

© Коллектив авторов, 2014

С. С. Зыкова¹, Т. Ф. Одегова², О. Г. Карманова³, Р. Р. Махмудов⁴

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 2,3-БИС-(2-ОКСОИЛИДЕН)-1,3,4,6-ТЕТРАГИДРОХИНОКСАЛИНОВ

¹ ФКОУ ВПО "Пермский институт федеральной службы исполнения наказаний", Пермь, Россия

² ФГБОУ ВПО "Пермская государственная фармацевтическая академия", Пермь, Россия, 614099, ул. Полевая, 2

³ ФГБОУ ВПО "Московский физико-технический институт (государственный университет)", Москва, Россия, 117303, ул. Керченская, 1а, корп. 1

⁴ ФГБОУ ВПО "Пермский государственный национальный исследовательский университет", Пермь, Россия

Конденсацией алкилметилкетонов с диэтилоксалатом и 1,2-диаминобензолом получены 2,3-бис-(2-оксоилиден)-1,3,4,6-тетрагидрохиноксалины (II – V). С помощью спектральных методов анализа выявлены четыре изомерные формы, обсуждаются особенности строения синтезированных соединений. Исследована биологическая активность полученных соединений. Обнаружено, что синтезированные соединения обладают низкой токсичностью. Выявлено, что (1Z,1'Z)-1,1'-(1,4-дигидрохиноксалин-2,3-диилиден)дипутан-2-он (соединение II) обладает антиноцицептивной активностью, превышающей активность метамизола натрия. Антиоксидантная активность на модели оценки окислительной устойчивости бактерий *Escherichia coli* BW 25113 в присутствии 3 мМ раствора пероксида водорода также наиболее выражена у соединения II, соединение V обладает прооксидантной активностью. Соединения показали высокую антирадикальную активность в реакции связывания дифенилпикрилгидразида (ДФПГ), которая не уступает тролоксу.

Ключевые слова: 1,3,4,6-тетракарбонильные соединения; 2,3-бис-(2-оксоилиден)-1,3,4,6-тетрагидрохиноксалины; *Escherichia coli* BW 25113; антиноцицептивная активность; антиоксидантная активность; антирадикальная активность; острая токсичность.

Ранее показано, что 1,3,4,6-тетракарбонильные соединения I [1, 2] легко взаимодействуют с 1,2-диаминобензолом с образованием биологически активных 2,3-бис-оксоилиденпроизводных 1,3,4,6-тетрагидрохиноксалинов (II) [1, 3, 4].

С целью поиска новых биологически активных веществ нами впервые получены 2,3-бис-(2-оксоилиден)-1,3,4,6-тетрагидрохиноксалины (II – V) (табл. 1), имеющие различные алкильные заместители в ацилметиленовых звеньях, в результате кратковременного нагревания (в течение 5 – 6 мин) 1,6-диалкил-3,4-дигидрокси-2,4-гексадиен-1,6-дионон I с 1,2-диаминобензолом в этаноле (метод А) (рис. 1).

Синтезированные соединения II – V представляют собой желтые или оранжевые кристаллические вещества, растворимые в хлороформе, диметилсульфоксиде (ДМСО), трудно растворимые в этаноле, не растворимые в воде. Выходы и константы хиноксалинов II – V представлены в табл. 1. С помощью спектральных методов у соединений II – V обнаружено несколько таутомерных форм (схема 1).

Нам впервые удалось осуществить одnoreакторную конденсацию алкилметилкетонов с диэтилоксалатом в присутствии метилата натрия при соотношении 2:1 с последующей нейтрализацией и действием 1,2-диаминобензола, в результате которой были выделены новые бис-(оксоилиден)хиноксалины II – V (метод Б).

Константы и выходы 2,3-бис-(2-оксоилиден)-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалинов II – V

Таблица 1

Соединение	Alk ¹	Alk ²	Т. пл., °С	Выход, %		Брутто-формула	Молекулярная масса
				Метод А	Метод Б		
II	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	122 – 124	61	39	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₂	270,33
III	n-C ₃ H ₇	n-C ₃ H ₇	114 – 116	61	43	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₂	298,38
IV	n-C ₆ H ₁₃	n-C ₆ H ₁₃	58 – 59	46	37	C ₂₄ H ₃₄ N ₂ O ₂	382,54
V	C ₂ H ₅	n-C ₃ H ₇	100 – 102	51	27	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₂	284,35

