Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

**Міністерство охорони здоров’я України**

**Національний фармацевтичний університет**

**Гриненко Василь Васильович**

**УДК 54.057:547.461.2/.3:615.015.11**

**СИНТЕЗ, ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНИХ 2-ГІДРОКСІОКСАНІЛОВОЇ ТА**

**2-ГІДРОКСИМАЛОНАНІЛОВОЇ КИСЛОТ**

15.00.02-фармацевтична хімія та фармакогнозія

АВТОРЕФЕРАТ

Дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата фармацевтичних наук

|  |  |
| --- | --- |
|  | Науковий керівник  Георгіянц Вікторія Акопівна  доктор фармацевтичних наук  професор |

Харків – 2008

# Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі якості, стандартизації та сертифікації ліків Національного фармацевтичного університету, Міністерство охорони здоров’я України

|  |  |
| --- | --- |
| Науковий керівник | Доктор фармацевтичних наук, професор **ГЕОРГІЯНЦ** Вікторія Акопівна**,**  *Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів», директор,*  *завідувач кафедри якості, стандартизації та сертифікації ліків Національного фармацевтичного університету* |
| Офіційні опоненти | Доктор фармацевтичних наук, професор **ПЕТЮНІН Геннадій Павлович,**  *Харківська медична академія післядипломної освіти,*  *завідувач кафедри клінічної біохімії та судово-медичної токсикології* |
|  | Доктор фармацевтичних наук, професор **МАЗУР Іван Антонович,**  *Запорізький державний медичний університет,*  *завідувач кафедри фармацевтичної хімії* |

# Захист відбудеться “ 6 ” червня 2008 року о 10-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м.Харків, вул. Пушкінська, 53

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м.Харків, вул.Блюхера, 4)

Автореферат розісланий “\_\_\_\_”\_\_\_\_\_\_травня\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2008 р.

Вчений секретар

спеціалізованоївченої ради,

професор Л.М.Малоштан

**ВСТУП**

**Актуальність теми.** Сучасна фармацевтична хімія дедалі стає більш спрямованою на результат та націленою на синтез нових потенційно біологічних активних речовин з поліпшеними властивостями у порівнянні з їх попередниками. Для цього застосовують багаторічний досвід науковців з вивчення впливу змін у структурі на активність та безпечність численної кількості сполук. У фармацевтичній практиці при створенні нових лікарських засобів здавна з успіхом застосовується так званий “принцип фенацетину”, що полягає у блокуванні функціональних угруповань у молекулі *п*-амінофенолу. Така модифікація структури погіршує реакційну здатність вихідної молекули, що робить її водночас менш токсичною для людини.

*о*-Амінофенол є найближчим структурним аналогом *п*-амінофенолу і має подібні хімічні властивості. Тому має сенс пошук у ряду його похідних потенційних біологічно активних сполук після попереднього ацилювання аміногрупи похідними малонової та щавлевої кислот. Ці дикарбонові кислоти є перспективними для розробки нових БАР, оскільки є біогенними речовинами, що приймають участь у великій кількості біохімічних процесів в організмі людини. Крім того, як було встановлено раніше, ці кислоти значно знижують токсичність ароматичних та гетероциклічних амінів при їх введенні до молекул.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**  Робота є продовженням наукових досліджень, що проводяться співробітниками хімічних кафедр Національного фармацевтичного університету в напрямку пошуку нових малотоксичних субстанцій з різними видами фармакологічної активності серед похідних дикарбонових кислот, зокрема щавлевої та малонової.

Робота виконана згідно з планом НДР НФаУ за проблемою «Фармація» - «Хімічний синтез, виділення та аналіз нових фармакологічно активних речовин, встановлення зв’язку «структура-дія», створення нових лікарських препаратів» (№ державної реєстрації 0103U000475).

**Мета і задачі дослідження.**  Метою дисертаційної роботи є синтез нових біологічно активних речовин на основі синтетичних субстанцій – похідних 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислот, встановлення їх структури та закономірностей залежності структура-активність у ряду синтезованих сполук.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити такі задачі:

* Розробити препаративні методи синтезу вихідних етилових естерів 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислот.
* Дослідити умови реакцій гідролізу, амідування, ацилювання та гідразинолізу синтезованих сполук, простежити їх поведінку в умовах термолізу.
* Синтезувати ряд N-заміщених амідів та β-N-ацилгідразидів 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислот.
* Довести структуру синтезованих сполук за допомогою спектральних методів, встановити їх чистоту.
* Здійснити прогноз фармакологічної активності, на основі якого спланувати фармакологічний скринінг.
* На основі проведеного фармакологічного скринінгу встановити закономірності взаємозв’язку структура-активність у ряду синтезованих сполук та обрати речовини для поглиблених фармакологічних досліджень.
* Розробити методики стандартизації найбільш активної речовини, рекомендованої фармакологами з метою подальшого вивчення та впровадження.

*Об’єкт дослідження –* етилові естери, аміди, β-N-ацилгідразиди 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислот.

*Предмет дослідження* – методи синтезу, фізико-хімічні та фармакологічні властивості похідних 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислот; прогноз фармакологічної активності. Аналіз нової синтетичної субстанції (ідентифікація, визначення чистоти, кількісне визначення).

*Методи дослідження* – методи органічного синтезу, фізичні та фізико-хімічні методи аналізу (елементний аналіз, визначення температури плавлення, хроматографія в тонкому шарі сорбенту (ТШХ), УФ-, ІЧ-, ЯМР1Н-спектроскопія, термогравіметричне дослідження), титриметричні методи аналізу, статистичні методи обробки результатів фізико-хімічних і біологічних досліджень.

**Наукова новизна одержаних результатів.** У процесі виконання експериментальної частини дисертаційної роботи синтезовано 92 нові речовини - етилові естери, аміди, β-N-ацилгідразиди 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислот. Вперше запропоновано препаративні методики синтезу ряду похідних 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислот. Вперше для синтезу діалкіл- та ариламідів 2-гідроксіоксанілової кислоти використано 1,4-бензоксазин-2,3-діон. Структуру синтезованих речовин та перебіг реакцій доведено спектральними даними.

