

О. Б. Флехтер, Е. В. Третьякова, Ф. З. Галин, Л. Т. Карачурина, Л. В. Спирихин,
Ф. С. Зарудий, Г. А. Толстиков

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИНОПИМАРОВЫХ КИСЛОТ И СИНТЕЗ АМИДОВ ЭТИХ КИСЛОТ

Институт органической химии Уфимского научного центра РАН

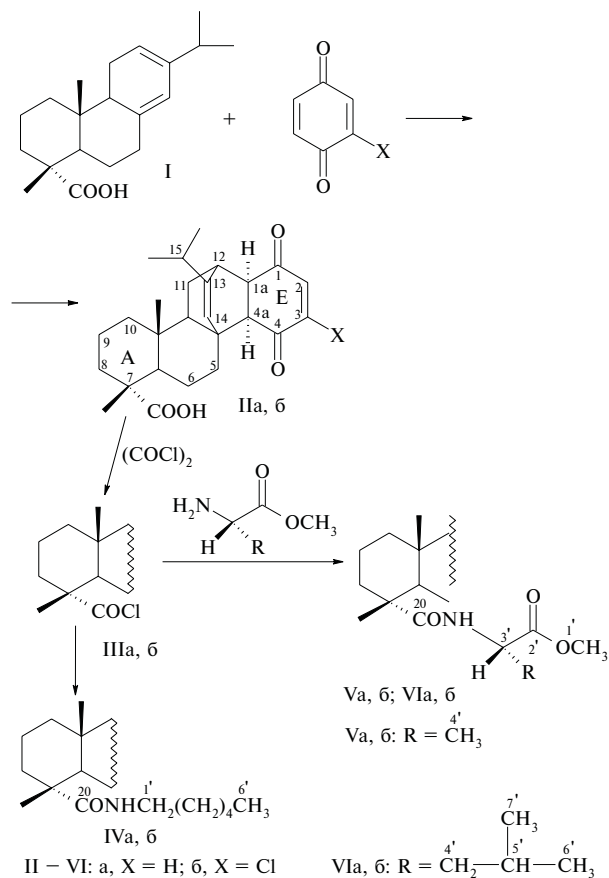
Сосновая живица содержит большой ряд биологически активных веществ [1]. Одним из основных компонентов живицы является левопимаровая кислота (I), производные которой обладают антибактериальной и фунгицидной активностью [2]. I легко образует аддукты диенового синтеза с бензо-, ацетамидо-, тиенафто-, α -, β -нафтохинонами и нафтазаринном [3 – 6].

Нами синтезированы производные хинопимаровой кислоты (IIa) и изучена их противовоспалительная активность. IIa и хлорхинопимаровую кислоту (IIб) получали из сосновой живицы по методу [4]. Установлено, что IIб образуется региоспецифично с выходом 50 %.

Строение дитерпеноида IIб установлено на основании данных спектра ЯМР ^1H : протон Н-12 (δ 2,85 м.д.) имеет две *транс*-константы с протонами Н-11 (аксиальный) и Н-1а ($J_1 = J_2 = 13,6$ Гц) и одну *цис*-константу с протоном Н-11 (экваториальный) (J 4,5 Гц). Протоны Н-1а и Н-4а проявляются при δ 2,40 (дд) и 2,48 (д) м.д., соответственно, и имеют между собой *цис*-константу (J 9 Гц). Из расчетов по аддитивным схемам с использованием инкрементов следует, что химические сдвиги протонов Н-1а и Н-4а соответствуют расположению атома хлора в положении С-3. В альтернативной структуре с положением хлора при С-2 химический сдвиг протона Н-1а должен быть больше, чем химический сдвиг Н-4а [7]. Следует отметить, что для аддукта IIб наблюдается слабopольный сдвиг протона Н-4а (δ 2,48 м.д) по сравнению с IIa (δ 1,93 м.д.) [4]. Из указанных величин КССВ для IIб следует, что цикл E имеет *цис*-сочленение с циклом C и *син*-положение к циклу D, что подтверждается сдвигом протона Н-14 в сильное поле (от δ 5,68 м.д. в IIa до δ 5,47 м.д. в IIб).

