

С. А. Лужнова¹, А. Г. Тырков², Н. М. Габитова¹, Е. А. Юртаева¹**СИНТЕЗ И АНТИМИКОБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ
5-(АРИЛМЕТИЛЕН)ГЕКСАГИДРОПИРИМИДИН-2,4,6-ТРИОНОВ**¹ Научно-исследовательский институт по изучению лепры МЗ РФ, Россия, Астрахань² Астраханский государственный университет, Россия, Астрахань

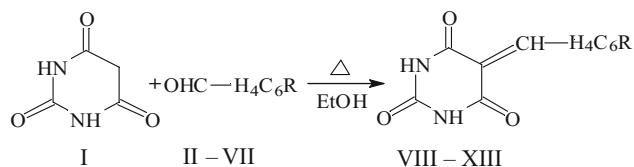
Осуществлен синтез, исследована антимикобактериальная активность и острая суточная токсичность серии 5-(арилметилден)гексагидропиримидин-2,4,6-трионов по отношению к *M. lufu*.

Ключевые слова: синтез; 5-(арилметилден)гексагидропиримидин-2,4,6-трионы; антимикобактериальная активность; минимальные ингибирующая и бактерицидная концентрации; острая токсичность.

В настоящее время в медицинской практике широко используется ряд известных противолепрозных препаратов, однако их высокая токсичность [1, 2], а также развитие к ним резистентности выдвигает на первый план задачу синтеза новых антимикобактериальных препаратов. Ранее нами была исследована суточная токсичность и антимикобактериальная активность замещенных 2-нитро-1-(4-толилсульфонил)-2-[3-метил(фенил)-1,2,4-оксаiazол-5-ил]этанов по отношению к *M. lufu* и *M. tuberculosis* [3].

Продолжая развивать исследования в этом направлении, а также с целью поиска соединений, обладающих более низким уровнем токсичности, нами синтезирована серия 5-(арилметилден)гексагидропиримидин-2,4,6-трионов (VIII – XIII) и исследована их антимикобактериальная активность.

В основе способа получения целевых соединений (VIII – XIII), выход которых составляет 82 – 92 %, лежит реакция конденсации 2,4,6-пиримидинтриона (I) с избытком ароматических альдегидов (II – VII). Процесс осуществляли в среде этанола, время кипячения реакционной смеси — 45 мин.



R = H (II, VIII);
 R = 4-CH₃O (III, IX);
 R = 4-(CH₃)₂N (IV, X);
 R = 4-Cl (V, XI);
 R = 3-NO₂ (VI, XII);
 R = -OH (VII, XIII)

Структура соединений установлена с помощью методов ИК, электронной спектроскопии, ЯМР ¹H, ¹³C, масс-спектрометрии, а состав — данными элементного анализа. В ИК-спектрах зафиксирована новая полоса поглощения, отсутствующая в исходных соединениях, — валентные колебания этеновой связи при 1625 см⁻¹. Картина спектров ЯМР ¹H и ¹³C характеризуется появлением соответственно синглетного сигнала протона метиновой группы в области 8,20 – 8,36 м.д. и сигнала метинового углерода (C₇) при

150 м.д. В электронных спектрах фиксируются 2 полосы поглощения с четко выраженными максимумами: 260 нм (локальное возбуждение π-электронов) и 350 – 450 нм (внутримолекулярный перенос заряда, характерный для сопряженных этенов [4]). В масс-спектрах полученных соединений присутствуют как высокоинтенсивные пики молекулярных ионов, позволяющие оценить молекулярную массу полученных соединений, так и пики фрагментов первичной и вторичной диссоциативной ионизации. Гексагидропиримидинтрионы представляют собой высокоплавкие бесцветные или окрашенные вещества, растворимые в большинстве органических растворителей и плохо растворимые в воде.

