

Джуади Селина^{1,2},
магистр, студент предаспирантуры;
*Драбли Шамседдин*²,
доцент, канд. хим. наук, доцент

СИНТЕЗ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И ОЦЕНКА ИХ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ

¹ Россия, Санкт-Петербург,
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
^{1,2} Алжир, Константина, Высшая школа биотехнологии,
¹ selenadjouadi@gmail.com, ² Cderabli@yahoo.fr

Аннотация. В данной работе проведен синтез серии гетероциклических соединений — производных оксазолона (ОХА). Комплексный спектральный анализ полученных соединений методами ¹H ЯМР, ¹³C ЯМР и ИК-спектроскопии подтвердил их структуру и высокую степень чистоты, а также продемонстрировал высокие выходы целевых соединений. Оценка антиоксидантных свойств *in vitro* с использованием спектрофотометрических методов ABTS, DPPH, FRAP и фенантролинового теста выявила, что исследуемые соединения проявляют более высокую активность в тестах с фенантролином и FRAP благодаря своей способности реагировать со свободными электронами. Однако, несмотря на успешный синтез, антиоксидантный потенциал большинства производных ОХА оказался незначительным, а в ряде случаев — практически отсутствующим.

Ключевые слова: синтез гетероциклических соединений, ABTS, DPPH, FRAP, фенантролин, оксазолон, ЯМР-спектроскопия, ИК-спектроскопия.

Celina Djouadi^{1,2},
MSc, pre-postgraduate student;
*Chamseddine Derabli*²,
Docent, PhD in Chemistry, Associate Professor

SYNTHESIS OF HETEROCYCLIC COMPOUNDS AND EVALUATION OF THEIR ANTIOXIDANT PROPERTIES

¹ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University,
St. Petersburg, Russia,

Abstract. In this paper a set of heterocyclic compounds – oxazolone derivatives (OXA) – were synthesized. Comprehensive spectral analysis of the obtained compounds using ¹H NMR, ¹³C NMR, and IR-spectroscopy confirmed their structure and high purity, and demonstrated high yields of the target compounds. In vitro evaluation of antioxidant properties using ABTS, DPPH, FRAP, and the phenanthroline test revealed that the studied compounds exhibited higher activity in the phenanthroline and FRAP tests due to their ability to react with free electrons. However, despite the successful synthesis, the antioxidant potential of most OXA derivatives was insignificant, and in some cases, virtually nonexistent.

Key words: synthesis of heterocyclic compounds, ABTS, DPPH, FRAP, phenanthroline, oxazolone, NMR-spectroscopy, IR-spectroscopy.

ВВЕДЕНИЕ

Современные исследования в области химии и фармакологии активно направлены на поиск новых биологически активных соединений, обладающих потенциалом для косметологического применения. Одним из приоритетных направлений является поиск и/или разработка эффективных и безопасных антиоксидантных средств. Антиоксиданты способны нейтрализовать действие свободных радикалов и препятствовать окислительному стрессу, который может вызывать развитие широкого спектра патологических состояний [1 – 4].

Гетероциклические соединения, благодаря своему структурному разнообразию и присущей им биологической активности, представляют собой перспективный класс молекул, являющийся богатым источником потенциальных антиоксидантных агентов. Особый интерес представляют соединения, содержащие оксазольное кольцо – важный фармакофор, входящим в состав ряда биологически активных молекул. Это позволяет использовать его как основу для конструирования молекул с заданными свойствами.

Несмотря на существующие исследования [5, 6], синтез новых, структурно разнообразных гетероциклических структур на основе

оксазолонa и полная оценка их антиоксидантной активности остаются актуальной задачей.

Основная *цель данного исследования* заключается в направленном синтезе серии молекул, являющихся производными оксазолонa, входящего в состав гетероциклических колец, с последующей оценкой их антиоксидантной активности. *Задачи исследования* включают:

- Химический синтез новых гетероциклических соединений, содержащих оксазольное кольцо.
- Оценку антиоксидантной активности химически синтезированных молекул с использованием стандартных *in vitro* методик.

Материалы и методы

Синтез производных оксазолонa (OXA). Процесс синтеза осуществляется в два этапа:

Первый этап: синтез уксусной кислоты путем реакции ацилирования глицина уксусным ангидридом. Этот этап является предварительным и необходимым для получения исходного реагента.

