

СЫЧЕВА ИРИНА ВАЛЕРЬЕВНА

**СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
N-(4-ГУАНИДИЛСУЛЬФОНИЛФЕНИЛ)АМИДОВ, ЕНАМИНОЭФИРОВ
АРОИЛПИРОВИНОГРАДНЫХ КИСЛОТ И ИХ ЦИКЛИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ**

Специальность 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Пермь – 2018

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор **Гейн Владимир Леонидович**

Официальные оппоненты:

Оганесян Эдуард Тоникович – доктор фармацевтических наук, профессор, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра органической химии, заведующий кафедрой;

Глушков Владимир Александрович – доктор химических наук, доцент, «Институт технической химии Уральского отделения Российской академии наук» – филиал федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, лаборатория биологически активных соединений, старший научный сотрудник

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Уфа.

Защита диссертации состоится «27» февраля 2018 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2, тел. (342) 233-55-01).

С диссертационной работой можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, д. 46) и на сайте (<http://www.pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Создание инновационных российских лекарственных препаратов, в особенности за счет оригинальных отечественных разработок, является одной из главных задач политики государства в области фармацевтической промышленности. Модификация молекул известных лекарственных средств с учетом их структурных особенностей, в частности, введение "фармакофорных" групп относится к основным направлениям поиска новых биологически активных соединений.

Особый интерес в этом отношении представляют лекарственные средства, относящиеся к классу сульфаниламидов, большой группе химиотерапевтических лекарственных препаратов антибактериального действия, являющихся производными амидов сульфаниловой кислоты. Одним из таких веществ является сульгин (4-аминобензолсульфонилгуанидин). Данное лекарственное средство обладает антибактериальным действием и применяется для лечения кишечных инфекций. На основе химических превращений 4-аминобензолсульфонилгуанидина могут быть получены новые высокоэффективные и малотоксичные органические соединения с различными видами фармакологической активности.

Степень разработанности темы исследования. За последние годы имеется небольшое количество публикаций по химии и биологической активности замещенных амидов, енаминоэфиров ароилпировиноградных кислот, а также пиррол-2,3-дионов, содержащих в своей структуре сульфамидную группу. В данной работе отражены результаты исследований по синтезу, свойствам, а также биологической активности ранее неописанных в литературе амидов, енаминоэфиров ароилпировиноградных кислот и 3-гидрокси-3-пирролин-2-онов, полученных на основе 4-аминобензолсульфонилгуанидина.

Цель работы. Целью данной работы является синтез ранее неизвестных *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов, енаминоэфиров ароилпировиноградных кислот и их циклических аналогов, изучение химических свойств, а также исследование связи структуры с фармакологическим действием полученных соединений.

Задачи исследования. Для достижения указанной цели перед нами были поставлены следующие задачи:

1. Разработать простые препаративные методики синтеза новых *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов ароилпировиноградных кислот, метиловых эфиров 4-арил-2-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]-4-оксо-2-бутеновых кислот и 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов.
2. Изучить взаимодействие *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов ароилпировиноградных кислот с бинуклеофильными реагентами и солями арилдиазония.
3. Исследовать реакции метиловых эфиров 4-арил-2-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]-4-оксо-2-бутеновых кислот с электрофильными реагентами.
4. Изучить взаимодействие 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов с моно-, бинуклеофильными и электрофильными реагентами.
5. Провести фармакологический скрининг синтезированных соединений на различные виды биологической активности, изучить зависимость «структура – фармакологическое действие», выявить наиболее перспективные соединения для дальнейшего изучения.

Научная новизна. Предложен новый простой способ синтеза *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот на основе реакции сульгина с метиловыми эфирами ароилпировиноградных кислот в среде ледяной уксусной кислоты в присутствии безводного ацетата натрия.

Установлено, что при взаимодействии 4-аминобензолсульфонилгуанидина с метиловыми эфирами 4-арил-4-оксо-2-бутеновых кислот без добавления ацетата натрия образуются метиловые эфиры 4-арил-2-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]-4-оксо-2-бутеновых кислот.

Осуществлен синтез ранее неописанных 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов трехкомпонентной реакцией метиловых эфиров ароилпировиноградных кислот со смесью ароматического альдегида и 4-аминобензолсульфонилгуанидина.

Изучены химические свойства полученных соединений. Установлено, что при кипячении *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот с гидразингидратом или гидроксиламином образуются *N*-[4-(гуанидилсульфонил)фенил]-5-арил-1*H*-пиразол-3-карбоксамиды либо *N*-[4-(гуанидилсульфонил)фенил]-5-арилизоксазол-3-карбоксамиды соответственно.

Обнаружено, что реакция эквимольных количеств метилового эфира 4-бромфенил-2-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]-4-оксо-2-бутеновой кислоты и нингидрина протекает нерегиоселективно, о чем свидетельствует образование 4-(4-бромбензоил)-3-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]спиро[2,5-дигидрофуран-5,2'-индан]-2,1',3'-триона и 4-(4-бромбензоил)-3-[4-[(4,10-дигидрокси-5-оксо-1,3-дигидробензоциклопентано[1,2-*b*]-2-имидазолиден)аминосульфони]фениламино]спиро[2,5-дигидрофуран-5,2'-индан]-2,1',3'-триона.

Исследованы реакции синтезированных 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов с различными моно-, бинуклеофильными и электрофильными реагентами.

Впервые изучена реакция 3,4-диарил-5-(4-гуанидилсульфонилфенил)-4,6-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-6-онов с нингидрином. Установлено, что 3,4-диарил-5-(4-гуанидилсульфонилфенил)-4,6-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-6-оны вступают в реакцию с нингидрином за счет имеющегося в них гуанидинового фрагмента с образованием новых гетероциклических соединений.

Структура синтезированных соединений подтверждена данными ИК-, ЯМР ¹H-, ¹³C-спектроскопии, масс-спектрометрии, элементного и рентгеноструктурного анализа (РСА).

Исследованы результаты антибактериальной, противогрибковой, гипогликемической, противовоспалительной, анальгетической активности и острой токсичности, а также ростостимулирующей активности на семена пшеницы. Выявлены некоторые закономерности между структурой соединений и их биологической активностью.

Теоретическая и практическая значимость. Разработаны или усовершенствованы препаративные методики синтеза ранее неизвестных *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот, *N*-[4-(гуанидилсульфонил)фенил]-5-арил-1*H*-пиразол-3-карбоксамидов, *N*-[4-(гуанидилсульфонил)фенил]-5-арилизоксазол-3-карбоксамидов, *N*-[(4-гуанидилсульфонил)фенил]-2,4-диоксо-4-(4-фторфенил)-3-(4-этилфенилгидразано)бутанамида, метиловых эфиров 4-арил-2-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]-4-оксо-2-бутеновых кислот, 4-(4-бромбензоил)-3-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]спиро[2,5-дигидрофуран-5,2'-индан]-2,1',3'-триона и 4-(4-бромбензоил)-3-[4-[(4,10-дигидрокси-5-оксо-1,3-дигидробензоциклопентано[1,2-*b*]-2-имидазолиден)аминосульфони]фенил-амино]спиро[2,5-дигидрофуран-5,2'-индан]-2,1',3'-триона, 4-(4-бромбензоил)-3-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]спиро[2,5-дигидрофуран-5,3'-индол]-2,2'-диола, 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов, 5-арил-4-ароил-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-(4-метоксифениламино)-3-пирролин-2-онов, 5-арил-4-ароил-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-(4-метилфениламино)-3-пирролин-2-онов, 3,4-диарил-5-(4-гуанидилсульфонилфенил)-4,6-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-6-онов, 5-арил-4-ароил-3-гидроксиимино-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов, 5-[*N*-(4,10-дигидрокси-5-оксо-1,3-дигидробензоциклопентано[1,2-*b*]-2-имидазолиден)аминосульфони]фенил]-3,4-диарил-4,6-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-6-онов.

Известно, что наиболее часто для получения амидов используется реакция 5-арил-2,3-дигидрофуран-2,3-дионон с аминами, которая имеет ряд недостатков. Нами разработан простой и более удобный способ синтеза *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов 4-арил-2-гидрокси-4-

оксо-2-бутеновых кислот, исключая стадию получения 5-арил-2,3-дигидрофуран-2,3-дионов.

В процессе работы синтезировано 88 неописанных в литературе соединений, 44 из них изучены на наличие антибактериальной активности, 33 – на наличие противогрибковой активности, 5 – на наличие гипогликемической активности, 5 – на противовоспалительную активность, 22 – на анальгетическую активность и 5 – на наличие ростостимулирующей активности на семена пшеницы, также у 4 веществ изучена острая токсичность. Среди полученных соединений для дальнейшего углубленного исследования выявлен перспективный 4-бензоил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-5-(4-хлорфенил)-3-пирролин-2-он, проявляющий анальгетическую активность.

Методология и методы диссертационного исследования. В ходе работы применялись основные методы органического синтеза и выделения продуктов реакции. Строение синтезированных соединений подтверждено современными методами установления структуры, состава и чистоты: ИК-, ЯМР ^1H -, ^{13}C -спектроскопия, масс-спектрометрия, элементный анализ и РСА. Фармакологическая активность полученных веществ изучена согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А.Н.).

Степень достоверности. Достоверность полученных данных подтверждена использованием современных приборов для определения структуры синтезированных соединений, а также применением стандартных утвержденных методик для проведения фармакологического скрининга.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы обсуждались на I студенческой школе-конференции «Современные аспекты химии» (Пермь, 2012), на Международной научно-практической конференции «Образование и наука: современное состояние и перспективы развития» (Тамбов, 2013), XVI молодежной школе-конференции по органической химии (Пятигорск, 2013), IV Международной конференции «Техническая химия. От теории к практике», посвященной 80-летию со дня рождения чл.-корр. РАН Ю.С. Клячкина (1934 – 2000) (Пермь, 2014), научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическая наука и практика: достижения, инновации, перспективы» (Пермь, 2015).

Внедрение результатов исследования. Результаты научных исследований внедрены в научно-исследовательский и учебный процесс кафедры фармацевтической химии факультета очного обучения ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, кафедры общей и биоорганической химии ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, а также научно-исследовательской лаборатории по изучению биологически активных соединений ФГБОУ ВО ПГНИУ.

Публикации. По материалами диссертационной работы опубликовано 12 научных публикаций, из них 6 статей в изданиях Перечня ВАК, 6 статей и тезисов докладов в сборниках и материалах научных конференций различного уровня.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (номер государственной регистрации 01.9.50 007419).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области специальности, конкретно пункту 1 паспорта фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Личное участие автора в получении научных результатов.

Автор активно участвовал на всех этапах представленной работы: анализе литературы, получении экспериментального материала (проведении синтезов, доказательстве структуры соединений), изучении результатов исследования биологической активности, а также написании и оформлении публикаций. Автором лично синтезированы все представленные в работе соединения.

