

УДК 541.49

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕПАРИНАТОВ Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}

М.А. Феофанова¹, Ю.В. Францева¹, Е.В. Журавлев¹, Н.В. Баранова¹,
Ю.М. Смирнов², В.В. Новикова¹

Тверской государственный университет,
¹кафедра неорганической и аналитической химии
²кафедра прикладной физики

Предложена методика синтеза, выделения и очистки комплексов высокомолекулярного гепарина с Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} . Проведены физико-химические исследования (элементный анализ, ИК-спектроскопическое исследование, термический анализ) выделенных металлокомплексов высокомолекулярного гепарина, установлен состав комплексов.

Ключевые слова: гепарин, комплекс, физико-химические исследования.

В течение всего XX века гепарин – природный антикоагулянт – привлекает исследователей, изучающих его химические и биологические свойства. Причем в последние десятилетия рост исследовательской активности связан прежде всего с тем, что данное соединение помимо антикоагулянтных обладает также модулирующими, канцеростатическими свойствами. Критический обзор уже имеющихся в литературе сведений выявил ряд противоречий в результатах исследований, посвященных комплексообразованию ионов металлов с гепарином.

Особый интерес представляет цикл работ, выполненный D. Grant с сотрудниками [1–5]. Авторы с помощью поляриметрической и потенциометрической методик показали, что гепарин способен координировать ионы металла, причем для ряда катионов координация носит локализованный характер; также была предпринята попытка охарактеризовать относительную устойчивость образующихся комплексов. Исследования проводились для ряда s-, p- и d-элементов. В частности, было показано, что устойчивость комплексов гепарина с ионами кальция несколько выше, чем с ионами магния, в то же время характер координации щелочных металлов остался невыяснен.

Определенного внимания заслуживают и работы, посвященные ИК-спектроскопическому исследованию гепарина, его производных и металлокомплексов. На основании данных ИК-спектроскопического исследования различных производных гепарина (N-десульфатированных, N-ацелированных, дейтерированных) авторам удалось провести отнесение характеристических полос поглощения нативного гепарина [2]. Однако никаких выводов о характере

координации катионов с донорными группами полимерной цепи гепарина данные работы не содержат.

Исследованию процессов комплексообразования гепарина с ионами 3-d переходных металлов посвящен ряд работ [6; 7], однако физико-химические свойства твердых гепаринатов изучено недостаточно.

Отсюда целью нашей работы явилось получение металлокомплексов высокомолекулярного гепарина, изучение полученных гепаринатов физико-химическими методами анализа.

В качестве исходного препарата, содержащего гепарин, использовали фармакологический раствор его тетранатриевой соли, упакованный во флаконы по 5 мл. Производитель – РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь, г. Минск. Каждый миллилитр такого раствора содержал 5000 ЕД (1 ЕД = 0,0077 мг гепарина) или 38,5 мг соли.

Растворы хлоридов меди, кобальта, никеля готовили растворением навесок солей в бидистилляте с последующей стандартизацией при помощи комплексонометрического титрования. Квалификация солей – «ч.д.а.».

Схема получения комплексов металлов с гепарином заключалась в следующем: рассчитанные количества реагентов помещали в микро стакан, величину рН доводили до требуемого значения раствором гидроксида натрия. В качестве осадителя выбрали ацетон, этанол и изопропанол осадения комплексов не вызывали. При добавлении ацетона происходило образование хлопьевидных осадков, отделенных от маточного раствора центрифугированием. Осадки высушивали в токе теплого воздуха. При этом происходило образование вязкого геля. По прошествии четырех-пяти часов гель высыхал с образованием хрупких стеклообразных масс, окрашенных в бледно-зеленый (гепаринат двухвалентного никеля), розовый (гепаринат двухвалентного кобальта), сине-зеленый (гепаринат двухвалентной меди) цвет. Выход продукта составил порядка 90%. Полученные вещества легко растворимы в воде. Растворы устойчивы в течение длительного времени. Соотношение между концентрациями ионов металлов и лиганда 1:1. Далее определяли содержание металлов в полученных комплексах согласно известным методикам.

