

СИНТЕЗ ТА АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК

УДК 547.857.4.03/.04.057-026.8

М. І. РОМАНЕНКО, д-р фарм. наук, проф., М. В. НАЗАРЕНКО,

Д. Г. ІВАНЧЕНКО, канд. фарм. наук,

О. М. КАМИШНИЙ, д-р мед. наук, доцент, Н. М. ПОЛІЩУК, канд. біол. наук

Запорізький державний медичний університет

СИНТЕЗ, ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ 8-АМІНОПОХІДНИХ 7-АЛКІЛ-3-МЕТИЛКСАНТИНІВ

Ключові слова: синтез, 3-метилксантин, 8-амінопохідні, ПМР-спектроскопія, протимікробна дія

Незважаючи на широкий арсенал сучасних природних, синтетичних та напівсинтетичних лікарських засобів для лікування інфекційних захворювань [1], пошук нових високоактивних сполук протимікробної дії наразі залишається однією з найважливіших задач сучасної фармацевтичної хімії. Особливо це стосується сполук природного походження, шляхом хімічної модифікації яких можна створити нові нетоксичні та ефективні препарати для лікування різноманітних інфекційних патологій. Останні дослідження в цьому напрямі [2–5] вказують на значну перспективу нових синтетичних похідних ксантину (2,6-диоксопурину), особливо враховуючи той факт, що ядро пурину є головною структурною одиницею таких протигерпетичних препаратів як Ацикловір, Ганцикловір та ін. [1].

Метою роботи є розроблення простих лабораторних методик синтезу 8-амінозаміщених 7-алкіл-3-метилксантину та вивчення їхніх фізико-хімічних і протимікробних властивостей.

Матеріали та методи дослідження

Температуру плавлення визначали відкритим капілярним способом на приладі ППП-М (прилад для визначення температури плавлення твердих речовин, Росія). Елементний аналіз виконано на приладі ElementarVario L cube (Німеччина), ПМР-спектри було знято на спектрометрі Bruker SF-400 (Німеччина) (робоча частота 400 МГц, розчинник – диметилсульфоксид (ДМСО), внутрішній стандарт – тетраметилсилан (ТМС)). Дані елементного аналізу відповідають розрахованим.

Аналітичні дані синтезованих сполук наведено в табл. 1, 2.

Т а б л и ц я 1

Фізико-хімічні характеристики синтезованих сполук (4–12)

Сполука	$T_{пл}, ^\circ C$	Емпірична формула	Вихід, %
4	218–219	$C_{13}H_{19}N_5O_2$	79,4
5	184–185	$C_{15}H_{23}N_5O_2$	80,0
6	138–139	$C_{15}H_{22}N_6O_2$	59,4
7	147–148	$C_{15}H_{22}N_6O_3$	44,6
8	158–159	$C_{20}H_{24}N_6O_2$	80,0
9	237–238	$C_{16}H_{25}N_5O_2$	71,9
10	203–205	$C_{13}H_{21}N_5O_3$	62,3
11	229–230	$C_{17}H_{28}N_6O_3$	70,0
12	210–211	$C_{16}H_{27}N_5O_3$	75,0

Величини хімічного зсуву в ПМР-спектрах 8-амінопохідних 7-алкіл-3-метилксантинів (4–12)

