

И. В. Кулаков*, О. А. Нуркенов, Д. М. Турдыбеков^а,
А. С. Махмутова^а, С. Б. Ахметова^а, Р. Б. Сейдахметова^а,
К. М. Турдыбеков^а

СИНТЕЗ N-АМИНОГЛИКОЗИДОВ
НА ОСНОВЕ АЛКАЛОИДА ЦИТИЗИНА, ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ
АКТИВНОСТЬ И КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА
N-(β-D-ГАЛАКТОПИРАНОЗИЛ)ЦИТИЗИНА

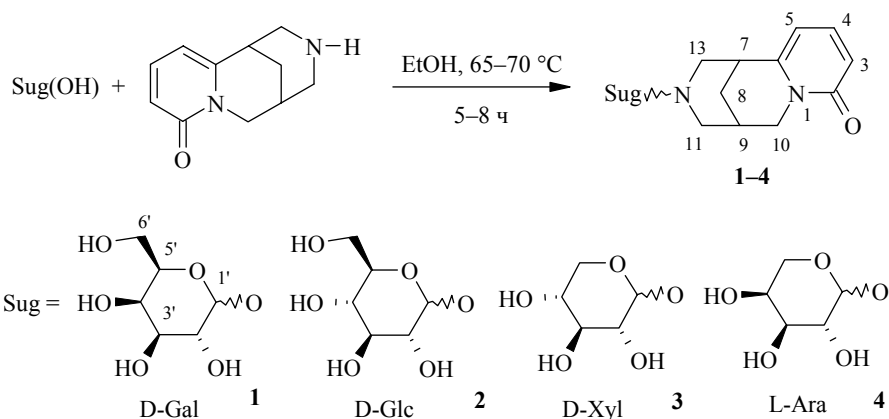
Разработаны оптимальные условия синтеза ряда новых N-аминогликозидов алкалоида цитизина с использованием промышленно доступных моносахаридов D-глюкозы, D-галактозы, D-ксилозы и L-арабинозы. На основе данных РСА установлена абсолютная β-аномерная конфигурация N-(β-D-галактопиранозил)-цитизина в кристаллическом состоянии. Определена сравнительная цитотоксическая характеристика алкалоида цитизина и некоторых его N-аминогликозидов.

Ключевые слова: алкалоид цитизин, N-аминогликозиды, N-(β-D-галактопиранозил)цитизин, моносахариды D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза, L-арабиноза, РСА, цитотоксическая активность.

Известно, что N-гликозилирование многих аминсоединений, в том числе гетероциклических и природных физиологически активных, рассматривается как новый подход к созданию перспективных и эффективных лекарственных средств целенаправленного действия за счёт активного транспорта углеводных фрагментов [1–4]. Введение в структуру физиологически активных веществ углеводных фрагментов не только повышает их водорастворимость, но и существенно снижает токсичность, что позволяет рекомендовать метод гликозилирования физиологически активного соединения (или его отдельных фрагментов) по гликозидному центру сахаров как один из возможных путей получения малотоксичных лекарственных средств [5].

В настоящей работе конденсацией D-галактозы, D-глюкозы, D-ксилозы и L-арабинозы с алкалоидом цитизином в небольшом количестве абсолютного спирта получены и описаны соответствующие 1-гликопиранозиламины 1–4.

Конденсация и, главное, последующее выделение целевых соединений значительно облегчаются при использовании абсолютного этанола, поскольку синтезированные гликозиды хорошо растворяются в воде и даже незначительные её количества затрудняют кристаллизацию. Установлено также, что использование первоначально в реакции каталитических количеств уксусной кислоты существенно влияет на скорость образования аминогликозидов, но заметно снижает выходы и затрудняет выделение конечных продуктов реакции. В связи с этим в дальнейшем мы отказались от её использования.