Региоспецифичность взаимодействия хлорбензохинона с I обусловлена влиянием электроноакцепторного атома хлора, который способствует образованию переходного состояния путем замыкания водородной связи между карбоксильной группой и карбонильным кислородом в положении С-1 [4, 8]. Это приводит к продукту, содержащему заместитель в положении С-3.

Реакцией IIa и IIб с оксалилхлоридом в хлороформе при комнатной температуре синтезированы их хлорангидриды (IIIa, б) с выходом 93 – 95 %. В ИК-спектрах хлорангидридов IIIa, б наблюдается полоса поглощения в области 1810 – 1800 см^{-1} (СОС1). Взаимодействием ацилхлоридов IIIa, б с гексиламином и метиловыми эфирами L-аланина и L-лейцина в хлороформе в присутствии триэтиламина получены амиды (IVa, б) и дитерпеновые пептиды (Va, б, VIa, б) с выходом 75 – 86 %.



Строение полученных амидов подтверждено данными элементного анализа, ИК- и ЯМР-спектрами (табл. 1, 2). ИК-Спектры всех амидов характеризуются полосами поглощения NH-групп ($3065 - 2840 \text{ см}^{-1}$) и CONH-групп ($1525 - 1510 \text{ см}^{-1}$).

В спектрах ЯМР ^{13}C амидов (IVa, б – VIa, б) (табл. 2) наблюдается сильнополюный сдвиг сигнала углеродного атома С-20 на 7 – 9 м.д. в результате образования CONH-связи. Карбонильные атомы углеродов С-1 и С-4 обнаруживаются в слабом поле (δ 199 – 197 м.д.) как и в спектрах исходных кислот. Дополнительные CH_2 -группы в остатках алифатических амидов IVa, б проявляются сигналами в области 22 – 39 м.д. В спектрах ЯМР ^1H протон амидной связи (CONH) обнаруживается в виде уширенного сигнала при 5,17 – 5,72 м.д.

Введение аминокислотных фрагментов в молекулу дитерпеноида приводит к появлению дополнительных сигналов карбонильных атомов углерода сложноэфирных групп в области 172 – 173 м.д. Сигналы С-1' в спектрах соединений Va, б, VIa, б обнаруживаются в области 51 – 52 м.д. Отмечено также смещение сигнала протона Н-14 в сильное поле до δ 5,15 и 5,31 м.д. по

Физико-химические свойства соединений Пб, IVa, б – VIa, б

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	R_f	ИК-спектр, ν , см^{-1}	Брутто-формула
Пб	50	220 – 222	0,46	3260 (ОН), 1695 (C=O), 1600 (COOH), 1585 (–CH=C–), 1470, 1400, 1340, 1255, 1200, 1160, 1130, 1080, 1020, 935, 850, 725.	$\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{ClO}_4$
IVa	75	148 – 150	0,30	3000 – 2850 (NH), 1745, 1670 (C=O), 1620 (–CH=CH–), 1520 (CONH), 1465, 1395, 1320, 1315, 1210, 1160, 1120, 1070, 1050, 1015, 975, 860, 840, 765, 735.	$\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{NO}_3$
IVб	81	187 – 189	0,40	2960 – 2840 (NH), 1740, 1670 (C=O), 1590 (–CH=C–), 1520 (CONH), 1465, 1380, 1360, 1240, 1215, 1160, 1140, 1070, 1010, 910, 850, 735.	$\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{ClNO}_3$
Va	77	208 – 210	0,33	3030 – 2840 (NH), 1680 (C=O), 1620 (–CH=CH–), 1510 (CONH), 1465, 1390, 1335, 1310, 1210, 1170, 1115, 1070, 1050, 1020, 980, 865, 840, 765, 740	$\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{NO}_5$
Vб	86	180 – 182	0,30	3050 – 2840 (NH), 1739, 1670 (C=O), 1590 (–CH=C–), 1516 (CONH), 1470, 1375, 1320, 1220, 1200, 1155, 1132, 1060, 1015, 890, 840, 725.	$\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{ClNO}_5$
VIa	79	268 – 270	0,35	3035 – 2860 (NH), 1740, 1660 (C=O), 1620 (–CH=CH–), 1515 (CONH), 1465, 1395, 1330, 1310, 1215, 1165, 1120, 1070, 1055, 1015, 980, 850, 840, 765, 745.	$\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{NO}_5$
VIб	83	194 – 195	0,45	3065 – 2860 (NH), 1745, 1670 (C=O), 1590 (–CH=C–), 1525 (CONH), 1470, 1385, 1320, 1230, 1205, 1160, 1130, 1070, 1020, 900, 850, 730.	$\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{ClNO}_5$

Таблица 2

Спектры ЯМР соединений Пб, IVa, б – VIa, б (CDCl_3 , δ , м.д.)

