

В. С. Агаджанян¹, Э. Т. Оганесян¹, В. Т. Абеев²

ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННЫЙ ПОИСК СОЕДИНЕНИЯ-ЛИДЕРА В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

¹ Пятигорская государственная фармацевтическая академия, Пятигорск, Россия;

² Северо-Осетинский государственный университет, Владикавказ, Россия

На основе данных квантово-химических методов анализа (PM3 и AM1) изучены индексы реакционной способности в ряду гидроксид- и метоксипроизводных коричной кислоты в отношении активных форм кислорода. Обоснована, а затем и экспериментально подтверждена высокая антиоксидантная активность 4-гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутилкоричной кислоты, которая в дальнейшем может представить интерес для создания на её основе лекарственного препарата.

Ключевые слова: производные коричной кислоты, пространственно затрудненные фенолы, взаимосвязь структура — антиоксидантная активность.

В наших предыдущих сообщениях были приведены результаты исследования антирадикальной активности коричной кислоты (I) и ее производных (II – XVI) в отношении активных форм кислорода (АФК) квантово-химическими методами [1, 2]. Полученные данные позволили определить наиболее реакционные центры в анализируемых структурах, подвергающиеся первичной атаке свободными радикалами. На примере взаимодействия (I) с гидроксильным радикалом предложен также предполагаемый механизм протекания данного процесса.

В продолжение этих исследований мы сочли целесообразным использовать аналогичный подход как для выявления функциональных взаимосвязей между структурой изучаемых соединений и уровнем проявляемой ими антирадикальной активности, так и для прогноза структуры соединения-лидера в ряду производных I. Структурные особенности, а именно наличие сопряженной системы, включающей ароматическое ядро, виниленовую и карбоксильную группы, создают предпосылки для проявления высокой реакционной способности производных I в отношении АФК.

С использованием полуэмпирических квантово-химических методов анализа нами были изучены индексы реакционной способности в ряду гидроксид- и метоксипроизводных I (табл. 1) в возможных радикальных реакциях с АФК. Такой подход с использованием репрезентативного ряда соединений позволяет не только выявить закономерности взаимосвязи структура — антиоксидантная активность, но и избежать неточностей и ошибок в интерпретации полученных результатов.

Анализируя полученные результаты квантово-химического анализа, легко убедиться в том, что производные коричной кислоты, содержащие гидроксигруппу в *пара*-положении к пропеновому фрагменту, занимают особое положение среди исследуемых структур.

Так, соединение XV характеризуется наименьшими значениями потенциала ионизации и величины порядка связи O-H в сравнении с другими исследуемыми соединениями. Более того, если учитывать такие характеристики, как суммарная ненасыщенность и суммарный заряд, локализующиеся на атомах циннамоильного фрагмента, то соединение XV по этим же показателям также является лидирующим.

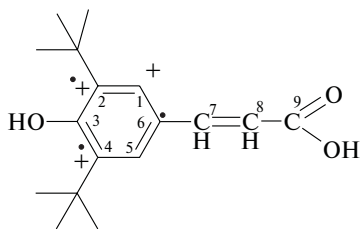
Отметим, что одним из многочисленных и интенсивно изучаемых представителей фенольных антиоксидантов являются пространственно-затрудненные фенолы. Так, в настоящее время широкое применение в ветеринарной и медицинской практике нашел препарат дибунол (ионол), представляющий собой 2,6-ди-*трет*-бутил-(4)-метилфенол (XVII).

Изначально 10 % линимент дибунола был предложен для внутривезикулярных инстилляций при лечении рака и папилломатоза мочевого пузыря [3], однако в последнее время появилось сообщение о высокой токсичности препарата [4]. Показано, что высокие дозы XVII способны подавлять антиоксидантную систему митохондрий, вызывая тем самым резкое увеличение генерации свободных радикалов.

Принцип молекулярного конструирования подобных соединений основан на использовании *пара*-замещенных 2,6-ди-*трет*-бутилфенолов с различными функциональными группами. Установлено, что введение заместителей именно в *пара*-положение по отношению к гидроксигруппе обеспечивает высокую стабильность образующихся феноксильных радикалов [5].

Основываясь на полученных нами результатах квантово-химического изучения производных I, а также учитывая влияние *трет*-бутильных заместителей, мы сочли целесообразным заменить метильную группу в *пара*-положении XVII на остаток пропеновой кислоты, что приведет к формированию циннамоильного фрагмента.

