

Д. Тирзите, А. Краузе, А. Зубарева, Г. Тирзитис, Г. Дубурс

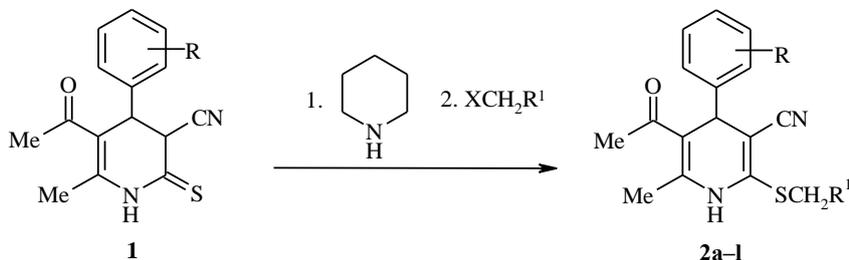
**СИНТЕЗ И АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НИТРИЛОВ
2-АЛКИЛТИО-4-АРИЛ-5-АЦЕТИЛ-6-МЕТИЛ-1,4-
ДИГИДРОПИРИДИН-3-КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ**

Алкилированием 3-циано-1,4-дигидропиридин-2(3Н)-тионов или конденсацией ароматического альдегида, цианотиоацетамида, ацетилацетона и метилиодида в присутствии пиперидина синтезирован ряд новых нитрилов 2-алкилтио-4-арил-5-ацетил-6-метил-1,4-дигидропиридин-3-карбоновых кислот. Из 3,5-ди(*трет*-бутил)-4-гидроксibenзальдегида получено соединение, в молекуле которого объединены активная часть антиоксиданта ионола и 1,4-дигидропиридиновый цикл. Установлено, что среди синтезированных соединений наибольшей антирадикальной активностью обладает соединение, имеющее две гидроксильных группы в 4-фенильном заместителе.

Ключевые слова: 1,4-дигидропиридины, 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил, катион-радикал, тролокс, антирадикальная активность.

Среди сложных эфиров 4-замещенных 1,4-дигидропиридин-3,5-дикарбоновых кислот выявлены многие соединения, обладающие кардиоваскулярным действием [1]. Широко исследована их антиокислительная (АОА) и антирадикальная (АРА) активность [2], а также взаимосвязь АОА и АРА с кардиоваскулярными свойствами [3, 4]. Несимметричные 2-алкилтио-1,4-дигидропиридины менее исследованы, однако у них тоже выявлены выраженная кардиоваскулярная [5], гепатопротекторная [6] и антиокислительная активность [7].

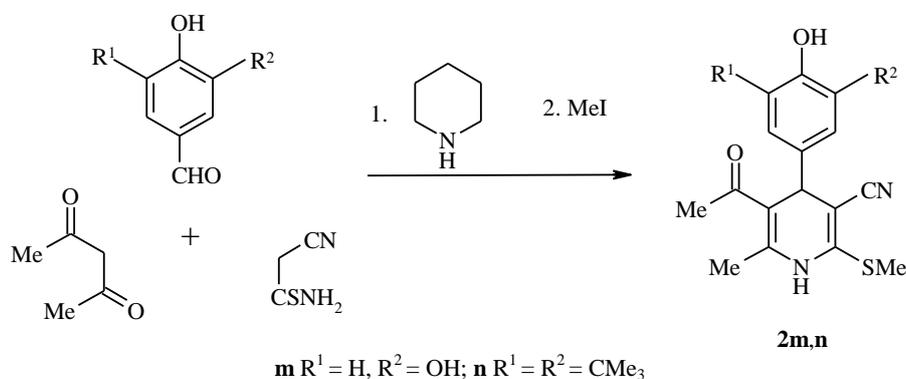
В продолжение изучения синтеза и свойств 2-алкилтио-1,4-дигидропиридинов [8], нами получен ряд новых нитрилов 2-алкилтио-4-арил-5-ацетил-6-метил-1,4-дигидропиридин-3-карбоновых кислот и исследована их АРА. Данные АРА и мембранотропных свойств ценны для более целенаправленного поиска биологически активных веществ, поскольку процессы перекисного окисления липидов и регуляция этих процессов мембранотропными соединениями имеют существенное значение при ряде заболеваний [9].



