Синтез і аналіз біологічно активних сполук та лікарських засобів

УДК 615.012.1:547.655.6.076

О.П. Бондарчук

БІООРГАНІЧНИЙ СИНТЕЗ ГЛІКОЗИЛЬОВАНИХ ПОХІДНИХ АНТРАХІНОНІВ. ЧАСТИНА 1. СИНТЕЗ ПОХІДНИХ ЕМОДИНУ.

Івано-франківський національний медичний університет, м. Івано-Франківськ, Україна

e-mail: syan@ukr.net

<u>Резюме:</u> Було розроблено методику та одержано способом біоорганічного синтезу глікозильовані похідні емодину за допомогою штаму культури ґрунтової бактерії *Saccharothrix espanaensis*. Розділення отриманих продуктів проводили методом LC/ESI-MS (BEPX-мас-хроматографії), підтвердження будови отриманих похідних проводили спектральними методами (УФ, IЧ, ¹Н і ¹³С ЯМР, COSY, HSQC, HMBC, 2D-NOESY, ROESY).

<u>Ключові слова:</u> глікозильовані похідні, *Saccharothrix espanaensis*, біоорганічний синтез, емодин, антрахінони.

Вступ. Глікозидні похідні хіноїдних сполук досить різноманітні і широко розповсюджені в природі, та представлені в синтетичній органічній та фармацевтичній хімії. Діевість чисельних антибіотиків і цитостатинів пов'язана із наявністю цукрів в їх молекулах. Як показано даними багатьох досліджень, що саме, вміст вуглеводневої складової є вирішальним для фармакокінетичних та фармакодинамічних властивостей глікозильованих лікарських речовин. Втрата одиниці цукру відбувається з втратою сили ефективності біологічної дії (антибіотичної, цитостатичної) тому що, як припускають, глікозидний фрагмент безпосередньо приймає участь у взаємодії з цільовою молекулою⁹.

Широко зустрічаються глікозидні похідні антрахінонів в рослинному і тваринному світі, так з кори крушини (*Cortex Frangulae*) був виділений франгулін-емодин-6-O-L-рамнопіранозид 1³. З морських водоростей виду *Boraginaceae* і губки *Fascaplysinopsis spaces* були виділені глікозидні похідні гідроксинафтохінонів **2а,б**, ацетильовані похідні яких володіють фунгіцидною активністю¹.



Одним з відомих представників глікозидів хіноїдних сполук є дауноміцин **3** – протипухлинний антибіотик, що продукується мікроорганізмом *Actinomyces coeruleorubidus*² і використовується в лікувальній практиці.

Показана раніше⁷ можливість біоорганічного синтезу за допомогою *Streptomyces* cyanogenus глікозидної частини Ландоміцину

А спонукала на розвиток наукових досліджень у цьому напрямі.

Складність будови антрахінонових сполук звужує межі хімічних модифікацій і тому наявність мікроорганізмів, здатних здійснювати ефективну глікозиляцію, дає можливість значно розширити синтетичні можливості та спектр біологічної активності речовин⁵.

ISNN 2070-3112



Мета дослідження. Розробка методик та одержання шляхом біоорганічного синтезу глікозильованих похідних емодину за допомогою штаму культури ґрунтової бактерії *Saccharothrix espanaensis*.

Матеріали та методи дослідження. Контроль за перебігом реакцій та індивідуальністю сполук проводили методом ТШХ на пластинах «Merk Kizelgel-60F254» і «Silufol UV-254». Препаративну хроматографію виконували на силікагелі марки «LS 5/40» (Merck).

Спектри ¹Н і ¹³С ЯМР, COSY, HSQC, HMBC, 2D-NOESY, ROESY реєстровані на спектрофотометрах «Varian XL-400», «Bruker Avance DRX 400», «JEOL Alpa», «Bruker WP-200», «Varian XL-200». Хромато-мас-спектри записані на «Agilent 1100». При визначенні температури плавлення сполук поправка на виступаючий стовпчик ртуті не проводилась.

