

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 543.421: 547.854.4

©Коллектив авторов

ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ УРАЦИЛА

А.Р. Гимадиева^{1}, Ю.З. Хазимуллина², Е.А. Белая¹, Ю.С. Зимин³,
И.Б. Абдрахманов^{1,2}, А.Г. Мустафин^{1,3}*

¹Уфимский институт химии РАН,

450054, Уфа, проспект Октября, 71; тел.: +7(347)235-38-15; эл. почта: alf_gim@mail.ru

²Башкирский государственный аграрный университет, Уфа

³Башкирский государственный университет, Уфа

Изучена антиоксидантная активность 19 производных урацила. Показано, что тест с использованием радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ) может быть применён для экспресс-оценки антиоксидантной активности урацилов. Среди изученных соединений наибольшую активность показали производные урацила с протонодонорной группой в положении С-5 – свободной или алкилированной аминогруппой, а также гидроксильной: 5-аминоурацил (IC₅₀ 3 мкг/мл), 5-амино-6-метилурацил (IC₅₀ 5 мкг/мл), 5-гидрокси-6-метилурацил (IC₅₀ 15 мкг/мл), 5-гидрокси-1,3,6-триметилурацил (IC₅₀ 15 мкг/мл), 5-этиламино-6-метилурацил (IC₅₀ 20 мкг/мл), 5-метиламино-6-метилурацил (IC₅₀ 20 мкг/мл), 5-аллиламиноурацил (IC₅₀ 20 мкг/мл), 5-амино-1,3,6-триметилурацил (IC₅₀ 25 мкг/мл). Данные соединения оказались более активными, чем референтные ионол (IC₅₀ 30 мкг/мл) и α-нафтиламин (IC₅₀ 45 мкг/мл), но менее активны по сравнению с аскорбиновой кислотой (IC₅₀ 0,8 мкг/мл). Установлена корреляция между результатами ДФПГ-теста (IC₅₀) и константами взаимодействия производных урацила с пероксидными радикалами 1,4-диоксана (fk₇). Производные урацила с протонодонорной группой при С-5 проявили также высокую железовосстанавливающую активность, определённую методом FRAP.

Ключевые слова: производные урацила, антиоксидантная активность, 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил, железовосстанавливающая способность

DOI: 10.18097/PBMC20156106765

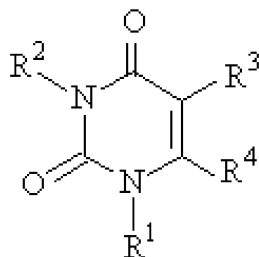
ВВЕДЕНИЕ

Активные формы кислорода инициируют процессы пероксидного окисления липидов (ПОЛ), приводят к повреждению биологических мембран, накоплению токсичных продуктов ПОЛ и снижают естественную антиоксидантную и иммунную защиту организма, что ведёт к развитию атеросклероза, иммунодефицитных состояний, токсических гепатитов и т.д. В связи с этим поиск новых эффективных антиоксидантов как природного, так и синтетического происхождения является актуальным. На наш взгляд, перспективными могут быть производные урацила, среди представителей которых обнаружены соединения с высокой антиоксидантной активностью [1].

В связи с этим синтез новых соединений пиримидиновой структуры и изучение их антиоксидантных свойств на биологических объектах имеет важное значение для медицины.

Поскольку испытания на лабораторных животных являются дорогостоящими, есть очевидная необходимость в других методах первичного скрининга синтезируемых соединений и выявления перспективных для последующих биологических исследований веществ. С целью поиска метода, подходящего для первичного скрининга антиоксидантной активности, нами была проанализирована литература [2] и выбрано несколько простых в аппаратном отношении способов: по ингибированию автоокисления адреналина [3], по ингибированию пероксида водорода, по восстановлению ионов железа (FRAP), по способности исследуемого соединения взаимодействовать со свободным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ) [4, 5] и др. Выбранные методы были апробированы на коммерчески доступных, а также синтезированных нами производных урацила (ПУ):

