

А. С. Кошевенко¹, И. П. Яковлев¹, В. Н. Юсковец¹, Е. П. Ананьева¹,
Н. Н. Кузьмич¹, Г. В. Ксенофонтова¹

СИНТЕЗ И ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ХЛОРИДОВ 2-[(Z)-1-(3,5-ДИАРИЛ-1,3,4-ТИАДИАЗОЛ-2(3H)-ИЛИДЕН)МЕТИЛ]-3,5- ДИАРИЛ-1,3,4-ТИАДИАЗОЛ-3-ИЯ

¹ ГБОУ ВПО СПХФА Минздрава России 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А.

* e-mail: anastasia.koshevenko@pharminnotech.com

Разработаны методы получения новых гетероциклических соединений, производных 1,3,4-тиадиазолов. Показано, что данные соединения обладают выраженной антифунгальной активностью и могут быть рекомендованы для дальнейшего изучения в качестве потенциальных антимикробных средств с фунгицидным действием.

Ключевые слова: 1,3,4-тиадиазол; малонилдихлорид; N'-арилтиобензгидразид; антифунгальная активность; минимальная ингибирующая концентрация.

Одной из актуальных проблем фармацевтической химии является поиск новых противогрибковых веществ [1 – 5]. Одними из перспективных в этом плане являются производные тиадиазолов, среди которых обнаружены соединения, обладающие антибактериальной и противогрибковой активностью [6 – 11].

Экспериментальная химическая часть

Спектры ЯМР ¹H и ¹³C веществ **IIIa** – **e** в DMSO-d₆, CDCl₃ и CF₃COOD записаны на спектрометре Bruker WM-400 (рабочая частота 400 МГц). В качестве внутреннего стандарта использовали ГМДС.

Масс-спектры получены на спектрометре МХ-1321 с ионизационным напряжением 70 В, температурой ионизирующей камеры 200 °С, в режиме прямого ввода. Рассчитанные молекулярные массы полностью совпали с экспериментально полученными.

Кристаллы соединения (**IIIa**), прозрачные желтые иглы, были выращены из раствора хлороформ + ДМСО (2:1) медленным испарением при 18 – 20 °С. Монокристалльный рентгеноструктурный анализ (РСА) этого соединения осуществляли на дифрактометре Bruker SMART 1000 CCD (MoK_α излучение). Кристаллы C₂₉H₂₁ClN₄S₂ относятся к моноклинной сингонии, пространственная группа P2₁/n, *a* = 14,3931(16) Å, *b* = 14,4841(17) Å, *c* = 27,348(2) Å, *Z* = 8, *D*_x = 1,544 г/см³, *R*₁ = 0,1411 (*I* > 2σ*I*), *wR*₂ = 0,3446, 2102 ненулевых независимых отражений.

Элементный анализ веществ выполнен на приборе LECO CHNS-932.

Чистоту полученных соединений и контроль протекания реакций осуществляли хроматографически на пластинах Sorbfil. В качестве элюентов использовали хлороформ — метанол, 2:1. Детекцию проводили в УФ-свете и парами йода.

Температуры плавления веществ определяли капиллярным методом и не корректировали.

Хлорид 2-[(Z)-1-(3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-3-ия (IIIa). К суспензии 4,56 г (20 ммоль) N'-фенил-

тиобензгидразида в 50 мл сухого бензола осторожно добавляют 2,12 г (15 ммоль) малонилдихлорида и кипятят в течение 3 ч. Желто-коричневый осадок отфильтровывают и промывают бензолом, затем нагревают со смесью бензол — ацетонитрил, 3:1. Теплый раствор фильтруют, желтый осадок промывают небольшим количеством холодного ацетонитрила, сушат на воздухе и перекристаллизовывают из воды, удаляя нерастворяющуюся взвесь фильтрацией через бумажный фильтр. При медленном охлаждении чистый продукт выпадает в виде ярко-желтых игл. *R*_f 0,87 (хлороформ — метанол, 2:1). Выход 3,88 г (85 %), *T*_{пл} 269 – 271 °С.

Соединения **IIIb** – **e** получены аналогичным образом (табл. 1).

Экспериментальная биологическая часть

Противогрибковую активность исследовали на дрожжах рода *Candida* — *C. albicans*, *C. tropicalis* — и мицелиальных грибах *Aspergillus niger*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus nigricans*. В качестве препаратов сравнения были выбраны из группы азолов — вориконазол, из группы эхинокандинов — каспофунгин [12].

Антифунгальную активность определяли методом серийных разведений в жидких питательных средах.