Объем и структура диссертации. Содержание работы изложено на 154 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, заключения, списка литературы, который включает 157 работ отечественных и зарубежных авторов, приложений. Диссертация содержит 88 схем, 39 таблиц и 3 рисунка.

Положения, выносимые на защиту:

1. Синтез новых *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот, метиловых эфиров 4-арил-2-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]-4-оксо-2-бутеновых, 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов.
2. Взаимодействие полученных соединений с моно-, бинуклеофильными и электрофильными реагентами.
3. Установление структуры полученных соединений на основании данных ИК-, ЯМР ^1H -, ^{13}C -спектроскопии, масс-спектрометрии и рентгеноструктурного анализа.
4. Результаты фармакологических испытаний синтезированных соединений, установление взаимосвязи их строения с активностью.

Благодарность. Автор выражает благодарность к.х.н. Гартману Г.А. (ПГФА, г. Пермь) за проведение исследований соединений методом ЯМР-спектроскопии, к.х.н. Степановой Е.С. (ПГНИУ, г. Пермь) за исследование соединений методом масс-спектрометрии, к.х.н. Дмитриеву М.В. (ПГНИУ, г. Пермь) за проведение рентгеноструктурных исследований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

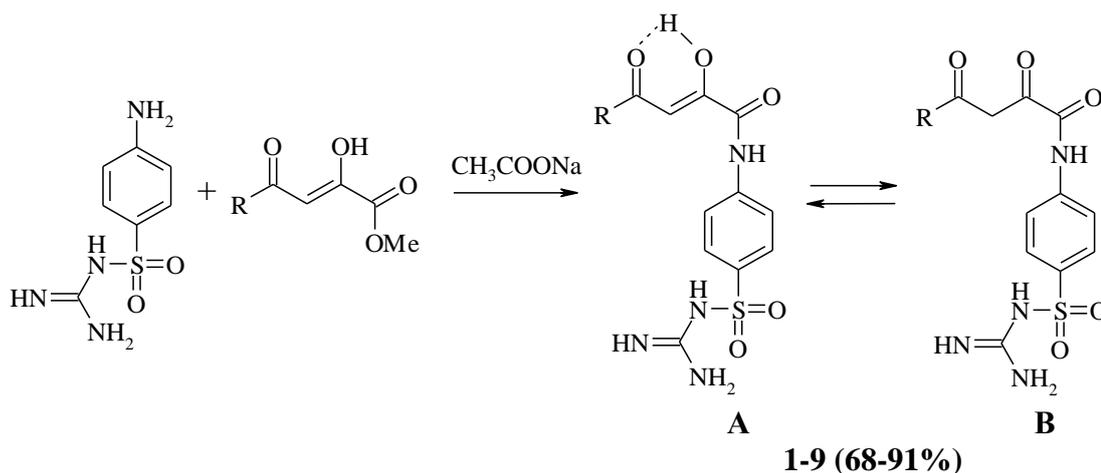
Глава 1. Синтез, свойства, биологическая активность амидов, енаминоэфиров ароилпировиноградных кислот и замещенных тетрагидропиррол-2,3-дионов (обзор литературы)

В главе систематизированы литературные данные по методам синтеза, реакционной способности, биологической активности амидов, енаминоэфиров ароилпировиноградных кислот и их циклических аналогов – тетрагидропиррол-2,3-дионов. Также приведен литературный материал по синтезу, свойствам и биологической активности 4-аминобензолсульфонилгуанидина (сульгина).

Глава 2. Синтез, изучение химических свойств *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов, енаминоэфиров ароилпировиноградных кислот и их циклических аналогов

2.1. Синтез *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот

При кипячении метиловых эфиров ароилпировиноградных кислот с 4-аминобензолсульфонилгуанидином в среде ледяной уксусной кислоты в присутствии эквивалентного количества безводного ацетата натрия в течение 15-20 минут образуются *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амиды 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот **1-9**, спектральные характеристики которых свидетельствуют о существовании их в енольной (А) и кетонной (В) форме (схема 1).

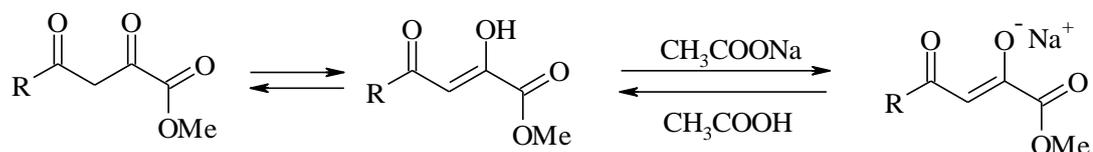


R= 4-BrC₆H₄ (1), 4-CH₃OC₆H₄ (2), 4-CH₃C₆H₄ (3), 4-FC₆H₄ (4), C₆H₅CH=CH (5), 4-C₂H₅OC₆H₄ (6), 3,4-(CH₃O)₂C₆H₃ (7), 4-ClC₆H₄ (8), C₆H₅ (9).

Полученные соединения **1-9** представляют собой кристаллические вещества желтого, светло-желтого или кремового цвета, растворимые в диметилсульфоксиде, диметилформамиде, при нагревании – в диоксане, ледяной уксусной кислоте, нерастворимые в воде.

Исключительное образование амидов **1-9** объясняется тем, что ацетат натрия вступает в обменное взаимодействие с исходным эфиром ароилпировиноградной кислоты, образуя натрийпроизводное, в котором происходит дезактивация карбонильной группы в α-положении и, следовательно, становится возможной атака сложноэфирного карбонила первичной аминогруппой 4-аминобензолсульфонилгуанидина (схема 2).

Схема 2



В ИК спектрах соединений **1-9** наблюдаются полосы валентных колебаний NH₂- и NH-групп в области 3448-3336 см⁻¹, гидроксильной группы в области 3220-3176 см⁻¹, амидного карбонила (CONH) в области 1704-1692 см⁻¹, кетонного карбонила от 1656 до 1600 см⁻¹, SO₂-группы в двух интервалах в области 1384-1320 см⁻¹ и 1140-1136 см⁻¹.

В спектрах ЯМР ¹H соединений **1-9** присутствуют уширенный синглет четырех протонов аминогрупп остатка гуанидина [NHC(=NH)NH₂] при 6.62-6.71 м.д., сигналы ароматических протонов при 7.09-8.09 м.д., синглет метинового протона при 7.11-7.19 м.д., синглет протона аминогруппы (CONH) при 10.73-10.91 м.д. Кроме того, во всех спектрах ЯМР ¹H соединений **1-9** наблюдается сигнал низкой интенсивности при 4.40-4.64 м.д., обусловленный β-метиленовой группой дикетонной формы. Исходя из соотношения значений интегральной интенсивности сигналов β-метиленовой группы и CH= протона в полученных соединениях преобладает енольная форма (A) (≈90%), а на кетонную форму (B) приходится (≈10%). Отсутствие в ЯМР ¹H спектрах сигналов протона енольной гидроксильной группы, по-видимому, объясняется их значительным уширением в результате обменных процессов.

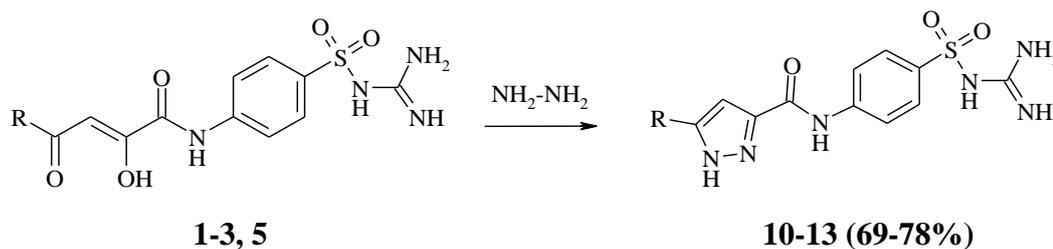
2.1.1. Взаимодействие N-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот с бинуклеофилами

2.1.1.1. Взаимодействие с гидразингидратом

Нами было изучено взаимодействие полученных N-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот с гидразингидратом. Реакция протекает при кипячении исходных реагентов в среде ледяной уксусной кислоты в течение 2 часов с

образованием *N*-[4-(гуанидилсульфонил)фенил]-5-арил-1*H*-пиразол-3-карбоксамидов **10-13** (схема 3).

Схема 3



R = 4-CH₃OC₆H₄ (10), 4-BrC₆H₄ (11), C₆H₅CH=CH (12), 4-CH₃C₆H₄ (13).

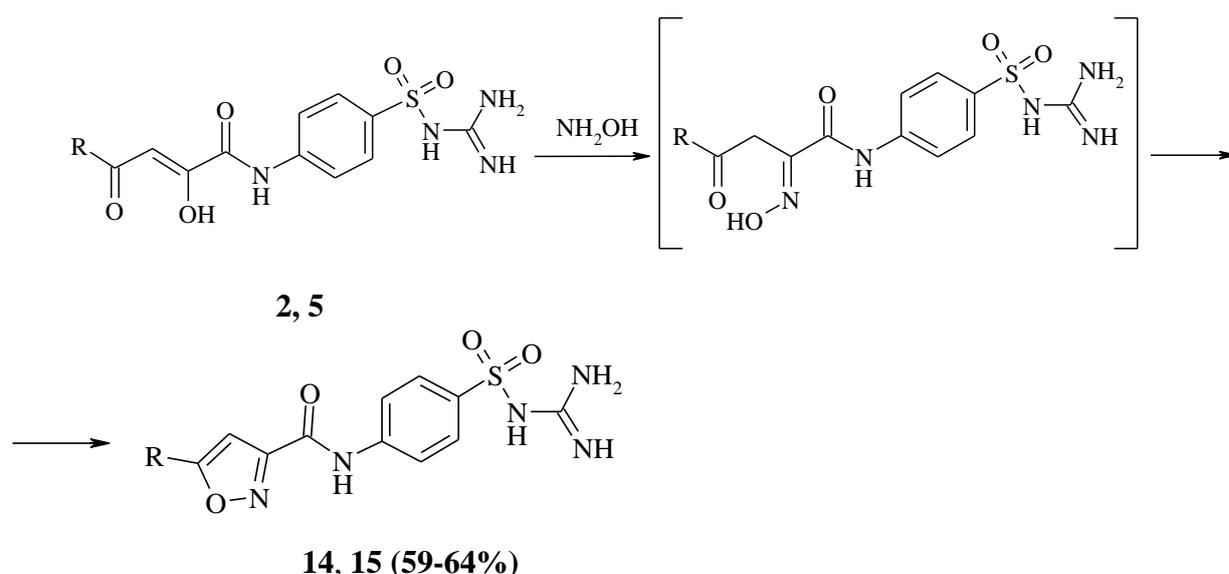
Полученные соединения **10-13** представляют собой кристаллические вещества белого или светло-желтого цвета, растворимые в диметилсульфоксиде, диметилформамиде, при нагревании – в диоксане, ледяной уксусной кислоте, изопропаноле и нерастворимые в воде.

