

0719584-1

*Цеп*

На правах рукописи

**Цепяева Ольга Викторовна**

***ВЫДЕЛЕНИЕ, СТРУКТУРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И  
ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ  
РАСТЕНИЯ АМАРАНТ И НЕКОТОРЫХ МОДЕЛЬНЫХ  
СОЕДИНЕНИЙ***

02.00.03 - органическая химия

***А В Т О Р Е Ф Е Р А Т***

*диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук*

**КАЗАНЬ - 2000**

Работа выполнена в Институте органической и физической химии им. А.Е.Арбузова Казанского научного центра Российской академии наук.

Научные руководители:

академик РАН А.И.Коновалов

доктор химических наук,  
профессор В.Ф.Мионов

Официальные оппоненты:

доктор химических наук,  
профессор П.А.Гуревич  
доктор химических наук  
А.Р.Бурилов

Ведущая организация:

Институт химии Коми научного  
центра Уральского отделения  
Российской академии наук

Защита состоится 26 декабря 2000 г. на заседании диссертационного Совета К 053.29.02 по химическим наукам Казанского государственного университета (г. Казань, ул. Кремлёвская, 18, КГУ, Бутлеровская аудитория).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке КГУ.

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлёвская, 18, Научная часть КГУ.

Автореферат разослан                      ноября 2000 г.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000006197

Ученый секретарь  
диссертационного Совета,  
кандидат химических наук

Н.Р.Федотова

Актуальность темы. Биополимеры полисахаридной структуры – важнейший класс природных соединений, находящихся практическое использование в различных областях науки и техники, в частности в качестве источника моносахаридов. Особое место среди растительных полисахаридов занимает пектин, который входит в состав структурных элементов клеточной ткани высших растений и выполняет функции связывающих и упрочняющих компонентов клеточной стенки, а также регулирует водный обмен. Велико значение пектина в повседневной жизни – он является универсальной пищевой добавкой, находит широкое применение в медицине как селективный детоксикант тяжелых металлов и регулирует обменные процессы в организме человека. Как правило, пектин получают из яблок и цитрусовых, что в климатических условиях России не рентабельно. Поэтому поиск новых источников пектиновых веществ является актуальным. Предварительные исследования травы амаранта – нетрадиционной культуры, дающей значительный прирост биомассы в условиях России, показывают, что она может явиться таким перспективным источником полисахаридов. С химической точки зрения пектин относится к одному из наименее изученных веществ в отличие от хорошо известных целлюлозы и крахмала. Исследование химических свойств этого сложного биополимера требует в свою очередь изучения свойств модельных соединений, таких как  $\alpha$ -гидроксикарбоновые кислоты. Одними из наиболее важных направлений химической модификации как пектиновых веществ, так и модельных соединений, являются реакции этерификации, амидирования, ацилирования и фосфорилирования. Последняя позволяет влиять на физико-химические характеристики пектинов, а также на сорбционную емкость и селективность комплексообразования, так как при этом появляются дополнительные центры координации. Поскольку пектиновые вещества, как правило, содержат в качестве элементарного звена природную  $\alpha$ -гидроксикислоту – галактуроновою, казалось целесообразным исследовать закономерности реакции фосфорилирования и свойства образующихся при этом продуктов на соответствующих доступных модельных соединениях, таких как миндальная, молочная и некоторые другие гидроксикарбоновые кислоты. Необходимо также отметить, что фосфорилирование самих гидроксикарбоновых кислот изучено на небольшом числе примеров.

**Цель исследования.** Целью исследования являлось 1) разработка способов выделения кислых полисахаридов из растения амарант, исследование их физико-химических характеристик, в том числе особенностей структуры методами ИКС и спектроскопии ЯМР, 2) разработка способов химической модификации пектиновых веществ (этерификация, амидирование, ацилирование, фосфорилирование), исследование реакции фосфорилирования модельных гидроксикарбоновых кислот и продуктов на их основе, 3) выявление физиологической активности полученных соединений.

**Научная новизна.** Впервые разработаны способы получения пектина из травы амаранта в условиях гидролиза слабыми кислотами, такими как щавелевая, лимонная, молочная, янтарная и проведена их сравнительная характеристика. Методами ИКС и спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$  впервые исследована структура молекул пектина из амаранта. Показано, что он близок по своим свойствам к

яблочному пектину. Впервые проведена химическая модификация пектиновых веществ амаранта: получены как высоко-, так и низкометоксилированные образцы пектина, а также фосфорилированные производные. Впервые предложены для алкилирования пектина новые реагенты на основе хлорпропанолпиридиниевых солей, содержащих остатки фармакофобных групп. Впервые проведено детальное исследование процесса фосфорилирования природных  $\alpha$ -гидроксикарбоновых кислот, выявлены условия образования циклических производных с трех-, четырех-, пятикоординированным атомом фосфора, показана зависимость результата от порядка смешения реагентов и присутствия в реакционной среде гидрохлорида амина. Впервые выделен кристаллический диастереомер фосфорана со связью P-H, содержащий три хиральных центра, структура которого доказана методом РСА. Впервые найдена реакция расширения пятичленного гетероцикла, содержащего фрагмент P-O-C(O), до шестичленного под действием высокоактивных карбонильных соединений.

**Практическая значимость** работы заключается прежде всего в подтверждении перспективности амаранта как промышленного источника пектиновых веществ и разработке новых способов их выделения с использованием экологически приемлемых слабых кислот, а также в разработке подходов для химической модификации пектиновых веществ амаранта. Предложен новый способ трансформации фосфорилированных производных гидроксикарбоновых кислот под действием карбонильных соединений, приводящий к получению функционально замещенных шестичленных гетероциклов – 1,3,2- и 1,4,2-диоксафосфоринанов. Показана перспективность дальнейшего изучения пектина из амаранта в качестве протективного антидиабетического средства, повышающего процент выживаемости животных, кардиопротекторного средства против ишемической болезни.

**Основные положения, выносимые на защиту:** способы выделения пектиновых веществ из амаранта и их структурно-химическое соответствие кислым полисахаридам; результаты спектрального изучения состава и структуры пектиновых веществ амаранта, их физико-химические характеристики; способы модификации пектинов и их спектральное подтверждение; результаты фосфорилирования модельных  $\alpha$ -гидроксикарбоновых кислот; спектральная интерпретация структуры полученных гетероциклов.

**Апробация работы и публикации.** Результаты работы обсуждались на следующих конференциях: I и II международных симпозиумах "*Новые и нетрадиционные растения и перспективы их практического использования*" (Пушино, 1995, 1997), международной конференции "*Питание, экология, человек*" (Москва, 1995), III Всероссийском национальном конгрессе "*Человек и лекарство*" (Москва, 1996), на Научно-практической конференции "*Амарант и люпин – источники новых пищевых и диетических продуктов*" (Санкт-Петербург, 1996), молодежной научной школе по органической химии (Екатеринбург, 1999), XII международной конференции по химии фосфора (Киев, 1999), молодежной школе-конференции "*Металлоорганическая химия на рубеже XXI века*" (Москва, 1999), в том числе на итоговых научных конференциях Казанского научного центра РАН (1995, 1999). По теме диссертации опубликовано 20 работ в том числе один патент РФ и 2 статьи находятся в печати.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА  
им. Н. И. Лобачевского  
Казанского гос. университета

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 180 страницах машинописного текста, содержит 36 таблиц и 19 рисунков. Список цитируемой литературы включает 282 наименования. Работа состоит из введения, литературного обзора, где рассмотрены вопросы получения, структурной идентификации, химической модификации и физиологической активности пектиновых веществ, обсуждения результатов собственных исследований, экспериментальной части, выводов, списка используемой литературы и приложения.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**1. Разработка способов получения пектиновых веществ растения амарант.** В соответствии с перечисленными целями работы нами были предложены и апробированы в лабораторных условиях различные способы экстракции пектиновых веществ из фитомассы растения амарант: экстракция сильными минеральными кислотами, экстракция слабыми органическими кислотами, экстракция кислотами в условиях предварительной водно-этанольной обработки исходного растительного сырья.