Соединение	Спектр ^{13}C ЯМР	Спектр ^1H ЯМР
Пб	15.9 (C-19), 16.4 (C-18), 16.9, 19.8 (C-17), 20.6 (C-16), 22.0, 28.1, 33.0 (C-15), 35.0, 36.7, 37.8, 38.1, 41.1, 42.8, 46.8, 48.9, 51.7, 56.0, 57.6, 124.7 (C-14), 139.2 (C-2), 148.4 (C-3), 150.6 (C-13), 184.6 (C-20), 190.9 (C-4), 196.6 (C-1).	0.66 (с, 3H, H-18), 0.73, 0.87, 0.90 и 0.94 (оба д, по 3H, J 6.9 Гц, H-16, H-17), 0.98, 1.08, 1.15 (с, 3H, H-19), 1.18, 1.20, 1.25, 1.50, 1.58, 1.71, 1.77, 2.08 (септ, 1H, J 6.8 Гц, H-15), 2.40, 2.48 (д, 1H, J 9.0 Гц, H-4a), 2.50, 2.85, 5.47 (уш. с, 1H, H-14), 6.80 (с, 1H, H-2).
IVa	14.0 (C-6'), 15.8 (C-19), 16.3 (C-18), 16.9, 19.7 (C-17), 20.6 (C-16), 22.0, 22.8 (C-5'), 26.1 (C-2'), 28.1, 29.4 (C-3'), 31.4 (C-4'), 32.8 (C-15), 35.0, 36.6, 37.7, 37.9, 38.8 (C-1'), 41.0, 41.9, 42.3, 48.9, 50.9, 56.0, 58.1, 125.1 (C-14), 141.6 (C-2), 143.8 (C-3), 147.6 (C-13), 175.1 (C-20), 198.5 (C-4), 199.4 (C-1)	0.63 (с, 3H, H-18), 0.66, 0.73, 0.87, 0.90 и 0.94 (оба д, по 3H, J 6.9 Гц, H-16, H-17), 0.98, 1.08, 1.13 (с, 3H, H-19), 1.14 – 1.20 (м, 12H, H-6, H-9, H-2', H-3', H-4', H-5'), 1.24, 1.29 (с, 3H, H-6'), 1.50, 1.58, 1.71, 1.77, 1.93 (д, 1H, J 9.0 Гц, H-4a), 2.08 (септ, 1H, J 6.8 Гц, H-15), 2.50, 2.56, 2.74, 3.20 – 3.30 (м, 2H, H-1'), 5.17 (уш. с, 1H, CONH), 5.68 (уш. с, 1H, H-14), 6.50 (д, 1H, J 10.3 Гц, H-2), 6.62 (д, 1H, J 10.3 Гц, H-3).
IVб	14.0 (C-6'), 15.9 (C-19), 16.4 (C-18), 16.9, 19.8 (C-17), 20.6 (C-16), 22.0, 22.6 (C-5'), 26.6 (C-2'), 28.1, 29.4 (C-3'), 31.5 (C-4'), 33.0 (C-15), 35.0, 36.7, 37.8, 38.1, 39.2 (C-1'), 41.1, 41.9, 42.8, 48.9, 51.7, 56.0, 57.6, 124.6 (C-14), 139.1 (C-2), 148.2 (C-3), 150.6 (C-13), 175.9 (C-20), 190.9 (C-4), 196.5 (C-1).	0.66 (с, 3H, H-18), 0.73, 0.87, 0.90 и 0.94 (оба д, по 3H, J 6.9 Гц, H-16, H-17), 0.98, 1.08, 1.15 (с, 3H, H-19), 1.16 – 1.22 (м, 12H, H-6, H-9, H-2', H-3', H-4', H-5'), 1.25, 1.28 (с, 3H, H-6'), 1.50, 1.58, 1.71, 1.77, 2.08 (септ, 1H, J 6.8 Гц, H-15), 2.40, 2.48 (д, 1H, J 9.0 Гц, H-4a), 2.50, 2.85, 3.20 – 3.30 (м, 2H, H-1'), 5.17 (уш. с, 1H, CONH), 5.47 (уш. с, 1H, H-14), 6.80 (с, 1H, H-2).
Va	13.8 (C-4'), 15.8 (C-19), 16.3 (C-18), 16.9, 19.7 (C-17), 20.6 (C-16), 22.0, 28.1, 32.8 (C-15), 35.0, 36.6, 37.7, 37.9, 41.0, 41.8, 42.3, 48.9, 50.9, 51.4 (C-1'), 56.0, 58.1, 59.5 (C-3'), 125.1 (C-14), 141.6 (C-2), 143.8 (C-3), 147.6 (C-13), 173.1 (C-2'), 176.1 (C-20), 198.4 (C-4), 199.2 (C-1).	0.63 (с, 3H, H-18), 0.66, 0.73, 0.87, 0.90 и 0.94 (оба д, по 3H, J 6.9 Гц, H-16, H-17), 0.98, 1.08, 1.13 (с, 3H, H-19), 1.18, 1.20, 1.24, 1.29 (с, 3H, H-4'), 1.50, 1.58, 1.71, 1.77, 1.93 (д, 1H, J 9.0 Гц, H-4a), 2.08 (септ, 1H, J 6.8 Гц, H-15), 2.50, 2.56, 2.74, 3.73 (с, 3H, H-1'), 4.50 – 4.62 (м, 1H, H-3'), 5.31 (уш. с, 1H, H-14), 5.39 (уш. с, 1H, CONH), 6.35 (д, 1H, J 10.3 Гц, H-2), 6.42 (д, 1H, J 10.3 Гц, H-3).