Предлагаемое производное коричной кислоты — 4-гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутилкоричную кислоту



(+) — атомы углерода в цикле с наибольшими значениями индекса “ненасыщенности” (IUA), (•) — атомы углерода в цикле с наибольшими значениями электронной плотности.

Рис. 1. Распределение индекса ненасыщенности и электронной плотности в структуре XVIII

(XVIII), лабораторное название дитретоксикор, легко получить по реакции [6], что и было использовано нами.

Попытка экспериментального изучения антирадикальной активности данного соединения сделана в работе [7]. В ней установлен достаточно высокий уровень антирадикальной активности XVIII, но он, по мнению авторов, не превосходит таковой для кофейной, феруловой и изоферуловой кислот. С нашей точки зрения, такие выводы не совсем корректны, так как для сопоставления уровня антирадикальной активности анализируемых соединений не были учтены значения молярных концентраций. Более того, авторам следовало бы определять концентрацию половинного ингибирования хемилюминесценции в системе, генерирующей свободные радикалы. Наконец, не установлено, что в приводимых данных между концентрацией в мкг/мл и уровнем активности имеется линейная зависимость.

В этой связи по опубликованным ранее методикам [1, 2] осуществлен квантово-химический анализ предлагаемой структуры. В табл. 2 и на рис. 1 приведены результаты квантово-химического анализа структуры XVIII.

В результате сравнения данных квантово-химического анализа предлагаемой структуры с таковыми для исследуемого ряда соединений выявлены следующие особенности XVIII:

1. XVIII обладает наибольшей суммарной степенью ненасыщенности 9 атомов углерода циннамоильного остатка;

2. XVIII характеризуется наименьшим значением величины первого потенциала ионизации $E_{\text{ВЗМО}} - E_{\text{НСМО}} = 8,152$ эВ, а значит легче переходит в возбужденное состояние и обладает более высокой реакционной способностью;

3. связь О-Н в предлагаемой структуре характеризуется наименьшей величиной порядка связи $P_{\text{ОН}} = 1,017$ по сравнению с таковой в исследуемом ряду производных, поэтому она более предрасположена к гомолитическому разрыву;

4. образующийся при таком типе разрыва связи феноксильный радикал имеет более низкую величину энтальпии образования, чем аналогичный радикал, обра-

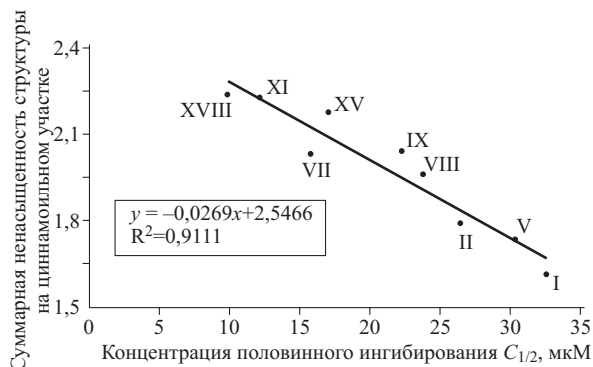
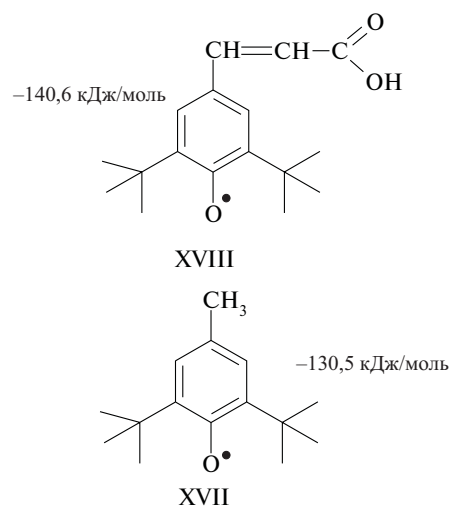


Рис. 2. Функциональная зависимость между суммарной степенью ненасыщенности на циннамоильном фрагменте и уровнем антиоксидантной активности

зуемый из XVII, а значит энергетически более выгоден и более устойчив.