* - адресат для переписки



$R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H$ (**1**); $R^1 = R^2 = R^4 = H$, $R^3 = F$ (**2**); $R^1 = R^2 = R^3 = H$, $R^4 = Me$ (**3**); $R^1 = R^2 = R^4 = H$, $R^3 = Br$ (**4**); $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = I$, $R^4 = Me$ (**5**); $R^1 = R^2 = R^4 = Me$, $R^3 = Br$ (**6**); $R^1 = R^2 = R^4 = Me$, $R^3 = H$ (**7**); $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = NO_2$, $R^4 = Me$ (**8**); $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = -CH_2N$ (cyclohexyl), $R^4 = Me$ (**9**); $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = Br$, $R^4 = Me$ (**10**); $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = -N$ (cyclohexyl), $R^4 = Me$ (**11**); $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = NHMe$, $R^4 = Me$ (**12**); $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = NH_2$, $R^4 = Me$ (**13**); $R^1 = R^2 = R^4 = H$, $R^3 = NHAlI$ (**14**); $R^1 = R^2 = R^4 = Me$, $R^3 = NH_2$ (**15**); $R^1 = R^2 = R^4 = Me$, $R^3 = OH$ (**16**); $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = OH$, $R^4 = Me$ (**17**); $R^1 = R^2 = R^4 = H$, $R^3 = NH_2$ (**18**); $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = NHEt$, $R^4 = Me$ (**19**).

В качестве веществ сравнения были использованы аскорбиновая кислота (**20**), ионол (**21**) и α -нафтиламин (**22**). Установлено, что наиболее подходящим для экспресс-оценки антиоксидантной активности производных урацила оказался тест с использованием ДФПГ. К достоинствам этого метода относятся высокая воспроизводимость, простота, доступность оборудования, высокая селективность по отношению к антирадикальным антиоксидантам [6].

МЕТОДИКА

Регистрацию оптической плотности проводили в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм на фотозлектроколориметре КФК-2МП.

Ингибирование радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила

К 3 мл водного раствора производного урацила соответствующей концентрации (0,001-6,0 мг/мл) добавляли 1 мл 0,2 мМ раствора ДФПГ в этаноле. Полученные растворы тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. Оптическую плотность измеряли при 540 нм.

Антиоксидантную активность (АОА) исследуемых веществ вычисляли по формуле:

$$AOA = \left(1 - \frac{A_{\text{исслед.р.}}}{A_{\text{контр.р.}}} \right) \times 100,$$

где $A_{\text{исслед.р.}}$ – оптическая плотность раствора, содержащего ДФПГ и исследуемое соединение, $A_{\text{контр.р.}}$ – оптическая плотность раствора ДФПГ, не содержащего исследуемое соединение.

Восстановление ионов трёхвалентного железа (FRAP)

1 мл водного раствора производного урацила соответствующей концентрации (25-100 мкг/мл), 2,5 мл фосфатного буфера (0,2 М, pH 6,6) и 2,5 мл 1% раствора феррицианида калия [$K_3Fe(CN)_6$] инкубировали при 50°C в течение 20 мин. Далее к полученной смеси добавляли 2,5 мл 10% раствора

трихлоруксусной кислоты и центрифугировали 10 мин при 1000 g. К 2,5 мл верхнего слоя полученного раствора приливали 2,5 мл дистиллированной воды и 0,5 мл 0,1% раствора $FeCl_3$. Оптическую плотность измеряли при 700 нм.

В работе использовали 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ) фирмы “Sigma-Aldrich” (США), $K_3[Fe(CN)_6]$ “Витареактив” (Россия), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ “Купавнареактив” (Россия), $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ “Реактив” (Россия), трихлоруксусная кислота, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ “УфаХимПроект” (Россия), 6-метилурацил, урацил, 5-фторурацил “Фармакон” (Россия). Производные урацила **4-19**, содержащие не менее 98% основного вещества, синтезированы по методикам, описанным ранее [7-10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение АОА производных урацила ДФПГ-тестом

Антиоксидантную активность производных урацила **1-19**, аскорбиновой кислоты, ионола и α -нафтиламина определяли по способности исследуемого соединения взаимодействовать со свободным радикалом ДФПГ. АОА исследована в диапазоне концентраций 0,001-6,0 мг/мл.