Экспериментальная химическая часть

В синтезе целевых соединений использовали I и ароматические альдегиды II – VII фирмы “Aldrich” (США), их физические константы соответствовали литературным данным. ИК-спектры синтезированных соединений снимали на спектрофотометре InfraLUM FT-02 в таблетках KBr в интервале 4000 – 400 см⁻¹. Спектры ЯМР ¹H и ¹³C записаны на приборе Bruker DRX 500 SF с рабочей частотой соответственно 500 и 300 МГц в ДМСО-d₆, внутренний стандарт — ГМДС. Электронные спектры (в этаноле) фиксировали на спектрофотометре Cary-50 с концентрацией 0,3 мг/мл. Масс-спектры получены на масс-спектрометре Finnigan SSQ 7000 в режиме прямого ввода образца в ионный источник, ионизирующее напряжение 70 эВ при температуре образца 150 °С, ускоряющее напряжение 5000 В (разрешение 5000). Ход реакции и контроль за степенью чистоты полученных соединений осуществляли методом восходящей ТСХ на пластинках Silufol UV-254 в системе растворителей ацетон — гексан, 2:3, проявление проводили парами йода [5]. Элементный анализ выполнен на автоматическом CHNS-анализаторе Euro EA-3000 фирмы Euro Vector. Данные элементного анализа соответствуют вычисленным значениям.

5-(Арилметилден)гексагидропиримидин-2,4,6-трионы (VIII – XIII). Раствор, состоящий из 10 ммоль соединения I и 11 ммоль соединений II – VII в 25 мл эта-

нола, кипятят 45 мин и охлаждают до комнатной температуры, осадок отфильтровывают, промывают 2 раза по 15 мл охлажденным этанолом, сушат на воздухе, растворитель для перекристаллизации веществ — метанол.

5-(Фенилметил)-2,4,6-пиримидинтрион (VIII). Выход 85 %, т. разл. 295 °С. ИК-спектр, ν_{\max} , см^{-1} : 3550 (NH), 1770, 1750 (C=O), 1625 (C=C). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 11,35 (уш. с, 1H, NH); 11,20 (уш. с, 1H, NH); 8,10 – 7,45 (м, 5H_{аром.}, C₆H₅); 8,30 (с, 1H, CH). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 163,4 (C₄), 161,6 (C₆), 154,7 (C₂), 150,2 (C₇), 133,1 (C₉), 132,7 (C₈), 132,2 (C₁₀), 128,0 (C₁₁), 119,1 (C₅). УФ-спектр, λ_{\max} , нм: 260 (lgε 3,5), 350 (lgε 3,1). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 216 [M]⁺ (70), 215 [M – 1]⁺ (100), 172 [M-CHNO]⁺ (51), 102 [C₈H₆]⁺ (15). C₁₁H₈N₂O₃. М 216,18.

5-[(4-Метоксифенил)метил]-2,4,6-пиримидинтрион (IX). Выход 87 %, т. разл. 270 °С. ИК спектр, ν_{\max} , см^{-1} : 3550 (NH), 1770, 1750 (C=O), 1625 (C=C). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 11,25 (уш. с, 1H, NH); 11,10 (уш. с, 1H, NH); 8,35 – 7,10 (м, 4H_{аром.}, C₆H₄); 8,25 (с, 1H, CH); 3,87 (с, 3H, CH₃O). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 163,9 (C₄), 163,4 (C₆), 162,2 (C₁₁), 155,0 (C₂), 150,2 (C₇), 137,5 (C₉), 125,2 (C₈), 115,5 (C₅), 113,9 (C₁₀), 55,7 (CH₃O). УФ-спектр, λ_{\max} , нм: 260 (lgε 3,6), 380 (lgε 3,2). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 246 [M]⁺ (100), 245 [M – 1]⁺ (66), 215 [M-CH₃O]⁺ (10), 202 [M-CHNO]⁺ (38), 172 [M-CHNO-CH₃O]⁺ (5), C₁₂H₁₀N₂O₄. М 246,20.