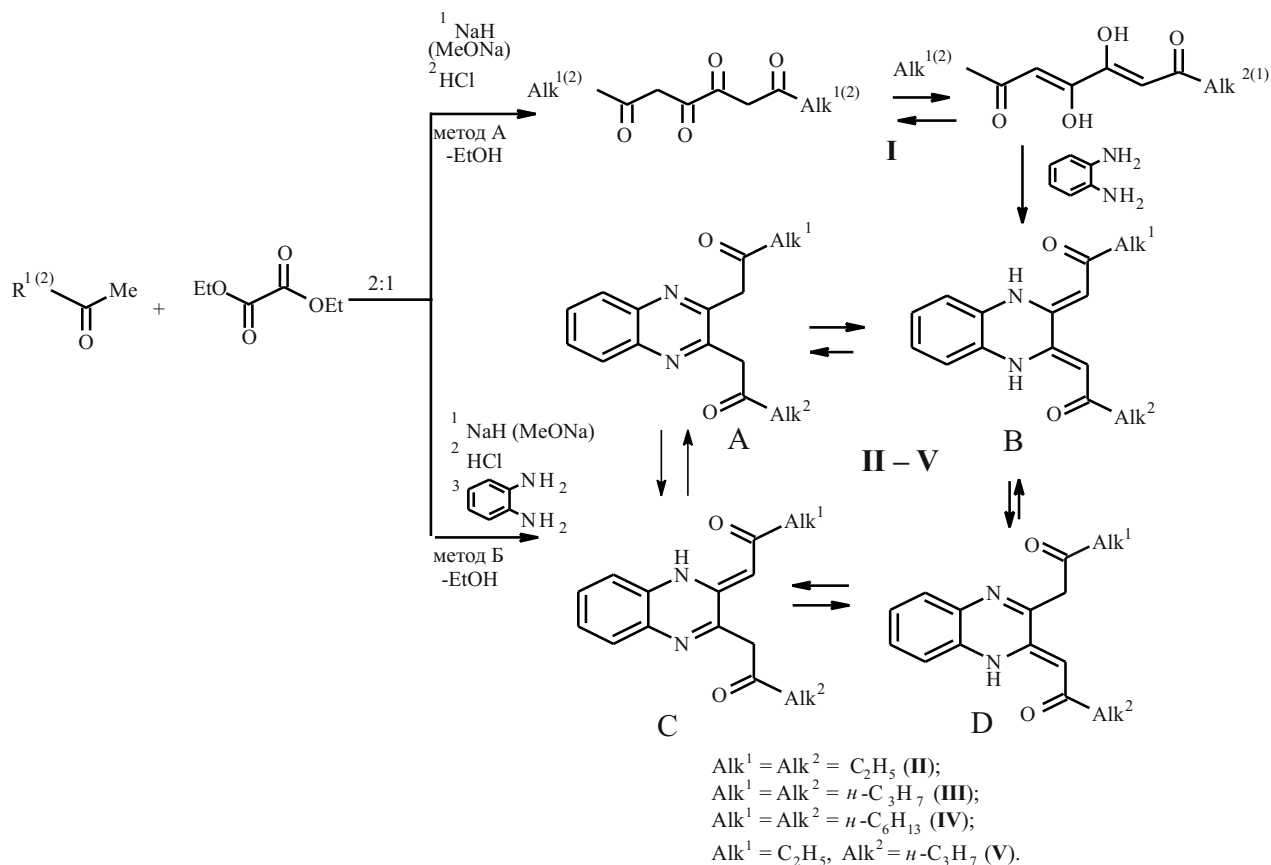


Рис. 1. Синтез 2,3-бис-(2-оксоаллиден)-1,3,4,6-тетрагидрохиноксалинов (II – V).

Соединения II – V в твердом состоянии существуют в форме изомера А, о чем свидетельствует отсутствие полос поглощения в области $3100 - 3400 \text{ см}^{-1}$ группы NH и наличие высокочастотных сигналов поглощения несопряженных карбонильных групп ацильных звеньев при $1705 - 1737 \text{ см}^{-1}$ в ИК спектрах (табл. 2).

В полярных растворителях (ДМСО) у соединений II – V преобладающей является форма В (86 – 99 %), стабилизированная двумя NH-хелатными циклами, что свидетельствует о ее большей устойчивости (табл. 3).

Таким образом, показано, что 1,6-диалкил-3,4-дигидрокси-2,4-гексадиен-1,6-дионы I легко вступают в реакцию с 1,2-диаминобензолом. В результате получена серия тетрагидрохиноксалинов II – V. Установлено, что новые оксипроизводные хиноксалина в твердом состоянии, судя по данным ИК-спектров, существуют в виде изомера А, а в растворах полярных растворителей наиболее устойчивой является форма В, стабилизированная двумя NH-хелатными циклами.

