

Zakład Farmakologii, Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Zdzisław Kleinrok
Samodzielny Zakład Chemii, Wyższa Szkoła Pedagogiczna w Krakowie
Kierownik: dr n. przyr. Maria Jolanta Korohoda

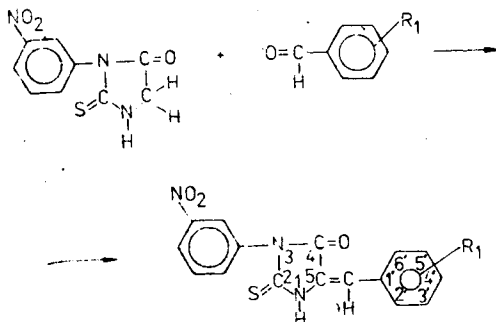
Zdzisław KLEINROK, Maria KOZICKA,
Kazimiera TOBIASZ-OTRĘBSKA, Wiesław SERMAK

**Własności farmakologiczne nowych 5-benzylidenowych
pochodnych 3-m-nitrofenylo-2-tiohydantoiny**

Фармакологические свойства новых 5-бензилиденовых дериватов
3-м-нитрофенил-2-тиогидантоина

Pharmacological Properties of New 5-benzylidene Derivatives
of 3-m-nitrophenyl-2-thiohydantoin

Pochodne 3-arylo-5-benzylidenowe 2-tiohydantoiny wywierają u zwierząt doświadczalnych działanie przeciwdrgawkowe i hipoglikemiczne (1, 3, 7, 9, 12). W świetle tego wydało się interesujące zbadanie, czy takimi właściwościami obdarzone są również i inne 5-benzylidenowe pochodne 2-tiohydantoiny, tj. pochodne 3-nitrofenylo-2-tiohydantoiny. Zagadnienie to wydaje się interesujące również i z tego względu, że w grupie tej znaleziono wiele związków odznaczających się wyraźnym działaniem biologicznym. Syntezę tych związków przeprowadzono przez kondensację z aldehydami aromatycznymi według następującego schematu:



CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

3-m-nitrofenylo-2-tiohydantoina została otrzymana w sposób ogólnie stosowany w preparatyce 2-tiohydantoin (9, 11):

Równoważne ilości m-nitrofenyloizotiocyanianu, glicyny i wodorotlenku potasu w 95% etanolu ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w czasie 1,5 godz. Otrzymany roztwór odparowano na łaźni wodnej do sucha i po rozpuszczeniu w wodzie zakwaszonej stężonym kwasem solnym. Surowy produkt był oczyszczany przez krystalizację z 95% etanolu. Wydajność 80,5%, żółte igły o temp. topn. 256—257°C.

OGÓLNA METODA OTRZYMYWANIA ZWIĄZKÓW 1—14

0,05 mola m-nitrofenylo-2-tiohydantoiny i 0,05 mola odpowiedniego aldehydu rozpuszczono w 200 cm³ lodowatego kwasu octowego z dodatkiem 15 g bezwodnego octanu sodu i 5 cm³ bezwodnika octowego. Mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 3 godz. Następnie całość wylewano do 500 cm³ zimnej wody i odsączano. Otrzymywane pochodne były krystalizowane z roztworów wodnych kwasu octowego i suszone w 100°C.

Wszystkie związki są bardzo łatwo rozpuszczalne w acetonie, pirydynie i stężonym kwasie siarkowym, nieco trudniej rozpuszczalne w chloroformie, kwasie octowym i alkoholach oraz nierozpuszczalne w eterze, wodzie i stężonym kwasie solnym. Otrzymane związki i ich dane fizykochemiczne są zestawione w tab. 1.

SPEKTROSKOPIA IR

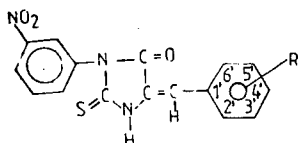
Widma w podczerwieni nowych pochodnych 2-tiohydantoiny wykonano w zawiesinach nujolowych na aparacie Zeiss 10 IR w zakresie 4000—400 cm⁻¹.

