

УДК 615.322.015:633.13

СИНТЕЗ И АНТИРЕЗИСТЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ АЦИЛИРОВАННЫХ И СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЭЛЛАГОВОЙ КИСЛОТЫ

Мустафа Али Альхуссейн, А.В.Мартынов

ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И.Мечникова НАМН Украины»
61057, г. Харьков, ул. Пушкинская, 14. E-mail: imiamn@ukr.net

Ключевые слова: эллаговая кислота; ацилирование; сукцинирование; ВЭЖХ; ЯМР ¹H; антибактериальные свойства; противогрибковые свойства

Целью исследований было получение новых, более растворимых и биологически активных производных эллаговой кислоты через ацилирование фенольных гидроксилы и получение супрамолекулярных комплексов с циклодекстринами, изучение способности синтезированных производных снимать резистентность микроорганизмов к аминогликозидным антибиотикам (на примере гентамицина). В работе представлены результаты исследований синтезированных ацилированных производных эллаговой кислоты и ее супрамолекулярных производных с β -циклодекстрином. Структура синтезированных соединений подтверждена ЯМР ¹H-спектроскопически и с применением ВЭЖХ с мультимолновым УФ-детектором. Показано, что в субэффективных концентрациях (0,001% раствор) при отсутствии прямых антимикробных и антигрибковых свойств тетра-сукцинил-дигалловая кислота (5) проявила способность восстанавливать чувствительность к гентамицину у полирезистентных штаммов микроорганизмов и чувствительность к нистатину у резистентных к нему грибов. Показано, что клатратные комплексы эллаготанина с β -циклодекстрином не обладали антирезистентной активностью равно как и другие ацилированные производные эллаговой кислоты.

SYNTHESIS AND THE ANTIRESTANT ACTIVITY OF ACYLATED AND SUPRAMOLECULAR DERIVATIVES OF ELLAGIC ACID

Alhussein Mustafa Ali, A.V.Martynov

Key words: ellagic acid; acylation; succinylation; HPLC (high-performance liquid chromatography); NMR ¹H (nuclear magnetic resonance); antibacterial properties; antifungal properties

The aim of our research was to obtain new, more soluble and biologically active derivatives of ellagic acid through acylation of phenol hydroxyls and obtaining supramolecular complexes with cyclodextrins, as well as to study the ability of the derivatives synthesized to eliminate the microorganism resistance to aminoglycoside antibiotics (by the example of gentamicin). The article represents the research results of the acylated derivatives of ellagic acid and its supramolecular derivatives with β -cyclodextrins. The structure of the compounds synthesized has been confirmed by NMR¹H -spectroscopy and HPLC with a multiwave ultraviolet-detector. It has been shown that in sub-effective concentrations (0.001% solution) in the absence of direct antimicrobial and antifungal properties, tetrasuccinyl-digallic acid (5) reveals the ability to reduce sensitivity to gentamicin in polyresistant strains of microorganisms and sensitivity to nystatin in fungi resistant to it. It has been found that clathrate complexes of ellagotannin with β -cyclodextrins have no antiresistant activity, as well as other acylated derivatives of ellagic acid.

СИНТЕЗ І АНТИРЕЗИСТЕНТНА АКТИВНІСТЬ АЦИЛЬОВАНИХ ТА СУПРАМОЛЕКУЛЯРНИХ ПОХІДНИХ ЕЛЛАГОВОЇ КИСЛОТИ

Мустафа Алі Альхуссейн, А.В.Мартинюв

Ключові слова: елагова кислота; ацилювання; сукцинілювання; ВЕРХ; ЯМР ¹H; антибактеріальні властивості; протигрибкові властивості