На основании полученных данных нами был произведен расчёт концентрации антиоксиданта, вызывающего 50% ингибирование радикалов ДФПГ в реакционной среде (IC_{50}). Данные IC_{50} представлены на рисунке 1. Наименьшее значение данного параметра указывает на более высокую АОА.

Полученные результаты показывают, что АОА зависит от структуры пиримидинового основания. Наибольшую АОА показали производные урацила **12-19**, имеющие в положении С-5 протонодонорную группу – свободную или алкилированную аминогруппу, а также гидроксильный заместитель (рис. 1).

Представляется интересным сравнение полученных в настоящей работе результатов с данными исследований по ингибированию

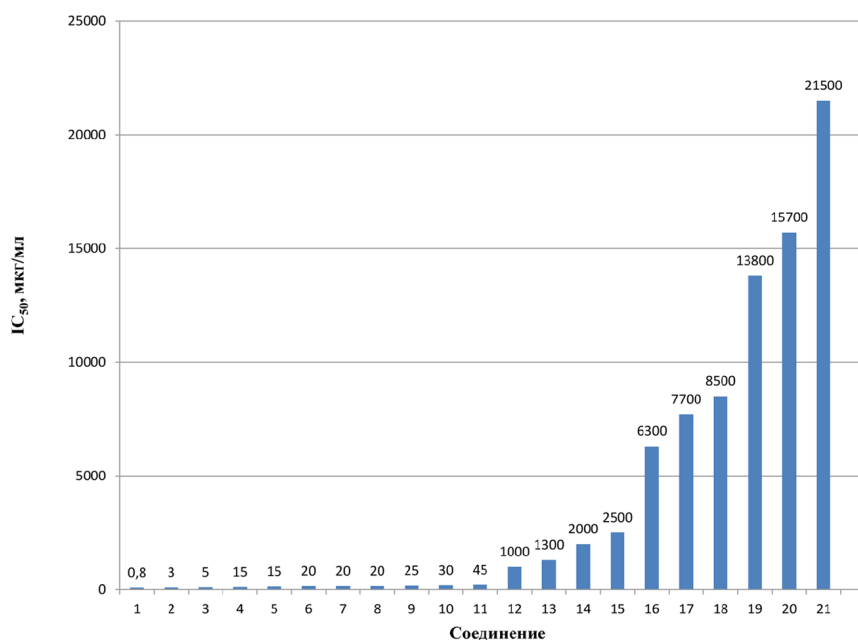


Рисунок 1. Значения IC₅₀ исследуемых соединений: 1) аскорбиновая кислота, 2) 5-аминоурацил, 3) 5-амино-6-метилурацил, 4) 5-гидрокси-6-метилурацил, 5) 5-гидрокси-1,3,6-триметилурацил, 6) 5-этиламино-6-метилурацил, 7) 5-метиламино-6-метилурацил, 8) 5-аллиламиноурацил, 9) 5-амино-1,3,6-триметилурацил, 10) ионол, 11) α-нафтиламин, 12) 5-нитро-6-метилурацил, 13) 5-бром-1,3,6-триметилурацил, 14) 5-йод-6-метилурацил, 15) 5-пиперидинил-6-метилурацил, 16) 5-бромурацил, 17) 5-морфолинометил-6-метилурацил, 18) 1,3,6-триметилурацил, 19) 5-фторурацил, 20) урацил, 21) 6-метилурацил.

окисления органических субстратов. В качестве примера в таблице 1 наши результаты сопоставлены со значениями k_7 , представляющими собой константы скорости реакции пероксидных радикалов 1,4-диоксана с производными урацила (f – стехиометрический коэффициент ингибирования). Из таблицы 1 следует, что разные по своей природе методы дают схожие результаты по изменению АОА производных урацила. Действительно, в ряду изученных урацилов наблюдается определённая симбатность в изменении АОА, установленной нами с помощью IC₅₀ (ДФПГ-теста) и другими авторами [7, 11, 12] с помощью k_7 . На основании данного факта можно утверждать, что ДФПГ-тест можно использовать для экспресс-оценки АОА производных урацила.