Сполука	R	R ₁	δ-Шкала, м. ч.						Інші сигнали
			N ₁ CH ₂ (с, 1H)	N ₇ CH ₂ (т, 2H)	N ₃ CH ₃ (с, 3H)	NCH ₂	C-CH ₂ -C	CCH ₃ (3H)	
4	C ₂ H ₅		10,70	4,15	3,30	3,54 (т, 4H)	1,97 (т, 4H); 1,66 (м, 2H)	0,82 (т)	
5	C ₂ H ₅		10,86	3,96	3,33	3,35 (м, 2H); 2,90 (т, 1H); 2,56 (т, 1H)	1,75 (м, 6H)	0,91 (д); 0,78 (т)	1,2 (м, 1H) – CH
6	C ₂ H ₅		10,94	4,01	3,32	3,21 (т, 4H); 2,5 (т, 4H); 2,4 (кв, 2H)	1,77 (м, 2H)	1,04 (т); 0,8 (т)	
7	C ₂ H ₅		10,91	3,98	3,34	3,18 (т, 4H); 2,55 (т, 4H); 2,45 (кв, 2H)	1,73 (м, 2H)	0,77 (т)	4,47 (т, 1H) – OH; 3,53 (кв, 2H) – OCH ₂
8	C ₂ H ₅		10,91	3,97	3,29	3,19 (т, 4H); 3,54 (с, 2H); 2,51 (т, 4H)	1,72 (м, 2H)	0,77 (т)	7,32 (м, 5H) – C ₆ H ₅
9	CH(CH ₃) ₂		10,90	3,85 (д)	3,30	3,41 (д, 2H); 2,88 (т, 2H)	1,7 (д, 2H); 1,25 (м, 2H)	0,95 (д); 0,74 (д, 6H)	2,1 (м, 1H) – CH; 1,54 (м, 1H) – CH
10	C ₃ H ₇		10,53	3,98	3,33	3,82 (м, 2H)	1,58 (м, 2H); 1,24 (м, 2H)	1,06 (д); 0,85 (т)	3,19 (м, 1H) – OCH; 6,89 (т, 1H) – C ₈ NH
11	C ₃ H ₇		10,53	3,95	3,30 (м, 7H) + O(CH ₂) ₂	2,31 (м, 6H)	1,78-1,45 (м, 4H); 1,21 (м, 2H)	0,85	6,93 (т, 1H) – C ₈ NH
12	C ₃ H ₇		10,54	3,94	3,34	3,38 (м, 2H)	1,54 (м, 2H); 1,2 (м, 2H)	1,08 (д, 6H); 0,83 (т)	6,88 (т, 1H) – C ₈ NH; 3,48 (м, 1H) – OCH; 1,78 (м, 2H) – OCH ₂

Синтез 8-бромо-3-метил-7-н-пропілксантину (1) описано в роботі [6], 7-н-бутилпохідного (2) – в роботі [7], 7-і-бутилксантину (3) – в роботі [8].

Синтез 3-метил-8-(піролідин-1-іл)-7-н-пропілксантину (4). Розчин 2,9 г (0,01 моль) 8-бромоксантину (1), 2,4 мл (0,03 моль) піролідину в 40 мл води кип'ять 5 год і в гарячому стані фільтрують, охолоджують, осад відфільтровують, промивають холодною водою і кристалізують із водного етанолу. Аналогічно отримують 8-амінозаміщені сполуки 6–8 (при синтезі 8-(4-бензилпіперазин-1-іл)ксантину (8) реакцію проводять у суміші 20 мл води та 20 мл діоксану).

Синтез 3-метил-8-(4-метилпіперидин-1-іл)-7-н-пропілксантину (5). Розчин 2,9 г (0,01 моль) 8-бромоксантину (1), 3 г (0,03 моль) 4-метилпіперидину в 40 мл етоксіетанолу кип'ять 4 год, охолоджують, фільтрують, фільтрат розводять водою. Осад, що утворився, відфільтровують, промивають водою і кристалізують із водного пропанолу-2. Аналогічно отримують 8-(4-метилпіперидин-1-іл)заміщене (9).

Синтез 8-амінозаміщених 7-н-бутил-3-метилксантину (10–12). Суміш 2,5 г (0,0083 моль) 8-бромо-7-н-бутил-3-метилксантину (2), 0,025 моль відповідного аміну, 20 мл води та 20 мл етанолу нагрівають 5 год у сталевому автоклаві. Охолоджують, додають 50 мл води, через добу осад відфільтровують, промивають водою та кристалізують із водного етанолу.

Оцінку протимікробної та протигрибкової активності здійснювали з використанням еталонних тест-штамів мікроорганізмів, отриманих з бактеріологічної лабораторії ДУ «Запорізький обласний лабораторний Центр Державної санітарної служби України». В дослідженнях використовували штами *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 885-653). Чутливість мікроорганізмів до новосинтезованих перспективних протимікробних сполук визначали відповідно до методичних рекомендацій [9]. Для культивування бактерій використовували бульйон та агар Мюллера–Хінтона (рН 7,2–7,4), а для грибів – середовище Сабуро (рН 6,0–6,8).

