

## Синтез та антиоксидантна активність 3-арил-4,7-дигідроксикумаринів

С.П. Бондаренко

Національний університет харчових технологій  
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна

**Резюме.** Синтезовано ряд заміщених 3-арил-4,7-дигідроксикумаринів та вивчено їх антиоксидантну активність в умовах *in vitro*. Проведене дослідження показало перспективність подальшого пошуку сполук з антиоксидантною дією серед похідних 3-арил-4,7-дигідроксикумаринів із розширенням бази досліджуваних субстанцій.

**Ключові слова:** 3-арил-4,7-дигідроксикумарин, антиоксидантна активність, твін-80, малоновий диальдегід, 2-тіобарбітурова кислота.

**Вступ.** В останні десятиріччя велика увага приділяється так званому «оксидативному стресу» — окиснювальному пошкодженню біологічних молекул, що генерується в основному вільними радикалами. Такі захворювання, як рак, атеросклероз, хвороба Паркінсона, ряд запальних захворювань, катаракта, серцево-судинні захворювання та процеси старіння все частіше асоціюють із наслідками вільнорадикального окиснення [1, 2].

Пошук нових антиоксидантних препаратів став предметом багатьох досліджень, оскільки становить великий інтерес для профілактики та терапії багатьох захворювань, у патогенезі яких має місце посилення перекисного окиснення ліпідів [3, 4].

Останнім часом похідні кумарину привертають усе більшу увагу фармакологів у зв'язку із широким спектром їх фізіологічної дії і, як правило, низькою токсичністю та відсутністю побічних ефектів. Як відомо, 3-заміщені 4-гідроксикумарини виявляють високу біологічну активність. Наприклад, фепромарон, фенпрокумон, варфарин, синкумар володіють антикоагулянтними властивостями і застосо-

вуються в терапевтичній практиці [5]. Крім того, 3-арил-4-гідроксикумарини здатні інгібувати HIV-1 протеазу [6].

Метою нашої роботи був синтез заміщених 3-арил-4,7-дигідроксикумаринів і дослідження їх антиоксидантної активності.

**Результати й обговорення.** Описані в літературі методи синтезу 3-арил-4-гідроксикумаринів ґрунтуються на циклізації 2',4'-дигідрокси-2-фенілацетофенонів під дією етилхлороформіату або метилхлороформіату в ацетоні в присутності безводного поташу [6–8], або під дією етилкарбонату в присутності натрію [9, 10] чи *трет*-бутилату натрію [11].

Так, 2,4-дигідроксидезоксибензоїни **1a-e** були синтезовані конденсацією резорцину із заміщеними арилацетонітрилами в етераті трифториду бору при пропусканні в реакційну суміш сухого хлороводню. У результаті гідролізу проміжних гідрохлоридів кетімінів під дією мінеральних кислот були отримані цільові кетони.

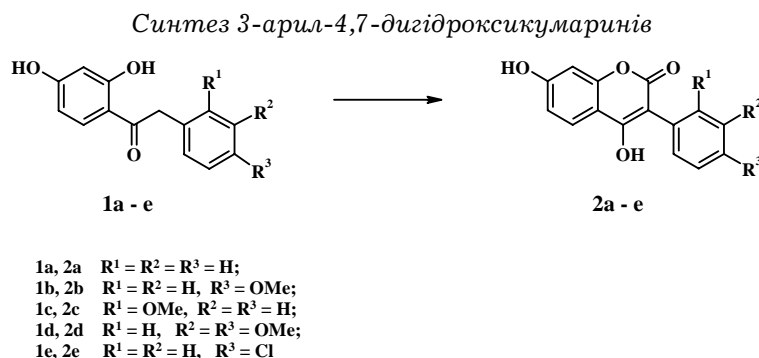
Ураховуючи літературні дані, циклізація 2',4'-дигідрокси-2-фенілацетофенонів **1a-e** була проведена під дією метилхлороформіату в ацетоні в присутності безводного поташу.

Цільові кумарини **2a-e** отримано з виходом 60–72 % після перекристалізації з метанолу. Структуру сполук **2a-e** підтверджено даними спектроскопії ЯМР <sup>1</sup>H та елементного аналізу.

