

С 1992 г. в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН под руководством академика РАН А.И. Коновалова и член-корреспондента РАН В.Ф. Миронова успешно развиваются работы по глубокой переработке растительного сырья для получения практически полезных соединений, в том числе и пектина. Пектины - это биополимеры полиуронидной природы, присутствующие в растворимой и нерастворимой форме практически во всех растениях. Повышенный интерес к этим природным соединениям связан с их хорошо известными лечебно-профилактическими, диетическими и защитными свойствами. Пектины широко используются в пищевой промышленности в качестве пищевых добавок и студнеобразующих веществ (Е 440), в медицинской практике как вспомогательные компоненты при производстве лекарственных форм. Благодаря особенностям химического строения - наличию свободных карбоксильных групп, пектины используются для выведения тяжелых металлов и радионуклидов из организма человека, т.е. это эффективные детоксиканты и радиопротекторы. По данным Всемирной организации здравоохранения ежедневный прием пектинов в профилактических целях должен составлять 4 г, а в экологически загрязненных районах до 16 г. Пектины были открыты еще в 1790 году французским химиком Вокленом, который выделил их из фруктового сока и описал как вещество, образующее в водном растворе студень. В самостоятельную группу веществ пектины выделены М. Браконом в 1825 году, он же впервые ввел термин "пектин" (от греч. *πεκτός* - свернувшийся). В 1917 году стало известно основное структурное звено пектина - остатки D-галактуроновой кислоты, часть из которых этерифицирована метиловым спиртом, в 1930 году Майером установлен тип связей в полигалактуронане - 1-4 (формула I). Пектины отличаются большим многообразием, их структура достаточно сложная. На основании исследований зарубежных и отечественных ученых пектины можно разделить на несколько больших классов: 1) гомогалактуронаны; 2) рамногалактуронан I; 3) рамногалактуронан II; 4) ксилогалактуронаны; 5) апиогалактуронаны; нейтральная составляющая пектинов может быть представлена арабинанами и арабиногалактанами [1-5]. На сегодняшний день промышленное производство пектина в России отсутствует, дефицит пектина компенсируется закупками за рубежом, но это не решает проблем. В связи с вышесказанным, разработка экологически безопасных технологий, позволяющих получать пектины высокого качества и поиск эффективных источников сырья остаются актуальными. Цель исследований - разработка научных основ и технологических аспектов получения пектинов из растительного сырья и создания на их основе новых препаратов лечебно-профилактического действия, перспективных для медицины и ветеринарии. В ИОФХ им. А.Е. Арбузова нами проведены исследования по разработке эффективных способов получения пектина из перспективных видов растительного сырья - амаранта, люпина, дайкона. Амарант и люпин привлекают внимание исследователей высоким

содержанием белка со сбалансированным набором незаменимых аминокислот, удивительно высокой урожайностью, достаточно высоким содержанием углеводов, витаминов, минеральных солей. Продуктивность амаранта по зеленой массе превосходит большинство традиционных сельскохозяйственных культур и достигает в благоприятных условиях 1200 ц/га. Урожайность зеленой массы однолетних кормовых люпинов в зависимости от почвенно-климатических условий, составляет в среднем 300-500 ц/га. Нами впервые выделены и исследованы характеристики пектинов из корнеплодов дайкона нового отечественного сорта Дракон, интродуцированного учеными ВНИИССОК и отличающегося высокой урожайностью (400-900 ц /га). В результате цикла исследований разработана схема комплексной переработки фитомассы амаранта, следовательно, и рентабельного его использования [6, 7]. Результаты исследований защищены патентами Российской Федерации. Известные в настоящее время методы получения пектиновых веществ базируются на использовании минеральных кислот, приводящих к частичному разрушению структуры биополимера, быстрому износу оборудования, а также нарушению экологической безопасности производства. В технологии извлечения пектина нами использован метод обработки растительного сырья в условиях механоакустического воздействия с применением роторно-пульсационных аппаратов (РПА) - S-Эмульгатора и гомогенизатора «YMIХ», позволяющих осуществлять эффективный процесс гидролиза-экстракции в «мягких условиях» без применения минеральных кислот, высоких температур и давления и значительно (в 10-15 раз) сократить продолжительность обработки сырья. Интенсификация процессов гидролиза-экстракции пектинов в условиях механоакустического воздействия в РПА позволило использовать такие пищевые кислоты как лимонная, молочная и янтарная. С использованием современного высокопроизводительного оборудования достигнута максимально возможная степень извлечения практически ценных веществ, оптимизированы технологические параметры гидролиза, при которых сохраняется структура пектиновых биополимеров и их высокая биологическая активность. Промежуточные пектинсодержащие продукты переработки амаранта (гидролизаты и экстракты) оказались высокоэффективными кормовыми добавками, оказывающими положительное влияние на рост сельскохозяйственной птицы и ее сохранность. Предложенный способ обработки растительного сырья является новым и защищен патентом РФ [6, 8]. При разработке способа получения пектинов с использованием янтарной кислоты установлено, что некоторые гидролизующие реагенты, такие как янтарная кислота, способны образовывать комплексы с пектином. Это послужило началом исследований комплексообразования пектина с дикарбоновыми кислотами (формула II). II При получении комплексов использовали переосажденный цитрусовый пектин марки “Classic C-401” производства фирмы “Herbstreith & Fox”