Структура синтезированных соединений **10-13** подтверждена данными ИК- и ЯМР ¹H-спектроскопии.

2.1.1.2. Взаимодействие с гидросиламином

При кипячении *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот с гидросиламином в смеси уксусная кислота-этанол в соотношении 1:1 в течение 2 часов образуются *N*-[4-(гуанидилсульфонил)фенил]-5-арил-изоксазол-3-карбоксамиды **14, 15** (схема 4).

Схема 4



R = 4-CH₃OC₆H₄ (14), C₆H₅CH=CH (15).

Реакция протекает через образование промежуточного *N*-замещенного амида 4-арил-2-гидроксиимино-4-оксо-2-бутановой кислоты, который в дальнейшем циклизуется в гетероциклическую систему 5-арил-изоксазол-3-карбоксамид (**14, 15**).

Полученные соединения **14, 15** представляют собой кристаллические вещества белого и зеленого цвета, растворимые в диметилсульфоксиде, диметилформамиде, при нагревании – в диоксане, ацетонитриле, ледяной уксусной кислоте, этаноле, нерастворимые в воде.

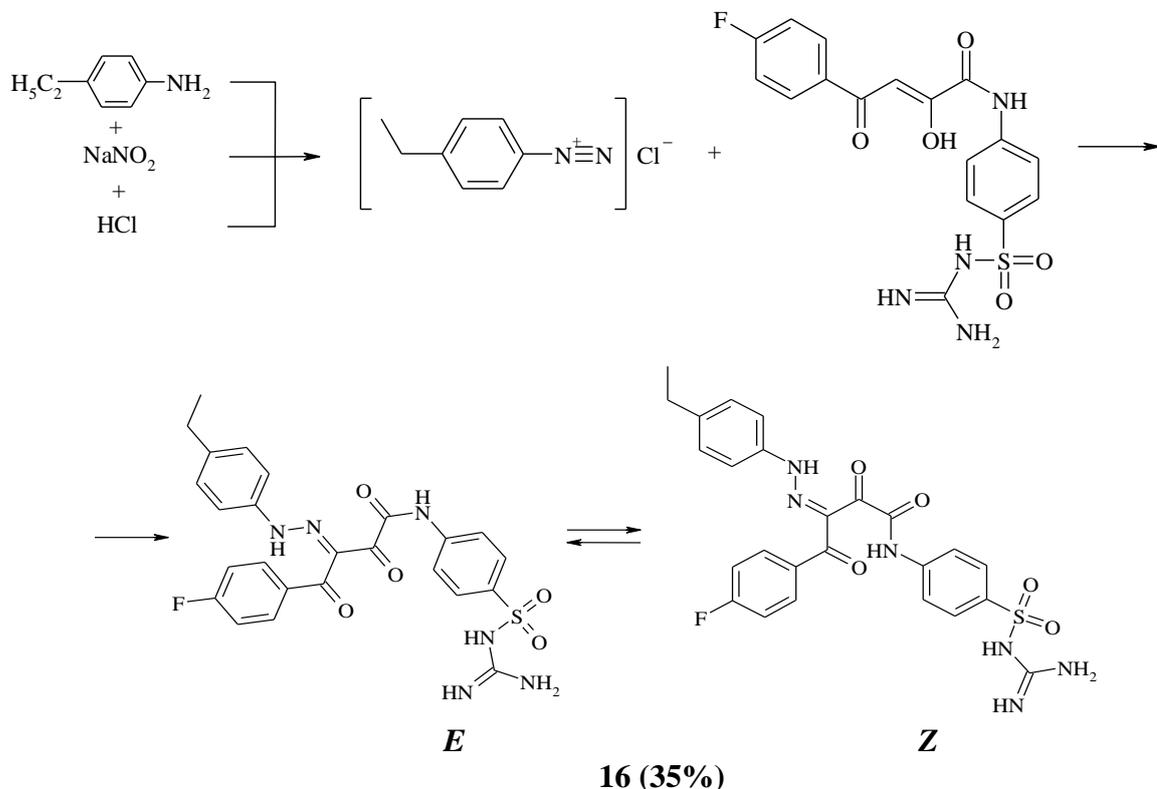
Структура соединений **14, 15** подтверждена данными ИК- и ЯМР ¹H-спектроскопии.

2.1.2. Взаимодействие *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амида 2-гидрокси-4-оксо-4-(4-фторфенил)-2-бутеновой кислоты с хлоридом 4-этилфенилдиазония

При дальнейшем исследовании химических свойств синтезированных амидов было интересно изучить реакцию азосочетания *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амида 2-гидрокси-4-оксо-4-(4-фторфенил)-2-бутеновой кислоты с хлоридом 4-этилфенилдиазония.

Установлено, что при взаимодействии исходных реагентов в среде диоксана в присутствии безводного ацетата натрия образуется *N*-[(4-гуанидилсульфонил)фенил]-2,4-диоксо-4-(4-фторфенил)-3-(4-этилфенилгидразоно)бутанамид **16** (схема 5).

Схема 5



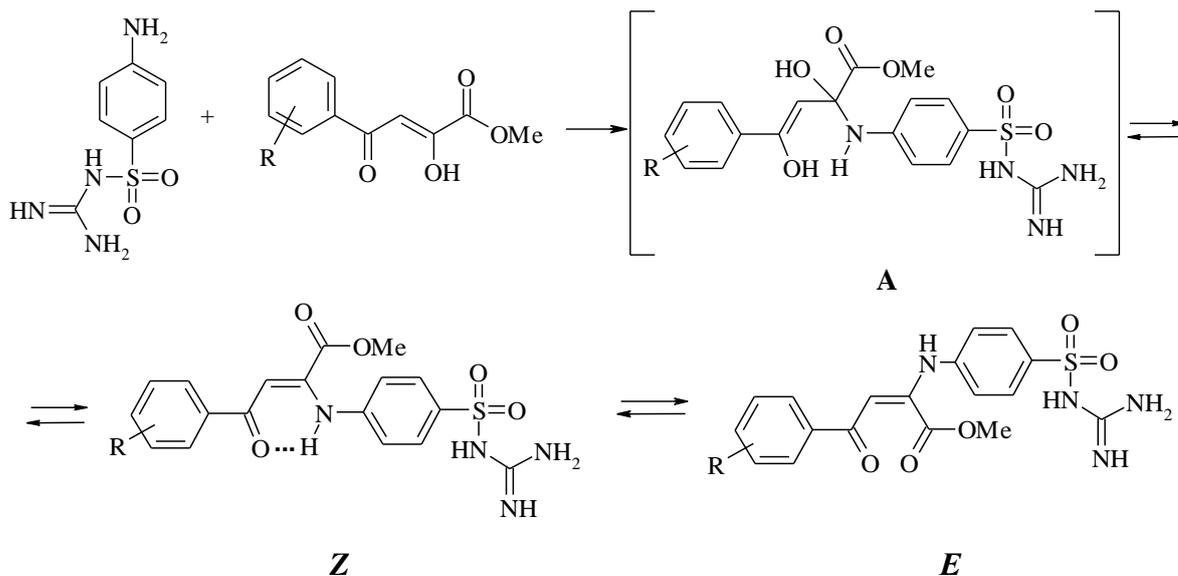
Полученное соединение **16** представляет собой кристаллическое вещество желтого цвета, растворимое в диметилсульфоксиде, диметилформамиде, при нагревании – в ацетонитриле, диоксане, ледяной уксусной кислоте и нерастворимое в воде.

В ИК спектре соединения **16** наблюдаются полосы валентных колебаний NH_2 - и NH -групп ($3424\text{--}3200\text{ см}^{-1}$), амидного карбонила (1672 см^{-1}), кетонного карбонила (1624 см^{-1}), SO_2 -группы в двух интервалах (1316 см^{-1} и 1140 см^{-1}).

В спектре ЯМР ^1H соединения **16** присутствуют сигналы этильной группы при 1.17 м.д. (т, 3H, CH_3CH_2 , J 7.20 Гц) и 2.58 м.д. (к, 2H, CH_3CH_2 , J 7.20 Гц), синглет четырех протонов аминогрупп остатка гуанидина (6.79 м.д.), сигналы ароматических протонов (7.20-7.98 м.д.), синглет протона аминогруппы (CONH) при 10.82 м.д. Также наблюдаются сигналы протонов гидразонной аминогруппы при 10.50 м.д. ($\text{NH}_{E\text{-форма}}$) и 11.10 м.д. ($\text{NH}_{Z\text{-форма}}$), что свидетельствует о существовании соединения **16** в растворе в виде смеси *Z*- и *E*-изомеров.

2.2. Синтез метиловых эфиров 4-арил-2-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]-4-оксо-2-бутеновых кислот

Продолжая изучать реакционную способность метиловых эфиров ароилпировиноградных кислот и 4-аминобензолсульфонилгуанидина, нами было установлено, что при кипячении реагентов в течение 5-10 минут в смеси уксусная кислота-этанол в соотношении 1:1 без добавления ацетата натрия образуются метиловые эфиры 4-арил-2-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]-4-оксо-2-бутеновых кислот **17-22** (схема 6).



17-22 (64-87%)

R= 4-Br (17), 4-C₂H₅O (18), H (19), 4-F (20), 3-CH₃O (21), 4-CH₃O (22).

На первой стадии ароматическая аминогруппа 4-аминобензолсульфонилгуанидина присоединяется по двойной связи α -карбонильной группы исходного метилового эфира ароилпировиноградной кислоты с образованием промежуточного соединения **A**, дегидратация которого приводит к соединениям **17-22**.

Полученные соединения **17-22** представляют собой кристаллические вещества желтого цвета, растворимые в диметилсульфоксиде, диметилформамиде, при нагревании – в диоксане, этаноле, ледяной уксусной кислоте, нерастворимые в воде.

В ИК спектрах соединений **17-22** наблюдаются полосы валентных колебаний NH₂- и NH-групп (3465-3240 см⁻¹), сложноэфирного карбонила (1748-1736 см⁻¹), кетонного карбонила (1640-1628 см⁻¹), SO₂-группы в двух интервалах (1320-1310 см⁻¹ и 1168-1136 см⁻¹).

