

ISSN 2227-7404

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

**НАЦІОНАЛЬНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ
ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ імені П.Л. ШУПИКА**



**ЗБІРНИК
НАУКОВИХ ПРАЦЬ
СПІВРОБІТНИКІВ НМАПО
імені П.Л. Шупика**

**ВИПУСК 22
КНИГА 4**

Київ – 2013

МЕТОДИ СИНТЕЗУ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ АНІЛІДІВ ЗАМІЩЕНИХ 2-КАРБОКСИСУКЦИНАНІЛОВИХ КИСЛОТ

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Вступ. З огляду на актуальність пошуку нових біологічно активних речовин серед похідних антранілових кислот була проведена робота з розробки методів синтезу та експериментальним дослідженням одержаних анілідів заміщених 2-карбоксібисукцинанілових кислот.

Мета. Розробка методів синтезу анілідів заміщених 2-карбоксібисукцинанілових кислот та вивчення їх фізико-хімічних та біологічних властивостей.

Матеріали та методи. Синтез був здійснений на кафедрі медичної хімії НФаУ. Біологічний скринінг нових сполук проведений на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології НФаУ.

Результати. Здійснено синтез та вивчено фізико-хімічні властивості анілідів 4-бром-, 4,6-дибром-, 4,6-дихлор- та 4,5-диметокси-2-карбоксібисукцинанілових кислот. Будову та індивідуальність сполук підтверджено даними ІЧ-спектрального, елементного та хроматографічного аналізу. За класифікацією К.К. Сидорова, синтезовані сполуки відносяться до класу малотоксичних речовин.

Висновок. Встановлено, що синтезовані сполуки проявляють протизапальну, анальгетичну, діуретичну, бактеріостатичну та фунгістатичну активність. Виявлені деякі закономірності взаємозв'язку «будова-активність».

Ключові слова: синтез, антранілова, бурштинова кислоти, фармакологічна активність.

ВСТУП

Пошук нових високоефективних та малотоксичних лікарських субстанцій з широким спектром біологічної дії є важливою проблемою медицини та фармації України. Інтерес до хімії антранілової та бурштинової кислот зумовлений високою біологічною активністю їх похідних [1,3-5]. Ці обставини обумовили необхідність здійснити синтез анілідів 4-бром-, 4,6-дибром-, 4,6-дихлор- та 4,5-диметокси-2-карбоксібисукцинанілових кислот, в структурі яких знаходиться три фармакофорні угруповання, а саме: антраніловий фрагмент, ковалентно зв'язаний бром або хлор, або дві метоксигрупи та залишок бурштинової кислоти.

Мета роботи - розробка методів синтезу анілідів заміщених 2-карбоксібисукцинанілових кислот та вивчення їх фізико-хімічних та біологічних властивостей.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

ІЧ-спектри синтезованих сполук вимірювали на спектрофотометрі «Specord M-80» у таблетках KBr (концентрація речовин 1%) та на ІЧ-спектрофотометрі з Фур'є-перетворювачем «Testcan Shimadzu FTIR 8000 series». Розчинником служив диметилсульфоксид D⁶. Елементний аналіз синтезованих сполук проводили на автоматичному аналізаторі M-185 фірми «Hewlett Packard». Хроматографічні дослідження здійснювали методом тонкошарової хроматографії на пластинках «Silufol-254», хроматографи проявляли парами йоду або при використанні УФ-випромінювання.

3'-метиланлід-4-бром-2-карбоксисукцинанілової кислоти (VIIa)

Спосіб А. Суміш 2,98г (0,01 моль) N-іміду 4-бром-2-карбоксисукцинанілової кислоти та 1,07г (0,01 моль) о-толуїдину в 10 мл ДМФА нагрівають протягом 3 годин. Реакційну суміш охолоджують, додають воду до 40 мл. Осад, що утворився відфільтровують, промивають водою, сушать. Вихід 2,63 г (65%). Аналогічно одержують сполуки (VIIд, ж-к).

