ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Том (А) XXXI 1989 № 1

УДК 541.64:542.952

СТРУКТУРА МАКРОМОНОМЕРА ГЕПАРИНА И ОСОБЕННОСТИ ЕГО РАДИКАЛЬНОЙ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ

Платэ Н. А., Малых А. В., Ужинова Л. Д., Панов В. П., Розенфельд М. А.

Синтезирован макромономер гепарина, изучена его структура и реакционная способность в реакции радикальной полимеризации. Оценено влияние концентрации инициатора и ионной силы раствора на молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение продуктов его гомополимеризации. Показано, что макромономер гепарина вступает в реакцию радикальной сополимеризации с акриламидом.

Интерес к химии макромономеров на основе физиологически активных веществ (ФАВ), т. е. биополимеров, имеющих в своем составе реакционноспособные связи C=C, возник в связи с их успешным применением в качестве промежуточных продуктов, используемых для химической модификации синтетических полимеров ФАВ, получения водорастворимых конъюгатов ФАВ с синтетическими гидрофильными мономерами и полимерами и т. д. [1, 2].

Изучение основных закономерностей процессов полимеризации с участием макромономеров на основе ФАВ открывает новые возможности для их дальнейшего использования в биоорганической и препаративной биохимии.

В работе [3] была описана реакция модификации гепарина, приводящая к получению его производного, способного к полимеризации, однако химическая структура этого продукта строго доказана не была.

Цель настоящей работы — синтез, изучение структуры и физико-химическая характеристика макромономера на основе природного антикоагулянта крови гепарина и изучение основных закономерностей радикальной полимеризации с его участием.

Использованы коммерческие препараты мукозного и легочного гепаринов с удельными антикоагуляционными активностями 175 и 140 ЕД/мг соответственно.

N-десульфатирование гепарина проводили согласно работе [4]. Навеску гепарина растворяли в дистиллированной воде (1 : 50), с помощью 1 н. HCl доводили pH раствора до 1,3, выдерживали в термостате при 60°. После гидролиза раствор нейтрализовали 1 н. NaOH до pH 6,0, затем добавляли 2,5 мл 2,5 м. ацетатного буферного раствора (pH 6,0). Гидролизованный продукт осаждали трехкратным избытком этилового спирта, осадок отделяли центрифугированием, обрабатывали этанолом, эфиром и сушили при 40° в течение 2 ч. Полученный N-десульфатированный гепарин использовали в дальнейшем для синтеза макромономера. Подробности синтеза макромономера гепарина будут опубликованы отдельно.

Гомо- и сополимеризацию макромономера гепарина проводили в водно-солевых растворах в атмосфере аргона при инициировании окислительно-восстановительной системой персульфат аммония – N,N,N′,N′-тетраметилэтилендиамин. Продукты реакции обессоливали на колонке с сефадексом G-25, добавляли ацетатный буфер и осаждали по указанной выше методике.

Электрофорез образцов гепарина и его производных проводили в ПАА-геле по методу Лэмли [5] на приборе GE-4 II «Фармация» (Швеция). Продукты проявляли 1%-ным раствором азура III в 7%-ной уксусной кислоте.

ММ образцов полигепарина определяли методом светорассеяния на приборе «Малверн» (Англия) с многобитовым 64-канальным коррелятором К-7025, а также на аналитической ультрацентрифуге 3180 фирмы МОМ (Венгрия) с использованием полуавтоматической системы обработки седиментационных данных на ЭВМ «Аспект-2000» [6].

