

Ж.Б.Сатпаева<sup>1</sup>, С.Д.Фазылов<sup>2</sup>, А.Мадреимов<sup>1</sup>, Р.Е.Бакирова<sup>3</sup>,  
А.К.Турсынова<sup>4</sup>, О.А.Нуркенов<sup>2</sup>, З.Т.Шульга<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букетова;

<sup>2</sup>Институт органического синтеза и углекислотной химии Республики Казахстан, Караганда;

<sup>3</sup>Карагандинский государственный медицинский университет;

<sup>4</sup>Карагандинский государственный технический университет;

<sup>5</sup>Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда  
(E-mail: satpaeva\_zh@mail.ru)

## Синтез и биологическая активность пиразольных производных морфолина

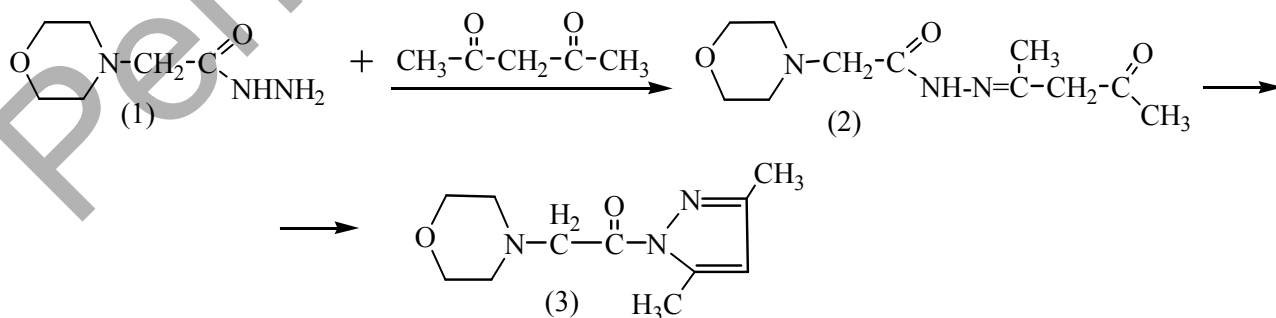
В статье приведены данные по синтезу и изучению фагоцитозстимулирующей и цитотоксической активности пиразольных производных морфолина. Взаимодействием гидразида N-морфолилуксусной кислоты с ацетилацетоном и ацетоуксусным эфиром в жестких условиях получены соответствующие пиразольные производные. С применением современных методов ИК- и ЯМР <sup>1</sup>H-спектроскопии установлено строение синтезированных соединений. В результате проведенного биоскрининга на фагоцитозстимулирующие и цитотоксические свойства установлено, что соединение N-(3,5-диметил-1H-пиразол-1ил)амид N-морфолилуксусной кислоты обладает фагоцитозстимулирующим действием, а также проявляет выраженную цитотоксическую активность в отношении личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach).

**Ключевые слова:** гидразид, пиразольные производные морфолина, фагоцитозстимулирующая и цитотоксическая активность.

Среди гетероциклических соединений вследствие большей препаративной доступности особое место занимают производные пиразолов. За последние годы это вызвано все большим применением их производных в качестве лекарственных препаратов, красителей, люминесцентных и флюоресцентных веществ. Производные пиразола относятся к старейшим противовоспалительным и обезболивающим лекарственным веществам [1–3]. Исследования по поиску новых биологически активных производных в ряду соединений с пиразольным циклом продолжаются и в настоящее время. Комбинация в структуре гетероциклических соединений других, не менее важных физиологически активных группировок может привести не только к усилению биологической активности, но и к появлению других, новых видов биологической активности [2]. Общие методы получения производных пиразола, его химические свойства подробно освещены в монографиях [3, 4].