\* Corresponding author.

Tel.: +38044-2879728

E-mail address: sp\_bondarenko@ukrpost.ua



Антиоксидантна активність кумаринів **2a-e** була оцінена за ступенем інгібування Fe<sup>2+</sup>-аскорбатіндукованого окиснення твіну-80 (сорбітанмоноолеату) («Serva») до малонового диальдегіду (МДА) [12, 13].

Концентрація МДА була визначена спектрофотометричним методом за показником оптичної густини утвореного хромогенного комплексу з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) і коефіцієнтом молярної екстинкції МДА [14].

Показник антиоксидантної активності (АОА, %) розрахований як співвідношення екстинкцій контрольної та дослідної проб.

Для порівняння використовували антиоксидант 4-метил-2,6-дитретбутилфенол (іонол) у тих самих концентраціях [15]. Статистичну обробку одержаних даних проведено з використанням t-критерію Стьюдента [16].

Результати вивчення дії кумаринів **2a-e** на процес вільнорадикального окиснення в умовах *in vitro* представлено в табл. 1 і 2. Як видно з табл. 1, досліджувані сполуки знижували концентрацію МДА в інкубаційному середовищі, порівняно з контролем, у різному ступені

залежно від їх концентрації. Так, статистично вірогідне зниження показника спостерігалось під впливом кумарину **2b** у всьому діапазоні концентрацій, починаючи з мінімальної (0,8 мкг/мл). Сполуки **2a** і **2e** виявляли активність також у всіх концентраціях, починаючи з 4,0 мкг/мл. Кумарини **2c** та **2d** у досліджуваних концентраціях не виявили впливу на процес окиснення.

Розрахунок показника АОА засвідчив, що сполуки **2a** і **2e** пригнічували процес окиснення на рівні іонолу, активність кумарину **2b** перевищувала інгібувальну активність іонолу при концентраціях 0,8-20,0 мкг/мл (табл. 2).

**Висновок.** Таким чином, синтезовано ряд 3-арил-4,7-дигідроксикумаринів та вивчено їх антиоксидантну активність. Виявлено, що сполуки **2a**, **2b** і **2e** пригнічують вільнорадикальне окиснення ліпідів в умовах *in vitro* та є перспективними для подальшого розширеного вивчення як антиоксидантних засобів.

**Експериментальна частина.** Хід реакцій і чистоту отриманих сполук контролювали методом ТПХ на пластинках «Sorbfil UV254»

Таблиця 1

Концентрація МДА в інкубаційному середовищі під впливом сполук **2a-e**, ммоль/г

Сполука	Концентрація сполуки, мкг/мл				
	100,0	20,0	4,0	0,8	0 (контроль)
Розчинник EtOH					
іонол	12,1±0,7*	15,8±1,8	15,9±2,4	17,0±1,7	21,2±1,4
<b>2a</b>	14,6±0,1***)	15,8±1,2*	19,4±1,4*	23,7±1,1***)	26,7±1,4
<b>2b</b>	15,8±1,2*	14,6±0*	15,8±1,2*	18,2±1,0*	26,7±1,4
<b>2e</b>	15,8±1,4*	16,4±1,0*	16,4±1,0*	20,6±2,9	29,1±4,2
Розчинник ДМСО					
іонол	12,7±0*	14,6±0*	29,1±1,9	31,0±2,1	34,6±1,0
<b>2c</b>	36,4±1,0***)	36,9±0,6***)	36,9±0,6***)	35,8±1,7	37,1±0,4
<b>2d</b>	29,1±0,8***)	29,7±1,8***)	30,3±1,4	29,2±2,2	26,7±0,7

Примітки: \* P<0,05 порівняно з контролем; (\*\*\*) P<0,05 порівняно з іонолом у відповідній концентрації.

