



БАХОЛДИНА Любовь Алексеевна

**СЛОЖНЫЕ ЭФИРЫ ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ: ВЫДЕЛЕНИЕ,
НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СИНТЕЗУ И ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ**

Специальность 02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Томск – 2018

Работа выполнена на кафедре «Биотехнология» Бийского технологического института (филиал) Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор,
Хлебников Андрей Иванович

Официальные оппоненты: **Ильясов Сергей Гаврилович**, доктор химических наук, доцент,
ФГБУН «Институт проблем химико-энергетических технологий» СО РАН, лаборатория синтеза высокоэнергетических соединений, заведующий лабораторией

Мальков Виктор Сергеевич, кандидат химических наук, доцент,
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», лаборатория органического синтеза, заведующий лабораторией

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Кузбасский государственный технический университет имени Т.Ф. Горбачева»

Защита состоится 19 декабря 2018 г. в 12 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 212.269.04 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 43а, 2-й корпус, Малая химическая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в Научно-технической библиотеке ФГАОУ ВО НИ ТПУ по адресу: 634050, г. Томск, ул. Белинского, 55 и на сайте <http://portal.tpu.ru/council/911/worklist>.

Автореферат разослан

"___" октября 2018 года.

И.о. ученого секретаря
диссертационного совета Д.212.269.04



Г.Б. Слепченко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Приоритетным направлением развития фармацевтики является создание высокоэффективных фармакологических средств, которое возможно за счет синтеза биологически активных соединений или выделения их из природных источников.

Феруловая кислота представляет собой природное соединение, которое обладает важными физиологическими и фармакологическими функциями. Химические, физические и фармакологические свойства этой фенолсодержащей кислоты могут быть улучшены путем ее функционализации. Такой подход позволит расширить сферы применения феруловой кислоты в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности.

К настоящему времени имеется значительное количество данных об антиоксидантной и противораковой активности феруловой кислоты и ее производных. В зависимости от природы заместителя (например, алифатические спирты, глицерин) в молекуле феруловой кислоты изменяются липофильные свойства ее производных, что влияет на их биологическую активность в среде, богатой липидами. Также наблюдается повышение антиоксидантной и противораковой активности функциональных производных в сравнении исходной феруловой кислотой. Большое значение имеет исследование влияния ее производных с олигосахаридными остатками, выделенных из гидролизной смеси клеточных стенок зерновых культур, на канцерогенез кишечника. Углеводный фрагмент в этом случае одновременно играет роль носителя и защиты для феруловой кислоты, обеспечивая ее транспорт в толстую кишку человека.

Также в настоящее время большой интерес представляют природные производные феруловой кислоты со стеролами (24-метиленциклоартенил, циклоартенил, кампестерил), которые составляют основную часть (около 80 %) природного антиоксиданта – γ -оризанола.

Однако, выделение соединений, обладающих биологической активностью, из природных источников сопровождается определенными трудностями, основными из которых являются невысокое содержание этих веществ в сырье, а также сложность выделения и очистки. Поэтому наиболее эффективным методом получения производных феруловой кислоты и ее аналогов является синтетический.

Ферулоилирование различных субстратов, в том числе полиолов, является одной из практически важных задач. Анализ способов получения ферулоилированных полиолов выявил две основные проблемы, требующие решения: первая – поиск более селективных и мягких ферулоилирующих средств, чем ангидриды и хлорангидриды; вторая – поиск способов селективного удаления ацетильной защиты с фенольного гидроксила феруловой кислоты. Рациональным способом решения этих проблем является сочетание химических и ферментативных методов в синтезе природных соединений.

Цели и задачи исследований

Цели: получение производных феруловой кислоты методами синтеза и путем выделения из пшеничных отрубей, оценка их цитотоксичности на линии клеток НСТ116 (рак толстой кишки человека).

Для достижения поставленных целей решались следующие задачи:

1. Исследование реакции ацилирования оксиметильных соединений на примере бензилового, фенилэтилового, аллилового, тетрагидрофурфурилового спиртов с применением дициклогексилкарбодиимида в качестве конденсирующего агента, оптимизация условий для повышения выхода эфиров;
2. Синтез стандарта 5-О-ферулоил-D-ксилофуранозы через 1,2-циклогексиден-D-ксилофуранозу и исследование селективности реакции ацилирования ксилозы без защитных групп в присутствии дициклогексилкарбодиимида;
3. Изучение способов селективного снятия защиты с фенольного гидроксила феруловой кислоты в продуктах ацилирования;
4. Проведение ферментативного гидролиза пшеничных отрубей, выделение производных феруловой кислоты с моно/олигосахаридами путем фракционирования гидролизата и их физико-химический анализ;
5. Определение цитотоксичности производных феруловой кислоты, полученных в ходе химического синтеза и путем выделения из пшеничных отрубей.

Научная новизна работы

- Впервые изучена селективность реакции ацилирования 4-О-ацетилферуловой кислотой незащищённой ксилозы в присутствии дициклогексилкарбодиимида;
- Разработан метод синтеза ранее неизвестных тетрагидрофурфурилового эфира феруловой кислоты и 5-О-ферулоил-D-ксилофуранозы, структура которых доказана физико-химическими методами;
- Впервые проведено изучение цитотоксичности на линии клеток НСТ116 (рак толстой кишки человека) производных феруловой кислоты, полученных путем синтеза, и производных, выделенных из пшеничных отрубей.

Практическая значимость

- Найдены оптимальные условия синтеза сложных эфиров феруловой кислоты с бензиловым, фенилэтиловым, аллиловым, тетрагидрофурфуриловым спиртами и ксилозой в присутствии дициклогексилкарбодиимида, которая может найти применение для синтеза стандартов при изучении производных феруловой кислоты в растительном сырье и в синтезе новых биологически активных соединений;

- Разработан метод снятия ацетильной защиты с фенольного гидроксила феруловой кислоты, определена продолжительность гидролиза в щелочной среде и описаны условия высокоселективного ферментативного метода;

- Предложены условия выделения производных феруловой кислоты и олигосахаридов из пшеничных отрубей. Установлен мономерный состав выделенных производных феруловой кислоты из пшеничных отрубей Алтайского края;

- Определены показатели цитотоксичности полученных производных феруловой кислоты в отношении линии клеток НСТ116 (рак толстой кишки человека), важные для дальнейшего поиска эффективных противораковых агентов.

Апробация работы. Основные результаты исследований докладывались и обсуждались на 6-й, 7-й, 8-й, 10-й Всероссийских научно-практических конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием «Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности» (г. Бийск, 2013, 2014, 2015, 2017); 6-й Всероссийской научно-практической конференции «Товарный консалтинг и аудит потребительского рынка» (г. Бийск, 2015); X международной научно-практической конференции «Аграрная наука – сельскому хозяйству» (г. Барнаул, 2015); международной конференции «Ломоносовские чтения на Алтае: фундаментальные проблемы науки и образования» (г. Барнаул, 2015); 2-й международной студенческой научно-практической конференции «Биотехнология: взгляд в будущее» (г. Ставрополь, 2016); VI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная техника и технологии: проблемы, состояние и перспективы» (г. Рубцовск, 2016); VI-й Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы сельского хозяйства горных территорий» (г. Горно-Алтайск, 2016); I-ой всероссийской конференции «Прикладные аспекты инноваций в биотехнологии», БТИ АлтГТУ им. И.И. Ползунова (г. Бийск, 2017).

