

Цепева 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 10 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.

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 α -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 α -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}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 α -гидроксикарбоновых кислот, выявлены условия образования циклических производных 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 α -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*" (Пушкино, 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.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 180 страницах машинописного текста, содержит 36 таблиц и 19 рисунков. Список цитируемой литературы включает 282 наименований. 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 пороволоконных 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) ₂	1.65	2	70	1 : 10	3.5	66	25000-30000
(COOH) ₂	1.65	2	90	1 : 10	3.7	50	20000
0.5 % (COOH) ₂		4	55	1 : 8	4.5	70	40000-50000
0.35 % (COOH) ₂		2.5	50	1 : 16	4.3	70	40000-45000
0.25 % (COOH) ₂		1	45	1 : 13	3.9	72	40000-45000
Ферментативный гидролиз	4.5	4	50-55	1 : 16	3.7	70	45000-50000
(CH ₂ COOH) ₂	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 шавелевой 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.

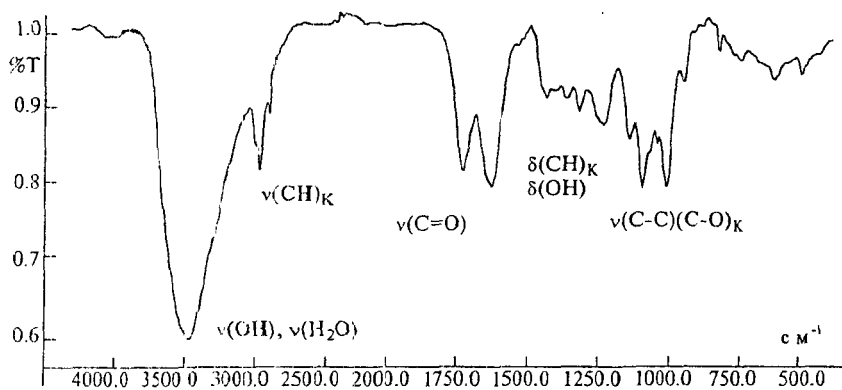


Рис. 1. ИК спектр пектина из амаранта.

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

частота, см^{-1}	Преимущественные типы колебаний	частота, см^{-1}	Преимущественные типы колебаний
3452	$\nu(\text{OH})_C, \nu(\text{H}_2\text{O})$	1231	$\delta(\text{CH})_K, \delta(\text{OH})_C, \delta(\text{OH})_A, \nu(\text{C-O-C})_E$
3198	$\nu_{as}(\text{CH})_E$	1145	$\nu(\text{C-O-C})$
2949	$\nu(\text{CH})_K$	1102	$\nu(\text{C-C})(\text{C-O})_K$
2573	$\nu(\text{OH})_C, \nu(\text{OH})_A,$	1080	$\nu, \delta(\text{C-OH})_C$
1748	$\nu(\text{C=O})_E$	1050	$\nu(\text{C-C})(\text{C-O})_K$
1634	$\delta(\text{H}_2\text{O})$	1015	$\nu(\text{C-C})(\text{C-O})_K$
1450	$\delta_{as}(\text{CH}_3)_E$	948	$\gamma(\text{OH})_C$
1400	$\nu, \delta(\text{C-OH})_A$	900	$\rho(\text{CH}_3)_E$
1331	$\delta(\text{CH})_K$	825, 800, 710, 629, 529	Пульсационные колебания пиранозных колец

В области $3000\text{-}3600 \text{ см}^{-1}$ наблюдается интенсивная широкая асимметричная полоса, соответствующая валентным колебаниям группы OH. Смещение полосы в низкочастотную область по сравнению с частотой свободной гидроксильной группы ($3670\text{-}3580 \text{ см}^{-1}$) $\nu(\text{OH})$ объясняется ее участием в водородных связях. Воздушно-сухие пектиновые вещества содержат около 10 % воды, поэтому, валентные колебания воды $\nu(\text{H}_2\text{O})$ перекрываются полосами $\nu(\text{OH})_C$ гидроксильных пектина. В области 2600 см^{-1} наблюдается широкая сложная полоса, относящаяся к валентным колебаниям гидроксильных групп карбоксиллов $\nu(\text{OH})_A$, связан-

