УДК 547.94 + 541.13

СИНТЕЗ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ О,О-ДИМЕТИЛ-N-ЦИТИЗИНИЛФОСФАТА

¹Кабиева С.К., ²Нуркенов О.А., ³Бакибаев А.А., ¹Газалиев А.М., ¹Такибаева А.Т., ³Воронова О.А., ³Плотников Е.В., ²Исаева А.Ж.

¹Карагандинский государственный технический университет, Караганда; ²Институт органического синтеза и углехимии РК, Караганда; ³Томский политехнический университет, Томск, e-mail: kabieva.s@mail.ru

В статье приведены данные по синтезу, строению и изучению влияния O,O-диметил-N-цитизинилфосфата (цитафата) на процесс электровосстановления кислорода (ЭВ O_2) в различных концентрациях. В качестве метода оценки применена катодная вольтамперометрия на ртутно-пленочном электроде. В данном подходе определение антиоксидантной активности отражало количество активных форм кислорода, нейтрализованных антиоксидантом за определенное время. Показано, что водный раствор цитафата проявляет антиоксидантную активность.

Ключевые слова: О,О-диметил-N-цитизинилфосфат, антиоксидантная активность, вольтамперометрия, электровосстановление кислорода (ЭВ О,)

SYNTHESIS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF O,O-DIMETYL-N-CYTISINILPHOSPHAT

¹Kabieva S.K., ²Nurkenov O.A., ³Bakibaev A.A., ¹Gazaliev A.M., ¹Takibaeva A.T., ³Voronova O.A., ³Plotnikov E.V., ²Isaeva A.Z.

¹Karaganda State Technical University, Karaganda; ²Organic synthesis and carbon chemistry Institute Republic of Kazakhstan, Karaganda; ³Tomsk Polytechnic University, Tomsk, e-mail: kabieva.s@mail.ru

Electrochemical properties and influence on oxygen electroreduction process of O,O-dimetyl-N-cytisinilphosphate (cytaphat) at various concentrations have been investigated in this work. Cathodic voltammetry on a mercury film electrode was applied as an estimation method. Voltammetric approach reflects the amount of active oxygen radicals being scavenged by the antioxidants within certain time. It was revealed, cytaphat exhibits antioxidant properties in water solution.

Keywords: O,O-dimetyl-N-cytisinilphosphate, antioxidant activity, voltammetry, oxygen electroreduction (ER O₂)

Известно, что в результате метаболических превращений веществ в организме человека образуются токсичные свободные радикалы кислорода [1]. Они образуются в реакциях перекисного окисления липидов, метаболизме различных препаратов, воздействии внешних факторов (действие ультрафиолета, ионизирующее облучение). Образовавшись в организме, они вступают во взаимодействие со структурами клетки, приводя в конечном счете к поражению мембран клеток, сопутствуя, таким образом, развитию патологического процесса при многих заболеваниях. В норме регуляция продукции активированных кислородных метаболитов и свободных радикалов в тканях и органах человека осуществляется многоуровневой физиологической антиоксидантной системой, которая включает в себя соединения различной химической природы: витамины, пигменты, гормоны, ферменты [2]. Несмотря на высокую эффективность антиоксидантной системы, она не всегда способна защитить организм человека от развития оксидантного стресса. В связи с этим одним из приоритетных направлений свободнорадикальной биохимии и медицины является создание препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами, с целью применения их для профилактики и лечения заболеваний, сопровождающихся усилением свободнорадикальных реакций. Широкие перспективы для практического использования в качестве лекарственных препаратов антиоксидантного действия представляют биологически активные вещества природного происхождения, например вещества алкалоидов хинолизидинового ряда. Интерес к исследованиям по химической модификации и свойствам алкалоида цитизина обусловлен широким спектром биологической активности производных цитизина [3, 4]. В этой связи получение новых производных алкалоида цитизина, исследование их структуры и фармакологической активности является актуальной задачей современной химии и медицины.

Цель исследования

Осуществить синтез и изучить антиоксидантную активность О,О-диметил-N- цитизинилфосфата (цитафата) в отношении кислородных радикалов методом катодной вольтамперометрии.

Материалы и методы исследования

ИК спектр снимали на спектрометре с Фурьепреобразователем AVATAR-320 Nicolet в таблетках с КВг. Спектр ЯМР¹Н записан на спектрометре Bruker 400 (400 МГц) в растворе ДМСО- $d_{\rm 6}$ относительно внутреннего стандарта — ТМС. Температуру плавления вещества определили на приборе Boetius.

Синтез О,О-диметил-N-цитизинилфосфата. К смеси 2,86 г диметилфосфита и 24,6 г четырех-хлористого углерода в 100 мл абсолютного бензола прикапывали при температуре 0–10 °С смесь 5 г цитизина и 2,63 г триэтиламина в 100 мл абсолютного бензола. Затем смесь перемешивали в течение 5 ч при комнатной температуре. Отфильтровывали и промывали гидрохлорид триэтиламина, отгоняли растворитель. Получили 5,6 г (72,1%) продукта (перекристаллизация из бензола) с т.пл. 156 °С.