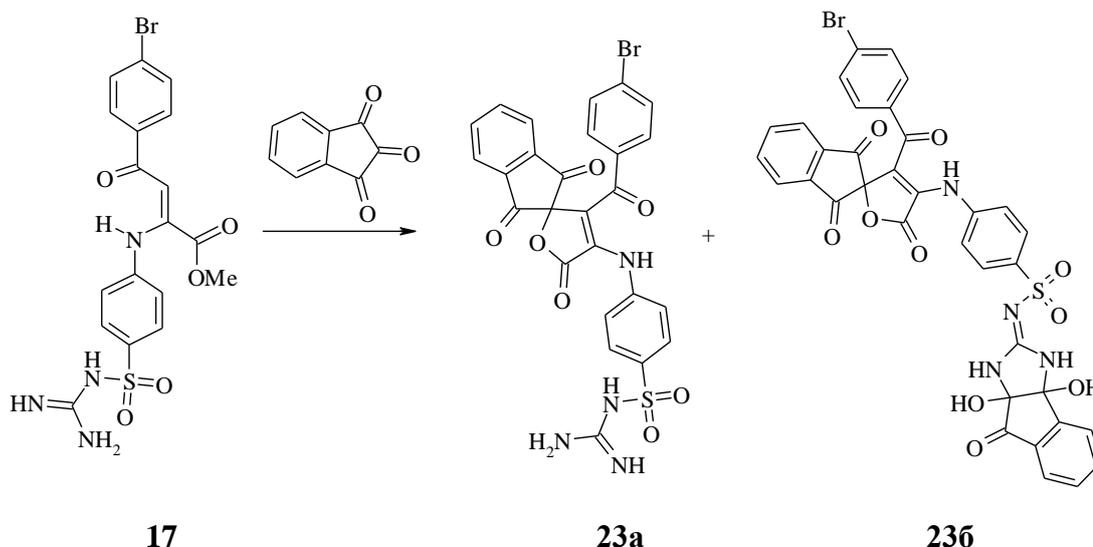
В спектрах ЯМР ¹H соединений **17-22** кроме сигналов ароматических протонов присутствует синглет трех протонов метоксигруппы (3.74-3.80 м.д.), синглет четырех протонов аминогрупп остатка гуанидина (6.62-6.64 м.д.), синглет метинового протона (7.06-7.10 м.д.), синглет протона аминогруппы (NH_{E-форма}) при 9.75-9.97 м.д., синглет протона аминогруппы (NH_{Z-форма}) при 11.58-11.63 м. д.

По данным спектров ЯМР ¹H соединения **17-22** существуют в виде *Z*- и *E*- изомеров с преобладанием *Z*-формы. Исходя из соотношения значений интегральной интенсивности сигналов протона NH-группы на *Z*-форму приходится ~ 90-92%, на *E*-форму – ~ 8-10%.

2.2.1. Взаимодействие метилового эфира 4-бромфенил-2-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]-4-оксо-2-бутеновой кислоты с электрофильными реагентами

2.2.1.1. Реакция с нингидрином

Реакция эквимольных количеств метилового эфира 4-бромфенил-2-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]-4-оксо-2-бутеновой кислоты **17** и нингидрина в среде ледяной уксусной кислоты протекает нерегиоселективно, о чем свидетельствует образование 4-(4-бромбензоил)-3-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]спиро[2,5-дигидрофуран-5,2'-индан]-2,1',3'-триона (**23a**) и 4-(4-бромбензоил)-3-[4-[(4,10-дигидрокси-5-оксо-1,3-дигидробензоциклопентано[1,2-*b*]-2-имидазолиден)аминсульфонил]фениламино]спиро[2,5-дигидрофуран-5,2'-индан]-2,1',3'-триона (**23b**) (схема 7).



Соединения **23a, б** представляют собой кристаллические вещества белого цвета, растворимые в диметилсульфоксиде, диметилформамиде, при нагревании – в ледяной уксусной кислоте, диоксане, изопропаноле и нерастворимые в воде.

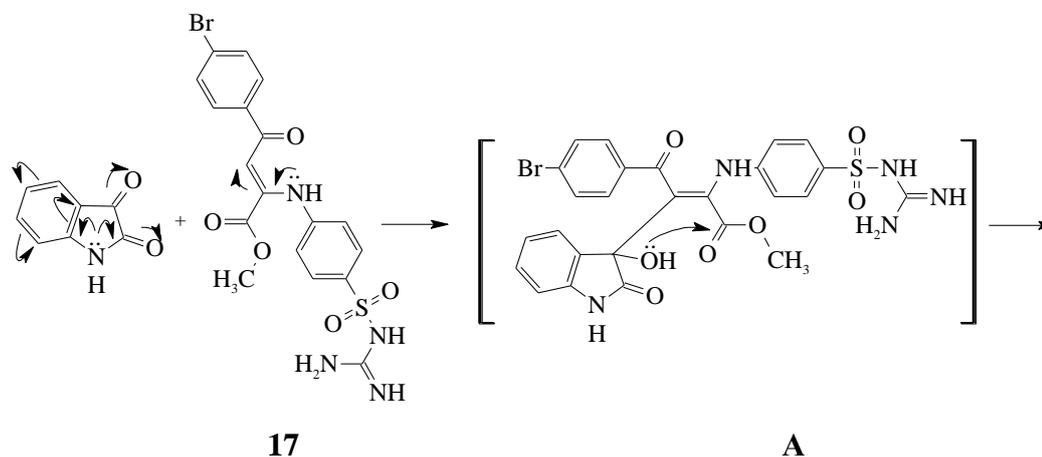
В ИК спектре соединений **23a, б** наблюдаются полосы валентных колебаний NH_2 - и NH -групп ($3312\text{-}3220\text{ см}^{-1}$), лактонного карбонила (1788 см^{-1}), кетонного карбонила ($1724\text{-}1630\text{ см}^{-1}$), SO_2 -группы в двух интервалах при 1360 см^{-1} и 1144 см^{-1} , гидроксильных групп ($3456\text{-}3400\text{ см}^{-1}$).

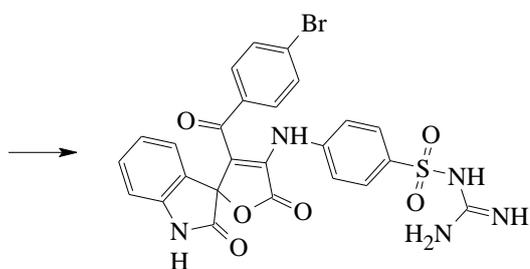
В спектре ЯМР ^1H соединений **23a, б** присутствуют синглет четырех протонов аминогрупп остатка гуанидина (6.60 м.д.), сигналы ароматических протонов (7.05-8.08 м.д.), синглет протона вторичной аминогруппы (9.85 м.д.), синглеты протонов двух OH -групп (6.70 и 6.78 м.д.), синглеты протонов двух NH -групп имидазолидинового цикла (8.64 и 8.94 м.д.). Исходя из соотношения значений интегральной интенсивности сигналов вторичной аминогруппы и NH -группы имидазолидинового цикла в полученной смеси преобладает соединение **23a** ($\approx 90\%$), а на соединение **23б** приходится ($\approx 10\%$).

В масс-спектре соединений **23a, б** присутствуют пики молекулярных ионов с m/z (%) 770 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (10) и 610 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (90), а также пики фрагментных ионов 428 $[\text{M}-\text{BrC}_6\text{H}_4\text{CO}]^+$ (38) и 412 $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2]^+$ (68).

2.2.1.2. Реакция с изатином

Было установлено, что при кипячении в ледяной уксусной кислоте метилового эфира 4-бромфенил-2-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]-4-оксо-2-бутеновой кислоты **17** и изатина образуется 4-(4-бромбензоил)-3-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]спиро[2,5-дигидрофуран-5,3'-индол]-2,2'-дион **24** (схема 8).



**24 (41%)**

На первой стадии метиловый эфир 4-бромфенил-2-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]-4-оксо-2-бутеновой кислоты **17** присоединяется по двойной связи карбонильной группы изатина в положении 3 с образованием промежуточного соединения **A**, которое циклизуется в соединение **24**.

Соединение **24** представляет собой кристаллическое вещество кремового цвета, растворимое в диметилсульфоксиде, диметилформамиде, при нагревании – в диоксане, изопропанол, этаноле и нерастворимое в воде.

В ИК спектре соединения **24** наблюдаются полосы валентных колебаний NH_2 - и NH -групп ($3448\text{--}3216\text{ см}^{-1}$), лактонного карбонила (1752 см^{-1}), лактамного карбонила (1632 см^{-1}), кетонного карбонила (1615 см^{-1}), SO_2 -группы в двух интервалах (1336 см^{-1} и 1136 см^{-1}).

В спектре ЯМР ^1H соединения **24** присутствуют синглет четырех протонов аминогрупп остатка гуанидина (6.75 м.д.), сигналы ароматических протонов (6.89-7.85 м.д.), синглет протона вторичной аминогруппы (10.94 м.д.), синглет протона NH -группы индольного цикла (11.04 м.д.).

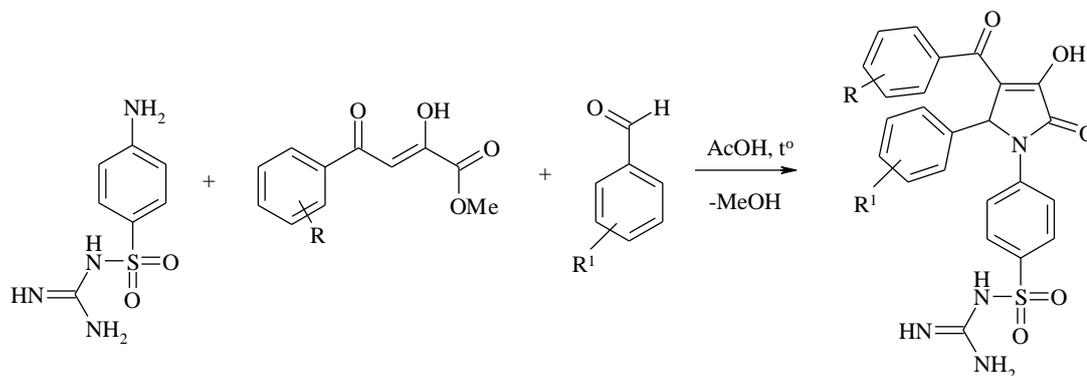
В масс-спектре соединения **24** присутствуют пик молекулярного иона с m/z (%) 597 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100) и пики фрагментных ионов 214 $[\text{C}_8\text{H}_5\text{NOC}_3\text{O}_2\text{NH}]$ (61), 290 $[\text{C}_8\text{H}_5\text{NOC}_3\text{O}_2\text{NHC}_6\text{H}_4]$ (42).

2.3. Синтез 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов

Наиболее часто применяемым методом синтеза замещенных 3-гидрокси-3-пирролин-2-онов является трехкомпонентная реакция эфиров ароилпировиноградных кислот со смесью ароматического альдегида и амина. Продолжая изучение данной реакции с целью создания новых функционально замещенных пиррол-2,3-дионов, во взаимодействие с метиловым эфиром ароилпировиноградной кислоты и ароматическим альдегидом впервые был вовлечен 4-аминобензолсульфонилгуанидин.

