

С. Г. Клочков, М. Е. Неганова, С. В. Афанасьева, Е. Ф. Шевцова

СИНТЕЗ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ СЕКУРИНИНА

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН), Россия, 142432, г. Черноголовка Московской обл., Северный пр., 1., E-mail: klochkov@ipac.ac.ru

Синтезирован ряд 9-амино-14-окса-7-азатетрацикло[6.6.1.0^{1,11}.0^{2,7}]пентадека-11-ен-13-онов. В качестве исходного соединения использован природный алкалоид секуринин, который вводили в реакцию Михаэля с фармакофорными аминами — триптамими и замещенными пиперазинами. Методом ЯМР с использованием двумерных экспериментов (COSY и NOESY) установлены строение и стереохимия присоединения для неизвестного ранее аддукта с 5-метокситриптамином. Исследована биологическая активность полученных аминопроизводных секуринина. Показано, что ряд синтезированных конъюгатов секуринина проявляет антиоксидантную и железо-хелатирующую активность и представляет интерес для дальнейшего изучения в качестве потенциальных фармакологически активных соединений.

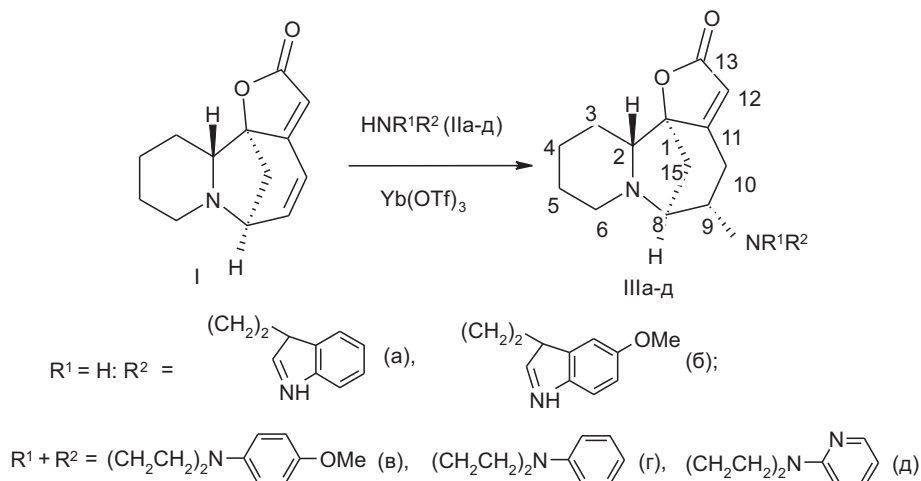
Ключевые слова: (2*R*,9*R*)-9-[2-(5-метокси-1*H*-индол-3-ил)этиламино]-14-окса-7-азатетрацикло[6.6.1.0^{1,11}.0^{2,7}]пентадека-11-ен-13-он; алкалоиды; секуринин; триптамин; реакция Михаэля; биологическая активность; антиоксиданты.

В последние годы в качестве объектов различных химических превращений все чаще используются природные соединения, поскольку на их основе можно легко получить новые производные с различными видами биологической активности. Это значительно ускоряет процесс поиска и создания современных высокоэффективных лекарственных препаратов. Кроме того, оптимизация структуры природных молекул позволяет решить, например, проблему их плохой растворимости в воде и полярных растворителях. В качестве объекта исследования нами выбран алкалоид секуринин (14-окса-7-азатетрацикло[6.6.1.0^{1,11}.0^{2,7}]пентадека-11-ен-13-он, I), выделенный из растения секуринегга полукустарниковая (*Securinega suffruticosa* (Pall.) Rehd., семейство Euphorbiaceae). Известно, что этот алкалоид активно воздействует на центральную нервную систему (ЦНС) человека и используется в традиционной медицине как препарат, стимулирующий функции спинного мозга (см. [1], т. 1, с. 161).

