

Том 429, Номер 2

ISSN 0869-5652  
Ноябрь 2009



# ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК

<http://www.naukaran.ru>  
<http://www.maik.ru>



“НАУКА”

## НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИГАЛАКТУРОНАТА С ИОНАМИ $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$

© 2009 г. С. Т. Минзанова, В. Ф. Миронов, А. Б. Выштакалюк, О. В. Цапаева,  
А. З. Миндубаев, Л. Г. Миронова, В. В. Зобов, О. А. Ленина,  
А. В. Ланцова, академик А. И. Коновалов

Поступило 14.07.2009 г.

Пектиновые полисахариды – уникальные биологически активные продукты с широким спектром действия [1, 2]. Благодаря наличию свободных карбоксильных групп в мономерных фрагментах основной цепи полимера пектиновые полисахариды образуют с металлами стойкие малодиссоциирующие соединения – хелаты, которые не всасываются при прохождении через желудочно-кишечный тракт. Данное свойство пектинов широко используется для выведения тяжелых металлов и радионуклидов из организма человека [3–6]. Взаимодействие пектинов с  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  и другими катионами происходит также и в растениях [1]. Интерес к комплексам металлов с природными углеводами, в том числе и с пектиновыми полисахаридами, в значительной степени связан с возможностью создания новых эффективных лекарственных препаратов на их основе. Установлено, что комплексообразование пектинов повышает терапевтическую активность лигандов и усвояемость лекарственных препаратов, снижает их токсичность и приводит к проявлению иммуностимулирующей активности [7, 8].

Важное значение при использовании металлокомплексов полисахаридов в медицине имеет их хорошая растворимость в воде. Возможность синтеза растворимых комплексов пектиновых полисахаридов с микро- и макроэлементами в литературе [9] показана лишь на основе тетрапектовой кислоты, выделенной при гидролизе пектинов. Ранее нами были получены водорастворимые комплексы пектиновых полисахаридов с катионами *d*-металлов –  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ . Эти вещества проявляли выраженное противоанемическое действие и обладали хорошей био-

логической доступностью микроэлементов [10, 11], в то же время они имели низкую токсичность [12]. Пектиновые полисахариды в данных веществах выступают в качестве полимерной биологически активной матрицы для ионов макро- и микроэлементов, выполняющих важнейшие функции в организме.

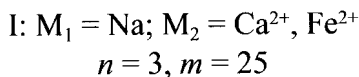
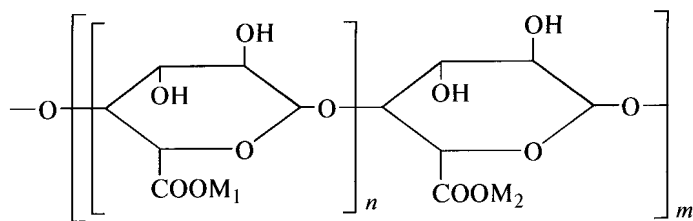
Целями настоящих исследований являются разработка метода синтеза и изучение закономерностей комплексообразования пектиновых биополимеров с *s*- и *d*-металлами –  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$ .

Железо является одним из основных микроэлементов, дефицит которого чаще всего испытывают люди в развитых странах мира; на сегодняшний день проблема анемий остается очень серьезной [13]. Кальций – важнейший элемент для человека и животных, потому что он обеспечивает опорную функцию костей. В виде катионов  $\text{Ca}^{2+}$  входит в состав плазмы крови и тканевых жидкостей, участвуя в поддержании гомеостаза (ионное равновесие, осмотическое давление в жидкостях организма), а также в регуляции сердечных сокращений и свертываемости крови [14], поэтому разработка синтеза растворимых органических соединений кальция, представляющих собой его биодоступную форму, имеет большое практическое значение.

В данной работе нами синтезированы новые водорастворимые комплексы пектиновых полисахаридов, содержащие макроэлементы – Na, Ca и микроэлемент Fe (I). Представленные результаты получены при использовании цитрусового пектина марки “Classic C-401” производства фирмы “Herbstreith & Fox” (Германия).

При разработке способа синтеза водорастворимых форм кальций- и железосодержащих металлокомплексов формулы I учитывали следующие факторы.

