

*Н. А. ВЕРЕЩАГИН¹, Т. Г. ТОЛСТИКОВА²,
Д. Ю. КОРУЛЬКИН¹, Р. А. МУЗЫЧКИНА¹*

СИНТЕЗ НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ N-ЗАМЕЩЕННЫХ АНТРАХИНОНОВ

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан,

²Новосибирский институт органической химии им.Н.Н.Ворожцова, Новосибирск, Россия.

E-mail: veresch85@rambler.ru

Аннотация. В статье приводятся результаты синтеза N-замещенных производных промышленно доступного диоксиантрахинона ализарина. В качестве ацилирующих агентов были использованы попарно близкие по структуре аминокислоты аспарагиновая и глутаминовая кислота, а также фенилаланин и тирозин. Для разделения и очистки синтезированных веществ разработана методика их препаративной ВЭЖХ хроматографии. В индивидуальном виде выделено 8 ранее не описанных аминокислотных производных, в том числе моно- и ди-N-аспарагилализарин, моно- и ди-N-глицилализарин, моно- и ди-N-фенилаланилизарин, моно- и ди-N-тирозилализарин. Структуры производных доказаны комплексом химическим и спектральных данных. Для каждого из синтезированных веществ впервые приведены их ИК-, ¹³C-ЯМР- и масс-спектральные характеристики и изучены их противовоспалительная и противоязвенная активности. Выявлены вещества, перспективные для расширенных биоиспытаний и возможного практического использования.

Ключевые слова: N-ацилирование, ализарин, антрахиноны, противовоспалительная, противоязвенная активность.

Природные производные антрахинона и их полусинтетические аналоги, являются активным началом многих лекарственных препаратов из растений, издавна применяемых в медицине. В наши дни широко используются около 50 таких препаратов.

Среди производных антрахинона наибольшая биологическая активность выявлена у гликозидированных, димерных, восстановленных форм и у антрациклиновых антибиотиков. Окисленные формы антрахинона проявляют, в зависимости от дозы, вяжущий или слабительный эффект и противовоспалительное действие. Несмотря на то, что существуют синтетические слабительные средства, препараты из растений до наших дней не утратили своего значения, так как действуют мягче, безболезненно, не раздражают другие органы и ткани, хорошо выводятся и оказывают общее благотворное действие на организм [1, 2].

Благодаря высокой активности исходных антрахинонов и разнообразных видах активности, поиск, путем химической модификации новых высокоэффективных препаратов, введение их в производство и разработка высокоточных, универсальных по отношению к этапам технологического цикла, методов стандартизации препаратов является актуальным.

Целью исследования являлся направленный синтез новых потенциально биологически активных N-замещенных антрахинонов.

В качестве исходного вещества был выбран промышленно доступный антрахинон – ализарин, N-ацилирование которого осуществляли по стандартным методикам [2]. Синтезированные вещества разделяли методами адсорбционной колоночной хроматографии и дробного фракционирования на колонке с силикагелем, проводя градиентное элюирование смесью н-гексан-этилацетат состава от 10:0 до 7:3. Разделение веществ контролировали методом ТСХ в системе толуол - этилформиат - муравьиная кислота (5:4:1). Окончательную очистку синтезированных антрахинонов осуществляли препаративной ВЭЖХ на колонках с Lichrospher RP₁₈ при использовании в качестве подвижной фазы смесь ацетонитрил – вода 65:35, с использованием УФ детектора (254 нм) [3].

