

БИЙСКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ (ФИЛИАЛ)
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. И.И. ПОЛЗУНОВА»

На правах рукописи

БАХОЛДИНА Любовь Алексеевна

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

Специальность 02.00.03 – Органическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук,
профессор
А.И. Хлебников

БИЙСК – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Список сокращений и условных обозначений	8
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	9
1.1 Обзор сложных эфиров феруловой кислоты	9
1.2 Получение сложных эфиров феруловой кислоты	13
1.2.1 Химический синтез	13
1.2.2 Выделение производных феруловой кислоты из растений	27
1.3 Противораковая активность сложных эфиров феруловой кислоты	34
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	39
2.1 Методы получения и анализа сложных эфиров феруловой кислоты	40
2.1.1 Синтез сложных эфиров феруловой кислоты	40
2.1.2 Выделение из пшеничных отрубей	48
2.2 Определение цитотоксичности	54
3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	57
3.1 Синтез сложных эфиров феруловой кислоты	58
3.1.1 Получение ацилирующего агента	61
3.1.2 Ацилирование спиртов	62
3.2.3 Ацилирование ксилозы	66
3.1.4 Снятие ацетильной защиты	70
3.1.5 Установление строения	75
3.2 Выделение сложных эфиров феруловой кислоты из пшеничных отрубей	76
3.2.1 Получение и анализ нерастворимых пищевых волокон	76
3.2.2 Ферментативный гидролиз нерастворимых пищевых волокон	80
3.2.3 Фракционирование гидролизата на Амберлите	80
3.2.4 Идентификация сложных эфиров феруловой кислоты	87
3.3 Оценка цитотоксичность сложных эфиров феруловой кислоты	90
ВЫВОДЫ	93
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	95

ВВЕДЕНИЕ

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

Феруловая кислота представляет собой природное соединение, обладающие важными физиологическими и фармакологическими функциями [1,2,3]. Химические, физические и фармакологические свойства этой фенолсодержащей карбоновой кислоты могут быть улучшены путем ее функционализации. Такой подход позволит расширить сферы применения феруловой кислоты в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности.

К настоящему времени имеется значительное количество данных об антиоксидантной и противораковой активности феруловой кислоты и ее производных. В зависимости от природы заместителя (например, алифатические спирты, глицерин) в молекуле феруловой кислоты изменяются липофильные свойства ее производных, что влияет на их биологическую активность в среде, богатой липидами. Также наблюдается повышение антиоксидантной и противораковой активности функциональных производных в сравнении с исходной феруловой кислотой. Большое значение имеет исследование влияния ее производных с олигосахаридными остатками, выделенных из гидролизной смеси клеточных стенок зерновых культур, на канцерогенез кишечника [4,5].

Также большой интерес представляют природные производные феруловой кислоты со стеролами (24-метиленциклоартенил, циклоартенил, кампестерил), которые составляют основную часть (около 80 %) природного антиоксиданта – γ -оризанола [6,7].

Однако, выделение соединений, обладающих биологической активностью, из природных источников сопровождается определенными

трудностями, основными из которых являются невысокое содержание этих веществ в сырье, а также сложность выделения и очистки. Поэтому наиболее эффективным методом получения производных феруловой кислоты и ее аналогов является синтетический.

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

Цели и задачи исследований

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

Для достижения поставленных целей решались следующие задачи:

1. Исследование реакции ацилирования оксиметильных соединений на примере бензилового, фенилэтилового, аллилового, тетрагидрофурурилового спиртов с применением дициклогексилкарбодиимида в качестве конденсирующего агента, оптимизация условий повышающих выход эфиров;

2. Синтез стандарта 5-О-ферулоил-D-ксилофуранозы через 1,2-циклогексиден -D-ксилофуранозу и исследование селективности реакции ацилирования ксилозы без защитных групп в присутствии дициклогексилкарбодиимида;

3. Изучение способов селективного снятия защиты с фенольного гидроксила феруловой кислоты в продуктах ацилирования;

4. Проведение ферментативного гидролиза пшеничных отрубей, выделение производных феруловой кислоты с моно/олигосахаридами путем фракционирования гидролизата и их физико-химический анализ;

5. Определение цитотоксичности производных феруловой кислоты, полученных в ходе химического синтеза и путем выделения из пшеничных отрубей.

Научная новизна работы

- Впервые изучена селективность реакции ацилирования 4-О-ацетилферуловой кислотой незащищённой ксилозы в присутствии дициклогексилкарбодиимида;

- Впервые синтезированы ранее неизвестные тетрагидрофурфуриловый эфир феруловой кислоты и 5-О-ферулоил-D-ксилофураноза, структура которых доказана физико-химическими методами;

- Впервые проведено изучение цитотоксичности на линии клеток НСТ116 (рак толстой кишки человека) производных феруловой кислоты, полученных путем синтеза, и производных, выделенных из пшеничных отрубей.

Практическая значимость

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

- Описан процесс снятия ацетильной защиты с фенольного гидроксила феруловой кислоты, приведены уточнения продолжительности гидролиза в щелочной среде и описаны условия высокоселективного ферментативного метода;

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

выделенных производных феруловой кислоты из пшеничных отрубей Алтайского края;

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

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

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

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав (литературный обзор, материалы и методы исследований, обсуждение результатов), выводов, списка использованных источников (142 наименования из них 119 на иностранных языках). Работа изложена на 114 страницах машинописного текста, содержит 19 таблиц, 20 рисунков и 22 схем.

Список сокращений и условных обозначений

- а.с.с. – абсолютно сухое сырье;
- БСК – бензолсульфокислота;
- ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектором;
- ГПХ – гелепроникающая хроматография;
- ДМАП – 4-диметиламинопиридин;
- ДМСО – диметилсульфоксид;
- ДМФА – диметилформамид;
- ДЦК – NN'-дициклогексилкарбодимид;
- ДЦМ – NN'-дициклогексилмочевина;
- ИК-спектр – инфракрасный спектр;
- ИЖ – ионная жидкость;
- НПВ – нерастворимые пищевые волокна;
- n*-ТСК – *para*-толуолсульфокислота;
- ТГФ – тетрагидрофуран;
- ФВ – фенольные вещества;
- ФК – феруловая кислота;
- ФОС – ферулоилолигосахариды;
- 3-О-ФХ – 3-О-ферулоилхинная кислота;
- 4-О-ФХ – 4-О-ферулоилхинная кислота;
- 5-О-ФХ – 5-О-ферулоилхинная кислота;
- ЯМР – ядерно-магнитный резонанс;
- DRPH – дифенилпикрилгидразил;
- DEAD – диэтилазодикарбоксилат;
- DIAD – диизопропилазодикарбоксилат;
- ММР – металлопротеиназа;
- МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид;
- ТЕА – триэтиламин.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Обзор сложных эфиров феруловой кислоты

Феруловая (4-гидрокси-3-метоксикоричная) кислота является природной фенольной кислотой и содержится в овощах, фруктах, злаковых культурах, а также в некоторых лекарственных травах [8,9,10].

В настоящее время исследован широкий спектр биологической активности феруловой кислоты (ФК). Она обладает уникальными токсикологическими и фармакокинетическими свойствами [4,11,12,13]. ФК считается природным антиоксидантом [14,15,16,17,18] и проявляет самую высокую активность связывания свободных радикалов в ряду полярных соединений: феруловая кислота > кумаровая кислота > пропилгаллат > галловая кислота > аскорбиновая кислота [16]. Отмечают противоаритмическое [19], кардиопротекторное [20], церебропротекторное [21], антимикробное, противовоспалительное, антитромбозное [1,22], противоопухолевое действия [23] ФК. Однако некоторые виды биологической активности ФК при определенных условиях проявляются слабо, что связано с быстрым поглощением ФК в организме [1]. Она поглощается и быстро выводится из организма животных и человека, в течение 5-10 мин может быть обнаружена в плазме, достигая своего пика через 30 мин [4, 11], выводится из организма с мочой в течение 1,5 ч после приема [12]. Свободная ФК быстро и эффективно поглощается в организме человека (до 25%) из томатов, а поглощение после приема зерновых культур значительно ниже из-за этерификации ее с углеводами [24,25].

Несмотря на высокую биологическую активность, применение ФК в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности ограничено из-за низкой липофильности, малой стабильности в различных системах растворителей [26]. После этерификации ФК неполярными соединениями –

такими, как фитостеролы, алифатические спирты, полярность молекулы уменьшается и улучшается растворимость в маслах [27].

Как у природных, так и у синтетических производных ФК в качестве заместителя атома водорода карбоксильной группы встречаются алифатические, имеющие в структуре алициклические, ароматические радикалы, а также углеводные остатки. Обзор литературы по биологической активности природных и синтетических соединений показывает, что в сравнении с исходной ФК ее производные проявляют более высокую биологическую активность. Например, они обладают повышенной антиоксидантной активностью [28,29,30,31], лучше защищают кожу от УФ-излучения, снижают меланогенез в коже [32,33], эффективнее в профилактике диабета и т.д. В некоторых случаях сложные эфиры ФК приобретают другие виды активности, которые ФК не может обеспечить, например, противораковую и противогрибковую активности, могут применяться при лечении болезни Альцгеймера, сердечно-сосудистых заболеваний и др. [4,8,23].

Таким образом, интерес к выделению природных производных ФК и синтезу их аналогов связан с изменением химических, физических и фармакологических свойств, которые увеличивают биологическую активность этих соединений в сравнении с ФК [8].

Сложные эфиры ФК, известные на сегодняшний день, можно условно классифицировать по трем признакам: по происхождению, по заместителю и по проявляемой биологической активности (рисунок 1).

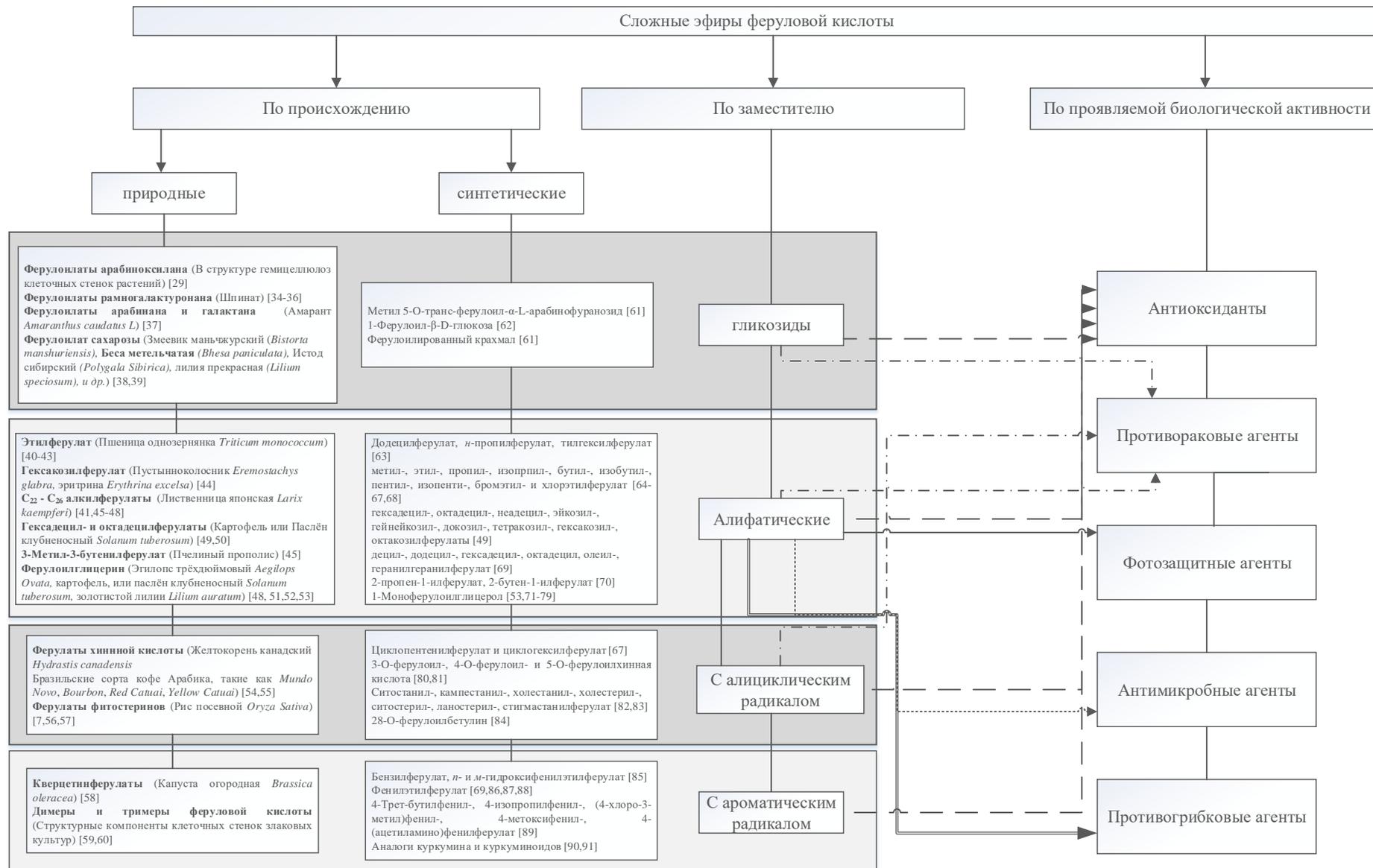


Рисунок 1 – Классификация сложных эфиров феруловой кислоты

Исследования сложных эфиров ФК указывают на возможную связь проявляемой биологической активности и структуры заместителя. Конформационный анализ алифатических (алкилферулаты, глицеринферулаты), алициклических (стеролферулаты) и других эфиров ФК показал, что пространственное строение и расположение боковой цепи в производных определяет доступ и связывание с фосфолипидным бислоем клеток [31,92,93]. Эти результаты свидетельствуют о том, что подобные соединения имеют более высокое сродство к клеточной мембране, чем ФК. Этот факт был подтвержден в работе [46] для мембраны эритроцита. Поэтому такие производные защищают фосфолипидный бислой от окисления. Более высокая липофильность особенно полезна в случае мозговой ткани для обеспечения лучшей транспортировки через гематоэнцефалический барьер [42,43]. Результаты изучения биологической активности синтетических эфиров ФК с наличием ароматических структур показывают высокую антиоксидантную активность (в два раза активнее α -токоферола) [89]. В гомогенном растворе модификация боковой цепи ФК путем этерификации различными фенолами не способствует увеличению антиоксидантной активности ФК через внутримолекулярные взаимодействия между боковой цепью и фенокси-ядром. Поэтому важной структурной особенностью, обеспечивающей высокую склонность к взаимодействию с радикалом дифенилпикрилгидразила (DPPH) является наличие свободной фенольной группы ФК, а не характер ароматического кольца в структуре заместителя сложных эфиров тестируемых в работе [89] соединениях. Для алифатических производных ФК эффективность соединений в повышении цитотоксичности зависит от наличия в структуре галогена и увеличения длины цепи заместителя, а разветвление цепи снижает активность [66].

Получение конъюгатов ФК из природного сырья или синтетическим путем решает проблему времени пребывания и локализации в частях желудочно-кишечного тракта. Так производные феруловой кислоты с

олигосахаридами (ферулоилолигосахариды, ФОС) могут оказывать благотворное влияние на толстую кишку человека. Углеводный фрагмент в этом случае играет роль носителя и защиты для ФК, обеспечивая ее транспорт в толстую кишку человека, тем самым уменьшая риск хронических заболеваний [4,5,94,95]. Ферулоилэстеразы желудочно-кишечного тракта могут только частично подвергать гидролизу эфирные связи между ФК и углеводами в тонкой кишке, основное всасывание происходит в толстой кишке после гидролиза ферментами бактериального происхождения [25]. Таким образом, производные ФК с углеводными фрагментами при длительном пребывании в кишечнике могут быть эффективными в профилактике онкологии.

Встречающиеся в природе сложные эфиры феруловой кислоты имеют низкое содержание, и разнообразие их ограничено. Различные сложные эфиры ФК в ощутимых количествах доступны через их химический и ферментативный синтез. Ферментативный синтез производных ФК, согласно литературным данным, проводится с применением различных бактериальных липаз [68,76,77,78,81,96] и некоторых видов эстераз [79,97].

1.2 Получение сложных эфиров феруловой кислоты

1.2.1 Химический синтез

В литературе довольно часто встречаются ферментативные способы получения сложных эфиров ФК. Например, ферулаты глицерина синтезируют с применением липазы *B* из *Candida antarctica* [76,77,78,98] или ферулоилэстеразы из *Aspergillus oryzae* [79]. Этерификация ФК с хинной и шикимовой кислотами описана с применением липазы *A* (*lipase A Candida antarctica*) [81]. Ферментативные синтезы сложных эфиров ФК представляют собой длительные процессы. Ферменты имеют специфичность к субстрату, поэтому их скрининг также занимает продолжительное время.

Химический синтез эфиров ФК является вполне реализуемым и актуальным, несмотря на многостадийность процесса. В таблицу 1 сведены условия синтеза эфиров ФК, описанных в настоящее время в литературе.

Таблица 1 – Сложные эфиры феруловой кислоты и условия их синтеза

Сложные эфиры ФК	Соединения	Ацилирующий агент		Растворитель	Катализатор	Условия реакции	Выход, %	Литература
		R	R ₁					
1	2	3	4	5	6	7	8	9
с углеводами	метил 5-О-транс-ферулоил- α -L-арабинофуранозид	Ac	Cl	толуол пиридин			56	99
	1-ферулоил- β -D-глюкоза	Ac	Cl	хлороформ пиридин	HCl	t _{комн} , 48 ч	73	62
	ферулоилированный крахмал	Ac	OH	DMCO	H ₂ SO ₄	110 °C 40 мин	64-85	61
с алифатическими радикалами в структуре соединения	<i>n</i> -пропилферулат, этилгексилферулат додecilферулат			толуол (бензол)	<i>n</i> -TCK	80 °C 13 ч		63
	метил-, этил- пропил-, изопропил-, бутил- изобутил-, пентил-, изопентилферулат	H	OH	ацилируе мые спирты	H ₂ SO ₄	T _{кип} , 2,5 ч	46-81	65
	бромэтил- и хлорэтилферулат					T _{кип} , 2,5 ч	91-95	64, 67
						T _{кип} , 2,5 ч	82-85	66
	гексадецил-, октадецил-, неадецил-, эйкозил-, гейнейкозил-, докозил-, тетракозил-, гексакозил-, октакозилферулаты	THP	OH	пиридин	<i>n</i> -TCK ДЦК	50-55 °C 15-24 ч	40-66	49
	децил-, додецил-, гексадецил-, октадецил-, олеил-, геранилгеранилферулат	COOEt	COOEt		DMAPI	T _{кип} , 6 ч	24-42	69
	2-пропен-1-илферулат, 2- бутен-1-илферулат	H	OH	толуол	MeNQ	135°C 24 ч	78	70
	1-Моноферулоилглицерол	H	Me		KOH	180-200 °C 6-14 ч	45	100
		H	OH	ДХМ, ДМФА	DMAPI ДЦК			53
		H	OH	ТГФ	DEAD Ph ₃ P		81	74
				ИЖ			73	

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
с алициклическими радикалами в структуре соединения	Циклопентенилферулат и циклогексилферулат	H	ОН	ацилируемые спирты	H ₂ SO ₄	150-171 °С МВ-излучение 6 мин	90-91	67
	3-О-ферулоил-, 4-О-ферулоил- и 5-О-ферулоилхинная кислота	Ac	Cl	пиридин	ДМАП	t _{комн} , 24 ч	60-86	80 101 102
	ситостанил-, кампестанил-, кампестанол-, холестанил-, холестерил-, ситостерил-, ланостерил-, стигмастанилферулат	Ac	ОН	ДХМ	ДМАП ДЦК	1-18 ч	43-90	82 83
	28-О-ферулоилбетулин	TBDM S	ОН	толуол	изопропоксид титана (VI)	140 °С 9 ч	26	84
с ароматическими радикалами в структуре соединения	бензилферулат, <i>n</i> - и <i>m</i> -гидроксифенилэтилферулат	H	ОН	ТГФ	DIAD Ph ₃ P	0 °С	60	85
	фенилэтилферулат	H	ОН	DMI	Na ₂ CO ₃ KJ	15-25 °С 9-12 ч	70	86
		H	Cl	спирт	–	65 °С 4ч	65,4	87
		Ac	Cl	пиридин толуол	–	t _{комн} , 12 ч		88
	2-(<i>n</i> -метилфенил)этил-, 2-(<i>o</i> -метилфенил)этил-, 2-(<i>n</i> -хлорофенил)этил-, 2-(1-нафтил)этил-, фенилэтилферулат,	EtOOC	OEt	ДХМ	ДМАП	t _{комн} , 6 ч	79	69
	4-трет-бутилфенил-, 4-изопропилфенил-, (4-хлоро-3-метил)фенил-, 4-метоксифенил-, 4-(ацетиламино)фенилферулат	Ac	Cl	ДХМ, ДМФА	TEA	t _{комн} , 45 мин	60-70	89
	аналоги куркумина и куркуминоидов	H	Cl	ТГФ	TEA	30 °С	80-90	90
Ac		ОН					91	

ФК в своей структуре имеет две реакционноспособные ОН группы. Для получения сложных эфиров по карбоксильной группе необходимо защищать фенольный гидроксил в положении 4.

Этерификация чаще всего проходит в условиях кислотного катализа как реакция нуклеофильного замещения. Обычно прибегают к превращению карбоновой кислоты в ацилгалогениды или ангидриды, так как гидроксил карбоновых кислот является плохой уходящей группой и для проведения

этерификации требуются относительно жесткие условия проведения процесса [103]. Для получения сложных эфиров ФК в качестве ацилирующего агента применяются: ФК, 4-О-ацетилферуловая кислота, хлорангидрид ФК, хлорангидрид 4-О-ацетилферуловой кислоты, сложные эфиры ФК (таблица 1).

Кислотный катализ. Реакцию этерификации ФК при кислотном катализе проводят в органическом растворителе, например, толуол, ксилол, хлорбензол или бензол. Количество растворителя особо не ограничивается, обычно используют 5-20 мл на 1 г ФК. Этерификацию можно проводить в избытке или в ацилируемого спирта. Реакцию проводят при 70-140 °С, чаще всего при температуре кипения ($T_{\text{кип}}$) используемого органического растворителя. Реакцию этерификации проводят до полной конверсии ФК, для чего обычно требуется 6-15 часов. Кислотный катализатор используют в количестве от 1/15 до 1/350 молей на моль ФК. В качестве катализатора применяют такие кислоты, как серная, соляная, *n*-ТСК, а также катионообменные смолы [63].

Применение серной кислоты описано для синтеза алкиловых эфиров ФК [65,66] и ферулоилированного крахмала [61]. Выход алкиловых эфиров составляет от 46 до 81 %. Микроволновое излучение (МВ-излучение) может весьма способствовать повышению эффективности этерификации, катализируемой серной кислотой (таблица 2).

Таблица 2 – Выход алкиловых эфиров ФК при обычном нагревании и микроволновом излучении

Эфиры ФК	Выход эфира, %	
	H ₂ SO ₄ , 2,5 ч [65]	МВ-излучение (200Вт), H ₂ SO ₄ , 3–5 мин [64, 67]
метиловый	79	95
этиловый	81	94
пропиловый	77	94
изопропиловый	69	93
бутиловый	73	93
изобутиловый	63	92
пентиловый	58	93
изопентиловый	46	91

Алкиловые эфиры ФК могут быть получены с помощью микроволнового излучения (МВ-излучение) с выходом более 90 % в течение всего 5 минут [64, 67].

Циклопентилферулат и циклогексилферулат были получены в работе [67] при воздействии микроволнового излучения (мощностью 200 Вт), температуре 150 °С и 171 °С в течение 6 минут с выходом 91 и 90 % соответственно. В качестве растворителя использовался ацилируемый спирт, катализатор – серная кислота (схема 1).

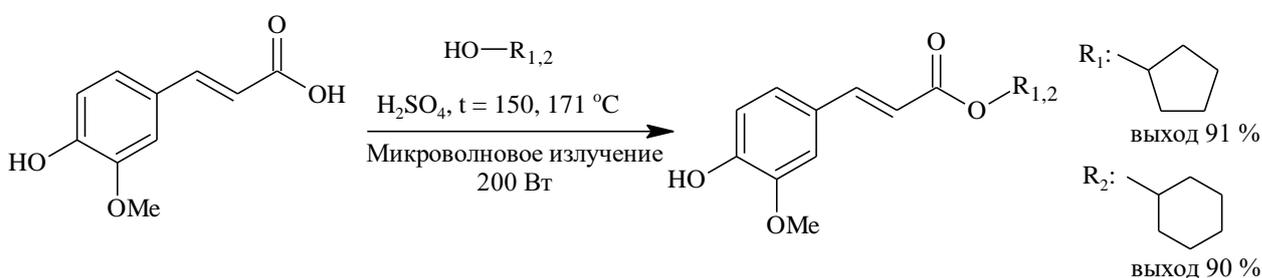


Схема 1

В литературе [62] описано применение хлористого водорода в качестве катализатора при получении 1-ферулоил- β -D-глюкозы. Ацилирование проводили хлорангидридом 4-О-ацетилферуловой кислоты, растворенного в хлороформе, с добавлением пиридина в течение 2 дней при комнатной температуре, выход продукта 73 %.

n-Толуолсульфокислота (*n*-ТСК) является коммерчески доступным, эффективным, экологически чистым катализатором [104].

В работе [63] описано получение 2-этилгексилферулата с применением разных катализаторов и растворителей (таблица 3). Реакцию проводили в течение 13 часов при 80 °С, получали продукт в виде вязкой бесцветной жидкости (при 25 °С).

Таблица 3 – Выход 2-этилгексилферулата в зависимости от применяемого растворителя и катализатора

№ опыта	Растворитель	Катализатор	Выход, %
1	толуол	<i>n</i> -ТСК	85
2	ксилол	H ₂ SO ₄	72
3	хлорбензол	<i>n</i> -ТСК	69
4	толуол	Ионообменная смола	59
5	бензол	<i>n</i> -ТСК	50
6	толуол	HCl (сухой)	39

Самый высокий выход 2-этилгексилферулата достигался в случае применения толуола в качестве растворителя и *n*-толуолсульфокислоты в качестве катализатора. В патенте [63] также приведен синтез *n*-пропилферулата и додецилферулата в бензоле с применением *n*-толуолсульфокислоты, выходы эфиров 64 % и 72 % соответственно.

Применение дициклогексилкарбодиимида (ДЦК). Конденсирующие агенты активируют карбоксильную группу и поэтому широко используются в непосредственном синтезе сложных эфиров [103]. Карбодиимиды, а особенно ДЦК, привлекли внимание как конденсирующие агенты в синтезе сложных эфиров. Характерной особенностью является формальное поглощение ДЦК воды, при этом образуется дициклогексилмочевина (ДЦМ). Однако, при применении ДЦК выход сложного эфира может уменьшаться из-за одновременного образования *N*-ацильных производных как побочных продуктов. Использование пиридина в качестве растворителя способствует получению сложного эфира, но обычно значительных количеств *N*-ацильных производных нельзя избежать. Отмечается, что добавление каталитического количества сильной кислоты к раствору с пиридином значительно увеличивает выход сложного эфира и уменьшает формирование в продукте *N*-ацила. Конденсация фенольных кислот с первичными и вторичными спиртами в пиридине с ДЦК в присутствии каталитического количества *n*-ТСК дает высокие выходы сложного эфира [105]. При таких условиях

синтезированы алкиловые эфиры ФК с выходом 40-66 % (гексадецил-, октадецил-, неодецил-, эйкозил-, гейнейкозил-, докозил-, тетракозил-, гексакозил-, октакозилферулат) [81] (схема 2).

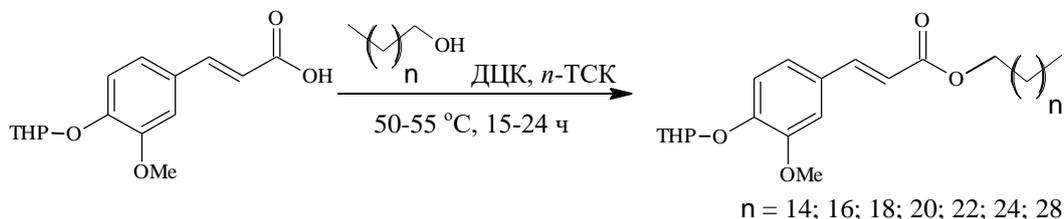


Схема 2

В некоторых случаях применяют комбинацию ДЦК с гидроксисбензотриазолом (НОВт), например, при реакции ФК с полимерами [106].

Катализ 4-диметиламинопиридином (ДМАП). Реакция этерификации ФК может протекать под действием ДМАП, например, при переэтерификации сложного эфира защищенной ФК. Эфиры ФК и жирных спиртов, нафтилэтиловый эфир ФК, фенилэтиловый эфир ФК (схема 3) и его аналоги были получены в присутствии каталитического количества ДМАП при комнатной температуре в течение 6 часов синтеза, выход эфиров от 68 до 80 % [69,88].