Известно [4, 5], что некоторые гидразиды вступают в конденсацию с дикарбонильными соединениями и ацетоуксусным эфиром с образованием производных пиразола и пиразолонна. В этом плане значительный интерес представляет модификация гидразида N-морфолилуксусной кислоты с ацетилацетоном и ацетоуксусным эфиром.

С целью получения пиразольных производных нами была проведена конденсация гидразида N-морфолилуксусной кислоты (1) с ацетилацетоном и ацетоуксусным эфиром при их нагревании в течение 20–25 часов в спиртовой среде.



При конденсации гидразида N-морфолилуксусной кислоты с ацетилацетоном при комнатной температуре в течение часа реакция протекала лишь до образования соответствующего гидразона (2) — кристаллический порошок лимонно-желтого цвета, тяжело растворимый во многих органических растворителях.

При увеличении продолжительности нагрева до 20–25 часов в 2-пропаноле гидраза N-морфолилукусной кислоты с ацетилацетоном образующийся на первой стадии как промежуточный продукт реакции гидразон (2) циклизуется с образованием продукта N-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)амида N-морфолилукусной кислоты (3), представляющего собой белый кристаллический порошок, легко растворимый во всех органических растворителях в холодном виде.

В ИК-спектре синтезированного соединения (3) имеются полосы поглощения групп амидной группы C(O)NH в области 1690 и 1675 см<sup>-1</sup>, а также валентных колебаний связи C=N при 1580 см<sup>-1</sup>, полосы поглощения неравноценных карбониллов в области 1730 и 1650 см<sup>-1</sup>.

В спектре ЯМР <sup>1</sup>H N-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)амид N-морфолилукусной кислоты (3) сигналы метиленовых протонов морфолинового фрагмента прописываются в виде двух триплетов в области с центром 2,52 м.д. и 3,56 м.д. с КССВ J<sub>1</sub> = 4,66 Гц, J<sub>2</sub> = 4,65 Гц. Метиленовые протоны NCH<sub>2</sub>-фрагмента проявляются в области 3,39 м.д. в виде уширенного синглета. В области 1,75 м.д. и 1,95 м.д. присутствуют интенсивные узкие синглеты почти эквивалентных метильных протонов пиразольного кольца. Синглет в области 6,21 м.д. принадлежит метиленовым протонам CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>-фрагмента. Соотношение интегральных интенсивностей отвечает структуре (3) (рис.).