Публикации. Основное содержание диссертации изложено в 23 опубликованных работах, из них: 2 работы в изданиях, рекомендованных ВАК; 1 статья в издании, индексируемом в базах данных Web of Science и Scopus.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав (литературный обзор, материалы и методы исследований, обсуждение результатов), выводов, списка использованных источников (142 наименования, из них 119 на иностранных языках). Работа изложена на 114 страницах машинописного текста, содержит 19 таблиц, 20 рисунков и 22 схемы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Сложные эфиры ФК получали путем химико-ферментативного синтеза и путем выделения из пшеничных отрубей.

1 Синтез сложных эфиров феруловой кислоты

Углеводы являются полифункциональными соединениями, которые имеют гидроксильные группы с различной реакционной способностью, вследствие чего необходимо использовать временные защитные группы для направленного синтеза по запланированной гидроксильной группе.

Использование дициклогексилкарбодиимид (ДЦК) в реакции этерификации имеет следующие преимущества. Во-первых, процесс проходит в мягких условиях, во-вторых, в литературе имеются указания на то, что реакция этерификации протекает селективно по оксиметильной группе при наличии оксиметиленовых, что представляет интерес для синтеза гликозидов феруловой кислоты.

1.1 Получение ацилирующего агента

Необходимая для синтеза эфиров 4-О-ацетилферуловая кислота (**4**) может быть получена по литературным данным двумя способами (схема 1). Ключевой стадией в обоих случаях является реакция Кневенагеля в модификации Дебнера, а исходными соединениями служат ванилин (**1**) и его 4-О-ацетильное производное (**3**).

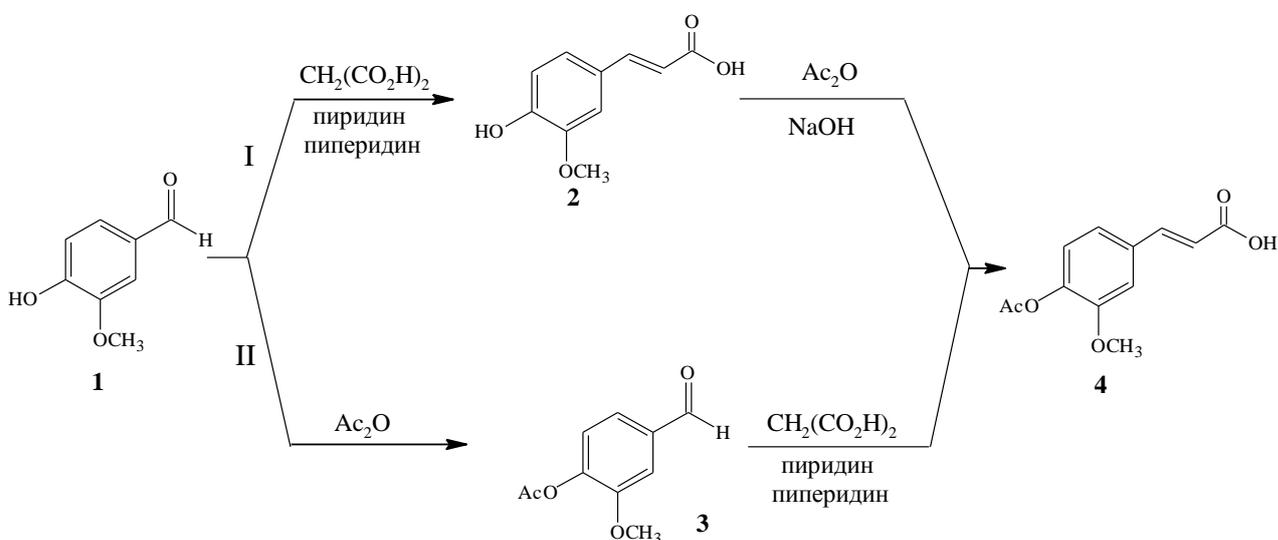


Схема 1

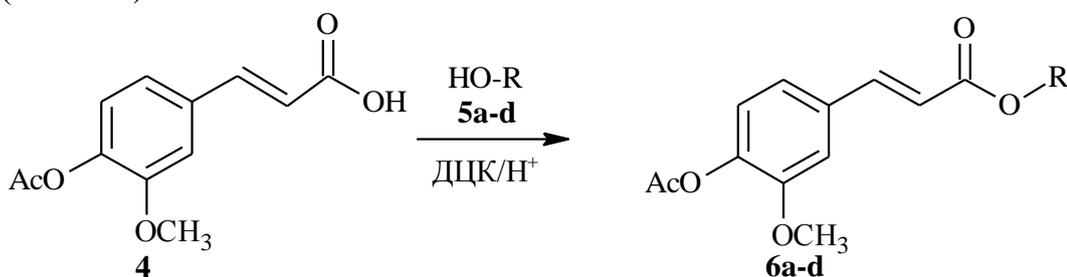
Температура плавления и УФ спектры полученной нами 4-О-ацетилферуловой кислоты соответствуют литературным данным. Температура плавления 196 °С. УФ спектр, $\lambda_{\text{макс.}}$ нм: 278; 215. ИК спектр ν , см^{-1} : 3013 (ОН), 2945 (СН в ArOCH_3), 1763 (C=O).

1.2 Ацилирование спиртов

При применении ДЦК встречаются трудности, связанные с образованием N,N-дициклогексилмочевины (ДЦМ) как побочного продукта, которая может трудно удаляться из реакционной смеси. Также при использовании ДЦК в качестве конденсирующего агента выход сложного эфира оказывается неудовлетворительным из-за формирования N-ацильного производного как побочного продукта.

Образование N-ацильного производного снижается при проведении реакции в пиридине, а присутствие каталитического количества *n*-толуолсульфокислоты (*n*-ТСК) значительно увеличивает выход эфиров. Установлено, что в среде пиридина происходит практически полная кристаллизация ДЦМ, что позволяет выделять целевой продукт без примеси ДЦМ.

Для отработки методики и уточнения условий синтеза были выбраны оксиметильные соединения с различными радикалами. Этерификацию 4-О-ацетилферуловой кислоты проводили в пиридине в присутствии ДЦК и *n*-ТСК (схема 2).



R = бензил (a), фенилэтил (b), пропен-2-ен-1-ил (c), (оксолан-2-ил)метил (d).

№ соедин-я	R	Выход
6 a		55%
6 b		45%
6 c		42%
6 d		45%

Схема 2

Реакцию проводили при комнатной температуре, избыток ДЦК переводили в N,N'-дициклогексилмочевину (ДЦМ) добавлением ледяной уксусной кислоты, реакционную смесь охлаждали до 2–5 °С, кристаллы ДЦМ отфильтровывали. Выделение целевого продукта из реакционной смеси проводили экстракцией хлороформом. Не вступившая в реакцию кислота (**4**) экстрагировалась вместе с эфиром, из-за низкого ее содержания она легко удалялась при перекристаллизации.

Анализ полученных эфиров по температуре плавления и спектральным характеристикам показал, что выбранный метод этерификации позволяет легко выделять эфиры без посторонних примесей. После перекристаллизации ДЦМ в полученных эфирах не была обнаружена.