Вперше здійснено прогноз фармакологічної активності синтезованих речовин, на основі якого сплановано фармакологічний скринінг. На основі проведеного фармакологічного скринінгу зроблено рекомендації щодо подальшого цілеспрямованого пошуку біологічно активних речовин (анальгетичних, протизапальних та антиоксидантів) серед похідних 2-амінофенолу.

Новизну досліджень підтверджено Патентом України.

**Практичне значення одержаних результатів.** Представлені наукові дослідження мають значення для продовження наукових досліджень, для виробництва фармацевтичних препаратів і для освіти.

Розроблені методи синтезу похідних 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислот є цінними для подальших синтетичних досліджень в цьому ряду сполук.

Рекомендації щодо цілеспрямованого пошуку біологічно активних речовин серед похідних 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислот впроваджено в практику наукових досліджень та навчальний процес кафедри фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету та кафедри органічної та фармацевтичної хімії Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я.Горбачевського.

Дані щодо залежності фармакологічної активності від будови синтезованих сполук дозволяють оптимізувати пошук нових потенційних лікарських засобів.

Методи стандартизації субстанції - 2-хлорбензиламіду 2-гідроксималонанілової кислоти впроваджено в практичну та наукову діяльність фармацевтичного виробничого підприємства «Астрафарм».

**Особистий внесок здобувача.** Авторомособисто проаналізовано джерела літератури стосовно сучасних досліджень у галузі вивчення фізико-хімічних властивостей та реакційної здатності, а також застосування в промисловості похідних 2-амінофенолу. Додатковий аналіз даних щодо синтезу похідних щавлевої та малонової кислот дозволив розробити препаративні методи синтезу та здійснити синтез етилових естерів, N-заміщених амідів та гідразидів 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислот, описаних в експериментальній частині дисертації.

Автором особисто з використанням експериментальних та обчислювальних методів встановлено фізико-хімічні параметри синтезованих речовин, здійснено прогноз фармакологічної активності.

Автором особисто розроблено методи аналізу нової синтетичної субстанції відповідно до вимог Державної фармакопеї України.

У наукових публікаціях за співавторством Н.Ю.Бевз, П.О.Безуглого, Н.В.Гарної, В.А.Георгіянц, С.М.Дроговоз, І.А.Сич, І.В.Українця автором особисто:

* Розроблено методики та здійснено синтез описаних речовин.
* Проаналізовано та узагальнено дані спектральних досліджень.
* Визначено фізико-хімічні властивості синтезованих речовин.
* Узагальнено та проаналізовано результати фармакологічного скринінгу.

Увесь експериментальний матеріал за даними хімічних, фізичних, фізико-хімічних та фармакологічних досліджень проаналізовано та узагальнено особисто автором.

**Апробація результатів дисертації.** Основний зміст дисертаційної роботи доповідався на науково-практичних конференціях: Міжнародній науковій конференції, присвяченої 100-річчю створення фармацевтичного факультету Запорізького державного медичного університету (Запоріжжя, 2004), “Створення, виробництво, стандартизація, фармакоекономіка лікарських засобів та біологічно активних добавок” (Тернопіль, 2004), “Ліки та життя. Аптека 2005” (Київ, 2005), VI Національному з’їзду фармацевтів України (Харків, 2005), «Створення, виробництво, стандартизація та фармакоекономічні дослідження нових лікарських засобів та біологічно активних добавок” (Харків, 2006), “Клінічна фармація в Україні” (Харків, 2007).

**Публікації.** Матеріали дисертації опубліковано в 12 наукових працях, з них 5 статей, 6 тез доповідей, 1 Патент України на винахід.

**Структура дисертації.** Дисертація складається з вступу, огляду літератури (Розділ 1), двох розділів експериментальної синтетичної частини (розділи 2,3), експериментального розділу з розробки методів якісного та кількісного аналізу потенційного засобу (розділ 4), загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Основний текст дисертації викладено на 168 сторінках. Робота ілюстрована 30 схемами, 6 таблицями, 26 рисунками. 13 таблиць винесено в додатки. Перелік використаних джерел містить 180 найменувань, з яких 136 – іноземні.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. **Ацилювання 2-амінофенолу похідними щавлевої кислоти**

Для здійснення однієї з поставлених задач – синтезу похідних 2-гідроксіоксанілової кислоти – необхідно було синтезувати її етиловий естер, що є вихідною речовиною у синтезі всіх запланованих речовин – похідних щавлевої кислоти. Наявність електроноакцепторної гідроксильної групи у *о*-положенні до аміногрупи створює певні ускладнення для проведення цієї реакції, оскільки крім впливу на легкість до ацилювання аміногрупи, фенольний гідроксил сам здатний вступати до реакції ацилювання у присутності похідних карбонових кислот з утворенням відповідних естерів. Перебіг такої побічної реакції може знизити вихід цільових речовин, а також додати супровідні домішки, що завдяки аналогічним фізико-хімічним властивостям будуть важко видалятися. Тому першочерговим завданням було розробити таку методику синтезу вихідного естеру (1), яка б дозволяла одержати його з високим виходом і задовільної чистоти. Для цього ми вивчили декілька способів його синтезу (схема 1).

Встановлено, що взаємодія 2-амінофенолу 1 з етоксалілхлоридом 5 однозначно приводить до утворення цільового продукту 2. Для запобігання осмолення продукту в результаті екзотермічної реакції, реакційну суміш охолоджували льодом. Для зв’язування гідрогенхлориду, що виділяється в процесі реакції, додавали триетиламін в еквівалентній кількості. Ацилювання здійснювали в хлороформі з подальшим видаленням розчинника. За таких умов цільовий етиловий естер 2-гідроксіоксанілової кислоти 2 утворюється досить швидко та з задовільним виходом.