W zakresie widma 3400—3200 cm⁻¹ występuje szerokie i intensywne pasmo absorpcji związanej z drganiami walencyjnymi grupy N—H pierścienia tiohydantoinowego. Analiza kształtu i położenia tego pasma pozwala domyślać się, że możliwe jest istnienie międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Rozmycie pasma N—H zależy prawdopodobnie od rodzaju i położenia podstawników w układzie benzyldenowym. Zwiększa się ono znacznie, gdy podstawnik znajduje się w położeniu meta-, a dla podstawników w położeniu orto- położenie pasma N—H jest często słabo widoczne.

W obszarze 1700—1600 cm⁻¹ zlokalizowane są dwa pasma drgań absorpcyjnych. Pierwsze z nich, o większej intensywności, leżące w zakresie 1780—1740 cm⁻¹, jest związane z występowaniem grupy karbony-

Tab. 1. Budowa chemiczna i wyniki badań analitycznych nowo zsyntetyzowanych pochodnych 3-m-nitrofenylo-5-benzylideno-2-tiohydantoiny

Chemical structure and analytical results of new synthesized derivatives of 3-m-nitrophenyl-5-benzylidene-2-thiohydantoin



Nr związku chemicznego	R	Temp. tpp. /°C/	Wydajność %/	A n a l i z a						Położenie pasm absorpcji w IR /cm ⁻¹ /	
				Obliczone %			Otrzymano %			C=O	C=C
				C	H	N	C	H	N		
1	4'-Cl	251-2	83,4	53,41	2,80	11,67	53,35	2,79	11,62	1740	1645
2	3'-Cl	227-8	61,8	53,41	2,80	11,67	53,28	2,69	11,60	1745	1640
3	2'-Cl	219-20	56,8	53,41	2,80	11,67	53,29	2,72	11,58	1745	1650
4	4'-CH ₃	279-80	76,5	60,16	3,86	12,38	60,12	3,85	12,32	1750	1655
5	3'-CH ₃	217-8	73,4	60,16	3,86	12,38	60,09	3,73	12,29	1780	1680
6	2'-CH ₃	215-6	66,3	60,16	3,86	12,38	60,06	3,82	12,33	1760	1670
7	4'-CH ₃ O	275-6	84,0	57,48	3,69	11,82	57,41	3,58	11,76	1750	1655
8	3'-CH ₃ O	246-7	76,3	57,48	3,69	11,82	57,14	3,58	11,56	1750	1660
9	2'-CH ₃ O	238-9	53,8	57,48	3,69	11,82	57,40	3,67	11,71	1760	1660
10	4'-NO ₂	260-1	90,5	51,90	2,70	15,13	51,69	2,69	15,17	1755	1670
11	3'-NO ₂	248-9	78,9	51,90	2,70	15,13	51,59	2,71	15,13	1760	1660
12	2'-NO ₂	247-8	46,6	51,90	2,70	15,13	51,89	2,68	15,13	1770	1680
13	4'-Br	262-3	75,8	47,55	2,47	10,39	47,48	2,50	10,32	1750	1660
14	2'-Br	236-7	68,7	47,55	2,47	10,39	47,51	2,46	10,30	1760	1670
15*	---	256-7	80,5	45,57	2,95	17,71	45,25	2,96	17,75	1780	--

* 3-m-nitrofenylo-2-tiohydantoina.

* 3-m-nitrophenyl-2-thiohydantoin.

lowej w cząsteczce, a drugie pasmo, o średnim natężeniu, określono jako absorpcję podwójnego wiązania $\text{C}=\text{C}$ (1680—1640 cm^{-1}) — tab. 1.

Położenie pasma absorpcji $\text{C}=\text{S}$ jest trudne do ustalenia. Przyczynia się do tego jego sprzężenie z drganiami obu sąsiednich atomów azotu. Dane z piśmiennictwa (5, 8) sugerują położenie tego pasma w obrębie 1425—1400 cm^{-1} i przy ok. 1200 cm^{-1} albo jako absorpcję mieszaną, występującą w zakresie 1570—1395 cm^{-1} lub 1420—1260 cm^{-1} — I i II pasmo tioureidowe (8). W widmach badanych związków nie stwierdzono drgań, które można by uznać jako czyste drgania walencyjne grupy $\text{C}=\text{S}$. Występują natomiast wyraźne pasma absorpcyjne w obrębie 1560—1530 cm^{-1} oraz 1265 cm^{-1} , które, zgodnie z powyższym, uznano jako drgania I i II pasma tioureidowego.