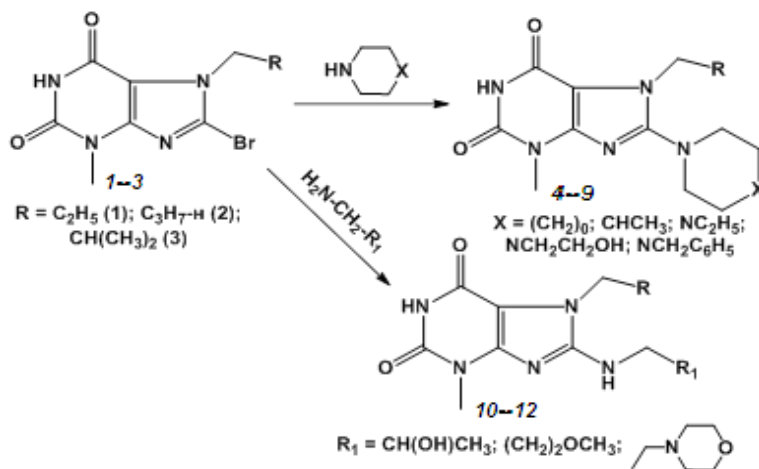
Визначали мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК). Як розчинник сполук в дослідженнях використовували диметилсульфоксид, вихідні розчини доводили до концентрації 1 мг/мл. Додатково виконано контроль поживних середовищ і розчинника за допомогою загальноприйнятих методик.

Результати дослідження та обговорення

Вихідні 7-алкіл-8-бромо-3-метилксантини (1–3) синтезовані по описаним нами раніше методикам [6–8] взаємодією калійної солі 8-бромо-3-метилксантину з галогеналканами в диметилформаміді (ДМФА).

Вивчення реакцій одержаних 7-алкіл-8-бромоксантинів (1–3) з первинними та вторинними гетероциклічними амінами в різних умовах показало, що заміщення атома бром у положенні 8 ксантинової молекули перебігає при нагріванні вихідних синтонів у воді, водному діоксані (у випадку нерозчинних у воді амінів), етоксіетанолі або в суміші вода–етанол (1:1) за 140 °С. За вказаними методами нагріванням вихідних бромоксантинів (1–3) із надлишком відповідного аміну одержано неописані раніше 8-амінозаміщені 7-алкіл-3-метилксантину (4–12) (схема).

Синтезовані 8-амінопохідні 4–12 є білими кристалічними сполуками, нерозчинними у воді, розчинними в нижчих спиртах, діоксані, ДМФА. Слід зазначити, що 8-піперазинілзаміщені 6–8 та морфолілпропіламінопохідне 11 легко розчиняються у розведених кислотах за рахунок наявності основного атома нітрогену введеного гетероциклу, що можна використати для їх якісного та кількісного аналізу, а також відкриває перспективу отримання на їх основі солей з неорганічними та органічними кислотами.



Будову синтезованих сполук 4–12 однозначно підтверджено даними ПМР-спектроскопії (табл. 2). Так, наприклад, в спектрі ПМР 3-метил-8-(піролідин-1-іл)-7-н-пропілксантину (4) наявність н-пропільного залишку у положенні 7 доводить триплет при 4,15 м. ч., зумовлений резонансом протонів N_7 -метиленової групи. Сигнали протонів метиленової групи, зв'язаної з атомами карбону, та кінцевої метильної групи реєструються у сильному полі у вигляді мультиплету при 1,66 м. ч. та триплету при 0,82 м. ч. відповідно інтенсивністю у дві та три протонні одиниці. Метиленові протони, зв'язані з атомом нітрогену залишку піролідину, фіксуються у вигляді інтенсивного триплету при 3,54 м. ч. (4H), а протони інших метиленових груп утворюють також інтенсивний триплет у сильнішому полі при 1,97 м. ч. (4H). Урацилову частину молекули характеризують два синглети при 10,70 м. ч. та 3,30 м. ч., зумовлені резонансним поглинанням протонів N_1H - та N_3CH_3 -груп з розподілом інтенсивностей 1:3 відповідно. Слід зазначити, що у ПМР-спектрах усіх синтезованих речовин положення сигналів протонів урацилового фрагмента мало залежить від будови замісників у положеннях 7 та 8 і знаходиться в межах 10,94–10,53 м. ч. (1H, N_1H) та 3,34–3,29 м. ч. (3H, N_3CH_3). Спектри ПМР всіх інших аміноксантинів 5–12 повністю відповідають їхній будові, про що свідчать положення, форма та інтенсивність резонансних сигналів (табл. 2).

Дані з біологічної дії 8-амінопохідних 4–12 наведено в табл. 3.