Антиоксидантна активність кумаринів **2a-e** в умовах *in vitro*, %

Сполука	Концентрація сполуки, мкг/мл			
	100,0	20,0	4,0	0,8
Розчинник EtOH				
<b>іонол</b>	52,4±2,8	38,1±6,9	34,1±1,3	22,1±8,2
<b>2a</b>	43,0±0*	38,3±5,4	23,8±5,5	7,1±2,1
<b>2b</b>	38,2±5,5	43,0±0	38,2±5,4	28,6±0
<b>2e</b>	40,6±5,3	38,4±4,0	38,4±4,0	31,5±0
Розчинник ДМСО				
<b>іонол</b>	65,0±0	60,0±0	20,0±5,8	20,0±7,3
<b>2c</b>	0	0	0	0
<b>2d</b>	0	0	0	0

Примітка: \*  $P < 0,05$  порівняно з іонолом у відповідній концентрації.

(Росія) та «Merck» (Німеччина). Як елюент використовували суміш хлороформу і метанолу (9:1). Спектри ЯМР  $^1\text{H}$  виміряно на приладі «VXR-300» (Varian, 300 МГц) у ДМСО- $d_6$  відносно ТМС (внутрішній стандарт), шкала. Температури плавлення визначали у відкритому каплярі на приладі «Buchі В — 535».

#### Загальна методика синтезу кумаринів **2a-e**.

До розчину 10 ммоль відповідного 2',4'-дигідрокси-2-(4-метоксибеніл)ацетофенону **1a-e** в 50 мл ацетону додають 2,3 мл (30 ммоль) метилхлороформіату і 6,9 г (50 ммоль) безводного поташу. Реакційну суміш кип'ятять при перемішуванні на магнітній мішалці протягом 6 год. Кінець реакції визначають методом ТШХ, після чого поташ відфільтровують і розчиняють у 200 мл води. Після підкислення розчину розведеною НСІ до рН=4-5 осад кумарину відфільтровують і кристалізують із метанолу.

**4,7-Дигідрокси-3-феніл-2Н-хромен-2-он (2a)**. Вихід 68 %.  $T_{\text{пл}}$  283-284 °С (літ. 284-285 °С [10]). ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ): 6,74 (1Н, д,  $^4J=2,4$ , Н-8), 6,83 (1Н, дд,  $^4J=2,4$ ,  $^3J=8,7$ , Н-6), 7,28-7,45 (5Н, м, Ph-3), 7,85 (1Н, д,  $^3J=8,7$ , Н-5), 10,57 (1Н, с, ОН-7), 11,16 (1Н, с, ОН-4). Знайдено, %: С 71,11, Н 4,13.  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$ . Вираховано, %: С 70,86, Н 3,96.

**4,7-Дигідрокси-3-(4-метоксибеніл)-2Н-хромен-2-он (2b)**. Вихід 72 %.  $T_{\text{пл}}$  282-283 °С (літ. 274-280 °С [8]). ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ): 3,79 (3Н, с, ОМе-4'), 6,72 (1Н, д,  $^4J=2,4$ , Н-8), 6,81 (1Н, дд,  $^4J=2,4$ ,  $^3J=8,7$ , Н-6), 6,97 (2Н, д,  $^3J=8,7$ , Н-3', Н-5'), 7,29 (2Н, д,  $^3J=8,7$ , Н-2', Н-6'), 7,82 (1Н, д,  $^3J=8,7$ , Н-5), 10,52 (1Н, с, ОН-7), 10,93 (1Н, с, ОН-4). Знайдено, %: С 67,52, Н 4,03.  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$ . Вираховано, %: С 67,60, Н 4,26.

**4,7-Дигідрокси-3-(2-метоксибеніл)-2Н-хромен-2-он (2c)**. Вихід 60 %.  $T_{\text{пл}}$  267-268 °С. ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ): 3,71 (3Н, с, ОМе-2'), 6,71 (1Н, д,  $^4J=2,4$ , Н-8), 6,80 (1Н, дд,  $^4J=2,4$ ,  $^3J=8,7$ , Н-6), 6,94-7,01 (1Н, м, Н-5'), 7,02-7,08 (1Н, м, Н-3'), 7,14-7,19 (1Н, м, Н-2'), 7,31-7,39 (1Н, м, Н-4'), 7,76 (1Н, д,  $^3J=8,7$ , Н-5), 10,44 (1Н, с, ОН-7), 10,75 (1Н, с, ОН-4). Знайдено, %: С 67,83, Н 4,42.  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$ . Вираховано, %: С 67,60, Н 4,26.

