

УДК 615.322.015:633.13

ДОСЛІДЖЕННЯ ЗМІН СТРУКТУРИ АЦИЛЬОВАНИХ ПОХІДНИХ ТАЇНІДІВ У ПРОЦЕСІ СИНТЕЗУ З ВИКОРИСТАННЯМ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ УФ-СПЕКТРОСКОПІЇ

Мустафа Альхуссейн, А.В.Мартинів

Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова Національної академії медичних наук України»

61057, м. Харків, вул. Пушкінська, 14. E-mail: imiamn@ukr.net

Ключові слова: галотанін; елаготанін; сукцинільовані та малеїнільовані похідні; диференційна електронна спектроскопія

Синтезовано ряд ацильованих похідних галотаніну промислового та елаготаніну з шишок вільхи сірої з різним ступенем заміщення фенольних гідроксилів. Синтез передбачав отримання суміші похідних з різними місцями заміщення фенольних гідроксилів та різною кількістю заміщень. Синтез ацильованих похідних проводили в умовах кип'ятіння, перекристалізацію отриманих похідних проводили з водно-етанольною сумішшю. Як модифікатори використовували бурштиновий та малеїновий ангідрид. Досліджували як первинний електронний спектр поглинання, так і першу та другу похідні спектрів – диференційні електронні спектри. В результаті вивчення електронних спектрів поглинання танідів з різним ступенем модифікації було встановлено, що значні зміни спектра із зсувом смуги поглинання ароматичних груп (250-270 нм) спостерігаються тільки для ацильованих галотанінів, а ступінь модифікації корелює зі ступенем зсуву основної смуги поглинання, що дає змогу використати вказану реакцію для ідентифікації комбінаторного похідного галотаніну. Електронні спектри поглинання різних ацильованих похідних елаготанінів фактично не відрізнялися, що свідчить про більш стабільну електронну та просторову структуру дигаллової кислоти, що не дозволяє використовувати спектроскопію в УФ-області для ідентифікації окремих похідних елаготанінів. ВЕРХ-спектр ацильованих танідів містить додаткові смуги, в тому числі в низькомолекулярній області спектра, що свідчить про появу нових похідних у комбінаторній суміші танідів. ВЕРХ – спектр ацильованих танідів містить додаткові смуги, зокрема в низькомолекулярній області спектра, що свідчить про появу нових похідних у комбінаторній суміші танідів.

INVESTIGATION OF THE STRUCTURE CHANGES OF TANNIDES ACYLATED DERIVATIVES IN THE PROCESS OF SYNTHESIS USING DIFFERENTIATING ELECTRONIC ABSORPTION SPECTROSCOPY

Mustafa Alhoussein, A.Martynov

Key words: gallotannins; ellagitannins; succinylated and maleylated derivatives; differential electronic spectroscopy
A number of acylated derivatives of industrial gallotannin and ellagitannin from alder cones with different substitution degrees of phenolic hydroxyls has been synthesized. The synthesis involved the preparation of a mixture of derivatives with different substitution places of phenolic hydroxyls and different number of substitutions. The synthesis of acylated derivatives was carried out under reflux with the mixture of the modifier with tannides in glacial acetic acid, and recrystallization of the derivatives obtained was performed from the water-ethanol mixture. Succinic and maleic anhydrides were used as modifiers. The primary electronic absorption spectrum and its first and second derivatives – differential electronic absorption spectra were studied. As the result of the study of the electronic absorption spectra of tannides with varying degrees of modification it has been found that significant changes in the spectrum shift of the absorption band of aromatic groups (250-270 nm) is observed only for the acylated gallotannins. Thus, it has been shown that the degree of modification correlates with the degree of the shift of the absorption band, and it allows to use this reaction for identification of the combinatorial derivative of gallotannin. The electronic absorption spectra of various acylated ellagitannins derivatives did not actually differ. It indicates a more stable and rigid electronic and spatial structure of digallic acid, which prevents the use of spectroscopy in the UV region to identify individual combinatorial derivatives of ellagitannins. In HPLC the spectrum of acylated tannins contains additional bands, including the low molecular weight region of the spectrum. It indicates the appearance of new acylated derivatives in the combinatorial mixture of tannides.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРЫ АЦИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТАЇНІДОВ В ПРОЦЕССЕ СИНТЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ УФ-СПЕКТРОСКОПИИ