Споры мицелиальных грибов получали с помощью смыва раствором фосфатного буфера с 0,05 % раствором полисорбата-80. Для проведения смыва использовали культуру гриба, выращенную на плотной питательной среде в течение 5 сут.

Определяли количество спор в 1 мл смыва, используя камеру Горяева, и далее доводили до концентрации 10⁶ клеток/мл.

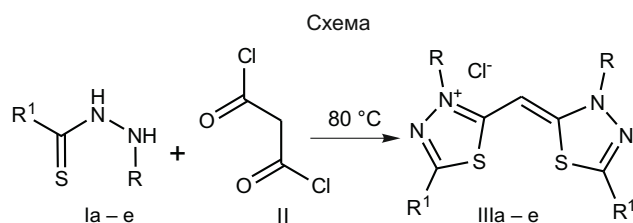
В ряд пробирок наливали по 1 мл среды Сабуро. В первую пробирку вносили 1 мл раствора исследуемого соединения и проводили последовательные разведения в ряду пробирок, перенося по 1 мл из предыдущей в последующую, после чего в каждую пробирку ряда вносили по 0,1 мл микробной взвеси (микробная нагрузка составляла 10⁵ клеток/мл). Пробирки культиви-

ровали при 24 °С в течение 24 ч (для дрожжей *C. albicans* и *C. tropicalis*) и 72 ч (для мицелиальных грибов).

Из пробирки, в которой не наблюдали роста культуры, делали высев в чашки Петри на агаризованную среду Сабуро. Чашки культивировали при 24 °С в течение 24 и 72 ч соответственно для дрожжей и мицелиальных грибов. Эксперименты проводили в 3 последовательностях до полной сходимости результатов [13].

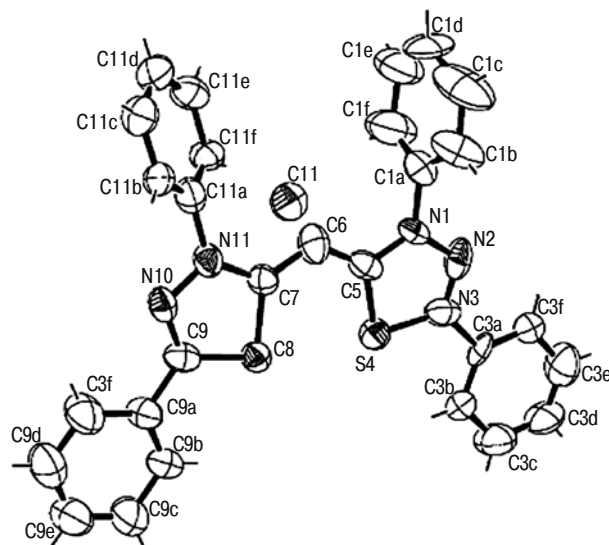
Результаты и их обсуждение

Нами впервые показано, что реакция *N'*-арилтиобензгидразидов (**Ia – e**) с малонилдихлоридом (**II**) в соотношении 2:1 в среде кипящего бензола приводит к получению хлоридов 2-[(*Z*)-1-(3,5-диарил-1,3,4-тиадиазол-2(3*H*)-илиден)метил(этил)]-3,5-диарил-1,3,4-тиадиазол-3-ия (**IIIa – e**) с выходом 81 – 85 % (схема, табл. 2).



R = Ph; R¹ = Ph (**Ia**, **IIIa**)
 R = 3,5-диFC₆H₄; R¹ = 4-FC₆H₄ (**Ib**, **IIIb**)
 R = 4-FC₆H₄; R¹ = Ph (**Ic**, **IIIc**)
 R = 3,5-диFC₆H₄; R¹ = Ph (**Id**, **IIId**)
 R = 3,5-диClC₆H₄; R¹ = Ph (**Ie**, **IIIe**)

В спектрах ЯМР ¹H соединений **IIIa – e** в CDCl₃ присутствуют сигналы протонов бензольных колец (δ 5,89 – 8,11 м.д.), протона метинового мостика между 1,3,4-тиадиазольными циклами (δ 5,89 – 6,35 м.д.) с



Строение соединения **IIIa** по данным рентгеноструктурного анализа.

соотношением интегральных интенсивностей 20:1 (табл. 3).

Спектры ЯМР ¹³C этих соединений характеризуются сигналами ядер углерода бензольных колец (δ 125,4 – 136,8 м.д.), тиадиазольных циклов (δ 153,67 – 168,56 м.д.) и метинового мостика (δ 79,26 – 83,88 м.д.) (табл. 3).

