

Н. И. Романенко, О. А. Пахомова, Д. Г. Иванченко, А. М. Камышный,  
Н. Н. Полищук

## СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 8-БЕНЗИЛИДЕНГИДРАЗИНО-3-МЕТИЛ-7-β-МЕТОКСИЭТИЛКСАНТИНОВ

Запорожский государственный медицинский университет, Запорожье, Украина

Разработан простой препаративный метод синтеза 8-гидразино-3-метил-7-β-метоксиэтилксантина. Изучена реакция полученного гидразиноксантина с альдегидами и кетонами, в результате чего получен ряд не описанных в литературе 8-илиденгидразинопроводных 3-метил-7-β-метоксиэтилксантина. Методом ПМР-спектроскопии подтверждена структура синтезированных веществ. В результате биологических испытаний установлено, что ряд исследованных соединений обладает выраженной антимикробной, антигрибковой и антиоксидантной активностью и может быть рекомендован для дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** ксантин; синтез; антиоксидантная активность; противомикробная активность; противогрибковая активность.

Настоящая работа является продолжением наших исследований [1 – 4] по поиску биологически активных соединений в ряду N-замещенных и конденсированных производных ксантина. Уникальность биологических эффектов замещенных ксантина заключается прежде всего в их роли агонистов или антагонистов [5 – 9] пуриновых рецепторов, а, следовательно, производные ксантина могут оказывать регуляторное влияние на любые функции человеческого организма.

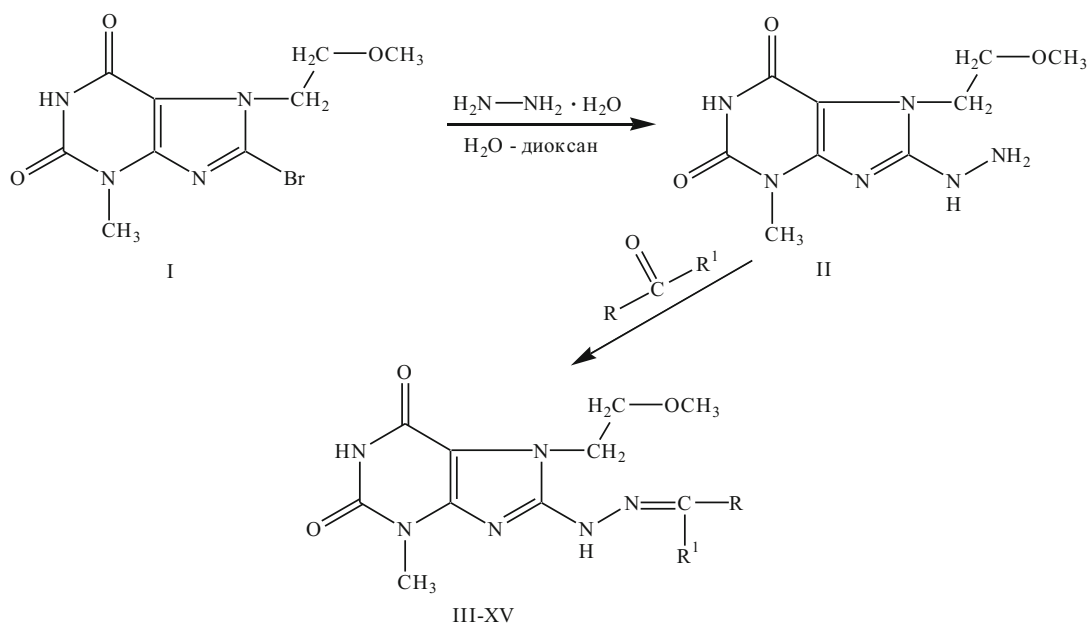
В соответствии с вышеизложенным, нами синтезированы не описанные ранее 8-бензилиденгидразинопроводные 3-метил-7-β-метоксиэтилксантина (III – XV) (схема) и изучена их антиоксидантная активность (АОА), противомикробное и противогрибковое действие.

