

Рекомендована д. фармац. наук, проф. Р. Б. Лесиком

УДК 615.28:547.569.1:547.574.3:547.732

ПРОТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЕТИЛ 4-[2-АРИЛІДЕНГІДРАЗИНО]-5-МЕТИЛТІЕНО[2,3-D]ПІРИМІДИН-6-КАРБОКСИЛАТІВ

© С. В. Власов, С. М. Коваленко, В. П. Черних

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: досліджено протимікробну активність синтезованих етил 4-[2-ариліденгідразино]-5-метилтієно[2,3-d]піримідин-6-карбоксилатів, отриманих на основі модифікації етил 4-гідразино-5-метилтієно[2,3-d]піримідин-6-карбоксилату ароматичними альдегідами. Скринінг протимікробної активності проводили методом дифузії в агар («метод колодязів»). У результаті встановлено, що етил 4-[2-ариліденгідразино]-5-метилтієно[2,3-d]піримідин-6-карбоксилати пригнічують ріст *Staphylococcus aureus* та *Bacillus subtilis*.

Ключові слова: тіофен, піримідин, гідразони, протимікробні засоби.

Вступ. Сполуки із гідразинною групою у положенні 4 тієно[2,3-d]піримідину тестували як протимікробні засоби та встановили, що 4-гідразино-5-фенілтієно[2,3-d]піримідин є перспективними агентами, що діють на такі штами мікроорганізмів, як *Serratia rhodnii*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum*, *Alternaria alternata*. Продукт циклізації подібного 4-гідразинотієно[2,3-d]піримідину і етоксиметиленціаноцетового естеру додатково проявив себе як активна сполука щодо бактерій роду *Staphylococcus*. Водночас продукт конденсації з ацетилацетоном проявив лише активність відносно *Pseudomonas aeruginosa* [1]. Серед 2-(5,6,7,8-тетрагідро[1]бензотієно[2,3-d]піримідин-4-іл)гідразонів також встановлено активні сполуки щодо *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*, що можуть використовуватися як хіміотерапевтичні засоби для країн, що розвиваються [2].

Методи дослідження. Хімічна частина

Всі розчинники та реагенти були одержані із комерційних джерел. Температуру плавлення (°C) визначали за допомогою приладу Кофлера. Спектри ¹H ЯМР записували на приладі Varian Mercury (200 МГц) в ДМСО-d₆ внутрішній стандарт ТМС. Етил 4-гідразино-5-метилтієно[2,3-d]піримідин-6-карбоксилат 1 отримували за відомою методикою [3].

Загальна методика синтезу етил 4-[2-ариліденгідразино]-5-метилтієно[2,3-d]піримідин-6-карбоксилатів 2.

До 0,5 г етил 4-гідразино-5-метилтієно[2,3-d]піримідин-6-карбоксилату 1 у етанолі додавали 2 ммоль відповідного ароматичного альдегіду та краплю оцтової кислоти і кип'ятили протягом 2–4 год до утворення яскраво забарвленого осаду. Після охолодження осад

відфільтровували, ретельно промивали водним спиртом та висушували.

Вивчення протимікробної активності

Дослідження протимікробної активності синтезованих сполук проводили на базі лабораторії біохімії мікроорганізмів та поживних середовищ ДУ «ІМІ ім. І. І. Мечнікова НАМНУ» під керівництвом кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника Осолодченко Тетяни Павлівни. Відповідно до рекомендацій ВООЗ [4–7] для оцінки активності тестованих сполук використовували тест-штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC653/885. Мікробне навантаження складало 10⁷ мікробних клітин на 1 мл середовища та встановлювалась за стандартом McFarland. До роботи брали 18–24-годинну культуру мікроорганізмів. Для досліджень використовували агар Мюллера–Хінтона (Дагестанський НДІ поживних середовищ). Сполуки вводили методом дифузії в агар (лунками) у вигляді розчину у ДМСО в концентрації 100 мкг/мл в об'ємі 0,3 мл. Препарати порівняння: ципрофлоксацин застосовували у вигляді розчину в NaOH 0,1 моль/л, а метронідазол у вигляді розчину в ДМСО в концентрації 30 мкг/мл.

При оцінці протимікробної активності сполук 3 застосовували такі критерії [5, 6]: відсутність зони затримки росту мікроорганізму або зону затримки, що не перевищує 10 мм, розглядали як відсутність чутливості мікроорганізм до сполуки або недостатня концентрація досліджуваної речовини; зона затримки росту діаметром близько 10–15 мм — мала чутливість культури мікроорганізму до досліджуваної речовини у даній концентрації; зона затримки росту діаметром 15–

25 мм – чутливість мікроорганізму до досліджуваної речовини; зони затримки росту, діаметр якої перевищує 25 мм – висока чутливість мікроорганізмів до досліджуваних речовин.