Строение полученных веществ однозначно установлено на основании данных рентгеноструктурного анализа вещества **IIIa** (рисунок). Из рисунка видно, что фрагмент, включающий оба тиадиазольных цикла с метиновым мостиком и фенильные заместители в положениях 5 гетероциклов, почти планарен. Максимальные значения двугранных углов в этом фрагменте достигают 5,9 град. Плоскости 2 бензольных колец в

Данные элементного анализа соединений **IIIa – e**

Таблица 1

| Соединение | Найдено, % | | | Формула | Вычислено, % | | |
|-------------|------------|------|-------|--|--------------|------|-------|
| | C | H | N | | C | H | N |
| IIIa | 66,16 | 4,06 | 10,71 | C ₂₉ H ₂₁ ClN ₄ S ₂ | 66,33 | 4,03 | 10,67 |
| IIIb | 55,12 | 3,27 | 8,76 | C ₂₉ H ₁₅ ClF ₆ N ₄ S ₂ | 55,01 | 3,35 | 8,85 |
| IIIc | 62,10 | 3,59 | 9,78 | C ₂₉ H ₁₉ ClF ₂ N ₄ S ₂ | 62,07 | 3,78 | 9,99 |
| IIId | 58,42 | 3,42 | 9,27 | C ₂₉ H ₁₇ ClF ₄ N ₄ S ₂ | 58,33 | 3,55 | 9,39 |
| IIIe | 52,60 | 3,11 | 8,36 | C ₂₉ H ₁₇ Cl ₅ N ₄ S ₂ | 52,54 | 3,20 | 8,45 |

Характеристика соединений **IIIa – e**

Таблица 2

| Соединение | R | R ¹ | T _{пл.} , °C | Выход, % | R _f ^a |
|-------------|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|----------|-----------------------------|
| IIIa | Ph | Ph | 269 – 271 | 85 | 0,87 |
| IIIb | 3,5-диFC ₆ H ₄ | 4-FC ₆ H ₄ | 279 – 281 | 83 | 0,62 |
| IIIc | 4-FC ₆ H ₄ | Ph | > 300 | 83 | 0,38 |
| IIId | 3,5-диFC ₆ H ₄ | Ph | 234 – 236 | 82 | 0,51 |
| IIIe | 3,5-диClC ₆ H ₄ | Ph | > 300 | 81 | 0,38 |

Таблица 3
Спектры ЯМР ¹H и ¹³C (DMCO-d₆) соединений IIIa – e

| Соединение | Спектр ЯМР ¹ H (DMCO-d ₆), δ, м.д. | Спектр ЯМР ¹³ C, δ _C , м.д. |
|------------|---|--|
| IIIa | 7,59 – 7,73 (м, 16H, Ar), 8,04 (д, 4H, J 6,9 Гц, Ar) 6,01 (с, 1H, CH) | 162,93, 168,56, 79,26, 125,37, 126,56, 126,85, 129,30, 129,71, 130,52, 132,50, 136,18 |
| IIIb | 5,89 (с, 1H, Ar), 7,37 (с, 2H, Ar), 7,51 – 7,57 (м, 4H, Ar), 7,66 – 7,75 (м, 4H, Ar), 7,81 – 7,86 (м, 4H, Ar), 8,04 – 8,09 (м, 4H, Ar), 5,89 (с, 1H, CH) | 156,96, 163,35, 80,52, 110,63, 112,53, 127,23, 127,58, 129,97, 131,39, 133,39, 153,79 |
| IIIc | 7,51 – 7,58 (м, 4H, Ar), 7,66 – 7,75 (м, 6H, Ar), 7,81 – 7,86 (м, 4H, Ar), 8,04 – 8,09 (м, 4H, Ar), 5,89 (с, 1H, CH) | 156,63, 163,46, 79,47, 117,60, 117,83, 127,63, 128,78, 129,27, 129,35, 130,33, 133,39 |
| IIIд | 7,63 – 7,79 (м, 12H, Ar), 8,06 – 8,11 (м, 4H, Ar), 6,35 (с, 1H, CH) | 157,16, 163,07, 81,02, 107,23, 110,97, 127,22, 127,84, 130,33, 133,60, 138,88, 163,46 |
| IIIe | 7,49 – 7,58 (м, 4H, Ar), 7,66 – 7,76 (м, 4H, Ar), 7,79 – 7,87 (м, 4H, Ar), 8,03 – 8,09 (м, 4H, Ar), 5,89 (с, 1H, CH) | 153,67, 167,44, 83,05, 109,27, 115,92, 123,21, 126,81, 133,39, 135,60, 137,85, 147,18 |

положениях 3 тиадиазольных циклов повернуты на 76 и 45 градусов относительно плоскостей гетероциклов.

