



РОССИЙСКИЙ
ФОНД
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

ISSN 1605-8070
eISSN 2410-4639

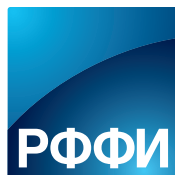
ВЕСТНИК

РФФИ

№1 (89) январь–март 2016 г.

**ТЕМАТИЧЕСКИЙ БЛОК:
ХИМИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ**

**стр.
13**



Вестник Российского фонда фундаментальных исследований

№ 1 (89) январь–март 2016 года

Основан в 1994 году

Зарегистрирован Комитетом РФ по печати, рег. № 012620 от 03.06.1994

Сетевая версия зарегистрирована Роскомнадзором, рег. № ФС77-61404 от 10.04.2015

Учредитель

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский фонд фундаментальных исследований»

Главный редактор В.Я. Панченко,
заместитель главного редактора В.В. Квардаков

Редакционная коллегия:

В.А. Геловани, Ю.Н. Кульчин, В.П. Матвеевко, Е.И. Моисеев,
А.С. Сигов, Р.В. Петров, И.Б. Федоров, В.В. Ярмолюк,
П.П. Пашинин, В.П. Кандидов, В.А. Шахнов

Редакция:

А.П. Симакова, Е.Б. Дубкова, Н.В. Круковская

Адрес редакции:

119991, г. Москва, Ленинский проспект, 32а

Тел.: (499) 995-16-05

e-mail: pressa@rfbr.ru



Russian Foundation for Basic Research Journal

N 1 (89) January–March 2016

Founded in 1994

Registered by the Committee of the Russian Federation for Printed Media, 012620 of 03.06.1994 (print)

Registered by the Roskomnadzor FS77-61404 of 10.04.2015 (online)

The Founder

Federal State Institution

“Russian Foundation for Basic Research”

Editor-in-Chief V. Panchenko,

Deputy Chief Editor V. Kvardakov

Editorial Board:

V. Gelovani, J. Kulchin, V. Matveenko, E. Moiseev,

A. Sigov, R. Petrov, I. Fedorov, V. Yarmolyuk,

P. Pashinin, V. Kandidov, V. Shakhnov

Editorial staff:

A. Simakova, E. Dubkova, N. Krukovskaya

Editorial address:

32a, Leninsky Prospect, Moscow, 119991, Russia

Tel.: (499) 995-16-05

e-mail: pressa@rfbr.ru

"RFBR Journal"

N 1 (89) January–March 2016 (Supplement to "Information Bulletin of RFBR" N 24)

THEMED ISSUE EDITOR'S COLUMN

About the Editor of the Themed Section RAS Corresponding Member A.V. Kuchin.....	6
<i>A.V. Kuchin</i>	
Abstract of the Themed Section	11

THEMED SECTION: CHEMISTRY OF PLANT MATERIALS

<i>S.V. Pestova, E.S. Izmestev, O.G. Shevchenko, S.A. Rubtsova, A.V. Kuchin</i> Synthesis and Membrane-Protective Properties of Sulfur-Containing Monoterpenoids with Monosaccharide Fragments.....	13
<i>S.M. Krutov, J.A. Gravitis, E.V. Ipatova, A.R. Akhmadullina, M.M. Andzs, R.R. Tupciauskas, A.V. Pranovich, A.V. Vasiliev</i> Technical Lignins Extractive Substances after Steam-Explosion Treatments.....	18
<i>D.A. Sevko, M.K. Beklemishev, O.A. Shevlyakova</i> Study of Plant Phytosteroid Profile by High Performance Liquid Chromatography Coupled with High Resolution Tandem Mass-Spectrometry.....	25
<i>S.B. Selyanina, M.V. Trufanova, S.A. Zabelina, M.V. Bogdanov, K.G. Bogolitsyn, T.V. Sokolova, V.P. Strigutskiy, T.I. Ponomareva, O.N. Yarygina, A.S. Orlov</i> Biologically Active Extractives of High-Moor Peat of Northern European Russia.....	31
<i>S.T. Minzanova, V.F. Mironov, A.B. Vyshtakalyuk, L.G. Mironova, V.I. Morozov, N.G. Nazarov, A.Z. Mindubaev, V.A. Milyukov</i> A Pharmacological Composite Preparation Based on Pectin Polymetallic Complexes Increase the Adaptive Capacity of the Organism During Intense Physical Efforts	38
<i>O.A. Banina, D.V. Sudarikov, L.L. Frolova, A.V. Kuchin</i> Hydroxythiols and Disulfides Based on α -, β -Pinene and 3-Carene	45
<i>S.A. Rubtsova, O.M. Lezina, O.N. Grebenkina, D.V. Sudarikov, A.V. Kuchin</i> Oxidation of Monoterpene Thiols by Chlorine Dioxide	52
<i>S.V. Kiselev, L.E. Nikitina, V.A. Startseva, A.V. Bodrov, Z.R. Azizova, A.A. Rakhmatullina, A.V. Khaliullina, R.G. Turaev</i> Hemocoagulation Activity of Sulfur-Containing Bicyclic Monoterpenoids.....	59

О редакторе тематического блока члене-корреспонденте РАН, профессоре А.В. Кучине



- Директор Института химии Коми научного центра Уральского отделения РАН
- Член редколлегии журнала «Известия РАН. Серия химическая»
- Член редакционного совета журнала «Химия растительного сырья»
- Руководитель рабочей группы ФАНО России «Развитие биотехнологий и генной инженерии»

Государственные награды, звания и премии:

- Лауреат премии РАН им. А.Н. Несмеянова (1999)
- Награжден медалью Ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени (1999)
- Награжден почетной грамотой Республики Коми (2005)
- Лауреат премии Правительства Республики Коми им. П.А. Сорокина (2006)
- Лауреат премии Правительства Республики Коми в области научных исследований (2010)
- Награжден Орденом Дружбы (2010)
- Лауреат премии им. академика И.Я. Постовского (2012)
- Награжден почетной грамотой Министерства экономического развития Республики Коми (2013)
- Награжден почетной грамотой Министерства развития промышленности и транспорта Республики Коми (2014)

- Director of Institute of Chemistry Komi Scientific Center, Ural Branch of Russian Academy of Sciences
- Member of the Russian Editorial Board of the Journal “Russian Chemical Bulletin”
- Member of the Editorial Council of “Chemistry of Plant Raw Material” Journal (in Russian)
- Head of the FASO Russia Working Group for “Biotechnology and Genetic Engineering Development”

Honours and awards:

- Nesmeyanov RAS Prize (1999)
- Medal of the Order “For Merit for the Motherland”, 2nd class (1999)
- Komi Republic Certificate of Honour (2005)
- Sorokin Award issued by Komi Republic Government (2006)
- Komi Republic Government Award for Contribution to the Field of Science Research (2010)
- Order of Friendship (Russian Federation) (2010)
- Academician I.Ya. Postovskiy Prize (2012)
- Komi Republic Ministry of Economic Development Certificate of Honour (2013)
- Komi Republic Ministry of Industry and Transport Development Certificate of Honour (2014)

Александр Васильевич Кучин родился 31 мая 1949 г. в Баку. Выпускник Уфимского нефтяного института (1971), доктор химических наук (1989), профессор (1997), член-корреспондент РАН (2000). С 1971 по 1990 г. работал в Институте химии Башкирского филиала АН СССР (в настоящее время Институт химии РАН), с 1990 г. – заведующий Отделом химии Коми научного центра УрО РАН, с 1995 г. по настоящее время – директор Института химии Коми НЦ УрО РАН.

А.В. Кучин – ведущий специалист в области органического и металлоорганического синтеза, внесший существенный вклад в развитие химии и технологии алюминийорганиче-

ских и природных соединений. Он является одним из пионеров широкого использования этих веществ как реагентов в тонком органическом синтезе. Им разработаны новые методы синтеза кетонов, алленов, аллильных спиртов, аминов, кислот, эфиров, сульфидов и других соединений и низкомолекулярных биорегуляторов. Под руководством А.В. Кучина разработаны научные основы химии и технологии растительных веществ, получены уникальные хиральные молекулы с высокой физиологической активностью.

А.В. Кучин внес значительный вклад в создание и развитие Института химии, является основателем признанной научной школы «Научные основы химии и технологии комплексной переработки растительного сырья», созданной в 1994 г.

А.В. Кучин – известный ученый-химик, автор более 700 научных работ, в том числе 385 статей, 109 авторских свидетельств и патентов РФ.

About the Editor of the Themed Section RAS Corresponding Member, Professor A. V. Kuchin

Aleksandr Vasilevich Kuchin was born on the 31st of May, 1949, in Baku. Ufa Petroleum Institute graduate (1971), Doctor of Chemical Sciences (1989), Full Professor (1997), RAS Corresponding Member (2000). In 1971-1990 A.V. Kuchin worked in Institute of Chemistry Bashkortostan Branch of USSR AS (RAS Institute of Chemistry nowadays), until in 1990 he had got a post of Head of Chemistry Department of Komi Scientific Center, Ural Branch of RAS, and from 1995 to date he works as the Director of Institute of Chemistry Komi Scientific Center, UB RAS.

A.V. Kuchin is a leading expert in the field of organic and organometallic synthesis. He made a significant contribution to the development of chem-

istry and technology of organoaluminum and natural compounds. He is one of the pioneers of the widespread use of these substances as reagents in the fine organic synthesis. A.V. Kuchin developed new methods of ketones, propadienes, allyl alcohols, amines, acids, ethers, sulfur-containing compounds and low-molecular weight bioregulators synthesis. Under his supervision scientific foundations of plant matter chemistry and technology have been developed, and unique chiral molecules with high physiological activity have been obtained.

A.V. Kuchin contributed substantively to the Institute of Chemistry creation and development. In 1994 he was a founder of scientific school in the area of scientific basis of chemistry and complex processing technology of plant materials.

A.V. Kuchin is a well-known chemist, he authored over 700 scientific works including 385 research papers and 109 copyright certificates and patents.

В работе С.Б. Селяниной, М.В. Труфановой, С.А. Забелиной, М.В. Богданова, К.Г. Боголицына, Т.В. Соколовой, В.П. Стригуцкого, Т.И. Пономаревой, О.Н. Ярыгиной, А.С. Орлова «Биологически активные экстракты верхового торфа Европейского Севера России» в качестве исследуемого субстрата использовали торф – возобновляемый источник разнообразных органических соединений растительного происхождения. Важными компонентами торфа являются экстрактивные вещества – низкомолекулярные органические соединения, извлекаемые водой или органическими растворителями. Экстракты были проанализированы методами химического анализа и выявлен состав торфяных битумов. Также исследована микробиологическая активность экстрактов по отношению к условно-патогенной микрофлоре.

Перспективными для фармакологии представляются и несимметричные сульфиды и дисульфиды, содержащие фрагменты монотерпеноидов и моносахаридов, поскольку от них можно ожидать не только усиления антиоксидантной активности, обусловленной включением терпенового фрагмента, но и относительно высокой биодоступности и биосовместимости, связанных с наличием углеводного фрагмента. В статье С.В. Пестовой, Е.С. Измestьева, О.Г. Шевченко, С.А. Рубцовой, А.В. Кучина «Синтез и мембранопротекторные свойства серосодержащих монотерпеноидов с моносахаридными фрагментами» получены и обобщены данные по синтезу сульфидов с неоментантановым, диацетонгалакто-, диацетонфруктопиранозным, моноацетонглюкофуранозным фрагментами, а также с фрагментами галактопиранозы и фруктопиранозы со свободными ОН-группами. При окислении сульфидов с диацетонзащищенными углеводными фрагментами синтезированы новые сульфоксиды. На основе 6-тиодиаце-

тонгалактопиранозы, 1-тиодиацетонфруктопиранозы и терпеновых тиолов: неоментантиола, изоборнантиола, *транс*-вербентиола, миррентиола и *цис*-миррантиола, – получены как симметричные дисульфиды с терпеновыми и углеводными фрагментами, так и несимметричные дисульфиды, содержащие одновременно терпеновый и моносахаридный фрагменты. Проведена оценка мембранопротекторных и антиоксидантных свойств полученных тиогликозидов.

В статье «Экстрактивные вещества технических лигнинов после паро-взрывных обработок» авторами С.М. Крутовым, Я.А. Гравитисом, Е.В. Ипатовой, А.Р. Ахмадуллиной, М.М. Анджс, Р.Р. Тупчаускас, А.В. Прановичем, А.В. Васильевым представлены результаты исследования экстрактивных веществ гидролизного лигнина после проведения паро-взрывных обработок. Из обработанных указанным методом образцов лигнина были выделены экстрактивные вещества и проанализированы методами хромато-масс-спектрометрии с применением двух методов дериватизации: силилирования и метилирования диазометаном, – для получения объективных результатов. Установлено преобладание в составе экстрактивных веществ всех образцов дегидроабетиновой и других смоляных кислот. Показано наличие жирных кислот состава C_{16} - C_{24} , а также стероидных компонентов: кампестерола, ситостерола и ситостанола.

Значительное внимание уделяется разработке новых социально значимых препаратов на основе модификации целевых продуктов комплексной переработки биомассы растений – флавоноидов и полисахаридов, полифенольного и полисахарид-белкового комплексов, выявлению их практического потенциала. При этом совершенствуются методы выделения и очистки биологически активных веществ, проводятся различные модификации, цель которых – получить препарат с заранее заданными лечебными свойствами, обеспечивающими укрепление здоровья человека. Эта задача также чрезвычайно важна и актуальна, так как позволяет выводить технологии переработки растительной биомассы на следующий уровень передела, получая при этом продукты с высокой добавленной стоимостью.

В статье С.Т. Минзановой, В.Ф. Миронова, А.Б. Выштакалюк, Л.Г. Мироновой, В.И. Морозова, Н.Г. Назарова, А.З. Миндубаева,

Abstract of the Themed Section

A.V. Kuchin

Fundamental and applied investigations in the area of vegetal materials processing and working out wood-chemical technologies, development of biologically active compounds and pharmacological preparations process engineering based on low-molecular and high-molecular weight substances of plant origin, as well as investigation of chemical transformation of forest, woodworking, pulp and paper industries cellulose-containing wastes, are relevant and priority trends of organic chemistry development. They promote rational use of available renewable raw materials and production of a wide range of valuable new goods. The strategic concept of these works corresponds to a very promising area of "white chemistry". This trend of technological progress advances rapidly in many countries and solves the problem of the chemical industry shift to the feedstock derived from renewable plant materials. Renewable bioresources allow human society to realize the sustainable development strategy and to meet the needs for energy and raw materials. The unique structure and biological activity of plant materials components have always attracted chemists dealing with synthesis, and renewability of natural resources makes them an inexhaustible source for production of new substances and materials with valuable properties and with a wide range of destination. The IX International Conference "Chemistry and Technology of Plant Materials" (Moscow, 28-30 September, 2015), organized by Institute of Chemistry Komi Scientific Center UB RAS and by Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, focused on subject of renewable plant resources. Conference on that subject meets regularly on a biennial basis. Previous conferences had been held in the Russian Federation in Syktyvkar, St. Petersburg, Kazan, Ufa, Saratov, Kaliningrad. The IX International Conference was attended by more than 200 scientists from Russia, Belarus (Institute of Bioorganic Chemistry of the NAN of Belarus, Belarusian State Technological University), Kazakhstan (Buketov Karaganda State University) and Uzbekistan (Tashkent Medical Academy).

This issue of "RFBR Journal" contains materials of some Conference reports reflecting the results of research projects supported by RFBR.

Relevant works are devoted to development of theoretical bases of vegetal biomass complex processing in order to design technologies for innovative medical (for human or for animal) preparations, biologically active food additives, medicines carrier, plant growth stimulants and technical products manufacturing. Nature of biological activity and the impact mechanism of vegetal materials individual components on living organisms were investigated, accordingly, a large number of the conference presentations discussed the research results of component composition of wild plants.

Authors of the article "Study of plant phytosteroid profile by high performance liquid chromatography coupled with high resolution tandem mass-spectrometry" (D.A. Sevko, M.K. Beklemishev, O.A. Shevlyakova) have applied an express identification algorithm for the phytosteroids in pharmaceutical drugs, based on *Rhaponticum Carthamoides*. Five target compounds (phytoecdysteroids) were detected and identified. It is well known that phytosteroids exhibit adaptogenic, antimicrobial properties, and stimulate the immune processes.

The work "Biologically active extractives of high-moor peat of Northern European Russia" (S.B. Selyanina, M.V. Trufanova, S.A. Zabelina, M.V. Bogdanov, K.G. Bogolitsyn, T.V. Sokolova, V.P. Strigutskiy, T.I. Ponomareva, O.N. Yarygina, A.S. Orlov) deals with peat as the investigated substrate. High-moor peat is a renewable source of multiple organic compounds of plant origin. Important peat components are extractive substances – low-molecular-weight organic compounds extracted with water or organic solvents. The extracts investigation by chemical analyses methods allowed the authors to determine the components of peat bitumen. The extracts microbiological activity against opportunistic microflora was also studied.

Asymmetric sulfides and disulfides containing monoterpenoids and monosaccharides fragments are expected to be very promising for pharmacology development not only because of their high antioxidative activity, but also because of their high bioavailability and biocompatibility due to presence of carbohydrate fragments. Data on the synthesis of sulfide compounds containing fragments of neomentan, diacetonegalacto- and diacetonefructopyranose, monoacetoneglucofuranose, as well as galactopyranose and fructopyranose fragments with free OH-groups have been obtained and summarized in the paper "Synthesis and membrane-protective properties of sulfur-containing monoterpenoids with monosaccharide fragments" (S.V. Pestova, E.S. Izmestev, O.G. Shevchenko, S.A. Rubtsova, A.V. Kuchin). By oxidation of sulfide compounds containing diacetoneprotected carbohydrate fragments the novel sulfoxides compounds

are synthesized. On the basis of 6-thiodiacetonegalactopyranose, 1-thiodiacetonefructopyranose and terpenic thiols (neomentanthiol, isobornanthiol, trans-verbenthionol, myrtenanthiol and cis-myrtanthiol) authors have synthesized both symmetrical disulfides containing terpenic and carbohydrate fragments (up to 41% and 13%, respectively) and asymmetric disulfides containing simultaneously terpenic and monosaccharide fragments. An estimate of membrane-protective and antioxidant properties of obtained thioglycosides was made.

The article "Technical lignins extractive substances after steam-explosion treatments" (S.M. Krutov, J.A. Gravitis, E.V. Ipatova, A.R. Akhmadullina, M.M. Andzs, R.R. Tupciauskas, A.V. Pranovich, A.V. Vasiliev) discusses the results of the technical lignin extractive substances investigation after steam-explosion treatments. After the lignin samples treatment the extractive substances have been elicited and analyzed using two methods of derivatization - silylation and methylation by diazomethane - in order to obtain reliable data. In all the analyzed samples high concentrations of dehydroabietic acid and other resin acids have been detected. Fatty acids C₁₆-C₂₄ and sterol components (campesterol, sitosterol and sitostanol) have been revealed as well.

The issues under focus also include the development of new socially important preparations based on the modification of the products of plant biomass complex processing: flavonoids and polysaccharids, polyphenol and polysaccharide-protein complexes. Thus, techniques for biologically active substances extracting and purifying are improved, various modification are studied in order to obtain a preparation with preset medicinal properties for human health improvement. This task is very important and relevant because it allows to transfer the processing technology to the next conversion level and to obtain novel products.

The article "A pharmacological composite preparation based on pectin polymetallic complexes increase the adaptive capacity of the organism during intense physical efforts" (S.T. Minzanova, V.F. Mironov, A.B. Vyshtakalyuk, L.G. Mironova, V.I. Morozov, N.G. Nazarov, A.Z. Mindubaev, V.A. Milyukov) discusses new pharmacological composite preparation based on pectin polysaccharide, containing three polymetallic complexes of polygalacturonic acid (Na,Mg-polygalacturonate, Na,Zn-polygalacturonate and Na,Cr-polygalacturonate). Physical-chemical properties, structural characteristics and biological activity of the considered preparation were examined. This compound was shown to have a pronounced ability to increase the adaptive capacity of the organism during intense physical efforts and can be used as a potential adaptogen, an erythropoiesis stimulant, and a drug for metabolism normalization.

One of the most interesting and promising classes of compounds in terms of synthesis possibilities is monoterpenoids. Important trend of monoterpenoids chemistry is the introduction of functional groups in parent substrates to produce pharmacologically active compounds: adaptogens, immunomodulators, anti-fungal, anti-inflamma-

tory and antiviral agents. Introduction into the molecule of terpene functional groups, containing sulfur, oxygen, nitrogen atoms, results in expansion of range of the compound biological activity. In the study "Hydroxythiols and disulfides based on α -, β -pinene and 3-carene" (O.A. Banina, D.V. Sudarikov, L.L. Frolova, A.V. Kuchin) a series of new isomeric 1,2- and 1,3-hydroxythiols of carane structure was obtained. Based on these compounds authors obtained high yields of corresponding disulfides.

S.A. Rubtsova, O.M. Lezina, O.N. Grebenkina, D.V. Sudarikov, A.V. Kuchin ("Oxidation of monoterpene thiols by chlorine dioxide") obtained novel S-, O- and Cl-containing terpenoids by oxidation of pinane and isobornane thiols by ClO₂; corresponding disulfides, thiol-sulfonate, sulfinyl- and sulfonylchlorides, sulfoacid and sulfonic ethers. Authors showed how the reaction conditions and terpene structure influence the direction of the reaction. The conclusion was made that the direction of reaction of diisobornyl disulfide oxidation by ClO₂ with formation of trisulfide is uncharacteristic for thiols and disulfides.

The article "Hemocoagulation activity of sulfur-containing bicyclic monoterpenoids" (S.V. Kiselev, L.E. Nikitina, V.A. Startseva, A.V. Bodrov, Z.R. Azizova, A.A. Rakhmatullina, A.V. Khaliullina, R.G. Turaev) covers investigation of hemocoagulation activity of sulfides, sulfoxides and sulfones compounds derived from (-)- β -pinene and (+)-camphene. The synthesized compounds exhibit antiaggregatory and anticoagulant activity and are very promising agents for development of more efficient methods of blood components storage in transfusiology as well as for creation of medicines for the treatment and prevention of thrombophilia.

Presented works are characterized by novelty, high scientific level, and show achievements in the field of fundamental and applied researches in plant materials chemistry and processing. The results, presented by the authors, are already being used in practice or can be recommended for use. To summarize, a comprehensive study of plant materials is a relevant field of research of great fundamental importance and has an implementation prospect in various fields of human activity.

Синтез и мембранопротекторные свойства серосодержащих монотерпеноидов с моносахаридными фрагментами*

С.В. Пестова, Е.С. Измestьев, О.Г. Шевченко, С.А. Рубцова, А.В. Кучин

Получены и обобщены данные по синтезу сульфидов с неоментановым и диацетонгалакто-, диацетонфруктопиранозным, моноацетонглюкофуранозным фрагментами, а также с фрагментами галактопиранозы и фруктопиранозы со свободными ОН-группами с выходом 62–98%. При окислении сульфидов с диацетонзащитными углеводными фрагментами синтезированы новые сульфоксиды. В качестве окислителей использовали *мета*-хлорпероксибензойную кислоту, системы *трет*-бутилгидропероксид–ацетилацетонат ванадила ($VO(acac)_2$), кумилгидропероксид– $VO(acac)_2$. На основе 6-тиодиацетонгалактопиранозы, 1-тиодиацетонфруктопиранозы и терпеновых тиолов: неоментантиола, изоборнантиола, *транс*-вербентиола, миртентиола и *цис*-миртантиола, – получены как симметричные дисульфиды с терпеновыми и углеводными фрагментами с выходом до 41% и 13% соответственно, так и несимметричные дисульфиды, содержащие одновременно терпеновый и моносахаридный фрагменты в количестве 51–90% от общей массы продуктов реакции. Мембранопротекторные и антиоксидантные свойства тиогликозидов с различными терпеновыми фрагментами оценены на основании их способности ингибировать H_2O_2 -индуцированный гемолиз эритроцитов, а также тормозить накопление вторичных продуктов перекисного окисления липидов.

Ключевые слова: сульфиды, сульфоксиды, дисульфиды, монотерпеновые тиолы, моносахариды, мембранопротекторные свойства, окислительный гемолиз.

*

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-03-01312_а).

На сегодняшний день задача синтеза аналогов природных гликозидов и их модификации [1] актуальна, так как известно, что они часто проявляют низкую токсичность и обладают широким спектром биологической активности [2]. Среди них известны соединения с противовирусной, противоопухолевой [3], противотуберкулезной [4, 5], противовоспалительной и антикоагуляционной активностью [6]. За счет наличия большого количества свободных гидроксильных групп в большинстве случаев природные моносахариды являются гидрофильными соединениями. Введение в структуру липофильного фрагмен-

та, например терпенового, биологически активного моносахарида позволяет сделать водорастворимым весь конъюгат, что облегчает дальнейшее применение его в фармакологии [5, 6]. Наличие в структуре одного или двух атомов серы, способных вступать в реакции окисления, может придавать соединению антиоксидантные свойства, обусловленные антипероксидной активностью серосодержащих групп [7, 8].

В данной работе приведены обобщенные сведения о синтезе, мембранопротекторной и антиоксидантной активности сульфидов, сульфоксидов и дисульфидов с моносахаридными и монотерпеновыми фрагментами. Подробный синтез моносеросодержащих соединений с неоментановым и моносахаридными фрагментами (галакто- и фруктопиранозный и глюкофуранозный) приведен в соответствующей литературе [9, 10].

Сульфиды I были синтезированы в кипящем этаноле с использованием Cs_2CO_3 (схема 1). Предвари-



ПЕСТОВА
Светлана Валерьевна
Институт химии Коми
научного центра УрО РАН



ИЗМЕСТЬЕВ
Евгений Сергеевич
Институт химии Коми
научного центра УрО РАН



ШЕВЧЕНКО
Оксана Георгиевна
Институт биологии Коми
научного центра УрО РАН



РУБЦОВА
Светлана Альбертовна
Институт химии Коми
научного центра УрО РАН



КУЧИН
Александр Васильевич
член-корреспондент РАН,
профессор,
директор Института химии Коми
научного центра УрО РАН

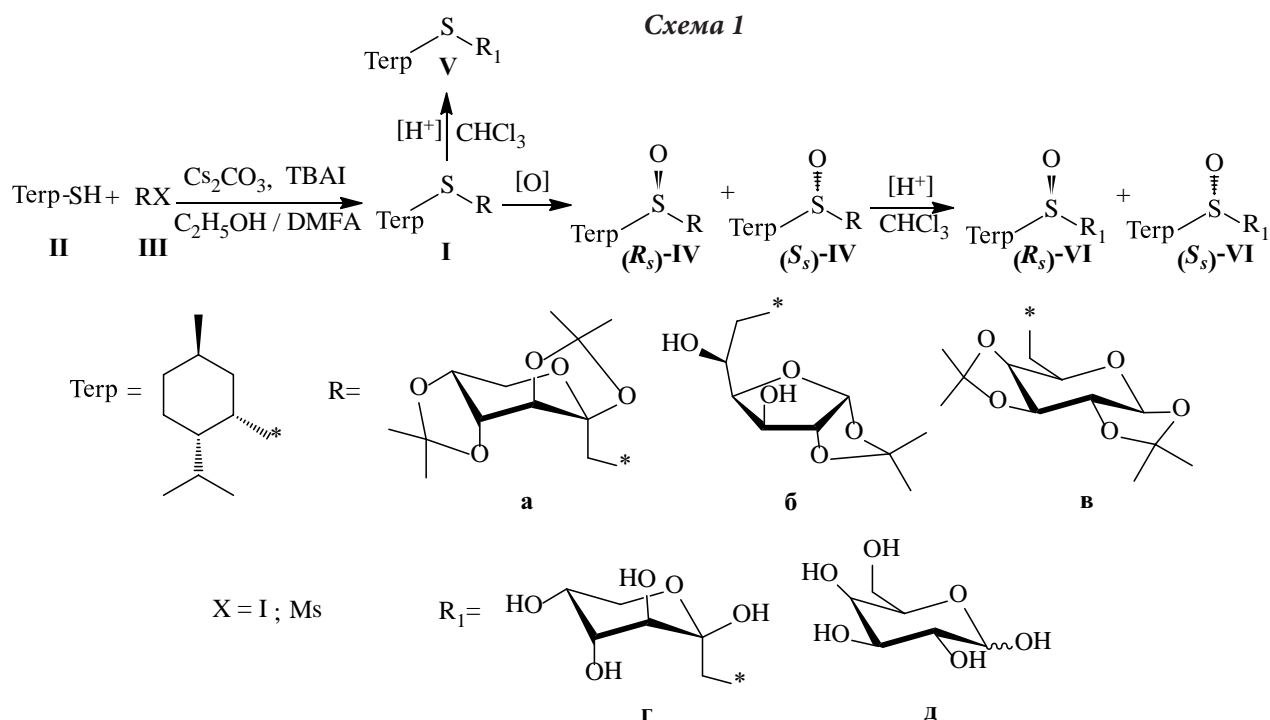
тельно для получения соединения II была использована известная методика, основанная на замещении пара-толуолсульфонильной группы соответствующего тозилата на остаток тиоуксусной кислоты с последующим восстановлением полученного тиоацетата до тиола. Соединения III синтезировали по реакции диацетонидов галакто- и фруктопиранозы с йодом в присутствии бензимидазола (BzIm) и Ph₃P, а также взаимодействием 1,2-моноацетонида глюкофуранозы с метансульфохлоридом.