Экспериментальная химическая часть

ИК спектры полученных соединений II – V записаны на спектрофотометре “Spectrum Two Perkin Elmer” в вазелиновом масле и на ИК-Фурье спектрометре Bruker Alpha, приставка НПВО (ZnSe) в растворе хлороформа. Спектры ЯМР ^1H соединений Bruker Alpha (500 МГц), внутренний стандарт — ТМС. Масс-спек-

тры записаны на приборе Agilent Technologies 6890N/5975B, колонка: HP-5ms, $30 \text{ м} \times 0,25 \text{ мм}$, $0,25 \text{ мкм}$, газ-носитель — гелий (1 мл/мин), ионизация электронным ударом (70 эВ). Элементный анализ вы-

Таблица 2
Спектральные характеристики 2,3-бис-(2-оксоаллиден)-1,3,4,6-тетрагидрохиноксалинов (II – V)

Соединение	ИК-спектр, $\nu, \text{ см}^{-1}$ (вазелиновое масло)
II	3082 слаб. (CH, C_6H_4), 1705 (C(2,2')=O), 1603, 1585 ушир. (C=C, C_6H_4), 1544 (N(1,4)=C(2,3)), 1482 $\delta_{\text{ас}}(\text{CH}_3)$, 1431 $\delta_{\text{крутильные}}(\text{CH}_2)$, 1385, 1358 $\delta_{\text{с}}(\text{CH}_3)$, 1283, 1214 $\delta_{\text{верные}}(\text{CH}_2)$, 1188, 1118, 1087, 1052, 1029, 945, 940 $\nu_{\text{скелетные}}(\text{C-C})$, 783 $\delta_{\text{маятниковые}}(\text{CH}_3)$, 640, 584 $\nu_{\text{скелетные}}(\text{C-C})$.
III	3084 слаб. (CH, C_6H_4), 1737 (C(2,2')=O), 1594, 1568 ушир. (C=C, C_6H_4), 1543 (N(1,4)=C(2,3)), 1491 $\delta_{\text{ас}}(\text{CH}_3)$, 1438 $\delta_{\text{крутильные}}(\text{CH}_2)$, 1377, 1364 $\delta_{\text{с}}(\text{CH}_3)$, 1321, 1297, 1283, 1215 $\delta_{\text{верные}}(\text{CH}_2)$, 1172, 1138, 1117, 1075, 1063, 1025, 967, 937 $\nu_{\text{скелетные}}(\text{C-C})$, 749 $\delta_{\text{маятниковые}}(\text{CH}_3)$, 619, 590 $\delta_{\text{скелетные}}(\text{C-C})$.
IV	3157 слаб. (CH, C_6H_4), 2923 $\nu_{\text{ас}}(\text{CH}_3)$, 2853 $\nu_{\text{с}}(\text{CH}_2)$, 1741 (C(2,2')=O), 1598 ушир. (C=C, C_6H_4), 1573 (N(1,4)=C(2,3)), 1491 $\delta_{\text{ас}}(\text{CH}_3)$, 1442 $\delta_{\text{крутильные}}(\text{CH}_2)$, 1348 $\delta_{\text{с}}(\text{CH}_3)$, 1325, 1282, 1229 $\delta_{\text{верные}}(\text{CH}_2)$, 1177, 1158, 1134, 1109, 1068, 1029, 981, 943 $\nu_{\text{скелетные}}(\text{C-C})$.
V	3084 слаб. (CH, C_6H_4), 1732 (C(2,2')=O), 1600, 1586 ушир. (C=C, C_6H_4), 1557 (N(1,4)=C(2,3)), 1492 $\delta_{\text{ас}}(\text{CH}_3)$, 1435 $\delta_{\text{крутильные}}(\text{CH}_2)$, 1377, 1363 $\delta_{\text{с}}(\text{CH}_3)$, 1323, 1281, 1214 $\nu_{\text{верные}}(\text{CH}_2)$, 1162, 1133, 1119, 1056, 936 $\delta_{\text{скелетные}}(\text{C-C})$, 766 $\delta_{\text{маятниковые}}(\text{CH}_3)$, 600, 551 $\nu_{\text{скелетные}}(\text{C-C})$.

Спектры ЯМР ^1H 2,3-бис-(2-оксоилиден)-1,3,4,6-тетрагидрохиноксалинов (II – V), записанные в ДМСО- d_6 , δ , м.д./(ТМС)

Соединение	C(1')H, с D	C(1')H, с C	C(1,1')H, с B	C(1)H, с D	C(1)H ₂ , с D	C(1,1')H ₂ , с A	N(1)H, с B	N(4)H, с D	N(4)H, с C	N(1,4)H, с B	N(4)H, с B	N(1)H, с D
II	5,64	-	6,06	-	4,14	4,24	13,95	14,72	-	-	-	-
III	5,62	-	6,05	-	4,15	-	14,02	14,76	-	-	-	-
IV	-	-	6,05	-	-	-	-	-	-	14,03	-	-
V	-	5,65	6,07	-	4,15	4,24	13,96	14,77	14,72	-	14,03	-

полнен на анализаторе углерода, водорода, азота и серы CHNS-932 LECO. Данные элементного анализа соответствуют вычисленным значениям.

