УДК 547.814.5

УТОЧНЕНИЕ СТРУКТУРЫ СИНТЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ 3-АРИЛ-КУМАРИНА С 1,4-БЕНЗОДИОКСАНОВЫМ ФРАГМЕНТОМ С ПОМОЩЬЮ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

[1]Исмаилова Г.О., [1]Юлдашев Н.М., [2]Узакбергенова З.Д., [2]Калимбетова Р.Ю., [2]Аташов А.К.

[1]Ташкентский педиатрический медицинский институт, Ташкент, Республика Узбекистан (100140, Ташкент, ул. Богишамол, 223), e-mail: y_nosir@rambler.ru.;
[2]Каракалпакский Государственный университет, Нукус, Республика Каракалпакстан (230113, Нукус, ул. Акад. Ш. Абдирова, 1)

Описана характеристика возможных путей фрагментации синтетической модели 3-(2,3-дигидробензо [1,4] диоксин-6-ил)-хромен-2-он с помощью масс-спектра. Масс-спектрометрическое исследование синтезированного нового кумарина проведено на приборе Q-TOF LC-MS Agilent Technologies серии 6520B. Показано, что фрагментация синтетической модели 3-арил-кумарина с 1,4-бензодиоксановым фрагментом идет по четырем направлениям. Расщепление кумарина по первому направлению фрагментации молекулярного иона идет с образованием вторичного иона с m/z 181, по второму с m/z 152, по третьему фрагмент с m/z 127, и по четвертому направлению образуется фрагмент с m/z 165. Синтезированный новый 3-арил-кумарин с 1,4-бензодиоксановым фрагментом был исследован in vitro на антимикобактериальную активность против M. Tuberculosis $H_{37}Rv$ в BACTEC-12B и Erdman, который проявил 49 % противотуберкулезную активность.

Ключевые слова: масс-спектр, структура, фрагменты, кумарин.

STRUCTURE REFINEMENT OF 3-ARYL-COUMARINS SYNTHETIC MODEL WITH 1, 4-BENZODIOKSAN FRAGMENT BY MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS

[1]Ismailova G.O., [1]Yuldashev N.M., [2]Uzakbergenova Z.D., [2]Kalimbetova R.Y., [2]Atashov A.K.

[1]Tashkent Pediatric Medical Institute, Tashkent, Republic of Uzbekistan (100140, Tashkent, Bogishamol str., 223), e-mail: y_nosir@rambler.ru.
[2]Karakalpakstan State University, Nukus, Republic of Karakalpakstan (230113, Nukus, Acad. Abdirov Sh. str., 1)

There is describe the characteristics of the possible ways of fragmentation of 3-(2,3-dihydro-benzo [1,4] dioxin-6-yl)-chromen-2-one synthetic model a mass spectrum. Mass spectrometric investigation of the synthesized new coumarin carried out on a Q-TOF LC-MS Agilent Technologies Series 6520V. It is shown that the fragmentation of 3-aryl-coumarin synthetic model with 1,4-benzodioksanovym fragment goes in four directions. Cleavage of coumarin in the first direction is the fragmentation of the molecular ion to form a secondary ion m/z 181, with the second m/z 152, the third fragment m/z 127 and the fourth direction is formed a fragment m/z 165. Synthesized new 3-aryl-coumarin with 1,4-benzodioksanovym fragment was investigated in vitro on M. antimycobacterial activity against Tuberculosis $H_{37}Rv$ in BACTEC-12B and Erdman, who took 49% of anti-TB activity.

Keywords: mass spectrum, structure, fragments, coumarin.

Большой интерес представляют аналоги природных биологически активных веществ, которые обладают собственной флуоресценцией, чувствительной к изменению условий внешней среды. К ним принадлежат кумарины с бензодиоксановыми фрагментами, изредка встречающиеся в растениях различных семейств. Например, соединение B и метиловый эфир пропацина встречаются в семействе Jatropha glandulifera (Euphorbiaceae), Дафнетицин – Daphne tangutica (Thymelaceae), Пропацин – Protium opacum (Burseraceae), Клеомискозин A – Cleome viscosa (Capparidaceae), Клеомискозин C (аквиллохин) и Клеомискозин D – Aquillaria agallocha (Thymelaeaceae), Молуцканин – Aleurites moluccana (Euphorbiaceae) и другие [5].

3-Арильные кумарины являются антикоагулянтами, среди них найдены вещества с антибактериальной, антифунгицидной, антиатеросклеротической и антилептической активностями. Строение этих кумаринов было изучено благодаря значительным успехам последних лет в структурном анализе кумариновых соединений и в большей степени обусловлены применением современных физико-химических методов, особенно ядерного магнитного резонанса на ядрах ^{1}H и ^{13}C.