До недоліків цього методу слід віднести необхідність попереднього синтезу етоксалілхлориду ***5***, що значно зменшує вихід продукту реакції у перерахунку на діетилоксалат, а також вірогідність перебігу побічного процесу ацилювання гідроксильної групи залишку о-амінофенолу ***1*** дуже сильним ацилюючим агентом.

Схема 1



Цікавою виявилась взаємодія 2-амінофенолу ***1*** з діетилоксалатом ***6.*** Нами було встановлено, що утворення того чи іншого продукту реакції залежить від температурного режиму здійснення синтезу. Так, при витримуванні вихідних речовин при температурі біля 80°С продуктом реакції виявився етиловий естер 2-гідроксіоксанілової кислоти ***2*** з досить високим виходом. Слід зазначити, що температура реакційної суміші сприяє видаленню з неї етилового спирту, в результаті чого утворюється кристалічна речовина. Але незначний перегрів реакційної суміші призводить до подальшої елімінації другого еквіваленту етилового спирту і утворення бензоксазин-2-ону ***3***. Цей факт є описаним в літературі, але зазвичай для синтезу цієї сполуки використовуються інші умови.

Наслідком подальшого нагрівання реакційної суміші до 150°С стало утворення іншого кінцевого продукту, структура якого за даними спектроскопії ПМР була інтерпретована нами як симетричний діанілід ***4***.

На нашу думку, при нагріванні відбувається взаємодія бензоксазин-2-ону ***3*** з 2-амінофенолом ***1***, що не вступив до реакції. Для остаточного доведення його будови, крім спектральних методів, нами був використаний зустрічний синтез – ацилювання подвійної кількості 2-амінофенолу ***1*** оксалілхлоридом ***7***, що підтвердило правильність наших припущень.

З урахуванням простоти виконання, виходу продукту реакції та доступності вихідних речовин як препаративний спосіб синтезу етилового естеру 2-гідроксіоксанілової кислоти ***2*** ми обрали взаємодію 2-амінофенолу ***1*** з діетилоксалатом ***5*** при чіткому дотриманні температурного режиму.

2. **Синтез та фізико-хімічні властивості N-заміщених амідів 2-гідроксіоксанілової кислоти**

Синтезовані раніше похідні гідроксіоксанілових кислот проявили себе перспективними біологічно активними речовинами. Тому ми вважали за доцільне розширити їх коло за рахунок синтезу нових амідованих похідних. Крім простіших алкіламідів, ми синтезували похідні, що містять фенілалкіламідні залишки, які за нашим власним досвідом створюють серйозні передумови для прояву протисудомних властивостей. Ці сполуки ***8-25*** одержано реакцією амінування вихідного естеру ***2*** у середовищі етанолу або ізопропанолу з високими виходами відповідно до *схеми 2* (спосіб А). Висока реакційна здатність первинних алкіл- та фенілалкіламінів в реакціях ацилювання дозволяє проводити цю реакцію без застосування додаткових технологічних прийомів, а також уникнути використання каталізаторів.

*Схема 2*



Для синтезу похідних діалкіл- та ариламінів цей спосіб виявився непридатним. Зважаючи на дані літератури, нами була здійснена спроба синтезу цих амідів за іншим способом (спосіб Б, схема 2) з використанням 1,4-бензоксазин-2,3-діону ***3***, який в свою чергу є продуктом циклоконденсації 2-гідроксіоксанілової кислоти ***26***, утвореної в результаті гідролізу вихідного естеру ***2***. Слід зазначити, що кислота ***26*** та бензоксазин ***3*** утворюються практично кількісно, тому такий спосіб синтезу може розглядатись як препаративний для одержання феніл- та діалкіламідів оксанілових кислот ***19-25***. Виходи алкіл- та арилалкіламідів ***8-18*** за цим способом також є більш високими. Будова синтезованого продукту ***3*** доведена зустрічним синтезом.

Для встановлення необхідності присутності в молекулі вільного фенольного гідроксилу нами було синтезовано О-ацильні похідні деяких речовин ***9, 10, 14, 18*** ацетилхлоридом (*Схема 3*). Ця реакція перебігає без додаткових ускладнень, і дозволяє отримати цільові ацильні похідні ***27-31*** з високими виходами в перерахунку на вихідні аміди.

ІЧ-спектри синтезованих речовин містять всі характеристичні смуги функціональних груп, які містяться у молекулах синтезованих речовин.

За результатами спектральних досліджень можна зробити висновок, що загальними сигналами в спектрах ЯМР 1Н синтезованих речовин є синглет в області слабкого поля (9,86-10,32 м.ч.), що відповідає протонам гідроксильної групи, а також синглет, що відповідає NH-протону анілідного угруповання (8,10-10,04 м.ч.).

*Схема 3*



Протони NH-групи другого амідного залишку проявляються здебільшого у вигляді триплетів (при наявності поруч метиленової групи, наприклад у сполуках ***9-15*** або синглетів (для залишків ароматичних амінів у сполуках ***19, 20***. В спектрах діалкіламідів ***21-25*** цей сигнал відсутній. Сигнали ароматичних протонів залишку 2-амінофенолу являють собою спектр АВСХ (рис.1), що пов’язано з впливом гідроксильної та заміщеної аміногруп.

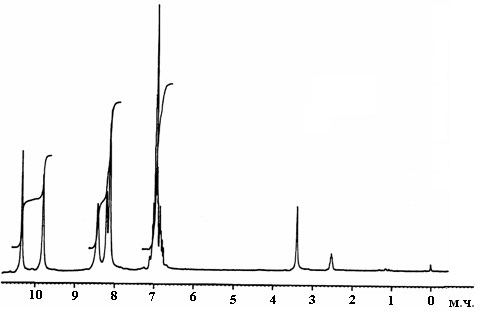


Рис. 1. Спектр ЯМР 1Н аміду 2-гідроксіоксанілової кислоти ***8***

Найбільшого впливу гідроксильної групи зазнає розташований в 3 положенні протон (о-положення по відношенню до гідроксилу). Завдяки цьому впливу дублетний сигнал цього протону на спектрі ПМР розташований у більш слабкому полі (7,37-8,19 м.ч.), інші 3 ароматичних протони проявляються у вигляді мультиплету у більш сильному полі (6,84-7,03).

