

TỔNG HỢP VÀ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME α -GLUCOSIDASE CỦA DẪN XUẤT DICLOROPHENYLINDOL-2-ON

Đến tòa soạn 14-09-2022

**Đặng Thái Hoàng¹, Nguyễn Văn Giang¹, Nguyễn Hữu Nhất Huy², Nguyễn Văn An²,
Nguyễn Thu Huyền², Phạm Hải Long³, Nguyễn Thị Sơn³, Đỗ Huy Hoàng^{*3}**

1. Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, Phan Chu Trinh, Hoàn Kiếm, Hà Nội

2. THPT Nguyễn Gia Thiều, Long Biên, Gia Lâm, Hà Nội

3. Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội,
19 Lê Thánh Tông, Phan Chu Trinh, Hoàn Kiếm, Hà Nội

Email: dohuyhoang@hus.edu.vn

SUMMARY

SYNTHESIS AND α -GLUCOSIDASE INHIBITION OF DICLOROPHENYLINDOL-2-ONE DERIVATIVES

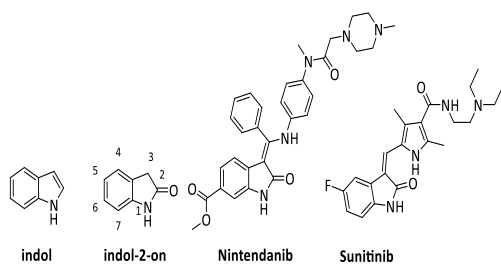
Oxindole (indol-2-one) is a crucial scaffold in medicinal chemistry for very common commercial drugs. In our work, two oxindole derivatives have been synthesized, and confirmed by ¹H & ¹³C-NMR, IR and MS data. Compound 2 and 3 showed potent inhibitory activity against α -glucosidase with IC₅₀ values of 57.5 and 348.7 μ M, respectively. Molecular docking has been studied for the binding interactions of these compounds with the active sites of the enzyme. Moreover, parameters drug-likeness and ADME properties were calculated.

Keywords: oxindole, indol-2-one, α -glucosidase inhibitor, molecular docking

1. TỔNG QUAN

Những năm gần đây, indol-2-on luôn là mối quan tâm lớn của các nhà khoa học trong lĩnh vực nghiên cứu và phát triển thuốc mới. Không chỉ là mô-típ quen thuộc trong rất nhiều các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính sinh học, các dẫn xuất indol-2-on còn được chú ý tổng hợp bằng khá nhiều phương pháp đa dạng khác nhau. Dẫn xuất indol-2-on thể hiện ưu thế hơn các dẫn xuất khác trong việc dẫn xuất hóa nhóm chức ở các vị trí 3, 4, 5 [5] và từ đó tạo thành rất nhiều các hợp chất mới có các hoạt tính sinh học đa dạng như kháng ung thư [10], kháng khuẩn [15], kháng lao [6], tiểu đường [9]. Một trong những biệt dược có dược dụng cao được thương mại hóa năm 2020, nintendanib, tại thị trường Mỹ được sử dụng

trong điều trị các bệnh phổi như ung thư phổi vô căn (IPF) hay ung thư ác tính. Hiệu quả của loại thuốc này dựa trên sự ức chế enzyme angiokinase and hạn chế sự tăng trưởng của các khối u. Bên cạnh đó, một cấu trúc thuốc khác cũng có nhóm indol-2-on, sunitinib được sử dụng như là chất ức chế enzyme tyrosine kinase trong điều trị các khối u mô đường tiêu hóa hay u biểu mô tế bào thận từ những năm 2006, do Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Hòa Kỳ cấp phép. Ngoài ra, các cấu trúc thuốc với tên gọi: ziprasidone, ropinirole, semaxanib, adibendan, indolidan đều đã được lưu hành trên thị trường với cấu trúc của nhóm indol-2-on [7].