При использовании этого метода синтеза для этерификации ФК и различных спиртов выход эфиров составлял от 42 до 55 %.

Недостатком этой методики является низкий выход эфиров 4-О-ацетилферуловой кислоты из-за неполного протекания реакции. 4-О-ацетилферуловая кислота находится в реакционной смеси даже после 72 часов реакции.

Нами было проведено исследование влияния соотношения реагентов на выход эфиров на примере бензилового эфира ФК. Бензиловый спирт был взят в небольшом избытке (опыт № 1). Дальнейшее увеличение количества спирта не приводит к значительному изменению выхода эфира (опыт № 2). Если в реакции использовать избыток соединения **4**, то выход эфира снижается (опыт № 3), а не вступившая в реакцию кислота выделяется из реакционной массы вместе с эфиром. Увеличение количества ДЦК свыше 20% не изменяет выход эфира (опыт № 4). Этерификация не протекает в отсутствие конденсирующего агента при комнатной температуре, экстракцией хлороформом выделяется непрореагировавшая 4-О-ацетилферуловая кислота (опыт №5).

Количественное соотношение реагентов в реакционной смеси и выход целевого продукта сведены в таблицу 1.

Таблица 1 – Влияние соотношения реагентов на выход эфира

№ опыта	Количество вещества, моль			Выход эфира 6a , %
	4	5a	ДЦК	
1	0.010	0.011	0.012	55±12
2	0.010	0.015	0.012	56±10
3	0.011	0.010	0.012	41±11
4	0.010	0.011	0.020	57±11
5	0.010	0.011	0	0

Изменение соотношения реагентов не приводит к существенному изменению выхода эфира.

Было изучено влияние различных кислот на выход эфиров. Использование минеральных кислот значительно снижает выход эфиров. Применение бензолсульфокислоты (БСК) повышает выход в среднем на 8 % (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние различных кислот на выход эфира

Эфир	Выход, %			
	с <i>n</i> -ТСК	с БСК	с H ₂ SO ₄	с HCl
6a	55±12	65±05	30±06	25±07
6b	45±09	57±08	27±08	22±10
6c	42±10	54±09	25±09	20±08
6d	45±11	56±06	29±07	21±09

Методом ВЭЖХ исследовали содержание эфира (в % от теоретического выхода эфира) в течение всего времени реакции (рисунок 1). Основное образование эфира происходит за 5-6 часов реакции.

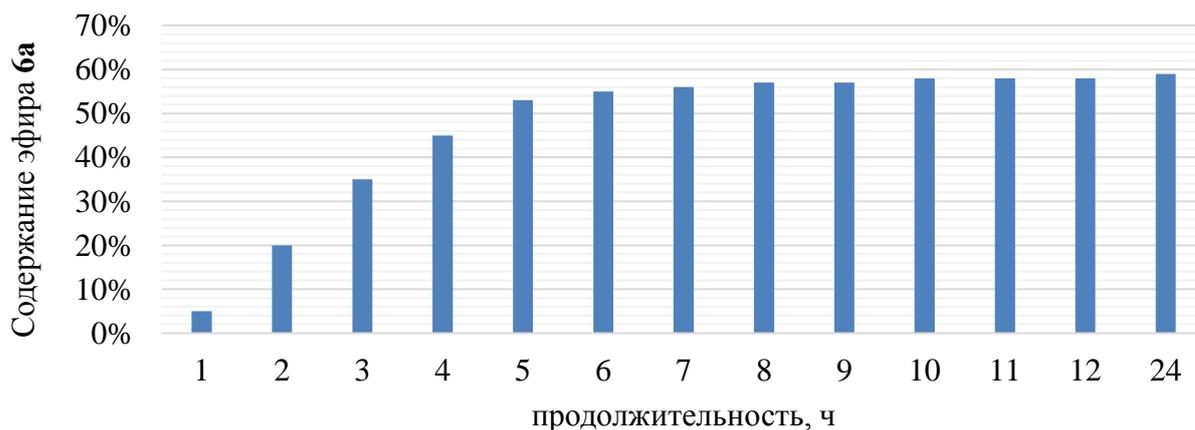


Рисунок 1 – Конверсия 4-О-ацетилферуловой кислоты в эфир **6a** в зависимости от продолжительности реакции

Также исследования показали, что после подкисления уксусной кислотой избыток мочевины выпадает после охлаждения до 0°C за 2 часа. Таким образом, продолжительность получения эфира можно сократить.

1.3 Ацилирование ксилозы

Из-за неселективности прямой этерификации, ацилирование углеводов превращается в многостадийный процесс. В литературе есть упоминание о том, что применение ДЦК обеспечивает селективность ацилирования по оксиметильной гидроксильной группе глюконолактона. В связи с этим, интерес представляет изучение реакции этерификации углеводов в присутствии ДЦК. Реакцию исследовали на примере ксилозы, и на первом этапе проводили синтез стандарта ацилированного по гидроксилу в положении С-5.

Для защиты ксилозы использовали циклогексилиденовую защиту, так как 1,2-циклогексилиден-*D*-ксилофураноза является белым кристаллическим веществом, хорошо кристаллизуется из воды.

На первой стадии получали 1,2;3,5-дициклогексилиден-*D*-ксилофуранозу путем выдерживания ксилозы в циклогексаноне в кислой среде. Затем защиту в 3,5-положении снимали в метанольном растворе хлористого водорода (схема 3) с получением 1,2-циклогексилиден-*D*-ксилофуранозы.

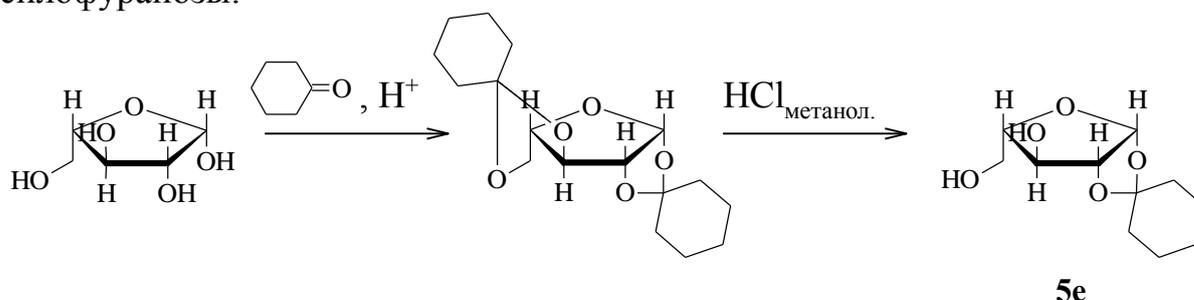


Схема 3

Ацилирование проводили 4-*O*-ацетилферуловой кислотой (**4**) (схема 4) с применением ДЦК в пиридине в кислой среде. Эфир выделялся в виде белых кристаллов с выходом 35 %.

Снятие циклогексилиденовой защиты проводили кислотным гидролизом уксусной кислотой в диоксане на кипящей водяной бане в течение 4 часов.