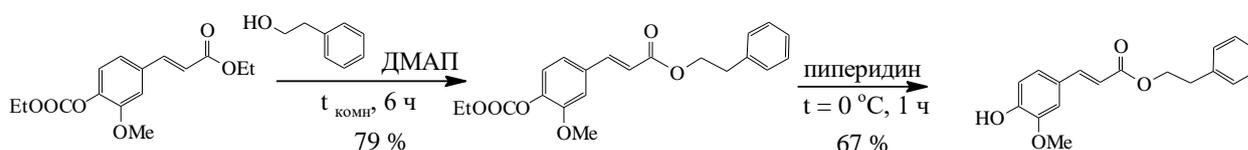
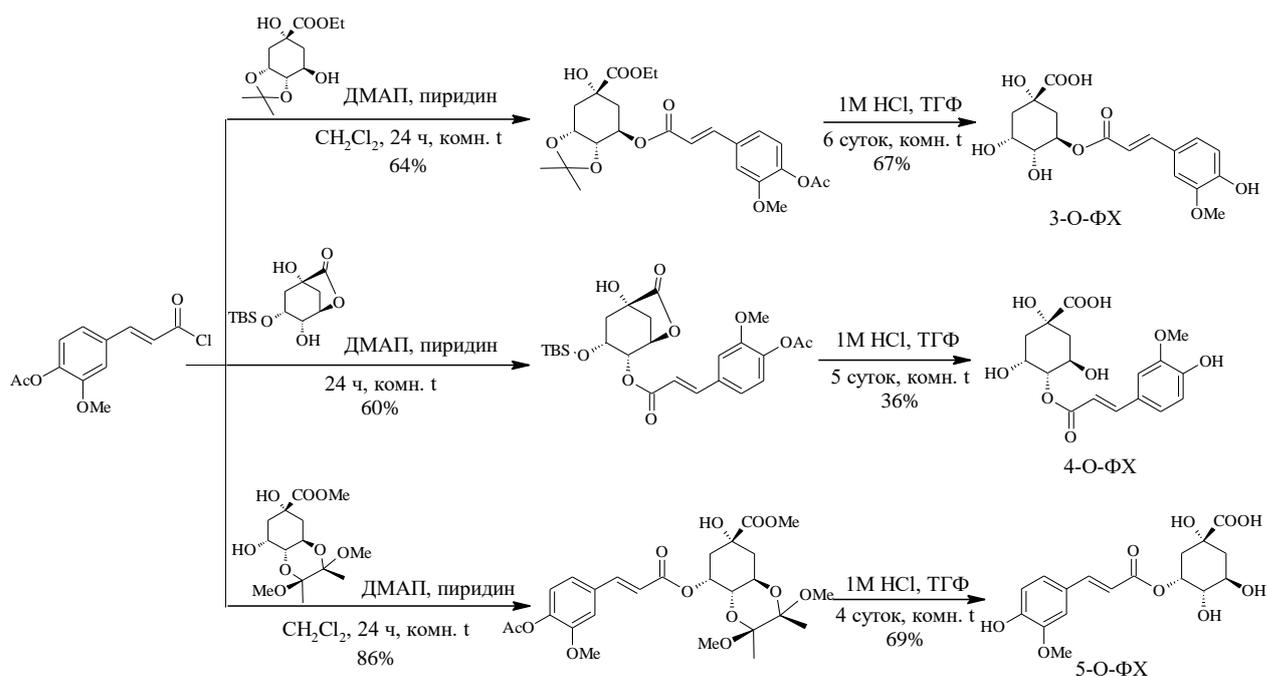


Схема 3

3-О-ферулоилхинная кислота (3-О-ФХ), 4-О-ферулоилхинная кислота (4-О-ФХ) и 5-О-ферулоилхинная кислота (5-О-ФХ) синтезированы в работе [80]. Этерификацию проводили в пиридине с ДМАП в течение 24 часов при комнатной температуре. Ацилирующим агентом являлся хлорангидрид

ацетилферуловой кислоты. Для получения 3-О-ФХ, 4-О-ФХ, 5-О-ФХ проводили ацилирование этилового эфира 4,5-О-изопропилиден-1,3-хинной кислоты, 5-трет-бутилдиметилсилилокси-1,4-дигидроксициклогексан-1,3-карболактона и метилового эфира 3,4-О-(2',3'-диметоксибутан-2',3'-диил)-1,5-дигидроксициклогексанкарбоновой кислоты соответственно (схема 4).



Этерификация Стеглиха. Этерификация Стеглиха представляет собой вариант этерификации с ДЦК в качестве конденсирующего агента и ДМАП в качестве катализатора. Реакция была впервые описана Вольфгангом Стеглихом в 1978 году [107]. Это адаптация более старого метода для образования эфиров с помощью ДЦК и НОВт.

Реакция Стеглиха обычно протекает при комнатной температуре. Подходящим растворителем является дихлорметан. Поскольку реакция протекает легко, могут быть получены сложные эфиры, которые недоступны с помощью других способов.

Механизм реакции описывается следующим образом:

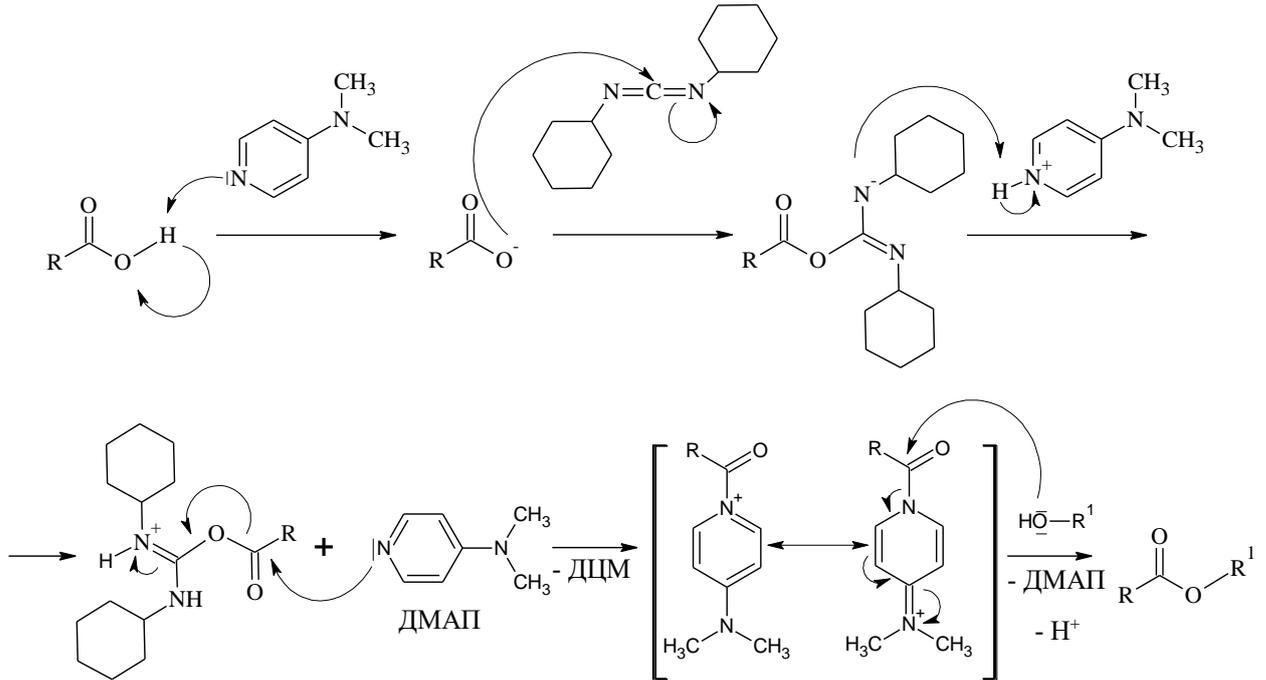
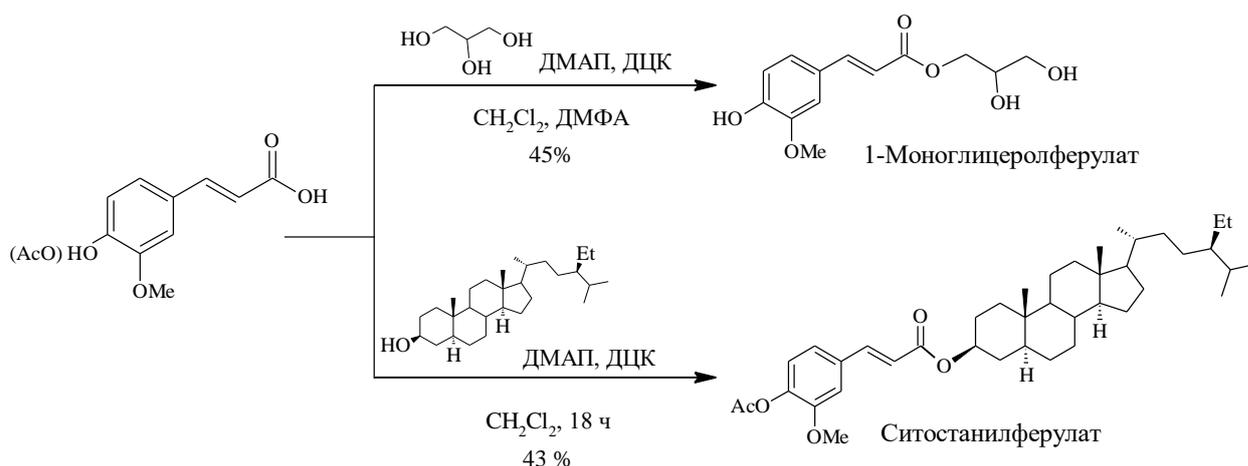


Схема 5

Если этерификация протекает медленно, то происходит побочная реакция, уменьшая конечный выход или усложняя очистку продукта. Эта побочная реакция представляет собой 1,3-перегруппировку *O*-ацильного промежуточного соединения с *N*-ацилмочевинной, продукт которой не может далее реагировать со спиртом. ДМАП подавляет этот побочный процесс, действуя как реагент переноса ацила.

1-Моноферулоилглицерол [53] и ферулаты стероидов [82] могут быть получены по этерификации Стеглиха в дихлорметане (схема 6).



Позже методику [82] улучшили в работе [83] и провели синтез сложных эфиров – производных некоторых фитостеринов – с высокими выходами (77-90 %), сократив продолжительность реакции до 1 часа при комнатной температуре.

Метод Мицунобу. Реакция, открытая в 1967 году Ойо Мицунобу, является важной химической трансформацией, которая позволяет осуществлять стереоселективное включение азидов, сложных эфиров, нитрилов, фталимидов и сульфонамидов с инверсией конфигурации в стереогенный центр. Однако многие методики, основанные на реакции Мицунобу, были разработаны для производных алифатических спиртов и фенольных карбоновых кислот [103].

Реакция Мицунобу представляет собой процесс, который превращает спиртовую группу в различные функциональные группы, такие как сложный эфир, с использованием трифенилфосфина (Ph_3P) и азодикарбоксилата, например, диэтилазодикарбоксилата (DEAD) или диизопропилазодикарбоксилата (DIAD). Азодикарбоксилатные эфиры являются взрывоопасными при сильном нагревании или ударе. Поэтому реакцию Мицунобу проводят в растворе, предпочтительно с небольшими количествами реагентов. DIAD и DEAD коммерчески доступны, но первый является менее дорогостоящим [108].

Механизм реакции Мицунобу довольно сложен. Первоначально трифенилфосфин (схема 7) вызывает нуклеофильную атаку на DEAD (1), продуцирующий бетаиновый интермедиат (3), который депротонирует карбоновую кислоту (4) с образованием ионной пары (5). DEAD сам депротонирует спирт (6), образуя алкоксид, который может образовывать основной оксифосфоний-ион (8). Соотношение и взаимопревращение промежуточных продуктов (8-11) зависят от рКа карбоновой кислоты и полярности растворителя. Хотя присутствует несколько фосфорсодержащих интермедиатов, атака карбоксилатного аниона на промежуточное соединение (8) является единственным продуктивным путем, образующим целевой продукт (12) и трифенилфосфиноксид (13).

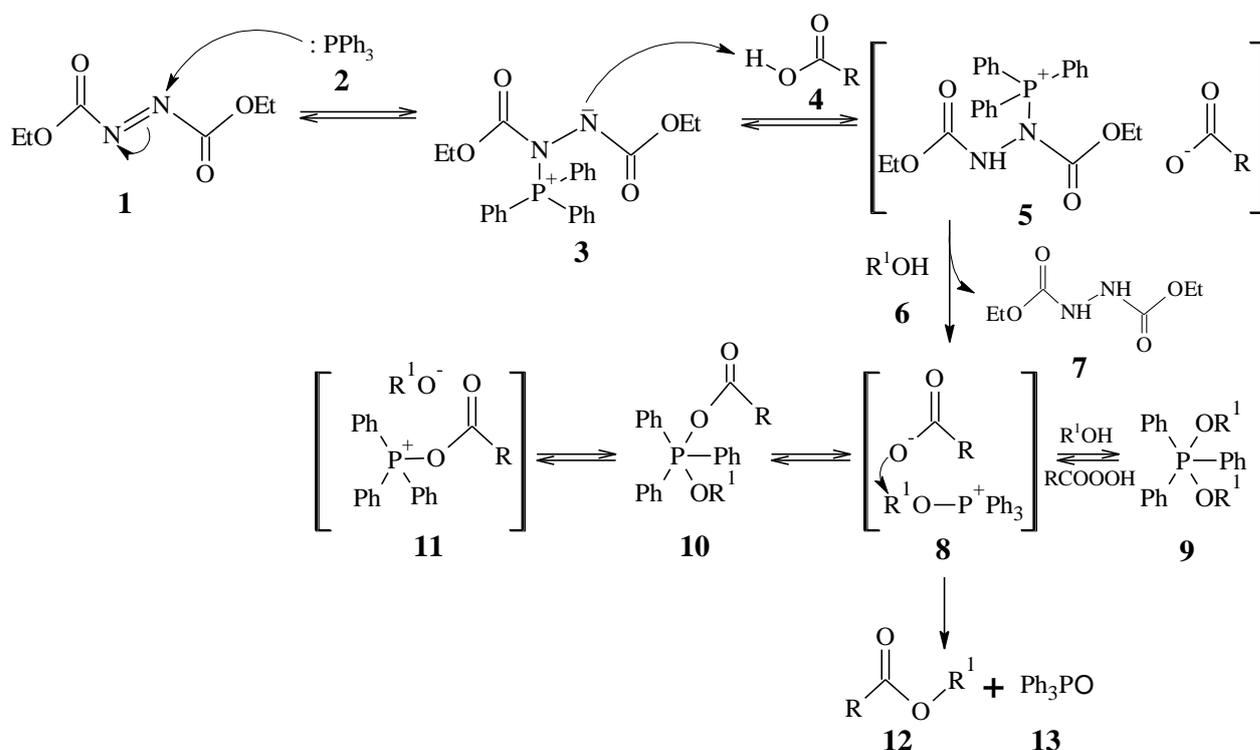


Схема 7

Важно порядок добавления реагентов в реакции Мицунобу. Готовят раствор спирта, трифенилфосфина и карбоновой кислоты в тетрагидрофуране (ТГФ), после охлаждения до 0 °С медленно добавляют раствор DEAD в ТГФ, реакцию проводят при комнатной температуре несколько часов [109].

По методу Мицунобу с высоким выходом (81 %) можно получить 1-моноферулоилглицерол [74]. Бензиловый, *n*-гидроксифенилэтиловый и *m*-гидроксифенилэтиловый эфиры ФК получают с выходом 60-65 % [85] (схема 8).

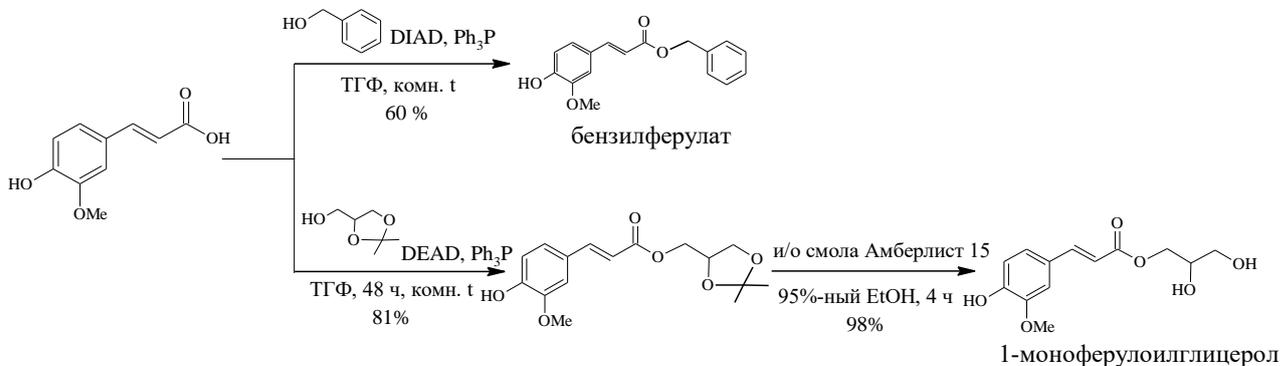


Схема 8

Применение оснований в реакции этерификации. В качестве основания в синтезе сложных эфиров из ацилхлоридов для связывания, образующегося хлороводорода широко используют триэтиламин (TEA) и пиридин.

Ароматические эфиры ФК были синтезированы в работе [89] с применением TEA по схеме 9. Ацетилферуловую кислоту выдерживают в сухом дихлорметане и ДМФА в атмосфере аргона с оксалилхлоридом для получения ацилхлорида. Далее без выделения добавляют соответствующее фенольное производное и TEA. Выход соединений по описанной методике составляет 60-70 %.

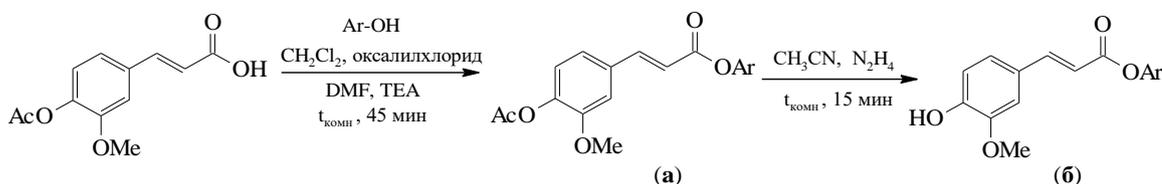


Схема 9

В работе [90] синтезированы и охарактеризованы ряд новых соединений, которые имитируют структуру куркумина и куркуминоидов, условно называемых ретро-куркуминоидами (схема 10).

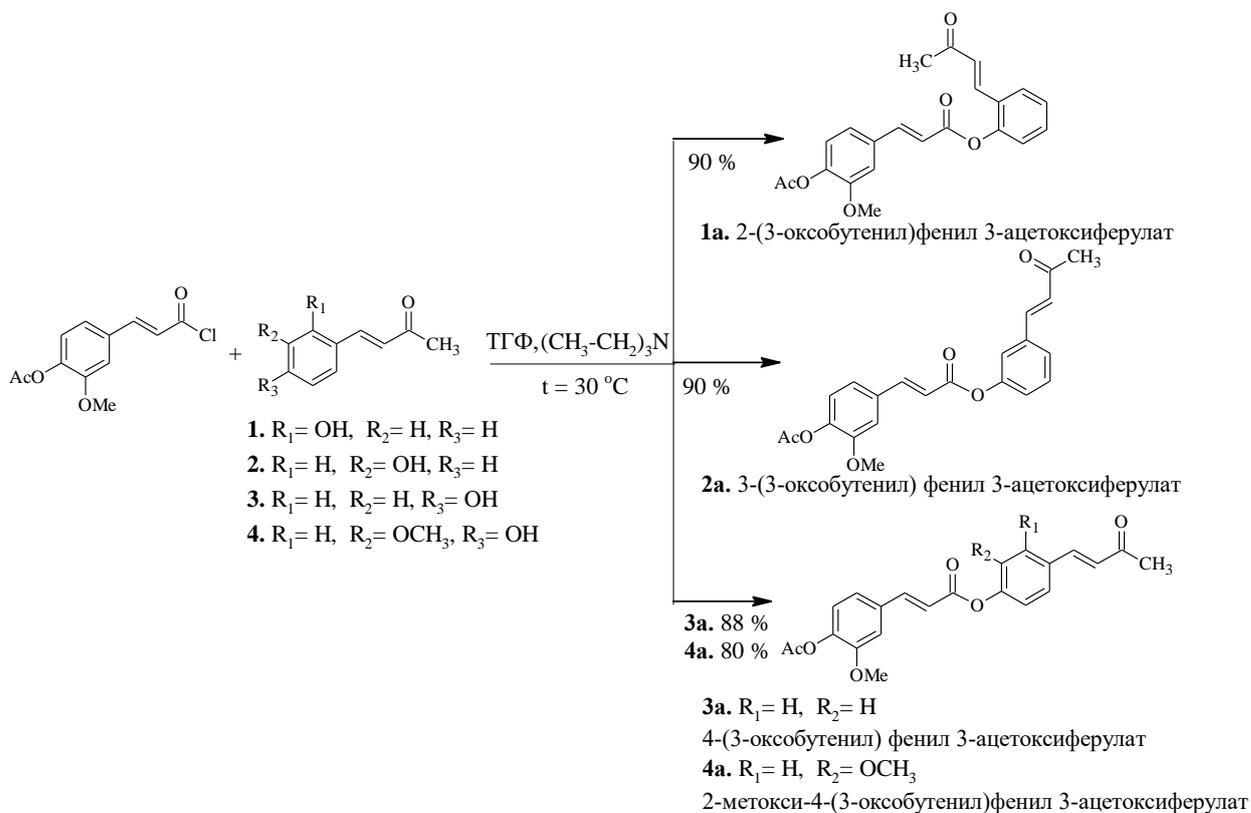


Схема 10

Раствор хлорангирида ФК в сухом ТГФ добавляют к раствору аналога дегидрозингерона (схема 10, соединения 1-3) или к самому дегидрозингерону (соединение 4) при 0 °С, содержащему триэтиламин, реакция протекает при 30 °С с выходом 80-90 %.

Применение пиридина в качестве основания встречается при получении метил 5-О-транс-ферулоил- α -L-арабинофуранозида [99] и фенилэтилового эфира ФК [87,88] (схема 11).

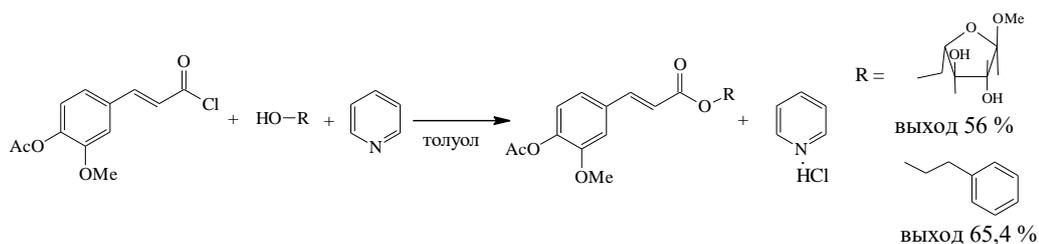


Схема 11

Применение ионной жидкости. Замена растворителя толуола на ионную жидкость, например, 1-бутил-3-метилимидазолитетрафторборат обеспечивает синтез ферулоилглицерина с выходом 98 % в течение 12 ч при 80 °С [73].

В последние годы ионные жидкости (ИЖ), состоящие полностью из органических катионов и органических или неорганических анионов, привлекают большой интерес как перспективные катализаторы и альтернативные растворители для многих реакций. Причиной является их низкая температура плавления, незначительное давление пара, невоспламеняемость, возможность повторного использования, отличная термическая стабильность, низкая коррозионная активность и перестраиваемая полярность [75]. Функционализированные ИЖ проявляют более высокую каталитическую активность, чем нефункционализированные. Функционализированные ИЖ, обработанные SO₃, проявляли высокую каталитическую активность в мягких реакционных условиях. Поэтому SO₃H-функционализированные ИЖ показали хорошие каталитические свойства при этерификации и переэтерификации, вместо традиционно применяемых минеральных кислот или органических твердых кислот. Переэтерификацию этилферулата с глицерином для синтеза ферулоилглицерина в работе [94] проводили с использованием различных функционализированных ИЖ: тозилат 1-бутилсульфонил-3-метилимидазолия ([BSO₃HMIM]TS), тозилат 1-пропилсульфонил-3-метилимидазолия ([PSO₃HMIM]TS), 1-бутилсульфоно-3-метилимидазолий трифторметансульфонат ([BSO₃HMIM]OTF), 1-бутилсульфоно-3-метилимидазолий гидросульфат ([BSO₃HMIM]HSO₄); N-метилимидазолий гидросульфат ([HMIM]HSO₄), 1-бутил-3-метилимидазолийгидроксид ([BMIM]OH), 1-бутил-3-метилимидазотетрахлорид молибсит ([BMIM]FeCl₄) и 1-гексил-3-метилимидазотетрахлорида [BMIM]FeCl₄). С использованием [BSO₃HMIM]TS были достигнуты высокая конверсия этилферулата (98,0 ±

1,5%), выход 1-ферулоил-sn-глицерина ($88,7 \pm 1,1$ %) и селективность реакции ($90,5 \pm 2,1$ %).

1.2.2 Выделение производных феруловой кислоты из растений

ФК является важным биологическим и структурным компонентом клеточных стенок растений, особенно большое ее содержание обнаружено в клеточных стенках зерновых культур [59,60,110,111].

Слои отрубей злаковых культур содержат большинство природных фенольных кислот. Следует отметить, что при переработке пшеницы в отруби переходит часть алейронового слоя, промежуточных слоев (например, нуцеллярный эпидермис и кожура), внутреннего околоплодника (поперечные и трубчатые клетки) и наружного околоплодника. В таблице 4 показано содержание основных фенольных кислот в перечисленных частях зерна на абсолютно сухое сырье (а.с.с.).

Из таблицы видно, что наружные слои зерна пшеницы содержат широкий набор фенольных кислот, в том числе ФК, димеры ФК, синаповую и *n*-кумаровую кислоты. Пшеничные отруби содержат также тримеры ФК, а именно 4-О-8' и 5-5'-дегидротрифферуловые кислоты, наибольшее содержание которых отмечено в околоплоднике [24].

Таблица 4 – Содержание основных фенольных кислот (мг/г а.с.с. зерновки) во внешних частях зерна пшеницы [24]

Ткани пшеницы	ФК	Димер ФК	Тример ФК	<i>n</i> -Кумаровая кислота	Синаповая кислота	Общее количество
Отруби	5,26	1,01	0,24	0,09	0,25	6,85
Алейроновый слой	8,17	1,07	0,11	0,44	0,21	10,00
Промежуточный слой	5,92	0,91	0,07	0,08	0,07	7,05
Околоплодник	8,18	5,12	1,21	0,01	0,04	14,56

Промежуточные слои в основном состоят из арабиноксилана, который характеризуется чрезвычайно низким содержанием арабинозы к ксилозе, и большим количеством очень слабо сшитых мономеров ФК. Алейроновый слой отличается от наружного околоплодника низким содержанием арабинозы к ксилозе, и более низким содержанием димеров и тримеров ФК. Эксперимент с выделением фенольных кислот из алейронового слоя и нуцеллярного эпидерма мягким омылением и омылением более сильной щелочной обработкой показал одинаковое содержание фенольных кислот, что говорит о преобладании в этих частях зерна свободных фенольных кислот. И наоборот, концентрация фенольных кислот, экстрагированных из промежуточного слоя и наружного околоплодника, увеличивалась примерно в два раза при обработке сильной щелочью. Было обнаружено, что тримеры ФК в основном сосредоточены в наружном околоплоднике пшеничных отрубей, в то время как *n*-кумаровая кислота, в основном, присутствует в алейроновом слое [24].

Гемицеллюлозы зерновых культур чаще всего состоят из ксиланов. Как правило, помимо звеньев ксилозы, гемицеллюлозы зерновых культур содержат арабинозу и глюкуроновую кислоту. Принципиальная схема построения арабиноксилана отрубей злаковых культур типична и состоит из поликсилозной цепи, в которой β -(1 \rightarrow 4)-связи объединены остатками ксилопираноз. Остатки L-арабинофуранозы присоединены к поликсилозной цепи по C-2 α -связями (рисунок 2).