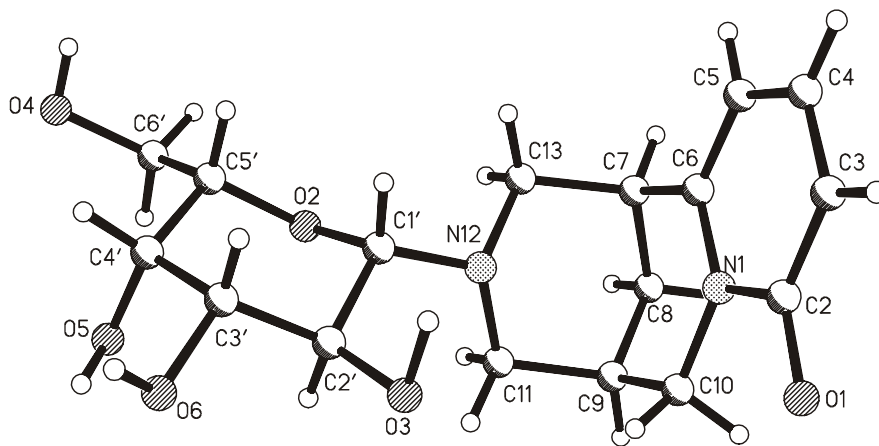


Полученные N-цитизиногликозиды могут быть весьма перспективными заменителями уже используемых фармацевтических препаратов на основе алкалоида цитизина (дыхательного analeптика "цититон", средства для отвыкания курения "лобесил"), поскольку, несомненно, будут иметь гораздо меньшую токсичность и пролонгированность действия, вследствие их постепенного гидролиза в организме.

Конформацию цитизинового агликона при гликозидном атоме С(1) однозначно можно установить по положению сигнала аномерного протона в спектре ЯМР ^1H . Известно [1], что для α -аномера в спектре ЯМР ^1H характерно положение сигнала в более слабом поле ($\sim 4.5-5.5$ м. д.) и с небольшой КССВ (2.5–5.0 Гц). У β -аномеров сигнал *транс*-аксиально расположенного протона проявляется в более сильном поле с $J \sim 6.0-10.0$ Гц. Анализ спектров ЯМР ^1H синтезированных N-цитизинилгликозидов показал, что, несмотря на объёмный цитизиновый каркас и устойчивость β -аномеров, в растворе ДМСО гликозиды **1-4** находятся в виде смеси α - и β -аномеров в соотношении 1:1, на что указывают соответствующие интегральные интенсивности и специфическое расположение дублетов аномерного протона, например, для соединения **1** в области 4.08 для Н(1' β) с $J = 8.8$ и 4.25 м. д. для Н(1' α) с $J = 4.5$ Гц.

Данный факт оказался для нас несколько неожиданным, поскольку многие синтезированные нами ранее N-аминогликозиды на основе производных анилина, 2-аминопиридина и алкалоида *d*-псевдоэфедрина, даже в условиях возможной мутаротации в растворе ДМСО, находились в более устойчивой и энергетически выгодной β -форме [6–8]. С целью определения абсолютной конфигурации синтезированных N-цитизинилгликозидов были проведены попытки вырастить необходимые для проведения РСА кристаллы. Установлено, что из всех синтезированных N-цитизинилгликозидов, более пригодные для исследования кристаллы были получены для N-(D-галактопиранозил)цитизина (**1**) при многократной перекристаллизации из смеси этанол–2-пропанол, 1 : 1, и последующем естественном испарении. При этом были выделены прозрачные с синим отливом игольчатые кристаллы.

Далее было проведено рентгеноструктурное исследование молекулы **1** (рисунок).



