

УДК 54.05

Synthesis of Sulfated Arabinogalactan Derivatives with Histidine and Arginine

**Natalia Yu. Vasilyeva^{a,b},
Alexander V. Levdansky^a, Alexander S. Kazachenko^a,
Galina P. Skvortsova^a, Boris N. Kuznetsov^{*a,b},
Laurent Djakovitch^c and Catherine Pinel^c**

*^aInstitute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS
FRC “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”
50/24 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

*^bSiberian Federal University
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

*^cIRCELYON
2 Albert Einstein av., F-69626 Villeurbanne Cedex, Lyon, France*

Received 09.06.2016, received in revised form 10.07.2016, accepted 21.08.2016

For the first time the water-soluble derivatives of sulfated arabinogalactan with amino acids histidine and arginine were prepared by ion exchange method. The obtained products were studied by elemental analysis and FTIR spectroscopy. From the analysis of FTIR spectra it is concluded that the resulting compounds contain the negatively charged sulfated arabinogalactan as an anion and the protonated forms of histidine and arginine – as a cations. Drugs on the basis of sulfated arabinogalactans with fixed amino acids have prospects for use in medicine.

Keywords: sulfated arabinogalactan, histidine, arginine, ion exchange, fixed amino acids, composition.

DOI: 10.17516/1998-2836-2016-9-3-318-325.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: inm@icct.ru

Синтез производных сульфатированного арабиногалактана с гистидином и аргинином

Н.Ю. Васильева^{а,б}, А.В. Левданский^а,

А.С. Казаченко^а, Г.П. Скворцова^а,

Б.Н. Кузнецов^{а,б}, Л. Дьякович^в, К. Пинель^в

^аИнститут химии и химической технологии СО РАН

ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/24

^бСибирский федеральный университет

Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

^вIRCELYON

2 Albert Einstein av., F-69626 Villeurbanne Cedex, Lyon, France

Впервые методом ионного обмена получены водорастворимые производные сульфатированного арабиногалактана (АГ) с основными аминокислотами: гистидином и аргинином. Методами элементного анализа и ИК-спектроскопии охарактеризованы продукты взаимодействия сульфатированного арабиногалактана с этими аминокислотами. После анализа ИК-спектров сделан вывод о том, что в полученных соединениях в качестве аниона выступает отрицательно заряженный сульфат арабиногалактана, а в качестве катиона – протонированная форма гистидина и аргинина. Препараты на основе сульфатированного арабиногалактана с фиксированными аминокислотами гистидином и аргинином имеют перспективы использования в медицине.

Ключевые слова: сульфатированный арабиногалактан, гистидин, аргинин, ионный обмен, фиксированные аминокислоты, состав.

Введение

Производные аминокислот, благодаря своему исключительно широкому спектру действия, входят в состав разнообразных лекарственных препаратов [1]. Они могут использоваться как самостоятельные лекарственные препараты, так и в составе комплексов различных биологически активных веществ [2, 3].

Производные аминокислот с полисахаридами представляют большой интерес для медицины, поскольку введение аминокислоты в структуру полисахарида открывает новые возможности для варьирования их липофильно-гидрофильных свойств, избирательности и продолжительности действия [4–6].

В литературе имеются сведения о том, что молекулярные комплексы гепарина с аминокислотами, образующиеся при участии кислых групп гепарина и аминогрупп аминокислот, обладают мощным антикоагулянтным эффектом, а также являются антиагрегантами и фибринолитиками [7-9].

Сульфатированный арабиногалактан обладает антикоагулянтной и гипополидемической активностью, он потенциальный гепариноид, а также самостоятельный антимикробный агент [10, 11]. Сульфатированный АГ, содержащий кислые сульфогруппы, как и гепарин, может взаимодействовать с аминокислотами с образованием комплексных соединений. Ранее авторами были получены глицин- и орнитинпроизводные сульфатированного арабиногалактана с использованием метода ионного обмена [12]. Синтезированные производные сульфатированного АГ с аминокислотами охарактеризованы качественными реакциями на соответствующие аминокислоты, данными элементного анализа и ИК-спектроскопией.

Гистидин – гетероциклическая альфа аминокислота, одна из 20 протеиногенных аминокислот, незаменимая кислота [13]. Остаток гистидина входит в состав активных центров множества ферментов. Гистидин – предшественник в биосинтезе гистамина, способствует росту и восстановлению тканей. В большом количестве он содержится в гемоглобине и используется при лечении ревматоидных артритов, язв и анемии [14]. Аналогично аргинину и лизину, он основная аминокислота. Тем не менее боковая цепь гистидина позволяет ему отдавать и принимать протоны, проявляя основные и кислотные свойства [15].