В ходе систематических структурных исследований различных лигноидов выявляются закономерности, которые применимы для всего этого класса природных соединений. В особенности это касается таких современных спектральных методов, как ЯМР ^{1}H-, ^{13}C – спектроскопия и масс-спектрометрия (техника INEPT).

Данные масс-спектров вышеперечисленных соединений показывают большое сходство фрагментации кумаринолигноидов. В масс-спектрах эти вещества показывают пики ионов с m/z 180, 162, 151, 137 и 124, которые доказывают наличие в молекуле остатка кониферилового спирта или его производных. Здесь анализ спектральных данных позволяет сделать выводы, что фрагментация производных кумаринов идет с образованием интенсивных пиков ионов (M-X) [1].

Рассмотрение вопросов структурного анализа кумаринолигнанов свидетельствует о том, что при решении структуры тех веществ, в молекуле которых содержится 1,4-диоксановое кольцо, обязательны не только спектральные методы, химические превращения, синтезы, но и их расщепления исходных соединений и модельных образцов.

Это удобные объекты для проведения химических модификаций, но их синтетические модели с точки зрения масс-спектра до сих пор не были изучены.

Масс-спектрометрия полифенольных соединений, и в частности флавоноидов, дополняет информацию, получаемую другими спектральными методами исследований, и позволяет оценить, каким образом отдельные структурные фрагменты соединены друг с другом в составе молекулы. Кроме того, по данным масс-спектра можно сделать вывод относительно размера и структуры боковых радикалов, что трудно установить химическими методами.

Неофлавоноиды [4] имеют специфическую схему фрагментации, пригодную для идентификации этих соединений, в отличие от флавоноидов других типов.

Поэтому **целью** нашей работы явилось охарактеризовать возможные пути фрагментации синтетической модели 3-арил-кумарина с 1,4-бензодиоксановым фрагментом **(4)** [3, 7, 8] с помощью масс-спектра.

Экспериментальная часть. Контроль за ходом реакции и определение индивидуальности синтезированного соединения **(4)** осуществляли методом ТСХ на

пластинках Silufol UV-254 (элюент: бензол – этанол, 9 : 1). Температуру плавления определяли на приборе ПТП (Россия). Исходные соединения гетероарилацетонитрил **(2)**, гетероарилуксусная кислота **(3)** синтезированы и охарактеризованы, как описаны в работах [6, 10]. Все остальные реактивы производства Реахим (Россия) и ЗАО «Ximreaktivkomplekt» (Узбекистан).

Методика синтеза 3-(2, 3-дигидробензо [1,4] диоксин-6-ил)-хромен-2-он (4) [3, 7, 8]. Смесь 10 ммоль гетероарилацетонитрила **(2)** или гетероарилуксусной кислоты **(3)**, 10 ммоль салицилового альдегида **(1)**, 0,12 мл пиперидина и 10 мл 95% этанола кипятили в течение 4-6 ч. (В случае гетероарилацетонитрила реакционную смесь гидролизовали 5 мл 2 н. соляной кислотой в течение 1 ч.) После охлаждения осадок отфильтровывали и промывали 1 % водным раствором $NaHCO_3$. Остаток кристаллизовали из этилацетата (схема 1).

Выход 25 %. Т.пл. 190-191^{0}C. R_f 0,44. $C_{17}H_{12}O_4$.

Масс-спектрометрия (LC-MS). Масс-спектрометрическое исследование синтезированного нового кумарина **(4)** проводили на приборе Q-TOF LC-MS Agilent Technologies серии 6520B в следующих условиях: источник ионизации – ESI+; поток осушающего газа – 5 л/мин; температура осушающего газа – 300°C; напряжение на конуса скиммера – 20V; на фрагменторе – 125V; диапазон масс – в режиме MS 100 – 400 m/z, а в режиме Targeted MS/MS 25 – 400 m/z; энергия столкновения (collision energy) – 65. Способ ионизации: положительный. Образец вводили в масс-спектрометр с помощью хроматографа фирмы Agilent Technologies серии 1200, колонка Zorbax SB C18, 3 µm, 0,5x150 мм. Мобильная фаза: A – 0,1 % раствор муравьиной кислоты, B – ацетонитрил + 0,1 % муравьиная кислота. Элюцию осуществляли на приборе Agilent Technologies серии 1260 Cap Pump при скорости потока 15 мкл/мин в изократическом режиме – 90 % раствора B. Растворы дегазировали на приборе Agilent Technologies 1260 µ-degasser. Образец наносили в колонку с помощью прибора Agilent Technologies Micro WPS по 1 мкл.

