

ХИМИКО фармацевтический журнал

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ И ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в январе 1967г.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор Р. Г. ГЛУШКОВ

В. А. БЫКОВ, Н. Б. ГРИГОРЬЕВ, В. И. ГУНАР, Т. А. ГУСЬКОВА, И. С. ГУЩИН,
Е. В. ДЕГТЕРЕВ, Ю. Г. ЗЕЛИНСКИЙ, П. М. КОЧЕРГИН, В. В. ПОРОЙКОВ,
М. Н. ПРЕОБРАЖЕНСКАЯ, Г. В. РАМЕНСКАЯ, А. Н. САПРИН, С. Б. СЕРЕДЕНИН,
Л. Н. СЕРНОВ, Т. А. СОКОЛЬСКАЯ, К. С. ШАНАЗАРОВ (ответственный секретарь),
Н. Л. ШИМАНОВСКИЙ, А. М. ЮРКЕВИЧ, С. Д. ЮЖАКОВ

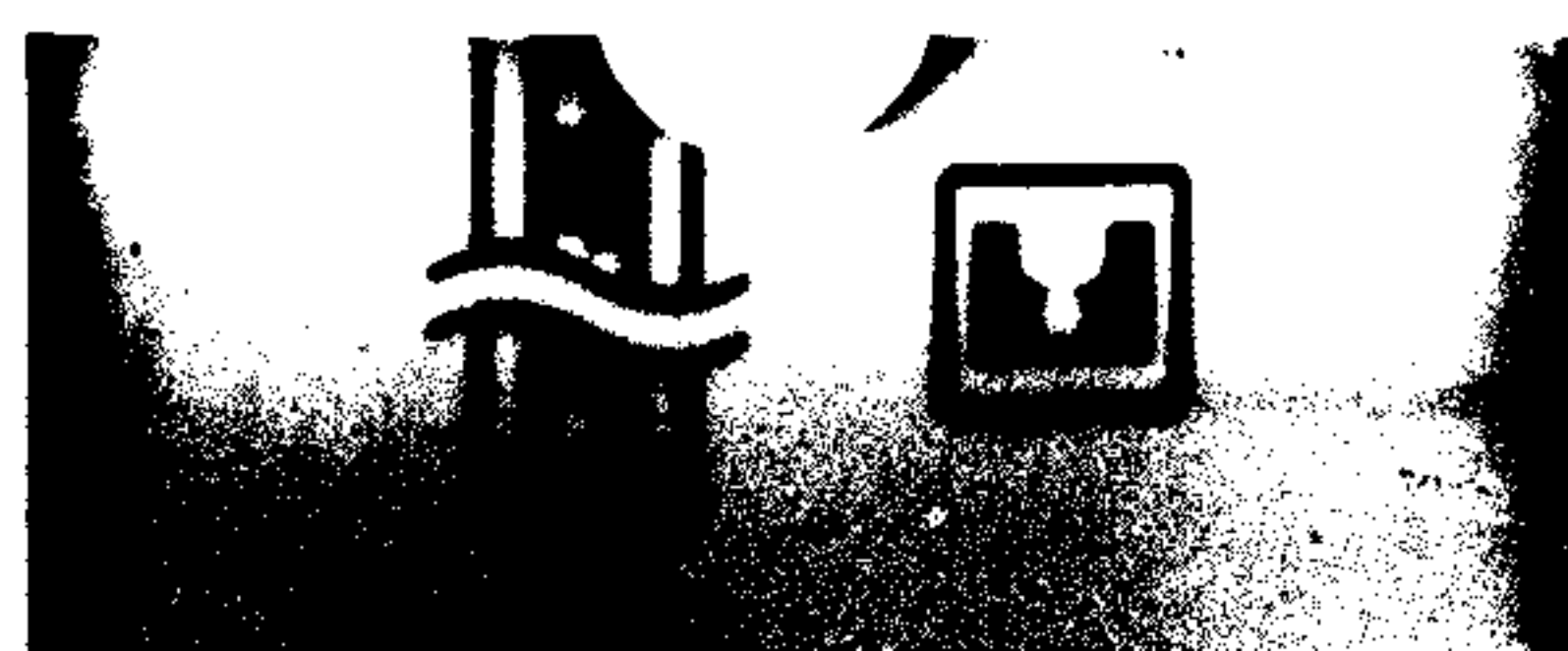
Журнал входит в перечень утвержденных ВАК РФ изданий
для публикации трудов соискателей ученых степеней