Исходные растворы исследуемых веществ с концентрацией 0,1 г/мл готовили следующим образом: на аналитических весах взвешивали 0,5 г образца и растворяли в 5 мл. Далее растворы с концентрацией 0,01 г/мл и 0,001 г/мл готовили последующим разбавлением дистиллированной водой в пенициллиновых флаконах объемом 10 мл.

Для исследований брали объем аликвоты 0,1 мл, соответственно концентрация исследуемых растворов представлена в таблице.

Методика эксперимента заключалась в съемке вольтамперограмм катодного ЭВО, с помощью вольтамперометрического анализатора, подключенного совместно с ПК [5]. Использовался постояннотоковый режим катодной вольтамперометрии, скорость развертки потенциала W = 30 мB/c, рабочий диапазон потенциалов от 0,0 до - 0,7 В, время перемешивания раствора 20 сек, время успокоения 10 сек. Электрохимическая ячейка представляла собой стеклянный стаканчик с раствором фонового электролита и опущенными в него индикаторным ртутно-пленочным электродом, хлорид-серебряным электродом сравнения и хлорид-серебряным вспомогательным электродом. В качестве фонового раствора выбран фосфатный буфер с рН 6,86, близким к физиологическому значению, объемом 10 мл.

Результаты исследования и их обсуждение

С целью поиска и изучения свойств новых биоактивных веществ на основе алкалоида цитизина нами осуществлен синтез О,Одиметил-N-цитизинилфосфата (цитафата) в условиях реакции Тодда-Атертона. Синтез О,О-диметил-N-цитизинилфосфата осуществляли взаимодействием О,О-диметилфосфита с цитизином в среде абсолютного бензола в присутствии четыреххлористого углерода и триэтиламина по следующей схеме:

$$NH_{+}$$
 (CH₃O)₂P(O)H + CCl₄ +(C₂H₅)₃N \longrightarrow О О СН₃ + CHCl₃ + (C₂H₅)₃N·HCl О СН₃

Синтезированный целевой продукт представляет собой белое кристаллическое вещество, легко растворим в воде, спирте, ацетоне и хлороформе, практически не растворим в эфире.

В ИК спектре данного соединения присутствуют интенсивные полосы поглощения, характерные для фосфорильной группы (P=O) при 1265–1270 см⁻¹, а в области 1025–1050 см⁻¹ – для P-O-С-группы.

При анализе ЯМР¹Н спектра цитафата три группы сигналов низкого поля соответствуют протонам α-пиридинового ядра. Сигналы при 7,30 м.д. соответствуют β-протону. Расщепленный дублет при 6,09 м.д. соответствует γ-протону, а расщепленный дублет при 6,36 м.д. – α-протону. Следующая группа линий, представляющая собой сложный сигнал в области 3,81—

4,12 м.д., соответствует аксиальному и экваториальному протонам в положении С10 Эта группа сигналов является АВ-частью системы АВХ, где Х – протон в положении C_9 . Экваториальный протон при C_{10} смещен в более слабое поле по сравнению с аксиальным. Группа линий в области 3,52–3,60 м.д. представляет собой сигналы пяти протонов, находящихся при C_{11} , C_{13} , и третичного протона С₇. Протоны метокси-группы у атома фосфора неэквивалентны, и они проявляются в области 3,30 и 3,44 м.д. в виде двух расщепленных дублетов. Два третичных протона в положениях С, и С, у метиленового мостика не эквивалентны, так как протон при С₇ находится в α-положении к двойной связи и подвержен влиянию анизотропии к ней, вследствие чего смещен в более слабое поле (б 3,03-3,10 м.д.) относительно протона C_9 . А широкий сигналет в области 2,43 м.д. принадлежит протону C_9 . Группа линий в области 1,91–2,03 м.д. относится к протонам при C_{11} и C_{13} .

Продолжая исследования фармакологической активности O,O-диметил-Nцитизинилфосфата, изучили его антиоксидантную активность с применением вольтамперограмм катодного $ЭВ O_2$ с помощью вольтамперометрического анализатора при различных концентрациях.

Активность образцов определяли, используя метод катодной вольтамперометрии, в частности процесс электровосстановления кислорода (ЭВ $\rm O_2$). Модельная реакция ЭВ $\rm O_2$ протекает на электроде по механизму, аналогичному восстановлению кислорода в тканях и клетках организма:

$$O_2 + e^- \longleftrightarrow O_2^{\bullet-}$$
 (1)

$$O_{2}^{-} + H^{+} \longleftrightarrow HO_{2}^{-}$$
 (2)

$$HO_2$$
 + H^+ + $e^- \longleftrightarrow H_2O_2$ (3)

$$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \iff 2H_2O$$
 (4)

В данном случае рассматривается первая волна ЭВ O_2 (восстановление кислорода до пероксида водорода) с образованием активных кислородных радикалов: O_2^- , $HO_2^{-\times}$ (выражения 1–3). Предполагается, что вещества реагируют с кислородом и его активными радикалами на поверхности индикаторного электрода, что отражается в изменении катодного тока ЭВ O_2 [6].