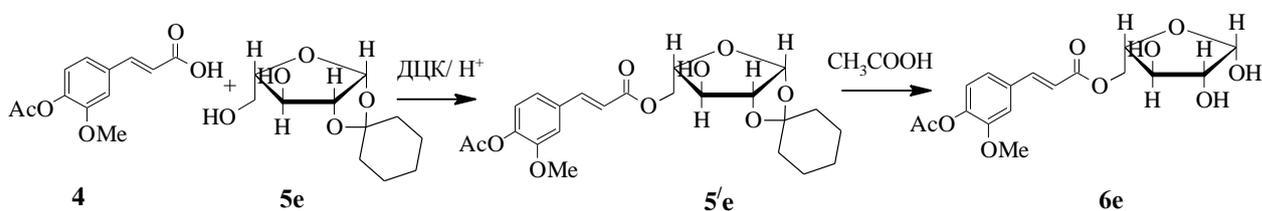


Схема 4

Ацилирование защищенной ксилозы с применением ДЦК приводит преимущественно (82 %) к одному продукту реакции. Продукт очищали на колонке с силикагелем и проводили элементный анализ, регистрировали спектры ЯМР ^1H и ^{13}C . Результаты показывают, что выделенное вещество соответствует продукту, этерифицированному в положении С-5 ксилозы.

В тех же условиях проводили ацилирование незащищенной ксилозы. Контроль реакции ТСХ показал наличие в реакционной смеси четырех компонентов. Установлено, что основными продуктами реакции являются 1-ферулоил-*D*-ксилофураноза и 5-ферулоил-*D*-ксилофураноза (схема 5). На ТСХ 1-ферулоил-*D*-ксилофураноза не проявлялась в анилиновом проявителе, так как полуацетальный гидроксил содержит ацильный заместитель.

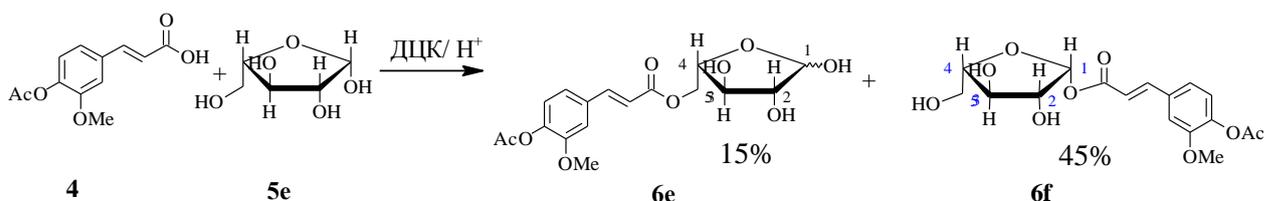


Схема 5

1-Ферулоил-D-ксилопираноза выделяется из реакционной массы после подкисления соляной кислотой в виде осадка белого цвета с выходом 45 %.

Эфиры ксилозы не экстрагируются хлороформом. После проведения реакции экстракцией хлороформом выделились кристаллы серо-белого цвета. Элементный анализ показал, что этот образец содержит в структуре азот (найд. С 73.00, Н 7.80, N 4.41%). Это указывает на то, что в структуре соединения содержится производное ДЦК. Проанализировав спектр ЯМР ^1H , мы пришли к выводу о том, что в результате реакции образуется двузамещенное N-ацильное производное (схема б).

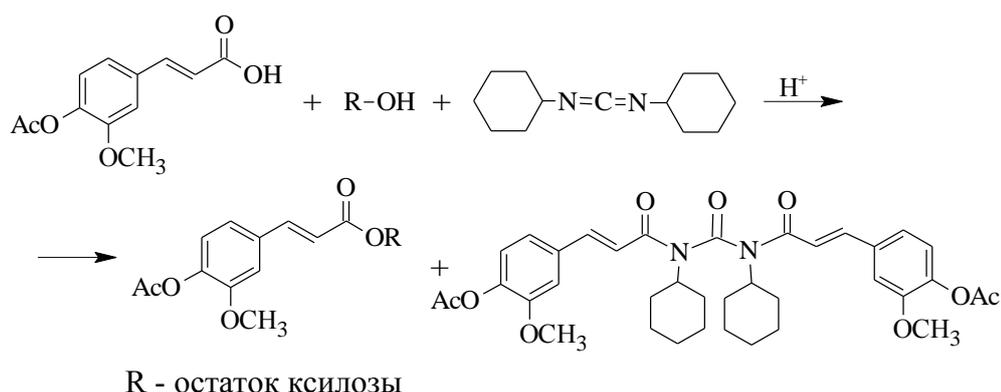


Схема б

Таким образом, в реакции этерификации 4-О-ацетилферуловой кислоты с применением ДЦК в качестве конденсирующего агента, не исключено образование N-ацильного производного, но его количество невелико (1,5 % от теор.) и оно легко удаляется при очистке эфиров.

1.4 Снятие ацетильной защиты

При всех преимуществах ацетильной защиты, существенным ее недостатком в синтезе сложных эфиров являются условия ее снятия, которые могут совпадать с условиями расщепления сложного эфира по карбоксильной группе феруловой кислоты. В результате химического гидролиза, помимо сложного эфира ФК, образуются и другие продукты реакции (схема 7).

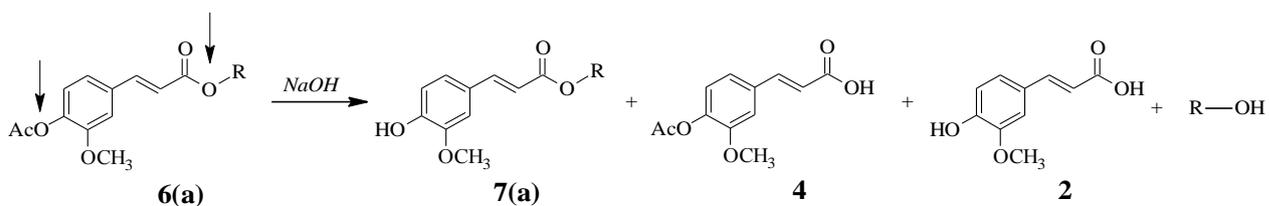


Схема 7

Предлагаемый в литературе щелочной гидролиз ацетильной защиты с эфиров с иной структурой, чем эфиры 4-О-ацетилферуловой кислоты, проводится в смеси 1 М водного раствора гидроксида натрия и ацетона в соотношении 1:1. Реакцию предлагается проводить в течение 20 минут при комнатной температуре. Было проведено исследование реакции щелочного гидролиза с целью уточнения продолжительности реакции. В течение гидролиза отбирали пробу и определяли содержание эфира методом ВЭЖХ. Полученные результаты показывают, что на 15-ой и 20-ой минуте гидролиза выход бензильного эфира ФК максимальный и составляет 94 % (рисунок 2). Однако разница заключается в содержании побочных продуктов. После 20-ой минуты в реакционной смеси наблюдается накопление свободной ФК. Таким образом, щелочной гидролиз позволяет снять ацетильную защиту в течение 15-20 минут при комнатной температуре.

