

© Коллектив авторов, 2002

Н. А. Чистоходова¹, И. Живирига², Ч. Нгуен², Г. Д. Майлс¹, Н. А. Ужегова³,
С. Ю. Солодников

β-АМИРИЛГЕКСАДЕКАНОАТ ИЗ *Parthenocissus quinquefolia* КАК ИНГИБИТОР ТРОМБИНА

¹ Университет Центральной Флориды, Орландо, США;

² Университет Флориды, Гейнсвилл, США;

³ Пермский государственный университет, Пермь, Россия

Регуляция свертывания крови — один из ключевых моментов в терапии таких серьезных заболеваний как инфаркт миокарда, инсульт, состояния после протезирования коронарных клапанов и т.д. При этом арсенал врача содержит незначительное количество средств, влияющих на процессы коагуляционного гемостаза. Таким образом поиск и изучение веществ, обладающих антитромбиновым действием, представляет собой актуальную задачу.

В продолжение исследований по поиску биологически активных веществ природного происхождения нами было изучено антитромбиновое действие метанольного и дихлорметанового экстрактов из *Parthenocissus quinquefolia* (*Virginia Creeper*) в опытах *in vitro*. Из дихлорметанового экстракта, проявившего активность по отношению к тромбину, в результате серии опытов по разделению смеси было выделено хроматографически чистое бесцветное кристаллическое вещество (время удерживания 12,4 мин на основании данных ВЭЖХ).

Анализ спектральных характеристик выделенного соединения позволил идентифицировать его как β-амирилгексадеcanoат. β-Амирин — широко известный тритерпен [1]. β-Амириновый фрагмент как основная часть молекулы выделенного вещества был идентифицирован с помощью серии экспериментов: DQCOSY, DEPT, GNMQC, GNMBC и NOESY. Спектры снимали в CDCl₃ и C₆D₆. Отнесение химических сдвигов ядер ¹³C и ¹H, полученное в результате обработки всей совокупности данных спектров, записанных в различных режимах, согласуется с опубликованными ранее данными о спектрах ЯМР тритерпеноидов [2 – 4]. По-

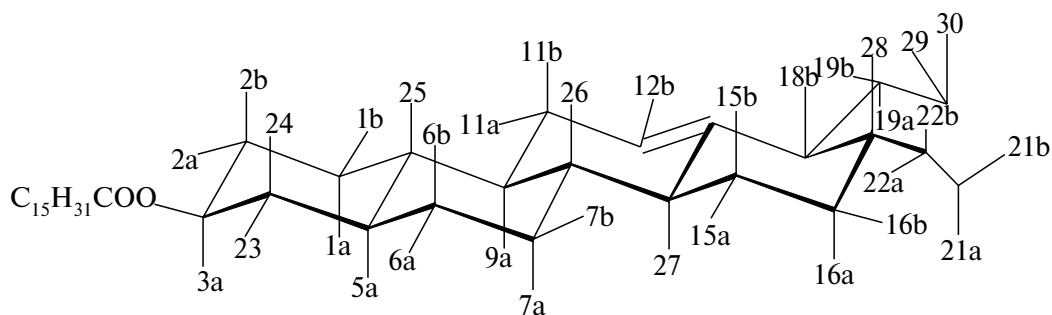
скольку характеристики спектров ПМР известных веществ позволяют значительно упростить процесс установления структуры новых сложных продуктов природного происхождения, мы представляем отнесение сигналов протонов, сделанное на основе констант спин-спинового взаимодействия, определенных из DQCOSY спектра, и на основе NOE-эффекта, наблюдаемого в NOESY-спектре (таблица).

Масс-спектр исследуемого соединения типичен для тритерпеновых алканоатов и содержит следующие сигналы (*m/z*): [M-1]⁺(663,6088), [M-C₁₅H₃₁COO]⁺(409,3875) и характеристичный для тритерпенов сигнал (218,2044)[5].

