

О.А. Нуркенов¹, А.М. Газалиев², С.Д. Фазылов¹, А.Е. Аринова¹,
Т.М. Сейлханов³, Г.Ж. Карипова⁴, С.К. Кабиева², А.А. Бакибаев⁵,
А.Т. Такибаева², О.А. Воронова⁶, Е.В. Плотников⁶

¹Институт органического синтеза и углехимии РК, Караганда;

²Карагандинский государственный технический университет;

³Кокшетауский государственный университет им. Ш. Уалиханова;

⁴Карагандинский государственный университет им. Е.А. Букетова;

⁵Томский государственный университет, Россия;

⁶Томский политехнический университет, Россия

(E-mail: nurkenov_oral@mail.ru)

Синтез, строение и антиоксидантная активность 4-(2-изоникотиноилгидразинил)-4-оксобутановой кислоты

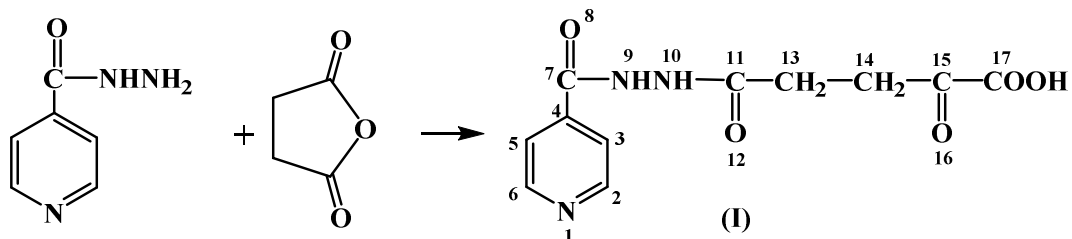
В статье приведены данные по синтезу и подробно интерпретированы одномерные (¹H и ¹³C) и двумерные (COSY, HMQC) спектры ЯМР 4-(2-изоникотиноилгидразинил)-4-оксобутановой кислоты, а также изучено влияние его на процесс электровосстановления кислорода (ЭВ O₂) в различных концентрациях. В качестве метода оценки применена катодная вольтамперометрия на ртутно-пленочном электроде. В данном подходе определение антиоксидантной активности отражало количество активных форм кислорода, нейтрализованных антиоксидантом за определенное время. Показано, что водный раствор 4-(2-изоникотиноилгидразинил)-4-оксобутановой кислоты проявляет антиоксидантную активность в широком диапазоне концентраций.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, гидразид изоникотиновой кислоты, янтарный ангидрид, 4-(2-изоникотиноилгидразинил)-4-оксобутановой кислоты, спектры COSY.

Всё более возрастающий интерес для синтеза биологически активных веществ и лекарственных средств представляют производные пиридина [1–3]. Большое число лекарственных средств получено на основе никотиновой кислоты и ее производных. Так, на основе амидов 3-гидроксинокотиновой кислоты синтезирован ряд эффективных лекарственных средств для лечения сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний, СПИДа и др. [4, 5]. Используемый в медицинской практике гидразид изоникотиновой кислоты (ГИНК) занимает ведущее место в лечении различных форм туберкулеза, и на его основе синтезировано множество различных производных с широкой вариацией противотуберкулезной активности и токсичности соединений [6, 7]. Модификация известных противотуберкулезных препаратов и к настоящему времени не потеряла свою актуальность, так как является одним из основных путей получения на их основе новых лекарственных средств [8, 9]. Введение амидного фрагмента и карбоксильной группы в молекулу биологически активных веществ представляет практический интерес, так как N-замещенные амиды карбоновых кислот, имеющие в своем составе амидную группировку, обладают ценными и уникальными свойствами, которые определяют их широкое применение в качестве биологически активных веществ [10–12], растворителей, красителей и полупродуктов [13].