**3. Гідразид 2-гідроксіоксанілової кислоти та його β-N-ацильні похідні**

Гідразид 2-гідроксіоксанілової кислоти ***32*** було синтезовано взаємодією етилового еcтеру ***2*** з гідразингідратом згідно схеми 4. Наступна взаємодія одержаного гідразиду ***32*** з ангідридами або хлорангідридами аліфатичних та ароматичних карбонових кислот приводить до цільових продуктів ***33-52***, що утворюються з високими виходами.

##### Схема 4



Будову синтезованих гідразидів доведено за допомогою спектральних даних.

**4. Фармакологічні властивості похідних 2-гідроксіоксанілових кислот**

З урахуванням отриманих даних прогнозу фармакологічної активності синтезованих речовин, а також даних попереднього вивчення структурних аналогів, нами було сплановано фармакологічний скринінг на прояв анальгетичної та протизапальної для всіх синтезованих амідів та гідразидів, а також вибірково – антиоксидантної активності для деяких речовин. Дослідження фармакологічної активності синтезованих речовин проводилось на кафедрі фармакології НФаУ під керівництвом д.м.н., проф. Дроговоз С.М. та на кафедрі фізіології НФаУ під керівництвом д.м.н., проф. Гладченка О.М.

Вивчення гострої токсичності показало, що всі синтезовані похідних 2-гідроксіоксанілової кислоти належать до класу малотоксичних за класифікацією К.К.Сидорова.

Найбільш активними серед похідних 2-гідроксіоксанілової кислоти виявився незаміщений амід ***8*** та ацетилсаліцилоїлгідразид ***52***, ефективність яких наближається до вольтарену (рис. 2).

Рис. 2. Протизапальна активність похідних 2-гідроксіоксанілової кислоти та вольтарену.

Аналізуючи результати вивчення анальгетичної активності, можна відзначити загальну тенденцію – гідразиди є активнішими, ніж аміди, а ацилювання гідроксильної групи призводить до значного зменшення анальгетичної дії. За антиоксидантною активністю більшість синтезованих речовин достовірно знижує рівень малонового діальдегіду в гомогенатах печінки, але жодна з досліджуваних речовин за активністю не наближається до препарату порівняння – вітаміну Е.

## 5. Синтез та фізико-хімічні властивості етилових естерів 2-гідрокси(ацилокси)малонанілових кислот

Для одержання цільових похідних малонанілових кислот необхідно синтезувати етиловий естер 2-гідроксималонанілової кислоти ***53***, що є основним напівпродуктом у синтезі несиметричних амідованих та гідразидних похідних. Враховуючи наш попередній досвід отримання оксанілових кислот, ми здійснили спробу синтезу цільового естеру ***53*** двома методами – ацилюванням 2-амінофенолу ***1*** діетилмалонатом ***54*** (спосіб 1) та етоксималонілхлоридом ***55*** (спосіб 2). Як видно зі схеми 5 взаємодія вихідного аміну ***1*** з монохлорангідридом ***55*** у середовищі ацетону та у присутності триетиламіну (спосіб 2) однозначно та з високим виходом приводить до цільового естеру ***53***. Щодо реакції з діетилмалонатом ***54***, її напрямок значною мірою, як і у випадку одержання оксанілових похідних залежить від температурного режиму (спосіб 1), що є у даному випадку визначальним фактором напрямку реакції. Для одержання етилового естеру 2-гідроксималонанілової кислоти ***53*** взаємодія 2-амінофенолу з діетилмалонатом ***54*** відбувається при нагріванні еквімолярних кількостей вихідних речовин при температурі 150°С (спосіб 1А).

*Схема 5*



Вихід продукту реакції при цьому становить 87%, що дозволяє вважати цей метод препаративним, оскільки він не вимагає додаткових стадій одержання напівпродукту – етоксималонілхлориду.

При нагріванні реакційної маси до температури 175-200°С (спосіб 1Б) відбувається утворення симетричного діаніліду ***56***.

Для доведення будови синтезованих речовин, нами було досліджено ІЧ- та ЯМР1Н спектри синтезованих речовин. Спектр ЯМР1Н естеру ***53*** характеризується наявністю сигналів протонів ароматичного кільця з двома замісниками в о-положенні по відношенню один до одного, що утворюють систему АВСХ аналогічно похідним 2-гідроксіоксанілової кислоти (рис. 3).

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| Рис.3. Спектр ЯМР1Н етилового естеру 2-гідроксималонанілової кислоти | Рис.4. Спектр ЯМР1Н ди(2-гідрокси-аніліду) малонової кислоти |

Протон фенольного гідроксилу спостерігається у вигляді синглету при 9,84 м.ч., амідної групи – при 9,48 м.ч. Присутність у молекулі залишку малонової кислоти обумовлює появу у спектрі синглету при 3,58 м.ч., що відповідає сигналу протонів метиленової групи, а також сигналів алкільних протонів естерного угруповання відповідної мультиплетності. Саме останні сигнали відсутні у спектрі аніліду ***56***. Натомість, у порівнянні з сигналом метиленової групи, інтенсивність сигналів ароматичних та амідних протонів є удвічі більшою (рис. 4).