С целью разработки оптимальных условий гидролиза – экстрагирования протопектина амаранта, обеспечивающих высокую молекулярную массу, высокую метоксильную составляющую и высокий выход пектина, нами проведены исследования по извлечению пектина из этого вида сырья путем варьирования температуры, pH реакционной среды, продолжительности гидролиза, природы гидролизующего агента. Предварительная водно-этанольная экстракция ускоряет процесс гидролиза протопектина и повышает выход целевого продукта. Это достигается путем частичного удаления белков, красящих веществ и других примесей. Установлено, что пектин, извлекаемый из жома содержит минимальное число примесей и имеет высокую степень этерификации.

Для извлечения пектина из растительной ткани в качестве гидролизующих агентов были использованы водные растворы следующих кислот различной концентрации: соляной, шавелевой, янтарной и молочной. В таблице 1 приведены основные физико-химические характеристики пектинов, полученных гидролизом перечисленными кислотами и ферментативным гидролизом, а также оптимизированные параметры процесса гидролиза–экстракции.

Пектиновые препараты, обладающие максимально высокими молекулярной массой, степенью этерификации и соответственно желирующей способностью, получен путем гидролиза–экстракции пектиновых веществ из растительного сырья 0.5 % шавелевой кислотой при температуре гидролиза 55°C и продолжительностью 4 ч. Для очистки от низкомолекулярных веществ органической и неорганической природы пектиновые вещества были подвергнуты фильтрации на полволоконных мембранах, очистке на ионообменных колонках, а также переосаждению ацетоном и этанолом из воды и лиофильной сушке. Полученные таким образом пектиновые препараты по своим физико-химическим характеристикам подобны пектину, полученному ферментативным способом.

Интенсификация процессов гидролиза–экстракции пектиновых веществ была достигнута при проведении стадии гидролиза протопектина в роторно-

пульсационном аппарате (РПА) при использовании молочной или янтарной кислоты. При этом достигаются наиболее мягкие условия гидролиза—экстракции (рН 4.0 + 4.5) и соответственно высокая молекулярная масса.

*Таблица 1. Условия экстракции пектиновых веществ и их характеристики.*

Гидролизующий агент	Условия экстракции				Характеристики		
	рН среды	Время ч	Температура °С	Соотношение сырье : экстрагент	Выход, %	Степень этерификации	Молекулярная масса
HCl	1.0	22	45	1 : 18	3.5	45	13000
HCl	2.0	22	45	1 : 20	3.7	65	15000
(COOH) <sub>2</sub>	1.65	2	70	1 : 10	3.5	66	25000-30000
(COOH) <sub>2</sub>	1.65	2	90	1 : 10	3.7	50	20000
0.5 % (COOH) <sub>2</sub>		4	55	1 : 8	4.5	70	40000-50000
0.35 % (COOH) <sub>2</sub>		2.5	50	1 : 16	4.3	70	40000-45000
0.25 % (COOH) <sub>2</sub>		1	45	1 : 13	3.9	72	40000-45000
Ферментативный гидролиз	4.5	4	50-55	1 : 16	3.7	70	45000-50000
(CH <sub>2</sub> COOH) <sub>2</sub>	4.0-4.5	0.05	45	1 : 10	8.5	72	90000
MeCH(OH)COOH	4.0-4.5	0.05	45	1 : 10	8.7	75	50000

Таким образом, установлено, что по содержанию пектиновых веществ, их физико-химическим характеристикам и физическим свойствам фитомасса растения амарант может служить в качестве потенциального промышленного источника их получения.

**2. Изучение моносахаридного состава и структуры пектиновых веществ амаранта.** Методами жидкостной хроматографии с использованием в качестве стандартов широкого набора сахаров было выяснено, что основными кислотными и нейтральными моносахаридами пектинов амаранта являются следующие: галактуроновая кислота (67 %), галактоза (7.7 %), рамноза (4.1 %), глюкоза (8.3 %), арабиноза (6.6 %) и ксилоза (2.1 %). Интересно также отметить, что методом ГЖХ среди продуктов гидролиза пектина наряду с метанолом обнаружены небольшие количества этанола, бутанола и формальдегида.

Пектины, выделенные из амаранта, как было представлено, несколько отличаются, своими физико-химическими характеристиками в зависимости от способа выделения, что находит отражение в ИК спектрах, которые были зарегистрированы в таблетках КВг. На рис. 1 приведен типичный ИК спектр пектина из амаранта, полученного экстракцией щавелевой кислотой. Проведенный ста-

тистический анализ пектиновых образцов, амарантового цитрусового, яблочного, табачного пектинов, а также пектина из люпина, как впервые полученных и исследованных нами, так и описанных в литературе, позволил выявить основные группы полос поглощения амарантового пектина, обобщенные в табл. 2.

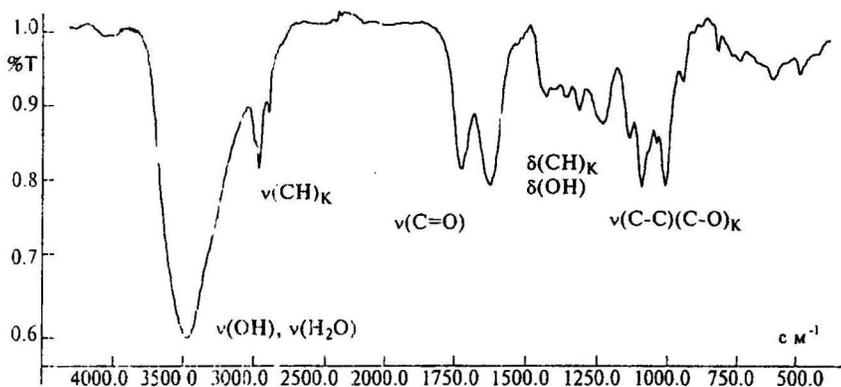


Рис. 1. ИК спектр пектина из амаранта.

Таблица 2. Данные ИКС пектина из амаранта, полученного гидролизом  $(COOH)_2$ .

частота, $cm^{-1}$	Преимущественные типы колебаний	частота, $cm^{-1}$	Преимущественные типы колебаний
3452	$\nu(OH)_C, \nu(H_2O)$	1231	$\delta(CH)_K, \delta(OH)_C, \delta(OH)_A, \nu(C-O-C)_E,$
3198	$\nu_{as}(CH)_E$	1145	$\nu(C-O-C)$
2949	$\nu(CH)_K$	1102	$\nu(C-C)(C-O)_K$
2573	$\nu(OH)_C, \nu(OH)_A,$	1080	$\nu, \delta(C-OH)_C$
1748	$\nu(C=O)_E$	1050	$\nu(C-C)(C-O)_K$
1634	$\delta(H_2O)$	1015	$\nu(C-C)(C-O)_K$
1450	$\delta_{as}(CH_3)_E$	948	$\gamma(OH)_C$
1400	$\nu, \delta(C-OH)_A$	900	$\rho(CH_3)_E$
1331	$\delta(CH)_K$	825, 800, 710, 629, 529	Пульсационные колебания пиранозных колец