*Институт органической и физической химии  
им. А.Е. Арбузова  
Казанского научного центра  
Российской Академии наук  
Казанский государственный университет*



Во-первых, известно, что комплексообразующие свойства пектиновых веществ зависят от содержания свободных карбоксильных групп, т.е. от степени этерификации основной цепи пектинов [10]. Степень этерификации определяет линейную плотность заряда макромолекулы и, следовательно, силу связывания катионов с ней. При высокой степени этерификации свободные карбоксильные группы или карбокси-анионы удалены друг от друга. При уменьшении степени этерификации они сближаются, происходят увеличение заряда макромолекулы и соответственно возрастание силы связывания пектинов с катионами. На основании таких литературных данных [7, 15] для синтеза наиболее прочных комплексов нами в качестве исходного лиганда была использована натриевая соль деэтерифицированного пектина — пектат натрия со степенью солеобразования 100%. Данную соль получали обработкой пектина щелочью при титриметрическом переходе pH из слабокислой в слабощелочную область. Наряду с контролем за pH при разработке способа синтеза этой соли параллельно контролировали состояние карбоксильных групп методом ИК-спектроскопии в области валентных колебаний группы  $COO^-$ . В ИК-спектрах комплексы имели характерные полосы поглощения карбокси-аниона в области  $1600-1800\text{ см}^{-1}$ . Такой подход позволил нам получить натриевую соль пектовой кислоты с точно известным содержанием ионов натрия в полимере и провести аналитические количественные расчеты для синтеза металлокомплексов пектовой кислоты с фиксированной степенью замещения иона натрия на катионы *s*- и *d*-металлов. Далее, для получения соединений общей формулы I к раствору пектата натрия добавляли растворы солей кальция и/или двухвалентного железа и через 20 мин осаждали целевой комплекс этанолом, центрифугировали и сушили при  $40-50^\circ\text{C}$ . При этом комплексы пектиновых полисахаридов с ионами  $Ca^{2+}$  и  $Fe^{2+}$  получали по реакции лигандного обмена ионов  $Na^+$  на соответствующие *s*- и *d*-металлы.

Вторым важным фактором, который учитывали при разработке способа получения металлокомплексов пектиновых полисахаридов с *s*- и *d*-металлами, была растворимость. Известные комплек-

сы пектинов с ионами  $Ca^{2+}$  на сегодняшний день нерастворимы в воде и выделяются из растворов в виде гелей. Это связано с координацией металлов различными цепями, которая определяет образование двойных и даже тройных цепочечных структур, т.е. со сшиванием параллельных макромолекул пектина металлом в трехмерном пространстве [15]. Такой межмолекулярный механизм комплексообразования для полисахаридных полимеров за счет образования гидрофильной полости между мономерными звеньями соседних цепей постулируется для металлокомплексов всех известных анионных полисахаридов, в том числе и пектинов, при координации их с *s*-, *p*- и *d*-металлами [7]. Первоначально для образования растворимых в воде металлокомплексов пектовой кислоты были определены пороговые концентрации между образованием растворимых и нерастворимых форм комплексов. Эксперименты планировали таким образом, чтобы создать достаточно разреженную трехмерную структуру комплексов с относительно невысокой степенью замещения ионов натрия на *s*- и *d*-металлы при сохранении большей части ионов натрия в солевой форме в составе полимерного комплекса для обеспечения его водорастворимых свойств (в пределах 1–40% двухвалентного металла относительно исходного содержания одновалентного натрия). Установлено, что образование водорастворимых форм металлокомплексов преимущественно наблюдается при замещении 1–25% ионов натрия в исходном пектате натрия *s*- и *d*-металлами.

Для определения оптимальных концентраций солей металлов, при которых происходит селективное образование водорастворимых комплексов, нами использован графический подход. Область концентраций солей железа (рис. 1), в которой происходит избирательное образование водорастворимых комплексов без побочного образования нерастворимых форм, находится в пределах  $0.009-0.02\text{ г-экв/л}$ .

Как можно видеть из рис. 2, для ионов  $Ca^{2+}$  имеется область концентраций меньше  $0.01\text{ г-экв/л}$ , в которой наблюдается образование растворимых комплексов.

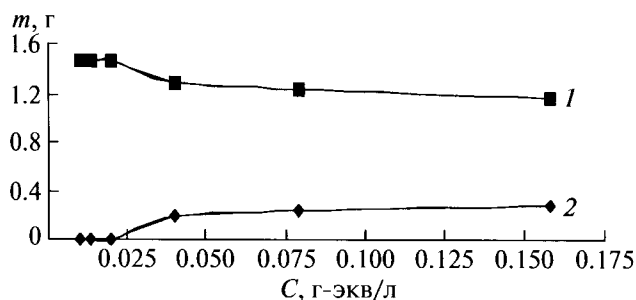


Рис. 1. Зависимость массы выделенных водорастворимых и нерастворимых комплексов из системы пектат натрия – FeSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O от концентрации соли металла. Комплекс: растворимый (1), нерастворимый (2).