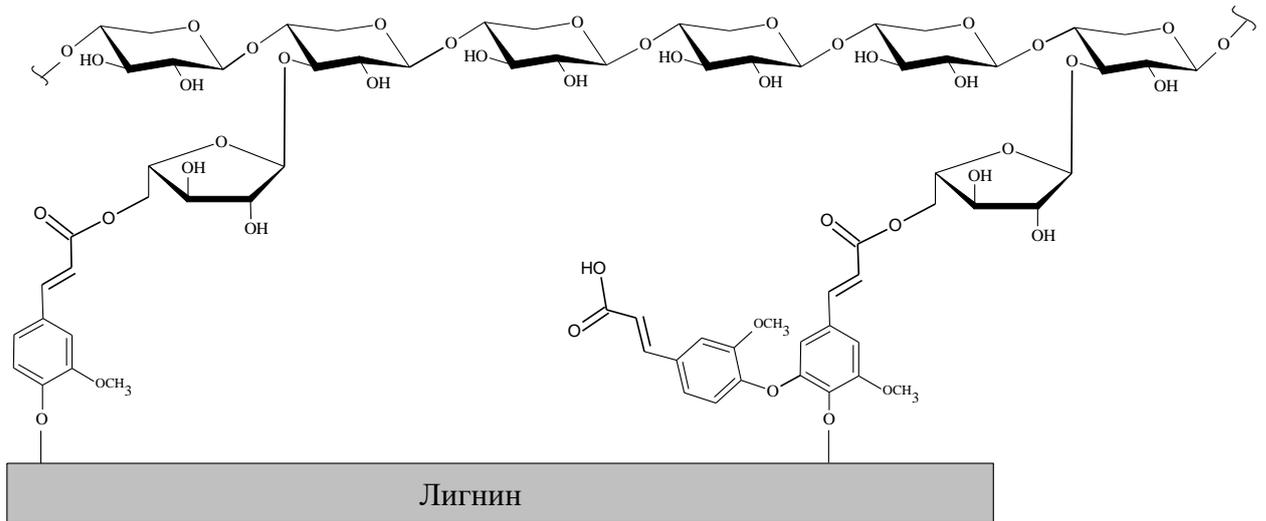


Рисунок 2 – Связь феруловой и 4-О-5'-диферуловой кислот с арабиноксиланом и лигнином

ФК этерифицирована по карбоксильной группе с С5-гидроксилом α -L-арабинофуранозы полимерной цепи арабиноксилана [112]. ФК также может соединяться через простые эфирные связи с лигнином; образовывать димеры, тримеры, тетрамеры между молекулами ФК с помощью окислительной и/или фотохимической димеризации [112].

Образование дегидродимеров ФК влияет как на степень сшивания и стабильность клеточной стенки, так и на растворимость и способность к ферментации этих полисахаридов микрофлорой кишечника человека [23].

Ферулоилированные арабиноксиланы могут быть получены из побочных продуктов пищевой промышленности, например, зерновых отрубей, кукурузных початков и т.д. Выделяемые соединения можно разделить на водорастворимые (10 кДа до 10000 кДа) и водонерастворимые (более 10000 кДа), в зависимости от их молекулярных масс.

Выделение производных ФК и олигосахаридов из клеточных стенок зерновых культур (на примере пшеничных отрубей) происходит в несколько этапов. На первом этапе пшеничные отруби очищают от крахмала и белка путем ферментативного гидролиза с получением нерастворимых пищевых волокон (НПВ).

На втором этапе происходит ферментативный или кислотный гидролиз гемицеллюлоз НПВ пшеничных отрубей. При кислотном гидролизе условия процесса должны тщательно соблюдаться, чтобы достигнуть расщепления гликозидных связей. Для кислотного гидролиза описано, прежде всего, использование трифторуксусной кислоты и щавелевой кислоты. Оптимальные результаты (максимальное расщепление гликозидных связей при минимальном расщеплении сложного эфира) получали при применении 50 мМ трифторуксусной кислоты и времени реакции 2 или 3 ч. при 100 °С или при применении 32 мМ щавелевой кислоты при температуре реакции 100 °С в течение 3 или 4 ч [113].

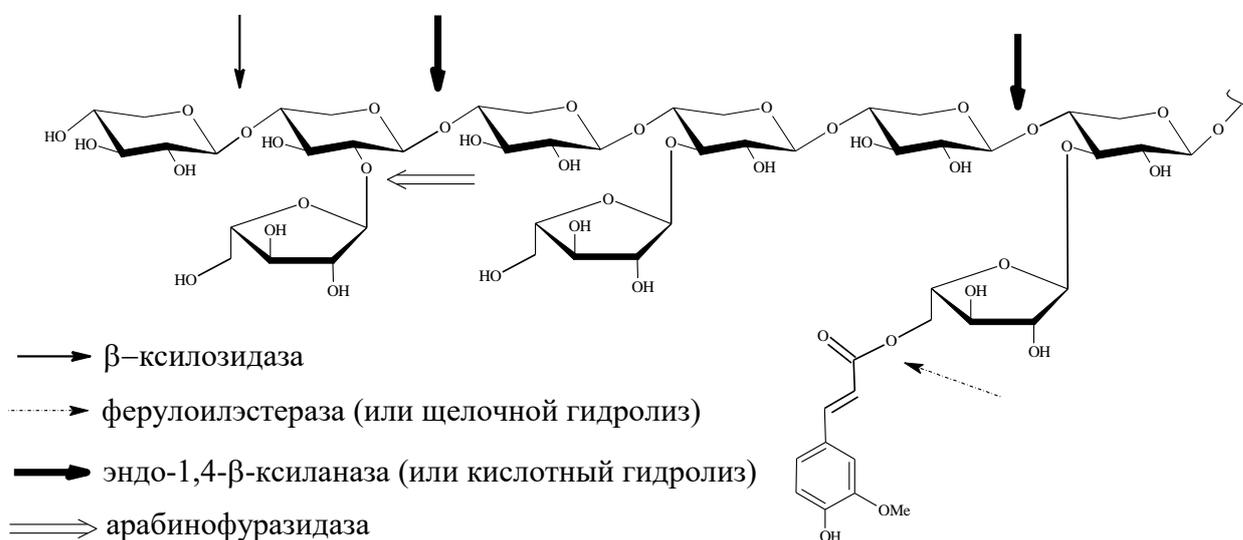


Рисунок 3 – Схема гидролиза цепи арабиноксилана

Ферментативный гидролиз арабиноксилана протекает под действием ксиланазы, при этом ферментный препарат не должен обладать эстеразной активностью, во избежание расщепления сложноэфирной связи углеводов-ФК [113].

Выделение ферулоилолигосахаридов (ФОС) из смеси свободных фенолкарбоновых кислот (преимущественно ФК) и свободных моно/олигосахаридов осуществляется колоночной хроматографией. При этом проблемой становится выбор материала колонок. Для этой цели необходимы

материалы, которые позволяют разделять вещества не только по величине молекулы, но и задерживать их обратимой адсорбцией. При элюировании с водой гидрофобные вещества остаются на колонке и элюируются в процессе нескольких промываний. Для выделения ФОС применяют полистерольный адсорбент Амберлит XAD-2, который адсорбирует, прежде всего, ароматические соединения. При элюировании водой должны смываться моно- и олигосахариды, смесью вода:метанол 50:50 элюируются с колонки ФОС, а метанолом – свободные фенолкарбоновые кислоты (а также прочие более неполярные фенольные соединения).

После разделения на Амберлите фракцию ФОС очищают с помощью гельпроникающей хроматографии (ГПХ). ГПХ является эффективной и очень щадящей разделительной техникой, которая преимущественно применяется для разделения высокомолекулярных материалов по величине молекулы. Обычно в качестве материалов колонок для ГПХ используют полимеры, которые содержат сеть из равномерных пор, в которые могут диффундировать растворимые молекулы, а также молекулы растворителя. Среднее время пребывания в порах зависит от эффективной величины анализируемой молекулы. Молекулы, имеющие размеры больше чем средняя величина пор полимера, исключаются и не задерживаются. Очень маленькие молекулы могут проникать в весь объем пор и будут удержаны дольше всех. Удерживание молекул средней величины в порах зависит от диаметра пор. В пределах молекул средней величины происходит фракционирование, которое состоит в непосредственном соотношении с величиной молекулы и с формой молекулы. В особых случаях, при проблемах разделения, применяются гели, имеющие физическое или химическое сродство к молекулам, не смотря на то что при ГПХ избегают химического или физического взаимодействия между анализируемыми молекулами и гелем-наполнителем.

В литературе описано два вида материала неподвижных фаз для преимущественного разделения ФОС: биогели с различной величиной пор и

Сефадекс LH-20. В случае биогеля речь идет о полиакриламидных гелях, а в случае Сефадекса LH-20 – о модифицированном декстрангеле.

В работе [113] для фракционирования гидролизата был протестирован биогель Р-2 с разделительной областью 100–1800 Да в комбинации с водой в качестве элюента. Предполагалось, что биогель Р-2 должен был разделять молекулы точно по величине, однако наблюдалось лишь незначительное взаимодействие с фенольными веществами, и разделение было недостаточным. На Сефадексе LH-20 должно было проводиться постфракционирование (разделительная область 100–5000 Да). После однократного пропускания этот гель не давал достаточно хорошие результаты разделения. По этой причине хроматография через Сефадекс LH-20 является рутинным фракционированием, этот процесс необходимо интенсифицировать.

Сродство растворимых веществ к определенным фазам геля также может использоваться для разделения. Адсорбцией и действием Ван-дер-Ваальсовых сил между растворенными молекулами и гельфазой могут задерживаться растворенные вещества. В этом случае, благодаря соответствующему выбору элюента, можно полностью подавлять разделение по величине молекулы (отделение без различий величин) или получать комбинацию с регулированием гельхроматографией и сродства к гельфазе для лучшего разделения. Сефадекс LH-20 имеет особенно сильное сродство к группировкам фенола. Благодаря применению органических растворителей, можно достичь чистого гельхроматографического разделения. Комбинированный эффект органических растворителей и воды при их применении дает хорошее разделение гидролизата, однако, этот процесс длительный (продолжительность до 60 ч).

Для идентификации ФОС субстанции подвергают очистке. ГПХ-фракции посредством ВЭЖХ далее фракционируют или очищают. Очистка ФОС посредством ВЭЖХ также представлена в литературе – имеется описание разделения с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой с элюентом

ацетонитрил/вода или метанол/вода (так же как разделение на нормальных фазах) [113]. После очистки и разделения проводят идентификацию соединений и/или оценку биологической активности.

В таблице 5 сведены данные о ранее выделенных и идентифицированных соединениях ФК в клеточных стенках растительного материала (преимущественно зерновых культур).

Таблица 5 – Выявленные структуры соединений феруловой кислоты и моно/олигосахаридов [60,113]

Структура	Номенклатура	Сырье
5- <i>O</i> -(<i>транс</i> -ферулоил)-L-арабиноза	F-Ara	пшеничные отруби кукурузные отруби рожь
<i>O</i> -[5- <i>O</i> -(<i>транс</i> -ферулоил)- α -L-арабинофуранозил]-(1 \rightarrow 3)-D-ксилоза	F-Ara-(1 \rightarrow 3)-Xyl	солома ячменя, листья пшеницы, пшеничные отруби
<i>O</i> - β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 2)-[5- <i>O</i> -(<i>транс</i> -ферулоил)-L-арабиноза]	Xyl-(1 \rightarrow 2)-(F-Ara)	кукурузные отруби, овсяница, рожь
<i>O</i> -[5- <i>O</i> -(<i>транс</i> -ферулоил)- α -L-арабинофуранозил]-(1 \rightarrow 3)- <i>O</i> - β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 4)-D-ксилоза	F-Ara-(1 \rightarrow 3)-Xyl-(1 \rightarrow 4)-Xyl	ячмень (алейроновый слой), ячмень (солома), кукурузные отруби, рожь
<i>O</i> -L-галактопиранозил-(1 \rightarrow 4)- <i>O</i> -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 2)-[5- <i>O</i> -(<i>транс</i> -ферулоил)-L-арабиноза]	Gal-(1 \rightarrow 4)-Xyl-(1 \rightarrow 2)-(FS-Ara)	кукурузные отруби
<i>O</i> - β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 3)- β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -[5- <i>O</i> -(<i>транс</i> -ферулоил)-L-арабиноза]	Xyl-(1 \rightarrow 3)-Xyl-(1 \rightarrow 2)-(FS-Ara)	овсяница
<i>O</i> - β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 4)- <i>O</i> -[5- <i>O</i> -(<i>транс</i> -ферулоил)- α -L-арабинофуранозил-(1 \rightarrow 3)]- <i>O</i> - β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 4)- β -D-ксилоза	Xyl-(1 \rightarrow 4)-[(FS-Ara)-(1 \rightarrow 3)-Xyl-(1 \rightarrow 4)]-Xyl	рожь

1.3 Противораковая активность сложных эфиров феруловой кислоты

Интерес к природным неусваиваемым олигосахаридам, содержащим в своей структуре фенольные фрагменты, связан с их дополнительными функциональными свойствами, которые могут обеспечить лучшую защиту от заболеваний, чем каждая из исходных биомолекул по отдельности. Предполагается, что углеводный фрагмент в молекуле ферулоилолигосахарида одновременно играет роль носителя и защиты для ФК, обеспечивая ее транспорт в толстый кишечник, уменьшая риск хронических заболеваний [4,5,94,95,114].

Исследование влияния ферулоиларабинозы на прогрессирование клеточного цикла в клетках H1299 показало, что с увеличением концентраций наблюдалось значительное снижение фазы G_0/G_1 , то есть клетка быстрее переходила из состояния покоя в первую фазу роста (увеличение клетки и синтез мРНК и белков). При этом наблюдалось значительное повышение популяции клеток за счет ускорения перехода G_2 -фазы (подготовки к делению) к М-фазе (митотическому делению клеток) [115].

Наблюдение, что ферулоиларабиноза вызывает значительное накопление популяции клеток, но не ингибирует пролиферацию клеток H1299, показывает нецитотоксическое свойство соединения. Результаты анализа заживления ран показали, что способность к миграции клеток заметно ингибировалась обработкой ферулоиларабинозой. Аналогичным образом, результаты исследования желатиновой зимографии показали, что действие ферулоиларабинозы значительно уменьшало активность матричной металлопротеиназы-2 (ММП-2) и металлопротеиназы-9 (ММП-9), указывая на то, что опосредуемое ингибирование миграции и инвазии клеток рака легких может быть достигнуто низкоуровневым регулированием деятельности ММП. Исследование дает новое понимание ингибирующей функции

ферулоиларабинозы в миграции клеток в H1299-клетках, что свидетельствует о ее многообещающей роли в химиопрофилактике рака легких [115].

Сложные эфиры ФК также проявляют противораковое действие. Синтезированный 2-метил-1-бутиловый эфир ФК оказывал более угнетающее действие на воспалительные реакции и распространение опухоли кожи, чем ФК. В другом исследовании было синтезировано 23 эфира ФК с числом атомов углерода в заместителе от 1 до 12, и проведен скрининг эффективной химиопрофилактики. Обнаружено, что почти все производные показывают значительное подавление активации вируса Эпштейна-Барра, 2-метил-1-бутилферулат оказался самым мощным химиопрофилактическим агентом [116].

По сравнению с ФК, которая не проявляла цитотоксический эффект в исследовании [117], гексилферулат и ферулоилгексиламид показывают цитотоксичность против трех линий клеток рака молочной железы человека, а именно, MCF-7 (эстроген-чувствительной), MDA-MB-231 (эстроген-нечувствительной) и HS578T (эстроген-нечувствительной).

Все синтезированные в работе [66] сложные эфиры феруловой кислоты проявили цитотоксическую активность с различными значениями IC_{50} против трех клеточных линий: HeLa (опухолевые клетки шейки матки), HT-29 (линия клеток аденокарциномы толстой кишки человека), A-549 (линия клеток рака легкого человека). В качестве стандарта в исследовании использовался метотрексат. Из всех соединений, протестированных против клеточных линий HT-29, β -хлороэтиловый эфир ФК показал максимальную цитотоксичность с величиной IC_{50} 19 мкг/мл (таблица 6). Среди соединений, протестированных на клеточных линиях HeLa, β -хлороэтиловый эфир ФК проявлял максимальную цитотоксичность с величиной IC_{50} 32 мкг/мл. Затем следуют бромэтиловый эфир ФК (IC_{50} = 55 мкг/мл), *n*-бутиловый эфир ФК (IC_{50} = 61 мкг/мл), *n*-пропиловый эфир ФК (IC_{50} = 64 мкг/мл). Другие соединения также были умеренно активными, но с более высокими значениями IC_{50} . Среди соединений, протестированных против клеточных

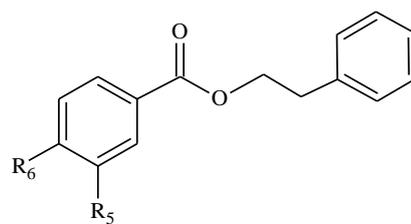
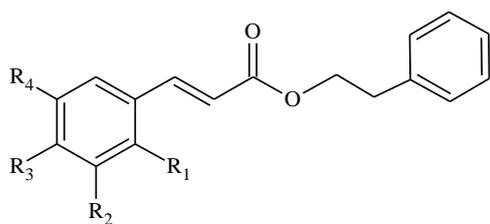
линий А-549, β -бромэтиловый эфир ФК, показал максимальную цитотоксичность с величиной IC_{50} 20 мкг/мл. Затем следуют β -хлорэтиловый эфир ФК (IC_{50} = 43 мкг/мл), *n*-пропиловый эфир ФК (IC_{50} = 60 мкг/мл), *n*-бутиловый эфир ФК (IC_{50} = 83 мкг/мл).

Эффективность соединений показала важность наличия в структуре галогена и увеличения длины цепи заместителя в повышении цитотоксичности. Тем не менее, разветвление цепи уменьшает активность.

Таблица 6 – Цитотоксичность сложных эфиров феруловой кислоты (IC_{50} , мкг/мл) [66]

Эфиры ФК	Линии опухолевых клеток		
	HT-29	HeLa	A-549
метиловый	126±1	92±2	101±2
этиловый	94±2	70±2	92±1
<i>n</i> -пропиловый	75±2	64±2	60±1
изопропиловый	92±2	138±2	не активно
<i>n</i> -бутиловый	74±1	62±2	83±2
изобутиловый	96±1	105±2	не активно
<i>m</i> -бутиловый	не активно	127±2	108±1
<i>n</i> -пентиловый	77±1	69±1	95±1
2-пентиловый	92±2	89±2	98±2
хлорэтиловый	19±2	32±1	43±2
бромэтиловый	50±2	55±2	20±1
контроль (метотрексат)	12±1	9±1	5±1

В работе [86] синтезированы семнадцать аналогов фенилэтилового эфира кофейной кислоты (схема 12), среди которых фенилэтиловый эфир ФК (соединение 14).



№ соед.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	H	H	H	H
2	H	OCH ₃	OCH ₃	H
3	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
4	H	H	OCH ₃	H
5	OCH ₃	OCH ₃	H	H
6	H	H	CH ₃	H
7	OCH ₃	H	H	H
8	H	OCH ₃	H	H
9	OCH ₃	H	H	OCH ₃
10	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
11	H	H	N(CH ₃) ₂	H
12	H	OH	H	H
13	H	H	OH	H
14	H	OCH ₃	OH	H
15	OH	H	H	H

№ соед.	R ₅	R ₆
16	OCH ₃	OH
17	OH	H

Схема 12

Проведена оценка их антипролиферативных эффектов по отношению к клеточным линиям рака печени человека Bel-7402 и рака молочной железы MCF-7. По сравнению с эфирами 1-11, соединения 12, 13, 14, 15 проявляли цитотоксические эффекты. Таким образом, аналоги фенилэтилового эфира кофейной кислоты обладают аналогичной активностью в отношении двух тестируемых клеточных линий. Порядок их значений IC₅₀: контроль <14 <15 <12 <13 <16 <17 ≤ (1-11). Соединение 14 (фенилэтиловый эфир ФК) показало более сильную антипролиферативную активность, чем другие аналоги. Значения IC₅₀ (мкМ) фенилэтилового эфира ФК (41,87; 51,98) были примерно равны таковым для фенилэтилового эфира кофейной кислоты

(34,60; 42,26). Ингибирование двух клеточных линий соединением 12 (с *m*-гидроксифенилом) активнее, чем ингибирование соединением 13 (с *n*-гидроксифенилом), но слабее, чем для соединения 15 (с *o*-гидроксифенилом) (таблица 7).

Таблица 7 – Значения IC₅₀ синтетических аналогов фенилэтилового эфира кофейной кислоты (мкМ) [86]

№ соединения по схеме 12	Линии опухолевых клеток	
	Bel-7402	MCF-7
1-11	>200	>200
12	51,36	67,11
13	55,67	92,87
14	41,87	51,98
15	44,59	58,55
16	80,13	101,60
17	81,26	>200
контроль (фенилэтиловый эфир кофейной кислоты)	34,6	42,26

Анализ зависимости структура-активность продемонстрировал, что наличие α,β -ненасыщенной двойной связи и фенольной гидроксильной группы являются существенными для проявления противоопухолевой активности. Кроме того, цитотоксические свойства этих соединений определялись метоксигруппами в ароматическом кольце. Метоксигруппы могут усиливать антипролиферативную активность при условии, что кольцо имеет соседний гидроксил. Эти результаты являются весьма полезными при скрининге новых противораковых препаратов [86].

Производные феруловой кислоты и фитостеринов, токоферола также проявляют противораковую активность, подавляют развитие рака толстой кишки и предстательной железы [7].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследований являлась феруловая кислота, сложные эфиры ФК, полученные путем синтеза (бензиловый, фенилэтиловый, аллиловый, тетрагидрофурфуриловый и ферулоилксилопираноза), и производные ФК, выделенные из отрубей пшеничных Алтайского края (смесь ферулоилолигосахаридов).

Снятие УФ-спектров и фотоколориметрический анализ проводили на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония). ИК-спектры снимали на ИК-Фурье спектрометре IR-Prestige-21 (Shimadzu, Япония) в диапазоне 400–4000 см⁻¹ в таблетках KBr (анализ проводился на базе МБУ "Бийский бизнес-инкубатор"). При выполнении анализа методом ВЭЖХ использовали УФ-детекцию (прибор: хроматографическая система Waters 2695, УФ-диодно-матричный детектор W 2996; колонка: Symmetry C 18 150×3,9 мм, 5 мкм; подвижная фаза: 9% ACN; объем пробы: 20 мкм; скорость потока: 0,5 мл/мин; температура: 35 °С; длины волн: 280, 325 нм).

Для тонкослойной хроматографии (ТСХ) применяли пластинки Cromatofolhas AL TLC 20×20 cm Silicagel 60 F₂₅₄ (Merk), УФ-визуализация осуществлялась на приборе «Хроматоскоп-М» («Фимет», Россия).

Ферментативные процессы проводили в термостатирующем устройстве Shaker-Incubator ES-20 (Латвия). Методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель 105М» (Люмэкс, Россия, Санкт-Петербург) определяли качественный и количественный анализ.

Ферментные препараты и ферменты: Термамил (Termamyl 120L) (термостабильная α-амилаза, КФ 3.2.1.1; Novozymes, Дания), Максазим NNP (бактериальная нейтральная протеаза, КФ 3.4.24, протеолитическая активность: 700-750±5 % ед ПС/см³; Германия), Брюзайм ВГХ (грибная гемицеллюлаза; активность препарата ксиланазная, КФ 3.2.1.8: 4200±5% ед. КС/см³; β-глюканазная КФ 3.2.1.21: 530±5% ед. β-ГкС/см³; целлюлазная КФ

3.2.1.4: $2100 \pm 5\%$ ед. КМС/см³; Польша), липаза *Amano PS* (иммобилизованная липаза из рода *Pseudomonas cepacia*, Aldrich, Япония).

Исследование цитотоксичности проведено в лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава РФ. Для исследования использовалась протестированная в American Type Culture Collection (США) клеточная линия рака толстой кишки человека (HCT116).

2.1 Методы получения и анализа сложных эфиров феруловой кислоты

2.1.1 Синтез сложных эфиров феруловой кислоты

Все использованные реактивы имели квалификацию «хч». В качестве ацилирующего агента в синтезе производных ФК была использована 4-О-ацетилферуловая кислота.

УФ-спектры регистрировали на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония). ИК спектры снимали на ИК-Фурье спектрометре IR-Prestige-21 (Shimadzu, Япония) в области 400–4000 см⁻¹ в таблетках KBr (анализ проводился на базе МБУ "Бийский бизнес-инкубатор"). Спектры ЯМР ¹H, ¹³C регистрировали на спектрометре Bruker AV300 (рабочие частоты 300 и 75 МГц соответственно), внутренний стандарт – Me₄Si.

Для тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовали пластинки Cromatofolhas AL TLC 20×20 cm Silicagel 60 F₂₅₄ (Merk), УФ-визуализация осуществлялась на приборе «Хроматоскоп-М» («Фимет», Россия), в качестве элюента использована смесь хлороформ/этанол (10:1).

2.1.1.1 Синтез феруловой кислоты (2)

Малоновую кислоту (2,2 моль) растворяли в 500 см³ сухого пиридина в круглодонной колбе на 1000 см³, снабженной обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой, наполненной гранулами КОН. К раствору добавляли 0,12 моль пиперидина и 1 моль ванилина (1). Реакционную смесь выдерживали 7 дней при 22-25 °С, во время реакции происходило выделение СО₂. Затем реакционную смесь нагревали до 40-45 °С в течение 30 часов, охлаждали в ледяной бане и выливали при перемешивании в смесь 600 см³ концентрированной соляной кислоты и 1 кг мелкоизмельченного льда. Феруловая кислота выпадает в осадок, выдерживали еще один час и отфильтровывали под вакуумом, промывали 100 см³ 5 %-ной соляной кислоты, затем дважды ледяной водой порциями по 100 см³ и сушили на воздухе в темном месте. Для очистки продукт перекристаллизовывали из 5 дм³ горячей воды (но не доводя до кипения), стремясь избежать потемнения вещества [118]. Выход феруловой кислоты 65-70 %, температура плавления 172-173 °С.

2.1.1.2 Синтез 4-О-ацетилванилина (3)

Ванилин (1) (0,2 моль), растворяли в 100 см³ уксусного ангидрида в круглодонной колбе на 500 см³ и добавляли 0,5 см³ пиридина. Смесь кипятили с обратным холодильником в течение 1 часа; добавляли 100 см³ воды, и реакционную смесь оставляли охлаждаться до комнатной температуры. Выпадали кристаллы соединения 3, которые фильтровали, промывали несколько раз горячей водой и перекристаллизовывали из этанола [119]. Выход 82 %, температура плавления 75-77 °С.

Получение 4-О-ацетилферуловой кислоты проводили в соответствии с методикой, описанной в разделе 2.1.1.1, вместо соединения 1 используя соединение 3 [119].

2.1.1.3 Синтез 4-О-ацетилферуловой кислоты (4)

Феруловую кислоту (2) (38,8 г, 0,2 моль) добавляли к раствору NaOH (25,4 г, 0,52 моль) в воде (200 см³), и смесь охлаждали до температуры ниже 10 °С. Уксусный ангидрид (25,4 г, 0,25 моль) добавляли к холодному раствору. Раствор перемешивали при 20 °С в течение 10 минут, а затем при комнатной температуре в течение 20 минут. Далее pH раствора доводили до 4-5 путем добавления разбавленной серной кислоты. Полученный белый осадок отфильтровывали и промывали водой. После перекристаллизации из этанола получали бесцветные игольчатые кристаллы. Выход соединения 4 65-70 %, температура плавления 196 °С [120].

2.1.1.4 Синтез 1,2-циклогексиден-D-ксилофуранозы

1,2;3,5-Дициклогексиден-D-ксилофураноза: суспензию из 90 г D-ксилозы и 950 см³ циклогексанона смешивали с 13 см³ концентрированной серной кислоты, перемешивали в течение 24 часов. После этого серную кислоту нейтрализовали 40 г бикарбоната натрия, сульфат натрия отфильтровывали, и избыточный циклогексанон отгоняли под вакуумом. Сильно охлажденный остаток смешивали с метанолом, при этом происходила кристаллизация. Выход сырого продукта 55 %. Сырой продукт перекристаллизовывали из этанола. Выход 45 %, температура плавления 105 °С [121].

1,2-Циклогексиден-D-ксилофураноза (5e): 60 г *1,2;3,5-дициклогексиден-D-ксилофуранозы* промывали метанолом в мерную колбу на 1 литр. Затем добавляли 10 см³ 4,5 %-ного метанольного раствора хлористого водорода, доводили до метки метанолом и встряхивали до полного растворения (примерно 1 час). Выдерживали еще 5 часов, а затем нейтрализовали карбонатом натрия. Осажденный хлорид натрия отфильтровывали, и метанол отгоняли под вакуумом. Кристаллический остаток на фильтре промывали водой до прекращения растворения кристаллов на фильтре. Нерастворимыми на фильтре остаются 16 г

дициклогексиденксилозы. Фильтрат выпаривали под вакуумом и кристаллический осадок при отстаивании с активированным углем перекристаллизовывали из воды [121]. Выход 30 %, температура плавления 90-92 °С. α_D^{25} : -12,3 °. C₁₁H₁₈O₅ (230,1) Выч. 57.41 (С); 7.82 (Н); Найд. 57.11(С); 7.58 (Н).

2.1.1.5 Синтез сложных эфиров 4-О-ацетилферуловой кислоты (6)

Катализатор *n*-ТСК. В коническую колбу, снабженную хлоркальциевой трубкой с гидроксидом натрия, помещали 0,01 моль 4-О-ацетилферуловой кислоты (4), приливали 49 см³ пиридина, к раствору добавляли 0,011 моль ацилируемого субстрата (5) и 0,09 г *n*-ТСК и 0,012 моль ДЦК. Выдерживали 24 часа при комнатной температуре, после чего добавляли 0,01 моль уксусной кислоты, охлаждали до 4 °С и оставляли на ночь. Смесь фильтровали, кристаллы промывали холодным пиридином. К фильтрату добавляли 80 см³ хлороформа и 80 г льда. Смесь подкисляли 5 М HCl. Фазы разделяли. Органическую фазу промывали водой, 5 %-ным водным раствором карбоната натрия и снова водой. Затем сушили над сульфатом натрия и упаривали под вакуумом. Продукт перекристаллизовывали из 96 %-го этилового спирта [105].