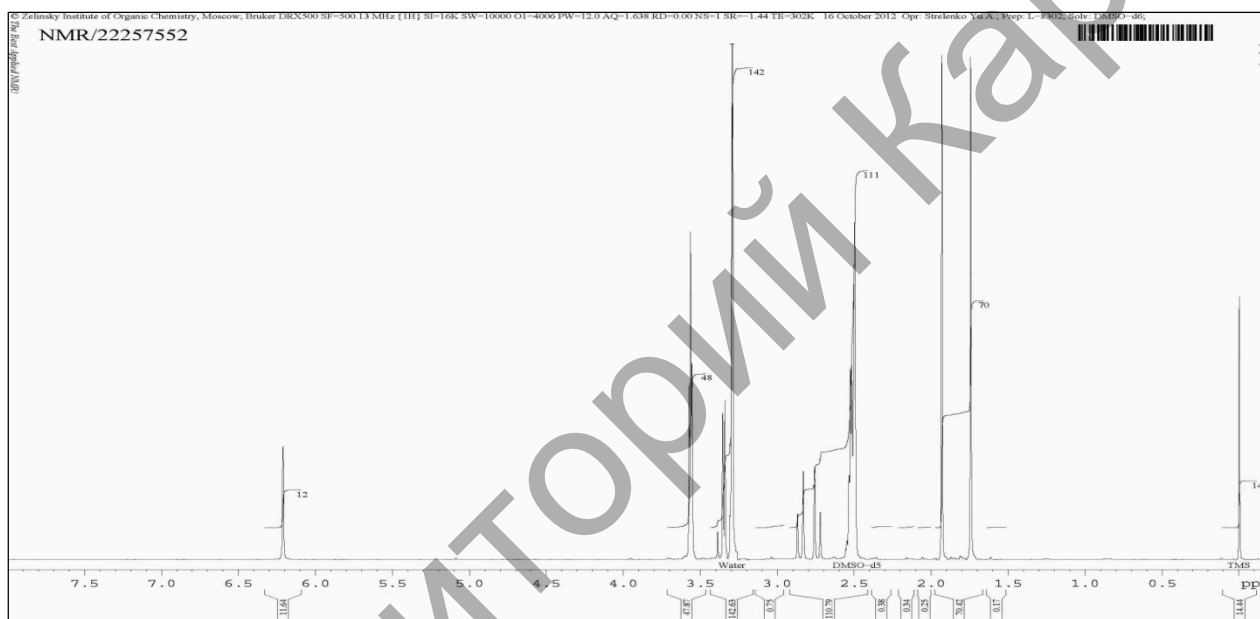


Рисунок. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H N-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)амид N-морфолилукусной кислоты (3)

Конденсация гидраза N-морфолилукусной кислоты с этиловым эфиром ацетоуксусной кислоты приводит к образованию циклического продукта — 3-метил-1-(2-морфолиноацетил)-1H-пиразол-5-(4H)-она (4). Циклизация протекает быстро через промежуточный гидразон, выделить который нам не удалось.

Синтезированное соединение (4) представляет собой кристаллический порошок белого цвета, растворимое во многих органических растворителях.

В спектре ЯМР <sup>1</sup>H 3-метил-1-(2-морфолиноацетил)-1H-пиразол-5-она (4) сигналы метиленовых протонов морфолинового фрагмента прописываются в виде двух триплетов в области с центром 2,47 м.д. и 3,59 м.д. с КССВ J<sub>1</sub> = 4,79 Гц, J<sub>2</sub> = 4,62 Гц. Метиленовые протоны NCH<sub>2</sub>-фрагмента проявляются в области 3,00 м.д. в виде узкого синглета. В области 2,09 м.д. присутствует интенсивный узкий синглет метильного протона пиразольного кольца. Синглет в области 9,06 м.д. принадлежит метиленовым протонам CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-фрагмента. Соотношение интегральных интенсивностей отвечает структуре (4).

Основные физико-химические характеристики и данные элементного анализа синтезированных соединений (2–4) приведены в таблице 1.

Синтезированные соединения (3, 4) прошли первичные скрининговые исследования на фагоцитозстимулирующую и цитотоксическую активность в отношении личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach) в АО МНПХ «Фитохимия» (г. Караганда).

Т а б л и ц а 1

**Физико-химические константы и данные элементного анализа  
синтезированных соединений (2–4)**

№ соед.	Выход, %	Т. пл., °С	Найдено, %			Брутто-формула	Вычислено, %		
			С	Н	N		С	Н	N
2	20	78–80	51,55	7,74	16,83	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	51,35	7,44	16,33
3	64	85–87	59,49	7,88	18,92	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	59,17	7,67	18,82
4	60	157–160	55,52	6,96	18,73	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	55,32	6,71	18,66

Фагоцитозстимулирующее действие образцов (3, 4) изучали на наличие фагоцитирующих клеток из 100 нейтрофилов (количественный показатель) и количество стафилококков, поглощенных одним нейтрофилом — фагоцитарное число (качественный показатель фагоцитоза) после 1 часа исследования [6]. Препарат сравнения — «Иммунорм». Исследования показали, что соединение (3) обладает фагоцитозстимулирующим действием в отношении количественного показателя фагоцитоза, достоверно увеличивая фагоцитарный индекс. Как и в группе с препаратом сравнения, фагоцитарное число под влиянием соединения (2) также имеет тенденцию к увеличению, и оказалось выше по сравнению с контролем на 66 %.