Синтез 2,3-бис-(2-оксоилиден)-1,3,4,6-тетрагидрохиноксалинов (II – V)

Метод А. К 10,8 мл (100 ммоль) 2-пентанона, или 14,2 мл (100 ммоль) 2-гептанона, или 15,6 мл (100 ммоль) 2-октанона или смеси 4,4 мл (50 ммоль) 2-бутанона и 5,4 мл (50 ммоль) 2-пентанона, 6,8 мл (50 ммоль) диэтилоксалата и 200 мл толуола добавляют при перемешивании и охлаждении 4,0 г (100 ммоль) 60 % суспензии гидроксида натрия в минеральном масле, 0,1 мл абсолютного метанола и кипятят 1,5 – 2 ч. Растворитель выпаривают, к остатку при перемешивании добавляют 100 мл охлажденной 15 % соляной кислоты, выпавший осадок соединений I отфильтровывают, сушат, перекристаллизовывают из этилацетата или этанола. К 4,96 г (25 ммоль) или 5,66 г (25 ммоль), или 7,06 г (25 ммоль), или 5,3 г (25 ммоль) в 50 мл этанола добавляют 2,7 г (25 ммоль) 1,2-диаминобензола при непродолжительном кипячении. Растворитель выпаривают, остаток растирают с диэтиловым эфиром, высушивают, получают соединения II – IV. Перекристаллизовывают из этилацетата или этанола.

Метод Б. К 4,4 мл (50 ммоль) 2-бутанона (для синтеза соединения II) или 5,4 мл (50 ммоль) 2-пентанона (для синтеза соединения III), или 7,1 мл (50 ммоль) 2-гептанона (для синтеза соединения IV), или смеси 2,2 мл (25 ммоль) 2-бутанона и 2,7 мл (25 ммоль) 2-пентанона (для синтеза соединения V), 3,4 мл (25 ммоль) диэтилоксалата и 100 мл толуола добавляют при перемешивании и охлаждении 2,0 г (50 ммоль) 60 % суспензии гидроксида натрия в минеральном масле, 0,1 мл абсолютного метанола и нагревают 1,5 – 2 ч.

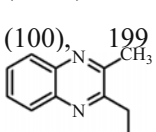
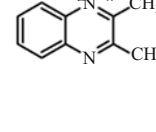
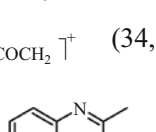
Таблица 4
Результаты фармакологических исследований соединений II – V

Соединение	Доза, мг/кг	Латентный период ноцицептивной реакции, с	Острая токсичность (LD ₅₀), мг/кг
II	50 мг/кг, в/б	21,80 ± 1,28	> 800
III	50 мг/кг, в/б	20,35 ± 1,12	> 800
IV	50 мг/кг, в/б	19,65 ± 0,86	> 800
V	50 мг/кг, в/б	19,89 ± 1,04	> 800
Контроль	50 мг/кг, в/б	10,70 ± 1,62	-
Метамизол натрия	93 мг/кг (ED ₅₀)	16,33 ± 3,02	-

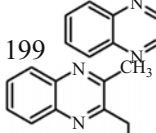
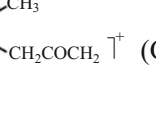
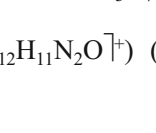
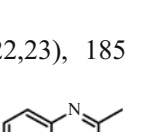
$p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Растворитель выпаривают, к остатку при перемешивании добавляют 50 мл 15 % соляной кислоты и 2,7 г (25 ммоль) 1,2-диаминобензола. Через 1 – 1,5 ч выпавший осадок соединений (II – V) отфильтровывают, сушат. Перекристаллизовывают из этилацетата или этанола.

(1Z,1'Z)-1,1'-(1,4-Дигидрохиноксалин-2,3-дилиден)дибутан-2-он (II). C₁₆H₁₈N₂O₂. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6): 1,01 (т, 6H, 2C(4,4')H₃, A), 1,03 (т, 3H, C(4)H₃, D), 1,12 (т, 6H, 2C(4,4')H₃, B), 1,13 (т, 3H, C(4')H₃, D), 2,45 (кв, 4H, 2C(3,3')H₂, A), 2,52 (кв, 4H, 2C(3,3')H₂, B), 2,53 (кв, 2H, C(3')H₂, D), 2,69 (кв, 2H, C(3)H₂, D), 4,14 (с, 2H, C(1)H₂, D), 4,24 (с, 4H, 2C(1,1')H₂, A), 5,64 (с, 1H, C(1')H, D), 6,06 (с, 2H, 2C(1,1')H, B), 7,12, 7,30 (два д, 4H, C₆H₄, B), 7,40 – 7,75 (м, 4H, C₆H₄, D), 7,85, 8,06 (два д, 4H, C₆H₄, A), 13,95 (с, 1H, N(1)H, B), 14,72 (с, 1H, N(4)H, D). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$): 271 M+1⁺ (4,78), 270 M⁺ (22,07), 241 M – C₂H₅⁺ (5,87), 213 M – C₂H₅CO⁺

(100),  199 CH₃⁺ (34,65), 185  CH₂COCH₃⁺ (47,42), 158  (C₁₀H₁₀N₂)⁺ (78,11), 103 C₆H₅CN⁺ (7,62), 57 C₂H₅CO⁺ (78,49), 43 MeCO⁺ (CONH⁺) (2,17).