a R = R¹ = H; **b** R = H, R¹ = Me; **c** R = H, R¹ = COOEt; **d** R = 4-OH, R¹ = H; **e** R = 4-Cl, R¹ = H; **f** R = 4-NO₂, R¹ = H; **g** R = 4-NO₂, R¹ = Me; **h** R = 3-NO₂, R¹ = H; **i** R = 3-NO₂, R¹ = Me; **j** R = 3-NO₂, R¹ = Et; **k** R = 3-NO₂, R¹ = CH=CH₂; **l** R = 3-NO₂, R¹ = (CH₂)₁₄Me
X = Br, I

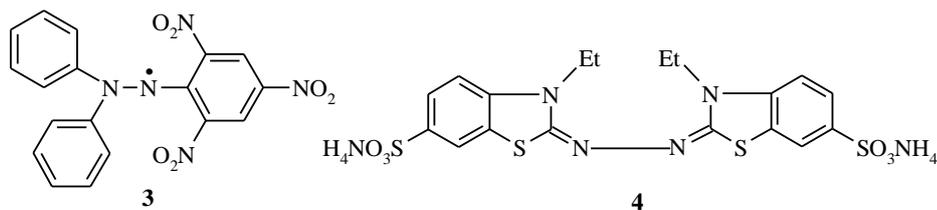
Нитрилы 2-алкилтио-4-арил-5-ацетил-6-метил-1,4-дигидропиридин-3-карбоновых кислот **2a–l** получены с высокими выходами (соединения **2h–l** впервые) алкилированием соответствующих 1,4-дигидропиридин-2(3H)-тионов **1** избытком алкилгалогенида (избыток возрастает в случае легко летучих метилиодида и этилбромиды) в присутствии пиперидина. Длина алкильной цепи в 2-алкилтиогруппе варьировалась с целью повышения липофильности.

4-(2,3-Дигидрокси)фенил- и 4-[3,5-ди(*tert*-бутил)-4-гидрокси]фенил-замещенные 1,4-дигидропиридин-2(3H)-тионы до сих пор не были синтезированы. Нами получены 1,4-дигидропиридины **2m,n** со средними выходами путем четырех компонентной конденсации ароматического альдегида, цианотиоацетамида и ацетилацетона, с последующим воздействием метилиодидом в присутствии эквимолярного количества пиперидина. Из 3,5-ди(*tert*-бутил)-4-гидроксибензальдегида, получено соединение **2n**, в котором в одной молекуле объединены фрагмент антиоксиданта ионала [3,5-ди(*tert*-бутил)-4-метилфенола] и 1,4-дигидропиридиновый цикл.



Структура соединений **2** доказана спектроскопически. В их ИК спектрах наиболее характерными являются полосы поглощения валентных колебаний цианогруппы при 2198–2204 cm^{-1} и полоса $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, которая из-за сопряжения β -аминовинилкетонного типа значительно понижена (в случае соединений **2h–l** до 1607–1612 cm^{-1}), что согласуется с данными публикаций [5, 6]. В спектрах ЯМР ^1H соединений **2** наиболее характерными являются сигналы протона 4-Н в виде синглета при 4.82–4.86 (дигидропиридины **2h–l**) и 4.44–4.54 м. д. (соединения **2m,n**). Характеристики впервые синтезированных соединений и данные их ЯМР ^1H и ИК спектров представлены в табл. 1 и 2.

АРА была оценена по способности соединений реагировать со стабильным радикалом 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (ДФПГ) (**3**) и катион-радикалом 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (АБТС) (**4**).