Метою дослідження було отримання нових, більш розчинних та біологічно активних похідних елагової кислоти через ацилювання фенольних гідроксилів і отримання супрамолекулярних комплексів з циклодекстринами, вивчення здатності синтезованих похідних знімати резистентність мікроорганізмів до аміноглікозидних антибіотиків (на прикладі гентаміцину). У роботі представлені результати досліджень синтезованих ацильованих похідних елагової кислоти та її супрамолекулярних похідних з β -циклодекстрином. Структура синтезованих сполук підтверджена ЯМР ¹H-спектроскопічними та із застосуванням ВЕРХ з мультимолновим УФ-детектором. Показано, що в субефективних концентраціях (0,001% розчин) при відсутності прямих антимікробних та антигрибкових властивостей тетра-сукциніл-дигалова кислота (5) проявила здатність відновлювати чутливість до гентаміцину у резистентних штамів мікроорганізмів та чутливість до нистатину у полірезистентних до нього грибів. Показано, що клатратні комплекси елаготаніну з β -циклодекстрином не володіли антирезистентною активністю так само як і інші ацильовані похідні елагової кислоти.

Эллаговая кислота представляет собой полифенольное соединение, состоящее из двух остатков галловой кислоты [1]. В форме разных производных с галловой кислотой и гликозидов она входит в состав многих лекарственных растений,

особенно семейства Миртовых [2, 3, 4]. Биологическая активность гликозидов эллаговой кислоты довольно хорошо изучена: от антимикробной, противовирусной, противораковой до антиоксидантной и кардиопротекторной [5, 6, 7]. В Украи-

не планируется к выпуску препарат на основе эллаговой кислоты Элгацин [8]. В отличие от известных природных производных эллаговой кислоты Элгацин представляет собой агликон или чистую эллаговую кислоту. Проблемой с внедрением данного препарата стала практически полная его нерастворимость в доступных для применения человеку жидкостях и соответственно низкая биодоступность. Но даже этой низкой биодоступности оказалось достаточно для проявления антиоксидантной и кардиопротекторной активности его таблетированной формы. С точки зрения химии представляют интерес фенольные гидроксилы эллаговой кислоты, весьма реакционноспособные и доступные для замещения в реакциях ацилирования и алкилирования. Ранее проведенные нами исследования подтвердили умеренную антимикробную активность высокомолекулярных производных эллаговой кислоты. Увеличить растворимость эллаговой кислоты можно либо путем ацилирования части фенольных гидроксилы и/или получения супрамолекулярных комплексов с циклодекстринами. Последнее направление исследований является весьма перспективным, т. к. именно гликозиды эллаговой кислоты проявили максимальную биологическую активность.

Целью исследований было получение новых, более растворимых и биологически активных производных эллаговой кислоты через ацилирование фенольных гидроксилы и получение супрамолекулярных комплексов с циклодекстринами, изучение способности синтезированных производных снимать резистентность микроорганизмов к аминогликозидным антибиотикам (на примере гентамицина). Элгацин в чистом виде был любезно предоставлен для исследований ПАТ «Борщаговский химфармзавод».

На рис. 1 приведена схема синтеза производных эллаговой кислоты **4**, **5**. В случае реакции в среде ледяной уксусной кислоты в результате синтеза образовывались дизамещенные производные **4a** и **4b**, но только по пара-положениям. В случае, если реакция происходила в среде ДМФА в присутствии гидроксида натрия, наблюдалось частичное раскрытие цикла эллаговой кислоты, и продукт реакции в виде натриевой соли после ацилирования давал уже продукт с четырьмя замещенными группами **5a** и **5b**. Бис-сукцинированный и бис-малеилированный продукты **4a** и **4b** были менее растворимы в полярных растворителях (воде, метаноле и этаноле), чем тетра-сукцинированный и тетра-малеилированный продукт **5a** и **5b**. Также следует обратить внимание на тот факт, что исходное соединение **1** было практически нерастворимо в полярных растворителях, в т. ч. ДМСО и ДМФА. Для проведения ре-

акции мы были вынуждены растворить **1** в смеси ДМФА и ледяной уксусной кислоты при нагревании. При этом продукт частичного раскрытия цикла эллаговой кислоты **2** легко растворялся в воде и метаноле и имел красную окраску. Исходя из данных HPLC, соединения **4** и **5** не являлись индивидуальными химически чистыми веществами, а представляли собой комбинаторную смесь от замещенного только по одной из групп до полностью замещенного по всем группам производного. На рис. 1 представлены полностью замещенные производные. Даже при значительном избытке ацилирующего агента реакция полного замещения всех доступных фенольных групп не идет. На рис. 2 показана HPLC [9] хроматограмма конечного продукта **5** при 255 нм, максимума, характерного для производных дигалловой кислоты (см. рисунок УФ-спектра эллаговой кислоты [10]). В растворах, особенно полярных, существует равновесие между эллаговой кислотой (**1**) и ее солями (**2**) и, вероятно, исходным соединением **1**. Данный феномен характерен не только для эллаговой кислоты, но и для галловой и для их более высокомолекулярных производных – таннидов.