Второй этап: синтез целевого соединения — 2-ацетиламинокоричной кислоты (оксазолонa) из производных уксусной кислоты, полученных на первом этапе, и бензальдегида. Реакция проводилась в присутствии ацетата натрия и уксусного ангидрида в качестве катализаторов.

Химические структуры полученных соединений представлены на рис. 1.

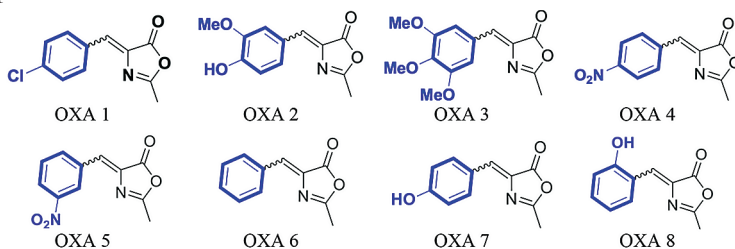


Рис. 1. Синтезированные производные оксазолонa

Методы исследования молекулярного строения химических веществ

Исследование молекулярной структуры проводилось с использованием спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия) и Инфракрасной спектроскопии (ИК-спектроскопии).

Метод ЯМР-спектроскопии основан на регистрации резонанса ядер атомов в магнитном поле под воздействием радиочастотного излучения. Химическое окружение ядер влияет на их резонансные частоты (химические сдвиги), что позволяет идентифицировать различные типы ядер и установить их взаимное пространственное расположение в молекуле, что в итоге определяет структуру соединения [7].

В данном исследовании для изучения структуры соединения были использованы ^1H ЯМР и ^{13}C ЯМР спектроскопии, фокусирующиеся на ядрах водорода на ядрах углерода-13, соответственно. ЯМР-спектры были получены в лаборатории LCP-A2MC Университета Лотарингии (Нанси, Франция) на спектрометре с рабочей частотой 400 МГц для ^1H и 100 МГц для ^{13}C . В качестве растворителя использовался дейтерированный хлороформ (CDCl_3).

Для определения функциональных групп и структурных элементов применялся *метод ИК-спектроскопии*. Метод основан на регистрации поглощения инфракрасного излучения молекулами, что приводит к возбуждению колебательных и/или вращательных состояний молекул. Спектр поглощения ИК-диапазона характеризуется пиками, частота и интенсивность которых зависят от типа химических связей и природы функциональных групп. Таким образом, ИК-спектры служат «отпечатками пальцев» для идентификации структурных особенностей органических соединений [8, 9]. ИК-спектры были получены в диапазоне $600 - 4000 \text{ см}^{-1}$ на оборудовании в лаборатории Национальной школы биотехнологии (Константина, Алжир).

Методы определения антиоксидантной активности. Для исследования антиоксидантных свойств использовались различные спектрофотометрические методы анализа, включая 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH), 2,2-азино-бис (3-этилбензтиазолин-6-сульфоновую кислоту) (ABTS), анализ железовосстанавливающей способности плазмы (FRAP) и фенантролиновый тест [10]. Для всех анализов осуществляли разведения образцов в метаноле.

DPPH-тест: 400 мкл раствора исследуемого образца смешивали с 160 мкл DPPH и инкубировали в темноте в течение 30 минут. Абсорбцию определяли при длине волны 517 нм.

ABTS-тест: 400 мкл раствора исследуемого образца смешивали с 160 мкл ABTS и инкубировали в темноте в течение 10 минут. Абсорбцию определяли при 734 нм.

FRAP-тест: К 10 мкл исследуемого образца (различные концентрации) добавляли 40 мкл фосфатного буфера (pH 6,6) и 50 мкл 1% раствора ферроцианида калия. Смесь инкубировали при 50 °C в течение 20 минут. Затем в реакционную смесь добавляли 50 мкл 10 % трихлоруксусной кислоты (ТХК), 40 мкл H_2O и 10 мкл 0,1% раствора хлорида железа $FeCl_3$. В качестве контроля (холостой образец) использовали раствор этанола вместо исследуемого образца, при этом соблюдая все остальные параметры. Адсорбцию определяли при 700 нм.