Т а б л и ц а 1

Характеристики синтезированных соединений 2h–n

Соединение	Брутто-формула	Найдено, % Вычислено, %				Т. пл., °С	Выход, %
		С	Н	N	S		
2h	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃ S	59.43	4.88	12.20	9.42	164–166	79
		59.46	4.99	12.24	9.34		
2i	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃ S	59.38	4.94	12.20	9.29	148–150	87
		59.46	4.99	12.24	9.34		
2j	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₃ S	60.42	5.22	11.80	9.01	129–131	61
		60.49	5.36	11.76	8.97		
2k	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₃ S	60.84	4.78	11.83	9.00	143–145	86
		60.83	4.82	11.82	9.02		
2l	C ₃₁ H ₄₅ N ₃ O ₃ S	68.82	8.54	8.01	5.71	76–78	80
		68.99	8.40	7.78	5.94		
2m	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	60.56	5.19	9.05	10.21	223–226	49
		60.74	5.10	8.85	10.13		
2n	C ₂₄ H ₃₂ N ₂ O ₂ S	69.91	8.03	6.76	7.72	193–194	62
		69.87	7.82	6.79	7.77		

Т а б л и ц а 2

Спектральные характеристики соединений 2h–n

Соединение	ИК спектр, ν, см ⁻¹	Спектр ЯМР ¹ H, δ, м. д.*
2h	1608 (C=O); 2200 (C≡N); 3266 (NH)	1.20 (3H, т, SCH ₂ CH ₃); 2.14 (3H, с, COCH ₃); 2.40 (3H, с, 6-CH ₃); 2.90 (2H, м, SCH ₂ CH ₃); 4.82 (1H, с, 4-H); 6.44 (1H, уш. с, NH); 7.42 и 8.18 (4H, д. д и д. д, 4-C ₆ H ₄)
2i	1607 (C=O); 2198 (C≡N); 3162, 3270 (NH)	1.22 (3H, т, SCH ₂ CH ₃); 2.17 (3H, с, COCH ₃); 2.32 (3H, с, 6-CH ₃); 2.92 (2H, м, SCH ₂ CH ₃); 4.84 (1H, с, 4-H); 6.62 (1H, уш. с, NH); 7.4–8.2 (4H, комплект, 4-C ₆ H ₄)
2j	1608 (C=O); 2198 (C≡N); 3160, 3278 (NH)	0.93 (3H, т, SCH ₂ CH ₂ CH ₃); 1.58 (2H, м, SCH ₂ CH ₂ CH ₃); 2.14 (3H, с, COCH ₃); 2.40 (3H, с, 6-CH ₃); 2.87 (2H, м, SCH ₂ CH ₂ CH ₃); 4.82 (1H, с, 4-H); 6.28 (1H, уш. с, NH); 7.4–8.2 (4H, комплект, 4-C ₆ H ₄)
2k	1612 (C=O); 2199 (C≡N); 3160, 3272 (NH)	2.14 (3H, с, COCH ₃); 2.37 (3H, с, 6-CH ₃); 3.62 (2H, м, SCH ₂ CH=CH ₂); 4.86 (1H, с, 4-H); 4.90 и 5.08 (2H, д. д и д. д, SCH ₂ CH=CH ₂); 5.70 (1H, м, SCH ₂ CH=CH ₂); 7.6–8.2 (4H, комплект, 4-C ₆ H ₄); 9.93 (1H, с, NH)
2l	1609 (C=O); 2198 (C≡N); 3272 (NH)	0.84 (3H, т, S(CH ₂) ₁₅ CH ₃); 1.1–1.5 (28H, т, SCH ₂ (CH ₂) ₁₄ CH ₃); 2.17 (3H, с, COCH ₃); 2.42 (3H, с, 6-CH ₃); 2.86 (2H, м, SCH ₂ (CH ₂) ₁₄ CH ₃); 4.82 (1H, с, 4-H); 6.28 (1H, с, NH); 7.4–8.2 (4H, комплект, 4-C ₆ H ₄)
2m	1614, 1668 (C=O); 2202 (C≡N); 3250, 3314 (NH, OH)	2.02 (3H, с, COCH ₃); 2.30 (3H, с, 6-CH ₃); 2.57 (3H, с, SCH ₃); 4.44 (1H, с, 4-H); 6.4–7.1 (3H, комплект, 4-C ₆ H ₅); 8.7–9.0 (2H, уш. с, 2 OH); 9.27 (1H, с, NH)
2n	1620, 1652 (C=O); 2204 (C≡N); 3250 (NH), 3624 (OH)	1.38 (18H, с, 2 C(CH ₃) ₃); 2.12 (3H, с, COCH ₃); 2.35 (3H, с, 6-CH ₃); 2.47 (2H, с, S-CH ₃); 4.54 (1H, с, 4-H); 6.66 (1H, с, OH); 7.06 (H, с, 4-C ₆ H ₂); 9.36 (1H, с, NH)