Строение молекулы N-(β-D-галактопиранозил)цитизина (**1**)

Установлено, что длины связей и валентные углы близки к стандартным значениям [9]. Цитизининовый остов достаточно жёсткий и практически не изменяется, что наблюдается в ранее исследованных молекулах [10–12]. Дигидропиридиновый цикл плоский с точностью $\pm 0.009 \text{ \AA}$, карбонильный атом O(1) лежит почти в плоскости остальных атомов, отклонение составляет 0.06 \AA . Тетрагидропиридиновый цикл N(1)C(6)C(7)C(8)C(9)C(10) принимает конформацию *идеальной софы* ($\Delta C_s^8 = 1.01 \text{ \AA}$) с выходом мостикового атома C(8) из средней плоскости остальных атомов цикла на 0.73 \AA (I). Пиперидиновый цикл находится в конформации *почти идеального кресла* ($\Delta C_s^{11} = 0.3 \text{ \AA}$). Пиранозное кольцо принимает конформацию *идеального кресла* ${}^1C_4'$ ($\Delta C_s^{C1'} = 3.0 \text{ \AA}$). Анализ пространственного строения изученной молекулы **1** однозначно показал, что в кристалле N-цититино-D-галактопиранозиламин (**1**) находится в более устойчивой β-аномерной конфигурации, о чём свидетельствует *транс*-аксиальное расположение гликозильного протона H(1') и протона H(2') пиранозного кольца.

Поскольку, как уже было сказано, в растворе ДМСО, по данным спектра ЯМР ${}^1\text{H}$, соединение **1** находится в равновесии между α- и β-аномерной формой, для возможного определения конфигурации аномерного атома водорода H(1') и атома H(2') мы провели квантово-химические расчёты полуэмпирическими методами MINDO/3, MNDO и AM1, входящими в программный пакет MOPAC версии 6.0. Результаты расчётов свидетельствуют о предпочтительной *цис*-ориентации данных атомов. Разница теплот образования между α- и β-конфигурациями составляет 2 ккал/моль в пользу первой. Следовательно при кристаллизации соединение **1** может принимать и α-аномерную конфигурацию. Известно [1], что в растворах углеводов и аминогликозидов в полярных растворителях, устанавливается определённое равновесие обеих форм. Вычисленные по Ривсу [13] энергии взаимодействия протонов и гидроксильных групп при атомах C(1') и C(2') в D-галактозе показали, что предпочтительной будет β-аномерная конфигурация из-за стерически выгодного экваториального расположения заместителя в положении 1', что и наблюдается в молекуле соединения **1**.

С целью определения сравнительной токсичности некоторых синтези-

рованных N-цитизинилгликозидов и исходного алкалоида цитизина были проведены испытания образцов N-(β-L-арабинопиранозил)цитизина (4) и N-(β-D-глюкопиранозил)цитизина (2) на цитотоксическую активность в отношении личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach) в условиях культивирования *in vitro*. Результаты тестирования цитотоксической активности, исходя из половинной токсической дозы LD₅₀, мкг/мл, следующие: N-(β-L-арабинопиранозил)цитизин – 189.36, N-(β-D-глюкопиранозил)цитизин – 172.55, алкалоид цитизин – 84.56.

В результате установлено, что синтезированные N-(β-L-арабинопиранозил)цитизин и N-(β-D-глюкопиранозил)цитизин проявляют слабую цитотоксическую активность в отношении личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach) и более чем в 2 раза меньшую цитотоксичность, чем образец сравнения – алкалоид цитизин, который проявляет умеренную цитотоксическую активность.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ИК спектры получены на спектрометре с фурье-преобразователем Avatar-320 в таблетках КВг. Спектры ЯМР ¹H зарегистрированы на приборе Bruker DRX500 (500 МГц) в ДМСО-d₆, внутренний стандарт ТМС. Контроль за ходом реакции и чистотой полученных соединений осуществлялся методом ТСХ на пластинках Sorbfil, в системе изопропиловый спирт–бензол–25% аммиак, 10:5:2, проявление парами иода.