Синтезированные системы довольно хорошо идентифицируются ЯМР¹H спектроскопически, хотя и представляют собой сложные неразделимые надмолекулярные системы.

Другой вариант получения растворимого **1** состоит в получении его комплекса включения с β -циклодекстрином (β -ЦД). На рис. 2 представлен результат моделирования комплекса включения с эллаговой кислотой с использованием полуэмпирического алгоритма Bio+ после оптимизации MM2. Данное моделирование было необходимо для определения целесообразности дальнейшего поиска методов синтеза комплекса включения между **1** и β -ЦД. Как видно из рис. 2, эллаговая кислота вполне соответствует размеру гидрофобной полости β -циклодекстрина. В связи с тем, что β -циклодекстрин растворим только в воде, а **1** нерастворим в воде вообще, возникла проблема получения комплекса включения. Нами было предложено несколько методов синтеза комплексов включения: впрыскивание раствора **1** в пиридине в 1% водный раствор β -ЦД с последующим охлаждением раствора до 5°C. При этом наблюдалась кристаллизация на дне колбы комплекса включения, что подтверждалось его растворимостью в воде вплоть до 2% при сохранении идентичного **1** спектра УФ-поглощения. Другой способ состоял в добавлении сухого измельченного **1** к раствору β -ЦД с последующей обработкой раствора ультразвуком и конденсацией комплекса включения охлаждением раствора до 5°C. В последнем случае выход конечного продукта,