Структура соединения I включает высокореакционную эндочиклическую диеновую систему,

активированную сложноэфирной карбонильной группой. Одним из путей модификации таких соединений может служить азареакция Михаэля (Michael reaction) — присоединение N-нуклеофильных реагентов к электронодефицитным алкенам [2]. Для усиления физиологического действия исходного алкалоида секуринина мы вводили в реакцию фармакофорные амины и исследовали строение и биологическую активность полученных продуктов.

Секуринин (I) взаимодействует с аминами в мягких условиях по типу 5,6-присоединения, в ходе реакции при атоме углерода в положении 9 формируется дополнительный асимметрический центр. Для стереоселективного протекания и ускорения процесса необходимо присутствие катализатора — кислоты Льюиса Yb(OTf)₃. В качестве первичных аминов мы использовали триптамины (IIa, б), относящиеся к классу физиологически активных индольных алкалоидов и интенсивно изучающиеся в качестве нейромодуляторов [3]. Из вторичных аминов наиболее легко вступали в реакцию замещенные пиперазины, фрагмент которых



входит в состав различных лекарственных препаратов [1]. В результате получены 9-аминопроизводные (IIIa – д) в виде одного стереоизомера.

Отметим, что соединение IIIa, названное нами алломаргаритарином, является эписмером природного алкалоида маргаритарина по положению 2 [4]. Синтез соединений IIIa, в – д и установление их структуры, за исключением конфигурации нового хирального центра, описаны нами ранее [5]. В продолжение этой работы мы получили новое производное IIIб (см. экспериментальную часть), определили его стереохимию и исследовали биологические свойства соединений данного класса.

Строение продукта IIIб, в том числе положение и стереохимия присоединения 5'-метокситриптаминового фрагмента к системе сопряженных двойных связей секуринина, определены по данным спектроскопии ЯМР с использованием двумерных экспериментов ^1H - ^1H COSY и NOESY. В спектре ПМР соединения IIIб наблюдается дублет алкенового протона при атоме С-12 (5,53 м.д., $J = 1,96$ Гц), имеющего аллильную константу спин-спинового взаимодействия (КССВ) с β -протоном при атоме С-10 (2,26 м.д.). Сигналы последнего, в свою очередь, связаны с сигналами протона при атоме С-9 (2,75 м.д.). α -Протон при атоме С-8 взаимодействует с β -протоном при атоме С-15 ($J = 6,54$ Гц), КССВ которого с α -протоном при атоме С-15 составляет 10,79 Гц. Таким образом, в соединении IIIб, так же как и в алломаргаритарине IIIa, триптаминовый фрагмент имеет 9- α -ориентацию, что проявляется в величине КССВ α -протона при атоме С-10 – 10,14 Гц и в наличии небольшой константы с протоном при атоме С-8. В пользу данного предположения свидетельствует присутствие соответствующих четко выраженных кросс-пиков в экспериментах ^1H - ^1H COSY и NOESY. Сигналы и интегральные интенсивности остальных протонов подтверждают предложенную структуру.

Экспериментальная химическая часть

Масс-спектры высокого разрешения снимали на масс-спектрометре Thermo Fisher Exactive (США) с масс-анализатором ORBITRAP, ортогональным вводом ионов и источником ионизации электрораспылением. Для ионизации взяты растворы исходных веществ в ацетонитриле с концентрацией $\approx 10^{-5}$ М, полученные значения m/z соответствовали пику протонированного молекулярного иона. Удельное вращение измеряли на поляриметре Model 341 (Perkin Elmer, США), величины вращения выражены в $(\text{град} \cdot \text{мл})(\text{г} \cdot \text{дм})^{-1}$, а концентрация раствора в $\text{г} \cdot (100 \text{ мл})^{-1}$. ИК-спектры регистрировали на приборе Bruker ZFS-113 (США) в таблетках с КВг. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на приборе Bruker AVANCE III (США) с рабочей частотой 500,13 МГц (для ^1H) и 126 МГц (для ^{13}C). Контроль за ходом реакции осуществляли методами ТСХ на пластинках Silufol UV-254 в системе бензол — этилацетат (3:2).