Цель данного исследования — синтез, изучение строения и антиоксидантной активности 4-(2-изоникотиноилгидразинил)-4-оксобутановой кислоты в отношении радикалов кислорода с помощью метода катодной вольтамперометрии.

Осуществлено взаимодействие гидразида изоникотиновой кислоты с янтарным ангидридом с целью введения в его молекулу остатка янтарной кислоты, содержащего свободную карбоксильную группу. Изучены строение и антиоксидантная активность получаемой при этом 4-(2-изоникотиноилгидразинил)-4-оксобутановой кислоты, которые ранее не исследовались. Реакцию янтарного ангидрида с ГИНК-ом проводили при соотношении реагентов 1:1 в среде изопропанола при температуре 50–60 °С в течение 5 ч. Показано, что реакция протекает с раскрытием оксоланового цикла, образуя моноамид дикарбоновой кислоты (I).



В спектре ЯМР ^1H соединения (I) в сильной области отмечается проявление сигналов четырех протонов Н-13 и Н-14 метиленовых групп сукцинильного фрагмента при 2,37 и 2,42 м.д. Эквивалентные протоны Н-3,5 и Н-2,6 пиридинового кольца дают сигналы в более слабом поле при 7,71 и 8,70 м.д. соответственно. Для двух протонов гидразидной группы CONH-NHCO характерно резонирование на частоте 10,01 м.д. и 10,61 м.д. В слабой области также присутствует небольшой сигнал (11,72 м.д.) в виде уширенного синглета, который принадлежит протону карбоксильной группы.

Сильнопольные сигналы (28,64–29,26 м.д.) спектра ЯМР ^{13}C соединения (I) можно отнести к метиленовым углеродным атомам С-13 и С-14. Для симметрично расположенных пиридиновых атомов С-3,5 и С-2,6 характерно резонирование на частоте 121,83 и 150,91 м.д. Четвертичный атом С-4 дает сигнал при 140,01 м.д. В области слабого поля наблюдаются сигналы карбонильных (164,43 и 171,00 м.д.) и карбоксильного (174,06 м.д.) атомов углерода.

Спин-спиновые взаимодействия, осуществляемые между атомами Н-Н и Н-С через одну или несколько связей, были установлены посредством двумерных спектров COSY (^1H - ^1H) и HMQC (^1H - ^{13}C) (рис. 1 и 2).

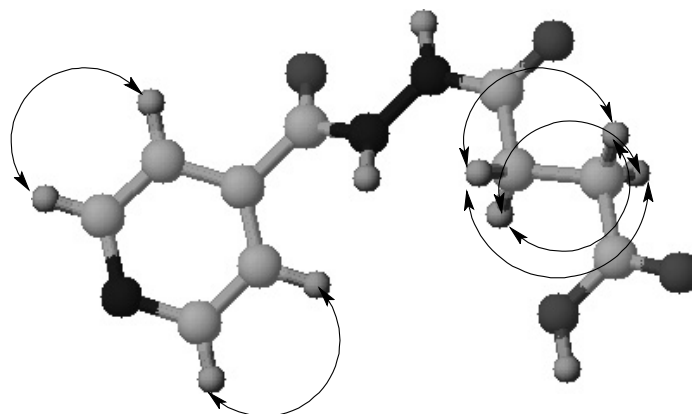


Рисунок 1. Корреляции COSY (^1H - ^1H) соединения (I)