Как показано на схеме, непродолжительное кипячение 8-бром-3-метил-7-β-метоксиэтилксантина (I) [4] с

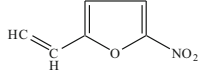
избытком гидразингидрата в водном диоксане приводит к образованию 8-гидразино-3-метил-7-β-метоксиэтилксантина (II). Реакцией гидразиноксантина II с альдегидами или *n*-метилацетофеноном в водном пропаноле-2 в присутствии каталитического количества хлоридной кислоты в течение 5 – 10 мин были получены соответствующие 8-бензилиденгидразиноксантины III – XV.

Строение синтезированных соединений однозначно подтверждено данными ПМР-спектроскопии. Наличие урацилового фрагмента подтверждается двумя синглетами соответствующей интенсивности в области 10,82 – 10,49 м.д. (N<sub>1</sub>H) и 3,28 – 3,19 м.д. (N<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>) (табл. 1). Метиленовые протоны метоксиэтильного заместителя в положении 7 фиксируются в виде 2 триплетов в интервале 4,74 – 4,46 м.д. (N<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>) и

Схема



## ПМР-спектры синтезированных соединений

Соединение	R	R <sup>1</sup>	δ-шкала, м.д.								
			N <sub>1</sub> H (с, 1H)	C <sub>8</sub> NH (с, 1H)	N=CH (с, 1H)	СН аром.	N-CH <sub>2</sub> (т, 2H)	OCH <sub>2</sub> (т, 2H)	OCH <sub>3</sub> (с, 3H)	N <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> (с, 3H)	Другие сигналы
II			10,64	7,99	-	-	4,15	3,54	3,30	3,19	4,34 (уш. с, 2H)-NH <sub>2</sub>
III	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	10,78	11,47	8,09	7,64 (д, 2H), 7,41 (м, 3H)	4,61	3,67	3,33	3,26	-
IV	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> - <i>n</i>	10,76	11,38	8,05	7,52 (д, 2H), 7,23 (д, 2H)	4,60	3,67	3,32	3,26	2,34 (с, 3H)-CH <sub>3</sub> - <i>n</i>
V	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> - <i>m</i>	10,77	11,51	8,04	7,32 (т, 1H), 7,19 (д, 2H), 6,93 (д, 1H)	4,62	3,68	3,80, 3,32	3,26	-
VI	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> - <i>n</i>	10,75	11,31	8,03	7,58 (д, 2H), 6,98 (д, 2H)	4,60	3,67	3,80, 3,32	3,26	-
VII	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> - <i>n</i>	10,75	11,30	8,02	7,57 (д, 2H), 6,96 (д, 2H)	4,59	3,67	3,32	3,26	4,06 (кв, 2H)-OCH <sub>2</sub> , 1,35 (т, 3H)-CCH <sub>3</sub>
VIII	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl- <i>o</i>	10,81	11,67	8,50	7,93 (м, 1H), 7,49 (м, 1H), 7,39 (м, 2H)	4,56	3,67	3,33	3,25	-
IX	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH- <i>o</i>	10,78	11,36	8,38	7,53 (д, 1H), 7,22 (т, 1H), 6,88 (м, 2H)	4,46	3,65	3,34	3,25	10,67 (с, 1H)-OH
X	H	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> - <i>n</i>	10,69	11,14	7,94	7,45 (д, 2H), 6,72 (д, 2H)	4,61	3,67	3,32	3,26	2,98 (с, 6H)-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
XI	H	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> OH(- <i>n</i> )OCH <sub>3</sub> (- <i>m</i> )	10,72	11,29	7,95	7,21 (с, 1H), 7,0 (д, 1H), 6,79 (д, 1H)	4,64	3,68	3,82, 3,32	3,26	9,35 (с, 1H)-OH
XII	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> - <i>n</i>	10,80	10,22	-	7,63 (д, 2H), 7,21 (д, 2H)	4,61	3,67	3,34	3,25	2,34 (с, 3H)-CH <sub>3</sub> - <i>n</i> , 2,29 (с, 3H)-CCH <sub>3</sub>
XIII	H	C(Br)=CH-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	10,77	11,84	7,93	7,83 (д, 2H), 7,42 (м, 3H)	4,74	3,66	3,32	3,24	7,54 (с, 1H)-CHPh
XIV	H	Пиридинил-3	10,82	11,83	8,22	8,90 (с, 1H), 8,64 (д, 1H), 8,27 (д, 1H), 7,65 (т, 1H)	4,59	3,66	3,33	3,25	-
XV	H		10,49	11,38	7,97 (д, 1H)	7,64 (д, 1H), 7,01 (д, 1H)	4,55	3,67	3,34	3,28	7,08 (м, 1H), 6,90 (д, 1H)