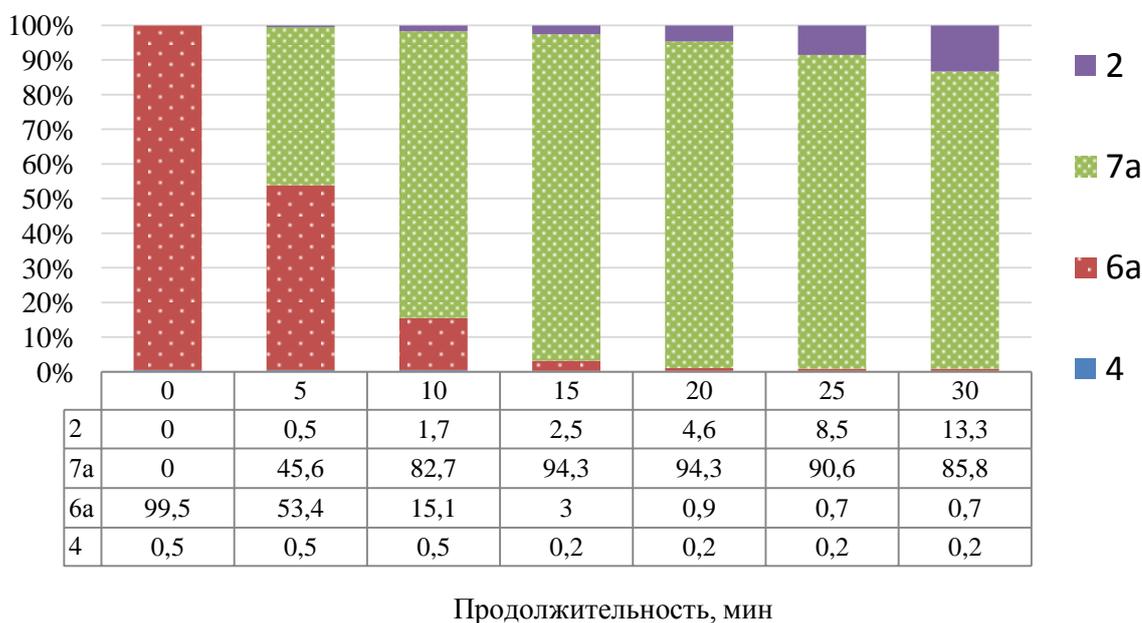


Рисунок 2 – Диаграмма изменения количества исходного бензильного эфира 4-О-ацетилферуловой кислоты и накопление продуктов щелочного гидролиза (в соответствии со схемой 7)

Селективность удаления защитной группы может быть достигнута применением липазы, катализирующей снятие ацетильной защиты. Исследование процесса снятия ацетильной защиты иммобилизованной липазой *Atano PS* проводили ферментированием ацетилферуловой кислоты. Количе-

ство образовавшейся ФК определяли методом Фолина-Чокальтеу, продолжительность 4 часа. Было исследовано изменение активности фермента при повторном применении. В течение двух часов ферментации образуется расчетное количество ФК. Липаза при повторном применении показала низкую эффективность в сравнении с коммерческой липазой. Потеря активности фермента может быть связана с некоторой степенью инактивации при первом применении, а также частичным смыванием фермента с носителя.

Исследование способности липазы *Amano PS* селективно гидролизовать ацетильную защиту проводили на примере эфира **6a**. Эфир ацетилферуловой кислоты растворяли в 96%-ном этаноле, добавляли липазу *Amano PS*, ферментацию проводили при температуре 37 °С и постоянном перемешивании (150 об/мин) в шейкере-инкубаторе. Имобилизованную липазу отфильтровывали и промывали этанолом. Анализ методом ТСХ реакционной смеси показал, что полное отщепление ацетильной защиты происходит в течение 4 часов ферментации.

Снятие ацетильной защиты с соединений **6(a-e)** проводили ферментативным гидролизом липазой *Amano PS*. Эфиры после реакции выделялись в виде желтых маслянистых жидкостей с выходом 80-85 %, при этом они не требовали дополнительной очистки. Таким образом, подход к получению сложных эфиров ФК заключается в сочетании химических и ферментативных методов (схема 8)

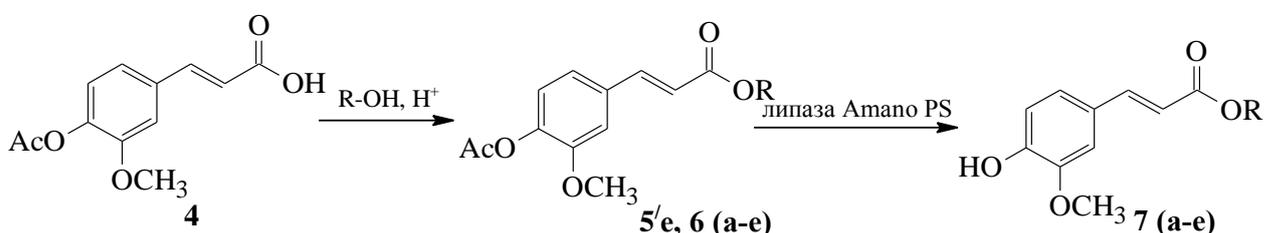


Схема 8

1.5 Установление строения сложных эфиров феруловой кислоты

Строение эфиров 4-О-ацетилферуловой кислоты доказано методами ИК и ЯМР ¹Н спектроскопии. В спектрах ЯМР ¹Н присутствуют сигналы винильных протонов (6.76–6.81 и 7.29–7.32 м.д.) с константой спин-спинового взаимодействия (~16 Гц), характерной для *транс*-конфигурации олефиновой связи. Синглет протонов ацетильной группы (2.26 м.д.) исчезает после снятия защиты, и появляется синглет протонов гидроксильной группы (9.68 м.д.). Кроме того, полоса поглощения средней интенсивности в ИК спектрах в области 3511 см⁻¹ доказывает присутствие свободной группы ОН. Сигналы, характерные для карбоксильной группы, в спектрах ИК и ЯМР соединений **6a–e**, **7a–e** отсутствуют.

2 Выделение сложных эфиров феруловой кислоты из пшеничных отрубей

2.1 Получение и анализ НПВ пшеничных отрубей

Соотношение компонентов в тканях зерновки пшеницы варьируется в зависимости от сортов и условий возделывания. Объектом нашего исследования служили пшеничные отруби с мукомольного производства Алтайского края (г. Бийск).

Производные феруловой кислоты и олигосахаридов получали из нерастворимых пищевых волокон (НПВ). В результате ферментативной обработки амилазой и протеазой удаляли крахмал и белок. Выход НПВ пшеничных отрубей составлял в среднем 60 % на абсолютно сухое сырье (а.с.с). Остаточное содержание в НПВ крахмала и белка в среднем 5,0 % и 3,4 % соответственно.

Гидролиз НПВ пшеничных отрубей для установления моносахаридного состава проводили по модифицированной методике Саймана. Для расщепления сложноэфирной связи между гидроксикоричными кислотами и арабиноксиланом НПВ пшеничных отрубей гидролизовали 2 М раствором NaOH в течение 18 ч при комнатной температуре. Чтобы избежать процессов окисления, гидролиз должен проводиться в атмосфере азота. Выделение гидроксикоричных кислот из щелочного гидролизата проводили диэтиловым эфиром. Анализ кислотного и щелочного гидролизатов проводили методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель». Результаты определения количественного мономерного состава сведены в таблицу 3.

