, содержащий в избытке группы SO_3^- , будет предпочтительнее связывать ионы K⁺, нежели Na⁺ [9].

В ИК-спектрах растворов гепаринатов дивалентных металлов в D₂O полоса $\nu_{as} COO^-$ уширена, имеет сложную структуру (рис. 7). Наиболее резко уширена полоса в спектре гепарината Zn ($\Delta\nu_{1/2}=46 \text{ см}^{-1}$). При разложении полосы на составляющие были выделены в явной форме две компоненты, интенсивности которых зависели от природы катиона. Менее интенсивная компонента полосы в спектрах растворов гепаринатов Ca, Cu и Zn проявляется в низкочастотной области с максимумом $\sim 1600 \text{ см}^{-1}$, тогда как в спектре раствора гепарината Mg она расположена в коротковолновой области при 1633 см^{-1} . В таблице представлены параметры полос $\nu_{as} COO^-$ и $\nu_{C=O}$ в ИК-спектрах растворов гепаринатов моно- и дивалент-

Рис. 6. Ионные радиусы r (1) [26], потенциалы ионизации I (2) [27] Li, Na, K, Rb, Cs и $pK_{\alpha=0.5}$ карбоксильных групп соответствующих гепаринатов ($c=18\%$)

Рис. 7. Участки ИК-спектров растворов гепаринатов Na (а), Mg (б) и Zn (в) в D_2O при $pD 7$ ($c=18\%$)

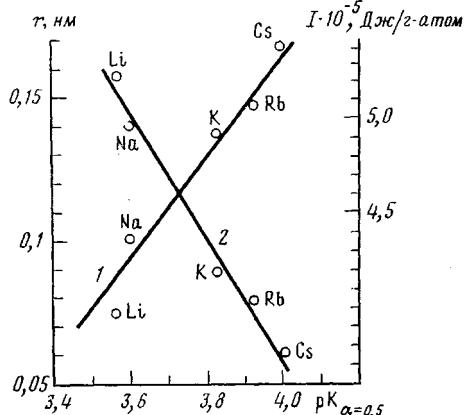


Рис. 6

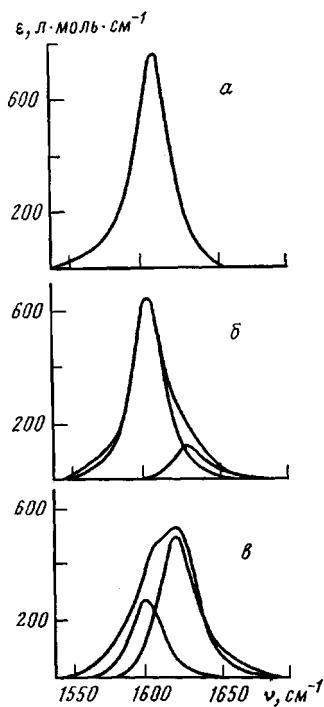


Рис. 7

ных металлов в D_2O . Заряд, масса противоиона, ионная сила, концентрация раствора практически не влияют на форму и коэффициенты интегральной интенсивности этих полос. Постоянство коэффициентов B позволяет использовать данные полосы в качестве аналитических при измерении концентрации гепарината, определении содержания остатков гексуроновых кислот.

Дивалентные катионы оказывают более сильное влияние на ионизацию карбоксильных групп гепарина. По-видимому, связывание гепарином ионов Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} и Cu^{2+} определяется прежде всего взаимодействием их с группами COO^- . Данные ЯМР 1H по слабопольному сдвигу сигналов протонов H_1 и H_5 в спектрах гепарината при замещении иона Na^+ на ион Ca^{2+} подтверждают это заключение [6]; значения $pK_{\alpha=0.5}$ карбоксильных групп гепаринатов Mg и Ca коррелируют со средством этих катионов к гепарину [9]. При добавлении низкомолекулярного электролита кислотные свойства карбоксильных групп гепаринатов дивалентных металлов еще более усиливаются.