11 2010

ТОМ 44

Издательство ФОЛИУМ Москва 2010

Научная библиотека
ИОФХ
им. А.Е. Арбузова
КазНЦ РАН



М. Г. Корочкина, Р. Р. Шарипова, И. Ю. Стробыкина, А. Д. Ланцова,
А. Д. Волошина, Н. В. Кулик, В. В. Зобов, В. Е. Катаев, В. Ф. Миронов

СИНТЕЗ, АНТИМИКРОБНАЯ И ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ ДИТЕРПЕНОИДА ИЗОСТЕВИОЛА И ГЛИКОЗИДА СТЕВИОЛБИОЗИДА, СОДЕРЖАЩИХ ОНИЕВЫЙ АТОМ АЗОТА

Учреждение Российской академии наук Институт органической и физической химии
им. А. Е. Арбузова Казанского научного центра РАН, Казань, Россия

Синтезированы неизвестные ранее производные дитерпеноида изостевиола и гликозида стевиолбиозид, содержащие ониевый атом азота. Изучена их антимикробная и противогрибковая активность.

Ключевые слова: изостевиол, гликозиды, стевиолбиозид, синтез, антимикробная и противогрибковая активность.

Основной компонент гликозидов растения *Stevia rebaudiana* Bertoni, гликозид стевиозид (I), используемый в качестве пищевого подсластителя [1], обладает гипотензивным [2], инсулинотропным и антигипергликемическим [3] свойствами. Продукты его гидролиза: щелочного — гликозид стевиолбиозид (II) [4], и кислотного — дитерпеноид изостевиол (16-оксо-энт-бейеран-19-овая кислота) (III) [5], также являются биологически активными соединениями. II проявляет гипогликемическую активность [6], а III — гипотензивную [7]. В свою очередь, активность проявляют и их производные, а именно эфиры и амиды II [8, 9], а также лактон [10], моно- и диэфиры III [11–13].

В настоящей работе синтезированы сложные эфиры соединений II и III (V–IX), содержащие кватернизованный атом азота, введение которого, согласно литературным данным [14, 15], могло бы придать им антимикробную активность.

Соединения V–VII были синтезированы по следующей схеме. Реакцией III с избытком тионил хлорида был получен хлорангидрид, взаимодействие которого с N,N-диметиламиноэтанолом в CCl₄ привело к смеси продуктов, хроматографированием которой на силикагеле было выделено соединение IV. В его спектре ЯМР ¹H, наряду с характеристическими [16] сигналами протонов энт-бейеранового каркаса, а именно синглетов при 0,63 м.д. (C²⁰H₃), 0,97 м.д. (C¹⁷H₃) и 1,21 м.д. (C¹⁸H₃), дублета при 2,15 м.д. (C³H_{eq}), а также дублета дублетов при 2,58 м.д. (C¹⁵H_α), наблюдаются мультиплет при 4,6 м.д. (CH₂O) и мультиплет при 3,3 м.д. (CH₂N). В ИК-спектре соединения IV имеются полосы поглощения сложноэфирной группы (1160, 1180, 1240, 1730 см⁻¹) и полосы поглощения, соответствующие третичному амину (2730, 2775, 2800 см⁻¹). Кватернизация амина (IV) была проведена его нагреванием с CH₃I, n-C₃H₇I и PhCH₂Br в абсолютном ацетонитриле. В спектрах ЯМР ¹H соединений V–VII сигналы протонов метиленовой группы, связанной с ониевым атомом азота, смещены в область слабого поля (3,7 м.д.) по сравнению с соответствующими протонами амина (IV) (3,3 м.д.). Резонируют в более