Таблица 3 – Количественный мономерный состав НПВ

Компонент	Концентрация мг/г НПВ	
	Исследуемые НПВ	литературные данные [Bunzel M., 2001]
Рафиноза	–	не найдено
Фукоза	–	не найдено
Арабиноза	99,7	102,50
Ксилоза	240,0	207,10
Моноза	–	17,10
Глюкоза	368,3	204,90
Галактоза	–	13,40
Феруловая кислота	11,50	5,95
<i>n</i> -Кумаровая кислота	3,40	0,2
Кофейная кислот	0,03	не найдено
Синаповая кислота	0,07	0,079

2.2 Ферментативный гидролиз НПВ пшеничных отрубей

Для получения ферулоилолигосахаридов (ФОС) необходимы методы гидролиза НПВ, которые расщепляют гликозидные связи, однако условия гидролиза должны сохранять сложноэфирную связь между ФК и углеводами. Для расщепления гликозидных связей могут применяться кислотные или ферментативные методы гидролиза. В нашей работе использовалась грибная гемицеллюлаза из штамма *Trichoderma longibrachiatum* под коммерческим названием «Брюзайм ВГХ», имеющая ксиланазную, β -глюканазную и целлюлазную активности. В соответствии с паспортом, рабочие зоны препарата: рН 3,5-7,0 и температура 45-75 °С. Инактивация препарата наступает при температурах выше 80 °С. Ферментацию проводили при 42 °С в темноте при перемешивании в течение 72 ч, гидромодуль 1:20, используя 1%-ный ферментный препарат.

2.3 Фракционирование гидролизата на Амберлите

Ферментативный гидролизат НПВ пшеничных отрубей содержит моно-/олигосахариды, ферулоилированные моно-/олигосахариды (ФОС), а также свободную ФК. Выделение фракции ФОС проводили путем фракционирования на колонке с полистирольным адсорбентом типа Амберлит. При хроматографии через колонку пропускают гидролизат, затем элюируют последовательно водой, смесью вода/спирт (соотношение 1:1) и чистым спиртом. С водой элюируются гидрофильные моно- и олигосахариды, смесью вода/спирт элюируются менее гидрофильные молекулы ФОС, и со спиртом – свободная ФК, а также элюируются прочие более неполярные фенольные вещества. В литературе для выделения ФОС на Амберлите ХАД-2 описано применение смеси вода/метанол. Замена метанола другими низшими спиртами, а также влияние марок адсорбента типа Амберлит в литературе не описан.

2.3.1 Исследование процесса фракционирования и влияния элюента

В нашей работе было проведено сравнительное исследование фракционирования гидролизата НПВ пшеничных отрубей с использованием метанола и этанола в составе элюента. Фракционирование гидролизата проводили колоночной хроматографией на Амберлите ХАД-4.

Распределение фенольных веществ по фракциям в процессе хроматографии гидролизата НПВ исследовали методом Фолина-Чокальтеу.

Таблица 4 – Распределение феруловой кислоты по фракциям

Образец	Общее содержание феруловой кислоты			
	Элюирование с метанолом		Элюирование с этанолом	
	мг	%	мг	%
Гидролизат	47,3±3,4	100,0	45,4±3,4	100,0
Фракция №1	1,5±1,1	3,2	1,4±1,2	3,0

Фракция №2	22,3±4,0	47,1	28,4±3,5	62,6
Фракция №3	7,1±1,5	15,0	3,3±1,5	7,3
Гидролизат после хроматографии	9,5±2,8	20,0	10,5±2,5	23,1
Потери на колонке	6,9±2,3	14,7	1,8±2,2	4

При анализе гидролизата НПВ методом Фолина-Чокальтеу было установлено, что в 90 см³ гидролизата содержится 42-50 мг (было принято за 100 %) фенольных веществ в пересчете на ФК. При пропускании гидролизата на колонке сорбируется 77-80 % фенольных веществ, остальная часть остается в гидролизате после хроматографии.

Наибольшее содержание фенольных веществ во фракции №2 – 47,1 % для водно-метанольного элюента и 62,6 % для водно-этанольного элюента.

После фракционирования гидролизата с использованием метанола десорбции не подверглось 14,7 % фенольных веществ, в то время как при фракционировании с этанолом потери на колонке составили всего 4 %.

2.3.2 Исследование состава фракций

Фракции, полученные после хроматографии на Амберлите XAD-4, анализировали методами УФ-спектроскопии и тонкослойной хроматографии. По методу Фолина-Чокальтеу определяются как свободные, так и связанные фенольные вещества (ФВ). Анализ свободных гидроксикоричных кислот в полученных фракциях проводили методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель». Результаты количественного содержания феруловой кислоты во фракциях сведен в таблицу 5.

Таблица 5 – Содержание свободной феруловой кислоты во фракциях

Фракция	Содержание феруловой кислоты	
	мг	%*
фракция №1	не обнаружена	не обнаружена
фракция №2	0,10±0,03	2,2
фракция №3	1,77±0,02	98,3

* в процентах от содержания фенольных веществ, определяемых по Фолину-Чокальтеу

Результаты показали, что ФК не десорбируется с Амберлита XAD-4 водой (фракция №1) и очень плохо десорбируется водными растворами спиртов (фракция №2). Для десорбции лучше всего подходят метиловый и этиловый спирты, позволяющие количественно удалить ФК с сорбента

2.3.3 Влияние марки Амберлита на процесс фракционирования

Для исследования влияния марки Амберлита типа XAD на процесс фракционирования гидролизата НПВ пшеничных отрубей, эксперимент проводили с использованием марок XAD-4, XAD-7HP и XAD-16H.

Во всех полученных фракциях, а также в гидролизате до и после хроматографии определяли содержание ФВ методом Фолина-Чокальтеу. Все полученные данные по содержанию ФВ во фракциях сведены в таблицу 6.

Таблица 6 – Результаты фракционирования гидролизата на различных марках Амберлита

Марка Амберлита	Количество фенольных веществ, мг				
	Гидролизат	Гидролизат после хроматографии	Фракция №1	Фракция №2	Фракция №3
XAD-4	45,4±3,4	12,3±2,8	1,4±1,2	28,4±3,5	3,3±1,5
XAD-7HP	44,9±3,5	11,1±3,1	1,1±1,0	29,3±2,1	3,1±1,1
XAD-16H	43,4±3,8	10,2±3,6	2,1±1,3	28,0±3,7	3,0±1,4

Как видно из таблицы, соотношение распределения ФВ по фракциям сохраняется для всех марок Амберлита. Следовательно, любая из исследованных марок Амберлита типа XAD может быть использована в целях выделения ФОС.

2.4 Идентификация полученных производных ФК

Фракцию №2, содержащую ФОС, упаривали и анализировали УФ-, ИК-спектрометрией и ВЭЖХ с УФ-детекцией, мономерный состав определяли методом капиллярного электрофореза после кислотного гидролиза и щелочного гидролиза.

Спектрофотометрия в УФ области показывает наличие в спектре ФОС характерную для ФК полосу поглощения при 325 нм.