Испытание β-амирилгексадеcanoата на наличие биологической активности показало, что он проявляет выраженные антитромбиновые свойства (ингибирование активности тромбина 92 %). Острая токсичность соединения, определенная на белых мышах, составляет более 1500 мг/кг, что указывает на малую токсичность β-амирилгексадеcanoата. Это — первое сообщение об антитромбиновой активности и острой токсичности β-амирилгексадеcanoата и, по нашим сведениям, первое сообщение об его выделении из *P. quinquefolia*.

Экспериментальная часть

Растительный материал был собран 16.12.97. в Центральной Флориде (США). Образцы представлены в лаборатории химии природных веществ Университета Центральной Флориды.



Химические сдвиги ^1H , ^{13}C и КССВ для фрагмента β -амирина в β -амирилгексадеканоате*

№ п/п	в CDCl_3		в C_6D_6	
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
1	38,7	α : 1,04 β : 1,61	38,3	α : 0,85 (ддд, J 13,7 Гц, 13,0 Гц, 3,9 Гц) β : 1,41 (дт, J 13,7 Гц, 3,4 Гц)
2	27,8	α : 1,60 β : 1,61	27,9	α : 1,77 (дддд, J 14,1 Гц, 4,6 Гц, 3,9 Гц, 3,4 Гц) β : 1,63 (дддд, J 14,1 Гц, 13,0 Гц, 11,9 Гц, 3,4 Гц) 4,76 (дд, J 11,9 Гц, 4,6 Гц)
3	80,8	4,49	80,1	–
4	38,0	–	37,9	–
5	55,5	0,84	55,4	0,77 (дд, J 11,7 Гц, 1,3 Гц)
6	18,5	α : 1,53 β : 1,40	18,4	α : 1,46 (м) β : 1,32 (ддд, J 14,7 Гц, 13,0 Гц, 11,7 Гц, 3,8 Гц)
7	32,7	α : 1,51 β : 1,32	32,7	α : 1,46 (ддд, J 15,4 Гц, 13,0 Гц, 3,5 Гц) β : 1,28 (дт, J 15,4 Гц, 3,8 Гц)
8	40,0	–	39,8	–
9	47,8	1,57	47,7	1,54 (дд, J 11,2 Гц, 7,2 Гц)
10	37,1	–	36,8	–
11	23,8	α : 1,83 β : 1,89	23,6	α : 1,77 (ддд, J 18,7 Гц, 7,2 Гц, 4,0 Гц) β : 1,82 (ддд, J 18,7 Гц, 11,2 Гц, 4,0 Гц)
12	121,8	5,17	122,2	5,24 (т, J 4,0 Гц)
13	145,5	–	145,0	–
14	41,9	–	41,6	–
15	26,3	α : 0,95 β : 1,75	26,5	α : 0,98 (ддд, J 14,9 Гц, 6,1 Гц, 4,3 Гц) β : 1,80 (ддд, J 14,9 Гц, 13,0 Гц, 4,6 Гц)
16	27,1	α : 1,98 β : 0,79	27,2	α : 2,05 (ддд, J 13,7 Гц, 13,0 Гц, 4,3 Гц) β : 0,83 (ддд, J 13,7 Гц, 6,1 Гц, 4,6 Гц)
17	32,7	–	32,5	–
18	47,4	1,93	47,5	2,08 (дд, J 13,8 Гц, 4,5 Гц)
19	47,0	α : 1,65 β : 1,01	47,1	α : 1,80 (ддд, J 16,2 Гц, 13,8 Гц, 2,6 Гц) β : 1,21 (ддд, J 16,2 Гц, 4,5 Гц, 2,6 Гц)
20	31,2	–	31,0	–
21	34,9	α : 1,32 β : 1,08	35,0	α : 1,42 (ддд, J 13,3 Гц, 13,0 Гц, 3,5 Гц) β : 1,15 (ддд, J 13,0 Гц, 3,8 Гц, 2,7 Гц)
22	37,4	α : 1,20 β : 1,41	37,5	α : 1,29 (ддд, J 14,3 Гц, 3,5 Гц, 2,7 Гц) β : 1,51 (ддд, J 14,3 Гц, 13,3 Гц, 3,8 Гц)
23	28,3	0,86	28,8	0,96 (с)
24	17,0	0,86	17,0	0,97 (с)
25	15,8	0,95	15,5	0,87 (с)
26	17,0	0,96	16,8	1,01 (с)
27	26,0	1,12	26,1	1,21 (с)
28	28,6	0,82	28,5	0,97 (с)
29	23,9	0,86	23,7	0,94 (с)
30	33,6	0,86	33,4	0,96 (с)