Для получения сульфоксидов IV проведено окисление сульфидов I мет-хлорпероксибензойной кислотой (m-CPBA) системами трет-бутилгидропероксид (TBHP)–ацетилацетонат ванадила (VO(acac)₂), кумилгидропероксид (CHP)–VO(acac)₂. Сульфоксиды получены в виде диастереомерных смесей, которые удалось разделить хроматографическими методами. С наибольшим выходом сульфоксиды образуются при использовании в качестве окислителя TBHP. Величина диастереоселективности окисления сульфидов была не выше 36%. Образование сульфоксидов с фруктопиранозным фрагментом при использовании CHP протекает недиастереоселективно. Для повышения водорастворимости полученных сульфидов Ia,в и сульфоксидов (R_s)-IVв и (S_s)-IVв проводили снятие изопропилиденовой защиты трифторуксусной кислотой в хлороформе. В результате синтезированы сульфиды VIгд и сульфоксиды (R_s)-VIд и (S_s)-VIд в виде аномерных смесей с различным соотношением. Снять изопропилиденовую защиту с сульфида и сульфоксидов с фрагментом моноацетонглюкофура-

нозы, а также сульфоксидов с фрагментом диацетонфруктопиранозы не удалось. Все попытки снятия ацетонидной защиты с данных соединений приводили к полному осмолению реакционной смеси. Во всех случаях выход сульфидов был более 90%, за исключением сульфида с фруктозным фрагментом со свободными OH-группами: его выход составил 62%.

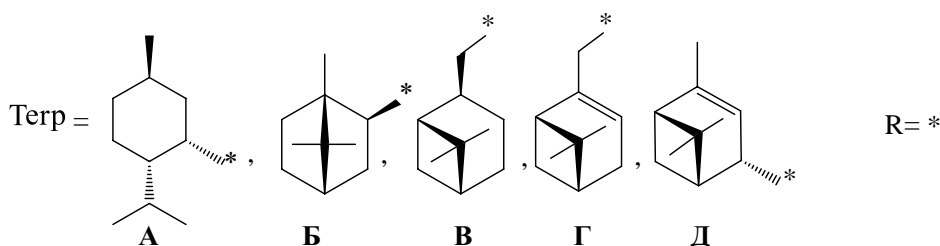
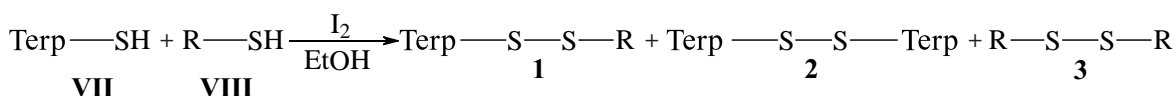
Далее осуществляли синтез дисульфидов, содержащих терпеновый и/или углеводный фрагменты в различных комбинациях [11]. Получали их методом окисления смесей соответствующих тиолов йодом при комнатной температуре (схема 2). В качестве исходных терпеновых субстратов использовали неоментантиол VIIА, изоборнантиол VIIБ, цистиомиртанол VIIВ, миртентиол VIIГ и транс-вербентиол VIIД, а в качестве углеводных субстратов – 1-тиоацетонфруктопиранозу VIIа и 6-тиоацетонгалактопиранозу VIIб.

Установлено, что основными продуктами окисления йодом смеси представленных терпеновых и углеводных тиолов являются несимметричные дисульфиды I. Наибольшее их количество образуется при окислении сме-



TBAI – тетрабутиламмония йодид; [O]: m-CPBA – мет-хлорпероксибензойная кислота; TBHP – трет-бутилгидропероксид; CHP – кумилгидропероксид.

Схема 2



*моносахаридный фрагмент (R) (см. схему 1).

си диацетонфруктопиранозного тиола **VIIIa** и изоборнантиола **VIIIb** – до 90% от общего количества продуктов, наименьшее – в случае неоментантиола **VIIIa** – 51%. Симметричные дисульфиды с терпеновыми заместителями **2** образуются в количестве от 7% до 41%, а с моносахаридными фрагментами **3** – до 13% от общего количества, что свидетельствует, вероятно, о низкой скорости их образования.

Далее было проведено исследование токсичности, мембранопротекторных и антиоксидантных свойств полученных сераорганических соединений различной структуры в концентрации 100 мкмоль/л для сульфидов/сульфоксидов и 10 мкмоль/л для дисульфидов в системе *in vitro* модели H_2O_2 -индуцированного гемолиза эритроцитов крови лабораторных мышей [12–17].

Поскольку токсичность соединений способна существенно ограничить их дальнейшее использование, предварительно оценивали их гемолитическую активность [18, 19]. Она была выявлена для трех сульфидов – **IA(a,v)** и **VAд**, которые оказались высокотоксичными по отношению к эритроцитам крови млекопитающих в концентрации 100 мкмоль/л. Среди исследованных дисульфидов в концентрации 10 мкмоль/л гемолитическая активность была выявлена лишь для несимметричных дисульфидов, содержащих неоментильный (**1Av**, **1Aa**), либо изоборнильный (**1Ba**) фрагмент.

Затем была проведена оценка мембранопротекторной и антиоксидантной активности группы соедине-

ний – сульфидов и сульфоксидов в концентрации 100 мкмоль/л. Наиболее высокие мембранопротекторная и антиоксидантная виды активности в исследуемой группе сульфидов и сульфоксидов отмечены для соединений на основе галакто- и фруктопиранозы: (R_s)-**IVAb**, (R_s)-**VIAd**, (S_s)-**VIAd**, (S_s)-**IVAa**, **VAг**. У соединений (R_s)-**IVб**, (S_s)-**IVб** и **Iб** статистически значимая мембранопротекторная активность в условиях H_2O_2 -индуцированного гемолиза эритроцитов в концентрации 100 мкмоль/л не была выявлена. Так, способность данных соединений защищать клетки в условиях острого окислительного стресса зависела от строения углеводного фрагмента: сульфиды и сульфоксиды с галакто- (**в,д**) и фруктопиранозным (**а,г**) фрагментами оказались более активными по сравнению с соединениями с глюкопиранозным (**б**) фрагментом.

В данной группе соединений наиболее активными в отношении гидроксильного радикала являются сульфоксиды, содержащие фрагменты диацетонгалакто- (**в,д**) и фруктопиранозы (**а,г**). Возможно, это объясняется тем, что именно сульфоксиды могут оказывать мгновенное антиоксидантное действие, в то время как исходные соединения – сульфиды – для проявления антиокислительных свойств должны предварительно провзаимодействовать с небольшим количеством кислорода [20].

Далее, как и в случае моносеросодержащих соединений, был проведен скрининг биологической активности (мембранопротекторной, антиоксидантной) полученных дисульфидов в концентрации 10 мкмоль/л. Концентрация была уменьшена в 10 раз по сравнению с предыдущим экспериментом, для того чтобы снизить гемолитическую активность конъюгатов. С использованием данной модельной системы показано, что мембранопротекторная активность полученных дисульфидов зависит от структуры обоих заместителей – как терпенового, так и моносахаридного. Наибольшую активность показали дисульфиды, имеющие в составе *цис*-миртанильный (**В**), миртенильный (**Г**)

и неоментильный (А) фрагменты. При этом активность соединений с галактопиранозным (в) фрагментом несколько выше, чем у аналогичных структур с фруктопиранозным (а). Для симметричных дисульфидов, не имеющих моносахаридные фрагменты, наибольшая активность выявлена у соединений, содержащих *цис*-миртанильный, миртенильный и изоборнилный (Б) фрагменты. Низкая активность в данной модельной системе отмечена у дисульфидов различной структуры, содержащих *транс*-вербенильный (Д) фрагмент.

Соединения, проявившие наибольшую мембранопротекторную активность, не только защищали клетки от гемолиза, но и статистически значимо ингибировали накопление вторичных продуктов перекисного окисления липидов (активные продукты тиобарбитуровой кислоты) в суспензии эритроцитов, что подтверждает наличие у исследуемых соединений анти-

оксидантной активности в данной модельной системе.

Таким образом, обобщены данные по синтезу новых сульфидов, сульфоксидов и дисульфидов с различными моносахаридными и монотерпеновыми фрагментами. На модели H_2O_2 -индуцированного гемолиза эритроцитов выявлено наличие антиоксидантной и мембранопротекторной активности у двух групп исследуемых конъюгатов с различной концентрацией.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Химия» Института химии Коми НЦ УрО РАН.

Литература

1. Р.Р. Шарипова, Б.Ф. Гарифуллин, О.В. Андреева, И.Ю. Стробыкина, О.Б. Базанова, В.Е. Катаев *ЖОРХ*, 2015, 51(3), 487.
2. P. Pouillart, G. Ronco, I. Cerutti, C. Chany, P. Villa *JBRFA*, 1990, 4(4), 135.
3. C. Nicolaou, W.-M. Dai *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1991, 30(11), 1387. DOI: 10.1002/anie.199113873.
4. О.В. Андреева, Р.Р. Шарипова, И.Ю. Стробыкина, М.А. Кравченко, А.С. Стробыкина, А.Д. Волошина, Р.З. Мусин, В.Е. Катаев *ЖОРХ*, 2015, 51(9), 1349.
5. Б.Ф. Гарифуллин, Р.Р. Шарипова, И.Ю. Стробыкина, О.В. Андреева, В.Е. Катаев *Химия прир. соед.*, 2015, №5, 760.
6. M.C. Aversa, A. Barattucci, P. Bonaccorsi *Tetrahedron*, 2008, 64(33), 7659. DOI: 10.1016/j.tet.2008.05.051.
7. Л.П. Овчинникова, У.Н. Роцкая, Е.А. Васюнина, О.И. Синицина, Н.В. Кандалинцева, А.Е. Просенко, Г.А. Невинский *Биоорг. химия*, 2009, 35(3), 417.
8. Е.С. Измestъев, Д.В. Судариков, О.Г. Шевченко, С.А. Рубцова, А.В. Кучин *Биоорг. химия*, 2015, 41(1), 90.
9. С.В. Пестова, Д.В. Судариков, С.А. Рубцова, А.В. Кучин *ЖОРХ*, 2013, 49(3), 379.
10. С.В. Пестова, Е.С. Измestъев, С.А. Рубцова, А.В. Кучин *ЖОРХ*, 2014, 50(5), 684.
11. С.В. Пестова, Е.С. Измestъев, О.Г. Шевченко, С.А. Рубцова, А.В. Кучин *Известия РАН. Серия химическая*, 2015, №3, 723.
12. F.N. Koa, G. Hsiaoa, Y.H. Kuob *Free Radic. Biol. Med.*, 1997, 22(1–2), 215. DOI: 10.1016/S0891-5849(96)00295-X.
13. A. López-Revuelta, J.I. Sánchez-Gallego, A. Hernández-Hernández, J. Sánchez-Yagüe, M. Llanillo *Chem. Biol. Interact.*, 2006, 161(1), 79. DOI: 10.1016/j.cbi.2006.03.004.
14. R.M. Costa, A.S. Magalhães, J.A. Pereira, P.B. Andrade, P. Valentão, M. Carvalho, B.M. Silva *Food Chem. Toxicol.*, 2009, 47(4), 860. DOI: 10.1016/j.fct.2009.01.019.
15. J. Takebayashi, J. Chen, A. Tai *In Advanced Protocols in Oxidative Stress II. Methods in Molecular Biology*, Ed. D. Armstrong, 2010, 594, 287. DOI: 10.1007/978-1-60761-411-1_20.
16. C. Wang, X. Qin, B. Huang, F. He, C. Zeng *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, 402(4), 773. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.10.108.
17. О.Г. Шевченко, Л.Н. Шишкина *Успехи совр. биол.*, 2014, 134(2), 133.
18. S. Henkelman, G. Rakhorst, J. Blanton, W. van Oeveren *Mater. Sci. and Eng.: C*, 2009, 29(5), 1503. DOI: 10.1016/j.msec.2009.01.002.
19. A. Banerjee, A. Kunwar, B. Mishra, K.I. Priyadarsini *Chem.-Biol. Interact.*, 2008, 174(2), 134. DOI: 10.1016/j.cbi.2008.05.009.
20. D. Barnard, L. Bateman, E.R. Cole, J.I. Cunneen *Chem. Ind. (London)*, 1958, 29, 918.

Экстрактивные вещества технических лигнинов после паро-взрывных обработок*

С.М. Крутов, Я.А. Гравитис, Е.В. Ипатова, А.Р. Ахмадуллина, М.М. Анджс,
Р.Р. Тупчаускас, А.В. Пранович, А.В. Васильев

Впервые исследовано влияние времени паро-взрывных обработок технических лигнинов на выход экстрактивных веществ с определением их химического состава методами хромато-масс-спектрометрии с использованием внутренних стандартов.

Для получения объективных результатов экстрактивные вещества из образцов лигнина, обработанных паро-взрывным гидролизом, анализировали хромато-масс-спектрометрией с использованием двух методов дериватизации: силилирования и метилирования диазометаном. Установлено преобладание в составе экстрактивных веществ всех проанализированных образцов дегидроабетиновой и других смоляных кислот. Показано наличие жирных кислот состава $C_{16}-C_{24}$, а также стероидных компонентов: кампестерола, ситостерола и ситостанола.

Ключевые слова: паро-взрывные обработки, экстрактивные вещества, гидролизный лигнин.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 15-03-02936) и Латвийской национальной государственной программы «Лесные и земельные возобновляемые ресурсы: исследование и устойчивое использование – новые продукты и технологии».

Введение

В последние годы проводятся интенсивные исследования по поиску новых подходов к получению композитных материалов из древесного сырья [1, 2]. В этом отношении весьма перспективными с точки зрения экономики и простоты производства представляются паро-взрывные обработки древесного исходного сырья, используемого в дальнейшем для получения плит

различного назначения. Данный метод предварительных обработок позволяет получать плиты из некоторых видов древесного сырья без связующих компонентов [3, 4].

Работами, проводимыми под руководством профессора Я.А. Гравитиса (Latvian State Institute of Wood Chemistry, Laboratory of Eco-Efficient



КРУТОВ

Степан Минович

профессор,
Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С.М. Кирова



ГРАВИТИС

Янис Аугустович

профессор,
Латвийский государственный институт химии древесины



ИПАТОВА

Елена Владимировна

Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С.М. Кирова



АХМАДУЛЛИНА

Аделия Рустамовна

Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С.М. Кирова



АНДЖС

Мартинс Миервалдисо

Латвийский государственный институт химии древесины



ТУПЧАУСКАС

Рамунас Рамутович

Латвийский государственный институт химии древесины



ПРАНОВИЧ

Андрей Викторович

Або Академия



ВАСИЛЬЕВ

Александр Викторович

профессор,
Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С.М. Кирова

Conversion of Biomass – Латвийский государственный институт химии древесины, лаборатория Экологической переработки биомассы), показана перспективность этого направления [5, 6].

В данной работе приведены результаты исследований по проведению паро-взрывных обработок технического гидролизного лигнина – отхода биохимических производств. Технический гидролизный лигнин представляет собой крупномасштабный малоиспользуемый отход гидролизного производства, который при хранении может вызвать серьезные экологические проблемы. Его количество, хранящееся в отвалах биохимических предприятий, исчисляется десятками миллионов тонн, и проблема его комплексной утилизации является актуальной.

Применение паро-взрывных обработок к гидролизному лигнину может открыть новый подход к его использованию в качестве компонента при получении новых композитных материалов, образующихся вследствие разрушения межклеточных микроструктур и микрогранулированных образований лигноуглеводного комплекса в лигнине. И, как следствие, увеличение его реакционной способности.

В составе гидролизных лигнинов, помимо собственно лигнина, значительную часть составляют экстрактивные вещества, которые сорбируются на поверхности лигнина и удаляются вместе с ним [7, 8].

Ранее было показано, что содержание экстрактивных веществ в гидролизном лигнине различного происхождения может достигать 15% в зависимости от времени хранения. Установлено, что относительное содержание экстрактивных веществ в лигнинах после длительного хранения несколько увеличивается при уменьшении углеводных компонентов [9–11].

При проведении паро-взрывных обработок могут происходить изме-

нения не только с морфологической структурой лигнина, но и с компонентным составом экстрактивных веществ. Последние представляют потенциальную ценность для дальнейшего использования в различных направлениях, в том числе и для получения разнообразных карбо- и гетероциклических структур.

Целью данной работы является исследование влияния паро-взрывных обработок на состав экстрактивных веществ гидролизного лигнина.

Экспериментальная часть

Для исследования использовали гидролизный лигнин действующего Кировского БиоХимЗавода (ГЛК). Лигнин высушили при комнатной температуре, просеяли через сита с диаметром отверстий от 2.5 до 0.5 мм, для исследований отобрана фракция с размером частиц до 0.5 мм. Образцы лигнина подвергали паро-взрывным обработкам (ГЛК_{пв} 1–3) при температуре 235 °С, давлении 3.2 МПа, времени обработок от 0.5 до 2 мин (табл. 1).

Таблица 1. Условия проведения паро-взрывных обработок (ПВО)

Образец	Условия ПВО		
	Температура, °С	Давление, МПа	Время, мин
ГЛК _{пв} 1	235	3.2	0.5
ГЛК _{пв} 2	235	3.2	1
ГЛК _{пв} 3	235	3.2	2

На рисунке 1 приведены экспериментальные данные, характеризующие внутренние и температурные режимы реактора и трех паровых генераторов.

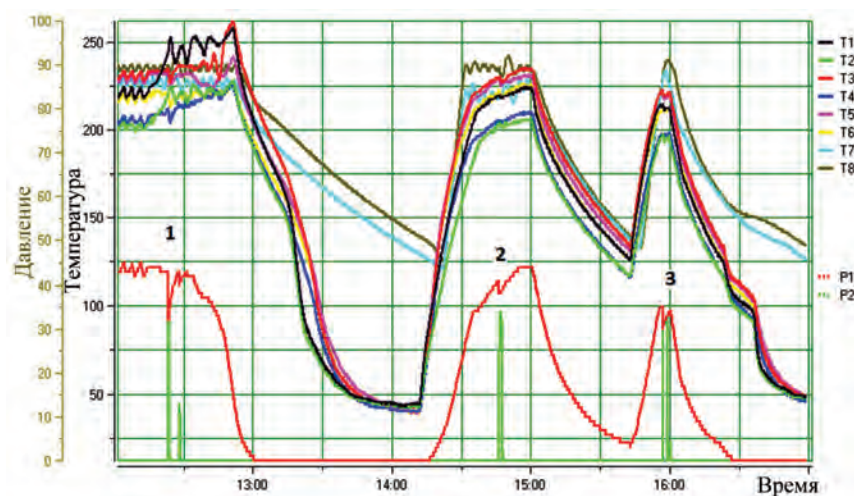


Рис. 1. Режим проведения паро-взрывных обработок. T1–T6 – кривые внутренней и наружной температуры трех генераторов пара; T7 и T8 – кривые внутренней и наружной температуры реактора; P1 – кривые давления на выходе генератора пара; P2 – кривые давления реактора. Цифры 1,2,3 обозначают номера обработок, соответствующих полученным образцам лигнина.

Образцы лигнина ГЛК и ГЛК_{нв} 1–3 экстрагировали смесью спирт–толуол в соотношении 1:2 в аппаратах Сокслета до обесцветивания экстрагента (30 циклов). После окончания экстракции, экстрагент отгоняли на водяной бане при температуре 40 °С на роторном вакуумном испарителе.

Массовую долю экстрактивных веществ, % к абсолютно сухому лигнину (Е), рассчитывали по формуле:

$$E = \frac{m_1 - m}{g} \cdot 100,$$

где m_1 – масса колбы со смолой, г; m – масса пустой колбы, г; g – масса абсолютно сухой навески лигнина, г.

Полученные экстракты ГЛК_{нв} 1–4 анализировали методами газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. Для получения более объективных результатов применили два метода дериватизации экстрактивных веществ: силилирование и метилирование.

Силилирование проводили смесью бис-триметилсилилтрифторацетамида и триметилхлорсилана в пиридине (соотношение 2:1:1) из расчета 120 мкл смеси на 1 мг сухой пробы при 70 °С в течение 40 мин.

Метилирование исследуемых образцов экстрактивных веществ проводили раствором диазометана в диэтиловом эфире [12] (десятикратный избыток), добавляя его к навеске экстрактивных веществ при интенсивном перемешивании в течение трех минут. Непрореагировавший избыток диазометана нейтрализовали уксусной кислотой. Полученную пробу экстрактивных веществ анализировали методом хромато-масс-спектрометрии. Газожидкостную хроматографию (ГЖХ) проводили на хроматографе PerkinElmer AutoSystem XL Gas Chromatograph с встроенным автосемплером и снабженном двумя капиллярными колонками с неполярной и среднеполярной жидкими фазами: HP-1 (25 м × 0.2 мм) и HP-5 (25 м × 0.2 мм); начальная температура колонок 120 °С, выдержка 1 мин, затем нагрев до 320 °С со скоростью 6 град/мин с выдержкой 15 мин; детектор пламенно-ионизационный, температура детектора 320 °С. Разделение потока газа-носителя (split) 1:24. Расход газа-носителя (водород) через колонки 0.8 мл/мин. Объем пробы 0.5 мкл.

Хромато-масс-спектрометрию (ГХ/МС) силилированных образцов проводили на хроматографе Agilent G 1530A в тандеме с масс-селективным детектором Agilent HP 5973 Mass Selective Detector. Капиллярная колонка HP-5 (25 м × 0.2 мм) с жидкой фазой (5%-ный раствор фенилметилсилоксана); начальная температура колонки 80 °С, выдержка 1 мин, затем нагрев до 320 °С со скоростью 8 град/мин с выдерж-

кой 6 мин. Температура испарителя 300 °С. Разделение потока газа-носителя (split) 18.8:1. Расход газа-носителя (гелия) 0.8 мл/мин. В качестве внутреннего стандарта использовали холестерин и бегеновую кислоту C₂₁H₄₃COOH. Объем пробы 1.0 мкл.

ГХ/МС метилированных образцов проводили на хроматографе 6850A модели G2629A с селективным масс-спектрометрическим детектором HP5973 Network, модель G2577A (Agilent Technologies, Inc.). Энергия ионизации 70 эВ. Колонка капиллярная HP-5MS (30 м × 0.25 мм) со стационарной жидкой фазой (5%-ный раствор фенилметилсилоксана) толщиной 0.25 мкм. Программирование температуры колонки: подъем с 60 до 280 °С со скоростью 5 град/мин и 10 мин изотермы при 280 °С. Скорость газа-носителя (гелия) 1 мл/мин.

Обсуждение результатов

После проведения паро-взрывных обработок образцы лигнинов после сушки в мягких условиях были проанализированы на содержание экстрактивных веществ и лигнина Класона [13].

В *таблицах 2 и 3* представлены результаты исследования образцов гидролизного лигнина после паро-взрывных обработок.

Потери, происходящие при проведении процесса, в зависимости от условий составляют от 7 до 13%.

Из анализа группового состава видно, что в образце ГЛК_{нв} 3 (время обработки 2 мин) содержится больше экстрактивных веществ, чем в остальных образцах лигнина после паро-взрывных обработок.

На *рисунке 2* приведены хроматограммы силиловых эфиров экстрактивных веществ гидролизного лигнина после паро-взрывных обработок. Видно, что в образцах (1–3) экстрактивных веществ химический состав анализируемых групп веществ в основном схож. Можно отметить, что преобладающими компонентами

экстрактивных веществ являются жирные и смоляные кислоты. Вместе с тем повышается содержание моносахаридов (время удержания 10–15 мин) с увеличением времени обработки.

Кроме того, полученные экстрактивные вещества были проанализированы методом хромато-масс-спектрометрии после метилирования диазометаном. На *рисунке 3* приведена хроматограмма образца ГЛК_{пв} 3. Хроматограммы всех образцов (1–3) имеют схожий характер.

Анализ образцов экстрактивных веществ методом хромато-масс-спектрометрии с использованием как силилирования, так и метилирования показал преобладание во всех образцах дегидроабиетиновой кислоты.

На *рисунках 4 и 5* приведены масс-спектры преобладающего компонента в составе экстрактивных веществ – дегидроабиетиновой кислоты – в просилилированной и прометилованной формах. Для сравнения на *рисунках 6 и 7* приведены соответствующие масс-спектры из справочной базы стандартов NIST [14].

Для оценки химического состава полученных образцов экстрактивных веществ использованы данные жидкостной хроматографии (условия приведены выше) с использованием метода внутренних стандартов.

На *рисунке 8* приведен относительный компонентный состав экстрактивных веществ. Расчет произведен относительно внутренних стандартов (холестерин и бегеновая кислота).

Анализ компонентного состава экстрактивных веществ показал наличие в образцах лигнина после паро-взрывных обработок жирных (C₁₆-C₂₄) и смоляных кислот (дегидроабиетиновой, абиетиновой), а также стероидных компонентов (кампестерола, систостерола, ситостанола), содержание которых увеличивается с увеличением времени обработки. Преобладающим компонентом экстрактивных веществ яв-

Таблица 2. Зависимость выхода конечных продуктов от длительности проведения паро-взрывных обработок образцов лигнина

Образец	Время, мин	Влажность после сушки, %	Сухой остаток, %
ГЛК _{пв} 1	0.5	3.7	86.4
ГЛК _{пв} 2	1	3.7	90.8
ГЛК _{пв} 3	2	3.4	87.6

Таблица 3. Групповой состав образцов гидролизного лигнина до и после паро-взрывных обработок лигнина

Образец	Время обработки, мин	Экстрактивные вещества, %	Лигнин Класона, %
ГЛК	0	14.3	65.3
ГЛК _{пв} 1	0.5	13.0	76.9
ГЛК _{пв} 2	1	12.3	77.5
ГЛК _{пв} 3	2	13.9	61.0

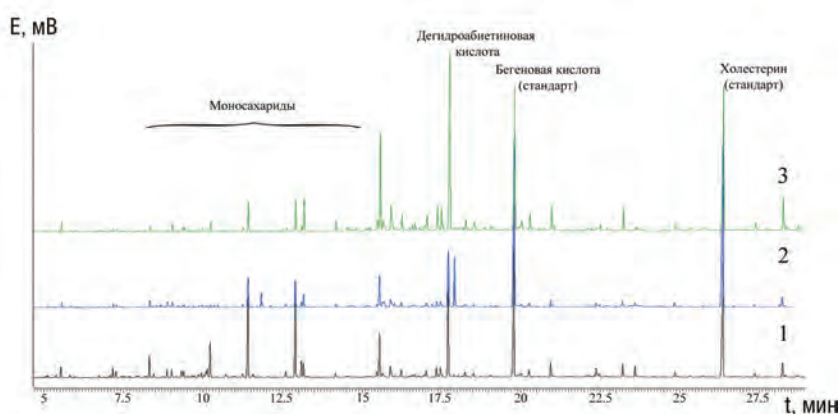


Рис. 2. Газожидкостные хроматограммы силиловых эфиров экстрактивных веществ гидролизного лигнина после паро-взрывных обработок: 1 (0.5 мин), 2 (1 мин), 3 (2 мин).

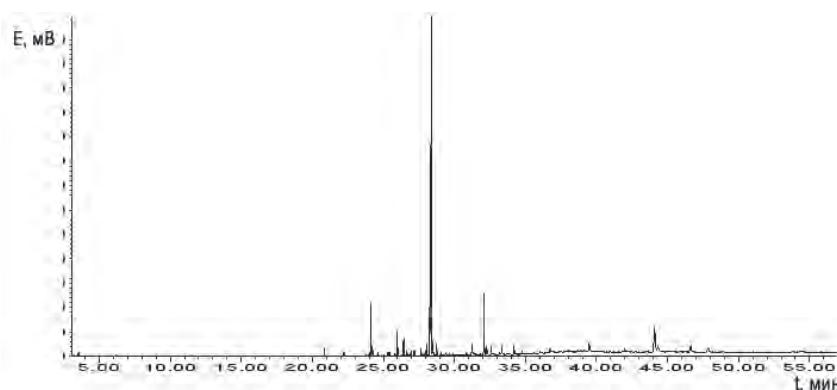


Рис. 3. Хроматограмма образца метиловых эфиров экстрактивных веществ ГЛК_{пв} 3.

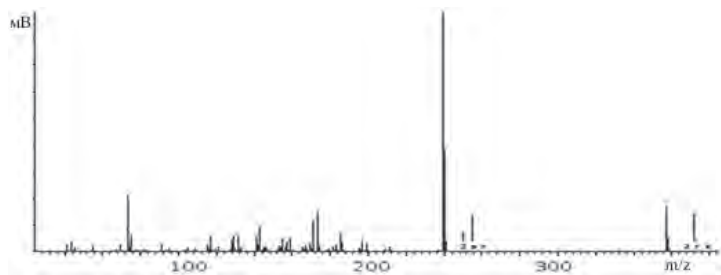


Рис. 4. Масс-спектр компонента со временем удержания 19 мин – силиловый эфир дегидроабиединовой кислоты.

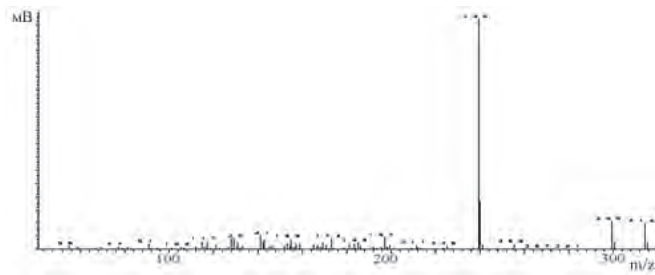


Рис. 5. Масс-спектр компонента со временем удержания 28 мин – метиловый эфир дегидроабиединовой кислоты.

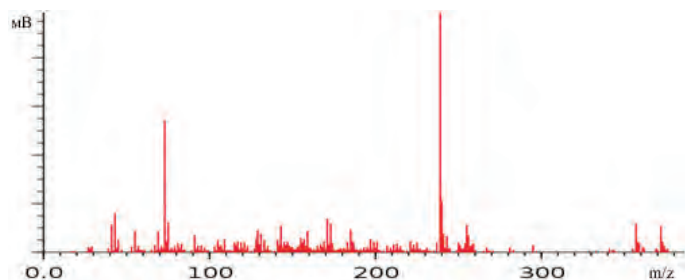


Рис. 6. Масс-спектр силилового эфира дегидроабиединовой кислоты из каталога NIST.