Аминокислота аргинин – один из ключевых метаболитов в процессах азотистого обмена [16]. Аргинин содержится в рецептуре гепатопротекторов, иммуномодуляторов, кардиологических препаратов, лекарственных препаратов для ожоговых больных, больных ВИЧ/СПИД, а также в рецептурах средств для парентерального питания в послеоперационный период [17]. Аргинин входит в состав белков и, в частности, гистонов, регулирующих состояние ДНК, используется в орнитиновом цикле мочевины и при синтезе креатина [18].

Целью данного исследования являлась разработка способов синтеза производных сульфатированного арабиногалактана с аминокислотами гистидином и аргинином, основанных на использовании метода ионного обмена. Выбор этих аминокислот обусловлен их большим физиологическим значением и широким использованием в качестве терапевтических препаратов.

Экспериментальная часть

Как исходное сырье использовали арабиногалактан (АГ) древесины лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) производства ООО «Химия древесины» (Иркутск, Россия) под наименованием препарата «ФиброларС».

Получение сульфатов АГ осуществляли по методике [19] сульфатированием АГ сульфаминовой кислотой в диоксане с последующим выделением сульфата АГ в виде аммониевой соли (содержание серы 10,0-12,0 % мас.).

Аминокислотные производные сульфатированного АГ получали из его аммониевой соли методом ионного обмена с использованием ионообменной смолы КУ-2-8 по ранее описанной методике [12]. Ионный обмен проводили в динамическом режиме. Предварительно ионообменную смолу КУ-2-8, находящуюся в Na^+ -форме, переводили в H^+ -форму. Для этого через слой смолы КУ-2-8 в Na^+ -форме, помещенной в вертикальную стеклянную колонку диаметром 15–20 мм и вместимостью 50 мл, пропускали водный 2М раствор HCl до равных концентраций поступающего и вытекающего из бюретки раствора соляной кислоты. После промывания катионита дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод на нем сорбиру-

вали соответствующую аминокислоту. С этой целью пропускали 1М раствор аминокислоты через катионит, промывали его дистиллированной водой до полного отсутствия в промывной воде соответствующей аминокислоты. Затем проводили ионный обмен катиона аммония в аммониевой соли сульфатированного АГ на протонированную аминокислоту, сорбированную катионитом. Для этого через слой подготовленного катионита пропускали раствор очищенной путем диализа аммониевой соли сульфатированного АГ (2,0–2,5 г). После прохождения через колонку 25 мл раствора соли сульфатированного АГ смолу в колонке промывали дистиллированной водой (3 раза по 25 мл). После пропускания второго объема воды определяли наличие аминокислоты при помощи качественной реакции. Затем собирали промывные жидкости и упаривали их досуха под вакуумом водоструйного насоса на ротационном испарителе при температуре не более 50 °С. Полученный после высушивания в вакууме твердый остаток – аминокислотное производное сульфатированного АГ – анализировали на содержание серы и азота.

ИК-спектры сульфатированного АГ, аминокислот и продуктов модификации сульфатированного АГ аминокислотами снимали с использованием ИК-Фурье спектрометра Tensor-27 (Bruker, Германия) в области длин волн 400–4000 см⁻¹. Обработку спектральной информации проводили по программе OPUS (версия 5.0). Твердые образцы для анализа готовили в виде таблеток в матрице KBr (2 мг образца / 1000 мг KBr).

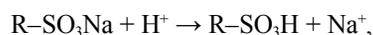
Содержание азота и серы в аммониевой соли сульфатированного АГ и его аминокислотных производных определяли на элементном анализаторе Flash EA-1112 (Thermo Quest Italia).

Количественное определение содержания аминокислот в полученных аминокислотных производных АГ в пересчете на содержание азота (% мас.) осуществляли фотокolorиметрическим методом с использованием нингидриновой реакции [20].

Результаты и обсуждение

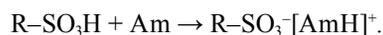
Процесс модификации сульфатированного АГ аминокислотами включал следующие стадии:

Вначале катионит КУ-2-8, выпускаемый в промышленности в Na-форме, переводили в H-форму:

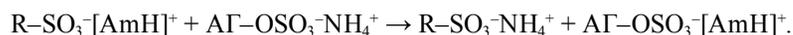


где R – матрица смолы КУ-2-8.