Спектры ЯМР ^{13}C растворов исследуемых образцов в D_2O регистрировали на спектрометрах WP-80DS и WM-250 фирмы «Брукер» (ФРГ) с рабочими частотами

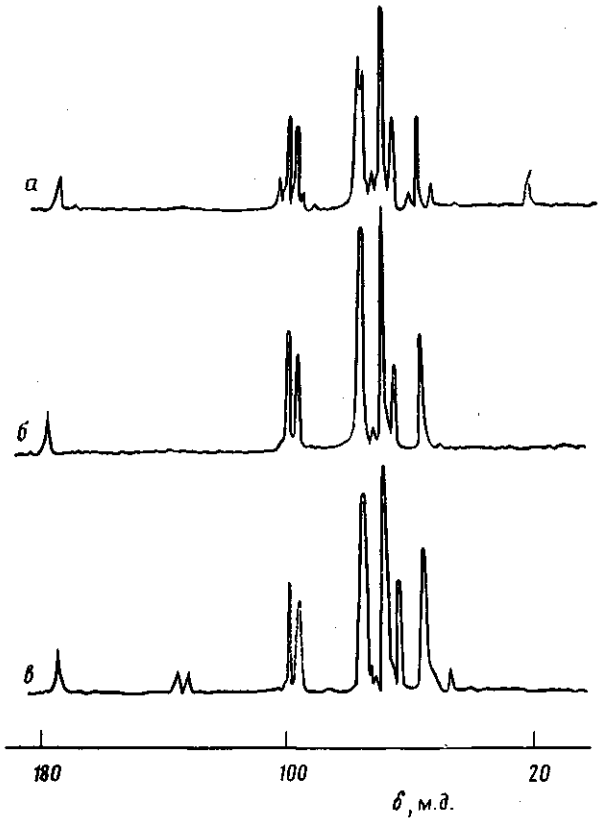


Рис. 1. Спектры ЯМР ^{13}C (20,115 МГц) растворов гепарина в D_2O с полным подавлением протонов: *а* – нативный мукозный гепарин, *б* – нативный легочный гепарин, *в* – макромономер легочного гепарина

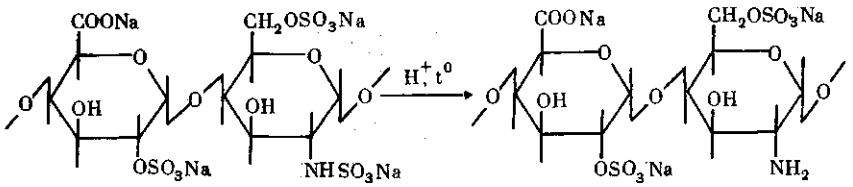
20,115 и 62,895 МГц. Условия регистрации спектров в режиме полного подавления спин-спинового взаимодействия с протонами: объем памяти на накопление спектра 4 К, на воспроизведение 2 К, машинное разрешение 1,8 Гц, длительность импульса 7 мкс (90°), интервал между импульсами 0,546 с, температура 70°, количество накоплений $(1,0-1,3)\cdot 10^5$. Хим. сдвиги отсчитывали от сигнала внешнего стандарта (ДМСО) и пересчитывали в δ-шкалу по формуле $\delta_{ТМС}=\delta_{ДМСО}+40,5$.

ММР сополимеров анализировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии в режиме гель-фильтрации в 0,02 м. фосфатном буфере (pH 8,0) на колонках 4000+5000 PW «Тоэсода» (Япония). Скорость элюирования 0,9 мл/мин, детектирование элюата осуществляли с помощью рефрактометрического детектора и детектора малоуглового лазерного светорассеяния КМХ-6 «Хроматикс» (США).

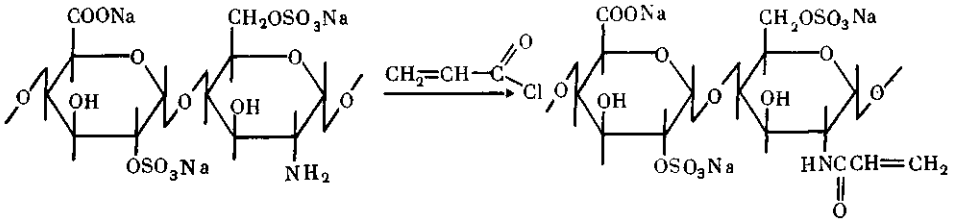
Число двойных связей в молекуле модифицированного гепарина определяли путем титрования их водным раствором брома в присутствии бромида калия [7].