Мустафа Альхуссейн, А.В.Мартынов

Ключевые слова: галлотанин; элаготанин; сукцинированные и малеилированные производные; дифференциальная электронная спектроскопия

Синтезирован ряд ацилированных производных галлотанина промышленного и элаготанина из шишек ольхи серой с разной степенью замещения фенольных гидроксильных групп. Синтез предусматривал получение смеси производных с разными местами замещения фенольных гидроксильных групп и разным количеством замещений. Синтез ацилированных производных проводили в условиях кипячения смеси модификатора с таннидами в ледяной уксусной кислоте, а перекристаллизацию полученных производных проводили из водно-этанольной смеси. В качестве модификаторов использовали янтарный и малеиновый ангидриды. Исследовали как первичный электронный спектр поглощения, так и первую и вторую его производные – дифференциальные электронные спектры поглощения. В результате изучения электронных спектров поглощения таннидов с различной степенью модификации было установлено, что

значительные изменения спектра со смещением полосы поглощения ароматических групп (250-270 нм) наблюдаются только для ацилированных галлотанинов; было показано, что степень их модификации при этом коррелирует со степенью смещения основной полосы поглощения, что позволяет использовать указанную реакцию для идентификации комбинаторного производного галлотанина. Электронные спектры поглощения различных ацилированных производных эллаготанинов фактически не отличались, что свидетельствует о более стабильной электронной и пространственной структуре дигалловой кислоты и не позволяет использовать спектроскопию в УФ-области для идентификации отдельных производных эллаготанинов. ВЖХ-спектр ацилированных таннидов содержит дополнительные полосы, в том числе в низкомолекулярной области спектра, что свидетельствует о появлении новых производных в комбинаторной смеси таннидов.

Дослідження структури похідних високомолекулярних речовин, що проявляють властивості квазіживих систем, є вельми актуальною проблемою стандартизації лікарських препаратів цієї групи [1]. До цієї групи речовин можна віднести практично всі нерегулярні мультиакцепторні речовини природного походження: дезоксирибонуклеїнові кислоти, рибонуклеїнові кислоти, білки, полісахариди, таніди.

Метою наших досліджень було синтезувати та дослідити динаміку змін «диференційний УФ-спектр/структура» в ряду заміщених похідних ацильованих танідів та дослідити динаміку синтезу вказаних похідних з використанням ВЕРХ. У дослідженні використали похідні галотаніну промислового та елаготаніну з шишок вільхи сірої (*Alnus glutinosa L.*).

Відрізняються елаготаніни від галотанінів не тільки тим, що між мономерами (елаговою кислотою) у структурі полімера існує С-С зв'язок, а й тим, що кожен залишок галлової кислоти пов'язаний з глюкозою естерним зв'язком [2]. Крім того, галотаніни є дуже нестійкими до світла та окиснювачів речовинами, тоді як елаготаніни вже є продуктами окиснення і є стійкими до дії цих зовнішніх факторів [3]. Разом з тим елаготаніни з глюкозою утворюють більш різноманітні похідні, зокрема естерні внутрішньомолекулярні структури [4].

Фактично галотанін (VI) та елаготанін (I) є сумішами продуктів гідролізу повної молекули таніду (рис. 1, 2). Відповідно при розрахунках молекулярної маси та заряду мова буде йти про речовини з найбільшими молекулярними масами, а не про домішки – продукти гідролізу.