Фенантролиновый тест: 10 мкл испытуемого раствора смешивали с 50 мкл 0,2 % раствора $FeCl_3$, 30 мкл 0,5 % раствора фенантролина и 110 мкл метанола (MeOH). Смесь инкубировали в темноте при 30 °C в течение 20 минут. Абсорбцию определяли при 510 нм.

В качестве контрольных образцов (стандартов) использовался бутилированный гидроксанизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ) и аскорбиновая кислота.

Результаты и обсуждения

В табл. 1 представлены основные характеристики синтезированных производных ОХА, такие как выход продукта (отражает

эффективность синтеза для каждого соединения), окрас и температура плавления.

Поскольку базовая структура (основа) для всех производных ОХА одинакова, в данной работе представлены результаты спектроскопического анализа только для образца ОХА 3.

В табл. 2 и 3 представлены данные ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров, где δ – это химический сдвиг, измеряемый в частях на миллион (ppm). Химический сдвиг зависит от химического окружения атомов и показывает, в каком магнитном поле (относительно стандартного сигнала) резонируют атомы.

На основе данных, представленных в табл. 2, можно предположить, что соединение имеет: ароматическую часть (возможно, замещенный фенил) с 3 протонами, три метокси-группы ($-\text{OCH}_3$), дающие сигнал от 9 протонов, и одну метильную группу ($-\text{CH}_3$), дающую сигнал от 3 протонов. Общая сумма интегральных интенсивностей ^{15}H согласуется с предполагаемым строением. Все сигналы являются синглетами, что указывает на отсутствие расщепления, т. е. нет близко расположенных протонов, которые могли бы вызвать спин-спиновое взаимодействие.

Таблица 1

Характеристики синтезированных производных оксазолона

	η (%)	Окрас	$T_{\text{плавления}}$ ($^{\circ}\text{C}$)
ОХА 1	13	жёлтый	162
ОХА 2	35	белый	140
ОХА 3	65	жёлтый	162
ОХА 4	99,5	жёлтый	182
ОХА 5	82	жёлтый	158
ОХА 6	39	жёлтый	156
ОХА 7	10	жёлтый	260
ОХА 8	57	апельсин	208

Таблица 2

**Сигналы ^1H ЯМР-спектра полученного соединения ОХА 3
(400 МГц, растворитель: CDCl_3)**

Химический сдвиг (δ , ppm)	Мультиплетность	Интегральная интенсивность (число протонов)	Предполагаемый фрагмент молекулы
7.40	s (синглет)	2H	Протоны ароматического кольца.
7.05	s (синглет)	1H	Протон ароматической системы. В совокупности с сигналом при 7.40 ppm (2H) может указывать на замещенный фенильный фрагмент, где эти протоны не имеют соседей.
3.92	s (синглет)	9H	Три метокси-группы ($-\text{OCH}_3$).
2.40	s (синглет)	3H	Метильная группа ($-\text{CH}_3$).

Для ^{13}C ЯМР диапазон химических сдвигов шире, чем для ^1H ЯМР, и различные типы атомов углерода резонируют в разных областях. Исходя из данных, представленных в табл. 3, можно предположить, что соединение, полученное в результате синтеза, содержит: две разные карбонильные группы, замещенную ароматическую систему и метильную группу.

Анализ ^1H и ^{13}C ЯМР спектров показал полную согласованность и подтвердил наличие в молекуле ароматического фрагмента, трех метокси-групп, одной метильной группы и двух карбонильных групп.

Ароматический фрагмент: Сигналы 7.40 ppm и 7.05 ppm ^1H ЯМР-спектра подтверждают наличие ароматического фрагмента, что согласуется с сигналами (133.3 – 129.0 ppm) ^{13}C ЯМР-спектра, также характерных для ароматической области. Число сигналов от углерода больше, чем количество протонов, что характерно для

замещенных ароматических колец, предположительно связанных с замещенным фенильным фрагментом.

Метокси-группы ($-\text{OCH}_3$): Выраженный синглет 3.92 ppm ^1H ЯМР-спектра однозначно свидетельствует о наличии трех метокси-групп. Отсутствие прямых сигналов ^{13}C ЯМР-спектра для углерода метокси-групп ожидаемо, однако наличие углеродов, связанных с кислородом (в карбонильных или ароматических фрагментах), согласуется с их присоединением.

