

И. Ю. Понеделькина (к.х.н., доц.), А. Р. Гаскарова (к.х.н., м.н.с.),
Э. А. Хайбрахманова (к.х.н., м.н.с.), В. Н. Одинок (д.х.н., проф.)

ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ АРАБИНОГАЛАКТАНА МАЛЕИНАТНЫМИ И ГЛИОКСАЛАТНЫМИ ГРУППАМИ

Институт нефтехимии и катализа УФИЦ РАН

450075, г. Уфа, пр. Октября, 141, тел. (347)2843150, e-mail: ink@anrb.ru, ponedelkina@rambler.ru

I. Yu. Ponedel'kina, A. R. Gaskarova, E. A. Khaibrakhmanova, V. N. Odinokov
**FUNCTIONALIZATION OF ARABINOGALACTAN
BY MALEATE AND GLYOXALATE GROUPS**

Institute of Petrochemistry and Catalysis UFRC RAS

141, Prospekt Oktyabrya Str., 450075 Ufa, Russia, ph. (347)2843150, e-mail: ink@anrb.ru,
ponedelkina@rambler.ru

С целью получения новых функционализированных производных арабино-3,6-галактана (AG), полисахарида из лиственницы сибирской (*Larix sibirica*), разработаны условия получения малеинатов AG без применения растворителей. Озонолизом малеината AG в водной среде осуществлен синтез глиоксалата AG с альдегид-гидратной функцией. Продемонстрирована высокая реакционная способность малеинатов при взаимодействии с тиольными соединениями, такими как *L*-цистеин и тиогликолевая кислота. На примере реакции с 4-аминоантипирином показана способность альдегид-гидратных групп глиоксалата AG образовывать основания Шиффа.

Ключевые слова: арабиногалактан; глиоксалат; малеинат; малеиновый ангидрид; озонолиз; основания Шиффа; «тиол-ен» реакции (Михаэля); этерификация.

Арабино-3,6-галактаны (AG) относятся к полисахаридам (PS) растительного происхождения, их сильно разветвленные макромолекулярные цепи состоят из остатков галактозы и арабинозы. Коммерчески значимыми источниками являются лиственницы западная (*Larix occidentalis*) и сибирская (*Larix sibirica*). Благодаря хорошей растворимости в воде, низкой токсичности, иммуномодулирующим, гастропротекторным и антимагистатическим свойствам, AG применяются для разработки различных лекарственных средств ¹.

Малеинатная группа, введенная в AG, может служить инструментом для синтеза многих практически значимых соединений ^{2, 3}, в том числе эфиров глиоксалево́й кислоты ⁴. Глиоксалаты (в виде альдегид-гидратов) легко получить озонолизом малеинатов в водной сре-

In order to obtain new functionalized derivatives of arabino-3,6-galactan (AG), a polysaccharide from Siberian larch (*Larix sibirica*), the conditions for obtaining AG maleates without the use of solvents were developed. By the AG maleate ozonolysis in an aqueous medium the synthesis of AG glyoxalate with an aldehyde-hydration function was carried out. The high reactivity of maleates in the interaction with thiol compounds, such as *L*-cysteine and thioglycolic acid, has been demonstrated. In the reaction with 4-aminoantipyrine the ability of aldehyde-hydrate groups of AG glyoxalate to form Schiff bases is shown.

Key words: arabinogalactan; esterification; glyoxalate; maleic anhydride; maleate; ozonolysis; Schiff bases; «thiol-ene» reactions (of Michael addition).

де ⁴, и для AG такой способ мог бы стать альтернативой периодатному окислению ⁵. И малеинатная, и альдегидная группы полезны в последующих трансформациях AG, например, при получении аддуктов с тиолами ⁶ или аминами ⁵.

В отличие от многих других PS, малеинат AG (AG-M) ранее не был получен. Целью настоящей работы являлась разработка условий синтеза AG-M с последующим озонированием AG-M в глиоксалат AG (AG-G) (схема 1).