Результаты и их обсуждение. Соединение **(4)** синтезировано в результате модифицированного метода в условиях конденсации Кневенагеля в присутствии спирта и пиперидина (схема 1) [3, 7, 8]. Полученный кумарин **(4)** – бесцветное кристаллическое вещество, хорошо растворим в большинстве органических растворителях и нерастворим в воде. Он легко обнаруживается по голубой флуоресценции в УФ-свете.

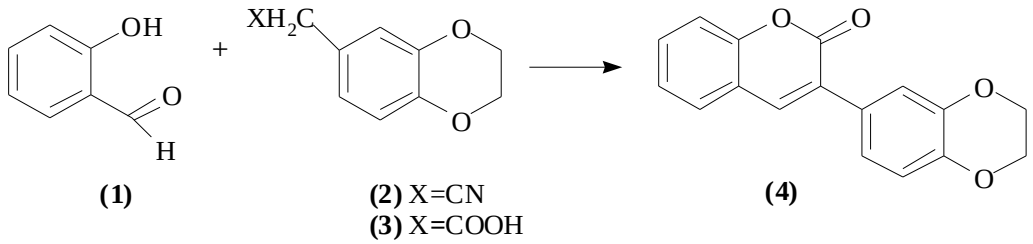

Схема 1. Синтез соединения (4)

1 – салициловый альдегид, 2 – гетероарилацетонитрил, 3 – гетероарилуксусная кислота.

Заболеваемость туберкулезом, несмотря на широту осуществляемых лечебных и профилактических мероприятий, растет, причем увеличивается число случаев лекарственно-устойчивого туберкулеза [2]. В связи с этим представляет интерес поиск новых противотуберкулезных средств, из числа ранее не использованных классов соединений. Так, синтезированный нами новый 3-арил-кумарин с 1,4-бензодиоксановым фрагментом **(4)** был исследован на антимикобактериальную активность против M. Tuberculosis, которая проводилась совместно с Southern Research Institute, Birmingham в рамках Антитуберкулезной программы «Tuberculosis Antimicrobial Acquisition & Coordinating Facility», USA. Первичный скрининг антимикобактериальной активности проводился in vitro. Для анализа минимальной ингибирующей концентрации (МИК) использовали образцы в концентрации 6,25 мкг/мл против Micobacterium tuberculosis $H_{37}Rv$ (ATTCC 27294) на среде BACTEC 12B, используя микропластины Alamar Blue Assay (MABA). Флуоресценцию составов определяли на радиометрической системе BACTEC 460, эффективность ингибирования выражали в %. В результате исследований обнаружено, что соединение **(4)** проявил 49 % противотуберкулезную активность.

Масс-спектрометрическое исследование синтезированного вещества **(4)** в режиме MS показало, что m/z молекулярного иона составляет 281,083. Далее в режиме Targeted MS/MS при энергии столкновения (collision energy) – 35, 65 из молекулярного иона образовались вторичные фрагменты положительных ионов с m/z 181, 165, 152, 141, 127, 115, 77 (рис. 1, схема 2).