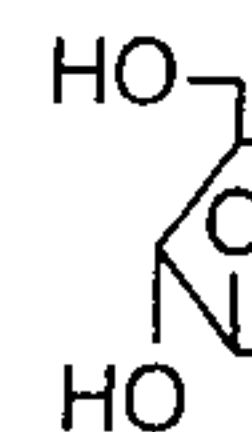
слабом поле (3,2 м.д.) и протоны алкильных групп у атома N⁺ солей V–VII.

Исходный III получен аналогично [17], а именно, кислотным гидролизом подсластителя SWETA, являющегося смесью гликозидов растения *Stevia rebaudiana* Bertoni и продуктов их ферментативной обработки [18].

Продукт щелочного гидролиза I, гликозид II, алкилировали дибромпропаном в среде KOH-DMCO аналогично [19]. В ИК-спектре образовавшегося бромида VIII, по сравнению с исходным II, отсутствует полоса поглощения карбоксильной группы в области 1690 см⁻¹, вместо которой появляются полосы поглощения сложноэфирной группы (1726, 1237, 1200, 1170 см⁻¹), а в спектре ЯМР ¹H появляется мультиплет при 4,01–4,16 м.д., соответствующий резонансу метиленовых протонов, связанных со сложноэфирной группой (спиновая система ABX₂). Взаимодействие соединения VIII с триэтиламинном в метаноле привело к производному II с ониевым атомом азота (соединение IX), на образование которого указывает наличие в спектре ЯМР ¹H триплета при 1,29 м.д. и квартета при 3,05 м.д., соответствующих резонансу этильных заместителей у кватернизованного атома азота. Углеводные (софорозильные) части спектров ЯМР ¹H соединений VIII и IX идентичны таковым в спектре ЯМР ¹H II [9] и содержат характеристические дублеты аномерных протонов при 4,47 и 4,53 м.д.

Экспериментальная химическая часть

ИК-спектры записаны на Фурье-спектрометре Vector 22 фирмы Bruker в интервале 400–4000 см⁻¹. Образцы исследовались в виде эмульсии в вазелиновом масле. Масс-спектры получены на приборе MX-1310 при ионизирующем напряжении 60 эВ, токе коллектора электронов 30 мкА, с использованием системы прямого ввода вещества в источник ионов при температуре 120 °С. Прогрев ампулы — испарителя осуществлялся в интервале 120–250 °С. Точные зна-