Сложный характер полосы $\nu_{as COO^-}$ в спектрах растворов гепаринатов дивалентных металлов предполагает как минимум два колебательных состояния групп COO^- . Концентрация, ионная сила, pD растворов гепаринатов Ca и Zn не влияют на соотношение компонент этой полосы. Однако при увеличении температуры относительная интенсивность низкочастотной компоненты при 1600 см^{-1} падает. Причиной сложной структуры полосы $\nu_{as COO^-}$ может быть образование солевых связей типа $COO^-...Me^{2+}...OOC(a)$, $COO^-...Me^{2+}...O_3SO(b)$ и $COO^-...Me^{2+}...O_3SNH(v)$, существование двух креслообразных форм идуроновых циклов. Из-за малой разности энергий форм идуроновых циклов [30] их равновесие будет определяться характером взаимодействия дивалентных катионов с группами COO^- гепарина. Интенсивность низкочастотной компоненты полосы $\nu_{as COO^-}$ в ИК-спектрах растворов гепаринатов (Γ) падает в ряду $Mg\Gamma > Zn\Gamma > Ca\Gamma > Cu\Gamma$. Соотношение компонент данной полосы, по-видимому, отражает конкуренцию ионогенных групп гепарина за связывание дивалентного катиона. Средство ионов Ca^{2+} , Zn^{2+} и Cu^{2+} к группам COO^- выше, нежели иона Mg^{2+} , т. е. можно предполагать, что при переходе от

гепарината Mg к гепаринатам Ca, Zn и Cu вымораживаются смешанные взаимодействия типа б и в.

Спектры ЯМР ^{13}C растворов гепаринатов Li, Na и Cs характеризуются одиночными линиями с близкими величинами хим. сдвигов. При замещении ионов Na^+ на Mg^{2+} наблюдается небольшой слабопольный сдвиг ($\sim 0,02$ м.д.) сигнала C_6'' ядер углерода групп COO^- идуроновых остатков, что свидетельствует о более предпочтительном связывании ионов Mg^{2+} этими группами. Другие изменения в спектре незначительны. Резкие изменения в спектрах гепаринатов происходят при замещении ионов Na^+ на Zn^{2+} — сдвиг в слабое поле на 0,6 и 0,2 м.д. сигналов C_1' и C_6'' (отнесение согласно работе [8]), а в сильное поле — на 0,1 м.д. сигнала C_1'' ; существенные сдвиги происходят и в области резонанса ядер C_4' , C_2'' и C_4'' . Изменения в спектрах ЯМР ^{13}C отражают прежде всего изменения в локальном окружении ядер углерода. Поведение полизелектролита определяется взаимозависимостью размера полииона и распределения противоионов в его окрестности, поэтому наблюдаемые трансформации в спектрах можно трактовать не конформационными превращениями макромолекул, а как результат кооперативного характера невалентных взаимодействий [31] — переориентацией ионогенных групп. В области резонанса ядер углерода C_6'' идуроновых остатков в спектрах растворов гепаринатов Mg и Zn присутствуют одиночные линии, т. е. при частоте наблюдения 20,115 МГц не проявляются сигналы ядер углерода C_6'' от разных состояний групп COO^- . Нами, согласно [31], были рассчитаны величины барьеров конверсии перехода кресло \rightleftharpoons кресло в широком интервале температур и Δv , существенно превосходящие значения, характерные для данного перехода. Из-за коалесценции наблюдение сигналов ядер C_6'' от разных форм идуроновых остатков невозможно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Heparin: Chemistry and Clinical Usage/Ed. by Kakkar V. V., Thomas D. P. L.: Acad. Press, 1976.
2. Heparin: Structure, Cellular Functions and Clinical Applications/Ed. by McDuffie N. M. N. Y.—San Francisco—L.: Acad. Press, 1979.
3. Панов В. П., Овсепян А. М. Хим.-фарм. ж., 1979, № 12, с. 72.
4. Perlin A. S., Casu B., Sanderson G. R., Johnson L. F. Canad. J. Chem., 1970, v. 48, N14, p. 2260.
5. Perlin A. S. In: Proc. of International Symposium on Macromolecules/Ed. by Mano E. B. Amsterdam: Elsevier, 1975, p. 337.
6. Perlin A. S. Federat. Proc., 1977, v. 36, N 1, p. 106.
7. Свергун В. И., Смирнов М. Е., Панов В. П. Хим.-фарм. ж., 1979, № 4, с. 92.
8. Perlin A. S., Ng Ying Kim N. M. K., Battacharjee S. S., Johnson L. F. Canad. J. Chem., 1972, v. 50, N 15, p. 2437.
9. Dunstone R. Biochem. J., 1962, v. 85, N 2, p. 336.
10. Herwate L., Laszlo P., Genard P. Nouv. J. Chim., 1977, v. 1, № 2, p. 173.
11. Perlin A. S., Hamer G. K., Casu B., Gatti G. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 19, № 2, p. 242.
12. Salminen S., Luomanmäki K. Biochim. Biophys. Acta, 1963, v. 69, № 3, p. 533.
13. Stivala S. S., Liberti P. A. Arch. Biochem., 1967, v. 122, N 1, p. 40.
14. Stivala S. S. Federat. Proc., 1977, v. 36, N 1, p. 83.
15. Ching Ming Chung M., Ellerton N. F. Biopolymers, 1976, v. 15, № 7, p. 1409.
16. Villiers C., Braud C., Vert M. Carbohydr. Res., 1980, v. 83, № 2, p. 335.
17. Braud C., Villiers C., Vert M. Carbohydr. Res., 1980, v. 86, № 1, p. 165.
18. Heparin: Chemistry and Clinical Usage/Ed. by Kakkar V. V., Thomas D. P. L.: Acad. Press, 1976, p. 25.
19. Glasol P. K., Long F. A. J. Phys. Chem., 1960, v. 64, № 1, p. 188.
20. Панов В. П., Овсепян А. М., Кобяков В. В., Жбанков Р. Г. Ж. прикл. спектроскопии, 1978, т. 29, № 1, с. 62.
21. Овсепян А. М., Кобяков В. В., Панов В. П. Хим.-фарм. ж., 1979, № 9, с. 104.
22. Овсепян А. М., Кобяков В. В., Панов В. П. Ж. прикл. спектроскопии, 1977, т. 26, № 2, с. 302.
23. Casu B., Scovenna G., Cifonelli A. J., Perlin A. S. Carbohydr. Res., 1978, v. 63, p. 43.
24. Моравец Г. Макромолекулы в растворе. М.: Мир, 1967, с. 266.
25. Gatti G., Casu B., Hamer G. K., Perlin A. S. Macromolecules, 1979, v. 12, № 5, p. 1001.
26. Handbook of Chemistry and Physics. 51th ed./Ed. by Weast R. C. Cleveland: Chem. Rubber Publ. Co., 1970–71, p. 171.
27. Краткий справочник физико-химических величин/Под ред. Мищенко К. П., Равделя А. А. Л.: Химия, 1974, с. 148.