Энтальпия образования возможных аддуктов, ΔH



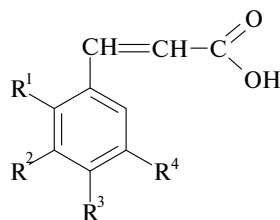
На следующем этапе наших исследований представлялось целесообразным осуществить прогноз предполагаемого спектра биологической активности XVIII с помощью программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) [8, 9]. В табл. 3 приведены результаты прогноза, из которых с помощью программы Pharma Expert отобраны такие показатели, которые в наибольшей степени характеризуют антиоксидантную активность.

Из полученных данных хорошо прослеживается лидирующая роль предлагаемого соединения в ряду остальных производных I, причем с достаточно высокой вероятностью проявления активности в эксперименте (все значения $P_a > 50$ %).

Среди множества существующих расчетных программ, позволяющих априори определить возможные пути биотрансформации веществ в организме (схема 1), нами была использована программа Pallas 2.1 (свободно распространяемая демо-версия).

На следующем этапе исследования с помощью данной программы (приложение Toxicity) определен предполагаемый уровень острой токсичности, как для предлагаемой структуры, так и для её метаболитов.

Рассчитанные дескрипторы гидрокси- и метоксипроизводных коричной кислоты



I – XVI

Соединение	Суммарная электронная плотность	Показатель суммарной ненасыщенности (IUA)	Потенциал ионизации * ЕВЗМО — ЕНСМО, эВ	Порядок связи О-Н
R ¹ =R ² =R ³ =R ⁴ =H (I)	36,303	1,612	8,934	—
R ¹ =OCH ₃ , R ² =R ³ =R ⁴ =H (II)	36,198	1,795	8,411	—
R ² =OH, R ¹ =R ³ =R ⁴ =H (III)	36,204	1,784	8,675	1,061
R ² =OCH ₃ , R ¹ =R ³ =R ⁴ =H (IV)	36,205	1,786	8,669	—
R ³ =OH, R ¹ =R ² =R ⁴ =H (V)	36,198	1,734	8,696	1,068
R ³ =OCH ₃ , R ¹ =R ² =R ⁴ =H (VI)	36,200	1,747	8,674	—
R ² =R ³ =OH, R ¹ =R ⁴ =H (VII)	36,087	2,029	8,132	1,044 (R ²) 1,070 (R ³)
R ² =OCH ₃ , R ³ =OH, R ¹ =R ⁴ =H (VIII)	36,084	1,961	8,555	1,068
R ² =OH, R ³ =OCH ₃ , R ¹ =R ⁴ =H (IX)	36,087	2,041	8,265	1,062
R ² =OCH ₃ , R ³ =OCH ₃ , R ¹ =R ⁴ =H (X)	36,104	2,034	8,392	—
R ² =R ³ =R ⁴ =OH, R ¹ =H (XI)	35,976	2,227	8,295	1,047 (R ²) 1,051 (R ³) 1,067 (R ⁴)
R ² =OCH ₃ , R ³ =R ⁴ =OH, R ¹ =H (XII)	35,977	2,231	8,277	1,051 (R ³) 1,066 (R ⁴)
R ² =R ⁴ =OH, R ³ =OCH ₃ , R ¹ =H (XIII)	35,970	2,059	8,606	1,068 (R ²) 1,073 (R ²)
R ² =R ³ =OCH ₃ , R ⁴ =OH, R ¹ =H (XIV)	35,971	2,092	8,560	1,071
R ² =R ⁴ =OCH ₃ , R ³ =OH, R ¹ =H (XV)	35,952	2,177	8,201	1,014
R ² =R ³ =R ⁴ =OCH ₃ , R ¹ =H (XVI)	35,975	2,118	8,408	—

* ЕНСМО — энергия низшей свободной молекулярной орбитали, ЕВЗМО — энергия высшей занятой молекулярной орбитали.

Расчетные данные показали, что острая токсичность XVIII и его метаболитов не превышает 3-го уровня токсичности (малотоксичные вещества) согласно заложенной в программу классификации.

Все рассчитанные выше прогностические критерии уровня антиоксидантной активности явились обоснованием для целенаправленного синтеза XVIII.

4-Гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутилкоричная кислота (XVIII).