Метильная группа ($-\text{CH}_3$): Наличие метильной группы подтверждается сигналом 2.40 ppm ^1H ЯМР и сигналом 15.8 ppm в ^{13}C ЯМР-спектров.

Карбонильные группы: Наличие двух карбонильных групп (167.9 и 166.2 ppm ^{13}C ЯМР-спектра), не несущих протонов по данным ^1H ЯМР-спектра, предположительно являются частью сложных эфиров или амидов, так как протоны от этих групп (если они есть) находятся в другой части спектра, а протоны, дающие сигналы в ^1H ЯМР-спектре, не привязаны непосредственно к $\text{C}=\text{O}$.

Таблица 3

**Сигналы ^{13}C ЯМР-спектра полученного соединения ОХА 3
(100 МГц, растворитель: CDCl_3)**

Химический сдвиг (δ , ppm)	Предполагаемый тип атома углерода	Предполагаемый фрагмент молекулы
167.9	Карбонильный	Часть сложного эфира, амида или карбоновой кислоты.
166.2	Карбонильный	Другой тип карбонильной группы, отличный от 167.9 ppm.
133.3, 132.7, 132.3, 131.6, 131.2, 129.9, 129.0	Ароматический / Винильный	Атомы углерода в ароматическом кольце или ненасыщенной двойной связи.
15.8	Алкильный (метильный)	Атом углерода метильной группы ($-\text{CH}_3$).

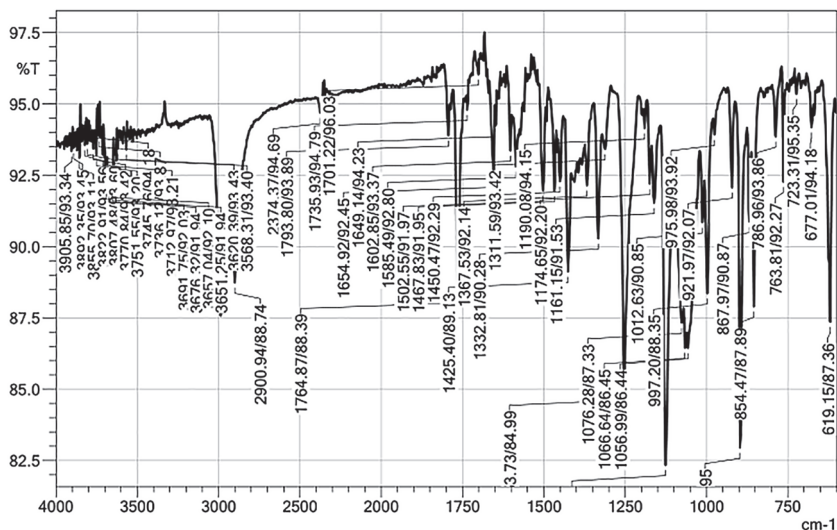


Рис. 2. ИК-спектры пропускания ОХА 3

Для полного представления о строении соединения необходимо подтверждение и сопоставления данных ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии с результатами других спектральных методов, например ИК-спектроскопии.

ИК-спектр исследуемого соединения, представленный на рис. 2, подтверждает наличие ароматического кольца (пик при 1602 см^{-1}), который соответствует валентным колебаниям $\text{C}=\text{C}$, что подтверждается наличием множества сигналов в ароматической области ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров. Пик при 1654 см^{-1} соответствует валентным колебаниям $\text{C}=\text{O}$, что подтверждает присутствие карбонильных групп, ранее идентифицированных по сигналам ^{13}C ЯМР-спектроскопии (167.9 и 166.2 ppm). Зона поглощения в диапазоне $3200 - 2800\text{ см}^{-1}$ характеризуется валентными колебаниями $\text{C}-\text{H}$ связей. Более высокие частоты (ближе к 3200 см^{-1}) могут указывать ароматические/винильные протоны, а более низкие (ближе к 2800 см^{-1}) характерны для протонов в алкильных группах ($-\text{CH}_3$,

–CH₂). ¹H ЯМР-спектр подтверждает наличие ароматических протонов (7.40, 7.05 ppm), метокси-протонов (3.92 ppm) и метильных протонов (2.40 ppm).