Проведенные исследования показали, что трехкомпонентная реакция протекает при кипячении эквимольных количеств исходных реагентов в течение 3-5 минут в среде ледяной уксусной кислоты с образованием 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов **25-59** (схема 9).

Схема 9

**25-59 (61-82%)**

R= 4-Cl (**25-33**); R₁= 3-F (25), 4-F (26), 2-F (27), 4-Cl (28), 4-NO₂ (29), 3-NO₂ (30), 2-HO (31), H (32), 4-Br (33);

R= H (**34-43**); R₁= H (34), 4-Br (35), 4-Cl (36), 4-CH₃O (37), 3-NO₂ (38), 4-F (39), 4-NO₂ (40), 2-NO₂ (41), 3-F (42), 3-C₂H₅O, 4-HO (43);

R= 4-CH₃ (**44-46**); R₁= 4-HO (44), 4-*i*-Pr (45), 2-NO₂ (46);

R= 4-F (**47-52**); R₁= 2-Cl (47), 2-NO₂ (48), 3-F (49), 3-C₂H₅O, 4-HO (50), 4-Br (51), 4-Cl (52);

R= 4-Br (**53-56**); R₁= 2-Cl (53), 3-F (54), 3,4-(CH₃O)₂ (55), 3-NO₂ (56);

R= 4-CH₃O (**57-59**); R₁= 4-Br (57), 2-Cl (58), 4-C₂H₅O (59).

Соединения **25-59** представляют собой белые, светло-желтые или желтые кристаллические вещества, растворимые в диметилформамиде, диметилсульфоксиде, при нагревании – в этаноле, диоксане, ледяной уксусной кислоте и нерастворимые в воде.

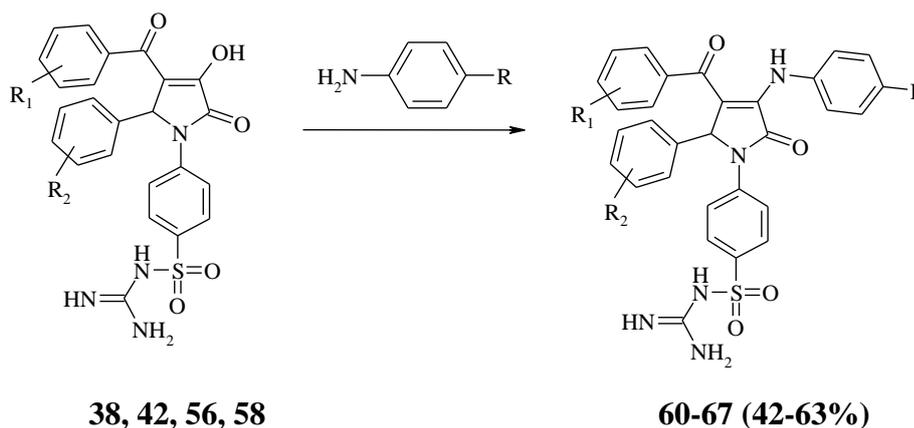
Структура соединений **25-59** подтверждена данными ИК-, ЯМР ¹H-, ЯМР ¹³C-спектроскопии и масс-спектрометрии.

2.3.1. Взаимодействие 5-арил-4-ароил-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов с нуклеофильными реагентами

2.3.1.1. Взаимодействие с мононуклеофильными реагентами

При кипячении полученных 3-гидрокси-3-пирролин-2-онов с 20% избытком ариламина (*n*-толуидин, *n*-анизидин) в среде ледяной уксусной кислоты образуются 5-арил-3-ариламино-4-ароил-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-оны **60-67** (схема 10).

Схема 10



R= CH₃ (60-63), CH₃O (64-67); R₁= 4-Br (60, 66), 4-CH₃O (61, 67), H (62-65);

R₂= 3-NO₂ (60, 62, 64, 66), 2-Cl (61, 67), 3-F (63, 65).

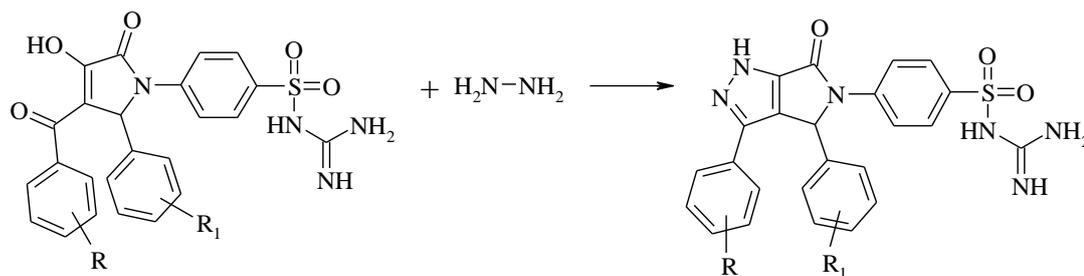
Соединения **60-67** представляют собой кристаллические вещества, окрашенные в светло-желтый, желтый, коричневый, зеленый цвет, растворимые в диметилформамиде, диметилсульфоксиде, диоксане, при нагревании – в ледяной уксусной кислоте, этаноле, изопропанолe и нерастворимые в воде.

Структура соединений **60-67** подтверждена данными ИК-, ЯМР ¹H-спектроскопии.

2.3.1.2. Реакции с бинуклеофильными реагентами

2.3.1.2.1. Взаимодействие с гидразингидратом

Нами было выявлено, что при кипячении 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов с гидразингидратом в ледяной уксусной кислоте в течение 1-2 часов образуются 3,4-диарил-5-(4-гуанидилсульфонилфенил)-4,6-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-6-оны **68-80** (схема 11).



28-30, 32, 33, 35, 36, 39, 42, 53, 54, 57

68-80 (59-76%)

R= H (68-71); R₁= 4-Br (68), 4-Cl (69), 4-F (70), 3-F (71);

R= 4-CH₃; R₁= 2-NO₂ (72);

R= 4-CH₃O; R₁= 4-Br (73);

R= 4-Cl (74-78); R₁= 4-Cl (74), 4-NO₂ (75), 3-NO₂ (76), H (77), 4-Br (78);

R= 4-Br (79,80); R₁= 2-Cl (79), 3-F (80).

Полученные соединения **68-80** представляют собой белые или слегка желтоватые кристаллические вещества, растворимые в диметилсульфоксиде, диметилформамиде, при нагревании – в диоксане, этаноле, ледяной уксусной кислоте, нерастворимые в воде.

Структура соединений **68-80** подтверждена данными ИК-, ЯМР ¹H-спектроскопии и рентгеноструктурным анализом.

Для установления пространственного строения соединений **68-80** медленной кристаллизацией из этанола был получен монокристалл соединения **78** и проведен его рентгеноструктурный анализ (рис. 1).

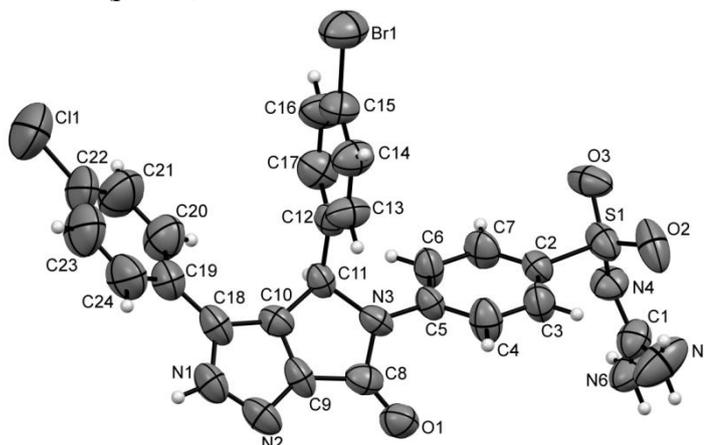
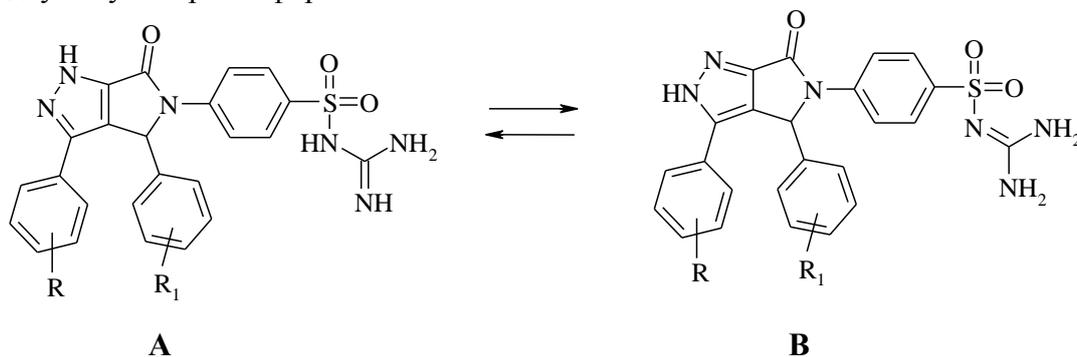


Рисунок 1. Общий вид молекулы соединения **78** по данным РСА в тепловых эллипсоидах 50 % вероятности.

Четыре кристаллографически независимые молекулы соединения **78** кристаллизуются в центросимметричной пространственной группе *P*-1 триклинной сингонии в виде сольвата с этанолом в соотношении 4:1. Независимые молекулы имеют близкую геометрию, на рисунке изображена одна из них. Пирролопиразольные бициклы во всех молекулах практически плоские. Кратные связи в пиразольных фрагментах сильно делокализованы. Ввиду небольшого размера исследованного монокристалла и наличия четырех независимых молекул однозначно локализуется из разностных синтезов электронной плотности только часть атомов водорода групп NH и NH₂. Выравнивание длин связей пиразольного и гуанидинового фрагментов вследствие делокализации электронной плотности также затрудняет осуществление выбора в пользу одной из возможных таутомерных форм. В кристалле присутствует большое количество межмолекулярных водородных связей вида NH...O и NH...N. Анализ этих укороченных контактов позволяет сделать вывод о преимущественной локализации атомов водорода у двух

первичных терминальных аминогрупп гуанидиновых фрагментов и атома азота, ближайшего к хлорфенильному заместителю.