Z innych charakterystycznych pasm absorpcji należy wymienić drgania w zakresie $1600\text{--}1590\text{ cm}^{-1}$ oraz ok. 1500 cm^{-1} , związane z obecnością pierścieni fenylowych w cząsteczce. W obrębie $1360\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$ znaleziono pasmo symetrycznych drgań grupy NO_2 w pierścieniu fenylowym.

SPEKTROSKOPIA PMR

Widma protonowego rezonansu jądrowego (PMR) wykonane zostały w pracowni specjalistycznej Instytutu Chemii i Technologii Organicznej Politechniki Krakowskiej przy pomocy aparatu Tesla BS 487 C (80 MHz). Jako rozpuszczalnik stosowano DMSO-d_6 o zawartości wody poniżej 4 ppm oraz TMS jako wzorzec wewnętrzny. Pomiary wykonywano w temperaturze pokojowej (23°C).

Badane widma sporządzono dla wybranych benzylidenowych pochodnych 2-tiohydantoiny i porównawczo dla macierzystej 3-m-nitrofenylo-2-tiohydantoiny (tab. 2). Potwierdziły one budowę strukturalną badanych związków.

Reakcja kondensacji, zachodząca przy atomie węgla C-5 pierścienia hydantoinowego, prowadzi do odszczepienia wodorów z grupy metylenowej, i utworzenia podwójnego wiązania. Konsekwencją tego jest zanik sygnału protonów metylenowych i pojawienie się nowego pasma rezonansowego grupy metinowej, związanej z wprowadzonym do cząsteczki ugrupowaniem benzylidynowym.

Ta zmiana w budowie wywiera także wpływ na zachowanie blisko położonego protonu związanego z atomem azotu N-1 poprzez zmniejszenie jego ekranowania i przesunięcie absorpcji do niższego pola, natomiast nie powoduje większych zmian w przesunięciach chemicznych pozostałych protonów cząsteczki (4). Przesunięcia chemiczne protonów i rodzaje sygnałów zestawiono w tab. 2.

Tab. 2. Widma PMR 3-m-nitrofenylo-2-tiohydantoiny i jej 5-podstawionych pochodnych

Spectra NMR of 3-m-nitrophenyl-2-thiohydantoin and its 5-substituted derivatives

Nr związku chemicznego	Przesunięcia chemiczne /ppm/			
	CH_2	$=\text{CH}-$	NH	pierścień aromatyczny
10	---	6,80 s	12,98 s	8,42-8,22 m; 8,10-7,33 m
11	---	6,86 s	12,98 s	8,54-8,14 m; 8,01-7,62 m
12	---	6,98 s	12,85 s	8,43-8,14 m; 8,02-7,55 m
15	4,30 s	---	10,54 s	8,38-8,18 d; 7,90-7,76 t

Oznaczenia (Explanation): s — singlet, d — dublet, t — tryplet, m — multiplet.

BADANIA FARMAKOLOGICZNE

Badania przeprowadzono na myszach Albino Swiss, obojga płci (17—28 g), i szczurach Wistar, samcach (160—240 g). Fenytoinę (Warszawskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”) stosowano dootrzewnowo w postaci zawiesiny w 3% wodnym roztworze Tweenu 80. Diabetol (Tolbutamide, Starogardzkie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”), glukozę (Lubelskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”) oraz pentetrazol (Cardiazolum, „Farmapol” Poznań) stosowano jako wodne roztwory podskórnie. Natomiast badane związki stosowano w postaci zawiesiny w 3% wodnym roztworze Tweenu 80 w stałej objętości 0,1 ml na 10 g masy ciała u myszy lub 0,5 ml na 100 g masy ciała u szczurów. Zwierzęta grup kontrolnych otrzymywały iniekcje takich samych objętości rozpuszczalnika. Przeprowadzono następujące badania:

1. Oznaczanie ostrej toksyczności

Toksyczność ostrą, jako LD_{50} , oznaczano u myszy zgodnie z metodą Litchfielda i Wilcoxa (6). Zwierzęta podzielone na grupy, liczące 10—15 myszy, otrzymywały dootrzewnowo iniekcje różnych dawek badanych związków i obserwowano je przez 3 godz. po iniekcji, a po 24 godz. rejestrowano liczbę zwierząt padłych. W przypadku, gdy dawka 3,0 g/kg okazała się nietoksyczna, przyjmowano ją jako LD_{min} .