Определение восстанавливающей способности производных урацила методом FRAP

Антиоксиданты, природные и синтетические, большей частью являются и хорошими восстановителями [13]. Восстанавливающая способность соединения может служить важным признаком его потенциальной антиоксидантной активности.

FRAP тест позволяет оценить в условиях *in vitro* восстанавливающую активность исследуемых производных урацила по восстановлению ионов железа.

Результаты исследований приведены в таблице 2 и на рисунке 2.

Таблица 1. Антиоксидантная активность производных урацила, определённая разными методами.

| Соединение | IC ₅₀ , мкг/мл | k_7 (333 K), M ⁻¹ s ⁻¹ |
|--------------------------------|---------------------------|---|
| 6-Метилурацил | 21500 | $(4,4 \pm 0,6) \cdot 10^2$ [7] |
| 5-Морфолинометил-6-метилурацил | 7700 | $(2,5 \pm 0,2) \cdot 10^3$ [7] |
| 5-Пиперидино-6-метилурацил | 2500 | $(5,3 \pm 0,3) \cdot 10^3$ [7] |
| 5-Метиламино-6-метилурацил | 20 | $(3,8 \pm 0,4) \cdot 10^3$ [7] |
| 5-Этиламино-6-метилурацил | 20 | $(4,6 \pm 0,1) \cdot 10^3$ [7] |
| 5-Гидрокси-6-метилурацил | 15 | $(5,2 \pm 0,1) \cdot 10^4$ [7] |
| 5-Амино-1,3,6-триметилурацил | 15 | $(2,23 \pm 0,25) \cdot 10^5$ [11] $(7,8 \pm 2,6) \cdot 10^{5*}$ [12] |
| 5-Амино-6-метилурацил | 5 | $(1,44 \pm 0,14) \cdot 10^5$ [11] $(5,6 \pm 1,8) \cdot 10^{5*}$ [12] |
| 5-Аминоурацил | 3 | $(3,7 \pm 1,6) \cdot 10^{5*}$ [12] |

Примечание: * - приведены значения k_7 .

ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ УРАЦИЛА

Таблица 2. Определение восстанавливающей способности производных урацила методом FRAP.

| № п/п | Соединение | 25 мкг/мл | 50 мкг/мл | 75 мкг/мл | 100 мкг/мл |
|-------|---------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | | ΔA | ΔA | ΔA | ΔA |
| 1 | Урацил | 0,003 | 0,020 | 0,022 | 0,023 |
| 2 | 5-Фторурацил | 0,001 | 0,012 | 0,013 | 0,014 |
| 3 | 6-Метилурацил | 0,068 | 0,077 | 0,078 | 0,09 |
| 4 | 5-Бромурацил | 0,002 | 0,002 | 0,012 | 0,024 |
| 5 | 5-Йод-6-метилурацил | -0,004 | 0,004 | 0,030 | 0,038 |
| 6 | 5-Бром-1,3,6-триметилурацил | -0,003 | 0,003 | 0,014 | 0,022 |
| 7 | 1,3,6-Триметилурацил | 0,007 | 0,010 | 0,021 | 0,026 |
| 8 | 5-Нитро-6-метилурацил | 0,021 | 0,023 | 0,028 | 0,035 |
| 9 | 5-Морфолинометил-6-метилурацил | 0,029 | 0,033 | 0,040 | 0,043 |
| 10 | 5-Бром-6-метилурацил | 0,032 | 0,034 | 0,026 | 0,042 |
| 11 | 5-Пиперидинил-6-метилурацил | 0,174 | 0,269 | 0,334 | 0,409 |
| 12 | 5-Метиламино-6-метилурацил | 0,239 | 0,462 | 0,679 | 0,827 |
| 13 | 5-Амино-6-метилурацил | 0,282 | 0,48 | 0,671 | 0,828 |
| 14 | 5-Аллиламиноурацил | 0,288 | 0,585 | 0,79 | 0,912 |
| 15 | 5-Амино-1,3,6-триметилурацил | 0,332 | 0,598 | 0,857 | 0,908 |
| 16 | 5-Гидрокси-1,3,6-триметилурацил | 0,366 | 0,704 | 0,911 | 1,007 |
| 17 | 5-Гидрокси-6-метилурацил | 0,417 | 0,752 | 0,919 | 0,961 |
| 18 | 5-Аминоурацил | 0,53 | 0,886 | 0,953 | 1,02 |
| 19 | 5-Этиламино-6-метилурацил | 0,428 | 0,701 | 0,744 | 0,762 |
| 20 | Аскорбиновая кислота | 0,298 | 0,599 | 0,853 | 1,002 |
| 21 | Ионол | 0,356 | 0,766 | 0,736 | 0,629 |