В результате, в индивидуальном виде было получено 8 новых антрахинонов (I–VIII):

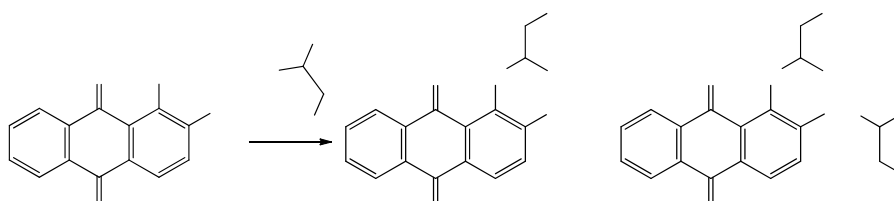


Рисунок 1 – Схема синтеза моно- и ди-N-аспарагилпроизводных ализарина

1-N-аспарагил-2-оксиантрахинон (I): ИК (KBr) ν см⁻¹: 3385 (NH), 3245 (OH), 2975, 2925, 1720, 1710 (COOH), 1670, 1630 (C=O), 1610 (NH). ¹³C-ЯМР (100 MHz, CDCl₃) σ м.д.: 146.2 (C-1), 148.7 (C-2), 120.1 (C-3), 118.5 (C-4), 127.0 (C-4a), 126.7 (C-5), 132.2 (C-6), 132.2 (C-7), 126.7 (C-8), 133.4 (C-8a), 185.5 (C-9), 111.0 (C-9a), 182.0 (C-10), 133.4 (C-10a), 64.7 (C-1'), 39.3 (C-2'), 173.2 (C-3'), 174.6 (C-2''). MS m/z (70 eV): 355 [M]⁺, 354, 338, 313, 296, 269, 239, 223, 212, 184, 138, 132, 117, 92, 89, 77, 72, 63, 51, 45, 42, 39.

1,2-Ди-N-аспарагилантрахинон (II): ИК (KBr) ν см⁻¹: 3390, 3385 (NH), 2980, 2975, 2945, 2925, 1730, 1720, 1710, 1705 (COOH), 1665, 1630 (C=O), 1620, 1610 (NH). ¹³C-ЯМР (100 MHz, CDCl₃) σ м.д.: 128.5 (C-1), 135.1 (C-2), 117.6 (C-3), 117.1 (C-4), 122.7 (C-4a), 126.7 (C-5), 132.2 (C-6), 132.2 (C-7), 126.7 (C-8), 133.6 (C-8a), 185.5 (C-9), 110.6 (C-9a), 182.0 (C-10), 122.8 (C-10a), 64.7 (C-1'), 39.3 (C-2'), 173.2 (C-3'), 174.6 (C-2''), 64.6 (C-1'''), 39.3 (C-2'''), 173.2 (C-3'''), 174.7 (C-2'''). MS m/z (70 eV): 518 [M]⁺, 517, 501, 475, 459, 431, 354, 338, 312, 295, 268, 239, 238, 223, 212, 184, 138, 132, 117, 92, 89, 77, 72, 63, 51, 45, 42, 39.

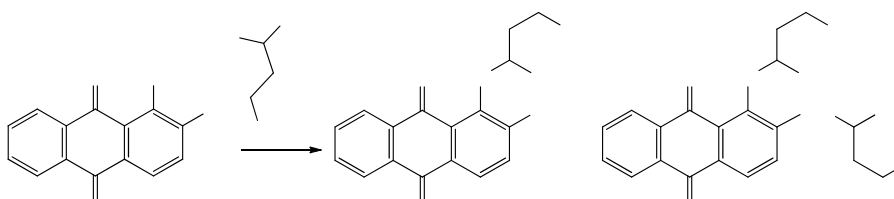


Рисунок 2 – Схема синтеза моно- и ди-N-глутамилпроизводных ализарина

1-N-глутамил-2-оксиантрахинон (III): ИК (KBr) ν см⁻¹: 3380 (NH), 3240 (OH), 2990, 2865, 1725, 1710 (COOH), 1675, 1630 (C=O), 1610 (NH). ¹³C-ЯМР (100 MHz, CDCl₃) σ м.д.: 146.3 (C-1), 148.8 (C-2), 120.1 (C-3), 118.5 (C-4), 127.0 (C-4a), 126.8 (C-5), 132.2 (C-6), 132.2 (C-7),

126.8 (C-8), 133.6 (C-8a), 185.6 (C-9), 111.2 (C-9a), 182.1 (C-10), 133.6(C-10a), 69.4(C-1'), 26.2(C-2'), 30.6 (C-3'), 178.4 (C-4'), 174.7 (C-2''). MS m/z (70 eV): 369 [M]⁺, 368, 352, 340, 324, 312, 295, 268, 239, 223, 212, 184, 146, 138, 131, 130, 102, 92, 77, 63, 58, 51, 45, 42, 39.