Hình 1. Cấu trúc của indol và các dẫn chất

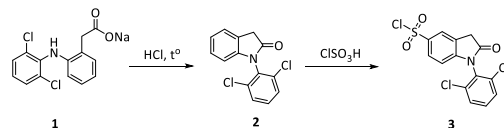
Dựa trên các nghiên cứu đa dạng về các dẫn xuất khác nhau của indol và indol-2-on ở các vị trí khác nhau, các mối liên hệ tương quan giữ vị trí của các nhóm thế và đặc trưng tương tác sinh học của chúng cũng đã được đề xuất. Vị trí C5 của indol-2-on xuất hiện các nhóm thế như halogen, este, amid cho kết quả đánh giá hoạt tính tốt hơn [8]. Sayed cùng các cộng sự đã chứng minh việc xuất hiện nhóm thế halogen, brom ở C5 tăng cường hoạt tính kháng khuẩn và tiếp đó làm ức chế sự tạo thành biofilm, qua đó làm mất khả năng gây bệnh của vi khuẩn [12]. Cùng với đó, nhóm sulfonyl ức chế enzym MurD mạnh hơn nhóm carbonyl và cho thấy tiềm năng trong kháng khuẩn [3]. Nhóm sulfonyl còn là nhóm chức quan trọng trong tác dụng kháng virus [4]. Vì vậy, với ý tưởng thiết kế phương pháp tổng hợp dẫn xuất oxindole **2** chỉ cần một giai đoạn đi từ nguyên liệu thông dụng, rẻ tiền và cho hiệu suất cao [13]. Với gợi ý nhóm thế ở C5 và nhóm sulfonyl, nhằm tổng hợp ra các hợp chất mới có hoạt tính cùng với tạo tiền đề cho các nghiên cứu xa hơn, chúng tôi tiến hành tổng hợp các dẫn chất của indol-2-on, khảo sát hoạt tính và mô phỏng docking phân tử. Các dẫn chất này cho kết quả ức chế α -glucosidase đáng kỳ vọng.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất và thiết bị

Diclofenac natri (Trung Quốc, 94%), acid clorosulfonic (Trung Quốc, 99%), acid chlohidric (Trung Quốc, 37%). Hóa chất và dung môi sử dụng không qua tinh chế. Sắc kí lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng silica gel 60F₂₅₄ (Merck) và quan sát dưới đèn UV, bước sóng 254nm. Nhiệt độ nóng chảy được đo trên máy EZ-Melt. Phổ hồng ngoại (IR) được ghi trên máy Shimadzu và phổ cộng

hưởng từ hạt nhân (NMR) trên máy NMR Bruker 500MHz. Phổ khối lượng (MS) được tiến hành trên máy Agilent 701B. Hoạt tính sinh học được tiến hành thử tại Phòng Hóa sinh Ứng dụng, Viện Hóa học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Sơ đồ 1. Quy trình tổng hợp chất 2, 3

Quy trình tổng hợp chất 2

Cho vào bình cầu 50ml dung dịch HCl 10%, đun nóng lên 80-90°C rồi nhỏ từ từ dung dịch chứa 0,5g diclofenac natri (**1**) trong nước vào bình phản ứng. Sau khi nhỏ hết, tiếp tục duy trì nhiệt độ trong 2 giờ. Kết thúc phản ứng, để nguội, thêm 50ml dichloromethan (DCM) rồi tiến hành chiết lỏng-lỏng. Rửa dịch DCM thu được với dung dịch KOH 1M (40 ml x 3 lần), nước (3 lần) rồi làm khan bằng Na₂SO₄. Cát thu hồi dung môi dịch DCM sau cùng thu được (**2**).

Quy trình này được cải tiến so với quy trình của Somashekar cùng các cộng sự. Hạn chế được việc sử dụng lò vi sóng tốn kém, đắt tiền [13]

Kết quả: 1-(2,6-dichlorophenyl)indol-2-on (**2**) là chất bột màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 126,1-127,3°C. Hiệu suất 80%. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7,51 (d, 2 H, 8,2 Hz, Ar-H), 7,39-7,33 (m, 2 H, Ar-H), 7,21 (t, 1 H, $J = 7,7$ Hz, Ar-H), 7,10 (t, 1 H, $J = 7,5$ Hz, Ar-H), 6,41 (d, 1 H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 3,78 (s, 2 H, CH₂). ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 173,67 (C=O), 143,31, 135,53, 130,81, 130,46, 129,05, 127,94, 124,83, 124,31, 123,08, 109,16 (Ar-H), 35,75 (CH₂). IR (KBr) cm⁻¹: 1730, 1608, 1435, 1360, 1301, 781, 746. MS (ESI, m/z): [M-H]⁻ 277.00

Đối chiếu với kết quả phổ đã công bố đã chứng minh công thức dự đoán hoàn toàn chính xác [13].