**4,7-Дигідрокси-3-(3,4-диметоксибеніл)-2Н-хромен-2-он (2d)**. Вихід 71 %.  $T_{\text{пл}}$  339-340 °С. ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ): 3,75 (3Н, с, ОМе-3'), 3,79 (3Н, с, ОМе-4'), 6,71 (1Н, д,  $^4J=2,0$ , Н-8), 6,81 (1Н, дд,  $^4J=2,0$ ,  $^3J=8,7$ , Н-6), 6,90 (1Н, дд,  $^4J=2,0$ ,  $^3J=8,7$ , Н-6'), 6,94 (1Н, д,  $^4J=2,0$ , Н-2'), 6,99 (1Н, д,  $^3J=8,7$ , Н-5'), 7,80 (1Н, д,  $^3J=8,7$ , Н-5), 10,49 (1Н, с, ОН-7), 10,86 (1Н, с, ОН-4). Знайдено, %: С 65,13, Н 4,62.  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$ . Вираховано, %: С 64,97, Н 4,49.

**4,7-Дигідрокси-3-(4-хлоробеніл)-2Н-хромен-2-он (2e)**. Вихід 64 %.  $T_{\text{пл}}$  315-319 °С. ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ): 6,71 (1Н, д,  $^4J=2,2$ , Н-8), 6,80 (1Н, дд,  $^4J=2,2$ ,  $^3J=8,7$ , Н-6), 7,38 (2Н, д,  $^3J=8,5$ , Н-3', Н-5'), 7,44 (2Н, д,  $^3J=8,5$ , Н-2', Н-6'), 7,82 (1Н, д,  $^3J=8,7$ , Н-5), 10,63 (2Н, с, ОН-4, ОН-7). Знайдено, %: С 62,34, Н 3,02, Cl 12,37.  $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{ClO}_4$ . Вираховано, %: С 62,41, Н 3,14, Cl 12,28.

**Методика дослідження антиоксидантної активності в умовах *in vitro*** [5, 6]. До 2,2 мл 0,8%-ного розчину твіну-80 додали 0,1 мл розчину  $\text{FeSO}_4$  концентрацією 2 ммоль, 0,1 мл розчину аскорбінової кислоти концентрацією 20 ммоль і 0,2 мл розчину досліджуваних кумаринів **2a-e** з розрахунку, що їх кінцева концентрація в пробі становила 0,8, 4,0, 20,0, 100,0 мкг/мл. Для внесення в інкубаційне сере-

довище кумарини **2a**, **2b**, **2e** розчиняли в етанолі, **2c**, **2d** — у ДМСО. Проби витримували 48 год у термостаті при 37 °С, після чого реакцію зупиняли додаванням до 2,0 мл інкубаційного середовища 1,0 мл 40%-го розчину трихлорооцтової кислоти. Через 1 год суміш центрифугували при 5000 об/хв і в надосадовій рідині спектрофотометрично визначали вміст ТБК-активного продукту — МДА. Для цього до 1,0 мл надосадової рідини додавали 2,0 мл 0,25%-го розчину ТБК, кип'ятили проби на водяній бані протягом 15 хв, швидко охолоджували до кімнатної температури і вимірювали оптичну густину на СФ-56 при довжині хвилі 532 нм. Кожну концентрацію кумарину вивча-

ли у трьох паралельних пробах. У контрольні проби замість кумаринів вносили по 0,2 мл відповідного розчинника. Концентрацію МДА встановлювали за коефіцієнтом молярної екстинкції (для МДА  $\epsilon=1,56 \cdot 10^5$  моль<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>) і виражали в мкмоль/г твіну-80 [7]. Показник антиоксидантної активності досліджуваних кумаринів **2a-e** (АОА), виражений у відсотках, розраховували за формулою:

$$AOA = \frac{E_k - E_s}{E_k} 100\% ,$$

де  $E_k$  — екстинкція контрольної проби,  $E_s$  — екстинкція дослідного зразка.