Бензил (2*E*)-3-(4-ацетокси-3-метоксифенил)проп-2-еноат (6а) Выход 55%, т.пл. 76–78°C. R_f 0.90. УФ спектр, $\lambda_{\text{макс.}}$, нм: 210, 233, 282. ИК спектр, ν , см⁻¹: 2951 (СН, в AgOCH₃), 1756 и 1707 (C=O), 1634 (C=C). Спектр ЯМР ¹H (DMCO-*d*₆), δ , м.д.: 2.26 с (3H, CH₃CO), 3.82 с (3H, CH₃O), 5.24 с (2H, CH₂), 6.80 д (1H, СН, *J* 16.0 Гц), 7.13 д (1H_{аром.}, *J* 8.1 Гц), 7.30 д (1H_{аром.}, *J* 8.4 Гц), 7.37–7.43м (5H_{аром.}), 7.52 с (1H_{аром.}), 7.71 д (1H, СН, *J* 16.0 Гц). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), δ , м.д.: 20.37, 38.69, 38.96, 39.24, 39.52, 39.79, 40.07, 40.35, 55.99, 65.72, 111.93, 118.14, 121.68, 123.22, 128.21, 128.49, 133.00, 136.17, 141.06, 144.28, 151.16, 166.10, 168.39. Выч. 69.94 (С); 5.52 (Н); Найд. 70.22 (С); 5.32 (Н).

2-Фенилэтил (2E)-3-(4-ацетокси-3-метоксифенил)проп-2-еноат (6b).

Выход 45%, т.пл. 108–110°C. R_f 0.88. УФ спектр, $\lambda_{\text{макс.}}$, нм: 210, 282. ИК спектр, ν , см^{-1} : 2957 (СН, в AgOCH_3), 1759 и 1719 (C=O); 1639 (C=C). Спектр ЯМР ^1H ($\text{DMCO-}d_6$), δ , м.д.: 2.26 с (3H, CH_3CO), 2.95 т (2H, CH_2 , J 13.5 Гц), 3.82 с (3H, CH_3O), 4.38 т (2H, CH_2 , J 13.2 Гц), 6.69 д (1H, СН, J 16.0 Гц), 7.12 д (1H_{аром.}, J 8.1 Гц), 7.27 д (1H_{аром.}, J 8,4 Гц), 7.30–7.22 м (5H_{аром.}), 7.52 с (1H_{аром.}), 7.64 д (1H, СН, J 16.0 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 20.40, 34.44, 38.69, 38.97, 39.24, 39.52, 39.80, 40.08, 40.35, 56.03, 64.61, 111.89, 118.22, 121.71, 123.23, 126.43, 128.43, 128.88, 132.99, 137.99, 141.05, 144.07, 151.19, 166.22, 168.41. Выч. 70.59 (С); 5.88 (H); Найд. 70.49 (С); 5.62 (H).

Проп-2-ен-1-ил (2E)-3-(4-ацетокси-3-метоксифенил)проп-2-еноат (6c).

Выход 42%, т.пл. 60–62°C. R_f 0.89. УФ спектр, $\lambda_{\text{макс.}}$, нм: 233, 282. ИК спектр, ν , см^{-1} : 2925 (СН в AgOCH_3), 1764 и 1708 (C=O); 1633 и 1601 (C=C). Спектр ЯМР ^1H ($\text{DMCO-}d_6$), δ , м.д.: 2.27 с (3H, CH_3CO), 3.83 с (3H, CH_3O), 4.69 д (2H, CH_2 , J 5.1 Гц), 5.25 д (1H, CH_2 , J 10.2 Гц), 5.37 д (1H, CH_2 , J 17.1 Гц), 5.99 м (1H, СН), 6.74 д (1H, СН, J 16.2 Гц), 7.12 д (1H_{аром.}, J 8.1 Гц), 7.30 д (1H_{аром.}, J 8.1 Гц), 7.68 д (1H, СН, J 16.2 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 20.38, 38.69, 38.96, 39.24, 39.51, 39.79, 40.06, 40.34, 56.00, 64.59, 111.96, 117.95, 118.07, 124.63, 123.23, 132.78, 133.00, 141.05, 144.20, 151.17, 165.88, 168.40. Выч. 65.22 (С); 5.80 (H); Найд. 64.92 (С); 5.72 (H).

(Оксолан-2-ил)метил (2E)-3-(4-О-ацетокси-3-метоксифенил)проп-2-еноат (6d).

Выход 45%, т.пл. 106–108°C. R_f 0.9. УФ спектр, $\lambda_{\text{макс.}}$, нм: 214, 281. ИК спектр, ν , см^{-1} : 2950 (СН в AgOCH_3), 1760 и 1705 (C=O), 1633 (C=C). Спектр ЯМР ^1H ($\text{DMCO-}d_6$), δ , м.д.: 1.92 м (4H, CH_2), 2.26 с (3H, CH_3CO), 3.66 т (2H, CH_2 , J 21.0 Гц), 3.83 с (3H, CH_3O); 4.13 м (3H, СН, CH_2 , J 26.7 Гц), 6.73 д (1H, СН, J 16.0 Гц), 7.12 д (1H_{аром.}, J 8.1 Гц), 7.30 д (1H_{аром.}, J 8.1 Гц), 7.53 с (1H_{аром.}), 7.65 д (1H, СН, J 16.0 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 20.40, 25.23, 27.54, 38.70, 38.97, 39.25, 39.53, 39.80, 40.08, 40.35, 56.74, 66.06, 67.46, 75.93, 111.89, 118.18, 121.71, 123.23, 133.01, 141.04; 144.13; 151.17, 166.19, 168.41. Выч. 63.75 (С); 6.25 (H); Найд. 64.07 (С); 6.02 (H).

5-[(4-О-ацетокси-3-метоксифенил)проп-2-енил]-1,2-циклогексиден -D-ксилофураноза (5e).

Выход 35 %, т.пл. 140-142°C. R_f 0.6. УФ спектр, $\lambda_{\text{макс.}}$, нм: 226, 286. ИК спектр, ν , см^{-1} : 3429 (ОН), 2945 (СН в ArOCH_3), 1767 и 1699 (C=O), 1630 (C=C), 1508 (C–O–C). Спектр ЯМР ^1H ($\text{DMCO-}d_6$), δ , м.д.: 1.33 м (2H, CH_2), 1.47 м (4H, CH_2), 1.58 м (4H, CH_2), 2.25 с (3H, CH_3CO), 3.82 с (3H, CH_3O); 4.11 м (1H, ОН), 4.24 т (1H, СН, J 27.6 Гц), 4.37 д (1H, СН, J 9.3 Гц) 5.47 д (1H, СН, J 4.8 Гц), 5.90 д (1H, СН, J 3 Гц), 6.77 д (1H, СН, J 16.0 Гц), 7.13 д (1H_{аром.}, J 8.1 Гц), 7,31 д (1H_{аром.}, J 8.1 Гц), 7.55 с (1H_{аром.}), 7.66 д (1H, СН, J 16.0 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ , м.д.: 20.42; 23.28; 23.62; 38.68; 38.96; 39.23; 39.51; 39.79; 40.07; 40.34; 56.05; 73.87; 78.18; 84.57; 104.27; 111.13; 123.24; 133.02; 141.06; 144.28; 151.18; 166.24; 168.42. Выч. 61.60 (С); 6.25 (Н); Найд. 62.22 (С); 6.45 (Н).

1-[(4-О-ацетокси-3-метоксифенил)проп-2-енил]-D-ксилофураноза (6f).

Выход 30 %. УФ спектр, $\lambda_{\text{макс.}}$, нм: 224, 287. ИК спектр, ν , см^{-1} : 3383 (ОН), 2927 (СН в ArOCH_3), 1762 и 1714 (C=O), 1629 (C=C), 1510 (C–O–C). Спектр ЯМР ^1H ($\text{DMCO-}d_6$), δ , м.д.: 2.25 с (3H, CH_3CO), 2.57 м (1H, СН); 3.12 м (1H, СН); 3.75 м (1H, СН), 3.82 с (3H, CH_3O); 3.85 м (2H, CH_2), 4.21 с (1H, ОН-5), 4,55 м (1H, ОН-3), 5.87 с (1H, СН), 6.19 с (1H, ОН-2), 6,55 д (1H, СН, J 12.0 Гц), 7.18 д (1H_{аром.}, J 6.0 Гц), 7.22 с (1H_{аром.}), 7.22 д (1H, СН, J 6.0 Гц), 7.87 д (1H_{аром.}, J 12.0 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C ($\text{DMCO-}d_6$), δ , м.д.: 56.81, 62.22, 74.58, 77.42, 84.69, 99.36, 112.57, 118.12, 121.85, 123.15, 134.12, 145.09, 146.84, 168.51, 170.16. Выч. 55.43 (С); 5.43 (Н); Найд. 55.41 (С); 5.40 (Н).

2.1.1.6 Снятие циклогексиденовой защиты

Для снятия циклогексиденовой защиты 0,002 моль соединения **6e** растворяли в 5 см^3 диоксана, к раствору добавляли 10 см^3 50 %-ной уксусной кислоты, смесь нагревали на кипящей водяной бане 4 ч. Реакционную смесь упаривали в вакууме досуха [122].

5-[(4-О-ацетокси-3-метоксифенил)проп-2-енил]-D-ксилопираноза

(6e). Выход 24 %. R_f 0.4. УФ спектр, $\lambda_{\text{макс.}}$, нм: 225, 281. ИК спектр, ν , см^{-1} : 3430 (ОН), 2948 (СН в ArOCH_3), 1765 и 1701 (C=O), 1631 (C=C), 1509 (C–O–C). Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 1,99 м (1H, СН), 2.30 м (1H, СН), 2.27 с (3H, CH_3CO), 3.17 м (1H, СН); 3.82 с (3H, CH_3O); 3.83 с (1H, ОН-3); 4.11 м (1H, ОН-2), 4,33 м (2H, СН); 4.65 с (1H, ОН-1), 4.85 д (1H, СН, J 9.3 Гц) 6,75 д (1H, СН, J 12.0 Гц), 7.32 с (1H_{аром.}) 7.40 д (1H_{аром.}, J 6.0 Гц), 7.64 д (1H, СН, J 6.0 Гц); 7.67 д (1H_{аром.}, J 12.0 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 20,89; 56,79; 64,45; 75,32; 77,21; 81,38; 99,59; 112,68; 117,34; 121,85; 122,85; 133,59; 145,10; 146,60; 151,66; 168,41; 170,18. Выч. 55.43 (C); 5.43 (H); Найд. 55.51 (C); 5.41 (H).

2.1.1.7 Снятие ацетильной защиты

Щелочной гидролиз: 50 см^3 1М гидроксида натрия добавляли к 50 см^3 раствора 1 ммоль **6 (a-e)** и **5'e** в ацетоне. Смесь перемешивали при 22-25 °С в течение 20 мин и подкисляли 2 М раствором соляной кислоты, затем охлаждали в бане со льдом. При охлаждении на поверхности выделялись маслянистые эфиры. Из реакционной смеси удаляли ацетон под вакуумом, эфир экстрагировали хлороформом. Хлороформ сушили и упаривали досуха. Эфиры ФК выделялись в виде светло-желтый маслянистых жидкостей [123].

Ферментативный гидролиз: 2,5 ммоль **6 (a-e)** и **5'e** растворяли в 40 см^3 95 %-ного этанола, добавляли 0,24 г липазы *Amano PS*. Гидролиз проводили при 37 °С в течение 4 часов и постоянном перемешивании. Липазу отфильтровывали, раствор упаривали под вакуумом примерно в два раза. Эфиры экстрагировали хлороформом, органическую фазу промывали водой, водным раствором карбоната натрия и снова водой, затем сушили над сульфатом натрия и упаривали в вакууме.

Бензил (2E)-3-(4-гидрокси-3-метоксифенил)проп-2-еноат (7a). Выход 85%, светло-желтая жидкость. УФ спектр, $\lambda_{\text{макс.}}$, нм: 237, 331. ИК спектр, ν , см^{-1} : 3510 (ОН), 2953 (СН в ArOCH_3), 1695 (C=O), 1627 (C=C).

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО-*d*₆), δ , м.д.: 3.81 с (3H, CH₃O), 5.20 с (2H, CH₂); 6.55 д (1H, CH, *J* 16.0 Гц), 6.84 д (1H_{аром.}, *J* 8.7 Гц), 7.13 д (1H_{аром.}, *J* 7.5 Гц), 7.37 м (5H_{аром.}), 7.40 с (1H_{аром.}), 7.61 д (1H, CH, *J* 16.0 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl₃), δ , м.д.: 38.70, 38.98, 39.26, 39.53, 39.81, 40.09, 40.37, 55.76, 55.47, 111.23; 114.29, 115.58, 123.39, 125.64, 128.18, 128.57, 136.49, 145.55, 148.02, 149.51, 166.62. Выч. 71.83 (C); 5.63 (H); Найд. 71.42 (C); 5.90 (H).

2-Фенилэтил (2E)-3-(4-гидрокси-3-метоксифенил)проп-2-еноат (7b).

Выход 80%, светло-желтая жидкость. УФ спектр, $\lambda_{\text{макс.}}$, нм: 234, 327. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3397 (OH), 2926 (CH в ArOCH₃), 1703 (C=O), 1632 (C=C). Спектр ЯМР ^1H (ДМСО-*d*₆), δ , м.д.: 2.91 т (2H, CH₂, *J* 10.8 Гц), 3.75 с (3H, CH₃O), 4.32 т (2H, CH₂, *J* 10.8 Гц), 6.18 д (1H, CH, *J* 12.0 Гц), 6.81 д (1H_{аром.}, *J* 6.0 Гц), 6.9 с (1H_{аром.}), 6.94 д (1H_{аром.}, *J* 6.0 Гц), 7.12–7.24 м (5H_{аром.}), 7.5 д (1H, CH, *J* 12.0 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl₃), δ , м.д.: 35.24, 55.94, 65.02, 76.88, 77.20, 77.51, 109.43, 115.26, 116.44, 123.50, 126.91, 127.14, 128.54, 129.00, 137.97, 145.17, 146.98, 148.12, 167.44. Выч. 72.48 (C); 6.04 (H); Найд. 72.12 (C); 6.20 (H).

Проп-2-ен-1-ил (2E)-3-(4-гидрокси-3-метоксифенил)проп-2-еноат (7с).

Выход 80%, светло-желтая жидкость. УФ спектр, $\lambda_{\text{макс.}}$, нм: 216, 235, 330. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3402 (OH), 2937 (CH в ArOCH₃), 1707 (C=O), 1601 (C=C). Спектр ЯМР ^1H (ДМСО-*d*₆), δ , м.д.: 3.79 с (3H, CH₃O), 4.63 д (2H, CH₂, *J* 4.2 Гц), 5.19 д (1H, CH₂, *J* 8.7 Гц), 5.30 д (1H, CH₂, *J* 12.9 Гц), 5.91 м (1H, CH), 6.24 д (1H, CH, *J* 12.0 Гц), 6.83 д (1H_{аром.}, *J* 6.0 Гц), 6.94 с (1H_{аром.}), 6.98 д (1H_{аром.}, *J* 6.0 Гц), 7.56 д (1H, CH, *J* 12.0 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl₃), δ , м.д.: 55.93, 65.15, 76.80, 77.12, 77.32, 77.43, 109.50, 114.91, 115.09, 118.46, 123.05, 126.88, 132.25, 145.27, 147.19, 148.08, 166.14, 166.61. Выч. 66.67 (C); 5.98 (H); Найд. 67.05 (C); 5.89 (H).

(Оксолан-2-ил)метил (2E)-3-(4-О-гидрокси-3-метоксифенил)проп-2-еноат (7d).

Выход 85%, светло-желтая жидкость. УФ спектр, $\lambda_{\text{макс.}}$, нм: 327. ИК спектр, ν , см⁻¹: 3450 (OH), 2924 (CH в ArOCH₃), 1743 (C=O), 1617 (C=C). Спектр ЯМР ^1H (ДМСО-*d*₆), δ , м.д.: 1.9 м (4H, CH₂), 3.76 т (2H, CH₂, *J* 21.0

Гц), 3.83 с (3H, CH₃O); 4.13 м (3H, CH, CH₂, J 37.2 Гц), 6.25 д (1H, CH, J 12.0 Гц), 6.83 д (1H_{аром.}, J 6.0 Гц), 6.94 с (1H_{аром.}), 6,96 д (1H_{аром.}, J 6.0 Гц), 7.55 д (1H, CH, J 12.0 Гц). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), δ, м.д.: 25.69, 27.99, 55.95, 66.48, 68.50, 76.72, 76.78, 77.10, 77.30, 77.41, 109.52, 114.80, 114.90, 115.07, 121.42, 126.88, 144.51, 146.85, 148.09. Выч. 64.75 (C); 6.47 (H); Найд. 64.35 (C); 6.62 (H).

5-(4-О-гидрокси-3-метоксифенил)проп-2-енил-D-ксилопираноза (6е).

Выход 80 %, светло-желтая жидкость. R_f 0.2. УФ спектр, λ_{макс.}, нм: 328.

ИК спектр, ν, см⁻¹: 3440 (ОН), 2940 (СН в ArOCH₃), 1735 (C=O), 1613 (C=C). Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 2.20 т (1H, СН), 2,32 т (1H, СН); 3.83 с (3H, CH₃O); 4.07 с (1H, ОН-3); 4.22 с (1H, ОН-2), 4,28 м (2H, СН); 4.70 с (1H, ОН-1), 4.83 м (1H, СН) 6,42 д (1H_{аром.}, СН, J 12.0 Гц), 6.89 д (1H_{аром.}, J 6.0 Гц), 7.07 с (1H_{аром.}) 7.10 д (1H_{аром.}, СН, J 6.0 Гц); 7.78 д (1H_{аром.}, J 12.0 Гц). Спектр ЯМР ¹³C (ДМСО-d₆), δ, м.д.: 57.85; 65.36; 75.26; 78.21; 81.78; 100.23; 111.65; 115.80; 117.30, 125.46; 127.01; 146.60, 148,50; 148.60; 149.60; 166.89. Выч. 55.21 (C); 5.52 (H); Найд. 55.54 (C); 5.61 (H).

2.1.2 Выделение из пшеничных отрубей

2.1.2.1 Анализ химического состава пшеничных отрубей

Количественный состав компонентов пшеничных отрубей определяли в пересчете на абсолютно сухое сырье (а.с.с.). Влажность определяли по ГОСТ 9404-88 [124], зольность – гравиметрическим методом по ГОСТ 27494-87 [125], крахмал – методом Эверса по ГОСТ 10845-98 [126], белок – методом Къельдаля по ГОСТ 10846-91 [127], липиды определяли по убыли массы сырья после экстракции диэтиловым эфиром в аппарате Сокслета по ГОСТ 15113.9-77 [128], сумму пектина и протопектина определяли комплексонометрическим методом [129], лигнин определяли по методу Класона [130], целлюлозу – по методу Кюшнера и Ганека [130],

гемицеллюлозу – гидролизом 2 %-ной соляной кислотой с последующим определением редуцирующих веществ методом Бертрана и пересчетом их в гемицеллюлозу умножением на коэффициент 0,9 [130].

2.1.2.2 Получение НПВ пшеничных отрубей

К 100 г пшеничных отрубей добавляли 1000 см³ воды, нагревали до 60 °С при постоянном перемешивании в течение 3 часов, затем температуру повышали до 85 °С и добавляли 3 см³ α-амилазы (Термамил 120L), перемешивали в течение 40 минут. Температуру снижали до 60 °С и добавляли 5 см³ протеазы (Максазим NNP), выдерживали в течение 30 минут при непрерывном перемешивании. После этого добавляли 5 см³ ферментного препарата смеси амилоглюкозидазы и грибной α-амилазы (Аттенузим), смесь выдерживали при 60 °С в течение 30 минут. Суспензию фильтровали под вакуумом через тканевый фильтр, отруби подвергали четырехкратной промывки дистиллированной водой и двукратной 96 %-ным этанолом. Полученные НПВ сушили на воздухе. Выход 60 % [131].

2.1.2.3 Кислотный гидролиз НПВ до мономерного состава

К 20 г НПВ добавляли 100 см³ 12 М серной кислоты, оставляли набухать в течение 30 мин при 35 °С. Суспензию разбавляли 500 см³ дистиллированной воды и при перемешивании нагревали до 100 °С в течение 60 минут. Смесь охлаждали и нейтрализовали 240 см³ 25 %-ного раствора аммиака (до рН 9). Гидролизат фильтровали, помещали в мерную колбу на 1000 см³ и доводили до метки [113].

2.1.2.4 Щелочной гидролиз НПВ до мономерного состава

К 2 г НПВ добавляли 100 см³ 2 М раствора гидроксида натрия, дегазированного азотом. Гидролиз проводили в атмосфере азота в защищенном от света месте в течение 18 ч при комнатной температуре. К

гидролизату добавляли 19 см³ концентрированной соляной кислоты (рН < 2). Гидролизат помещали в делительную воронку и экстрагировали диэтиловым эфиром (3×160 см³). Объединенные органические фазы упаривали под вакуумом досуха [113].

2.1.2.5 Определение углеводов методом капиллярного электрофореза

Методика определения углеводов методом капиллярного электрофореза с использованием системы «Капель» разработана ООО «Люмэкс-маркетинг» для определения фруктозы, глюкозы и сахарозы в напитках, плодовоовощной продукции, БАДах и меде. В этой работе методика адаптирована для определения углеводов (в первую очередь пентозанов) в гидролизате НПВ.

Условия разделения: размер капилляра – диаметр 50 мкм, рабочая длина 65 см, полярность – отрицательная. Состав буфера: 7 мМ сорбата калия, 0,05 мМ цетилтриметиламмония бромид, 50 мМ гидроксида натрия.

Приготовление градуировочных и контрольного растворов, построение градуировки проводили в соответствии с таблицей 8 по методике, разработанной ООО «Люмэкс-маркетинг» [132].

Таблица 8 – Номинальные значения массовой концентрации углеводов в градуировочных и контрольном растворах

Углевод	Массовая концентрация, мг/дм ³			
	Градуировочный раствор			Контрольный раствор
	№1	№2	№3	
Глюкоза	500	200	80	250
Галактоза	500	200	80	250
Манноза	500	200	80	250
Арабиноза	500	200	80	250
Ксилоза	500	200	80	250

2.1.2.6 Определение гидроксикоричных кислот методом капиллярного электрофореза

Методика определения гидроксикоричных кислот методом капиллярного электрофореза с использованием системы «Капель» разработана ООО «Люмэкс-маркетинг» для определения органических кислот и их солей в продукции винодельческой, соковой, безалкогольной, слабоалкогольной и алкогольной, а также продуктах пивоварения. В настоящей работе методика адаптирована для определения гидроксикоричных кислот в гидролизате НПВ.

Условия разделения: размер капилляра – диаметр 75 мкм, рабочая длина 50 см, полярность – отрицательная. Состав буфера: 10 мМ бензойной кислоты, 9 мМ диэтанолamina, 0,5 мМ цетилтриметиламмония бромида, 0,1 мМ трилона Б.

Приготовление градуировочных и контрольного растворов, построение градуировки проводили в соответствии с таблицей 9 по методике, разработанной ООО «Люмэкс-маркетинг» [133].

Таблица 9 – Номинальные значения массовой концентрации фенольных кислот в градуировочных и контрольном растворах

Кислота	Массовая концентрация, мг/дм ³			
	Градуировочный раствор			Контрольный раствор
	№1	№2	№3	
Феруловая	40	16	4	20
<i>n</i> -Кумаровая	40	16	4	20
Синаповая	40	16	4	20
Кофейная	40	16	4	20

2.1.2.7 Ферментативный гидролиз НПВ пшеничных отрубей

К 5 г НПВ пшеничных отрубей добавляли 100 см³ дистиллированной воды, суспензию автоклавировали при 0,5 атм в течение 30 минут. Затем вносили 1 см³ ферментного препарата с ксиланазной активностью Брюзайм. Гидролиз проводили при 42 °С в темноте при перемешивании в течение 72 ч.

Остаток НПВ отфильтровывали, фильтрат доводили до кипения и фильтровали через складчатый фильтр. Остаток 2,5-3,2 г (50-64 %) [131].

2.1.2.8 Определение фенольных веществ

Количественное содержание фенольных веществ в пищевых продуктах определяют фотометрическим методом Фолина-Чокальтеу. Ниже приведены наши уточнения методики Фолина-Чокальтеу для определения фенольных веществ в сусле и вине в пересчете на галловую кислоту [134].

Модификация метода заключается в построении калибровочного графика по ФК. Для этого готовили стандартный раствор ФК в дистиллированной воде (при небольшом нагревании) концентрацией 1 г/дм³. В четыре мерные колбы на 100 см³ помещали 5, 10, 15, 20 см³ стандартного раствора и доводили до метки дистиллированной водой. Концентрация ФК в каждой из колб составляла 50, 100, 150, 200 мг/дм³ соответственно. Из каждой колбы отбирали по 1 см³ раствора и помещали в другие 4 мерные колбы объемом 100 см³, добавляли по 1 см³ реактива Фолина-Чокальтеу, 15-20 см³ воды, 10 см³ раствора углекислого натрия, доводили водой до метки и перемешивали. По окончании 30 минут измеряли оптическую плотность растворов при 670 нм против контрольного раствора в кювете с длиной оптического пути 10 мм. Контрольный раствор готовили как описано выше, но без добавления ФК. По полученным значениям оптических плотностей строили калибровочный график.

В таблице 10 представлены данные оптической плотности стандартных растворов ФК.

Таблица 10 – Оптическая плотность стандартных концентраций ФК

Концентрация ФК, мг/дм ³	Оптическая плотность (Abs)
50,000	0,046
100,000	0,069
150,000	0,108
200,000	0,141

На рисунке 4 представлен калибровочный график, построенный по данным таблицы 10.

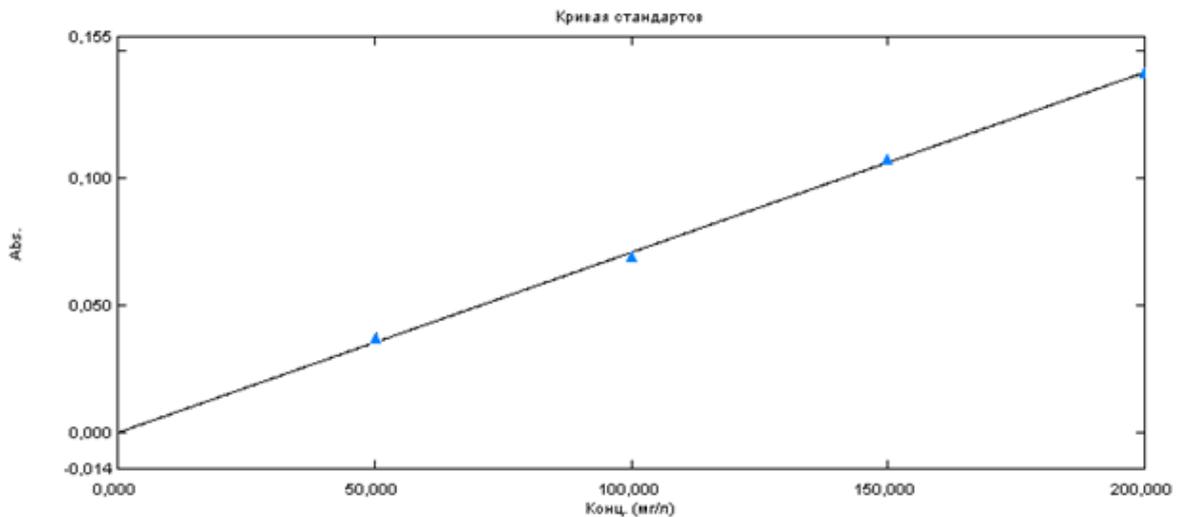


Рисунок 4 – Калибровочный график

Калибровочная кривая имеет линейный характер. Рекомендуемый диапазон измеряемой величины 50-200 мг/дм³. В соответствии с рекомендациями подбирался коэффициент разведения образца. Методика определения аналогична построению калибровочного графика, объем испытуемой пробы 1 см³.

За окончательный результат принимали среднеарифметические результаты двух параллельных определений.

2.1.2.9 Фракционирование гидролизата НПВ на Амберлите

Через колонку (размер 25×3 см) с Амберлитом, предварительно промытую 95 %-ым этанолом и затем водой, пропускали 50 см³ ферментативного гидролизата НПВ. Через колонку пропускали два колоночных объема дистиллированной воды (фракция №1), три колоночных объема 50 % (об/об) водного раствора метанола или этанола (фракция №2) и два колоночных объема метанола или этанола (фракция №3). Фракцию №2

(содержащую ФОС) упаривали в вакууме досуха с получением вещества светло-коричневого цвета, выход 25-30 % (от массы НПВ на а.с.с.) [131].

2.1.2.10 Анализ полученных фракций

Для качественного определения наличия ФОС использовали тонкослойную хроматографию. В качестве подвижной фазы применяли две системы растворителей: I – хлороформ/этанол (10:1) и II – н-бутанол/этанол/вода (6:3:2). Хроматограммы располагали под УФ-светом до и после обработки парами аммиака. Для проявления углеводов использовали анилиновый проявитель (1 см³ анилина растворяли в 100 см³ 95 %-ного этилового спирта и добавляли 10 см³ 80 %-ной фосфорной кислоты), при 10 минутном нагревании при 90 °С углеводы давали темно-коричневое окрашивание.