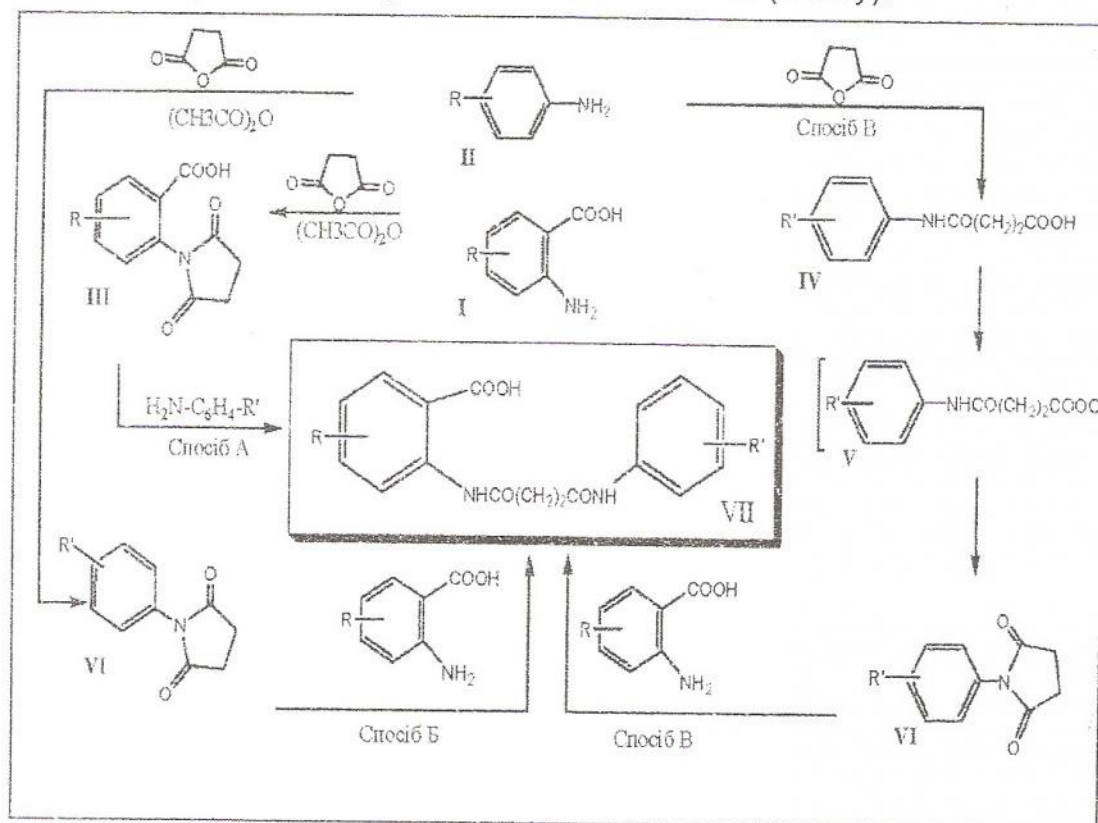
Спосіб Б. До розчину 1,89г (0,01 моль) N-іміду 3-метилсукцинанілової кислоти в 20 мл ДМФА додають 2,16г (0,01 моль) 5-бром-3-амінобензойної кислоти і кип'яють 3 години. Реакційну суміш охолоджують, розбавляють водою. Осад, що утворився відфільтровують, промивають водою, сушать. Вихід 3,40г (84%). Аналогічно одержують сполуки (VIIб-д, ж-і).

Спосіб В. До 2,07г (0,01 моль) 3-метилсукцинанілової кислоти додають 2,96 мл (0,015 моль) тіоніл хлориду і кип'яють протягом 15 хвилин. Надлишок тіоніл хлориду відганяють і після охолодження реакційну суміш змішують з розчином безводного діоксану (10мл), в якому знаходиться 2,16г (0,01 моль) 5-бром-2-амінобензойної кислоти та 0,8г (0,01 моль) піридину, залишають на 3 години, після чого розбавляють водою. Осад відфільтровують, сушать. Вихід 3,48г (86%). Аналогічно одержують сполуки (VIIб-і).

Суміш продуктів, одержаних різними способами, депресії температури топлення не дає.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Синтез анлідів заміщених 2-карбоксисукцинанілових кислот (VII) здійснювали трьома альтернативними способами (схему):