1,2-Ди-N-глутамилантрахинон (IV): ИК (KBr) ν см⁻¹: 3390, 3385 (NH), 2980, 2975, 2965, 2955, 1730, 1725, 1715, 1710 (COOH), 1675, 1630 (C=O), 1615, 1610 (NH). ¹³C-ЯМР (100 MHz, CDCl₃) σ м.д.: 128.6 (C-1), 135.1 (C-2), 117.7 (C-3), 117.1 (C-4), 122.8 (C-4a), 126.8 (C-5), 132.2 (C-6), 132.2 (C-7), 126.8 (C-8), 133.6 (C-8a), 185.6 (C-9), 110.6 (C-9a), 182.1 (C-10), 133.6 (C-10a), 69.1 (C-1'), 26.2 (C-2'), 30.7 (C-3'), 178.4 (C-4'), 174.7 (C-2''), 69.2 (C-1'''), 26.2 (C-2'''), 30.7 (C-3'''), 178.4 (C-4'''), 174.7 (C-2'''). MS m/z (70 eV): 498 [M]⁺, 497, 481, 469, 453, 441, 425, 409, 351, 323, 309, 292, 265, 239, 223, 212, 184, 146, 138, 131, 130, 102, 92, 77, 63, 58, 51, 45, 42, 39.

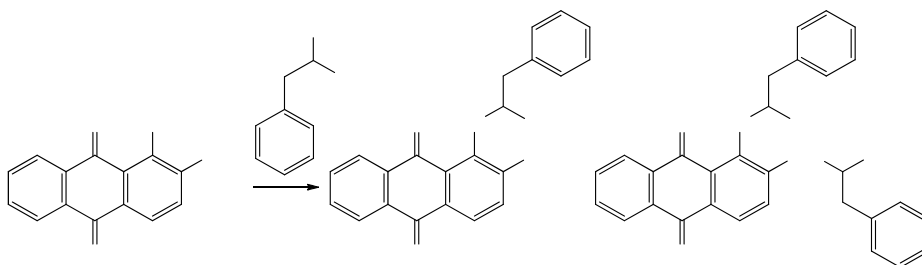


Рисунок 3 – Схема синтеза моно- и ди-N-фенилаланилпроизводных ализарина

1-N-фенилаланил-2-оксиантрахинон (V): ИК (KBr) ν см⁻¹: 3385 (NH), 3235 (OH), 3005, 1720 (COOH), 1670, 1630 (C=O), 1610 (NH). ¹³C-ЯМР (100 MHz, CDCl₃) σ м.д.: 146.2 (C-1), 148.9 (C-2), 120.1 (C-3), 118.4 (C-4), 127.0 (C-4a), 126.8 (C-5), 132.1 (C-6), 132.1 (C-7), 126.8 (C-8), 133.6 (C-8a), 185.7 (C-9), 111.2 (C-9a), 182.1 (C-10), 133.6 (C-10a), 72.1 (C-1'), 36.6 (C-2'), 135.6 (C-3'), 127.6 (C-4'), 128.6 (C-5'), 125.8 (C-6'), 128.6 (C-7'), 127.6 (C-8'), 174.7 (C-2''), MS m/z (70 eV): 387 [M]⁺, 386, 371, 358, 342, 325, 314, 310, 298, 281, 270, 254, 239, 223, 212, 184, 164, 148, 138, 132, 120, 107, 92, 77, 63, 51, 45, 42, 39.