Для вивчення хімічних властивостей синтезованого естеру нами було здійснено реакції лужного гідролізу та взаємодію з ацетилхлоридом (схема 6). У результаті лужного гідролізу з наступним підкисленням нами було одержано кислоту ***57***. Осадження цільової кислоти ***57*** відбувається після підкислення реакційної суміші розведеною хлоридною кислотою. Така поведінка сполуки 53 підтверджує збереження реакційної здатності та кислотні властивості фенольного гідроксилу синтезованого естеру, що може бути корисним при розробці методик аналізу похідних 2-гідроксималонанілової кислоти. Високу рухомість та збереження реакційної здатності фенольного гідроксилу підтверджує також високий вихід ацетильного похідного 58, що утворюється під дією ацетилхлориду на етиловий естер 2-гідроксималонанілової кислоти 53 при кімнатній температурі у пристуності триетиламіну.

## Схема 6



## 6. Амінування етилового естеру 2-гідроксималонанілової кислоти

Етиловий естер 2-гідроксималонанілової кислоти ***53*** став вихідною речовиною в синтезі N-заміщених амідів 2-гідроксималонанілової кислоти ***59-69***. При проведенні реакції амінування нами було виявлено, що естерне угруповання сполуки ***53*** характеризується високою реакційною здатністю, завдяки чому взаємодія з алкіл- та арилалкіламінами на холоду, згідно схеми 7, відбувається без будь-яких ускладнень і за відсутності каталізаторів і дозволяє одержати цільові аміди ***59-69*** з задовільними виходами.

#### ***Схема 7***



Для вивчення впливу на фармакологічну активність блокування вільної гідроксильної групи нами було здійснено ацилювання гексиламіду ***63*** та 2-хлорбензиламіду ***66***, що виявились найбільш активними сполуками за результатами фармакологічного скринінгу. Таке перетворення в подальшому може дати відповідь на запитання щодо порівняння активності та токсичності у сполук з вільною та захищеною гідроксильною групою.

**7. Синтез та ацилювання гідразиду 2-гідроксималонанілової кислоти**

Синтез гідразиду 2-гідроксималонанілової кислоти ***74*** здійснювався взаємодією етилового естеру 2-гідроксималонанілової кислоти ***53***, з гідразингідратом у середовищі 2-пропанолу після нагрівання до кипіння згідно схеми 8.

## Схема 8



Цільовий гідразид ***74*** утворюється з виходом біля 60 % у вигляді білих блискучих кристалів. Отриману сполуку обробляли хлорангідридами або ангідридами органічних кислот (схема 8), в результаті чого були одержані відповідні β-N-ацильні похідні ***75-92***. Виходи β-N-ацилгідразидів у більшості випадків є достатньо високими і не залежать від того, який ацилюючий агент було використано в реакції – ангідрид чи хлорангідрид.

**8. Дослідження УФ-, ІЧ- та ПМР-спектрів N-R-заміщених амідів та β-N-ацилгідразидів 2-гідроксималонанілової кислоти**

Для доведення будови синтезованих речовин нами були використані дані елементного аналізу, а також спектральні методи. Амінування етилового естеру 2-гідроксималонанілової кислоти ***53*** та подальше ацилювання гідроксильної групи не впливає значним чином на характер УФ-спектрів синтезованих сполук. УФ-спектри синтезованих сполук характеризуються наявністю поглинання в ділянці 246-248 нм і є близькими один до одного внаслідок подібної електронної будови.

ІЧ-спектри синтезованих речовин характеризуються набором смуг поглинання, що відповідають наявності основних функціональних груп. В ІЧ-спектрах N-R-заміщених амідів та β-N-ацилгідразидів 2-гідроксималонанілової кислоти ***59-92*** загальними є смуги, що відповідають смугам валентних коливань гідроксильної групи (3600 см-1), NH (3465-3200 см-1), СО (1680, 1620 см-1) груп, деформаційних коливань ОН (1359 см-1) та смуг дизаміщеного бензольного кільця (1515, 835 см-1). Найбільш характерною в ІЧ-спектрі є полоса карбонільного поглинання амідних груп “амід-1” біля 1710-1670 см-1, з чого можна зробити висновок про асоційований характер амідної групи. Характерним для ІЧ-спектрів синтезованих сполук є також наявність смуг поглинання, що виявляються завдяки наявності в молекулі фенольного гідроксилу (валентні νС=О на ділянці 1180-1260 см-1 , деформаційні δОН  при 1330-1390 см-1, а також валентні νAr-OH на ділянці 3200-3250 см-1).

Спектри ПМР дозволяють довести наявність у молекулах синтезованих сполук усіх функціональних груп, що містять гідроген. Загальними в усіх спектрах є сигнали аміногруп гідразидних при 9,87-10,72 м.д. (рис. 3.4) та амідних (9,61-9,87 м.д.) залишків (рис. 4, 5). У деяких випадках спостерігається накладання цих сигналів. Наявність у сполуках гідроксильної групи зі значним позитивним мезомерним ефектом викликає підвищення електронної густини на атомах карбону в *о*- та *п*-положеннях. Внаслідок цього в спектрах синтезованих сполук ароматичні протони, ближчі до гідроксильної групи, проявляються у вигляді дублету в ділянці 7,85-7,95 м.д., інші ароматичні протони являють собою мультиплет біля 6,86-6,88 м.д. Подібна дія аміногрупи залишку амінофенолу відсутня внаслідок її ацилювання. Метиленова група малонової кислоти дає синглетний сигнал при 3,37-3,53 м.д.

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| Рис. 4. Спектр ПМР гідразиду 2-гідроксималонанілової кислоти | Рис. 5. Спектр ПМР метиламіду 2-гідроксималонанілової кислоти |

Таким чином, за допомогою спектральних методів (УФ-, ІЧ- та ПМР) доведено структуру синтезованих речовин.

**9. Фармакологічна активність похідних 2-гідроксималонанілових кислот**

Фармакологічному скринінгу похідних 2-гідроксималонанілових кислот також передував логіко-структурний аналіз та прогноз можливої біологічної активності за допомогою програми PASS. За результатми фармакологічного скринінгу встановлено, що заміна щавлевої кислоти на малонову приводить в цілому до незначного зниження гострої токсичності синтезованих речовин. Усі синтезовані речовини в тій чи іншій мірі здатні знижувати больову реакцію та процес запалення у тварин, але ця активність є значно нижчою, ніж у препарату порівняння.