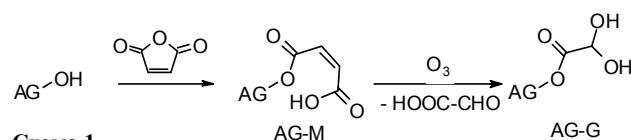


Схема 1

Нами изучена этерификация AG в расплаве малеинового ангидрида (МА, $T_{пл}$ 52 °С), взятого в многократном избытке (AG:МА=1:7). Титрованием продукта раствором

Дата поступления 30.09.18

NaOH установлено, что при температуре реакции 70–80 °C получен AG-M, в котором степень замещения гидроксигрупп (DS) составила 0.30 ммоль на 1 г AG-M в H⁺-форме; при увеличении температуры до 110–120 °C DS возросла до 0.72. Выход составил 76–81% (табл. 1). Добавление в сухие смеси AG/МА K₂CO₃, Na₂CO₃ или (NH₄)₂CO₃ привело к существенному повышению степени малеинирования (до 1.27–2.22 ммоль/г). Наиболее эффективным проявил себя K₂CO₃ (DS 2.22, выход 64%, табл. 1). В спектрах ¹H ЯМР малеинатным группам в AG-M соответствовали уширенные сигналы олефиновых протонов с 5.6 и 6.7 м.д.

Согласно литературным данным ⁷, полезными приемами для увеличения DS в малеинатах PS являются многократная обработка ангидридом ⁸ и добавление воды (3–12 % мас.). Увлажнение образцов, даже в присутствии K₂CO₃, не дало преимуществ перед использованием сухих смесей, DS и выход AG-M уменьшились. Повторное малеинирование образца с DS 2.22 привело к продукту с DS 2.87, но последний был выделен с существенными потерями, обусловленными, по-видимому, деструктивным действием как температуры, так и сильноокислотных -COOH-групп малеиновой кислоты (рK_α 1.81), образующейся при раскрытии МА в присутствии воды ⁹ (табл. 1).

Таблица 1
Условия малеинирования AG
и характеристики образцов AG-M

№	Условия	DS, ммоль/г	Выход, %
1	70-80 °C	0.30	81
2	70-80 °C, 20% мас. K ₂ CO ₃	1.27	86
3	110-120 °C	0.72	75
4	110-120 °C, 20% K ₂ CO ₃	2.22	64
5	110-120 °C, 15% ^a Na ₂ CO ₃	1.91	70
6	110-120 °C, 14% ^a (NH ₄) ₂ CO ₃	1.85	76
7	повторная обработка ангидридом образца №4 с DS 2.22 в условиях опыта №4	2.87	55
8	70-80 °C, 10% H ₂ O	0.29	71
9	70-80 °C, 10% H ₂ O, 20% K ₂ CO ₃	0.53	54
10	110-120 °C, 10% H ₂ O, 20% K ₂ CO ₃	1.08	40

^a – Моль-масса каждого из этих карбонатов ниже, чем K₂CO₃, соответственно, Na₂CO₃ и (NH₄)₂CO₃ добавляли в смеси AG/МА в меньшем количестве.

Важной характеристикой продуктов малеинирования является DS первичных гидроксигрупп (DS_p) AG-M. Нами предложен спектральный метод определения DS_p в AG-M с помощью двумерных спектров HSQC, в которых кросс-сигнал этерифицированных

-CH₂OH групп сдвигался в более слабое поле (δ 4.15-4.36/63.3 м.д.) по сравнению с кросс-сигналом для интактных -CH₂OH групп (δ 3.66-3.82/61.0 м.д.) (рис. 1). Из отношения интенсивности (I_m) сигнала в слабом поле к суммарной интенсивности кросс-пииков (I_m+I) для образца AG-M с DS 2.22 было найдено значение DS_p, равное 0.56, т.е. в структуре AG-M более половины (56%) первичных гидроксигрупп были этерифицированы.