ных водородной связью в карбоксил-карбоксильной димерной группировке. Область 2000-1500 см^{-1} - область колебаний $\text{C}=\text{O}$ группы. Здесь возможно поглощение $\nu(\text{C}=\text{O})$ трех групп: (1748-1739 см^{-1}), (1700-1680 см^{-1}), (1610-1550 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 см^{-1} характерна для колебаний $\nu(\text{C}-\text{C}, \text{C}-\text{O})$ пиранозных колец. В области 950-960 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 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, α - (888, 840, 770 см^{-1}) и β -Galp (927, 880, 780 см^{-1}) с конформацией ${}^4\text{C}_1$ явно показывает, что пиранозные циклы в полимерных цепях амарантового пектина находятся в ${}^4\text{C}_1$ - α -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 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 α -полигалактуроновой кислоты остатки α -, β -глюкозы, α -, β -арабинозы, α -, β -галактозы.

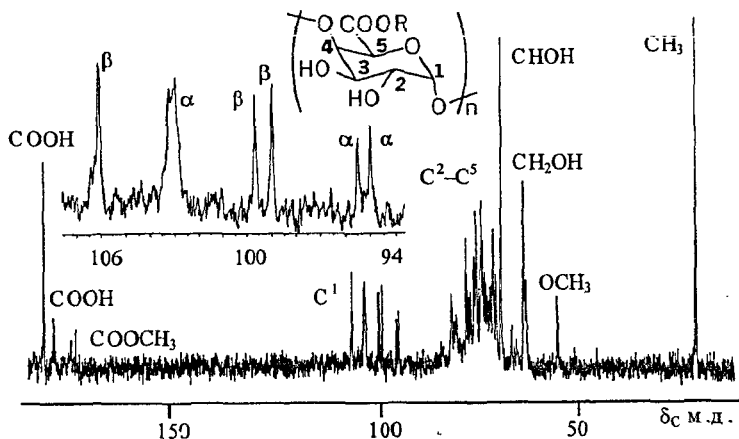


Рис. 2. Спектр ЯМР ${}^{13}\text{C}$ образца пектина из амаранта, полученного гидролизом молочной кислотой ($\text{R} = \text{H}, \text{OCH}_3$)

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}C очищенного пектина, полученного с помощью гидролиза щавелевой кислотой приведены в табл. 3.

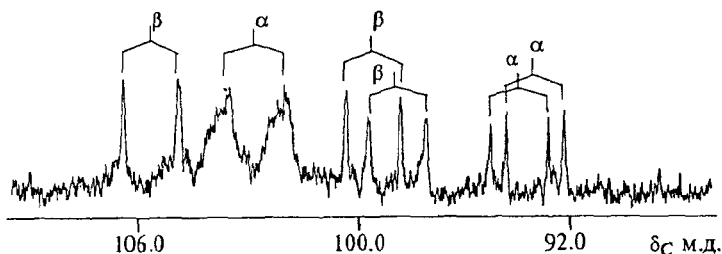


Рис. 3. Область аномерных углеродов образца пектина из амаранта, полученного гидролизом молочной кислотой.

Исходя из величин КССВ ацетального углерода C^1 нами установлено, что основное звено пектина — галактуроновая кислота является α -аномером. В α -аномере КССВ $^1\text{J}_{\text{HC}}$ $\sim 169.0\text{--}172.0$ Гц, тогда как в β -аномере она меньше (160–164 Гц). Присутствие в нативном пектине небольшого числа метоксилированных групп COOMe ($\sim 10\text{--}20\%$) приводит к появлению соответствующих минорных сигналов 173.67 (COOMe), 107.73 (C^1), 82.33 (C^4), 55.74 (OCH_3).