1,2-Ди-N-фенилаланилантрахинон (VI): ИК (KBr) ν см⁻¹: 3390, 3385 (NH), 3005, 2990, 1720, 1710 (COOH), 1675, 1630 (C=O), 1615, 1610 (NH). ¹³C-ЯМР (100 MHz, CDCl₃) σ м.д.: 128.6 (C-1), 135.1 (C-2), 117.7 (C-3), 117.1 (C-4), 122.8 (C-4a), 126.8 (C-5), 132.1 (C-6), 132.1 (C-7), 126.8 (C-8), 133.6 (C-8a), 185.7 (C-9), 110.6 (C-9a), 182.1 (C-10), 133.6 (C-10a), 71.8 (C-1'), 36.6 (C-2'), 136.6 (C-3'), 127.7 (C-4'), 128.6 (C-5'), 125.9 (C-6'), 128.6 (C-7'), 127.7 (C-8'), 174.7 (C-2''), 71.8 (C-1'''), 36.6 (C-2'''), 136.6 (C-3'''), 127.7 (C-4'''), 128.6 (C-5'''), 125.9 (C-6'''), 128.6 (C-7'''), 127.7 (C-8'''), 174.7 (C-2'''). MS m/z (70 eV): 534 [M]⁺, 533, 516, 505, 489, 473, 458, 441, 430, 414, 402, 371, 357, 342, 325, 314, 298, 280, 269, 254, 239, 223, 212, 184, 146, 138, 131, 130, 102, 92, 77, 63, 58, 51, 45, 42, 39.

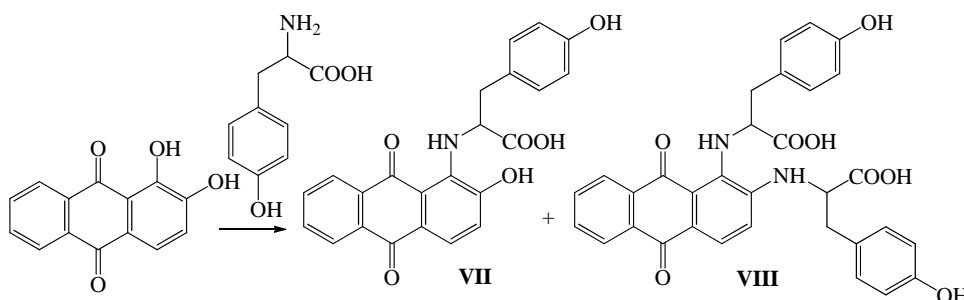


Рисунок 4 – Схема синтеза моно- и ди-N-тирозилпроизводных ализарина

1-N-тирозил-2-оксиантрахинон (VII): ИК (KBr) ν см⁻¹: 3385 (NH), 3245 (OH), 3010, 1715 (COOH), 1670, 1630 (C=O), 1610 (NH). ¹³C-ЯМР (100 MHz, CDCl₃) σ м.д.: 146.2 (C-1), 148.9

(C-2), 120.1 (C-3), 118.4 (C-4), 127.0 (C-4a), 126.8 (C-5), 132.1 (C-6), 132.1 (C-7), 126.8 (C-8), 133.6 (C-8a), 185.7 (C-9), 111.2 (C-9a), 182.1 (C-10), 133.6 (C-10a), 72.1 (C-1'), 36.6 (C-2'), 129.2 (C-3'), 130.2 (C-4'), 115.8 (C-5'), 155.7 (C-6'), 115.8 (C-7'), 130.2 (C-8'), 174.7 (C-2''). MS m/z (70 eV): 403 [M]⁺, 402, 386, 374, 371, 358, 342, 325, 314, 310, 298, 281, 270, 254, 239, 223, 212, 184, 164, 148, 138, 132, 120, 107, 92, 77, 63, 51, 45, 42, 39.