Анализируя ИК-спектр, можно сказать, что в образце ФОС гидроксильные группы включены в межмолекулярную водородную связь и имеют характерную широкую полосу поглощения в области 3385 см^{-1} . Отдельная полоса в области 2932 см^{-1} характеризует симметричное валентное колебание метиленовой группы углеводов. Полоса 1659 см^{-1} определяется как валентные колебания $\text{C}=\text{O}$, которая является характерным пиком поглощения сложноэфирных связей, между углеводом и ФК. Полоса около 1041 см^{-1} соответствует валентному колебанию мостика $\text{C}-\text{O}-\text{C}$. В ИК-спектре эта полоса очень интенсивная, что может быть связано с наличием большого количества эфирных связей между углеводом и феруловой кислотой в молекуле ФОС, а также других эфирных связей олигосахарида. Интенсивный пик поглощения около 1037 см^{-1} указывает на образование простой эфирной связи $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ между арабинозой и атомом углерода $\text{C}-3$ пиранозной формы ксилозы. Полоса поглощения в области 1516 см^{-1} характерна для колебаний скелета структуры ароматического кольца, что свидетельствует о наличии моноядерного ароматического кольцевого фрагмента. Образец ФОС имеет β -конфигурацию остатков D-ксилопираноз, характерная полоса поглощения наблюдается при 899 см^{-1} .

Анализ образца ФОС методом ВЭЖХ с УФ-детекцией показало наличие четырех компонентов.

При определении углеводов методом капиллярного электрофореза в кислотном гидролизате ФОС были обнаружены ксилоза и арабиноза. При определении гидроксикоричных кислот в щелочном гидролизате была обнаружена ФК. Она идентифицирована как единственная фенольная кислота. Количественное соотношение компонентов в мг на 1,4 г ФОС составляет: феруловая кислота – 35,7; арабиноза – 199,7 и ксилоза – 1165 (соотношение 0,2:1:6).

3 Оценка цитотоксичности сложных эфиров феруловой кислоты

Для исследования цитотоксичности использовалась клеточная линия рака толстой кишки человека (НСТ116), которая протестирована в American Type Culture Collection, США. Исследование проведено в лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава РФ. Цитотоксическое действие соединений исследовалось методом МТТ-теста (по способности восстановления желтой соли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид в темно-синий кристаллический формазан митохондриями живых клеток).

По результатам исследования цитотоксичности построены кривые выживаемости (рисунок 3).

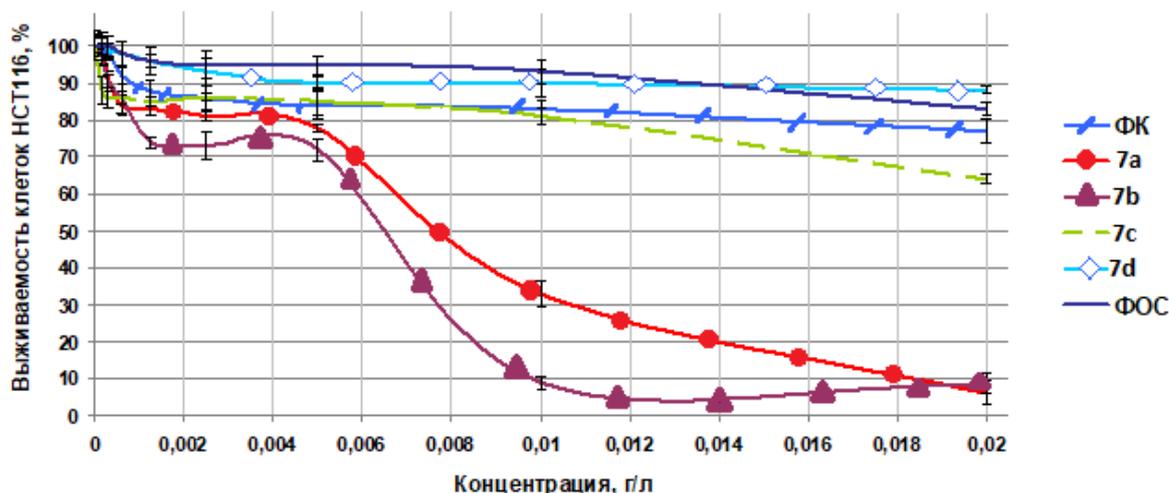


Рисунок 3 – Кривые выживаемости клеток НСТ116 при действии растворов производных ФК разной концентрации

На клеточную линию НСТ116 исследованные соединения действуют в различной степени. Из приведенных данных следует, что все синтезированные производные ФК проявляют большую активность, чем сама ФК. Наиболее активны из представленного ряда растворы синтезированных производных 7a и 7b. Производные ФК, выделенные из пшеничных отрубей (ФОС), оказались наименее активными в отношении опухолевых клеток НСТ116. При воздействии максимальной концентрации растворов все соединения по-

казывают низкую выживаемость клеток. Морфологические признаки клеточной гибели наблюдались после первых 24 часов инкубации клеток с растворами соединений и развивались в течение всего времени инкубации (72 часа). Гибель клеток является необратимой.

По результатам исследования цитотоксичности определены показатели IC_{50} , которые приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Показатели цитотоксичности исследованных растворов в отношении опухолевых клеток НСТ116

Образец	ФК	7a	7b	7c	7d	ФОС
IC_{50} , г/л	>0,02	0,0077±0,0005	0,0065±0,0002	>0,02	>0,02	>0,02

Наилучший показатель цитотоксичности соединений 7a (бензиловый эфир ФК) и 7b (фенилэтиловый эфир ФК), вероятней всего, можно объяснить тем, что в структуре этих соединений имеется еще одно ароматическое кольцо. Полученная смесь соединений ферулоилолигосахаридов из пшеничных отрубей в отношении опухолевых клеток НСТ116 имеет самый худший показатель цитотоксичности. Таким образом, интерес представляют конъюгаты феруловой кислоты с соединениями, имеющими ароматические кольцевые структуры.

ВЫВОДЫ

1. Исследована реакция ацилирования бенилового, фенилэтилового, аллилового тетрагидрофурфурилового спиртов с применением дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) в качестве конденсирующего агента; показано, что замена *n*-толуолсульфокислоты бензолсульфокислотой увеличивает выход сложных эфиров; определена оптимальная продолжительность получения сложных эфиров.

2. Впервые изучена этерификация феруловой кислоты и незащищённой ксилозы в присутствии ДЦК; установлено, что при катализе *n*-толуолсульфокислотой реакция протекает селективно с преимущественным образованием 1-О-ферулоил-*D*-ксилофуранозы.

3. Изучены способы селективного снятия ацетильной защиты с фенольного гидроксила феруловой кислоты в продуктах ее ацилирования. Показано, что использование щелочного гидролиза приводит к снятию защиты в течение 15-20 минут с конверсией 94%. Предложен высокоселективный способ полного снятия ацетильной защиты при использовании липазы *Amano PS* в этаноле при 37°C.

4. Исследованы производные феруловой кислоты с моно- и олигосахаридами, полученные путем фракционирования гидролизата пшеничных отрубей. Доказано, что использование этанола при элюировании компонентов гидролизата позволяет снизить потери феруловой кислоты в 4 раза по срав-

нению с метанолом. Установлено, что мономерный состав выделенных ферулоилолигосахаридов представлен феруловой кислотой, арабинозой и ксилозой в соотношении 0,2:1:6 соответственно.