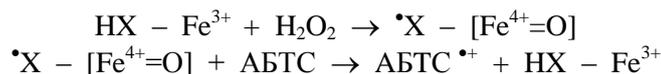
* Спектры соединений **2h–k** сняты в CDCl₃; **2l–n** – в DMSO-d₆.

Антирадикальная активность нитрилов 2-алкилтио-4-арил-5-ацетил-6-метил-1,4-дигидропиридин-3-карбоновой кислоты

Соединение	К _п , л·моль ⁻¹ с ⁻¹	ЭТ, мМ	Соединение	К _п , л·моль ⁻¹ с ⁻¹	ЭТ, мМ
2a	4.29 ± 0.10	4.5	2i	0.85 ± 0.10	3.0
2b	1.53 ± 0.02	4.1	2j	1.12 ± 0.21	2.5
2c	4.77 ± 0.25	4.4	2k	0.39 ± 0.02	2.9
2d	3.80 ± 0.08	4.6	2l	0.40 ± 0.03	0.3
2e	2.45 ± 0.04	4.0	2m	346.1 ± 17.4	2.8
2f	2.97 ± 0.45	3.6	2n	4.26 ± 0.05	4.1
2g	1.01 ± 0.13	3.4	Тролокс	562.4 ± 33.9	5.0
2h	1.09 ± 0.10	3.2	Ионол	*	3.7

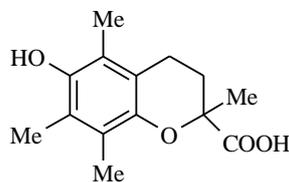
* В условиях эксперимента не реагирует.

АБТС в последнее время широко применяют для характеристики антиоксидантных свойств плазмы крови, экстрактов растений и химических соединений [10]. Катион-радикал АБТС^{•+} образуется при взаимодействии АБТС с радикальными частицами феррилметгемоглобина, которые генерируются при реакции метгемоглобина (НХ – Fe³⁺) с H₂O₂.



В длинноволновой полосе УФ спектра катион-радикал АБТС имеет характерные максимумы поглощения при 660, 734 и 820 нм. АРА оценивается по уменьшению интенсивности поглощения катион-радикала АБТС при 734 нм в присутствии испытуемого соединения. Степень ингибирования сравнивается с эффектом тролокса, аналогом витамина Е, и выражается в эквивалентах тролокса. Одной из наших задач являлось сравнение АРА, определенной двумя различными методами. Полученные результаты представлены в табл. 3.

Согласно данным таблицы, в реакции с ДФПГ наиболее активным является соединение **2m**, имеющее 4-(3,4-дигидроксифенильный) заместитель. АРА соединения **2m** сравнима с активностью стандартного антиоксиданта тролокса – 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислоты (**5**).



5

Высокая АРА соединений, содержащих дигидроксифенильный заместитель, отмечена и раньше при изучении АРА симметричных эфиров и амидов 2,6-диметил-4-арил-1,4-дигидропиридин-3,5-дикарбоновой кислоты [11]. Наличие группировки антиоксиданта ионола (две *трет*-бутильные

группы и гидроксил) в соединении **2n** приводит к существенному снижению значения константы скорости реакции. Соединения **2a–l** также реагируют с радикаломДФПГ, но скорость реакции также значительно ниже, чем у **2m**. Введение в 2-алкилтиозаместитель длинной алкильной цепи (**2l**) и аллильного радикала (**2k**) существенно уменьшает константу скорости реакции.