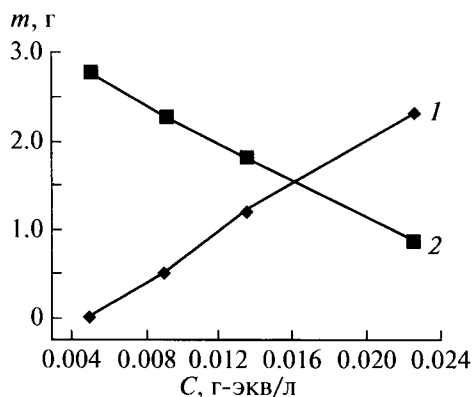


Рис. 2. Зависимость массы выделенных водорастворимых и нерастворимых комплексов из системы пектат натрия – CaCl<sub>2</sub> от концентрации соли металла. Комплекс: растворимый (1), нерастворимый (2).

Выделены и охарактеризованы целевые продукты:

1) Na-, Ca-, Fe-полигалактуронат выделен в твердом виде и представляет собой порошок желтовато-коричневого цвета, без запаха и вкуса. Растворим в воде при 50–60°C с образованием растворов концентрации до 1.5%, оптически активен:  $[\alpha]_D^{20} = +327.27^\circ$  (C 0.15; H<sub>2</sub>O). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 954 пл.(CH), 1015, 1101 (C–O, C–C), 1149 ср. (C–C–C), 1334 сл. (C–O–O), 1633 (C=O);

2) Na-, Ca-полигалактуронат – порошок белого цвета, без запаха и вкуса, растворим в воде при 50–60°C с образованием растворов концентрации до 1.5%, оптически активен:  $[\alpha]_D^{20} = +307.25^\circ$  (C 0.15; H<sub>2</sub>O). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 954 пл.(CH), 1015, 1101 (C–O, C–C), 1149 ср. (C–C–C), 1333 сл. (C–O–O), 1634 (C=O);

3) Na-, Fe-полигалактуронат – порошок светло-коричневого цвета, без запаха и вкуса. Растворим в воде при 50–60°C, оптически активен:  $[\alpha]_D^{20} = +237.5^\circ$  (C 0.46; H<sub>2</sub>O). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 955 пл., 958 сл. (CH), 1016, 1102 (C–O, C–C), 1145 ср. (C–C–C), 1328 сл. (C–O–O), 1636 (C=O).

Содержание металлов в целевых продуктах определяли атомно-адсорбционным методом, содержание Fe<sup>2+</sup> дополнительно определяли фенантролиновым методом.

Биологическая активность полученных в настоящей работе Na-, Ca-; Na-, Fe- и Na-, Ca-, Fe-полигалактуронатов была исследована на лабораторных животных. Показано, что при внутрибрюшинном введении смертельная доза этих препаратов (LD<sub>50</sub>) превышает 1000 мг/кг. При пероральном введении препараты не вызывают гибели животных при дозе 12 500 мг/кг [10–12]. Найдено, что Na-, Fe-полигалактуронат [10] и Na-, Ca-, Fe-полигалактуронат не оказывают раздражающего и кожно-резорбтивного действия при их нанесении на выстриженный участок ко-

жи крыс или внесении в конъюнктивный мешок глаза кролика. Показано, что Na-, Ca-, Fe-полигалактуронат при одно- и четырехкратном пероральном введении в дозе 600 мг/кг не оказывает раздражающего действия на слизистую желудка, т.е. не проявляет ulcerогенного действия. Полученные результаты позволяют исследованные в настоящей работе целевые продукты (Na-, Ca-; Na-, Fe- и Na-, Ca-, Fe-полигалактуронаты) отнести к классу малотоксичных соединений.

При потреблении полученных Na-, Ca- и Na-, Ca-, Fe-полигалактуронатов растущим молодым крысам в дозе 1250 мг/кг в течение 2.5 мес эти препараты не проявляли токсических эффектов, падеж молодняка не возрастал и динамика роста по сравнению с контрольной группой животных не нарушалась.

При исследовании гематологических показателей для Na-, Fe- и Na-, Ca-, Fe-полигалактуронатов было выявлено гемопоэзстимулирующее действие веществ, проявляющееся в увеличении концентрации гемоглобина более чем на 10% ( $p < 0.01$ ). Было проведено сравнение эффективности Na-, Ca-, Fe-полигалактуроната с современными противоанемическими препаратами “Актиферрин” и “Сорбифер-Дурулес”. Крысам, подвергнутым кровопотере, в виде болюсов скармливали твердый Na-, Ca-, Fe-полигалактуронат в дозе 126 мг/кг (содержание железа 1.3 мг). Аналогичные контрольные группы животных получали в виде болюсов препараты “Актиферрин” и “Сорбифер-Дурулес” в дозах, содержащих эквивалентное количество железа. Было показано, что Na-, Ca-, Fe-полигалактуронат проявляет ту же эффективность, действуя на восстановление концентрации гемоглобина у крыс после кровопотери, что и указанные препараты (рис. 3).