В области  $3000-3600\text{ cm}^{-1}$  наблюдается интенсивная широкая асимметричная полоса, соответствующая валентным колебаниям группы OH. Смещение полосы в низкочастотную область по сравнению с частотой свободной гидроксильной группы ( $3670-3580\text{ cm}^{-1}$ )  $\nu(OH)$  объясняется ее участием в водородных связях. Воздушно-сухие пектиновые вещества содержат около 10 % воды, поэтому, валентные колебания воды  $\nu(H_2O)$  перекрываются полосами  $\nu(OH)_C$  гидроксильных пектина. В области  $2600\text{ cm}^{-1}$  наблюдается широкая сложная полоса, относящаяся к валентным колебаниям гидроксильных групп карбоксилатов  $\nu(OH)_A$ , связан-

ных водородной связью в карбоксил-карбоксильной димерной группировке. Область 2000-1500  $\text{см}^{-1}$  - область колебаний  $\text{C}=\text{O}$  группы. Здесь возможно поглощение  $\nu(\text{C}=\text{O})$  трех групп: (1748-1739  $\text{см}^{-1}$ ), (1700-1680  $\text{см}^{-1}$ ), (1610-1550  $\text{см}^{-1}$ ). Соотношение интенсивностей поглощения, соответствующих этим группам, может меняться в зависимости от того какая форма в структуре пектиновых веществ преобладает (эфирная, кислотная или ионная). Область 1200-1000  $\text{см}^{-1}$  характерна для колебаний  $\nu(\text{C}-\text{C}, \text{C}-\text{O})$  пиранозных колец. В области 950-960  $\text{см}^{-1}$  находится полоса средней интенсивности, основной вклад в которую вносит колебание возмущенного водородной связью гидроксила кольца  $\gamma(\text{OH})_{\text{C}}$ . Из-за сильного взаимодействия между структурными элементами молекулы в области спектра 400-850  $\text{см}^{-1}$  возникают полосы, обусловленные сложными колебаниями, которые можно охарактеризовать как пульсационные колебания пиранозных колец, которые зависят от конформации звеньев полимерной цепи. Сопоставление полос пектиновых веществ,  $\alpha$ - (888, 840, 770  $\text{см}^{-1}$ ) и  $\beta$ -Galp (927, 880, 780  $\text{см}^{-1}$ ) с конформацией  ${}^4\text{C}_1$  явно показывает, что пиранозные циклы в полимерных цепях амарантового пектина находятся в  ${}^4\text{C}_1$ - $\alpha$ -конформации. Данные ИК спектроскопии позволяют сделать заключение, что пектиновые вещества, полученные из одного и того же источника (надземная часть амаранта) отличаются друг от друга различной степенью этерификации, т. е. содержат различное число метоксикарбонильных и свободных карбоксильных и групп.

Более детальное изучение структуры пектинов проводилось методом спектроскопии ЯМР  ${}^{13}\text{C}$ . На рис. 2. представлен спектр образца пектина, полученного с помощью молочной кислоты в РПА. Можно отметить, что выделенный в этих очень мягких условиях пектин содержит большое количество нейтральных сахаров и неоднороден по составу и структуре. Он включает кроме  $\alpha$ -полигалактуроновой кислоты остатки  $\alpha$ -,  $\beta$ -глюкозы,  $\alpha$ -,  $\beta$ -арабинозы,  $\alpha$ -,  $\beta$ -галактозы.

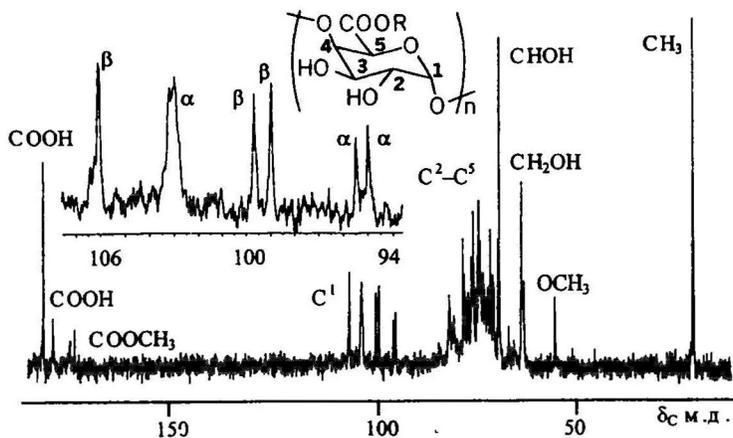


Рис. 2. Спектр ЯМР  ${}^{13}\text{C}$  образца пектина из амаранта, полученного гидролизом молочной кислоты ( $R = \text{H}, \text{OCH}_3$ )

На рис. 3 приведена область аномерных углеродов, которая включает сигналы перечисленных сахаров. Установлено, что очищенный пектин, полученный гидролизом янтарной кислотой, состоит из почти чистой полигалактуроновой кислоты с небольшим количеством нейтральных сахаров (рис. 4). Интересной особенностью пектинов является их способность образовывать комплексы с молочной и янтарной кислотами, что видно из рис. 2, 4. Данные спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$  очищенного пектина, полученного с помощью гидролиза щавелевой кислотой приведены в табл. 3.

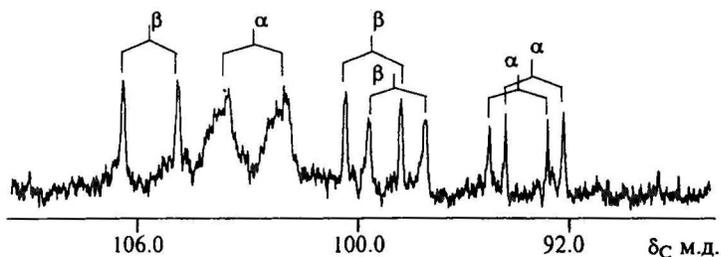


Рис. 3. Область аномерных углеродов образца пектина из амаранта, полученного гидролизом молочной кислотой.

Исходя из величин КССВ ацетального углерода  $\text{C}^1$  нами установлено, что основное звено пектина — галактуроновая кислота является  $\alpha$ -аномером. В  $\alpha$ -аномере КССВ  $^1J_{\text{HC}}$   $\sim 169.0\text{-}172.0$  Гц, тогда как в  $\beta$ -аномере она меньше (160-164 Гц). Присутствие в нативном пектине небольшого числа метоксилированных групп  $\text{COOMe}$  ( $\sim 10\text{-}20\%$ ) приводит к появлению соответствующих минорных сигналов 173.67 ( $\text{COOMe}$ ), 107.73 ( $\text{C}^1$ ), 82.33 ( $\text{C}^4$ ), 55.74 ( $\text{OCH}_3$ ).

Рис. 4. Спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$  образца пектина из амаранта, полученного гидролизом янтарной кислотой.