чения масс

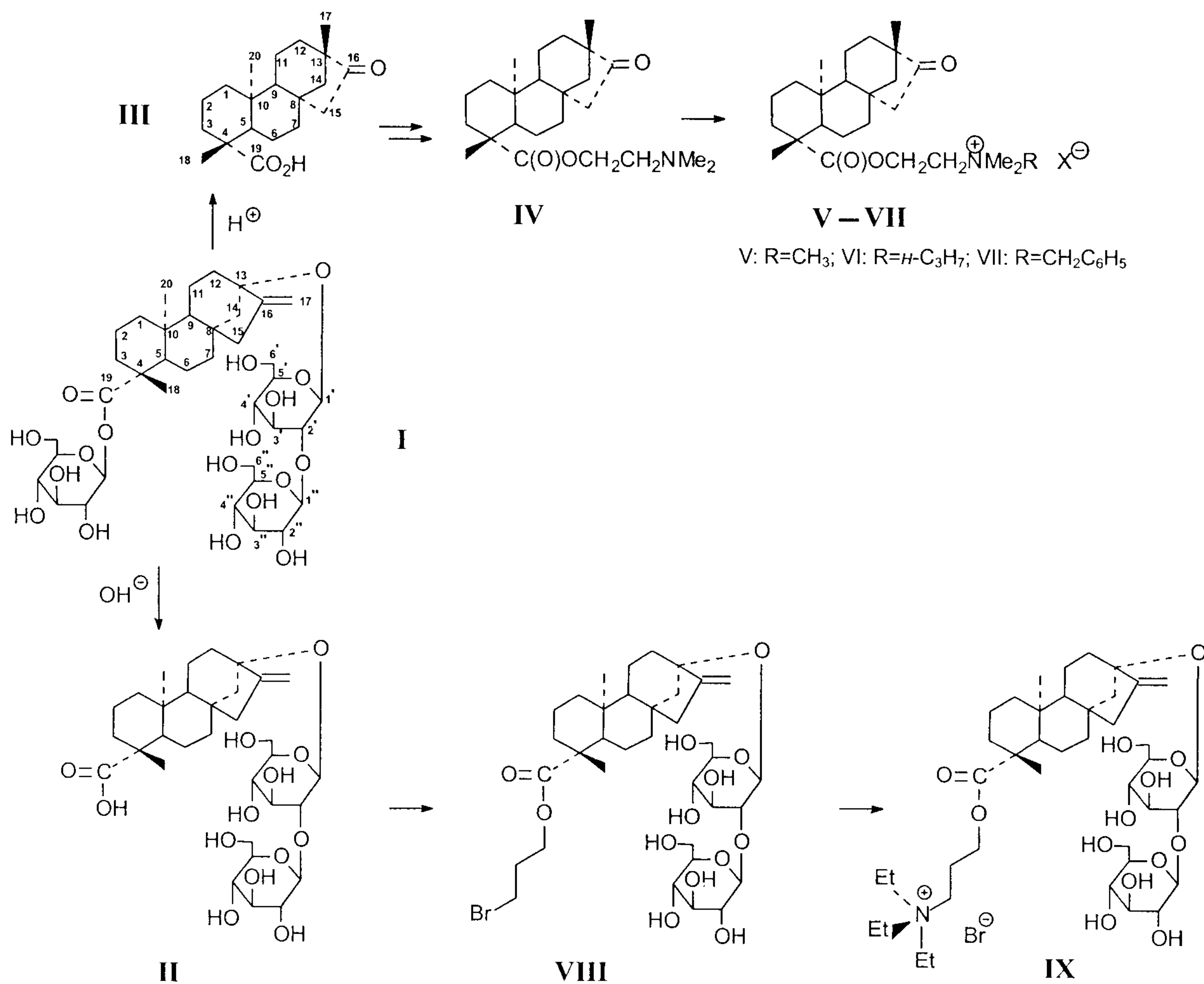
по репернь

Масс-сп десорбции пролетном фирмы "Firm на прибора полноты пр водили мет стинках Silb этилацетат

Соедине методикам станты соо коммерчес Stevia С впервые с ставлены в ветствуют

IV–IX яв лого или с римыми в ских раство

19-Нор-16-оксо-энт-III 0,5 г (1 0,9 мл (8,9 онную сме



чения масс ионов определялись методом совмещения по реперным пикам перфторкеросина.

Масс-спектры матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI) получены на время-пролетном масс-спектрометре Dynamo Maldi TOF фирмы "Finnigan", США. Спектры ЯМР ¹H получены на приборах Avance-600 и Bruker MSL-400. Контроль полноты протекания реакции и чистоту веществ проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol UV-254, элюент — петролейный эфир — этилацетат (1:1). Пятна фиксировали парами йода.

Соединения I, II и III получали по описанным ранее методикам ([20], [4] и [17] соответственно), их константы соответствуют литературным. Использовался коммерческий подсластитель SWETA производства Stevia Corp. Физико-химические характеристики впервые синтезированных соединений IV – IX представлены в табл. 1. Данные элементного анализа соответствуют вычисленным значениям. Соединения IV – IX являются кристаллическими веществами белого или слегка желтоватого цвета, частично растворимыми в воде и хорошо растворимыми в органических растворителях.