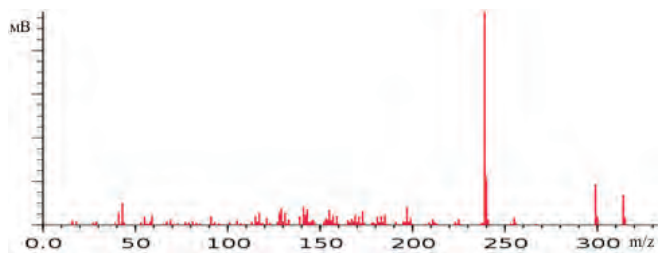


Рис. 7. Масс-спектр метилового эфира дегидроабиединовой кислоты из каталога NIST.

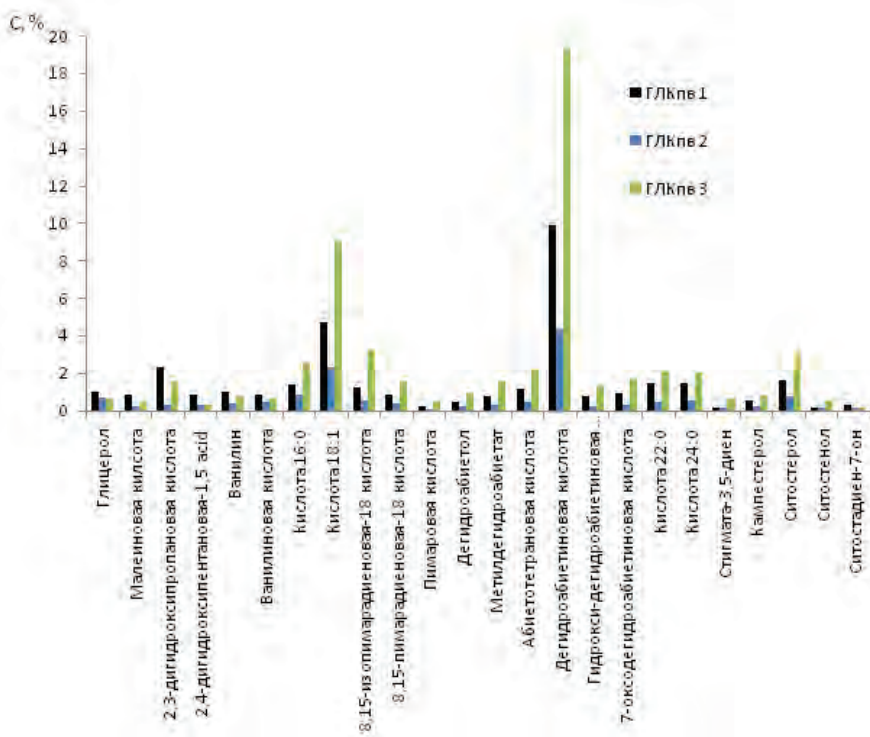


Рис. 8. Относительный компонентный состав экстрактивных веществ гидролизованного лигнина после паро-взрывных обработок.

ляется дегидроабиединовая кислота.

Из рисунка 8 видно, что в образце ГЛК_{пв} 3 (время обработки 2 мин) достигается наибольшее относительное содержание экстрактивных веществ после паро-взрывных обработок. Дегидроабиединовая кислота составляет 18% от общего содержания экстрактивных веществ.

Анализ группового состава (табл. 3) исходного лигнина и лигнина после паро-взрывных обработок показывает, что после обработок содержание экстрактивных веществ (~13%) снижается относительно исходного лигнина (14.3%). Ранее было установлено, что в составе экстрактивных веществ гидролизованного лигнина Кировского БиоХимЗавода (рис. 9) преобладают те же компоненты, что определены в данном исследовании [10].

Однако относительное содержание таких соединений, как олеиновая кислота, дегидроабиединовая кислота, ситостерин в исходном лигнине не превышает 5%.

Такая разница в относительном содержании индивидуальных компонентов в составе экстрактивных веществ может быть вызвана уменьшением содержания экстрагируемых остаточных моносахаридов в процессе паро-взрывных обработок и раскрытием микроструктур лигнина, связанных с экстрактивными веществами на поверхности.

Увеличение содержания экстрактивных веществ в исследованных образцах может быть связано с условиями проведения паро-взрывных обработок, в том числе с относительным уменьшением остаточных полисахаридов и потерями, в силу особенностей проведения процесса паро-взрывных обработок.

Выводы

Проведены паро-взрывные обработки образцов гидролизного лигнина Кировского БиохимЗавода и проанализирован состав их экстрактивных веществ.

Показано увеличение относительного содержания основных компонентов экстрактивных веществ с

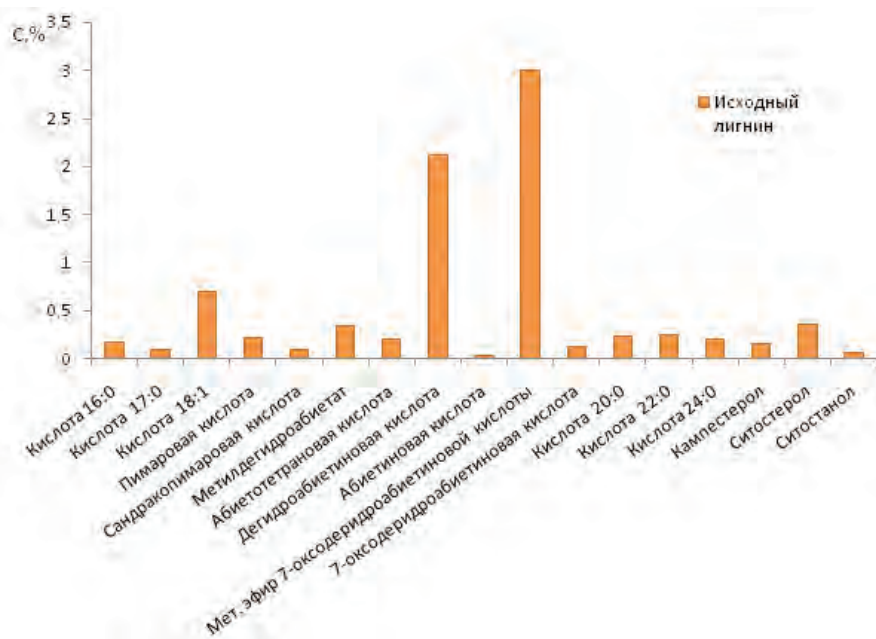


Рис. 9. Относительный компонентный состав экстрактивных веществ исходного гидролизного лигнина.

увеличением времени паро-взрывных обработок.

Установлено преобладание в составе всех исследованных экстрактивных веществ смоляных кислот, среди которых превалирует дегидроабиетиновая кислота, жирных кислот состава C_{16} - C_{24} и стероидных компонентов, представленных кампестеролом, ситостеролом и ситостанолом.

Литература

1. F.P. La Mantia, M. Morreale *Composites: Part A*, 2011, **42**(6), 579. DOI: 10.1016/j.compositesa.2011.01.017.
2. G. Koronis, A. Silva, M. Fontul *Composites: Part B*, 2013, **44**, 120. DOI: 10.1016/j.compositesb.2012.11.018.
3. M.N. Anglès, F. Ferrando, X. Farriol, J. Salvadó *Biomass Bioenergy*, 2001, **21**, 211. DOI: 10.1016/S0961-9534(01)00031-9.
4. T.Y.A. Fahmy, F. Mobarak *Cellulose*, 2013, **20**(3), 1453. DOI: 10.1007/s10570-013-9911-9.
5. J. Abolins, J. Gravītis *Latvian J. Phys. Techn. Sci.*, 2009, **46**(5), 16. DOI: 10.2478/v10047-009-0017-y.
6. T. Liitiä, S. Rovio, R. Taljia, T. Tamminem, J. Rencoret, A. Gutiérrez Suárez, J.C. Río Andrade, A. Sutka, R. Tupciauskas, M. Andzs, J. Gravītis *In Proc. The 13th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp*, Seville, Spain, June 2014, p. 515.
7. М.И. Чудаков *Промышленное использование лигнина: Монография*, Москва, Лесная промышленность, 1983, 200 с.
8. В.И. Азаров, А.В. Буров, А.В. Оболенская *Химия древесины и синтетических полимеров: учеб. для вузов*, Санкт-Петербург, Лесотехническая академия, 1999, 627 с.
9. И.В. Грибков, С.М. Крутов, А.В. Пранович, М.Я. Зарубин *Химия растительного сырья*, 2008, №2, 15.
10. Е.В. Ипатова, С.М. Крутов *Известия СПбЛТА*, 2013, Вып. 203, 135.
11. Е.В. Ипатова, С.М. Крутов, И.В. Сумерский, А.В. Пранович *Известия СПбЛТА*, 2015, Вып. 210, 190.
12. Е.В. Шулишов, И.П. Клименко, Ю.В. Томилов *В Сб. Синтезы органических соединений: Сборник 3*, под ред. М.П. Егорова, Москва, Макс-Пресс, 2008, с. 266-269.
13. Г.Ф. Закис *Функциональный анализ лигнинов и их производных: научное издание*, Рига, Зинатне, 1987, 230 с.
14. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69 (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>).

Изучение фитостероидного профиля растений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения *

Д.А. Севко, М.К. Беклемишев, О.А. Шевлякова

Фитостероиды обладают адаптогенными, антимикробными свойствами, стимулируют иммунные процессы. Их идентификация, определение и поиск новых представителей в растительном сырье являются важными задачами. В отличие от спектроскопии ЯМР (^1H , ^{13}C) высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения позволяет получать брутто-формулу и подтверждать структуру целевых аналитов при малом их содержании в экстракте. В работе применен алгоритм экспрессной идентификации фитостероидов в аптечных препаратах на основе левзеи сафлоровидной. Обнаружены и идентифицированы пять фитоэкдистероидов, их масс-спектры второго порядка содержали характеристичные m/z с точностью менее 5 ppm. Содержание этих аналитов в исследуемых образцах оценено по градуировочной зависимости для 20-гидроксиэкдизона.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, тандемная масс-спектрометрия, фитостероиды, растительные экстракты.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-03-00441-а).

Введение

Фитостероиды являются физиологически активными компонентами многих лекарственных препаратов и биологически активных добавок на основе растений. Эти соединения обладают адаптогенными и антимикробными свойствами, стимулируют иммунные процессы, снижают артериальное давление, снимают спазмы и головные боли [1–3]. Согласно Отраслевому стандарту Министерства здравоохранения [4] в лекарственных средствах помимо основного действующего компонента необходимо определять также и группы родственных ему соединений. В связи с этим разработка подхода к селективному определению группы соединений данного класса представляется актуальной.

Ранее на примере анализа экстракта серпухи венценосной [5] нами был разработан алгоритм экспрессной идентификации фитостероидов в объектах сложного состава методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. Целью данной работы было применить этот подход к анализу фармпрепаратов на основе левзеи сафлоровидной для идентификации и определения полного комплекса содержащихся в них соединений данного класса.

Экспериментальная часть

Реактивы и оборудование

Хроматографическое определение целевых аналитов проводили методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС) на хроматографе Dionex Ultimate 3000 с термостатируемой колонкой (Thermo HypersilGold aQ, 150 × 2.1 мм, размер зерна 3 мкм) и масс-спектрометром Thermo QExactive, оснащенным источником ионизации электрораспылением при атмосферном давлении.

В работе использовали два элюента: А – смесь ацетонитрил–вода (5 : 95 об.) с добавкой 0.1% (об.) HCOOH ; В – ацетонитрил с добавкой 0.1% (об.) HCOOH . Разделение проводили в режиме градиентного элюирования: 0–1 мин: 10% В; 1–9 мин: 10–90% В; 9–12 мин:



СЕВКО
Дарья Анатольевна
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова



БЕКЛЕМИШЕВ
Михаил Константинович
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова



ШЕВЛЯКОВА
Олеся Александровна
Федеральное государственное унитарное предприятие «Научный центр «Сигнал»

90% В; 12–12.5 мин: 90–10% В; 12.5–15 мин: 10% В. Объем вводимой пробы составлял 3 мкл. Температура термостата колонки 30 °С, скорость подачи элюента 0.5 мл/мин. Измерения проводили в режиме регистрации отрицательных ионов по полному ионному току в диапазоне масс 100.00–1000.00 Да с разрешением 35000. Температура источника ионизации 320 °С, температура фокусирующего капилляра 270 °С, напряжение источника ионизации 4 кВ. Масс-спектры второго порядка получали высокоэнергетической диссоциацией соударением с азотом в качестве газа-реагента.

Пробоподготовка фармпрепаратов на основе левзеи сафлоровидной

Для определения фитостероидов в аптечном экстракте левзеи дозатором отбирали 1 мл препарата и добавляли к нему 3 мл 96%-ного этилового спирта. Полученный раствор анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Для определения фитостероидов в таблетках «Левзея» одну таблетку помещали в виалу на 15 мл, добавляли 1 мл 0.1 моль/л HCl и помещали на 10 мин в ультразвуковую (УЗ) ванну. Далее к содержимому виалы добавляли 9 мл 96%-ного этилового спирта и снова помещали в УЗ-ванну на 10 мин, затем центрифугировали при 2000 об/мин. Надосадочный слой далее анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Результаты и обсуждение

Высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС) – один из наиболее информативных и эффективных методов органического анализа. В отличие от обычного масс-спектра спектры второго порядка (МС/МС) получают при фрагментации ионов-предшественников целевых аналитов. Тандемная масс-спектрометрия приводит к существенному улучшению селективности, так как позволяет выбрать и использовать характеристичные (для каждого соединения или их группы) переходы ион-предшественник → ион-продукт (режим регистрации селективных реакций), при этом также возрастают точность и чувствительность анализа.

Повысить чувствительность и селективность анализа сложных матриц, таких как растительные экстракты и лекарственные препараты на их основе, можно при использовании современных техник детектирования. Метод ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения позволяет получать значения масс определяемых ве-

ществ с точностью до 5 миллионов долей (м.д.), что делает обнаружение целевых аналитов в сложных матрицах более селективным, чем при использовании масс-спектрометрии низкого разрешения. Этот метод позволяет однозначно обнаружить наличие и определить содержание каждого аналита в смеси.

Алгоритм идентификации фитостероидов методом ВЭЖХ-МС/МС

На основе изученных тандемных масс-спектров фитостероидов (стандартов – 20-гидроксиэкдизона и туркестерона, рис. 1 и 2) нами были установлены закономерности [5] их фрагментации, которые могут быть использованы в качестве характеристичных при отнесении неизвестного соединения к классу фитостероидов:

1. При фрагментации молекулы фитостероидов происходит разрыв связи между атомами C(17) и C(18) (рис. 3).

2. Образуются ионы-продукты фрагмента со стероидным скелетом и бокового радикала при атоме C(17).

3. Происходит отрыв молекулы H₂O от стероидного фрагмента.

4. Масс-спектр первого порядка содержит интенсивный пик [M+HCOOH–H]⁻ – аддукта молекулярного иона с муравьиной кислотой, являющейся компонентом подвижной фазы.

В итоге для идентификации этого класса аналитов выработали следующий алгоритм:

1) регистрация масс-спектра второго порядка неизвестного соединения;

2) поиск в спектре *m/z* характеристичных ионов-продуктов класса фитостероидов (табл. 1);

3) сравнение экспериментально полученных точных значений *m/z* и брутто-формул с аналогичными параметрами стандартных образцов фитостероидов (могут быть получены масс-спектры доступных стандартов или взяты уже полученные в данной работе МС/МС-спектры 20-гидроксиэкдизона и туркестерона);

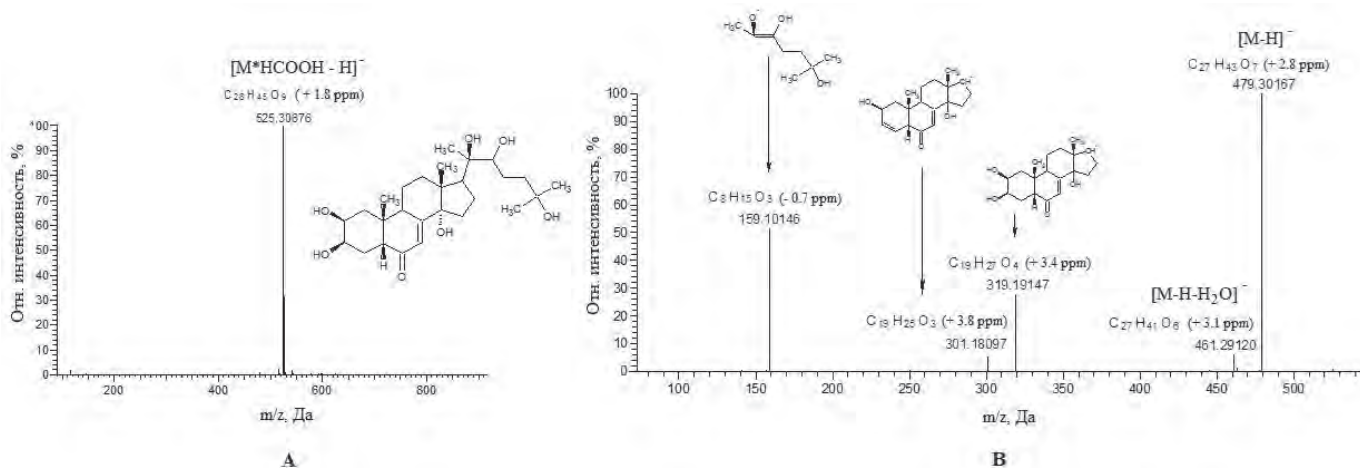


Рис. 1. Масс-спектры 20-гидроксиэkdизона: в режиме сканирования отрицательных ионов (А) и тандемный второго порядка (В) (режим сканирования отрицательных ионов, ион-предшественник m/z 525.31, энергия в соударительной ячейке 30 эВ).

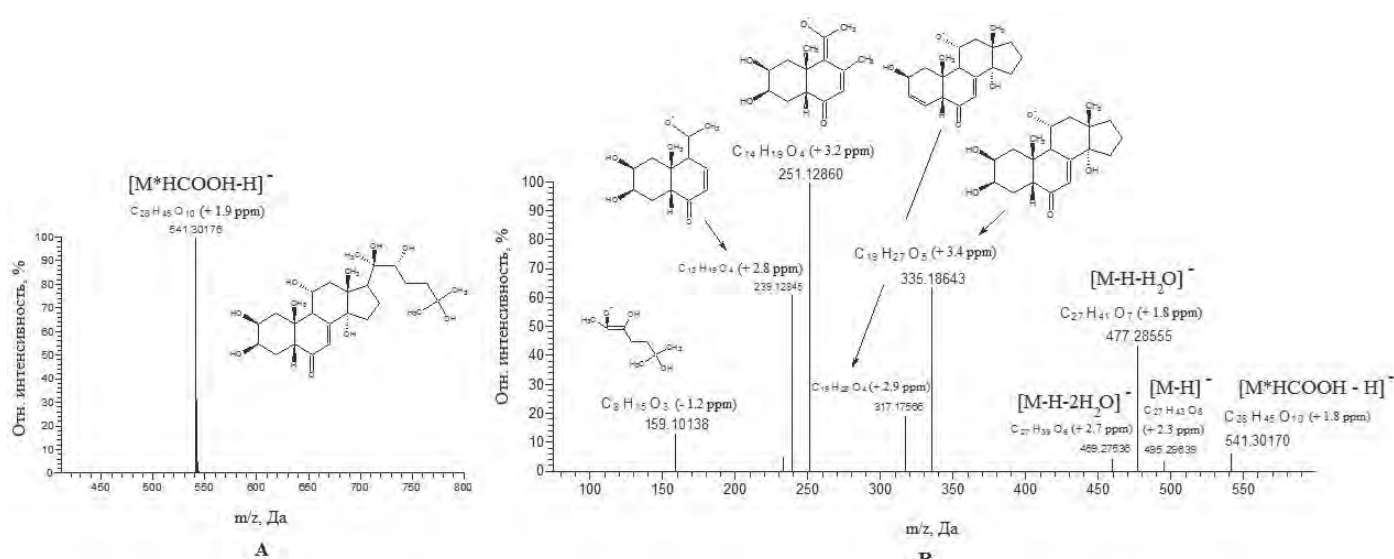


Рис. 2. Масс-спектры туркестерона: в режиме сканирования отрицательных ионов (А) и тандемный второго порядка (В) (режим сканирования отрицательных ионов, ион-предшественник m/z 541.30, энергия в соударительной ячейке 30 эВ).

4) поиск и соотнесение m/z $[M+HCOOH-H]^-$, $[M-H]^-$, $[M-H_2O-H]^-$ и т.д., а также бокового радикала при атоме С(17) для неизвестного соединения и стандартов;

5) выводы о строении исследуемого аналита, а в случае подтверждения его принадлежности к классу фитостероидов – поиск возможной структуры по литературным данным.

Анализ препаратов на основе левзеи сафлоровидной

При хроматографическом анализе препаратов на основе левзеи в их составе был найден 20-гидроксиэkdизон, а также еще одно соединение, предположительно являющееся фитостероидом (рис. 4). Этот аналит совпадал по рассчитанным



Рис. 3. Закономерности фрагментации фитостероидов на примере молекулы 20-гидроксиэkdизона.

Таблица 1. Экспериментально полученные значения точных масс ионов $[M-H]^-$ и $[M+HCOOH-H]^-$

Аналит	$[M-H]^-$, Да	$[M+HCOOH-H]^-$, Да	Значения m/z характеристических ионов, Да
20-Гидроксиэkdизон	479.30167	525.30676	301 и 319
Туркестерон	495.29639	541.30176	317 и 335
Аюгастерон С	479.30167	525.30676	317 и 335

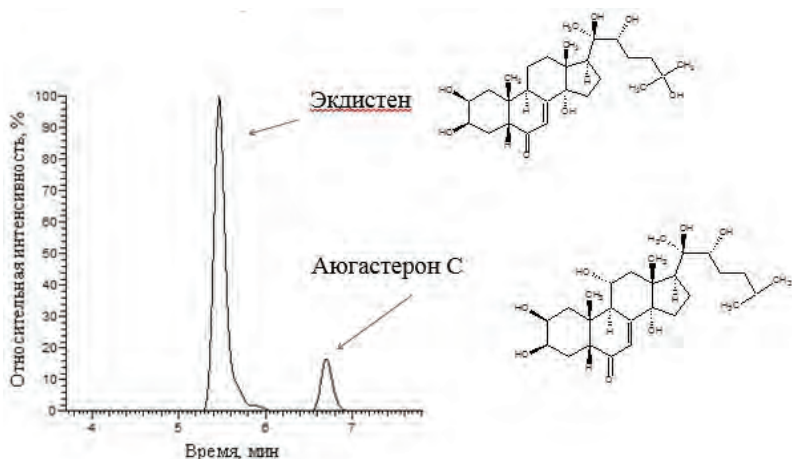


Рис. 4. Хроматограмма экстракта левзеи (20-гидроксиэкдизон – tR = 5.5 мин, аюгастерон С – tR = 6.7 мин) со структурами найденных в нем фитостероидов.

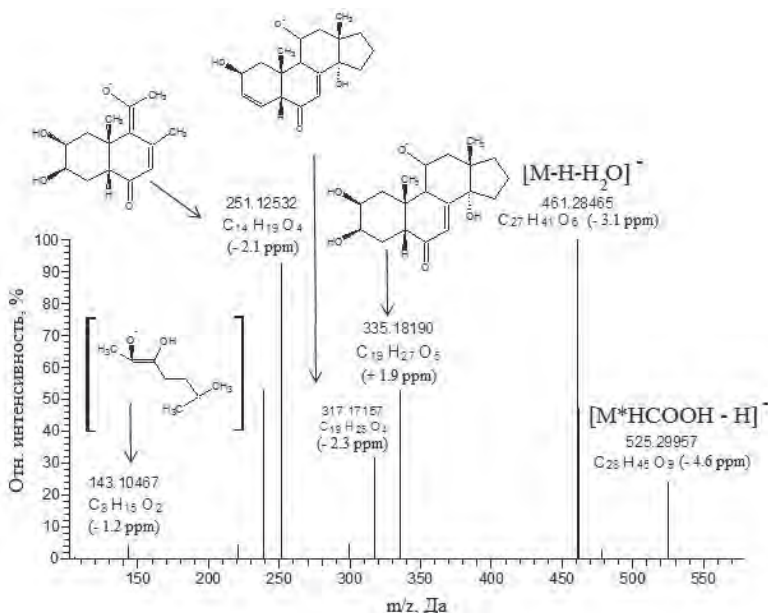


Рис. 5. Масс-спектр второго порядка изомера 20-гидроксиэкдизона (аюгастерона С) (режим сканирования отрицательных ионов, ион-предшественник m/z 525.31, энергия в соударительной ячейке 30 эВ).

Таблица 2. Содержание фитостероидов в препаратах на основе левзеи (n = 3, P = 0.95)

Препарат, единицы концентрации	Фитостероид	
	20-Гидроксиэкдизон	Аюгастерон С
Таблетки «Левзея», мкг/табл.	40 ± 3	5.0 ± 0.4
Экстракт левзеи, мкг/мл	365 ± 15	42 ± 2

брутто-формуле и точной молекулярной массе с 20-гидроксиэкдизоном, т.е. был его изомером. Для определения принадлежности этого аналита к классу фитостероидов действовали по описанному выше алгоритму. В режиме регистрации отрицательных ионов получили масс-спектр второго порядка изучаемого аналита (рис. 5). Присутствующие в нем пики ионов-продуктов с m/z 317 и 335 по экспериментально полученным точным массам и рассчитанным брутто-формулам соответствуют фрагментам стероидного скелета в MS/MS-спектре одного из исследованных стандартов – туркестерона (рис. 3B). Таким образом, исследуемый аналит также принадлежит к классу фитостероидов. Как отмечено ранее, m/z этих ионов-продуктов туркестерона отличаются от соответствующих m/z в спектре 20-гидроксиэкдизона за счет наличия в стероидном скелете туркестерона дополнительной OH-группы в положении C(11). При совпадении точных масс и брутто-формул рассматриваемого аналита и 20-гидроксиэкдизона это означает, что в стероидном скелете изучаемого соединения на одну OH-группу больше, а в радикале при атоме C(17) – на одну OH-группу меньше. По литературным данным [6] среди фитостероидов, присутствующих в левзее сафлоровидной, соединение с такой структурой – это аюгастерон С (рис. 4).

Содержание фитостероидов (табл. 2) устанавливали по градуировочному графику для определения 20-гидроксиэкдизона.

Таким образом, в ходе анализа фармпрепаратов на основе левзеи сафлоровидной с использованием разработанного алгоритма [5] удалось найти два фитостероида и определить их содержание.

Такой подход позволяет экспрессно идентифицировать соединения класса фитостероидов в образцах сложного состава без их препаративного выделения и установления точ-

ной структуры, в частности методом ЯМР (^1H , ^{13}C). Предложенный алгоритм не заменяет метод ЯМР, так как не позволяет однозначно определить структуру, однако может быть использован для предварительного обнаружения фитостероидов в образце и определения содержания каждого в отдельности.

В литературе МС/МС-спектры фитостероидов встречаются редко [7] и получают их только на приборах низкого разрешения; в единичных работах [8] описаны их масс-спектры высокого разрешения первого порядка. Однако при работе с такими сложными объектами, как растительные экстракты, содержащими большое число различных классов соединений, для идентификации целевых аналитов (при отсутствии подтверждения методом ЯМР) необходимо использовать масс-спектрометрию высокого разрешения. В отличие от описанных в литературе методик идентификации в нашем случае нет необходимости выделять каждый фитостероид в отдельности для подтверждения его структуры, ни иметь в наличии весь

спектр стандартов фитостероидов, достаточно всего лишь 1–2 стандартных образцов. Отметим, что имеется лишь ограниченное количество коммерчески доступных стандартных образцов фитостероидов, а при высокой стоимости каждая ампула содержит лишь 0.5–1 мг вещества.

При наличии в литературе необходимых дополнительных сведений о структурах изученных фитостероидов можно на основании данных ВЭЖХ-МС/МС с высокой достоверностью определить строение аналита. Кроме того, систематическое изучение механизма фрагментации ионов-предшественников до характеристичных ионов-продуктов соединений этого класса позволит перенести данную методику на МС-приборы низкого разрешения как наиболее доступные и часто встречающиеся в аналитических лабораториях. Разработанный алгоритм идентификации фитостероидов может быть эффективно использован в рутинном контроле качества растительного сырья, являющегося основой для фармпрепаратов и биологических добавок, так как позволяет определять количество, суммарное содержание и соотношение концентраций биологически активных соединений.

Работа выполнена при участии К.Ю. Васильева, А.А. Ихалайнена, А.М. Антохина, В.Ф. Таранченко, А.В. Удинцева, Д.А. Митрофанова, А.В. Аксенова (Федеральное государственное унитарное предприятие «Научный центр «Сигнал»).

Литература

1. R. Lafont, C. Blais, J. Harmatha, I.D. Wilson. В *Encyclopedia of Separation Science*, Eds I.D. Wilson, E.R. Adlard, C.F. Poole, M. Cooke, London, Academic Press, 2000, pp. 2631–2643. DOI: 10.1016/B0-12-226770-2/06431-0.
2. T. Large, R. Lafont, E.D. Morgan, I.D. Wilson. *Anal. Proc.*, 1992, 29(9), 386. DOI: 10.1039/AP922900386.
3. M. Bathori, Z. Pongracz. *Curr. Med. Chem.*, 2005, 12(2), 153. DOI: 10.2174/0929867053363450.
4. Отраслевой стандарт «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» №91500.05.001-00, Москва, 2000 (http://koapp.narod.ru/pay/ty/ost/ost_91500_05_001_00.htm).
5. Д.А. Севко, М.К. Беклемишев, И.А. Родин, А.А. Ихалайнен, А.М. Антохин, В.Ф. Таранченко, В.М. Гончаров, А.В. Аксенов, Д.А. Митрофанов. *Масс-спектрометрия*, 2015, 12(3), 177.
6. L. Kokoska, D. Janovska. *Phytochemistry*, 2009, 70(7), 842. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.04.008.
7. G. Wainwright, M.C. Prescott, L.O. Lomas, S.G. Webster, H.H. Rees. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1997, 35(1-2), 21. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6327(1997)35:1/2<21::AID-ARCH3>3.0.CO;2-#.
8. B. Destrez, G. Pinel, E. Bichon, F. Monteau, R. Lafont, B. Le Bizec. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, 22(24), 4073. DOI: 10.1002/rcm.3816.