(1Z,1'Z)-1,1'-(1,4-Дигидрохиноксалин-2,3-дилиден)дипентан-2-он (III). C₁₈H₂₂N₂O₂. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6): 0,78 (т, 3H, C(5)H₃, D), 0,96 (т, 6H, 2C(5,5')H₃, B), 1,19 (т, 3H, C(5')H₃, D), 1,66 (м, 4H, 2C(4,4')H₂, B), 1,66 (м, 4H, 2C(4,4')H₂, D), 2,47 (т, 4H, 2C(3,3')H₂, B), 2,47 (т, 2H, C(3')H₂, D), 2,67 (т, 2H, C(3')H₂, D), 4,15 (с, 2H, C(1)H₂, D), 5,62 (с, 1H, C(1')H, D), 6,05 (с, 2H, 2C(1,1')H, B), 7,12, 7,28 (двад, 4H, C₆H₄, B), 7,40 – 7,80 (м, 4H, C₆H₄, D), 14,02 (с, 1H, N(1)H, 7B). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$): 299 M+1⁺ (4,79), 298 M⁺ (20,97), 255 M – C₃H₇⁺ (4,10), 228 M – C₃H₇CO + H⁺ (75,39), 227 M – C₃H₇CO⁺ (99,67),

199  CH₃⁺ (22,23), 185  CH₂COCH₃⁺ (38,19), 160  (C₁₀H₁₂N₂)⁺ (1,35), 158  (C₁₀H₁₀N₂)⁺ (68,73), 103 C₆H₅CN⁺ (5,11), 77 C₆H₅⁺ (5,11), 71 C₃H₇CO⁺ (40,45), 43 C₃H₇⁺ (43 MeCO⁺) (100).

(1Z,1'Z)-1,1'-(1,4-Дигидрохиноксалин-2,3-дилиден)диоктан-2-он (IV). Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6): 0,91 (т, 6H, 2C(8,8')H₃, B), 1,32 (м, 4H, 2C(7,7')H₂, B), 1,32 (м, 4H, 2C(6,6')H₂, B), 1,32 (м, 4H, 2C(5,5')H₂, B), 1,63 (м, 4H, 2C(4,4')H₂, B), 2,48 (т, 4H, 2C(3,3')H₂, B), 6,05 (с, 2H, 2C(1,1')H, B), 7,12, 7,28 (двад, 4H, C₆H₄, B), 14,03 (с, 1H, N(1,4)H, B). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$): 382 M^+ (41), 364 $\text{M} - \text{H}_2\text{O}^+$ (1,5), 269 $\text{M} - \text{C}_6\text{H}_{13}\text{CO}^+$

(100), 213 $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}^+$ (13,5),

185 $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}^+$ (21), 158 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2^+$ (32), 113 $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CO}^+$ (8), 103 $\text{C}_6\text{H}_5\text{CN}^+$ (1), 85 $\text{C}_6\text{H}_{13}^+$ (7), 43 MeCO^+ (CONH^+) (88).

(1Z)-1-[(3Z)-3-(2-Оксобутилиден)-3,4-дигидрохиноксалин-2(1H)-илиден]пентан-2-он (V). Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6): 0,75 (т, 3H, C(5)H₃, A), 0,89 (т, 3H, C(5)H₃, D), 0,91 (т, 3H, C(4')H₃, C), 0,96 (т, 3H, C(5)H₃, B), 1,01 (т, 3H, C(4')H₃, A), 1,12 (т, 3H, C(4')H₃, B), 1,21 (т, 3H, C(5)H₃, C), 1,33 (т, 3H, C(4')H₃, D), 1,57 (м, 2H, C(4)H₂, D), 1,57 (м, 2H, C(4)H₂, A), 1,66 (м, 2H, C(4)H₂, B), 1,86 (м, 2H, C(4)H₂, C), 2,32 (т, 2H, C(3)H₂, A), 2,38 (т, 2H, C(3)H₂, D), 2,42 (кв, 2H, C(3')H₂, C), 2,42 (кв, 2H, C(3')H₂, A), 2,48 (т, 2H, C(3)H₂, B), 2,55 (кв, 2H, C(3')H₂, B), 2,65 (т, 2H, C(3)H₂, C), 2,70 (кв, 2H, C(3')H₂, D), 4,15 (с, 2H, C(1')H₂, D), 4,15 (с, 2H, C(1)H₂, C), 4,24 (с, 4H, 2C(1,1')H₂, A), 5,62 (с, 1H, C(1)H, D), 5,65 (с, 1H, C(1')H, C), 6,07 (с, 2H, 2C(1,1')H, B), 7,13, 7,32 (двад, 4H, C₆H₄, B), 7,40 – 7,80 (м, 4H, C₆H₄, D), 7,40 – 7,80 м (4H, C₆H₄, C), 7,82, 8,09 (два д, 4H, C₆H₄, A), 13,96 (с, 1H, N(1)H, B), 14,03 (с, 1H, N(4)H, B), 14,77 (с, 1H, N(1)H, D), 14,72 (с, 1H, N(4)H, C).