Цитотоксическая и фагоцитозстимулирующая активность синтезированных соединений 3 и 4 приведены в таблицах 2 и 3.

Т а б л и ц а 2

**Влияние соединения 2 и 4 на фагоцитарную активность нейтрофилов крови, (M±m)**

№ соед.	Наименование вещества	Нейтрофилы	
		ФИ, %	ФЧ, ед.
	Контроль со средой разведения	36,0 ± 3,2	8,2 ± 1,7
	Иммунорм	69,7 ± 1,8*	13,3 ± 1,7
2	N-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)амид N-морфолилуксусной кислоты	48,0 ± 1,0*	13,6 ± 1,6
4	3-метил-1-(2-морфолиноацетил)-1H-пиразол-5-он	35,0 ± 4,0	8,0 ± 2,1

Примечание. \* — Достоверность различий относительно показателя контроля.

В таблице 2 показано, что соединение N-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)амид N-морфолилуксусной кислоты (3) обладает фагоцитозстимулирующим действием в отношении как количественного, так и качественного показателей фагоцитоза нейтрофилов крови. Соединение (4) не обладает фагоцитозстимулирующим действием.

Т а б л и ц а 3

**Цитотоксическая активность образцов**

№ соед.	Наименование вещества	Концентрация, мкг/мл	Количество выживших личинок			ЛД <sub>50</sub> , мкг/мл	95 % доверительный интервал
			1-я параллель	2-я параллель	3-я параллель		
2	N-(3,5-Диметил-1H-пиразол-1-ил)амид N-морфолилуксусной кислоты	1	10	10	10	124,32	48,95–1003,13
		10	9	7	7		
		100	6	6	5		
4	3-Метил-1-(2-морфолиноацетил)-1H-пиразол-5-он	1	10	10	10	–	–
		10	10	9	9		
		100	9	7	8		

Изучение цитотоксической активности указанных выше образцов (3, 4) оценивали в тесте выживаемости личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach) в условиях культивирования *in vitro*.

Исследования показали, что по истечении 24 часов пересчитывали выжившие и погибшие личинки. Затем с использованием полученных данных по верхнему и нижнему токсическому лимиту рассчитывали половинную токсическую дозу образца, т.е. соединение N-(3,5-диметил-1H-пиразол-

1-ил)амид N-морфолилуксусной кислоты (3) проявляет выраженную цитотоксическую активность в отношении личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach). Соединение (4) не проявляет цитотоксического действия.

Таким образом, нами на основе физиологически активного гидразида N-морфолинилуксусной кислоты (1) конденсацией с дикарбонильными соединениями получены весьма перспективные в биологическом плане гидразоны и пиразольные производные. Проведенное биоиспытание показало, что соединение N-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)амид N-морфолилуксусной кислоты обладает фагоцитозстимулирующим действием, а также проявляет выраженную цитотоксическую активность.

#### Экспериментальная химическая часть

ИК-спектры сняты на спектрометре с Фурье-преобразователем «AVATAR-320» фирмы NICOLET в таблетках с KBr. Спектры ЯМР <sup>1</sup>H записаны на спектрометре Bruker DRX500 с частотой 500 МГц в растворе DMSO-d<sub>6</sub> относительно внутреннего стандарта TMS. Температуры плавления определены на приборе «Voetius». Контроль за ходом реакции и чистотой полученных соединений осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol UV-254» в системе изопропиловый спирт–бензол–аммиак — 10:5:2. Пластинки проявляли парами йода.

**Метил 3-(2-(2-морфолиноацетил)гидразон)бутаноат (2).** 1,59 г (0,01 моль) гидразида N-морфолинилуксусной кислоты (1) растворили в 10 мл изопропилового спирта. При перемешивании прикапывали 1,2 г (0,012 моль) ацетилацетона. Смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Завершение реакции контролировали по ТСХ. Раствор упаривали под вакуумом, маслообразный остаток растирали гексаном до получения порошкообразного вещества лимонно-желтого цвета. После перекристаллизации из изопропилового спирта удается получить продукт с т. пл. 78–80 °С. Выход продукта (2) составляет 20 %.