3,68 – 3,65 м.д. (OCH<sub>2</sub>), а протоны метильной группы резонируют в виде интенсивного синглета при 3,34 – 3,32 м.д. Следует отметить, что протоны метоксигруппы замещителя исходного гидразиноксантина II смещены в более слабое поле (табл. 1). Наличие арилметилиденгидразиновой группировки в положении 8 молекулы ксантина подтверждают интенсивные сигналы в слабом поле при 11,84 – 10,22 м.д. (C<sub>8</sub>NH) и 8,50 – 7,93 м.д. (N=CH). Сигналы протонов ароматических колец и замещителей в ароматическом ядре

четко регистрируются в соответствующем поле, соответствующей интенсивности и формы, что полностью подтверждает их структуру.

## Экспериментальная химическая часть

Температуру плавления определяли открытым капиллярным методом на приборе ПТП (М). ПМР-спектры записаны на спектрометре Bruker SF-400 (растворитель ДМСО-d<sub>6</sub> или ДМСО-d<sub>6</sub> + CDCl<sub>3</sub>, внутренний стандарт — ТМС). Элементный анализ выполнен на приборе Elementar Vario L cube. Данные элементного анализа соответствуют рассчитанным.

**8-Гидразинил-3-метил-7-(2-метоксиэтил)-3,7-дигидро-1H-пурин-2,6-дион (II).** Смесь 3,0 г (0,01 моль) бромоксантина I [4], 5 мл (0,1 моль) гидразингидрата, 30 мл воды и 10 мл диоксана кипятят 1 ч, охлаждают, осадок отфильтровывают, промывают водой и кристаллизуют из водного диоксана (табл. 2).

**Бензальдегид [7-(2-метоксиэтил)-3-метил-2,6-диоксо-2,3,4,5,6,7-гексагидро-1H-пурин-8-ил]гидразона (III).** К подогретому (50 – 60 °С) раствору 1,27 г (5 ммоль) гидразиноксантина II в смеси 20 мл воды и 20 мл пропанола-2 в присутствии 5 капель конц. HCl прибавляют 0,61 мл (6 ммоль) бензальдегида, кипятят 15 мин, охлаждают, осадок отфильтровывают, промывают водой, пропанолом-2, эфиром и кристаллизуют из водного диоксана (табл. 2).

Аналогично получают гидразоны IV – XV.

Таблица 2  
Выходы и температуры плавления полученных соединений

Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	Брутто-формула
II	89,4	245 – 247	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
III	93,5	261 – 263	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
IV	87,6	266 – 267	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
V	88,6	253 – 254	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
VI	94,0	266 – 267	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
VII	83,3	265 – 266	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
VIII	96,6	257 – 258	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
IX	97,7	257 – 258	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
X	67,5	259 – 260	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub>
XI	87,5	246 – 247	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub>
XII	92,9	250 – 252	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
XIII	95,2	235 – 237	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> BrN <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
XIV	41,9	246 – 247	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub>
XV	96,2	248 – 249	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>

## Противомикробная, противогрибковая и антиоксидантная активность синтезированных соединений

Соединение	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>		АОА *, %		
	МИК, мкг/мл	МБцК, мкг/мл	МИК, мкг/мл	МБцК, мкг/мл	МИК, мкг/мл	МБцК, мкг/мл	МИК, мкг/мл	МБцК, мкг/мл	$C = 10^{-3}$ , моль/л	$C = 10^{-5}$ , моль/л	$C = 10^{-7}$ , моль/л
III	100	100	50	100	100	200	100	200	57,59	10,34	0,69
IV	200	200	100	200	100	400	100	100	78,46	50,0	48,08
V	100	200	12,5	25	100	200	100	200	67,01	11,68	27,41
VI	100	200	12,5	50	100	200	100	200	52,76	15,86	9,66
VII	100	200	100	200	100	400	100	100	77,3	51,15	53,85
VIII	200	200	100	200	100	100	100	200	92,39	31,47	28,93
IX	100	100	100	100	100	200	100	100	81,38	11,72	4,14
X	200	200	25	50	100	400	100	100	61,15	36,92	35,15
XI	100	200	100	100	100	400	100	100	72,4	34,4	34,4
XII	100	100	200	200	100	400	100	100	78,46	28,25	30,77
XIII	100	200	25	100	50	400	50	100	84,4	50,4	40,4
XIV	200	200	50	50	100	200	100	100	44,16	24,87	25,38
XV	100	200	12,5	25	100	400	50	100	50,8	40,8	33,6
Аскорбиновая кислота	-	-	-	-	-	-	-	-	65,31	39,13	43,59
Дибунол	-	-	-	-	-	-	-	-	25,2	-	-