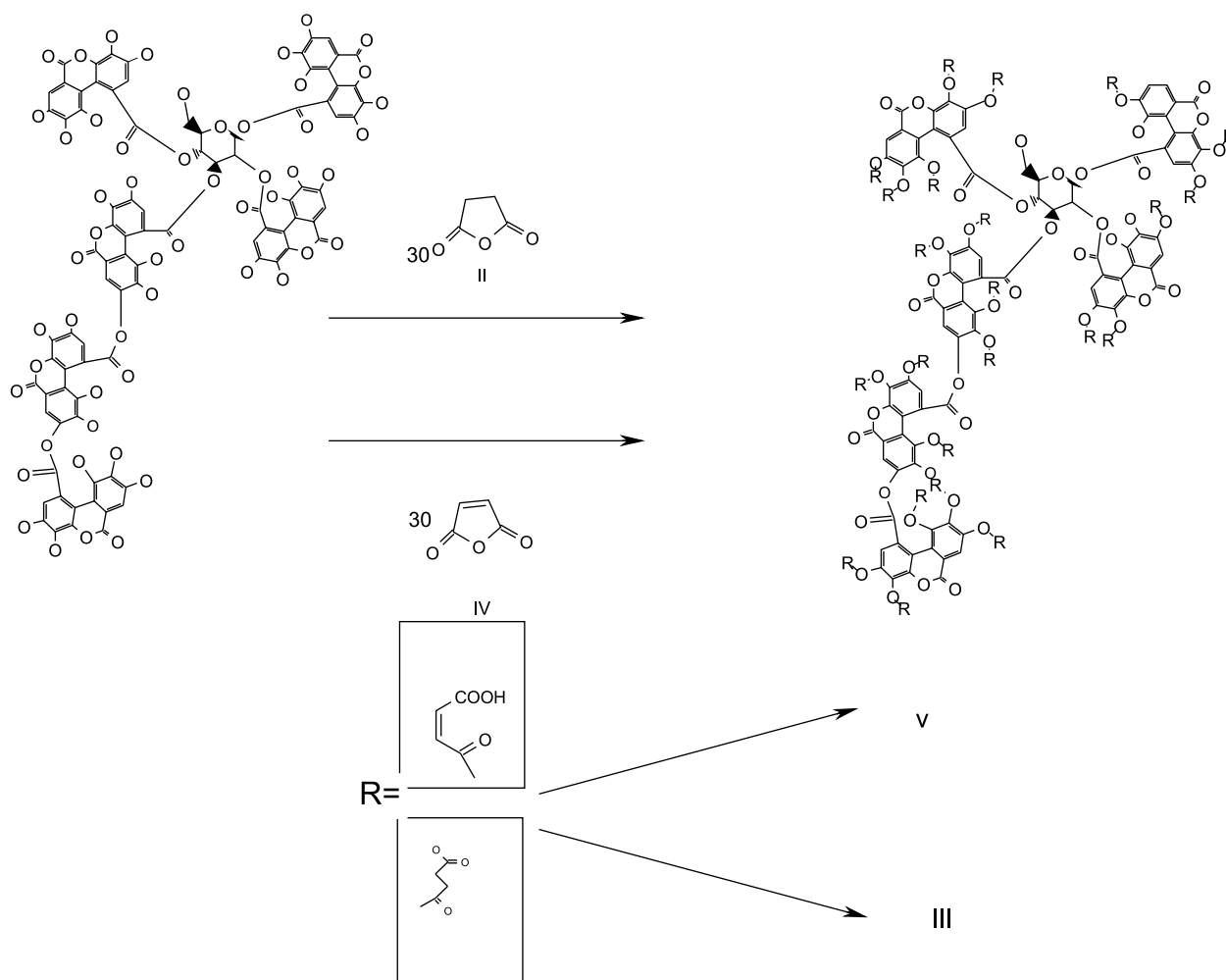


Рис. 1. Схема синтезу сукцинільованого елаготаніну (III) та малеїльованого елаготаніну (V).