Quy trình tổng hợp chất 3

Cho vào bình cầu dung tích 50ml được sấy khô 2ml (30,0 mmol) acid clorosulfonic rồi thêm từ từ 2g (7,2 mmol) 1-(2,6-dichlorophenyl)indol-2-on (**2**). Quá trình thêm từ từ (**2**) được làm lạnh bằng nước đá, khuấy trong 4 giờ. Kết thúc phản ứng, hỗn hợp phản ứng được đưa vào

nước đá, thu tủa bằng lọc hút chân không, rửa sạch với nước thu được sản phẩm (**3**). Kiểm tra độ tinh khiết của sản phẩm bằng sắc kí lớp mỏng.

Kết quả: 1-(2,6-diclorophenyl)-2-oxoindolin-5-sulfonyl clorid (**3**) là chất bột màu hồng, nhiệt độ nóng chảy 243,5-245,4°C. Hiệu suất 95%. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 8,02 (s, 1 H, Ar-H), 7,95 (d, 1 H, *J* = 8,1 Hz, Ar-H), 7,56 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz, Ar-H), 7,46 (t, 1 H, *J* = 8,0 Hz), 6,57 (d, 1 H, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 3,90 (s, 2 H, CH₂). ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 172,55 (C=O), 149,21, 138,80, 135,21, 131,67, 129,29, 129,13, 128,84, 125,53, 123,93, 109,35 (Ar-H), 35,13 (CH₂). IR (KBr) cm⁻¹: 1738, 1609, 1435, 1364, 1281, 785. MS (ESI, *m/z*): 376.90

2.2. Thử hoạt tính sinh học

Phương pháp xác định hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase được thực hiện trên đĩa 96 giếng theo các tài liệu [1]. Mẫu thử được pha loãng bằng DMSO đến nồng độ cuối cùng trong phản ứng là 1024, 256; 64; 16; 4; 1 μ g/ml. Lấy vào mỗi giếng 40 μ l đệm phosphat 100mM pH 6,8, 25 μ l α -glucosidase (EC 3.2.1.20) 0,4 U/ml và 10 μ l chất thử. Hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 15 phút rồi thêm 25 μ l *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranosid 2,5mM rồi tiếp tục ủ ở 37°C trong 30 phút. Dừng phản ứng bằng Na₂CO₃ và Độ hấp thụ của phản ứng được xác định trên máy BIOTEK với bước sóng 410 nm (A). Acarbose được sử dụng làm chất tham khảo. Khả năng ức chế enzyme α -glucosidase của mẫu thử được xác định bằng công thức: Độ ức chế (%) = $[A(\text{đối chứng âm}) - A(\text{mẫu thử})] / A(\text{đối chứng âm}) \times 100\%$.

2.3. Mô phỏng docking phân tử

Mô phỏng docking phân tử được thực hiện với 2 hợp chất với α -glucosidase. Quá trình được thực hiện trên phần mềm Molecular Operation Environment (MOE 2015.10). Công thức cấu trúc các ligand được vẽ trực tiếp trên phần mềm qua công cụ Builder. Các cấu trúc sẽ được tối ưu năng lượng đến RMS gradient 0,1. Cấu trúc tinh thể của enzyme α -glucosidase chưa có nên thực hiện trên cấu trúc tinh thể của isomaltase (PDB ID: 3A4A) có cấu trúc tương

đồng cao với α -glucosidase của *Saccharomyces cerevisiae* [16]. Vùng hoạt tính của protein được xác định bằng SiteFinder. Quá trình docking sử dụng chế độ (Placement method) và đánh giá điểm (Scoring method) là London dG và GBVI/WSA dG. Kết quả docking thu được năng lượng tương tác, được mô phỏng tương tác, số lượng tương tác thông qua phần mềm Discovery Studio Visualizer v21.1.0.