2. Działanie przeciwdrgawkowe

Własności przeciwdrgawkowe oceniano u myszy w teście maksymalnych drgawek elektrycznych (MES) według metody Swinyarda i wsp. (10). Drgawki wywoływano przez użycie elektrod rogówkowych, prądu zmiennego o częstotliwości 60 Hz, natężenia 50 mA i czasu trwania bodźca 0,2 sek. Siłę działania przeciwdrgawkowego określano przez liczbę myszy ochronionych przed drgawkami tonicznymi. Badane związki stosowano 1 godz. przed MES, w dawkach odpowiadających 0,4 LD_{50} lub LD_{min} . W teście drgawek chemicznych wywoływanych pentetrazolem (120 mg/kg) badane związki podawano 0,5 godz. wcześniej, a zwierzęta obserwowano przez 0,5 godz. po zastosowaniu pentetrazolu. Badane związki stosowano w dawkach odpowiadających 0,4; 0,2; 0,1 i 0,05 LD_{50} lub LD_{min} . Poszczególne grupy doświadczały 8—10 myszy.

3. Działanie hipoglikemiczne

Badania przeprowadzono na szczurach otrzymujących glukozę w dawce 8 g/kg. W 30 min. po podaniu glukozy stosowano Diabetol oraz badane związki w dawkach stanowiących 0,4 LD₅₀ lub LD_{min.} Poziom glukozy we krwi oznaczano metodą Hyvarinena i Nikkiła (2) przed oraz 1 i 2 godz. po zastosowaniu badanych związków. Porównywano wzrost poziomu glukozy w odniesieniu do poziomu przed zastosowaniem badanych związków. Poszczególne grupy doświadczalne liczyły po 3 szczury.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wszystkie badane pochodne, z wyjątkiem związku oznaczonego nr 11 (LD₅₀ — 270 mg/kg), odznaczają się bardzo małą toksycznością, a ich LD_{min.} jest większe od 3 g/kg. Nie wywierają one działania ochronnego, zarówno w teście drgawek elektrycznych, jak i kardiazolowych, z wyjątkiem związków nr 11 i 12, a zwłaszcza związku nr 2, które odznaczają się słabym działaniem przeciwdrgawkowym w teście drgawek pentetrazolowych. Również słabe działanie hipoglikemiczne w porównaniu z Diabetolem charakteryzuje badane związki. Jedynie związki nr 1, 2 i 3 wywierają słabe działanie hipoglikemiczne. Pozostałe związki albo są nieaktywne w tym zakresie działania, albo też wywierają działanie hiperglikemiczne (związki nr 9 i 11 oraz w mniejszym stopniu nr 4, 10 i 12).

Z przeprowadzonych badań nie można wysnuć żadnych hipotez na temat zależności budowy chemicznej od działania. Wszystkie badane związki odznaczają się znikomą toksycznością, czemu towarzyszy słaba aktywność farmakologiczna. Aktywność ta nie dorównuje aktywności stosowanych porównawczo leków przeciwdrgawkowych i hipoglikemicznych. Jednak uzyskane wyniki, zestawione w tab. 3, mogą posiadać istotne znaczenie przy planowaniu dalszych syntez, gdyż, jak już zaznaczono na wstępie, z tej grupy związków chemicznych wywodzi się wiele związków posiadających bardzo wyraźne działanie, które stosowano już w próbach klinicznych.

Tab. 3. Wpływ pochodnych 3-m-nitrofenylo-5-benzylideno-2-tiohydantoiny na poziom glukozy we krwi szczurów
 The influence of derivatives of 3-m-nitrophenyl-5-benzylidene-2-thiohydantoin on level of glucose in the blood of rats

Nr związku chemicznego	R	Poziom glukozy /mg %/ we krwi po podaniu glukozy w czasie /min./		Wzrost poziomu glukozy w stosunku do poziomu wyjściowego /%/ $\bar{x} \pm \text{SEM} = 81,7 \pm 3,5/$	
		90	150	90	150
	Kontrola	151,4	174,0	85,3	113,0
1	4' - Cl	151,7	121,4	85,7	48,6
2	3' - Cl	130,6	132,2	60,0	61,8
3	2' - Cl	138,0	196,9	59,0	111,0
4	4' - CH ₃	178,8	275,9	118,8	237,7
5	3' - CH ₃	164,9	176,7	101,8	116,3
7	4' - CH ₃ O	172,7	190,1	111,4	132,7
8	3' - CH ₃ O	176,6	177,0	116,1	116,6
9	2' - CH ₃ O	261,6	221,5	220,1	171,4
10	4' - NO ₂	228,5	213,7	180,0	161,2
11	3' - NO ₂	211,4	270,5	148,8	231,1
12	2' - NO ₂	237,8	205,7	191,1	144,9
13	4' - Br	196,1	183,7	140,0	124,1
14	2' - Br	195,7	183,6	139,5	114,7
15*	--	224,0	230,8	174,2	182,5
	Diabetol 10 mg/kg	104,4	130,8	27,8	62,1
	Diabetol 100 mg/kg	67,1	69,1	-17,1	-14,5