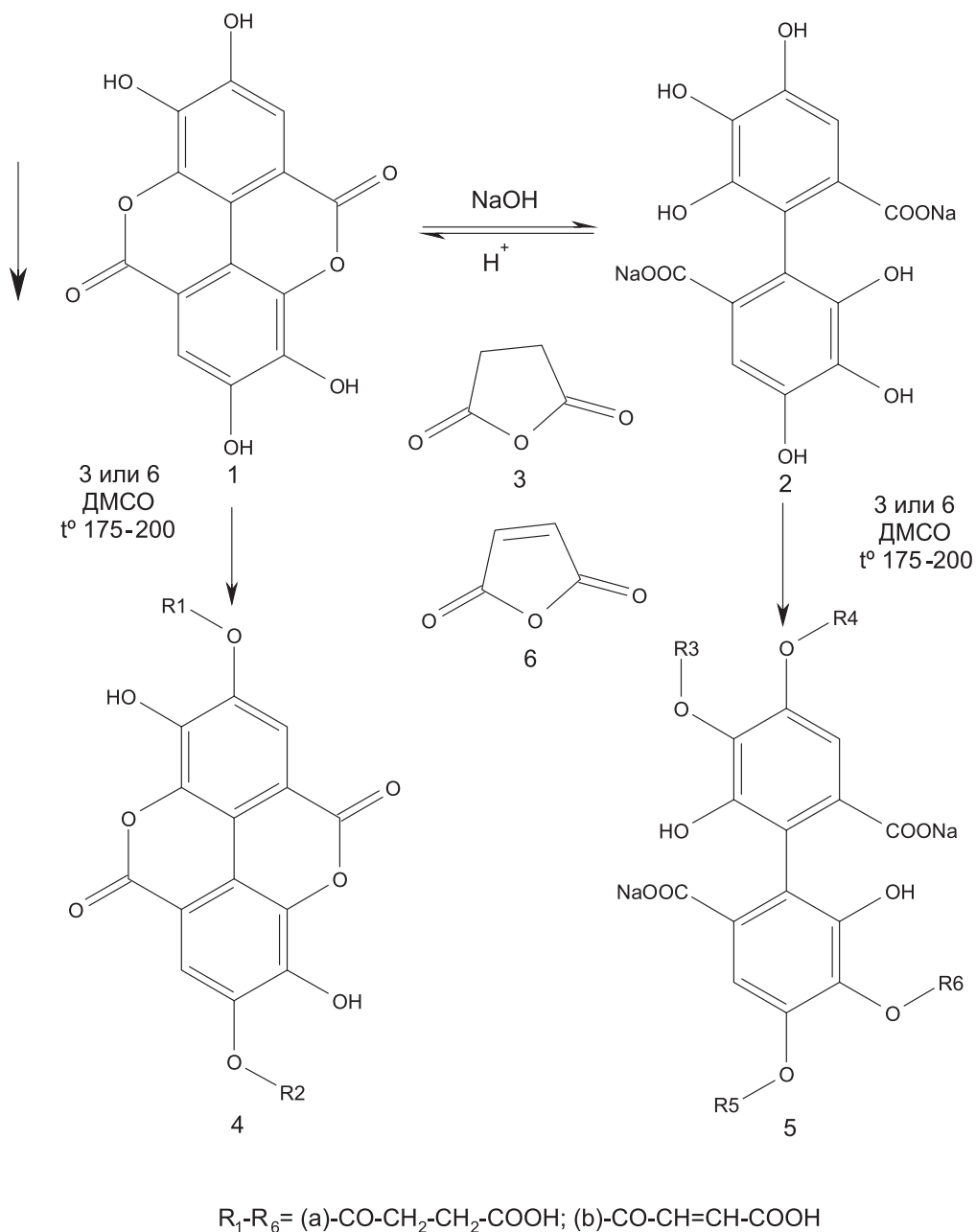


Рис. 1. Синтез ацилированных производных эллаговой кислоты.

растворимого в воде, оказался значительно ниже ($12 \pm 3\%$) как планируемого ($70 \pm 10\%$), так и выхода продукта в первом методе ($52 \pm 7\%$). В любом случае, метод 1 позволил получить полностью растворимый в воде эллаготанин в виде комплекса включения с β -ЦД с возможностью создания растворов со стабильными концентрациями вплоть до 2%. Комплексы 1 с β -ЦД отличались от чистого 1 только повышенной растворимостью в воде, а при попытке их растворения в чистом ДМСО разрушались до образования белых кристаллов β -ЦД и раствора (1). УФ-спектр полученного раствора соответствовал спектру эллаговой кислоты.

Антирезистентная активность изучалась в суб-эффективных дозах, когда вещество не проявляет противомикробной и противогрибковой активности, но значительно потенцирует действие

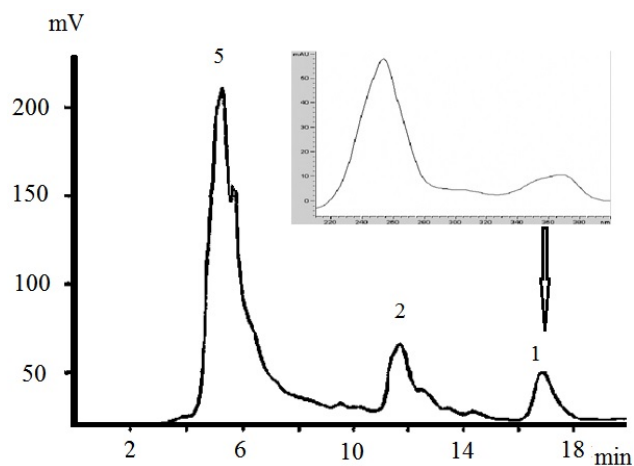


Рис. 2. Фрагмент HPLC-хроматограммы и УФ-спектр эллаготанина (1); натриевая соль дигалловой кислоты (2); тетраsuccинилдигалловая кислота (5).