2.4. Nghiên cứu đặc tính “giống thuốc” và dự đoán ADMET

Tiến hành dự đoán các thông số ADMET và đặc tính “giống thuốc” bằng cách sử dụng công cụ dự đoán pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>) [11]. Dữ liệu đầu vào là công thức SMILES của các hợp chất. Kết quả phân tích các tiêu chí và dự đoán các thông số được động học bao gồm hấp thụ, phân bố, chuyển hóa, thải trừ và độc tính.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tổng hợp hóa học

Quy trình tổng hợp các dẫn chất indol-2-on được trình bày trên Sơ đồ 1. Đã có nhiều công bố liên quan đến tổng hợp dẫn chất indol-2-on như sử dụng xúc tác kim loại, nhiều giai đoạn [2] hoặc sử dụng vi sóng [14]. Các phương pháp này yêu cầu các hóa chất, thiết bị tương đối phức tạp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp hiệu quả, thân thiện với môi trường xuất phát từ diclofenac natri (**1**) thu được 1-(2,6-diclorophenyl)indol-2-on (**2**). Ở giai đoạn tiếp theo xảy ra phản ứng thế electrophile với tác nhân acid closulfonic. Phản ứng chọn lọc ở vị trí C5 tạo thành dẫn xuất sulfonyl clorid với hiệu suất cao và quy trình đơn giản.

Cấu trúc của các hợp chất được khẳng định bằng các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H, ¹³C-NMR, phổ hồng ngoại (IR) và phổ khối lượng (MS). Phổ ¹H-NMR của hợp chất **2** và **3** cho thấy peak đặc trưng của CH₂ (singlet, ~ 3,80-3,90 ppm), đặc biệt ở **3** có H-C4 (singlet, ~ 8,02 ppm). Ở **3** xuất hiện thêm nhóm -SO₂Cl làm mất đi H-C5 ở **2**. Đối với phổ ¹³C-NMR có peak đặc trưng của C=O (~ 173 ppm), CH₂ (~ 35 ppm). Phổ IR cũng thể

hiện các nhóm chức đặc trưng xuất hiện trong hợp chất với C=O (1738 cm⁻¹), C-N (~ 1608 cm⁻¹), C-Cl (783, 750 cm⁻¹). Ở hợp chất **3** có S=O (1281 cm⁻¹). Đối với phổ MS của các hợp chất thì xuất hiện các pic phù hợp với công thức cấu tạo dự kiến.

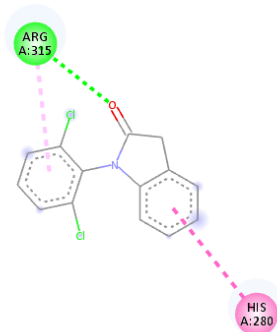
3.2. Thử hoạt tính sinh học

Bảng 1. Kết quả thử hoạt tính sinh học của hợp chất 2, 3

Hợp chất	Phân tử khối (MW)	α -glucosidase	
		IC ₅₀ (μg/ml)	IC ₅₀ (μmol/ml)
2	278,13	16,0 ± 0,81	0,0575 ± 0,0029
3	376,63	131,32 ± 5,3	0,3487 ± 0,0141
Acarbose	645,60	166,40 ± 4,5	0,2577 ± 0,0070

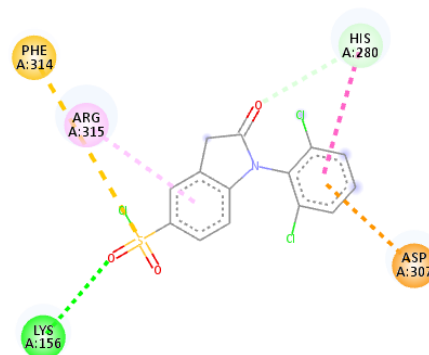
Đánh giá hoạt tính cho thấy cả hai hợp chất đều cho thấy khả năng ức chế α -glucosidase. Trong đó hợp chất **2** (IC₅₀ = 57,5 μM) cho kết quả tốt hơn so với chất đối chiếu là Acarbose (IC₅₀ = 257,7 μM) trong khi đó hợp chất **3** (IC₅₀ = 348,7 μM) có khả năng ức chế tương đương với chất chuẩn. Để phân tích kỹ hơn về hoạt tính ức chế enzyme α -glucosidase, mô phỏng docking phân tử được thực hiện để tìm hiểu về khả năng liên kết của hợp chất với enzyme. Bên cạnh đó, sau khi pha loãng hệ chất **3** trong DMSO bằng nước dung dịch hệ đệm phosphat 100 mM pH 6,8, có kết tủa của hợp chất xuất hiện khi quan sát dưới kính hiển vi. Kết tủa được khẳng định là hợp chất **3** bằng phổ hồng ngoại (IR).