Як показали результати дослідження антиоксидантної активності, досліджувані сполуки здатні знижувати рівень малонового діальдегіду в гомогенатах печінки. Найбільшу активність проявили сполуки ***65*** та ***66***, відповідно бензиламід та хлорбензиламід 2-гідроксималонанілової кислоти. Слід зазначити, що свою активність ці сполуки виявляють у дозі, що є у 2 рази нижчою, ніж у препарату порівняння. Достовірне зниження рівню МДА, низька токсичність та синтетична доступність дозволили захистити речовину ***66*** патентом України на винахід та рекомендувати її для поглибленого фармакологічного вивчення.

**10. Розробка методів аналізу 2-хлорбензиламіду 2-гідроксималонанілової кислоти**

Стандартизацію 2-хлорбензиламіду 2-гідроксималонанілової кислоти ***66*** здійснювали згідно сучасних вимог до розробки методик аналізу фармацевтичних субстанцій фармакопейної якості.

Досліджувана сполука являє собою дрібнокристалічний порошок білого кольору (після кристалізації – білі голки), без запаху, легко розчинний в диметилформаміді, розчинний в гарячому діоксані, етанолі та ізопропанолі, нерозчинний у хлороформі, гексані, бензолі, воді. Температура плавлення хроматографічно чистого зразка речовини становить 176-177°С.

З урахуванням наявних в молекулі функціональних груп для ідентифікації можуть бути використані хімічні реакції – лужного гідролізу, що супроводжується виділенням аміну (амідна група), окиснення перманганатом калію в кислому середовищі (залишок 2-амінофенолу), ацетилювання оцтовим ангідридом (фенольний гідроксил), азосполучення з солями діазонію (фенольний гідроксил). Надійним підтвердженням ідентичності є аналіз УФ-, ІЧ- та ЯМР 1Н -спектрів речовини. На жаль, останній метод, хоча і дозволяє визначити як ідентичність, так і чистоту речовини, на сьогодні не можна розглядати як рутинний у фармацевтичному аналізі.

При розробці визначення чистоти досліджуваної сполуки ми проаналізували наявність можливих специфічних домішок в результаті її синтезу. Такою домішкою може бути вихідний етиловий естер 2-гідроксималонанілової кислоти ***53***. Для виявлення цієї домішки нами була розроблена методика з використанням методу хроматографії у тонкому шарі сорбенту.

На основі даних літератури та проведених реакцій ідентифікації можна передбачити можливість застосування для кількісного визначення декількох хімічних методів – неводне кислотно-основне титрування (ґрунтуючись на кислотних властивостях фенольного гідроксилу), метод зворотної броматометрії (на основі взаємодії речовини з бромом), фотоколориметричне визначення продукту взаємодії речовини з солями діазонію, метод К’єльдаля, окисно-відновне титрування (використовуючи здатність речовини до окиснення).

За результатами наших досліджень, з усіх названих методів, лише метод визначення азоту в органічних речовинах (метод К’єльдаля) виявився відтворюваним.

**ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ**

1. Синтезовано нову групу біологічно активних речовин на основі 2-амінофенолу, щавлевої та малонової кислот.
2. Розроблено препаративні методи синтезу вихідних етилових естерів 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислот – ацилюванням 2-амінофенолу діетилоксалатом та діетилмалонатом відповідно.
3. Встановлено, що напрямок перебігу реакції ацилювання 2-амінофенолу діетилоксалатом та діетилмалонатом залежить від температурного режиму. Виділено та встановлено структуру інших продуктів ацилювання – 1,4-бензоксазин-2,3-діону, та симетричних діанілідів щавлевої та малонової кислот, що утворюються при більш високих температурах.
4. Розроблено препаративні методи синтезу похідних 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислоти
5. Амінуванням вихідних етилових естерів 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислоти синтезовано відповідні N-R-заміщені аміди. Експериментальними даними доведено, що взаємодія вихідних естерів з більш слабкими нуклеофілами – діалкіламінами та ариламінами не відбувається.
6. Цільові діалкіл- та ариламіди 2-гідроксіоксанілової кислоти синтезовано з використанням як вихідної речовини 1,4-бензоксазин-2,3-діону, для якого розроблено препаративний метод синтезу.
7. Гідразинолізом вихідних етилових естерів синтезовано відповідні гідразиди. Наступне ацилювання синтезованих гідразидів галогенангідридами або ангідридами аліфатичних та ароматичних кислот приводить до β-N-ацилгідразидів 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислот.
8. Структура синтезованих речовин доведена даними елементного аналізу, УФ-, ІЧ- та ПМР-спектроскопії.
9. Фармакологічному скринінгу речовин передував логіко-структурний аналіз та комп’ютерний прогноз фармакологічної активності, на основі якого фармакологічні дослідження були спрямовані на предмет виявлення анальгетичної, протизапальної та антиоксидантної активності.
10. За результатами фармакологічного скринінгу встановлено, що синтезовані речовини є малотоксичними або практично нетоксичними речовинами. За анальгетичною та протизапальною активністю деякі речовини наближаються до референс-препаратів.
11. За результатами вивчення антиоксидантної активності 2-хлорбензиламід 2-гідроксималонанілової кислоти рекомендовано для поглибленого фармакологічного вивчення. Для даної речовини розроблено методи стандартизації, які покладено в основу проекту аналітичної нормативної документації.

