

ОРИГІНАЛЬНІ СТАТТІ

УДК 615:542.951.3/4:54.057

А. О. ДЕВЯТКІНА, аспірант, С. Г. ІСАЄВ, д-р фарм. наук, проф.,

О. В. КИЗЬ, канд. фарм. наук, доцент, Г. П. ЖЕГУНОВА, канд. біол. наук, доцент
Національний фармацевтичний університет, м. Харків

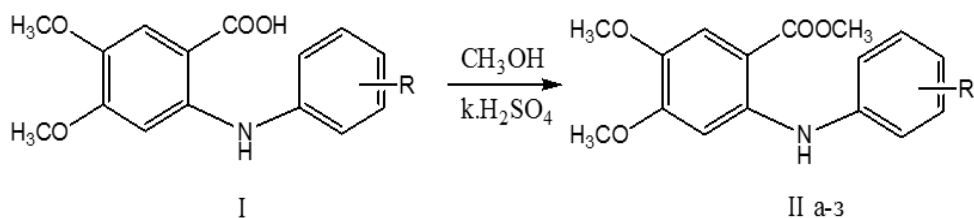
СИНТЕЗ, БУДОВА ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ МЕТИЛОВИХ ЕСТЕРІВ 4,5-ДИМЕТОКСИ-N-ФЕНІЛАНТРАНІЛОВИХ КИСЛОТ

Ключові слова: синтез, метилові естери N-фенілантранілових кислот, фармакологічна активність

Упродовж багатьох років вчені інституту органічної хімії НАН України, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Національного фармацевтичного університету здійснюють пошук біологічно активних речовин серед похідних N-фенілантранілових кислот [4]. На основі арилантранілових кислот створено лікарські препарати (мефенамінова кислота, дифторант, антраль та ін.), які широко застосовують для лікування різних захворювань. Проте, поряд із їхніми позитивними фармакологічними властивостями, препарати вищезазначених похідних мають істотний недолік – це побічна дія на організм: ульцерогенна, гемато-, нефро-, кардіотоксична [6]. Наведені фактори зумовили необхідність пошуку нових біологічно активних сполук серед естерів 4,5-диметокси-N-фенілантранілових кислот (N-ФАК), які ще не вивчали в хімічному та біологічному плані.

Матеріали та методи дослідження

Вихідні 4,5-диметокси-N-фенілантранілові кислоти (I) синтезовано за модифікованою нами реакцією Ульмана взаємодією 4,5-диметокси-2-хлорбензойної кислоти з ароматичними амінами або арилюванням 4,5-диметоксиантранілової кислоти заміщеними галоген бензолу в присутності оксиду міді, калію карбонату без розчинника [4, 5, 10]. Синтез метилових естерів 4,5-диметокси-N-фенілантранілових кислот (II) здійснено реакцією естерифікації за Фішером [8] у середовищі абсолютного метанолу у присутності концентрованої сульфатної кислоти як каталізатора та водовіднімаючого засобу (схема):



Будову та індивідуальність естерів (II a-3) підтверджено даними елементного, ІЧ-спектрального, хроматографічного аналізу та якісними реакціями. Дані елементного аналізу (табл. 1) відповідають розрахованим (автоматичний аналізатор М-185 фірми «Hewlett Packard»). ІЧ-спектри синтезованих речовин вимірювали

на спектрофотометрі «Specord M-80» в таблетках KBr (концентрація речовин 1%). Хроматографічний аналіз здійснювали методом тонкошарової хроматографії на пластинках Silutol UV-254 фірми «Avalier» (Чехія), хроматографи проявляли парами йоду або за використання УФ-випромінювання.

Методика одержання метилових естерів 4,5-диметокси-N-фенілантранілової кислоти (II а)

Суміш 1,97 г (0,01 моль) 4,5-диметокси-N-фенілантранілової кислоти, 0,75 мл концентрованої сульфатної кислоти в 30 мл абсолютного метанолу нагрівали зі зворотним холодильником 5 год. Після охолодження реакційну суміш виливали у воду, нейтралізували натрію гідрокарбонатом. Осад відфільтровували, сушили. Вихід 2,5 г (90%).

Сполуки II б-з одержували аналогічно.

Для виявлення протизапальної активності у нових сполуках досліджували їхню здатність пригнічувати розвиток набряку за гострого запалення, спричиненого субплантарним введенням карагеніну в лапку миші [2]. Досліджувані сполуки (II а-з) вводили перорально у вигляді суспензії, стабілізованої емульгатором твіном-80 у дозі 20 мг/кг тіла тварини. Анальгетичну дію речовин (II а-з) вивчали на білих щурах масою 160–210 г з використанням моделі «оцтових корчів» у дозі 20 мг/кг [2].

