

П. А. Гуревич, А. В. Еремкин, С. В. Карпов,
Е. А. Соленова, С. И. Павлова, Г. В. Андреева

АЦЕТИЛИРОВАНИЕ 2-(3-АМИНО-1,4-ДИАЗАСПИРО[4.5]ДЕК-3-ЕН-2-ИЛИДЕН)МАЛОНОНИТРИЛА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К *S. AUREUS*

Ключевые слова: имидазол, полицианоорганические соединения, антимикробная активность.

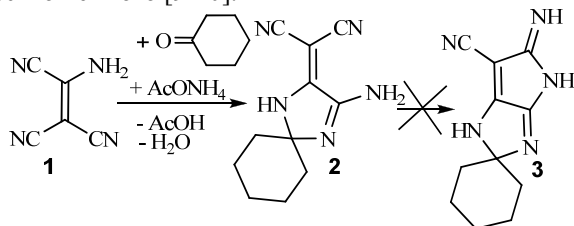
Реализовано ацетилирование 2-(3-амино-1,4-дiazаспи́ро[4.5]дек-3-ен-2-илиден)малононитрила и исследована ростоподавляющая активность полученных производных по отношению к *S. Aureus*.

Keywords: imidazole, polycyanoorganic compound, antimicrobial activity.

Implemented acetylation of 2 - (3-amino-1,4-diazaspiro[4.5]dec-3-ene-2-ylidene)malononitrile, and inhibitory activity was investigated derivatives obtained according to *S. Aureus*.

В современной синтетической химии имидазольный цикл формируется на основе реакций гетероциклизации, которым посвящена монография Гриммита [1]. Основным реагентом для синтеза цианосодержащих имидазолов является диаминоэтилендикарбонитрил. Он применяется в основном в реакциях образования цикла с одновременным формированием связей 1,2 и 2,3. В ходе проведенных исследований нами был предложен подход к построению гидрированных аминокимидазолов на основе полученного нашим коллективом ранее неизвестного 2-аминоэтилен-1,1,2-трикарбонитрила [2]. Разработанный нами подход к синтезу основан на формировании 1,2 и 3,4 (или 1,5 и 2,3) связей цикла [1], существенно отличает данный метод от известных подходов [3].

Несмотря на то, что соединения этого типа ранее в литературе не были описаны, для ряда структур, содержащих имидазольный фрагмент показано наличие выраженной противораковой [4], противовирусной [5] и антимитотической [6] активности. Также среди производных имидазола известны антагонисты различных биологических рецепторов [7-8]. Работ, посвященных исследованию антимикробных свойств производных имидазола к настоящему времени известно немного [9-10].



Продолжая поиск эффективных методов получения азасодержащих гетероциклических соединений [11], нами был оптимизирован метод получения 2-(3-амино-1,4-дiazаспи́ро[4.5]дек-3-ен-2-илиден)малононитрила **2**. В качестве исходных соединений были использованы выделенный и очищенный 2-аминоэтилен-1,1,2-трикарбонитрил [2] и циклогексанон в присутствии ацетата аммония. Выход соединения **2** составил 72%.

Строение 2-(3-амино-1,4-дiazаспи́ро[4.5]дек-3-ен-2-илиден)малононитрила (**2**) было подтверждено соотносением кристаллографических параметров с

полученными ранее [3]. Строение соединения дополнительно установлено проведенным рентгеноструктурным анализом. Молекулярная структура имидазола (**2**) приведена на рис. 1.

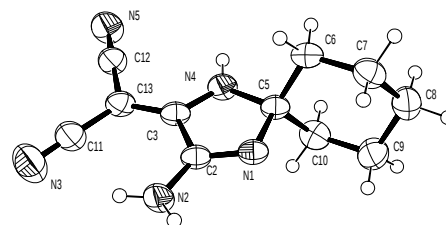
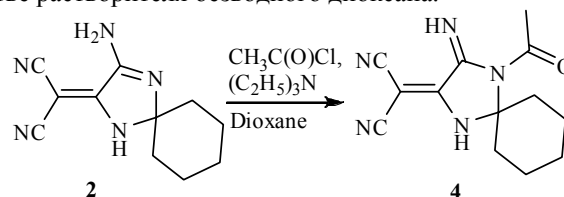


Рис. 1 - Молекулярная структура 2-(4-амино-1,3-дiazаспи́ро[4.5]дек-3-ен-2-илиден)малононитрила