\* Достоверность результатов АОА всех соединений при  $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем.

## Экспериментальная биологическая часть

Противомикробное и противогрибковое действие соединений изучали с использованием эталонных тест-штаммов микроорганизмов, полученных из бактериологической лаборатории ГУ “Запорожский областной лабораторный центр государственной санитарной службы Украины”. В исследованиях использовали штаммы *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 885-653). Определение противомикробной и противогрибковой активности проводили методом двукратных серийных разведений на жидкой питательной среде. Для культивирования бактерий использовали бульон и агар Мюллера-Хинтона. Для выращивания грибов использовали среду Сабуро. Активность соединений оценивали по минимальной ингибирующей концентрации (МИК) и минимальной бактерицидной концентрации (МБцК). Выявленные эффекты сравнивали с литературными данными для препаратов сравнения: ампициллина, фарингосепта (амбазона моногидрата) и нистатина [10].

АОА изучали *in vitro* методом неферментного иницирования свободнорадикального окисления. В качестве субстрата использовали суспензию яичных липопротеидов (СЯЛ) [11], которую готовили путем гомогенизации яичного желтка в фосфатном буфере (рН = 7,4). К полученной суспензии с помощью дозатора (Biohit Proline) прибавляли спиртовые растворы исследуемых соединений в концентрациях  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-7}$  моль/л. Реакцию свободнорадикального окисления иницировали прибавлением 0,025 М раствора  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  с последующей инкубацией смеси на протяжении 60 мин при 37 °С. Реакцию останавливали 25 % раствором трихлоруксусной кислоты с трило-

ном Б. После центрифугирования в течение 30 мин к 25 % раствору тиобарбитуровой кислоты (ТБК) прибавляли надосадочную жидкость и нагревали на водяной бане 60 мин. Окрашенный комплекс малонового диальдегида с ТБК извлекали прибавлением *n*-бутанола. Методом спектрофотометрии определяли концентрацию малонового диальдегида, которая свидетельствовала об интенсивности процессов свободнорадикального окисления. Антиоксидантную активность (в процентах) определяли по формуле:

$$\text{АОА} = (C_{K1} - C_0) / (C_{K1} - C_{K2}) \cdot 100 \%,$$

где  $C_{K1}$ ,  $C_{K2}$  — содержание ТБК-реагентов в контрольных пробах, моль/л;  $C_0$  — содержание ТБК-реагентов в исследуемой пробе, моль/л.

Эталонными препаратами сравнения служили субстанции известных антиоксидантов [10] — аскорбиновой кислоты (Асфарма, Россия) и дибунола (ГНИИСКЛС, Россия).

Полученные данные обработаны общепринятыми методами вариационной статистики по критерию *t* Стьюдента с использованием программного обеспечения “Windows-2000”, электронных таблиц Excel и пакета математической обработки Mathcad-5,0 [12].

Как видно из приведенных в табл. 3 данных, в основном синтезированные соединения оказывают умеренное противомикробное и противогрибковое действие в отношении изученных штаммов микроорганизмов, однако ряд соединений (V, VI, X, XIII–XV) проявляет высокую избирательную активность в отношении *S. aureus*. Их минимальная бактериостатическая концентрация составляет 12,5–50 мкг/мл, а минимальная бактерицидная концентрация находится в пределах 25–100 мкг/мл. В соответствии с данными [13] минимальная бактериостатическая концентрация

ампициллина и амбазона моногидрата (фарингосепта) в отношении *S. aureus* составляет 62,5 мкг/мл. Наиболее высокая активность в отношении *Candida Albicans* выявлена у гидразонов XIII и XV, содержащих остатки  $\alpha$ -бромкоричного альдегида и 5-нитрофурил-2-акролеина. Минимальная ингибирующая концентрация противогрибкового препарата нистатина [13] составляет 62,5 мкг/мл. Следует отметить, что наиболее высокое бактериостатическое действие проявляют гидразины V и VI, содержащие метоксигруппы в *n*- и *m*-положениях бензольного ядра, а также гидразон XV, содержащий остаток 5-нитрофурана, что вполне закономерно, учитывая высокую противомикробную активность его производных.