28. Pase G., Phillips G. O., Wedlock D. J., Morley R. G. In: Carbohydrate Sulfates. Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. Washington: Pergamon Press, 1978, v. 77, p. 259.
 29. Чундель Г. Гидратация и межмолекулярное взаимодействие. М.: Мир, 1972, с. 137.
 30. Панов В. П., Грицан В. И., Жбанков Р. Г. Докл. АН БССР, 1978, т. 22, № 3, с. 238.
 31. Панов В. П., Жбанков Р. Г. Конформации сахаров (физические методы исследования). Минск: Наука и техника, 1975, с. 33, 93.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт технологии кровезаменителей
и гормональных препаратов

Поступила в редакцию
21.IV.1983

STUDY OF HEPARINE SALTS BY SPECTROSCOPIC METHODS

Panov V. P., Ovsepyan A. M.

Summary

Ionization of carboxyl groups of Li, Na, K, Rb, Cs, Mg, Ca, Zn and Cu heparinates at various concentrations and ionic strength of solution has been studied by IR-spectroscopy of aqueous media and ^{13}C NMR methods. The contribution of ionization of carboxyls into the electrostatic energy of repulsion is negligible comparing with strong electrostatic interaction of sulfogroups. The $\text{pK}_{\alpha \rightarrow 0}$ value of carboxyl groups of heparinates depends on the value of shielding of OSO_3^- and NHSO_3^- groups and is a function of concentration, ionic strength of solution, charge, mass, ionization potential of the counterion, its capacity to hydration. The interaction of the ion of multivalent metal with COO^- group becomes weaker with increase of its radius. Ionogenic groups of heparine have the selectivity towards binding of certain ions of metals. Several types of salt bonds of ions of bivalent metals with heparine COO^- groups are assumed, the choice of which depends on the nature of the counterion.