Затем проводили сорбцию аминокислот (Am) на H-форме катионита КУ-2-8:



На заключительной стадии осуществляли обмен катионов аммония в сульфатированном АГ на катион протонированной аминокислоты, сорбированной на катионите:



Ионный обмен проводили в динамическом режиме. Содержание серы в исходной аммониевой соли сульфатированного АГ составляло 10,1 % (мас.).

Введение аминокислот в структуру сульфатированного АГ было подтверждено нингидриновой реакцией, данными элементного анализа и ИК-спектроскопии.

Таблица 1. Результаты элементного анализа сульфатированного арабиногалактана, модифицированного аминокислотами

Аминокислота		Содержание элементов (% мас.)		Соотношение S:N, моль/моль	
Название	Брутто-формула	S	N	Расчитано	Получено
Гистидин	$C_6H_9N_3O_2$	6,9	9,1	1/3,0	1/2,9
Аргинин	$C_6H_{14}N_4O_2$	6,0	10,8	1/4,0	1/4,1

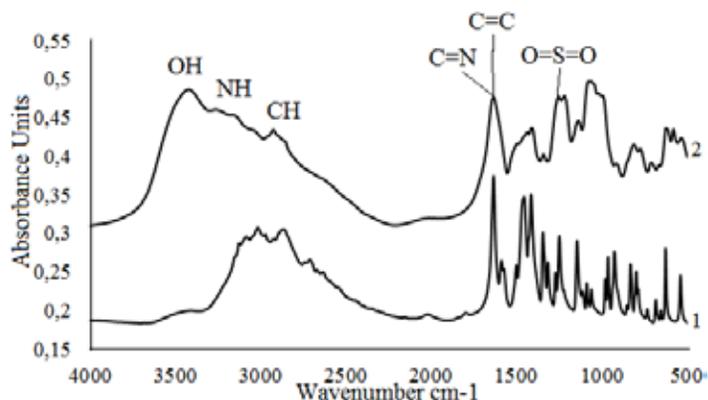


Рис. 1. ИК-спектр гистидина (1) и продукта его взаимодействия с сульфатированным арабиногалактаном (2)

Результаты элементного анализа на содержание серы и азота в продуктах модифицирования сульфатированного арабиногалактана аминокислотами представлены в табл. 1.

По данным элементного анализа мольное соотношение SO_3 -группа/аминокислота в полученных полимерах сульфатированного АГ близко к 1 (табл. 1).

В ИК-спектре гистидинового производного сульфата арабиногалактана – в отличие от спектра исходного гистидина – присутствует полоса поглощения высокой интенсивности при 1254 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям $O=S=O$ -группы (рис. 1).

Происходит также значительное изменение характера спектра в области $1677\text{--}1557\text{ см}^{-1}$, в которой присутствуют полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям $C=N$ -, $C=C$ -связей имидазольного цикла и ионизированной карбоксильной группы [21, 22]. Область спектра $3427\text{--}2920\text{ см}^{-1}$ соответствует валентным колебаниям $N-H$ -, $O-H$ - и CH -связей [21, 22].

Из анализа ИК-спектра полученного производного сульфата арабиногалактана с гистидином можно сделать вывод о том, что в его составе присутствует диссоциированная карбоксильная группа и протонированные аминогруппа и имидазольный цикл.

Таким образом, можно предположить, что гистидинсодержащее производное сульфатированного арабиногалактана представляет собой сложную структуру, в которой в качестве аниона выступает арабиногалактан-сульфат-ион, а в качестве катиона – протонированная форма гистидина. Причем протонированию подвергаются аминогруппа и имидазольный атом азота.

С учетом полученных данных предположена следующая структура гистидинсодержащего производного сульфатированного АГ:

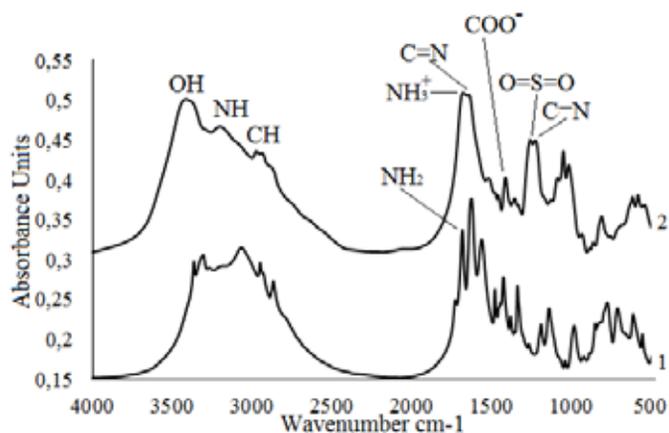
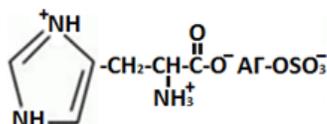
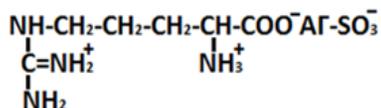