Биологически активные экстракты верхового торфа Европейского Севера России *

С.Б. Селянина, М.В. Труфанова, С.А. Забелина, М.В. Богданов, К.Г. Боголицын, Т.В. Соколова, В.П. Стригуцкий, Т.И. Пономарева, О.Н. Ярыгина, А.С. Орлов

Торф – возобновляемый источник разнообразных органических соединений растительного происхождения. Важными компонентами торфа являются экстрактивные вещества – низкомолекулярные органические соединения, извлекаемые водой или органическими растворителями. Частично они наследуются от растений-торфообразователей, в которых выполняют различные жизненные функции, а отчасти образуются за счет деструкции и конденсации при биodeградации.

Анализ экстрактов методами химического анализа (газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией и газожидкостная хроматография) выявил, что более 70% компонентов исследованных торфяных битумов – сложные эфиры предельных жирных кислот C₁₀-C₂₆ (пальмитиновой, бегеновой, стеариновой, лигноцериновой, арахидиновой, миристиновой) и высших одно- и двухатомных спиртов C₁₄-C₂₉ (как алифатических, так и полициклических).

Исследование микробиологической активности экстрактов по отношению к условно-патогенной микрофлоре показало, что наибольшую антимикробную активность проявляют препараты, выделенные с помощью липофильных экстрагентов. Омыление экстрактов приводит к потере антимикробной активности.

Ключевые слова: битумы торфа, торфяной воск, гуминовые соединения, антимикробная активность, антиоксидантная активность.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-05-90011-Бел_а) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проекты X 12P-147, X 143-233).

Торф – один из основных ресурсов растительного происхождения на Европейском Севере России, прежде всего, верхового типа, доля которого достигает 80% на этих территориях [1].

Органическая часть торфа частично наследуется от растений-торфообразователей, в которых она

выполняет разнообразные жизненные функции и отчасти образуется за счет деструкции и конденсации растительных веществ при биodeградации [2]. Известно, что в Белоруссии, на Украине, в Юго-Западной Сибири и других регионах торф добывается как для нужд энергетики, так и для получения органических соединений различных классов. Вместе с тем ресурсный потенциал торфа северных терри-



СЕЛЯНИНА
Светлана Борисовна
Институт экологических проблем Севера УрО РАН



ТРУФАНОВА
Марина Витальевна
Институт экологических проблем Севера УрО РАН



ЗАБЕЛИНА
Светлана Александровна
Институт экологических проблем Севера УрО РАН



БОГДАНОВ
Михаил Владиславович
Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова



БОГОЛИЦЫН
Константин Григорьевич
профессор, Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова



СОКОЛОВА
Тамара Владимировна
Институт природопользования НАН Беларуси



СТРИГУЦКИЙ
Виктор Петрович
Институт природопользования НАН Беларуси



ПОНОМАРЕВА
Тамара Игоревна
Институт экологических проблем Севера УрО РАН



ЯРЫГИНА
Ольга Николаевна
Институт экологических проблем Севера УрО РАН



ОРЛОВ
Александр Сергеевич
Институт экологических проблем Севера УрО РАН

торий России оценен только с точки зрения энергетического потребления [3].

Перспективным, прежде всего, представляется использование гуминовых соединений, извлекаемых щелочными растворами и составляющих около половины органического вещества торфа. Сферы, где находят применение эти высокомолекулярные соединения, чрезвычайно широки. На их основе получают не только удобрения и структурообразователи почв, но и кормовые добавки, сорбенты, средства гигиены, лечебные грязи и многое другое [4]. Не меньший интерес представляет экстрактивная составляющая торфа, хоть и содержится в значительно меньшем количестве. Вместе с тем состав ее чрезвычайно разнообразен [5, 6]. Если признать, что основная часть экстрактивных веществ торфа, называемых также битумами по аналогии с другими ископаемыми, наследуется от исходной растительности, то можно ожидать от этой фракции высокой биологической активности в соответствии с функциями, выполняемыми этими соединениями в живых организмах. Следует отметить, что зачастую вклад битумной составляющей не учитывается при характеристике биологической активности продуктов на основе торфа.

При этом разнообразие и лабильность органических компонентов торфа затрудняет обнаружение и идентификацию индивидуальных соединений. Поэтому в химии торфа зачастую ограничиваются следующей классификацией:

- битумы;
- растворимые в воде вещества, иногда с градацией на растворимые в холодной (углеводы) и в горячей воде (полифенолы);
- гуминовые вещества (разделяемые в некоторых случаях на фульвовые (кислоторастворимые) и гуминовые (кислотонерастворимые) кислоты, из последних иногда выделяют спирторастворимую фракцию – гимато-мелановые кислоты);
- клетчатка;
- лигнин.

Несмотря на логичность и кажущуюся простоту, вопрос выделения отдельных фракций в разных исследованиях решается неоднозначно [7–12].

В отношении выделения гуминовых веществ большинство исследователей сходятся во мнении и используют 0.1 М раствор гидроксида натрия, чего нельзя сказать о стадии обезбитуминирования. Некоторые исследователи используют этанол, смесь этанол–гексан, гексан, бензин или хлороформ, тогда как другие отказываются от этой стадии и выделяют гуминовые соединения вместе с частью битумов, растворимой в щелочных средах. Это в

свою очередь привносит неопределенность в описание свойств, в том числе и биологической активности, компонентов торфа. Поэтому в данном исследовании проведен сравнительный анализ продуктов, выделяемых различными экстрагентами из верхового (как наиболее представительного) торфа Европейского Севера России.

Для исследования были отобраны репрезентативные образцы верхового торфа Европейского Севера России, в качестве образцов сравнения использовали торф месторождений Белоруссии со сходными физико-химическими показателями. Групповой состав торфа исследовали согласно методике, подробно рассмотренной в работе [13]. Характеристики торфа представлены в *таблице 1*.

Битумную часть торфа извлекали методом настаивания экстрагентами, применяемыми в химии растительных соединений и технологиях переработки торфа.

Компонентный состав экстрактов характеризовали методами газожидкостной хроматографии (ГЖХ) и газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ/МС). Для оценки антиоксидантных свойств использовали методику, описанную в работе [14], для оценки микробиологической активности – в статье [15].

Диаграмма, представленная на *рисунке 1*, наглядно демонстрирует разницу в извлекающей способности различных экстрагентов. Наибольшая она у хлороформа и смеси этанол–гексан, а наименьшая – у гексана.

Высокий выход извлекаемой фракции при использовании первых двух растворителей связан, по-видимому, с присутствием этанола (в хлороформ он добавляется для стабилизации), что приводит к снижению селективности. Это подтверждается наличием инкрустов коричневого цвета при переводе экстрактов в масляную форму. На снимке, представленном на *рисунке 2*, отчетливо

видно также изменение окраски растворов в зависимости от экстрагента и наличие рыхлого беловатого осадка воскоподобных веществ, образующегося при охлаждении раствора ниже 25 °С. Интересно, что обычно при экстракции торфа, сформировавшегося в других (более теплых) климатических условиях, торфяной воск имеет темно-коричневую окраску.

Полученные экстракты после удаления растворителя проверяли на микробиологическую активность в виде масляного раствора и на твердом носителе, для чего диски диаметром 5 мм из фильтровальной бумаги пропитывали экстрактом и высушивали на воздухе. К масляным растворам исследуемые штаммы микроорганизмов чувствительности не проявили. Результаты определения микробиологической активности твердых экстрактов представлены в таблице 2. *Escherichia coli* и *Candida albicans* проявили наибольшую чувствительность к бензиновому экстракту торфа Европейского Севера России, а *Staphylococcus aureus* – к фракции, выделенной этоксиэтаном. Микробиологически активны в отношении всех исследованных штаммов экстрактивные вещества, выделенные при экстракции бензином и гексаном, причем именно они наименее эффективны для экстракции (рис. 1). По-видимому, бензин и гексан наиболее селективны по отношению к тем группам компонентов торфа, которые обеспечивают микробиологическую активность. Интересно, что бензиновый экстракт торфа, сформированного в условиях умеренно-континентального климата (Белоруссия), проявляет значительно меньшую микробиологическую активность и только в отношении *Candida albicans*.

Изучение методами ГЖХ и ГХ/МС выявило значительные отличия в компонентном составе битумов торфа различных климатических зон. В экстрактивной части торфа северного региона доля связанных

Таблица 1. Характеристика образцов верхового торфа Европейского Севера России (1) и Белоруссии (2)

Показатель	Образец торфа	
	1	2
Тип	Магеланикум	Магеланикум
Глубина отбора, см	20–70	20–70
Степень разложения, %	5–10	20–25
Зольность, %	1.0	12.8
Битумы*	5.4	3.5
Гуминовые вещества*	11.0	17.6**
Фульвовые кислоты / гуминовые кислоты*	3.5	2.8
Водорастворимые вещества*	3.5	-
Негидролизруемый остаток*	18.1	25.8

* - содержание от органических веществ, %;

** - в том числе водорастворимые вещества.

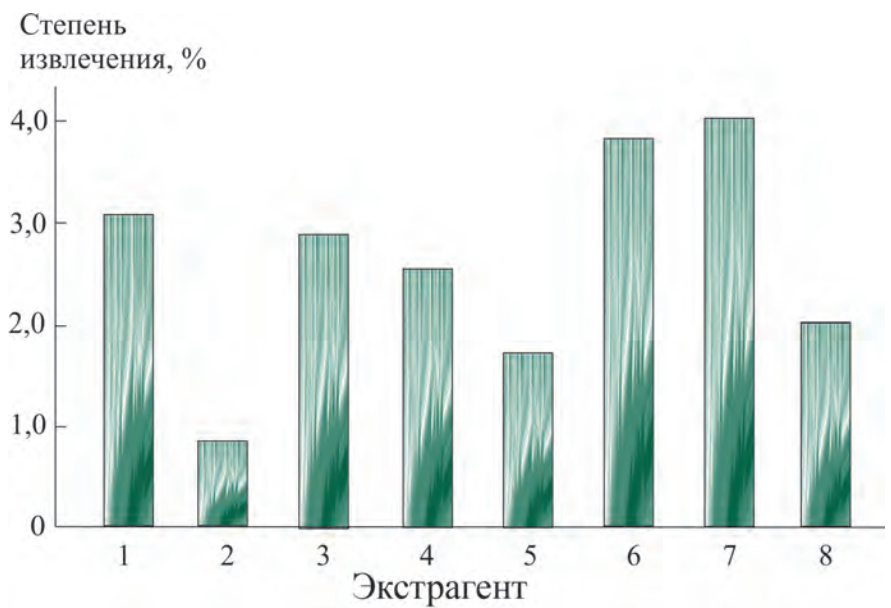


Рис. 1. Диаграмма зависимости степени извлечения битумов от экстрагента: 1 – этанол; 2 – гексан; 3 – этоксиэтан; 4 – этилацетат; 5 – тетрахлоформ; 6 – этанол-гексан; 7 – хлороформ; 8 – бензин.

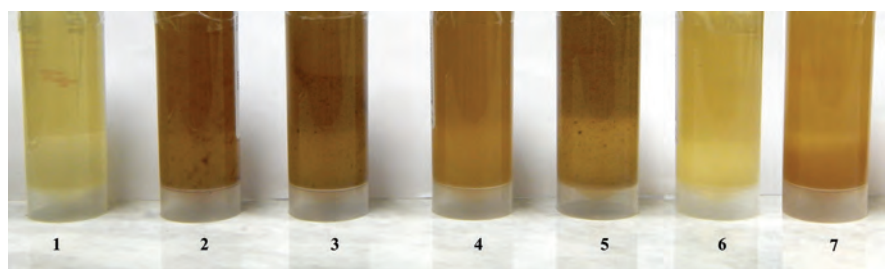


Рис. 2. Внешний вид экстрактов в масляной форме при 20 °С в зависимости от использованного экстрагента: 1 – гексан; 2 – смесь этанол-гексан; 3 – этанол; 4 – этилацетат; 5 – хлороформ; 6 – тетрахлоформ; 7 – этоксиэтан.

Таблица 2. Характеристика образцов верхового торфа Европейского Севера России (1) и Белоруссии (2)

Образец торфа	Экстрагент	Чувствительность*		
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	Этанол	+	+	-
1	Гексан	+	+	+
1	Этоксизтан	-	-	++
1	Этилацетат	+	+	-
1	Тетрахлорметилен	-	-	-
1	Этанол-гексан (1:1)	+	+	-
1	Хлороформ	-	+	-
1	Бензин	++	++	+
2	Бензин	-	+	-

* «+» - средняя, «++» - высокая чувствительность.

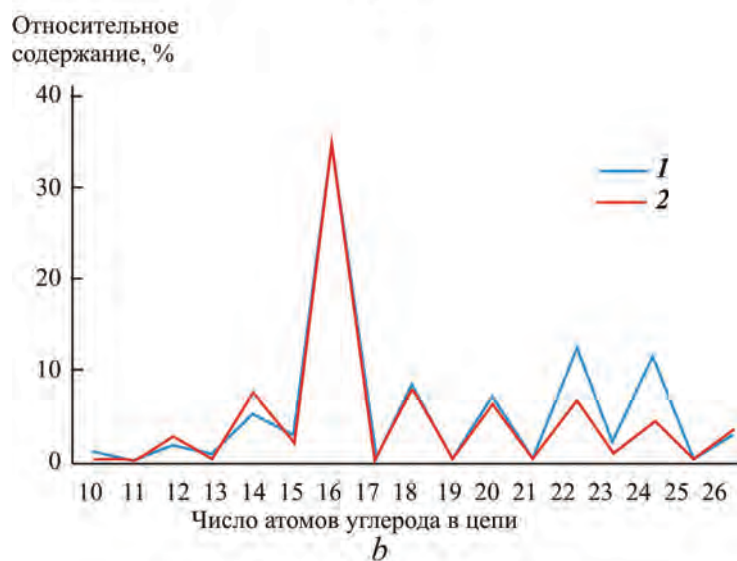
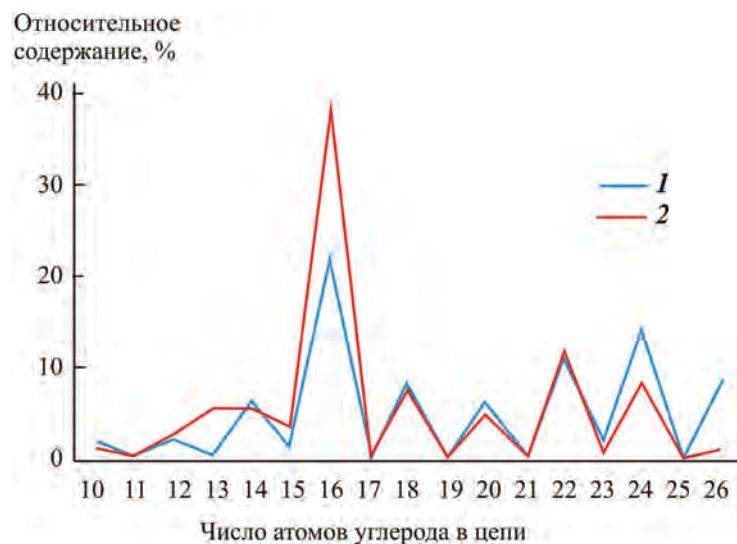


Рис. 3. Относительное содержание свободных (а) и связанных (б) жирных кислот с различным числом атомов углерода в цепи во фракциях, которые были выделены из экстрактов торфа различной зональности: кривая 1 - Архангельская область; кривая 2 - Белоруссия.

кислот значительно выше и достигает 70–78% в зависимости от экстрагента. В составе кислот исследованных образцов торфа обнаружены только алифатические с преобладанием предельных одноосновных (75–82%). Как видно из графиков на рисунке 3, состав как связанных, так и свободных жирных кислот битумов изученных образцов торфа схож. Это алифатические кислоты C_{10} - C_{26} , преимущественно с четным числом атомов углерода (в порядке убывания массовой доли): пальмитиновая > бегеновая > стеариновая > лигноцерилловая > арахидиновая > миристиновая.

Более заметно отличие в неомыляемой фракции. В экстрактах торфа Белоруссии выделено 49 веществ, а в экстрактах торфа Европейского Севера России – 36 соединений этой группы, причем последние (табл. 3) значительно обогащены алканами, алифатическими спиртами, эфирами и окислосоединениями, но обеднены терпеноидами, альдегидами и кетонами. Это, по-видимому, объясняется меньшей биодegradацией растительных соединений при торфонакоплении в условиях холодного климата.

Анализ микробиологической активности на примере *Staphylococcus aureus* продуктов фракционирования битумов торфа (табл. 4) показал, что антимикробное действие оказывает только суммарный экстракт как в твердом виде, так и в спиртовом растворе (*S. Aureus* к этанолу резистентен). В процессе омыления битумов эта активность теряется. Представляется закономерным, что гуминовые соединения, очищенные от битумов, не оказывают угнетающего действия на микроорганизмы, а служат для них питательной средой.

Вместе с тем изучение антиоксидантного воздействия водорастворимых извлечений торфа (табл. 5) демонстрирует 5–8-кратный рост этого показателя биологической активности в результате очистки препаратов

от примесей, в том числе от битумов. Это, в совокупности с обсужденными выше данными, свидетельствует в пользу выдвинутого ранее тезиса о необходимости учитывать вклад битумной составляющей при характеристике биологической активности продуктов на основе торфа.

Таким образом, исследование микробиологической активности экстрактов торфа по отношению к условно-патогенной микрофлоре показало, что наибольшую антимикробную активность проявляют препараты, выделенные с помощью липофильных экстрагентов из верхового торфа Европейского Севера России. Омыление экстрактов приводит к потере антимикробной активности.

Антиоксидантная активность водорастворимых экстрактов верхового торфа Европейского Севера России повышается при удалении битумов.

При характеристике биологической активности продуктов на основе торфа необходимо учитывать вклад битумной составляющей.

Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием «Арктика» (Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова).

Таблица 3. Содержание (%) отдельных групп соединений в неомыляемой части битумов верхового торфа различных климатических зон: Архангельской области (1) и Белоруссии (2)

Группы химических веществ	Образец торфа	
	1	2
Алканы	33.5	7.3
Алкены	Не определены	0.5
Алифатические спирты	23.5	16.9
Терпеноиды (в том числе терпеновые спирты)	24.2 (24.2)	40.2 (31.7)
Альдегиды и кетоны	1.1	6.6
Эфирные соединения	4.0	0.9
Производные оксикислот	10.3	5.7

Таблица 4. Микробиологическая активность различных фракций экстрактов верхового торфа по отношению к *Staphylococcus aureus*

Фракция	Чувствительность*	
	Твердый образец	Спиртовой раствор
Суммарный экстракт	++	+
Смолы (алифатические кислоты)	-	-
Неомыляемые вещества	-	-
Гуминовые соединения (очищенные)	-	-

* «+» - незначительная, «++» - высокая чувствительность.

Таблица 5. Антиоксидантная активность водорастворимых экстрактов верхового торфа Европейского Севера России

Описание образца	Содержание антиоксидантов, мг/г
Гуминовые вещества неочищенные	0.60
Гуминовые кислоты очищенные, промытые	5.11
Фульвовые кислоты очищенные, декатионированные	3.21

Литература

1. **И.О. Алябина, В.А. Андроханов, В.В. Вершинин, С.Н. Волков, Н.Ф. Ганжара, Г.В. Добровольский, А.В. Иванов, А.Л. Иванов, Е.А. Иванова, Л.И. Ильин, М.Л. Карпачевский, А.Н. Каишанов, В.И. Киришин, В.М. Колесникова, Л.Г. Колесникова, П.Ф. Лойко, И.Е. Манылов, М.С. Маречек, А.Ф. Махинова, Э.Н. Молчанов, А.Н. Прохоров, Э.Т. Пягай, В.А. Рожков, Н.Н. Рыбальский, И.Ю. Савин, Н.С. Самойлова, П.М. Сапожников, В.В. Сизов, В.С. Столбовой, П.А. Суханов, И.С. Урусевская, А.Х. Чочаев, Б.В. Шеремет, С.А. Шоба, А.С. Яковлев**
Единый государственный реестр почвенных ресурсов России. Версия 1.0: Коллективная монография, Москва, Почвенный институт им. В.В. Докучаева Россельхозакадемии, 2014, 768 с.
2. **В.Е. Раковский, Л.В. Пигулевская**
Химия и генезис торфа, Москва, Недра, 1978, 231 с.
3. **О.М. Соколов, В.Р. Ивко**
Торфяные ресурсы Архангельской области и их использование, Архангельск, Редакционно-издательский отдел Архангельского государственного технического университета, 2000, 37 с.
4. **В.И. Косов, А.С. Беляков, О.В. Белозеров, Д.Ю. Гогин**
Торф: ресурсы, технологии, геоэкология, Санкт-Петербург, Наука, 2007, 451 с.
5. **О.Н. Никуличева, В.П. Фадеева, В.Н. Пиоттух-Пелецкий, Л.М. Покровский, Т.Ф. Богданова, Н.В. Юдина**
ЖПХ, 2005, 78(8), 1388.
6. **П.И. Белькевич, Н.Г. Голованов, Е.Ф. Долодovich**
Битумы торфа и бурого угля, Минск, Наука и техника, 1989, 127 с.
7. **И.И. Лиштваи, Н.Т. Король**
Основные свойства торфа и методы их определения, Минск, 1975, 320 с.
8. **В.В. Пономарева, Т.А. Плотникова**
Гумус и почвообразование (методы и результаты изучения), Ленинград, Наука, 1980, 222 с.
9. **Н.А. Шинкеева, С. Г. Маслов, В.С. Архипов**
Вестник Томского государственного педагогического университета, 2009, №3, 116.
10. **Н.Н. Бамбалов, Т.Я. Бельнская**
В Мелиорация и проблемы органического вещества, Минск, БелНИИМВХ, 1994, с. 92–102.
11. **R.S. Swift**
В *Methods of soil analysis. Part 3, Chemical methods*, Ed. D.L. Sparks, Madison, Wisconsin, Soil Science Society of America: American Society of Agronomy, 1996, pp. 1011–1069.
DOI: 10.2136/sssabookser5.3.c35.
12. **R. Klöcking, Y. Felber, M. Guhr, G. Meyer, R. Schubert, J.I. Schoenherr**
Mires and Peat, 2013, 11, Article 03 (http://pixelrauschen.de/wbmp/media/map11/map_11_03.pdf).
13. **О.Н. Ярыгина, Т.И. Пономарева, М.В. Труфанова, С.Б. Селянина, Л.Н. Парфенова, С.С. Хвиозов, А.Э. Томсон, Т.В. Соколова, В.П. Стригуцкий, В.С. Пехтерева**
Природопользование, 2015, 28, 211.
14. **И.В. Федько, М.В. Гостищева, Р.Р. Исмазова**
Химия растительного сырья, 2008, №1, 127.
15. **Л.И. Иншиева, М.С. Гостищева, Е.В. Порохина, М.А. Сергеева, И.В. Федько**
Большой практикум: Физикохимия, биология и комплексная переработка торфа: Учеб. пособие, Томск, Издательство Томского государственного педагогического университета, 2007, 149 с.

English

Biologically Active Extractives of High-Moor Peat of Northern European Russia*

Svtelana B. Selyanina –
Institute of Environmental Problems of the North,
Ural Branch of Russian Academy of Sciences
23, Severnoy Dviny Emb., Arkhangelsk, 163000, Russia
e-mail: smssb@yandex.ru

Marina V. Trufanova –
Institute of Environmental Problems
of the North, Ural Branch of Russian
Academy of Sciences
23, Severnoy Dviny Emb.,
Arkhangelsk, 163000, Russia
e-mail: mtrufanova@yandex.ru

Svtelana A. Zabelina –
Institute of Environmental Problems
of the North, Ural Branch of Russian
Academy of Sciences
23, Severnoy Dviny Emb.,
Arkhangelsk, 163000, Russia
e-mail: svetzabelina@rambler.ru

Mikhail V. Bogdanov –
Northern (Arctic)
Federal University (NARFU)
17, Severnoy Dviny Emb.,
Arkhangelsk, 163002, Russia
e-mail: smssb@yandex.ru

Konstantin G. Bogolitsyn –
Professor,
Northern (Arctic) Federal University (NARFU)
17, Severnoy Dviny Emb.,
Arkhangelsk, 163002, Russia
e-mail: biopolimer@iepn.ru

Tamara V. Sokolova –
Institute for Nature Management,
National Academy of Sciences of Belarus
10, F. Skoriny Str., Minsk,
220114, Republic of Belarus
e-mail: nature@ecology.basnet.by

Victor P. Strigutskiy –
Institute for Nature Management,
National Academy of Sciences of Belarus
10, F. Skoriny Str., Minsk,
220114, Republic of Belarus
e-mail: nature@ecology.basnet.by

Tamara I. Ponomareva –
Institute of Environmental Problems
of the North, Ural Branch of Russian
Academy of Sciences
23, Severnoy Dviny Emb.,
Arkhangelsk, 163000, Russia
e-mail: ponomtamara@gmail.com

Olga N. Yarygina –
Institute of Environmental Problems
of the North, Ural Branch of Russian
Academy of Sciences
23, Severnoy Dviny Emb.,
Arkhangelsk, 163000, Russia
e-mail: Olga.yarigina@gmail.com

Alexander S. Orlov –
Institute of Environmental Problems
of the North, Ural Branch of Russian
Academy of Sciences
23, Severnoy Dviny Emb.,
Arkhangelsk, 163000, Russia
e-mail: alseror@yandex.ru

* The work was financially supported by RFBR (project N 14-05-90011-Bel_a) and Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (projects X 12P-147, X 143-233).

Abstract

Peat is a renewable source of multiple organic compounds of plant origin. Important peat components are extractive substances – low-molecular-weight organic compounds extracted with water or organic solvents. Partly these substances appear to be the remnants of peat-forming plants, and partly they are formed by the plant material degradation and condensation in biodegradation process.

The extracts investigation by chemical analyses (gas chromatography combined with mass spectrometry and gas-liquid chromatography methods) showed that more than 70% of peat bitumen components are esters which are resulted from the combination of saturated fatty acids C₁₀-C₂₆ (palmitic, behenic, stearic, lignoceric, arachidonic, myristic acids) with mono- and diatomic higher alcohols C₁₄-C₂₉ (both aliphatic and polycyclic).

The study of extracts microbiological activity against opportunistic microflora showed that the most microbiologically active preparations are those produced with lipophilic extractants. Extracts saponification is found to cause a loss of antimicrobial activity.

Keywords: peat bitumen, peat wax, humic substances, antimicrobial activity, antioxidant activity.

References

1. I. I.O. Alyabina, V.A. Androkhano, V.V. Vershinin, S.N. Volkov, N.F. Ganzhara, G.V. Dobrovolskiy, A.V. Ivanov, A.L. Ivanov, E.A. Ivanova, L.I. Ilin, M.L. Karpachevskiy, A.N. Kashtanov, V.I. Kirushin, V.M. Kolesnikova, L.G. Kolesnikova, P.F. Loiko, I.E. Manylov, M.S. Marechek, A.F. Makhinova, E.N. Molchanov, A.N. Prokhorov, E.T. Pyagay, V.A. Rozhkov, N.N. Rybalskiy, I.Yu. Savin, N.S. Samoylova, P.M. Sapozhnikov, V.V. Sizov, P.A. Sukhanov, V.S. Stolbovov, I.S. Urusevskaya, A.Kh. Chochaev, B.V. Sheremet, S.A. Shoba, A.S. Yakovlev *Unified State Soil Resources Registry of Russia. Edition 1.0 [Ediniy gosudarstvennyy reestr pochvennykh resursov Rossii. Versiya 1.0]*, Moscow, V.V. Dokuchaev Soil Science Institute, 2014, 768 pp. (in Russian).
2. V.E. Rakovskiy, L.B. Pigulevskaya *Chemistry And Genesis Of Peat [Khimiya and genesis torfa]*, Moscow, Nedra Publishing group, 1978, 231 pp. (in Russian).
3. O.M. Sokolov, V.R. Ivko *Arkhangelsk Region's Peat Resources And Their Use [Torfyanye resursy Arkhangelskoy oblasti i ikh ispolzovanie]*, Arkhangelsk, Arkhangelsk State Technical University, 2000, 37 pp. (in Russian).
4. V.I. Kosov, A.S. Belyakov, O.V. Belozherov, D.Yu. Gogin *Peat: Resources, Technology, Geo-Ecology [Torf: resursy, tekhnologiya, geokologiya]*, Saint-Petersburg, Nauka Publishing group, 2007, 451 pp. (in Russian).
5. O.N. Nikulicheva, V.P. Fadeeva, V.N. Piottukh-Peletskiy, L.M. Pokrovskiy, T.F. Bogdanova, N.V. Yudina *Russian J. Appl. Chem.*, 2005, 78(8), 1364 pp. DOI: 10.1007/s11167-005-0516-4.
6. P.I. Belkevich, N.G. Golovanov, E.F. Dolidovich *Peat And Brown Coal Bitumen [Bitumy torfa i burogo uglya]*, Minsk, Nauka i Tekhnika Publ., 1989, 127 pp. (in Russian).
7. I.I. Lishtvan, N.T. Korol *The Basic Properties Of Peat And Methods Of Their Research [Osnovnye svoystva torfa i metody ikh opredeleniya]*, Minsk, 1975, 320 pp. (in Russian).
8. V.V. Ponomareva, T.A. Plotnikova *Humus And Soil Formation (Methods And Results Of The Study) [Gumus i pochvoobrazovanie (metody i rezultaty izucheniya)]*, Leningrad, Nauka Publishing group, 1980, 222 pp. (in Russian).
9. N.A. Shinkeeva, S.G. Maslov, V.S. Arkhipov *Tomsk State Pedagogical University Bulletin (TSPU Bulletin)*, 2009, №3, 116. (in Russian).
10. N.N. Bambalov, T.Ya. Belenkaya *In Reclamation And The Problem Of Organic Matter [Melioratsiya i problemy organicheskogo veshchestva]*, Minsk, BelNIIMVKh, 1994, pp. 92–102. (in Russian).
11. R.S. Swift *In Methods of soil analysis. Part 3, Chemical methods*, Ed. D.L. Sparks, Madison, Wisconsin, Soil Science Society of America: American Society of Agronomy, 1996, pp. 1011–1069. DOI: 10.2136/sssabookser5.3.c35.
12. R. Klöcking, Y. Felber, M. Guhr, G. Meyer, R. Schubert, J.I. Schoenherr *Mires and Peat*, 2013, 11, Article 03 (http://pixelrauschen.de/wbmp/media/map11/map_11_03.pdf).
13. O.N. Yarygina, T.I. Ponomareva, M.V. Trufanova, S.B. Selyanina, L.N. Parfenova, S.S. Hviyuzov, A.E. Tomson, T.V. Sokolova, V.P. Strigutskiy, V.S. Pehtereva *Management of Nature [Prirodopolzovanie]*, 2015, 28, 211. (in Russian).
14. I.V. Fedko, M.V. Gostischeva, R.R. Ismatova *Chemistry Of Plant Material [Khimiya rastitel'nogo syr'ya]*, 2008, №16, 127. (in Russian).
15. L.I. Inisheva, M.S. Gostischeva, E.V. Porokhina, M.A. Sergeeva, I.V. Fedko *Large Tutorial: Physical Chemistry, Biology And Complex Processing Of Peat: Textbook [Bolshoy praktikum: Fizikokhimiya, biologiya i kompleksnaya pererabotka torfa: uchebnik]*, Tomsk, Tomsk State Pedagogical University Publ., 2007, 149 pp. (in Russian).