Vб	14.3 (C-4'), 15.9 (C-19), 16.4 (C-18), 16.9, 19.8 (C-17), 20.6 (C-16), 22.0, 28.1, 33.0 (C-15), 35.0, 36.7, 37.8, 38.1, 41.1, 42.8, 43.0, 48.9, 51.1 (C-1'), 51.7, 56.0, 57.6, 59.7 (C-3'), 124.7 (C-14), 139.2 (C-2), 148.2 (C-3), 150.6 (C-13), 172.3 (C-2'), 176.6 (C-20), 190.7 (C-4), 196.8 (C-1).	0.66 (с, 3H, H-18), 0.73, 0.87, 0.90 и 0.94 (оба д, по 3H, J 6.9 Гц, H-16, H-17), 0.98, 1.08, 1.15 (с, 3H, H-19), 1.18, 1.20, 1.25, 1.30 (с, 3H, H-4'), 1.50, 1.58, 1.71, 1.77, 2.08 (септ, 1H, J 6.8 Гц, H-15), 2.40, 2.48 (д, 1H, J 9.0 Гц, H-4a), 2.50, 2.85, 3.78 (с, 3H, H-1'), 4.53 – 4.65 (м, 1H, H-3'), 5.15 (уш. с, 1H, H-14), 5.40 (уш. с, 1H, CONH), 6.40 (с, 1H, H-2).
VIa	15.8 (C-19), 16.3 (C-18), 16.9, 19.7 (C-17), 20.6 (C-16), 22.0, 22.7 (C-6'), 23.9 (C-7'), 25.8 (C-5'), 28.1, 32.8 (C-15), 35.0, 36.6, 37.7, 37.9, 41.0, 40.5 (C-4'), 41.3, 42.3, 48.9, 50.9, 51.6 (C-1'), 53.7 (C-3'), 56.0, 58.1, 125.1 (C-14), 141.6 (C-2), 143.8 (C-3), 147.6 (C-13), 172.5 (C-2'), 176.0 (C-20), 198.5 (C-4), 199.8 (C-1).	0.63 (с, 3H, H-18), 0.66, 0.73, 0.87, 0.90 и 0.94 (оба д, по 3H, J 6.9 Гц, H-16, H-17), 0.98, 1.00 (с, 6H, CH ₃), 1.08, 1.10 – 1.14 (м, 3H, H-6', H-7'), 1.17 (с, 3H, H-19), 1.19, 1.22, 1.24, 1.50, 1.58, 1.71, 1.77, 1.93 (д, 1H, J 9.0 Гц, H-4a), 2.08 (септ, 1H, J 6.8 Гц, H-15), 2.50, 2.56, 2.74, 3.71 (с, 3H, H-1'), 4.58 – 4.65 (м, 1H, H-3'), 5.31 (уш. с, 1H, H-14), 5.71 (уш. с, 1H, CONH), 6.35 (д, 1H, J 10.3 Гц, H-2), 6.42 (д, 1H, J 10.3 Гц, H-3).
VIб	15.9 (C-19), 16.4 (C-18), 16.9, 19.8 (C-17), 20.6 (C-16), 22.0, 22.9 (C-6'), 24.9 (C-7'), 26.4 (C-5'), 28.1, 33.0 (C-15), 35.0, 36.7, 37.8, 38.1, 41.0, 41.5 (C-4'), 41.8, 42.8, 46.8, 48.9, 51.7, 52.1 (C-1'), 55.5 (C-3'), 56.0, 57.6, 124.7 (C-14), 139.2 (C-2), 148.4 (C-3), 150.6 (C-13), 173.8 (C-2'), 176.0 (C-20), 190.8 (C-4), 196.6 (C-1).	0.66 (с, 3H, H-18), 0.73, 0.87, 0.90 и 0.94 (оба д, по 3H, J 6.9 Гц, H-16, H-17), 0.98, 1.00 (с, 6H, H-6', H-7'), 1.08, 1.10 – 1.14 (м, 3H, H-4', H-5'), 1.16 (с, 3H, H-19), 1.18, 1.20, 1.25, 1.50, 1.58, 1.71, 1.77, 2.08 (септ, 1H, J 6.8 Гц, H-15), 2.40, 2.48 (д, 1H, J 9.0 Гц, H-4a), 2.50, 2.85, 3.75 (с, 3H, H-1'), 4.60 – 4.68 (м, 1H, H-3'), 5.15 (уш. с, 1H, H-14), 5.72 (уш. с, 1H, CONH), 6.20 (с, 1H, H-2).