(Германия) со средней молекулярной массой M_n 17600, степенью этерификации (СЭ) 68 %. Янтарная и фумаровая кислоты - важнейшие продукты и субстраты цикла трикарбоновых кислот. Они являются известными БАД, на основании проведенных токсико-гигиенических исследований ГК СЭН РФ разрешено использование янтарной (Е 363), фумаровой (Е 297) кислот и их солей в качестве пищевых добавок в дозах, регламентируемых в технологических инструкциях по изготовлению пищевых продуктов и напитков. Насыщенные и ненасыщенные дикарбоновые кислоты активизируют обменные процессы живых организмов, повышая их энергетические возможности и сопротивляемость к различным неблагоприятным воздействиям. Тем не менее, эти соединения обладают выраженным раздражающим (ульцерогенным) действием на желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), что существенно ограничивает их использование для большой группы населения, страдающей заболеваниями ЖКТ. Изучена зависимость комплексообразования дикарбоновых кислот с пектином от температуры, определена стехиометрия комплексов, оптимизированы условия их получения. Показано, что с увеличением температуры выход комплексов увеличивается, достигая максимума при 50-60°C. Рис. 1 - Зависимость процесса комплексообразования пектина с янтарной кислотой от температуры. Образование устойчивых комплексов подтверждено методами ЯМР, ИКС и порошковой дифрактографии. Проведено исследование биологической активности полученных комплексов. На белых лабораторных мышах исследовали токсичность (ЛД₅₀) комплексов и ульцерогенное их воздействие на слизистую оболочку желудка. Показатели биологической активности комплексов сравнивали с соответствующими показателями для свободных янтарной и фумаровой кислот в эквимоллярных дозах. Были получены следующие результаты: 1) Токсичность. Установлено, что для янтарной кислоты ЛД₅₀ 1500 мг/кг, для фумаровой - 1000 мг/кг. В эквимоллярных дозах, соответствующих тем же дозам органических кислот, с учетом их процентного содержания в комплексах (24.5-25%), исследованные комплексы пектиновых полисахаридов [(Ia) комплекс с янтарной кислотой, 6000 мг/кг; (Ib) комплекс с фумаровой кислотой, 4000 мг/кг) не проявляли токсичности на лабораторных мышах. 2) Ульцерогенное действие - повреждающее влияние на слизистую желудочно-кишечного тракта. У животных после введения кислот (1500 мг/кг янтарная и 1000 мг/кг фумаровая) на слизистой желудка наблюдали признаки раздражающего влияния вводимых веществ, проявляющиеся в появлении гиперемии, точечных кровоизлияний, а в отдельных случаях эрозий. У животных после введения комплексов (Ia,b) (6000 мг/кг) отсутствовали признаки раздражающего воздействия на слизистую. Лишь в единичных случаях наблюдали отдельные точечные кровоизлияния и отечность слизистой. Согласно полученным результатам, комплексообразование дикарбоновых кислот - янтарной и фумаровой кислот с пектиновыми полисахаридами приводит к