19-Нор-4α-(2-диметиламиноэтилоксикарбонил)-16-оксо-энт-бейеран (IV). К раствору хлорангидрида III 0,5 г (1,4 ммоль) в абсолютном CCl₄ приливают 0,9 мл (8,9 ммоль) N,N-диметиламиноэтанола. Реакционную смесь нагревают при температуре бани 80 °C

24 ч, промывают водой (2 × 10 мл), сушат над CaCl₂. Полученный остаток хроматографируют на силикагеле (элюэнт — хлороформ). ИК-спектр, ν, см⁻¹: 1160, 1180, 1240, 1730 (COO), 1740 (C=O), 2730, 2775, 2800 (C–N(CH₃)₂). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м.д. (J, Гц): 0,67 (с, 3H, C²⁰H₃); 0,97 (с, 3H, C¹⁷H₃); 1,21 (с, 3H, C¹⁸H₃); 2,15 (д, 1H, J 13,7, C³H_{eq}); 2,58 (дд, 1H, J 18,6, 3,7, C¹⁵H_α); 2,76 (с, 6H, N(CH₃)₂); 3,18 (м, 2H, –CH₂N); 4,50 (м, 2H, –OCH₂–). Масс-спектр, m/z (MALDI): 389,75. C₂₄H₃₉NO₃.

Общая методика получения кватернизованных производных аминокетона (IV). К раствору 0,24 г (0,6 ммоль) амина IV в 5 мл абсолютного ацетонитрила приливают 0,04 мл (0,6 ммоль) галоидного алкила. Реакционную смесь нагревают при температуре бани 80 °C 20 ч. Растворитель отгоняют при пониженном давлении. Полученный продукт перекристаллизовывают из метанола.

19-Нор-4α-[2-(триметиламмоние)этилоксикарбонил]-16-оксо-энт-бейераниодид (V). ИК-спектр, ν, см⁻¹: 1128, 1140, 1730 (COO), 1735 (C=O). Спектр ЯМР ¹H (CD₃OD), δ, м.д. (J, Гц): 0,68 (с, 3H, C²⁰H₃); 0,87 (с, 3H, C¹⁷H₃); 1,17 (с, 3H, C¹⁸H₃); 2,09 (д, 1H, J 13,7, C³H_{eq}); 2,53 (дд, 1H, J 18,6, 3,7, C¹⁵H_α); 3,16 (с, 9H, N(CH₃)₃); 3,67 (м, 2H, –CH₂N⁺); 4,46 (м, 2H, –OCH₂–). Масс-спектр, m/z (MALDI): 405 [M–I]⁺. C₂₅H₄₂INO₃.

Таблица 1
Физико-химические свойства синтезированных производных
изостевиола (IV – VII) и стевииолиозида (VIII, IX)

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	Брутто- формула	Молекулярная масса
IV	45	230	C ₂₄ H ₃₉ NO ₃	389,58
V	78	263 – 265	C ₂₅ H ₄₂ INO ₃	531,52
VI	61	125 – 129	C ₂₇ H ₄₆ INO ₃	559,57
VII	70	215	C ₃₁ H ₄₆ BrNO ₃	560,62
VIII	77	147	C ₃₅ H ₅₅ BrO ₁₃	763,72
IX	61	115	C ₄₁ H ₇₀ BrNO ₁₃	864,91

**19-Нор-4α-[2-(диметил-*n*-пропиламмоний)этил-
оксикарбонил]-16-оксо-энт-бейераниодид (VI).** ИК-спектр, ν , см⁻¹: 1131, 1146, 1725 (COO), 1738 (C=O). Спектр ЯМР ¹H (CD₃OD), δ , м.д. (J, Гц): 0,69 (с, 3H, C²⁰H₃); 0,88 (с, 3H, C¹⁷H₃); 1,18 (с, 3H, C¹⁸H₃); 2,10 (д, 1H, J 13,7, C³H_{eq}); 2,54 (дд, 1H, J 18,6, 3,7, C¹⁵H_α); 3,11 (с, 6H, N(CH₃)₂); 3,67 (м, 2H, -CH₂N⁺); 4,45 (м, 2H, -OCH₂-). Масс-спектр, m/z (MALDI): 433 [M-I]⁺. C₂₇H₄₆INO₃.