1. Определение содержания меди в полученном комплексе. Навеску комплекса растворяли в воде и титровали стандартным раствором трилона Б в среде аммиачного буфера и в присутствии мурексида в качестве металлохромного индикатора.
2. Определение содержания кобальта и никеля. Метод основан на образовании устойчивого комплекса кобальта с трилоном Б в слабокислой среде в присутствии индикатора ксиленолового оранжевого.

В результате эксперимента были получены твердые гепаринаты металлов (Cu, Ni, Co). Состав комплексов был подтвержден элементным анализом, а также анализом на содержание металла в образце.

Результаты определения содержания ионов металлов в выделенных образцах были сопоставлены с рассчитанными и приведены в табл.1. Содержание воды в синтезированных комплексах определяли на основании результатов дериватографического анализа [8]. На основании этих данных были предложены брутто-формулы выделенных комплексов.

Таблица 1

Результаты определения содержания металлов
в выделенных образцах комплексов

Комплекс	Содержание металла, % найденно/вычислено
$\text{Na}_2 [\text{CuHeP}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8,78 / 8,90
$\text{Na}_2 [\text{NiHeP}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8,15 / 8,26
$\text{Na}_2 [\text{CoHeP}] \cdot \text{H}_2\text{O}$	8,15 / 8,26

Как следует из таблицы, мы имеем средние комплексы состава $\text{Na}_2[\text{MeHeP}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Все выделенные комплексы являются кристаллогидратами и содержат две молекулы воды, в случае иона кобальта — одну.

Для подтверждения предполагаемого количественного состава выделенных соединений был проведен элементный анализ. Результаты приведены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, ожидаемые и найденные количества углерода, водорода, азота и серы находятся в хорошем соответствии между собой, что является подтверждением предложенной стехиометрии выделенного комплекса. Выделенные комплексы были исследованы термическим методом.

Термолиз выделенных гепаринатов микроэлементов носит сложный многостадийный характер. Дериватографическое исследование образцов показало, что отщепление гидратной воды заканчивается до 100-110°C [9], что следует из табл. 3. Было обнаружено, что потеря веса исследуемых комплексов при этих температурах соответствует отщеплению двух молекул воды, в случае комплекса кобальта с гепарином — одной молекулы. Термолиз органической части молекулы сложен и имеет многостадийный характер, о чем говорят характерные изломы кривой TG.

Таблица 2

Результаты элементного анализа комплексов
с высокомолекулярным гепарином

Комплекс	С		Н		N		S		Me	
	Практ. %	Теор. %								
Cu-HeP	17,77	19,75	3,79	2,61	1,86	1,92	9,55	9,89	8,78	8,90
Ni-HeP	18,47	19,89	4,47	3,62	1,89	1,93	7,12	7,87	8,15	8,26
Co-HeP	18,35	19,89	4,31	3,62	1,87	1,93	8,48	9,15	8,15	8,26

Таблица 3

Данные термограмм

Формула	I порог температур °C	nMe^{n+}/nH_2O	II порог температур °C	nMe^{n+}/nH_2O
$Na_2 [CuHeP] \cdot 2H_2O$	88,4	1:1	112,1	1:2
$Na_2 [NiHeP] \cdot 2H_2O$	104	1:2	-	-
$Na_2 [CoHeP] \cdot H_2O$	112	1:1	-	-

Таблица 4

ИК-спектроскопические характеристики гепарина и синтезированных комплексов на его основе