Синтез указанного соединения может быть осуществлен 2 путями (схема 2):

1. Конденсацией ароматических альдегидов с кислотами по аналогии с реакцией Перкина [6] с использованием 4-гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутилбензальдегида и малоновой кислоты;

2. Конденсацией дибунола с глиоксиловой (глиоксальной) кислотой, по аналогии с синтезом халконов из

Таблица 2
Рассчитанные дескрипторы антиоксидантной активности 4-гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутилкоричной кислоты (XVIII)

C _v	V _μ	N _μ	IUA	Заряд на атоме а. е.	Электронная плотность
1	3,951	3,659	0,293	- 0,058	4,058
2	3,952	3,651	0,301	- 0,072	4,072
3	3,935	3,647	0,288	0,143	3,857
4	3,948	3,649	0,300	- 0,13	4,13
5	3,951	3,665	0,287	- 0,041	4,041
6	3,963	3,701	0,262	- 0,086	4,086
7	3,945	3,767	0,177	0,034	3,966
8	3,945	3,679	0,266	- 0,186	4,186
9	3,839	3,775	0,064	0,441	3,559
		Σ	2,236		35,955

Примечание: C_v — номер атома углерода; V_μ — теоретическая валентность; IUA — индекс ненасыщенности [1, 2].

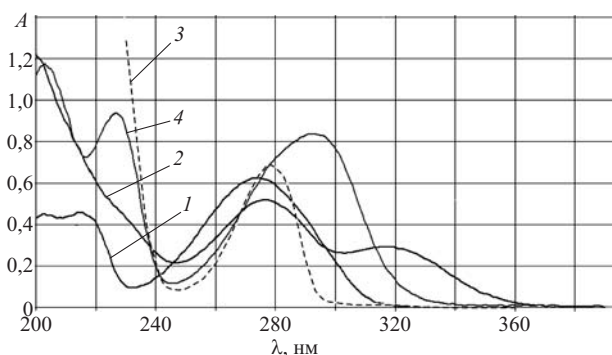
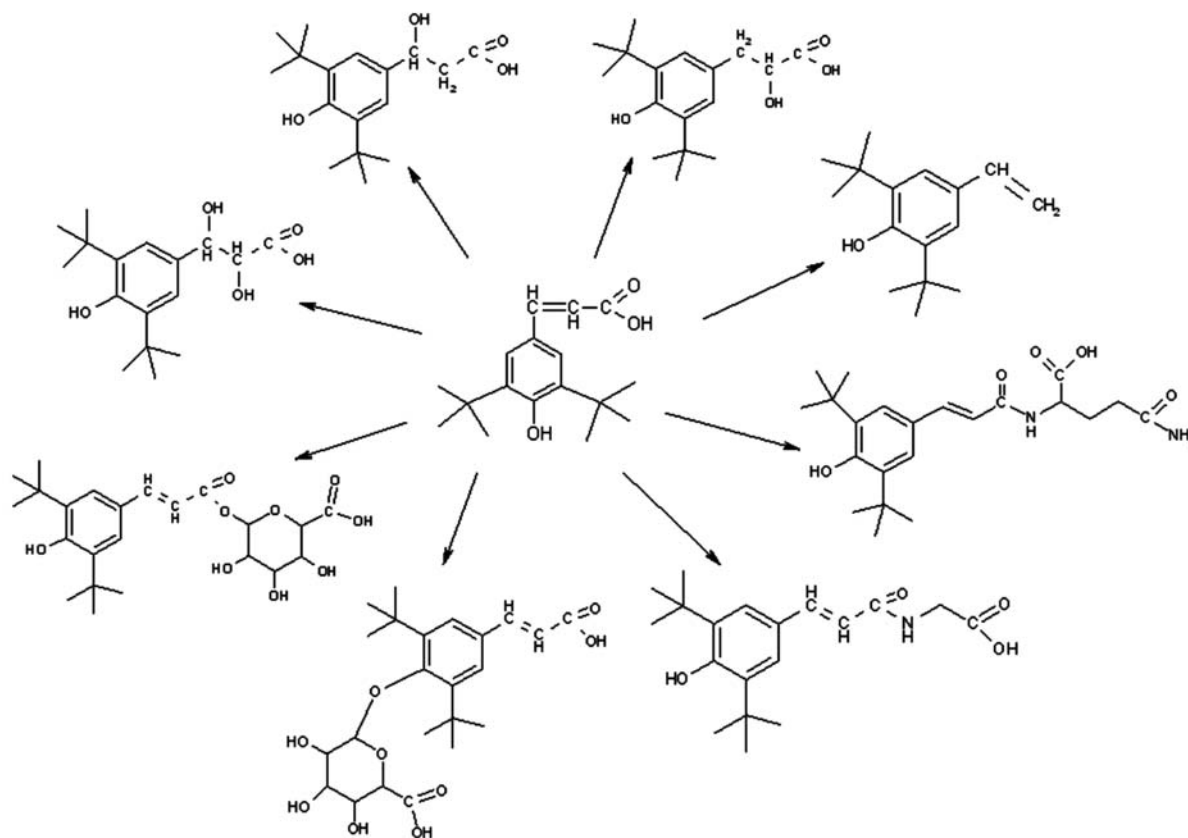