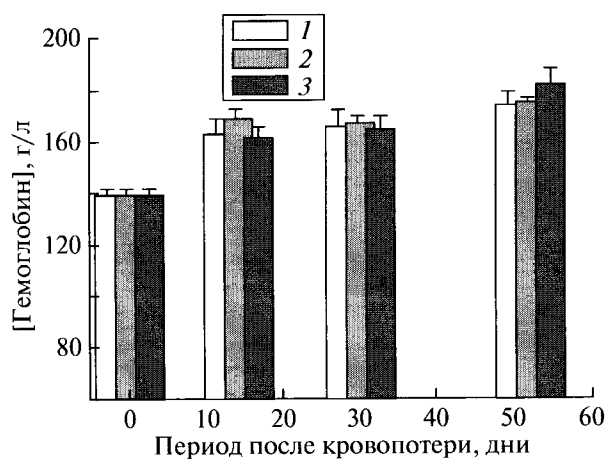


Рис. 3. Динамика восстановления концентрации гемоглобина после кровопотери у крыс, получавших Na-, Ca-, Fe-полигалактуронат (1), в сравнении с таковой у аналогичных групп животных, получавших лекарственные противоанемические препараты “Актиферрин” (2) и “Сорбифер-Дурулес” (3).

В тесте “бег на третбане”, проведенном на тренированных лабораторных мышках, в группах, получавших Na-, Ca-, Fe-полигалактуронат в дозах 360 и 480 мг/кг, все животные выдерживали тестовую нагрузку. Это свидетельствует о том, что вещество не оказывает побочных эффектов на физическую работоспособность, являющуюся интегральным показателем общего функционального состояния животных.

Таким образом, разработан способ получения малотоксичных водорастворимых комплексов пектина с кальцием и железом, содержащих ионы металлов в биодоступной форме.

Работа поддержана программой № 5 ОХНМ РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Комиссаренко С.Н., Спиридонов В.Н. // Раст. ресурсы. 1998. Т. 34. В. 1. С. 111–119.
2. Донченко Л.В., Фирсов Г.Г. Пектин: основные свойства, производство и применение. М.: ДеЛи, 2007. 276 с.
3. Seymour G.B., Knox J.P. Pectins and their Manipulation. L.: CRC Press, 2002. 250 p.
4. Лазарева Е.Б., Меньшиков Д.Д. // Антибиотики и химиотерапия. 1999. Т. 44. № 2. С. 37–40.
5. Крисс Е.Е., Волченкова И.И., Бударин Л.И. // Координац. химия. 1990. Т. 6. В. 1. С. 11–21.
6. Ашубаева З.Д. Химические реакции пектиновых веществ. Фрунзе, 1984. 186 с.
7. Алексеев Ю.Е., Гарновский А.Д., Жданов Ю.А. // Успехи химии. 1998. Т. 67. С.723–744.
8. Jianlong Wang, Can Chen // Biotechnol. Adv. 2009. V. 27. № 2. P. 195–226.
9. Deulofeu J.B. Process for the Preparation in a Water-soluble and Atoxic Form of Inorganic Compounds of Heavy Metals. Pat. № GB475182. 1937.
10. Миронов В.Ф., Коновалов А.И., Карасева А.Н. и др. Способ получения би- и полиметаллических комплексов полигалактуроновой кислоты. Пат. № 2220981 // Бюл. изобр. 2004. № 1.
11. Выштакалюк А.Б., Карасева А.Н., Карлин В.В. и др. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2007. Т. 143. № 1. С. 46–48.
12. Выштакалюк А.Б., Карасева А.Н., Карлин В.В. и др. // Токсикол. вестн. 2006. № 6. С. 10–15.
13. Haram K., Nilsen S.T., Ulvik R.J. // Acta obstetrica et gynecolog. scand. 2001. V. 80. P. 683–688.
14. Скальный А.В., Рудаков И.А. Биэлементы в медицине. М.: Оникс 21 век; Мир, 2004. С. 48–100.
15. Yapeng Fang, Saphwan Al-Assaf, Glyn O. Phillips // J. Phys. Chem. 2007. V. 111. № 10. P. 2456–2462.