Результати й обговорення. Зважаючи на дані огляду літератури, слід зазначити, що у багатьох випадках сполуки із гідразинівим фрагментом у положенні 4 тієно[2,3-d]піримідинової системи проявляють протимікробну активність. Тому метою нашої роботи стало дослідження протимікробної активності не відомих раніше етил 4-[2-ариліденгідразино]-5-метилтієно[2,3-

d]піримідин-6-карбоксилатів. Для синтезу гідрозонів **2** застосовували реакцію між ароматичними альдегідами та етил 4-гідразино-5-метилтієно[2,3-d]піримідин-6-карбоксилатом **1** [3] у середовищі етанолу в умовах кислотного каталізу (схема). В результаті отримано ряд сполук (табл. 1). У ¹H ЯМР спектрах сполук **2** спостерігаються сигнали групи CH₃ тієнового ядра при 2,83-2,93 м.ч. та сигнали протонів карбетокси групи 1,24-1,3 м.ч. (3H, т., OCH₂CH₃) та 4,22-4,27 м.ч. (2H, кв., COOCH₂CH₃). Сигнал протону СН піримідинового циклу знаходиться при 8,37-

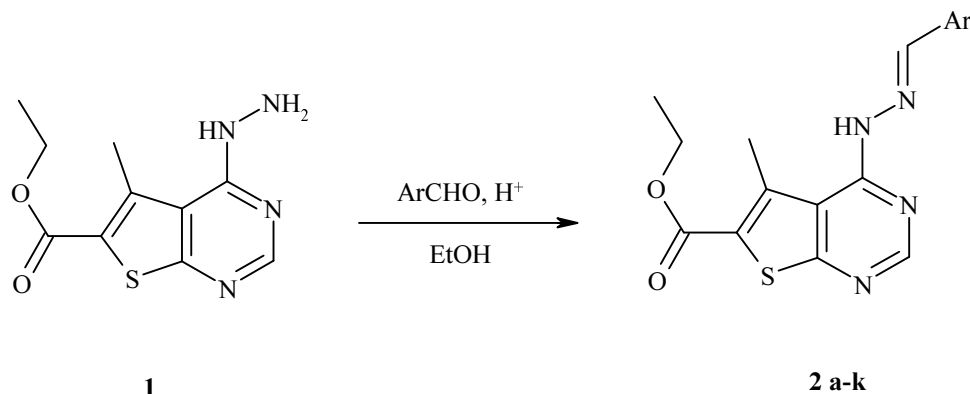


Схема. Синтез етил 4-[2-ариліденгідразино]-5-метилтієно[2,3-d]піримідин-6-карбоксилатів **2**.

Таблиця 1. Фізико-хімічні характеристики етил 4-[2-ариліденгідразино]-5-метилтієно[2,3-d]піримідин-6-карбоксилатів **2**

№ спол.	Ar	Молекулярна формула М.м., T _{пл.} , °C	N, % Розр. експ.	Вихід, %
1	2	3	4	5
2a	Ph	C ₁₇ H ₁₆ N ₄ O ₂ S 340,41 205-206	<u>16,46</u> 16,62	81
2b	<i>n</i> -F-Ph	C ₁₇ H ₁₅ FN ₄ O ₂ S 358,40 243-245	<u>15,63</u> 15,71	73
2c	<i>o</i> -F-Ph	C ₁₇ H ₁₅ FN ₄ O ₂ S 358,40 198-200	<u>15,63</u> 15,68	61
2d	<i>m</i> -Br-Ph	C ₁₇ H ₁₅ BrN ₄ O ₂ S 419,30 241-242	<u>13,36</u> 13,56	93
2e	<i>n</i> -OMe-Ph	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃ S 370,43 219-220	<u>15,12</u> 15,23	69
2f	<i>n</i> -OEt-Ph	C ₁₉ H ₂₀ N ₄ O ₃ S 384,46 210-211	<u>14,57</u> 14,61	57
2g	<i>n</i> -N(Me) ₂ -Ph	C ₁₉ H ₂₁ N ₅ O ₂ S 383,48 255-256	<u>18,26</u> 18,34	75
2h	<i>n</i> -SMePh	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₂ S ₂ 386,50 243-245	<u>14,50</u> 14,73	88

1	2	3	4	5
2i	3,4-diF-Ph	C ₁₇ H ₁₄ F ₂ N ₄ O ₂ S 376,39 250-252	<u>14,89</u> 14,92	84
2j	3,4-diOMe-Ph	C ₁₉ H ₂₀ N ₄ O ₄ S 400,46 201-203	<u>13,99</u> 14,17	53
2k	3,4,5-triOMe-Ph	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₅ S 430,49 221-223	<u>13,01</u> 13,10	64

8,51 м.ч. Сполуки **2** також мають сигнал СН протону гідразону, положення якого значно залежить від природи ароматичного замісника при 7,91–8,05 м.ч. (табл. 2).