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

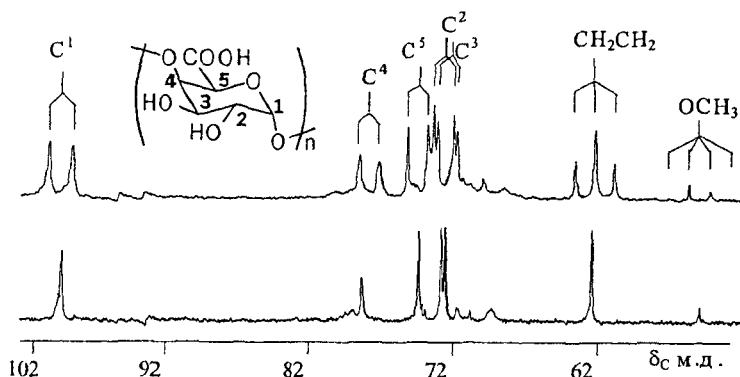


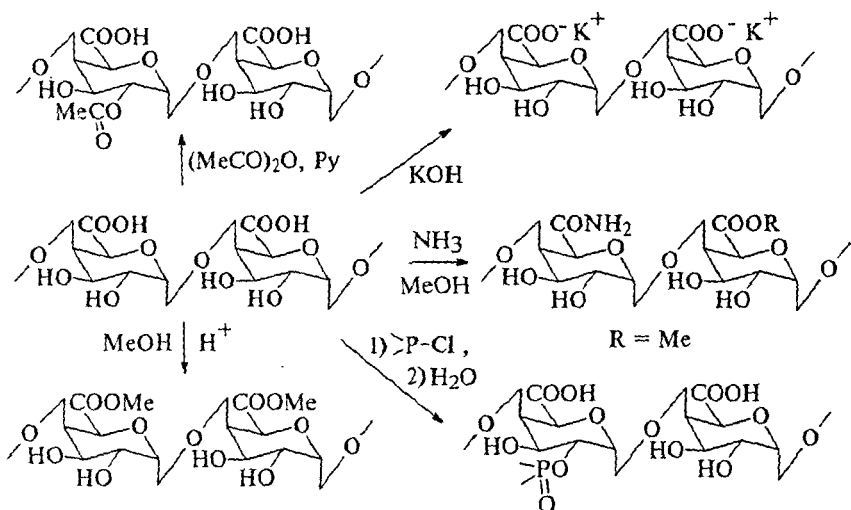
Таблица 3. Данные спектра ЯМР ^{13}C образца пектина, полученного гидролизом щавелевой кислоты.

№С	δ д.д.	J Гц
COOH	174.44 с (уш. с)	-
C ¹	102.77 уш. с (уш. д)	169.0-171.0 (НС)
C ⁴	80.86 уш. с (уш. д)	138.0-142.0 (НС)
C ⁵	73.67 уш. с (уш. д)	139.0-143.0 (НС)
C ² , C ³	72.20 уш. с (уш. д)	139.0-143.0 (НС)

Таким образом, проведенный анализ спектров ЯМР ^{13}C очищенного пектина позволяет заключить, что полученный биополимер полисахаридной природы является α -(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. Отрабатывая 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 см^{-1} , обусловленная как валентными колебаниями групп N-H, так и колебаниями $\nu(\text{OH})$, $\nu(\text{H}_2\text{O})$. В области 1650-1430 см^{-1} присутствуют три интенсивные полосы, вызванные колебаниями амидной группы. Полоса $\nu(\text{C}=\text{O})_a$ в (1749 см^{-1}), обусловленная колебаниями карбонила ацетильных групп, перекрывается с частотами $\nu(\text{C}=\text{O})_d$ карбоксильных групп. Очень интенсивное поглощение, соответствует колебанию эфирной связи $\nu(\text{COC})_a$ (1250 см^{-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 C² и C³. Более размытый характер полос в области 1100-1000 см^{-1} в спектре амида говорит о влиянии состояния карбоксильных групп пектина на систему водородных связей макромолекулы. На основании стабильности спектра в области 650-900 см^{-1} для пектозой кислоты, ацетилированного и амидированного пектинов можно утверждать, что введение ацетильных и амидных групп не нарушает $^4\text{C}_1$ -конформации пиранозных колец пектинов и α -конформации гликозидных связей.