Согласно литературных данных, пирролопиразолы, содержащие гуанидиновый фрагмент, находятся в двух таутомерных формах **A** и **B**:

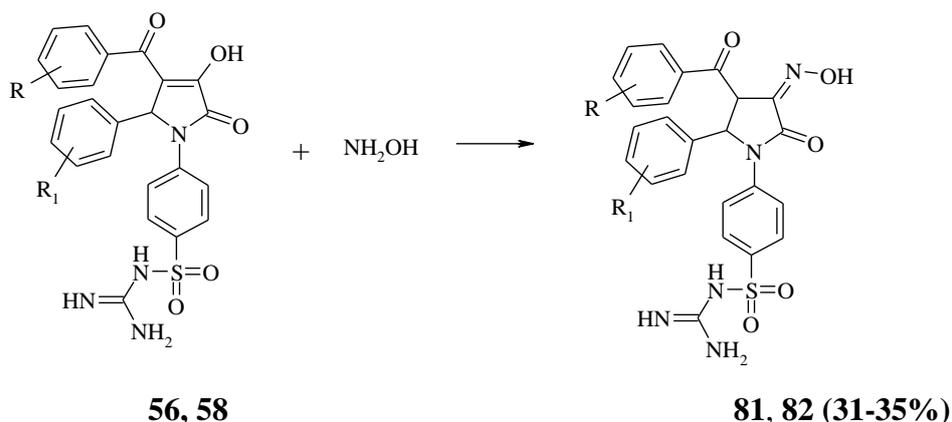


По данным РСА выбор в пользу одной из возможных таутомерных форм затруднён, но наиболее вероятно существование соединений в кристаллическом состоянии со структурой в форме **B**.

2.3.1.2.2. Взаимодействие с гидроксиламином

При взаимодействии 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов с гидроксиламином в смеси уксусная кислота-этанол в соотношении 1:1 образуются соответствующие 5-арил-4-ароил-3-гидроксиимино-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-оны **81**, **82** (схема 12).

Схема 12



R=4-CH₃O, R₁=2-Cl (**81**); R=4-Br, R₁=2-NO₂ (**82**).

Синтезированные соединения **81**, **82** представляют собой кристаллические вещества белого или слегка желтоватого цвета, растворимые в диметилформамиде, диметилсульфоксиде, при нагревании – в диоксане, этаноле, изопропанол, ледяной уксусной кислоте и нерастворимые в воде.

В ИК спектрах соединений **81**, **82** наблюдаются полосы валентных колебаний NH₂- и NH-групп (3440-3340 см⁻¹), гидроксильной группы (3225-3220 см⁻¹), лактамной карбонильной группы (1712-1710 см⁻¹), кетонной карбонильной группы боковой цепи (1636-1632 см⁻¹), SO₂-группы в двух интервалах в области от 1396 до 1352 см⁻¹ и 1144 см⁻¹.

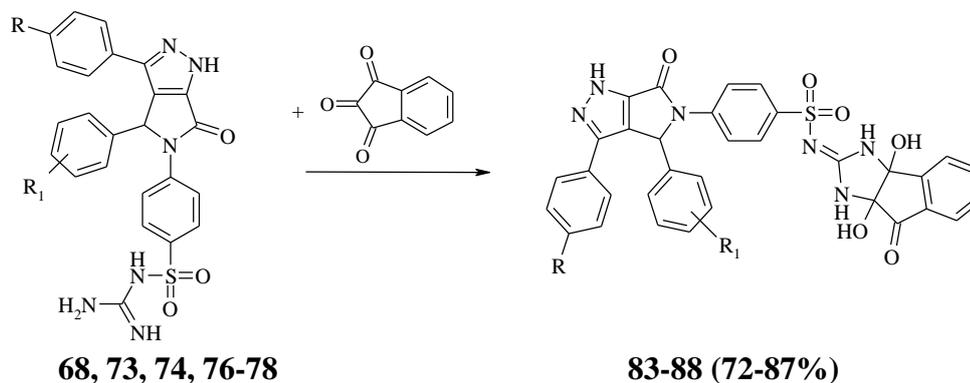
В спектрах ЯМР ¹H соединений **81**, **82** присутствуют синглет протонов аминогрупп остатка гуанидина (6.59 м.д.), мультиплет ароматических протонов (6.92-8.06 м.д.), синглет OH-группы (8.41-8.59 м.д.). Сигналы протонов других групп наблюдаются в ожидаемых областях. Кроме того, в спектрах наблюдаются два сигнала метиновых протонов в виде двух дублетов (4.82-4.96 м.д. и 6.27-6.46 м.д., J 10.20 Гц), которые свидетельствуют о существовании полученных соединений преимущественно в оксимной форме.

2.3.1.3. Взаимодействие с электрофильными реагентами

В продолжение работ по химической модификации полученных 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов (**28**, **30**, **32**, **33**, **35**, **57**) и синтезированных на их основе 3,4-диарил-5-(4-гуанидилсульфонилфенил)-4,6-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-6-онов (**68**, **73**, **74**, **76-78**) представляло интерес изучить возможность использования имеющегося в них гуанидинового фрагмента для синтеза гетероциклических соединений.

Вследствие этого нами в качестве поликарбонильного электрофильного реагента был выбран нингидрин. Проведенные исследования показали, что реакция протекает при кипячении указанных реагентов в течение 2-2,5 часов в среде этанола с образованием 5-[*N*-(4,10-дигидрокси-5-оксо-1,3-дигидробензоциклопентано[1,2-*b*]-2-имидазолиден)аминсульфонилфенил]-3,4-диарил-4,6-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-6-онов (**83-88**) (схема 13).

Схема 13



R = H (**83**), Cl (**84-87**), CH₃O (**88**); R₁ = 4-Br (**83,87,88**), 4-Cl (**84**), 3-NO₂ (**85**), H (**86**).

Полученные соединения **83-88** представляют собой белые или светло-желтые кристаллические вещества, растворимые в диметилформамиде, диметилсульфоксиде, при нагревании – в этиловом спирте, ледяной уксусной кислоте, диоксане и нерастворимые в воде.

В ИК спектрах соединений **83-88** присутствуют полосы поглощения валентных колебаний гидроксильных групп (3450-3405 см⁻¹), аминогрупп (3380-3200 см⁻¹), лактамного карбонила (1732-1680 см⁻¹), кетонного карбонила (1696-1604 см⁻¹), сульфониальной группы в двух интервалах (1356-1320 и 1176-1130 см⁻¹).

В спектрах ЯМР ¹H соединений **83-88** присутствуют сигналы ароматических протонов в виде мультиплета (6.92-8.33 м.д.), синглет метинового протона в положении 4 (6.86-7.15 м.д.), синглет протона при атоме азота пиразольного цикла (13.89-14.31 м.д.), синглеты протонов двух NH-групп имидазолидинового цикла (8.53-8.80 и 8.91-9.10 м.д.), синглеты протонов двух OH-групп (6.57-7.17 и 6.77-7.26 м.д.).

Глава 3. Экспериментальная химическая часть

В третьей главе приведены методики синтеза полученных соединений, приборы, с помощью которых устанавливалась их структура, а также результаты спектральных методов анализа и некоторые физические константы.

Глава 4. Биологическая активность синтезированных соединений

Синтезированные соединения были исследованы на наличие антибактериальной, противогрибковой, гипогликемической, противовоспалительной и анальгетической активности, а также ростостимулирующей активности на семена пшеницы.

Антимикробная активность изучалась на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России под руководством зав. кафедрой, к.ф.н., доцента Новиковой В.В.

Гипогликемическая активность исследовалась на базе ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России зав. виварием Марковой Л.Н. и аспирантом Селиверстовым Г.В.

Изучение анальгетической активности проводилось на кафедре фармакологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России под руководством зав. кафедрой, д.ф.н., профессора Яковлева И.Б., а также в лаборатории биологически активных соединений ФГБОУ ВО ПГНИУ под руководством к.ф.н., доцента Махмудова Р.Р.

Противовоспалительная активность синтезированных веществ исследовалась в лаборатории биологически активных соединений ФГБОУ ВО ПГНИУ под руководством к.ф.н., доцента Махмудова Р.Р.

Изучение острой токсичности проводилось на кафедре физиологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России под руководством зав. кафедрой, к.м.н., доцента Рудаковой И.П.

Исследование ростостимулирующей активности на семена пшеницы проводилось на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России под руководством зав. кафедрой, д.ф.н., профессора Белоноговой В.Д.

4.1. Антибактериальная активность

Антибактериальную активность полученных соединений определяли методом двукратных серийных разведений в мясопептонном бульоне в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P и *Escherichia coli* ATCC 25922. В качестве эталонов сравнения использовали сульгин, нитрофурац (фурацилин) и диоксидин.

Антибактериальная активность изучена у 44 синтезированных соединений. Проведенные исследования показали, что полученные соединения проявляют антибактериальное действие с минимальной подавляющей концентрацией (МПК) 125 – 1000 мкг/мл. В ряду 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов, соединения **30-33**, **37**, **44** обладают антибактериальным действием в отношении золотистого стафилококка с МПК 250 мкг/мл, действуя на уровне фурациллина (МПК 250 мкг/мл). Образование гетероциклической системы пирроло[3,4-*c*]пиразола (соединения **74**, **76**) приводит к увеличению антибактериальной активности (МПК 125 мкг/мл). Наибольшей активностью в отношении кишечной палочки обладает 5-(4-бромфенил)-4-(4-хлорбензоил)-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-он, что, вероятно, связано с введением в структуру ковалентно связанного хлора и брома (МПК 125 мкг/мл).

4.2. Противогрибковая активность

Противогрибковую активность определяли методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде Сабуро. Для всех испытуемых соединений были определены МПК в отношении фармакопейного штамма – *Candida albicans* ATCC 885-653. В качестве эталона сравнения использовали флуконазол.

Противогрибковая активность была определена у 33 полученных соединений. Согласно результатам исследования, синтезированные соединения проявляют низкую противогрибковую активность (МПК 250-1000 мкг/мл) и не превышают действие эталона сравнения – флуконазола. Самая высокая противогрибковая активность наблюдается у 5-(2-фторфенил)-4-(4-хлорбензоил)-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-она, что вероятно связано с наличием в его структуре ковалентно связанных галогенов (МПК 125 мкг/мл).

4.3. Гипогликемическая активность

Гипогликемическую активность определяли пероральным глюкозотолерантным методом у пяти синтезированных соединений. Опыты проведены на интактных белых нелинейных крысах обоего пола.

Исследуемые вещества вводили внутривентриально в скрининговой дозе 25 мг/кг в виде суспензии в 1% крахмальной слизи. Контрольной группе вводили эквивалентное количество 1% крахмальной слизи. В качестве эталона сравнения использовали гипогликемический препарат глибенкламид. Результаты исследования приведены в таблице 1.