Озонолиз AG-M открывает путь к глиоксалатам (AG-G, схема 1) – эфирам глиоксальной кислоты (HOOC-CHO), перспективным в качестве соединений с альдегидной функцией. При озонировании непредельных соединений в воде восстановления пероксидных продуктов озонолиза не требуется; например, малеинат метилового спирта в водной среде (pH 8.5–9.1, 30–35 °C, 96 ч) непосредственно превращался в глиоксалат (в альдегид-гидратной форме) ⁴. Поэтому озонирование образца AG-M с DS 2.22 выполняли в воде (pH 8), контролируя завершенность реакции по исчезновению в спектрах ¹H ЯМР сигналов малеинатных протонов с δ 5.6 и 6.7 м.д. По сравнению с методикой ⁴, условия озонирования AG-M оказались более мягкими, при комнатной температуре реакция заканчивалась уже через 40 мин. В ¹H ЯМР спектре озонированного продукта в области с δ 5.40 м.д. наблюдался уширенный сигнал, в спектре HSQC он коррелировал с сигналом с δ 86.3 м.д., характерным для атома углерода метиновой группы в альдегид-гидратах, и свидетельствовал об образовании AG-G. Кросс-сигнал, соответствующий атомам метиновой группировки в глиоксалатных группах -CH₂OC(O)CH(OH)₂, сдвигался в еще более слабое поле по сравнению с кросс-сигналом малеинированных -CH₂OH групп (δ 4.15-4.36/63.3 м.д.) и регистрировался в области с 4.27-4.42/64.6 м.д.; его интенсивность составила 41% от суммарной интенсивности обоих кросс-сигналов (рис. 1). Это на 15% меньше, чем для малеината с DS 2.22 (56%), что свидетельствовало о частичном гидролизе сложноэфирных групп во время озонолиза. Содержание глиоксалатных групп, найденное кислотно-основным титрованием свободной глиоксальной кислоты после щелочного гидролиза образца, составило 1.79 ммоль/г.

Как известно, активированная двойная связь малеиновой кислоты и ее производных легко вступает в реакцию с тиолами ⁶. Это свойство положено в основу «тиол-ен» клихимии ^{10, 11}, методы которой в настоящее время широко применяются в органическом син-

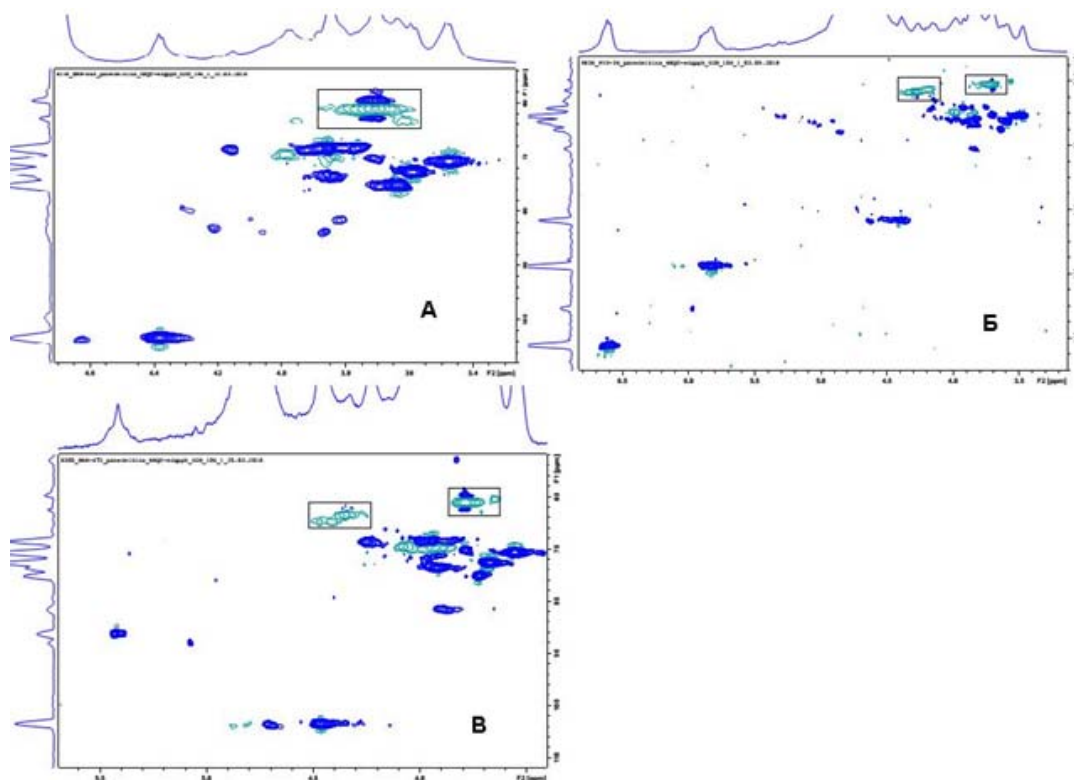
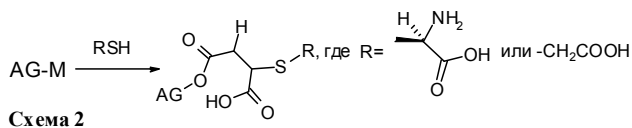