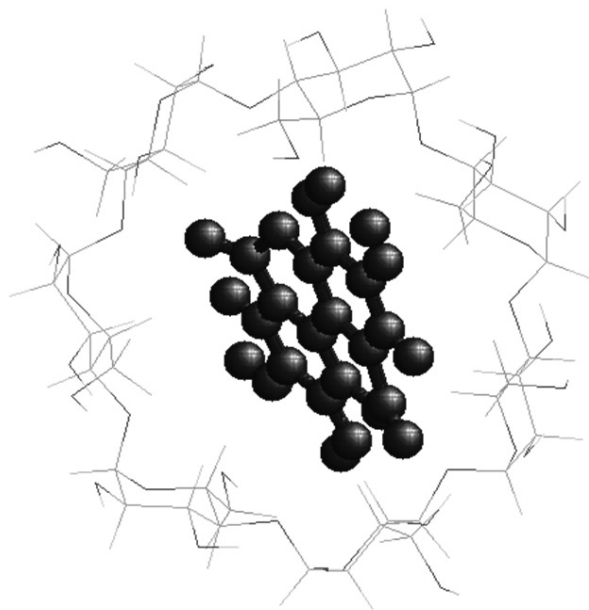


Рис. 3. Результат моделирования включения молекулы эллаготаннина в комплекс с β -ЦД.

противомикробных средств либо «отменяет» устойчивость микроорганизмов к распространенным антибиотикам и антимикробным препаратам. Для исследования антимикробных свойств использовали гентамицин и резистентные к нему штаммы микроорганизмов лаборатории клинической микробиологии и лаборатории биохимии микроорганизмов и питательных сред ГП «ИМИ НАМН» штаммы *S. aureus poly-2008*, *P. aeruginosa Port 293*, а также резистентные к нистатину *C. albicans rts232*, *A. niger rs33*. Антирезистентная и антимикробная активность изучались согласно метода серийных разведений.

Экспериментальная часть

Для детального изучения качественного состава применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) как один из самых надежных для определения индивидуальных фенольных соединений [12]. Для идентификации фенольных соединений использовали стандартные образцы фенолоксилов. Критериями для

Таблица 1

Противомикробная активность гентамицина 0,1% в отношении резистентных форм микроорганизмов

Экспозиция в присутствии микроорганизмов (1 мл раствора на 5 мл среды)	Требования ЕР-2012		Количество микроорганизмов, КОЕ/мл			
	количество бактерий КОЕ/мл	количество грибов КОЕ/мл	<i>S. aureus poly-2008</i>	<i>P. aeruginosa Port 293</i>	<i>C. albicans rts232</i>	<i>A. niger rs33</i>
			$8,90 \cdot 10^5$	$5,90 \cdot 10^6$	$1,50 \cdot 10^5$	$1,80 \cdot 10^5$
2 дня	НР	НР	$8,21 \cdot 10^5$	$5,50 \cdot 10^6$	$1,11 \cdot 10^5$	$1,11 \cdot 10^5$
7 дней	НР	НР	$1,59 \cdot 10^4$	$1,47 \cdot 10^4$	$5,00 \cdot 10^4$	$1,70 \cdot 10^4$
14 дней	НР	НР	$1,50 \cdot 10^3$	$6,56 \cdot 10^2$	$6,50 \cdot 10^2$	$7,00 \cdot 10^2$
28 дней	НР	НР	$5,70 \cdot 10^2$	$1,15 \cdot 10^2$	$3,20 \cdot 10^2$	$2,70 \cdot 10^5$

* – Наведено для контролю відсутності антигрибкових властивостей у композиції.

Таблица 2

Противомикробная и противогрибковая активность соответственно 0,1% гентамицина и 0,1% нистатина в присутствии 0,001% антирезистентного компонента (5а*) на резистентные формы микроорганизмов

Экспозиция в присутствии микроорганизмов (1 мл раствора на 5 мл среды)	Требования ЕР-2012		Количество микроорганизмов, КОЕ/мл			
	количество бактерий КОЕ/мл	количество грибов КОЕ/мл	<i>S. aureus poly-2008</i>	<i>P. aeruginosa Port 293</i>	<i>C. albicans rts232</i>	<i>A. niger rs33</i>
День внесения	–	–	$8,00 \cdot 10^5$	$5,00 \cdot 10^6$	$1,00 \cdot 10^5$	$1,11 \cdot 10^5$
2 дня	НР	НР	НР	НР	НР	НР
7 дней	НР	НР	НР	НР	НР	1 НР
14 дней	НР	НР	НР	НР	НР	НР
28 дней	НР	НР	НР	НР	$1,20 \cdot 10^2$	$1,10 \cdot 10^2$

* – Предварительные данные скрининга других производных показали: соединения 4а,б; 5б и комплекс 1 с β -ЦД в субэффективных концентрациях не проявили антирезистентных свойств.