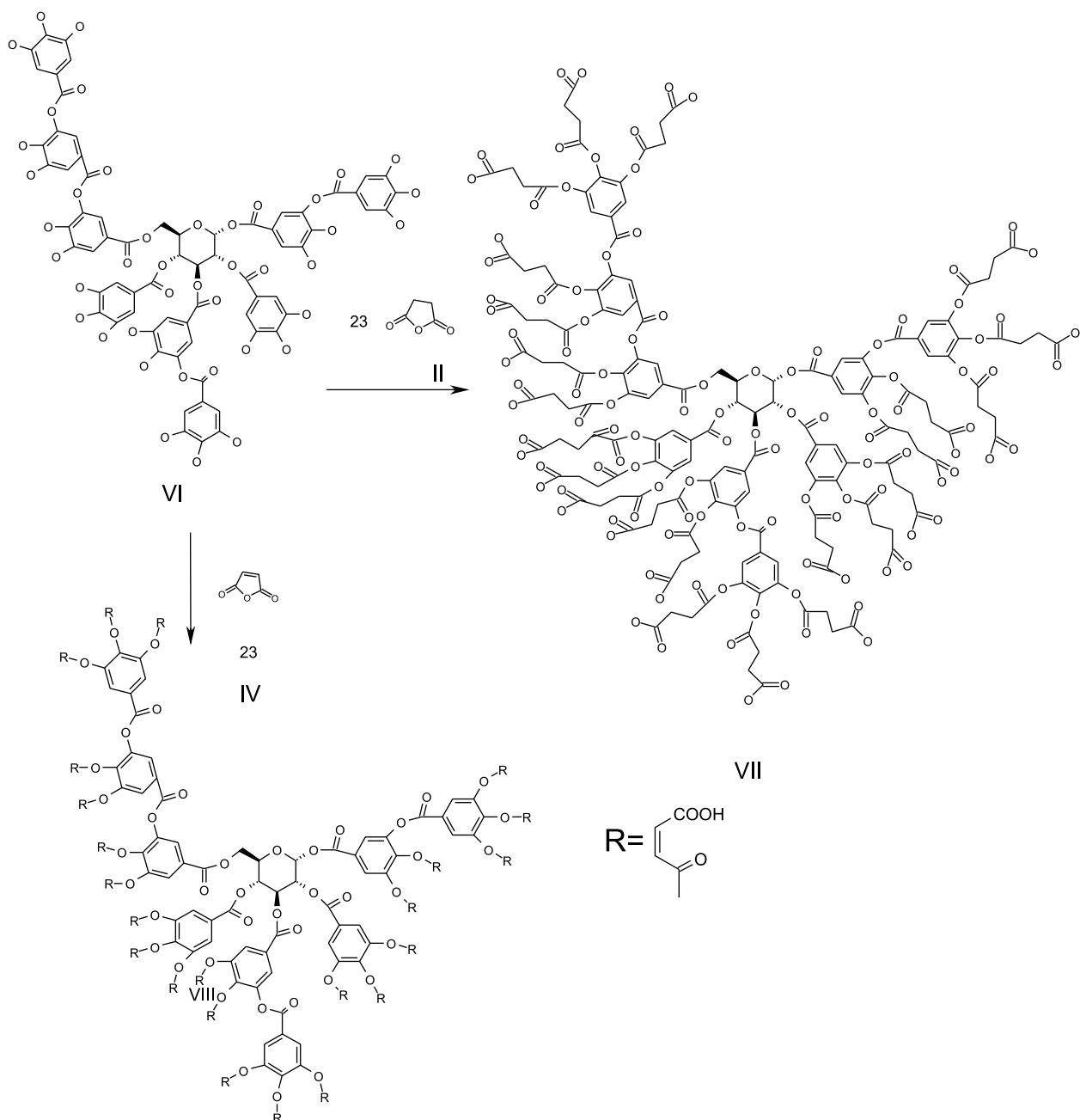


Рис. 2. Схема синтезу сукцинільованих та малеїнільованих похідних галотаніну (VII, VIII).