Анализируя результаты, полученные методом АБТС, можно видеть, что все исследованные соединения проявляют АРА, которая не превышает эффективность тролокса **5**. Самыми активными в этой системе являются соединения **2a–e** и **2n**. Меньшую активность, как и в реакции сДФПГ, проявляет дигидропиридин **2l**, имеющий длинную алкильную цепь в 2-алкилтиозаместителе. Следует заметить, что не наблюдается корреляции между АРА, определенной обоими методами. Это особенно заметно при рассмотрении АРА соединения **2m**, которое имеет наибольшую константу скорости реакции сДФПГ, но обладает лишь посредственной активностью в системе АБТС. Необходимо учесть, что в тест-системе АБТС испытуемые соединения могут действовать и как "ловушки" радикалов (реакция с катион-радикалом АБТС), и ингибировать их образование [12], а в системеДФПГ возможна только бимолекулярная реакция с радикалами. Добавление испытуемых соединений в ходе реакции в систему АБТС показывает, что действительно соединения **2** кроме АРА еще и ингибируют образование катион-радикала АБТС; это обстоятельство и является возможной причиной различия результатов, полученных в обеих системах.

Сравнение влияния заместителей на АРА показывает относительно незначительные изменения АРА в зависимости от электронной природы заместителей R и R¹. Сравнительно высокая АРА 1,4-дигидропиридина **2m**, имеющего 4-(3,4-дигидроксифенильный) заместитель, обусловлена *орто*-дигидроксифенильной группой вне зависимости от остальной молекулы. Отсутствие АРА у аналога ионола (**2n**) объяснимо сравнительно низкой АРА молекулы ионола, особенно с довольно малоактивными радикалами. Так, с АБТС⁺ (более активный радикал) 1,4-дигидропиридин **2n** относительно реакционноспособнее, чем сДФПГ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ИК спектры сняты на спектрометре Perkin–Elmer 580В в вазелиновом масле. Спектры ЯМР ¹H записаны на спектрометре WH 90/DC (90 МГц) в CDCl₃ или DMSO-d₆ (внутренний стандарт ТМС). Контроль за ходом реакции и индивидуальностью веществ осуществлен с помощью ТСХ на пластинках Silufol UV-254, элюент хлороформ–гексан–ацетон, 2:1:1. Соединения перекристаллизованы из этанола. Синтез соединений **2a–c** описан в [6], **2d** – в [13], **2e–g** – в [5].

Общие методы синтеза нитрилов 2-алкилтио-4-арил-5-ацетил-6-метил-1,4-дигидропиридин-3-карбоновых кислот (2). А. Смесь 10 ммоль 1,4-дигидропиридин-2(3H)-тиона [14], 11 ммоль пиперидина и алкилгалогенида (30 ммоль метилиодида, 30 ммоль этилбромид, 20 ммоль *n*-пропилбромид, 15 ммоль аллилбромид и 12 ммоль гексадецилбромид) в 30–50 мл этанола кипятят 10–15 мин на водяной бане, затем перемешивают в течение 1 ч при комнатной температуре. Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают 10–15 мл охлажденного до 0 °С этанола и 20 мл воды и получают соединения **2h–l**.

Б. Смесь 10 ммоль ароматического альдегида, 10 ммоль цианотиоацетамида в 30–50 мл этанола и 1 ммоль пиперидина нагревают до растворения. Затем, перемешивая при комнатной температуре, добавляют 10 ммоль ацетилацетона и 10 ммоль пиперидина и через 10 мин 30 ммоль метилиодида. Через 1 ч постепенно добавляют 5 мл воды (в случае с **2m** дополнительно 1 мл конц. HCl). Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают 20 мл 50% этанола и 20 мл воды и получают соединения **2m,n**.