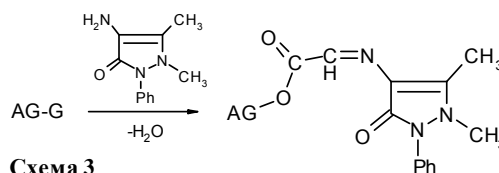
Рис. 1. Спектры HSQC AG (А), AG-М (Б) и AG-Г (В), кросс-сигналы $-\text{CH}_2\text{OH}$ групп выделены прямоугольниками

тезе, функционализации полимеров, биоорганической химии. В реакциях с *L*-цистеином (Cys) или тиогликолевой кислотой (TGA) (схема 2) образец AG-М с DS 2.22 проявил высокую реакционную способность, о чем свидетельствовало быстрое исчезновение сигналов малеинатных протонов в спектрах ^1H ЯМР. Сигналы, появившиеся в области с $\delta \sim 3$ и ~ 4 м.д., были характерны для *S*-производных Cys, сигнал с $\delta 3.14$ м.д. отвечал аддукту AG-М с TGA. Согласно ¹², наиболее вероятными являются региоизомеры, представленные на схеме 2.



Свойство AG-G (DS 1.79) реагировать с аминами с образованием оснований Шиффа продемонстрировано нами на примере реакции с 4-амино-2,3-диметил-1-фенил-3-пиразолин-5-оном (4-аминоантипирином, 4-ААР) – прекурсором для синтеза анальгина, известного лекарственного средства анальгетического, противовоспалительного и жаропонижающего действия. При взаимодействии AG-G с 4-ААР в D_2O конъюгат AG-ААР (схема 3) получен с

количественным выходом, об этом свидетельствовало исчезновение в ^1H ЯМР спектре сигнала метинового протона альдегид-гидратной группы с $\delta 5.40$ м.д. Характерные для остатка 4-ААР сигналы наблюдались в области с $\delta 2.33$ ($\text{C}=\text{CCH}_3$), 3.40 (NCH_3), 7.50 и 7.70 м.д. (Ph).



Таким образом, разработаны условия для эффективной функционализации AG малеинатными и глиоксалатными (альдегид-гидратными) группами. Для малеинатов продемонстрирована высокая реакционная способность в реакции присоединения тиолов по Михаэлю, для глиоксалатов – способность образовывать основания Шиффа при взаимодействии с аминами.