1,2-Ди-N-тирозилантрахинон (VIII): ИК (KBr) ν см⁻¹: 3390, 3385 (NH), 3010, 3000, 1720, 1715 (COOH), 1670, 1630 (C=O), 1620, 1610 (NH). ¹³C-ЯМР (100 МГц, CDCl₃) σ м.д.: 128.6 (C-1), 135.1 (C-2), 117.7 (C-3), 117.1 (C-4), 122.8 (C-4a), 126.8 (C-5), 132.1 (C-6), 132.1 (C-7), 126.8 (C-8), 133.6 (C-8a), 185.7 (C-9), 110.6 (C-9a), 182.1 (C-10), 133.6 (C-10a), 71.8 (C-1'), 36.6 (C-2'), 129.2 (C-3'), 130.2 (C-4'), 115.8 (C-5'), 155.7 (C-6'), 115.8 (C-7'), 130.2 (C-8'), 174.7 (C-2''), 71.8 (C-1'''), 36.6 (C-2'''), 129.2 (C-3'''), 130.2 (C-4'''), 115.8 (C-5'''), 155.7 (C-6'''), 115.8 (C-7'''), 130.2 (C-8'''), 174.7 (C-2'''). MS m/z (70 eV): 550 [M]⁺, 549, 533, 522, 516, 505, 489, 473, 458, 441, 430, 414, 402, 371, 357, 342, 325, 314, 298, 280, 269, 254, 239, 223, 212, 184, 146, 138, 131, 130, 102, 92, 77, 63, 58, 51, 45, 42, 39.

Биоскрининг синтезированных N-аминокислотных производных ализарина проводился в лаборатории фармакологических исследований Новосибирского института органической химии им. Н. Н. Ворожцова.

Противовоспалительную активность производных ализарина на модели гистаминового воспаления мышей [4] оценивали по снижению воспалительного отека лапы мышей самцов (100 особей), вызванного субпланарным введением 0.1% раствора гистамина. Агенты в виде водно-твиновой взвеси вводили в желудок в дозе 50 мг/кг за час до флогена. Контрольным животным вводили тем же способом водно-твиновую взвесь. Референсным препаратом являлся индометацин (Fluka) в дозе 20 мг/кг. Величину отека определяли через 6 часов после введения агентов по разности масс воспаленной и здоровой лап. Для каждого животного рассчитывали индекс воспаления как отношение этой разности к массе здоровой лапы. Результаты обрабатывали статистически с помощью пакета программ «Statistika 6». Различия считали достоверными с вероятностью $p < 0,05$. Для каждой опытной группы рассчитывали величину отека относительно контроля, который принимали за 100%. За противовоспалительный эффект принимали разность относительной величины отека в контрольной группе и соответствующим значением в опытной группе. Результаты эксперимента представлены в таблице 1.

Согласно полученным данным, у соединений II, V, VI, VII и VIII обнаружен достоверный противовоспалительный эффект. Наиболее выраженным противовоспалительным действием из протестированных агентов обладает вещество VII.

Противовоспалительная активность убывала в ряду агентов: VII > VI > VIII > V > II.

Изучение противоязвенной активности производных ализарина на индометациновой модели язвы желудка проводили на 50 крысах-самцах линии Вистар (180-230 г, 1.5 мес.) [4].

Модель индометациновой язвы: после пищевой и питьевой депривации в течение 24 ч. моделирование язвы производят однократным внутривентральным введением индометацина в дозе 20 мг/кг. Исследуемые препараты вводили за час до воспроизведения язв. Через 24 ч. животных забивают под

Таблица 1 – Противовоспалительная активность N-замещенных производных ализарина на модели индуцированного гистамином отека

Вещества	Доза, мг/кг	Индекс отека, %	Противовоспалительная активность, %
Контроль	–	27.7±0.8	0
I	50	26.1±1.5	6
II	50	25.0±0.8*	10
III	50	25.4±2.8	8
IV	50	25.7±2.3	7
V	50	24.1±1.1*	13
VI	50	21.8±1.4**	21
VII	50	21.3±1.8**	23
VIII	50	23.0±1.3**	17
Индометацин	20	14.7±1.0***	47

*P < 0.05; **P < 0.01 – различия с контролем достоверны; ***P < 0.01 – различия с индометацином достоверны во всех группах.