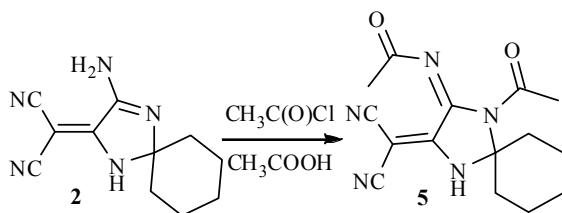
Структурной особенностью изучаемых производных имидазола **2** является наличие аминогруппы и NH-фрагмента имидазольного цикла, что потенциально позволяет осуществить его встраивание в полимерные цепи, в том числе полиамидные и полипептидные, а так же возможно присоединение к боковым и С-концевым кислотным функциям полипептидов. С целью определения возможности проявления биологической активности структурного фрагмента имидазола (**2**) в составе полимерной цепи нами было реализовано его моно- и диацетилирование, и исследовано влияние полученных производных на рост стандартной культуры *S. Aureus*.

Моноацетилированное производное **4** было получено с выходом 79% при действии на 2-(3-амино-1,4-дiazаспи́ро[4.5]дек-3-ен-2-илиден)малононитрил **2** эквимолярного количества ацетилхлорида в присутствии триэтиламина и использовании в качестве растворителя безводного диоксана.



Диацетилированное производное **5** было получено при нагревании смеси имидазола **2** с избытком ацетилхлорида в среде безводной уксусной кислоты.

По-видимому данное взаимодействие реализуется через стадию промежуточного образования соединения **4**.



Строение соединений **4** и **5** было предложено на основании данных ИК- спектроскопии и спектроскопии ЯМР ^1H . Для соединений **2** и **4** были получены данные спектроскопии ЯМР ^{13}C .

В ИК спектрах соединений имеются характерные полосы поглощения валентных колебаний $\text{C}\equiv\text{N}$ группы в области $2210\text{--}2225\text{ см}^{-1}$. В ЯМР ^1H спектрах соединений **2**, **4**, **5** присутствуют сигналы протона NH -группы гидрированного имидазольного цикла при $11,41\text{--}11,38$ м.д.

В результате исследования влияния соединений **4** и **5** на рост стандартной культуры *S. Aureus* было обнаружено, что они обладают ростоподавляющим действием по отношению к данным микроорганизмам в достаточно низких концентрациях (МПК $64\text{--}32$ мкг/мл).

Таким образом, было проведено исследование ацетилирования 2-(3-амино-1,4-дiazаспиро[4.5]дек-3-ен-2-илиден)малононитрила, получены моно- и диацетилированные производные. Установлено наличие ростоподавляющего действия ацилированных производных 2-(3-амино-1,4-дiazаспиро[4.5]дек-3-ен-2-илиден)малононитрила по отношению к *S. Aureus*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № $12\text{--}03\text{--}31673$ мол.а.

Экспериментальная часть

Контроль над ходом реакций и чистотой синтезированных веществ осуществлялся методом ТСХ на пластинках «Silufol UV-254», проявитель – УФ облучение, пары йода, термическое разложение. ИК-спектры снимали на приборе ИК-Фурье-спектрометре ФСМ-1202 в тонком слое (суспензия в вазелиновом масле). Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на спектрометре Bruker DRX-500 при рабочих частотах 500.13 МГц и 125.76 МГц соответственно, растворитель – $\text{DMSO-}d_6$, внутренний стандарт – ТМС. Масс-спектры получены на приборе Finnigan MAT.INCOS 50 (электронный удар 70 эВ) и Simadzu GCMS-QP2010S DI (электронный удар 70 эВ). Элементный анализ проводили на приборе laboratorni Pístroje.

2-(4-Амино-1,3-дiazаспиро[4.5]дек-3-ен-2-илиден)малононитрил (2). К 2.9 г (0.025 моль) аминотрицианоэтилена (полученного по методики изложенной в [2]) в 25 мл 1,4-диоксана добавляли 4.7 г ацетата аммония и 0.025 моль циклогексанола. Через 2 ч интенсивного перемешивания реакционную массу разбавляли водой и отфильтровывали выделившийся осадок, промывали водой и пропанолом-2. Перекристаллизовывали из пропанола-2. Выход 72% , т.пл. $198\text{--}199^\circ\text{C}$. ИК спектр, ν , см^{-1} : 3440 , $3280\text{--}3100$ (NH),