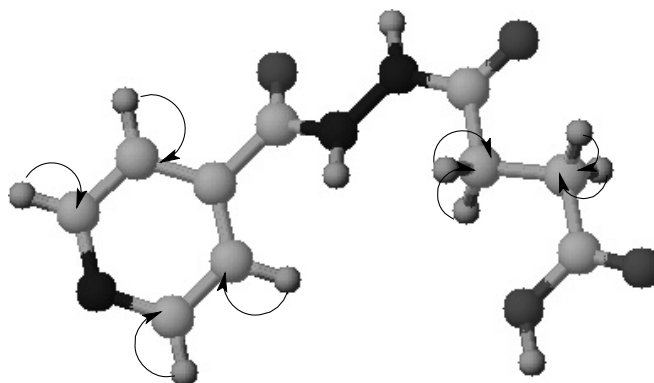
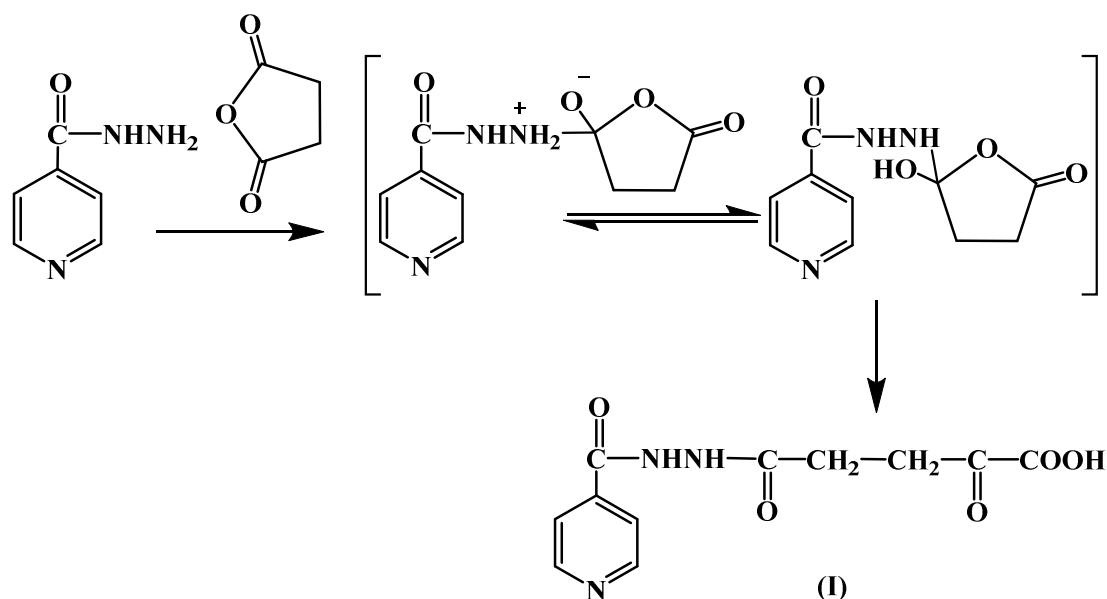


Рисунок 2. Корреляции HMQC (^1H - ^{13}C) соединения (I)

Механизм реакции представлен в виде следующей схемы:



На первой стадии происходит атака аминогруппой гидразидного фрагмента изоникотиновой кислоты карбонильной группы янтарного ангидрида и образуется цвиттер-ион. Затем протон аммониевого катиона перемещается к отрицательно заряженному кислороду, получается промежуточный продукт, который путем миграции протона к циклическому атому кислорода и раскрытия цикла превращается в целевой продукт (I).

Важным разделом в изучении фармакологической активности производных гидразида изоникотиновой кислоты является определение антиоксидантной активности (АОА) 4-(2-изоникотиноилгидразинил)-4-оксобутановой кислоты, так как известно, что свободные радикалы играют роль в развитии многих заболеваний. АОА определяли с использованием вольтамперометрического анализатора при различных концентрациях в водном растворе, используя метод катодной вольтамперометрии, в частности процесс электровосстановления кислорода (ЭВ O_2). Модельная реакция ЭВ O_2 протекает на электроде по механизму, аналогичному восстановлению кислорода в тканях и клетках организма:



В ходе эксперимента определения АОА учитывалась первая волна ЭВ O_2 (восстановление кислорода до пероксида водорода) с образованием активных кислородных радикалов $O_2^{\cdot -}$, HO_2^{\cdot} (выражения 1–3). Предполагается, что вещества реагируют с кислородом и его активными радикалами на поверхности индикаторного электрода, что отражается в изменении катодного тока ЭВ O_2 , которое по своему абсолютному значению свидетельствует о том, что исследуемые образцы реагируют с кислородом и его активными радикалами в исследуемом растворе. Степень изменения тока ЭВ O_2 являлась показателем активности исследуемого образца. Коэффициент активности образцов — K , мкмоль/(л·мин) рассчитывался по формуле

$$K = \frac{C_{O_2}}{t} \left(1 - \frac{I_i}{I_0} \right), \quad (5)$$

где C_{O_2} — концентрация кислорода в исходном растворе без вещества, мкмоль/л; I_i — текущее значение предельного тока ЭВ O_2 , мкА; I_0 — значение предельного тока ЭВ O_2 в отсутствии вещества в растворе, мкА; t — время протекания процесса, мин.

Антиоксидантную активность определяли, используя выражение (5), результаты представлены в таблице.

Т а б л и ц а

Антиоксидантная активность 4-(2-изоникотиноилгидразинил)-4-оксобутановой кислоты по отношению к процессу электровосстановления кислорода, $n = 5, p = 0,95$

Концентрация вещества, мг/мл	K , мкмоль/л мин	Стандартное отклонение
0,1	0,218	0,05
1	0,625	0,02

Полученные данные показывают, что 4-(2-изоникотиноилгидразинил)-4-оксобутановая кислота в максимальной исследованной концентрации проявляет наибольшую антиоксидантную активность. Показано, что даже в минимально изученной концентрации данное вещество взаимодействует с кислородом и его активными формами, дезактивируя их в растворе. Антиоксидантную активность в данном случае можно рассматривать как полезное свойство, расширяющее потенциальный спектр применения данного соединения.

Таким образом, осуществлен синтез 4-(2-изоникотиноилгидразинил)-4-оксобутановой кислоты и изучено его влияние на процесс электровосстановления кислорода (ЭВ O_2) в различных концентрациях, показано наличие антиоксидантной активности в отношении радикалов к кислороду.

Полученные результаты предполагают проведение в дальнейшем расширенных испытаний [14].

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР 1H соединения (I) записаны на спектрометре JNN-ECA 400 компании «Jeol» (Япония). Рабочая частота спектрометра 400 и 100 МГц на ядрах 1H и ^{13}C соответственно. Съемка осуществлялась при комнатной температуре с использованием растворителя ДМСО- d_6 . Химические сдвиги измерены относительно сигналов остаточных протонов или атомов углерода дейтерированного диметилсульфоксида. Температуры плавления определены на приборе Voetius. ТСХ анализ выполнили на пластинках Silufol UV-254, система — 2-пропанол – бензол – 25 % водный раствор аммиака 10:5:2, проявление параами йода.

4-(2-изоникотиноилгидразинил)-4-оксобутановая кислота (I). К 2,74 г (0,02 моль) гидразида изоникотиновой кислоты в 20 мл этанола добавляют при перемешивании раствор 2 г (0,02 моль) янтарного ангидрида в 20 мл этанола. Реакционную смесь перемешивают при 40–50 °С в течение часа. Выпавший осадок отфильтровывают и перекристаллизовывают из этанола. Выход продукта (I) составил 3,59 г (86,1 %) с т. пл. 245–246 °С. Данные элементного анализа соединения (I) отвечали вычисленным. $C_{11}H_{11}N_3O_5$. Спектр ЯМР 1H (400 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 2,37 (2H, т, $\underline{CH_2-CH_2}$); 2,42 (2H, т, $CH_2-\underline{CH_2}$); 7,71 (2H, д, $J = 2,34$, 2CH-2 4-пиридин); 8,70 (2H, д, $J = 2,31$, 2CH-1 4-пиридин); 10,01 (1H, с, $\underline{HNH-NC=O}$); 10,61 (1H, с, $\underline{H-NHNC=O}$); 11,72 (1H, уш. с, OH).