Соединение IIIб выделяли с помощью полупрепаративной ВЭЖХ (хроматограф Turbo LC 200 (PerkinElmer, (США)), детектирование — УФ 254 нм; аналитическая колонка — 4×100 мм с Kromasil C18 5 мкм; препаративная колонка 10×250 мм, с Kromasil C18 5 мкм); использовали градиентное элюирование: элюент А — 0,1 % трифторуксусная кислота в дистиллированной воде (рН 2,0), элюент В — ацетонитрил; скорость элюирования — $1 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ для аналитической колонки, $4 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ — для препаративной колонки.

В работе использовали трифторметилсульфонат иттербия и амины производства фирмы “Aldrich” (США); свежеперегранные растворители и реагенты квалификации ч.

(1R,2R,8R,9R)-9-[2-(5-Метокси-1H-индол-3-ил)-этиламино]-14-окса-7-азатетрацикло[6.6.1.0^{1,11}.0^{2,7}]-пентадека-11-ен-13-он (IIIб). Раствор 0,217 г (1 ммоль) секуринина (I), 0,209 г (1,1 ммоль) 5-метокситриптамина (IIб) и 0,062 мг (0,1 ммоль) трифторметилсульфоната иттербия перемешивают при комнатной температуре 12 ч. По завершении реакции (контроль ТСХ) реакционную смесь упаривают в вакууме на роторном испарителе, остаток растворяют в этилацетате и пропускают через колонку с нейтральным Al_2O_3 (5 г) для удаления соли иттербия. Остаток очищают методом ВЭЖХ. Выход 0,325 г (80 %); т. пл. $70 - 72$ °С; $[\alpha]_D^{20} + 91^\circ$ (с 0,1; хлороформ). Найдено: m/z 408,2276 $[\text{M} + \text{H}]^+$. $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$. Вычислено: $\text{M} + \text{H} = 408,2282$. ИК-спектр, ν_{max} , см^{-1} : 1753 (С=О), 2856 и 2941 (СН), 3481 (NH). Спектр ПМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 1,21 (д, $J = 10,95$ Гц, 1H, 3- H_a); 1,30 (д, $J = 11,12$ Гц, 1H, 15- H_a); 1,32 – 1,57 (м, 3H, 4- H_a , 5- H); 2,05 (дд, $J_1 = 3,27$ Гц, $J_2 = 14,71$ Гц, 1H, 4- H_b); 2,26 (ддд, $J_1 = 1,96$ Гц, $J_2 = 10,14$ Гц, $J_3 = 13,41$ Гц, 1H, 10- H_a); 2,31 (т, $J = 4,27$ Гц, 1H, 6- H_a); 2,36 (м, 1H, 3- H_b); 2,47 (дд, $J_1 = 2,41$ Гц, $J_2 = 10,93$ Гц, 1H, 2- H); 2,67 (дд, $J_1 = 6,67$ Гц, $J_2 = 10,79$ Гц, 1H, 15- H_b); 2,75 (м, $J_1 = 6,21$ Гц, $J_2 = 9,81$ Гц, 1H, 9- H); 2,88 (дд, $J_1 = 4,25$ Гц, $J_2 = 11,44$ Гц, 1H, 6- H_b); 2,93 (м, 2H, NCH_2CH_2); 2,98 (д, $J = 13,73$ Гц, 1H, 10- H_b); 3,00 (м, 2H, NCH_2CH_2); 3,26 (д, $J = 6,54$ Гц, 1H, 8- H); 3,84 (с, 3H, OMe); 5,53 (д, $J = 1,96$ Гц, 1H, 12- H); 6,83 (дд, $J_1 = 1,96$ Гц, $J_2 = 8,83$ Гц, 1H, 6'- H); 7,04 (с, 1H, 4'- H); 7,05 (с, 1H, 2'- H); 7,23 (д, $J = 8,83$ Гц, 1H, 7'- H); 7,90 (уш.с., 1H, NH). Характеристичные кросс-пики в двумерном ПМР ^1H - ^1H COSY: 8- $\text{H}/15a$ - H , 9- $\text{H}/10_a$ - H , 12- $\text{H}/10$ - H_a , 10- $\text{H}_a/10$ - H_b , 15- $\text{H}_a/15$ - H_b . Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 21,1 (NCH_2CH_2), 23,7 (C-4), 25,7 (C-3), 26,0 (C-5), 31,3 (C-10), 35,6 (C-15), 46,6 (NCH_2CH_2), 49,3 (C-6), 56,0 (OCH_3), 60,5 (C-9, C-8), 61,8 (C-2), 91,2 (C-1), 100,8 (C-4'), 109,8 (C-3'), 111,9 (C-6'), 112,2 (C-7'), 113,3 (C-12), 123,0 (C-2'), 127,7 (C-3a'), 131,7 (C-7a'), 153,9 (C-5'), 173,3 (C-11), 173,6 (C-13).