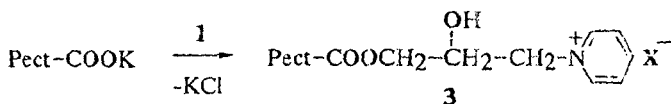
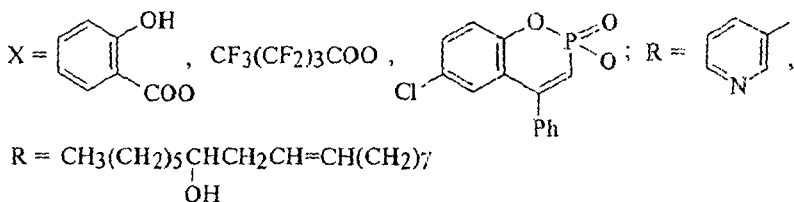
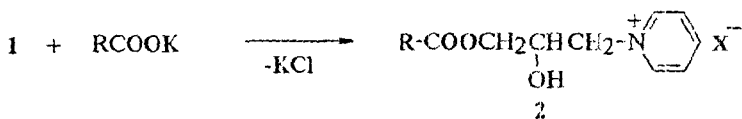
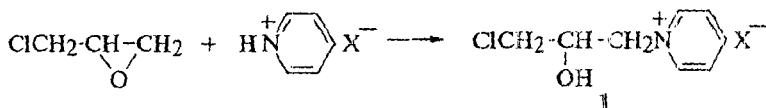


Силилирование пектина гексаметилдисилазаном и триметилхлорсиланом приводит к незначительному введению в молекулу пектина триметилсилильных групп, которые в процессе выделения гидролизуются, что не вызвало сколь-нибудь существенного изменения свойств исходного пектина. Фосфорилирование пектинов позволяет 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. Строение полученных с количественным выходом функционально замещенных эфиров (2) доказано методом ИКС и ЯМР ¹³C (по появлению сигналов ОСН₂ вместо ССН₂). Процесс этерификации пектата натрия солями (1) протекает значительно сложнее, чем модельных соединений. Полученные произ-

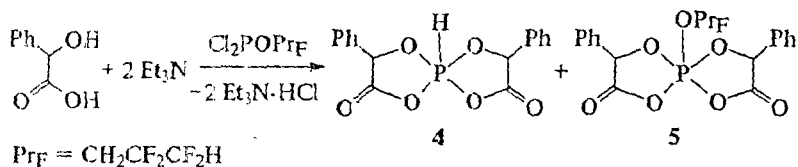
водные (3) (Рест – остаток пектина) представляют собой стекла или аморфные порошки, хорошо растворимые в воде и ДМФА в отличие от самого пектина пектата.

В ИК спектрах полученных образцов появляются интенсивные полосы при 1730-1740 см⁻¹, принадлежащие группам этерифицированного пектина. В спектре ЯМР ¹³С интенсивность сигналов ядер углерода фрагмента COO-CH₂CH(OH)CH₂N⁺ выше интенсивности сигналов ядер углерода СН пиранозных колец пектиновых веществ. О степени протекания реакции можно судить по исчезновению сигналов группы CH₂Cl (δ_С 45.86 м.д., ¹J_{НС} 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 α -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-триметилсилильного производного миндальной кислоты $\text{Me}_3\text{SiOCH}(\text{Ph})\text{COOSiMe}_3$.

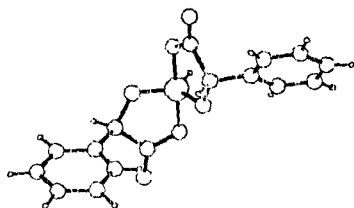
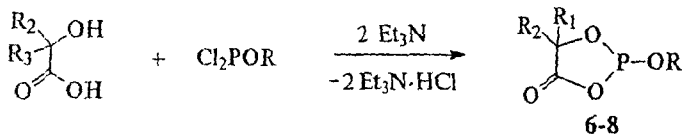


Рис. 5. Геометрия молекулы (4).

Гидроспирофосфоран (4) был выделен в кристаллическом виде и его структура подтверждена данными ЯМР ^{31}P ($\delta_{\text{P}} -44.3$ и -45.1 м.д., $\nu_{\text{H-P}}$ 943-944 Гц, CH_2Cl_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 аксиальные, протон находится в экваториальной позиции.