Подготовка растворов. Исходные растворы исследуемых веществ с концентрацией 0,1 г/мл готовили следующим образом: на аналитических весах взвешивали 0,5 г образца и растворяли в 5 мл. Далее растворы с концентрацией 0,01 г/мл готовили последующим разбавлением дистиллированной водой во флаконах объемом 10 мл.

Для исследований брали объем аликвоты 0,1 мл, получая соответствующие рабочие концентрации исследуемых растворов, которые представлены в таблице.

Методика эксперимента по определению антиоксидантной активности заключалась в съемке и анализе вольтамперограмм катодного ЭВ O_2 с помощью вольтамперометрического анализатора, подключенного к компьютеру [15]. Использовался постоянно-токовый режим катодной вольтамперометрии, скорость развертки потенциала $W = 30$ мВ/с, рабочий диапазон потенциалов от 0,0 до –0,7 В, время перемешивания раствора 20 с, время успокоения 10 с. Электрохимическая ячейка представляла собой стеклянный стаканчик с раствором фонового электролита и опущенными в него индикаторным ртутно-пленочным электродом, хлорид-серебряным электродом сравнения и хлорид-серебряным вспомогательным электродом. В качестве фонового раствора выбран фосфатный буфер с pH 6,86, близким к физиологическому значению, объемом 10 мл. Активность исследуемого вещества (I) по отношению к ЭВ O_2 определялась по следующей методике: снимались вольтамперограммы тока ЭВ O_2 в отсутствие исследуемого вещества (фоновая кривая) по описанному выше способу. При отсутствии посторонних пиков фоновый раствор считался чистым. Затем в ячейку добавлялось ис-

следуемое вещество с известной концентрацией (брали объем аликвоты 0,1 мл на 10 мл объема фонового электролита) и снималась катодная вольтамперограмма ЭВ O₂ при тех же условиях. Измерения повторялись не менее 3 раз через определенный промежуток времени (180 с), и каждый раз оценивалось значение предельного тока ЭВ O₂.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 15–04–01110.