Вивчення діуретичного ефекту естерів N-ФАК (II а-з) здійснювали за методом Є. Б. Берхіна [1]. Досліджувані речовини та препарат порівняння (гіпотіазид) вводили внутрішньоочеревино за 30 хв до водного навантаження у дозі 50 мг/кг (табл. 3).

Дослідження бактеріостатичної та фунгістатичної активності сполук (II а-з) *in vitro* здійснювали за методикою двократних серійних розведень [2] у рідкому живильному середовищі (табл. 4).

Гостру токсичність синтезованих речовин вивчали на білих мишах при внутрішньошлунковому введенні [2].

Для комп'ютерного прогнозу спектра біохімічної активності метилових естерів 4,5-диметокси-N-ФАК (II а-з) використовували комп'ютерну програму PASS [11].

Результати дослідження та обговорення

Метилієві естери 4,5-диметокси-N-ФАК (II а-з) – кристалічні речовини, практично нерозчинні у воді, гексані, хлороформі, добре розчинні в етанолі, діоксані, ДМФА. Естери можна ідентифікувати за реакцією утворення гідроксаматів феруму (III) відповідних N-ФАК, які забарвлені в червоний колір (гідроксамова проба). В ІЧ-спектрах метилових естерів N-ФАК (II а-з) спостерігаються смуги поглинання валентних коливань NH-групи при 3 344–3 328 cm^{-1} , карбонільної групи при 1 730–1 703 cm^{-1} (табл. 2). В області 1 288–1 270 cm^{-1} та 1 158–1 145 cm^{-1} знаходяться смуги валентних коливань C-O-C-груп ($\nu_{\text{C-O}}^{\text{кисл}}$ і $\nu_{\text{C-O}}^{\text{спирт}}$) відповідно. Перша смуга відноситься до валентних коливань C-O-C-групи, основний вклад в яку вносить коливання «кислотного» фрагмента молекули, а у коливання другої смуги основний вклад вносить «спиртовий» фрагмент молекули [7]. Деформаційні коливання NH-групи (δ_{NH}) представлені в спектрограмах піком у ділянці 1 588–1 565 cm^{-1} .

Аналіз результатів комп'ютерного прогнозу за допомогою програми PASS показав, що вперше синтезовані метилієві естери 4,5-диметокси-N-ФАК (II а-з) з найбільшою вірогідністю мають проявляти протизапальну, протипухлинну, діуретичну, бактеріостатичну, фунгістатичну активність.

Метиллові естери 4,5-диметокси-N-фенілантранілових кислот

Сполука	R	Вихід, %	T _{пл} , °C ¹	Знайдено, %			Брутто-формула			Розраховано, %			R _f ²	
				C	N	H	C	N	H	C	N	H	1 (м-г)	2 (м-с-а)
II а	H	90	129–131	66,85	4,87	5,93	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	4,88	4,88	5,96	0,51	0,62		
II б	2'-CH ₃	92	109–113	67,58	4,61	6,63	C ₁₇ H ₂₀ NO ₄	4,63	4,63	6,67	0,48	0,60		
II в	4'-CH ₃	87	144–145	67,59	4,65	6,65	C ₁₇ H ₂₀ NO ₄	4,63	4,63	6,67	0,49	0,59		
II г	3',4'-(CH ₃) ₂	88	155–157	68,10	4,47	7,39	C ₁₈ H ₂₃ NO ₄	4,41	4,41	7,30	0,45	0,55		
II д	4'-OCH ₃	89	120–123	64,17	4,34	6,38	C ₁₇ H ₂₀ NO ₅	4,39	4,39	6,33	0,46	0,44		
II е	4'-OC ₂ H ₅	90	138–142	65,11	4,25	6,65	C ₁₈ H ₂₂ NO ₅	4,21	4,21	6,67	0,43	0,43		
II є	4'-OC ₃ H ₇	87	151–154	65,83	4,13	6,93	C ₁₉ H ₂₄ NO ₅	4,04	4,04	6,98	0,42	0,46		
II ж	4'-Cl	91	162–164	59,59	4,32	5,38	C ₁₆ H ₁₇ ClNO ₄	4,34	4,34	5,31	0,38	0,40		
II з	4'-Br	92	169–171	52,37	3,88	4,69	C ₁₆ H ₁₇ BrNO ₄	3,81	3,81	4,67	0,35	0,38		

Примітки: ¹ Кристалізують із водного метанолу.