Рентгеноструктурный эксперимент. Параметры ячейки и интенсивности 1731 независимого отражения соединения **1** измерены при 20 °С на автоматическом четырёхкружном дифрактометре BrukerP4 с графическим монохроматором с использованием MoKα-излучения (θ/2θ-сканирование, 2θ < 52.7°). Кристаллы ромбические, *a* = 7.158, *b* = 10.753, *c* = 21.855, *V* = 1682.2 Å³, *d*_{выч} = 1.391 г/см³, *Z* = 4 (C₁₇H₂₄N₂O₆). Пространственная группа P2(1)2(1)2(1).

В расчётах использованы 1035 отражений с интенсивностью *I* > 2σ(*I*). Структура расшифрована прямым методом по программе "Sir-2002" [14] и уточнена полноматричным МНК в анизотропном приближении для неводородных атомов. Атомы Н задавались геометрически и фиксированы по типу "наездник", кроме водородов гидроксильных групп, которые выявлены из разностного синтеза электронной плотности. Окончательные факторы расходимости *R* = 0.0614, *wR*₂ = 0.1337. Уточнение геометрии проведено по программе SHELXL-97 [15]. Данные по геометрической структуре **1** депонированы в Кембриджском банке структурных данных (CCDC 692503).

N-(β-D-Галактопиранозил)цитизин (1). К раствору 1.80 г (0.01 моль) D-галактозы в 15 мл абсолютного этанола при перемешивании добавляют 1.90 г (0.01 моль) цитизина, перемешивание продолжают 8 ч при 65–70 °С. При сильном охлаждении (–10 °С) выпадают белые кристаллы, которые отфильтровывают, промывают ацетоном. Выход 2.62 г (74%). Т. пл. 188–189 °С (из смеси 2-пропанол–этанол). ИК спектр, ν, см⁻¹: 3410 (ОН), 1642 (N–C=O). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (*J*, Гц): 1.75 (2H, м, H-8); 2.40 (1H, уш. д, H-9); 2.65 (2H, м, H-11); 2.80 (2H, м, H-2'); 3.02 (2H, м, H-13); 3.09 (1H, уш. д, H-7); 3.20 (1H, м, H-4'); 3.39 (1H, м, H-5'); 3.48 (2H, м, H-6'); 3.72 (1H, м, H-3'); 3.80 (1H, м, H-10a); 3.85 (1H, д, *J*_{10a,10e} = 15.5, H-10e); 4.08 (1H, д, *J*_{1',2'} = 8.8, H-1'β); 4.25 (1H, д, *J*_{1',2'} = 4.5, H-1'α); 6.06 (1H, д, *J*_{5,4} = 6.8,

H-5); 6.18 (1H, д, $J_{3,4} = 9.0$, H-3); 7.30 (1H, д, д, $J_{4,5} = 6.8$, $J_{4,3} = 9.0$, H-4). Найдено, %: C 58.29; H 6.51; N 8.18. $C_{17}H_{24}N_2O_6$. Вычислено, %: C 57.94; H 6.86; N 7.95.

N-(β-D-Глюкопиранозил)цитизин (2) получают аналогично соединению **1**, но время реакции 5 ч. Выделение и кристаллизацию соединения **2** проводят после 3-дневной сушки в эксикаторе над P_2O_5 , остаток кристаллизуют из ацетонитрила. Выход 90%. Т. пл. 183–184 °С. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3406 (OH), 1648 (N–C=O). Спектр ЯМР 1H , δ , м. д. (J , Гц): 1.75 (2H, м, H-8); 2.36 (1H, уш. с, H-9); 2.65 (2H, м, H-11); 2.95 (2H, м, H-4',2'); 3.02 (2H, м, H-13); 3.06 (1H, м, H-7); 3.14 (2H, м, H-6'); 3.38 (1H, м, H-5'); 3.51 (1H, д, $J_{1',2'} = 9.0$, H-1'β); 3.62 (1H, д, д, $J_{3',2'} = 6.0$, $J_{3',4'} = 5.8$, H-3'); 3.72 (1H, д, д, $J_{10a,10e} = 15.0$, $J_{10a,9} = 7.2$, H-10a); 3.85 (1H, д, $J_{10a,10e} = 15.0$, H-10e); 3.98 (1H, д, $J_{1',2'} = 5.1$, H-1'α); 6.07 (1H, д, $J_{5,4} = 6.8$, H-5); 6.18 (1H, д, $J_{3,4} = 9.0$, H-3); 7.30 (1H, д, д, $J_{4,5} = 6.8$, $J_{4,3} = 9.0$, H-4). Найдено, %: C 58.12; H 6.47; N 8.24. $C_{17}H_{24}N_2O_6$. Вычислено, %: C 57.94; H 6.86; N 7.95.