Определение АРА. Тест-система с ДФПГ. Смесь 2.5 мл 10^{-4} М этанольного раствора ДФПГ и 50 мкл $5 \cdot 10^{-3}$ М этанольного раствора 1,4-ДФП инкубируют при 30 °С (конечная концентрация соединения в кювете 10^{-4} М). Скорость восстановления ДФПГ оценивают по уменьшению поглощения при 517 нм (спектрофотометр Hitachi 557 UV-vis). АРА выражают константой скорости реакции второго порядка, которую вычисляют по формуле [15]:

$$K_{II} = [\Delta \text{ДФПГ}] / [\text{ДФПГ}]_0 [\text{ДФПГ}]_t t \quad (\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1})$$

Тест-система с АБТС. В кювету помещают 300 мкл $5 \cdot 10^{-4}$ М раствора диаммониевой соли АБТС, 36 мкл $7 \cdot 10^{-5}$ М раствора метгемоглобина, 16 мкл $5 \cdot 10^{-3}$ М этанольного раствора исследуемого соединения (контроль – этанол) и 489 мкл $5 \cdot 10^{-3}$ М раствора физиологического фосфатного буфера (рН 7.4). Растворы АБТС и метгемоглобина готовят в физиологическом фосфатном буфере. Перемешивают, добавляют 167 мкл 0.01 М раствора H_2O_2 и инкубируют при 37 °С. Периодически измеряют абсорбцию при 734 нм (спектрофотометр Hitachi 557 UV-vis). В качестве стандарта используют $5 \cdot 10^{-3}$ М этанольный раствор тролокса (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметил-2-карбоновой кислоты). АРА выражают в эквивалентах тролокса (ЭТ) и рассчитывают по формуле [16]:

$$\text{ЭТ} = c_{\text{тролокс}} \cdot (A_{\text{контроль}} - A_{\text{образец}}) / (A_{\text{контроль}} - A_{\text{тролокс}}),$$

где А – абсорбция при 734 нм через 2 мин.

В табл. 3 приведены средние значения трех опытов. Относительная ошибка не превышала ± 10 % основного значения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. J. Triggle, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **68**, 1474 (1990).
2. G. Tirzitis, I. Kirule, G. Duburs, *Fett. Wiss. Technol.*, **90**, 411 (1988).
3. N. Rojstaczer, D. J. Triggle, *Cardiovasc. Drug Rev.*, **12**, 70 (1994).
4. W. F. Kauder, J. Watts, *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 811 (1996).
5. А. А. Краузе, Р. О. Витолина, М. Р. Романова, Г. Я. Дубур, *Хим.-фарм. журн.*, **22**, 955 (1988).
6. А. А. Краузе, А. Г. Одынец, А. А. Веррева, С. К. Германе, А. Н. Кожухов, Г. Я. Дубур, *Хим.-фарм. журн.*, № 7, 40 (1991).
7. И. Э. Кируле, А. А. Краузе, А. Х. Велена, Д. Ю. Антипова, Г. Я. Арнице, И. А. Вуцина, Г. Я. Дубур, *Хим.-фарм. журн.*, № 11/12, 59 (1992).
8. A. Krauze, J. Popelis, G. Duburs, *Tetrahedron*, **54**, 9161 (1998).
9. J. M. C. Gutteridge, B. Halliwell, *React., Oxygen Species Biol. Syst.*, Eds. D. L. Gilbert. C. A. Colton, Kluwer Acad./Plenum Publ., New York, 1999.
10. C. Rice-Evans, N. J. Miller, *Methods Enzymol.*, **234**, 279 (1994).
11. М. Плотниче, Г. Тирзитис, Я. Улдрикис, Ж. Коронова, Д. Тирзите, Н. Макарова, Г. Дубурс, *XTC*, 1358 (1996).
12. M. Strube, G. R. M. M. Haenen, H. van den Berg, A. Bast, *Free Radical Res.*, **26**, 515 (1997).
13. A. Krauze, R. Verhe, G. Duburs, *Latv. ķīm. žurn.*, No. 1/2, 94 (1996).
14. А. А. Краузе, Р. О. Витолина, М. Р. Романова, Г. Я. Дубур, *Хим.-фарм. журн.*, **22**, 548 (1988).
15. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **28**, 25 (1995).
16. M. Wang, Y. Shao, J. Li, N. Zhu, M. Rangarajan, E. LaVoie, Chi-T. Ho, *J. Nat. Prod.*, **62**, 454 (1999).

Латвийский институт органического
синтеза, Рига LV-1006
e-mail: dace@osi.lv
e-mail: krauze@osi.lv

Поступило в редакцию 25.03.2002