² Значення R_f наведено в системах: 1 – метанол-гексан (1:3);

2 – метанол-етілацетат-аміак (1:8,5: 0,5).

Таблиця 2

Максимуми поглинання в ІЧ-спектрах метилових естерів 4,5-диметокси-N-фенілантранілових кислот

Сполука	Частота поглинання, см ⁻¹												
	ν_{NH}	$\nu_{C=O}^{KISL.}$	$\nu_{C=O}$	$\nu_{C-O}^{KISL.}$	$\nu_{C-O}^{SPIRT.}$	δ_{NH}	ν_{C-Ph}	ν_{CN}	ν_{C-Cl}	ν_{C-Br}	$\nu_{CH_3}^{cs}$	$\nu_{CH_3}^s$	δ_{CH_2}
II а	3334	1685	1708	1288	1155	1576	1602	1230	–	–	2972	2885	–
II б	3342	1692	1705	1285	1152	1578	1600	1228	–	–	2990	2876	–
II в	3338	1695	1703	1283	1150	1567	1605	1225	–	–	2985	2880	–
II г	3344	1682	1725	1280	1148	1584	1604	1232	–	–	2982	2888	–
II д	3336	1670	1702	1284	1152	1565	1600	1234	–	–	2980	2894	–
II е	3330	1683	1730	1282	1146	1578	1598	1226	–	–	2982	2898	1408
II є	3328	1680	1728	1275	1145	1576	1596	1230	–	–	2878	2882	1415
II ж	3342	1675	1720	1270	1158	1586	1605	1224	805	–	2960	2874	–
II з	3340	1677	1718	1272	1156	1588	1605	1226	–	740	2964	2878	–

Біологічна активність метилових естерів 4,5-диметокси-N-фенілантранілових кислот ($n=7$)

Сполука	Протизапальна активність у дозі 20 мг/кг		Анальгетична активність у дозі 20 мг/кг		Діуретична активність у дозі 25 мг/кг		DI ₅₀ , мг/кг (в/шлунково)
	Об'єм лапки (M±m) в мм через 4 год	Активність, %	Кількість корчів (M±m)	Активність, %	Кількість сечі (мл) за 4 години	Активність, в % до контролю	
II а	1,05 ± 0,11	18,0	51,8 ± 3,12	4,9	3,41 ± 0,22	122,7	–
II б	0,95 ± 0,09	25,8	39,7 ± 4,1	11,8	3,29 ± 0,09	118,0	>1500
II в	0,98 ± 0,07	15,2	36,6 ± 5,1	17,1	3,25 ± 0,19	116,5	>1700
II г	1,02 ± 0,09	22,1	33,6 ± 4,5	28,5	2,85 ± 0,11	100,3	>1800
II д	1,28 ± 0,12	2,3	45,3 ± 5,2	0	3,08 ± 0,19	97,8	–
II е	0,88 ± 0,09	33,6	33,5 ± 4,6	28,5	4,66 ± 0,11	160,7	>1800
II є	0,95 ± 0,19	27,5	42,7 ± 1,17	22,0	4,85 ± 0,12	158,4	>2000
II ж	0,94 ± 0,06	28,2	36,2 ± 7,2	23,0	2,56 ± 0,13	83,5	>2000
II з	0,85 ± 0,09	35,9	34,7 ± 1,83	36,5	2,45 ± 0,12	80,1	>1800
Натрію диклофінак у дозі 8 мг/кг	0,75 ± 0,07	42,7	–	–	–	–	360
Анальгін у дозі 25 мг/кг	–	–	30,4 ± 1,25	44,3	–	–	1197
Контроль	1,31 ± 0,12	100	54,6 ± 2,43	100	2,95 ± 0,05	100	–
Гіпотіазид у дозі 25 мг/кг	–	–	–	–	4,72 ± 0,16	169,8	320
Фуросемід у дозі 20 мг/кг	–	–	–	–	7,72 ± 0,21	262,6	–

Т а б л и ц я 4
Бактеріостатична та фунгістатична активність метилових естерів 4,5-диметокси-N-фенілантранлілових кислот