Рис. 3. УФ-спектры поглощения растворов: 1 — I, V — 2, XVII — 3 и XVIII — 4.

Схема 1



Возможные пути метаболических превращений XVIII в организме животного, рассчитанные с помощью программы Pallas 2.1. (Result of Metabol Expert 10,0 for Windows)

ацетофенона [10]. Реакцию проводят в среде диметилсульфоксида (ДМСО).

По второму пути синтеза наблюдается очень низкий выход целевого продукта, а процесс очистки его из ДМСО — достаточно трудоемкий. По понятным причинам мы остановили свой выбор на конденсации соответствующего альдегида с малоновой кислотой (направление 1).

Антиоксидантную активность XVIII определяли по степени ингибирования генерации супероксидного анион-радикала, инициированного аутоокислением адреналина [11].

С целью выявления возможных корреляционных взаимосвязей между квантово-химическими параметрами структур и их активностью была изучена антиок-

сидантная активность большинства производных I из числа соединений, представленных в табл. 1 (9 структур, которыми располагали авторы статьи).

Для визуальной оценки уровня антиоксидантной активности производных I в сравнении с представителями других классов полифенольных антиоксидантов были изучены также и другие индивидуальные соединения (табл. 4).

В эксперименте определяли так называемую концентрацию половинного ингибирования ($C_{1/2}$), т.е. концентрацию, вызывающую ингибирование реакции генерации супероксидного анион-радикала в 2 раза. Очевидно, что чем меньше значение $C_{1/2}$, тем выше активность изучаемого соединения. В табл. 4 приведены результаты данного исследования, откуда следует,

Таблица 3

Результаты прогноза антиоксидантной активности

Прогнозируемые эффекты	Соединения *
Антиоксидантная активность	XVIII, XI, XII, VII, XV, XIV, XIII, VIII, IX, III, V, XVI, X, IV, VI, I, II
Регуляция метаболизма липидов	XVIII, II, I, V, III, VI, IV, VII, X, XVI, IX, VIII, XIII, XI, XIV, XV, XII
Ловушка свободных радикалов	XVIII, XI, XII, XV, XIV, XIII, VIII, IX, VII, III, V, XVI, X, IV, VI, II
Поддержание целостности клеточной мембраны	XVIII, XIV, XIII, VIII, IX, VII, XII, XVI, III, XV, II, V, X, XI, IV, VI

* Сортировка структур (слева направо) проведена в порядке убывания достоверности прогноза (Pa).

что уровень выявленной в эксперименте антиоксидантной активности производных I на 3 порядка превышает таковой для бензойной (XIX) и салициловой кислот (XX). Это, очевидно, объясняется отсутствием в их структурах цепи сопряжения с участием пропенонового фрагмента.

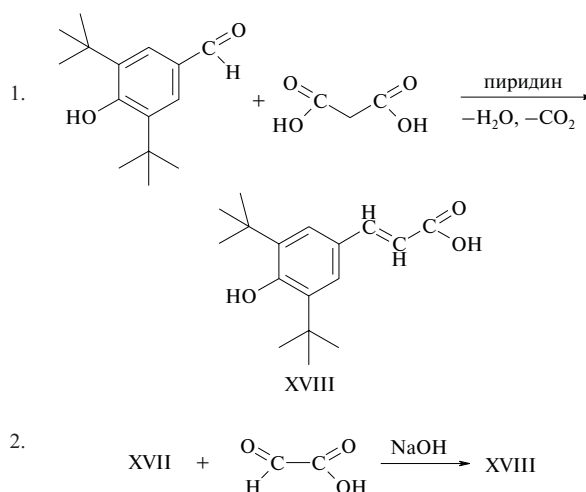
Более того, антиоксидантная активность исследуемых I достоверно превышает активность рутина, кверцетина и дигидрокверцетина.