**N-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)амид N-морфолилуксусной кислоты (3).** 1,59 г (0,01 моль) гидразида N-морфолинилуксусной кислоты (1) растворили при нагревании 50 °С в 10 мл изопропилового спирта. К горячему раствору при перемешивании прикапывали 1,2 г (0,012 моль) ацетилацетона. Смесь перемешивали в течение 20 часов при температуре 70–80 °С с обратным холодильником. Завершение реакции контролировали по ТСХ. Раствор охладили, выпавший мелкокристаллический осадок отфильтровали и перекристаллизовали из петролейного эфира. Получили 1,43 г (64 %) белого порошкообразного вещества с т. пл. 85–87 °С. Продукт во всех органических растворителях в холодном виде растворяется.

**3-метил-1-(2-морфолиноацетил)-1H-пиразол-5-(4H)-он (4).** 1,59 г (0,01 моль) гидразида N-морфолинилуксусной кислоты (1) растворили при нагревании 50 °С в 10 мл изопропилового спирта. К горячему раствору при перемешивании прикапывали 1,43 г (0,011 моль) этилового эфира ацетуксусной кислоты. Смесь перемешивали при температуре 70–80 °С около 10 часов с обратным холодильником, до отсутствия по ТСХ исходных реагентов. Раствор упаривали под вакуумом, маслообразный остаток растирали бензолом до получения порошкообразного вещества белого цвета. После перекристаллизации из бензола удается получить продукт с т. пл. 157–160 °С. Выход продукта (4) составляет 1,49 г (60 %).

#### Экспериментальная биологическая часть

**Цитотоксичность** оценивали в тесте выживаемости личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach). Эксперименты проводились на личинках 2-дневного возраста в условиях культивирования *in vitro*. Личинки выращены погружением яиц морских рачков *Artemia salina* (Leach) в искусственную морскую воду. Инкубировали 48 ч при температуре 37 °С. Навеску исследуемого образца растворили в 2 мл метанола, затем из этого раствора брали по 500 мкл (3 параллели), 50 мкл (3 параллели), 5 мкл (3 параллели). После испарения метанола в каждый флакон добавили по 5 мл искусственной морской воды. Таким образом, если начальная масса навески составляла 2 мг, то конечные концентрации образца составили 100 мкг/мл, 10 мкг/мл и 1 мкг/мл, соответственно, каждой концентрации в 3-х повторениях. В каждый опыт с образцом с помощью пастеровской пипетки сажали по 10 личинок морских рачков *Artemia salina* 2-дневного возраста. После этого все флаконы оставляли при комнатной температуре на свету на 24 часа. По истечении 24-х часов пересчитывали выжившие и погибшие личинки. Затем, с образованием полученных данных по верхнему и нижнему токсическому лимиту, рассчитывали половинную токсическую дозу образца.

**Фагоцитозстимулирующая активность**

Препарат сравнения «Иммунорм» (сок эхинацеи пурпурной в спирте, «Мериде», Германия), который тестировался в разведении 0,9 %-ным раствором натрия хлорида в конечной концентрации 8 %.

Забор крови производился у здорового донора натошак из локтевой вены в гепаринизированные пробирки. В качестве объекта фагоцитоза использовали суточную культуру *Staphylococcus aureus* (штамм 209). При микроскопировании (увеличение 15×90, масляная иммерсия) подсчитывали количество фагоцитирующих клеток (фагоцитарный индекс, ФИ) из 100 нейтрофилов (количественный показатель) и количество стафилококков, поглощенных одним нейтрофилом, — фагоцитарное число (ФЧ, качественный показатель фагоцитоза) после 1 часа исследования.