Экспериментальная биологическая часть

Для определения антиноцицептивной активности на мышах синтезированных соединений II – V использован метод термического раздражения лап “горячая пластинка” [5]. Показателем ноцицепции являлось облизывание лапок животными при помещении их на металлическую пластинку, нагретую до 55 °С. Оценивали продолжительность пребывания животного на горячей пластинке до проявления ноцицептивной реакции (латентный период) в минутах. Исследуемые соединения вводили внутривентриально белым беспородным мышам (самки) массой 18 – 22 г в дозе 50 мг/кг за 30 мин до помещения животного на металлическую пластинку. Каждое соединение испытывали на шести животных. В качестве препарата сравнения использовали коммерчески доступную субстанцию метамизола натрия (анальгин) производства ООО “Фармхимкомплект” в дозе 93 мг/кг, соответствующей ЕД₅₀ по тесту “горячая пластинка”. Контрольной группе животных вводили соответствующий объем 2 % крахмальной слизи. Результаты оценивали по увеличению времени наступления оборонительного рефлекса

по сравнению с исходными данными. Статистическую обработку эксперимента проводили с использованием t -критерия Стьюдента. Эффект считали достоверным при $p < 0,05$.

Исследования показали, что соединения II – V вдвое увеличивают латентный период ноцицептивной реакции по сравнению с контрольной группой. Анальгетическая активность синтезированных соединений превышает на 22 – 35 % анальгетическую активность эталонного препарата метамизола натрия (табл. 4).

Определение острой токсичности соединений II – V проводили на мышах обоего пола массой 18 – 22 г по 10 животных в группе на дозу. Исследуемые вещества вводили перорально в 3 % крахмальной слизи в диапазоне от 500 до 1500 мг/кг. Токсичность изучали при пероральном введении, т.к. это путь, который предполагается в дальнейшем для клинического применения [6]. Наблюдение за животными осуществляли в течение 10 дней. Оценивали состояние волосяного и кожного покровов, окраску слизистых оболочек, интенсивность и характер двигательной активности, потребление воды и пищи, изменение массы тела. Контрольной группе животных вводили перорально 3 % крахмальную слизь. Показателем токсичности служила доза, вызывающая к концу опыта гибель 50 % животных (ЛД₅₀). Острую токсичность рассчитывали, соблюдая рекомендации по изучению общетоксического действия биологически активных веществ [6].

Как показали результаты исследования острой токсичности синтезированных соединений II – V, достоверно значимых отклонений в массе экспериментальных животных и других симптомов интоксикации не выявлено. ЛД₅₀ исследуемых соединений при однократном пероральном введении составляет > 800 мг/кг (диклофенак ЛД₅₀ = 62,5 мг/кг, ибупрофен ЛД₅₀ = 636 мг/кг) [7, 8]. Данные соединения, согласно классификации К. К. Сидорова, относятся к разряду малотоксичных [9].

Антиоксидантную активность синтезированных соединений изучали на модели оценки окислительной устойчивости, которую создают на бактериях *E. coli* штамм BW 25113 при добавлении раствора H₂O₂ в концентрации 3 мМ [8]. Культуру бактерий выращивали аэробно на минимальной среде М-9 с добавлением глюкозы. После центрифугирования клетки из конечной культуры ресуспендировали в 100 мл свежей среды до показателя оптической плотности при 600 нм от 0,1 – 0,5 и далее выращивали при 37 °С в колбах объемом 250 мл перемешиванием при частоте вращения 150 об/мин. За ростом бактерий следили по изменению величины оптической плотности, измеряемой на фотометре КФК-3 (толщина кюветы 5 мм). В середине логарифмической фазы роста клетки центрифугировали и затем ресуспендировали в 4 мл среды М-9. По 100 мкл клеточной суспензии (до конечной оптической плотности 0,1) вносили в пробирки, содержащие 5 мл среды и 50 мкл веществ, взятых в конечных концентрациях $1 \cdot 10^{-5}$ М и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. В дальнейшем клетки бактерий под-