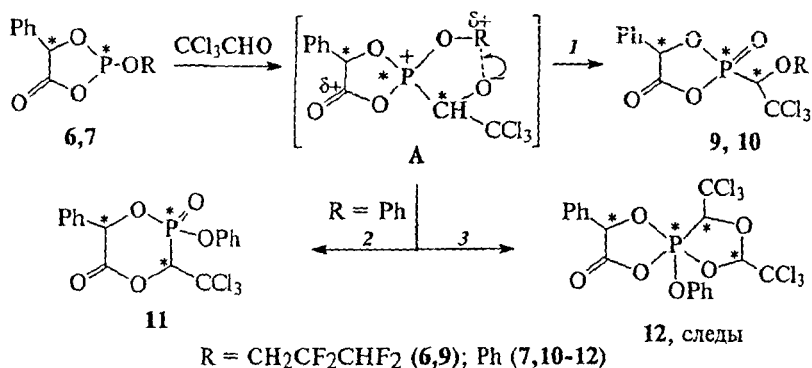
При изменении порядка смешения реагентов — добавлении триэтиламина к смеси фосфита и кислоты удалось получить производные Р(III) (6-8), строение которых подтверждено данными ЯМР ^{31}P (δ_{P} 115-125 м.д.).



$\text{R}, \text{R}_1, \text{R}_2 = \text{Pr}_F, \text{H}, \text{Ph}$ (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-диоксафосфоранов (6-8) — фосфорилированные производные хлорилевой кислоты — проявляют необычную реакционную способность в реакциях с карбонильными соединениями, образуя продукты расширения цикла,

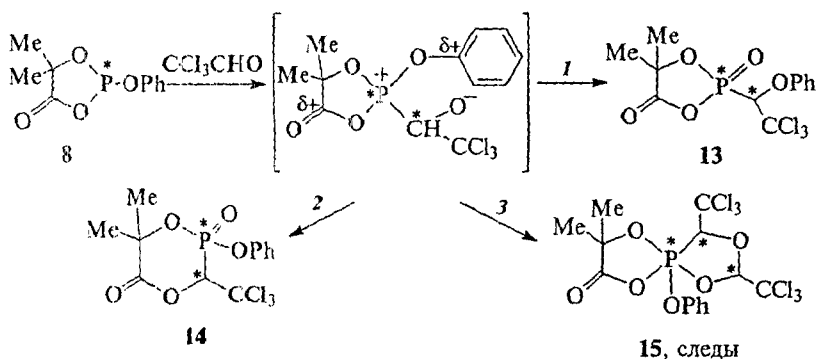
причем наиболее однозначные результаты были получены для хлорала и гексафторацетона. Исходя из структурных особенностей диоксафосфоланов (6-8) (присутствие нуклеофильного атома фосфора и электрофильной карбонильной группы) можно было ожидать, что они также способны к реакциям расширения цикла с перечисленными 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 хлорала 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 хлорала — фосфоната (9) [ρ_C , δ 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) [δ_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) [δ_P 5.7, 4.6 м.д.

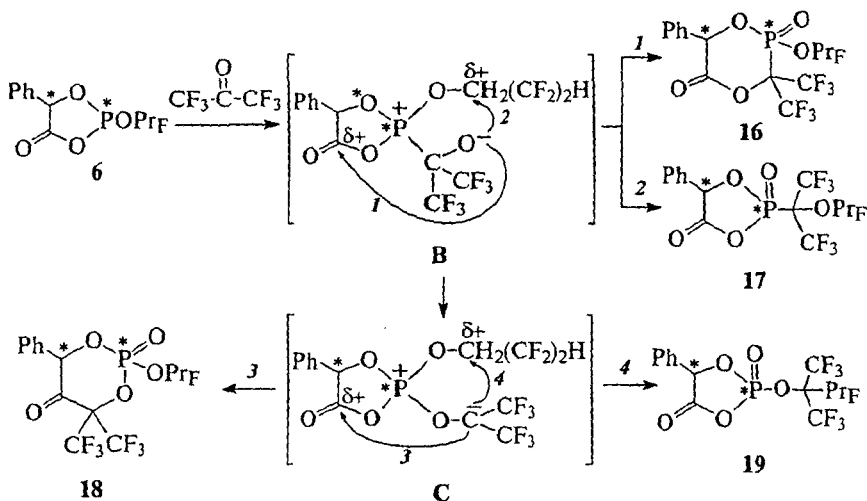
(10 : 1)] – продуктов формальной миграции фенольного заместителя на оксианионный центр промежуточного биполярного иона (А) (путь 2) (20-25 %). По всей вероятности, этот процесс является внутримолекулярным и не имеет аналогий в химии эфиров фосфора. И наконец, в следовых количествах происходит образование спирофосфоранов со связью Р-С (12) [δ_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, δ_p 13.0, 11.1 м.д. (15 : 14); 14, δ_p 6.0, 4.0 м.д. (87 : 17); 15, δ_p -32.0, -32.3 м.д. (9 : 7)].