На рис. 1, *а* и *б* представлены ЯМР ^{13}C спектры растворов образцов гепарина из мукозы свиней и легких крупного рогатого скота в D_2O. Различия спектров обусловлены присутствием в составе мукозного гепарина небольшого числа N-ацетильных групп, которые в ряде случаев препятствуют строгому доказательству химического строения аминопроизводных гепарина. Поэтому строение макромономера гепарина и его полимерных производных изучали в основном на примере гепарина из легких крупного рогатого скота. В спектре легочного гепарина отсутствует сигнал при 55,1 м.д., обусловленный резонансом ядер углерода С-2 остатка 2-дезокси-2-амино-α-*D*-глюкопиранозил-6-сульфата [4, 8], что свидетельствует о практически 100%-ном сульфатировании всех аминогрупп в молекуле нативного гепарина. В ЯМР ^{13}C спектре мукозного гепарина также не обнаружено сигнала ядер углерода С-2 со свободными аминогруппами. Поэтому непосредственное введение связи С=С в молекулу гепарина (независимо от его видовой принадлежности) неосуществимо.

Ранее в работе [4] было показано, что кислотный гидролиз гепарина при повышенных температурах приводит к частичному N-десульфатированию остатков 2-дезокси-2-сульфамино-α-*D*-глюкопиранозил-6-сульфата



Глубина протекания этой реакции определяется pH среды, температурой и временем гидролиза. При глубоких степенях превращения наряду с N-десульфатированием гепарина при кислотном гидролизе происходит и частичное O-десульфатирование, хотя скорость этой реакции существенно ниже [4]. После кислотного гидролиза гепарина становится возможным ацилирование свободных аминогрупп остатков 2-дезокси-2-амино-α-*D*-глюкопиранозил-6-сульфата хлорангидридом акриловой кислоты (ХАК).



В ЯМР ^{13}C спектрах ацилированных образцов легочного и мукозного гепаринов проявляются сравнительно широкие сигналы при 131,8 и 128,7 м.д., а также слабый сигнал при 170,2 м.д. Путем анализа спектров ЯМР ^{13}C модельного соединения

$$(CH_3)_3CNHC(=O)-CH=CH_2$$

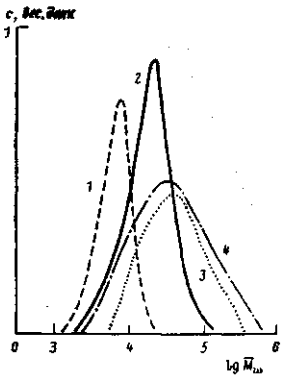
(режимы съемки «broad band» и «gated decoupling») и литературных данных [9] указанные сигналы следует отнести к резонансу ядер углерода групп $-CH=$, $CH_2=$ и $-C(O)-CH=$ соответственно. Наличие указанных групп в составе полисахарида свидетельствует о протекании реакции ацилирования (рис. 1, *в*).

Имеет место корреляция числа вводимых в гепарин двойных связей с временем кислотного гидролиза при pH 1,3 и 60°. При увеличении времени десульфатирования (т. е. с ростом количества свободных аминогрупп в молекуле гепарина) число вводимых связей C=C также увеличивается.

Из сравнения кривых ММР (рис. 2) и электрофореграмм (рис. 3) исходного гепарина и его макромономера следует, что в процессе синтеза макромономера гепарина основная цепь не претерпевает химических превращений.

Методом ЯМР ^{13}C исследовано строение продукта гомополимеризации макромономера гепарина (рис. 4). Наблюдается исчезновение сигналов, характерных для связи C=C, что свидетельствует об их участии в реакции. Появление группы слабых сигналов в интервале 32—45 м.д., вероятно, обусловлено резонансом ядер углерода образовавшейся алифатической цепи.