четкому снижению их токсического воздействия на организм и снижению раздражающего влияния кислот на слизистую желудочно-кишечного тракта [9]. Таким образом, впервые получены молекулярные комплексы пектиновых полисахаридов с дикарбоновыми кислотами, перспективные в качестве БАД. Установлено, что при сохранении высокой биологической активности комплексов кислот с пектином наблюдается достоверное снижение ulcerогенного действия и токсичности, что существенно расширяет перспективы их использования в медицине. Важнейшим направлением исследований является получение противоанемических и иммуностимулирующих препаратов на основе пектинов. Железодефицитная анемия - наиболее известный пример дисбаланса микроэлементов в организме, связанный с недостаточным поступлением железа или низкой его усвояемостью. По данным Всемирной организации здравоохранения, число людей с дефицитом железа достигает 200 миллионов человек, причем в наибольшей степени страдают женщины детородного возраста, беременные женщины, дети младшей возрастной группы. Социально значимые заболевания (онкологические заболевания, ВИЧ-инфекция, туберкулез) часто сопровождаются возникновением анемии из-за нарушения обмена железа в организме и вследствие побочного действия применяемой терапии. Большинство существующих лекарственных препаратов противоанемического действия основано на использовании неорганических соединений металлов, являющихся токсичными и проявляющих побочные эффекты: раздражение слизистой желудочно-кишечного тракта, ряд системных нарушений, возникающих при передозировках. Нами впервые получены комплексы пектиновых биополимеров с биогенными металлами (кобальт, медь, железо и кальций), выполняющими важнейшие функции в организме человека, включая образование гема крови. При разработке способов получения водорастворимых комплексов пектиновых полисахаридов с биогенными микро-и макроэлементами учитывали следующие факторы. Во-первых, известно, что комплексообразующие свойства пектиновых веществ зависят от содержания свободных карбоксильных групп, то есть, степени этерификации основной цепи пектинов [10]. Степень этерификации определяет линейную плотность заряда макромолекулы и, следовательно, силу связи катионов с ней. При высокой степени этерификации свободные карбоксильные группы или карбоксианионы удалены друг от друга. При уменьшении степени этерификации они сближаются, происходит увеличение заряда макромолекулы и, соответственно, возрастание силы связывания пектинов с катионами. На основании этих литературных данных для синтеза наиболее прочных комплексов нами в качестве исходного лиганда использована натриевая соль деэтерифицированного пектина - пектат натрия со степенью солеобразования 100% [10, 11]. Данная соль получена обработкой пектина щелочью при титриметрическом переходе pH из слабокислой в слабощелочную область.

Наряду с контролем pH при разработке способа получения этой соли параллельно использовался контроль за состоянием карбоксильных групп методом ИК - спектроскопии в области валентных колебаний группы COO-. В ИК спектрах комплексы имеют характерные полосы поглощения карбоксианиона в области 1600-1800 см⁻¹. Такой подход позволил нам получить натриевую соль пектовой кислоты с точно известным содержанием ионов натрия в биополимере и провести аналитические количественные расчеты для получения металлокомплексов пектовой кислоты с фиксированной степенью замещения иона натрия на катионы s- и d - металлов. Далее целевые соединения получают по реакции лигандного обмена ионов Na⁺ на соответствующие s-, d-металлы (рис.2). Целевой комплекс осаждают этанолом, центрифугируют и сушат при 40-50° С. Вторым важным фактором, который учитывался при разработке способа получения металлокомплексов пектиновых полисахаридов с ионами d-металлами, была растворимость. Известные комплексы пектинов, например с ионами Ca²⁺, на сегодняшний день нерастворимы в воде и выделяются из растворов в виде гелей. Это связано с координацией металлов различными цепями, которая определяет образование двойных и даже тройных цепочечных структур, то есть со сшиванием параллельных макромолекул пектина металлом в трехмерном пространстве. Такой межмолекулярный механизм комплексообразования для полисахаридных полимеров за счет образования гидрофильной полости между мономерными звеньями соседних цепей постулируется для металлокомплексов всех известных анионных полисахаридов, в том числе и пектинов, при координации их с s-, p- и d-металлами [10, 11]. Возможность синтеза растворимых комплексов олиго- и полисахаридов с микро-и макроэлементами в литературе [12] показана лишь на основе тетрапектовой кислоты, выделенной при гидролизе пектинов. Рис. 2 - Новый подход к синтезу водорастворимых металлокомплексов пектинов. Первоначально для образования растворимых в воде металлокомплексов пектовой кислоты были определены пороговые концентрации между образованием растворимых и нерастворимых форм комплексов. Эксперименты планировались таким образом, чтобы создать достаточно разреженную трехмерную структуру комплексов с относительно невысокой степенью замещения ионов натрия на s-, d- металлы при сохранении большей части ионов натрия в солевой форме в составе полимерного комплекса для обеспечения его водорастворимых свойств (в пределах 1-40% двухвалентного металла относительно исходного содержания одновалентного натрия). Установлено, что образование водорастворимых форм металлокомплексов наблюдается при замещении 1-25% ионов натрия в исходном пектате натрия s-, d- металлами. Для определения оптимальных концентраций солей металлов, при которых происходит селективное образование водорастворимых комплексов, нами использован графический подход. Были исследованы графические зависимости массы образующихся