Экспериментальная часть

Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР регистрировали для растворов в D_2O на спектрометре Bruker AVANCE 400 (400.13 (^1H) и 100.62 МГц (^{13}C)) или Bruker DRX-500 (500.17 и 125.78 МГц), внутренний стандарт – ацетон. В работе ис-

пользовали озонатор «ТЛ-2», рН-метр «рН-340» и реактивы: АГ из лиственницы сибирской *Larix sibirica*, М 14-16 кДа (Институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск), Cys, TGA и 4-ААР фирмы Асгус.

Общая методика получения АГ-М. 4.2 г МА нагревали в фарфоровой чашке до требуемой температуры, затем в расплав при интенсивном перемешивании добавляли 0.6 г АГ или смесь АГ с добавками (табл. 1). Через 5-7 мин отвердевшую массу охлаждали до комнатной температуры, затем промывали Et₂O для удаления избытка МА. Остаток растворяли в 10 мл Н₂O, нейтрализовали NaOH и осаждали в MeOH (40 мл). Осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 10 мл Н₂O при рН 2-3, осаждали MeOH, промывали MeOH, Et₂O и высушивали, получив в виде белых порошков образцы АГ-М в кислотной форме. DS (в ммоль -COOH групп на г АГ-М) определяли титрованием 0.05 н NaOH в присутствии фенолфталеина. Характеристики продуктов приведены в табл. 1.

Синтез АГ-G. 0.30 г АГ-М с DS 2.22 растворяли в 3 мл Н₂O, рН 8, затем барботировали озono-кислородную смесь со скоростью 10

мл/мин при комнатной температуре, поддерживая рН с помощью NaOH и отбирая пробы V=0.05 мл через 10, 20, 30 и 40 мин для анализа методом ЯМР. По окончании реакции (40 мин) продукт выделяли осаждением из MeOH и высушивали, получив 0.18 г (64%) в виде белого порошка.

Содержание глиоксалатных остатков в АГ-G (ммоль/г) определяли следующим образом. Точную навеску АГ-G (0.1 г) помещали в колбу, добавляли 5 мл 75% EtOH, 2 мл 0.5 М NaOH и выдерживали 24 ч при комнатной температуре. По окончании гидролиза избыток щелочи титровали 0.2 М HCl.

Аддукты АГ-М (DS 2.22) с Cys и TGA. 15 мг АГ-М (0.033 ммоль -COOH групп) растворяли в 0.7 мл D₂O, рН 7, добавляли 4 мг (0.033 ммоль) Cys гидрохлорида или 3 мг (0.033 ммоль) TGA. Через 20-30 мин регистрировали спектры ¹H ЯМР.

Конъюгат АГ-G (DS 1.79) с 4-ААР. 20 мг АГ-G (0.036 ммоль глиоксалатных групп) растворяли в 0.7 мл D₂O, добавляли 7.3 мг (0.036 ммоль) 4-ААР, оставляли на ночь при комнатной температуре. По завершении реакции регистрировали спектры ¹H ЯМР.

Литература

1. Grischenko L.A., Parshina L.N., Larina L.I., Novikova L.N., Trofimov B.A. Modification of arabinogalactan propargyl ethers by triazolylfunctions // *Carbohydr. Polym.*— 2015.— V. 115.— Pp.294-304.
2. Vasi A.-M., Popa M. I., Butnaru M., Dodi G., Verestiuc L. Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications // *Mat. Sci. Eng.: C.*— 2014.— V.38.— Pp.177-185.
3. Patent EP 1065217, Germany. Polysaccharide aspartate / Kretzschmar G. // www.espacenet.com.— 2001.
4. Patent US 20040254395, USA. Ozonolysis process for preparing menthyl glyoxylate hydrate / Cook F. P., Keller J. M., Yang X. Y. // www.espacenet.com.— 2004.
5. Golenser J., Frankenburg S., Ehrenfreund T., Domb A.J. Efficacious treatment of experimental leishmaniasis with amphotericin B-arabinogalactan water-soluble derivatives // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 1999.— V.43.— Pp.2209-2214.
6. Morgan E. J., Friedmann E. Interaction of maleic acid with thiol compounds // *Biochem. J.*— 1938.— V.32, №4.— Pp.733-742.
7. Xing G.-X., Zhang S.-F., Ju B.-Z., Yang J.-Z. Microwave-assisted synthesis of starch maleate by dry method // *Starch.*— 2006.— V.58.— Pp.464-467.
8. Patent US 2891947, USA. Preparation of starch esters / Paschall E.F., Katzbec W.J. // www.espacenet.com.— 1959.