Т а б л и ц я 3

Біологічна активність синтезованих сполук

Сполука	МІК, мкг/мл			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
4	100	6,25	100	25
5	100	50	100	6,25
6	100	6,25	50	25
7	100	6,25	100	50
8	100	6,25	100	50
9	100	6,25	50	25
10	100	6,25	100	100
11	100	6,25	100	50
12	100	6,25	100	50
Ампіцилін	12,5	50	25	–
Ністатин	200	100	100	50

У ході первинного скринінгового дослідження протимікробної активності 8-амінопохідних 7-алкіл-3-метилксантинів відносно еталонних штамів мікроорганізмів і грибів роду *Candida* встановлено, що синтезовані сполуки відносно *S. aureus* виявляють активність вищу за препарат порівняння (Ампіцилін, ПАТ «Київмедпрепарат», Україна), а показники протигрибкової активності більшості речовин дорівнюють Ністатину (Борщагівський ХФЗ, Україна). Порівнюючи активність 3-метил-8-(4-метилпіперидин-1-іл)-7-н-пропілксантину (5) та 3-метил-8-(4-метилпіперидин-1-іл)-7-і-бутилксантину (9) слід відмітити, що подовження і розгалуження бічного радикала в положенні 7 спричинює зниження протигрибкової активності та підвищення бактеріостатичної. Одержані дані свідчать про те, що пошук антибактеріальних засобів серед 8-амінозаміщених 7-алкіл-3-метилксантинів є перспективним. Водночас, розроблення протигрибкових препаратів перспективніше серед 8-амінозаміщених 7-н-пропіл-3-метилксантину.

В и с н о в к и

1. Розроблено доступні лабораторні методики синтезу нових 8-амінозаміщених 7-алкіл-3-метилксантину – потенційних біологічно активних сполук.
2. Вивчено ПМР-спектральні характеристики одержаних речовин.
3. Первинне скринінгове дослідження протимікробної активності синтезованих сполук показало, що після додаткових досліджень 8-аміноксантини (4, 6–12) можуть знайти застосування в медичній практиці як антистафілококові засоби, а 3-метил-8-(4-метилпіперидин-1-іл)-7-н-пропілксантин (5) – як протигрибковий засіб.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Машковський М. Д.* Лекарственные средства. Изд. 16-е, перераб., испр. и доп. – М.: ООО «Издательство Новая волна», 2012. – 1216 с.
2. *Hayallah A. M., Elgaher W. A., Salem O. I., Alim A. A. M. A.* Design and Synthesis of Some New Theophylline Derivatives with Bronchodilat or and Antibacterial Activities // Arch. Pharm. Res. – 2011. – V. 34, N 1. – P. 3–21.
3. *Hayallah A. M., Talhouni A. A., Alim A. A. M. A.* Design and Synthesis of New 8-Anilide Theophylline Derivatives as Bronchodilators and Antibacterial Agents // Ibid. – 2012. – V. 35, N 8. – P. 1355–1368.
4. Interaction of methylxanthines and gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*: role of phosphodiesterase inhibition // Acta Microbiol. Immunol. Hung. – 2012. – V. 59, N 1. – P. 13–20.
5. *Voynikova Yu., Valchevab V., Momekova G. et al.* Theophylline-7-acetic acidderivativeswithaminoacidsas anti-tuberculosisagents // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2014. – V. 24, N 14. – P. 3043–3045.
6. *Прийменко Б. А., Романенко Н. И., Гармаш С. Н. и др.* Получение 3-метил-8-бромксантина и его алкилирование // Укр. хим. журн. – 1985. – Т. 51, № 6. – С. 660–663.
7. *Романенко М. И., Федулова І. В., Приймєнко Б. О., Орестенко Л. П.* Синтез та біологічна активність 3-метил-7-алкіл-8-алкіл-, діалкіл-, циклоалкіламіноксантинів // Фармац. журн. – 1986. – № 5. – С. 41–44.
8. *Романенко Н. И., Пехтерева Т. М., Червинский А. Ю. и др.* Синтез и ПМР-спектроскопическое изучение 8-ацетилгидразиноксантинов // Укр. хим. журн. – 1988. – Т. 54, №12. – С. 1305–1309.
9. *Волянський Ю. Л., Гриценко І. С., Ширококов В. П. та ін.* Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів. Метод. реком. – К.: ДФЦ МОЗ України, 2004. – 38 с.

Надійшла до редакції 10. 08. 2015.