Таблиця 2. Дані ¹H ЯМР-спектрів етил 4-[2-ариліденгідразино]-5-метилтієно[2,3-d]піримідин-6-карбоксилатів **2**

№ спол.	Хімічне зміщення, δ, м.ч.			
	СН, NH	СН ₃ (3H, с.)	аліфатичні протони	ароматичні протони
2a	8,48 СН піримід.	2,91	1,25 (3H, т., OCH ₂ CH ₃); 4,27 (2H, кв., OCH ₂ CH ₃)	7,43 (3H, м., 3'H+4'H+5'H); 7,97 (3H, м., 2'H+6'H+CH _{гідразон});
2b	8,43 СН піримід.	2,83	1,25 (3H, т., OCH ₂ CH ₃); 4,22 (2H, кв., OCH ₂ CH ₃)	7,23 (2H, м., 3'H+5'H); 7,97 (3H, м., 2'H+6'H+CH _{гідразон});
2c	8,51 СН піримід. 7,92 СН гідраз.	2,88	1,24 (3H, т., OCH ₂ CH ₃); 4,22 (2H, кв., OCH ₂ CH ₃)	7,1–7,5 (3H, м., 3'H+4'H+5'H); 8,43 (1H, м., 2'H);
2d	8,46 СН піримід. 7,97 СН гідраз.	2,89	1,26 (3H, т., OCH ₂ CH ₃); 4,27 (2H, кв., OCH ₂ CH ₃)	7,23 (2H, д., 4'H+5'H); 7,82 (1H, т., 6'H); 8,17 (1H, с., 2'H);
2e	8,43 СН піримід. 8,01 СН гідраз.	2,93	1,26 (3H, т., OCH ₂ CH ₃); 3,76 (3H, с., OCH ₃); 4,25 (2H, кв., OCH ₂ CH ₃)	6,97 (2H, д., 3'H+5'H); 7,89 (2H, д., 2'H+6'H);
2f	8,43 СН піримід. 7,95 СН гідраз.	2,89	1,3 (6H, м., OCH ₂ CH ₃); 4,07 (2H, кв., AgOCH ₂ CH ₃) 4,25 (2H, кв., COOCH ₂ CH ₃)	6,97 (2H, д., 3'H+5'H); 7,90 (2H, д., 2'H+6'H);
2g	8,37 СН піримід. 7,97 СН гідраз.	2,92	1,27 (3H, т., OCH ₂ CH ₃); 2,96 (6H, с., N(CH ₃) ₂); 4,26 (2H, кв., COOCH ₂ CH ₃)	6,86 (2H, д., 3'H+5'H); 7,79 (2H, д., 2'H+6'H);
2h	8,43 СН піримід.	-	1,25 (3H, т., OCH ₂ CH ₃); 2,87 (3H, с., SCH ₃); 4,23 (2H, кв., OCH ₂ CH ₃)	7,28 (2H, м., 3'H+5'H); 7,9 (3H, м., 2'H+6'H+CH _{гідразон});
2i	8,42 СН піримід. 7,91 СН гідраз.	2,89	1,25 (3H, т., OCH ₂ CH ₃); 4,22 (2H, кв., OCH ₂ CH ₃)	7,42 (2H, кв., 5'H); 7,67 (1H, м., 6'H); 8,15 (1H, т., 2'H);
2j	8,51 СН піримід. 7,96 СН гідраз.	2,89	1,27 (3H, т., OCH ₂ CH ₃); 3,78 (6H, д., 2OCH ₃); 4,25 (2H, кв., COOCH ₂ CH ₃)	7,12 (2H, м., 2'H + 5'H); 7,85 (1H, т., 6'H);
2k	8,44 СН піримід. 8,05 СН гідраз.	2,89	1,27 (3H, т., OCH ₂ CH ₃); 3,67 (3H, с., OCH ₃); 3,84 (6H, д., 2OCH ₃); 4,25 (2H, кв., COOCH ₂ CH ₃)	7,28 (2H, м., 2'H + 6'H);

Скринінг протимікробної активності сполук **2** проводили методом дифузії в агар («метод колодязів»). Антибактеріальну активність оцінювали шляхом вимірювання зон затримки росту відповідного мікроорганізму (табл. 3) [4, 5].