ФАРМАЦЕВТИЧНА ХІМІЯ ТА ФАРМАКОГНОЗІЯ

Практичне значення, враховуючи легкість проведення експерименту і достатньо високий вихід цільового продукту (VII), має спосіб В (86-92%), де R-сукцинанілові кислоти (IV) оброблялися тіонілхлоридом. Однак, виділити хлорангідриди кислот (V) у вільному стані не було можливості, оскільки вони перетворювалися у відповідні N-іміди (VI), що узгоджується з даними раніше проведених досліджень [4]. Одержані сукциніміди (VI) без стадії виділення амідувалися заміщеною антраніловою кислотою (I) в середовищі безводного діоксану. Як препаративні методики одержання анілідів 4-бром-, 4,6-дибром-, 4,6-дихлор- та 4,5-диметокси-2-карбоксисукцинанілових кислот (VII) можна рекомендувати способи А та Б. За способом А аніліди (VII) синтезовано взаємодією N-імідів 4-бром-, 4,6-дибром-, 4,6-дихлор- та 4,5-диметокси-2-карбоксисукцинанілових кислот (III), які є високореакційними електрофільними реагентами, з ариламинами в середовищі ДМФА при нагріванні (вихід 65-69%). За способом Б 4-бром-, 4,6-дибром-, 4,6-дихлор- та 4,5-диметокси-2-карбоксисукцинанілові кислоти (VII) синтезували взаємодією відповідних N-імідів (VI) з монобром-, дибром-, дихлор- або 4,5-диметоксизаміщеними антраніловими кислотами (вихід 82-89%).

Аніліди заміщених 2-карбоксисукцинанілових кислот (VII а-к) – кристалічні речовини, практично не розчинні у воді, гексані, хлороформі, добре розчинні в етанолі, діоксані, ДМФА та водних розчинах лугів. Будову речовин (VIIа-к) підтверджено зустрічним синтезом, даними елементного аналізу, ІЧ-спектроскопією, а індивідуальність – методом хроматографії у тонкому шарі сорбенту (табл. 1,2).

Таблиця 1

Аніліди заміщених 2-карбоксисукцинанілових кислот

Сполука	R	R'	Вихід, %			Т. пл. °С	Знайдено, %		Брутто-формула	Вираховано, %		R _f **	
			A	B	B		C	N		C	N		
VIIa	4-Br	3'-CH ₃	65	84	86	224-226	52,98	6,92	C ₁₆ H ₁₉ BrN ₂ O ₄	53,08	6,88	0,64	-
VIIб	4-Br	3'-NO ₂	65	88	92	178-181	46,55	9,64	C ₁₇ H ₁₆ BrN ₃ O ₆	46,59	9,59	0,59	-
VIIв	4-Br	4'-Br	67	85	87	208-210	43,29	5,99	C ₁₇ H ₁₆ Br ₂ N ₂ O ₄	43,25	5,93	0,45	-
VIIг	4,6-Br	4'-CH ₃	69	85	90	230-232	44,35	5,81	C ₁₈ H ₁₉ Br ₂ N ₂ O ₄	44,38	5,75	0,42	0,35
VIIд	4,6-Br	4'-OC ₂ H ₅	65	82	88	215-218	44,02	5,47	C ₁₉ H ₂₁ Br ₂ N ₂ O ₅	44,12	5,42	0,37	0,30
VIIе	4,6-Cl	4'-COOC ₂ H ₅	-	-	85	170-173	52,69	6,24	C ₂₀ H ₂₁ Cl ₂ N ₂ O ₆	52,64	6,14	0,48	-
VIIе	4,6-Cl	4'-COOCH ₃	-	-	85	165-167	51,62	6,41	C ₁₉ H ₁₉ Cl ₂ N ₂ O ₆	51,59	6,33	0,52	-
VIIж	4,5-(OCH ₃) ₂	2'-CH ₃	69	88	90	199-200	61,62	7,28	C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ₆	61,69	7,19	0,68	0,55
VIIз	4,5-(OCH ₃) ₂	3'-CH ₃	67	89	92	169-171	61,68	7,23	C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ₆	61,69	7,19	0,67	0,54
VIIи	4,5-(OCH ₃) ₂	4'-NO ₂	65	88	90	189-191	54,22	10,02	C ₁₉ H ₂₂ N ₃ O ₈	54,28	9,99	0,60	0,55
VIIк	4,5-(OCH ₃) ₂	4'-SO ₂ NH ₂	-	-	85	250-252	50,25	9,29	C ₁₉ H ₂₄ N ₃ O ₈ S	50,21	9,25	0,49	0,42

Примітка: * кристалізують з водного етанолу, ** значення R_f наведені в системах: 1-ацетон-гексан (1:1); 2-ацетон-гексан-етанол (40:10:1).