***Список опублікованих праць за темою дисертації***

1. Ацилирование орто-(пара)-замещенных ароматических аминов производными малоновой кислоты / П.А. Безуглый, В.И. Трескач, И.В. Украинец и др. // Журн. орган. химии. – 1991. – Т. 27, вып. 7. – С. 1410-1413. (дисертантом здійснено експериментальну частину по дослідженню похідних 2-амінофенолу)
2. Синтез та фармакологічна активність β-N-ацилгідразидів 2-гідроксималонанілової кислоти / П.О.Безуглий, В.А.Георгіянц, В.В.Гриненко, С.М.Дроговоз // Фармацевтичний журнал. – 2003. - № 6. – С. 36-41 (дисертантом здійснено синтез речовин, аналіз та узагальнення даних спектральних та фармакологічних досліджень).
3. Синтез та фармакологічна активність β-N-ацилгідразидів 2-гідроксіоксанілової кислоти / П.О. Безуглий, В.А. Георгіянц, В.В. Гриненко, І.А. Сич // Запорожский мед. журн. – 2004. – Т. 2, № 6. – С. 30-32. (дисертантом здійснено синтез речовин, аналіз та узагальнення даних спектральних та фармакологічних досліджень).
4. Синтез та фармакологічна активність N-R-заміщених амідів 2-гідроксималонанілової кислоти / П.О.Безуглий, В.А.Георгіянц, В.В.Гриненко, Н.В.Гарна // Ліки України. – 2005. - № 9 (98) (Додаток). – С. 126-129 (дисертантом здійснено синтез речовин, аналіз та узагальнення даних спектральних та фармакологічних досліджень).
5. Синтез, фізико-хімічні та фармакологічні властивості N-заміщених амідів 2-гідроксіоксанілової кислоти / П.О. Безуглий, В.А. Георгіянц, В.В. Гриненко, Н.В. Гарна // Журн. орган. та фармац. хімії. – 2007. – Т. 5, № 3 (19). – С. 7.11. (дисертантом здійснено синтез речовин, аналіз та узагальнення даних спектральних та фармакологічних досліджень).
6. Пат. на винахід 75491 України, МПК А61К 31/03, 31/16, 31/22, С07С 231/00. 2-Хлорбензиламід 2-гідроксималонанілової кислоти, що проявляє антиоксидантну активність / П.О. Безуглий, В.В. Гриненко, В.А. Георгіянц та ін.; НФаУ. – № 20040605045; заявл. 25.06.04; опубл. 17.04.06, Бюл. № 4.
7. Фармакологічна активність β-N-ацилгідразидів 2-гідроксималонанілової та 2-гідроксиоксанілової кислот / П.О.Безуглий, В.А.Георгіянц, В.В.Гриненко, С.М.Дроговоз // у зб. “Створення, виробництво, стандартизація, фармакоекономіка лікарських засобів та біологічно активних добавок” – Мат. Науково-практ. конф. з міжнар. Участю. Тернопіль, 14-15 вересня 2004 р. – Тернопіль.: Укрмедкнига. – 2004. – С. 9-11.
8. Дослідження фармакологічних властивостей N-заміщених амідів 2-гідроксималонанілової та 2-гідроксиоксанілової кислот / П.О.Бе­зуглий, В.А.Георгіянц, В.В.Гриненко, С.М.Дроговоз // Ліки України. – 2004. - № 9 (86) (Додаток). – С.156
9. Пошук нових потенційних протисудомних засобів серед похідних 2-гідрокисмалонанілової кислоти, 1,2,3-триазолу та 2,3-дигідропіразину / Георгіянц С.В. Плис С.В. Шиньова Н.В. Гриненко В.В. // У зб. “Ліки та життя. Аптека 2005”. Мат наук. Конф. 15-18 лютого 2005, м.Київ. – с. 108-109
10. Амиды 2-гидроксималонаниловых кислот – новая группа перспективных антиоксидантов / Безуглый П.А., Георгиянц В.А., Гриненко В.В., Гарная Н.В. // «Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України” – Мат. VI Національного з’їзду фармацевтів України, 28-30 вересня 2005 р. м.Харків. – С.61-62.
11. Георгіянц В.А., Шиньова Н.В., Гриненко В.В. Хімічна модифікація етилових ефірів оксанілових кислот у біологічно активні речовини // В сб. «Створення, виробництво, стандартизація та фармакоекономічні дослідження нових лікарських засобів та біологічно активних добавок” Тези доп. II міжнародної науково-практ. конф. (12-13 жовтня 2006 р.) – Х.: Вид-во НФаУ, 2006. – С. 11-12.
12. Цілеспрямований пошук нових біологічно активних речовин на основі метиленактивних сполук / П.О.Безуглий, В.А.Георгіянц, Амжад абу Шарк, В.В.Гриненко, Г.І.Гашко, Н.В.Шиньова // В кн.”Клінічна фармація в Україні” – Мат. VII Всеукр. Наук.-практ.конф. з міжнар. участю, Харків, 15-16 листопада, 2007. – С. 16.

**Гриненко В.В. Синтез, фізико-хімічні та фармакологічні властивості похідних 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислот. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія – Національний фармацевтичний університет, Міністерство охорони здоров’я України, Харків, 2008.

Дисертація присвячена пошуку нових біологічно активних сполук серед похідних 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислот та встановленню закономірностей залежності структура – активність у ряду синтезованих сполук.

Розроблено препаративні методики синтезу і одержано ряд нових похідних N-заміщених амідів та β-N-ацилгідразидів 2-гідроксіоксанілової та 2-гідроксималонанілової кислот.

Структура синтезованих сполук підтверджена фізико-хімічними методами (УФ-, ІЧ-, ЯМР 1Н-спектроскопія).

Проведено фармакологічний скринінг синтезованих сполук на виявлення анальгетичної, протизапальної та антиоксидантної активності з урахуванням отриманих даних прогнозу фармакологічної активності. За результатами досліджень відібрано перспективну антиоксидантну сполуку з метою подальшого вивчення та впровадження – 2-хлорбензиламід 2-гідроксималонанілової кислоти. Для цієї сполуки розроблено хімічні та фізико-хімічні методи ідентифікації, кількісного визначення та випробування на чистоту.

**Ключові слова:** 2-гідроксіоксанілова кислота, 2-гідроксималонанілова кислота, аміди, ацилгідразиди, синтез, фізико-хімічні властивості, фармакологічний скринінг, антиоксидантна активність, стандартизація.