Активность исследуемого вещества по отношению к ЭВ O_2 определялась по следующей методике: снимались вольтамперограммы тока ЭВ O_2 в отсутствии исследуемого вещества (фоновая кривая) по описанному выше способу. При отсутствии посторонних пиков фоновый раствор считался чистым. Затем в ячейку добавлялось исследуемое вещество с известной концентрацией (брали объем аликвоты 0,1 мл на 10 мл объема фонового электролита) и снималась катодная вольтамперограмма ЭВ O_2 при тех же условиях. Измерения повторялись не менее 3 раз через определенный промежуток времени

(180 с) и каждый раз оценивалось значение предельного тока ЭВ О₃.

Изменение тока ЭВ O_2 по своему абсолютному значению свидетельствует о том, что исследуемые образцы реагируют с кислородом и его активными радикалами в исследуемом растворе. Степень изменения тока ЭВ O_2 являлась показателем активности исследуемого образца.

По полученным данным строилась зависимость относительного изменения тока

ЭВ
$$O_2 \left(1 - \frac{I}{I_0}\right)$$
 от времени протекания про-

цесса в присутствии одной концентрации исследуемого образца.

По линейной части графика и по тангенсу угла наклона касательной к данному участку кривой рассчитывался коэффициент активности образцов — K, мкмоль/(л×мин) по формуле:

$$K = \frac{C_{o_2}}{t} \left(1 - \frac{I_i}{I_o} \right), \tag{5}$$

где Co_2 – концентрация кислорода в исходном растворе без вещества, мкмоль/л;

Ii — текущее значение предельного тока ЭВ O_2 , мкA;

Io — значение предельного тока ЭВ O_2 в отсутствии вещества в растворе, мкА; t — время протекания процесса, мин.

Для исследуемого вещества получена однотипная вольтамперограмма, наблюдалось уменьшение катодного тока ЭВ $\rm O_2$, что свидетельствует о проявлении ими антиоксидантной активности по отношению к данному процессу. Кроме того, наблюдался сдвиг потенциала катодного тока ЭВ $\rm O_2$ в положительную область потенциалов. Все вышесказанное предполагает наличие механизма ЕС (электрохимическая — химическая стадии), который включает последующую химическую реакцию взаимодействия антиоксидантов с активными кислородными радикалами.

При этом общая схема электродного процесса с последующими химическими реакциями взаимодействия антиоксидантов с активными кислородными радикалами будет выглядеть следующим образом:

$$(O_{2}) \xrightarrow{+e^{-}} (O_{2}) \xrightarrow{+H^{+}} (HO_{2}) \xrightarrow{+H^{+}; +e^{-}} (H_{2}O_{2}) + 2(RCHO)$$

$$-e^{-} + H^{+} + RCH_{2}OH$$

$$+ RCH_{2}OH$$

Антиоксидантная активность О,О-диметил-N-цитизинилфосфата по отношению
к ЭВ O, с различной концентрацией ($n = 5$, $p = 0.95$)

Концентрация вещества	Среднее значение, <i>K</i> , мкмоль/л мин	Стандартное отклонение, S	Относительное стандартное от- клонение, Sr	Стандартное откло- нение среднего, Sx	Доверительный интервал, δ
0,00001 г/мл	0,183	0,032	0,174	0,019	0,05
0,0001 г/мл	0,280	0,012	0,043	0,007	0,02
0,001 г/мл	0,399	0,045	0,113	0,026	0,07

Антиоксидантную активность определяли, используя выражение (5) (см. таблицу).

Выводы

Осуществлен синтез и изучено влияние О,О-диметил-N-цитизинилфосфата на процесс электровосстановления кислорода в различных концентрациях. В качестве метода оценки применена катодная вольтамперометрия на ртутно-пленочном электроде. В данном подходе определение антиоксидантной активности отражало количество активных форм кислорода, нейтрализованных антиоксидантом за определенное время. Показано, что водный раствор цитафата проявляет антиоксидантную активность.

Эксперименты выполнены при поддержке гранта РФФИ, проект № 15-04-01110.

Список литературы

- 1. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестн. РАМН. − 1998. − Т. 98, № 7. − С. 43–51.
- 2. Деев А.И., Добрецов Г.Е., Владимиров Ю.А. Влияние физической структуры фосфолипидных мембран на перекисное окисление, индуцированное ионами Fe^{2+} // Вопр. мед. химии. 1977. Т. 23, № 4. С. 545–549.
- 3. Нуркенов О.А., Кулаков И.В., Фазылов С.Д. Синтетические трансформации алкалоида цитизина. Караганда: Гласир, 2012, С. 165.
- 4. Садыков А.С., Асланов Х.А., Кушмурадов Ю.К. Алкалоиды хинолизидинового ряда. – М.: Наука, 1975. – 292 с.
- 5. Avramchik O.A., Korotkova E.I., Plotnikov E.V., Lukina A.N., Karbainov Y.A. // J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2005. Vol. 37. P. 1149.
- 6. Korotkova E.I., Karbainov Y.A., Avramchik O.A.// J. Anal. Bioanal. Chem. 2003. Vol. 375, $N\!\!_{2}$ 3. P. 465.