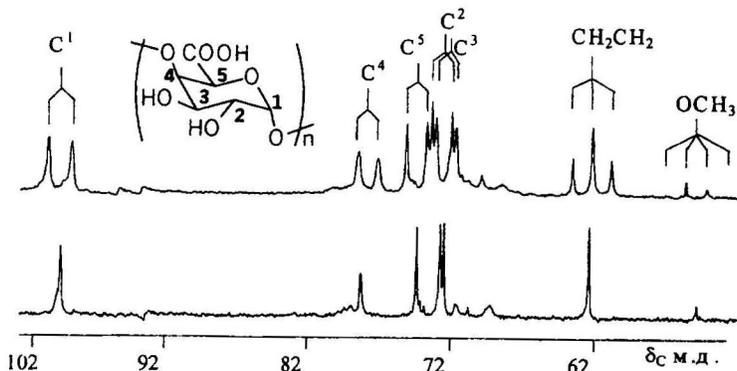


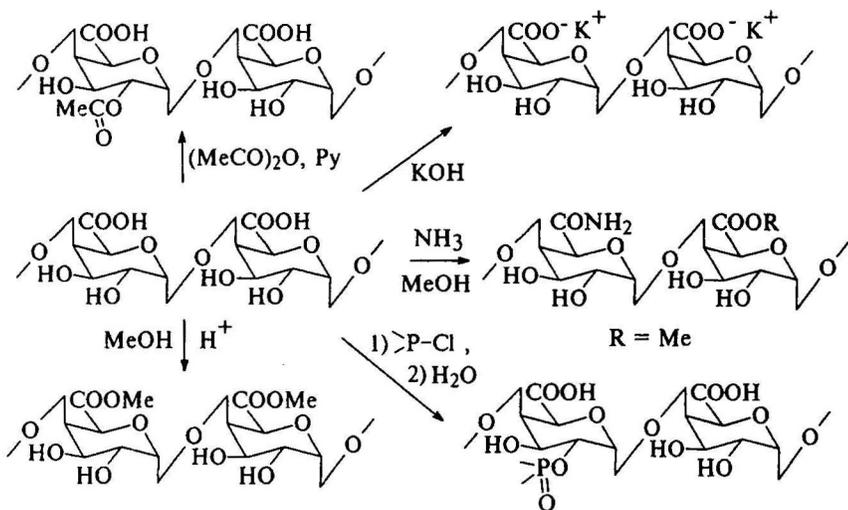
Таблица 3. Данные спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$  образца пектина, полученного гидролизом щавелевой кислотой.

№С	$\delta$ дм.д.	J Гц
COOH	174.44 с (уш. с)	-
C <sup>1</sup>	102.77 уш. с (уш. д)	169.0-171.0 (НС)
C <sup>4</sup>	80.86 уш. с (уш. д)	138.0-142.0 (НС)
C <sup>5</sup>	73.67 уш. с (уш. д)	139.0-143.0 (НС)
C <sup>2</sup> , C <sup>3</sup>	72.20 уш. с (уш. д)	139.0-143.0 (НС)

Таким образом, проведенный анализ спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  очищенного пектина позволяет заключить, что полученный биополимер полисахаридной природы является  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-полигалактуроновой кислотой с высокой уронидной составляющей. Полученный пектин, по всей видимости, имеет линейное строение и содержит небольшое число метоксилированных карбоксильных групп.

**3. Химическая модификация пектиновых веществ амаранта.** Отработав способы выделения пектина из амаранта, нами были предприняты попытки его химической модификации с целью получения пектиновых производных с новыми свойствами. Так, были проведены реакции полного гидролиза, метилирования, ацетилирования, амидирования, силилирования, фосфорилирования, алкилирования некоторыми функционально замещенными алкилгалогенидами, а также получены соли пектовой и пектиновой кислот со щелочными металлами. Структурные изменения, вызванные введением в молекулу пектина ацетильных, амидных групп, а также ионов металлов исследовались методом ИК спектроскопии.

При ацилировании пектовой кислоты происходит ослабление полос  $\nu(\text{OH})_c$  и незначительное их смещение в высокочастотную область. Из этого следует, что оставшиеся гидроксильные группы участвуют в водородных связях, природа которых с ацетилированием существенно не изменилась. В спектре амидированного пектина присутствует очень широкая интенсивная полоса в области 2800-3500  $\text{cm}^{-1}$ , обусловленная как валентными колебаниями групп N-H, так и колебаниями  $\nu(\text{OH})$ ,  $\nu(\text{H}_2\text{O})$ . В области 1650-1430  $\text{cm}^{-1}$  присутствуют три интенсивные полосы, вызванные колебаниями амидной группы. Полоса  $\nu(\text{C}=\text{O})_a$  в (1749  $\text{cm}^{-1}$ ), обусловленная колебаниями карбонила ацетильных групп, перекрывается с частотами  $\nu(\text{C}=\text{O})_A$  карбоксильных групп. Очень интенсивное поглощение, соответствует колебанию эфирной связи  $\nu(\text{COC})_a$  (1250  $\text{cm}^{-1}$ ). Ацилирование существенно отражается на колебаниях пиранозных колец. Это можно объяснить тем, что валентные колебания пиранозных колец зависят от участия в системе водородных связей гидроксильных групп при C<sup>2</sup> и C<sup>3</sup>. Более размытый характер полос в области 1100-1000  $\text{cm}^{-1}$  в спектре амида говорит о алиянии состояния карбоксильных групп пектина на систему водородных связей макромолекулы. На основании стабильности спектра в области 650-900  $\text{cm}^{-1}$  для пектовой кислоты, ацетилированного и амидированного пектинов можно утверждать, что введение ацетильных и амидных групп не нарушает  $^4\text{C}_1$ -конформации пиранозных колец пектинов и  $\alpha$ -конформации гликозидных связей.

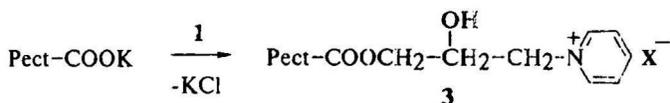
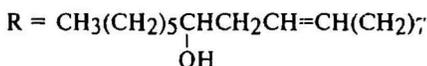
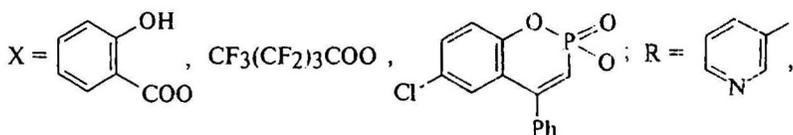
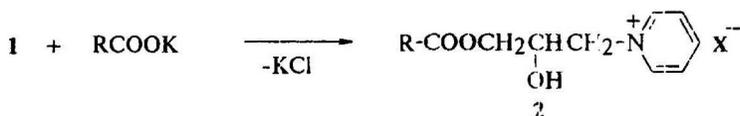
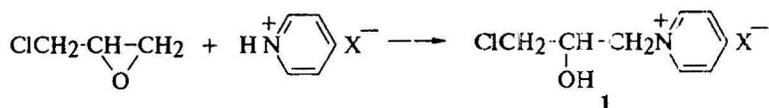


Силилирование пектина гексаметилдисилазаном и триметилхлорсиланом приводит к незначительному введению в молекулу пектина триметилсилильных групп, которые в процессе выделения гидролизуются, что не вызвало сколь-нибудь существенного изменения свойств исходного пектина. Фосфорилирование пектинов позволяет влиять на их физико-химические характеристики, сорбционную емкость и селективность особенно по отношению к ионам кальция. Фосфорилирование пектина с различной степенью этерификации (33 %, 58 %) и пектата натрия осуществлялось большим избытком 2-метокси-4-оксо-, 2-хлор-4-оксо- и 2-хлор-2,4-диоксо-5,6-бензо-1,3,2-диоксафосфоринанов – наиболее мягких и эффективных реагентов, используемых в химии углеводов и нуклеотидов. По данным элементного анализа максимальное количество фосфора введенного в пектин составляет 4-5 %. При этом независимо от природы производного фосфора (III или IV) образуются смеси фосфатов, которые выделяли пересаживанием ацетоном из водных растворов. Учитывая известные и полученные в этой работе данные по фосфорилированию и ацилированию целлюлозы и других полисахаридов, можно предположить, что фосфорилирование, так же как и ацилирование, протекает как во второе, так и третье положение пиранозного цикла.