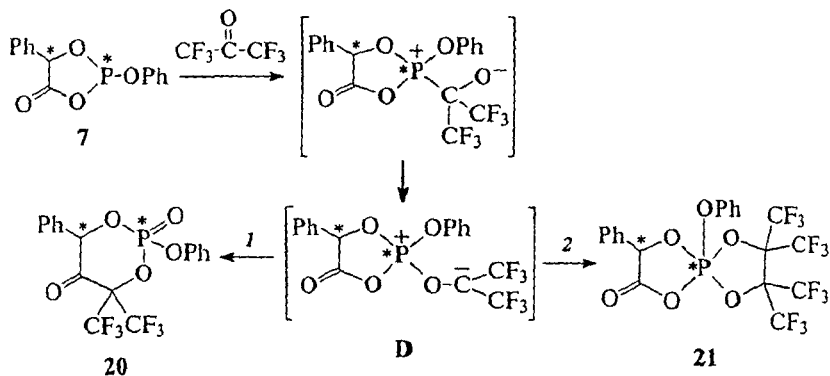


Значительное внимание было уделено исследованию взаимодействия 1,3,2-диоксафосфоланов (6-8) с гексафторацетоном, поскольку здесь процесс расширения гетероцикла мог сопровождаться Р-С-О → Р-О-С-перегруппировкой, как это имеет место в реакциях сапидилфосфитов с гексафторацетоном. Реакция 2-тетрафторпропокси производного (6) с гексафторацетоном протекает значительно медленнее, 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, ¹³C, ³¹P и ИК спектроскопии. Так, в спектре ЯМР ³¹P им соответствуют 8 сигналов (δ_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 см⁻¹, свидетельствующая о сложноэфирном и кетонном окружении группы С=О. В спектре ЯМР ¹³C смеси соединений (16-19) имеются три типа углеродов С=О, принадлежащих кетонным группам (δ_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(CF₃)₂-О-Р(О)], карбонильным груп-

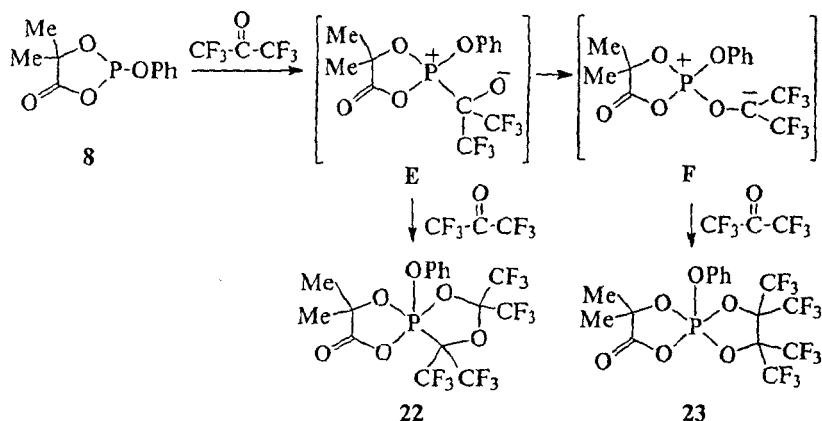
пам, входящим в состав фосфоринана (16) в окружении $\text{C}(\text{O})\text{-O-C}(\text{CF}_3)_2\text{-P}(\text{O})$ (162.78 и 162.79 м. д., $^3J_{\text{P}=\text{O}} 15.2\text{-}14.6$ Гц), и наконец, карбонильным группам региоизомерных фосфонатов и фосфатов с пятичленным циклом (17, 19) (170.41, 169.82, 169.74, 169.4 м.д., $^2J_{\text{P}=\text{O}}$ 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) [$\text{C}=\text{O}$, 187.40 м (d₁) ($^3J_{\text{P}=\text{O}}$ 7.7, $^2J_{\text{HCC}}$ 3.6, $^3J_{\text{FCC}}$ 1.0-1.2), 188.04 м (d₂) ($^3J_{\text{P}=\text{O}}$ 7.9-8.1, $^2J_{\text{HCC}}$ 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) [δ_{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) ($\delta_p -45.6 \div -46.5$ 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}C впервые показано, что в состав пектиновых веществ амаранта кроме α -D-галактуроновой кислоты входят рамноза, арабиноза, глюкоза, ксилоза. Основная цепочка полимера содержит связанные