Вказана особливість досліджень цього класу речовин спонукала нас провести дослідження в динаміці синтезу з використанням диференційної УФ-спектроскопії та ВЕРХ з метою встановлення відзнак впливу ацилюючих агентів на галове та елагове ядро танідів.

На рис. 1 та 2 представлені схеми синтезу ацильованих похідних танідів. Різного ступеня ацилювання досягали різним співвідношенням танідів та відповідних ангідридів.

Як вже ми казали раніше, реакцію ацилювання провести кількісно дуже важко у зв'язку з нечіткістю структури первинного таніду. Також практично неможливо провести процедуру валідації методик кількісного аналізу однієї речовини в складі суміші у зв'язку з різним компонентним

складом первинної сировини. Вираховані фізико-хімічні властивості танідів прив'язані до речовини з максимальною молекулярною масою, а саме до повного таніду. У зв'язку з тим, що саме суміш похідних речовин надає нових біологічних властивостей структурам ацилтанідів, нами був проведений синтез неповністю модифікованих танідів з різним ступенем модифікації за співвідношенням модифіканта та модифікатора.

Для кожного похідного вимірювали УФ-спектри в динаміці синтезу, розраховували їх диференційні похідні першого та другого порядку.

В результаті аналізу первинного спектра поглинання фактично неможливо зробити зрозумілі висновки про структуру речовини у зв'язку з відсутністю чітко виділених смуг поглинання,

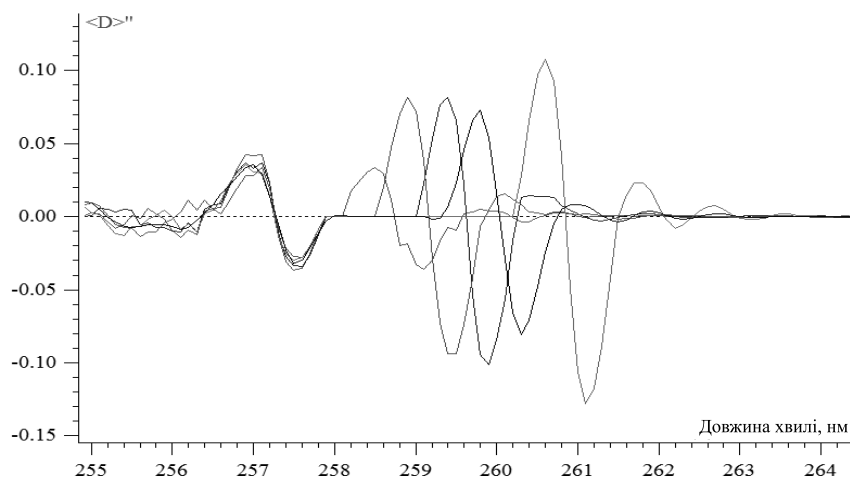


Рис. 3. Диференційний УФ-спектр похідних сукцинілгалотанінів VII (а-с) – друга похідна (смуга при 259 нм зміщується до 260,5 нм при збільшенні ступеня модифікації).

хоча динаміка збільшення ароматичної смуги в залежності від ступеня модифікації явно прослідковується.

Для більш детального аналізу нами були побудовані диференційні спектри (перша та друга похідні) та окреслені основні смуги поглинання.

Більш чіткі зміни в замісниках ароматичного ядра галової кислоти у складі галотанінів при заміщенні явно прослідковуються на спектрі другої похідної композитного спектра, який представлено на рис. 3.

Як видно з рис. 3, прослідковується чітка закономірність між ступенем заміщення фенолів у структурі галотаніну та зрушення смуги поглинання ароматичного ядра, як і було показано для попереднього графіка. При цьому область поглинання до 258 нм залишається незмінною, що свідчить про відсутність впливу ацилювання на глюкостанозний залишок та на карбоксильні групи галової кислоти. Максимум поглинання при 258,9 нм поступово зміщувався до 259,3 нм для похідно-

го VIIa та до 259,9 нм для похідного VIIb і відповідно до 260,1 нм для похідного VIIc. Найбільш цікавою була інформація про зміни поглинання ароматичних ядер при повному ацилюванні структури (остання смуга). Смуга поглинання повністю модифікованого похідного зміщувалася до 261 нм, що свідчить про значну конформаційну обмеженість структури та підтверджує гіпотезу про повну модифікацію за всіма фенольними гідроксилами структури галової кислоти в галотанінах.