N-(β-D-Ксилопиранозил)цитизин (3) получают аналогично соединению **2**. Выход 77%. Т. пл. 162–164 °С. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3390 (OH), 1642 (N–C=O). Спектр ЯМР 1H , δ , м. д. (J , Гц): 1.73 (2H, м, H-8); 2.35 (1H, уш. с, H-9); 2.55 (2H, м, H-11); 2.72 (1H, уш. д, H-7); 2.89 (1H, т, $J_{2,3} = 10.9$, H-2'); 3.02 (3H, м, H-4',13); 3.16 (2H, м, H-5'); 3.46 (1H, д, $J_{1',2'} = 9.1$, H-1'β); 3.64 (1H, д, д, $J_{3',2'} = 5.5$, $J_{3',4'} = 5.4$, H-3'); 3.71 (1H, д, д, $J_{10a,10e} = 15.3$, $J_{10a,9} = 6.9$, H-10a); 3.84 (1H, д, $J_{10a,10e} = 15.3$, H-10e); 3.93 (1H, уш. с, H-1'α); 6.04 (1H, д, $J_{5,4} = 6.8$, H-5); 6.17 (1H, д, $J_{3,4} = 8.9$, H-3); 7.30 (1H, д, д, $J_{4,5} = 6.8$, $J_{4,3} = 8.9$, H-4). Найдено, %: C 59.92; H 6.60; N 9.04. $C_{16}H_{22}N_2O_5$. Вычислено, %: C 59.61; H 6.88; N 8.69.

N-(β-L-Арабинопиранозил)цитизин (4) получают аналогично соединению **2**. Выход 62%. Т. пл. 175–177 °С. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3390 (OH), 1646 (N–C=O). Спектр ЯМР 1H , δ , м. д. (J , Гц): 1.75 (2H, м, H-8); 2.40 (1H, уш. д, H-9); 2.66 (2H, м, H-11); 2.80 (1H, т, $J_{2',3'} = 9.7$, H-2'); 3.04 (2H, м, H-13); 3.21 (1H, м, H-7); 3.30 (1H, м, H-4'); 3.50 (2H, м, H-5'); 3.63 (1H, д, $J_{1',2'} = 7.2$, H-1'β); 3.73 (1H, м, H-3'); 3.81 (1H, д, д, $J_{10a,10e} = 15.2$, $J_{10a,9} = 6.4$, H-10a); 3.85 (1H, д, $J_{10a,10e} = 15.2$, H-10e); 4.05 (1H, д, $J_{1',2'} = 5.6$, H-1'α); 6.07 (1H, д, $J_{5,4} = 6.7$, H-5); 6.18 (1H, д, $J_{3,4} = 8.5$, H-3); 7.31 (1H, д, д, $J_{4,5} = 6.7$, $J_{4,3} = 8.5$, H-4). Найдено, %: C 60.02; H 7.19; N 9.11. $C_{16}H_{22}N_2O_5$. Вычислено, %: C 59.61; H 6.88; N 8.69.