водорастворимых и нерастворимых комплексов (м, г) от концентрации солей металлов (рис. 3-4). Железо является одним из основных элементов, по которому испытывается дефицит даже в развитых странах мира, и на сегодняшний день проблема анемий остается очень серьезной. Кальций является важнейшим элементом для человека и животных, обеспечивая опорную функцию костей, а также в виде катионов Ca^{2+} , входящих в состав плазмы крови и тканевых жидкостей, участвуя в поддержании гомеостаза (ионное равновесие, осмотическое давление в жидкостях организма), в регуляции сердечных сокращений и свертываемости крови [13, 14], поэтому разработка синтеза растворимых органических соединений кальция, представляющих собой его биодоступную форму, имеет большое практическое значение. Рис. 3 -

Зависимость массы выделенных водорастворимых и нерастворимых комплексов (м, г) из системы пектат натрия - $\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ от концентрации металла.

Верхняя кривая - растворимый комплекс, нижняя кривая - нерастворимый Рис. 4 -

Зависимость массы выделенных водорастворимых и нерастворимых комплексов (м, г) из системы пектат натрия - CaCl_2 от концентрации соли металла

Область концентраций солей железа (рис. 3), в которой происходит избирательное образование водорастворимых комплексов без побочного образования нерастворимых форм, находится в пределах 0.009-0.02 г-экв/л. Как можно видеть из графика (рис. 4), для ионов Ca^{2+} имеется область концентраций меньше 0.01 г-экв/л, в которой наблюдается образование растворимых комплексов. При разработке способа получения Na-, Fe-, Co-, Cu-полигалактуроната дополнительно рассмотрены системы пектат натрия - $\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и пектат натрия - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, и экспериментально найдена область концентраций (0.019-0.002 г-экв/л), в которой наблюдается селективное образование только водорастворимых соединений без побочного образования нерастворимых структур. Целевые металлокомплексы представляют собой порошки с характерной окраской для каждого комплекса (сиреневой для CoII , зеленоватой для CuII , желто-коричневой для FeII , бесцветной для CaII) и обладают оптическим вращением в интервале $[\alpha]_{\text{D}20}^{240-150^\circ}$, то есть являются оптически активными. В ИК спектрах комплексы имеют характерные полосы поглощения карбоксианиона в области 1600-1700 см^{-1} . Для биологического применения было важно исследовать устойчивость металлокомплексов в широком интервале pH. На рис. 5 приведена зависимость интегральной интенсивности сигналов ЭПР (I, %) пектата меди в зависимости от pH раствора, показывающая, что комплекс устойчив при pH в пределах 3-7. При значениях pH 3 в спектрах ЭПР фиксируется образование аква-комплексов меди, то есть переход ионов Cu^{2+} в раствор. Уменьшение интенсивности сигнала ЭПР при $\text{pH} > 6$ связано, скорее всего, с образованием ЭПР-недетектируемых гидроксо-мостиковых димерных комплексов CuII с сильным электронным обменом. Рис. 5 -