5-[(4-Диметиламинофенил)метил]-2,4,6-пиримидинтрион (X). Выход 92 %, т. разл. 277 °С. ИК-спектр, ν_{\max} , см^{-1} : 3550 (NH), 1770, 1750 (C=O), 1625 (C=C). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 11,20 (уш. с, 1H, NH); 11,05 (уш. с, 1H, NH); 9,60 – 8,30 (м, 4H_{аром.}, C₆H₄); 8,20 (с, 1H, CH); 2,95 (с, 6H, CH₃N). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 163,4 (C₄), 161,6 (C₆), 155,1 (C₂), 151,1 (C₁₁), 150,2 (C₇), 130,7 (C₉), 121,9 (C₈), 112,3 (C₁₀), 40,1 (CH₃N). УФ-спектр, λ_{\max} , нм: 260 (lgε 3,7), 450 (lgε 3,3). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 259 [M]⁺ (100), 258 [M – 1]⁺ (53), 216 [M-CHNO]⁺ (34), 215 [M-(CH₃)₂N]⁺ (15). C₁₃H₁₃N₃O₃. М 259,26.

5-[(4-Хлорфенил)метил]-2,4,6-пиримидинтрион (XI). Выход 90 %, т. разл. 298 °С. ИК спектр, ν_{\max} , см^{-1} : 3550 (NH), 1770, 1750 (C=O), 1625 (C=C). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 11,45 (уш. с, 1H, NH); 11,30 (уш. с, 1H, NH); 8,15 – 7,55 (м, 4H_{аром.}, C₆H₄); 8,32 (с, 1H, CH). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 163,3 (C₄), 162,9 (C₆), 155,2 (C₂), 150,6 (C₇), 135,7 (C₁₁), 133,2 (C₈), 129,7 (C₁₀), 129,3 (C₉), 118,1 (C₅). УФ-спектр, λ_{\max} , нм: 260 (lgε 3,6), 350 (lgε 3,3). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 250 [M]⁺ (100), 249 [M – 1]⁺ (42), 215 [M-Cl]⁺ (10), 207 [M-CHNO]⁺ (30). C₁₁H₇N₂O₃Cl. М 250,62.

5-[(3-Нитрофенил)метил]-2,4,6-пиримидинтрион (XII). Выход 82 %, т. разл. 245 °С. ИК спектр, ν_{\max} , см^{-1} : 3550 (NH), 1770, 1750 (C=O), 1625 (C=C), 1540, 1365 (NO₂). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 11,50 (уш. с, 1H, NH); 11,35 (уш. с, 1H, NH); 8,91 – 7,75 (м, 4H_{аром.}, C₆H₄); 8,36 (с, 1H, CH). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 162,8 (C₄), 161,5 (C₆), 151,2 (C₂), 150,2 (C₇), 147,2 (C₁₂), 138,4 (C₁₃), 134,5 (C₁₀), 129,4 (C₈), 126,1 (C₉), 125,5 (C₁₁),

121,6 (C₅). УФ-спектр, λ_{\max} , нм: 260 (lgε 3,7), 350 (lgε 3,3). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 261 [M]⁺ (65), 260 [M – 1]⁺ (47), 244 [M-NH]⁺ (100), 214 [M-NO₂]⁺ (69), 172 [M-NO₂-CHNO]⁺ (21). C₁₁H₇N₃O₅. М 261,16.

5-[(2-Гидроксифенил)метил]-2,4,6-пиримидинтрион (XIII). Выход 85 %, т. разл. 290 °С. ИК-спектр, ν_{\max} , см^{-1} : 3550 (NH), 3250 (OH), 1770, 1750 (C=O), 1625 (C=C). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д.: 11,20 (уш. с, 1H, NH); 11,05 (уш. с, 1H, NH); 9,45 (уш. с, 1H, OH), 8,05 – 7,05 (м, 4H_{аром.}, C₆H₄); 8,22 (с, 1H, CH). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 163,4 (C₄), 161,9 (C₆), 159,1 (C₉), 155,1 (C₂), 150,2 (C₇), 134,8 (C₁₁), 132,9 (C₁₃), 121,2 (C₅), 120,1 (C₈), 118,3 (C₁₂), 115,5 (C₁₀). УФ спектр, λ_{\max} , нм: 260 (lgε 3,5), 350 (lgε 3,2). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 232 [M]⁺ (100), 231 [M – 1]⁺ (41), 215 [M-OH]⁺ (18), 139 [M-C₆H₅O]⁺ (54). C₁₁H₈N₂O₄. М 232,17.