Образец	Частота, см ⁻¹	Отнесение
Чистый гепарин	3500-3300 3400 3000-2840 1640 1550 1270 1230 1160-1075 1135	ν_{N-H} ν_{O-H} ν_{C-H} $\nu_{as CO} (B COO^-)$ $\nu_{s CO} (B COO^-)$ $\nu_{as S=O}$ $\nu_{s S=O}$ $\nu_{as C-O-C}$ $\nu_{s C-O-C}$
Cu - Неп	3500-3300 3300 3000-2800 1600 1430 1210 1140 1150 - 1085 1125	ν_{N-H} ν_{O-H} ν_{C-H} $\nu_{as CO} (B COO^-)$ $\nu_{s CO} (B COO^-)$ $\nu_{as S=O}$ $\nu_{s S=O}$ $\nu_{as C-O-C}$ $\nu_{s C-O-C}$
Co - Неп	3500-3300 3300 3000-2800 1600 1420 1200 1140 1150 - 1085 1125	ν_{N-H} ν_{O-H} ν_{C-H} $\nu_{as CO} (B COO^-)$ $\nu_{s CO} (B COO^-)$ $\nu_{as S=O}$ $\nu_{s S=O}$ $\nu_{as C-O-C}$ $\nu_{s C-O-C}$
Ni - Неп	3500-3300 3300 3000-2800 1590 1420 1210 1140 1140 - 1085 1120	ν_{N-H} ν_{O-H} ν_{C-H} $\nu_{as CO} (B COO^-)$ $\nu_{s CO} (B COO^-)$ $\nu_{as S=O}$ $\nu_{s S=O}$ $\nu_{as C-O-C}$ $\nu_{s C-O-C}$

Далее, для подтверждения структуры полученных комплексов, использовали ИК-спектроскопический метод анализа. ИК-спектры гепаринатов металлов и чистого гепарина могут дать ценную информацию о вероятной структуре комплекса. Кроме того, на основании данных ИК-спектроскопического исследования можно провести идентификацию органической части.

Для идентификации органической части комплексов были получены их ИК-спектры и спектр чистого гепарина (табл. 4). Во всех спектрах комплексов гепарина с металлами полоса в области 3300см^{-1} соответствует валентным колебаниям связи О-Н [10–13]. Отчетливо разрешена полоса 1600 см^{-1} , соответствующая асимметричным валентным колебаниям связи С-О в карбоксилатной группе [11]. К симметричным колебаниям связи С-О внутри карбоксилатной группы очевидно относится полоса 1430 см^{-1} . Полосы поглощения сульфоновых групп имеют перегибы и разрешены недостаточно отчетливо (вероятно, это можно связать с идентичностью окружения). Поглощение в области 1210 см^{-1} , вероятно, следует приписать асимметричным колебаниям связей $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ внутри сульфатной группировки, симметричные колебания – 1140 см^{-1} . Поглощение в области $1150\text{--}1085\text{ см}^{-1}$ и 1125 см^{-1} соответствует асимметричным и симметричным валентным колебаниям связей С-О-С [10]. Неразрешенная полоса в области $3500\text{--}3300\text{ см}^{-1}$ отвечает валентным колебаниям связи N-H в монозамещенной сульфамидной группе и перекрывается с валентными колебаниями О-Н. Валентные колебания связи С-N в области $3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$ также перекрываются с валентными колебаниями О-Н. С 1000 см^{-1} начинается область отпечатков пальцев, где идентифицировать полосы становится труднее. В этой области мы можем выделить лишь деформационные колебания связи N-H- 800 см^{-1} [11]. Что касается спектра чистого гепарина, то по сравнению со спектрами комплексов все полосы смещены в высокочастотную область. Видимо, в комплексах прослеживается действие металлов. Но различия небольшие. Таким образом, исходя из результатов ИК-спектроскопического исследования, можно полагать, что гепарин сохраняет в комплексах свою структурную целостность.

ВЫВОДЫ:

1. Предложена методика синтеза, выделения и очистки твердых гепаринатов Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} .
2. Установлен состав полученных комплексов с помощью элементного анализа и определения содержания металла в комплексе.

3. Полученные комплексы были исследованы термическим и ИК-спектроскопическим методами анализа.