3.3. Mô phỏng docking phân tử



Hình 2. Mô phỏng docking phân tử 2 với isomaltase (PDB: 3A4A) tương đồng với α -glucosidase

Như đã đề cập ở phần thực nghiệm, cấu trúc của isomaltase có cấu trúc tương đồng với cao với α -glucosidase của *Saccharomyces cerevisiae*. Kết quả năng lượng liên kết của các hợp chất **2, 3** với isomaltase tương ứng là -4,75 và -5,34 kcal/mol. Các hợp chất **2** và **3** đều có tương tác với các amino acid quan trọng (His280, Arg315) của isomaltase qua liên kết π - π , liên kết hydro. Cụ thể, ở hợp chất **2**, Arg315 tạo liên kết hydro với C=O của khung indol-2-on và tạo liên kết Van der Waals với vòng 2,6-diclophenyl. His280 tạo liên kết π - π với vòng benzen khung indol-2-on. Còn ở hợp chất **3** có nhóm sulfonyl clorid tạo liên kết π -anion với Phe314 và liên kết hydro với Lys156.



Hình 3. Mô phỏng docking phân tử 3 với isomaltase (PDB: 3A4A) tương đồng với α -glucosidase

Mặc dù ở hợp chất **3** có thêm tương tác với α -glucosidase qua nhóm sulfonyl clorid tuy nhiên kết quả đánh giá hoạt tính kém hơn 6 lần so với hợp chất **2**. Kết quả này có thể giải thích do độ tan của hợp chất **3** kém hơn trong hệ DMSO/H₂O khi đánh giá hoạt tính dẫn đến kết quả ức chế enzyme thấp và trái ngược so với mô phỏng docking phân tử đích.

3.4. Nghiên cứu ADMET và đặc tính “giống thuốc”

Thông thường, trước khi thử nghiệm *in vivo* hoặc thử nghiệm lâm sàng, các hợp chất sẽ được tiến hành phân tích *in silico*. Tiến hành đánh giá quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski. Các quy tắc đó bao gồm khối lượng phân tử nhỏ hơn 500 Dalton, giá trị logP nhỏ hơn 5, ít hơn 5 gốc cho liên kết hidro, ít hơn 10 gốc nhận

liên kết hidro và số liên kết quay dưới 10. Kết quả phân tích được trình bày trong **Bảng 2**.

Từ **bảng 2** cho thấy, 2 hợp chất đều thỏa mãn 5/5 tiêu chí của Lipinski. Từ đó cho thấy hai hợp chất đều có đặc tính “giống thuốc”.

Bảng 2. Kết quả đánh giá quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski

Hợp chất	Khối lượng phân tử	Nhóm cho liên kết hydrogen (HBD)	Nhóm nhận liên kết hydrogen (HBA)	LogP	Số liên kết có thể xoay
2	278,14	1	2	4,64	1
3	376,65	1	4	4,57	2

Tiếp tục phân tích, đánh giá một số thông số quan trọng được động học và độc tính (ADMET) như **Bảng 3**.

Kết quả ở **Bảng 3** cho thấy các hợp chất đều có khả năng hấp thu ở ruột tốt, độ thanh thải thấp và độc tính thấp.

Bảng 3. Dự đoán ADMET

Hợp chất	Hấp thu	Phân bố	Thải trừ	Độc tính
	Hấp thu ở ruột (%)	VD ₅₀ (logL/kg)	Độ thanh thải toàn phần (log mL/phút/kg)	Độc tính cấp trên chuột (mol/kg)
2	90,88	0,213	0,498	1,998
3	90,97	-0,008	0,348	2,727

4. KẾT LUẬN

Đã tổng hợp được hai dẫn chất **2** và **3** có cấu trúc indol-2-on. Các hợp chất này được khẳng định bằng các phương pháp phổ cộng hưởng từ (NMR), phổ hồng ngoại (IR), phổ khối lượng (MS). Các dẫn chất này cho thấy khả năng ức chế α -glucosidase với $IC_{50} = 57,5 \pm 2,9$ và $348,7 \pm 14,1 \mu M$. Khi mô phỏng docking phân tử cho thấy tương tác với các amino acid His280 và Arg315. Bên cạnh đó, các hợp chất này cũng được nghiên cứu ADMET và đặc tính “giống thuốc”. Các tiêu chí của Lipinski cùng với các thông số dược động học đều cho thấy tiềm năng của các hợp chất này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen H., Yan X., Lin W., Zheng L., Zhang W. (2004), "A New Method for Screening α -Glucosidase Inhibitors and

Application to Marine Microorganisms", *Pharmaceutical Biology*, 42(6), pp.416-421.