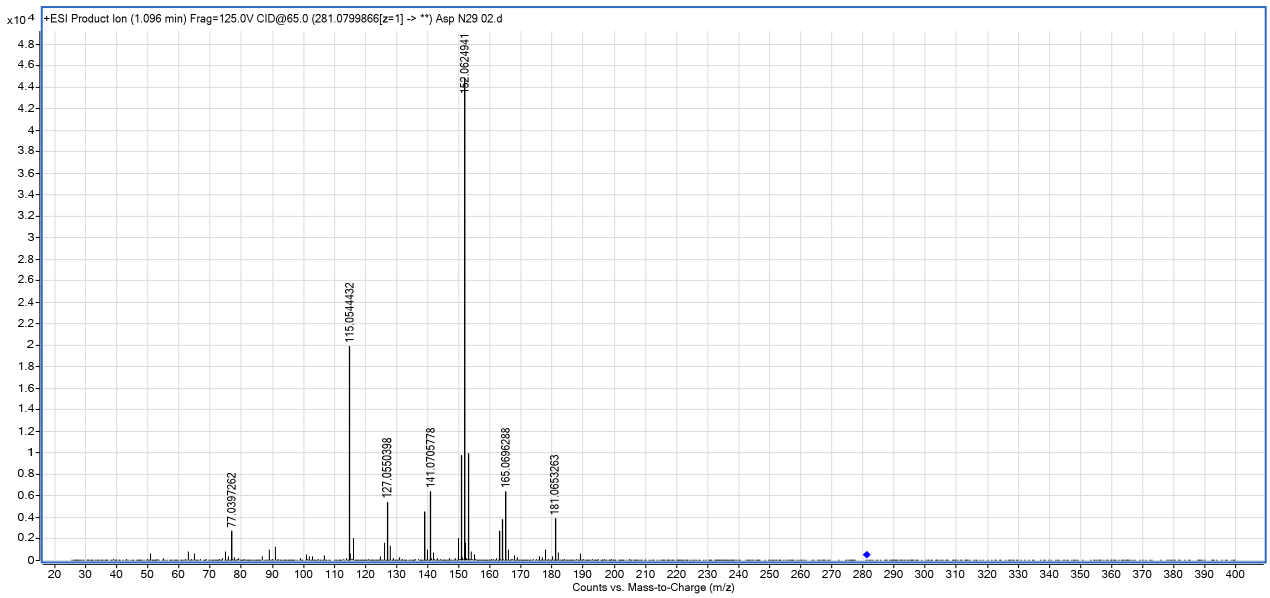

Рис.1. Масс-спектр соединения (4)