References

1. Grischenko L.A., Parshina L.N., Larina L.I., Novikova L.N., Trofimov B.A. [Modification of arabinogalactan propargyl ethers by triazolylfunctions] *Carbohydr. Polym.*, 2015, vol.115, pp.294-304.
2. Vasi A.-M., Popa M. I., Butnaru M., Dodi G., Verestiuc L. [Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications] *Mat. Sci. Eng.: C.*, 2014, vol.38, pp.177-185.
3. Kretzschmar G. [Polysaccharide aspartate]. Patent no.EP1065217, 2001.
4. Cook F. P., Keller J. M., Yang X. Y.[Ozonolysis process for preparing menthyl glyoxylate hydrate]. Patent no.US 20040254395, 2004.
5. Golenser J., Frankenburg S., Ehrenfreund T., Domb A.J. [Efficacious treatment of experimental leishmaniasis with amphotericin B-arabinogalactan water-soluble derivatives] *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol.43, pp.2209-2214.
6. Morgan E. J., Friedmann E. [Interaction of maleic acid with thiol compounds] *Biochem. J.*, 1938, vol.32, pp.733-742.
7. Xing G.-X., Zhang S.-F., Ju B.-Z., Yang J.-Z. [Microwave-assisted synthesis of starch maleate by dry method]. *Starch*, 2006, vol.58, pp.464-467.
8. Paschall E.F., Katzbec W.J. [Preparation of starch esters]. Patent no.US 2891947, 1959.
9. Biswas A., Shogren R.L., Kim S., Willett J.L. [Rapid preparation of starch maleate half-esters] *Carbohydr. Polym.*, 2006, vol.64, pp.484-487.

9. Biswas A., Shogren R.L., Kim S., Willett J.L. Rapid preparation of starch maleate half-esters // *Carbohydr. Polym.*— 2006.— V.64.— Pp.484-487.
10. Hoyle Ch. E., Bowman Ch. N. Thiol-ene click chemistry // *Angew. Chem. Int. Ed.*— 2010.— V.49 (9)— Pp.1540-1573.
11. Chan J. W., Hoyle C. E. Lowe A. B. Bowman M. Nucleophile-initiated thiol-Michael reactions: effect of organocatalyst, thiol, and ene // *Macromolecules.*— 2010.— V.43(15)— Pp. 6381-6388.
12. Baczko K., Chasseray X., Larpent Ch. Synthesis and surfactant properties of symmetric and unsymmetric sulfosuccinic diesters, Aerosol-OT homologues // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.*— 2001.— V.11.— Pp.2179-2188.
10. Hoyle Ch. E., Bowman Ch. N. [Thiol-ene click chemistry]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, vol.49, no.9, pp.1540-1573.
11. Chan J. W., Hoyle C. E. Lowe A. B. Bowman M. [Nucleophile-initiated thiol-Michael reactions: effect of organocatalyst, thiol, and ene]. *Macromolecules*, 2010, vol.43, no.15, pp.6381-6388.
12. Baczko K., Chasseray X., Larpent Ch. [Synthesis and surfactant properties of symmetric and unsymmetric sulfosuccinic diesters, Aerosol-OT homologues]. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2001, vol.11, pp.2179-2188.