**Гриненко В.В. Синтез, физико-химические и фармакологические свойства производных 2-гидроксиоксаниловой и 2-гидроксималонаниловой кислот. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Национальный фармацевтический университет, Харьков, 2008.

Диссертация посвящена поиску новых биологически активных веществ в ряду производных 2-гидроксималонаниловой и 2-гидроксиоксаниловой кислот.

Разработаны препаративные методы синтеза исходных этиловых эфиров 2-гидроксиоксаниловой и 2-гидроксималонаниловой кислот ацилированием 2-аминофенола диэтилоксалатом и диэтилмалонатом соответственно. В качестве альтернативных ацилирующих агентов также использовались этоксалилхлорид и этоксималонилхлорид соответственно. Использование названных хлорангидридов позволяет синтезировать целевые продукты однозначно, но ограничено необходимостью их предварительного многостадийного синтеза.

Экспериментально установлено, что повышение температурного режима реакции ацилирования 2-аминофенола диэтилоксалатом приводит к образованию 1,4-бензоксазин-2,3-диона (150оС) и ди-(2-гидроксианилида) щавелевой кислоты (> 180оС). При ацилировании исходного амина диэтилмалонатом при температуре выше 150оС также происходит образование симметричного дианилида малоновой кислоты.

Синтезирован ряд новых N-замещенных алкил- и ариламидов 2-гидроксиоксаниловой и 2-гидроксималонаниловой кислот. Для синтеза амидов 2-гидроксиоксаниловой кислоты предложены 2 альтернативных метода синтеза – аминирование исходного этилового эфира алкил- и арилалкиламинами и взаимодействие аминов с 1,4-бензоксазин-2,3-дионом. Синтез диалкил- и ариламидов возможен только с использованием второго метода, для осуществления которого разработан метод синтеза исходного бензоксазина - циклоконденсацией 2-гидроксиоксаниловой кислоты. Синтез амидированных производных 2-гидроксималонаниловой кислоты осуществлен взаимодействуем соответствующего этилового эфира с алкил- и ариламинами на холоду без использования катализаторов. Анилиды в таких условиях получить не удалось.

Реакцией гидразинолиза этиловых эфиров 2-гидроксиоксаниловой и 2-гидроксималонаниловой кислот были получены соответствующие гидразиды. Ацилирование их ангидридами или хлорангидридами алифатических и ароматических кислот привели к образованию соответственно β-N-ацилгидразидов 2-гидроксиоксаниловой и 2-гидроксималонаниловой кислот. Экспериментальными данными установлено, что использование того или юного ацилирующего агента в значительной мере не вляет на выход продукта реакцции.

Установлено, что во всех синтезированных соединениях (эфиры, амиды, гидразиды) – производных как малоновой, так и щавелевой кислот – фенольный гидроксил сохраняет реакционую способность, что подтверждается синтезом соответствующих ацильных производных.

Структура синтезированных соединений была подтверждена данными элементного анализа и физико-химических методов УФ-, ИК- и ЯМР1Н-спектроскопии. Поведение веществ в условиях сухого нагрева описано дериватографическими исследованиями.

Чистота и индивидуальность синтезированных веществ доказана с использованием хроматографии в тонком слое сорбента с использованием различных систем растворителей.

Планирование фармакологического скрининга осуществлялось на основе данных прогноза фармакологической активности синтезированных соединений (программа PASS) и логико-структурного анализа. Перспективными для исследования видами фармакологической активности стали анальгетическая, противовоспалительная и антиоксидантная.

Изучение острой токсичности показало, что синтезированные соединения относятся к малотоксичным и практически нетоксичным веществам согласно классификации К.К.Сидорова. Установлено, что проявление анальгетической и противовоспалительной активности в ряду производных 2-гидроксиоксаниловой и 2-гидроксималонаниловой кислот в наибольшей степени характерно для ацетилсалицилоилгидразидов и бензиламидов, которые по эффективности приближаются к препаратам сравнения – анальгину и вольтарену соответственно.

В результате биологического скрининга на выявление веществ с антиоксидантной активностью 2-хлорбензиламид 2-гидроксималонаниловой кислоты рекомендован для углубленных фармакологических испытаний. Для этого соединения осуществлена стандартизация в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Украины - разработаны методы идентификации, испытания на чистоту и количественного определения.

**Ключевые слова:** 2-гидроксиоксаниловая кислота, 2-гидроксималонаниловая кислота, амиды, ацилгидразиды, синтез, физико-химические свойства, фармакологический скрининг, антиоксидантная активность, стандартизация.

**Grinenko. V. V. Synthesis, physical-chemical and pharmacological properties of the derivatives of 2-hydroxyoxanilic and 2-hydroxymalonic acids. – Manuscript.**

The thesis for Ph.D. (Pharmacy), specialty 15.00.02. – Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. – National University of Pharmacy, Kharkiv, 2008.

This thesis is dedicated to the search of the new biologically active substances among derivatives of such as 2-hydroxymalonanylic acid and 2- hydroxyoxanilic acid, and to the establishment of conformities of dependence structure-action in the range of the synthesized substances.

The methods of synthesis have been elaborated and the range of new derivatives among N-substituted amides and β-N-acylhydrazides 2-hydroxyoxanilic and 2-hydroxymalonic acids have been obtained.

The structure of the compounds obtained was proved by methods NMR-, UV- and IR- spectroscopy and their purity and individuality was determined by thin-layer chromatography (TLC).

Pharmacological screening for analgesic, anti-inflammatory and anti-oxidative activity has been carried out. By tits results the perspective anti-oxidative substance – 2-chlorobenzylamide- has been chosen for the further investigations. For this substance chemical and physical-chemical methods of identification and assay and tests for purity have been elaborated.

**Key-words:** 2-hydroxyoxanyl acid, 2-hydroxymalonanyl acids, amides, acylhydrazides, synthesis, physico chemical properties, pharmacological screening, anti-oxydative activity, standardisation.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>