Для алкилирования пектинов более сложными соединениями, которые могут нести фармакофобные группы были впервые предложены хлорпропанолпиридиниевые соли (1), полученные из эпихлоргидрина и пиридиниевых солей. Высокая алкилирующая способность соединений (1) была предварительно проверена на удобных модельных соединениях, таких как соли никотиновой и рицинолевой кислот. Стрение полученных с количественным выходом функционально замещенных эфиров (2) доказано методом ИКС и ЯМР  $^{13}\text{C}$  (по появлению сигналов  $\text{OCH}_2$  вместо  $\text{SiCH}_2$ ). Процесс этерификации пектата натрия солями (1) протекает значительно сложнее, чем модельных соединений. Полученные произ-

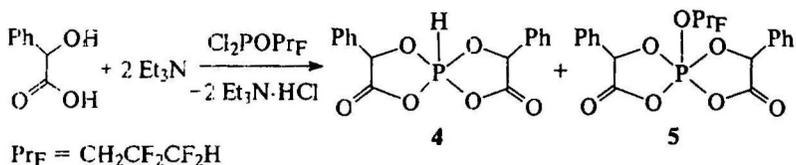
водные (3) (Pect – остаток пектина) представляют собой стекла или аморфные порошки, хорошо растворимые в воде и ДМФА в отличие от самого пектина и пектата.

В ИК спектрах полученных образцов появляются интенсивные полосы при 1730-1740 см<sup>-1</sup>, принадлежащие группам этерифицированного пектина. В спектре ЯМР <sup>13</sup>C интенсивность сигналов ядер углерода фрагмента COO-CH<sub>2</sub>CH(OH)-CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup> выше интенсивности сигналов ядер углерода CH пиранозных колец пектиновых веществ. О степени протекания реакции можно судить по исчезновению сигналов группы CH<sub>2</sub>Cl (δ<sub>C</sub> 45.86 м.д., <sup>1</sup>J<sub>HC</sub> 152.0-152.4 Гц).



Поскольку фосфорилирование самого пектина, как было выяснено, весьма сложный и неоднозначный процесс, перед нами стояла задача исследовать процесс фосфорилирования на простых модельных соединениях – природных гидроксикарбоновых кислотах. В качестве таких кислот были выбраны миндальная и метилмолочная как наиболее доступные, а также их триметилсилильные производные. Использование в качестве моделей галактурановой и глюкуроновой кислот является весьма сложным, поскольку они содержат несколько гидроксильных групп, затрудняющих получение однозначного результата. В качестве фосфорилирующих реагентов были использованы различные производные Р(III), среди которых однозначные результаты были получены для трис(1,1,3-тригидроперфторпропил)фосфита, 1,1,3-тригидроперфторпропилдихлорфосфита и фенилдихлорфосфита.

4. Синтез и некоторые реакции фосфорсодержащих гетероциклов на основе  $\alpha$ -гидроксикарбоновых кислот. При исследовании процессов фосфорилирования миндальной и метилмолочной кислот выяснилось, что результат зависит от порядка смешения реагентов и присутствия солей аминов. Так, при добавлении тетрафторпропилдихлорфосфита к смеси миндальной кислоты и триэтиламина в эфире происходит необычная реакция окислительного фосфорилирования, приводящая к образованию спирофосфоранов (4,5).



Аналогичный результат был получен при использовании бис-триметилсильного производного миндальной кислоты  $\text{Me}_3\text{SiOCH(Ph)COOSiMe}_3$ .

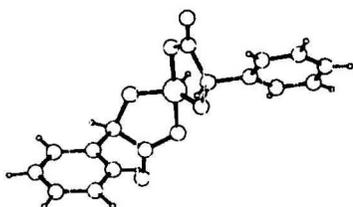
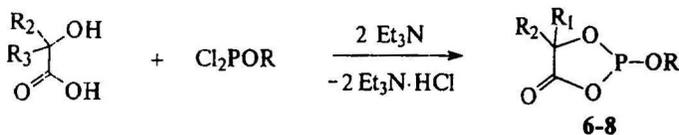


Рис. 5. Геометрия молекулы (4).

Гидроспирофосфоран (4) был выделен в кристаллическом виде и его структура подтверждена данными ЯМР  $^{31}\text{P}$  ( $\delta_{\text{P}} -44.3$  и  $-45.1$  м.д.,  $^1\text{J}_{\text{HP}}$  943-944 Гц,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). На рис. 5 приведена геометрия молекулы согласно данным рентгеноструктурного анализа. Следует отметить, что это первый случай установления конфигурации Р-Н-фосфорана, содержащего три хиральных центра и две ангидридные связи Р-ОС(О). Оба цикла занимают аксиально-экваториальную

ориентацию, причем ангидридные атомы кислорода аксиальны, протон находится в экваториальной позиции.

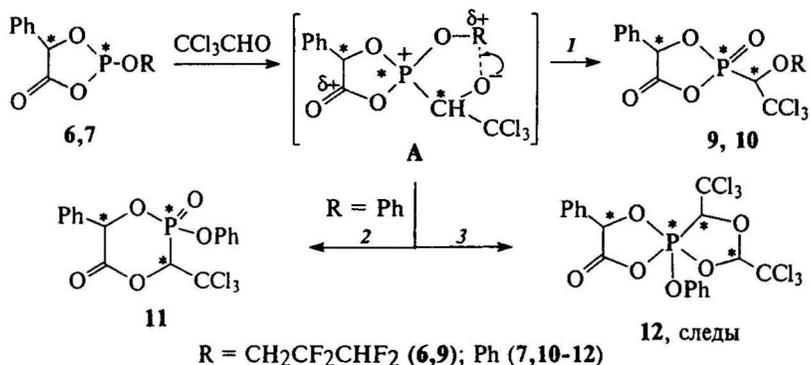
При изменении порядка смешения реагентов – добавлении триэтиламина к смеси фосфита и кислоты удалось получить производные Р(III) (6-8), строение которых подтверждено данными ЯМР  $^{31}\text{P}$  ( $\delta_{\text{P}}$  115-125 м.д.).



$\text{R}, \text{R}_1, \text{R}_2 = \text{PrF}, \text{H}, \text{Ph}$  (6);  $\text{Ph}, \text{H}, \text{Ph}$  (7);  $\text{Ph}, \text{Me}, \text{Me}$  (8).

Из литературы известно, что близкие структурные аналоги полученных нами 4-оксо-1,3,2-диоксафосфоланов (6-8) – фосфорилированные производные салициловой кислоты – проявляют необычную реакционную способность в реакциях с карбонильными соединениями, образуя продукты расширения цикла,