Максимуми поглинання в ІЧ-спектрах анілідів заміщених 2-карбоксисукцинанілових кислот

Сполука	Частота поглинання, cm^{-1}								
	ν_{NH}	$\nu_{\text{C=O}}$	$\nu_{\text{C-Ph}}$	δ_{NH}	$\nu_{\text{S}^{\text{as}}_{\text{SO}_2}}$	$\nu_{\text{S}^{\text{as}}_{\text{NO}_2}}$	δ_{CH_2}	δ_{OH}	$\nu_{\text{C-Hal}}$
VIIa	3480 3375	1715 1650	1600	1574	-	-	1402	810	810 (C-Br)
VIIб	3490 3362	1714 1660	1602	1588	-	$\frac{1532}{1345}$	1403	840	695 (C-Br)
VIIв	3482 3350	1710 1655	1598	1520	-	-	1408	820	612 (C-Br)
VIIг	3470 3305 3250	1720 1680	1600	1572	-	-	1412	815	630 (C-Br)
VIIд	3485 3370	1712 1665	1600	1576	-	-	1415	825	640 (C-Br)
VIIе	3470 3360	1705 1655	1595	1574	-	-	1405	825	815 (C-Cl)
VIIє	3492 3374	1715 1674	1602	1575	-	-	1418	870	805 (C-Cl)
VIIж	3485 3365	1718 1650	1603	1572	-	-	1412	850	-
VIIз	3480 3358	1714 1655	1602	1577	-	-	1408	845	-
VIIи	3475 3367	1720 1672	1608	1578	-	$\frac{1534}{1348}$	1410	855	-
VIIк	3490 3370	1715 1675	1600	1582	$\frac{1335}{1142}$	-	1398	840	-

В ІЧ-спектрах анілідів заміщених 2-карбоксисукцинанілових кислот (табл. 2) в області $3492\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$ спостерігаються дві смуги валентних коливань вторинної аміногрупи, що закономірно, враховуючи наявність двох карбонільних груп в їх структурі. Однак головним є те, що кожна з NH-груп утворює водневий зв'язок різного типу. Так, одна NH-група за рахунок внутрішньо-молекулярного водневого зв'язку бере участь в утворенні квазіароматичного циклу, а друга NH-група, ймовірно, утворює міжмолекулярний водневий зв'язок, якому відповідає більш високочастотна смуга ($\nu_{\text{NH}}=3492\text{-}3470\text{ cm}^{-1}$). Це вказує на більш низьку енергію даного типу водневого зв'язку, що підтверджується більш поширеним характером високочастотної смуги NH-групи у порівнянні з низькочастотною смугою ($\nu_{\text{NH}}=3375\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$), де електронодонором виступає карбоніл карбоксильної групи. Незначний зсув смуги валентних коливань карбонілу карбоксильної групи ($\nu_{\text{CO}}=1720\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$) та її виражений резонансний характер також підтверджує факт її воднезв'язаності.

ФАРМАЦЕВТИЧНА ХІМІЯ ТА ФАРМАКОГНОЗІЯ

Деформаційним коливанням метиленових груп відповідає смуга при 1412-1398 cm^{-1} , яка має середню інтенсивність і є синглетом, тому що її інтенсивність адитивна через наявність двох CH_2 -груп у молекулі, а симетричний і синглетний характер смуг пояснюється незначною можливістю впливу замісників в ароматичній системі з одного боку, і з другого – малою поляризованістю CH_2 -груп. У спектрограмі сполуки (VIIк) спостерігаються асиметричні та симетричні валентні коливання SO_2 -групи в області 1335 cm^{-1} ($\nu_{\text{SO}_2}^{\text{as}}$) і 1142 cm^{-1} ($\nu_{\text{SO}_2}^{\text{s}}$), а в спектрах анілідів 2-карбоксібукцинанілових кислот (VIIб,і) ідентифіковані також дві смуги поглинання, які відповідають валентним асиметричним ($\nu_{\text{NO}_2}^{\text{as}} = 1534\text{-}1532 \text{ cm}^{-1}$) і симетричним ($\nu_{\text{NO}_2}^{\text{s}} = 1343\text{-}1345 \text{ cm}^{-1}$) коливанням нітрогрупи.

Виходячи з даних літератури [1,3-5], аніліди заміщених 2-карбоксібукцинанілових кислот були досліджені на наявність протизапальної, анальгетичної, діуретичної, фунгістатичної та бактеріостатичної активності [2].