Экспериментальная биологическая часть

Микробиологический антибактериальный скрининг соединений VIII – XIII проводили в отношении *M. lufu* — тестовой культуры для определения активности противолепрозных препаратов *in vitro* [6]. За основу был взят метод серийных разведений, применяемый при изучении антибактериальной активности в отношении *M. tuberculosis* [7]. Для культивирования *M. lufu* использовали плотную среду Левенштейна-Йенсена, применяемую при выращивании микобактерий [7]. Антимикобактериальную активность соединений изучали на среде Школьниковой [7]. Для посева брали 2-недельную культуру *M. lufu* в дозе 10⁵ микробных тел на 1 мл среды. С целью получения более стабильных результатов перед посевом проводилась синхронизация культуры холодом (4 ± 1) °С в течение 72 ч. В качестве препарата сравнения использовали дапсон фирмы “Novartis” (Швейцария). Посевы инкубировали с добавлением соединений на среде Школьниковой в течение 10 дней при температуре (31 ± 1) °С. По истечении этого срока из каждой про-

Острая суточная токсичность (ЛД₅₀) и антимикобактериальная активность 5-(арилметил)гексагидропиримидин-2,4,6-трионов (VIII – XIII)

Соединение	ЛД ₅₀ , мг/кг	Антимикобактериальная активность	
		МИК, мкг/мл	МБК, мкг/мл
VIII	> 1500	2,5 ± 0,09***	8,1 ± 1,9*
IX	> 1500	42,8 ± 3,4**	64,0 ± 12,3**
X	1500	128,0 ± 11,6**	220,0 ± 19,8
XI	> 1500	2,3 ± 0,11**	7,65 ± 1,65*
XII	1500	256,0 ± 16,2***	428,5 ± 28,3**
XIII	1500	256,0 ± 18,9***	560,0 ± 26,4**
Дапсон	600	4,0 ± 0,7	8,3 ± 1,56

* Различия статистически недостоверны по отношению к дапсону ($p \leq 0,05$);

** различия статистически достоверны по отношению к дапсону ($p \leq 0,01$);

*** различия статистически достоверны по отношению к дапсону ($p \leq 0,001$).

бирки переносили по 0,05 мл суспензии в пробирки на скошенную среду Левенштейна — Йенсена с целью определения жизнеспособности *M. lufu*. Оставшееся содержимое пробирок центрифугировали, из осадка готовили мазки, которые затем окрашивали по методу Циля — Нильсена на кислотоустойчивость [7]. В мазках просматривали 20 полей зрения, считали общее количество микобактерий, оценивали их морфологию, наличие кислотоустойчивых и измененных форм. Посевы на среде Левенштейна — Йенсена инкубировали в течение 10 дней при температуре $(31 \pm 1)^\circ\text{C}$, проводили подсчет колоний, выросших на плотной среде. Минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) соединений считали наименьшую, при которой количество выросших на среде колоний *M. lufu* составляло не более 50 % в сравнении с контролем. Минимальной бактерицидной концентрацией (МБК) соединений считали такую, при которой после инкубации на среде не обнаруживалось роста колоний *M. lufu*. Исследования проводили в 5 сериях повторных экспериментов. Результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Острую токсичность (LD_{50}) определяли на мышак-самцах линии СВА массой 25 – 28 г по 7 животных в группе. Соединения вводили мышам в желудок в водной взвеси в дозах 5 – 50 и 1500 мг/кг. LD_{50} рассчитывали по методу Миллера и Тейнтера, Гаддема [8]. Все животные были синхронизированы по условиям содержания и кормлению. Продолжительность наблюдения составляла 10 сут.