сравнению с сигналом исходных дитерпеноидов Па, б (δ 5,47 и 5,68 м.д. соответственно).

Установлено, что соединения Па, б проявляют противовоспалительную активность на каррагениновой и формалиновой моделях воспаления, не уступая по силе действия ортофену (табл. 3).

Экспериментальная химическая часть

ТСХ проводили на пластинках Silufol (Chemapol, Чехия), используя систему растворителей хлороформ-метанол, 20 : 1. Пятна проявляли 20 % раствором фосфорновольфрамовой кислоты в этаноле с последующим нагреванием при 100 – 120°C в течение 2 – 3 мин.

Спектры ^{13}C и ^1H ЯМР регистрировали на спектрометре “Bruker AM-300” (75,5 и 300 МГц соответственно) в дейтерохлороформе, внутренний стандарт — SiMe_4 . ИК-спектры снимали на спектрометрах Specord M80 в пасте с вазелиновым маслом. Температуры плавления определяли на микростолике “Boetius”. Хинонимаровую кислоту получали по методике [4] из сосновой живицы, собранной в 1999 г. в Белорецком районе (Башкортостан), т.пл. 189 – 190°C (лит.: т.пл. 192°C [3]). Метилловые эфиры L-аминокислот в виде гидрохлоридов получали по стандартной методике [10] и перекристаллизовывали из этилацетата. Данные элементного анализа для соединений (IIб, IVа, б – VIа, б) соответствуют расчетным. Выходы и физико-химические свойства полученных соединений приведены в табл. 1, 2.

Хлорхинонимаровая кислота (IIб). К 100 г сосновой живицы в 250 мл хлороформа прибавляют раствор 0,1 моль хлор-бензохинона в 50 – 100 мл ацетонитрила и реакционную массу выдерживают 7 дней без доступа света. Растворитель упаривают в вакууме водоструйного насоса, остаток кристаллизуют из смеси метанол – петролейный эфир. Очистку проводят повторной кристаллизацией.

Общая методика получения хлорангидридов (IIIа, б). К 1 ммоль кислоты Па (0,41 г) или кислоты IIб (0,44 г) в 10 мл абсолютного хлороформа при перемешивании прибавляют 0,14 мл оксалилхлорида, смесь выдерживают в атмосфере азота в течение 4 ч. Растворитель упаривают в вакууме, выход 93 – 95 % (0,39 и 0,44 г). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1810 – 1800 (COCl).