Биологические исследования. Цитотоксичность N-(β-L-арабинопиранозил)-цитизина, N-(β-D-глюкопиранозил)цитизина и алкалоида цитизина оценивают в тесте выживаемости личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach) 2-дневного возраста в условиях культивирования *in vitro*. Личинки выращивают погружением яиц морских рачков в искусственную морскую воду и инкубируют 48 ч при 37 °С. Навеску каждого исследуемого образца растворяют в 2 мл метанола, затем из этого раствора берут по 500 (3 параллели), 50 (3 параллели), 5 мкл (3 параллели). После испарения метанола в каждый флакон добавляют по 5 мл искусственной морской воды. Таким образом, если начальная масса навески составляет 2 мг, то конечные концентрации образца составят 100, 10 и 1 мкг/мл, соответственно, каждой концентрации в 3 повторениях. В каждый флакон с образцами с помощью пастеровской пипетки сажают по 10 личинок морских рачков *Artemia salina* 2-дневного возраста. После этого все флаконы оставляют при комнатной температуре на свету на 24 ч. По истечении 24 ч пересчитывают выжившие и погибшие личинки. Затем с использованием полученных данных по верхнему и нижнему токсическому лимиту рассчитывают половинную токсическую дозу каждого образца.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Б. Н. Степаненко, *Химия и биохимия углеводов (моносахариды)*, Высшая школа, Москва, 1977, 224 с.
2. Л. С. Красавина, Р. П. Турчина, М. М. Вигдорчик, К. Ф. Турчин, Р. Н. Ахвледзани, Н. Н. Суворов, *ЖОрХ*, **24**, 1960 (1988).
3. М. А. Салех, Л. С. Красавина, М. М. Вигдорчик, К. Ф. Турчин, А. А. Сапукова, О. С. Анисимова, Н. Н. Суворов, *ЖОрХ*, **25**, 2619 (1989).
4. А. М. Газалиев, О. А. Нуркенов, И. В. Кулаков, А. А. Айнабаев, Д. В. Бессонов, *Журн. прикл. химии*, **79**, 517 (2006).
5. Р. К. Сарымзакова, Ю. А. Абдурашитова, Ж. А. Джаманбаев, *Вестн. МГУ, Сер. 2. Химия*, **47**, 242 (2006).
6. И. В. Кулаков, А. И. Ильин, Ж. А. Кабыл, А. М. Газалиев, *Изв. АН, Сер. хим.*, 2393 (2008).
7. Д. В. Бессонов, И. В. Кулаков, А. М. Газалиев, О. А. Нуркенов, *Журн. прикл. химии*, **80**, 510 (2007).
8. И. В. Кулаков, *ЖОХ*, **79**, 147 (2009).
9. F. H. Allen, O. Kennard, D. G. Watson, L. Brammer, A. G. Orpen, R. Taylor, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, No. 12, S1 (1987).
10. A. A. Freer, D. J. Robins, G. N. Shelldrake, *Acta Crystallogr.*, **C43**, 1119 (1987).
11. А. М. Газалиев, К. М. Турдыбеков, С. В. Линдеман, Ю. Т. Стручков, Б. И. Тулеуов, М. Ж. Журинов, *ЖОХ*, **62**, 456 (1992).
12. О. А. Нуркенов, А. М. Газалиев, А. Б. Шалбаева, К. М. Турдыбеков, М. Ж. Журинов, А. Аубакирова, *ЖОХ*, **69**, 675 (1999).
13. R. E. Reeves, in: *Advances in Carbohydrate Chemistry*, C. S. Hudson, S. M. Cantor (Eds.), 1951, vol. 6, p.107.
14. M. C. Burla, M. Camalli, B. Carrozzini, G. L. Cascarano, C. Giacovazzo, G. Polidori, R. Spagna, SIR2002: the program, *J. Appl. Crystallogr.*, **36**, 1103, Pt. 4 (2003).
15. G. M. Sheldrick, SHELXL-97 – Crystal Structure Refinement – dos/win95/nt version + 1993-97, Release 97-2.

*Институт органического синтеза и углеродной химии
Республики Казахстан, Караганда 100008, Казахстан
e-mail: kulakov_iv@mail.ru*

Поступило 05.06.2009

^a*Научно-производственный центр
"Фитохимия" МОН РК, Караганда 100009, Казахстан*