Н. И. Романенко, М. В. Назаренко, Д. Г. Иванченко, А. М. Камышный, Н. Н. Полищук
Запорожский государственный медицинский университет

СИНТЕЗ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА 8-АМИНОПРОИЗВОДНЫХ 7-АЛКИЛ-3-МЕТИЛКСАНТИНОВ

Ключевые слова: синтез, 3-метилксантин, 8-аминопроизводные, ПМР-спектроскопия, противомикробное действие

А Н Н О Т А Ц И Я

Несмотря на широкий арсенал современных природных, синтетических и полусинтетических лекарственных средств для лечения инфекционных заболеваний, поиск новых высокоэффективных соединений противомикробного действия остается одной из важнейших задач современной

фармацевтической химии. Особенно это касается соединений природного происхождения, путем химической модификации которых можно создать новые нетоксичные и эффективные препараты для лечения различных инфекционных патологий. Последние исследования в этом направлении указывают на значительную перспективу новых синтетических производных ксантина.

Целью работы является разработка простых лабораторных методик синтеза 8-аминозамещенных 7-алкил-3-метилксантина и изучение их физико-химических и противомикробных свойств.

Температуру плавления определяли открытым капиллярным способом на приборе ПТП (М). Элементный анализ выполняли на приборе ElementarVario L cube, ПМР-спектры снимали на спектрометре Bruker SF-400 (рабочая частота 400 МГц, растворитель диметилсульфоксид, внутренний стандарт – тетраметилсилан). Данные элементного анализа отвечают рассчитанным.

Для первичного скринингового исследования новосинтезированных веществ использовали эталонные тест-культуры как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, принадлежащих к разным по морфобиологическим свойствам клинически значимым группам возбудителей инфекционных заболеваний.

Реакцией 7-алкил-3-метилксантина с первичными и вторичными аминами в воде, водном этаноле, водном диоксане или целлозольве получен ряд не описанных ранее 8-аминозамещенных.

Разработаны доступные лабораторные методики синтеза новых 8-аминозамещенных 7-алкил-3-метилксантина – потенциальных биоактивных соединений. Изучены ПМР-спектральные характеристики полученных веществ.

Первичное скрининговое исследование противомикробной активности синтезированных соединений показало, что после дополнительных исследований 8-аминоксантины (4, 6–12) могут найти применение в медицинской практике в качестве антистафилококковых препаратов, а 3-метил-8-(4-метилпиперидин-1-ил)-7-н-пропилксантин (5) – противогрибкового средства.

M. I. Romanenko, M. V. Nazarenko, D. G. Ivanchenko, O. M. Kamyshny, N. M. Polishchuk
Zaporizhzhia State Medical University

SYNTHESIS, PHYSICAL-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF 8-AMINODERIVATIVES OF 7-ALKYL-3-METHYLXANTHINES

Key words: synthesis, 3-methylxanthine, 8-aminoderivatives, NMR-spectroscopy, antimicrobial activity

ABSTRACT

The search for new high-performance antimicrobial compounds remains one of the most important tasks of modern pharmaceutical chemistry, despite the wide range of modern natural, synthetic and semi-synthetic drugs for the treatment of infectious diseases. This is especially true for the naturally occurring compounds, new non-toxic and effective drugs can be created by their chemical modification for the treatment of various infectious pathologies. Recent researches in this area point to significant prospect of new synthetic derivatives of xanthine.

The aim of this work is to develop simple laboratory methods for synthesizing 8-aminoderivatives of 7-alkyl-3-methylxanthines and to study their physical and chemical peculiarities and antimicrobial properties.

The meltingpoint has been determined with the help of an open capillary method with TAP device (M). Elemental analysis has been performed with the help of the instrument ElementarVario L cube, NMR-spectra have been taken on a spectrometer Bruker SF-400 (operating frequency of 400 MHz, solvent DMSO-d₆, internal standard – TMS). These data correspond to the calculated elemental analysis.

For the initial screening study of the newly-synthesized substances benchmark testing-cultures of both gram-positive and gram-negative bacteria have been used, which belong to clinically significant groups of infections agents which are differing by their morpho-physiological properties.

Through the reaction of 7-alkyl-3-methylxanthines with primary and secondary amines in water, water-ethanol, water-dioxane or cellosolve environment a range of 8-aminoderivatives has been obtained which was not described earlier.

Developing accessible laboratory methods to synthesize new 8-aminoderivatives of 7-alkyl-3-methylxanthines, which are potential bioactive compounds. Studying NMR-spectral characteristics of the obtained substances.

Initial screening research of antimicrobial activity of the synthesized compounds has shown that 8-aminoxanthines (4, 6–12) can be used in medical practice as antistaphylococcal drugs, and 3-methyl-8-(4-methylpiperidine-1-yl)-7-n-propylxanthine (5) – antifungal agent after additional studies.

Електронна адреса для листування з авторами: ivanchenkodima@yandex.ua