NH_2), 2225 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 2210 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1645 ($\text{C}=\text{N}$). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 11.41 с (1H , NH), 6.25 с (2H , $\text{N}=\text{C}-\text{NH}_2$), $1.8\text{--}1.2\text{ м}$ (10H , CH_2). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 158.9 ($=\text{C}-\text{N}$), 156.4 ($\text{C}=\text{N}$), 115.6 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 113.9 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 76.1 ($\text{C}=\text{C}(\text{CN})_2$), 42.2 ($\text{N}-\text{C}-\text{N}$), 36.6 ($\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2$), 21.9 ($\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 23.8 (CH_2). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн.}}$, %): 215 (52) Найдено, %: $\text{C } 61.23$; $\text{H } 5.93$; $\text{N } 32.47$. $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_5$. Вычислено, %: $\text{C } 61.38$; $\text{H } 6.09$; $\text{N } 32.54$.

Исследование монокристаллов соединений **2** проводили на 4-х кружном автоматическом дифрактометре CAD-4 фирмы «Enraf Nonius», $\text{Cu K}\alpha$ излучение, графитовый монохроматор, ω -сканирование. Кристаллы **2** относятся к моноклинной сингонии. Кристаллографические параметры: $a = 20.7450(7)\text{ \AA}$, $b = 5.822(1)\text{ \AA}$, $c = 20.852(1)\text{ \AA}$, $\beta = 116.10(1)^\circ$, Z 8, пространственная группа $\text{C } 1$ $2/c$ 1. Факторы недовосторности R 0.051 [3].

2-(4-ацетил-3-имино-1,4-дiazаспиро[4.5]декан-2-илиден)малононитрил (4). 2.15 г 2-(4-Амино-1,3-дiazаспиро[4.5]дек-3-ен-2-илиден)малононитрил (0.01 моль) и 0.8 г сухого триэтиламина растворяли в 15 мл безводного диоксана. К полученному раствору при интенсивном перемешивании прикапывали 0.78 г (0.01 моль) свежеперегнанного ацетилхлорида, поддерживая температуру реакционной массы не выше 20°C , после чего смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 0.5 ч . К полученной суспензии прибавляли 50 мл холодной дистиллированной воды, выделившийся осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из ледяной уксусной кислоты. Выход соединения **4** составил 2.0 г (79%). Т пл. $256\text{--}258^\circ\text{C}$ (разл.). ИК спектр, ν , см^{-1} : 3440 , 3220 (NH), 2225 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 2210 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1730 ($\text{C}=\text{O}$), 1645 ($\text{C}=\text{N}$). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 171.7 ($\text{O}=\text{C}-\text{N}$), 152.6 ($=\text{C}-\text{N}$), 157.5 ($\text{C}=\text{N}$), 116.0 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 115.0 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 91.2 ($\text{C}=\text{C}(\text{CN})_2$), 43.7 ($\text{N}-\text{C}-\text{N}$), 35.6 ($\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2$), 24.3 ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_3$), 22.8 ($\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 22.7 (CH_2). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн.}}$, %): 257 (43) Найдено, %: $\text{C } 60.63$; $\text{H } 5.92$; $\text{N } 27.37$. $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}$. Вычислено, %: $\text{C } 60.69$; $\text{H } 5.88$; $\text{N } 27.22$.

N-(1-ацетил-3-(дицианометилен)-1,4-дiazаспиро[4.5]декан-2-илиден)ацетамид (5). 0.215 г 2-(4-Амино-1,3-дiazаспиро[4.5]дек-3-ен-2-илиден)малононитрил (0.01 моль) и 0.8 г уксусного ангидрида нагревали до кипения. Далее выделяли при комнатной температуре в течение 0.5 ч . К полученному раствору добавляли 5 мл холодной дистиллированной воды, выделившийся осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из ледяной уксусной кислоты. Выход соединения **5** составил 0.20 г (74%). Т пл. $223\text{--}224^\circ\text{C}$ (разл.). ИК спектр, ν , см^{-1} : 3203 (NH), 2221 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1732 ($\text{C}=\text{O}$), 1661 ($\text{C}=\text{N}$). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 11.38 с (1H , NH), 2.61 с (3H , $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.53 м (2H , CH_2), 2.22 с (3H , $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), $1.8\text{--}1.2\text{ м}$ (8H , CH_2). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн.}}$, %): 299 (39) Найдено, %: $\text{C } 60.16$; $\text{H } 5.80$; $\text{N } 23.55$. $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_2$. Вычислено, %: $\text{C } 60.19$; $\text{H } 5.72$; $\text{N } 23.40$.