Данные всех трех спектральных методов (¹H ЯМР, ¹³C ЯМР, ИК) полностью согласуются и взаимно подкрепляют друг друга. Спектральные методы также подтверждают, что синтезированные производные ОХА получены с высокими выходами и характеризуются высокой степенью чистоты.

Антиоксидантная активность синтезированных производных ОХА была оценена с помощью трех методов: DPPH, ABTS, FRAP и фенантролинового теста. На основании результатов (табл. 4), полученных в ходе испытаний антиоксидантной активности восьми полученных производных ОХА, очевидно, что некоторые из них проявляют большую антиоксидантную активность, чем другие, в то время как некоторые не продемонстрировали заметной эффективности по сравнению с использованными стандартами.

Таблица 4

Результаты IC₅₀ для исследуемых химических соединений

	DPPH IC₅₀ (мкМ)	ABTS IC₅₀ (мкМ)	FRAP A_{0,5} (мкМ)	Фенантролиновый тест A_{0,5} (мкМ)
ОХА 1	>1600	>1600	>1600	>1600
ОХА 2	>1600	734±13,78	>1600	>1600
ОХА 3	>1600	>1600	>1600	>1600
ОХА 4	>1600	>1600	130,79±12,12	66,78±0,16
ОХА 5	>1600	>1600	>1600	>1600
ОХА 6	>1600	>1600	>1600	48,44±2,96
ОХА 7	>1600	>1600	>1600	900,53±0,48
ОХА 8	>1600	>1600	>1600	>1600
ВНА	36,11±0,31	16,16±0,09	31,23±1,43	5,61±0,22
ВНТ	20,13±6,69	21,08±0,46	66,74±2,36	6,40±1,27
Аскорбиновая кислота	>1600	>1600	7,51±0,46	>1600

В тесте DPPH все соединения показали низкую антиоксидантную активность IC_{50} (Half maximal inhibitory concentration – это концентрация вещества, которая необходима для подавления окислительной реакции на 50 %, чем ниже значение IC_{50} или $A_{0,5}$, тем более сильным антиоксидантом является соединение). Это может быть объяснено sp^3 -гибридизованной структурой DPPH и стерическими затруднениями, связанных с наличием трёх колец, окружающих атом азота. Полициклические молекулы не могут эффективно связываться с данной молекулой для её восстановления, т. е. этим молекулам (антиоксидантам) трудно отдавать протон (H^+), что объясняет их неспособность реагировать со свободным радикалом.

В тесте DPPH все соединения показали низкую антиоксидантную активность IC_{50} (Half maximal inhibitory concentration – это концентрация вещества, которая необходима для подавления окислительной реакции на 50 %, чем ниже значение IC_{50} или $A_{0,5}$, тем более сильным антиоксидантом является соединение). Это может быть объяснено sp^3 -гибридизованной структурой DPPH и стерическими затруднениями, связанных с наличием трёх колец, окружающих атом азота. Полициклические молекулы не могут эффективно связываться с данной молекулой для её восстановления, т. е. этим молекулам (антиоксидантам) трудно отдавать протон (H^+), что объясняет их неспособность реагировать со свободным радикалом.

В тесте ABTS было больше активных молекул, чем в тесте DPPH. Это различие можно объяснить sp^2 -структурой радикала ABTS, которая облегчает взаимодействие молекул с атомом азота. Следовательно, антиоксиданты легче отдают протон (H^+) в тесте ABTS. Соединение ОХА 2 проявило наибольшую активность ($IC_{50} = 734 \pm 13,78$ мкМ), чем другие соединения. Однако его поглощающая способность была в 46 раз ниже, чем у ВНА ($IC_{50} = 16,16 \pm 0,09$ мкМ) и в 35 раз ниже, чем у ВНТ ($IC_{50} = 21,08 \pm 0,46$ мкМ). Таким образом, можно сделать вывод, что тест ABTS более эффективен, чем тест DPPH при оценке антиоксидантной активности полученных соединений.