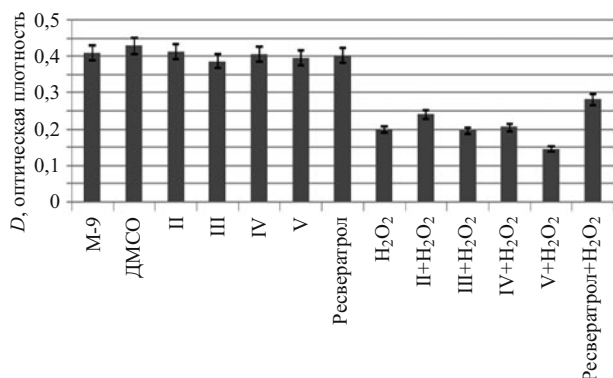


Рис. 2. Удельная скорость роста бактерий *Escherichia coli* BW 25113 за 1 ч.

вергали действию H₂O₂ (3 мМ) и инкубировали ещё в течение 1 ч каждые 30 мин [9]. Удельную скорость роста рассчитывали по уравнению:

$$\mu = \ln(N/N_0)/t;$$

где μ — удельная скорость роста, ч⁻¹, N и N_0 — значения оптической плотности в начальный и t момент времени соответственно.

На модели окислительного стресса в культуре клеток штамма *E. coli* BW 25113 исследовали удельный рост за 1 ч в присутствии 4 соединений 2,3-бис-оксоилиденпроизводных 1,3,4,6-тетрагидрохиноксалинов II – V. Исследуемые вещества вводили в эквимольной концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М в ДМСО. В качестве стандарта антиоксидантной активности использовали субстанцию ресвератрола (производство ООО “Фитопанацея”), который соответствовал молярной концентрации исследуемых соединений. Результаты исследований отражены на рис. 2.

Показатели удельной скорости роста бактерий в присутствии соединений III, IV, V статистически значимо отличались от контроля ($p < 0,05$ по t -критерию Стьюдента).

Удельная скорость роста бактерий за 1 ч позволяет оценить протективное антиоксидантное действие синтезированных соединений на бактерии кишечной палочки. Показатель удельной скорости роста позволяет оценить вклад соединений в создании устойчивости бактерий к раствору пероксида водорода [11, 12]. Наиболее активно защищает бактериальную культуру со-

единение II, проявляющее антиоксидантную активность, соединение V обладает прооксидантной активностью, усиливая бактериостатическое действие пероксида водорода.

Для определения антирадикальной активности использовали реакцию со стабильным свободным радикалом дифенилпикрилгидразилом (ДФПГ) (производство Sigma-Aldrich) [10]. Концентрация ДФПГ в 95 % этаноле составила $6,5 \cdot 10^{-5}$ М. В качестве эталона сравнения антирадикальной активности использовался тролокс (производство Sigma-Aldrich).

Реакционная смесь, которая состоит из 3 мл 0,3 мМ раствора ДФПГ, 1 мл буферного раствора ТРИС-НСl с рН = 7,4 и $1 \cdot 10^{-5}$ М веществ или тролокса, растворенных в ДМСО, инкубируется при стандартных температурных условиях ($T = 293$ К) в течение 30 мин. Затем при длине волны 517 нм в кюветах с толщиной слоя 0,5 см определяют оптическую плотность реакционной смеси на фотоэлектроколориметре КФК-3-01. Были сделаны контрольные измерения синтезированных соединений без ДФПГ при 517 нм. Ингибирующий эффект представляет собой убыль радикалов ДФПГ (Q), которую рассчитывают по формуле:

$$Q = 100(D_0 - D_x)/D_0,$$

где D_0 — оптическая плотность контрольного раствора ДФПГ, D_x — оптическая плотность раствора ДФПГ в присутствии исследуемого вещества, либо раствора эталона сравнения. Полученные измерения обрабатывали по стандартной методике с использованием критерия Стьюдента (доверительная вероятность составляла 0,95). Каждый результат представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (табл. 5).