Рис. 2. ИК-спектр аргинина (1) и продукта его взаимодействия с сульфатированным арабиногалактаном (2)



В ИК-спектре аргининового производного сульфатированного арабиногалактана полосы поглощения, характерные для аргинина, смещены в сторону меньших частот в результате протонирования [23]. Отсутствует полоса поглощения 1720 см^{-1} , обусловленная валентными колебаниями свободной NH_2 -группы [23], и присутствует широкая полоса поглощения в области $1675\text{--}1637 \text{ см}^{-1}$, характерная для деформационных колебаний группы NH_3^+ и связи $\text{C}=\text{N}$. Полосы поглощения высокой интенсивности при 1220 см^{-1} соответствуют валентным колебаниям $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ -связи. Полосы поглощения в области $1512\text{--}1410 \text{ см}^{-1}$ соответствуют колебаниям связей COO^- и CH_2 . В области $3500\text{--}2800 \text{ см}^{-1}$ наблюдается усложнение ИК-спектра за счет наложения полос поглощения валентных колебаний NH -, OH - и CH -связей.

Из анализа полученных данных можно сделать вывод, что полученное аргининсодержащее производное сульфатированного АГ имеет следующую структуру:



В этом соединении в качестве аниона выступает арабиногалактан-сульфат-ион, а в качестве катиона – аргинин, протонированный по аминогруппе и гуанидиновой группе.

Заключение

Впервые получены гистидин- и аргининпроизводные сульфатированного АГ с использованием метода ионного обмена.

Факт образования производных сульфатированного АГ с этими аминокислотами подтвержден качественными реакциями на соответствующие аминокислоты, данными элементного анализа и ИК-спектроскопии.

Из анализа ИК-спектров производных сульфатированного АГ с гистидином и аргинином сделан вывод о том, что в полученных соединениях в качестве аниона выступает арабиногалактан-сульфат-ион, а в качестве катиона – протонированные формы гистидина и аргинина. Причем в производном гистидина протонированию подвергается аминогруппа и имидазольный атом азота, а в производном аргинина – аминогруппа и гуанидиновая группа.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Красноярского края в рамках научного проекта № 16-43-242083.

В работе использованы приборы Красноярского регионального центра коллективного пользования СО РАН.

Список литературы

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2012, 1216 с.
2. Rusciano, D., Roszkowska, A.M., Gagliano, C., Pezzino, S. Free amino acids: an innovative treatment for ocular surface disease. *European journal of pharmacology*. 2016. Vol. 787. P. 9-19
3. Reis R.L., Neves N.M., Mano J.F., Gomes M.E., Marques A.P., Azevedo H.S. Natural-Based Polymers for Biomedical Applications. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2008, 832 p.
4. Беляев Е.Ю. Новые медицинские материалы на основе модифицированных полисахаридов (Обзор). *Хим.-фарм. журн.* 2000. Т. 34(11), С. 36–41. [Belyaev E. Yu. New medical materials based on modified polysaccharide (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2000. Vol. 34(11), P. 607–612.].
5. Ehrenfreund-Kleinman T., Golenser J., Domb A.J. Conjugation of amino-containing drugs to polysaccharides by tosylation: amphotericin B–arabinogalactan conjugates. *Biomaterials*. 2004. Vol. 25(15), P. 3049–3057.
6. Maiti S., Ranjit S., Sa B. Polysaccharide-based graft copolymers in controlled drug delivery. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 2010. Vol. 2(2), P. 1350–1358.
7. Крылов В.Б., Устюжанина Н.Е., Нифантьев Н.Э. Синтез низкомолекулярных углеводных миметиков гепарина. *Биоорганическая химия*. 2011. Т. 37(6), С. 745–779. [Krylov V.B., Ustyuzhanina N.E., Nifantiev N.E. Synthesis of low-molecular-weight carbohydrate mimetics of heparin. *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2011. Vol. 37(6), P. 672–706.].
8. Grigorieva M.E., Obergan T.Y., Maystrenko E.S., Kalugina M.D. Anticoagulant Effects of Heparin Complexes with Prolyl-Glycine Peptide and Glycine and Proline Amino Acids *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016. Т. 161. № 1. С. 54-57.
9. Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Майстренко Е.С., Калугина М.Д. Сравнительные исследования антикоагулянтных соединений гепарина с аминокислотами – аланином, валином и глицином // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. – 2015. – № 11-3. – С. 412-415.
10. Медведева Е.Н., Бабкин В.А., Остроухова Л.А. Арабиногалактан лиственницы – свойства и перспективы использования (обзор). *Химия растительного сырья* 2003. (1), С. 27–37. [Medvedeva E.N., Babkin V.A., Ostroukhova L.A. Arabinogalactan from larch – properties and prospects. *Chemistry of plant raw materials* 2003. (1), P. 27–37. (in Russ.).]