(1→4)-гликозидной связью остатки D-галактуронозой 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 ^{13}C .

3. Предложены и апробированы новые мягкие алкилирующие реагенты для получения функционально замещенных сложных эфиров на основе доступных солей пиридиния, 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 — хлорпропанолпиридиниевыми солями, содержащими остатки фармакофобных групп. Методом ИК спектроскопии выявлены косвенные данные, свидетельствующие о том, что при химической модификации пектиной конформация пиранозного цикла основного звена полисахарида — галактуронозой 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 силильные 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 гидро спирофосфоран, содержащий три хиральных центра и две эндоциклически ангидридные связи P-OC(O); методом РСА установлена его конфигурация.

7. Впервые показано, что взаимодействие 2-алкокси-4-оксо-1,3,2-диоксафосфоранов, полученных из α -гидроксикарбоновых кислот, с хлоралем в зависимости от природы экзациклического заместителя у атома фосфора протекает по двум направлениям — по пути внутримолекулярного замещения либо у эндоциклического карбонильного атома углерода, либо у экзациклического углерода и приводит к образованию либо 1,4,2-диоксафосфоринанов, либо 1,3,2-диоксафосфола нов с экзациклической 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., Левацковский 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 фосфоланового гетероцикла в продукте реакции 4-оксо-2-(2,2,3,3-тетрафторпропокси)-5-фенил-1,3,2-диоксафосфолаана с хлоралем: неожиданно легкая миграция фтор-лигильного 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-диоксафосфолаана с гексафторацетоном: расширение фосфоланового 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. 31.
7. Konovalov 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., Мирноз В.Ф., Магафурова И.В., Сохно С.В., Ведерникова Е.Ю., Миронова О.Ю., Офицеров Е.Н., Коновалов А.И. *Изучение комплексообразующих свойств амарантового пектина физико-химическими методами* // Научно-практическая конференция "Амарант и люпин – источники новых пищевых и цветических 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-*

12. // 1996. . 82. 0.J3., // II Me)K4jHapoi
13. " 1997. . 12. *Amaranthus cruentus* // II ; "
14. . 1997. . 17-18. // II ^
15. " . 1997. . 22-24. 1. £ ;
16. . 1997. . 339. *Amaranthus cruentus* // .\ > 6 !,
17. . 1997. . 342-343. // 2119497 (1998).
18. *KuoiGm* ^' II ;(1> . 1999. . 62.
19. Tsepaeva O.V., Mironov V.F., Kononov .I., Musia R.Z , IMkeev K.M. The action of 2-tetrafluoropropoxy-4-oxo-5-phenyl-1,3,2-dioxapho.[^]iokme wilk carbonyl pounds. Unexpectedly facile migration of the fluoroalkyl substituent on the O-anionic cer: II XII International Conference on Chemistry of Phosphoms Compounds. Kiev. 19 P, 39.
20. . . .I ()- ;
- 9- -5- [4,4] // ;4 - -3,8- -j,'I "N
- 95. XXI " .
- RiSO. • i j
1. 60*84 1/16. 1,25 . . 100 . 12.
- j-nacrKe « »,
- 70.