2 мг сухого образца с учетом его растворимости разводили в 0,2 мл 96 %-ного спирта до полного растворения и доводили до 2 мл 0,9 %-ным раствором натрия хлорида. Вещества тестировались в концентрации 1 мг/мл в трех параллельных определениях. Контролем служили мазки крови, инкубированной со средой разведения (96 %-ный спирт и физиологический раствор 1:9).

Статистическую обработку результатов проводили методами арифметической статистики с вычислением средней арифметической ( $M$ ) и ее стандартной ошибки ( $m$ ).

## References

- 1 Soldatenkov A.T., Kolyadina N.M., Shendrik I.V. Basics of organic chemistry of medicinal compounds. — M.: Khimiya, 2001. — 192 p.
- 2 Mashkovskiy M.D. Medicinal compounds. — 15th Ed. — Moscow: Novaya volna, 2007. — 1206 p.
- 3 Ivanskiy I.V. Chemistry of heterocyclic compounds. — Moscow: Vysshaya shkola, 1978. — 559 p.
- 4 Elderfield R. Heterocyclic compounds / Ed. by R.Elderfield. — Moscow: Izdatel'stvo inostrannoy literatury, 1961. — P. 88–89.
- 5 Rodionov V.M., Fedorova A.M. New data in the field of chemistry of pyrazolone derivatives // News of the Academy of sciences of the USSR. — 1952. — No. 4. — P. 1049–1052.
- 6 Galankin V.N., Yunushkhodzhaev E.H., Tokmakov A.M., Mamedov L.A. Way of determination of phagocytosis activity of polymorphonuclear leucocytes // Arch. Pathology. — 1987. — No. 6. — P. 77–79.

Ж.Б.Сатпаева, С.Д.Фазылов, А.Мадрейімов,  
Р.Е.Бәкірова, А.К.Тұрсынова, О.А.Нұркенов, З.Т.Шұлғау

**Морфоллиннің пиразолды туындыларының синтезі  
мен биологиялық белсенділігі**

Мақалада морфоллиннің пиразолды туындыларының синтездері жүргізіліп, фагоцитоздың дамуын жылдамдататын және цитотоксикалық белсенділіктер анықталды. Гидразид N-морфоллинилсірке қышқылының ацетилацетонмен және ацетосірке эфирімен әрекеттесуі нәтижесінде өздеріне тиісті пиразолды туындылары алынды. Синтезделген қосылыстардың құрылымы мен құрамы ИҚ-, ЯМР <sup>1</sup>H-спектроскопия сынды қазіргі заманғы физикалық-химиялық әдістер арқылы дәлелденді. Фагоцитоздың дамуын жылдамдататын және цитотоксикалық қасиеттерін анықтау мақсатында жүргізілген биоскрининг нәтижесінде N-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)амид N-морфоллинилсірке қышқылының қосылысы фагоцитоздың дамуын жылдамдататыны және цитотоксикалық белсенділіктерінің айырықша екендігін көрсетті.

Zh.B.Satpayeva, S.D.Fazylov, A.Madreimov,  
R.Ye.Bakirova, A.K.Tursynova, O.A.Nurkenov, Z.T.Shulgau

**Synthesis and biological activity of pyrazole derivatives of morpholine**

The article presents data on synthesis and investigation of a phagocytosis stimulating and cytotoxic activity of pyrazole derivatives of morpholine. Corresponding pyrazole derivatives were obtained by the interaction of N-hydrazide of morpholinylacetic acid with acetylacetone and acetoacetic ester under harsh conditions. Structures of the synthesized compounds were proved with the use of modern methods such as IR and NMR-spectroscopy. It is found that the compound N-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl) amide of N- morpholinylacetic acid has a phagocytosis stimulating activity and a pronounced cytotoxic activity against the larvae of marine crustacean *Artemia salina* (Leach) in accordance with the results of bioscreening on phagocytosis stimulating and cytotoxic properties.