Сполука	Бактеріостатична, мінімальна пригнічуюча концентрація, мкг/мл			Фунгістатична, МПК, мкг/мл		
	Золотистий стафілокок, АТСС 25923	Сінна паличка, АТСС 6639	Кишкова паличка, АТСС 25922	Синьогнійна паличка, АТСС 97853	<i>Candida albicans</i> АТСС 653/885	<i>Microsporium canis</i> ВКПГЕ
II а	250	500	125	250	125	250
II б	250	500	125	125	125	250
II в	125	250	125	250	125	250
II г	125	250	125	500	–	–
II д	125	250	125	250	250	125
II е	125	62,5	62,5	250	62,5	125
II є	125	62,5	62,5	250	62,5	125
II ж	62,5	125	31,2	125	31,2	31,2
II з	62,5	125	31,2	125	31,2	31,2
Етакридина лактаг	31,2	15,6	31,2	62,5	–	–
Фталазол	7,8	7,8	250	–	–	–
Нітрофурал	–	–	–	–	64	125

За класифікацією К. К. Сидорова метилові естери (II а-з) належать до класу малотоксичних речовин, їх DL_{50} за внутрішньошлункового введення мишам перебуває у межах 1 500–2 000 мг/кг (табл. 3). Як і очікувалось, метилові естери більш токсичні, ніж вихідні кислоти. Фармакологічний скринінг на протизапальну та анальгетичну активність (табл. 3) в дозі 20 мг/кг виявив сполуки (II е, II ж, II з) з антиексудативним ефектом на рівні мефенамової кислоти (30%). Слід зазначити, що метилові естери N-ФАК (II а-з) менш активні, ніж відповідні вихідні кислоти [10]. Протизапальна активність N-ФАК та їхніх похідних перебуває в тісному зв'язку з будовою, за антиексудативною дією їх можна розташувати в ряд: D-глюкозамонієві солі N-ФАК > калієві солі > кислоти > аніліди > метилові естери [3–5, 10].

Серед естерів 4,5-диметокси-N-ФАК (табл. 3) найбільшу діуретичну активність проявляють сполуки (II а, II є), але вони за дією поступаються гіпотіазиду. Встановлено, що етерифікація карбоксильної групи в 4,5-диметокси-N-ФАК (II а-з) призводить до зниження діуретичного, анальгетичного, протизапального ефекту та до збільшення гострої токсичності. Сполуки (II ж, II з) проявляють антидіуретичну активність, але поступаються адіурекрину (65%).

Мікробіологічні дослідження свідчать, що синтезовані речовини відносно золотистого стафілококу, сінної, кишкової, синьогнійної паличок інгібують ріст мікроорганізмів у концентрації 31,2–500 мкг/мл (табл. 4). Найвираженішу бактеріостатичну активність проявляють естери (II ж, II з), які містять у своїй структурі ковалентнозв'язані хлор та бром в неантраніловому фрагменті молекули. Ці речовини більш вибірково інгібують ріст золотистого стафілококу та кишкової палички. Фунгістатична активність метилових естерів 4,5-диметокси-N-ФАК (II а-з) становить 31,2–250 мкг/мл стосовно *Candida albicans* та *Microsporum canis*. Сполуки (II ж, II з) за протигрибковою активністю перевищують дію нітрофуралу в 2–4 рази (табл. 4) та є менш токсичними.

В и с н о в к и

1. З метою пошуку біологічно активних речовин здійснено синтез і вивчено будову та чистоту метилових естерів 4,5-диметокси-N-фенілантранілових кислот.

2. За програмою PASS проведено комп'ютерний прогноз можливих видів біологічної активності. У ході експериментальних фармакологічних досліджень встановлено, що синтезовані речовини проявляють помірну протизапальну, анальгетичну, діуретичну, антидіуретичну, бактеріостатичну та фунгістатичну дію. Визначено деякі закономірності зв'язку «структура–активність–токсичність» серед похідних N-фенілантранілових кислот.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Берхин Е. Б. Методы изучения действия новых химических соединений на функцию почек // Хим.-фарм. журн. – 1977. – Т. 11, № 5. – С. 3–11.

2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації / За ред. О. В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.

3. Девяткіна А. О., Ісаєв С. Г., Жегунова Г. П., Яременко В. Д. Синтез, властивості та фармакологічна активність алкіл амідів і анілідів 3,5-дихлор-N-фенілантранілових кислот // Укр. журн. клін. лаб. мед. – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 238–243.

4. Ісаєв С. Г. Синтез, реакційна здатність і біологічна активність похідних ортогалогенбензойних, ароматичних амінокислот та акридину: Автореф. дис. ... д-ра фарм. наук. – Харків, 2008. – 36 с.

5. *Исаев С. Г., Свечникова О. М., Алферова Д. О. та ін.* Реакційна здатність N-фенілантранілових кислот. XX. Синтез та кислотно-основні властивості 3,5-дібром-N-фенілантранілових кислот // Укр. журн. клін. лаб. мед. – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 228–232.