Анализ фракций проводили методом УФ-спектроскопии. Наличие свободной ФК определяли методом капиллярного электрофореза.

2.1.2.11 Установление строения ФОС

Фракцию №2, содержащую ФОС, упаривали при пониженном давлении досуха. Для установления мономерного состава проводили кислотный гидролиз 2 М трифторуксусной кислотой с целью расщепления гликозидных связей и щелочной гидролиз 1 М гидроксида натрия для расщепления сложноэфирных связей [62]. Мономерный состав определяли методом капиллярного электрофореза.

Образец ФОС анализировали также методами ИК-спектроскопии и ВЭЖХ с УФ-детекцией при длине волны 280 нм.

2.2 Определение цитотоксичности

Соединения использовались в виде стоковых растворов. Концентрации соединений для исследований стандартизировались по активному веществу

методом Фолина-Чокальтеу (в пересчете на ФК) и были равны 1,6 г/л. Растворы соединений хранились при +4°C, размораживались при комнатной температуре непосредственно перед использованием.

Исследования цитотоксичности проводили на линии НСТ116 (карцинома толстой кишки человека). Она протестирована в American Type Culture Collection, США. Клетки НСТ116 культивировали в среде DMEM. В культуральную среду добавляли следующие компоненты до конечных концентраций: 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 2mM L-глутамин, 100ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (среды и добавки производства ПанЭко, Россия), инкубация проводилась при 37°C, 5 % CO₂ в увлажненной атмосфере. В экспериментах использована культура в логарифмической фазе роста. Для профилактики микоплазменного заражения использовался препарат Мусоkill (GE, США). Перед началом экспериментов проводились не менее трех пассажей на свободной от антимикоплазменного препарата среде.

Цитотоксическое действие соединений исследовалось методом МТТ-теста (по способности восстановления желтой соли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтераразола в темно-синий кристаллический формазан митохондриями живых клеток) [135].

Клетки рассевали в лунки 96-луночного планшета (NUNC, США) (5000 клеток в 190 мкл культуральной среды), инкубировали 24 часа при 37 °C, 5 % CO₂, в увлажненной атмосфере. Вносили по 10 мкл раствора исследуемых веществ в культуральной среде, приготовленных серийными разведениями из исходных растворов, до 8 конечных концентраций (от 0,000156 до 0,02 г/л). Контролем служили клетки без препарата (интактный контроль). Клетки инкубировали 72 часа при 37 °C, 5 % CO₂, в увлажненной атмосфере. За 1 час до окончания инкубации в лунки вносили по 20 мкл водного раствора МТТ (5 мг/мл, ПанЭко, Россия). После окончания инкубации культуральную среду отбирали, клетки ресуспендировали в 100 мкл ДМСО и измеряли оптическую плотность раствора на планшетном спектрофотометре Multiscan FC (Thermo

Scientific, США) при длине волны 571 нм. Конечная концентрация растворителя в пробах с клетками не превышала 0,5 %, что не влияло на выживаемость клеток на данном времени инкубации.

Процент клеток, выживших при действии каждой дозы соединения, подсчитывали как частное от деления средней оптической плотности в лунках после инкубации с данной дозой к средней оптической плотности контрольных лунок (значения последних приняты за 100 %). Каждую концентрацию изучали троекратно, приводили усредненные данные по результатам двух экспериментов; погрешности не превысили 10 %.

В качестве положительного контроля используется противоопухолевый препарат доксорубицин (Тева, Нидерланды), характеризовавшийся показателем цитотоксичности 0,000109 г/л. Но так как этот препарат и исследуемые соединения разные по структуре, целесообразно использовать в качестве сравнения ФК.

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Химико-ферментативный синтез проводили по общей методике этерификации с применением в качестве конденсирующего агента дициклогексилкарбодиимида (ДЦК). Ацилирующий агент получали, путем постановки ацетильной защиты на фенольный гидроксил ФК. В качестве субстратов в реакции этерификации использовали оксиметильные соединения с различными радикалами, а также исследовали реакцию этерификации с ксилозой. Выделение ферулоилолигосахаридов из пшеничных отрубей проводили путем фракционирования гидролизата на колонке с полистирольным адсорбентом типа Амберлит. Общий ход эксперимента представлен на блок-схеме (рисунок 5).

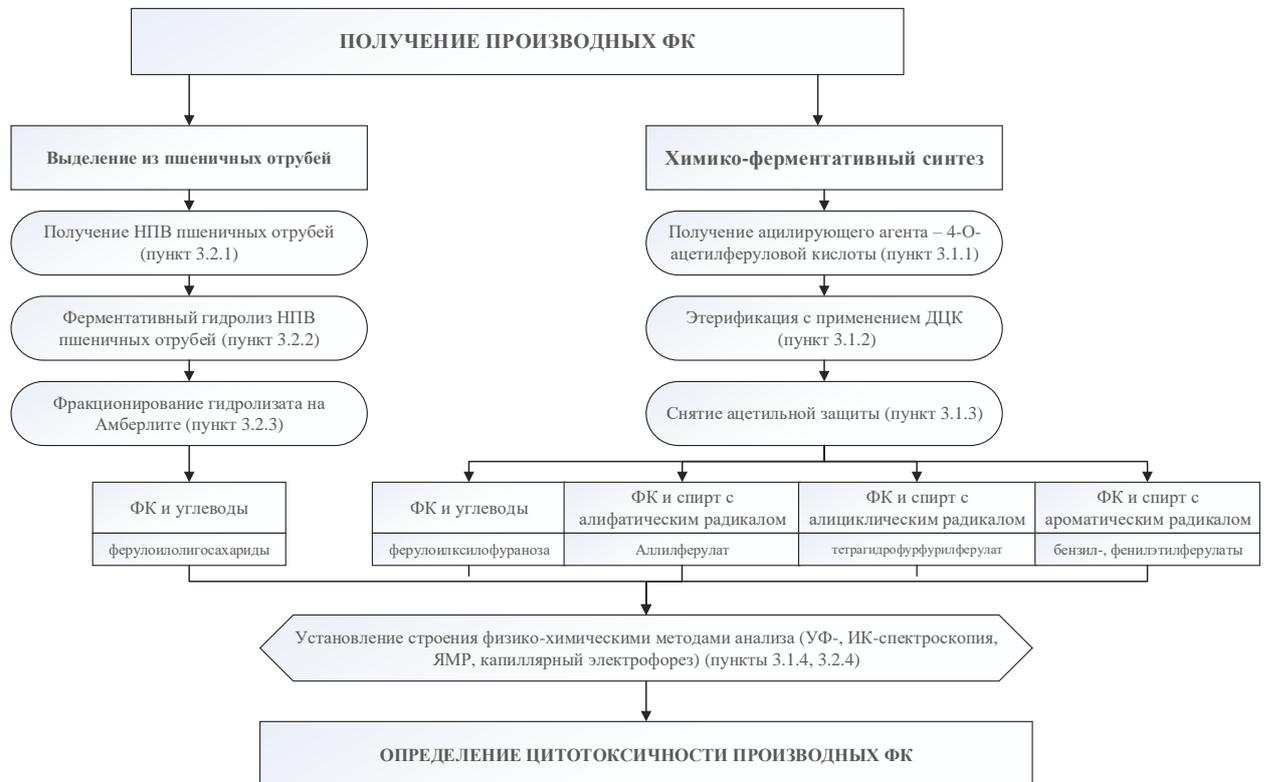


Рисунок 5 – Блок-схема эксперимента

3.1 Синтез сложных эфиров феруловой кислоты

Углеводы являются полифункциональными соединениями, которые имеют гидроксильные группы с различной реакционной способностью, вследствие чего необходимо использовать временные защитные группы для направленного синтеза по запланированной гидроксильной группе. Для достижения региоселективной (частичной) защиты используют различную реакционную способность гидроксильных групп углевода. Из-за неселективности прямой этерификации, процесс ацилирования углеводов превращается в многостадийный процесс.

Использование дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) в реакции этерификации имеет следующие преимущества, во-первых, процесс проходит в мягких условиях, во-вторых, в литературе имеются указания на то, что реакция этерификации протекает селективно по оксиметильной группе при наличии окисметиленовых, что представляет интерес для синтеза гликозидов феруловой кислоты [136].

При применении ДЦК встречаются трудности связанные с образованием N,N-дициклогексилмочевины (ДЦМ) как побочного продукта, которая может трудно удаляться из реакционной смеси [105]. Также при использовании ДЦК в качестве конденсирующего агента выход сложного эфира оказывается неудовлетворительным из-за формирования N-ацильного производного как побочного продукта (схема 13).

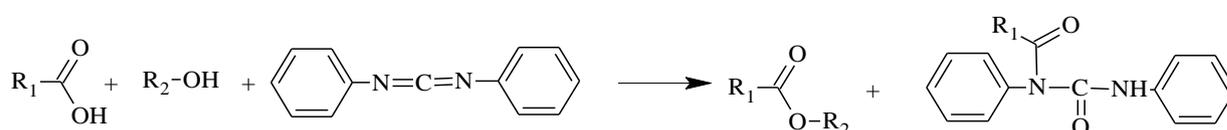


Схема 13

Образование N-ацильного производного снижается при проведении реакции в пиридине, а присутствие каталитического количества *n*-ТСК значительно увеличивает выход эфиров [105]. Так же преимуществом

применения пиридина является практически полная кристаллизация ДЦМ по окончании реакции, что позволяет выделять целевой продукт без примеси ДЦМ.

Роль кислотного катализатора объясняют следующим образом (схема 14). В некатализируемой реакции промежуточное соединение 3, которые первоначально формируются из карбоновой кислоты 1 и ДЦК 2, может либо путем электронного смещения привести к устойчивому N-ацилу 4 либо подвергнуться нападению спирта 5, вследствие чего образуется сложный эфир 6 и ДЦМ 7.

В присутствии кислоты промежуточное звено 3 протонируется и образуется форма 3', которая менее склонна образовывать N-ацил 4. Сложный эфир 6 тогда сформируется из 3' непосредственно атакой спирта 5 (путь I), или через N-ацилпиридин ион 8 (путь II).

Промежуточные звенья ацилпиридина также могут образовываться и в некатализируемой реакции. Однако, поскольку O-ацилмочевина 3 является бедным электрофилом, чем его протонированная форма 3', скорость атаки пиридином будет намного медленнее в этом случае.

синтезе производных ФК могут выступать: ФК, хлорангидрид ФК, а также сложные эфиры ФК.

Для получения сложных эфиров по карбоксильной группе с наибольшим выходом и селективностью, чаще всего прибегают к защите фенольного гидроксила в положении 4 бензольного кольца. Известно несколько подходов к защите фенольного гидроксила: получение сложных эфиров (ацетатов) и получение ацеталей.

3.1.1 Получение ацилирующего агента

Для получения сложных эфиров ФК нами была выбрана 4-О-ацетилферуловая кислота в качестве ацилирующего агента. Достоинством ацетильной защиты является простота и высокий выход при постановке защитной группы. Недостатком ацетильной защиты является условия ее снятия, которые могут совпадать с расщеплением сложного эфира по карбоксильной группе.

Необходимая для синтеза эфиров 4-О-ацетилферуловая кислота может быть получена по литературным данным двумя способами, представленными на схеме 15. Ключевой стадией в обоих случаях является реакция Кневенагеля в модификации Дебнера, а исходными соединениями служат ванилин (**1**) и его 4-О-ацетильное производное (**3**).

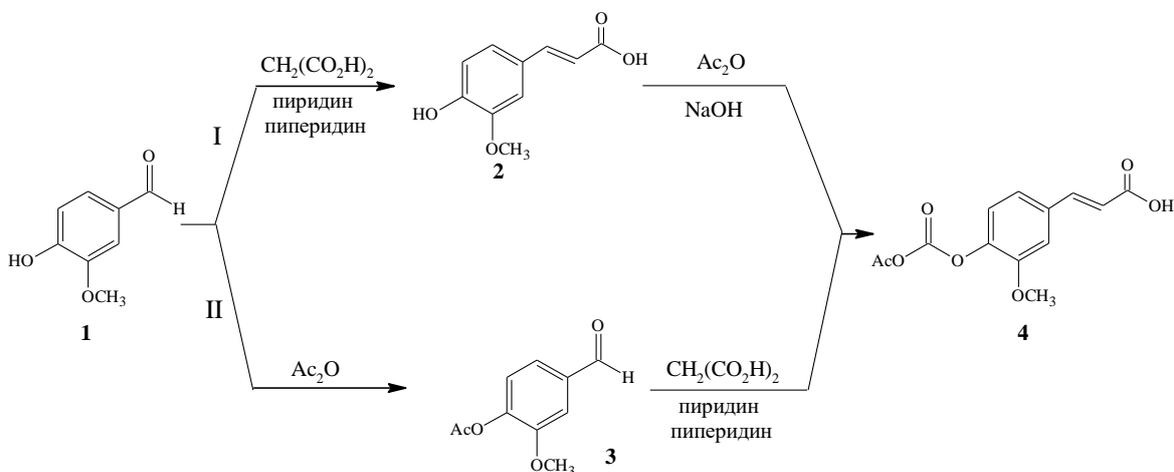


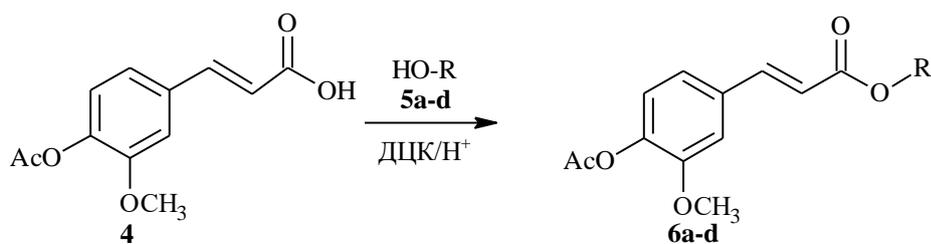
Схема 15

Выходы 4-О-ацетилферуловой кислоты (**4**) по этим двум способам существенно не различаются. Однако недостатком синтеза по I-му способу являются трудности, возникающие при перекристаллизации ФК (**2**) (ее потемнение при перегревании), а также затруднительна перекристаллизация полученной по этому способу (**4**) из-за образующихся побочных продуктов реакции. Температура плавления и УФ спектры полученной этими способами 4-О-ацетилферуловой кислоты идентичны и соответствуют литературным данным. Т.пл. 196 °С. УФ спектр, $\lambda_{\text{макс.}}$, нм: 278; 215. ИК спектр ν , см^{-1} : 3013 (ОН), 2945 (СН в ArOCH_3), 1763 (C=O), данные соответствуют литературным данным [120].

3.1.2 Ацилирование спиртов

Так как реакция этерификации обратима, в литературе встречаются различные подходы, которые могут обеспечивать высокий выход и чистоту конечного продукта.

Этерификацию 4-О-ацетилферуловой кислоты проводили в пиридине в присутствии ДЦК и *n*-ТСК. Ацилируемые субстраты представляли собой спирты с различными заместителями (схема 16).



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

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

Схема 16

Реакцию проводили при комнатной температуре, избыток ДЦК переводили в N,N'-дициклогексилмочевину (ДЦМ) добавлением ледяной уксусной кислоты, реакционную смесь охлаждали до 2–5 °С, кристаллы ДЦМ отфильтровывали. Выделение целевого продукта из реакционной смеси проводили экстракцией хлороформом. Не вступившая в реакцию кислота (4) экстрагировалась вместе с эфиром, из-за низкого ее содержания она легко удалялась при перекристаллизации [137].

Анализ полученных эфиров по температуре плавления и спектральным характеристикам показал, что выбранный метод этерификации позволяет легко выделять эфиры без посторонних примесей. После перекристаллизации ДЦМ в полученных эфирах не была обнаружена. ДЦМ соответствует всего один максимум поглощения при 203 нм (рисунок 6).

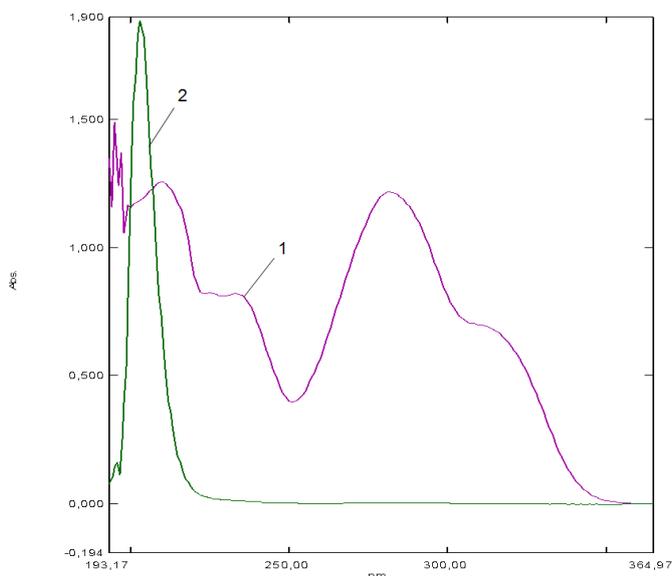


Рисунок 6 – УФ-спектры поглощения: 1 – бензилового эфира 4-О-ацетилферуловой кислоты; 2 – NN'-дициклогексилмочевины

Используя этот метод синтеза для этерификации ФК и различных спиртов выход эфиров составлял от 42 до 55 %.

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

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

Количественное соотношение реагентов в реакционной смеси и выход целевого продукта сведены в таблицу 11.

Таблица 11 – Влияние соотношения реагентов на выход эфира

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

Изменение соотношения реагентов не приводит к существенному изменению выхода эфира.

Было изучено влияние различных кислот на выход эфира. Использование минеральных кислот значительно снижает выход эфиров. Применение бензолсульфокислоты повышает выход эфиров в среднем на 8 %.

Таблица 12 – Влияние различных кислот на выход эфира

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

Методом ВЭЖХ было изучено накопление эфира 6а в процессе реакции с целью выявления ее продолжительности (рисунок 7). Основное образование эфира происходит за 5-6 часов реакции.

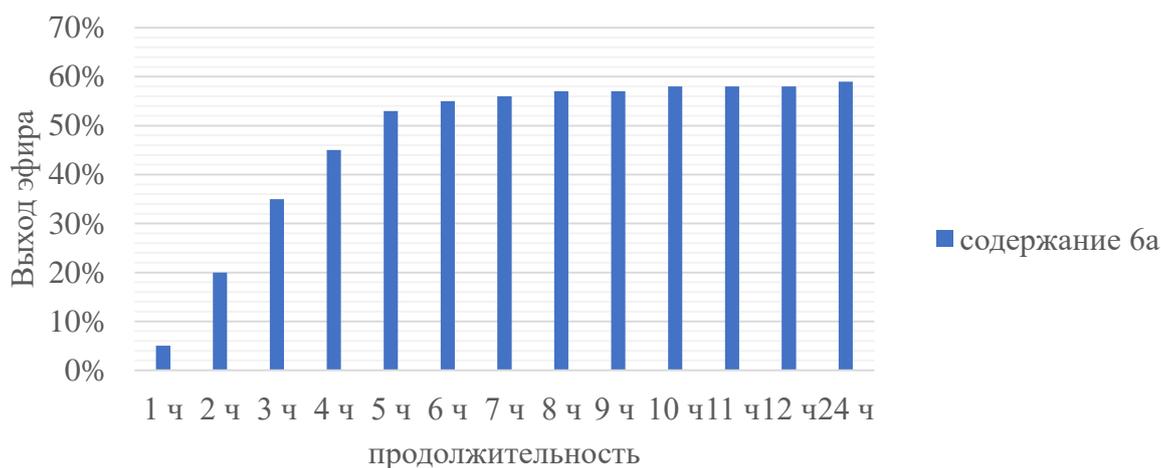


Рисунок 7 – Конверсия ацетилферуловой кислоты в эфир ба в зависимости от продолжительности реакции

Также исследования показали, что после подкисления уксусной кислотой избыток мочевины выпадает после охлаждения до 0 °С за 2 часа. Таким образом, продолжительность получения эфира можно сократить 36 часов до 8 часов.

3.1.3 Ацилирование ксилозы

Реакцию исследовали на примере ксилозы и на первом этапе проводили синтез стандарта ацилированного по гидроксилу в С-5 положении.

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

На первой стадии получали 1,2;3,5-дициклогексилиден-*D*-ксилофуранозу путем выдерживания ксилозы в циклогексаноне в кислой среде.

Затем защиту в 3,4-положении снимали в метанольном растворе хлористого водорода (схема 17) с получением 1,2-циклогексилиден-*D*-ксилофуранозы [121].

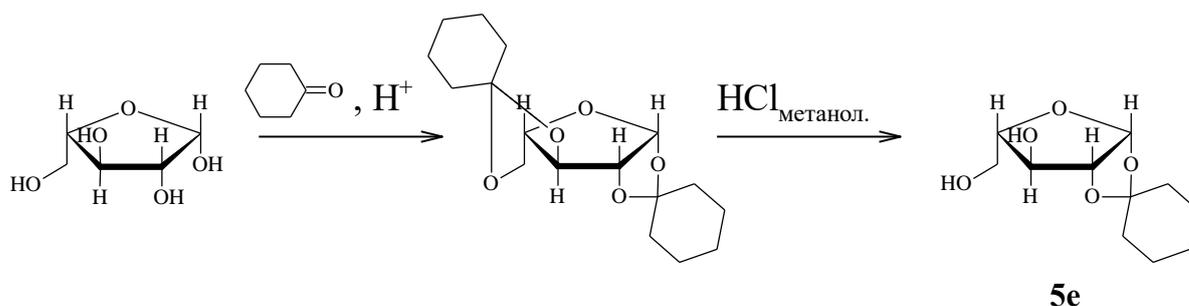


Схема 17

Ацилирование проводили 4-О-ацетилферуловой кислотой (**4**) (схема 18) с применением ДЦК в пиридине в кислой среде (п. 2.1.1.5). Эфир выделялся в виде белых кристаллов с выходом 35 %.

Снятие циклогексилиденовой защиты проводили кислотным гидролизом уксусной кислотой в диоксане на кипящей водяной бане в течение 4 часов (п. 2.1.1.6).

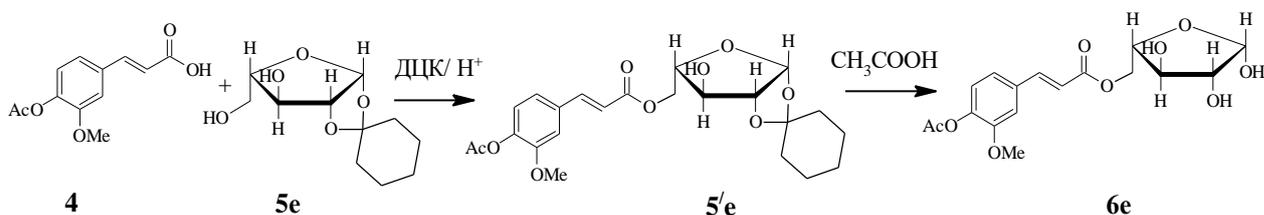


Схема 18

По результатам ВЭЖХ-УФ анализа, время удержания основного продукта реакции составляет 3,5 минуты. Ацилирование защищенной ксилозы с применением ДЦК приводит преимущественно (82 %) к одному продукту реакции (рисунок 8).

Auto-Scaled Chromatogram

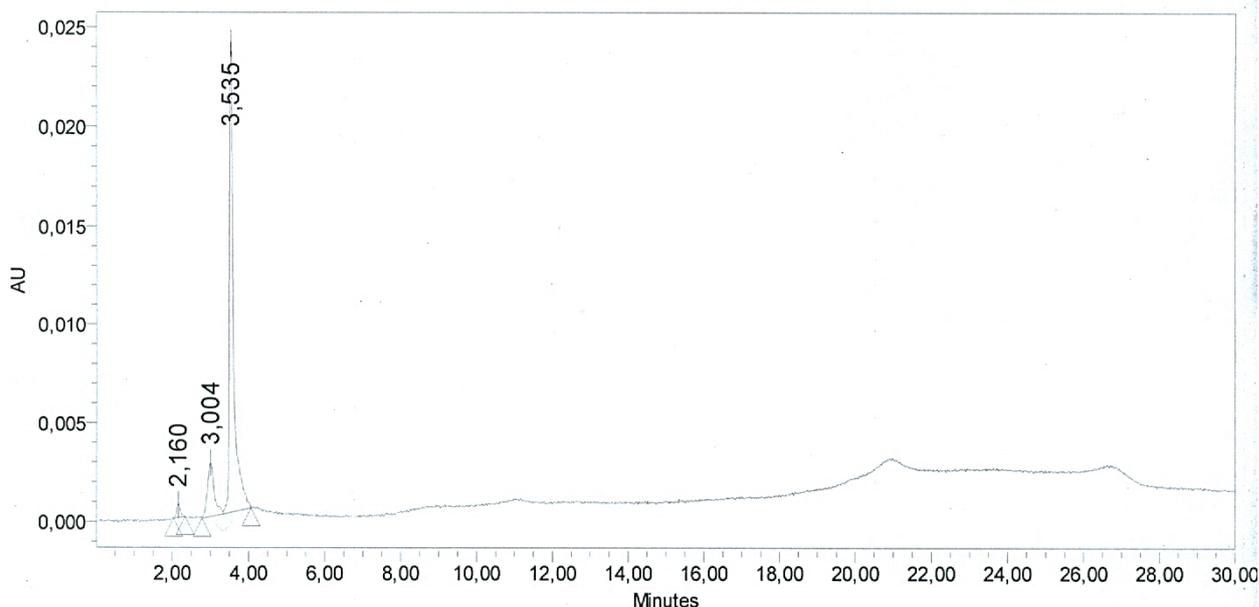


Рисунок 8 – ВЭЖХ-УФ 5-(4-*O*-ацетилферулоил)-*D*-ксилопиранозы (при 280 нм)

Продукт очищали на колонке с силикагелем и проводили элементный анализ, ЯМР ^1H и ^{13}C . Результаты показывают, что выделенное вещество соответствует продукту, этерифицированному в положении С-5 ксилозы.

В тех же условиях проводили ацилирование незащищенной ксилозы. Контроль реакции ТСХ показал наличие в реакционной смеси четырех компонентов которые светятся в УФ-свете, два из которых проявляются анилиновым проявителем. Установлено что основными продуктами реакции являются 1-ферулоил-*D*-ксилопираноза и 5-ферулоил-*D*-ксилопираноза, причем последняя существует в двух изомерах: 5-ферулоил- α -*D*-ксилопираноза, 5-ферулоил- β -*D*-ксилопираноза. На ТСХ 1-ферулоил-*D*-ксилопираноза не проявлялась в анилиновом проявителе, так как ацилирована по полуацетальному гидроксилу.

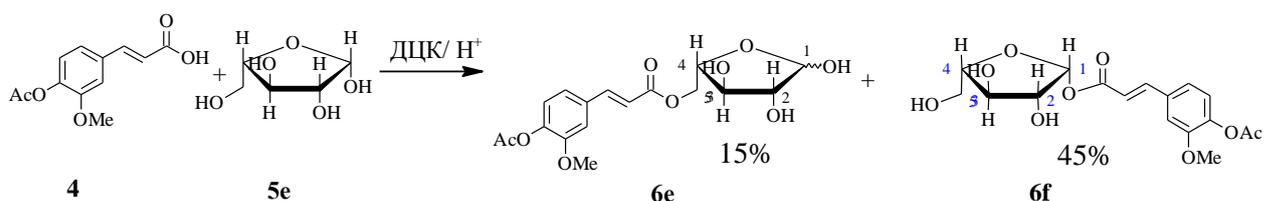


Схема 19

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

В результате реакции экстракцией хлороформом выделилось 0,1 г кристаллического вещества серого цвета из 0,01 моль (2,39 г) 4-О-ацетилферуловой кислоты. Элементный анализ показал, что этот образец содержит в структуре азот (найд. 73.00 (С); 7.80 (Н); 4.41 (N)). Это указывает на то, что в структуре соединения содержится производное ДЦК.

Проанализировав спектр ЯМР ^1H (рисунок 9) пришли к выводу, о том, что в результате реакции образуется двузамещенное N-ацильное производное (схема 20).