Результаты антимикобактериальной активности соединений VIII – XIII приведены в таблице.

Анализ полученных результатов представлен в таблице и показывает, что исследованные соединения VIII – XIII обладают низкой токсичностью (≥ 1500 мг/кг). Антимикобактериальная активность соединений VIII – XIII в отношении *M. lufu* широко варьирует. Наибольшей антимикобактериальной активностью (МБК) обладают соединения VIII и XI, по эффективности их воздействие схоже с дапсоном, а

различия между ними недостоверны ($p \leq 0,05$). Соединение XI по активности (МИК $(2,3 \pm 0,11)$ мкг/мл) достоверно ($p \leq 0,01$) отличается от дапсона (МИК $(4,0 \pm 0,7)$ мкг/мл), а соединение VIII (МИК $(2,5 \pm 0,09)$ мкг/мл) достоверно ($p \leq 0,001$) превышает его по активности. Остальные соединения также оказались активны в отношении *M. lufu*, однако достоверно ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$) отличались от дапсона превышением величины минимальной ингибирующей дозы.

Таким образом, исследования показали, что соединения обладают низкой токсичностью, антимикобактериальная активность выражена у всех соединений в разной степени при сопоставлении с дапсоном. Проведенные исследования позволяют рассматривать соединения VIII и XI в качестве перспективных для дальнейшего изучения их антимикобактериальных свойств.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы “Развитие инновационной инфраструктуры в Российских вузах” (грант № 13.637.31.0038) с использованием научного оборудования ЦКП “Биотехнологии создания оригинальных фармпрепаратов”.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. S. Blanchard, *An. Rev. Biochem.*, **65**, 215 – 239 (1996).
2. Т. Бердсли, *В мире науки*, **1**, 78 – 79 (1993).
3. А. Г. Тырков, Н. Г. Урляпова, А. Д. Даудова, *Хим.-фарм. журнал*, **40**, 30 – 31 (2006); *Pharm. Chem. J.*, **40**(7), 377 – 379 (2006).
4. Э. Преч, Ф. Бюльманн, К. Аффольтер, *Определение строения органических соединений*, Бином, Лаборатория знаний, Мир, Москва (2006), сс. 393 – 395.
5. Ю. Кирхнер, *Тонкослойная хроматография*, Т. 1, Мир, Москва (1981), сс. 129, 218.
6. О. А. Иртуганова, Н. А. Урляпова, *Актуальные вопросы лепрологии*, Астрахань (1984), сс. 147 – 150.
7. Ф. Герхард, *Методы общей бактериологии*, Т. 2, Мир, Москва (1983), с. 29.
8. О. Н. Елизарова, *Определение пороговых доз промышленных ядов при пероральном введении*, Медицина, Москва (1971), сс. 240, 207.

Поступила 29.12.14

SYNTHESIS AND ANTIMICOBACTERIAL ACTIVITY OF 5-(ARYLMETHYLENE)HEXAHYDROPIRIMIDIN-2,4,6-TRIONES

S. A. Luzhnova¹, A. G. Tyrkov², N. M. Gabitova¹, and E. A. Yurtaeva¹

¹ Leprosy Research Institute, Astrakhan, 414057 Russia;

² Astrakhan State University, Astrakhan, 414956 Russia

We have synthesized a series of 5-(arylmethylene)hexahydropyrimidin-2,4,6-triones and studied their antimycobacterial activity and acute daily toxicity with respect to *M. lufu*.

Keywords: 5-(arylmethylene)hexahydropyrimidine-2,4,6-triones; synthesis; antimycobacterial activity; minimum inhibitor concentration; bactericidal concentration; acute toxicity.