Для соединения XVIII выявлен наибольший уровень антиоксидантной активности ($C_{1/2} = 9,8 \pm 0,4$ мкМ), который превышал аналогичный показатель для кофейной VII ($C_{1/2} = 15,7 \pm 0,4$ мкМ), синаповой XV ($C_{1/2} = 17,0 \pm 0,3$ мкМ) и XI ($C_{1/2} = 12,0 \pm 0,6$ мкМ) кислот, а также для XVII ($C_{1/2} = 21,2 \pm 0,8$ мкМ).

Сопоставление полученных экспериментальных значений уровня антиоксидантной активности производных I с рассчитанными на основе квантово-химического анализа показателями суммарной ненасыщенности их молекул позволило выявить линейную зависимость между ними с коэффициентом корреляции 0,911 (рис. 2). Аналогичная зависимость не выявлена для соединений XVII, XIX – XXV (табл. 4). На наш взгляд, это прежде всего связано с иной природой этих соединений, не относящихся к производным I. Решение данной проблемы мы видим в использовании иного более универсального параметра, например, учитывающего молекулярную массу исследуемых структур, что позволяет определять относительную суммарную ненасыщенность молекулы, приходящуюся на единицу её массы.

Таким образом, проведенный условно фармакологический скрининг (изучение антиоксидантной активности *in vitro*) подтвердил более высокую активность

Схема 2



Возможные пути синтеза XVIII

соединения XVIII в сравнении с остальными индивидуальными соединениями.

Экспериментальная часть

Квантово-химические расчеты производных I и их интермедиатов проводили на рабочей станции с процессором Intel Celeron 2,66 ГГц и 512 МБ оперативной памяти. С этой целью использовали 2 полуэмпирических метода: PM3 и AM1 (программа WinMoras 7.21). В качестве основного метода использовалась параметризация PM3, с помощью которой были рассчитаны такие показатели, как порядок связей ($P_{\mu\nu}$), связевые

Таблица 4

Антиоксидантная активность индивидуальных соединений

Соединение	Концентрация половинного ингибирования, реакции генерации супероксидного анион-радикала, $C_{1/2}$, мкМ	Показатель суммарной ненасыщенности
Бензойная кислота (XIX)	$(8,4 \pm 0,2) \cdot 10^3$	–
Салициловая кислота (XX)	$(3,6 \pm 0,1) \cdot 10^3$	–
Галловая кислота (XXI)	$55,4 \pm 0,5$	–
XVII	$21,2 \pm 0,8$	–
Аскорбиновая кислота (XXII)	$27,5 \pm 0,4$	–
Рутин (XXIII)	$49,9 \pm 0,4$	–
Кверцетин (XXIV)	$60,3 \pm 0,3$	–
Дигидрокверцетин (XXV)	$45,5 \pm 0,5$	–
I	$32,4 \pm 0,3$	1,612
II	$26,4 \pm 0,4$	1,795
V	$30,3 \pm 0,5$	1,734
VII	$15,7 \pm 0,4$	2,029
VIII	$23,7 \pm 0,6$	1,961
IX	$22,2 \pm 0,4$	2,041
XI	$12,0 \pm 0,6$	2,227
XV	$17,0 \pm 0,3$	2,177
XVIII	$9,8 \pm 0,4$	2,236

числа (N_{μ}), теоретическая валентность (V_{μ}) атомов углерода по аналогии с работами [13, 14].

Для оценки стабильности частиц мы использовали полуэмпирический метод AM1, который хорошо себя зарекомендовал при изучении радикальных реакций, особенно при расчете энтальпий гомолитического разрыва связи, как показано в работе [15].

Прогноз спектра биологической активности соединений осуществляли с помощью программ PASS и Pharma Expert, любезно предоставленных нам их разработчиками. Возможные пути биотрансформации, а также оценку токсичности структур изучали с помощью программы Pallas 2.1. (свободно распространяемая демо-версия).

Синтез XVIII проводили по методике [6]. Выход составил 70 %. Подлинность целевого продукта устанавливали по данным элементного анализа ($C_{17}H_{24}O_3$), температуре плавления ($t_{пл}$, 213 – 214 °C) [6], хроматографически, а также сопоставлением его УФ-спектра со спектрами РСО растворов I, V, XVII (рис. 3).