Различие в активности, наблюдаемое в FRAP и фенантролиновом тестах, можно объяснить тем, что в FRAP-тесте ионы Fe^{+3} связаны, что затрудняет реакцию соединений. В анализе с фенантролином ионы Fe^{+3} находятся в свободном состоянии в растворе, что делает их более доступными и способствует более эффективной реакции с исследуемыми молекулами. Следует отметить, что в FRAP и фенантролиновом тестах были получены более активные молекулы по сравнению с анализами DPPH и ABTS, что может быть объяснено тем, что синтезированные соединения богаты электронами (анализы с DPPH и ABTS основаны на переносе протонов, в то время как FRAP и фенантролин основаны на переносе электронов). Молекулы, богатые электронами, как правило, легче реагируют в анализах с переносом электронов, что объясняет наличие более активных молекул. В FRAP-тесте соединение ОХА 4 проявляет более высокую антиоксидантную активность ($A_{0,5} = 130,79 \pm 12,12$ мкМ), что в 19 раз ниже результатов для аскорбиновой кислоты. В фенантролиновом тесте соединение ОХА 6 выделяется среди других соединений, демонстрируя более высокую активность ($A_{0,5} = 48,44 \pm 2,96$ мкМ), что делает его в 8 раз менее эффективным, чем стандарт ВНА.

Подводя итог, полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемые соединения проявляют более высокую активность в тестах с фенантролином и FRAP благодаря своей способности реагировать со свободными видами электронов. Эти наблюдения подчеркивают важность выбора подходящих методов анализа антиоксидантной активности с учетом механизмов реакции изучаемых соединений.

Выводы

Полученные в результате синтеза продукты были подвергнуты комплексному спектральному анализу для подтверждения их структуры и степени чистоты. Анализ ЯМР-спектров (как по атомам водорода, так и по атомам углерода) подтвердил правильность выбранного подхода к синтезу, демонстрируя сигналы,

соответствующие ожидаемым положениям протонов и атомов углерода, а также их интегральную интенсивность и мультиплетность, согласующиеся со структурой целевых соединений. ИК-спектроскопия, в свою очередь, предоставила информацию о наличии характерных функциональных групп. Несмотря на успешную структурную идентификацию и подтверждение чистоты полученных соединений, при последующей оценке их антиоксидантной активности было выявлено, что большинство синтезированных молекул демонстрируют очень низкий или практически отсутствующий антиоксидантный потенциал.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 2015. 4 (1). 180 – 183. DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.002.
2. Marrocco I., Altieri F., Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid Med Cell Longev*, 2017. 6501046. DOI: 10.1155/2017/6501046.
3. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. 39 (1). 44 – 84. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
4. Mandal S., Yadav S., Yadav S., Kumar N.R. Antioxidants: A Review. *Journal of Chemical Sciences, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2009. 1 (1). 102 – 104. URL: <https://www.jocpr.com/articles/antioxidants-a-review.pdf>
5. Siddaiah V., Basha G., Sudhakar D., Srinuvasarao R., Kumar Y. Practical Synthesis of 4-Benzylidene-2-phenyl-5 (4 H)-oxazolones. *Synthetic Communications*, 2013. 20 (1). 2191 – 2197. DOI: 10.1080/00397911.2012.696301.
6. Betłakowska B., Banecki B., Czaplewski C., Łankiewicz L., Wicz W. Reaction of 4-Benzylidene-2-methyl-5-oxazolone with Amines, Part 2: Influence of substituents in para-position in the phenyl ring and a substituent on Amine Nitrogen Atom on the reaction kinetics. *International Journal of Chemical Kinetics*, 2002. 34. 148 – 155. DOI: 10.1002/kin.10039.
7. Сильверстейн Р., Вебетер Ф., Кимл Д. Спектрометрическая идентификация органических соединений / Пер. с англ. Н.М. Сергеева и Б.Н. Тарасевича. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 557 с. URL: <https://moodle.kstu.ru/mod/resource/view.php?id=23480&forceview=1>

8. Бёккер Ю. Спектроскопия / Пер. с нем. Л. Н. Казанцевой, под ред. А. А. Пупышева, М. В. Поляковой. М.: Техносфера, 2009. 528 с. URL: https://rusneb.ru/catalog/000199_000009_02000011343/

9. Larkin P. Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation. Elsevier, 2011. DOI: 10.1016/C2010-0-68479-3.

10. Gülçin İ. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. Archives of Toxicology, 2020. 94 (3). 651 – 715. DOI: 10.1007/s00204-020-02689-3.