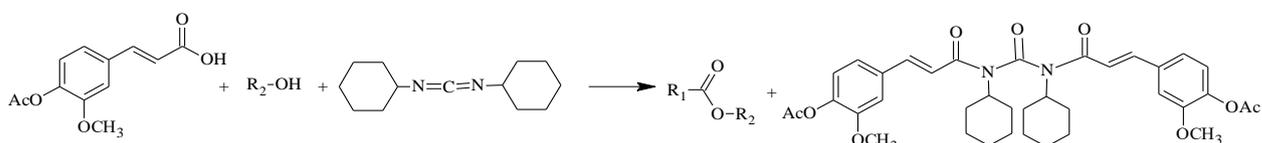


Схема 20

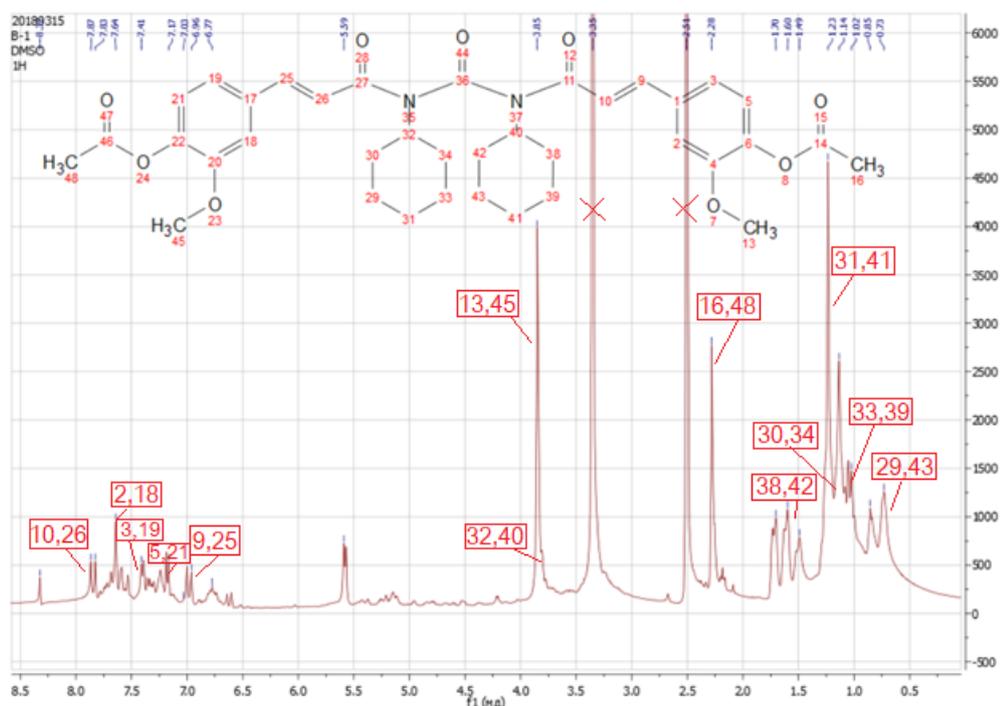


Рисунок 9 – ЯМР ^1H продукта реакции этерификации ксилозы и 4-О-ацетилферуловой кислоты

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м.д.: 1.33 м (2H, CH_2), 1.47 м (4H, CH_2), 1.58 м (4H, CH_2), 2.25 с (3H, CH_3CO), 3.82 с (3H, CH_3O); 4.11 м (1H, OH), 4.24 т (1H, CH, J 27.6 Гц), 4.37 д (1H, CH, J 9.3 Гц) 5.47 д (1H, CH, J 4.8 Гц), 5.90 д (1H, CH, J 3 Гц), 6.77 д (1H, CH, J 16.0 Гц), 7.13 д (1H_{аром.}, J 8.1 Гц), 7,31 д (1H_{аром.}, J 8.1 Гц), 7.55 с (1H_{аром.}), 7.66 д (1H, CH, J 16.0 Гц). Выч. 61.60 (C); 6.25 (H); Найд. 62.22 (C); 6.45 (H). Данные элементного анализа: 73.00 (C); 7.80 (H); 4.41 (N).

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

Отсутствие эфиров ксилозы объясняется тем, что эти эфиры не экстрагируются хлороформом.

3.1.4 Снятие ацетильной защиты

Самым распространенным методом снятия ацетильной защиты является щелочной гидролиз. Реакцию омыления обычно проводят в водном растворе с добавлением органических растворителей, таких как ацетон, метанол, этанол, тетрагидрофуран, диоксан и диметоксиэтан, чтобы обеспечить растворение как эфиров, так и гидроксидов (KOH, NaOH, LiOH). Температуру реакции варьируют от комнатной, до температуры кипения смеси, в то время как продолжительность реакции составляет от 30 мин до 24 ч. Для реакции используют избыток гидроксида с концентрацией, обычно от 0,1 до 2 Н.

При всех преимуществах ацетильной защиты, существенным ее недостатком в синтезе сложных эфиров является условия ее снятия, которые могут совпадать с расщеплением сложного эфира по карбоксильной группе феруловой кислоты. В результате химического гидролиза, помимо сложного эфира ФК, образуются и другие продукты реакции (схема 21).

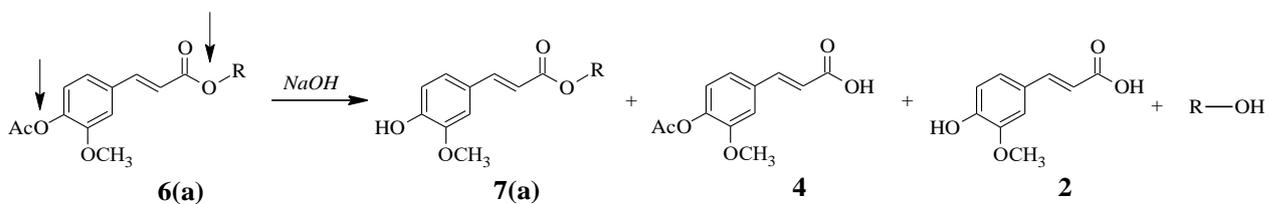


Схема 21

Предлагаемый в литературе [123] щелочной гидролиз проводится в смеси 1 М водного раствора гидроксида натрия и ацетона в соотношении 1:1. Реакцию предлагается проводить в течение 20 минут при комнатной температуре.

Нами было проведено исследование реакции щелочного гидролиза с целью уточнения продолжительности реакции снятия ацетильной защиты и установление побочных продуктов гидролиза. Бензиловый эфир 4-О-ацетилферуловой кислоты (**6a**) растворяли в ацетоне, добавляли 1 М раствор гидроксида натрия, гидролиз проводили при комнатной температуре (23 °С), каждые 5 минут отбирали пробу и нейтрализовали 5 М раствором соляной кислоты. Образцы анализировали методом ВЭЖХ-УФ, в качестве подвижной фазы использовали 9% ацетонитрил, детектировали при 280 нм.

В процессе щелочного гидролиза в реакционной смеси присутствуют побочные продукты гидролиза, такие как 4-О-ацетилферуловая кислота и феруловая кислота. Так, после 20 минутного гидролиза на хроматограмме появляются 4 пика (рисунок 10).

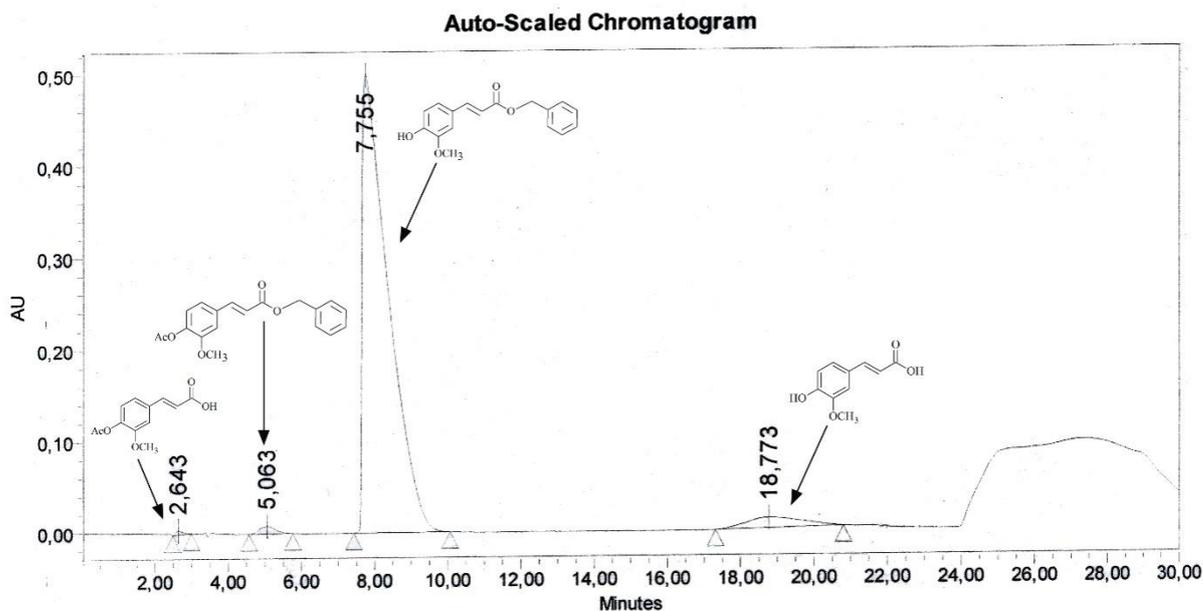
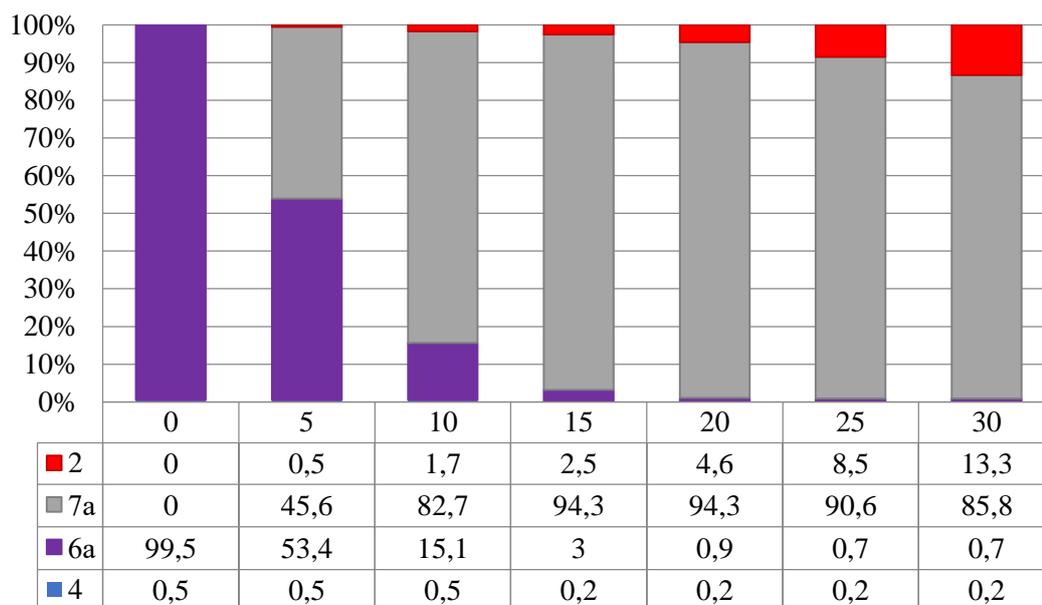


Рисунок 10 – ВЭЖХ-УФ реакционной смеси щелочного гидролиза бензилового эфира 4-О-ацетилферуловой кислоты после 20 минут реакции

Результаты щелочного гидролиза представлены на диаграмме (рисунок 11). Бензиловый эфир 4-О-ацетилферуловой кислоты изначально содержал 0,5 % 4-О-ацетилферуловой кислоты. Как видно из рисунка 10 в первые 5 минут происходит гидролиз ацетильной защиты, и образуется около 46 % бензилового эфира ФК, при этом образуется незначительное количество ФК (0,5%). В последующие 5 минут выход бензилового эфира ФК возрастает до 82,7 %, а содержание ФК до 1,7 %. На 15-ой и 20-ой минуте гидролиза выход бензилового эфира ФК одинаков и составляет 94,3 %. Однако незначительная разница заключается в содержании исходного эфира 4-О-ацетилферуловой кислоты и ФК. После 20-ой минуты в реакционной смеси наблюдается накопление свободной ФК.



Продолжительность, мин

Рисунок 11 – Диаграмма изменения количества в % исходного бензилового эфира 4-О-ацетилферуловой кислоты и накопление продуктов щелочного гидролиза (в соответствии со схемой 21)

Щелочной гидролиз позволяет снять ацетильную защиту в течение 15-20 минут при комнатной температуре, при этом наблюдается частичное расщепление сложноэфирной связи по карбоксильной группе ФК.

Селективность снятия ацетильной защиты может быть достигнута применением липазы, катализирующей снятие ацетильной защиты.

Исследование процесса снятия ацетильной защиты иммобилизованной липазой Amano PS проводили ферментированием ацетилферуловой кислоты. Количество образовавшейся ФК определяли методом Фолина-Чокальтеу, продолжительность 4 часа (240 минут). Было исследовано изменение активности фермента при повторном применении. Результаты гидролиза ацетильной защиты показаны на рисунке 12.

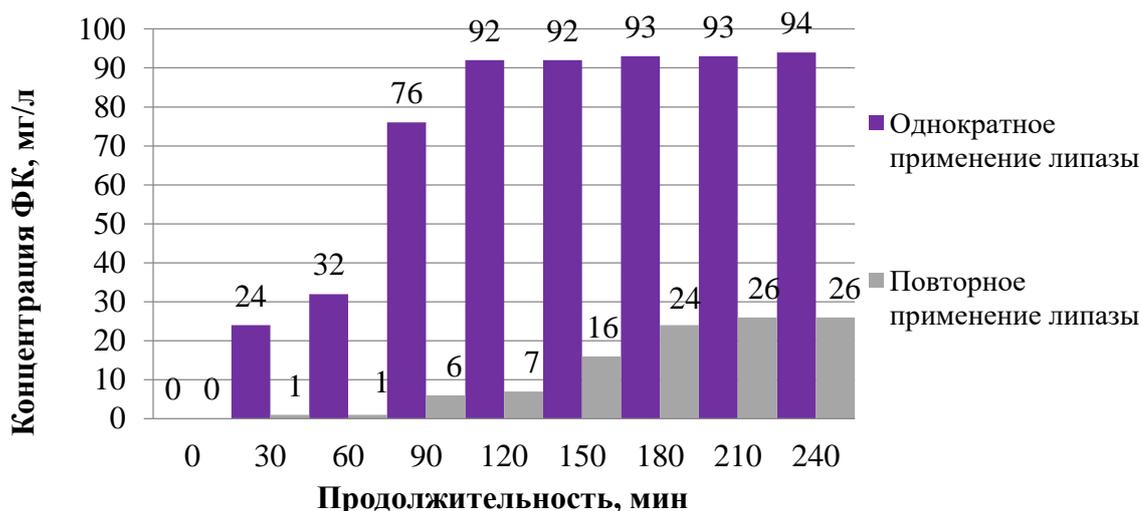


Рисунок 12 – Накопление феруловой кислоты в процессе ферментации

В течение двух часов ферментации образуется расчетное количество ФК. Липаза при повторном применении показала низкую эффективность в сравнении с коммерческой липазой. Потеря активности фермента может быть связана с некоторой степенью инактивации при первом применении, а также частичным смыванием фермента с носителя.

Исследование способности липазы Amano PS селективно гидролизовать ацетильную защиту проводили на примере эфира **6a**.

Эфир **6a** (2,5 ммоль) растворяли в 40 мл этанола, добавляли 0,24 г иммобилизованной липазы Amano PS. Ферментацию проводили при температуре 37 °C и постоянном перемешивании (150 об/мин) в шейкере-инкубаторе. Иммобилизованную липазу отфильтровывали и промывали этанолом. Снятие ацетильной защиты анализировали методом ТСХ, в качестве свидетеля использовали эфир **7a** полученный путем щелочного гидролиза ацетильной защиты с соединения **6a**. Анализ ТСХ реакционной смеси показал, что полное отщепление ацетильной защиты происходит в течение 4 часов ферментации.

Таким образом, подход к получению сложных эфиров ФК заключается в сочетании химических и ферментативных методов (схема 22).

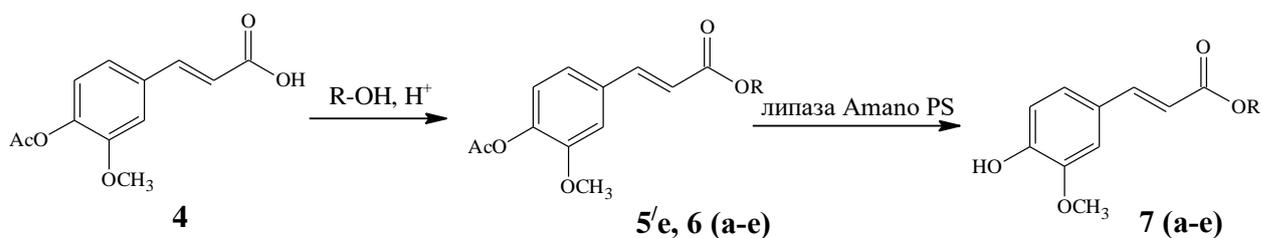


Схема 22

Применение липазы Amano PS в синтезе сложных эфиров ФК приводит к образованию целевого продукта за 2-4 часа ферментации, по сравнению с химическими методами процесс снятия ацетильной защиты селективен, что позволяет повысить выход и чистоту получаемого соединения.

3.1.5 Установление строения

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

3.2 Выделение сложных эфиров феруловой кислоты из пшеничных отрубей

3.2.1 Получение и анализ нерастворимых пищевых волокон

Соотношение компонентов в тканях зерновки пшеницы варьируется в зависимости от сортов и условий возделывания. Анализ пшеничных отрубей проводили в соответствии с пунктом 2.1.2.1. Состав пшеничных отрубей включает в себя основные компоненты – такие, как белок 17 %, крахмал 23 % и НПВ (гемицеллюлоза, целлюлоза и лигнин) 58 % на абсолютно сухое сырье (а.с.с.). Влажность пшеничных отрубей в среднем 11 %. На диаграмме представлен состав компонентов исследуемых пшеничных отрубей с мукомольного производства Алтайского края (г. Бийск).

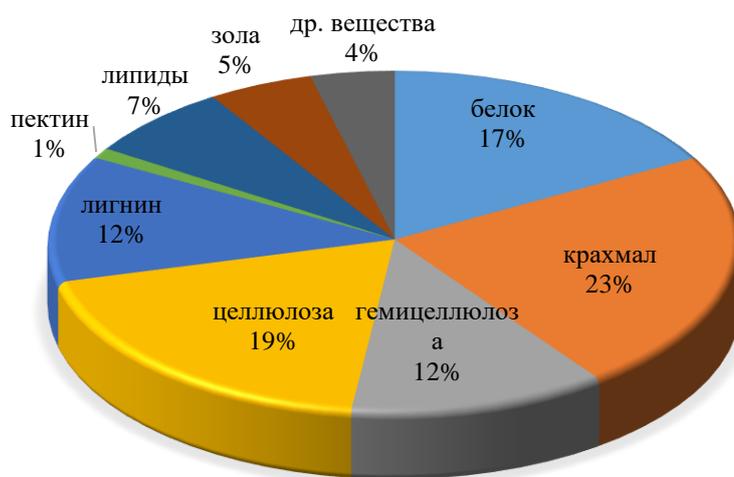


Рисунок 13 – Химический состав пшеничных отрубей мукомольного производства Алтайского края (на а.с.с.)

Для определения содержания НПВ в сырье на сегодняшний день имеют преимущества два метода: ферментативно-химический и ферментативно-гравиметрический. При ферментативно-химическом методе после ферментативного разложения крахмала (частичный дополнительный этап диметилсульфоксид-экстракции для отделения устойчивого крахмала)

гидролизуют полисахариды до моносахаридов и после их дериватизации определяют методом газовой хроматографии (ГХ). Уроновые кислоты определяются колориметрически или декарбоксилированием, а лигнин (лигнин Класона) – гравиметрически. При ферментативно-гравиметрическом методе ферментативно гидролизуют как крахмал, так и протеины. После фильтрации остаток определяется гравиметрически как НПВ [113]. В нашей работе использовался ферментативно-гравиметрический метод, так как он подходит как для количественного определения, так и для получения НПВ.

В результате ферментативной обработки амилазой и протеазой удаляется крахмал, белок, а также уходят вместе с гидролизатом растворимые пищевые волокна. Выход НПВ пшеничных отрубей составлял в среднем 60 % на а.с.с. Остаточное содержание в НПВ крахмала и белка в среднем 5,0 % и 3,4 % соответственно.

ФОС получают из растворимых пищевых волокон и НПВ растительного сырья. По литературным данным, растворимые пищевые волокна пшеницы не отличается по качественному мономерному составу от НПВ, однако количественный состав у них различен. Так, в РПВ содержится большее количество маннозы, галактозы, а глюкозы значительно меньше, чем в НПВ. Выход РПВ из пшеничных отрубей примерно в 4 раза ниже, чем выход НПВ.

Для гидролиза полисахаридов клеточных стенок растений описывается 2 разных метода. Первый метод включает гидролиз с трифторуксусной кислотой при 121 °С. Эффективным, тем не менее, признан гидролиз Саймана (Saeman) с серной кислотой [113]. Целлюлоза имеет микрокристаллическую структуру и в разбавленной серной кислоте не гидролизует. Гидролиз, предложенный Сайманом, включает в себя стадию пред-набухания, на которой материал клеточных стенок растений выдерживается в 12 М серной кислоте при умеренных температурах. После разбавления серной кислоты при 100 °С происходит непосредственно гидролиз.

При кислотном гидролизе все же существует проблема разложения уже свободных моносахаридов. Так, мономеры легче освобождаются в фуранозной форме из полисахаридов, чем в пиранозной, и α -гликозидные соединения являются более кислотонеустойчивыми чем, β -гликозидные. Поэтому условия гидролиза должны обеспечивать оптимум между освобождением и разложением моносахаридов. Так, в работе [113] описана модифицированная методика Саймана, которая включает пред-набухание с 12 М серной кислотой при 35 °С в течение 30 мин. После разбавления до 2 М серной кислоты проводился гидролиз продолжительностью 60 мин при 100 °С. Гидролиз НПВ пшеничных отрубей для установления моносахаридного состава проводили по модифицированной методике Саймана.

Для расщепления сложноэфирной связи между гидрокискоричными кислотами и арабиноксиланом может применяться как щелочной, так и ферментативный гидролиз. Количественное определение кислот после ферментативного гидролиза эстеразой может давать некорректные результаты в связи с ферментной специфичностью. На практике щелочные условия являются более эффективными для гидролиза сложноэфирных связей. При этом прежде всего варьируют концентрацию щелочи и продолжительность гидролиза. НПВ пшеничных отрубей гидролизовали 2 М раствором NaOH в течение 18 ч при комнатной температуре. Чтобы избежать процессов окисления, гидролиз должен проводиться в атмосфере азота. Под действием света может происходить изомеризация гидрокискоричных кислот (*цис*-/*транс*-конфигурации), поэтому гидролиз проводится в темноте [113]. Гидрокискоричные кислоты выделяют из гидролизата экстракцией после его нейтрализации и подкисления. В качестве органического растворителя возможно использование этилацетата или диэтилового эфира [113]. Нами был проведен сравнительный эксперимент экстракции гидрокискоричных кислот диэтиловым эфиром и этилацетатом. Экстракты анализировали с помощью тонкослойной хроматографии, элюент использовали хлороформ–этанол (10:1). В результате в экстракте диэтилового эфира было обнаружено

5 компонентов, в экстракте этилацетатом находились компоненты, которые остались на линии старта. Мы пришли к выводу, что этилацетат не подходит для целей экстракции гидроксикоричных кислот, так как при использовании указанного элюента коэффициент подвижности составляет для феруловой кислоты – 0,69; для *n*-кумаровой – 0,59; для синаповой – 0,65, для кофейной – 0,31.

Таким образом выделение гидроксикоричных кислот из щелочного гидролизата проводили диэтиловым эфиром, условия проведения гидролиза и экстракции представлены в разделе 2.1.2.4.

Анализ кислотного и щелочного гидролизатов проводили методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель» в соответствии с разделом 2.1.2.5 и 2.1.2.6.

Результаты определения количественного мономерного состава сведены в таблицу 13.

Таблица 13 – Количественный мономерный состав НПВ

Компонент	Концентрация мг/г НПВ	
	Исследуемые НПВ	литературные данные [113]
Рафиноза	–	не найдено
Фукоза	–	не найдено
Арабиноза	99,7	102,50
Ксилоза	240,0	207,10
Моноза	–	17,10
Глюкоза	368,3	204,90
Галактоза	–	13,40
Феруловая кислота	11,50	5,95
<i>n</i> -Кумаровая кислота	3,40	0,2
Кофейная кислот	0,03	не найдено
Синаповая кислота	0,07	0,079

3.2.2 Ферментативный гидролиз нерастворимых пищевых волокон

Для получения ФОС необходимы методы гидролиза НПВ, которые расщепляют гликозидные связи, однако условия гидролиза должны сохранять сложноэфирную связь между ФК и углеводами. Для расщепления гликозидных связей могут применяться кислотные или ферментативные методы гидролиза. Эти виды гидролиза ведут к разным продуктам расщепления [60].

Используемые ферменты должны расщеплять разные виды гликозидных связей для того, чтобы исследовать соединения ФК с различными углеводами полисахаридов клеточных стенок растений. В литературе встречается применение разных ферментных препаратов. Часто применяют смесь разных полисахаридгидролаз, выделенных из *Trichoderma viride* под названием «Целлюлаза». Еще чаще находит применение изолированная ферментная смесь Дриселаза из *Basidiomyceten*. Дриселаза содержит различные эндо- и экзоферменты, включая арабиназу, целлюлазу, ксиланазу, галактаназу и полигалактуроназу [113].

В нашей работе использовалась грибная гемицеллюлаза из штамма *Trichoderma longibrachiatum* под коммерческим названием «Брюзайм ВGX» имеющая ксиланазную, β -глюкканазную и целлюлазную активности. В соответствии с паспортом, рабочие зоны препарата: pH 3,5-7,0 и температура 45-75 °C. Инактивация препарата наступает при температурах выше 80 °C. Ферментацию проводили при 42 °C в темноте при перемешивании в течение 72 ч, гидромодуль 1:20, используя 1%-ный ферментный препарат.

3.2.3 Фракционирование гидролизата на Амберлите

Ферментативный гидролизат НПВ пшеничных отрубей содержит моно-/олигосахариды, ферулоилированные моно-/олигосахариды, а также свободную ФК. Для выделения фракции ФОС возможно применение

колоночной хроматографии. Материал колонны должен подбираться с условием разделения на основе обратимой адсорбции. При элюировании, например, водой гидрофобные вещества (ФОС и фенольные вещества) должны оставаться в колонне. Для выделения ФОС из гидролизата растительного сырья в литературе описывается применение полистирольного адсорбента – Амберлит ХАД-2 (Amberlite ХАД-2) [30,113]. Это полимерный адсорбент, который сорбирует прежде всего ароматические соединения. При хроматографии через колонку пропускают гидролизат, затем элюируют последовательно водой, смесью вода:спирт (соотношение 1:1) и чистым спиртом. С водой элюируются гидрофильные моно- и олигосахариды, смесью вода/спирт элюируются менее гидрофильные молекулы ФОС, и со спиртом – свободная ФК, а также элюируются прочие более неполярные фенольные вещества.

3.2.3.1 Исследование процесса фракционирования и влияния элюента

В литературе для выделения ФОС на Амберлите ХАД-2 описано применение смеси вода:метанол [30,113]. Замена метанола другими низшими спиртами, а также влияние марок адсорбента типа Амберлит в литературе не описывается. В нашей работе проведено сравнительное исследование фракционирования гидролизата НПВ пшеничных отрубей с использованием метанола и этанола в составе элюента. Фракционирование гидролизата проводили колоночной хроматографией на Амберлите ХАД-4 в соответствии с разделом 2.1.2.9.

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

При анализе гидролизата НПВ методом Фолина-Чокальтеу было установлено, что в 90 см³ гидролизата содержится 42-50 мг (было принято за 100 %) фенольных веществ в пересчете на ФК. При пропускании гидролизата

на колонке сорбируется 77-80 % фенольных веществ, оставшаяся часть остается в гидролизате после хроматографии.

Результаты распределения фенольных веществ гидролизата по фракциям в процессе хроматографирования представлено в таблице 14.

Таблица 14 – Распределение феруловой кислоты по фракциям

Образец	Общее содержание феруловой кислоты	
	мг	%
Элюирование с метанолом		
Гидролизат	47,3±3,4	100,0
Фракция №1	1,5±1,1	3,2
Фракция №2	22,3±4,0	47,1
Фракция №3	7,1±1,5	15,0
Гидролизат после хроматографии	9,5±2,8	20,0
Потери на колонке	6,9±2,3	14,7
Элюирование с этанолом		
Гидролизат	45,4±3,4	100,0
Фракция №1	1,4±1,2	3,0
Фракция №2	28,4±3,5	62,6
Фракция №3	3,3±1,5	7,3
Гидролизат после хроматографии	10,5±2,5	23,1
Потери на колонке	1,8±2,2	4

Наибольшее содержание фенольных веществ во фракции №2 – 47,1 % для водно-метанольного элюента и 62,6 % для водно-этанольного элюента. Согласно литературным данным, во фракции №2 элюируются соединения связанных фенольных кислот с углеводами, поэтому можно утверждать, что в гидролизате преимущественно содержатся связанные фенольные вещества.

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

Из вышеизложенного следует, что применение этанола для хроматографии гидролизата на Амберлите является не только альтернативой

применения метанола, но этанол оказывается более эффективным компонентом элюента [131].

3.2.3.2 Исследование состава фракций

Фракции, полученные после хроматографии на Амберлите XAD-4, анализировали методами УФ-спектроскопии и тонкослойной хроматографии (раздел 2.1.2.10). По методу Фолина-Чокальтеу определяются как свободные, так и связанные фенольные вещества, поэтому анализ свободных гидроксикоричных кислот дает информацию о количестве связанных кислот во фракциях. Анализ свободных гидроксикоричных кислот проводили методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель» в соответствии с разделом 2.6.