**19-Нор-4α-[2-(диметилбензиламмоний)этилокси-
карбонил]-16-оксо-энт-бейеранбромид (VII).** ИК-спектр, ν , см⁻¹: 1133, 1148, 1213, 1716 (COO), 1730 (C=O). Спектр ЯМР ¹H (CD₃OD), δ , м.д. (J, Гц): 0,66 (с, 3H, C²⁰H₃); 0,89 (с, 3H, C¹⁷H₃); 1,17 (с, 3H, C¹⁸H₃); 2,10 (д, 1H, J 13,7, C³H_{eq}); 2,51 (дд, 1H, J 18,6, 3,7, C¹⁵H_α); 3,07 (с, 6H, N(CH₃)₂); 3,66 (м, 2H, -CH₂N); 4,54 (м, 2H, -OCH₂-); 4,55 (с, 2H, -CH₂Ph); 7,51 (м, 5H, аром). Масс-спектр, m/z (MALDI): 481 [M-Br]⁺. C₃₁H₄₆BrNO₃.

**19-Нор-4α-(3-бром-*n*-пропилоксикарбонил)-13-
О-(β-D-софорозил)-энт-каурен (VIII).** К смеси 0,09 г КОН и 15 мл ДМСО, перемешиваемой в течение 10 мин при комнатной температуре, добавляют 0,5 г (0,7 ммоль) II; продолжают перемешивать еще 30 мин, затем прикапывают 0,8 мл (7 ммоль) 1,3-дибромпропана и выдерживают при перемешивании еще 4 ч. Затем реакцию смесь разбавляют 30 мл воды, выпавший осадок отфильтровывают, сушат при пониженном давлении и перекристаллизовывают из метанола. ИК-спектр, ν , см⁻¹: 1726 (COO), 1662 (CH₂=), 640 (C-Br). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ , м.д. (J, Гц): 0,74 (с, 3H, C²⁰H₃); 1,09 (с, 3H, C¹⁸H₃); 1,36 – 2,11 (14H, агликон), 3,13 – 3,73 (м, 12H, β-D-софорозил), 4,01 – 4,16 (м, CO₂CH₂CH₂), 4,47 (д, 1H, J 7,6, C¹H), 4,53 (д, 1H, J 7,6, C¹H), 4,77 (с, 1H, C¹⁷H_A), 5,01 (с, 1H,

C¹⁷H_B). Масс-спектр, m/z (MALDI): 785 [M+Na]⁺ C₃₅H₅₅BrO₁₃.

13-О-(β-D-софорозил)-19-нор-4α-[3-(триэтиламмонио)-*n*-пропилоксикарбонил]-энт-кауренбромид (IX). К раствору 0,17 г (0,22 ммоль) бромида VIII в 30 мл абсолютного метанола прикапывают 0,04 мл (0,24 ммоль) триэтиламина в 5 мл метанола. Реакционную смесь кипятят с обратным холодильником 5 дней. Растворитель и избыток триэтиламина отгоняют в вакууме 10 мм. рт. ст. Остаток перекристаллизовывают из метанола. ИК-спектр, ν , см⁻¹: 1723 (COO), 1662 (CH₂). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ , м.д. (J, Гц): 0,74 (с, 3H, C²⁰H₃); 1,09 (с, 3H, C¹⁸H₃); 1,29 (т, 9H, J 7,2, 3N⁺-CH₂CH₃); 3,05 (к, 6H, J 7,2, 3N⁺-CH₂CH₃); 3,14 – 3,74 (м, 12H, β-D-софорозил); 4,02 – 4,16 (м, CO₂CH₂CH₂); 4,47 (д, 1H, J 7,8, C¹H); 4,53 (д, 1H, J 7,8, C¹H); 4,77 (с, 1H, C¹⁷H_A); 5,00 (с, 1H, C¹⁷H_B). Масс-спектр, m/z (MALDI): 785 [M-Br]⁺. C₄₁H₇₀BrNO₁₃.