У результаті досліджень встановлено, що гідразони **2** в основному проявляють активність відносно *Staphylococcus aureus* та *Bacillus subtilis*. Причому сполуки **2b**, **2f**, **2j**, які містять невеликі замісники донорного характеру, а саме фтор чи

Таблиця 3. Протимікробні властивості досліджуваних етил 4-[2-ариліденгідразино]-5-метилтієно[2,3-d]піримідин-6-карбоксилатів **2** у концентрації 100 мг/мл

№ спол.	Середнє значення діаметра зони затримки росту в мм; кількість повторів дослідів n=3					
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 653/885
2a	15	13	13	12	16	18
2b	14	14	16	13	16	19
2c	15	14	15	13	17	15
2d	15	13	13	12	15	16
2e	14	13	12	12	15	19
2f	14	14	14	13	15	21
2g	16	14	15	14	17	18
2h	15	13	15	13	16	17
2i	15	14	13	14	17	15
2j	15	14	15	13	16	21
2k	15	13	13	13	16	17
Ципро-флуксацин	26	28	25	24	28	ріст
Метронідазол	14	14	ріст	ріст	16	14

алкокси групи, також пригнічують ріст грибів *Candida albicans*.

Висновки. Отримано нові етил 4-[2-ариліденгідразино]-5-метилтієно[2,3-d]піримідин-6-карбоксилати, які без виключення всі пригнічують

ріст *Staphylococcus aureus* та *Bacillus subtilis*, причому сполуки, що містять невеликі замісники донорного характеру, а саме фтор чи алкокси групи у ариліденовому заміснику, також пригнічують ріст грибів *Candida albicans*.

Література

1. Synthesis and Application of Some New Thienopyrimidine Derivatives as Antimicrobial Agents / Z. A. Hozien, F. M. Atta, Kh. M. Hassan [et al.] // *Synth. Commun.* – 1996. – Vol. 26, № 20. – P. 3733–3756.
2. Trypanoside, anti-tuberculosis, leishmanicidal, and cytotoxic activities of tetrahydrobenzothienopyrimidines / J. C. Aponte, A. J. Vaisberg, D. Castillo [et al.] // *Bioorg. and Med. Chem.* – 2010. – Vol. 18, № 8. – P. 2880 – 2886.
3. Синтез, модифікація і біологічна активність етилових естерів 4-гідразино та 4-тіо 5-метилтієно[2,3-d]піримідин-6-карбонової кислоти / А. І. Федосов, С. М. Коваленко, С. В. Власов [та ін.] // *Журнал органічної та фармацевтичної хімії.* – 2008. – Т. 6, № 3 (23). – С. 33–38.
4. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. Методичні вказівки МВ 9.9.5-143-2007 / [Л. С. Некрасова, В. М. Свита, Т. Г. Глушкевич та ін.]. – К. : МОЗ України, Державна сан.-епід. служба., 2007. – 79 с.
5. Coyle M. B. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing* / M. B. Coyle. – Washington : American Society for Microbiology, 2005. – 236 p.
6. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів : метод. рек. / [Ю. Л. Волянський, І. С. Гриценко, В. П. Широбоков та ін.]. – К. : ДФЦ МОЗ України, 2004. – 38 с.
7. Інформаційний лист МОЗ України № 05.4.1/1670. Бактеріологічний контроль поживних середовищ. – К. : Вид. офіц. 2001.

ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭТИЛ 4-[2-АРИЛИДЕНГИДРАЗИНО]-5-МЕТИЛТИЕНО[2,3-D]ПИРИМИДИН-6-КАРБОКСИЛАТОВ

С. В. Власов, С. Н. Коваленко, В. П. Черных

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: исследована противомикробная активность синтезированных этил 4-[2-арилиденгидразино]-5-метилтиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксилатов, полученных на основе модификации этил 4-гидразино-5-метилтиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксилата ароматическими альдегидами. Скрининг противомикробной активности проводили методом диффузии в агар («метод колодцев»). В результате установлено, что этил 4-[2-арилиденгидразино]-5-метилтиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксилаты угнетают рост *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*.

Ключевые слова: тиофен, пиримидин, гидразоны, противомикробные средства.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ETHYL 4-[2-ARYLIDENEHYDRAZINO]-5-METHYLTHIENO[2.3-D]PYRIMIDINE-6-CARBOXYLATES

S. V. Vlasov, S. M. Kovalenko, V. P. Chernykh

National University of Pharmacy, Kharkiv

Summary: the antimicrobial activity of synthesized ethyl 4-[2-arylidenehydrazino]-5-methylthieno[2.3-d]pyrimidine-6-carboxylates, obtained by modification of ethyl 4-hydrazino-5-methylthieno[2.3-d]pyrimidine-6-carboxylate with benzaldehydes was studied. Antimicrobial activity of the compounds was investigated by agar well diffusion method. It was found that ethyl 4-[2-arylidenehydrazino]-5-methylthieno[2.3-d]pyrimidine-6-carboxylates inhibited *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* growth.

Key words: thiophene, pyrimidine, hydrazones, antimicrobial agents.

Отримано 31.10.14