Композиция на основе пектиновых металлокомплексов, повышающая адаптационные возможности организма при физических нагрузках*

С.Т. Минзанова, В.Ф. Миронов, А.Б. Выштакалюк, Л.Г. Миронова,
В.И. Морозов, Н.Г. Назаров, А.З. Миндубаев, В.А. Милюков

Создано фармакологическое композиционное средство на основе пектинового полисахарида, содержащее три полиметаллических комплекса полигалактуроновой кислоты – Na,Mg-полигалактуронат, Na,Zn-полигалактуронат и Na,Cr-полигалактуронат. Исследованы его физико-химические свойства, структурные особенности и биологическая активность. В тесте «принудительное плавание» установлено, что композиция в дозе 50–100 мг/кг обладает выраженным свойством повышать адаптационные возможности организма в условиях интенсивных физических нагрузок и может рассматриваться как потенциальный адаптоген, стимулятор эритропоэза, нормализующий обмен веществ.

Ключевые слова: пектиновый биополимер, магний, цинк, хром, комплексообразование, адаптогены.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-03-00046).

Адаптогены – фармакологическая группа препаратов природного или искусственного происхождения, способных повышать неспецифическую сопротивляемость организма к широкому спектру вредных воздействий физической, химической и биологической природы [1]. Адаптация – это совокупность физиологических особенностей, обуславливающих уравнивание организма с факторами среды [2]. Влияние адаптогенов на системы организма определяется конкретной структурой и набором биологически активных химических веществ, входящих в их состав. Так, например, в растениях-адаптогенах действующим началом могут быть: гликозиды [3], флавоноиды [4], полисахариды [5, 6] и гликопептиды. Биохимический

механизм действия адаптогенов различен. Например, сапониновые гликозиды (гинсенозиды) женьшеня [7] или гликозиды – элеутерозиды элеутерококка [8] активируют фермент глюкозо-6-фосфотрансферазу (гексокиназа). Это помогает мышечным, нервным тканям и иммунным клеткам теплокровных получать больше энергии и продлевать стадию адаптации к стрессу.

Стресс – одна из реакций, составляющих общую систему неспецифических адаптационных реакций



МИНЗАНОВА
Салима Тахиятулловна
Институт органической
и физической химии
им. А.Е. Арбузова
Казанского научного центра РАН



МИРОНОВ
Владимир Федорович
член-корреспондент РАН, профессор,
Институт органической
и физической химии им. А.Е. Арбузова
Казанского научного центра РАН



ВЫШТАКАЛЮК
Александра Борисовна
Институт органической
и физической химии
им. А.Е. Арбузова
Казанского научного центра РАН



МИРОНОВА
Любовь Геннадьевна
Институт органической
и физической химии
им. А.Е. Арбузова
Казанского научного центра РАН



МОРОЗОВ
Владимир Иванович
Институт органической
и физической химии
им. А.Е. Арбузова
Казанского научного центра РАН



НАЗАРОВ
Наиль Госманович
Казанский (Приволжский)
федеральный университет



МИНДУБАЕВ
Антон Зуфарович
Институт органической
и физической химии
им. А.Е. Арбузова
Казанского научного центра РАН



МИЛЮКОВ
Василий Анатольевич
Институт органической
и физической химии
им. А.Е. Арбузова
Казанского научного центра РАН

организма, поскольку организм как более чувствительная система, чем составляющие его подсистемы, реагирует на разные по силе и качеству раздражители, вызывающие колебания гомеостаза в пределах, в первую очередь, нормальных показателей; это реакция на сильные раздражители. Адаптогены проявляют свое действие именно на фоне стресса и позволяют человеку, принимающему препараты-адаптогены, или лабораторным животным в эксперименте легче переносить последствия стресса. В современных условиях интенсификации труда, а также для спортсменов создание препаратов, обладающих адаптогенным воздействием на организм при повышенных физических нагрузках, является чрезвычайно актуальным.

Цель настоящей работы – разработка нового композиционного средства на основе растительного биополимера – пектинового полисахарида, содержащего макроэлементы Na, Mg и микроэлементы Zn, Cr, оказывающего адаптогенное воздействие на организм при повышенных физических нагрузках.

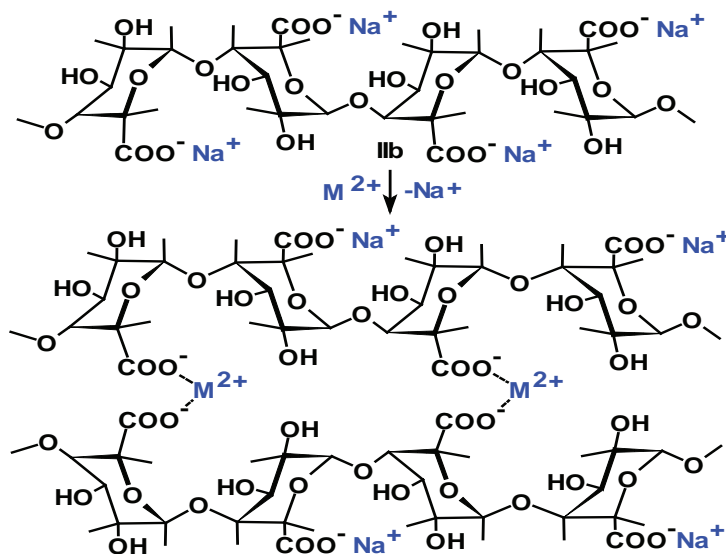
Выбор вышеперечисленных ионов металлов при разработке фармакологической композиции обусловлен тем, что они выполняют различные жизненно важные функции в живых организмах. Так, магний находится во всех тканях организма и необходим для нормального функционирования клеток. Участвует в большинстве реакций обмена веществ, в регуляции передачи нервных импульсов и в сокращении мышц, оказывает спазмолитическое и антиагрегантное действие. Оксид и соли магния традиционно применяются в медицине: в кардиологии, неврологии и гастроэнтерологии (аспаркам, сульфат магния, цитрат магния). Хром – один из биогенных элементов, входящий в состав тканей растений и животных. У животных хром участвует в обмене липидов, белков (входит в состав фермента трипсина), углеводов. Сни-

жение содержания хрома в пище и крови приводит к уменьшению скорости роста, увеличению холестерина в крови. Цинк принимает участие в синтезе и расщеплении белков, жиров и углеводов. Выполняет каталитическую, структурную и регуляторную функции в многочисленных ферментах, является мощным активатором Т-клеточного иммунитета. Суточная потребность человека в магнии – 350 мг, цинке – 15 мг, хrome – 50 мкг [9].

В рамках проведенных исследований нами создана фармакологическая композиция, состоящая из трех металлокомплексов пектинового полисахарида: Na,Mg-полигалактуроната, Na,Zn-полигалактуроната и Na,Cr-полигалактуроната, в определенном массовом соотношении в качестве средства для повышения адаптации организма белых крыс к большим физическим нагрузкам. Исходные металлокомплексы (Na,Mg-полигалактуронат, Na,Zn-полигалактуронат и Na,Cr-полигалактуронат) получали по методике, аналогичной описанной нами в патентах [10], где заявлены иные водорастворимые Na,Fe,Cu,Co-содержащие и Na,Ca,Fe-содержащие полигалактуронаты в качестве стимуляторов процесса кроветворения. Общая схема синтеза металлокомплексов пектиновых полисахаридов с магнием, цинком и хромом представлена на *схеме 1*.

Для обеспечения лучшей растворимости и, следовательно, биодоступности целевых продуктов на первом этапе обработкой цитрусового пектина щелочью в контролируемых значениях pH при титриметрическом переходе из слабокислой (pH 3.8) в слабощелочную область (pH 8.5–9.0) был получен пектат натрия со степенью солеобразования 100% (*схема 1*).

Схема 1



M = Mg²⁺, Zn²⁺, Cr³⁺

Контроль за состоянием карбоксильных групп проводили методом ИК-спектроскопии в области валентных колебаний группы COO^- ($1600 - 1800 \text{ см}^{-1}$). На завершение реакции указывало исчезновение полосы поглощения валентных колебаний $\nu (\text{C}=\text{O})$ карбоксильной группы при $1745-1750 \text{ см}^{-1}$ и появление полосы поглощения валентных колебаний $\nu (\text{C}=\text{O})$ при $1600-1650 \text{ см}^{-1}$, характерных для ионной формы. Метод ИК-спектроскопии является доступным информативным методом исследования качественных и количественных особенностей структуры полисахаридов [11, 12].

Полученный пектат натрия был исходным лигандом для синтеза металлокомплексов: целевые со-

Таблица 1. Характеристики исследуемых металлокомплексов пектиновых биополимеров

Образец	Внешний вид	рН 1%-ного раствора	Кинематическая вязкость при 20 °С, мм ² /с	Элементный анализ		
				С, %	Н, %	Н, %
Na-ПГ*	Порошок белого цвета	7.23	2.41	29.35–29.79	4.15–3.85	1.43–1.38
Na,Mg-ПГ	Порошок кремового цвета	7.69	2.48	30.07–30.10	3.11–3.14	0.34–0.32
Na,Zn-ПГ	Порошок кремового цвета	8.51	1.84	28.12–28.57	2.60–2.54	0.46–0.26
Na,Cr-ПГ	Порошок темно-бирюзового цвета	6.71	1.62	29.88–29.64	3.44–3.12	0.83–0.79

*ПГ – полигалактуронат.

Для оценки влияния новой композиции «тройчатка» на адаптационные возможности белых крыс в экстремальных условиях повышенных физических нагрузок использовали метод «принудительное плавание до полного отказа» [13].

Таблица 2. Металлокомплексы пектиновых биополимеров и их характеристики

Образец	Содержание металлов, мас. %	$[\alpha]_D^{20}$
Пектин цитрусовый	-	+255.7° (C = 1.0)
Na-ПГ	8.54	+212.8° (C = 1.0)
Na,Zn-ПГ	3.44 (Na); 3.13 (Zn)	+195.4° (C = 0.43)
Na,Mg-ПГ	4.60 (Na); 2.75 (Mg)	+215.1° (C = 1.0)
Na,Cr-ПГ	4.60 (Na); 2.87 (Cr)	+174.5° (C = 0.46)

Примечание. ПГ – полигалактуронат, С – концентрация водного раствора, %.

единения синтезировали по реакции лигандного обмена ионов Na^+ на катионы Mg^{2+} или Zn^{2+} или Cr^{3+} . Эксперименты планировали таким образом, чтобы создать разреженную трехмерную структуру комплексов с относительно невысокой степенью замещения ионов натрия на макро- и микроэлементы при сохранении большей части ионов натрия в солевой форме в составе полимерного комплекса для обеспечения его водорастворимых свойств (в пределах 1–40% двухвалентного металла относительно исходного содержания одновалентного натрия).

Определены органолептические, физико-химические свойства (кинематическая вязкость растворов) и элементный состав целевых комплексов (табл. 1). В таблице 2 приведены значения оптической плотности вышеперечисленных металлокомплексов пектиновых биополимеров и количественное содержание макро- и микроэлементов, определенное на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой iCAP 6300 DUO (фирма Thermo Scientific, США). Все соединения оптически активны – обладают оптическим вращением $[\alpha]_D^{20}$ в интервале $174.5-255.7^\circ$.

Схема проведения опыта была следующая: 1) плавание до отказа на первые сутки эксперимента и формирование групп животных по времени первого плавания методом попарного отбора; 2) плавание до отказа на седьмые сутки эксперимента; 3) плавание на 14-е сутки. Плавание осуществляли следующим образом: животных с грузом, прикрепленным к основанию хвоста и составляющим 7% от массы тела, помещали в цилиндрический сосуд (высота 80 см, диаметр 50 см) с водой при $T = 29 - 30 \text{ }^\circ\text{C}$. Композицию вводили ежедневно в течение всего периода наблюдения двум экспериментальным группам крыс в виде растворов на дистиллированной воде перорально через зонд в дозах 50 и 100 мг/кг. Контрольной группе

животных вводили дистиллированную воду. Для статистической надежности оценок определяемых показателей в каждой группе использовали не менее 12 крыс. Увеличение продолжительности плавания у животных опытных групп по сравнению с контролем на 14-е сутки рассматривали в качестве критерия эффективности новой композиции. Для оценки статистической значимости различий с контролем и с фоновыми значениями проводили статистическую обработку по непараметрическим тестам Манна–Уитни ($pU < 0.05$) и Вилкоксона ($pT < 0.05$).

Выбор этих критериев объясняется непараметрическим распределением полученных данных по длительности плавания. Статистическую обработку проводили в программе SPSSv13.0. Результаты исследования приведены в *таблице 3*. На седьмые сутки во всех группах наблюдали статистически незначимое увеличение времени плавания крыс по отношению к фоновому времени. На 14-е сутки происходил значительный рост продолжительности плавания по отношению к значениям на 7-е сутки в опытных группах, которым вводили композицию в дозах 50 и 100 мг/кг, а в контрольной группе наблюдали снижение длительности плавания до уровня исходных значений. То есть исследуемая композиция в дозе 50–100 мг/кг оказывает статистически значимое ($p < 0.05$) адаптогенное влияние, повышая выносливость животных в экстремальных условиях, что проявляется в увеличении средних значений продолжительности плавания более чем в три раза по сравнению с фоновыми значениями (*табл. 3*). Следует отметить, что при пероральном введении в дозах 5000–20000 мг/кг композиция не вызывает гибели животных. Это позволяет отнести композицию к классу малотоксичных соединений [14].

В условиях повышенных физических нагрузок у животных исследовали биохимические показатели крови

Таблица 3. Результаты теста «принудительное плавание» в условиях многократного (курсового) введения заявляемой композиции

Образец	Время плавания крыс, с		
	1-е сутки (фон)	7-е сутки	14-е сутки
Контроль (вода дист.)	377.4 ± 27.1	608.7 ± 398.8	351.7 ± 60.63
Животные, которым вводили композицию 50 мг/кг	378.2 ± 72.5	676.6 ± 228.5	1236.4 ± 563.1
Животные, которым вводили композицию 100 мг/кг	378.7 ± 57.6	410.7 ± 52.3	1195.3 ± 568.4

(уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), лактата, мочевины, глюкозы, белка, альбумина) на биохимическом анализаторе Daytona Randox и морфологические показатели крови (гемоглобин – гемоглобинцианидовым методом, число эритроцитов и число лейкоцитов – в камере Горяева).

В *таблице 4* приведены исследованные показатели крови, которые изменились под действием физических нагрузок у крыс (на примере контрольной группы) и по отношению к которым проявилось адаптогенное действие композиции: исходный уровень – до физических нагрузок и введения композиции и на 14-й день опыта. Биохимические показатели – АЛТ, АСТ, глюкоза, белок, альбумин – под влиянием физических нагрузок не изменились и отличий в динамике изменений с контрольной группой не выявлено. Число лейкоцитов увеличивалось после физических нагрузок как в контрольной, так и в опытной группе. В динамике наблюдения показателей крови в интактной группе животных не было выявлено каких-либо статистически значимых изменений в течение опыта (*табл. 4*). Полученные данные свидетельствуют о стабильном состоянии животных, не подвергающихся каким-либо воздействиям. Наиболее существенные изменения под действием плавания наблюдались по биохимическим показателям: мочевины в контрольной группе повышалась на 36.4% ($p < 0.05$), молочная кислота на 39.7% ($p < 0.05$); по морфологическим показателям крови: гемоглобин снижался на 10.1% ($p < 0.05$), число эритроцитов не изменялось (*табл. 4*, контрольная группа).

Выявленные изменения со стороны морфологических показателей крови могут быть обусловлены нарушением процесса эритропоэза вследствие стрессового воздействия, вызванного повышенными физическими нагрузками, требующими повышенного расхода питательных веществ. Изменение со стороны биохимических показателей свидетельствует о преобладании анаэробного расщепления глюкозы в качестве энергетического субстрата и интенсификации процесса

Таблица 4. Показатели крови крыс в условиях повышенных физических нагрузок

Группа животных	Показатель							
	Гемоглобин, г/л		Число эритроцитов, $\times 10^{12}/л$		Молочная кислота, ммоль/л		Мочевина, ммоль/л	
	Исходный уровень	На 14-й день	Исходный уровень	На 14-й день	Исходный уровень	На 14-й день	Исходный уровень	На 14-й день
1	118.3 ± 2.7	120.2 ± 1.5	5.22 ± 0.09	5.13 ± 0.11	5.72 ± 0.16	5.63 ± 0.14	5.51 ± 0.16	5.41 ± 0.13
2	117.9 ± 1.5	130.3 ± 3.1 ^{aa,b}	4.99 ± 0.17	6.64 ± 0.48 ^{a,b}	5.93 ± 0.16	5.78 ± 0.12 ^{aa}	5.62 ± 0.16	5.72 ± 0.18 ^{aa}
3	117.8 ± 1.7	133.0 ± 2.4 ^{aa,bb}	5.22 ± 0.09	6.21 ± 0.26 ^{a,bb}	5.78 ± 0.17	5.93 ± 0.06 ^{aa}	5.71 ± 0.15	5.52 ± 0.21 ^{aa}
4	119.1 ± 2.5	107.4 ± 2.8 ^b	5.03 ± 0.13	5.11 ± 0.13	5.81 ± 0.23	8.10 ± 0.33 ^{bb}	5.55 ± 0.16	7.53 ± 0.11 ^{bb}

Примечание. Группы животных: 1 – интактные; 2 – животные, которым вводили композицию в дозе 50 мг/кг; 3 – животные, которым вводили композицию в дозе 100 мг/кг; 4 – контрольная.

^a Различия статистически достоверны ($p < 0.01$) с соответствующими показателями контрольной группы;

^{aa} то же при $p < 0.001$;

^b различия статистически достоверны ($p < 0.01$) с исходными значениями;

^{bb} то же при $p < 0.001$.

катаболизма белков для восполнения энергетических нужд. То есть физические нагрузки, которым подвергались животные, в контрольной группе приводят к состоянию истощения организма, нарушению тканевого дыхания вследствие снижения выработки гемоглобина и неэффективному процессу обеспечения энергетических потребностей – преобладают анаэробные процессы. Все эти процессы являются предпосылкой к быстрому развитию утомления.

В опытных группах крыс, получавших исследуемую композицию в дозах 50 и 100 мг/кг, изменения в крови были менее существенными по сравнению с контрольной группой. Гемоглобин и число эритроцитов повышались в обеих опытных группах, которым вводили композицию: на 10.5% и 33.1% при введении в дозе 50 мг/кг и на 12.9% и 19.0% при введении в дозе 100 мг/кг (табл. 4).

Увеличение в циркулирующей крови красных кровяных клеток (эритроцитов) и гемоглобина приводит к улучшению насыщенности тканей кислородом, интенсификации тканевого дыхания и, как следствие, к повышению эффективности энергетического обмена, что создает более высокий потенциал устойчивости и адаптации организма к повышенным нагрузкам. Это подтверждается результатами теста «принудительное плавание» и исследованиями биохимических показателей крови. Показано, что у животных в опытных группах, получавших препарат, в условиях повышенных физических нагрузок

не выявили повышения уровня молочной кислоты и мочевины. Следовательно, энергетические нужды организма удовлетворяются за счет более эффективного аэробного процесса расщепления глюкозы, в результате которого не происходит накопления продукта обмена молочной кислоты и увеличивается период наступления утомления. Отсутствие изменения уровня мочевины по отношению к исходным значениям свидетельствует о достаточном обеспечении энергетических потребностей организма за счет углеводов без дополнительного вовлечения белков в процесс образования энергии.

Таким образом, разработанная композиция, состоящая из трех металлокомплексов пектинового полисахарида: Na, Mg-полигалактуроната, Na, Zn-полигалактуроната и Na, Cr-полигалактуроната, – в определенном массовом соотношении может быть перспективным для фармакологии в качестве средства для повышения адаптации организма к большим физическим нагрузкам.

Литература

1. V.S. Pawar, Sh. Hugar
Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2012, 2(1), 480.
DOI: 10.1016/S2222-1808(12)60207-2.
2. A. Panossian, G. Wikman, P. Kaur, A. Asea
Phytomed., 2009, 16(6-7), 617. DOI: 10.1016/j.phymed.2008.12.003.
3. A.N. Shikov, O.N. Pozharitskaya, V.G. Makarov, W.-Zh. Yang, D.-A. Guo
Chin. J. Nat. Med., 2014, 12(10), 721. DOI: 10.1016/S1875-5364(14)60111-4.
4. A. Asea, P. Kaur, A. Panossian, K.G. Wikman
Phytomed., 2013, 20(14), 1323.
DOI: 10.1016/j.phymed.2013.07.001.
5. S.T. Minzanova, V.F. Mironov, A.B. Vyshtakalyuk, O.V. Tsepaeva, L.G. Mironova, A.Z. Mindubaev, I.R. Nizameev, K. V. Kholin, V.A. Milyukov
Carbohydr. Polym., 2015, 134, 524.
DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.07.034.
6. J. Gertsch, J.M. Viveros-Paredes, P. Taylor
Journal of Ethnopharmacol., 2011, 136(3), 385.
DOI: 10.1016/j.jep.2010.06.044.
7. E.M. Schlag, M.S. McIntosh
Phytochem., 2013, 93, 96. DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.03.002.
8. C.A.R.A. Costa, A. Tanimoto, A.E.V. Quaglio, L.D. Almeida Jr., J.A. Severi, L.C. Di Stasi
Int. Immunopharm., 2015, 28(1), 459.
DOI: 10.1016/j.intimp.2015.07.002.
9. А.П. Авцын, А.А. Жаворонков, М.А. Риш, Л.С. Строчкова
Микроэлементозы человека: Этиология, классификация, органопатология, Москва, Медицина, 1991, 496 с.
10. В.Ф. Миронов, А.И. Коновалов, А.Н. Карасева, Н.А. Соснина, В.В. Карлин, О.В. Цепяева
Пат. РФ, 2220981, 2004.
В.Ф. Миронов, А.И. Коновалов, А.Н. Карасева, С.М. Минзанова, А.Б. Выштакалюк, В.В. Карлин, А.З. Миндубаев
Пат. РФ, 2281957, 2006.
11. A. Assifaoui, C. Loupiac, O. Chambin, Ph. Cayot
Carbohydr. Res., 2010, 345(7), 929. DOI: 10.1016/j.carres.2010.02.015.
12. Э.Д. Ауубаева
Химические реакции пектиновых веществ, Фрунзе, Изд. Илим, 1984, 186 с.
13. N.G. Nazarov, V.V. Zobov, A.B. Vyshtakalyuk, V.S. Reznik
RJPBCS, 2015, 6(6), 1617.
(http://www.rjpbcs.com/pdf/2015_6%286%29/%5B271%5D.pdf).
14. К.К. Сидоров
В Сб. Токсикология новых промышленных химических веществ, Москва, Медицина, 1973, Вып. 13, с. 47.

English

A Pharmacological Composite Preparation Based on Pectin Polymetallic Complexes Increase the Adaptive Capacity of the Organism During Intense Physical Efforts *

Salima T. Minzanova –

A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences
8, Arbuzov Str., Kazan, 420088, Tatarstan Republic, Russia
e-mail: minzanova@iopc.ru

Vladimir F. Mironov –

RAS Corresponding Member, Professor
A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences
8, Arbuzov Str., Kazan, 420088, Tatarstan Republic, Russia
e-mail: mironov@iopc.ru

Alexandra B. Vyshtakalyuk –

A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences
8, Arbuzov Str., Kazan, 420088, Tatarstan Republic, Russia
e-mail: alex.vysh@mail.ru

Lubov G. Mironova –

A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences
8, Arbuzov Str., Kazan, 420088, Tatarstan Republic, Russia
e-mail: lubovmironova08@gmail.com

Vladimir I. Morozov –

A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences
8, Arbuzov Str., Kazan, 420088, Tatarstan Republic, Russia
e-mail: vmorozov@iopc.ru

Nail G. Nazarov –

Kazan (Volga Region) Federal University
18, Kremlevskaya Str., Kazan, 420008, Tatarstan Republic, Russia
e-mail: nail-naz@yandex.ru

Anton Z. Mindubaev –

A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences
8, Arbuzov Str., Kazan, 420088, Tatarstan Republic, Russia
e-mail: mindubaev@iopc.ru

Vasily A. Milyukov –

A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences
8, Arbuzov Str., Kazan, 420088, Tatarstan Republic, Russia
e-mail: miluykov@iopc.ru

* *The work was financially supported by RFBR (project N 13-03-00046).*

Abstract

A pharmacological composite preparation based on pectin polysaccharide containing three polymetallic complexes of polygalacturonic acid (Na,Mg-polygalacturonate, Na,Zn-polygalacturonate and Na,Cr-polygalacturonate) was obtained. Physical-chemical properties, structural characteristics, and biological activity of the considered compound were examined. Under a "swimming to failure" test the preparation at a dose of 50–100 mg/kg-of-body-weight was shown to have a pronounced ability to increase the adaptive capacity of the organism during intense training and physical efforts. The preparation can be used as a potential adaptogen, an erythropoiesis stimulant, and a drug for metabolism normalization.

Keywords: pectin biopolymer, magnesium, zinc, chrome, complex formation, adaptogens.

References

1. V.S. Pawar, Sh. Hugar
Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2012, 2(1), 480.
DOI: 10.1016/S2222-1808(12)60207-2.
2. A. Panossian, G. Wikman, P. Kaur, A. Asea
Phytomed., 2009, 16(6-7), 617. DOI: 10.1016/j.phymed.2008.12.003.
3. A.N. Shikov, O.N. Pozharitskaya, V.G. Makarov, W.-Zh. Yang, D.-A. Guo
Chin. J. Nat. Med., 2014, 12(10), 721. DOI: 10.1016/S1875-5364(14)60111-4.
4. A. Asea, P. Kaur, A. Panossian, K.G. Wikman
Phytomed., 2013, 20(14), 1323. DOI: 10.1016/j.phymed.2013.07.001.
5. S.T. Minzanova, V.F. Mironov, A.B. Vyshtakalyuk, O.V. Tsepaeva, L.G. Mironova, A.Z. Mindubaev, I.R. Nizameev, K.V. Kholin, V.A. Milyukov
Carbohydr. Polym., 2015, 134, 524.
DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.07.034.
6. J. Gertsch, J.M. Viveros-Paredes, P. Taylor
Journal of Ethnopharmacol., 2011, 136(3), 385.
DOI: 10.1016/j.jep.2010.06.044.
7. E.M. Schlag, M.S. McIntosh
Phytochem., 2013, 93, 96. DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.03.002.
8. C.A.R.A. Costa, A. Tanimoto, A.E.V. Quaglio, L.D. Almeida Jr., J.A. Severi, L.C. Di Stasi
Int. Immunopharm., 2015, 28(1), 459. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.07.002.
9. A.P. Avtsyn, A.A. Zhavoronkov, M.A. Rish, L.S. Strochkova
Human Microelementoses: Aetiology, Classification, Organopathology [Mikroelementozy cheloveka: etiologiya, klassifikatsiya, organopatologiya], Moscow, Medicine Publ., 1991, 496 pp. (in Russian).
10. V.F. Mironov, A.I. Konovalov, A.N. Karaseva, N.A. Sosnina, V.V. Karlin, O.V. Tsepaeva
Pat. RU, 2220981, 2004. (in Russian).
V.F. Mironov, A.I. Konovalov, A.N. Karaseva, S.M. Minzanova, A.B. Vyshtakalyuk, V.V. Karlin, A.Z. Mindubaev
Pat. RU, 2281957, 2006. (in Russian).
11. A. Assifaoui, C. Loupiac, O. Chambin, Ph. Cayot
Carbohydr. Res., 2010, 345(7), 929. DOI: 10.1016/j.carres.2010.02.015.
12. Z.D. Ashubaeva
Chemical Reactions of Pectin Substances [Khimicheskie reaktsii pektinovykh veshchestv], Kyrgyzstan, Frunze, Ilim Publ., 1984, 186 pp. (in Russian).
13. N.G. Nazarov, V.V. Zobov, A.B. Vyshtakalyuk, V.S. Reznik
RJPBCS, 2015, 6(6), 1617.
(http://www.rjpbcs.com/pdf/2015_6%286%29%5B271%5D.pdf).
14. K.K. Sidorov
In Proc. Toxicology of New Industrial Chemicals [Toksikologiya novykh promyshlennykh khimicheskikh veshchestv], Moscow, Medicine Publ., 1973, Iss. 13, p. 47. (in Russian).