6. *Машковский В. Д.* Лекарственные средства. – 16-е изд., испр. и доп. – М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2012. – 1216 с.

7. *Сильверстейн Р., Басслер Г., Морил Т.* Спектрометрическая идентификация органических соединений. – М.: Мир, 1977. – 590 с.

8. *Шмидт Р., Сапунов В. Н.* Неформальная кинетика. В поисках путей химических реакций. – М.: Мир, 1985 – 264 с.

9. *Alferova D. O., Gritsenko I. S., Isaev S. G.* Synthesis, structure and pharmacological studies of methyl esters of 3,5-dibromo-N-phenylanthranilic acids // Харбашиси (Kazakhstan). – 2013. – N 1 (62). – P. 214–219.

10. *Isaev S. G., Svechnikova E. N., Devjatkina A. O. et al.* Reactivity ability of N-phenylanthranilic acids. XXII. Synthesis and acid-base properties of 4,5-dimethoxy-N-phenylanthranilic acids // News of pharmacy. – 2013. – N 2 (74). – P. 45–48.

11. *Anzali S., Barnickel G., Cezanne B. et al.* Discriminating between drags and nondrags by Prediction of Activity Spectra for substances (PASS) // J. Med. Chem. – 2001 – N 4 (15). – P. 2432–2437.

Надійшла до редакції 10. 10. 2013.

А. А. Девяткина, С. Г. Исаев, О. В. Кизь, Г. П. Жегунова
Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ 4,5-ДИМЕТОКСИ-N-ФЕНИЛАНТРАНИЛОВЫХ КИСЛОТ

Ключевые слова: синтез, метиловые эфиры N-фенілантранілових кислот, фармакологічна активність

А Н Н О Т А Ц И Я

Производные N-фенілантранілових кислот широко используют в медицинской и химической промышленности. Исходя из актуальности поиска новых биологически активных веществ среди производных антранілової кислоти была проведена работа по разработке методов синтеза и экспериментальным исследованиям метиловых эфиров 4,5-диметокси-N-фенілантранілових кислот.

Синтез был осуществлен на кафедре медицинской химии Национального фармацевтического университета. Биологический скрининг новых соединений проведен на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Национального фармацевтического университета.

Осуществлен синтез метиловых эфиров 4,5-диметокси-N-фенілантранілових кислот. Строение 9 синтезированных веществ подтверждено данными элементного анализа и ИК-спектров. Чистоту контролировали методом тонкослойной хроматографией. Установлено, что синтезированные вещества проявляют противовоспалительную, анальгетическую, диуретическую, антидиуретическую, бактериостатическую и фунгистатическую активность. По классификации К. К. Сидорова, синтезированные вещества при внутривенном введении относятся к классу малотоксичных соединений ($DL_{50}=1\ 500-2\ 000\text{ мг/кг}$). Установлен ряд закономерностей «структура–активность–токсичность».

A. O. Devyatkina, S. G. Isaev, O. V. Kiz, G. P. Zhegynova
National University of Pharmacy, Kharkiv

SYNTHESIS, STRUCTURE AND RESEARCH OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF METHYL ESTERS OF 4,5-DYMETHOXY-N-HENYLANTHRANILIC ACIDS

Key words: syntheses, methyl esters N-phenylanthranilic acids, pharmacological activity

ABSTRACT

The derivatives of N-phenylanthranilic acid is widely used in the medical and chemical industries. Based on the urgency of the search for new biologically active substances derivatives of anthranilic acids work has been done on the development of methods of synthesis and experimental studies of the methyl esters of 4,5-dymethoxy-N-phenilanthranilic acids.

The synthesis was carried out at the Department of Medical Chemistry The National University of Pharmacy. The biological screening of new compounds conducted at the Department of Microbiology, Virology and Immunology The National University of Pharmacy.

The synthesis of methyl esters of 4,5-dymethoxy-N-phenylanthranilic acids has been carried out. The composition of 9 synthesized compounds was proved by the data of element analysis and their IR-spectra. The purity was controlled by the method of thin-layer chromatography. It was established, that the synthesized substances have anti-inflammatory, analgetic, diuretic, antidiuretic, bacteriostatic and antifungal activity. According to classification by K.K. Sydorov, synthesized compounds at their intrastomach entering belong to low toxic compounds ($DL_{50}=1\ 500-2\ 000\ \text{mg/kg}$). A number of regularities of the «structure–activity–toxicity» relationship have been determined.

Електронна адреса для листування з авторами: annushkane@mail.ru