Надійшла в редакцію 20.11.2012 р.

### Synthesis and antioxidant activity of 3-aryl-4,7-dihydroxycoumarins

S.P. Bondarenko

National University of Food Technologies  
68, Volodymirska Str., Kyiv, Ukraine, 01601

**Summary.** A number of substituted of 3-aryl-4,7-dihydroxy coumarins were synthesized and tested their antioxidant activity *in vitro*. The carried research has shown promising of the further search for compounds possessed antioxidant activity among 3-aryl-4,7-dihydroxycoumarins with expansion of investigating compounds database.

**Keywords:** 3-aryl-4,7-dihydroxycoumarin, antioxidative activity, tween 80, malonaldehyde, 2-thiobarbituric acid.

### Перелік літератури

1. Bandyopadhyay D., Chattopadhyay A., Ghosh G., Datta A. Oxidative stress-induced ischemic heart disease: protection by antioxidants // *Curr. Med. Chem.* — 2004. — Vol. 11, No. 3. — P. 369-387.
2. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. — Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2008. — 284 с.
3. Яшин Я.И., Рыжнев В.Ю., Яшин А.Я., Черноусова Н.И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека. — М.: Транслит, 2009. — 212 с.
4. Зенков Н.К., Кандалинцева Н.В., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б., Просенко А.Е. Фенольные биоантиоксиданты. — Новосибирск: СО РАМН, 2003. — 328 с.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Т. 2. — Харьков: Торсинг, 1998. — 592 с.
6. Kirkiacharian S., Thuy D.T., Sicsic S., Bakhchini-an R., Kurkjian R., Tonnaire T. Structure-/activity relationships of some 3-substituted-4-hydroxycoumarins as HIV-1 protease inhibitors // *Farmaco.* — 2002. — Vol. 57, No. 9. — P. 703-708.
7. Ahluwalia V.K., Prakash C., Jolly R.S. Synthesis of linear 3-phenylpyranocoumarins: synthesis of robustin, robustic acid, and their methyl ethers // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* — 1981. — P. 1697-1702.
8. Micheli R.A., Booth A.N., Livingston A.L., Bickoff E.M. Coumestrol, plant phenolics, and synthetic estrogens: a correlation of structure and activity // *J. Med. Pharm. Chem.* — 1962. — Vol. 5. — P. 321-334.
9. Gilbert A.H., McGookin A., Robertson A. Iso-sheikangenin and the synthesis of 4-hydroxycoumarins // *J. Chem. Soc.* — 1957. — P. 3740-3745.
10. Boyd J., Robertson A. The chemistry of the «insoluble red» woods. Part II. A new synthesis of 4-hydroxycoumarins // *J. Chem. Soc.* — 1948. — P. 174-177.
11. Айтмамбетов А., Хиля В.П. Синтетические и модифицированные изофлавоны. VIII. Новые аналоги деррусина // *Химия природ. соедин.* — 1994. — № 2. — С. 226-230.
12. Коленченко Е.А., Сонина Л.Н., Хотимченко Ю.С. Сравнительная оценка антиоксидантной активности низкоэтерифицированного пектина из морской травы *Zostera marina* и препаратов-антиоксидантов *in vitro* // *Биология моря.* — 2005. — № 5. — С. 380-383.
13. Волобой Н.Л., Зверев Я.Ф., Брюханов В.М., Талалаева О.С., Замятина С.В., Зяблова О.Н., Смирнов И.В. Антиоксидантный и прооксидантный эффекты арбутина и гидрохинона в эксперименте *in vitro* // *Бюллетень сибирской медицины.* — 2011. — № 5. — С. 41-44.
14. Современные методы в биохимии. Под ред. В.Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — 390 с.
15. Ельчанинова С.А., Галактионова Л.П., Молчанов А.В., Варшавский Б.Я. Состояние перекисного окисления липидов у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки // *Клин. лаб. диаг.* — 1998. — № 6. — С. 10-14.
16. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Л.: Медицина, 1963. — 148 с.