идентификации компонентов были времена удерживания исследуемых веществ, УФ-спектры, базы данных и обзорные статьи по основным спектральным характеристикам дубильных кислот [13]. Анализ проб выполняли на аналитической ВЭЖХ-системе, состоящей из жидкостного хроматографа «Agilent 1200» с диодно-матричным детектором и системы для сбора и обработки хроматографических данных ChemStation. Диодно-матричный детектор позволил осуществить детектирование и запись спектров поглощения в диапазоне длин волн 255-370 нм [14]. Разделение осуществляли на колонке Zorbax SB-C18 размером 4,6×150 мм с диаметром частиц 5 мкм при градиентном режиме элюирования. В подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0,1%) изменялось от 50 до 52% за 18 мин. Скорость потока элюента – 1 мл/мин. Объем вводимой пробы – 5 мкл. Температура колонки – 27°C. Детектирование – при λ 360 (агликоны) [15]. Перед использованием подвижную фазу фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Для приготовления подвижных фаз использовали метанол, ортофосфорную кислоту, бидистиллированную деионизированную воду. Стандартные растворы готовили в концентрации 10 мкг/мл [16].

ЯМР ^1H спектр соединений 4 и 5 записывали на спектрометре Bruker WM (300 МГц); растворитель ДМСО- d_6 .

Тетрасукцинил-дигалловой кислоты динатриевая соль (5а). В пиридиновый раствор 0,005 Моль (1) добавляли 0,01 Моль NaOH в пиридине, осадок растворялся, и раствор приобретал красную окраску. К полученному раствору прибавляли 0,02 Моль (3), раствор перемешивали до растворения осадка 3, выдерживали 20 минут на водяной бане при 100°C, охлаждали, добавляли двукратный раствор этанола. Через 60 минут образовывался осадок (5а), который отфильтровывали. Выход – 60%. Т. пл. – 175-200°C. NMR ^1H δ , м.д. 5,37 (s, 2H, Ph-OH), 11,6 (s, 4H, -COOH), 7,65 (s, 2H, Ar-H), 2,72 (s, 8H, -CH $_2$ -).

Дисукцинил-эллаговая кислота (4а). В ледяную уксусную кислоту вливают предварительно растворенный в пиридине 0,005 Моль (1), всыпают 0,01 Моль (3), греют с обратным холодильником 30 минут, раствор охлаждают. Выпавший осадок (4а) отфильтровывают. Выход – 62%. Т. пл. – 175-200°C. NMR ^1H δ , м.д. 5,35 (s, 2H, Ph-OH), 11,6 (s, 2H, -COOH), 7,84 (s, 2H, Ar-H), 2,72 (s, 4H, -CH $_2$ -).

Тетрамалеинил-дигалловой кислоты динатриевая соль (5б). В пиридиновый раствор

0,005 Моль (1) добавляли 0,01 Моль NaOH в пиридине, осадок растворялся, и раствор приобретал красную окраску. К полученному раствору прибавляли 0,02 Моль (6), раствор перемешивали до растворения осадка (6), выдерживали 20 минут на водяной бане при 100°C, охлаждали, добавляли двукратный раствор этанола. Через 60 минут образовывался осадок (5б), который отфильтровывали. Выход – 43%. Т. пл. – 175-200°C. NMR ^1H δ , м.д. 5,37 (s, 2H, Ph-OH), 11,8 (s, 4H, -COOH), 7,63 (s, 2H, Ar-H), 6,35 (d, 4H, -CH=), 6,50 (d, 4H, -CH=).