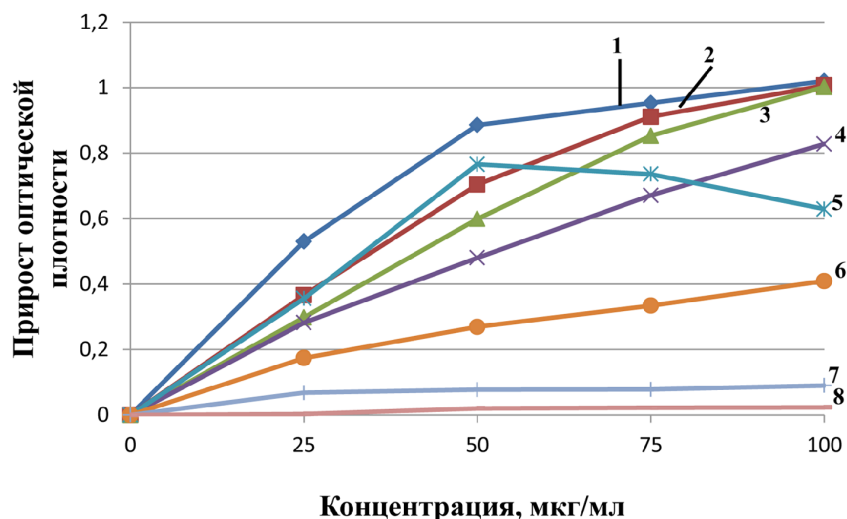


Рисунок 2. Восстанавливающая способность некоторых производных урацила: 1 - 5-аминоурацил, 2 - 5-гидрокси-6-метилурацил, 3 - аскорбиновая кислота, 4 - 5-амино-6-метилурацил, 5 - ионол, 6 - 5-пиперидинил-6-метилурацил, 7 - 6-метилурацил, 8 - урацил.

Полученные результаты показывают, что все исследованные соединения в той или иной степени способны восстанавливать ионы Fe^{3+} до Fe^{2+} . Производные урацила 1-10 обладают очень слабой восстанавливающей активностью. Как и в случае

восстановления радикала ДФПГ наибольшей активностью в методе FRAP обладают урацилы, содержащие в положении С-5 гидроксильную или амино-группы. С увеличением концентрации восстанавливающая активность увеличивается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, тест с использованием свободных радикалов 2,2-дифенил-1-пигрилгидразила позволяет проводить экспресс-оценку антиоксидантной активности производных урацила.

Работа выполнена при поддержке проекта №4.299.2014/К, исполненного в рамках проектной части государственного задания Министерства образования и науки РФ в сфере научной деятельности и гранта РФФИ (проект 14-03-97026 ф_поволжье_а).