Экспериментальная биологическая часть

Культивирование музейного штамма *S. Aureus* J49 (ATCC 25923) осуществлялось в питательном

бульоне Brain-Heart Infusion (BHI; Gibco, США) во флаконах с аэрацией при 35°C. Для экспериментальных целей ночную культуру разводили так, чтобы концентрация в свежем BHI составила 10^7 микробных тел/мл, затем растили при 37°C до достижения средней log-фазы (время было установлено в предварительном эксперименте). Расчет концентрации микробных тел производили, измеряя оптическую плотность бактериальной суспензии (1 единица оптической плотности = $8,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл при длине волны 540 нм).

Использован метод серийных разведений в бульоне (Методические указания 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам», Минздрав России, 2004). Исследуемое вещество протестировано в двух сериях экспериментов, в каждом повторе опыта для него готовились 2 ряда разведений. В пробирки, содержащие по 0,5 мл соответствующего разведения тестируемого вещества в BHI или стерильном BHI (референтная проба), вносили по 0,5 мл инокулума (10^6 КОЕ/мл) не позднее 30 мин с момента его приготовления так, чтобы конечная концентрация *S. aureus* составляла 5×10^5 КОЕ/мл. Опытные аэрируемые пробирки инкубировали в течение 24 ч в обычной атмосфере при 35°C, а пробирки с референтной пробой – при 4°C. Наличие роста определяли в проходящем свете, сравнивая опытные пробирки с референтной пробой. Минимальной подавляющей концентрацией (МПК) счи-

тали наименьшую концентрацию, которая приводила к видимому подавлению роста микроорганизма.

Литература

1. M.R. Grimmett, *Imidazole and benzimidazole synthesis*. Academic Press, London, 1997, 265 p.
2. П.А. Гуревич, А.В. Еремкин, К.В. Липин, О.В. Ершов, *Вестник Казанского технологического университета*, **15**, 16, 29-30 (2012).
3. А.В. Еремкин, О.В. Ершов, Я.С. Каюков, А.Н. Лыщиков, О.Е. Насакин, В.А. Тафеев, *Журнал органической химии*, **44**, 4, 575–581 (2008).
4. C. Temple, J. D. Rose, R. N. Comber, G. A. Renner, *J. Med. Chem.* **30**, 1746-1751 (1987).
5. G. Cristalli, S. Vittori, A. Eleuteri, R. Volpini, E. Camaioni, G. Lupidi, N. Mohmoud, F. Bevilacqua, G. Palu, *J. Med. Chem.* **38**, 4019-4025 (1995).
6. C. Temple, *J. Med. Chem.* **33**, 656-661 (1990).
7. N. B. Mantlo, P. K. Chakravarty, D. L. Ondeyka, P. K. S. Siegl, R. S. Chang, V.J.Lotti, K.A. Faust, T.B. Chen, T.W. Schorn, C.S. Sweet, *J. Med. Chem.* **34**, 9, 2919-2922 (1991).
8. E. Nicolai, J. Goyard, T. Benchetrit, J. M. Teulon, F. Causade, A. Vitone, C. Delchambre, A. Cloarec, *J. Med. Chem.* **36**, 1175-1187 (1993).
9. L. Bukowski, M. Janowiec, *Pharmazie*. **44**, 267-269 (1989).
10. P. G. Baraldi, M. G. Pavan, C. Nuñez Mdel, P. Brigidi, B. Vitali, R. Gambari, Romagnoli, *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 449-456 (2002).
11. П. А. Гуревич, С. В. Федосеев, К. В. Липин, О. В. Ершов, А. В. Еремкин, Л. Ф. Саттарова, О. Е. Насакин, *Вестник Казанского технологического университета*, **15**, 15, 59-60 (2012).

© П. А. Гуревич – д-р хим. наук, проф. каф. органической химии КНИТУ; А. В. Еремкин – канд. хим. наук, доц. каф. органической и фармацевтической химии ФГБОУ ВПО «ЧГУ им И.Н.Ульянова», eremkin80@mail.ru; С. В. Карпов – канд. хим. наук, ст. препод. той же кафедры, serg31.chem@mail.ru; Е. А. Соленова – студ. ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н.Ульянова», elensoul@mail.ru; С. И. Павлова – д-р мед. наук, зав. каф. фармакологии медицинского факультета ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н.Ульянова», flavonoid@yandex.ru; Г. В. Андреева – асс. каф. ХТОСА КНИТУ.