5. Впервые определена цитотоксичность производных феруловой кислоты, полученных в ходе химического синтеза и путем выделения из пшеничных отрубей на примере клеточной линии НСТ116 (раковые клетки толстой кишки человека). Отмечено, что синтезированные производные феруловой кислоты проявляют бóльшую активность по сравнению с природными производными, выделенными из пшеничных отрубей.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, входящие в перечень ВАК:

1. Бахолдина, Л.А. Взаимодействие первичных спиртов с феруловой кислотой в мягких условиях / Л.А. Бахолдина, А.И. Хлебников, В.П. Севодин // Журнал органической химии. – 2016. – Т. 52. Вып. 3. – С. 449–451.

Переводная версия: Bakholdina, L.A. Mild reaction of primary alcohols with ferulic acid / L.A. Bakholdina, V.P. Sevodin, A.I. Khlebnikov // Russian Journal of Organic Chemistry. – 2016. – Т. 52. № 3. – P. 441–443.

2. Бахолдина, Л.А. Синтез ферулоилированных оксиметильных соединений / Л.А. Бахолдина, Е.С. Терешкова, А.Л. Верещагин, В.П. Севодин // Ползуновский вестник. – 2014. – №4, Т2. – С.67–70

3. Бахолдина, Л.А. Исследование процесса фракционирования ферментативного гидролизата пшеничных отрубей на амберлите XAD-4 / Л.А. Бахолдина, В.П. Севодин // Техника и технология пищевых производств. – 2015. – № 1. – С. 82–86.

Публикации в материалах конференций:

1. Бахолдина, Л.А. Синтез бензил-О-ацетилферулоилата / Л.А. Бахолдина, Е.Е. Старикова // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 6-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с Международным участием. – Бийск: Изд-во АлтГТУ, 2013. – С. 180–183.

2. Бахолдина, Л.А. Фракционирование гидролизата пшеничных отрубей на Амберлите XAD-4 / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 7-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с Международным участием. – Бийск: Изд-во АлтГТУ, 2014. – С. 321–325.

3. Бахолдина, Л.А. Исследование гемицеллюлоз плодовых оболочек зерновых культур / Л.А. Бахолдина, А.А. Легостаева // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 7-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с Международным участием. – Бийск: Изд-во АлтГТУ, 2014. – С. 316–321.

4. Терешкова, Е.С. Исследование свободной феруловой кислоты в кислых гидролизатах пшеничных отрубей при получении ферулоилолигосахаридов / Е.С. Терешкова, Л.А. Бахолдина // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 7-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с Международным участием. – Бийск: Изд-во АлтГТУ, 2014. – С. 409–412.

5. Бахолдина, Л.А. Пшеничные отруби как источник ферулоилолигосахаридов / Аграрная наука – сельскому хозяйству: сборник статей: в 3 кн. X Международная научно-практическая конференция. – Барнаул: РИО АГАУ, 2015. – С. 25–27.

6. Бахолдина, Л.А. Исследование процесса фракционирования гидролизата пшеничных отрубей на полистирольном адсорбенте типа Амберлит / Товарный консалтинг и аудит потребительского рынка: материалы 6-й Всероссийской научно-практической конференции. – Бийск: Изд-во АлтГТУ, 2015. – С. 7–13.

7. Грудистова, Е.Г. Фракционирование гидролизата пшеничных отрубей на сорбенте типа Амберлит / Е.Г. Грудистова, Л.А. Бахолдина // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 8-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с Международным участием. – Бийск: Изд-во АлтГТУ, 2015. – С. 499–505.

8. Бахолдина, Л.А. Синтез сложных эфиров феруловой кислоты / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы 8-й Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с Международным участием. – Бийск: Изд-во АлтГТУ, 2015. – С. 105–109.

9. Шубина, Я.В. Феруловая кислота: биосинтез, способы локализации в клеточных стенках растений / Я.В. Шубина, Л.А. Бахолдина // Сборник научных статей международной конференции «Ломоносовские чтения на Алтае: фундаментальные проблемы науки и образования», Барнаул, 20-24 октября, 2015. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. – С. 1328–1321.

10. Ласко, А.В. Способы выделения феруловой кислоты из растительных ресурсов / А.В. Ласко, Н.А. Севодина, Л.А. Бахолдина // Сборник научных статей международной конференции «Ломоносовские чтения на Алтае: фундаментальные проблемы науки и образования», Барнаул, 20-24 октября, 2015. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. – С. 1309–1312.

11. Шубина, Я.В. Ферментативный синтез сложных эфиров феруловой кислоты / Я.В. Шубина, Л.А. Бахолдина // Биотехнология: взгляд в будущее: Материалы II междунар. студ. науч.-практ. конф. – Ставрополь: Изд-во СтГМУ, 2016. – С. 259–262.

12. Бахолдина, Л.А. Определение каталитической активности липазы *Amano PS* / Л.А. Бахолдина, Я.В. Шубина // Современная техника и технологии: проблемы, состояние и перспективы: Материалы VI Всероссийской

научно-практической конференции с международным участием 24-25 ноября 2016 г, посвященной 70-летию Рубцовского индустриального института. / Под ред. к.т.н. О.А. Михайленко; к.ф.-м.н., доцента Г.А. Обуховой / Рубцовский индустриальный институт. – Рубцовск, 2016. – С. 362–367.

13. Бахолдина Л.А. Получение и оценка биологической активности природных и синтетических производных феруловой кислоты // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы X Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2017. – С. 434–438.

14. Плотникова А.С. Синтез и анализ парацетамол-(4-О-ацетилферулата) // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы X Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2017. – С. 394–397.

15. Любятинская, А.Ю. Идентификация ферулоилолигосахаридов методом капиллярного электрофореза и ИК-спектроскопии / А.Ю. Любятинская, Л.А. Бахолдина // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы X Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2017. – С. 417–421.

16. Бахолдина, Л.А. Мономерный состав ферулоилолигосахаридов из пшеничных отрубей / Актуальные проблемы сельского хозяйства горных территорий: материалы VI-й Международной научно-практической конференции. Горно-Алтайск, 2017. – С. 306–309.

17. Плотникова, А.С. Синтез 4-(ацетиламино)фенилового эфира феруловой кислоты и оценка биологической активности / А.С. Плотникова, Н.А. Алексеева, Л.А. Бахолдина // Прикладные аспекты инноваций в биотехнологии: материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 20-летию юбилею кафедры «Биотехнология». – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2017. – С. 17–23.

18. Алексеева, Н.А. Обзор катализаторов применяемых в синтезе сложных эфиров ароматических карбоновых кислот / Н.А. Алексеева, А.С. Плотникова, Л.А. Бахолдина, А.Л. Верещагин // Прикладные аспекты инноваций в биотехнологии: материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 20-летию юбилею кафедры «Биотехнология». – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2017. – С. 23–26.

19. Шубина, Я.В. Этерификация феруловой кислоты и эргостерина / Я.В. Шубина, А.С. Логунова, Л.А. Бахолдина // Прикладные аспекты инноваций в биотехнологии: материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 20-летию юбилею кафедры «Биотехнология». – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2017. – С. 39–43.

20. Бахолдина, Л.А. Получение и исследование биологической активности ферулоилолигосахаридов из пшеничных отрубей / Л.А. Бахолдина, А.Ю. Любятинская // Прикладные аспекты инноваций в биотехнологии: материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 20-летию юбилею кафедры «Биотехнология». – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2017. – С. 62–68.