Гипогликемическая активность синтезированных соединений

Соединение	Изменение гликемии, ммоль/л						
	-40 мин	0	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	120 мин
35	3.90±0.47	5.28±0.37**	6.03±0.58	7.17±0.92	7.55±1.13	6.94±0.46*	4.86±0.23**
36	4.57±0.21**	5.83±0.35***	6.85±0.56	8.58±0.56	7.30±0.43	6.97±0.45*	5.84±0.43**
70	4.95±0.27*	4.55±0.13***	9.10±0.34***	7.37±0.39	7.72±0.68	5.97±0.39	4.60±0.18**
79	4.37±0.31	4.60±0.21**	8.53±0.43**	10.28±0.69**	8.87±1.14	7.65±1.13	4.95±0.50*
80	5.02±0.16***	4.70±0.11***	8.22±0.60**	11.27±0.29***	6.80±0.66	6.08±0.35	4.53±0.35
Контроль	3.67±0.11	3.73±0.06	6.10±0.18	7.50±0.35	6.75±0.26	5.67±0.26	3.70±0.18
Глибенкламид	2.62±0.24	2.00±0.21	3.83±0.29	3.25±0.27	3.27±0.24	3.23±0.27	1.87±0.32

* достоверность отличий по сравнению с контролем *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Проведенные исследования показали, что синтезированные соединения проявляют низкую гипогликемическую активность и не превышают действие эталона сравнения – глибенкламида. Соединения 79 и 80 проявили выраженное гипергликемическое действие на 30 минуте эксперимента.

4.4. Противовоспалительная активность

Противовоспалительную активность изучали на беспородных белых крысах массой 180-220 г на модели каррагенинового отека, вызываемого субплантарным введением 0,1 мл 1% водного раствора каррагенина.

Исследуемые соединения вводили внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг в виде суспензии в 2% крахмальной слизи за 1 час до введения флоггена. В качестве эталона сравнения использовали диклофенак.

Противовоспалительная активность была изучена у 5 синтезированных соединений. Исследуемые соединения не обладают выраженным противовоспалительным действием и уступают по действию эталону сравнения – диклофенаку.

4.5. Анальгетическая активность

Скринингу на анальгетическую активность было подвергнуто 22 соединения с использованием методов термического раздражения «горячая пластинка» и химического раздражения «уксусные корчи».

4.5.1. Метод «горячая пластинка»

Анальгетическую активность синтезированных соединений определяли на белых нелинейных мышках (самках) методом термического раздражения "горячая пластинка".

Исследуемые вещества вводили внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг в виде взвеси в 2% крахмальной слизи. Контрольной группе животных вводили 2% крахмальную слизь, в качестве эталона сравнения использовали метамизол натрия. Результаты фармакологических испытаний представлены в таблице 2.

Таблица 2

Анальгетическая активность синтезированных соединений по методу «горячая пластинка»

Соединение	Доза, мг/кг, в/б	Время оборонительного рефлекса, сек
1	50	19,28±0,48*
2	50	20,78±0,91*
3	50	21,40±0,76*
4	50	19,92±0,46*
5	50	22,30±2,00*
10	50	22,10±1,22*
47	50	19,10±0,53*
51	50	19,10±0,33*

Продолжение таблицы 2

52	50	19,70±0,66*
53	50	19,80±0,73*
70	50	20,10±0,68*
71	50	19,60±1,48*
75	50	21,00±2,80*
84	50	18,50±1,30*
Метамизол натрия	50	16,33±3,02*
Контроль	-	10,10±0,40
* достоверность отличий по сравнению с контролем p<0,05		

В результате исследования установлено, что все анализируемые вещества обладают анальгетической активностью, превосходящей по действию эталон сравнения – метамизол натрия.

Введение в структуру *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот алкильного заместителя в пара-положение фенильного радикала приводит к увеличению анальгетической активности. Самой высокой анальгетической активностью обладает соединение **5**, что, вероятно, связано с удлинением линейной структуры соединения.

Пирроло[3,4-*c*]пиразолы (соед. **70**, **75**) проявляют более выраженную активность по сравнению с исследуемыми 3-гидрокси-3-пирролин-2-онами, что, видимо, объясняется наличием пиразольного цикла в их структуре.

4.5.2. Метод «уксусных корчей»

Анальгетическую активность определяли на беспородных мышах по методике «уксусных корчей». Уксусную кислоту вводили в виде 0,75%-ного раствора внутривентриально в левую подвздошную область в объеме 0,2 мл (0,1 мл/10 г массы тела), подсчет «корчей» начинали сразу и производили в течение 15 мин. Исследуемые соединения вводили внутривентриально в виде взвеси в 2% крахмальном растворе в правую подвздошную область в дозе 50 мг/кг за 30 мин до введения уксусной кислоты. Анальгетический эффект оценивали по уменьшению количества «корчей» по сравнению с контрольными животными. В качестве эталонов сравнения использовали метамизол натрия (анальгин) и нимесулид в дозах 50 мг/кг.

Таблица 3

Анальгетическая активность синтезированных соединений по методу «уксусные корчи»

Соединение	Доза, мг/кг в/б	Количество корчей	% уменьшения корчей (ПБА)
34	50	7,40±2,25****	73,19
35	50	10,20±2,58**	63,04
36	50	4,60±3,08****	83,33
37	50	8,20±3,65**	70,29
39	50	18,00±3,85*	34,78
40	50	17,00±5,96*	38,41
43	50	15,00±4,42*	45,65
46	50	8,00±2,69***	71,01
Метамизол натрия	50	16,40±3,46*	40,58
Нимесулид	50	7,50±2,23****	75,50
Контроль	-	27,6±3,27	-
* достоверность отличий по сравнению с контролем *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,002, ****p<0,001			

Как видно из таблицы 37, все изученные соединения, кроме **39** и **40**, обладают выраженной анальгетической активностью в дозе 50 мг/кг и превосходят активность метамизола натрия в этой же дозе по методике «уксусных корчей». Вероятно, уменьшение

анальгетической активности в соединениях **39** и **40** связано с введением в 5 положение 3-гидрокси-3-пирролин-2-она электроноакцепторных заместителей (4-F и 4-NO₂).

Кроме того, соединения **34**, **37**, **46** оказывают анальгезирующее действие, сравнимое с действием нимесулида, а соединение **36** превосходит активность нимесулида.

Выявлено, что соединения **34**, **37**, **46** проявляют противоболевую активность примерно на одном уровне, вызывая уменьшение корчей ~ на 70%, значительно превосходя анальгетический эффект эталона сравнения – метамизола натрия.

Наибольшую противоболевую активность оказывает соединение **36** (% уменьшения корчей составляет 83,33), что практически в 2 раза превышает анальгетическую активность эталона сравнения – метамизола натрия. Данное соединение содержит в 5 положении гетероцикла 4-хлорфенильный заместитель, а в 4 положении - бензоильный фрагмент.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований и поиска биологически активных соединений в ряду 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов.

4.6. Острая токсичность

Острую токсичность определяли в опытах на белых нелинейных мышах обоего пола. Исследуемые соединения вводили внутрибрюшинно в виде взвеси в 2% крахмальной слизи в возрастающих дозах. Контрольной группе животных вводили 2% крахмальную слизь.

Согласно проведенным исследованиям установлено, что соединения относятся к классу малотоксичных веществ или являются практически нетоксичными веществами по классификации Сидорова К.К. Относительная безопасность полученных веществ делает их перспективными для дальнейшего изучения.

4.7. Ростостимулирующая активность на семена пшеницы

Ростостимулирующая активность на семена пшеницы изучена у 5 синтезированных соединений ряда метиловых эфиров 4-арил-2-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]-4-оксо-2-бутеновых кислот.

Ростостимулирующую активность определяли по их влиянию на лабораторную всхожесть семян пшеницы. Исследование лабораторной всхожести проводили на семенах пшеницы местной репродукции (Пермский район Пермского края) урожая 2015 г. Лабораторную всхожесть определяли по общепринятой методике, предусмотренной ГОСТом. Пробы отбирали в пятикратной повторности по 50 семян в каждой. Проращивание семян осуществляли в комнатных условиях при температуре 24-27°C при естественном освещении в чашках Петри, в качестве ложа применяли увлажненную фильтровальную бумагу. Всхожесть семян определяли в течение 10 дней. Срок определения энергии прорастания определяли экспериментальным путем.

В качестве контроля использовали дистиллированную воду, а также 20% водный раствор диметилформамида (ДМФА). Для обработки семян использовали 0,05% и 0,005% растворы испытуемых веществ в 20%-м растворе ДМФА. Семена перед посевом выдерживали в данных растворах 2 часа. Полив и анализ проб семян осуществляли ежедневно. На третьи сутки определяли длину побега, число корешков и длину наибольшего корешка. Количество измерений – 50 для каждого типа проб семян. Все полученные данные обрабатывали с применением вариационной статистики.

Для выявления влияния испытуемых веществ на семена мы применяли несколько параметров. Кроме определения всхожести и энергии прорастания изучены морфометрические характеристики проростков пшеницы на третьи сутки после посева семян (длина побега, длина наибольшего корешка и количество корешков). Результаты определения ростостимулирующей активности соединений **18-22** представлены в таблице 5.

Ростостимулирующая активность синтезированных веществ на семена пшеницы

Вещество	Всхожесть, %	Энергия прорастания,		Длина побега, мм	Длина корешка, мм	Число корешков
		%	срок			
18 0,05%	86,00±2,45	73,20±4,67	1 сут.	36,31±1,73	37,65±2,03	4,68±1,17
18 0,005%	91,60±1,10	78,40±3,56	1 сут.	28,67±2,56	25,13±3,27	4,42±0,25
19 0,05%	89,20±1,14	78,40±1,79	1 сут.	38,53±2,51	46,00±3,25	4,98±0,04
19 0,005%	91,20±1,95	69,20±3,65	1 сут.	32,79±1,59	38,58±2,41	4,72±0,15
20 0,05%	92,80±1,14	88,00±1,41	1 сут.	40,35±1,49	43,70±1,95	4,83±0,12
20 0,005%	86,80±1,67	75,20±4,45	1 сут.	29,38±2,14	34,36±2,91	4,49±0,25
21 0,05%	87,20±3,58	78,80±3,58	1 сут.	33,15±1,45	37,62±1,70	4,76±0,19
21 0,005%	90,40±3,11	86,00±3,08	1 сут.	31,32±1,90	33,06±3,46	4,36±0,24
22 0,05%	86,00±2,35	84,80±2,61	1 сут.	32,47±1,27	35,84±1,81	4,82±0,17
22 0,005%	92,80±1,14	88,40±1,10	1 сут.	30,58±1,06	33,15±1,52	5,00±0,00
Вода (контроль)	88,80±3,78	88,00±3,74	1 сут.	40,25±1,50	44,57±2,12	4,98±0,04
ДМФА 20%	88,00±5,82	62,00±16,09	2 сут.	8,4±1,2	13,1±1,3	3,0±0,1

По экспериментальным данным ДМФА действует на семена пшеницы угнетающе: снижает энергию прорастания, замедляет рост корней и побега.

Ростостимулирующие свойства мы предположили у тех соединений, пробы семян которых показали посевные качества, сходные с контрольными образцами (замоченными в воде), или превысили их.

У образцов, обработанных раствором соединения **18**, в обеих исследуемых концентрациях всхожесть высокая, однако остальные показатели ниже таковых контрольных проб.