Состав полученных веществ также подтвержден данными масс-спектрометрии (*m/z*: 525 (IIIa), 633(IIIb), 561(IIIc), 597(IIIд), 662(IIIe)) и данными элементного анализа (табл. 1).

Минимальная ингибирующая концентрация соединения IIIa в отношении *C. albicans* составила 1 мкг/мл. Следует отметить, что активность хлорида 2-[(Z)-1-(3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-3-ия (IIIa) находится на уровне препаратов сравнения (табл. 4).

Установлено, что соединения IIIa – e проявляли активность в отношении грибов зигомицетов (МИК = 32 – 1000 мкг/мл). Препараты сравнения не оказывали ингибирующего действия на данные мицелиальные грибы. В отношении *A. niger* исследуемые соединения, в отличие от каспофунгина и вориконазола, обладали фунгицидным действием.

Таким образом, производные хлорида 2-[(Z)-1-(3,5-диарил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3,5-диа-

SYNTHESIS AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF NEW 2-[(1Z)-1-(3,5-DIARYL-1,3,4-THIADIAZOL-2(3N)-YLIDENE)METHYL]-3,5-DIARYL-1,3,4-THIADIAZOL-3-IUM CHLORIDES

A. S. Koshevenko*, I. P. Yakovlev, V. N. Yuskovets, E. P. Anan'eva, N. N. Kuz'mich, and G. V. Ksenofontova

Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, St. Petersburg, 197022 Russia
* e-mail:anastasia.koshevenko@pharmminnotech.com

Methods have been developed for the synthesis of new heterocyclic compounds representing 1,3,4-thiadiazoles. It is established that the synthesized compounds possess pronounced antifungal properties and can be recommended for further investigation as potential antimicrobial agents with fungicidal activity.

Keywords: 1,3,4-thiadiazole; malonyl dichloride; N'-arylthiobenzhydrazide; antifungal activity; MIC.

Таблица 4
Антифунгальная активность соединений IIIa – e

| Соединение | МИК, мкг/мл | | | | |
|-------------|--------------------|----------------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| | <i>C. albicans</i> | <i>C. tropicalis</i> | <i>A. niger</i> | <i>M. racemosus</i> | <i>R. nigricans</i> |
| IIIa | 1 | 1 | 16 | 32 | 250 |
| IIIb | 16 | 32 | 125 | 125 | 500 |
| IIIc | 8 | 32 | 250 | 250 | 1000 |
| IIIд | 16 | 62,5 | 125 | 125 | 1000 |
| IIIe | 8 | 32 | 125 | 125 | 500 |
| Вориконазол | 0,5 | 16 | 64(стат) | > 1000 | > 1000 |
| Каспофунгин | 0,5 | 62,5 | 125(стат) | > 1000 | > 1000 |

рил-1,3,4-тиадиазол-3-ия (IIIa – e) могут рассматриваться в качестве потенциальных противогрибковых веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. C. Cardoso, S. M. S. C. Cadena, A. M. S. Arruda, et al., *Drug Develop. Res.*, **61**(4), 207 – 217 (2004).
2. H. A. Mastalerz, M. S. Gibson, T. Mohammad, *Canad. J. Chem.*, **12**, 2713 – 2716 (1987).
3. C. J. Collier, *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations*, **13**, 349 – 414 (2003).
4. A. D. M. Curtis, *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations*, **13**, 603 – 640 (2003).
5. M. Ivarez and J. A. Joule, *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations*, **15**, 661 – 838 (2004).
6. P. A. Keller, *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations*, **15**, 285 – 388 (2004).
7. P. A. Koutentis and C. P. Constantinides, *Comprehensive Heterocycl. Chem. III*, **5**, 568 – 605 (2008).
8. R. D. Larsen and D. Cai, *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations*, **15**, 389 – 495 (2004).
9. R. D. Larsen, *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations*, **15**, 551 – 660 (2004).
10. W.-D. Pfeiffer, *Comprehensive Heterocycl. Chem. III*, **9**, 402 – 455 (2008).
11. L. Yet, *Comprehensive Heterocycl. Chem. III*, **4**, 3 – 141 (2008).
12. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая волна, Москва (2005), с. 856.
13. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Гриф и К, Москва (2012), сс. 509 – 525.

Поступила 20.06.16