Результаты количественного определения гидроксикоричных кислот во фракциях показывают наличие только свободной ФК. Она не десорбируется с Амберлита XAD-4 водой (фракция №1) и очень плохо десорбируется водными растворами спиртов (фракция №2). Для десорбции лучше всего подходят метиловый и этиловый спирты, позволяющие количественно удалить ФК с сорбента (таблица 15).

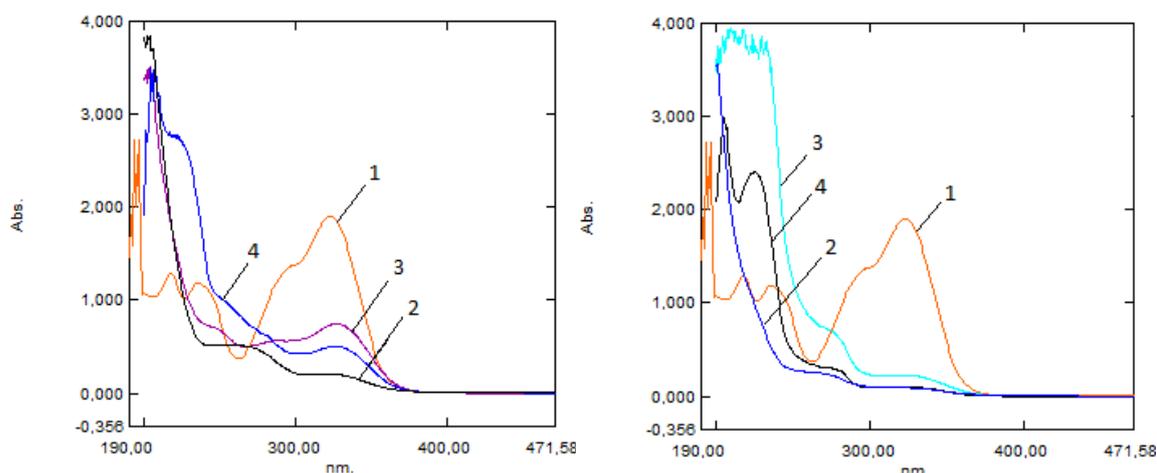
Таблица 15 – Содержание свободной феруловой кислоты во фракциях

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

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

При пропускании гидролизата через колонку с сорбентом в гидролизате остается около 20 % фенольных веществ, определяемых по методу Фолина-Чокальтеу. Гидролизат, содержащий непоглощенные фенольные вещества, подвергали повторному хроматографированию, которое приводит к снижению их концентрации в 2,5 раза.

Сравнение УФ-спектров фракций показывает, что при первом разделении гидролизата на Амберлите XAD-4 происходит полное поглощение ФК, для которой характерен максимум поглощения при 325 нм (рисунок 14).

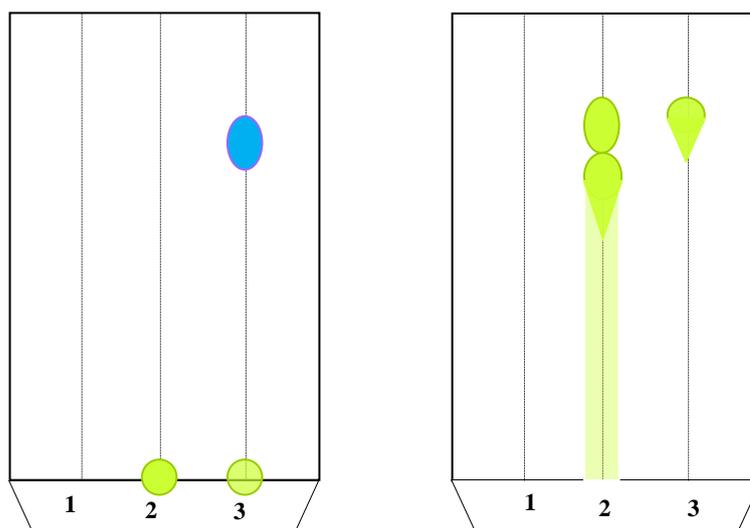


1 – ФК, 2 – фракция №1, 3 – фракция №2, 4 – фракция №3

Рисунок 14 – УФ-спектры ФК и полученных фракций (слева 1-е пропускание)

Анализ УФ спектров фракций после повторного пропускания гидролизата показывает отсутствие поглощения при 325 нм, что свидетельствует об отсутствии ФК и ее производных в элюатах.

Для качественного определения наличия ФОС проводили тонкослойную хроматографию в двух системах растворителей. Хроматограммы располагали под УФ-светом до и после обработки парами аммиака. После обработки аммиаком пятна бледно фиолетового цвета начинали флуоресцировать светло-зеленым цветом, кроме пятна, которое наблюдалось в системе I во фракции №3, оно флуоресцировало голубым цветом. Голубое пятно идентифицировали как феруловую кислоту. В системе II во фракции №2 свечение наблюдалось с линии старта, происходило разделение двух ярких пятен. Для фракции №3 наблюдалось одно бледное пятно. Фракция №1 не имела пятен в обеих системах растворителей (рисунок 15).



1 – фракция №1; 2 – фракция №2; 3 – фракция №3

Рисунок 15 – Хроматограммы упаренных фракций, полученных фракционированием гидролизата пшеничных отрубей (система I – слева, система II – справа)

Светло-зеленая флуоресценция пятен после обработки парами аммиака указывает на ФОС [30]. ФК после обработки парами аммиака приобретает ярко-голубую флуоресценцию в УФ-свете [139].

Наличие углеводной части в соединениях, находящихся во фракциях №2 и №3, установили с помощью анилинового проявителя.

Из вышеизложенного следует, что ФК сорбируется и подвергается хроматографии при первом пропускании через колонку, фракция № 3 содержит преимущественно свободную ФК, фракция № 2 содержит ФОС.

3.2.3.3 Влияние марки Амберлита на процесс фракционирования

Эффективность сорбции Амберлита типа ХАД объясняется его структурой (рисунок 16).

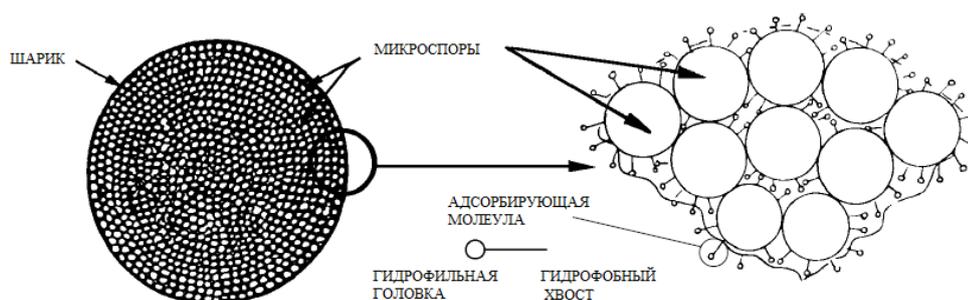


Рисунок 16 – Структура Амберлита типа XAD

Пористая структура Амберлита представляет собой открытые ячейки такого типа, что молекулы воды легко могут проникать в поры сорбента. Адсорбирующиеся соединения не проникают в глубину микросферы полимера, а сорбируются на его поверхности, что позволяет быстро элюировать адсорбат в соответствии с гидрофобностью соединений.

Смолы XAD-7, 8, 9 и 12 более удобны для отбора полярных соединений, а XAD-1, 2 и 4 – для неполярных. Сорбционная емкость сорбентов уменьшается в ряду: XAD-4 > XAD-7 > XAD-2 >> XAD-1, хотя XAD-7 [140].

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

Таблица 16 – Физические свойства марок Амберлита типа XAD

Физический показатель	Амберлит		
	XAD-4	XAD-7HP	XAD-16H
Внешний вид	белые, полупрозрачные шарики	Белые, прозрачные шарики	Белые, полупрозрачные шарики
Пористость, мл пор/мл шарика	$\geq 0,50$	$\geq 0,50$	$\geq 0,55$
Площадь поверхности, м ² /г	≥ 750	≥ 380	≥ 800
Средний диаметр пор, Å	140	90	145

Во всех полученных фракциях, а также в гидролизате до и после хроматографии определяли содержание ФВ методом Фолина-Чокальтеу. Все полученные данные по содержанию ФВ во фракциях сведены в таблицу 17.

Таблица 17 – Результаты фракционирования гидролизата на различных марках Амберлита

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

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

3.2.4 Идентификация сложных эфиров феруловой кислоты

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

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

Анализируя ИК-спектр (рисунок 17), можно сказать, что в образце ФОС гидроксильные группы включены в межмолекулярную Н-связь и имеют характерную широкую полосу поглощения в области 3385 см⁻¹. Отдельная

полоса в области 2932 см^{-1} характеризует симметричное валентное колебание метиленовой группы углеводов. Полоса 1659 см^{-1} определяется как валентные колебания $\text{C}=\text{O}$, которая является характерным пиком поглощения сложноэфирных связей, между углеводом и ФК [141].

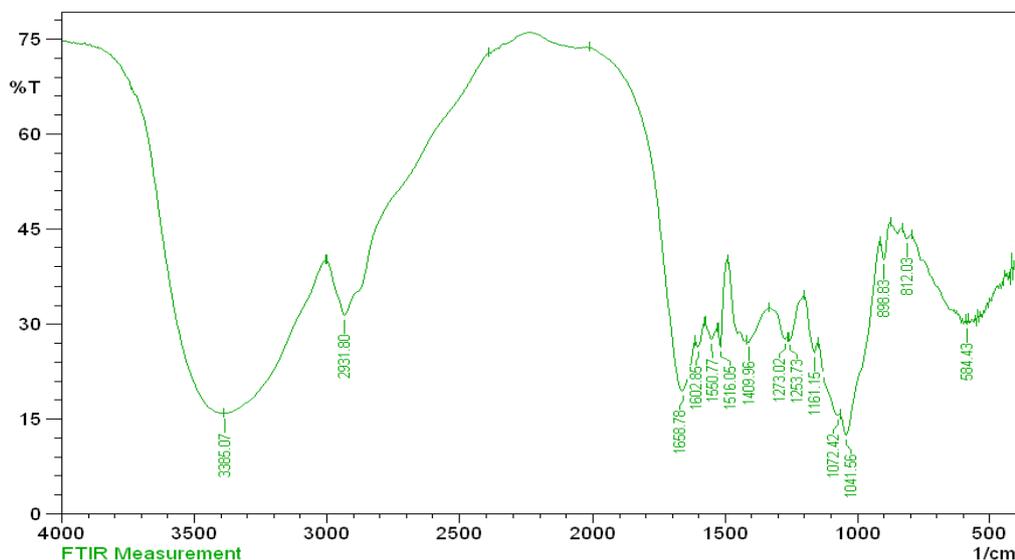


Рисунок 17 – ИК-спектр ферулоилолигосахаридов из пшеничных отрубей

Полоса около 1041 см^{-1} соответствует валентному колебанию мостика $\text{C}-\text{O}-\text{C}$. В ИК-спектре эта полоса очень интенсивная, что может быть связано с наличием большого количества эфирных связей между углеводом и феруловой кислотой в молекуле ФОС, а также других эфирных связей олигосахаридов. По литературным данным [141], интенсивный пик поглощения около 1037 см^{-1} указывает на образование простой эфирной связи $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ между арабинозой и атомом углерода $\text{C}-3$ пиранозной формы ксилозы. Полоса поглощения в области 1516 см^{-1} характерна для колебаний скелета структуры ароматического кольца, что свидетельствует о наличии моноядерного ароматического кольцевого фрагмента.

По наличию в ИК-спектрах полосы поглощения в области 840 см^{-1} и 890 см^{-1} можно судить об α - или β -конфигурации гликозидных связей

соответственно. Образец ФОС имеет β -конфигурацию остатков D-ксилопираноз, характерная полоса поглощения наблюдается при 899 см^{-1} .

Образец ФОС разделяли ВЭЖХ с УФ-детекцией, детектирование проводили при 280 нм. При этом детектируются все мономерные фенольные кислоты, поэтому для обзора хроматограмм предлагается данная длина волны [24]. Исходя из хроматограмм, представленных на рисунке 18, можно сказать, что образец ФОС состоит из четырех компонентов.

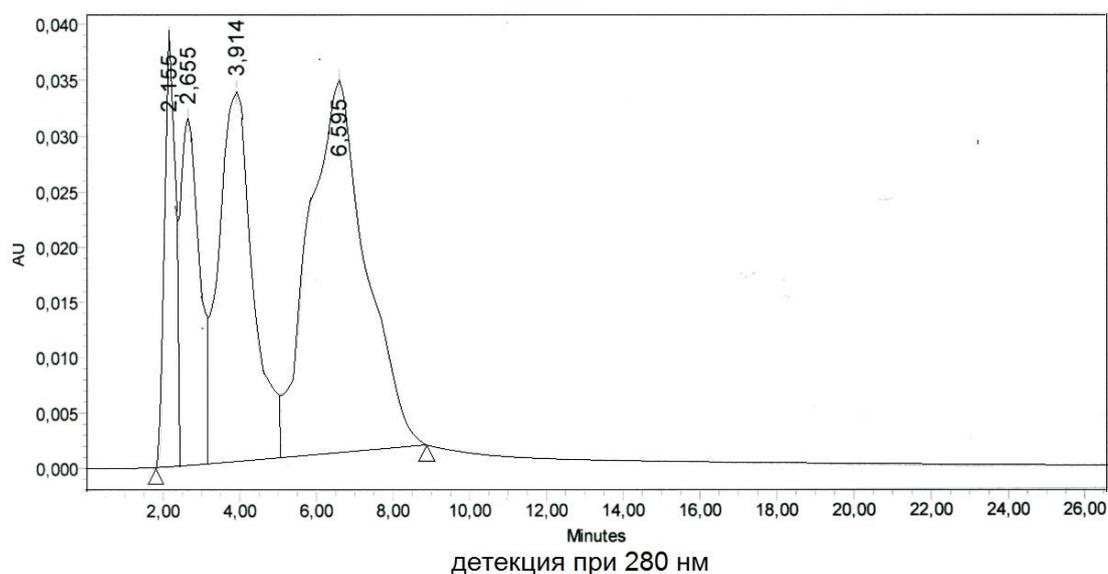


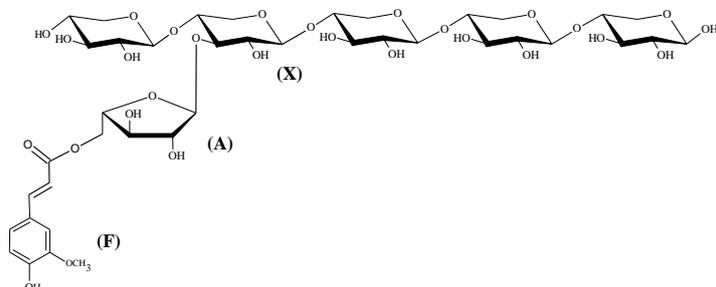
Рисунок 18 – ВЭЖХ-УФ ФОС из пшеничных отрубей

При определении углеводов методом капиллярного электрофореза в кислотном гидролизате ФОС были обнаружены ксилоза и арабиноза. При определении гидроксикоричных кислот в щелочном гидролизате была обнаружена ФК. Она идентифицирована как единственная фенольная кислота, так как фенольные кислоты имеют отрицательную площадь пика в буфере.

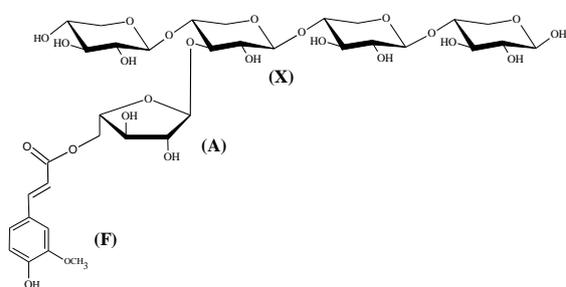
Количественное соотношение компонентов в мг на 1,4 г ФОС составляет: феруловая кислота – 35,7; арабиноза – 199,7 и ксилоза – 1165 (соотношение 0,2:1:6).

Наши результаты анализа ФОС из пшеничных отрубей согласуются с результатами, полученными в работе [141], в которой были

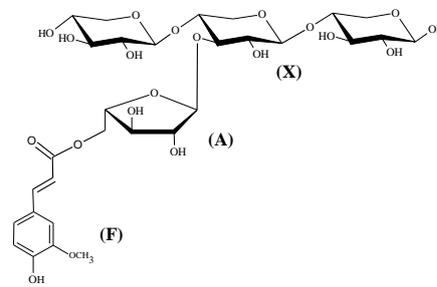
идентифицированы четыре основных ФОС: ферулоиларабинозилксилопентоза (FAX5), ферулоиларабинозилксилотетроза (FAX4), ферулоиларабинозилксилотриоза (FAX3), ферулоиларабинозилксилобиоза (FAX2).



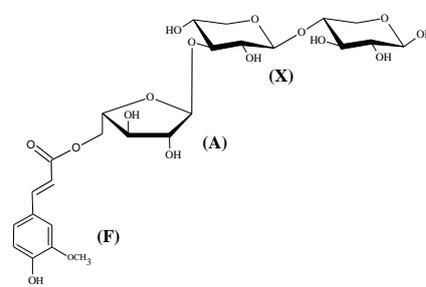
Ферулоиларабинозилксилопентоза (FAX5)



Ферулоиларабинозилксилотетроза (FAX4)



Ферулоиларабинозилксилотриоза (FAX3)



Ферулоиларабинозилксилобиоза (FAX2)

Рисунок 19 – Ферулоилолигосахариды выделенные из пшеничных отрубей

3.3 Оценка цитотоксичности сложных эфиров феруловой кислоты

Количественные данные, полученные при исследовании выживаемости клеток под действием разных концентраций производных ФК, сведены в таблицу 18. По результатам исследования цитотоксичности построены кривые выживаемости (рисунок 20).

Таблица 18 – Результаты исследования цитотоксичности

Конечная концентрация, г/л	Выживаемость НСТ116, %					
	ФК	Синтезированные производные ФК				Природные производные ФК
		4a	4b	4c	4d	ФОС
0	100	100	100	100	100	100
0,000156	99	98	97	100	88	100
0,000313	98	91	90	99	86	100
0,000625	92	84	86	98	86	98
0,00125	88	83	74	96	85	96
0,0025	86	81	73	93	86	95
0,005	84	78	72	90	85	95
0,01	83	33	8,8	90	81	93
0,02	77	6,1	8,7	88	64	83

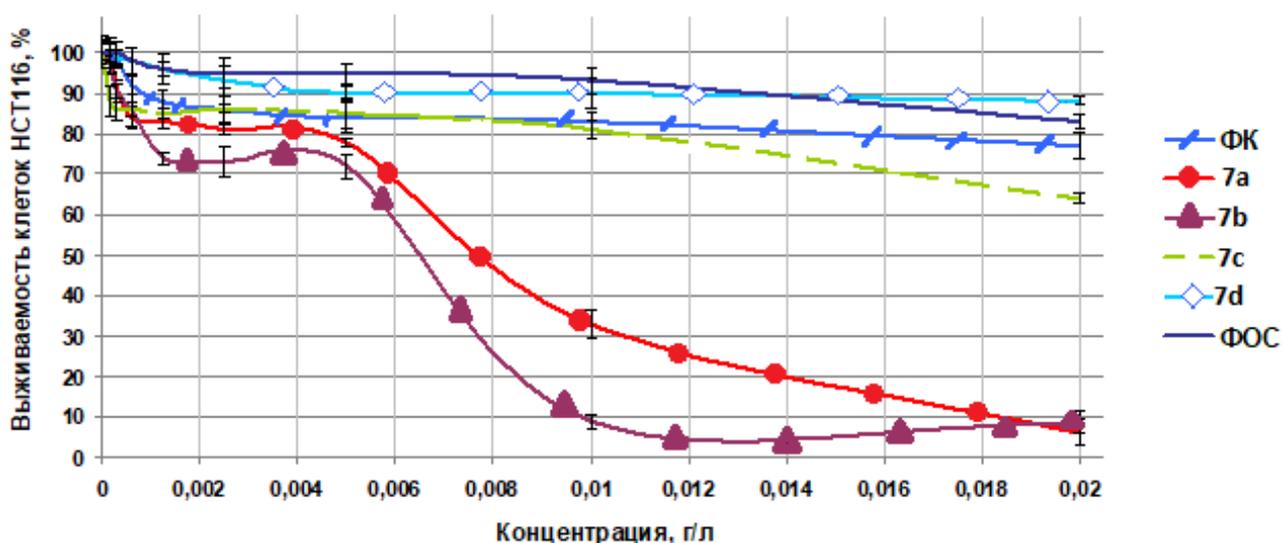


Рисунок 20 – Кривые выживаемости клеток НСТ116 при действии растворов производных ФК разной концентрации

На клеточную линию НСТ116 исследованные соединения действуют в различной степени. Из графиков видно, что все синтезированные производные ФК проявляют большую активность, чем сама ФК. Наиболее активны из представленного ряда растворы синтезированных производных 4a и 4b. Производные ФК, выделенные из пшеничных отрубей (ФОС), оказались наименее активными в отношении опухолевых клеток НСТ116.

При воздействии максимальной концентрации растворов все соединения показывают низкую выживаемость клеток. Морфологические признаки клеточной гибели наблюдались после первых 24 часов инкубации клеток с растворами соединений и развивались в течение всего времени инкубации (72 часа). Гибель клеток является необратимой.

По результатам исследования цитотоксичности определены показатели IC_{50} , которые приведены в таблице 19.

Таблица 19 – Показатели цитотоксичности исследованных растворов в отношении опухолевых клеток НСТ116

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

Наилучший показатель цитотоксичности соединений 7a (бензиловый эфир ФК) и 7b (фенилэтиловый эфир ФК), вероятней всего, можно объяснить тем, что в структуре этих соединений имеется еще одно ароматическое кольцо. Полученная смесь соединений ферулоилолигосахаридов из пшеничных отрубей в отношении опухолевых клеток НСТ116 имеет самый худший показатель цитотоксичности.

Таким образом, интерес представляют конъюгаты феруловой кислоты с соединениями, имеющими ароматические кольцевые структуры.

ВЫВОДЫ

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

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

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

4. Исследованы производные феруловой кислоты с моно- и олигосахаридами полученные путем фракционирования гидролизата пшеничных отрубей. Доказано, что использование этанола при элюировании компонентов гидролизата позволяет снизить потери феруловой кислоты в 4 раза по сравнению с метанолом. Установлено, что мономерный состав выделенных ферулоилолигосахаридов представлен феруловой кислотой, арабинозой и ксилозой в соотношении 0,2:1:6 соответственно.

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

феруловой кислоты проявляют бóльшую активность по сравнению с природными производными, выделенными из пшеничных отрубей.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ou, S. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. / S. Ou, K.C. Kwok // *J. Sci. Food Agric.* – 2004. – 84. – P. 1261–1269.
2. Mancuso, C. Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects. / C. Mancuso, R. Santangelo // *Food Chem. Toxicol.* – 2014. – 65. – P. 185–195.
3. Song, Y. Ferulic acid alleviates the symptoms of diabetes in obese rats. / Y. Song, T.G. Wu, X.Q. Yang, X.Y. Chen et al. // *J. Funct. Foods.* – 2014. – 9. – P. 141–147.
4. Zhao, Z Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review / Z. Zhao, M.H. Moghadasian // *Food Chem.* – 2008. – 109. – P. 691–702.
5. Couto, J. S. Development of a novel biocatalytic approach for the synthesis of feruloylated glycosides by feruloyl esterase expressed in selected multi-enzymatic extracts. Degree of Master of Science dissertation, Canada, 2011. – 97 p.
6. Нилова, Л.П. Функциональные и технологические свойства растительных масел / Л.П. Нилова, Т.В. Пилипенко, К.Ю. Маркова, З.Х. Сикоев // *Масложировая промышленность*, 2013 – №6 – С. 22–27.
7. Patel, M. Gamma-oryzanol from rice bran oil – A review / M. Patel, S. N. Naik // *Journal of Scientific & Industrial Research.* – 2004. – Vol. 63. – P. 569–578.
8. Pei, K. Derivatives of Ferulic Acid: Structure, Preparation and Biological Activities / K. Pei, J. Ou, C. Huang, S. Ou // *Annual Research & Review in Biology.* – 2015. – 5(6). – P. 512–528.
9. Paiva, L. B. Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field / L. B. Paiva, R. Goldbeck, W. D. Santos, F. M. Squina // *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2013. – Vol. 49, № 3. – P. 395–411.

10. Тутельян, В.А. Биологически активные вещества растительного происхождения. Фенольные кислоты: распространенность, пищевые источники, биодоступность / В.А. Тутельян, Н.В. Лашнева // Вопросы питания, том 77, №1 – 2008. – С. 4–19.

11. Ou, J. Feruloylated oligosaccharides: structure, metabolism and function / J. Ou, Z. Sun // J. Funct. Foods. – 2013. – 7. – P. 90–100.

12. Rondini, L. Sulfated ferulic acid is the main in vivo metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats / L. Rondini, M.N. Peyrat-Maillard, A. Marsset-Baglieri, C. Berset // J. Agric. Food Chem. – 2002. – 50. – P. 3037–3041.

13. Tada, Y. Acute oral toxicity of ferulic acid, natural food additive, in rats / Y. Tada, K. Tayama, N. Aoki // Ann. Rep. Tokyo Metr. Lab. P.H. – 1999. – 50. – P. 311–313.

14. Hyogo, A. Antioxidant effects of protocatechuic acid, ferulic acid, and caffeic acid in human neutrophils using a fluorescent substance // A. Hyogo, T. Kobayashi, E. Garcia Del Saz, H. Seguchi / Int. J. Morphol. – 2010. – 28(3). – P. 911–920.

15. Khare, V. Pharmacognostic Evaluation and Antioxidant Activity of *Urtica dioica* L. / V. Khare, P. Kushwaha, S. Verma, A. Gupta, S. Srivastava, A. K. S. Rawat // Chinese Medicine. – 2012. – Vol. 3. – P. 128–135.

16. Alamed, J. Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods / J. Alamed, W. Chaiyasit, D.J. McClements, E.A. Decker // J Agric Food Chem. – 2009. – 57(7). – P. 2969–2976.

17. Brewer, M.S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications Comprehensive Reviewsin / Food Science and Food Safety. – 2011. – Vol.10. – P. 221–247.

18. Rossi, C. Intercalation of the radical scavenger ferulic acid in hydrotalcite-like anionic clays / C. Rossi, A. Schoubben, M. Ricci et al. // International Journal of Pharmaceutics. – 2005. – Vol. 295, №1-2. – P. 47– 55.

19. Дьяков, А.А. Противоаритмическое действие феруловой кислоты / А. А. Дьяков, В. Н. Перфилова, И. Н. Тюренков // Вестник аритмологии. – 2005. – № 39. – С. 49–52.

20. Перфилова, В.Н. Кардиопротективное действие феруловой кислоты при стрессорном повреждении сердца / В.Н. Перфилова, А.А. Дьяков, И.Н. Тюренков // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2005. – №5. – С.19–22.

21. Назарова, Л.Е. Влияние кислоты феруловой на зону некроза, возникающего в результате окклюзии средней мозговой артерии / Л.Е. Назарова, И.Н. Дьякова // Медицинский вестник Башкортостана. – 2011. – № 3. – С.133–135.

22. Ивашев, М.Н. Влияние оксикоричных кислот на систему мозгового кровообращения / М.Н. Ивашев, Р.Е. Чуклин // Фармация и фармакология. – 2013. – № 1. – С. 44–48.

23. Osterhues, A. Untersuchungen zum Einfluss von Ferulasäure auf zelluläre Mechanismen der Kolonkarzinogenese und Tumorprogression mit einem Zellkulturmodell (HT29 Klon 19A); Dissertation, TU München, 2007. – 123 p.

24. Laddomada, B. Wheat Bran Phenolic Acids: Bioavailability and Stability in Whole Wheat-Based / B. Laddomada, S. Caretto, G. Mita // Foods Molecules. – 2015. – 20. – P. 15666–15685.

25. Manach, C. Polyphenols: food sources and bioavailability / C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jime'nez // Am J Clin Nutr. – 2004. – 79. – P. 727–47.

26. Compton, D.L. Antioxidant properties of feruloyl glycerol derivatives / D.L. Compton, J.A. Laszlo, K.O. Evans // Ind. Crops Prod. – 2012. – 36. – P. 217–221.

27. Nystrom, L. A comparison of the antioxidant properties of steryl ferulates with tocopherol at high temperatures / L. Nystrom, T. Achrenius, A.-M. Lampi, R.A. Moreau, V. Piironen // Food Chemistry. – 2007. – 101. – P. 947–954.