Основные закономерности радикальной гомополимеризации макромономера гепарина были изучены с использованием образца предварительно десульфатированного и ацилированного гепарина, содержащего в среднем 1,3—1,5 связей C=C на молекулу (расчет производили на $\overline{M}_n$). Гомопо-



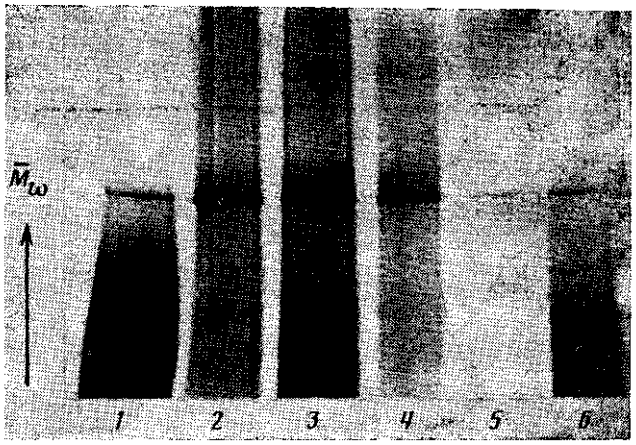


Рис. 2 Рис. 3

Рис. 2. Кривые ММР нативного гепарина и его макромономера (*1*); полигепарина, полученного при концентрации инициатора 0,08 (*2*); 0,3 (*3*) и 0,6% (*4*)

Рис. 3. Электрофореграммы образцов нативного гепарина (*1*); полигепарина с $\overline{M}_w = 8 \cdot 10^4$ (*2*); $2{,}9 \cdot 10^4$ (*3*) и $1{,}6 \cdot 10^4$ (*4*); сополимера гепарин – акриламид (*5*) и макромономера гепарина (*6*)

лимеризация макромономера гепарина (независимо от видовой принадлежности) сопровождается ростом ММ. Доказательством этого служат приведенные на рис. 2 кривые ММР (степень полимеризации 10 и более) и на рис. 3 – электрофореграммы образцов полигепарина. Методом светорассеяния была получена зависимость $\overline{M}_w$ продуктов гомополимеризации макромономера от концентрации инициатора (рис. 5). Детальный механизм этой реакции нуждается в специальном исследовании с учетом передачи цепи и рекомбинационных процессов. Как следует из кривых ММР образцов полигепарина, полученных при различных соотношениях мономер : инициатор (рис. 2), данных таблицы и рис. 5, экстремальный характер этой зависимости можно объяснить следующим образом. На первом участке кривой образуются в основном только ди- и тримеры.

Возрастание ММ продуктов реакции при увеличении концентрации инициатора (второй участок кривой), по-видимому, связано с укрупнением гепарина вследствие вступления в реакцию непрореагировавших ранее двойных связей C=C и активной передачи цепи. При больших концентрациях инициатора вновь образуются продукты с низкой степенью полимеризации, вероятно, вследствие большей вероятности гибели макрорадикалов гепарина на радикалах инициатора.

Зависимость молекулярной массы и ММР образцов полигепарина от концентрации инициатора

Образец	Концентрация инициатора, вес.%	$\overline{M}_w \cdot 10^{-3}$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	$\overline{M}_z/\overline{M}_n$
Нативный (мукозный)	–	8,8	1,2	1,8
Полигепарин	0,08	35,0	2,0	6,0
	0,3	81,0	2,4	7,6
	0,6	54,0	4,1	12,8
Полигепарин (легочный) *	0,07	20,0	–	–

* Определено аналитическим ультрацентрифугированием.

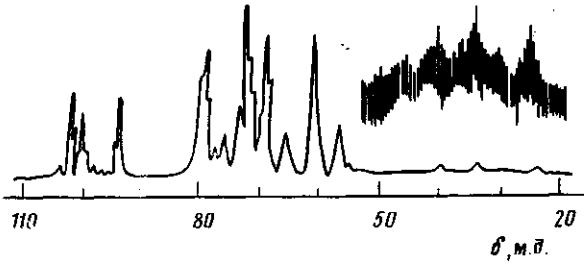


Рис. 4. Спектр ЯМР ^{13}C (62,859 МГц) раствора политепарина в D_2O с полным подавлением протонов