* Нижние индексы a и b означают неэквивалентные протоны.

Для экспериментов по исследованию влияния соединений на пероксидное окисление липидов (ПОЛ) в гомогенатах мозга крыс использовали самцов белых нелинейных крыс массой 300 – 400 г. Животные имели свободный доступ к корму и воде. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с решениями комиссии по Биоэтике ИФАВ РАН. Декапитацию животных, заранее наркотизированных диоксидом углерода, проводили с помощью гильотины (OpenScience). Извлеченный мозг гомогенизировали в растворе 120 ммоль · л⁻¹ KCl — 20 ммоль · л⁻¹ Hepes (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты производства фирмы Sigma), pH 7,6, на холоду. Для получения субклеточной фракции гомогенат мозга центрифугировали при 1500 g и работали с супернатантом. Приготовленный гомогенат мозга использовали в эксперименте в этот же день. Белок в гомогенате мозга крыс определяли по биуретовому методу [6]. Интенсивность ПОЛ гомогената мозга крыс определяли по модифицированному ТБК-тесту, используя в качестве индуктора ионы Fe³⁺ (0,5 ммоль · л⁻¹ Fe(NH₄)(SO₄)₂) или *трет*-бутилгидроксипероксид (т-БГП) [7].

Хелатирующую активность по отношению к ионам Fe²⁺ (ХА_{Fe²⁺}) определяли по стандартной методике с использованием феррозина и рассчитывали в соответствии со следующим уравнением:

$$ХА_{Fe} = (A_0 - A_1)/A_0 \cdot 100,$$

где A₀ – величина поглощения контрольных проб; A₁ – величина поглощения опытных проб [8].

Для того чтобы исключить вероятность связывания исследуемых веществ с феррозином, были сняты УФ-спектры в диапазоне 300 – 800 нм феррозина в чистом виде и в присутствии исследуемого вещества.

Радикал-связывающую активность определяли с использованием модельного стабильного радикала дифенилпикрилгидразила (ДФПГ), рассчитывая значе-

Влияние производных секуринина на ПОЛ гомогената мозга крыс, индуцированное Fe³⁺ и т-БГП, а также их Fe²⁺-хелатирующая и антирадикальная активность

Соединение	Ингибирование ПОЛ, %		Fe ²⁺ -хелатирующая активность, ХА _{Fe} , %	Антирадикальная активность (ДФПГ-тест), I, %
	Fe ³⁺ индуцированное	т-БГП индуцированное		
I	–	–	–	–
IIIa	86,6 ± 4,5	19,2 ± 4,8	49,3 ± 3,7	12 ± 0,5
IIIб	88,3 ± 0,9	13,25 ± 5,9	53,0 ± 1,8	–
IIIв	прооксидант	прооксидант	–	–
IIIг	–	–	–	–
IIIд	69,1 ± 5,7	–	8,2 ± 0,9	53,6 ± 0,4

Примечание. Концентрация соединений — 100 мкмоль · л⁻¹; прочерк означает, что соответствующая активность в условиях эксперимента не обнаружена.

ние антирадикальной активности в процентах (I %) по формуле:

$$I\% = ((A_0 - A_1)/A_0) \cdot 100,$$

где A₀ — оптическая плотность контрольного раствора ДФПГ, A₁ — оптическая плотность раствора с анализируемым веществом [9].