PIŚMIENNICTWO

1. Casagrande C. i wsp.: Synthesis and Antiarrhythmic Activity of 5,5-disubstituted 3-aminoalkylhydantoin and Some Heterocyclic and Noncyclic Analogs. *Il Farmaco Ed. Sci.* **24**, 757, 1974.
2. Hyvarinen A., Nikkil E. A.: Specific Determination of Blood Glucose with o-toluidine. *Clin. Chim. Acta* **7**, 140, 1962.
3. Korohoda M. J. i wsp.: Synthesis of 3-aryl-2-thiohydantoin and 3-aryl-hydantoin-5-Acetic Acids and Screening of Some of Their Pharmacological Properties. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **28**, 423, 1976.
4. Korohoda M. J.: Application of Proton Magnetic Resonance (NMR) for Identification of Hydantoin, 2-thiohydantoin, and 2-selenohydantoin. *Chem. Anal.* **28**, 157, 1983.
5. Kozicyna L. A., Kupletska N. B.: Metody spektroskopowe wyznaczania struktury związków organicznych. PWN, Warszawa 1974.

6. Litchfield J. T., Wilcoxon F.: A Simplified Method of Evaluating Dose-effect Experiments. *J. Pharm. Exp. Ther.* **96**, 99, 1949.
7. Musiał L. i wsp.: Poszukiwania nowych związków przeciwdrgawkowych wśród 3-arylo-5-benzylidenowych i 3-arylonaftolowych pochodnych 2-tiohydantoiny. *Acta Polon. Pharm.* **33**, 183, 1976.
8. Rao C. R.: *Chemical Application of IR Spectroscopy*. Academic Press, N.Y.—London 1963.
9. Sermak W. i wsp.: Researches for New Anticonvulsant Drugs among 5-benzylidene Derivatives of 3-p-methoxyphenyl- and 3-p-ethoxyphenyl-2-thiohydantoin. *Acta Pharm. Jugoslav.* **26**, 301, 1976.
10. Swinyard E. A., Brown W. C., Goodman L. S.: Comparative Assays of Antiepileptic Drugs in Mice and Rats. *J. Pharm. Exp. Ther.* **106**, 319, 1959.
11. Tobiasz-Otrębska K. i wsp.: New Anticonvulsive Drugs, 3-o-nitro-5-benzylidene Derivatives of 2-tiohydantoin. *Acta Pharm. Jugoslav.* **26**, 61, 1976.
12. Zubenko V. G., Kolodii E. N. (Med. Inst. Lvov.): Synthesis of Azolidine Derivatives with Possible Hypoglycemic Activity. *Farmatsevt. Zh. (Kiev)* **21**, 6, 1966.

Otrzymano 15 I 1985.

РЕЗЮМЕ

Проведено синтез 14 новых 5-бензилиденовых дериватов 3-м-нитрофенил-2-тиогидантоина и исследовано их противосудорожные и гипогликемические свойства. Химическая структура этих соединений была подтверждена элементарным, а также IR и NMR спектральными анализами. Фармакологические исследования проведены на мышях и крысах показали, что все исследованные соединения обладают малой токсичностью и слабыми гипогликемическими и противосудорожными свойствами в коразоловых и электрических судорогах.

SUMMARY

New 5-benzylidene derivatives of 3-m-nitrophenyl-2-thiohydantoin (14) were obtained and preliminary tested for anticonvulsant and hypoglycemic activity. Their chemical structure was confirmed by elemental analyses, IR and NMR spectra. The pharmacological investigations performed in mice and rats show that they possess low toxicity and anticonvulsant activity in PTZ and MES tests as well as low hypoglycemic properties. Results and conclusions are discussed.