ЛИТЕРАТУРА

- Гимадиева А.Р., Чернышенко Ю.Н., Абдрахманов И.Б., Мустафин А.Г. (2013) Синтез, модификации и биологическая активность урацилов, Уфа: Гилем, 176 с.
- Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. (2004) Химия растительного сырья, №3, 63-75
- Сирота Т.В. (2000) Патент №2144674 РФ. 20.01.2000, Бюлл. изобретений.
- Gülçin I. (2006) Life Sciences, **78**, 803-811.
- Gülçin I., Huyut Z., Elmastaş M., Aboul-Enein H. (2010) Arabian J. Chem., **3**, 43-53.
- Волков В.А., Дорофеева Н.А., Пахомов П.М. (2009) Хим.-фарм. журнал, **43**(6), 27-31.
- Якупова Л.Р., Иванова А.В., Сафиуллин Р.Л., Гимадиева А.Р., Чернышенко Ю.Н., Мустафин А.Г., Абдрахманов И.Б. (2010) Известия Академии наук. Серия химическая, №3, 507-511.
- Кривоногов В.П., Толстиков Г.А., Муринов Ю.И., Куковинец А.Г., Шакирова А.М., Сорокина Г.А., Селезнев Л.Г., Витвицкая А.С., Брилль А.С., Казаков В.П., Караваев А.Д., Зарудий Ф.С., Лазарева Д.Н., Комиссаров В.Д., Ахунов И.Р. (1993) Патент №2000298 РФ, Бюлл. изобретений, 33-36, 11.06.1993.
- Фаттахов А.Х., Лобов А.Н., Гимадиева А.Р., Мустафин А.Г., Абдрахманов И.Б. (2012) Вестн. Башкирского университета, **17**(4), 1710-1714.
- Чернышенко Ю.Н., Мустафин А.Г., Гимадиева А.Р., Абдрахманов И.Б., Герчиков А.Я., Сафарова И.В. (2010) Хим.-фарм. журнал, **44**(3), 14-16.
- Фаттахов А.Х. (2011) Синтез и исследование таутомерных и кислотно-основных превращений биологически активных C(5)-, N(1)-, N(3)-замещенных производных урацила. Автореф. дисс. канд. хим. наук, Уфа.
- Сахаутдинова Р.А. (2014) 5-Амино-6-метилурацил и его производные как ингибиторы радикально-цепного окисления 1,4-диоксана. Автореф. дисс. канд. хим. наук, Уфа.
- Тирзитис Д., Тирзитис Г., Антипова Д. (1999) Химия гетероциклических соединений, №5, 661-663.

Поступила: 22. 06. 2015.

EXPRESS EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF URACIL DERIVATIVES

A.R. Gimadieva¹, Yu.Z. Khazimullina², E.A. Belaya¹, Yu.S. Zimin³, I.B. Abdrakhmanov^{1,2}, A.G. Mustafin^{1,3}

¹Ufa Institute of Chemistry of the Russian Academy of Sciences,
71 Oktyabrya av., Ufa, 450054 Russia; tel.; +7(347)235-38-15; e-mail: alf_gim@mail.ru

²Bashkir State Agrarian University, Ufa, Russia

³Bashkir State University, Ufa, Russia

Using photometric methods the antioxidant activity of 19 uracil derivatives has been analyzed. The test using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals can be applied for the rapid assessment of antioxidant activity of uracils. Among uracil derivatives studied the compounds possessing a proton-donor group in C-5 position – free or alkylated amino group, as well as hydroxyl group were the most active: 5-aminouracil (IC₅₀ 3 µg/ml), 5-amino-6-methyluracil (IC₅₀ of 5 µg/ml), 5-hydroxy-6-methyluracil (IC₅₀ of 15 µg/ml), 5-hydroxy-1,3,6-trimethyluracil (IC₅₀ of 15 µg/ml), 5-ethylamino-6-methyluracil (IC₅₀ of 20 µg/ml), 5-methylamino-6-methyluracil (IC₅₀ of 20 µg/ml), 5-allylaminouracil (IC₅₀ of 20 µg/ml), 5-amino-1,3,6-trimethyluracil (IC₅₀ of 25 µg/ml). These uracil derivatives were more active than the reference compounds ionol (IC₅₀ of 30 µg/ml) and α-naphthylamine (IC₅₀ of 45 µg/ml), but less active than ascorbic acid (IC₅₀ 0.8 µg/ml). There was a correlation between the results of DPPH test (IC₅₀) and coupling constants of uracil derivatives with peroxide radicals of 1,4-dioxane (fk₇). Uracil with proton-donor group at C-5 also showed high ferrum-reducing activity as determined by FRAP.

Key words: uracil derivatives, antioxidant activity, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, ferrumrestoring capacity