11. Васильева Н.Ю., Левданский А.В., Карачаров А.А., Мазурова Е.В., Бондаренко Г.Н., Левданский В.А., Казаченко А.С., Кузнецов Б.Н. Изучение строения продуктов сульфатирования арабиногалактана из древесины лиственницы хлорсульфоновой кислотой в пиридине. *Журнал СВУ. Химия*. 2014. Т. 7(4), С. 547–555. [Vasilyeva N.Yu., Levdansky A.V., Karacharov A.A., Mazurova E.V., Bondarenko G.N., Levdansky V.A., Kazachenko A.S., Kuznetsov B.N. Study of structure of product's obtained by sulfation of arabinogalactan from larch wood with chlorosulfonic acid in pyridine. *J. SFU. Chemistry*. 2014. Vol. 7(4), P.547-555. (in Russ.)]
12. Васильева Н. Ю., Левданский А. В., Казаченко А. С., Скворцова Г. П., Кузнецов Б. Н. Модификация сульфатированного арабиногалактана аминокислотами методом ионного обмена. *Журнал Сиб. федер. ун-та. Химия*. 2016. Т. 9(1), С. 20–28.
13. Mrozek, Agnieszka; Karolak-Wojciechowska, Janina; Kieć-Kononowicz, Katarzyna (2003). "Five-membered heterocycles. Part III. Aromaticity of 1,3-imidazole in 5+n hetero-bicyclic molecules". *Journal of Molecular Structure*. 655 (3): 397–403.
14. Wang, Lijun; Sun, Na; Terzyan, Simon; Zhang, Xuejun; Benson, David R. (2006). "A Histidine/Tryptophan π -Stacking Interaction Stabilizes the Heme-Independent Folding Core of Microsomal Apocytochrome b5 Relative to that of Mitochondrial Apocytochrome b5". *Biochemistry*. 45 (46): 13750–9.
15. Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd edition / David L. Nelson, Michael M. Cox. Worth Publishers: New York, 2000. 1255 p.
16. Andrew, P.J.; Myer, B. (August 15 1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research* 43 (3): 521–531 REVIEW.
17. Finsterer J (November 2009). «Management of mitochondrial stroke-like-episodes». *Eur. J. Neurol*. 16 (11): 1178–84.
18. Morris Jr. Sidney M. Arginine: beyond protein. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006. Vol. 83. № 2. P. 508-512.
19. Vasil'eva N.Yu., Levdansky A.V., Kuznetsov B.N., Skvortsova G.P., Kazachenko A.S., Djakovitch L., Pinel C. Sulfation of arabinogalactan by sulfamic acid in dioxane. *Russ. J. Bioorg. Chem*. 2015. Vol. 41(7), P. 725–731.
20. Jones D.L., Owen A.G., Farrar J.F. Simple method to enable the high resolution determination of total free amino acids in soil solutions and soil extracts. *Soil. Biol. Biochem*. 2002. Vol. 34(12), P. 1893–1902.
21. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. М.: Изд-во: «Книга по требованию», 2012. 295 с.
22. Kumar S., Kumar-Rai A., Rai S. B., Rai D. K. Infrared and Raman spectra of Histidine: an ab initio DFT calculations of Histidine molecule and its different protonated forms. *Indian Journal of Physics*. 2010. V. 84. № 5. P. 563–573.
23. Kumar S., Rai S. B. Spectroscopic studies of L-arginin molecule. *Indian Journal of Pure and Applied Physics*. 2010. V. 48. P. 251-255.