Гидрокситиолы и дисульфиды на основе α -, β -пинена и 3-карена *

О.А. Банина, Д.В. Судариков, Л.Л. Фролова, А.В. Кучин

Впервые синтезирован 1,3-гидрокситиол пинановой структуры – (1*S*,2*S*,3*S*,5*R*)-6,6-диметил-2-(сульфанилметил)бицикло[3.1.1]гептан-3-ол. Предложены три способа его получения на основе кислородсодержащих производных α - и β -пинена. Синтезированы ранее неизвестные изомерные 1,2- и 1,3-гидрокситиолы карановой структуры. С высокими выходами получены соответствующие пинановые и карановые дисульфиды, структура которых подтверждена методом рентгеноструктурного анализа.

Ключевые слова: α - и β -пинен, 3-карен, гидрокситиолы, дисульфиды.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-03-01064) и программы «УМНИК» (№ 0018200).

Одним из важных направлений химии терпеноидов является их модификация серосодержащими реагентами с целью получения высокоэффективных хиральных индукторов. Данные соединения являются ключевыми синтонами в синтезе хиральных сульфоксидов, тиосульфидов, сульфениминов, сульфинамидов и хиральных α -разветвленных аминов. На примере гидрокситиолов на основе камфоры [1–3] и пулегона [4] было показано, что трансформации подобного типа идут по тиогруппе, а гидроксильная группа выполняет роль хирально-направляющей, повышая тем самым диастереоселективность реакций образования сульфениминов. Применение других терпеновых гидрокситиолов в литературе не описано, хотя природные α -, β -пинены и 3-карены являются доступным и возобновляемым сырьем.

Наряду с хиральной индуктивностью терпеновых серосодержащих

соединений следует отметить их важное биологическое значение: большое количество соединений данного ряда обладают противогрибковой активностью и низкой токсичностью. В работе [5] было экспериментально установлено, что среди тиотерпеноидов ментанового ряда наиболее высокую противогрибковую активность проявил продукт реакции (+)-1,2-оксида лимонена с метиловым эфиром меркаптоуксусной кислоты (рис. 1). Помимо сульфида лимонена выраженный противогрибковый эффект наблюдался у тиотерпенола и его дисульфида.

Известно, что терпеновые сульфиды на основе (+)-карвона и R-(+)-лимонена оказывают умеренное антималярийное действие, а их сульфенамидные производные являются обезболивающими агентами [6]. В отличие от моноциклических тиотерпеноидов бициклические серосодержащие соединения не обладают сильно выраженной противогрибковой активностью, однако введение фармакофорного фрагмента метилового эфира меркаптоуксусной кислоты в молекулу способствует значительному повышению данной активности монотерпеноидов пинановой структуры [8, 9]. Большое число работ посвящено исследованию биологической активно-



БАНИНА
Ольга Аркадьевна
Институт химии Коми
научного центра УрО РАН



СУДАРИКОВ
Денис Владимирович
Институт химии Коми
научного центра УрО РАН



ФРОЛОВА
Лариса Леонидовна
Институт химии Коми
научного центра УрО РАН



КУЧИН
Александр Васильевич
член-корреспондент РАН, профессор,
директор Института химии Коми
научного центра УрО РАН

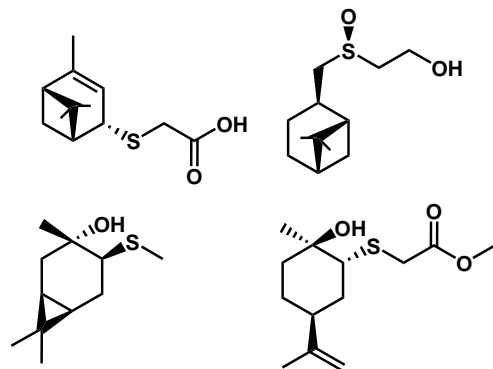


Рис. 1. Тиотерпеноиды пинановой, карановой и ментановой структуры.

сти бициклического монотерпеноида 3-карена. При этом его противогрибковые свойства не изучались, хотя он входит в состав эфирных масел антимикотического действия [10–13].

Синтез гидрокситиолов, в частности гидроксисульфидов, может быть осуществлен через реакции присоединения тиолов к ненасыщенным кетонам, олефинам и нитроалкенам (реакция Михаэля) [14–16], реакции раскрытия циклических и ациклических эпоксидов тиолами [17–20]. Широко применяемыми нуклеофильными реагентами в данных реакциях являются тиоуксусная и тиобензойная кислоты, бензилмеркаптан и тиоацетат калия [21–24].

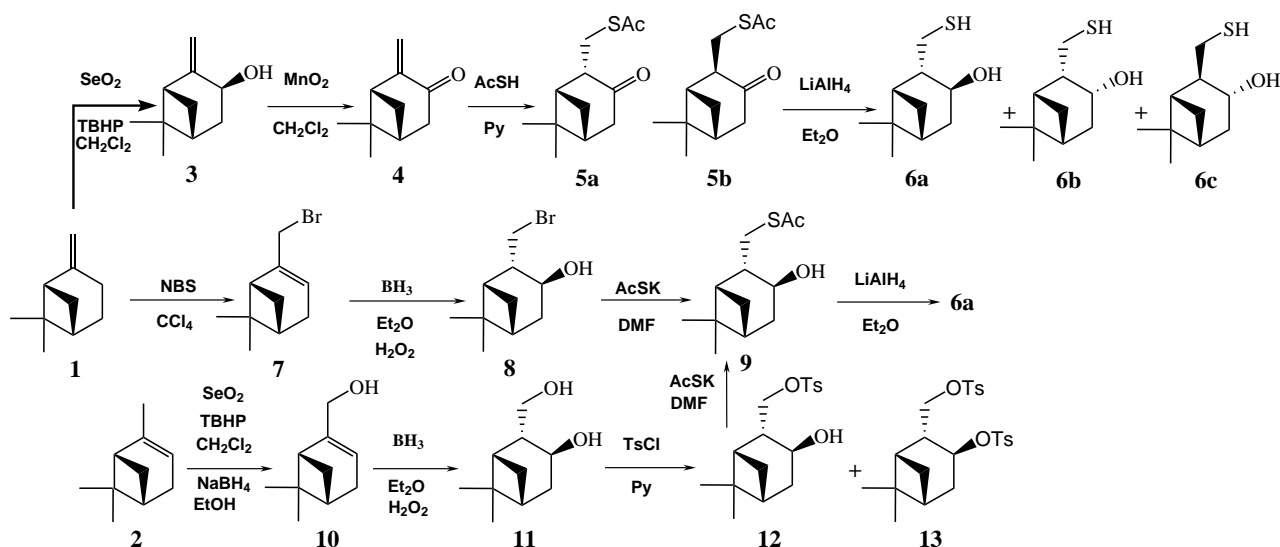
Среди продуктов окислительных трансформаций гидрокситиолов можно выделить дисульфиды, которые находят применение в качестве лигандов в различных асимметрических трансформациях [25–29]. Кроме этого, они являются структурными звеньями биологически активных веществ [30].

Нами предложены три способа получения изомерных гидрокситиолов пинановой структуры (схема 1) [31].

Первый был осуществлен путем окисления (-)-β-пинена **1** трет-бутилгидропероксидом (ТВНР) в присутствии каталитических количеств SeO₂. В результате реакции с выходом 84% образовался *транс*-пинокарвеол **3**, который был окислен активным MnO₂ в дихлорметане до пинокарвона **4** с выходом 70%. При обработке кетона **4** тиоуксусной кислотой в присутствии пиридина (Py) при -5 °С была получена смесь *цис*- и *транс*-тиоацетатов **5a** и **5b** в соотношении 2:1 с выходом 95%.

Восстановление диастереомерной смеси 10-ацетилтиопинан-3-онов (**5a,b**) 2 молями LiAlH₄ в диэтиловом эфире привело к образованию смеси гидрокситиолов **6a–c** в соотношении 1:1:1 с общим выходом диастереомеров после колоночной хроматографии 59%. Четвертого возможного диастереомера (1*S*,2*R*,3*S*,5*R*)-6,6-диметил-2-(сульфанилметил)бицикло[3.1.1]-гептан-3-ола в смеси обнаружено не было. Следовательно, *цис*-тиоацетат **5a** восстанавливается до двух возможных гидрокситиолов **6a** и **6b**, а *транс*-тиоацетат **5b** до единственного гидрокситиола **6c** (рис. 2).

Схема 1



Соединение **6b** удалось выделить в виде индивидуального вещества методом колоночной хроматографии на силикагеле с выходом 20%. Два других диастереомера разделить не удалось.

По второму способу бромирование исходного β -пинена **1** *N*-бромсукцинимидом (NBS) приводит к образованию миртенилбромида **7** с выходом 59% [32, 33], гидроборирование–окисление которого дает 10-бромоизопинокамфеол **8** с выходом 69% [34]. Замещением атома брома тиоацетатной группой по реакции **7** с тиоацетатом калия был получен 10-ацетилтиопинан-3-ол **9** с количественным выходом. Восстановление тиоацетата **9** 1 молем LiAlH_4 приводило к образованию единственного гидрокситиола **6a** с общим выходом 40% на исходный β -пинен **1**.

Было установлено, что тиол **6a** также может быть получен, если в качестве исходного соединения использовать α -пинен **2**. Окисление α -пинена **2** *tert*-бутилгидропероксидом в присутствии каталитических количеств SeO_2 приводит к образованию миртенила, при восстановлении которого

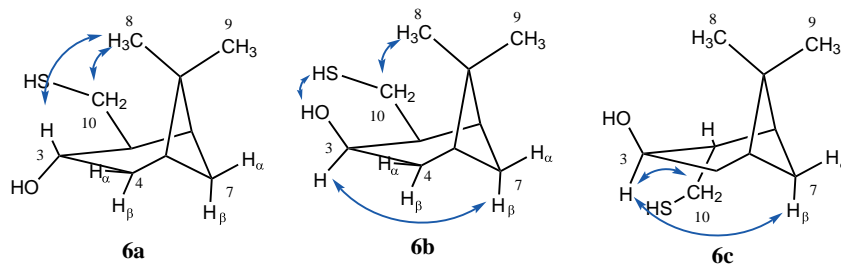
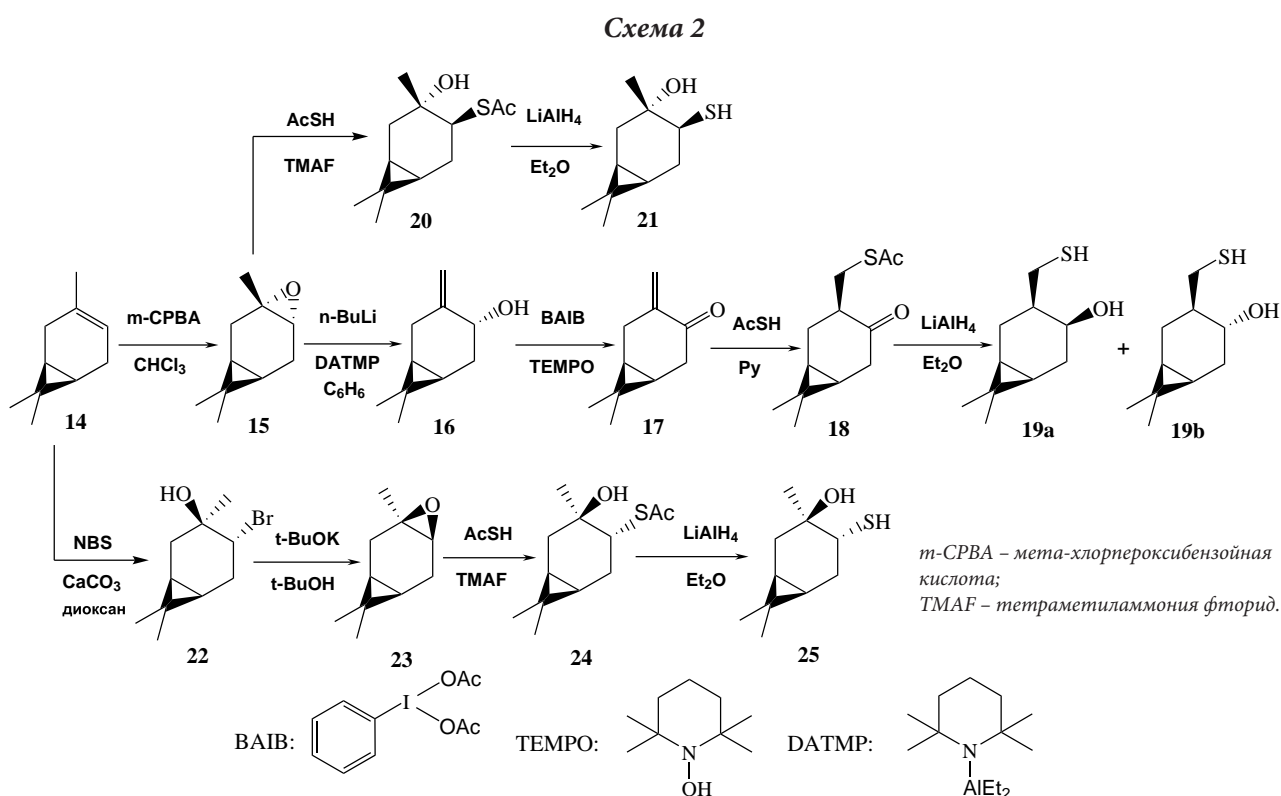


Рис. 2. NOE-взаимодействия в гидрокситиолах **6a-c**.

го NaBH_4 в этаноле *in situ* был получен миртенол **10** с общим выходом 45%. В результате гидроборирования спирта **10** с последующим окислением образовался диол **11** (выход 86%) [35]. По реакции пинандиола **11** с тозилхлоридом в пиридине при -5°C образуется соответствующий тозилат **12** с выходом 76%. В качестве побочного соединения образуется дитозилат **13** с выходом 10%. Взаимодействие тозилата **12** с тиоацетатом калия в диметилформамиде также приводит к образованию соединения **9**, ранее полученного из 10-бромоизопинокамфеола **8**, с общим выходом 29% на исходный α -пинен **2**.

Таким образом, наиболее эффективным методом синтеза 10-тиоизопинокамфеола **6a** как по выходу, так и по количеству стадий оказался путь по маршруту **7**→**8**→**9**→**6a**.

На основе природного 3-карена **14** (схема 2) были синтезированы изомерные 1,2- и 1,3-гидрокситиолы.



По методике [36] был получен *транс*-эпоксид 15. *Транс*-3(10)-карен-4-ол 16 был синтезирован нами из оксирана 15 с использованием диэтилалюминий-2,2,6,6-тетраметилпиперида (DATMP), который позволяет исходному эпоксиду изомеризоваться до соответствующего спирта 16 с выходом 97%. Последующее окисление спирта 16 проводили системой [бис(ацетокси)йод]бензол (BAIB)–TEMPO, являющейся высокоселективной и эффективной в реакциях окисления спиртов в карбонильные соединения [37]. Нами было показано, что окисление спирта 16

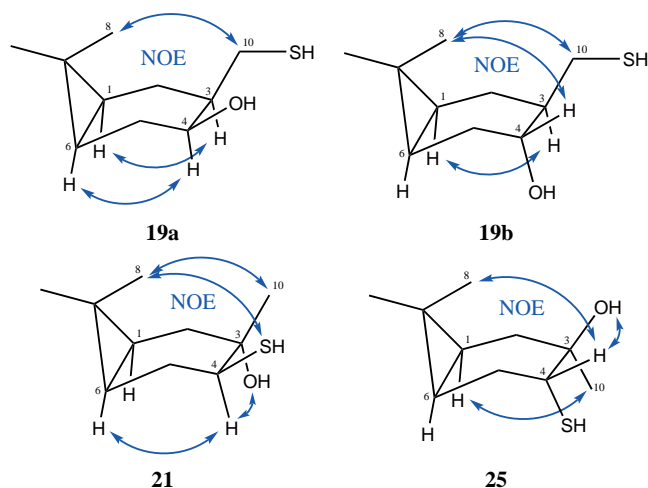
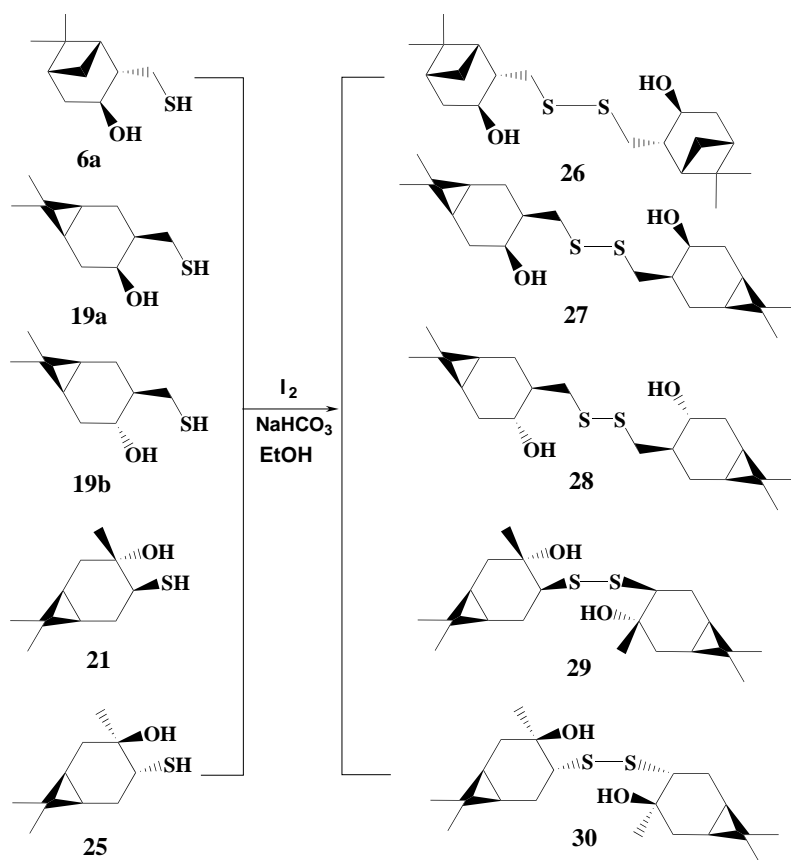


Рис. 3. NOE-взаимодействия в гидрокситиолах 19a,b, 21 и 25.

Схема 3



данной системой в дихлорметане при комнатной температуре в течение 6 ч протекает с 95%-ной конверсией и приводит к образованию кетона 17 с селективностью 70%. Известно, что при выделении данного соединения методом колоночной хроматографии на силикагеле происходит его димеризация [38]. Поэтому синтез 10-ацетилтиокаран-4-она 18 осуществляли *in situ* по реакции с тиоуксусной кислотой в присутствии пиридина при комнатной температуре. Колоночной хроматографией выделили единственный тиоацетат 18. Восстановление соединения 18 LiAlH_4 (2 моля) в Et_2O привело к образованию смеси двух диастереомеров 19a и 19b (2:1), которые разделили на индивидуальные вещества методом колоночной хроматографии. В ИК-спектрах полученных гидрокситиолов по сравнению с исходным тиоацетатом исчезают полосы поглощения карбонильных групп и появляются в области 3470–3480 cm^{-1} , характерные для OH-групп. В спектрах ЯМР ^1H гидрокситиолов 19a и 19b присутствуют сигналы OH-группы при атоме C(4) в области 3.4–4.2 м.д. и триплеты SH-группы в области 1.31–1.35 м.д. с константой спин-спинового взаимодействия, равной 8 Гц. В NOESY-спектре у мажорного тиола 19a наблюдается взаимодействие протонов H(4) и H(6), а у минорного 19b – одного протона H(4) и трех протонов H(8), что подтверждает их стереохимию (рис. 3).

Еще одним направлением синтеза гидроксисульфидов различного строения является тиолиз эпоксидов [39–44]. Нами были подобраны условия для селективного раскрытия *транс*-3,4-эпоксикарана 15. Наилучшие результаты получены при взаимодействии данного эпоксида с тиоуксусной кислотой в присутствии фторида тетраметиламмония (TMAF). Тиоацетат 20 был выделен в чистом виде методом колоночной хроматографии с выходом 48%. Снятием тиоацетатной группы с соеди-

нения **20** LiAlH_4 (1 экв.) в Et_2O был получен соответствующий гидрокситиол **21** (рис. 3) с выходом 80%.

Аналогичным образом тиолизу был подвергнут *цис*-эпоксид **23**, полученный из 3-карена, через бромгидрин **22** (общий выход на 3-карен – 61%) [45]. В результате реакции образовался тиацетат **24** с выходом 48%. Восстановлением соединения **24** 1 моле LiAlH_4 в Et_2O был получен соответствующий гидрокситиол **25** (рис. 3) с выходом 76%.

Путем окислительной димеризации гидрокситиолов **6a**, **19a**, **19b**, **21** и **25** йодом были получены соответствующие дисульфиды **26–30** (схема 3) с выходом 78–99%.

Структуры дисульфидов **27** и **30** подтверждены рентгеноструктурным анализом (рис. 4).

Таким образом, нами получена серия новых изомерных 1,3-гидрокситиолов пинановой структуры, изомерных 1,2- и 1,3-гидрокситиолов карановой структуры. Было показано, что присоединение тиоуксусной кислоты к 3(10)-карен-4-ону протекает с образованием одного тиацетата в отличие от данной реакции с пинакареном – образовывалась диасте-

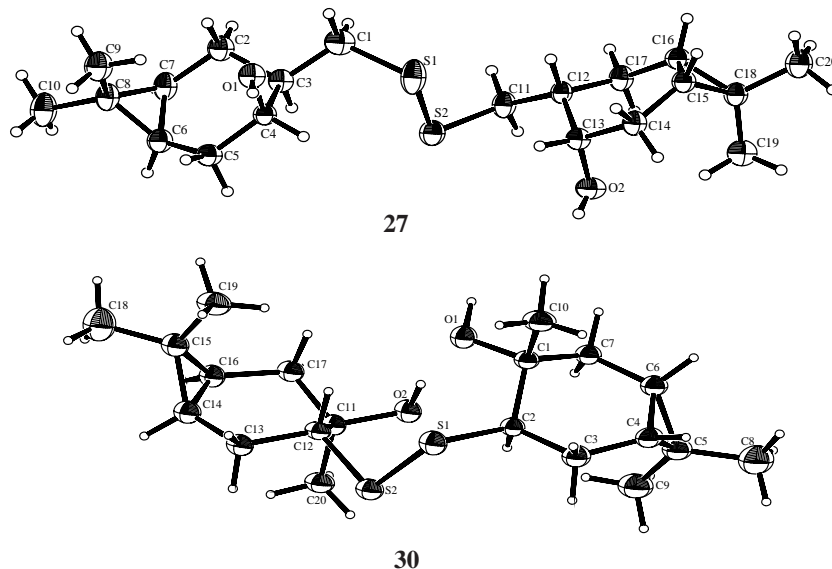


Рис. 4. Общий вид молекул соединений **27** и **30** по данным рентгеноструктурного анализа.

реомерная смесь двух тиацетатов. Установлено, что раскрытие *транс*- и *цис*-эпоксидов 3-карена тиоуксусной кислотой наиболее селективно проходит в присутствии TMAF с образованием одного стереоизомера. На основе синтезированных гидрокситиолов были получены соответствующие дисульфиды с высокими выходами.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования «Химия» Института химии Коми НЦ УрО РАН.

Литература

1. T.-K. Yang, R.-Y. Chen, D.-S. Lee, W.-S. Peng, Y.-Z. Jiang, A.-Q. Mi, T.-T. Jang
J. Org. Chem., 1994, **59**(4), 914. DOI: 10.1021/jo00083a037.
2. O. De Lucchi, V. Lucchini, C. Marchioro, G. Valle, G. Modena
J. Org. Chem., 1986, **51**(9), 1457. DOI: 10.1021/jo00359a014.
3. R. Kawęcki
Tetrahedron: Asymmetry, 1999, **10**(21), 4183. DOI: 10.1016/S0957-4166(99)00433-4.
4. R. Kawęcki
Tetrahedron Asymmetry, 2003, **14**(18), 2827. DOI: 10.1016/S0957-4166(03)00624-4.
5. В.А. Старцева, Л.Е. Никитина, Е.В. Сиразиева, Л.Ю. Дорофеева, С.А. Лисовская, Н.П. Глушко, Р.А. Гараев, И.В. Акулина
Химия в интересах устойчивого развития, 2009, №5, 539.
6. A.A. Versteegen-Haaksma, H.J. Swarts, B.J.M. Jansen, A. de Groot, N. Bottema-MacGillavry, B. Witholt
Ind. Crops Prod., 1995, **4**(1), 15. DOI: 10.1016/0926-6690(95)00006-X.
7. D.P. de Sousa, F.F.F. de Nóbrega, R.N. Almeida, T.J. Brocksom
Z. Naturforsch. B. 2009, **64**(3), 351. DOI: 10.1515/znb-2009-0319.
8. И.А. Вакуленко
Дисс. канд. хим. наук, Казан. гос. технол. ун-т, Казань, 2008, 187 с.
9. Л.Е. Никитина, В.А. Старцева, И.А. Вакуленко, И.М. Хисматулина, С.А. Лисовская, Н.П. Глушко, Р.С. Фассахов
Хим.-фарм. Ж., 2009, **43**(5), 20.
10. A. Uzel, T. Dirmenci, A. Celik, T. Arabaci
Chem. Nat. Compd., 2006, **42**(2), 169. DOI: 10.1007/s10600-006-0069-7.
11. J.H. Lee, H.Y. Yang, H.S. Lee, S. K. Hong
J. Microbiol. Biotechnol., 2008, **18**(3), 497.
12. C. Cavaleiro, E. Pinto, M.J. Gonçalves, L. Salgueiro
J. Appl. Microbiol. 2006, **100**(6), 1333. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.02862.x.
13. S. Gallori, A.R. Bilia, N. Mulinacci, C. Bicchi, P. Rubiolo, F.F. Vincieri
Planta Med., 2001, **67**(3), 290. DOI: 10.1055/s-2001-12001.
14. H. Li, L. Zu, J. Wang, W. Wang
Tetrahedron Lett., 2006, **47**(18), 3145. DOI: 10.1016/j.tetlet.2006.02.140.
15. N.K. Rana, S. Selvakumar, V.K. Singh
J. Org. Chem., 2010, **75**(6), 2089. DOI: 10.1021/jo902634a.
16. Q.-L. Pei, W.-Y. Han, Z.-J. Wu, X.-M. Zhang, W.-C. Yuan
Tetrahedron, 2013, **69**(26), 5367. DOI: 10.1016/j.tet.2013.04.125.
17. Z. Wang, W.K. Law, J. Sun
Org. Lett., 2013, **15**(23), 5964. DOI: 10.1021/ol402797v.
18. M.H. Wu, E.N. Jacobsen
J. Org. Chem., 1998, **63**(15), 5252. DOI: 10.1021/jo980155d.
19. B.P. Bandgar, A.V. Patil, O.S. Chavan, V.T. Kamble
Catal. Commun., 2007, **8**(7), 1065. DOI: 10.1016/j.catcom.2006.10.003.
20. P. Gao, P.-F. Xu, H. Zhai
Tetrahedron Lett., 2008, **49**(46), 6536. DOI: 10.1016/j.tetlet.2008.09.004.
21. B. Paulsen
Master Thesis In Organic Chemistry, Faculty of Science and Technology, Department of Chemistry, University of Tromsø, 2011, 76 pp.

Abstract

This paper considers hydroxythiols and disulfides syntheses. The authors for the first time had synthesized a 1,3-hydroxythiol of pinane structure – (1S,2S,3S,5R)-6,6-dimethyl-2-(sulfanylmethyl)bicyclo[3.1.1]heptane-3-ol. Three ways of the substance production from oxygenated derivatives of α - and β -pinene are suggested. Previously unknown isomeric 1,2- and 1,3-hydroxythiols of carane structure were synthesized. Authors obtained high yields of corresponding pinane and carane disulfides, the products structures were confirmed by X-ray analyses.

Keywords: α - and β -pinene, 3-carene, hydroxythiols, disulfides.