Серед анілідів 4,6-дихлорзаміщених 2-карбоксібукцинанілових кислот найбільшу протизапальну і анальгетичну активність (табл. 3) проявляють сполуки (VIIе,є), які за широтою терапевтичної дії перевищують деклофенак натрію та анальгін. Протизапальний ефект на рівні мефенамової кислоти у дозі 20 mg/kg також виявляють сполуки (VIIа,д,з). Помірна анальгетична дія у дозі 20 mg/kg на моделі «гарячої пластинки» [2] характерна для анілідів 4,5-диметокси-2-карбоксібукцинанілової кислоти (VIIж,з), але вони за активністю поступаються анальгіну. Аналіз скринінгових досліджень на діуретичну дію (табл. 3) свідчить, що для анілідів 4-бром та 4,6-дибром-2-карбоксібукцинанілових кислот є характерним цей вид активності (VIIа,в,г,д). Показано, що введення в структуру анілідів сульфамідної групи сприяє підвищенню діуретичної, протизапальної та анальгетичної активності. Проведені мікробіологічні дослідження показали, що аніліди заміщених 2-карбоксібукцинанілових кислот проявляють бактеріостатичну дію у концентрації 15,6-500 mg/kg відносно грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів. Встановлено, що введення в анілідний фрагмент молекули сульфамідної або нітрогрупи сприяє збільшенню бактеріостатичного ефекту відносно золотистого стафілококу та кишкової палички (VIIб,і,к). Для вищезазваних речовин є характерною і фунгістатична активність (табл. 3) на рівні фурациліну.

Біологічна активність анілідів бромзаміщених 2-карбоксисукцинанілових кислот

Сполука	Проти-запальна, % У дозі 20 мг/кг	Анальгетична, % У дозі 20 мг/кг	Діуретична, % У дозі 50 мг/кг	Фунгістатична		Бактеріостатична, МПК (мкг/мл)				DL ₅₀ , мг/кг (в/шлунково)
				Candida albicans	Candida triadis	Staphylococcus aureus	Bacillus subtilis	Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa	
VIIa	34,5	0	190	125	250	125	250	62,5	125	>2500
VIIб	10,8	28,3	150	62,5	250	31,2	250	31,2	62,5	>3000
VIIв	15,3	31,2	224	125	62,5	62,5	125	31,2	62,5	-
VIIг	10,3	0	230	125	125	31,2	125	15,6	62,5	-
VIIд	28,9	0	268	125	125	31,2	125	7,8	31,2	>1500
VIIе	DE ₅₀ =8,12	DE ₅₀ =9,15	355	125	62,5	62,5	250	31,2	62,5	>3500
VIIє	DE ₅₀ =10,2	DE ₅₀ =11,5	380	125	31,2	62,5	125	31,2	62,5	>3500
VIIж	15,1	40,1	152	125	250	62,5	250	62,5	125	-
VIIз	30,4	42,3	137	125	250	125	500	125	125	>2500
VIIи	9,1	-	122	62,5	250	31,2	125	31,2	62,5	>3500
VIIк	40,2	49,4	344	62,5	62,5	15,6	62,5	15,6	31,2	>3000
Диклофенак натрію (DE ₅₀ =8мг/кг)	37,5	-	-	-	-	-	-	-	-	360
Мефенамова кислота у дозі 100мг/кг	30,0	-	-	-	-	-	-	-	-	628
Анальгін (DE ₅₀ =55мг/кг)	-	52,0	-	-	-	-	-	-	-	1197
Гіпотіазид у дозі 50 мг/кг	-	-	212	-	-	-	-	-	-	320
Етакридину лактат	-	-	-	-	-	31,2	15,6	31,2	62,5	21 (в/черевно)
Фурацилін	-	-	-	64	-	-	-	-	-	-

За класифікацією К.К. Сидорова, аніліди бромзаміщених 2-карбоксисукцинанілових кислот належать до малотоксичних речовин, їх DL₅₀ при внутрішньошлунковому введенні мишам перебуває у межах 1500-3500 мг/кг.

ВИСНОВКИ

• Проведено порівняльний аналіз способів синтезу анілідів 4-бром-, 4,6-дибром-, 4,6-дихлор- та 4,5-диметокси-2-карбоксисукцинанілових кислот і запропоновані оптимальні умови їх одержання.

ФАРМАЦЕВТИЧНА ХІМІЯ ТА ФАРМАКОГНОЗІЯ

• Будову та індивідуальність синтезованих речовин підтверджено даними елементного, ІЧ-спектрального аналізу, хроматографічного аналізу і зустрічним синтезом.