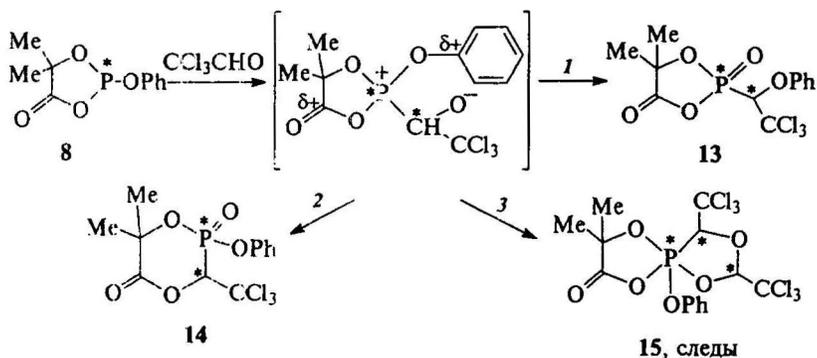
причем наиболее однозначные результаты были получены для хлоралей и гексафторацетона. Исходя из структурных особенностей диоксафосфоланов (6-8) (присутствие нуклеофильного атома фосфора и электрофильной карбонильной группы) можно было ожидать, что они также способны к реакциям расширения цикла с перечисленными карбонильными соединениями. Однако оказалось, что взаимодействие фосфоланов (6-8) с хлоралем и гексафторацетоном определяется прежде всего природой экзоциклического заместителя при атоме фосфора и может приводить как к образованию продуктов расширения цикла, так и к соединений иной природы. Так, в реакции хлоралей с 2-тетрафторпропокси-1,3,2-диоксафосфоланом (6) ( $d_1 : d_2 = 3 : 2$ ) происходит неожиданно легкое образование продукта миграции тетрафторпропильного заместителя на атом кислорода хлоралей – фосфоната (9) [ $P$ ,  $\delta$  80.84 д.д. ( $d_1$ ) ( $^1J_{PC}$  164.5,  $^1J_{HC}$  147.4); 80.63 д.д. ( $d_2$ ) ( $^1J_{PC}$  166.2,  $^1J_{HC}$  146.8);  $CCl_3$ , 99.33 д.д. ( $d_1$ ) ( $^2J_{PCC}$  11.7,  $^2J_{HCC}$  3.0); 99.24 д.д. ( $d_2$ ) ( $^1J_{PCC}$  11.7,  $^1J_{HCC}$  3.0 Гц)] с высокой степенью стереоселективности ( $d_1 : d_2 = 3 : 2$ ). Этот результат, связан, с нашей точки зрения, с реализацией внутримолекулярного нуклеофильного замещения у экзоциклического атома углерода в промежуточном биполярном ионе (А), поскольку известно, что фторалкильные заместители очень трудно отщепляются в большинстве известных реакций ФОС, протекающих с образованием фосфорильной группы. Обычные фосфиты реагируют с хлоралем по реакции Перкова. Получив такой неожиданный результат, мы вовлекли во взаимодействие с хлоралем 2-фенокси-1,3,2-диоксафосфолан (7), который содержит фенильную группу, не проявляющую в обычных условиях склонности к отщеплению, аналогичному алкильной группе в реакциях ФОС. Оказалось, что взаимодействие фосфолана (7) с хлоралем также протекает в мягких условиях, но носит значительно более сложный характер, давая три продукта (10-12).



В качестве основного процесса наблюдается расширение пятичленного гетероцикла до шестичленного (11) [ $\delta_p$  -6.0, -6.7 м.д. (3 : 1)] (путь 2) (70-75 %). Несмотря на присутствие трудноотщепляемого фенильного заместителя, в незначительной степени также происходит образование фосфонатов (10) [ $\delta_p$  5.7, 4.6 м.д.

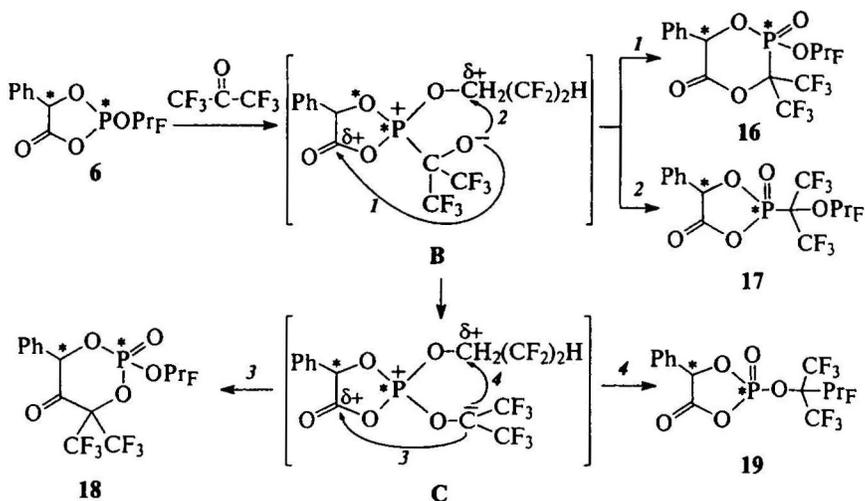
(10 : 1)] – продуктов формальной миграции фенильного заместителя на оксианионный центр промежуточного биполярного иона (А) (путь 2) (20-25 %). По всей вероятности, этот процесс является внутримолекулярным и не имеет аналогий в химии эфиров фосфора. И наконец, в следовых количествах происходит образование спирофосфоранов со связью Р-С (12) [ $\delta_p$  –37.8, –40 м.д. (52 : 9)] (путь 3). Таким образом, синтетический результат реакции с хлоралем зависит от природы заместителя у атома фосфора; процесс обладает высокой стереоселективностью.

С целью выяснения возможного влияния заместителей в пятичленном цикле на синтетический результат реакции нами было предпринято изучение взаимодействия фосфорилированного производного метилмолочной кислоты – соединения (8) с хлоралем. В отличие от производного миндальной кислоты, здесь процесс является менее регио- и стереоселективным – реализуется три направления (1-3), причем пути 1, 2 с сопоставимыми вкладами [13,  $\delta_p$  13.0, 11.1 м.д. (15 : 14); 14,  $\delta_p$  6.0, 4.0 м.д. (87 : 17); 15,  $\delta_p$  –32.0, –32.3 м.д. (9 : 7)].

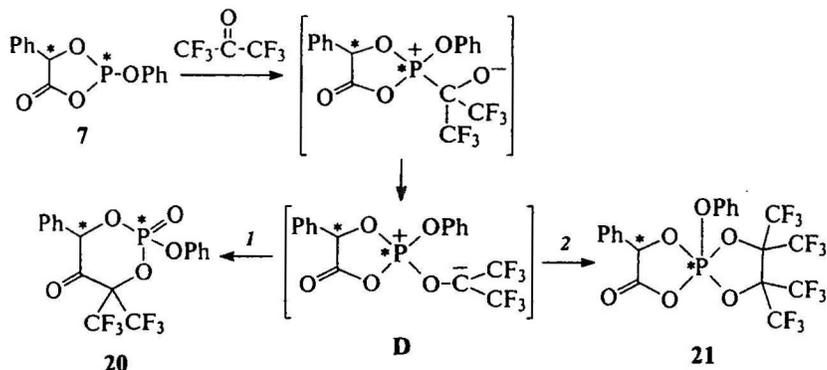


Значительное внимание было уделено исследованию взаимодействия 1,3,2-диоксафосфоланов (6-8) с гексафторацетоном, поскольку здесь процесс расширения гетероцикла мог сопровождаться Р-С-О → Р-О-С-перегруппировкой, как это имеет место в реакциях салицилфосфитов с гексафторацетоном. Реакция 2-тетрафторпропоксипроизводного (6) с гексафторацетоном протекает значительно сложнее, чем с хлоралем, обладает низкой регио- и стереоселективностью и приводит к образованию четырех региоизомерных соединений – продуктов расширения и сохранения фосфоланового цикла (16-19), образование которых происходит, по-видимому, из биполярных ионов Р-С-О (В) и Р-О-С (С) (направления 1-4). Изомерные соединения (16-19) идентифицированы на основании данных ЯМР  $^1H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{31}P$  и ИК спектроскопии. Так, в спектре ЯМР  $^{31}P$  им соответствуют 8 сигналов ( $\delta_p$  3.0, 2.6, –4.2, –4.8, –12.0, –13.1, –16.4, –17.4). В ИК спектре смеси имеется целая серия полос от 1700 до 1790  $cm^{-1}$ , свидетельствующая о сложноэфирном и кетонном окружении группы С=О. В спектре ЯМР  $^{13}C$  смеси соединений (16-19) имеются три типа углеродов С=О, принадлежащих кетонным группам ( $\delta_c$  187.42, 187.35 м.д.,  $^3J_{POCC}$  5.4-5.8 Гц) в фосфоринане (18) [и указывающим на присутствие фрагмента С(О)-С(СF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-О-Р(О)], карбонильным груп-