эфирным наркозом путем цервикальной дислокации и подсчитывают количество и площадь язв, интегральный показатель Индекс Паулса (ИП) и противоязвенную активность (ПА). Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Противоязвенная активность N-замещенных производных ализарина на модели индометациновой язвы (индометацин в дозе 20 мг/кг)

I гр контроль индометацин 20 мг/кг per os	II гр. вещество V 100 мг/кг per os + + индометацин	III гр. вещество VI 100 мг/кг per os + + индометацин	IV гр. вещество VII 100 мг/кг per os + + индометацин	V гр. вещество VIII 100 мг/кг per os + + индометацин
Язв – 42	Язв - 41	Язв - 8	Язв - 17	Язв - 24
ИП = 5.1	ИП = 3.6	ИП = 0.65	ИП = 2.4	ИП = 1.95
	ПА = 1.4	ПА = 7.8	ПА = 2.1	ПА = 2.6

Примечание: ИП – индекс Паулса; * P < 0,05 – достоверные различия с фамотидином; ** противоязвенная активность (ПА) = ИП контр / ИП опыт; исследуемые препараты считаются эффективными, если ПА составит 2 и более единиц.

На основании проведенных исследований установлено, что наибольшую противоязвенную активность проявило соединение VI, вещества VII, VIII считаются также эффективными, но в меньшей степени, чем VII.

Литература

- [1] Файн В.Я. 9,10-антрахиноны и их применение. – М.: Фазис, 1999. – 92 с.
- [2] Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю. Модифицированные оксиантрахиноны и их биологическая активность. – В 4 т. – М.: Фазис, 2010. – 1328 с.

[3] Arnold U.W. Separation of nine anthraquinones by high performance liquid chromatography // *Z. Naturforsch.* – 2005. – N 6. – P. 969-975.

[4] Gupta S.K., *Drug Screening Methods.* – Kent: Anshan Publishers, 2009. – 682 p.

Резюме

Н. А. Верещагин, Т. Г. Толстикова, Д. Ю. Коренькин, Р. А. Музычкина

ЖАҢА БИОЛОГИЯЛЫҚ БЕЛСЕНДІ N-ОРЫНБАСҚАН АНТРАХИНОНДАРДЫ СИНТЕЗДЕУ

Мақалада өндірістік қолжетімді диоксиантрахинон ализариннің N-орынбасқан туындыларын синтездеу нәтижелері келтіріледі. Жеке түрде бұрындары сипатталмаған 8 аминқышқылды туындылары бөлініп алынды, соның ішінде моно- мен ди-N-аспарагиллизарин, моно- мен ди-N-глицилизарин, моно- менди-N-фениланилизарин, моно- менди-N-тирозиллизарин. Синтезделініп алынған заттардың әрқайсысы үшін алғаш олардың ИҚ-, ¹³C-ЯМР- мен масс-спектрлік сипаттамалары келтірілді және олардың қабынуға қарсы және жараға қарсы белсенділіктері зерттелінді.

Тірек сөздер: N-ацилдеу, ализарин, антрахинондар, қабынуға қарсы, жараға қарсы белсенділік.

Summary

N. A. Vereschagin, T. G. Tolstikova, D. Yu. Korulkin, R. A. Muzychkina

SYNTHESIS OF NEW BIOACTIVE N-SUBSTITUTED ANTHRAQUINONES

Results of synthesis of the N-substituted alizarin derivatives are presented. The technique of a preparative HPLC chromatography of the synthesized derivatives is created. As a result of 8 new aminoacid derivatives (mono- and di-N-asparagylalazarin, mono- and di-N-glutamylalazarin, mono- and di-N-phenylalanylalazarin, mono- and di-N-tyrosylalazarin) were synthesized. For each of the synthesized substances their IR-, NMR- and MS- spectral characteristics for the first time are given and their anti-inflammatory, anti-ulcerous activities were researched.

Key words: N-acylation, alizarin, anthraquinones, anti-inflammatory, anti-ulcerous activity.