Экспериментальная биологическая часть

Бактериостатические и фунгиостатические свойства изучали методом серийных разведений в жидкой питательной среде согласно [21, 22]. В качестве тест-объектов использовали *Staphylococcus aureus* 209-P, *Escherichia coli* F-50, *Bacillus cereus* 8035, *Pseudomonas aeruginosa* 9027, *Aspergillus niger* VKMF-1119, *Trichophyton mentagrophytes*-1773 и *Candida albicans* 855 – 653. В качестве препарата сравнения использовали линкомицин.

ЛД₅₀ определяли в опытах на беспородных белых мышах обоего пола массой 19,0 ± 2,0 г, содержащихся на стандартном рационе питания в условиях природного режима освещения помещения при комнатной температуре, при внутрибрюшинном введении. В экспериментальные группы животных отбирали по методу случайных выборок. В контрольных опытах ($n = 10$) мышам вводилась дистиллированная вода в эквивалентных массе животных количествах. Время наблюдения за экспериментальными животными 5 сут.

Установлено, что в отношении грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus* 209-P и *Bacillus cereus* 8035) наиболее высокую активность проявляет соединение VII (табл. 2). В отношении грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli* F-50 и *Pseudo-*

Таблица 2

Острая токсичность, антимикробная и противогрибковая активность соединений V – IX

Соединение	ЛД ₅₀ , мг/кг	Минимальная ингибирующая концентрация, мкг/мл						
		<i>St.aureus</i> 209p	<i>B.cereus</i> 8035	<i>E.coli</i> F 50	<i>Ps.aureus</i> 9027	<i>Asp.niger</i>	<i>Trich. gypseum</i>	<i>Candida albicans</i>
V	75,0	250	500	> 10 ³	> 10 ³	> 10 ³	> 10 ³	125
VI	60,0	125	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	500	125
VII	60,4	31,25	250	> 1000	> 1000	500	62,5	31,25
IX	–	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
Линкомицин	–	10	500	не активен	не активен	–	–	–

ЛИТЕРА

1. K. Mizutani (ed.), *Tay*
2. P. Chan, 1679 – 16
3. P. B. Jeppelism, 52(
4. H. B. Wo 20(7), 87
5. E. Moser (1955).
6. J. M. C. Med., 23
7. K. L. Wo 2379 – 23
8. G. E. Du. Chem., 3
9. L.-H. Lin 52(9), 11

SYNTHESIS OF DITERPENIC DERIVATIVES

M. G. Koroch

V. V. Zobov, V

Arbuzov Institut

Previously un
al and antifung

Key words: Is

monas aeruginosa 9027) все испытанные вещества не активны.

Наиболее активным по отношению к грибам (*Aspergillus niger* ВКМФ-1119, *Trichophyton mentagrophytes*-1773, *Candida albicans* 855 – 653.) оказалось также соединение VII.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН № 21 “Фундаментальные науки — медицине” и РФФИ (грант 10-03-00499).