Для незамещенной I характерна широкая полоса поглощения с максимумом при λ 273 нм, что хорошо согласуется с данными литературы [12]. Введение в пара-положение гидроксигруппы (V) приводит к bathochromному сдвигу максимума поглощения примерно на 5 – 7 нм (λ_{max} 278 нм). Введение же в структуру V двух трет-бутильных радикалов (XVIII) способствует ещё большему сдвигу максимума поглощения (λ_{max} 293 нм; $\Delta\lambda$ 15 нм).

Для определения концентрации половинного ингибирования $C_{1/2}$ индивидуальных веществ нами был использован метод, основанный на генерации супероксидного анион-радикала при аутоокислении адреналина [11].

Генерацию АФК (аутоокисление адреналина) проводили в нетермостатированной кювете ($l = 1$ см) при комнатной температуре. Кинетику данного процесса регистрировали на спектрофотометре СФ-103 с помощью компьютерной программы “КИНЕТИКА-Spektr-2004”.

Процедура проведения реакции аутоокисления адреналина: к 3 мл гидрокарбонатного буферного раствора pH = 10,5 добавляли растворы исследуемых веществ, а затем 150 мкл 0,1 % раствора адреналина, перемешивали и регистрировали изменение величины оптической плотности при длине волны λ 347 нм в течение 500 с. В контрольную пробу, относительно которой проводилось измерение, также добавляли раствор исследуемого вещества, но не вносили раствор адреналина.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. С. Агаджанян, Э. Т. Оганесян, *Хим.-фарм. журн.*, **42**(11), 12 – 17 (2008).
2. V. Agadjanyan, E. Oganessian, *Fourth intern. symp. on computational methods in toxicology and pharmacology integrating internet resources (СМТPI 2007)*, Москва (2007), с. 72.
3. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая волна, Москва (2000).
4. Л. С. Вартанян, С. М. Гуревич, *Вопр. мед. химии*, **45**(4), 8 – 16 (1999).
5. В. Б. Вольева, И. С. Белостоцкая, Н. Л. Комисарова и др., *Журн. орган. химии*, **43**(10), 1495 – 1498 (2007).
6. И. С. Белостоцкая, В. Б. Вольева, Н. Л. Комисарова и др., *Журн. орган. химии*, **44**(6), 814 – 817 (2008).
7. А. А. Аванесян, А. Н. Пашков, Н. А. Симонян и др., *Хим.-фарм. журн.*, **43**(5), 18 – 19 (2009).
8. А. В. Садым, А. А. Лагунин, Д. А. Филимонов, В. В. Поройков, *Хим.-фарм. журн.*, **36**(10), 21 – 26 (2002).
9. Д. А. Филимонов, В. В. Поройков, *Рос. хим. журн.*, **50**(2), 66 – 75 (2006).
10. Э. Т. Оганесян, *Хим.-фарм. журн.*, **20**(6), 696 – 702 (1986).
11. Т. В. Сирота, *Вопр. мед. химии*, **45**(3), 23 – 34 (1999).
12. Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс, *Справочник биохимика*, Москва (1991).
13. Э. Т. Оганесян, Е. Г. Доркина, М. Р. Хочава и др., *Хим.-фарм. журн.*, **36**(12), 21 – 25 (2002).
14. Э. Т. Оганесян, Ю. А. Мальцев, Д. Е. Творовский, *Журн. общей химии*, **71**(6), 999 – 1005 (2001).
15. К. К. Тимергазин, С. Л. Хурсан, *Изв. АН. Сер. хим.*, № 12, 2858 – 2861 (1996).

Поступила 26.06.09

TARGETED SEARCH FOR LEAD COMPOUND IN SERIES OF CINNAMIC ACID DERIVATIVES POSSESSING ANTIRADICAL ACTIVITY

V. S. Agadzhanian¹, E. T. Oganessian¹, and V. T. Abaev²

¹ Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy, Pyatigorsk, Russia;

² North-Ossetian State University, Vladikavkaz, North Ossetia, Russia

Based on the results of quantum-chemical calculations (PM3 and AM1), indices of reactivity with respect to reactive oxygen species have been studied in a series of hydroxy and methoxy derivatives of cinnamic acid. The high antioxidant activity of 4-hydroxy-3,5-di-tert-butylcinnamic acid has been predicted and then experimentally confirmed, which can be of interest for the creation of new drugs.

Key words: Cinnamic acid derivatives, spatially constrained phenols, chemical structure – antioxidant activity relationship