Початкові УФ-спектри як модифікованого, так і немодифікованого похідних елаготанінів Va,b фактично не відрізняються, а смуги поглинання не зрушуються в залежності від ступеня модифікації.

Скоріше за все, це пов'язано з дуже жорсткою структурою елагової кислоти та відсутністю впливу зовнішніх замісників поза ароматичним ядром на саму структуру елагової кислоти.

Для більш детального підтвердження цієї гіпотези були отримані перша та друга похідні від спектра (рис. 4).

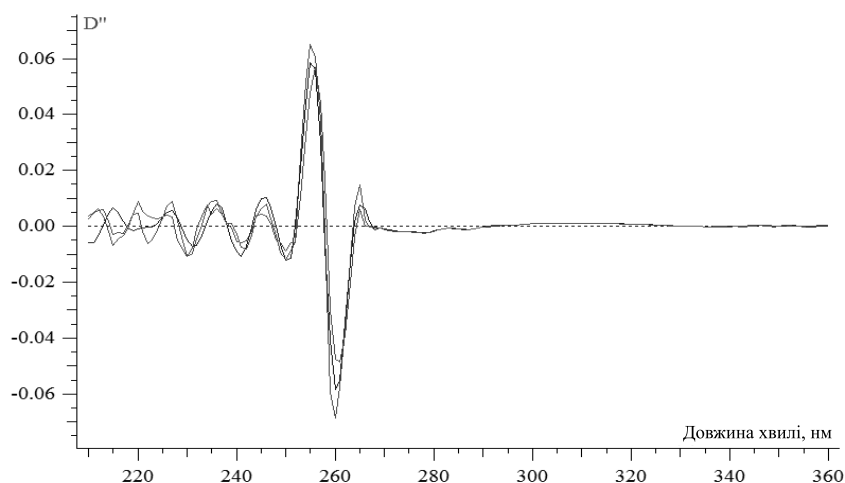


Рис. 4. Накладені УФ-спектри поглинання (друга похідна) елаготанінів Va,b з різними ступенями модифікації та немодифікований I (похідні накладаються одна на одну та практично не відрізняються, що свідчить про більшу стабільність ароматичних кілець дигалової кислоти).

Як видно з рис. 4, модифікація структури елаготанінів не чинить такого впливу на рухомість ароматичного ядра, як для галотанінів.

Відповідно, можна зробити висновки про більш жорстку структуру елаготаніну та його більшу конформаційну стійкість, що корелює з практичною нерозчинністю чистої галової кислоти ані у воді, ані у неполярних розчинниках. Ця відзнака елаготанінів від галотанінів може бути використана в методиках ідентифікації основних діючих речовин при розробці методів контролю якості елаготанінів та запропонована нами для впровадження на ПАТ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод» для контролю якості альтану та альтабору.

Експериментальна частина

Ацилювання таніну (VI) та елаготаніну (I) проводили з використанням бурштинового ангідриду (II) з утворенням сукцинілтаніну (IIIa-c) та сукцинілелаготаніну (VII) та малеїнового ангідриду (IV) [5] з утворенням малеїнілтаніну (Va-c) та малеїнілелаготаніну (VIIIa-c) (рис. 1 та 2).

УФ-спектри отримували на повністю автоматизованому спектрофотометрі Ломо СФ-56 [6]. Довжина щілини 1 мм, кювети – 10 мм, спектр знімали в 0,5% розчині речовин в ізопропанолі.