2. Gassman P.G., Van Bergen T.J. (1973), "General method for the synthesis of oxindoles", *Journal of the American Chemical Society*, 95(8), pp.2718-2719.

3. Humljan J., Kotnik M., Contreras-Martel C., Blanot D., Urleb U., Dessen A., Solmajer T., Gobec S. (2008), "Novel naphthalene-N-sulfonyl-D-glutamic acid derivatives as inhibitors of MurD, a key peptidoglycan biosynthesis enzyme", *J Med Chem*, 51(23), pp.7486-94.

4. Hwu J.R., Kapoor M., Tsay S.C., Lin C.C., Hwang K.C., Horng J.C., Chen I.C., Shieh F.K., Leyssen P., Neyts J. (2015), "Benzouracil-coumarin-arene conjugates as inhibiting agents for chikungunya virus", *Antiviral Res*, 118, pp.103-9.

5. Ji Ram V., Sethi A., Nath M., Pratap R. (2019), "Chapter 5 - Five-Membered Heterocycles", *The Chemistry of Heterocycles*, Ji Ram Vishnu, Sethi Arun, Nath Mahendra, Pratap Ramendra, Elsevier, pp.149-478.

6. Kashyap A., Singh P.K., Silakari O. (2018), "In silico designing of domain B selective gyrase inhibitors for effective treatment of resistant tuberculosis", *Tuberculosis*, 112, pp.83-88.

7. Khetmalis Y.M., Shivani M., Murugesan S., Chandra Sekhar K.V.G. (2021), "Oxindole and its derivatives: A review on recent progress in biological activities", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141, pp.111842.

8. Lackey K., Cory M., Davis R., Frye S.V., Harris P.A., Hunter R.N., Jung D.K., McDonald O.B., McNutt R.W., Peel M.R., Rutkowske R.D., Veal J.M., Wood E.R. (2000), "The discovery of potent cRaf1 kinase inhibitors", *Bioorg Med Chem Lett*, 10(3), pp.223-6.

9. Lozinskaya N.A., Babkov D.A., Zaryanova E.V., Bezsonova E.N., Efremov A.M., Tsymlyakov M.D., Anikina L.V., Zakharyasheva O.Y., Borisov A.V., Perfilova

- V.N., Tyurenkov I.N., Proskurnina M.V., Spasov A.A. (2019), "Synthesis and biological evaluation of 3-substituted 2-oxindole derivatives as new glycogen synthase kinase 3 β inhibitors", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(9), pp.1804-1817.
10. Nagarsenkar A., Prajapati S.K., Guggilapu S.D., Birineni S., Sravanti Kotapalli S., Ummanni R., Babu B.N. (2016), "Investigation of triazole-linked indole and oxindole glycoconjugates as potential anticancer agents: novel Akt/PKB signaling pathway inhibitors", *MedChemComm*, 7(4), pp.646-653.
11. Pires D.E.V., Blundell T.L., Ascher D.B. (2015), "pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures", *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(9), pp.4066-4072.
12. Sayed A.M., Alhadrami H.A., El-Hawary S.S., Mohammed R., Hassan H.M., Rateb M.E., Abdelmohsen U.R., Bakeer W. (2020), "Discovery of Two Brominated Oxindole Alkaloids as Staphylococcal DNA Gyrase and Pyruvate Kinase Inhibitors via Inverse Virtual Screening", *Microorganisms*, 8(2).
13. Somashekar P.L., Pai P.N.S., Rao G. (2013), "Synthesis and Characterization of Specified Impurities of Aceclofenac", *Chemical Science Transactions*, 2(3), pp.813-820.
14. Teichert A., Jantos K., Harms K., Studer A. (2004), "One-Pot Homolytic Aromatic Substitutions/HWE Olefinations under Microwave Conditions for the Formation of a Small Oxindole Library", *Organic Letters*, 6(20), pp.3477-3480.
15. Yagnam S., Rami Reddy E., Trivedi R., Krishna N.V., Giribabu L., Rathod B., Prakasham R.S., Sridhar B. (2019), "1,2,3-Triazole derivatives of 3-ferrocenyldiene-2-oxindole: Synthesis, characterization, electrochemical and antimicrobial evaluation", 33(4), pp.e4817.
16. Yamamoto K., Miyake H., Kusunoki M., Osaki S. (2010), "Crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose", *Febs j*, 277(20), pp.4205-14.