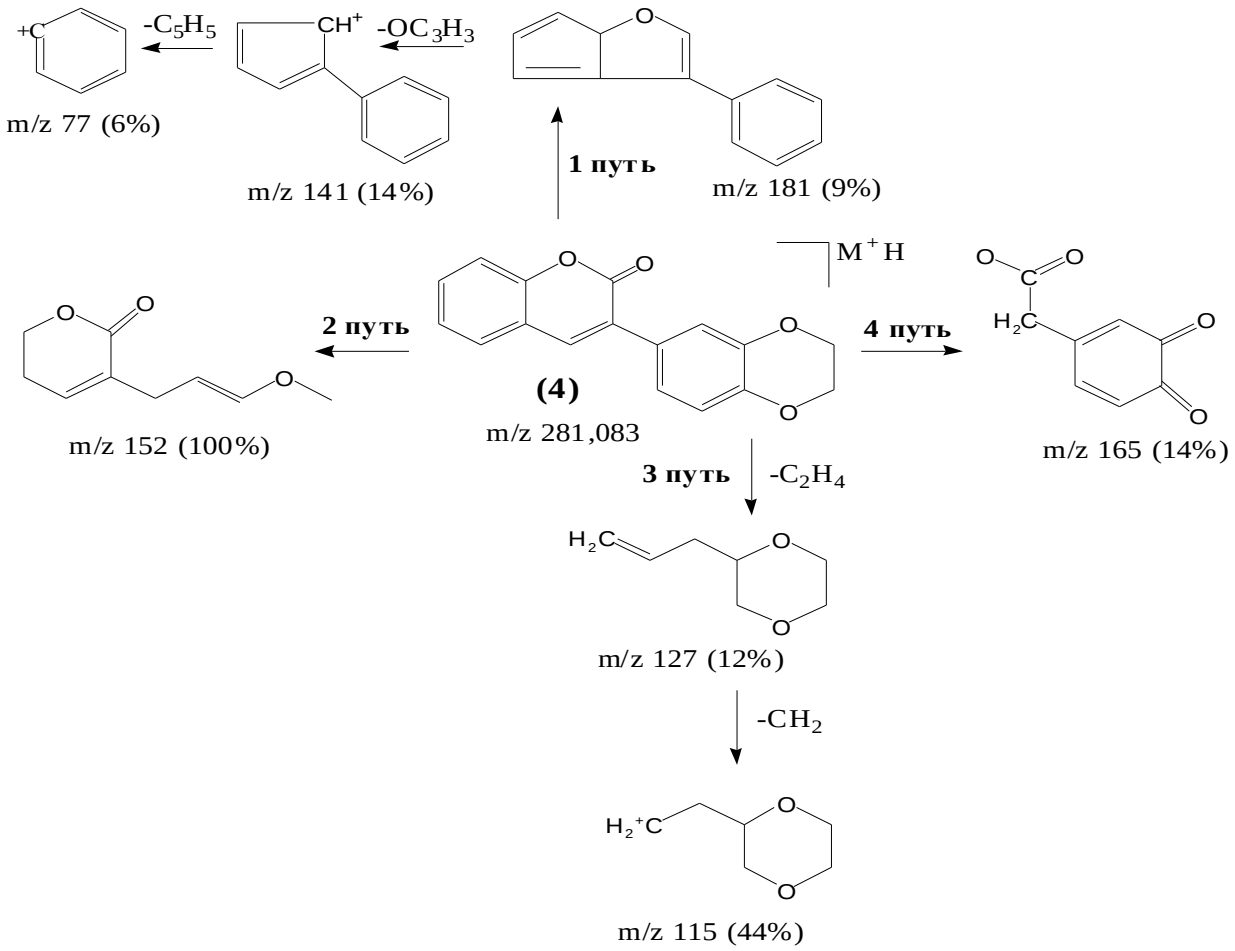

Схема 2. Возможные пути масс-спектрометрического распада соединения **(4)**

Из-за термической неустойчивости масс-спектрометрические исследования флавоноидов проводят на их силиловых эфирах. Для большинства флавоноидных агликонов

основным сигналом в спектрах является сигнал M^+, затем $(M\text{-}CO)^+$, а фрагментация идет по двум основным путям [9]. В нашем случае, как видно из схемы 2, фрагментация идет по четырем (1, 2, 3, 4) направлениям.

Расщепление кумарина **(4)** по первому направлению фрагментации молекулярного иона идет с образованием вторичного иона с m/z 181, который далее распадается с образованием дочерних ионов с m/z 141 и 77. По второму направлению из молекулярного иона образуется фрагмент с m/z 152, а по третьему фрагмент с m/z 127. В дальнейшем из последнего образуется осколок с m/z 115. Четвертое направление характеризуется образованием фрагмента с m/z 165. Следует отметить, что фрагмент с m/z 181 более интенсивный, чем другие фрагменты, что также служит доказательством достройки фуранового цикла.

Таким образом, с помощью масс-спектрометрического анализа нами охарактеризованы четыре возможных путей фрагментации с образованием боковых радикалов синтетической модели 3-арил-кумарина с 1,4-бензодиоксановым фрагментом **(4).** Показано, что данные положительных ионов, образующихся в процессе фрагментации исследуемого соединения **(4)**, дополняют друг друга.

Авторы выражают благодарность Ж.Ф. Зиявитдинову за проведение масс-спектров.

Список литературы

1. Айтмамбетов А., Ибрагимова З.Ю., Ибрагимов М.Ю., Исмаилова Г.О. Установление строения кумаринолигнанов (обзор) // Вестник ККО АН РУз. – 2010. – № 1–2 (6-7). – С. 13-18.
2. Гулямова А.К., Акбарова М.С. Особенности выявления больных туберкулезом легких в общесоматических лечебных учреждениях // Сб. тез. Республиканской НПК «На пути к открытию». – Ташкент, 2013. – С. 175-176.
3. Исмаилова Г.О., Айтмамбетов А. Модифицированные флавоноиды VII. Новый синтез 1,3-бензодиоксоловых, 1,4-бензодиоксановых аналогов 3-арил-4Н-кумаринов // Вестник ККО АН РУз. – 1998. – № 1. – С. 98-100.
4. Корулькин Д.Ю., Абилова Ж.А., Музычкина Р.А., Толстиков Г.А. Природные флавоноиды. – Н.: ГЕО, 2007. – 232 с.
5. Пименов М.Г. Перечень растений-источников кумариновых соединений. – Л.: НАУКА, 1971. – 200 с.

6. Bidlo Z., Vonasek F. Vonne Latky z pyrokatechine heliotropin a benzodioxanove derivaty // Prum. portavin. – 1958. – 9, N. 11. – P. 589-592.
7. Ismailova G.O., Aitmambetov A. Synthesis of natural coumarin analogues // Second international symposium on the chemistry of national compounds. – Turkey, 1996. – P. 120.
8. Ismailova G.O. Synthesis of Analogues of Natural Coumarins and Coumarinolignans // Russian Journal of Bioorganic chemistry. – 2005. – 31, N. 3. – P. 292-296.
9. Mabry T.Y., Markham K.R., Thomas M.B. The systematic identification of flavonoids. – Berlin: Springer, 1970. – 707 p.
10. Sasamoto M. Synthesis in the morphinan group. III. A synthesis of 2,3- and 3,4-ethylenedioxy-N-methylmorphinan and their optical resolution // Chem. Pharm. Bull. – 1960. – N. 3. – P. 324.

Рецензенты:

Зияев Х.Л., д.х.н., старший научный сотрудник лаборатории полифенолов Института биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз, г. Ташкент.

Саитмуратова О.Х., д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биорегуляторов Института биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз, г. Ташкент.