Синтез повністю сукцинільованого елаготаніну (IIIa)

10^{-4} Моль (0,1885 г) елаготаніну (I) розчиняли у 10 мл концентрованої оцтової кислоти у круглодонній колбі зі зворотним холодильником, додавали $3,0 \cdot 10^{-4}$ Моль (0,3000 г) II, який попередньо розтирали до мілкового порошку в ступці. Суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом 60 хв. Відганяли концентровану оцтову кислоту. Кристали, що утворилися, зі стінок колби змивали 10 мл холодної дистильованої води та залишали у випарювальній чашці до повного висихання. Одержану речовину III перекристалізували з водно-метанольної суміші (1:1).

Синтез повністю малеїльованого елаготаніну (Va)

10^{-4} Моль (0,1885 г) елаготаніну (I) розчиняли у 10 мл концентрованої оцтової кислоти у круглодонній колбі зі зворотним холодильником, додавали $1,7 \cdot 10^{-4}$ Моль (0,6935 г) IV. Суміш гріли зі зворотним холодильником протягом 20 хв. Відганяли концентровану оцтову кислоту. Кристали,

що утворилися на стінках колби, змивали 10 мл етанолу та залишали у випарювальній чашці до повного висушування. Одержану речовину V перекристалізували з водно-етанольної суміші (1:1).

Синтез повністю сукцинільованого галотаніну (VIIa)

10^{-4} Моль (0,1549 г) галотаніну (VI) розчиняли у 10 мл концентрованої оцтової кислоти у круглодонній колбі із зворотним холодильником, додавали $1,7 \cdot 10^{-4}$ Моль (0,1700 г) II, який попередньо розтирали до мілкового порошку в ступці. Суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом 60 хвилин. Відганяли концентровану оцтову кислоту. Кристали, що утворилися на стінках колби, змивали 10 мл холодної дистильованої води та залишали у випарювальній чашці до повного висихання. Одержану речовину VII перекристалізували з водно-метанольної суміші (1:1).

Синтез повністю малеїнільованого галотаніну (VIIIa)

10^{-4} Моль (0,1549 г) елаготаніну (VI) розчиняли у 10 мл концентрованої оцтової кислоти у круглодонній колбі зі зворотним холодильником, додавали $1,7 \cdot 10^{-4}$ Моль (0,3930 г) IV. Суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом 20 хв. Відганяли концентровану оцтову кислоту. Кристали, що утворилися на стінках колби, змивали 10 мл етанолу та залишали у випарювальній чашці до повного висушування. Одержану речовину (VIIIa) перекристалізували з водно-етанольної суміші (1:1).

Висновки

1. У результаті вивчення електронних спектрів поглинання танідів з різним ступенем модифікації було встановлено, що значні зміни спектра зі зсувом смуги поглинання ароматичних кілець (250-270 нм) спостерігаються тільки для ацильованих галотанінів, ступінь їх модифікації пов'язаний зі ступенем зміщення основної смуги поглинання, що дає змогу використати вказану реакцію для ідентифікації похідного галотаніну.

2. Електронні спектри поглинання похідних елаготанінів з різним ступенем ацилювання фактично не відрізнялися, що свідчить про більш стабільну та жорстку електронну та просторову структуру дигалової кислоти, що не дозволяє використовувати спектроскопію в УФ-області для ідентифікації окремих похідних елаготанінів.

Література

1. Martynov A., Farber B., Farber S. *Curr. Med. Chem.*, 2011, Vol. 18, No.22, pp.3431-3436.
2. Okuda T. *New York, Springer*, 1995, 420 p.
3. Juha-Pekka Salminen, Ossipov V. *Naturforsch.*, 2002, Vol. 57, pp.248-253.
4. Haslam E. *Cambridge University Press: Cambridge, UK*, 1989, 273 p.
5. Shemchuk L. A., Chernykh V. P., Martynov A. V. *Zhurnal organichnoi khimii – Journal of Organic Chemistry*, 1997, Vol. 33, No.8, pp.1257-1258.
6. Masoud M. S., Hagagg S. S., Ali A. E., Nasr N. M. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2012, Vol. 94, pp.256-264.

Надійшла до редакції 28.01.2014 р.