Список литературы

- 1 Лукевин Э. Производные пиридина в арсенале лекарственных средств // ХГС. — 1995. — № 6. — С. 723–734.
- 2 Гильманов Р.З., Фаляхов И.Ф., Петров Е.С., Филиппов Ю.В., Федоров Б.С. Способ получения 3-гидрокси-2,4,6-триметилпиридина — активного вещества для получения нитросукцината-3-гидрокси-2,4,6-триметилпиридина — перспективного противоишемического средства // Вестн. Казан. технол. ун-та. — 2012. — Т. 15, № 1. — С. 82–84.
- 3 Арзамасцев А.Р. Фармацевтическая химия. — 2-е изд., испр. — М.: Гэотар-Медиа, 2004. — 640 с.
- 4 Пат. РФ 2295517. Производные дикарбоновых кислот, ингибиторы метастазов и средства, повышающие химиотерапевтическую активность противоопухолевых препаратов, способ усиления эффективности цитостатиков, способ ингибирования процесса метастазирования. Оpubл. 2007.
- 5 Гильманов Р.З., Филиппов Ю.В., Петров Е.С., Петрова С.С., Шамилов Р.И. Синтез и изучение биологической активности амидов 5-бромникотиновой кислоты // Вестн. Казан. технол. ун-та. — 2012. — Т. 15, № 12. — С. 258–259.
- 6 Беззубец Э.А., Остапкевич Н.А., Дьяченко Е.К., Иванов В.Е. Реакция тубазида с солями меди алифатических кислот // Хим.-фарм. журн. — 1980. — № 12. — С. 56–60.
- 7 Федоряк С.Д., Присяжнюк П.В., Сидорчук И.И. Синтез и биологическая активность изоникотиноилгидразонов некоторых ди- и трикарбонильных соединений // Хим.-фарм. журн. — 1982. — № 1. — С. 48–50.
- 8 Глушков Р.Г., Машиковский М.Д. Современные принципы поисков новых лекарственных средств // Хим.-фарм. журн. — 1990. — № 7. — С. 4–10.
- 9 Каюкова Л.А., Пралиев К.Д. Основные направления поиска новых противотуберкулезных средств (обзор) // Хим.-фарм. журн. — 2000. — Т. 34, № 1. — С. 12–19.
- 10 Биологические активные вещества в растворах: Структура, термодинамика, реакционная способность / Ин-т химии растворов РАН / Отв. ред. А.М. Кутепов. — М.: Наука, 2001. — 402 с.
- 11 Долженко А.В., Козьминых В.О., Колотова Н.В., Бурди Н.З., Котегов В.П., Новоселова Г.Н., Сыропятов Б.Я. Замещенные амиды и гидразиды дикарбоновых кислот. Сообщение 13. Синтез и изучение антибактериальной и противосудорожной активности некоторых замещенных амидов и ацилгидразидов фталевой кислоты // Хим.-фарм. журн. — 2003. — Т. 37, № 7. — С. 7–9.
- 12 Долженко А.В., Колотова Н.В., Козьминых В.О., Сыропятов Б.Я., Котегов В.П., Година А.Т., Рудакова Г.В. Замещенные амиды и гидразиды дикарбоновых кислот. Сообщение 13. Синтез и гипогликемическая активность некоторых замещенных амидов и ацилгидразидов фталевой кислоты // Хим.-фарм. журн. — 2003. — Т. 37, № 1. — С. 21–23.
- 13 Гордон П., Грегори П. Органическая химия красителей. — М.: Мир, 1987. — 344 с.
- 14 Avramchik O.A., Korotkova E.I., Plotnikov E.V., Lukina A.N., Karbainov Y.A. // J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. — 2005. — Vol. 37. — P. 1149. DOI: 10.1016/j.jpba.2004.11.016.
- 15 Plotnikov E., Korotkova E., Voronova O., Dorozhko E., Bohan N., Plotnikov S. Lithium-based antioxidants: electrochemical properties and influence on immune cells // Physiology and pharmacology. — 2015. — Vol. 19. — P. 107–113.

О.А. Нуркенов, А.М. Газалиев, С.Д. Фазылов, А.Е. Аринова,
Т.М. Сейілханов, Г.Ж. Кәріпова, С.К. Кәбиева, А.А. Бәкібаев,
А.Т. Тәкібаева, О.А. Воронова, Е.В. Плотников

4-(2-Изоникотиноилгидразинил)-4-оксобутан қышқылының синтезі, құрылымы және антиоксиданттық белсенділігі

Мақалада 4-(2-изоникотиноилгидразинил)-4-оксобутан қышқылын синтездеу мен біркеністікті (¹H және ¹³C) және екікеністікті (COSY, HMQC) ЯМР спектрлері толық қарастырылып, оның әр түрлі концентрацияларда оттегінің электрототықсыздандыру (ЭТ O₂) процесіндегі әсері зерттелді. Бағалау әдісі ретінде қорғасын-қабатты электродта катодтық вольтамперометрия қолданылды. Келтірілген әдісте антиоксиданттық белсенділік белгілі уақытта антиоксидантпен бейтараптандырылған оттегінің белсенді формаларының санын көрсетті. 4-(2-Изоникотиноилгидразинил)-4-оксобутан қышқылының сулы ерітіндісі антиоксиданттық белсенділікті кең ауқымды концентрацияда көрінетіндігі анықталды.