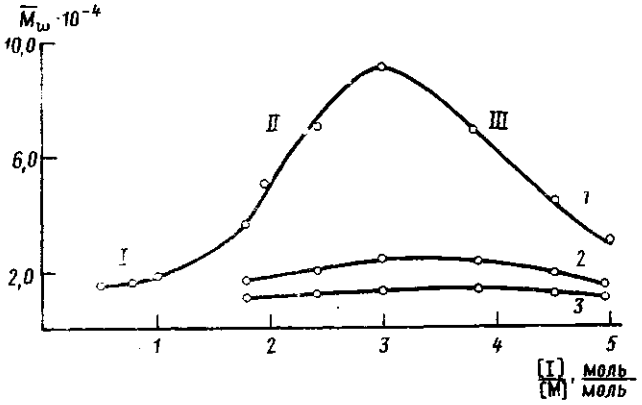


Рис. 5. Зависимость $\overline{M}_w$ полигепарина от концентрации инициатора. Концентрация NaCl 0,35 (*1*); 0,2 (*2*) и 0,1 моль/л (*3*)

Известно, что в водных растворах гепарин ведет себя как типичный анионный полиэлектролит. Представленные на рис. 5 зависимости характеризуют влияние ионной силы раствора на реакционную способность введенной в гепарин связи С=С. При низких ионных силах реакционной смеси реакции макромономера гепарина практически не идут, что, по всей видимости, обусловлено взаимным отталкиванием одноименно заряженных молекул гепарина. С ростом ионной силы реакционной смеси происходит экранирование отрицательных зарядов, что приводит к увеличению проницаемости клубков и доступности связей С=С для полимеризации. Подобный эффект наблюдали и при полимеризации низкомолекулярных ионизующихся мономеров [10].

Макромономер гепарина легко вступает в реакцию радикальной сополимеризации с гидрофильными мономерами, в частности с акриламидом, при различных соотношениях мономеров и различных ионных силах реакционной смеси с образованием высокомолекулярных (рис. 3) сополимеров по аналогии с макромономерами на основе альбумина и трипсина [11, 12].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Платэ Н. А., Валуев Л. И., Чупов В. В.* // Высокомолек. соед. А. 1985. Т. 27. № 10. С. 2019.
2. *Платэ Н. А., Валуев Л. И., Чупов В. В.* // Высокомолек. соед. А. 1980. Т. 22. № 9. С. 1963.
3. *Платэ Н. А., Валуев Л. И., Гумирова Ф. Х.* // Докл. АН СССР. 1979. Т. 244. № 6. С. 1505.
4. *Свергун В. И., Смирнов М. Б., Бушин А. П., Требоганов А. Д., Кожевникова И. В., Панов В. П.* // Хим. фарм. журн. 1979. Т. 13. № 3. С. 59.
5. *Laemmli U. K.* // Nature. 1970. V. 227. P. 680.
6. *Дубровин В. И., Лавут Е. Э., Панов В. П.* // Хим.-фармацевт. журн. 1984. № 11. С. 1382.
7. Organic Analysis. V. III. N. Y., 1956.

8. *Сверзун В. И., Смирнов М. Б., Панов В. П.* // Хим.-фармацевт. журн. 1979. Т. 13. № 4. С. 92.
9. *Леви Т., Нельсон Г.* // Руководство по ядерно-магнитному резонансу углерода-13. М., 1975.
10. *Топчиев Д. А., Кабанов В. А.* // Полимеризация ионизующихся мономеров. М., 1975.
11. *Платэ Н. А., Постников В. А., Лукин Н. Ю., Эйсмонт М. Ю., Грудкова Г.* // Высокомолек. соед. А. 1982. Т. 24. № 11. С. 2326.
12. *Платэ Н. А., Малых А. В., Ужинова Л. Д., Можаев В. В.* // Высокомолек. соед. А. 1989. Т. 31. № 1.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
11.II.1988

STRUCTURE OF HEPARIN MACROMONOMER AND FEATURES OF ITS RADICAL POLYMERIZATION

Platé N. A., Malykh A. V., Uzhinova L. D., Panov V. P., Rozenfel'd M. A.

Summary

Heparin macromonomer has been synthesized, its structure and reactivity in radical polymerization have been studied. The influence of the initiator concentration and ionic strength of a solution on MM and MMD of homopolymers was evaluated. The possibility of radical copolymerization of the heparin macromonomer with acrylamide was shown.