Работа выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 г.» (соглашение № 14.132.21.1308, соглашение № 14.В37.21.1109), соглашение № 14.В37.21.0653)

Список литературы

1. Grant D.A., Long W.F., Williamson F.B. Potentiometric titration study of the interaction of heparin with metal cations // *Biochem J.* 1992, V. 285, №. 2, P. 477-480.
2. Grant D.A., Long W.F., Moffat C.F., Williamson F.B. Cu – heparin interaction studied by polarimetry // *Biochem J.* 1992, V. 283, №. 1, P. 243-246.
3. Grant D., Long W.F., Williamson F.B. The binding of platinum (II) to heparin // *Biochem Soc Trans.* 1996. V. 24, №. 4, P. 204.
4. Grant D., Long W.F., Williamson F.B. Similarity and dissimilarity in aspects of the binding to heparin of Ca²⁺ and Zn²⁺ as revealed by potentiometric titration // *Biochem Soc Trans.* 1996. V. 24, №. 2, P. 203.
5. Grant D., Long W.F., Williamson F.B. Complexation of Fe²⁺ ions by heparin. // *Biochem Soc Trans.* 1992. V. 20, №. 4, P. 361.
6. Феофанова М.А., Францева Ю.В., Лапшин С.В. Комплексообразование в системе гепарин-ион металла // *Координационная химия.* 2012. Т. 38, №. 5, С. 387–392.
7. Феофанова М.А., Францева Ю.В., Баранова Н.В. Металл-ионные равновесия в системах с гепарином // *Международ. журн. приклад. и фундамент. исслед.* 2011. №. 12, С. 56–59.
8. Россоти Ф., Россоти Х. Определение констант устойчивости и других констант равновесия в растворе. М.: Мир, 1965. 364 с.
9. Хартли Ф., Бергес К., Оллок Р. Равновесия в растворах. М.: Мир, 1983. 360 с.
10. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. Практическое руководство. М.: Мир, 1965. 216 с.
11. Шрайнер Р., Фюзон Р., Кёртин Д., Моррил Т. Идентификация органических соединений.-М.: Мир, 1983.
12. Казицына Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-ИК-, ЯМР- и Масс-спектроскопии в органической химии. 2-е издание, переработанное и дополненное. М.: Изд-во Московского университета, 1979.
13. Сильверстейн Р., Басслер Г., Моррил Т. Спектрометрическая идентификация органических соединений. М.: Мир, 1977.

**PHYSICO-CHEMICAL STUDIES COMPLEX HEPARIN
WITH Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}**

**M.A. Feofanova, YU.V. Franceva, E.V. Zhuravlev, N.V. Baranova,
Yu.M. Smirnov, V.V. Novikova**

Tver state University,
Department of Inorganic and Analytical Chemistry

The synthesis strategy, isolation and purification of high molecular weight heparin complexes with cations Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} is proposed. The elemental analysis, IR-spectroscopic study and thermal analysis of selected metal complexes of high-molecular weight heparin is carried out. The complexes composition is determined.

Keywords: *heparin, complex, physicochemical studies.*

Об авторах:

БАРАНОВА Надежда Владимировна – кандидат химических наук, доцент кафедры неорганической и аналитической химии Тверского государственного университета, e-mail: nbaranova78@mail.ru

ЖУРАВЛЕВ Евгений Вячеславович – ведущий инженер кафедры неорганической и аналитической химии Тверского государственного университета, e-mail: evgeniy-zhuravlev@mail.ru

НОВИКОВА Виктория Владимировна – студентка 4 курса химико-технологического факультета Тверского государственного университета, e-mail: novikovaviktori@yandex.ru

СМИРНОВ Юрий Мстиславович – профессор, доктор технических наук, зав. кафедрой прикладной физики Тверского государственного университета, e-mail: applied.physics@tversu.ru

ФЕОФАНОВА Мариана Александровна – доцент, кандидат химических наук, доцент кафедры неорганической и аналитической химии Тверского государственного университета, m000371@tversu.ru

ФРАНЦЕВА Юлия Викторовна – аспирант кафедры неорганической и аналитической химии Тверского государственного университета, e-mail: Juli_Pavlova@mail.ru