O.A. Nurkenov, A.M. Gazaliev, S.D. Fazylov, A.E. Arinova,
T.M. Seilkhanov, G. Zh. Karipova, S.K. Kabieva, A.A. Bakibaev,
A.T. Takibayeva, O.A. Voronova, E.V. Plotnikov

Synthesis, structure and antioxidant activity of 4-(2-isonicotinoylhydrazinyl)-4-oxobutanoic acid

The article presents data on the synthesis and detailed interpretation of one-dimensional (^1H and ^{13}C) and two-dimensional (COSY, HMQC) NMR spectra of 4-(2-izonikotinoilgidrazinil)-4-oxobutanoic acid, and studied its effect on the process of electrochemical reduction of oxygen (O_2 ER) at various concentrations. As an estimation method applied cathodic voltammetry on a mercury film electrode. In this approach, determination of antioxidant activity reflects the amount of reactive oxygen species antioxidant neutralized over time. It is shown that an aqueous solution of 4-(2-izonikotinoilgidrazinil)-4-oxobutanoic acid exhibits antioxidant activity within a wide concentration range.

References

- 1 Lukevin E. *Chem. Heterocycl. Comp.*, 1995, 6, p. 723–734.
- 2 Gilmanov R.Z., Falyakhov I.F., Petrov E.S., Filippov Yu.V., Fedorov B.S. *Bull. Kazan. tehnol. Univ.*, 2012, 15, 1, p. 82–84.
- 3 Arzamastsev A.R. *Pharmaceutical Chemistry*, 2nd ed., corr., Moscow: Geotar-Media, 2004, 640 p.
- 4 Pat. RF 2295517. *Derivatives of dicarboxylic acids, metastasis inhibitors and agents enhancing chemotherapeutic activity of anticancer drugs, a method of enhancing the effectiveness of cytostatic drugs, a method of inhibiting metastasis process*, Publ. 2007.
- 5 Gilmanov R.Z., Filippov Yu.V., Petrov E.S., Petrova S.S., Shamilo R.I. *Bull. of Kazan. tehnol. Univ.*, 2012, 15, 12, p. 258–259.
- 6 Bezzubets E.A., Ostapkevich N.A., Dyachenko E.K., Ivanov V.E. *Chem.-Pharm. J.*, 1980, 12, p. 56–60.
- 7 Fedoryak S.D., Prysyzhnyuk P.V., Sydorhuk I.I. *Chem.-Pharm. J.*, 1982, 1, p. 48–50.
- 8 Glushkov R.G., Mashkovskii M.D. *Chem.-Pharm. J.*, 1990, 7, p. 4–10.
- 9 Kayukova L.A., Praliev K.D. *Chem.-Pharm. J.*, 2000, 34, 1, p. 12–19.
- 10 *Biologically active substances in solutions: the structure, thermodynamics, reactivity*, Institute of Solution Chemistry, Ed. A.M.Kutepov, Moscow: Nauka, 2001, 402 p.
- 11 Dolzhenko A.V., Kozminykh V.O., Kolotova N.V., Burdi N.Z., Kotegov V.P., Novoselova G.N., Syropyatov B.Ya. *Chem.-Pharm. J.*, 2003, 37, 7, p. 7–9.
- 12 Dolzhenko A.V., Kolotova N.V., Kozminykh V.O., Syropyatov B.Ya., Kotegov V.P., Godina A.T., Rudakova G.V. *Chem.-Pharm. J.*, 2003, 37, 1, p. 21–23.
- 13 Gordon P., Gregory P. *Organic dye chemistry*, Moscow: Mir, 1987, 344 p.
- 14 Avramchik O.A., Korotkova E.I., Plotnikov E.V., Lukina A.N., Karbainov Y.A. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 37, p. 1149. DOI: 10.1016/j.jpba.2004.11.016.
- 15 Plotnikov E., Korotkova E., Voronova O., Dorozhko E., Bohan N., Plotnikov S. *Physiology and pharmacology*, 2015, 19, p. 107–113.