Радикал-связывающая активность с ДФПГ наиболее выражена у соединений II и V. Убыль радикалов в присутствии соединений II и V незначительно уступает тролоксу.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что конденсация алкилметилкетонов с диэтилоксалатом и 1,2-диаминобензолом приводит к 2,3-бис-(2-оксоилиден)-1,3,4,6-тетрагидрохиноксалинам II – V. С помощью спектральных методов анализа выявлены 4 изомерные формы, доказаны особенности строения синтезированных соединений. Исследована биологическая активность полученных соединений. Антиоксидантной активностью обладает соединение II, а прооксидантной активностью — соединение V. Данные соединения продемонстрировали высокую радикал-связывающую активность, незначительно уступающую тролоксу. Прооксидантная активность синтезированного хиноксалина V, возможно, связана со способностью присоединять протоны, как от органических молекул, так и от металлов переменной валентности (в реакции Фентона) [13]. Проведенные исследования позволяют предположить перспективность дальнейших поисков биологически активных соедине-

Таблица 5
Антирадикальная активность 2,3-бис-(2-оксоилиден)-1,3,4,6-тетрагидрохиноксалинов

Соединение	Убыль радикалов Q , %
II	81,51 \pm 6,42*
III	27,84 \pm 6,34*
IV	40,50 \pm 3,78
V	80,85 \pm 5,57*
Тролокс	87,40 \pm 5,18*

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

ний в ряду 2,3-бис-оксоилиденпроизводных 1,3,4,6-тетрагидрохиноксалинов.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Poje, K. Balenović, *J. Heterocycl. Chem.*, **16**(3), 417 – 420 (1979).
2. В. О. Козьминых, В. И. Гончаров, А. Г. Макаров и др., *Вестн. Оренбург. гос. ун-та*, **3**(67), 112 – 122 (2007).
3. В. О. Козьминых, Н. М. Игидов, Ю. С. Андрейчиков и др., *Хим.-фарм. журн.*, **26**(9 – 10), 59 – 63 (1992); *Pharm. Chem. J.*, **26**(9 – 10), 735 – 739 (1992).
4. П. П. Муковоз, В. О. Козьминых, *Инновационные процессы в области химико-педагогического и естественно-научного образования: материалы Всерос. науч.-практич. конф.*, Оренбург (2009), т. 1, сс. 231 – 234.
5. N. V. Eddy, D. J. Leimbach, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **107**(3), 385 – 393 (1953).
6. А. Н. Миронов, Н. С. Бунатян, *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Гриф и К, Москва (2012), с. 212.
7. О. П. Неугодна, Г. В. Цариченко, С. Е. Рындина и др., *Фармакол. и токсикол.*, № 1, с. 123 (1986).
8. Р. Д. Сюбаев, М. Д. Машковский, Г. Я. Шварц и др., *Хим.-фарм. журн.*, **20**(1), 33 – 39 (1986); *Pharm. Chem. J.*, **20**(1), 17 – 22 (1986).
9. Н. Ф. Измеров, И. В. Саноцкий, К. К. Сидоров, *Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном введении*, Медицина, Москва (1997), сс. 196 – 197.
10. К. В. Безматерных, Т. И. Ширшова, И. В. Бышлей и др., *Хим.-фарм. журн.*, **48**(2), 36 – 40 (2014); *Pharm. Chem. J.*, **48**(2), 116 – 120 (2014).
11. O. Oktyabrsky, G. Vysochina, N. Muzyka, et al., *J. Appl. Microbiol.*, **106**, 1175 – 1183 (2009).
12. P. Molyneux, *Songklanakar J. Sci. Technol.*, **26**(2), 211 – 219 (2004).
13. V. Halliwell, J. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine, third ed.*, Oxford Univer. Press, Oxford, UK (1999), p. 936.

Поступила 07.03.14

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF 2,3-BIS-OXOYLIDENE-1,3,4,6-TETRAHYDROQUINOXALINES

S. S. Zykova¹, T. F. Odegova², O. G. Karmanova², and R. R. Makhmudov³

¹ Perm State Penal Service Institute, Perm, 614012 Russia

² Perm State Humanitarian-Pedagogical University, 614990 Perm

³ Moscow Physico-Technical Institute (State University), Moscow, Russia (117303, Moscow, Kerchenskaya st., 1-A, build. 1)

e-mail: o_karmanova@mail.ru

⁴ Perm State University, Perm, 614990 Russia

* e-mail: zykova.sv@rambler.ru

It is established that condensation of alkyl methyl ketones with diethyl oxalates and 1,2-diaminobenzene yields 2,3-bis-(2-oxoalkylidene)tetrahydro-1,2,3,4-quinoxalines. Structural peculiarities of the synthesized compounds have been investigated by IR, ¹H NMR spectroscopy, and mass spectrometry. With the help of spectral methods, four isomeric forms of synthesized compounds are found. The biological activity of the synthesized compounds has been studied. It is established that one compound (II) possesses analgesic activity that exceeds the activity of sodium metazolone. Compound also exhibits the antioxidant activity, while another compound (V) possesses a pro-oxidant activity. Some compounds showed high antiradical scavenging activity, which did not exceed that trolox.

Keywords: 1,3,4,6-tetrahydrocarbonyl compounds; 2,3-bis-(2-oxoalkylidene)-1,3,4,6-tetrahydro-quinoxalines; *Escherichia coli* BW 25113; antinociceptive activity; antioxidant activity; antiradical activity; acute toxicity