Результати дослідження та їх обговорення. Була розроблена стратегія біоорганічного синтезу глікозильованих антрахінонів за допомогою штаму культури ґрунтової бактерії *Saccharothrix espanaensis*. Останні відносяться до актиноміцетів – прокаріотичних грам позитивних мікроорганізмів, які продукують понад 90% промислово-важливих антибіотиків⁸. З іншого боку, відомості, стосовно похідних емодину, що містяться в екстракті алое, корі крушини⁶ та листях сени¹⁰, показують *in vitro* та *in vivo* вибіркову активність проти невроектодермальних клітин раку⁴, що

спонукало у якості вихідної речовини обрати емодин **11**.



Необхідно відзначити, що лише саме глікозилювання за класичними методами органічного синтезу вимагає багато кроків при доволі часто мізерному виході продукту і без необхідної специфічності та просторової орієнтації продуктів.

Біоорганічний синтез проводили за стандартними методиками⁷ протягом 6-денного інкубаційного періоду. Екстракт трансформаційних продуктів спочатку аналізували за допомогою рідинної хромато-масс-спектроскопії, а утворення нових глікозильованих антрахінонів підтверджувалось за допомогою порівняння УФ-спектрів вихідних та кінцевих продуктів.

Більше всього, як у відсотковому виході, так і за кількістю глікозильованих продуктів, біотрансформація спостерігається у випадку емодину **11**, встановлено, що при глікозилюванні емодину **11** Saccharothrix espanaensis, з реакційної маси були виділені три продукти: 8-О- α -L-рамнозилемодин **12**: 1-О- α -L-рамнозилемодин **13**: 6,8-ди-О- α -L-рамнозилемодин **14** з загальним виходом 87% і у співвідношенні 37%:27%:23% відповідно (схема 1).



На першому етапі етилацетатний екстракт реакційної суміші після обробки емодину **11** культурою *S. espanaensis* був проаналізований методом LC/ESI-MS (BEPX-мас-хроматографія) (рис. 1), результати якого свідчать про наявність трьох новоутворених продуктів із зростанням молекулярної маси у порівнянні з вихідним емодином **11** на 146 в.о. (EmoPro1, EmoPro2) і 2*146 в.о. (EmoPro3).

Схема 1



Рис. 1. LC/ESI-MS аналіз етилацетатного екстракту реакційної суміші після біотрансформації емодину 11

ISNN 2070-3112 «Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація» 2013, №3-4 Смуга абсорбції з λ_{max} =440нм у емодину 11 в усіх нових продуктах 12-14 гіпсохромно зсунута до λ_{max} =282 нм (ЕтоPro1), 284 нм (ЕтоPro2) і 268 нм (ЕтоPro3). Інтенсивності цих смуг абсорбції сприяють гідроксильні групи похідних емодину 12-14. Таким чином, збільшення молекулярної маси на залишок рамнози (146 в.о.) або на два залишки рамнози (2х146 в.о.) свідчить, що емодин 11 біотрансформувався.

У спектрах ¹Н ЯМР ЕтоРго1 **13** і ЕтоРго2 **13** (рис. 2.) спостерігається звичайний простий сигнальний набір О-глікозидної сполученої *a*-L-рамнози.



Рис. 2. Спектри ¹Н ЯМР 8-О-*а*-L-рамнозилемодину 12 і 1-О-*а*-L-рамнозилемодину 13 в DMSO-d₆, (6/ppm)

Незважаючи на подібні хімічні структури ЕтоРго1 **2.55 і** ЕтоРго2 **2.56**, їх ¹Н ЯМР спектри суттево відрізняються. В той час, як у спектрі ЕтоРго2 **2.56** з'являються чіткі сигнали протонів гідроксильних груп рамнозильного фрагменту та синглети протонів *а*гідроксильних груп, то відповідні сигнали ЕтоРго1 **2.55** ширші та не проявляють тенденції до мультиплікації, тобто визначення повторення і сигнал ОН⁸ відсутні. Найбільш чітка різниця між ними існує щодо сигналу H₂O. Плоский та широкий сигнал протонів води в спектрі EmoPro1 **2.55** дає можливість побачити Н⁴-сигнал, який є дуплетом дуплетів із трансдіаксіальним (J-J=9,2 Hz) розщепленням і виглядає як псевдотриплет.