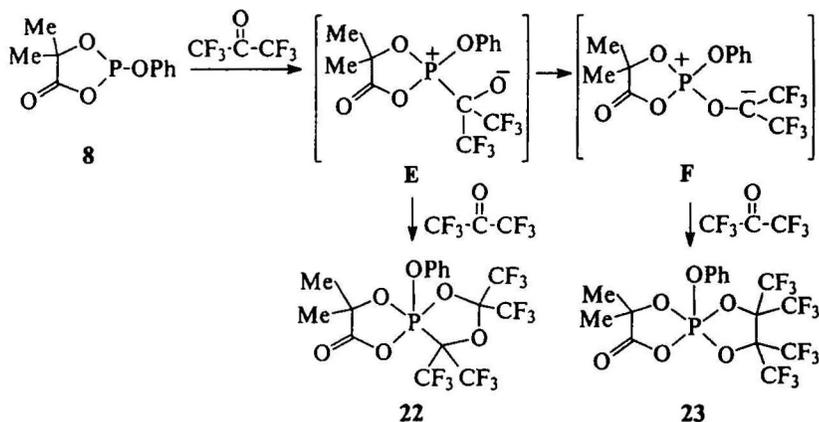
пам, входящим в состав фосфоринана (16) в окружении C(O)-O-C(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-P(O) (162.78 и 162.79 м. д., <sup>3</sup>J<sub>POC</sub> 15.2-14.6 Гц), и наконец, карбонильным группам региоизомерных фосфонатов и фосфатов с пятичленным циклом (17, 19) (170.41, 169.82, 169.74, 169.4 м.д., <sup>2</sup>J<sub>POC</sub> 7.1-8.4 Гц).



Только по двум направлениям протекает взаимодействие 4-оксо-5-фенил-2-фенокси-1,3,2-диоксафосфолана (7) с гексафторацетоном. При этом основным продуктом реакции является фосфоринан (20) [C=O, 187.40 м (d<sub>1</sub>) (<sup>3</sup>J<sub>POCC</sub> 7.7, <sup>2</sup>J<sub>HCC</sub> 3.6, <sup>3</sup>J<sub>FCCC</sub> 1.0-1.2); 188.04 м (d<sub>2</sub>) (<sup>3</sup>J<sub>POCC</sub> 7.9-8.1, <sup>2</sup>J<sub>HCC</sub> 3.5)], который образуется в результате нуклеофильного замещения атома кислорода у карбонильного углерода карбанионным центром биполярного иона (D). В следовых количествах также происходит присоединение второй молекулы гексафторацетона к этому иону с образованием фосфорана (21) [ $\delta_P$  -75.1, -75.8 м.д. (16 : 5)].



В отличие от описанных процессов взаимодействие 2-фенокси-4-оксо-5,5-диметил-1,3,2-диоксафосфолана (8) с гексафторацетоном неожиданно приводит к образованию только изомерных спирофосфоранов со связями P-C (22) ( $\delta_p -45.6 + -46.5$  м.д.) и POC (23) ( $\delta_p -73.2$  м.д.) в соотношении 4 : 7. Очевидно здесь скорости перегруппировки P-C-O  $\rightarrow$  P-O-C и присоединения промежуточных биполярных ионов (E, F) сопоставимы.



**5. Физиологическая активность пектиновых веществ амаранта.** Изучены протективные свойства пектина, выделенного из амаранта, при экспериментальном диабете, вызванном у крыс. Установлено, что введение пектина крысам с аллоксановым диабетом повышает гликемию и одновременно оказывает протективное (иммуностимулирующее) действие, проявляющееся в увеличении процента выживаемости животных по сравнению с контрольной группой.

В опытах на изолированном сердце крыс с ишемической болезнью показано, что применение амарантового пектина вызывает спазм коронарных сосудов, но не влияет на тонус сокращения сердечной мышцы. Пектин оказывает кардиопротекторное действие на сердечную мышцу при ишемической болезни.

#### Основные результаты и выводы.

1. Разработаны способы выделения высокомолекулярных полисахаридов – пектинов из травы амаранта в условиях ферментативного и кислотного гидролиза при использовании слабых кислот, показано, что их физико-химические характеристики соответствуют полисахаридам со средней молекулярной массой 20000-60000, содержанием галактуроновой кислоты ~ 70 % и степенью этерификации 55-65 %.

2. Методами жидкостной хроматографии с использованием мембранной фильтрации, ИКС и спектроскопии ЯМР  $^{13}\text{C}$  впервые показано, что в состав пектиновых веществ амаранта кроме  $\alpha$ -D-галактуроновой кислоты входят рамноза, арабиноза, глюкоза, ксилоза. Основная цепочка полимера содержит связанные

(1→4)-гликозидной связью остатки *D*-галактурановой кислоты; нейтральные сахара могут присутствовать как в основной цепи, так и в боковых ответвлениях, о чем свидетельствует сложная спектральная картина в области ацетального углерода в спектре ЯМР <sup>13</sup>C.

3. Предложены и апробированы новые мягкие алкилирующие реагенты для получения функционально замещенных сложных эфиров на основе доступных солей пиридина, содержащих остатки карбоновых и фосфоновых кислот и эпихлоргидрина, которые позволяют модифицировать природные карбоновые кислоты с гидрофобными заместителями, повышая растворимость модифицированных производных в воде.

4. Впервые получены модифицированные производные амарантового пектина на основе реакций ацилирования, амидирования и фосфорилирования, а также алкилирования как традиционными алкилирующими средствами, так и новыми типами последних — хлорпропанолпиридиновые соли, содержащими остатки фармакофобных групп. Методом ИК спектроскопии выявлены косвенные данные, свидетельствующие о том, что при химической модификации пектинов конформация пиранозного цикла основного звена полисахарида — галактурановой кислоты — сохраняется; изменяется лишь система водородных связей молекулы.

5. Выявлена высокая биологическая активность амарантового пектина: протективная — у крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом, проявляющаяся в увеличении процента выживаемости животных по сравнению с контрольной группой, а также кардиопротекторная, которая установлена на изолированном сердце крыс с ишемической болезнью.

6. Результат фосфорилирования α-гидроксикарбоновых кислот и их сильных производных хлорангидридами и полными эфирами кислот P(III) зависит от порядка смешения реагентов и присутствия кислых примесей. При фосфорилировании хлорангидридами и фосфитами осуществляется процесс необычного окислительно-восстановительного диспропорционирования до спирофосфоранов и фосфатов; циклическое производное P(III) можно получить с высоким выходом лишь при добавлении основания к смеси дихлорфосфита и α-гидроксикарбоновой кислоты. Впервые выделен кристаллический изомерно чистый гидроспирофосфоран, содержащий три хиральных центра и две эндоциклические ангидридные связи P-OC(O); методом PCA установлена его конфигурация.

7. Впервые показано, что взаимодействие 2-алкокси-4-оксо-1,3,2-диоксафосфанов, полученных из α-гидроксикарбоновых кислот, с хлоралем в зависимости от природы экзоциклического заместителя у атома фосфора протекает по двум направлениям — по пути внутримолекулярного замещения либо у эндоциклического карбонильного атома углерода, либо у экзоциклического углерода и приводит к образованию либо 1,4,2-диоксафосфоринанов, либо 1,3,2-диоксафосфанов с экзоциклической связью фосфор-углерод с высокой степенью стереоселективности. В реакции с гексафторацетоном происходит образование как 1,3,2-диоксафосфоринанов, так и спирофосфоранов со связями P—C и P—O.

**Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:**

1. Соснина Н.А., Хазиев Р.Ш., Вандюкова И.И., Гарусов А.В., Цапаева О.В., Офицеров Е.Н., Коновалов А.И. *Пектиновые вещества *Amarantus cruentus* L* // Химия природных соединений. 1996. № 1. С. 7-10.
2. Десалень Т.Д., Цапаева О.В., Соснина Н.А., Елкина Г.И., Левандовский И.А., Бравова И.Н., Офицеров Е.Н., Коновалов А.И. *Выделение пектина из *Amarantus cruentus* и изучение его влияния на работу изолированного сердца крыс* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1997. Т. 123. № 1. С. 91-94.
3. Цапаева О.В., Миронов В.Ф., Еникеев К.М., Коновалов А.И. *Сохранение фосфоанового гетероцикла в продукте реакции 4-оксо-2-(2,2,3,3-тетрафторпропокси)-5-фенил-1,3,2-диоксафосфолана с эюралем: неожиданно легкая миграция фторалкильного заместителя на О-анионный центр* // ЖОХ. 2000. Т. 70. Вып. 3. С. 517-518.
4. Миронов В.Ф., Цапаева О.В., Еникеев К.М., Коновалов А.И. *Реакция 4-оксо-5-фенил-2-фенокси-1,3,2-диоксафосфолана с гексафторацетоном: расширение фосфоанового гетероцикла до фосфоринанового* // ЖОХ. 2000. Т. 70. Вып. 3. С. 519-520.
5. Вандюкова И.И., Цапаева О.В., Соснина Н.А., Офицеров Е.Н. *Спектроскопическое изучение пектинов *Amarantus cruentus**. // I Международный симпозиум "Новые и нетрадиционные растения и перспективы их практического использования". Тезисы докладов. Пушкино. 1995. С. 30-31.
6. Соснина Н.А., Цапаева О.В., Е.Н.Офицеров Е.Н., Коновалов А.И. *Пектины растений вида *Amarantus cruentus** // I Международный симпозиум "Новые и нетрадиционные растения и перспективы их практического использования". Тезисы докладов. Пушкино. 1995. С. 32.
7. Kononov A.I., Sosnina N.A., Tsepaeva O.V., Ofitserov E.N., Lapin A.A., Yacubov Sh.M. *Pectins of *Amarantus cruentus* L* // Proceeding of the Fifth international Congress of Leaf Protein Research "LeafPro-96". Russia, Rostov-on-Don. 1996. Vol. 3. P. 102-104.
8. Коновалов А.И., Ашаева Л.А., Хазиев Р.Ш., Лапин А.А., Соснина Н.А., Цапаева О.В., Якубов Ш.М. *Протективные свойства пектиновых веществ *Amarantus cruentus** // III Российский национальный конгресс "Человек и лекарство". Тезисы докладов. Москва. 1996. С. 140.
9. Десалень Т.Д., Цапаева О.В., Соснина Н.А., Офицеров Е.Н., Гинс В.К. *Исследование активности действия фракций *Amarantus cruentus* на модели изолированного сердца крыс* // III Российский национальный конгресс "Человек и лекарство". Тезисы докладов. Москва. 1996. С. 19.
10. Цапаева О.В., Мирснз В.Ф., Магафурова И.В., Сохно С.В., Ведерникова Е.Ю., Миронова О.Ю., Офицеров Е.Н., Коновалов А.И. *Изучение комплексобразующих свойств амрантового пектина физико-химическими методами* // Научно-практическая конференция "Амарант и люпин – источники новых пищевых и диетических продуктов". Тезисы докладов. Санкт-Петербург. 1996. С. 85.
11. Цапаева О.В., Лапин А.А., Миронов В.Ф., Магафурова И.В., Вандюкова И.И., Офицеров Е.Н., Коновалов А.И. *Изучение особенностей структуры амаран-*

тового пектина // Научно-практическая конференция "Амарант и люпин – источники новых пищевых и диетических продуктов". Тезисы докладов. Санкт-Петербург. 1996. С. 82.

12. Офицеров Е.Н., Костин В.И., Цапаева О.В., Пузырева Л.А., Коновалов А.И. *Пектиновые вещества из Амаранта в качестве фиторегуляторов* // II международный симпозиум "Новые и нетрадиционные растения и перспективы их практического использования". Тезисы докладов. Пушкино. 1997. С. 12.

13. Соснина Н.А., Еникеев К.М., Цапаева О.В., Минзанова С.Т., Миронов В.Ф., Лапин А.А., Офицеров Е.Н., Коновалов А.И. *О строении пектиновых веществ растений рода *Amaranthus cruentus** // II Международный симпозиум "Новые и нетрадиционные растения и перспективы их практического использования". Тезисы докладов. Пушкино. 1997. С. 17-18.

14. Соснина Н.А., Цапаева О.В., Минзанова С.Т., Миронов В.Ф., Лапин А.А., Офицеров Е.Н., Коновалов А.И. *Химический состав растений Амаранта как основа разработки направлений его использования* // II международный симпозиум "Новые и нетрадиционные растения и перспективы их практического использования". Тезисы докладов. Пушкино. 1997. С. 22-24.

15. Соснина Н.А., Еникеев К.М., Цапаева О.В., Миронов В.Ф. *Изучение структуры пектиновых веществ и их производных методом спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$*  // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии. Тезисы докладов. Саратов. 1997. С. 339.

16. Соснина Н.А., Цапаева О.В., Миронов В.Ф. *Комплексообразующая способность веществ растений рода *Amaranthus cruentus** // Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии. Тезисы докладов. Саратов. 1997. С. 342-343.

17. Коновалов А.И., Офицеров Е.Н., Соснина Н.А., Шекуров В.Н., Цапаева О.В., Лапин А.А., Минзанова С.Т., Бережной А.Н., Мутрисков А.Я. *Способ получения пектина* // Патент РФ № 2119497 (1998).

18. Цапаева О.В., Миронов В.Ф., Коновалов А.И. *Фосфорилирование  $\alpha$ -гидроксикарбоновых кислот производными трехвалентного фосфора* // Молодежная научная школа по органической химии. Тезисы докладов. Екатеринбург. 1999. С. 62.

19. Tseraeva O.V., Mironov V.F., Konovalov A.I., Musin R.Z., Enikeev K.M. *The reaction of 2-tetrafluoropropoxy-4-oxo-5-phenyl-1,3,2-dioxaphospholane with carbonyl compounds. Unexpectedly facile migration of the fluoroalkyl substituent on the O-anionic center* // XII International Conference on Chemistry of Phosphorus Compounds. Kiev. 1999. P. 39.

20. Цапаева О.В., Миронов В.Ф., Губайдуллин А.Т., Литвинев И.А., Коновалов А.И. *Реакция производных миндальной кислоты с трис(тетрафторпропил)- и тетрафторпропилдихлорфосфитами. Структура 5-гидро-2,7-диоксо-3,8-дифенил-1,4,6,9-тетраокса-5-фосфаспиро[4,4]нонана* // Молодежная школа-конференция "Металлоорганическая химия на рубеже XXI века". Тезисы докладов. Москва. 1999. С. 95.

Отпечатано с готового оригинал-макета. Печать RISO.

Бумага офсет № 1. Формат 60\*84 1/16.

Объем 1,25 п.л. Тираж 100 экз. Заказ 12.

Отпечатано на полиграфическом участке издательства «Экоцентр»,

г. Казань, ул. К. Маркса, 70.

*Зяб-*