• Встановлено, що аніліди 4-бром-, 4,6-дибром-, 4,6-дихлор- та 4,5-диметокси-2-карбоксисукцинанилових кислот проявляють протизапальну, анальгетичну, діуретичну, бактеріостатичну та фунгістатичну активність і належать до класу малотоксичних речовин при внутрішньошлунковому введенні.

Література

1. **Арзуманов П.С.** Синтез похідних 3-аміно-4-оксо-3,4-дигідрохіназоліну на основі антранілоїлгідразину та дикарбонових кислот, їх хімічні перетворення та біологічна активність: Автореф. дис.... канд. фармац. наук. Х. 2008.

2. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації). За ред. О.В. Стефанова. К.: Авіцена. 2001.

3. **Ісаєв С.Г.** Синтез, реакційна здатність і біологічна активність ортогалогенбензойних, ароматичних амінокислот та акридину: Автореф. дис.... д-ра фармац. наук. Х. 2008.

4. Кобзар Н.П., Ісаєв С.Г., Хрушова О.В. та ін. Методи синтезу та фармакологічні властивості анілідів 4-бром- та 4,6-дибром-2-карбоксисукцинанилових кислот. Фармац. журн. 2011, 2: 49-55.

5. Ісаєв С.Г., Єрьоміна З.Г., Семенов А.М. та ін. Синтез та біологічна активність в-N-ацилгідразинів-4-карбокси-сукцинанилової кислоти. Мед. хімія. 2010, 12 (4): 60-63.

А.А. Девяткина, С.Г. Исаев, В.Д. Яременко

Методы синтеза и биологическая активность анилидов замещенных 2-карбоксисукцинаниловых кислот

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Введение. Учитывая актуальность поиска новых биологически активных веществ среди производных антраниловой кислоты была проведена работа по разработке методов синтеза и экспериментальным исследованиям полученных анилидов замещенных 2-карбоксисукцинаниловых кислот.

Цель. Разработка методов синтеза анилидов замещенных 2-карбоксисукцинаниловых кислот и изучение их физико-химических и биологических свойств.

Материалы и методы. Синтез был осуществлен на кафедре медицинской химии НФаУ. Биологический скрининг новых соединений проведен на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии НФаУ.

Результаты. Осуществлен синтез и изучены физико-химические свойства анилидов 4-бром-, 4,6-дибром-, 4,6-дихлор- и 4,5-диметокси-2-карбокси-сукцинаниловых кислот. Строение и чистота соединений подтверждены данными ИК-спектрального, элементного и хроматографического анализа. По классификации К.К. Сидорова, вещества при внутривнутреннем введении относятся к классу малотоксичных соединений.

Вывод. Установлено, что синтезированные вещества проявляют противовоспалительную, анальгетическую, диуретическую, фунгистатическую и бактериостатическую активность. Установлены некоторые закономерности взаимосвязи «структура-активность».

Ключевые слова: синтез, антраниловая, янтарные кислоты, фармакологическая активность.

A.O. Deviatkina, S.G. Isaev, V.D. Yaremenko

The methods of synthesis and biological activity of 2-carboxysuccinamic acids derivatives

National University of Pharmacy, Kharkov

Introduction. Given the urgency of search for new biologically active substances among anthranilic acid derivatives there was carried out work on the development of methods of synthesis and experimental investigation of received substituted 2-carboxysuccinamic acids anilides .

Purpose. Development of methods for the synthesis of derivatives 2-carboxysuccinamic acids and study of their physicochemical and biological properties.

Materials and methods. The synthesis of substances was carried out at the Department of Medical Chemistry of NPhaU. The biological screening was carried out at the Department of Microbiology, Virusology and Immunology of NPhaU.

Results. 4-bromo-, 4,6-dibromo-, 4,6-dichloro- and 4,5-dimethoxy-2-carboxysuccinamic acids anilides were synthesized and their physicochemical properties were studied. The structure of the received substances were confirmed with the help of IR-spectral, element and chromatographic methods. According to the classification by K.K. Sidorov, the substances belong to low-toxic compounds class.

Conclusion. The synthesized substances were found to have antiinflammatory, analgesic, diuretic, fungistatic and bacteriostatic activity. Certain regularities of the "structure-activity" relationship were determined.

Key words: synthesis, anthranilic, succinic acid, pharmacological activity.