Встановлення просторової будови одержаних продуктів **2.55** і **2.56** може бути здійснено шляхом інтерпретації та оцінки спектрів (¹³C ЯМР, COSY, HSQC, HMBC, 1D-/2D-ROESY (EmoPro1), 2D-NOESY (EmoPro2)). В обох випадках відбулось рамнозилювання *а*гідроксильої групи -OH¹ або -OH⁸ і їх структури представлені на рис. 3.





Третім продуктом біотрансформації емодину **11** є 6,8-ди-О-*a*-L-рамнозилемодин ЕтоPro3 **14** з молекулярною масою 562 в.о., що відповідає присутності в молекулі двох фрагментів рамнози.

При порівнянні спектрів ¹Н ЯМР (рис. 4) вихідного емодину **11** (спектр **a**) з продуктом глікозилювання ЕтоРгоЗ **14** (спектр **б**) спостерігається наявність двох синглетів в області $\delta_{\rm H}$ =11-12 ppm трьох протонів трьох гідроксильних угрупувань в положеннях 1, 6 і 8 емодинового фрагменту (спектр **a**) та сигнали протонів рамнозильних замісників в області $\delta_{H}=3,4$ -5,6 ррт (спектр **б**). Крім того, наявність тільки одного синглета при $\delta_{H}=13,12$ ррт, що відноситься до сигналу протона -OH¹ гідроксильної групи та відсутність інших, притаманних сигналу протонів -OH⁶ і -OH⁸ групи (спектр **б**), однозначно підтверджує запропоновану структуру ЕтоРгоЗ (рис. 4).



Рис. 4. Спектри ¹Н ЯМР емодину 11 (а) та 6,8-ди-О-*a*-L-рамнозилемодину EmoPro3 14 (б) в DMSO-d₆, (б/ррm)

Детальний аналіз сукупності інших спектрів ЯМР (¹H, ¹³C, HMBC, H-COSY, ROESY) повністю підтверджують запропоновану структуру ЕmoPro3 **2.57** (рис. 5).



Рис. 5. Структура 6,8-ди-О-а-L-рамнозилемодину (ЕтоРгоЗ) 14

Таким чином, те, що не вдалося одержати хімічним шляхом – глікозиди антрахінонів, з успіхом було компенсовано біоорганічним синтезом за допомогою штаму *Saccharothrix* *espanaensis*. Вдалося селективно і з достатньо добрими виходами ввести глікозидний фрагмент в хіноїдну структуру.

Висновки:

1. Вперше було одержано біосинтетичним шляхом глікозильовані похідні емодину,

використовуючи штам бактерій Saccharothrix espanaensis.

ISNN 2070-3112

 Проведений аналіз даних LC/ESI-MS показав, що у ході біосинтезу утворюється суміш трьох продуктів з загальним виходом 87% і у співвідношенні 37%:27%:23%

Література:

- А.с. 1088346⁽¹³⁾ А1 СССР, МПК С07Н15/20, А61К31/704. Ацетилированные гликозиды 2,5и 2,8-гидрокси-1,4-нафтохинонов, обладающие антигрибковой активностью / С.Г. Полоник, А.М. Толкач, Н.И. Уварова, С.И. Стехова, Е.Б. Шенцова. – № 3506842/23-04; заявл. 28.09.1982; опубл. 30.12.1986, Бюл. № Ф 48.
- Машковский М.Д. Лекарственные средства [15-е изд., перераб., испр. и доп.] / М.Д. Машковский – М.: ООО «Издательство «Новая Волна», 2005. – 1200 с.
- Новиков В.Л. Синтез и свойства вторичных метаболитов некоторых высших растений и морских беспозвоночных и родственных им соединений: дис. доктора хим. наук: 02.00.03 / В.Л. Новиков. – Владивосток, 2000. – 149 с.
- Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors / T. Pecere, MV Gazzola, C. Mucignat [et al.] // Cancer Research. - 2000. - №60. -P. 2800-2804.
- 5. Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene / S.A. Joyce, A.O. Brachamann, I. Glazer [et al.] //

відповідно, будова яких була підтверджена даними спектрів ЯМР (¹H, ¹³C, HMBC, H-COSY, ROESY).

Angewandte Chemie-International Edition. – 2008. – No 47. – P.1942-1945.

- 6. Labeda D.P. Phylogenetic analysis of Saccharothrix and related taxa: proposal for Actinosynnemataceae fam. nov / D.P. Labeda, R.M. Kroppenstedt //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. $-2000. N_{\odot} 50. P.331.336.$
- LanGT2 catalyzes the first glycosylation step during landomycin A biosynthesis / A. Luzhetskyy, T. Taguchi, M. Fedoryshyn [et al.] // Chembiochem. - 2005. - V. 6. - №8. - P.1406-1410.
- Thomas R. A biosynthetic classification of fungal and streptomycete fused-ring aromatic polyketides / R. Thomas // ChemBioChem. – 2001. – №2. – P.612-627.
- 9. Thomson R.H. Naturally occurring quinones, second edition / R.H. Thomson. London and New York: Academic Press, 1971. 734 p.
- Three chromone components from Aloe vera leaves / N. Okamura, N. Hine, S. Harada [et al.] // Phytochemistry. – 1996. – №43. – P.495-498.

УДК 615.012.1:547.655.6.076 БИООРГАНИЧЕСКОЙ СИНТЕЗ ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО ПРОИЗВОДНЫХ АНТРАХИНОНА. ЧАСТЬ 1. СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ ЭМОДИНА.

О.П. Бондарчук

Ивано-Франковский национальный медицинский університет, г. Ивано-Франковск, Украина

<u>Резюме:</u> Была разработана методика и получены способом биоорганической синтеза гликозилированные производные эмодина с помощью штамма культуры почвенной бактерии *Saccharothrix espanaensis*. Разделение полученных продуктов проводили методом LC/ESI-MS (ВЭЖХ-масс-хроматографии), подтверждение строения полученных производных проводили спектральными методами (УФ, ИК, ¹H и ¹³C ЯМР, COSY, HSQC, HMBC 2D-NOESY, ROESY).

<u>Ключевые слова:</u> гликозилированные производные, *Saccharothrix espanaensis*, биоорганический синтез, эмодин, антрахиноны.

UDC 615.012.1:547.655.6.076 BIOORGANIC SYNTHESIS OF GLYCOSYLATED ANTHRAQUINONE DERIVATIVES. PART 1. SYN-THESIS OF EMODIN DERIVATIVES.

O.P. Bondarchuk Ivano-Frankivsk national medical university, Ivano-Frankivsk, Ukraine

Summary: It was developed the method and obtained a way of bioorganic synthesis of glycosylated of emodin derivatives using soil bacterium strain culture *Saccharothrix espanaensis*. Separation of the resulting products was performed by LC/ESI-MS (HPLC -mass chromatography), to confirm the structure of the obtained derivative was performed spectral methods (UV, IR, 1H and 13C NMR, COSY, HSQC, HMBC, 2D-NOESY, ROESY).

Keywords: glycosylated derivatives, Saccharothrix espanaensis, bioorganic synthesis, emodin, anthraquinones.

Надійшла до редакції 16.12.2013 р.