Интегральная интенсивность сигналов ЭПР (I, %) пектата меди в зависимости от

pH раствора (квадраты - % пектатного комплекса меди, черные кружки - % аква-комплекса меди) Исследована биологическая активность и токсичность полученных соединений, обладающих противоанемическим действием, на лабораторных животных. Среди полиметаллокомплексов пектиновых полисахаридов (с ионами CuII, CoII, FeII) выявлены соединения, обладающие самой высокой противоанемической активностью, повышающие концентрацию гемоглобина и число эритроцитов на 23-26%, а при кровопотере обеспечивающие интенсивное восстановление гематологических показателей: среднесуточный прирост гемоглобина и числа эритроцитов превышал контрольные значения в 1.7 раз. Показано, что при внутрибрюшинном введении острая смертельная доза препаратов (LD50) превышает 1000 мг/кг. При пероральном введении препараты не вызывают гибели животных при дозе 25000 мг/кг [15, 16]. В настоящей работе представлены результаты биологических исследований Na-, Ca-, Feполигалактуроната, нормализующего минеральный обмен, успешно прошедшего первичные доклинические исследования по токсикологической безопасности и перспективного в качестве БАД. Проведена оценка токсикологической безопасности Na-, Ca-, Fe-полигалактуроната в сертифицированной лаборатории ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (ФЦТРБ-ВНИВИ). Были исследованы кумулятивные свойства и определена хроническая токсичность препарата на белых крысах, исследованы аллергизирующие свойства на морских свинках и эмбриотоксическое и тератогенное действие препарата на самках белых крыс. Было использовано 154 животных, из них: 130 белых крыс, 24 морские свинки. Результаты токсикологического исследования показали, что Na-, Ca-, Feполигалактуронат при максимально вводимой дозе (20 г/кг) не вызывает гибели опытных крыс, обладает слабым кумулятивным действием (коэффициент кумуляции 8.3). Согласно классификации опасности веществ по степени воздействия на организм в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76, Na-, Ca-, Feполигалактуронат относится к малотоксичным соединениям. В дозе 1000 мг/кг соединение не проявляет эмбриотоксического и тератогенного действия на потомство, не вызывает нарушения течения беременности у лабораторных крыс и каких-либо отклонений в постэмбриональном развитии. Вещество не вызывает аллергических реакций и обладает слабым сенсibilизирующим действием на организм морских свинок. Полученное соединение не оказывает раздражающего и кожно-резорбтивного действия при нанесении на выстриженный участок кожи крыс или в конъюнктивальный мешок глаза кролика. Показано, что Na-, Ca-, Fe- полигалактуронат при однократном и четырехкратном пероральном введении в дозе 600 мг/кг не оказывает раздражающего действия на слизистую желудка, то есть не проявляет ульцерогенного действия. Полученные результаты показали высокую токсикологическую безопасность исследованного вещества. При потреблении

Na-, Ca-, Fe- полигалактуроната растущим молодняком крыс в дозе 1250 мг/кг в течение 2,5 месяцев не проявлялось токсических эффектов, повышения падежа и нарушения динамики роста по сравнению с контрольной группой животных. При исследовании гематологических показателей для Na-, Ca-, Fe- полигалактуроната было выявлено гемопоэз-стимулирующее действие, проявляющееся в увеличении концентрации гемоглобина на 10% ($p < 0,01$) и более. Было проведено сравнение эффективности Na-, Ca-, Fe-полигалактуроната с современными противоанемическими препаратами «Актиферрин» и «Сорбифер-Дурулес». Крысам, подвергнутым кровопотере, в виде болюсов скармливали твердый Na-, Ca-, Fe-полигалактуронат в дозе 126 мг/кг (содержание железа 1,3 мг). Аналогичные контрольные группы животных получали в виде болюсов препараты «Актиферрин» и «Сорбифер-Дурулес» в дозах, содержащих эквивалентное количество железа. Было показано, что Na-, Ca-, Fe-полигалактуронат проявляет ту же эффективность по действию на восстановление концентрации гемоглобина у крыс после кровопотери, что и указанные препараты (рис. 6). Рис. 6 - Динамика восстановления концентрации гемоглобина у крыс после кровопотери, получавших натрий-, кальций-, железо полигалактуронат (ПК Na Ca Fe), в сравнении с аналогичными группами животных, получавшими лекарственные противоанемические препараты Актиферрин и Сорбифер В тесте «бег на третбане», проведенном на тренированных лабораторных мышках, в группах, получавших Na-, Ca-, Fe-полигалактуронат в дозах 360 и 480 мг/кг, все животные выдерживали тестовую нагрузку. Это свидетельствует о том, что вещество не проявляет побочных эффектов на физическую работоспособность, являющуюся интегральным показателем общего функционального состояния животных [17, 18]. Таким образом, результаты проведенной работы по биологическим испытаниям металлокомплексов пектиновых полисахаридов свидетельствуют об отсутствии токсичности (LD_{50} выше 25 г/кг), высокой их эффективности при коррекции микроэлементозов, связанных с дефицитом железа, т.е. при лечении и профилактике анемии. Разработанный способ синтеза водорастворимых металлокомплексов достаточно простой и дешевый, и открывает перспективы для создания новых препаратов на основе пектиновых полисахаридов, эффективных для профилактики и лечения различных форм микроэлементозов, связанных не только с дефицитом железа, но и других микро- и макроэлементов.