Анализ результатов изучения АОА синтезированных соединений (табл. 3) показал, что большинство из них проявляет высокую АОА. Установлено, что с уменьшением концентрации АОА падает или практически исчезает (III, VI, IX). Для большинства синтезированных соединений высокая АОА сохраняется даже в концентрации  $10^{-7}$  моль/л. Наиболее активные соединения — *n*-метилбензилиден (IV)- и *n*-этоксibenзилиден (VII) производные, по нашему мнению, являются весьма перспективными для дальнейших биологических исследований.

Некоторые из синтезированных веществ можно отнести к потенциальным кандидатам для создания новых химиотерапевтических (V, VI, X, XIII, XV) и антиоксидантных (IV, VI) препаратов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Н. И. Романенко, И. В. Федулова, А. Н. Лесничая и др., *Хим.-фарм. журн.*, **31**(4), 28 – 29 (1997); *Pharm. Chem. J.*, **31**(4), 183 – 190 (1997).
2. Н. И. Романенко, И. В. Федулова, Б. А. Приймак и др., *Хим.-фарм. журн.*, **30**(3), 49 – 51 (1996); *Pharm. Chem. J.*, **30**(3), 194 – 196 (1996).
3. І. М. Білай, А. О. Остапенко, М. І. Романенко и др., *Запорж. мед. ж.*, **13**(4), 8 – 10 (2011).
4. М. І. Романенко, О. О. Мартинюк, С. О. Васюк и др., *Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики*, **10**(3), 53 – 56 (2012).
5. S. A. Kim, M. A. Marshall, N. Melman, et al., *J. Med. Chem.*, **45**(11), 2131 – 2138 (2002).
6. A. M. Hayallah, J. Sandoval-Ramirez, U. Reith, et al., *J. Med. Chem.*, **45**(7), 1500 – 1510 (2002).
7. J. Hockemeyer, J. C. Burbiel, and C. E. Muller, *J. Org. Chem.*, **69**(10), 3308 – 3318 (2004).
8. A. Richter and M. Hamann, *Brit. J. Pharmacol.*, **134**(2), 343 – 352 (2001).
9. L. Yan and C. E. Muller, *J. Med. Chem.*, **47**(4), 1031 – 1043 (2004).
10. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая волна, Москва (2005).
11. М. І. Романенко, Д. Г. Іванченко, Р. В. Жмурін и др., *Запорж. мед. ж.*, **33**(4), 144 – 147 (2005).
12. С. Н. Лапчан, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич, *Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL*, Морион, Киев (2000).
13. А. В. Таран, Н. И. Романенко, Л. В. Евсеева и др., *Український біофарм. ж.*, **9**(4), 62 – 66 (2010).

Поступила 26.07.13

## SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF 8-BENZYLIDENEHYDRAZINO-3-METHYL-7- $\beta$ -METHOXYETHYLXANTHINES

N. I. Romanenko, O. A. Pakhomova, D. G. Ivanchenko, A. M. Kamyshnyi, and N. N. Polishchuk

Zaporozhye State Medical University, 69035 Zaporozhye, Ukraine

A simple preparative synthesis of 8-hydrazino-3-methyl-7- $\beta$ -methoxyethylxanthine has been developed. The reactions of obtained hydrazinoxanthine with aldehydes and ketones have been studied and, as a result, a series of previously undescribed 8-ylidenehydrazino derivatives of 3-methyl-7- $\beta$ -methoxyethylxanthine have been synthesized. The structures of synthesized compounds have been proven by the data of elemental analysis and NMR spectroscopy. Biological activity testing showed that some of the obtained compounds exhibit pronounced antibacterial, antifungal, and antioxidant properties and can be recommended for further investigation as potential drugs.

**Keywords:** xanthine; synthesis; antioxidant activity; antibacterial activity; antifungal activity