Растворы соединений **19** и **20** в концентрации 0,005% не проявляют явных ростостимулирующих свойств, поскольку по совокупности анализируемых параметров образцы семян не превышают показатели контрольных образцов. Результаты всхожести и энергии прорастания, а также длина побегов и корешков семян, обработанных 0,05% растворами соединений **19** и **20** сходны с результатами контрольных проб, следовательно данные соединения в концентрации 0,05% проявляют ростостимулирующие свойства.

У образцов, обработанных растворами соединений **21** и **22** в обеих исследуемых концентрациях всхожесть высокая, однако остальные показатели ниже таковых контрольных проб.

Таким образом, растворы соединений **19** и **20** в концентрации 0,05% компенсируют угнетающее действие 20% раствора ДМФА. По результатам исследования данные соединения проявляют ростостимулирующие свойства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработан новый простой метод синтеза *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот реакцией метиловых эфиров ароилпировиноградных кислот с 4-аминобензолсульфонилгуанидином в присутствии безводного ацетата натрия. Установлено, что при взаимодействии метиловых эфиров ароилпировиноградных кислот с 4-аминобензолсульфонилгуанидином без добавления безводного ацетата натрия образуются енаминоэфиры ароилпировиноградных кислот.

2. Предложена общая методика синтеза 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов на основе трехкомпонентной реакции метиловых эфиров ароилпировиноградной кислоты, ароматического альдегида и 4-аминобензолсульфонилгуанидина.

3. Обнаружено, что при взаимодействии синтезированных амидов 2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот с гидразингидратом или гидроксиламином образуются соответствующие *N*-замещенные 5-арил-1*H*-пиразол-3-карбоксамиды или 5-арилизоксазол-3-карбоксамиды. Установлено, что *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амид 2-гидрокси-4-оксо-4-(4-фторфенил)-2-бутеновой кислоты реагирует с хлоридом 4-этилфенилдиазония по активированной метиленовой группе с образованием *N*-[(4-гуанидилсульфонил)фенил]-2,4-диоксо-4-(4-фторфенил)-3-(4-этилфенилгидразоно)бутанамида.

4. Обнаружено, что реакция эквимольных количеств метилового эфира 4-бромфенил-2-ариламино-4-оксо-2-бутеновой кислоты и нингидрина приводит к образованию смеси спирогетероциклических соединений. При взаимодействии с изатином образуется 4-(4-бромбензоил)-3-[4-(гуанидилсульфонил)фениламино]спиро[2,5-дигидрофуран-5,3'-индол]-2,2'-дион.

5. Реакция полученных 1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов с *n*-толуидином и *n*-анизидином приводит к образованию соответствующих 3-ариламинопроизводных 3-гидрокси-3-пирролин-2-онов. При взаимодействии 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов с гидразингидратом либо гидроксиламином были получены 3,4-диарил-5-(4-гуанидилсульфонилфенил)-4,6-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-6-оны либо 5-арил-4-ароил-3-гидроксиимино-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-оны, соответственно.

6. Впервые установлено, что 3,4-диарил-5-(4-гуанидилсульфонилфенил)-4,6-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-6-оны реагируют с нингидрином за счет имеющегося в них гуанидинового фрагмента с образованием 5-[*N*-(4,10-дигидрокси-5-оксо-1,3-дигидробензоциклопентано[1,2-*b*]-2-имидазолиден)аминсульфонилфенил]-3,4-диарил-4,6-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-6-онов.

7. Проведен фармакологический скрининг соединений на наличие антибактериальной, противогрибковой, гипогликемической, противовоспалительной, анальгетической активности, острой токсичности, а также ростостимулирующей активности на семена пшеницы, позволивший выявить некоторые закономерности фармакологической активности от химического строения синтезированных соединений.

8. Для дальнейшего углубленного исследования рекомендован 4-бензоил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-5-(4-хлорфенил)-3-пирролин-2-он, обладающий анальгетическим действием и являющийся практически нетоксичным.

Основное содержание диссертации опубликовано в работах:

Статьи в рецензируемых научных журналах и изданиях Перечня ВАК

1. Синтез 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов / В.Л. Гейн, **И.В. Ковтоногова**, О.В. Бобровская [и др.] // Журн. общ. химии. – 2014. – Т. 84, вып. 2. – С. 271 - 274.
2. Синтез и антибактериальная активность *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых (ароилпировиноградных) кислот / В.Л. Гейн, О.В. Бобровская, **И.В. Ковтоногова** [и др.] // Журн. общ. химии. – 2015. – Т. 85, вып. 4. – С. 588-591.
3. Синтез 5-[*N*-(4,10-дигидрокси-5-оксо-1,3-дигидробензоциклопентано[1,2-*b*]-2-имидазолиден)аминосульфониленфенил]-3,4-диарил-4,6-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-6-онов / В.Л. Гейн, О.В. Бобровская, **И.В. Ковтоногова** [и др.] // Журн. органич. химии. – 2015. – Т. 51, вып. 8. – С. 1151 - 1153.
4. Синтез и антибактериальная активность 3,4-диарил-5-(4-гуанидилсульфонилфенил)-4,6-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-6-онов / О.В. Бобровская, **И.В. Ковтоногова**, В.Л. Гейн [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 2016. – Т. 50, № 1. – С. 17 - 18.
5. Синтез метил-4-арил-2-{[4-(карбамимидаоилсульфамойл)фенил]амино}-4-оксобут-2-еноатов / В.Л. Гейн, О.В. Бобровская, **И.В. Ковтоногова** [и др.] // Журн. органич. химии. – 2016. – Т. 52, вып. 12. – С. 1771 - 1773.
6. Синтез и ростостимулирующая активность метил 4-арил-2-{[4-(*N*-*R*-сульфамойл)фенил]амино}-4-оксобут-2-еноатов / В.Л. Гейн, О.В. Бобровская, **И.В. Ковтоногова** [и др.] // Бутлеровские сообщения. – 2016. – Т. 48, № 12. – С. 26 - 31.

Тезисы докладов и другие публикации

7. Синтез 5-арил-4-ацил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов / **И.В. Ковтоногова**, О.В. Бобровская, Г.В. Селиверстов [и др.] // Современные аспекты химии: материалы студ. школы-конференции / Под ред. А.В. Меркушева, Д.В. Иванова; Перм. гос. нац. иссл. ун-т. – Пермь, 2012. – С. 30 - 31.
8. **Ковтоногова, И.В.** Взаимодействие 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов с гидразингидратом / **И.В. Ковтоногова**, В.Л. Гейн, О.В. Бобровская // XVI Молодежная школа-конференция по органической химии: сб. науч. статей, г. Пятигорск, 14-16 сентября 2013 г. – Ставрополь: Изд-во СКФУ, 2013. – С. 97.
9. **Ковтоногова, И.В.** Синтез 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов и их противомикробная активность / **И.В. Ковтоногова**, Г.В. Селиверстов // Вестник Перм. гос. фарм. акад. – Пермь, 2013. – № 10. – С. 61 - 62.
10. **Ковтоногова, И.В.** Синтез 4-арил-5-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-(4-хлорфенил)-4,6-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-6-онов / **И.В. Ковтоногова**, В.Л. Гейн, О.В. Бобровская // Современные тенденции и перспективы развития фармацевтического образования и науки в России и за рубежом: материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Пермь, 2013. – № 11. – С. 78 - 79.
11. Синтез 5-арил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-4-(4-хлорбензоил)-3-пирролин-2-онов / **И.В. Ковтоногова**, О.В. Бобровская, Г.В. Селиверстов [и др.] // Образование и наука: современное состояние и перспективы развития: сб. науч. трудов по материалам Междунар. науч.-практ. конф., г. Тамбов, 28 февраля 2013 г.: в 10 частях. – Часть 6. – Тамбов: Изд-во ТРОО «Бизнес-Наука-Общество», 2013. – С. 62 - 63.
12. **Ковтоногова, И.В.** Реакция 3,4-диарил-5-(4-гуанидилсульфонилфенил)-4,6-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-6-онов с нингидрином / **И.В. Ковтоногова**, О.В. Бобровская, В.Л. Гейн // Техническая химия. От теории к практике: сб. тез. докл. IV Междунар. конф., посвящ. 80-летию со дня рождения чл.-корр. РАН Ю.С. Клячкина (1934-2000), г. Пермь, 20-24 октября 2014 г. – Пермь, 2014. – С. 115.

Сычева Ирина Валерьевна (Россия)

Взаимодействием метиловых эфиров ароилпировиноградных кислот с 4-аминобензолсульфонилгуанидином в уксусной кислоте в присутствии безводного ацетата натрия получены *N*-(4-гуанидилсульфонилфенил)амиды 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот. В реакции метиловых эфиров ароилпировиноградных кислот и 4-аминобензолсульфонилгуанидина в смеси уксусная кислота-этанол в соотношении 1:1 без добавления безводного ацетата натрия образуются енаминоэфиры ароилпировиноградных кислот. Синтез 5-арил-4-ароил-3-гидрокси-1-(4-гуанидилсульфонилфенил)-3-пирролин-2-онов осуществлен трехкомпонентной реакцией метиловых эфиров ароилпировиноградной кислоты, ароматического альдегида и 4-аминобензолсульфонилгуанидина. Изучено взаимодействие синтезированных соединений с *p*-толуидином, *p*-анизидином, гидразингидратом, гидроксиламином, хлоридом 4-этилфенилдиазония, изатином и нингидрином. Проведен фармакологический скрининг синтезированных соединений на наличие антибактериальной, противогрибковой, гипогликемической, противовоспалительной, анальгетической активности и острой токсичности, а также ростостимулирующей активности на семена пшеницы.

Sycheva Irina (Russia)

The *N*-(4-guanidilsulfonylphenyl)amides of 4-aryl-2-hydroxy-4-oxo-2-butenic acids were synthesized by interaction of methyl esters of aroylpyruvic acids and 4-aminobenzolsulfonylguanidine in acetic acid in the presence of anhydrous sodium. Enaminoesters of aroylpyruvic acids were obtained by reaction methyl esters aroylpyruvic acids with 4-aminobenzolsulfonylguanidine in a mixture of ethanol-acetic acid in the ratio 1:1 without the addition of anhydrous sodium acetate. The 5-aryl-4-aryl-3-hydroxy-1-(4-guanidilsulfonylphenyl)-3-pyrrolin-2-ones were synthesized by three-component reaction of methyl ester of aroylpyruvic acid, aromatic aldehyde and 4-aminobenzolsulfonylguanidine. The interaction of synthesized compounds with *p*-toluidine, *p*-anisidine, hydrazine hydrate, hydroxylamine, 4-ethylphenyldiazonium chloride, isatin and ninhydrin was studied. Pharmacological screening of the synthesized compounds for the presence of antibacterial, antifungal, hypoglycemic, anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity, as well as growth stimulating activity on wheat seeds, was carried out.