Методика синтеза амидов IVа, б. 1 ммоль хлорангидрида IIIа или IIIб в 10 мл сухого хлороформа и 1,6 ммоль (0,16 г) гексиламина кипятят 2 ч. Реакционную смесь промывают 15 мл 5 % раствора бикарбоната натрия, водой (2 × 10 мл) и сушат над MgSO_4 . Растворитель упаривают в вакууме, остаток очищают колоночной хроматографией на окиси алюминия, элюируя хлороформом.

Методика синтеза амидов Va, б, VIа, б. К суспензии 1,3 ммоль гидрохлорида метилового эфира L-аланина (0,13 г) или L-лейцина (0,19 г) в 5 мл сухого хлороформа при перемешивании прибавляют по каплям 0,23 мл триэтиламина и добавляют раствор 1 ммоль

Таблица 3
Противовоспалительная активность соединений Па, б*

Соединение	Доза, мг/кг	Средний процент отека лапок при воспалении, вызванном:	
		каррагенином	формалином
Па ($n = 7$)	50	33,62 ± 3,99*	42,96 ± 4,64*
IIб ($n = 7$)	50	43,59 ± 4,78*	43,46 ± 2,90*
Ортофен ($n = 7$)	8	37,66 ± 2,07*	45,6 ± 2,56*
Контроль ($n = 7$)	–	50,2 ± 3,49	57,46 ± 4,40

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем

хлорангидрида IIIа или IIIб в 10 мл сухого хлороформа. Смесь кипятят 1 ч. Реакционную массу оставляют на ночь, фильтрат промывают 10 мл 10 % раствора соляной кислоты, 2 × 10 мл воды, сушат над MgSO_4 , растворитель упаривают в вакууме. Остаток очищают, как описано для IV а, б.

Экспериментальная фармакологическая часть

Противовоспалительную активность изучали на 56 белых беспородных мышах массой 18 – 20 г на моделях асептических артритов, вызванных 3 % раствором формалина и 1 % раствором каррагенина, которые вводили в апоневроз стопы одной из задних лапок в объеме 0,05 мл. Исследуемые соединения (Па, IIб) в дозе 50 мг/кг (1/100 от ЛД₅₀) и препарат сравнения ортофен в дозе 8 мг/кг вводили через зонд в желудок за 1 ч до воспроизведения отека и через 1 ч и 2 ч после введения флогогенов. Через 3 ч после воспроизведения воспаления животных забивали и взвешивали задние лапки [9]. Противовоспалительный эффект соединений оценивали по степени подавления увеличения массы отечной лапки. Статистическую обработку результатов проводили с определением достоверности различий по критерию Стьюдента. Результаты опытов приведены в табл. 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Пентегова, Ж. В. Дубовенко, В. А. Ралдугин и др., *Терпеноиды хвойных растений*, Наука, Новосибирск (1987).
2. S. S. Feio, B. Gigante, J. C. Roseiro, M. J. Marcelo-Curto, *J. Microbiol. Met.*, **35**, 201 – 206 (1999).
3. W. Herz., R. C. Blackstone, M. G. Nair, *J. Org. Chem.*, **32**(10), 2992 – 2998 (1967).
4. Г. А. Толстикова, Э. Э. Шульц, Т. Ш. Мухаметзянова и др., *Ж. орган. химии*, **29**(4), 698 – 716 (1993).
5. Б. А. Арбузов, *ДАН СССР*, **30**(8), 718 – 720 (1941).
6. Б. А. Арбузов, *ДАН СССР*, **12**(7 – 8), 343 – 350 (1940).
7. E. Pretch, T. Clerc, J. Seibe, W. Simon, *Tables of spectral data for structure determination of organic compounds*, Springer-Verlag, Berlin (1990).
8. Г. А. Толстикова, Э. Э. Шульц, Г. Ф. Вафина и др., *Ж. орган. химии*, **25**(6), 1232 – 1245 (1989).
9. Ф. П. Тринус, Н. А. Мохорт, Б. М. Клебанов, *Нестероидные противовоспалительные средства*, Здоровье, Киев (1975), 204 – 216.

Поступила 21.05.02