28. Ohta, T. Antioxidant activity of ferulic acid beta-glucuronide in the LDL oxidation system / T. Ohta, T. Nakano, Y. Egashira, H. Sanada // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 1997. – 61(11). – P. 1942–1943.
29. Lin, Q. In vitro antioxidant activity of feruloyl arabinose isolated from maize bran by acid hydrolysis / Q. Lin, S. Ou, Q. Wen // *J Food Sci. Technol.* – 2014. – 51(7). – P. 1356–1362.
30. Yuan, X. Antioxidant activity of feruloylated oligosaccharides from wheat bran / X. Yuan, J. Wang, H. Yao // *Food Chemistry.* – 2005. – 90. – P. 759–764.
31. Anselmi, C. Antioxidant activity of ferulic acid alkyl esters in a heterophasic system: a mechanistic insight / C. Anselmi, M. Centini, P. Granata, A. Segal and al. // *J. Agric. Food Chem.* – 2004. – 52. – P. 6425–6432.
32. Funasaka, Y. Depigmenting Effect of α -Tocopheryl Ferulate on Normal Human Melanocytes / Y. Funasaka, M. Komoto, M. Ichihashi // *Pigment cell Res* – 2000. – 13 (Suppl. 8). – P. 170–174.
33. Funasaka, Y. The depigmenting effect of α -tocopheryl ferulate on human melanoma cells / Y. Funasaka, A.K. Chakraborty, M. Komoto, Ohashi A., M. Ichihashi // *British Journal of Dermatology.* – 1999. – 141. – P. 20–29.
34. Jankovská, P. The determination of ferulic acid in sugar beet pulp / P. Jankovská, J. Eopíková, A. Sinitsya // *Czech J. Food Sci.* – 2001. – 19. – P. 143–147.
35. Levigne, S.V. Isolation from Sugar Beet Cell Walls of Arabinan Oligosaccharides Esterified by Two Ferulic Acid Monomers / S.V. Levigne, M.-C.J. Ralet, B.C. Quemener, B.N.-L. Pollet and al. // *Plant Physiology.* – 2004. – Vol. 134. – P. 1173–1180.
36. Ishii, T. Structural characterization of feruloyl oligosaccharides from spinach-leaf cell walls / T. Ishii, T. Tobita // *Carbohydrate Research.* – 1993. – 248. – P. 179–190.

37. Bunzel, M. Association of non-starch polysaccharides and ferulic acid in grain amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) dietary fiber / M. Bunzel, J. Ralph, H. Steinhart // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2005. – 49. – P. 551–559.
38. Chen, X.-Y. An Update on Oligosaccharides and Their Esters from Traditional Chinese Medicines: Chemical Structures and Biological Activities / X.-Y. Chen, R.-F. Wang, B. Liu // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* – 2015. – P. 1–23.
39. Vafiadi, C. Structural Characterisation by ESI-MS of Feruloylated Arabino-oligosaccharides Synthesised by Chemoenzymatic Esterification / C. Vafiadi, E. Topakas, E.J. Bakx, H.A. Schols, P. Christakopoulos // *Molecules.* – 2007. – 12. – P. 1367–1375.
40. Szwajgier, D. Anticholinesterase activity of phenolic acids and their derivatives // *Zeitschrift fur Naturforschung C.* – 2013. – 68. – P. 125–132.
41. Nazaré, A.C. Ethyl Ferulate, a Component with Anti-Inflammatory Properties for Emulsion-Based Creams / A.C. Nazaré, C.M.Q.G. Faria, B.G. Chiari, M.S. Petrônio and al. // *Molecules.* – 2014. – 19. – P. 8124–8139.
42. Zhang, L.-W. A comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives: Evaluation of their efficacy and safety / L.-W. Zhang, S.A. Al-Suwaye, P.-W. Hsieh, J.-Y. Fang // *International Journal of Pharmaceutics.* – 2010. – 399. – P. 44–51.
43. Sultana, R. Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders / *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2012. – 1822. – P. 748–752.
44. Delazar, A. Two bioactive ferulic acid derivatives from *Eremostachys glabra*. / A. Delazar, M. Shoeb, Y. Kumarasamy, M. Byres and al. // *DARU* – 2004. – 12. – P. 49–53.
45. Figueroa-Espinoza, M.C. Phenolic acids enzymatic lipophilization / M.C. Figueroa-Espinoza, P. Villeneuve // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – 53. – P. 277–2787.

46. Anselmi, C. Interaction of ferulic acid derivatives with human erythrocytes monitored by pulse field gradient NMR diffusion and NMR relaxation studies / C. Anselmi, F. Bernardi, M. Centini, E. Gaggelli and al. // *Chem. Phys. Lipids.* – 2005. – 134. – P. 109–117.

47. Sultana, R. Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* – 2012. – 1822. – P. 748–752.

48. Evans, K.O. Feruloyl glycerol and 1,3-diferuloyl glycerol antioxidant behavior in phospholipid vesicles / K.O. Evans, D.L. Compton, J.A. Laszlo, M. Appell // *Chemistry and Physics of Lipids.* – 2016. – 195. – P. 1–11.

49. Bernards, M.A. Alkyl ferulates in wound healing potato tubers / M.A. Bernards, N.G. Lewis // *Phytochemistry.* – 1992. – Vol. 31, № 10. – P. 3409–3412.

50. Anselmi, C. Conformational analysis: A tool for the elucidation of the antioxidant properties of ferulic acid derivatives in membrane models / C. Anselmi, M. Centini, M. Andreassi, A. Buonocore and al. // *J. Pharam. Biomed. Anal.* – 2004. – 35. – P. 1241–1249.

51. U.S. Patent 7744856 B2 Formulations with feruloyl glycerides and methods of preparation / Compton D.L., DeFilippi L.J., Grall S.G., Kinney J.F., Laszlo J.A.; Patent Applicant Biotech Res and Dev Corp [US], Biotechnology Res & Dev [US]. Patent Submission Date 28.02.2008; Patent Grant Date 29.06.2010. – 11 p.

52. Shimomara, H. Phenolic glycerides from *Lilium auratum* / H. Shimomara, J. Sashida, J. Mimari // *Phytochemistry.* – 1987. – 26, № 3. – P. 844–845.

53. Gracüa, J. Structure in Potato Periderm: Glycerol, Long-Chain Monomers, and Glyceryl and Feruloyl Dimers / J. Gracüa, H. P. Suberin // *J. Agric. Food Chem.* – 2000. – 48. – P. 5476–5483.

54. Clifford, M.N. Characterization by LC-MSⁿ of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyldimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-

dimethoxycinnamoylquinic acids / M.N. Clifford, S. Knight, B. Surucu, N. Kuhnert // *J. Agric. Food Chem.* – 2006. – 54. – P. 1957–1969.

55. Monteiro, M.C. Chlorogenic acids in Brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops / M.C. Monteiro, A. Farah // *Food Chem.* – 2012. – 134. – P. 611–614.

56. Mizushina, Y. Cycloartenyl trans-ferulate, a component of the bran byproduct of sake-brewing rice, inhibits mammalian DNA polymerase and suppresses inflammation / Y. Mizushina, I. Kuriyama, A. Yamazaki, T. Akashi, H. Yoshida // *Food Chemistry.* – 2013. – 141. – P. 1000–1007.

57. Sakunpak, A. Antioxidant individual γ -oryzanol screening in cold pressed rice bran oil of different thai rice varieties by HPLC-DPPH method / A. Sakunpak, J. Suksaeree, P. Pathompak, T. Charoonratana, N. Sermkaew // *Int J Pharm PharmSci.* – 2014. – Vol 6, Iss 6. – P. 592–597.

58. Fernandes, F. Kale extract increases glutathione levels in V79 cells, but does not protect them against acute toxicity induced by hydrogen peroxide / F. Fernandes, C. Sousa, F. Ferreres, P. Valentão and al. // *Molecules.* – 2012. – 17. – P. 5269–5288.

59. Iiyama, K. Covalent Cross-Links in the Cell Wall / K. Iiyama, T.B.T. Lam, B.A. Stone // *Plant Physiol.* – 1994. – 104. – P. 315–320.

60. Ishii, T. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.* – 1997. – 127. – P. 111–127.

61. Ou, S. A study on the synthesis of starch ferulate and its biological properties. / S. Ou, A. Li, A. Yang // *Food Chem.* – 2001. – 74. – P. 91–95.

62. Gokhale, K.M. New Method for Synthesis of 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) prop-2-enoic acid and 1-feruloyl- β -D-glucose // *Int. J. Pharm. Phytopharmacol. Res.* – 2011. – 1(1). – P. 17–22.

63. EP 0681825 A2 Ferulic acid ester antioxidant/UV absorbent / H. Taniguchi, E. Nomura, T. Tsuno, S. Minami, Applicant: Tsuno Food Industrial Co., Ltd., Wakayama Prefecture. – № 95107181.0; Date of filing: 11.05.95; Date of publication of application: 15.11.95. – 9 p.

64. Li, N.G. Highly efficient esterification of ferulic acid under microwave irradiation. / N.G. Li, Z.H. Shi, Y.P. Tang, B.Q. Li, J.A. Duan // *Molecules*. – 2009. – 14. – P. 2118–2126.
65. Zhang, P.-X. Synthesis, and In Vitro Antiplatelet Aggregation Activities of Ferulic Acid Derivatives / P.-X. Zhang, H. Lin, C. Qu, Y.-P. Tang, N.-G. Li, J. Kai, G. Shang and al. // *Journal of Chemistry*. – 2015. – P. 1–7.
66. Kiran, T.N.R. Synthesis, Characterization and Biological Screening of Ferulic Acid Derivatives / T.N.R. Kiran, Ch.S. Alekhya, B.V.S. Lokesh, A.V.S. Madhu Latha and al. // *Journal of Cancer Therapy*. – 2015. – 6. – P. 917–931.
67. Shi, Z.-H. Synthesis, and Preliminary Evaluation of Substituted Cinnamic Acid Esters as Selective Matrix Metalloproteinase Inhibitors / Z.-H. Shi, N.-G. Li, Q.-P. Shi, Hao-Tang, Y.-P.T. Design // *Drug Dev Res*. – 2012. – Vol. 73. Iss. 6. – P. 317–324.
68. Compton, D.L. Lipase-catalyzed synthesis of ferulate esters / D.L. Compton, J.A. Laszlo, M.A. Berhow // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2000. – 77. – P. 513–519.
69. Sonar, V.P. Natural product-inspired esters and amides of ferulic and caffeic acid as dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase / V.P. Sonar, A. Corona, S. Distinto, E. Maccioni and al. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2017. – P. 248–260.
70. EP 2716625 A1 Cinnamic acid derivative, polymer thereof, and liquid crystal alignment layer comprising cured article thereof / M. Hayashi, Y. Nagashima, I. Nishiyama, H. Takatsu; Applicant: DIC Corporation; Date of publication: 09.04.2014; Date of filing: 31.05.2012. – 138 p.
71. Holser, R.A. Kinetics of cinnamoyl glycerol formation // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2008. – 85. – P. 221–225.
72. Holser, R. Preparation and characterization of 4-methoxy cinnamoyl glycerol / R. Holser, T. Mitchell, R. Harry-O’kuru, S. Vaughn, E. Walter, D. Himmelsbach // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2008. – 85. – P. 347–351.

73. Sun, S. Chemoenzymatic synthesis of feruloylated monoacyl- and diacyl-glycerols in ionic liquids / S. Sun, G. Yang, Y. Bi, F. Xiao // *Biotechnol. Lett.* – 2009. – 31. – P. 1885–1889.

74. Batovska, D.I. Synthesis of Some Phenylpropanoid Monoglycerides via the Mitsunobu Protocol / D.I. Batovska, T. Kishimoto, V.S. Bankova, Z.G. Kamenarska, M. Ubukata // *Molecules.* – 2005. – 10. – P. 552–558.

75. Sun, S. Functionalized Ionic Liquid-Catalyzed 1-Feruloyl-sn-glycerol Synthesis / S. Sun, X. Chen, Y. Bi, J. Chen, G. Yang, W. Liu // *J Am Oil Chem Soc.* – 2014. – Vol. 91, Iss. 5. – P. 759–765.

76. Compton, D.L. Identification and Quantification of Feruloylated Mono-, Di-, and Triacylglycerols from Vegetable Oils / D.L. Compton, J.A. Laszlo, M.A. Berhow // *JAOCS.* – 2006. – Vol. 83, № 9. – P. 753–758.

77. Laszlo, J.A. Glycerol acyl-transfer kinetics of a circular permuted *Candida antarctica* lipase B / J.A. Laszlo, Y. Yu, S. Lutz, D.L. Compton // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* – 2011. – 72. P. 175–180.

78. Sun, S.-D. Solvent-Free Enzymatic Preparation of Feruloylated Monoacylglycerols Optimized by Response Surface Methodology / S.-D. Sun, L. Shan, Y.-F. Liu, Q.-Z. Jin, L.-X. Zhang, X.-G. Wang // *J. Agric. Food Chem.* – 2008. – 56. – P. 442–447.

79. Zenga, Y. Expression of a novel feruloyl esterase from *Aspergillus oryzae* in *Pichia pastoris* with esterification activity / Y. Zenga, X. Yinb, M.-C. Wub, T. Yua, F. Fenga, T.-D. Zhub, Q.-F. Pang // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* – 2014. – 110. – P. 140–146.

80. Dokli, I. Syntheses of 3-, 4-, and 5-O-feruloylquinic acids / I. Dokli, L. Navarini, Z. Hameršak // *Tetrahedron: Asymmetry.* – 2013. – 24. – P. 785–790.

81. Armesto, N. Novel Enzymatic Synthesis of 4-O-Cinnamoyl Quinic and Shikimic Acid Derivatives / N. Armesto, M. Ferrero, S. Fernandez, V. Gotor // *J. Org. Chem.* – 2003. – 68. – P. 5784–5787.

82. Condo, A.M. Improved Method for the Synthesis of trans-Feruloyl- β -sitostanol / A.M. Condo, D.C. Baker, R.A. Moreau, K.B. Hicks // *J. Agric. Food Chem.* – 2001. – 49. – P. 4961–4964.

83. Winkler-Moser, J.K. Synthesis of steryl ferulates with various sterol structures and comparison of their antioxidant activity / J.K. Winkler-Moser, H.-S. Hwang, E.L. Bakota, D.A. Palmquist // *Food Chemistry.* – 2015. – 169. – P. 92–101.

84. Šilhár, P. Synthesis and evaluation of library of betulin derivatives against the botulinum neurotoxin A protease / P. Šilhár, S. Alakurtti, K. Capková, F. Xiaochuan, C.B. Shoemaker, J. Yli-Kauhaluoma, K.D. Janda // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* – 2011. – 21. – P. 2229–2231.

85. Maresca, A. Inhibition of mammalian carbonic anhydrase isoforms I–XIV with a series of phenolic acid esters / A. Maresca, G. Akyuz, S.M. Osman, Z. AlOthman, C.T. Supuran // *Bioorg. Med. Chem.* – 2015. – 23(22). – P. 7181–7188.

86. Wang, Y.-H. Synthesis of Caffeic Acid Phenethyl Ester Analogues and Their Cytotoxicities Against Human Cancer Cells / Y.-H. Wang, Q.-S. Li, P.-L. Wang, K. Xu and al. // *Asian Journal of Chemistry.* – 2014. – Vol. 26, № 9. – P. 2686–2690.

87. Shi, H. Synthesis of Caffeic Acid Phenethyl Ester Derivatives, and Their Cytoprotective and Neuritogenic Activities in PC12 Cells / H. Shi, D. Xie, R. Yang, Y. Cheng // *J. Agric. Food Chem.* – 2014. – 62. – P. 5046–5053.

88. Yamazaki, Y. Induction of adiponectin by natural and synthetic phenolamides in mouse and human preadipocytes and its enhancement by docosahexaenoic acid / Y. Yamazaki, Y. Kawano, M. Uebayasi // *Life Sciences.* – 2008. – 82. – P. 290–300.

89. Ergün, B.Ç. Synthesis, Antioxidant and Antimicrobial Evaluation of Simple Aromatic Esters of Ferulic Acid / B.Ç. Ergün, T. Çoban, F.K. Onurdag, E. Banoglu // *Arch Pharm Res.* – 2011. – Vol. 34, № 8. – P. 1251–1261.

90. Obregón-Mendoza, M.A. Retro-Curcuminoids as Mimics of Dehydrozingerone and Curcumin: Synthesis, NMR, X-ray, and Cytotoxic Activity

/ M.A. Obregón-Mendoza, M.M. Estévez-Carmona, S. Hernández-Ortega, M. Soriano-García and al. // *Molecules*. – 2017. – 22, 33. – P. 1–14.

91. Cao, Y.-K. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Curcuminoid Derivatives / Y.-K. Cao, H.-J. Li, Z.-F. Song, Y. Li // *Molecules*. – 2014. – 19. – P. 16349–16372.

92. Zhang, L.W. Comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives: evaluation of their efficacy and safety. / L.W. Zhang, S.A. Al-Suwayeh, P.W. Hsieh, J.Y.A. Fang // *Int. J. Pharam.* – 2010. – 399. – P. 44–51.

93. Sun, S. Enhanced Enzymatic Preparation of Lipophilic Feruloylated Lipids Using Distearin as Feruloyl Acceptors: Optimization by Response Surface Methodology / S. Sun, W. Zhou // *J. Oleo Sci.* – 2014. – 63. – P. 1011–1018.

94. Yuan, X. Feruloyl oligosaccharides stimulate the growth of *Bifidobacterium bifidum* / X. Yuan, J. Wang, H. Yao // *Anaerobe* – 2005. – 11. – P. 225–229.

95. Vaidyanathan, S. Development and Application of a Methodology to Determine Free Ferulic Acid and Ferulic Acid Ester-Linked to Different Types of Carbohydrates in Cereal Products / S. Vaidyanathan, M. Bunzel // *Cereal Chem.* – 2012. – 89(5). – P. 247–254.

96. Lee, G.S. Enzymatic synthesis of cinnamic acid derivatives / G.S. Lee, A. Widjaja, Y.H. Ju // *Biotechnol. Lett.* – 2006. – 28. – P. 581–585.

97. Topakas, E. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases / E. Topakas, C. Vafiadi, P. Christakopoulos // *Process Biochem.* – 2007. – 42. – P. 497–509.

98. Ciftci, D. Enzymatic synthesis of phenolic lipids using flaxseed oil and ferulic acid in supercritical carbon dioxide media / D. Ciftci, M.D.A. Saldaña // *Journal of Supercritical Fluids*. – 2012. – Vol. 72. – P. 255–262.

99. Hatfield, R.D. Synthesis of methyl 5-O-trans-feruloyl-alpha-L-arabinofuranoside and its use as a substrate to assess feruloyl esterase activity / R.D. Hatfield, R.F. Helm, J. Ralph // *Analytical Biochemistry*. – 1991. – 194(1). – P. 25–33.

100. Artamonov, A.F. Synthesis of α -monoglycerides of aromatic acids / A.F. Artamonov, F.S. Nigmatullina, M.T. Aldabergenova, B.Zh. Dzhiembaev // *Chemistry of Natural Compounds*. – 1999. – Vol. 35, № 4. – P. 404–408.

101. US Patent 5395950 Production of quinic acid derivatives / Huynh-Ba, T., Assignee: Nestec S.A.; Date of Patent: Mar. 28, 1995. – 9 p.

102. Paulis, T. Dicinnamoylquinides in roasted coffee inhibit the human adenosine transporter / T. Paulis, D.E. Schmidt, A.K. Bruchey, M.T. Kirby and al. // *European Journal of Pharmacology*. – 2002. – 442. – P. 215–223.

103. Gilles, V. A New, Simple and Efficient Method of Steglich Esterification of Juglone with Long-Chain Fatty Acids: Synthesis of a New Class of Non-Polymeric Wax Deposition Inhibitors for Crude Oil / V. Gilles, M. A. Vieira, V. Lacerda Jr., E. V. R. Castro et al. // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2015. – Vol. 26, №1. – P. 74–83.

104. Mahindaratne, M.P. Detailed characterization of p-toluenesulfonic acid monohydrate as a convenient, recoverable, safe, and selective catalyst for alkylation of the aromatic nucleus / M.P. Mahindaratne, K. Wimalasena // *J. Org. Chem.* – 1998. – 63. – P. 2858–2866.

105. Holmberg, K. Ester Synthesis with Dicyclohexylcarbodiimide Improved by Acid Catalysts / K. Holmberg, B. Hansen // *Acta Chemica Scandinavica B* – 1979. – 33. – P. 410–412.

106. Trombino, S. Preparation, Characterization and Efficacy Evaluation of Synthetic Biocompatible Polymers Linking Natural Antioxidants / S. Trombino, R. Cassano, T. Ferrarelli, S. Leta and al. // *Molecules*. – 2012. – 17. – P. 12734–12745.

107. Neises, B. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids / B. Neises, W. Steglich // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 1978. – 17 (7). – P. 522–524.

108. Swamy, K.C.K. Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications / K.C.K. Swamy, N.N.B. Kumar, E. Balaraman, K.V.P.P. Kumar // *Chemical Reviews*. – 2009. – 109 (6). – P. 2551–2651.

109. Grochowski, E. Mechanism of the triphenylphosphine and diethyl azodicarboxylate induced dehydration reactions (Mitsunobu reaction). The central role of pentavalent phosphorus intermediates / E. Grochowski, B.D. Hilton, R.J. Kupper, C.J. Michejda // *Journal of the American Chemical Society*. – 1982. – 104 (24). – P. 6876–6877.

110. Wende, G. O-Feruloylated, O-acetylated oligosaccharides as Side-chains of grass xylans / G. Wende, S.C. Fry // *Phytochemistry*. – 1997. – Vol. 44, №6. – P. 1011–1018.

111. Hüseyin, B.O.Z. Ferulic Acid in Cereals – a Review // *Czech J. Food Sci.* – 2015. – 330 (1). – P. 1–7.

112. Marcia, M.D.O. Feruloylation in grasses: current and future perspectives // *Mol. Plant*. – 2009. – 2. – P. 861–872.

113. Bunzel, M. Monomere und dimere Phenolcarbonsäuren als strukturbildende Elemente in löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Hamburg, 2001. – 159 p.

114. Katapodis, P. Enzymic production of a feruloylated oligosaccharide with antioxidant activity from wheat flour arabinoxylan / Katapodis P., Vardakou M., Kalogeris E., Kekos D. and al. // *Eur J. Nutr.* – 2003. – 42. – P. 55–60.

115. Fang, H.-Y. Feruloyl-L-arabinose attenuates migration, invasion and production of reactive oxygen species in H1299 lung cancer cells / H.-Y. Fang, H.-M. Wang, K.-F. Chang, H.-T. Hu, L.-J. Hwang // *Food and Chemical Toxicology* – 2013. – 58. – P. 459–466.

116. Murakami, A. Suppressive effects of novel ferulic acid derivatives on cellular responses induced by phorbol ester, and by combined lipopolysaccharide and interferon- γ / A. Murakami, M. Kadota, D. Takahashi, H. Taniguchi, E. Nomura // *Cancer Lett.* – 2000. – 157. – P. 77–85.

117. Serafim, T.L. Lipophilic caffeic and ferulic acid derivatives presenting cytotoxicity against human breast cancer cells / T.L. Serafim, F.S. Carvalho, M.P. Marques, R. Calheiros and al. // *Chem. Res. Toxicol.* – 2011. – 24. – P. 763–774.

118. Методы получения химических реактивов и препаратов. Выпуск 26. М.: Иреа – 1974. – 352 с.

119. Balba, H.M. Synthesis of ^{14}C -Coniferyl Alconol (4-Hydroxy-3-Methoxycinnamyl Alconol) / H.M. Balba, G.G. Still // *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* – 1978. – Vol XV. – P. 309–319.

120. Hosoda, A. Preparation of a (\pm)-1,6-Di-O-feruloyl-myo-inositol Derivative: An Efficient Method for Introduction of Ferulic Acid to 1,6-Vicinal Hydroxyl groups of myo-Inositol / A. Hosoda, E. Nomura, K. Mizurio, H. Taniguchi // *J. Org. Chem.* 2001. – 66. – P. 7199–7201.

121. Heyns, K. Über katalytische Oxydationen, XVI: Über die Darstellung von Penturonsäuren / K. Heyns, J. Lenz // *Chemische Berichte*. – 1961. – 94 (2). – P. 348–352.

122. Жданов, Ю.А. Практикум по химии углеводов / Ю.А. Жданов, Г. Н. Дорофеев, Г. А. Корольченко, Г. В. Богданова // Изд. 2-е, переработ, и доп. Под ред. Ю. А. Жданова. – М.: «Высш. школа», 1973. – 204 с.

123. Desideri, N. Synthesis and anti-human immunodeficiency virus type 1 integrase activity of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid flavon-3-yl esters / N. Desideri, I. Sestili, M.L. Stein, E. Tramontano, S. Corrias, P. La Colla // *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* – 1998. – 9. – P. 497–509.

124. ГОСТ 9404-88 Мука и отруби. Метод определения влажности. – М.: Стандартинформ, 2007. – 4 с.

125. ГОСТ 27494-87 Мука и отруби. Методы определения зольности. – М.: Стандартинформ, 2007. – 4 с.

126. ГОСТ 10845-98 Зерно и продукты его переработки. Метод определения крахмала. – Минск: Стандартинформ, 2009. – 4 с.

127. ГОСТ 10846-91 Зерно и продукты его переработки. Метод определения белка. – М.: Стандартинформ, 2009. – 7 с.

128. ГОСТ 15113.9-77 Концентраты пищевые. Методы определения жира. – М.: Стандартинформ, 2003. – 51 с.

129. Починок, Х.Н. Методы биохимического анализа растений / Х.Н. Починок. – Киев: Наукова думка, 1976. – 336 с.
130. Методы биохимического исследования растений / под ред. Ермакова А.И. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.
131. Бахолдина, Л.А. Исследование процесса фракционирования ферментативного гидролизата пшеничных отрубей на амберлите ХАД-4 / Л.А. Бахолдина, В.П. Севедин // Техника и технология пищевых производств. – 2015. – № 1. – С. 82–86.
132. Напитки. Плодовоовощная продукция, БАД, мед. Определение фруктозы, глюкозы и сахарозы методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель». – СПб.: ООО «Люмэкс», 2013. – 34 с.
133. Продукция винодельческая, соковая, безалкогольная, слабоалкогольная и алкогольная, продукты пивоварения. Методика измерений массовой концентрации органических кислот и их солей методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель». – СПб.: ООО «Люмэкс», 2012. – 43 с.
134. Методы теххимического контроля в виноделии / под ред. Гержиковой В.Г. – Симферополь: «Таврида», 2002. – 260 с.
135. Berridge, M. V. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction / M. V. Berridge, P. M. Herst, A. S. Tan // *Biotechnology Annual Review*. – 2005. – 11. – P. 127–152.
136. Юркевич, А.М. Пангамовые кислоты (витамины группы В15). III. Лактон 6-О-диметилглицил-D-глюконовой кислоты и его производные / А.М. Юркевич, С.Г. Вереникина, М.С. Долгих, Н.А. Преображенский // *Журнал органической химии*. – 1967. – №6. – С. 1267–1272.
137. Бахолдина, Л.А. Синтез ферулоилированных оксиметильных соединений / Л.А. Бахолдина, Е.С. Терешкова, А.Л. Верещагин, В.П. Севедин // *Ползуновский вестник*. – 2014. – С. 67–70.

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

139. Гончаров, Н.Ф. Гидроксикоричные кислоты цветков и листьев нефармакопейных видов рода боярышник / Н.Ф. Гончаров, И.В. Михайлов, Н.Н. Гончаров // Фундаментальные исследования. – 2011. – №9. – С.146–148.

140. Другов, Ю. С. Методы анализа загрязнений воздуха / Ю. С. Другов, А. Б. Беликов, Г. А. Дьякова, В. М. Тульчинский. – М.: Химия, 1984. – 384 с.

141. Yu, X. Aureobasidium pullulans Fermented Feruloyl Oligosaccharide: Optimization of Production, Preliminary Characterization, and Antioxidant Activity / X. Yu, Z. Gu // BioResources – 2014. – 9(1). – P. 241–255.

142. Calabrese, V. Redox regulation of cellular stress response by ferulic acid ethyl ester in human dermal fibroblasts: Role of vitagenes. / V. Calabrese, S. Calafato, E. Puleo, C. Cornelius, M. Sapienza and al. // Clin. Dermatol. – 2008. – 26. – P. 358–363.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

Статьи, входящие в перечень ВАК:

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

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

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

3. Бахолдина, Л.А. Исследование процесса фракционирования ферментативного гидролизата пшеничных отрубей на амберлите XAD-4 /

Л.А. Бахолдина, В.П. Севедин // Техника и технология пищевых производств. – 2015. – № 1. – С. 82–86.

Статьи в материалах конференций:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10. Ласко, А.В. Способы выделения феруловой кислоты из растительных ресурсов / А.В. Ласко, Н.А. Севодина, Л.А. Бахолдина // Сборник научных статей международной конференции «Ломоносовские чтения на Алтае: фундаментальные проблемы науки и образования»,

Барнаул, 20-24 октября, 2015. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. – С. 1309–1312.

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

12. Бахолдина, Л.А. Определение каталитической активности липазы *Amano PS* / Л.А. Бахолдина, Я.В. Шубина // Современная техника и технологии: проблемы, состояние и перспективы: Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием 24-25 ноября 2016 г, посвященной 70-летию Рубцовского индустриального института. / Под ред. к.т.н. О.А. Михайленко; к.ф.-м.н., доцента Г.А. Обуховой / Рубцовский индустриальный институт. – Рубцовск, 2016. – С. 362–367.

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

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

15. Любятинская, А.Ю. Идентификация ферулоилолигосахаридов методом капиллярного электрофореза и ИК-спектроскопии / А.Ю. Любятинская, Л.А. Бахолдина // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы X

Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2017. – С. 417–421.

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

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

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

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

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