References

1. T.-K. Yang, R.-Y. Chen, D.-S. Lee, W.-S. Peng, Y.-Z. Jiang, A.-Q. Mi, T.-T. Jong
J. Org. Chem., 1994, **59**(4), 914. DOI: 10.1021/jo00083a037.
2. O. De Lucchi, V. Lucchini, C. Marchioro, G. Valle, G. Modena
J. Org. Chem., 1986, **51**(9), 1457. DOI: 10.1021/jo00359a014.
3. R. Kawęcki
Tetrahedron: Asymmetry, 1999, **10**(21), 4183. DOI: 10.1016/S0957-4166(99)00433-4.
4. R. Kawęcki
Tetrahedron Asymmetry, 2003, **14**(18), 2827. DOI: 10.1016/S0957-4166(03)00624-4.
5. V.A. Startseva, L.E. Nikitina, E.V. Sirazieva, L.Y. Dorofeeva, S.A. Lisovskaya, N.P. Glushko, R.A. Garaev, I.V. Akulina
Chem. Sustain. Developm., 2009, **17**(5), 539.
6. A.A. Versteegen-Haakma, H.J. Swarts, B.J.M. Jansen, A. de Groot, N. Bottema-MacGillavry, B. Witholt
Ind. Crops Prod., 1995, **4**(1), 15. DOI: 10.1016/0926-6690(95)00006-X.
7. D.P. de Sousa, F.F.F. de Nóbrega, R.N. Almeida, T.J. Brocksom
Z. Naturforsch. B. 2009, **64**(3), 351. DOI: 10.1515/znb-2009-0319.
8. I.A. Vakulenko
PhD Thesis in Chemistry [Dissertation for the Degree of Candidate of Chemical Sciences], Kazanskiy Gosudarstvennyy Tekhnologicheskii Universitet, Kazan, 2008, 187 pp.
9. L.E. Nikitina, V.A. Startseva, I.A. Vakulenko, I.M. Khismatulina, S.A. Lisovskaya, N.P. Glushko, R.S. Fassakhov
Pharm. Chem. J., 2009, **43**(5), 251. DOI: 10.1007/s11094-009-0282-3.
10. A. Uzel, T. Dirmenci, A. Celik, T. Arabaci
Chem. Nat. Compd., 2006, **42**(2), 169. DOI: 10.1007/s10600-006-0069-7.
11. J.H. Lee, H.Y. Yang, H.S. Lee, S. K. Hong
J. Microbiol. Biotechnol., 2008, **18**(3), 497.
12. C. Cavaleiro, E. Pinto, M.J. Gonçalves, L. Salgueiro
J. Appl. Microbiol. 2006, **100**(6), 1333. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.02862.x.
13. S. Gallori, A.R. Bilia, N. Mulinacci, C. Bicchì, P. Rubiolo, F.F. Vincieri
Planta Med., 2001, **67**(3), 290. DOI: 10.1055/s-2001-12001.
14. H. Li, L. Zu, J. Wang, W. Wang
Tetrahedron Lett., 2006, **47**(18), 3145. DOI: 10.1016/j.tetlet.2006.02.140.
15. N.K. Rana, S. Selvakumar, V.K. Singh
J. Org. Chem., 2010, **75**(6), 2089. DOI: 10.1021/jo902634a.
16. Q.-L. Pei, W.-Y. Han, Z.-J. Wu, X.-M. Zhang, W.-C. Yuan
Tetrahedron, 2013, **69**(26), 5367. DOI: 10.1016/j.tet.2013.04.125.
17. Z. Wang, W.K. Law, J. Sun
Org. Lett., 2013, **15**(23), 5964. DOI: 10.1021/ol402797v.
18. M.H. Wu, E.N. Jacobsen
J. Org. Chem., 1998, **63**(15), 5252. DOI: 10.1021/jo980155d.
19. B.P. Bandgar, A.V. Patil, O.S. Chavan, V.T. Kamble
Catal. Commun., 2007, **8**(7), 1065. DOI: 10.1016/j.catcom.2006.10.003.
20. P. Gao, P.-F. Xu, H. Zhai
Tetrahedron Lett., 2008, **49**(46), 6536. DOI: 10.1016/j.tetlet.2008.09.004.
21. B. Paulsen
Master Thesis In Organic Chemistry, Faculty of Science and Technology, Department of Chemistry, University of Tromsø, 2011, 76 pp.
22. J. Chen, S. Meng, L. Wang, H. Tang, Y. Huang
Chem. Sci., 2015, **6**(7), 4184. DOI: 10.1039/C5SC00878F.
23. M.C.S. Mattos, A.M. Sanseverino
Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 2004, **179**(6), 1203. DOI: 10.1080/10426500490459849.
24. W. Yanga, D.-M. Du
Org. Biomol. Chem., 2012, **10**(34), 6876. DOI: 10.1039/C2OB26068A.
25. M. Mellah, A. Voituriez, E. Schulz
Chem. Rev., 2007, **107**(11), 5133. DOI: 10.1021/cr068440h.
26. H. Matsunaga, R. Tokuda, M. Nakajima, T. Ishizuka
Chem. Pharm. Bull., 2010, **58**(10), 1419. DOI: 10.1248/cpb.58.1419.
27. A. Grudniewska, R. Gniłka, C. Wawrzęńczyk
Chirality, 2010, **22**(10), 929. DOI: 10.1002/chir.20862.
28. J.A. Mukhlall, B.C. Noll, W.H. Hersh
J. Sulfur Chem., 2011, **32**(3), 199. DOI: 10.1080/17415993.2011.580346.
29. J.A. Mukhlall, W.H. Hersh
Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2011, **30**(9), 706. DOI: 10.1080/15257770.2011.597366.
30. N.A. Calandra, Y.L. Cheng, K.A. Kocak, J.S. Miller
Org. Lett., 2009, **11**(9), 1971. DOI: 10.1021/ol900436f.
31. A. Banina, D.V. Sudarikov, Yu. V. Krymskaya, L.L. Frolova, A.V. Kuchin
Chem. Nat. Compd., 2015, **51**(2), 261. DOI: 10.1007/s10600-015-1257-0.
32. G. Zweifel, C.C. Whitney
J. Org. Chem., 1966, **31**(12), 4178. DOI: 10.1021/jo01350a071.
33. P.A. Baguley, J.C. Walton
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1998, №13, 2073. DOI: 10.1039/A802024H.
34. Z. Rafinski, J. Scianowski, A. Wojtczak
Lett. Org. Chem., 2009, **6**(4), 321. DOI: 10.1016/S1570-17809788489846.
35. Y. Chretien-Bessiere, G. Boussac
Bull. Soc. Chim. France, 1967, **12**, 4728.
36. L.A. Paquette, R.J. Ross, Y.J. Shi
J. Org. Chem., 1990, **55**(5), 1589. DOI: 10.1021/jo00292a039.
37. J.-M. Vatele
Tetrahedron Lett., 2006, **47**(5), 715. DOI: 10.1016/j.tetlet.2005.11.100.
38. M. Lajunen
Tetrahedron, 1994, **50**(46), 13181. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)89328-5.
39. B. Srinivas, R. Sridhar, K. Surendra, N.S. Krishnaveni, V.P. Kumar, Y.V.D. Nageswar, K.R. Rao
Synth. Commun., 2006, **36**(22), 3455. DOI: 10.1080/00397910600775572.
40. R. Pal, T. Sarkar, Sh. Khasnabis
In ARKIVOC: Part (i): Special Issue "Reviews and Accounts", Ed. V.V. Zhdankin, Switzerland, Zurich, ARKAT-USA Inc., 2012, pp. 570-609.
41. B. Tamami, N. Iranpoor, R. Rezaei
Synth. Commun., 2004, **34**(15), 2789. DOI: 10.1081/SCC-200026220.
42. M. Abbasi
Tetrahedron Lett., 2012, **53**(21), 2608. DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.03.045.
43. Ch. Korupalli, A. Dandapat, D.J.C. Prasad, G. Sekar
Org. Chem. Int., 2011, **2011**. (<http://www.hindawi.com/journals/oci/2011/980765/>). DOI: 10.1155/2011/980765.
44. W. Cocker, D.H. Grayson
Tetrahedron Lett., 1969, **10**(51), 4451. DOI: 10.1016/S0040-4039(01)88721-9.

Окисление монотерпеновых тиолов диоксидом хлора *

С.А. Рубцова, О.М. Лезина, О.Н. Гребенкина, Д.В. Судариков, А.В. Кучин

Окислением терпеновых тиолов диоксидом хлора (ClO_2) получены новые S-, O- и Cl-содержащие терпеноиды. Показано, что реакции изоборнанных тиолов с ClO_2 отличаются от реакций пинановых тиолов высокой стереоселективностью в отношении сульфинильных производных. Выявлено не характерное для тиолов и дисульфидов направление реакции при окислении диизоборнилдисульфида ClO_2 с образованием соответствующего трисульфида.

Ключевые слова: диоксид хлора, монотерпеноиды, гидрокситиол, дисульфид, трисульфид, тиолсульфонат, сульфохлорид.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-03-98807_p_север).

Важным направлением в современном органическом синтезе является поиск новых физиологически активных веществ, в частности путем химической модификации природных соединений. Одним из наиболее интересных и перспективных с точки зрения синтетических возможностей классом природных соединений являются монотерпеноиды. Они обладают бактерицидным, обезболивающим и отхаркивающим действием, благодаря чему используются как антисептики, фунгициды и противовирусные средства. Введение в молекулу терпена функциональных групп, содержащих атомы S, O, N, позволяет расширить спектр биологической активности соединения [1]. Продукты окисления тиолов широко используются в химической и фармацевтической промышленности. Так, тиолсульфинаты и тиолсульфонаты обладают бактерицидной и фунгицидной активностями. Сульфинхлориды и эфиры сульфоновых кислот используют в асимметрическом синтезе. Сульфохлориды применяют в производстве лекарств, красителей, гербицидов и моющих средств. Сульфокислоты обладают противогрибковым действием, а введение сульфогруппы в структуру соединения позволяет повысить растворимость в воде и уменьшить токсичность соединения, сохранив его биологическую активность. Ранее нами была

показана высокая антиоксидантная активность терпеновых тиолов и дисульфидов [2]. Однако функционализация терпеновых соединений известными методами введения сульфогруппы в молекулу осложняется высокой лабильностью терпенового фрагмента. В настоящей работе предложен синтез S-, O-, N-, Cl-содержащих терпеноидов посредством получения соответствующих тиолов и сульфидов и их дальнейшее окисление.

Реагентом-окислителем служил диоксид хлора ClO_2 , который является промышленным продуктом и используется в целлюлозно-бумажной промышленности для отбеливания целлюлозы, а также при очистке и обеззараживании воды. Такие особенности строения молекулы диоксида хлора, как наличие неспаренного электрона и двух реакционных центров (хлор и кислород), придают данному реагенту свойства, отличные от других окислителей. По срав-



РУБЦОВА

Светлана Альбертовна

Институт химии Коми
научного центра УрО РАН



ЛЕЗИНА

Ольга Михайловна

Институт химии Коми
научного центра УрО РАН



ГРЕБЕНКИНА

Ольга Николаевна

Институт химии Коми
научного центра УрО РАН



СУДАРИКОВ

Денис Владимирович

Институт химии Коми
научного центра УрО РАН



КУЧИН

Александр Васильевич

член-корреспондент РАН,
профессор,
директор Института химии
Коми научного центра УрО РАН

нению с хлором и хлорноватистой кислотой диоксид хлора, прежде всего, действует как окислитель, а не как хлорирующий агент. Будучи хорошо растворимым в воде и в органических растворителях, диоксид хлора позволяет проводить реакции в различных средах. В работах [3–6] изучена кинетика окисления диметилсульфоксида, алкан- и арилтиолов, дисульфидов и сульфидов ClO_2 в среде органических растворителей, предложен механизм реакции окисления.

Ранее нами было показано, что диоксид хлора (ClO_2) является хемоселективным окислителем триазол-, тетразол-, имидазол- и бензимидазолсодержащих сульфидов [7, 8], α , β - и γ -кетосульфидов [9] и приводит к соответствующим сульфоксидам без образования хлорированных продуктов. При окислении *N*-замещенных имидазолсодержащих сульфидов ClO_2 выход сульфоксида составляет не более 8%, а основным направлением реакции становится хлорирование гетероциклического фрагмента [10].

Изучены реакции асимметрического окисления оптически активных монотерпенилсульфанилимидазолов диоксидом хлора [11]. Взаимодействие диоксида хлора с незамещенными имидазол- и бензимидазолсодержащими сульфидами с ментановым, карановым и пинановым фрагментами приводит к образованию соответствующих сульфоксидов с выходами 71–91% и стереоселективностью *de* 10–37%. При этом синтез сульфоксидов, содержащих ментильный и каранильный фрагменты, протекает с большей стереоселективностью (*de* 16–30%), чем миртанилсодержащих сульфоксидов (*de* 10–14%). Замена неоментильного фрагмента молекулы субстрата на каранильный приводит, вероятно, к большим стерическим затруднениям для атаки диоксида хлора, в результате чего стереоселективность реакции увеличивается с 16% до 37%. В случае мир-

танилсульфанилимидазолов хиральная индукция удаленных асимметрических центров от прохирального центра оказалась недостаточной для получения высоких диастереомерных избытков сульфоксидов.

Основными продуктами реакций алкан-, арил- и гетерилтиолов с ClO_2 являются дисульфиды [12], тиолсульфонаты [13], сульфониохлориды [14] и сульфоновые кислоты [15, 16]. Было выявлено, что на состав продуктов реакции основное влияние оказывает структура субстрата, а на выходы продуктов – условия реакции, такие как мольное соотношение реагентов, природа растворителя и способ смешения реагентов. Информация по реакциям ClO_2 с монотерпеновыми тиолами до сих пор в литературе отсутствовала.

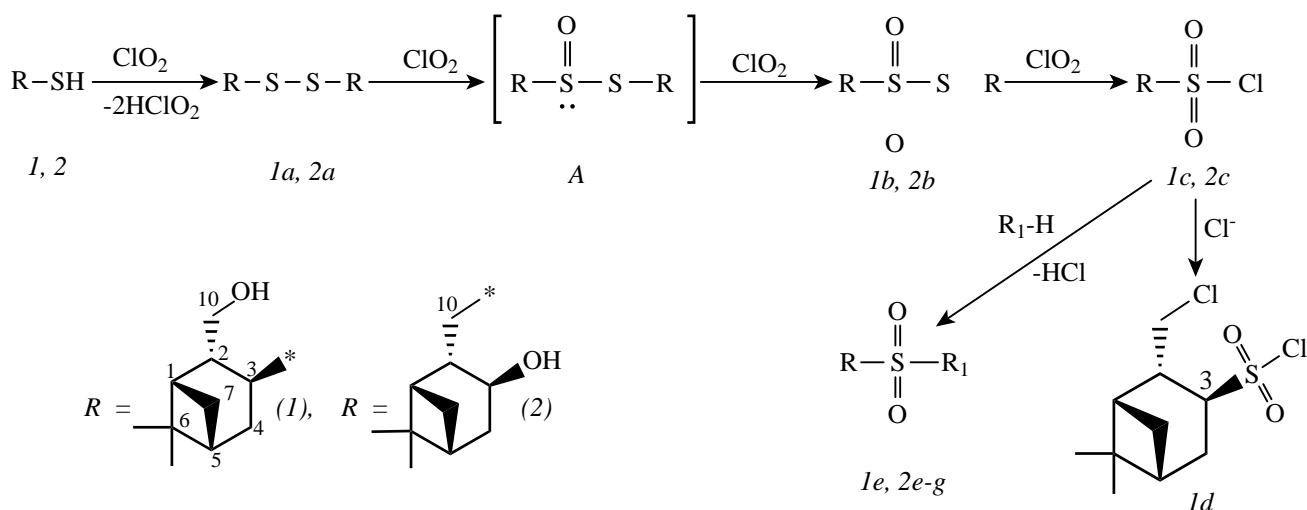
В качестве исходных субстратов в настоящей работе были использованы терпеновые тиолы пинановой и изоборнановой структур, синтезированные нами различными способами: 3-сульфанилмиртанол (1) [17], 10-сульфанилизопинокамфеол (2) [18], изоборнантиол (3) [19] и 10-сульфанилизоборнеол (4) [20]. Для поиска оптимальных условий окисления каждого из тиолов реакции проводили в растворителях с различными свойствами: гексане, дихлорметане, спирте и пиридине. Так как промышленный ClO_2 производится в виде водного раствора, то было исследовано влияние воды на направление реакции. Состав и соотношение продуктов реакции определяли методом спектроскопии ЯМР ^1H по интегральным интенсивностям неперекрывающихся сигналов протонов. Продукты реакции выделяли колоночной хроматографией. Структуры новых соединений доказаны методами ЯМР- и ИК-спектроскопии, подтверждены данными элементного анализа.

При сравнении реакционной способности тиолов пинановой 1, 2 и изоборнановой 3, 4 структур выявлено, что она убывает в ряду: $2 > 1 > 4 > 3$. Так, при окислении данных тиолов ClO_2 в среде гексан–вода в соотношении тиол:окислитель равном 1:0.5 в течение 0.5 ч конверсия тиола 3 составила 26%, тиола 4 – 50%, тиола 1 – 78%, а у тиола 2 – 100%. Это связано, вероятно, с пространственной доступностью атома серы для молекулы окислителя.

Основным продуктом на первой стадии окисления тиолов ClO_2 традиционно являются соответствующие дисульфиды (1*a*–4*a*) (схемы 1, 2 и 4). Максимальные выходы дисульфидов 1*a*, 2*a* и 4*a* достигаются при окислении в гексане или хлороформе эквимолярным количеством ClO_2 и составляют 79–92%. Дисульфид 3*a* с выходом 78% был получен при окислении тиола 3 лишь в более полярном дихлорметане двукратным избытком ClO_2 .

Нами выявлена зависимость направления реакции от структуры терпенового фрагмента. В реакциях дисульфидов пинановых структур 1*a*, 2*a* с ClO_2

Схема 1



$R_1 = -OH$ (1e, 2e); $-OMe$ ¹¹ (2f); $-OCH_2CH_3$ ¹² (2g).

следующим продуктом окисления после дисульфидов обычно являются соответствующие тиолсульфинаты А (схема 1), но общее содержание их в реакционной смеси при окислении в различных условиях не превышает 5%. Тиолсульфинаты А быстро превращаются в тиолсульфонаты 1b и 2b, которые более устойчивы в среде реакции.

Выходы тиолсульфонатов 1b и 2b достигают 46% и 58% соответственно при использовании эквимольных количеств окислителя в среде дихлорметана. Увеличение мольного соотношения реагентов тиол:диоксид хлора до 1:2–3 в среде гексан–вода или в дихлорметане приводит к образованию сульфохлоридов 1c, 2c (до 70% по данным спектроскопии ЯМР). Увеличение времени синтеза до 2 ч в реакциях тиола 1 способствует накоплению продукта 1d. В реакции тиола 2 с ClO₂ замещения OH-группы на Cl не происходит.

Выявлено, что наличие воды в качестве соразтворителя стимулирует разрыв связи S–S в дисульфиде 1a и образование сульфохлорида 1c. Так, при окислении тиола 1 ClO₂ в соотношении 1:0.5 в среде гексана с водой (время реакции 0.5 ч) в реакционной смеси наблюдаются исходный тиол 1, дисульфид 1a и сульфохлорид 1c в соотношении 1:3:1, в то время как реакция в безводных условиях приводит к смеси тиола 1, дисульфида 1a и тиосульфоната 1b в соотношении 1:7.5:1.5 соответственно.

Окисление в аналогичных условиях тиола 2, как упоминалось выше, протекает с полной конверсией субстрата, а присутствие воды в реакционной среде не оказывает существенного влияния. Продуктами реакции в обоих случаях являются дисульфид 2a, тиосульфонат 2b, сульфохлорид 2c и сульфокислота 2e в

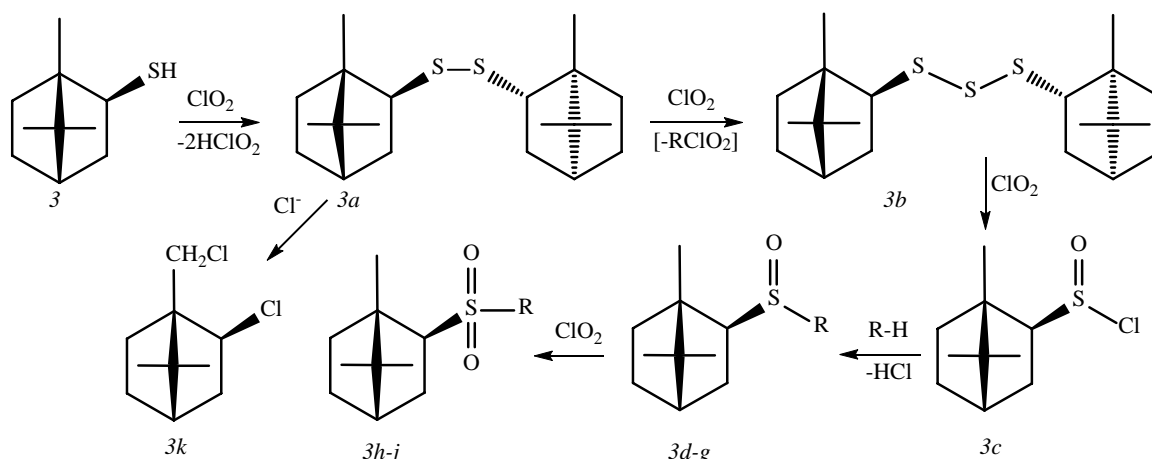
соотношении примерно 5.5:6:1:2 соответственно (схема 1).

При проведении реакций тиола 2 с ClO₂ в спиртовой среде происходит алкоголиз сульфохлоридов с образованием соответствующих эфиров сульфоновых кислот 2f,g. В среде водного пиридина при взаимодействии тиолов 1, 2 с двухкратным количеством ClO₂ количественно образуются сульфокислоты 1e, 2e.

Взаимодействием диизоборнилдисульфида 3a с ClO₂ в различных растворителях нами были получены трисульфид 3b, сульфинхлорид 3c, эфиры сульфоновой 3e–g и сульфоновой кислот 3h,i (схема 2).

В работе выявлено новое направление реакции диизоборнилдисульфида 3a с ClO₂ с образованием трисульфида 3b (выход до 78%), которое не характерно для реакций окисления диалкил- и диарилдисульфидов. Вероятно, образование трисульфида происходит по схеме 3. Известно [21], что на первой стадии окисления дисульфида ClO₂ образуется катион-радикал. Далее он, возможно, фрагментируется до тиольного катиона RS⁺ и радикала RS[•]. Тиолят-катион вступает в реакцию с новой молекулой дисульфида с образованием промежуточного катиона трисульфида Б. Под

Схема 2



$R = N(\text{Et})_2$ (d); OMe (e); OEt (f, h); $\text{O}(i\text{-Bu})$ (g, i); OH (j).

действием нуклеофила, например ClO_2^- , связь R-S в интермедиате *Б* разрывается, образуя трисульфид *3b* и неустойчивое соединение типа ROClO (эфир хлористой кислоты) или другие. Радикалы RS^\bullet димеризуются до новой молекулы дисульфида.

В масс-спектре трисульфида *3b* зарегистрирован пик, соответствующий молекулярному иону m/z 370. Сохранение изоборнановой структуры подтверждено методами двумерной спектроскопии ЯМР: HSQC , COSY , NOESY , HMBC . Данные ИК-спектроскопии и элементного анализа подтверждают состав трисульфида.

Образования тиолсульфинатов, тиолсульфонатов и сульфохлоридов в реакциях дисульфида *3a* с ClO_2 не наблюдалось. Было установлено, что структура изоборнанового фрагмента влияет на стереоселективность сульфинхлорирования с образованием в качестве основного сульфинхлорида *3c*, вероятно, стерически менее затрудненного стереомера (*de* 47%).

Реакция сульфинхлорида *3c* с диэтиламиноом приводит к диастереомерной смеси сульфинамидов *3d* (*de* 10%). Снижение диастереомерной чистоты продукта *3d* дает основания предположить, что

амидирование *3c* протекает преимущественно по $\text{S}_\text{N}1$ -механизму. Невысокие значения *de* (10–18%) получены и для соединений *3e-g*.

Замечено, что образование сульфохлорида в реакциях дисульфида *3c* с ClO_2 не наблюдается, в то время как эфиры сульфеновой кислоты *3f,g* окисляются до сульфозэфиров *3h,i* с высокими выходами (78–85%). Эфиры *3h,i* представляют собой аддукты $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{SO}_2\text{OR}\cdot\text{ROH}$, в которых молекулы связаны, вероятно, сильной водородной связью.

Основным побочным продуктом окисления дисульфида *3a* ClO_2 в органических растворителях является дихлорзамещенное производное *3k*, содержание которого в реакционной смеси по данным спектроскопии ЯМР ^1H может достигать 45%. Хлорирование связано с вступлением в реакцию хлорид-ионов или

Схема 3

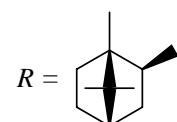
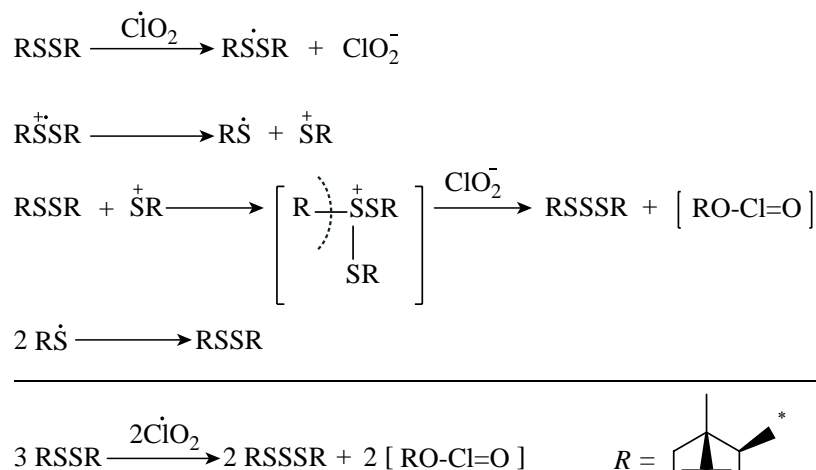
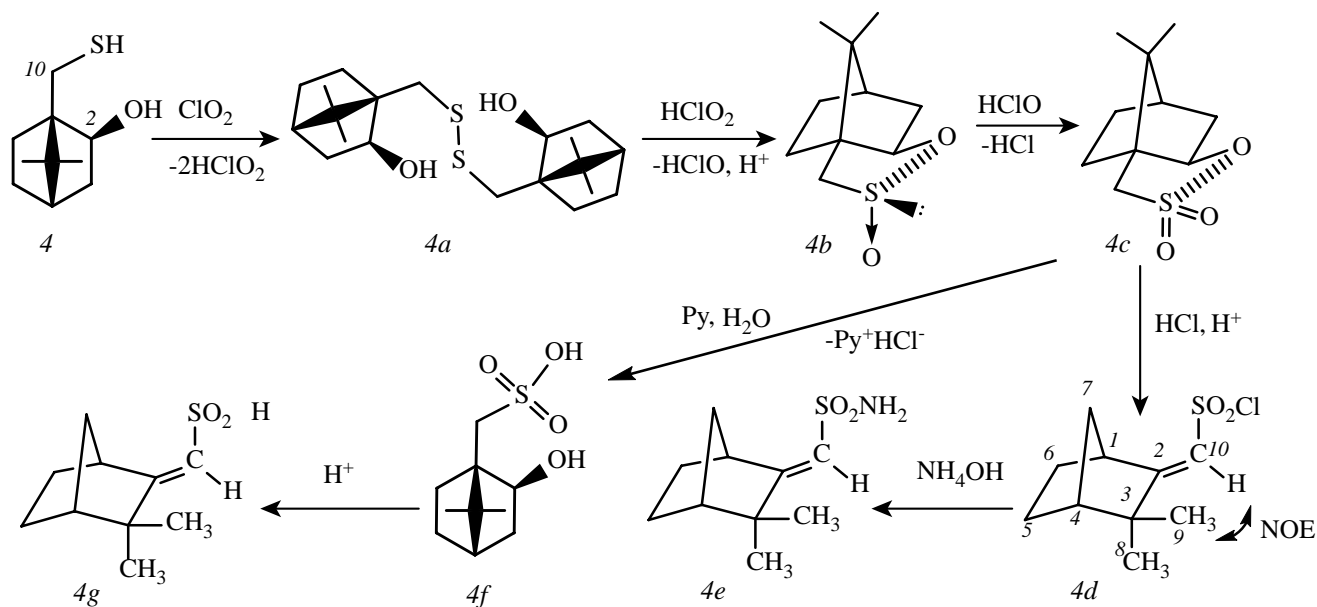


Схема 4



Py – пиридин.

радикалов хлора – форм предельного восстановления окислителя [5, 22]. Этому направлению реакции способствует недостаток ClO₂ в реакционной смеси и большая продолжительность реакции. Присутствие в реакционной смеси пиридина приводит к резкому снижению содержания соединения 3k и увеличению выхода целевых продуктов вследствие связывания им свободных ионов H⁺ и Cl⁻. Так, выход эфиров 3h,i в среде безводного пиридина возрастает с 45–50% до 85% (по данным спектроскопии ЯМР ¹H). При окислении соединения 3a в водных растворах пиридина и спиртов количественно образуется сульфокислота 3j.

При окислении тиола 4 в дихлорметане двухкратным избытком ClO₂ в течение 0.25 ч образуется единственный S_S-диастереомер сультина 4b (de 100%) с содержанием в смеси до 70% (схема 4). В реакциях пинановых гидрокситиолов 1,2 аналогичного замыкания в цикл не наблюдалось. Реализации данного направления реакции, вероятно, способствует экзоположение OH-группы в тиоле 4, в то время как в тиолах 1,2 сульфанильный и гидроксильный заместители находятся по разные стороны кольца (в эндо- и экзо-положениях соответственно). Наряду с 4b образуется сультон 4с.

Увеличение времени реакции в четыре раза приводит к образованию камфенсульfoxлорида 4d с содержанием в смеси до 55%. Камфеновой перегруппировке способствует накопление в реакционной среде свободных протонов. Наличие кросс-пика в двумерном спек-

тре NOESY сульфохлорида 4d между сигналами метильных протонов (1.17 м.д.) и сигналом протона H(10) свидетельствует о E-конфигурации соединения (схема 4). Реакцией 4d с аммиаком был количественно получен соответствующий сульфамид 4e.

В водном пиридине образуется смесь кислот 4f и 4g. Кислота 4f получается в результате гидролиза сультонa 4с, что подтверждено зависимостью накопления 4f от времени реакции. Кислота 4f постепенно перегруппировывается с образованием камфеновой кислоты 4g.

Таким образом, окислением терпеновых гидрокситиолов пинановой и изоборнановой структур диоксидом хлора получены новые S-, O-, N- и Cl-содержащие терпеноиды. Выявлены направления реакций терпеновых тиолов с диоксидом хлора и их зависимость от структуры субстрата. Показано, что реакции изоборнановых тиолов с ClO₂ отличаются от реакций пинановых тиолов высокой стереоселективностью в отношении сульфанильных производных. Это связано с наличием стерических факторов со

стороны изоборнанных фрагментов, обуславливающих координацию окислителя преимущественно с одной стороны молекулы. В результате реакции диизоборнилдисульфида с ClO_2 впервые получен соответствующий трисульфид. Для изоборнанонового гидрокситиола характерно замыкание цикла с образованием единственного диастереомера соответствующего сульфина. Образование тиолсульфонатов пинановой

структуры говорит об устойчивости связи S–S в данных соединениях, в то время как аналогичных продуктов с изоборнанными фрагментами не образуется. Выявлено хемоселективное окисление тиолов 1–3 в пиридине до соответствующих кислот с выходами до 96%. Содержание изоборнаноновой гидроксикислоты не превышает 57%, так как она подвергается перегруппировке с образованием камфенсульфонокислоты.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Химия» Института химии Коми НЦ УрО РАН.