ЛИТЕРАТУРА

1. K. Mizutani and O. Tanaka, in: *Stevia*, Vol. 9, A. D Kinghorn (ed.), *Taylor & Francis*, New York (2002), pp. 178 – 195.
2. P. Chan, De-Yi Xu, Ju-Chi Liu, et al., *Life Sci.*, **63**(19), 1679 – 1684 (1998).
3. P. B. Jeppesen, S. Gregersen, S. E. D. Rolfsen, et al., *Metabolism*, **52**(3), 372 – 378 (2003).
4. H. B. Wood, R. Allerton, H. W. Dichl, et al., *J. Org. Chem.*, **20**(7), 875 – 883 (1955).
5. E. Mosettig and W. R. Nes, *J. Org. Chem.*, **20**(7), 884 – 890 (1955).
6. J. M. C. Geuns, J. Buyse, A. Vankeirsbilck, et al., *Exp. Biol. and Med.*, **232**, 164 – 173 (2007).
7. K. L. Wong, P. Chan, H. Y. Yang, et al., *Life Sci.*, **74**(19), 2379 – 2387 (2004).
8. G. E. DuBois, L. A. Bunes, P. S. Dietrich, et al., *Agric. Food Chem.*, **32**, 1321 – 1325 (1984).
9. L.-H. Lin, L.-W. Lee, Sh.-Y. Sheu, et al., *Chem. Pharm. Bul.*, **52**(9), 1117 – 1122 (2004).
10. W. L. Braguini, M. A. Biazon Gomes, B. H. de Oliveira, et al., *Toxicol. Let.*, **143**(1), 83 – 92 (2003).
11. В. Е. Катаев, О. И. Милицина, И. Ю. Стробыкина и др., *Хим.-фарм. журн.*, **40**(9), 12 – 13 (2006).
12. V. E. Kataev, O. I. Militsina, I. Yu. Strobokina, et al., *J. Incl. Phenom.*, **60**(1 – 2), 51 – 58 (2008).
13. J. Hershenhorn, M. Zohar, B. Crammer, et al., *Plant Growth Regul.*, **23**, 173 – 178 (1997).
14. Ma Minghua, Sun Yuyu, Sun Gang, *Dye and Pigments*, **58**, 27 – 35 (2003).
15. G. Lu, D. Wua, R. Fu, *Reactive & Functional Polymers*, **67**, 355 – 366 (2007).
16. M. Korochkina, M. Fontanella, A. Casnati, et al., *Tetrahedron*, **61**, 5457 – 5463 (2005).
17. Р. Н. Хайбуллин, И. Ю. Стробыкина, В. Е. Катаев и др., *Ж. общей химии*, **79**(5), 795 – 799 (2009).
18. Е. Кояма, К. Kitazawa, Y. Ohori, et al., *Food Chem. Toxicol.*, **41**, 359 – 374 (2003).
19. О. В. Андреева, О. И. Милицина, Г. И. Ковыляева и др., *Ж. общей химии*, **77**(3), 505 – 509 (2007).
20. В. А. Альфонсов, Г. А. Бакалейник, А. Т. Губайдуллин и др., *Ж. общей химии*, **68**(11), 1813 – 1821 (1998).
21. Е. А. Ведьмина, Н. М. Фурер, *Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней*, Т. 1, Медицина, Москва (1964), сс. 670 – 675.
22. С. Н. Милованова, З. Г. Степанищева, *Методы экспериментальной химиотерапии*, Медицина, Москва (1971), сс. 318 – 321.

Поступила 21.07.09

SYNTHESIS, ANTIFUNGAL AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF DITERPENOID ISOSTEVIOL AND GLYCOSIDE STEVIOLBIOSIDE DERIVATIVES CONTAINING ONIUM NITROGEN ATOM

M. G. Korochkina, R. R. Sharipova, I. Yu. Strobokina, A. D. Voloshina, A. V. Lantsova, N. V. Kulik, V. V. Zobov, V. E. Kataev, and V. F. Mironov

Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Tatarstan, Russia

Previously unreported derivatives of diterpenoid isosteviol and glycoside steviolbioside containing onium nitrogen atom have been synthesized. Antibacterial and antifungal activity and acute toxicity of the synthesized compounds have been studied.

Key words: Isosteviol, steviolbioside, synthesis, antimicrobial activity,