Используемая концентрация исследуемых веществ во всех тестах составила 100 мкмоль · л⁻¹.

Результаты и их обсуждение

Известно, что окислительный стресс является важным патогенетическим механизмом в развитии многих заболеваний человека. При изучении биологических свойств полученных аминопроизводных был проведен скрининг по их влиянию на процесс ПОЛ в гомогенатах мозга крыс. Установлено, что исходный алкалоид не влияет на ПОЛ (таблица), а конъюгат секуринина с 4-(4-метоксифенил)пиперазином (IIIв) проявляет прооксидантную активность, увеличивая ПОЛ, индуцированное ионами Fe³⁺, на 57,8 %. В то же время в данном ряду полученных синтетических конъюгатов выявлены соединения IIIа, IIIб, IIIд, эффективно подавляющие Fe³⁺-индуцированное ПОЛ (таблица). При этом наибольшей активностью обладали конъюгаты на основе триптамина (IIIа, б). По-видимому, значительную роль в антиоксидантном эффекте последних играет выявленная феррозиновым методом железо-хелатирующая активность. При иницировании ПОЛ действием т-БГП только эти соединения показали слабый антиоксидантный эффект (менее 20 % ингибирования ПОЛ). Незначительная антирадикальная активность выявлена для соединения IIIб (таблица). В то же время для соединения IIIд очевидно, что его антиоксидантная активность в отношении ПОЛ, вызванного ионами Fe³⁺, в большей степени связана с антирадикальной активностью (более 50 % связывания ДФПГ-радикала при концентрации соединения 100 мкмоль · л⁻¹) и в меньшей — с железо-хелатирующей активностью.

Таким образом, полученные аминопроизводные секуринина представляют интерес в качестве эффективных антиоксидантов и хелатирующих агентов для иона железа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума Российской академии наук “Фундаментальные науки – медицина”.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Т. 1, 2. Медицина, Москва (1993).
2. А. Ю. Рулев, *Успехи химии*, **80**(3), 211 – 232 (2011).
3. R. S. G. Jones, *Prog. Neurobiol.*, **19**, 117 – 139 (1982).
4. D. Arbain, A. A. Birkbeck, L. T. Byrne, et al., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1863 – 1869 (1991).
5. С. Г. Ключков, С. В. Афанасьева, В. В. Григорьев, *Химия природ. соедин.*, № 2, 156 – 160 (2008).

6. A. G. Gornall, C. J. Bardawill, M. M. David, *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 – 766 (1949).
7. J. K. Callaway, P. M. Beart, B. Jarrott, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **39**, 155 – 162 (1998).
8. C. A. Perez, Y. Wei, M. Guo, *J. Inorg. Biochem.*, **103**, 326 – 332 (2009).
9. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, *LWT—Food Sci. Technol.*, **28**, 25 – 30 (1995).

Поступила 14.11.12

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SECURININE DERIVATIVES

S. G. Klochkov*, M. E. Neganova, S. V. Afanas'eva, and E. F. Shevtsova

Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow oblast, 142432 Russia

* e-mail: klochkov@ipac.ac.ru

A series of 9-amino-14-oxa-7-azotetracyclo[6.6.1.0^{1,11}.0^{2,7}]pentadeca-11-en-13-ones were synthesized. The starting material was natural alkaloid securinine, which was introduced in the Michael reaction with pharmacophore amines including tryptamines, and substituted piperazines. The structure and stereochemistry of a previously unknown adduct with 5-methoxytryptamine were established by two-dimensional NMR techniques (COSY and NOESY). The biological activity of the synthesized amino derivatives of securinine has been investigated. It is established that some of these compounds possess antioxidant and iron-chelating activity and are of interest for further study as potential pharmacologically active compounds.

Keywords: (2*R*,9*R*)-9-[2-(5-methoxy-1*H*-indole-3-yl)ethylamino]-14-oxo-7-azatetracyclo[6.6.1.0^{1,11}.0^{2,7}]pentadeca-11-en-13-one, alkaloids, securinin, tryptamine, Michael reaction, biological activity