Литература

1. Л.Е. Никитина, Н.П. Артемова, В.А. Старцева *Природные и тиомодифицированные монотерпеноиды: Синтез и биологическая активность тиотерпеноидов*, Германия, «LAP Lambert Academic Publishing», 2012, 176 с.
2. С.В. Пестова, Е.С. Измestьев, О.Г. Шевченко, С.А. Рубцова, А.В. Кучин *Изв. АН. Сер. хим.*, 2015, №3, 723.
3. М.З. Якупов, Н.К. Ляпина, В.В. Шерешовец, У.Б. Имашев *Кинетика и катализ*, 2001, 42(5), 673.
4. М.З. Якупов, В.В. Шерешовец, У.Б. Имашев, Ф.Р. Исмаилов *Изв. АН. Сер. хим.*, 2001, №12, 2244.
5. М.З. Якупов, Н. М.Шишлов, В.В. Шерешовец, У.Б. Имашев *Нефтехимия*, 2001, 41(1), 52.
6. И.М. Кузванов, Р.А. Садыков, Д.В. Судариков, А.В. Кучин *Изв. Коми НЦ УрО РАН*, 2015, №4, 24.
7. И.В. Логинова, К.С. Родыгин, С.А. Рубцова, П.А. Слепухин, А.В. Кучин, В.А. Полукеев *ЖОРХ*, 2011, 47(1), 125.
8. К.С. Родыгин, С.А. Рубцова, А.В. Кучин *ЖОРХ*, 2011, 47(9), 1407.
9. И.В. Логинова, Е.В. Ашихмина, С.А. Рубцова, Ю.В. Крымская, А.В. Кучин *ЖОРХ*, 2008, 44(12), 1799.
10. Ю.В. Крымская, И.В. Логинова, С.А. Рубцова, А.В. Кучин *ЖОРХ*, 2013, 49(2), 215.
11. М.Я. Демакова, Д.В. Судариков, С.А. Рубцова, И.В. Груздев, А.В. Кучин *ЖОРХ*, 2012, 48(11), 1510.
12. О.М. Лезина, С.А. Рубцова, А.В. Кучин *Изв. АН, Сер. хим.*, 2003, №8, 1779.
13. О.М. Лезина, С.А. Рубцова, А.В. Кучин *Пат. РФ*, 2302407, 2007.
14. О.М. Лезина, С.А. Рубцова, А.В. Кучин *ЖОРХ*, 2011, 47(8), 1230.
15. О.М. Лезина, С.А. Рубцова, В.А. Полукеев, А.В. Кучин *ЖОРХ*, 2012, 48(9), 1223.
16. О.М. Лезина, С.А. Рубцова, Д.В. Белых, П.А. Слепухин, А.В. Кучин *ЖОРХ*, 2013, 49(1), 117.
17. R. Kawęcki, Z. Urbańczyk-Lipkowska *Synthesis*, 1996, №5, 603. DOI: 10.1055/s-1996-4258.
18. F.A. Davis, R. Boyd, P. Zhou, N.F. Abdul-Malik, P.J. Carroll *Tetrahedron Lett.*, 1996, 37(19), 3267. DOI: 10.1016/0040-4039(96)00567-9.
19. О.А. Банина, Д.В. Судариков, Ю.В. Крымская, Л.Л. Фролова, А.В. Кучин *Химия природ. соед.*, 2015, 2, 231.
20. Е.С. Измestьев, Д.В. Судариков, С.А. Рубцова, П.А. Слепухин, А.В. Кучин *ЖОРХ*, 2012, 48(11), 1412.
21. K.L. Handoo, S.K. Handoo, K. Gadru, A. Kaul *Tetrahedron Lett.*, 1985, 26(14), 1765. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)98333-3.
22. И.В. Никитин *Химия кислородных соединений галогенов*, Москва, Наука, 1986, 104 с.

Гемокоагуляционная активность серосодержащих бициклических монотерпеноидов *

С.В. Киселев, Л.Е. Никитина, В.А. Старцева, А.В. Бодров, З.Р. Азизова, А.А. Рахматуллина, А.В. Халиуллина, Р.Г. Тураев

Серия сульфидов, сульфоксидов и сульфонов, полученных на основе (-)-β-пинена и (+)-камфена, исследована на гемокоагуляционную активность, которая определена по скорости агрегации тромбоцитов методом G.Vorn и поверхностно-зависимым стандартным коагуляционным тестам. Показано, что все изученные соединения в той или иной степени обладают антиагрегационной и антикоагуляционной активностью. С учетом низкой токсичности тиотерпеноидов полученные соединения представляются перспективными агентами для разработки более эффективных способов хранения препаратов крови, используемых в трансфузиологии, а также для создания потенциального лекарственного средства для лечения и профилактики тромбофилии.

Ключевые слова: камфены, β-пинены, тиотерпеноиды, гемокоагуляционная активность, гемостаз.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 04-04-97511_офи).

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания продолжают оставаться основной причиной смертности во всем мире. Развитие этих заболеваний обусловлено атеросклеротическим поражением артериальных кровеносных сосудов. Вызванные атеросклерозом изменения сосудистой стенки способствуют активации гемостаза, что в конечном итоге приводит к образованию тромба, резко уменьшающему или полностью блокирующему кровоток [1]. Тромбообразование инициируется реорганизацией мембран клеток, контактирующих с кровью, в первую очередь тромбоцитов, что приводит к их адгезии, агре-

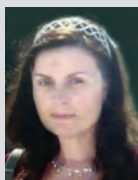
гации и активации коагуляционных факторов свертывания [2]. С целью лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний широко применяются средства, угнетающие активность тромбоцитов. Однако используемые в настоящее время препараты не гарантируют эффективную профилактику и лечение сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, у некоторых пациентов (5.5–60%), получающих, например, ацетилсалициловую кислоту, выявляется резистентность к аспирину [3].



КИСЕЛЕВ
Сергей Васильевич
Казанский государственный
медицинский университет



НИКИТИНА
Лилия Евгеньевна
профессор,
Казанский государственный
медицинский университет



СТАРЦЕВА
Валерия Андреевна
Казанский государственный
медицинский университет



БОДРОВ
Андрей Вениаминович
Казанский государственный
медицинский университет



АЗИЗОВА
Зульфия Рашидовна
ГАУЗ «Городская поликлиника №4
Студенческая», Медицинский центр
«Деревни Универсиады»



РАХМАТУЛЛИНА
Адэля Анваровна
Казанский государственный
медицинский университет



ХАЛИУЛЛИНА
Алия Владимировна
Казанский государственный
медицинский университет



ТУРАЕВ
Рамиль Габдельхакович
Республиканский центр
переливания крови
Минздрава Татарстана

Этим и обусловлен интерес многих ведущих фармацевтических компаний к поиску и созданию лекарственных препаратов нового типа, способных ингибировать активность тромбоцитов. Подавление активации тромбоцитов необходимо и при получении тромбоконцентрата, используемого в трансфузиологии. В настоящее время с этой целью применяют цитрат натрия или гепарин, которые, как показывают результаты исследования функционального состояния тромбоцитов, не в полной мере блокируют их активацию при получении и хранении тромбоконцентрата [4, 5].

Ранее нами при поддержке РФФИ (проект № 04-04-97511_офи) были разработаны синтетические подходы к получению серосодержащих монотерпеноидов различной структуры. Было показано, что полученные соединения обладают противогрибковой, противовоспалительной, антибактериальной и антихеликобактерной активностью [6–10] и характеризуются низкой токсичностью, отсутствием мутагенного и генотоксического эффектов [11]. Перспективность использования монотерпеноидов для лечения сердечно-сосудистых заболеваний показана и в работах зарубежных исследователей [12].

В настоящей работе проведена сравнительная оценка воздействия синтезированных сульфидов, сульфоксидов и сульфонов, полученных на основе (-)- β -пинена и (+)-камфена, на функциональную активность тромбоцитов и коагуляционную способность плазмы крови человека *in vitro*. Предложен молекулярный механизм антикоагуляционного действия тиотерпеноидов с использованием метода молекулярного моделирования.

Материалы и методы

Сульфиды (-)- β -пинена **1** и (+)-камфена **3** (рис. 1) получали реакцией электрофильного присоединения тиолов по двойной связи терпена в присутствии

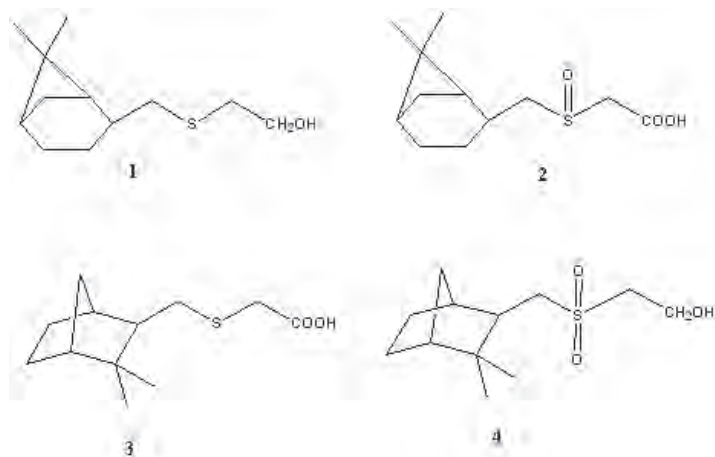


Рис. 1. Структура синтезированных тиотерпеноидов.

хлористого цинка. Сульфоксид пинановой структуры **2** и сульфен камфенового ряда **4** были получены путем окисления соответствующих сульфидов [10, 13].

Для изучения влияния на систему гемостаза синтезированных веществ использовали кровь здоровых доноров и больных ишемической болезнью сердца (ИБС). Кровь получали путем пункции кубитальной вены и стабилизировали 3.8%-ным раствором цитрата натрия. Для оценки гемокоагуляционной активности полученных веществ определяли скорости агрегации тромбоцитов и поверхностно-зависимые стандартные коагуляционные тесты: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ) и тромбиновое время (ТВ). Агрегационную способность тромбоцитов устанавливали на анализаторе «Chrono-Log Corporation» (США) по методу G. Born [14]. Коагуляционную активность определяли на коагулометре «Минилаб-7001» (Россия). Гемокоагуляционную активность синтезированных соединений оценивали показателями спонтанной агрегации тромбоцитов и коагуляционной активности плазмы, полученной из венозной крови больных ИБС и выраженными изменениями в системе гемостаза. С этой целью к 0.45 мл плазмы добавляли 0.05 мл раствора исследуемого соединения и инкубировали полученную смесь в течение 5 мин при 37 °С. В контрольных опытах к плазме добавляли растворитель, используемый для приготовления препарата (30%-ный водный раствор этилового спирта). Индуцированную агрегацию тромбоцитов исследовали на плазме, полученной от здоровых доноров, используя растворы аденозиндифосфата (АДФ) (5 мкмоль/л), адреналина (10 мкмоль/л), коллагена (2 мкг/мл), арахидоновой кислоты (0.5 ммоль/л) и ристомицина (1 мг/мл). Полученные вещества по химической природе не имеют

аналогов среди лекарственных препаратов, поэтому их активность сравнивали с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелем (плавиксом) как наиболее клинически значимыми антиагрегационными средствами. Для этого использовали плазму больных ИБС, получающих соответствующие лекарственные препараты.

Мицеллы додецилсульфата натрия (ДСН) готовили согласно рекомендациям [15]. Коагуляционную активность этих мицелл устанавливали в тесте АЧТВ с использованием раствора (40 ммоль/л) мицелл вместо каолин-кефалиновой смеси.

Результаты исследования обработаны с помощью пакета статистических программ Microsoft Excel. Достоверность различий параметров определяли регрессионным и вариационным анализами по критерию Стьюдента при уровне значимости менее 0.05.

Результаты и их обсуждение

Синтезированные на основе как камфена, так и β-пинена соединения показали высокую антиагрегационную активность: спонтанная скорость и показатель агрегации значительно уменьшались и достигали нормальных значений (не более 0.05 отн.ед./мин и 1.41 отн.ед. соответственно, табл. 1). Кроме того, снижалась коагуляционная активность плазмы: АЧТВ достигало нормальных значений, увеличивалось ПВ ($p < 0.05$). Однако при этом соединения не влияли на активность тромбина (ТВ не менялось). Следовательно, полученные вещества ингибируют активацию как тромбоцитов, так и коагуляционных факторов.

Для изучения влияния соединений на индуцированную агрегацию мы исследовали наиболее гидрофильные тиотерпеноиды 2 и 4. Результаты были сопоставлены с антиагрегантным действием

Таблица 1. Влияние тиотерпеноидов камфенового и пинанового ряда на агрегацию тромбоцитов и показатели коагуляционного гемостаза *in vitro* у пациентов с ИБС

Соединение	Скорость агрегации, отн.ед./мин	Показатель агрегации, отн.ед	АЧТВ, с	ПВ, с	ТВ, с
Без препарата (n = 14)	0.265±0.191	2.01±0.60	24.4±0.4	8.9±0.3	15.5±0.3
Сульфид 1 (n = 14)	0.012±0.022	1.37±0.02	30.1±5.1	11.5±1.4	15.5±0.3
Сульфоксид 2 (n = 19)	0.042±0.011	1.29±0.24	30.6±1.5	11.7±1.1	15.1±1.0
Сульфид 3 (n = 10)	0.012±0.021	1.27±0.02	28.5±2.4	9.9±0.7	15.3±0.4
Сульфид 4 (n = 10)	0.053±0.022	1.41±0.24	27.9±2.2	9.8±0.7	14.9±0.2

Примечание: n – количество измерений; достоверность $p < 0.05$ для всех соединений по сравнению с показателями, полученными в исследованиях без препарата.

ацетилсалициловой кислоты и клопидогреля. Обнаружено, что тиотерпеноиды, в отличие от ацетилсалициловой кислоты и клопидогреля, в более значимой степени ингибировали рецепторную активацию тромбоцитов: практически полностью подавляли индуцированную адреналином, АДФ, коллагеном агрегацию тромбоцитов и снижали воздействие ристомицина (табл. 2).

Таблица 2. Влияние соединений 2 и 4 на индуцированную агрегацию тромбоцитов

Индуктор	Норма, %	Плазма без препарата (n = 19)	Соединение 2 (n = 19)	Соединение 4 (n = 5)	Ацетилсалициловая кислота (n = 5)	Клопидогрель (n = 5)
АДФ	50–75	54.4±1.6	49.3±1.3*	20.1±5.6*	46.3 ± 9.1*	35.1 ± 3.2*
Адреналин	60–71	66.5±3.5	40.33±7.3*	0	36.3 ± 3.1*	51.3 ± 0.7*
Арахидоновая кислота	62–69	65.5±3.5	1.2±0.9*	0	24.6 ± 2.4*	64.6 ± 2.8
Коллаген	50–75	63.3±10.2	9.8±4.1*	10.1±4.2*	38.4 ± 14.6*	33.1 ± 0.7*
Ристомицин	50–75	66.7±6.3	70.7±1.32	20.2±6.4*	48.2 ± 19.1	56.4 ± 9.8

Примечание: n – количество измерений, * – $p < 0.05$ по отношению к показателям, полученным в исследованиях без препарата.

Полученные результаты позволяют предположить, что антикоагуляционные свойства тиотерпеноидов обусловлены их способностью стабилизировать клеточные мембраны за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий с фосфолипидами наружного слоя [16]. Об этом свидетельствуют результаты изменения агрегации тромбоцитов, индуцированной арахидоновой кислотой. Арахидоно-

вая кислота, в отличие от других использованных индукторов, активирует тромбоциты, непосредственно проникая в клетку [17]. Следовательно, потеря этого свойства в присутствии тиотерпеноидов обусловлена изменением проницаемости мембраны тромбоцитов за счет образования дополнительных межмолекулярных взаимодействий между гидрофобными частями молекул и фосфолипидами мембраны.

Возможность взаимодействия производных терпена с фосфолипидами клеточных мембран подтверждают результаты молекулярного динамического моделирования методом классической молекулярной динамики. На *рисунке 2* представлен снимок системы сульфон-ДСН после 10 нс моделирования, из которого видно, что сульфон встроен своей гидрофобной частью внутрь мицеллы ДСН, а его гидрофильная часть – фрагмент $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ – расположен на внешней поверхности мицеллы.

Для установления возможности использования ДСН-мицелл в качестве модельных мембран исследовали взаимодействие камфенового сульфона с модельными ДСН-мицеллами, коагуляционную активность которых оценивали по тесту АЧТВ и сравнивали с активностью плазмы. Добавление ДСН-мицелл к плазме показало их высокие коагуляционные свойства (время образования фибринового сгустка 28.7 с), превышающие активность плазмы (34.6 с). В присутствии сульфона **4** коагуляционная активность ДСН-мицелл значительно снижалась (60.85 с). Эти результаты подтверждают общеизвестное положение о высокой степени коагуляционной активности отрицательно заряженной поверхности, на которой формируются и функционируют коагуляционные комплексы факторов свертывания.

Скорее всего, связывание сульфона **4** с фрагментами ДСН-мицелл понижает возможность функционирования коагуляционных комплексов либо за счет снижения подвижности молекул ДСН в мицелле, либо за счет блокады доступности их углеводородных цепей для связывания с ними факторов свертывания. Эти изменения также могут сказываться и на функционировании рецепторных белков, отвечающих за активацию тромбоцитов, так как их работа может зависеть от свойств фосфолипидного окружения.

Заключение

Из проведенного исследования следует, что гемокоагуляционная активность полученных веществ обусловлена их свойством ингибировать активацию тромбоцитов и подавлять каталитическую способность фосфолипидной поверхности. Учитывая низкую токсичность тиотерпеноидов, их способность подавлять индуцированную и спонтанную агрегацию, серосодержащие соединения терпенового ряда можно рассматривать в качестве перспективных агентов для стабилизации тромбоцитарных препаратов крови, а также в лечении и профилактике тромбофилии различной этиологии.

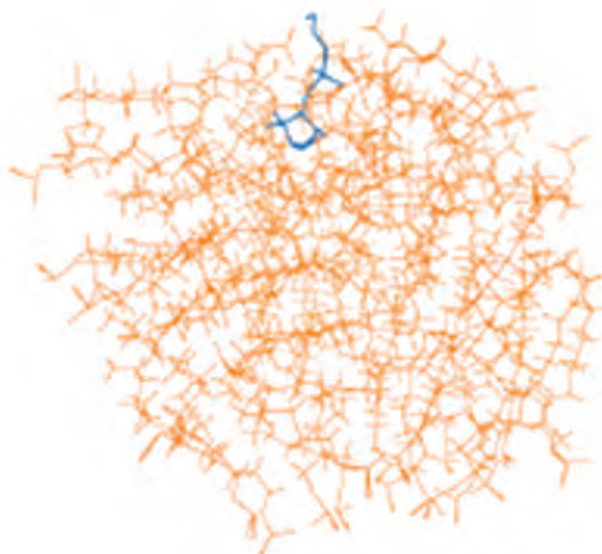


Рис. 2. Данные молекулярного моделирования сульфона **4** с ДСН-мицеллами.

Литература

1. J. Krudysz-Amblo, K.G. Mann, S. Butenas
В *Thrombosis and Inflammation in Acute Coronary Syndromes*, Eds
E. Ercan, G. Ece, Bentham Science Publishers Ltd, 2015, pp. 23-57.
DOI: 10.2174/97816810802911150101.
2. С.В. Киселев, Д.М. Зубаиров, В.Н. Тимербаев
Биомедицинская химия, 2003, 49(5), 443.
3. А.Ю. Gasparyan, T. Watson, G.Y.H. Lip
JACC, 2008, 51(18), 1829. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.11.080.
4. L.V. Iversen, O. Ostergaard, C.T. Nielsen, S. Jacobsen,
N.H. Heegaard
JIM, 2013, 388(1-2), 49. DOI: 10.1016/j.jim.2012.12.001.
5. М.М. Воронцова, Р.Г. Тураев, С.В. Киселев, Л.Е. Никитина,
И.Г. Мустафин, Р.М. Набиуллина
Вестник современной клинической медицины, 2014, 7(5), 62.
6. Л.Е. Никитина, В.А. Старцева, Л.Ю. Дорофеева,
Н.П. Артемова, И.В. Кузнецов, С.А. Лисовская, Н.П. Глушко
Химия природ. соед., 2010, №1, 27.
7. Л.Е. Никитина, В.А. Старцева, Н.П. Артемова, Л.Ю. Дорофеева,
И.В. Кузнецов, С.А. Лисовская, Н.П. Глушко, М.П. Кутырева
Хим.-фарм. Ж., 2011, 45(11), 16.
8. Л.Е. Никитина, И.В. Акулина, Р.С. Гараев, Н.П. Артемова,
Л.Ю. Дорофеева, В.А. Старцева, Е.В. Старцева
Хим.-фарм. Ж., 2012, 46(1), 23.
9. Л.Е. Никитина, В.А. Старцева, И.А. Вакуленко,
И.М. Хисматулина, С.А. Лисовская, Н.П. Глушко, Р.С. Фассахов
Хим.-фарм. Ж., 2009, 43(5), 20.
10. В.В. Гаврилов, В.А. Старцева, Л.Е. Никитина,
О.А. Лодочникова, О.Л. Гнездилов, С.А. Лисовская,
Н.И. Глушко, Е.Н. Климовицкий
Хим.-фарм. Ж., 2010, 44(3), 17.
11. Л.Е. Никитина, Н.П. Артемова, В.А. Старцева
Природные и тиомодифицированные монотерпеноиды, Казань,
Отечество, 2011, 156 с.
12. M.R.V. Santos, F.V. Moreira, B.P. Fraga, D.P. De Sousa,
L.R. Bonjardim, L.J. Quintans-Jr.
Rev. Bras. Farmacogn., 2011, 21(4), 764.
DOI: 10.1590/S0102-695X2011005000119.
13. А.В. Бодров, Л.Е. Никитина, В.А. Старцева,
О.А. Лодочникова, Р.З. Мусин, О.И. Гнездилов
Ж. общей химии, 2013, 83(1), 88.
14. G.V.R. Vorn
Nature, 1962, 194(4832), 927. DOI: 10.1038/194927b0.
15. L. Caillon, O. Lequin, L. Khemtémourian
BBA - Biomembranes, 2013, 1828(9), 2091.
DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.05.014.
16. M. Farzaneh, M. Ahmadzadeh, J. Hadian
Commun. Agric. Appl. Biol. Sci., 2006, 71(3 Pt B), 1327.
17. А.С. Шутикова
Тромбоцитарный гемостаз, Санкт-Петербург, Издательство
Санкт-Петербургского государственного медицинского
университета, 2000, 227 с.

English

Hemocoagulation Activity of Sulfur-Containing Bicyclic Monoterpenoids *

Sergey V. Kiselev –
Kazan State Medical University
49, Butlerov Str., Kazan, 420012,
Tatarstan Republic, Russia
e-mail: svkiselev08@mail.ru

Liliya E. Nikitina –
Professor,
Kazan State Medical University
49, Butlerov Str., Kazan, 420012,
Tatarstan Republic, Russia
e-mail: nikitl@mail.ru

Valeriya A. Startseva –
Kazan State Medical University
49, Butlerov Str., Kazan, 420012,
Tatarstan Republic, Russia
e-mail: valestar@mail.ru

Andrey V. Bodrov –
Kazan State Medical University
49, Butlerov Str., Kazan, 420012,
Tatarstan Republic, Russia
e-mail: avbodroff@gmail.com

Zulfiya R. Azizova –
City Students Polyclinic №4,
Medical Center «Universiade Village»
95, Orenburg Highway, Kazan, 420048,
Tatarstan Republic, Russia
e-mail: g2r27@yandex.ru

Adel A. Rakhmatullina –
Kazan State Medical University
49, Butlerov Str., Kazan, 420012,
Tatarstan Republic, Russia
e-mail: adelina_vau@inbox.ru

Aliya V. Khaliullina –
Kazan State Medical University
49, Butlerov Str., Kazan, 420012,
Tatarstan Republic, Russia
e-mail: alija_syl@mail.ru

Ramil G. Turaev –
Republican Hemotransfusion Center
of Tatarstan Ministry of Health
85, Pobedy Ave., Kazan, 420140,
Tatarstan Republic, Russia
e-mail: Ramil.Turaev@tatar.ru

* The work was financially supported by RFBR (project N 04-04-97511_ofi).

Abstract

The authors investigate the hemocoagulation activity of sulfides, sulfoxides and sulfones compounds derived from (-)- β -pinene and (+)-camphene. The rate of platelet aggregation is determined by G. Born aggregometry procedure and by standard surface-dependent coagulation tests. It was found that all the studied compounds show anticoagulant activity in varying degrees. Taking into consideration thioterpenoids low toxicity, the synthesized compounds are expected to be very promising for development of the more efficient method of blood components storage in transfusiology as well as for creation of medicines for the treatment and / or prevention of thrombophilia.

Keywords: camphene, β -pinene, thioterpenoids, hemocoagulation activity, hemostasis.

References

1. J. Krudysz-Amblo, K.G. Mann, S. Butenas
In *Thrombosis and Inflammation in Acute Coronary Syndromes*, Eds E. Ercan, G. Ece, Bentham Science Publishers Ltd, 2015, pp. 23-57.
DOI: 10.2174/97816810802911150101.
2. S.V. Kiselev, D.M. Zubairov, V.N. Timerbaev
Biomedical Chemistry [Biomeditsinskaya khimiya], 2003, **49**(5), 443.
(in Russian).
3. A.Yu. Gasparyan, T. Watson, G.Y.H. Lip
JACC, 2008, **51**(18), 1829. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.11.080.
4. L.V. Iversen, O. Ostergaard, C.T. Nielsen, S. Jacobsen, N.H. Heegaard
JIM, 2013, **388**(1-2), 49. DOI: 10.1016/j.jim.2012.12.001.
5. M.M. Vorontsova, R.G. Turayev, S.V. Kiselev, L.E. Nikitina, I.G. Mustafin, R.M. Nabiullina
The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine [Vestnik Sovremennoi Klinicheskoi Mediciny], 2014, **7**(5), 62. (in Russian).
6. L.E. Nikitina, V.A. Startseva, L.Yu. Dorofeeva, N.P. Artemova, I.V. Kuznetsov, S.A. Lisovskaya, N.P. Glushko
Chemistry of Natural Compounds, 2010, **46**(1), 28.
DOI: 10.1007/s10600-010-9517-5.
7. L.E. Nikitina, V.A. Startseva, N.P. Artemova, L.Yu. Dorofeeva, I.V. Kuznetsov, S.A. Lisovskaya, N.P. Glushko, M.P. Kutryeva
Pharm. Chem. J., 2012, **45**(11), 664. DOI: 10.1007/s11094-012-0699-y.
8. L.E. Nikitina, I.V. Akulina, R.S. Garaev, N.P. Artemova, L.Yu. Dorofeeva, V.A. Startseva, E.V. Strazieva
Pharm. Chem. J., 2012, **46**(1), 20. DOI: 10.1007/s11094-012-0727-y.
9. L.E. Nikitina, V.A. Startseva, I.A. Vakulenko, I.M. Khismatulina, S.A. Lisovskaya, N.P. Glushko, R.S. Fassakhov
Pharm. Chem. J., 2009, **43**(5), 251. DOI: 10.1007/s11094-009-0282-3.
10. V.V. Gavrilo, V.A. Startseva, L.E. Nikitina, O.A. Lodochnikova, O.I. Gnezdilov, S.A. Lisovskaya, N.I. Glushko, E.N. Klimovitsky
Pharm. Chem. J., 2010, **44**(3), 126. DOI: 10.1007/s11094-010-0413-x.
11. L.E. Nikitina, N.P. Artemova, V.A. Startseva
Natural and Sulphur-Modified Monoterpenoids [Prirodnye i tiomodifitsirovannye monoterpenoidy], Russia, Kazan, Otechestvo Publ., 2011, 156 pp. (in Russian).
12. M.R.V. Santos, F.V. Moreira, B.P. Fraga, D.P. De Sousa, L.R. Bonjardim, L.J. Quintans-Jr.
Rev. Bras. Farmacogn., 2011, **21**(4), 764.
DOI: 10.1590/S0102-695X2011005000119.
13. A.V. Bodrov, L.E. Nikitina, V.A. Startseva, O.A. Lodochnikova, R.Z. Musin, O.I. Gnezdilov
Russ. J. Gen. Chem., 2013, **83**(1), 80. DOI: 10.1134/S1070363213010131.
14. G.V.R. Born
Nature, 1962, **194**(4832), 927. DOI: 10.1038/194927b0.
15. L. Caillon, O. Lequin, L. Khemtémourian
BBA - Biomembranes, 2013, **1828**(9), 2091.
DOI: 10.1016/j.bbmem.2013.05.014.
16. M. Farzaneh, M. Ahmadzadeh, J. Hadian
Commun. Agric. Appl. Biol. Sci., 2006, **71**(3 Pt B), 1327.
17. A.S. Shitikova
Platelets Hemostasis [Trombotsitarnyy khemostaz], Saint-Petersburg, Izdatelstvo Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta, 2000, 227 pp. (in Russian).



**Подписано в печать 25.03.2016. Формат 60 x 90 ¹/₈.
Печ. л. 8.5. Тираж 300 экз.**

Оригинал-макет ЗАО «ИТЦ МОЛНЕТ»
123104, г. Москва, Малый Палашевский пер., д. 6
Тел./факс: (495) 927-01-98,
e-mail: info@molnet.ru
Печать ООО «ЛАЙФ»
105264, г. Москва,
7-я Парковая ул., д. 24, офис 100