Дималеинил-эллаговая кислота (4б). В ледяную уксусную кислоту вливают предварительно растворенный в пиридине 0,005 Моль (1), всыпают 0,01 Моль (6), греют с обратным холодильником 30 минут, раствор охлаждают. Выпавший осадок (4б) отфильтровывают. Выход – 47%. Т. пл. – 175-200°C. NMR ^1H δ , м.д. 5,35 (s, 2H, Ph-OH), 11,6 (s, 2H, -COOH), 7,84 (s, 2H, Ar-H), 6,35 (d, 4H, -CH=), 6,51 (d, 4H, -CH=).

Метод 1: комплекс (1) и β -ЦД. В 1% водный раствор 0,01 Моль β -ЦД впрыскивали при перемешивании 0,01 Моль (1) в пиридине, затем раствор охлаждали до +5°C, выпавший осадок комплекса отфильтровывали и высушивали, отмывали этанолом от пиридина и снова высушивали. Выход – 52%. Растворимость осадка – до 2% в воде. UV (mn): 255, 370.

Метод 2: комплекс (1) и β -ЦД. В 1% водный раствор 0,01 Моль β -ЦД всыпали предварительно измельченный в пыль 0,01 Моль (1) и полученный раствор обрабатывали ультразвуком с частотой 44 кГц мощностью 900Вт на установке УЗДН-2Т 15 минут. Затем раствор отфильтровывали через складчатый фильтр «красная лента», невключенный в комплекс осадок отбрасывали. Надосадочную жидкость охлаждали до +5°C, выпавший осадок комплекса отфильтровывали и высушивали. Выход – 12%. Растворимость осадка – до 2% в воде. UV (mn): 255, 370.

Выводы

1. Наиболее перспективным соединением для дальнейшего исследования и внедрения, которое в субэффективных концентрациях восстанавливает чувствительность микроорганизмов к антимикробным препаратам, а грибов к антигрибковым (нистатину), является тетрасукцинил-дигалловая кислота (5).

2. Хотя и удалось получить растворимый в воде комплекс включения эллаговой кислоты с β -циклодекстрином, он все же не проявил антимикробной и антирезистентной активности.

Литература

1. Ghasemzadeh A., Ghasemzadeh N. J. *Med. Plant Res.*, 2011, Vol. 5, No.31, pp.6697-6703.
2. Masuda T., Yonemori S., Oyama Y. et al. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, Vol. 47, No.4, pp.1749-1754.
3. Chung K.-T., Wong T. Y., Wei C.-I. et al. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1998, Vol. 38, No.6, pp.421-464.

4. Tanaka T, Nonaka G. I., Nishioka I. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1986, Vol. 34, No.2, pp.650-655.
5. Сахарова Т. С., Нікітченко Ю. В., Дзюба В. М. *Медицина хімія*, 2003, Т. 5, №2, С.52-55.
6. Яковлева Л. В., Сахарова Т. С. *Український біохімічний журнал*, 2002, Т. 74, №4а, С.93-94.
7. Marzo F, Tosar A., Santidrian S. *Journal of Animal Science*, 1990, Vol. 68, No.10, pp.3306-3312.
8. Хардід О. А., Цимбал Л. В., Сахарова Т. С. *Фізіологічно активні речовини*, 2002, №1(33), С.81-83.
9. Francisco M., Resurreccion A. *Food Chem.*, 2009, Vol. 117, pp.356-363.
10. Kale A., Gaikwad S., Mundhe K., Deshpande N., Salvekar J. *Int. J. Pharma Bio. Sci.*, 2010, Vol. 1, pp.1-4.
11. Machado T. D. B., Leal I. C. R., Amaral A. C. F. et al. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2002, Vol. 13, No.5, pp.606-610.
12. Robards K. *Journal of Chromatography*, 2003, Vol. 1000, No.1-2, pp.657-691.
13. Qu W., Breksa A. P., Pan Z., Ma H., *Food Chemistry*, 2012, Vol. 132, No.3, pp.1585-1591.
14. Khoddami A., Wilkes M. A., Roberts T. H. *Molecules*, 2013, Vol. 18, pp.2328-2375.
15. Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L. (*Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons). New York, NY, USA, 2nd ed., 1997.
16. Bressolle F., Bromet-Petit M., Audran M. *Journal of Chromatography*, 1996, Vol. 686, No.1, pp.3-10.

Надійшла до редакції 08.10.2014 р.