* Химические сдвиги были соотнесены с сигналами растворителей: хлороформ $\delta_H = 7,25$ м.д., $\delta_C = 77,1$ м.д.; бензол $\delta_H = 7,15$ м.д., $\delta_C = 128$ м.д.

Эксперименты ЯМР выполнены на приборе Varian Inova 500. Масс-спектры высокого разрешения записаны на Finnigan MAT 95Q. УФ-спектры сняты на спектрофотометре UV-VIS-NIR. ИК-спектры сняты в KBr на спектрометре FT-IR (Perkin Elmer Spektrum). Хроматограмма записана на газовом хроматографе GC 6890MS5973 (Hewlett Packard). Была использована капиллярная колонка HP 19091 – 60312.

Метод выделения

Высушенные и измельченные листья *P. quinquefolia* (530 г) экстрагировали дихлорметаном в аппарате Соколета в течение 24 ч. Полученный экстракт хромато-

рафировали на силикагеле, элюирование проводили серией смеси растворителей с увеличивающейся полярностью (гексан/дихлорметан/метанол). Гександихлорметановую фракцию хроматографировали далее, элюируя гексаном. Полученную гексановую фракцию хроматографировали повторно, выделили 0,471 г β -амирилгексадеканоата. Т.пл. 60 – 65 °С. ИК-спектр (KBr), ν_{max} , cm^{-1} : 2851, 1730, 1471, 1380, 1265, 1174, 1097, 991, 719. УФ-спектр (CHCl_3), ν_{max} , нм (lg ϵ): 220 (3, 6). ГХ ($t_{\text{уд}}$: 12, 903 мин). Масс-спектр, m/z : $[\text{M}-1]^+$ (663,6088), $[\text{M}-\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COO}]^+$ (409, 3875), M-445, 4044(218, 2044).

Биологическое тестирование

Антитромбиновое действие изучали в опытах *in vitro* с использованием хромогенного субстрата *D*-Phe-*L*-Pipesoyl-Arg *p*-нитроанилида (Sigma Chemical Company) по методике, основанной на выделении под действием тромбина свободного *p*-нитроанилина из субстрата. Антитромбиновое действие оценивали по уменьшению образования *p*-нитроанилина в присутствии изучаемого соединения в сравнении с контрольным опытом. Подробно методика исследования и оценка полученных результатов описаны ранее [6].

Острую токсичность изучали на белых мышах по стандартной методике [7]. Соединение вводили внутривенно в виде взвеси в 2 % крахмальной слизи.

ЛИТЕРАТУРА

1. S. B. Mahato, A. K. Nandy, G. Roy, *Phytochemistry*, **31**, 2199 (1992).
2. S. A. Knight, *Org. Magn. Reson.*, **6**, 603(1974).
3. S. B. Mahato, A. P. Kundu, *Phytochemistry*, **37**, 1517 (1994).
4. M. Ali, A. Heaton, D. Leach, *J. Nat. Prod.*, **60**, 1150 (1997).
5. V. O. Elias, B. R. T. Simoneit, A. S. Pereira, J. N. Cardoso, *J. Mass. Spectrom.*, **32**, 1356 (1997).
6. J. M. R. Medeiros, M. M. Masedo, J. P. Contancia, et al., *J. Ethnopharm.*, **72**, 157 – 165 (2000).
7. Г. Н. Першин, *Методы экспериментальной химиотерапии*, Медицина, Москва (1971), сс. 113 – 115.

Поступила 23.08.01